

東京医科歯科大学教養部

自然科学アドバンスコース

学生論文集

2009年3月

目 次

メタボ健診におけるゲルろ過 HPLC 分析法によるリポ蛋白サブクラス定量の有用性 光井 潤一郎-----	1
CA-180 による apo A I, B, E 及び Lp(a) 測定の実現性についての考察 今井 彩乃-----	7
高気圧酸素治療によるリポタンパクプロファイルの変化 杉原 潤-----	14
全身性の炎症による血中の免疫系細胞の増加 鈴木里彩 (共同実験者 鈴木健人) -----	20
プラナリアの再生とメラトニン 宮城夏子 (共同研究者 笹川麻由) -----	28
メラトニンは鱗に作用して、鱗の再生を促進する可能性がある 西井直人 (共同研究者 高橋純一) -----	35
The effects of cortisol on osteoclasts induced by allogeneic graft of scales in goldfish Eiichiro Amano, Tatsuya Sato, Yuma Noguchi-----	41
側線鱗の穴について 福与涼介 (共同研究者 加賀谷渉) -----	48

メタボ健診におけるゲルろ過 HPLC 分析法によるリポ蛋白サブクラス定量の有用性

医学科 2 年 光井 潤一郎

概要

メタボリック・シンドローム対策として開始された特定健診では、脂質検査項目が中性脂肪 (TG) と HDL-Cholesterol (HDL-C) に限られている。しかし近年、リポ蛋白サブクラスの心疾患等への影響が注目されている。

ゲルろ過 HPLC 分析法は、TG、HDL-C を含むリポ蛋白主要クラスにおいて従来の自動分析法と高い相関を示した。さらに、LDL-C において BMI と有意な相関が見られなかったが、small LDL-C において BMI と正の相関 ($p < 0.05$) を示した。また、LDL-C において腹囲と正の相関 ($p < 0.05$) を示したが、small LDL-C においてより有意な正の相関 ($p < 0.001$) を示した。さらに、small LDL-C は特定健診の検査対象に含まれない CRP と非常に有意な正の相関 ($p < 0.0001$) を示した。

1. 目的

2008 年 4 月からメタボリック・シンドロームの予防を目的とした特定健診と特定保健指導が開始された。その脂質検査項目は、中性脂肪 (TG) と HDL-C のみである。しかし、生活習慣病の危険因子として近年、small dense LDL が注目されるなど、TG や HDL-C のみでなく、リポ蛋白サブクラスの定量を行うことの意義が論議されている。本研究では、少量の血清から短時間でリポ蛋白主要クラス、サブクラスの Cho と TG を同時に分析できるゲルろ過 HPLC 分析法のメタボ健診における有用性を検討した。

2. 方法と対象

静岡健康管理センターで人間ドックを受診した男性 100 名 (年齢 53 ± 7 歳) を対象とした。表 1 に各データの平均値、標準偏差、最大値、最小値を示した。

HPLC 測定は、全自動リポ蛋白分析装置 (SC-8020 / 東ソー) を用い、ゲルろ過カラムは LDL 分画の分離能を向上させた試験開発品 (内径 7.8 mm、長さ 30 cm) を用いた。血清 5 μ l を 13 分間隔で注入し、溶離液 (0.3 M 酢酸ナトリウム、50 mM トリス酢酸緩衝液、pH 6.8) を流速 0.7 ml/min で送液し、血清中のリポ蛋白を粒子サイズによって分離した。本装置ではカラムからの溶出液を 2 つの経路に分岐させ、オンライン酵素反

表 1 対象のデータ

年齢 (歳)	52.8 ± 7.1	(35 ~ 68)
体重 (kg)	68.4 ± 9.2	(46.8 ~ 92.1)
体脂肪率 (%)	23.5 ± 4.9	(12.1 ~ 35.2)
BMI	24.1 ± 2.9	(17 ~ 30.9)
腹囲 (cm)	84.4 ± 7.3	(67.7 ~ 101.5)
TC (mg/dl)	223.2 ± 33.9	(151 ~ 358)
TG (mg/dl)	148.7 ± 82.8	(46 ~ 419)
LDL-C (mg/dl)	138.0 ± 31.2	(71 ~ 258)
HDL-C (mg/dl)	63.8 ± 16.5	(35 ~ 110)

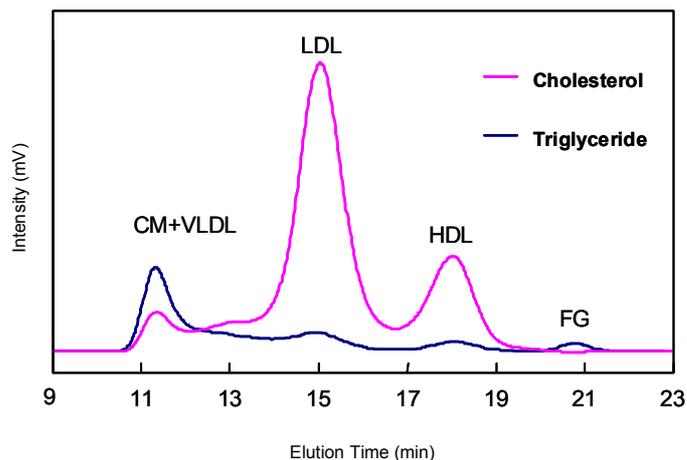


図 3 検出パターン例

応(HPLC 専用酵素/協和メデックス提供)で Cho と TG を同時に検出した(図 2、図 3)。Cho、TG の定量は脂質濃度既知の標準血清を用い、クロマトグラム総面積を基準に行った。リポ蛋白主要クラス(CM+VLDL、LDL、HDL)及び LDL と HDL のサブクラスの Cho、TG 各濃度は、ガウス近似に基づいた自家製プログラムによって算定した。得られたパターンはガウス近似により 20 個の分画に分離される(図 4)。青色のピークは CM+VLDL に、赤色は LDL に、緑色は HDL にそれぞれ該当する。さらに本研究では、この 20 の分画を、small、medium、large、および very small、very large のよ

うに、12 のグループにまとめた。また、ピーク検出時間から主要クラスの粒子サイズを求めた。

2.3. 統計解析

測定値は Windows 用統計解析ソフト SPSS Manager16.0 により分析した。統計分析は t 検定を用いた。判定は $p < 0.05$ を有意差ありとした。表記については平均 ± 標準誤差 (mean ± SE) とした。

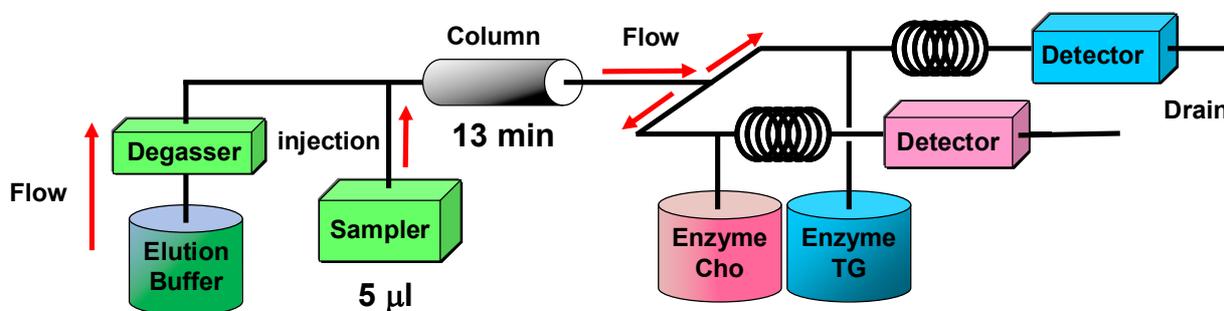
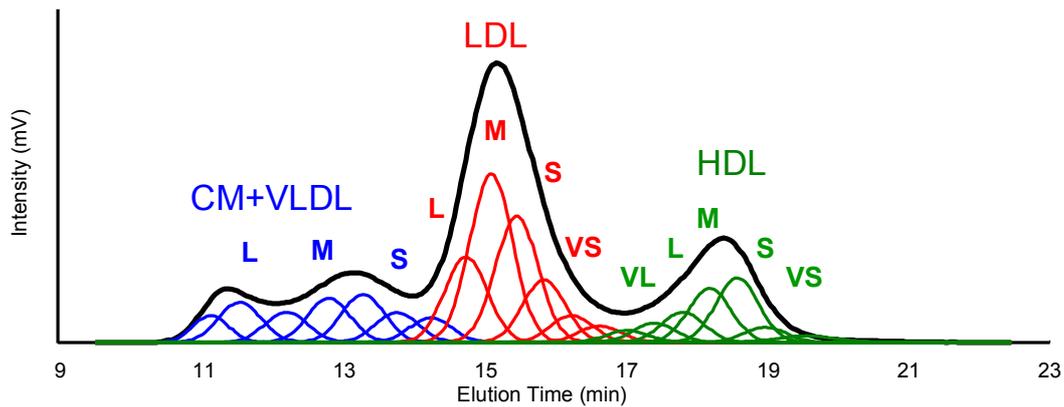


図 2 ゲルろ過 HPLC 分析法



Major Class	CM+VLDL > 30 nm							LDL 30~16 nm						HDL 16~8 nm						
Component Peak Number	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
Particle Diameter (nm)	>64.0		53.6~44.5			36.8~31.3		28.6	25.5	23.0	20.7~16.7			15.0~13.5		12.1	10.9	9.8	8.8~7.6	
Subclass	L		M			S		L	M	S	VS			VL	L	M	S	VS		

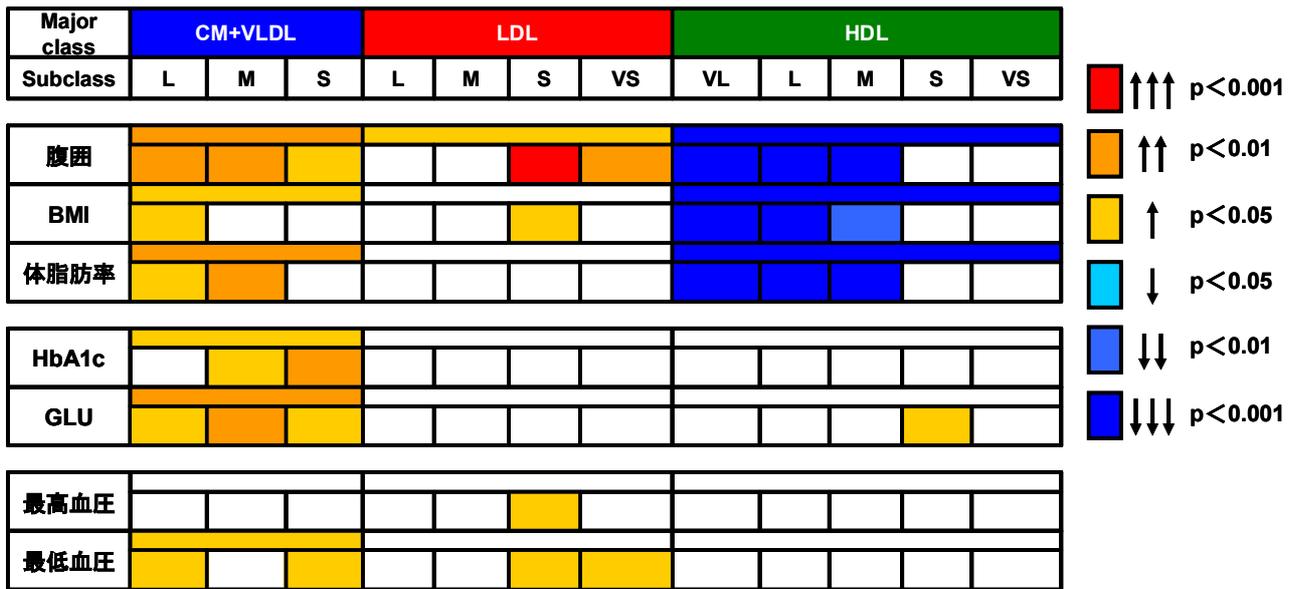
VL, very large; L, large; M, medium; S, small; VS, very small

図 4 ガウス近似解析例

3. 結果と考察

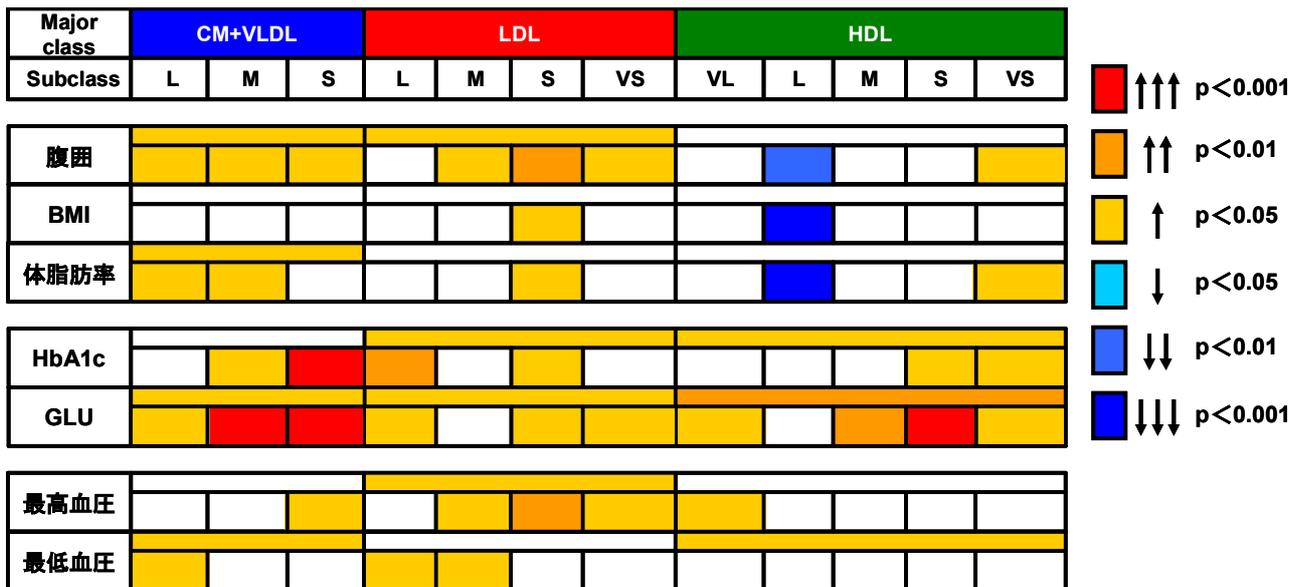
メタボ健診での脂質検査項目である TG と HDL-C に関して、自動分析法と本ゲルろ過 HPLC 分析法を比較したところ、TG は相関係数 0.995、HDL-C は相関係数 0.978 で両者間に高い相関が得られた。本法の LDL 粒子サイズは、TG と有意な負の相関($r = -0.590$ 、 $p < 0.0001$)を示した。LDL 全体の TG/TC 比は 0.235 ± 0.078 (平均値 \pm SD)、small LDL の TG/TC 比は 0.242 ± 0.068 であり、small LDL は有意に TG/TC 比が高かった($p < 0.01$)。さらに自動分析法での TG 値と LDL-C の相関が有意でなかったのに対して、本法における large LDL-C と TG は有意な負の相関($p < 0.001$)を、small LDL-C とは正の相関($p < 0.001$)を示した。はじめに、リポ蛋白主要クラスの Cho と特

定健診の検査項目との相関を示す。各ブロックの上部にリポ蛋白主要クラスとの相関を、下部に各サブクラスとの相関を示した。さらに、暖色と寒色により、相関の正負を表し、色の濃さで有意の度合いを示した。主要クラスの Cho は、腹囲、BMI、体脂肪率が HDL-C と有意な負の相関を示した(図 5)。各サブクラスの Cho では、腹囲、BMI、体脂肪率において、HDL の中でも特に very large および large HDL-C と有意な負の相関を示した。さらに、腹囲では small および very small LDL-C が LDL 全体よりも有意な正の相関($p < 0.001$)を示した。このように、サブクラスでは主要クラスよりも有意な相関が見られ、サブクラス定量の有用性が示された。次に、TG と特定健診の検査項目との相関を示す(図 6)。主要クラスの TG では全体的に



VL, very large; L, large; M, medium; S, small; VS, very small

図 5 主要及びサブクラス(Cho)とメタボ健診項目の相関

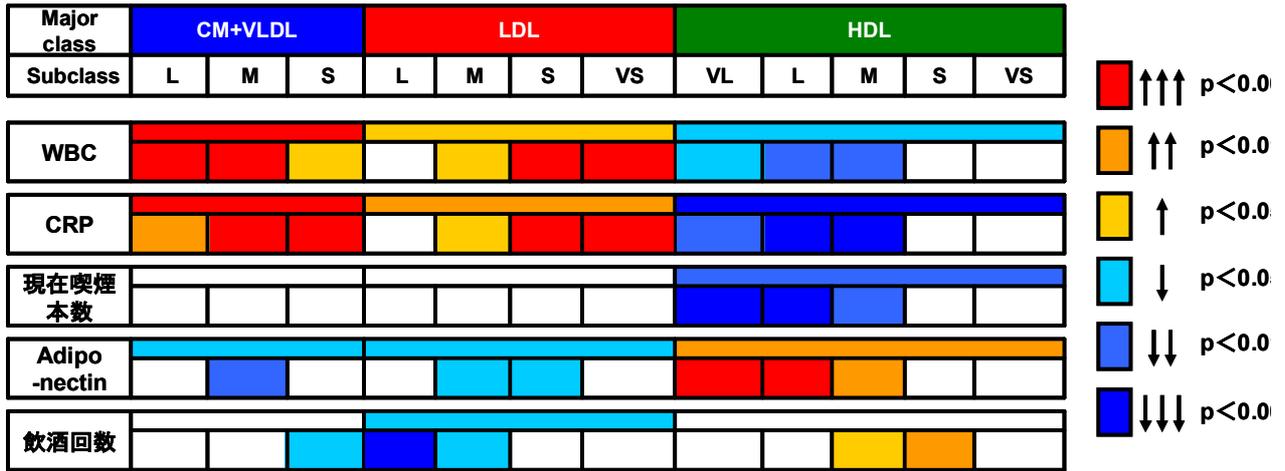


VL, very large; L, large; M, medium; S, small; VS, very small

図 6 主要およびサブクラス(TG)とメタボ健診項目の相関

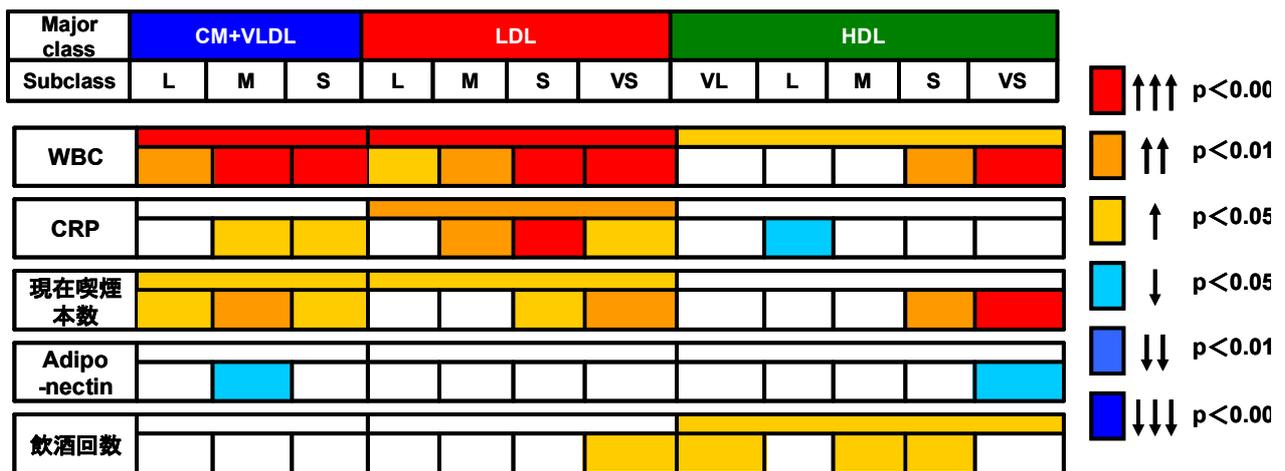
正の相関を示した。Cho との相関とは異なり、腹囲、BMI、体脂肪率のどれも HDL-TG とは有意な相関が見られなかった。各サブクラスの TG では、腹囲、BMI、体脂肪率において、large HDL-TG が有意な負の相関を示した。

