

- pp15, 克誠堂出版, 1994.
- 3) Lee, J. Y., Yang, C. C., Chao, S. C., Wong, T. W. : Histopathological differential diagnosis of keloid and hypertrophic scar. *Am J Dermatopathol.* 26(5) : 379-384, 2004.
 - 4) Ogawa, R., Mitsuhashi, K., Hyakusoku, H., Miyashita, T. : Postoperative electron-beam irradiation therapy for keloids and hypertrophic scars : retrospective study of 147 cases followed for more than 18 months. *Plast Reconstr Surg.* 111 (2) : 547-553, discussion 554-555, 2003.
 - 5) Rahban, S. R., Garner, W. L. : Fibroproliferative scars. *Clin Plast Surg.* 30 (1) : 77-89, review, 2003.
 - 6) de Felice, B., Ciarmiello, L. F., Mondola, P., Damiano, S., Seru, R., Argenziano, C., Nacca, M., Santoriello, M., Garbi, C. : Differential p63 and p53 expression in human keloid fibroblasts and hypertrophic scar fibroblasts. *DNA Cell Biol.* 26(8) : 541-547, 2007.
 - 7) Vincent, A. S., Phan, T. T., Mukhopadhyay, A., Lim, H. Y., Halliwell, B., Wong, K. P. : Human Skin Keloid Fibroblasts Display Bioenergetics of Cancer Cells. *J Invest Dermatol.* 128 (3) : 702-709, 2008.

綜合臨牀 第58巻第1号

(平成21年1月1日発行 別刷)

皮膚の再生医療の実際と課題

Practical skin regeneration and its shortcoming

秋田 定伯

AKITA Sadanori

永 井 書 店

皮膚の再生医療の実際と課題

Practical skin regeneration and its shortcoming

特集

秋田 定伯
AKITA Sadanori

Regenerative Medicine—
期待される21世紀の新しい医療

Key words 骨髄由来細胞 人工真皮 皮膚付属器

骨髄由来幹細胞が組織修復、心筋¹⁾、血管²⁾、受傷後の骨、腱、軟骨³⁾、半月板、皮膚再生⁴⁾⁵⁾に関与する。最近の研究では、骨髄由来細胞の多くは皮膚の細胞になると報告されている⁶⁾⁷⁾。正常皮膚には骨髄由来細胞があり、宿主免疫と創傷治癒を含めた炎症過程にすると理解されている。一方では、骨髄由来細胞は皮膚を構成するケラチノサイトや線維芽細胞の生成に貢献するとの報告もある^{8)~9)}。白血球の凝集と同様に、骨髄由来幹細胞は、骨髄前駆細胞を含めて皮膚などの障害を受けた部位に集合可能である。骨髄由来細胞の組織修復/再生について検討する。

骨髄由来幹細胞による 組織修復/再生

骨髄幹細胞には2系統あって、造血幹細胞(HSC)と間葉系幹細胞(MSC)がある。成人骨髄由来HSCは造血系の全部に関与し、赤血球、血小板、白血球系列の幹細胞と考えられてきた。興味深いことには、HSCが肝細胞⁹⁾、血管内皮細胞、平滑筋細胞、心筋細胞¹⁾などの非造血系の細胞産生に関与するとの報告もある。骨髄由来間葉系幹細胞は自己再生し、非造血系組織の前駆細胞である。骨髄内の細胞比率はおそらく有核細胞のなかでは0.001~0.01%にすぎず、HSCと比較しても1/10未満である。

骨髄由来幹細胞の損傷部位への定着

骨髄由来幹細胞が骨髄から出て行き、血流内を通過して損傷部位に定着可能であることが示されてきた²⁾。

骨髄由来血管内皮前駆細胞(EPC)は、HSC系列に加えられているものの、骨髄から末梢血に移動可能であり¹⁰⁾、サイトカインで動員可能である。循環血中のEPCは成人末梢血からCD34+細胞として分離、培養・増幅され体外で血管内皮細胞に転換された。この発見が、胎生期において中胚葉系細胞分化のみが血管芽細胞に分化し、さらに血管内皮細胞に分化する概念を変えた。循環血中のEPCは正常成人血管内皮細胞を一定の割合で構成している²⁾。

またEPCは創傷治癒に関与すると考えられて

いる。

骨髄由来間葉系幹細胞の凝集・定着能についてはさまざまな研究で検討されているものの、間葉系幹細胞(MSC)特異的マーカーがないために血中または組織内の内因性MSCを追跡不可能である。体外増幅後の骨髄由来MSCを、致死量の放射線照射後のヒビの全身性に注入すると細胞の皮膚、小腸、肝、肺、胸腺、腎などの多臓器での長期間定着を認めている。骨髄間葉系幹細胞の増殖能、分化能が強力であり、皮膚創傷への定着と治癒促進/再生を誘導することが推察される。

骨髄由来細胞と再生皮膚細胞

骨髄由来細胞は皮膚の細胞の大きな割合を占める⁶⁾⁷⁾¹¹⁾。C57BLマウス骨髄を刺激緑色蛍光蛋白(EGFP)トランスジェニックマウス骨髄由来幹細胞(BMSC)で再建したキメラモデルが使用されており⁶⁾、多くのEGFP陽性骨髄由来細胞が正常皮膚に認められ、創傷治癒過程に積極的に関与していることが分かった。さらに正常皮膚のEGFP陽性骨髄由来細胞のうち1/3がCD45陰性であり、紡錘形真皮線維芽細胞群のおよそ15~20%を占める。

マウス皮膚硬化モデルにGFP陽性骨髄由来細胞を全身性に注入すると、正常皮膚細胞のうち8.7%がGFP陽性細胞であり、GFP陽性骨髄由来細胞は線維硬化部位でのI型コラーゲン発現の線維芽細胞様細胞に重要な割合を占め、ガン移植における誘導線維硬化59.7%、切開誘導線維化の32.2%を占めており、そのうちCD45陽性細胞も含まれる¹¹⁾。

この結果から骨髄由来細胞は炎症細胞制御に関与するばかりでなく、皮膚のとくに創傷治癒の線維芽細胞に関与すると思われる。さらに、骨髄由来細胞はケラチノサイト産生にも関連するとの報告もあり、EGFP再構築マウスモデルを用いてEGFP陽性骨髄由来細胞は表皮、毛包周辺に多数認められている⁶⁾⁷⁾。他にも致死量放射線照射後

のC57BLマウスにおいて(体毛は黒色)Balb/C白色体表由来Flk陽性骨髄由来幹細胞を移植すると、マウスは白色毛を再生し、白色体毛部位皮膚を用いた免疫組織、RT-PCR法、細胞培養では細胞はドナー由来であった⁷⁾。

骨髄由来幹細胞の皮膚構造と創傷治癒への関与

これまでに骨髄由来幹細胞は皮膚修復/再生に関与すると示唆されてきた⁵⁾⁻⁸⁾¹²⁾。骨髄由来細胞はいくつかの研究で皮膚表皮に見つけられている。骨髄由来表皮細胞は表皮内で増殖性を有し、幹細胞ニッチであるCD34陽性毛包膨大部に局在する傾向があることが知られている⁸⁾。さらに、表皮への骨髄細胞の動員は損傷皮膚で有意に多く認められ、骨髄由来ケラチノサイトは生体内で表皮再生が可能なコロニーを形成する。このコロニー形成能力は*in vitro*でも再現可能である。多くの研究で、表皮での骨髄由来ケラチノサイトにとって分化能が重要であると結論づけている¹²⁾¹³⁾。

Cre/loxシステム、 β ガラクトシダーゼを用いたEGFP発現トランスジェニックマウスモデルでは、間葉系幹細胞を含めた骨髄由来細胞は皮膚表皮細胞、肝、肺に細胞融合なしに分化可能であった¹³⁾。間葉系幹細胞からケラチノサイトへの分化誘導は、*in vitro*の骨髄由来間葉系幹細胞と気道上皮の共培養で表皮形質を示し、上皮系の単一培養として上皮系ケラチン発現を認める¹⁴⁾。

培養EPCは血管内皮増殖因子(VEGF)、肝細胞増殖因子、G-CSF、GM-CSF、血小板由来増殖因子-B(PDGF-B)など増殖因子を放出しており、内因性の血管内皮細胞と心筋細胞の保護効果を示している。骨髄由来間葉系幹細胞は培養するとVEGF、塩基性線維芽細胞増殖因子(bFGF)、IL-6、胎盤増殖因子(PlGF)、単核球遊走因子を産生すると報告されている。

