

国立公衆衛生院研究懇話会記事

第292回（平成6年11月24日）

1. リゾチーム蛋白の構造と機能に関する研究

— 陽イオン性界面活性剤との反応を中心に —

寺田 宙（放射線衛生学部）

脾臓、鼻水、卵白、植物ラテックスなど動・植物体に比較的広く存在するリゾチームは、フレミングによって発見された溶菌酵素であり、その活性の本体は基質であるN-アセチルグルコサミンの重合体を加水分解する β -グリコシダーゼ作用である。リゾチームは基質に対してA~Fまでの6つの結合部位をもっており、その中でもC部位の結合エネルギーが最も大きいことが知られている。またC部位中のTrp-62(N末端から数えて62番目に位置するトリプトファン)が基質との結合に大きく寄与していることが知られているが、その結合様式等は明らかにされていない。

一般に酵素の性質を調べる1つの方法は、阻害剤との反応を調べることである。なかでも拮抗阻害剤は酵素の構造を変化させずにその活性を阻害するのでよく用いられている。陽イオン性界面活性剤であるジメチルベンジルミリスチルアンモニウムクロライド(DBMA)はニワトリ卵白リゾチーム(HEL)に対し拮抗阻害剤として作用することが報告されている。ところで、HEL分子中には蛍光分子であるトリプトファンが基質結合部位に存在する。蛍光は、酵素がある物質と反応する際に起こる蛍光分子近傍の環境の変化に対して敏感である。そこで、今回は、HELとDBMAとの反応機構を明らかにするため、蛍光スペクトル法を用いて、1) DBMAのHELの蛍光スペクトルに及ぼす影響、HELとDBMAとの反応の、2) 濃度、3) 時間、4) pH、5) 温度の各影響、そして6) HELの拮抗阻害剤であるN-アセチルグルコサミンの3量体((NAG)₃)存在下における、両者の反応について調べ、得られた結果を中心に紹介した。

1)、2)の結果、DBMAはHELの蛍光スペクトル

のピークの位置を変化させないこと、また蛍光強度は0.3mM以下のDBMA濃度において増大、0.3mM以上では濃度の上昇に従って減少すること、同様の実験をHEL分子中のTrp-62がTyr-62に置換されている人尿リゾチームについても行ったところ、いずれの濃度でも蛍光強度の減少は認められないこと、以上の結果からHELのDBMAに対する結合部位は親和性の比較的高い部位と低い部位があること、そして親和性の比較的低い部位についてはTrp-62が関与することなどが推察された。3)では、HELとDBMAとの反応の律速段階が一次反応に従うこと、そしてその速度定数が $3.7 \times 10^{-3} (\text{s}^{-1})$ と極めて小さいことが示唆された。4)ではpH2~4の範囲ではpHの上昇に従って相対的な蛍光強度も増大するが、pH4以上ではpHの上昇に従って蛍光強度が減少する傾向が認められ、pH2~4にpK(側鎖の解離定数)をもつAsp-52、pKが6であるGlu-35の関与が推察された。また速度定数のpH依存性もあわせて調べたところ、速度定数はpHの上昇に従って単調に増加していくことが明らかとなり、反応速度についてはHEL分子全体の荷電の影響が大きいことが推察された。また5)で得られた結果についてアレニウスプロットを行い、pH5.6と9.3におけるHELとDBMAの反応の活性化エネルギーを求めたところ、両者に大きな差異は認められなかった。6)ではHELとDBMAとの反応が(NAG)₃によって拮抗的に阻害されることが明らかとなり、DBMAがHELの基質結合部位の1つであるC部位に作用することが示唆された。

現在、動・植物細胞の放射性核種の取り込み機構について研究中である。細胞がある物質を取り込む場合、

細胞膜中の透過系を利用することが知られている。この透過系は蛋白質と脂質からなり、その機能発現には両者の間の疎水の相互作用が関与していると考えられ、本研究への応用が期待される。また人尿リゾチー

