

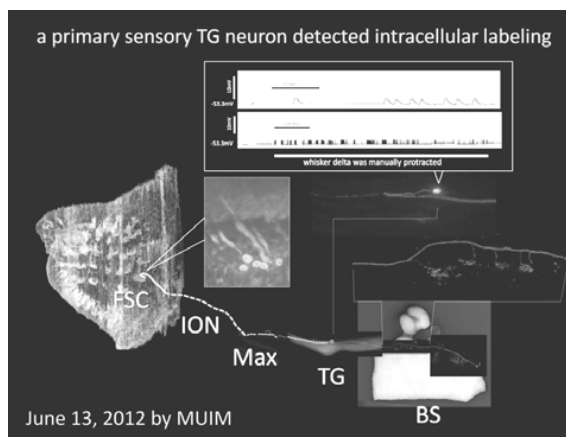
平成25年度 ユニット・講座研究

単一三叉神経節ニューロンの電気生理的・形態学的解析

熊本賢三, 榎原智美, 外村宗達, 高橋茉莉衣, 大槻妙子, 黒田大地 解剖学ユニット

三叉神経節の偽単極性ニューロンの末梢は主に顔面、口腔、鼻腔、歯などの顔面領域に神経終末を広げて感覚を支配し、中枢では中脳路核、主感覚核および脊髄路核からなる三叉神経感覚核においてシナプスを形成して感覚を二次ニューロンに伝達する。主感覚核は脊髄神経系の後索核と同等の性質を持ち顔面部の皮膚からの識別性触覚を受け入れ、脊髄路核は橋下部から第3頸髄にかけて下方へ続く長い核を形成し、吻側亜核、中間亜核および尾側亜核の3つに区分される。吻側亜核と中間亜核は口腔領域の感覚、尾側亜核は顔面および周辺領域の侵害・温度感覚を受け入れる。一方、齧歯類やネコでは顔面部にヒゲといわれる洞毛を持ち、これを支配する三叉神経主感覚核、中間亜核および尾側亜核は洞毛の配列を反映するモジュール構造を有している。我々はすでにラットの洞毛において6種類の感覚神経終末、Merkel endings, lanceolate endings, club-like endings, reticular endings, spiny endings, free nerve endings が分布することをこれまでに明らかにした。三叉神経節にある感覚一次ニューロン全体の入出力部位は明らかにされているが、個々の単一ニューロン全貌は未だ解明されておらず、末梢で形成する神経終末の形態と三叉神経感覚核におけるシナプス形成の詳細は不明である。我々は三叉神経感覚一次ニューロンの電気生理学的特性と末梢性・中枢性終末の形態を明らかにするために、顔面部洞毛内の感覚神経終末に注目し、3~5週齢のWistar系雄性ラット(体重40~120g)を用いて実験を行った。動物を深麻酔して脳定位装置に固定し、右頭頂骨の一部を除去し、実体顕微鏡下に脳組織を円筒に三叉神経節に至るまで除去後、脳硬膜を剥離した。剥離後、三叉神経節の表面が乾燥しないように生理食塩水を満たし、三叉神経一次ニューロンの細胞体に1 μ lの1Mの酢酸カリウムに溶解した15-20% neurobiotinを満したガラス電極を一次元油圧マイクロマニピュレータにて挿入した。皮膚表面をエアープフとvon Frey Hairにより刺激して受容野を探索し、反応電位を記録後、トレーサーを電気泳動的に細胞体に注入した。1匹のラットには1回のみトレーサーを注入し、単一の一次感覚ニューロンのみが組織化学により視覚化されるようにした。実験終了後、動物は20時間麻酔下に生存させた後、深麻酔して経心臓的に生理食塩水で前灌流し、1Mのリン酸緩衝液(PB)に溶解した8% formaldehydeで灌流固定した。固定後、頭部を摘出して同固定液に冷蔵庫内で浸漬した。洞毛部皮膚、上顎神経、三叉神経節および脳幹の一連の組織を実体顕微鏡下に剖出し、洞毛部皮膚進入部、脳底部正中の蝶形骨と後頭骨の縫合位、三叉神経根中央で切断した。標本は氷結防止処理後、クライオスタ

ットにて凍結連続浮遊切片とした。三叉神経節はAlexa594標識streptavidinに冷蔵庫内で一晚浸漬して標識ニューロン内のneurobiotinを可視化し、洞毛部皮膚および脳幹の全ての連続切片は、TSA強化反応後、同様にstreptavidinで標識した。全ての組織は封入し、蛍光顕微鏡にて観察し、必要な画像イメージを顕微鏡用デジタルカメラにて取得した。皮膚神経終末形態の確認のため、必要に応じて、切片を再びT-PBSにて洗浄後、ウサギ抗PGP9.5抗体を用いて免疫組織化学的に全ての軸索を可視化し(二次抗体; Alexa 488標識抗ウサギIgG)、共焦点レーザー顕微鏡システムにて観察した。また、洞毛内の神経終末の同定は、共焦点レーザーのみならず、



電子顕微鏡にても微細構造を確認している。下図に示すように洞毛内に位置する棍棒状終末を形成する感覚一次ニューロンの全景が明確にされている。末梢性軸索は、上顎神経内を走行して洞毛の下方から内部へ侵入し、海綿静脈洞内を上行し、ringwulst(輪状塊)の高さで外根鞘外側にある1個の棍棒状終末を形成していた。また、その中枢性軸索は三叉神経主感覚核に微細な有節状線維となり樹状に広く分布し、さらに主幹軸索は脊髄方向に下行して脊髄路核に向かって多数の側枝を出して樹状に広がっていた。また、洞毛を動かすことにより得られた反応電位も記録されており、この感覚神経終末が洞毛の動きを捕らえていることがわかる。現在、この感覚終末は7例が明らかにされており、いずれも同様の中枢性投射を形成しており、このタイプのニューロンの構造解析を進めている。このタイプのニューロンは、脊髄神経系の識別性触覚を伝える系と同様の中枢投射をしている。すなわち、脊髄では、識別性触覚のニューロンは脊髄の後角に終末し、さらに後索路を通過して延髄の後索核にいたる。三叉神経系では、はじめに主感覚核に終末し、さらに枝を脊髄路核に延ばしている。

メルケル細胞とメルケル神経複合体を形成す

る神経終末を形成するニューロンを標識できた。これは、洞毛に間歇的に触れると発火するニューロンで、末梢性軸索は洞毛下部より内部に侵入し、海綿静脈洞内を上行し、外根鞘を貫いて分枝して数珠状線維となり、煉瓦状に配列するメルケル細胞と接するメルケル終末となっていた。中枢性軸索は棍棒状終末を形成するニューロンと同様の分布を示していた。

洞毛間の皮膚にある毛包の周囲に分布する柵状終末の一部を形成するニューロンを標識できている。1本の毛包周囲の柵状終末は多数のニューロンに支配されており、末梢性軸索は、そのうちの一部の槍型終末を形成していた。中枢性軸索は棍棒状終末を形成するニューロンと同様の分布を示していた。

さらに、いくつかの神経終末を形成する感覚一次ニューロンも標識されているが、ニューロンの全体像を得ることができていないものがある。

今後は、各神経終末について例数を集め、構造解析を行うと共に、中枢における軸索の投射領域と終末の分布状況と微細構造を明らかにすると共に、二次ニューロンについても解明していきたい。

【著書】

熊本賢三, 榎原智美; 皮膚器械受容器の構造. 触覚認識メカニズムと応用技術-触覚センサ・触覚ディスプレイ-【増補版】第1章第2節:19-33, 下条 誠, 前野隆司, 篠田裕之, 佐野明人編 S&T出版 2014. 3. 19.

【論文および学会発表等】

外村宗達, Meir Inbal, 榎原智美, 黒田大地, 歌大介, 古江秀昌, 古田貴寛, Bagdasarian Knarik, Ahissar Ehud, 熊本賢三; Full visualization of single trigeminal ganglion neuron. 第118回日本解剖学会総会・全国学術集会 講演プログラム・抄録集 P181 ポスター3P-H128

高橋菜里衣, 榎原智美, 黒田大地, 藤原浩芳, 小田 良, 久保俊一, 熊本賢三; Distribution of Merkel cells around human finger nail 学会同上 P180 ポスター3P-H123

古田貴寛, 榎原智美, 金子武嗣; ラット洞毛の毛包内における器械受容器の形態的特徴と反応特性の関係 学会同上 P138 ポスター2P-G023

榎原智美, 外村宗達, 熊本賢三, 黒田大地, 歌大介, 古江秀昌, 古田貴寛, Ahissar Ehud; in vivo 単一神経細胞電位記録による三叉神経一次感覚ニューロンの形態学的解析 Neuro 2013, P3-1-144

榎原智美, 外村宗達, 熊本賢三, 歌大介, 古江秀昌; ラットヒゲニューロンにおける一次感覚ニューロンの機能形態の同時追究. 自然科学研究機構生理学研究所年報 第34巻 P165.(一般共同研究報告)

研究区分：重点研究（ユニット研究）

胸腺髄質上皮前駆細胞の分化に関わる胸腺細胞因子と髄質上皮細胞の分化の解明

研究代表者：糸井マナミ【医学教育研究センター、免疫・微生物】

共同研究者：千葉章太【医学教育研究センター、免疫・微生物】

【目的】胸腺は T 細胞分化の場であり、胸腺上皮細胞は T 細胞分化に必要なシグナルを提供する。胸腺上皮細胞の機能に関わる分子背景については、近年、T 細胞初期分化に関わる DLL4, SCF, CCL25 や正の選択に関わる $\beta 5t$ 、組織特異的抗原に対する自己寛容形成に関わる Aire が同定されてきているが十分に明らかにされていない。また、胸腺皮質および髄質上皮細胞は共通の前駆細胞からそれぞれの系列へと分化するが、その詳細についても十分に解明されていない。胸腺上皮細胞の分化・成熟には胸腺内で分化する T 系細胞との相互作用が必要である。昨年までの学内研究助成研究において、我々は、胸腺内に T 系細胞が無いために胸腺形成に異常がある huCD3 ϵ -tg26 (eTg) マウスを用いた解析を行い、eTg マウス胸腺において、胸腺細胞因子非依存的に RANK 陽性髄質上皮前駆細胞が形成されること、髄質上皮前駆細胞の分化において LT β R シグナルと RANK シグナルは異なる機能分子発現を誘導することを明らかにした。また、eTg 胎仔胸腺では、髄質上皮前駆細胞が胸腺細胞シグナルを一切受けずに未分化な状態で維持されていることが示唆されている。そこで、本研究では、eTg マウス胎仔胸腺の器官培養系を用いて、LT β R および RANK シグナルの胸腺上皮細胞分化への作用をさらに詳細に検討することにより、上皮細胞分化とその調節機構の解明を試みた。

【結果と考察】これまでの我々の解析より、胸腺細胞の無い eTg マウスの胎生 14 日胎仔胸腺の器官培養系に TNFR ファミリーリガンドの RANKL または LT β R 刺激型抗体の添加により髄質上皮細胞の異なる分化が誘導されることが示唆されている。そこで、RANKL または LT β R 抗体に反応する上皮前駆細胞の胸腺内分布領域を特定するために、BrdU 取り込みを指標として増殖細胞を検出した。その結果、RANKL および LT β R 抗体添加群の両群で、皮質および髄質上皮細胞マーカーの発現境界領域で細胞増殖の増加が見られた。さらに、LT β R 刺激抗体の添加群では皮質上皮細胞マーカー発現領域での細胞増殖にも増加が見られた。このことより、RANK および LT β R シグナルによって増殖する髄質上皮前駆細胞が皮質・髄質境界領域に存在すること、さらに、LT β R シグナルは皮質上皮細胞の分化・増殖にも関わる可能性が考えられた。そこで、eTg マウスの胎仔胸腺の器官培養を用いて RANKL および LT β R 抗体添加による胸腺皮質および髄質上皮細胞の機能分子発現への作用を定量的 PCR により比較検討した (図 1)。昨年の報告の通り、RANKL を添加した場合、Aire の発現誘導と RANK の発現増強が見られ、CCL19 や CCL21 の発現は影響されなかった。LT β R 刺激型抗体の添加では、RANK および CCL19 の発現増加が認

められた。RANKL および LT β R 抗体の同時添加で、Aire、RANK および CCL19 は相加的な発現増強が見られ、CCL21 の発現増強は相乗的であった。さらに、LT β R 抗体の添加群では、胸腺皮質上皮細胞の機能分子である CathepsinL、Prss16、 $\beta 5t$ 、DLL4、IL7、CCL25 および CXCL12 の発現が増強された。この発現増強作用は RANKL の同時添加で抑制された。このことから、LT β R シグナルは髄質上皮細胞だけでなく皮質上皮細胞の分化・増殖にも関わることを示唆された。LT β R の胸腺内の発現分布を免疫組織化学にて検討したところ、LT β R は胸腺の keratin8 陽性の皮質上皮細胞にも広く発現していることが確認された (図 2)。これらのことより、TNF スーパーファミリー受容体である LT β R および RANK シグナルが胸腺皮質・髄質共通前駆細胞からの系列分化の過程に関わることを示唆された。

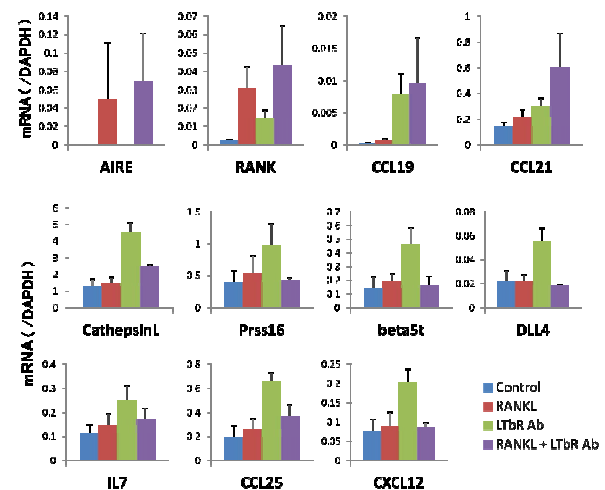
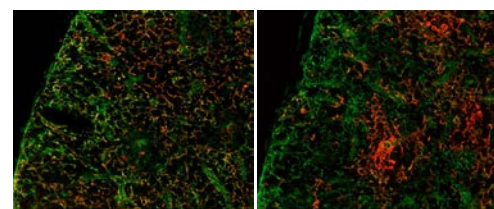


