

平成22年度共同研究結果報告書

学校法人 順正学園
九州保健福祉大学

学校法人 順正学園

建学の理念

学生一人ひとりのもつ能力を最大限に
引き出し引き伸ばし、社会に有為な
人材を養成する。

加野



共同研究結果報告書に寄せて

「研究者の目」と「セレンディピティー」

学長 和田 明彦

他の言語への翻訳不能な語彙として英語「**serendipity**」がある。日本語では、「洞察力(物事の本質を見抜く力)」と訳せなくもないが、「**serendipity**」という言葉の持つ背景や意味の広がりや深さは伝わりようがない。通常は、音写の「セレンディピティー」が用いられる。

「**serendipity**」は、イギリスの政治家であり小説家である **Horace Walpole** (ホレス・ウォルポール) (1717-1797 年)が 1754 年に生み出した「造語」である。彼が、子供時代に読んだ「セレンディップの 3 人の王子(**The Three Princes of Serendip**)」という童話に因んだものである。「セレンディップ」は、セイロン (現在のスリランカ) のことであり、「セイロンの 3 人の王子達」という小説である。王子達は、旅の途中、もともと探し求めていなかった意外なものに遭遇するが、その意外なものに値打ちを、彼らの聡明さにより見抜くことができた。この卓越した見抜く能力こそが、セレンディピティーである。しかし、凡人の世界では、セレンディピティーを「単なる偶然の幸運」の意味に用いられる傾向にあり、小生は憤慨している。

Louis Pasteur (ルイ・パスツール)(1822-1895 年)は、フランスの生化学者・細菌学者であり、「科学に国境はないが、科学者には祖国がある」という小生の好きな言葉を遺している。「偶然は、準備のできていない人を、助けない」「観察の場でも、幸運は、待ち受ける心構え次第である」という言葉も、偶然の出会いの本質を見抜く力が画期的な新しい発見に重要であることを表している。

Albert Szent-Gyorgyi(アルバート・セントージェルジ)(1893-1986 年)は、ハンガリーの生理学者・生化学者・薬理学者であり、1937 年ノーベル医学・生理学賞を受賞している。彼の有名な言葉は、” **Discovery consists of seeing what everybody has seen and thinking what nobody has thought**” (発見とは、万人の目に映るものを見て、誰も考えなかったことを考えることである) である。

Claude Bernard (クロード・ベルナール)(1813-1878 年)は、フランスの生理学者で 1865 年名著「実験医学序説」を著述した。この著作は、**Virchow**(ウィルヒョウ)の「細胞病理学」、**Darwin** (ダーウィン) の「種の起源」とともに 19 世紀の医学・生物学の重要な古典であり、当時の思想界にも影響をあたえた。ベルナールの衝撃的で逆説的な言葉「統計学に立脚しているかぎり、医学は永久に推理科学に止まるであろう」は、眼前の一つ一つの実験結果の隠れた意味を見抜く力量の重要性を皮肉を込めて表現している。

小生も、40 年間、好き放題に実験してきた。行動しない「評論家研究者」は大嫌い、実証主義に徹してきた。実験を中心とした研究の世界で長年暮らしてくると、確かに、「他人に見えないものが見える」というのが真実であることを何度も体験してきた。

目 次

共同研究結果報告書に寄せて

学 長 和田 明彦

共同研究結果報告

- ①地域包括ケアシステムにおけるインフォーマルサポート活用に関する研究
～ケアマネジメントにおけるインフォーマルサポート活用の阻害要因分析～
社会福祉学部 臨床福祉学科 井上 孝徳 他 . . . 1
- ②園芸療法におけるシーティングを中心とした環境設定に関する基礎研究
保健科学部 作業療法学科 押川 武志 他 . . . 3
- ③過疎エリアにおける運動を中心とした健康づくりシステムの開発
保健科学部 作業療法学科 樋口 博之 他 . . . 5
- ④高齢者の発音・発話機能の低下が健康に及ぼす影響
保健科学部 言語聴覚療法学科 原 修一 他 . . . 7
- ⑤光反応基による糖鎖機能解明を目指した分子ツールの創製
～ガレクチンと糖鎖の関係を明らかにする
薬学部 薬学科 大塚 功 他 . . . 9
- ⑥ドコサヘキサエン酸による認知機能障害の予防効果の検討
～培養神経細胞のシナプス構造維持作用～
薬学部 薬学科 蒲生 修治 他 . . . 11
- ⑦腎上皮細胞の細胞障害における生理活性リン脂質の産生に関する網羅的研究
薬学部 薬学科 堤 敏彦 他 . . . 13
- ⑧接触性皮膚炎の治療薬であるステロイド剤のリバウンド発現機序の解析
薬学部 薬学科 日高 宗明 他 . . . 15
- ⑨環化付加反応を用いる(-)-Clausenamide の全合成研究
薬学部 薬学科 鳥や尾 篤 他 . . . 17
- ⑩ヒト血管におけるインスリンの内皮非依存性血管弛緩反応の作用機序解明
薬学部 薬学科 金井 祐 他 . . . 19
- ⑪病態時のマーカーとなる内因性物質の異常変動を非侵襲的に感知する方法の開発
薬学部 薬学科 緒方 賢次 他 . . . 21
- ⑫酸化チタンナノ粒子暴露に肺組織で誘導される炎症性ケモカインRANTES の
誘導メカニズムの解析
薬学部 動物生命薬科学科 渡辺 渡 他 . . . 23
- ⑬新しく固定したヒトナイーブリンパ球(CD4+CD45RA+CD93+細胞)の機能形態学的解析
薬学部 動物生命薬科学科 池脇 信直 他 . . . 25

編集後記

地域包括ケアシステムにおけるインフォーマルサポート活用に関する研究

～ケアマネジメントにおけるインフォーマルサポート活用の阻害要因分析～

井上孝徳¹⁾, 川崎順子²⁾, 三宮基裕¹⁾

- 1) 九州保健福祉大学・社会福祉学部・臨床福祉学科
- 2) 九州保健福祉大学・社会福祉学部・スポーツ健康福祉学科

1. 研究目的

本研究では、地域包括ケアシステムの重要な要である介護支援専門員が行うケアマネジメントにおけるインフォーマルサポート（以下、「インフォーマル」という。）の活用における阻害要因を把握することにより、マイクロソーシャルワークからメゾソーシャルワークへの発展的段階における課題を抽出し、地域包括ケアシステムの構築にむけた方策を見出すことを目的とする。

2. 研究方法

宮崎県北地区の居宅介護支援事業所に従事する介護支援専門員 50 名を対象とし、集合調査を実施した。調査項目は、①基本属性②事業所の状況③インフォーマルの活用状況④地域包括支援センターの主任介護支援専門員との関係⑤介護支援専門員の業務範囲である。また、延岡市・西臼杵地区の地域包括支援センターに従事する主任介護支援専門員 14 名を対象に郵送調査を実施した。回答率は 100%である。調査項目は、①基本属性②事業所の状況③主任介護支援専門員の業務状況④介護支援専門員との関係⑤インフォーマルの活用状況である。

3. 結果

1) 介護支援専門員の調査

① 介護支援専門員の業務範囲として、コーディネーションモデル¹⁾ 7 項目と包括的ケアモデル²⁾ 7 項目の 14 項目について回答を得た。(図 1)コーディネーションモデルの範囲

として捉えている平均値 73.7%、包括的モデルの範囲として捉えている平均値が 21%である。

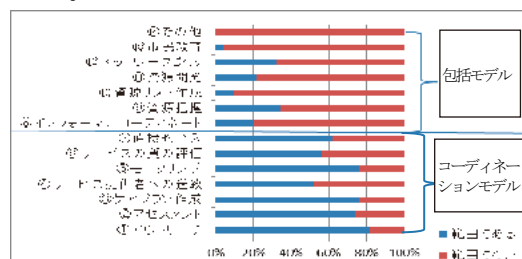


図1 介護支援専門員の業務範囲の捉え方

- ② インフォーマル活用の必要性について、必要性を感じるが 72%、必要性がないが 2%である。
 - ③ 業務の悩みとして自由回答を得たところ、業務の問題（業務量・業務の煩雑さ）、支援のあり方、介護報酬への反映、資質向上の必要性、サービス事業者との関係の 5 つに分類された。その中で業務の問題が 66%を占めた。
 - ④ インフォーマル情報の把握状況について、十分把握・まあ把握できているが 40%、把握できていないが 58%である。
 - ⑤ インフォーマル活用状況について、活用した経験がある 56%、ないが 34%である。活用できていない理由として、活用の仕方がわからない 43%、情報がない 29%、サービスがない 21%、相談するところがない 7%である。
 - ⑥ 主任介護支援専門員への相談の有無について、あるが 50%、ないが 38%である。相談しない理由については、11 項目について回答を得た結果、上位として、相談するケースがない 38%、関係性がない 15%、どんなことを相談していいかわからない 15%である。
 - ⑦ 主任介護支援専門員への期待として、支援指導 42%、相談できる関係 26%、同行訪問 16%である。
 - ⑧ インフォーマル活用の課題として、利用者の理解、安全性・責任性がいずれも 21%、継続性、守秘義務がいずれも 16%である。
- ### 2) 主任介護支援専門員の調査
- ① 主任介護支援専門員の包括的・継続的ケアマネジメント業務 9 項目について 5 段階評価を行った。(図 2) 連携体制としてかなりできている大体できている評価の上位としては、関係機関 71%、入退院支援 57%、医療機関 50%である。ほとんどできていない・あまり

できていない評価の上位は、ケアプラン指導 64%、担当者会議 42%、インフォーマルとの連携体制 35%である。以下、介護支援専門員との相談窓口、サービスの把握が困難、地域との関係性がとれていないのである。

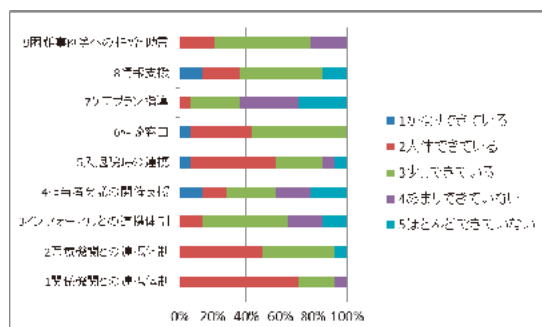


図2 主任介護支援専門員の業務評価

② インフォーマル活用の必要性については、自立支援のために必要であるが 100%である。インフォーマルの把握状況として、十分・まあ把握できているが 43%、できているとは思わないが 57%である。

③ インフォーマル活用における主任介護支援専門員の役割として、情報提供が 85%、インフォーマルへの仲介・調整が 64%、開発・働きかけが 28%と捉えている。

④ 主任介護支援専門員の包括的・継続的ケアマネジメントの業務課題として、業務量・業務の煩雑さでゆとりがない、主任介護支援専門員としての役割が果たせない、介護支援専門員からの相談のしづらさや地域包括支援センターからのアプローチのしづらさ、社会資源の把握と情報提供ができていないなどが挙げられた。

⑤ インフォーマル活用の課題について、サービスの制約があり活用が難しい、継続性が得られない、守秘義務、利用者・家族との関係性が挙げられた。

考察

以上により、介護支援専門員の調査結果から明らかになったこととして、インフォーマル活用の必要性については、高い認識度を示している。しかし現実的には介護支援専門員が担っているケアマネジメントスタイルは、コーディネーションモデルであり、インフォーマルの活用を含めた包括的モデルとして展開されていない。包括的モデルを業務とし

て展開できない理由として介護保険業務に追われていることがある。インフォーマルを活用できる環境課題として、①主任介護支援専門員との関係の取りづらさ、②インフォーマル情報の不十分さ、③インフォーマルがもつ特性による活用のしづらさが要因として抽出できた。

また、主任介護支援専門員の調査結果から明らかになったこととして、インフォーマル活用の必要性の認識度は高く、主任介護支援専門員の役割としてインフォーマル活用に仲介・調整の役割を果たすことを認識している。しかし、介護支援専門員と連携して包括的・継続的ケアマネジメントを展開していく主任介護支援専門員の役割が十分に果たされていない。その要因として、主任介護支援専門員の業務量や煩雑さが影響していると推察される。

これらのことから、インフォーマル活用における阻害要因として、①介護支援専門員・主任介護支援専門員が抱える業務にそれぞれの課題があること、②介護支援専門員と主任介護支援専門員との関係性が十分ではないこと、③インフォーマルの活用のしづらさがあることが抽出された。この阻害要因はいずれも連動性があり、関係性の中で影響を及ぼしあっていると推察される。

したがって、地域包括ケアシステムの構築に向けた方策を見出すためには、ミクロ・メゾ領域における課題解決に向けて①各々が抱える課題への取り組み、②両者が課題を共有して取り組むための協議・協働していく学びの必要性、③インフォーマルの環境整備への取り組みが必要であると考えられる。さらに、マクロ領域における課題として、制度改善や行政施策への働きかけが求められる。

註) 1)2)のモデルについては、白澤政和が「ケアマネジメントの過程」『社会福祉学双書 2006 ケアマネジメント』全国社会福祉協議会 39 において示されたものを活用したものである。

園芸技法におけるシーティングを中心とした環境設定に関する基礎研究

押川武志¹⁾, 小浦誠吾¹⁾, 山内利秋²⁾, 金子芳一³⁾, 内川義和⁴⁾

¹⁾九州保健福祉大学保健科学部作業療法学科

²⁾九州保健福祉大学社会福祉学部臨床福祉学科

³⁾九州保健福祉大学保健科学部臨床工学科

⁴⁾九州保健福祉大学保健科学部視機能療法学科

【目的】

園芸療法は作業療法士が活用する場合は園芸技法と称され、多くの高齢者になじみのある安心してリハビリテーションに導入できる作業活動である。また、特別な工夫がなくても五感への刺激が容易かつ自然にできるため、知覚がもたらす脳刺激により心（精神）が動き、結果として身体が動くというスムーズな廃用症候群や認知障害の予防も期待される本格的な作業療法技法である。また、作業と人、環境の関係について吉川は、その作業を行う人とその作業を行う環境を必要と述べている。しかしながら、車いすの機能を利用者に適合・調整する技術（以下、シーティング）が活動に与える影響、活動時のシーティングなどの環境設定に関する基礎研究はほとんど行われていない。そこで、本学内共同研究により、園芸技法を有効にするための1.園芸活動を実施前と実施後の座位姿勢の変化について、および2.座位姿勢の「ズレ」に焦点をあてた、ズレ度と車いす駆動との関係について報告する。