ムは白血病や、妊娠において多量に発現されることが知られており、このため放射線照射によるリゾチームの量の変動という観点についても興味を持たれる。

2. 中国重慶市の大気汚染と健康被害

溝口 次夫 (地域環境衛生学部)

1. はじめに

中国重慶市は中国大陸の奥地、東シナ海沿岸から直線距離で約1,500kmのところであり、北緯28°27'に位置している。市街地は長江(楊子江)と嘉陵江の合流点から上流の三角洲と両河の沿岸地域で形成されており、周囲は3,000m近い山に囲まれた盆地になっている。市街地、周辺地域とともに急な坂道になっており、北京や上海のように自転車交通はほとんどなく、交通機関はバス、タクシー、乗用車に限られている。周辺部も含めて人口は1,500万人に近く、中国第一の都市である。

2. 大気汚染

重慶市のモニタリング結果によると同市は中国の大都市の中で最もSO₂濃度が高く(図参照)、浮遊粉じん濃度もかなり高い。

重慶市のSO₂排出量は年間100万トンを超えていると言われており、わが国の人為起源によるSO₂の総排出量に匹敵する。しかも、前述したように高い山に囲まれた盆地の中を二大河川が流れ、年間を通じて風が弱く、大気環境容量が小さいことから、大気汚染の悪化は当然と言える。さらに自動車以外の交通手段がないため、狭い道路での渋滞がこれに拍車をかけている。二大河川からの水蒸気のために従来から霧が深く、年間約270

日もの霧の発生を記録している。産業の発展と共に霧中にSO₂が溶け込み酸性霧を形成し、これも人の健康被害の原因となっている。

3. 健康被害

昭和30年代後半四日市塩浜地区は大気汚染のために慢性気管支炎患者が10%近く出現していた。現在の重慶市の汚染地区では学童、老人などの呼吸器疾患は約20%と言われている。呼吸器疾患以外の健康被害も中国の他の地域と比較すると重慶市はかなり高い罹患率となっている。

4. 大気汚染対策

重慶市は現在、経済成長、産業発展の途上であり、今後ますます大気汚染物質の排出量が増加することが予想される。大気汚染を軽減するためには、重慶市で実用化できる脱硫、脱硝技術を導入する必要がある。そのためには脱硫/脱硝システムに余分に維持費がかからない手法が必要である。そのための方法として、次の3つの技術を提案している。

- (1) ブリケット燃料の使用(小規模施設用)
- (2) 流動層燃焼技術(中規模施設用)
- (3) 石炭吹込み式微粉炭燃焼技術(大規模施設用)

重慶市のためにこれらの技術が採用されることを期待している。

第293回(平成6年12月22日)

1. 窓面からの不快グレアの評価に関する研究

岩田 利枝 (建築衛生学部)

1. はじめに

視野の中に高輝度の部分が存在すると不快グレア(まぶしさによる不快感)を生じる。人工光源を対象にした小さい光源のための不快グレアの研究は1950年代

から進められたが、窓面のような広い面積を持つ光源からの不快グレアに関しては世界的にも有効なデータが不足している。本研究は執務空間での昼光の有効利用を最終的な目的として、窓面からの不快グレアの評

価法について、人工窓を用いた被験者実験を基に検討したものである。

点光源からの不快グレアについては各国でそれぞれの評価法を持つが、基本的には Hopkinson らの以下による式で表される。

$$\text{Glare Index} = 10 \log 0.478 \Sigma \frac{L_s^{1.6} \omega^{0.8}}{L_b P^{1.6}}$$

L_s : 光源の輝度 (cd/m^2) L_b : 背景の輝度 (cd/m^2)

ω : 光源の立体角 (sr) P : ポジションインデックス

また、この式から導かれたグレイインデックス (GI) と対応する感覚は $GI=16$ で感じはじめる, $GI=20$ で気になりはじめる, $GI=24$ で不快になりはじめる, $GI=28$ で耐え難いと感じはじめる, である。