図 1. 器官培養系における胸腺上皮細胞機能分子発現

図 2. LT β R の胸腺内発現

【論文及び学会発表】

・Itoi M, Chiba S and Amagai T.: Generation of RANK positive thymic medullary epithelial progenitors does not require interaction with developing thymocytes. The 6th International Workshop of Kyoto T Cell Conference 2013. 6:48. 2013. Kyoto. (2013.6.3-7)

研究区分：重点（ユニット）研究

灸法の有用性と灸法における普及に関する調査

和辻直、日野こころ、渡邊勝之、斉藤宗則、新原寿志、
関真亮、谷口博志、角谷英治、篠原昭二【基礎鍼灸学】

【背景】日本における鍼灸治療の受診率は、国民の1割にも満たないと報告され、同様な伝統医学を持つ韓国や中国、台湾と比較して、治療として活用されていない。特に灸療法は近年、鍼灸臨床でも利用率が鍼よりも低い。その理由は「熱い」や「跡が残る」といった負のイメージが先行して正しい灸法が普及されていないこととともに、灸刺激の科学的作用メカニズムに不明な点が多いためと考えられる。このため、灸法の有用性を研究・調査することと、健康予防や健康維持に活用できる灸法を再普及させることが必要である。灸療法を活用する人口を増やすには、利用者に灸法の良さを正しく認識して、かつ灸法の体験を通して実際に活用できる学習機会が必要である。

本研究の目的は、希望者に対して灸法の説明会を実施し、灸法をセルフケアとして活用してもらうことであり、同時に灸のイメージの変化、および対象者の体調に関して調査することである。

【方法】対象は本調査に同意した本学看護学部、保健医療学部の学生とした。手順は対象に温灸体験を2〜3回行い、自らが温灸を据えられるように鍼灸師が指導した。1回目の温灸体験は山谷、三陰交、足三里の左右に2壮を目安に行った。2回目以降の温灸体験は1回目の経験を踏まえて興味のある疾患に関係した経穴への施灸を行った。施灸後に温灸の印象、意見を独自に作成したアンケート用紙に記載してもらった。なお健康把握のために健康調査票（SF-8 アキュート版）を用い、身体的サマリースコア（Physical component summary :PCS）と精神的サマリースコア（Mental component summary :MCS）を平均±標準偏差にて表記した。なお学内研究倫理委員会の承認を得た。

【結果】対象は22名（男性14名、女性8名）、平均年齢は21±1歳であった。アンケートの結果を図1に示す。温灸を経験したことがあるのは11名（50%）であった。温灸を行った感じは「温かかった」が最も多かった（15名、68%）。煙は「あっても良い」「少しなら良い」が18名（82%）、香りは「好き」「少し好き」が15名（68%）、効果は「判った」「少し判った」が17名（72%）、終わった後の気持ちは「良い」「少し良い」が20名（91%）、機会があれば続けたいかという問いには全員が「続けたい（12名、55%）」「少しなら続けたい（10名、45%）」と回答した。今回の体験については、全員が「良かった（22名、100%）」と回答した。温灸のイメージについては、経験あり群（11名）は「変わらない」が最も多く（7名、64%）、経験なし群は半数以上が「変わった（2名、18%）」「少し変わった（5名、45%）」と回答した。

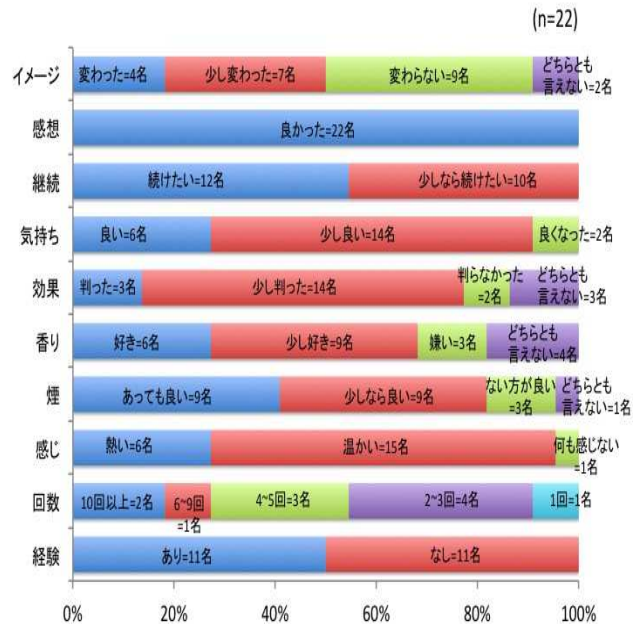


図1. アンケートの回答

健康調査票のPCSは49.2±7.6、MCSは47.2±7.5であった。

【考察】今回のアンケート結果より温灸に対して好意的な回答が多かった。体験に関する感想については「良かった」、「機会があれば続けたい」と全員が回答し、温灸の経験が全くなかった半数以上が「イメージが変わった」と回答した。体験後に温灸のイメージが変わった学生は多く、また受けたという取り組みを継続していくことで灸のイメージが変わるきっかけとなり、自宅でも温灸をする機会を増やすことで啓蒙活動へつながる。いずれ疾患や問題が生じた時にはもっと専門的な治療を受けたいと思うきっかけになる可能性があると考えられる。健康調査票による評価は、年代別サマリースコアの標準値と同様であった。しかし個別にみると低値を示す対象者もいた。温灸を継続することで、現在持っている自覚症状が改善されると考えられる対象者が散見された。温灸が簡便な予防策であり、温灸への負のイメージを払拭することで、より身近なセルフケアとして取り入れられる可能性が考えられる。本調査の対象は、少数で学生としたために、いわゆる一般市民の結果と異なる可能性がある。今後は一般市民を対象とした調査も必要であると考えている。

【論文及び学会発表】

全日本鍼灸学会雑誌, 64(別冊), 253, 2014.

研究区分：ユニット研究

発生胚の筋組織におけるパネキシンチャンネルの分布と機能に関する研究

氏名 廣瀬 英司、松浦 忠夫 【所属】 解剖学ユニット

1 パネキシン分子群に関する研究

【背景と目的】

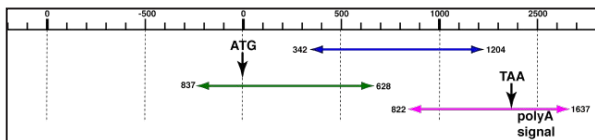
パネキシン分子群はギャップ結合構成分子群コネキシンの相同分子群として見いだされたが、その後の研究で細胞間チャンネル以外にヘミチャンネルとしてATP受容体と共役して隣接する細胞へと情報を伝達すると考えられている。パネキシン1（以降 Pan1 と表記）はその分布が脳内で早くから知られたために、神経細胞間の電気的カップリングを担う神経細胞間ギャップ結合による電気的シナプスの成立に関与すると考えられ積極的に研究されている。一方、Panx2,3 の分布と機能に関しての情報は少ない。Panx2 はゼブラフィッシュにおいては脈管系（心臓や血管）、筋組織系において発現があることを昨年我々は報告した。

本年度、マウスにおいて Panx3 は骨、軟骨組織で発現しているという興味深い報告がカナダのグループからなされた。(Bond SR, et al. J Bone Miner. Res.) それによると Panx3 は膜内骨化（扁平骨）、軟骨内骨化（長骨）の両方において、骨成長点において分化しつつある骨芽細胞（Osteocyte）や石灰化しつつある軟骨組織内の肥大軟骨細胞（Hypertrophic Chondrocyte）で発現が認められる。

我々は本大学（特に保健医療学部）の教育・研究の分野的関連性から急遽、ゼブラフィッシュパネキシン3（ZePanx3）の研究を本年度の研究テーマとして重点的に展開することとした。

【方法】

受精 24 時間後の発生胚から cDNA を作製し、部分配列情報と哺乳類の Panx 群との整合性から ZePanx3 配列を予想し、複数個のプライマーを設計し、cDNA を PCR 増幅後、カラム精製し再度両端にマッチするプライマーからダイレクトシーケンシングで配列情報を得た。（下図）

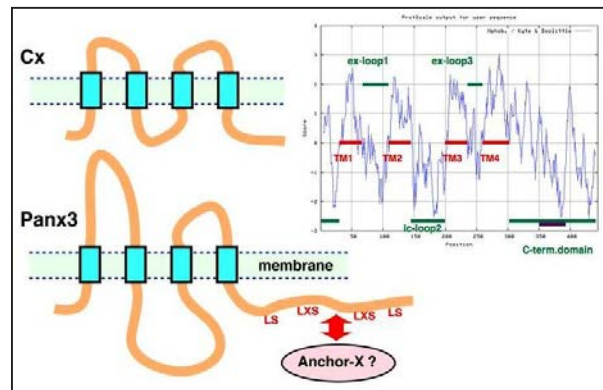


配列情報は NCBI (blast & gene collected information)、ExPASy (Hphob. Kyte & Doolittle)、Myhits (Motif Scan) 等のプログラムを用いてプロファイリングを行った。

【結果と考察】

ZePanx3 は、マウスの Panx3 (MusPanx3) とよく保存されたアミノ酸配列を有しており、1 次配列の相同性は全長の 88% の領域にわたり homology 77%、identity 56% と高いものになった。（下図右

段プロット図）また構造上も Hydrophobicity plots より典型的な 4 回膜貫通型のチャンネル分子の性状を示しており、哺乳動物の相同体と同じく細胞内第 2 ループや細胞外第 3 ループがコネキシン分子群と比べて明らかに長い。（下図）この類似性は、哺乳類 Panx1/2/3 各分子の機能分担が魚類 Panx1/2/3 にも反映されることを強く示唆する。



また特筆すべき特徴に下の 2 点が挙げられる。

ZePx3	1	MSIANTAAQAAILSDALLKESNGDNRIHLELDLPDKVIRKISVGLPPLLVSMAFAREIS	60
		MS+A+TAA+ +LSDALL + G +R++ L L+LPLDK+KFI+VG PLLL++AFA+E S	
MusPx3	1	MSLAHTAAEYMLSDALLPDRRG-SRLKGLRLELPDKMKFPIVGFVGLLMSLAFQEFSS	59
		TM 1	
ZePx3	61	IGPQISCFPPNFTVQQAAYVDYCWDSLHMFHFDTCNIEERSLWVHKMFPYSLLVWAM	120
		G ISCF P+NF+V+QAAYVD+ CWDSL HH D G + +SLW HK PYSLL +A+	
MusPx3	60	SGSPISCFSPNSFVQQAAYVDSSCWDSLHHTQDKAQYKQVYVWPHKALPYSLLAIV	119
		TM 2	
ZePx3	121	MHYLPALIRYLVAVPSLTSDFIIDELOKSYNRSVRLAQNLIDLKHESEALQFOTELE	180
		MYLP L+W+Y+AVPSL+SDL FII ELDKSYNRS+RL Q++L +++ S F ELE	
MusPx3	120	AMHLPVLLWQYVAVPSLSDLLFIIELOKSYNRSIRLVQHMQLIQGSSSDPHVDFWDE	179
		TM 3	
ZePx3	181	RAKRKRYFEYPLLLERYMCKHGSYFLVSMFLRGLFLLTFMSASCLYLYPHLSFLQDE	240
		+A+++RYFE+PLLLERY++CK S++LV+ LR LLL F SA+ LYL PHL F QDE	
MusPx3	180	KARKERYFEYPLLLERYLECKQRSHMLVATYLLRNLALLFTSATYLYLQGFHLDVDFQDE	239
		TM 4	
ZePx3	241	FSCFVRTGLLRDQWVPELVQCKMTGLLVFQVSVANGAVVLLAIVLFLSLLRFLCWD	300
		F+CF++TGLL D+ VPEL+ C++T L VFQ++SV++ A+Y +L P++++L RL WD	
MusPx3	240	FNCFIKTGLLHDHETVPELITCRLTSLVFOIVSVAIAIYTLVPIIYINLTALCRWDK	299
		TM 4	
ZePx3	301	TFLSLYEVLPGGLISGQKLCPLNDLVLLFLRANVAQIQSYRRLRAICSLAPPRLKG	360
		LS+VE+LD L+S + LGC+NDLVN++LFLRAN++L S+S L + L	
MusPx3	300	GLLSIYEMLPALDLSRKLKGLCPINDLVLLFLRANISELIFGSLVSLVSLKDTTQK	359
		homologous C-terminal domain	
ZePx3	361	AKGVLTEEQAEMLETAEELEEMREAREEGKMLNLDVIMVGLGARGNVNCPEQRPLVE	420
ZePx3	420	PDMTLEPQQGYHELKETTCCYA 444	
MusPx3	360	HNIDTVVDFMTFVAGLEPSKPKHLTQHTYDEHA 392	

ZePanx3 (ゼブラフィッシュ)とMusPanx3 (マウス)の配列比較

4つの膜貫通部(TM1-4)に加え、Pannexinファミリー分子に特徴的な長い細胞内外のループ(細胞外ループ1:TM1-TM2間、細胞内ループ:TM2-TM3間、細胞外ループ2:TM3-TM4間)の相同性もその一部で高い。細胞内の局在やアンカー蛋白質との相互作用する可能性の高い細胞内C-端も非常に高い相同性を示すと同時に、LS or LXS(X=hydrophobic amino acid; L I Q)の繰り返しを含むロイシンリッチな特徴的配列を示す。

① C 末端側の特異的構造

コネキシン分子群と比較してパネキシン分子群の細胞質側 C-term. tail は長い ZePanx2 程ではない。他の蛋白質（特にアンカー蛋白質等）に結合が示唆される C 末端側もマウスと魚類でよく保存されている領域が存在する。この周辺に Leu-zipper に似た構造に加え、疎水性残基と親水性（または荷電性）の特有の配列パターンが多く含まれることを見いだした。（※Leu-Ser または Leu-X-Ser 配列、仮にこれを LS or LXS repeat と命名する。上図）このことは C 末端側がドメイン構造として固有の構造を取り、Cx 分子群の様にアンカー機構を有することを示唆すると同時に、（お

