日本財団補助金による
２０００年度日中医学学術交流促進事業

①. 調査・共同研究助成

(1) 中国及び本邦に於ける食道癌化機構の比較検討

＜研究課題＞　中国および本邦における食道癌化機構の比較検討

＜研究代表者氏名＞杉町　圭蔵

＜所属＞九州大学大学院　消化器・総合外科（第二外科）

＜役職＞教授

＜要旨＞

ヒトパピローマウイルス16型、18型(HPV-16/18)は子宮及び食道の扁平上皮癌(SCC)の発癌に関与する。p53のコドン72に存在するアルギニン型対立遺伝子は、in vivoにおいてプロリン型対立遺伝子に比しHPVが産生するE6蛋白質による分解を受けやすく、実際、アルギニン型ホモ接合性のヒトに子宮頚部扁平上皮癌の頻度が高いとされている。子宮頚部扁平上皮癌とアルギニン型対立遺伝子に関してはいくつかの臨床研究の結果が論争されている。本研究では、75例の食道扁平上皮癌(日本；38例、中国；37例)の癌組織とその周囲正常組織を用いて、p53コドン72とHPV-16/18E6をコードする配列の直接塩基配列決定法を行った。HPV陽性症例では、アルギニン型対立遺伝子のみを検出した症例が70.6% (12/17)であるに対し、HPV陰性症例では43.1%(25/58)であった($p<0.05$)。一方、このようなHPV感染の有無とp53多型との著しい相関は周囲正常粘膜を用いた検討では認められなかった。癌組織を用いた検討と周囲正常粘膜を用いた検討で結果が異なることより、HPV陽性症例における食道発癌にプロリン型対立遺伝子のヘテロ接合性の消失(LOH)が重要な役割をはたしていることが示唆された。特定のp53多型をもつ人はHPV関連食道癌となる危険性があることを示している。

＜KEY WORDS＞

1) 食道癌、2) 扁平上皮癌、3) P53多型、4) ヒューマンパピローマウイルス、5) ヘテロ接合性の消失

＜目的＞

HPVは外性器や肛門に認められ、癌との関連により低危険型と高危険型に分類される。HPV-16/18は最も一般的な高危険型で、子宮頚部扁平上皮癌の90%がHPV-16/18のDNAを組み込んでおり(1)、食道扁平上皮癌の10-20%に感染を認める(2-4)。HPV-16/18によりコードされるE6蛋白質が、細胞内癌抑制蛋白質p53と結合することにより、p53蛋白質はユビキチン経路により直接分解される(5)。これはユビキチン経路を構成するE6-APとよばれるもう一つの細胞内蛋白質を介しておこる(6,7)。これらの実験結果から、HPV関連癌の細胞ではp53はE6蛋白質により機能的に不活性化されており、すなわち高リスク型HPVの感染はp53遺伝子の変異が起こる場合と同様にp53の機能を消失すると一般的に考えられている。

p53コドン72の多型とHPV関連子宮頚部扁平上皮癌の関係はいくつかのグループによって研究されいるが一致した結果は得られていない。Storeyらは、この部位にアルギニンを持ったp53蛋白質は、プロリンを持ったものより著しくE6蛋白によるin vivo分解を受けやすいと報告している(8)。さらに重要なことは、p53のコドン72にアルギニンを持つp53が子宮頚部扁平上皮癌の患者に多く認められるということである。しかし、文献的には未だに論争中である(9-14)。

食道扁平上皮癌の一部はHPV-16/18の存在と関係する(2,3)。しかし、食道癌におけるp53多型はまだ報告されていない。我々は、東アジアの食道扁平上皮癌におけるp53コドン72の多型とHPV16/18の感染頻度を調査した。我々の研究は、この多型がHPV感染による食道癌の危険因子に関係するという最初の報告である。この研究で我々は、HPV関連扁平上皮癌のp53コドン72多型の頻度が一致しない原因を解析した。

＜方法＞

組織検体

1993から1998年に九州大学第二外科で切除された食道扁平上皮癌38例、及び1996から1998年に中国・北京の中国医科学研究所で切除された37例の癌組織と癌に隣接する正常粘膜を検体とした。どの症例も術前治療は受けていない。すべての症例が組織型は扁平上皮癌である。外科的に切除された食道より、癌組織及び癌から完全に離れている正常粘膜を迅速に凍結し、液体窒素で保存した。ゲノムDNAはプロテネースK処理した後、フェノール/クロロホルム法にて抽出し、エタノール沈殿した(15)。

HPVの検出と型の決定

精製したゲノムDNAはHPV-16とHPV-18に対しPCR法を用いて増幅した。オリゴヌクレオチドプライマーは以下の通りである。

HPV-16；順向；5'-GAATCCATATGCTGTATGTGATAAAT-3'

逆向；5'-GATGATCTGCAACAAGACATACATC-3'

HPV-18；順向；5'-ACCTGTGTATATTGCAAGACAGT-3'　逆向；5'-TGTTTCTCTGCGTCGTTGGCT-3'

増幅したPCR産物は、それぞれの順向プライマーを用い、Perkin-Elmer 310 ABI社自動塩基配列決定装置により塩基配列を決定した。

p53多型解析

精製したゲノムDNAは以下のオリゴヌクレオチドプライマーを用い、p53のエクソン4に対し、PCR法を用いて増幅した。

順向；5'-TGAGGACCTGGTCCTCTGAC-3'　逆向；5'-AGAGGAATCCCAAAGTTCCA-3'

増幅したPCR産物は、順向プライマーを用い、塩基配列を決定した。アルギニン／プロリン型の判定は、グアニンの高さがシトシンの高さの50%以下のものをシトシン型、シトシンの高さがグアニンの高さの50%以下であるものをグアニン型とした。

統計解析

食道扁平上皮癌患者のp53コドン72多型とHPV16/18の感染に関する相関に関してはカイ二乗検定を用い、オッズ比も算出した。

＜結果と考察＞

食道扁平上皮癌におけるHPV16/18の感染頻度

同一のDNA75検体（日本：38検体；中国：37検体）に対し、二つの独立したPCR法、及び型（HPV16またはHPV18）特異性のオリゴヌクレオチドPCRプライマーを用い、発癌性HPVの感染を調べた。HPV DNAは、75例中17例（22.6%）に認められた。日本と中国間にHPV感染頻度やHPV感染の型に差を認めなかった。また、これらの結果はこれまでの報告と同様であった(2-4)。

HPV関連食道扁平上皮癌におけるコドン72アルギニン型対立遺伝子

HPV関連食道癌とコドン72多型との相関を調べる為に、腫瘍組織から得られたDNA75検体に対し、直接塩基配列決定法を行った。

HPV陽性食道扁平上皮癌症例の検体と、HPV陰性症例の検体における二つの対立遺伝子の頻度を比較した。HPV陽性群とHPV陰性群間でプロリン／アルギニン型の対遺伝子の頻度は著しく異なっていた。HPV陽性群において、p53のアルギニン型対立遺伝子のみの症例は17例中12例(70.6%)であるのに対し、HPV陰性群では58例中25例(43.1%)であった。

HPV陽性群ではプロリン型対立遺伝子のみあるいはプロリン／アルギニン型は17例中5例(29.4%)にみられたのに対し、HPV陰性群では58例中32例(55.2%)に認められた。これらのことよりp53のアルギニン型対立遺伝子をホモで持つ個体は、プロリン／アルギニン型をヘテロで持つ個体、あるいはプロリン型対立遺伝子をホモで持つ個体よりHPV関連食道癌になる可能性が高いことが示唆された($P<0.05$；オッズ比，3.17；95%信頼区間，1.02-9.85)。

HPV関連食道扁平上皮癌の周囲正常粘膜におけるコドン72アルギニン型対立遺伝子

腫瘍組織におけるアルギニン型対立遺伝子のみの頻度17例中12例(70.6%)は、肺癌における報告(16,17)と比較して高い。Storeyらは(8)この遺伝子座におけるLOHの頻度は低いと報告しているが、実際はこの対立遺伝子に高頻度のLOHが起こっている可能性があることを意味する。この仮説を調べる為に、我々はLOHによる影響を除く目的で正常粘膜を調べた。癌周囲の正常粘膜を用いた検討では、HPV陽性と陰性の症例間で、p53多型に差は認められなかった($p=0.64$；オッズ比，1.32；95%信頼区間，0.42-4.13)。HPV陽性群では腫瘍周囲の正常粘膜を用いた検討でプロリン／アルギニン型を呈した8例のうち6例が腫瘍組織でLOHを起こしていた。興味深いことに、LOHをおこしたすべての症例はプロリン型対立遺伝子を消失しており、一例もアルギニン型対立遺伝子を消失している症例はなかった。

p53癌抑制蛋白質はDNAが障害されると、転写後の調節で急速に蓄積し、また転写調節因子により活性化され、成長阻止あるいはアポトーシスに導く(18)。ユビキチン依存性蛋白質分解経路は、選択的な蛋白質分解の主な役割を果たしている。発癌性HPV16/18が産生するE6発癌蛋白質もp53を標的としたこの細胞蛋白質分解機構を用いている(5)。E6発癌性蛋白質は細胞内蛋白E6-APと結合し、さらにE6-E6AP複合体はp53と結合することにより、結果としてp53は急速にユビキチン依存性に分解される(19)。E6蛋白質により不死化した細胞株あるいはHPV陽性の子宮頚癌細胞におけるp53の量や半減期は一般的に減少している(20)。HPV-16/18といったHPVの型は子宮頚部あるいは食道の扁平上皮癌に検出されることから、E6蛋白質がp53癌抑制蛋白質の分解を通じて細胞増殖の調節を破壊することが、HPV関連食道癌や子宮頚癌の発癌に導いているというモデルが示唆される。

我々の研究によりプロリン型対立遺伝子のヘテロ接合性の消失が、HPV関連食道癌の発癌に役割を担っている事が明らかになった。p53遺伝子を標的としたヘテロ接合性の消失とHPV感染の関与に関し今後研究が望まれる。

<参考文献>

1. Riou, G., Favre, M., Jeannel, D., Bourhis, J., Le Doussal, V., and Orth,G. Association between poor prognosis in early-stage invasive cervical carcinomas and non-detection of HPV DNA. Lancet, 335: 1171-1174, 1990.

2. Toh, Y., Kuwano, H., Tanaka, S., Baba, K., Matsuda, H., Sugimachi, K.,and Mori, R. Detection of human papillomavirus DNA in esophageal carcinoma in Japan by polymerase chain reaction. Cancer, 70: 2234-2238, 1992.

3. He, D., Zhang, D. K., Lam, K. Y., Ma, L., Ngan, H. Y., Liu, S. S., and Tsao, S. W. Prevalence of HPV infection in esophageal squamous cell carcinoma in Chinese patients and its relationship to the p53 gene mutation. Int. J. Cancer, 72: 959-964, 1997.

4. Togawa, K. and Rustgi, A. K. A novel human papillomavirus sequence based on L1 general primers. Virus Res., 36: 293-297, 1995.

5. Scheffner, M., Werness, B. A., Huibregtse, J. M., Levine, A. J., and Howley, P. M. The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16and 18 promotes the degradation of p53. Cell, 63: 1129-1136, 1990.

6. Huibregtse, J. M., Scheffner, M., and Howley, P. M. A cellular protein mediates association of p53 with the E6 oncoprotein of human papillomavirus types 16 or 18. EMBO Journal, 10: 4129-4135, 1991.

7. Huibregtse, J. M., Scheffner, M., and Howley, P. M. Localization of the E6-AP regions that direct human papillomavirus E6 binding, association with p53, and ubiquitination of associated proteins. Mol. Cell. Biol., 13: 4918-4927, 1993.

8. Storey, A., Thomas, M., Kalita, A., Harwood, C., Gardiol, D.,Mantovani, F., Breuer, J., Leigh, I. M., Matlashewski, G., and Banks, L. Role of a p53 polymorphism in the development of human papillomavirus-associated cancer. Nature, 393: 229-234, 1998.

9. Zehbe, I., Voglino, G., Wilander, E., Genta, F., and Tommasino, M. Codon
72 polymorphism of p53 and its association with cervical cancer. Lancet, 354: 218-219, 1999.

10. Rosenthal, A. N., Ryan, A., Al-Jehani, R. M., Storey, A., Harwood, C.A., and Jacobs, I. J. p53 codon 72 polymorphism and risk of cervical cancer in UK. Lancet, 352: 871-872, 1998.

11. Lanham, S., Campbell, I., Watt, P., and Gornall, R. p53 polymorphism and risk of cervical cancer. Lancet, 352: 14, 1998.

12. Hayes, V. M., Hofstra, R. M., Buys, C. H., Hollema, H., and van der Zee, A. G. Homozygous arginine-72 in wild type p53 and risk of cervical cancer. Lancet, 352: 28, 1998.

13. Helland, A., Langerod, A., Johnsen, H., Olsen, A. O., Skovlund, E., and Borresen-Dale, A. L. p53 polymorphism and risk of cervical cancer. Nature, 396: 530-531, 1998.

14. Hildesheim, A., Schiffman, M., Brinton, L. A., Fraumeni, J. F., Jr., Herrero, R., Bratti, M. C., Schwartz, P., Mortel, R., Barnes, W., Greenberg, M., McGowan, L., Scott, D. R., Martin, M., Herrera, J. E., and Carrington, M. p53 polymorphism and risk of cervical cancer. Nature, 396: 531-532, 1998.

15. Josefsson, A. M., Magnusson, P. K., Ylitalo, N., Quarforth-Tubbin, P., Ponten, J., Adami, H. O., and Gyllensten, U. B. p53 polymorphism and risk of cervical cancer. Nature, 396: 10, 1998.

16. Murata, M., Tagawa, M., Kimura, M., Kimura, H., Watanabe, S., and Saisho, H. Analysis of a germ line polymorphism of the p53 gene in lung cancer patients; discrete results with smoking history. Carcinogenesis, 17: 261-264, 1996.

17. Kawajiri, K., Nakachi, K., Imai, K., Watanabe, J., and Hayashi, S. Germ line polymorphisms of p53 and CYP1A1 genes involved in human lung cancer. Carcinogenesis, 14: 1085-1089, 1993.

18. Levine, A. J. p53, the cellular gatekeeper for growth and division. Cell, 88: 323-331, 1997.

19. Scheffner, M., Huibregtse, J. M., Vierstra, R. D., and Howley, P. M. The HPV-16 E6 and E6-AP complex functions as a ubiquitin-protein ligase in the ubiquitination of p53. Cell, 75: 495-505, 1993.

20. Scheffner, M., Munger, K., Byrne, J. C., and Howley, P. M. The state of the p53 and retinoblastoma genes in human cervical carcinoma cell lines. Proc. Natl. Acad. sci. USA, 88: 5523-5527, 1991.

日本財団補助金による
２０００年度日中医学学術交流促進事業

①. 調査・共同研究助成

(2) 中国雲南省に於ける母子保健の実体とその要因に関する研究

研究テーマ

中国雲南省における母子保健の実態とその要因に関する研究

I.中国雲南省少数民族地域における乳幼児の発育支援

研究代表者　　牛島廣治

東京大学大学院医学系研究科　国際保健学専攻　発達医科学分野

教授

要旨

対象地域である中国雲南省徳宏州は中国全体の平均と比較して栄養不良がより広がっている傾向にあり、近隣諸国との比較においては特に消耗症において高い割合を示した。地域特性としての環境的要因および経済状態からの栄養摂取の不適切さによる栄養不良状態を前提的な条件とし、対象集団の内部における Kaup 指数が低い子どもへのリスク要因は、〈母親の養育行動〉に関する項目として「離乳食の有無」、「子どもの性別」、「子どもの栄養不良の原因の把握」、〈社会的なサポート〉に関する項目として「両親間での子どもの養育方針の一致」、「育児について相談できる医師の有無」があげられた。

母親へのグループインタビューでは、母親の自覚的な問題として子どもの痩せがあげられ、また子どもの健康上の問題についての母親の非科学的な対処が目立った。また多くの母親は子どもの健康や育児の情報についての意識が高く、適切なサポートの受けられる専門職へのアクセスが望まれていた。

これらのことから、この地域の栄養不良に対する今後のサポートに向けて、保健専門職や専門的教育を受けたボランティアによる、母親が育児についての豊富で適切な情報を得ることができる育児講座や育児相談、また緊急時に容易に医師をはじめとした専門職にアクセスできる保健サービスシステムの構築が必要であると考えられた。

Key Words

中国、雲南省、少数民族、母子保健、発育支援

Ⅰ．緒論

文化大革命の終焉以降、資本主義化に伴った一連の経済改革により、中国では一般の生活・健康水準が大きく改善されてきた。また「ひとりっこ政策」が施行された 1979 年以来、子どもの精神的・身体的な健康に大きな関心が払われてきた過程で、1960 年には 20.9%であった 5 才以下乳幼児死亡率の全国平均は 1999 年の時点では 4.7%と著しい減少を遂げ[1]、北京・上海などの都市部における子どもの成長水準は WHO の推奨する National Center of Health Statistics の参照人口に近づきつつある[2]。都市部ばかりではなく、農村部においてもこの 20 年間に子どもの成長水準は顕著な向上を示している[3]。

しかしながら都市部と農村部における栄養不良水準は未だ顕著な格差があり[4]-[6]、特に貧困地域の指定を受けた地域においては、所得の低さによる不十分な栄養摂取、水道の供給などインフラストラクチャーの不備、医師の不在をはじめとした医療サービスの不足など、子どもの発育の問題についての多くのリスク要因を抱えている。とりわけ少数民族農村貧困地域においてこの状況は深刻であり、5 才以下乳幼児死亡率が 67.3%と非常に高い値を示す地域も報告されている[7]-[11]。

中国が抱える 55 の民族のうち、全省内で最多である 26 以上もの民族を抱える雲南省は[12]、10 年毎に代表的な 6 つの民族を対象として 6 才以下の子どもについて身長・体重などの基礎的なデータをまとめているが、他地域を対象とした多くの調査とは対照的に、子どもの成長水準に明らかな変化が認められた結果は出ていない[13]。

このように少数民族農村貧困地域における成長水準の低さ、栄養不良の広がりがある程度明らかになっているにせよ、子どもの発育の問題についてはその現状すら正確に把握されてはおらず、保健学的視点からの調査もほとんどなされてはいない。また子どもの発育支援として実際に行われているサポートは、一部の地域でのクル病予防のためのビタミン B1 サプリメントのみである。

子どもの発育問題の大きな要因である貧困、衛生状態、医療制度などの早期的な改善は非常に困難であるが、それらを踏まえた上で、子どもの発育の問題に向けた効果的なサポートが急務であると考えられる。

本研究では、母親をはじめとした育児者の養育方法、社会的なサポート、家族の社会人口学的要因、遺伝的要因が子どもの栄養不良に影響を与えているという仮説を設定する。また中国雲南省徳宏州タイ族自治区において、子どもの栄養不良の広がりを把握し、関連を持つ因子を明らかにすることで、今後の保健サービス構築の一助とすることを目的とする。

Ⅱ．対象および方法

1．調査対象

雲南省は中国南西部に位置し、ミャンマー、ラオス、ベトナムと国境を接している。漢族を含め 51 もの民族が混在し、およそ 4 千万人の人口の内 33.4%が少数民族である。[14] 17 の県、127 の州や市を有し、そのうち 79 の地域で民族自治が認められ、そのなかで徳宏州を含めた 72 が貧困地域に指定されている。

本調査は、中国雲南省徳宏州において 2000 年 6 月から 8 月にかけて行われた。1 村を 1 単位とし、子どもが重篤な疾病を抱えている場合などを除き、そこに居住する 0-60 ヵ月の子どもを持つ全ての世帯に対して行われた。世帯に複数の子どもがいる場合、それぞれの子どもに対して独立して調査を行った。総計で 36 村、1173 の母子の組対象とした。

2．調査方法

対象となった世帯の母親に対し訪問によるインタビュー形式の質問紙調査、子どもに対して身体測定を行い、また 8 名の母親に対してグループインタビューを行った。

1）質問紙調査

質問紙調査は 15.6％という識字率の低さ[14]を考慮してインタビュー形式をとった。調査の精度を高める目的で、病院や保健院などのヘルスケアスタッフからなるインタビュアーに対して、4 日間延べ 26 時間を費やし、身体測定、インタビュー方法、質問紙記入法、ロールプレイングおよびプレ調査を含めた事前訓練を行った。回収した質問紙は当日中にチェックを行い、ミスのあったものについては再調査を行った。

2）子どもの身体測定

身長 100cm 以下の子どもに対しては、WHO の推奨する Baby length measure（by the Appropriate Health Resources and Technologies Action Group,Ltd.）を用い１５）、0.1cm 単位の計測を行った。[15]身長 100cm 以上の子どもに対しては、100cm から 200cm を計測可能な金属製メーターを用い、0.1cm 単位の計測を行った。体重については、全ての子どもについて分銅式体重計を用い、0.1kg 単位の計測を行った。

3）母親に対するグループインタビュー

県レベルの病院の医師をインタビュアーに、8 名の母親に対して約 90 分間のグループインタビューを行った。写真を含めた画像の記録を禁止されたために、記録には筆記および IC レコーダーを用いた。

3．調査内容

1）質問紙調査内容

〈家族の社会人口学的背景〉として、「家族の形態」（家族の構成員の種類とそれぞれの人数）、「前年度の家族一人当りの年収（元）」、「家族一人当りの居住面積（㎡）」、「飲料水の水源（水道水、ポンプ式井戸水、汲み取り式井戸水、川や湖、雨水、その他）」、「トイレの種類（屋内洋式、室内和式、開放式水流型、土穴式、最寄りの公衆トイレ、その他）」、「電気の供給の有無」の質問項目を用いた。

〈両親の情報〉として、「両親の「年齢（年)」、「両親の身長（cm)」、「両親の体重（kg)」、「民族（タイ族、漢族、その他)」、「教育年限（年)」、「職業（農業、自営業、会社員、教師、医師、その他)」の質問項目を設定した。

〈周産期の情報〉として「出生順位（位)」、「在胎週数（週)」、「出生体重計測の有無（有りの場合出生体重)」、「出産方法（自然分娩、帝王切開、吸引分娩、その他)」、「出産場所（県級以上の病院、農村衛生院、村の衛生院、自宅、病院へ向かう途中、その他)」、「自宅出産および病院へ向けう途中に出産した場合の助産者の種類」の質問項目を用いた。

〈離乳期に情報〉として、「離乳食の有無」、「母乳のみによる養育の期間（月)」、「母乳をやめた時期（月)」、「大人と同じ食事を与え始めた時期（月)」の質問項目を用いた。

〈母親の栄養についての意識と行動〉として、「子どもに規則的に食事を与えるようにしているか」、「どのような栄養が子供の健康によいか知りたいと思うか」（非常に思う、思う、できればそう思う、どちらでもよい、知りたくない)」、「健康のために今の食習慣を変えなければいけない場合どうするか（すぐ変えたい、変えたい、変えてもいい、どちらでもよい、変えたくない)」、「子どもの栄養不良がどのような症状を引き起こすか(体重が軽い、背が伸びない、お腹をこわしやすい、食欲がない、風邪をひきやすい、むくむ、ひどく泣く、元気がないわからない、その他)」、「子どもの栄養不良は何によって起こるのか（食べる量が少ない、食べているものの種類が少ない、頻繁に病気である、わからない、その他)」の質問項目を用いた。

〈母親の養育行動〉として、「主な育児者の種類（母親、父親、祖母、その他)」、「1 週間にどのくらい子どもと遊んでいるか」、「1 週間にどのくらい子どもと一緒に食事をしているか」、「子どもの要求にどのように接しているか（必ず応じる、ほとんど応じる、時々応じる、応じない)」、「子どもが駄々をこねた場合どのように接するか（叩いて叱る、無視する、理由をいってきかせる、要求に応じる、その他)」、「子どもが過ちを犯した場合どのようにするか（叩いて叱る、言葉できつく叱る、道理を説いてきかせる、無視する、その他)」、「先週子どもを何回叩いたか」、「子どもにどのような生活

習慣を教えているか（人に挨拶をする、食事の作法、トイレの始末、手洗い、歯磨き、入浴の仕方、服の脱ぎ着、靴のはき方)」、「子どもは週に何回水やお湯で体全体を洗うか」、「生後何日間子どもを布でくるんで養育したか」の質問項目を用いた。

〈育児環境〉として、「両親間で子どもの養育方針が一致しているか（ほぼ完全に一致している、大部分は一致している、一致している部分もある、一致していない、わからない)」、「祖父母と両親の間で子どもの養育方針が一致しているか（ほぼ完全に一致している、大部分は一致している、一致している部分もある、一致していない、わからない)」、「育児について相談できる人は誰か（夫、祖父母、親戚、近所の人、医師、その他)」、「育児について手助けが必要なとき、頼めるのは誰か（夫、祖父母、親戚、近所の人、その他)」の質問項目を用いた。

〈過去２週間の子どもの疾病罹患状況〉として、「最近２週間で子どもは次の病気にかかったか（発熱、急性呼吸器系疾患、下痢、皮膚疾患、寄生虫病、なにもない、わからない、その他)」の質問項目を用いた。

２）子どもの身体測定

子どもの栄養不良状態を評価するために、身長・体重についての計測を行った。

３）母親に対するグループインタビュー

「育児や子どもの健康について、実際に困っていることはなにか」、「将来的に何らかのサポートが得られるとしたら、どのようなものが必要か」を主なテーマに、８名の母親に対してグループインタビューを行った。

４．分析方法

全ての統計学的な分析は SPSS version9.0J for windows（SPSS Inc.）によって行った。

子どもの身長・体重について、中国全土および近隣諸国との栄養不良水準

の比較を行うため、WHOによって推奨されるアメリカのNational Center of Health Statisticsの参照人口から-2SDを基準として、低体重（weight for age）、発育阻害（height for age）、消耗症（weight for height）の3つの指標による評価を行い[15]、同時にkaup指数の算出を行った。また両親の身長・体重からそれぞれのBMIを算出した。

それぞれの年齢において、Kaup指数が下位25パーセンタイルに含まれる子どもを低Kaup指数群（リスク群）、それ以外の子どもを非低Kaup指数群（非リスク群）とし、低Kaup指数群についてのリスク要因を探る目的で、リスク群・非リスク群の2値データに加工した各項目との2×2のクロス集計によるχ二乗検定を行った。順序尺度変数についてはMantel-Haenszel法により年齢についての因子を調整した。

子どもの栄養不良状態が、母親の養育行動、遺伝的要因、社会人口学的要因、社会的サポートによる影響を受けているという仮説のもとに、「母親のBMI」、「父親のBMI」を〈遺伝的要因〉、「前年度の家族一人当りの年収」、「家族一人当りの居住面積」、「家族の形態」、「飲料水の水源」、「トイレの種類」を〈家族の社会人口学的要因〉、「児の性別」、「離乳食の有無」、「体罰の有無」、「食事の規則性に対する留意」、「子どもの栄養不良の原因の把握」、「子どもの栄養不良が誘引する症状の把握」、「よりよい栄養の情報についての積極性」、「よりよい栄養方法への転換に対する積極性」を〈母親の養育行動〉、「両親間での児の養育方針の一致」、「両親と祖父母間での児の養育方針の一致」、「育児について相談できる医師の有無」を〈社会的サポート〉として分類し分析を行った。

各項目におけるリスク群・非リスク群の群分けの基準は、「母親のMBI」、「父親のMBI」、「前年度の家族一人当りの年収」、「家族一人当りの居住面積」について下位25パーセンタイルに含まれるケースをリスク群、それ以外のケースを非リスク群とした。「子どもの性別」について、将来的な労働力になりにくいことからよい栄養を与えらない場合があるとされる女子をリスク群、男子を非リスク群とした。「家族の形態」について、夫以外の同居者のサポートが受けにくいと思われる核家族をリスク群、それ以外を非リス

ク群とした。「父親の教育年限」、「母親の教育年限」について中国農村地域の小学校卒業年に相当する５年以下をリスク群、それ以外を非リスク群とした。「飲料水の水源」について、頻繁な下痢症が開発途上国の高い 5 才以下乳幼児死亡率の一因であるという先行研究から、[16)-18)] 外気に晒されより不衛生だと考えられる汲み上げ式井戸、川や湖、雨水をリスク群、それ以外を非リスク群とし、「トイレの種類」について屋内溜め置き式をリスク群、開放式流水型および屋外公衆トイレを非リスク群とした。「離乳食の有無」について離乳食を与えていなかった群をリスク群、与えていた群を非リスク群。「体罰の有無」について、体罰有りをリスク群、それ以外を非リスク群とした。「よりよい栄養情報への積極性」、「子どもの栄養不良の原因の把握」、「子どもの栄養不良が誘引する症状の把握」、「よりよい栄養方法への転換に対する積極性」、「両親間での児の養育方針の一致」、「祖父母と両親間での児の養育方針の一致」についてわからない以下の否定的な回答の群をリスク群、それ以外を非リスク群とした。「育児について相談できる医師の有無」について、相談できる医師無しをリスク群、それ以外を非リスク群とした。「下痢の罹患」、「急性呼吸器感染の罹患」について罹患有りをリスク群、それ以外を非リスク群とした。

またχ二乗検定の結果から、有意水準 5%以上の変数を説明変数に、低 Kaup 指数群に対するステップワイズ変数増加法による多重ロジスティック回帰分析を行った。

子どもの栄養不良についての母親の意識と知識を把握する目的で、質的なデータから、サポートを受ける側である母親が実際に抱えている子どもの発育、育児上の問題を把握し、現地で望まれているサポートのあり方を明らかにする目的で、母親に対するグループインタビューによる情報の分析を行った。

Ⅲ．結果

１）対象の特徴（表 1-1、1-2、1-3、1-4）

対象となった子どもは、男子 572 人（50.0%）、女子 571 人（50.0%）であり、その全てがタイ族であった。

母親の民族はタイ族が 1123（98.3%）、漢族が 19（1.7%）、その他の民族が 1（0.1%）、父親の民族はタイ族が 1100（96.2%）、漢族が 43（3.8%）であった。母親と父親の民族にはタイ族以外の民族も含まれたが、両親ともにタイ族以外であるケースはなく、子どもは全てタイ族として養育されていることから、特に分析上の分類は行わなかった。母親の年齢は 18 から 45 才（Mean=26.53，SD=3.84）、父親の年齢は 18 から 48 才（Mean=27.41，SD=3.97）に分布していた。母親および父親の教育年限は、小学校卒業にあたる 5 年がそれぞれ 60.5%および 58.7%であり、それ以下が 16.8%および 18.2%、中学校進学以上が 22.7%および 22.9%であった。

家族形態は核家族が 165 世帯（14.4%）、拡大家族が 978 世帯（85.6%）であり、家族の人数は 3 から 9 人に分布していた（Mean=5.71，SD=1.53）。父親の職業はほとんどが農業（97.3%）であり、他に自営業（1.0%）、会社員（0.4%）、教師（0.4%）などがあげられた。母親の職業は同様に農業が最も多く（98.7%）、次いで教師（0.4%）、自営業（0.3%）、会社員（0.1%）となっていた。家族一人当りの年収は 25 から 8200 元に分布しており（Mean=517.9，SD=489.5）、中国国民統計における貧困の定義である平均年収 500 元以下だったのはおよそ 71.4%となっていた。

2）中国全土および近隣諸国との栄養不良水準の比較（表 2）

低体重（weight for age）、発育阻害（height for age）、消耗症（weight for height）の各指標について対象集団の平均は、低体重で 36.1%、発育阻害で 30.8%、消耗症で 12.0%となっていた。χ 二乗検定において男女間で有意差はみられなかったが、各年齢間では有意差が認められた（$p<0.001$）。また消耗症に評価された子どもの内 84.2%が低体重を兼ねていた。

対象となった集団と中国全土および近隣諸国との低体重、発育阻害、消耗症の割合の比較を表 2 に示した。対象集団における各年齢の平均と中国全土および近隣諸国の平均との t 検定による比較では、低体重について対象集

団は中国全土、ミャンマー、タイよりも有意に高く、発育阻害についてタイよりも有意に高く、ラオスよりも有意に低く、消耗症についてミャンマーよりも有意に高かった。

3）低 Kaup 指数群についてのリスク要因の検討

それぞれの項目のリスク群・非リスク群の割合を表 3-1 に示す。

〈遺伝的要因〉に含まれる項目は、「父親の MBI（リスクカテゴリー：20.7 未満）」についてリスク群 310（27.1%）、非リスク群 833（72.9%）、以下同様に「母親の MBI について（18.8 未満）」について 275（24.0%）、868（76.0）であった。

〈家族の社会人口学的な要因〉に含まれる項目は、「父親の教育年限（5 年未満）」について 171（15.0%）、971（85.0%）、「母親の教育年限（5 年未満）」について 186（16.3%）、957（83.7%）、「家族形態（核家族）」について 165（14.4%）、978（85.6%）、「兄弟の有無（兄弟有り）」について 467（40.9%）、676（59.1%）、「飲料水の水源（水道・ポンプ式井戸以外）」について 610（53.4%）、533（46.6%）、「家族の年収（300 元未満）」について 349（30.6%）、794（69.4%）、「家屋の広さ（20 ㎡未満）」について 230（20.1%）、913（79.9%）であった。

〈母親の養育行動〉に含まれる項目は「子どもの性別（女子）」につい 571（50%）、572（50%）、「離乳食の有無（離乳食無し）」について 841（73.6%）、302（28.0%）、「食事の規則性に対する留意（留意無し）」について 144（12.6%）、999（87.4%）、「子どもの栄養不良の原因の把握（把握無し）」について、991（86.3%）、153（13.7%）、「子どもの栄養不良が誘引する症状の把握」について 920（80.5%）、223（19.5%）、「よりよい栄養の情報に対する積極性（積極性無し）」について 18（1.7%）、1125（98.3%）、「よりよい栄養方法への転換に対する積極性（積極性無し）」において 20（1.7%）、1123（98.3%）、「体罰の有無（体罰有り）」について 247（21.6%）、896（78.3%）であった。

〈社会的サポート〉に含まれる項目は、「両親間での子どもの育児方針の

一致（一致無し）」について 45（3.9%）、1098（96.1%）、「両親と祖父母間での子どもの育児方針の一致（一致無し）」ついて 108（9.4%）、1035（90.6%）、「子どもの養育について相談できる意思の有無（相談できる医師無し）」について 1095（95.8%）、48（4.2%）であった。

（過去 2 週間に罹患した疾病）に含まれる項目は、下痢症の罹患について 110（9.6%）、1033（93.4%）、急性呼吸器感染について 220（19.2%）、923（80.3%）であった。

表 3-2 において、低 Kaup 指数群・非低 Kaup 指数群と各項目のリスク群・非リスク群との 2×2 のクロス集計によるχ二乗検定においては、「子どもの性別」（リスク群に占める低 Kaup 指数群：28.2%、非リスク群における低 Kaup 指数群：22.0%、$p<0.01$ 以下同様）、「トイレの種類」（28.8%、23.8%、$p<0.05$）、「離乳食の有無」（19.5%、40.7%、$p<0.001$）、「よりよい栄養の情報に対する積極性」（55.6%、24.6%、$p<0.01$）、「両親間での子どもの育児方針の一致」（44.2%、23.9%）、「両親と祖父母間での子どもの養育方針の一致」（33.3%、24.3%、$p<0.05$）、「相談できる医師の有無」（25.8%、10.4%、$p<0.01$）の項目について 5%以下の水準で有意差がみられた。

その他有意差がみられなかった項目におけるリスク群・非リスク群のそれぞれに占める低 Kaup 指数群の割合は、「父親の BMI」（22.3%、28.2%）、「父親の教育年限」（23.8%、25.4%）、「母親の BMI」（26.5%、24.8%）、「母親の教育年限」（23.7%、25.5%）、「家族形態」（35.0%、25.4%）、「兄弟の有無」（27.2%、23.8%）、「飲料水の水源」（22.8%、28.0%）、「前年度の家族一人当りの年収」（26.1%、24.8%）、「家族一人当りの居住面積」（25.7%、25.1%）、「食事の規則性に対する留意」（25.0%、25.1%）、「よりよい栄養方法への転換に対する積極性」（35.0%、25.0%）、「体罰の有無」（31.6%、23.4%）、「下痢の罹患」（23.6%、25.4%）、「急性呼吸器感染の罹患」（20.0%、26.0%）となっていた。

χ二乗検定における結果から有意水準 5%以下を基準として、「児の性別」、「トイレの種類」、「離乳食の有無」、「よりよい栄養の情報に対する積極性」、「よりよい栄養方法への転換に対する積極性」、「両親間での児の養育方針の

一致」、「祖父母と両親間での児の養育方針の一致」、「育児について相談できる医師の有無」を説明変数として投入し、低 Kaup 指数群に対するステップワイズ変数増加法によるロジスティック回帰分析を行った（表 3-3）。「子どもの性別」（OR=1.42，95%CI=1.07-1.88）について女子であること、「離乳食の有無」（OR=0.35，95%CI=0.26-0.46）について離乳食を与えていること、「子どもの栄養不良の原因の把握」（OR=1.82，95%CI=1.16-2.89）について把握がないこと、「よりよい栄養の情報に対する積極性」（OR＝2.97，95%CI=1.07-8.18）について積極性がないこと、「両親間での養育方針の一致」（OR=3.15，95%CI=1.12-4.11）で一致がないこと、「育児について相談できる医師の有無」（OR＝3.17，95%CI＝1.22-8.22）で相談できる医師のないことが児の Kaup 指数の低さと有意な関連を示した。「トイレの種類」、「祖父母と両親間での児の養育方針の一致」、「よりよい栄養方法への転換に対する積極性」は児の Kaup 指数の低さと有意な関連がみられなかった。「離乳食の有無」については離乳食無しをリスク群として評価したが、非リスク群に対するリスク群のオッズ比は負の方向を示した。また「相談できる医師の有無」が最もリスクの高い要因として導かれた。

4）子どもの栄養不良についての母親の意識と知識（表 4-1、4-2）

「子どもの栄養不良の原因は何か」の項目については、「食べる量が少ない」が 83（7.3%）、「食べる品目が少ない」が 15（1.3%）、「頻繁に病気になる」が 60（5.2%）、「わからない」が 998（86.4%）、「その他」が 29（2.5%）であった。

「子どもの栄養不良はどのような症状を誘引するか」の項目については、「体重が増えない」が 70（6.1）、「背が伸びない」が 24（2.1%）、「下痢をしやすい」が 24（2.1%）、「風邪をひきやすい」が 46（4.0%）、「むくみがちになる」が 2（0.2%）、「元気がなくなる」が 46（4.0%）、「わからない」が 920（80.5%）、「その他」が 15（1.3%）となっていた。

5）母親のグループインタビュー

対象となった８名は全て１児の母親かつ農業従事者であった。インタビューは村の寺院の離れにおいて、村医および村長の立会いのもとに行われた。対象者はアンケートおよびインタビューを受けるのは初めてであったが、特に緊張もなく全員に積極的な発言がみられた。

母親は全員が農業に従事していた。作業時間は全ての母親が原則として夜明けから午前 11 時、15 時から日没までと答えていた。作業中の子どもの養育については、「子どもを布で繰るみ背中に背負って作業をする」、「作業中は夫の母親に面倒を見てもらう」など子どもの年齢やそれぞれの母親によって違いがあったが、全ての母親は３食ともに子どもと一緒に食事をし、子どもとのコミュニケーションが不足していると感じている母親はいなかった。

「育児や子どもの健康について、困っていることは何か」というテーマについては、「いくら食べさせても痩せたままだ」、「背は伸びるのに、体重は増えない」など体重不増の問題が目立った。対処法としては、「よくわからないが特に困ったこともないので、そのままでもかまわない」、「なるべくたくさん食べさせる」などがあげられた。他に「子どもが大量の涙が出る」、「尿の色がおかしい気がする」などが個々の問題としてあげられた。対処の仕方としては科学的な根拠によるよりも、育児上の反復的な経験から導き出した例が多く、それぞれ「鶏肉を食べていることが原因なのでしばらく食べさせなければ直る」、「子どもの頃は体調がかわりやすいので大人になればなおる」としていた。母親が自分たちで解決困難な問題としては子どもの痩せの問題のみを８名全員があげていた。

「将来的に何らかのサポートが得られるとしたら、どのようなものが必要か」というテーマについては、「今は困っていないが、何か困ったことがあった時に専門家に相談したい」、「何か有益なことを教えてくれる集会があれば参加したい」などの意見が出された。

育児上の相談者としての役割が可能な専門職としては、現状では村医の存在が考えられる。しかし「村医のいるところまで遠い」、「そのようなこと（育児上の相談）は村医の仕事ではない」として、村医は医療提供者としての役割のみを認知されていた。また同時に、「自分の手にあまるような重症なら

もっと大きな病院がよい」などの意見があり、村医の存在は必ずしも有効に活かされてはいなかった。

Ⅳ．考察

本研究は中国少数民族農村貧困地域において、子どもの発育についての将来的なサポートに向けて、保健学的視点でなされた最初の調査である。

本研究の特徴は、第１に対象集団全体の栄養不良水準を把握した上で対象集団内での低 Kaup 指数へのリスク因子を明らかにしたことで、より効果的なサポートに向けての特徴的な情報を提供可能な点である。また第２に、保健サービスシステム構築のためには量的データおよび質的データからの多角的・複合的な情報の検討が必要であることから[19]、子どもの発育問題に対する母親の現状認識と実際に望むサポートの種類をグループインタビュー法により把握することで、対象者のニーズに適合したサポートのあり方を提示した点である。

１）中国全土および近隣諸国との栄養不良水準の比較

中国全土の平均と比較して、対象集団の平均は低体重について高く、発育阻害について低い傾向にあった。低体重、発育阻害、消耗症の各指標ともに、ミャンマー、タイよりも高く、低体重、発育阻害についてベトナム、ラオスより低くなっていたが、消耗症についてはベトナムについで高い値をとった。このことから対象地域の栄養不良水準は近隣諸国と同様に高く、特に消耗症の広がりが顕著であることが明らかになった。

２）低 Kaup 指数群についてのリスク要因の検討

本研究では、子どもの栄養不良に母親の養育行動、社会的サポート、社会人口学的特徴、遺伝的な要因が子どもの Kaup 指数の低さに影響を与えているという仮説のもとに、各質問項目をそれぞれのカテゴリーに分類した。一

連のχ二乗検定およびステップワイズ法によるロジスティック回帰分析の結果では、〈母親の養育行動〉、〈社会的サポート〉に分類された項目のみがリスク要因として導きかれた。社会人口学的特徴、遺伝的な要因は多くの先行研究でリスク要因として明らかにされており[20)-29)]、今回有意なリスク要因として導かれなかったことは当初の仮説に反した結果であったが、少数民族貧困地域においては、各世帯の経済状態、環境、両親の教育期間、生活習慣などに差異が少なく、相互に交絡しているこれらの因子が特徴付けられにくかったこと、また世帯間で比較的均一であるこれらの要因が、サンプル内での子どもの Kaup 指数の低さよりも、むしろサンプル全体の栄養不良を誘引しているものと考えられた。

リスク要因として抽出されたもののうち、「子どもの性別」については、女子は労働力として男子に劣り、婚姻によって家を離れることからよい栄養が与えられにくいことが考えられた。「離乳食の有無」については、非リスク群と分類した離乳食を与えていることがリスク要因としてあげられた。幾つかの先行研究は離乳の時期と後の発育状態との関連を示し[30)-32)]、早期の離乳や離乳食の内容の不適切さが原因である可能性が考えられたが、今後さらに離乳食の種類と与え方を充分に把握する必要がある。「子どもの栄養不良の原因の把握」、「よりよい栄養情報に対する積極性」については、栄養不良およびその原因についての認識が非常に低いレベルに留まっていることから、この項目のみがリスクであるというよりも子どもの栄養全般についての母親の意識や態度のあり方を反映していると考えられた。「両親間での育児方針の一致」、「相談できる医師の有無」についての項目により、家族の精神的な支援や、育児について相談可能な保健および医療の専門職の必要性が示唆された。

今回対象となった母親について、育児についての相談者、育児についての協力者の有無について、その双方でひとりもいないと答えた母親ないなかった。しかし今後ニーズの多様化が予測され、また栄養不良を含めた子どもの養育問題については、近親者よりも一定の距離が保たれた人間関係が問題の評価および解決に有効であるとの報告もあり[33)]、特に専門的な知識をもっ

た保健専門職の相談者としての役割が重要であると考えられる。

3）子どもの栄養不良に対する母親の意識と知識

グループインタビューの結果が示すように、母親が栄養不良を養育上の問題点と認識しているにせよ、子どもの栄養不良の原因および子どもの栄養不良が誘引する症状についての認識は全体的に低い率を示した。

「子どもの栄養不良の原因は何か」については「食べる量が少ない」が最も広く認知されており、「子どもの栄養不良が誘引する症状は何か」においては「食欲がわかない」だったことから、栄養不良と栄養摂取の関連が比較的しられていたが、両項目とも「わからない」と答えた母親がそれぞれ 80%を超えていた。

「子どもの栄養不良の原因の把握」は低 Kaup 指数についてのリスク要因として導かれており、保健一般についての基礎的な知識の欠如が栄養不良や疾病罹患と有意な関連を持っているとする先行研究からも[34),37)]、母親に対して栄養不良の広がりや原因、誘引される症状とその対処法などの教育を行うことの重要性が考えられる。

4）母親の育児における問題認識および育児ニーズの把握

子どもの健康および育児について多くの母親が共通して解決困難な問題として認識しているのは子どもの痩せの問題であった。個々に母親が気づいている子どもの異常については、それぞれが対処方法を持っていたが、因果関係が曖昧な場合や、科学的な根拠よりも母親の経験による傾向があり、必ずしも適切な対処といいきれないケースが多かった。

母親たち自身が望んでいる具体的なサポートは今回あげられなかったが、子どもの健康および育児についての知識に対する意識は高く、緊急時の専門職へのアクセスが望まれていた。

少数民族農村貧困地域において、育児上の相談者および非常時の医療提供者としての役割が可能な専門職は、現時点では村医のみである[38)]。しかし、

農村部においては 3 千人に 1 人の割合でしか村医がいない地域もあり、その数が不足している傾向がある。また「村医」(village doctor) は農業改革以前の「はだしの医者」(bear-foot doctor) が、医療制度の改変後にそのまま呼称を変えたものであり、ライセンス制ではなく、特別な教育を受けていないため、医療行為も鎮痛剤、解熱剤、ビタミン剤、ぶどう糖などの投与にとどまる。また経済的な利益も低いことから、各個人の能力と仕事に対する意識に差異がある。

これらの要因から、中国農村部の他地域あるいは開発途上国農村貧困地域を対象とした幾つかの先行研究と同様に[39)-41)]、この地域おける保健医療サービス提供者である村医は有効な情報・医療提供者として認知されていない場合が多く、母親のサポートに向けてまず個々の村医の専門職としての知識と意識を高めることが重要であると考えらる。

5) 今後の保健サービスの構築に向けて

対象地域の栄養不良水準は高く、地域特性としての貧困、環境的要因、医療サービスの不足などがその原因として考えられた。

しかしそれらの問題は早期的には改善が困難であり、現段階で可能かつ効果的なサポートに向けて、対象集団内部での低 kaup 指数に対するリスク要因としてあげられたのは〈母親の養育行動〉および、〈社会的サポート〉についての項目であり、また母親の子どもの栄養不良に対する認識は低かったが、情報に対する積極性は高かった。

以上のことから、母親に有効かつ豊富な情報を提供し、非常時に容易にアクセスできる専門職の存在が必要であると考えられた。しかし、対象地域に常駐する唯一の医療提供者である村医は必ずしも有効な存在として認知されてはおらず、県レベルの医師による村医の指導、保健専門職や健康についての専門的な教育を受けたボランティなどによる、母親に対する巡回式の育児講座や育児相談などが、現時点での子どもの発育支援に向けた効果的なサポートとして考えられる。

6）研究の限界と今後の課題

本研究は雲南省の行った先行調査により、少数民族農村貧困地域に居住する主要（人口 100 万人以上）な6民族のなかで、最も栄養不良が広がっていたタイ族を対象に行われた。

〈母親の養育行動〉、〈社会的サポート〉、〈家族の社会人口学的要因〉、〈遺伝的要因〉が子どもの発育に影響を与えるという仮説を設定し、訪問式のインタビュー調査の手法をとった。

また質問票は英語で作成され、中国語に翻訳し、それをさらにタイ族の言語に訳して用いられた。質問票を翻訳については、全ての過程で別の翻訳者による再び元の言語への再翻訳を行い、両者の比較により違いがみられた項目や表現を改善することで信頼性を高めた。またインタビュアーは全て専門的な知識を持つ医師および看護士であり、長時間にわたるディスカッションと事前訓練により、データの精度を高めることに努めたが、他言語に翻訳することによるバイアスを完全には除去することは極めて困難であると考えられる。

子どもの発育支援のための保健サービスシステム構築に向けて、母親に対する育児についての教育の必要性が示唆されたが、今後子どもの栄養不良に直接的に影響するとされる母乳・離乳食を含めた栄養摂取の実態を具体的に把握することが、更に効果的な情報提供に繋がるものと考えられた。

また本研究は質問紙調査およびグループインタビューの方法をとったが、地理的に隔離された対象集団は自らの養育方法についての比較対象を持ってはいない。したがって民族に独自な養育方法をはじめ、回答者が気づかない子どもの発育についてのリスク要因が存在すると考えられ、長期的なオブザベーションを含めた情報の収集、およびタイ族のみではなく少数民族農村貧困地域に居住する他民族との比較がより効果的なサポートに繋がるものと考えられた。

東京大学大学院医学系研究科発達医科学教室牛島廣治・堀田正央、雲南省乳幼保健院李燕が中心に行った。東北文化学園大学保健福祉学科高山忠雄、国立身体障害者リハビリテーションセンター研究所社会適応システム開発室安梅勅江が協力した。また調査および報告書作製に多くの方々の協力を得た。この研究は日中医学協会の研究費を得て行った。

文献

1)NICEF. The State of the World's Children. Oxford University Press, New York, 1999.

2)Liu NX, Chen XX, Jia GN. The analysis of child growth trend after investigation of child development. Chin. J. Child Care 1998; 6: 27-29.

3)Ding ZY. A longitudinal study on growth velocity of children aged 0-7. Chin. J. pediatr. 1996; 34: 93.

4)Chang Y, Xian ZD, He W, Chang SY, Ma HJ, Chen CM. Child malnutrition in China--present status and changing trend. Biomed Environ Sci 1996;9:164-180.

5)Popkin BM, Keyou G, Zhai F, Guo X, Ma H, Zohoori N.The nutrition transition in China: a cross-sectional analysis. Eur. J. Clin. Nutr. 1993;47(5):333-346.

6)Department of Physical of the Capital Institute of Pediatrics. An investigation in 1985 on the physical development of children under 7 years of age in urban and suburban districts of 9 cities of china. Natl. Med. J. China 1987;67:423-428.

7)Coordinating Group of nine cities on physical growth and department of Physical of the Capital Institute of Pediatrics. An investigation in 1985 on the physical development of children under 7 years of age in urban and suburban rural areas of nine cities of china in 1995. Natl. Med. J. China 1998;78: 187-191.

8)Zhu ZH. Preliminary analysis on children survival level of china Chin. Maternal Child Health Care 1992; 7: 1-7.

9)Lin LM, Liu YL, Feng SY et al. Levels and trends of mortality of infant and under 5 years old child in China from 1991 to 1993. Pop. Res. 1996;20:50-60.

10)Lui JT, Du KL. Survey on surviving levels of child in different periods andifferent areas in Yunnan Province. Chin. Maternal Child Health

Care.1995;10:118-120.

11)Fei YJ, Zhu XQ, Wan Y. An analysis on mortality of five years old child in rural Yunnan. Chin Maternal Child Health Care 1994;9:51-52.

12)謝蘊秋. 云南境内的少数民族　北京：民族出版社,1999；1-3.

13)云南省十地区六民族 0-7 才正常児童体格発育調査研究資料　昆明：云南省乳幼保健所,1991:82-91.

14)中国年鑑 2000　東京：中国研究会,2000:346.

15) World Health Organization. Measuring Change in Nutritional status. WHO, Geneva; 1983.

16) Mittal SK. Chronic diarrhea in toropics. Indian J Pediatr 1999;66:4-15.

17) Patwari AK. Diarrhoea and malnutrition interaction.Indian J Pediatr 1999;66:124-134.

18) Bertard W, Walmus B. Maternal knowledge, attitude,and practices as predictors of diarrheal disease in young children. Int. J. Epidemiol. 1983;12:205-210

19)高山忠雄,安梅勅江. グループインタビュー法の理論と実際. 東京川島書店；1993.

20) Murray CJ, Lopez AD. Global mortality, disability, and the contribution of risk factors: Global Burden of Disease Study. : Lancet.1997;349(9063):1436-1442.

21) Francois PJ, James WP. An assessment of nutritional factors affecting the BMI of a population. Eur. J. Clin. Nutr. 1994;48 :S110-114.

22) Wang Y, Ge K, Popkin BM.Tracking of body mass index from childhood to adolescence: a 6-y follow-up study in China: Am J Clin Nutr 2000;72(4):1018-1024.

23) Guldan GS, Zhang MY, Zhang YP, Hong JR, Zhang HX, Fu SY, Fu NS Weaning practices and growth in rural Sichuan infants: a positive deviance study. : J Trop Pediatr. 1993;39(3):168-175.

24) Wang Y, Ge K, Popkin BM.Tracking of body mass index from childhood to adolescence: a 6-y follow-up study in China: Am J Clin Nutr 2000;72(4):1018-1024.

25) Saito K, Korzenil JR, Jekel JF. Bhattacharji S. A case-control study of maternal knowledge of malnutrition and health-care-seeking attitudes in rural South India. Yale J. Biol. Med. 1997;70:149-160.

26) Delemarre-van Waal HA. Environment of factors influencing growth and pubertal development. Environ, Health Perspect, 1993;70:149-160.

27) Amigo H, Bustos P, Radrigan ME. Is there a relationship between parent's short height and their children's ? Social interclass epidemioligic study. Rev. Med. Chile 1997; 125: 863-868.

28) Miller JE, Korenman S. poverty and children's nutritional status in the United States. Am. J. Epidemol. 1994;140:233-243.

29) Valenzuela CY. Assessment of height as an indicator of population Nutritional status. Rev. Med, chile. 1997;125:595-604.

30) Orozco M. Martinez H. Reyes H. Guiscafre H. A scale without anthropometric measurements can be used to identify low weight-for-age in children less than five years old. Journal of Nutrition. 1998;128(12):2363-2368.

31) Nagandu NH, Watts TE, Child growth and duration of breastfeeding in urban Zambia. J. Epidemiol. Comm. Health 1990;44:281-285.

32) Habicht JP, The association between prolonged breastfeeding and poor growth—what are the implications? 2000;478:193-200.

33) Ticao CJ. Aboud FE. A problem-solving approach to nutrition education with Filipino mothers. Soc. Sci. Med. 1998;46(12):1431-1541.

34) Arifeen SE, Black RE, Caulfield LE, Antelman G, Baqui AH, Nahar Q, Alamgir S, Mahmud H, Infant growth patterns in the slums of Dhaka

in relation to birth weight, intrauterine growth retardation, and prematurity. Am. J. Clin. Nutr 2000;72(4):1010-1017.

35) Abidoye RO, Silabofori, A study of prevalence of protein energy malnutrition among 0-5 years in rural Benue State,Nigeria. Nutr. Health. 2000;13(4):235-247.

36) Jeyasselan L, Lakshman M, Risk factors for malnutrition in south Indian children. J. Biosoc. Sci. 1997;29(1):93-100.

37) Agueh VD. Makoutode M. Diallo P. Soton A. Ouendo EM. Infant malnutrition and associated maternal factors in a secondary city south of Benin, Oudah. Revue d' Epidemiologie et de Sante Publique, 1999;47(3):219-228.

38) Feng X, Tang S, Gerald B, Malcolm S, Gu X, Cooperative medical schemes in contemporary rural China. Soc. Sci. Med. 1995;41(8):1111-1118.

39) Glenn C, et al. Seeking women's voice: setting the context for women's health intervention in two rural countries in Yunnan,China.Soc.Sci.Med. 1995;41(8):1147-1157.

40) Caldwell J. S. et al. Maternal education and child's feeding practices in rural Bangkadesh. Soc.Sci,Med 1993;36:925.

41) Caldwell J. C. Healthe transition: the cultural, social and behavioural determinants of hehalth in Third World. Soc.Sci.Med. 1993;36:125-135.

表1-1　対象となったこどもの月齢の分布
(N=1143)

月齢	n	%
0-	154	13.5
6-	171	15.0
12-	138	12.1
18-	179	17.5
24-	92	8.0
30-	84	7.3
36-	68	5.9
42-	93	8.1
48-	73	6.4
54-60	91	8.0
合計	1143	100.0

表1-2　対象の民族(N=1143)

	こども		母親		父親	
	n	%	n	%	n	%
タイ族	1143	100	1123	98.3	1100	96.2
漢族	0	0	19	1.7	43	3.8
その他	0	0	1	0.1	0	0
合計	1143	100	1143	100	1143	100

表1-3　両親の職業(N=1143)

	母親		父親	
	n	%	n	%
農業	1127	98.6	1112	97.3
自営業	4	0.3	11	1.0
会社員	1	0.1	5	0.4
教師	5	0.4	5	0.4
医師	1	0.1	1	0.1
その他	5	0.4	9	0.8
合計	1143	100	1143	100

表2　対象集団と中国全土および近隣諸国との栄養不良水準の比較

	低体重	発育阻害	消耗症
対象集団	36.1	30.8	12.0
中国	16.0*	34.0	-
ベトナム	41.0	44.0	14.0
ミャンマー	9.0**	23.0	2.0**
ラオス	40.0	47.0*	11.0
タイ	19.0*	16.0*	6.0

*:p<0.05、**:p<0.01

表3-1 人口学的背景、母親の養育方法、社会的サポートおよび疾病罹患のリスク・非リスク群の分布

項目	リスクカテゴリー	リスク群		非リスク群	
		n	%	n	%
児の性別	女児	571	50.0	572	50.0
父親のMBI	20.7未満	310	27.1	833	72.9
父親の教育年限	5年未満	172	15.0	971	85.0
母親のMBI	18.8未満	275	24.0	868	76.0
母親の教育年限	5年未満	186	16.3	957	83.7
家族形態	核家族	165	14.4	978	85.6
兄弟の有無	有り	467	40.9	676	59.1
飲料水の水源	水道・ポンプ式井戸以ヶ	610	53.4	533	46.6
トイレの種類	水洗以外のトイレ	823	72.0	320	28.0
家族の年収	300元未満	349	30.6	794	69.4
家屋の広さ	20㎡未満	230	20.1	913	79.9
離乳食の有無	無し	841	73.6	302	26.4
食事の規則性に対する留意	留意無し	144	12.6	999	87.4
こどもの栄養不良の原因の把握	把握無し	991	86.7	152	13.3
こどもの栄養不良が誘引する症状の把握	把握無し	920	80.5	223	19.5
よい栄養の情報に対する積極性	積極性無し	18	1.7	1125	98.3
よりよい栄養方法への転換に対する積極性	積極性無し	20	1.7	1123	98.3
体罰の有無	体罰有り	247	21.6	896	78.3
両親間での児の養育方針の一致	一致無し	45	3.9	1098	96.1
両親と祖父母間での児の養育方針の一致	一致無し	108	9.4	1035	90.6
育児について相談できる医師の有無	無し	1095	95.8	48	4.2
下痢	罹患有り	110	9.6	1033	93.4
急性呼吸器系感染	罹患有り	220	19.2	923	80.8

表3-2 リスク群・非リスク群における低Kaup指数者の割合(N=1143)

項目	リスク群		非リスク群		
	n	%	n	%	
児の性別	162	28.2	126	22.0	**
父親のBMI	69	22.3	219	26.3	
父親の教育年限	41	23.8	247	25.4	
母親のBMI	73	26.5	215	24.8	
母親の教育年限	44	23.7	244	25.5	
家族形態	40	35.0	248	25.4	
兄弟の有無	127	27.2	161	23.8	
飲料水の水源	139	22.8	149	28.0	
トイレの種類	92	28.8	196	23.8	*
家族の年収	91	26.1	197	24.8	
家屋の広さ	59	25.7	229	25.1	
離乳食の有無	165	19.6	123	40.7	***
食事の規則性に対する留意	36	25.0	252	25.2	
こどもの栄養不良の原因の把握	263	26.5	25	16.4	**
こどもの栄養不良が誘引する症状の把握	242	26.3	46	19.7	
よりよい栄養の情報に対する積極性	10	55.6	277	24.6	**
よりよい栄養方法への転換に対する積極性	7	35.0	281	25.0	
体罰の有無	78	31.6	210	23.4	
両親間での児の養育方針の一致	19	42.2	269	23.9	**
両親と祖父母間での児の養育方針の一致	36	33.3	252	24.3	*
育児について相談できる医師の有無	283	25.8	5	10.4	**
下痢の罹患	26	23.6	262	25.4	
急性呼吸器系感染の罹患	48	20.0	240	26.0	+

+:p＜0.1、*:p<0.05、**:p<0.01、***:p<0.001

表3-3　低Kaup指数に対するステップワイズ法による多重ロジスティック回帰分析(N=1143)

項目	カテゴリー	n	%	OR	95%CI
こどもの性別	男子:0	572	50.0	1.00	
	女子:1	571	50.0	1.42	1.07-1.88*
離乳食の有無	離乳食有り:0	302	26.4	1.00	
	離乳食無し:1	841	73.6	0.35	0.26-0.46***
よりよい栄養の情報に対する積極性	積極性有り:0	1123	98.3	1.00	
	積極性無し:1	25	2.2	2.97	1.07-8.18*
こどもの栄養不良の原因の把握	把握有り:0	152	13.3	1.00	
	把握無し:1	991	86.7	1.82	1.16-2.89**
両親間での児の養育方針の一致	一致有り:0	1098	96.1	1.00	
	一致無し:1	45	3.9	2.15	1.12-4.11*
育児について相談できる医師の有無	有り:0	48	4.2	1.00	
	無し:1	1095	95.8	3.17	1.22-8.22**

*:p<0.05、**:p<0.01、***:p<0.001

表4-1　こどもの栄養不良の原因は何か
（N＝1143、複数回答）

	n	%
食べる量が少ない	83	7.3
食べる品目が少ない	15	1.3
頻繁に病気になる	60	5.2
わからない	998	86.4
その他	29	2.5

表4-2　こどもの栄養不良はどのような症状を誘引するか
（N＝1143、複数回答）

	n	%
体重が軽い	70	6.1
背が伸びない	24	2.1
食欲がわかない	96	8.4
下痢をしやすい	24	2.1
風邪をひきやすい	46	4.0
むくみがちになる	2	0.2
元気がなくなる	46	4.0
わからない	920	80.5
その他	15	1.3

中国雲南省における唾液によるSTDのスクリーニング

目的

近年痛みを伴わない無侵襲的検査の重要性が増している。血液を採取しての検査は被検査者に苦痛を与えるだけでなく、採取する医療従事者にとっても針刺し事故などによる感染のリスクがあるため、唾液を検体とした検査の確立は重要と考える。今回は、唾液をサンプルとしてSTDのスクリーニングを行った。

材料と方法

中国雲南省ろ西市近郊のイ泰族の自然村において2000年6月7月にかけて18才から37才、平均26.7才の86人の経産婦を対象に唾液の採取を行った。すべてが既婚で、子供は、1人か2人であった。

唾液をサンプルとし、遠心分離機で細胞成分と上清に分けた。上清を用いて抗クラミジアトラコマチス(IgAのみ)（クラミジア抗体 IgA/IgG「ミツビシ」、三菱化学株式会社)、抗HIV抗体（ジェンスクリーンHIV1/2、富士レビオ株式会社)、HBs抗原（エルジアFキャリブーHBs抗原、国際試薬株式会社)、HBc抗体（エルジアFキャリブーHBc抗体、国際試薬株式会社)、HCV抗体（イムチェックFキャリブーHCV C50Ab、国際試薬株式会社)、TP抗体（TPオートFキャリブ、国際試薬株式会社）に対してのELISAを行った。方法はキットのプロトコールに従った。唾液は、抗クラミジアトラコマチスについては5倍、抗HIV抗体についてはプロトコール通り、HBs抗原、HBc抗体、HCV抗体、TP抗体については2倍希釈した後測定した。また唾液に含まれる細胞成分をサンプルとして、DNAを抽出しクラミジアトラコマチスの抗原、HIVの抗原をターゲットとしたプライマーを用いてPCRを行った。また、DNA抽出のポジティブコントロールとして、βアクチンのPCRも同時に行った。

結果（表1）

クラミジアトラコマチスのELISA法では86検体中、陽性が9検体、判定不能が5検体、残りは陰性であった。また、抗原をターゲットにしたPCR法では、すべてが陰性であった。βアクチンのPCRは86検体中2検体でバンドが得られなかったが残りの84検体でバンドは得られた。

HIVはELISA法、PCR法ともに86検体すべてが陰性であった。

HBs抗原では67検体中、陽性が3、陰性が62、判定不能が1検体であった

HBc抗体は83検体中、陽性が2、陰性が80、判定不能が、1検体であった。

HCV抗体、およびTP抗体は、すべてが陰性であった。

本研究にご協力いただきました三菱化学株式会社診断事業部の神野英毅先生、中国雲南省婦幼保健院の李燕先生、国際試薬研究部上村先生に深く感謝いたします。

II.中国雲南省における唾液によるSTD（性感染症）のスクリーニング

要旨

雲南省イ泰族の自然村でSTDの有無を唾液を用い検査した。この地区はすべてがイ泰族同士の結婚で一夫一婦制が強く守られており、STDに感染する機会がほとんど無いと思われるが、クラミジアの感染が10%以上あり、またHBV、HCVの感染も見られた。HIVの感染はなかった。感染ルートに関しては更に検討する必要がある。

Key Words
中国、雲南省、少数民族、母子保健、性感染症

目的

近年痛みを伴わない無侵襲的検査の重要性が増している。血液を採取しての検査は被検査者に苦痛を与えるだけでなく、採取する医療従事者にとっても針刺し事故などによる感染のリスクがあるため、唾液を検体とした検査の確立は重要と考える。今回は、唾液をサンプルとしてSTDのスクリーニングを行った。

材料と方法

中国雲南省ろ西市近郊のイ泰族の自然村において2000年6月7月にかけて18才から37才、平均26.7才の86人の経産婦を対象に唾液の採取を行った。すべてが既婚で、子供は、1人か2人であった。

唾液をサンプルとし、遠心分離機で細胞成分と上清に分けた。上清を用いて抗クラミジアトラコマチス(IgAのみ)（クラミジア抗体 IgA/IgG「ミツビシ」、三菱化学株式会社)、抗HIV抗体（ジェンスクリーン HIV1/2、富士レビオ株式会社)、HBs抗原（エルジア F キャリブーHBs抗原、国際試薬株式会社)、HBc抗体（エルジア F キャリブーHB c抗体、国際試薬株式会社)、HCV抗体（イムチェック F キャリブーHCV C50Ab、国際試薬株式会社)、TP抗体（TPオート F キャリブ、国際試薬株式会社）に対してのELISAを行った。方法はキットのプロトコールに従った。唾液は、抗クラミジアトラコマチスについては5倍、抗HIV抗体についてはプロトコール通り、HBs抗原、HBc抗体、HCV抗体、TP抗体については2倍希釈した後測定した。また唾液に含まれる細胞成分をサンプルとして、DNAを抽出しクラミジアトラコマチスの抗原、HIVの抗原をターゲットとしたプライマーを用いてPCRを行った。また、DNA抽出のポジティブコントロールとして、βアクチンのPCRも同時に行った。

結果（表1）

クラミジアトラコマチスのELISA法では86検体中、陽性が9検体(10.5%)、判定不能が5検体(5.8%)、残りの72検体(83.7%)は陰性であった。また、抗原をターゲットにしたPCR法では、すべてが陰性であった。βアクチンのPCRは86検体中2検体(2.3%)でバンドが得られなかったが残りの84検体(97.7%)でバンドは得られた。

HIVはELISA法、PCR法ともに86検体すべてが陰性であった。

HBs抗原では67検体中、陽性が3(4.5%)、陰性が62(92.5%)、判定不能が2検体(3%)であった

HBc 抗体は 83 検体中、陽性が 2(2.4%)、陰性が 80(96.4%)、判定不能が、1 検体(1.2%)であった。

HCV 抗体、および TP 抗体は、すべてが陰性であった。

考察

調査したイ泰族の自然村では、ほぼすべてがイ泰族同士の結婚で一夫一婦制が強く守られており、STD に感染する機会がほとんど無いと思われる。ところがクラミジアの感染が 10%以上あり、多いと言えよう。また HBV の感染も見られるが、このような環境では性交による感染でないもの血液感染、母子感染などが考えられる。

HBs 抗原と HBc 抗体は、ともに陽性のものが 2 検体(2.4%)、HBs 抗原陽性で HBc 抗体判定不能が 1 検体(1.2%)で、HBs 抗原判定不能で HBc 抗体陰性が 2 検体(2.4%)、他は陰性であった。(表 2)

本研究は東京大学医学系研究科発達医科学教室 牛島廣治・柳生文宏、雲南省婦幼保健院李燕が中心に行った。ご協力いただきました三菱化学株式会社診断事業部の神野英毅先生、中国雲南省婦幼保健院の李燕先生、国際試薬研究部上村先生に深く感謝いたします。この研究は日中医学協会の研究費を得て行った。

表1	クラミジア ELISA	HIV ELISA	HCV抗体	HBc抗体	HBs抗原
陽性	9(10.5%)	0	0	2(2.4%)	3(4.5%)
陰性	72(83.7%)	86(100%)	86(100%)	80(96.4%)	62(92.5%)
判定不能	5(5.8%)	0	0	1(1.2%)	2(3%)
合計	86	86	86	83	67

クラミジア PCR	HIV PCR	beta actin PCR	TP抗体
0	0	84(97.7%)	0
86(100%)	86(100%)	2(2.3%)	84(100%)
0	0	0	0
86	86	86	84

表1

検体番号	クラミジア	HIV ELISA	HCV	HBc抗体	HBs抗体	クラミジア PCR	HIV PCR	beta actin
1	−	−	−	−	−	−	−	+
2	−	−	−	−	+−	−	−	+
3	−	−	−	−	−	−	−	+
4	−	−	−	−	−	−	−	+
5	−	−	−	−	n.t.	−	−	+
6	−	−	−	−	−	−	−	+
7	−	−	−	−	+−	−	−	+
8	−	−	−	−	−	−	−	+
9	−	−	−	−	−	−	−	+
10	−	−	−	−	−	−	−	+
11	+	−	−	−	−	−	−	+
12	−	−	−	−	−	−	−	+
14	+	−	−	−	−	−	−	+
15	+	−	−	−	−	−	−	+
16	+−	−	−	−	n.t.	−	−	−
17	−	−	−	−	−	−	−	+
18	−	−	−	−	−	−	−	+
19	−	−	−	−	−	−	−	+
20	+	−	−	−	−	−	−	+
21	−	−	−	−	−	−	−	+
22	−	−	−	+	+	−	−	+
23	−	−	−	−	−	−	−	+
24	−	−	−	−	n.t.	−	−	+
25	−	−	−	+−	+	−	−	+
26	−	−	−	−	n.t.	−	−	+
27	−	−	−	−	−	−	−	+
28	−	−	−	−	−	−	−	+
29	−	−	−	−	−	−	−	+
30	−	−	−	−	−	−	−	+
31	+	−	−	−	−	−	−	+
32	−	−	−	−	−	−	−	+
33	−	−	−	−	−	−	−	+
34	−	−	−	−	−	−	−	−
35	−	−	−	−	−	−	−	+
36	+−	−	−	−	−	−	−	+
37	−	−	−	−	−	−	−	+
38	−	−	−	−	−	−	−	+
39	−	−	−	−	−	−	−	+
40	−	−	−	−	−	−	−	+
41	−	−	−	−	−	−	−	+
42	+	−	−	−	−	−	−	+
43	−	−	−	−	−	−	−	+
44	−	−	−	−	−	−	−	+
45	−	−	−	−	−	−	−	+
46	−	−	−	−	n.t.	−	−	+
47	+−	−	−	−	−	−	−	+
48	−	−	−	−	−	−	−	+
49	−	−	−	n.t.	n.t.	−	−	+
50	−	−	−	−	−	−	−	+
51	−	−	−	n.t.	n.t.	−	−	+
52	+−	−	−	−	−	−	−	+
53	−	−	−	−	−	−	−	+
54	+	−	−	−	n.t.	−	−	+

表1

55	−	−	−	−	−	−	−	+
56	−	−	−	−	n.t.	−	−	+
57	−	−	−	−	−	−	−	+
58	−	−	−	−	−	−	−	+
59	+−	−	−	−	n.t.	−	−	+
60	−	−	−	−	−	−	−	+
61	−	−	−	−	−	−	−	+
62	−	−	−	−	n.t.	−	−	+
63	−	−	−	−	−	−	−	+
64	−	−	−	n.t.	n.t.	−	−	+
65	−	−	−	−	n.t.	−	−	+
66	−	−	−	−	−	−	−	+
67	−	−	−	−	n.t.	−	−	+
68	−	−	−	−	−	−	−	+
69	−	−	−	−	n.t.	−	−	+
70	−	−	−	−	n.t.	−	−	+
71	−	−	−	−	n.t.	−	−	+
72	−	−	−	−	−	−	−	+
73	−	−	−	−	−	−	−	+
74	−	−	−	−	−	−	−	+
75	−	−	−	−	−	−	−	+
76	+	−	−	−	−	−	−	+
78	−	−	−	−	−	−	−	+
79	−	−	−	−	−	−	−	+
80	−	−	−	−	n.t.	−	−	+
81	−	−	−	−	−	−	−	+
82	−	−	−	−	−	−	−	+
83	−	−	−	−	−	−	−	+
84	+	−	−	−	n.t.	−	−	+
85	−	−	−	+	+	−	−	+
86	−	−	−	−	−	−	−	+
87	−	−	−	−	−	−	−	+
88	−	−	−	−	−	−	−	+

日本財団補助金による
２０００年度日中医学学術交流促進事業

①. 調査・共同研究助成

(3) 肝癌発生の分子機構に関する研究

研究テーマ：肝癌発生の分子機構に関する研究

研究代表者：　回　愛民
所属：　東京大学医学部
役職：　講師

要旨

日本では肝癌の発生の７０％はC型慢性肝炎・肝硬変がベースになっている。これに対し、中国では７わりの肝癌はB型肝炎ウイルスに起因するものである。今度B型肝炎ウイルス(HBV)とC型肝炎ウイルス（HCV）による肝発癌の分子機構の対比研究を行った。

p21はp53依存性またはp53非依存性的に調節され、細胞周期調節因子として働いている。本研究は肝癌におけるp21とp53蛋白の発現を免疫組織化学の手法により検索した。肝癌65例の81腫瘍の中、p53異常は43（53％）例、p21蛋白発現低下は59（73％）例において認められた。ｐ21とp53の相関性を検討すると、HCVに起因する肝癌ではp21蛋白発現低下はp53異常との相関は強く認められ、p21発現の調節はp53依存的であり、HBVに起因する肝癌及び肝炎ウイルスの感染の伴わなかった肝癌ではその相関性は認められなく、p21発現異常の調節はp53非依存的であることが示唆された。

p16 は細胞周期G1期を制御する重要な遺伝子であり、その蛋白欠失は多くのヒト癌で報告されている。p16不活性のメカニズムとして遺伝子の欠失、変異およびDNA過剰メチル化による転写ブロックが考えられたが、 肝細胞癌ではp16遺伝子の欠失及び変異が検出されなかった。本研究は肝細胞癌よりDNAを抽出し、肝癌におけるp16 遺伝子promoterのメチル化状況をMethylation-specific PCR法を用いて調べた。p16 遺伝子promoterの過剰メチル化は50例中の29例（58％）において認められた。それらの肝癌におけるp16蛋白の発現を免疫染色法を用いて検索するとp16 遺伝子promoterの過剰メチル化と蛋白欠失の相関が認められた。さらに、肝炎ウイルス感染との関係を見ると、HBVに起因する肝癌と比べて、HCVに起因する肝癌ではp16 遺伝子の過剰メチル化する症例が比較的に多かった。p16 遺伝子の過剰メチル化は肝発癌、特にHCVによる発癌に関与することが示唆された。

Keywords: $p21^{WAF1/CIP1}$; p53; p16; hepatocellular carcinoma

研究報告

背景と目的

Cell cycle progression is governed by several checkpoints, which are regulated by a family of protein kinases, the cyclin-dependent kinases (CDKs) and the cyclins (Hunter and Pines, 1994). The restriction point is one of the most important checkpoints in the late G1 phase. Disruption of the checkpoints is one mechanism of oncogenesis. $p21^{WAF1/CIP1}$ protein, a universal CDK inhibitor (Xiong et al, 1993), and p53 protein are two important components of the G1 restriction point.

Recently, the $p21^{WAF1/CIP1}$ gene was cloned and mapped to the 6p21.2 chromosome region (El-Deiry et al, 1993; Noda et al, 1994). $p21^{WAF1/CIP1}$ inhibits a wide variety of cyclin–CDK complex activities by binding to the complexes (Xiong et al, 1993; Harper et al, 1993). $p21^{WAF1/CIP1}$ has also recently been shown to bind to and inactivate proliferation cell nuclear antigen, the processivity subunit of DNA polymerase ((Waga et al,1994). These observations suggest that $p21^{WAF1/CIP1}$ may play a dual role in blocking entry into S phase (Noda et al, 1994). In addition, $p21^{WAF1/CIP1}$ has also been suggested to play a role in inducing differentiation and apoptosis (Michieli et al, 1994; Sheikh et al,1995), and introduction of $p21^{WAF1/CIP1}$ cDNA suppresses the growth of human tumor cells in culture (El-Deiry et al, 1993).

Cells lacking functional p53 express a very low level of $p21^{WAF1/CIP1}$ and the $p21^{WAF1/CIP1}$ promoter contains a p53-binding site, suggesting that expression of $p21^{WAF1/CIP1}$ depends on p53 function (Xiong et al, 1993; El-Deiry et al, 1993, 1994). However, $p21^{WAF1/CIP1}$ can be inducible in p53-null cells, showing that the expression of $p21^{WAF1/CIP1}$ can also be induced by p53-independent pathways (Michieli et al, 1994; Zhang et al, 1995).

We previously investigated $p21^{WAF1/CIP1}$ mRNA expression by reverse-transcriptase polymerase chain reaction and p53 mutational status by polymerase chain reaction single-strand conformation polymorphism and direct DNA sequencing in hepatocellular carcinomas (HCCs). We suggested that $p21^{WAF1/CIP1}$ mRNA expression is regulated predominantly by a p53-dependent pathway and that reduced $p21^{WAF1/CIP1}$ mRNA

expression may contribute to hepatocarcinogenesis (Hui et al, 1997). However, we did not evaluate the expression of $p21^{WAF1/CIP1}$ and p53 at the protein level. Because post-transcriptional regulation is also an important mechanism in gene expression (Hui et al, 1996b; Loda et al, 1997; Maki and Howley, 1997), and loss of function of p53 is caused not only by gene mutation but also when p53 protein interacts with viral or cellular oncoproteins (Sarnow et al, 1982; Farmer et al, 1992; Yew and Berk 1992; Steegenga et al, 1996; Somasundaram and El-Deiry, 1997), it is necessary to investigate $p21^{WAF1/CIP1}$ and p53 at the protein level. The wild-type p53 protein has a short half-life of about 20 min, and in general it cannot be detected by immunohistochemistry. However, a p53 gene mutation or p53 interacting with oncoproteins may stabilize p53 protein and result in altered expression of p53 that can be detected by immunohistochemistry (Sarnow et al, 1982; Farmer et al, 1992; Yew and Berk, 1992; Steegenga et al, 1996; Somasundaram and El-Deiry, 1997; Iggo et al, 1990; Finlay et al, 1988; Hall et al, 1991).

We investigated the expression of $p21^{WAF1/CIP1}$ and p53 proteins in 81 tumors from 65 patients with HCC by immunostaining to determine whether $p21^{WAF1/CIP1}$ expression depends on p53 functional status, and the relationship between the two proteins' expression and clinicopathological features.

方法

Patients and specimens

Eighty-one primary HCC tissues were obtained from 65 patients. Fifty patients were found to have underlying cirrhosis, and 15 had chronic hepatitis. The study included 13 (20%) women and 52 (80%) men with a mean age of 61 years (range 13–74 yr). Fifty-six patients had serological evidence of viral infection (11 were positive for hepatitis B surface antigen [HBsAg], 43 were positive for hepatitis C virus [HCV] antibody and 2 were positive for both markers). The remaining 9 patients were negative for both hepatitis markers. Tissue samples were obtained at the time of operation, fixed in 10% formalin, and histopathologically examined. The size of the tumors varied from 0.6 to 15 cm (mean, 4.0 ± 3.5 [SD]). The 81 tumors comprised 23 well, 43 moderately, and 15 poorly differentiated HCCs. Portal vein tumor thrombi were found in 18 (22.2%) HCCs, and intrahepatic metastatic lesions were found in 11 (13.6%).

Immunohistochemical staining for $p21^{WAF1/CIP1}$ and p53

Immunohistochemistry was done using the avidin–biotin–peroxidase complex method. Paraffin-embedded sections (4 (m thick) were deparaffinized in xylene, rehydrated in decreasing concentrations of ethanol and then treated with 3% hydrogen peroxide in methanol for 30 min to block endogenous peroxidase activity. After brief washing with distilled water, tissue sections were processed in 10 mM citrate buffer (pH 6.0) and heated to 120_ in an autoclave for 10 min for antigen retrieval (Hui et al, 1999a; 1999b; 2000; Li et al, 2000). Slides were allowed to cool at room temperature for 20 min and then rinsed with phosphate-buffered saline (PBS). To inhibit nonspecific binding activity, slides were incubated with blocking serum at room temperature for 30 min. Sections then were incubated with primary monoclonal antibody against $p21^{WAF1/CIP1}$ (clone EA10, Oncogene Science, Cambridge, MA, USA) diluted at 1:200, or with monoclonal antibody against p53 (clone DO-7; DAKO A/S, Denmark) at 1:100, at 4_ in a moist chamber overnight. The sections were then incubated with biotinylated anti-mouse immunoglobulins (Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA, USA) for 30 min, and avidin–biotin complex (Vector Laboratories) for 30 min at room temperature, with washing in PBS before each incubation. 3,3(-Diaminobenzidine tetrahydrochloride was used as the color reagent, and haematoxylin was used as a counterstain. Normal esophageal squamous epithelium and HCC with known p53 gene mutation and p53 protein overexpression were used as positive controls for $p21^{WAF1/CIP1}$ and p53, respectively. Negative controls were obtained by omitting primary antibody. Only nuclear staining was considered to be positive for $p21^{WAF1/CIP1}$ and p53. Based on the previously published criteria, positive staining of $p21^{WAF1/CIP1}$ was considered when (5% of tumor cells were stained (Ogawa et al, 1997). Positive scoring for p53 was considered when (10% of the nuclei were stained, according to the criteria used previously (Esrig et al, 1994; Cote et al, 1998).

Statistical analysis

$_^2$ test or Fisher's exact test was used to examine differences and relationships between groups of patients classified by $p21^{WAF1/CIP1}$ and p53 staining. Differences at $P < 0.05$ were judged to be statistically significant.

結果

$p21^{WAF1/CIP1}$ expression

$p21^{WAF1/CIP1}$ immunoreactivity was always nuclear, and no cytoplasmic staining of $p21^{WAF1/CIP1}$ was seen in any specimen. The HCCs showed heterogeneous expression of $p21^{WAF1/CIP1}$; the percentage of $p21^{WAF1/CIP1}$-positive cells ranged from 0% to 60% (median 5%). Twenty-two of 81 HCCs (27.2%) showed positive staining for $p21^{WAF1/CIP1}$ protein . Most (86.4%) $p21^{WAF1/CIP1}$-negative tumors showed < 1% positive cells or complete loss of immunoreactivity. $p21^{WAF1/CIP1}$ expression was not associated with viral infection, histological features of non-tumorous livers, tumor size, tumor differentiation, intrahepatic metastasis, or tumor portal or hepatic vein involvement ($P > 0.05$).

p53 expression

Forty-three of 81 HCCs (53.1%) showed positive staining for p53 protein. No positive p53 expression was observed in the corresponding non-tumorous liver tissue. p53 overexpression was more frequent in moderately differentiated tumors (23/43 HCCs, 53.5%) than in well differentiated tumors (8/23 HCCs, 34.8%), and was even more frequent in poorly differentiated tumors (12/15 HCCs, 80%) (poorly *vs.* well differentiated, $P = 0.0064$). A trend approaching significance was observed between positive p53 expression and tumor portal vein invasion ($P = 0.06$). No association was found between positive p53 expression and any other clinicopathological parameters examined.

Relationship between $p21^{WAF1/CIP1}$ and p53 expression

The expression of $p21^{WAF1/CIP1}$ was significantly associated with p53 status ($P = 0.0008$); 38 of the 43 tumors (88.4%) with aberrant p53 expression showed loss of $p21^{WAF1/CIP1}$ expression and 38 of the 59 tumors (64.4%) without $p21^{WAF1/CIP1}$ expression were accompanied by altered p53 expression (two tumors showing an inverse staining pattern of $p21^{WAF1/CIP1}$ and p53 are shown in Figures 1A–D). However, 21 of the 59 (35.6%) tumors lacking $p21^{WAF1/CIP1}$ protein showed p53-negative staining, and 5 tumors showed concurrent positive staining of $p21^{WAF1/CIP1}$ and p53.

The relationship between $p21^{WAF1/CIP1}$ and p53 expression was further evaluated in HCV-related HCCs, HBV-related HCCs and HCCs with no virus infection. The expression of $p21^{WAF1/CIP1}$ was significantly correlated with p53 expression in HCV-related HCCs, but not in HBV-related HCCs or HCCs without virus infection.

The tumors were divided into two groups based on the expression patterns of the two proteins: I, $p21^{WAF1/CIP1}$+/p53– (17 HCCs; no

abnormality in either protein); and II, $p21^{WAF1/CIP1}$+/p53+, $p21^{WAF1/CIP1}$–/p53– or $p21^{WAF1/CIP1}$–/p53+ (64 HCCs; at least one altered expression involved in the two proteins). When this was done, a trend approaching significance was observed between the two groups (P = 0.066); intrahepatic metastasis was observed more frequently in group II (11/64, 17.2%) than in group I (0/17, 0%). There was no significant relationship between either group and any of the clinicopathological features examined ($P > 0.05$).

考察

$p21^{WAF1/CIP1}$ plays a key role in p53-mediated arrest of the cell cycle in response to DNA damage (Xiong et al,1993; El-Deiry et al, 1993, 1994; Dulic et al, 1994). $p21^{WAF1/CIP1}$ inhibits transition from G1 to the S phase by inhibiting a wide variety of cyclin–CDK complexes, including cyclin D–CDK4, cyclin D–CDK2, and cyclin E–CDK2 (Xiong et al, 1993; Harper et al, 1993; Gu et al, 1993). Strikingly, in normal cells, $p21^{WAF1/CIP1}$ is associated with quaternary complexes of most cyclins, CDKs, and proliferation cell nuclear antigens, but is absent from these complexes in most transformed cells (Xiong et al, 1993). These observations suggest that reduction or loss of $p21^{WAF1/CIP1}$ expression plays an important role in tumorigenesis. Our results showed that absence of $p21^{WAF1/CIP1}$ expression was very common (59/81; 72.8%) in HCCs, suggesting that the absence of $p21^{WAF1/CIP1}$ expression may be involved in hepatocarcinogenesis.

There are several possible mechanisms that downregulate $p21^{WAF1/CIP1}$ expression. First, the expression of $p21^{WAF1/CIP1}$ is transcriptionally induced by wild-type but not mutant p53 (El-Deiry et al, 1993). We have shown previously that HCCs with wild-type p53 express significantly greater $p21^{WAF1/CIP1}$ mRNA than tumors with mutant p53 (Hui et al, 1997). In the present study, absence of $p21^{WAF1/CIP1}$ protein was significantly associated with altered p53 expression (P = 0.0008). Drawing together the observations of our present and previous (Hui et al, 1997) studies, we suggest that the p53-dependent transcriptional pathway is the main mechanism that regulates $p21^{WAF1/CIP1}$ expression in HCCs.

Second, 21 of the 59 (35.6%) tumors lacking $p21^{WAF1/CIP1}$ protein showed p53-negative staining. Considering that negative immunoreactivity of p53 reflects functional p53, we hypothesize that, in these cases, $p21^{WAF1/CIP1}$ is probably downregulated by other factor(s). Recently, it has been reported that HCV core protein suppresses the transcriptional activity of the $p21^{WAF1/CIP1}$ promoter (Ray et al, 1998). In the present study, 59

(including 5 HCCs positive for both HCV and HBV markers) of the 81 HCCs were associated with HCV infection. Therefore, we consider it is highly probable that HCV core protein downregulates $p21^{WAF1/CIP1}$ expression in HCV-related HCCs. In this study group, 13 patients (20%) were HBsAg-positive. No direct evidence that HBV virus represses $p21^{WAF1/CIP1}$ promoter activity has been reported.

Third, proteins can be regulated at the post-transcriptional level. Downregulation of $p21^{WAF1/CIP1}$ expression through degradation by a ubiquitin-dependent proteolytic pathway has recently been reported (Maki and Howley, 1997). Therefore, we suggest that post-transcriptional regulation may be another mechanism that downregulates $p21^{WAF1/CIP1}$ expression in HCCs. Drawing together the results of our present and previous (Hui et al, 1997) studies, we consider that the higher incidence of $p21^{WAF1/CIP1}$ protein absence (72.8%) than the incidence of reduced $p21^{WAF1/CIP1}$ mRNA expression (38.1%) further supports this hypothesis. These observations also suggest that analysis of $p21^{WAF1/CIP1}$ status at the protein level may be more sensitive than analysis at the mRNA level.

Fourth, a mutation rate of 5% in $p21^{WAF1/CIP1}$ has been reported in HCCs (Furutani et al, 1997), so mutation of $p21^{WAF1/CIP1}$ may be a possible mechanism leading to altered $p21^{WAF1/CIP1}$ expression in a small proportion of HCCs.

We found concurrent positive expression of $p21^{WAF1/CIP1}$ and p53 in five HCCs. Because p53 overexpression is a hallmark of nonfunctional p53, the expression of $p21^{WAF1/CIP1}$ in these cases may be induced by p53-independent pathways (Michieli et al, 1994; Zhang et al, 1995).

Two previous studies have evaluated the relationship between the expression of $p21^{WAF1/CIP1}$ and p53 at the protein level in HCCs, although the results were controversial (Qin et al, 1998; Naka et al, 1998). Naka et al demonstrated a significant inverse correlation between expression of the two proteins, whereas Qin et al did not. This discrepancy may be due to the difference in hepatitis viral infection status between the two groups of patients, since the molecular basis underlying HCV-related and HBV-related HCCs appears to differ, at least partially. In Qin's group (Chinese patients), the majority (81/97, 84%) of the HCCs were HBV-related, and a small subset (16/97, 16%) were HBsAg-negative. No information about HCV infection was given for this group. On the other hand, in Naka's group (Japanese patients), 38% of HCCs were HBV-related, 44% were HCV-related, and 18% had no hepatitis virus infection. In both of these studies, the relationship between $p21^{WAF1/CIP1}$ and p53 expression in HBV-related HCCs or HCV-related HCCs or HCCs without viral infection was

not studied separately. In contrast to the situation in China, the majority (more than 65%) of HCCs in Japan are associated with HCV, and only a small portion (10-15%) are caused by HBV infection (Okuda, 1997). In our study group, 54 of the 81 HCCs (67%) were HCV-related. We found that there was an inverse relationship between $p21^{WAF1/CIP1}$ and p53 expression in HCV-related HCCs, but failed to establish such a relationship in HBV-related HCCs or HCCs without viral infection, suggesting that different modes of $p21^{WAF1/CIP1}$ regulation are involved in HCCs differing in their hepatitis viral infection status. Our data are generally consistent with the results of Qin et al and Naka et al, and offer a credible explanation for the discrepancy between the conclusions of the above two studies.

We found that p53 overexpression was significantly associated with poor tumor differentiation. This is consistent with results of a previous study of p53 in HCCs (Ng et al, 1995). We also found that p53 overexpression was more frequent in tumors with portal vein invasion than in tumors without. These observations suggest that altered p53 may be involved in the progression of HCCs.

Increased $p21^{WAF1/CIP1}$ mRNA levels can make metastatic human melanoma cells lose their metastatic potential (Jiang et al, 1995). We found a tendency for a relatively higher rate of $p21^{WAF1/CIP1}$ expression in the group without intrahepatic metastasis than in the group with intrahepatic metastasis, indicating a potential role of $p21^{WAF1/CIP1}$ dysfunction in the process of HCC metastasis. A correlation between loss of $p21^{WAF1/CIP1}$ expression and tumor metastasis has been previously reported in gastric carcinoma (Ogawa et al, 1997). It is striking that we found no intrahepatic metastasis in 17 HCCs with no abnormality in either the $p21^{WAF1/CIP1}$ or the p53 protein, and that all HCCs with intrahepatic metastasis had altered expression of $p21^{WAF1/CIP1}$, p53, or both. These observations strongly suggest that the p53–$p21^{WAF1/CIP1}$ cell-cycle-regulating pathway may play an important role in suppressing tumor metastasis in HCCs.

We previously showed that other CDK inhibitors, $p16^{INK4}$ (Hui et al, 1996b) and $p27^{Kip1}$ (Hui et al, 1998), are involved in hepatocarcinogenesis. $p16^{INK4}$, $p21^{WAF1/CIP1}$, and $p27^{Kip1}$ appear to be independently inactivated and dysfunction of CDK inhibitors is a very common event in HCCs (Hui et al, 1996a, 1998; Hui and Makuuchi, 1999c). Understanding the mechanisms that inactivate these CDK inhibitors may be important for seeking new biological therapies for HCCs.

In conclusion, our present study has shown that: (1) absence of $p21^{WAF1/CIP1}$ expression is very common in HCCs; (2) $p21^{WAF1/CIP1}$ is probably regulated via different pathways in HCCs differing in their

hepatitis viral infection status, and $p21^{WAF1/CIP1}$ expression appears to be predominantly related to altered p53 in HCV-related HCCs; (3) in addition to p53-dependent transcriptional regulation, HCV core protein suppression of the transcriptional activity of the $p21^{WAF1/CIP1}$ promoter and post-transcriptional regulation are alternate pathways by which $p21^{WAF1/CIP1}$ expression can be downregulated; (4) disruption of the p53–$p21^{WAF1/CIP1}$ cell-cycle-regulating pathway may contribute to malignant progression of HCC.

参考文献

Cote RJ, Dunn MD, Chatterjee SJ, Stein JP, Shi SR, Tran QC, Hu SX, Xu HJ, Groshen S, Taylor CR, Skinner DG and Benedict WF (1998) Elevated and absent pRb expression is associated with bladder cancer progression and has cooperative effects with p53. *Cancer Res* **58:** 1090(1094

Dulic V, Kaufmann WK, Wilson SJ, Tlsty TD, Lees E, Harper JW, Elledge SJ and Reed SI (1994) p53-dependent inhibition of cyclin-dependent kinase activities in human fibroblasts during radiation-induced G1 arrest. *Cell* **76:** 1013(1023

El-Deiry WS, Harper JW, O'Connor PM, Velculescu VE, Canman CE, Jackman J, Pietenpol JA, Burrell M, Hill DE, Wang Y, Wilman KG, Mercer WE, Kastan MB, Kohn KW, Elledge SJ, Kinzler KW and Vogelstein B (1994) WAF1/CIP1 is induced in p53-mediated G1 arrest and apoptosis. *Cancer Res* **54:** 1169(1174

El-Deiry WS, Tokino T, Velculescu VE, Levy DB, Parsons R, Trent JM, Lin D, Mercer WE, Kinzler KW and Vogelstein B (1993) WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell* **75:** 817(825

Esrig D, Elmajian D, Groshen S, Freeman JA, Stein JP, Chen S-C, Nichols PW, Skinner DG, Jones PA and Cote RJ (1994) Accumulation of nuclear p53 and tumor progression in bladder cancer. *New Engl J Med* **331:** 1259(1264

Farmer G, Bargonetti J, Zhu H, Friedman P, Prywes R and Prives C (1992) Wild-type p53 activates transcription in vitro. *Nature* **358:** 83(86

Finlay CA, Hinds PW, Tan T-H, Eliyahu D, Oren M and Levine AJ (1988) Activating mutations for transformation by p53 produce a gene product that forms an hsc70-p53 complex with an altered half-life. *Mol Cell Biol* **8:**531(539

Furutani M, Arii S, Tanaka H, Mise M, Niwano M, Harada T, Higashitsuji

H, Imamura M and Fujita J (1997) Decreased expression and rare somatic mutation of the CIP1/WAF1 gene in human hepatocellular carcinoma. *Cancer Lett* **111:** 191(197

Gu Y, Turck CW and Morgan DO (1993) Inhibition of CDK2 activity in vivo by an associated 20K regulatory subunit. *Nature* **366:** 707(710

Hall PA, Ray A, Lemoine NR, Midgley CA, Krausz T and Lane DP (1991) p53 immunostaining as a marker of malignant disease in diagnostic cytopathology. *Lancet* **338:** 513

Harper JW, Adami GR, Wei N, Keyomarsi K and Elledge SJ (1993) The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases. *Cell* **75:** 805(816

Hui A-M, Cui X, Makuuchi M, Li X, Shi Y-Z and Takayama T (1999a) Decreased $p27^{Kip1}$ expression and cyclin D1 overexpression, alone and in combination, influence recurrence and survival of patients with resectable extrahepatic bile duct carcinoma. *Hepatology* **30:** 1167-1173

Hui A-M, Kanai Y, Sakamoto M, Tsuda H and Hirohashi S (1997) Reduced $p21^{WAF1/CIP1}$ expression and p53 mutation in hepatocellular carcinomas. *Hepatology* **25:** 575(579

Hui A-M, Li X, Makuuchi M, Takayama T and Kubota K (1999b) Over-expression and lack of retinoblastoma protein are associated with tumor progression and metastasis in hepatocellular carcinoma. *Int J Cancer* **84:** 604-608

Hui A-M and Makuuchi M (1999c) Molecular basis of multistep hepatocarcinogenesis: genetic and epigenetic events. *Scand. J Gastroenterol* **34:**737-742

Hui A-M, Makuuchi M and Li X (1998) Cell cycle regulators and human hepatocarcinogenesis. *Hepato-Gastroenterology* **45:** 1635(1642

Hui A-M, Sakamoto M, Kanai Y, Ino Y, Gotoh M and Hirohasi S (1996a) Cyclin-dependent kinase inhibitors and hepatocarcinogenesis. In *Recent advances in gastroenterological carcinogenesis*, Tahara E, Sugimachi K, Oohara T. (ed) pp 481(485. Monduzzi Editore: Bologna

Hui A-M, Sakamoto M, Kanai Y, Ino Y, Gotoh M, Yokota J and Hirohashi S (1996b) Inactivation of $p16^{INK4}$ in hepatocellular carcinoma. *Hepatology* **24:** 575(579

Hui A-M, Shi Y-Z, Li X, Takayama T and Makuuchi M (2000) Loss of $p16^{INK4}$ protein, alone and together with loss of retinoblastoma protein, correlate with hepatocellular carcinoma progression. *Cancer Lett* in press.

Hui A-M, Sun L, Kanai Y, Sakamoto M and Hirohashi S (1998) Reduced $p27^{kip1}$ expression in hepatocellular carcinomas. *Cancer Lett* **132:**

67(73

Hunter T and Pines J (1994) Cyclins and Cancer_: Cyclin D and CDK Inhibitors Come of Age. *Cell* **79:** 573(582

Iggo R, Gatter K, Bartek J, Lane D and Harris AL (1990) Increased expression of mutant forms of p53 oncogene in primary lung cancer. *Lancet* **335:** 675(679

Jiang H, Lin J, Su ZZ, Herlyn M, Kerbel RS, Weissman BE, Welch DR and Fisher PB (1995) The melanoma differentiation-associated gene mda-6, which encodes the cyclin-dependent kinase inhibitor p21, is differentially expressed during growth, differentiation and progression in human melanoma cells. *Oncogene* **10:** 1855(1864

Li X, Hui A-M, Takayama T, Cui X, Shi Y-Z and Makuuchi M (2000) Altered $p21^{WAF1/CIP1}$ expression is associated with poor prognosis in extrahepatic bile duct carcinoma. *Cancer Lett* in press.

Loda M, Cukor B, Tam SW, Lavin P, Fiorentino M, Draetta GF, Jessup JM and Pagano M (1990) Increased proteasome-dependent degradation of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27 in aggressive colorectal carcinomas. *Nat Med* **3:** 231(234

Maki CG and Howley PM (1997) Ubiquitination of p53 and p21 is differentially affected by ionizing and UV radiation. *Mol Cell Biol* **17:** 355(363

Michieli P, Chedid M, Lin D, Pierce JH, Mercer WE and Givol D (1994) Induction of WAF1/CIP1 by a p53-independent pathway. *Cancer Res* **54:** 3391(3395

Naka T, Toyota N, Kaneko T and Kaibara N (1998) Protein expression of p53, $p21^{WAF1}$, and Rb as prognostic indicators in patients with surgically treated hepatocellular carcinoma. *Anticancer Res* **18:** 555-564

Ng IO, Lai EC, Chan AS and So MK (1995) Overexpression of p53 in hepatocellular carcinomas: a clinicopathological and prognostic correlation. *J Gastroenterol Hepatol* **10:** 250(255

Noda A, Ning Y, Venable SF, Pereira-Smith OM and Smith JR (1994) Cloning of senescent cell-derived inhibitors of DNA synthesis using an expression screen. *Exp Cell Res* **211:** 90(98

Ogawa M, Maeda K, Onoda N, Chung YS and Sowa M (1997) Loss of $p21^{WAF1/CIP1}$ expression correlates with disease progression in gastric carcinoma. *Br J Cancer* **75:** 1617(1620

Okuda k (1997) Hepatitis Cvirus and hepatocellular carcinomas. In *Liver Cancer,* Okuda K and Tabor E. (ed) pp39-50. Churchill Livingstone: Edinburgh

Qin LF, Ng IO, Fan ST and Ng M (1998) p21/WAF1, p53 and PCNA expression and p53 mutation status in hepatocellular carcinoma. *Int J Cancer* **79:** 424-428

Ray RB, Steele R, Meyer K and Ray R (1998) Hepatitis C virus core protein represses $p21^{WAF1/Cip1/Sid1}$ promoter activity. *Gene* **208:** 331-336

Sarnow P, Ho YS, Williams J and Levine AJ (1982) Adenovirus E1b-58kd tumor antigen and SV40 large tumor antigen are physically associated with the same 54 kd cellular protein in transformed cells. *Cell* **28:** 387(394

Sheikh MS, Rochefort H and Garcia M (1995) Overexpression of $p21^{WAF1/CIP1}$ induces growth arrest, giant cell formation and apoptosis in human breast carcinoma cell lines. *Oncogene* **11:** 1899(1905

Somasundaram K and El-Deiry WS (1997) Inhibition of p53-mediated transactivation and cell cycle arrest by E1A through its p300/CBP-interacting region. *Oncogene* **14:** 1047(1057

Steegenga WT, van Laar T, Riteco N, Mandarino A, Shvarts A, van der Eb AJ and Jochemsen AG (1996) Adenovirus E1A proteins inhibit activation of transcription by p53. *Mol Cell Biol* **16:** 2101(2109

Waga S, Hannon GJ, Beach D and Stillman B (1994) The p21 inhibitor of cyclin-dependent kinases controls DNA replication by interaction with PCNA. *Nature* **369:** 574(578

Xiong Y, Hannon GJ, Zhang H, Casso D, Kobayashi R and Beach D (1993) p21 is a universalinhibitor of cyclin kinases. *Nature* **366:** 701(704

Yew PR and Berk AJ (1992) Inhibition of p53 transactivation required for transformation by adenovirus early 1B protein. *Nature* **357:** 82(85

Zhang W, Grasso L, McClain CD, Gambel AM, Cha Y, Travali S, Deisseroth AB and Mercer WE (1995) p53-independent induction of WAF1/CIP1 in human leukemia cells is correlated with growth arrest accompanying monocyte/macrophag differentiation. *Cancer Res* **55:** 668(674

日本財団補助金による
２０００年度日中医学学術交流促進事業

①. 調査・共同研究助成

(4) 中国に於ける「い草」従事者健康影響調査

中国における「い草」従事者健康影響調査

日本側研究者代表
岸本卓巳
岡山労災病院勤労者呼吸器病センター長

中国側研究者代表
王仁元
寧波市衛生防疫站站長

要旨

中国浙江省寧波市周辺でイ草生産作業者 1,500 人を対象として、性別、年齢、作業内容と作業期間、喫煙歴、自覚症状として咳、痰等の呼吸器症状の有無についてアンケートによる問診を行った。一方、胸部レントゲン直接撮影を 650 人に対して行い、じん肺症の有無について検討した。また、各作用場における作業環境測定を行うとともに染土の鉱物分析と石英の含有率を算定した。アンケートの回収率は 1,452 人（96.8%）であった。性別では男女の比率はほぼ同様であったが、平均年齢は 35.6 歳と若年者が多かった。作業内容別では製織作業者が最も多く、もと抜き、選別が次いでいた。作業期間では平均 2.7 年と短期間であった。自覚症状としては咳、痰ともに各々約 10%の労働者が訴えており、喫煙者では非喫煙者の約 2 倍高率であった。じん肺有所見者は 650 人中 9 例であったが、そのうち、ＰＲ２型が 5 例あった。これら９例の有所見者の平均作業年数は約 5 年であった。作業環境測定では総粉塵量は最高量の選別で 100.87mg/m^3、最低量の製織でも 13.32.mg/m^3 といずれの作業場においても大量の粉塵曝露が窺われた。一方、吸入粉塵量では乾燥、もと抜き、選別、製織作業場で 9.35 から 13.95mg/m^3 高濃度の粉塵曝露環境であることが判明した。一方、染土の鉱物分析では石英の他、雲母、カオリナイト、明礬石から成り立っていたが、一部では緑泥石のほかに石綿の一種であるトレモライトを検出した。寧波周辺のイ草生産工場では高濃度粉塵曝露により、咳、痰等の呼吸器症状を呈する労働者が少なくなかった。また、平均作業期間が短いにもかかわらず、既にじん肺症に罹患している症例が 9 例あったことから、今後もじん肺症の発生が予想される。そのため、作業環境の改善とともに防塵対策が早急に望まれる。

Key words: Tatami, Rush pneumoconiosis, Dust
キーワード：畳、い草染土じん肺、粉塵

研究報告

目的

畳は日本人の生活に欠かせないものであるが、その生産拠点は1980年代からは中国に移っている。一方、畳表を製造する際にはイ草に艶を与え、その色を長期間保持するため泥染めする過程がある。その際には大量の粉塵が発生し、粉塵吸入によってじん肺症が発症することが日本では古くから知られており、じん肺法によってもその指定作業であることが明文化されている。今回我々は、中国の畳表の生産拠点である浙江省寧波市周辺において畳製造に関わる作業者に対して問診、胸部レントゲン撮影とともに作業環境測定と染土の成分分析を行ったので報告する。

調査対象および方法

浙江省寧波市周辺の335のイ草生産工場に働く12,183人の労働者のうち1,500人を対象とした。これらイ草生産工場における製織機械の台数は4から96と大工場から小工場まで多彩であった。

方法としてはアンケート調査法により、性別、年齢、イ草作業内容と作業年数、喫煙歴、自覚症状としては咳、痰のほか呼吸困難感，胸痛、胸部不快感の有無について問診を行った。また、640人の労働者にはじん肺症の有無を検討するため、胸部レントゲン直接撮影を行った。じん肺所見の有無については日中のじん肺専門医が各2名合計4名で読影後、意見に相違のあった症例については協議によりじん肺区分を1980年のILO分類に従って決定した。

さらに、各作業場における粉塵量を測定するため個人サンプラー、ＴＲサンプラー、デジタル粉塵計を用いて作業環境測定を行い、総粉塵量（333ヶ所）と吸入粉塵量（60ヶ所）を測定した。測定作業場は乾燥、もと抜き、選別、製織作業場とした。一方、中国におけるイ草染土は蘇州染土、寧海染土を使用しているためこれら染土と作業場の堆積粉塵を日本に持ちかえり、X線回析法を用いてその鉱物分析を行うとともに遊離珪酸の含有率を算定した。

結果

イ草生産工場の労働者1500人に対して問診アンケートを行ったところ1452人(96.8%)から有効回答を得た。性別では男性687人、女性766人であった。年齢分布では表1のごとく、20-60歳代が大半で、平均年齢は35.6歳であった。

作業内容別では製織作業者が最も多く、その他では元抜き、選別作業者が多かった。イ草作業を開始した年齢は平均30.4歳であった。職歴期間は6年以下のものが大半であったが、最長15年間の職業歴を持つ者もいた。しかし、平均では2.7年と比較的短期間であった(表2)。

喫煙状況では表3のごとく1,056人が非喫煙者で、喫煙者は396人（27.3%）であった。そのうち、男性では387人（56.4%）が喫煙者であったが、女性では9人（1.8%）のみで、性別によって喫煙率に大きな差があった。

自覚症状別では表4に示すごとく169人（11.6%）に咳の自覚症状があったが、喫煙者では61例（15.4%）であったのに対して非喫煙者では57例（8.1%）と低率であった。同様に喀痰があった症例は157例（10.8%）であったが、喫煙者では60例（15.2%）であったのに対して非喫煙者では56例（5.3%）と咳よりも低率であった（表5)。その他の自覚症状としては胸痛が1,089例中19例（1.7%)、胸部不快感が76人（7.0%）であり、呼吸困難感を訴えた人は3

人（0.3%）のみであった。

作業環境測定の結果では総粉塵量は乾燥工程で 61.02±4.07mg/m^3、選別で 100.87±2.72mg/m^3、もと抜きで 44.11±1.83mg/m^3、製織で 13.32±1.70mg/m^{3}であり、吸入粉塵量では乾燥工程で 15.75±3.07mg/m^3、選別で 13.28±1.50mg/m^3、もと抜きで 10.58±2.15mg/m^3、製織で 9.35±3.32mg/m^{3}であった。製織作業場では総粉塵量に比較して吸入粉塵量の割合が高かった。

一方、650 例の胸部レントゲン直接写真上じん肺所見のあった症例が 9 例あった。症例の詳細は表 6 に示すが、性別では男性 7 例、女性 2 例であり、年齢は平均 29.5 歳であった。職業別ではもと抜きが 8 例で、1 例は畳表の出荷前の最終修理作業者であった。職業期間では 2 から 19 年と幅があったが、中央値は 5 年と短期間であった。これら症例の 1 年間にイ草製造に関わる期間は 4 から 10 ヵ月であり、もと抜きを行う期間は大半が 5 ヶ月以上であり、長期間高濃度粉塵曝露を受けていたことが窺われた。じん肺症の程度をＰＲ分類するとＰＲ２型が 5 例で、ＰＲ１型が 4 例であった。また、その他の 8 例ではじん肺所見を PR 0/1 であると診断した。すなわち、じん肺所見が疑われたが、じん肺と確定できなかった症例である。この 8 症例の性別では男性 5 例、女性 3 例であり、7 例がもと抜きで 2 例が製織であった。年齢では 22 歳から 50 歳で、中央値は 37 歳であった。また、職歴期間は 1 から 12 年（中央値は 7 年）であり、じん肺有所見者より、高齢で曝露期間も長い傾向にあった。

イ草染土の分析の結果では 7μm以下の小粒状鉱物が占める割合は 27.5±7.9%であった。また、総粉塵に占める石英の含有率は 47±3.9%であったが、吸入粉塵に占める石英の含有量は 13.75±2.28%であり、一般に石英の含有率は低く、日本の染土とほぼ同様の結果であった。一方、染土の鉱物分析の結果では石英の他、雲母、カオリナイト,明礬石から成り立っていたが、寧海染土では amphibole 系石綿の 1 種であるトレモライトと緑泥石が検出された。

考察

畳表製造過程で最も重要なイ草生産工程において、泥染めすることによって発生する粉塵吸入により、じん肺症が発生することは 1970 年ころから日本で報告されている[1)]。当時の生産拠点は広島・岡山が中心であったが、1980 年頃から中国で畳表の生産が開始されたため、生産拠点が中国に移っていった。初期にはその中心は上海郊外の青浦県であったが、発塵が問題になり始めた 1995 年頃からは今回対象とした浙江省寧波市周辺での畳表の生産が開始され、現在では中国畳表の最大の生産拠点となっている。今回我々は寧波市郊外の畳表製造工場従事者のうち 1,500 人にアンケート調査を行った。この地区の作業者の特徴は日本のそれに比較して年齢層が若く、平均年齢が 35 歳であったことである。また、従事期間がわずか 2．7 年であるにもかかわらず、咳や痰などの自覚症状を訴える人が多いことである。喫煙者における咳、痰症状の有所見率は約 15%であったが、非喫煙者においても約 5 から 8%程度にこれらの自覚症状を認め、全体では約 10%の労働者にこれら自覚症状を認めた。我々も日本の岡山・福山地方において同様の調査を行ったが、じん肺有所見者でも通常自覚症状はなく、喫煙者を含めても約 2%程度しかいなかった[2)]。従来より日本で報告されているように、本じん肺症は胸部レントゲン上に陰影があっても、自覚症状あるいは呼吸機能障害が少ないことが特徴である[1)-5)]。確かに喫煙は本じん肺の呼吸器症状を来たす要因であり、1 秒率の低下を来すことは我々の研究でも明らかである。しかし、今回中国において対象とした労働者の大半が若年者であったにもかかわらず、約 10%に咳、痰などの呼吸器症状が認められたことは重大である。日中

間の本じん肺症における自覚症状の差の要因として、最も重要な点として作業場の粉塵濃度が考えられる。実際、今回の中国での作業環境測定結果においても日本の作業環境基準をはるかに上回ったこと、日本の作業場に比較して高い濃度の粉塵曝露があったことが判明した。イ草染土の吸入粉塵中の石英の含有率は約 15%であり、日本のそれとほぼ同様である。これから計算すると日本の作業環境基準に基づく許容濃度は 0.53mg/m^3 である。乾燥、もと抜き、選別、製織のすべての作業場所において吸入粉塵濃度は日本の基準の約 20 倍であった。特に、1 年中行われる製織作業場の吸入粉塵濃度は日本では平均 1.62mg/m^3 であるのに対して、その約 5 倍である 9.35mg/m^3 であった。この原因として、中国では室内で製織が行われているが、製織機械の台数が多くなおかつ全体換気はあるものの局所排気装置が取り付けられていないことが原因ではないかと考えられた。さらに、これらの劣悪な環境にかかわらず、ガーゼマスクをしている人はいても、適正な防塵マスク等の保護具を使用をしていないことが、咳、痰等の自覚症状が高率になった原因である可能性が示唆された。また、平均 4 年という短い作業期間にもかかわらず、ＰＲ２型のじん肺症例が 5 例、ＰＲ１型のじん肺症例が 4 例あったことは特筆すべきことである。我々は広島県福山市周辺のイ草作業者のじん肺検診を行い、約 40%の作業者にじん肺所見があることを報告しているが、このうちＰＲ２型以上の重症例は 20 年未満の作業者では極稀れであり、じん肺有所見率と作業期間は相関することを確認している。しかし、浙江省寧波市周辺の場合にはわずか 2 年の作業期間でＰＲ２型のじん肺症を呈した症例がいた。また、じん肺予備軍であるＰＲ0/1 の症例も 8 例あった。イ草染土じん肺症の画像所見は通常の珪肺症に比較して、線維性増殖性変化が少なく、胸部レントゲンフィルムの条件によっては診断が難しい場合が多い[6) 7)]。今回の中国で撮影された胸部レントゲン写真は条件が悪く、低圧であり、フィルム自体の問題もあり、適正な写真であったかどうかに疑問が残った。すなわち、本来はじん肺症があるのに見逃した可能性は少なくないと思われる。

現状を考慮し、今後もこの作業環境状態が継続するかぎり、新たなるじん肺症例が発生することは明白である。

結語

浙江省寧波市周辺における畳表製造作業者は作業年数は短期間ながら、劣悪な作業環境で長時間働いていることから、9 例のじん肺患者が既に発生しているとともに自覚症状として咳、痰等が多いことが判明した。今後も当該地区では同様の作業が行われる予定である。新たなるじん肺症の発生を防ぐためには、粉塵作業によりじん肺症が既に発生している事実を作業者に明らかにするとともに、適正なじん肺検診を行ってじん肺症有所見者の早期発見に努めることが重要であると思われた。また、作業者には適切な防塵マスクを配布するとともに適正な使用方法を指導するような安全衛生教育を行う必要があると思われた。

参考文献

1） 藤井保：花えん業者のい草染土による塵肺。日本医放会誌,30:166-286,1970.