日本は独自の評価法を持っていなかったが、最近国際照明委員会で統一的なグレアの評価法として上式を基にした Unified Glare Rating (UGR) 式を採用することになり、これに従う方向にある。この UGR 式は新たな実験から導かれたものではなく、Hopkinson の式を修正したものである。この修正の理由は工学的簡便さであると考えられるが、Hopkinson の式、UGR 式のいずれでも、光源輝度が高いほど、光源の立体角が大きいほど、背景の輝度が低いほどグレア感が増すことを示している。

2. 大きい光源による従来の式の検討

筆者らはまず人工窓を用いた被験者実験を行い、大きい光源の評価では、従来の小さい光源の評価式を求めた実験のような光源に十分順応した場合の評価ではなく、机の上から窓を見上げた場合のような過渡の評

価が重要であることを示した。また、小さい光源のための評価式ではいずれも背景輝度の重みが大きすぎることを確認した。すなわち、光源が十分に大きい場合、背景輝度を上げてしまふしき感は減少せず、むしろ輝度の高いところでは、背景輝度が大きいほどまぶしさ感も大きくなる傾向があることを示した。

このように不快グレアには「過度の効果」「対比の効果」「総量の効果」があり、小さい光源では「対比の効果」によるところが大きい。大きい光源ではむしろ「過度の効果」と「総量の効果」を評価する必要があると結論し、従来の評価式のように背景輝度のべき指数が光源の大きさによらず一定なままでは、大きい光源に対応できないと考えた。

3. 大きい光源のための不快グレア評価式の提案

以上のように検討した上で、さらに被験者実験を行い、大きい光源のための不快グレアの式を以下のように提案した。

$$\text{PGSV} = 3.2 \log L_s - 0.64 \log \omega + (0.79 \log \omega - 0.61) \log L_b - 8.3$$

ここで PGSV は予測されるグレア感 (Predicted Glare Sensation Vote) で 0: 感じはじめる, 1: 気になりはじめる, 2: 不快になりはじめる, 3: ひどすぎると感じはじめるで表される。この評価式では光源が大きくなると背景輝度の影響が小さくなり、背景が明るくなってもまぶしさが減らない。しかしながら、この式は輝度分布が一様な光源でのみ適用されるもので、実際の窓のような一様でない輝度分布を持つ光源については、さらに研究が必要である。

第294回 (平成7年1月26日)

1. Dorsal skinfold chamber 法を用いた白血球血管内皮相互作用の研究

山田 重行 (生理衛生学部)

1924年に J.C. Sandison が生きている組織の生体顕微鏡観察のための Chamber (観察窓) をウサギ耳介に作製してから種々の Chamber が実験動物あるいはヒトにおいて微小循環を研究するために開発されてきた。

今回は、演者が Harvard 大学から日本に初めて持ち

帰った Mouse dorsal skinfold chamber (マウス背部皮膚窓, MDSC) を紹介し、それを用いて行った白血球と血管内皮の相互作用 (L/E 相互作用) に関する研究のうち、加齢と L/E 相互作用との関連、白血球-血管内皮接着分子の1つである P-selectin を欠損させた Transgenic mouse における虚血再灌流後の L/E 相

相互作用についての知見を報告した。

MDSCの装着手順は以下の通りである。まず除毛したマウスの背部皮膚を摘み上げ、2層の皮膚が適度に伸展した状態になるよう中央に直径11mmの穴を開けたチタン製フレームを、摘み上げた皮膚の側に垂直に装着する。フレームと接していない側の皮膚を直径15mm程の円形に切り、実体顕微鏡を用いて完全に除去し、切り取った円形窓から対側皮膚の微小血管網が観察できるようにする。その上にもう1枚のチタン製フレームを皮膚をサンドイッチ状に挟むように重ねて置き、上下のフレームをビスで固定し、観察面をカバーガラスで被って生体顕微鏡観察ができるようにして終わる。

Chamberは、装着後72時間後には麻酔や外科的侵襲の影響を残すことなく観察が可能となり、以後1ヵ月余に亘って同一血管網を継続して観察できる。観察に際しては、長軸方向に細長い溝が切ってある。動物とほぼ同じ内径のアクリル製パイプにマウスを入れ、溝から筒外にChamberを突き出して観察窓を対物レンズの下にセットできるようにする。筒にはリボンヒーターを着けて37°Cに加温できるようにし、それを保定台に固定して顕微鏡ステージに置き、無麻酔下で観察を行う。