骨髄由来間葉系幹細胞のうち皮膚に存在するのは表皮の発生を調整する。真皮におけるケラチ

ノサイトと間葉系細胞の相互連絡交流が、皮膚の構造維持に不可欠であると報告されている。ヒト間葉系幹細胞は隔壁二重培養にて、血管内皮細胞や真皮線維芽細胞と比較して、ケラチノサイトとの培養にて有意に走化遊走性を示した¹⁵⁾。重症感染症、重篤な外傷などによるこの連絡網の遮断が、創傷治癒過程における上皮化遅延を引き起こし、高頻度に線維硬化像を認めることになる。骨髓由来間葉系幹細胞、皮下脂肪前駆細胞、真皮線維芽細胞はおのおの個別に表皮再生時のケラチノサイトに影響すると報告されている。皮膚再生モデルにおいて、ケラチノサイトと間葉系細胞を共培養するとケラチノサイトの生存率が向上し増殖促進することが分かった。骨髓由来間葉系幹細胞はとくに表皮の稜線構造に関与しており IL-1/c-Jun 系情報伝達とは異なる経路を通じている。またここでも骨髓由来間葉系幹細胞の特異的マーカーが欠けており、皮膚での量、生物学的意義は不明である。

骨髓の幹細胞には、他にどのような細胞が皮膚を構成するのか不明である。理論的には循環血中の EPC は、皮膚の血管内皮細胞に関与するであろうと思われるが、EGFP 陽性骨髓由来細胞では血管構造を作ることができていない。EPC は虚血組織の血管新生に参加することが分かっており²⁾、将来的には EGFP 陽性骨髓細胞の創傷治癒での新生血管への役割について、血管内皮特異的マーカーを用いて検討すべきである。

創傷治癒における骨髓由来線維細胞

骨髓由来幹細胞 (HSC, MSC, EPC を含む) は骨髓内細胞の有核細胞のなかで 1% 未満であり、末梢血中有核細胞においてはさらにその数は少ない。この少ない数を考慮して、骨髓由来幹細胞が他の細胞に分化する前に急速に増殖しない限り、創傷内で EGFP 陽性骨髓由来細胞の大部分を占めるとは考えられにくい⁶⁾¹¹⁾。

線維細胞は新たに発見された白血球分画であ

り、末梢循環血中において炎症細胞として、さらに受傷部位に瞬時に侵入する。線維細胞はマウスの血中から移植後の創傷チャンバーへ急速かつ特異的な凝集細胞として同定された¹⁶⁾。線維細胞は末梢血中の 0.1~0.5% を占めており、単核球と線維芽細胞様特徴を持ち I 型コラーゲン、ファイブロネクチン、CD11b, CD34, CD45 を発現するが、CD14, CD3, CD10 は発現しない。末梢血中、創傷部位、リモデリング組織中に存在する¹⁶⁾。

線維細胞は骨髓を起源とし、創傷部位での筋線維芽細胞への関連が示唆されている。細胞外マトリクスの分泌、抗原呈示、サイトカイン産生、血管新生、創閉鎖などのさまざまな機序に関与すると考えられている¹⁶⁾¹⁷⁾。例として、線維細胞はケモカイン受容体である CCR5, CCR7, システイン-X-アミノ酸-システイン (CXCR4) を通じて損傷部位に急激に侵入し、I, III 型コラーゲン、ファイブロネクチンを産生し創傷治癒に関与する¹⁶⁾¹⁷⁾。

線維細胞は CD4+, CD8+ T リンパ細胞に抗原呈示し、遊走因子を分泌しつつ免疫反応を刺激する。さらに線維細胞は血管新生を *in vitro*, *in vivo* で誘導するとされている¹⁸⁾。また、 α 平滑筋細胞を介して創収縮に関与する¹⁷⁾。熱傷患者から I 型コラーゲンおよび CD34 陽性細胞を以前、末梢血単核細胞 (PBMC) から線維細胞を定量したところ、熱傷患者では、健康人では 0.5% 未満であるのに対して末梢血単核細胞のうち 10% 近くまで増加した。線維細胞は分化過程のなかで徐々に CD34 発現を失っていくので¹⁷⁾、創傷部位における線維細胞の正確な定量同定のためには、安定した線維細胞マーカーが必要である。

熱傷患者と健康人由来の線維細胞培養において、線維細胞マーカーの白血球特異タンパク (Leukocyte-specific protein 1, LSP-1) を二次元電気泳動と分光分析特異解析にて同定した¹⁹⁾。LSP-1 と I 型コラーゲン C 末端抗体による二重染色にて、培養細胞と組織から線維細胞を検出した。さらに最近の研究で、熱傷患者由来の線維細胞が

真皮線維芽細胞の機能を調整することが分かった。これらデータから、骨髄由来線維細胞は皮膚において周囲細胞と相互作用を有し、正常および肥厚性瘢痕などの異常創傷治癒に重要な役割を有すると考えられる。組織修復・リモデリングにおける骨髄由来間葉系幹細胞と線維細胞は相反的である。循環血中の線維細胞はプレオマイシン誘導性の肺炎症部位に定着し、線維芽細胞に分化し肺線維症の病態となる。対照的に全身性の骨髄間葉系幹細胞の投与により、プレオマイシン誘導性肺炎症とコラーゲン沈着を抑制する。



皮膚由来間葉系幹細胞と骨髄由来間葉系幹細胞を模倣する他の組織

“間葉”は胎児の組織を包み込む疎な結合織であり、主に中胚葉からなり成人の大部分の結合織細胞を構成する。ヒト頭皮由来間葉系幹細胞様細胞は、ヒト間葉系幹細胞培地(Dulbecco's modified Eagle medium + 10% FBS)へEGFおよびbFGF補充の後、限界希釈法でクローン細胞が単離可能となった。培養頭皮間葉系幹細胞は表面膜抗原のCD90, SH2, SH4, CD166, CD44, CD49d-e ヒト白血球抗原Iを発現し、ヒト骨髄由来間葉系幹細胞と近似している。

非骨髄由来間葉系幹細胞起源のものは、単離方法の標準化や規格培地はないものすべて骨髄由来間葉系幹細胞と同様の膜表面マーカーを発現している²⁰⁾。骨髄由来間葉系幹細胞と他の組織由来間葉系幹細胞の相似性で問題となるものは、骨髄の間葉系幹細胞は成人臓器のあらゆる間葉系組織の修復と再生に構造上関与する。間葉系幹細胞は骨髄に定着し、全身的注入で多くの間葉系組織が出現する。さらに重要なことは間葉系幹細胞様接着細胞として、骨髄由来間葉系幹細胞と同等の膜表面タンパク発現と分化能を有する細胞が臍帯血、胎児血中、G-CSFまたはGM-CSF投与後の成人血中から分離されている。これらは、一定の環境下に正常胎児あるいは成人血中に循環間葉

系幹細胞の存在を示唆するものである。



骨髄由来幹細胞と人工皮膚

早期切除と広範囲の皮膚欠損、熱傷部位の被覆は、救命と肥厚性瘢痕発生を減少化させる。自家皮膚移植の疼痛、瘢痕、感染、さらにドナー部位の治癒の問題から人工真皮が開発されてきた。人工真皮のなかには、豚皮を使用した一過性のもの、ウシを成分とするもの、合成膜、同種皮膚、理想的永久人工真皮などがある。細胞培養技術の発達と人工物技術の発展により、ケラチノサイトおよび線維芽細胞を含めた自家または同種人工真皮が開発されてきた。

同種由来のフィブリンや異種由来のコラーゲン、ヒアルロン酸マトリクスなども含まれる。理想的には人工皮膚には細胞外マトリクスの合成、リモデリング、ケラチノサイトの増殖と分化が可能な表皮を含むことが必要である。人工表皮培養は生検からの自家表皮により、培養表皮を含み広範囲欠損を永久に被覆可能となる。レシピエント部位からの真皮層への急速な血管開通が、移植表皮の生存には最も重要である。人工真皮の条件を改善するために種々のサイトカインを組み込んだりしたもの、ほとんど成功していない²¹⁾。