このように、HDL-TG に関して主要クラスでは示されなかった相関が、サブクラスにおいて見出すことが可能であった。主要およびサブクラスの Cho と特定健診の検査項目以外のリスクマーカーの相関について考察した(図 7)。



VL, very large; L, large; M, medium; S, small; VS, very small

図 7 主要及びサブクラス(Cho)とその他リスクマーカーの相関



VL, very large; L, large; M, medium; S, small; VS, very small

図 8 主要及びサブクラス(TG)とその他リスクマーカーの相関

Cho において、炎症性マーカーの白血球、CRP では VLDL、LDL と有意な正の相関を示した。特に small および very small LDL-C は LDL 全体よりも有意な正の相関 (p<0.0001) を示す一方、HDL-C は有意な負の相関を示した。一方、アディポネクチンでは、ほかのリスクマーカーと比較して、

全ての主要クラスにおいて相関の正負が逆転した。さらに、白血球、喫煙本数、アディポネクチン、飲酒回数では HDL 全体よりサブクラスの方が有意な相関が得られた。このように、その他のリスクマーカーにおいても主要クラスよりサブクラスの方が有意な相関が見られることが示された。

次に、主要およびサブクラスの TG と特定健診の検査項目以外のリスクマーカーの相関について考察した (図 8)。

白血球、CRP で LDL 全体が有意な正の相関を示した。HDL では、白血球、喫煙本数では HDL 全体よりも small、very small HDL-TG の方がより有意な正の相関を示した。

5. 参考文献

- 1) 岡崎三代、新しい血清リポタンパク質の分析方法：ゲルろ過 HPLC、生物物理化学, 49 巻 4 号 pp 111-118, 2005 年
- 2) 高橋伯夫、メタボリックシンドロームのことがよくわかる本、中経出版、2007 年
- 3) 加瀬澤信彦、遠山和成、島田昌也、望月和樹、合田利尚、人間ドック男性受診者におけるコンピューター断層撮影スキャン腹部皮下および内臓脂肪面積の増減と生活習慣性の関連性、人間ドック、22 巻 (4 号) : 370-377、2007 年
- 4) Eckel RH, Grundy SM, Zimmet PZ. 、 The metabolic syndrome. (review)、Lancet、365 巻 (9468 号) : 1415-1428、2005 年
- 5) Okazaki M., Usui S., Fukui A. Kubota I., Tomoike H., Component Analysis of HPLC Profiles of Unique Lipoprotein Subclass Cholesterols for Detection of Coronary Artery Disease. Clin Chem, 2006; 52(11):2049-2053.

6.. 発表状況

第 48 回日本臨床化学学会年会, “メタボ健診におけるゲルろ過 HPLC 分析法によるリポ蛋白サブクラス定量の有用性”, 光井潤一郎、河本亮介、岡崎三代、高橋美帆、今井利夫、遠山和成、加瀬澤信彦 (2008)

7. 謝辞

この授業を通じて、実際の研究でどのようなことをやり、学会での発表や卒業論文のような論文の読み方、書き方を学べ、非常にいい経験をできたと思います。

このような経験は、普通に大学生生活を送っていたならばできなかったことであり、将来、自身が研究者になったとき、あるいは研究者にならなくとも、常に技術が進歩していき、知識が更新されている医学に身を置く上で、大いに生かせると思います。

最後になりましたが、このような未熟者を快く研究室に入れてくださった岡崎先生、僕をこの企てに誘ってくれた河本君、そして、一緒に学び、一緒に楽しく過ごした研究室のメンバーのみんなに、感謝の意を述べさせていただきます。

CA-180 による apo A I, B, E 及び Lp(a) 測定の 再現性についての考察

医学科 2 年 今井 彩乃

概要

本研究室では 2008 年 9 月頃から小型生化学自動分析装置 (CA-180/古野電気) の今後の使用検討を目的とし、借用という形での測定を行った。小型生化学自動分析装置を用いるにあたり、精度や特性を知るため、apo A I, B, E, Lp(a) の測定精度の検討を行った。

測定時のミスがない場合、apo A I, B, E の測定結果はそれぞれ、 132.45 ± 2.62 mg/dl, 62.00 ± 2.36 mg/dl, 3.19 ± 0.065 mg/dl となった ($n = 114$)。CV 値はそれぞれ、1.97 %, 3.81 %, 2.05 % であった。Lp(a) の測定結果は 11.06 ± 0.377 mg/dl となった ($n = 102$)。CV 値は 3.40 % となった。

サンプル量の不足、試薬の混合といった測定時のミスがあると、測定値にずれが生じるため、これらのミスに注意しなければならない。Apo A I, E, Lp(a) において、サンプルをセットする位置による違いは見られなかった。Apo B に関しては今後の検討が必要である。

東京医科歯科大学の 2008 年度職員一般健康診断を受診したうち、同意を得られた男女 1016 名の血清を対象として、CA-180 を用いて、apo A I, B, E, Lp(a) を測定し、HPLC 法により、血清の主要クラスに含まれる総コレステロール及び中性脂肪を定量した。健診のサンプルについて apo A I と HDL-C 及び apo B と non HDL-C の相関を見ると、相関係数はそれぞれ 0.874, 0.958 となり、いずれも高い相関が見られ、既知の知見に合うことが確かめられた。

1. 目的

自動分析装置は生化学分析において広く用いられている。2008 年 9 月より、当研究室で小型生化学自動分析装置 (CA-180/古野電気) を借用し、測定に用いることができた。この装置を用いるにあたり、精度や特性を知るため、CA-180 を用いた apo A I, B, E, Lp(a) の測定精度を検討した。

CA-180 による apo A I, B, E, Lp(a) の測

定が正しいことを確かめるため、HPLC 法により TC, TG を測定し、apo A I と HDL-C 及び apo B と non HDL-C の相関を検討した。

2. 方法と対象

2.1. 対象

制度管理測定には、デタミナー標準血清 HDL-C 測定用 (協和メデックス) を用いた。

また、実測定の対象として東京医科歯科大学の 2008 年度職員一般健康診断を受診したうち、同意を得られた男女 1016 名の血清を対象とした。

2.2. 方法

Apo A I, B, E, Lp(a)の測定には、小型生化学自動分析装置 (CA-180/古野電気) を用いた。これは、キュベットに試薬 1 とサンプルを分注し、攪拌し、37 °C の恒温槽で 5 分間反応させ、試薬 2 を加え、攪拌し、37 °C の恒温槽で 5 分間反応させたのち、吸光度を測定する装置である。試薬は、アポ A-I オート・N「第一」(積水メディカル)、アポ B オート・N「第一」(積水メディカル)、アポ E オート・N「第一」(積水メディカル)、Lp(a)ラテックス「第一」(積水メディカル) を用いた。このとき、apo A I の測定では、サンプルを 2.4 μ l、試薬 1 を 240 μ l、試薬 2 を 80 μ l 分注し、主波長 600 nm と副波長 700 nm で測光した。apo B の測定では、サンプルを 2.4 μ l、試薬 1 を 240 μ l、試薬 2 を 80 μ l 分注し、主波長 340 nm と副波長 700 nm で測光した。apo E の測定では、サンプルを 8 μ l、試薬 1 を 240 μ l、試薬 2 を 80 μ l 分注し、主波長 340 nm と副波長 700 nm で測光した。Lp(a)の測定では、サンプルを 4 μ l、試薬 1 を 240 μ l、試薬 2 を 80 μ l 分注し、主波長 600 nm で測光し、副波長は使用しなかった。

デタミナー標準血清 HDL-C 測定用 (協和メデックス) を解凍し、200 μ l ずつ 3 つのカップに分注した。3 つのカップを検体保管庫の 1, 21, 40 の位置にセットし、間に別のサンプルをセットした。ただし、124

～126 番目を測定するときには、1, 21, 27 の位置にセットし、28～40 の位置にはサンプルをセットしなかった。セットしたサンプルの apo A I, B, E, Lp(a)を上記の設定で CA-180 を用いて 1 回で測定した。これを連続した 14 日間の間に 43 回行った。

健診で得られた血清サンプルについて、CA-180 を用いて、apo A I, B, E, Lp(a)を測定し、HPLC 法により、血清の主要クラスに含まれる総コレステロール及び中性脂肪を定量した。

HPLC 測定は、全自動リポ蛋白分析装置 (SC-8020/東ソー) を用いた。カラムは LDL 分画の分離能を向上させた試験開発品 (内径 7.8 mm、長さ 30 cm) を用いた。血清 5 μ l を一定間隔で注入した。溶離液 (0.3 M 酢酸ナトリウム、50 mM トリス酢酸緩衝液、pH 6.8) を一定の流速で送液し、粒子サイズによって分離分析した。このとき、流速 0.7 ml/min、13 分間隔 (n = 73) または流速 1.0 ml/min、9 分間隔 (n = 943) で測定した。カラムからの溶出液を 2 つの経路に分岐させ、オンライン酵素反応 (HPLC 専用 TC、TG 酵素/協和メデックス提供) により、TC 及び TG を同時に検出した。TC、TG の定量は脂質濃度既知の標準血清を用い、クロマトパターンの全面積を基準に行った。リポ蛋白主要クラスの TC、TG 各濃度は、ガウス近似により分離したピーク面積 (自家製プログラム) により算定した。

3. 結果と考察

図 1 に標準血清 (n = 129) の apo A I, B, E, Lp(a)の測定結果を示す。また、得られ

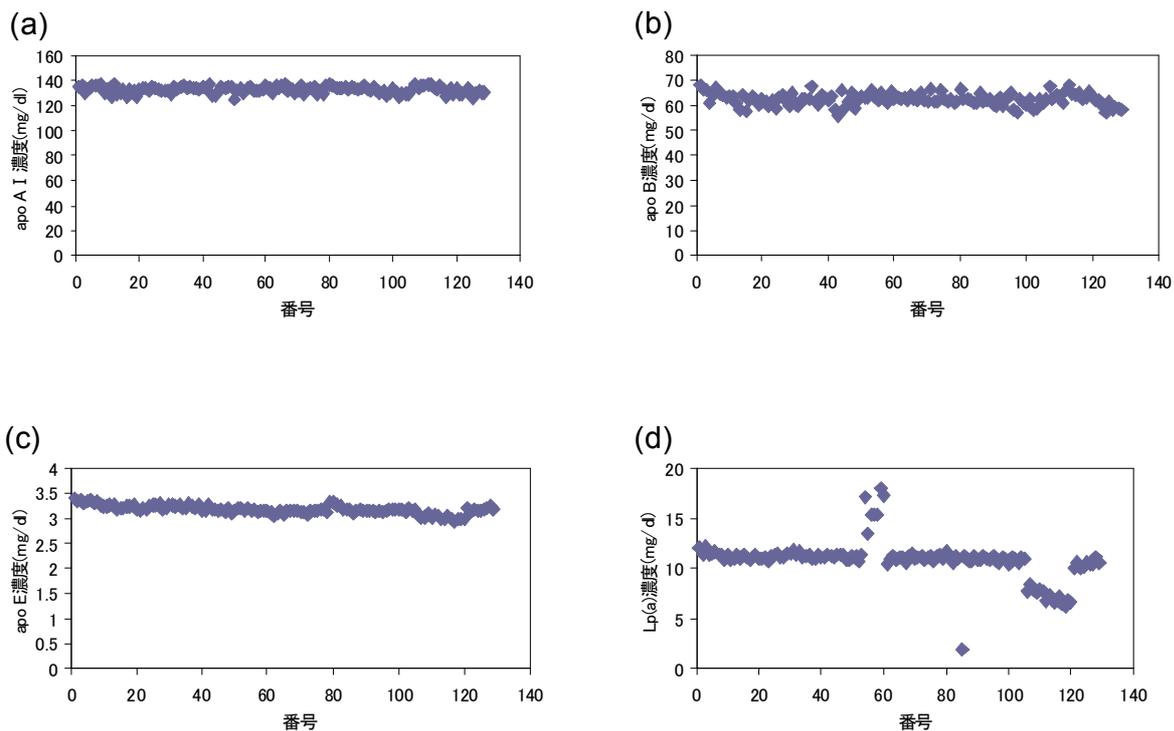


図 1. apo A I (a), B (b), E (c), Lp(a) (d)の濃度

たタイムコースの一例として、1 番目の測定における apo A I, B, E, Lp(a)のタイムコースを図 2 に示した。全データにおける apo A I, B, E, Lp(a)濃度の平均と標準誤差はそれぞれ、 132.61 ± 2.67 mg/dl, 62.26 ± 2.42 mg/dl, 3.17 ± 0.085 mg/dl, 10.80 ± 1.99 mg/dl となった。それぞれの CV 値は、2.01 %, 3.89 %, 2.68 %, 18.39 %であった。

106~120 番目の測定では、apo E は低値 (3.01 ± 0.039 mg/dl) となり、Lp(a) は低値 (7.17 ± 0.64 mg/dl) となった。一方、apo A I, B は、それぞれ 133.88 ± 2.84 mg/dl, 64.22 ± 1.95 mg/dl となり、いずれも大きなずれは見られなかった。106~120 番目の測定で apo E 及び Lp(a) が低値となった原因として、直前の測定でサンプル量が不足したことが考えられる。サン

プル量が足りず、空打ちをしたため、サンプルピペットの精度が下がり、それ以降の測定にずれが生じたと考えられる。

54~60 番目の測定では、Lp(a) は高値 (15.95 ± 1.53 mg/dl) となった。しかし、apo A I, B, E は、それぞれ 133.15 ± 1.74 mg/dl, 63.04 ± 1.62 mg/dl, 3.16 ± 0.029 mg/dl となり、いずれも大きなずれは見られなかった。54~60 番目の測定で Lp(a) が高値となった原因として、試薬の混合が考えられる。Lp(a) の試薬として、Lp(a) ラテックス「第一」(積水メディカル) を用いていたが、試薬補充の際、誤って Lp(a) オート「第一」(積水メディカル) を混入させてしまった。

85 番目の測定では、Lp(a) は 1.87 mg/dl となった。この原因は不明であるが、同時に測定した 86, 87 番目の測定ではそれぞれ

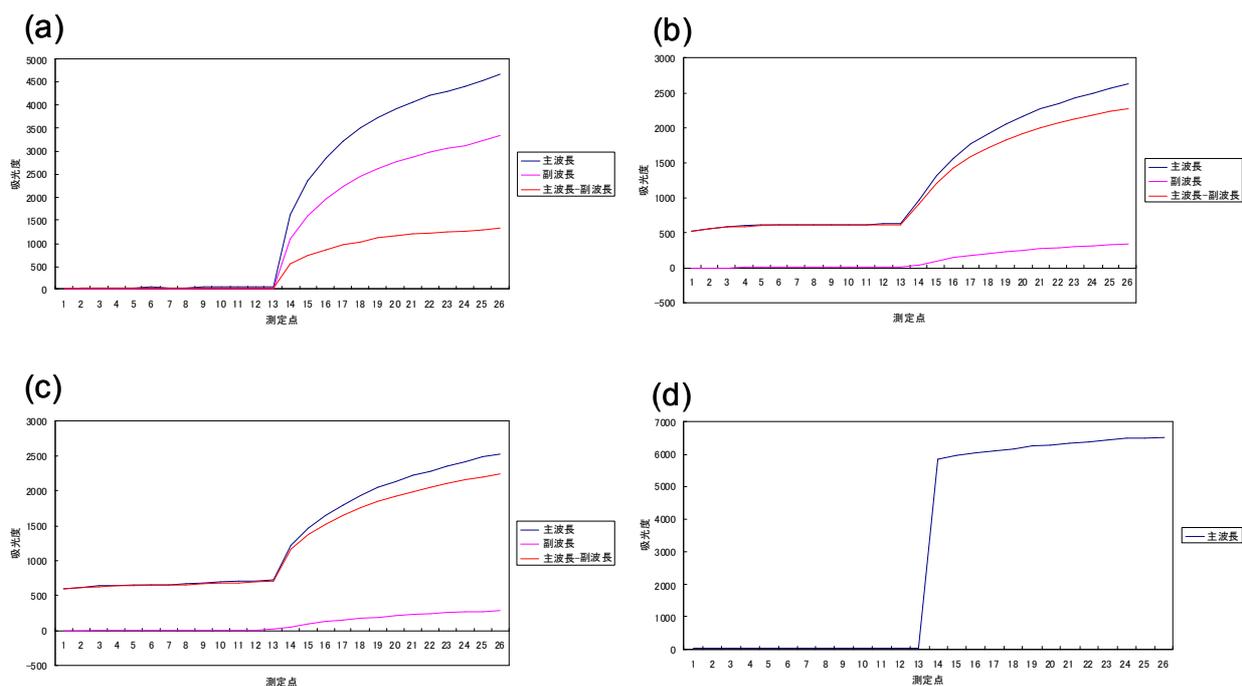


図 2. 1 番目の測定における apo A I (a), B (b), E (c), Lp(a) (d)のタイムコース

11.20 mg/dl, 10.73 mg/dl という値が得られている。また、apo A I, B, E は、それぞれ 133.98 ± 1.63 mg/dl, 62.20 ± 2.04 mg/dl, 3.15 ± 0.046 mg/dl となり、いずれも大きなずれは見られなかった。

106~120 番目を除いた場合(n = 114)、apo A I, B, E, Lp(a)の測定結果はそれぞれ、 132.45 ± 2.62 mg/dl, 62.00 ± 2.36 mg/dl, 3.19 ± 0.065 mg/dl, 11.28 ± 1.56 mg/dl となった。それぞれの CV 値は、1.97 %, 3.81 %, 2.05 %, 13.83 %であった。また、106~120 番目に加えて、52~60 番