【方法1】

園芸活動を実施前と実施後の座位姿勢の変化について、同意を得た自ら姿勢の修正が不可能な高齢者（Hoffer¹⁾：レベル2）を対象に、車いすシーティングを施していない状態で離床後90分の姿勢の変化と園芸活動実施90分間の姿勢の変化をデジタル傾斜角度計：Horizon（以下、Horizon）、日本シーティング協会が規準を設けた「ズレ度」（Slide ratio）を使用して測

定した。測定部位および方法は、表1のとおりである。

各部位での結果を対応のあるt検定を用いて検証した。なお、統計処理にはStat View 5.0を使用し、有意水準は5%未満とした。

表1. 骨盤の測定部位および測定方法・機器

測定部位	測定方向	測定方法・機器
骨盤	i. 後方傾斜	Slide ratio
	ii. 水平傾斜	Horizon
	iii. 捻れ	Horizon

【方法2】

ズレ度が日常生活活動（以下、ADL）に及ぼす影響を測定するため、同意を得た学生30名を対象にズレ度の増大が車いす駆動に与える影響について調査を実施した。車いすの設定は、日本シーティング・コンサルタント協会の基準に基づき対象者個人の身体状況にあわせて調整（フットサポートの調整、車いす駆動位置の確認）し、理想的アライメントの車いす座位姿勢²⁾（以下ズレ度0%）（図1）を設定した。車いすはモジュラー車いす（etac社製）を使用した。

実施方法は、両上肢のみ使用し、20mの車いす駆動を30秒間（誤差前後3秒間）で行うように走行を行った（3-5回実施）。

次にズレ度0%、ズレ度5%、ズレ度10%、ズレ度15%、ズレ度20%の5回20m走行をそれぞれ実施し経過時間を記録した。測定のパーセンテージの決定には我々が行ったパイロットスタディーを参考に決定した³⁾。また、学習効果防止のため、対象者の半数にあたる15名の学生をズレ度20%から実施した。

その他、調査実施の条件として①駆動時のズレ防止の滑り止めシートの使用、②スタート時の車いすの状況の統一化、③バックサポートから背中を離さない、④駆動以外の動作を運営スタッフが行った。（20m以外の移動）、⑤研究終了まで学生に走行時間を提示しない、⑥車いす駆動後のズレ度の誤差の確認実施、を行った。

ズレ度の結果は、ズレ度0%を基準に対処のあるt検定にて各ズレ度との有意差を検定した。なお、統計処理にはStat View 5.0を使用し、

有意水準は5%未満とした。

【結果・考察】

方法1では同一時間によるFree timeでの姿勢の変化と園芸活動実施後の姿勢の変化を比較検討した。結果、すべての測定部位（骨盤の後方傾斜，側方傾斜，捻れ）に有意差（ $p < 0.05$ ）が認められた。（図1.2）

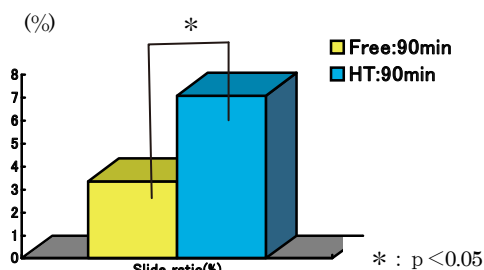


図1 後方傾斜の結果

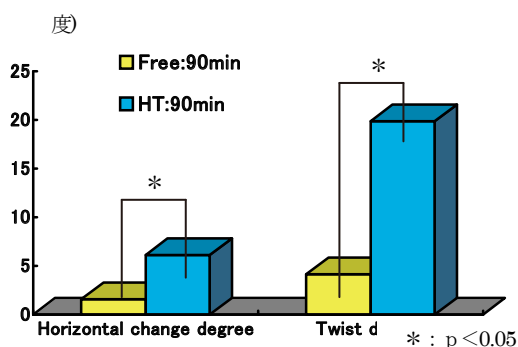


図2 水平傾斜および捻れの結果

この結果は、車いすにおいて必要最小限の動きしか必要としない時間は姿勢の崩れは少ないものの、園芸活動を行うことで姿勢の崩れが生じるという結果が得られたこととなる。対象者は自ら率先して園芸活動を行っているのであるが、実はその楽しみ活動が身体機能を積極的に動かすことに繋がり、結果として姿勢が崩れてしまうことが判明した。自ら姿勢修正可能な対象者であれば問題になることは少ないが、今回の対象者のように自ら姿勢の修正が不可能な対象者にとっては、その後のADLにも影響を与えることも考えられるため、大きな問題となりえることが判明した。今後、シーティングを施行した後、活動前と後の姿勢の状況を調査することによってシーティングの必要性を明確にしていきたい。また、どの程度の姿勢の変化が作業やADLにどのように影響を与えるかについても検証していくことが必要であると考え。

方法2での結果はズレ度10%までは有意差が

認められなかったものの、15%より有意差（ $p < 0.01$ ）が認められた。（図3）

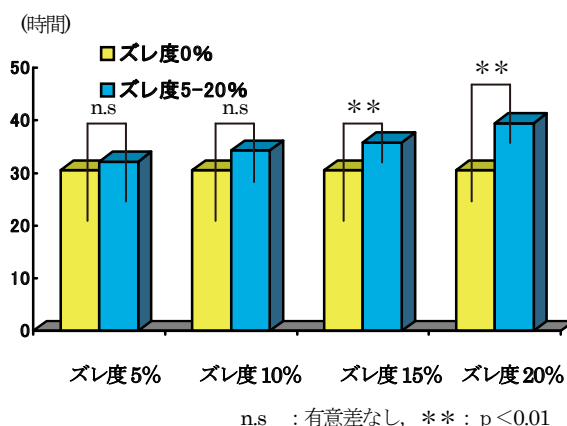


図3 車いす駆動時間とズレ度の結果

この結果は、身体機能に問題の無い健常学生を対象として行ったのであるが、実際に車いすを使用する対象者は様々な障がいを抱える。そのこと加味すると今回の結果よりも早く影響が出ることが予想されるがズレ度を測定・評価する1つの指標となりえる。今後、症例を増やし疾患別・障がいの重症度別の特徴について分析をしていく必要があると考える。

今回の研究を通じて我々は対象者に対して園芸活動を含めた作業活動を提供する際、環境、特に身近な車いす剤の姿勢の変化にも注意深く観察し、必要に応じてシーティングを施行していくことの大切さを感じた。特に認知症高齢者などコミュニケーションの障がいを持ち合わせた対象者にとって必要不可欠な視点であると考え。

この研究は九州保健福祉大学の学内共同研究費の助成を受け研究を遂行した。

【引用文献】

- 1) 廣瀬秀行，木之瀬隆著：高齢者のシーティング。三輪書店。東京。2006。
- 2) Hallenborg, S.C.: Wheelchair needs of the disabled therapeutic considerations for the elderly. Churchill livingston. pp93-111. 1987.
- 3) 押川武志，小浦誠吾，小川敬之：車いすシーティングにおけるズレ度と車いす駆動との関係—健常学生を対象としたパイロットスタディー。第7回宮崎県作業療法学会誌 7: 26, 2010

過疎エリアにおける運動を中心とした健康づくりシステムの開発

樋口博之（保健科学部・作業療法学科）
前田直樹（社会福祉学部・臨床福祉学科）

【研究目的】

一般に、過疎エリアは交通の便が悪く、高齢者人口の割合が大きいことが特徴としてあげられる。宮崎県の65才以上の高齢者人口割合（高齢化率）は23.5%で、全国平均20.1%よりも高い（平成17年国勢調査）。特に、過疎エリアの高齢化率は33.4%と高く、健康の維持・増進や疾病の予防は重要であると考えられる。

規則的な運動習慣の獲得は、疾病の予防や治療に有効であることは知られている。しかしながら、平成21年の調査によると日本人で運動習慣のある者は男性32.2%、女性27.0%と低い割合である（国民健康・栄養調査）。また、1日の歩数の平均値は、男性で7214歩、女性6352歩であり、「健康日本21」の目標値よりも2000歩低い値である。

健康づくりを目的とした運動教室は、日本各地で行われているが、日常身体活動量を評価した上で、運動目標を指導するプログラムはわずかである。一般に、運動教室は体育施設などに集まり、集団を対象として行われることが多い。しかしながら、過疎エリアでは運動を行える体育施設がない、または移動距離が遠いという地域が多い。

そこで、本研究では運動を中心とした健康づくりシステムを開発するために、歩数計を用いて日常身体活動量を評価し、個別に目標歩数を設定し健康づくりシステムを開発することを目的とした。その第一段階として、過疎エリア在住者を対象に、日常身体活動と健康感の現状を調査した。

【方法】

対象は、宮崎県過疎地域および過疎地域とみなされる区域に在住する17名（男性6名、女

性11名）である。

表1 対象者の年齢および身体的特徴

	年齢(才)	身長(cm)	体重(kg)
女(n=11)	62.3 ± 2.9	156.5 ± 2.3	53.5 ± 6.3
男(n=6)	61.0 ± 3.7	164.0 ± 4.3	67.3 ± 7.9
全体(n=17)	61.7 ± 3.3	159.7 ± 5.0	59.4 ± 9.8

平均±標準偏差

歩数計による日常身体活動量の測定

日常身体活動量の測定は、Lifecorder GS または Ex（スズケン、名古屋）を用いて行った。身長、体重、年齢、性別の設定を行った後、歩数計を右腰部に10日間装着させた。尚、装着時間は起床から就寝までとし、入浴時にははずすよう指示した。

歩数計を回収した後、1日の歩数と強度別活動時間の解析を行った。

健康感に関する調査

「健康感」は主観的認識により基準は異なるが、文部科学省・新体力テストの分類に基づき、「1. 大いに健康」、「2. まあ健康」、「3. 健康でない」の3択より、回答させた。

【結果】

全ての対象者は運動習慣がなく、日常生活における歩行に支障はなかった。男性2名は高血圧症であり、薬を服用していたが、運動の制限はなかった。

1日の平均歩数は、5107.3±909.6歩であった。男女別では、女性4941.8±616.3歩、男性5328.0±1157.1歩であった。

健康感は、女性1名が「大いに健康」、他の16名は「まあ健康」と回答した。

【考察】

平成22年に国勢調査は実施されているが、高齢化率など詳細な結果は報告されていない。しかしながら、日本の少子高齢化は5年前よりも進んでおり、宮崎県の高齢化率は前回の調査よりも高くなっていると予測される。

今回の対象者は、日常生活に支障のなく、主観的な健康感も良好であった。

健康づくり日本21に示されている1日の歩数目標値は、男性9,200歩、女性8,300歩であ

る (70 才以上の目標値 : 男性 6,700 歩、女性 5,900 歩)。したがって、本研究の対象者では、1 日の歩数は少ないと考えられる。歩数と歩行時間については、10 分で 1000 歩と簡易的に求めることができる。つまり、本研究の対象者に対して、運動指導する場合には、およそ 40 分間の歩行を勧めることになる。1 日に 40 分の歩行を取り入れるために、運動時間を 2 回に分けて 20 分+20 分でも健康づくりに対する効果は同じである。しかし、継続して実行することは困難である。

鈴木ら (2006) は、3 ヶ月のライフスタイル改善プログラム (3 回の介入) と運動教室 (15 回の介入) をそれぞれ実施し、1 年後の運動継続率を比較している。その結果、持久的運動を 30 分以上、週 2 回以上の頻度で行っている者の割合が増加したことを報告している。ライフスタイル改善プログラムの内容は、自宅でできるレジスタンス運動とストレッチングであり、運動を記録する方法である。つまり、運動教室に通うことができない過疎エリアの人であっても、在宅で運動習慣を獲得できるといえる。

一方、原ら (2006) は、目標心拍数を設定した 3 ヶ月の運動教室 (13 回の介入) を実施し、体重減少に効果があったことを報告している。また、本研究で使用した歩数計と異なるが、加速度の測定から日常身体活動強度を評価し、3METs および 4METs 以上の活動が体重減少に有効であることを示している。つまり、1 週間に 1 回の運動教室に参加するだけで、体重を減少させることができることになる。ウェイト・コントロールを目的とした運動教室は全国各地で開催されているが、食事の影響を受けるために必ずしも成果が得られるとはいえない。おそらく、3 ヶ月の運動教室に継続して参加することができた人を対象としたため、効果が認められたのであろう。

本研究では、過疎エリア在住者の日常身体活動と健康感の現状を調査した段階である。したがって、運動を中心とした健康づくりシステムを構築するために、対象者に運動習慣を獲得させる方法として、歩数計のデータを紙面でフィード・バックし、電話によるサポートも必要になると考えられる。何よりも、本人が「疲れにくくなった」、「シェイプ・アップ」という認識

を持つことができれば、運動の継続は可能になるはずである。

最後に、過疎エリアでの運動を中心とした健康づくりシステムを一つのモデルとして開発するだけでなく、運動指導を含め、マネジメントできる人材を育成する必要があると考えられる。今後、介入研究を実施するにあたり、運動を継続できない要因についても分析する必要があると思われる。

【参考文献】

- 1) Ayabe M, Yoshioka M, Yahiro T, Higuchi H, Higaki H, Tanaka H. Objectively measured age-related changes in the intensity distribution of daily physical activity in adults. *J Phys Act Health* 6(4):419-425 2009
- 2) Dunn, AL, BH. Marcus, JB. Kampert, et al., Comparison of lifestyle and structured interventions to increase physical activity and cardiorespiratory fitness. *JAMA* 1999
- 3) 厚生労働省, 平成 21 年国民健康・栄養調査結果の概要
- 4) 鈴木久雄, 西河英隆, 宮武伸行ほか. ライフスタイル方式とエクササイズ方式による身体活動介入の長期効果. *体力科学*, 55:229-236 2006
- 5) 樋口博之, 松田隆治, 岩本壮太郎, 福本安甫, 日常生活に対する主観的満足度と日常身体活動との関連性について. *九州保健福祉大学研究紀要*, 8:113-116 2007
- 6) 原丈貴, 松村吉浩, 山本松樹ほか. 3 軸加速度計を用いて評価した日常生活の活動強度と体重減少の関連性. *体力科学*, 55 (4) :385-392 2006