2） 山脇靖弘、森永謙二、岸本卓巳、他：備後地方のイ草染土じん肺に関する疫学的、労働衛生工学的、鉱物学的研究、産業医ジャーナル、23:31-37,2000.

3） 岸本卓巳、森永謙二、山脇靖弘、他：大陰影をきたしたい草染土塵肺症例の検討、臨床放射線、44:127-132,1999.

4） Yamawaki Y, Kuwahara K, Morinaga K, et al.:Rush(Igusa) pneumoconiosis in

Fukuyama,Japan. pp1199-1202. Adv.Prevent.Occup.Resp.Dis. Chiyotani K et al eds,Elsevier 1998.

5） 上田厚、二塚信、上田恵子、他：い草作業者の呼吸器障害に関する追跡調査研究.産業医学、26:32-44.1984.

6） 伊藤清隆、土井俊治，清藤千景、他：熊本県八代地方におけるい草染土じん肺症の画像的検討、臨床放射線、44:133-138,1999.

7） 岸本卓巳、小崎晋司、大家政志，他：広島県福山地方におけるい草染土塵肺の検討―胸部ＣＴ画像をもちいて―日職災会誌、48:128-132,2000.

い草作業者の年齢と性別

年齢（歳）	男性（%）	女性（%）	合計（%）
10-	12 (1.75)	21 (2.74)	33 (2.27)
20-	196 (28.57)	223 (29.11)	419 (28.86)
30-	239 (34.84)	326 (42.56)	565 (38.91)
40-	152 (22.16)	168 (21.93)	320 (22.04)
50-	74 (10.79)	27 (3.52)	101 (6.96)
60-	13 (1.90)	1 (0.13)	14 (0.96)

い草作業者の職業歴

性別	症例数	年齢	開始年齢	就業期間
男	686	36.19±10.27 (17.35-68.13)	31.72±10.17 (13.34-62.12)	2.84±2.47 (0.10-16.90)
女	766	34.32±8.37 (17.18-67.22)	29.28±8.45 (13.67-64.04)	2.57±2.20 (0.10-16.50)
合計	1452	35.44±9.39 (17.18-68.13)	30.43±9.08 (13.34-64.04)	2.70±2.34 (0.10-16.90)

作業者の喫煙歴

	非喫煙者	喫煙者	合計
男	299 (43.59%)	387 (56.41%) ***	686
女	757 (98.83%)	9 (1.17%)	766
合計	1056 (72.73%)	396 (27.27%)	1452

*** P＜0.0001 vs. 女

喫煙者・非喫煙者別咳症状の有無

	咳なし	昼間のみ咳あり	夜間のみ咳あり	1日中咳あり	合計
喫煙者	310 (78.28%) ***	61 (15.40%) ***	9 (2.27%) *	16 (4.04%) *	396
非喫煙者	973 (92.14%)	57 (5.40%)	11 (1.04%)	15 (1.42%)	1056
合計	1283 (88.36%)	118 (8.13%)	20 (1.38%)	31 (2.13%)	1452

* P＜0.05, *** P＜0.001 vs. 非喫煙者

喫煙者・非喫煙者別痰症状の有無

	痰なし	昼間のみ痰あり	夜間のみ痰あり	1日中痰あり	合計
喫煙者	317 (80.05%) ***	60 (15.15%) ***	6 (1.52%)	13 (3.28%) ***	396
非喫煙者	978 (92.61%)	56 (5.30%)	8 (0.76%)	14 (1.33%)	1056
合計	1295 (89.19%)	116 (7.99%)	14 (0.96%)	27 (1.86%)	1452

*** P＜0.001 vs. 非喫煙者

じん肺有所見者一覧

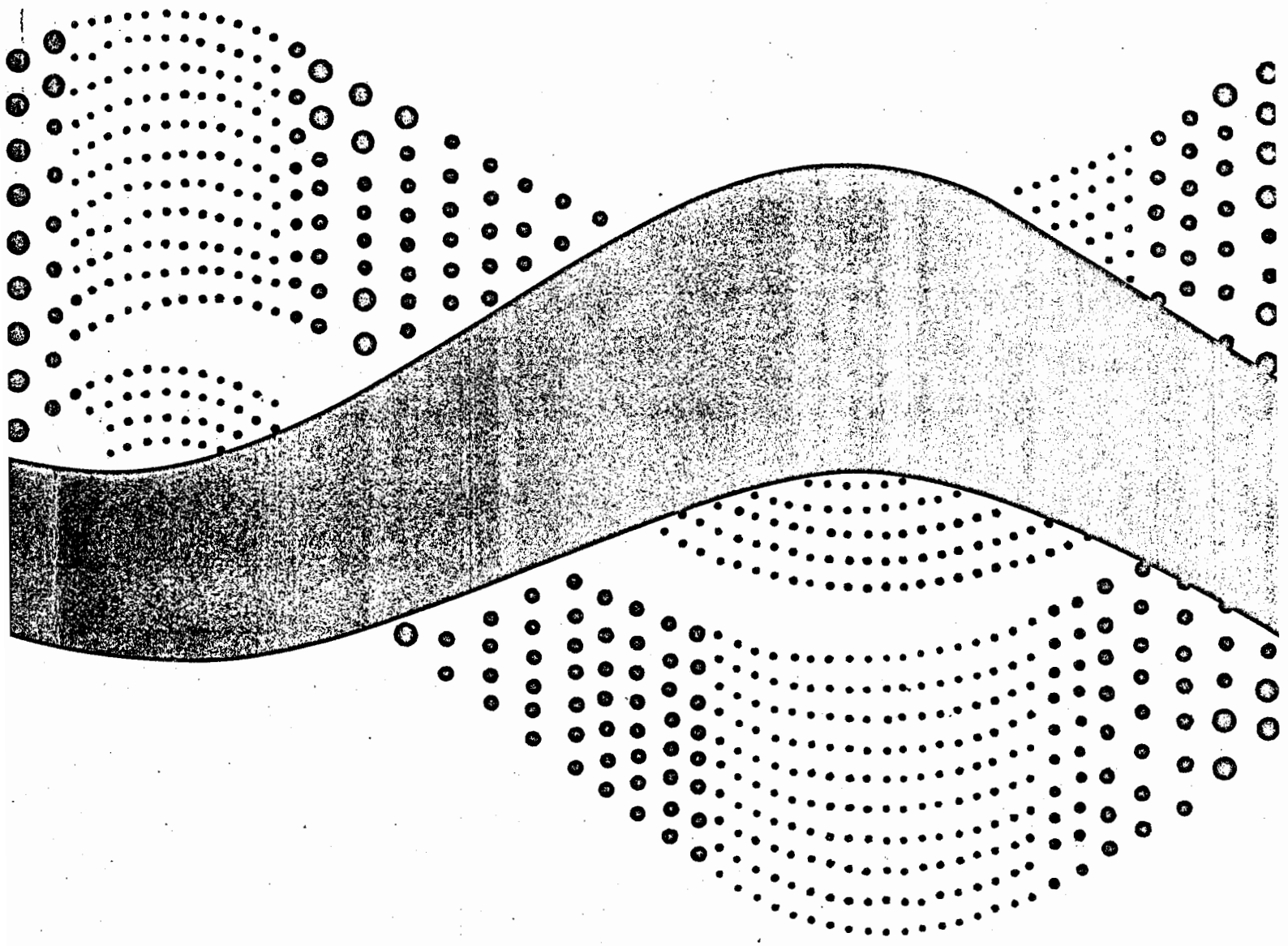
症例	年齢	性別	職業歴	年数	内容	PR	喫煙歴
1	31	男	元抜き	5年	4月/年	2/1	20X20
2	33	男	元抜き	2年	5月/年	2/3	10X7
3	34	男	元抜き	7年	5月/年	2/3	8X18
4	37	女	元抜き	4年	5月/年	2/1	20X16
5	39	男	元抜き	19年	7月/年	2/2	0
6	30	男	元抜き	4年	6月/年	1/2	0
7	36	男	元抜き	4年	5月/年	1/2	20X17
8	39	男	修理	7年	8月/年	1/1	20X20
9	48	女	元抜き	14年	9月/年	1/0	0

ISSN 1341-0725

産業衛生学雑誌

第44巻 臨時増刊号

第75回 日本産業衛生学会講演集(2002年 4月 神戸)



産 衛 誌
San Ei Shi

社団法人 日本産業衛生学会

G 114

中国浙江省寧波周辺におけるい草染土じん肺に関する検討

岡山労災病院内科　○岸本卓巳、大阪成人病センター調査部　森永謙二、
産業医学総合研究所　神山宣彦、浙江省医学科学院衛生学研究所　張幸

目的

畳表を製造する際には大量の粉塵が発生し、粉塵吸入によってじん肺症が発症することが日本では古くから知られている。今回我々は、中国の畳表の生産拠点である浙江省寧波市周辺において畳製造に関わる作業者に対して胸部レントゲン撮影を行ったので報告する。

調査対象および方法

浙江省寧波市周辺には約330のイ草生産工場に約12,000人の労働者が働いているという。今回我々は協力の得られた22の工場に働く640人を対象として胸部レントゲン直接撮影を行った。じん肺所見の有無については日中のじん肺専門医が各2名合計4名で読影、協議によりじん肺区分を1980年のILO分類に従って決定した。

結果

650例の胸部レントゲン上じん肺所見のあった症例が9例あった。性別では男性7例、女性2例であり、年齢は平均29.5歳であった。職業別ではもと抜きが8例で、1例は畳表の出荷前の最終修理作業者であった。職業期間では2から19年と幅があったが、中央値は5年と短期間であった。これら症例の1年間にイ草製造に関わる期間は4から10ヵ月であり、もと抜きを行う期間は大半が5ヶ月以上であり、長期間高濃度粉塵曝露を受けていたことが窺われた。じん肺症の程度をＰＲ分類するとＰＲ２型が５例、ＰＲ１型が４例であった。また、じん肺所見がPR 0/1であると診断した者は8例あった。この8症例の性別は男性5例、女性3例であり、7例がもと抜きで2例が製織であった。年齢では22歳から50歳で、中央値は37歳であった。また、職歴期間は1から12年（中央値は7年）であった。

考察

現在、畳表の生産拠点である中国浙江省寧波市周辺での畳表の生産に従事している労働者に対してじん肺検診を行ったところ、作業期間が平均4年という短い作業期間にもかかわらず、ＰＲ２型のじん肺症例が５例、ＰＲ１型のじん肺症例が４例あったことは特筆すべきである。我々は広島県福山市周辺のイ草作業者のじん肺検診を行い、約40%の作業者にじん肺所見があることを報告しているが、このうちＰＲ２型以上の重症例は20年未満の作業者では極めて稀であった。しかし、浙江省寧波市周辺の場合にはわずか2年の作業期間でＰＲ２型のじん肺症を呈した症例があった。また、じん肺予備軍であるＰR0/1の症例も8例あった。イ草染土じん肺症の画像所見は通常の珪肺症に比較して、線維性増殖性変化が少なく、胸部レントゲンフィルムの条件によっては診断が難しい場合が多い。今回の中国で撮影された胸部レントゲン写真の一部は条件が必ずしも良くないものがあり、その結果、軽度のじん肺所見を見逃している症例がある可能性は否定できない。

結語

浙江省寧波市周辺における畳表製造作業者は作業年数が短期間ながら、劣悪な作業環境で長時間働いていることから、じん肺患者が既に発生していることが判明した。ここで製造される畳表は全て日本に輸入されているものであり、日中共同のじん肺予防対策が必要である。

本調査は（財）日中医学協会の共同研究助成を得、寧波市衛生防疫站（王仁元站長）との共同研究として実施された。

日本財団補助金による
２０００年度日中医学学術交流促進事業

①. 調査・共同研究助成

(5) 酸化ストレスと循環器疾患－医食同源による生活習慣病予防のための基礎研究

Diet-related factors, educational levels and blood pressure in a Chinese population sample: findings from the Japan-China Cooperative Research

Yukio Yamori for the Japan-China Cooperative Study (Chongqing Project)

Purpose: As part of China-Japan cooperative study, a cross-sectional study was carried out to investigate risk factors for high blood pressure (BP) in male adults in Chongqing, China.

Methods: This study was carried out in Oct. 2000, with a sample of 177 males aged 43-55 years old who lived in an urban area, Daping District of Chongqing. Participants were invited to Chongqing Jianshe Hospital (a teaching-practice hospital of Chongqing University of Medical Sciences) for physical examination, blood tests, and to have 24-hour (24h) urine sample collection. A structured questionnaire was used for interview. Various biological makers of diet intake were measured centrally in the WHO Collaborating Center for Research on Primary Prevention of Cardiovascular Diseases, Kyoto Univ., Japan. Hypertension (HT) was defined as those with systolic BP (SBP) ≥140 mmHg or diastolic BP (DBP) ≥90 mmHg or those with anti-hypertensive drug therapy. Body mass index (BMI) was calculated as weight (kg) divided by the square of height (m). Educational levels (years) were categorized as three groups: the lowest (≤6 years), middle (7-9 years), and the highest (≥10 years).

Results: (a) Mean (SD) age was 51 (2.5) years old, and mean SBP and DBP were 120 (19.5) mmHg and 80 (13.3) mmHg. Prevalence of HT was 20.3%, of hypercholesterolemia (serum total cholesterol (TC) ≥220 mg/dl) was 16.7%, of overweight (BMI ≥25 kg/m^2) was 23.4%. (b) Mean 24h sodium (Na) and potassium (K) excretion levels were 140.7 (58.5) mmol/day and 30.9 (10.9) mmol/day. (c) After adjustment for age, SBP and DBP were significantly associated positively with BMI (partial correlation coefficient: 0.33 and 0.41, both $p<0.01$), Na (0.27 and 0.25, both $p<0.01$) and TC to high density lipoprotein cholesterol ratio (TC/HDL) (0.17, $p<0.05$, and 0.25, $p<0.01$). SBP and DBP tended to be negatively associated with 24h urinary K and magnesium (Mg) excretion. (d) Subjects with the highest educational level had the lowest prevalence of HT (11.6%) compared to those with middle (25.0%) and the lowest educational levels (22.6%). ($p<0.05$). (e) Logistic regression analysis, by taking HT as dependent variable, indicted that relative risks (95%CI) of overweight, TC/HDL ratio, Na excretion and less education (<10 years) for the risk of HT were 5.39 (2.42-1.98), 1.30 (1.06-1.58), 1.73 (1.13-2.63) and 2.56 (1.41-6.71) respectively. (f) Subjects with the highest educational level had significantly lower Na, Na/K ratio excretion, and had higher K and Mg excretion values compared to those with middle and the lowest educational levels.

Conclusion: BP is strongly associated with BMI, salt intake and other diet-related factors. Subjects with higher educational level have lower risk of HT and have lower risk profiles of HT. The results emphasize that education plays an important role in public health for control high BP in the Chinese population.

Key words: Diet habits, education, blood pressure, Chinese

Introduction

High blood pressure is one of the most important risk factors for stroke and coronary heart disease. These two diseases have become leading causes of death in both developed and developing countries, including in China. The Chinese population consists of more than one forth of the total world population. Therefore, it is very important to have effective monitoring systems investigate risk factors of hypertension, coronary heart disease, stroke and other major diseases. Since 1985, we have established Japan-China cooperative study, as part of the World Health Organization (WHO) Cardiovascular Diseases and Alimentary Comparison (CARDIAC) Study, in 12 cooperative centers in China (1-3). Several important findings have been reported from our previous studies (2,3,5-7). In this paper, we report the preliminary results from our most recent study in Chongqing, China, which was financially supported by a grant from the Japan-China Medical Association.

Subjects and Methods

A total of 177 men aged 43-55 years old were randomly selected from Daping District of Chongqing, China, with a cross-sectional study design and cluster randomization method. All participants were invited to Jianshi hospital (a teaching-practice hospital of Chongqing University of Medical Sciences) to have physical examination and blood tests between October 16 to 27, 2001. During the field survey, a modified questionnaire from the WHO-CARDIAC Study (1) was used for interview. Main items included in the questionnaire were information on demographic variables, smoking, alcohol consumption, medical history of diseases, diet habits and physical activity. Nine ml blood sample was collected after participants' 12-8 hours fasting at 8:00am to 10:am. Twenty-four hour (24-h) urine sample was collected after carefully explaining each participant by a trained investigator.

All collected serum blood samples and urine samples were sent to the WHO Collaborating Center for Primary Prevention of Cardiovascular Diseases, Graduate School of Human and Environmental Studies, Kyoto University, Japan. The laboratory of this center has been well standardized since the start of WHO-CARDIAC Study in 1983. Serum total cholesterol (TC), high density lipoprotein cholesterol (HDL), triglycerides, total protein (TP), urinary creatinine, sodium, potassium and magnesium excretion values were measured using Express Plus Operator machine (Ciba Corning Diagnostics Corp. USA) (1).

In statistical analysis, Body mass index (BMI) was calculated as weight (kg) divided by the square of height (m). Overweight was defined as those with BMI>= 25 kg/m2. Hypertension was defined as those with systolic BP 140 mmHg or greater, or diastolic BP 90 mmHg or greater or those with anti-hypertensive drug therapy. Educational levels were categorized as three groups: the lowest (<=6 years), middle (7-9 years), and the highest (>=10 years). Student t test, analysis of variance and $\chi 2$ tests were used to examine differences in mean BP, lipid profiles, urinary factors and prevalence of hypertension among different groups (such as by educational levels, and by those with and without hypertensive). Pearson correlation analysis was used to examine associations of BP with age, body mass index (BMI), sodium excretion, and other factors. Finally, to summarize the strongest determinants of hypertension, stepwise logistic regression model was performed. All data analyses were conducted using SPSS software (SPSS Inc. Chicago, USA) (4).

Results

A total of 177 subjects participated in the study, and completed questionnaire survey (session one). One hundred thirty-eight of them had blood tests (the participants rate: 80.0%), (session two). One hundred and eighteen of them completed urine sample collection (66.7%), (session three). No significant differences were found among the three sessions in age, education and occupational status.

Main characteristics of participants are shown in Table 1. Mean (SD) age, educational level, systolic and diastolic BP (SBP and DBP) were 51 (2.5) years old, 8.2 (2.9) years, 120.0 (19.5) mmHg and 79.9 (13.3) mmHg, respectively. Prevalence of hypertension, hypercholesterolemia and overweight were 20.3%, 16.7%, and 23.4%. Mean urinary sodium (Na), potassium (K), magnesium (Mg) excretion values were 140.7 (58.5) mmol/day, 30.93 (10.86) mmol/day and 51.06 (16.31) mg/day.

Table 2 shows that SBP was significantly associated positively with BMI (Pearson correlation coefficient: 0.33, $p<0.01$), Na (0.27, $p<0.01$), total cholesterol (0.17, $p<0.05$), TC/HDL ratio (0.17, $p<0.04$) and TG (0.18, $p<0.05$). DBP was significantly associated with BMI (0.41, $p<0.01$), Na (0.25, $p<0.01$), total cholesterol (0.25, $p<0.01$), TC/HDL ratio (0.25, $p<0.01$), TG (0.22, $p<0.05$), and TP (0.23, $p<0.01$). Serum HDL and urinary potassium and magnesium excretion were negatively associated with both SBP and DBP, while these associations did not reach statistically significant ($p>0.05$).

To examine the strongest determinants of hypertension, Table 3 shows the results of stepwise logistic regression analysis, by taking hypertension (0, 1 for none and yes) as dependent variable, and age (years), occupation (0, 1 for workers and professionals), smoking (0, 1 for none and yes), alcohol consumption (0, 1 for none and yes), overweight (0,1 for none and yes), less education (<10 years), Na/K ratio, Mg (mg/day), TC/HDL ratio and TP as independent variables. The final model showed that subjects with less education, overweight, Na/K ratio and TC/HDL ratios were at significantly higher risk of hypertension. The relative risks (95%CI) of hypertension associated with less education (< 10 years), overweight (BMI>=25 kg/m2), increased Na/k ratio and TC/HDL ratio were 2.56 (1.41-6.71), 5.39 (2.42-11.98), 1.30 (1.06-1.58) and 1.73 (1.13-2.63), respectively.

Figure 2 shows subjects with the highest educational; level had the lowest prevalence of hypertension. Table 4 shows that subjects with the highest educational level had significantly lower Na, Na/K ratio, and had significantly higher Mg and K excretion levels.

Discussion

The present study showed that blood pressure was significantly associated with several diet-related factors, and these factors were also strongly associated with people's educational levels. The results indicated that improvement in education might play an important role in control high blood pressure at population level.

Blood pressure and diet-related factors

A number of studies showed a positive association between BMI and BP, including our present study. The most interesting finding is that the present study was carried out in people who have a relative lower mean BMI as

compared with those in the West. This results indicates that an increase in BMI is one of the strongest determinants of high blood pressure, even in the lean population. Secondly, as compared with our previous studies which were carried out in 1985s in 10 in the Chinese (2,3,5), the mean BMI increased greatly from 21.5 kg/m2 (in 1985) to 23.0 kg/m2 (in 2000). Similar increased trend of mean BMI was also reported in our comparison studies among Taiwan, Guangzhou and Guying population samples (6). The present result emphasized again that an increasing mean BMI in the Chinese population should be concerned seriously since increased BMI is strongly associated with high blood pressure and other diseases, including coronary heart disease, diabetes, etc. (7,8).

High salt intake is associated with risks of high blood pressure, stroke and stomach cancer mortality rates. The results of present study are consistent with previous findings. Significantly positive association between salt intake (assessed by 24-h urinary sodium excretion) and blood pressure was observed. Our previous findings in 25 population samples demonstrated a significantly positive association between salt intake and stroke mortality rates (7). Higher salt intake in the Chinese population is suggested as one of most important risk factors for their higher stroke mortality rates, as compared to populations in the West (7). The salt-BP association may indicate one possible mechanism of by which higher salt intake increases risk of stroke.

An increase in total cholesterol level in the Japanese population has been observed since early 1980s (9). The trend of changes in total cholesterol levels in the Chinese is not very clear. To compare with our previous findings in the Chinese (with the same study design, although not in the same city) (5), it showed that mean total cholesterol level increased from 164.2 mg/dl in 1985 to 184.6 mg/dl in 2000. An increase in total cholesterol level is suggested as a maker of an increase in fat food intake, or so-called "lifestyle westernized". Increased total cholesterol has been observed consistently as a risk factor for coronary heart disease in several studies, including the Framingham Study (8), and our WHO-CARDIAC Study (7).

On the public health implication, the most important findings in the present study are that several unhealthy diet habits were observed in subjects with less educational levels. For example, subjects with less education had higher salt intake, higher sodium to potassium ratio, and lower potassium and magnesium intakes. Most studies have confirmed protective effects of increased potassium and magnesium on lowering blood pressure (10). An inverse association of BP with potassium and magnesium was observed in the present study, although these associations did not reach statistically significant.

Finally, three main limitations should be noted in the present study. First, the number of sample size was somewhat small. It may be one of possible reasons of the non-significant associations of BP with potassium and magnesium, etc. Secondly, the link of cause-effect association between diet-related factors and BP can not be interpreted directly by the present study due to the nature of study design (a cross-sectional study). Thirdly, we previously also wished to examine the association between oxidative DNA damage and BP. However, at this stage, we are unable to report the results because part of urine sample was not well-frozen, and to ship to Japan due to the long distance travel from Chongqing (located in the southeast China) to Japan. Fortunately, we have dietary intake data (assessed using questionnaire), which should provide further evidence on food intake and BP, including anti-oxidative food intake and BP in our further reports.

In conclusion, BP is strongly associated with BMI, salt intake and other diet-related factors. Subjects with higher educational level have lower risk of HT and have lower risk profiles of HT. The results emphasize that education plays an important role in public health for control high BP in the Chinese population.

Acknowledgement: We would greatly appreciate the finical support from the Japan-China Medical Association, and the invaluable cooperation from the local doctors and participants in Chongqing, China.

References

1. Cardiovascular Disease and Alimentary Comparison (CARDIAC) Study. Shimane / Geneva: CARDIAC Study protocol and manual of operations. WHO Collaborating Center on Primary Prevention of Cardiovascular Diseases, and Cardiovascular Disease Unit, WHO 1986.
2. Yamori Y, Nara Y, Mizushima S, Mano M, Sawamura M, Kihara M, Horie R on behalf of the CARDIAC Cooperative Research Group: International cooperative study on the relationship between dietary factors and blood pressure: a report from the cardiovascular disease and alimentary comparison (CARDIAC) study. *J Cardiovasc Pharmacol* 1990; 16(suppl 8):S43-S47.
3. Yamori Y, Nara Y, Mizushima S, *et al:* Gene-environmental interaction in hypertension, stroke and atherosclerosis in experimental models and supportive findings from a world-wide cross-sectional epidemiological survey: a WHO-CARDIAC Study. *Clin Exp Pharmaco Physiol* 1992; 19(Suppl 20):43-52.
4. SPSS software 8.0, 1998; SPSS Inc., 444 N. Michigan Avenue, Chicago, IL, 60611
5. Liu LJ, Mizushima S, Ikeda K, *et al*: Comparative studies of dietary related factors and blood pressure among Chinese and Japanese: Results from the China-Japan Cooperative Research of the WHO-CARDIAC Study. *Hypertens Res*, 2000; 23:413-420.
6. Gao M, Ikeda K, Hattori H, Miura A, Nara Y, Yamori Y: Cardiovascular risk factors emerging in Chinese populations undergoing urbanization. *Hypertens Res* 1999; 22:209-215.
7. Yamori Y, Liu LJ, Mizushima S, Ikeda K, Nara Y, Simpson F.O. Male cardiovascular mortality and dietary markers in 25 populations: results from the WHO-Cardiovascular Diseases and Alimentary Comparison Study. (Submitted to Hypertension, now for revising).
8. Kannel WB. Risk stratification in hypertension: mew insights from the Framingham Study. Am J Hypertens 2000;13:35-105.
9. Okayama A, Ueshima H, Marmot MG, et al. Changes in total serum cholesterol and other risk factors for cardiovascular disease in Japan. Int J Epidemol. 1993;22:1038-1947.
10. Yamori Y, Mizushima S. A review of the link between dietary magnesium and cardiovascular risk. J of Cardiovasc Risk 2000;7:31-35.

Table 1 Characteristics of participants

	Mean (SD), %
Age (years)	51 (2.5)
Education (years)	8.2 (2.9)
<=6 (%)	36.16
7-9 (%)	40.68
>=10 (%)	23.16
Occupation (%)	
Workers	84.8
Professionals	15.2
BMI (kg/m2)	23.0 (3.1)
BMI (>=25 kg/m2) (%)	23.4
SBP (mmHg)	120.0 (19.5)
DBP (mmHg)	79.9 (13.3)
Hypertension (%)	20.3
Smoking (%)	66.1
Never smoking	23.2
Ex-smoking	10.7
Current smoking	66.1
Alcohol consumption (%)	
None	36.2
Yes	63.8
Total cholesterol (mg/dl)	184.6 (35.0)
Hypercholesterolemia (%)	16.7
HDL (mg/dl)	52.5 (13.6)
TG (g/dl)	1.9 (1.4)
TP (g/dl)	7.5 (0.5)
Sodium (mmol/day)	140.7 (58.5)
Potassium (mmol/day)	30.9 (10.9)
Magnesium (mg/day)	51.1 (16.3)

Table 2 Correlation coefficients of blood pressure with body mass index and other diet-related factors

	SBP	*p*	DBP	*p*
BMI (kg/m2)	0.329	<0.001	0.414	<0.001
Na (mmol/d)	0.268	0.003	0.248	0.009
K (mmol/d)	-0.010	0.771	-0.012	0.683
Mg (mg/d)	-0.068	0.466	-0.067	0.474
TC	0.172	0.044	0.248	0.003
HDL	-0.009	0.917	-0.074	0.385
TC/HDL ratio	0.173	0.043	0.254	0.003
TG	0.179	0.036	0.215	0.011
TP	0.156	0.067	0.234	0.006

Table 3 Logistic regression analysis: relative risks (RR)
of hypertension associated with less education and other factors

	RR	(95%CI)	p
Education (<10 years)	2.56	(1.41 - 6.71)	<0.01
BMI (>=25 kg/m2)	5.39	(2.42 - 11.98)	<0.01
Na/K ratio	1.30	(1.06 - 1.58)	0.02
TC/HDL ratio	1.73	(1.13 - 2.63)	0.01
TG	3.63	(1.50 - 8.77)	<0.01

The logistic regression analysis was performed using stepwise procedure, by taking hypertension (0,1 for none and yes) as dependent variable, and age, occupation, smoking, alcohol consumption, education, BMI, Na/K ratio, magnesium, TC/HDL ratio, TP, and TG as independent variables. (see text).

Table 4 Mean diet-related factors by education levels

	Educational levels (years)			
	<=6	7-9	>=10	*p*
	Mean (SD)	Mean (SD)	Mean (SD)	
Na (mmol/day)	171.2 (56.0)	144.8 (51.5)	94.0 (39.7)	<0.001
K (mmol/day)	26.2 (8.0)	31.3 (10.9)	40.3 (10.3)	<0.001
Na/K ratio	7.1 (2.7)	5.1 (2.5)	2.5 (1.3)	<0.001
Mg (mg/day)	47.8 (15.4)	48.5 (14.0)	61.3 (17.8)	0.02
TC	180.2 (30.2)	189.6 (38.3)	185.4 (38.2)	0.39
HDL	52.5 (12.7)	51.6 (13.7)	54.0 (15.2)	0.75
TC/HDL ratio	3.6 (1.1)	3.9 (1.0)	3.6 (1.0)	0.45
TG	2.0 (1.6)	1.9 (1.3)	1.7 (1.1)	0.65
TP	7.5 (0.5)	7.5 (0.5)	7.4 (0.6)	0.46

日本財団補助金による
２０００年度日中医学学術交流促進事業

①. 調査・共同研究助成

(6) 中国における飲水型慢性ヒ素汚染地域での患者-対照研究

中国における飲水型慢性ヒ素汚染地域での患者-対照研究：血液中ヒ素濃度と生体内一酸化窒素（NO）産生の変動との関係

下條信弘

筑波大学社会医学系

教授

要旨

1980年代以降、中国大陸では地域性のヒ素中毒が多発している。飲水型慢性ヒ素中毒は神経系や心血管系に発現することが、その原因は知られていない。一方、生体内で産生される一酸化窒素（NO）は神経伝達や血管調節に重要な役割を果たすガス状分子であり、酸化的ストレスにより変動する。そこで本研究では、中国内蒙古自治区において、ヒ素（非）曝露患者の血液中ヒ素濃度と血清中NO濃度（安定代謝物NO_2^-/NO_3^-として測定）および酸化的ストレスとの関係を調べた。井戸水中ヒ素濃度および慢性ヒ素中毒症状より、五原県住人から慢性ヒ素曝露患者として33名および対照として10名を抽出して行った。その結果、ヒ素曝露群の血液中総ヒ素濃度の平均値（0.41 μg/ml）は対照群のそれ（0.02 μg/ml）より顕著に高い値を示したが、ヒ素曝露群および対照群の血清中NO代謝物の平均濃度はそれぞれ24.7 μMおよび51.6 μMであった。慢性ヒ素曝露により、血液中抗酸化物質であるグルタチオン（GSH）の平均濃度も対照群の約半分まで低下し（4.34 vs. 7.54 μmol/g of Hb）、脂質の過酸化（LPO）は有意に上昇していた。測定したすべての住民の血液中ヒ素濃度は、血清中NO代謝物濃度および血液中GSH濃度に対して有意に逆相関した。さらにヒト血管内皮細胞を使用した研究より、無機ヒ素は血管内皮型NO合成酵素活性を有意に阻害することが明らかとなった。以上より、ヒトがヒ素に慢性的に曝露されると、①酸化的ストレスが誘発されること；②生体内のNO産生量が著しく低下し、この原因のひとつが血管内皮細胞に存在するNO合成酵素の活性阻害によることが示唆された。血液中GSHおよび血清中NO量の顕著な変動は今後、慢性ヒ素曝露に対する有効なバイオマーカーとなりうることが期待される。

KEY WORDS

地域性ヒ素中毒、飲水型、酸化的ストレスの誘発、一酸化窒素、神経疾患、心血管疾患

目的

ヒ素は自然界に広範に存在し、地下水汚染により地域性のヒ素中毒を引き起こしている。その汚染は地球規模で見られ、特に中国における地域性ヒ素中毒は深刻で1990年初めには重点的な予防・治療対象の地方病のひとつとして指定されている。これまでの報告によると、中国の地域性ヒ素多発地域でのヒ素曝露人口は180万人、そのうち5万6千人のヒ素中毒患者が発生していると推定されている[1]。一方、中国の飲料水のヒ素の基準値0.05 μg/mlを越える地域は1,500 km^2以上であり、曝露人口は290万人に及ぶとされている[2]。地域性ヒ素中毒のうち、内蒙古、山西、新疆や台湾では井戸水の飲水に起因するヒ素中毒が多い。一般にヒトが慢性的にヒ素に曝露されると、色素沈着、色素脱落、手のひら・足の裏の角質変性のような皮膚疾患、レイノー症候群のような末梢血管障害、台湾に代表される重度の動脈硬化症である黒脚病のような循環器疾患や種々の癌が生じる。しかし、これらの中毒症状の発症機序は今だ明らかにされていない。

NOは1987年に“血管内皮由来弛緩因子”として同定されて以来、生体において様々な生理作用を有することが明らかにされてきた。たとえば、NOは神経系では神経伝達に重要な役割を演じ、血管系では血管弛緩だけでなく、血管内皮細胞の保護、赤血球の凝集阻止、活性酸素種の産生および脂質の過酸化抑制等に働くホルモン様物質である[3]。そのため、NO産生が低下した場合には種々の循環器疾患が生じる。最近の報告により、NO産生が抑制されると生体内抗酸化物質であるGSHの合成が低下することが明らかにされた[4]。これらの結果はNO産生と酸化的ストレスとの関連を示唆している。実験動物や培養細胞を使用した研究成果から、ヒ素に曝露されると酸化的ストレスが誘発されることが明らかにされている[5]。しかし、慢性ヒ素曝露されたヒトでの報告は全くない。

以上の事例を踏まえて、我々は「慢性ヒ素曝露により見られる神経および血管障害の一因は、生体内NO産生の低下によるのではないか」という作業仮説を構築した。上記したとおり、NO産生減少はGSH低下にも関連するため、その結果、生体は酸化的ストレスの状態に傾くことが予想される。本研究では

地域性ヒ素汚染地域として知られている内蒙古自治区の五原県の住民を対象にして、生体内ヒ素濃度とNOおよび酸化的ストレスとの量-反応関係を明らかにすることを目的として行った。

方法

対象：中国内蒙古自治区五原県住人に対してインフォームドコンセントを行い、慢性ヒ素曝露患者として33名（男性21名、女性12名）および対照として10名（男女5名）を抽出した。慢性ヒ素曝露患群は什巴/銀定図に在住の11家族からのボランテイアからなり、年齢は13～73歳（平均年齢42歳）で、彼らが使用している井戸水のヒ素濃度は0.41±0.11 μg/mlであった。対照群は什巴/銀定図から35 km離れた沙河在住の5家族からのボランテイアからなる。年齢は23～68歳（平均年齢37歳）で、彼らが使用している井戸水のヒ素濃度は0.02±0.01 μg/mlと中国の飲料水基準値を下回っていた。両群はおよそ15 m程度の深さの井戸を使用し、食を含めた生活環境は共に似ており、対象者はいずれも出稼ぎ等により村を離れることのない人々であった。井戸の使用期間は平均18年程度である。手足の痺れ等の末梢血管障害に関しては問診票より、皮膚疾患は検診により調査した。前日午後9時から絶食を行い、翌朝9時に採血した。血液の一部（1.5 ml）は遠心分離して血清を得た。

血清中NO量：生体内で産生したNOは不安定なため、その安定代謝物であるNO_2^-/NO_3^-として決定した。血清中のNO_3^-をカドミウム粉末を用いてNO_2^-に還元し、Greenらの方法[6]に従って540 nmにおける吸光度を測定した。血液中GSH量：血液中非タンパク性SH基（その95%がGSH）量として、Ellmanの方法[7]に従いDTNBを用いて412 nmの吸光度を測定した。血液中ヒ素濃度：超低温-還元気化-原子吸光法を用いて測定した。血清中LPO：Wako社より市販されているキットを使用して、チオバルビツール酸反応成績体として測定した。酵素液の調製と酵素活性：ヒト臍帯血管内皮細胞ほホモジネート液を10,000 x g、60分遠心分離して得た沈殿画分を血管内皮型NO合成酵素源とした。血管内皮型NO合成酵素活性は、[^{3}H]アルギニンからNOと等モル産生する[^{3}H]シトルリン量から算出した[8]。

結果

什巴/銀定図および沙河の住民が使用している井戸水中ヒ素の化学形態を調べた結果、82%が5価の無機ヒ素であった。慢性ヒ素曝露群が飲水していた井戸水ヒ素濃度は対照群のそれの約20倍高い値を示した。ヒ素曝露群の住民において、色素沈着（全体の65%）、色素脱落（全体の67%）、手足の角質変性（全体の39%）、末梢血管障害（全体の45%）等の症状が認められた。これらのヒ素中毒症状は男性（色素沈着、90%；色素脱落、86%；角質変性、48%；末梢血管障害、43%）の方が女性（色素沈着、25%；色素脱落、33%；角質変性、25%；末梢血管障害、50%）に比較して顕著であった（数字は何れも全体に対しての値）。一方、対照群には色素沈着、色素脱落、手足の角質変性、末梢血管障害等症状を示す住民は全くいなかった。両群共に高血圧症を呈する人はいなかった。

慢性ヒ素曝露群の血液中ヒ素濃度の平均値は対照群のそれの約6倍高かった（42.1 μM vs. 7.3 μM, P<0.001）。しかし、慢性ヒ素曝露群の血清中NO_2^-/NO_3^-濃度の平均値は対照群の48%であった（24.7 μM vs. 51.6 μM, P<0.001）。慢性ヒ素曝露群の血液中GSH量も対照群の57%まで低下していた（4.3 μmol/g of Hb vs. 7.5 μmol/g of Hb, P<0.01）。このような条件下、酸化的ストレスのマーカーのひとつであるLPO量を比較したところ、慢性ヒ素曝露群の方が対照群より有意に高い値を示した（8.8 _M vs. 7.1 _M, P<0.05）。一方、血液中の抗酸化酵素であるスーパーオキシドジスムターゼ活性は両群共に殆ど変化は見られなかった。

今回調査した全ての住民を対象として、血液中ヒ素濃度と血清中NO_2^-/NO_3^-濃度および血液中GSH濃度との関係を調べた結果、血液中ヒ素濃度はこれらのバイオマーカーと有意な逆相関を示した（血清中NO2-/NO3-濃度、r=-0.47 P<0.05；血液中GSH濃度、r=-0.51 P<0.001）。また、血清中NO_2^-/NO_3^-濃度と血液中GSH濃 との間には有意な正の相関性が見られた（r=0.58, P<0.001）。

3価および5価の無機ヒ素によるヒト血管内皮型NO合成酵素活性の影響を調べた。その結果、血管内皮型NO合成酵素を含んだ酵素液と無機ヒ素（100 μM）を37° Cで5分間インキュベートすると、NO合成酵素活性は3価無機ヒ素添加により18%（P<0.05）および5価無機ヒ素添加により27%（P<0.01）それぞれ有意に阻害された。

考察

今回の結果より、ヒトが慢性的にヒ素に曝露されると、生体内NO産生および抗酸化物質であるGSHが正常時の約半分まで低下しているという興味ある事実が明らかとなった。ヒ素によるNO産生量低下の原因のひとつは、NO合成酵素活性の阻害によることがヒト臍帯血管内皮細胞を使用した実験より示唆された。これまでの研究より、ヒ素が血管内皮細胞にダメージを与える金属であることが明らかにされている11)。NOの生理作用のひとつが血管内皮細胞の保護であることから、慢性ヒ素曝露によるNO産生抑

制は結果的な血管内皮細胞の障害と関連される。また、ヒトがヒ素に慢性曝露されると、GSH低下やLPO上昇で示されたような酸化的ストレスの誘発が生じていることが初めて明らかとなった。NO産生抑制がGSH合成低下に関係する知見[4]から考え併せると、ヒ素によって生じるNO産生低下が血液中GSH量の低下に一部寄与していることが示唆された。今回調査したヒ素慢性曝露群の住民は、中国の基準値の約8倍高いヒ素を含んだ井戸水を慢性的に飲水し、色素沈着、色素脱落、手足の角質変性および末梢血管障害のような典型的な慢性ヒ素中毒症状を高頻度で呈していた。さらに、これらの臨床症状は女性より男性が顕著であったことから、ヒ素中毒症状に対して性特異性が存在することも示唆された。

本研究より、血液中ヒ素濃度の上昇は血清中NO_2^-/NO_3^-濃度低下および血液中GSH濃度低下と有意に相関することが示された。このことは、慢性ヒ素曝露に対して生体内NO産生およびGSH濃度がバイオマーカーになることを示唆している。今後、母集団を増やしてヒ素中毒症状の程度と生体内NO産生およびGSH濃度の低下との関係を調べる研究が要求される。

謝辞

本研究は臨床医を含めて中国医科大学公衆衛生院孫貴範教授の研究グループと内蒙古地方病研究所の支援により行った。また、聖マリアンナ大学医学部予防医学および東海大学医学部環境保健の研究グループの協力に深謝する。本研究成果はフォーラム2000:衛生薬学・環境トキシコロジーで発表した（研究内容の一部をEnviron. Health Perspect.に投稿中）。

参考文献

1) 郭新彪：中国におけるヒ素中毒の現状および今後の対策、日中医学、15(5)、2-5 (2001)
2) 羅振東ら：内蒙古自治区におけるヒ素中毒の調査・研究、日中医学、15(5)、7-21 (2001)
3) Moncada, S. et al.: Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology, Pharmacol. Rev., 43, 109-142 (1991)
4) Levonen, A. L. et al.: Down-regulation of renal glutathione synthesis by systemic nitric oxide synthesis inhibition in spontaneously hypertensive rats, Biochem. Pharmacol., 59, 441-443 (2000)
5) Bernstam, L. and Nriagu, J.: Molecular aspect of arsenic stress, J. Toxicol. Environ. Health, PartB, 3, 293-322 (2000)
6) Green, L. C. et al.: Analysis of nitrite, and [^{15}N]nitrite in biological fluids. Anal. Biochem. 126, 131-138 (1982)
7) Ellman, G. L.: Tissue sulfhydrylgroup, Arch. Biochem. Biophys., 82, 70-77 (1959)
8) Bredt, D. S. and Snyder, S. H.: Isolation of nitric oxide synthase, a calumodulin-requiring enzyme, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87, 682-685 (1990)

Evidence for Induction of Oxidative Stress Caused by Chronic Exposure of Chinese Residents to Arsenic Contained in Drinking Water

Jingbo Pi [*] [$], *Hiroshi Yamauchi* [#], *Yoshito Kumagai* [&] [@], *Guifan Sun* [$], *Takahiko Yoshida* [¶], *Hiroyuki Aikawa* [£], *Claudia Hopenhayn-Rich* [§] *and Nobuhiro Shimojo* [&]

* Graduate School Doctoral Program in Medical Sciences, University of Tsukuba, 1-1-1 Tennodai, Tsukuba, Ibaraki 305-8575, Japan. [#] Department of Preventive Medicine, St. Marianna University School of Medicine, 2-16-1 Sugao, Miyamae-ku, Kawasaki 213, Japan. [&] Department of Environmental Medicine, Institute of Community Medicine, University of Tsukuba, 1-1-1 Tennodai, Tsukuba, Ibaraki 305-8575, Japan. [$] Department of Labor Hygiene and Occupational Health, School of Public Health, China Medical University, Shenyang 110001, China. [¶] Department of Hygiene, Asahikawa Medical University, Midorigaoka E2-1-1-1, Asahikawa, Hokkaido 078-8510, Japan. [£] Department of Environmental Health, Tokai University School of Medicine, Boseidai, Isehara, Kanagawa 259-1193, Japan. [§] Department of Preventive Medicine & Environmental Health, University of Kentucky, 1141 Red Mile Rd., Suite 201 Lexington, KY 40504 U.S.A.

[@] To whom correspondence should be address: *Yoshito Kumagai, Ph.D.*
Department of Environmental Medicine,
Institute of Community Medicine,
University of Tsukuba,
1-1-1 Tennodai, Tsukuba, Ibaraki 305-8575, Japan
Tel: 0298-53-3297(Japan); Fax: 0298-53-3039(Japan)
E-mail: yk-em-tu@md.tsukuba.ac.jp

Environmetal Health Perspective (Submitted)

Running title: Arsenic Induces Oxidative Stress in Human

Key words: arsenic, lipid peroxidation, oxidative stress, chronic arsenic poisoning, methylation, non-protein sulfhydryl, glutathione, drinking water, human

Acknowledgment

We thank Dr. H.X. Gao, Chifeng Epidemic Prevention Station, Inner Mongolia, China, Dr. G.J. Dai, Department of Epidemiology, School of Public Health, China Medical University, Dr. H.Z. Ma, Endemic Diseases Prevention Institute of Inner Mongolia, China for their excellent contribution to this work.

This work was supported in part by founding from Japan-China Medical Association.

Abstract

Exposure of experimental animals or cultured cells to arsenic induces oxidative stress, but, so far, no examination about this phenomenon in humans has been reported. In this study, we conducted a cross-sectional study in Wuyuan, Inner Mogolia, China, to explore the relationship between chronic arsenic exposure from drinking water and oxidative stress in humans. Thirty-three inhabitants who had been drinking tube-well water with high concentrations of inorganic arsenic (mean value = 0.41 mg/L) for about 18 years constituted the high exposed group, while ten residents who lived nearby but were exposed to much lower concentrations of arsenic in their drinking water (mean value = 0.02 mg/L) were selected as the low exposure comparison group. The present study indicated that although the activity for SOD in blood did not differ significantly between the two groups, the mean serum level of LPO was significantly higher among the high exposed compared to the low exposed group. Elevated serum LPO concentrations were not only correlated with blood levels of inorganic arsenic (iAs) and its methylated metabolites, but also they did have an inverse correlation with non-protein sulfhydryl (NPSH) levels in whole blood. In addition, the mean blood NPSH level of the high arsenic exposed subjects was 57.6% lower than that of the low exposed subjects. Blood NPSH levels were inversely correlated with the concentrations of iAs and its methylated metabolites in blood. Furthermore, the concentrations of blood NPSH were also inversely correlated with the ratios of monomethylarsenic (MMeAs) to iAs in blood. These results provide evidence that human chronic exposure to arsenic from drinking water results in induction of oxidative stress, as indicated by the reduction in NPSH and the increase in LPO. Some possible mechanisms for the arsenic-induced oxidative stress are discussed.

Introduction:

Arsenic is widely distributed in nature and mainly transported in the environment by water [1]. Consumption of high concentration of arsenic in drinking water is associated with skin lesions [2, 3], peripheral vascular disease [4], hypertension [5], black foot disease [2, 6], and high risk of cancers [2, 7]. Inorganic arsenic (iAs) predominantly exists in two oxidation states naturally, trivalent arsenite, iAs(III) and pentavalent arsenate, iAs(V). It is generally recognized that toxicity of iAs(III) is due to its ability to bind with sulfhydryl (SH) groups, especially vicinal thiols in proteins, resulting in the dysfunction of enzyme activity [8] and iAs(V) can substitute phosphate in enzyme-catalyzed reactions where it can disrupt normal functions of the enzymes [9, 10]. Recent evidence suggests that arsenic also exerts its toxicity through the generation of reactive oxygen species (ROS) [11, 12, 13, 14], which include hydrogen peroxide and other chemical forms known as free radicals (e.g., superoxide $O_2\cdot^-$, hydroxyl OH·, and peroxyl ROO· radicals) [15]. iAs(III) has been shown to enhance the production of heme oxygenase, an indicator for oxidative stress [11] and to increase intracellular peroxide levels [12, 16]. Acute and chronic intake of arsenic increased lipid peroxides (LPO) in blood, liver, kidney and other organs of rats [13, 14]. However, no information has been available on the relationship between oxidative stress and chronic exposure of humans to arsenic contained in drinking water.

In biological systems, a diversity of antioxidant defense systems including enzymatic and nonezymatic routes operate to control excessive levels of ROS [15]. Superoxide dismutase (SOD), an antioxidase catalyzing the dismutation of superoxide anion into H_2O_2 and O_2, is thought to be essential for the protection of cells against ROS and is used experimentally or clinically as an antioxidant drugs [17]. SOD has been shown to effectively reduce the

frequency of arsenite-induced sister chromatid exchanges in human peripheral lymphocytes [18] and XRS-5 X-ray sensitive cells [19]. Glutathione (GSH), the most abundant non-protein sulfhydryl (NPSH) in most cells, acts as a nucleophilic "scavenger" of numerous compounds and their metabolites via enzymatic and chemical mechanisms, and plays important roles in the protection against oxidative damage caused by ROS [20, 21, 22]. GSH can react nonenzymatically with ROS or acts as a substrate in the GSH peroxidase-mediated destruction of hydroperoxides [22]. GSH depletion can impair the cell`s defense against the toxic actions of many compounds and may lead to cell injury and death [21, 22]. Cellular toxicity of arsenic was found to be inversely related to intracellular GSH levels and thus may be enhanced by GSH depletion [23]. Acute arsenical administration to mice produced a significant reduction of hepatic GSH [24]. Chronic exposure of rat via injections or of mice via drinking water to arsenic caused up to 35% depletion in hepatic GSH, along with liver injury [14, 25].

The purpose of this study is to investigate whether prolonged ingestion of arsenic contained in drinking water can cause oxidative stress in humans, by comparing serum levels of LPO between the high and low arsenic exposed subjects. Secondly, to elucidate the possible underlying mechanisms of the oxidative stress induced by arsenic.

Study Participants

The present study was carried out in Wuyuan, Inner Mongolia, China where the drinking water supply system has been dependent on tube-wells with a depth of about 15 meters. Thirty-three volunteer residents (42.4 ± 13 years old, age range 13-73 years, 21 male and 12 female) from 11 families who lived in villages of Yindingtu/Shiba were selected as high

arsenic exposed subjects. The tube-well water they drunk contained high concentrations of arsenic (mean ± SD, 0.41 ± 0.11 mg/L). Ten residents from 5 families who lived in Shahe, located 35 kilometers from Yindingtu/Shiba and with drinking water containing lower arsenic levels (0.02 ±0.01 mg/L) were recruited as control subjects (37.3 ±16.4 years old, age range 23-68 years, 5 male and 5 female). Mean duration of tube-well water consumption for the high and low arsenic exposed groups was similar (about 18 years). A questionnaire was administered as an in-person interview by two trained doctors and the information obtained mainly included lifetime drinking sources, medical history, alcohol drinking, cigarette smoking, and dietary habits. Two trained dermatologists conducted detailed physical examinations. All the subjects who participated in the study signed informed consents.

Fasting peripheral venous blood was drawn from the study participants and the levels of NPSH and SOD activity in blood were determined on the spot. Serum was separated immediately from 1.5 ml of blood and transferred on dry ice to China Medical University for the measurement of LPO. 1.5 ml of each whole blood sample was transferred on dry ice to St. Marianna University School of Medicine, Japan where arsenic was measured. Blood samples of all study subjects were tested simultaneously, blinded with respect to the exposure status of case and control. Water samples were taken from tube-wells directly and preserved at room temperature before determination of arsenic concentrations.

Arsenic Analysis

Quantitation of total arsenic (tAs) in water or iAs, monomethylarsenic (MMeAs) and dimethylarsenic (DMeAs) in blood, urine and hair was performed as reported previously

[26]. Briefly, 0.5 ml of each sample was transferred into a 10 ml polymethylpentene test tube, and after the addition of 2 ml of 2M NaOH to the sample, the mixture was heated at 95℃ for 3h. The assay sample was stirred with a magnetic stirrer once every 30 min. The treated sample was diluted to make 10 ml, and a part of the sample was used for each assay. iAs and methylated arsenic compounds do not undergo changes in chemical species (e.g. distribution of methyl groups) even when heated in 2M NaOH [26]. iAs, MMeAs and DMeAs were determined by atomic absorption spectrophotometer (Shimadzu model AA-6103). Due to limited seafood ingestion, no TMeAs in blood or urine samples of all subjects were detected.

Assay of Serum LPO

Serum LPO was determined by measuring the thiobarbiturate-reactive substances (TBA-RS) by the method of Yagi et al [27]. Briefly, Serum (300 μl) was mixed with 20% trichloroacetic acid (2700 μl) and 0.67% TBA (1000 μl) followed by incubation at 100℃ for 30 min. After cooling with tap water, the resulting chromogen was extracted with n-butyl alcohol (4000 μl) by vigorous shaking. Then the mixtures were centrifuged at 3,000 rpm for 10 min and the supernatants obtained were monitored at the wavelength of 535 nm by a Shimazu spectrophotometer (UV-1600, Kyoto, Japan). 1,1,3,3-Tetraethoxypropane (TEP) was used as the external standard and the concentration of LPO was expressed as nmol of malondialdehyde equivalents.

Determination of NPSH in Whole Blood

Whole blood NPSH levels were determined using 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoic acid

(DTNB) and the absorbance were measured at 412 nm according to the method of Ellman [28]. Briefly, whole blood (100 μl) was diluted with 0.4 ml of cold DDW, and 0.5 ml of 10% Trichloroacetic acid was added to precipitate the protein. The sample were mixed well and centrifuged at 15000 rpm for 5 min. The supernatant was used for the determination.

Whole Blood SOD Activity Determination:

Whole blood (50 μl) was washed with 5 ml of saline and centrifuged at 2000 rpm for 3 min. The rinsed cells were diluted with cold DDW to make a final volume of 0.2 ml. Ethanol (0.1 ml) and chloroform (0.1 ml) were mixed with the erythrocyte lysis to precipitate the hemoglobin. The tubes were shaken vigorously for 15 min and centrifuged at 4000 rpm for 3 min. The water-ethanol layer was used for SOD activity determination according to the method by Oyanagui et al [29].

Data Analysis

Statistical significance for the differences of LPO, NPSH, SOD and arsenic levels between the high and low arsenic exposed groups were determined by independent-sample T Test using SPSS (Version 6.0). All p values are two tailed.

Results

The concentrations of arsenic in well water drunk by our subjects and the prevalence of the main clinical manifestations were described previously [30, 31]. Table 1 showed that the mean blood concentration of iAs, MMeAs and DMeAs of the high arsenic exposed group was about 3.0, 9.9 and 5.1 times higher than those of the low arsenic exposed group,

respectively. While the urine level of iAs, MMeAs and DMeAs of the high arsenic exposed group was about 5.1, 11.7 and 10.3 times higher than those of the controls. Although the determination of arsenic in blood by using our method did not separate MMeAs(V) and MMeAs(III), the total MMeAs (49.2%) was markedly higher than iAs (19.4%) and DMeAs (31.4%) in blood. In contrast, DMeAs was the most abundant metabolite in urine (65.3%). The total arsenic in hair of the high arsenic exposed group was 4.5 times higher than that of the low arsenic exposed group.

Table 2 showed that the mean serum LPO level of the high arsenic exposed group was significantly higher than that of controls, conversely, mean NPSH level in whole blood of the high arsenic exposed subjects was only 57.6% of controls. However, the SOD activity in whole blood showed no significant difference between the high and low arsenic exposed subjects.

As shown in figure 1, the serum LPO levels were significantly correlated with the concentrations of iAs, MMeAs, DMeAs and total arsenic in blood, respectively. In addition, an inverse correlation of serum LPO concentrations with NPSH levels in whole blood was observed, but no correlation was found between serum LPO concentrations and the SOD activities in whole blood (Figure 2). Figure 3 showed that the NPSH levels in whole blood was correlated with blood concentrations of iAs, its methylated metabolites and total arsenic, respectively. In addition, the concentrations of whole blood NPSH were significantly correlated with the ratios of MMeAs to iAs in blood which reflect the extent of the first methylation of iAs in body (figure 4), but were not correlated with the ratios of DMeAs to MMeAs in urine which reflect the extent of the second methylation of MMeAs in body (p=0.69; data not shown).

Discussion

Recently, some chronic arsenic poisoning areas were found in Inner Mongolia, China, where underground water was the only source of water supply commonly obtained from tube-wells of about 15-30 meters in depth. The water sources in some villages of our study area of Wuyuan, were contaminated with naturally occurring arsenic. The mean arsenic concentration in tube-well water from Yindingtu and Shiba, two of the seriously contaminated villages in Wuyuan, was 0.41 mg/L which is about 8.2 and 41 times higher than the limit set for drinking water in China (0.05 mg/L) and the present WHO drinking water guideline value 0.01 mg/L [32], respectively. The mean level in the control village of Shahe was 0.02 mg/L. Because the groundwater was not used for irrigation and the surface soil contained minimal levels of arsenic, arsenic concentrations in wheat, the main farm crops, grown in both the high and low exposure areas were similar (0.029 *vs.* 0.024 μg/g, n= 5, respectively). Hence, we can conclude that the ingestion of tube-well water was the main exposure source of arsenic in our study subjects. The average daily dose of arsenic from drinking water calculated from the arsenic concentration of well water and average consumption of water (1-2.5 L/Day) was approximately 0.4-1.0 mg for the high exposed group. The main clinical manifestations of the exposed subjects were similar to that found in other arsenic poisoning areas of the world [2, 3, 33], mainly including cutaneous depigmentation, hyperpigmentation and hyperkeratosis, increased incidence of peripheral vascular disorder, peripheral neuropathy and liver swelling [30, 31]. Both of blood and urine levels of iAs, MMeAs and DMeAs in the high arsenic exposed group were significantly higher than those found in the low exposed control. While the proportion of the three metabolic forms in blood and urine were different: MMeAs was the main proportion in

blood (49.2%); in contrast, the DMeAs was the major metabolite in urine (65.3%). This difference suggests that part of the MMeAs in blood was methylated into DMeAs before excreted into urine.

The present study showed that subjects chronically exposed to arsenic-contaminated drinking water in Wuyuan of Inner Mogolia had increased serum level of LPO. This may be due to either overproduction of ROS or accumulation of ROS resulted from dysfunction of antioxidases/antioxidants during chronic arsenic exposure. Previous works suggested that the toxicity of arsenic compounds may be mediated by ROS generated during the metabolism of arsenic compounds in cells [16, 17, 34]. Genotoxicity of arsenite [35] and As-induced apoptosis in NIH3T3 cell [36], NB4 cell [37] and Chinese hamster ovary cell [16] was triggered by the generation of hydrogen peroxide (H_2O_2). Superoxide and H_2O_2 were produced by endothelial cells exposed to low levels of arsenite [38]. DMeAs, a metabolite of iAs, induced DNA damage via formation of superoxide and dimethylarsenic peroxyl radical [39, 40]. 8-Hydroxy-2`-Deoxyguanosine (8-OhdG), one of the major ROS-induced DNA base-modified products, was detected in the skin of arsenic related Bowen`s disease [41] and in the liver of rats administrated of DMeAs [42]. In our study, serum LPO concentrations was significantly correlated with blood levels of arsenic and its metabolites, indicated that the overproduction of ROS induced by chronic arsenic exposure was one of the possible causes of the elevation of serum LPO observed in the high arsenic exposure subjects.

On the other hand, although arsenite produced superoxide and H_2O_2 in endothelial cell [38], and SOD was shown to effectively reduce the frequency of arsenite-induced sister chromatid exchanges in cells [18, 19], determination of SOD activity in blood indicated it was

not affected by chronic arsenic exposure and no correlation was found between the serum LPO levels and whole blood SOD activities. This suggests the increased LPO level observed in the high arsenic exposed group was not associated with dysfunction of SOD in human. While the NPSH determination showed the mean NPSH level in whole blood of the high arsenic exposed group was only 57.6% of control, and serum levels of LPO were inversely and strongly correlated with blood NPSH concentrations. This suggests chronic arsenic exposure induced lipid peroxidation in our study was also associated with the depletion of NPSH.

One of the mechanisms by which arsenicals produce toxic effects is through their interaction with cellular sulfhydryl groups in proteins or elsewhere [43]. Although iAs(III) and iAs(V) have been shown to react with some NPSH to form As-SH complexes in vitro at high doses [44, 45], our recent data showed that iAs(III) could only oxidize dithiol efficiently but did not affect monothiol in vitro (data not shown). In addition, the level of arsenic in blood of high arsenic exposed group was just about micromolar level, too low comparing with the level of NPSH in blood, suggested consumption by direct combination was not the main cause of NPSH depletion in blood. In this research, the depletion of blood NPSH, which correlated with enhanced serum LPO, was significantly correlated with the ratio of MMeAs to iAs in blood, suggesting the first methylation of iAs would tend to deplete available NPSH, which would then aggravate the oxidative damage caused by arsenic. In fact, previous results have showed that GSH or other NPSH, such as L-cysteine, plays critical roles in the reduction of As(V) to As(III) in blood and the process of methylation reaction of iAs in liver [46, 47].

Present results suggest the consumption of NPSH caused by oxidative reaction with

overproduced ROS, and/or by the arsenic methylation process were the two causes of NPSH depletion. However, because GSH is almost present in all cells at high concentrations (generally millimolar) [22], only by the two mechanisms does not seem to explain the striking depletion of NPSH in blood. We have reported that long-term exposure to arsenic by drinking water results in decreased nitric oxide (NO) production in humans [30]. While inhibition of NO synthesis has been shown to lead to a marked decrease in GSH synthesis through down-regulation of the rate-limiting enzyme γ-glutamylcysteine synthetase (γ-GCS) in vitro and in vivo [48, 49]. NO itself up-regulates γ-GCS and increase GSH concentration [50]. Our data showed that serum NO metabolites level correlated positively with whole blood NPSH levels [30]. Decreased NO synthesis caused by chronic arsenic exposure may be associated with GSH depletion through down-regulation of γ-GCS.

Furthermore, the redox cycling of GSH is also central to the cellular response to oxidative stress. The balance between the oxidation of GSH to GSSG and the rapid reduction of GSSG by GSH reductase contributes to the maintenance of a cellular GSH:GSSG ratio of about 300:1 [51, 52]. Inhibition of GSH reductase will diminish the intracellular level of GSH. Styblo et al. demonstrated that arsenicals and arsenothiols, especially methylated trivalent arsenicals and arsenothiols, were potent inhibitors of the reduction of GSSG by GSH reductase. The *Ki* `s for the $CH_3As^{III}(GS)_2$ and $CH_3As^{III}(Cys)_2$, two possible intermediates of iAs metabolism in vivo, were 0.009 and 0.018 mM, respectively [53, 54]. Either the trivalent organoarsenicals generated during biomethylation of arsenic, or arsenothiols formed in the cell by reaction with NPSH, could alter the cellular GSH:GSSG ratio, decrease the GSH level by the inhibition of GSH reductase. Recently,

the concentrations of MMeAs(III) and MMeAs(V) in hamster liver after a single intraperitoneal dose of iAs(V) (2 mg of As /kg of body weight) were determined as 38.5 and 31.4 ng/g of liver, respectively. The MMeAs(III) was 55.1% of the total MMeAs in liver [55] . Although the present method used in determination of blood arsenic could not separate MMeAs(III) and MMeAs(V), high levels of total MMeAs (49.2%) were observed in blood, suggesting the possibility that high levels of MMeAs(III) exists in other organs.

In summary (Fig. 5), our data provide evidence that human chronic exposure to arsenic from drinking water results in induction of oxidative stress, as indicated by the increase of serum LPO. The oxidative stress induced by chronic arsenic exposure was associated with high levels of iAs and its methylated metabolites in blood, and also with NPSH depletion caused by iAs and its methylated metabolites via different mechanisms.

References

1. Cullen WR, Reimer KJ. Arsenic speciation in the environment. Chem Rev 89:713-774. (1989).
2. Tseng WP. Effects and dose response relationships of skin cancer and blackfoot disease with arsenic. Environ Health Perspect 19:109-119 (1979).
3. Tondel M, Rahman M, Magnuson A, Chowdhury IA, Faruquee MH, Ahmad SA. The relationship of arsenic levels in drinking water and the prevalence rate of skin lesions in Bangladesh. Environ Health Perspec 107:727-729 (1999).
4. Engel RR, Hopenhayn-Rich C, Receveur O, and Smith AH. Vascular effects of chronic arsenic exposure: A review. *Epidem Rev* 16:184-209 (1994).
5. Chen CJ, Hsueh YM, Lai MS, Shyu MP, Chen SY, Wu MM, Kuo TL, Tai TY. Increased prevalence of hypertension and long-term arsenic exposure. *Hypertension* 25:53-60 (1995).
6. Chen CJ. Blackfoot disease. *Lancet* 335:442 (1990).
7. Bates MN, Smith AH, Hopenhayn-Rich C. Arsenic ingestion and internal cancers: A review. *Am J Epidem* 135:462-476 (1992).
8. Aposhian HV. Biochemical toxicology of arsenic. Rev Biochem Toxicol 10:265-299 (1989).
9. Mitchell RA, Chang BF, Huang CH, DeMaster EG. Inhibition of mitochondrial energy-linked functions by arsenate. Evidence for a nonhydrolytic mode of inhibitor action. Biochemistry 10:2049-2054 (1971).
10. Bhuvaneswaran C. The influence of phosphorylation state ratio on energy conservation in mitochondria treated with inorganic arsenate. Biochem Biophys Res Commun.

90:1201-1206 (1979).

11. Applegate LA, Luscher P, Tyrrell RM. Induction of heme oxygenase: A general response to oxidant stress in cultured mammalian cells. Cancer Res 51:974-978 (1991).

12. Lee TC, Jan KY, Wang TC. Modulation of cellular antioxidant defense activities by sodium arsenite in human fibroblasts. Arch Toxicol 69:498-504 (1995).

13. Flora S JS. Arsenic-induced oxidative stress and its reversibility following combined administration of N-acetylcysteine and MESO 2,3-dimercaptosuccinic acid in rats. Clin Exp Pharm Physiol 26:865-869 (1999).

14. Ramos O, Carrizale L, Yáñez L, Mejía J, Batres L, Ortíz D, Díaz-Barriga F. Arsenic increased lipid peroxidation in rat tissues by a mechanism independent of glutathione levels. Environ Health Perspec 103 (supply1):85-88 (1995).

15. Peng J, Jones GL, Watson Kenneth. Stress proteins as biomarkers of oxidative stress: effects of antioxidant supplements. Free Rad Biol Med 28:1598-1606 (2000).

16. Wang TS, Kuo CF, Jan KY, Huang H. Arsenite induces apoptosis in Chinese hamster ovary cells by generation of reactive oxygen species. J Cell Physiol. 169:256-268 (1996).

17. Kumagai Y, Shinyashiki M, Sun GF, Shimojo N, Sagai M. An efficient method for purification of cuprozinc superoxide dismutase from bovine erythrocytes. Experientia 50: 673-676 (1994).

18. Nordenson I, Beckman L. Is the genotoxic effect of arsenic mediated by oxygen free radical ? Human Hered 41:71-73 (1991).

19. Wang TS, Huang H. Active oxygen species are involved in the induction of

micronuclei by arsenite in XRS-5 cells. Mutagenesis 9:253-257 (1994).

20. M. Reed DJ. Glutathione: Toxicological implications. Annu Rev Pharmacol Toxicol. 30:603-631 (1990).
21. Deneke SM, Fanburg BL. Regulation of cellular glutathione, Invited review. Am Physiol Rep L163-173 (1989).
22. Anderson ME. Glutathione and glutathione delivery compounds. Advances in pharmacol 38:65-79 (1996).
23. Ochi T, Kaise T, Oya-Ohta Y. Gluthathione plays different roles in the induction of the cytotoxic effects of inorganic and organic arsenic compounds in cultured BALC/c 3T3 cells. Experientia 50:115-120 (1994).
24. Ahmad S, Anderson WA, Kitchin KT. Dimethylarsenic acid effects on six biochemical parameters in B6C3F1 mice. Toxicol Sci. 48(suppl):353 (1999).
25. Liu J, Liu Y, Robert AG, Achanzar W, Waalkes MP. Metallothionein-I/II null mice are more sensitive than wild-type mice to the hepatotoxic and nephrotoxic effects of chronic oral or injected inorganic arsenicals. Toxicol Sci. 55:460-467 (2000).
26. Yamauchi H, Yamamura Y. Metabolism and excretion of orally administered dimethylarsinic acid in the hamster. Toxicol Appl Pharmacol 74:134 (1984).
27. Yaki K, Goto Y. Lipid peroxide and allied disease. Japan:IGAKU-SHOIN 1981;23-28.
28. Ellman GL. Tissue sulfhyfryl groups. Arch Biochem Biophys 82:70-77 (1959).
29. Oyanagui Y. Reevaluation of assay methods and establishment of kit for superoxide dismutase activity. Anal Biochem 142:290-296 (1984).
30. Pi JB, Kumagai Y, Sun GF, Yamauchi H, Yoshida T, Iso H, Endo A, Yu LY, Yuki K,

Miyauchi T, Shimojo N. Decreased serum concentrations of nitric oxide metabolites among Chinese in an endemic area of chronic arsenic poisoning in Inner Mongolia. Free Rad Biol Med 28:1137-1142 (2000).

31. Yoshida T, Aikawa H, Kinoue T, Sakabe M, Yamauchi H, Kayama F, Okazaki I. Skin regions and their histological observations on chronic arsenic poisoning people in Inner Mongolia, China. Jpn J Hyg. 54:138 (1999).
32. World Health Organization, Guideline for drinking-water quality. 2nd ed., Vol 1, 1993;174.
33. Cebrian ME, Albores A, Aguilar M, and Blakely E. Chronic arsenic poisoning in the north of Mexico. *Hum Toxicol* 2:121-131 (1983).
34. Yamanara K, Hasegawa A, Sawamura R, Okada, S. Cellular response to oxidative damage in lung induced by the administration of dimethylarsenic acid, a major metabolite of inorganic arsenics, in mice. Toxicol Appl Pharmacol 108:205-213 (1991).
35. Wang TS, Shu YF, Liu YC, Jan KY, Huang H. Glutathione peroxidase and catalase modulate the genotoxicity of arsenite. Toxicology 121:229-237 (1997).
36. Chen YC, Lin-Shiau SY, Lin JK. Involvement of reactive oxygen species and caspase 3 activation in arsenite-induced apoptosis. J Cell Physiol. 177:324-333 (1998).
37. Jing YK, Dai J, Chalmers-Redman RME, Tatton WG, Waxman S. Arsenic trioxide selectively induces acute promyelocytic leukemia cell apoptosis via a hydrogen peroxide-dependent pathway. Blood 94:2102-2111 (1999).
38. Barchowsky A, Klei LR, Dudek EJ, Swartz HM, James PE. Stimulation of reactive oxygen, but not reactive nitrogen species, in vascular endothelial cells exposed to low

levels of arsenite. Free Rad Biol Med. 27:1405-1412 (1999).

39. Yamanaka K, Hoshino M, Okamoto M, Sawamura R, Hasegawa A, Okada S. Induction of DNA damage by dimethylarsine, a methabolite of inorganic arsenic, is for the major part likely due to its peroxyl radical. Biochem Biophys Res Commun 168:58-64 (1990).

40. Yamanaka K, Hasegawa A, Sawamura R, Okada S. Dimethylated arsenics induce DNA strand breaks in lung via the production of active oxygen in mice. Biochem Biophys Res Commun. 165:43-50 (1989).

41. Matsui M, Nishigori C, Toyokuni S, Takada J, Akaboshi M, Ishikawa M, Imamura S, Miyachi Y. The role of oxidative DNA damage in human arsenic carcinogenesis: Detection of 8-Hydroxy-2`-deoxyguanosine in arsenic-related Bowen`s disease. J Invest. Dermatol. 113:26-31 (1999).

42. Wanibuchi H, Hori T, Meenakshi V. Promotion of rat hepatocarcinogenesis by dimethylarsinic acid: association with elevated ornitine decarboxylase activity and formation of 8-hydroxydeoxyguanosine in the liver. Jpn J Cancer Res. 88:1149-1154 (1997).

43. Aposhian VH. Enzymatic methylation of arsenic species and other new approaches to arsenic toxicity. Annu Rev Pharmacol Toxicol 37:397-419 (1997).

44. Winski SL, Carter DE. Interactions of rat blood cell sulfhydryls with arsenate and arsenite. J Toxicol. Environ. Health 46: 379-397 (1995).

45. Scott N, Hatlelid KM, MacKenzie NE, Carter DE. Reactions of arsenic (III) and arsenic (V) species with glutathione. Chem Res Toxicol 6:102-106 (1993).

46. Delnomdedieu M, Basti MM, Otvos JD, Thomas DJ. Reduction and binding of

arsenate and dimethylarsenate by glutathione: A multinuclear magnetic resonance study. Chem Biol Interact. 90:139-155 (1994).

47. Thompson DJ. A chemical hypothesis for arsenic methylation in mammals. Chem Biol Interact. 88:89-114 (1993).

48. Kuo PC, Abe KY, Schroeder RA. Interleukin-1-induced nitric oxide production modulates glutathione synthesis in cultured rat hepatocytes. Am J Physiol 271:C851-C862 (1996).

49. Levonen AL, Laakso J, Vaskonen T, Mervaala E, Karppanen H, Lapatto R. Down-regulation of renal glutathione synthesis by systemic nitric oxide synthesis inhibition in spontaneously hypertensive rats. Biochem Pharmacol 59:441-443 (2000).

50. Moellering D, McAndrew J, Patel RP, Cornwell T, Lincoln T, Cao X, Messina JL, Forman HJ, Jo H, Darley-Usmar VM. Nitric oxide-dependent induction of glutathione synthesis through increased expression of γ -glutamylcysteine synthetase. Arch Biochem Biophys 358:74-82 (1998).

51. Alpert AJ, Gilbert HF. Detection of oxidized and reduced glutathione with a recycling post column reaction. Anal. Biochem. 144:553-562 (1985).

52. Chung PM, Cappel RE, Gilbert HF. Inhibition of glutathione disulfide reductase by glutathione. Arch. Biochem, Biophys. 288:48-53 (1991).

53. Styblo M, Serves SV, Cullen WR, Thomas DJ. Comparative inhibition of yeast glutathione reductase by arsenicals and arsenothiols. Chem Res Toxicol 10:27-33 (1997).

54. Styblo M, Thomas DJ. In vitro inhibition of glutathione reductase by arsenotriglutathione. Biochem Pharmacol. 49:971-974 (1995).

55. Sampayo-Reyes A, Zakharyan RA, Healy SM, Aposhian HV. Monomethylarsonic acid reductase and monomethylarsonous acid in hamster tissue. Chem Res Toxicol. 13:1181-1186 (2000)

Legends to figures

Figure 1 Correlation of serum levels of LPO with iAs, its methylated metabolites and total arsenic in whole blood of subjects examined (n=38). Note: Serum LPO in five samples could not be determined because limited sample volume.

iAs, inorganic arsenic; MMeAs, monomethylarsenic; DMeAs, dimethylarsenic; tAs, total arsenic.

Figure 2 Correlation of serum levels of LPO with whole blood levels of NPSH and SOD activity in subjects examined (n=38). Note: Serum LPO in five samples and whole blood NPSH in one sample could not be determined because limited sample volume.

Figure 3 Correlation of levels of NPSH with iAs, its methylated metabolites and total arsenic in whole blood of subjects examined (n=42). Note: Whole blood NPSH in one sample could not be determined because limited sample volume.

iAs, inorganic arsenic; MMeAs, monomethylarsenic; DMeAs, dimethylarsenic; tAs, total arsenic.

Figure 4 Correlation of whole blood levels of NPSH with the ratios of MMeAs to iAs in blood and the ratios of DMeAs to MMeAs in urine (n=42). Note: Whole blood NPSH in one sample could not be determined because limited sample volume.

iAs, inorganic arsenic; MMeAs, monomethylarsenic.

Figure 5 Putative mechanism of oxidative stress induced by chronic arsenic exposure

ROS, reactive oxygen species; GSH, glutathione; NPSH, non-protein sulfhydryl; NOS, nitric oxide synthase; NO, nitric oxide; γ-GCS, γ-glutamylcysteine synthase; LPO, lipid peroxides.

Table 1. Levels of iAs, MMeAs and DMeAs in blood, urine and total arsenic in hair of the high and low arsenic exposed subjects

Groups	Blood (μg/L)			Urine (μg/L)			Hair (μg/g)
	iAs	MMeAs	DMeAs	iAs	MMeAs	DMeAs	
High	8.2±3.4*	20.7±7.9*	13.2±5.5*	360±173*	468±240*	1559±529*	1.8±0.8*
Low	2.7±0.9	2.1±0.9	2.6±0.8	71±13	40±22	152±53	0.4±0.2

Values are means ± SD. iAs, inorganic arsenic; MMeAs, monomethylarsenic; DMeAs, dimethylarsenic. * Different from low group, $p< 0.001$.

Table 2. Comparison of serum LPO concentration, whole blood NPSH level and SOD activity between the high and low arsenic exposed group

Group	LPO (μM)	NPSH (μmol/g of Hb)[#]	SOD (NU/ml of blood)
High	8.8±1.8 *	4.3±1.2 **	2654±400
Low	7.1±1.0	7.5±0.5	2830± 99

Note: Serum level of LPO in five samples and whole blood NPSH in one sample could not be determined because limited sample volume. Values are means ± SD.

Different from low group: * $p<0.05$; ** $p<0.01$.

cited from ref. (30)

Fig. 1.

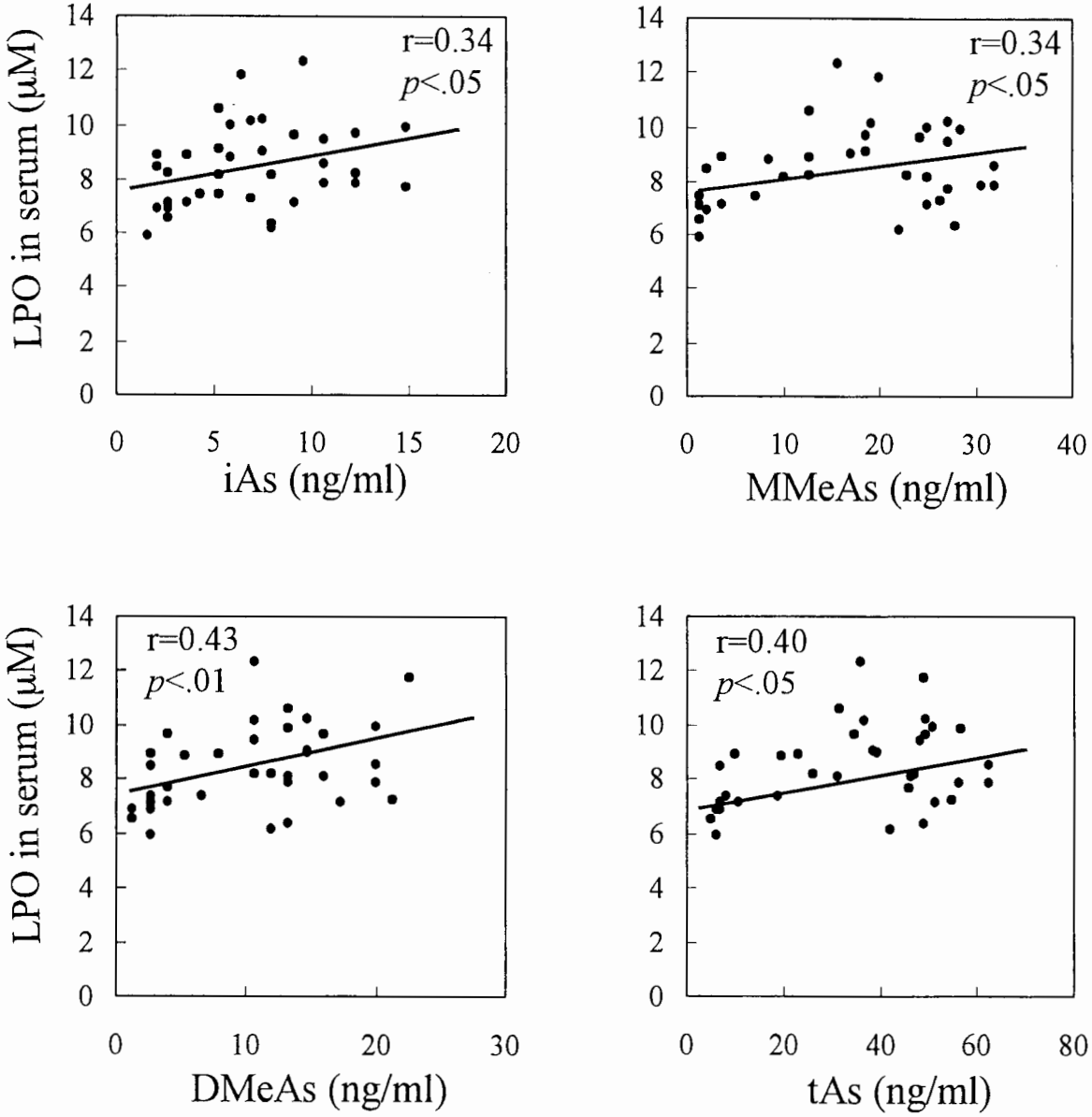

LPO in serum (μM)
r=0.34
p<.05
iAs (ng/ml)
r=0.34
p<.05
MMeAs (ng/ml)
r=0.43
p<.01
DMeAs (ng/ml)
r=0.40
p<.05
tAs (ng/ml)

Fig. 2.

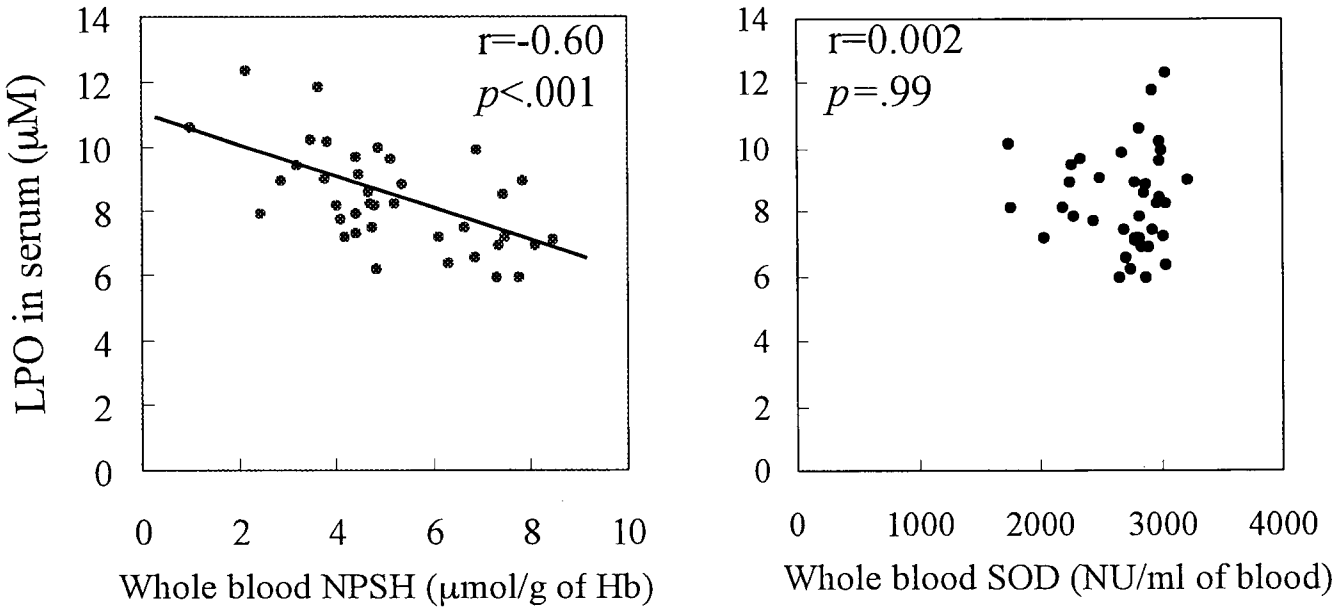

LPO in serum (μM)
14
12
10
8
6
4
2
0
r=-0.60
p<.001
0
2
4
6
8
10
Whole blood NPSH (μmol/g of Hb)
r=0.002
p=.99
0
1000
2000
3000
4000
Whole blood SOD (NU/ml of blood)

Fig. 3.

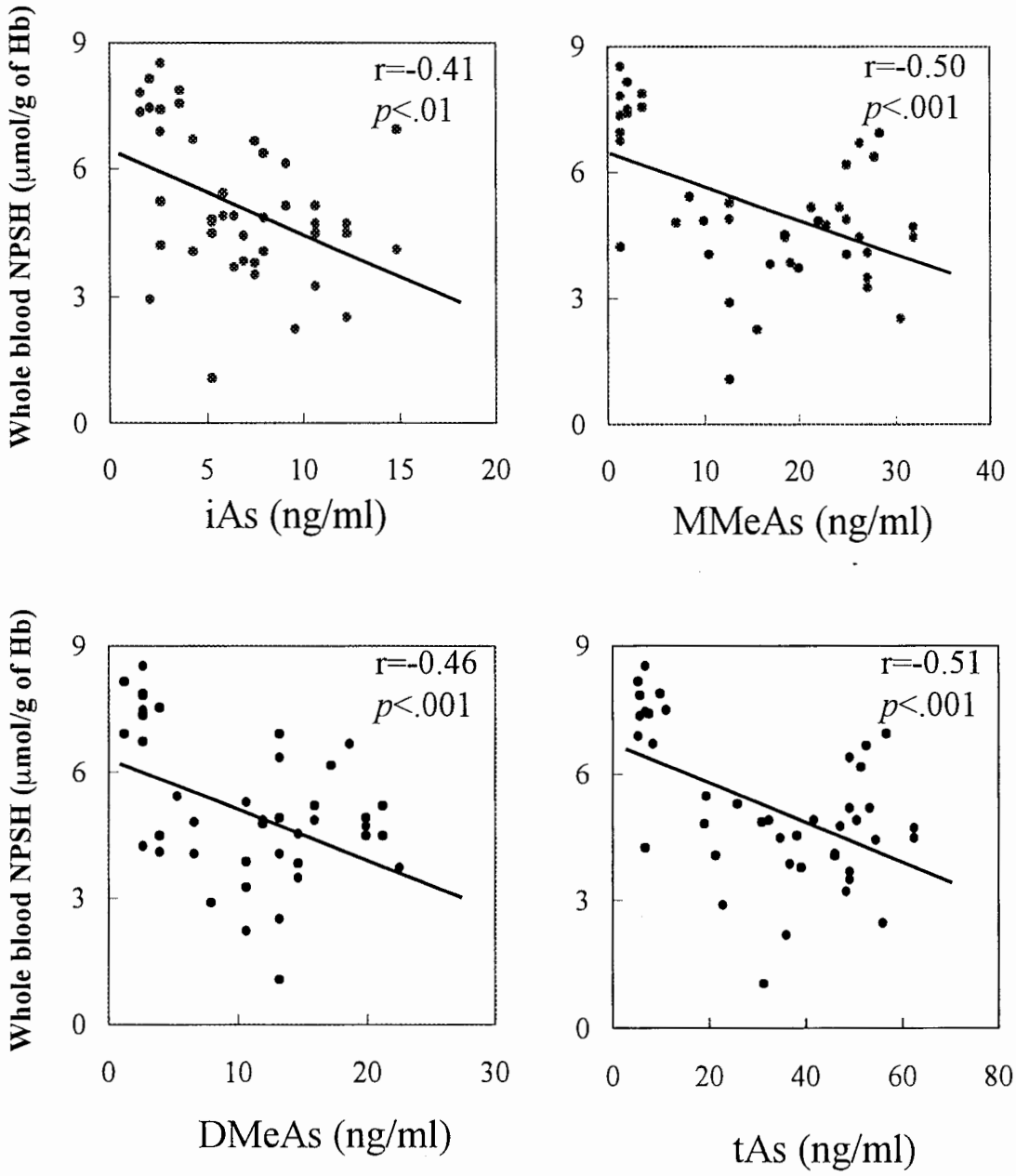

Whole blood NPSH (μmol/g of Hb)
r=-0.41
p<.01
iAs (ng/ml)
r=-0.50
p<.001
MMeAs (ng/ml)
r=-0.46
p<.001
DMeAs (ng/ml)
r=-0.51
p<.001
tAs (ng/ml)

Fig. 4.

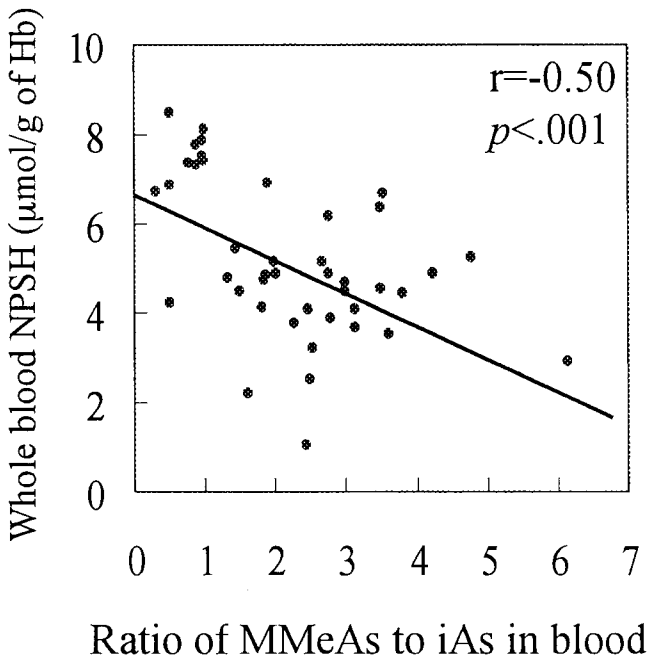
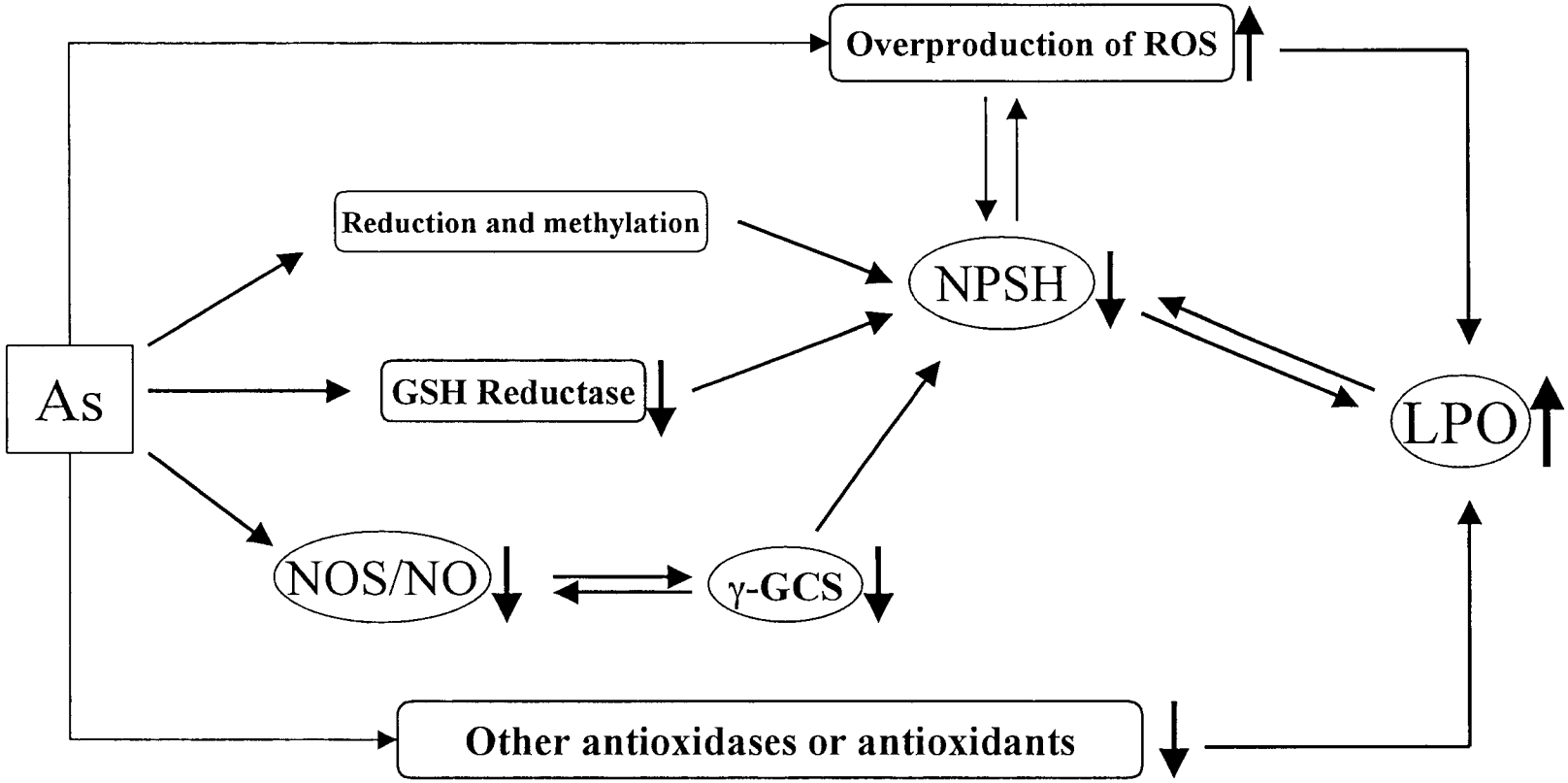

Whole blood NPSH (μmol/g of Hb)
10
8
6
4
2
0
r=-0.50
p<.001
0 1 2 3 4 5 6 7
Ratio of MMeAs to iAs in blood

Fig.5.


Overproduction of ROS
Reduction and methylation
NPSH
As
GSH Reductase
LPO
NOS/NO
γ-GCS
Other antioxidases or antioxidants

日本財団補助金による
２０００年度日中医学学術交流促進事業

①. 調査・共同研究助成

(7) 口腔粘膜扁平上皮癌発生に関する日本と中国の比較

研究テーマ　口腔粘膜扁平上皮癌発生に関する日本と中国の比較

研究代表者氏名　高木　実
所属　東京医科歯科大学
役職　教授

要旨

口腔粘膜扁平上皮癌の発生について明らかにするために日本側は白板症の癌化の初期病変として LOH について研究を行い（研究 I)、中国側は均交系マウスを用いて腫瘍の実験発生について研究した（研究 II)。また口腔癌の病態を明らかにする為に細胞周期調節因子であるについて免疫組織化学的研究を行っている（研究 III)。

研究 I

白板症の癌化の過程でどのような遺伝学的な変化が起こっているのかを明らかにする為に、われわれは白板症とその後に発生した初期癌のパラフィン包埋ブロックを用いてマイクロディセクションし、^{32}P でラベルした３３個のマイクロサテライト・マーカーで PCR-based LOH 解析を行った。白板症で最も高い頻度で LOH がみられた染色体は 9p21 で、66.7%であった。次は 3p14-25 の 61.5%, 4q31-32 の 45.5% と 17p12-14 の 44.4%であった。白板症中の初期癌化巣で最も高い頻度で LOH がみられた染色体は 9p21 で、91.7%であった。次は 3p14-25 の 76.9%、4q31-32 の 54.5%、17p12-14 の 66.7%、 5q21-23 の 50%、6p25-27 の 44.4%、6q21-23 の 40% と 11q23 の 40%であった。

研究 II

３ケ月の均交系マウスの腎臓に 17.5 日の C3H 均交系マウスの第一大臼歯歯胚を移植した。３２例中の１３例に角化嚢胞様病変がみられ、移植後の早期に嚢胞はエナメル上皮から形成された。７例には含歯性嚢胞様病変がみられ、移植後の後期に嚢胞は網状層から形成された。角化嚢胞様病変と含歯性嚢胞様病変は違う組織学的発生経路をもつと示唆された。

研究 III

口腔病理の扁平上皮癌のパラフィン包埋資料を用いて細胞周期調節因子である MDM2、P27、Cyclin D1 抗体を免疫組織学的に染色し、現在解析中である。

KEY WORDS

初期癌化、Loss of Heterozygosity、遺伝学的変化、歯胚移植、組織学的発生

研究報告

研究I

1　目的

口腔扁平上皮癌の発生はどのような過程で起こるかは明らかでないが、多段階的な遺伝学変化を通って起こってくるものと考えられる。癌化のフロントはどんな遺伝学的な変化が起こっているのかを明らかにする為に、われわれは白板症とその後に発生した初期癌をマイクロディセクションし、LOH解析を行った。

2　材料および方法

対象は東京医科歯科大学分子病態学および検査部で、１回目の生検で白板症と診断され、２回目の生検で同じ白板症に小さな初期癌化巣が病理学的に認めた１３症例を用いた。１３症例の白板症と初期癌のパラフィン包埋ブロックを用いて、６～８μm の厚さで連続して薄切し、脱パラフィン後 H&E 染色を行った。初回の生検の白板症の部と 2 回目の生検の白板症から癌化の起こっている部を 26 ゲージ注射針を用いてマイクロディセクションした。マイクロディセクションした組織は 200μg/ml proteinase K で消化し、PCR を行った。^{32}P でラベルした３３個のマイクロサテライト・マーカーを用いた。5%ポリアクリルアミト・ゲルを用いて PCR の産物を電気泳動した。正常のアリルと比べて、バンド濃さが 50%以上の減少したものを LOH と判断した。MI は正常と比べて、病変組織で新しいアリルが発現された場が MI ありと判断した。すべてのLOH及びMI陽性症例は再実験により確認した。LOHのある染色体の腕数をinformative

の正常細胞の染色体腕数で割って得られる値がFALの値である。

Fisher' exact test と student-t test を用いて解析した。

3　結果

1）　板症のLOH

白板症で最も高い頻度で LOH がみられた染色体は 9p21 で、66.7%であった。次は 3p14-25 の 61.5%, 4q31-32 の 45.5% と 17p12-14 の 44.4%であった。

2）　板症中の初期癌化巣のLOH

白板症中の初期癌化巣で最も高い頻度で LOH がみられた染色体は 9p21 で、91.7%であった。次は3p14-25 の 76.9%、4q31-32 の 54.5%、17p12-14 の 66.7%、 5q21-23 の 50%、6p25-27 の 44.4%、6q21-23 の 40% と 11q23 の 40%であった。

3）白板症と白板症中の初期癌化巣のLOHとの比較

１３症例の１１症例で白板症にみられた LOH がいずれも白板症中の初期癌化巣にも検出された。

4）　白板症と初期癌におけるMI

３症例では１個マイクロサテライト・マーカーにしか M が I みられなかった。症例 1 では白板症と白板症中の初期癌化巣ともに 10q に MI があり、症例 9 と 11 では白板症中の初期癌化巣に 8p の MI がみられた。

5）　白板症と白板症中の初期癌化巣におけるFAL

FAL は DNA のダメージのレベルを表するものであるが、白板症中の初期癌化巣での FAL の平均は 0.46 で、白板症での平均は 0.27 で、両者の間に有意差が認められた($p<0.05$)。

6）　アリルの異方向性

症例7では3p, 6pと9pのLOHが白板症と白板症中の初期癌化巣の両方には認められたが、17qのLOHが白板症中の初期癌化巣のみにあった。8pのLOHが白板症のみにあった。

4　考察および結論

本研究で最も高い頻度のLOHは白板症では9p21にみられ、次に3p14-25であったが、これらの遺伝子変異は白板症の癌化過程の中で早期に起こる変化と考えられる。9p21のLOHはp16の失活を起こすものと推察される。白板症及び白板症中の初期癌化巣でp53癌抑制遺伝子に関係する17p12-14のLOHは白板症で44.4%で、白板症中の初期癌化巣で66.7%で観察された。APC遺伝子を含む5q21-23のLOHは50%の白板症中の初期癌化巣で5q21-23のLOHがみられたが、白板症ではいずれの症例にもみられなかった。このことは、5q21-23があるいはその近くに白板症癌化に関与する抑制遺伝子があると推理できる。

FALは遺伝学的なダメージを表するが、本研究では白板症の平均FALは0.27で、このことは白板症が高いリスクをもつ前癌性病変であることと示す。また白板症中の初期癌化巣の平均FALは0.46で、白板症との間に有意差が認められた。これらの結果から口腔の白板症の癌化過程中では遺伝学的なダメージの蓄積が主要な変化と考えられる。

本研究ではすべて白板症のLOHが白板症中の初期癌化巣に検出できたんことから白板症と白板症中の初期癌化巣は同じクローンであることが明らかとなった。遺伝子のdivergenceがあった症例については、症例7では白板症と白板症中の初期癌化巣が同じ3p, 6q, 9pのLOHをもち、症例8では白板症と白板症中の初期癌化巣が同じ3p, 4q, 9p, 11p, 17p, 17qのLOHを示したので、これらも同じクローンからのものと考えられる。

結論としては、白板症に高い頻度のLOHがあったことから、白板症が高いリスクをもつ前癌性病変であることが示され、白板症と白板症中の初期癌化巣は同じクローンからのものと考えられる。白板症から初期癌までの一連の変化では、遺伝子のダメージが蓄積されて増えてい

くことが示された。

研究 II

1　目的

歯原性上皮は口腔粘膜から分化したものである。この上皮がどのように腫瘍をつくることが出来るかについて明らかにするためにまず歯胚の腎被膜マウスの移植実験を行った。次いでに移植歯胚に発癌剤の作用を検討しているが、今回は正常歯胚の移植までを論文とした。

2　材料および方法

均交系 C3H マウスを使用した。17.5 日分の第一大臼歯歯胚を 32 カ月分のマウスの腎被膜下に移植をそのまま観察し、1 カ月、２カ月、３カ月、４カ月、５カ月後に経時的屠殺して移植歯胚の連続切片を作った。

3　結果および結論

移植役１～２カ月の早期には角化嚢胞様嚢胞が４、５カ月後には含歯性嚢胞様嚢胞が生じ、経過時間により発生する嚢胞に差異がみられた。また、発生母地は角化嚢胞では歯提が、含歯性嚢胞では歯乳頭の網状層からの発生が示唆された。

研究 III

1　目的

口腔粘膜の扁平上皮癌について細胞周期調節因子の染色性と癌の病態の関係を明らかにする。

2　材料および方法

上海第二医科大学口腔病理の症例を用い、日本からの抗体を染色キットで染色を行う。

3　結果

現在解析中である。

Different Histogenesis of Experimental Odontogenic Cysts by the Renal Subcapsular Transplantation of Tooth Germs of Mice

En-Xin Zhu[1], Jing Xiao[1], Ting-Jiao Liu[1], Wei-Wen Jiang[2] and Minoru Takagi[2]

[1]Department of Oral Pathology, Faculty of Dentistry, Dalian Medical University, Dalian, Republic of China, [2]Molecular Pathology, Department of Oral Restitution, Division of Oral Health Sciences, Graduate School, Tokyo Medical and Dental University, Tokyo, Japan

Zhu EX, Xiao J, Liu TJ, Jiang WW and Takagi M. Different Histogeneses of Experimental Odontogenic Cysts by the Renal Subcapsular Transplantation of Tooth Germs of Mice. *Oral Med Pathol* 2000; 5: 83-86, ISSN 1342-0984.

The tooth germs of first mandibular molars of 17.5-day-old C3H mouse embryos were transplanted into the renal subcapsular spaces of 3-month-old syngenic male mice. Grafts were harvested at timed sequences from 1, 2, 3, 4 weeks and 2, 3, 4, 5 months, and were examined histopathologically by total serial sections. Of 32 cases of grafts, keratocyst-like lesions were formed in 13 cases, and dentigerous cyst-like lesions were formed in 7 cases. None of the cases developed two cysts at the same time. In the keratocyst-like lesions the cavity developed from the enamel epithelium in the early stage after transplantation, and in the dentigerous cyst-like lesion the cavity developed by cystic degeneration of stellate reticular layer of enamel organ in the late stage after transplantation. The present experiment revealed that keratocyst-like lesions and dentigerous cyst-like lesions developed through different histogeneses.

***Key words*: animal model, odontogenic cysts, tooth germ, transplantation**

***Correspondence*: Wei-Wen Jiang,** Molecular Pathology, Department of Oral Restitution, Division of Oral Health Sciences, Graduate School, Tokyo Medical and Dental University,1-5-45, Yushima, Bunkyo-ku, Tokyo, 113-8549, Japan
Tel: +81-3-5803-5453 Fax: +81-3-5803-0188 E-mail: ww.mpa@tmd.ac.jp

Introduction

Odontogenic cysts in human beings are not uncommon. There are many types displaying various biologic behaviors, but little is known about their histopathogenesis. It is generally considered that each of the odontogenic cysts is derived from one of the following epithelial sources: 1) enamel organ, 2) reduced enamel epithelium of a tooth crown, 3) epithelial rests of Malassez and remnants of the sheath of Hertwig, 4) remnants of the dental lamina, or 5) basal cells of oral mucosa (1, 2). However, the exact relationship between these epithelia and various types of cysts is unknown, and experimental studies in this field have been limited. In order to investigate whether enamel organ is one of the sources of odontogenic cysts, and which type of odontogenic cyst is closely connected with it, we performed the following animal experiment.

Materials and Methods

C3H/HeN mice were used. They were given mixing solid food and sterile drinking water. Two-month-old mice of both sexes mated at 9 o'clock at night and before 9 o'clock the next morning. The mice which had vaginal plugs were recognized as becoming pregnant after 0.5 day. And on day 17.5, the tooth germs of the embryos were in the bell stage, in which a specialization of cells of the enamel organ itself occur, resulting in the establishment of four distinct epithelial layers: external enamel epithelium, stellate reticulum, stratum intermedium, and internal enamel epithelium. The 17.5-day embryos were removed from pregnant females and placed in 2% bovine serum in Hanks solution. Under a dissecting microscope,

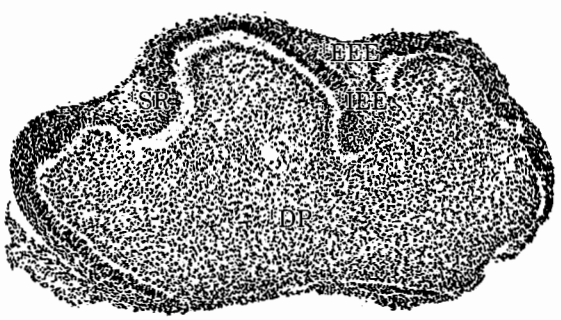


Fig. 1: First mandibular tooth germ as removed from a 17.5-day-old mouse. IEE: internal enamel epithelium, EEE: external enamel epithelium, DP: dental papilla SR: stellate reticulum. H.E. ×20

the first mandibular molar tooth germs of these embryos were dissected from the surrounding connective tissues, dental lamina and oral epithelium. The tooth germs which were just in the bell stage, had only components of enamel organ, dental papilla and dental follicle, and not other tissues, such as dental lamina and oral epithelium (Fig. 1). Three-month-old syngenic male mice were anaesthetized by the intraperitioneal injection of pentobarbital sodium (Sommonpentyl), and 32 dental germs were transplanted under the left renal subcapsular spaces of the mice at the rate of one graft per capita. The grafts were harvested 1, 2, 3, 4 weeks and 2, 3, 4, 5 months after transplantation. For histological examination, the grafts were fixed in 10% neutral buffered formalin and demineralized in 5% formic acid at 4℃ for 12 hours. Routinely the paraffin-embedded specimens were serially sectioned 4 μm thick and stained with hematoxylin-eosin.

For determining the relationship between duration of transplantation and formation of experimental odontogenic cysts, pearson chi-squared test (χ^2 test) was applied.

Results

1) Histopathological Findings

(1) One-week group

At 1 week after transplantation, small amounts of dentin and enamel appeared in the bell stage, tooth germs and stellate cells of enamel organs were still abundant. External enamel epithelium proliferated partially and the serial sections showed that these proliferations were sticking out of the enamel organs and were still connected with enamel organs by epithelial strands (Fig. 2). Formation of the inner space with hyperkeratinization was observed in these epithelial nest (Fig. 3)

(2) Two-week group

At 2 weeks after transplantation, the enamel and dentin of the tooth crown were almost formed and the stellate reticulum layer disappeared. The size of epithelial nests enlarged and keratocyst-like lesions were filled with keratin. The inner surface of cysts was lined by with keratinized or parakeratinized stratified squamous epithelium. Basal layer of stratified squamous epithelium was smooth without rete pegs (Fig. 4).

(3) Three-week group

At 3 weeks after transplantation, the crown was formed and the root began to develop. Keratocyst-like lesions continuously increased in size and daughter-cysts were sometimes seen. Alveolar bone developed and bone marrow appeared.

(4) Four-week group

At 4 weeks after transplantation, parts of enamel organs enlarged and bulged outwards and a cystic cavity was formed. There were dentigeous cyst-like lesions, and the epithelium of the cystic lining was composed of 2 to 4 layers of non-keratinized stratified squamous epithelium. Basal layer of the epithelium was flat and rete pegs were not formed (Fig. 5). The cystic cavity was filled with a fluid, desquamated epithelial cells and foamy cells.

(5) Two-to-three-month group

Dentigerous cyst-like lesions were lined with 2 to 4 layers of flattened non-keratinized stratified squamous epithelium. The crown of the tooth was enclosed in a cys-

Fig. 2: one-week transplantation. The cyst was connected with enamel organ by epithelial strand. IEE: internal enamel epithelium, EEE: external enamel epithelium SR: stellate reticulum, C: cyst. H.E. ×10

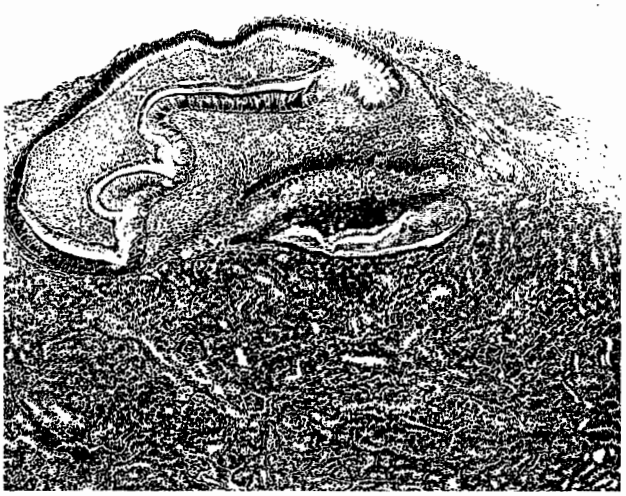


Fig. 3: One-week transplantation. Formation of inner space with hyperkeratinization is observed in the epithelial nest (*). H.E. ×80

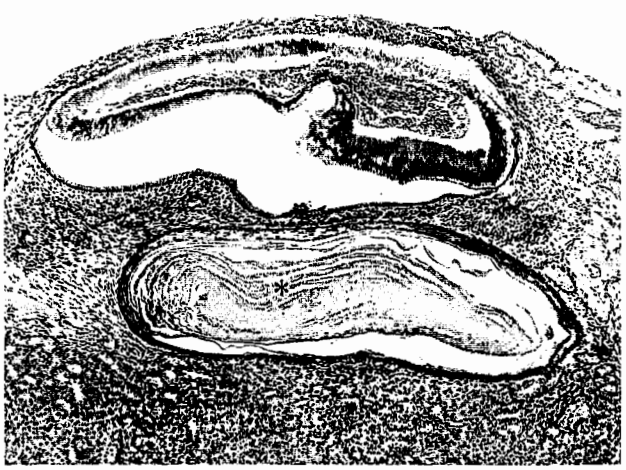


Fig. 4: Two-week transplantation. Keratocyst-like lesion is formed outside of tooth germ and filled with keratin (*). H.E. × 160

tic cavity and the cavity was filled with a fluid.

(6) Four-to-five-month group

The dentigerous cyst-like lesions continued to develop in size (Fig. 6). The lining epithelium was thin non-keratinized stratified squamous epithelium without rete pegs and was attached to the cementoenamel junction of the unerupted tooth (Fig.7) In some tooth germs, large amounts of cementum-like hard tissue was formed. The cystic cavity was filled with a faintly eosinophilic fluid and scanty cells. In the reduced enamel epithelium, a cuticle-like eosinophilic substance and irregular calcification were seen. Large amounts of alveolar bone formation and bone marrow tissue were seen.

2) Relationship between duration of transplantation and formation of odontogenic cyst

The findings in experimental transplants are summarized in Table 1.Thirteen cases of 32 transplants developed keratocyst-like lesions during 1 to 4 weeks, and 7 cases developed dentigerous cyst-like lesions during 2 to 5 months. There was also a tendency for keratocyst-like lesions to develop in the early stage and the dentigerous cyst-like lesions to develop in the late stage ($P<0.05$).

Table 1: Relationship between duration of transplantation and formation of odontogenic cysts

Duration of transplantation	Transplanted cases	Keratocyst-like lesions	Dentigerous cyst-like lesions	Total
1-2 weeks	8	8	0	8
3-4 weeks	8	1	2	3
2-3 months	8	0	2	2
4-5 months	8	4	3	7
Total	32	13	7	20

Discussion

It is well known that tooth germs continue to develop even in transplanted conditions (3-6). Thus it is reasonable to study histogenesis of odontogenic cysts by using transplanted tooth germs. In human beings, each of the odontogenic cysts have different histological features and biological behaviors, and it can be supposed that they have different epithelial origins. According to the development of keratocysts, two sources of the epithelium have been considered; remnants of the dental lamina and extensions of basal cells from the overlying oral epithelium (7, 8). In animal experiments, it has been demonstrated that the cervical loop and dental lamina were the sources of odontogenic keratocyst (9). Experimental odontogenic keratocysts by transplantation have been reported by Bartlett *et al*. and Soskolne *et al*. (10, 11). The histology of the cysts in these experiment was the similar to those seen in ours. In the present experiment, the serial sections from 13 cases of keratocyst-like lesions showed that the epithelial nests proliferated and finally keratocyst-like lesions were formed. Formation of keratocyst-like lesion was not seen within enamel organs. In those lesions, epithelial lining of the cysts were connected with external enamel epithelium which developed toward surrounding connective tissues. Therefore, it is suggested that exter-

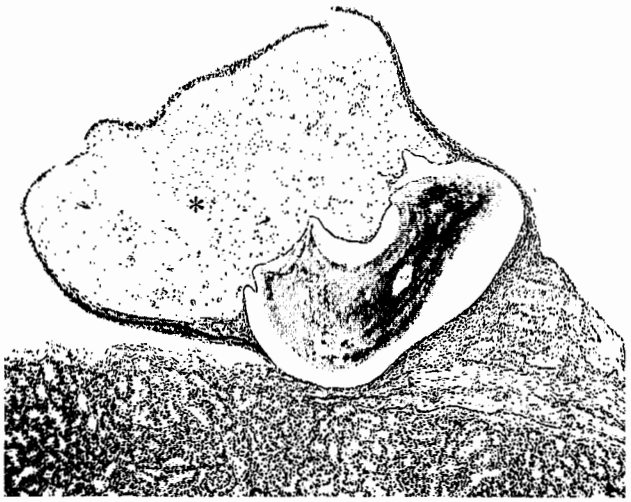


Fig. 5: Four-week transplantation. Dentigerous cyst-like lesion is lined with non-keratinized stratified squamous epithelium (*). The cystic cavity is filled with liquid, desquamated epithelial cells and infiltrating cells. H.E. ×72

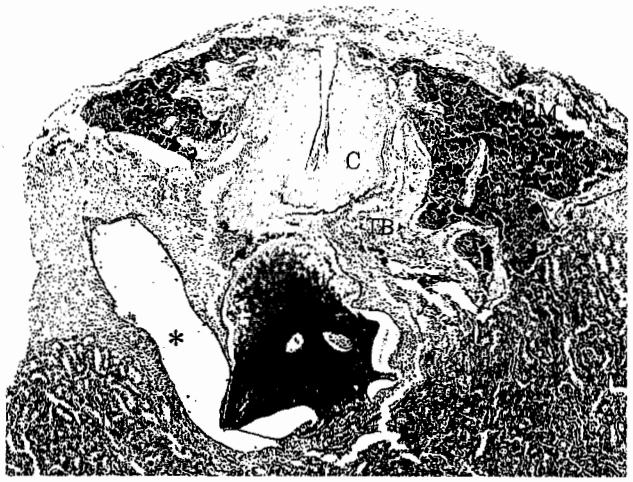


Fig. 6: Five-month transplantation. Dentigerous cyst is attached to amelocemental junction of the tooth (*). Large amount of cementum-like (C) hard tissue is formed. TB: trabecular bone, BM: bone marrow H.E. ×50

Fig. 7: Five-month transplantation. Higher magnification of Fig. 6. Cyst is lined by non-keratinizing stratified squamous epithelium. H.E. ×160

nal enamel epithelium is the sources of keratocyst-like lesions. However the biological behaviors of the keratocyst-like lesions were considered to be different from odontogenic keratocysts of humans. The keratocyst-like lesion in the present experiment did not show aggressive growth.