目及び 85~87 番目を除いた場合(n = 102)、Lp(a)の測定結果は 11.06 ± 0.377 mg/dl となり、CV 値は 3.40 %となった。

以下では、測定時のミスがない場合について考える。すなわち、apo A I, B, E では 106~120 番目を除いた場合について、Lp(a)では 52~60 番目、85~87 番目、106~120 番目を除いた場合について考える。

Apo A I, B, E, Lp(a)のサンプルをセットした位置ごとに分けた測定結果の値を表 2 に示す。ただし、1, 21, 27 の位置にセットした 124~126 番目の値は除いてある。

表 1. apo A I, B, E, Lp(a)の測定結果

	平均±標準誤差(mg/dl)	CV 値(%)	平均±標準誤差(mg/dl)	CV 値(%)
Apo A I	132.61 ± 2.67^a	2.01 ^a	132.45 ± 2.62^b	1.97 ^b
Apo B	62.26 ± 2.42^a	3.89 ^a	62.00 ± 2.36^b	3.81 ^b
Apo E	3.17 ± 0.085^a	2.68 ^a	3.19 ± 0.065^b	2.05 ^b
Lp(a)	10.80 ± 1.99^a	18.39 ^a	11.06 ± 0.377^c	3.40 ^c

^a n = 129, ^b n = 114, ^c n = 102

表 2. 位置ごとの apo A I , B, E, Lp(a)の濃度

位置	1	21	40
Apo A I	132.76 ± 2.42 ^a	132.11 ± 2.64 ^a	132.70 ± 2.63 ^a
Apo B	61.22 ± 2.16 ^a	63.82 ± 1.72 ^a	61.22 ± 2.10 ^a
Apo E	3.20 ± 0.060 ^a	3.18 ± 0.069 ^a	3.20 ± 0.069 ^a
Lp(a)	10.97 ± 0.428 ^b	11.15 ± 0.246 ^b	11.15 ± 0.364 ^b

(mg/dl)

^a n = 37, ^b n = 33

Apo A I , B, E, Lp(a)のそれぞれにおいて、一元配置の分散分析を行うと、apo A I , E, Lp(a)ではいずれも $p > 0.05$ となり、有意な差は見られなかった。Apo B では $p < 0.001$ となり、有意な差が見られた。その中で、1と21及び21と40の間で $p < 0.001$ となり、有意な差が見られた。1と40でほぼ同じ値となり、21で高値となる。装置の性質上、常に位置番号の小さいサンプルから順に測定されていくため、測定中に apo B の濃度が上がり、再び下がるということになる。しかし、そのようなことが起きたとは考えにくいいため、21にセットした apo B の値が高くなった原因は不明である。

健診サンプルの測定結果を表 3 に示す。Apo A I と HDL-C 及び apo B と non HDL-C の相関が取れることが知られてい

る。今回の健診サンプルの測定結果について、apo A I と HDL-C 及び apo B と non HDL-C の相関を見ると、図 3 のようになった。それぞれの相関係数は、0.874, 0.958 となり、いずれも高い相関が見られた。

4. まとめ

CA-180 による測定では、測定時のミスがなければ、apo A I , B, E, Lp(a)はいずれも 4 %以下の誤差に収まることが分かった。

測定時のミスとして、サンプル量の不足、試薬の混合などが考えられるので、サンプルの分注量、補充する試薬の種類に注意を払わなければならない。

空打ちをした場合、管理血清による値が正常に戻ってから再測定をする必要があり、

表 3. 健診サンプル(n = 1016)の測定結果

	最小値	最大値	平均値	標準偏差
apo A I (mg/dl)	25.68	227.07	149.75	19.46
apo B (mg/dl)	18.72	160.85	78.02	20.86
apo E (mg/dl)	1.23	9.93	3.80	1.13
Lp(a) (mg/dl)	.02	104.68	12.54	14.68
TC (mg/dl)	111.00	364.80	195.83	33.41
(CM+VLDL)-C (mg/dl)	3.89	154.71	25.46	16.29
LDL-C (mg/dl)	31.66	283.88	110.75	30.06
HDL-C (mg/dl)	12.03	150.64	71.09	16.92

同時に測定した全ての項目に対して再測定の必要がある。試薬を混合した場合、適切な試薬を用いて再測定をすればよく、同時に測定した別の項目のデータは再測定する必要はない。

Apo A I, E, Lp(a)において、サンプルをセットする位置による違いは見られなかった。Apo Bに関しては今後の検討が必要である。

健診のサンプルを用いて apo A I と HDL-C 及び apo B と non HDL-C の相関を見ると、いずれも高い相関が確認され、既知の知見に合うことが確かめられた。

5. 文献

- 1) Okazaki M, Usui S, Ishigami M, et al. Identification of unique lipoprotein subclasses for visceral obesity by component analysis of cholesterol profile in HPLC. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005;25:578-84.
- 2) Wu LL, Warnick GR, Wu JT, Williams RR, Lalouel JM. A rapid micro-scale procedure for determination of the total lipid profile. *Clin Chem*,1989;35: 1486-94.

6. 謝辞

本論文は東京医科歯科大学教養部岡崎HPLC研究室においておこなった研究成果をまとめたものです。

私は、後期の臨床化学演習から授業に参加しました、9月末から10月初旬に行われた本学の職員一般健診の大量のサンプルについて、小型の自動分析計 (CA-180)を用

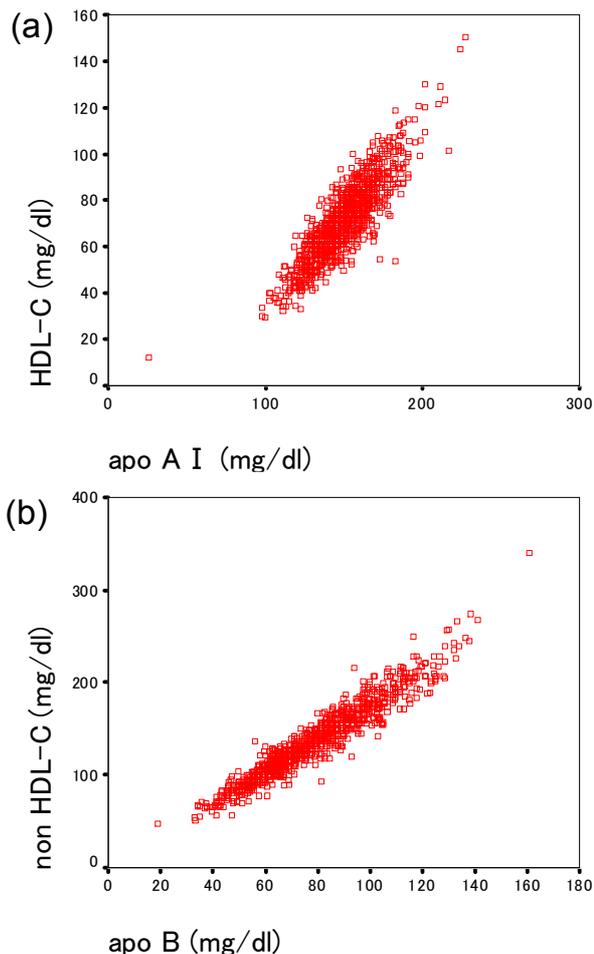


図 3. 健診サンプルの apo A I と HDL-C (a)、apo B と non HDL-C (b)の相関

いて、アポリポ蛋白の分析を行なう機会に恵まれました。装置の使い方の説明を受けたのが9月27日(土)でした。自動分析計を使うことが楽しくなって、土日に研究室に通うようになりました。また学会発表は経験しませんでした。10月11日に横浜パシフィコで開催された日本臨床検査自動化学会第40回大会に参加し、一緒にこのコースを履修した仲間の発表を聞き、また大きな展示会場ではオーソ・クリニカル・ダイアグノスティックスの大型自動分析装置を見学しました。また後期のコース履修の前に、岡崎研究室のラボのメンバーと薬科

と一緒に出かけたり、楽しい思い出が一杯の半年でした。

研究室のメンバーである、高橋さん、石垣さんには共同研究者としてお世話になりました。同期の河本君、杉原君、成相さん、光井君、山鹿さん達とも一緒に楽しい研学生活を経験できました。

お世話になった全ての方々に感謝の意を表し、謝辞とさせていただきます。

高気圧酸素治療による リポタンパクプロファイルの変化

医学科 2 年 杉原 潤

概要

高気圧酸素治療は、密閉したチャンバー内で、患者に高気圧酸素を曝露することにより、血中酸素濃度を高め、代謝を促進する治療法である。これまで高気圧酸素治療による脂質代謝の促進は報告されているが、サブクラスまで言及した詳細なプロファイリングの報告はない。

本研究では、高気圧酸素治療における脂質代謝の詳細なプロファイリングを目的とした。高気圧治療前後の血液を 2 回にわたり採取し、ゲルろ過 HPLC 法を用いて血中脂質の濃度を測定した。得られたデータから高気圧酸素治療によるリポ蛋白の主要クラス (CM, VLDL, LDL, HDL) においての変化が確認された。さらに、得られたプロファイルをガウス分離により詳細に検討した。サブクラスの詳細な検討の結果、高気圧酸素治療により、LDL, HDL に含まれる中性脂肪が分解されることにより小型化することが明らかになった。治療間にはこれらの変化が元に戻ることから、高気圧酸素治療により脂質代謝の活性化が観察された。

1. 目的

高気圧酸素治療とは、患者を 2 絶対気圧以上の環境下で 100% 酸素に 60 分以上曝露する治療法である。(図 1) 高気圧酸素療法は、一酸化炭素中毒、減圧症、骨髄炎、虚血性疾患、スポーツ外傷の治療に加え、近年では脂質代謝の促進を利用して美容目的など、幅広い用途に利用されており、その需要は増加傾向にある¹⁾。

高分圧酸素への曝露は、血中酸素分圧を上昇し、血管を拡張することにより多くの酸素 (特に溶存酸素) が末梢の細胞に運搬・供給され、細胞の代謝が改善・向上することが報告されている²⁾。

また、高分圧酸素への曝露により、血管壁に定着したコレステロールが減少する、酸化型の脂質が減少するなどの変化が報告されている³⁾。

このように、高気圧酸素への曝露により血中脂質の代謝が増す可能性が示唆されている。一方で、詳細なりポ蛋白プロファイリングに関する報告はなされていない。

そこで、本研究は、高気圧酸素療法による HPLC リポ蛋白プロファイルの変化の検討を目的とした。



図 1. 高気圧酸素治療用チャンバー (a)大型、(b)一人用。

2. 方法と対象

2.1. 対象

東京医科歯科大学医学部附属病院高気圧治療部で受診した減圧症患者のうち、研究に対する同意の得られた 6 名（男女各 3 名、 34.8 ± 4.3 歳）に対し、高気圧酸素治療（連続した 2 日間で計 2 回、 $1.9 - 2.8$ ata の高気圧酸素に 1 回 5 時間曝露）を行った。1 日目治療前後の血清をステージ 1、2、2 日目治療前後の血清をステージ 3、4 とした。

2.2. 方法

得られた血清の、主要クラス及びサブクラスに含まれる総コレステロール(TC)及び中性脂肪(TG)を、HPLC 法により定量した。

HPLC 測定は、全自動リポ蛋白分析装置(SC-8020/東ソー)を用いた。カラムは LDL 分画の分離能を向上させた試験開発品(内径 7.8 mm、長さ 30 cm)を用いた。血清 $5 \mu\text{l}$ を 13 分間隔で注入した。溶離液(0.3 M 酢酸ナトリウム、 50 mM トリス酢酸緩衝液、 $\text{pH } 6.8$)は流速 0.7 ml/min で送液した。カラムからの溶出液を 2 つの経路に分岐させ、オンライン酵素反応(HPLC 専用 TC、TG 酵素/協和メデックス提供)により、TC 及び TG を同時に検出した。

脂質濃度既知の標準血清の総面積を基準として各パターンの総面積から濃度を求めた。さらに、ガウス近似に基づいた自家製プログラムを用いて、粒子サイズで定義されたリポ蛋白主要クラス及び、LDL と HDL サブクラスの各濃度を、またピーク検出時間から主要クラスの平均粒子サイズを求めた。

2.3. 統計解析

測定値は Windows 用統計解析ソフト SPSS Manager10.0 により分析した。統計分析は t 検定を用いた。判定は $p < 0.05$ を有意差ありとした。表記については平均 \pm 標準誤差 (mean \pm SE) とした。

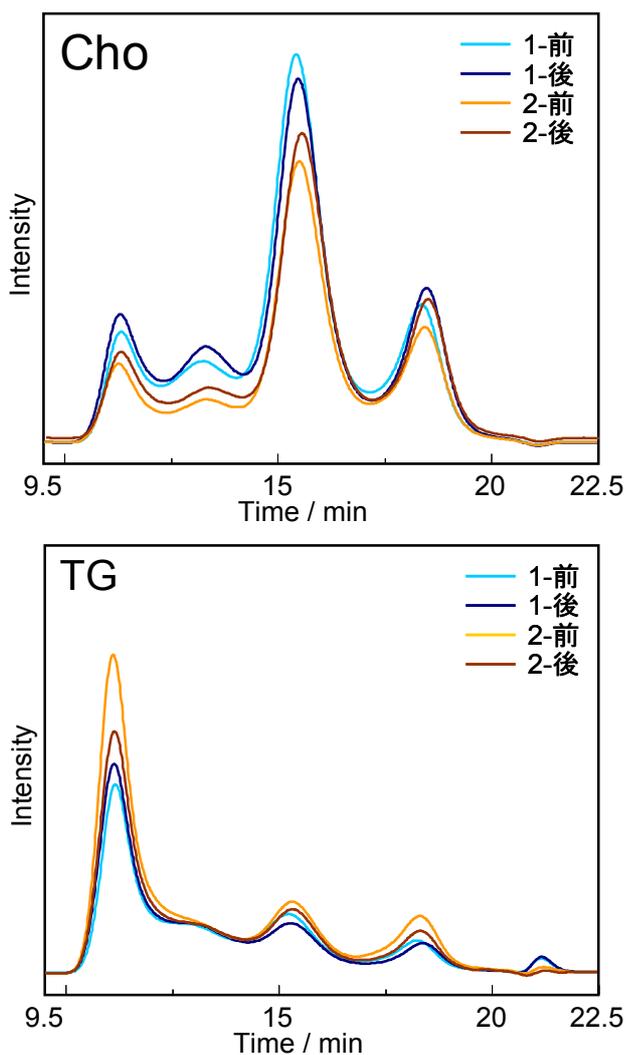


図2. 高気圧酸素治療による HPLC パターンの変化

3. 結果

図2に高気圧酸素治療による HPLC パターンの変化を示す。パターンから治療前後、治療間でリポ蛋白のサイズや量が変化している様子が観察された。これらのパターンをガウス近似によりピーク分離し、リポ蛋白主要クラスおよびサブクラスを定量した。

各主要クラスのステージごとの平均値の変化を図3に示す。

治療前後(治療中)において、LDL, HDL-

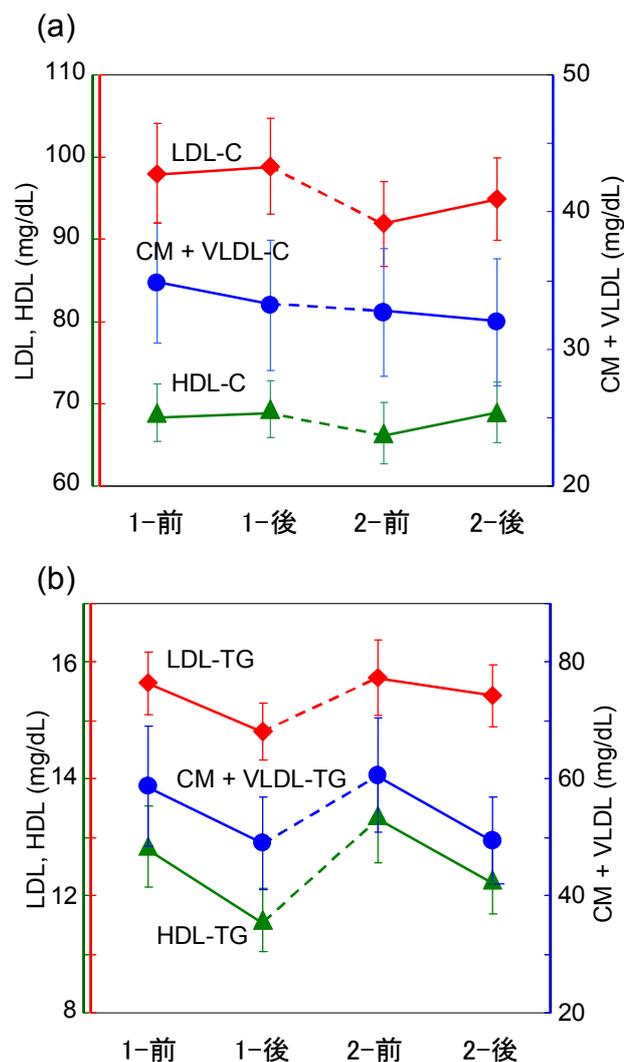


図3. 高気圧酸素治療による主要クラスのコレステロール量(a)および中性脂肪量(b)の変化

コレステロールの増加、CM+VLDL-コレステロール、中性脂肪の減少が観察された。一方で、1日目と2日目の間(治療間)においては、LDL、HDLコレステロールの減少と、中性脂肪の増加という、治療中とは逆の傾向が観察された。

次に、各サブクラスの治療1日目の前後、1日目と2日目の間、2日目の前後での濃度変化を表1、2に示す。有意差が観察されたサブクラスは網掛けで表示した。

主に、CM+VLDL の中性脂肪、小型

	1→2	2→3	3→4
Large VLDL	-1.004±1.200	0.776±1.332	-1.222±0.658
Medium VLDL	-0.651±0.849	-0.981±0.789	0.499±0.332
Small VLDL	0.012±0.467	-0.313±0.548	0.012±0.291
Large LDL	0.737±0.959	-1.131±0.461	-0.056±0.241
Medium LDL	0.170±0.672	-2.196±0.577	0.969±0.342
Small LDL	0.103±0.336	-2.104±0.490	1.202±0.321
Very Small LDL	-0.088±0.328	-1.553±0.375	0.859±0.301
Very Large HDL	-0.308±0.510	0.004±0.513	-0.638±0.195
Large HDL	-0.106±0.259	-0.565±0.484	-0.087±0.211
Medium HDL	-0.404±0.544	-0.125±0.513	0.978±0.246
Small HDL	0.747±0.393	-1.326±0.275	1.591±0.304
Very Small HDL	0.507±0.206	-0.875±0.127	0.710±0.153

(mg/dL)