高齢者の発声・発話機能の低下が健康に及ぼす影響

原 修一¹⁾ 山崎 きよ子²⁾

1) 九州保健福祉大学・保健科学部・言語聴覚療法学科

2) 同・社会福祉学部・臨床福祉学科

1. 研究の目的

高齢者は、声門閉鎖機能低下や嗄声の出現、喉頭挙上距離の延長等により摂食・嚥下障害のリスクや誤嚥性肺炎発症のリスクが更に高くなると報告されている(安達, 2005, 渡嘉敷, 2006). 高齢者の「声の健康」の維持は、摂食・嚥下障害発症の予防だけでなく、高齢者の身体・日常生活機能や生活の質(QOL)の向上につながる可能性がある。しかし、高齢者の声の所見と摂食・嚥下機能、身体・日常生活機能、QOLとの相互の関連性を検討した報告は見あたらない。

本研究は、養護老人ホームに入所する虚弱高齢者を対象に、音響学的分析を含む発声・発話機能および口腔機能を評価した。そして、摂食・嚥下機能や身体・日常生活機能、健康関連QOLとの関連性を横断的・縦断的に検討し、高齢者の声の所見が健康にどのような影響を及ぼすかを明らかにした。

2. 対象と方法

1) 対象

宮崎県北部の養護老人ホームに入所している高齢者87名(男性18名, 女性69名, 平均年齢 82.3 ± 8.6 歳, 平均入居年数 5.6 ± 4.7 年)。

2) 方法

① **発声・発話機能評価**: 「あ」([a])の持続発声、オーラルディアドコキネシス(OD)を実施した¹⁾。音声はソリッドステートレコーダー(Marantz社製PMD660)と単一指向性マイクロフォン(Audio-technica社製ATM31a)を用いて録音した。

② **摂食・嚥下機能評価**: 口腔内視診、反復唾液嚥下テスト(RSST)、水のみテスト(WST)を実施した。

③ 質問紙調査

既往歴・基礎疾患、健康状態、日常生活動作、地域高齢者誤嚥リスク評価指標(DRACE: Miuraら, 2007)²⁾による摂食・嚥下機能評価を実施した。また、QOLの評価として、General Oral Health Index(GOHAI)による口腔関連QOL、SF-8(福原ら, 2005)³⁾による身体健康関連QOL評価、ADL20による日常生活動作(ADL)評価、HDS-Rによる認知機能評価を行った。

3) 分析

① **発話機能の音響学的分析**: 「あ」の持続発声は持続時間(秒)を算出した。「あ」の録音音声を基に、デスクトップパソコン(HP Compaq社 dc5850 OS: Windows Vista)上で音響分析用ソフトマルチスピーチ3700およびマルチディメンジョナルボイス・プログラム(共にKAY PENTAX社製)を用いて声の基本周波数、音声の揺らぎ成分(基本周期変動指数: PPQ, 振幅変動指数: APQ), 震動(FTRI), 雑音(NHR), Sub-harmonic成分(DSH, NSH)等を評価した。ODは1秒間の発話回数を算出した。

② **発話機能に関わる関連要因の検討**: 年齢を共変量とした偏相関分析により、発話機能と摂食・嚥下機能、健康関連QOL等の相関を検討した。

③ **嚥下障害のリスクと発話機能の関連性の検討**: ODの1秒あたりの回数は、平均値の-1SD値により、/pa/ /ta/ /ka/は3回以上と3回未満、/pataka/は1回以上と1回未満とそれぞれ2群に分けた(反復運動維持群・反復運動低下群)。上記2群間のADL20, HDS-R, RSST, MPT, WST, 質問紙調査の結果をt検定またはカイ二乗検定で比較検討した。

3. 結果

1) 発話機能に関わる関連要因の検討

MPTとODは、PPQ・APQとNHRと有意な負の相関を認めた($p < 0.05$: 表1)。

一方、FTRIや、Sub-harmonic成分(DSH・NSH)は、SF-8の下位尺度の全体的健康感(GH)や体の痛み(BP), 活力(VT), 身体的日常役割機能(RP)およびGOHAIと有意な負の相関を認めた($p < 0.05$: 表2)。

表1 発話機能と音響分析のパラメーターの関連性

	MPT	OD			
		/pa/	/ta/	/ka/	/pataka/
PPQ	-0.328**	-0.113	-0.289*	-0.284*	-0.009
APQ	-0.270**	-0.190	-0.199	-0.191	-0.136
NHR	-0.215*	-0.323**	-0.317**	-0.338**	-0.203

** $p<0.01$ * $p<0.05$.

表2 健康/口腔関連QOLと音響分析のパラメーターとの関係

	FTRI	DSH	NSH
日常役割機能 (身体: RP)	-0.281*	0.049	0.094
SF-8 体の痛み (BP)	-0.160	-0.237*	-0.318**
全体的健康感 (GH)	-0.411**	-0.214*	-0.218*
活力 (VT)	-0.300**	-0.117	-0.121
GOHAI	-0.035	-0.358**	-0.377**

** $p<0.01$ * $p<0.05$.

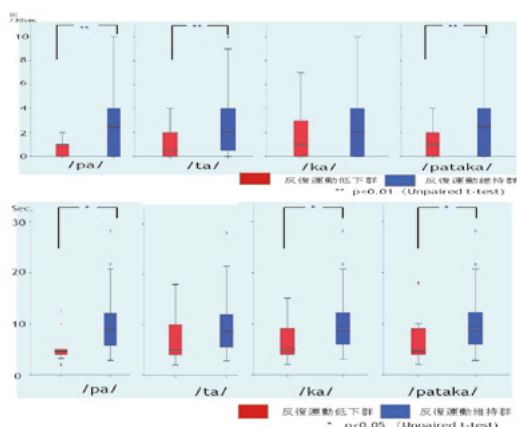


図1 ODの反復運動維持群(青グラフ)と低下群(赤グラフ)におけるRSST(上)とMPT(下)の比較

2) 発話機能と嚥下障害のリスクとの関連性

RSST, MPT, ADL20, HDS-Rにおいて、反復運動低下群(図内の赤いグラフ)は有意に各得点や時間の低下を認めた($p<0.05$: 図1).

また、DRACEの下位質問項目では、「口から食べ物がかぼれてしまうことがある」、「口に入れた食べ物を飲み込むことが難しい」については、反復運動低下群において「よくある」または「時々ある」と回答した者の比率は、維持群と比較して有意に高かった($p<0.05$).

4. 考察

高齢者の口腔機能の向上は、特に誤嚥性肺炎の予防や良好な栄養状態の保持という点で、介護予防の視点からも重要視されている。本研究の対象施設の高齢者においては、約7割の者が

摂食・嚥下障害に対する何らかのリスクを有していた。一般的にも介護予防的視点による高齢者の口腔機能向上への介入方法の確立は、今後早急に行う必要があると考える。

本研究は、高齢者の音声の質的側面を音響分析により客観的に示し、他の発話機能の側面やQOLとの関連性を明らかにした。これにより、高齢者の音声に関する音響学的分析データは、高齢者の発話機能の低下や、健康関連QOLの低下を予測し、口腔機能やQOLに関連する問題点を抽出できる可能性が示唆される。一方、ODの低下はHDS-RやADL20の得点低下と有意な関連性があった。この結果からは、摂食・嚥下障害に対して高いリスクを持つ高齢者は、口腔機能の低下だけでなく、認知機能の低下やADLの低下も有していることが考えられる。

ODに関わる運動は、口唇を閉鎖して食物が漏れないようにし、嚥下運動に必要な十分な陰圧を保つ(/pa/)、舌尖で食物をつぶす、食塊を咽頭へ送り込むために舌尖を口蓋に接する(/ta/)食塊を咽頭へ送り込む(/ka/)等の摂食・嚥下に関する動作と関連性がある。更に/pataka/は、一連の摂食・嚥下運動を反映する運動としてとらえることができる。ODの回数の低下は摂食・嚥下運動における困難を反映していると考えられる。

以上より、高齢者における声の所見等の発話機能の評価は、口腔機能や身体・日常生活機能、QOLの低下の有無を予測できる可能性がある。

今後は健常高齢者と虚弱高齢者との発話機能の比較や介入研究等により、高齢者の「声の健康」に関わる要因と「声の健康」の維持を通じた健康や日常生活機能の維持のための方法について、更に検討していきたい。

引用・参考文献

- 1) 日本音声言語医学会(編). 新版 声の検査法. 医歯薬出版, 東京, 2009.
- 2) Miura H, et al. Evaluation of chewing and swallowing disorders among frail community-dwelling elderly individuals. J Oral Rehabil. 34: 422-427, 2007.
- 3) 福原俊一, 鈴鴨よしみ. 健康関連QOL尺度SF-8とSF-36. 医学の歩み213: 133-136, 2005.

光反応基による糖鎖機能解明を目指した分子ツールの創製～ガレクチンと糖鎖の関係を明らかにする

大塚 功 定金 豊

九州保健福祉大学・薬学部・薬学科

研究目的

細胞表面に存在する糖鎖は、細胞間情報伝達機構に深く関与しており、その機能解明は生命現象を知る上で必要不可欠である¹⁾。しかし、糖鎖はタンパク質との親和性が低いものが多く、糖鎖の結合を頼りに結合タンパク質を見つけ出すことは不可能とされている。この問題の解決には、糖鎖機能解明を目指したツールの開発が重要だと考える(図1)。

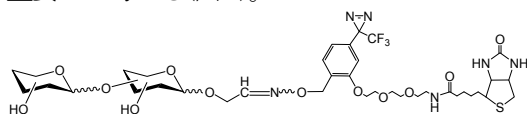


図1 糖鎖リガンドを持った光反応基による新規分子ツール

光アフィニティーラベル法²⁾は、光反応基ジアジリンを利用し、光照射により最寄の分子と共有結合を形成することで、適切な糖鎖結合性タンパク質を得ることが可能となる(図2)。

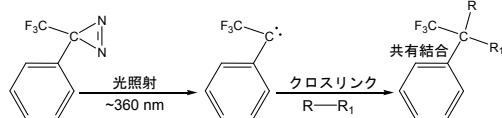


図2 光照射によるジアジリン基と隣接分子の共有結合

ガレクチンは動物界に広く分布し、様々な生命現象に関与しているが、機能発現の機構や糖鎖認識については未解決な部分が多い。本申請では、ガレクチンと糖鎖の関係に焦点を絞り、認識する糖鎖であるラクトサミンを構成するガラクトース-グルコサミンの結合位置による認識能の違いについて検討する。

今回申請者は、糖鎖リガンドの合成法にオルソゴナルグリコシル化法⁴⁾の導入を検討し

た。オルソゴナルグリコシル化法は最も効率よく糖鎖を合成することができる優れた手法である。特色は、それぞれが重なり合わない独立した系(オルソゴナル)からなる二種類の官能基を互いに活性化して、合成を進めていく点である。具体的には、条件Aにおいて官能基Xを活性化させたとき、官能基Yは不活性化状態であるが、条件Bで官能基Yを活性化した場合、官能基Xは活性化されず保持された状態を保つ。これを繰り返すことで、理論上糖鎖は限りなく伸長されていく(図3)。この概念は、ある過程の連続性を基礎とする系において、最も合理的であり重要であると考えられる。

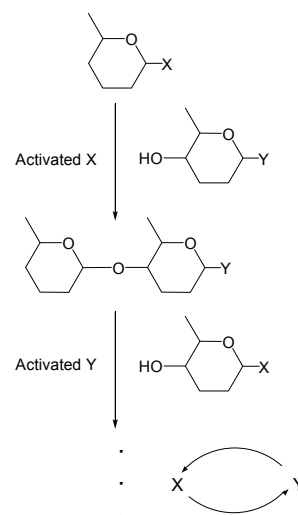
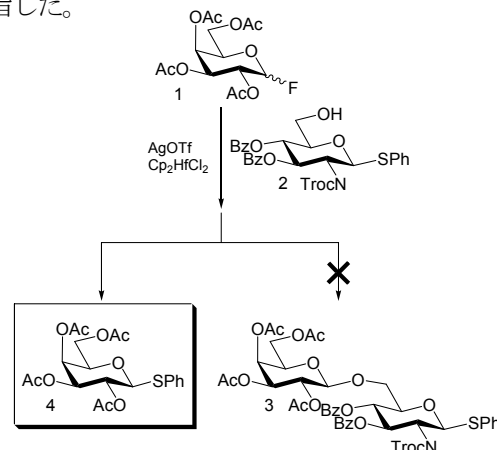


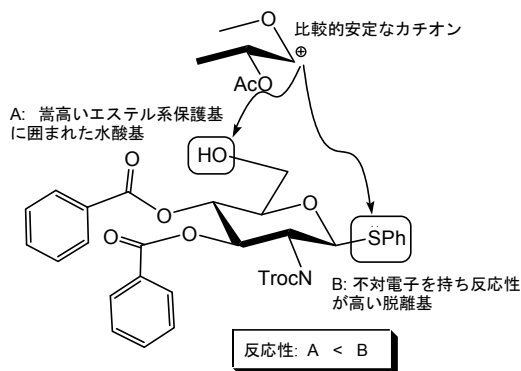
図3 オルソゴナルグリコシル化による糖鎖合成

方法・結果

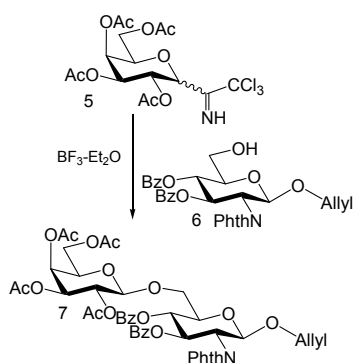
1位にF基を有する糖供与体1と1位にSPh基を有する糖受容体2を用いてAgOTf-Cp₂HfCl₂の系により二糖誘導体3の合成を目指した。