MDSCと蛍光生体顕微鏡を組み合わせることでより微小循環障害発生の基礎的現象であるL/E相互作用が観察できる。演者は、若いマウスの血管内皮上をローリングする白血球数が古いマウスのそれより少ないことに偶然気づき、この観察が、L/E相互作用の強さが加齢と共に変化し増大することを示唆するものと考え、それを検証した。

MDSCを装着した4週から1年令(4, 5, 7, 10, 14週及び1年の6群)の雄C3Hマウスを用い、1個体につき3~4本の後毛細管細静脈(12~31 μ m)を選定して尾静脈より0.1%ローグミン生理食塩水溶液50 μ lを注入し、直ちに赤血球速度計測用の録画を1分間行い、次いで水銀ランプ落射光によりL/E相互作用解析用の録画を30秒間行った。上記操作を全選定血管について順次無麻酔下で行い、録画終了後、白血球数及びヘモグラム検査用の採血を心臓より行った。L/E相互作用の解析のために、録画した30秒間に所定の200 μ m長の血管内を流下する白血球数及び接着、ローリングす

る白血球数を計数した。その結果、少なくとも30秒間血管内皮から離れずにいる接着白血球数は、6群間で有意な差が認められなかったが、流下、接着、ローリング白血球数の和に対する百分率で表わしたローリング白血球パーセント(RLP)は、7週令で有意に増加し、10週令でピークとなり、以後僅かに減少する加齢変化を示した。8V/D(V:平均赤血球速度、D:口径)として計算された擬ずり速度は6群間に差が認められず、ほぼ類似の値であった。血液検査値には加齢に伴う有意な変化が認められたが、その変化パターンはRLPの加齢変化に一致するものではなく、ローリングの加齢変化が少なくとも白血球数や白血球分画の変化によるものではないことが示された。以上の結果から、白血球と血管内皮間の係留(tethering)相互作用は加齢の早い時期に増大し、それには内皮上のP-selectin等の発現が関与しているものと考えられた。また、本実験は皮膚の老化防止等の研究のための有効な実験系となることが期待された。

次いで、P-selectinのL/E相互作用への関与の様態を検討するために、P-selectin欠損マウス(PSDM, Cell, Vol.74, 541-554, 1993)とその野性型非欠損マウス(WTM)における虚血再灌流後のL/E相互作用の経時変化を観察した。虚血再灌流は、マウスを保定筒に入れ、観察面の裏側の皮膚上に直径10mm厚さ2mmのプラスチック製円形チップを置き、それを特製の虚血作製器で50~55mmHgに圧迫して皮膚血流を杜絶し、そのまま虚血状態で4時間放置し、その後圧迫を解除して灌流を再開した。上述の加齢実験と同様に1個体につき3本の後毛細管細静脈を選定し、それぞれの血管の同一部位を虚血前および虚血再灌流の0.5, 3, 6, 24時間後に無麻酔下で観察、録画した。その結果、RLPは虚血再灌流によって増加し、24時間後には虚血前値に戻った。PSDM群の値がWTM群より全ての時点で有意に低いことが特徴的であった。単位血管内皮面積当たりで表した接着白血球数は、RLPと同様虚血再灌流によって増加し、24時間後には虚血前値に戻ったが、2群の値はほぼ同値で推移した。一般に、虚血再灌流後の赤血球速度は虚血再灌流障害により増加する。WTM群では3時間後から有意な平均赤血球速度の増加が認められたが、PSDM群では有意な増加が認められなかった。口径は30分後に僅かに

増大したのみで顕著な変化が示されなかったため、擬ずり速度は平均赤血球速度とほぼ同じ変化パターンを示し、WTM群の3時間以降で高値となった。

ずり応力はL/E相互作用に影響を及ぼし、高いずり応力はL/E相互作用を減弱させる方向に作用する。従って、虚血再灌流後に擬ずり速度の上昇を見なかったPSDM群にずり応力によるL/E相互作用の減少効果が効いていたとは考え難く、この群の低いRPL値はP-selectin欠損に起因するものと考えられた。接着