表1. 各サブクラスのコレステロール濃度変化

p < 0.05
 p < 0.01
 p < 0.001

	1→2	2→3	3→4
Large VLDL	-6.393±4.917	8.438±4.874	-8.848±3.789
Medium VLDL	-2.283±1.099	1.870±0.729	-1.584±0.759
Small VLDL	-1.067±0.458	1.332±0.411	-0.775±0.421
Large LDL	-0.304±0.200	0.428±0.222	-0.152±0.222
Medium LDL	-0.569±0.145	0.419±0.241	-0.003±0.166
Small LDL	-0.386±0.113	0.381±0.243	-0.149±0.125
Very Small LDL	-0.386±0.181	0.601±0.293	-0.309±0.228
Very Large HDL	-0.399±0.168	0.564±0.167	-0.317±0.163
Large HDL	-0.618±0.184	0.805±0.203	-0.618±0.177
Medium HDL	-0.955±0.319	1.072±0.276	-0.551±0.182
Small HDL	-0.499±0.210	0.850±0.304	-0.434±0.149
Very Small HDL	-0.032±0.154	0.251±0.128	-0.254±0.103

(mg/dL)

表2. 各サブクラスの中性脂肪濃度変化

p < 0.05
 p < 0.01
 p < 0.001

LDL-C、小型 HDL-C、大型 HDL の中性脂肪において有意な変化が観察された。

3. 考察

以上の現象を、脂質代謝の観点から考察した。図4に現在知られている代謝モデルと、関連する酵素、酵素の活性化により起こると考えられる変化のスキームを示した。

治療前後の中性脂肪の減少は、LPL、HTGL が活性化されたことにより、中性脂肪の分解が促進されることによるものと推測される。これと同様に VLDL の代謝産物である LDL のコレステロールの減少も LPL、HTGL の活性化に由来すると推測される。

一方、治療間の変化については ABCA1 と LCAT の活性化によるものと推測される。ABCA1 と LCAT の働きにより小型 HDL 内にコレステロールが取り込まれ、HDL が大型化する。

治療中の大型 HDL の中性脂肪の増加は、CETP の働きによるものと考えられる。CETP の活性化により、成熟した大型 HDL 中のコレステロールが中性脂肪と入れ替り、結果として大型 HDL における TG の増加が生じるものと推測される。

これらの変化から、2回に渡る治療により、血中の中性脂肪の代謝経路に関わる酵素が活性化し、全体の代謝が促進されていると考えられる。

以上の考察は、ゲルろ過 HPLC による血中リポ蛋白主要クラスおよびサブクラスの変化から、これまでに報告されている事実を元に推察された。しかし、ゲルろ過 HPLC のみのデータでは十分な証明とはいえない。今後、LPL や CETP などの酵素の活性をヘパリン静注など別の角度から評価すること

Rabbits

7. 発表状況

第 48 回日本臨床化学会年会, “高気圧酸素治療による HPLC リポ蛋白プロファイルの変化”, 杉原潤, 山鹿絵美, 河本亮介, 岡崎三代, 鈴木直子, 山本和雄, 金剛寺純子, 山見信夫(2008)

8. 謝辞

この授業を通じて、実際の研究でどのようなことをやり、学会での発表や卒業論文のような論文の読み方、書き方を学べ、非常にいい経験をできたと思います。

このような経験は、普通に大学生活を送っていたならばできなかったことであり、将来、自身が研究者になったとき、あるいは研究者にならなくとも、常に技術が進歩していき、知識が更新されている医学に身を置く上で、大いに生かせると思います。

最後になりましたが、このような未熟者を快く研究室に入れてくださった岡崎先生、僕をこの企てに誘ってくれた河本君、そして、一緒に学び、一緒に楽しく過ごした研究室のメンバーのみんなに、感謝の意を述べさせていただきます。

全身性の炎症による血中の免疫系細胞の増加

医学科 2年 鈴木里彩（共同実験者 鈴木健人）

Abstract

この実験の目的は、キンギョに全身性の炎症を引き起こし、それに伴って血中の免疫系細胞数が変化するかどうか、するならばどのように変化するか調べることであった。ウロコを一度引き抜き、ホルマリン固定（36.0~38.0%ホルマリン溶液 10 倍希釈、10 分間）した後に洗浄し、同じ位置に再度移植すると部分的な炎症を引き起こすことができる。これを多数行うことで全身性に炎症を起こし、1 日後、3 日後、4 日後、6 日後に採取した血液中の免疫系細胞数を数えた。すると、リンパ球の数に大きな変化は見られないが、顆粒白血球の数が 1~4 日後に有意に増加していた。また顆粒白血球数は、3~4 日後にもっとも多く、6 日後までにゆるやかに減少していることが分かった。この結果から、再移植の操作が免疫系細胞に影響を与えており、確かに全身性の炎症を引き起こしていること、免疫系細胞の増加は、体表に著しい変化の現れる 1 週間後よりやや前に起こっていることがいえる。また、外部の異物に対してははじめに反応するのは顆粒白血球であることが推測される。

1, Introduction

メラトニンは、明暗周期に同調して、脊椎動物の松果腺から分泌されるホルモンである。近年、メラトニンが持つ効果について研究が進められ、免疫システムへの関与が指摘されてきた。たとえば、哺乳類や鳥類においては、メラトニンが自然免疫および獲得免疫を共に刺激し、抗体価、NK 細胞活性、サイトカインの放出、リンパ球の増殖、抗原提示、顆粒白血球・マクロファージの数などに影響を与えることが示されている。また、魚類においては、一部の魚の液性自然免疫に光周期が影響しており、非常に高い濃度ではメラトニンが *in vitro* で細胞性免疫を調節することが報告されている。(Alberto Cuesta, Rebeca Cerezuela, M. Angeles Esteban and Jose Mesequer, 2008) そこで、キンギョを用いて、魚類の免疫応答に対し、メラトニンが *in vivo* でどのように作用するのか検討したいと考えた。そのためにはまず、キンギョの免疫システムを効率的に活性化する方法を検証する必要がある。

キンギョをはじめとする魚類に炎症刺激を与えると、局所の血圧上昇、静脈の拡張、血管内皮細胞間の間隙の拡大が起こり、各種免疫系細胞が組織内に浸潤、これが赤みや腫れとして観察される。また、キンギョの免疫系の指標となる血液中の免疫系細胞には以下のようなものがある。まず、急速に集合するのは好塩基球であり、その後数時間から数日の間に好中球が出現する。好中球に遅れ、リンパ球、マクロファージの集合が起こる。キンギョでは好酸球はほとんど見られない。(会田勝美、魚類生理学の基礎、2002) それぞれの免疫系細胞の機能はよく分かっていないが、炎症刺激に対し、これらの免疫系細胞数が血中で変化することが示されれば、炎症を起こすことでキンギョの免疫応答を誘導できることになる。すると、メラトニンを与えた場合の、炎症刺激に対する免疫応答の様子の変化を検討することができる。よって、本実験ではまず、炎症刺激によって免疫系細胞の血中濃度がどのように変化するか、あるいはしないのかを検討した。

2, Materials and methods

2.1. 動物

近日中に実験に使用された痕跡、すなわち採血痕や移植痕のない、だいたい同じ大きさのキンギョ 5 匹を、予備のキンギョの水槽から選んだ。実験開始後は小さな丸い水槽で 1 匹ずつ飼育した。餌は一日一回とし、光は日中電気をつけ、夕方に消すという周期にした。コントロール群のキンギョも同様の条件を満たすものを選ぶが、採血する日ごとに予備のキンギョの水槽から無作為に選んで使用した。

2.2. 炎症刺激

キンギョの左側面から、一列につき 10 枚、一列おきに 4 列、計 40 枚のウロコを、ピンセットを用いて抜いた。ホルマリン溶液 (36.0-38.0%) を 10 倍に希釈、48 傑プレートに $500 \mu\text{l}/\text{cell}$ ずつ入れたものを用意し、ウロコを 1 枚/cell ずつ浸し、10 分間放置した。10 分後、ホルマリン溶液そのものによる皮膚の変性を防ぐため、一枚ずつ多量の蒸留水が入ったビーカーでゆすぎ、抜いた個所と同じポケットに再移植した。

2.3. 採血・標本作製

1 日後、3 日後、4 日後、6 日後のそれぞれにおいて、各個体から 0.1ml の血液を採取し、1 個体につき 3 枚の血球標本作製した。染色は、以下のギムザ染色を用いて行った。即ち、5 分間メタノール (純度 99.8%) で固定した後十分に乾燥し、30 分間ギムザ染色液に浸す。水道水で洗い、よく乾かしてから観察に用いた。

2.4. 血球の数え方

光学顕微鏡を用いて、200 倍の倍率で観察した。各個体につき、無作為に 10 画面を選び、 1280×1024 の画面サイズでキャプチャーした。各個体における血球数は、基本的にこの 10 画面の合計値で代表させている。ただし、全体の血球数は膨大であったため、画面全体の血球の散らばりを反映した 160×128 の部分のみ数え、64 倍して全体の血球数とした。

免疫応答の指標となる免疫系細胞としては、リンパ球と顆粒白血球それぞれについて、画面全体で個数を数えた。ただし、染色性にムラがあり、標本によって見え方が異なる場合もあったため、染色によっては見分けにくくなる好塩基球・好中球はひとまとめに顆粒白血球として数えている。

2.5. コントロール群

近日中に実験操作された痕がなく、実験群とほぼ同じ大きさのキンギョを使用した。ただし、炎症刺激を与える移植操作は行わず、飼育環境も広い水槽であったため、条件は実験群とかなり異なっている。

2.6. データ処理

2.4. で述べたように、10 画面の合計値を一個体の値として用いた。実験群の 1, 3, 4, 6 日後それぞれについて $n=5$ として平均、標準誤差を求めた。コントロール群に対しては移植操作を行っていないので、日付は区別せず、5 個体について同様の処理を行う。実験群とコントロール群の全血球に対する免疫系細胞の割合の母分散は等しいと仮定し、帰無仮説；コントロール群と実験群で、免疫系細胞が全血球に占める割合に差はない、としてスチューデントの T 検定を用いて統計処理をした。

3, Results

3.1. リンパ球数の推移

Table.1 リンパ球の全血球中に占める割合

	平均	標準誤差
1日後	1.2%	0.0013
3日後	1.6%	0.0013
4日後	0.6%	0.0069
6日後	0.8%	0.0019
コントロール	1.8%	0.0049

Figure.1

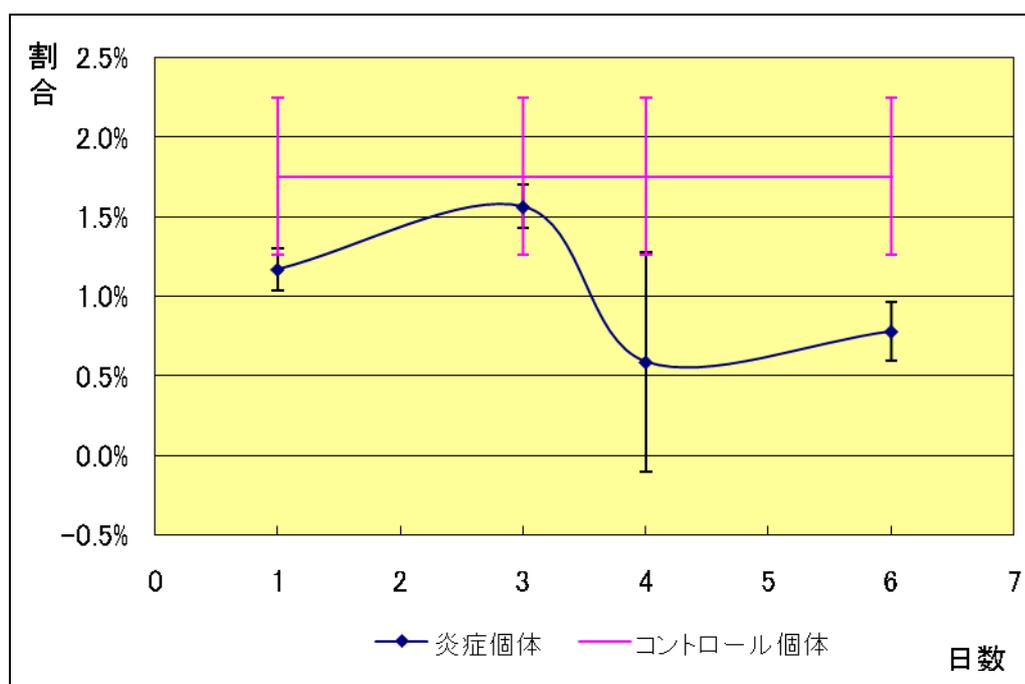


Table.1 をグラフに表したものが Figure.1 である。グラフの曲線は血球の割合の平均値を緩やかにつないだものであり、ポイント両側の線分は標準誤差を示す。コントロール群には操作を行っていないので日数は関係ないが、考察のため 1, 3, 4, 6 日後のみ標準誤差を示した。炎症刺激を与えた後のいずれの日も、コントロール群との間に有意差は認められない。また、4 日後の標準誤差が非常に大きく、実験群のリンパ球数の推移もほとんど見られないと言える。

3.2. 顆粒白血球数の推移

Table.2 顆粒白血球の全血球中に占める割合

	平均	標準誤差
1日後	1.1%	0.0033
3日後	1.3%	0.0024
4日後	0.8%	0.0018
6日後	0.3%	0.0009
コントロール	0.2%	0.0007

Figure.2

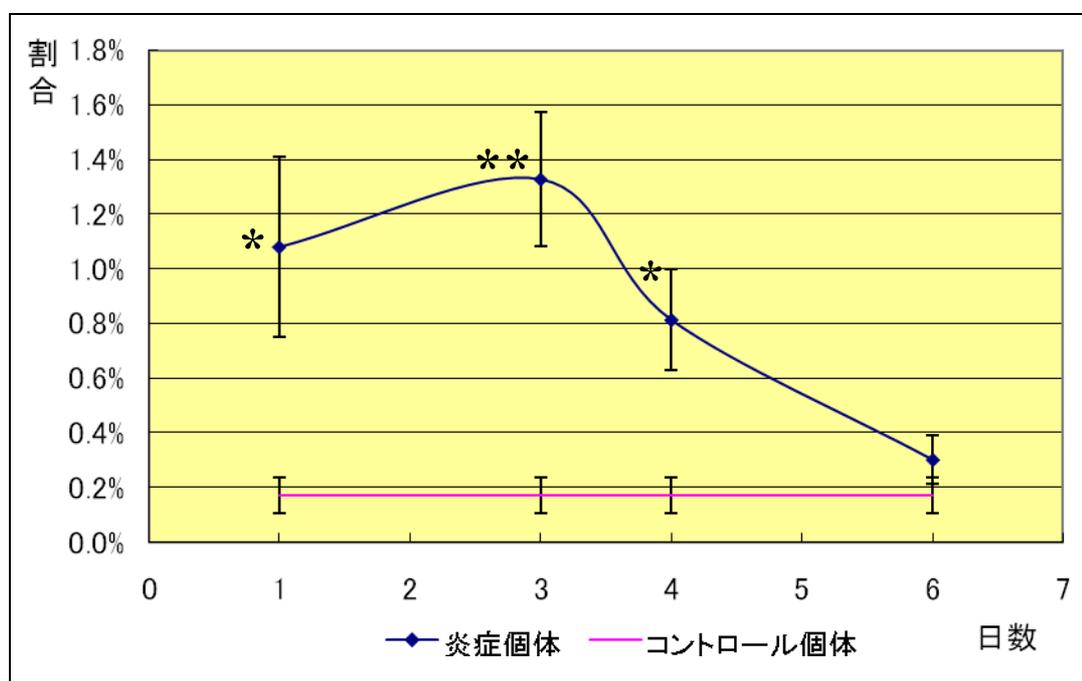
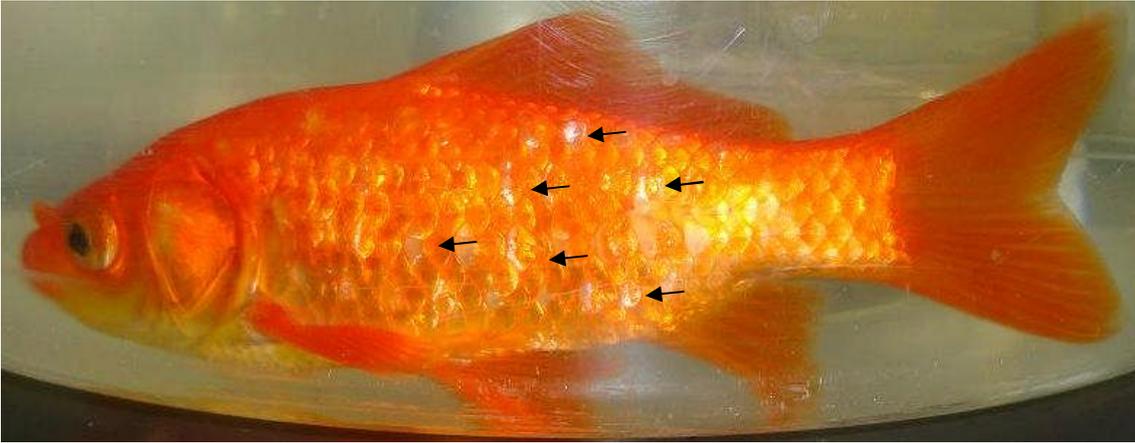


Table.2 をグラフに示したものが Figure.2 である。グラフの曲線は血球の割合の平均値を緩やかにつないだものであり、ポイント両側の線分は標準誤差を示す。コントロール群には操作を行っていないので日数は関係ないが、考察のため 1, 3, 4, 6 日後のみ標準誤差を示した。* コントロール群との間に有意差が見られることを示す ($P<0.05$) ** コントロール群との間に有意差が見られることを示す ($P<0.01$) また、グラフの概形から、顆粒白血球が全血球に占める割合は 3 日後頃ピークを迎え、その後ゆるやかに減少し、6 日後頃にはもとの水準まで戻っていく様子が読み取れる。

3.3. 炎症の様子

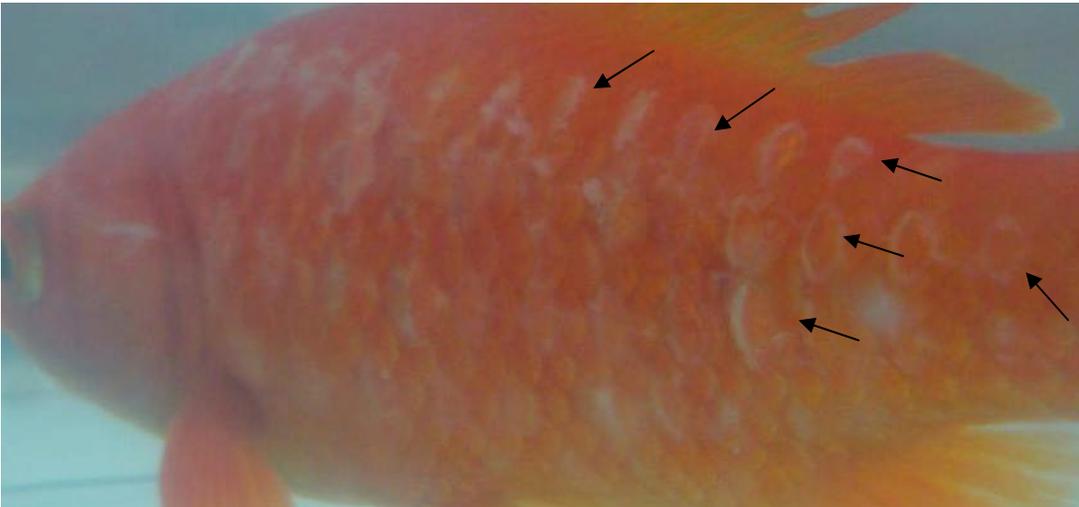
キンギョ体表の炎症の様子を示す。1, 3 日目は本実験の操作をしたキンギョの様子だが、4, 6 の両日で写真を撮り忘れてしまったため、同じ操作を施した別のキンギョの様子である。