骨髄由来幹細胞の皮膚再生臨床応用が検討されている。骨髄由来幹細胞は多くの場合、周辺条件によって分化系列が決まることから、骨髄幹細胞と分化系列を含んだ細胞を混合した骨髄由来細胞を用いて実験した⁴⁾。GFP陽性トランスジェニックマウス由来骨髄細胞は、胎生期17.5日のマウス胎児皮膚細胞との混合によりヌードマウス背部皮膚欠損部位に移植すると、3週間以内に皮膚と毛が完全に再生した。GFP陽性細胞は表皮、毛包、脂腺および真皮に認められた。細胞局在と形態を免疫組織法により確認すると骨髄由来細胞が表皮ケラチノサイト、脂腺、毛包表皮、樹状細胞、血管内皮細胞に分化した⁴⁾。骨髄由来細胞の移植の際には病変部位は上皮化しておらず、シリコン

チャンバーの除去に伴って、皮膚周辺からの急速な上皮化を認めたことによりニッシュ細胞、他の皮膚細胞が骨髄由来幹細胞が生存して分化するためには必要と考えられた。本研究では骨髄のどの幹細胞が皮膚を再生したのかは不明であった⁴⁾。ヒト骨髄由来間葉系幹細胞とブタ由来人工真皮を用いてヌードラット全層欠損皮膚に移植し、創傷治癒の促進とラットと交差発現しないヒト由来パンサイトケラチンが移植表皮に認められ、ヒト骨髄由来間葉系幹細胞がケラチノサイトに分化したと推測される⁵⁾。とくに骨髄由来間葉系幹細胞は *in vitro* でも表皮、皮膚付属器に一定条件下で分化可能である。



結 論

血液は皮膚に可溶性成分のみをもたらすのでは

なく細胞も供給し、動的に皮膚または他の組織を治癒させる。骨髄由来細胞は炎症細胞や真皮内での間葉系細胞に関与するばかりでなく、表皮ケラチノサイトにも関与する。多くの問題は残っているものの、骨髄由来細胞が皮膚へ分化誘導している。正常皮膚の構成に骨髄由来細胞が必要か、どの骨髄由来細胞または骨髄由来幹細胞にそのような働きがあるのかは不明である。骨髄由来幹細胞の創傷治癒における有用性はさらに研究が必要である。骨髄由来間葉系幹細胞がケラチノサイトに分化し上皮化し創閉鎖となるのか検討を要する。創傷治癒、リモデリング、皮膚移植起源における骨髄由来間葉系幹細胞と血管内皮前駆細胞の役割はさらなる検討を要する。

これらの研究から、皮膚の恒常性維持、創傷治癒過程理解、皮膚欠損・慢性創傷への新規治療方法の開発が将来嘱望されている。

文 献

- 1) Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, et al : Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature* 410 : 701-705, 2001.
- 2) Rafii S, Lyden D : Therapeutic stem and progenitor cell transplantation for organ vascularization and regeneration. *Nat Med* 9 : 702-712, 2003.
- 3) Noel D, Djouad F, Jorgense C : Regenerative medicine through mesenchymal stem cells for bone and cartilage repair. *Curr Opin Investig Drugs* 3 : 1000-1004, 2002.
- 4) Kataoka K, Medina RJ, Kageyama T, et al : Participation of adult mouse bone marrow cells in reconstitution of skin. *Am J Pathol* 163 : 1227-1231, 2003.
- 5) Nakagawa H, Akita S, Fukui M, et al : Human mesenchymal stem cells successfully improve skin-substitute wound healing. *Br J Dermatol* 153 : 29-36, 2005.
- 6) Fathke C, Wilson L, Hutter J, et al : Contribution of bone marrow-derived cells to skin : collagen deposition and wound repair. *Stem Cells* 22 : 812-822, 2004.
- 7) Deng W, Han Q, Liao L, et al : Engrafted bone marrow-derived flk-(1+) mesenchymal stem cells regenerate skin tissue. *Tissue Eng* 11 : 110-119, 2005.
- 8) Brittan M, Braun KM, Reynolds LE, et al : Bone marrow cells engraft within the epidermis and proliferate in vivo with no evidence of cell fusion. *J Pathol* 205 : 1-13, 2005.
- 9) Lagasse E, Connors H, Al Dhalimy M, et al : Purified hematopoietic stem cells can differentiate into hepatocytes in vivo. *Nat Med* 6 : 1229-1234, 2000.
- 10) Asahara T, Murohara T, Sullivan A, et al : Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science* 275 : 964-967, 1997.
- 11) Ishii G, Sangai T, Sugiyama K, et al : In vivo characterization of bone marrow-derived fibroblasts recruited into fibrotic lesions. *Stem Cells* 23 : 699-706, 2005.
- 12) Borue X, Lee S, Grove J, et al : Bone marrow-derived cells contribute to epithelial engraftment during wound healing. *Am J Pathol* 165 : 1767-1772, 2004.
- 13) Harris RG, Herzog EL, Bruscia EM, et al : Lack of a fusion requirement for development of bone marrow-derived epithelia. *Science* 305 : 90-93, 2004.
- 14) Wang G, Bunnell BA, Painter RG, et al : Adult stem cells from bone marrow stroma differentiate into airway epithelial cells : potential therapy for cystic fibrosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 102 : 186-191, 2005.

- 15) Akino K, Minoda T, Akita S: Early cellular changes of human mesenchymal stem cells and their interaction with other cell. *Wound Repair Regen* 13: 434-440, 2005.
- 16) Bucala R, Spiegel LA, Chesney J, et al: Circulating fibrocytes define a new leukocyte subpopulation that mediates tissue repair. *Mol Med* 1: 71-81, 1994.
- 17) Abe R, Donnelly SC, Peng T, et al: Peripheral blood fibrocytes: differentiation pathway and migration to wound sites. *J Immunol* 166: 7556-7562, 2001.
- 18) Hartlapp I, Abe R, Saeed R, et al: Fibrocytes induce an angiogenic phenotype in cultured endothelial cells and promote angiogenesis in vivo. *FASEB J* 15: 2215-2224, 2001.
- 19) Yang L, Scott PG, Dodd C, et al: Identification of fibrocytes in postburn hypertrophic scar. *Wound Repair Regen* 13: 398-404, 2005.
- 20) Jeong JA, Hong SH, Gang EJ, et al: Differential gene expression profiling of human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells by DNA microarray. *Stem Cells* 23: 584-593, 2005.
- 21) Sahota PS, Burn JL, Brown NJ, et al: Approaches to improve angiogenesis in tissue-engineered skin. *Wound Repair Regen* 12: 635-642, 2004.



実地医家のための

永井書店

肛門疾患診療プラクティス

改訂第2版

編著 岩垂 純一 岩垂純一診療所 所長

定価 10,500円

(本体 10,000円+税5%)

B5判・250頁・図179・カラー122・表39

ISBN 978-4-8159-1783-8

肛門疾患の専門医だけでなく、幅広く専門医を目指す若手医師、肛門疾患に馴染みのない一般臨床医を対象に、基本的理解とより実際的な内容で明日からの日常診療に役立つよう企画された実践書。今回の改訂では、初版刊行以来7年の間に肛門疾患の治療に登場したさまざまな新しい試みを取り入れて、up to dateな治療内容とした。ぜひ一読してほしい良書である。

広範囲熱傷患者における血中白血球抑制因子の上昇

秋田 定伯・秋野 公造・Song-Guang Ren
Shlomo Melmed・今泉 敏史・平野 明喜

有限責任中間法人
日本熱傷学会機関誌
第 34 卷 1 号別冊
2008 年 3 月発行

<原 著>

広範囲熱傷患者における血中白血病抑制因子の上昇¹

秋田 定伯*・秋野 公造**・Song-Guang Ren***
Shlomo Melmed***・今泉 敏史*・平野 明喜*

長崎大学形成外科において重症熱傷における循環血中のサイトカインと全身性ストレス反応性を調査する目的で広範囲熱傷症例に関して、視床下部-下垂体-副腎系マーカーを検討した。

視床下部-下垂体-副腎系は重要なストレス反応性系であり、白血病抑制因子 (Leukemia inhibitory factor, LIF) は視床下部-下垂体-副腎系の刺激因子であるので、循環血中のLIFとの関連を熱傷患者で検討した。

20例の熱傷患者 (熱傷総面積20%以上) で37~77歳 (平均59.1歳) の10名の女性患者, 10名の男性患者が調査対象として、血中のLIF値, adrenocorticotrophic hormone (ACTH), 他の炎症性マーカーと24時間蓄尿遊離コルチゾル値を調査した。