Dentigerous cysts may develop by accumulation of fluid either between the reduced enamel epithelium and the enamel or within the enamel organ itself. Atkinson described the formation of cysts derived from the enamel organ around the crowns of mouse molar teeth transplanted subcutaneously into an inbred strain of mice (12). He also examined proliferative populations of cells by ^{3}H labelling method in the experimental odontogenic cysts (13). In the present experiment, the dentigerous cyst-like lesions occurred in the stellate reticular layer. At first cellular degeneration and necrosis appeared within the stellate reticular layer, and a fluid accumulated. The cysts were attached to cementoenamel junctions, showing a tooth-containing or half-tooth-containing appearance. In those cases proliferation of external enamel epithelium was not observed. It is suggested that the enamel organ is one of the sources of dentigerous cyst-like lesions. Experimental dentigerous cysts have been reported by Riviere *et al*., Al-talabani *et al*. and Alini *et al*. (14-16), and they suggested the same histogenesis.

In the present experiment, most of keratocyst-like lesions were observed during 1 to 4 weeks, and dentigerous cyst-like lesions developed during 2 to 5 months. None of the cases developed the two cysts at the same time. It is supposed that keratocyst-like lesions were formed in the early stage of tooth development, and dentigerous cyst-like lesion were formed in the late stage ($P< 0.05$).

Atkinson described that the initial loss of blood supply and subsequent establishment of vascular connection between host and graft influenced the pattern and types of degeneration and repair (12). Formation of experimental odontogenic cysts by transplantation without any specific pretreatment has been reported by several authors (11-16). Maeda *et al*. reported that mechanical injury was an important factor in the production of odontogenic carcinoma by N-ethyl-N-nitrourea (17). However Miura *et al*. considered that in vitro 4-nitroquinoline-1-oxide (4 NQO) treatment is necessary for induction of experimental odontogenic cysts (18). In the present experiment, the injury factors might have three sources. The first is the procedure of removing the tooth germ from pregnant females and dissecting it from the surrounding tissues. The second might come from the pressure of the renal capsule. The third factor may be connected with the orientation of the tooth germ under the renal capsule since the orientation has something to do with the resistance of the surrounding tissues to the tooth germ.

Acknowledgment

This work was supported by a Grand-in Aid from the Japan China Medical Association.

References

1. Shafer WG, Hine MK and Levy BM. A Textbook of Oral Pathology. 4 th ed. W.B. Saunders. Philadelphia. 1983; 258-75.
2. Shear M and Seward GR. Cysts of the Oral Regions. 3rd ed. Oxford, London. 1992; 85.
3. Hay MF. The development *in vivo* and *in vitro* of the lower incisor and molars of the mouse. *Arch Oral Biol* 1961; **3**: 86-109.
4. Atkinson ME. A histological study of tooth grafts in an inbred strain of mice. *J Oral Pathol* 1972; **1**: 115-24.
5. Al-Talabani NG and Smith CJ. Continued development of 5-day old tooth-germs transplanted to syngeneic hamster (*mesocricetus auratus*) cheek pouch. *Arch Oral Biol* 1978; **23**: 1069-76.
6. Morio I. Recombinant study of the mouse molar cervical loop and dental papilla by renal transplantation. *Arch Oral Biol* 1985; **30**: 557-61.
7. Harris M and Toller P. The pathogenesis of dental cysts. *Br Med Bull* 1975; **31**: 159-63.
8. Brannon RB. The odontogenic keratocyst: A clinicopathologic study of 312 cases. Part II. Histologic features. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1977; **43**: 235-55
9. Zhu E-X. Dental lamina as presumptive source of odontogenic cyst. *J Stomatol Soc Jpn* 1990; **57**: 549-61. (In Japanese with English abstract)
10. Bartlett PF, Radden BG and Reade PC. The experimental production of odontogenic keratocysts. *J Oral Pathol* 1973: **2**: 58-67.
11. Soskolne WA, Bab J and Sochat S. Production of keratinizing cysts within mandibles of rats with autogenous gingival epithelial grafts: A histologic study. *J Oral Pathol* 1976: **5**: 122-8.
12. Atkinson ME. A histological study of odontogenic cysts formed following mouse molar tooth transplantation. *J Oral Pathol* 1976; **5**: 347-57.
13. Atkinson ME. An autoradiographic study of experimental odontogenic cyst formation in the mouse. *J Oral Pathol* 1977; **6**: 382-6.
14. Riviere GR and Sabet TY. Experimental follicular cysts in mice: A histologic study. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1973; **36**: 205-13.
15. Al-Talabani NG and Smith CJ. Experimental dentigerous cysts and enamel hypoplasia: their possible significance in explaining the pathogenesis of human dentigerous cysts. *J Oral Pathol* 1980; **9**: 82-91.
16. Altini M and Cohen M. Experimental extra-follicular histogenesis of follicular cysts. *J Oral Pathol* 1987; **16**: 49-52.
17. Maeda H, Kameyama Y, Fujita K, *et al*. Experimental odontogenic tumors produced by ethylnitrosourea injections and mechanical injuries. *J Oral Pathol Med* 1991; **20**: 296-9
18. Miura Y, Ozaki HS, Li T-J, *et al*. Experimental odontogenic cysts induced by *in vitro* 4-nitroquinoline 1-oxide (4 NQO) treatment of F344 rat incisor tooth germs. *J Oral Pathol Med* 1998; **27**: 53-8.

(Accepted for publication October 16, 2000)

日本財団補助金による
２０００年度日中医学学術交流促進事業

①. 調査・共同研究助成

(8) 口腔・顎・顔面領域における静脈奇形の遺伝子診断システムを第二軍医大学に構築するための共同研究

口腔・顎・顔面領域における静脈奇形(Vascular Malformations:VMs)の遺伝子診断システムを第二軍医大学に構築するための共同研究

研究代表者氏名：岡本哲治
所属：広島大学歯学部口腔外科学第一講座
役職：教授
住所：〒734－8553
広島市南区霞1－2－3

要旨

第二軍医大学および広島大学歯学部附属病院で臨床的及び病理組織学的に確定診断された散在性静脈奇形(VMs) 37 例（男性21 例，女性16例）におけるTie-2 チロシンキナーゼ領域の遺伝子変異をPCR-SSCP, direct sequenceにて検討した。その結果，8症例にG2646A の変異によるGlyのAspへの置換が，1 症例にA2659T の変異による Glu のHis への置換が存在することが示唆された。さらに，その組織像，Tie-2 及びVEGF 蛋白の発現を検討し遺伝子変異との関連性について考察し，遺伝子変異の質的相違と臨床症状には密接な関係があることが明らかとなり，遺伝子診断の有用性が強く示唆された。

Key Words; 静脈奇形(VMs); Tie-2, Angiopoietin, VEGF, チロシンキナーゼ型受容体，遺伝子診断，血管形成，血管内皮細胞，血管平滑筋細胞，血管周皮細胞

目的

VMsはヒトの血管奇形のうち最も頻度が高く，頭頸部の皮膚，粘膜および脳，肝臓，脾臓，膵臓などの臓器に好発し，この疾患を放置すると重大な合併症を引き起こす。早期はほとんど無症状で，症状発現までに数十年かかることもあり，特に脳等の深部臓器で発症した例では症状が出るまで診断は出来ない。血管腫よりも大きく，辺縁は不規則で境界は不明瞭なことが多く，自然退縮することはない。さらにVMsの血管腔は拡大し，全体として海綿様構造をとり，海綿様血管腫と呼ばれることもある[1,2]。組織学的には，不規則な形をした大小の血管腫と種々の量の線維性間質により構成される。血栓及びその石灰化，結石形成などをみることもあり，血管壁は一般に薄く，平滑筋細胞を欠損していることが多い。発病早期ではほとんど無症状で，発症までに数十年かかる事もあるが，放置すると重大な合併症を引き起こすことから，早期診断システムの確立が必須である。

1994年Boonら[3,4]は常染色体優性遺伝を示し，皮膚や粘膜に多発性の静脈異形成症を有する2家系のVMsの連鎖解析を行い，9q21に責任遺伝子が存在することを示した。さらに，1996年Vikkulaら[5]は，独立した2家系の静脈異形性症においてEndothelial-specific receptor tyrosine kinase Tie-2のチロシンキナーゼ領域にArg 849 (CGG) → Trp (TGG) の変異を同定し，Tie-2はVMsの責任遺伝子であることを明らかにした。

中国におけるVMsの発生頻度は高く，第二軍医大学口腔外科では年間数10例の同患者の診断・治療を行っている。しかし，確定診断の困難さに加えて，同病変は境界が不明瞭で浸潤性であるため外科的切除後も局所再発しやすくその予後は極めて悪い。従って、Tie-2遺伝子を標的としたVMsの遺伝子診断システムを第二軍医大学で構築する事はその早期診断・治療を行う上で重要である。そこで本研究においては，第二軍医大学においてVMsの早期遺伝子診断システムを構築することを目指して，第二軍医大学および広島大学歯学部附属病院で過去に治療した37症例のVMsの組織像，Tie-2, VEGF蛋白の発現およびTie-2-TKの変異を解析し，VMsの遺伝子変異の質的相違と臨床症状や病理組織像との関係を明らかにし，さらにTie-2遺伝子変異のVMsにおける機能の解明を行った。

方法

対象：臨床的及び病理学的に確定診断された散在性静脈異形成症37例（男性21　例，女性16　例）。

方法：組織パラフィンブロックからDNAを抽出し，Tie-2チロシンキナーゼ領域に設計したPCRプライマーを用いてPCR及びPCR-SSCPを行った。PCR-SSCPにて変異の存在が示唆された症例についてdirect sequenceを行い，変異の部位を同定した。さらにリンタングステン酸ヘマトキシリン染色及び免疫組織染色を行い，その組織像，Tie-2及びVEGF蛋白の発現を解析した。次に，変異型Tie-2遺伝子(Tie-2Q837H, Tie-2G833D)および野生型(WT)Tie-2遺伝子をマウス由来内皮細胞株MSS31MAに導入し，コラーゲンゲル内での三次元構築能，増殖能を検討した。また，pGEX発現系を用いてTie-2のリガンドAngiopoietin-1の遺伝子組換え蛋白(ANG-1)を作成し，これら細胞におけるMAPキナーゼおよびSTAT系シグナルを検討した。

結果

PCR-SSCP の結果，9 症例に Tie-2-TK領域の遺伝子変異が示唆された。Direct sequenceを行った結果，8症例にG2646A の変異によるGly のAsp への置換(G833D)が，1 症例にA2659T の変異による Glu のHis への置換(Q 837H)が示唆された（表１）。

これら症例のなかで，症例 1 及び症例 2 を詳細に解析した。

症例 1 ；男性，15才，生下時に下唇及び頬部皮下あるいは粘膜下に境界不明瞭な弾性軟の腫脹を認め，徐々に増大傾向を示したが，受診までに治療を受けたことはなかった。圧迫によって赤紫色の腫脹を認め，搏動は触知しなかった。頭低位によって腫脹の増大を認めた。海綿様血管腫の臨床診断下，入院手術を受けた。

病理組織診断の結果，VMsであった。術後約 1 年経過後に同じ部位に再発したため再手術を行い現在経過良好である（図 1 ）。

本症例を含め他の 7 症例いずれにおいても，G2646A の変異によるGlyのAsp への置換(G833D) が示唆された。リンタングステン酸ヘマトキシリン染色にて，平滑筋細胞数は少ないものの，内皮細胞は比較的正常であった。免疫組織染色にて，血管内皮細胞にTie-2の高発現を認め，血管内皮細胞，平滑筋細胞及び周皮細胞にはVEGF 蛋白の高発現を認めた。

症例 2 ；男性，21才，生下時に左頬部皮下に境界不明瞭な弾性軟の腫脹を認め，臨床症状は症例 1 に類似していた。海綿様血管腫の臨床診断下，入院手術を受けた。摘出組織の病理

表 1　散在性静脈異形成症における Tie-2 チロシンキナーゼ領域の変異

症例	年齢	変異
1	15	GGC→GAC　G833D
2	21	CAA→CAT　Q837H
3	3	GGC→GAC　G833D
4	8	GGC→GAC　G833D
5	3	GGC→GAC　G833D
6	7	GGC→GAC　G833D
7	15	GGC→GAC　G833D
8	12	GGC→GAC　G833D
9	50	GGC→GAC　G833D

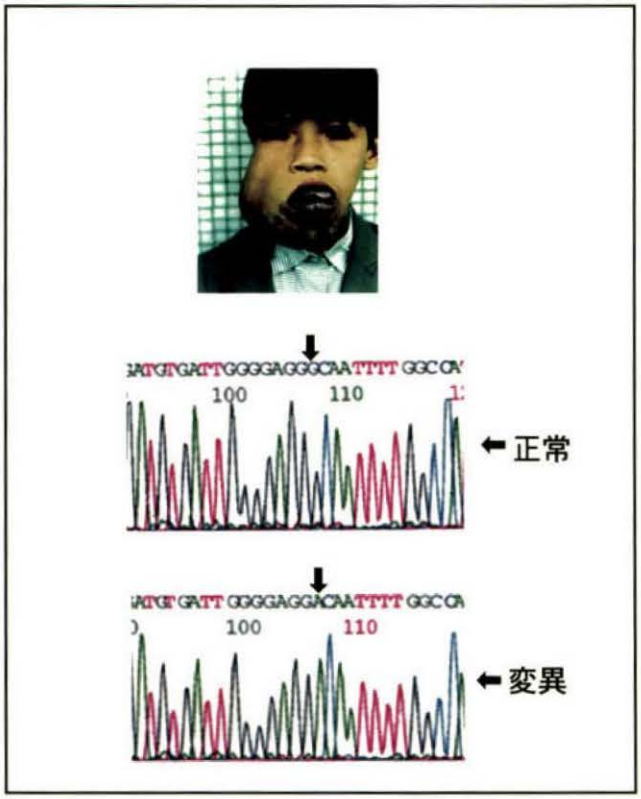


図 1　症例 1 初診時顔貌と Tie-2 チロシンキナーゼ領域の G2646A 変異

組織検査でVMsと診断された。術後再発など認めず経過良好である。Direct Sequence及びPCR-RFLPの結果，A2659Tの変異によるGluのHisへの置換Q837Hが示唆された（図２）。リンタングステン酸ヘマトキシリン染色にて，円形をした平滑筋細胞及び周皮細胞が認められた。また，免疫組織染色では，血管内皮細胞及び周囲の間葉系細胞にTie-2の発現を認めたがVEGFの発現は全く認めなかった。

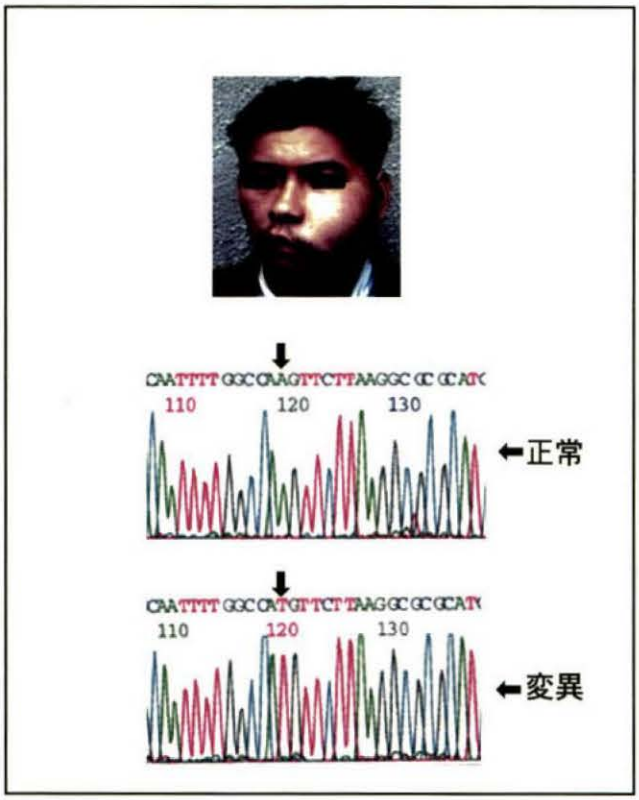


図２ 症例２初診時顔貌とTie-2チロシンキナーゼ領域のA2659T変異

変異Tie-2遺伝子の機能解析

Tie-2Q837H細胞は，コラーゲンゲル内培養系において，内皮細胞数は比較的正常なものの拡張した管腔様構造を形成した。Tie-2G833D細胞は，内皮細胞数は極めて少なく，薄く拡張した管腔様構造を示した。

これら組織像はそれぞれの変異を有するVMsの病理組織像と類似していた。一方，Tie-2wt細胞は，多数に枝分かれした樹枝状で，多層な内皮細胞で裏打ちされた管腔を形成した。Tie-2Q837HおよびTie-2G833D細胞はTie-2wt細胞に比べTie-2-TKの恒常的自己リン酸化の上昇を認めた。ANG-1刺激により，変遺伝子導入細胞では速やかなMEKおよびSTAT3の活性化を認め，Tie-2Q837H細胞ではp38 MAPキナーゼ活性を，Tie-2G833D細胞ではSTAT1の自己リン酸化活性を認めた。

考察

チロシンキナーゼ型受容体Tie-2とそのリガンドangiopoietin (ANG)は，胎生中期，後期の内皮細胞と平滑筋細胞（及び周皮細胞）の相互作用に重要と考えられている[6]。ANG-1またはTie-2ノックアウトマウスでは周皮細胞の遊走や細胞外マトリックス(ECM)の産生が認められないために，壁の薄い内腔の拡張した血管が形成され，胎生10.5日目で死亡する[7,8]。

Tie-2シグナルは，PDGF-BB, IGF, PDGF-AA及びHB-EGFの分泌を促進し，周皮細胞や平滑筋細胞を血管内皮の周囲に引き寄せる[9,10,11]。その後，Tie-2シグナルは抑制され，内皮細胞と間葉系細胞の接触により活性化されたTGF-βは内皮細胞の増殖を抑制し，ECMの蓄積を促し，間葉系細胞の動員と遊走，周皮細胞や平滑筋前駆細胞の分化を誘導して，血管構築を終了する[12]。間葉系細胞の動員及び遊走，周皮細胞や平滑筋前駆細胞の分化誘導が障害されると，VMsに見られるような血管壁の薄い内腔の拡張した異常血管が形成されるものと考えられている。

我々は，37症例のVMsにおける，Tie-2-TK領域の変異を検討し9症例において現在までに報告されていない変異を2種類同定した。Tie-2-TK領域の変異は野生型に比べ，自己リン酸化活性が上昇していた。この活性型遺伝子は，JAK/STAT1系シグナル経路を活性化する[13]。TGF-βはECMの蓄積及び間葉系細胞の周皮細胞や平滑筋細胞への分化を促進することから，血管壁に平滑筋細胞が欠損する原因として，JAK/STAT1系によるTGF-βシグナルの抑制が考えられる。VEGFは内皮細胞の遊走，増殖とECMの消化を促進し，angiogenicに作用すると考えられている[6,12]。我々が今回報告したG833D変異症例における緩慢な増殖及び術後の再発は，VEGF蛋白の高発現が関与している可能性が考えられた。一方，Q837H変異症例ではVEGFの発現はほとんど認めず，平滑筋細胞及び周皮細胞は円形を呈したことから，平滑筋細胞の分化が阻害されていることが考えられた。さらに，3次元ゲル内培養系から，Tie-2シグナルはstroma細胞の血管周囲への動員と周皮細胞や平滑筋細胞への分化に関与しているのみならず，内皮腔形態の構築にも重要な働きをしていることが示唆された。また，Q837H変異を伴うVMsで極端に内皮細胞数が少なかったのは，p38 MAPKシグナルが内皮細胞の遊走を阻害することに起因すると考えられた。

以上の結果から，Tie-2チロシンキナーゼ領域の変異の質的差異はその臨床像，組織像や臨床経過にも強く反映することが明らかとなり，遺伝

子診断や分子診断の有用性が示唆された。従来，VMs患者では臨床症状に乏しいため，若年期から診断する事は困難であったが，本遺伝子診断により早期に発見することが可能となった。今後さらに，日中共同でVMsの治療及び遺伝子診断さらにその発症機序の解明を進める必要がある。

文　献

1) Mulliken J.B. et al: *Surgery* 92: 348-353, 1982

2) Berthelsen B. et al: *Acta Radiologica Diagnosis* 27:149-155, 1986

3) Boon, L.M. et al: *Hum. Mol. Genet.* 3: 1583-1587, 1994

4) Dument,D.J. et al: *Genomics* 23: 512-513, 1994

5) Vikkula M. et al: *Cell* 87: 1181-1190, 1996

6) Hanahan D. et al: *Science* 277: 48-50, 1997

7) Dumont D.J et al: *Genes Dev.* 8: 1897-1909, 1994

8) Suri C. et al: *Cell* 87: 11, 1996

9) Carmeliet P. et al: *Nature* 380: 435-439, 1996

10) Lindahl P. et al: *Science* 277: 242-245, 1997

11) Bornfeldt K.E. et al: *J. Clin. Invest* 93: 1266-1274, 1994

12) Folkman J. and D'Amore P. et al: *Cell* 87: 1153-1155, 1996

13) Korpelainen E.I. et al: *Oncogene* 18: 1-8, 1999

日本財団補助金による
２０００年度日中医学学術交流促進事業

①. 調査・共同研究助成

(9) 漢薬「紫蘇」及び「細辛」の多様性と品質評価

漢薬「紫蘇」および「細辛」の多様性と品質評価

本多義昭
京都大学大学院薬学研究科
教授

要旨

品質確保の上から遺伝的多様性の制御は重要であり、精油含有生薬類の「紫蘇」と「細辛」とをとりあげ、共同研究を行った。その結果、紫蘇においては、日中で主たる精油型に違いがあること、また新精油型の存在が明らかになった。また、雲南省の一部の地域では、*Microtoena*属植物が、紫蘇の異物同名品として使われていることが判明した。また、中国におけるシソ属の野生種として、レモンエゴマとトラノオジソの存在を確認した。現在日本市場の細辛に日本産はなく、いずれも中国産のケイリンサイシン由来の北細辛であった。また、中国国内では７割以上が北細辛で、この他、単葉細辛やウスバサイシン由来の華細辛も見られた。精油成分の含量および組成から、北細辛と華細辛は類似するが、個々に変異があり、その実態は明らあかではなく、さらに検討の余地がある。

KEY WORDS: 紫蘇、細辛、精油成分、モノテルペン、フェニルプロパノイド

研究報告

目的

漢方医学や中医学で用いられる薬物は天然物であることから、その品質は必ずしも一様ではなく、すぐれた品質を確保することは日常の現場における重要な課題である。薬物という視点から、漢薬の異物同名は言うまでも無いが、今後は全ての生物種に内在し得る遺伝的多様性、とりわけ活性成分に関する多様性について、その実態把握と制御を追求することが、品質確保の上からも重要であると考えられる。

そこで本研究では、多様性が見られる典型として、精油含有生薬類の代表である「紫蘇」と「細辛」をとりあげた。紫蘇は栽培植物として長い歴史をもっており、細辛は様々なエコタイプが見られることが知られている。いっぽう、両生薬の原植物が属する植物群は、それぞれシソ科とウマノスズクサ科とで異なるものの、両者ともフェニルプロパノイド系およびモノテルペン系の精油成分を産生・蓄積するという共通の生物学的特徴をもっている。また両者は、近年の研究によって、精油成分に関する種内の化学的多様性が比較的良く知られている植物群である。加えて、この両生薬の原植物は日中双方に野生または栽培があり、共同研究に適した素材であると考えられた。

方法

①紫蘇：本多義昭は、これまで日本産シソ属植物を中心に、植物分類学的研究や分子系統学的研究、精油型生成に関する遺伝解析や精油成分の生合成機構の解明、薬理活性研究など多面的な研究を行ってきた。本共同研究では、これらの方法を中国産に応用して、実態を把握、日本産のものと比較考察する。

②細辛：本生薬については、中国側共同研究者の蔡少青がこれまで化学的品質評価を中心に研究を行ってきた。本共同研究では、細辛原植物の確定と種に固有の精油型との関係など生物学的理解を進め、日中両国の多様な市場品の基原を明らかにする。

結果

1. 「紫蘇葉」および「紫蘇子」

中国各地由来の市場品「紫蘇葉」を収集し、形態学的に検討したところ、その基原はいずれも*Perilla frutescens* Britton由来のものであることを確認した。しかし精油型については、いずれの試料も収穫後時間が経過していたためか、殆ど判定できなかった。いっぽう「紫蘇子」については、殆ど全てが*P. frutescens*由来のものであったが、1市場品から、近縁の*Mosla*属植物由来の分果が混在していることが、播種実験から確認された。また、これら「紫蘇子」由来の植物について精油成分を分析したところ、ペリラケトン(PK)を主成分とするPK型のほか、日本産シソに見られない新精油型として、ピペリテノン(PT)を主成分とするPT型とアピオール(AP)を主成分とするフェニルプロパノイド型(PP-A)の2種の精油型の存在が明らかになった。また、わが国で最も多いペリラアルデヒド(PA)型の紫蘇の存在は確認できなかった。

雲南省大理で白族が「紫蘇(ツースー、tsusu)」と称して栽培していたものは、茎葉の形態的特徴や、風邪や風寒に用いるという効能・効果の点から、当初、*P. frutescens*の一変種であると推定された。しかし、このものは同じシソ科の多年生草本の*Microtoena*属植物であることが明らかとなった。

これまで、中国の各植物誌には、シソ(*Perilla*)属植物として唯一種*Perillafrutescens*のみ記載されてあった。今回、北京の中国科学院標本館と南京植物研究所標本館を訪問し、中国各地のシソ(*Perilla*)属植物の標本を全て閲覧・観察した。その結果、これまで中国では未記載のレモンエゴマ*Perilla citriodora* Nakaiとトラノオジソ*P. hirtella* Nakaiが中国南部（長江流域）に野生することが明らかとなった。

2. 「細辛」

中国市場品「細辛」について基原植物の同定を行った。最も繁用されるものは北細辛（ケイリンサイシン）*Asarum heterotropoides* Fr. Schmidt var. *mandshuricum* Kitag. (=*Asiasarum heterotropoides* F. Maekawa var. *mandshuricum* F. Maekawa)で70%以上がこのものに由来している。次いで、単葉細辛*A. himalaicum* Hook. f. et Thoms. ex Klotzsch.、華細辛（ウスバサイシン）*A. sieboldii* Miq.、杜衡*A. forbesii* Maxim.、小葉馬蹄香*A. ichangense* C,Y, Cheng et C.S. Youngの順に少なくなる。いっぽう、日本産のものはウスバサイシン由来のものであったが、現在ではその生産はない。現在日本市場で見られる細辛は、多く中国産の北細辛である。

また、精油含量を検討したところ、北細辛、漢城細辛、華細辛は、それぞれ、2.5~3.0%、1.0~2.0%、2.6%であった。さらに、北細辛、華細辛、杜衡3種について精油成分の比較を行った。その結果、前2種は精油主成分としてmethyleugenolをそれぞれ、20.37%、16.92%含んでいた。第2成分は、北細辛はsafrole(11.70%)、華細辛は1,8-cineole(12.43%)で、これ以外にも成分組成に違いがあった。杜衡の場合、methyleugenolは8.62%であった。ただし、杜衡の主成分はasarone（9.68%）で、asaroneは北細辛、華細辛には全く検出されなかった。

中国薬典に収載されている北細辛、漢城細辛および華細辛3種は、根表面が褐色で断面は類白色で、根の直径が約1.0mmであったが、根表面と断面ともに褐色で、根直径0.5mm以下である単葉細辛とも、根直径が2.0mmに達する杜衡や小葉馬蹄香などとも明らかに異なっていた。

考察

1. 紫蘇

市場品として見られる紫蘇の精油型は、日中両国間で相違点が認められる。すなわち、日本産のものは殆どがPA型であるのに対し、中国産のものはPK型が主であるなど、日本と中国とで相違点があった。このことは、今回の市場品のみならず、過去に得た市場品でも同様であった。このような違いは、「紫蘇の香り」に関して、日本と中国とで認識が違っているという可能性を示唆している。今後、この点についてはさらに検討を続けて行く必要があると思われる。

白族が使用していた「紫蘇」は、*P. frutescens*ではなく、中国において紫蘇に同名異物があることが明かとなった。「雲南植物誌」によれば、同省には*Microtoena*植物は１１種３変種が知られている。このうち薬用途が記載されているものは、真冠唇花 *M. pachoulii* C.Y. Wu et Hsuan ex Hsuanのみである。本植物は雲南省西南部の２０００mまでのところ、林の下あるいは縁に自生するもので、インドまで分布があり、薬用には風邪や風寒に用いられている。しかしながら、毛冠唇花*M. mololis* Levl. や雲南冠唇花 *M. delavayi* Prain なども原植物である可能性を否定できない。今後、本植物は分類学的同定を行い、精油成分についても明らかにしてゆく必要があると考えられる。

1996年、本多は昆明植物園の*Perilla*属標本を観る機会があり、その際、中国においてもレモンエゴマ*P. citriodora*とトラノオジソ*P. hirtella*の野生があることをほぼ確認していた。今回の２標本館の標本観察によって、その分布域もほぼ明かとなったが、今後は更なる現地調査や形態、精油成分の分析を行って、日本産のものと比較検討を行う機会を得たいと考えている。

2. 細辛

本草学的に細辛は、華細辛が正品と考えられる。しかし現在、中国薬典では細辛として、北細辛、漢城細辛、華細辛の３品が挙げられ、また薬用部位は全草とされている。いっぽう、日本薬局方では、北細辛と華細辛とに規定されていて、薬用部位は根であるとされる。この点、日中間で明らかな相違がある。中国市場品は地方によって異なる細辛（土細辛）があり、必ずしもこれら３種に限られていない。成分組成や薬理活性を考慮に入れると、やはり、各種の土細辛や杜衡は区別して使用されるべきものであろう。

わが国のウスバサイシン*A. sieboldii* Miq.は、その精油成分組成が東のものと西のものとで相違が有る事が知られている。すなわち、主精油成分はどちらもmethyleugenolであるが、副成分は東のものはeucarvone、西のものは1,8-cineoleであるという。このような同様の種内変異が、広大な中国の細辛原植物にも見られることは容易に予想される。しかしながら、そのことについては、多くの野生品の収集を行う必要があり、今後の大きな課題であろう。

参考文献

1. A. Yuba,et al, Genetic analysis of essential oil variants in *Perilla frutescens,* Biochemical Genetics **33**(9/10) 341-348 (1995)
2. M. Ito et al, Phylogenetic analysis of Japanese *Perilla* species by using DNA polymorphysms, Natural Medicines **52**(3) 248-252 (1998)
3. 蔡少青ほか、細辛類薬材的性状研究、中国薬科大学学報、28巻、46-49、（1996）
4. 蔡少青ほか、中薬細辛商品薬材的基源研究、中国中薬雑誌、21巻、712-717、（1996）

日本財団補助金による
２０００年度日中医学学術交流促進事業

③．中国人研究者・医療技術者招聘助成事業

（1）虚血性神経傷害のメカニズム解明と治療法の開発に関する研究

日本財団助成金による

2000 年度日中医学学術交流促進事業報告書

－中国人研究者・医療技術者招聘助成－

財団法人 日 中 医 学 協 会

理事長 中 島 章 殿

年 月 日

研究発表中または研究中の本人のスナップ写真、及び発表論文等のコピーを添付

1．招へい責任者 永田 泉 (永田)

所属機関 国立循環器病センター 職名 脳神経外科部長

所在地 〒565-8565 大阪府吹田市藤白台5-7-1 電話 06 6833 5012

招へい研究者氏名 蒋 暁帆

所属機関 第四軍医大学西京病院脳神経外科 職名 助手

研究テーマ 虚血性神経傷害のメカニズム解明と治療の開発に関する研究

2．日本滞在日程

2000年8月3日 関西空港到着（Mu515便）
同日より国立循環器病センター・レジデント宿舎に寄宿し、研究に従事。
2001年4月より 当センターで脳科学研究員として研究を継続する予定。

3．研究報告

別紙書式により、報告本文4000字以上(英文は2600語以上)で報告して下さい（枚数自由・ワープロ使用）

タイトル・要旨等は日本語で、KEY WORDS以下は日本語或いは英語で記入、使用文字はタイトル１３ポイント、その他は１０ポイント、日本語は明朝体を使用して下さい。

研究成果の発表予定がある場合は発表原稿・抄録集等を添付して下さい。

論文発表に当っては、*日中医学協会助成事業－日本財団助成金による*旨を明記して下さい。

虚血性神経傷害のメカニズム解明と治療の開発に関する研究

来日研究者氏名: 蒋暁帆 (Jiang Xiao-Fan)
所属・役職: 第四軍医大学西京病院脳神経外科助手

招聘者氏名: 永田 泉
所属: 国立循環器病センター脳神経外科
役職: 部長

要 旨

「緒言」マトリックス・メタロプロテアーゼ(matrix metalloproteinase: MMP)が脳傷害に関与するという報告がある。我々は、局所脳虚血による脳梗塞形成に MMP が関与するかを調べた。
「方法」
雄 ICR(18—22ｇ)マウスを用いた。ハロセン麻酔下に左頸動脈を露出し、8—0ナイロンフィラメントを外頸動脈より挿入、先端を 起始部まで進め中大脳動脈を閉塞し、局所脳虚血を誘導した。虚血後の局所脳血流量、動脈圧、動脈血ガス分圧、pH、直腸温をモニターした。 (0.5%カルボメチルセルロースに溶解)を皮下注射により投与した。MMP の活性をゲラチンを基質とする zymography により調べた。中大脳動脈閉塞 24 時間後に脳を取り出し冠状断を作成、2%TTC 溶液により染色し、脳梗塞領域を測定した。各脳断面の脳梗塞領域を加算することにより、脳梗塞体積を算出した。
「結果」zymography を用いて、中大脳動脈閉塞 6 時間後より MMP-9 の活性が虚血脳半球に検出された。MMP 阻害剤 (100mg/kg)の中大脳動脈閉塞 30 分前投与は、中大脳動脈閉塞 24 時間後の MMP-9 活性を有意に減弱させた。また、KB-R7785(0、30、100mg/kg)は、濃度依存性に脳梗塞体積を減少し、100mg/kg 投与では、溶解液投与に比べて有意に脳梗塞体積を縮小させた。 さらに、KB-R7785(100mg/kg)の 3.5 時間間隔による 2 回繰り返し投与では、中大脳動脈閉塞開始 1 時間後の投与でも有意な脳梗塞体積縮小効果が得られた。
「結論」以上の結果は、 MMP-9 の活性化が局所脳虚血による脳梗塞形成に重要な役割を果たしていることを示す。MMP-9 阻害による脳虚血急性期治療の可能性を示唆するものと考えられる。

KEY WORDS

Cerebral ischemia, focal – matrix metalloproteinase – infarct – activity – MCAO

A novel (MMP) inhibitor KB-R7785 attenuates brain damage resulting from focal cerebral ischemia in mice

Abstract

Background and purpose- Matrix metalloproteinases (MMPs) are a family of proteolytic enzymes that can degrade all of the extracellular matrix when they are activated. In normal conditions, they are involved in tissue development, bone remodeling, wound healing, implantation, and ovulation and are strictly regulated of their activities by multiple factors. Over-expressions and abnormal activities of MMPs would lead to tissue injury. In brains, the main components of cerebral vascular basement membrane are type IV and V collagen and laminin, fibronectin that are the substrates of gelatinase A (MMP-2) and gelatinase B (MMP-9). It has suggested that MMP-9 and MMP-2 were involved in brain damage after focal cerebral ischemia by disrupting the blood brain barrier, contributing to brain edema, facilitating invasion of inflammatory cell and promoting neuronal cell death. The present study intended to investigate the effect of a new inhibitor of MMPs, KB-R7785, on ischemic stroke.

Methods- Adult male ICR mice (18 to 22 g, n=110) were randomly subdivided into 9 groups treated with KB-R7785 and corresponding vehicle in single pretreatment with different doses (30mg/kg, 100mg/kg,) and in repeated administrations (100mg/kg) at different time points (**A**: 30minutes before and 3 hours after MCAO; **B**: 1 hour and 4.5 hours after MCAO; **C**: 3 hours and 6.5 hours after MCAO). Ischemia was induced by intraluminal permanent MCAO under halothane anesthesia. rCBF and body temperature were monitored during surgery. The infarction volumes at 24 hours after MCAO were determined with 5 equidistant coronal sections stained with 2% TTC. MMPs zymography was conducted with brain tissues from other separate mice subjected to ischemia.

Results- The zymogram showed that MMP-9 is activated initially 3 hours after MCAO and maximized at 24 hours after ischemia. Single injection of KB-R7785 attenuated infarction size in a dose dependant manner; by 20% and 39% with 30 mg/kg and 100 mg/kg, respectively. In repeated administration groups, KB-R7785 showed decreasing lesion ranges in a certain time window. The lesion volumes were significantly decreased in group A and B ($p<0.01$, Scheffe and t test) but not in group C. There were no differences in body temperature and %rCBF reductions between each group.

Conclusions- We demonstrated that the new inhibitor of MMPs KB-R7785 has a beneficial effect against ischemic brain injury, and our data provides further evidence that MMP-9 is activated after cerebral ischemia, contributing to brain infarct formation.

Introduction

Matrix metalloproteinases (MMPs) are a group of zinc-containing protease that can proteolytically degrade and remodel extracellular matrix components (EMC). They have wide substrate specificity and provide tissue with the collective ability to degrade collagens, laminin, gelatin, elastin fibronectin, and proteoglycans. According to their substrate specificity, MMPs are classified as collagenase (Type I collagenase/MMP-1); gelatinase A (72-kDa Type IV collagenase/MMP-2); stromelysins (MMP-3, -10 and -11); uterine metalloproteinase (PUMP-1/MMP-7); neutrophil collagenase (MMP-8); and gelatinase B (92-kDa Type IV collagenase/MMP-9) (11). MMPS physiologically benefits tissue development, wound healing, bone growth, ovulation and angiogenesis; meanwhile they would pathologically promote a variety of disease processes such as tumor invasion and metastasis, rheumatoid arthritis and atherosclerosis as well as multiple sclerosis, Alzheimer's disease and malignant gliomas in central nervous system (13). On account of this feature, MMPs are tightly controlled by multiple steps. Initially they are all released as latent forms that may be proteolytically activated by cleavage of amino-terminal propeptides

at a conserved sequence. This cleavage can be mediated by serine protease or plasmin or undergo autocatalytic activation. The activities of MMPs are regulated by gene expression, proenzyme activation, and inhibition of active enzymes by their specific tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs).

Recently, MMPs have been implicated in pathogenesis of brain injury after cerebral ischemia (1,5,7,9). Among MMPs, MMP-2 and MMP-9 attack type IV collagen, laminin, and fibronectin, which are the major components of the basal lamina around the cerebral blood vessels and define blood brain barrier (13). It has been reported that the expression and activities of MMP-2 and MMP-9 was elevated after onset of stroke in human patients (2). Animal model study also showed that level of MMP-9 in ischemic brain was increased quite early and was related to the destruction of blood brain barrier, contributing to the increases of permeability of BBB and promoting brain edema (9). MMPs may also promote tissue invasion of neutrophils and macrophages, and contribute to hemorrhages that result after reperfusion of ischemic tissue (7). It suggested that MMP-9 may be a potential target of therapeutical treatment (12,10). Related studies have shown that some inhibitors of MMPs can reduce infarct size after ischemia and MMP-9 gene knock-out mouse showed reduced brain damage compared with that in wild-type mouse (4, 10). But so far there's no report showing a direct evidence in vivo that synthetic inhibitor of MMPs exert its neuroprotection by downregulating the activity of MMP. In this study, we investigated the effect of a new synthetic inhibitor of MMPs, KB-R7785 (6,8), on focal cerebral ischemia in mice in different dose and determined the therapeutic time window and further we compared the activities of MMP-9 between drug-treated group and vehicle group using gelatinase zymography and activity assay.

Materials and methods

Focal cerebral ischemic model in mice

One hundred forty-seven adult male ICR mice (18 to 22 g) were used in the study. The procedures performed following the National Cardiovascular Center's guidelines for animal care and experiments. The focal ischemia was induced by permanent intraluminal middle cerebral artery occlusion method. Mice were anesthetized with 1.0% halothane in 70% N_2O and 30% O_2 using a vaporizer (Halowick, Muraco Medical, Tokyo, Japan). The right femoral artery was cannulated for measuring blood pressure and collecting arterial blood sample. Rectal and temporal muscular temperatures were maintained at 37℃ with a thermostat and a heating pad (NS-TC, Neuroscience, Tokyo, Japan; and BAT-12, Physitemp, NJ). Following a midline skin incision and exposing of left carotid artery, an 8-0 nylon monofilament coated with a silicon resin/hardener mixture was introduced into the left internal carotid artery through left external carotid artery, up to the origin of the middle cerebral artery and left for 24 hours. Regional cerebral blood flow (rCBF) was monitored with laser Doppler flowmetry during operations (to confirm the induction of focal ischemia and to control the reductions of CBF between groups within a comparable range). Sham control animals were just subjected to exposing of left carotid artery without occluding middle cerebral artery. All the animals were kept in a 32℃ incubator (Thermocare, Incline Village, NV) for 3 hours after surgery.

Administration of matrix metalloproteinase inhibitor KB-R7785

KB-R7785 (New Drug Discovery Research Lab. Of Kanebo, Ltd, Osaka, Japan) was suspended in 0.5% carboxymethyl cellulose (CMC) and administered subcutaneuously. To

determine its efficacy on infarct volumes, single as well as twice dose were administered in separate group. Single dose was given 30 minutes before ischemia onset with different dosage (30mg/kg n=15, 100mg/kg n=15) in each subgroup; Twice administration (100mg/kg per dose) was also subdivided into 3 subgroups by different time point at which drug were given. To prepare for tissue extracts used in testing the effect of KB-R7785 on inhibition of MMP activity, another separate single-dose group (100mg/kg, n=8) was treated. Every corresponding vehicle control received 0.5% carboxymethyl cellulose (CMC).

Infarct measurement

Mice were killed 24 hours after ischemia onset. The brain was cut into 5 coronal 2-mm-thick sections, and stained with 2% 2.3.5-triphenyltetrazolium chloride (TTC) for 30 minutes and then fixed in 10%formalin solution for more than 3 hours. Infarct volumes were measured with standard computer-assisted image analysis technique.

Preparations of brain tissue extracts

To determine the gelatinase activity at different time point in ischemic brain, mice were killed at 1,3,6,12,24 hours after MCAO (n=4 per time point). While in single treated mice (n=8) and its corresponding control (n=7), this procedure was performed only at 24 hours. Sham-operated control (n=2) was also performed at 24 hours. The brains were removed immediately and divided into ispilateral ischemic and contralateral noischemic hemispheres.

Hemispheric tissue was quickly frozen in liquid nitrogen and then stored at −80℃until use. Tissue samples were homogenized on ice with a Potter glass homogenizer in lysis buffer (50mM Tris-HCl pH 7.6, 150mM NaCl, 0.5% IGAPAL, 0.1% BRIJ, 0.1% deoxycholic acid) including protease inhibitors (10μg/ml leupeptin, 2μg/ml aprotinin, and 1mM PMSF). The homogenates were then centrifuged at 14,000×g for 15 minutes at 4℃.

Supernatants were collected, and the total protein concentrations of them were determined by Bradford assay using a Beckman spectrophotometer (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, U. S. A.).

MMP zymography

Ten microliters (10ul) of total protein extract from per sample was prepared and standardized the protein concentration to 3ug/uL. Ten microliters of 2×sample buffer (125mM Tris-HCl, 20% glycerol, 2% sodium dodecyl sulfate, 0.005% bromophenol blue) was added to each protein extract. The prepared samples (30ug/20ul) were loaded on lanes of 7.5% polyacrylamide gel containing 1mg/ml gelatin as substrate. Electrophoresis was performed with a Tris-glycine running buffer at 4mA constant current for 1.5 to 2 hours. The gel was removed and incubated in renaturing buffer (2.5% Triton-X 100 in distilled water) at room temperature with gentle agitation for 1 hour. Replaced renaturing buffer with developing buffer (50mM Tris-HCl pH 7.5, 200mM NaCl, 5mM $CaCl_2$, 0.2% BRIJ 35), the gel was incubated on a rotary shaker at 37℃ for 20 minutes then for 24 hours with refreshed developing buffer. After developing, the gel was stained with 0.5% Coomasie Blue R-250 for 30 minutes and then destained in 30% methanol and10% acetic acid properly.

Statistical analysis

Data were expressed as mean±SEM. For statistical analysis of infarct volumes in each group, an ANOVA was followed by Scheme and student's t test. For physiological parameters, t test was used. All these statistical analysis were performed with Statview J-4.5 software. Statistical significance was accepted when $p<0.05$.

Results

KB-R7785 inhibits MMP-9 activity after permanent cerebral ischemia

First we examined the MMP activities ischemic brain .We observed a light band of 98 kD molecular weight which should reflect the activity of gelatinase B (MMP-9) on blue background zymographic gel was initially detected at 6 hours after MCAO and increased its density with time course, reached to its peak at 24 hours after ischemia whereas in contralateral hemispheres this band was defective (Figure 1).

The effect of KB-R7785 on inhibiting the activity of MMP-9 was then investigated using this technique. Compared with vehicle control (n=9), pretreatment with KB-R7785 (100mk/kg, n=10) 30 minutes before MCAO showed a reduced band 98 kD representing the inhibition of MMp-9 activity (Figure 2A). Densitometric analysis showed that KB-R7785 significantly inhibited activity of MMP-9 ($p<0.05$; figure 2B).

KB-R7785 reduces brain infarction

Next we examined whether KB-R7785 protects brain against cerebral ischemia. Pretreatment with KB-R7785 30 minutes before MCAO reduced brain infarction in a dose dependent manner (Figure 3). Compared with vehicle-control group (n=15), high dose-treated (100mg/kg) group significantly reduced the infarct size by 39% ($p<0.01$, n=16). There were no differences in body temperature and %rCBF reductions as well as mean arterial blood pressure and blood gas analysis between each group (Table 1).

Delayed treatment of KB-R7785 at 1 hour is protective

Finally, to evaluate the therapeutic time window of KB-R7785, repeated administrations

(100mg/kg per dose) with an interval of 3.5 hours were performed at 3 different time points in 3 groups. Group A was injected 30 minutes before and 3 hours after MCAO; group B was administrated 1 hour and 3.5 hours after MCAO while group C was given 3 hours and 6.5 hours after ischemia. Each group was paired with corresponding vehicle control in which mice only received 0.5% CMC solution with same volume and administration as their KB-R7785 partners. The comparisons of infarct volumes in each group were as follows: $160.6 \pm 7.8 mm^3$ (n=9) vs $97.2 \pm 5.7\ mm^3$ (n=10, $p<0.001$); $144.5 \pm 7.5\ mm^3$ (n=12) vs $107.6 \pm 5.6\ mm^3$ (n=10, $p<0.05$); $157.4 \pm 9.0\ 6\ mm^3$ (n=9) vs $147.3 \pm 5.2\ mm^3$ (n=10, $p>0.05$) (Figure 4). The data suggested that KB-R7785 exerted its effect of reducing infarct size when it was administered between the time points of 30 minutes before and 1 hour after induction of cerebral ischemia. Beyond 3 hours after cerebral ischemia onset, it showed no protective effect on ischemic brain injury.

Discussion

The present study demonstrated that (I) KB-R7785 has a protective effect on ischemic stroke by reducing the infarct size; (II) KB-R7785 can inhibit the level of MMP-9 activity after onset of cerebral ischemia. Apart from these, KB-R7785 didn't apparently affect the physiological parameters and showed no detectable side effect.. It has been well defined by others that MMP-9 was involved in the pathogenesis of brain damage (10) but the mechanism underlying the effect of KB-R7785 remains unclear. Our data just provided a possibility that KB-R7785 may exert its brain protection by inhibiting the activity of MMP-9 after ischemia. As we have known, the activation of MMPs after ischemia involves multifactorial events. Some immediate early gene and cytokines such as c-fos, c-jun and tumor necrosis factor-α are increased in ischemia These factors can bind to the AP-1binding site of gelatinase B (MMP-9) and further promote activation

of MMP-9 (12). It has been demonstrated that KB-R7785 can effectively inhibit the expression of TNF-α (6, 8). This indirectly explained that KB-R7785 may exert its brain protection by inhibiting the activation of MMP-9.

Current study also determined the time course of MMPs expression and therapuetical time window of KB-R7785. The data showed that MMP-9 was initially expressed at 6 hours after ischemic insult and peaked at 24 hours. Although this result appeared much delayed than other's data, it still reflected some tendency that MMP-9 was expressed and activated at early period. And this time course was consistent with that of TNF-α elevation. The therapeutic time window indicated that KB-R7785 could protect brain injury when it was injected 30 minutes before and 1 hour after MCAO. Considering the time it would take for the drug to be absorbed, we may postulate that KB-R7785 protected brain injury by inhibiting the early activation of MMP-9. This temporal relationship between time course of MMP–9 activation and therapeutical time window of KB-R7785 provide further indirect evidence that KB-R7785 protect brain injury by inhibiting MMP-9 activity.

In conclusion, our study demonstrated that KB-R7785, a novel inhibitor of MMPs has a dramatic effect of protecting brain tissue from injury, the result suggested that MMPs inhibition may be a potential strategy in stroke treatment and provide another evidence that MMPs are involved in the pathology of cerebral ischemia.

References

1. Heo JH, Lucero J, Abumiya T, Koziol JA, Copeland, del Zoppo GJ (1999) Matrix Metalloproteinases Increase Very Early During Experimental Focal Cerebral Ischemia. *Blood Flow Metab* 19:624-633

2. Clark AW, Krekoski CA, Bou S, Chapman KR, Edwards RE (1997) Increased gelatinase A (MMP-2) and gelatinase B (MMP-9) activities in human brain after focal ischemia. *Neurosci Lett*

238:53-56

3.Asahi M, Asahi K, Wang XY, Lo EH. (2000) Reduction of tissue plasminogen activator-induced hemorrhage and brain injury by free radical spin trapping after embolic focal cerebral ischemia in rat *Blood Flow Metab* 20: 452-457

4.Wang XY, JunJC, Ashahi M,Chwang W, Russo L, Moskowitz MA, Dixon C.E,Fini M.E, Lo EH (2000) Effects of matrix metalloproteinase-9 gene knock-out on morphologicaland motor outcomes after traumatic brain injury *J Neurosci* 20 (18):7037-7042

5. Rosenberg GA, Navratil M, Barone F, Feuerstein G (1996) Proteolytic cascade enzymes increase in focal cerebral ischemia in rat *Blood Flow Metab* 16:360-366

6. Morimoto Y, Nishikawa K, Ohashi M (1997) KB-R7785, a novel matrix meta;;oproteinase inhibitor, exerts its antidiabetic effect by inhibiting tumor necrosis factor-α production *Life science* 61 (8):795-803

7.Romanic AM, White RF, Arleth AJ, Ohlstein EH, Barone FC (1998) Matrix metalloproteinase expression increased after cerebral focal ischemia in rat *Stroke* 29:1020-1030

8.Hattori K, Hirano T, Ushiyama C, Miyajima H, Yamakawa N, Ebata T, Wada Y, Ikeda S, Yoshino K, Tateno M, Oshimi K, Kayagaki N, Yagita H, Okumura K (1997) A metalloprteinase inhibitor prevents lethal acute graft-versus-host disease in mice *Blood* 90 (2): 542-548

9.Gasche Y, Fujimura M, Morita-Fujimura Y, Copin JC, Kawase M, Massengale J, Chan PH (1999) Early appearance of activated matrix metalloproteinase-9 after focal cerebral ischemia in mice: a possible role in blood grain barrier dysfunction *Blood Flow Metab* 19:1020-1028

10. Ashahi M, Ashahi K, Jung JC, del Zoppo GJ, Fini ME, LO EH (2000) Role for matrix metalloproteinase 9 after focal cerebral ischemia:Effects of gene knockout and enzyme inhibition with BB-94 *Blood Flow Metab* 20:1681-1689

11. Yong VW, Krekoski CA, Forsyth PA, Bell R, Edwards R (1998) Matrix metalloproteinases and diseases of the CNS *TINS* 21 (2): 75-80

12.Mun-Bryce S, Rosenberg GA (1998) Matrix metalloproteinases in cerebrovascular disease *Blood Flow Metab* 18:1163-1172

13. Lukes A, Mun-Bryce S, Lukes M, Rosenberg GA (1999) Extracellular matrix degradation by metalloproteinases and central nervous system diseases *Molecular Neurobiology* 19 (3): 267-284

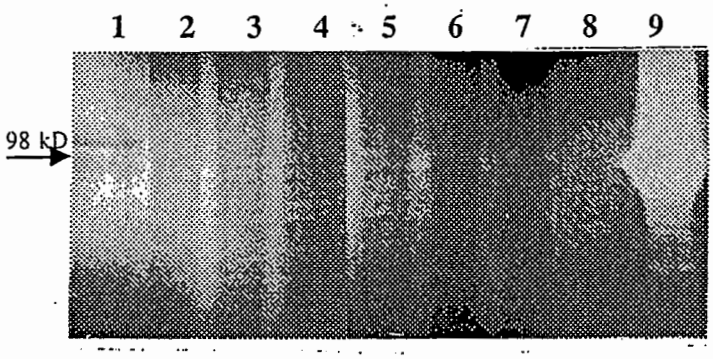


Figure 1 The gelatin zymogram showing time-dependent change in MMP-9 activity after brain ischemia. Lanes are as follows: 1, molecular weight marker; 2, sham; 3, 1hour; 4, 3hour; 5, 6 hour; 6, 12 hour; 7, 24 hour; 8, blank; 9, standard MMP-9. The band at 98 kD level initially appeared at 6 hour and further increased until 24 hour after ischemia.

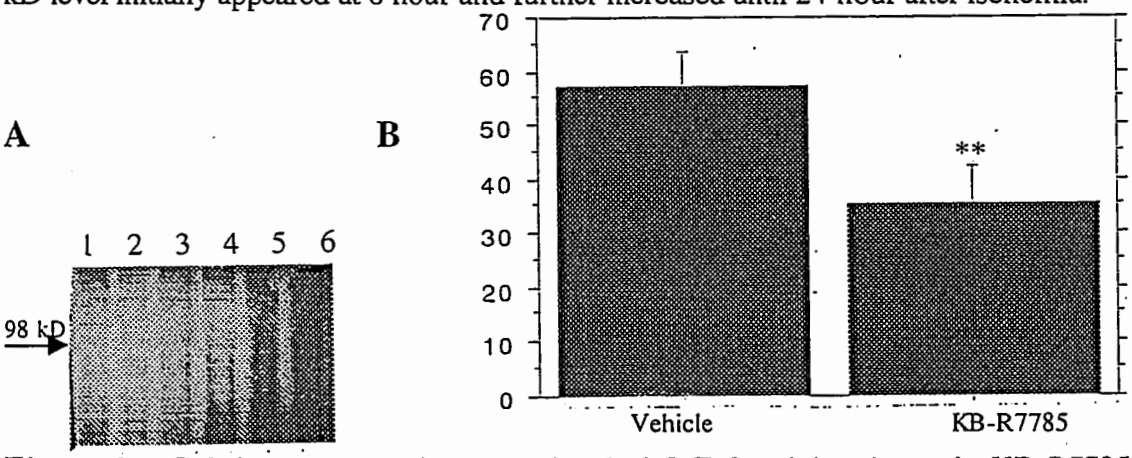


Figure 2 Gelatin zymogram demonstrating the MMP-9 activity change in KB-R7785 treated mice. (A) Lane 1, 2, 3 represent vehicle-control group and Lane 4, 5, 6 represent KB-R7785 treated group. All of these brain samples were taken at 24 hours after MCAO. From the zymogram we can easily identify that 98 kD band in vehicle group appeared more bright than that in KB-R7785 treated group, indicating that KB-R7785 inhibits activity of MMP-9 in ischemic brain. (B) Comparison of the density of 98 kD band reflecting MMP-9 activity between vehicle- and KB-R7785 treated mice. N = 9 and 10 for vehicle and KB-R7785, respectively. Data are mean ± SEM. **, $p < 0.01$ as compared with controls.

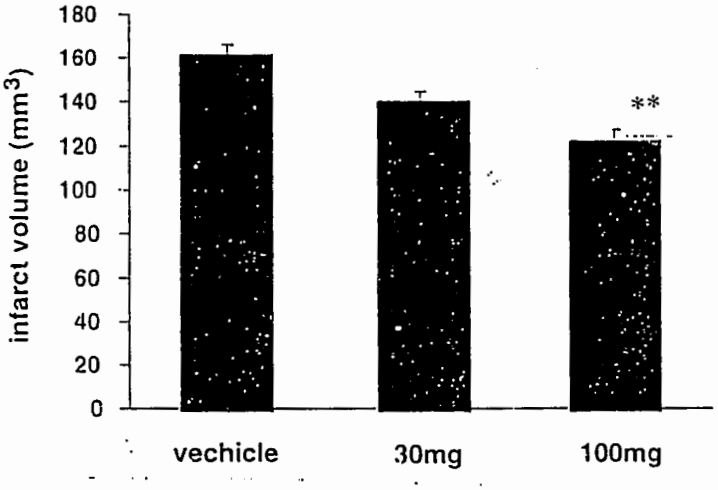


Figure 3 KB-R7785 reduces infarct volume in a dose-dependent manner when administered 30 minutes before MCAO. Infarct volume was determined at 24 hours after MCAO as described in methods. Treatment with KB-R7785 (100mg/kg) significantly decreased infarct volume compared with vehicle. n = 15-17 in each group. Data are mean±SEM. **, $p < 0.01$ as compared with controls.

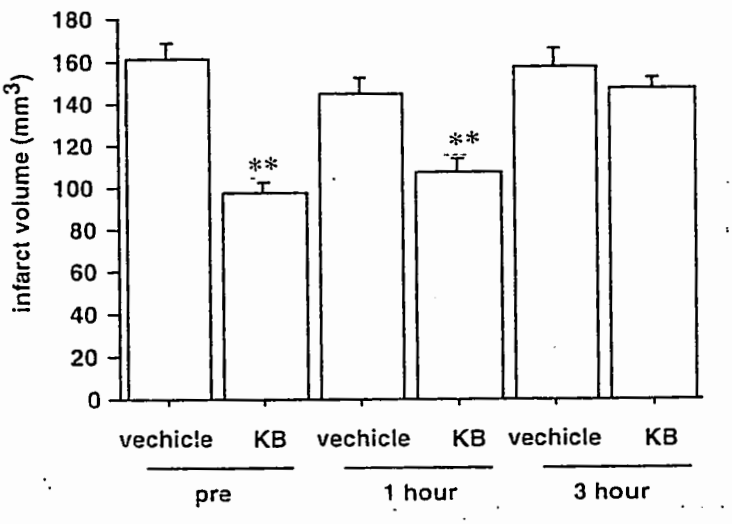


Figure 4 Delayed administration of KB-R7785 at 1 hour after MCAO protect brain against ischemia. Mice received initial injection of vehicle or KB-R7785 (100mg/kg) at 30min before (pre), or 1 or 3 hour after MCAO and then the second injection 3.5 hours thereafter. Infarct volume was determined at 24 hours after MCAO. KB-R7785 injection initiated at 30 min before and 1 hour after MCAO significantly reduced infarct volume compared with their vehicle-injected control. n = 7-9 in each group. Data are mean ± SEM. **, $p < 0.01$ as compared with controls

Table 1 physiological parameters 30 minutes after MCAO

	Vehicle	30mg/kg	100mg/kg
MABP (mmHg)	72±3	74±2	73±2
reduction of CBF (%)	19±4	18±5	20±4
Arterial PH	7.32±0.02	7.35±0.01	7.33±0.01
Arterial Pco_2 (mmHg)	44±2	45±2	45±1
Arterial Po_2 (mmHg)	156±6	152±11	155±10
Rectal temperature (℃)	37.1±0.3	37±0.2	37.2±0.3
Blood glucose (mg/dl)	166±4	160±3	165±5

Data are mean ± SEM, n = 15 in each group.

日本財団補助金による
２０００年度日中医学学術交流促進事業

③. 中国人研究者・医療技術者招聘助成事業

(2) 通常のリニアックによる定位放射線照射とサイバーナイフの比較研究

日本財団助成金による

2000年度日中医学学術交流促進事業報告書

－中国人研究者・医療技術者招聘助成－

財団法人　日　中　医　学　協　会

理事長　中　島　章　　殿

2000　年　12　月　14　日

研究発表中または研究中の本人のスナップ写真、及び発表論文等のコピーを添付

1．招へい責任者　井上 俊彦　㊞

所属機関　大阪大学大学院医学系研究科　職名　教授

所在地〒 565-0871　吹田市山田丘 2-2　電話 06-6879-3480

招へい研究者氏名　洛 小林

所属機関　北京中日友好病院　職名　副教授

研究テーマ　通常のリニアックによる定位放射線照射とサイバーナイフの比較研究

2．日本滞在日程

2000年10月1日　関西空港（大阪）到着

2000年10月2日　医学部長・関係教授･医師・職員に紹介

大学及び周辺生活圏の案内

大阪大学大学院医学系研究科集学放射線治療学研究部にて研究打合せならびに研修開始

集学放射線治療学 教授　井上俊彦　（医学博士）

集学放射線治療学 助教授 井上武宏　（医学博士）

その他の関係職員

2000年11月17日　厚生省がん研究助成金井上班班会議参加

2000年11月30日　関係者への挨拶・帰国準備

2000年12月1日　関西空港（大阪）出発　　北京市へ帰国

3．研究報告

別紙書式により、報告本文4000字以上(英文は2600語以上)で報告して下さい（枚数自由・ワープロ使用）

タイトル・要旨等は日本語で、KEY WORDS以下は日本語或いは英語で記入、使用文字はタイトル１３ポイント、その他は１０ポイント、日本語は明朝体を使用して下さい。

研究成果の発表予定がある場合は発表原稿・抄録集等を添付して下さい。

論文発表に当っては、*日中医学協会助成事業－日本財団助成金による*旨を明記して下さい。

通常のリニアックによる定位放射線照射とサイバーナイフの比較研究

来日研究者氏名　　洛 小林

中国での所属・役職　　北京中日友好病院・副教授

招聘者氏名・所属・役職　井上 俊彦・大阪大学大学院医学系研究科・教授

要旨：
定位放射線治療は近年目覚しい発展を遂げている放射線治療法の一つである。ナロービームを病巣に集中させ、周囲の正常組織への影響を少なくして治療効果を高める。これによって放射線治療の望ましい姿としての有効性、QOL と安全性を求める。サイバーナイフは超小型ライナックを搭載したロボットによる定位放射線治療装置である。1998 年 4 月に大阪大学はサイバーナイフを大学病院として日本で初めて導入した。2000 年 9 月末までに頭蓋内病巣・頭頚部腫瘍 106 例、延べ 153 部位の治療を行なった。
サイバーナイフの物理的・臨床的評価を行なった。（1）2000 年 4 月から 11 月の間にルーシ・ファントムによる計 25 回の治療計画で照射精度を評価した。総照射誤差の中央値は 0.89 mm (2.09～0.52 mm)であった。（2）臨床現場に立ち会い、2000 年 10 月から 11 月までのサイバーナイフによる 14 例の定位放射線治療症例をまとめた。（3）1998 年 5 月から 1999 年 10 月の間に治療された 6 例の小脳橋角部腫瘍の治療効果を評価した。PR 2 例、NC 3 例、PD 1 例であった。腫瘍内部の低吸収領域は 4 例に見られた。聴力改善は 1 例、耳鳴減少は 3 例であった。有害事象は認めなかった。（4）サイバーナイフの取扱い手順をまとめた。

KEY WORDS
サイバーナイフ、定位放射線治療、頭蓋内病巣、頭頚部腫瘍、照射精度、小脳橋角部腫瘍、取扱い手順

研究報告

目的：
定位放射線治療は近年目覚しい発展を遂げている放射線治療法の一つである。ナロービームを病巣に集中させることによって、周囲の正常組織への影響を少なくして治療効果を高めることを狙いとしている。これによって放射線治療の望ましい姿としての有効性、QOL と安全性を求めるものである。
従来、脳腫瘍は摘出手術が第一選択であった。しかし、手術では術後の障害を避けることができない。また全摘が困難で、対症的な治療しかできない場合も多い。定位放射線治療によれば脳腫瘍の病巣に限局した照射を行なうことができる。定位放射線治療による AVM の治療効果は 80%以上であり、脳転移は 90%、聴神経腫瘍は 85%である。この治療は有害事象が少なく、外科手術より優れた成績である。
中国においても定位放射線治療技術が普及し始めているが、その技術水準は未だ高くない。大阪大学大学院医学系研究科集学放射線治療学研究部は世界でも最先端放射線治療装置であるサイバーナイフ(CyberKnife)を 1998 年 4 月に大学病院として日本で初めて導入し、基礎的・臨床的研究を進めてきた。2000 年 9 月末までに 106 例、延べ治療部位数 153 部位の治療を行なってきた。
本サイバーナイフの唯一の欠点は装置が高額であることである。研究者はサイバーナイフの特徴を研究し、

帰国後通常のリニアックによる定位放射線治療法の改良を目的として本招聘により来日し、大阪大学大学院医学系研究科集学放射線治療学研究部で2ヶ月間臨床研究に従事した。

方法：

1）サイバーナイフに関する調査

ⅰ）サイバーナイフとは：

定位放射線治療技術は高度な位置精度を求めている。この精度は数ミリ以下に抑える必要がある。このため、従来の定位放射線手術(Stereotactic Radiosurgery, SRS)は侵襲式フレームを必要とし、その装着に麻酔を伴う小手術が不可欠である。したがって患者の負担は大きく、分割照射による治療可能比の改善は困難である。一方、通常のライナックによる非侵襲性のライチネン・フレームを用いた定位放射線治療(Stereotactic Radiotherapy, SRT)は患者の予期できない動きにより位置精度が良くないのが欠点である。

1992年に米国スタンフォード大学のAdler博士により開発が始められた超小型ライナックを搭載したロボットによる定位放射線治療装置がサイバーナイフである。1998年4月に大阪大学大学院医学系研究科集学放射線治療学研究部は世界でも最先端装置であるサイバーナイフ(CyberKnife)を大学病院として日本で初めて導入した。2000年9月末までに頭蓋内病巣・頭頚部腫瘍106例、延べ153部位の治療を行なってきた。本装置は最先端のコンピュータ技術とロボット工学と画像認識技術を応用している。したがって、102ヶ所からの集中照射が可能である。画像監視装置(Image Processing System, IPS)によって標的位置を追尾するので侵襲式フレームが不用である。この画像処理システムは治療計画のためのCT画像から再構成されるディジタル再構成X線像(Digitally Reconstructed Radiography, DRR)と2組のX線透視装置によるリアル・タイム画像で照合し、患者の3次元位置情報を求める。治療中に患者が動くと、そのズレを定量的に認識する。このズレをロボットにフィード・バックしてライナックの照準を補正し、計画された標的を追尾して正確にナロービームを照射する。この追尾システムは巡航ミサイルのナビゲーション技術を応用したものである。これにより照射精度は従来のものと比べ物にならない程向上した。

ⅱ）分割照射と任意形状の線量分布

侵襲式フレームが不用なために、分割定位放射線治療が容易に実施できる。比較的大きな病巣や悪性腫瘍、重要臓器に近接した病巣の治療に分割照射は威力を発揮する。サイバーナイフは超小型ライナックを6軸制御の産業用ロボットに装着している。したがって高い自由度を持っているためにライナックの任意の点における自動的な方向、位置出しを行なうことができる。またサイバーナイフは任意形状の治療計画と3次元照射技術のおかげで、1回照射においてアイソセンター以外への照射が可能になった。そのため複雑な形状の病巣に対してもそれにあった線量分布を作成することができる。

現在、国内では頭蓋内病巣と頭頚部腫瘍に対してサイバーナイフは応用されている。しかし、米国ではハード面の開発により、体幹部（肺癌、肝臓癌、前立腺癌、旁脊髄腫瘍）への治療も既に臨床研究の段階に入った。4次元原体照射を可能にする装置としてこのロボット・ライナック治療は期待されている。

2）サイバーナイフによる定位放射線治療の臨床現場に立ち会い、2000年10月2日から11月24日までの自験症例をまとめた。

3）1998年5月から1999年10月の間に、サイバーナイフによる定位放射線治療を行なった小脳橋角部腫瘍の治療効果の評価を行なった。

4）サイバーナイフの取扱い手順をまとめた。

結果

1）照射精度

2000年4月から11月13日の間にルーシ・ファントムによる計25回の治療計画を評価した。総照射誤差($dr = \sqrt{dx^2 + dy^2 + dz^2}$)の中央値は0.89 mm (0.52～2.09 mm)であった。

2）治療症例

2000年10月2日から11月24日までにサイバーナイフによる定位放射線治療を14例の頭蓋内腫瘍と頭頸部腫瘍に対して行なった。その内訳は、男性9例、女性5例である。年齢は16～64歳（中央値51歳）である。新鮮例7例、再発例7例である。原発性腫瘍は10例、転移性が4例であった。脳神経膠腫2例、髄膜腫2例、上咽頭癌2例、中耳癌1例、悪性リンパ腫1例、扁桃癌1例、上顎歯肉癌1例、転移性脳腫瘍4例である。時期をおいて、1例は3部位に、3例は2部位に治療された。したがって計19部位に照射された。腫瘍径は0～50x35 mm^3（中央値15x12 mm^3）であった。

治療計画は任意形状計画3部位、アイソセントリック計画16部位であった。分割照射は、1分割12部位、3分割7部位であった。使用したコリメータの径は10～60 mm（中央値25 mm）であった。有害事象は1例に限局性顔面腫脹が照射の翌日に認められた。

3）過去の治療症例による治療効果の評価

1998年5月から1999年10月の間に、小脳橋角部腫瘍でサイバーナイフによって定位放射線治療を受けた6例を対象にした。男性3例、女性3例である。年齢は44～70歳（中央値60歳）である。再発例は1例である。腫瘍径は12x10～25x15 mm^3（中央値15x10 mm^3）であった。総線量は21～30 Gy（中央値21 Gy）であった。全例とも3分割照射を受けた。観察期間は9～19 ヶ月（中央値12 ヶ月）であった。そのうち、PR 2例、NC 3例、PD 1 例であった。腫瘍内部の低吸収領域(Low Density Area, LDA)は4例に見られた。聴力改善は1例、耳鳴減少は3例であった。有害事象は認められなかった。

4）サイバーナイフの取扱い手順

ⅰ）CT scan

① 熱可塑性 shell で固定
② 造影剤の注射
③ CT scan 撮像
④ 治療台の角度の登録

ⅱ）治療計画

① 患者 CT データをネット・ワークで転送
② 標的と ROI を CT 上に描画
③ コリメータの選択
④ 標的の形状に合わせて、Single Iso/Arb Shape を選択
⑤ 処方線量を決定し、線量計算を実施
⑥ DVH、3次元画像で評価
⑦ 計画の保存

ⅲ）ファントムによる治療計画の評価

① ルーシ・ファントムにフィルムを装填し、CT scan を撮像
② 上記患者 CT 画像の取込みと同じ手順で処理
③ 治療計画の評価

ⅳ）DRR

① リアル・タイム画像でＸ線カメラによる位置確認

② 0.5 mm 以上のずれがあれば治療台の移動で位置修正

ⅴ）治療

① 治療データに問題なければ、治療を開始

② モニターカメラで治療室内を監視し、事故のないように注意

考察：

現在までの大阪大学大学院医学系研究科集学放射線治療学研究部における治療症例と文献を見た限りにおいては、サイバーナイフによる定位放射線治療症例には特に重篤な有害事象は認められなかった。局所治療効果についてみると、縮少効果と局所制御例を多く認めた。サイバーナイフによる定位放射線治療は安全かつ有効な新しい治療技術であることを認めた。

しかし、以下の問題点が挙げられた。

１）聴神経腫瘍の治療効果は不十分であった。放射線感受性が比較的低いことと、有害事象が認められていないので、総線量の増加（現行は中央値が 21 Gy）を検討する必要性のあることを指摘した。

２）過去に種々の治療を併用している症例が治療対象の大多数を占めている。より多くの新鮮症例を対象にすることで、サイバーナイフによる定位放射線治療をより正しく評価することが今後の重要な課題である。

３）サイバーナイフの治療計画から実施まで（CT、治療計画、計画評価、治療実施）に長時間を要する。

４）サイバーナイフは高額であるため、その普及が難しい。

５）治療症例数が少なく観察期間が短いので、長期の治療効果判定は将来の課題である。

おわりに

来日研究者は短期間であったが、大阪大学大学院医学系研究科集学放射線治療学研究部において熱心に研修した。サイバーナイフによる定位放射線治療のみならず、前立腺癌に対する高線量率組織内照射、乳房温存療法などの先端放射線治療法を学ぶとともに、病棟回診と外来診察への参加により、延べ約 455 例の症例を見学することができた。研究者は本研究部の医師が毎日進んで仕事をする精神と目覚しい研究業績を見て敬意を表すとともに、帰国に当たり関係職員に述べた感謝の挨拶にあったように、短期間であるが互いに真の友好を深めることができた。

ここに、財団法人 日中医学協会の日本財団助成金による中国人研究者招聘助成に厚く感謝の意を表します。

参考文献：

1)井上武宏, 井上俊彦:ナロービーム放射線治療ーロボットとトラッキングを用いた新しいナロービーム放射線治療装置:癌の臨床. 43: 221-225, 1997.

2)塩見浩也、井上武宏、山崎秀哉、田中英一, 吉田謙、今井敦,吉岡靖生,井上俊彦:サイバーナイフの初期使用経験.日本放射線腫瘍学会誌.10 (Suppl 1): 253, 1998.

3)井上俊彦,塩見浩也:サイバーナイフとは.日本医事新報.No.3905: 109-110,1999.2.27.

4)井上武宏, 井上俊彦, 塩見浩也:サイバーナイフ.先端医療シリーズ２・脳神経外科.脳神経外科の最先端ーQOL 向上のためにー.監修,高倉公朋,先端医療技術研究所(東京)pp.158-160,1999.3.

5)塩見浩也、井上武宏、井上俊彦:サイバーナイフ. 直線加速器による定位放射線照射の理論と実際.編集.柴

田尚武,白土博樹,平岡真寛.医学書院（東京）,pp.45-48,1999.
6)中村聡明、井上武宏、塩見浩也、井上俊彦:サイバーナイフの現状. 新医療,26(12):82-84,1999.
7)井上俊彦、塩見浩也、井上武宏:放射線治療用ロボット「サイバーナイフ」による治療技術と成果.Isotope News, No.547: 2-4, 1999.
8)塩見浩也、井上武宏、井上俊彦、清水恵司、吉峰俊樹:大阪大学における CyberKnife の初期使用経験について.定位的放射線治療. 3: 89-95,1999.
9)井上武宏、井上俊彦：サイバーナイフ治療. CADM Newsletter, No. 29: 6-7, 2000. 5.
10)井上俊彦井上武宏, 塩見浩也、中村聡明:ロボットを使った超小型リニアックによる定位放射線治療.がん治療のあゆみ.191-197,2000.4.
11)中村聡明,塩見浩也,島本茂利,井上武宏,井上俊彦:CyberKnife による頭頚部領域への定位放射線照射.第 9 回日本定位的放射線治療研究会抄録集. p.58, 2 000.
12)島本茂利,塩見浩也,中村聡明,井上武宏,井上俊彦,森内秀祐,丸野元彦,吉峰俊樹: CyberKnifeによる頭蓋内悪性病変への定位放射線照射.第 9 回日本定位的放射線治療研究会抄録集.p.69,2000.
13)森内秀祐,丸野元彦,井上武宏,井上俊彦,吉峰俊樹:サイバーナイフ.脳神経外科Advanced Practice 1.定位的放射線治療.編集,高倉公明,斎藤勇,河瀬斌,寺本明,メジカルビュー社,東京, pp. 106-111,2000.11.
14)島本茂利,井上武宏,井上俊彦:サイバーナイフの現況.新医療.27(12):99-102, 2000.
15) Inoue To, Inoue Ta, Shiomi H.: Preliminary experience of new stereotactic radiotherapy system using robot and tracking method (Cyberknife). Proceedings of the 9th workshop of the German-Japanese Radiological Affiliation. p.190, 1999.
16) Kai J, Shiomi H, Sasama T, Sato Y, Inoue Ta, Tamura S, Inoue To : A 3D optical head motion measurement system and its application in stereotactic radiosurgery. Medical Imaging Technology, 17(2):155-164,1999.
17) Shiomi H, Inoue Ta, Nakamura S, Inoue To: Quality assurance for an image-guided frameless radiosurgery system using radiochromic film. Radiat. Med. 18(2): 107-113, 2000.
18) Inoue T: The CyberKnife treatment for intracranial and head and neck cancer. Innovative Radiotherapy Technologies. Yonsei International Radiation Oncology Symposium, pp.93-98, 2000.

日本財団補助金による
２０００年度日中医学学術交流促進事業

③．中国人研究者・医療技術者招聘助成事業

（4）胆汁うっ滞の発生機構に関する分子生物学的研究

日本財団助成金による

２０００年度日中医学学術交流促進事業報告書

－中国人研究者・医療技術者招聘助成－

財団法人　日　中　医　学　協　会
理事長　　中　島　　章　殿

平成１３年３月１５日

研究発表中の本人のスナップ写真、及び発表論文のコピーを添付

１．招聘責任者　　足　立　幸　彦

所属機関　　三重大学医学部内科学第三講座　　職名　教授
所在地　　〒514-8507 三重県津市江戸橋2-174　　電話059-231-5017

招聘研究者氏名　裴　　秋　玲　（Pei, Qiu-Ling）
所属機関　　中国山西医学院職業医学講座　　職名　助教授

研究テーマ　　胆汁うっ滞の発生機構に関する分子生物学的研究

２．日本滞在日程

平成１２年２月２８日に来日され、それ以降は当大学にて研究を継続している。途中同年１０月２４日開催の第８回肝病態生理研究会（神戸）にて研究発表を行った。平成１３年９月末まで滞在の予定としている。

３．研究報告

別紙様式のとおり。

研究テーマ：胆汁うっ滞の発生機構に関する分子生物学的研究

来日研究者氏名：　裴　秋玲　（Ｐｅｉ，　Ｑｉｕ－Ｌｉｎｇ）
中国での所属・役職：　山西医学院職業医学講座・助教授
招聘者氏名・所属・役職：　足立幸彦・三重大学医学部内科学第三講座・教授

要旨

肝臓において、毛細管膜上に存在するATP 依存性の輸送蛋白である多剤耐性関連蛋白(mrp) ファミリーは抱合型有機物質などの胆汁中排泄に与かっている。この中でもmrp1とmrp2が同様の基質親和性を有する。mrp1の健常時及び胆汁うっ滞時の発現についての報告がないので、まずこれを明らかとする為に、下記の実験を行った。ラットの総胆管を結紮して閉塞性黄疸を作成し、経日的に肝と腎を摘出しmrp1の免疫組織化学的染色を行った。対照のラット肝細胞では、mrp1は細胞質内に弱く顆粒状に染色された。総胆管結紮術後には、細胞質内の染色性の増加と共に類洞側肝細胞膜上に帯状～顆粒状の染色が認められた。mrp1の染色性は経日的に増加した。ラット腎では、対照グループではmrp1の発現は無かったが、総胆管結紮術後にはかなりの尿細管上皮に発現が認められた。本研究では、ラットの閉塞性黄疸モデルの肝と腎におけるmrp1の変動から病態時の臓器相関を明らかにしたものである。

KEY WORDS:　胆汁うっ滞、mrp1、肝腎相関、免疫組織染色

(注：集大成を Hepatology Research に投稿中です.)

Research Report

Background and aims:

The liver and kidney play a major role in the elimination of a wide variety of endo-xenobiotic anionic substances into bile and urine [1, 2]. Biliary and urinary excretion of these anionic compounds is mediated by adenosine triphosphate (ATP)-dependent conjugate pumps that have been identified as members of the multidrug resistance-associated protein family. Two members of this family, MRP1/mrp1 and MRP2/mrp2 have been demonstrated to have similar substrate specificity and nucleotide sequence [3, 4]. MRP2/mrp2 is located on the canalicular membrane of hepatocytes as well as on the brush border membrane of renal proximal tubules [5, 6, 7, 8]. The activity of this transporter is absent in the mutant Groningen Yellow (GY/TR$^-$) rats and Eisai hyperbilirubinemic rats (EHBR) [9], which are rat models of Dubin-Johnson syndrome [10, 11, 12, 13]. In MRP1-transfected hepatic/renal cells and in various multidrug-resistant tumor cells, MRP1 has been found to be located on the basolateral membrane [2, 14, 15]. However, no exact localizations of hepatic and renal MRP1/mrp1 have been as yet demonstrated in cholestatic condition. In the present study, we evaluated immunohistochemically the intracellular localization of mrp1 in liver and kidney during acute biliary obstruction.

Materials and Methods

Animals.

Male Wistar rats weighing 240~260g were purchased from Nihon SLC (Shizuoka, Japan). All animals were kept according to the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (the National Institutes of Health Publication 86-23, revised 1985). Animals were housed in a temperature and humidity controlled room under a constant light and dark cycle and allowed free access to feed and water. Animals were anaesthetized with pentobarbital. All surgical procedures were performed under sterile condition. The common bile duct was ligated at 2 points and cut between distal and proximal ligatures as described previously [16]. The liver and kidneys were removed on 0 (control group; n=4), 1 (n=3), 3 (n=3), and 5 (n=3) days after BDL. For immunohistochemistry, liver or kidneys were immediately embedded in OCT

embedding medium (Miles Inc, Elkhart, IN, USA) on dry ice and then stored at -80 ℃ until use. Blood and urinary samples were collected from animals, and their billirubin levels were determined using a standard assay.

Antibodies.

Mrp1 (m-20), an affinity-purified goat polyclonal antibody raised against a peptide mapping near the carboxy terminus of mouse mrp1 was purchased from Santa Cruz Biotechnology Inc. (Santa Cruz, CA, USA). The mouse monoclonal antibody CD26, raised against rat dipeptidylpeptidase IV (DPPIV), a canalicular marker enzyme, was purchased from Serotec Ltd (Oxford, England). Alexa fluor goat anti-rabbit/mouse and donkey anti-goat IgG (H+L) conjugates were obtained from Molecular Probes Europe BV (Leiden, Netherlands). Other reagents were of high quality commercially available.

Immunofluorescence staining.

Tissue sections were cut into 8μm-thickness with a cryostat and placed on poly-L-lysine-coated glass microscope slide. After air-drying for 2 hours, the tissue sections were fixed in acetone at -20 ℃ for 10 min and then rehydrated with Tris buffer solution (TBS), pH 7.6. Nonspecific binding sites were blocked with 2 % bovine serum albumin (BSA) in TBS pH 7.6 for 30 min at room temperature. Thereafter, the tissue sections were incubated overnight at 4 ℃ with mrp1 (m-20) antibody or CD26 antibody at 1:100 or 1:50, respectively. Unbound antibody was washed from the tissue with TBS (pH 7.6). Then, the tissue sections were incubated with donkey anti-goat or goat anti-mouse IgG-Alexa in 2% BSA-TBS at 1:400 for 3 hours at room temperature. After appropriate washing with TBS (pH 7.6), the tissue specimens were mounted with SlowFade (Molecular Probes Europe BV, Leiden, Netherlands). Finally, the sections were observed by epifluorescence microscopy (Nikon UFX, Tokyo, Japan) and confocal laser scanning microscopy (Lsm410, Carl Zeiss, Jena, Germany) using the excitation wavelength of argon (488 nm) or helium (543 nm). Negative staining was performed by incubating the medium without the primary antibody.

Results

Plasma bilirubin level and liver histological changes

Compared to controls, the serum level of total bilirubin increased 8, 12, and 10 times on days 1, 3, and 5 after BDL, respectively. Urinary excretion of bilirubin also increased in parallel with serum bilirubin after BDL.

Immunofluorescence staining of hepatic mrp1

Weak granular staining of mrp1 was mainly observed in hepatocyte cytoplasm of control rats. The green staining with belt- and granule-like appearance gradually increased in hepatocyte plasma membrane after BDL. Double staining with antibodies against mrp1 (green) and DPPIV (red) revealed that the distribution of belt- and granule-like staining of mrp1 5 days after BDL was absent in the canalicular membrane of hepatocytes.

Immunofluorescence staining of renal mrp1

In the present study, no specific immunofluorescence of mrp1 was detected in control rat kidney. The expression of renal mrp1 was not significantly different from the control 1 day after BDL. However, mrp1-positive staining was detected in epithelia of some tubules in the kidney 3 days after BDL. Similar staining patterns were essentially observed in some renal tubules 5 days after BDL.

Discussion

Although mrp1 has been reported to increase in membrane fractions of isolated hepatocytes in experimental cholestasis [17], subcellular localization of the protein has not been as yet reported. In our study, weak immunostaining of mrp1 was observed at least in hepotocyte cytoplasm of control rats. In agreement with this, previous reports [18, 19] have shown that mrp1 is predominantly found in the intracellular vesicles of normal hepatocytes. However, the granular staining of mrp1 was observed in both basolateral membrane and cytoplasm of hepatocytes after BDL. It is inferred from the staining that the newly synthesized mrp1 was being shipped through transcytotic vesicles from the endoplasmic reticulum to the basolateral membrane. Immunocytochemical studies have shown that mrp1 is located in the plasma membrane of mrp1-transfected carcinoma cells [15] and drug-resistant tumor cells [20]. Our data, together with previous reports, indicate that changes in the localization of mrp1 may depend on the pathophysiological condition of hepatocytes.

The substrate specificity of mrp1 appears to be very similar to that of mrp2, also known as canalicular multispecific organic anion transporter (cmoat) [21, 22]. In addition, mrp1 knockout mice are hypersensitive to inflammatory stimuli [23]. Thus, the expression of mrp1 may be associated with the cytosolic concentration of both cholephilic compounds and mediators of inflammatory reaction during cholestasis.

Furthermore, the number of mrp1-positive basolateral membranes of hepatocytes increased concomitantly with the duration of ligation, suggesting the occurrence of increased efflux of conjugated organic anions into the systemic circulation.

Elevation of serum bilirubin was consistent with a steady increase in urinary bilirubin, suggesting that the kidneys may play a significant role in the elimination of conjugated bilirubin and other organic anions from blood into urine. Mrp2 is expressed in the apical membrane of renal proximal epithelia where it may function as a pump of amphiphilic anionic compounds across the luminal membrane [10, 24]. BDL induces high expression of mrp2 in renal proximal epithelial cells (Kobayashi Y et al. Hepatology 2000:32: 429a [abstract]), This mechanism may facilitate elimination of anionic constituents into urine. In the present study, we also demonstrated that the location of mrp1, different from that of mrp2 (date not shown), was in some renal tubules after BDL. These tubules might be distal ones. Under normal conditions, distal tubules participate in the transport of ions and H_2O. On the other hand, the distal tubules may be easily exposed to high concentrations of excretory compounds during the course of water reabsorption [25]. Induction of mrp1 might protect distal tubules from these putative nephotoxic compounds. Polyuria occurring in mrp1 knockout mice caused by some drugs such as etoposide [25] is consistent with this hypothesis.

In brief, the present study demonstrated that granular staining of mrp1 is over-expressed in basolateral membrane and cytoplasm of rat hepatocytes after BDL. Mrp1 was also detected in some tubules of kidneys. The induction of mrp1 may be the results of an adaptive or protective response to impairment of hepato-biliary organic anion transport during obstructive cholestasis.

References

[1] Van Aubel RA, Masereeuw R, Russel FG. Molecular pharmacology of renal organicanion transporters. Am J Physiol 2000; 279:216-232.

[2] Roelofsen H, Müller M and Jansen PLM. Regulation of organic anion transport in the liver. Yale J Biol Med 1997a; 70:435-445.

[3] Borst P, Evers R, Kool M, Wijnholds J. The multidrug resistance protein family. Biochim Biophys Acta1999; 146:347-357.

[4] Hipfner DR, Deeley RG, Cole SPC. Structural, mechaniatic and clinical aspects of MRP1. Biochim Biophys Acta1999; 1461:359-376.

[5] Büchler M, König J, Brom M et al. cDNA cloning of the hepatocyte canalicular isoform of the multidrug resistance protein, cMrp, reveals a novel conjugate export pump deficient in hyperbilirubinemic mutant rats. J Biol Chem 1996; 271:15091-15098.

[6] Paulusma CC, Bosma PJ, Zaman GJ et al. Congenital jaundice in rats with a mutation in a multidrug resistance -associated protein gene. Science 1996;271:1126-1128.

[7] Keppler D, König J. Expression and localization of the conjugate export pump encoded by the MRP2 (cMRP/cMOAT) gene in liver. FASEB J 1997;11:509-516.

[8] Schaub TP, Kartenbeck J, König J et al. Expression of the conjugate export pump encoded by the mrp2 gene in the apical membrane of kidney proximal tubules. J Am Soc Nephrol 1997;8:1213-1221.

[9] Mayer R, Kartenbeck J, Büchler M, Jedlitschky G, Leier I, Keppler D. Expression of the MRP gene-encoded conjugate export pump in liver and its selective absence from the canalicular membrane in transport-deficient mutant hepatocytes. J Cell Biol 1995; 131:137-150.

[10]Schaub TP, Kartenbeck J, König J et al. Expression of the MRP2 gene-encoded conjugate export pump in human kidney proximal tubules and in renal cell carcinoma. J Am Soc Nephrol 1999; 10:1159-1169.

[11]Kartenbeck J, Leuschner U, Mayer R, Keppler D. Absence of the canalicular isoform of the MRP gene encoded conjugate export pump from the hepatocytes in Dubin-Johnson syndrome. Hepatology 1996;23:1061-1066.

[12]Paulusma CC, Kool M, Bosma PJ et al. A mutation in the human canalicular multispecific organic anion transporter gene causes the Dubinb-Johnson syndrome. Hepatology 1997;25:1539-1542.

[13]Tsujii H, König J, Rost D, Stockel B, Leuschner U, Keppler D. Exon-intron organization of the human multidrug resistance protein 2 (MRP2) gene mutated in Dubin-Johnson syndrome. Gastroenterology 1999; 117:653-660.

[14]Roelofsen H, Vos T. A, Schippers IJ et al. Increased levels of the multidrug resistance protein in lateral membranes of proliferating hepatocyte-deruved cells. Gastroenterology 1997b; 112:511-521.

[15]Evers R, Zaman GJR, van Deemter L et al. Basolateral localization and export activity of the human multidrug resostance-associated protein in polarized pig

kidney cells. J Clin Invest 1996; 97:1211-1218.

[16]Gartung C, Ananthanarayanan M, Rahman MA et al. Down-regulation of expression and function of the rat liver Na^+ / bile acid cotransporter in extrahepatic cholestasis. Gastroenterology 1996; 110:199-209.

[17]Vos TA, Hooiveld GJEJ, Koning H, Childs S, Meijer DKF,Moshage H, Jansen PLM, and Müller M. Up-regulation of the multidrug resistance genes, mrp1 and mdr1b, and down-regulation of the organic anion transporter, mrp2, and the bile salt transporter, spgp, in endotoxemic rat liver. Hepatology 1998; 28: 1637-1644.

[18]Roelofsen H, Hooiveld GJEJ, Koning H, Havinga R, Jansen PLM, and Müller M. Glutathione s-conjugate transport in hepatocytes entering the cell cycle is preserved by a switch in expression from the apical MRP2 to the basolateral MRP1 transporting protein. J Cell Science 1999; 112:1395-1404.

[19]Flens MJ, Zaman GJR, van der Valk P et al. Tissue distribution of the multidrug resistance protein. Am J Pathol 1996; 148:1237-1247.

[20]Roelofsen H, Vos TA, Schippers IJ et al. Increased levels of the multidrug resistance protein in lateral membranes of proliferating hepatocyte-derived cells.Gastroenterology. 1997 Feb; 112(2): 511-21.

[21]Müller M, Meijer C, Zaman GJR et al .Overexpression of the gene encoding the multidrug resistance-associated proein results in increased ATP-dependent glutathione s-conjugate transport, Proc Natl Acad Sci USA 1994; 91:13033-13037.

[22]Jedlitschky G, Leier I, Buchholz U, Center M, and Keppler D. ATP-dependent transport of glutathione s-conjugates by the multidrug resistance-associated protein. Cancer Res 1994; 54:4833-4836.

[23]Renes J, De Vries EE, Hooiveld GJ, Krikken I, Jansen PL, Muller M. Multidrug resistance protein MRP1 protects against the toxicity of the major lipid peroxidation product 4-hydroxynonenal Biochem J 2000 Sep 1; 350 Pt 2:555-61.

[24]Leier I, Hummel-Eisenbeiss J, Cui Y, Keppler D. ATP-dependent para-aminohippurate transport by apical multidrug resistance protein MRP2. Kidney Int 2000; 57:1636-1642.

[25]Wijnholds J, Scheffer GL, van der Valk M et al. Multidrug resistance protein 1 protects the oropharyngeal mucosal layer and the testicular tubules against drug-induced damage J Clin Invest 1998; 188:797-808.

第8回肝病態生理研究会プログラム・抄録集

The Japanese Study Group for the Pathophysiology of the Liver: (JGPL)

●会長●

順天堂大学 名誉教授	浪久利彦

●顧問●

近畿大学 名誉教授	山本俊夫
金沢医科大学 名誉教授	高田昭
北里大学 客員教授	柴田久雄
奈良県立医科大学 名誉教授	辻井正
三重大学 名誉教授	水本龍二
順天堂大学 名誉教授	南部勝司
鳥取大学 第二内科 教授	川崎寛中
旭川医科大学 第二内科 教授	牧野勲
三楽病院 副院長	神坂和明
日本医科大学 第一内科 教授	荒牧琢己

●世話人●

岡山済生会総合病院 副院長	糸島達也
北海道大学 薬学部代謝分析学 教授	鎌滝哲也
三重大学 第三内科 教授	足立幸彦
旭川医科大学 第二外科 教授	葛西眞一
東京都情報サービス産業健康保健組合 東中野検診センター 所長	北見啓之
東京鑿察病院 内科 部長	平野正憲
大阪市立大学 生化学 教授	井上正康
東京大学 製剤学 教授	杉山雄一
三重大学 医学部看護学科 教授	野口孝
奈良県立医科大学 第三内科 教授	福井博
鳥取大学 第二内科 講師	村脇義和
秋田大学 第一内科 教授	渡辺純夫
帝京大学 内科 教授	滝川一
福岡大学 第三内科 教授	向坂彰太郎
広島大学 第一内科 講師	田妻進
東京大学 消化器内科	吉田晴彦
信州大学 第一外科 教授	川崎誠治
北里大学東病院 消化器内科 講師	國分茂博

日時	平成12年10月24日(火) 13:30～17:50
場所	ホテルオークラ神戸 平安の間
住所	神戸市中央区波止場町2－1
	TEL. 078(333)0111
会費	2,000円

19. **肝細胞血管側膜を介した胆汁酸排出機構の解析：正常およびMRP2-欠損ラットにおける比較検討**

東京大学大学院 薬学系研究科 鈴木　洋史、秋田　英万、杉山　雄一

〈セッション6〉　16：22～

座長：東京大学大学院　薬学系研究科　製剤設計学教室 助教授　鈴木　洋史

---

20. **閉塞性黄疸モデルラットにおけるmultidrug resistance-associated protein 2（mrp2）発現の肝腎相関**

三重大学 医学部 第三内科 田中　裕滋、小林　由直、樋口　国博、裴　秋玲、竹内　圭介、垣内　雅彦、足立　幸彦

近畿大学 医学部 消化器内科 上裕　俊法

21. **Intracellular localization of multidrug resistance-associated protein 1 (mrp1) and mrp2 in hepatocytes and renal tubular epithelial cells after bile duct ligation in rats**

三重大学 医学部 第三内科 裴　秋玲、小林　由直、樋口　国博、田中　裕滋、竹内　圭介、垣内　雅彦、足立　幸彦

近畿大学 医学部 消化器内科 上裕　俊法

22. **ヒト肝小胞体内へのUDP-glucuronic acidの取り込み機構の解析**

東京大学大学院 薬学系研究科 守屋　優、鈴木　洋史、杉山　雄一

23. **肝細胞癌患者とALDH2、CYP2E1の遺伝子多型**

鳥取大学 医学部 第二内科 岡本　欣也、村脇　義和、孝田　雅彦、川崎　寛中

特別講演　17：00～17：45　座長：大阪市立大学 生化学　井上　正康

「ポストゲノム時代における肝構成細胞の分子解析」

大阪市立大学 医学部 第三内科　河田　則文

17:50　閉会の辞　大阪市立大学 生化学 教授　井上　正康

21. Intracellular localization of multidrug resistance-associated protein 1 (mrp1) and mrp2 in hepatocytes and renal tubular epithelial cells after bile duct ligation in rats

三重大学 医学部 第三内科　裴　秋玲、小林　由直、樋口　国博、
田中　裕滋、竹内　圭介、垣内　雅彦、
足立　幸彦
近畿大学 医学部 消化器内科　上裕　俊法

【目的】mrp1およびmrp2は、抱合ビリルビンを始め多くの有機アニオンを細胞内から外に排泄するATP依存性トランスポーターの一つである。我々は閉塞性黄疸モデルラットにおいて肝細胞及び腎尿細管上皮細胞のmrp1およびmrp2蛋白発現とその細胞内局在について蛍光免疫組織染色を用いて検討した。【方法】Male Wistar ratに総胆管結紮 (Bile Duct Ligation ; BDL) を施行し、BDL前後に肝臓および腎臓を摘出した。それぞれ凍結切片を作成した後、mrp1およびmrp2に対するポリクローナル抗体を用いて蛍光免疫組織染色を行い、レーザー顕微鏡にて観察した。【成績】肝細胞においては、BDL前にはmrp1蛋白は明らかな発現を認めなかったが、BDL施行120時間後には、mrp1蛋白は肝細胞毛細胆管側膜上に弱いながらも発現が認められた。mrp2蛋白はBDL前には肝細胞毛細胆管側の膜上に発現が認められたが、BDL施行後には肝細胞膜上に存在したmrp2蛋白は著明に減少し、細胞膜近傍の細胞質内にmrp2蛋白が不明瞭なシグナルとして認められた。腎臓においては、BDL施行前にはmrp2蛋白は近位尿細管上皮のbrush border上に発現していた。BDL施行後にはbrush border上及び細胞質内ともに発現の増強が認められた。mrp1蛋白の腎臓における発現は現在検討中である。【結論】閉塞性黄疸モデルラットにおいて、mrp1の肝細胞毛細胆管側膜上への発現が弱いながらも認められた。また、肝細胞毛細胆管側膜上のmrp2蛋白は著明に減少し、腎尿細管上皮brush border膜上のmrp2蛋白は増加していた。

日中医学協会助成事業－日本財団助成金による

薬理と治療（印刷中）
Vol. 29 Suppl.

総胆管結紮ラットの肝および腎における multidrug resistance-associated protein 1 (mrp1) および mrp2 の組織内分布と細胞内局在に関する検討

斐 秋玲、小林由直、田中裕滋、田口由紀子、樋口国博、垣内雅彦、馬 寧（＊）、 仙波礼治（＊）、足立幸彦、上谷俊法（＊＊）

三重大学第３内科、三重大学第２解剖学（＊）、近畿大学消化器内科（＊＊）

Distribution and intracellular localization of multidrug resistance-associated proteins 1 (mrp 1) and 2 (mrp2) in rat liver and kidney after bile duct ligation

Qiu-Ling Pei,
Yoshinao Kobayashi,
Yuji Tanaka, Yukiko,
Taguchi, Kunihiro,
Higuchi, Ning Ma (*),
Reiji Semba (*),
Yukihiko Adachi and Toshinori Kamisako (**)

Third Department of Internal Medicine,
Mie University
School of Medicine,
(*) Second Departmentof Anatomy, Mie
University School
of Medicine, and (**) Department of
Gastroenterology andHepatology, Kinki
University School ofMedicine

SUMMARY

The liver and kidney play a major role in the elimination of a wide variety of endo-xenobiotic anionic substrates into bile and urine. They are mediated by adenosine triphosphate (ATP)-dependent conjugate export pumps, multidrug resistance-associated proteins. In this report, chronological regulations and localization of mrp1 and mrp2 in rat liver and kidney during bile duct ligation were exanimated using immunoflurescence staining. BDL induced down-regulation and fuzzy pericanalicular localization of mrp2 in rat liver. This change was accompanied by the corresponding increase in hepatorenal mrp1, increase in renal mrp2. Reciprocal changes of these transporters in liver and kidney are probably the results of an adaptation to impaired hepatic excretion of conjugated organic anions.

始めに

肝や腎では多くの物質を血中から摂取し、胆汁や尿中に排泄している（1，2）。これらの物質のうち、有機アニオンの排泄には細胞膜上に存在するｍｕｌｔｉｄｒｕｇｒｅｓｉｓｔａｎｃｅ－ａｓｓｏｃｉａｔｅｄ　ｐｒｏｔｅｉｎｓ（ｍｒｐ）とよばれるＡＴＰ依存性のトランスポーターが関与している。ｍｒｐのうちｍｒｐ１とｍｒｐ２は輸送する基質、アミノ酸配列が類似している。しかしｍｒｐ１はｍｒｐ２に較べて生理的な状態での発現量が著明に少ないことが報告されており、肝や腎における局在が十分に検討されていない。我々は総胆管結紮（ｂｉｌｅ　ｄｕｃｔ　ｌｉｇａｔｉｏｎ：ＢＤＬ）によりラットの胆汁うっ滞モデルを作製し、肝および腎におけるｍｒｐ１およびｍｒｐ２の発現の変化を蛍光免疫染色により検討した。

対象と方法

雄性ＳＤラット（体重　２４０～２６０ｇ）にＢＤＬを施行した。ＢＤＬ前（＝コントロール、ｎ＝４）、１日後（ｎ＝３）、３日後（ｎ＝３）および５日後（ｎ＝３）に肝及び腎を摘出した。又、臓器摘出時に血液を採取し、血清ビリルビンを測定した。

免疫組織染色：ラットｍｒｐ２に対する抗体としてはドイツ癌研究センターのＫｅｐｐｌｅｒ教授より供与されたＥＡＧ１５ウサギポリクローナル抗体を使用した。ラットｍｒｐ１に対する抗体しては、Ｍｒｐ（ｍ－２０）ヤギポリクローナル抗体（Ｓａｎｔａ　Ｃｒｕｚ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ　Ｉｎｃ.，Ｓａｎｔａ　Ｃｒｕｚ，　ＣＡ）を使用した。これらの一次抗体と蛍光標識した２次抗体を用いて組織免疫染色を行った。

結果

血清ビリルビン濃度：

血清ビリルビン濃度は、ＢＤＬ１日、３日および５日後にはコントロールと較べてそれぞれ約８，１２，１０倍に上昇した　（Ｆｉｇ．１）。　血清ビリルビンはＢＤＬ３日後に最も上昇し、５日後にはやや下降した。

ｍｒｐ２の免疫組織染色：

コントロール肝では、ｍｒｐ２　蛋白は肝細胞毛細胆管側に限局して存在した（Ｆｉｇ．２）。ＢＤＬ１日後には、ｍｒｐ２　の染色性はコントロールと比較して弱くなり、ＢＤＬ３日後には毛細胆管側膜に近い肝細胞質内に不明瞭な　ｍｒｐ２　が染色された。ＢＤＬ５日後には毛細胆管側肝細胞膜上の明瞭なｍｒｐ２　染色が門脈域周辺を中心に認められた。

一方、腎において　ＢＤＬ後は、近位尿細管内腔側および内腔に近い細胞質に　ｍｒｐ２　蛋白の増加が認められた。

ｍｒｐ１の免疫組織染色：

コントロール肝では、ｍｒｐ１　は主に肝細胞内ベシクルとして染色された　（Ｆｉｇ．３）。ＢＤＬにより肝肝細胞膜上の　ｍｒｐ１　は徐々に増加し、肝細胞毛細胆管側膜および外側膜　（ｌａｔｅｒａｌ　ｍｅｍｂｒａｎｅ）に多く認められた。一方、今回の検討では、コントロール腎においては　ｍｒｐ１　の明らかな存在は確認できなかった　（Ｆｉｇ．４）。しかしＢＤＬ３日から５日後では、ｍｒｐ１　蛋白はいくつかの遠位尿細管において発現が認められた。

考察

ＢＤＬにより、肝細胞毛細胆管側膜上におけるｍｒｐ２蛋白の　ｄｏｗｎ－ｒｅｇｕｌａｔｉｏｎ　が観察された。肝細胞膜および細胞質内における形態的な特徴は従来の報告と一致した（５～７）。興味深いことにＢＤＬ５日後においてｍｒｐ２蛋白の肝細胞毛細胆管側膜への復帰はまず門脈域周辺に起こり、次第に中心静脈周囲にまで進行していく傾向が認められ、門脈域から開始する何らかの回復機序の存在が示唆された。

ｍｒｐ１はコントロールではわずかに肝細胞質内に認められるのみであったが、ＢＤＬにより毛細胆管側膜および外側膜に発現が認められた。このことは、閉塞性黄疸においてｍｒｐ２を介して行われる有機アニオン輸送の障害をｍｒｐ１が協調して調節している可能性を示唆した。さらに腎においては、閉塞性黄疸時には、これらのトランスポーターがビリルビンや他の有機アニオンを代償的に尿中に排泄

していると思われた。

文献

1. Van Aubel RA et al. Molecular pharmacology of renal organicanion transporters. Am J Physiol Renal Physiol 2000;279:216-232

2. Roelofsen H et al. Regulation of organic anion transport in the liver. Yale J. Biol. Med.1997a; 70:435-445.

3. Borst Pet al. The multidrug resistance protein family. Biochimica et Biophysical Acta1999;1461:347-357.

4. Hipfner D et al. Structural, mechaniatic and clinical aspects od MRP1. Biochimica et Biophysical Acta1999;1461:359-376.

5. Trauner M et al. The rat canalicular conjugate export pump (mrp2) is downregulated in intrahepatic and obstructive cholestasis. Gastroenterology 1997; 113:255-264.

6. Accatino L et al. Modulation of hepatic content and biliary excretion of p-glycoproteins in hepatocellular and obstructive cholestasis in the rat. J Hepatology 1996;25:349-361

7. Ogawa K et al. Characterization of inducible nature of mrp3 in rat liver. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 2000;278:G438-G446.

図表の解説

Fig.1. Time course of plasma bilirubin after BDL.

Fig.2. Immunofluorescence staining of mrp2 in the control rat liver .

Mrp2 was localized on the canalicular membrane in control rat liver. (original magnification:× 75)

Fig.3. Immunoflurescence staining of mrp1 in the liver of control rats.

Weak staining of mrp1 diffused in hepatic cytoplasm in the absence of clear membrane domains in control rat liver. (original magnification:×150)

Fig.4. Immunoflurescence staining of mrp1 in the kidney of control rats.

No specific staining was recognized In the control kidney.

日本財団補助金による
２０００年度日中医学学術交流促進事業

③．中国人研究者・医療技術者招聘助成事業

(3) ＨＩＶの細胞侵入機構の解明とその阻止

日本財団助成金による

2000年度日中医学学術交流促進事業報告書

－中国人研究者・医療技術者招聘助成－

財団法人　日　中　医　学　協　会

理事長　中　島　章　　殿

年　　月　　日

研究発表中または研究中の本人のスナップ写真、及び発表論文等のコピーを添付

1．招へい責任者　服部俊夫　㊞

所属機関　東北大学大学院感染病態学分野　職名　教授

所在地　〒980-8574 仙台市青葉区星陵町1-1　電話　022-717-8220

招へい研究者氏名　凌　虹

所属機関　中国ハルピン医科大学微生物学教室　職名　助教授

研究テーマ　HIVの細胞侵入機構の解明とその阻止

2．日本滞在日程

平成12年4月10日より　8月末の期間

研究室に於て研究をした。

3．研究報告

別紙書式に従い、報告本文4000字以上(英文は2600語以上)で報告して下さい（枚数自由・ワープロ使用）

タイトル・要旨等は日本語で、KEY WORDS以下は日本語或いは英語で記入して下さい。

研究成果の発表予定がある場合は発表原稿・抄録集等を添付して下さい。

論文発表に当っては、*日中医学協会助成事業－日本財団助成金による*旨を明記して下さい。

HIV の細胞侵入機構の解明とその阻止

来日研究者　凌虹　(Hong Ling)
中国ハルピン医科大学　微生物学教室・助教授
招聘者　服部俊夫・東北大学大学院　感染病態学分野・教授

要旨

エイズの原因ウイルスである、HIV-1 の感染機構を解析する為に外膜糖蛋白である gp120 の V3 loop 由来ペプチドの HIV-1 感染に及ぼす影響を観察した。異なる HIV-1 株、BH10 (X4 strain) ADA (R5 strain) および 89.6 (X4R5 strain) 由来の V3 loop を作成した。またビオチン化した BH10 由来 V3 ペプチドも作成した。感染系として、ルシフェラーゼレポーター遺伝子と HXB2, ADA 及び 89.6 の どれかの外膜蛋白を用いた偽ウイルスを U87/ CD4/ CXCR4 あるいは U87/ CD4/ CCR5 に感染させて用いた。. V3-BH10 は HXB2 に対し感染促進作用を示し、たが V3-ADA と V3-89.6 はそれらの作用を示さなかった。同様に検索すると若干のオーバーラップがあるものの、それぞれの合成ペプチドは由来ウイルス特異的に感染促進作用を示した。.Virus Gprotein (VSV-G) をコートした偽ウイルスにはそのような促進作用は認められなかった。ビオチン化した BH10 由来 V3 ペプチドは T 細胞株、末梢血リンパ球、マクロファージ、等の様々な細胞に強く結合した。またこの結合は非ビオチン化Ｖ３ループを添加することにより促進した。これらのことは V3 loop がウイルス感染に対して positive に作用することを明らかにした、最初の報告である。

Key words: V3-loop, HIV-1, peptide

Name: Hong Ling

Institution in China: Associate professor, Department of Microbiology, Harbin Medical University

Abstract

We investigated if V3 loop of envelope gp120 of HIV-1 can interfere the HIV-1 entry into the corresponding target cells. V3 loop of different HIV-1 strains including X4 strain, BH10, R5 strain, ADA and X4R5 strain, 89.6 were made. As a control non-looped peptide, BH10/CA in which both cysteine residues were replaced by alanine was synthesized. The biotinylated V3 peptides for BH10 and BH10/CA were also synthesized. For entry assay, the pseudotyped HIV-1 HXB2, ADA and 89.6 bearing Luciferase reporter gene were constructed by cotransfection of pNL-LucE-R- and one of the corresponding envelope gene into 293T cells. Binding ability of the biotinylated V3 BH10 and CA to the CEM/CCR5 was tested using PE-streptavidin staining via FACS analysis. U87/CD4/CXCR4 or U87/CD4/CCR5 cells were used as the target cells for the entry assay and the luciferase activity was detected 2 days after incubation of the peptides and the pseudotyped viruses. T140, which is a derivative of T22, was used as a control peptide. The results showed that when the peptides were added to the cells simultaneously with pseudoviruses, V3-BH10 and V3-BH10/CA showed enhancement effect on HIV-1 HXB2 infection, and this effect has apparent dose-dependence. The maximum percentages of enhancement are 93.6% and 88.2%, respectively, while peptides V3-ADA and V3-89.6 did not show the same effect on HXB2 infection. However, the peptide T140 showed inhibitory effect. For HIV-1 ADA infection, both V3-ADA and V3-89.6 can significantly enhanced HIV-1 ADA infection. For HIV-1 89.6 infection, only V3-89.6 can significantly enhanced HIV-1 89.6 infection no matter the target cells bearing CCR5 or CXCR4 as the coreceptors. When the retroviral pseudotype bearing vesicular stamotitis Virus G protein (VSV-G) was used for observing the effect of the V3-peptides on virus entry, the viral infectivity was not affected by any of V3-peptides. Biotinylated V3-BH10 and V3-BH10/CA were found to bind to not only T cell line, PBMC and MDM, also human astroglia cell line U87, U87 transferred and stably expressed CD4 or coexpressed both CD4 and CXCR4 or CCR5 molecules on the cell surface, U87.CD4 and U87.CD4.CXCR4 or U87.CD4.CCR5. This demonstrated the binding does not depend on CD4 and coreceptor presence. While biotinylated V3-ADA binding ability is limited. It could bind to monocyte, MDM, and the U87 cell lines but not T cell line. The results were identical with that of the effect of V3-peptides on the coreceptors expression or direct competition. We did not see any increasing coreceptor expression and the peptides did not inhibit the binding of the antibodies anti-coreceptors used in present experiment

Key words: V3-loop, HIV-1, peptide

Research report

The effect of the peptides derived from the V3-loop of HIV-1 on the virus infection

Purpose

V3-loop is the neutralizing epitope and cell tropism determinant of HIV-1. To clarify its functions on viral entry the looped peptides derived from the V3-loop of X4 (BH10), R5 (ADA) and X4R5 (89.6) HIV-1 strains were designed and synthesized and their influences on HIV-1 entry into corresponding target cells were observed via a sensitive one round fusion system, replication defective retroviral vector system.

Methods

1. Peptides design and synthesis

The amino acid sequences of the peptides derived from the V3 loop of T-tropic (III BH10), M-tropic (ADA) and Dual-tropic (89.6) HIV1 strains are listed in table 1. All V3-peptides were synthesized using an automatic peptide synthesizer 430A. After synthesis, the protecting group was removed, and the peptides were cleaved from the supporting resin with trifluoromethanesulfonic acid. The obtained peptides were purified then by high-performance liquid chromatography (HPLC). A disulfide bond was made for V3-BH10, ADA and 89.6. The formation of disulfide bond was verified by the determination of triol groups by using a fluorescent probe, ammonium 7-fluobenzo-2-oxa-1,3-diazol-4-sulfonate and L-cysteine as a standard. The looped peptide with an intramolecular disulfide bond was disalted and purified by HPLC. The fractions containing the peptide were collected and lyophilized. The peptide purity was investigated and exceeded 95%. The rsult of Ion spray spectrum analysis of the all peptides indicated that these peptides had their theoretical molecular weights. As the control, a non-looped peptide V3-BH10/CA was synthesized by substituting both of the cysteins of V3-BH10 with two alanines. To determine if the V3 loop could bind to the target cell surface directly, the biotinylated V3-peptides including Bio-V3-BH10, BIO-BH10/CA and BIO-V3-ADA were designed and synthesized by linking biotin molecules to the N-termini of the original V3-peptides.

The peptide quantity was carried out using BIO-RAD DC protein assay kit.

Table 1 The sequence of V3-peptides

peptides	Sequence
V3-BH10	EINCTRPNNNTRKSIRIQRGPGRAFVTIGKIGNMRQAHCNIS
V3-BH10/CA	---A----------A---
V3-89.6	ESVV----------RRLS-··------YARRN-IGDI--------
V3-ADA	----------H-··-------Y-T-E-IGDI-------

2. Pseudoviruses production and p24 antigen determination

The effects of the peptides on HIV-1 entry and replication ware examined using pseudotype viruses containing luciferase reporter gene. The envelope expression plasmids pSM-HXB2, pSM-ADA and pSP272-89.6 containing the env gene of X4 HIV-1 strain, HXB2, R5 strain, ADA and the X4R5 HIV strain 89.6, and a retroviral expression vector bearing *P. pyralis* luciferase reporter gene, pNL4-3-Luc-E$^-$R$^-$, which contains a frameshift mutation near the 5'- end of *env* in the *NdeI* site of NL43, were used for generation of luciferase reporter gene-containing pseudotyped viruses.