白血球数の変化に2群間で差が認められなかったことと考え併せると、この接着分子が白血球のrecruitmentからextravasationまでの一連のL/E相互作用のうちの係留相互作用の発現に強く関与していることが示唆された。また、虚血再灌流後の赤血球速度の増加がPSDM群で認められなかったことは、P-selectinが虚血再灌流障害の発生に関与していることを窺わせた。

2. ポルフィリン症研究の現状と問題点

近藤 雅雄 (栄養生化学部)

ポルフィリン症はヘム生合成系の酵素の遺伝的障害により生じる一連の疾患群をいう。この系には8個の酵素が関与しているが、すべての酵素において遺伝的障害が証明されている。ポルフィリン症は稀少疾患であり治療法が確立していないが、その特異的な症状(殆どすべての神経障害、精神障害、消化器症状、内分泌症状、皮膚症状、造血障害など)と発症年齢(0-70歳)が様々である。本症は、古く医聖といわれるヒポクラテスにより既に紀元前460年頃に記載されているが、現在の定義では世界最初の報告例は1876年Schultzによって、また、わが国では1920年、佐藤ら(東北帝国大学)が先天性ポルフィリン症を報告したのに始まる。

本症は各病型とも世界中に分布するが、疫学的調査の報告は少ない。その理由として、1)本症が比較的まれな疾患であり、誤診が多いこと。2)急性ポルフィリン症(ポルフィリン症8病型中4病型)は症状が間欠性であり発作があっても治療によってはほぼ完全に回復し、後遺症を残すことが少ないこと。3)大部分の病型は遺伝的障害のみでは発症せず、これに何らかの誘因が加わって初めて発症するため、発症者数と不顕性遺伝子保有者(キャリア)数との間に大きな解離があり、いずれに基点を置くかにより統計的にはまったく異なった結果が出ること、などが困難な理由と思われる。

わが国では1992年までの約70年間に612例の患者が報告されている。本症の殆どは常染色体優性遺伝であり、生体内外の環境の変化により主に発症する。したがって、生涯発症しないキャリアが多く、逆に誘発因子(月経、生理不順、妊娠等の内的因子;鎮痛剤、風

邪薬、アルコール、ストレスなどの多くの薬物・外的因子)により急激にポルフィリンの代謝異常を引き起こし、発症するためキャリアの早期発見は極めて重要である。急性発症した場合、早期に治療しないと死亡する例も多い。

本稀少疾患は世界においてもわが国に比較的多く、ポルフィリン症の研究は国際的に注目されている(ポルフィリン症の1病型である先天性骨髄性ポルフィリン症は世界中で約100例報告されているにすぎないが、わが国では33例が報告されている。しかしケアはまったく成されていないのが現状である)。本疾患は患者数(年間数十例が報告)が稀少なために、医師の教育、広報が不十分であり、誤診が多く、誤って開腹手術する例が多い。また、優秀な医師によって発見されても治療及びケアが確立されておらず、対症療法の域を脱していないのが現状である。さらに、臨床、生化学的研究に対する国内の対応としては、本疾患が稀少疾患であることから予算化が極めて困難な現状にある。

これらの現状から、現在早急に検討すべき問題点として、1)疫学調査を全国規模で行い、本症の臨床統計、患者の分布等を把握し、患者登録、患者手帳を発刊し、患者の生涯ケアを行う必要がある。2)本症の誘因・増悪因子として薬剤は重要な位置を占めているが、新薬がどんどん開発されている現在、これらの安全性に対する情報システムがまったくなく、これらの情報を伝える手段・システムの整備が必要である。3)遺伝子診断を含め診断法の確率を早急に行い、早期診

断により患者の発症を予防し、健常人と同じ日常生活が送れるよう予防法の確立も同時に検討する必要がある。4)本疾患の遺伝子異常を解明し、障害遺伝子を実験動物に組み替え、実験動物を作成すると同時に、本症の遺伝子治療を含め各種治療法の確立を行うための