受傷後36時間でのLIF値は死亡患者群で、生存患者群と比較して有意に高値であり (186.1 ± 80.4 , 83.5 ± 64.5 pg/ml, 死亡群, 生存群, $p < 0.001$), ACTH値は死亡群が生存群より有意に高値であった (41.3 ± 8.3 , 25.2 ± 7.8 pg/ml, 死亡群, 生存群, $p < 0.0001$)。受傷後24時間から48時間での24時間蓄尿での遊離コルチゾル値は死亡群が生存群より有意に高値であった (235.0 ± 36.49 μ g/day, 69.0 ± 18.04 μ g/day, 死亡群, 生存群, $p < 0.0001$)。血清LIF値と蓄尿遊離コルチゾル値は正相関を示し ($r^2 = 0.30$, $p < 0.01$)。血清LIF値と血漿ACTH値も正相関を示した ($r^2 = 0.24$, $p < 0.01$)。視床下部-下垂体-副腎系のみならず血清LIF値も熱傷重症度と予後に関与する因子であると思われた。

Key Words : 白血病抑制因子, 視床下部-下垂体-副腎系, ストレス

はじめに

IL-1 α , IL-1 β , IL-6, TNF- α などの炎症性サイトカインは, *in vitro* および *in vivo* で視床下部-下垂体-副腎系 (hypothalamic-pituitary-adrenal axis, HPA axis) を刺激することが知られている。熱傷患者においては、感染が

確立する前に血清中IL-6濃度の上昇が認められている¹⁾。IL-6は敗血症への進行に関与し、熱傷モデルで可溶性の抗IL-6抗体の効果が検討されている²⁾。損傷程度とサイトカイン値は致死的指標となり、治療的な効果判定に用いられることもある³⁾。白血病抑制因子 (leukemia inhibitory factor, LIF) は多機能サイトカインであり、多くの組織・細胞で発現している。また、LIFは炎症反応と密接に関係しており、ストレス下におけるHPA axisの刺激因子とされている。最近の研究では、血漿中のストレスホルモンのうち副腎皮質刺激ホルモン (adrenocorticotrophic hormone, ACTH)、バソプレッシン (vasopressin, AVP)、副腎皮質刺激ホルモン放出因子 (corticotropin-releasing hormone,

¹ Revised from Journal of Burn Care & Research, Vol 27 (2) : 221-225, 2006. Elevated circulating leukemia inhibitory factor in patients with extensive burns, with permission from Lippincott Williams & Wilkins.

*長崎大学大学院医歯薬学総合研究科発生分化機能再建学講座構造病態形成外科学

**同 神経解剖学

***シーダース・サイナイ メディカルセンター
内分泌代謝学

(受理日 2007. 7. 12)

表1 患者

		最小	最大	平均±SD
1. 性・年齢	女性 10	37	77	61.3 ± 12.2 (years)
	男性 10	42	70	56.8 ± 12.2 (years)
	合計 20			59.1 ± 12.1 (years)
2. 総熱傷面積	合計 20	21	90	52.6 ± 18.7 (%)
	合計 20	9	65	30.2 ± 14.5 (%)

CRH)などは、重症熱傷に反応すると報告されている⁴⁾。LIFとIL-6はgp130と呼ばれる共通な情報伝達ユニットを有し、JAK/STAT経路リン酸化経路が関与しており⁵⁾、LIFとIL-6はHPA axisを障害に反応して発現する⁶⁾ため、循環血中のこれらサイトカインはHPA axisの神経軸刺激にもかかわるとされる⁷⁾。

以上から血清中LIF値の変動と広範囲熱傷との相関を検討し、視床下部-下垂体-副腎系のマーカーとなりうるか自験例で検討した。

対象および患者

1996年8月から2004年7月までの観察期間中、年齢は37歳から77歳(平均59.1歳)の広範囲熱傷患者(総熱傷面積20%以上)を対象患者とした(表1)。研究方法は“前向き”研究とし、長崎大学病院内倫理委員会にて承認を得た。全例、受傷後24時間から36時間以内にアメリカ胸部疾患学会/救急医学会 合同会議での合意事項の全身性炎症反応症候群(systemic inflammatory response syndrome, SIRS)のうち2項目以上を満たした。すなわち、①体温 38°C >または 36°C <、②脈拍数90回/分以上、③呼吸回数20回/分または $\text{PaCO}_2 < 32$ torr、④白血球数 $12,000/\text{mm}^3$ または $4,000/\text{mm}^3$ ⁸⁾である。患者または家族からのインフォームドコンセント取得後、留置動脈カテーテルまたは静脈穿刺により滅菌EDTA添加または単純シリコン被膜のガラス管に採血した。血液検体は氷冷し、血漿においてはただちに650 rpmで15分間遠心分離し、血清は採血

後室温で凝血後650 rpmで遠心分離した。血漿・血清ともにアッセイ実施まで -20°C で冷凍保存した。血漿ACTHアッセイはAllegro社のACTHキット(Nichols Institute Diagnostics, SanClemente, CA)を用いた。本ACTHアッセイキットの測定正常範囲は $8.2\sim 54.8\text{pg/ml}$ であった。血清C反応プロテイン(CRP)アッセイは長崎大学病院臨床検査室で実施し、栄研化学株式会社のラテックス凝集試験法で測定した。ACTH血漿検体と血清CRPは受傷2日目の朝8時に採取した。

LIFラジオイムノアッセイ

ヒトLIF(leukemia inhibitory factor, 白血球抑制因子)ラジオイムノアッセイは以前われわれの確立した方法に沿って実行した。本法は、検体またはLIF標準、抗体、ヨード125でラベルしたLIFを総量 $300\mu\text{l}$ となるよう混合し、 4°C 、72時間反応させた。沈降物はヤギIgG(Sigma Chemical社, St. Louis, ミズーリ州)および抗ヤギウサギ抗体(リン酸緩衝生理食塩水にて原液を6倍希釈, Gemini社, Calabasas, CA)と6%ポリエチレングリコール(Sigma社)を用いて作製し、ガンマ計測器で測定した。標準曲線は $250\sim 100,000\text{pg/ml}$ の範囲の計測で求めた。本法で使用した抗ヒトLIF抗体は製造元(R & D Systems, Boston)から他のサイトカインとの交差反応はないと報告されている。検体計測はおのおの3度繰り返し、LIFラジオイムノアッセイの採血は視床下部-下垂体-副腎系の他のホルモンとの関係と、データの統一

表2 生と死の患者比較

	生存±SD	死亡±SD
1. 数	13名	7 (女性5名, 男性2名)
2. 総熱傷面積	46.8 ± 16.3 (%)	63.3 ± 19.2 (%)
3. III度熱傷面積	39.1 ± 16.3 (%)	25.3 ± 11.3 (%) *
4. LIF値	83.5 ± 64.5 (pg/ml)	186.1 ± 80.4 (pg/ml) **
5. ACTH値	25.2 ± 7.8 (pg/ml)	41.3 ± 8.3 (pg/ml) **
6. Cortisol値	69.0 ± 18.0 (μg/day)	235.0 ± 36.5 (pg/ml) **
7. CRP値	12.8 ± 4.4	15.7 ± 3.6

* ; P < 0.05 ** ; p < 0.01

性を保つ目的で受傷後36時間後に、留置動脈カテーテルまたは静脈穿刺法で実施した。ヒトLIFラジオイムノアッセイの感度は50pg/mlであった。

統計

データは平均±標準偏差で表記し、群間比較にはSheffeのt検定を用い、p値<0.05を統計学的有意とした。各変数の相関係数も検討した。相関関係の回帰分析には、単回帰分析 (single regression analysis) を用いた。

結果

20症例中、7症例 (男性5名, 女性2名) が敗血症や肝機能不全, 心不全, DICなど他の合併疾患で受傷後3日, 8日, 10日, 11日, 20日, 24日で熱傷治療経過中死亡した。死亡群は生存群と比較して熱傷総面積は広範囲であったものの、統計学的な有意差はなかった (63.3 ± 19.2%, 46.8 ± 16.3%, 各々死亡群, 生存群, p=0.06) もの、III度熱傷面積は生存群において有意に広範囲であった (39.1 ± 16.3%, 25.3 ± 11.3%, 各々生存群, 死亡群, p<0.05)。受傷後36時間での血清LIF値は20例全例で調査しており死亡群は生存群と比較して有意に高値であった (186.1 ± 80.4, 83.5 ± 64.5pg/ml, 各々死亡群, 生存群, p<0.001)。血漿ACTH値は死亡群が生存群と比較して有意に高値であった (41.3 ± 8.3, 25.2 ± 7.8pg/ml, 各々死亡群, 生存群, p<0.0001)。蓄尿遊離コチゾル値は死亡群が生存群よりも有意に高値であっ