These pseudotyped viruses were obtained 48 h after co-transfection of luciferase reporter gene-containing vector, pNL43-Luc-E-R-, and one of the Env-expressing vectors (pSMHXB2, pSMADA, pSP89.6) into 293T cells upon the transfection manufacture (LIPOFECTAMINE PLUS PEAGENT, GIBCO.BRL).

After transfection, the cell culture supernatant was collected and the amount of p24 antigen was determined using antigen capture ELISA. The p24 antigen of pseudoviruses was above 100 ng/ml.

3. The effects of V3 peptides on HIV infection

Human astroglia cell lines expressing CD4 antigen and coreceptor CXCR4 (cell line U87.CD4.CXCR4) or CCR5 (cell line U87.CD4.CCR5) were used as the target cells for X4, R5 and X4R5 viruses, respectively. G418 (Geneticin Disulfate, Wako Pure Chem., Osaka) and puromycin (Sigma, St. Louis, MO) were added as selection reagents. The viability of the cells was estimated using the trypan blue dye exclusion method.

For infection assay, pseudotyped viruses were used to infect target cells seeded in 24-well-plate ($4x10^4$ cells/ well) one day before the experiments. The V3 peptides were added at serial concentrations simultaneously with the pseudotyped viruses. After incubating the cells at 37°C for 1hour, the cells were washed in Hank's and incubated for another 48 h at 37°C. The cells were collected by treating in 150 μl/ well of 1X luciferase cell Culture Lysis Reagent (Promega, Madison,WI), and the luciferase activity of each lysate was measured

by luminometer (Bio Orbit 1251 luminometer, Turku, Finland). The luciferase activity (RLU, relative light unit) in cells treated with pseudotyped viruses only was used as the negative control. The enhancement percentage of the compounds were calculate as (RLU of the cells treated by compounds- RLU of the cells treated by medium without compounds)/ RLU of the cells treated by medium without compounds x 100%. T140, a derivative of T22 (antagonist for CXCR4) was used as a control peptide.

4. Binding of Biotinylabeled V3-peptides to the cells and FACS analysis

Human T cell line SupT1, MolT4, and CEM.CCR5, a cell line transfected with coreceptor CCR5 gene, human PBMC, monocyte derived macrophage (MDM), U87, U87/CD4 (U87 cell transfected with human CD4 gene), U87/CD4/CXCR4 and U87/CD4/CCR5 were used for binding assay.

$5X10^5$ of cells were incubated in RPMI 1640 containing 0.5% BSA and 0.01% sodium azide (incubation solution) and corresponding biotinylated-V3 peptides at different concentrations for 40 min at 4 °C. After being washed with PBS-BSA-NaN3 (washing solution), the cells were stained by phycoerythrin conjugate streptavidin(PE-streptavidin, S-886, Molecular probes, Inc. Oregon, USA) in the same buffer for 30min at 4 °C. After removing the PE-streptavidin by washing twice, the cells were resuspended in 1% formalin buffered solution and analyzed using a Flow cytometer (FACScan, Becton Dickinson Immunocytometry System, USA). The negative control consisted of cells treated with the PE-conjugated streptavidin but not preincubated with the biotinylated V3-peptides. 10000 cells were counted and the result was represented as the mean of fluorescent intensity of stained cells by PE-streptavidin-biotin.

5. The effect of the V3-peptides on the binding of the antibodies anti-coreceptors

The monoclonal antibodies anti-CXCR4, 12G5, MAB170, 171, 172 and 173, and anti-CCR5, 2D7, 5C7, MAB181, 182 were used in the experiments of the coreceptors expression and direct competition assay. Both of them are provided via *NIH AIDS research and references and reagent program*. FITC conjugated Goat F(ab') 2 anti-mouse Ig"s was purchased from BIOSOURSE INTERNATIONAL CORP.(Tagoimmunologicals, TM, California).

$5X10^5$ of CEM.CCR5 cells were incubated in RPMI 1640 containing corresponding V3 peptides at the concentration of 10nM, 100nM, 1 μM and 10 μM for 0min and 1 hours at 37 °C. After being washed twice, the cells were resuspended in washing solution containing mouse MAb anti-coreceptors and were maintained for 30 min at 4 °C. Subsequently, the cells were washed and stained by FITC-conjugated goat anti-mouse- F(ab')2 for 30 min at 4 °C. The

collected cells were washed twice and analyzed using Flow cytometer (FACScan, Becton Dickinson Immunocytometry System, USA).

Results

The results showed that when the peptides were added to the cells simultaneously with pseudoviruses, V3-BH10 and V3-BH10/CA showed enhancement effect on HIV-1 HXB2 infection, and this effect has apparent dose-dependence. The maximum percentages of enhancement are 93.6% and 88.2%, respectively, while peptides V3-ADA and V3-89.6 did not show the same effect on HXB2 infection. However, the peptide T140 showed inhibitory effect. For HIV-1 ADA infection, both V3-ADA and V3-89.6 can significantly enhanced HIV-1 ADA infection. For HIV-1 89.6 infection, only V3-89.6 can significantly enhanced HIV-1 89.6 infection no matter the target cells bearing CCR5 or CXCR4 as the coreceptors. When the retroviral pseudotype bearing vesicular stamotitis Virus Gprotein (VSV-G) was used for observing the effect of the V3-peptides on virus entry, the viral infectivity was not affected by any of V3-peptides, meaning the enhancement effect of the V3-peptides was envelope dependent. The results of the experiments by pretreating the target cells with the V3-peptides followed by washing out the compounds and infecting them with HIV-1 pseudoviruses showed the enhancement effect in the same manner indicating that the peptides can interact with some molecules on the target cell surface and the enhancement effect was involved in this interaction.

As the fact that the biotinylated V3-BH10 can bind to the surface of some of T, B cell line and peripheral blood monocytes was investigated previously (1), we are wondering if the binding ability is specificly limited within lymphocytes and monocytes, and if this binding is related tightly to the enhancement effect of the V3-peptides. We synthesized biotinylated V3-BH10, BH10/CA and ADA. The binding ability of these peptides to wide range of cells was examined. As expected, biotinylated V3-BH10 and V3-BH10/CA were found to bind to not only T cell line, PBMC and MDM, also human astroglia cell line U87, U87 transferred and stably expressed CD4 or coexpressed both CD4 and CXCR4 or CCR5 molecules on the cell surface, U87.CD4 and U87.CD4.CXCR4 or U87.CD4.CCR5. This demonstrated the binding does not depend on CD4 and coreceptor presence. While biotinylated V3-ADA binding ability is limited. It could bind to monocyte, MDM, and the U87 cell lines but not T cell line. The results were identical with that of the effect of V3-peptides on the coreceptors expression or direct competition. We did not see any increasing coreceptor expression and the peptides did not inhibit the binding of the antibodies anti-coreceptors used in present experiment

Discussion

The early molecular events associated with human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) infection have not been clarified. The HIV-1 glycoproteins play an essential role in virus attachment and entry. Interaction of gp120 with the CD4 molecules on the target cells as the receptor is confirmed to be the early step of the entry. Chemokine receptors, mainly CXCR4 or CCR5, are involved in the subsequent step of virus-cell attachment as a coreceptor for HIV-1. Chemokine receptor binding is believed to trigger additional conformational changes in the viral envelope glycoproteins that ultimately lead to the fusion of viral and target cell membranes. The V3-loop is thought to be involved in this chemokine-gp120 interaction (2,3, 4, 5).

In present works, we have found the enhancing effects of synthesized V3-peptides derived from different tropic HIV-1strains on their original viruses infection. The enhancement is viral restricted except that of peptide derived from X4R5 strain 89.6. The biotinylated V3-BH10 binding range is as wide as to CD4 positive, coreceptor expressing, and the cells, which do not bear CD4 or any of the coreceptors. The finding showed that there are other ligand molecules on cell surface except if the coreceptors were the binding target of the V3-loop.

The mechanisms of the enhancement effect of the V3-peptides on virus infectivity are exploring now.

References

1. Murakami, T., S. Matsushita, Y. Maeda, K. Takatsuki, T. Uchiyama, and T. Hattori. 1993. Application of biotinylated V3 loop peptides of human immunodeficiency virus type 1 to flow cytometric analysis and affinity chromatographic techniques. Biochemica et Biophisica Acta 1181:155-162.
2. Lapham, C.K., J. Ouyang, B. Chandrasekhar, N. Y. Kguyen, D. S. Dimitrov, and H. Golding. 1996. Evidence for cell-surface association between fusin and the CD4-gp120 complex in human cell lines. Science 274:602–605.
3. Trkola, A., T. Dragic, J. Arthos, J. M. Binley, W. C. Olson, G. P. Allaway, C. Cheng-Mayer, J. Robinson, P. J. Maddon, and J. P. Moore. 1996. CD4 dependent, antibody sensitive interactions between HIV-1 and its co-recep-torCCR-5. Nature 384:184–187.
4. Ugolini, S., M. Moulard, I. Mondor, N. Barois, D. Demandolx, J. Hoxie, A. Brelot, M. Alizon, J. Davoust, and Q. J. Sattentau. 1997. HIV-1 gp120 binding to CD41 cells induces an interaction between CD4, gp120 and the chemokine receptor CXCR4. J. Immunol. 159:3000–3008.
5. Wu, L., N. P. Geradr, R. Wyatt, H. Choe, C. Parolin, N. Ruffing, A. Borsetti, A. A. Cardoso, E. Desjardin, W. Newman, C. Gerard, and J. Sodroski. 1996. CD4-induced interaction of primary HIV-1 gp120 glycoproteins with the chemokine receptor CCR-5. Nature 384:179-183

日本財団補助金による
２０００年度日中医学学術交流促進事業

③．中国人研究者・医療技術者招聘助成事業

(5) 環境中のフッ素化合物の生体影響

日本財団助成金による

2000 年度日中医学学術交流促進事業報告書

－中国人研究者・医療技術者招聘助成－

財団法人　日　中　医　学　協　会

理事長　中　島　章　　殿

2001 年 3 月 14 日

研究発表中または研究中の本人のスナップ写真、及び発表論文等のコピーを添付

1．招へい責任者　角田　正史　㊞

所属機関　福島県立医科大学 公衆衛生学講座　職名　助教授

所在地　〒960－1295　福島市光が丘1番地　電話　024－548－2111

招へい研究者氏名　劉　場

所属機関　中国医科大学公共衛生学院　職名　助教授

研究テーマ　環境中のフッ素化合物の生体影響

2．日本滞在日程

2000年7月25日　来日。
2000年8月～9月　有機スズの生体影響の実験に従事。
2000年10月　マクロファージ系細胞を使ったフッ素の免疫毒性実験に従事。
2000年10月18日～20日　日本公衆衛生学会参加。
2000年11月～12月　在日中国人労働者の健康・栄養調査。
2001年1月～2月　フッ素の亜急性経口投与による生体影響に関する実験に従事。
2001年3月　リンパ系細胞を使ったフッ素の免疫毒性実験、高感度フッ素測定装置による試験に従事。
2001年3月13日　帰国。

3．研究報告

別紙書式により、報告本文4000字以上(英文は2600語以上)で報告して下さい（枚数自由・ワープロ使用）

タイトル・要旨等は日本語で、KEY WORDS以下は日本語或いは英語で記入、使用文字はタイトル１３ポイント、その他は１０ポイント、日本語は明朝体を使用して下さい。

研究成果の発表予定がある場合は発表原稿・抄録集等を添付して下さい。

論文発表に当っては、*日中医学協会助成事業－日本財団助成金による*旨を明記して下さい。

研究テーマ：環境中のフッ素化合物の生体影響

来日研究者　劉　揚
中国での所属・役職　中国医科大学公共衛生学院　助教授
招聘者氏名　角田正史　福島県立医科大学医学部公衆衛生学講座　助教授

要旨
フッ素は自然界に広く存在し、人体に摂取される。毒性の面では慢性中毒による骨硬化症の病因として指摘されて、中国においては原因の確定しえない4000万人の慢性フッ素中毒患者がいる。しかし、フッ素の影響の機構は明確でない。骨代謝にはインターロイキンー１（IL-1）及びtumor necrosis factor-α (TNFα)等のサイトカインの作用が考えられている。そこで、フッ素のサイトカイン遺伝子発現に対する影響を検討し、免疫毒性から見たフッ素の生体への影響の機構を研究した。マウス由来のマクロファージ系細胞であるJ-774細胞を用いたin vitroのフッ化ナトリウムの暴露実験を行ない、IL-1β及びTNFαの遺伝子発現に対する影響をRT-PCR(reverse transcription polymerase chain reaction)法で検討した。J-774細胞のサイトカイン遺伝子発現の検討では、IL-1β, TNFα共に１μM暴露で発現が０となり、TNFαについては100nM暴露でも相対的発現の平均値の低下が見られた。骨吸収性のサイトカインであるIL-1β、TNFαの遺伝子発現の抑制が示された。これらが、フッ素の骨に対する影響の機構に関連する可能性がある。また、フッ化ナトリウムのマウスに対する亜急性経口投与による免疫毒性の評価も試みた。この他、滞在中に以下の実験、研究への参加を行った。１）有機スズ化合物の亜急性経口投与による免疫毒性の検討、２）中国人労働者における食生活とストレスの関係。

KEY WORDS; フッ素、IL-1β、TNFα、J-774細胞、RT-PCR

研究報告
【目的】フッ素はフッ化物の形で自然界に広く存在し、水、空気、食物などを介し人体に摂取される。毒性の面では慢性中毒による骨硬化症の病因として指摘されて、中国においては原因の確定しえない4000万人の慢性フッ素中毒がいる。一方、近年、フッ素化合物は、現代の高齢化社会においての大きな問題である骨粗鬆症に関する治療薬としても注目されている。またう蝕予防を目的として水道水へのフッ素添加も世界各地で行われている。しかしながら、フッ素の薬理作用、毒性発現の機構は明確でない。

骨代謝にはインターロイキンー１（IL-1）及びtumor necrosis factor-α (TNFα)等のサイトカインの作用が考えられている。そこで、フッ素のサイトカイン発現に対する影響を検討することにより、免疫毒性から見たフッ素の生体への影響の機構を研究が可能となる。

今回の研究ではマクロファージ系細胞であるJ-774細胞を用いたin vitroのフッ化ナトリウムへの暴露実験を行ない、IL-1β及びTNFαの遺伝子発現に対する影響を検討した。またフッ化ナトリウムの亜急性経口投与により、脾細胞におけるサイトカインの遺伝子発現に対する影響を検討した。

【方法】
１）培養細胞による実験
培養細胞の暴露実験においては、マクロファージ系細胞とリンパ球系細胞のそれぞれについてサイトカインの遺伝子発現に関する影響を検討した。培養細胞としてマクロファージ系細胞としてマウス由来のJ-774細胞、リンパ系細胞として同じくマウス由来のEL4-TK細胞を用いた。これらにフッ化ナトリウムを暴露して、サイトカインの発現に対するフッ素の影響を検討した。暴露濃度はフッ素濃度100ｎM及び１μMとして、各濃度５ウェルずつ細胞を培養した。各ウェルからRNAをそれぞれ抽出しmRNAの発現についてRT-PCR(reverse transcription polymerase chain reaction)法で検討した。検討するサイトカインはマクロファージ系はIL-1β, TNFα、リンパ球系はIL-2について行った。標準物質としてβ-actinを用い補正した。

PCR終了後、エチジウムブロマイド入り2%アガロースゲルで電気泳動し、ATTO社のPrintgraph、Imagesaver及び解析ソフトLane & Spot Analyzer Ver. 5.0を用いてバンドを定量化した。統計解析は一元配置分散分析にて行い、post hoc testにはFisherのPLSD法を用いた。

2）フッ素化合物の亜急性毒性試験

フッ素化合物の塩化フッ素の毒性をマウスへの亜急性経口投与で検討した。この実験では、脾細胞をマクロファージとリンパ球に分け、それぞれについて、特に骨代謝に関連するサイトカインについて、mRNAの発現及び産生を検討する。

マウス5群（1群6匹、対照群1群、実験群4群）に対し、飲料水を介し、フッ化ナトリウムを4週間、投与した。投与濃度は1～125 ppmとした。投与期間終了後、マウス脾臓を摘出し、リンパ球、マクロファージを分離し、それぞれについて、リンパ球のIFN-γ及びIL-2、マクロファージのIL-1β、IL-6、TNFαのmRNAの発現を検討を行った。

また血液など試料中のフッ素イオン濃度を、極めて高感度である測定法、フッ素イオン電極を検出器とするフローインジェクション分析装置で測定し、暴露の指標とした。

【結果】J-774細胞のサイトカインmRNAの発現の検討では、IL-1β, TNFα共に1 μM暴露で発現が0となり、TNFαについては100nM暴露でも相対的発現の平均値の低下が見られた。EL4-TK細胞については結論に至らなかった。

亜急性投与実験については脾臓の相対重量が低濃度暴露群で、有意に低下していた。免疫機能の検討、フッ素暴露の程度については結論に至らなかった。

【考察】

骨吸収に関連するサイトカインとしてIL-1やTNFαがあげられている。フッ素は骨硬化症の病因として指摘され、また、骨粗鬆症に対しては治療薬としての効果が指摘されてきた。フッ素のサイトカインに対する影響として、Aussel et al. (1988)はフッ化ナトリウムによる活性化Jurkat細胞のIL-2産生の増大を報告した。Loftenius et al. (1999)は、ヒト全血中の細胞のサイトカイン産生へのフッ化ナトリウムの影響を検討し、PHAによって活性化された細胞からのIFN-γの産生が、フッ化ナトリウムによって増大する事を示した。これら、従来のフッ素とサイトカインとの関連を検討した研究ではELISAを用いて細胞上清のサイトカイン量を検討したが、本研究では今まで検討されてこなかった、フッ化ナトリウムのサイトカインの遺伝子発現レベルでの影響を検討した。特にフッ素と骨代謝に関連するサイトカイン、つまり骨吸収性のサイトカインであるIL-1β、TNFαの遺伝子発現の抑制が示された。これらが、フッ素の骨に対する作用に関連している可能性がある。

マウスに飲料水を介し4週間、フッ化ナトリウムを投与する事により、実際の環境による暴露のモデルとする事が出来る。環境中からの暴露に近い濃度から、中毒レベルまでを投与濃度として比較するため、フッ素摂取の安全性の検討も可能である。今後のより一層の検討が必要である。

【参考文献】

Aussel, C., Mary, D., Peyron, J.F., Pelassy, C., Ferrua, B. and Fehlmann, M. (1988) Inhibition and activation of interleukin 2 synthesis by direct modification of guanosine triphosphate-binding proteins. Journal of Immunology, 140, 215-220.

Loftenius, A., Andersson, B., Butler, J. and Ekstrand, J. (1999) Fluoride augments the mitogenic and antigenic response of human blood lymphocytes in vitro. Caries Research, 33, 148-155.

この他、滞在中に以下の実験、研究への参加を行った。

1）有機スズ化合物の亜急性経口投与による免疫毒性の検討

2）中国人労働者における食生活とストレスの関係

1）有機スズ化合物の亜急性経口投与による免疫毒性の検討

【目的】船舶等の防汚剤として使用されるトリブチルスズ（TBT）化合物の海洋汚染が問題になっており、魚介類の摂取を通した健康影響が懸念されている。今回、TBTの毒性の内、免疫毒性について、脾臓マクロファージのTNFα, IL-1β, IL-6産生に対する影響、脾リンパ球のIFN-γ産生に対する影響を指標に、亜急性経口投与の評価を試みた。また、この実験に参加することでフッ素化合物の免疫毒性の実験に必要な手技を取得することも目標とした。

【方法】BALB/cマウス30匹（♂、平均体重23.8g）に対し1群6匹とし塩化TBTをそれぞれ0、1、5、25、125ppm含む固形試料を自由に4週間摂取させた。投与終了後、屠殺し、肝臓、脾臓を摘出し、脾臓についてはストマッカー（Colworth社製）にて処理し、分離された細胞を24穴の細胞培養プレートで37℃、5%CO_2の条件下で1時間培養した。培養後、上清を取り、プレートに付着した細胞をマクロファージとして再度2mlの培養液で懸濁し細胞数を測定し、1mlを別の細胞プレートに移した。上清中の浮遊細胞はリンパ球とした。マクロファージをLPSで活性化し培養し、6時間後、一つのプレートについては上清を除去してTRIzolを用いRNAを抽出した。12時間後、もう一つのプレートの上清を取り、-80℃で保存した。リンパ球についてはPHAにて活性化し、12時間培養後、RNAを抽出し上清を保存した。マクロファージ上清についてはELISAキット（Biosource International社）にてTNFα, IL-1β, IL-6量を定量した。抽出したRNAからFirst strand cDNA合成キット（Amersham社）を用いてcDNAを合成し、RT-PCR法を用いて、マクロファージについてはTNFα, IL-1β, IL-6のmRNA発現を検討し、リンパ球についてはIFN-γについて検討した（35サイクル）。標準物質としてβ-actinを用い補正した。PCR終了後、エチジウムブロマイド入り2%アガロースゲルで電気泳動し、ATTO社のPrintgraph、Imagesaver及び解析ソフトLane & Spot Analyzer Ver. 5.0を用いてバンドを定量化した。統計解析は一元配置分散分析にて行い、post hoc testにはFisherのPLSD法を用いた。

【結果】体重は125ppm投与群に一時的減少は見られたが最終的には有意な変化は見られなかった。肝臓の体重当たり重量は125ppm投与群の平均値が、対照群、1ppm、5ppm投与群に比べ有意に高かった。脾臓重量については有意差は見られなかったが用量依存性の低下が見られた。mRNAの発現については全てのサイトカインについて有意差はなかった。マクロファージ細胞上清中のIL-1β濃度については（細胞数で補正）、有機スズ暴露群全てで対照群に比べ低下していた。TNFαについては1ppm及び25ppm投与群の平均値が対照群に比べ有意に低く、1ppm群は125ppm群に対しても有意な低値を示した。IL-6濃度については1ppm及び5ppm投与群の平均値が対照群、125ppm群に比べ有意に低かった。25ppm群の平均値も125ppm群に比べ有意な低値を示した。IFNγについては対照群で高値を示したが、有意差はなかった。

【考察】TNFα, IL-1β, IL-6の上清中の蛋白量は低濃度暴群で低下していたが、mRNAの発現については有意な変化が見られなかった。これらの結果からTBT化合物の脾マクロファージのサイトカイン産生に対する影響が比較的低濃度で起こるが、用量依存性の反応ではない場合がある事が示唆される。また、抑制のメカニズムは転写より後の段階で起こる可能性がある。

2）中国人労働者における食生活とストレスの関係

【目的】近年、国際化の進展に伴い、多くの外国人労働者が来日し、そのメンタルヘルスが問題になっている。来日後1年経った中国人女性労働者を対象に、NIOSH職業性ストレス調査票の抑鬱尺度を用いストレスに影響を与える因子を検討し、今後の有効な健康教育について探った。

【方法】対象は福島県北部にて縫製業に従事している20～30歳代の中国人女性労働者36名。来日7日目に食生活について通訳を介し健康教育を行った。来日後1年経った時点で、身体状況、健康状況、食生活一般を含む質問紙票にNIOSH職業性ストレス調査票の抑鬱尺度を加えたものを中国語に翻訳し調査を行った。調査は職場を通じて依頼し自記式で記入されたものを職場毎に郵送で回収した。年齢、BMIについて抑鬱尺度との相関を検討した。t検定または一元配置分散分析にて項目間の抑鬱尺度の平均値の差を検討しpost hoc testにはScheffeの方法を用いた。更に関連が見られた項目についてステップワイズ回帰分析を行い、抑鬱尺度の説明因子を検討した。

【結果】アンケートについては36名中30名の回答を得たが、抑鬱尺度の記入に不備のあった7名を除き計23名で分析した（有効回答率63.9%）。抑鬱尺度との相関では、年齢（r=-0.436, p=0.036）、BMI

（r=-0.517, p=0.011）とも有意な負の相関が見られた。質問紙票項目間の平均値の差の検定で「栄養のバランスを食べる時に考えているか」「緑黄色野菜の摂取頻度」「疲れやすさ」「夏場の体調保持」に関して有意差が見られ、バランスを考えない群、緑黄色野菜の摂取頻度が低い群、疲れやすい群、体調を崩した群の平均値が高かった。便秘についても、「よく便秘する」群が「殆ど便秘しない」群に比べて有意に抑鬱尺度の平均値が高かった。その他、「健康講座や料理講習会に出たことがない」群は「ある」群に比べ有意に抑鬱尺度の平均値が高く、「中国での健康教育を受けたことがない」群は「ある」群より抑鬱尺度の平均値が高い傾向にあった。以上の項目を利用しステップワイズ回帰分析によって説明因子を検討した結果では" 抑鬱尺度 =39.97-0.824(BMI)-2.329(便秘)" （R^2=0.427, p=0.038）の回帰式が得られた。

【考察】在日中国人女性のストレスには疲労や体調、便秘に加え、栄養のバランスや緑黄色野菜の摂取頻度など食生活が関連していた。便秘は有意な抑鬱尺度の説明因子であることから、便秘の予防やバランスのとれた食生活に焦点を当てた健康教育がストレスの対策に有効と考えられた。

学会発表予定（発表原稿添付）

Tsunoda, M, Konno, N., Nakano, K. Nakano, K., **Liu, Y.** and Suzuki, Y. (2001) The inhibitory effects of tributyltin chloride on cytokine production in murine splenocytes after subacute oral exposure. Toxicologist 54 (Supplement) (March, 2001).

Konno, N., Tsunoda, M., Nakano, K. Nakano, K., **Liu, Y.** and Suzuki, Y. (2001) In vivo and in vitro effects of tributyltin on the N-methyl-D-asparatate (NMDA) receptors in the brain of mice. Toxicologist 54 (Supplement) (March, 2001).

角田正史、**劉揚**、中野匡子、鈴木礼子、陳霞芬（2001）在日中国人労働者における職業性ストレス（抑鬱尺度）に対する食生活及び身体状況の影響. 産業衛生学雑誌、43、第71回日本産業衛生学会講演集、332.

角田正史、中野憲、**劉揚**、中野匡子、紺野信弘（2001）塩化トリブチルスズ亜急性経口投与によるマウス脾臓マクロファージにおけるインターロイキン－6 (IL-6)産生に対する影響. 第71回日本衛生学会総会抄録集（2001年4月）

紺野信弘、角田正史、中野憲、**劉揚**、中野匡子（2001）トリブチルスズ化合物のマウス脳内NMDAレセプターに及ぼす影響. 第71回日本衛生学会総会抄録集（2001年4月）

中野匡子、角田正史、紺野信弘、**劉揚**、中野憲（2001）女子学生の生活習慣と疲労の関連についての検討. 第71回日本衛生学会総会抄録集（2001年4月）

鈴木礼子、**劉揚**、中野匡子、角田正史、陳霞芬（2001）在日中国人労働者に対する健康教育実施一年後の状況. 第55回日本栄養・食糧学会大会抄録集（2001年5月）

フッ素については今後発表予定。

THE INHIBITORY EFFECTS OF TRIBUTYLTIN CHLORIDE ON CYTOKINE PRODUCTION IN MURINE SPLENOCYTES AFTER SUBACUTE ORAL EXPOSURE.

M Tsunoda, N Konno, K Nakano, K Nakano, Y Liu and Y Suzuki.
Department of Public Health, Fukushima Medical University, Fukushima, Japan.

The pollution of the waters, fish and shellfish by tributyltin (TBT) compounds as antifouling agents have been reported worldwide. The immune system is a target of TBT intoxication. We evaluated immunotoxicity of TBT on splenocytes following subacute oral exposure. Male BALB/c mice were exposed to 0, 1, 5, 25, 125 ppm of TBT chloride in the feed for 4 weeks. Following the treatment period, mice were euthasized, liver and spleen were removed and weighed. Splenocytes were divided into adherent cells (macrophages) and non-adherent cells (lymphocytes). Adherent cells were activated by lipopolysaccharide (LPS) and cultured. Non-adherent cells were activated by phytohemagglutinin (PHA). The mRNA expressions of tumor necrosis factor α (TNFα) or interleukin-1β (IL-1β) in adherent cells and interferon γ (IFNγ) in non-adherent cells were examined by RT-PCR. The concentrations of cytokines in the supernatant were also determined by ELISA. The mean value of relative liver weights in the group exposed to 125 ppm of TBT was significantly increased compared to those in control and low-dose groups. The relative spleen weights were also decreased dose-dependently. The mean concentration of IL-1β in the supernatant of adherent cell adjusted by cell counts was significantly lower among exposed groups compared to the control. The relative LPS-stimulated TNF α expression or IL-1β expression in adherent cells, and the relative PHA-induced IFNγ expression in non-adherent cells were lower in the higher dose groups. The splenocytes and its cytokine production may be affected by TBT at the levels similar to environmental pollution.

トリブチルスズ化合物のマウス脳内 ＮＭＤＡレセプターに及ぼす影響

○紺野信弘、角田正史、中野憲、劉揚、中野匡子
（福島県立医科大学・医・公衆衛生）

[目的] 船舶や漁網の防汚剤として、塗料に含まれる有機スズ化合物（特にトリブチルスズ）の使用はわが国では規制されているが外国の船舶等による海洋汚染は依然として続いている。また最近外因性の内分泌撹乱化学物質としてその環境毒性が再び注目されている。今回はトリブチルスズの神経毒性（行動毒性）の有無を、マウス脳内の興奮性アミノ酸受容体の一つであるＮＭＤＡレセプターに対する影響を調べることにより検討した。NMDAレセプターは学習や記憶に関与している生理的に重要なレセプターの一つである。

[材料と方法] 塩化トリブチルスズ（ＴＢＴＣｌと略記）、塩化トリメチルスズ（ＴＭＴＣｌ）は市販の特級試薬を使用した。レセプターアッセイは常法に従ったが、ラジオリガンドとしては[^{3}H]CGP39653(比活性44.0 Ci/mmole)を用いた。*In vitro*実験ではBALB/cマウス(オス、体重20-22ｇ)を用いたが、ＴＢＴＣｌの投与実験では1週間の馴らし飼育の後（1群5匹）1,5,25及び125ppmを含む固形飼料を4週間自由に摂取させた。尚、大脳皮質からの膜画分の調製はMugnaini *et al*(1993)の方法に従い、結合実験のデータ解析にはグラフパド社のソフト" プリズム" を用いた。

[結果と考察] 飽和曲線とScatchard解析の結果をFig.1と2に示した。最大結合量Bmaxは2.20±0.22 pmol/mg protein、解離定数Kdは37.8 ±9.07nMであった(n=3, 平均値±SD)。[^{3}H]CGP39653の膜画分に対する結合に及ぼすTBTClとTMTClの影響を*in vitro*で検討した（Fig. 3）。3回実験の平均値±SDで示したが、0.1uM-1mMの濃度範囲ではTBTClはレセプター・リガンド結合には殆ど影響しなかった。一方、TMTClは濃度が高くなるとむしろ結合を増加させる傾向があったが、測定ごとのバラつきもやや大きかった。次に、1-125ppmのTBTClを含む食餌を４週間与えたマウスの大脳皮質から調製した膜画分に対する[^{3}H]CGP39653の結合をみると、1ppm 群と125ppm群で有意（$p<0.05$）に低下した（Fig. 4）。5ppm 群と25ppm群では低下の傾向を認めたが有意差はなかった。これらの成績は比較的低濃度のTBTClの経口暴露によってもNMDAレセプターに対する影響が発現することを示唆している。

[まとめ] *In vitro*では著明な影響は認められなかったが、マウスの餌に1-125ppm濃度のTBTClを混ぜ４週間摂取させたところ、弱いながらもNMDAレセプターに対するリガンドの結合低下があり、低濃度長期間のTBTCl暴露による神経毒性の発現が懸念される。

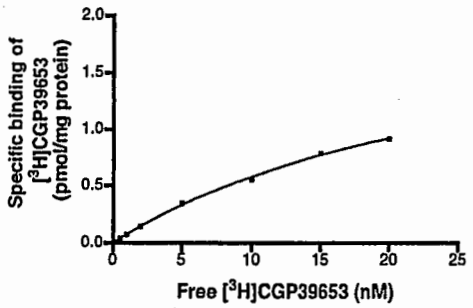


Fig1.Saturation curve

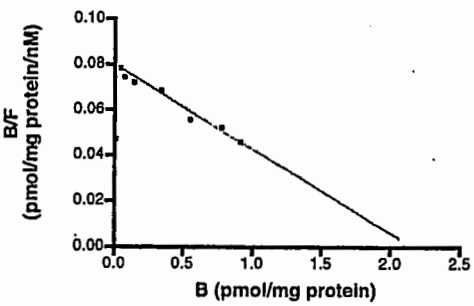


Fig2. Scatchard plot

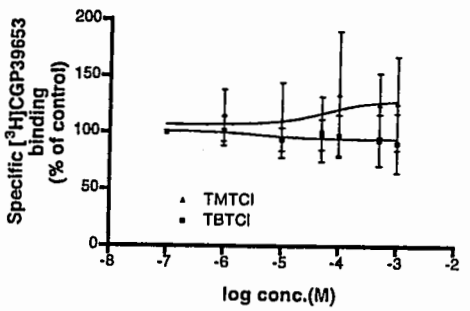


Fig3. Effects of TMTCl and TBTCl on the binding of [^{3}H]CGP39653 *in vitro*

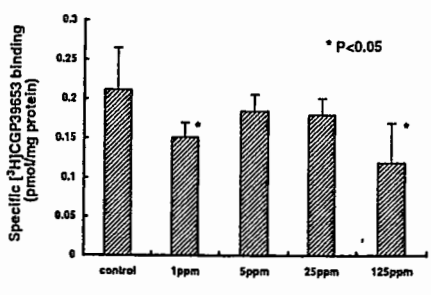


Fig4. Effect of 28-day TBTCl administration on [^{3}H] binding to mouse brain membranes

女子学生の生活習慣と疲労の関連についての検討

福島県立医科大学 医学部 公衆衛生学講座
○中野匡子，角田正史，紺野信弘，劉楊，中野憲

目的：近年、疲労は青年期の健康の指標としての有効性が指摘され，食生活等生活習慣との関連が注目されている。産業職場では質問紙法による疲労の評価が行われ、勤務時間の生活習慣への影響と疲労の関連が示唆されている。今回我々は，産業職場での“自覚症状調べ”を使用し，女子学生を対象として，生活習慣と疲労の関連を検討した。

対象及び方法：平成 12 年 9 月，福島市の女子大学生 242 名(四年制大学看護学部 1 年生 80 名、看護専門学校 1 年生 33 名、短期大学 1 年生 129 名：平均年齢 19.0±0.1 歳)を対象とし，無記名・自記式アンケートを留置法で実施した。調査項目は、年齢、身長、体重、睡眠の深さ、睡眠時間、運動習慣の有無と頻度、食生活(朝食、昼食、夕食の摂取頻度)、喫煙･飲酒習慣の有無と頻度、自覚的疲労感、現在の疾病罹患の有無と、疲労度調査(日本産業衛生学会“自覚症状調べ”1970)とした。疲労度調査は，①眠気とだるさ②注意集中の困難③身体違和感 を示す項目群（以下、疲労度①,②,③とする）で構成され，得点が高いほど疲労度が高いと評価される（疲労度①～③の各々に対して，得点は 0～10 点)。解析は、それぞれの疲労度得点の平均値を、3 群以上で一元配置分散分析(post hoc test は Scheffe の方法)、2 群間では t 検定を用いて比較した。

結果：調査票の回収率は 92.6%(224 名)で，疾病者 2 名を除いた 222 名について分析した。大学別に回答に有意な差が見られなかったため、全体をまとめて分析した。眠りの深さについては，“よく眠れる”群が“あまり眠れない”群に比べ有意に疲労度①,②及び①②③の合計の得点が低かった(表１)。睡眠時間，運動習慣と喫煙、アルコールの習慣の有無により，疲労度に有意な差は見られなかった。BMI と疲労度との相関は見られなかった。朝食をとる頻度によって区分した 4 群の疲労度得点の平均値は、いずれの項目でも有意差は見られなかったが、“とることは少ない”群と“とらない”群の平均値は高値を示した。昼食･夕食について，“毎日とる”群と“欠食”（とることが多い＋とることが少ない＋とらない）群の 2 群で比較したところ，疲労度①,②,③,①②③の合計の得点で有意な差はないが，欠食群の得点はいずれも高かった。自覚的疲労感については、疲労度①,③,①②③の合計の得点が，“疲れを感じる”群は“時々感じる”または“感じない”群に対し，有意に高かった(表２)。

考察：今回我々は、疲労度の評価法として産業職場における“自覚症状調べ”を用いたが、この方法を学生に適用することの妥当性について自覚的疲労感との関連をみたところ，自覚的に“疲れを感じる”と答えた群は“時々感じる”または“感じない”群に比べ疲労度①、③の得点が高く，自覚的疲労感は，眠気やだるさ、身体的な違和感の自覚であると考えられた。今回の調査から，眠りの深さが眠気とだるさ、注意集中の困難へ影響すること，食事の欠食が疲労度を増す傾向にあるという結果が得られた。疲労の蓄積は学業へ支障をきたし、ひいては様々な疾病を引き起こす可能性が指摘されており、特に睡眠の深さ、規則正しい食生活に留意した生活習慣の改善が望まれる。

表1 眠りの深さと疲労度得点

眠りの深さ	回答数	①眠気とだるさ	②注意集中の困難	③身体違和感	合計
よく眠れる	84	3.774±0.237	1.786±0.228	1.679±0.172	7.262±0.526
ふつう	108	3.657±0.2	2.019±0.208	1.62±0.149	7.306±0.445
あまり眠れない	30	5.367±0.4	3.033±0.448	2.033±0.273	10.433±0.857

*：p<0.05　**：p<0.01　得点は平均値±標準偏差で表わす

表2 自覚的疲労感と疲労度得点

自覚的疲労感	回答数	①眠気とだるさ	②注意集中の困難	③身体違和感	合計
いつも疲れを感じる	102	4.853±0.216	2.441±0.236	2.225±0.162	9.529±0.495
時々疲れを感じる	107	3.290±0.181	1.869±0.195	1.355±0.130	6.533±0.387
疲れは感じない	8	1.625±0.625	0.875±0.611	0.125±0.125	2.625±1.267

*：p<0.01　得点は平均値±標準偏差で表わす

日本財団補助金による
２０００年度日中医学学術交流促進事業

③．中国人研究者・医療技術者招聘助成事業

(6) 消化器疾患の内視鏡診断と治療

日本財団助成金による

2000年度日中医学学術交流促進事業報告書

－中国人研究者・医療技術者招聘助成－

財団法人　日中医学協会

理事長　中島　章　殿

2001年　3月　14日

研究発表中または研究中の本人のスナップ写真、及び発表論文等のコピーを添付

1．招へい責任者　藤野　雅之

所属機関　山梨医科大学内科学講座第１教室　職名　教授

所在地〒409-3898　山梨県中巨摩郡玉穂町下河東1110　電話055-273-9581

招へい研究者氏名　呉　明利

所属機関　河北医科大学第四医院内視鏡室　職名　助教授

研究テーマ　消化器疾患の内視鏡診断と治療

2．日本滞在日程

2000年8月30日から2001年3月30日まで山梨医科大学第１内科にて研修。

2000年10月25日から10月28日まで神戸で開催されたDDW-Japanに参加した。

3．研究報告

別紙書式により、報告本文4000字以上(英文は2600語以上)で報告して下さい（枚数自由・ワープロ使用）

タイトル・要旨等は日本語で、KEY WORDS以下は日本語或いは英語で記入、使用文字はタイトル１３ポイント、その他は１０ポイント、日本語は明朝体を使用して下さい。

研究成果の発表予定がある場合は発表原稿・抄録集等を添付して下さい。

論文発表に当っては、*日中医学協会助成事業－日本財団助成金による*旨を明記して下さい。

研修報告書

氏名：　呉明利

生年月日：1964年1月24日　　所属：　河北医科大学第四病院内視鏡室

国籍：　中華人民共和国　　研修期間：2000年8月30日～2001年3月30日

日中医学協会の御後援と藤野教授のお招きにあずかり、私は来日研修助成の研修医として来日し、「早期胃、食道癌の内視鏡診断と治療」を中心に山梨医科大学第 1 内科教室において、2000年8月30日から2001年3月30日までの7ヶ月間研修しました。

山梨医科大学第1内科教室は、特に消化器内視鏡の分野において優れた実績をあげています。学識が広く、内視鏡領域で有名な藤野教授のご指導で時間は短くても、充実した研修生活を楽しく送ることができました。以下その成果について報告いたします。

1.早期胃、食道癌の内視鏡診断：確実に治癒可能な消化器癌は早期癌であり、早期癌の診断は非常に大切です。現在、中国の大部分施設では早期癌が胃、食道癌症例中 10%に過ぎませんが、日本では50%を超えています(山梨医大第1内科で、1998年から2000年まで早期胃癌67%、表在食道癌 50%)。半年の研修で私はそれが健診制度、進んだ X 線と内視鏡診断技術、優れた機器設備などの成果だと理解しました。同時に先生方の立派な手技に大変驚き、感服いたしました。研修を通じて実際に早期癌巣の特徴、深達度診断、良性病変との鑑別診断、色素内視鏡、微小病変の発見など、特に超音波内視鏡（EUS）診断技術(EUS の操作手技、読影方法、注意すべきことなど)を熱心に教えていただき、勉強になりました(「従来型内視鏡像による深達度判定の可能性に関する検討」、「内視鏡検査の既往がある胃、食道癌症例における内視鏡診断の質の評価」、「EUS による深達度診断の精度に関する検討」及び「日本と中国の早期胃、食道癌的特徴の対比に関する検討」の論文について、資料整理中)。

通常、胃、食道癌は早期癌から進行癌となるまで 4、5 年以上の時間がかかりますので、時間的に見ると、胃、食道癌を早期階段で発見することは可能なことです。実際、早期胃、食道癌の診断は健診と high risk 群の症例の follow-up、X線と内視鏡による拾い上げ及び精密検査に基づいて行われます。

1）健診と high risk 症例 follow-up の重要性：早期胃、食道癌の患者の多数は症状はなく、患者は検査を受けなければ、医療が進歩していても発見されることはありません。山梨医科大学では早期胃、食道癌のうち年度の健診を通して発見された癌が９０％以上占めています。日本の年度の健康健診制度はすばらしいですが、中国で実施するのは困難です。

2）早期癌の拾い上げ診断の注意点：小さく変化の乏しい早期癌は内視鏡検査の熟練者でもしばしば見逃されます。政信太郎らによれば切除標本を全割して発見された2cm 以下早期胃癌238

病変中 60 病変（5mm 以下の病変が 63.3％）がX線、内視鏡を併用したルーチン検査で見逃されています。そのようなことを防ぐには以下の点に注意することが重要です。

①良い条件で盲点のない観察：内視鏡検査中に正確に観察する習慣は非常な重要です。すなわち、良い条件で内視鏡検査を行う習慣の有無が診断能力を左右します。半年の研修でわかったことは、一定な観察手順、レンズ面を明瞭に保持すること、胃粘膜に付着する粘液と食物残査を除去すること、適量な送気、遠望や近接など各方向からの観察、挿入時から観察することなどです。

②優れた読影力：検査者の読影力と経験も内視鏡検査の質に影響します。消化管の内視鏡画像に正常と異常、炎症と腫瘍、良性と悪性など区別する能力を良く修練すべきです。早期癌の拾い上げの能力から見ると、いろいろな症例を見たことがあるという経験とともに、所見を観察した瞬間にその所見がどういう病理構築から成立っているか判断する能力は非常に大切であり、出きるだけ病理組織構築の明らかな多数の症例をカンファレンスなどで検討し、瞬時の判断力を養っておきます。

③生検診断：X線に比べて内視鏡検査の最大利点は生検ができることです。胃、食道癌、特に早期胃、食道癌の内視鏡診断は生検が不可欠です。すなわち、早期癌の診断は最終的に病理で確認する必要があります。しかし、癌が存在する場所から生検しなければ癌組織は検出できないわけで、どこから採取したかでその診断能は全く異なります。また、正面から適切な距離で観察され最も癌が疑わしい場所に生検鉗子が当たっている写真がある症例と接線方向から観察のみの症例とでは生検結果の信頼性は全く異なります。一般的技術としての具体的な生検方法に加えて、生検結果（特に陰性結果）に対応するのはもっと重要です。

適切な場所から生検されたかどうか、特に２回目以後は出血のため部位が不正確になるので初回の生検が重要です。診断が不一致例や境界病変の病理診断については消化管病理の専門医と臨床医が連絡をとり、検討することが不可欠です。

３）内視鏡精密検査：早期癌の治療法の選択（内視鏡治療と外科手術，手術術式の選択）にあたり、癌浸潤深達度と範囲の診断は非常に重要となります。内視鏡精密検査を行い、内視鏡治療の適応を判定します。内視鏡精密検査には通常内視鏡検査と色素内視鏡検査と超音波内視鏡検査があります。

内視鏡精密検査においては、検査時に異なった空気量、全方向、近接と遠望で動的変化を観察し、記録することで検査後に静止画像の検討においても情報量を維持し、客観的情報に基づいて全体像を把握することは癌浸潤深達度と範囲診断に不可欠といえます。また、色素散布法は特に凹凸変化を際立たせ、微細な所見や隆起成分の成り立ちを明らかにしうることから深達度と範囲の診断にも有用です。食道癌においても、色素散布法は癌の性質、深達度、範囲の診断に有用性があります。

超音波内視鏡診断：超音波内視鏡検査は内視鏡の先端に超音波発生装置を装着したもので、あ

超音波内視鏡診断：超音波内視鏡検査は内視鏡の先端に超音波発生装置を装着したもので、あるいは内視鏡鉗子口より挿入可能な細径超音波プローブで、従来の内視鏡による診断能に加えて断層像により検査します。これにより消化管壁の層構造の描出、病変の内部所見と周辺の層構造との関係や周辺臓器との関連などが客観的に認識できるようになりました。したがって早期胃、食道癌深達度診断に有用です。私は EUS に興味が強くありますが、EUS は初心者にとって、どのような検査、どのような読影をすべきのか難しいです。先生方から基本知識と技術を教えていただきました。

一般に正常消化管壁の EUS 像は原則的に 5 層構造に描出され、第 1 層と第 2 層（第 2 層が粘膜筋板）が粘膜層、第 3 層が粘膜下層、第 4 層が固有筋層、第 5 層が漿膜下層及び漿膜（食道が線維膜）相当します。癌組織は 5 層に描出される消化管壁層構造を破壊し、エコー像の多くは非病変部の第 3 層より低エコーに描出されます。EUS による癌深達度診断は周辺の非病変部と比較し、病変により変化が認めた最も深い層構造所見から判定されます。内視鏡粘膜切除の適応症例は EUS による癌浸潤深達度が第 1 層と第 2 層にとどまるものです。しかし癌と線維化組織のエコーレベルの差が表現できないので、癌巣内に潰瘍、線維化を有する例は癌正確な深達度診断が困難です。ほかに EUS の操作手技などの多くの要素が診断能に影響します。

2.早期胃、食道癌の内視鏡治療：日本で早期胃癌の内視鏡治療ははじめて開発されましたが、現在は普及し発展していきます。山梨医科大学第 1 内科教室では早期胃、食道癌の内視鏡治療(主な内視鏡的粘膜切除)は従来の外科的手術に代わる治療として積極的に行われています。中国では早期胃、食道癌の内視鏡治療特に内視鏡的粘膜切除は行われる施設が少ないです。私の病院では１９９０年から２０００年まで約 80 例(含 microwave 治療)に行われました。そのため、適応症の選択、治療手技、術後標本の処理、完全切除と治癒の判定、術中術後合併症の予防と治療、術後 follow - up などの面では、経験がかなり不足で，山梨医大の熟達した先生方には多く学ぶことがありました。私は研修期間に行った全ての早期癌の内視鏡治療を見学し、先生方から貴重な経験をいただきました。

早期胃、食道癌の内視鏡的治療において、殊に粘膜内癌の根治的治療法として内視鏡的粘膜切除術（EMR）は第 1 選択治療法が定着しています。しかしその適応、方法、手技、完全切除の判定、遺残、再発などについて未解決の問題も多く残されています。例えば、EMR 後遺残と再発と対して、創面や瘢痕などがあるので、EMR を再度行うのは困難な場合もあります。最近、補助的内視鏡治療として、Argon Plasma Coagulation（APC）が利用されています。APC はアルゴンガスを媒体とする非接触型の高周波凝固装置で、最初、外科手術において、止血目的として使われていましたが、次第に腹腔鏡下手術、胸腔鏡下手術中で利用されるようになりました。ここ 3、4 年では消化器内視鏡領域で止血、Barrett 粘膜の焼灼、Barrett 腺癌の治療のに使われています。山梨医大第 1 内科では APC を用いて主に内視鏡的早期胃、食道癌の補助的治療

をしています。私が 7 ヶ月に経験した内視鏡 APC 治療 11 例：早期食道癌 3 例、早期胃癌 8 例；単独治療 2 例、EMR 後補助治療 9 例、うちの EMR 遺残 7 例、再発 2 例；男性 9 例、女性 2 例；年齢 55—86 歳。1 症例が 1 － 4 回 APC 照射、平均 1.5 回治療しました。1 回の治療は約 10—20 分で終了します。内視鏡的 APC 治療は電導性の高いアルゴンガスの中の放電が電流密度が低く均一に凝固されます。Nd:YAG レーザーによる凝固に比較して、安全性が高く、設置費用が少ないですが，microwave に比べて、非接触性凝固なので、組織の癒着を伴うことなく、出血をきたしにくいとされています。〈「APC を用いる早期胃、食道癌の内視鏡治療」の論文準備中)

3 .その他に内視鏡的食道静脈瘤注射硬化療法と食道静脈瘤内視鏡結札術、内視鏡的逆行性胆道膵管造影、内視鏡的胆管ドレナージ、内視鏡的乳頭切開、胆管結石粋石術、内視鏡止血治療、大腸内視鏡の診断と治療などのいろいろな内視鏡診断と治療新技術及び内視鏡画像のｺﾝﾋﾟｭ－ﾀ－管理ｼｽﾃﾑを見学しました。また平成 12 年 10 月には神戸に行って消化器病週間として開催された学会の年度会議に参加し日本の内視鏡診療の現状を理解しました。まだまだ学ぶべきことは非常に多く、研修期間が短くて残念ですが、たくさんのものを勉強させていただきました。皆さんの御親切な指導は一生忘れません。国に帰りましたら微力ですが、、中国と日本の友好のために、精一杯努力するつもりです。中国において内視鏡医を育てるためにも皆さんと今後も研究を進めてゆきたいと思います。今後ともどうも御指導をよろしくお願い申し上げます。

最後に日中医学会の皆様、藤野教授、1 内と内視鏡室の皆様の活躍をお祈りいたします。あらためてお礼のことばといたします。

日本財団補助金による
２０００年度日中医学学術交流促進事業

③. 中国人研究者・医療技術者招聘助成事業

(7) 重心移動と咬合力、咬合接触面積咬合平均圧及び咬合バランスとの関連

日本財団助成金による
2000年度日中医学学術交流促進事業報告書
—中国人研究者・医療技術者助成—

財団法人　日中医学協会

理事長　中島章　殿

H13年3月1日

1.招へい責任者 下野　勉

所属機関 岡山大学歯学部小児歯科学講座　　職名 教授

所在地 〒7000914 岡山市鹿田町 2-5-1　　電話 86-235-6715

招へい研究者氏名 馬文利

所属機関 北京大学口腔医学院小児歯科　　職名 講師

研究テーマ 重心移動と咬合力，咬合接触面積咬合平均圧および咬合バランスとの関連

2. 日本滞在日程

H12年7月　重心動揺計の扱方の修得と計測

H12年8月　デンタルプレスケールによる咬合採得と計測

H12年9月　重心動揺計によるサンプル採得と計測

プレスケールによる咬合採得と計測

H12年10月　咬合と重心動揺の関連性の検討

H12年11月　咬合と重心動揺の関連性の検討

中国上海・アジア小児歯科学会発表

中国北京・プレスケールによる咬合採得と計測

H12年12月　東京・重心動揺計によるサンプル採得と計測

プレスケールによる咬合採得と計測

日本体育大学と交流

子どもの身体と心全国連絡会議

H13年1月　結果および考察

H13年2月　結果および考察

論文完成

H13年3月　まとめ

帰国

重心移動と咬合力咬合接触面積

咬合平均圧および咬合バランスとの関連

(研 究 要 旨)

身体バランスと咬合力，咬合接触面積，咬合平均圧および咬合バランスなどの咬合状態との関係を明らかにすることを目的にした。被験者は，歯列不正と咬合異常のみられない，全身的に健康の成人対象４１名(男子１６名,女子２５名，平均年齢 31.3 歳)である。

方法は咬合状態測定および両足，片足で立つ時の重心動揺測定を実施した。咬合状態測定には，デンタルプレスケール 50H type R(富士写真フイルム社)を用いた。重心動揺測定には，自動姿勢装置 VTS-311，EGG 2000V(Patella 社)を用いた。各起立状態別の咬合力，咬合接触面積，咬合平均圧および咬合バランス点の相関関係について検討したところ，以下のような結論を得た。

1. 身体の重心（足底圧中心点）の平均値は，片足立ちの時は両足立ちの時に比べ有意に軸足の方および前方へ移動した。
2. 両足立時に咬合力，咬合接触面積には非対称性かあり，左右側の咬合力，咬合接触面積を比較するとは有意な差がみられた。
3. 片足立ちの時，重心（足底圧中心）の平均値につれて，咬合中心の左右の移動は有意な差がみられた；しかし，方向は同じでなかった。

本研究結果より，普遍的に咬合の非安定性が有ることがわかだ。今後，口顎機能系と身体姿勢制御系との関係に関して，更に深く検討する必要があるものと思われる。

Key words: デンタルプレスケール　咬合力　咬合接触面積　咬合中心　足底圧中心　非対称性

Influence of Standing Gravity Center's Shift on Bite Force, Occlusal Contact Area and Average Bite Pressure

Wenli Ma, Sagiri Ogata, Lihong Ge* and Tsutomu Shimono

Department of Pediatric Dentistry, Okayama University School of Dentistry
2-5-1 Shikata-Cho, Okayama City 700-0914, JAPAN
* Department of Pediatric Dentistry, Peking University School of Stomatology
22 Zhongguancun South Road, Haidian District, Beijing 100081, CHINA

Name and address of author responsible for correspondence:
1) Dr. Wenli Ma
Department of Pediatric Dentistry
Peking University School of Stomatology
22 Zhongguancun South Road, Haidian District, Beijing 100081
CHINA
E-mail: wenlyma@sina.com

2) Dr. Wenli Ma c/o Pro. Shimono
Department of Pediatric Dentistry
Okayama University School of Dentistry
2-5-1 Shikata-Cho, Okayama City 700-0914
JAPAN

Abstract

There are a several hypotheses of correlation between occlusal and postural disturbance. In this study, we attempted to clarify the influence of body's gravity center's moving on bite force, occlusal contact area, average bite pressure and the position of occlusion balance point. Human subjects with normal occlusion and general health were examined with an occlusion pressure graph system and a gravity center measuring system. The information about center of foot pressure, the bite force, occlusal contact area and bite pressure in three standing postures (standing with double feet, stand with right or left foot) was analyzed.

When the subjects stand with only one foot. The center of pressure shifted anterio-laterally to the same side. Comparing to standing with double feet, the difference was significant ($P<0.01$). It had been found that there was an obvious occlusal asymmetry even in the healthy subjects. Significant difference of bite force and occlusal contact area were observed between the two sides when the subjects stood with double feet (bite force, $P<0.01$; contact area, $P<0.05$). The average bite pressure of two sides was not significantly different. As the gravity center shifting, the medio-lateral position of the occlusal balance point moved significantly in most of the subjects (35/41). But the directions were not identical. According to the shift direction of occlusion balance point (medio-lateral axis), the subjects could be divided into four groups. It expressed the instability and multiplicity. No significant differences were detected in other variables among different standing postures.

The results suggested that occlusal instability was very common. Further research is required to explain the relationships between the stomatognathic system and the body regulating system.

Key words

Dental Prescale bite force occlusion contact area occlusion balance point center of pressure occlusal asymmetry

Introduction

With the developing of science and technology, more and more new methods and materials are used to explore the profound mysteries of human being's body. And the

clinicians tend to attention the general relations even more instead of focusing on isolate organs and systems. The problem of gravity center's moving is a region including biodynamics and neuromuscular activities. There are a several hypotheses of correlation between occlusal and postural disturbance. In the last decade these argument have gained a great social impact. As a consequence there have been a growing number of patients seeking concomitant occlusal and postural treatments.

The prevalence of stomatognathic dysfunction syndrome is quite high. A study showed that the temporomandibular joint syndrome was closely related to the asymmetry of masseter muscle activity and only slightly related to the asymmetry of temporal muscle activity. The asymmetry of anterior-temporal muscle's activity appeared little clinical significance. Clenching under conditions of left and right muscle imbalance can further aggravate stomatognathic dysfunction syndrome[1)]. The vertebra is the body's pivot. A survey found that some patients of stomatognathic dysfunction syndrome appeared obviously spinal lateral curvature and the body's center of gravity moved aside obviously[2)].

Although there are some evidences of correlation between occlusion and posture, it appears limited to the cranio-cervical tract of the column and tends to disappear when descending in cranio-caudal direction. Some scholars regard it's not advisable to treat postural imbalance by means of occlusal treatment or vice versa, particularly if the therapeutic modalities are irreversible.

We have to admit that we are really not very familiar to this domain but the success which taken from the treatment of a little amount of cases encourages us to probe further about the correlation between the stomatognathic system and other parts of the body. It is believed that many mysteries are waiting for being discovered.

In order to find that is there any functional relation between the stomatognathic system and the body regulating system. We attempted to clarify the influence of body gravity center's moving on four parameters: bite force, occlusal contact area, average bite pressure and the position of balance point in this study.

Materials and methods

The bite force measuring system

In these years, Dental Prescale system has been developed which is reliable for the

measurement of bite force. Using this system, we can now evaluate the bite force and occlusal contact area on each tooth in the intercuspal position more reliably. This device also enables us to evaluate the bite force balancing point.

The measuring system consists of a pressure-sensitive sheet (Dental Prescale, Fuji Film Co., Tokyo, Japan) and an image scanner (Dental Occlusion Pressuregraph FPD-705 Fuji Film Co. Japan). The sheet, derived from a material used in industrially and known as Prescale, was developed especially for dental use so that its thickness and flexibility would be suitable for measurement of occlusal force. When the sheet is bitten, microcapsules are broken to release staining granules[3]. The occlusal contacts can be detected by a color-developing chemical reaction. Two types of pressure-sensitive sheet are available: Type-R (97um thick) and Type-W (800um thick). The type-R sheet is used for precise measurement of bite force, contact area, and average pressure. The type-W sheet is used for detecting the outline of the teeth and the site of occlusal contacts. Each type of sheet is further divided into two subtypes: 30H and 50H, according to the range of pressure measured. The 30H sheet is used for a range of 3 to 13mPa, and the 50H sheet for a range of 5 to 120mPa. In present study, only Type-R, 50H sheet was used.

The gravity center measuring system

The system consists of a dynamometric platform (VTS-311 EGG 2000v, Patella Co. Japan) and a computer analysis system. This system can measure and calculate the center of pressure (CoP) automatically. The CoP is the vertical projection of the body's mass center (gravity center). It reflects the gravity center's moving indirectly. The system records the moving of CoP for 10 seconds in each phase. The computer can calculate the total distance and area that the Cop moved and the average position of the CoP. We just evaluated the average position of CoP in this research to show the tendency of the gravity center's moving as the standing posture's changing[4,5].

Subjects

41 health adult volunteers (15 males and 26 females; mean age 31.3y, age range 20.5y to 49.7y) with complete dentition except for third molars participated in this study. They exhibited Angle Class I molar relationships without serious teeth crowding or clinical signs of jaw dysfunction. Their general health was well without known musculoskeletal or neurological impairments. All subjects' informed consent was obtained prior to the

investigation.

Data collection and analysis

A. The occlusion samples were collected in three different standing postures:

1) Stand on double feet closing together and the two hands hanged down beside the body and shoulders were parallel to the floor. The head and neck were in natural position.
2) Stand on right foot.
3) Stand on left foot.

In last two postures, the other foot lifted about 10 to 15 cm (the distance between heel to floor), other parts of body were in natural position, no special posture and restriction. In the test design, we wanted to observe the influence of gravity's moving on the stomatognathic system, so no face-bow and support was used.

After a several practice attempts to maintain the intercuspal position, a pressure-sensitive sheet was positioned at the appropriate place in the subject's mouth. The subject was asked to bite in maximum voluntary clenching for 3 seconds. There was 3 minutes interval between two tests. The pressure sheet was place into the occlusion pressure graph within 30 min of being removed from the subject's mouth. After the density of the coloration was converted to a pressure scale, the data of the bite pressure and the occluded area were then transferred to a computer (Windows 95, NEC Computer Inc. Japan). The information about bite force, occlusal contact area and bite pressure was analyzed by means of a software program.

We attempt to estimate force and its location and amplitude. We proposed that the bite force acted perpendicularly to the occlusal planet because of the difficulty of getting accurate information of bite force direction. The anterior-posterior axis of the upper dental arch was located on the middle palatine suture. The medio-lateral axis, perpendicular to the antero-posterior axis, was located on the contact point between the upper central incisors (Fig. 1). All the 41 subjects participated in this part of study.

B. Measuring of center of pressure

The subjects were asked standing quite with eyes open. The feet must put against the base line and the middle line that were marked on the force platform exactly. The test was also divided into three groups:

1) Stood with double feet;

2) Stood with right foot;

3) Stood with left foot.

The other details have been described above. The center of pressure (CoP) in each posture was surveyed and recorded. Then the distance between the CoP and the platform's middle line (X) and the ratio (G) of A to the foot's length (L) were calculate by computer system. A is the distance between the CoP to the connecting line of two feet's heels (Fig. 2). 23 subjects (male 10 and female 13) of the total volunteers were tested in this course. Each one was measured twice in every posture.

Statistical Analyses

All the data were analyzed with SPSS 9.0 for windows statistical package.

ANOVA test was used to examine the difference among the three groups and between two groups classified by posture; and Scheff's F test was used to exam the difference of the bite force, contact area and mean pressure between the subjects' two sides.

Result

1. When a health person stood with only one foot. The center of pressure shifted anteriolaterally to the same side. The difference is significant (Fig. 3.)

Comparing the x-axis position of CoP, ANOVA: $P<0.01$; Comparing the value of G,

D-R $P<0.05$; D-L $P<0.01$; R-L $P>0.05$.

2. The occlusal symmetry is a very important character we want to observe. To determine the preferred chewing side is not very easy. Just declared by the subjects is not exact since some people never mentioned such kind of difference. If you try to observe it, some sensitive subjects maybe can't help changing their normal chewing habit. But just like other parts of body, such as hands, feet, eyes and ears, most people have a preferred chewing side. The difference is just obviously and un-obviously. Actually we observed that most subjects had a stronger side and a weaker side. Significant difference of bite force and occlusal contact area were observed between the two sides of the dental arch in the posture of standing with double feet (Scheff's F test: bite force $P<0.01$; contact area, $P<0.05$). The data of average bite pressure of two sides were not significantly different (Table 1)

3. According to the shift direction of occlusion balance point (medio-lateral axis), the subjects were divided into four groups (Table 2). It expresses multiplicity.

As the shifting of gravity center, the medio-lateral position of the OBP moved

significantly in Group A, B, C (Fig. 4). ANOVA: Group B & C, $P<0.05$ (among three groups); Group A: R-L $P<0.05$; Group B: D-L $P<0.01$; Group C: D-R & D-L $P<0.05$. In other variables of above 3 groups, no significantly difference was found. There wasn't any significant in all variables of group D.

Discussion

The asymmetry of the bite force is due to the activities of the jaw-closing muscle. An investigation[6] found that on the preferred chewing side, the motor units of the masseter muscle appear to differ from those on the non-preferred chewing side. In human body, there are extensive anatomy symmetric phenomena except some internal organs. However most of the symmetric structures appear asymmetry functionally. On the preferred chewing side the teeth had more change to be worn. The contact points changed to small contact planes gradually. If the mean pressure didn't change obviously, when the occlusal contact area increased, the bite force increased accordingly. Tooth contact could bring about a change in the activity of the muscle activity. In another hand the muscle activity would change bite fore, which could affect tooth contact because of physiological tooth mobility. So some scholars[7] indicated that the contact couldn't be simply regarded as either the cause alone or the result alone of the force's change. Each of the two factors, tooth contact and muscle activity has an effect on the other.

In present research we observed that the bite force and the contact area were greater at one side than another side of the dental arch. It seems differ to some previous findings that there was no significant difference of bite force and occlusion area between the two sides at maximal voluntary clenching[6, 8]. Maybe some subjects biting the sheet in sub-maximal voluntary clenching was the main factor that induced the different results. Some studies suggested that the asymmetry of the masseter muscle tend to be greater at lower contraction levels[8, 9]. Different classified criterions used in these researches (stronger side/ weaker side VS prefer chewing side/ un-prefer chewing side) maybe another reason. At the same time, we found that the different between the average bite pressures of the dental arch's two sides was no significant. It's in accord with the previous findings[8, 10].

Bite force, occlusal contact area and average bite pressure are directly observing variables but the occlusion balance point (OBP) is an indirect varible. Although the OBP is not the point at which actual bite force moment is zero, it can be a point that

represents the bite force exerted on all occlusal contacts. At least it's useful for estimating the symmetry of bite force distribution. We found that the OBP shifted as the center of pressure (CoP) moving. But the direction was instability. This result couldn't be compared with previous findings directly because, as we know, there is no corresponding study.

When a person changed his (her) posture from standing with double feet to one foot, the gravity center shifted to the same direction. To maintain the body's balance, there were a chain of neuromuscular activity including legs, arms, trunk and neck. Some studies have examined the functional relationship between mandibular movement and head or body posture. Zafar *et al* certificated that moving of chewing and opening-closing jaw was not only the moving of stomatognatic system muscle but also affect other parts of body[11]. A research of Yamabe *et al* suggested that the head extend-flex motion often accompanied the jaw open-close movement, and the motion of the neck and trunk existed which serve the purpose of promoting the mandible to move smoothly[12]. Eriksson's research showed a functional relationship between the temporomandibular and the cranio-cervical neuromuscular system[13].

In our research a little bit relation was observed. In three groups' subjects (35/41) there was significant different among the distance between the OBP to the antero-posterior axis of three standing postures. Unfortunately, the change's direction seems disorderly; no obvious regulation was founded. It appeared the instability and multiplicity of occlusion. A study of Kim *et al*[14] also reported there was not any significant different between different chair-position in the chewing activities. These results suggested that occlusal instability was very common.

However we can't conclude that the exploring about the relationship between occlusion and body posture is not very significant. It encourages us to explore the deeper and internal correlation. Zafar's study[11] showed that mouth open movement is preceded by extension of the head and that mouth closing is followed by head flexion. Further more, it seems reasonable to believe that such integrated activation of jaw and neck muscles is controlled by a central nervous network common for both jaw and neck muscles. But some other researches indicated that in a standing position, the masseter muscle's EMG activity was significant higher during maximal voluntary clenching; but the EMG activity of sternocleidomastoid did not change. The opposite patterns of EMG

activity supported the idea that there may exist differential modulations of the motor neural pools of the sternocleidomastoid and masseter muscles of peripheral and/or central origin. It suggests that the presence of parafunctional habits and body position could be closely correlated with the clinical symptomatology in these muscles of patients with myogenic craniomandibular dysfunction[15, 16].

There were a several case reports that some patients complained waist and back pain, in clinical examination, the spinal lateral curvature and the unilateral intermaxillary vertical distance's loss were found and their gravity centers shifted lateral. The clinicians inferred that that unilateral vertical loss induced unbalance clenching of stomagtonathic system's muscles and then affected the other parts of body. After improving of occlusion, those general symptoms alleviated dramatically[2]. It illustrated that maybe there were really some functional relationships between the stomatognathic system and body's posture regulating system and they effected in double ways.

When a healthy subject changes his (her) posture from standing with double feet to one foot, the gravity center shifts aside obviously. To maintain the body's balance, a series of reactions appear and many parts of the body are involved. Some researches showed that the displacement of head and lumbar position and the muscles' activity of leg and toes were important factors associated with the center of gravity[17, 18]. The human body has very strong buffering skill. To a specific part, for example, the leg, trunk, neck or the stomatognathic system, the muscular activity changes. However the different is ether obvious or not un-obvious. If the body's normal balance has been broken for a long time, over the limit, neurological and musculoskeletal impairment of some parts will emerge. On the other hand, if the abnormal occlusal relation appeared, the continuing stress is inputted through the sensory nerves. As a feedback, the monitor nerves will adjust to adapt the stimulation. When the type of neuromuscular activity changes significantly, the physical and psychological disorders reflected by this or that kind of symptoms will appear.

The occlusal theory in its original form is based on the findings in adults and assumes that the causal chain proceeds from structure to function. However, the close developmental relationship between function and structure and the recent changes in the functional environment of the stomatognathic organ indicate that the causal influences take place in both directions. During growth, function and structure interact each other.

Conclusion

1 When a health person stood with one foot instead of double feet the center of gravity shifted anteriolaterally to the same side obviously.

2. Even standing with double feet, there was an obvious occlusal asymmetry in healthy persons. The bite force and occlusal contact area in one side of dental arch were greater than in another side.

3. As the shifting of gravity center, the medio-lateral position of the occlusal balance point moved significantly. But the direction was not identical.

The results suggested that occlusal instability was very common. Further research is required to explain the relationships between the stomatognathic system and the body posture regulating system.

Acknowledgement

This study is supported by the Japan-Sino Medical Association's grant.

Table1. The occlusal station when standing with double feet

	Stronger side	**Weaker side**	**P**
Bite force	826.95±342.59	709.60±300.10	<0.01
Occlusal contact area	23.57±11.17	20.52±12.61	<0.01
Average bite pressure	36.44±5.30	35.74±6.57	>0.05

In the posture of standing with double feet significant difference of bite force and occlusal contact area were observed between the two sides (Scheff's F test: bite force, $P<0.01$; occlusal contact area, $P<0.05$).

Table2. The moving direction of occlusion balance point

Group	n	GC shift to right	GC shift to left
A	13	+	+
B	9	+	_
C	13	_	+
D	6	_	_

Positive indicates that the moving direction of the OBP and the CoP was identical;

Negative indicates that the moving direction of the two points were opposite.

Figure 1

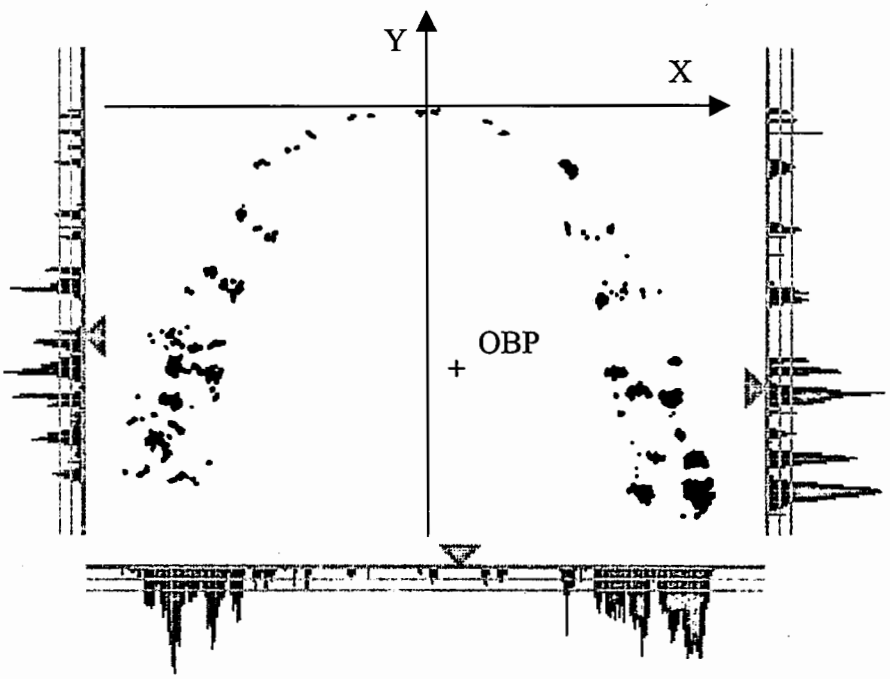


Figure 1. The distribute of bite force

Y axis of the upper dental arch was located on the middle palatine suture. X axis, perpendicular to Y axis, was located on the contact point between the upper central incisors.

Figure 2

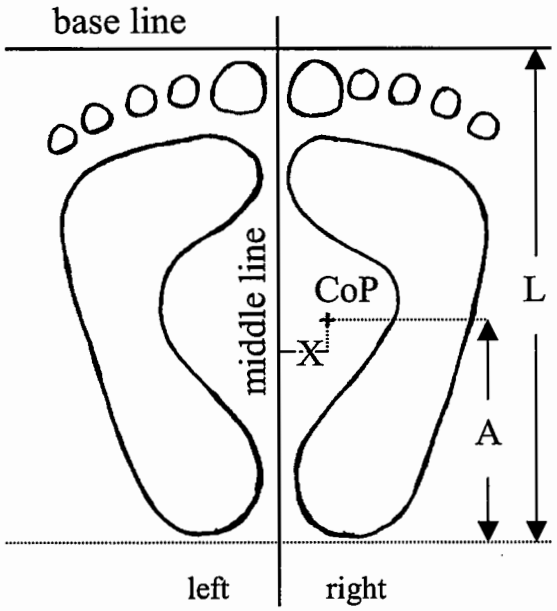


Figure 2 The distribution of foot pressure

X: the distance between the CoP and the platform's middle line
A: the distance between the CoP to the connecting line of two feet's heels
L: the length of foot

Figure 3.

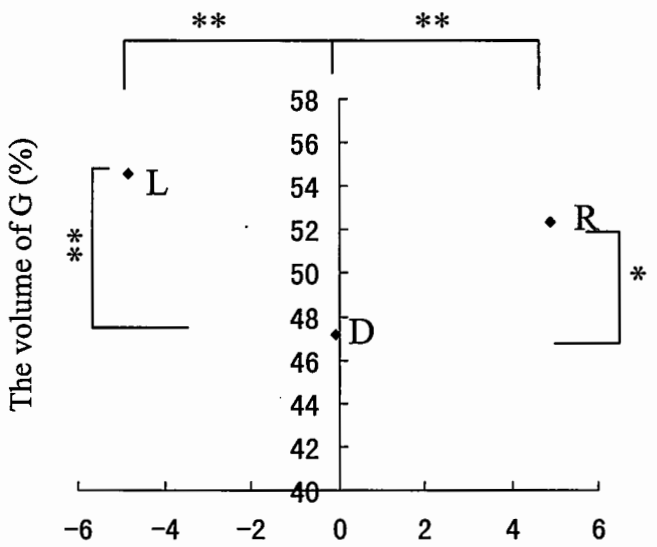


Figure 3. The shift of the center of foot pressure

When the subjects stood with only one foot, the center of gravity shifted to the same side and anterior obviously (N=23, ANOVA: * $P<0.05$, ** $P<0.01$). D: double feet; L: left foot; R: right foot.

Figure 4

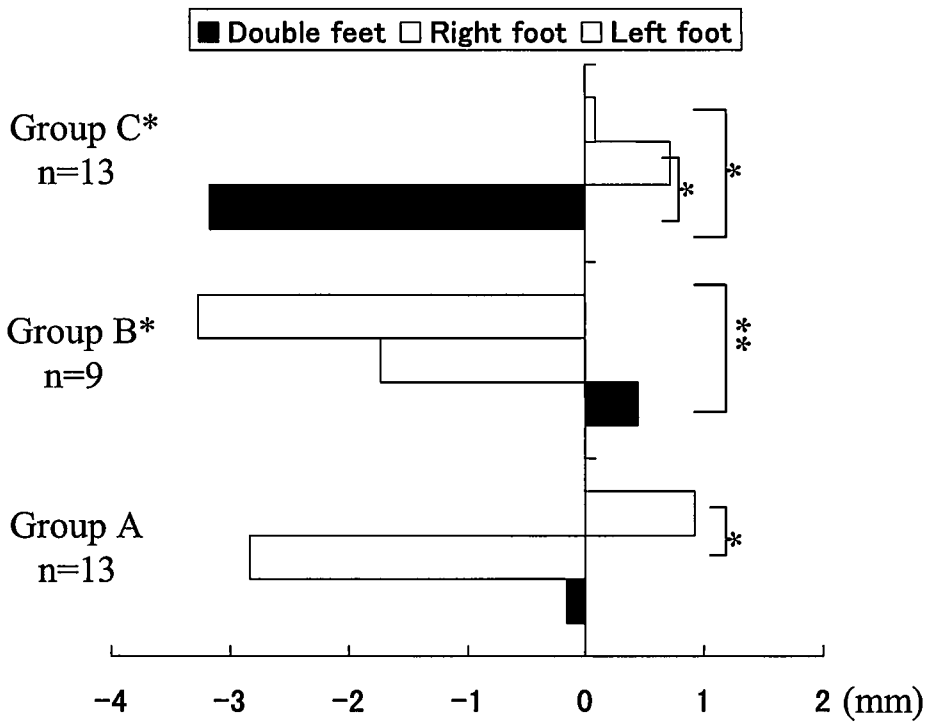


Figure 4. The vary of the occlusion balance point's medio-lateral position

As the shifting of gravity center, the medio-lateral position of the OBP changed significantly in group A,B,C (ANOVA: *P<0.05, **P<0.01)

Reference

1. Abecura, H., Kotani, H., Tokuyama, H., Hamada, T.: Asymmetry of masticatory muscle activity during intercuspal maximal clenching in healthy subjects and subjects with stomatognathic dysfunction syndrome. *J Oral Rehabil* **22**: 699-704, 1995.
2. Ozawa, F. and Ozawa, N.: Occlusion and biomechanics. *Japan Medical Culture Center* 7:104-137, 1990.
3. Matsui, Y., Ohno, K., Suzuki, Y. and Yamagata, K.: A computerized method for evaluating balance of occlusal load. *J Oral Rehabil* **23**:530-535,1996.
4. Usui, N., Maekawa, K. and Hirasawa, Y.: Development of the upright postural sway of children. *Dev Med Child Neurol* **37**:985-996,1995.
5. Nichols, D., Glenn, T. and Hutchinson, K.: Changes in the mean center of balance during balance testing in young adults. *Phys Ther* **75**: 699-706,1995.
6. Wilding, R. and Lewin, A.: A model for optimum functional human jaw movements based on values associated with preferred chewing patterns. *Arch Oral Biol* **36**:519-523, 1991.
7. Trulsson, M. and Johansson, R.: Encoding of tooth loads by human periodontal afferents and their role in Jaw motor control. *Prog Neurobiol* **49**: 207-284,1996.
8. Hidaka, O., Iwasaki, M., Saito, M. and Morimoto, T.: Influence of clenching intensity on bite force balance, occlusal contact area, and average bite pressure. *J Dent Res* **78**:1336-1344,1999.
9. Naeije, M., McCarroll, R.S. and Weijs, W.A.: Electromyographic activity o the human masticatory muscles during submaximal clenching in the inter-cuspal position. *J Oral Rehabil* **16**:63-70, 1989.
10. Riise, C., Ericsson, S.G.: A clinical study of the distribution of occlusal tooth contacts in the intercuspal position at light and hard pressure in adults. *J Oral Rehabil* **10**:473-480,1983.
11. Zafar, H., Nordh, E. and Eriksson, O.: Temporal coordination between mandibular and head-neck movements during jaw opening-closing tasks in man. *Arch oral Bio* **45:** 675-682,2000.
12. Yamabe, Y., Yamashita, R. and Fujii, H.: Head, nck and trunk movements accompanying jaw tapping. *J Oral Rehabil* **26**: 900-905, 1999.

13. Eriksson, P.O., Haggman-Henrikson, B., Nordh, E. and Zafar, H.: Co-ordinated mandibular and head- neck movements during rhythmic jaw activities in man. *J Dent Res* **79**: 1378-1384, 2000.
14. Kim, Y.K., Lee, S.W., Chung, S.C. and Kho, H.S.: Comparison of muscle activity and occlusal contacts during maximal and habitual clenching in varied chair positions. *J Oral Rehabil* **24**: 237-239, 1997.
15. Ormeno, G., Miralles, R., Santander, H., Casassus, R., Ferrer, P., Palazzi, C. and Moya, H.: Body position effects on sternocleidomasoid and masseter EMG pattern activity in patients undergoing occlusal splint therapy. *Cranio* **15**: 300-309,1997.
16. Miralles, R., Palazzi, C., Ormeno, G., Giannini, R., Verclugo, F., Valenzuela, S. and Santander, H.:Body position effects on EMG activity of sternodeidomastoid and masseter muscles in healthy subjects. *Cranio* **16**:90-99,1998.
17. Tanaka, T., Takeda, H., Izumi, T., Ino, S. and Ifukube, T.: Effects on the location of the center of gravity and the foot pressure contribution to standing balance associated with ageing. *Ergonomics* **42**: 997-1010,1999.
18. Takigawa, Y., Matsuoka, S., Iida, J. and Soma, K.: Jaw position, head position, body posture: development of an integrated system of examination, Part I. *Kokubyo Gakkai Zasshi* **62**: 441-450, 1995.

日本財団補助金による
２０００年度日中医学学術交流促進事業

④．日本人研究者派遣助成

(1) 大腸腫瘍の内視鏡的治療の標準化と安全性の研究

交流・指導テーマ
大腸腫瘍の内視鏡的治療の標準化と安全性の研究

訪中研究者氏名　宇野良治

所属・役職　　弘前大学医学部第一内科助手

招聘責任者氏名　袁士宗

所属・役職　　北京軍区総医院院長

◆訪問地の状況，課題

訪問先の北京軍区総医院のみならず中国では，大腸内視鏡の挿入技術や大腸内視鏡による治療が日本のそれと異なる状況がある．その根本にはハードがあってもソフトを維持できない中国の医療事情をとりまく経済的な問題があり（内視鏡があっても高価なディスポーザブル器具が購入出来ないこと），日本における最先端治療の技術指導が今日明日の診療に役立たないことも事実であるが，今後の中国の経済発展を期待した場合，日本と同様の医療が行われる可能性がないとないえない．そのため，現時点でも中国で即座に導入できる手技とその理論を指導することと，現在，日本で中心に行われている手技とその理論を中心に指導することを目的とした．

◆講演，指導の内容

9月25日は北京軍区総医院の見学を行い，翌日より行われる実技デモンストレーションで使用する内視鏡および日本から搬入した治療器具の点検を行った．

9月26日は北京軍区総医院の内視鏡室で午前8時30分から12時30分まで合計11人の患者の大腸内視鏡検査を行った．内視鏡室に数人入り，また別室にテレビを2台用意し，内視鏡室で大腸内視鏡を操作している画像と内視鏡画像の2画面をテレビ中継した．そのテレビ中継の部屋には常時20～30人の見学者が訪れた．午後2時から5時30分まで大腸内視鏡の挿入法についてスライドとホワイトボードを利用して講演を行った．

9月27日は午前中に病室を回診し，問題のある患者についてのコメントを行った．午後は中華医学会北京分会でnon-lifting signについてスライド及びビデオで講演した．参加者は300名前後であった．

9月28日，9月29日の午前中は10月26日と同様にライブデモンストレーションを行った．28日は9人，29日は6人の患者の内視鏡検査を行った．合計26人の患者のうち20人は治療を要し，内視鏡的ポリープ切除術および内視鏡的粘膜切除術を行った．特に30mmと非常に大きなポリープの切除や表面型腫瘍の粘膜切除術を行ったことは非常に有意義であった．また，潰瘍性大腸炎の鑑別診断や大腸悪性リンパ腫の診断と2例の大腸癌を発見した．

9月28日の午後は安全な大腸内視鏡治療について午後2時から午後5時30分まで講義し，29日の午後は内視鏡診断について午後2時から午後5時30分まで講義した．

9月30日はホテル内で完全休養し，10月1日～10月3日まで市内観光の予定であったが，中国始まって以来の連休に重なり，大混雑のため十分な観光も出来ずに帰途についた．

◆今後の交流計画

ライブデモンストレーションを見学に来た他病院の医師から自分の病院にも来て大腸内視鏡を行って欲しいとの要望があったが，連休であったため赴くことは出来なかった．今後は内視鏡の指導を希望する施設を事前に調べ上げ，余裕を持って各病院に伝道師のごとく赴くことが必要と考えた．今回のような指導が出来るならば要請に応えたい．

日本財団補助金による
２０００年度日中医学学術交流促進事業

④．日本人研究者派遣助成

(3) ほ乳類の培養細胞を用いた遺伝子突然変異試験の技術指導とその応用

日本財団助成金による
2000年度日中医学学術交流推進事業報告書

－日本人研究者派遣－

平成12年8月28日

財団法人　日中医学協会
理事長　中島章　殿

1．訪中者氏名　本間正充

所属機関名　国立医薬品食品衛生研究所・変異遺伝部　職名　室長

所在地　〒158-8501 東京都世田谷区上用賀 1-81-1　電話 03-3700-9847

受入機関名　華西医科大学公衆衛生学院

所在地　中国四川省成都市人民南路三段17号

受入責任者名・役職　張朝武(Zhang Cauowu)・華西医科大学公衆衛生学院学部長

2．中国滞在日程

月	日	訪問地・機関	活動内容等
7月	7日 (金)	成都	中国成都到着
	8, 9日 (土、日)	成都	資料整理、観光
	10日 (月)	成都・華西医科大学	大学案内、学部長表敬訪問、講義準備
	11日 (火)	成都・華西医科大学	講義
	12～14日 (水～金)	成都・華西医科大学	実技指導
	15,16日 (土、日)	成都	資料整理、観光
	17,18日 (月、火)	成都・華西医科大学	実技指導
	19日 (水)	北京	乗り継ぎ
	20日 (木)	帰国	

3．交流報告

交流テーマ

「ほ乳類培養細胞を用いた遺伝子突然変異試験の技術指導とその応用」，

訪中研究者氏名：本間正充

所属：国立医薬品食品衛生研究所

役職：室長

報告

＜概要＞

平成12年7月7日から7月20日までの14日間、華西医科大学衛生学部・学部長張朝武(Zhang Chaowu)教授の招聘を受け、同大学・同学部張立実(Zhang Li-Shi)教授の研究室を訪問した。張教授は現在、衛生学部の副学部長であると同時に、栄養学、食品衛生学、遺伝毒性学の3つの研究室の責任者でもある。張教授は平成6年から7年までの2年間、国立医薬品食品衛生研究所・変異遺伝部に客員研究員として在籍し、主としてほ乳類培養細胞を用いた染色体異常、遺伝子突然変異の研究に従事し、多くの研究業績を残し帰国した。帰国後は日本での研究経験を生かし、中国国内での遺伝子突然変異試験の普及や、それを用いた漢方薬成分の遺伝的影響などの研究を行っている。中国における遺伝毒性の研究はエームス試験や染色体異常試験が定着し始めたばかりで、ほ乳類培養細胞を用いた遺伝子突然変異試験に関してはほとんど行われておらず、張教授は中国におけるこの分野のパイオニア的存在である。ほ乳類培養細胞による遺伝子突然変異試験は最近ICH(international Conference of Harmonization)において医薬品の遺伝毒性試験法の1つとして認知され、その国際的普及が計られている。今回の滞在の第一の目的は張教授の研究を助け、遺伝子突然変異の研究を中国国内に普及させることである。この目的のため滞在中、以下の活動を行なった。

(1)遺伝子突然変異試験法、特にMLA試験の原理、役割に関する講義

(2)遺伝子突然変異発生のメカニズムに関する講義

(3)遺伝子突然変異試験法の技術指導、および遺伝子突然変異体の分子生物学的、細胞遺伝学的解析技術の指導

(4)毒性・遺伝毒性に従事する中国人研究者とのインタビュー

なお、上記(3)の目的を達成するため、日本からマウス細胞株1種、ヒト細胞株2種と細胞培養のための培地、血清、実験器具等を携行した。また、今回の滞在には北京の中国薬品生物製品検定所の王雪(Wang Xue)博士も同行した。王博士もまた平成9年～10年まで国立医薬品食品衛生研究所・変異遺伝部に在籍した研究者である。日本語が堪能であることから、私の講義の一部について通訳を努めていただき、また同時に本人も日本で行っ

た遺伝子突然変異に関する研究について講演を行った。

滞在中のこの時期の大学は夏期休暇に入ったばかりで学生はまばらであった。ただし、日本と同様、研究室に属する大学院生や教官の多くは残っているため上記活動を行うには何ら問題はなかった。むしろ、教官の多くは卒業式や、学位授与式を終えたばかりであるため、比較的時間的余裕があり、多くの中国人研究者と話し合う機会を得ることができた。

＜活動内容＞

(1)遺伝子突然変異試験法、特にMLA試験の原理、役割に関する講義

MLA試験はマウスL5178Y細胞を用いたチミジンキナーゼ遺伝子をターゲットした遺伝子突然変異試験である。我が国においてもこれまでなじみのない試験であったが、ICHにおいて医薬品の遺伝毒性に関する安全性試験の１つとして採用されて以来、急速に広まりつつある。張教授は、日本滞在中に、我が国におけるMLA試験導入に貢献し、その経験から現在、中国国内で本試験法の啓蒙、普及を行っている。講義では、まず最初に、医薬品、化学物質、農薬等における遺伝毒性試験のガイドラインについて、我が国と、米国、ECを比較し、またOECDやICHの国際的ガイドラインを紹介した。その後、MLA試験の原理、MLA試験導入によるこれらガイドラインへのインパクトを解説した。特に、1994年から1996年まで行った国際共同研究の成果について触れ、遺伝毒性試験としてのMLA試験の優位性を強調した。さらには、突然変異体を遺伝子レベル、染色体レベルで解析した最新のデータを紹介した。突然変異体には染色体の構造的変化だけでなく、染色体の数的変化を有する物も含まれていることから、MLAのAneugen検出系としての有効性にも言及した。

中国は医薬品資源が豊富で、特に漢方生薬を利用した薬物治療に関しては歴史的に大きな経験の蓄積がある。しかしながら、中国医薬品の需要のほとんどは中国国内に限定され、国外向けの医薬品の割合はきわめて少ない。その理由の１つとして、中国で生産される医薬品の品質および安全性に関する保証が国際レベルに達していないことがあげられる。中国の医薬品産業をより活性化するためには、今後国際市場をターゲットとした展開が重要と考えられるが、そのためには国際水準のGLP（Good Laboratory Practice）の確立が不可欠である。この講義によって、医薬品開発における国際的ガイドラインの現状とその重要性を少しでも多くの聴衆が理解してくれることを期待した。

(2) 遺伝子突然変異発生のメカニズムに関する講義

MLA試験を含む常染色体劣性型遺伝子突然変異検出系は、点突然変異だけでなく染色体レベルの欠失、組換え、染色体不分離等をも検出できるきわめて変異スペクトルが広い遺伝子突然変異検出系である。また、ここで検出される突然変異は、がん抑制遺伝子の体細胞での突然変異スペクトルと一致するため、細胞がん化における遺伝子変異のモデルとしても有用である。我々は最近この系を用いて、がん抑制遺伝子のひとつであるp53が相同

組換えを介して、染色体上で生じたDNAの二本鎖切断を修復することをを解明したが、本講義では主にこの内容を中心たp53の遺伝的安定化機構について解説した。また、その応用として、p53正常細胞、変異細胞、欠損細胞を用いて各種遺伝毒性物質の性質を検討することにより、突然変異のメカニズムや、それら遺伝毒性物質の性質を詳細に解析できることなどを紹介した。

華西医科大学の遺伝毒性学研究室においては最近日本においても問題となっている内分泌撹乱化学物質（いわゆる環境ホルモン）の毒性に関する研究が行われている。これまで内分泌撹乱化学物質の毒性に関してはホルモンレセプターを介した生理学的影響が中心であり、遺伝的影響はほとんどないものと理解されてきた。しかしながら、最近の我々のこの検出系を用いた研究からダイオキシン、ビスフェノールA等の内分泌撹乱化学物質の一部は、相同組換え反応を亢進させる作用があることが示唆されている。このことから、講義終了後、多くの研究者から相同組換えの機構、相同組換えの検出法についての質問を受けた。また、一部の研究者とは、情報提供または共同研究ということで内分泌撹乱化学物質の遺伝的影響について一緒に研究する約束をした。

(3)遺伝子突然変異試験法の技術指導、および遺伝子突然変異体の分子生物学的、細胞遺伝学的解析技術の指導

遺伝子突然変異試験の基本的な方法に関しては張教授が日本で学んでいたため、基本的な技術に関しては特別な指導は必要ないと判断された。しかしながら、試験に必要な細胞の状態が悪く、今回新たな細胞を日本から持ち込んだことからわかるように、細胞の維持管理に関する環境は必ずしもいいとは言えなかった。具体的には、(1)細胞を保存する超低温フリーザー（-80℃以下）または液体窒素容器がないこと、(2)培養に必要な超純水の確保が困難であること、(3)細胞培養に必要なプラスチック容器が不足していることなどが挙げられる。今後、中国側に何らかの研究援助が可能な場合、これら機器、器具の提供が重要であると考えられた。また、MLA等の突然変異試験では96穴のマイクロプレートを用いるのが通常であるが、これは使い捨てで、比較的高価であることが、中国での本試験の普及を妨げていることも痛感した。安価なマイクロプレートの開発や、マイクロプレートを用いない試験法の改良も重要と考えられる。

遺伝子突然変異体の解析には分子生物学的解析（サザンブロット、ノーザンブロット、ウェスタンブロット、PCR法、DNAシークエンス法等）および細胞遺伝学的解析（ギムザ染色による染色体分析、FISH法、SKY法等）などがあるが、現状ではサザンブロット、ウェスタンブロット、ギムザ染色のみが行われていた。これら技術にに関しては問題ないと判断された。しかしながら、詳細な変異体の解析に関してはPCR法、シークエンス法が必須であるが、高額な機械を必要とするため、いまだ実現していない。また、FISH法に必要とされる蛍光顕微鏡の設備は十分であったが、試薬としての蛍光プローブの作成や入手は困難なようであった。研究援助が可能な場合、これら機器、試薬も考慮すべきと思われ

る。

張教授の研究室では、日本から持ち帰った培養細胞を用いて、遺伝子突然変異だけでなくDNA損傷試験（コメット試験）やアポトーシス誘導試験も行っていたことには驚いた。DNA損傷やアポトーシスは突然変異の発生と密接に関連しており、p53もその制御に大きく関与していることが明らかとなっている。我々の研究室でも最近、導入し始めたばかりであるが、張教授の方がデータの蓄積が多く、改めて彼の先見の目の高さを認識した。張教授とはこれら研究に関して共同研究を行うことを約束した。

(5)毒性・遺伝毒性に従事する中国人研究者とのインタビュー

滞在中以下の研究者とインタビューする機会を得た。その内容も簡単に記載する。

(a) 張立実(Zhang Li-Shi)：華西医科大学教授・公共衛生学院副学部長

私の親友であり、今回招聘してくれた人物。滞在中、公私に関わらずすべてを面倒見ていただいた。専門は栄養学、食品衛生学、遺伝毒性学で遺伝子突然変異、遺伝毒性のガイドライン、GLPを含むすべてのことに関して意見交換を行った。

(b) 王雪(Wang Xue)：中国薬品生物製品検定所毒理室副教授

私の友人であり、今回の訪問に際して、北京から同行していただき、日本語と中国語の通訳も務めていただいた。専門は遺伝毒性。遺伝子突然変異、中国におけるGLPの現状などについて情報交換を行った。

(c) 張朝武(Zhang Chaowu)：華西医科大学教授・公共衛生学院学部長

今回の招聘責任者。中国における医薬品、医薬品試験の現状。ダイオキシンや重金属汚染等の中国の環境問題。大学教育等について主に話をした。ダイオキシン等の内分泌攪乱化学物質の生体影響について、張立実教授の仕事通じ華西医科大学の研究を支援することを約束した。

(d) 黄承玉(Hang Cheng-yu)：華西医科大学教授

専門は食品衛生学。生薬成分、栄養補助食品について話をした。米国に留学経験があり。

(e) 張健新(Zhang Jianxin)：華西医科大学副教授

専門は腫瘍学。中国におけるがん研究の現状を話していただいた。また、研究室も案内していただいた。日本への留学経験有り。

(f) 来宋生(Rongsheng Luan)：華西医科大学副教授

専門は予防医学、疫学。中国におけるエイズ問題。特に雲南省少数民族での麻薬汚染が、エイズの罹患率を高めており、極めて深刻な現状であることなどを話していただいた。日本への留学経験有り。

(g) 何涛：華西医科大学講師

張立実教授の研究室で実際に遺伝子突然変異試験を行う試験責任者。細胞の培養、維持、突然変異試験、変異体の同定など、具体的な実験について指導等を行った。

(h) 張健静(Zhang Jianging)：華西医科大学博士研究員

張立実教授の研究室で実際に遺伝子突然変異試験や遺伝子解析を行う研究者。突然変異試験のみならず、アポトーシス、コメット試験についても議論した。

(i) 呂暁英(Lu Xiao)：華西医科大学大学院生

張立実教授の研究室で実際に遺伝子解析等を行う学生。がん遺伝子やp53などのがん抑制遺伝子の役割に興味をもっており。おもに講義内容に関して更に説明等を行った。

(j) 越春(Zhao Chun)：昆明医学院栄養食品研究所副教授

専門は栄養学、食品学。アロエ、霊芝、余甘子等に含まれる薬用成分を研究しており、栄養補助食品としての可能性について話していただいた。

他に多くの研究者、学生とも話をする機会を得たが、代表的なもののみを記載した。

＜今後の交流計画＞

張立実教授の研究室を中心に今後、いくつかの研究テーマに関して共同研究を行い、研究交流を計るとともに、我々の研究室への中国人研究者を受け入れ、人的交流を進めていきたいと考える。具体的な計画を以下の示す。

1.「ヒト培養細胞を用いた新しい遺伝毒性評価システムの構築」：本共同研究には現在、日本において製薬企業を中心とする約25の研究機関が参画している。ヒト培養細胞を用いた遺伝子突然変異、コメット試験について研究経験豊富な張教授に参加していただくことは共同研究の大きな発展になると考えられる。

2.「内分泌攪乱化学物質の遺伝毒性に関する研究」：ダイオキシン、PCB等の内分泌攪乱化学物質によって誘発される遺伝子突然変異、特に組み換え型遺伝子突然変異の発現機構を解明することにより、それら化学物質の発がんリスクを評価する。中国側で主に突然変異体の分離、日本側で変異体の解析を担当する。

3.「中国薬草中に含まれる抗変異作用をもつ薬物のスクリーニングに関する研究」：遺伝子突然変異検出系を用い、突然変異を抑制する化学物質を中国薬草中から検索する。中国側で主に抗変異作用のスクリーニング、日本側でその作用メカニズムの検討を行う。

4.人的交流として、来年度から張教授の研究室出身者で、現在、成都衛生防疫所のZhan Li氏を留学生として受け入れる予定である（現在、日中医学協会に申請中)。

＜最後に＞

今回の訪問では何よりも私を招聘してくれた張立実教授に何より感謝したい。彼は、副学部長という忙しい立場であるにも関わらず、滞在中公私にわたり私をもてなしてくれた。あまりの接待ぶりを私が心配すると、彼は「日本から来た一番の親友をこのように接待するのは当然のことだ」と言ってくれた。彼が日本に滞在した2年間、私が彼にどれだけのことをしてあげれたのかはわからないが、彼が私のことを一番の親友と思ってくれている

ことを聞いて感激した。彼もまた、私にとって一番の親友である。また、彼の家族、友人、大学・研究室の方々にも感謝したい。彼らはいつも友好的に私に接してくれ、彼らのおかげですべてをいい思い出で過ごすことができた。多くの中国人の暖かさに触れ、私はいっぺんで中国と中国人が好きになった。また、いつかこの地に来ようと思う。

最後に、今回の訪中を援助していただき、私を中国好きにしてくれた日中医学協会に感謝いたします。

日本財団補助金による
２０００年度日中医学学術交流促進事業

④．日本人研究者派遣助成

(2) 北京中医薬大学附属東直門医院看護部に対する看護研究指導

日本財団助成金による

2000 年度日中医学学術交流促進事業報告書

－日本人研究者派遣－

平成 12 年 10月 20日

財団法人 日中医学協会

理事長 中島章 殿

講演・手術指導等の写真を添付して下さい。

訪中記等発表に当っては、*日中医学協会助成事業－日本財団助成金による*旨を付記して下さい。

1．訪中者氏名 緒方昭 ㊞

所属機関名 福井医科大学 職名 名誉教授

所在地 〒910-1193 福井県吉田郡松岡町下合月23-3 電話 0776-61-3111

受入機関名 北京中医薬大学付属東直門病院 看護部

所在地 北京市東城区海運倉胡同5号

受入責任者名・役職 鄭平 看護部長

2．中国滞在日程 （訪問都市・機関名等主な日程を記入して下さい）

別紙

3．交流報告

別添書式により、講演・指導内容、訪問地の状況・課題、今後の交流計画等を4000字以上で報告して下さい。

（ワープロ使用）

使用文字は交流テーマ１３ポイント、その他は１０ポイント、明朝体を使用して下さい。

3．交　流　報　告　書

Ⅰ．訪中目的

1．北京中医薬大学付属東直門醫院看護部に対する看護研究指導。

2．中日看護交流会における研究発表。

3．中国鉄道部北京鉄路総醫院看護職者に対する『看護研究論並びに日本における訪問看護実施状況』の講演。

4．JICA専門家大西幸子言語療法師の中国人民解放軍総醫院における言語療法に関する講演会参加と中国人民解放軍総醫院韓忠福看護部長および看護部職員と看護研究についての意見交換。

5．緒方昭著書『看護研究への招待・看護統計学への招待』の中国語翻訳書出版内容の検討。

Ⅱ．中国滞在日程

200年 月 日　　訪問地・機関・学術交流内容等

8月6日(日) 関西空港 MU008　10:00発。上海経由MU5161にて北京空港 16:40着。
北京市漁陽飯店宿泊。

7日(月) 北京鉄道病院講演内容につき游兆媛看護婦（通訳者）と講演内容の打ち合わせ。北京市漁陽飯店宿泊。

8日(火) 緒方昭著書『看護研究への招待・看護統計学への招待』の中国語翻訳書出版内容の検討のため侯召棠氏・料博物館長・陸静氏・中国出版会社科学社記者との打ち合わせ。北京市漁陽飯店宿泊。

9日(水) 中日看護交流会における緒方講演内容につき中日友好病院江秀栄看護婦（通訳者）と打ち合わせ。北京市漁陽飯店宿泊。

10日(木) 北京中医薬大学付属東直門醫院護理部鄭平看護部長に看護職者に対する看護研究実践に関する指導。北京市漁陽飯店宿泊。

11日(金) 北京中医薬大学付属東直門医院護理部鄭平看護部長に日本における訪問看護実施状況の紹介。北京市漁陽飯店宿泊。

12日(土) 中日看護交流会歓迎パーテイ出席。北京市園山大酒店宿泊。

13日(日) 北京看護学会主催市内見学。万里の長城・明の十三陵見学。
北京市園山大酒店宿泊。

14日(月) 中日看護交流会第1日目。開会式 北京看護学会会長 黄 人健氏挨拶
特別講演２題。中国演題５題、日本演題５題。北京市園山大酒店宿泊。

15日(火) 中日看護交流会第２日目。特別講演２題、中国演題３題。
日本演題２題（緒方演題：看護職養成課程における研究能力の育成についての私見）。北京鉄路総醫院内宿泊施設宿泊。

16日(水) 中国鉄道部北京鉄路総醫院周玉皎院長の招聘により病院見学並びに看護職者に対する看護研究並びに日本の訪問看護実施状況の講演。
北京鉄路総醫院内宿泊施設宿泊。

17日(木) 休養。北京鉄路総醫院内宿泊施設宿泊。

18日(金) 中国中醫薬報社（医学薬学関係新聞社）訪問。陳貴廷社長と意見交換。
宇博氏（友人）宅宿泊。

19日(土) 休養。郭宇博氏（友人）宅宿泊。

20日(日) 休養。郭宇博氏（友人）宅宿泊。

21日(月) 中華人民共和国国家中醫薬管理局呉厚新氏・趙文華氏と看護制度について意見交換。郭宇博氏（友人）宅宿泊。

22日(火) 休養。北京四環ホテル宿泊。

23日(水) 北京中医薬大学付属東直門医院護理部鄭平看護部長に病院看護機能評価に関する研究指導。北京四環ホテル宿泊。

24日(木) 陸静氏と書籍『看護研究・統計学』訳本出版内容の打ち合わせ。
北京四環ホテル宿泊。

25日(金) 休養。北京四環ホテル宿泊。

26日(土) 休養。北京四環ホテル宿泊。

27日(日) 休養。北京四環ホテル宿泊。

28日(月) 中国中日友好醫院李秀華副看護部長を訪問し看護現任教育について意見交換。
北京四環ホテル宿泊。

29日(火) JICA専門家大西幸子言語療法師の中国人民解放軍総醫院における言語療法に関する講演会参加、及び、韓忠福看護部長並びに看護部職員と看護研究について意見交換。北京四環ホテル宿泊。

30日(水) 北京空港 MU5186 09:10発　上海経由 MU 007 12:30発　関西空港 15:25着。

Ⅲ．交流内容の詳細

1．指導テーマ：北京中医薬大学付属東直門醫院看護部に対する看護研究指導。

研究者氏名　　鄭　平 氏
所属・役職：北京中医薬大学付属東直門醫院護理部　看護部長
招聘責任者氏名　鄭　平 氏
所属・役職：北京中医薬大学付属東直門醫院護理部　看護部長

指導内容：

北京中医薬大学付属東直門醫院における病院看護機能の向上を図る手段として、先ず、現在実践中の病院看護業務の種類と業務量の実態を明らかにする必要がある。

そのためには、当醫院の考える看護の定義を明らかにした上で、具体的に看護業務の種類を特定しておかなければならない。

したがって、看護部長に対して『本醫院の考える看護の定義ならびに具体的看護業務の種類決定に関する委員会』を幹部看護婦数名で編成し、勉強会の段階から作業を進めるよう指導した。

なお、この委員会活動が円滑に実施されるならば、看護業務量の具体的測定方法が考案され、調査活動によって実態が明らかになり、本醫院の特長や問題点が指摘されて、将来、本醫院の発展向上に向けての活動が論理的に展開される。したがって、本委員会の役割は重要で、委員の人選には特に留意し、明るく進歩的な運営がなされるよう指導することが特に大切である事を強調した。

また、勉強会の資料として『新・病院看護機能評価マニュアル』日本看護協会編、『ＴＮＳ忙しさの尺度』メヂカルフレンド社（共に日本語版）を提供した。

2．中日看護交流会における研究発表。

招聘責任者氏名　黄　健人 氏

所属・役職：北京看護学会　会長

発表演題：看護職養成課程における研究能力の育成についての私見。

発表内容：日本国の看護職者養成所数と入学定員は増加を続け、1999年４月現在では、大学・短期大学・看護婦（士）養成学校の合計 1,087校、入学定員 52,645名を数える。この内、大学は 73大学（6.7%）、入学定員は 5,125名（9.7%）であるが新設大学が多く、大学院を設置している大学は少ない。

看護研究は、看護学を向上発展させるための唯一の手段であり、看護職者自身の手によって、正しい方法で実施する必要がある。したがって、看護教育課程において研究能力を育成しておかなければならない。

研究能力を育成する方法として、大学の教育課程を修めた者を、さらに大学院において、２年以上をかけて具体的な研究課題について個別的指導を実施し、研究論文を完成させる方法が主流とされている。

このような努力に期待するところは大きいが、看護基礎教育課程の間に、少なくとも次の事項について、正しい理解を得させておくことが大切と考え、その実施経験例を紹介した。

1)看護研究の定義を理解させる。

定義：看護研究とは、看護に関して知りたいことを明らかにするための工夫・努力である。

2)統計学の定義と基礎を教育する。

定義：統計学とは、集団を対象とし、集団を構成する要素を分類して数えた数字で集団の状況を簡単に描写する方法を工夫する。そして、自然界の法則性を解明することを目的とする。

3)事例研究の定義と役割を理解させる。

定義：事例研究とは、特殊と考える事例、ある意図を持って試みた事例を詳細に記述説明した上で、その事例を根拠に推論する研究である。

役割：推理した事を確かめるための、研究課題を導く役割を有す。

4)分析的研究の進め方と論文構成を理解させる。

3．中国鉄道部北京鉄路総醫院看護職者に対する『看護研究論並びに日本における訪問看護実施状況』の講演。

招聘責任者氏名　　周　玉皎　氏

所属・役職：中国鉄道部北京鉄路総醫院　院長

講演内容：看護研究並びに日本の訪問看護実施状況

看護職者が看護研究を正しく認識して看護研究を実施し、研究の成果を発表できることを願い、『看護研究の定義』『なぜ看護婦が看護研究をしなければならないのか』『看護研究の進め方』等、看護研究の概念に関する事項と、日本の訪問看護実施状況を説明した。

その要点は次のごとくである。

Ⅰ．看護研究に関して

1)看護研究の定義

看護研究とは、看護学に関する研究である。看護研究は、医学に関する研究でも、生物学に関する研究でも、経済学に関する研究でもなく、看護学に関する研究である。したがって、看護研究とは、看護に関して知りたいことを明らかにするための工夫・努力である。

2)看護研究を実施しなければならない理由

看護研究は、看護学を向上・発展させるただ一つの行動であり、看護学を向上発展させるのは、看護研究以外には無いからである。

3)看護研究を看護専門職者がしなければ奇妙である理由

もしも看護の専門家である看護婦が看護研究を実施せずに、他の研究者に任せるということは大変奇妙であることは説明するまでもない。

そのためには、正しい研究方法を計画し実施できる能力を備えなければならず、看護職者を養成する過程有効な教育が必要である。

4)研究の成果を発表する理由

研究発表とは、研究の結果明らかにした事を、多くの人に正しく伝える事により科学に貢献するのである。

5)研究の結果導いた結論が真理・真実であるか否かの判断

その判断は、その研究で採用した研究方法が科学的に正しいか否かによる。したがって、発表に際してその研究に使用した研究方法を正確に述べると同時に、その妥当性を示す必要がある。

6)看護研究の種類と特長

看護研究の種類を、事例研究と分析的研究の二つに分けることができる。

A．事例研究の定義

事例研究とは、特殊と考える事例、あるいはある意図をもって試みた事例を詳細に記述説明した上で、その事例を根拠として推論する研究であり、次の研究課題を導く役割を持つ。

B．分析的研究の定義

分析的研究とは、原因の究明や予測を目的とするもので、主に謎を解くことを目的とする研究の総称でる。

7)仮説検証方法の実験と観察

実験とは、研究者がある意図の下に設定した人工的条件の中で観察し、結論を導く方法である。

観察とは、研究者は、どのような人工的操作も加えないで、自然のままを観察した結果から、結論を導く方法である。

8)統計学の定義

統計学とは、集団を対象として、集団を構成する要素の各個体の違いに注目して分類法を考え、分けて数えた数字を用いて、その集団の状況を記述描写する。さらにすすんで、個体観察のみでは得ることのできない自然界の法則性（統計的法則性）を明らかにすることを目的とする学問である。

統計学で用いられる表現方法は、平均値、標準偏差、百分率、相関係数が基礎的なものであり、少なくともこれらの求め方、意義、利用方法を心得ておかなければならない。

9)既存資料の有効活用の考え方

既存資料とは、文献、あるいは看護業務やその他の業務の実施に伴って残された記録、また、ある目的でまとめられた統計数値などが、研究資料として利用できるならば、これらを既存資料と呼ぶ。

このような資料が自分の研究に役立つならば、自分が直接関係したものでなくても、大いに利用する事を考えるのが良い。

ある既存資料の存在を知った場合に、その資料が、どのような研究目的の答えを導くために役立つかを思いつく事ができれば、資料から逆に研究目的を考え出すことになる。しかも、資料が既に存在するから、その研究は実施可能である。

Ⅱ．日本における訪問看護実施状況

老人医療の在り方としては、特に老人のＱＯＬ（クオリティ・オブ・ライフ生活の質）の確保を中心に据え、家族及び外部からの支援によって、住み慣れた家庭や地域社会で療養できるようにすることが基本である。

このため、介護を必要とする老人が在宅でも安心して療養生活を送れるよう、かかりつけ医師との連携の下に訪問看護サービスを提供するシステムが作られた。

１訪問看護ステーションは、常勤換算で2.5人以上の保健婦・看護婦・准看護婦のほかＰＴ・ＯＴも担当し、次のサービスを実施する。

①療養者のＱＯＬの確保

②病院在院期間の短縮・回転率の向上

③家族介護者の介護負担の軽減

④家庭を死亡場所とする希望の実現

スライドにより、日本の実施風景を説明する。

【スライド１】訪問看護ステーション施設数の推移

【スライド２】訪問看護ステーション利用者数の推移

【スライド３】訪問看護ステーション新利用者数の推移

【スライド４】訪問看護ステーション利用終了者数の推移

【スライド５】１事業所当たり利用者数・利用者当たり回数

【スライド６】利用者の性別・年齢階級別分布

【スライド７】訪問看護ステーション利用前の場所の推移

【スライド８】訪問看護ステーション利用終了後の状況の推移

【スライド９】訪問看護内容：サービス内容は、主治医の指示を受けて看護婦が在宅で行う療養上の世話又は必要な診療の補助は、具体的には、病状観察、清拭・洗髪、褥瘡処置、体位交換、カテーテルの管理、リハビリテーション、食事・排泄の介助、家族への介護指導、等である。

4．中国人民解放軍総醫院におけるJICA専門家大西幸子言語療法師の言語療法に関する講演会参加、及び、韓忠福看護部長並びに看護部職員と看護研究についての意見交換。

招聘責任者氏名　　韓　忠福 氏

所属・役職：中国人民解放軍総醫院　看護部長

言語療法に関する講演会並びに看護部職員との意見交換内容

大西言語療法師は、日本における言語療法師制度と活躍状況に加えて、看護職者が心得ておくべき失語症患者の発生病理と診断法並びにリハビリテーションの考え方と方法を、自ら中国語で説明され、看護職者たちに強い感銘を与えた。今後、当病院における言語障害者対策における看護の役割についての意見交換がなされた。

また、看護研究の必要性とその教育の重要性が強調され、2001年に当病院看護職者を対象に教育を担当するよう要請があった。

5．緒方昭著書『看護研究への招待・看護統計学への招待』の翻訳書出版内容の検討。

招聘責任者氏名　陸　静　氏

所属・役職：中国中醫薬報社　記者

検討内容：

陸　静氏が、日本語版の原著書を中国看護界に普及することを考え、侯召棠氏・料博物館長並びに日本と中国の両出版会社の協力を得て、約１年前より中国語訳本の作成に努力中である。正確な訳本作成のため、原著者緒方昭との内容検討を数回実施した。

日本財団補助金による
２０００年度日中医学学術交流促進事業

④. 日本人研究者派遣助成

(4) リン酸カルシウム系生体材料の改良と臨床応用

日本財団助成金による

2000年度日中医学学術交流促進事業報告書

－日本人研究者派遣－

平成12年10月17日

財団法人 日中医学協会

理事長中島章殿

講演・手術指導等の写真を添付して下さい。

訪中記等発表に当っては、*日中医学協会助成事業－日本財団助成金による*旨を付記して下さい。

1．訪中者氏名 倉科憲治

所属機関名 信州大学医学部 歯科口腔外科 職名 講師

所在地 〒390-8621 松本市旭3-1-1 電話 0263-37-2675

受入機関名 四川大学生物材料工程研究中心

所在地 成都、四川省

受入責任者名・役職 李玉宝・副教授

2．中国滞在日程 （訪問都市・機関名等主な日程を記入して下さい）

9月25日	成都着	
26日	成都を	四川大学生物材料工程研究中心
～		四川大学医学部（旧華西医科大学）
30日		（30日休日）
10月1日	綿阳市へ	西南工学院（綿阳泊）…当初の計画外．
～		
2日	成都市へ	
3日	成都から北京へ移動（北京泊）	
4日	北京発（成田へ）	

3．交流報告

別添書式により、講演・指導内容、訪問地の状況・課題、今後の交流計画等を4000字以上で報告して下さい。

（ワープロ使用）

使用文字は交流テーマ１３ポイント、その他は１０ポイント、明朝体を使用して下さい。

リン酸カルシウム系生体材料の改良と臨床応用

訪中研究者氏名　　倉　科　憲　治
所　　属　　信州大学医学部歯科口腔外科
役　　職　　教　授

1．講演について

当初予定されていた四川大学（生体材料工程研究中心および無機材料学教室）の大学院生および教官に対して講演の他に、受け入れ先の李玉宝教授の依頼で、急遽予定外の西南工学院・無機材料学教室（　　市）でも講演した。

内容は、我々がここ数年間研究している骨代替材料についてであり、特に骨形成に有利な生体材料の開発との観点から、骨組織を誘導する生体用セラミックスについて報告をした。従来より生体用セラミックスは骨を誘導するものではないと考えられていたが、新しく開発して実験してきた材料は、全く骨のない組織（例えば筋肉内）に埋入した場合にも骨組織を形成することを示したものである。これにより、より臨床の場で有利な生体材料の開発に向けて方向付けを行うことができたと考えられる。

いずれの大学においても対象が材料学の専門家であり、講演が臨床面からの報告であったために興味を持って聞いてもらえた。講演後の質疑応答でも活発な意見交換がなされ、特に臨床に関連する質問が多く出された。当初の目的とした臨床家と材料研究者の交流および意見交換という点で、今回の講演会は有効であったと考えられる。

講演は、英語で行われたが当方の英語も十分ではないとはいえ、お互いに母国語以外で意見交換をしているので、時々意味の通じないことがあり困惑したこともあった。しかしながら、学生であっても何とか発言しようと英語を使って質問をしてくる態度は好感が持てた。

また、日本の学生と違って自分の意見をきちんと述べようとする点も感心できるものであった。本当は、講演者が中国語をマスターして出かけるのが最良ではあるが、学問は国際的に通用しないといけないと考えると、お互いに英語をもう少し勉強しなければいけないと感じた。

2．指導内容および学生との懇談について

今回の訪問では、講演の他に四川大学の材料工程研究中心で製作している医用材料についての指導を行った。また、大学院生には日本への留学について説明を行ってきた。

医用材料については、歯科用インプラント、眼窩用インプラント、骨充填用材料などの製品を見せてもらい臨床サイドからの意見を述べた。歯科インプラントについては、一応のシステムが完成しているが、サイズおよび形態に改良の余地がある点を指摘した。開発メンバーの中に臨床家の意見があまり反映されていないようであることと、従来より市販されている他のシステムについての情報が足りないのではと考えられた。臨床応用する時には、開発時には予想できない問題が生じてくることがよくあり、臨床家の意見を十分に取り入れないと臨床的に満足できるシステムは開発できないものである。この点について、臨床家を開発メンバーの中心に加えることの大切さを強調した。他の製品については、歯科インプラントと同様に先行製品に対する知識がやや不足しているのではないかと感じられ、現在の世界の状況や、日本での状況について説明し、臨床的にこれらの材料が有すべき特性などについても概説した。

大学院生の中には日本への留学を希望している者も多く、院生との懇談の場では、留学の可能性、日本での研究システム、日本での生活上の問題点などのついて説明を求められた。一番の問題は経済的な問題であり、多くの日本の大学では生活費まで保障してくれることはほとんどないこと、何らかの奨学金を取得すること（特に日本の国費によるもの）が一番重要であることなどを説明した。彼らのほとんどは日本での学位取得が目的であり、目的が明確である点と、そのためには数年を費やしてもかまわないと考えていることはよく理解できた。しかしながら、以前の学生に比して、現在の学生にはなんとしてもというバイタリティーが感じられないという李玉宝教授の言葉が気になるところである。

3．訪問地の状況・課題について

1）臨床家との連係について

生体材料の開発には、臨床家との連係が最も重要なことの一つである。その点四川大学は、旧華西医科大学を合併し医学部、歯学部が存在するのにあまりうまくいっていないようである。詳しい事情はよく理解できないが、この点は大変気になるところである。臨床家が実際に開発製品を使用してみて問題点をフィードバックすることで製品の改良が行われること、また、開発の段階から臨床家も含めて検討することが大切なことは、容易に理解されると考えられるのであるが、実際にはあまりよくこのシステムが構築されていないようである。臨床の場では、机上の計算どうりに行かないことや、動物実験でうまく行ったことがヒトではそのとおりにならないことなどはよくあることで、今後は十分な臨床経験を有する臨床家（材料学的知識を有する臨床家が望ましい）との密な連係を構築することが必要である。

2）設備について

四川大学生物材料工程研究中心をはじめ、無機材料学教室でも器材が古く決して十分ではない。施設の予算のことなどはよく理解できないが、設置されている器材はかなり基本的なものばかりで、しかも旧型のものばかりである。自分たちで工夫したり、他施設のものを利用したりしているようであるが、研究施設としてはかなりおそまつと言わざるを得ない。最も基本的なものである顕微鏡にしても、他施設のものを借用しているとのことで、設備の面でかなり困難を感じているだろうと予想できる。また、消耗品なども品薄であり、そのために十分に器材を活用できいない状況もある。予算のシステムも異なり、国家の体制も日本とは異なるので、正しい理解はできていないと思われるが、日本の大学の研究施設に比べ設備面ではかなり劣っている。

3）情報の入手

文献入手が困難である。特に欧米誌に関しては、最新の文献入手はまだまだかなり難しいようである。インターネットなどの活用で以前に比べ情報は入りやすくなっているようであるが、最新の文献はあまり読んでいる様子はないと感じられた。実際に聞いてみると、何でも入手可能であると返答していたが、この点に関しては日本のように容易ではないし、時間もかかるようである。現在のように研究面でも変化が激しい時代では、常に新しい情報を入手できないと不安である。

4）動物実験設備の不備など

現在、日本をはじめ動物実験においては、それなりの設備の整った飼育施設での実験飼育が常識である。しかし、専門の動物実験施設がなく、屋外での実験や飼育が行われていることもある。また、実験に関する倫理委員会などもないようであって、動物保護の面でも世界のレベルに達していない。数年前に、中国（四川大学の例）での動物実験を見分した外国人が、この点に関して非難の論文を発表したことがあるとのことで、以来外国人には動物実験を見せないようにしているとのことあるが、当時と状況はあまり変わっていないようである。

5）若い人の海外流出のチャンス

一番は経済的な理由によると思われるが、若いスタッフが海外に出るチャンスがあまりないことが問題と思われる。教授クラスは、学会等々チャンスは結構あるようなのであるが、意欲ある若いスタッフがチャンスをつかむのはなかなか困難であるようである。意欲

ある若いスタッフ程海外に出ていくべきである。しかし、李玉宝教授の昔に比べ意欲ある人が少なくなっているという言葉も気になることではあるが、まだまだ意欲的で優秀なスタッフも多く、日本でも協力を進めていくことが重要である。また、日本よりアメリカへと希望する人が多いというのも残念なことである。

4．今後の交流計画等

今後の交流計画では、学術面では従来と基本的には変わらない。すなわち、臨床面からの意見を日本側から呈示し、材料学的な立場からの意見を四川大学側が呈示し、お互いに意見を交換して新しい材料を開発していくことである。具体的には、四川大学が現在開発しつつあるCa—Pセラミックスとポリマーの複合材について、信州大学で動物実験を行い、材料学的な検討を四川大学で行うという合意に達した。今度の材料は、強度的には従来の材料に比べかなり改善されているようであるが、臨床の場では高強度であればよいというものではなく、より天然の骨に近い材料へと改良していく必要がある。とりあえず、今回は生体材料の最も基本である、生物学的に為害作用あるいは毒性がないかなどを動物実験によって確認することと、骨代替材料として考える場合には、骨組織との親和性などについても検討を加えなくてはならない。設備や施設の問題で、今後動物実験の主体が信州大学で行われるようになり、協同で世界にデータを公表していくことも合意された。

また、今回学生あるいはスタッフの交換についても合意が得られ、お互いに研究者や学生を受け入れるように努力することが決められた。今回このために直接大学院生などと懇談し、彼らの希望を質し、また、疑問点にも答えるようにした。しかし、両国の経済格差が大きすぎるため、中国からの留学生は何らかの経済的裏付けが必要であり、日本政府よりの奨学金などの情報を送ることと、その取得について努力することを取り決めた。日本からの留学生については現在希望者はないが、短期の訪問でもよいので若手スタッフ等を派遣し、お互いの交流を密接にするようにしていくことが話し合われた。

最後に、来年は李玉宝教授が当方を訪問予定する希望を有していることと、私の客員教授としての申請を四川大学当局に行うことが伝えられた。

綴 II

数字はＩＮＤＥＸNo.