研究区分：H25 年度学内研究助成 重点研究（ユニット研究）

タイトル：光る iPS 細胞による腱細胞分化誘導と移植治療

氏名 鳴瀬 善久 【所属】自然科学ユニット

【目的】

スポーツ外傷で最も多いのは、足関節、手指部や膝の捻挫や骨折である。とくにその部位でみられる腱損傷・腱断裂は、治療期間も長く完治が極めて難しく、新しい治療法が望まれている。近年、再生医療研究が注目され、iPS 細胞などに代表される多能性幹細胞から腱細胞を作製することができれば、損傷した腱組織に新たに作製した腱細胞を移植し修復させ、治療に大きく貢献できると考えられる。これまで我々は、再生医療の移植実験で移植細胞がどのような細胞に分化しても特異的に追跡調査できるよう全身に EGFP を発現するマウスから多分化能を持つ EGFP-iPS 細胞株を樹立し、腱細胞へ分化誘導できることを遺伝子レベルで解析してきました。今研究では、腱損傷の治癒過程に関与すると考えられている細胞成長因子の FGF-2 や BMP や薬剤などを用いて、iPS 細胞から効率的に腱細胞へ分化誘導できるか、腱分化マーカーの MKX や TNMD タンパク質の発現レベルを指標に検討を行い、腱細胞移植治療の基盤を確立することを目的とした。

【方法】

・光 iPS 細胞株（EGFP-iPS 細胞）の培養

EGFP-iPS 細胞株は、mitomycin C 処理したフィーダー細胞の SNL76/7 の細胞上に播種し、幹細胞増殖培地に 1000units/ml LIF を加えたものを用いて培養した。コロニーがある程度の大きさになったら、0.25% trypsin/1 mM EDTA 処理により EGFP-iPS 細胞株を剥がし、 4×10^5 cells/ $\phi 3.5$ cm になるようにフィーダー細胞上に再播種した。以後この操作を繰り返し、未分化状態を維持した。

・EB(embryoid body)形成

未分化状態を維持した EGFP-iPS 細胞株を 96well U 底プレート 1well 中に 2×10^3 cells ずつ播き、2 日間培養し EB 形成を行い、増殖因子による分化誘導実験を行った。

・腱分化誘導の検討

腱損傷の治癒過程で損傷部位から FGF-2, TGF- β , BMP などが産生されており、腱再生に重要であることが報告されている。そのため、まず EB 形成の 2 日後、細胞の増殖分化因子である FGF-2, BMP-4 用いて分化誘導を行った。それぞれの因子を 0 ng/ml, 10 ng/ml, 50 ng/ml, 100 ng/ml の濃度で 3 日間培養した。その後ゼラチンコーティングした 8 well ガラスプレートに 1 EB/well ずつ播種し、それぞれ 7 日後、17 日後、22 日後に MKX（腱細胞分化初期マーカー）、TNMD（腱細胞分化成熟マーカー）、GATA4（中胚葉マーカー）に対する抗体を用いて免疫蛍光染色を行い腱細胞の分化を検討した。

【結果】

iPS 細胞から EB 形成後、分化誘導因子である FGF-2 または BMP-4 を投与し、分化誘導を行い免疫蛍光染色法で細胞を観察した。その結果、中胚

葉分化マーカーの GATA4 は、培養 7 日目で多くの細胞の核に免疫陽性を示し、iPS 細胞から中胚葉系の細胞へ分化していることが分かった。腱分化マーカーにおいて、腱細胞の初期マーカーである MKX と腱細胞の成熟分化マーカーの TNMD は、培養 17 日目で免疫陽性細胞が多くなり（図 1A, B）、また、どちらの因子も濃度依存的に免疫陽性細胞が増加し、BMP-4 と FGF-2 で比較すると FGF-2 100ng/ml の濃度で免疫陽性細胞が最も多かった（図 1A）。

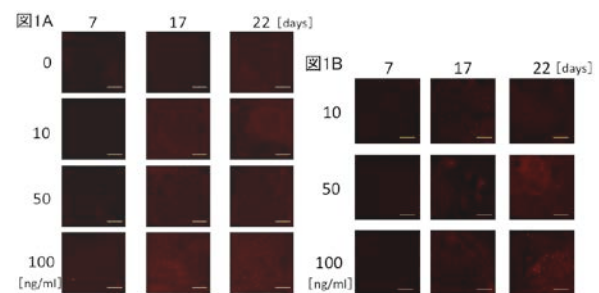


図 1. 腱細胞成熟分化マーカーの TNMD における蛍光染色像。図 1A は FGF-2、図 1B は BMP-4 での腱分化誘導。図の上段数字は培養日数、左側数字は濃度を示した。スケールは $50 \mu\text{m}$ 。

【考察】

以前我々は、アキレス腱組織切断端から腱再生に関わる分子が産生されていると仮定し、iPS 細胞とアキレス腱組織の共培養が腱分化に影響するか検討し、遺伝子発現レベルで腱分化マーカーの *Scx*, *Mkx*, *Col1a2*, *Col3a1* が培養 17 日目で上昇し、iPS 細胞が腱細胞へと分化誘導されている結果を得ていた。今回、腱損傷の治癒過程に関与する因子の FGF-2 や BMP-4 を用い、iPS 細胞からより効率的に腱細胞へ分化誘導できるか検討した。結果、腱組織のマーカーである MKX, TNMD の免疫陽性細胞が経時的に増加することが示された。このことから、これらの因子を用いて iPS 細胞から腱細胞へ分化誘導する事が可能であることが示された。また、FGF-2 の 100ng/ml では、低濃度に比べてより多くの TNMD 免疫陽性細胞を確認できたことから、濃度依存的に分化誘導を行っていることが示唆された。Phil Campbell らは、間葉系幹細胞株の C3H10T1/2 細胞や C2C12 細胞で FGF-2 濃度依存的に腱分化誘導することを報告したことから、我々の研究結果も妥当であると考えられた。

以上のことから、FGF-2 は iPS 細胞から腱細胞分化を積極的に誘導していることが示唆された。今後は、iPS 細胞から分化誘導された腱細胞を腱断裂部へ移植して腱再生を検討する予定である。

【研究発表】

- 1) 松本由加利, 安芸洗平, 谷遼典, 水田絢子, 尾崎修平, 光信明日香, 都築英明, 松浦忠夫, 鳴瀬善久: iPS 細胞における腱細胞分化誘導の検討. 平成 25 年度全学研究ポスターワークショップ, 2013. 10. 18

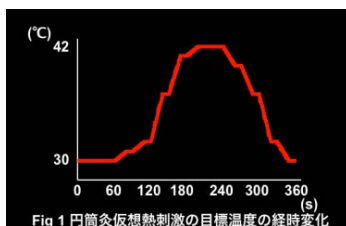
ユニット研究

fMRI を利用した体性感覚刺激の脳機能解析
樋口敏宏, 梅田雅宏, 渡邊康晴, 河合裕子, 村瀬智一
【脳神経外科学/医療情報学ユニット】

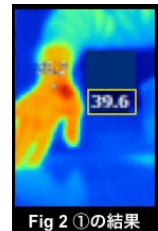
【はじめに】これまで我々は、定常的な体性感覚刺激を行うために、電流量によって温度制御ができるペルチェ素子を用いて、MRI 装置内で使用可能な熱刺激装置を自作し、その性能確認を行ってきた。本年度は、熱刺激時の表面皮膚温が目標温度に到達しているかについて、サーモグラフィーを用いて検証した。(①) また、自作した温熱刺激装置を用いて、鍼灸臨床で用いる温筒灸を仮定した緩やかな温度変化をする熱刺激や遠赤を仮定した一定温度を維持した熱刺激に伴う脳活動を解析した。(②) さらに、鍼刺激に伴う脳活動は、信号の立ち上がりが遅れ、信号の立ち下がりも遅れるという経時変化を誘起することから、温熱刺激や熱痛刺激でも同様の変化が観察されるのかの検証を行った。(③)

【使用装置】熱刺激装置：自作温熱刺激装置。MRI 装置：3.0 T MRI (Trio A Tim System：シーメンス社) と 32ch head coil。皮膚温測定：サーモグラフィー (Ti125：フルーク社)

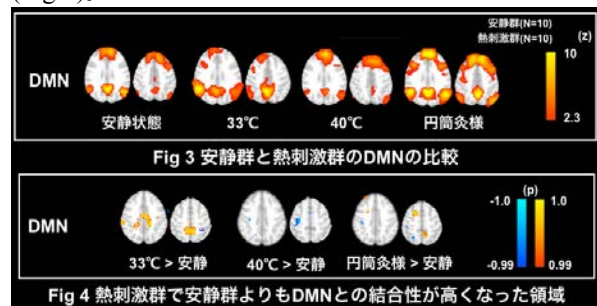
【実験方法】全ての実験は、実験内容の説明を受けた上で、同意の得られた被験者を対象に行った。①皮膚表面温度の測定は、室温 24 度の非静磁場下で行い、被験者 1 名の右合谷部に自作熱刺激装置を当てた状態で、目標温度(40°C)まで加温した後、熱刺激装置を外し、刺激部位の温度をサーモグラフィーによって撮影した。温度データの解析には付属ソフトウェアを使用した。②緩やかな熱刺激の fMRI は、被験者 20 名を安静群(10 名)と熱刺激群(10 名)の 2 群に分けて行った。安静群は何も刺激しない状態、熱刺激群は右手母子球に温度刺激装置を当てた状態で、33°C 一定、40°C 一定、円筒灸仮想刺激 (円筒灸様) (Fig 1) の 3 種類の熱刺激を行い、それぞれ 6 分間の fMRI を測定した。刺激に伴う脳活動が予測出来ないため、FSL アドインの MELODIC を用いて、独立成分分析を行い、脳内ネットワークである default mode network (DMN) の変化について解析した。さらに熱刺激による DMN の変化を検証するために、独立成分分析の結果を比較出来る、FSL program の dual regression 解析を用いて、安静群の DMN を基準として検証した。③温熱・熱痛刺激の fMRI は被験者 12 名を対象に行った。刺激部位は②と同様。刺激条件は刺激期間 10 秒と安静期間 120 秒を 3 回繰り返す、計 6 分 30 秒間の fMRI を測定した。温熱刺激は刺激到達目標温度を 40°C に設定し、熱痛刺激は 45~47°C に設定した。解析には AFNI software program を用いた。



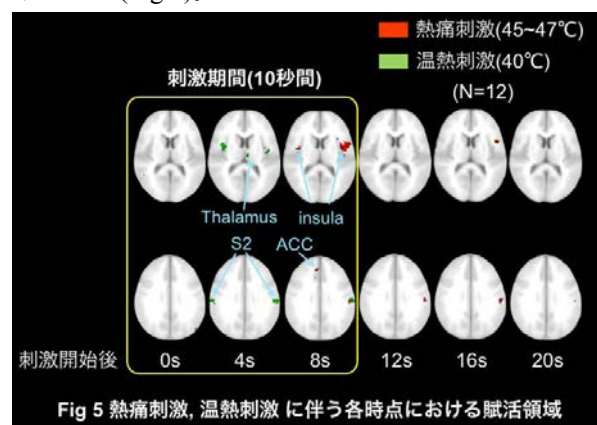
【結果と考察】自作熱刺激装置を用いて熱刺激後の皮膚温度をサーモグラフィーで解析した結果、刺激装置の目標温度 40°C に対して、右合谷部周辺の最高温度は 39.6°C であり、熱刺激時の皮膚表面温度がほぼ目標温度に到達していると確認された (Fig 2)。



②各条件の測定データを独立成分分析した結果、それぞれ DMN の成分が確認された (Fig 3)。また、安静群に比べ、熱刺激群の「33°C 一定」と「円筒灸様」では、頭頂葉の一部で DMN の有意な結合性の増加が観察された (Fig 4)。



DMN は精神神経疾患や慢性疼痛の患者で結合性の減少が報告されており、現在、研究が盛んに行われている。今後、DMN と疾患の関連性が明らかになれば、疾患に対する鍼灸治療の有効性を客観的に評価する指標として応用が期待できる。③温熱刺激は、刺激開始 4 秒後から刺激期間中において、視床 (Thalamus)、二次体性感覚野 (S2)、島領域 (Insula) で賦活が確認された。一方、熱痛刺激は、刺激開始 8 秒後から、前帯状回 (ACC: anterior cingulate cortex)、S2 と島領域で賦活が観察され、S2 と島領域の賦活は刺激終了後の 16 秒後まで観察された (Fig 5)。



今回の結果から、同じ C 繊維によって伝達される熱刺激であっても 43°C を超えて侵害刺激となった場合の脳活動は、鍼刺激同様立ち上がりが遅れ、刺激終了後も持続すると考えられた。