た (235.0 ± 36.5, 69.0 ± 18.0 μg/day, 各々死亡群, 生存群, p<0.0001) がCRPは死亡群, 生存群で有意な差はなかった (15.7 ± 3.6, 12.8 ± 4.4, 各々死亡群, 生存群) (表2)。

血清LIF値と他の因子 (総熱傷面積, 血漿ACTH値, 尿中コチゾル値) との相関を調べたところ, 血清LIF値と総熱傷面積は有意に相関しており ($y=4.3x-95.6$, $r^2=0.84$, $p<0.0001$) (図1), 視床下部-下垂体-副腎系では血漿ACTH値と尿中遊離コチゾル値が有意な相関関係を示した ($y=4.7x-15.2$, $r^2=0.38$, $p<0.001$) (図2)。血清LIF値と血漿ACTH値, 血清LIFと尿中遊離コチゾル値も同様に有意な相関関係を示した ($y=0.06x+23.64$, $r^2=0.24$, $p<0.01$; $y=0.55x+65.91$, $r^2=0.30$, $p<0.01$; 各々血清LIF値と血漿ACTH値, 血清LIF値と尿中コチゾル値) (図3, 4)。一方, 血清LIFとCRPには相関は認められなかった ($y=-0.003x+14.313$, $r^2=0.003$, $p=0.77$) (図5)。

考察

血清LIFアッセイのラジオイムノアッセイは非常に特異的で鋭敏で正確なアッセイ方法であり¹⁾, 本研究で血清LIFが広範囲熱傷で重症度と相関し, 予後因子となる可能性が示唆された。Tumor necrosis factor (TNF)-α, interleukin (IL)-1β, interleukin (IL)-6などの炎症性サイトカインは, 感染・損傷・急性期反応などでの宿主の炎症性サイトカインとして重要であり, IL-6とプロカルシトニン値は総熱傷面積30%

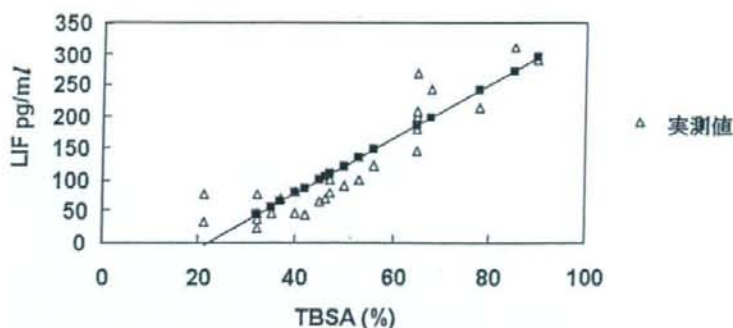


図1 血清LIF値と総熱傷面積の相関

総熱傷面積が大きいかほど血清LIF値は有意に高値となる ($y=4.3x - 95.6$, $r^2=0.84$, $p<0.0001$).

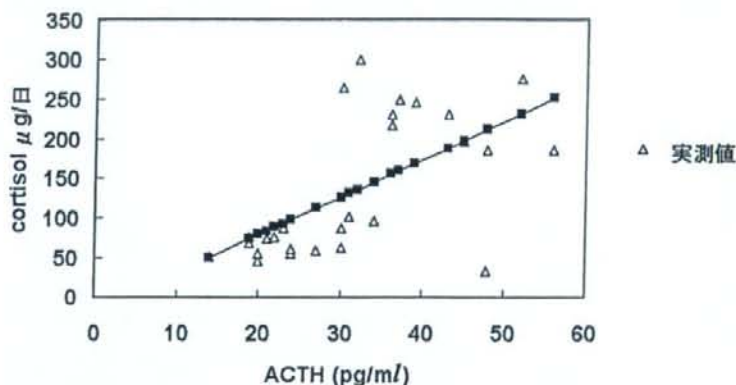


図2 蓄尿中遊離コーチゾルと血漿ACTH値の相関

蓄尿中遊離コーチゾルと血漿ACTH値との間には有意な相関がある ($y=4.7x - 15.2$, $r^2=0.38$, $p<0.001$).

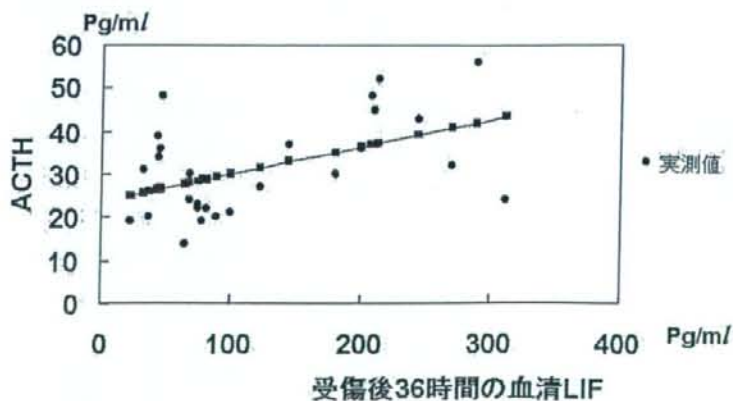


図3 血清LIF値と血漿ACTH値の相関

血清LIF値と血漿ACTH値は有意に相関する ($y=0.06x + 23.64$, $r^2=0.24$, $p<0.01$).

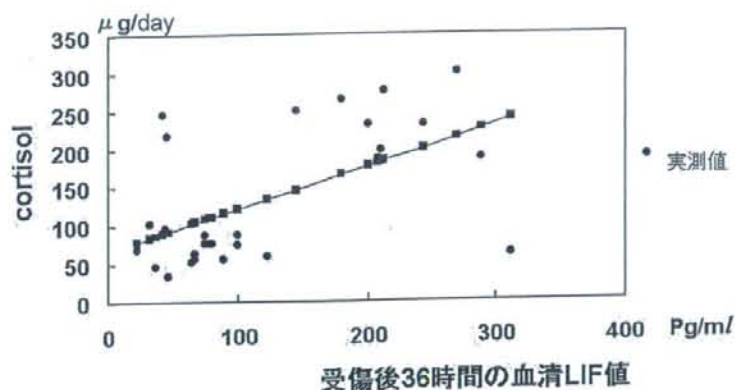


図4 血清LIF値と蓄尿中遊離コルチゾルの相関
血清LIF値と蓄尿中遊離コルチゾルは有意な相関がある ($y=0.55x + 65.91$, $r^2=0.30$, $p<0.01$).

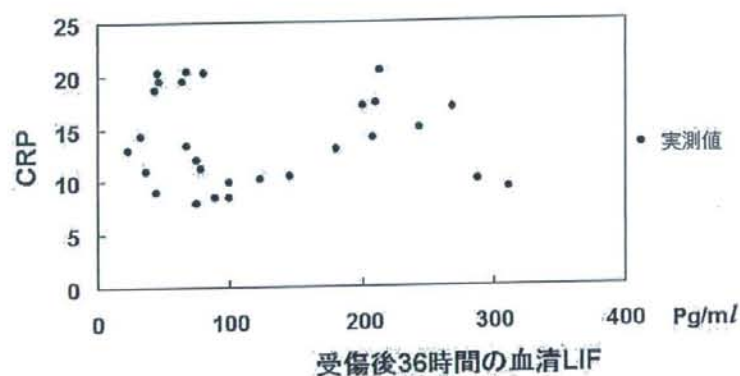


図5 血清LIF値とCRPの相関
血清LIF値とCRP値は相関しない ($y=0.003x + 14.313$, $r^2=0.003$, $p=0.77$).