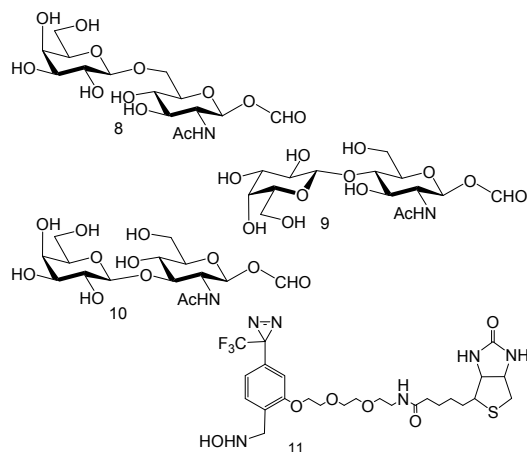
しかしながら、得られた化合物は **3** ではなく **4** のみが単離されてきた。この反応を詳しく調べていくと、活性化剤 ($\text{AgOTf}-\text{Cp}_2\text{HfCl}_2$) により供与体の F 基が脱離してカチオン状態になるものの、**2**、**3**、**4**、**6** 位がエステル系保護基で保護されているため、安定な状態を維持する。また、受容体の OH 基はそれ以外の OH 基をエステル系により保護しており、さらに保護基であるベンゾイル基が嵩高いことから反応性が低いと考えられる。これにより、供与体カチオンは受容体 OH 基を攻撃できず、安定な状態で系中を彷徨い、脱離基として機能し比較的反応性の高い SPh 基の対電子と反応する。結果、糖供与体脱離基が F 基から SPh 基に置換された化合物のみが合成されるものとの結論に至った。



オルソゴナル法による糖鎖合成が困難であることから、合成戦略の再構築を図り、供与体には高い反応性であるトリクロロアセトイミデート基を有する **5**、還元末端にアリル基を導入した **6** を受容体とすることで解決を目指した。その結果、望みの二糖誘導体 **7** を得ることに成功した。この **7** の還元末端に存在するアリル基をオゾン分解した後、脱保護することで、リガンド部分 **8** の合成が完了する。



ここまで得られた知見を基に、**1-4** 結合、**1-3** 結合からなる糖鎖リガンド **9**、**10** も同様に合成し、それぞれをアフィライト-CHO (**11**) と縮合させることで三種類の分子ツールが合成される。



まとめ

オルソゴナル法による糖鎖合成が今回の系では困難であることが判明したものの、解決策を見出すことで目的とする分子ツールの合成に大きく前進したと言える。今後はこれら分子ツールを合成した後、光アフィニティーラベル法により糖鎖の結合位置の違いによるレクチンとの認識能を検証していくことで、糖鎖-ガレクチンの相互関係を解明を目指す。

文献

- 1) Varki, A., *Glycobiology*, **3**, 97–130 (1993).
- 2) a) Sadakane Y., *YAKUGAKUZASSHI*, **127**(10), 1693–1699 (2007). b) Ohtsuka, I., Sadakane, Y., Higuchi, M., Hada, N., Hada, J., Kakiuchi, N., Sakushima, A., *Bioorg. Med. Chem.*, **19**, 894–899 (2011).
- 3) Liu, F. T., Rabinovich, G. A., *Nat. Rev. Cancer*, **5**, 29–41 (2005).
- 4) Ohtsuka I., et al., *Carbohydr. Res.*, **341**(10), 1476–1487 (2006).
- 5) Schmidt, R. R., Toepfer, A., *Tetrahedron. Lett.*, **132**, 3353–3356 (1991).

「ドコサヘキサエン酸による 認知機能障害の予防効果 の検討 ～培養神経細胞の シナプス構造維持作用～」

蒲生 修治、川原 正博、小山 裕也
九州保健福祉大学・薬学部・薬学科

研究目的

社会の高齢化に伴う認知症患者の増加は、先進諸国が共通して抱える問題であり、より有効性の高い予防・治療法の確立が急がれている。

海水魚などに豊富に含まれる n-3 系多価不飽和脂肪酸 (n-3PUFA) のひとつであるドコサヘキサエン酸 (DHA) は、哺乳動物の脳に高度に局在していることから、かねてより中枢機能発現に関与する可能性が推察されていた。研究代表者の蒲生は、DHA の経口投与が、ラットの空間認知学習能を有意に向上させることを見出し、DHA の中枢機能への関与を証明した¹⁾。また近年では、DHA による認知症の予防、あるいは症状の改善効果が報告され始め²⁾、世界中から注目が集まってきているが、その詳細は未だ不明な点が多い。

共同研究者の川原は、脳血管性認知症 (VD) の発症に亜鉛が重要であることを見出し、そのメカニズムの解明を行っている (科研費採択研究)。そして、GT1-7 細胞 (不死化視床下部神経細胞) を用いて、脳虚血後に生じる神経障害を予防する物質を簡便にスクリーニングできるアッセイ法を開発した³⁾。

そこで本研究では、川原らの持つスクリーニング技術を駆使して DHA による神経細胞保護効果の有無を明らかにするとともに、AD 患者の脳で顕著な減少が見られるドレブリン (シナプス特異的アクチン結合タンパク) の発現を観察することにより、シナプス形成に対する DHA の影響を検討することを目的とする。

研究方法

DHA による神経細胞保護効果の検討

ラット海馬神経細胞は、ラット 18 日齢胎児より摘出した海馬を、酵素処理によって分散させることにより得た。GT1-7 細胞は、血清を添加した培地中で増殖させ、目的の細胞数を得た。各細胞を 96 穴培養用プレートにまき、DHA またはオレイン酸 (OLA) を培地に添加した。その後、細胞を過酸化水素または塩化亜鉛で処理し、生存している細胞数を WST-1 法³⁾により測定した。培地に添加した DHA または OLA の濃度は以下の通りである。10 μ M DHA (LD DHA)、50 μ M DHA (HD DHA)、10 μ M OLA (LD OLA)、50 μ M OLA (HD OLA)。

シナプス構造の観察

海馬初代培養神経細胞を、神経細胞のマーカーである MAP2、および神経突起スパインに局在するドレブリンに対する抗体で蛍光免疫二重染色し、共焦点レーザー蛍光顕微鏡を用いて染色像を得た。

結果

過酸化水素処理により、海馬神経細胞は 90% 程度死滅したが、その細胞死は培地に添加した DHA の濃度依存的に抑制された (Fig. 1)。また、OLA にも同様の神経細胞死抑制効果が認められたが、その効果は DHA より小さく、濃度依存性も認められなかった。

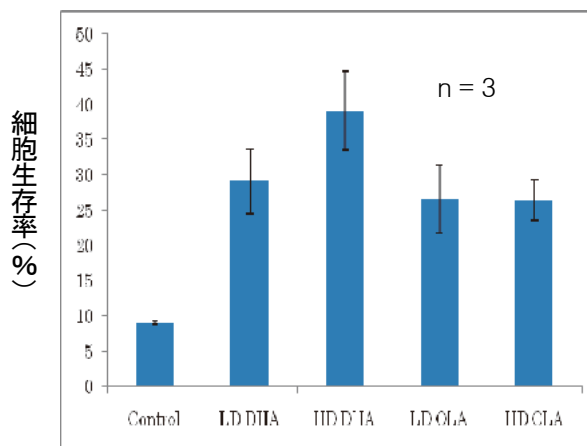


Fig. 1 過酸化水素添加後の海馬初代神経細胞生存率に及ぼす脂肪酸の影響..

塩化亜鉛処理により、GT1-7 細胞は 60% 以上死滅したが、その細胞死は低濃度の DHA 添加によって有意に抑制された。ところが、高濃度の DHA 添加では、DHA そのものによる細胞毒性が現れた (Fig. 2)。一方、OLA は細胞の生存率に影響

を及ぼさなかった。

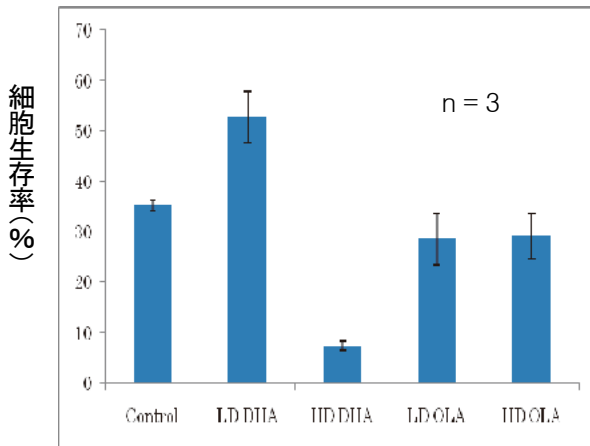


Fig. 2 塩化亜鉛添加後の GT1-7 細胞生存率に及ぼす脂肪酸の影響.

蛍光免疫二重染色画像を Fig. 3 に示す。ドレブリンは、MAP2 陽性神経細胞の細胞体、ならびに神経突起の周囲に発現していた。

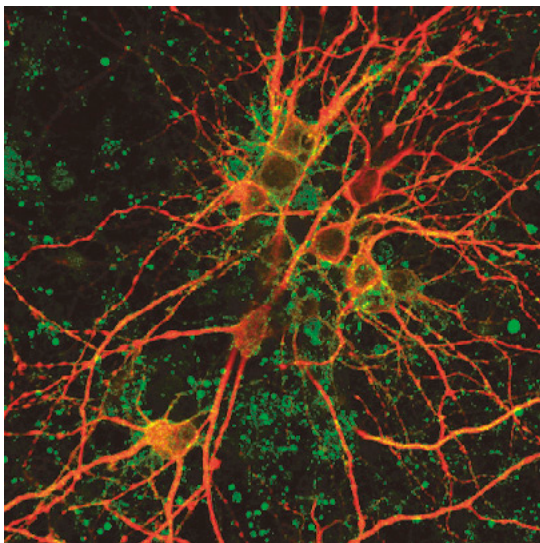


Fig. 3 ラット海馬初代培養神経細胞の蛍光免疫二重染色画像。MAP2(赤)およびドレブリン(緑)

考察

DHA は、過酸化水素による刺激に対して神経細胞保護作用を示した (Fig. 1)。申請者らは以前、DHA を経口投与したラットでは、空間認知学習能の向上に伴って脳内の過酸化脂質量が低下することを見出した⁴⁾。この結果から、DHA は脳内での酸化ストレスから神経細胞を保護することで中枢機能改善効果を発揮する可能性を推察したが、今回の結果は、その仮説を支持す

るものである。

DHA をはじめとする n-3 PUFA の摂取は、かねてより VD を予防する効果が期待されていたが、それは血清脂質値の改善や血圧の正常化作用によって、血管の状態が正常に保たれることでもたらされると考えられてきた。ところが今回は、虚血によって引き起こされる神経障害そのものに対して DHA が保護作用を示した (Fig. 2)。この結果は、DHA が脳梗塞の発症リスクを低下させるだけでなく、梗塞巣における神経細胞死を抑制する可能性を示唆するものであり、これまでとはまったく異なる新しい知見である。

ドレブリンは、樹状突起スパインの頭部に局在するタンパクであるため、Fig. 3 で示したように、ドレブリンが MAP2 陽性細胞の細胞体や神経突起に沿って並んで発現していることは妥当である。しかしながら、本研究で得られた画像には、非特異的結合と思われる puncta も多いため、現時点では画像解析によって客観的なデータを得られる段階には達していない。今後は、染色条件をもう一度見直して、よりクリアな画像を得られるように調整していかねばならない。

本研究により、DHA による神経細胞保護効果が in vitro でも証明された。この研究結果は、国民に健康で豊かな老後生活を提供する点で社会貢献性の高いものであり、今後も継続していく意義が極めて大きいと考える。

文献

- 1) Gamoh S, Hashimoto M, Yanagimoto K, Katakura M, Haque A and Shido O, Krill-derived phospholipids rich in n-3 fatty acid improve spatial memory in adult rats. *J Agricul Sci* (2011, in press)
- 2) Hashimoto M, Tanabe Y, Fujii Y, Kikuta T, Shibata H, Shido O, *J Nutr* (2005) 135: 549-555
- 3) Sadakane Y, Konoha K, Nagata T, Kawahara M, Improvement of screening for protective substances against zinc-induced neuronal cell death. *Trace Nutrient Res* 25: 59-63 (2008) *Trace Nutrient Res* (2008) 25: 59-63
- 4) Gamoh S, Hashimoto M, Hossain S, Masumura S, Chronic administration of docosahexaenoic acid improves the performance of radial arm maze task in aged rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol* (2001) 28: 266-270

腎上皮細胞の細胞障害における生理活性リン脂質の産生に関する網羅的研究

堤 敏彦^{#1}, 程 炳鈞^{#2}, 徳村 章^{#3}

^{#1}九州保健福祉大学・薬学部・薬学科

^{#2}九州保健福祉大学・薬学部・動物生命薬科学

^{#3}徳島大学大学院・ヘルスバイオサイエンス

研究目的

腎臓は生体内に取り込まれた食物や薬物を体外に排泄にする臓器である。糸球体や尿細管は、薬物のろ過や分泌および再吸収に関与する部位であり、薬物が毒性を有する場合は、これらの部位は毒性物質に罹患される危険性が特に高くなる。このため正常な腎機能を維持していくことは、より良いQOLを得るうえで必須事項である。ところが、腎機能が悪化した患者は増加傾向にあり、例えば慢性透析患者数は、2009年の我が国の統計では人口100万あたり2279.6人と前回2年前より66.2人多くなっている(1)。

腎障害は様々な要因で発症する。我々はすでに慢性閉塞性腎症のモデルとしてラットの片側尿管を結紮した腎障害(UUO)を作成し、結紮した腎臓内に蓄積する腎内液には生理活性リゾ型リン脂質であるリゾホスファチジン酸(LPA)の産生酵素であるlysophospholipase D/autotaxin (lysoPLD/ATX)の活性が尿の値と比較して異常に高いことを見いだした。またLPAには脂肪酸側鎖の鎖長と不飽和度により複数の分子種が存在することから、LC-MS-MSで血漿および腎臓内液中のLPAの分子種を調べ、腎臓内液中のLPAは血漿以外の体液・組織からも産生することを明らかにした。また、慢性閉塞性腎症の増悪にはLPAの受容体のサブタイプであるLPA₁受容体に関与することが明らかにされている。これらの結果から腎障害の進行や増悪にLPAが関与することが明白になった(2)。lysoPLDおよびlysophospholipase C (lysoPLC)は細胞外でスクレオチドを分解する酵素のファミリーに属している。lysoPLDはエキソ型の酵素であり、細胞外へ分泌されて作用する。一方、lysoPLCは