【論文及び学会発表】

①著書

特記事項なし

②学術論文

- 1) *川島康裕, 山城博幸, 山本洋紀, 村瀬智一, 市村好克, 梅田雅宏, 樋口敏宏. 高照度照明が脳視覚過程に及ぼす影響: 脳機能イメージング研究. 照明学会誌, 98 巻 2 号: 87-92, 平成 25 年 2 月. 査読有り.
- 2) 村瀬智一, 樋口敏宏. 独立性成分分析法を用いた鍼刺激後も持続する脳機能 MRI の解析. 明治国際医療大学誌, 8 号: 13-22, 2013. 査読有り.
- 3) Murase T, Umeda M, Fukunaga M, Tanaka C, Higuchi T. Deconvolution analyses with tent functions reveal delayed and long-sustained increases of BOLD signals with acupuncture stimulation. Magn Reson Med Sci., 12(2):121-7, 2013. 査読有り.
- 4) 田中忠蔵, 村瀬智一, 博田節夫: fMRI の最近の動向について -AKA-博田法の脳内処理過程の解析に向けて. 日本関節運動学的アプローチ医学会誌. (14), 査読有り.
- 5) *Tenjin H, Tanigawa S, Takadou M, Ogawa T, Mandai A, Nanto M, Osaka Y, Nakahara Y, Umeda M, Higuchi T. Relationship between preoperative magnetic resonance imaging and surgical findings: aneurysm wall thickness on high-resolution T1-weighted imaging and contact with surrounding tissue on steady-state free precession imaging. Neurol Med Chir (Tokyo), 53(5):336-42, 2013. 査読有り.
- 6) *Kido M, Ikoma K, Hara Y, Matsuda KI, Kawata M, Umeda M, Kubo T. Selective visualization of rabbit knee cartilage using MR imaging with a double-contrast agent. J Magn Reson Imaging., in press. 査読有り.
- 7) *Yamashiro H, Yamamoto H, Mano H, Umeda M, Higuchi T, Saiki J. Activity in early visual areas predicts interindividual differences in binocular rivalry dynamics. J Neurophysiol., in press. 査読有り.
- 8) Yuko, Watanabe Yasuharu, Naruse Shoji, Tanaka Chuzo, Highchi Toshihiro: Deconvolution Analyses with Tent Functions Reveal Delayed and Long-Sustained Increases of BOLD Signals with Acupuncture Stimulation. International Society for Magnetic Resonance in Medicine 21st Annual Meeting & Exhibition, Salt Lake City, 20-26 April.
- 9) Bito Yoshitaka, Kawai Yuko, Hirata Koji, Ebisu Toshihiko, Otake Yosuke, Hirata Satoshi, Shirai Toru, Soutome Yoshihisa, Ochi Hisaaki, Umeda Masahiro, Higuchi Toshihiro, Tanak, Chuzo: Diffusion Tensor Spectroscopic Imaging of Multiple Metabolites in Rat Brains. International Society for Magnetic Resonance in Medicine 21st Annual Meeting & Exhibition, Salt Lake City, 20-26 April.
- 10) Watanabe Yasuharu, Kimura Keisaku, Umeda Masahiro, Kawai Yuko, Murase Tomokazu, Higuchi Toshihiro, Tanaka Chuzo, Naruse Shoji: Visualization of Hysteresis in Passive Time-Dependent Responses of Skeletal Muscle in vivo by Using DTI. International Society for Magnetic Resonance in Medicine 21st Annual Meeting & Exhibition, Salt Lake City, 20-26 April.
- 11) 川島康裕, 山城博幸, 山本洋紀, 村瀬智一, 市村好克, 梅田雅宏, 樋口敏宏: 照明強度のヒト脳視覚野活動への影響: fMRI 研究. 第 46 回照明学会全国大会, 名古屋, P-3-232, 2013 年 5 月.
- 12) 木村啓作, 渡邊康晴, 有馬義貴, 片山憲史, 矢野忠: 体表から得られる硬さの変化要因(9). 第 62 回全日本鍼灸学会学術大会, 福岡, 2013 年 6 月.
- 13) 渡邊康晴, 木村啓作, 梅田雅宏: 触診によって生じる組織変形領域の可視化. 第 62 回全日本鍼灸学会学術大会, 福岡, 2013 年 6 月.
- 14) 木村啓作, 渡邊康晴, 梅田雅宏, 樋口敏宏: 加圧運動負荷による水分子の動態評価 - 加圧運動後と加圧解放安静時の評価-. 第 68 回日本体力医学会大会, 東京, 2013 年 9 月.
- 15) 梅田雅宏, 渡邊康晴, 河合裕子, 村瀬智一, 田中忠蔵, 樋口敏宏: 磁性イオン液体を用いた局所シム調整の試み. 第 41 回日本磁気共鳴医学会大会, 徳島, O-1-121, 2013 年 9 月.
- 16) 村瀬智一, 梅田雅宏, 福永雅喜, 河合裕子, 渡邊康晴, 田中忠蔵, 樋口敏宏: Deconvolution 解析を用いた鍼刺激に伴う賦活領域毎の経時変化の検討. 第 41 回日本磁気共鳴医学会大会, 徳島, O-2-218, 2013 年 9 月.
- 17) 村瀬智一, 梅田雅宏, 山城博幸, 山本洋紀, 河合裕子, 田中忠蔵, 樋口敏宏: MEGA-PRESS 法による異なる視覚野間の GABA 計測の検討. 第 41 回日本磁気

③その他の印刷物

特記事項なし

④学会発表

- 1) Tanaka Chuzo, Hakata Setsuo, Murase Tomokazu, Umeda Masahiro, Watanabe Yasuharu, Kawai Yuko, Someya Yoshiaki, Naruse Shoji, Higuchi Toshihiro: Brain Activation Study by Passive Intra-Articular Movement of Radiolunate and Sacroiliac Joints Using fMRI. International Society for Magnetic Resonance in Medicine 21st Annual Meeting & Exhibition, Salt Lake City, 20-26 April.
- 2) Murase Tomokazu, Umeda Masahiro, Kawai

共鳴医学会大会, 徳島, O-2-237, 2013年9月.

- 12) 梅田雅宏, 渡邊康晴, 河合裕子, 村瀬智一, 田中忠蔵, 樋口敏宏: 1H-MRSI を用いた骨格筋中アセチル-L-カルニチン濃度の運動による変化. 第41回日本磁気共鳴医学会大会, 徳島, O-2-238, 2013年9月.
- 13) 尾藤良孝, 河合裕子, 平田宏司, 恵飛須俊彦, 大竹陽介, 平田智嗣, 白猪亨, 五月女悦久, 越智久晃, 梅田雅宏, 樋口敏宏, 田中忠蔵: Diffusion-weighted Spectroscopic Imaging を用いた脳虚血モデルラットにおける複数代謝物 ADC の解析. 第41回日本磁気共鳴医学会大会, 徳島, P-3-254, 2013年9月.
- 14) 木村啓作, 渡邊康晴, 梅田雅宏, 樋口敏宏: 加圧運動負荷による水分子の動態評価 -加圧運動後と加圧解放安静時の評価-. 第68回日本体力医学会大会, 東京, 2013年9月.
- 15) K kimura, Y watanabe, M umeda, T yano, K katayama: The intramuscular water mobility relates muscle deformation during the increase of internal pressure. 5th Guntm International Symposium 2013, Kyoto, 2013年11月.
- 16) Y. Watanabe, K. Kimura, M. Umeda, Y. Kawai, T. Higuchi: The visualization of muscle contracting region using electrical stimulation -comparison between LFEA and percutaneous electrical stimulation -. 5th Guntm International Symposium 2013, Kyoto, 2013年11月.
- 17) Tomokazu Murase, Masahiro Umeda, Yuko Kawai, Yasuharu Watanabe, Toshihiro Higuchi, Chuzo Tanaka: Deconvolution Analyses with Tent Functions Reveal Delayed and Long-Sustained Increases of BOLD Signals with Acupuncture Stimulation. 5th Guntm International Symposium 2013, Kyoto, 2013年11月.

⑤その他の発表

- 1) 梅田雅宏: NMR の基礎④RF パルスとフーリエ変換. 第35回MR基礎講座(関西), 国立京都国際会館. 2013年8月.

⑥研究費補助金

- 1) 樋口敏宏: 科学研究費補助金, 基盤研究(C), 生体における新たな neurogenesis imaging の確立と臨床応用. 1,700千円(510千円).
- 2) 田中忠蔵: 科学研究費補助金, 基盤研究(C), Default mode network 解析による脳内疼痛処理機構の解明. 1,500千円(450千円).
- 3) 梅田雅宏: 科学研究費補助金, 基盤研究(C), MR viscography による新しい心筋評価法の開発. 1,400千円(420千円).
- 4) 渡邊康晴: 科学研究費補助金, 基盤研究(C), 磁気共鳴拡散強調画像を利用した

viscography 画像法の開発と応用. 1,200千円(360千円).

- 5) 樋口敏宏, 田中忠蔵, 梅田雅宏, 渡邊康晴, 河合裕子, 村瀬智一: 受託研究, No.146, 3T-MRI を用いた、高質感画像呈示時の脳機能測定法の研究. 2,100千円(0千円).
- 6) 樋口敏宏, 梅田雅宏, 河合裕子, 田中忠蔵, 渡邊康晴, 恵飛須俊彦: 受託研究, No.148, 疾患モデル動物を用いた超高磁場MRI向けアプリケーションの研究. 2,000千円(0千円).

⑦学外との共同研究

- 1) 樋口敏宏(脳神経外科学), 梅田雅宏(医療情報学), 渡邊康晴(医療情報学), 河合裕子(医療情報学), 村瀬智一(博士研究員), 齋木潤(京都大学), 山本洋紀(京都大学), 山城博幸(京都大学): ヒト大脳における視覚情報処理に関する fMRI 研究.
- 2) 樋口敏宏(脳神経外科学), 梅田雅宏(医療情報学), 渡邊康晴(医療情報学), 河合裕子(医療情報学), 恵飛須俊彦(南丹病院), 田中忠蔵(脳神経外科学), 尾藤良孝(日立製作所中央研究所): 疾患モデル動物を用いた超高磁場MRI向けアプリケーションの研究.
- 3) 梅田雅宏(医療情報学), 福永雅喜(大阪大学), 河合裕子(医療情報学), 樋口敏宏(脳神経外科学): 磁気共鳴法による中枢神経系免疫現象の画像化.

⑧受賞

特記事項なし

非小細胞肺癌の生長にともなう DNA ploidy の変化に関する研究

苗村建慈、前倉知典（医学教育研究センター・内科学）、廣瀬真理、後藤渉子、澤谷友香理（医学教育研究センター・病理学）。

【緒言】

Vogelstein B らは、大腸癌の発生において、多段階発生説を提唱したが、どのような癌でも、癌の発生や進展には、遺伝子の変異、癌遺伝子の活性化、癌抑制遺伝子の欠損、転位や欠損などの染色体変化などの多段階の遺伝子や染色体の変化を経て起こるものと考えられている。Vogelstein B らの、大腸癌における多段階発生説では、染色体の変化として、DNA ploidy の異倍体化が癌発生における一つのステップとして挙げられている。肺癌の発生・進展においては、癌の進行とともに、DNA ploidy の異倍体化がみとめられるが、肺癌の発生や進展のどのような段階で、DNA ploidy の異倍体化が起こるのか、また、他の遺伝子の変化と関連して起こるものか、詳細は明らかにされていない。

【目的】

本研究では、肺癌の生長において、DNA ploidy の異倍体化がどのようにして起こり、肺癌の進展にどのように関与しているのか、非小細胞肺癌である肺腺癌と肺扁平上皮癌を対象に、DNA ploidy の異倍体化に、癌抑制遺伝子 p53 の欠損、テロメア長が関連しているかを検討する。

具体的には、癌細胞の P53 遺伝子は免疫抗体法を用いて標識、テロメアについては in situ hybridization 法で標識し、フローサイトメーターを用いて、癌細胞の DNA ploidy とともに、これらの標識した p53 遺伝子産物、テロメアを同時に測定する。これにより、DNA ploidy と DNA ploidy によって示される癌細胞のクローンの変化と、テロメア長、癌抑制遺伝子である P53 遺伝子の変異、との関連が判定できる。

使用する研究手段は、すべて、確立され汎用されている方法と機器で行うことができる。フローサイトメーターについては、東洋医学研究所の研究機器（免疫学教室）を使用する。

【検体と方法】

（検体）

本大学附属病院内で診断され、本病院または他院で手術摘除され、同意の得られている症例を主体とした、ホルマリン固定・パラフィン包埋ブロック標本（肺腺癌、肺扁平上皮癌の各 25 例）を用いて行う。

（方法）

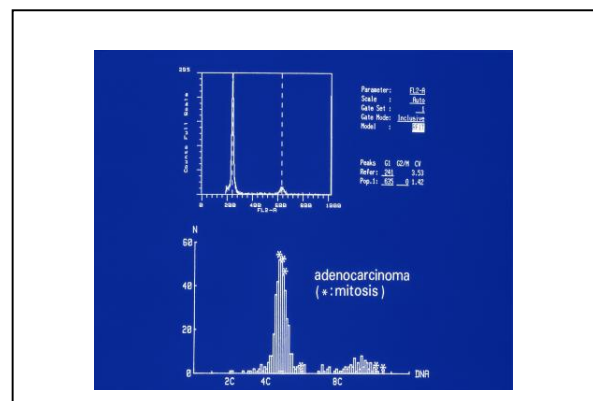
- ①肺癌のホルマリン固定・パラフィン包埋ブロック標本から、脱パラフィンを行い、実体顕微鏡下に腫瘍組織を分け取る。腫瘍組織から、蛋白分解酵素による化学的分解とホモジナイザーによる物理的分解により、単離癌細胞を作成する。
- ②上皮細胞を認識するサイトケラチンに対する抗体を癌細胞に反応させて標識し、癌細胞のみを選別してサンプルとする。
- ③単離した癌細胞を、上皮細胞の指標であるサイ

トケラチンに対する抗体により、マイクロ・ビーズを用いて選別し、上皮細胞である癌細胞について、PI による核染色、FITC 標識の p53 抗体による免疫染色、テロメアに対する Cy5 標識 PNA プローブによる in situ hybridization、の三重蛍光染色を行い、フローサイトメーターを用いて、DNA ploidy の変化と癌抑制遺伝子 p53 の変異やテロメア長の関係について、解析する。

【研究経過】

- 1) 癌組織を分離し、細胞単離を行い、PI(Propidium Iodide)による核染色を施し、核 DNA 量を測定する段階まで、施行可能である。

図 1. (肺腺癌の DNA ploidy: Flow cytometry (上) と顕微蛍光測光法 (下) との比較)



Flow cytometry (上のヒストグラム) では、非系上皮細胞を除外しないと、正確な癌細胞（上皮細胞）の DNA ploidy が測定できないことがある。

- 2) 癌細胞のみを測定するためには、癌細胞を蛍光標識して他の標識された蛍光と同時に測定するが、癌細胞を選別収集することが必要である。測定すべき蛍光の種類をできる限り少なくするため、マイクロ・ビーズ標識の抗ケラチン抗体で癌細胞を標識する方法を採用し、検討を行っている。
- 3) ホルマリン固定の検体では、癌抑制遺伝子 p53 産物の免疫染色は、PI による核染色と両立する染色条件を確立するため、さらに予備実験が必要である。
- 4) テロメアを蛍光標識するための in situ hybridization については、安定した結果を得るために、反応条件などについて、さらに、数回の予備実験の実施が必要と考えられる。
- 5) 参考までに、単離した癌細胞に核染色を行い顕微蛍光測光法により DNA 量を測定した結果については、以下に簡略して記述する。

- ①肺腺癌 14 例について、DNA ploidy を検索した結果、Diploid stem line の癌細胞集団のみで構成される肺腺癌 (Diploid tumor) は、腫瘍径

が1 cm以下、1 cm～2 cm以下、2 cm～3 cm以下と大きくなると、4例中2例(50%)、6例中2例(33%)、4例中0例(0%)と減少した。

- ②また、Aneuploid stem line の癌細胞集団が併存する症例は、腫瘍径が1 cm以下、1 cm～2 cm以下、2 cm～3 cm以下と大きくなるにともない、4例中1例(25%)、6例中4例(67%)、4例中4例(100%)と増加した。