以上の重篤な熱傷症例で上昇しているものの¹⁰⁾, プロカルシトニンは幼児例では敗血症初期の指標とはならない¹¹⁾. LIFは敗血症において急性期反応分子であるとされ^{12,13)}, 胸膜浸出液中にも上昇し¹⁴⁾, 炎症性滑液に認められ¹⁵⁾, 巨細胞関節炎患者の血清中にも認められる¹⁶⁾. LIFの上昇する機序はサイトカイン産生系列に関連していると思われる. TNF- α は敗血症ショックモデルにおいてLIFを調節している¹⁷⁾. LIFは視床下部-下垂体-副腎系で循環血漿中のACTH値と副腎皮質ホルモンを調節し, LIF遺伝子欠損マウスを用いたストレス反応では, 視

床下部-下垂体-副腎系は有意に低下しており^{18,19)}, 下垂体由来LIFはIL-1 β によって調節されている²⁰⁾.

視床下部-下垂体-副腎系が生体のホメオスタシス, 免疫系, 神経系の維持に重要であり²¹⁾, LIFは視床下部-下垂体-副腎系を刺激し, 熱傷症例においても, 蓄尿中コルチゾル値の上昇もみられていることから, LIFは熱傷の重症度, 進行度の指標となるのではないかと推察される. 血清IL-6は臓器障害の程度と相関することが知られており²²⁻²⁴⁾, 可溶性TNF- α とともに, 新生児期感染の初期指標とされている²⁵⁾. コー

チゾル値によって敗血症ショックの予後分類では、基礎コーチゾル値とACTH刺激に対する反応性により、予後は分類され、最も悪い予後は、基礎コーチゾル値が高く、ACTHに対する最大反応が低いものである²⁶⁾。われわれの検討症例でも、死亡例の全例敗血症単独で亡くなったわけではないので、ACTH刺激試験を視床下部-下垂体-副腎系の関与の検討に実施してもよかったかもしれない。

CRPはたびたび炎症性マーカーとして使用され、IL-6と急性肺炎で正相関し、病態の重症度を反映するとされている²⁷⁾。今回の検討ではCRPと熱傷重症度の正相関はみられなかった。CRPは急性熱傷においては、十分に鋭敏かつ正確ではないのかもしれない。さらに、LIFとIL-6機能は似通った受容体と受容体後の情報伝達経路gp130およびSTATタンパクを通じて、視床下部-下垂体-副腎系では発揮される^{28,29)}。血漿LIF値が高値の場合と予後不良例は敗血症患者で相関するとの報告があり³⁰⁾、われわれのデータでは広範囲熱傷における受傷後36時間での血清LIF値は予後と相関があった。これはLIFが視床下部-下垂体-副腎系の初期に関与しており、神経-免疫-内分泌系を調節するのではないかと推測している^{30,31)}。蓄尿中の遊離コーチゾル値は視床下部-下垂体-副腎系の最終産物を反映しており、ヒトではこの上昇はインターフェロン β をガン患者に注射したあとにみられ、精神状態を反映するとの報告もある^{32,33)}。本研究では、蓄尿遊離コーチゾル値は血清LIF値と相関していた。尿中コーチゾルは比較的持続的に上昇していた。

交感神経による下垂体以外の経路からカテコラミンによる副腎皮質の活性が関与すること、LIFの上昇がPOMC遺伝子の発現上昇とACTH分泌上昇に関与するのではないかとと思われる³⁴⁾。LIF遺伝子欠損マウスを用いると、LIFは視床下部-下垂体-副腎系をストレスと炎症の際に刺激し、維持に関与する^{17,18)}。熱傷においてもLIFと視床下部-下垂体-副腎系の指標との間に正相関を認めており、特に初期からのLIF値の持続的高値は致死に関連すること

が分かった。熱傷において、LIFは重症度の予測因子として使用可能ではないかと思われた。

文 献

- 1) Ueyama M, Maruyama I, Osame M, et al.: Marked increase in plasma interleukin-6 in burn patients. *J Lab Clin Med* 1992; **120**: 693-698.
- 2) Pallua N, Low JFA, Von Heimburg D: Pathogenic role of interleukin-6 in the development of sepsis. Part II: Significance of anti-interleukin-6 and anti-soluble interleukin-6 receptor- α antibodies in a standardized murine contact burn model. *Crit Care Med* 2003; **31**: 1495-1501.
- 3) Biffl WL, Moore EE, Moore FA, et al.: Interleukin-6 in the injured patient. Marker of injury or mediator of inflammation?. *Ann Surg* 1996; **224**: 647-664.
- 4) Murton SA, Tan ST, Prickett TCR, et al.: Hormone responses to stress in patients with major burns. *Brit J Plast Surg* 1998; **51**: 388-392.
- 5) Taga T: The signal transducer gp130 is shared by interleukin-6 family of hematopoietic and neurotropic cytokines. *Ann Med* 1997; **29**: 63-72.
- 6) Kurek JB, Austin L, Cheema SS, et al.: Up-regulation of leukaemia inhibitory factor and interleukin-6 in transected sciatic nerve and muscle following denervation. *Neuromuscul Disord* 1996; **6**: 105-114.
- 7) Rivest S: How circulating cytokines trigger the neural circuits that control the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Psychoneuroendocrinology* 2001; **26**: 761-788.
- 8) Members of The American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine Consensus Conference Committee: American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine Consensus Conference: Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. *Crit Care Med* 1992; **20**: 864-874.
- 9) Ren SG, Seliktar J, Li X, et al.: Measurement of leukemia inhibitory factor in biological fluids by radioimmunoassay. *J Clin Endocrinol Metab* 1998; **83**: 1275-1283.
- 10) Carsin H, Assicot M, Feger F, et al.: Evolution and significance of circulating procalcitonin levels compared with IL-6, TNF- α and endotoxin levels early after thermal injury. *Burns* 1997; **23**: 218-224.
- 11) Neely AN, Fowler LA, Kagan RJ, et al.: Procalcitonin in pediatric burn patients:

- an early indicator of sepsis?. *J Burn Care Rehabil* 2004 ; 25 : 76-80.
- 12) Waring P, Wycherley K, Cary D, et al. : Leukemia inhibitory factor levels are elevated in septic shock and various inflammatory body fluids. *J Clin Invest* 1992 ; 90 : 2031-2037.
 - 13) Villers D, Dao T, Nguyen JM, et al. : Increased plasma levels of human interleukin for DA1, a cells/leukemia inhibitory factor in sepsis correlate with shock and poor prognosis. *J Infect Dis* 1995 ; 171 : 232-236.
 - 14) Heymann D, Her EL, Nguyen JM, et al. : Leukaemia inhibitory factor (LIF) production in pleural effusions : comparison with production with of IL-4, IL-8, IL-10 and macrophage-colony stimulating factor (M-CSF). *Cytokine* 1996 ; 8 : 410-416.
 - 15) Waring PM, Carroll GJ, Kandiah DA, et al. : Increased levels of leukemia inhibitory factor in synovial fluid from patients with rheumatoid arthritis and other inflammatory arthritides. *Arthritis Rheum* 1993 ; 36 : 911-915.
 - 16) Lecron JC, Roblot P, Chevalier S, et al. : High circulating leukemia inhibitory factor (LIF) in patients with giant cell arteritis : independent regulation of LIF and IL-6 under corticosteroid therapy. *Clin Exp Immunol* 1993 ; 92 : 23-26.
 - 17) Jansen PM, de Jong IW, Hart M, et al. : Release of leukemia inhibitory factor in primate sepsis : analysis of the role of TNF- α . *J Immunol* 1996 ; 156 : 4401-4407.
 - 18) Akita S, Malkin J, Melmed S : Disrupted murine leukemia inhibitory factor (LIF) gene attenuates adrenocorticotrophic hormone (ACTH) secretion. *Endocrinology* 1996 ; 137 : 3140-3143.
 - 19) Chesnokova V, Auernhammer CJ, Melmed S : Murine leukemia inhibitory factor gene disruption attenuates the hypothalamo-pituitary-adrenal axis stress response. *Endocrinology* 1998 ; 139 : 2209-2216.
 - 20) Auernhammer CJ, Chesnokova V, Melmed S : Leukemia inhibitory factor modulates interleukin-1 β -induced activation of hypothalamo-pituitary-adrenal axis. *Endocrinology* 1998 ; 139 : 2201-2208.
 - 21) Basedovsky HO, del Rey A : Immune-neuro-endocrine interactions : facts and hypotheses. *Endocr Rev* 1996 ; 17 : 64-102.
 - 22) Hack CE, De Groot ER, Felt-Bersma RJ, et al. : Increased plasma levels of interleukin-6 in sepsis. *Blood* 1989 ; 74 : 1704-1710.
 - 23) Rosenbloom AJ, Pinsky MR, Bryant JL, et al. : Leukocyte activation in the peripheral blood of patients with cirrhosis of the liver and SIRS. Correlation with serum interleukin-6 levels and organ dysfunction. *JAMA* 1995 ; 274 : 58-65.
 - 24) Damas P, Ledoux D, Nys M, et al. : Cytokine serum level during severe sepsis in human. IL-6 as a marker of severity. *Ann Surg* 1992 ; 215 : 356-362.
 - 25) Messer J, Eyer D, Donato L, et al. : Evaluation of interleukin-6 and soluble receptors of tumor necrosis factor for early diagnosis of neonatal infection. *J Pediatr* 1996 ; 129 : 574-580.
 - 26) Annana D, Sebile V, Troche G, et al. : A 3-level prognostic classification in septic shock based on cortisol levels and cortisol response to corticotrophin. *JAMA* 2000 ; 283 : 1038-1045.
 - 27) Leser HG, Gross V, Scheibenbogen C, et al. : Elevation of serum interleukin-6 concentration precedes acute-phase response and reflects severity in acute pancreatitis. *Gastroenterology* 1991 ; 101 : 782-785.
 - 28) Ray DW, Ren SG, Melmed S : Leukemia inhibitory factor (LIF) stimulates proopiomelanocortin (POMC) expression in a corticotroph cell line. role of STAT pathway. *J Clin Invest* 1996 ; 97 : 1852-1859.
 - 29) Mastorakos G, Weber JS, Magiakou MA, et al. : Hypothalamic-pituitary-adrenal axis activation and stimulation of systemic vasopressin secretion by recombinant interleukin-6 in humans : potential implications for the syndrome of inappropriate vasopressin secretion. *J Clin Endocrinol Metab* 1994 ; 79 : 934-939.
 - 30) Chrousos GP : The hypothalamic pituitary adrenal axis and immune-mediated inflammation. *N Engl J Med* 1995 ; 332 : 1351-1362.
 - 31) Patterson PH : Leukemia inhibitory factor, a cytokine at the interface between neurobiology and immunology. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994 ; 91 : 7833-7835.
 - 32) Nolton WE, Goldstein D, Lindstrom M, et al. : Effects of cytokines on the pituitary-adrenal axis in cancer patients. *J Interferon Res* 1993 ; 13 : 349-357.
 - 33) Scott LV, Dinan TG : Urinary free cortisol excretion in chronic fatigue syndrome, major depression and in healthy volunteers. *J Affect Disord* 1998 ; 47 : 49-54.
 - 34) Ehrhart-Bornstein M, Bornstein SR, Scherbaum WA : Sympathoadrenal system and immune system in the regulation of adrenocortical function. *Eur J Endocrinol* 1996 ; 135 : 19-26.