エクソ型の酵素であって、酵素の触媒部位が細胞外を向いている。

本研究の目的は、環境汚染物質である重金属イオンCd²⁺および活性酸素(HO・)等によって誘導される化学的腎障害時にLPAがいかに関与しているかを調べることである。体内に取り込まれたCd²⁺は腎臓中では、近位尿細管に局在することが報告されていることから(3)、まずCd²⁺による尿細管上皮細胞障害へのLPA産生の関与に着目して研究を行った。

研究方法

細胞はラットの腎臓由来の尿細管上皮細胞(NRK52E)および間質性線維芽細胞(NRK49F)を使用した。アルブミンの影響を除外するために、細胞が培養容器に80%ほど増殖した後、リン酸緩衝液で洗浄し血清を除外した培養液に置換して細胞刺激を行った。化学的細胞障害は、活性酸素としてFeSO₄-アスコルビン酸-EDTA(Fe²⁺)、あるいはNTA-Fe(NO₃)₃・7H₂Oまた擬似的低酸素状態としてCo²⁺さらに重金属イオンとしてCd²⁺を使用して誘導した。細胞の形態変化は位相差顕微鏡で確認した。細胞毒性はCell Titer 96 (Promega)で調べた。LPAの産生および代謝に関与する酵素(lysoPLD/ATX、acyl glycerol kinase、Ca²⁺-independent phospholipase A₂-β、Ca²⁺-independent phospholipase A₂-γ、phosphatidic acid phosphatase)さらにLPA₁受容体のmRNA発現量をリアルタイムRT-PCRで測定した。培養メディアム中のlysoPLD/ATXおよびlysoPLC酵素活性は酵素共役蛍光法で調べた(4)。

結果

予備的にNRK52E細胞を「研究方法」に記載した試薬で化学的細胞障害を誘導し、lysoPLD/ATX mRNA発現量を調べた。しかし、研究を進める過程でNRK52E細胞ではlysoPLD/ATXのmRNA発現量には定量的な増幅が認められないことが明らかとなった。そこで、NRK49F細胞を対象に加えて細胞障害薬物をCd²⁺に的を絞って以後の実験を行った。

NRK52E細胞およびNRK49F細胞の培養液に最終濃度5~200μMのCd²⁺を添加して6時間および24時間インキュベートした。6時間後では

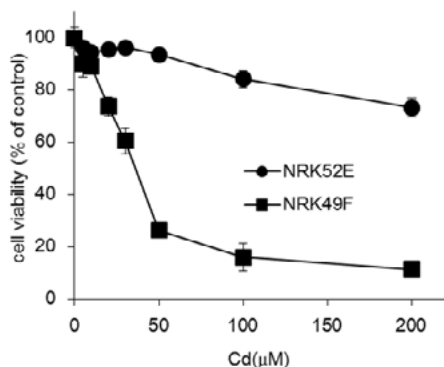


図1 腎臓由来の細胞に及ぼす Cd²⁺の細胞毒性

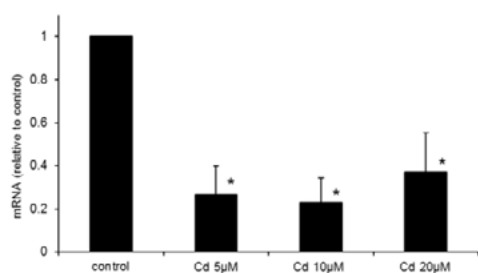


図2 NRK49F 細胞での lysoPLD/ATX 発現に対する Cd²⁺の影響

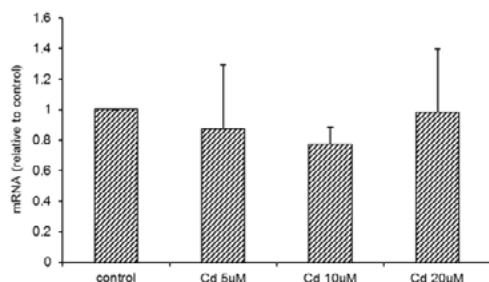


図3 Cd²⁺処理 NRK49F 細胞での LPA₁ 受容体発現

NRK52E 細胞は Cd²⁺濃度が 20 μM を超えると細胞間の密着結合が外れて球状に変化した。しかし、生存率は Cd²⁺濃度が 50 μM でも 93%であった (図1)。一方、NRK49F 細胞では Cd²⁺濃度が 5 μM から細胞間密度が低下しはじめ、20 μM では完全に線維状の形態を消失した。50 μM での生存率は 26%に著しく減少した (図1)。24 時間後では両細胞ともに生存率は低下するものの NRK52E 細胞の方が NRK49F 細胞よりも、Cd²⁺に対する毒性に抵抗性を示した (data not shown)。

検討した LPA の産生および代謝に関与する酵素の中で、Cd²⁺は NRK49F 細胞の lysoPLD/ATX の mRNA 発現量を有意に減少させた (図2)。さらに lysoPLD 活性も Cd²⁺添加により有意に減少した

(data not shown)。しかし、LPA₁ 受容体の発現量は有意に減少しなかった (図3)。

一方、NRK52E 細胞では Cd²⁺により lysoPLC 活性が有意に低下した (data not shown)。

考察

Cd²⁺による腎臓由来の細胞に対する細胞障害性は、NRK52E 細胞よりも NRK49F 細胞が高いことが判明した。閉塞性腎疾患では、上皮細胞、メサングウム細胞および線維芽細胞は、上皮間葉移行あるいは活性化により筋線維芽細胞に変化し、さらに TGF β が作用して線維化が進行する。NRK49F 細胞は筋線維芽細胞様の形態を有していることが報告されていることから、これが Cd²⁺に対する高い感受性に何らかの影響を与えているのかもしれない。今回の研究結果から Cd²⁺は、腎線維芽細胞の lysoPLD 酵素活性および lysoPLD/ATX の mRNA の発現、また腎上皮細胞の lysoPLC 酵素活性を有意に阻害することが明らかとなった。これらの結果をネフロン構造に適用することができると仮定すると、血中の Cd²⁺は糸球体を通過後、尿細管の頂側膜でモノグリセリドへの変換を抑制し、また腎臓内の血管から漏れ出た Cd²⁺は間質中の lysoPLD/ATX を阻害して、リン脂質のホメオスタシスを妨害し腎臓の機能に影響を与えることが推測された。今後は *in vivo* での Cd²⁺の作用についてさらに検討を行ってきたい。

文献

- 1) <http://docs.jsdt.or.jp/overview/>
- 2) Tsutsumi T, Adachi M, Nikawadori M, Morishige J, Tokumura A. Presence of bioactive lysophosphatidic acid in renal effluent of rats with unilateral ureteral obstruction. *Life Sci* 2011; 89: 195-203
- 3) Felley-Bosco E, Diezi J. Fate of cadmium in rat renal tubules: a micropuncture study. *Toxicol Appl Pharmacol* 1989; 272: 11369-77
- 4) Tokumura A, Majima E, Kariya Y, Tominaga K, Kogure K, Yasuda K, Fukuzawa K. Identification of human plasma lysophospholipase D, a lysophosphatidic acid-producing enzyme, as autotaxin, a multifunctional phosphodiesterase. *J Biol Chem* 2002; 277: 39436-42

「接触性皮膚炎の治療薬であるステロイド剤のリバウンド発現機序の解析」

氏名 日高 宗明, 黒川 昌彦
九州保健福祉大学・薬学部・薬学科

研究目的

関節リウマチ, 膠原病, アレルギー性皮膚疾患などの炎症性疾患の治療に, 高い抗炎症作用と免疫抑制作用があり, かつ, 鎮痛効果も強力である副腎皮質ホルモンが, ステロイド剤として広く使用されている. しかし, 生体で恒常的に作用している副腎皮質ホルモンの投与により, 生理機能バランスが変化し, その投与を急に中止すると本来の病状の悪化につながる可能性がある. これはステロイドのリバウンド現象と呼ばれる^①. このため, 临床上ステロイド剤の長期使用からの離脱が問題となっている. しかし, リバウンド現象による病状悪化の機序は十分に解明されておらず, 対処法の検討が困難であるのが現状である. そこで, 本研究では, ステロイド剤の安全な離脱法の確立を目指して, リバウンド現象を解析できる動物モデル系を確立し, 免疫学的, 病理学的にリバウンド現象による病状悪化の機序を明らかにすることを目的とした.

研究方法

動物は免疫学の研究に広く用いられている雄性 BALB/c マウス (日本 SLC 株式会社) を用いた. オキサゾロンおよびプレドニゾロンは和光純薬工業株式会社より購入し, 特級エタノールを用いて溶解した.

マウス耳介に皮膚炎誘発物質であるオキサゾロンを投与することで, 接触性皮膚炎を誘発させた. 投与方法と投与群は Tamura et. al. の方法^②を参考にした. 詳細は以下の通りである. ①対照群, ②オキサゾロン(1.5%)単独群, ③プレドニゾロン(0.5%)単独群, ④オキサゾロン(1.5%)+プレドニゾロン(0.5%)併用群. 本研究においては, 臨床現場でステロイド剤として幅広く使用されているプレドニゾロンを選

択した. オキサゾロンは感作目的で, 実験開始の7日前にマウスの耳に10 μ L 塗布した. 実験開始後, 2日間隔(0日目, 2日目, 4日目, 6日目, 8日目, 10日目, 12日目, 14日目, 16日目, 18日目, 20日目, 22日目, 24日目, 26日目)で各10 μ L 塗布を行った. ステロイド剤であるプレドニゾロンは, 実験開始後14日間連続で10 μ L 塗布した. 接触性皮膚炎が発症した場合には, 炎症により耳が肥大し, さらに炎症の重篤度も判断できることから, 耳の厚さを毎日測定した. その測定は, 薬物の投与前にノギスを用いて行った. また一部のマウスは, 14日目に麻酔化で解剖し, 脾臓, 胸腺, 体重の測定を行った.

なお, 全ての実験は「動物実験の適正な実施に向けたガイドライン」に従い行った. また, 本プロトコールは九州保健福祉大学動物実験委員会にて承認されている.

結果

上記のプロトコールに従い, オキサゾロンをマウス耳に投与した結果, オキサゾロンの隔日投与により, マウス耳の厚さが最大で0.4 mmにまで肥大していた. エタノールのみを投与した対照群の耳の厚さは, 0.15 mmであったため, この投与方法でオキサゾロンが接触性皮膚炎を誘発することが確認できた. またプレドニゾロンの併用により, 14日目までは耳の厚さが0.2程度であり, 皮膚炎が抑制されていた. しかしながら, プレドニゾロンの投与中止後の15日以降では, 耳は徐々に肥大していき, 最大で0.55 mmとなった. 耳の厚さの最大値は, オキサゾロン単独投与群よりも有意に高かった. つまり, プレドニゾロン投与中止後に, オキサゾロン単独投与群に比べてより症状が悪化したことから, このモデルにおいてステロイドのリバウンド現象が発現することが明らかとなった.

リバウンド現象を解析できるモデル系としての妥当性が検証できたことから, 次にリバウンド現象の発現機序について検討した. プレドニゾロンの投与により免疫力が低下することは, 添付文書^③にも記載されている事実であるため, 免疫力の抑制がリバウンドと関係している可能性が高いと考え, プレドニゾロン投与の免疫系組織への影響を調べた. プレドニゾロンおよび

オキサゾロンを上記の方法で 14 日間投与した後に、麻酔化で免疫系組織である脾臓、胸腺を摘出し、それぞれの質量を測定した結果を Table 1 に示した。プレドニゾロンの有害作用である発育抑制⁽³⁾が本実験でも現れ、プレドニゾロン投与群では体重の増加率が低かった。そこで、脾臓および胸腺の結果は、体重当たりの各臓器の重量で示している。脾臓では、プレドニゾロンの 14 日間塗布投与により、対照群と比較し、60%程度にまで有意に縮小した。一方、胸腺の重量に有意な変化は見られなかった。

Table 1. Body weights and spleen/body weights, thymus/body weights of oxazolone (15 mg/mL) and/or prednisolone (5 mg/mL) treated mice. Data are shown at average \pm S.D. of six mice.

Group	B. W. (g)	Spleen / B. W. (mg/g)	Thymus / B. W. (mg/g)
Control	24.3 \pm 2.4	3.5 \pm 0.3	2.2 \pm 0.8
Oxa	24.3 \pm 1.6	3.9 \pm 0.2	2.1 \pm 0.5
PLS	20.0 \pm 1.5	2.0 \pm 0.4	2.0 \pm 0.4
Oxa with PLS	19.9 \pm 0.7	2.3 \pm 0.1	1.8 \pm 0.3

B. W. : Body Weight

Oxa: oxazolone, PLS: prednisolone

考察

接触性皮膚炎モデルマウスを用いて、ステロイドリバウンド現象の発現機序について検討した結果、ステロイド剤であるプレドニゾロンの 14 日間連続塗布投与により、脾臓が縮小することが明らかとなった。脾臓の内部には、白脾髄と呼ばれるリンパ球が集まる部位があり、免疫機能を担っている。生体における脾臓の免疫学的な役割は、B 細胞、T リンパ球、形質細胞を成熟させることにあるため⁽⁴⁾、脾臓の縮小は、未熟な B 細胞、T リンパ球の増加につながることを示唆された。この B 細胞、T リンパ球の成熟

細胞のバランスの変化により、接触性皮膚炎に対する免疫反応性が変化して、リバウンド現象が発現する可能性が考えられる。リバウンド現象発現時には、免疫系サイトカインである interleukin-4 等の発現量が変化すると報告^(2, 5)されている。この報告は、今回の結果および仮説を支持するものである。

以上の仮説を証明するために、実際に B 細胞、T リンパ球の成熟細胞のバランスがどれだけ変化しているのか、そして炎症部位にどれだけ浸潤しているのか調べる必要がある。

文献

(1) Steroid Withdrawal Syndrome by Topical Corticosteroid. 榎本充邦, 荒瀬誠治, 重見文雄, 武田克之; *香粧会誌* 15(1) (1991)

(2) Olopatadine hydrochloride suppresses the rebound phenomenon after discontinuation of treatment with a topical steroid in mice with chronic contact hypersensitivity. T. Tamura, M. Matsubara, K. Hasegawa, K. Ohmori, and A. Karawasa; *Clin Exp Allergy* 35: 97-103 (2005)