【論文及び学会発表】

現時点では、なし。

研究区分：重点研究（ユニット研究）

鍼通電刺激の腱修復能に与える影響—経時的な力学的強度および組織像の観察—

井上基浩¹⁾ 中島美和¹⁾ 糸井恵²⁾ 北小路博司¹⁾

【所属】1) 臨床鍼灸学講座 2) 整形外科学講座

【背景】

これまで、我々は組織の再生と鍼通電刺激との関連について着目し、その1つとして、腱修復に対する影響についても明らかにするべく、アキレス腱断裂モデルラットを作成し、腱断裂後の治癒過程に及ぼす鍼通電刺激の検討を進めてきた。そして、腱断裂後早期（断裂後3日）においては、直流鍼通電刺激が無処置と比べて、組織学的に有益な変化をもたらす可能性を報告した（2012年度学内研究助成）。

【目的】

本研究では、鍼通電刺激が組織学的に見て如何なる段階において作用するか、より詳細な検討を進めるとともに、修復腱の力学的強度に与える影響について断裂後早期、および長期経過後における検討を行った。

【方法】

Wistar系ラット（雄性、12週齢）69匹を用いた。アキレス腱断裂モデルを作成し、無作為に鍼通電刺激群（EA群、n=34）、無処置群（Control群、n=35）に分けた。EA群は軽度麻酔拘束下にアキレス腱断裂部の内外側に先端が腱断裂部に接触するようにそれぞれ鍼を経皮的に刺入し、間欠的直流鍼通電刺激（刺激幅5ms、50Hz、20 μ A、20分間）をモデル作成日の翌日から評価日まで連日行った。Control群は拘束処置とそれに伴う麻酔のみ行った。モデル作成後7日、10日に腱断裂部を採取、組織標本作成後、HE染色、および免疫組織化学染色（Transforming growth factor- β 1 : TGF- β 1、basic-Fibroblast growth factor : b-FGF）を行い、光学顕微鏡による観察を行い、関心領域内の全細胞数（HE染色）、および陽性細胞数（免疫組織化学染色）をカウントし、定量的に評価した。また、モデル作成後10日、90日には修復腱を採取し、修復部の前後径、左右

径を計測した後、引張試験により最大破断強度を測定した（最大負荷容量100N、試験速度0.05mm/sec）。統計解析として、Bonferroni/Dunn法を用いて各評価項目、各評価日における群間比較を行った（有意水準5%）。

【結果】

組織学的評価の結果を図1に示す。モデル作成後7日においては、全細胞数、TGF- β 1、b-FGF陽性細胞数何れに関しても群間に有意差を示し、EA群で細胞数、陽性細胞数の増大を認めた。モデル作成後10日においては、全細胞数とb-FGF陽性細胞数については有意差を示し、EA群で細胞数、陽性細胞数の増大を認めたが、TGF- β 1陽性細胞数に関しては、有意差を認めなかった（図中にp値記載）。※2012年度に報告した結果を併せて図示する（モデル作成後3日）。力学的評価の結果を図2に示す。モデル作成後10日においては、群間に有意差を認め、EA群で高い値を示した。モデル作成後90日に関しては、EA群で高い値を示す傾向は見られたものの、群間に有意差を認めなかった。また、引張試験を行うにあたり計測した修復腱の断面積については何れも有意差を認めなかった（図中にp値記載）。

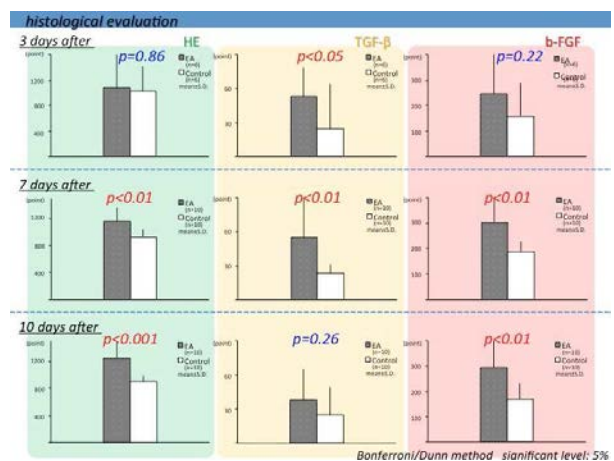


図1 組織学的評価の結果

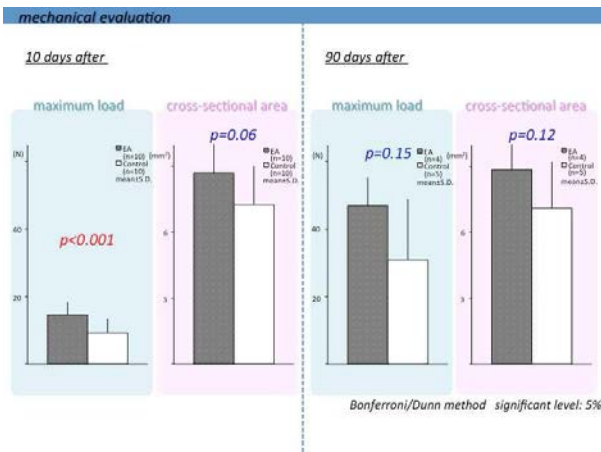


図2 力学的評価の結果

【考察】

腱修復に対する鍼通電刺激の影響として、組織学的には、腱修復に促進的に作用する成長因子（TGF- β 1、b-FGF）に関して、それぞれが強く発現される時期において、その発現を増大する可能性が示唆された。また、炎症期に TGF- β 1 の発現量が増大した後、増殖期にかかる時期において修復部の全細胞数が増大したことから、これらは線維芽細胞を主とした変化である可能性が高く、鍼通電刺激が成長因子の発現を促した後に起こる変化であることが推測された。修復腱の力学的強度に関しては、モデル作成後 10 日において EA 群で有意な増大を示したことから、少なくとも断裂後早い段階で力学的強度を再獲得できる可能性が示唆された。長期経過後の強度については現在、検討を継続している段階であり、その結果によっては鍼通電刺激が腱の再断裂の予防に寄与するか否か言及できるものとする。

【関連論文のみ記載】

Inoue M, Nakajima M, Oi Y, Itoi M, Kitakoji H: The effects of electroacupuncture on Achilles tendon rupture repair in rats. *Acupunct med*, (submit), 2014.

中島美和, 井上基浩, 北條達也, 糸井恵: ラットを用いたアキレス腱断裂後の治癒過程に及ぼす鍼通電刺激の影響. *日本生体電気・物理刺激研究会誌*, 26: 27-32, 2012.

研究区分：重点研究（ユニット研究）

網膜色素上皮細胞とマクロファージによる悪循環の解析による

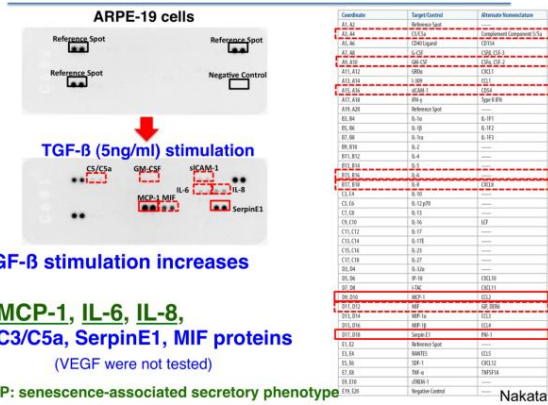
cell senescence、EMT (epithelial-mesenchymal transition)、線維化機序の解明

山田 潤、堀内稔子【所属】眼科ユニット

加齢黄斑変性 (AMD: age-related macular degeneration) 発症と増悪に関連する眼内微小環境について検討し、予防治療への礎を築き、さらなるメカニズム解明への手がかりをつかんだ。

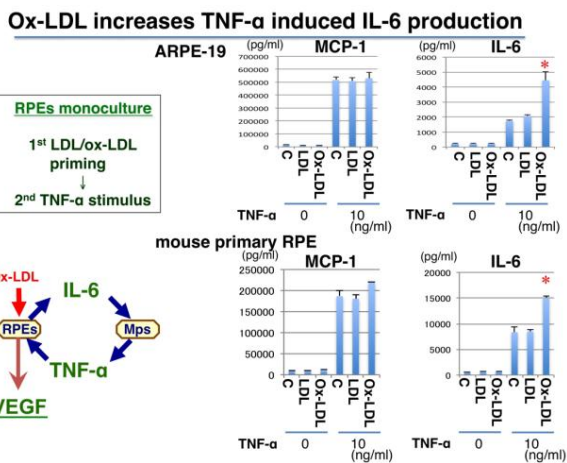
1. 網膜色素上皮細胞 (RPE) から産生される蛋白を抗体アレイを用いて解析したところ、TGF-β 刺激による RPE からの MCP-1, IL-6, IL-8, C3/C5a, SerpinE1, and MIF proteins の発現が上昇した。

Comprehensive analysis of secreted proteins



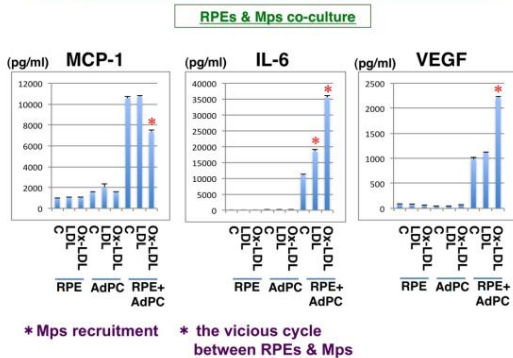
チオールレドックス偏倚は局所では困難である事と持続的に偏倚を行う事が困難である。そこで、還元型グルタチオン優位である還元型マクロファージを特異的にアポトーシスさせる薬剤について検討した。LPS 刺激による TNF- α 産生を完全に阻害出来た。今後、このような薬剤を AMD に応用出来るかどうかについて検討を行う。

6. 生活習慣病に関連している酸化 LDL は VEGF や IL-6 産生を促進させる。また、RPE から産生された IL-6 とマクロファージから産生された TNF- α とで増悪サイクルを形成している事もわかった。



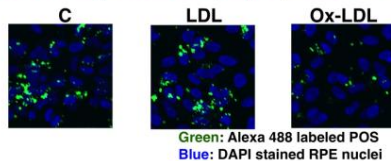
7. マクロファージと RPE との共培養系を作成し、酸化 LDL 刺激を行うと、IL-6, VEGF 産生が促進する事でも検証できた。また、酸化 LDL によって RPE が視細胞外節の食食を抑制する事も明らかとなった。

Ox-LDL decreases MCP-1, but increases IL-6 and VEGF productions in RPE & Mps co-culture



Vicious cycle and functional degeneration

Ox-LDL suppressed the phagocytosis of POS

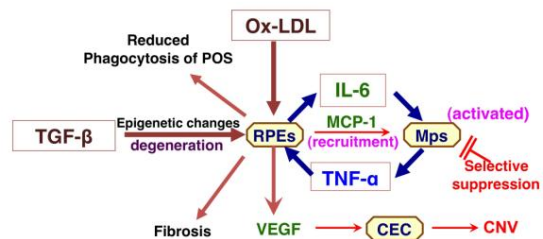


The distinction of receptors for LDL vs ox-LDL
The distinction of functional signaling for LDL vs ox-LDL

まとめ
病的となった RPE から MCP-1 が産生され、マクロファージが浸潤する。RPE からの IL-6 産生とマクロファージからの TNF- α 産生によって炎症増強が生じる。この増強は眼内の TGF- β 、そして、過酸化脂質によっても増強され、VEGF 産生増強につながり、AMD 病態の増悪につながる。チオールレドックス偏倚によるマクロファージ機能変換や RPE 機能変換で病態抑制は可能であるが、現実的には活性化マクロファージ選択的阻害剤などの臨床応用に期待が持てる。

Summary

The vicious cycle between RPEs and Mps



【論文及び学会発表】

1) Jun Yamada, Kenichi Kimura, Atsushi Mukai, Junji Hamuro, Shigeru Kinoshita: The role of IL-6 and TNF- α in generating the vicious inflammatory cycle between macrophages and retinal pigment epithelium in age-related macular degeneration. 86th Annual meeting of the ARVO (Association for Research in Vision and Ophthalmology). Orlando. FL. U.S.A. 2014.5

2) A.Mukai, K.Asada, M.toda, J.Yamada, H.Hatanaka, T. Yamagishi, K. Nagata, M.Ueno, J.Hamuro, S.Kinoshita: The role of cell to cell interaction through extracellular microvesicles, miRNA and exosome in deregulated functions of RPE and macrophages. 86th Annual meeting of the ARVO (Association for Research in Vision and Ophthalmology). Orlando. FL. U.S.A. 2014.5

3) K. Yoneda, A.Mukai, K. Shinomiya, J.Yamada, H.Hatanaka, T. Yamagishi, K. Nagata, K.Asada, M.Ueno, J.Hamuro, S.Kinoshita: The role of C1qTNF-related proteins (CTRPs) CTRP6 and CD46, CD55, CD59 in the pathogenesis of age-related macular degeneration (AMD). 86th Annual meeting of the ARVO (Association for Research in Vision and Ophthalmology). Orlando. FL. U.S.A. 2014.5

研究区分：ユニット研究
在宅高齢者に対する鍼灸治療の応用に関する研究
－ 歩行機能と包括的健康状態の維持・向上における鍼灸治療の有用性 －
氏名：江川 雅人【保健・老年鍼灸学講座】（研究代表者）

【研究の背景】

我が国の高齢化率は21%を越え、高齢人口の増加とともに高齢者独居世帯、高齢者夫婦のみ世帯は増加し、在宅高齢者数は増加している。また、近年の医療政策では、在宅におけるケアが推奨され、家族の介護を受けながら、医師、看護婦、ヘルパー等の医療従事者が巡回してケアする方法が多く選択されて、これも在宅高齢者の増加につながっている。在宅高齢者が外出し、地域と交流して生活できる良好な日常生活動作を維持するためには、歩行機能の維持や精神機能の安定によるQOLの維持・向上が不可欠である。こうした中、高齢者の歩行機能やQOLを維持・向上させる各種体操や物理療法などの介入の有効性も報告されている。