基礎的な実験が必要である。5)本症については、いまだに、医師、医療従事者への教育体制が不備であり、そのため、発見が送れるケースが多い。そこで、全国医療従事者に広報すべく、学術図書、パンフレット等の作成を行う必要がある。

第295回 (平成7年2月23日)

1. 乳幼児における腸管アデノウイルス感染について

西尾 治 (衛生微生物学部)

1. 目的

日本、タイおよびパキスタン乳幼児における腸管アデノウイルス (EAd), すなわちアデノウイルス40型 (Ad40) および41型 (Ad41) の感染状況を明らかにすることを目的とした。

2. 材料と方法

1971年から1993年の間に愛知県下に在住する乳幼児下痢症患者2,064名, 同時期の健康者940名および下痢症以外の各種疾患患者10,237名, タイ, チェンマイ地区の新生児16名について誕生直後から毎週1回, 2年間連続して糞便を採取した。1989年から1993年の間にパキスタン, カラチ地区の下痢症患者551名, ポリオ患者215名, 健康者249名の糞便を用い, Ad40およびAd41特異モノクローナル抗体を用いた酵素免疫吸着法でAd40およびAd41の検出を行なった。さらにAd41 DNAについて制限酵素の切断泳動パターンについて検討するとともに, ファイバー (long) 部分のシーケンスを行った。

3. 結果

1971年から1993年の愛知県下に在住する乳幼児下痢症患者からの腸管EAdの検出率は3.0%で, Ad40は2.2%およびAd41は0.8%であった。Ad40およびAd41共にほぼ毎年のように検出され両ウイルス共に常在性と考えられた。同時期の健康者の糞便からは0.2%, 上気道炎は0.5%であった。日本では6月および7月に多く検出された。またEAdが検出された年齢は1歳以下が75%以上を占めた。

タイでは生後2年間に16名中4名がEAdに感染し, Ad41が3名 (1名はAd5と混合感染), Ad40とAd41に感染したものが1名であった。このうち下痢症

状が見られたのはAd40に感染した1名のみであった。

パキスタンの乳幼児下痢症からのEAd検出率は2.2%, Ad40およびAd41共に1.1%で, 健康者は0.4%, ポリオ患者は0.9%であった。日本ではAd41よりもAd40の方が多く, パキスタンでは両ウイルスが同数検出された。日本のAd41 DNAの制限酵素切断泳動パターンは1975年, 1979年から1986年および1987年以降の3つに大きく分けることができた。日本, パキスタンおよびタイ国のAd41 DNAの泳動パターンを比較したところ, 日本, パキスタン, タイ国で少し異なったパターンも見られた。

1992年の日本の株のファイバー部分のシーケンスではTak株 (1973年のオランダの株) と比較したところほぼ99%で一致した。また1991年および1992年のタイ株は極めて変異が少なく99.4%から99.8%で, パキスタンの株は最も変異が多いが, 98%で一致した。

4. 考察およびまとめ

日本およびパキスタンともに, EAd感染は主に1歳以下の乳幼児の間で, 年間を通じ生じており, 下痢症の起因となっている。下痢症に対する割合は日本では3.0%, パキスタンでは2.2%であった。パキスタンでは下痢症に他の要因 (細菌等) が日本よりも関与していると考えられた。EAdによる下痢症はA群ロタウイルスに比べ1/7から1/9程度と推測された。Ad41の制限酵素切断パターンからはDNA変異は少ないものと考えられた。日本, パキスタンおよびタイ国の間では切断パターンに違いが見られ, 国によるウイルスDNAの相違が認められた。ファイバー (long) 部分のシーケンスではタイ国のウイルスが最も変異が少なく, 次

いで日本，パキスタンの順であった。しかしその変異は極めて少数であった。Ad41のDNAは変異が少なく，時間をかけてゆっくりと点突然変異を起こしてい

るものと考えられた。本研究は愛知県衛生研究所，チェンマイ大学，カラチ市民病院等と共同研究である。