1日後



移植部位の一部を矢印で示した。移植されたウロコは若干目立つものの、ウロコにも体表にも大きな変化はない。

3日後



移植部が若干赤みを帯び、ウロコが柔らかくなっている。

4-5日後



移植部位の拡大を示した。ウロコは柔らかく薄くなっており、体表が赤く充血している。

7日後



体表の赤みはなくなり、ウロコは抜け落ちたり、分解されて柔らかくなったりしている。体表が黒く変色しているのはストレスのためであり、炎症とは直接関係がない。

4, Discussion

4.1. リンパ球数の推移と炎症の関係

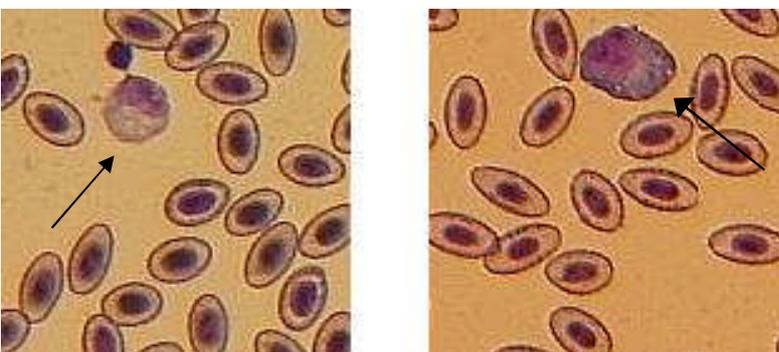
リンパ球数は、この炎症刺激によって変化しないという結果が出た。ただし、染色にムラがあったこと、また初めのうち判定に慣れなかったため、破裂した赤血球核を混同して数えた可能性を否定できない。さらに、Introduction で述べたように、好中球や好塩基球といった顆粒白血球は免疫応答の初期に遊走し、その後リンパ球やマクロファージが誘導されてくる。よって、1~2 週間の長いスパンで測定を行ってみると違う結果が得られるかもしれない。

4.2. 顆粒白血球数の推移と炎症の関係

顆粒白血球数は 1~3 日の間に有意に増加し、その後約 6 日後までに、ほぼ通常の水準まで戻っている。これは、数時間~数日の間に好中球・好塩基球が集まるといったキンギョの免疫応答機序にも合致している。よって、体表に異物を移植するという今回の炎症刺激によって、確かにキンギョの免疫応答を促せると言っていだろう。注意したいのは、体表からはっきりと炎症が見て取れる 4-5 日後には顆粒白血球数は減少を始めており、免疫応答が収束に向かっているということである。

4.3. 顆粒白血球の肥大と濃染色

顕微鏡で観察する中で、顆粒白血球が有意に増加している 4 日目頃まで、好塩基球が全体的に肥大しており、青い染色が強くなっている傾向にあると感じた。一例を下に示す。



左：対照群、右：実験群

この傾向は、6 日後に顆粒白血球の数が通常の水準に戻る頃にはなくなっていたことから、顆粒白血球の機能が亢進していることを示しているのではないかと考えられる。

4.4. 実験の改善点と結果への影響

本実験にはまず、標本によって染色性や血球の分布に差があること、目で見てどの血球かを判断するため、一定の間違いが起こることを避けられないという問題点がある。染色方法や時間の徹底はもちろんだが、血球を判断する際の基準を明確にしておくことが必要だろう。

また、全血球数を 1/64 画面から計算しているため、血球数を数える過程がかなり雑な作業になってしまっている。血球の分布をほぼ一定にし、もう少し大きい画面でカウントすると改善が期待される。さらに、酵素活性のように定量化できる免疫系の指標を見つけることができれば、より厳密に評価することができる。例えばブリヤスズキでは、溶菌作用を持つリゾチームが、免疫系の指標として有効とされており、この濃度は分光光度計で簡便に測定することができる。(M. Angeles Esteban, Alberto Cuesta, Alejandro Rodriguez and Jose Mosequer,2006; 山下浩史、川上秀昌、2001) しかし、キンギョではほとんど検出できなかった。

少し性質の異なる改善点としては、コントロール群の条件設定が挙げられる。今回はまったく通常状態のキンギョ 5 体のデータをコントロール群として用いたが、本来は飼育環境や操作を同じにしなければならない。免疫系はストレスに影響を受けるためである。本実験では、空気中に出される時間が長く、何回も採血される実験群の方に、重いストレスがかかると考えられる。ただし、このストレスが結果に影響してくるかどうかに関しては現段階では分からない。

4.5. 考察実験の余地がある点

本実験で、炎症刺激によって顆粒白血球の免疫応答が起こるということが分かった。では、今度は二つの相関関係を調べれば、どの程度の炎症刺激でどれくらいの免疫応答を引き起こせるのか検討できるだろう。例えば、移植枚数によって免疫応答に差は見られるかという実験が考えられる。また、ホルマリン固定されたウロコを異物と認識すると破骨細胞活性が上がることから、採血時の破骨細胞の活性と免疫系細胞数の関係を検討しても良いかもしれない。

また、今回リンパ球の数に大きな変化は見られなかったが、好中球・好塩基球・マクロファージの区別を含めた、さらに細かい分類で血球の推移を追うことができれば、キンギョの免疫応答の機序が分かってくるだろう。

4.6. 今後の展望

今回の実験で、ホルマリン固定したウロコの再移植という炎症刺激によって、少なくとも顆粒白血球の増加という免疫応答を促せることが明らかになった。

そこで次に、当初の目的であった、メラトニンが免疫応答に及ぼす影響について検討する実験が考えられる。メラトニンを投与した上で炎症刺激を与えた群、メラトニンを投与せずに炎症刺激を与えた群(本実験の実験群と同じ)、炎症刺激を与えなかった群で免疫応答にどのような違いがみられるか検討できるだろう。この際、メスの方がメラトニンに対する反応性が良い(Nobuo Suzuki, Masanori Somei, Kei-Ichiro Kitamura, Russel J, Reiter and Atsuhiko Hattori, 2008) という報告もあるので、性差を検討する必要もあるかもしれない。

References

Alberto Cuesta, Rebeca Cerezuela, M. Angeles Esteban and Jose Mesequer. In vivo actions of melatonin on the innate immune parameters in the teleost fish gilthead seabream. *J.Pineal Res.* 2008.

会田勝美、魚類生理学の基礎、恒星社厚生閣、2002

M. Angeles Esteban, Alberto Cuesta, Alejandro Rodriguez and Jose Mosequer, 2006. Effect of photoperiod on the fish innate immune system: a link between fish pineal gland and the immune system. *J. Pineal Res.* 2006 Oct; 41(3):261-6

山下浩史、川上秀昌：ブリ血漿リゾチーム活性測定法：愛媛水試研報、第9号、17～20、2001

Nobuo Suzuki, Masanori Somei, Kei-Ichiro Kitamura, Russel J, Reiter and Atsuhiko Hattori. Novel bromomelatonin derivatives suppress osteoblastic activity and increase osteoblastic activity: implications for the treatment of bone diseases. *J. Pineal Res.* 2008; 44:326-334.

プラナリアの再生とメラトニン

11070712 医学科二年 宮城夏子 (共同研究者 笹川麻由)

Abstract

0.4~0.7mmol/L メラトニン存在下で頭部・腹部・尾部の再生実験を行うと、体の細胞の再生は阻害されるが、眼の再生だけは阻害されないことが分かっている。

今回の実験ではこの追実験として、濃度の異なるメラトニン溶液中で切断個体の再生の様子を観察した。その結果、メラトニンはプラナリアの再生芽の成長を抑制する効果があることが再確認された。

Materials & Methods

材料：プラナリア（ナミウズムシ） *Dugesia japonica*

実験計画では、頭部の神経系の再生へのメラトニンの影響を、シッフ溶液を用いたPAS染色により観察する予定であった。しかし、染色の成功率が低く一貫性のあるデータを取るのが困難であったため、染色は完全個体における神経走行の観察のみに使い、切断個体へのメラトニンの影響については染色を行わず、切断部の再生芽の実体顕微鏡写真を撮るにとどまった。以下に神経染色と、メラトニン影響下における再生芽の観察の実験手順を記す。

・神経染色

手代木・大場の方法（『プラナリアの形態文化—基礎から遺伝子まで—』手代木渉・渡辺憲二 編著、共立出版株式会社）

- 1) 10%の酢酸液を滴下し、2分間放置する。
- 2) 水、瞬時。
- 3) 1N塩酸、5分間。
- 4) 水、5分間。
- 5) 亜硫酸、瞬時。
- 6) シッフ試薬。
- 7) 亜硫酸、1分間ずつ3回。
- 8) 水、2~3分。
- 9) グリセリンを滴下してカバーガラスをかける。

・メラトニン影響下における再生芽の観察

1.0・0.5・0.1・0.05mmol/Lのメラトニン溶液と、コントロール群としてエタノールを相当量加えた溶液を調整し、これら5群の頭部と尾部の切断部の再生を毎日経過観察する。

横2等分は、総排泄腔を目安として行い、切断の次の日を「1日目」と数えた。切断には使い捨てのメス

を用いた。

Results

・神経染色

染色した個体を図1・2に示す。

・メラトニン影響下における再生芽の観察
頭部と尾部の再生の様子を図3～6に示す。



図1：染色個体

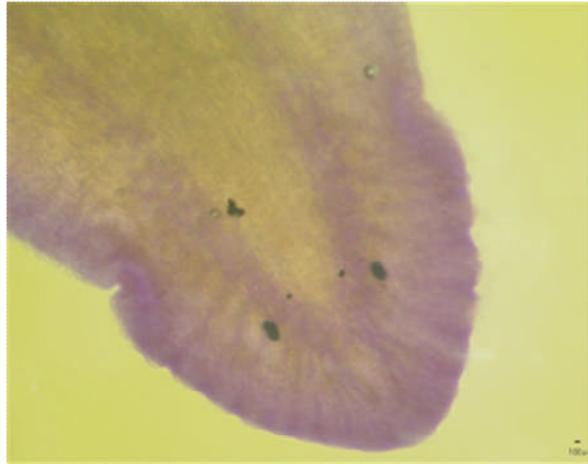


図2：染色個体（拡大）

cont



0.5mmol



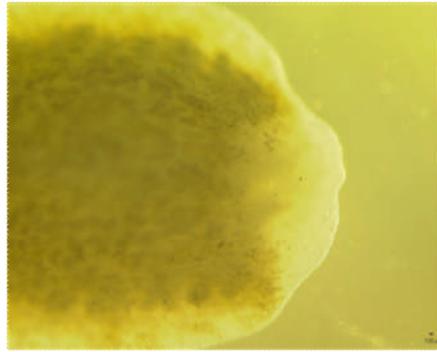
1日目

3日目

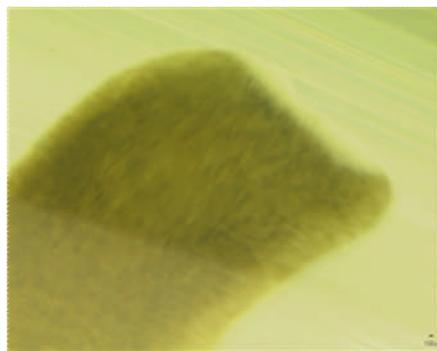
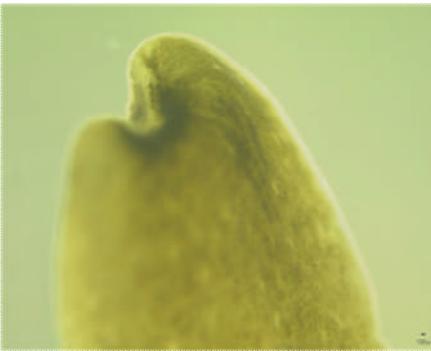
7日目

図3：頭部個体の再生

cont



0.5mmol



1日目

8日目

図4：頭部個体の再生（拡大）

cont



0.5mmol



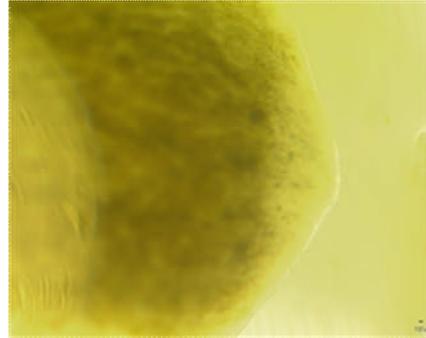
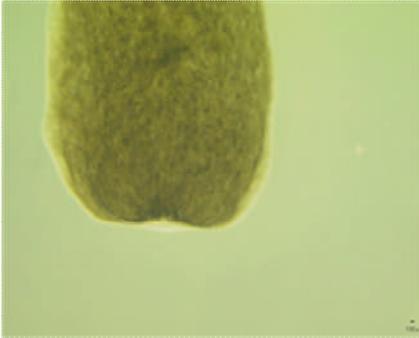
1日目

3日目

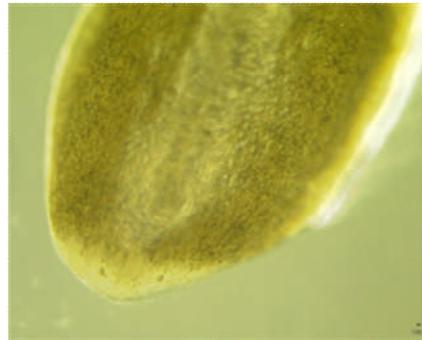
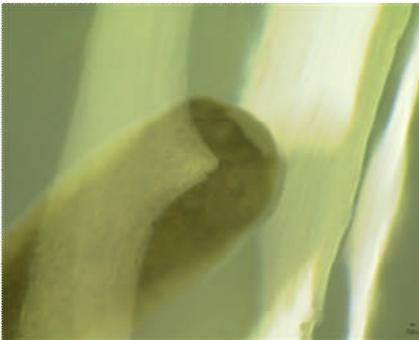
7日目

図5：尾部個体の再生

cont



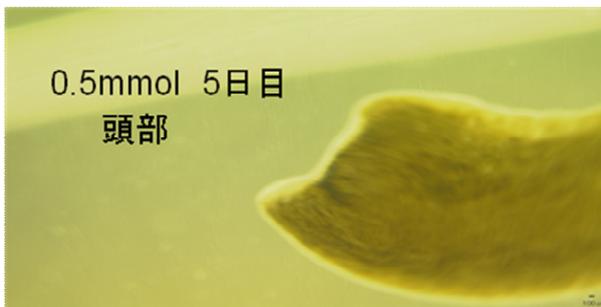
0.5mmol



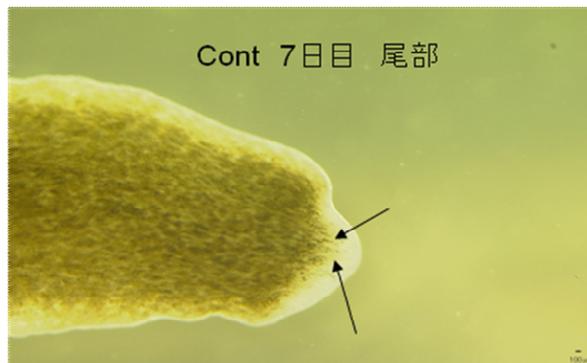
1日目

8日目

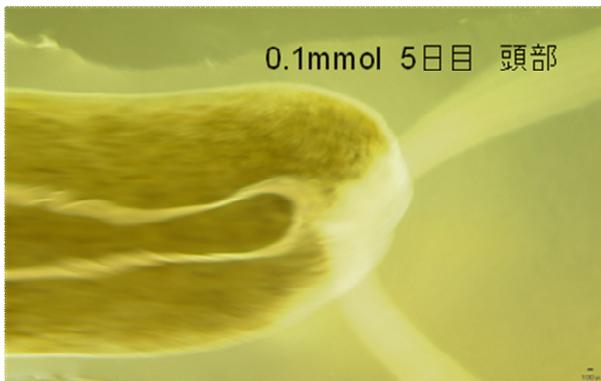
図6：尾部個体の再生（拡大）



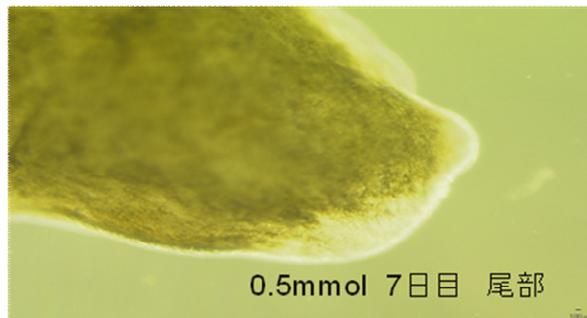
0.5mmol 5日目
頭部



Cont 7日目 尾部



0.1mmol 5日目 頭部



0.5mmol 7日目 尾部

図7：0.1mmolと0.5mmolの比較

図8：contと0.5mmolの比較

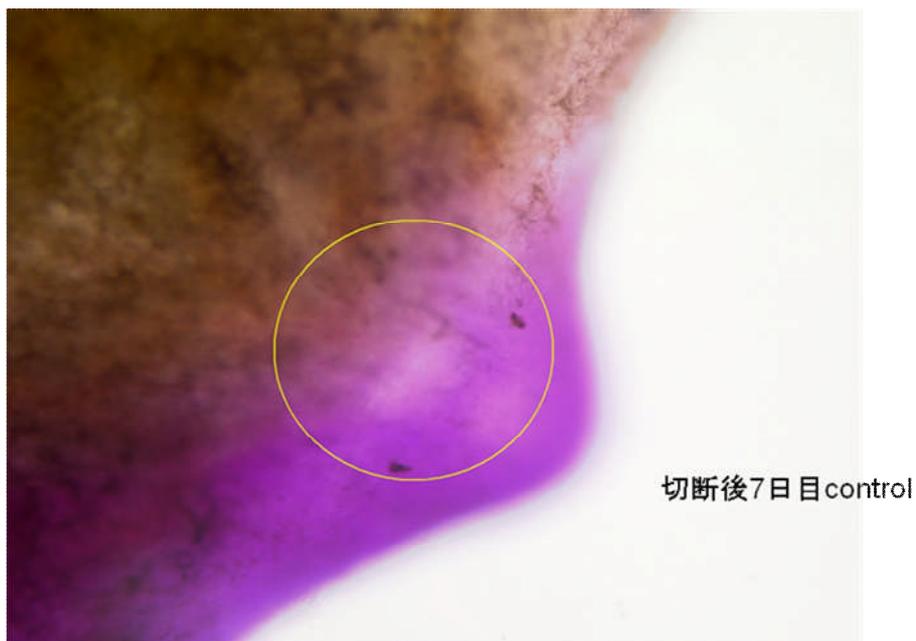


図 9 : 眼の再生 (染色)