一方、鍼灸治療は歩行困難の原因となる腰下肢痛を軽減したり、神経-筋機能や血流を改善させるなど、歩行機能の維持・向上に寄与できることが報告されている。したがって、在宅の高齢者を対象に鍼灸治療を実践するシステムを構築し、かつ実際に治療を行って、歩行機能の維持・向上ができれば、在宅高齢者の健やかな長寿の実現に多大な貢献ができると考えられる。

【目的】

在宅高齢者の歩行機能と健康状態の維持に対する鍼灸治療の効果を検討する。

【対象】

南丹市内に在住の65歳以上の在宅高齢者12名とし、以下の条件を満たす者とする。1. 本人と同居家族より研究内容について承諾が得られた者 2. 鍼灸治療の遂行に支障となる重篤な疾患を持たない者 3. 自立歩行が可能な者、または杖歩行あるいは歩行器を用いての歩行が可能な者

【鍼灸治療方法】

鍼灸治療は在宅高齢者を訪問して施術する出張治療の形態をとる。

1. 歩行機能の維持・向上を目的とした鍼灸治療
 配穴：血海、梁丘、足三里、陰陵泉、三陰交、腎兪、大腸兪、殷門、委中、陰谷、飛陽、崑崙、承山

刺激：ステンレス製ディズポーザブル鍼灸針（16-18号）を用いて0.5～1.0cm程度刺入、10分間の置鍼術とする。

2. 全身症状の改善を目的とした鍼灸治療
 対象者の訴える全身症状（肩こり等の感覚症状、便秘等の消化器症状、不眠等の精神心理症状など）に対しては、対症療法的な鍼灸施術を行う。

【評価項目と方法】

1. 歩行機能

- 1) 携帯型歩行測定器「見守りゲイト（三菱ケミカル社製）」により、『歩行の力強さ』『歩行速度』『歩幅』『歩行の周期』を評価する。

- 2) TUGT (Timed Up and Go test)

- 3) バランス機能：FRT (Functional Reach Test)

2. 包括的健康状態

- 1) 「食欲」「睡眠」「便通」「起居動作」「気分」「健康感」について健康調査票を用いて評価する。

- 2) 日常生活動作：ADLを「Barthel index」、IADLを「Lawtonの評価法」を用いて評価する。

- 3) QOL：モラールテストを用いて評価する。

3. 全身症状については主となる1つの症状についてVisual Analogue Scale (VAS)により評価する。

4. 介護家族を対象に、多次元介護負担感尺度(BIC-11)により介護負担感を評価する。

【結果】

1. 研究機関としての出張治療の届け出

研究開始に当たって、南丹保健所に出張治療の可否について問い合わせたところ、「前例が無い」、「京都府との協議が必要である」具体的には、京都府知事および京都府南丹保健所長宛の「出張業務開始届」の提出が必要とのことであった。また、施術者氏名欄には、本学学長名を記述し、実際に出張業務を行う鍼灸師の施術者免許証の添付が必要であった。提出は、出張による鍼灸治療開始後10日以内であった。

2. 対象者の選出

高齢者福祉施設「はぎの里」ケアマネージャー職員との協議により、同施設利用者から対象者の選出を行った。その選出条件として、1) 患者と患者家族の背景をとらえている、2) 患者の鍼灸治療に対する印象をとらえている、3) 評価等のために同施設の協力を得られる、などがあげられた。

3. 症例

〔患者〕80歳、女性。日吉町内在住。

〔主訴〕左側腰痛

〔診断名〕側弯症、変形性腰椎症、脊柱管狭窄症

〔現病歴〕10年前より上記症状が出現し、当時近医整形外科を受診し、「腰の骨が原因」と言われた。当時の疼痛は自制内であったが、8年前より脊椎側弯の増強とともに疼痛も強くなった。整形外科よりコルセットと頓用の鎮痛剤（ロキソニン）が処方されているが、胃痛を招くため、服用していない。

〔既往歴〕慢性リウマチ（ステロイド剤服用中）、慢性心不全（発症時期不明）、逆流性食道炎（同）また、腰痛に対して本学附属鍼灸センターで鍼灸治療の経験あり、著効であったとのこと。

〔家族歴〕夫と二人暮らし。夫からの介護を受けて生活しているが、夫自身も膝関節痛があり、介護に不便を感じている。

〔社会歴〕ほとんど一日を屋内で過ごしている。
月曜日：午前訪問介護、水曜日：午前午後デイサービス、金曜日：午後訪問介護、を受けている。

〔個人歴〕喫煙、飲酒、運動等の習慣無し。

〔患者情報〕身体障害者2級（肢体不自由）

自立歩行：杖付き、歩行器で可、排泄：自力（失禁あり）、入浴：訪問介助、褥瘡（-）

緊急時の対応：本学附属病院内科医、整形外科医
〔身体所見〕

1) 腰部所見

胸椎下位から腰椎にかけて右側弯を認める。

疼痛領域：腰椎位の傍脊柱から側腹部にかけて左側に広範。同領域に他覚的な冷えと圧痛（+）、動作開始時と動作時痛（+）、安静時痛（-）

ADL：腰痛と慢性リウマチによる四肢疼痛、心臓病により屋外への行動制限がある。屋内でも器具を要する。

動作開始時の疼痛VAS値：80（想像する最も辛い疼痛を100とする）

2) 歩行、バランス機能

TUGT：36秒、歩幅：27cm、歩行速度：15m/min、歩行周期：2.1秒、歩行の力強さ：0.11G

3) 全身所見

食欲：良好、睡眠：良好、便通：良好
認知機能低下を認めず。コミュニケーション能力良好。

4) 日常生活動作

ADL (Barthel index)：70/0-95

IADL (Lawton)：22/8-31

老研式活動能力指標：7/13

QOL (モラールスケール)：9/17

5) 介護負担感

BIC-11：8/0-44

〔鍼灸治療〕

下肢機能の改善と腰痛の軽減：疼痛閾値の上昇と循環の改善を治療目的とする。

1) 配穴：両側の足三里、陰陵泉、三陰交

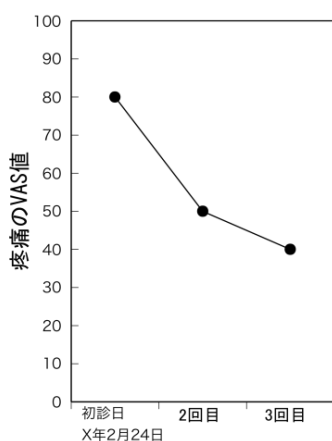
刺激：単刺術

2) 配穴：左側の三焦兪、腎兪、大腸兪、志室

刺激：置鍼術10分間、温筒灸1壮

〔治療結果〕

初診日：X年2月24日。以後、3月11日まで週1回、計3回の鍼灸治療を行った。初回鍼灸治療後より疼痛の軽減が認められ、VAS値は初診時：80、2診目：50、3診目：40となり、疼痛の軽減が客観的に示された。疼痛の軽減に伴って「ベッドからの起き上がり



80歳女性。主訴：左腰痛。診断名：側弯症等 鍼灸治療の経過に伴い疼痛の軽減傾向が認められた。

が容易になった」との回答が得られた。歩行機能とADLの変化、介護負担感については、鍼灸治療10回毎に計測、3月11日時点でデータは得られていない。

【考察】

1. 本研究の位置付けと意味について

鍼灸治療が出張治療で在宅高齢者を治療することは市中の鍼灸治療施設において既に多く実施されている。心身機能の低下に伴い、鍼灸治療院等への受診が困難な高齢者にとって、出張治療は利便性も高く、今後とも需要が高まる可能性がある。しかし、本学附属鍼灸センター（前 附属治療所）が、高齢化の進む日吉町（南丹市）において30年以上経過しながら、出張治療を行った経験はない。また、在宅医療における鍼灸治療の在り方を論じた研究成果はほとんど認められない。本研究は、在宅の地域高齢者を対象とした鍼灸治療システムを構築、実践し、その臨床的な効果を明確にすることを目的とし、また、これを通して、地域医療における鍼灸治療のモデルケースとしての位置付けを明らかにすることにある。また、本研究の結果が、卒業後に地域医療において鍼灸治療を実践する鍼灸学部学生の教育の一環となることも期待して実践した。

2. 在宅での鍼灸治療上の問題点と克服

鍼灸治療の開始に際しては、南丹保健所への届け出が必要であった。本学が（研究の一環として）出張治療を行うことは、地域において初の試みであり、如何なる審査と書類が必要であるかが検討され、回答を得るまでに数ヶ月間を要した。対象者の選出・募集にあたっては、高齢者施設のケアマネージャーとの協議が必要であった。すなわち、在宅として治療を行うには「はぎの里」からの紹介により信用を得て対象者の了解を得る必要があった。高齢者施設からは患者の症状や家族と家屋の構成、鍼灸治療への理解度などの情報を得ることができた。患者は多彩な症状（疾患）により、複数の医療機関（医師）を受診しており、医師への鍼灸治療開始の連絡と報告が必要と感じられた。したがって、在宅で高齢者に鍼灸治療を実施する場合には、患者や患者家族とのコミュニケーションだけでなく、保健所や、受療している医療機関（医師）や介護施設とも情報交流し、関係性を構築する必要があると考えられた。

3. 鍼灸治療の実践と効果

患者の同意を得て、研究期間内に1症例の治療を開始することができた。過去の研究により歩行機能の改善を目指した治療プロトコルを設定したが、実際に行った施術内容との相違が生じた。室温が低いなど治療環境が十分に確保できないことも一因であり、再検討により適切なプロトコルに改良する予定である。症例が訴えた症状に対しては治療効果が認められ、疼痛の軽減とADLの改善がうかがわれた。歩行機能等は、さらに治療を継続して評価する予定である。

【学会発表】

江川雅人，近藤啓次，山本豪，兵頭明：超高齢社会における鍼灸治療の役割と可能性. 第63回全日本鍼灸学会愛媛大会シンポジウム，松山，2014.5.18 予定

研究区分：ユニット研究
足関節捻挫既往が身体に及ぼす影響
 岡本武昌 中川達雄 神内伸晃 上見美智子 中川貴雄【臨床柔道整復学講座】

【目的】

足関節捻挫はスポーツ外傷のうち、損傷頻度の高い外傷である。また足関節捻挫の発生頻度は、高く、反復しやすい特徴がある。そのため治療、予防法が大切となる。また足関節捻挫が慢性化すると、痛みや不安定感などの後遺症が残存し、二次的な外傷やパフォーマンスの低下を引き起こす可能性が高く、慢性足関節不安定症(以下、CAI)と呼ばれる。この CAI は、「機械的不安定性」と「機能的不安定性」からなり、機械的不安定性は解剖的・組織的变化とされている。一方で機能的不安定性は、足関節捻挫者により生じる筋・神経・姿勢制御機能の低下とされているが詳細は明らかではない。そこで本研究では、足関節捻挫既往における機能的変化の詳細を明らかにするために足部機能・足圧中心制御の特徴を把握し、捻挫の既往が身体バランス特徴に与える影響を検討する事を目的とした。また捻挫の発生には転倒やバランス能力の低下が関与する可能性があるため、大腿筋膜張筋、中臀筋などの外転筋の筋力低下が生じている場合がある。そこで足関節捻挫既往と大腿筋膜張筋の筋力との関連、また内反捻挫受傷時を再現する目的で、足関節内反固定位での大腿筋膜張筋の筋力についても検討した。

【対象・方法】本学学生の 40 足（男性 11 名、女性 9 名、年齢 20.8 ± 1.4 歳）を対象とし、過去に足関節内反捻挫の既往がある 22 足を捻挫群、捻挫の既往がない 18 足を健常群とした。測定項目は、足関節可動域（背屈、底屈、内反）を自動的および他動的に計測した。下肢筋力として足趾力と股関節外転筋（大腿筋膜張筋）の筋力測定を自然下垂位と最大底屈内反位での 2 つの肢位で行った。また重心動揺軌跡（片脚立位）を平衡機能測定器 GAIT VIEW (aison 社製) を用いて測定した。

測定値は 2 回行った平均値とした。

【結果】

足関節可動域は他動底屈で健常群($63.9 \pm 11.4^\circ$)と比較し、捻挫群($57.5 \pm 8.2^\circ$)で有意に可動域が小さかった ($p < 0.05$)。その他の可動域では有意な差は認められなかった。大腿筋膜張筋の筋力においては、健常群と捻挫群で差が認められなかったが、捻挫群で自然下垂位と比較し、最大内反固定位で、筋力が有意に低下した($p < 0.05$) (図 1)。

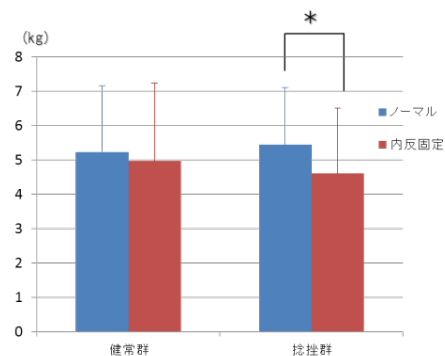
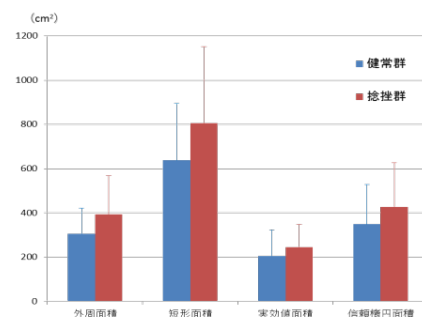


図 1：大腿筋膜張筋の筋力

平衡機能測定においては、捻挫群での片脚立位で重心動揺面積（外周面積）が健常群の片脚立位と比較し、広い傾向がみられたが有意な差は認められなかった(図 2)。

図 2：片脚立位による重心動揺面積



【考察】

本研究では、足関節捻挫既往が身体に及ぼす影響として、足部機能、筋力、重心動揺軌跡を測定し、その特徴が捻挫既往者のバランス能力、筋力

に与える影響を検討した。

他動底屈で捻挫群の角度が有意に小さかった理由は、自動底屈では捻挫既往者は代償的に軽度内反をさせながら底屈したことが考えられ、他動底屈では代償運動が正され、足部アライメント不良による底屈角度の制限が生じたことが考えられた。

次に、捻挫群において、足関節最大内反底屈位での大腿筋膜張筋の筋力低下が認められた。よって捻挫既往者の再捻挫の要因の一つとして、足関節最大内反底屈時の大腿筋膜張筋の筋力低下が考えられた。日常動作や運動時に捻挫足が最大内反底屈位におかれ、前外方に体重がかかった際、大腿筋膜張筋等の外転筋の筋力発揮が、捻挫を防ぐ一つの機序になっていることが考えられる。よって捻挫を繰り返す人の要因として、足関節内反底屈位での大腿筋膜張筋の筋力低下が考えられた。

また捻挫足での片脚立位での重心動揺面積が広い傾向がみられたことから、捻挫の既往足はバランスの安定性が悪いことが他の研究同様に示唆された¹⁾。この現象の要因は、損傷した前距腓靭帯等の靭帯や関節包の関節受容器等の関与が大きいと考えられる²⁾。

また再捻挫を防ぐために、腓骨筋等の筋力トレーニングが推奨されているが^{3,4)}、今回の結果から足関節内反位での外転筋のトレーニングが再捻挫を予防するのに効果的であることも考えられ、効果の検証が必要である。

今後は、足関節最大内反底屈位での大腿筋膜張筋以外の筋力に及ぼす影響についても検証し、足関節捻挫既往が身体に及ぼす影響についてさらに検証を進め、足関節内反捻挫の再発防止へと発展させていきたい。

参考文献

1. 八木優英, 鈴木謙太郎, 阿南雅也, 新小田幸一. 足関節の機能的不安定性が片脚立位のバランス応答に与える影響. 理学療法学 27(4), p373-377, 2012.
2. 横山茂樹, 蒲田和芳, 根地嶋誠. 足関節機能的不安定性者における足関節位置角検査法の検討. 理学療法学 26(5), p557-562, 2011.
3. 藤高紘平, 藤竹俊輔, 来田晃幸, 橋本雅至, 大槻伸吾, 大久保衛. 大学サッカー選手の足部・足関節傷害に対する足部アーチ保持筋力トレーニングの効果. 理学療法科学 27(3), p263-267, 2012.
4. 小林 直行, 宮川 俊平, 向井 直樹, 竹村 雅裕, 佐藤 理史, 山本 純. 足関節不安定症に対する不安定板トレーニングが下腿筋断面積に及ぼす影響. 日本臨床スポーツ医学会誌 15(3), p448-453, 2007.