(3) プレドニゾロン錠「タケダ」5mg/プレドニゾロン散「タケダ」1% 添付文書. 武田薬品工業株式会社

(4) 医学・薬学のための免疫学 第2版. 豊島聰 著

(5) The effects of olopatadine hydrochloride on the number of scratching induced by repeated application of oxazolone in mice. T. Tamura, T. Amano, K. Ohmori, H. Manabe; *Euro J Pharmacol* 524: 149-154 (2005)

環化付加反応を用いる (-)-Clausenamide の全合成研究

鳥や尾 篤¹⁾, 反田 和宏²⁾, 坂本 正徳³⁾, 山崎 哲郎²⁾

九州保健福祉大学・薬学部¹⁾ 薬学科・医薬品化学研究室²⁾ 薬学科・薬化学講座,³⁾ 動物生命薬科学科・薬品製造学研究室

【はじめに】 (-)-Clausenamide は *Clausenallansium skeel* から単離された、高度に置換された γ -lactam 化合物であり、長期記憶を改善する化合物として、アルツハイマー治療薬への期待がなされている。(-)-clausenamide は 1 μ M/L で神経成長因子 (NGF) 5 μ g/L と同等のコリンアセチルトランスフェラーゼ (ChAT) 活性を有し、また、神経栄養効果があることが知られている。¹⁾ 一方、同様な γ -lactam 骨格を有する化合物として、プロテアソーム阻害剤である (+)-lactacystin などもあることから、これら一連の化合物群に対する効率的合成法の開発が精力的に行われている (Fig.1)。²⁾

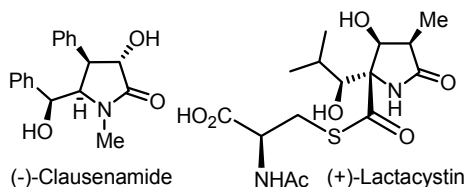
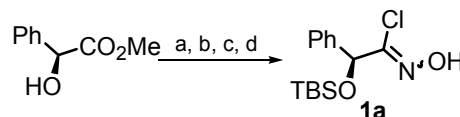


Fig. 1

しかしながら、天然物合成には多段階反応を有する物が多く、その骨格構築は容易ではない。また、clausenamide の全合成はほとんど報告されておらず、その立体構築法に問題を抱えている。³⁾ そこで、我々は種々の誘導体が合成可能なキラルニトリルオキシドの 1,3-双極子環化反応、続く立体選択的還元反応を鍵反応とする (-)-clausenamide の新規合成法の開発を昨年より行っている。以下、これまでに得られた知見について報告する。

【双極子環化反応を鍵反応とする骨格の構築】

まず、鍵反応となるキラルニトリルオキシドの 1,3-双極子環化反応に着手した。すなわち市販の *L*-マンデル酸メチルを出発原料に用い、水酸基の保護、還元、続くオキシム形成と次亜塩素酸ブチルによるクロロ化を行い、ニトリルオキシド前駆体 **1a** を通算収率 91% で合成した (Scheme 1)。



Scheme 1 Reagents and conditions: (a) TBSCl, I₂, 1-methylimidazole, CH₂Cl₂, -78 °C- r.t.; (b) DIBAL-H, toluene, -78 °C; (c) NH₂OH HCl, NaHCO₃(aq), EtOH-H₂O, r.t.; (d) ^tButyl hypochlorite, CH₂Cl₂, -78 °C- r.t.

昨年の研究成果により、**1a** の環化反応は、Et₃N を塩基として用いた場合、環化反応は円滑に進行せず、フロキササン **3**⁴⁾ が主生成物となることが分かっている (Fig. 2)。

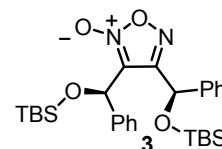


Fig. 2

そこで、**3** の生成を抑える目的で Mg アルコキシドとニトリルオキシドのキレート効果を用い、⁵⁾ 環化反応における位置および立体選択性について詳細に検討した (Table 1)。その結果、シンナミルアルコール存在下、**1a** を EtMgBr と 2-プロパノールで処理したところ、環化反応は速やかに進行し、位置化学が制御された環化生成体 **4a**, **4a'** が 62 : 38 の混合物として 69% の収率で得られた (Entry 1)。さらに、保護基の異なる種々の基質について環化反応を行ったところ、MOM 基、MEM 基を有する基質 **1c**, **1d** において立体選択の向上がみられた (Entry 3, 4)。最終的に基質 **1d** を toluene 中で反応を行うと立体選択性は 87 : 13 まで向上し、望む立体化学を有する環化体が優先して得られることを見出した (Entry 5)。本反応は末端に (+)-MM 基を有する基質を用いても同様な立体選択性、収率で反応が進行することから、環化反応中におけるニトリルオキシドのラセミ化はおきてないものと推測している (Entry 6)。

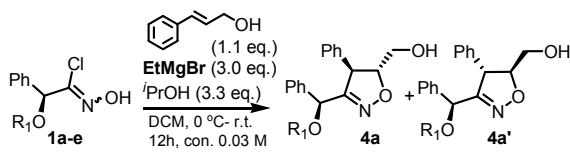
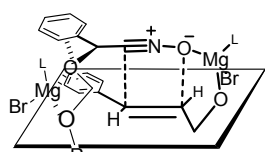


Table 1 Cycloaddition of α -protected nitrile oxides.

Entry	Starting Material	R ₁	Solvent	% Yield (4a-e:4a'-e' ratio)
1	1a	TBS	CH ₂ Cl ₂	69 (62:38)
2	1b	n-propyl	CH ₂ Cl ₂	80 (54:46)
3	1c	MOM	CH ₂ Cl ₂	85 (75:25)
4	1d	MEM	CH ₂ Cl ₂	56 (78:22)
5			toluene	64 (87:13)
6	1e	(+)-MM	CH ₂ Cl ₂	56 (77:23)

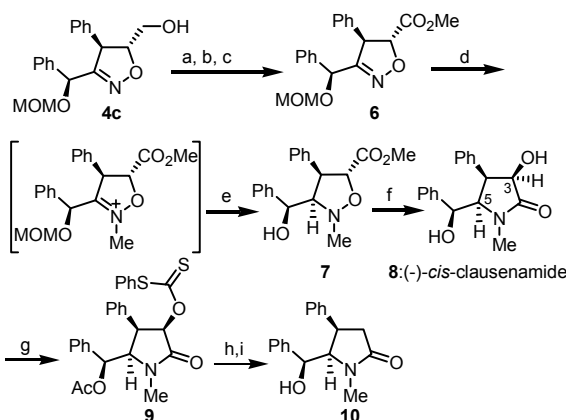
The ratio of **4a** and **4a'** was determined by ¹H NMR spectra after purification.

n-プロピル基を有する基質 **1b** について同様な条件で反応を行うと、その選択性が 54:46 まで低下した。このことから、MEM 基の立体選択性の発現には、中間遷移状態におけるアルコール部分とニトリルオキシドとのキレート効果に加え、MEM 基への Mg 金属の配位効果が重要である (Fig. 3)。



【立体構造の決定と Clausenamide 類の合成】

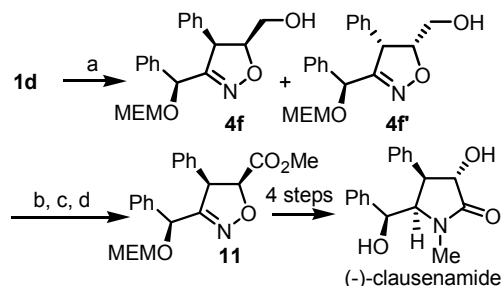
環化体 **4c** の立体化学は次のように決定した。すなわち、**4c** から導いたエステル体 **6** を *N*-メチル化、続く Zn(BH₄)₂ による還元を行うと MOM 基の脱保護を伴いながら還元体 **7** が単一の立体異性体として 63% の収率で得られた。次いで、**7** を Zn, 酢酸で処理し、(-)-*cis*-clausenamide **8** を経た後、3 位水酸基の除去を行い文献既知化合物 **10** へと導き立体構造を確定した (Scheme 2)。



Scheme 2 Reagents and conditions: (a) DMP, CH₂Cl₂, r.t.; (b) NaClO₂, NaH₂PO₄, 2-methyl-2-butene, ^tBuOH-H₂O, r.t.; (c) TMSCH₂N₂, C₆H₅-MeOH, 3 steps 91%; (d) (CH₃)₂OBF₄, CH₂Cl₂, r.t.; (e) Zn(BH₄)₂, THF, -78 °C, 63%; (f) Zn, AcOH-H₂O, 90 °C, 66%; (g) phenyl chlorothionoformate, pyridine, DMAP, CH₂Cl₂, 40%; (h) Bu₃SnH, cat. Et₃B, toluene, r.t.; (i) aq LiOH, MeOH, r.t., 63% from **9**

【(-)-Clausenamide の全合成】

次に、我々は (-)-clausenamide の簡便合成を試みた。すなわち、先に確立した環化条件を用いて (*Z*)-シナミルアルコールを反応させたところ、(*E*)-シナミルアルコールを用いた場合と比べ、立体選択性の低下が見られたものの、環化成績体 **4f**, **4f'** が 73 : 27 の混合物として 60% の収率で得られた。得られた **4f** は確立した官能基変換を行い (-)-clausenamide の全合成を達成した (Scheme 3)。



Scheme 3 Reagents and conditions: (a) (*Z*)-cinnamyl alcohol, EtMgBr, ^tPrOH, toluene, r.t., 60% (**4f**:**4f'**=73:27); (b) DMP, CH₂Cl₂, r.t.; (c) NaClO₂, NaH₂PO₄, 2-methyl-2-butene, ^tBuOH-H₂O, r.t.; (d) TMSCH₂N₂, C₆H₅-MeOH, 81% from **4f**.

以上、我々は MEM 基、ニトリルオキシドへの金属二重キレート効果を用いた高立体選択的 1,3- 双極子環化反応を開発し、(-)-*cis*-clausenamide, (-)-clausenamide の全合成を達成した。今後、clausenamide 誘導体の合成並びに、医薬品化学へと展開していきたいと考えている。

【引用文献】

- (a) Liu, S. L.; Zhang, J. T. *Acta pharm. Sin.* **1998**, *33*, 254.; (b) Feng, Z.; Li, X.; Zheng, G.; Huang, L. B. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2009**, *19*, 2112. 2) Fukuda, N.; Sasaki, K.; Sastry, T. V. R. S.; Kanai, M.; Shibasaki, M. *J. Org. Chem.*, **2006**, *71*, 1220. 3) (a) Hartwig, W.; Born, L. *J. Org. Chem.* **1987**, *52*, 4352.; (b) Yakura, T.; Matsumura, Y.; Ikeda, M. *Synlett* **1991**, 343.; (c) Roberts, S. M. et. al. *Chem. Commun.*, **1998**, 1159. 4) For froxan formation, see; Bode, J. M.; Carreira, E. M. *J. Org. Chem.* **2001**, *66*, 6410. 5) Kanemasa, S. et. al. *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 2324.

「ヒト血管におけるインスリンの内皮非依存性血管弛緩反応の作用機序解明」

金井祐 山本隆一 田中直子 松尾徳子 岡野真弓

九州保健福祉大学・薬学部・薬学科

九州保健福祉大学・保健科学部・視機能療法学科

研究目的

インスリンは糖代謝に重要な生理活性物質であることは広く知られている。インスリンはインスリン受容体を介して Insulin receptor substrate(IRS)/Phosphoinositide3-kinase(PI3K)/Akt を活性化させ、結果としてグルコーストランスポーターを細胞膜に発現することで細胞内にグルコースを取り込む¹⁾²⁾。しかしながら、ヒト血管緊張調節におけるインスリンの作用は未だ明らかではない。

本研究室では内皮除去し、5-HT で持続収縮させたヒト大伏在静脈においてインスリンが弛緩作用を引き起こすことを見出した。さらにこの弛緩作用には一酸化窒素(NO)依存性のみならずNO非依存性の血管弛緩作用があることを明らかとしたが、その詳細な機序は解明されていない。

糖尿病患者では IRS/PI3K/Akt という一連のインスリンシグナル経路に障害が起こるため、細胞内にグルコースを取り込む作用が減弱する³⁾。今回の研究でヒト血管におけるインスリンの緊張調節を明らかにすることは、インスリン作用不全を引き起こしている糖尿病患者の循環器障害メカニズムの解明にもつながる。本研究では、このインスリンの血管弛緩反応の作用機序を細胞内情報伝達系を含めバイオアッセイ、分子生物学的手法を用いて明らかとする。

研究方法

血管張力変化の測定 (マグヌス法)

当研究室では宮崎市内の病院から患者の同意

を文書で得た場合にのみ静脈瘤のストリッピング手術により摘出された大伏在静脈の提供を受けている(倫理委員会の承認済み)。提供された血管は内皮細胞の NO 産生の影響を除くため、全て内皮除去標本として実験で使用した。ヒト大伏在静脈を 2m 幅にカットしリング状標本とした。このリング状標本を栄養液で満たしたマグヌス管内に懸垂し、張力変化を等尺性に記録した。生体内血管収縮物質であるセロトニン 30 nM 添加し血管を収縮させ、その安定期(プラトー相)においてインスリンを濃度依存的に添加し、血管弛緩反応を検討した。NO 合成酵素阻害薬や血管弛緩反応に関与するインスリンシグナルの各種阻害薬はセロトニン添加 15 分前に処置した。

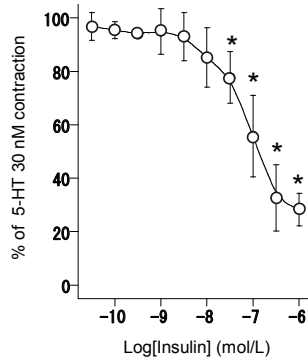
シグナル分子の解析 (ウエスタンブロット法)

マグヌス法で解析したリング状標本を液体窒素で瞬間凍結した。この凍結した血管に Lysis buffer を加えたのちホモジナイザーで粉碎し、15,000×g、4°C、15 分間遠心し、上清を回収した。回収した上清を BCA 法でタンパク質濃度を補正したのち、2×SDS sample buffer を加え 98°C、5 分間ボイルした。ボイルしたサンプルを 10%または 12.5%アクリルアミドゲルで分離し、PVDF 膜に転写した。その後、転写した PVDF 膜を 2%BSA で室温、1 時間の条件でブロッキングし、シグナル分子を特異的に認識する抗体、またはリン酸化部位認識抗体を用いて 24 時間、4°Cの条件で反応させ、Akt、リン酸化 Akt、iNOS、β-actin の発現レベルを解析した(希釈倍率はすべて 1:5000 とした)。2次抗体は anti-rabbit IgG HRP-linked antibody または anti-mouse IgG HRP-linked antibody を使用し室温で 1 時間反応させ(希釈倍率はすべて 1:10000)た。画像解析装置は LAS-4000 を使用した。抗体の希釈液にはイムノエンハンサー(WAKO)を用いた。