在留中国人研究者研究助成

24. 崔　泰興　延辺大学医学部腎臓病科医師
ラット胎児平滑筋細胞に於けるアンジオテンシンＩＩ２型受容体刺激によるチロシンホスファターゼ、SHP-1活性化の意義
研究指導者　堀内　正嗣　愛媛大学医学部医化学第一講座教授

25. 邱　旭光　福建省長楽市衛生防疫所伝染病防治医師
尿ＥＬＩＳＡを用いた法肺吸虫症の診断
研究指導者　木村　英作　愛知医科大学寄生虫学部門教授

26. 楼　　宏　重慶医科大学臨床遺伝学講座医師
日本人（南九州人)、中国人（チベット人）の起源と拡散に関するウイルス学的、人類遺伝学的研究
研究指導者　園田　俊郎　鹿児島大学大学院医学研究科ウイルス学教室教授

27. 程　世斌　中山医科大学基礎医学院生理学教室医師
ダイオキシンによる脳セロメニン異常に関する研究
研究指導者　口岩　聡　鹿児島大学医学部第一解剖学教室助教授

28. 郭　潮潭　浙江中医学院附属医院内科医師
水性バクテリアより新規なシアル酸を含まない抗インフルエンザウイルス活性物質の分離及びその化学構造の同定
研究指導者　鈴木　康夫　静岡県立大学薬学部生化学教室教授

29. 李　素雲　中国医科大学基礎医学院講師
てんかん患者に観察される環状20番染色体の解析：遺伝子レベルでのてんかん原因遺伝子の解明
研究指導者　猪子　英俊　東海大学医学部分子生命科学教室教授

30. 駱　晨虹　上海第二肺科病院外科医師
インフルエンザウイルス血球凝集の脱シアル酸の場所に於ける検討
研究指導者　中島　捷久　名古屋市立大学医学部ウイルス学教室教授

31. 呂　月平　首都医科大学附属同仁医院外科医師
創傷治癒過程に於ける制御機構の研究
研究指導者　浅野伍朗　日本医科大学病理学第二講座教授

32. 王　愛平　吉林医学院消化器内科医師
Aeromonas,Sobriaが産生するヘモリシン受容体精製と機構解析
研究指導者　河野　茂　長崎大学医学部第二内科学教室教授

33. 張　文日　吉林省竜井市医院医師
ラット一過性局所脳虚血モデルでのＥＰＣ-Ｋ１の効果
研究指導者　阿部　康二 岡山大学医学部神経内科教授

34. 陳　偉萍　蘭州医学院第二医院神経内科講師
長期追跡脳血管造影からみた未破裂脳動脈瘤の自然経過
研究指導者　奥寺　利男　秋田県立脳血管研究センター放射線医学研究部長

35. 張　　岩　大連医科大学第二医院放射線科医師
神経節腫のＭＲimaging:組織との関連
研究指導者　早渕　尚文　久留米大学医学部放射線医学教室教授

36. 張　燕軍　中国人民解放軍総医院消化器内科助教授
肝類洞内皮細胞のアポトーシスの制御機構に関する研究
研究指導者　佐藤　信紘　順天堂大学医学部消化器内科教授

37. 趙　　紅　北京協和医院産婦人科看護婦
化学療法受療肺癌,乳癌及び婦人科癌患者のＱＯＬ
研究指導者　菅田　勝也　東京大学大学院医学系研究科看護管理学分野助教授

38. 郭　　鐳　長春市中心病院胸部外科医師
アヂノウイルスベクターを用いたＣＴＬＡ４-Ｉg遺伝子導入法によるハムスター・ラット異種肝移植に於ける免疫抑制効果の検討
研究指導者　幕内　雅敏　東京大学医学部肝胆膵外科教室教授

39. 戚　思華　ハルピン医科大学第二医院麻酔学教室医師
マウス前脳虚血モデルにおいてカスパーゼ3活性化に対する虚血前処置の抑制効果
研究指導者　下地　恒毅　新潟大学医学部麻酔学教室教授

40. 範　小虎　西安医科大学第一医院臓器移植センター医師
抗炎症性単球を用いた臓器移植に於ける免疫制御の研究
研究指導者　浅原　利正　広島大学医学部外科学第二教室教授

41. 南　暁利　佳木斯大学口腔医学院口腔組織病理学助手
プラークー感受性(SUS)と抵抗性(RES)ラット三大唾液腺に於けるアドレナリン性受容体サブタイプ遺伝子の発現動態

42. 劉　　傑　佳木斯医学院補綴学講師
チタンの陶材焼付強度に関する研究ーマイクロリテンションの効果ー
研究指導者　熱日　充　長崎大学歯学部歯科補綴学第一講座教授

43. 張　紹輝　長春中医学院卒業
一過性虚血及び抗コリン薬スコポラミン誘発の学習障害に対する釣藤散の改善作用
研究指導者　渡辺　裕司　富山医科薬科大学和漢薬研究所生物試験部門教授

44. 王　徳勝　瀋陽薬科大学卒業
ラットにおける糖尿病治療薬ビグアニドの体内動態、排泄機構及び乳酸アシドーシスとの関連
研究指導者　杉山　雄一　東京大学薬学部製剤設計学講座教授

45. 康　熙雄　　東京大学医科学研究所
ＢＡＩ１遺伝子の抗腫瘍機能に対する基礎研究
研究指導者　浅野　茂隆　東京大学医科学研究所附属先端医療研究センター

日本財団補助金による
２０００年度日中医学学術交流促進事業

⑤．在留中国人研究者研究助成

(1)ラット胎児平滑筋細胞に於けるアンジオテンシンＩＩ２型受容体刺激によるチロシンホスファターゼ、SHP-1活性化の意義

ラット胎児平滑筋細胞におけるアンジオテンシンII２型受容体刺激によるチロシンホスファターゼ、SHP-1活性化の意義

崔　泰興
中国吉林省延辺大学医学院附属病院　医師
愛媛大学医学部医化学第一

研究要旨
本研究では、アンジオテンシン２型受容体刺激が細胞内情報伝達系においてもアンジオテンシン１型受容体からの刺激に拮抗するか否かを初代培養系を用いて検討し、さらにそのメカニズムとしてホスファターゼに着目した研究を行った。ラット胎児より平滑筋細胞を調整することで、AT1R および AT2R の両方を発現する初代培養系を確立し、特異的な受容体拮抗剤を用いた検討を行った。AT2R 選択的刺激により caspase の活性化を伴うアポトーシスの亢進が認められたが、AT1R 選択的刺激によりその作用は抑制された。また、細胞内情報伝達系の Extracellular signal-regulated kinase (ERK)の解析では、AT1R 選択的刺激による活性化が AT2R 選択的刺激により抑制された。チロシンホスファターゼの SHP-1 が AT2R 選択的刺激により活性化されることに着目し、その優性抑制型変異体遺伝子を過剰発現させた系で詳細な検討を行ったところ、AT2R 選択的刺激によるアポトーシスの亢進および ERK の活性化抑制作用は減弱した。つまり、AT2R 選択的刺激はチロシンホスファターゼ、SHP-1 を介した作用を有することが確認された。　キーワード：　アンジオテンシン II、ホスファターゼ、ERK、アポトーシス

1. Introduction

Angiotensin (Ang) II is classically considered as a vasoconstricting, progrowth molecule acting via stimulation of the G protein-coupled seven membrane-spanning Ang II type 1 (AT1) receptor. In addition to the "classical" AT1 receptor, it is now conceivable that Ang II activates another receptor subtype (type 2 or AT2 receptor). Although both AT1 and AT2 receptors belong to the seven-transmembrane, G protein-coupled receptor family, recent evidence reveals that the functions of AT1 and AT2 receptors are mutually antagonistic. The AT2 receptor is abundantly and widely expressed in fetal tissues, but present only at low levels in adult tissues and re-expressed in certain pathological conditions such as ovarian atresia, wound injury, myocardial infarction, and vascular injury [1]. The highly abundant expression of this receptor during embryonic and neonatal growth and its quick disappearance after birth has led us to the suggestion that this receptor may be involved in growth, development and/or differentiation. In many organs, tissue remodeling and degeneration involve an active process, termed apoptosis (programmed cell death), which is a ubiquitous, evolutionally conserved, physiological mechanism of cell death that regulates mass and architecture in many tissues. The genetic program for apoptosis may be activated at a defined time during embryogenesis or in the maturation of adult cells, by a wide range of physiological stimuli. These results provide us with the possibility that AT2 may induce apoptosis. Actually proapoptotic effects of AT2 receptor have been demonstrated in PC12W cells [2-5], R3T3 mouse fibroblasts [2,4], rat ovarian granulosa cells [6], human umbilical venous endothelial cells [7] and AT2 receptor-transfected adult rat VSMCs [8].

The growth inhibitory effects of the AT2 receptor have been shown to associate with the activation of a series of phosphatases including the protein tyrosine phosphatase SHP-1 [9,10] or the mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 (MKP-1) [2,4], and the serine/thronine phosphatase 2A (PP2A) [11], which results in the inactivation of AT1 receptor- and/or growth factor-activated extracellular signal-regulated kinase (ERK). SHP-1[formerly termed PTP1C, SH-PTP-1, SHP, and HCP], a two Src homology 2 (SH2) domain-containing cytosolic tyrosine phosphatase, has been implicated in the negative regulation of a broad spectrum of growth-promoting receptors, including receptor tyrosine kinases such as c-Kit [12,13], TrK A [14], and epidermal growth factor (EGF) [15] receptors; cytokine receptors such as interleukin-3 (IL-3) [12], interferon-α/β [16] and erythropoietin [17] receptors; and B cell FcγRIIB [18] receptor. Given the breadth of its interaction with multiple growth factor receptors, we hypothesize that SHP-1 is involved in AT2 receptor intracellular pathway which negatively crosstalks with AT1 receptor signaling. Moreover, we have

recently observed that SHP-1 is one of the most proximal effector in AT2 receptor-mediated ERK inhibition and apoptosis in PC12 cells [10].

Accordingly, we used fetal VSMC, which endogenously express both AT1 and AT2 receptors, and examined the possibilities that AT2 receptor stimulation exerts proapoptotic effects by antagonizing the function of AT1 receptor and that SHP-1 is pivotal in the proapototic effect of AT2 receptor stimulation.

2. Methods

2.1. Cell Culture

Fetal VSMCs were prepared from the thoracic aortae of Sprague-Dawley rat fetuses (embryonic day 20) and cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (Life Technologies Inc., Rockville, Maryland, USA) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) as previously described [19]. In addition to the morphological observation, characterization of VSMC was examined by indirect immunofluoresence using a monoclonal antibody specific for α-smooth muscle actin (clone 1A4; Sigma Chemical Co.) [20]. Our culture of fetal VSMCs exhibited the "hill-and-valley" appearance which is characteristic of adult VSMC. The cells were uniformly positive for α-smooth muscle actin by immunofluorescence. These results indicate that the cells are characteristic of VSMC although the possible contamination of fibroblasts and endothelial cells cannot be avoided. All the experiments were performed using the cells at the second or third passage. AT1 and AT2 receptor binding was measured as previously described [19].

2.2. Plasmid Constructs and Transfection

The SHP-1(C453/S) mutant and SHP-2(C463/S) mutant cDNA were inserted into the pcDNA3 vector [21]. Transient transfection was performed with 0.5 μg of plasmid DNA per well of a 6-well plate and LipofectAMINE PLUS (GIBCO-BRL) according to the manufacturer's instructions (DNA:LipofectAMINE:PLUS ratio, 1:10:10μl). After transient transfection, the transfected cells were fed with complete growth medium for 48 h to allow protein expression. Transfected cells were identified by β-galactosidase staining. The transfection efficiency was 25 ± 5%, a similar level as previously reported [22]. Overexpression of SHP-1(C453/S) mutant and SHP-2(C463/S) mutant was confirmed by immunoblot with an anti-SHP-1 or an anti-SHP-2 antibody (Santa Cruz Biotechnology, Inc.).

2.3. Determination of Cell Death

Rat fetal VSMCs were grown in 10% FBS DMEM to a subconfluent state in 10-cm dishes and incubated for an additional 48 h in serum-free DMEM. Nuclear chromatin morphology analysis and caspase-3 activity assay were used as quantitative indices of apoptosis. Nuclear chromatin morphology was analyzed by staining with Hoechst33342 (Molecular Probes, Inc., Eugene, Oregon, USA) and viewed under fluorescence microscopy, as previously described [2]. The caspase-3 activity assay was performed using an adaptation of a previously described protocol [23]. Results were normalized to basal activity in viable cells maintained in serum-containing medium.

2.4. Determination of ERK Activity

Subconfluent VSMCs were incubated in serum-free DMEM for 24 h and were treated with vehicle or Ang II (0.3 μmol/L) with or without PD123319 (10 μmol/L) or CV11974 (10 μmol/L) for 15 min. The activation of ERK was assessed as previously described [19]. Briefly, the cells were washed quickly with HEPES-buffered saline, frozen in liquid nitrogen, scraped and lysed. The lysate was centrifuged for 20 min at 6000 g at 4°C. Protein concentration was measured in the cleared supernatant by Bio-Rad protein
assay. The supernatant (20 μg) was subjected to SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) and electrotransferred onto Hybond-ECL nitrocellulose membrane. Phosphorylated or total ERK was detected with a phospho-ERK antibody or a total ERK antibody (New England Biolabs Inc., Beverly, Massachusetts, USA), respectively, visualized by enzyme-linked chemiluminescence (Amersham). Densitometric analysis was performed using an image scanner (EPSON GT-8000) and National Institutes of Health image software. Densities of the bands corresponding to ERK-1/2 were added to represent total ERK.

2.5. Measurement of SHP-1 Tyrosine Phosphatase Activity

Subconfluent VSMCs were incubated in serum-free DMEM for 24 h and were treated with vehicle or Ang II (0.3 μmol/L) with or without PD123319 (10 μmol/L) or CV11974 (10 μmol/L) for 3 min. SHP-1 tyrosine phosphatase activity was measured as previously described [9,10].

2.6. *Data Analysis*

All values are expressed as mean ± SEM. The data were evaluated by analysis of variance followed by a Newman-Keuls' test for multiple comparisons. The difference was considered to be significant if $p < 0.05$.

3. Results

3.1. Cross-talk of AT1 and AT2 Receptors Regulate Cell Death in fetal VSMCs

To examine the role of endogenous AT2 receptor in Ang II regulated apoptosis, we employed VSMC prepared from rat fetal aorta. VSMCs were cultured from the aorta of fetal rat at embryonic day 20, and shown to express both AT1 and AT2 receptors (AT1 receptor 11.7 ± 0.65 fmol/10^6 cells; AT2 receptor, 5.27 ± 2.28 fmol/10^6 cells, n= 6, mean ± SE). Upon serum starvation for 24 h, chromatin dye staining showed that VSMCs underwent morphological changes of typical apoptosis, such as fragmented nuclei with condensed chromatin (data not shown). We characterized the time course of caspase-3 activation after serum deprivation in our system and we examined the effects of Ang II, since caspase-3 plays a central role in serum or trophic factor deprivation-induced apoptosis. Serum starvation induced a significant increase in caspase-3 activity, reaching a maximum at 12 h and declining to basal level within 48 h. However, the addition of Ang II (0.3 μmol/L) significantly inhibited caspase-3 activation measured at 12 h after serum depletion. Stimulation with Ang II (0.3 μmol/L) in the presence of AT2 receptor-specific antagonist PD123319 (10 μmol/L) further inhibited caspase-3 activity compared with stimulation with Ang II alone. On the contrary, addition of the AT1 receptor-specific antagonist CV11974 (10 μmol/L), Ang II stimulation further increased the serum starvation-induced caspase-3 activation. Neither CV11974 nor PD123319 alone influenced the caspase 3 activity.

3.2. Ang II Activates ERK via the AT1 Receptor and Inhibits ERK via the AT2 Receptor in Fetal VSMCs

To explore the molecular mechanism involved in the cross-talk of AT1 and AT2 receptors in regulating cell death in rat fetal VSMCs, we examined ERK activation in response to the stimulation of AT1 or/and AT2 receptors. Immunoblot using an anti-phospho-ERK antibody demonstrates that Ang II (0.3 μmol/L) stimulation significantly increased ERK phosphorylation. CV11974 (10 μmol/L) strongly attenuated the Ang II-induced ERK phosphorylation. In contrast, PD123319 (10 μmol/L) significantly enhanced the Ang II-induced ERK phosphorylation. ERK phosphorylation was not affected by treatment with CV11974 (10 μmol/L) and PD123319 (10 μmol/L) alone.

3.3. Activation of AT2 Receptor Increases SHP-1 Activity in Fetal VSMCs

We first examined the protein level of SHP-1 in rat fetal VSMCs and found that SHP-1 is expressed in fetal VSMC. Next we examined the SHP-1 activity and observed that Ang II (0.3 μmol/L) stimulation for 3 min significantly increased SHP-1 activity and this Ang II-mediated SHP-1 activation was blocked with PD123319 (10 μmol/L) but not by CV11974 (10 μmol/L).

3.4. Role of SHP-1 in AT2 Receptor-induced Apoptosis in Fetal VSMCs

To investigate whether SHP-1 plays a role in the proapoptotic effect of AT2 receptor, we transfected rat fetal VSMCs with a dominant negative (dn) SHP-1 mutant in which the active site cysteine 453 was mutated to serine (C453/S) [21]. Overexpression of dn SHP-1 mutant was confirmed by immunoblot showing 6-fold increase in SHP-1 immunoreactivity compared with the control vector pcDNA3 transfected cells. Basal SHP-1 activity was low in VSMCs transfected with dnSHP-1 mutant and we could not observe further significant increase in SHP-1 activity in response to Ang II. We then examined the functional significance of SHP-1 activation on AT2 receptor-mediated ERK inhibition and apoptosis. Since the SHP-2 phosphatase [formerly termed SHPTP-2, SHPTP-3, Syp, PTP2C, and PTP1D], in contrast to SHP-1, frequently functions as a positive effector of growth-stimulatory signaling pathway, we also examined the possible involvement of SHP-2 in the regulation of ERK activation and cell death by Ang II in rat fetal VSMCs. After identification of endogenous expression of SHP-2 in rat fetal VSMCs by immunoblot, we transfected rat fetal VSMCs with a dnSHP-2 mutant in which the active site cysteine 463 was mutated to serine (C463/S). Overexpression of dn SHP-2 mutant was confirmed by immunoblot showing 3-fold increase in SHP-2 immunoreactivity compared with the control vector pcDNA3 transfected cells. We first examined the ERK activation in cells overexpressing dnSHP-1 or dnSHP-2. In dnSHP-1 transfected VSMCs, increase in ERK activity by Ang II was further significantly enhanced compared to that in pcDNA3 transfected VSMCs and ERK activation by Ang II was not influenced with PD123319. In contrast, dnSHP-2 transfection did not modify the effect of Ang II on ERK

activation. Moreover, we observed that transfection of dn SHP-1 or dn SHP-2 did not influence the protein levels of total ERK. Next we examined the effect of Ang II treatment on apoptotic changes in dnSHP-1 or dnSHP-2 transfected rat fetal VSMCs. Upon serum starvation for 12 h, a near 4-fold increase in caspase-3 activity was observed in each transfectant. In control vector pcDNA3 transfected VSMCs, Ang II (0.3 μmol/L) stimulation led to inhibition of the caspase-3 activation, which was enhanced by addition of PD123319 (10 μmol/L), and selective activation of AT2 receptor by Ang II in presence of CV11974 (10 μmol/L) further increased the caspase-3 activation induced by serum-starvation, as that observed in non-transfected VSMCs. However, the enhancement of Ang II stimulation-induced inhibition of the caspase-3 activation by PD123319 or the aggravation of serum starvation-induced caspase-3 activation by Ang II in presence of CV11974 were blocked by overexpression of dnSHP-1 in VSMCs. Transfection of dnSHP-2 did not modulate the effects of Ang II on caspase-3 activation caused by serum depletion in VSMCs.

4. Discussion

Increasing evidence reveals that AT2 receptor acts as an antagonist against the classical AT1 receptor, i.e., the AT2 receptor exerts antigrowth, antihypertrophic, and proapoptotic effects and promotes differentiation [1]. Expression of the AT2 receptor in rat embryonic blood vessels is " turned on" at late gestation (embryonic days 16-21) and early neonatal period, but decreases rapidly to very low levels in the adult vessel [24,25]. The spatial and temporal patterns of rat vascular AT2 receptor expression, together with its growth modulatory action, have led us to hypothesize that this receptor plays an important role in vascular development and remodeling in late gestation. Indeed, pharmacological blockade of the AT2 receptor using the specific antagonist PD123319 during rat embryonic days 16-21 results in increased aortic DNA synthesis [24]. Our previous results using AT2 receptor null mice suggest that AT2 receptor promotes vascular differentiation and contributes to vasculogenesis [26]. Moreover, we observed that VSMCs prepared from the aorta of fetal or newborn AT2 receptor null mice showed enhanced proliferative activity [19]. Here we demonstrate that Ang II regulates apoptosis in fetal VSMCs, i.e., stimulation of AT1 receptor inhibits apoptosis, whereas activation of AT2 receptor potentiates it. These results provide
further support to the hypothesis that Ang II-regulated programmed cell death is involved in vascular development or vasculogenesis.

To explore the molecular mechanism of Ang II-regulated apoptosis in fetal VSMCs, we focused on ERK activation since the ERK cascade is crucial in proliferation, differentiation, and hypertrophy or apoptosis of VSMC [27], and is likely involved in AT2 receptor-mediated antigrowth and proapoptotic actions on VSMC [8,24,28]. In cultured VSMCs prepared from embryonic day 20 rat, we found that activation of AT1 increases ERK phosphorylation and activation of AT2 receptor shows an inhibitory effect on the AT1 receptor-mediated ERK phosphorylation. Such opposite modulation of ERK by AT1 and AT2 receptors was also observed in rat cultured neurons, which contained both AT1 and AT2 receptors [29]. Our results suggest that the facilitating effect of AT2 receptor stimulation on serum deprivation-induced cell death in fetal VSMCs is at least partly due to the inhibitory effect of AT2 receptor activation on ERK phosphorylation.

SHP-1 is a soluble tyrosine phosphatase that participates in the negative regulation of receptor tyrosine kinase pathway [12-15]. Our previous results have shown that stimulation of AT2 receptor rapidly activates SHP-1 in N1E-115 and AT2 receptor-transfected Chinese hamster ovary (CHO) cells [9], and that SHP-1 is a proximal effector of the AT2 receptor, implicated in the apoptotic effect of AT2 receptor in PC12 cells [10]. Therefore we speculated that SHP-1 may be a key molecule in AT2 receptor signaling in rat fetal VSMCs. We observed that stimulation of AT2 receptor also rapidly activates SHP-1 in rat fetal VSMCs, where AT1 activation does not. To establish a functional link between AT2 receptor-mediated activation of SHP-1 and inactivation of ERK, we used a catalytically inactive, dominant negative (dn) mutant SHP-1 and demonstrated that preventing SHP-1 activation abrogates AT2 receptor stimulation-induced ERK inhibition in rat fetal VSMCs. Moreover, the ERK inhibition is due to activation/phosphorylation, not to translation of ERK, since total protein level of ERK was not changed by overexpression.of dnSHP-1 in rat fetal VSMCs.

It has already been demonstrated that for a number of membrane receptors such as EGF receptor, SHP-1 terminated these receptors' signal by direct interaction with the receptors [12,15,17,18]. Tyrosine kinase activation by the AT1 receptor is at least partly attributed to transactivation of a tyrosine kinase receptor such as the epidermal growth factor (EGF) receptor or the platelet derived growth factor (PDGF)
receptor [30-32]. In VSMC, Ang II stimulation has been shown to activate the EGF receptor by tyrosine phosphorylation [31]. Very recent evidence showed that activation of AT2 receptor results in functional transinactivation of insulin receptor kinase in CHO cells, leading to inhibition of ERK phosphorylation and cell proliferation [33]. Therefore, it is likely that ERKs may not be direct cellular targets for AT2 receptor-activated SHP-1, but rather that AT2 receptor-activated SHP-1 affects upstream intermediates of AT1 receptor-induced ERK pathway such as EGF receptor.

The result of inhibition of AT2 receptor-meediated apoptosis by overexpression of dnSHP-1 suggests that the proapoptotic effect of AT2 receptor is associated with the inactivation of ERK via a signaling pathway involving the activation of SHP-1 in rat fetal VSMCs. In addition, sst2 somatostatin receptor-mediated activation of SHP-1 has been shown to act as an initial transducter of the antiproliferating aignaling mediated by this receptor [21]. It is interesting that SHP-1 has been reported to be required for the delivery of the Fas apoptosis signal in lymphoid cell [34]. These observation suggest that SHP-1 is a transducer of the antimitogenic and/or proapoptotic signals mediated by different membrane receptors, including AT2 receptor, probably through negative regulation of signaling of growth factor receptors, such as AT1 receptor.

In contrast, SHP-2 has been shown as a positive effector of tyrosine kinase growth factor receptors including those of PDGF, EGF, insulin-like growth factor, insulin and nerve growth factor [35-37]. In addition, it has also been suggested that SHP-2 functions as an adaptor protein for Janus kinase 2 (JAK2) association with AT1 receptor, thereby facilitating JAK2 phosphorylation and activation [38]. However, our data showed that preventing SHP-2 activation with transfection of dnSHP-2 into fetal VSMCs did not affect either AT1 receptor-mediated ERK phosphorylation and cell survival nor AT2 receptor-mediated ERK inhibition and cell death. These results indicate that SHP-2 may not be involved in the crosstalk between AT1 and AT2 receptors in regulating ERK activation and cell death in fetal VSMCs.

The results of this study may be relevant to vascular pathobiology. It has been shown that neointimal VSMCs in vascular lesions such as atherosclerosis and restenosis after balloon angioplasty resemble fetal VSMCs, rather than adult medial VSMCs [39,40]. AT2 receptor is re-expressed in injured blood vessels and attenuates neointima formation [1]. Furthermore, a recent study clearly showed that selective stimulation of AT2 receptor induces vascular mass regression by stimulating VSMC apoptosis in spontaneously hypertensive rats in vivo [41]. Thus, SHP-1 might play an important role in AT2 receptor-mediated apoptosis, which contributes to the pathogensis and remodeling of cardiovascular diseases.

In summary, these results provide us with direct evidences that crosstalk between AT1 and AT2 receptor controls the fate of fetal VSMCs. It is also possible that this antagonistic interaction may contribute to the fetal vascular development or vasculogenesis. We also demonstrated that SHP-1 is a pivotal effector in the signal transduction pathway of AT2 receptor in fetal VSMCs.

References

[1] Horiuchi M, Akishita M, Dzau VJ. Recent progress in angiotensin II type 2 receptor research in cardiovascular system. Hypertension. 1999;33:613-621.

[2] Yamada T, Horiuchi M, Dzau VJ. The novel angiotensin II type 2 receptor mediates programmed cell death. Proc Natl Acad Sci USA. 1996;93:156-160.

[3] Horiuchi M, Yamada T, Hayashida W, Dzau VJ. Interferon regulatory factor-1 upregulates angiotensin type 2 receptor and induces apoptosis. J Biol Chem. 1997;272:11952-11958.

[4] Horiuchi M, Hayashida W, Kambe T, Yamada T, Dzau VJ. Angiotensin type 2 receptor dephosphorylates Bcl-2 by activating mitogen-activated protein kinase phophatase-1 and induces apoptosis. J Biol Chem. 1997;272:19022-19026.

[5] Lehtonen JYA, Horiuchi M, Daviet L, Akishita M, Dzau VJ. Activation of the de novo biosynthesis of sphingolipids mediates angiotesin II type 2 receptor-induced apoptosis. J Biol Chem. 1999;274:16901-16906.

[6] Tanaka M, Ohnishi J, Ozawa Y, Sugimoto M, Usuki S, Naruse M, Murakami K, Miyazaki H. Charaterization of angiotensin II receptor type 2 during differentiation and apoptosis of rat ovarian cultured granulosa cells. Biochem Biophys Res Commun. 1995;207:593-598.

[7] Dimmeler S, Rippmann V, Weiland U, Haendeler J, Zeiher AM. Angiotensin II induces apoptosis of human endothelial cells: protective effect of nitric oxide. Circ Res. 1997;81:970-976.

[8] Yamada T, Akishita M, Pollman M, Gibbons GH, Dzau VJ, Horiuchi M. Angiotensin II type 2 receptor mediates vascular smooth muscle cell apoptosis and antagonizes angiotensin II type 1 receptor action: an in vitro gene transfer study. Life Sci. 1998;63:289-295.

[9] Bedecs K, Elbaz N, Sutren M, Masson M, Susini C, Strosberg AD, Nahmias C. Angiotensin II type 2 receptors mediate inhibition of mitogen-activated protein kinase cascade and functional activation of SHP-1 tyrosine phophatase. Biochem J. 1997;325;449-454.

[10] Lehtonen JYA, Daviet L, Nahmias C, Horiuchi M, Dzau VJ. Analysis of functional domains of angiotensin II type 2 receptor involved in apoptosis. Mol Endocrinol. 1999;13:1051-1060.

[11] Shenoy UV, Richards EM, Hang XC, Sumners C. Angiotensin II type 2 receptor-mediated apoptosis of cultured neurons from newborn rat brain. Endocrinology. 1999;140:500-509.

[12] Yi T, Ihle J. Association of hematopoietic cell phosphatase with c-Kit after stimulation with c-Kit ligand. Mol Cell Biol. 1993;13:3350-3358.

[13] Paulson RF, Vesely S, Siminovitch KA, Bernstein A. Signaling by the W/Kit receptor tyrosine kinase is negatively regulated in vivo by the protein tyrosine phosphatase Shp1. Nat Genet. 1996;13:309-315.

[14] Vambutas V, Kaplan DR, Sells MA, Chernoff J. Nerve growth factor stimulates tyrosine phosphorylation and activation of Src homology-containing protein-tyrosine phosphatase 1 in PC12 cells. J Biol Chem. 1995;270:25629-25633.

[15] Tomic S, Greise RU, Lammers R, Kharitonenkov A, Imyanitov E, Ullrich A, Bohmer F. Association of SH2 domain protein tyrosine phophatases with the epidermal growth factor receptor in human tumor cells:phosphatidic acid activates receptor dephosphorylation by PTP1C. J Biol Chem. 1995;270:21277-21284.

[16] David M, Chen HE, Goelz S, Larner AC, Neel BG. Differential regulation of the α/β interferon-stimulated Jak/Stat pathway by the SH2 domain-containing tyrosine phosphatase SHPTP1. Mol Cell Biol. 1995;15:7050-7058.

[17] Klingmüller U, Lorenz U, Cantley LC, Neel BG, Lodish HF. Specific recruitment of SH-PTP1 to the erythropoietin receptor causes inactivation of JAK2 and termination of proliferative signals. Cell. 1995;80:729-738.

[18] Nadler MJB, Chen B, Anderson JS, Wortis HH, Neel BG. Protein tyrosine phosphatase SHP-1 is dispensable for FcγRIIB-mediated inhibition of B cell antigen receptor activation. J Biol Chem. 1997;272:20038-20043.

[19] Akishita M, Ito M, Lehtonen JYA, Daviet L, Dzau VJ, Horiuchi M. Expression of the AT2 receptor developmentally programs extracellular signal-regulated kinase activity and influences fetal vascular growth. J Clin Invest. 1999;103:63-71.

[20] Skalli O, Ropraz P, Trzeciak A, Benzonana G, Gillessen D, Gabbiani G. A monoclonal antibody against a-smooth muscle actin: a new probe for smooth muscle differentiation. J Cell Biol. 1986;103:2787-2796.

[21] Lopez F, Estéve JP, Buscail L, Delesque N, Saint-Laurent N, Thévenian M, Nahmias C, Vaysse N, Susini C. The tyrosine phosphatase SHP-1 associates with the sst2 somatoststin receptor and is an essential component of sst2-mediated inhibitory growth signaling. J Biol Chem. 1997;272:24448-24454.

[22] Bai HZ, Pollman MJ, Inishi Y, Gibbons GH. Regulation of vascular smooth muscle cell apoptosis: Modulation of bad by a phosphatidylinositol 3-kinase-dependent pathway. Circ Res. 1999;85:229-237.

[23] Shimizu S, Eguchi Y, Kamiike W, Matsuda H, Tsujimoto Y. Bcl-2 expression prevents activation of the ICE protease cascade. Oncogene. 1996;12:2251-2257.

[24] Nakajima M, Hutchinson H, Fujinaga M, Hayashida W, Morishita R, Zhang L, Horiuchi M, Pratt RE, Dzau VJ. The angiotensin II type 2 (AT2) receptor antagonizes the growth effects of AT1 receptor: gain-of-function study using gene transfer. Proc Natl Acad Sci USA. 1995;92:10663-10667.

[25] Shanmugan S, Corvol P, Gasc JM. Angiotensin II type 2 receptor mRNA expression in the developing cardiopulmonary system of the rat. Hypertension. 1996;28:91-97.

[26] Yamada H, Akishita M, Ito M, Tamura K, Daviet L, Lehtonen JYA, Dzau VJ, Horiuchi M. AT2 receptor and vascular smooth muscle cell differentiation in vascular development. Hyertension. 1999;33:1414-1419.

[27] Force T, Bonventre JV. Growth factor and mitogen-activated protein kinase.Hypertension. 1998;31:152-161.

[28] Hayashida W, Horiuchi M, Dzau VJ. Intracellular third loop domain of angiotensin II type 2 receptor: role in mediating signal transduction and cellular function. J Biol Chem. 1996;271:21985-21992.

[29] Huang XC, Richards EM, Sumners C. Mitogen-activated protein kinase in rat brain neuronal cultures are activated by angiotensin II type 1 receptors and inhibited by angiotensin II type 2 receptors. J Biol Chem. 1996;271:15635-15641.

[30] Li X, Lee JW, Graves LM, Earp HS. Angiotensin II stimulates ERK via two pathways in epithelial cells: protein kinase C suppresses a G-protein coupled receptor-EGF receptor transactivation pathway. *EMBO J.* 1998;17:2574-2583.

[31] Eguchi S, Numaguchi K, Iwasaki H, Matsumoto T, Yamakawa T, Utsunomiya H, Motley ED, Kawakatsu H, Owada K, Hirata Y, Marumo F, Inagami T. Calcium-dependent epidermal growth factor receptor transactivation mediates the angiotensin II-induced mitogen-activated protein kinase activation in vascular smooth muscle cell. J Biol Chem. 1998;273:8890-8896.

[32] Murasawa S, Mori Y, Nozawa Y, Gotoh N, Shibuya M, Masaki H, Maruyama K, Tsutsumi Y, Moriguchi Y, Shibazaki Y, Tanaka Y, Iwasaka T, Inada M, Matsubara H. Angiotensin II type 1 receptor-induced extracellular signal-regulated protein kinase activation is mediated by Ca2+/calmodulin-dependent transactivation of epidermal growth factor receptor. *Circ Res.* 1998;82;1338-1348.

[33] Elbaz N, Bedecs K, Masson M, Sutren M, Strosberg ADS, Nahmias C. Functional transinactivation of insulin receptor kinase by growth-inhibitory angiotensin II AT2 receptor. Mol Endocrinol. 2000;14:795-804.

[34] Su X, Zhou T, Wang Z, Yang P, Jope RS, Mountz JD. Defective expression of hematopoietic cell protein tyrosine phosphatase (HCP) in lymphoid cells blocks Fas-mediated apoptosis. Immunity 1995;2:353-362.

[35] Xiao S, Rose DW, Sasaoka T, Maegawa H, Burke TR, Roller JPP, Shoelson SE, Olefsky JM. Syp (SH-PTP2) is a positive mediator of growth factor-stimulated mitogenic signal transduction. J Biol Chem. 1994;269:21244-21248.

[36] Milarski KL, Saltiel AR. Expression of catalytically inactive Syp phosphatase in 3T3 cells blocks stimulation of mitogen-activated protein kinase by insulin. J Biol Chem. 1994;269:21239-21243.

[37] Wright JH, Drueckes P, Bartoe J, Zhao Z, Shen SH, Krebs EG. A role of the SHP-2 tyrosine phosphatase in nerve growth factor-induced PC12 cell differentiation. Mol Biol Cell. 1997;8:1575-1585.

[38] Marrero MB, Venema VJ, Ju H, Eaton DC, Venema RC. Regulation of angiotensin II-induced JAK2 tyrosine phosphorylation: roles of SHP-1 and SHP-2. Am J Physiol. 1998;275:C1216-C1223.

[39] Majesky MW, Giachelli CM, Reidy MA, Schwartz SM. Rat carotid neointimal smooth muscle cells reexpress a developmentally regulated mRNA phenotype during repair of arterial injury. Circ Res. 1992;71:759-768.

[40] Schwartz SM, Campbell GR, Campbell JH. Replication of smooth muscle cells in vascular disease. Circ Res. 1986;58:427-444.

[41] Tea BS, Sarkissian SD, Touyz RM, Hamet P, DeBlois D. Proapoptotic and growth-inhibitory role angiotensin II type 2 receptor in vascular smooth muscle cells of spontaneously hypertensive rats in vivo. Hypertension. 2000;35:1069-1073.

日本財団補助金による
２０００年度日中医学学術交流促進事業

⑤．在留中国人研究者研究助成

(2) 尿ＥＬＩＳＡを用いた法肺吸虫症の診断

尿 ELISA 法を用いた肺吸虫症の診断

邱　旭光

中国福建省長楽市衛生防疫所　　技師

愛知医科大学寄生虫学教室

肺吸虫症の診断には糞便検査あるいは喀痰検査で虫卵を検出するのが困難なため、血清中に肺吸虫に特異的な抗体を検出する診断法が主に使われている。しかし流行地での集団検診には血液採取は困難な場合が多い。そこで、採取が簡単でかつ安全な尿を検体として用いた肺吸虫症の診断法の開発を目的として本研究を行なった。本研究では肺吸虫症患者の尿でウェステルマン肺吸虫成虫抗原に対する IgG、IgG4、IgM、IgA 抗体を測定した。その結果、患者尿中には抗ウェステルマン肺吸虫抗体が検出できた。IgG では感度８５％、特異性９４％であり、IgG4 ではそれよりやや高い感度特異性が得られ、疫学調査に有用な方法と考えられた。

Materials and Methods

1. Urine and serum samples :Totally 38 serum samples and 40 urine samples were obtained from 20 paragonimiasis westermani- patients in Japan. These patients were confirmed as paragonimiasis clinically and serologically. from patients with schistosomiasis japonicum(39), opisthorchiasis (24 samples), ascariasis (23 samples) and other parasitic infections(28 samples)were also used. Urine samples collected from 39 healthy Japanese students were used as controls.

2. Preparation of crude adult worm Antigen. P.westermani adult worm were recovered from dogs infected withmetacercariae collected from E.japonicus. The worms were washed repeatedly and homogenized in phosphate-buffered saline (PBS),pH7.2.The homogenate was centrifuged at 5,000×g for 20 minutes at 4℃ ,and the supernatant was used as crude AW antigen. After adjusting to 10mg/ml ,the antigens were kept at -20℃ until used.

3. ELISA for antibody detection .Ninety-six well polystyrene flat-bottom microtiter plate was coated with 10ug/ml of the AW crude antigen in a coating buffer(pH) at 4℃ overnight. After washing twice with washing buffer(0.05%Tween 20 in PBS).the plate was blocked with casein buffer 200ul/well at room temperature for 2h. then urine samples, four times diluted with PBS were applied and the plate was incubated at 37℃ for 2h.After washing four times, 4000 times diluted anti-human immunoglobulins conjugatedwith peroxidase; IgG or IgM or IgA was added and incubated at 37℃ for 2h.while IgG4 was used with 1000 times dilution and incubated at 25℃ overnight. After washing, ABTS was used as a substrate, and the absorbency at 415nm was measured using a microplate autoreader. The value Mean titer of healthy Japanese donors +3SD was used as a cut-off point. Three times serially diluted pooled positive sera were used in each plate to make a standard curve, antibody unit of each samples were calculated from the curve.

Results

Pretreatment of urine samples. On the prep-experiment for dilution of urine samples by using PBS solution,the result showed that the antibody titer of 4 times dilution increase significantly in most cases.(Fig,1).so it was decided using 4 times diluted urine samples at all experiments lately.

The AW-specific antibodies in urine form patients with parasitic diseases. The paragonimus westermani adult worm specific antibodies were examined, in parallel, in sera of patients, and urine of patients with schistosomiasis Japonicum(39), Opisthorchiasis(24 samples),Ascariasis(23 samples) and some different parasitic infections(28 samples) by ELISA. The data demonstrated that IgG antibodies to paragonimus westermani AW were detected in 85.0% (17/20)of paragonimiasis patients ,and 7 positive appeared in 114 patients infected with parasites other than paragonimus westermani such as schistosomiasis, Opisthorchiasis.(Fig,2).For case of IgG4, it seemed better than IgG in either sensitivity or specificity with 93.7% and 96.6%.The data was shown in Fig,3.Conversely,AW-specific IgM and IgA antibodies were not so good neither sensitivity nor specificity(The data were not shown).

In order to reduce the cross-reaction, A ELISA method using cysteine proteinase in ES instead of crude antigen was also be tried in the study.(The method has been reported by Ikeda.etc,1996).However, not better result was obtained in our condition.(Fig,4).

Follow up antibody detection for patients' urine samples. Using the urine samples from 11 patients collected before and after treatment, the IgG and IgG4 antibodies were detected, and changes were observed. In almost cases, the titer was going to down generally due to treatment (Fig5,6).This may be usefully in evaluation of efficacy for treatment.

Discussion

Enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA) are widely used to immunodiagnosis infectious diseases including parasite infections. There have been many studies of paragonimiasis . Using fractionated antigens or characterized antigens with serum, already have given higher sensitivity and specificity of ELISA. However , for mass screening at the endemic area in the developing countries. it ask low cost, painless, rapid, and safety. There have been none using urine samples as examining individuals that collected easily and safely. Recently, urine samples have been used in some study at filariasis, schistosomiasis and more. For rapid diagnosis (7,8).In this study, the specimens-specific antibodies were detected with the same level reactivity of serum although the titers were lower than serum one.

About diluted treatment of urine samples, almost cases reached the highest titer at 4 times diluted point, and reduced orderly after 8 times dilution, but in some cases, those couldn't be detected appeared in specific antibodies detection without dilution and warming. The reason isn't known, but we may think that antibodies bind to the deposit and release into solution after dilution or warming for liberation of cold agglutination.

The ELISA using urine samples for antibodies detection showed higher sensitivity and specificity can compare with those of serum. This finding suggested that The URINE-ELISA may be a valuable method of immunodiagnosis in mass investigation helping us to master epidemiological information at endemic fields. Base on the above information, we propose that the specific antibodies detection like most usefully in both IgG detection and IgG4 detection. The IgG detection indicate much better than IgG4 with its less time need and similar specificity to IgG4.

After treatment, the antibody titer in urine samples from patients decreased orderly among a long period. This show that the specific antibody detection can help to judgment of treatment, but cannot be used to monitor the outcome of drug treatment or differentiate between past exposure to the parasite and the presence of an active infection.

References

1. HU X,Feng R,Hu A,etal. Immunodiagnosis of paragonimiasis by counter-immunoelectrophoresis and agar gel diffusion.Chin Med J 1980;93:557-561.

2. Maleewong W,Intapan PM,etal. Monoclonal antibodies to paragonimus heterotremus and their potential for diagnosis of paragonimiasis. Am J Trop Med Hyg 1997;56:413-417.

3. Zhong Z,Zhang Y,Shi Z,etal. Diagnosis of active paragonimus westermani infections with a monoclonal antibody-based antigen detection assay. Am J Trop Med Hyg 1993;49:329-334.

4. Yong TS,Seo JH,Yeo IS. Serodiagnosis of human paragonimiasis by ELISA inhibition test using monoclonal antibodies. Korean J parasitol 1993;31:141-147.

5. Ikeda T,Oikawa Y,Nishiyama T. Enzyme-linked immunosorbent assay using cysteine proteinase antigens for immunodiagnosis of human paragonimiasis. Am J Trop Med Hyg 1996;55:435-437.

6. Zhang Z,Zhang Y,Liu L,etal. Antigen detection assay to monior the efficacy of praziquantel for treatment of paragonimus westermani infections. Trans R Soc Trop Med Hyg 1996;90:43.

7. Abdelfattah M.ATTALLAH,Hisham ISMAIL,etal. Rapid detection of a Schistosoma mansoni Circulating Antigen Excreted in Urine of Infected Individuals by Using a Monoclonal Antibody. Journal of Clinical Microbiology,Feb.1999,p.354-357.

8. M.Itoh, M.V, etal. Sensitive and specific ELISA for the diagnosis of Wuchereria bancrofti infection using urine samples. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene . (in press).

Fig1

Effect of dilution of urine on anti-*P.westermani* IgG titers

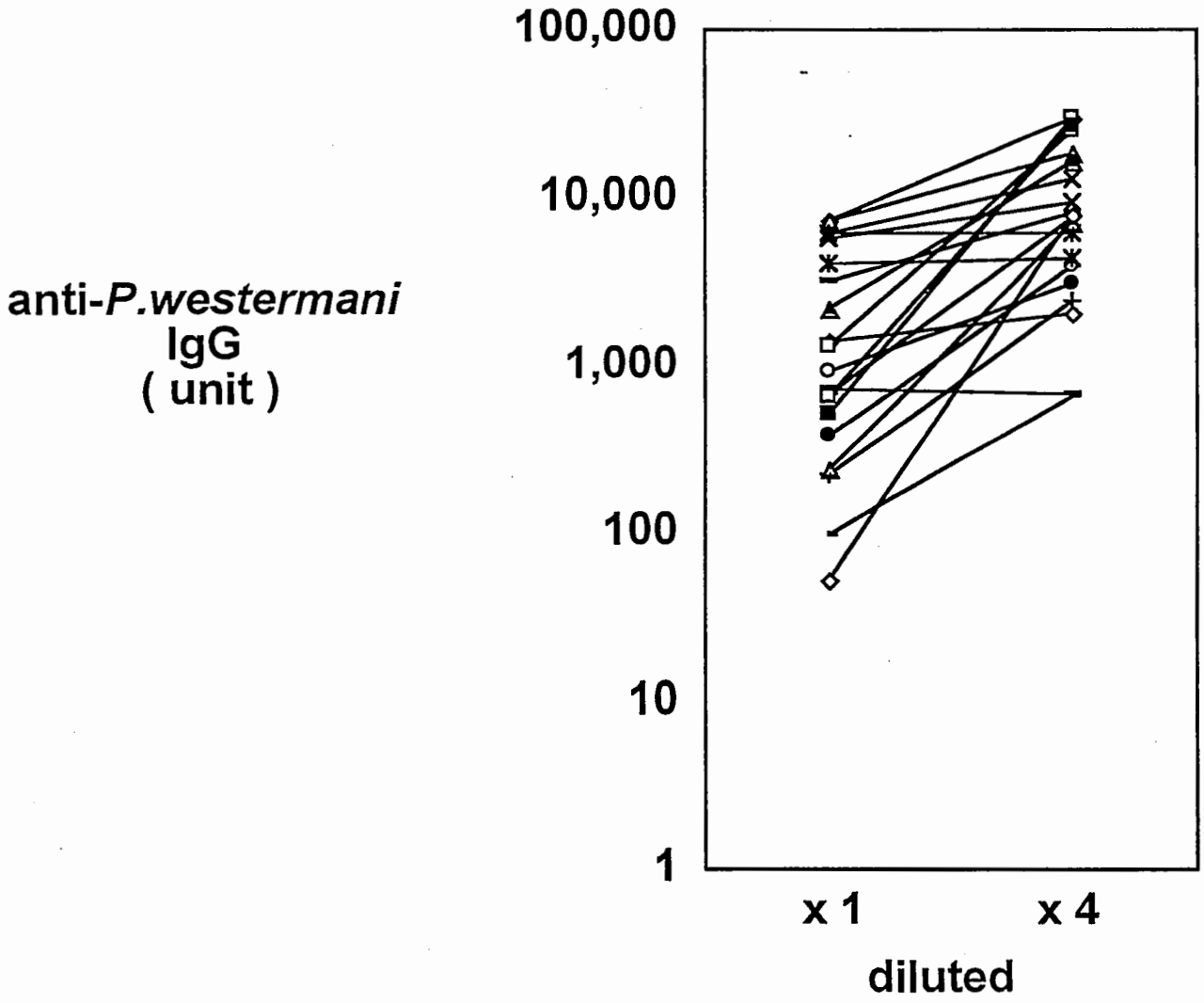


Fig2

IgG antibody units to *P.westermanii* adult worm according to different species of parasites

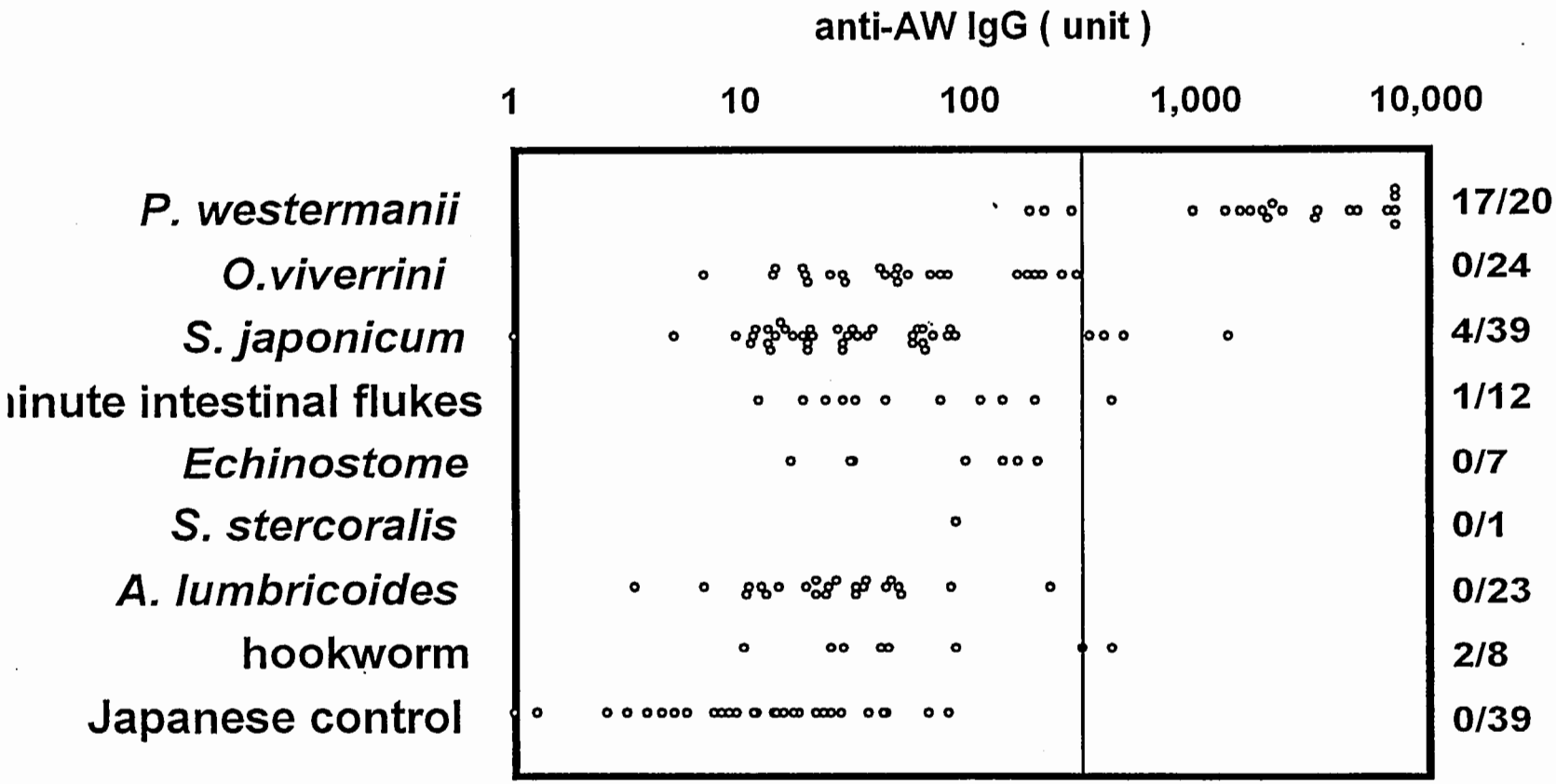


Fig3

IgG4 antibody units to *P.westerr...nii* adult worm according to different species of parasites

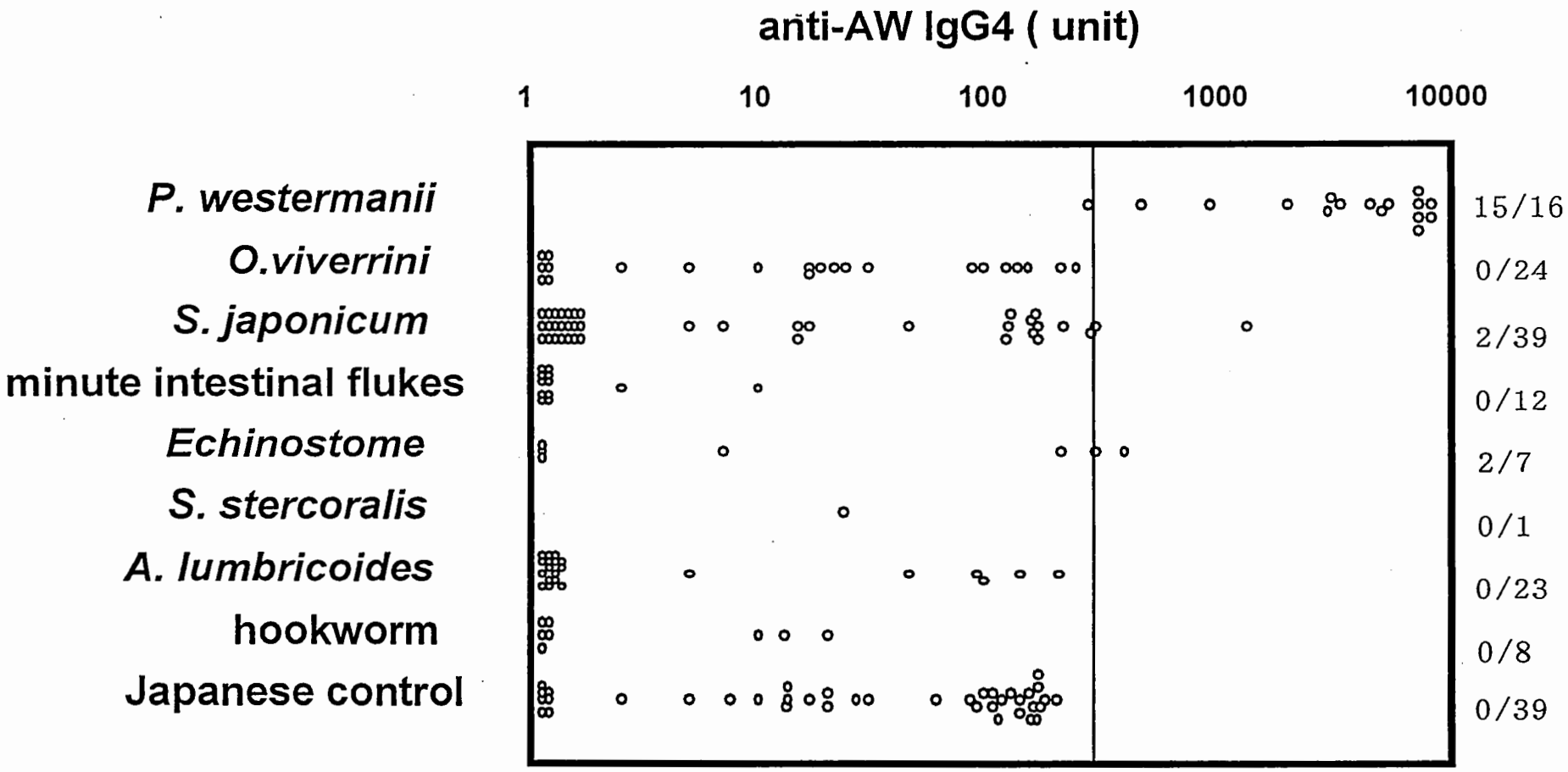


Fig4

Antibody units to *P.westermanii* cysteine proteinase according to different species of parasites

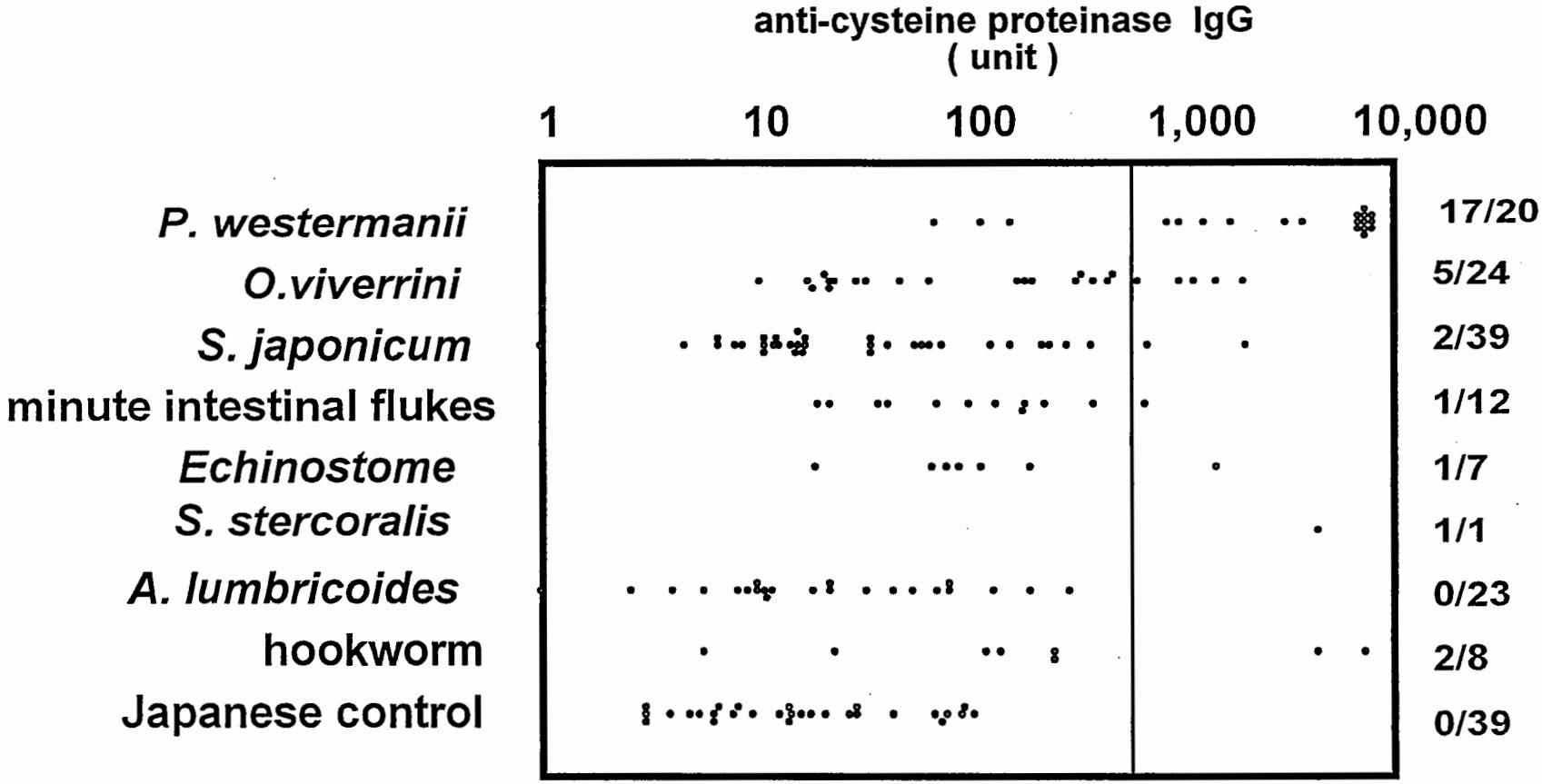


Fig5

Changes of anti-*P.westermanii* IgG in urine after treatment

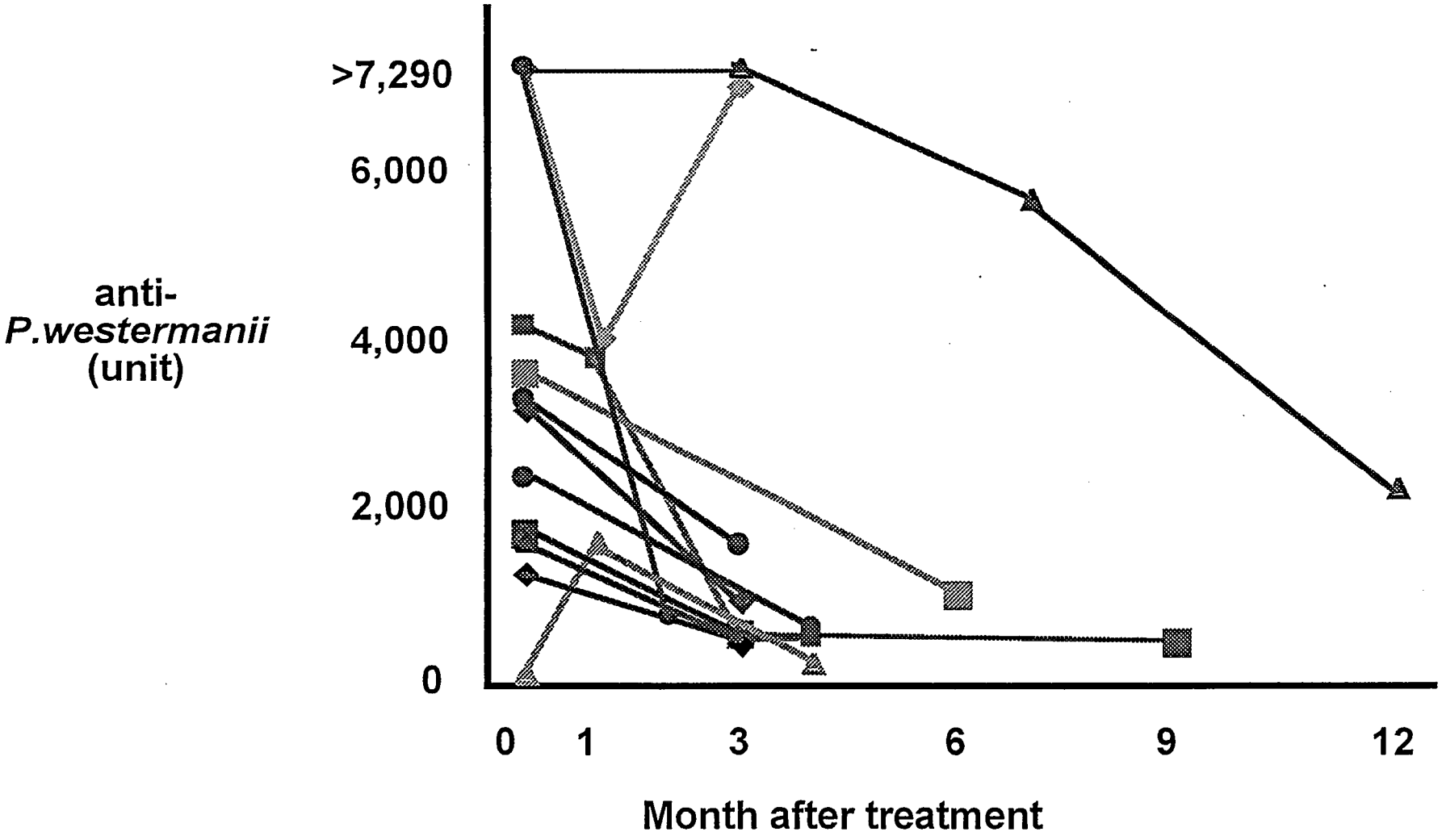
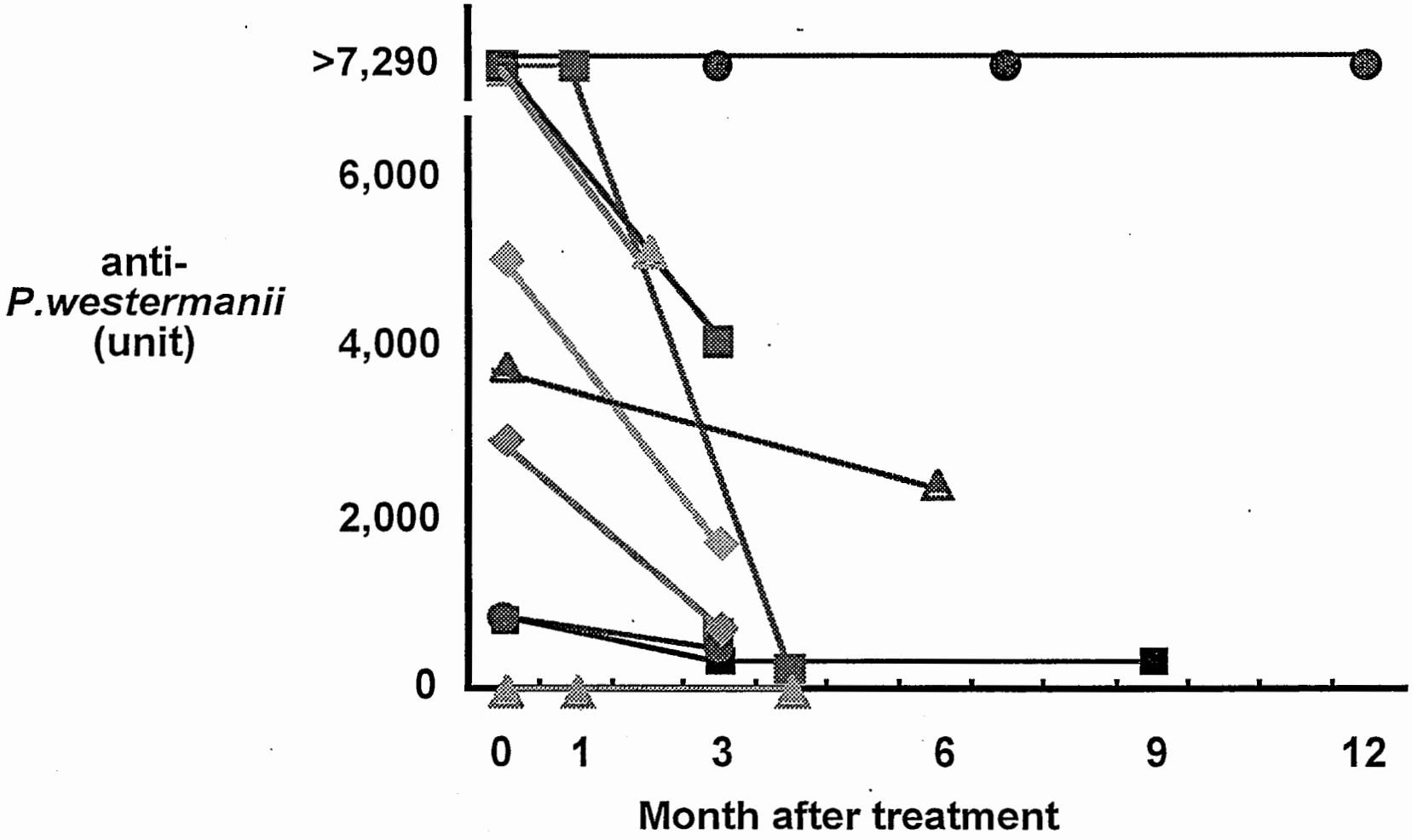


Fig6

Changes of anti-*P.westermanii* IgG4 in urine after treatment



Diagnosis for paragonimiasis by using URINE-ELISA

採集が簡単でかつ安全な尿を検体として用いた URINE-ELISA という方法で肺吸虫症患者の尿中でウェステルマン肺吸虫成虫抗原に対する IgG,IgG4,IgM,IgA 抗体を測定下。その結果、患者尿中には抗ウェステルマン肺吸虫抗体が検出できた。IgG では感度８５％、特異性９４％であり、IgG４ではそれよりやや高い感度、特異性が得られ、疫学調査に有用な方法だと考えられた。

（第３４回東海寄生虫談話会、名古屋市立大学）

第34回　東海寄生虫談話会

日時：　2000年11月25日（土）　午後2時より

会場：　名古屋市立大学医学部構内　　（同窓会館２Ｆ、寄生虫学会西日本支部大会会場の隣の２階建ての建物）

演題：

"-5 enhances intestinal immunity against adult Strongyloides nezuelensis.
Mohamed El-Marky　先生　（名市大・医学部・医動物）

Diagnosis of paragonimiasis by URINE-ELISA.
邱　旭光　先生（愛知医大・寄生虫）

Diagnosis of visceral leishmaniasis (Kala-azar) by ELISA using urine samples.
Mohammad Zahidul Islam　先生　（愛知医大・寄生虫）

ネズミマラリア原虫（P. berghei）オオキネートの蚊中腸壁への侵入に関係するCTRPタンパク質の免疫電顕観察
Wutipong Limviroj 先生（三重大・医学部・医動物）

旋毛虫のシスト形成における筋肉細胞の変異機序
呉　志良先生　（岐阜大・医学部・寄生虫）

会費：　1,500円

日本財団補助金による
２０００年度日中医学学術交流促進事業

⑤．在留中国人研究者研究助成

(10)ラット一過性局所脳虚血モデルでのＥＰＣ-Ｋ１の効果

ラット一過性局所脳虚血モデルでのEPC-K1の効果

張文日，　林健，佐々木千穂子，阿部康二　（岡山大学神経内科）

［要約］

EPC-K1は抗酸化作用を有する物質であり、虚血性細胞障害を軽減させることが期待されている。そこでわれわれはラット局所脳虚血モデルを用いて脳虚血性障害に対するEPC-K1の効果について検討した。中大脳動脈（MCA）60分間閉塞後に形成された脳梗塞は、EPC-K1投与により有意に縮小された。また、EPC-K1投与群ではアポトーシス関連蛋白であるcaspase-3、DNAの酸化的損傷のマーカーである8-OHdG、TUNELの全てにおいて、それらの陽性細胞はvehicle群に比較して減少した。これらのことより、EPC-K1による酸化的DNA障害抑制が神経細胞死の抑制、および梗塞巣の縮小に関与していたものと思われた。

【目的】　EPC-K1は、vitamin CとvitaminEのエステル化合物であり、抗酸化作用を有することが知られている。生理的状況下においては，スーパーオキサイドはSODやグルタチオンペルオキシダーゼ、カタラーゼにより消去されている。しかし、虚血下においてはフリーラジカルが多量発生し、これらの機構では消去しきれなくなる。そのような理由から、虚血再灌流による脳障害において、ラジカルスキャベンジャーによる脳保護作用が検討され、今まで種々の分子においてその有効性が確認されてきた。われわれはラット局所脳虚血モデルを用いて本薬剤の脳梗塞巣に与える影響と、酸化的DNA障害に与える影響についてTTC染色と8-OHdG免疫染色を行うことにより検索した。さらに、caspase-3染色とTUNEL染色を行うことによってアポトーシスの関与についても検索した。

【方法】　Wistar ratの総頚動脈からナイロン栓子を挿入し右中大脳動脈起始部を60分間閉塞した。脳血流再開の直後と3時間後に、EPC-K1 20mg/kg(n=7)、またはEPC-K1 10mg/kg(n=9)を頚静脈から投与した。vehicle(n=9)群においては生食(1ml/kg)を投与した。脳梗塞巣の定量は、再灌流２４時間後に麻酔下ラットを断頭、脳の２mm厚スライスを作製し、TTC染色を行うことによって判定した。また、再灌流２４時間後にラットの脳を摘出し、10μm厚の凍結切片を作成、この切片を用いてTUNELと免疫組織化学染色を行った。TUNEL染色は-80℃で保存しておいた脳凍結切片を、乾燥状態のまま常温に戻した後、10%中性ホルマリンにて10分間固定した。PBSで洗浄後、H2O2処理し、TdT、ビオチン化dNTPと反応

させた。反応後、streptavidin-horseradish peroxidase(HRP)処理を行い、2,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB)で発色させた。8-OHdG、caspase-3およびactive caspase-3の免疫組織化学染色においては、1次抗体として抗8-OHdG抗体(MOG-020、JICA、Shizuoka、Japan)、抗 caspase-3 抗体 (sc-1217、Sana Cruz Biotechnology Inc、CA)、抗 active caspase-3 抗体 (CFZ-05、Genzyme/Techne、U.S.A) を用いた。染色は、ABC法を用い、DABを発色物質として行った。

【結果】 脳梗塞巣は、Vehicle群 (230.0±61.2mm^3) に対しEPC-K1 20mg/kg投与群 (156.8±60.5mm^3) で有意に縮小していた。EPC-K1 10mg/kg投与群 (216±78 mm^3)では有意な縮小を認めなかった。組織学的検索では、Sham群の脳では、caspase-3、8-OHdG、TUNEL陽性細胞はいずれも認められなかったが、vehicle 群の梗塞脳では神経細胞の細胞質にてcaspase-3が、細胞核にて8-OHdGが著明に染色され、TUNEL陽性細胞が多数出現していた。一方、EPC-K1投与群ではcaspase-3、8-OHdG、TUNELともに陽性細胞がvehicle群に比較して減少した。

【考察】 抗酸化物質である EPC-K1 の投与により梗塞巣の縮小が認められた。これには、8-OHdG 産生の抑制も認められることから、その抗酸化作用が障害軽減に関与している可能性があると考えられた。一方、caspase-3 陽性細胞、TUNEL 陽性細胞も減少したことから、アポトーシスの抑制も関与している可能性があると思われた。

Glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) の脳保護作用の治療的有効時間域 (therapeutic time window)および治療 mechanism の検討

張文日, 林健, 阿部康二 (岡山大学神経内科)

[要約]

GDNF は神経細胞保護作用を有する物質であり、虚血性細胞障害を軽減させることが期待されている。そこでわれわれはラット局所脳虚血モデルを用いて脳虚血性障害に対する本薬剤の脳梗塞巣に対する治療の有効時間域について検討した。中大脳動脈 (MCA) 90 分間閉塞後に形成された脳梗塞は、再潅流直後と 1 時間の GDNF の投与により有意に縮小された。また、再潅流直後の GDNF 投与群ではアポトーシス関連蛋白である active caspase-3 と active caspase-9 の二重免疫蛍光染色、TUNEL の全てにおいて、それらの陽性細胞は vehicle 群に比較して減少し、TUNEL と active caspase-3 の陽性細胞は active caspase-9 のより有意な減少されった。これらのことより、GDNF の保護作用の治療的有効時間域は 1 時間で、この作用は cytochrome c と active caspase-9 の経路に対する弱いと思われた。

【目的】 GDNF は神経細胞保護作用を有することが知られている。我々はラット局所脳虚血モデルを用いて本薬剤の脳梗塞巣に対する治療の有効時間域について TTC 染色を行うことにより検索した。さらに、active caspase-3 と caspase-9 の蛍光二重染色と TUNEL 染色を行うことによって治療効果の mechanism についても検索した。【方法】 Wistar rat の総頚動脈からナイロン栓子を挿入し右中大脳動脈起始部を 90 分間閉塞した。脳血流再開の直後と 1 時間と 3 時間後 GDNF (2.5μg/体重 250g) を投与を行った。脳梗塞巣の定量は、再灌流 24 時間後に麻酔下ラットを断頭、脳の 2mm 厚スライスを作製し、TTC 染色を行うことによって判定した。また、再灌流 12 時間後にラットの脳を摘出し、10μm 厚の凍結切片を作成、この切片を用いて TUNEL と蛍光免疫組織化学染色を行った。TUNEL 染色は-80℃で保存しておいた脳凍結切片を、乾燥状態のまま常温に戻した後、10%中性ホルマリンにて 10 分間固定した。PBS で洗浄後、H2O2 処理し、TdT、ビオチン化 dNTP と反応させた。反応後、streptavidin-horseradish peroxidase(HRP) 処理を行い、2,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB)で発色させた。Active caspase-3 および active caspase-9 の蛍光二重染色においては、1 次抗体として抗 active caspase-3 抗体 (#IMG-144, San Diego, CA) と抗 active caspase-9 抗体 (#9501S, Cell Signaling Tech, MA) を用いた。二次抗体は Goat anti-rabbit IgG-FITC (#5570500, Biomedical Tech Inc, USA) と Goat

anti-mouse IgG-TRITC (＃108H9165, Sigma Chemical Co, USA)を用いた。

【結果】 脳梗塞巣は、Vehicle群（295.7 ± 56.6, n=7）に対しGDNF投与群は直後（177.0 ± 52.8 mm^3, n=6, $p<0.01$）と1時間後（220.2 ± 51.5, n=7; $p<0.05$）で有意に縮小していた。GDNF 3時間後投与群（250 ± 57.7, n=6)では有意な縮小を認めなかった。組織学的検索では、GDNF直後投与群ではactive caspase-3とactive caspase-9、TUNELともに陽性細胞がvehicle群に比較して明らかに減少した。GDNF3時間後投与群は変化がなかった。蛍光二重染色は細胞中にactive caspase-9の蛋白質がactive caspase-3のより有意な減少がなかった。

【考察】 GDNFの脳保護作用の治療的有効時間は、脳血流再開の直後から投与のが最も有効であって、GDNFの保護作用の治療的有効時間域は1時間で、この作用はcytochrome cとactive caspase-9の経路に対する弱いと思われた。

Attenuation of oxidative DNA damage with a novel antioxidant EPC-K1 in rat brain neuronal cells after transient middle cerebral artery occlusion

W.R. Zhang, T. Hayashi, C. Sasaki, H. Warita, Y. Manabe, and K. Abe

Department of Neurology, Okayama University Medical School, 2-5-1 Shikatacho, Okayama, Japan

No. of text pages: 15 pages including 1 table and 2 figures.

Correspondence: Prof. Abe, MD, PhD.

Department of Neurology

Okayama University Medical School,

2-5-1 Shikatacho

Okayama 700-8558, Japan

Tel: +81-86-235-7365

Fax: +81-86-235-7368

E-mail: zhang@cc.okayama-u.ac.jp

Acknowledgments: This work was partly supported by Grants-in-Aid for Scientific Research on 12877211 and 12470141 from the Ministry of Education, Japan, and grants from Japan Brain Foundation, Takeda Medical Research Foundation, and Japan Heart Association.

Abstract

EPC-K1, L-ascorbic acid 2-[3,4-dihydro-2,5,7,8-tetramethyl-2-(4,8,12-trimethyltridecyl)-2H-1-benzopyran-6-yl-hydrogen phosphate] potassium salt, is a novel antioxidant. In this study, we investigated a reduction of a oxidative neuronal cell damage with EPC-K1 by immunohistochemical analysis for 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG) in rat brain with 60 min transient middle cerebral artery occlusion, in association with terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP-biotin in situ nick end labeling (TUNEL) and staining for total and active caspase-3. Treatment with EPC-K1 (20mg/kg iv) significantly reduced infarct size ($p<0.05$) at 24 h of reperfusion. There were no positive cells for 8-OHdG and TUNEL in sham-operated brain, but numerous cells became positive for 8-OHdG, TUNEL and caspase-3 in the brains with ischemia. The number was markedly reduced in the EPC-K1 treated group. These reductions were particularly evident in the border zone of the infarct area, but the degree of reduction was less in caspase-3 staining than in 8-OHdG and TUNEL stainings. These results indicate EPC-K1 attenuates oxidative neuronal cell damage and prevents the neuronal cell death.

Abbreviations: ANOVA, two way analysis of variance; CBF, cerebral blood flow; DAB, 2,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride; MCAO, middle cerebral artery occlusion; 8-OHdG, 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine; SOD, superoxide dismutase; TTC, 2,3,5 triphenyltetrazolium chloride; TUNEL, terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP-biotin in situ nick end labeling.

INTRADUCTION

L-Ascorbic acid (vitamin C) and α-tocopherol (vitamin E), two endogenous antioxidants, are important members of non-enzymatic antioxidant defense systems. However, as vitamin E is insoluble in water, its water-soluble analogs are synthesized in order to improve its absorption. EPC-K1, L-ascorbic acid 2-[3,4-dihydro-2,5,7,8-tetramethyl-2-(4,8,12-trimethyltridecyl)-2H-l-benzopyran-6-yl-hydrogen phosphate] potassium salt, is a novel phosphate ester of vitamin C and vitamin E, which is soluble in both water and lipid [1]. It was reported that EPC-K1 could act as a scavenger of hydroxyl radicals and an inhibitor of lipid peroxidation [2]. Hydroxyl radical is highly reactive, and oxidizes cellular lipids, protein and nucleic acids, leading to cell death [3, 4,]. Under physiological condition, superoxide and hydrogen peroxide are constantly scavenged by superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase, and catalase. Under condition of ischemia, however, an overproduction of oxygen free radicals perturbs the antioxidative defense mechanisms, and hydroxyl radicals are generated. Studies have shown that radical scavengers and inhibitors of lipid peroxidation can ameliorate ischemic neuronal damage [5,6,7,8,9,10,11,12,13,]. Indeed, previous study demonstrated that EPC-K1 reduced ischemic brain damage [14]. However, the mechanism of its neuroprotective effect had been unclear.

In the present study, therefore, we examined the effect of EPC-K1 on ischemic/reperfusion brain injury by measuring infarct volume and performing terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP-biotin in situ nick end labeling (TUNEL) study. Furthermore, we also investigated its effect on oxidative DNA damage and apoptosis by immunohischemical analysis for 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG), which is a oxidative DNA damage marker and caspase-3.

MATERIALS AND METHODS

Adult male Wistar rats (body weight, 270 to 300 g) were anesthetized with an intraperitoneal injection of pentobarbital (4 mg/100 g), and a burr hole with a diameter of 1.5 mm was made in the skull using an electric dental drill with care to avoid traumatic brain injury. The location of the burr hole was 3 mm dorsal and 5 mm lateral to the right from the bregma, which was located in the upper part of MCA territory. Thin bone was preserved in the burr hole. The animals were allowed to recover at ambient atmosphere.

On the next day, at about 24 h after the drilling, the rats were anesthetized by inhalation of a nitrous oxide/oxygen/halothane (69%/30%1%) mixture and the right MCA was occluded by insertion of nylon thread through the common carotid artery according to previous report. Body temperature was maintained at 37 ± 0.3°C during surgical procedure. After 60 min of occlusion, the cerebral blood flow (CBF) was restored by withdrawal of the nylon thread. EPC-K-1 was diluted into 0.9% NaCl containing 1N NaOH, to give a ultimate EPC-K1 concentration of 10 mg/1 ml with pH 7.5. Vehicle group was treated the saline. Animals were infused intravenously with EPC-K1 0.25ml /250g, EPC-K1 0.125ml/250g and same amount of saline through the jugular vein just and 3 h after the reperfusion. Blood samples (90 μl) were collected before and just after MCAO from ventral tail artery for measurement of PO_2, PCO_2, and pH (blood gas analyzer model ABL330, Radiometer). Regional CBF of right frontoparietal cortex region was measured before and just after MCAO, as well as before, just after (0), and at 3 h after the reperfusion. Rectal temperature was monitored continuously with a rectal probe inserted to a 4 cm. The animals were allowed to recover at ambient temperature (21 to 24 °C) until sampling. The experimental protocol and procedures were approved by the Animal Committee of the Okayama University Medical School.

To examine a possible effect of EPC-K1 on infarct size after transient MCAO, forebrains were removed at 24 h of reperfusion and divided into sections of 2-mm thickness. The coronal sections were immersed in 2% solution of 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (TTC) at 37 °C for

30 min, and their sections were fixed in 10 % neutralized formalin. The infarct areas of each section were measured using Scion Image software, version 1.62a.

For TUNEL study and immunohistochemical analysis, the forebrains were quickly removed at 24 h after the reperfusion and frozen in powered dry ice (n=4 each, in vehicle and 20mg/kg EPC-K1 applied groups). Coronal sections were cut on a cryostat at –25 °C and collected on glass slides coated with silan. Sham control sections (n=2) were also obtained. TUNEL study was performed with use of a kit (TACS TdT in situ apoptosis detection kit #80-4625-00, Genzyme), as our previous report [15]. For immunohistochemical analysis of 8-OHdG, the sections were fixed in ice-cold acetone for 5 min and air-dried, followed by a rinse in phosphate-buffered saline (PBS). After blocking with 2% normal horse serum in PBS for 2 h, the slides were incubated with mouse monoclonal antibody against 8-OHdG (MOG-020, JICA, Shizuoka, Japan) at a concentration of 7.0 μg/mg in 2% normal horse serum and 0.3% polyoxyethelene octyphenyl ether (Triton-X) for 8 h at 4 °C. The specificity of this antibody had been established elsewhere [16,17]. The slides were then washed and incubated for 3 h with biotinylated anti-mouse IgG (BA-2000, Vector Laboratories) for 30 min, and then developed using diaminobenzidine (DAB) as a color substrate. The reaction were stopped by washing them in distilled water. A set of sections was stained in a similar way without the first antibody.

For immunohistochemical analysis for total caspase-3 and active caspase-3, the sections were also fixed in ice-cold acetone, air-dried, and then rinsed 3 times in PBS. After blocking with 2% normal serum for 2 h, the slides were incubated for 16 h at 4 °C with first antibody: a goat polyclonal antibody against total caspase-3 (sc-1217, Sana Cruz Biotechnology Inc, CA) at 1 : 100 or a rabbit polyclonal antibody against active caspase-3 at 1 : 100. A set of sections was treated without the first antibody, in order to ascertain specific finding of the first antibodies. The speciaficity of this antisera had been confirmed elsewhere [18]. The sections were then washed and incubated for 1 h with the biotinylated second antibody (1 : 200), followed by incubation with avidin-biotin-peroxidase complex for 30 min. Diaminobenzidine (DAB) was used as a color substrate. In this study, we performed quantitative analysis as our previous report with slight

modification [15]. Briefly, the number of positive cells were counted in three pixels of 1×1 mm^2. First is a region of cortex 2 mm from the midline rendered ischemia by MCAO. This region falls within the border of infarction in vehicle-treated group, but is spared in EPC-K1-treated group. Second is a region of dorsolateral cortex involved in infarcts in both vehicle- and EPC-K1 group. Third is a region of medial striatum involved in infarcts in vehicle-treated group, but variably involved in EPC-K1 group. These staining were categorized into 4 grades to count in the following: (-) no staining, (+) small (1-25), (2+) moderate (26-70), or (3+) a large (more than 71), respectively (Table).

Statistical analyses were performed using Student's t-test for infarct volume, two way analysis of variance (ANOVA) followed by Bonferroni/Dunnett for infarct area, or ANOVA repeated measure for rCBF data, respectively.

RESULTS

There was no significant difference in physiological parameters between the vehicle- and two EPC-K1-treated groups. rCBF was declined to lesser than 40% of basal level immediately after MCAO, and recovered after reperfusion in vehicle or two EPC-K1-treated group, respectively. There was no significant difference in rCBF between two animal groups.

Infarct area of two sections (8 and 10 mm caudal from frontal pole) of EPC-K1-treated (20 mg/kg) group was significantly smaller ($p<0.05$) than vehicle group (Fig. 1A). The infarct volumes of vehicle-treated and EPC-K1-treated (20 mg/kg) group at 24 h after transient MCAO were 230.0 ± 61.2 (mean $\pm$ SD, n=9) and 156.8 ± 60.5 mm^3 (n=7; $p<0.05$ vs. the vehicle-treated group), respectively (Fig. 1B). Infarct area and volume of 10 mg/kg EPC-K1-treated group were also smaller than vehicle-treated group, but there was no statistical significance between two groups (Fig. 1).

TUNEL and 8-OHdG staining were negative in the sham control brain (Fig. 2a, d), but

became positive in the brain at 24 h of reperfusion (Fig. 2b, e). Positive cells were mainly distributed in the ischemic core, but were also present in the border of MCA area. Approximately 70% of cells were positive for TUNEL and 8-OHdG in that area. No positive cells were found in the contralateral area. Treatment with EPC-K1 (20 mg/kg) markedly reduced the number of both TUNEL and 8-OHdG positive cells, especially in the border of the infarct area (Fig. 2c, f). Total and active caspase-3 staining showed numerous positive cells in the ischemic hemisphere of rats at 24 h of reperfusion, especially in the border of the infarct area (Fig. 2h, k). There were no positive cells in the contralateral hemisphere or in the either hemisphere of sham controls (Fig. 2g, j). Treatment with EPC-K1 (20 mg/kg) greatly reduced the number of positive cells in the ischemic hemisphere, particularly in the border of the infarct area as compared to vehicle-treated group (Fig. 2h, k). The degree of reduction was milder in caspase-3 staining than 8-OHdG and TUNEL stainings (Table, Fig. 2).

DISCUSSION

In this study, we found that EPC-K1 (20 mg/kg) reduced infarct volume when administered intravenously. The mechanism of the protective effect of EPC-K1 after transient MCAO seems to be related with several important findings. First, there is no significant difference between the vehicle and EPC-K1-treated group in the rCBF after transient MCAO and reperfusion. Second, the effect was associated with reduction of 8-OHdG-positive cells. Under a condition of severe oxidative stress, the C-8 position of 2′-deoxyguanosine, which is the constituent of DNA, is hydroxylated, and 8-OHdG is produced [19]. Hydroxyl radical, singlet oxygen, and peroxynitrite are proposed to be responsible for this production [20,21]. In our previous study, the extent of oxidative damage was investigated in rat brain after transient MCAO by immunohistochemical analysis for 8-OHdG [22]. In the current study, we showed that intravenous EPC-K1 (20 mg/kg) decreased 8-OHdG immunoreactivity, especially in the border (penumbra) of the ischemic area

that is spared from infarction. This result shows that EPC-K-1 attenuates oxidative DNA damage induced by the transient MCAO.

On the other hand, abundant evidence suggest that apoptosis plays an important role in cell death after stroke. This includes evidence of DNA fragmentation (laddering) in the ischemic hemisphere, as well as evidence that protein synthesis inhibitors can block cell death, both prominent characteristics of apoptosis [23]. In the current study, we used TUNEL and caspase-3 staining as markers of apoptosis. We found that, consistent with its infarct-reducing effects, intravenous EPC-K1 (20 mg/kg) reduced the number of TUNEL positive cells in the ischemic hemisphere, especially in the ischemic "penumbra" that was spared from infarction. Previous studies show that 90-95% of TUNEL positive cells in the ischemic brain are neurons [24]. Caspases, which are strongly related to the process of apoptotic cell death, were induced and mainly located in the ischemic penumbra, suggesting that the expansion of neuronal cell damage in this area may be primarily by an apoptotic mechanism. Caspase-3, 29-kDa pro-apoptosis cysteine protease, exists in both inactive and active forms. The inactive form of the enzyme is present at very low levels, and the active form is barely detectable in normal rat brain. Following focal cerebral ischemia, caspase-3 immunoreactivity increased in the ischemic penumbra of affected hemisphere [25]. In the current study, we found the reduction of the number of positive cells for both active and total caspase-3 in the border of the ischemic area, although the degree of the reduction was less than 8-OHdG and TUNEL. These results indicate that there are direct or indirect cytoprotective effects of EPC-K1 in the ischemic tissue.

In conclusion, the current study demonstrated that the ameliorative effect of EPC-K1 on ischemic brain injury was associated with reduction of 8-OHdG-, TUNEL-, total and active caspase-3-positive cells.

Reference

1 Ogata K, Yamamoto K, and Tsuruoka H, Chemical structure and physicochemical properties of L-ascorbic acid 2-[3,4,-dihydro-2,5,7,8-tetramethyl-2-(4,8,12-trimethyltridecyl)-2H-1-benzopyran-6-yl hydrogen phosphate] potassium salt (EPC-K1). *Iyakuhin Kenkyu* 990; 211: 222-228

2 Mori A, Edamatsu R, Kohno M, Ohmor S, A new hydroxyl radical scavenger: EPC-K1. *Neurosciences* 1989; 15: 371-376

3 Floyd RA, West MS, Eneff K, Schneider JE, Methylene blue plus light mediates 8-hydroxyguanine formation in DNA. *Arch Biochem Biophys* 1989; 273: 106-111

4 Oliver CN, starke-Reed PE, Stadtman ER, Oxidative damage to brain proteins, loss of glutamine synthetase activity, and production of free radicals during ischemia/reperfusion-induced injury to gerbil brain. *proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87: 5144-5147

5 Pahlmark K, Siesjö BK, Effects of the spin trap-α-Phenyl-*tert*-butylnitrone (PBN) in transient forebrain in the rat. *Acta Physiol Scand* 1996; 157: 41-51

6 Takasago T, Peters EE, Graham DL, Masayasu H, Macrae IM, Neuroprotective efficacy of ebseren, an anti-oxidant with anti-inflammatory actions, In a rodent model of permanent middle cerebral artery occlusion. *Br J Pharmacol* 1997; 122: 1251-1256

7 Umemura K, Wada K, Umemura T, Mizuno A, Nakashima M, Effect of 21-aminosteroid lipid peroxidation inhibitor, U74006F, in the rat middle cerebral artery occlusion model. *Eur J Pharmacol* 1994; 251: 69-74

8 Zhao Q, Pahlmark K, Smith ML, Siesjö BK, Delayed treatment with the α-Phenyl-*tert*-butylnitrone (PBN) reduces infarct size following transient middle cerebral artery occlusion in rats. *Acta Physiol Scand* 1994; 152: 349-350

9 Abe K, Yuki S, Kogure K, Strong attenuation of ischemic and postischemic brain edema in rats by a novel free radical scavenger. *Stroke* 1988; 19 : 480-485

10 Nishi H, Watanabe T, Sakurai H, Yuki S, Ishibashi A, Effect of MCI-186 on brain edema in

rats, *stroke* 1989; 20: 1236-1240

11 Patt A, Horesh IR, Berger EM, Harken AH, Repine JE, Iron depletion or chelation reduces ischemia/reperfusion-induced edema in gerbil brains. *J Pediatr Surg* 1990; 25: 224-228

12 Cao X, J. Phyllis W, α-Phenyl-*tert*-butylnitrone reduces cortical infarct and edema in rats subjected to focal ischemia. *Brain Res* 1994; 644: 267-272

13 Clemens JA, Sauders RD, Ho PP, Phebus LA, Panetta JA, The antioxidant LY231617 reduces global ischemic neuronal injury in rats. *Stroke* 1993; 24: 716-723

14 Hyroyuki T, Kazunao K, Yasuhiko I, Kazuo U, Hydroxyl radical generation after the third hour following ischemia contributes to brain damage. *Eur J Pharmacol* 1998; 352: 165-169

15 Hayashi T, Ab K, Itoyama Y, Reduction of ischemic damage by application of vascular endothelial growth factor in rat brain after transient ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 1998;18 : 887-895

16 Tanaka T, Nishiyama Y, Okada K, Hirota K, Matsui M, Yodoi J, Hiai H, Toyokumi S, Induction and nuclear translocation of thioredoxin by oxidative damage in the mouse kidney: independence of tubular necrosis and sulfohydryl depletion. *Lab Invest* 1997; 77: 145-155

17 Toyokuni S, Tanaka T, Hattori Y, Nishiyama Y, Yoshida A, Uchida K, Hiai H, Ochi H, Osawa T, Quantitative immunohistochemical determination of 8-hydroxy-2′-deoxyguanosine by a monoclonal N45.1: its application to ferric nitrilotriacetate-induced renal carcinogensis model. *Lab Invest* 1997; 76: 365-374

18 Rasper D, Vaillancourt J, Hadano S, Houtzager V, Seiden I, Keen S, Tawa P, Xanthoudakis S, Nasir J, Martindale D, Koop B, Peterson E, Thornberry N, Huang JQ, Huang Macpherson D, Black S, Hornung F, Cell death attenuation by 'Usurpin', a mammalian DED-caspase homologue that precludes caspase-8 recruitment and activation by the CD-95 (Fas, APO-1) receptor complex. *Cell Death Differ* 1998; 5: 271-288

19 Kasai H, Nishimura S, Hydroxylation of deoxyguanosine at the C-8 Position by ascorbic acid and other reducing agents. *Nucl Acids Res* 1984; 12: 2137-2145

20 Devasagayam TPA, Steeken S, Obendorf MSW, Schultz WA, Sies H, Formation of 8-

Hydroxy (deoxy)-guanosine and generation of strand breaks at guanine residues in DNA by singlet oxygen. *Biochemistry* 1991; 30: 6283-6289

21 Floyd RA, Carney JM, Free radical damage to protein and DNA: mechanisms involved and relevant observations on brain under-going oxidative stress. *Ann Neurol* 1992; 32: S22-S27

22 Hayashi T, Sakurai M, Itoyama Y, Abe K, Oxidative damage and breakage of DNA in rat brain after transient MCA occlusion. *Brain Res* 1999; 832: 159-163

23 Du C, Hu R, Csernansky CA, Liu XZ, Hsu CY, Choi DW, Additive neuroprotective effects of dextrorphan and cycloheximide in rats subjected to transient focal cerebral ischemia. *Brain Res* 1996; 718: 233-236

24 Li Y, Sharov VG, Jiang N, Zaloga C, Sabba HN, Chopp M, Ultrastructual and light microscopic evidence of apoptosis after middle cerebral artery occlusion in the rat. *Am J Pathol* 1995;146: 1045-1051

25 Kitagawa H, Hayashi T, Mitsumoto Y, Koga N, Itoyama Y, Abe K, Reduction of ischemic brain injury by topical application of glial cell line-derived neurotrophic factor after permanent middle cerebral artery occlusion in rats. *Stroke* 1998; 29: 1417-1422

Figure legends

Fig. 1) Effects of EPC-K1 (10 mg/kg and 20 mg/kg) on infarct area (A), and infarct volume (B) at 24 h after 60 min of transient MCAO. A, Infarct areas of 2 coronal sections (8 and 10 mm caudal) from EPC-K1 (20 mg/kg) treated group (n=7) were significantly smaller than those of the vehicle group (n=9, $*p<0.05$). B, Infarct volume in the brain sections was significantly reduced by EPC-K1 (20 mg/kg) treatment ($*p<0.05$). There are no significant difference between 10 mg/kg EPC-K1 group and vehicle group.

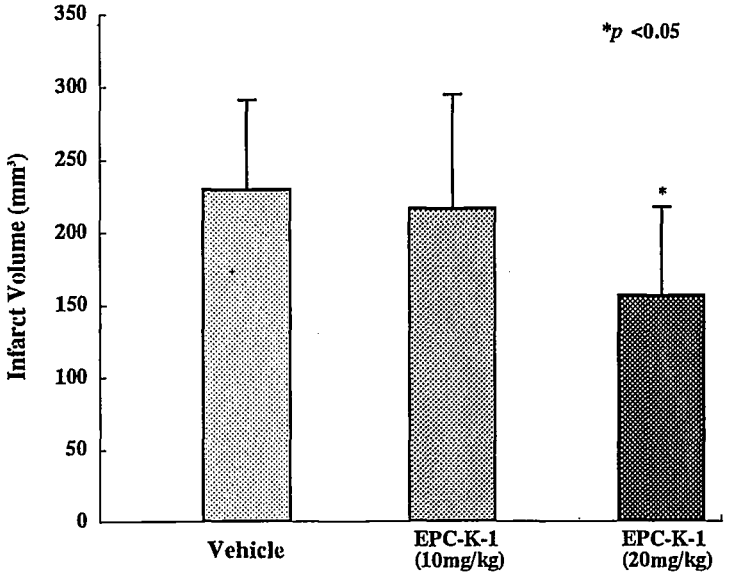
Fig. 2) Representative stainings of TUNEL (a-c), 8-OHdG (d-f), active caspase-3 (g-i) and total caspase-3 (j-l) in sham control brain (a, d, g, j), vehicle (b, e, h, k) or EPC-K1 (20mg/kg) (c, f, i, l) brain, respectively. No cells are stained in the sham control brain (left column). In contrast, large number of staining cells became positive in the vehicle group (middle column), which are reduced in the EPC-K1 (20mg/kg) group (right column). Magnifications, ×50. Bar in panel l, 0.05 mm.

Table. Number of TUNEL and immunohistochemical staining of positive neurons with or without EPC-K-1 (20 mg/kg) treatment after MCA occlusion

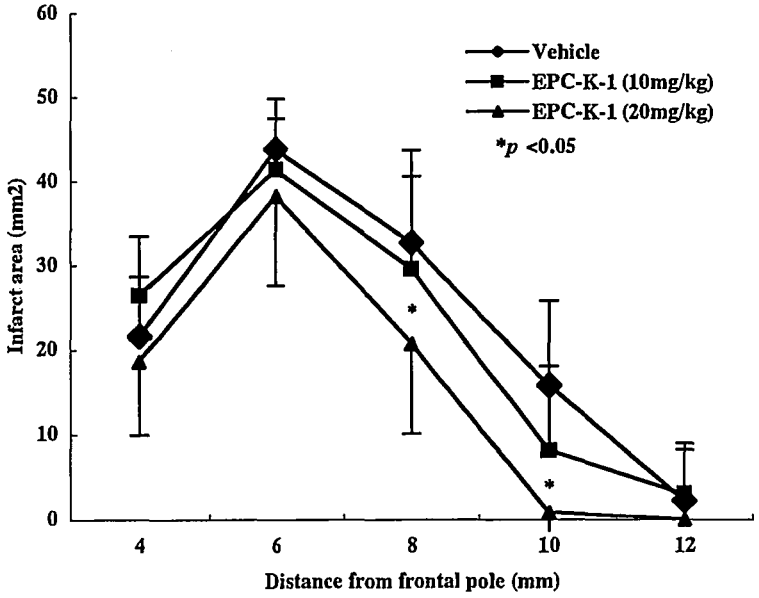
	TUNEL	Active caspase-3	Total caspase-3	8-OH dG
Sham	-	-	-	-
	-	-	-	-
Vehicle				
1	3+	2+	3+	+
2	2+	3+	3+	2+
3	3+	3+	3+	2+
4	3+	3+	2+	2+
EPC-K-1(20 mg/kg)				
1	2+	2+	2+	+
2	+	2+	+	+
3	2+	2+	2+	+
4	+	2+	+	+

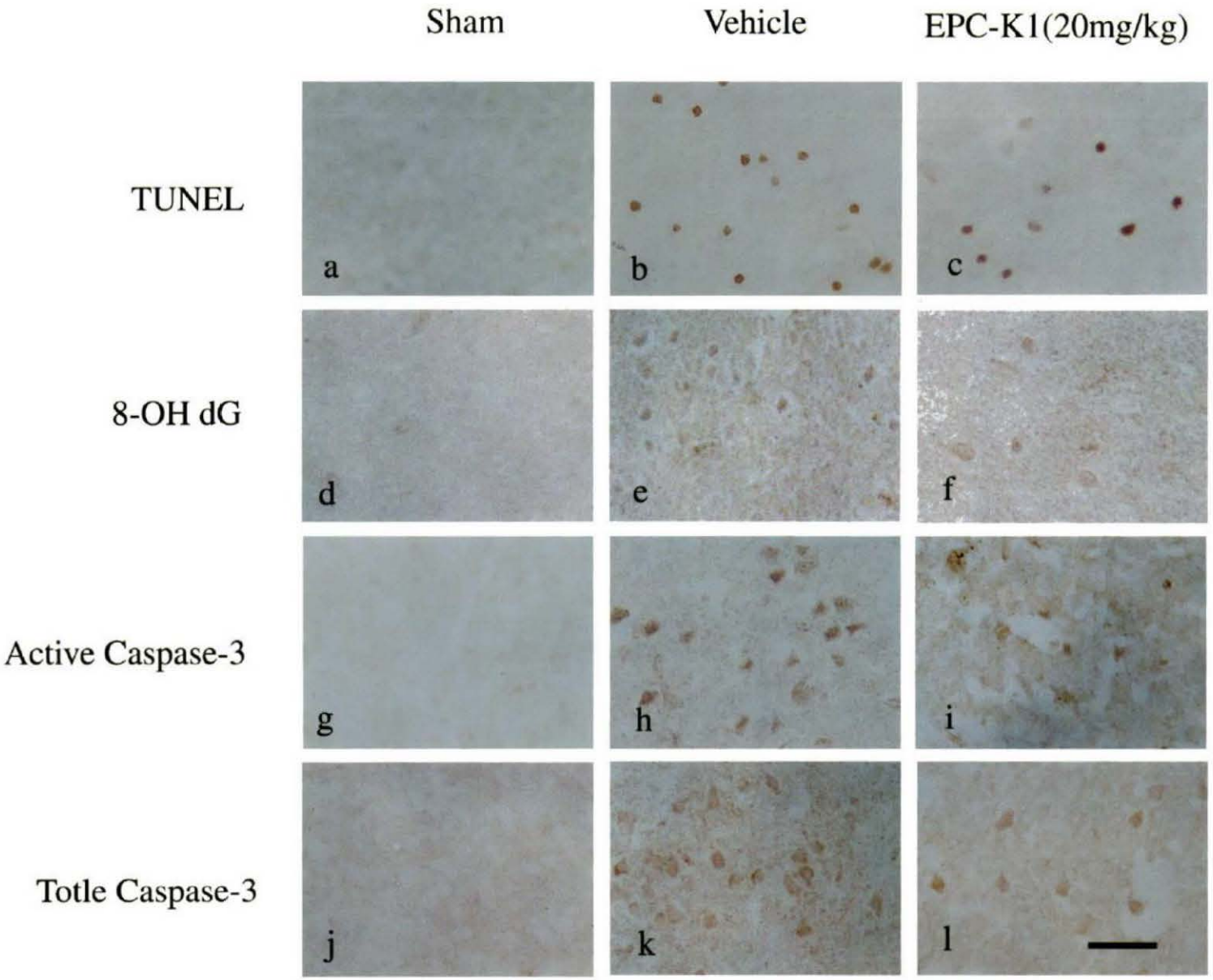
The staining was categorized into the following four grades: no staining, small (1-25), moderate (26-70), or a large (71-100 or more) number of stained cells into (-), (+), (2+), (3+), respectively. Sham control group, n=2, Vehicle and EPC-K-1(20 mg/kg) group, n=4.

A


*p <0.05
Infarct Volume (mm³)
350
300
250
200
150
100
50
0
*
Vehicle
EPC-K-1 (10mg/kg)
EPC-K-1 (20mg/kg)

B


Vehicle
EPC-K-1 (10mg/kg)
EPC-K-1 (20mg/kg)
*p <0.05
Infarct area (mm2)
60
50
40
30
20
10
0
*
*
4
6
8
10
12
Distance from frontal pole (mm)


Sham
Vehicle
EPC-K1(20mg/kg)
TUNEL
8-OH dG
Active Caspase-3
Totle Caspase-3
a
b
c
d
e
f
g
h
i
j
k
l

Time dependent amelioration against ischemic brain damage by glial cell line-derived neurotrophic factor after transient middle cerebral artery occlusion in rat

W.R. Zhang, T. Hayashi, M. Iwai, H. Warita, K. Sato, Y. Manabe, and K. Abe

Department of Neurology, Okayama University Medical School, 2-5-1 Shikatacho, Okayama, Japan

No. of text pages: 13 pages including 3 figures.

Correspondence: Prof. Abe, MD, PhD.
Department of Neurology
Okayama University Medical School,
2-5-1 Shikatacho
Okayama 700-8558, Japan

Tel: +81-86-235-7365
Fax: +81-86-235-7368
Email: zhang@cc.okayama-u.ac.jp

Acknowledgments: This work was partly supported by Grants-in-Aid for Scientific Research (B) 12470141 and (Hoga) 12877211 from the Ministry of Education, Science, Culture and Sports of Japan, and by Grants (Tashiro K, Itoyama Y) and Comprehensive Research on Aging and Health (H11-Choju-010, No. 207, Koizumi A) from the Ministry of Health and Welfare of Japan.

Abstract

Time dependent influence of glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) was examined after 90 min of transient middle cerebral artery occlusion (MCAO) in rats. Treatment with GDNF significantly reduced the infarct volume stained with 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (TTC) when GDNF was topically applied at 0 and 1 h of reperfusion, but became insignificant at 3 h as compared to vehicle group. The protective effect of GDNF was closely related to the significant reduction of the number of TUNEL positive cells as well as immunofluorescently positive cells for active forms of caspases, especially active casapase-3 but not -9.