研究区分：重点研究

ヒーリングタッチによるリラクゼーション効果の検証

看護学部 成人・老年看護学講座 田口豊恵 中森美季

【はじめに】

HT とは、セラピストの手から送られる気（エネルギー）によって人間のエネルギーシステムの清浄とバランスの回復を図り、疼痛軽減、リラクゼーション、ストレスや不安の軽減など全人的レベルでのセルフヒーリングを促す補完代替療法の1つである。昨年度、看護学部の学生を対象にHTのリラクゼーション効果を検証した。その結果、介入群は、HTにより心拍数が低下し、交感神経系が全員低下していたことより、緊張が緩和する傾向が示された。しかし、研究参加者のリクルート法を考慮し、施術者が与える影響をできるだけ少なくすること。HTを介入しない生体反応を評価することが課題となった。本研究の目的は、昨年度の課題を踏まえ、HTによるリラクゼーション効果を再検証することである。

【研究方法】

対象は、京都府下のA看護大学生で無作為化して2群に分類した。研究期間は平成25年10月～12月である。HTは国際認定プログラムを修了した者による約30分間のチャクラコネクションとし、温度調整した部屋で実施した。また、リラクゼーション効果は心拍変動、気分の変化（Visual Analog Scale、以下、VAS）で評価した。さらに、HT前後のチャクラの状態を評価した。心拍変動はアクティブトレーサー（GMS社製）で測定し、専用ソフトを用いて副交感神経系（high frequency、以下HF）、交感神経系（low frequency/high frequency、以下LF/HF）の変化を介入前と介入中で比較した。また、サーモスタットにより、足趾の末梢循環状態を評価した。VASは集計して比較、8つのチャクラポイントについて介入前後で気の流れを評価した。統計学的解析にはWilcoxonの符号和順位検定を用いた。本研究は、著者らが所属する研究倫理委員会の承認（受付番号24-30-3）を得たうえで実施し、対象者には事前

に十分な説明を行うとともに文書で同意を得た。また、学業や生活の妨げにならない時間帯を選んで実施し、個人情報を守った。

【結果】

研究参加者は16名であった。心拍変動解析は、介入群8名（男性3名）、対照群8名（男性2名）が分析対象となったが、両群の年齢に有意差はなかった。以下のデータは、両群の介入前と介入中の平均値と標準偏差を示す。介入群の心拍数は（以下、HR）は 77 ± 11 回/分から 68 ± 6 回/分、HFは $442 \pm 201 \text{ms}^2$ から $809 \pm 543 \text{ms}^2$ 、LF/HFは 3 ± 3 から 2 ± 2 であった。HFは介入中に増加傾向（ $P=0.07$ ）、HRは介入中に低下する傾向（ $P=0.05$ ）を示した。一方、対照群では、HRは 73 ± 12 回/分から 67 ± 8 回/分、HFは $1075 \pm 932 \text{ms}^2$ から $1272 \pm 1107 \text{ms}^2$ 、LF/HFは 3 ± 3 から 2 ± 1 であったがいずれも有意差はなかった。足趾の温度については、介入群は 0.18 度上昇がみられたが、対照群では 0.04 度低下していた。VASについては介入群のみHT後に気分がよくなっていた（ $P=0.01$ ）。また、チャクラの変化については、介入群の75%がHT後に気の流れが改善していたが、対照群の63%は不変または低下したままであった。

【考察】

介入群は対照群と比較すると、HT中はHFが増加、HRは低下し、やや末梢循環が改善する傾向を示した。また、介入後に気分が良くなっていたことより、リラクゼーション効果が得られた可能性がある。また、介入群では、HT後に気の流れが改善する傾向を示した。今後は心拍変動の個体差を考慮し、サンプルを増やしての継続研究による再評価と個人の生活統制についての評価基準を検討していきたい。

【論文及び学会発表】

1. 第40回 日本看護研究学会学術集会審査中
2. 上記学会に発表後、研究報告として投稿予定

研究区分：学内研究助成研究

タイトル：泡マッサージによる足浴の洗浄効果及びリラクゼーション効果の検証

氏名：岡田朱民、糀谷康子、假谷ゆかり、那須さとみ、仲口路子、小山敦代、中山登揆、都築英明

所属：看護学部基礎看護学講座、医学教育研究センター

【目的】

足浴は、清潔援助にとどまらず循環促進、睡眠促進、リラクゼーション効果などが得られることが検証されている。しかし、浮腫のある皮膚の弱い患者などは、湯につけて足浴を実施することで皮膚を傷つけ逆効果となる場合があり、近年、湯を使わず泡を使った足浴が緩和ケア病棟などで実施されてきている。

そこで、弾力のある、きめ細かい Soap Bubbles によるマッサージを取り入れた足浴（泡足浴）の洗浄効果及びリラクゼーション効果について科学的に検証する。

【研究方法】

1. 研究デザイン：実験研究
2. 研究期間：2013年8月～2014年3月
3. 研究対象
 - 実験群（泡足浴）：女性10名
 - 対照群（温湯と石鹸による足浴）：女性10名
4. 分析対象とする指標
 - 1) 生理的指標
 - (1) 口腔体温 (2) 腋窩体温 (3) 脈拍 (4) 呼吸 (5) 血圧 (6) 皮膚水分量・油分量・弾力性 (7) 皮膚表面温 (8) 皮膚血流量 (9) 心電図 (LF/HF の算出) (10) 足底の細菌培養
 - 2) 主観的指標
 - (1) 日本語版 Profile of Mood Scale; POMS
 - (2) 一般健康調査票 (General Health Questionnaire; GHQ) 12項目版
 - (3) 自己評価
 - ・足浴中の心地よさ、温かさ、マッサージ時間、マッサージの力加減感

- ・足浴後の肌のさわり心地、疲労感、満足感

5. データ収集方法

両群の実施方法は表1及び図1のとおりである。

表1 実験プロトコル

経過	実験群(泡足浴)	対照群(湯足浴)
0分	★心理テスト(前)	
10分	★被験者着替え	
13分	★身体測定・足底の細菌培養検査	
15分	★被験者ベッド上安静(10分間)	
25分	★口腔体温測定(10分間) ★安静時心電図測定開始 ★皮膚血流量測定開始	
35分	★バイタルサイン測定 ★皮膚水分量・油分量・弾力性の測定 ★皮膚表面温・深部温測定	
45分	★泡マッサージ開始	★湯による足浴開始
50分	★皮膚表面温・深部温測定	
55分	★口腔体温測定(10分間) ★安静時心電図測定開始	
65分	★バイタルサイン測定 ★皮膚水分量・油分量・弾力性の測定 ★皮膚表面温・深部温測定・足底の細菌培養検査	
	★心電図・皮膚血流量測定終了 ★着かえ	
75分	★心理テスト(後)	
90分	★終了	

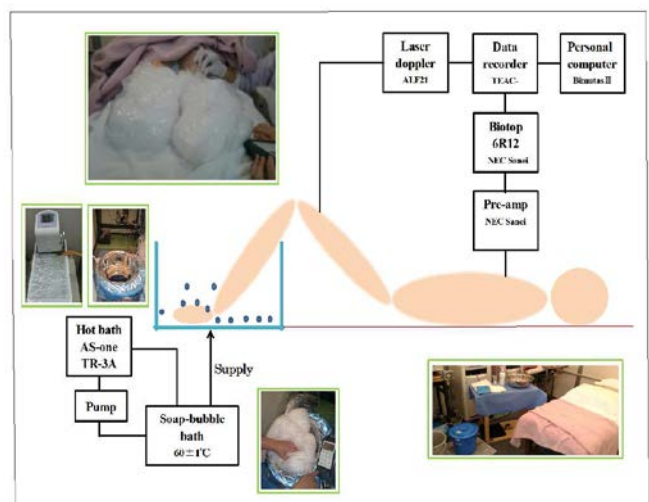


図1 足浴実験の概略

6. 解析方法

足浴前後の生理的指標及び POMS、GHQ の結果は、Wilcoxon の符号付順位検定を実施した。

【結果】

1. 群内比較の結果、介入後皮膚表面温および深部温、皮膚血流量は上昇し、有意な差が見られた(図2, 図3)。しかし口腔体温、呼吸、脈拍、血圧、心電図、皮膚水分量・油分・弾力性については有意な差は見られなかった。

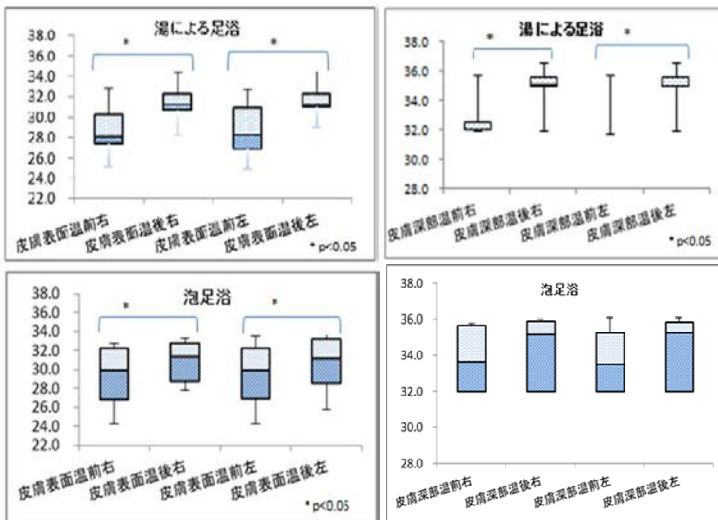


図2 皮膚温の群内比較

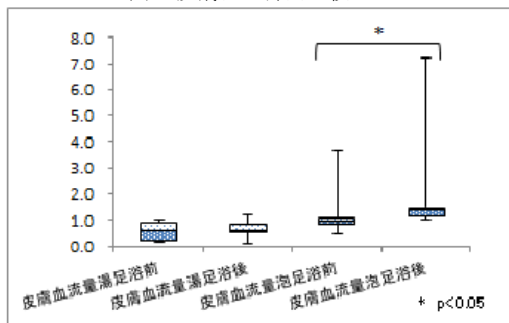


図3 皮膚血流量の群内比較

2. 足底の細菌培養では、肉眼的観察の結果群内で細菌数の減少が見られた(図4)。

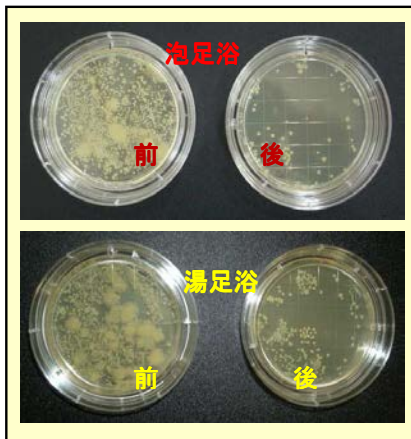


図4 両群の足底の細菌培養結果の一例

3. POMS では、群内比較の結果、介入後「T-A(緊張-不安)」「D(抑うつ-落込み)」「A-H(怒り-敵意)」「F(疲労)」「C(混乱)」で低下し、有意な差が見られた(図5)。また GHQ では、群内比較において陽性に傾いたが、有意差は見られなかった。

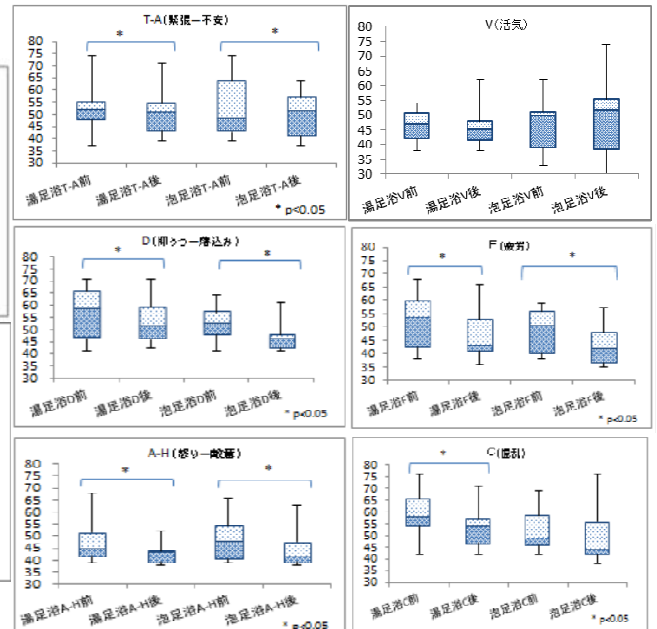


図5 POMS の群内比較

4. 自己評価表の結果は、実験群では「足浴中の温かさ」、対照群では「マッサージ時間」以外は半数以上が『非常に良い』『良い』と答えた。

【結論】

1. 皮膚表面温及び深部温、皮膚血流量において有意な差が見られたことから、泡足浴は湯による足浴同様、循環促進効果があるといえる。
2. POMS において有意な差が見られたことから、リラクゼーション効果があるといえ、泡足浴は苦痛のある患者にも効果が期待できると示唆された。
3. 足底の細菌培養では、実験群で著明な細菌数の減少が見られ、洗浄効果があるといえる。