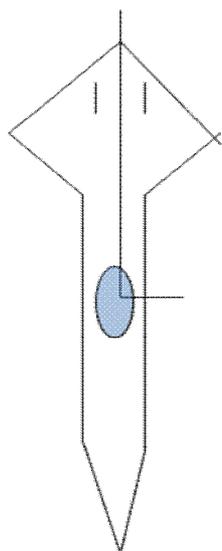


図 10 : 鍵型切断の方法

Discussion

・神経染色

最初の過程の酢酸溶液の滴下により個体が非常にもろくなり、途中で個体が崩れることが多く、観察部位の損傷もしばしばあった。

また、染色の度合いも安定性を欠き、多くの場合濃く染まりすぎて神経を見分けるのが困難であった。以上より、この方法には再現性がなく、経過観察の染色法としては適切でないと言える。

代替法として、カルノアの固定液を用いて固定したのち脱色作業を施してから、PAS染色を行う方法が考えられる。以下にその手順を示す。

固定

カルノアの固定液（*）に4℃の下3時間浸ける。

*カルノアの固定液：エタノール（60%）、クロロホルム(30%)、無水酢酸(10%)

脱色

脱色液（*）に室温、蛍光灯下で14時間浸ける。

*脱色液：メタノール：水 = 5：1

しかし、上記の方法を実際に行ったところ、神経とは異なると思われる部位（おそらく消化管）が染色されるようであった。これについてはさらなる検討を要する。

・メラトニン影響下における再生芽の観察

2日目に cont 群でははっきりした再生芽が観察できる(0.05、0.1mmol 群は個体差大)。

1.0mmol 群はこの日までに全て死亡した。

3～5日目では cont、0.05、0.1mmol 群の個体差は大きいものの、0.5mmol 群との差ははっきりしてくる。一部の再生芽では色素ができ始めているのが観察できた。図7に、0.1mmol と 0.5mmol の比較（5日目、頭部）を示す。

7日目には眼の再生が肉眼で確認できた(cont 群と 0.1mmol 群)。図8に cont と 0.5mmol の比較（7日目、尾部）を示す。また、図9に7日目の cont 群の個体を染色した写真を示す。

0.05mmol～cont 群で死亡した個体は尾部の 0.05mmol 一匹のみ(3~4日目、原因不明)。

以上より、メラトニンは再生芽の成長を抑制すると考えられる。

しかし、横切断では切断面のすぐ近くに眼ができるので色素との見分けが難しく、眼の再生が観察しづらかった。よって、その他の切断方法として、①完全な縦切断、②不完全な縦切断（双頭）、③鍵型切断の三種類を試みた。以下にその方法と結果を記す。

①完全な縦切断

正中線で完全に2つに体を切断する。

数日間で全個体が死亡。

②不完全な縦切断（双頭）

総排泄腔を目安として、体の半分ほどまで切れ込みを入れる。

数日間でほとんどの個体が癒合してしまった。

メスよりも刃の鈍いカッターでの切断や、切断後30分ほど氷上に放置するなどの方法も試みたが、実験に使用できるほどまで成功率は上がらなかった。

③鍵型切断

切断法は図10参照。

時間不足などの理由により再生が追えなかった。

しかし、理由は不明だが、横切断よりも再生が遅くなることが判明した。

今回の実験を成功させるには、より精密な染色方法と、観察に適した切断方法の設定が必要となると考えられる。

メラトニンは鱗に作用して、鱗の再生を促進する可能性がある

歯学科 2年西井直人 (共同研究者 高橋純一)

Abstract

この実験の目的は、金魚の鱗の再生に対するメラトニンの影響を調べることから、骨再生に対するメラトニンの影響を推測することである。DMSOに溶かしたメラトニンを水に溶かした水槽と、DMSOのみをとかした水槽に金魚を4匹ずつ入れ、1個体から20枚ずつ鱗を採集し、2週間後再生した鱗の隆起線の数数を数えた。メラトニン影響下の群は、コントロール群に比べて、隆起線の数が有意に多かった ($P < 0.0005$)。メラトニンが鱗の再生機構に影響を与えたことが原因であるかもしれない。

1, Introduction

メラトニンには、体内時計として概日リズムを調整する働きがあるが、そのほかに骨再生に影響を及ぼすということが最近の研究で発見された。ある研究(参考論文)によると、犬を抜歯し、骨に穴をあけ、その穴にメラトニンの粉末を入れてからインプラントを挿入すると、なにも入れないコントロール群に比べて骨結合が促進されたという。骨結合とは、インプラントを挿入した場合、歯槽骨と金属であるインプラントとの間に新しく結合組織が形成されることをいい、骨結合によってインプラントが骨に定着する。

メラトニンが骨結合を促進する原因として、メラトニンが歯槽骨付近の骨芽細胞、破骨細胞に影響を与えた可能性が強い。この論文では、メラトニンが(1)骨芽細胞の増殖を促した(2)骨芽細胞前駆体に働いて、分化を促進した(3)骨基質の大部分を占めるタンパク質をコードする遺伝子の発現を刺激、といった骨芽細胞活性化の働きと、(4)抗酸化作用による破骨細胞の不活性化(5)RANKの活性を抑制することによる破骨細胞の形成抑制、といった破骨細胞を抑制する働きがあったのだろうと述べている。

私たちはこの「メラトニンは骨芽細胞を活性化し、破骨細胞を不活性化する」という働きから、メラトニンは骨再生を促進するだろうと推測し、これを実験で確かめようと考えた。しかし、これを骨再生の仕組みが単純ではない哺乳類で実験するのは非常に難しいため、私たちは骨再生のモデルとして金魚の鱗を使うこととした。

金魚の鱗はヒドロキシアパタイトとI型コラーゲンからなる石灰層と、I型コラーゲンから成る基底層の、2つの層から成り立っている。魚類の鱗は体内のカルシウム濃度の調整の役割を果たしており、破骨細胞が働くことにより鱗のカルシウムが溶け出し血中に広

がり、血中のカルシウムが鱗に取り込まれ、骨芽細胞が働くことで鱗の石灰化が進む。これは骨のリモデリングと構造が似ており、骨と比べて構造が非常にシンプルであることが特徴である。また、鱗は強い再生能をもっているため、骨再生のモデルとして最適であると私たちは判断した。

ここで、鱗の再生の進行度の指標として、われわれは「隆起線の数」を選んだ。隆起線とは図 1 のように、鱗にある同心円状の線である。隆起線ができる仕組みはまだ分かっていないが、まず内側から外側に向かって徐々に形成され、外側が完成すると今度は内側に向かってできていく。形成される仕組みが分かっていないため、隆起線が多いからと言っては骨芽細胞が活性化されている、などと決めつけることはできないが、隆起線が多い鱗ほど面積、厚みともに成長しているため、鱗の再生の進行度をあらわすことができると考えた。鱗の面積や密度も指標として考えられるが、それらは測定が困難であるのに対し、隆起線の数は実態顕微鏡を使えば目で数えられるため、測定が非常に容易であることが隆起線の数を指標とした最たる理由である。

図 1

(ただしこれは再生鱗の隆起線である。本来の金魚由来の鱗の場合、内側まで隆起線が存在する。)



以上を踏まえ、われわれは「メラトニンが鱗の再生を促進するか」を調べるために、鱗を採集してから 2 つの全く同じ水槽 A、B で、ポケットにメラトニンを作用させた群と、そうではない対照群の金魚を飼育した。2 週間後再生鱗を採集し、隆起線の数を測定する、という実験を行った。水槽 A、B の状況が同じであるということは、以下の予備実験によって確かめた。

予備実験：室温 25 度、24 時間明の環境に設定してある飼育室に全く同じ水槽 A、B を用意する。180 ずつ汲み置き水をいれ、5 枚ずつ鱗を抜いた金魚を 2 匹ずつ入れた。なお、鱗を抜くのは側線の上、または下である。えさの量、回数、水換えの時期も 2 つの水槽で等しくし、2 週間後に再生鱗を採集し隆起線の数を測定した。すると、隆起線の平均値について、2 つの水槽の間に有意差はみられなかった ($p < 0.25$)。このことから水槽 A、B の環境

が等しいことが確かめられた。

2, Materials and Methods

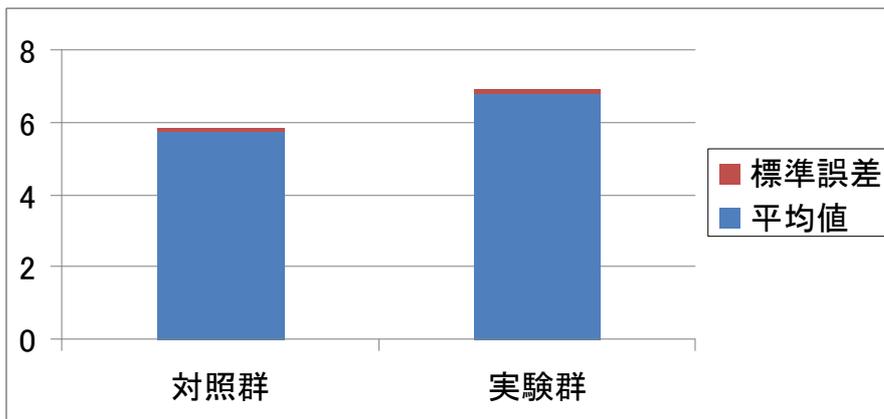
まず、水槽 A、B に汲み置き水 180 ずつ入れる。次に、ジメチルスルホキシド (DMSO) 2.25ml にメラトニン約 90mg を溶かし (つまりメラトニン濃度は $5\mu\text{g/ml}$)、水槽 A に入れ、水槽 B には DMSO のみを 2.25ml 入れた。DMSO は毒性をもつが、非常に薄い濃度であるため金魚に影響はないと考えられる。また DMSO はマイクロピペットで、メラトニンは電子天秤で量ったが、メラトニンについては水槽 A、B の差がメラトニンの有無であるため、わずかなずれは無視して、約 90mg 量った。以上のようにしてメラトニン影響下の水槽 A と、コントロール群の水槽 B を作った。

しかし、ここで我々は 1 つミスをした。水道水 1ml に含まれる塩素はメラトニンを $3\mu\text{g}$ 分解してしまう。それを防ぐためにチオ硫酸ナトリウムを入れて塩素を中和しなければならなかったのだが、それを怠ってしまった。そのため、水槽 A のメラトニン濃度は $5\mu\text{g/ml}$ ではなく、 $2\mu\text{g/ml}$ になってしまった。ここでは水槽 A、B の差がメラトニンの有無であるためこれでも実験が成立するが、メラトニンの影響が予定より小さくなってしまい、結果が出にくくなったのは事実である。

この実験では、オスの金魚 8 匹を用いた。すべて、今まで 1 度も実験に使われたことのない固体である。個体の裏表の側線の上下から 5 枚ずつ、つまり 1 匹当たり 20 枚の鱗を採集し、4 匹ずつ 2 つの水槽に入れた。餌は 1 日一回、自動給餌機によって決められた時間に、等しい量 (5 分間でえさがなくなる程度を目安にした) だけ与えた。2 週間後に再生鱗を採集したのであるが、14 日間のうち 3 回水の交換を行った。1 回の水交換において、水槽 A、B ともに水槽内の水すべてを取り換え、再び同様の環境を作り出した。メラトニンをエタノールに溶かしてから水槽に入れて実験すると水が非常に白濁したのであるが、この実験期間中、水槽 A において主だった白濁は生じなかった。

3, Results

隆起線の平均値は、対照群において $5.74 \pm 8.60 \times 10^{-2}$ 本、実験群において $6.78 \pm 1.16 \times 10^{-1}$ 本であった (下のグラフ参照)。



まず母分散の検定を行い、等分散ではないことが分かったため、母分散が未知で異なるときの平均値の差の検定を行った。すると、

$$T_{cal}=6.90、自由度=143、T_{cal}>3.373>t(143,0.0005)$$

となり、有意差が存在することが判明した。このことから、メラトニンを作用させた水槽 A では、対照群の水槽 B に比べ、有意に隆起線が増加していた、ということがわかった。

4, Discussion

ここでは、①メラトニンがポケットに作用したのか②メラトニンがポケット以外に作用した可能性はないか③ポケットに作用したとして、メラトニンのどのような作用がこの結果を引き起こしたのか④実験の反省、これからの展望について考えていきたいと思う。

まず、大前提となる①について考えてみる。メラトニンはアミン系ホルモンであるため、細胞膜を透過する。金魚は鰓から水を吸収するため、メラトニンは鰓を通して体内に取り込まれ、細胞膜を透過するために血管までいき、全身に作用する。そのためメラトニンはポケットおよび鱗に作用したと考えられる。また、メラトニンは金魚の松果体でも産生されるため、体内で生成されるメラトニンに比べ投与したメラトニンが無視できるくらい少量であった場合、結果はメラトニンに直接起因しない可能性がある。体内では、光刺激を受けていないときだけセロトニンからメラトニンへの合成反応が起こる。しかし光刺激を受けるとその合成反応は遮断されるのであるが、私たちは金魚を 24 時間明の環境で飼育したため、体内でメラトニン合成反応はほとんど起こっていなかった可能性が高い。このことから、この実験では投与したメラトニンはポケットに有意に作用したと判断した。

しかし、メラトニンがポケットに作用していても、②メラトニンがポケット以外に作用して結果に影響を及ぼした可能性もある。今回の実験では、メラトニンをポケットに部分的に作用させる方法が考えられなかったため、個体全体に影響してしまう「水自体にメラトニンを溶かす」という方法をとった。そのため、鱗ではなく、神経系など体内のほかの

部分にメラトニンが影響し、その結果隆起線の数が増えたという可能性を否定することができないのである。例えば、眠い状態の人ではメラトニン濃度が上がっており、またメラトニンを投与すると眠りに陥る人が多いということから、メラトニンには催眠作用があるといわれている。実際メラトニンは、睡眠促進のサプリメントとして販売されている。そのため全くメラトニンがなかった水槽 B の個体に比べて、水槽 A の個体はより多くの睡眠をとり、それが隆起線の増加につながった、ということもこの方法では否定できないと考える。

では③もしメラトニンがポケットに作用したために隆起線が増えたのならば、メラトニンがどのように作用したと考えられるか。鱗の再生において破骨細胞はほとんど働かないため、メラトニンは骨芽細胞を活性化したと考えられる。具体的には、参考資料①より、

- 骨芽細胞の増殖
- 骨芽前駆細胞に働いて、分化促進
- 骨基質の大部分を占めるタンパク質をコードする遺伝子の発現を刺激

の3つが予想される。

以上を踏まえて、今回の研究から言えることは、

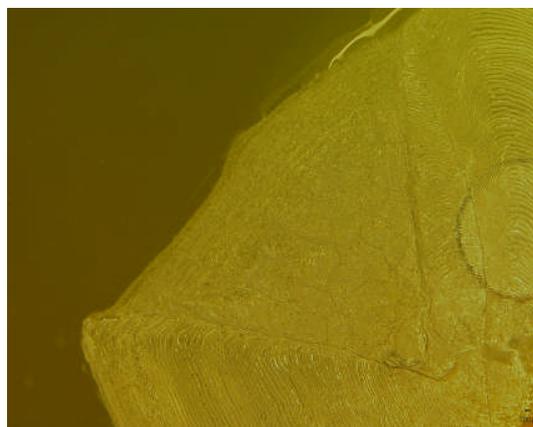
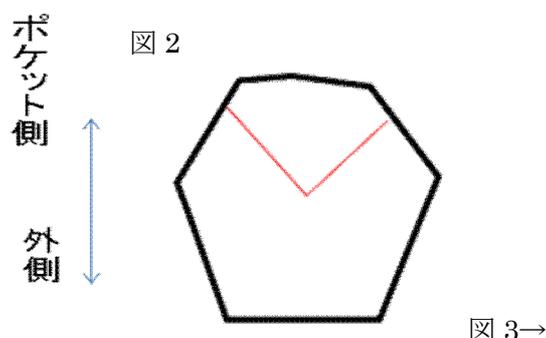
メラトニンは鱗の再生を促進した。その原因はメラトニンが鱗の骨芽細胞を活性化したことにあるのかもしれない

ということである。骨再生について考察するには、メラトニンを鱗のポケットに部分的に作用させることが必要不可欠であった。実行することはできなかったが、我々が考えた方法を示す。

まず鱗を V 字カットするところから私たちの実験は始まる。鱗を採集したのち、図 2 のように、鱗のポケットに埋まっていた部分を一部 V 字型に切り取り、その鱗を元あったポケットに戻す。すると 2 週間後には図 3 のようにカットした一部だけが再生する。この方法を使って私たちが考えたのは以下のものである。

①鱗を採集し、V 字カットする②スポンゲルを V 字の大きさに合わせて切り取り、その中にメラトニンパウダーを詰める。③メラトニンを詰めたスポンゲル（発泡スチロールのようなもので、水に溶けるといふ特徴を持つ）を V 字にはめこみ、鱗をポケットに戻す。これならばポケットに部分的にメラトニンが作用するうえ、鱗でふたをされるためあまり水中に流れ出ないと考えた。しかしスポンゲル自体が鱗のポケットに入らないということが実験を試みたときわかり、この方法は不可能であることがわかった。ただし V 字にスポ

ングルではなく、接着剤などを利用してメラトニンのシートを作り、それを作用させればできるのではないかと、などの案があり、メラトニンを鱗に局所的に作用させるうえで、V字カットが利用できるのではないかと考えている。



メラトニンは様々な作用を持ち、作用する部位も多様であるため、たとえメラトニンを使って再生が促進されたとしても、実際何が起こったのかを見極めるのは困難である。今回の実験で、物質を局所的に作用させることの重要性、難しさを学んだ。同時にメラトニンの作用の一端に触れることができ感動も覚えた。これからメラトニンの具体的な作用が解明されていくにつれ、メラトニンが再生医療と密接にかかわっていくのであろうと思うし、鱗は歯の構造に非常によく似ているため、今回の実験からメラトニンが歯の再生に応用される可能性もあるのではないかと考えた。私は歯科の分野における再生医療に非常に興味を持っているため、これからも再生医療とメラトニンの動向を追っていきたいと思う。

References

”Melatonin stimulates osteointegration of dental implants”

Journal of Pineal Research 2008; 45:174-179

The effects of cortisol on osteoclasts induced by allogeneic graft of scales in goldfish

Eiichiro Amano, Tatsuya Sato, Yuma Noguchi

Sophomore student of Faculty of Medicine, Tokyo Medical and Dental University

医学科 2 年 天野永一朗

Abstract

High doses of cortisol are known to suppress the immune system, and osteoclasts differentiate from hematopoietic stem cells under control of immune system. We examined both in vivo and in vitro the effects of cortisol in high concentration on the formation and activity of osteoclasts which were induced by allogeneic graft of scales, and analyzed the action of cortisol in the relationship between the immune system stimulated by grafting and the induction of osteoclasts. In this study, we used the scale of goldfish, which is similar to mammalian membrane bone and contains a set of cells related to bone metabolism as mammals. We first transplanted allogeneic scales to goldfish, and three days later, we observed a cluster of osteoclasts in scales and higher activity of tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) which was estimated as indicator of activity in osteoclasts. When we injected cortisol in vivo, the activities of TRAP in scales transplanted to the recipient were down-regulated by injection, and this was not seen in non-transplanted scales. We second extracted scales from normal goldfish whose immune system was not stimulated by transplantation, incubated them with cortisol in various concentration for three days, and found that both the activity of TRAP and the mRNA expression of RANKL, a kind of cytokine bound to the membrane of osteoblasts, T cells, and synovial cells which facilitates the formation of osteoclasts, CathK and TRAP, functional proteins of osteoclasts, were not influenced by cortisol. We third transplanted allogeneic scales, and three days after the transplantation, we extracted them and incubated with cortisol for three days. In allogeneic scales, The mRNA expression of RANKL and CathK increased by transplantation and that of RANKL and TRAP decreased by cortisol, but in non-transplanted scales, these parameters did not change significantly. These results demonstrate that the inhibitory action of cortisol on acquired immune system results in the repression of the formation and induction of osteoclasts.