Thus, the present study showed that topical application of GDNF significantly reduced infarct size in a time-dependant manner, while the therapeutic time window was shorter than other chemical compounds such as an NMDA receptor antagonist (MK-801) and a free radical scavenger (PBN). The effect of GDNF was stronger in suppressing active caspase-3 than active caspase-9.

THEME A: DEVELOPMENT AND REGENERATION

TOPIC: GDNF: Biological effect

Keyword: GDNF, Ischemia, TUNEL, caspase-3, caspase-9

Abbreviations: ANOVA, two way analysis of variance; BDNF, brain-derived neurotrophic factor; CBF, cerebral blood flow; DAB, 2,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride; FITC, fluorescein-isothiocyanate; GDNF, glial cell line-derived neurotrophic factor; MCA, middle cerebral artery; MCAO, middle cerebral artery occlusion; rCBF, regional cerebral blood flow; TTC, 2,3,5 triphenyltetrazolium chloride; TRITC, tetramethylrhodamine-isothyocyanate; TUNEL, terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP-biotin in situ nick end labeling.

Glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF), a member of the transforming growth factor-β superfamily, is a potent neurotrophic factor that promotes the survival and morphological differentiation of dopaminergic neurons [3, 7, 11,16] and motoneurons [13, 18]. GDNF is upregulated after mechanical injury and cerebral ischemia/reperfusion [1, 15]. When cells receive apoptotic stimuli, mitochondria releases cytochrome c which then binds to Apaf-1 together with ATP. The resultant complex recruits caspase-9 leading to its activation. Activated caspase-9 cleaves downstream caspases such as caspase-3, -6 and -7 for initiating the caspase cascade [9], finally induces the DNA fragmentation. Another pathway for caspase-3 activation has also been identified that is independent of mitochondrial cytochrome c release and caspase-9 activation [14].

Others and we have reported that topical application and intracerebral administration of GDNF decreased the size of ischemia-induced brain infarction [8,17]. GDNF decreased ischemic brain edema and the number of TUNEL positive neurons with suppressing apoptotic pathways such as caspases-1 and -3 [2, 8]. However, therapeutic time window is not still clear when GDNF should be administered after ischemia in relation to caspase activations. In this study, therefore, we examined a time dependent influence of GDNF on the infarct size after 90 min of transient middle cerebral artery (MCA) occlusion model in relation to modification of active forms of caspases-3 and -9.

Animal experiment was performed in the similar way to our previous reports [1, 6]. In brief, a burr hole was made in the skull of adult male Wistar rats (body weight, 250 to 280 g) at 3 mm dorsal and 5 mm lateral to the right from the bregma at 24 h before MCA occlusion (MCAO). On the next day, the rats were anesthetized by inhalation of a nitrous oxide/oxygen/halothane (69%: 30%: 1%) mixture and the right MCA was occluded by insertion of a nylon thread with silicon coating through the common carotid artery. Body temperature was maintained at 37 ± 0.3°C during surgical procedure. After 90 min of occlusion, the cerebral blood flow (CBF) was restored by withdrawal of the nylon thread. A

small piece (8 mm^3) of spongel presoaked vehicle (Ringer solution) or GDNF Ringer solution (2.5 μg/9 μl), was placed in contact with the surface of the cerebral cortex, just after, or 1 h and 3 h after the reperfusion. Blood samples (90 μl) were collected just after MCAO and reperfusion from ventral tail artery for measurement of PO_2, PCO_2, and pH (blood gas analyzer model ABL330, Radiometer). Regional CBF (rCBF) of right frontoparietal cortex was measured before, during, and just after MCAO. The animals were allowed to recover at ambient temperature (21 to 24 °C) until sampling. The experimental protocol and procedures were approved by the Animal Committee of the Okayama University Medical School.

At 24 h of reperfusion, the animal forebrains (n=7, 6, 7 and 6, in vehicle, just, 1 h and 3 h after reperfusion of GDNF treatment groups, respectively) were divided into coronal sections of 2-mm thickness, and were stained with 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (TTC), and infarct size was measured [19].

For TUNEL and immunofluorescent analyses, the forebrains were frozen at 12 h after the reperfusion (n=3, both vehicle and GDNF applied groups), and coronal sections (10 μl) were obtained. Sham control sections (n=2) were also obtained. TUNEL study was performed as our previous report [6]. For immunofluorescent staining, the coronal sections at caudate level were incubated together with 1 : 10 dilution of rabbit anti-cleaved caspase-9 polyclonal antibody (# 9501S, Cell Signaling Tech, MA) and 1 : 40 dilution of mouse anti-active caspase-3 monoclonal antibody (# IMG-144, San Diego, CA) overnight at 4℃. After washing, the sections were incubated with both secondary antibodies: Goat anti-rabbit IgG-FITC (# 5570500, Biomedical Tech Inc, USA) and Goat anti-mouse IgG-TRITC (# 108H9165, Sigma Chemical Co, USA) for 30 min at room temperature. Immunofluorescence was evaluated by a fluorescence microscope with a filter cube (excitation filter, 541 nm; suppression 572 nm) for TRITC labeling and another filter cube (excitation filter, 490 nm; suppression filter, 520 nm) for FITC labeling. For the detection of double immunofluorescence, both cubes were used.

The positive cell stainings were counted in the three 1 × 1 mm^2 regions of inner boundary zone of subsequent infarction or control cerebral cortex. Statistical analyses were performed using Student's t-test for infarct volume, two way analysis of variance (ANOVA) followed by Bonferroni/Dunnett for infarct area and positive cells, or ANOVA repeated measure for rCBF data, respectively.

There was no significant difference in physiological parameters such as pH, pO_2 and pCO_2 between the vehicle- and three GDNF-treated groups before and after MCAO. There was also no significant difference in rCBF between vehicle and GDNF groups similar to our previous report [19]. The infarct volumes of GDNF-treated groups were significantly reduced when GDNF was applied at 0 h (177.0 ± 52.8 mm^3, n=6, mean ± SD; $p<0.01$), and 1 h (220.2 ± 51.5, n=7; $p<0.05$), but not at 3 h (250 ± 57.7, n=6), as compared with vehicle group (295.7 ± 56.6, n=7) (Fig. 1).

TUNEL and caspase stainings were negative in the sham control brain section (Fig. 3a, e, i, m), but became strongly positive in the brain at 12 h of reperfusion with vehicle treatment (Fig. 3b, f, j, n). Positive cells were distributed in the ischemic core and border of occluded MCA area. TUNEL labeling was essentially found in the nucleus of cells. The number of TUNEL positive cells was larger than the positive cells of caspase stainings (Fig. 2). Treatment with GDNF significantly reduced the number of both TUNEL and active caspases -3 and -9 positive cells in the border of the infarcts, especially when GDNF was applied at 0 h (Fig. 2; Fig. 3c, k, o) of reperfusion than 3 h (Fig. 2; Fig. 3d, l, p).

In the double staining, some cells were positive only for active caspase-3 (Fig. 3k, arrowheads) or active caspase-9 (Fig. 3o, arrows), or double positive (Fig. 3f). Treatment with GDNF reduced the number of double positive cells as well (Fig. 3g).

In this study, we demonstrated that topical application of GDNF significantly reduced infarct size in a time-dependant manner. The extent of penetration of

GDNF was roughly 2/3 part of the affected hemisphere which cover the MCAO territory (data not shown). Amelioration of the infarct size by GDNF application was the strongest at 0 h, still effective at 1 h, but became unsignificant at 3 h (Fig. 1). This effect was closely related to the reduction of the numbers of TUNEL, active caspase-3 and -9 positive cells (Fig. 2; Fig. 3). Because there was no significant difference between the vehicle and GDNF groups in the rCBF before, during and after MCAO, the protective effect was not secondary to rCBF improvement but primarily to reducing apoptotic pathways by GDNF. DNA fragmentation detected by TUNEL method can be found in both apoptotic and necrotic neurons, although they can be discriminated morphologically [5]. Larger number of TUNEL-positive cells than active caspase-3 or caspase-9 positive cells (Fig. 2) may be due to colocalization of necrotic and apoptotic cells in the boundary region of infarction.

Caspase-3 is activated through caspase-9 or other pathway [8, 10, 14]. Presence of active caspase-9 negative but active caspase-3 positive cells (Fig. 3k, arrowheads) suggests an activation of the alternative pathway in the ischemic brain [14]. Double positive cells suggest the serial activation of caspase-9 and caspase-3 in the cells (Fig. 3f). Treatment with GDNF reduced the number of TUNEL and active caspase-3 positive cells, while the reduction was weak in active caspase-9 or double positive cells (Fig. 2). Thus, the effect of GDNF was stronger in suppressing active caspase-3 than active caspase-9, or the effect of GDNF may be weak in the pathway of cytochrome c, caspase-9, and caspase-3.

Therapeutic time window of many drugs have been reported after cerebral ischemia. Combinations of an NMDA receptor antagonist (MK-801) and a free radical scavenger (alpha-phenyl-tert-butyl-nitrone, PBN), increased the therapeutic window up to 3 h [4]. Combinations of a GABA agonist and glutamate antagonist showed a synergistic neuroprotective effect up to 4 h following the onset of cerebral ischemia [12]. However, such therapeutic time window has not been reported in neurotrophic factors such as GDNF or others. This study first demonstrated a time-dependant ameliorative effect of GDNF after transient

cerebral ischemia, while the time window was shorter than previous report with other drugs above mentioned. Because the effect of GDNF seemed to be weaker in cytochrome c and caspase-9 pathway, potentiation of this pathway with other drug may further prolong the time window in the future.

References

[1] K. Abe, T. Hayashi, Expression of the glial cell line-derived neurotrophic factor in rat brain after transient MCA occlusion, Brain Res 776 (1997) 230-234.

[2] K. Abe, T. Hayashi, Y. Itoyama, Amelioration of brain edema by topical application of glial cell line-derived neurotrophic factor in reperfused rat brain, Neurosci Lett 231 (1997) 37-40.

[3] K. D. Back, J. Valverde, T. Alexi, K. Poulsen, B. Moffat, R. A. Vandlen, A. Rosenthal, F. Hefti, Mesecephalic dopaminergic neurons protected by GDNF from axotomy-induced degeneration in the adult brain, Nature 373 (1995) 339-341.

[4] A. Barth, L. Barth, DW. Newell, Combination therapy with MK-801 and alpha-phenyl-tert-butyl-nitrone enhances protection against ischemic neuronal damage in organotypic hippocampal slice cultures, Exp Neurol 141(1996) 330-336.

[5] C. Charriaut-Marlangue, I. Margaill, A. Represa, T. Popovici, M. Plotkine, Y. Ben-Ari, Apoptosis and necrosis after reversible focal ischemia: an in situ DNA fragmentation analysis, J Cereb Blood Flow Metab 16 (1996) 186-194.

[6] T. Hayashi, K. Ab, Y. Itoyama, Reduction of ischemic damage by application of vascular endothelial growth factor in rat brain after transient ischemia, J Cereb Blood Flow Metab 18 (1998) 887-895.

[7] B. Hoffer, L. Olson, Treatment strategies for neurodegenerative diseases based on trophic factors and cell transplantation techniques, J Neural Transm suppl

49 (1997) 1-10.

[8] H. Kitagawa, T. Hayashi, Mitsumoto. Y, N. Koga, Y. Itoyama, K. Abe, Reduction of ischemic brain injury by topical application of glial cell line-derived neurotrophic factor after permanent middle cerebral artery occlusion in rats, Stroke 29 (1998) 1417-1422.

[9] K. Kuida, Caspase-9, Int J Biochem Cell Biol 32 (2000) 121-124.

[10] P. Li, D. Nijhawan, I Budihardjo, S. M. Srinivasula, M. Ahmad, ES. Alnemri, Xd. Wang, Cythchrome c and dATP-dependent formation of apaf-1/caspase-9 complex intiates an apoptotic protease cascade, Cell 91 (1997) 479-489.

[11] GT. Liberatore, JYF. Wong, MJ. Porritt, GA. Donnan, DW. Howells, Expression of glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) mRNA following mechanical injury to mouse striatum, Neuroreport 8 (1997) 3097-3101.

[12] PD. Lyden, C. Jackson-Friedman, C. Shin, S. Hassid, Synergistic combinatorial stroke therapy: A quantal bioassay of a GABA agonist and a glutamate antagonist, Exp Neurol 163 (2000) 477-489.

[13] R. W. Oppenheim, L. J. Houenou, J. E. Johson, L-F. H. Lin, L. Li, A. C. Lo, A. L. Newsome, D.M. Prevtte, S. Wang, Developing motor neurons rescued from programmed and axotomy-induced cell death by GDNF, Nature 373 (1995) 344-346.

[14] AG. Porter, RU. Janicke, Emerging roles of caspase-3 in apoptosis, Cell Death Differ, 6 (1999) 99-104.

[15] YP. Tang, YL. Ma, CC. Chao, KY. Chen, EHY. Lee, Enhanced, glial cell line-derived neurotrophic factor mRNA expression upon (-)-deprenyl and melatonin treatments, J Neurosci. Lett 53 (1998) 593-604.

[16] A. Tomac, E. Lindqvist, L-F. Lin, S. O. Ogren, D. Young, J. B. Hoffer, L. Olson, Protection and repair of the nigrostriatal dopaminergic system by GDNF *in vivo*, Nature 373 (1995) 335-339.

[17] Y. Wang, SZ. Lin, AL. Chiou, LR. Williams, BJ. Hoffer, Glial cell line-derived neurotrophic factor protects against ischemia-induced injury in

the cerebral cortex, J Neurosci 17 (1997) 4341-4348.

[18] Q. Yan, C. Matheson, and O. T. Lopez, *In vivo* neurotrophic effects of GDNF on neonatal and adult facial motor neurons, Nature 373 (1995) 341-344.

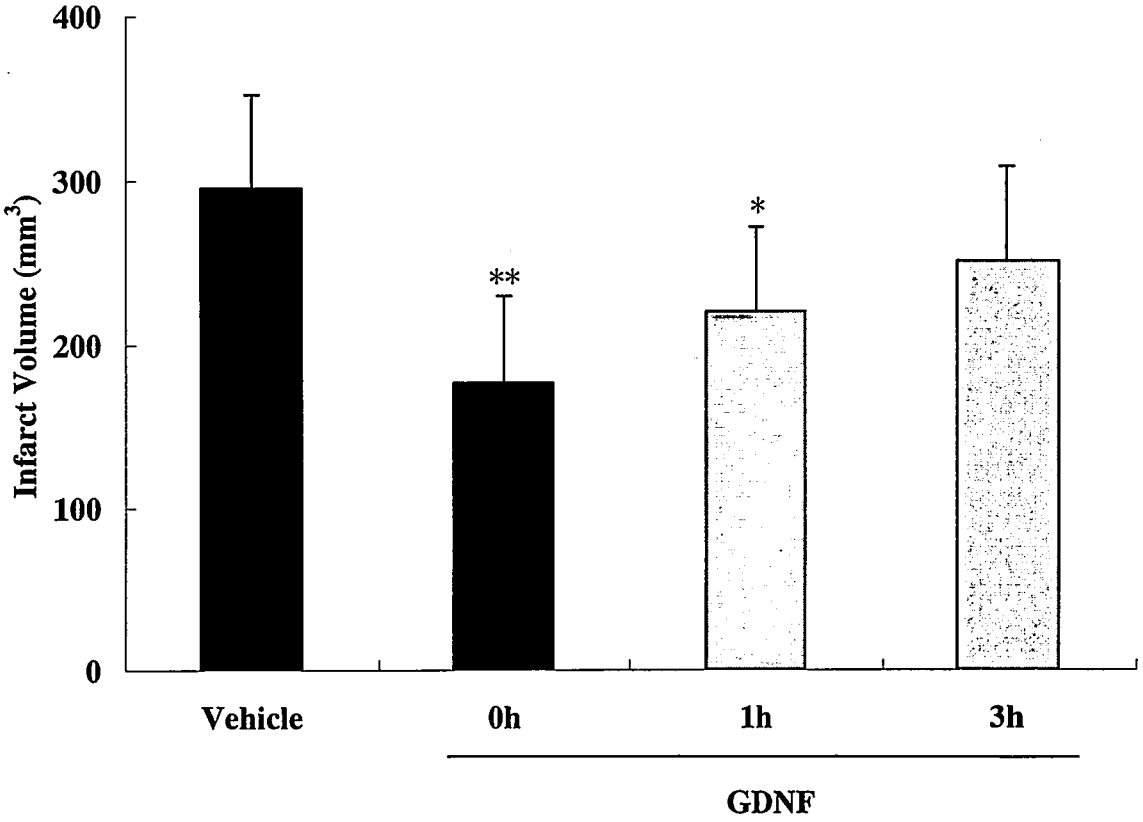
[19] W. R. Zhang, H. Kitagawa, T. Hayashi, C. Sasaki, H. Warita, and K. Abe, Topical application of neurotrophin-3 attenuates ischemic brain injury after transient middle cerebral artery occlusion in rats, Brain Res 842 (1999) 211-214.

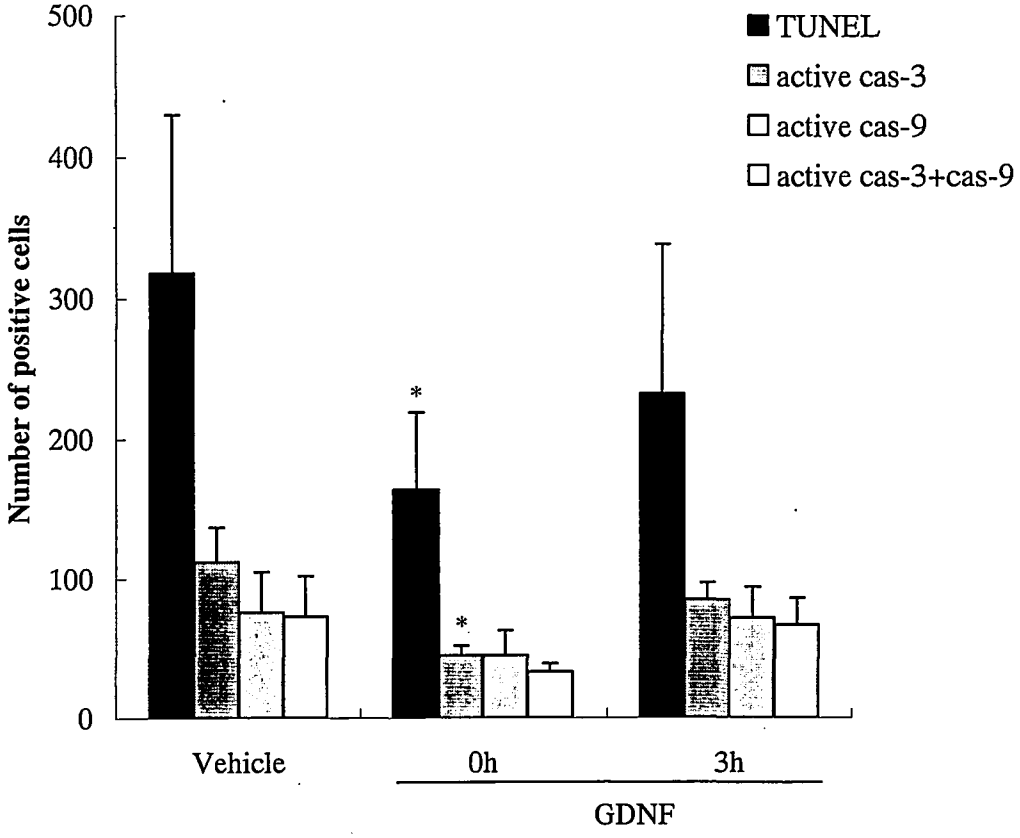
Figure legends

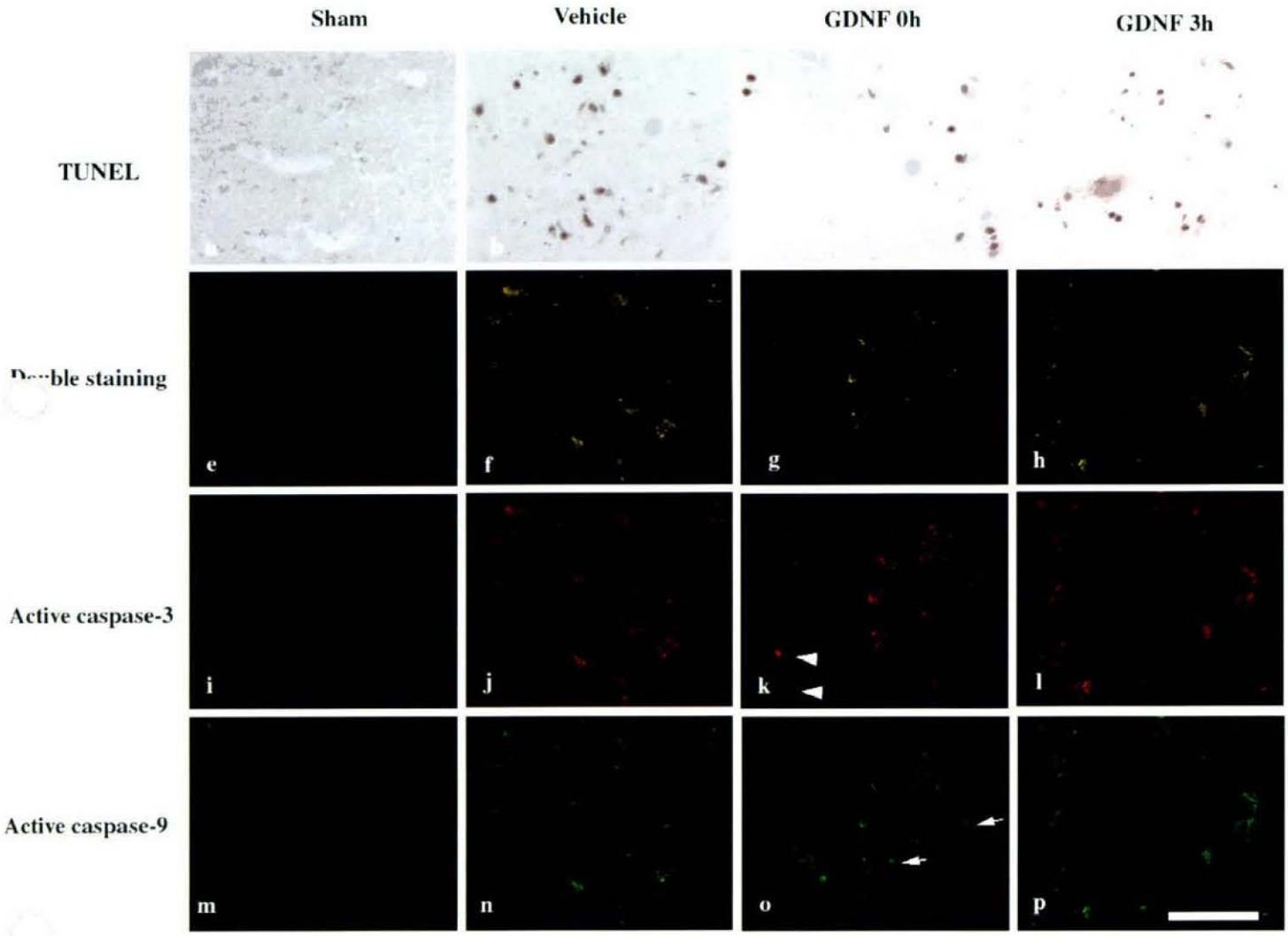
Fig. 1) Effects of GDNF (GDNF 0h, 1h and 3h) on infarct volume at 24 h after 90 min of transient MCAO. Note significant reduction of the GDNF treatment at 0 h and 1 h (**p<0.01, *p<0.05).

Fig. 2) Number of TUNEL and active caspases-3 and -9 positive neurons with or without GDNF at 12 h after transient MCAO. Note significant reduction in the number of both TUNEL and active caspase-3 positive cells in the border of the infarcts at 0 h of treatment (*p<0.05).

Fig. 3) Representative stainings of TUNEL (a-d), double (e-h), active caspase-3 (i-l) and active caspase-9 (m-p) in sham control (a, e, i, m), vehicle (b, f, j, n), GDNF treatment at 0 h (c, g, k, o) and 3 h group, respectively. In contrast to the sham control group (left column), large number of cells became positive in the vehicle group (second column), which are reduced in the GDNF 0 h group especially in TUNEL and active caspase-3 (p<0.05) (third column), less change in GDNF 3 h group. Magnifications, ×200. Bar in panel p, 32 μm.


400
300
200
100
0
Infarct Volume (mm3)
**
*
Vehicle
0h
1h
3h
GDNF


500
400
300
200
100
0
Number of positive cells
TUNEL
active cas-3
active cas-9
active cas-3+cas-9
*
*
Vehicle
0h
3h
GDNF


Sham
Vehicle
GDNF 0h
GDNF 3h
TUNEL
Double staining
Active caspase-3
Active caspase-9
e
f
g
h
i
j
k
l
m
n
o
p

日本財団補助金による
２０００年度日中医学学術交流促進事業

⑤．在留中国人研究者研究助成

(11)長期追跡脳血管造影からみた未破裂脳動脈瘤の自然経過

長期追跡脳血管造影から見た未破裂脳動脈瘤の自然経過

陳　偉萍

中国甘粛省蘭州医学院医学院第二付属医院神経内科主治医師

秋田県立脳血管研究センター放射線医学研究部

目的

近年，中枢神経系における画像診断の進歩とくにMRI（Magnetic Resonance Imaging 磁気共鳴画像）の進歩は著しく，高磁場MRIによるMRA（Magnetic Resonance Angiography 磁気共鳴血管造影）を用いた脳ドックの普及により未破裂脳動脈瘤の発見の頻度が高まっている。破裂脳動脈瘤によるくも膜下出血を起した症例においても，MRA，脳血管造影，3D-CTA（Three Dimensional Computed Tomographic Angiography）などにより未破裂脳動脈瘤が同時に認められることも少くない。一方，近年1959年から2000年間の文献を渉猟すると，脳動脈瘤の破裂によるくも膜下出血症例の死亡率は依然として高い[1,2,3,4,5,6]。このような状況下において，未破裂脳動脈瘤の時間的消長（自然経過）に関して多症例を長期間追跡し，経時的形態学的変化を分析した研究はいまだ少ない[7,8,9]。

我々は秋田県立脳血管研究センターにおいて何らかの理由によって最短半年から最長27年，平均5.3年の間隔をおいて，二回以上脳血管造影が行われた720例を検討し，未破裂脳動脈瘤の経時的変化，新生の頻度と機序に関し数々の知見を得たので報告する。

方法

1969年6月から1997年12月までの間に最短半年から最長27年，平均5.3年の間隔をおいて2回以上脳血管造影が行なわれた720例（男444，女276例）（モヤモヤ病を除く）を検討した。初回造影施行時年齢は13歳から81歳，平均男53.6，女52.6歳であった。対象症例は初回造影時の目的が，くも膜下出血で発症し，その出血の原因検索であった群とくも膜下出血以外で発症した群とに大別した。その内訳はくも膜下出血群175，非くも膜下出血群545例〔脳梗塞群251，脳腫瘍群96，脳出血群68，TIA（Transient Ischemic Attack）群56，脳血管奇

形群 27，その他群 47 例 〕である。脳血管造影は右頸動脈造影 544，左頸動脈造影 504，椎骨動脈造影 370 例で，ほぼ全例経大腿動脈性カテーテル法による連続立体撮影ないし連続拡大立体撮影が行なわれた。脳動脈瘤の大きさは脳血管造影上最大径 / 拡大倍数で計測し，最大計の値により 5mm より小さい，5－10mm，10mm より大きいと分けて解析した。なお，脳梗塞群においては臨床経過および脳血管造影により脳塞栓と診断された症例を除外した。

初回造影時または，初回造影前から危険因子の合併は以下に記す脳血管障害症例の中では高血圧（ WHO の定義により収縮期血圧≧160mmHg，拡張期血圧≧95mmHg 両者またはいずれかを満たすものを高血圧とした[10]。 ）を最も高率に認めた（ 脳出血群 93%，脳梗塞群 87%，TIA 群 77%，くも膜下出血群 64% ）。糖尿病の合併は脳梗塞群で最も高く，24%を占め，高脂血症の合併は TIA 群で最も高く，25%であり，心疾患の合併は TIA 群で 39%，脳梗塞群で 32%。脳出血群で 28%，くも膜下出血群で 13%であった。

症例と脳動脈瘤の統計処理には Wilcoxn Rank Test，χ^2 Test および Fisher's Exact Test を用い，$p < 0.05$ をもって有意とした。

結　果

1. 未破裂脳動脈瘤の経時的変化：くも膜下出血群においては 175 例中 164 例 164 個（ 93.7% ）の破裂脳動脈瘤を認めた。11 例（ 6.3% ）は動脈瘤を同定しえず，出血源は不明であった。164 例中に多発性脳動脈瘤例を 86 例（ 49.1% ）認め，133 個（ 嚢状 132 個，紡錘状 1 個 ）の未破裂脳動脈瘤が同定された。うち 50 例 66 個には手術が行われなかった。

一方，非くも膜下出血群（ くも膜下出血群を除いた 6 群 ）においては 545 例中 107 例（ 19.6% ）に 130 個（ 嚢状 127，紡錘状 3 個 ）の未破裂脳動脈瘤を認め，うち，非手術は 75 例 94 個であった。したがって，これらくも膜下出血群の 50 例 66 個と非くも膜下出血群の 75 例 94 個の非手術例を経時的に観察した。

1） 破裂：

① 破裂率：くも膜下出血群においては未破裂脳動脈瘤 50 例 66 個は，脳血管

造影追跡総年数（50例の追跡年数の和）295年，平均5.9年間に10例10個（15.2%）が破裂し，年間破裂率（破裂した脳動脈瘤数 / 追跡総年数）は3.4%であった。破裂率（破裂した脳動脈瘤数 / 総脳動脈瘤数）の性別と年齢分布では表1に示すように有意差はなく，60歳代と70歳代では破裂を認めなかった。

非くも膜下出血群においては未破裂脳動脈瘤75例94個は，脳血管造影追跡総年数（75例の追跡年数の和）321年，平均4.3年間に14例14個（14.9%）が破裂し，年間破裂率は4.4%であった。破裂率は性別と年齢分布に有意差はなく，かつ，くも膜下出血群，非くも膜下出血群間に有意差は認められなかった

非くも膜下出血群の前記14個の破裂脳動脈瘤の内訳は脳梗塞群48個中9個（18.8%），脳出血群13個中2個(15.4%)，その他群 7個中1個（14.3%），AVM群 8個中1個（12.5%），TIA群 14個 中1個（7.1%)であった。また，年間破裂率の内訳は脳梗塞群5.5%，脳出血群4.8%，TIA群 2.8%，AVM群 3.2%，その他群 2.4%であった。未破裂脳動脈瘤の破裂率，年間破裂率ともに脳梗塞群で最も高かった。脳腫瘍群 4 個は追跡中破裂しなかった。しかし，これら非くも膜下出血群間での有意差はなかった。

②破裂と大きさ：くも膜下出血群66個においては，最短半年から最長23年4ヵ月，平均5.9年後に，最大径が5mmより小さい脳動脈瘤 51 個中 8 個（15.7%），5－10mm13 個中 2 個（15.4%）が破裂した。最大径が 10mm より大きいものは，clipping されなかったものは 2 個のみであったが，それぞれ追跡2年2ヵ月，8年5ヵ月後破裂を認めなかった。したがって，破裂した動脈瘤全例の最大径は 10mm 以下であった。一方，非くも膜下出血群 94 個においては，最短半年，最長21年4ヵ月，平均4.3年後，最大径が5mmより小さいもの72個中7個（9.6%），5－10mm17個中4個（23.5%），10mmより大きいもの5個中3個（60.0%)が破裂し，脳動脈瘤が大きいほど破裂率が高かった。

③破裂までの期間：くも膜下出血群，非くも膜下出血群あわせて，破裂した脳動脈瘤計 24 個においては初回造影から破裂までの年数はくも膜下出血群で1.3-23.7年，平均9.1年に対して，非くも膜下出血群で 0.5-17.2 年，平均 4.4 年であり，両群間に破裂までの年数に有意差を認めた（$p<0.05$）。くも膜下出血群においては破裂した脳動脈瘤10個中3個（4.5%）が初回造影か

ら5年以内，3個（4.5%）が5－10年間，2個（3.0%）が10－15年間，1個（1.5%）が15－20年間，もう1個が20－23.7年間に破裂した。

一方，非くも膜下出血群においては破裂した脳動脈瘤の14個中10個（10.6%）が初回造影から5年以内に破裂し，この10例は全例脳血管障害症例群（脳梗塞群，脳出血群，TIA群）であった。14個中3個（3.2%）は5－10年間，14個中1個（1.1%）は10－17.2年間に破裂し，5年以内の破裂率が有意に高かった（$p<0.05$）。したがって，非くも膜下出血群の方が破裂までの年数がくも膜下出血群より短く，破裂した脳動脈瘤の多く（71.4%）が初回造影から5年以内に破裂した。

以上の破裂した脳動脈瘤計24例においてはくも膜下出血群10例中1例（10.0%），非くも膜出血群14例中4例（28.6%），計5例が死亡し，5例とも親動脈および周辺動脈に中等度から高度の脳動脈硬化が見られた。非くも膜下出血群4例中，3例は脳梗塞群であり，初回脳血管造影から3年半以内に破裂した。

④破裂した部位：両群とも前交通動脈での破裂頻度が比較的高いが，部位別の有意差は認めなかった。また，両群計5例の破裂前交通動脈瘤中，3例で一側の前大脳動脈水平部（A1）の低形成を認めた。

⑤破裂と危険因子：くも膜下出血群では破裂した脳動脈瘤10例中8例（80.0%），非くも膜下出血群14例中12例（85.7%）に高血圧を有し，高血圧の合併率が有意に高かった（$p<0.05$）。一方，高血圧を有する症例群の破裂率は高血圧を有さない症例群より高かったが，両群間に有意差は認めなかった。

⑥破裂と動脈硬化：破裂脳動脈瘤24例は前述した死亡例も含めて全例親動脈の動脈硬化が進行し，全体的には拡張，延長，蛇行，壁不整，狭窄，および閉塞など，中等度から高度の脳動脈硬化を認めた。動脈硬化は非くも膜下出血群でより進行が早く，硬化の程度もより強かった。脳梗塞群における破裂脳動脈瘤9例中の4例においては初回造影時に，すでに内頸動脈，椎骨・脳底動脈系の頸部走行部および頭蓋内走行部主幹枝（内頸動脈の起始部，前大脳動脈の脳梁下部，中大脳動脈の水平部・島部および椎骨動脈の頭蓋内走行部，脳底動脈）の閉塞を伴い，1年4ヵ月から2年半以内に破裂した。左内頸動脈－後交通動脈瘤が破裂した1例では初回造影時脳底動

脈の閉塞と壁不整，蛇行，拡張など高度の動脈硬化を認めた。2 年後，左内頸動脈－後交通動脈瘤が破裂し，親動脈である左内頸動脈の動脈硬化がさらに進行していた。

2）増大：

①増大率：くも膜下出血群においては未破裂脳動脈瘤 50 例 66 個は，脳血管造影追跡総年数 295 年，平均 5.9 年間に 20 例 26 個（39.4%）が増大した。増大率は女性が高く，年齢別では 30 歳代で最も高かった。70 歳代の 3 個においては増大を認めなかった。

一方，非くも膜下出血群においては未破裂脳動脈瘤 75 例 94 個は，脳血管造影追跡総年数 321 年，平均 4.3 年に 19 例 21 個（22.3%）が増大した。増大率はくも膜下出血群，非くも膜下出血群ともに性別と年齢別に有意差はなかった 。なお，くも膜下出血群の増大率（39.4%）は非くも膜下出血群（22.3%）より高く，両群間に有意差を認めた（$p<0.05$）。

非くも膜下出血群 19 例 21 個の増大した脳動脈瘤の内訳は脳出血群 13 個中 5 個（38.5%），脳梗塞群 48 個中 11 個（22.9%），その他群 7 個中 2 個（28.6%），AVM 群 8 個中 2 個，脳腫瘍群 4 個中 1 個（それぞれ 25.0%）であった。脳出血群の増大率 38.5%はくも膜下出血群とほぼ同率であり，最も高かった。脳動静脈奇形群では増大した 2 例 2 個はともに同奇形の輸入動脈に形成されたものであり，同動脈は強い動脈硬化を伴っていた。

②増大までの期間と増大程度：くも膜下出血群においては 4 ヵ月から 23.3 年，平均 10.4 年であり，非くも膜下出血群においては 1.3 年から 21.3 年，平均 7.7 年であった。初回造影から 5 年以内に増大した動脈瘤はくも膜下出血群においては 26 個中 7 個（26.9%），非くも膜下出血群においては 21 個中 10 個（47.6%）であった。くも膜下出血群，非くも膜下出血群ともに増大までの年数に差は認めなかった。増大程度に関しては二回造影時増大した脳動脈瘤の最大径はくも膜下出血群では初回造影時の 2.03 倍であり，非くも膜下出血群（1.68 倍）に比し有意に増大した。

③増大した部位：くも膜下出血群においては中大脳動脈が最も高く，非くも膜下出血群においては前交通動脈と前大脳動脈は比較的高かった。くも膜下出血群，非くも膜下出血群ともに部位別の増大率に有意差はなかった。なお，両群あわせて前交通動脈瘤の増大 6 例中，3 例（50%）

において一側の前大脳動脈の水平部（A1）は低形成であり，1例は初回造影時から一側の内頸動脈，両側の椎骨動脈の閉塞を認めた。これらの4例（66.7%）はいずれも一側のA1から前交通動脈を介して両側の前大脳動脈域への灌流を認めた。

④増大と危険因子：高血圧の合併はくも膜下出血群においては増大脳動脈瘤20例中17例（85.0%），非くも膜下出血群においては19例中17例（89.5%）に認め，両群とも合併率が有意に高かった（$p<0.05$）。また，高血圧を有する症例群では未破裂脳動脈瘤の増大率が高血圧のない症例群に比べ有意に高かった（$p<0.05$）。

⑤増大と動脈硬化：増大を示した脳動脈瘤症例は全例において親動脈と周辺脳動脈に中等度から高度の動脈硬化を認め，かつその進行を認めた。これらの所見はとくに非くも膜下出血群で顕著であった。なお，くも膜下出血群においては増大脳動脈瘤20例中2例，非くも膜下出血群においては19例中6例に初回造影時すでに内頸動脈，椎骨・脳底動脈系の頭蓋外走行部および頭蓋内走行主幹枝（内頸動脈の起始部，前大脳動脈の水平部，後大脳動脈の交通前部・脚部，椎骨動脈の頭蓋内走行部，脳底動脈）の閉塞および高度の狭窄を認めた。

くも膜下出血群においては増大脳動脈瘤20例26個中9個（34.6%）が初回造影から最短1年3ヵ月，最長23年3ヵ月目に破裂したが，死亡例はなかった。一方，非くも膜下出血群においては増大脳動脈瘤19例21個中9個（42.9%）が最短1年4ヵ月，最長17年3ヵ月目に破裂し，うち4例（44.4%）が死亡した。両群間には増大脳動脈瘤の破裂率に有意差は認めなかったが，増大脳動脈瘤の破裂による死亡率は非くも膜下出血群がくも膜下出血群に比し有意に高かった（$p<0.05$）。

2.嚢状脳動脈瘤の新生：

①発見率：くも膜下出血群175例においては，脳血管造影追跡総年数（175例の追跡年数の和）1096.5年，平均6.3年間に11例13個の嚢状脳動脈瘤の新生を認めた。年間発見率（新生脳動脈瘤数 / 追跡総年数）としては男性0.5%，女性2.0%，平均1.2%であった。一方，非くも膜下出血群545例においては，脳血管造影追跡総年数（545例の追跡年数の和）2704.3年，平均5.0年間に11例13個の嚢状脳動脈瘤の新生を認めた。年間発見率は男性0.3%，女性0.8%，平均0.5%であった。両群

ともに女性に新生脳動脈瘤の発見率，年間破裂率が高いが，統計学的には男女差はなかった。新生脳動脈瘤の年齢分布では両群ともに 40 から 60 歳代にみられ，両群ともに発見率は 40 歳代に有意に高かった。新生脳動脈瘤発見率は群別では，くも膜下出血群が非くも膜下出血群より有意に高かった（ $p<0.05$ ）。

非くも膜下出血群における新生脳動脈瘤 11 例は非脳血管障害症例（ 脳腫瘍群，その他群 1 例 ）143 例中においては 1 例（0.7%）見出されたのみであったが，その他の 10 例は全例脳血管障害症例（ 脳梗塞群 5 例，脳出血群 4 例，TIA 群 1 例 ）375 例中に見出され（2.7%），発見率は脳出血群で最も高く（5.9% ），非脳血管障害症例に比べて有意差が認められた（$p<0.05$ ）（ 表 6）。

②新生までの期間：初回造影時から新生までの年数はくも膜下出血群においては 1 から 19.9 年，平均 12.8 年であり，非くも膜下出血群では 2.7 から 25.7 年，平均 12.8 年であった。両群ともに新生脳動脈瘤の新生までの年間の分布に有意差はなかった。

③新生部位：新生脳動脈瘤はくも膜下出血群においては部位による差があり（ $p<0.05$ ），中大脳動脈に発見率が最も高かった。一方，非くも膜下出血群では内頸動脈，中大脳動脈に新生脳動脈瘤の発見率が高かったが，部位による差はなかった。前交通動脈瘤の新生例 5 例は全例において一側 A1 の低形成を認めた。

④危険因子との関連：くも膜下出血群では新生をきたした症例 11 例中 9 例（ 81.8% ），非くも膜下出血群では 11 例中 10 例（ 90.9% ）に高血圧を有していた。また，くも膜下出血群 175 例において，高血圧を有する 112 例では 8 例（ 7.1% ）8 個の新生脳動脈瘤を認めたが，高血圧を有さない 63 例でも 3 例（ 4.8% ）5 個の新生脳動脈瘤を認めた。これら症例群の間には新生脳動脈瘤の発見率に有意差はなかった。一方，非くも膜下出血群 545 例においては，高血圧を有する 385 例では 10 例（ 2.6%)12 個の新生脳動脈瘤を認め，高血圧を有さない 160 例では 1 例（ 0.6%)1 個を認めた。高血圧を有する症例群が新生脳動脈瘤の発見率が有意に高かった（$p<0.05$）。

⑤動脈硬化との関連：くも膜下出血群，非くも膜下出血群ともに新生脳動脈瘤をきたした 22 例では親動脈，周辺脳動脈に中等度から高度の動脈硬化およびその進行を認めたが，非くも膜下出血群で動脈硬化がより強く，新生 11 例中 5 例に初回造影から内頸動脈，椎骨・脳底動脈系の

頭蓋外および頭蓋内走行主幹枝の閉塞（内頸動脈の起始部，前大脳動脈の脳梁下部，中大脳動脈の島部，椎骨動脈の起始部・頭蓋内走行部）を認めた。なお，全新生脳動脈瘤 22 例 26 個中 9 例 9 個が破裂したが，内訳はくも膜下出血群 5 例（45.5%）5 個であり，2 例（18.2%）が死亡し，非くも膜下出血群は 4 例（36.4%）4 個で 1 例（9.1%）が死亡した。

考　察

未破裂脳動脈瘤の破裂：未破裂脳動脈瘤の破裂率に関しては数多くの報告があるが[7, 9, 11, 12, 13]，Juvela らの報告[7]においては 142 例の 1944 総追跡年で 27 例（19%）が破裂し，年間破裂率は症候性未破裂脳動脈瘤群（場所占拠性病変，瘤内栓子による脳梗塞を起こした症例など）では 3.6%，無症候性脳動脈瘤症例群 1.5%，多発性脳動脈瘤群 1.3%，平均 1.4%であった。一方，Locksley らは症候性未破裂脳動脈瘤を有する 34 例を 41 ヵ月追跡した結果 9 例（26.5%）が破裂し，年間破裂率は 6.9%であるとしている[11]。しかし，ほとんどの報告では年間破裂率は 1-3%であり[7, 9, 12, 13]，症候性未破裂脳動脈瘤群で最も高い[7, 11]。自験例のくも膜下出血群においては 50 例 66 個の 294.5 総追跡年で 10 例 10 個（15.2%），非くも膜下出血群では 75 例 94 個 321.2 総追跡年で 14 例 14 個（14.9%）が破裂し，年間破裂率はそれぞれ 3.4%，4.4%であった。この非くも膜下出血群 4.4%の年間破裂率は他の報告より高い[7, 9, 12, 13]。これは非くも膜下出血群に脳血管障害症例（脳梗塞群，脳出血群，TIA 群）が含まれ，これら症例に未破裂脳動脈瘤の破裂率が高く，親動脈の脳動脈硬化が強いためであると思われる。また，初回造影から破裂までの年数は非くも膜下出血群では平均 4.4 年であり，くも膜下出血群の平均 10.1 年より有意に短い。非くも膜下出血群においては 5 年以内に破裂した 10 例の全例は脳血管障害例であり，中等度から高度の脳動脈硬化を伴っていた。また，この 10 例中，7 例は脳梗塞群であり，うち 3 例（21.4%）が死亡している。このことは脳動脈硬化が強いほど動脈瘤が早く破裂し，死亡率も高いことを示唆している。なお，脳梗塞群の破裂脳動脈瘤の 9 例中，4 例は初回造影時にすでに内頸動脈，椎骨・脳底動脈系の頭蓋外および頭蓋内走行主幹枝の閉塞を伴っていた。他方，破裂前交通動脈瘤 3 例（くも膜下出血群 2 例，脳梗塞群 1 例）中，2 例に一側 A1 の低形成を認めた。これらの症例は脳動脈閉塞，一側 A1 の低形成による親動脈への血行力学的侵襲（hemodynamic stress）の増強が脳動脈瘤の破裂に関与していると考えられる[14]。このように，脳動脈瘤の親

動脈に hemodynamic stress が増強し，かつ，脳動脈硬化が強いほど，短期間に破裂する可能性が大きく，それに伴って死亡率も高い事実は未破裂脳動脈瘤の手術適応を検討する上に重要である。

脳動脈瘤の破裂と大きさとの関連性について，Wiebers ら[13]は虚血性脳血管症候群，症候性未破裂脳動脈瘤群，脳卒中群，頭痛など，いずれも非くも膜下出血群計 130 例 161 個未破裂脳動脈瘤を 25 年間追跡し，破裂した 15 例全例の脳動脈瘤最大径がすべて 10mm または 10mm 以上であったと報告している。Inagawa ら[15]の 10529 剖検例中 133 例破裂脳動脈瘤の報告によると，破裂脳動脈瘤 109 個の最大径は 4mm 以下は 17%，5－9mm46%，10mm 以上 38%を占めていた。最近報告された世界 53 ヵ所の医療施設における 21 年間，1449 例 1937 個未破裂脳動脈瘤の追跡結果では最大径が 10mm 以上の未破裂脳動脈瘤の破裂率が非くも膜出血群，くも膜下出血群ともに最も高い。一方，最大径が 10mm より小さい脳動脈瘤の破裂率は非くも膜下出血群ではきわめて低いが，くも膜下出血群では 10mm 以上の破裂率よりやや低い程度である[16]。われわれの結果においてはくも膜下出血群では 10mm 以上の未破裂脳動脈瘤がほとんど clipping され，評価できなかったが，今後の課題として研究すべきである。非くも膜下出血群では脳動脈瘤が大きいほど破裂の可能性が高かった。したがって，脳動脈瘤の大きさと破裂に関して十分に留意すべきである。

破裂脳動脈瘤の部位は椎骨－脳底動脈系（脳底動脈の遠位先端部，椎骨動脈－後下小脳動脈）が他の部位より破裂率が高く（66.7%），中大脳動脈の動脈瘤の破裂率は 13.0%であるとされている[17]。一方，未破裂脳動脈瘤の国際的調査では脳底動脈の最遠位先端部，後大脳動脈，内頸動脈－後交通動脈分岐部で動脈瘤破裂の危険性が他の部位より高いと報告されている[16]。われわれの検討では二回造影時，両群ともに前交通動脈瘤の破裂率が最も高く（両群とも 25.0%），ついで非くも膜下出血群における椎骨－脳底動脈系（23.1%）（脳底動脈最遠位端部 2，椎骨－後下小脳動脈 1 個）であった。

年齢分布は Taylor らの報告によれば 65 歳以上では加齢とともに脳動脈瘤の破裂率が低下する[12]。自験例ではくも膜下出血群においては，60 歳以上の 13 個の脳動脈瘤には破裂はなかった。破裂率はくも膜下出血群で 40 歳代（25.0%），非くも膜下出血群で 50 歳代（24.1%）に高

かった。また，両群とも高血圧を有さない 60 歳以上症例の 14 個には破裂を認めなかった（表 5）。このように，未破裂脳動脈瘤の破裂ピークは 40 歳代から 50 歳代であることを示している。

危険因子との関連においては，高血圧が脳動脈瘤破裂の危険因子であるか否かの結論はいまだ出ていない。Sacco らは Massachustts 州 Famingham の居住者 5184 人を 26 年間追跡し，くも膜下出血を起こした 36 人はくも膜下出血発症前の高血圧の発症率がコントロール群より有意に高いと報告している [18]。Taylor らの未破裂脳動脈瘤と診断された 65 歳以上老年者 20,767 例の報告 [12]では高血圧は未破裂脳動脈瘤を有する症例においてより頻発しており，くも膜下出血には有意な危険因子と報告している。一方，Juvela らの報告では，181 個未破裂脳動脈瘤を有する 142 例を少なくとも 10 年間追跡した結果では高血圧が脳動脈瘤の破裂に有意であるとは認められなかった [7]。自験例においては破裂脳動脈瘤 24 例中 20 例に高血圧（83.3%）を有し，高血圧の合併率は有意に高い。また，高血圧を有する症例群の破裂率は高血圧を有さない症例群より高いが，両症例群間に有意差は認めなかった。一方，血圧の急激な上昇が動脈瘤の破裂を引き起こす危険性があるとの報告もある [19]。したがって，今後，さらに多くの症例において比較検討する必要があると思われる。

未破裂脳動脈瘤の増大と新生：脳動脈瘤の増大に関しては種々検討されているが，動脈壁へのずり応力（血流による接線方向に加わる摩擦力）[20]の増大によって動脈瘤壁内の弾性組織，コラーゲンの変性が促進され [19, 20, 21, 22]，さらに，この変性により動脈壁が脆弱化し，血流の拍動や乱流 への抵抗力を低下させ，脳動脈瘤の増大をきたすとされている [19, 21]。中谷らは高血圧ラットを用いた脳動脈瘤モデル研究において，動脈瘤開口部近位端にずり応力が最大であり，動脈瘤壁の変性障害を進行させ，この部位から脳動脈瘤の増大をもたらすと報告している [23]。これらの報告は脳動脈瘤の増大には hemodynamic stress が重要であることを示している。自験例では増大脳動脈瘤計 40 例 47 個中，前交通動脈瘤増大例 6 例 6 個において， 3 例に一側 A1 の低形成を認め，1 例に初回造影時から片側の内頸動脈と両側の椎骨動脈の閉塞を認めた。これら 4 例 (66.7%)は非低形成側 A1 から両側前大脳動脈域へ灌流し，前交通動脈を介する血流が増加していた。非くも膜下出血群に含んだ脳動静脈奇形群においては 2 例（いずれも非手術例）2 個が増大したが，増大脳動脈瘤の親動脈は同奇形の輸入動脈であり，強い脳動脈硬化も伴って

いた。脳梗塞群における増大脳動脈瘤 10 例中 6 例，くも膜下出血群の 19 例中 2 例は初回造影時から脳底部主幹動脈の閉塞を認めた。以上のような周辺動脈閉塞下においては，増大した動脈瘤の親動脈に局所的な hemodynamic stress が増強され，脳動脈瘤の増大を引き起こすと思われた。

危険因子との関連においては，高血圧により内弾性板の変性が生じることはよく知られている[24]。自験例の増大脳動脈瘤全例では高率に高血圧を合併しており，高血圧を有している症例群の増大率が高血圧のない症例群より有意に高い。また，全例において親動脈および周辺動脈には動脈硬化とその進行を認めた。これらの結果から脳動脈瘤の増大には高血圧，脳動脈硬化および hemodynamic stress の増大による脳動脈壁の変化が関与していると考えられる。

一方，増大と破裂との関係を見ると自験例においては，くも膜下出血群，非くも膜下出血群を含めて，計 39 例 47 個の増大脳動脈瘤中，18 例 18 個（38.3%）が破裂しているが，破裂は初回脳血管造影から最短 1 年 3 ヵ月，最長 23 年半目に起こっている。したがって，増大例は 1 年 3 ヵ月位でも破裂する可能性があり，初回造影で未破裂脳動脈瘤が発見された場合は少なくとも半年間隔の追跡(MRA，3D-CTA などによる）が必要と思われる。

脳動脈瘤の成因に関してはよく知られているように，先天性説と後天性説がある。先天説では脳血管壁の先天的中膜欠損部から動脈瘤が発生すると推定されている[25,26]。Meyer ら の報告[27]では小児の頭蓋内脳動脈瘤が全世代症例の 1.7%を占めており，出生後 1 ヵ月以内の新生児や 5 歳以下の小児の脳動脈瘤の報告もある[28,29,30,31]。また，疫学的には脳動脈瘤破裂によるくも膜下出血例あるいは未破裂脳動脈瘤を有する症例の約 9.8-11.4%には家族歴に脳動脈瘤患者を有している[32,33,34]。自験例では新生脳動脈瘤の発見率はくも膜下出血群が非くも膜下出血群より高く，女性が男性より高い。かつ，自験例では 720 例中，10 歳代 17 例において，2 例（13, 19 歳）（0.3%）に 2 個の脳動脈瘤を認めた。一方，成因に関する最近の実験的研究においては，Hashimoto らのグループ（1983-1993）によるラット，猿を使っての脳動脈瘤作製の一連の研究 がある[23,24,35,36,37,38]。これらの研究は脳動脈瘤の形成には高血圧下に，脳血管退行変性が主原因であることを明らかにし，発生する動脈瘤の局在から hemodynamic stress の重要性が示されている。その他，脳動脈瘤新生には高血圧が重要な役割を演じていると強調している報

告[24, 39, 40, 41]や，AVM，先天性内頸動脈欠損，脳動脈硬化による hemodynamic stress の増大と動脈壁の変化が脳動脈瘤の発生，増大には関与しているとの報告が多く見られる[42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50]。自験例においては脳動脈瘤新生例には高血圧の合併が有意に高く，親動脈および周辺動脈に中等度から高度な動脈硬化とその進行を伴い，血管走行の屈曲度も増している。一方，非くも膜下出血群では新生 11 例中 5 例に脳底部主幹動脈の閉塞を認めている。文献的にも Charbel らは前交通動脈瘤の 51 例を検討し，前交通動脈瘤を有する症例群では一側 A1 の低形成の発生率が有意に高く，前交通動脈瘤の発生に hemodynamic stress が重要であると報告している[51]。自験例では新生動脈瘤計 22 例 26 個中，新生前交通動脈瘤の 5 例 5 個全例で一側の A1 は低形成であった。このように，脳動脈瘤の発生には親動脈，周辺動脈の欠損や閉塞などに伴う hemodynamic stress の増大，高血圧，脳動脈硬化が深く関与していることを示唆している。したがって，後天的な要因も極めて重要であることが示されている。

新生脳動脈瘤の発見率に関しては Juvela らの報告によれば，脳血管造影追跡 279 年に 31 例中 6 例（19%）7 個の新生を認め，年間発見率は 2.2%であった[7]。一方，Miller らはくも膜下出血 620 例の 29 年間に 7 例（1.1%）新生動脈瘤を認め，年間発見率は 0.1%であった[52]。自験例ではくも膜下出血群 175 例における 1096.5 追跡年では 11 例（6.3%）13 個嚢状脳動脈瘤の新生を認め，年間発見率は男女平均 1.2%であった。一方，非くも膜下出血群 545 例では，2704.3 追跡年に 11 例（2.0%）13 個 が新生し，平均年間発見率は 0.5%であった。非くも膜下出血での 11 例はほとんど脳血管障害症例の中に発見され，なかでも，脳出血群の発見率（5.9%）はくも膜下出血群（6.3%）とほぼ同じく有意に高かった。したがって，この結果から脳血管障害症例，とくにくも膜下出血，脳出血の患者に脳動脈瘤新生の可能性が高いことが分かった。

以上の結果から，日常の脳血管障害診療においては，とくに脳動脈瘤の増大を示した症例，親動脈硬化が強く，かつ，高血圧を合併した症例には脳動脈瘤の破裂や新生の可能性があることを十分に留意し，3D-CTA，MRA，脳血管造影などによる追跡が必要である。

結　論

二回以上長期追跡脳血管造影を行った症例群をくも膜下出血群（93.7%は破裂脳動脈による）と非くも膜下出血群（脳梗塞群，脳腫瘍群，脳出血群，TIA 群， AVM 群，その他群を含む）とに分け検討し，以下の結果を得た。

1) 脳動脈瘤の破裂率，年間破裂率とも非くも膜下出血群の中の脳梗塞群で最も高かった。非くも膜下出血群においては脳動脈瘤が大きいほど破裂率は高く，かつ，破裂までの期間はくも膜下出血群に比べ有意に短く，5 年以内に破裂したのは全例脳血管障害例（脳梗塞群，脳出血群，TIA 群）であった。破裂全例には高率に高血圧を有し，親動脈および周辺脳動脈に中等度から高度な脳動脈硬化を伴い，この所見は非くも膜下出血群においてより強かった。脳動脈瘤が大きく，かつ親動脈・周辺脳動脈の動脈硬化が強いほど短期間に破裂する可能性が高かった。

2) 未破裂脳動脈瘤の増大率はくも膜下出血群，非くも膜下出血群の中の脳出血群で最も高かった。増大例における最大径の増大はくも膜下出血群が非くも膜下出血群より有意に高かった。また，増大例は高血圧を有する症例が高血圧のない症例より有意に高く，親動脈および周辺動脈に中等度から高度な動脈硬化とその進展を認めた。これらの結果は未破裂脳動脈瘤の増大には高血圧，脳動脈硬化が関与していることが示された。

3) 脳動脈瘤の新生率はくも膜下出血群，非くも膜下出血群の中の脳出血群で有意に高かった。非くも膜下出血群においては新生例のほとんどは脳血管障害例（脳出血群の他，脳梗塞群，TIA 群）であった。新生脳動脈瘤例には高血圧の合併が有意に高く，かつ，親動脈，周辺動脈に中等度から高度な動脈硬化とその進行を認めた。以上のことから嚢状脳動脈瘤の新生には高血圧，脳動脈硬化が密接に関連し合うことが示された。

文　献

1) The ACROSS group (2000) Epidemiology of aneurysmal subarachnoid hemorrhage in Australia and New Zealand: incidence and case fatality from the Australasian cooperative research on subarachnoid hemorrhage study(ACROSS). Stroke 31:1843-1850

2) Bonita R, Beaglehole R, North JDK (1983) Subarachnoid hemorrhage in New Zealand: an

epidemiological study. Stroke 14:342-347,

3) 藤島正敏 (1996) 日本人の脳血管障害。日本内科学会雑誌 85:39-50

4) Ingall T, Asplund K, Mähönen M, Bonita R (2000) A multinational comparison of subarachnoid Hemorrhage epidemiology in the WHO MONICA stroke study. Stroke 31:1054-1061

5) Sarti C, Tuomilehto J, Salomaa V, Sivenius J, Kaarsalo E, Narva EV, Salmi K, Torppa J (1991) Epidemiology of subarachnoid hemorrhage in Finland from 1983 to 1985. Stroke 22: 848-853

6) Truelsen T, Bonita R, Duncan J, Anderson NE, Mee EM (1998) Changes in subarachnoid hemorrhage mortality, incidence, and case fatality in New Zealand between 1981-1983 and 1991-1993. Stroke 29:2298-2303

7) Juvela S, Porras M, Heiskanen O (1993) Natural history of unruptured intracranial aneurysms: a long-term follow- up study. J Neurosurg 79:174-182

8) 奥寺利男，陳 偉萍，安井信之（1999）長期追跡脳血管造影から見た未破裂脳動脈瘤について。三宅悦夫（編）脳動脈瘤の手術。第一版，金芳堂，京都，pp. 97-113

9) Yasui N, Suzuki A, Nishimura H, Suzuki K, Abe T (1997) Long-time follow-up unruptured intracranial aneurysms. Neurosurgery 40:1155-1159

10) 野本保夫（1997）高血圧症。亀山正邦，亀田治男，高久史麿，阿部令彦（編）今日の診断指針。第４版第２刷，医学書院，東京，pp. 849-851

11) Locksley HB (1966) Report on the cooperative study of intracranial aneurysms and subarachnoid hemorrhage. Section V, Part II. Natural history of subarachnoid hemorrhage, intracranial aneurysms and arteriovenous malformations; based on 6368 cases in the cooperative study. J Neurosurg 25: 321-368

12) Taylor CL, Yuan Z, Selman WR, Ratcheson RA, Rimm AA (1995) Cerebral arterial aneurysm formation and rupture in 20767 elderly patients: hypertension and other risk factors. J Neurosurg 83:812-819

13) Wiebers DO, Whisnant JP, Sundt Jr TM, O'Fallon WM (1987) The singnificance of unruptured

intracranial saccular aneurysms. J Neurosurg 66:23-29

14) Matsuda M, Handa J, Saito A, Matsuda I, Kamijyo Y (1983) Ruptured cerebral aneurysms associated with arterial occlusion. Surg Neurol 20:4-12

15) Inagawa T, Hirano A (1990) Ruptured intracranial aneurysms: an autopsy study of 133 patients. Surg Neurol 33:117-123

16) The international study of unruptured intracranial aneurysms investigators (1998) Unruptured intracranial aneurysms: risk of rupture and risks of surgical intervention. N Engl J Med 339:1725-1733

17) Iwamoto H, Kiyohara Y, Fujishima M, Kato I, Nakayama K, Sueishi K, Tsuneyoshi M (1999) Prevalence of intracranial saccular aneurysms in a Japanese community based on a consecutive autopsy series during a 30-year observation period; The Hisayama study. Stroke 30:1390-1395

18) Sacco RL, Wolf PA, Bharucha NE, Meeks SL, Kannel WB, Charette LJ, McNamara PM, Palmer EP, D'Agostino R (1984) Subarachnoid and intracerebral hemorrhage: natural history, prognosis, and precursive factors in the Framingham Study. Neurology 34:847-854

19) Ferguson GG (1972) Physical factors in the initiation, growth, and rupture of human intracranial saccular aneurysms. J Neurosurg 37:666-677

20) 岡野光志，吉田洋二（1994）血流と動脈硬化－その細胞学的機序－。病理と臨床 12:42-46

21) Ferguson GG (1970) Turbulence in human intracranial saccular aneurysms. J Neurosurg.33:485-497

22) Hassler O (1971) A study of intracranial aneurysms with ultrasoft X-rays. J Neurosurg 34:380-386

23) 中谷英幸（1991）脳動脈瘤の発生，増大に関する流体力学的研究。日外宝 60:435-448

24) Kim Ch, Cervós-Navarro, Kikuchi H, Hshimoto N, Hazama F (1993) Degenerative change in the internal elastic lamina relating to the development of saccular cerebral aneurysms in rats. Acta Neurochir (wien) 121:76-81

25) Bassett RC, Lemmen LJ (1954) Intracranial aneurysms; II. Some clinical observations concerning their development in the posterior circle of Willis. J Neurosurg 11:135-142

26) Bremer JL (1943) Congenital aneurysms of the cerebral arteries; an embryologic study. Arch Pathol 35:819-831

27) Meyer FB, Sundt Jr TM, Fode NC, Morgan MK, Forbes GS, Mellinger JF (1989) Cerebral aneurysms in childhood and adolescence. J Neurosurg 70:420-425

28) Ferrante L, Fortuna A, Celli P, Santoro A, Fraioli B (1988) Intracranial arterial aneurysms in early childhood. Surg Neurol 29:39-56

29) Hungerford GD, Marzluff JM, Kempe JG, Powers JM (1981) Cerebral arterial aneurysm in a neonate. Neuroradiology 21:107-110

30) Kuchelmeister K, Schulz R, Bergmann M, Schwuchow R, Vollmer E (1993) A probably familial saccular aneurysm of the anterior communicating artery in a neonate. Child's Nerv Syst 9:302-305

31) Lipper S, Morgan D, Krigman MR, Staab EV (1978) Congenital saccular aneurysm in a 19-day-old neonate: case report and review of the literature. Surg Neurol 10:161-165

32) Ronkainen A, Hernesniemi J, Tromp G (1995) Special features of familial intracranial aneurysms: report of 215 familial aneurysms. Neurosurgery 37:43-47

33) Schievink WI, Parisi JE, Piepgras DG (1997) Familial intracranial aneurysms: an autopsy study. Neurosurgery 41: 1247-1452

34) Wang PS, Longstreth Jr WT, Koepsell TD (1995) Subarachnoid hemorrhage and family history: a population-based case-control study. Arch Neurol 52:202-204

35) Handa H, Hashimoto N, Nagata I, Hazama F (1983) Saccular cerebral aneurysms in rats: a newly developed animal model of the disease. Stroke 14:857- 866

36) Hashimoto N, Kim Ch, Kikuchi H, Kojima M, Kang Y, Hazama F (1987) Experimental induction of cerebral aneurysms in monkeys. J Neurosurg 67: 903-905

37) Kim Ch, Kikuchi H, Hashimoto N, Hazama F (1990) Angiographic study of induced cerebral aneurysms in primates. Neurosurgery 27: 715-720

38) Kim Ch, Kikuchi H, Hashimoto N,Hazama F (1989) Histopathological study of induced cerebral aneurysms in primates. Surg Neurol 32: 45-50

39) Misra BK, Whittle IR, Steers AJW, Sellar RJ (1988) De novo saccular aneurysms. Neurosurgery 23:10-15

40) Ostergaard JR, Hog E (1985) Incidence of multiple intracranial aneurysms.Influence of arterial hypertension and gender. J Neurosurg 63:49-55

41) Sakaki T, Tominaga M, Miyamoto K, Tsunoda S, Hiasa Y (1993) Clinical studies of De Novo aneurysms. Neurosurgery 32:512-517

42) Drapkin AJ, Rose WS (1992) Serial development of 'de novo' aneurysms after carotid ligation: case report. Surg Neurol 38:302-308

43)林 靖二，船橋利理，板倉 徹，仲 寛，横手秀義，駒井則彦 (1982) 脳動脈瘤発生に及ぼす hemodynamic stress の重要性—脳動脈瘤・脳動静脈奇形合併例の分析—。Neurol Mid Chir (Tokyo) 22:219-226

44) 平野 亮, 今泉俊雄, 加藤孝顕,官尾邦康, 端 和夫 (1995) 脳底動脈閉塞に合併した growing up aneurysm の 1 例。脳神経外科 23:693-698

45) 井口 太， 川哲二，加藤幸雄，徳田佳生，大林直彦 (1994) 脳動脈瘤術後に新生した動脈瘤からクモ膜下出血をきたした 3 例。脳卒中 16：206-211

46) 片岡和夫，種子田 護 (1982) 両側頸動脈閉塞に併した脳動脈瘤。Neurol Med Chir (Tokyo) 22:744-750

47) Kotwica Z (1993) Middle cerebral artery aneurysm developing apparently de nove. Neurochirurgia 36:70-72

48) 貫井英明，長屋孝雄，宮城 修，玉田潤平，金子的実，佐々木秀夫，三塚 繁，川渕純一，河野徳雄，狩野忠雄 (1982) 脳動脈瘤の成因および増大，破裂に関する臨床的検討。Neurol Med Chir (Tokyo) 22:437-445

49) 杉浦康仁，宮本恒彦，竹原誠也，平松久弥，赤嶺 荘一，内山晴旦 (1997) 片側内頸動脈欠損症に合併した脳底動脈動脈瘤の 2 例。脳神経外科 25:385-390

50) Tognetti F, Limoni P, Testa C (1983) Aneurysm growth and hemodynamic stress. Surg Neurol 20:74-78

51) Charbel FT, Seyfried D, Mehta B, Dujovny M, Ausman JI (1991) Dominant A1: angiographic and clinical correlations with anterior communicating artery aneurysms. Neurological Research 13:253-256

52) Miller CA, Hill SA, Hunt WE (1985) "De novo" aneurysms: a clinical review. Surg Neurol 24:173-180

Akita J Med 27: 141-147, 2000

前交通動脈瘤の新生と前大脳動脈水平部の一側性低形成との関連

——長期追跡脳血管造影による5例報告——

陳　偉萍*,**・渡会二郎*・奥寺利男**
畑澤　順**・下瀬川恵久**

*秋田大学医学部放射線医学講座
**秋田県立脳血管研究センター　放射線医学研究部

(平成12年9月26日受付，平成12年10月3日掲載決定)

De Novo Anterior Communicating Artery Aneurysm in Association with Unilateral Hypoplasia of Horizontal Segment of Anterior Cerebral Artery

—— Report of Five Cases by Long-term Follow-up Cerebral Angiography ——

Wei-Ping Chen*,**, Jiro Watarai*, Toshio Okudera**
Jun Hatazawa**, and Eku Shimosegawa**

*Department of Radiology, Akita University School of Medicine, Akita 010-8543, Japan
**Department of Radiology and Nuclear Medicine, Akita Research Institute of Brain and Blood Vessels, Akita 010-0874, Japan

Abstract: Five cases (four females and one male) of saccular anterior communicating artery aneurysm in adults which had apparently developed "*de novo*" were identified in 720 patients who underwent repeated cerebral angiography during a 28.5 year period from June 1969 to December 1997. The age at the second cerebral angiography ranged from 62 to 74 years, with an average age of 67.6 years. Cerebral angiography showed that all cases had unilateral hypoplasia of a horizontal segment of the anterior cerebral artery (A1) and progression of arteriosclerosis. Four cases had a history of hypertension and one case had suffered from diabetes mellitus prior to the first angiography. These findings suggest that unilateral hypoplasia of A1, in addition to hypertension and arteriosclerosis, may participate in the initiation of an aneurysm of the anterior communicating artery.

Key words: *de novo* aneurysm, anterior communicating artery, anterior cerebral artery, hypoplasia, hemodynamic stress.

緒　言

脳動脈瘤の新生に関しては，Graf と Hamby[1] による報告をはじめとして，数多く報告されている[2)-5)]。前交通動脈瘤は，脳血管造影および手術所見上は，Willis 動脈輪前半部の奇形，または血流動態異常を伴うものが多い[6)7)]。中でも一側の前大脳動脈水平部（A1）の低形成を伴う症例は57%[8)] ないし68.1%[9)] を占めている。A1の一側性低形成では，低形成側の前大脳動脈域の灌流は，ほとんど非低形成側の A1 から前交通動脈を介してなされる。この際，前大脳動脈—前交通動脈分岐部への hemodynamic stress（血管内を灌流する血液の乱流や渦流により生じる血管壁ずり応力を主体とする血行力学的侵襲）が増大し，動脈瘤が生じやす

いと考えられている[10]。

今回，我々は最長27年にわたる長期追跡脳血管造影群において，5例の前交通動脈瘤の新生を認めた。これらの症例の脳血管造影所見を分析し，前交通動脈瘤の新生と一側A1低形成との関連について若干の知見を得たので報告する。

症　　例

1969年6月から1997年12月までの間に，秋田県立脳血管研究センターで，最短半年，最長27年，平均5.3年の間隔をおいて2回以上脳血管造影が行われた720例（男444例，女276例）を検討した。その結果，720例中5例に前交通動脈瘤の新生を認め，いずれも一側1の低形成を伴っていた。なお，内頸動脈造影動脈相の正面像で，左右A1の中央部の血管径を測定し，左右の直径が2倍以上の差がある場合を，直径の小さい側の一側A1低形成と判定した。全例，経大腿動脈性カテーテル法による連続立体撮影ないし連続拡大立体撮影が行われた。

症例1：74歳，女性，主訴：右上下肢脱力，既往歴：高血圧症。現病歴と経過：1971年10月12日，左中大脳動脈瘤の破裂により，くも膜下出血を発症した。脳血管造影では，右A1の直径は左A1の1/2であり（図A, B），左A1を介して両側前大脳動脈が造影されたが，右前大脳動脈域の描出は右A1よりも左A1から前交通動脈を介しての方が優位であった。この時，前交通動脈瘤は認められなかった。9年後の1980年10月19日右上下肢脱力が出現し，10月23日脳梗塞の疑いで当センターへ入院した。脳血管造影では，左A1一前交通動脈瘤の新生を認めた（図1C）。また，左中大脳動脈瘤の増大，脳動脈硬化の進行を示す親動脈および周辺動脈の蛇行の増強，壁不整，狭窄を認めた（図1C）。

症例2：62歳，男性，主訴：左眼視力低下，既往歴：高血圧症。現病歴と経過：1979年1月14日，左上下肢

Fig. 1.

Case 1.

74-year-old hypertensive woman with subarachnoid hemorrhage due to rupture of the left middle cerebral artery aneurysm.

A, B. Initial bilateral internal carotid angiograms at the onset of subarachnoid hemorrhage, right (A), left (B), arterial phase, AP view. Caliber of right horizontal segment of the anterior cerebral artery (A1) (arrow, A) is a half of left A1. Anterior cerebral arteries are opacified bilaterally through the left dominant A1. Aneurysm at the bifurcation of the left middle cerebral artery (arrow, B) is also noted.

C. Angiogram 9 years later. Left internal carotid angiogram, arterial phase, AP view. Small saccular de novo anterior communicating artery aneurysm (white arrow) is noted with progression of atherosclerotic changes of the left A1 (black arrowhead), left horizontal segment of middle cerebral artery (M1) (white arrowhead), and left internal carotid artery (small arrow). Increase in size of the aneurysm at left bifurcation of the middle cerebral artery is noted (arrow).

脱力，言語障害が出現し，脳梗塞の疑いで当センターに入院した。右内頸動脈造影では，右内頸動脈およびその分枝の蛇行が強く，右 A1 から両側前大脳動脈領域が造影されていた。前交通動脈に動脈瘤は認められなかった(図 2A)。15 年後の 1994 年 3 月頃より左眼の視力低下を来たし，magnetic resonance angiography (MRA) にて左内頸動脈一後交通動脈瘤が疑われた。脳血管造影で，右 A1一前交通動脈に，1 個の新生嚢状脳動脈瘤 (図 2B) を認め，脳動脈の蛇行が進行し，管径不同が認められた (図 2B)。また，左内頸動脈一後交通動脈に 1 個の小さな嚢状脳動脈瘤 (図 2C) および左 A1 には低形成 (図 2C) を認めた。なお，15 年前の初回脳血管造影時には左内頸動脈の造影が行われず，したがって，2 回目の脳血管造影時認めた左内頸動脈一後交通動脈の動脈瘤が新生か否かは，判定できなかった。同年 5 月 4 日，上述の二個の動脈瘤に対して clipping が行われた。手術所見で，新生前交通動脈瘤は右 A1一前交通動脈分岐部に発生し，左 A1 は低形成であることが確認された。

症例 3：69 歳，女性，主訴：頭痛，既往歴：糖尿病。現病歴と経過：1970 年 5 月 25 日，右側頭部痛，嘔吐で精査のため当センターへ入院した。脳血管造影で，右 A1 は低形成であり (図 3A)，左 A1 (図 3B) が発達し，両側前大脳動脈域が造影された。脳動脈には，全体的に蛇行を認めた。脳動脈瘤は，認められなかった。25 年後の 1995 年 10 月 9 日，右側頭部痛を訴え，MRA で前交通動脈瘤が疑われた。1996 年 1 月 17 日，精査目的にて再入院した。脳血管造影では，左 A1一前交通動脈 (図 3C)，左中大脳動脈蝶形骨部一島部移行部 (図 3C)，左後大脳動脈からの後側頭動脈起始部 (図 3C) に，それぞれ 1 個の新生脳動脈瘤が発見された。親動脈を含め脳動脈硬化が進行し，左内頸動脈最末梢部は直立化していた (図 3C)。

症例 4：63 歳，女性，主訴：左眼瞼下垂，既往歴：高血圧症。現病歴と経過：1971 年 11 月 29 日，左内頸動脈瘤破裂によるくも膜下出血を発症した。脳血管造影で，左 A1 の直径は右 A1 の 1/2 で(図 4A)，左前大脳動脈は前交通動脈を介して主に右 A1 (図 4B) から造影されていた。左内頸動脈瘤以外に脳動脈瘤は認められなかった。約 19 年後の 1990 年 8 月中旬より左顔面のしびれ感，9 月より左眼瞼下垂が出現した。脳動脈瘤が疑われ，同年 11 月 5 日に入院した。脳血管造影では，左 A1一前交通動脈(図 4C)，左中大脳動脈水平部から分岐する前側頭動脈の起始部 (図 4C) に，それぞれ 1 個の新生嚢状動脈瘤が発見された。内頸動脈と中大脳動脈の蛇行が進行し，壁不整が出現した(図 4C)。1990

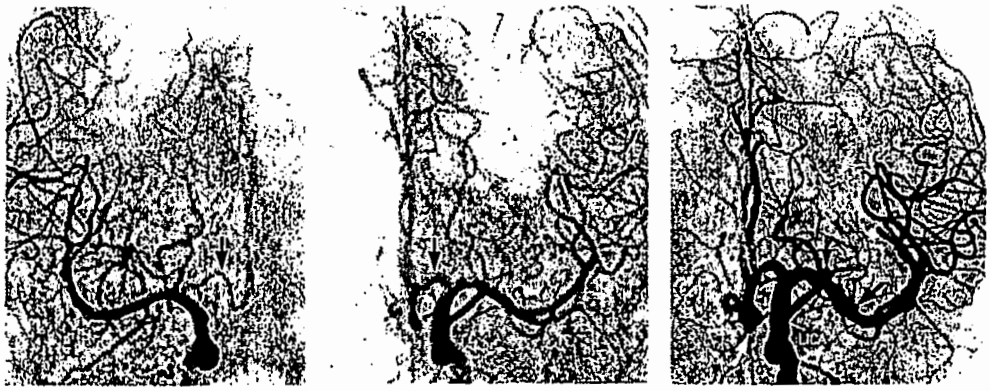
Fig. 2.

Case 2.

62-year-old hypertensive man with cerebral infarction.

A. Right internal carotid angiogram, arterial phase, AP view. Right internal carotid artery and its branches are tortuous.

B, C. Angiogram 15 years later. Bilateral internal carotid angiograms, arterial phase, AP view. Small *de novo* anterior communicating artery aneurysm (arrow, B) is noted with increased tortuosity of right M1 (black arrowheads, B), and slight dilatation of right internal carotid artery (white arrowhead, B). Left A1 is hypoplastic (arrow, C). Aneurysm is also noted at the left internal carotid-posterior communicating artery (small arrow, C).



A B C

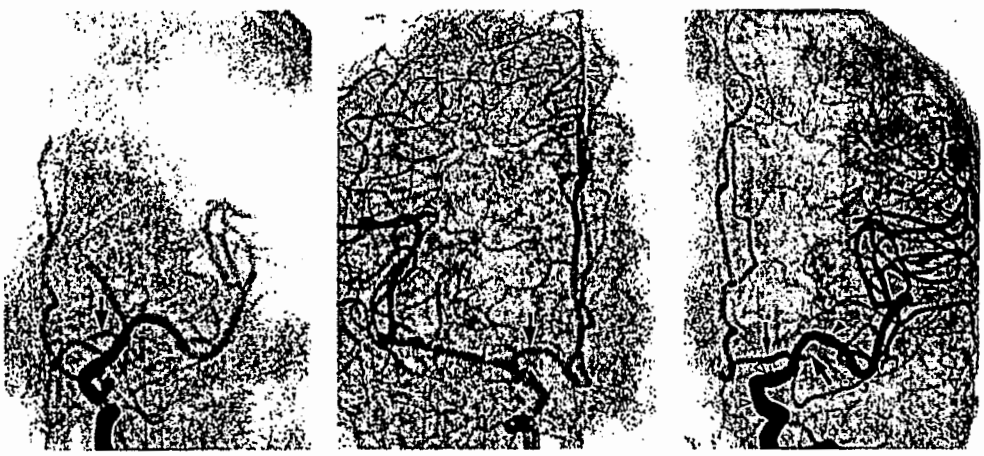
Fig. 3.

Case 3.

69-year-old woman with diabetes mellitus.

A, B. Initial bilateral internal carotid angiograms, right (A), left (B), arterial phase, AP views. Right A1 (arrow, A) is hypoplastic. Anterior cerebral arteries are opacified bilaterally through the left dominant A1 (arrow, B).

C. Angiogram 25 years later. Left internal carotid angiogram, arterial phase, AP view. A *de novo* anterior communicating artery aneurysm (white arrow) is noted with increased turtuosity of the left A1 (black arrowheads) and left M1 (white arrowheads). Left internal carotid artery (LICA) is straightened. De novo aneurysms are also noted at the left bifurcation of the left middle cerebral artery (large arrow), and at the origin of left posterior temporal branch of the posterior cerebral artery (small arrow).



A B C

Fig. 4.

Case 4.

63-year-old hypertensive woman with subarachnoid hemorrhage due to rupture of left internal carotid artery aneurysm.

A, B. Initial bilateral carotid angiograms at the onset of subarachnoid hemorrhage, right (A), and left (B), arterial phase, AP views. Caliber of left A1 (arrow, A) is a half of right A1 (arrow, B). Anterior cerebral arteries are opacified bilaterally through the right dominant A1.

C. Angiogram 19 years later. A tiny *de novo* anterior communicating artery aneurysm (white arrow) is noted with progression of atherosclerotic changes of the left A1 (small arrow), internal carotid artery (white arrowheads) and M1 (black arrowhead). A de novo aneurysm is also demonstrated at the origin of the left anterior temporal branch of the middle cerebral artery (large arrow).

A B

Fig. 5.

Case 5.

70-year-old hypertensive woman with subarachnoid hemorrhage due to rupture of a basilar tip aneurysm.

A. Left internal carotid angiogram, arterial phase, AP view. Left internal carotid artery and its branches are elongated and tortuous. Right A1 (black arrow) is hypoplastic in comparison with left A1. Therefore, anterior cerebral arteries are opacified bilaterally through the left dominant A1.

B. Angiogram 9 years later. Saccular *de novo* anterior cmmunicating artery aneurysm (arrow) is noted with increased tortuosity and wall irregularity of the left M1 (white arrowheads) and left internal carotid artery (black arrowheads).

年11月28日，上述の二個の脳動脈瘤に対してclippingが行われた。新生前交通動脈瘤は，前交通動脈に存在することが術中所見から証明された。

症例5：70歳，女性，主訴：頭痛，嘔吐，既往歴：高血圧症。現病歴と経過：1974年8月23日，脳底動脈遠位端部の動脈瘤の破裂によるくも膜下出血を発症した。脳血管造影で，右A1は低形成(図5A)であり，主に左A1（図5A）から両側前大脳動脈は造影されていた。9年後の1983年11月25日，突然の激しい頭痛，嘔吐を訴え，当センターに再入院した。Computed tomography (CT) では，前大脳縦裂，両側シルビウス裂，鞍上槽を主とするくも膜下出血を認めた。脳血管造影では，左A1—前交通動脈に新生嚢状動脈瘤(図5B)を認めた。なお，親動脈を含め全体的に管径不同，壁不整などの動脈硬化の進行が認められた(図5B)。CTでの血腫の分布から，新生前交通動脈瘤の破裂と推定した。同年12月5日，同新生前交通動脈瘤再破裂のため手術前に死亡した。

考　　察

新生前交通動脈瘤を有する5例（男性1例，女性4例)を報告した。新生脳動脈瘤が認められた年齢は，62歳から74歳，平均67.6歳であった。脳血管造影上，新生嚢状脳動脈瘤が認められるまでの追跡期間は，最短9年，最長25年8ヵ月，平均15年6ヵ月であった。5例全例，一側A1の低形成を認め，非低形成側A1より，前交通動脈を介して低形成側の前大脳動脈への造影を認めた。新生脳動脈瘤の親動脈および周辺動脈は動脈硬化が進行していた。なお，初回脳血管造影検査以前より，5例中4例に高血圧症，1例に糖尿病を認めた。

脳動脈瘤の発生には，動脈壁の先天的中膜欠損，後天的内弾性板変性が重要な因子であることは良く知られている[11)-13)]。最近では，hemodynamic stressとそれによる内弾性板変性および中膜平滑筋細胞の減少が深く関与していると考えられている[14)-17)]。hemodynamic stressは，先天性血管奇形(脳動静脈奇形，内頸動脈欠損，前交通動脈の窓形成，奇前大脳動

脈など）の存在や，高血圧，脳動脈硬化，局所的な乱流により増強する[6)7)14)18)-20)]。またhemodynamic stressが増強すると，同ストレスの負荷の最も高い血管分岐部の内弾性板が変性するといわれている[21)22)]。本報告の新生前交通動脈瘤を認めた5例全例においては一側のA1低形成とそれにともなう非低形成側A1からの両側前大脳動脈域への灌流を認めた。前交通動脈瘤柄は，前交通動脈に1例，非低形成側A1—前交通動脈の分岐部に4例であり，2例では手術により確認され，hemodynamic stressが最も高い部位での新生が多かった。文献的にはCharbelらの検討[8)]では，一側A1低形成を伴う前交通動脈瘤は51例中27例（57%）であり，郭らの前交通動脈瘤の報告[23)]では，A1部低形成を伴うものが54.4%，Willis輪前半部にmedian artery of corpus callosum（脳梁正中動脈），窓形成などの前大脳動脈奇形を伴うものが10.3%であった。また，前交通動脈瘤204例の検討[10)]では，動脈瘤柄が優位側（低形成側の対側）A1—前交通動脈の分岐部にあったものは34.8%，低形成側A1—前交通動脈の分岐部にあったものは10.0%，前交通動脈にあったものは55.7%であった。以上の報告および本報告例は，いずれも前交通動脈瘤の発生とWillis動脈輪前半部の形成異常が深く関係していることを示している。前大脳動脈の一側A1低形成が存在する場合には，非低形成側A1から両側前大脳動脈域へ灌流し，前交通動脈を介する血流が増加し，局所的なhemodynamic stressが増強され，動脈壁のずり応力が増して前交通動脈瘤が発生すると考えられる。

実験的には，Kimらは実験的高血圧ラットを用いて，高血圧により内弾性板が変性し，嚢状脳動脈瘤が形成されることを証明した[15)]。また，中谷ら[17)]は，高血圧ラットの実験的脳動脈瘤誘発モデルで，脳底部動脈（前大脳動脈—嗅動脈）分岐部を観察している。すなわち，Latex粒子を流し，そのflow patternを解析した結果，動脈瘤を有する分岐部では，分岐部前の前大脳動脈と動脈瘤遠位部に螺旋流を認めた。かつ，動脈瘤開口部遠位端で最大のずり応力を認めた。これらの結果は，脳動脈瘤の発生には局所的なhemodynamic stressが重要であることを示している。われわれの報告例においては，初回造影時より，4例は高血圧症，1例は糖尿病を有し，親動脈と周辺部脳動脈に中等度から高度の動脈硬化を認めた。二回目の造影時には，親動脈と周辺部脳動脈を含め，広範な領域での脳動脈硬化の進行が認められた。したがって，A1低形成に伴う前交通動脈および周辺動脈へのhemodynamic stressの増大に加え，高血圧症による動脈壁の変性が，前交通動脈瘤の新生に関与したと考えられる。

脳動脈瘤の破裂は部位別には前交通動脈瘤の破裂率が最も高い[24)]。われわれの報告例においては，5例中1例で新生前交通動脈瘤が破裂し，くも膜下出血により死亡した。したがって，高血圧を伴い，一側A1低形成がある症例では，前交通動脈瘤新生の可能性が高いことを念頭に置き，侵襲の少ない画像診断法であるMRA, three dimension-computed tomographic Angiography（3D—CTA）を用いて，注意深く追跡する必要がある。

結　論

1969年6月から1997年12月までの28年半の間に，2回以上の脳血管造影が行われた720例を検討した。720例中5例に，前交通動脈瘤の新生を認めた。新生までは最短9年，最長25年5ヵ月，平均15年6ヵ月を要し，5例とも，一側のA1低形成と，非低形成側A1からの両側前大脳動脈への灌流を認めた。また，5例中4例は高血圧症を有していた。全例脳動脈硬化による血管の狭窄，壁不整，蛇行が進行していた。前交通動脈瘤の発生には，一側のA1低形成，高血圧症，および脳動脈硬化が関与していると考えられた。

謝辞：本論文は日中医学協会助成事業-日本財団助成金による補助受けた.

1) Graf CJ, Hamb WB (1964) Report of a case of cerebral aneurysm in an adult developing apparently de nove. J Neurol Neurosurg Psychiatry 27: 153-156
2) 藤井博之，能崎純一，伊藤治英，山本信二郎（1981）多発性脳動脈瘤術後に新生した脳動脈瘤．臨牀放射線 26: 295-298
3) Miller CA, Hill SA, Hunt WE (1985) "De Novo" aneurysms: a clinical review. Surg Neurol 24: 173-180
4) Misra BK, Whittle IR, Steers AJW, Sellar RJ (1988) De Novo saccular aneurysms. Neurosurgery 23: 10-15
5) Sakaki T, Tominaga M, Miyamoto K, Tsunoda S, Hiasa Y (1993) Clinical studies

of De Novo aneurysms. Neurosurgery 32: 512-517

6) Kwak R, Niizuma H, Hatanaka M, Suzuki J (1980) Anterior communicating artery aneurysms with associated anomalies. J Neurosurg 52: 162-164

7) 鈴木倫保, 小川 彰, 嘉山孝正, 桜井芳明, 鈴木二郎 (1988) 前交通動脈瘤に伴う血管奇形. 脳神経外科 16: 498-502

8) Charbel FT, Seyfried D, Mehta B, Dujovny M, Ausman JI (1991) Dominant A1: angiographic and clinical correlations with anterior communicating artery aneurysms. Neurological Research 13: 253-256

9) 郭 隆瑮, 大井隆嗣, 新妻 博, 鈴木二郎 (1978) 前交通動脈瘤症例の Willis 動脈輪前半部血流動態; 脳血管写による検討. 脳神経外科 6: 1065-1069

10) 郭 隆瑮, 大井隆嗣, 新妻 博, 鈴木二郎 (1978) 前交通動脈瘤の流入動脈および動脈瘤柄部位 Willis 動脈輪前半部の血流動態. 脳神経外科 6: 1159-1163

11) Bremer JL (1943) Congenital aneurysms of the cerebral arteries; an embryologic study. Arch Pathol 35: 819-831

12) Hashimoto N, Kim Ch, Kikuchi H, Kojima M, Kang Y, Hazama F (1987) Experimental induction of cerebral aneurysms in monkeys. J Neurosurg 67: 903-905

13) Kim Ch, Kikuchi H, Hashimoto N, Hazama F (1989) Histopathological study of induced cerebral aneurysms in primates. Surg Neurol 32: 45-50

14) 林 靖二, 船橋利理, 板倉 徹, 仲 寛, 横手秀義, 駒井則彦 (1982) 脳動脈瘤発生に及ぼ hemodynamic stress の重要性—脳動脈瘤・脳動静脈奇形合併例の分析—. Neurol Med Chir (Tokyo) 22: 219-226

15) Kim Ch, Cervõs-Navarro, Kikuchi H, Hashimoto N, Hazama F (1993) Degenerative change in the internal elastic lamina relating to the development of saccular cerebral aneurysms in rats. Acta Neurochir (Wien) 121: 76-81

16) Kondo S, Hashimoto N, Kikuchi H, Hazama F, Nagata I, Kataoka H (1998) Apoptosis of medial smooth muscle cells in the development of saccular cerebral aneurysms in rats. Stroke 29: 181-189

17) 中谷英幸 (1991) 脳動脈瘤の発生, 増大に関する流体力学的研究. 日外宝 60: 435-448

18) 平野 亮, 今泉俊雄, 加藤孝顕, 官尾邦康, 端 和夫 (1995) 脳底動脈閉塞に合併した growing up aneurysm の 1 例. 脳神経外科 23: 693-698

19) Stehbens WE (1963) Aneurysms and anatomical variation of cerebral arteries. Arch Pathol 75: 57-76

20) 杉浦康仁, 宮本恒彦, 竹原誠也, 平松久弥, 赤嶺荘一, 内山晴旦 (1997) 片側内頸動脈欠損症に合併した脳底動脈動脈瘤の 2 例. 脳神経外科 25: 385-390

21) Ferguson GG (1972) Physical factors in the initiation, growth, and rupture of human intracranial saccular aneurysms. J Neurosurg 37: 666-677

22) Ferguson GG (1970) Turbulence in human intracranial saccular aneurysms. J Neurosurg 33: 485-497

23) 郭 隆瑮, 高橋正晃, 鈴木二郎 (1970) 前交通動脈動脈瘤と Willis 動脈輪前半部の奇形及び血流動態. 脳と神経 22: 95-99

24) 陳 偉萍, 渡会二郎, 奥寺利男 長期追跡脳血管造影から見た未破裂脳動脈瘤の自然経過. 秋田医学 投稿中

日本財団補助金による
２０００年度日中医学学術交流促進事業

⑤．在留中国人研究者研究助成

(3) 日本人（南九州人）、中国人（チベット人）の起源と拡散に関するウイルス学的、人類遺伝学的研究

日本人（南九州人）、中国人（チベット人）の起源と拡散に関する ウイルス学的、人類遺伝学的研究

楼　宏
中国重慶医科大学基礎医学部生物学教研室・講師
鹿児島大学医学部ウイルス学講座

【要旨】
HTLV-Iは日本の南西九州、沖縄、東北、北海道の辺境の人々のほか、アフリカ、中近東、メラネシア、カリブ海ならび南米アンデスの先住民にも感染しATLやHAM/TSP（痙性脊髄麻痺）を発症させている。中国大陸では、チベット族やその他の小数民族のなかにHTLV-I感染のフォーカスがあり同様の疾病が流行している可能性が示唆されている。本研究は、日本人、中国チベット人の血液検体を用いて、HTLV-I感染者のHLA遺伝子型とウイルス遺伝子の塩基配列を決定し、アジアモンゴロイドとともに進化してきたHTLV-Iの起源と拡散の様相をさらに詳細に検索することを目的とした。日本人HTLV-I感染者から採取された末梢血リンパ球からDNAを抽出し、HTLV-I LTR領域をDNAシークエンサーによる塩基配列を決定した。中国チベットラサの東部地域と西部地域から合計272名のチベット族から血液を採取保存した。チベット族のHTLV-I保有者を全く検出できなかったが、HBV抗原の保有率が高く、特に東部地域の某部落では38%の保有率であった。チベット族のHBV保有者の血漿から、DNAを抽出しHBVの遺伝子の亜型を決定した。チベット族のHBVの遺伝子的亜型はタイ、中央アジア、韓国などに広く分布しているC型であった。チベット族のHLA遺伝子型の結果、アジアモンゴロイドに多く見られたA*02, A*24, B*40, B*35, DRB1*0901を保有していた。これらの結果を考察すると、チベット族は中央アジア地域のモンゴロイド集団に属し、日本人やアンデス先住民と共同先祖をもつと考えられた。

KEY WORDS : HTLV-I; HLA; HBV; Japanese; Chinese; Tibet; Phylogenetic Tree;

研究報告

【目的】
HTLV-Iは日本の南西九州、沖縄、東北、北海道の辺境の人々のほか、アフリカ、中近東、メラネシア、カリブ海ならび南米アンデスの先住民にも感染しATLやHAM/TSP（痙性脊髄麻痺）を発症させている。中国大陸では、チベット族やその他の小数民族のなかにHTLV-I感染のフォーカスがあり同様の疾病が流行している可能性が示唆されている。本研究は、日本人、中国チベット人の血液検体を用いて、HTLV-I感染者のHLA遺伝子型とウイルス遺伝子の塩基配列を決定し、アジアモンゴロイドとともに進化してきたHTLV-Iの起源と拡散に関する解析を行うことにより、先史モンゴロイドの起源と移動拡散の軌跡を明らかにする。

【方法】
1. 検体の収集：南九州日本人29名（HTLV-Iキャリア11名 AC001-AC036; ATL患者18名 UTM01710-BMT/ATL011）と中国チベット人272名の同意を得て、minibag用いて、血液検体収集した。採集血液からリンパ球分離し、グアニジン塩酸法により高分子DNAを分離精製した。
2. HTLV-I遺伝子配列の同定：２９名南九州日本人のDNAより、ヒトT細胞白血病ウイルス（HTLV-I）LTR領域のprimerを用いて、DNAシークエンサーによる塩基配列を決定する。（Fig 1.）
3. HLA遺伝子型の同定：10名チベット人のヒト組織適合性抗原(HLA)クラスIアリルタイプはPCR-SSP, PCR-SSO法を用いてHLA遺伝子型を決定した。HLAクラスIIアリルタイプはPCR-SSO法を用いてHLA遺伝子型を決定した。（Table 1.）
4. HBVの感染状況およびHBV遺伝子型の同定：上記チベット検体の血清からHBV(HBsAg, HbsAb,

HbeAg, HbeAb, HbcAb) の検索を行った。HBV保有者の血漿から、DNA を抽出し HBV の遺伝子の亜型を決定した。 (Table 2., Fig 2.)

5. 系統樹の作成：既報の各民族から分離された HTLV-I の遺伝型と比較し、近隣結合法で HTLV-I Subtypes の遺伝系統樹を作成した。 (Fig 3)

【結果】

南九州日本人 HTLV-I キャリアの HTLV-I-LTR 塩基配列は既報の日本人の HTLV-I と高い相同性を持ち、同一系統のウイルスであった。 (Fig 1.) 南九州日本人の HTLV-I-LTR の塩基配列を用いて、既報他の集団の HTLV-I-LTR の塩基配列と比較し、HTLV-I Subtypes の遺伝系統樹を作った。29 名南九州 HTLV-I キャリア中一例除く、全て Japanese subtype であった (Fig 3.) 。

チベット族の HLA-クラス I アリルは A *02 , A *24 , B *40 , B *35 が検出され、DRB1 アリルは *0901, *1401, *1101 , DQB1 アリルは *0301, *0303 が 検出された (Table 1.) 。

チベット検体の HBV の感染は、HBsAg 陽性率 19.1％ (50/262), 過去感染率 29.4％(77/262) であった (Table 2.)。一方、チベット族の HTLV-I 保有者を全く検出できなかった。林芝地区の某部落では 38％の HBV 保有率である、HBV の遺伝子的亜型は全て C 型であった。 (Fig 2.)

【考察】

チベット族に検出された A*02, A*24, B*35, B *40, DRB1 *0901, *1401, DQB1*0301, *0303 は南九州, 沖縄, 北海道アイヌの人々のほか南米アンデス先住民族にも好発する HLA アリルであった。このことから中国のチベット族は南九州・沖縄人, 北海道アイヌおよび南米先住民と共通の祖先をもつ民族である可能性が示唆された。

今回の検体から、チベット人の HBV 感染率高いことが明らかになった。また、地域より大きな差がみられ、遺伝要因および環境要員が関与していることが示唆された。 ヒト B 型肝炎ウイルス (HBV) は、その遺伝子配列の相同性より A~G、6 種類の遺伝子型が分布しておりますが、各々の地域ごとにみると、約 2～3 の遺伝子型で局在がみられます。欧州からユーラシア大陸を東に行くにつれ、A, D 型->B, C 型と分布しており、アメリカ先住民には F 型、西アフリカには E 型が多くみられます。中国には B, C, D 型が存在し、チベットの報告がなかった。今回。我々は初中国チベット族の HBV 陽性者から HBV 遺伝子型を決定し、HBV Genotype C が唯一の遺伝子型と同定された (Fig. 2.) 。チベット族の HBV の遺伝子的亜型はタイ、中央アジア、中国、韓国などに広く分布している C 型であり、チベット族は中央アジア地域のモンゴロイド集団に属し、日本人やアンデス先住民と共同先祖をもつと考えられた。

HTLV-I の感染力は非常に低く、母から子への垂直感染が主で、水平感染は、夫婦間、あるいは輸血などに限られるため、このウイルスの分布は、過去における人種の移動といった人類学的背景と密接に関連することが予想される。現在までに分離されている HTLV-I は、これまでの遺伝子解析から一般に大きく３つのグループに分けられていた。まず第一に、パプアニューギニアやソロモン諸島のメラネシア人からの分離株 (メラネシアグループ) 、次にザイール、ガボンなど中央アフリカからの分離株 (中央アフリカグループ) 、そして最後に日本、カリブ海沿岸地域、西アフリカ等、世界的に広く分布しているもの (コスモポリタングループ) である。さらにコスモポリタングループは四つのサブグループに分類される (Fig 3.) 。そこで、我々は世界各地から分離したウイルスの遺伝子配列を詳細に解析することによって、このウイルスのさらに細かい系統関係を明らかにし、より具体的にこれらウイルスの起源とその人類学的背景との関係について考察を加えた。

解析部位としては LTR 領域を選んだ。その理由は、１) HTLV-I は、非常によく保存されているウイルスであるため、より変異しやすい部位であること、２) 免疫機構などの環境からの正の選択圧による (例えば env など) が少なく、より中立であること、３) これまでにその遺伝子配列が報告されているウイルス数が多いこと、４) 系統解析を行うのに手ごろな長さであることなどである。

日本人の HTLV-I は日本人集団に独特のウイルス (Japanese subgroup) とアフリカ・ユーラシア・南米大陸に広く分布するウイルス (Transcontinental subgroup) がみられる。今回、南九州日本人 HTLV-I キャリアの HTLV-I 塩基配列解析の結果、28／29 例は Japanese subgroup に属く、1／29 例は Transcontinental

subgroup であった（Fig 3.）。

HTLV-I の系統、特に「コスモポリタン型」においては有史以前からの人類の移動の歴史と密接に関連して説明できることである。すなわち、太古の昔、後に古モンゴロイドと呼ばれる系統が、少なくとも二つの集団、Transcontinental Subgroup と Japanese Subgroup に別れてアジア大陸を東へと移動し、おそらくインドの方から日本に別々に到達した。この内、先に到達した一集団 Transcontinental Subgroup が、当時、陸続きであったベーリング海（ベーリング陸橋）を渡って、アメリカ大陸を北米から南米へと南下していった。HTLV-I は、九州・沖縄などの西南日本にかぎらず、北海道の一部地域（アイヌ人）や海岸沿い、特に日本海側の離島、半島に感染率の高い地域がみられた。これらのことから、このウイルスは外から日本に侵入してきたのではなく、原日本人ともいうべき古くから日本にいた人々がもっており、その後、朝鮮半島から渡来した人々の勢力が増すにつれ　地矢南北に押しやられたと推論した。私達も、今回の系統解析から古モンゴロイド集団が日本に HTLV-I を持ち込んだと考えられ、南米先住民族やアンデスミイラの研究結果考慮し、チベット人、日本人と南米アンデス先住民族はアジア系古モンゴロイドの共通先祖に由来することが強く示唆された。

【参考文献】

1. 園田　俊郎、藤吉　利信、屋敷　伸治、李　洪川、楼　宏、カロリーナ・レマ：HLA と HTLV-I. ウイルス　2000; 50: 37-45.

2. Li HC, Fujiyoshi T, Lou H, et al.: The presence of ancient HTLV-I provirus DNA in an Andean mummy. Nature Med 1999;5:1428-1432.

3. Fujiyoshi T, Li HC, Lou H, et al.: Characteristic distribution of HTLV type I and HTLV type II carriers among native ethnic groups in South America. AIDS Res Hum Retroviruses 1999;15:1235-1239.

4. Lou H, Li HC, Kuwayama M, et al.: HLA class I and class II of the Nivkhi, an indigenous population carrying HTLV-I in Sakhalin, Far Eastern Russia. Tissue Antigens 1998; 52: 444-451.

5. Miura T, Fukunaga T, Igarashi T, et al.: Phylogenetic subtypes of human T-lymphotropic virus type I and their relations to the anthropological background. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1994;91:1124-1127.

6. Yamashita M, Picchio G, Veronesi R, Ohkura S, Bare P, and Hayami M: HTLV-Is in Argentina are phylogenetically similar to those of other South American countries, but different from HTLV-Is in Africa. J Med Virol 1998;55: 152-160.

7. Suzuki Y, and Gojobori T: The origin and evolution of human T-cell lymphotropic virus type I and type II. Virus Genes 1998;16:69-84.

8. Seiki M, Hattori S, Hirayama Y, and Yoshida M: Human adult T-cell leukemia virus: Complete nucleotide sequence of the provirus genome integrated in leukemia cell DNA. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1983;80:3618-3622.

Table 1. HLA-class I and class II allele typing of the samples in Tibet

		HLA Types							
	HTLV-I	class I				class II			
NO.	Ab#	A		B		DRB1		DQB1	
1	<16	A*02	A*02	B*35	B*51	DRB1*1101	DRB1*0901	DQB1*0301	DQB1*0303
2	<16	A*02	A*11	B*18	B*40	DRB1*1604	DRB1*0403	ND	ND
3	<16	A*02	A*02	B*3915	B*4803	DRB1*1407	DRB1*0403	DQB1*0301	DQB1*0304
4	<16	A*11	A*24	B*4801	B*51	ND##	ND	ND	ND
5	<16	A*02	A*31	B*51	B*52	ND	ND	ND	ND
6	<16	A*02	A*24	B*1538	B*5110	DRB1*1601	DRB1*0403	ND	ND
7	<16	A*11	A*24	B*1538	B*3517	DRB1*1101	DRB1*1401	DQB1*0301	DQB1*0502
8	<16	A*0103	A*11	B*35	B*5001	DRB1*0101	DRB1*0701	DQB1*0501	DQB1*0201
9	<16	A*24	A*68	B*3701	B*4002	DRB1*0901	DRB1*1001	DQB1*0303	DQB1*0501
10	<16	A*24	A*24	B*35	B*40	DRB1*1101	DRB1*1301	ND	ND

#: PA test

##: Not determinated

Table 2. **Prevalence of viral infection among Tibetan, China**

		HBV			
Location	Number of People	Numbers of HBsAg Positive	Rate of Current infection (%)	Numbers of positives either HBcAb or HBsAb	Rate of Past infection (%)*
東部地域					
村1	40	15	37.5	19	47.5
村2	62	5	8.1	13	21.0
村3	10	ND*		ND	
西部地域					
村1	55	7	12.7	16	29.1
村2	105	23	21.9	29	27.6
Total	272	50	19.1	77	29.4

*: Not determinated

Fig 1. The Alignments of HTLV-I-LTR DNA Sequence for HTLV-I Carriers and ATL Patients in Southern Japan

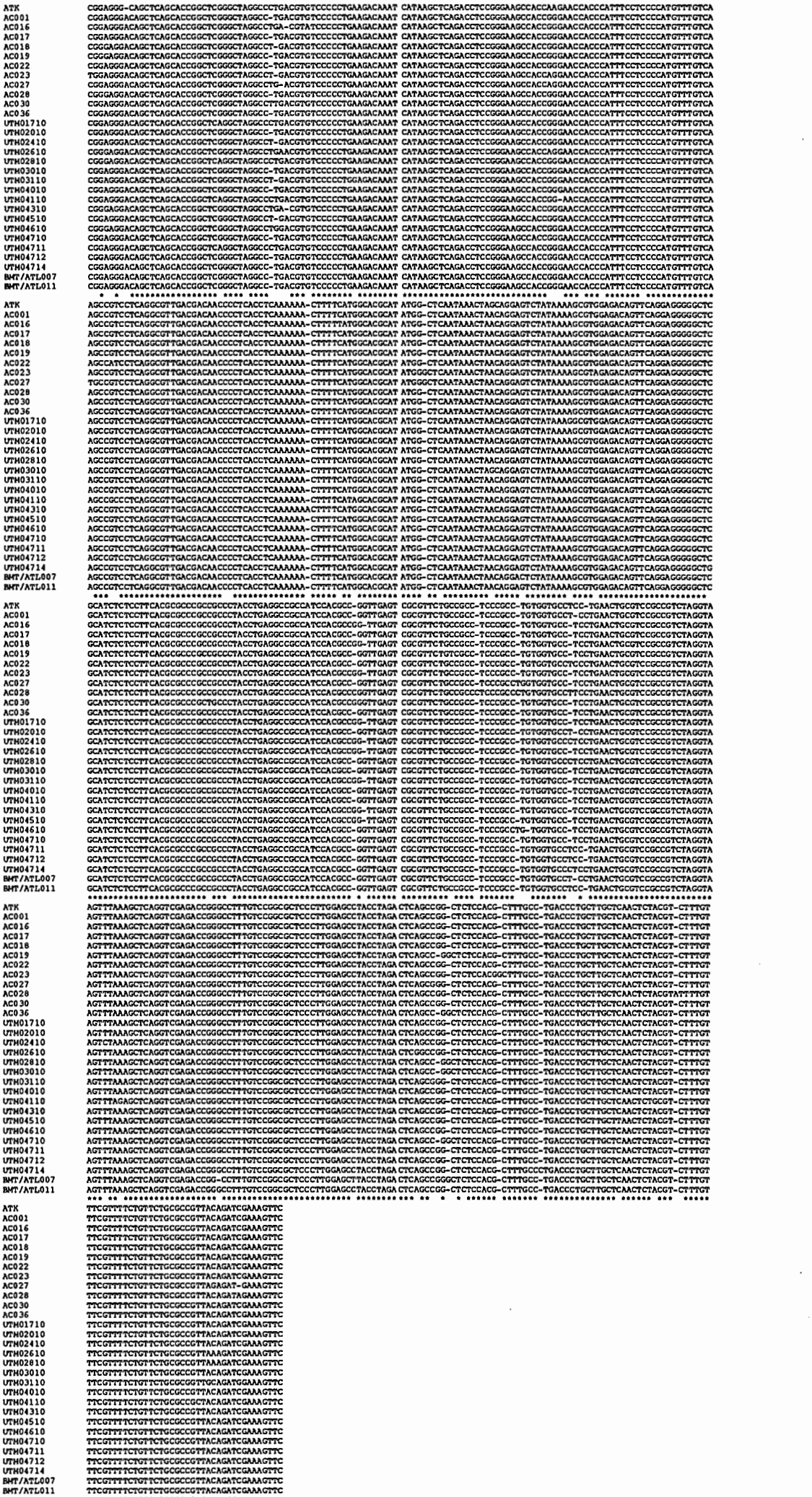


Fig 2. Geographic Distribution of HBV Genotypes

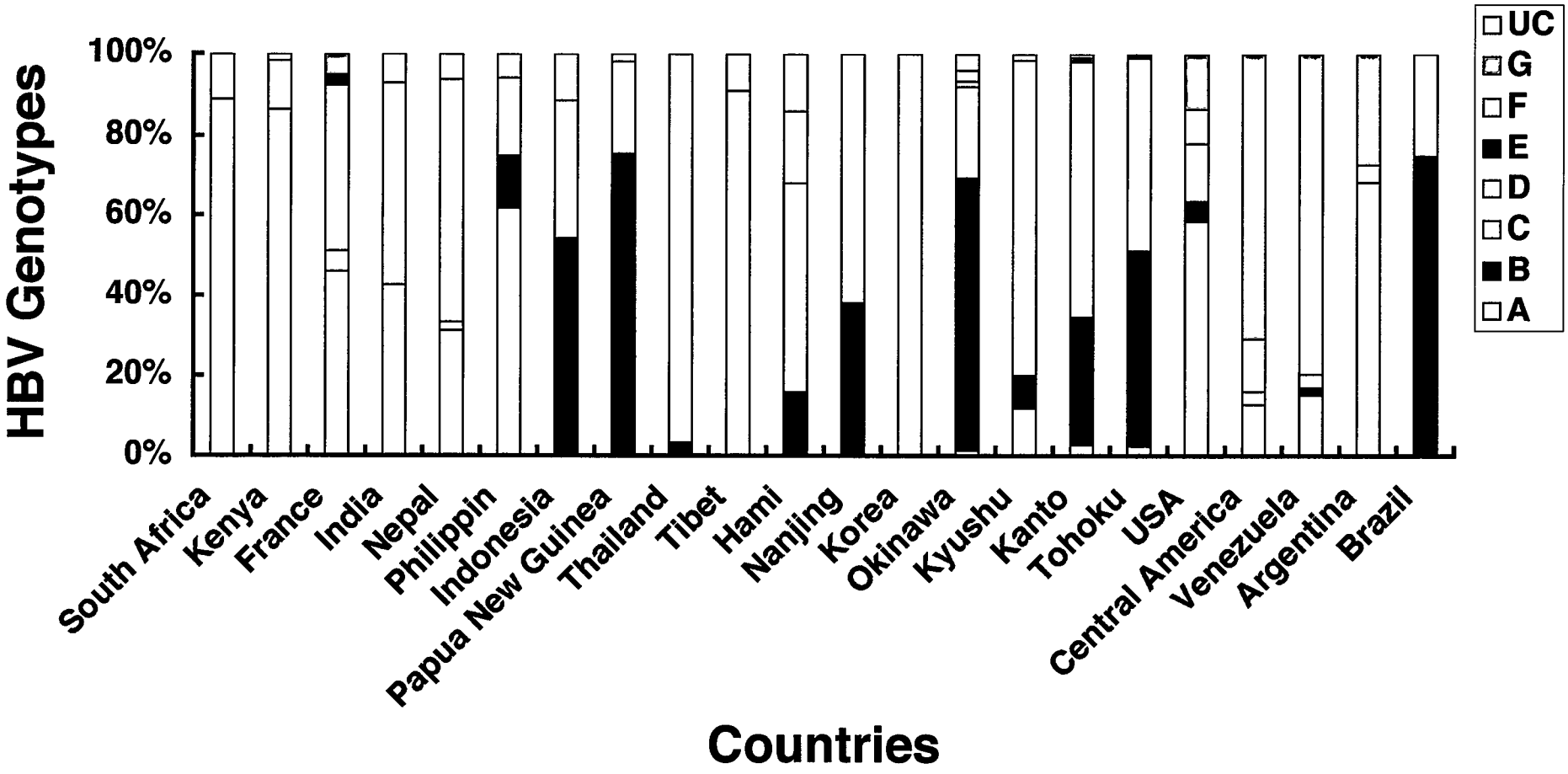
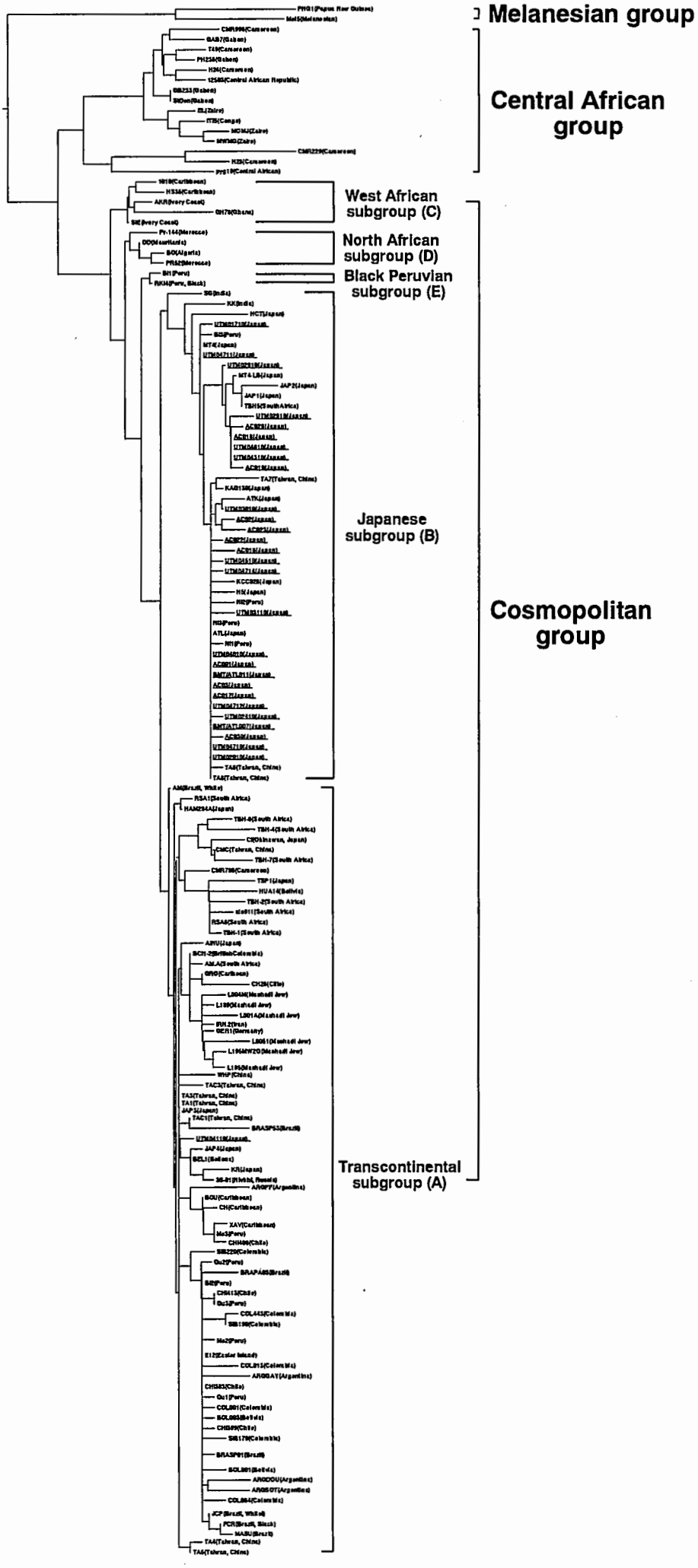


Fig 3. A Phylogenetic Tree of HTLV-I Subtypes (LTR Region, 144-650 n.p. in ATK)



「ATLの予防治療の新展開 - 緑茶による予防介入と骨髄移植」

園田純一郎[1]、李 洪川[1]、楼　宏[1]、カロリーナ・レマ[1]、
屋敷伸治[1]、藤吉利信[1]、宇都宮 與[2]、園田俊郎[1]
([1]鹿児島大学医学部ウイルス学講座、[2]今村病院分院血液内科)

Advances in prevention and treatment of ATL
- Green tea intervention study and bone marrow transplantation -

Jun-ichiro SONODA[1] , Hong-Chuan LI[1] , Hong LOU[1] , Carolina LEMA[1] , Shinji YASHIKI[1] ,
Toshinobu FUJIYOSHI[1] , Atae UTSUNOMIYA[2] and Shunro SONODA[1]
([1] Department of Virology, Faculty of Medicine, Kagoshima University, [2] Department of Hematology, Imamura Bun-in Hospital)

【目的】

ATL 発症予防を目的として、無症候性HTLV-Iキャリアを対象に緑茶抽出カプセル服用による介入試験を行い、血中HTLV-Iプロウイルス量の変動を観察することにより緑茶のATL 発症予防効果を検討する。併せてATL 患者に施行された同種骨髄移植の治療効果も検討する。

【対象と方法】

緑茶介入試験の趣旨を十分に説明し同意が得られた無症候性HTLV-Iキャリア101 名を無作為に2群に分け（第1群は前半6ヶ月緑茶カプセルを服用し後半は服用なしとする。第2群は前半6ヶ月非服用とし、後半は緑茶カプセルを服用する。）、緑茶カプセルを1回3個1日3回計9 カプセル（緑茶10杯分相当）を服用してもらう。全ての被験者から月一回の採血を行い、血中 HTLV-I プロウイルス量をリアルタイムPCR定量装置（LightCycler）で測定した。ATL患者の治療研究に関しては鹿児島大学医学部附属病院、関連医療機関の協力を得て行った。骨髄移植前後のHTLV-I プロウイルスの定量は上記の定量装置で測定し臨床所見との対比を行った。

【試験結果と考察】

1) 緑茶カプセル服用後のHTLV-Iプロウイルス量の変動：介入開始前に末梢血リンパ球1000個あたり100コピー以上の高いHTLV-Iプロウイルス量を示した21/101例を対象に経時変化を追跡し、初期的検討をおこなった。このうち緑茶カプセル服用者群（8名）では、HTLV-Iプロウイルス量の変動は小さく、一定の範囲内に収束する傾向がみられた。一方、非服用者群（13名）のプロウイルス量は50～700 コピーまでの大きな変動が観察された。
2) ATLの骨髄移植による治療成績：過去5年間におこなわれたATL患者に対する骨髄移植の成績がまとめられた。その結果、ATL患者の10例中6 例が骨髄移植後12～35 ヶ月以上にわたり無病状態で生存していることが明らかになった。これは従来の化学療法を主体とするATLの治療と比較して、抜群の好成績である。

子宮頸がんのHPV感染とHLAアリル

藤吉利信，　Carolina Lema，　李洪川，　楼宏，　屋敷伸治，　園田俊郎
（鹿児島大・医・ウイルス）

目的：子宮頸がん発症にはHPV感染とHLA遺伝子多型などの宿主要因の関与が考えられる。子宮頸がん発生率が先進国の5-10倍高いことが報告されているボリビアの子宮頸がん患者群と、日本人（鹿児島県地方）の子宮頸がん患者群のHPV感染とHLA遺伝子多型を比較することにより、子宮頸がん発症におけるHPV感染とHLAの遺伝背景を明らかにすることを目的とする。

結果と考察：1）HPV-DNA検出：ボリビアではHPV typeは31型が最も多く、鹿児島地区では16型が優位であった。2）HLAタイピング：鹿児島症例のHLAクラスIIアリルタイピング解析から子宮頸がんのリスク因子としてHLAクラスII DRB1*0401およびDQB1*0402、防御因子としてHLAクラスII　DRB1* 1302、およびDQB1*604が明らかになった。ボリビア症例については、優位なHPV typeが鹿児島地区と異なることから、それぞれのHLAクラスIIアリルが認識するエピトープが何か興味深く、これを特定することによりHPV抗原ペプチドの候補を決定することができる。

日本財団補助金による
２０００年度日中医学学術交流促進事業

⑤．在留中国人研究者研究助成

(4)ダイオキシンによる脳セロメニン異常に関する研究

In utero and lactational exposure to 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin decreases serotonin immunoreactivity in the raphe nuclei of mice

Shi-Bin Cheng

Lecturer, Department of Physiology, Faculty of Medicine, Sun Yat-sen University of Medical Sciences, Guangzhou, P. R. China;

PhD student, Department of Anatomy, Faculty of Medicine, Kagoshima University, Japan

要旨

メスマウスにダイオキシンを経口投与したあと交配し、その産子を母乳飼育した。ダイオキシン胎盤/母乳暴露動物を6週齢で殺し、脳内セロトニンを免疫組織学的に検出した。さらに、セロトニン産生細胞の数をコンピュータ解析法を用いて定量的に分析した。その結果、ダイオキシン胎盤/母乳暴露動物の脳内セロトニン産生細胞は対照群に比較して著しく減数していることが明らかとなった。以上を学会報告した。

Key Words: 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin; Raphe nuclei; Serotonin; Mouse; Brain

Purpose:

2, 3, 7, 8-tetrachlorodibendizo-p-dioxin (TCDD) is one of the most toxic members among a broad group of chemical environmental contaminants termed dioxin. It is formed during combustion of municipal waste and many industrial processes. Because of its lipophilicity and resistance to physical and biological breakdown, it wildly persists and accumulates in the environment and food chain. A body of data has indicated a wide spectrum of toxic effects of TCDD on growth, reproduction, immune system, endocrine, carcinogenesis and central nervous system in laboratory animals and human. Acute administration of a lethal dose of TCDD to adult animals induces a variety of severe intoxication including anorexia, progressive body weight loss, and reduced locomotor activity before death. Perinatal exposure to TCDD elicited low core body temperature in the rat. However, the mechanisms of these pathophysiological syndromes are still unknown. Serotonin is wildly localized in the central nervous system and involved in mediating many physiological functions, e.g., food intake, cognition, emotion and body temperature. Thus, the present study is to

examine the serotonin activity in the brain of the mouse by *in utero* and *lactation* exposure to TCDD.