Elevated Circulating Leukemia Inhibitory Factor in Extensive Burns

Sadanori Akita*, Kozo Akino**, Song-Guang Ren***,
Shlomo Melmed***, Toshifumi Imaizumi* and Akiyoshi Hirano*

In order to investigate circulating cytokine responsiveness in major burns in association with the systemic stress response system, hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis markers were tested in extensive burn cases treated in the department of Plastic and Reconstructive Surgery, Nagasaki University.

The HPA axis is a major stress response system and leukemia inhibitory factor (LIF) may be a potent mediator of the HPA axis : circulating LIF levels in burn patients were therefore studied.

Twenty extensive burn patients (Burn Surface Area>20%), 37 to 77 years old, (average : 59.1 ± 12.1 years), 10 females and 10 males, were assessed. Circulating LIF, adrenocorticotrophic hormone (ACTH), other inflammatory markers and 24-hour urinary free-cortisol excretion levels were investigated. LIF levels were higher in patients who died than in those who survived (186.1 ± 80.4 , 83.5 ± 64.5 pg/mL, respectively, $p < 0.001$) at 36-hour after injury. ACTH levels were more significantly elevated in fatal cases than in those who survived. (41.3 ± 8.3 , 25.2 ± 7.8 pg/mL, respectively, $p < 0.0001$). Twenty-four-hour (24 to 48 hours after injury) pooled urinary free-cortisol excretion levels were also significantly higher in fatal cases than in the surviving patient group (235.0 ± 36.5 mg/day, 69.0 ± 18.0 mg/day, respectively, $p < 0.0001$). The correlation between serum LIF and urine free cortisol was significant ($r^2=0.30$) ($p < 0.01$) as was the correlation of serum LIF with plasma ACTH ($r^2=0.24$) ($p < 0.01$).

Serum LIF as well as HPA axis activity markers is a good marker of disease severity and prognosis in patients with extensive burns.

* Division of Plastic and Reconstructive Surgery, Nagasaki University

** Division of Anatomy and Neurobiology, Department of Developmental and Reconstructive Medicine, Nagasaki University, Graduate School of Biomedical and Sciences

*** Division of Endocrinology and Metabolism, Cedars-Sinai Medical Center, Los Angeles

ORIGINAL PAPER

Yasuharu Hidaka · Don Operario · Mie Takenaka · Sachiko Omori · Seiichi Ichikawa · Takuma Shirasaka

Attempted suicide and associated risk factors among youth in urban Japan

Received: 12 May 2007 / Accepted: 25 March 2008 / Published online: 16 May 2008

Abstract *Background* Suicide is a major social and health issue in Japan. We assessed prevalence of attempted suicide and explored individual, interpersonal, behavioral, and psychological risk factors associated with attempted suicide in a general community sample of youth in a metropolitan Japanese city. *Method* Survey of 2,095 participants age between 15 and 24 who were recruited using street-intercept techniques. *Results* Overall, 6% of males and 11% of females reported a prior suicide attempt. For males, attempted suicide was independently associated with experience of school bullying, being homosexual or bisexual, history of drug use, experience of unwanted sex, history of a diagnosed sexually transmitted infection, and low self-esteem. For females, attempted suicide was independently associated with being younger (ages 15–19 compared to 20–24), experience

of school bullying, history of drug use, and history of smoking. *Conclusion* Prevention intervention programs for youth in Japan are necessary to achieve national aims to reduce attempted suicides and suicide mortality.

Key words Japan – suicide – mental health – youth

Introduction

Japan has experienced an alarming suicide epidemic for over a decade [17]. Globally, Japan is ranked ninth highest in reported deaths by suicide [21], and second highest in annual suicides among OECD countries. Suicide incidence has been estimated at 24 per 100,000, and there have been over 30,000 suicide mortalities annually since 1998 [7]. Age-adjusted mortality due to suicide in Japan is twice as high among males and 3 times as high among females than in the United States [22]. Prevention of suicide has consequently been declared a national public health priority, with a goal of reducing suicide incidence by 10% each year until 2010 [21].

Youth in Japan are among the most vulnerable groups for attempted suicide and suicide mortality, which accounts for the second highest number of deaths among 15–24 year olds [7]. This falls in line with international trends. Recent literature reviews depict adolescents and young adults as vulnerable to suicidal ideation, attempts, and mortality [4, 25]. One international review reported 30% of adolescents had ever considered suicide and 10% had ever attempted suicide, with both indicators higher among females than males [10]. Suicidal mortality is higher among young males than females; young males tend to use more irreversible methods [3]. Some frequently reported risk factors for suicide among youth include mental health problems [24],

Y. Hidaka, PhD (✉)
Dept. of Global Health and Socio-epidemiology
Kyoto University School of Public Health
Yoshidakonoe-cho, Sakyo-ku
Kyoto-shi, Kyoto 606-8501, Japan
E-Mail: yass@kita.att.ne.jp

D. Operario, PhD
Dept. of Social Policy and Social Work
University of Oxford
Oxford, UK

M. Takenaka, MN
Center for Health and Rights of Migrants
Osaka, Japan

S. Omori, RN, MN · S. Ichikawa, PhD
Graduate School of Nursing
Nagoya City University
Nagoya, Japan

T. Shirasaka, MD, PhD
AIDS Medical Center
National Hospital Organization
Osaka National Hospital
Osaka, Japan

drug use [8, 29], and stressful or traumatic life events [6] including experience of sexual abuse and violence. Based on a comprehensive analysis of the literature on adolescent suicidality, researchers have offered a heuristic model describing determinants of youth suicidal behavior including affective, developmental, interpersonal, and environmental levels of analysis, which operate over time to exacerbate risk [4]. This model articulates how adolescent suicidality can arise from multiple parallel sources, and suggests that the processes by which they operate to determine adolescent suicidality might be context and culture dependent.