Introduction

破骨細胞は、血液幹細胞から分化する多核細胞であり、その分化・誘導は RANK-RANKL の相互作用等を介して免疫系との密接な関係の中で制御されていると考えられているが、その詳細は不明な点が多い(1)。

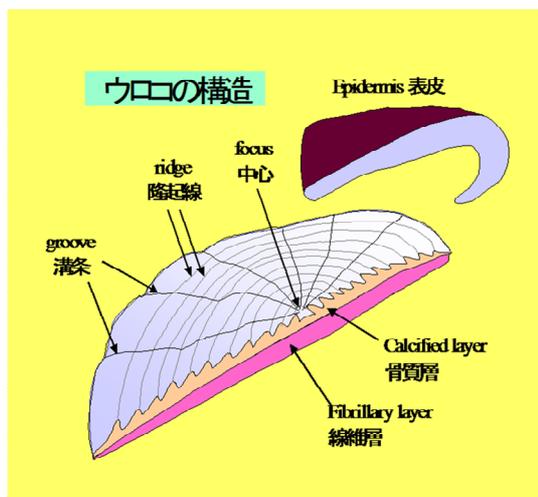
一方、抗炎症作用(免疫抑制作用)をもつ高濃度のコルチゾールが骨代謝に影響を与えることで生じる疾患も病態も不明な点が多い。クッシング

症候群では、血漿コルチゾール濃度が増加し、骨粗鬆症が認められ、またグルココルチコイドの長期投与でも著明な骨減少症がみられる。これらの疾患では、グルココルチコイドの骨芽細胞への直接抑制作用・腎尿細管の Ca 吸収の抑制・腸管への直接抑制作用・ビタミン D 代謝異常への関与なども考えられている一方で、グルココルチコイドが分化途上の破骨細胞に対して高濃度で抑制作用・生理的濃度で促進作用、成熟破骨細胞に対しては促進作用をもつと考えられており、破骨細胞

とコルチゾールとの関係も注目されている(2,3)。

本実験では、ウロコの他家移植という、非自己の移植片の排除という免疫拒絶反応が誘導された状況において、コルチゾールの投与による破骨細胞の分化・誘導がどのように影響されるかを *in vivo* と *in vitro* で分析し、免疫系(特に移植片拒絶に関与すると考えられる獲得免疫系と、炎症に関与する免疫系)と破骨細胞の関係について検討した。

なお、本実験で使用したキンギョのウロコは、I型コラーゲンを基盤としてハイドロキシアパタイトの形でカルシウムが沈着した骨質層(図1)の上に、破骨細胞と骨芽細胞が共存しており、血中カルシウムの供給源として破壊(吸収)と形成を繰り返している骨と類似した硬組織である。このモデルには、ウロコの移植が容易な上、個体を殺さずに、個体ごとに条件をそろえて多数のうろこを同時に摘出できるという利点がある。



【図1】キンギョのウロコの構造

Materials and Methods

Transplantation of scales

キンギョは成熟した雄を使用した。移植の際は、キンギョを氷の中に入れてショックを与えて動き回らない状態で、片側からピンセットで抜き取り、同じくウロコを抜き取られた別個体のキンギョの片側に移植した。

Cortisol

コルチゾールは SIGMA H0888-1G hydrocortisone (FW 362.47) を使用した。 *in vivo* では生理食塩水で調整、 *in vitro* ではエタノールで調整した。

Activity of osteoclasts and osteoblasts

破骨細胞の活性は、マーカーである酒石酸耐性酸ホスファターゼ (tartrate-resistant acid phosphatase: TRAP) の酵素活性を指標として測定した。ウロコ1枚につき、20mM 酒石酸-0.1M 酢酸緩衝液 100 μ l を緩衝液とし、緩衝液を溶媒とする 10mM PNPP 反応液 100 μ l で 20分反応させ、50mM EDTA-3N NaOH 50 μ l で停止させた(4)。

骨芽細胞の活性は、マーカーであるアルカリフォスファターゼ (alkaline phosphatase: ALP) の酵素活性を指標として測定した。ウロコ1枚につき 100mM Tris-HCl を 100 μ l 緩衝液とし、緩衝液を溶媒とする 10mM PNPP 反応液 100 μ l で 15分反応させ、3N NaOH 50 μ l で停止させた(4)。

mRNA expression

免疫に関連する破骨細胞分化因子であり、骨芽細胞・T細胞などの細胞膜表面に存在する receptor activator of NF- κ B ligand (RANKL)、破骨細胞の機能に関わる Cathepsin K (CathK)、および tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) の三つの遺伝子発現を RT-PCR 法で測定した(5)。

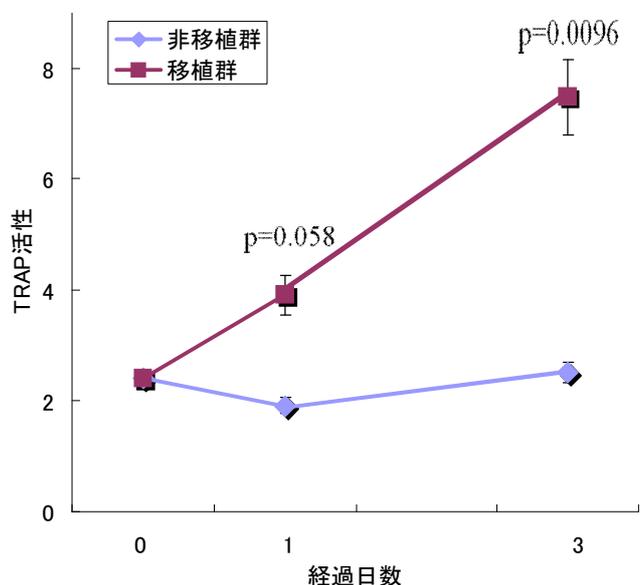
Experiment 1-the *in vivo* effects of cortisol on osteoclastic activity in both transplanted and non-transplanted scales

まず、成熟雄キンギョを2群に分け、1群には生理食塩水のみ、もう1群にはコルチゾールを体重 1g あたり 10ng ずつ腹腔内注射により投与した(6)。またそれぞれキンギョの片側からウロコを抜き、別の個体に他家移植した。次に、投与後1日、3日経過した時点で、移植されたウロコ及び非移植ウロコを抜き、それぞれのウロコの破骨細

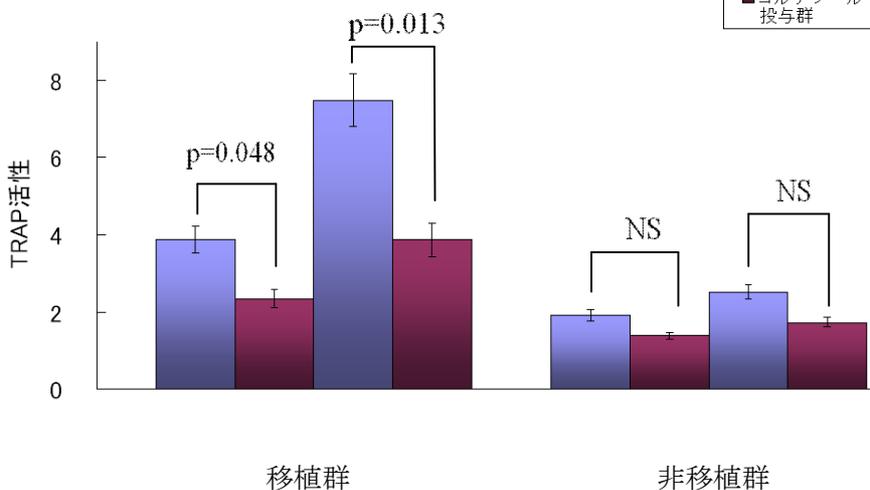
胞活性は TRAP、骨芽細胞活性は ALP の酵素活性を指標として測定した。

Experiment2-the in vitro effects of cortisol on osteoclasts in scales of normal goldfish

成熟雄キンギョの通常ウロコを用い、コルチゾールを 0ng/ml・5ng/ml・50ng/ml・500ng/ml 含む培地で 3 日間培養した(7)。培養後、破骨細胞活性 (TRAP) を測定した。また、500ng/ml 添加群に対して、RANKL、Cath K、ならびに TRAP の mRNA の発現量を比較した。



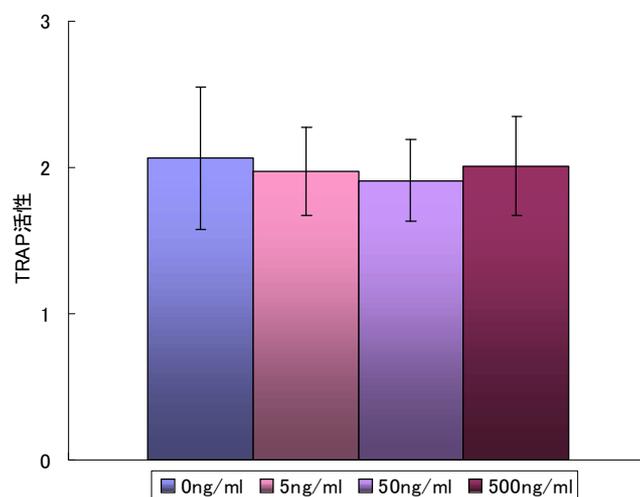
【図 2】 他家移植によるウロコの破骨細胞活性の変化



【図 3】 コルチゾール投与による破骨細胞活性への影響

Experiment3-the in vitro effects of cortisol on osteoclasts in both transplanted and non-transplanted scales

成熟雄キンギョのウロコを別個体の片側に他家移植した。移植後 3 日間経過した時点でこれらの移植ウロコと、反対側にある非移植ウロコを抜き、コルチゾールを 0ng/ml・500ng/ml 含む培地で(7)3 日間培養した。培養後、破骨細胞活性 (TRAP) と、RANKL・CathK・TRAP の mRNA の発現量を比較した。



【図 4】 通常ウロコの破骨細胞活性に対するコルチゾールの効果

Results

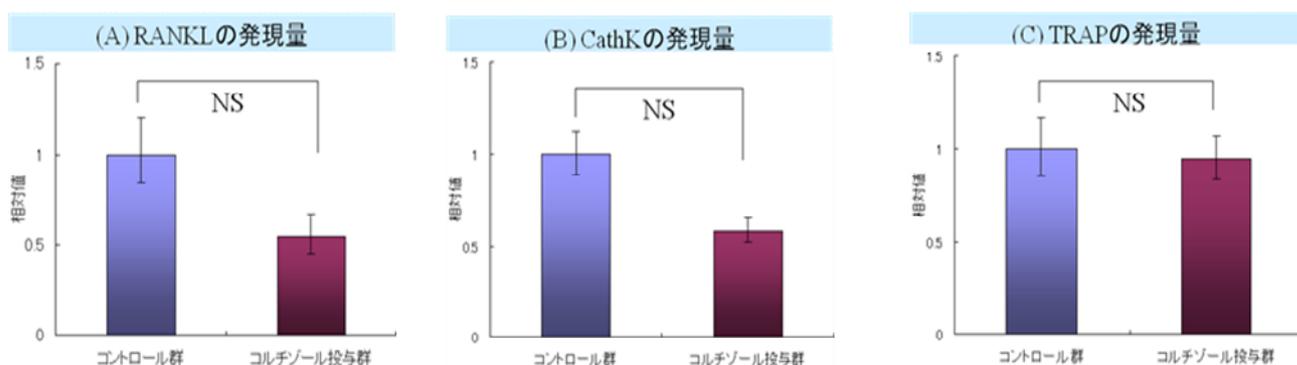
Experiment 1

他個体に移植されたウロコの破骨細胞活性は、移植1日目より上昇し、3日目には有意に高くなった(図2)。コルチゾールを投与すると、移植ウロコ群において破骨細胞活性が有意に下がったが、非移植群では減少傾向はみられるものの、有意な差は認められなかった(図3)。

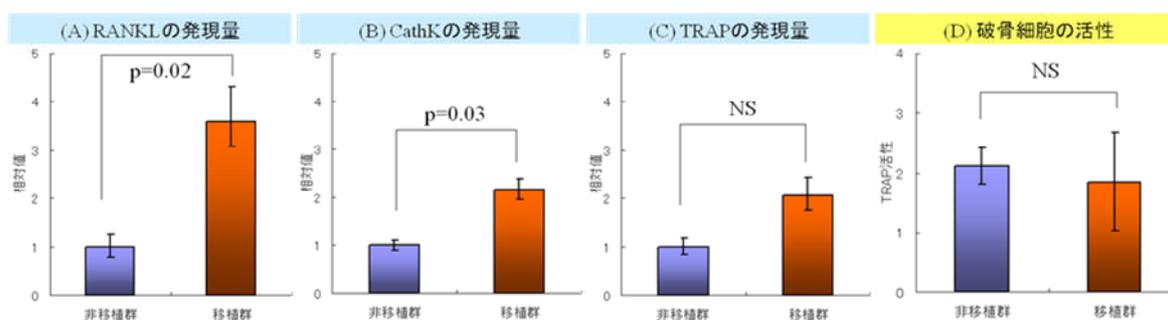
一方で、他個体に移植されたウロコの骨芽細胞活性は移植による有意な変化がみられなかった。コルチゾール投与による変化も移植ウロコ群・非移植ウロコ群双方に認められなかった。

Experiment 2

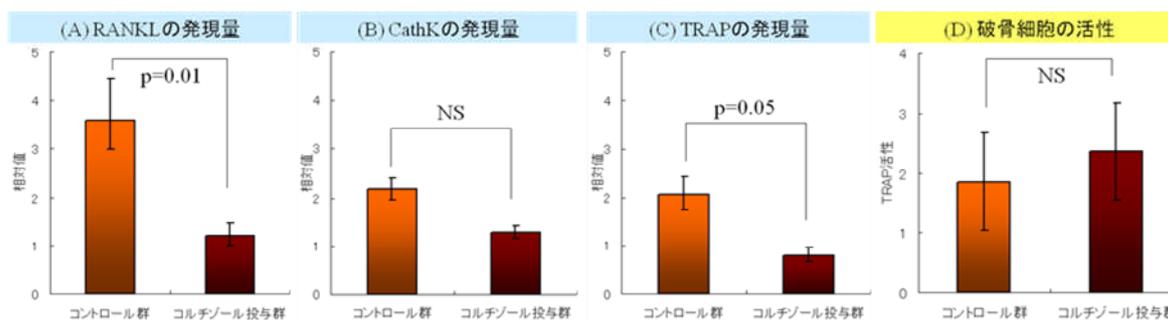
通常ウロコを用いた培養実験では、どの濃度においてもコルチゾール添加による破骨細胞活性の低下はみられなかった(図4)。また、免疫に関連する遺伝子(RANKL)と、破骨細胞の機能遺伝子(CathK、TRAP)の mRNA の発現量に有意差はなかった(図5A,B,C)。



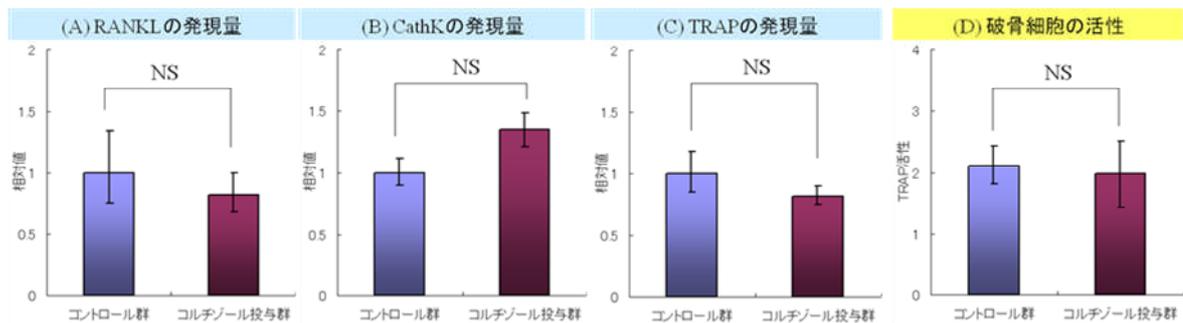
【図5】通常ウロコの遺伝子発現に対するコルチゾールの効果



【図6】他家移植による免疫関連遺伝子と破骨細胞機能遺伝子および破骨細胞活性の変化



【図7】他家移植におけるコルチゾールの効果



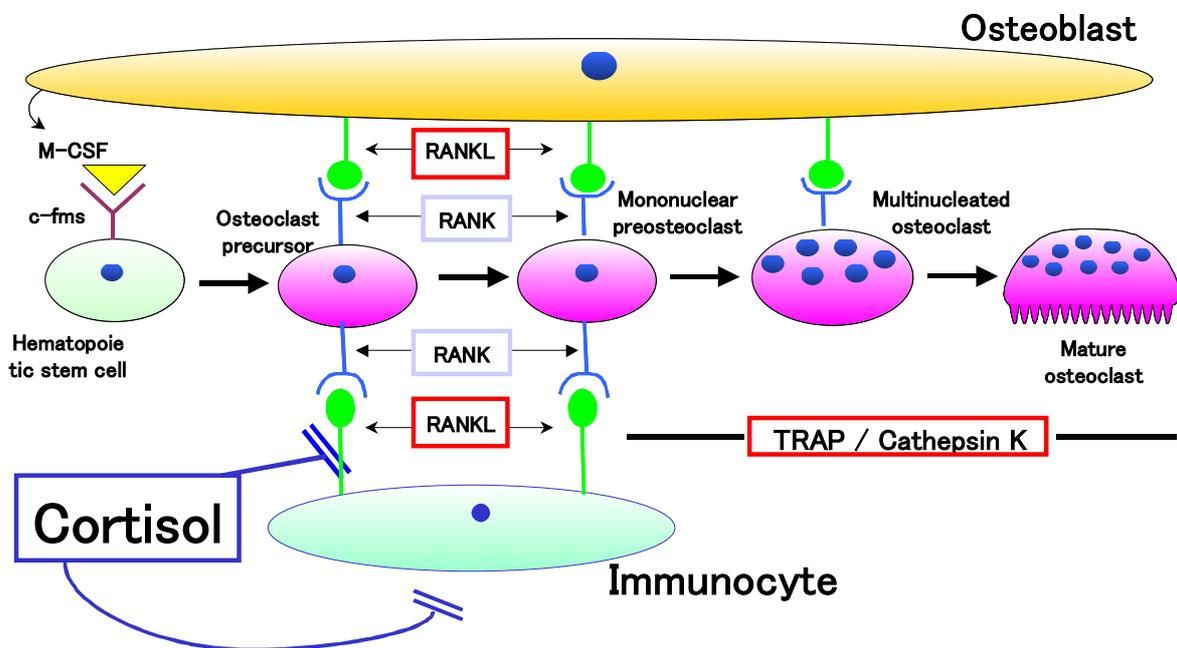
【図8】非移植ウロコにおけるコルチゾールの効果

Experiment 3

非移植群と移植群で mRNA 発現量の比較をすると、RANKL、CathK は移植によって有意に上昇した (図 6A, B) が、TRAP には mRNA 発現量及び活性に有意差がみられなかった (図 6C, D)。