Methods:

Twelve female adult ddY mice were orally exposed to olive oil or olive oil containing TCDD for 8 weeks prior to mating. The offspring were consequently exposed to TCDD in utero and via lactation. Offspring were weaned on postnatal day 28 and group-housed in plastic cages, and then allowed to survive for another 6 weeks. After anesthetized, all animals were transcardially perfused with 100 ml 0.1 M phosphate-buffered saline followed by a fixative containing 4% paraformaldehyde and 0.2% picric acid in 0.1M phosphate buffer (pH 7.4) at 4℃. The brains were removed, post-fixed in the same fixative, and then immersed in 30% phosphate-buffered sucrose at 4℃. Serial colonial sections were cut on freeze microtome and collected in 0.1M PBS and then processed for serotonin immunocytochemistry by PAP method. In briefly, after blocking endoperoxidase by using 0.15% H_2O_2, the floating sections were pre-incubated in a blocking solution of 0.3% Triton X-100, 1% normal goat serum, 0.05% sodium azide and 0.3% bovine serum albumin (BSA) in

phosphate buffer saline, pH 7.4 (PBS), and then incubated for 3 days at 4℃ in a solution containing rabbit anti-serotonin antibody (1:10000) diluted in the blocking solution. After several rinses with PBS, sections were immersed in a solution of goat anti-rabbit IgG (1:2000) overnight at 4℃, and following several rinses, sections were then incubated rabbit PAP (1: 2000) overnight at 4℃. The second and third antibodies were diluted in 0.1M PBS containing 0.3% BSA and 1% normal goat serum. Following several rinses with 0.1 M Tris-HCl buffer (pH 7.6), the sections were treated with 0.02% diaminobenzidine in 0.003% hydrogen peroxide. After final washes, the sections were mounted onto gelatin-chrome alum-coated glass slides, air dried, dehydrated with ethanol, cleared in xylene, and cover-slipped. Number of serotonin-immunostained cell bodies was counted with aid of a public domain NIH image system. For statistical analysis of the differences in serotonin-immunostained cell number between TCDD-exposed offsprings and control mice, Dannett's test was used. The specificity of serotonin antibody was tested.

Results:

The distribution of immunohistochemically stained serotonergic neurons

in the control and TCDD-treated mice was similar to that of other mammals. Serotonin-immunoreactive neurons were present in the caudal linear nucleus, the median raphe nucleus, the supralemniscal area, the pedunculopontine tegmental nuclei, the deep mesencephalic nucleus, the raphe magus, the raphe obscurus, the raphe pallidus, ventrolateral medulla, dorsal and medial to the facial nucleus and surrounding the central canal of the rostral end of the spinal cord. In the male offspring animals by in utero and lactational TCDD-exposure, a marked decrease in intensity of serotonin-immunostaining and number of serotonin-positive neurons was found in all raphe nuclei. Dunnett's test analysis showed that there were significant differences in cell number between all TCDD-exposed offspring and vehicle mice.

Discussion:

Our results indicate that in utero and lactational exposure to TCDD induces a great decrease in serotonin activity of ddY mouse brain. This suggests that TCDD may act as a neuroteratogen, which produces long-term alterations in serotonin synthesis. It was reported that serotonin and/or its metabolite concentration in the brain of the adult

TCDD-susceptible Long-Evans rat increased after a single lethal dose of TCDD. Similar results were also reported in the Sprague-Dawley rat and hamster. Other studies indicated that prenatal and early postnatal exposure to dioxins changed behavior and psychic function in human and animals. Our present results suggest that a great decrease in serotonin activity may be associated with these pathological changes. This study is the first morphological demonstration of TCDD-induced biochemical changes in the central nervous system.

References:

1. Bjerke D. L., Brown T. J. et al., 1994. Toxicology and Applied Pharmacology 127, 258-267
2. Unkila M., Pohjanvirta R. et al., 1995. Int. J. Biochem. Cell Biol. 27, 443-455
3. Pohjanvirta R., Unkila M., et al., 1993. Life Sci. 53, 1479-1487
4. Bestervelt L.L., Nolan C. J., et al., 1991, 495-497
5. Schantz S., Ferguson S. A., et al., 1992. Neurotoxicology and Teratology, 14, -433-446

日本財団補助金による
２０００年度日中医学学術交流促進事業

⑤．在留中国人研究者研究助成

(12) 神経節腫のＭＲimaging:組織との関連

神経節腫の MR imaging ： 組織との関連

張　岩
大連医科大学　第２付属病院　放射線科
久留米大学医学部　放射線教室

今回我々は，手術にて組織学的に確診が得られ，MRI が施行された後腹膜・後縦隔・頚部の神経節腫に対し MRI 所見・組織像との関連を検討した．検討項目は画像の形態学特徴(サイズ，被膜，周囲への浸潤と whorled appearance の有無)，信号，dynamic enhancement pattern，および粘液基質，膠原線維，と細胞成分の量などを含む．

被膜は，組織像で薄い膠原線維として，画像(造影後の T1 強調像)でリング状の enhancement として認められる． T1,T2 強調像で腫瘍内部に存在する線状・曲線状又は結節状の低信号領域（いわゆる whorled appearance）は，組織上は，束状・島状に集簇する schwann 細胞と膠原線維に相当する． T2 強調像で著明な高信号を呈する腫瘍には，組織上は，腫瘍内部に大量の粘液基質が認められるが，細胞成分と膠原線維が相対的に少ない．一方，T2 強調像で中等度信号～高信号を呈する腫瘍は細胞成分と膠原線維を富み，内部の粘液基質が乏しい．また，Dynamic study にて腫瘍は経時的な漸増の enhancement 効果を示す．

腫瘍信号の変化は組織成分(主に粘液基質・線維成分の量)の変化と一致する．後腹膜・後縦隔・頚部に被膜を有し，漸増の enhancement を呈する腫瘍が認められる時，可能性として神経節腫が挙がるべきと思われる．

Key Words: Neoplasms-ganglioneuromas-magnetic resonance imaging

研究報告

PURPOSE :

Ganglioneuroma is an uncommon benign neurogenic tumor arising from sympathetic ganglia. There have been many studies to clarify the cross-sectional imaging features of ganglioneuroma (1-7). To our knowledge, however, the contrast-enhanced dynamic magnetic resonance (MR) imaging features of this tumor have been reported for only a small series of patients (1). A relation between the MR images and histologic findings of ganglioneuroma has not yet been completely evaluated (8). The present paper attempts to correlate findings from spin-echo (SE) and contrast-enhanced dynamic MR images with histologic findings in 10 cases of ganglioneuroma. Imaging features that help differentiate this tumor from other neurogenic tumors and adrenal tumors are also described.

MATERIALS AND METHODS

The study population consisted of 10 patients (8 female, 2 male) with ganglioneuroma. The mean age at diagnosis was 27 y (range, 3-71 y). Tumors originated in the retroperitoneum (n = 4), the left adrenal gland (n = 1), the posterior mediastinum (n = 4), and the right parapharyngeal space (n = 1). Initial symptoms and signs included abdominal pain (n = 1), nausea and vomiting (n = 1), chest pain (n = 1), and a palpable mass (n = 2). In the remaining five cases, the lesions were incidentally discovered with imaging studies performed for other reasons. All 10 cases were confirmed pathologically by means of complete resection.

MR images were obtained using a superconducting magnet operating at 1.5 T (n = 3), at 1.0 T (n = 1), or at 0.5 T (n = 6). Both T1-weighted (repetition time msec / echo time msec =450-800 / 15-25) SE images and T2-weighted (1500-4500 / 80-120) SE images with a section thickness of 10 mm were obtained; the section gap was 2 mm, the image matrix was 256 x 162 to 180 pixels. Dynamic MR examinations were performed with a T1-weighted gradient echo sequence (190/6) at 1.5 T (n = 1), and with a T1-weighted SE sequence (140-150/15-20) at 1.5 T (n = 3), at 1.0 T (n = 1), and at 0.5 T (n = 6). One slice or two to four contiguous slices were obtained. Gadopentetate dimeglumine (0.2 mL/kg body weight) was manually injected (1 mL/s) through an antecubital vein. Dynamic MR images were obtained immediately after the injection and then every 40 s for 5 min. Ten minutes after administration of gadopentetate dimeglumine, post-contrast T1-weighted SE images were obtained in the same plane as used for the unenhanced images.

The MR images were evaluated in conference by two radiologists (Y.Z., H.N.) with knowledge of the diagnosis of ganglioneuroma, but without knowledge of the histologic findings. The radiologists reached a consensus regarding the following features: (a) tumorous morphologic features including size and

capsule; (b) signal intensity and signal homogeneity; (c) contrast enhancement; (d) so-called whorled appearance; and (e) dynamic enhancement pattern. The capsule was determined to be present when a ring-like enhancement structure was identified to partially or completely surround the tumor on post-contrast T1-weighted images, and the whorled appearance was present when a linear, curvilinear, or nodular structure of low intensity was demonstrated within the tumor on T1- and/or T2-weighted images.

Low signal intensity was defined as equal to or less than that of muscles on both T1-weighted images and T2-weighted images, intermediate intensity as greater than that of muscles but less than that of fat on both T1-weighted images and T2-weighted images, high intensity as equal to or higher than that of fat on T1-weighted images but less than that of water on T2-weighted images, and markedly high intensity as equal to that of water on T2-weighted images (1).

For conventional histologic observations, formalin-fixed paraffin embedded sections were stained with hematoxylin-eosin. The sections were also stained with Azan and Elastica van Gieson methods for determining the collagenous tissues and vascular components, respectively. In all cases, immunohistochemical staining for S-100 protein and neuron specific enolase were performed for confirmation of neurally-derived cells and for highlighting neurites. Both primary antibodies and an LSAB staining kit were obtained from DAKO Japan (Kyoto, Japan) and staining proceeded according to the manufacturer's instructions. These sections were reviewed by a board-certified pathologist (S.K.) without knowledge of the MR findings, and all cases were confirmed as benign ganglioneuromas. Histologic findings were described, focusing on (a) tumor capsule, (b) Schwann cells with sheathed neurites and ganglions, (c) interstitial collagen, and (d) stromal myxoid tissues. The amount of myxoid stroma, fibers, and cellular components were analysed on visual appearances.

We retrospectively reviewed the T1-, T2-weighted images and the dynamic MR images, directly comparing the findings with the microscopic histologic findings. Because some resected specimens were not cut in the exact same plane as those of MR images, correlation of pathologic descriptions by the pathologist with image findings on a site-to-site basis could not be obtained.

RESULTS

Morphologic features

The mean largest diameter of the tumors was 85 mm (range, 32-120mm). Capsules were observed as thin and not striking collagen bundles (Fig. 1D) at histologic examination in all tumors. The boundaries between capsule and tumor components were indistinct in some cases. Surrounding normal tissue, however, was not observed in any specimens. All the tumors were encapsulated and well circumscribed. A ring-like enhancement structure on post-contrast T1-weighted images, which suggested the presence of

a capsule, was depicted in five cases (Fig. 1C). A definite low intensity ring around the tumor on T1- or T2-weighted images, however, was not present in any case.

Signal intensity and contrast enhancement versus amount of myxoid stroma, fibers, and cellular components

In four tumors, histologic examination revealed a large amount of myxoid stroma, a relatively small number of Schwann cells with sheathed neurites and ganglions, and relatively few collagen fibers (Fig. 1E). Some Schwann cells and collagen fibers interlaced linearly, curvilinearly, and/or nodularly, and scattered against the myxoid stroma background (Figs. 2E and 3D). On T1-weighted images, these four tumors had homogeneously low signal intensity and the whorled appearance was not definitively observed in any tumor (Figs. 1A, 2A, and 3A). On T2-weighted images, the tumors were inhomogeneous but with predominantly markedly high signal intensity (Figs. 1B, 2B, and 3B), and a whorled appearance, which corresponded to interlacing bundles of Schwann cells and collagen fibers on histologic specimens, was observed sporadically within these tumors (Figs. 2B and 3B). These four tumors were inhomogeneous on post-contrast T1-weighted images, with mixed slight (or no) and moderate enhancement (Figs. 1C, 2C, and 3C) which corresponded chiefly to the myxoid stroma and the components of fibers and cellularity, respectively.

In five tumors, histologic examination revealed numerous Schwann cells with sheathed neurites and ganglions, abundant collagen fibers, and scanty myxoid stroma (Fig. 4D). Four of these five tumors had homogeneously low signal intensity (Fig. 4A) and one, which had a fat component within the tumor, had mixed low and intermediate signal intensity on T1-weighted images. Four of the five tumors had mixed intermediate and high signal intensity (Fig. 4B) and one had high signal intensity on T2-weighted images. Post-contrast T1-weighted images showed minimally inhomogeneous moderate enhancement in two (Fig. 4C), minimally inhomogeneous slight enhancement in two, and inhomogeneous moderate enhancement in one tumor. The degree of enhancement heterogeneity in these five tumors was less than that in the four tumors with a large amount of myxoid stroma. Linearly and thickly interlacing bundles of Schwann cells and collagen fibers were observed in only one tumor and had a whorled appearance on T1- and T2-weighted images. Post-contrast T1-weighted images were only partially enhanced in this region. Histologically, the bundles of Schwann cells and collagen fibers of this tumor were not different from that of other tumors.

In the remaining tumor, striking degeneration and hemorrhage were observed. Furthermore, vessels were relatively numerous as compared with other tumors. Neuroblasts, however, which suggest the potential of malignancy, were not observed at histologic examination (Fig. 5E). This tumor had mixed low and intermediate signal intensity on T1-weighted images and was inhomogeneous but predominantly

intermediate signal intensity on T2-weighted images. Post-contrast T1-weighted images showed inhomogeneous moderate enhancement (Figs. 5A, 5B, and 5C).

Dynamic enhancement pattern

On dynamic MR studies, all but one tumor lacked early enhancement, however enhancement gradually increased (Fig. 2D). The single exception was the above-mentioned degenerative tumor with a relatively early enhancement pattern, followed by partial washout of contrast material (Fig. 5D).

DISCUSSION

Ganglioneuroma is a rare benign tumor arising from sympathetic ganglia. Early detection, however, is important because complete resection results in a cure and the tumor rarely undergoes malignant transformation (2-6). Ganglioneuromas occur in all age groups but are more common before the age of 40 y, and are most often located in the posterior mediastinum, followed by the retroperitoneum and cervical region (9). These characteristics of age and anatomic distribution are consistent with those of our patients, that is, 7 of 10 patients were less than 40 y of age, and 8 tumors arose in the posterior mediastinum or retroperitoneum.

On T1- and/or T2-weighted images, the capsule is theoretically identified as a low intensity ring around the tumor. In the present study, however, T1- and T2-weighted images were not sensitive for this finding because the capsules were too thin to be observed. Moreover, ganglioneuromas do not occur in the parenchymal organs such as the liver and thyroid gland, so there is no parenchymal tissue to serve as a foil for the capsule. By contrast, the post-contrast T1-weighted image was more sensitive for viewing the capsule.

Ganglioneuromas were previously reported to have homogeneously low signal intensity on T1-weighted images and inhomogeneously high signal intensity on T2-weighted images (3,4,7,8). In the present study, ganglioneuromas had homogeneously low signal intensity on T1-weighted images, with the exception of the two tumors with hemorrhage or fat components, which had mixed low and intermediate signal intensity. On T2-weighted images, however, the tumors could be classified roughly into two types, markedly high signal intensity tumors and intermediate to high signal intensity tumors. Histologic examination confirmed that the amount of myxoid stroma, collagen fibers, and cellular components varied in ganglioneuroma. Comparison of tumor signal intensity on T2-weighted images with pathologic findings showed a good correlation in all tumors, except the degenerating tumor. A large amount of myxoid troma with relatively few cellular components and collagen fibers was observed in the tumor with markedly high signal intensity, while there was an abundance of cellular components and collagen fibers with relatively scarce myxoid stroma in the tumor with intermediate to high signal intensity. Accordingly,

the proportion of myxoid stroma to cellular components and collagen fibers influenced the tumor signal intensity on T2-weighted images to a large extent. Ganglioneuromas show different degrees of contrast enhancement (1,7): some show no enhancement, while others show inhomogeneous moderate or marked enhancement. In the present study, tumors showed inhomogeneous moderate (eight cases) or slight (two cases) enhancement. Comparison of tumor contrast enhancement with histologic findings revealed that the intensity of enhancement corresponded well to the histologic component and the degree of enhancement heterogeneity was also consistent with that of histologic heterogeneity. This finding supports the conclusion that different enhancement is due to variations in the myxoid stroma volume and in the amount of cellular components and collagen fibers. Despite the small number of patients in this series, the good correlation between MR imaging and histology suggests that histologic features can be estimated in the preoperative evaluation by analyzing the tumor signal intensity and the tumor enhancement.

One of the MR imaging characteristics of ganglioneuroma is a whorled appearance. Based on the results of a previous MR-pathologic correlation study that included two ganglioneuromas (8) and the results of the present study, this appearance is caused by interlacing bundles of Schwann cells and collagen fibers within the tumor. Five tumors had this appearance on T2-Weighted images in contrast to only one on the T1-weighted images. This might be because the difference of signal intensity between the myxoid stroma and the areas of interlacing bundles of Schwann cells and collagen fibers is greater on T2-weighted images. The tumor with a whorled appearance on T1-weighted images had thicker interlacing bundles of Schwann cells and collagen fibers than other tumors. Therefore, the visibility of a whorled appearance is also thought to be influenced by Its thickness. In this tumor, however, the area of the thicker interlacing cellular components and fibers was not completely enhanced on post-contrast T1-weighted images. The cause is not known. Histologically, this area was not different from that of other tumors. The timing of the scan might also influence the contrast enhancement. If post-contrast scans were performed after 10 min, better enhancement might be observed.

In all tumors, except one with degeneration, lack of early enhancement but gradually increasing enhancement was observed. In a previous study that included five ganglioneuromas examined with dynamic MR imaging, the same enhancement pattern was reported (1). Consequently, this pattern can be considered as characteristic of ganglioneuroma. The early enhancement is thought to be due to relative hypervascularity and capillary permeability. By contrast, delayed enhancement is caused by slow diffusion of the contrast medium into the extravascular space (1). Therefore, fibrous tissue having a large extravascular space and low blood supply demonstrates a delayed and prolonged enhancement. The single exceptional enhancement pattern was relatively early enhancement, followed by partial washout of

the contrast material. Based on previous reports (1) and our own experience, this enhancement pattern is observed in neuroblastoma, ganglioneuroblastoma, or other malignancies. There was no evidence to suggest malignancy, however, at histologic examination. Early enhancement might correlate with the relatively numerous vessels found within this tumor.

The differential diagnosis of ganglioneuroma includes neuroblastoma, ganglioneuroblastoma, neurofibroma, schwannoma, adrenal adenoma, adrenocortical carcinoma, and pheochromocytoma (1,2,5-8). Neuroblastomas and ganglioneuroblastomas have similar signal intensity compared to ganglioneuromas (7). Dynamic MR studies cannot be easily applied in younger cases, although there is usually marked early enhancement in neuroblastomas and ganglioneuroblastomas (1). Neuroblastomas and ganglioneuroblastomas are more aggressive tumors than ganglioneuromas, and the majority of them usually have an irregular contour, sometime with invasion to adjacent organs and encasement of vessels (2,4,7). Neuroblastomas are often associated with metastases to bone, regional lymph nodes, liver, and skin (9), while ganglioneuromas are not. Furthermore, neuroblastomas and ganglioneuroblastomas occur in a younger age group and the pattern of calcification on computerized tomography is more commonly amorphous and coarse rather than discrete and a punctate pattern observed in ganglioneuroma (1,2).

The most problematic differentiation is between ganglioneuroma and schwannoma or neurofibroma. It is difficult to differentiate these tumors with signal intensity characteristics alone. Schwannomas reveal late enhancement similar to that of ganglioneuroma, and curvilinear or nodular low intensity regions composed of collagenous fibrous tissue are observed within neurofibroma as well (8,10-12). Schwannomas and neurofibromas, however, are predominantly round and might produce bony erosion or destruction, whereas the majority of ganglioneuromas are flat and elongated and usually do not result in bony changes (2-9,13). Moreover, cystic degeneration frequently noted in schwannomas might be helpful in making the distinction (10-11), because it is not found in ganglioneuromas. On the other hand, neurofibromas are nonencapsulated tumors (5), and the possibility of neurofibroma can be excluded if the findings suggest the presence of a capsule.

Adrenal adenomas show mild early enhancement and quick washout, and pheochromocytomas and adrenocortical carcinomas reveal strong early enhancement and slower washout (14-15). Furthermore, local invasion into vascular structures is present in more than 50% of adrenocortical carcinoma cases (6).

The results of the present study suggest that the MR features of ganglioneuroma are well correlated with histologic findings. Ganglioneuroma shows different signal intensity and signal homogeneity, which depend on the amount and distribution of myxoid stroma, fibers, and cellular components. Ganglioneuroma usually demonstrates lack of early enhancement but gradually increasing enhancement on contrast-enhanced dynamic MR imaging. When a well-encapsulated mass with this enhancement

pattern is found in the posterior mediastinum, retroperitoneum, or cervical region, ganglioneuroma should be included in the differential diagnosis.

REFERENCES

1. Ichikawa T, Ohtomo K, Araki T, et al. Ganglioneuroma: computed tomography and magnetic resonance features. Br J Radiol 1996; 69:114-121.

2. Lee JY, Lee KS, Han J, et al. Spectrum of neurogenic tumors in the thorax: CT and pathologic findings. J Comput Assist Tomogr 1999; 23: 399-406.

3. Radin R, David C, Goldfarb H, Francis IR. Adrenal and extra-adrenal retroperitoneal ganglioneuroma: Imaging findings in 13 adults. Radiology 1997; 202: 703-7.

4. Daneman A. Adrenal neoplasms in children. Seminars in Roentgenology 1988; 23: 205-15

5. Strollo DC, Rosado-de-Christenson LML, Jett JR. Primary mediastinal tumors part II. tumors of the middle and posterior mediastinum. Chest 1997; 112:1344-57.

6. Primary adrenal ganglioneuroma: CT findings in four patients. AJR 1997; 169: 169-71.

7. Wang YM, Li YW, Sheih CP, Hsu JCY. Magnetic resonance imaging of neuroblastoma, ganglioneuroblastoma, and ganglioneuroma. Acta Paed Sin 1995; 36:420-4.

8. Sakai F, Sone S, Maruyama A, et al. Intrathoracic neurogenic tumors: MR-pathologic correlation. AJR 1992; 159: 279-83.

9. Enzinger FM, Weiss SW. Soft tissue tumor. 3rd ed. St Louis, Mo: Mosby-Year Book, 1995: 929-64

10. Hayasaka k, Tanaka Y, Huppert P, Claussen CD. MR findings in primary retroperitoneal schwannoma. Acta Radiologica 1999; 40: 78-82.

11. Takatera H, Takiuchi H, Namiki M, Takaha M, Ohnishi S, Sonoda T. Retroperitoneal schwannoma. Urology 1986; 28: 529-31.

12. Ikushima I, Korogi Y, Kuratsu J, et al. Dynamic MRI of meningiomas and schwannomas: is differential diagnosis possible? Neuroadiology 1997;39:633-8.

13. Ikezoe J, Sone S, Higashibara T, et al. CT of intrathoracic neurogenic tumors. Europ J Radiol 1986; 6: 266-9.

14. Krestin G, Steinbrich W, Friedmann G. Adrenal Masses: Evaluation with fast gradient-echo MR imaging and Gd-DTPA-enhanced dynamic studies. Radiology 1989; 171:675-80.

15. Ichikawa T, Fujimoto H, Murakami K, Ishikawa N, Itami J and Arimizu N. Extraadrenal pheochromocytoma: dynamic demonstration at 0.5 tesla. Clinical Imaging 1992; 16:187-9

日本財団補助金による
２０００年度日中医学学術交流促進事業

⑤．在留中国人研究者研究助成

(13)肝類洞内皮細胞のアポトーシスの制御機構に関する研究

肝類洞内皮細胞のアポトーシスの制御機構に関する研究

張燕軍

中国人民解放軍総医院　軍医進修学院　消化内科

順天堂大学　医学部　消化器内科

要旨

肝類洞内皮細胞は種種の肝疾患においてその早期から障害を受けることが知られている．近年肝阻血再灌流障害や肝移植時に肝類洞内皮細胞がアポトーシスに陥ることが明らかにされた。また、アミノ酸の1種であるグリシンには細胞保護作用があることが知られているが、近年、移植肝をグリシンで処置することにより、グラフト生着率が向上することが報告され注目されている。一方，肝類洞内皮細胞の単離および初代培養の系が確立され，この細胞の増殖のみならず生存に各種増殖因子，とくにVascular Endothelial Growth Factor(VEGF)が必須であることが明らかとなった．本研究の目的は類洞内皮細胞の増殖因子枯渇時に生じる細胞死のメカニズムを検討し，さらに細胞死を制御する方法を検討することにある．(方法)Wistar 系雄性ラットよりコラゲナーゼ灌流およびPercollによる比重遠心法で肝類洞内皮細胞を単離し、牛胎児血清およびVEGF含む各種増殖因子を添加したEBM-2培地を用いてtype 1 collagen coated dish 上で3日間培養した後、実験に供した。培地をVEGF非添加EBM-2に交換し、4~12時間後に細胞を固定し、terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT)-mediated d-uridine triphosphate (dUTP)-biotin nick end labeling (TUNEL)法を用いてアポトーシスの検出を行った。さらに、この類洞内皮細胞アポトーシスに対する各種アミノ酸の効果および機序について検討した。また、この際の類洞内皮細胞のBcl-2蛋白の変化をWestern blot法で確認した。(結果および考察)1、まず、VEGF枯渇時の類洞内皮細胞の形態変化を位相差顕微鏡で観察した。培養三日目の類洞内皮細胞は、紡錘状に伸展した形態をしている。しかしその後 VEGF を抜いた培地に交換してインキュベートすると細胞の伸展は阻害されdishから剥離する傾向を認めた。従ってVEGF枯渇によって類洞内皮細胞に細胞死が惹起されるものと考えられた。2、この類洞内皮細胞のVEGF枯渇時の変化がアポトーシスであるかどうかを検討するために、TUNEL 法を用いて染色した。VEGF存在下の類洞内皮細胞では TUNEL 陽性細胞はわずかに認められるのみであったが、VEGF枯渇後4時間で TUNEL 陽性細胞の増加を認め、16時間以降はほとんどすべての細胞がTUNEL 陽性となった。濃染している核には凝縮や分断化が認められ、これらの細胞の大半がアポトーシスに陥っているものと考えられた。3、次にVEGF枯渇によるアポトーシスに対するグリシンの影響を検討するために VEGF 枯渇と同時に培地中に1mM~10mM のグリシンを添加し、TUNEL 染色を試みた。グリシンは VEGF 枯渇によるアポトーシスを有意に抑制した。4、このVEGF 枯渇によってアポトーシスの抑制作用は、グリシンに特有のものであるかどうかを検討するために、他のアミノ酸(アラニン、バリン、 グルタミン、 メチオニン、セリン)を用いて同様に実験を行った。これらの他のアミノ酸には、アポトーシス抑制作用が認められなかった。すなわちアポトーシスの抑制作用はグリシンに特有のものと考えられた。5、グリシンには様々な作用があることが知られており、その一つとしてレセプターを介した反応があることが主に中枢神経系で知られている。ここで認められたグリシンのアポトーシス抑制作用がグリシンレセプターを介した反応であるかどうかを明らかにするために、グリシンレセプターの特異的アンタゴニストであるストリキニーネを用いて

検討した。グリシンのアポトーシス抑制効果は1μM のストリキニーネによって有意に阻害されることが明らかとなった。つまり、グリシンのアポトーシス抑制効果の少なくとも一部にはグリシンレセプターを介した機序が関与している可能性があると考えられた。6、さらに、VEGF 枯渇時のアポトーシス関連蛋白の変動について検討した。他の血管内皮細胞を用いた検討では VEGF がアポトーシス抑制蛋白である Bcl-2 をアップレギュレートすることが報告されている。そこで類洞内皮細胞の VEGF 枯渇時による Bcl-2 の蛋白レベルがグリシンにより変化するかどうかを Western blot 法で検討した。VEGF 枯渇時には Bcl-2 が減少することおよびグリシンは VEGF 枯渇による Bcl-2 減少を抑制する作用を有することが明らかになった。

以上の検討より、グリシンが類洞内皮細胞のアポトーシスを抑制することによって肝移植時などにおける阻血再灌流障害を軽減する可能性が示唆された。

KEY WORDS

cell death, glycine receptors, strychnine, chloride channels, Bcl-2

OBJECTIVES

The aim of this study was: (1) to determine the death pattern of primary cultured sinusoidal endothelial cells (SECs) due to VEGF deprivation; (2) to investigate the effect of glycine on VEGF deprivation-induced apoptosis in SECs; and (3) to explore mechanism by which glycine prevents apoptosis in SECs.

METHODS

Isolation and primary culture of Liver Sinusoidal Endothelial Cells:

SECs were isolated from male Wister rats weighing 350 to 400g (Charles River Japan Inc. Saitama, Japan) by collagenase perfusion and differential centrifugation using Percoll (Amersham Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Sweden) according to the method described by F. Braet et al with slight modifications.[1] Briefly, the liver was perfused *in situ* through the portal vein with Gey's balanced salt solution (GBSS) without calcium at 37°C for 10 minutes at a flow rate of 20 mL/min, followed by GBSS with calcium containing 0.05% collagenase A (Roche Diagnostics Co., Manheim, Germany) at 37°C for 10 minutes at a flow rate of 10 mL/min. Subsequently the liver was excised and further digested by shaking in 100 mL fresh GBSS with calcium containing 0.05% collagenase A, 0.001% DNase (Roche Diagnostics Co.) and 5.3 mL of heat-inactivated fetal bovine serum (FBS) for 5 minutes at 37°C. The cell suspension was then filtered through nylon gauze and centrifuged at 100g for 4 minutes. The supernatant enriched in SECs was centrifuged for 6 minutes at 350g, and then the pellet was layered on the double layer of Percoll gradient (25% and 50%) and centrifuged immediately at 900g for 20 minutes. The fraction of SECs was collected and washed in phosphate-buffered saline (PBS). The viability of SECs judged by the Trypan blue exclusion test was above 95% in all isolations. The purity of SECs examined by a phase contrast microscope was 89.45%±3.46%. Furthemore, the purity of cultured SECs was confirmed by the uptake of acetylated low-density lipoprotein and ovalbumin (data not shown). Cells were seeded onto collagen-coated polyethylene dishes (Sumilon, Sumitomo Bakelite Co., Tokyo, Japan) and cultured in EBM-2 medium (Bio Whittaker Co., Walkersville, MD), supplemented with the EGM-2 bullet kit (Bio Whittaker Co.; containing long R insulin-like growth factor-1, human epidermal growth factor, human fibroblast growth factor-B) and 20ng/mL human recombinant VEGF (Wako Junyaku Co., Osaka, Japan) in humidified air with 5% CO_2 at 37°C for 3 days before experiments.

Induction of Cell Death in Primary cultured SECs and Evaluation of Apoptosis:

At day 3 of culture, cell death of primary cultured SECs was induced by exchanging the culture media with VEGF-free EBM-2 (VEGF deprivation). Cells were then further cultured in a CO_2 incubator for up to 24 hours. Morphological changes of SECs were observed and photographed under a phase-contrast microscope (F-601 AF Quartz Data, Nikon Optics, Tokyo, Japan).

Apoptosis of SECs was detected by a terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT)-mediated d-uridine triphosphate (dUTP)-biotin nick end labeling (TUNEL) technique using a fluorescein apoptosis detection system kit (Apoptosis Detection System, Fluorescein, Promega Corp., Madison, WI) according to the manufacturer's instructions. This method measures the fragmented DNA by catalytically incorporating fluorescein-12-dUTP at the 3'-OH ends generated by DNA fragmentation using the TdT enzyme. Briefly, cells were fixed with 4% formalin, permeabilized with 0.2% Triton X-100 in PBS on ice, and incubated in an equilibration buffer containing 5 μ mol/L fluorescein-12-dUTP and 25 U TdT for 1 hour at 37°C to stain fragmented DNA. Subsequently, 0.2 μ g/mL propidium iodide in PBS was applied for 15 minutes to stain both apoptotic and nonapoptotic cells. Thus, propidium iodide stains both apoptotic and nonapoptotic cells red throughout the cytoplasm, whereas fluorescein-12-dUTP is incorporated at the 3'-OH ends of fragmented DNA, resulting in localized green fluorescence within the nucleus of apoptotic cells. The stained cells were observed under a fluorescence microscope (Axiophot ZVS™ 3C75DE, Carl Zeiss Inc,Goleta, CA) and the photographs were taken. To calculate the percentage of apoptotic SECs, TUNEL-positive nuclei were counted in a middle-power field (200×). Four random fields were examined in a blinded manner in each preparation.

Western Blotting for Bcl-2:

Cultured SECs were washed with ice-cold PBS and harvested by scraping in cold PBS, followed by a centrifugation at 1,500 rpm for 5 minutes. The cell pellet was then homogenized in a buffer containing 66 mmol/L Tris, pH 8.0; 5 mmol/L ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), 1% Triton

X-100, and protease/phosphatase inhibitors [40 μg/mL Bestatin (Roche Diagnostics Co.,), 20 mmol/L β-glycerophosphate (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO), 10 mmol/L p-nitrophenyl phosphate (PNPP; Roche Diagnostics Co.), 500 μmol/L Pefabloc (Roche Diagnostics Co.), 700 ng/mL Pepstatin A (Roche Diagnostics Co.), 2 μg/mL Aprotinin (Roche Diagnostics Co.), 500 μmol/L Na3VO4 (Sigma Chemical), and 500 ng/mL Leupeptin (Roche Diagnostics Co.)]. After centrifugation at 15,000 rpm for 15 minutes, the supernatant was collected and protein concentration was determined using a Bio-Rad protein assay kit (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA)). Aliquots containing equal amounts of proteins were suspended in sodium dodecyl sulfate (SDS)-glycerol loading buffer (62.5 mmol/L Tris pH 6.8, 2% SDS, 10% glycerol, 5% mercaptoethanol, 0.01% bromphenol blue), and separated by 10% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis and transferred to a polyvinylidene fluoride (PVDF) membrane (Immobilon-P, Millipore Corp., Bedford, MA) using a semidry transfer apparatus. Membranes blocked with 20% FBS in Tris-buffered saline containing 0.1% Tween-20 (TBS-T) for nonspecific bindings of antibodies were hybridized with a polyclonal rabbit anti-Bcl-2 antibody (Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA) in 20% FBS in TBS-T for 2 hours at room temperature, followed by incubation with a horseradish peroxidase-conjugated anti-rabbit IgG (Santa Cruz Biotechnology Inc.) in 20% FBS in TBS-T for 1 hour at room temperature. An enhanced chemiluminescence (ECL) detection kit (Amersham-Pharmacia Biotech, Denver, CO) was applied for the detection of specific bands according to the manufacturer's instructions.

Statistical Analysis:

Data were expressed as mean ±SD, and analysis of variance (ANOVA) and the Tukey's post-hoc test were used for the multiple comparisons of the differences in mean values. $P<0.05$ was selected before the analysis to determine the significance.

RESULTS

VEGF deprivation causes apoptosis in primary cultured rat SECs:

Under a phase contrast microscope, the primary cultured rat SECs showed spindle-like shapes and were nearly confluent at 3 days of culture. However, cells tended to shrink during the time course of VEGF deprivation, and finally, cells started detaching from dishes in 24 hours of VEGF deprivation, indicating that VEGF deprivation caused cell death in SECs.

To clarify whether the cell death of SECs as a result of VEGF deprivation is apoptosis, TUNEL staining was performed. As expected, most cells 3 days after culture in EBM-2 medium containing VEGF were negative for TUNEL staining, and TUNEL-positive cells were only 2.0% in this condition. However, the TUNEL-positive cells start to increase in number 4 hours after VEGF deprivation, and almost all cells were TUNEL-positive 16 hours after VEGF deprivation. The nuclei of TUNEL-positive cells showed condensation and fragmentation under a high-power view, representing typical features of apoptotic cells (data not shown).

Effects of Glycine on VEGF deprivation-induced apoptosis of SECs:

To evaluate the protective effect of amino acids against the apoptosis of SECs, we utilized this VEGF deprivation-treated apoptosis in primary cultured SECs. Interestingly, this increase in TUNEL-positive cells after VEGF deprivation was significantly prevented by addition of glycine (1-10 mmol/L) in the medium in a dose dependent manner. The percentages of apoptotic cells in the presence of glycine were almost half 4 hours and 8 hours after VEGF deprivation. To investigate whether this antiapoptotic effect on SECs is glycine-specific, the effects of other amino acids were examined. The percentages of apoptotic cells 8 hours after VEGF deprivation were 59.80%± 13.37%, 65.96%± 10.40%, 60.53%± 7.95%, 62.11%± 4.98% and 71.27%± 15.16% in the presence of 10 mmol/L alanine, valine, glutamine, methionine and serine, respectively, which had no significant difference as compared with VEGF-deprived controls. These observations indicated that the amino acids other than glycine tested here had no protective effect on the apoptosis in primary cultured SECs, and the effect of glycine was unique.

Strychnine Antagonizes the Effect of Glycine on the Apoptosis in SECs:

To test the hypothesis that this antiapoptotic effect of glycine in SECs is mediated through glycine receptor on the plasma membrane, we tried strychnine, a putative glycine receptor antagonist[2]. The percentage of TUNEL-positive cells 8 hours after VEGF deprivation was 40.3% ±2.0 % when strychnine (1 μmmol/L) was added in combination with glycine (10 mmol/L),

which was significantly higher than that of glycine alone ($P<0.05$). In contrast, the percentage of TUNEL-positive cells 8 hours after VEGF deprivation in the presence of strychnine (1 μ mol/L) was 50.8%±9.3 %, which was not significantly different from VEGF deprivation alone. These findings indicated that a low dose of strychnine inhibited, at least in part, the antiapoptotic effect of glycine in primary cultured SECs.

Bcl-2 Expression in SECs Under VEGF Deprivation:

The expression of Bcl-2, an antiapoptotic protein, in SECs was detected by Western blotting. As expected, the 25- to 26-kd specific band for Bcl-2 was detected clearly in the control SECs 3 days after inoculation. However, the expression of Bcl-2 was decreased dramatically in the SECs 8 hours after VEGF deprivation. Surprisingly, the decrease of Bcl-2 as a result of VEGF deprivation was prevented almost completely in the presence of 10 mmol/L glycine.

DISCUSION

Necrosis is a passively uncontrolled process and usually occurs in large cell groups, which characterized morphologically by cell swelling and bursting, nuclear and cytoplasmic lysis. However, apoptosis (programmed cell death) is a tightly controlled process and typically occurs in single cell, which characterized morphologically by cell shrinkage, nuclear and cytoplasmic blebbing, disintegration of nuclear membrane and formation of apoptosis bodies. The activation of the *de novo* synthesis of endonucleases results in fragmentation of DNA, which can be detected by TUNEL method. Deprivation of growth factors is well known to induce apoptosis in various types of cells. In the current study, TUNEL-positive SECs increased dramatically during the time course of VEGF deprivation, and the TUNEL-positive nuclei showed condensation and fragmentation in shape, which are characteristic morphological features of apoptosis. According to the characteristics of the TUNEL positive nuclei, we demonstrates that VEGF deprivation caused apoptotic cell death in primary cultured SECs, which constitutes a promising system for studying the protective chemicals of apoptosis of SECs.

It was reported that SECs express VEGF receptors (Flt-1 and KDR/Flk-1) abundantly, and VEGF maintains isolated SECs for an extended time course in culture, indicating that VEGF is one of the essential survival factors for SECs[3]. More recently, Moriga et al. reported that VEGF is preventive against sinusoidal endothelial damage and apoptosis induced by cold ischemia-reperfusion.[4] These findings support the hypothesis that VEGF plays a crucial role in the damage of SECs during cold ischemia-reperfusion, including liver transplantation. Therefore, we evaluated the effect of glycine on apoptotic cell death in SECs induced by VEGF deprivation. Interestingly, glycine prevented this VEGF deprivation-induced apoptosis in SECs in a dose-dependent manner. Furthermore, the other amino acids we tested (alamine, valine, glutamine, methionine, and serine) had no effect in this model, which indicated that this antiapoptotic effect of glycine is a unique property rather than a nonspecific effect of amino acids. It is concluded, therefore, that glycine has an antiapoptotic effect in SECs.

It is well known that glycine acts as a neurotransmitter in the central nervous system, and a glycine receptor has been identified and well characterized. The glycine receptor in the central nervous system constitutes a chloride channel on the plasma membrane, and glycine causes the influx of chloride ion, leading to hyperpolarization of the plasma membrane, thereby counteracting depolarization stimuli.[5] Recently, Kupffer cells, resident macrophages in the liver, have been demonstrated to possess a similar type of receptors, by which glycine prevents the production of inflammatory cytokine.[6] These observations suggest a possibility that SECs contain a similar type of glycine receptor on the plasma membrane. To clarify whether the antiapoptotic effect of glycine observed here is through this possible glycine receptors, strychnine, a putative glycine receptor antagonist, was tested. Interestingly, the antiapoptotic effect of glycine was antagonized in part by a low dose of strychnine (1 μ mol/L). It is postulated, therefore, that SECs most likely contain a glycine receptor, though which glycine elicits antiapoptotic properties. It is not clear how the glycine receptor modulates apoptotic cell death, but one possibility is that this glycine receptor/chloride channel increased the chloride influx, which may alter the osmolarity of cytoplasm, thereby preventing the shrinkage of cells during the apoptotic process.

On the other hand, Bcl-2, an antiapoptotic protein locating on the mitochondrial membrane,[7] is recognized as one of the key factors in growth factor deprivation-induced apoptosis in endothelial cells. Indeed, it has been reported that VEGF increases the expression of Bcl-2 in human umbilical

vein endothelial cells, and the overexpression of Bcl-2 prevents the apoptotic cell death caused by growth factor deprivation in human umbilical vein endothelial cells.[8] Furthermore, the adenoviral gene transfer of Bcl-2 has been shown to reduce ischemia-reperfusion injury in the liver.[9] In the present study, it was demonstrated that Bcl-2 protein levels decreased dramatically after 8 hours of VEGF deprivation in isolated SECs, which may be one of the key regulating factors of apoptosis under this condition. Surprisingly, glycine prevented this decrease of Bcl-2 protein levels almost completely. Although the precise mechanisms by which glycine prevented the decrease of Bcl-2 is unclear, these findings support the hypothesis that glycine prevents apoptosis of SECs by maintaining Bcl-2 protein levels.

In conclusion, glycine is protective against apoptotic cell death in SECs. Glycine most likely acts through glycine receptor on SECs, and it also prevents the decrease of Bcl-2 under VEGF deprivation. This antiapoptotic effect of glycine in SECs might be involved, at least in part, in the mechanism by which glycine prevents various types of liver injury in which apoptosis of SECs plays an important role.

REFERENCES

1. Bréat F, De Zanger R, Sasaoki T, Baekeland M, Janssens P, Smedsrød B, et al. Assessment of a method of isolation, purification, and cultivation of rat liver sinusoidal endothelial cells. Lab Invest 1994; 70: 944-952.
2. Young AB, Snyder SH. The glycine synaptic receptor: evidence that strychnine binding is associated with the ionic conductance mechanism. Proc Natl Acad Sci USA 1974; 71: 4002-4005.
3. Yamane A, Seetharam L, Yamaguchi S, Gotoh N, Takahashi T, Neufeld G, et al. A new communication system between hepatocytes and sinusoidal endothelial cells in liver through vascular endothelial growth factor and FLT tyrosine kinase receptor family (Flt-1 and KDR/Flk-1). Oncogene 1994; 9: 2683-2690.
4. Moriga T, Arii S, Takeda Y, Furuyama H, Mizumoto M, Mori A, et al. Protection by vascular endothelial growth factor against sinusoidal endothelial damage and apoptosis induced by cold preservation. Transplantation 2000; 69: 141-147.
5. Langosch D, Becker CM, Betz H. The inhibitory glycine receptor: a ligand-gated chloride channel of the central nervous system. Eur J Biochem 1990; 194: 1-8.
6. Ikejima K, Qu W, Stachlewitz RF, Thurman RG. Kupffer cells contain a glycine-gated chloride channel. Am J Physiol 1997; 272(6 Pt 1): G1581-G1586.
7. Reed JC. Bcl-2 and the regulation of programmed cell death. J Cell Biol 1994; 124: 1-6.
8. Gerber HP, Dixit V, Ferrara N. Vascular endothelial growth factor induces expression of the antiapoptotic proteins Bcl-2 and A1 in vascular endothelial cells. J Biol Chem 1998; 273: 13313-13316.
9. Bilbao G, Contreras JL, Eckhoff DE, Mikheeva G, Krasnykh V, Douglas JT, et al. Reduction of ischemia-reperfusion injury of the liver by in vivo adenovirus-mediated gene transfer of the antiapoptotic Bcl-2 gene. Ann Surg 1999; 230: 185-193.

Glycine Prevents Apoptosis of Rat Sinusoidal Endothelial Cells Caused by Deprivation of Vascular Endothelial Growth Factor

YAN-JUN ZHANG, KENICHI IKEJIMA, HAJIME HONDA, TSUNEO KITAMURA, YOSHIYUKI TAKEI, AND NOBUHIRO SATO

Apoptosis of sinusoidal endothelial cells (SECs) is one of the initial events in the development of ischemia-reperfusion injury of the liver. Glycine has been shown to diminish ischemia-reperfusion injury in the liver and improve graft survival in the rat liver transplantation model. Here, we investigated the effect of glycine on apoptosis of primary cultured rat SECs induced by vascular endothelial growth factor (VEGF) deprivation. Isolated rat SECs were cultured in EBM-2 medium supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) and growth factors including 20 ng/mL VEGF for days. SECs at 3 days of culture showed spindle-like shapes; however, cells started shrinking and detaching from dishes by VEGF deprivation. Apoptosis was detected by terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT)-mediated d-uridine triphosphate (dUTP)-biotin nick end labeling (TUNEL) staining in these conditions. Control SECs contained only a few percent of TUNEL-positive cells; however, they started increasing 4 hours after VEGF deprivation, and the percentage of TUNEL-positive cells reached about 50% at 8 hours and almost 100% at 16 hours after VEGF deprivation. Interestingly, this increase in TUNEL-positive cells after VEGF deprivation was prevented significantly when glycine (1-10 mmol/L) was added to the medium, the levels being around 60% of VEGF deprivation without glycine. Furthermore, strychnine (1 μmol/L), a glycine receptor antagonist, inhibited this effect of glycine, suggesting the possible involvement of the glycine receptor/chloride channel in the mechanism. Moreover, Bcl-2 protein levels in SECs were decreased 8 hours after VEGF deprivation, which was prevented almost completely by glycine. It is concluded that lycine prevents apoptosis of primary cultured SECs under EGF deprivation. (HEPATOLOGY 2000;32:542-546.)

Liver sinusoidal endothelial cells (SECs) have been demonstrated to play an important role in the development of various types of liver injury. In particular, the cell death of SECs is one of the initial events in ischemia-reperfusion injury in the liver,[1] and the degrees of injury in SECs have inversely correlated well with the graft survival in liver transplantation. Recently, several reports demonstrated that apoptosis occurs primarily in SECs after cold storage–reperfusion of the liver,[2-4] indicating that the apoptosis of SECs most likely plays a pivotal role in primary graft nonfunction. In this aspect, prevention of apoptosis in SECs appears to be important for successful liver transplantation. On the other hand, vascular endothelial growth factor (VEGF) is one of the key factors for the survival and proliferation of endothelial cells.[5] Indeed, the starvation of serum or growth factor has been used for the induction of apoptosis in various types of endothelial cells in culture. It was also reported that VEGF promotes extended survival of SECs in the primary culture.[6]

Glycine, a nonessential amino acid, is known to possess various physiological functions besides being a source of protein synthesis and metabolism. In the central nervous system, glycine works as a neurotransmitter, and a glycine-receptor is identified in nerve cells.[7] Furthermore, cyto- and organ-protective effects of glycine has been reported in renal tubules,[8-10] isolated hepatocytes,[11-13] and an ischemia-reoxygenation injury model using perfused liver *ex vivo*.[14] It has also been demonstrated that a diet containing glycine is preventive against endotoxin-induced mortality and liver injury[15] and early alcohol-induced liver injury in the rat.[16] Moreover, the organ rinse solution containing glycine increased graft survival in the rat liver transplantation model,[17] and intravenous administration of glycine to the recipient also improved survival in rat liver transplantation.[18] The effect of glycine rinse on cold ischemia-reperfusion injury in the liver was further confirmed in human liver transplantation.[19] More recently, Nishimura et al. reported that hypoxia-reoxygenation injury in isolated SECs was reduced by glycine.[20] These observations support the hypothesis that glycine is cytoprotective in various types of cells including SECs; however, it is not clear whether glycine can prevent apoptotic cell death in SECs. Therefore, the purpose of this study was to investigate the effect of glycine on VEGF deprivation–induced apoptosis in primary cultured SECs. Furthermore, we investigated the mechanism by which glycine prevents apoptosis in SECs. The preliminary account of this work has been reported elsewhere in abstract form.[21]

MATERIALS AND METHODS

Isolation and Primary Culture of Liver Sinusoidal Endothelial Cells. SECs were isolated from male Wistar rats weighing 350 to 400 g (Charles River Japan Inc., Saitama, Japan) by collagenase perfusion and differential centrifugation using Percoll (Amersham Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Sweden) according to the method described by Braet et al., with some modifications.[22] All animals used in this study received humane care, and the protocol was approved by the commit-

Abbreviations: SEC, sinusoidal endothelial cell; VEGF, vascular endothelial growth factor; GBSS, Gey's balanced salt solution; FBS, fetal bovine serum; PBS, phosphate-buffered saline; TdT, terminal deoxynucleotidyl transferase; dUTP, d-uridine triphosphate; TUNEL, TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling; TBS, Tris-buffered saline.

From the Department of Gastroenterology, Juntendo University School of Medicine, Tokyo, Japan.

Received May 3, 2000; accepted June 28, 2000.

Address reprint requests to Nobuhiro Sato, M.D., Ph.D., Professor and Chairman, Department of Gastroenterology, Juntendo University School of Medicine, 2-1-1, Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8421 Japan. E-mail: nsato@med.juntendo.ac.jp; fax: (81) 3-3813-8862.

Copyright © 2000 by the American Association for the Study of Liver Diseases.

0270-9139/00/3203-0015$3.00/0
doi:10.1053/jhep.2000.16605

tee of laboratory animals according to institutional guidelines. Briefly, the liver was perfused *in situ* through the portal vein with Gey's balanced salt solution (GBSS) without calcium at 37°C for 10 minutes at a flow rate of 20 mL/min, followed by GBSS with calcium containing 0.05% collagenase A (Roche Diagnostics Co., Mannheim, Germany) at 37°C for 10 minutes at a flow rate of 10 mL/min. Subsequently, the liver was excised and further digested by shaking in 100 mL fresh GBSS with calcium containing 0.05% collagenase A, 0.001% DNase (Roche Diagnostics Co.), and 5.3 mL heat-inactivated fetal bovine serum (FBS) for 5 minutes at 37°C. The cell suspension was then filtered through nylon gauze and centrifuged at 100g for 4 minutes. The supernatant enriched in SECs was centrifuged for 6 minutes at 350g, and then the pellet was layered on the double layer of Percoll gradients (25% and 50%) and centrifuged immediately at 900g for 20 minutes. The fraction of SECs was collected and washed in phosphate-buffered saline (PBS). The viability of isolated SECs judged by the Trypan blue exclusion test was above 95% in all isolations. The purity of SECs examined by a phase-contrast microscope was 89.5% ± 3.5%. Furthermore, the purity of cultured SECs was confirmed by the uptake of acetylated low-density lipoprotein and ovalbumin (data not shown). Cells were seeded onto collagen-coated polyethylene dishes (Sumilon, Sumitomo Bakelite Co., Tokyo, Japan) and cultured in EBM-2 medium (Bio Whittaker Co., Walkersville, MD), supplemented with the EGM-2 bullet kit (Bio Whittaker Co.; containing long R insulin-like growth factor-1, human epidermal growth factor, and human fibroblast growth factor-B) and 20 ng/mL human recombinant VEGF (Wako Junyaku Co., Osaka, Japan) in humidified air with 5% CO_2 at 37°C for 3 days before experiments.

Induction of Cell Death in Primary Cultured SECs and Evaluation of Apoptosis. At day 3 of culture, cell death of primary cultured SECs was induced by deprivation of VEGF by exchanging the culture media with VEGF-free EBM-2. Cells were then further cultured in a CO_2 incubator for up to 24 hours. Morphological changes of SECs were observed and photographed under a phase-contrast microscope (F-601 AF Quartz Data, Nikon Optics, Tokyo, Japan).

Apoptosis of SECs was detected by a terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT)-mediated d-uridine triphosphate (dUTP)-biotin nick end labeling (TUNEL) technique using a fluorescein apoptosis detection system kit (Apoptosis Detection System, Fluorescein, Promega Corp., Madison, WI) according to the manufacturer's instructions. Briefly, cells were fixed with 4% formalin, permeabilized with 0.2% Triton X-100 in PBS on ice, and incubated in an equilibration buffer containing 5 μmol/L fluorescein-12-dUTP and 25 U TdT for 1 hour at 37°C to stain fragmented DNA. Subsequently, 0.2 μg/mL propidium iodide in PBS was applied for 15 minutes to stain both apoptotic and nonapoptotic cells. Thus, propidium iodide stains both apoptotic and nonapoptotic cells red throughout the cytoplasm, whereas fluorescein-12-dUTP is incorporated at the 3'-OH ends of fragmented DNA, resulting in localized green fluorescence within the nucleus of apoptotic cells. The stained cells were observed under a fluorescence microscope (Axiophot ZVS 3C75DE, Carl Zeiss Inc., Goleta, CA), and photographs were taken. To calculate the percentage of apoptotic SECs, TUNEL-positive cells were counted in a middle-power field (200×). Four random fields were examined in a blinded manner in each preparation.

Western Blotting for Bcl-2. Cultured SECs were washed with ice-cold PBS and harvested by scraping, followed by a centrifugation at 1,500 rpm for 5 minutes. The cell pellet was homogenized in a buffer containing 66 mmol/L Tris (pH 8.0), 5 mmol/L ethylenediaminetetraacetic acid, 1% Triton X-100, and protease/phosphatase inhibitors (40 μg/mL bestatin [Roche Diagnostics], 20 mmol/L β-glycerophosphate [Sigma Chemical Co., St. Louis, MO], 10 mmol/L *p*-nitrophenyl phosphate [Roche Diagnostics], 500 μmol/L Pefabloc [Roche Diagnostics], 700 ng/mL pepstatin A [Roche Diagnostics], 2 μg/mL aprotinin [Roche Diagnostics], 500 μmol/L Na_3VO_4 [Sigma Chemical], and 500 ng/mL leupeptin [Roche Diagnostics]). After centrifugation at 15,000 rpm for 15 minutes, the supernatant was collected and protein concentration was determined using a Bio-Rad protein assay kit (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA). The whole-cell protein extracts (20 μg) were separated by 10% sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis and transferred to a polyvinylidene fluoride membrane (Immobilon-P, Millipore Corp., Bedford, MA) using a semidry transfer apparatus. Membranes were blocked with 20% FBS in Tris-buffered saline containing 0.1% Tween-20 (TBS-T) for nonspecific bindings of antibodies, and then hybridized with a polyclonal rabbit anti–Bcl-2 antibody (Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA) in 20% FBS in TBS-T for 2 hours at room temperature. Membranes were washed 3 times with TBS for 5 minutes and incubated with a horseradish peroxidase–conjugated anti-rabbit IgG (Santa Cruz Biotechnology) in 20% FBS in TBS-T for 1 hour at room temperature. Following 3× washes with TBS for 5 minutes, an enhanced chemiluminescence detection kit (Amersham-Pharmacia Biotech, Denver, CO) was applied for the detection of specific bands according to the manufacturer's instructions.

Statistical Analysis. Data were expressed as mean ± SD, and ANOVA and the Tukey's *post-hoc* test were used for the multiple comparisons of the differences in mean values. $P < .05$ was selected before the analyses to determine the significance.

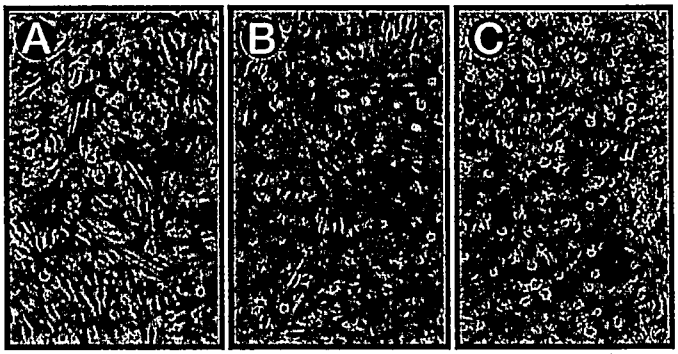


FIG. 1. Morphological changes in primary cultured rat SECs under VEGF deprivation. SECs were isolated from rat livers by collagenase digestion and cultured for 3 days before the experiment, as described in Materials and Methods. Cells were then cultured in fresh media without VEGF (VEGF deprivation) for 24 hours. Representative phase-contrast views of SECs from 5 individual experiments are shown. (A) Control SECs 3 days after inoculation. (B) SECs 12 hours after VEGF deprivation. (C) SECs 24 hours after VEGF. (Original magnification ×200.)

RESULTS

VEGF Deprivation Causes Apoptosis in Primary Cultured Rat SECs. Under a phase-contrast microscope, the primary cultured rat SECs showed spindle-like shapes and were nearly confluent at 3 days of culture. However, cells tended to shrink during the time course of VEGF deprivation, and finally, cells started detaching from dishes after 24 hours of VEGF deprivation (Fig. 1), indicating that VEGF deprivation caused cell death in SECs. To clarify whether the cell death of SECs as a result of VEGF deprivation is apoptosis, TUNEL staining was performed (Fig. 2). As expected, most cells 3 days after culture in EBM-2 medium containing VEGF were negative for TUNEL staining, and TUNEL-positive cells were only 2.0% in this condition. However, the TUNEL-positive cells start to increase in number 4 hours after VEGF deprivation, and almost all cells were TUNEL-positive 16 hours after VEGF deprivation (Fig. 3). The nuclei of TUNEL-positive cells showed condensation and fragmentation under a high-power view, representing typical features of apoptotic cells (data not shown).

Effects of Glycine on VEGF Deprivation–Induced Apoptosis of SECs. To evaluate the protective effect of amino acids against the apoptosis of SECs, we used this VEGF deprivation–treated

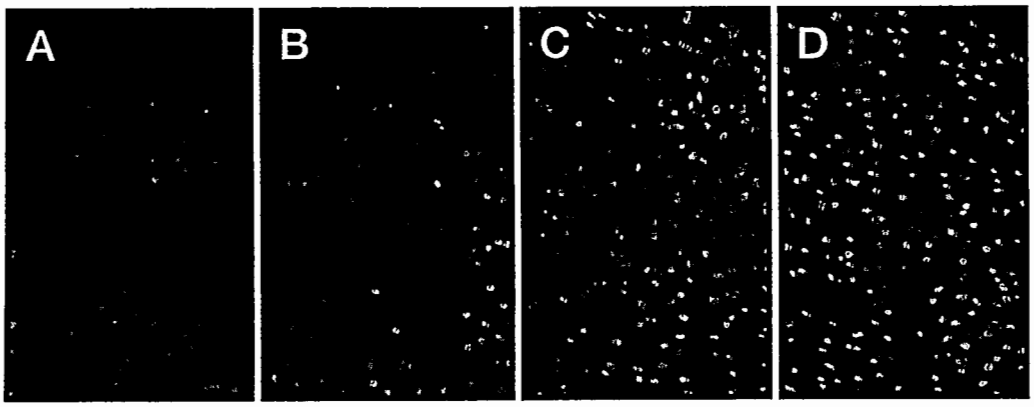


FIG. 2. Apoptosis of primary cultured rat SECs under VEGF deprivation. Experimental design as in Fig. 1. Apoptotic cells were detected by TUNEL staining as described in detail in Materials and Methods. Photographs were taken under fluorescent microscopy. (A) Control SECs 3 days after inoculation. (B) SECs 4 hours after VEGF deprivation. (C) SECs 8 hours after VEGF deprivation. (D) SECs 12 hours after VEGF deprivation. Representative photographs from 5 individual experiments are shown. (Original magnification ×200.)

apoptosis in primary cultured SECs. Interestingly, the increase in TUNEL-positive cells as a result of VEGF deprivation was significantly prevented by the addition of glycine (1-10 mmol/L) in the medium in a dose dependent manner (Fig. 4). The percentages of apoptotic cells in the presence of glycine were almost half 4 hours and 8 hours after VEGF dep ion (Fig. 5). To investigate whether this antiapoptotic effe ı SECs is glycine-specific, the effects of other amino acids were examined. The percentages of apoptotic cells 8 hours after VEGF deprivation were 59.8% ± 13.4%, 66.0% ± 10.4%, 60.5% ± 8.0%, 62.1% ± 5.0%, and 71.3% ± 15.2% in the presence of 10 mmol/L alanine, valine, glutamine, methionine, and serine, respectively, which had no significant difference as compared with VEGF-deprived controls. These observations indicated that the amino acids other than glycine tested here had no protective effect on the apoptosis in primary cultured SECs, and the effect of glycine was unique.

Strychnine Antagonizes the Effect of Glycine on the Apoptosis in SECs. To test the hypothesis that this antiapoptotic effect of glycine in SECs is mediated through glycine receptors on the plasma membrane, we tried strychnine, a putative glycine receptor antagonist.[23] Figure 6 shows the percentage of TUNEL-positive cells 8 hours after VEGF deprivation in the presence of glycine (10 mmol/L) and strychnine (1 μmol/L). The percentage of TUNEL-positive cells was 40.3% ± 2.0% when strychnine was added in combination with glycine, which was significantly higher than that of glycine alone ($P < .05$). In contrast, the percentage of TUNEL-positive cells 8 hours after VEGF deprivation in the presence of strychnine alone (1 μmol/L) was 50.8% ± 9.3%, which was not significantly different from VEGF deprivation alone. These findings indicated that a low dose of strychnine inhibited, at least in part, the antiapoptotic effect of glycine in primary cultured SECs.

Bcl-2 Expression in SECs Under VEGF Deprivation. The expression of Bcl-2, an antiapoptotic protein, in SECs was detected by Western blotting (Fig. 7). As expected, the 25- to 26-kd specific band for Bcl-2 was detected clearly in the control SECs 3 days after inoculation. However, the expression of Bcl-2 was decreased dramatically in the SECs 8 hours after VEGF deprivation. Surprisingly, the decrease of Bcl-2 as a

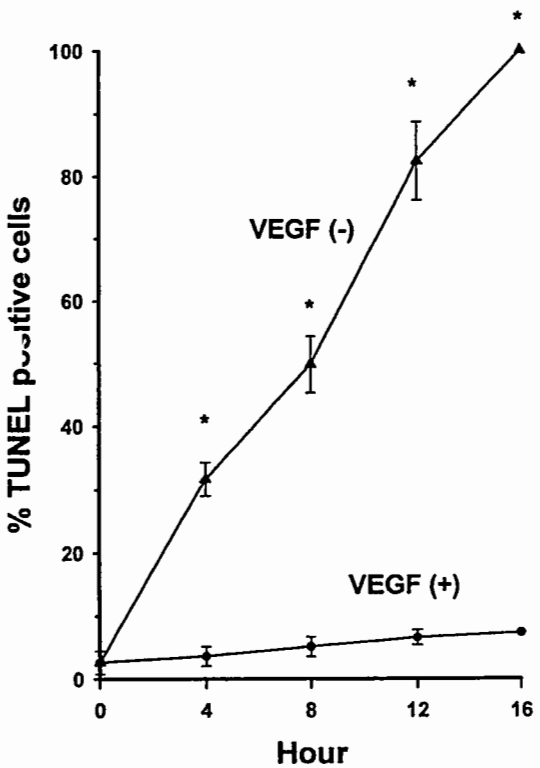


FIG. 3. Time course of VEGF deprivation–induced apoptosis in rat SECs. Experimental design as in Fig. 2. TUNEL-positive cells were counted in a middle-power field (×200) in each condition, and the percentages of TUNEL-positive cells were plotted. Data represent mean ± SD of 5 individual experiments (*$P < .05$ by ANOVA and Tukey's *post-hoc* test as compared with controls).

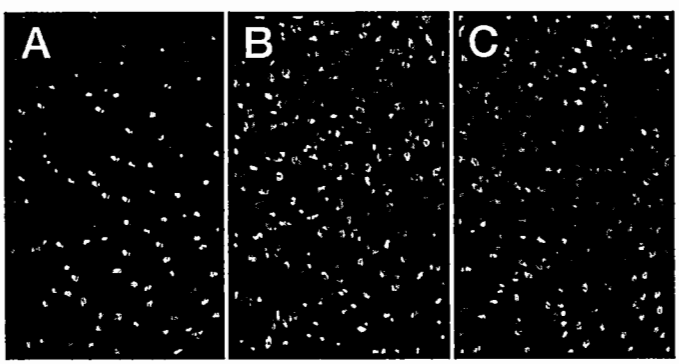


FIG. 4. Effect of glycine on VEGF deprivation–induced apoptosis in rat SECs. Experimental design as in Fig. 2. Glycine (1-10 mmol/L) was added in the medium without VEGF. (A) SECs 8 hours after VEGF deprivation (control). (B) SECs 8 hours after VEGF deprivation in the presence of 1 mmol/L glycine. (C) SECs 8 hours after VEGF deprivation in the presence of 10 mmol/L glycine. Representative photographs from 5 individual experiments are shown. (Original magnification ×200.)

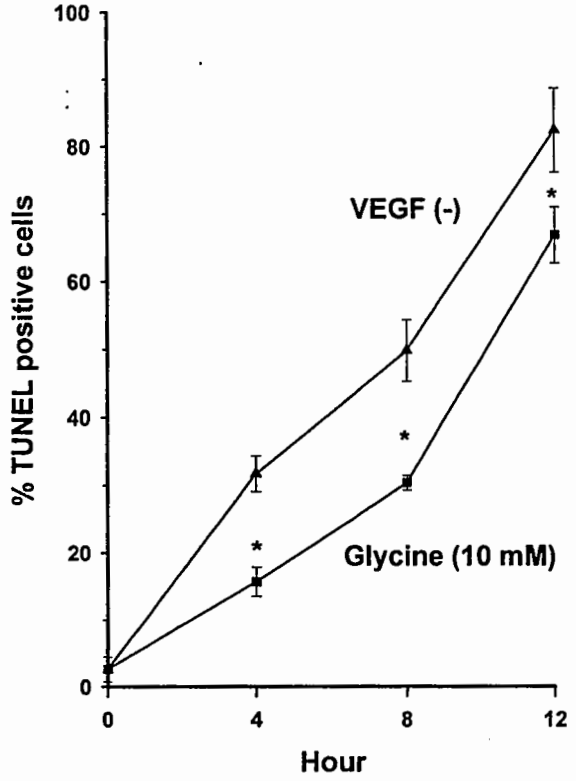


FIG. 5. Effect of glycine on VEGF deprivation–induced apoptosis in rat SECs. Experimental design as in Fig. 4. Percentages of TUNEL-positive cells were plotted. Data represent mean ± SD of 5 individual experiments (*$P < .05$ by ANOVA and Tukey's *post-hoc* test as compared with VEGF-deprivation groups).

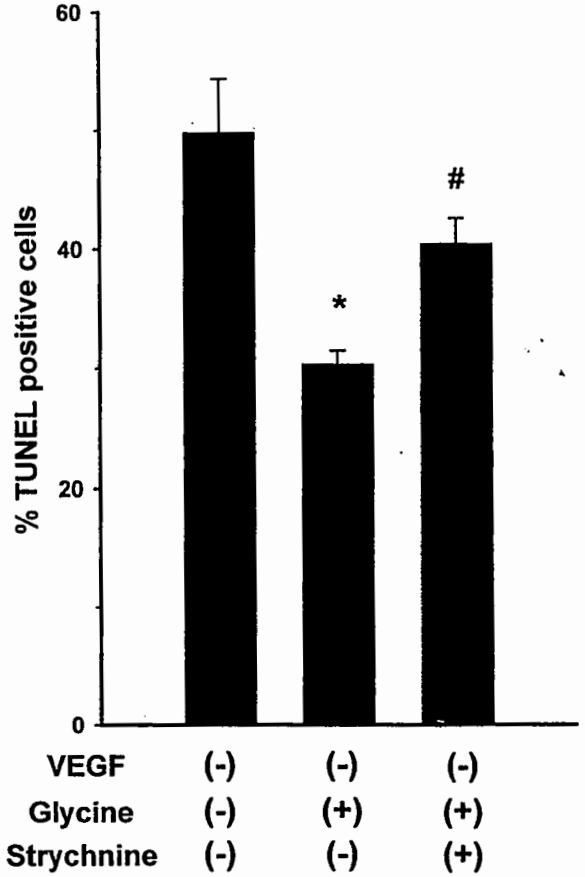


FIG. 6. Strychnine antagonizes the antiapoptotic effect of glycine in rat SECs. Experimental design as in Fig. 4. Strychnine (1 μmol/L), a glycine receptor antagonist, was added to the media without VEGF supplemented with glycine (10 mmol/L), and cells were incubated for 8 hours before TUNEL staining. Percentages of TUNEL-positive cells were plotted. Data represent mean ± SD from 5 individual experiments (*$P < .05$ as compared with controls; #$P < .05$ as compared with glycine alone by ANOVA and Tukey's *post-hoc* test).

result of VEGF deprivation was prevented almost completely in the presence of 10 mmol/L glycine.

DISCUSSION

Deprivation of growth factors is well known to induce apoptosis in various types of cells. In this study, we demonstrated that VEGF deprivation caused apoptotic cell death in primary cultured SECs (Figs. 1 and 2). TUNEL-positive SECs increased dramatically during the time course of VEGF deprivation (Fig. 3), and the TUNEL-positive nuclei showed condensation and fragmentation in shape, which are characteristic morphological features of apoptosis. It was reported that SECs express VEGF receptors (Flt-1 and KDR/Flk-1) abundantly, and VEGF maintains isolated SECs for an extended time course in culture, indicating that VEGF is one of the essential survival factors for SECs.[6] More recently, Moriga et al. reported that VEGF is preventive against sinusoidal endothelial damage and apoptosis induced by cold ischemia-reperfusion.[24] These findings support the hypothesis that VEGF plays a crucial role in the damage of SEC during cold ischemia-reperfusion, including liver transplantation. Therefore, we evaluated the effect of glycine on apoptotic cell death in SECs induced by VEGF deprivation. Interestingly, glycine prevented this VEGF deprivation–induced apoptosis in SECs in a dose-dependent manner (Fig. 4). Furthermore, the other amino acids we tested (alanine, valine, glutamine, methionine, and serine) had no effect in this model, which indicated that this antiapoptotic effect of glycine is a unique property rather than a nonspecific effect of amino acids. It is concluded, therefore, that glycine has an antiapoptotic effect in SECs.

It is well known that glycine acts as a neurotransmitter in the central nervous system, and a glycine receptor has been identified and well characterized. The glycine receptor in the

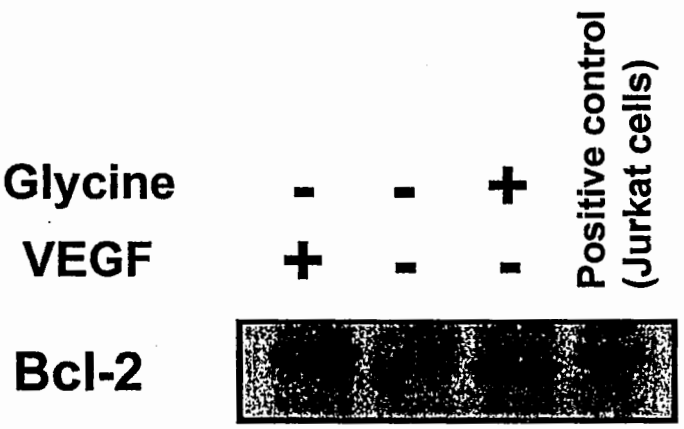


FIG. 7. Effect of glycine on Bcl-2 expression in rat SECs under VEGF deprivation. Bcl-2 in rat SECs was detected by Western blotting using a polyclonal antibody for Bcl-2 as described in Materials and Methods. Specific bands at 25 to 26 kd are shown. *First lane*: SECs 3 days after inoculation (control); *second lane*: SECs were incubated in the media without VEGF for 8 hours; *third lane*: SECs were incubated in the media without VEGF in the presence of glycine for 8 hours; *fourth lane*: whole-cell extracts from Jurkat cells (positive control).

central nervous system constitutes a chloride channel on the plasma membrane, and glycine causes the influx of chloride ion, leading to hyperpolarization of the plasma membrane, thereby counteracting depolarization stimuli.[7] Recently, Kupffer cells, resident macrophages in the liver, have been demonstrated to possess a similar type of receptors, by which glycine prevents the production of inflammatory cytokine production.[25] These observations suggest a possibility that SECs contain a similar type of glycine receptor on the plasma membrane. To clarify whether the antiapoptotic effect of glycine observed here is through this possible glycine receptors, strychnine, a putative glycine receptor antagonist, was tested (Fig. 6). Interestingly, the antiapoptotic effect of glycine was antagonized in part by a low dose of strychnine (1 μmol/L). It is postulated, therefore, that SECs most likely contain a glycine receptor, through which glycine elicits antiapoptotic properties. It is not clear how the glycine receptor modulates apoptotic cell death, but one possibility is that this glycine receptor/chloride channel increased the chloride influx, which may alter the osmolarity of cytoplasm, thereby preventing the shrinkage of cells during the apoptotic process.

On the other hand, Bcl-2, an antiapoptotic protein locating on th ɔchondrial membrane,[26] is recognized as one of the key factɔrs in growth factor deprivation–induced apoptosis in endothelial cells. Indeed, it has been reported that VEGF increases the expression of Bcl-2 in human umbilical vein endothelial cells, and the overexpression of Bcl-2 prevents the apoptotic cell death caused by growth factor deprivation in human umbilical vein endothelial cells.[27] Furthermore, the adenoviral gene transfer of Bcl-2 has been shown to reduce ischemia-reperfusion injury in the liver.[28] In the present study, it was demonstrated that Bcl-2 protein levels decreased dramatically after 8 hours of VEGF deprivation in isolated SECs (Fig. 7), which may be one of the key regulating factors of apoptosis under this condition. Surprisingly, glycine prevented this decrease of Bcl-2 protein levels almost completely. Although the precise mechanisms by which glycine prevented the decrease of Bcl-2 is unclear, these findings support the hypothesis that glycine prevents apoptosis of SECs by maintaining Bcl-2 protein levels.

In conclusion, glycine is protective against apoptotic cell death in SECs. Glycine most likely acts through glycine receptor on SECs, and it also prevents the decrease of Bcl-2 under VE⁻ deprivation. This antiapoptotic effect of glycine in SE ight be involved, at least in part, in the mechanism by whicn glycine prevents various types of liver injury in which apoptosis of SECs plays an important role.

Acknowledgment: The authors thank Dr. Miyoko Hirose for excellent technical assistance.

REFERENCES

1. Caldwell-Kenkel JC, Currin RT, Tanaka Y, Thurman RG, Lemasters JJ. Reperfusion injury to endothelial cells following cold ischemic storage of rat livers. HEPATOLOGY 1989;10:292-299.
2. Gao W, Bentley RC, Madden JF, Clavien PA. Apoptosis of sinusoidal endothelial cells is a critical mechanism of preservation injury in rat liver transplantation. HEPATOLOGY 1998;27:1652-1660.
3. Kohli V, Selzner M, Madden JF, Bentley RC, Clavien PA. Endothelial cell and hepatocyte deaths occur by apoptosis after ischemia-reperfusion injury in the rat liver. Transplantation 1999;67:1099-1105.
4. Natori S, Selzner M, Valentino KL, Fritz LC, Srinivasan A, Clavien PA, et al. Apoptosis of sinusoidal endothelial cells occurs during liver preservation injury by a caspase-dependent mechanism. Transplantation 1999;68(1):89-96.
5. Neufeld G, Cohen T, Gengrinovitch S, Poltorak Z. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. FASEB J 1999;13(1):9-22.
6. Yamane A, Seetharam L, Yamaguchi S, Gotoh N, Takahashi T, Neufeld G, et al. A new communication system between hepatocytes and sinusoidal endothelial cells in liver through vascular endothelial growth factor and Flt tyrosine kinase receptor family (Flt-1 and KDR/Flk-1). Oncogene 1994;9:2683-2690.
7. Langosch D, Becker CM, Betz H. The inhibitory glycine receptor: a ligand-gated chloride channel of the central nervous system. Eur J Biochem 1990;194(1):1-8.
8. Weinberg JM, Davis JA, Abarzua M, Rajan T. Cytoprotective effects of glycine and glutathione against hypoxic injury to renal tubules. J Clin Invest 1987;80:1446-1454.
9. Weinberg JM, Davis JA, Roeser NF, Venkatachalam MA. Role of increased cytosolic free calcium in the pathogenesis of rabbit proximal tubule cell injury and protection by glycine or acidosis. J Clin Invest 1991;87:581-590.
10. Miller GW, Lock EA, Schnellmann RG. Strychnine and glycine protect renal proximal tubules from various nephrotoxicants and act in the late phase of necrotic cell injury. Toxicol Appl Pharmacol 1994;125:192-197.
11. Dickson RC, Bronk SF, Gores GJ. Glycine cytoprotection during lethal hepatocellular injury from adenosine triphosphate depletion. Gastroenterology 1992;102:2098-2107.
12. Marsh DC, Vreugdenhil PK, Mack VE, Belzer FO, Southard JH. Glycine protects hepatocytes from injury caused by anoxia, cold ischemia and mitochondrial inhibitors, but not injury caused by calcium ionophores or oxidative stress. HEPATOLOGY 1993;17:91-98.
13. Nichols JC, Bronk SF, Mellgren RL, Gores GJ. Inhibition of nonlysosomal calcium-dependent proteolysis by glycine during anoxic injury of rat hepatocytes. Gastroenterology 1994;106(1):168-176.
14. Zhong Z, Jones S, Thurman RG. Glycine minimizes reperfusion injury in a low-flow, reflow liver perfusion model in the rat. Am J Physiol 1996; 270(2 Pt 1):G332-G338.
15. Ikejima K, Iimuro Y, Forman DT, Thurman RG. A diet containing glycine improves survival in endotoxin shock in the rat. Am J Physiol 1996;271(1 Pt 1):G97-G103.
16. Iimuro Y, Bradford BU, Forman DT, Thurman RG. Glycine prevents alcohol-induced liver injury by decreasing alcohol in the rat stomach. Gastroenterology 1996;110:1536-1542.
17. Currin RT, Caldwell-Kenkel JC, Lichtman SN, Bachmann S, Takei Y, Kawano S, et al. Protection by Carolina rinse solution, acidotic pH, and glycine against lethal reperfusion injury to sinusoidal endothelial cells of rat livers stored for transplantation. Transplantation 1996;62:1549-1558.
18. Schemmer P, Bradford BU, Rose ML, Bunzendahl H, Raleigh JA, Lemasters JJ et al. Intravenous glycine improves survival in rat liver transplantation. Am J Physiol 1999;276(4 Pt 1):G924-G932.
19. Arora AS, Nichols JC, DeBernardi M, Steers JL, Krom RA, Gores GJ. Glycine rinse protects against liver injury during transplantation. Transplant Proc 1999;31(1-2):505-506.
20. Nishimura Y, Romer LH, Lemasters JJ. Mitochondrial dysfunction and cytoskeletal disruption during chemical hypoxia to cultured rat hepatic sinusoidal endothelial cells: the pH paradox and cytoprotection by glucose, acidotic pH, and glycine. HEPATOLOGY 1998;27:1039-1049.
21. Zhang YJ, Ikejima K, Takei Y, Honda H, Hirose M, Fukuda T, et al. Glycine prevents apoptosis of sinusoidal endothelial cells due to vascular endothelial growth factor (VEGF) deprivation [Abstract]. HEPATOLOGY 2000;30:225A.
22. Braet F, De Zanger R, Sasaoki T, Baekeland M, Janssens P, Smedsrod B, et al. Assessment of a method of isolation, purification, and cultivation of rat liver sinusoidal endothelial cells. Lab Invest 1994;70:944-952.
23. Young AB, Snyder SH. The glycine synaptic receptor: evidence that strychnine binding is associated with the ionic conductance mechanism. Proc Natl Acad Sci U S A 1974;71:4002-4005.
24. Moriga T, Arii S, Takeda Y, Furuyama H, Mizumoto M, Mori A, et al. Protection by vascular endothelial growth factor against sinusoidal endothelial damage and apoptosis induced by cold preservation. Transplantation 2000;69(1):141-147.
25. Ikejima K, Qu W, Stachlewitz RF, Thurman RG. Kupffer cells contain a glycine-gated chloride channel. Am J Physiol 1997;272(6 Pt 1):G1581-G1586.
26. Reed JC. Bcl-2 and the regulation of programmed cell death. J Cell Biol 1994;124:1-6.
27. Gerber HP, Dixit V, Ferrara N. Vascular endothelial growth factor induces expression of the antiapoptotic proteins Bcl-2 and A1 in vascular endothelial cells. J Biol Chem 1998;273:13313-13316.
28. Bilbao G, Contreras JL, Eckhoff DE, Mikheeva G, Krasnykh V, Douglas JT, et al. Reduction of ischemia-reperfusion injury of the liver by in vivo adenovirus-mediated gene transfer of the antiapoptotic Bcl-2 gene. Ann Surg 1999;230:185-193.

日本財団補助金による
２０００年度日中医学学術交流促進事業

⑤．在留中国人研究者研究助成

(15)アヂノウイルスベクターを用いたＣＴＬＡ４－Ｉg遺伝子導入法によるハムスター・ラット異種肝移植に於ける免疫抑制効果の検討

アヂノウィルスベクダ-を用いたCTLA4-Ig 遺伝子導入法によるハムスター・ラット異種肝移植における免疫抑制効果の検討

郭　雷

中国吉林省長春市中心病院・主治医
東京大学医学部第二外科・移植外科

要旨

免疫抑制剤 FK506 を用いた異種移植への応用が報告されているが、一方、臨床応用にあたっては、同種異系に較べて大量かつ長期にわたった免疫抑制を必要とし。単剤のみで、拒絶反応を制御することは、その毒性ために限界があると考えられる。従って作用機序の異なる他の免疫抑制剤との併用療法を行いながら個々の免疫抑制剤の副作用を軽減し、総合的な免疫抑制を実行することがこれからの研究課題と考えられる。本研究では、ラット同種異系移植モデルでその有効性が報告されている、アヂノウィルスにCTLA4Ig fusion protein を組み替えた遺伝子ベクター AdexCTLA4Ig のハムスタ-・ラットの異種肝移植モデルに於ける免疫抑制効果に関して、検討を行った。

KEY WORDS

遺伝子治療・異種肝移植・ CTLA4Ig ・アヂノウィルス

研究の目的

ドナー不足が臓器移植における最も深刻な問題となっているこの現状を、打開するために異種移植が注目されているが従来の免疫抑制療法では免疫学的障害が同種移植に比べるとはるかに大きく臨床応用は不可能である。これを解決するために現在臨床応用されつつある遺伝子治療の技術を新しい免疫抑制療法として臓器移植への応用を試みる。

方法

LEW(RT1l)ラットをレシピエント、golden hamster をドナ-とする異種移植の組み合わせにて同所性肝移植を行い、CTLA4Ig(AdexCTLA4Ig)を発現する組み換えた型アヂノウィルス 10^9pfu を移植直後に尾静脈より one shot injection で導入、肝臓移植後の生存期間を観察した。

結果

CTLA4Ig(AdexCTLA4Ig)を発現する組み替え型アヂノウィルスを、正常LEWラットに、尾静脈より一回投入後、その遺伝子発現の効果を血中のCTLA4Ig力価で検討したところ、AdexCTLA4Ig の pfu 依存性に血中の CTLA4Ig が発現するが、本研究で用いた 10^9pfu では、遺伝子導入後、一週目をそのピークとして、その後４週間以上有意な血中濃度を保持していることが、ELISA 法により確認できた。10^9pfu での、ハムスタ-・ラットの生存率は MST 9.2±1.48、AdexLacZ を投入した対象群では、その生存率が MST 6.0±0.71 と有意な生着延長効果を認めた。

考察

アヂノウィルス CTLA4Ig fusion protein の組み替え型遺伝子ベクター CTLA4Ig は、ハムスタ-・ラットの同所性異種肝移植のモデルに於いて有意な生着延長効果をもたらす事が観察された。今後は、他の免疫抑制剤との併用療法と組み合わせて、その免疫抑制効果の増進が得られるか否か、更なる検討が必要と考えられる。

参考文献

1. Elwood ET, Larsen CP, Cho HR, Corbascio M, Ritchie SC, Alexander DZ, Tucker-Burden C, Linsley PS, Aruffo A, Hollenbaugh D, Winn KJ, Pearson TC.
Prolonged acceptance of concordant and discordant xenografts with combined CD40 and CD28 pathway blockade.
Transplantation. 1998 Jun 15;65(11):1422-8.

2. Rehman A, Tu Y, Arima T, Linsley PS, Flye MW.
Long-term survival of rat to mouse cardiac xenografts with prolonged blockade of CD28-B7 interaction combined with peritransplant T-cell depletion.
Surgery. 1996 Aug;120(2):205-12.

3. Yin DP, Sankary HN, Chong AS, Blinder L, Ma LL, Williams JW.
Effect of anti-CD4 monoclonal antibody combined with human CTLA4Ig on the survival of hamster liver and heart xenografts in Lewis rats.
Transplantation. 1997 Jul 27;64(2):317-21.

4. Drazan KE, Shen XD, Wu L, Jurim O, Busuttil RW, Shaked A.
Adenoviral-mediated gene transfer to liver xenografts results in successful expression and protein production.
Transplant Proc. 1995 Feb;27(1):331-2.

日本財団補助金による
２０００年度日中医学学術交流促進事業

⑤．在留中国人研究者研究助成

(14)化学療法受療肺癌，乳癌及び婦人科癌患者のＱＯＬ

化学療法受療肺癌、乳癌及び婦人科癌患者の QOL

—EORTC QLQ-C30 (version 3.0)の信頼性と妥当性の検討—

趙　紅

東京大学大学院医学系研究科

健康科学・看護学専攻

看護管理学分野

要旨：本研究の目的は、European Organization for Research and Treatment of Cancer により開発された EORTC Quality of Life Questionnaire-C30 (version 3.0)の標準中国語版の信頼性，妥当性と適用可能性を検討することである．調査対象は７つの大学附属病院に入院していた婦人科癌（n=17)、肺癌（n=33）および乳癌患者（n=20）であった．９つの多項目尺度に含まれる項目間の相関係数について，項目が属している尺度との相関係数の絶対値は，項目 1, 10, 20 および 25 を除いてすべて 0.4 以上で，属していないほかの尺度との相関係数より高かった．9 つの多項目尺度のうち，８つの Cronbach アルファ係数は 0.70 より大きく、認識機能ＣＦは 0.70 未満であった．各尺度間のピアソン相関係数はほとんど 0.7 未満であった．EORTC QLQ-C30 の尺度は期待された SF-36 の尺度と相関した．異なる転移範囲を持つ患者の間多くの機能尺度と症状症状尺度・項目に有意差が認められた．敏感性の検討では、役割機能、社会機能および吐き気、不眠と食欲不振の得点が経時的に変動した．全般的にはこの標準中国語版が中国婦人科癌、肺癌および乳癌患者の QOL を評価するための有効な調査票だと示唆された．

Keywords: Quality of life, EORTC QLQ-C30, psychometric property, cancer

Introduction

Cancer affects at least 9 million people and causes 5 million deaths worldwide each year. Epidemiological studies show that cancer is the second leading cause of death in most developed countries, and similar trends are

emerging in developing countries as well (WHO, 1995). Advances in cancer treatment have raised the survival rate of cancer patients. Disease of cancer and its treatment, however, cause numerous physical and psychosocial conditions of cancer patients, which may subsequently affect the patients' normal patterns of social activities and their psychosocial and spiritual well being. This, in turn, may interfere with their successful process of cancer treatment. Traditionally, the evaluation of cancer therapies has been focusing on biomedical outcomes such as tumor response, disease-free conditions, overall survival rate, and treatment-related toxicity. While these biomedical parameters remain significant in the process of outcome evaluation, a comprehensive and holistic method of assessment for cancer patients is increasingly needed to measure the impact of cancer treatment on functional and psychosocial health of the patient.

It is commonly believed that the quality of life (QOL) reflects the subjective perceptions of well being in each individual. A concept of QOL was first used in the U.S. shortly after the Second World War in order to designate the view of a better life in which a person has much more to do with than just with financially secured states. The earliest research on QOL in medical field can be traced back to the 1940s. The World Health Organization (WHO) implicitly introduced the concept of QOL into health care field when health was defined as "state of physical, mental, and social well being and not merely the absence of disease or infirmity (WHO, 1947)." Karnofsky and Burchenal (1949) studied quality of life of the oncology population by looking objectively at the functional status of patients. In the 1970s, the WHO (1978) explicitly stated that all individuals have a right to psychosocial care and an adequate quality of life in addition to physical care. In the 1980s, the U.S. Food and Drug Administration (FDA) indicated that the approval of new drugs would require a favorable effect on survival and/or quality of life of patients (Johnson & Temple, 1985). Recently, quality of life has become one of the most important foci in oncology nursing practice and research. Issues related to quality of life have been identified as among the top three priorities for research by the American Oncology Nursing Society (Stetz & Haberman, 1995). Within oncology field, quality of life has been assessed for the following five purposes: First, to describe the nature and extent of functional and psychosocial problems encountered by

patients at various stages in the course of disease trajectory; second, to establish norms of psychosocial morbidity among specific patient groups; third, to monitor quality of life and quality of care with eyes toward improvement of the way in which treatment is delivered; forth, to evaluate the efficacy of alternative medical or psychosocial interventions through clinical trials; fifth and lastly, to screen individual patients for the necessity of psychosocial interventions such as counseling or psychotherapy (Aaronson, 1990).

Although quality of life has become an important indicator to evaluate the treatment outcome, there has been little agreement on the definition of health related QOL. There are as many definitions of the "quality of life" as the number of people who use the term. For example, Donovan et al. (1989) defined quality of life as "a person's subjective sense of well-being derived from current experience of life as a whole." The domains of QOL for cancer patients included at least physical and psychosocial fields, and spiritual and global measures are also recommend to be added (Donovan et al., 1989). Hornquist (1982) described a construct of QOL based on the satisfaction of human needs in six domains: physical, psychological, social, active, marital, and political. Cella and Cherin (1988) proposed a definition of QOL that "refers to patient's appraisal of and satisfaction with their current level of functioning compared to what they perceive to be possible or ideal." Ferrans (1990) reviewed existing definitions of QOL from various disciplines and classified into five broad categories: (1) normal life; (2) happiness/satisfaction; (3) achievement of personal goals; (4) social utility; and (5) natural capacity.

There is now a general agreement on two main points (Aaronson et al., 1991). First, health-related quality of life is a multidimensional concept that includes the broad area of functional status, psychosocial well being, health perceptions, and disease- and treatment-related symptoms. Second, quality of life assessment is essentially subjective. The target individual is the primary source of information on the quality of his or her life, although information from family members and health care personnel may often be useful. The focus is on identifying the subjective experience of the person whose quality of life is in question.

Based on these two points, a great deal of effort has been made by numerous researchers toward

operationalizing quality of life in a multidimensional framework using traditional methods of instrument development. A number of self-administered questionnaires have been developed for patients to quantify their psychosocial health status within a range of discrete domains. Examples include the Functional Living Index-Cancer (FLIC, Schipper H et al., 1984), the Spitzer Quality of Life Index (Spizer WO et al. 1981) and the European Organization for Research and Treatment of Cancer Quality of Life Questionnaire (EORTC QLQ-C30, Aaronson NK et al., 1988). These instruments have the following characteristics in common (McCartney & Larson, 1987; Aaronson et al., 1991). (1) These questionnaires have been developed for specific use among cancer populations. (2) They cover an adequate range of QOL domains. (3) Their psychometric testings demonstrate their reliability and validity. (4) They are sufficiently brief but comprehensive to use in clinical research settings. The use of these multidimensional instruments would provide accurate means to capture the subjects' QOL.

This study focused on the quality of life questionnaire (QLQ-C30) developed by the European Organization for Research and Treatment of Cancer (EORTC), an international non-profit organization established in 1962. The aims of the EORTC are to conduct, develop, coordinate and facilitate cancer research projects that have been carried out in Europe by multidisciplinary groups of oncologists and basic scientists. The Quality of Life Study Group in the EORTC was set up in 1980. In 1986, the group initiated a research program to develop an integrated modular approach to evaluate QOL of patients participating in clinical trials of cancer treatment (Fayers et al., 1999). The EORTC QLQ-C30 has been used in a wide range of cancer clinical trials as well as in non-trial studies by a number of research groups. Since the EORTC QLQ-C30 was designed as a core questionnaire for potential use for cancer patients, it was necessary to determine whether its psychometric properties are stable in various cancer populations. The initial test was carried out by the EORTC QOL Study Group with 346 lung cancer patients (Aaronson et al., 1993). Subsequently, another test was conducted by the National Cancer Institute of Canada (NCIC) Clinical Trials Group (CTG) (Osoba et al., 1994) including 535 patients with heterogeneous cancer diagnoses (breast cancer, lung cancer, ovarian cancer, and other cancer) as

well as Norwegian patients with head, neck, and other cancer. The EORTC QLQ-C30 has been translated into various languages and has been tested for its validity and reliability through its replication study on three subgroups of patients from 12 international study sites including English-speaking countries, Northern Europe countries, and Southern Europe countries. Reliability and validity of the translated versions of the EORTC QLQ-C30 were highly consistent across the three subgroups (Anderson, Aaronson, & Wilkin, 1993). The QLQ-C30, (version 2.0) was translated into Standard Chinese (Zhao & Kanda, 2000). The validation of this "Chinese" version have been tested, but reliability and validation of physical and cognitive functioning subclass did not meet the standards. In the version 3.0 of QLQ-C30 first five items are coded with the same response categories as item 6 to 28, namely "Not at all", "A little", "Quite a bit", and "very much" (Fayers et al., 1999).

The aims of this study were to evaluate psychometric properties of the Standard Chinese version of European Organization for Research and Treatment of Cancer Quality of Life Core Questionnaire (version 3.0).

Method

Subjects. Gynecological ,lung, and breast cancer patients were recruited from 7 hospitals affiliated with universities in China. Inclusion criteria were a confirmed diagnosis of cancer; aged 18 years or older; an ability to read and write Standard Chinese; and a consent to participate in the study.

Questionnaire. EORTC QLQ-C30 (version 3.0) is a 30-item questionnaire including multi-item subclass and single items that reflect the multidimensionality of the construct of QOL. Subclass and single items in the QLQ-C30 include: five functional subclass (physical, role, cognitive, emotional, and social); three symptom subclass (fatigue, pain, and nausea/vomiting); a global health/QOL subscale; single items for the assessment of additional symptoms commonly reported by cancer patients (dyspnea, appetite loss, sleep disturbance, constipation, and diarrhea); and an item related to the perceived financial impact of cancer and cancer treatment. The two items in the global health/QOL subscale use modified 7-point linear analogue scales. All of the other items are scored on 4-point Likert-type scales ranging from 1 "not at all" to 4 "very much."

The SF-36 is a health survey questionnaire which includes eight general health concepts: Physical

Functioning (PF); role limitations due to physical health problems (Role-Physical, RP); Bodily Pain (BP); General Health perceptions (GH); Vitality (VT); Social Functioning (SF); role limitations due to emotional problems (Role-Emotional, RE); and Mental Health (MH). The SF-36 has been translated into Chinese (Ren et al., 1998). The psychometric analyses found that the Chinese version of the SF-36 satisfied conventional psychometric criteria. All items use 5 or 6-choice response scales.

Data collection. The QLQ C30 was completed by patients before start of treatment, the last day of first course middle time of treatment circle and the last day of a circle. The SF-36 was completed before start of treatment and the last day of first course. The patients were asked to complete the questionnaires before being discharged from the hospital. Sociodemographic and clinical data of the patients were also collected from their medical records at those time.

Statistical analysis. Three approaches were taken to evaluate the construct validity of the QLQ-C30SC. First, a multitrait scaling analysis (Hays, et al., 1998, Stewart, Hays & Ware, 1998) was performed to test item convergent and discriminant validity based on the examination of correlation coefficients among the items and subscales. Correlation of an item with its own subscale was calculated by the correlation of this item with the sum of the other items in the same subscale (overlap-corrected correlation). Item convergent validity was indicated when a Pearson's correlation coefficient between an item and its own subscale was above 0.40. Item discriminant validity was indicated when an item correlated significantly higher with its own subscale as compared with the other subscales (referred to as "scaling success"). The second approach involved examining of the correlations among various subscales in the questionnaire. It was hypothesized that conceptually related subscales such as physical and role functioning subscales would correlate substantially high with each other (Pearson's correlation coefficient $\geqq 0.40$). It was considered as undesirable that a Pearson's correlation coefficient between subscales is too high, such as above 0.70, which would raise a question about the distinctiveness of the concepts being measured by each subscale. In the third approach, known-groups method was used to assess the clinical significance and construct validity. One-way analysis of variance (ANOVA) was

used to test the extent which the scores of the QLQ-C30SC were able to discriminate between subgroups of patients with different extent of disease. The internal consistency of each subscale was assessed by Cronbach's alpha (Cronbach, 1951) coefficient as a part of reliability testing. It was considered to be acceptable as a stable and internally consistent measure when Cronbach's alpha was 0.70 or greater.

Correlation coefficients between EORTC QLQ-C30 and SF-36 were calculated in evaluating the criterion-related validation of this Standard Chinese version.

The sensitivity of QLQ-C30 was tested by comparison of mean scores in four time points.

The Statistical Analysis System (SAS, Version 6.12) for Windows was used to analyze the data.

Results

1) Patients' demographic data. Sixty nine patients were recruited in the study from August 2000 to February 2001, including gynecological cancer patients (n=17), lung cancer patients (n=33), and breast cancer patients (n=20). Because the study is continuing, a complete response group includes 44 patients. The sociodemographic data of the 69 patients are shown in Tables 1. The age of the patients ranged from 24.0 to 70.0 years, with a mean of 50.1 years (SD=12.4). Forty percent of patient was male, and 94% was married. Fifty-nine percent of patients were under the educational level of senior schools. The majority of the patients were office workers (39%) and pensioners (35%). Ninety-one percent of the patients had a child/children. The clinical characteristics of the sample are reported in Table 2. The sample was heterogenous with regard to type of cancer, Karnofsky Performance Status, extent of disease, and treatment received.

2) Reliability and validity of the Standard Chinese version of the EORTC QLQ-C30 (3.0). A raw score of each subscale/item was linearly transformed into a percentage of the maximum score of the subscale/item (each score ranged from 0 to 100). A higher score on the functional subscale represented a higher level of functioning. A higher score on the global health/QOL subscale represented a higher level of QOL. A higher score on the symptom subscale or item represented a higher (more severe) level or incidence of symptom(s).

Table 3 shows the means, standard deviations of each subscale/item and Cronbach's alpha coefficients for the

multi-item subscales of the QLQ-C30. Mean scores of more than 50 were found in the physical, role, emotional cognitive and social functioning subscales, fatigue subscale, the appetite loss item, and the financial impact item. Eight out of nine subscales met the minimal standards of reliability (Cronbach's alpha coefficient>0.70), but cognitive functioning subscale did not meet these standards.

Pearson's correlation coefficients between each item and the subscales are shown in Table 4. The absolute value of Pearson's correlation coefficients ranged from 0.36 to 0.87. Correlation coefficients between an item and its own subscale were significantly higher than the coefficients with the other subscales except item 1, 10, 20 and 25.

Table 5 shows Pearson's correlation coefficients between subscales. All correlation coefficients were lower than 0.70 except fatigue subscale. The fatigue subscale correlated substantially with most of the other subscales, ranging from an absolute value of 0.41 to 0.73. Strong correlation coefficients (Pearson's correlation coefficient r>0.60) were found between the following functioning subscales: role and physical functions (r=0.64), role and social functions (r=0.60), fatigue and physical functions (r=-0.73), and fatigue and emotional functions (r=-0.61).

Pearson's correlation coefficients between subscales of EORTC QLQ-C30 and SF-36 are showed in Table 6. The physical, role, emotional and social functioning subscales, and fatigue and pain subscales of EORTC QLQ-C30 correlated well with similar subscales in SF-36. In addition, some subscales of EORTC QLQ-C30 correlated well with conceptually related scales in SF-36. For example, the correlation coefficients between vitality subscale in SF36 and fatigue and pain subscales in EORTC QLQ-C30 were 0.65, and physical functioning subscale in SF-36 and fatigue subscale in EORTC QLQ-C30 was 0.57.

Table 7 shows the comparison of the mean scores in each subscale between patients with different extent of disease. Significant mean score differences between different extent of disease were found in physical, role, emotional and social functioning subclass, as well as fatigue, nausea/vomiting, pain sleep disturbance and loss of appetite subclass/items.

Table 8 shows the mean scores of QLQ-C30 at different time points. The significant differences were found

in role, social functioning subscales, and nausea/vomiting, sleep disturbance and loss of appetite subscale and items.

Discussion

This study examined the reliability and validity of the Standard Chinese version of the EORTC QLQ-C30 (version 3.0). The multitrait scaling method confirmed that the structure of this version was generally similar to that of the original version. Correlation coefficients of items of concentration and memory in cognitive functioning subscale were 0.36. The other item-subscale correlation coefficients exceeded the criterion of 0.40 for item-convergent validity. Scaling success was not found in four items: one in physical functioning subscale, two in cognitive functioning subscale, and another one in fatigue subscale. Although several subscales in this version correlated significantly with one another, the magnitude of these correlation coefficients among all subscales were modest (r=0.40 to 0.70) except the correlation coefficient between fatigue subscale and physical functioning subscale. These results suggest that the subscales were assessing distinct components of the construct of QOL. Eight out of nine subscales met the minimal standards of reliability (internal consistency), but the cognitive functioning subscales did not meet this standard.

The results of the previous study showed that the physical and cognitive functioning subscales of version 2.0 were in question. The items (from 1 to 5) in the physical functioning subscale have been modified into a 4-point Likert-type scale by Osoba et al.[12] Its preliminary data indicated that a Cronbach's alpha of greater than 0.80 was likely with the new format. The QLQ-C30 version 3.0 adopts 4-point Likert-type scale for the first five items, and it was also translated into Standard Chinese by the author. The result of this study indicated that the Cronbach's alpha of physical functioning subscale was greater than 0.80 (It was 0.67 in version 2.0). Cronbach's alpha coefficient and different factor structure of the cognitive function subscale still didn't meet the standards. The moderate correlations between scales of EORTC QLQ-C30 and SF-36 confirmed the criterion-related validation of EORTC QLQ-C30. But there were not significant correlation between general health perceptions subscale of SF-36 and global quality of life in EORTC QLQ-C30.

The ability of this version to discriminate the different groups of patients was tested by known-group method, which can be taken as evidence of its responsiveness to clinical measures. In this study, most functioning subclass and symptom subclass/items were able to distinguish clearly between subgroups of patients in different disease stages.

The sensitivity of QLQ-C30 is moderately well. The mean scores of two functioning subscales and three symptom subscales/items changed over time.

Conclusions

The results of this study suggested that the Standard Chinese version of EORTC QLQ-C30 (version 3.0) was a valid instrument overall in assessing the QOL of Chinese gynecological, lung and breast cancer patients.

Acknowledgments

The author thanks the patients, nurses for their active participation in this study. This study was made possible by grants from The Japan-China Medical Association.

References

Aaronson NK, Bullinger M, Ahemdzai S. (1988). A modular approach to quality-of-life assessment in cancer clinical trials. Recent Results in Cancer Res, 111, 231-249.

Aaronson NK. (1990). Quality of life research in cancer clinical trials: A need for common rules and language. Oncology, 4(5), 59-66.

Aaronson NK, Meyerowitz JE, Bard M, et al. (1991). Quality of life research in oncology: Past achievements and future priorities. Cancer, 67, 839-843.

Aaronson NK, Ahmedzai S, Bergman B. et al. (1993). The European Organization for Research and Treatment of Cancer QLQ-C30: A Quality-of-Life instrument for use in international clinical trials in oncology. Journal of the National Cancer Institute, 85(5), 365-375.

Anderson RT, Aaronson HK, Wilkin D. (1993). Critical review of the international assessments of health-related quality of life. Quality of Life Research, 2, 369-395.

Cella DF, Cherin EA. (1988). Quality of Life during and after cancer treatment. Comprehensive Therapy, 14(5), 69-75.

Cronbach LJ. Coefficient alpha and the internal structure of tests. Psychometrika 1951; **16**: 297.

Donovan K, Sanso-Fisher RW, Redman S. (1989). Measuring quality of life in cancer patients. Journal of Clinical Oncology, 7, 959-968.

Fayers P, Aaronson NK, Bjordal K, Curran D, Groenvold M. (1999). EORTC QLQ-C30 scoring manual. Brussels, Belgium: EORTC Quality of Life Group.

Ferrans CE. (1990). Quality of Life: Conceptual issues. Seminars in Oncology Nursing, 6(4), 248-254.

Hays RD, Hayashi T, Carson S, et al. User's guide for the multitrait analysis program (MAP). Santa Monica, Calif: Rand Corporation, 1988.

Hornquist JL. (1982). The concept of quality of life. Scand J Soc Med, 10, 57-61.

Johnson JR, Temple R. (1985). Food and Drug Administration requirements for approval of new anticancer drugs. Cancer Treatment Reports, 69 (10), 1155-1157.

Karnofsky DA, Burchenal JH. (1949). The clinical evaluation of chemotherapeutic agents in cancer. In: Evaluation of Chemotherapeutic Agents, edited by CM McCleod, Columbia University Press, New York, 191-205.

McCartney CF, Larson DB. (1987). Quality of Life in patients with gynecologic cancer. Cancer, 60, 2129-2136.

Osoba D, Zee B, Pater J, Warr D, Kaizer L, Latreille J. (1994). Psychometric properties and responsiveness of the EORTC Quality of Life Questionnaire (QLQ-C30) in patients with breast, ovarian and lung cancer. Quality of Life Research, 3, 353-364.

Osoba D, Aaronson NK, Zee B, Sprangers M. Velde A. (1997). Modification of the EORTC QLQ-C30 (version 2.0) based on content validity and reliability testing in large samples of patients with cancer. Quality of Life Research, 6, 103-108.

Ren XS. et al. (1998). Translation and Psychometric Evaluation of a Chinese Version of the SF-36 Health

Survey in the United States. J Clin Epidemiol 51, 1129-1138.

Schipper H, Clinch J, McMurray A, et al. (1984). Measuring the quality of life of cancer patients. The function living index-cancer: development and validation. J Clin Oncol, 2, 472.

Spitzer WO, Dobson AJ, Hall J et al. (1981). Measuring the quality of life of cancer patients. J chron Dis, 34, 585-597.

Stetz KM, Haberman MR, Holcombe J, Jones LS. (1995). 1994 Oncology Nursing Society research priorities survey. Oncology Nursing Forum, 22 (5), 785-789.

Stewart AL, Hays RD, Ware JE Jr. The MOS short-form general health survey: reliability and validity in a patient population. *Med Care* 1988; **26**: 724-735.

World Health Organization. (1947). The constitution of the World Health Organization. WHO Chronicle, 29.

World Health Organization. (1978). Primary Health Care: report of the International Conference on Primary Health Care, Alma-Ata, USSR, 6-12 September 1978. WHO, Geneva, Switzerland.

World Health Organization. (1995). National cancer control proagrammes, policies and managerial guidelines. Executive summary, Geneva, Switzerland.

Zhao H, Kanda K. (2000). Translation and validation of the Standard Chinese version of the EORTC QLQ-C30. Quality of Life Research, 9, 129-137.