研究区分：ユニット・講座研究

タイトル：医療用ワゴンの騒音対策とその効果

北村雄児・川村晃右・山本明弘【明治国際医療大学看護学部 成人・老年看護学講座】

【はじめに】騒音は患者に不快感を与え睡眠の邪魔をするなど、療養の妨げとなるものである。そこで病棟における騒音を調査した先行研究がいくつも存在するが、その中に医療用ワゴンから出る音について触れたものがあり、例えば伊藤¹⁾、田中²⁾、坂田³⁾、高田⁴⁾といった研究者が医療用ワゴンが騒音源となっていることを指摘している。また溝口⁵⁾が、医療用ワゴンを動かす音を聴くことで交感神経活動が優位になったと報告しているなど、ワゴンの音が人体に影響を及ぼすことを示した研究もある。

現在の医療用ワゴンは振動しやすく音を発生しやすい構造である。従来点滴ボトルはガラス製であったものが、今ではビニール製が主となるなどの変化があり、よって物品とワゴンの台板との接触による音に関しての問題は少なくなった。しかし依然として床の凹凸によってワゴンが振動し音を発生するという問題は残っている。ワゴンに騒音対策を施せば病棟はより望ましい療養環境になるものと期待できる。そこで本研究では容易に実施できて効果のある騒音対策方法は何かを明らかにする。

【方法】実験に用いたワゴンは三和製作所ステンレスワゴンM（幅 600mm 奥行 450mm 高さ 790mm、台板 2 段）であり、このワゴンに対し①対策なし（図 1）②台板の裏側にゴム板（300×580mm厚さ 3mm）を貼る（図 2）③台板を支える 4 本の支柱に砂利（計 1800 g）を入れる（図 3）④本研究者が考案した、振動吸収効果がありキャスターの付いた台（幅 600mm 奥行 450mm 厚さ 5mm の MDF 板 2 枚をブチルゴムで張り合せ、さらにワゴンと接する部位には 100mm 角で厚さ 5mm のスポンジゴムと 100mm 角で厚さ 5mm の MDF 板を重ねたもの—以下これを防振台と呼ぶ）に載せる（図 4）以上の各条件で走行した時の音の大きさを騒音計（アコー社・アキュラ type 6230）で測定した。

ワゴンを走らせるコースとして、①平坦なコース（図 5）と、②段差（底辺が 12mm で高さが 6mm の直角三角形断面の角材）を乗り越えるコース（図 6）の 2 種を設定した。騒音計は床からの高さ 50 cm、ワゴンからの距離 100 cm の位置に設置して、測定モードは Lmax（A 特性で測った単位時間内の最大騒音レベル）とした。ワゴンは人間が押して走行させたが、速度が一定になるよう、60 cm 間隔に刻んだ線に歩幅を合わせ、かつ電子メトロノームのリズム（1 分間に 85 拍）をイヤフォンで聞きながらそのリズムに合わせて歩いて（時速約 3km）ワゴンを押した。1 つの条件につき 8 回測定し平均と標準偏差を求めた。



図 1. 対策なしワゴン



図 2. ゴム板を貼る



図 3. 支柱に砂利を詰める



図 4. 製作途中の防振台（左）と防振台にのせたワゴン（右）

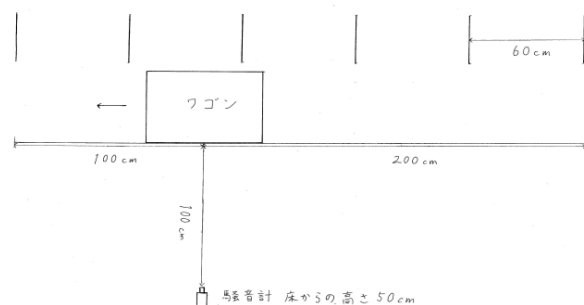


図 5. 平坦コースでの騒音レベル測定

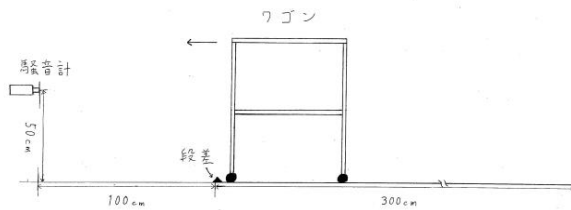


図 6. 段差コースでの騒音レベル測定

【結果】平坦コースにおいては、対策なしのワゴンと比較して、台板にゴム板を貼った場合に平均 10.1dB(A)、ワゴンを防振台にのせた場合 16.1dB(A)、支柱に砂利を詰めた場合 8.8dB(A)の騒音レベルの低下が見られた。(表 1)

表 1. 平坦コース 単位 dB(A)

対策	騒音レベル
対策なし	62.6±1.0
ゴム板を貼る	52.5±1.4
防振台にのせる	46.5±2.3
砂利を詰める	53.8±1.3

段差コースにおいては、対策なしのワゴンと比較して、台板にゴムを貼った場合に平均 6.4dB(A)、ワゴンを防振台にのせた場合 9.0dB(A)、支柱に砂利を詰めた場合 5.7dB(A)の騒音レベルの低下が見られた。(表 2)

表 2. 段差コース 単位 dB(A)

対策	騒音レベル
対策なし	82.4±0.6
ゴム板を貼る	76.0±1.0
防振台にのせる	73.4±1.0
砂利を詰める	76.7±1.3

ゴム板を貼ることと、防振台にのせることの効果が大きいことが分かったため、この 2 種類の対策を組み合わせるとその効果を調べたところ、対策なしのワゴンと比較して、平坦コースで平均 17dB(A)、段差コースで 9.5dB(A)の騒音レベルの低下が見られた。(表 3)

表 3. ゴム板と防振台の組み合わせ 単位 dB(A)

対策	平坦コース	段差コース
対策なし	62.6±1.0	82.4±0.6
ゴム板+防振台	45.6±1.8	72.9±0.7

防振台を製作するのは手間を要するため、より簡単な方法で大きな騒音低減効果を得られないかと考え、ゴム板を貼ることと砂利を詰めることを組み合わせるとその効果を調べたところ、対策な

しのワゴンと比較して、平坦コースで平均 15.1dB(A)、段差コースで 7.9dB(A)の騒音レベルの低下が見られた。(表 4)

表 4. ゴム板と砂利の組み合わせ 単位 dB(A)

対策	平坦コース	段差コース
対策なし	62.6±1.0	82.4±0.6
ゴム板+砂利	47.5±1.1	74.5±1.1

【考察】3 種類の騒音対策のうち最も効果の大きかったのは防振台にワゴンをのせることであった。床面の凹凸による振動を防振台で吸収し、ワゴン本体に伝わる振動をかなり小さくできたためと考えられる。防振台と比較すると、台板にゴム板を貼って台板の振動を抑えても支柱が振動して音を発し、支柱に砂利を入れて支柱の振動を抑えても台板が振動して音を発するため騒音レベルが高めになると考えられる。そこで台板にゴム板、支柱には砂利で、台板と支柱の両方の振動を抑えると、ワゴンを防振台にのせた場合に近い騒音低減効果が得られた。

手軽に行なえる騒音対策という点から見ると、防振台の製作にはやや手間を要するのが難点である。それに対しゴム板と砂利による対策は簡単に行なえる割に騒音低減効果が大きいのが利点だと言える。しかしワゴンに対策を施すことにより重量が増加するため使い勝手が悪くならないか、また、衛生面で問題が生じないかが今後の検討課題である。

【参考文献】

- 1) 伊藤伸江, 白石久子, 峠歩美: 夜間騒音調査に視点をおいた病院の療養環境改善の試み. 福山医学, 17, 63-66, 2010.
- 2) 田中靖弘: 騒音に対する病棟看護師の認識. 看護教育, 46,(8), 634-636, 2005.
- 3) 坂田和子, 松永直子, 森原有紀: 病棟内で生じる騒音と患者が感じる不快感に関する研究. 日本看護学会論文集 成人看護 II, 37, 333-335, 2007.
- 4) 高田利香, 野々下裕貴子, 森歌織: 音環境に対する意識調査. 十全総合病院雑誌, 13(1), 4-5, 2007.
- 5) 溝口弥生, 佐藤都也子: 看護実践場面で発生する音の健康大学生の自律神経活動および気分への影響. 山梨大学看護学会誌, 7(1), 39-44, 2008.

【論文および学会発表】

未発表

研究区分：学内助成研究

更年期のストレス軽減へのアロマ芳香浴の効果

-日本古来の精油での試み-

夏山洋子 糠塚亜紀子 矢野恵子 看護学部 母性・小児看護学講座

【目的】補完代替療法の一つである芳香療法の中でも、メディカルアロマセラピーは嗅覚研究の発展とともに現在、臨床で多く実施、報告されている。本来、香りにより刺激される脳の部分は記憶や情動などへ影響を与えることが知られている。日本人には日本古来の香りがよりなじみが深くて良いという指摘もあり、本研究は日本人ならではの癒しを考える意味でも、鬱、無気力、興奮等へ効果があるとされるヒノキ精油が女性の更年期の不定愁訴やストレスの軽減に効果があるかどうかを検証することを目的とする。

【方法】対象：産婦人科外来を受診した更年期女性で、医師の承認の得られた人に、研究への参加募集を行い、同意の得られた人を対象とした。外来の待ち時間に原則として1室にてまず非介入状態で安静のみを15分実施し、その後ヒノキ精油による芳香浴を15分実施した。芳香浴は同じアロマポットを利用し、80mlの水に4滴の精油を加えて実施した。介入の前後に血圧・脈拍測定を行い、SMI(更年期指数)及びPOMS(Profile of Mood States)を実施し、加えてVAS(視覚アナログ尺度)で気分を評価した。生理学的指標として、リラックス効果を交感神経と副交感神経等のバランス等で評価する為、入室後にボナリーライトで解析するための心電図用電極を装着した。<ボナリーライト=日常の生活活動を、心拍数(R-R間隔)と活動度(加速度センサーと傾斜センサー)で記録。>測定結果はMemCalc/Win ver.2等で分析した。調査期間は、平成25年11月～平成26年3月である。

【倫理的配慮】本研究は明治国際医療大学研究倫理委員会の承認を得て実施した(受付番号25-71)。

精油は成分表の付いた安全性の高いものを使用し、対象の方には、必ず、実施前に好みを確認した。香りに拒否感を持たれた場合は実施しない。また途中で気分が悪くなれば中止できる事、途中で研究を中止しても何も支障はないこと等を伝えた。

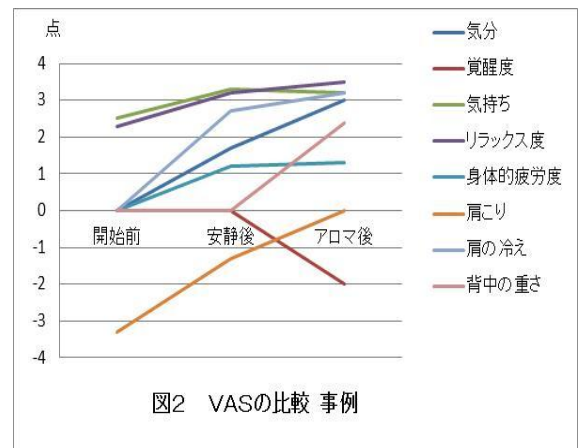
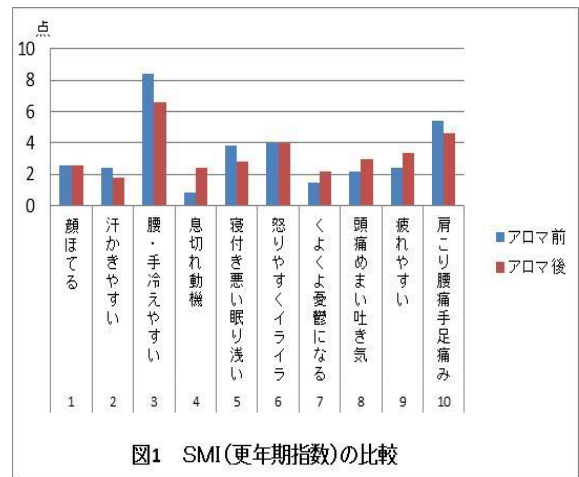
【結果】対象者は5名で、平均年齢49.2歳(41-55歳)。全員が1-2年前から通院中で、内4名がホルモン療法や漢方の処方を受けていた。

血圧は安静時とアロマ芳香浴時で大きな変化はみられなかったSMIについては、アロマ芳香浴後に、腰や手足の冷え、肩こり、寝つき、発汗について点数が低下したが、息切れや動悸、頭痛やめまい、疲れやすいでは点数が高くなった。(図1)

POMSについては、緊張・不安、抑うつ・落込み、怒り・敵意、活気、疲労、混乱の6項目について、5名全員が安静後とアロマ芳香浴後の両方で低下し、両者間で有意差は見られなかった。

VASについては、背中の中の重さや肩こりが、アロマ芳香浴により改善される可能性が示唆された。ま

た、覚醒度がアロマ芳香浴後に低下しており、睡眠導入効果も示唆された。(図2)



【考察】今回の研究により、日本古来の精油を使用したアロマ芳香浴の更年期障害に対する効果の可能性が示唆されたが、短期での実施では効果が得にくいことも考えられる。今後、症例数を増やして検討を加えていきたい。

引用・参考文献

- 小林麻衣子, 李 卿, 若山葉子他. ヒノキ精油によるリラックス効果. 日衛誌 (Jpn J. Hyg) 第64巻 第2号 2009年3月 p. 418