結果

摘出ヒト大伏在静脈においてインスリンはセロトニンによる血管収縮に対して濃度依存的に弛緩させた (図 1)。

図1:インスリンは濃度依存的に5-HTで収縮させたヒト大伏在静脈を弛緩させる



このインスリンの血管弛緩反応はNO合成酵素阻害薬 L-NAME(300 μ M)により一部抑制された。L-NAME と PI3K 阻害薬 wortmannin(100 nM)前処置によりインスリンの血管弛緩反応はほぼ抑制されたが、L-NAME と MEK 阻害薬 PD98059(10 μ M)併用前処置では L-NAME 単独処置と差はなかった。

さらにウエスタンブロット法を用いてインスリンシグナル分子の変動を検討した。インスリンは濃度依存的に Akt のリン酸化レベルと iNOS の蛋白レベルを増加させることが明らかとなった。Akt と β -actin の蛋白量に変化は見られなかった。

考察

本研究結果よりインスリンは5-HT刺激により血管収縮させた内皮除去ヒト大伏在静脈においてiNOSを誘導し、NO依存的に血管を弛緩させる作用のみならず、PI3K/Akt経路を介しNO非依存性に血管を弛緩させることが示唆された。糖尿病患者ではインスリンシグナル(特にPI3K/Akt経路)が減弱していることが知られている⁴。このことからインスリンの血管弛緩反応を詳細に検討することで糖尿病患者の循環系リスク増大の機序解明の一助となる可能性がある。

文献

- (1) Manabu I, Amira K. *Endocrinology* 146(12):5071-5078, 2005
- (2) James R. Sowers. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 286:H1597-H1602, 2004
- (3) Okon EB, Chung AW, Rauniyar P, Padilla E, Tejerina T, McManus BM, Luo H, van Breemen C. *Diabetes* 54(8):2415-23, 2005
- (4) Cecilia C. Low Wang, Marc L. Goalstone, Boris Drazin. *Diabetes* 53:2735-2740, 2004

病態時のマーカーとなる内因性物質の異常変動を非侵襲的に感知する方法の開発

緒方 賢次¹⁾、高村 徳人¹⁾、徳永 仁¹⁾、
瀬戸口 奈央¹⁾、近藤 照義²⁾、松岡 俊和¹⁾
1) 九州保健福祉大学・薬学部・薬学科
2) 九州保健福祉大学・保健科学部・臨床工学科

研究目的

生体内では、生理機能に応じて種々の内因性物質が産生されるため、これらの濃度変化を経時的に調べて病態や治療効果を評価する。しかし、血液や組織中に存在する内因性物質の濃度を調べるためには、患者に穿刺するため侵襲性が高く、頻繁に繰り返すことが困難である。内因性物質が尿中に排泄される場合、その濃度を非侵襲的かつ頻繁に調べることが可能になるが、指標となる物質を尿中から抽出することもあり、操作が煩雑になる。したがって、尿中排泄される内因性物質（尿中物質）の濃度変化を簡便に調べる方法の構築が望まれる。

尿中物質には血清タンパク質であるアルブミン（HSA）と強く結合するものがある。HSAには2つの主要薬物結合サイト（サイトIとサイトII）が存在し、我々はこれまでに、HSAの各結合サイトに結合するサイトプローブを患者血清に一定量添加し、血清中の内因性物質がサイトプローブのHSA結合を置換することを利用し、置換されたサイトプローブ濃度（遊離形濃度）から内因性物質の濃度変化を評価する方法を構築している¹⁾。ここで、ネフローゼ症候群患者においては、病態の程度に応じて尿中物質やHSAが尿に漏出する。したがって、尿にHSAのサイトプローブを添加し、その遊離形濃度変化から病態変化を評価できる可能性が高い。今回、疑似ネフローゼ尿を用いて、その評価の妥当性について検討した。

方法

1. サイトプローブの選定と定量法の確立

尿中物質の濃度は血液中よりも低濃度になることもあるため、そのタンパク結合置換能を調べるためには、サイトプローブを低濃度で評価する必要がある。したがって、今回、これまで報告されているサイトプローブ²⁾から蛍光サイトプローブを新たに見出し、蛍光検出によるHPLC測定条件を調べた。

2. 疑似ネフローゼ尿の調製と尿中物質の選定

2名の健常人から採取した尿にそれぞれHSAを溶解して疑似ネフローゼ尿を調製した（U1とU2）。また、尿中物質が各サイトプローブとHSAの結合能におよぼす影響を調べるために、HSAのサイトIに結合する尿中物質として3-カルボキシ-4-メチル-5-プロピル-2-フランプロパン酸（CMPF）、サイトIIに結合する尿中物質としてインドール酢酸（IA）およびインドキシル硫酸（IS）を選び、疑似ネフローゼ尿と同濃度に調製したHSA溶液に混合して試験液を調製した。

3. サイトプローブのHSA結合能の評価

疑似ネフローゼ尿または尿中物質とHSAを含む試験液に一定量の各サイトプローブ（10 μ M）を添加し、限外ろ過法にてろ液を調製した。ろ液中の各サイトプローブ濃度（遊離形濃度）をHPLCで測定した。

結果

HPLCにより高感度に測定できる蛍光サイトプローブは、ワルファリン（サイトIプローブ）およびイブプロフェン（サイトIIプローブ）であったことから、本試験にはこれらのサイトプローブを用いた。HPLCによる測定条件を表1に示す。プローブの検出波長は、移動層における各サイトプローブの吸光スペクトルおよび蛍光スペクトルから決定した。

2名の健常人から採取した尿（U1とU2）が各サイトプローブとHSAの結合におよぼす影響について調べた結果、U1およびU2において、それぞれのワルファリン遊離形分率（遊離形濃度 / 総濃度）はHSA濃度が100 μ Mから300 μ Mに増大すると低下することがわかった（図1A）。また、イブプロフェンについても同様の結果が得られた（図1B）。これらはHSA

の濃度が増大することによって、各サイトプローブの結合が増強したためであり、今回選択した各サイトプローブとその測定条件が適切であることがわかった。

表1 HPLCによるサイトプローブ測定条件

カラム	LiChrosorb RP-18 (7 μ m) 4.0 \times 250 mm
移動層	アセトニトリル:0.1M 酢酸緩衝液 (pH 5.7) = 40:60
流速	1.0 mL/min
カラム温度	40 $^{\circ}$ C
検出	ワルファリン(励起波長 309 nm, 蛍光波長 405 nm) イブプロフェン(励起波長 223 nm, 蛍光波長 285 nm)

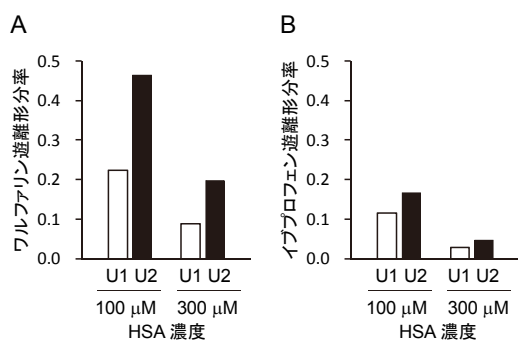


図1 疑似ネフローゼ尿における各サイトプローブの遊離形分率

また、ワルファリンの遊離形分率は、同じ HSA 濃度であっても U1 と U2 で差がみられ、イブプロフェンにおいても同様であった。この遊離形分率の差は尿中物質の種類や濃度の差に起因することから、種々の尿中物質が各サイトプローブと HSA の結合におよぼす影響について調べた (図 2)。その結果、ワルファリンの遊離形分率は、サイト II に結合する IA、IS の濃度変化の影響を受けず、サイト I に結合する CMPF の濃度増大にあわせて大きくなった (図 2A)。また、イブプロフェンの遊離形分率は、サイト I に結合する CMPF の濃度変化の影響を受けず、サイト II に結合する IA、IS の濃度増大にあわせて大きくなった (図 2B)。これらは各サイトにおいて、サイトプローブと HSA の結合が尿中物質によって置換されたためであり、今回の測定条件においてその現象が確認できたことから、測定条件が適切であることがわかった。

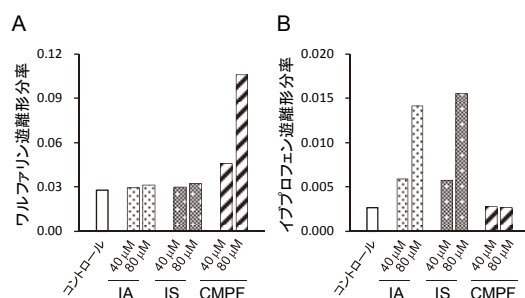
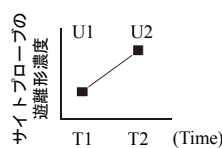


図2 尿中物質による各サイトプローブの結合阻害効果 (HSA 100 μ M)

考察

一般に HSA 濃度に対してサイトプローブ濃度が増大すると、サイトプローブの結合が弱くなるため遊離形分率も増大する。この場合、尿中物質濃度が増大してもサイトプローブの置換効果が弱いため、遊離形分率の変化に現れないことも推測される。したがって、サイトプローブの選択だけでなく、その濃度の選択も本評価法には重要な因子となる。今回、疑似ネフローゼ尿に含まれる HSA や尿中物質の濃度変化を各サイトプローブの遊離形分率の変化から評価することができたことから、尿を用いてネフローゼの病態を評価するための適切なサイトプローブおよび濃度の選択ができたと思われる。

今後、この診断法を様々な疾患の経時的な病態変化の評価に応用したい (図 3)。



病態の悪化に伴い尿中物質濃度が高くなる疾患に対して、異なる時間 (T1とT2) に患者から採尿し (U1とU2)、病態変化を評価する
U1 遊離形プローブ濃度 低 \rightarrow 尿中物質濃度 低
U2 遊離形プローブ濃度 高 \rightarrow 尿中物質濃度 高
この場合、時間経過とともに病態が悪化していると評価する

図3 サイトプローブを用いた尿中診断法

文献

- 1) Takamura N., et al. *YAKUGAKU ZASSHI*, 127, 1805-1811 (2007).
- 2) Kragh-Hansen U., et al. *Biol. Pharm. Bull.*, 25, 695-704 (2002).

酸化チタンナノ粒子暴露により肺組織で誘導される炎症性ケモカイン RANTES の誘導メカニズムの解析

渡辺 渡¹、紺野 克彦¹、広瀬 明彦²

¹九州保健福祉大学・薬学部・動物生命薬科学科、

²国立医薬品食品衛生研究所・安全性生物試験センター

目的

平成 21 年度学内共同研究テーマとして採択を受けた“ウイルス感染マウスにおいて酸化チタン暴露により特異的に影響を受ける疾患関連因子の探索”の研究において、酸化チタンナノ粒子を暴露し、RS ウイルスを感染させたマウスでは、肺組織中の炎症性ケモカイン RANTES の遺伝子発現が有意に上昇していることを見出した¹⁾。このケモカインは RS ウイルス感染における気管支炎や肺炎などの呼吸器感染病態の進行を促進する重要な因子である。本研究では、酸化チタンナノ粒子が RANTES を誘導する細胞種を同定し、その作用機序を明らかにすることを目的とした。

研究方法

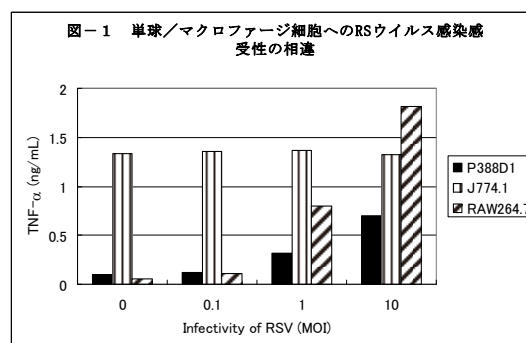
酸化チタン (粒径 35 nm) は、ルチル型 (化粧品用) のサンプル R を用いた。In vitro 実験として、単球/マクロファージ系細胞 (J774.1、P388D1、RAW264.7) を超音波破碎機で分散させたサンプル R の存在下でそれぞれ培養し、その後 RS ウイルス A2 株を感染させた。そして培養上清中の IL-6 および TNF- α 量を eBioscience 社製の Ready-set-Go Mouse ELISA キットを用いて添付のプロトコールに準じて測定した。

In vivo 実験として、サンプル R を PBS に超音波破碎機を用いて懸濁して、BALB/c マウス (雌; 6 週齢) に麻酔下で経鼻投与した。4 日後、RS ウイルス A2 株 (3×10^6 PFU) を同様に麻酔下で経鼻感染させた。感染対照 (mock infection) マウスには同様に PBS を投与した。

ウイルス感染 1 日後に麻酔下で、マウス気道にカテーテル経由で冷 PBS を注入し、肺洗浄液 (BALF) を取得した。その後、肺を摘出し、RNA をキアゲン RNeasy extraction キットを用いて調製した。肺組織中の RS ウイルスコピー数は、リアルタイム RT-PCR 法により測定した²⁾。なお、動物実験は、九州保健福祉大学動物実験に関する規則に従って、安全面および倫理面に配慮して適正に実施した。

結果

今まで環境化学物質の RS ウイルス感染病態増悪化に、感染初期のマクロファージへの影響が大きく寄与していることを報告してきた^{3), 4)}。そこで、マクロファージへの酸化チタンの影響を評価するため、単球/マクロファージ系培養細胞での RS ウイルス感受性を TNF- α 産生量を指標に検討した (図-1)。



RAW264.7 細胞ではウイルス感染量に比例して TNF- α 量が顕著に増加することが判明した。そこで、これらの結果を基に RAW264.7 細胞における酸化チタンサンプル R の RS ウイルス感染応答を検討した (表-1)。