Factors associated with attempted suicide among youth have not been studied extensively in Japan, though a review of existing research points to a number of potential risk factors. A study of youth undergoing drug treatment found that illicit drug use at early ages is associated significantly with suicide attempts [23]. Another study of youth in Japan who had been placed in a juvenile detention center found that deliberate self-harm was associated with a history of school bullying and prior sexual abuse [18]. Sexual orientation can also contribute to suicidal thoughts or behaviors, as shown in a recent study of homosexual and bisexual men in Japan that found 15% had attempted suicide [14]. However, there is little information about factors associated with attempted suicide from general community populations of youth, for example individuals not enrolled in drug treatment or juvenile detention programs. One relevant study, based on a large school sample of Japanese youth, identified a pattern of related adverse health outcomes including cigarette smoking, drug use, and sexual behavior [30], and for females, cigarette smoking was independently associated with suicidal ideation [31].

The aim of this research was to assess prevalence of attempted suicide in a community sample of urban Japanese youth and explore risk factors related to attempted suicide. Following from previous multi-level models of determinants of suicide risk, this study aimed to explore four general factors identified in previous Japanese youth samples as potential contributors to attempted suicide: (1) individual characteristics (e.g., age, sexual orientation), (2) interpersonal factors (e.g., school bullying, family closeness), (3) risk behaviors (e.g., sexual activity, drug use, alcohol use, smoking), and (4) psychological factors (e.g., self-esteem). The study was not designed to test any specific theory or hypothesis on attempted suicide. Although exploratory by design, this research aimed to offer the first known study of prevalence and correlates of attempted suicide in this population, and to contribute additional information toward building conceptual models and evidence-informed preventative measures against the suicide crisis in Japan.

Method

Participants and recruitment

Participant recruitment took place in Osaka, which is Japan's second largest urban city beyond metropolitan Tokyo, and the largest city in western Japan. Street-intercept methods were used to recruit a large sample of Japanese urban youth. Although not as robust as other methods in yielding generalizable samples, street-intercept methods are frequently used in studies dealing with sensitive and stigmatized topics including drug use, sexual behavior, and mental health, and can be more cost-effective at yielding higher response rates in comparison with random-digit telephone surveys while achieving high degrees of community representation [27].

Formative environmental assessments were conducted to identify community places where large numbers of youth congregate. Four street sites in the America-mura district, a hub of cultural and commercial activity for youth, were selected as recruitment areas. A team of interviewers was present at the four street recruitment sites between 5 and 9 pm during August and September 2001. Interviewers were trained on identifying and approaching potential participants, screening techniques, informed consent procedures, and survey administration. Participant inclusion criteria included being between 15 and 24 years of age, lifetime history of sexual behavior, residing in the Kinki region of western Japan (which encompasses Kyoto, Osaka, Hyogo, Nara, Shiga, and Wakayama prefectures), and spending time in the America-mura district at least once per month. Individuals who met inclusion criteria and agreed to be in the study provided verbal consent, and were given a self-administered survey. Participants were directed to a discrete nearby area to complete the surveys, which were checked for completion by the interviewer and placed into sealed envelopes. Participants received pre-paid gift cards valued at 1,000 yen (about 8 US dollars) and a pamphlet with written information about health topics included in the survey.

In total, 4,650 youth were approached and invited to participate in the study, of whom 893 immediately declined and 95 had already completed the survey. Of 3,662 individuals screened, 1,295 did not meet eligibility criteria and 138 eligible individuals declined to participate, most frequently due to time constraints. Of 2,229 participants who took the survey, data from 134 were discarded due to high levels of missing data. The valid number of cases analyzed was 2,095, including 1,035 males and 1,060 females.

Measures

The questionnaire was written entirely in Japanese. Participants reported individual demographic characteristics including age, gender, and sexual orientation. Participants described whether they ever had attempted suicide in their life. Participants described whether they had ever experienced school bullying and whether they currently lived with their family. They described whether they had ever used drugs, smoked cigarettes, or used alcohol and, if so, whether they had rarely, occasionally, or regularly smoked cigarettes or used alcohol. They also responded to items about specific sexual risk factors, including whether they had ever engaged in forced or unwanted sex, ever been diagnosed with a sexually transmitted infection, and ever received money in exchange for sex. Participants completed a measure of self-esteem [32], which was an adapted version of the Rosenberg self-esteem scale [26] validated previously with Japanese samples.

Data analysis

Chi-square tests were conducted to examine associations between having ever attempted suicide with individual demographic characteristics (age, sexual orientation), interpersonal factors (school bullying, living with parents), health risk behaviors (sexual activities, drug use, smoking), and psychological well-being (self-esteem);

Table 1 Associations between sample characteristics and history of attempted suicide

	Overall		Males (N = 1,035)			Females (N = 1,060)		
	(%)	n	(%)	n	P	(%)	n	P
Overall		2,095	5.6	58		11.4	121	
Age group, years					0.28			<0.01
15-19	54.4	1,140	6.5	31		13.6	90	
20-24	45.5	954	4.8	27		7.8	31	
Sexual orientation					<0.01			0.13
Heterosexual	96.3	2,017	4.7	46		11.2	115	
Homosexual/bisexual/other	3.7	78	24.5	12		20.7	6	
Living with family					0.34			0.92
No	38.0	796	6.5	30		11.2	37	
Yes	62.0	1,299	4.9	28		11.5	84	
Experienced school bullying					<0.01			<0.01
No	69.2	1,449	2.9	22		8.2	56	
Yes	30.8	646	13.5	36		17.2	65	
Ever used drugs					<0.01			<0.01
No	81.7	1,711	3.7	29		9.3	86	
Yes	18.3	384	11.8	29		25.2	35	
Smoking in lifetime					0.51			<0.01
Never	17.3	362	3.1	4		3.0	7	
Rarely use	34.4	720	5.4	19		8.9	33	
Occasional use	3.3	70	9.1	2		18.8	9	
Regular use	45.0	943	6.2	33		17.7	72	
Drinking in lifetime					0.23			<0.01
Never	2.1	45	8.7	2		4.5	1	
Rarely use	34.5	722	5.1	17		6.7	26	
Occasional use	34.6	724	3.9	12		11.6	48	
Regular use	28.8	604	7.3	27		19.7	46	
Unwanted sex in lifetime					<0.01			<0.01
No	72.8	1,525	4.3	35		9.1	64	
Yes	27.2	570	10.7	23		16.1	57	
Diagnostic STI in lifetime					<0.01			0.29
No	92.9	1,946	4.8	47		11.1	108	
Yes	7.1	149	17.7	11		14.9	13	
Ever received money for sex					0.02			<0.01
No	95.4	1,998	5.2	51		10.8	109	
Yes	4.6	97	14.3	7		25.0	12	
Self-esteem					0.06			<0.01
Low	49.7	1,041	6.9	38		10.2	50	
High	50.3	1,054	4.1	20		12.5	71	

P values are associated with χ^2 tests

with dichotomous categories 'high' and 'low' created based on the sample median). Males and females were analyzed separately due to robust gender differences. Logistic regression analysis was used to evaluate the independent correlates of attempted suicide, separately, for males and females. Co-factors were entered into the model based upon univariate logistic regression associations that were significant at $P < 0.20$ [15]. Data were analyzed using SPSS (Version 13.0).

Result

Sample characteristics

Table 1 shows descriptive characteristics of the sample. The average age was 19.7 years (SD = 2.0) for males and 18.9 years (SD = 2.3) for females. Participants were primarily heterosexual (96%), and more than half (62%) currently lived with their family. Overall, 31% reported having a history of being bullied at school and 18% reported having ever used

drugs. Forty-five percent of the sample reported regularly smoking cigarettes, and 29% reported regularly drinking alcohol. Over one-quarter (27%) reported ever experiencing unwanted sex, 7% had ever been diagnosed with a sexually transmitted infection, and 5% had ever received money in exchange for sex.

Prevalence and correlates of attempted suicide

Nine percent of the sample had ever attempted suicide; this was more common among females (11%) than males (6%). Associations between sample characteristics and history of attempted suicide were assessed using chi-square tests and are presented in Table 1. For males, attempted suicide was associated with identifying as homosexual/bisexual and questioning their sexual orientation, having ever experienced school bullying, having a history of drug use, having ever experienced unwanted sex, having ever