非移植群においては、RANKL、TRAP、CathK のどれもコルチゾールの添加による影響はなかった (図 8) が、移植群においては、コルチゾールにより RANKL、TRAP が有意に下がり (図 7A, C)、CathK には減少傾向が認められた (図 7B)。

コルチゾールの破骨細胞に対する作用



【図9】コルチゾールと破骨細胞との相互作用

Discussion

本実験では、実験 1 においてウロコの移植による破骨細胞の誘導が可能であることを確認し (図

2)、生体内へのコルチゾール投与が有意に移植ウロコの破骨細胞活性を抑えることを確認した (図 3)。また、骨芽細胞活性には有意な差がみられなかったことと、非移植ウロコではコルチゾールによる抑制効果が小さかったことから、移植に

よって免疫系が刺激されている際には、コルチゾールの作用は骨芽細胞よりも免疫系に対して強く働いていると考えられる。

しかし、生体内投与の場合、コルチゾールがPTH等の他のホルモンに作用している可能性や、多かれ少なかれ破骨細胞・骨芽細胞に直接作用している可能性など、免疫系との関連から離れた、他の作用の影響の可能性を無視できない。

そこで、実験2・実験3において、*in vitro*での実験を行った。実験2では、予測通り、免疫系が特に誘導されていない通常キンギョではコルチゾールが破骨細胞活性を抑制しないことが確認できた。RANKLやTRAP・CathKといった遺伝子発現も有意差はみられなかったことがそれを裏付けているといえよう。そして、コルチゾールが免疫系を介さずに破骨細胞に直接強い抑制作用をもつ可能性も小さいことがわかる。

しかし、有意差がみられなかったとはいえ、遺伝子発現が減少傾向にあることは否めない(図5)。考えられる解釈としては、まず、通常時に既にウロコ上に存在していた免疫担当細胞がコルチゾールによって抑制されたという可能性がある。移植を受けなくとも、ウロコには常時生体防御に関わる細胞がある程度存在することは不思議ではない。もう一つの可能性は、移植による免疫系の刺激が特別に誘導されていない状況では、コルチゾールは骨芽細胞に作用するというものである。骨芽細胞もRANKLによって破骨細胞の分化・誘導をコントロールしている。実験1と異なり、移植を受けていないために骨芽細胞のほうにコルチゾールがより強い作用を示したと考えられる。

一方、実験3では、まず移植によって免疫系が活性化するため、RANKLの発現が増加し、それによる破骨細胞の機能遺伝子の増加も予測通り確認できた(図6、ただしTRAPに関しては増加傾向があるが有意差はない)。ここでのRANKLの増加は、実験1で移植によって骨芽細胞の活性が上がらなかったことを考えれば、骨芽細胞上のRANKLによるものとは考えにくい。そして移植によって免疫拒絶反応が誘導されたウロコでは、コルチゾ

ールによる免疫抑制作用の影響を受けて、遺伝子発現が抑制されている(図7)一方、非移植ウロコでは特に遺伝子発現に変化はなかった(図8)。これらは、移植を受けることによる免疫系の刺激をコルチゾールが抑制することが、破骨細胞の分化抑制という結果につながる可能性を示唆している。

しかし、実験1とは同様に移植による免疫系の誘導を行っているのにも関わらず、移植による破骨細胞活性に変化はなく(図6D)、コルチゾールによる破骨細胞活性への効果も認められなかった(図7D)。これは図2の結果と矛盾してしまうが、考えられる解釈として、3日間の培養によって生体との連絡を断たれ、免疫系による破骨細胞分化の誘導が弱まった可能性がある。今後は培養液にサイトカイン等を添加することで、免疫系をコントロール状態できる実験系を開発しなければならないだろう。

また、移植期間が3日間だったので、さらに期間を長くすることで、より免疫系が強く活性化される状態を作り出して再検討する必要もある。

移植期間により破骨細胞の分化段階も異なりと予想されるので、成熟破骨細胞と未熟破骨細胞それぞれに対するコルチゾールの作用を免疫系との関連で別々に分析できるように、破骨細胞の分化段階の指標となるマーカー等をみつける必要もあろう。

今回の実験では、少なくとも免疫系が関与する破骨細胞の誘導に対して抑制作用をもつことが明らかになった。骨芽細胞のみを選択的に不活性化させるなどして、免疫系以外の破骨細胞分化に関与する要因をより厳密に排除できる実験を行えば、コルチゾールの免疫系に対する効果・破骨細胞分化に対する効果の詳細が明らかになることだろう。

References

1. 『骨研究がわかる シグナル研究から広がる骨代謝と生体制御のクロストーク』(高柳広/著) : 羊土社,2007
2. **Swanson C, Lorentzon M, Conaway H. H, Lerner H. Ulf** 2006 Glucocorticoid Regulation of Osteoclast Differentiation and Expression of Receptor Activator of Nuclear Factor- κ B Ligand, Osteoprotegerin, and Receptor Activator of NF- κ B in Mouse Calvarial Bones. *Endocrinology* 147(7):3613-3622
3. **Defranco J. D, Lian B. J, Glowacki J** 1992 Differential Effects of Glucocorticoid on Recruitment and Activity of Osteoclasts Induced by Normal and Osteocalcin-Deficient Bone Implanted in Rats. *Endocrinology* 131:114-121
4. **Suzuki N, Somei M, Kitamura K, Reiter J. R, Hattori A** 2008 Novel bromomelatonin derivatives suppress osteoclastic activity and increase osteoblastic activity: implications for the treatment of bone diseases *J.Pineal Res.* 44:326-334
5. **Azuma K, Kobayashi M, Nakamura M, Suzuki N, Yashima S, Iwamuro S, Ikenaga M, Yamamoto T, Hattori A** 2007 Two osteoclastic markers expressed in multinucleate osteoclasts of goldfish scales *BBRC* 362:594-600
6. **Watanuki H, Yamaguchi T, Sakai M** 2002 Suppression in function of phagocytic cells in common carp *Cyprinus carpio* L. injected with estradiol, progesterone or 11-ketotestosterone *CBP* 132:407-413
7. **Wang R, Belosevic M** 1995 The invitro effects of estradiol and cortisol on the functional of a long-term goldfish macrophage cell line *Developmental and Comparative Immunology*, Vol. 19, No.4:327-336

側線鱗の穴について

医学科 2年 福与涼介 (共同研究者 加賀谷渉)

1, Introduction

魚類や両生類など、水中に生息している生物は側線という器官がついている。側線とは水流や水圧を感じ取る感覚器官であり、それによって水の変化を感知する。魚類の側線の上にある鱗には穴が開いており、それによって側線に水が接することができる。ここで、側線のある位置にほかの部分から穴の開いていない鱗を持ってきて、そこに移植すると穴があくという情報を得たので、その穴の開く過程を観察しようと思った。

2, Materials and Methods

今回の実験にはキンギョ (*Carassius auratus auratus*) を使用した。キンギョの側線鱗を抜き取り、そこに同じ固体から抜き取った同じくらいの大きさの鱗を差し込み移植した。これを実験群として1個体につき7～8枚用意し、さらに側線でない部分にも3枚ほどの鱗を移植しコントロール群とした。その後、適当に飼育し、3, 5, 7, 10, 14 日後および1ヵ月後に再び抜き取り観察した。観察には TRAP 染色と TRAP 活性測定により行った。

～TRAP 染色～

資料をホルマリン-カコシル酸混合溶液に 10 分間つけることにより固定し、蒸留水で洗浄した後、染色液(37°C DW:4.5ml/Naphthol AS-BI phosphate solution:50 μ l/Acetate solution:200 μ l/Tartrate solution:100 μ l/Fast garnet GBC base solution:50 μ l/Sodium nitrite solution:50 μ l)につける。遮光、37°Cの環境において1時間反応させ、その後に蒸留水ですすいで顕微鏡で観察する。TRAP 染色をすると、破骨細胞の細胞質を紫色に染色できるので、顕微鏡により鱗の何処に破骨細胞が分布しているのかが観察できる。

～TRAP 活性測定～

96 穴のマイクロプレートに1枚ずつ鱗を入れ、緩衝溶液につける。ここでは緩衝溶液として酒石酸 20mM、酢酸 0.1M の緩衝溶液 100 μ lを使用した。そこに反応溶液 (10mM P-nPP 溶液 50 μ l) を加え、20 分間反応させる。そこに停止液 (3N NaOH-50mM EDTA 液 50 μ l) を加え、反応を停止させた。この操作により、P-nPP が酒石酸耐性酸フォスファターゼにより P-nP に変化し、EDTA とキレートを形成するようになり黄色を呈色するようになる。これを分光光度計により吸光度測定にかけることで破骨細胞の活性を測定できる。今回は鱗の外縁部分は元から活性が高いことがわかったいたので、外縁部分を切り取って中心部分のみの活性を計測した。

3, Results

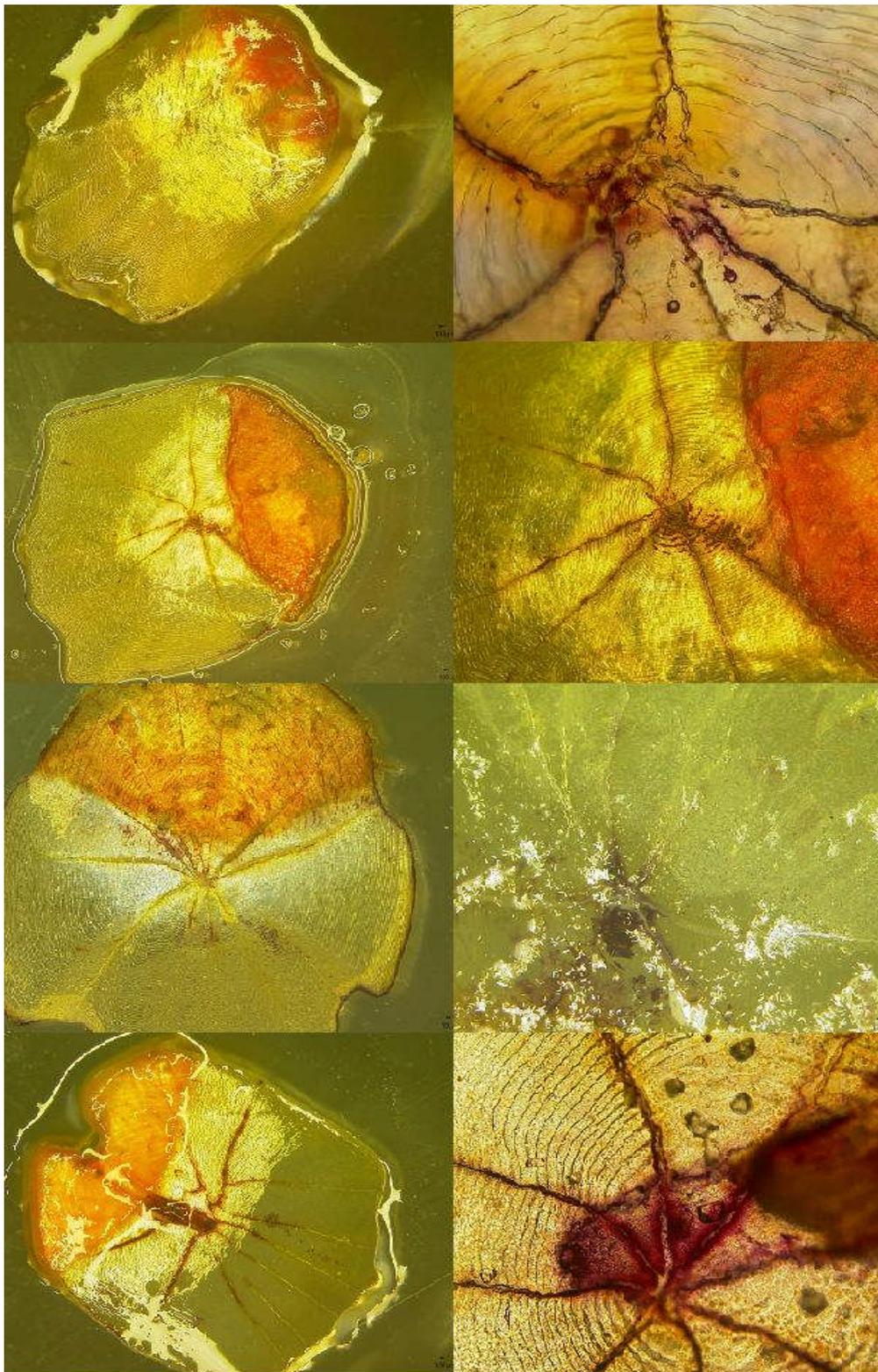


Fig1. TRAP 染色の写真：上から順に 3 日後、5 日後、14 日後、1 ヶ月後 左は低倍、右は高倍率での写真

平均	0.192333	0.226333	0.32675	0.3095	0.034714	0.131714	0.241	0.101667
誤差	0.011	0.030	0.047	0.045	0.005	0.044	0.090	0.052
	実験群	対象群	実験群	対象群	実験群	対象群	実験群	対象群
	3日目		7日目		10日目		30日目	

Fig2. TRAP 活性測定の結果 吸光度は実験群、対象群ともに吸光度データから空の穴の吸光度を差し引いて値を出した。誤差は EXCEL の関数により算出した。

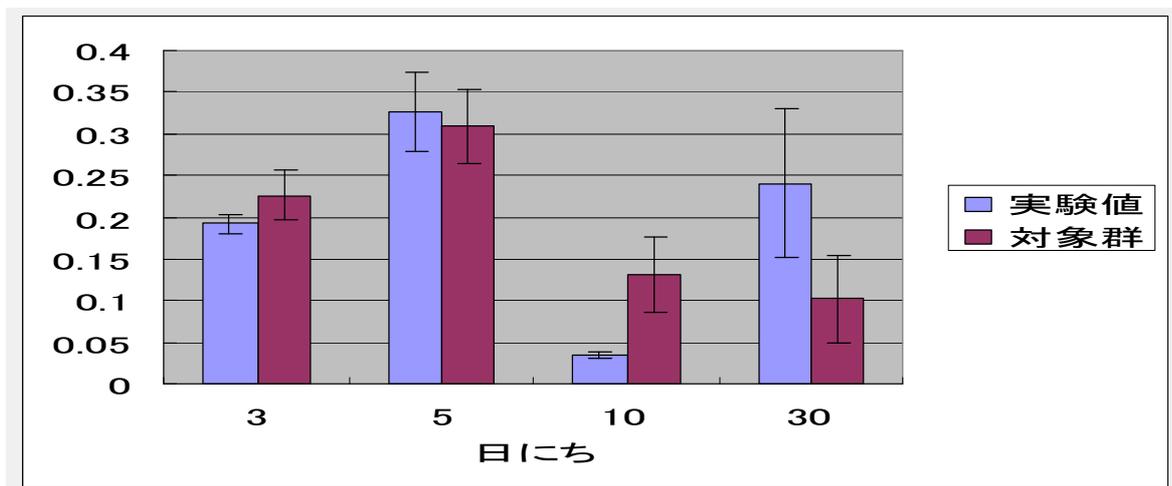


Fig3. TRAP 活性の結果のグラフ 縦軸が吸光度で横軸が移植してからの日数である。

4. Discussion

TRAP 染色の写真により、移植してから3日後には鱗の中心部分に破骨細胞が集まってきており、1ヵ月後には完全に穴が開いていることが観察される。5日後より後の写真により、中心から外縁部分へ伸びている線（溝条）に沿っては骨細胞が集まってきていることが見て取れる。これにより、普段は外縁部分に分布している破骨細胞が溝条を通して中心部に集まり、それによって側線の穴が形成されるものと思われる。14日後と1ヵ月後の間は都合により撮影していないが、14日の段階では溝条が多少太くなっているくらいで穴は開いていないが、1ヵ月後の写真では完全に穴が開いているので、この間の期間の何時かに急激に穴が形成されるものと思われる。

次に TRAP 活性についてだが、対象群が5日まで破骨活性が上昇し、10日後までに低下し安定しているのに対して実験群のほうは10日後にかなり下降している。対象群が移植後に破骨活性があがるのは、側線の位置に鱗を移植するためにほかの部分から鱗を抜き取っているため、その再生鱗を形成するために血中 Ca 濃度を上げる必要があるため鱗から Ca の補充を行っているためと思われる。しかし、実験群の10日目に大幅に値が下降する理由は特に見当たらないので、おそらく実験の手順か、もしくは摘出した後の鱗の保存方法に何かの問題があったと思われる。写真での考察により、14日以降の何時かに穴が形成されるので、そのときまで TRAP 活性の値は高い値をキープしているはずである。もし、穴が急激に形成されるという仮定が当たっていたとしたら、そのときに活性を測ればほかの値と比べて飛びぬけて高い数値が得られるかもしれない。

5, Conclusion

今回の実験では当初の予定より穴が開くまでの時間が長かったことにより急遽1ヶ月後という群を作ったので、14日後と1ヵ月後の間の値が出せなかった。しかし、今回の実験により、側線上に穴のない鱗を移植すると穴が開くという事実を確認することが出来、さらにそれが14日~1ヶ月の間であるということが確実となった。今後の課題としては、もっと正確に穴の開く時を測り、その穴が開くメカニズムを解明するところにあると思う。ある程度、穴が開く期間が絞られてきたので、14日以降をもっと頻繁に観察し、出来れば穴が開いている途中の写真が撮りたい。また、側線の上に移植した鱗だけに穴が開くということは、おそらく側線が鱗の破骨細胞か破骨細胞の前駆体に何らかのシグナルを送っていると思われるので、そのシグナルがどのようにして送られるのか、受け取られるのかを何らかの方法で示せないかと思う。