表-1 RAW264.7細胞における酸化チタンRの影響

サンプル R (μ g/mL)	0	1	10	100
RSV-infected				
TNF- α (ng/mL)	0.06	0.76	4.77	9.22
IL-6 (ng/mL)	<0.02	<0.02	<0.02	<0.02
Mock-infected				
TNF- α (ng/mL)	0.41	0.72	0.51	1.40
IL-6 (ng/mL)	<0.02	<0.02	<0.02	<0.02

その結果、ウイルス感染時において、濃度に依存して TNF- α 産生量が顕著に増加した。一方、代表的な炎症性サイトカインである IL-6 の産生には影響が認められなかった。このように、酸化チタンが RS ウイルス感染マクロファージの機能に影響することが判った。そこで、これら

の結果を受けて、RS ウイルス感染マウスモデルを用いて、ウイルス感染直後での酸化チタンRの感染応答への影響を検討した（表-2）。

表-2 RSウイルス感染マウスBALF中のサイトカインへの酸化チタンR暴露の影響

サンプルR投与量(mg/kg)	0	0.5
RSV-infected		
TNF- α (ng/mL)	1.41	0.39
IL-1 β (ng/mL)	<0.04	<0.04
IL-6(ng/mL)	0.80	0.34
Mock-infected		
TNF- α (ng/mL)	0.04	0.03
IL-1 β (ng/mL)	<0.04	<0.04
IL-6(ng/mL)	<0.02	<0.02

RS ウイルス感染マウスにおいて、サンプルR 0.5 mg/kg 投与群のBALF中のTNF- α レベルは、非投与群と比較して有意に（ $P < 0.01$ ）低下していた。また、IL-6のレベルも低下傾向が認められた。そこで肺組織中のRSウイルスのコピー数をリアルタイムRT-PCRで測定したところ、両群の間で明確な差は認められなかった（結果は示さず）。

考察

今回の研究により、酸化チタンナノ粒子がマクロファージの機能へ影響し、炎症性サイトカイン産生を促進することがin vitroの試験から明らかとなった。しかしながら、RSウイルス感染マウスモデルで検証したところ、酸化チタンナノ粒子場暴露によりBALF中のそれらのレベルは逆に低下していた。そして、それらの影響が臭素化難燃物質のように、感染初期の肺組織でのウイルス量を上昇させるのではなく、サイトカイン応答に局限している可能性が示唆された⁴⁾。即ち、酸化チタンナノ粒子による感染応答影響がサイトカインカスケードに作用し、間接的に下流の炎症性ケモカイン RANTES の遺伝子発現に作用していることが強く示唆された。

酸化チタンナノ粒子は、懸濁する溶媒の性質により異なった二次粒径をとることが知られている。今回の試験では、in vitro と in vivo では、それぞれ培養液とPBSと懸濁溶媒が異なっている。サンプルRをこれらの溶媒で懸濁し、ゼータサイザーナノでそれぞれ二次粒径を測定したところ、平均粒径ならびにそれらの分布に差があることが判った（結果は示さず）。今後、

粒子径の相違が、RS ウイルス感染応答への様に影響するか検討していく。

今回、酸化チタンナノ粒子の肺組織、特に上皮細胞への直接的な影響が検討できなかった。これは、マウスでは気道上皮細胞の培養系が未だ確立されていない事による。今後、培養系が確立されている正常ヒト気道上皮細胞を利用して、直接的な酸化チタンナノ粒子の影響を検討し、マクロファージへの作用と比較しながら標的細胞種を明らかにする予定である。

謝辞

本研究の実施に際して、国立医薬品食品衛生研究所・生活衛生化学部・五十嵐良明室長、本学生化学第二講座・黒川昌彦教授、吉田裕樹助教、並びに薬学科5年生・黒木奈緒、山中紗代子さんの多大なるご協力に感謝いたします。

文献

- 1) 渡辺 渡、清水 寛美、紺野 克彦、広瀬明彦。ウイルス感染マウスにおいて酸化チタン暴露により特異的に影響を受ける疾患関連因子の探索 平成 21 年度共同研究報告書 (2010) 27-28.
- 2) Watanabe, W., Shimizu, T., Hino, A., Kurokawa, M. Effects of decabrominated diphenyl ether (DBDE) on developmental immunotoxicity in offspring mice. Environ. Toxicol. Pharmacol. (2008) 26, 315-319.
- 3) Watanabe, W., Shimizu, T., Sawamura, R., Hino, A., Konno, K., Hirose, A., Kurokawa, M. Effects of tetrabromobisphenol A, a brominated flame retardant, on the immune response to respiratory syncytial virus infection in mice. Int. Immunopharmacol. (2010) 10, 393-397.
- 4) Watanabe, W., Shimizu, T., Sawamura, R., Hino, A., Konno, K., Kurokawa, M. Functional disorder of primary immunity responding to respiratory syncytial virus infection in offspring mice exposed to a flame retardant, decabrominated diphenyl ether, perinatally. J. Med. Virol. (2010) 82, 1075-1082.

新しく同定したヒトナイーブ Tリンパ球の生化学的および 形態学的解析

池脇信直¹⁾ 川野純一²⁾

九州保健福祉大学・¹⁾薬学部・動物生命薬科学科
²⁾保健科学部・視機能療法学科

【目的】

我々は、自主開発し米国で特許を取得したCD93抗体、さらに既存のCD4抗体およびCD45RA抗体を組み合わせることで、臍帯血細胞中に新しいナイーブTリンパ球(CD4+CD45RA+CD93+細胞)を発見した¹⁾。本研究は、この新しいナイーブTリンパ球の生化学的および形態学的解析について報告する。

【材料と方法】

抗体：CD93抗体(mNI-11、R139、R3、X-2)を用いた。

細胞：臍帯血細胞、健常成人末梢血細胞(提供同意済み)を用いた。

生化学的解析：免疫沈降法ならびにウエスタンブロッティング法を用いた。

形態学的解析：FITC標識CD93抗体を用いた蛍光抗体法を用いた。

【結果】

健常成人末梢血細胞をビオチンで標識し、lysing bufferで可溶性抗原を作製した。まず始めに、可溶性抗原をCD93抗体(mNI-11)と反応させ、対応分子を免疫沈降させた。次にセルロース膜にブロッティングし、ビオチン化標識CD93抗体(R139、R3、X-2)とPOD標識ストレプトアビジンを反応させ、DABで発色させた。図1に示すように、本研究で用いたCD93抗体(mNI-11、R139、R3、X-2)は約98.1kDaの分子を認識することがわかった。さらに、その認識エピトープはそれぞれ異なっていることも明らかになった。

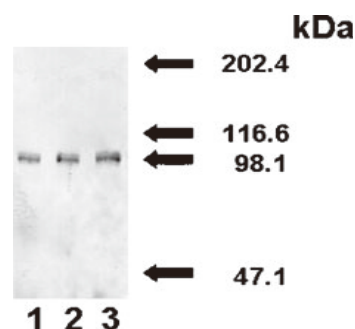


図1. CD93抗体の認識エピトープの解析

CD93抗体(R139、R3、X-2)の認識エピトープをCD93抗体(mNI-11)のシークエンス免疫沈降法とウエスタンブロッティング法で解析した。レーン1: R139抗体、レーン2: R3抗体、レーン3: X-2抗体。

次に、健常成人末梢血細胞(パネルA)および臍帯血細胞(パネルB)をビオチンで標識し、lysing bufferで可溶性抗原を作製した。次にCD93抗体(mNI-11、R139、X-2)で対応分子を免疫沈降させた。セルロース膜にブロッティング後、POD標識ストレプトアビジンを反応させ、DABで発色させた。図2に示すように、CD93抗体(mNI-11、R139、X-2)は健常成人末梢血細胞および臍帯血細胞の約98.1kDaの分子を認識した。健常成人末梢血細胞の顆粒球と単球、臍帯血細胞のリンパ球、顆粒球、単球のCD93分子を認識していると推測された。

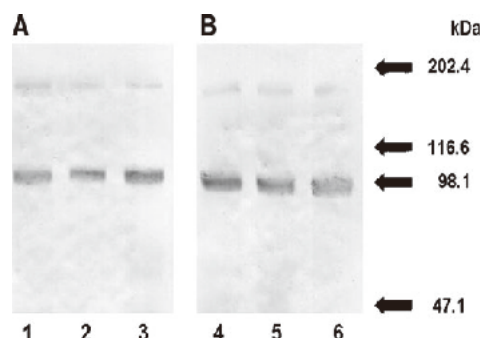


図2. CD93抗体の認識する分子の解析(1)

CD93抗体(mNI-11、R139、R3、X-2)の認識する分子を免疫沈降法とウエスタンブロッティング法で解析した。パネルA: 健常成人末梢血細胞、パネルB: 臍帯血細胞。レーン1と4: mNI-11抗体、レーン2と5: R139抗体、レーン3と6: X-2抗体。

次に、ネガティブセレクションによって高純化した健康成人末梢血細胞（パネル A）および臍帯血細胞（パネル B）由来の CD4+CD45RA+細胞およびヒト単球系細胞株（U937 細胞）をビオチンで標識し、lysing buffer で可溶性抗原を作製した。次に、CD93 抗体（mNI-11、R139、X-2）で対応分子を免疫沈降させた。セルロース膜にブロットイング後、POD 標識ストレプトアビジンを反応させ、DAB で発色させた。図 3 に示すように、CD93 抗体（mNI-11、R139、X-2）は健康成人末梢血細胞由来の CD4+CD45RA+細胞には全く反応しなかった。しかしながら、CD93 抗体（mNI-11）が臍帯血細胞由来の CD4+CD45RA+細胞上の約 98, 1kDa の分子と反応した。mNI-11 抗体によって認識される CD93 分子は臍帯血細胞由来の CD4+CD45RA+細胞に発現している新規の CD93 分子であると推測された。

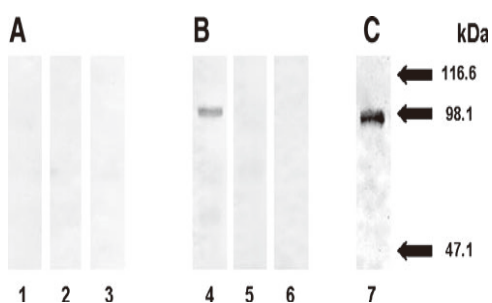


図3. CD93抗体の認識する分子の解析（2）

CD93抗体（mNI-11、R139、X-2）の認識する分子を免疫沈降法とウェスタンブロットイング法で解析した。パネルA：健康成人末梢血細胞由来のCD4+CD45RA+細胞、パネルB：臍帯血細胞由来のCD4+CD45RA+細胞、パネルC：U937細胞。レーン1、4、7：mNI-11抗体、レーン2と5：R139抗体、レーン3と6：X-2抗体。

最後に、ネガティブセレクションによって高純化した臍帯血細胞由来の CD4+CD45RA+細胞の形態を蛍光抗体法で解析した。図 4 に示すように、mNI-11 抗体で認識される CD93 分子はキャップフォーメーションを形成することがわかった。

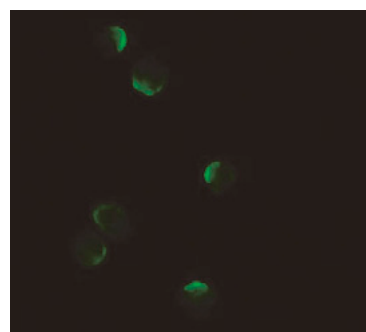


図4. mNI-11 抗体で認識される CD93 分子の局在

高純化した臍帯血細胞由来の CD4+CD45RA+細胞の形態を蛍光抗体法で解析した。

【考察】

CD93（分子量 100 kDa）は、主に単球・顆粒球・血管内皮細胞・造血幹細胞に発現し、初期の生体防御システムに重要な役割を演じている²⁻⁵。本研究の結果から、臍帯血細胞由来のナイーブTリンパ球（CD4+CD45RA+細胞）には CD93 が発現していることが生化学的、形態学的解析によって明らかになった。臍帯血細胞に存在するナイーブTリンパ球（CD4+CD45RA+CD93+細胞）の免疫機能は現時点では明らかではないが、おそらく新規の抑制性Tリンパ球ではないかと推測している。すなわち、自己免疫疾患の治療としての供給細胞源として利用できると考えられる。将来は再生医療分野での応用性もあることから社会的貢献度は極めて高いと考えられる。

【文献】

- 1) Ikewaki, N., Yamao, H., Kulski, J. K., et al. *J. Clin. Immunol.* 30:723, 2010.
- 2) Tenner, A. J. *Immunobiology* 199: 250, 1998.
- 3) Wing, K., Ekmark, A., Karlsson, H., et al. *Immunology* 106: 190, 2002.
- 4) Greenlee, M. C., Sullivan, S. A., Bohlsion, S. S. *Curr. Drug Targets* 9:130, 2008.
- 5) Jeon JW, Jung JG, Shin EC, et al. *J. Immunol.* 185: 4921, 2010.

平成22年度共同研究報告書

編集後記

最近、大学に対する社会的な期待が「研究より教育」へと変化しているような気がします。こうした変化は社会そのものの多様化・複雑化に関連して生じている現象といえますが、大学における教育の本質を探る試みが失われては大学としての意味がありません。「研究に基づく教育の実践」こそ真の大学教育であるという自負を持って研究活動に取り組みたいものです。

大学に対する社会的期待の変化によって、研究そのものも当然変わらなければなりません。その方向性の一つが「学際的研究」ということになるでしょう。異なる専門領域間における共通テーマへの挑戦こそ学際的研究の意義でもあり、その研究スタイルが共同研究の姿といえます。

本学では、教育のエビデンスとして実践される学際的研究の推進という考えのもとで、積極的に共同研究を推奨し毎年多額の研究費が配分されています。平成22年度は25件の申請がありましたが、そのうち13件が共同研究費の恩恵にあずかることができました。本報告書はそうして実施された共同研究の成果をまとめたものですが、今後の研究活動に少しでもお役に立つことができると幸いです。

最後に、本報告書の出版にあたりご尽力いただいた、加計美也子理事長・総長ならびに和田明彦学長に感謝申し上げます。

教育開発・研究推進中核センター
研究推進部門長 福本安甫

平成 22 年度共同研究結果報告書

平成 23 年 9 月

編集発行 学校法人順正学園 九州保健福祉大学
教育開発・研究推進中核センター研究推進部門
〒882-8508 宮崎県延岡市吉野町 1714 番地 1
電 話 0982-23-5555 (代表)

<非 売 品>