Table 1. The sociodemographic data of the patients

	N	%
Sample size		
Gynecological Cancer	17	24.3
Lung Cancer	33	47.1
Breast Cancer	20	28.6
Sex		
male	28	40.0
female	42	60.0
Age		
mean	50.1	
SD	12.4	
range	24.0-70.0	
Education (n=68)		
compulsory	5	7.4
junior school	14	20.6
senior school	21	30.9
diploma	16	23.6
university	12	17.6
Occupation (n=68)		
industry	7	10.3
office work	27	39.7
service	7	10.3
pensioner	24	35.3
unemployed	1	1.5
other	2	2.9
Marital status		
single	2	2.9
married	66	94.3
divorced	1	1.4
widowed	1	1.4
Have child (n=69)		
yes	63	91.3
no	6	8.7

Table 2. The clinical data of the patients

	N	%
Type of cancer		
Gynecological cancer	17	24.3
Lung cancer	33	47.1
Breast cancer	20	28.6
KPS		
<=70	41	58.6
>70	29	41.4
Extent of disease		
Local	14	20.0
Local regional	33	47.1
Distance metastasis	23	32.9
Treatment		
Chemotherapy	43	61.4
Chemotherapy+surgery	27	38.6

Table 3. Mean scores and Cronbach's alpha coefficients of each subscale/item in the standard Chinese

	Item no. [a]	Mean (SD)	Cronbach's alpha coefficient [b]
Functioning scales			
Physical (PF)	1 to 5	66.4 (23.7)	0.84
Role (EF)	6, 7	55.5 (35.3)	0.92
Emotional (EF)	21 to 24	67.3 (24.0)	0.83
Cognitive (CF)	20, 25	76.2 (25.0)	0.52
Social (SF)	26, 27	54.5 (32.3)	0.72
Glabal health/Qol (QL2) [c]	29, 30	49.8 (23.3)	0.93
Symptom scales/items [d]			
Fatigue (FA)	10, 12, 18	53.3 (26.1)	0.82
Nausea and vomiting (NV)	14, 15	35.7 (32.1)	0.88
Pain (PA)	9, 19	37.9 (31.2)	0.82
Dyspnoea (DY)	8	32.9 (30.8)	–
Sleep disturbance (SL)	11	45.7 (34.6)	–
Appetite loss (AP)	13	56.7 (33.3)	–
Constipation (CO)	16	40.0 (37.5)	–
Diarrhoea (DI)	17	17.1 (27.1)	–
Financial impact (FI)	28	53.8 (34.2)	–

a Number correspond to the item numbers in the questionnaire.

b Cronbach's alpha coefficients>0.70 indicate adequate scale reliability.

c Scores range from 0 to 100. The higher scores represent higher levels of functioning of QOL..

d Scores range from 0 to 100. The higher scores represent higher levels of symptoms or problems.

Table 4. Pearson's correlation coefficients between the items and subscales in the Standard Chese version of the QLQ C-30

Item		Subscales								
Number [a]	Descriptors [b]	PF	RF2	EF	CF	SF	QL2	FA	NV	PA
1	Strenuous activity	**0.59**	0.65	0.39	0.44	0.50	0.20	−0.65	−0.39	−0.49
2	Long walk	**0.74**	0.58	0.43	0.37	0.35	0.29	−0.70	−0.43	−0.40
3	Short walk	**0.62**	0.35	0.20	0.20	0.31	0.30	−0.48	−0.44	−0.38
4	Stayed in bed/chair	**0.65**	0.49	0.39	0.21	0.29	0.36	−0.58	−0.39	−0.44
5	Needed help eating/dressing/washing	**0.55**	0.40	0.32	0.21	0.41	0.42	−0.37	−0.53	−0.52
6	Limited work	0.66	**0.85**	0.35	0.25	0.58	0.17	−0.54	−0.30	−0.28
7	Limited hobbies	0.57	**0.85**	0.29	0.28	0.57	0.19	−0.49	−0.30	−0.27
21	Tense	0.33	0.23	**0.70**	0.62	0.44	0.17	−0.40	−0.28	−0.45
22	Worried	0.44	0.34	**0.74**	0.43	0.40	0.35	−0.56	−0.35	−0.54
23	Irritable	0.29	0.19	**0.52**	0.45	0.11	0.26	−0.42	−0.24	−0.18
24	Depressed	0.42	0.32	**0.66**	0.43	0.35	0.25	−0.58	−0.43	−0.52
20	Concentration	0.40	0.28	0.45	**0.36**	0.31	0.14	−0.35	−0.29	−0.42
25	Memory	0.22	0.16	0.53	**0.36**	0.32	0.24	−0.41	−0.16	−0.33
26	Family life	0.46	0.53	0.29	0.35	**0.56**	0.20	−0.39	−0.16	−0.43
27	Social life	0.40	0.50	0.42	0.31	**0.56**	0.22	−0.36	−0.22	−0.35
29	Physical condition	0.40	0.21	0.34	0.23	0.21	**0.87**	−0.42	−0.36	−0.44
30	Overall QOL	0.37	0.15	0.28	0.21	0.20	**0.87**	−0.37	−0.25	−0.39
10	Need rest	−0.67	−0.52	−0.53	−0.43	−0.43	−0.32	**0.65**	0.38	0.62
12	Felt weak	−0.48	−0.34	−0.45	−0.27	−0.27	−0.28	**0.63**	0.44	0.36
18	Tired	−0.73	−0.52	−0.60	−0.48	−0.41	−0.45	**0.77**	0.47	0.53
14	Nausea	−0.56	−0.40	−0.46	−0.33	−0.25	−0.31	0.56	**0.78**	0.39
15	Vomiting	−0.49	−0.19	−0.28	−0.20	−0.17	−0.28	0.38	**0.78**	0.38
9	Had pain	−0.57	−0.30	−0.44	−0.37	−0.36	−0.42	0.58	0.38	**0.69**
19	Pain interfered with daily activities	−0.47	−0.22	−0.51	−0.46	−0.42	−0.36	0.49	0.35	**0.69**

a The item number corresponds to the number of each item in the questionnaire.

b The brief item descriptors approximate the questions asked in each item.

c Pearson's correlation coefficients between the subscales and items within the same subscale (corrected for overlap) are in are in bold lettering.

Table 5. Pearson's correlation coefficients among subscales in the standard Chinese version of the QLQ C-30

Subscales	PF	RF2	EF	CF	SF	QL2	FA	NV
RF2	0.64							
EF	0.46	0.33						
CF	0.37	0.27	0.59					
SF	0.48	0.60	0.40	0.38				
QL2	0.40	0.19	0.32	0.23	0.21			
FA	−0.73	−0.54	−0.61	−0.46	−0.43	−0.41		
NV	−0.56	−0.31	−0.39	−0.28	−0.22	−0.31	0.50	
PA	−0.57	−0.29	−0.52	−0.46	−0.43	−0.43	0.59	0.40

The negative values refer to an inverse correlation: e.g., the higher the fatigue, the lower the physical functioning.

Table 6. Comparison of the subscale scores in the QLQ-C30 between the patients in different level of Karnofsky Performance Status (KPS)

subscales/Items	KPS<=70		KPS>70			
	n	mean	n	mean	t*	p
PF	41	58.3	29	77.8	-3.68	0.0005
RF2	41	47.2	29	67.2	-2.43	0.0179
EF	41	61.4	29	75.6	-2.52	0.0143
CF	41	74.0	29	79.3	-0.88	0.3836
SF	41	45.9	29	66.7	-2.77	0.0073
QL2	41	47.2	29	53.4	-1.11	0.2689
FA	41	61.8	29	41.4	3.47	0.0009
NV	41	42.7	29	25.9	2.22	0.0299
PA	41	44.3	29	28.7	2.11	0.0387
DY	41	38.2	29	25.3	1.75	0.0839
SL	41	55.3	29	32.2	2.90	0.0051
AP	41	64.2	29	46.0	2.33	0.0226
DI	41	16.3	29	19.8	-0.32	0.7482
CO	41	42.3	29	36.8	0.60	0.5495
FI	41	58.5	29	47.1	1.38	0.1801

*: t value of t-test

Table 7. Pearson's correlation coefficients of subscales between QLQ-C30 and SF-36

	Subscales of QLQ-C30								
Subscales of SF36	PF	RF2	EF	CF	SF	QL2	FA	NV	PA
PF	0.54	0.51	0.46	0.39	0.29	0.23	−0.57	−0.37	−0.45
RP	0.37	0.45	0.40	0.33	0.37	0.30	−0.52	−0.18	−0.58
BP	0.39	0.18	0.51	0.36	0.38	0.41	−0.45	−0.24	−0.73
GH	0.24	0.26	0.41	0.44	0.30	0.24	−0.28	−0.21	−0.29
VT	0.50	0.32	0.67	0.54	0.44	0.40	−0.65	−0.42	−0.65
SF	0.48	0.54	0.46	0.34	0.64	0.32	−0.50	−0.37	−0.53
RE	0.37	0.34	0.56	0.50	0.36	0.30	−0.46	−0.26	−0.51
MH	0.35	0.32	0.61	0.44	0.29	0.35	−0.42	−0.21	−0.53

PF: physical functioning RP: role-physical BP: bodily pain GH: general health perception
VT: vitality SF: social functioning RE: role-emotional MH: mental health

Table 8. Comprison of mean scores of QLQ-C30 at different time points

	baseline		second		third		forth			
Subscales/items	n	mean	n	mean	n	mean	n	mean	F*	p
PF	69	72.6	69	66.4	53	63.6	44	64.4	1.93	0.1248
RF2	69	69.3	69	55.5	53	46.9	44	46.6	7.19	0.0001
EF	69	64.1	69	67.3	53	66.8	44	62.9	0.44	0.7235
CF	69	75.1	69	76.2	53	75.2	44	72.7	0.20	0.8993
SF	69	59.4	69	54.5	53	48.1	44	43.9	2.90	0.0358
QL2	69	56.8	69	49.8	53	52.0	44	48.9	1.61	0.1879
FA	69	45.4	69	53.3	53	53.2	44	54.0	1.61	0.1873
NV	69	20.5	69	35.7	53	36.2	44	40.9	6.26	0.0004
PA	69	30.0	69	37.9	53	39.6	44	39.4	1.44	0.2313
DY	69	31.9	69	32.9	52	40.4	44	39.4	1.22	0.3025
SL	69	40.6	69	45.7	53	50.9	44	59.1	3.47	0.0168
AP	69	40.6	69	56.7	53	47.2	44	52.3	2.87	0.0372
DI	69	15.5	69	17.1	53	13.8	44	18.2	0.33	0.8054
CO	68	32.8	69	40.0	53	41.5	44	40.2	0.83	0.4804
FI	69	51.7	69	53.8	53	50.3	44	56.8	0.35	0.7891

* F value of ANOVA

日本財団補助金による
２０００年度日中医学学術交流促進事業

⑤．在留中国人研究者研究助成

(6) てんかん患者に観察される環状20番染色体の解析：遺伝子レベルでのてんかん原因遺伝子の解明

てんかん患者に観察される環状 20 番染色体の解析：遺伝子レベルでのてんかん原因因子の解明

李　素雲

中国医科大学　講師

東海大学医学部　分子生命科学 2

要旨

1972 年に Uchida らによって第 20 番染色体が環状化したてんかん症例が報告された。このてんかん患者群の核型は、環状型をヘテロに保有したモザイクであることが明らかになっている。環状型の 20 番染色体では、染色体末端部である 20p13 と 20q13.3 領域が結合しているが、現在のところ正確な切断点は不明である。また、本症例の患者では、第 20 番染色体のみが環状化することから、原因は染色体構造を保持する機構の異常ではないと推測される。本研究では、てんかん発症機構を知るために、環状化した 20 番染色体の組み換えによる切断点の位置と周辺領域の異常の有無に注目する。以下の二つの手法により第 20 番染色体の末端領域を解析した. 第 1 の手法は、ヒト DNA のクローン化による物理地図の作成である。第 2 の手法は 蛍光 in situ ハイブリダイゼーション（FISH）法による 解析であり、個々の細胞を観察対象としてシグナルを検出する. 現在までに第 20 番染色体の末端領域に相当する 20p13 と 20q13.3 に位置する 4 つの BAC/PAC コンティグが得られ、16 個の PAC クローンをプローブとして FISH 解析をおこなった。この結果、既知のてんかん原因遺伝子である KCNQ2 や CHRNA4 を含んだ 4 つのコンティグの位置する各領域が、環状染色体にも存在しており環状化の影響を受けていないことが判明した。また、環状染色体にはテロメア配列も観察されることから、環状染色体が、少なくとも一方の末端を完全に保持していることが示された。長腕側の最末端領域に位置する PAC 608I1 と 809E4 は、 サブテロメリック・リピートと考えられる配列を含み、これらのクローンを用いた FISH によって長腕の末端領域が環状染色体に残されていることが示され、長腕部が染色体の環状化とてんかんの発症に関与しないと結論した。

キーワード： てんかん　環状染色体　 ヒト第 20 番染色体

Genetic investigation of the epilepsy associated with ring chromosome 20

Suyun Li,　Tetsushi Yamagata　and　Hidetoshi Inoko

Purpose: Ring chromosome is a rare chromosomal anomaly. An association of ring chromosome 20 with epilepsy was first reported in 1972. The epilepsy syndrome characterized by mental

Retardation, behavioral abnormalities and nonconvulsive status epileptic seizures with unique EEG expression (continuous bilateral high-voltage slow waves with occasional spikes). Ring chromosome 20 is a characteristic of the Epilepsy syndrome and is often observed as the sole cytogenetic abnormality. More than 30 cases have been reported. Most of the epilepsy patients show different rate of ring chromosome mosaicism (1-100%), and the onset age seems to relate to the degree of mosaicism. The locus of ring formation was mapped between 20p13 and 20q13.3 in all cases by cytologic analysis. These characteristics suggest that some kind of malfunction of the chromosome 20 be caused by ring formation. In this respect, CHRNA4 and KCNQ2 genes located on 20q13.3 near the telomere are excellent candidate genes for the epilepsy associated with ring chromosome 20. In order to elucidate the genetic cause of epilepsy with ring chromosome, identification of precise fusion point on the ring chromosome is necessary. Thus, we established PAC/BAC contig map of the critical region to 20p13 (D20S1156-telomere) and 20q13.3 (D20S20-telomere) based on STS content mapping and public databases. Clones from the contigs can be applied to genome analysis on loss of genetic materials in ring chromosome 20.

Methods:

1.End sequencing of PAC clones: Purification of the PAC clone DNA using the QIAGEN Large-Construct Kit. Digesting the DNA with HindIII, the total products were used for sequencing reaction using T7 and sp6 primers by Bigdye terminator sequence kit. After sequencing on ABI377 automated sequencer, homology searches using BLAST2.1 program was carried out to test the presence of repetitive sequences and any other homology. Unique sequences were used as new STS marker to rescreen the library to get addition clones for the presence of STS.

2.PCR analysis: PCR amplification was conducted in 3 step conventional protocol /GeneAmp PCR System 9700. The annealing temperatures varied for different primer sets.

3. Fingerprinting: DNA was digested with BamHI and fractionated on a 0.4% agarose gel in 1 ×TAE buffer

4. Fluorescence in situ hybridization: Probe DNA labeled with biotin and chromosome 20 marker labeled with digoxigenin by nick-translation method.

Slides of metaphase chromosome were hybridized with the labeled probes.

A battery of chromosome 20 probes was used to identify the genetic content of the ring.

Hybridization was performed using 100ng probe per slide at 37℃for 12-16h. Post -hybridization washes were performed in 50% formamide 2×SSC at 42℃ (3 washes, 5 min each) and then in 0.1 ×SSC at 60℃ (3 washes, 5 min each)

Results:

In this study, we have constructed a high-resolution physical map around CHRNA4 and KCNQ2 genes (D20S1156-telomere) and 20q13.3 (D20S20-telomere) regions based on STS content mapping. Total 4 contigs were constructed (Fig.1) and these provided us with a backbone for identifying the precise fusion point of the ring chromosome. Fluorescence in situ hybridization were performed using the PAC clones from those contigs(Fig.2,4) and the telomeric repeat (TTAGGG)n sequence as probes, (Fig.3) along with lymphoid cells from 3 patients with ring chromosome 20 (table 1). All of the hybridization signals were detected in the ring chromosome, indicating that the CHRNA4 and KCNQ2 genes as well as at least one end sequence of the chromosome were intact in these patients. In addition, we confirmed that some kind of fragile terminal structure of chromosome 20 in the patients was generated without a significant deletion.

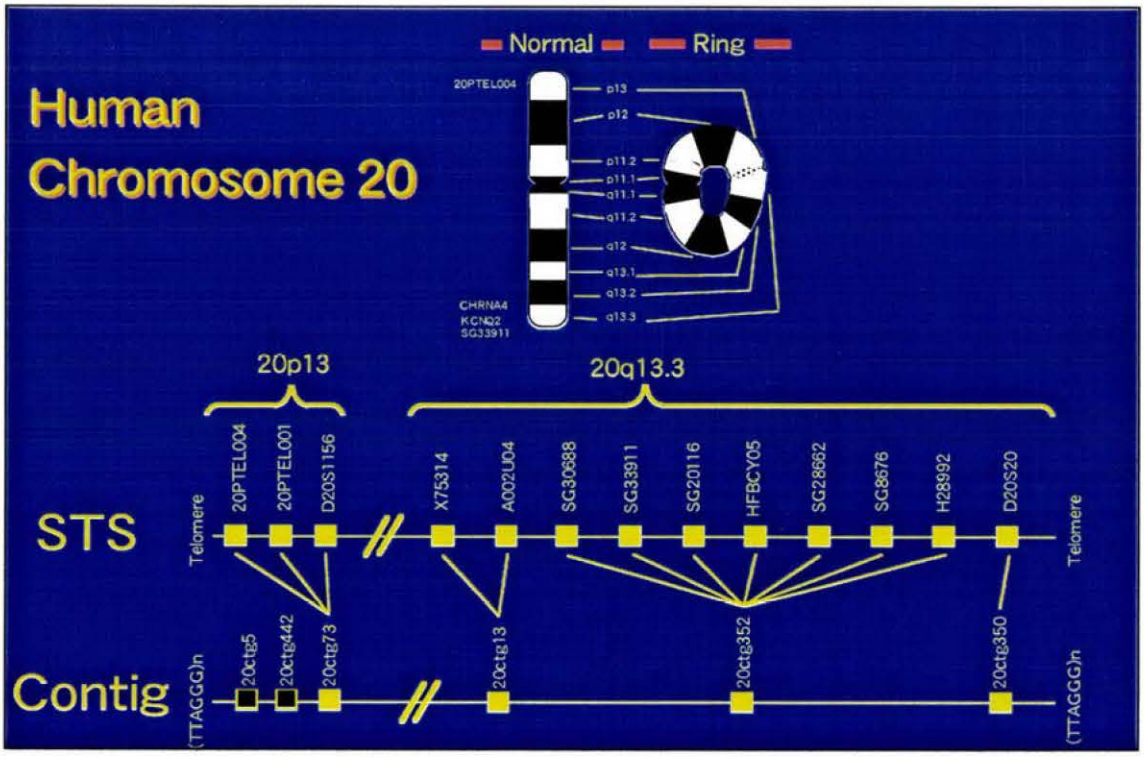


Fig 1. The schematic morphology of human normal and ring chromosome. Three contigs and one contig based on STS mapping and public databases were established in 20q13.3 and 20p13.3, respectively

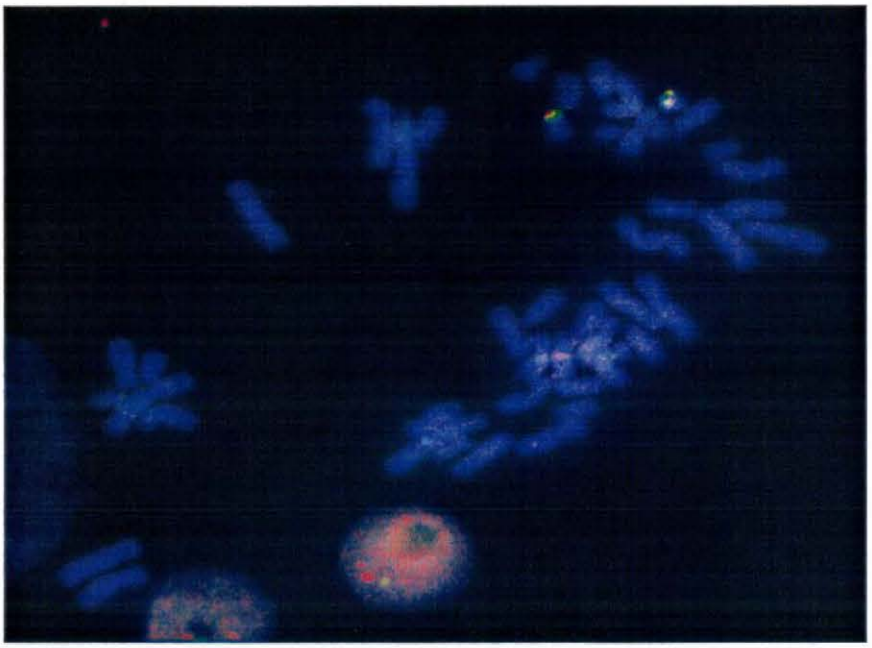


Fig 2. Probe dJ1022E24 (green) is mapped on ctg350. SG33911 content clone dJ610L18 and dJ800N20 were used as specific marker for chromosome 20 (red). FISH signals were present in both normal and ring chromosome 20. Probes mapped on other contigs showed the same signals as this one

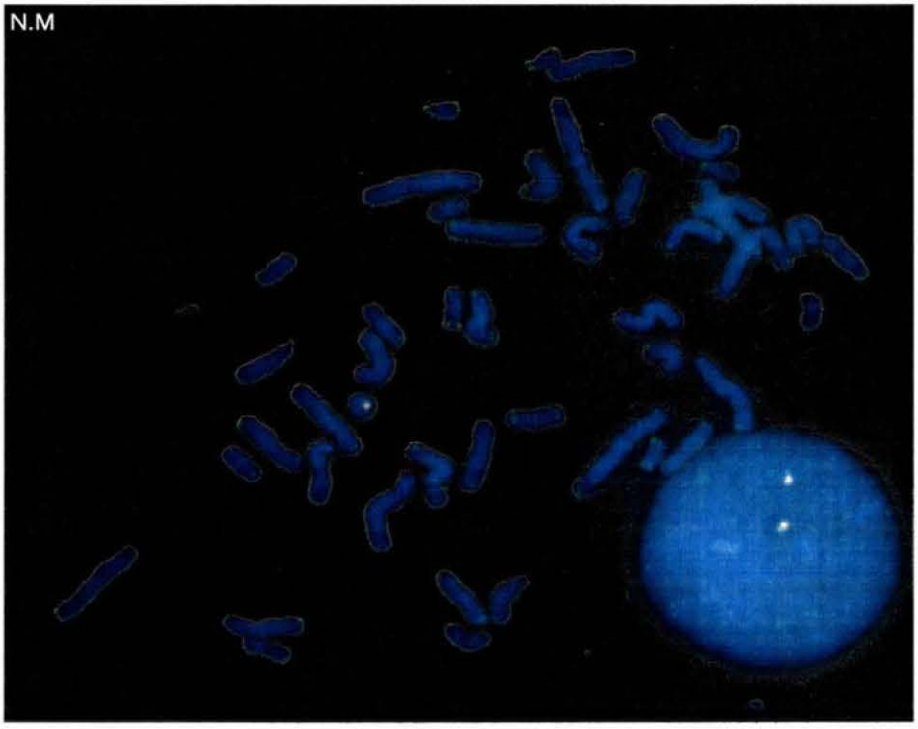
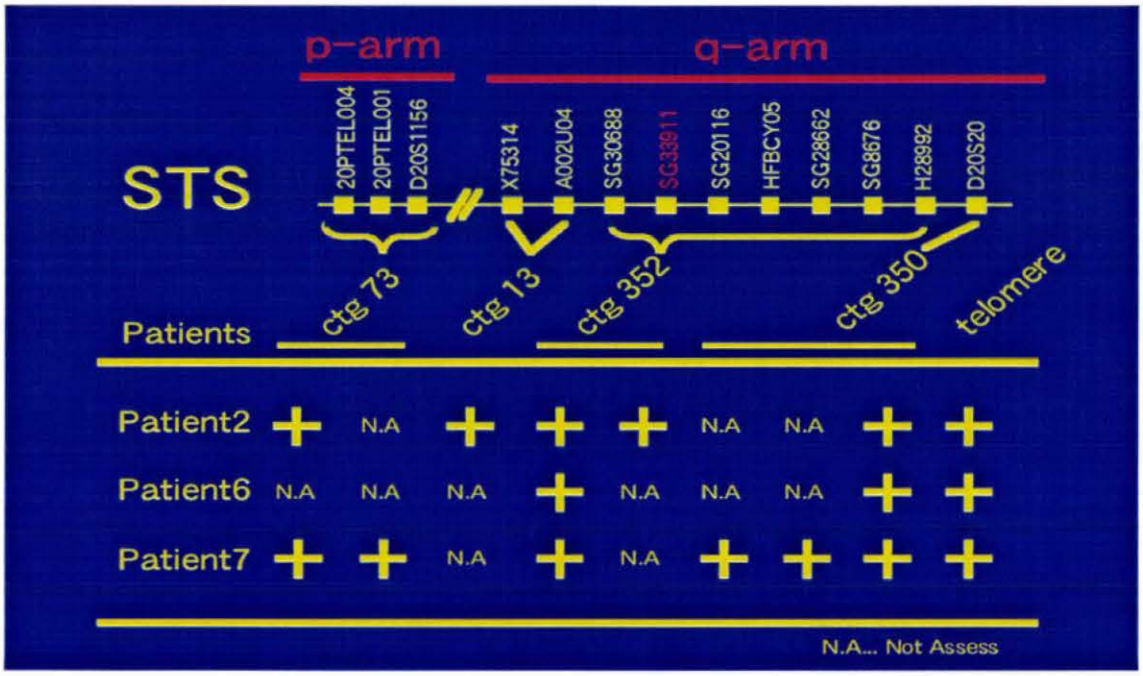


Fig 3. Telomere Repeat (TTAGGG)n (green). Marker dJ800N20 (red). FISH signals were present in both normal and ring chromosome 20. Additional signals appeared in other chromosomes.

Fig. 4. 7.5kb DNA fragment (green) from the end of ctg350 as probe. FISH signals were also present in the ring chromosome 20. Marker dJ610L18 (red)

Table 1



FISH analysis of ring chromosome (3 patients) Telomere repeat and 16 PAC clones from 3 contigs were used as probes, all signals were present. Observation of positive signal on the ring chromosome 20 is indicated by +

Discussion: It is now well established that ring chromosome 20 are associated with a severe phenotype including non- convulsive status epileptics and a specific EEG in the patients. First the CHRNA4 (neuronal nicotinic acetylcholilne receptor alpha 4 subunit gene) and KCNQ2 (potassium channel gene) located 20q13.3 near the telomere are excellent candidate genes for the epilepsy associated with ring chromosome 20, we constructed a high -resolution map 20q13.3 (D20S20-telomere) regions based on STS content mapping. Use a high-resolution cytogenetic based physical map of 20q13 enabled breakpoints to be assigned to a precise region. 14 PAC clones from the 3 contigs in the end of the long arm and telomeric sequence (TTAGGG) n were used as the probes to detect the content of the ring 20. In our three ring cases, all of the hybridization signals were detected in the ring chromosome, indicating that the CHRNA4 and KCNQ2 genes as well as at least one end sequence of the chromosome were intact in these patients. To gain further insight into the mechanism. We hybridized with probe located in close proximity to the telomeric sequences of the long arm of the chromosome 20, the fluorescence signals were present not only in the long arm of the remaining normal chromosome 20 but also in the ring chromosome. This finding could exclude that the ring chromosome had lost the material from the long arm but now a slight deletion (20p004-telomere) can not be ruled out.

Cote *et al*, 1981 and Kosztolanyi, 1987 have postulated that the ring syndrome is not a consequence of the loss of genetic material but is attributable to the death of cells with secondary aneuploidy caused by instability of the ring chromosome. Pezzolo *et al*, 1993 and Canevini *et al*, 1998 demonstrated that both telomeric and subtelomeric sequences are present in one case of ring chromosome 20.This would further support the hypothesis above. On the other hand, Brandt *et al.* 1993 examined the absence of telomeric sequence in the ring 20 by multicolor PRINS, in this case, Ring chromosomes is thought to be the result of breaks at both ends of the chromosome and subsequent fusion of the open ends. And this mechanism of formation presumes a loss of genetic material. Gene loss from the terminal segment and the disordered equilibrium of the residual genes may be responsible for the occurrence of epileptic seizures.

The diversity of origin of ring 20 will hamper attempts to define the mechanism of ring formation. One possibility for this discrepancy may be that the mechanism was different between the cases reported: when all cells containing ring 20 chromosome before gamete formation, breakage and reunion is involved, while abnormal structure of telomere and a probabilistic process of the terminal fusion of 20 chromosome. The other is consistent with our cases analyzed in this report; all of, which showed mosaics of the cells bearing, ring 20 chromosome and normal cells.

In conclusion, we defined the structure of ring chromosome at molecular level. The ring formation

can occur without loss of the genetic material in the long arm of the chromosome 20. We are now processing identification of the deleted region and screening the difference in genomic structure between normal and ring chromosomes to understand molecular mechanism for chromosome specific rearrangement.

References

1. Cote GB, Katsantoni A, Deligeorgis D.

The cytogenetic and clinical implications of a ring chromosome 2.

Ann Genet. 1981; 24(4): 231-5.

2.Pezzolo A, Gimelli G, Cohen A, Lavaggetto A, Romano C, Fogu G, Zuffardi Presence of telomeric and subtelomeric sequences at the fusion points of ring chromosomes indicates that the ring syndrome is caused by ring instability.

Hum Genet. 1993 Aug; 92(1): 23-7.

3.Canevini MP, Sgro V, Zuffardi O, Canger R, Carrozzo R, Rossi E, Ledbetter D, Minicucci F, Vignoli A, Piazzini A, Guidolin L, Saltarelli A, dalla Bernardina B

Chromosome 20 ring: a chromosomal disorder associated with a particular electroclinical pattern. Epilepsia. 1998 Sep; 39(9): 942-51.

4.Brandt CA, Kierkegaard O, Hindkjaer J, Jensen PK, Pedersen S, Therkelsen AJ. Ring chromosome 20 with loss of telomeric sequences detected by multicolor PRINS.

Clin Genet. 1993 Jul; 44(1): 26-31.

5.Kosztolanyi G Does "ring syndrome" exist? An analysis of 207 case reports on patients with a ring autosome. Hum Genet. 1987 Feb; 75(2): 174-9.

6. Yamadera H, Kobayashi K, Sugai K, Suda H, Kaneko S.

A study of ring 20 chromosome karyotype with epilepsy.

Psychiatry Clin Neurosci. 1998 Feb; 52 (1):63-8. Review.

7. Inoue Y, Fujiwara T, Matsuda K, Kubota H, Tanaka M, Yagi K, Yamamori K, Takahashi Y.Ring chromosome 20 and nonconvulsive status epileptics. A new epileptic syndrome.Brain. 1997 Jun; 120 (Pt 6): 939-53.

8. van Langen IM, Otter MA, Aronson DC, Overweg-Plandsoen WC, Hennekam RC, Leschot NJ, Hoovers JM. Supernumerary ring chromosome 20 characterized by fluorescence in situ hybridization. Clin Genet. 1996 Jan; 49(1): 49-53.

日本財団補助金による
２０００年度日中医学学術交流促進事業

⑤．在留中国人研究者研究助成

(16)マウス前脳虚血モデルにおいてカスパーゼ3活性化に対する虚血前処置の抑制効果

マウス前脳虚血モデルにおいてカスパーゼ−3活性化に対する虚血前処置の抑制効果

戚　思華
中国　ハルビン医科大学　第二病院　麻酔学講座　講師
日本　新潟大学　医学部麻酔学講座 外国人客員研究員

要旨

あらかじめ脳に非致死的虚血を負荷した後には、後続する長い虚血による障害が軽減できることを虚血耐性という。虚血耐性機序の解明は将来、脳虚血治療方法の開発に役が立つと思われる。カスパーゼファミリー蛋白質はアポトーシスの発生に深く関与し脳虚血による神経細胞死にも重要な役割を演じると考えられる。この一年間にわたって、当研究者はマウス前脳虚血モデルを用いてこの虚血前処置による保護効果がカスパーゼ−3 活性の変化と関連するか否かのを検索しを行った。

18−22g の雄性 C57/BL マウスをハロセン麻酔下に、両総頚動脈を遮断、虚血を負荷した。動物はコントロール、6 分間虚血、18 分間虚血と 6-18 分間虚血の４群にわけた。カスパーゼ−3 活性は、再潅流後４、24、72 時間の時点に Ac-DEVD-AMC を substrate として蛍光光度法によって測定した。組織的変化について、再潅流後 7 日目に PLP による脳潅流固定を行い、16μm の凍結切片を作製し蛍光免疫組織化学染色行い、線条体領域の残存神経細胞数を算出した。カスパーゼ−3 活性は、コントロールと 6 分間虚血の両群間に有意差がないのに対して、18 分間虚血群と比べて 6-18 分間虚血群は著しく抑制された。また、6-18 分間虚血群の残存神経細胞数は 18 分間虚血群より有意に多かった。
以上の結果から、一過性脳虚血によるニューロン死に対して、虚血前処置はニューロン保護作用があり、カスパーゼ−3 活性の抑制が虚血前処置の神経保護作用に深く関与していることが解った。

Key word: C57BL/6 mice; Ischemic preconditioning; Striatum; Caspase-3; Neuro-specific nuclear protein

Introduction

Present findings indicate that caspases are key mediators of apoptosis initiating complex proteolytic reactions leading to cell assembly and eventually cell death [1,2]. Caspase-3 is an established member of the caspases family known to be involved in final execution phase of apoptosis [2]. There is now evidence in support of activation of caspase-3 in the brain after ischemia in newborn animals. The caspase-3-like activity increases progressively between 1 and 24 h of reperfusion and inactive (32 kDa proform) is cleaved to active forms (e.g. 17 kDa) along with increased immunoreactivity of active caspase-3 in tissue sections [3,4]. Furthermore, treatment with caspase-3 inhibitors reduces brain injury even if applied several hours after the insult [3]. These data suggest that caspase-3 is an important effector for development of brain injury after ischemia.

This phenomenon of ischemic preconditioning that was discovered in the myocardium in 1986 by Murray et al. [5] has been subsequently documented in a variety of tissues including the brain [6,7], skeletal muscle [8], spinal cord [9] and liver [10]. The hope that this fascinating phenomenon may find new therapeutic applications has provided a great impetus to identify the underlying mechanisms. Although a multitude of mediators have been investigated in various tissues and different experimental conditions, including adenosine [11], nitric oxide [12] and heat shock protein [13], the mechanisms by which ischemic preconditioning can protect the cells from a subsequent lethal insult remain to be elucidated.

Taken together, we postulated that attenuation of caspase-3 activation might be a pathway through which ischemic

preconditioning provide neuron protection. To test our hypothesis, we evaluate the extent to which caspase-3-like activity and neuronal cell damage after lethal ischemia are affected by ischemic preconditioning.

Materials and methods

This study was approved by the Committee on the Guidelines for Animal Experimentation of Niigata University.

Experiments were performed in C57Black/Crj6 mice. The methods for induction of cerebral ischemia and ischemic tolerance were described previously [14]. Briefly, mice weighting 18 to 22 g (8-9 weeks olds) were given free access to food and water and housed in a climate-controlled environment before surgery. Animals were divided into four groups (n = 6 for each). Forebrain ischemia was induced by occlusion of bilateral common carotid arteries for 18 min. In conditioning ischemic group, animals were treated with two episodes of 6-min bilateral common carotid artery occlusion (BCCAO) at an interval of 24 h. In ischemic preconditioning group, animals were treated with two episodes of 6-min ischemia BCCAO 48 h before the 18-min BCCAO. In sham group, bilateral common carotid arteries were exposed for two times at an interval of 48 hours. During the operation, the rectal temperature was maintained at 36.8 to 37.2°C. After recovery from anesthesia, the animals were cared in a warm, humidified chamber (32-33°C) for 3 hours before being returned to their cages.

essment of neuronal damage

On the 7th day after reperfusion, animals were reanesthetized by an intraperitoneal injection of sodium pentobarbital (150 mg/kg) and transcardiacally perfused with 0.1 M PBS containing heparin (4 units/ml), followed by 0.01 M periodate-0.075 M lysine-2% paraformaldehyde (PLP) in 0.0375 M phosphate-buffered solution (pH 6.3). The whole brain was removed from the skull, and post-fixed in the same fixative for 4 h. Thereafter, the brains were washed in gradually increasing concentrations of sucrose in 0.1 M PBS (10% for 4 h, 15% and 20% for 12h each) and then rapidly frozen in 2-methylbutane chilled at -80°C. Consecutive coronal sections (12 μm) were prepared on a microtome and used for assessing neuronal damage. Neurons in the striatum were visualized by neuro-specific nuclear (NeuN) protein immunofluorescent staining. After the sections were washed four times with 0.1 M PBS, they were incubated with 5% goat serum in 0.1 M PBS containing 1.5% BSA and 0.3% Triton X-100 (blocking solution) for 120 minutes at room temperature. The sections were then incubated with mouse anti-NeuN monoclonal antibody (Chemicon Inc. Temecula, CA, USA) diluted with the blocking solution at a concentration of 5 μg/ml at 4°C overnight. After washing, the sections were incubated with Cy3-labeled goat anti-mouse IgG (Chemicon Inc. Temecula, CA, USA) diluted in the ' ' cking solution for 6 h at room temperature. Sections were examined with a Nikon fluorescence microscope (Optiphot-2, ...on, Tokyo, Japan). The number of NeuN–positive cells was counted in five assigned subregions (250 × 125 μm) as described previously [14].

Fluorometric assay of caspase-3-like activity

Caspase-3-like activity was measured in extracted cytosolic fraction, as described [15] with modifications. At 8, 24 and 72 h after reperfusion and 24 h after sham operation, the animals were anesthetized with an intraperitoneal injection of sodium pentobarbital (150 mg/kg) and decapitated. Brains were quickly removed, and the bilateral striatums were dissected. Striatal protein extracts were prepared on ice by Dounce homogenization of tissues in a lysis buffer containing 15 mM Tris-HCl (pH 7.5), 250 mM sucrose, 2mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM $MgCl_2$, 1 mM DTT, 50 mM NaF, 100 mM Na_3VO_4, 2 mM sodium pyrophosphate, 100 μg/ml of PMSF and 10 μg/ml each of pepstain, leupeptin, and aprotinin (all obtained from Sigma, St. Louis, MO, USA). Cell lysates were centrifuged at 14000 g for 60 min, and the supernatants were stored at -80°C until use. Protein concentrations were determined using the method of Lowry with BSA as a standard. For each reaction, 100 μg of the striatal protein extracts and 5 μl (1 μg/μl) of reconstituted Ac-DEVD-AMC were mixed with the reaction buffer [20 mM HEPES (pH

7.5), 10% glycerol, 2 mM DTT] in a total volume of 150 μl. Ac-DEVD-AMC [*N*-acetyl-Asp-Glu-Val-Asp-AMP (7-amino-4-methylcoumarin)] (PharMingen, component no.) was used to determine caspase-3-like activity. Ac-DEVD-AMC has been reported to have linear Michaelis-Menton kinetics with a Michaelis constant of 10 μmol/L for caspase-3. Caspase-3 cleaves the tetrapeptide between D and AMC, releasing the fluorescent AMC, which can be quantified by microscopic fluorospectrometer (JASCO CAM-500, Japan Spectroscopic Co., Tokyo, Japan), using an excitation wavelength of 380 nm and emission wavelength of 440 nm. The change of caspase-3-like activity was expressed by the net change in fluorescence.

Statistical analysis

Data are expressed as mean ± standard deviation (SD) and analysed using Student's t test or one-way ANOVA as appropriate. ANOVA was followed by Dunnett's *post hoc* test for multiple comparisons. We considered significant differences at less than 5% level of p value.

Results

A sublethal Ischemic preconditioning protects neurons against subsequent prolonged ischemia

The extent of neuroprotection achieved by 6-min ischemic preconditioning was similar to that reported previously [14]. There e no significant differences between sham group and 6-min ischemia group in the number of NeuN-positive neurons in the bilateral striatum. In contrast, an 18-min ischemia caused a near complete loss of NeuN-positive neurons in the bilateral striatum in 4 out of 6 animals. In ischemic preconditioning group, a 6-min ischemic episode performed 48 h before the 18-min ischemia strongly reduced the loss of NeuN-positive neurons due to the ischemia group in 5 out of 6 animals.

Ischemic preconditioning decreased caspase-3-like activity

In comparison with sham group (2.28 ± 0.47 arbitrary units), almost no changes in conditioning ischemic group (2.80 ± 0.75 arbitrary units) in the caspase-3-like activity of striatum extracts as assessed by monitoring the cleavage of the fluorogenic peptide substrate Ac-DEVE-AMC. In contrast, an 18-min ischemia caused significant increasing of caspase-3-like activity at 8 (17.68 ± 1.93 arbitrary units), 24 (14.03 ± 1.77 arbitrary units) and 72 h (9.96 ± 1.83 arbitrary units) after reperfusion, respectively. In ischemic preconditioning group, 6-min BCCAO significantly reduced the caspase-3-like activity induced by subsequent 18-min ischemia at 4 h (10.63 ± 1.57; $p < 0.05$, compared with 18-ischemia group) and 24 h (7.5 ± 0.76, $p < 0.05$), but not 72 h of reperfusion. The effect of ischemic preconditioning to caspase-3-like activity induced by subsequent lethal ischemia at 4 h, 24 h ' 72 h for reperfusion was shown in figure.

.scussion

Our major finding is that striatal neuroprotection achieved by ischemic preconditioning was associated with an attenuation of caspase-3-like activity in striatal extracts in C57Black/Crj6 mice.

There have been several lines of evidence indicating that activation of caspase-3 is involved in ischemic neuronal death [16, 17]. At the transcription level, a study has found that transient global forebrain ischemia upregulated expression of the caspase-3 mRNA in rat hippocampal CA1 pyramidal neurons [18]. Additionally, many studies have shown that cerebral ischemia enhanced caspase-3 activity [19]. The involvement of caspase-3 in ischemic neuronal death is further supported by that inhibition of caspase-3 activity with chemically synthesized peptides enables to protect neurons against ischemia [20].

Recent studies have shown that attenuation of caspase-3 activation may be involved in ischemic tolerance. Studies on the heart [21] and the liver [22] have shown that ischemic preconditioning could inhibit caspase-3 activation. Our study confirmed that inhibition of caspase-3 activation by ischemic preconditioning occurred in the mouse brain also. Taken these results together, attenuation of caspase-3 activation may take part in the neuroprotection achieved by ischemic preconditioning.

Why ischemic preconditioning could inhibit caspase-3 activation induced by subsequent prolonged ischemia? It is known that caspase-3 exists as an inactive precursor (procaspase-3) in the mammalian cells. The procaspase-3 can be activated via both the extrinsic and intrinsic pathways. The extrinsic pathway involves in caspase-8_activation through tumor necrotic factor family of cytokine receptors. The intrinsic pathway needs the release of cytochrome c from mitochondria. Once in the cytosol, cytochrome c binds to Apaf-1 and enables this protein to activate procaspase-9, with the existing of dATP. The activated caspase-9 then cleaves pro-caspase-3 to the active form of caspse-3 [23]. There have been several studies showing that ischemic preconditioning enables to attenuate the release of cytochrome c from mitochondria [24]. So inhibition of cytochrome c release from mitochondria may take part in attenuating caspase-3 activation by ischemic preconditioning. Further study is necessary, however, to examine if other pathways are involved.

Conclusion

The ischemic preconditioning inhibited the caspase-3-like activity induced by subsequent lethal ischemia, suggesting that attenuation of caspase-3 activation by ischemic preconditioning may be an important step in protecting the brain against ischemia/reperfusion injury

erences

1. Kothakota S. Azuma T. Reinhard C. Klippel A. Tang J. Chu K. McGarry TJ. Kirschner MW. Koths K. Kwiatkowski DJ. Williams LT. Caspase-3-generated fragment of gelsolin: effector of morphological change in apoptosis. *Science* 1997;278:294-8.
2. Miller DG. The role of the caspase family of cysteine proteases in apoptosis. *Semin immunol* 1997;9:35-9.
3. Cheng Y, Deshmukh M, D'Costa A et al. *J Clin Invest* 1998;101:1992-9.
4. Zhu C. Wang X. Hagberg H. Blomgren K. Correlation between caspase-3 activation and three different markers of DNA damage in neonatal cerebral hypoxia-ischemia. *Journal of Neurochemistry* 2000;75:819-29.
5. Murry CE. Jennings RB. Reimer KA. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation* 1986;74:1124-36.
6. Takahata Y. Shimoji K. Brain injury improves survival of mice following brain ischemia. *Brain Res* 1986;381:368-71.
7. Glazier SS. O'Rourke DM. Graham DI. Welsh FA. Induction of ischemic tolerance following brief focal ischemia in rat brain. *J ereb Blood FlowMetab*1994;14:545-53.
8. ang CY, Yang RZ, Zhong A, Xu N. Boyd B. Forrest CR. Acute ischaemic preconditioning protects against skeletal muscle infarction in the pig. *Cardiovasc Res* 1995;29:782-8.
9. Sakurai M, Hayashi T, Abe K. Aoki M, Sadahiro M, Tabayashi K. Enhancement of heat shock protein expression after transient ischemia in the preconditioned spinal cord of rabbits. *J Vasc Surg* 1998;27:720-5.
10. Nilsson B, Friman S, Wallin M, Gustafsson B, Delbro D. The liver protective effect of ischemic preconditioning may be mediated by adenosine. *Transpl Int* 2000;13:558-61.
11. Peralta C, Hotter G, Closa D, Gelpi E, Bulbena O, Rosello-Catafau J. Protective effect of preconditioning on the injury associated to hepatic ischemia-reperfusion in the rat: role of nitric oxide and adenosine. *Hepatology* 1997; 25:934-7.
12. Heurteaux C. Lauritzen I. Widmann C. Lazdunski M. Essential role of adenosine, adenosine A1 receptors, and ATP-sensitive K+ channels in cerebral ischemic preconditioning. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92:4666-70.
13. Mestril R. Chi SH. Sayen MR. O'Reilly K. Dillmann WH. Expression of inducible stress protein 70 in rat heart myogenic cells confers protection against simulated ischemia-induced injury. *J Clin Invest* 1994;93:759-67.

14. Chaoran Wu, Ren-Zhi Zhan, Sihua Qi, Hideyoshi Fujihara, Kiichiro Taga, Koki Shimoji. A forebrain ischemic preconditioning model established in C57Black/Crj6 Strain mice. (in press)

15. Enari M. Talanian RV. Wong WW. Nagata S. Sequential activation of ICE-like and CPP32-like proteases during Fas-mediated apoptosis. *Nature* 1996;380:723-6.

16. Sasaki C, kitagawa H, Zhang WR, Warita H, Sakai K, Abe K. Temporal profile of cytochrome c and caspase-3 immunoreactivities and TUNEL staining after permanent middle cerebral artery occlusion in rats. *Neurol Res* 2000;22:223-8.

17.Puka-Sundvall M, Wallin C, Gilland E, Hallin U, Wang X, Sandberg M, Karlsson J, Blomgren K, Hagberg H. Impairment of mitochondrial respiration after cerebral hypoxia-ischemia in immature rats: relationship to activation of caspase-3 and neuronal injury. *Brain Res* 2000 29;125:43-50.

18. Ni B. Wu X. Su Y. Stephenson D. Smalstig EB. Clemens J. Paul SM. Transient global forebrain ischemia induces a prolonged expression of the caspase-3 mRNA in rat hippocampal CA1 pyramidal neurons. *J Cereb Blood Flow Metab*1998;18:248-56.

19. Chen J. Nagayama T. Jin K. Stetler RA. Zhu RL. Graham SH. Simon RP. Induction of caspase-3-like protease may mediate delayed neuronal death in the hippocampus after transient cerebral ischemia. *J Neurosci* 1998;18:4914-28.

Himi T, Ishizaki Y, Murota S. A caspase inhibitor blocks ischaemia-induced delayed neuronal death in the gerbil. *Eur J Neurosci* 1998;10:777-81.

21. Piot CA, Martini JF, Bui SK, Wolfe CL. Ischemic preconditioning attenuates ischemia/reperfusion-induced activation of caspases and subsequent cleavage of poly (ADP-ribose) polymerase in rat hearts in vivo. *Cardiovasc Res* 1999;44:536-42.

22. Yadav SS. Sindram D. Perry DK. Clavien PA. Ischemic preconditioning protects the mouse liver by inhibition of apoptosis through a caspase-dependent pathway. *Hepatology* 1999;30:1223-31.

23. John C. Reed. Mechanisms of Apoptosis. *Am J Pathol* 2000;157:1415-30.

24. Zhan R-Z, Wu Chaoran, Fujihara H, Taga K, Qi Sihua, Naito M, Shimoji K. Both caspase-dependent and –independent pathways are involved in hippocampal CA1 neuronal death due to loss of cytochrome c from mitochondria in a rat forebrain ischemia model. *J Cereb Blood Flow Metab* (in press 2001).

日本財団補助金による
２０００年度日中医学学術交流促進事業

⑤．在留中国人研究者研究助成

(7) 「インフルエンザウイルス血球凝集の脱シアル酸の場所に於ける検討」

インフルエンザウイルス血球凝集素の脱シアル酸の場所における検討

駱晨虹
上海市第二肺科病院　医者
名古屋市立大学医学部　ウイルス教室

要旨

B 型インフルエンザウイルスは血球凝集素 (HA) とノイラミニダーゼ(NA)の 二種類膜糖蛋白質をもっている。それらの糖蛋白質の糖鎖末端にシアリ酸が付着している。ノイラミニダーゼはそのシアリ酸及び細胞表面のシアリ酸を切って、形成されたウイルス粒子を細胞表面から遊離させる (Palese、P. et al.1974)。ノイラミニダーゼが血球凝集素のシアリ酸をどこで切るのかはまだ明らかにされていない。しかし、血球凝集素の脱シアリ酸がゴルギ装置で起こると推測されている (Wandinger-Ness et al.1990)。我々の研究結果は B 型インフルエンザウイルスの場合には感染細胞 MDCK の血球吸着活性に血球凝集素の脱シアリ酸が必要であることを示した (Luo et al.1999)。Zanamivir は A 型及び B 型インフルエンザウイルスのノイラミニダーゼの阻害剤で、ノイラミニダーゼの活性を阻害し、ウイルスの増埴を阻止する。Morris などはノイラミニダーゼ阻害剤 Zanamivir が MDCK 細胞膜を越えないことを示した。我々の研究は Zanamivir が B 型インフルエンザウイルスに感染した MDCK 細胞表面でノイラミニダーゼの活性を阻害することにしたがって、血球吸着活性を阻害することを明らかにした。以上の結果により、我々は B 型インフルエンザウイルスの HA は感染した MDCK 細胞表面で脱シアリ酸されたと推測した。さらに、二次元電気泳動で MEMO 中に Zanamivir が存在及び存在していない場合に免疫沈降で感染した MDCK 細胞から取られた L-(^{35}S)methionine ラベルされた HA を泳動して、異なる条件で血球凝集素の等電点を調べた。その結果は異なる条件で B 型インフルエンザウイルス HA の等電点が違うこと或いは HA に付いているシアリ酸数が違うことを示した。B 型インフルエンザウイルスの HA は MDCK 感染細胞表面で脱シアリ酸されたことを更に示した。

Key Word：B 型インフルエンザウイルス　Zanamivir　MDCK 細胞

目的：B 型インフルエンザウイルスは血球凝集素 (HA) とノイラミニダーゼ(NA)の二種類の膜糖蛋白質を持っている。それらの膜糖蛋白質末端にシアル酸が付着している。ノイラミニダーゼは血球凝集素及び細胞表面のシアル酸を切って、形成されたウイルス粒子を細胞表面から遊離させる。しかし、ノイラミニダーゼはウイルス粒子形成過程のどこで血球凝集素のシアル酸を切るのかはまだ明らかにされていない。血球凝集素の脱シアル酸の場所を究明するために本研究を行った。

材料と方法：

ウイルス、細胞および抗体：インフルエンザウイルスB／Kanagawa／76, B／Kanagawa／76由来のノイラミニダーゼ耐温株 ts5 (SHIBATA, S., et al, 1993) .インフルエンザウイルスの増殖細胞 Madin-Darby canine kidney cell、mouse 由来の anti-HA monoclonal 抗体、ウサギ由来の anti-NA polyclonal 抗体

ノイラミニダーゼ活性阻害剤：Zanamivir （4-guanidino-2, 3-dehydro-N-acetylneuraminc acid, GG167)

NA activity assays: 感染したMDCK細胞はMEMと一緒に回収された、その細胞のNA活性はfetuinを基質として用いて、その細胞と37℃で18時間インキュベションし、分析された。(Palmer et al., 1975) .

Pulse labeling：MDCK細胞はB／Kanagawa／76に感染した6時間後、MEMをmethionine freeのMEMに替えして、細胞を37℃で1時間インキュベーションした後、methionine freeのMEMにL-[^{35}S] methionine (Amersham；1,000Ci／mmol) を加えてから、細胞を37℃で1時間インキュベションした。ラベルしたMDCK感染細胞を回収した (MAENO, K et al., 1979)。

蛍光抗体染色：B／Kanagawa／76に感染した8時間後のMDCK細胞をエタノール：アセトン（1：1）で固定してから、マウス由来の anti-HA monoclonal 或いはラビット由来 anti-NA polyclonal 一次抗体を感染細胞内の抗原に37℃で1時間反応させる。PBSで感染細胞を洗い、anti-IgG 抗体 conjugated- FITC 或いは Rhotamine を二次抗体として一次抗体と反応させる。蛍光顕微鏡でHAとNAの局在を観察した。

免疫沈降実験：回収したMDCK感染細胞をRIPA Bufferでボルテクスを使って懸濁させた後、遠心して、上清を取り出して、anti-HA monoclonal 抗体を上清に加えて、4℃で3時間ローテーターで攪拌し、反応させた。次、IgGと結合できるSepharose 4Bを加えて、4℃に一晩で攪拌し、反応させた。そして、遠心でHA抗原抗体複合体と結合したSepharose4Bを取り残った。残った複合体に等電点電気泳動バッファIIを加えて、5分間100℃で処理した後、遠心して、上清を取った。HA蛋白質を含んだ上清を二次元電気泳動に用いた。

二次元電気泳動：免疫沈降法で取られた HA の等電点を二次元電気泳動法 (O' Farrell, P.H et al., 1975) により調べた.

結果：

感染細胞のノイラミニダーゼの活性、血球吸着及びZanamivirの影響

B／Kanagawa/76 に感染した MDCK 細胞の血球吸着細胞数とノイラミニダーゼの活性の経時的の変化は観察された。血球吸着の細胞数は Figla に示されたようにノイラミニダーゼの活性の増加に従って、増えた。ノイラミニダーゼの阻害剤 Zanamivir は HA の血球吸着にどんな影響を与えるかを調べるため、異なる濃度の Zanamivir を感染 MEM に加えて、感染 8 時間後の血球吸着細胞数及びノイラミニダーゼの活性を観察した、この結果は Figlb に示されたように Zanamivir 濃度の増加に伴って血球吸着細胞数とノイラミニダーゼの活性が減っている。

血球凝集素の等電点 (pI)におけるノイラミニダーゼ活性の阻害剤 (Zanamivir) の影響

MEM 中に Zanamivir が存在及び存在していない或いは Zanamivir を含む MEM 中に bNA を加えた条件で感染細胞から免疫沈降で取られたラベルされた血球凝集素を二次元電気泳動に用いて、それらの血球凝集素の等電点を調べた。fig2 に示されたように MEM に Zanamivir がない場合に血球凝集素の等電点は Zanamivir がある場合の等電点より塩基性に移動している。感染 MEM に Zanamivir を入れて 8 時間後、感染細胞をバクテリア由来のノイラミニダーゼで処理した血球凝集素の等電点も Zanamivir がある場合の等電点より塩基性に移動している。B 型インフルエンザウイルスの NA 温感株 ts 5 (SHIBATA, S., et al., 1993)は 37℃で MDCK 細胞に感染した 5 時間後、方法に述べたように L- [^{35}S] methionine でラベルしてから、免疫沈降で取られた HA を二次元電気泳動に用いて流した。この HA の等電点は感染 MEM 中に Zanamivir が存在する場合の HA の等電点と一致した。

蛍光抗体の二重染色で感染細胞内 HA と NA の分布状況：

HA と NA に対する特異抗体を用いて、方法に述べたように二重染色を行った、その結果は Fig3 に示されたように感染細胞内に HA と NA の分布がほぼ一致であることを示した。

考察：

B 型インフルエンザウイルスの HA 蛋白質の血球吸着活性はノイラミニダーゼでの脱シアル酸が必要である (Luo et al., 1999) . ノイラミニダーゼ活性の阻害剤 Zanamivir は MDCK 感染細胞の血球吸着の細胞数への阻害が Zanamivir の濃度の高さに従って、強くなった。それは HA 蛋白質の脱シアル酸が Zanamivir に阻害されていることを示した。Morris などはノイラミニダーゼ阻害剤 Zanamivir が MDCK 細胞膜を越えないことを示したので、ノイラミニダーゼの脱シアル酸の活性は細胞表面で阻害されて、この二つの糖蛋白質はゴルギ体で糖鎖を付けられてから小胞体で細胞膜への輸送まで互いに作用を起こしていないと推測した。もしこの推測は確かならば、Zanamivir が存在しているかどうかにより HA 蛋白質 pI の差があると考えられる。結果に述べたように確かにこのような差が存在している。なぜ細胞膜表面で脱シアル酸が起こるのかを検討するため、HA と NA 蛋白質の感染細胞の分布を蛍光抗体の二重染色で観察した。HA と NA 蛋白質の感染細胞の分布差はないと示された。我々は免疫電顕で trans-golgi と sortig vesicle での HA と NA 蛋白質の分布差をまた観察していないので、細胞内で脱シアル酸しない原因は HA と NA 蛋白質の感染細胞内での局在の違いだと判断できない。A 型インフルエンザウイルスの場合には trans-golgi に局在する M2 蛋白質は H7 の HA の変化を阻害する (Sugrue, R. J. & Hay, A. J. 1991) . Sakaguchi らは M2 蛋白質が HA 蛋白質の輸送に影響を与えることを示した。B 型インフルエンザウイルスの場合に M2 蛋白質と同じような活性を持っている蛋白質は NB である。そして、我々は NB 蛋白質が細胞内で HA 蛋白質に脱シアル酸をさせない原因かもしれないと考えている。

我々はその細胞表面での脱シアル酸の原因を究明するため、今度、HA、NA 及び NB 蛋白質のウイルス粒子形成過程での位置関係を解析したい。

References

Luo,C.,Nobusawa,E.,&Nakajima,K.,(1999).An analysis of the role of neuraminidase in the receptor-binding activity of influenza B virus: The inhibitory of effect of Zanamivir on heamadsorption. J. Gen. Virol. 80, 2969-2976

Maeno,K.,Yoshii,S.,Mita,K.,Hamaguchi,M.,Yoshida,T.,Linuma,M.,Nagai,Y.,Matsumato,T.,(1979). Analysis of the inhibitory effect of canavanine on the replication of influenza RI/5+ virus. Inhibitory of assembly of RNP. Virology. 94, 128-37

Morris,J.S., Price,E.G., Barnett,J.M., Hiscox,S.A., Smith,H. & Sweet,C.(1999).Role of neuraminidase in influenza virus-induced apotosis J.Gen.Virol

O'Farrell, PH. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins J.Biol.Chem.,(1975).250 4007-4021

Palese,P.,Tobita,K.,Ueda,M.,&Compans,R.W.(1974).Characterizationof temperature sensitive influenza virus mutants defective in neuraminidase. Virology 61,397-410

Palmer,D.F., Coleman,M.T., Dowdle,W.R.,& Schild,G.C.,(1975).Neuraminidase inhibition test. In Advanced Laboratory Techniques for Influenza Diagnosis,pp. 107-126. Atlanta:Center for Disease Control.

Sakaguchi,T.,Leser,G.P.,and Lamb,R.A.,(1996).The ion channel activity of the influenza virus M2 protein affects transport through the Golgi apparatus J. Cell Biol.133,733-747

Shibata,S.,Yamamoto-G.F., Maeno,K.,Hanaichi,T.,Fujita,Y.,Nakajima,K.,Imai,M.,Komatsu,T.&Sugiura,S.(1993). Characterization of a temperature-senstive influenza B virus mutant defective in neuraminidase. Journal of Virology 67 3264-3273

Sugrue,R.J., & Hay,A.J.(1991). Structural characteristics of the M2 protein of influenza A viruses: Evidence that it forms a tetrameric channel. Virology 180,617-624.

WandingerNess,A.,Bennett,M.K., Atonny, C.& Simons,K.(1990).Distinct transport vesicles mediate the delivery of pla sma membrane proteins to apical and basolateral domains of MDCK cells. The Journal of Cell Biology 111, 987-1000

Figure legends

Fig.1.Effect of Zanamivir on haemadsorption and neuraminidase activity
Time course of haemadsorption (○) and neuraminidase activity (□) after B/Kanagawa/73 virus infection of MDCK cells(a). Effects of Zanamivir on haemadsorption of MDCK cells (b) are shown. Haemadsorption and neuraminidase activity were measured at 8h postinfection. Haemadsorption was carried out at 4℃ for 15min with CRBC, then haemadsorbed cells were counted under a microscope.Neuraminidase activity was measured as described in the method. (■ shows haemadsorption activity.(□)shows neuraminidase activity.
Fig.2.Effect of Zanamivir to isoelectric point of haemagglutinin
Haemagglutinin proteins labeled by 35s-methionine and extracted by inmmunoprecipitation from MDCK cells infected with B/Kanagawa/73 in maintenance medium (a)or in maintenance medium+Zanamivir(b),in maintenance medium+Zanamivir, then treated by bacterial neuraminidase were electrophorated with two-dimensional electrophoresis.
Fig.3.The distribution of HA and NA proteins
The distribution of HA(a)and NA(b)proteins on infected MDCK cells

Fig1

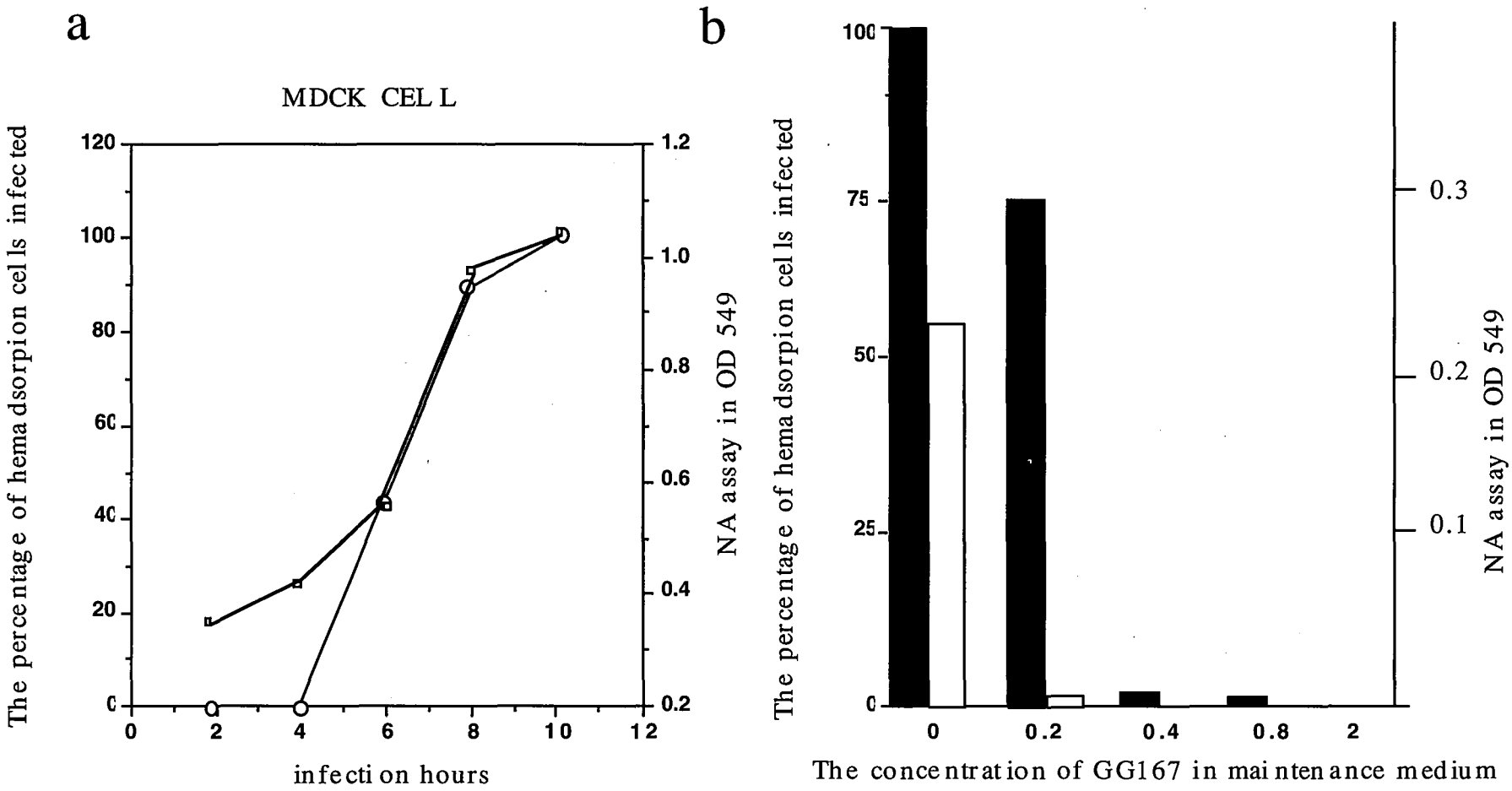
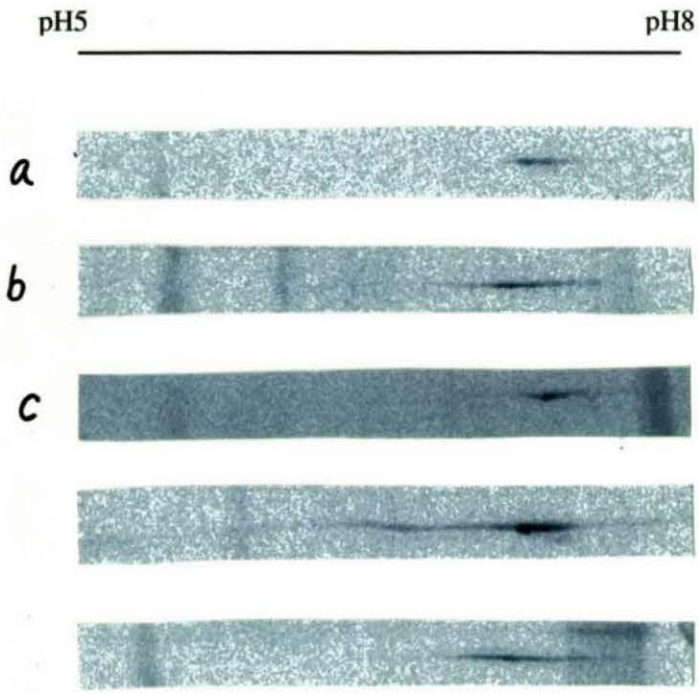

a
MDCK CELL
The percentage of hemadsorpion cells infected
NA assay in OD 549
infection hours
0
20
40
60
80
100
120
0.2
0.4
0.6
0.8
1.0
1.2
0
2
4
6
8
10
12
b
The percentage of hemadsorpion cells infected
NA assay in OD 549
The concentration of GG167 in maintenance medium
0
25
50
75
100
0.1
0.2
0.3
0
0.2
0.4
0.8
2

Fig 2

Two-dimensional Electrophoresis of HA Protein



MDCK B/K Zanamivir(-) HA protein

MDCK B/K Zanamivir(+) HA protein

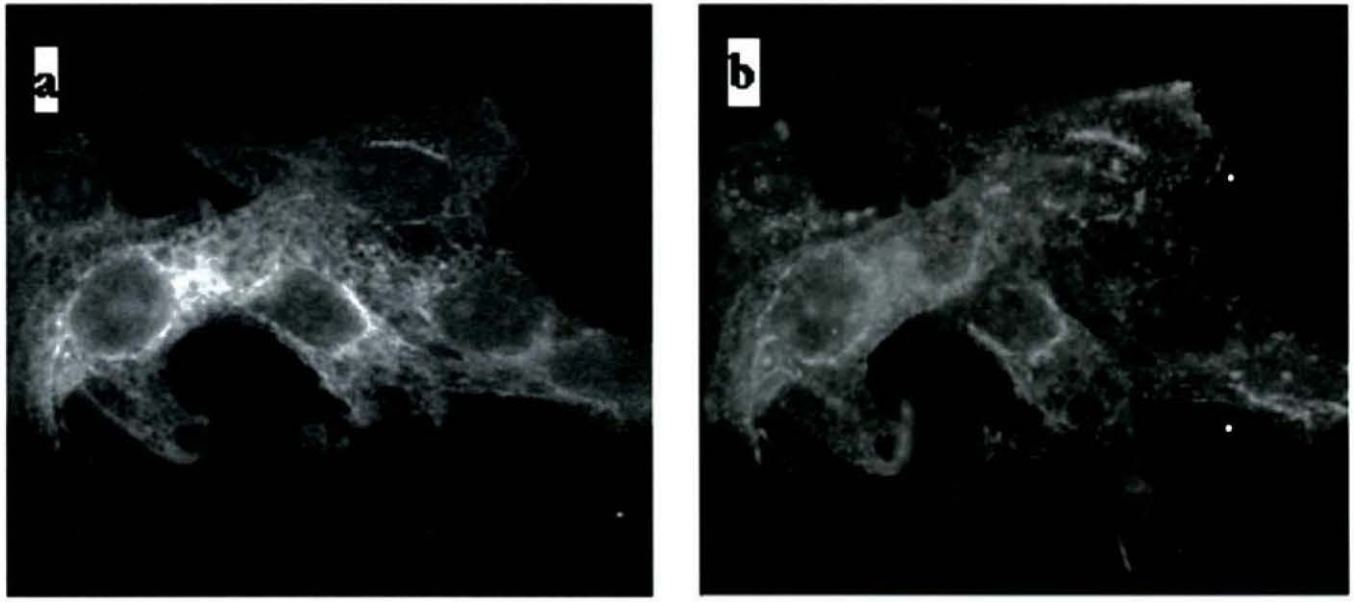
MDCK B/K Zanamivir(+)+bNA HA protein

MDCK B/K 20℃ 1hr Zanamivir(+)HA protein

MDCK ts5 37℃ HA protein

Fig3

Immunostain with anti HA-conjugated FITC or anti NA-conjagated Rhotamine



Haemagglutinin **Neuraminidase**

日本財団補助金による
２０００年度日中医学学術交流促進事業

⑤．在留中国人研究者研究助成

（8）創傷治癒過程に於ける制御機構の研究

日本財団助成金による
2000 年度日中医学学術交流促進事業報告書

－在留中国人研究者研究助成－

2001 年 3 月 3 日

財団法人 日中医学協会
理事長 中島 章 殿

研究発表中または研究中の本人のスナップ写真、及び発表論文のコピーを添付

1．研究者氏名 呂月予

研究機関 日本医科大学病理学第二教室 研究指導者 石渡 俊行 職名 講師

所在地 〒113-8602 東京都文京区千駄木1-1-5 電話 03-3811-2131 内線 5389

研究テーマ 創傷治癒過程における制御機構の研究

2．本年度の研究業績

(1) 学会・研究会等においての口頭発表 (有) ・ 無 (学会名・内容)

1．Combined Meeting of American Pancreatic Association and International Association of Pancreatology ２０００年１１月 Chicago USA
EXPRESSION AND LOCALIZATION OF LUMICAN IN HUMAN PANCREATIC CANCER
2．第５６回日本癌学会総会 ２０００年１０月 日本 横浜
大腸癌における Fibroblast growth factor-10(FGF-10)の発現の検討
3．第３０回創傷治癒学会 ２０００年８月 日本 東京
心虚血再灌流モデルにおける lumican の発現とその局在の検討
4．第１１回日本医科大学 外国人留学生研究会 ２０００年 １１月
膵臓癌における lumican の発現とその役割の検討

(2) 学会誌等に発表した論文 有 ・ (無) (雑誌名・論文名)

3．今後の研究計画

今後は研究対象を広げ、創傷治癒と癌組織増殖過程における細胞外基質とプロテオグリカンの局在と発現につき比較研究を行予定である。
正常の大腸組織においてプロテオグリカンの一種の lumican messenger RNA の発現と局在を検討し、大腸癌組織、正常大腸組織と人工肛門組織での lumican タンパクの発現を検討する. 大腸癌組織と人工肛門組織における lumican mRNA 発現細胞の比較検討を行う。大腸癌組織、正常大腸組織、人工肛門創と比較し、それぞれの病態における Lumican の役割を明らかにする.

4．研究指導者の意見

呂君は日本医科大学病理学第二教室の研究生として一般病理学研修とともに免疫組織化学的手法と分子病理学的手法を用いた研究に、精力的に取り組んでおります。人工肛門創の治癒過程における促進制御機構についての研究では、Transforming growth factor-β (TGF-β)と Hepatocyte growth factor (HGF)の役割につき検討し、第２８回、２９回の創傷治癒学会と第８８回病理学会総会、第７回アジア大腸肛門学会（北京）にて報告しております。これらの成果の一部は Wound Repair and Regeneration 誌にまとめております (WOUND REP REG 2000,8; 59-67)。

１９９９年より同君は膵臓癌細胞の増殖と浸潤における細胞外マトリックスの役割と制御機構の研究を行っております。その成果を２０００年１１月に米国シカゴで開かれた、Combined Meeting of American Pancreatic Association and International Association of Pancreatology で報告し、その内容は評価を受け Research Travel Award を受賞しております。今後はさらに研究の進歩が期待できるものと思われます。

研究指導者氏名 石渡俊行 ㊞

5．研究報告

別紙形式により、報告本文4000字以上(英文は2600語以上)で報告して下さい（枚数自由・ワープロ使用）
タイトル・要旨等は日本語で、KEY WORDS以下は日本語或いは英語で記入、使用文字はタイトル１３ポイント、その他は１０ポイント、日本語は明朝体を使用して下さい。
研究成果の発表予定がある場合は発表原稿・抄録集等を添付して下さい。
論文発表に当っては、*日中医学協会助成事業－日本財団助成金による*旨を明記して下さい。

Differential expression of hepatocyte growth factor and its receptor (c-Met) in a rat artificial anus model

呂　月平

中国　首都医科大学附属同仁病院　外科　医師

日本　日本医科大学病理学第二教室

要旨

人工肛門は皮膚の重層扁平上皮と大腸腺上皮という異なった種類の上皮細胞が吻合し、特異的な創傷治癒過程を示すことが知られている。一方 Hepatocyte Growth Factor (HGF) は腫瘍の増殖、進展や創傷治癒過程において、細胞増殖、組織の再生、修復に重要な役割を果たしていることが報告されている。消化管においては、胃潰瘍の治癒過程で胃の腺上皮の再生増殖と腺管の管腔形成に関与することが示されている。HGF は主に間葉系細胞で産生され、HGF activator により活性化された後、細胞膜に局在する HGF receptor (c-Met) を介し上皮系細胞に作用する増殖因子である。今回ラットの人工肛門創モデルを作成し、術後１、３、７、１４日目に人工肛門組織を摘出した。HGF と c-Met の局在とそれぞれの messenger RNA の発現動態および HGF と c-Met の役割につき免疫組織化学法、Competitive RT-PCR 法および In situ hybridization 法で検討を行った。H.E 染色では術後１日目に重層扁平上皮と腺上皮細胞の増殖がみられ、吻合部の間質にフィブリンと軽度の炎症細胞浸潤が認められた。３日目では吻合部にフィブリンと炎症細胞浸潤が著明で、間質には fibroblast と血管の増生が認められた。７日目には吻合部周囲の腺管構造が正常の腺上皮と同様の形態を示し、肉芽組織内には collagen fiber の出現もみられた。１４日目には間質内に広範囲に線維化がみられ、炎症細胞浸潤も吻合部周囲に限局していた。Competitive RT-PCR 法では術後に HGF mRNA の発現量が術後１日から 14 日まで徐徐と増加するのに対し C-Met mRNA の発現量は術後１日と７日目で増加が認められた。In situ hybridization 法では HGFmRNA は主に間質の fibroblast に、c-Met mRNA は吻合部の重層扁平上皮細胞と腺上皮細胞の胞体内に発現が確認された。Western blot 法では人工肛門組織で６２kd の成熟型の HGF のバントが認められるのに対し、無処置対照の皮膚と大腸組織では成熟型 HGF のバントは認められなかった。HGF 蛋白は大腸粘膜上皮と皮膚の扁平上皮、肉芽組織の中の fibroblast, 血管内皮細胞と炎症細胞に局在がみられた。術後３日目で再生した吻合部の大腸腺管に強い c-met 蛋白の陽性像がみられ。腺管再生上皮と吻合部の肥厚した表皮細胞には豊富な c-met の局在が見られた。

以上の結果よりラットの人工肛門創傷治癒過程では、重層扁平上皮と腺上皮の増殖が術後早期より起こり、１週後には再生腺管が形成されることが確認された。HGF は治癒過程早期では人工肛門組織に産生が少なく増殖期以降は増加しており、肉芽組織の形成に伴う線維芽細胞や血管内皮細胞が重要な役割を果たしていることが示唆された。 創傷治癒過程早期と上皮の形態形成期では HGF receptor が皮膚の重層扁平上皮と大腸の腺上皮細胞に豊富に局在することが確認され、HGF/c-Met 系の作用が人工肛門の治癒過程において皮膚と大腸の両上皮の再生修復に重要であることが示された。

Key words: HGF, c-Met, artificial anus, in situ hybridization, competitive RT-PCR

Aim

Hepatocyte growth factor (HGF) is a hepatotrophic factor, initially purified from rat platelets[1] that promotes liver regeneration. HGF has been shown to stimulate the growth of various epithelial cells, including epithelial cells of the gastrointestinal tract[2], renal tubular cells[3], epidermal melanocytes[4], and keratinocytes[5], and furthermore the proliferation of endothelial cells[6]. On the other hand, HGF also promotes the organization and reconstruction of tissues, suggesting that it might play an important role in the process of tissue repair[7]. It is known to be predominantly produced in mesenchymal cells, including fibroblasts[8], Ito cells[9], Kupffer cells and endothelial cells[10]. The HGF receptor has been identified as the product of the proto-oncogene, c-Met, which has been reported to be a specific transmembrane receptor[11,12]. C-Met is mainly localized in epithelial cells and endothelial cells, suggesting that HGF/c-Met signals play a role in mesenchymal-epithelial interactions[13]. Clinically, an artificial anus is constructed as a curative and preservative operation for colorectal cancer. Construction of an artificial anus is surgically established operation, however it shows a unique regenerative process. In the artificial anus, two different histological types of epithelial cells (the squamous cells of the skin and colonic ductal cells) intermingle with each other. Some of the squamous-ductal junctions known in the normal human body are the esophago-gastric junction (EC-junction), junction between the cervix and body of uterus, and the anorectal junction. The repair process at artificial squamous-ductal epithelial junctions and the role of growth factors have not been clarified. Therefore, in the present study, we examined the localization and mRNA expression of HGF and c-Met in the colonic and skin epithelial cells in an artificial anus. Furthermore, we also attempted to clarify the main epithelial target of HGF in this regenerative condition. We now report that HGF is overexpressed predominantly in the stromal component (macrophages, fibroblasts and endothelial cells) and c-Met and its mRNA are overexpressed predominantly in the regenerating squamous cells of the skin in the rat artificial anus.

Materials and Methods

Animals : Wistar male rats weighing 190-210 g were used for all the experiments (Sankyo Co., Tokyo, Japan). An artificial anus was surgically constructed with its opening at the lower left quadrant of the rat abdomen. Animals were sacrificed 1, 3, 7 or 14 days after the operation and the artificial anus was excised along with the abdominal skin The study was approved by the Animal Ethics Committees of the Nippon Medical School, Japan.

Western blot analysis : The artificial anal tissue specimens from the rats were solubilized in lysis buffer. The proteins extracted were subjected to SDS-PAGE and transferred to IPVH membranes, which were then incubated for 60 min with anti-HGF α antibody. The membranes were then washed and incubated with secondary biotinylated anti- goat IgG antibody for 60 min, and thereafter with the peroxidase-avidin complex. After washing, antibodies were visualized by enhanced chemiluminescence.

Immunohistochemistry : The highly specific goat anti-human HGF α antibody used for Western blotting, and goat anti-mouse c-Met polyclonal antibodies were utilized for immunohistochemistry. Paraffin-embedded sections (3 m) were subjected to immunostaining using the streptavidin-peroxidase technique.

Competitive reverse transcriptase polymerase chain reaction (Competitive RT-PCR) :

Total RNA extraction and cDNA synthesis were performed. Competitive RT-PCR was performed according to the protocol of the PCR MIMIC Construction Kit (Clontech). Before cDNA synthesis, total RNA was run on denatured gel to eliminate the possibility of RNA degradation, then used for reverse transcription. Competitive RT-PCR was repeated at least two times from initial transcription step. Total RNA not subjected to reverse-transcription was employed as the negative control.

In situ hybridization : To make a riboprobe for in situ hybridization, a 512-bp cDNA fragment of HGF and a 320-bp cDNA fragment of c-Met generated by RT-PCR amplification from rat liver RNA or rat heart were subcloned into the pGEM-T vector. The probes were labeled with digoxigenin-UTP by SP6 or T7 RNA polymerase using the DIG RNA Labeling Kit. In situ hybridization was performed.

Results

Histological findings : On the day 1 after the operation, fibrin deposition, neutrophil and lymphocytic infiltration were noted at the site of anastomosis (Fig. 1A, arrow). Colonic ductal cells showed regeneration and a simple layer of colonic epithelium proliferated at that site (Fig. 1A arrowheads). Fresh granulation tissue with fibroblasts, macrophages, capillaries and lymphocytes was formed at the site of anastomosis three days after the operation (Fig. 1B). The skin and colonic epithelium came into contact on day 7 after the surgery (Fig. 1C, arrow). The regenerated ductal cells showed common duct-like structures (Fig. 1C, arrowheads) and the squamous epithelium of the skin exhibited proliferation and acanthosis. Fibrotic changes with macrophages and lymphocytic infiltration were recognized in the granulation tissue (Fig. 1C). At fourteen days after the operation, regenerated ductal cells of the colon and squamous cells of the skin intermingled closely with marked fibrosis (Fig. 1D). Focal inflammatory cell infltration was noted under the ductal epithelium and the ductal cells showed inflammatory change (Fig. 1D, arrowheads).

Western blot analysis : HGF is synthesized as pro-HGF, and then digested by a HGF activator to the mature form of HGF. Only the HGF has any biological effects on epithelial cells. To confirm whether mature HGF is localized in the rat artificial anus, Western blot analysis was performed. The normal skin and colonic tissue did not show any bands, corresponding to pro-HGF or mature HGF. In contrast, all the tissue specimens obtained from the artificial anus exhibited a positive band at 62 Kd, corresponding to the a chain of the mature HGF protein of the rat(20) (Fig. 2).

Immunohistochemistry : To confirm the localization of HGF and the HGF receptor (c-Met), immunohistochemistry was performed. In the normal skin and colonic tissues. In the artificial anus, the regenerated ductal epithelium of the colon and the squamous epithelium of the skin exhibited mild to moderate HGF immunoreactivity (Fig. 3A-F). On the day 1 after the surgery, HGF immunoreactivity was not observed in the stroma (Fig. 3A). Macrophages showed strong, and fibroblasts and endothelial cells revealed moderate HGF immunoreactivity on day 3 to day 14 after surgery (Fig. 3B-F). Faint c-Met immunoreactivity was present nonuniformly in the normal epithelium of the skin and colon. In contrast, regenerated colonic epithelium uniformly showed moderate c-Met immunoreactivity on day 3 (Fig. 4B) to day 14 (Fig. D). Colonic ductal cells next to regenerated colonic epithelium exhibited faint c-Met immunoreactivity in the basal cells (Fig. 4C, arrows). Regenerated skin epithelium of the prickle cell layer revealed strong c-Met immunoreactivity on day 3 (Fig. 4 A) to day 14 (Fig. 4D, E).

Competitive RT-PCR: To quantify the expression level of HGF and c-Met mRNA at each stage of healing of the artificial anus, competitive RT-PCR was employed. The HGF mRNA level increased gradually from day 1 to day 14 after the operation. On day 1, the concentration of HGF mRNA was about 0.001 attomole/ml, which increased up to 0.05 attomole/ml on day 14 (Fig. 5A, B). On the other hand, the c-Met mRNA level showed two peaks, on day 1 and day 7. The highest

concentration of c-Met mRNA was 0.005 attomole/ml, on day 1 (Fig. 5C, D).

In situ hybridization: To identify cells that overexpressed HGF or c-Met mRNA, ISH was performed. In normal colonic and skin tissue, faint expression of HGF mRNA was focally recognized in fibroblasts and macrophages (data not shown). HGF mRNA was overexpressed in fibroblasts (Fig. 6A, B, arrowheads), endothelial cells and macrophages (Fig. 6C, arrows) on day 14 after surgery, whereas colonic ductal cells and squamous epithelial cells did not express HGF mRNA. C-Met mRNA was weakly expressed in the normal epithelial cells of the skin and colon. In the artificial anus, c-Met mRNA was expressed strongly in basal to parabasal cells in the squamous epithelium of the skin (Fig. 6D, F) and moderately in the regenerated ductal epithelium of the colon on day 1 (Fig. 6D, G). Colonic ductal cells next to regenerated colonic epithelium expressed c-Met mRNA in a few basal cells (Fig. 6H, arrows). In situ hybridization used sense probe did not show any positive signals (Fig. 6E).

Discussion

HGF, also called the scatter factor, is a pleiotropic growth factor, originally identified as a mitogen for hepatocytes[1]. It is a kringle-containing polypeptide growth factor possessing structural homology with plasminogen[14]. In wound healing on various tissues, HGF has many roles, including in cell proliferation, cell motility, tissue organization, formation of duct-like structures and neovascularization [15,16]. HGF is synthesized as pro-HGF and then digested by a proteolytic enzyme named HGF activator[24]. Mature HGF is a heterodimeric protein consisting of a and b chains held together by a disulfide bond[17]. Only the mature HGF has biological activity and its effects are dependent on the presence of the highly specific HGF receptor (c-Met, product of the c-Met proto-oncogene) on the target cell membrane[11,12].

Clinically, construction of the artificial anus is used mainly in the management of anorectal diseases, such as anal-rectal carcinoma. In this study, we selected artificial anus in the rat as a unique wound healing model, because the artificial anal wound includes two different types of epithelium (the squamous epithelium of the skin and ductal epithelium of the colon) and some mesenchymal cells (fibroblasts, macrophages and endothelial cells) in the granulation tissue. The epithelial cells are considered to be the target cells of HGF, and the mesenchymal cells are reported to mainly synthesize HGF[8, 9, 10]. The model used in this study may also clarify the predominant target epithelium of HGF on the regenerative condition in vivo.

At the early stage of healing, squamous and ductal cell proliferation was recognized; however, fibroblast and endothelial cell proliferation was not observed yet. The epithelial cell proliferation was observed earlier than the formation of granulation tissue at the site of anastomosis. Mature HGF protein and its mRNA were detected by Western blotting and competitive RT-PCR, respectively. Moderate HGF immunoreactivity was recognized in regenerated epithelial cells in the early stage. This immunoreactivity in the epithelial cells was apparently not due to the protein being synthesized in these cells, because HGF mRNA expression was not recognized by ISH. The HGF is considered to be produced in other organs or tissues and then to bind to the c-Met receptor on the epithelial cells. Similar immunohistochemical staining results were reported previously for HGF[18]. In contrast, the increase in the c-Met mRNA level at the early healing stage may indicate that increased HGF/c-Met binding signals induce c-Met protein synthesis in the regenerated epithelial cells. HGF is reported to be secreted as a single chain of pro-HGF and stored in stromal compartments including type I, III, V and VI collagen in various tissues[19]. It is suggested that the stromal HGF or HGF in blood may take part in the stimulation of the epithelial cell growth during the early stage of wound healing in an endocrine or paracrine manner.

HGF has morphogenic potential that makes this molecule unique, in that it induces branching and formation of ductal epithelium in the late phase of wound healing[20,21]. In the rat gastric ulcer model, both HGF and c-Met expressions were more prominent on day 3 and day 15 of

healing of the gastric ulcer as determined by immunohistochemical analysis.[22]. In our studies, the HGF mRNA level was low at the early healing phase in rat artificial anus (day 1 and day 3) and then increased during the late phase (day 7 and day 14). In contrast, the c-Met mRNA level exhibited two peaks, the first during the early phase (day1) and the second during the late phase (day 7) of healing. C-Met and its mRNA were colocalized in regenerated ductal cells close to the anastomotic site. Near the anastomotic site, c-Met mRNA was overexpressed in the entire layer of ductal epithelium of the colon. In contrast, in the nonproliferative area away from the site of anastomosis, c-Met protein and its mRNA were localized only in the basal layer of the ductal epithelium. We also found the formation of normal ductal-like structures of regenerated epithelial cells during the late phase (day 7) of healing. It is suggested that the activation of the HGF/c-Met signaling pathway during the late stage of healing may be involved in not only cellular proliferation of the skin and colonic epithelium, but also in formation of ductal structure of colon on rat artificial anus. Increased HGF production in the artificial anus may be induced by cytokines such as interleukin-1 (IL-1) or tumor necrosis factor-α (TNF-α), reported previously as being inducers of HGF mRNA expression [23,24]. C-Met has a multifunctional docking site, binding Grb 2, Gab 1, PI 3 kinase and PLC-g, and these transduction signals may be involved in different functions, such as cell proliferation or tissue organization[25].

Interestingly, during process of wound healing in the rat artificial anus, HGF and c-Met showed differences in expression levels between the squamous cells of the skin and the colonic ductal cells. In our study, throughout the healing process of the artificial anus, HGF immunoreactivity was stronger in the squamous epithelium of the skin than in the ductal epithelium of the colon in the proliferative area. Furthermore expression of c-Met and its mRNA was more prominent in the squamous epithelium of the skin. We can suggest that these differences in the expression levels of HGF and c-Met between squamous cells and ductal cells may account for the differences in the effects on these epithelium.

In summary, HGF and c-Met were overexpressed in rat artificial anus, and HGF/c-Met may play a role in epithelial cell proliferation and formation of colonic ducts. HGF is suggested as having more predominant effects on the regenerating squamous cells in the skin of the artificial anus.

References

1. Nakamura T, Nawa K, Ichihara A: Partial purification and characterization of hepatocyte growth factor from serum of hepatectomized rat. Biochem Biophys Res Commun 1984, 122: 1450-1459

2. Takahashi M, Ota S, Shimada T, Hamada E, Kawabe K, Okudaira T, Matsumura M, Kaneko N, Terano A, Nakamura T, Omata M: Hepatocyte growth factor is the most potent endogenous stimulant of rabbit gastric epithelial cell proliferation and migration in primary culture. J Clin Invest 1995, 95: 1994-2003

3. Igawa T, Kanda S, Kanetake H, Saitoh Y, Ichihara A, Tomota Y, Nakamura T: Hepatocyte growth factor is a potent mitogen for cultured rabbit renal tubular epithelial cells. Biochem Biophys Res Commun 1991, 174: 831-838

4. Matsumoto K, Tajima H, Nakamura T: Hepatocyte growth factor is a potent stimulator of human melanocyte DNA synthesis and growth. Biochem Biophys Res Commun 1991, 176 : 45-51

5. Matsumoto K, Hashimoto K, Yoshikawa K, Nakamura T: Marked stimulation of growth and motility of human keratinocytes by hepatocyte growth factor. Exp Cell Res 1991, 196:114-120

6. Bussolino F, Di Renzo MF, Ziche M, Bocchietto E, Olivero M, Naldini L, Gaudino G, Tamagnone L, Coffer A, Comoglio PM: Hepatocyte growth factor is a potent angiogenic factor which stimulates endothelial cell motility and growth. J Cell Biol 1992, 119:629-641

7. Rubin JS, Bottaro DP, Aaronson SA: Hepatocyte growth factor/scatter factor and its receptor, the c-Met proto-oncogene product. Biochem Biophys Acta 1993, 1155:357-371

8. Rubin JS, Chan AML, Bottaro DP, Burgess WH, Taylar WG, Cech AC, Hirschfield DW, Wong J, Miki T, Finch PW, Aaronson SA: A broad-spectrum human lung fibroblast-derived mitogen is a variant of hepatocyte growth factor. Proc Natl Acad Sci USA 1991, 88:415-419

9. Schirmacher P, Geerts A, Pietrangelo A, Dienes HP, Rogler CE: Hepatocyte growth factor/hepatopoietin A is expressed in fat-storing cells from rat liver but not myofibroblast-like cells derived from fat-storing cells. Hepatology 1992, 15:5-11

10. Noji S, Tashiro K, Koyama E, Nohno T, Ohyama K, Taniguchi S, Nakamura T: Expression of hepatocyte growth factor gene in endothelial and Kupffer cells of damaged rat liver, as revealed by in situ hybridization. Biochem Biophys Res Commun 1990, 173:42-47

11. Gonzatti HM, Seth A, Patk M, Copeland T, Oroszlan S, Vande WGF: Characterization of the TPR-MET oncogene p65 and the MET protooncogene p140 protein-tyrosine kinases.Proc Natl Acad Sci USA 1988. 85:21-25

12. Giordano S, Ponzetto C, Di Renzo MF, Cooper CS, Comoglio PM: Tyrosine kinase recepter indistinguishable from the c-met protein. Nature 1989. 339:155-156

13. Matsumoto K, Nakamura T: Energing Multipotent aspects of hepatocyte growth factor. J

Biochem 1996, 119:591-600

14. Nakamura T, Nishizawa T, Hagiya M, Seki T, Shinonishi M, Sugimura A, Tashiro K, Shimizu S: Molecular cloning and expression of human hepatocyte growth factor. Nature 1989, 342:440-443

15. Matsumoto K, Nakamura T: Roles of HGF as a pleiotropic factor in organ regeneration. Hepatocyte growth factor-scatter factor (HGF/SF) and c-met receptor. Edited by Gildberg ID, Rosen ER. Birhauser Verlag, Basel, 1993, pp. 225-250

16. Matsumoto K, Nakamura T: Hepatocyte growth factor (HGF) as a tissue organizer for organogenesis and regeneration. Biochem Biophys Res Comm 1997, 239:639-644

17. Miyazawa K, Shimomura T, Kitamura A, Kondo J, Morimoto Y, Kitamura N: Molecular cloning and sequence analysis of the cDNA for a human serine protease responsible for activation of hepatocyte growth factor. Structural similarity of the protease precursor to blood coagulation factor XII. J Biol Chem 1993. 268:10024-10028

18. Gohda E, Tsubouchi H, Nakayama H, Hirono S, Sakiyama O, Takahashi K, Miyazaki H, Hashimoto S, Daikuhara Y: Purification and partial characterization of hepatocyte growth factor from plasma of a patient with fulminant hepatic failure. J Clin Invest 1988, 81:414-419

19. Wolf HK, Zarnegar R, Michalopoulos GK: Localization of hepatocyte growth factor in human and rat tissues: An immunohistochemical study. Hepatology 1991, 14:488-494

20. Sakata H, Stahl SJ, Taylor WG, Rosenberg JM, Sakaguchi K, Wingfield PT, Rubin JS: Heparin binding and oligomerization of hepatocyte growth factor / scatter factor isoforms. Heparan sulfate glycosaminoglycan requirement for Met binding and signaling. J Biol Chem 1997, 272:9457-9463.

21. Montesano R, Matsumoto K, Nakamura T, Orci L: Identification of a fibroblast-derived epithelial morphogen as hepatocyte growth factor. Cell 1991, 67:901-908

22. Brinkmann V, Foroutan H, Sachs M, Weidner KM, Birchmeier W: Hepatocyte growth factor/scatter factor induces a variety of tissue-specific morphogenic program in epithelial cells. J Cell Biol 1995, 215:483-488

23. Schmassmann A, Stettler C, Poulsom R,Tarasova N, Hirschi C, Flogerzi B, Matsumoto K, Nakamura T, Halter F: Roles of hepatocyte growth factor and its receptor Met during gastric ulcer healing in rats. Gastroenterol 1997, 113:1858-1872

24. Matsumoto K, Okazaki H, Nakamura T: Up-regulation of hepatocyte growth factor gene expression by interleukin-1 in human skin fibroblasts. Biochem Biophys Res Commun 1992, 188:235-243

25. Tamura M, Arakaki N, Tsubouchi H, Takada H, Daikuhara Y: Enhancement of human hepatocyte growth factor production by interleukin-1a and tumor necrosis factor-a by fibroblasts in culture. J Biol Chem 1993, 268:8140-8145

26. Weidner KM, Sachs M, Birchmeier W: The met receptor tyrosine kinase transduces motility, proliferation, and morphogenic signals of scatter factor/hepatocyte growth factor in epithelial cells. J

Cell Biol 1993, 121:145-154

日本財団補助金による
２０００年度日中医学学術交流促進事業

⑤．在留中国人研究者研究助成

(9) Aeromonas, Sobriaが産生するヘモリシン受容体精製と機構解析

Aeromonas sobria が産生するヘモリシン宿主受容体の同定と性状解析

王　愛平
中国吉林省北華大学医学部付属病院　医師
日本長崎大学医学部内科学第二講座

要旨

Aeromonas sobria の産生するヘモリシンが下痢病原性に関与していることが報告されている。我々は*A. sobria* ヘモリシンの受容体として腸管由来株化細胞 Intestine 407 細胞において、p66を同定した①。本研究では免疫沈降法により同定した*A. sobria* ヘモリシン受容体（p66）を分離、精製し、如何なる蛋白質であるかを明らかにしたので報告する。*Aeromonas sobria* ヘモリシンの受容体 p66 はIntestine 407 細胞を界面活性剤の Triton-X100 で可溶化した時と比べ、N-Dodecyl-beta-D-maltosideを用いた時に顕著に可溶化した。N-Dodecyl-betadmaltosideで可溶化した遠心上清にヘモリシンと抗ヘモリシン 抗体 を用いて、従来の免疫沈降法により、p66を特異的に沈殿、分取した。そして、TCAで濃縮し、SDS-PAGE 後にp66をGel から抽出した。以上のように精製した受容体蛋白質を還元カルボキシメチル化後、質量分析器より解析した。得られた質量分析値を蛋白質データーベースにて解析した結果、p66は胎盤型Alkaline phosphatase（PLAP）であることが分かった。

KEY WORDS: *A. sobria* ヘモリシン、受容体蛋白質、p66、胎盤型Alkaline phosphatase（PLAP）

研究報告

目的：

食中毒は日本や発展している国における常見病、多発病、特に集団発生の場合大変社会問題さらに国際問題となっている。*Aeromonas hydrophila. A. sobria* 菌種は,1982年に厚生省より食中毒菌として指定され、毎年多数の下痢症例が報告されている。この菌による下痢病原性にヘモリシン等が 関与する報告がある。しかしながらヘモリシンによる下痢の詳細は明らかではありません。私たちの研究室では感染症について毒素の役割及び受容体の構造と機能を中心に研究を行っている。私の研究で、*A.sobria* 菌食中毒における下痢に関与するヘモリシン受容体は腸管細胞膜に存在する66KDa蛋白質（P66）であることを、また糖蛋白質であることも初めて明らかにした。（Microbial Pathogenesis 1999,27,215-221）。そして、今回は、*A. sobria* 菌の受容体蛋白質（P66）を精製し、シークエンスを明らかにして、その受容体蛋白質の構造を決定を行った。それで、*A. sobria* 菌食中毒におけるヘモリシン及びヘモリシン受容体の役割を明らかにし、下痢を予防する研究の推進を期待したいわけです。平成12年度日中医学協会の在留外国人研究助成金を受け、研究継続しているが結果として報告する。

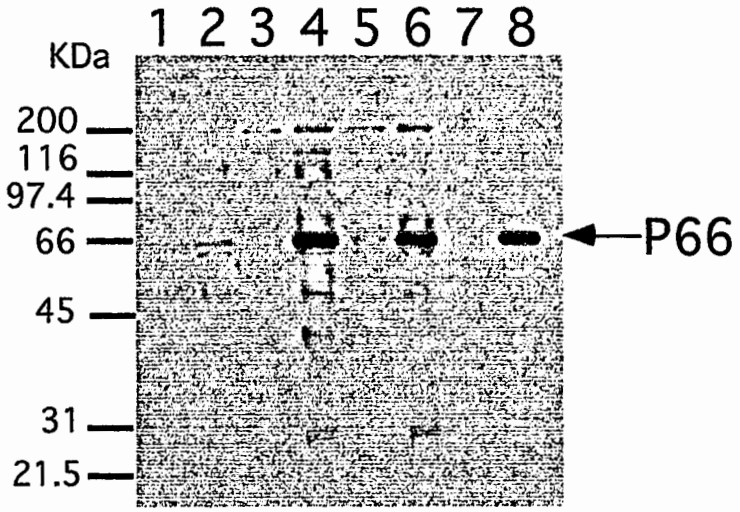
方法と結果：

1、p66の精製

(1)、可溶化物質の選択

蛋白質精製するのはまず蛋白質の可溶化する事が考えなければならない。我々は腸管由来株化細胞 Intestine 407 細胞を用いて検出したp66は膜蛋白質であるし、GPI-アンカー蛋白質である報告により、従来使用した可溶化物質Tritonx-100はGPI-アンカー蛋白質を溶かしにくいので可溶化物質の選択は精製に重要なことだと考えられる。そして、16種類の可溶化物質を初選し、さらに 下記の 4 種類を選択して、Intestine 407 細胞を可溶化後免疫沈降法によりp66を検出した。結果としてIntestine 407 細胞を界面活性剤の Triton-X100 で可溶化した時と比べ、N-Dodecyl-beta-D-maltosideを用いた時に顕著に可溶化し、*Aeromonas sobria* ヘモリシンの受容体 p66 はよく検出できた（図1）。

図1：



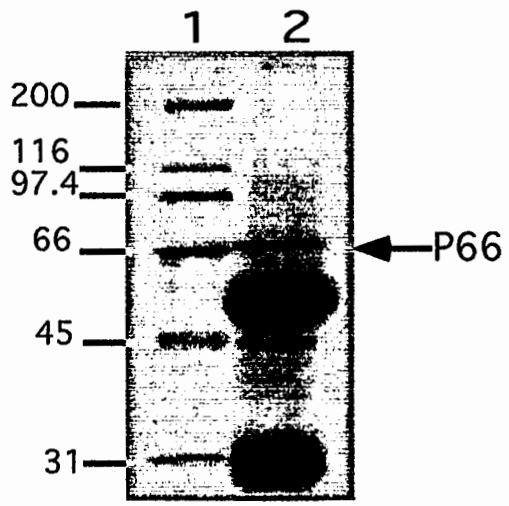
レーン1、2　TritonX-100
レーン3、4　n-dodecyl-β-D-maltoside
レーン5、6　n-Heptyl-β-D-thioglucoside 30mM
レーン7、8　n-Octyl-b-D-glucoside

レーン1、3、5、7　Heat-hemolysin
レーン2、4、6、8　hemolysin

(2)、免疫複合物質からp66の精製

選択したn-dodecyl-b-D-maltoside でIntestine 407 細胞を可溶化した遠心上清にヘモリシンと抗ヘモリシン 抗体 を用いて、従来の免疫沈降法により、p66を特異的に沈殿、分取した。そして、TCAで濃縮し、SDS-PAGE 後にp66をGel から抽出した。

図2：



レーン1：マーカー　　レーン2：免疫複合物

2、p66のシークエンス解析

以上のように精製した受容体蛋白質を還元カルボキシメチル化後、質量分析器より解析し

た。得られた質量分析値を蛋白質データーベースにて解析した結果、p66は胎盤型Alkaline phosphatase（PLAP）であることが分かった。

考察：

われわれは*A.sobria*菌が産生するヘモリシンが食中毒における下痢に関与する詳細を解明するために腸管細胞膜に存在するヘモリシン受容体として66KDa蛋白質（P66）であることを初めて明らかにした。このP66は如何なる蛋白質であるかを追求する目的でIntestine 407 細胞を用いてP66を精製、それに質量分析器より解析した。結果としてp66は胎盤型Alkaline phosphatase（PLAP）であることが分かった。ALP はオルガネラ成分や膜成分に多く含まれる。生体内での真の役割については不明の点が多い。胎盤型 ALPはアルカリフォスファターゼのアイソザイムの一つで、妊娠後期の胎盤絨毛の合胞体層 Syncytiotrophoblastに含まれ、IAPのSequence の相同性が86.1%である。一方、小腸分泌性下痢の病態に小腸型アルカリフォスファターゼ（IAP）が重要な役割を果たしている可能性あると報告があったが③PLAPは*A.sobria*菌の産生するヘモリシンが食中毒における下痢にどう関与するか、あるいは、PLAPは下痢を起こす正確な機序の解明が今後の課題になる。

参考文献：

① Ai-ping W, Akihiro W, Kinnosuke Y,Tomohiko N,Yoshio F,Keinoske O,Youhei M, Shigeru K,Joel M, and Toshiya H. Identification and characterization of the *Aeromonas soblia* hemolysin glycoprotein receptor on Intestine407cells.Microbial Pathogenesis 1999Oct;27(4): 215-221

② Larner J, Huang LC, Schwartz CF, Oswald AS, Shen TY, Kinter M, Tang GZ, Zeller K Rat liver insulin mediator which stimulates pyruvate dehydrogenase phosphatecontains galactosamine and D-chiroinositol.Biochem Biophys Res Commun 1988 Mar 30;151(3):1416-26

③吉岡　政洋：小腸分泌性下痢における絨毛膜 Alkaline phosphataseの役割.日消病会誌88：1981ー1989,1984

日本財団補助金による
２０００年度日中医学学術交流促進事業

⑤．在留中国人研究者研究助成

(17)抗炎症性単球を用いた臓器移植に於ける免疫制御の研究

抗炎症性単球を用いた臓器移植における免疫制御の研究

范小虎

中国西安医科大学第一臨床医学院臓器移植中心

日本広島大学医学部外科学第二講座

要旨

lipopolysaccharide (LPS) 刺激による単球・マクロファージからのサイトカイン産生の動態を利用し、in vitroでサイトカイン産生のパテーンを抗炎症性にシフトさせてアロ免疫応答抑制能を検討した。DAおよびLewisラット末梢血から単球を濃縮する。これをLPSの存在下に培養し、in vitroおよびin vivoの実験に使用するために上清および細胞（マクロファージ）を採取した。単球・マクロファージからのTNF-alpha、IL-1betaとIL-10をLPS培養上清中の濃度を調べた。LPS培養細胞内のサイトカイン(TNF-alpha, IL-10)をフローサイトメトリーで検出し、個々の細胞レベルで細胞表面マーカーと各サイトカイン産生の関係を調べ、この細胞を採集し、in vitroでのTh1細胞活性化の抑制を研究した。最後にDAからLewisへの異所性心移植モデルを用いて、移植直後にLPSで誘導したレシピエントあるいはドナーのIL-10産生性単球・マクロファージを静脈内投与し、グラフト生着延長を確認した。LPS誘導抗炎症性マクロファージはアロ樹状細胞に対するＴ細胞からのIFN-gammaの産生を抑制する。

KEY WORDS

lipopolysaccharide (LPS)、単球・マクロファージ、免疫応答

研究報告

目的

Ex vivoでのlipopolysaccharide (LPS)による刺激後、炎症惹起性サイトカインであるTNF-alphaの産生が低下し、逆に、強力な免疫制御作用を有するサイトカインであるIL-10を産生するようになった単球が臓器移植における拒絶反応を抑制しうるか検討する。

方法

１．単球採取とLPSによる活性化

DAおよびLewisラット末梢血から単球を濃縮する。これをLPSの存在下に培養し、in vitroおよびin vivoの実験に使用するために上清および細胞（マクロファージ）を採取する。

２．単球・マクロファージの細胞表面マーカーとサイトカイン産生能の検討

1) 単球・マクロファージからのproinflammatory cytokines (TNF-alpha、IL-1beta)とanti-inflammatory cytokine (IL-10)をLPS培養上清中の濃度としてELISAで調べる。

2) LPS培養細胞内のサイトカイン(TNF-alpha, IL-10)をフローサイトメトリーで検出し、個々の細胞レベルで細胞表面マーカーと各サイトカイン産生の関係を調べる。

3) 抗原提示に必要なMHC Class II、CD80とCD86、およびFc receptorの細胞表面への発現の程度をフローサイトメトリーで調べる。

３． in vitroでのTh1細胞活性化の抑制

臓器移植における拒絶反応は、グラフト内の樹状細胞が脾臓やリンパ節といった二次性リンパ組織へと移動しそこで抗原提示細胞として成熟して、レシピエントのＴ細胞を活性化し特にTh1タイプの免疫応答が惹起されることに始まると考えられている(23)。これをin vitroでsimulateするためにDAドナーから調整した樹状細胞とLewisレシピエントから調整したＴ細胞をcocultureしTh1 cytokinesの代表であるIFN-gammaの分泌量をELISAで定量する。この培養系にLPSで誘導したレシピエントあるいはドナーのIL-10産生性単球・マクロファージを加えることでIFN-gamma産生が抑制されるか調べる。

４．in vivoでの移植グラフト拒絶反応の抑制

DAからLewisへの異所性心移植モデルを用いる。移植直後にLPSで誘導したレシピエントあるいはドナーのIL-10産生性単球・マクロファージを静脈内投与し、グラフト生着が延長するか調べる。

結果

我々がラット脾から調整したマクロファ_ジを用いて、LPS刺激後の時間経過とTNF-alpha、IL-10分泌の関係を検討したところ、刺激後４時間ではproinflammatory cytokineであるTNF-alphaの高レベルの分泌が認められたが、anti-inflammatory cytokineであるIL-10分泌は測定感度以下であった。24時間後、48時間後と経過するにしたがい、培養上清中のTNF-alpha濃度は減少し、逆にIL-10分泌は著明に増加した。この結果から、LPS存在下に24時間刺激した脾マクロファージはIL-10産生状態にあると考えられるため、

このマクロファージをリンパ球とアロの樹状細胞の混合培養の系に培養開始24時間後に加えると、拒絶反応を惹起するTh1サイトカインであるIFN-gammaの産生が著明に抑制された。

考査

1．本研究では臨床応用を考慮して、ドナーラットの末梢血単球から強力な免疫制御作用を有するIL-10を産生するマクロファージを誘導できた、その細胞表面マーカーとサイトカインの産生能、および、in vitroでのTh1細胞活性化制御能を確認した。

2．臓器移植における拒絶反応抑制効果を検討し、グラフト生着延長に応用する試みは免疫寛容誘導および維持の達成につながる。

3．単球・マクロファージはリンパ組織および炎症の場に集積すると考えられ、遺伝子導入等を応用する場合も免疫組織へのdelivery systemとしてin vivoでの免疫療法の効率を高める可能性が充分に考えられる。

参考文献

1. Aste Amezaga M, Ma X, Sartori A, Trinchieri G (1998) Molecular mechanisms of the induction of IL-12 and its inhibition by IL-10. J Immunol 160: 5936-44.

2. de Waal Malefyt R, Haanen J, Spits H, Roncarolo MG, te Velde A, Figdor C (1991) Interleukin 10 (IL-10) and viral IL-10 is strongly reduce antigen-specific human T cell proliferation by diminishing the antigen-presenting capacity of monocytes via downregulation of class II major histocompatibility complex expression. J Exp Med 174: 915-24.

3. Willems F, Marchant A, Delville JP, Gerard C, Delvaux A, Velu T (1994) Interleukin-10 inhibits B7 and intercellular adhesion molecule-1 expression on human monocytes. Eur J Immunol 24:1007-9.

4. Shaked A, Csete ME, Drazan KE, Bullington D, Wu L, Busuttil RW (1994) Adenovirus-mediated gene transfer in the transplant setting. II. Successful expression of transferred cDNA in syngeneic liver grafts. Transplantation 57: 1508-11.

5. de Roos WK, Fallaux FJ, Marinelli AW, Lazaris Karatzas A, von Geusau AB, van der Eb MM (1997) Isolated-organ perfusion for local gene delivery: efficient adenovirus-mediated gene transfer into the liver. Gene Therapy 4: 55-62.

6. Shinozaki K, Yahata H, Tanji H, Sakaguchi T, Ito H, Dohi K (1999) Allograft transduction of IL-10 prolongs survival following orthotopic liver transplantation. Gene Therapy 6: 816-22.

日本財団補助金による
２０００年度日中医学学術交流促進事業

⑤．在留中国人研究者研究助成

(19)チタンの陶材焼付強度に関する研究－マイクロリテンションの効果－

研究者：劉杰

中国での所属・役職：佳木斯大学医学院附属口腔医院　修復科講師

日本での所属先・研究室名：長崎大学歯学部歯学研究科　第一補綴学講座

チタンの陶材焼付強度に関する研究

―マイクロリテンションの効果―

要旨：

本研究目的はチタンの表面に附与した機械的な維持装置がチタンと陶材の 3 点曲げ焼付強さに及ぼす影響について調べた．陶材焼付用白金加金金合金と陶材の焼付強さとの比較検討を行った．3 点曲げ試験片用に板状パターン 0.5×5.0×25.0 ㎜を用意し，中央部（8.0×5.0 ㎜）に 3 種類のリテンションビーズ〔150 μm，200 μm，600 μm 〕をそれぞれのパターンに振り掛けてから埋没、鋳造を行った．また，サンドブラストによるマイクロリテンションの効果を調べるため 3 種類のアルミナ（50 μm，125 μm，250 μm）を用意し，各種サイズのアルミナでサントブラスド処理したチタン鋳造体では，酸化処理と酸化処理しない試験片も用意した．対照として白金加金金合金を用い 200 μm のリテンションビーズを施した板状鋳造体と 50 μm のサンドブラスド処理だけを施した鋳造体を作製した．金型を用い各板状鋳造体中央部（8.0×5.0 ㎜）に陶材を焼成した．焼成後の陶材はその厚さが 1.0 ㎜になるように研磨した．3 点曲げ焼付強度試験（n＝5）は万能試験機を用い，ヘッドスピート 1.5 ㎜/min，支点間距離 20 ㎜の条件で行った．陶材破壊時の Fracture force（N）及びその時 Deflection（㎜）を求めた．また，50 μm サントブラスト処理した試験片から得られた結果より DIN13927 の規格に従い Ti と Au 合金に対する陶材の焼付強度を求めた．

チタンではサンドブラスドを施した試験片で酸化した試験片は酸化しないものよりに有意に（P>0.05）高い Fracture force の値を示した．リテンションビーズではその径が大きくなるに従い Fracture force が有意に高くなった．粒径の異なるアルミナによるサンドブラスド処理の Fracture force の値に有意な差は認められなかった．

試験片より求めたチタンと金合金に対する陶材の焼付強度はそれぞれ厚さ 0.5 mmで 50>のアルミナサントブラスト処理したチタン焼付強度は（50.34±1.75MPa），（52.59±2.09MPa）で，有意な差は認められなかった．

Key words: チタン，陶材，焼付強度，リテンション

研究報告

目的：

純チタンは生体親和性，耐食性に優れていることから，歯科補綴領域で使用されている貴金属合金に代わる新しい金属材料として注目されている．しかしながら，チタンは高温で非常に活性が高いということと熱膨張係数が従来の焼付用合金に比較して小さいことから，陶材との結合強度に難点があり，陶材の破折剥離がチタンとの界面で起こることが多い[1]．陶材焼付用金属として広く使われているとはいえない．本研究目的はチタンの表面に附与した機械的な維持がチタンと陶材の 3 点曲げ焼付強さに及ぼす影響について調べ，陶材焼付用白金加金金合金と陶材の焼付強さとの比較検討を行った．

方法

本研究で使用した金属はチタン（JIS TypeⅡ，Selec）と白金加金金合金（Degudent Universal）である．陶材はチタン用にスーパーポーセレン TITAN（ノリタケ），白金加金金合金用に VITA Omega 900（VITA）を用いた．チタンの 3 点曲げ試験片用に板状パターン 0.5（D）×5.0（W）×25.0（L）㎜を用意し，中央部（8.0×5.0 ㎜）に 3 種類のサイズのリテンションビーズ〔150 μm, 200 μm，600 μm〕をそれぞれのパターンに振り掛けてからマグネシア系埋没材（Selevest CB, Selec）で埋没を行った．室温に一時間放置してから，鋳型はメーカー指示に従い焼却し，アルゴンアーク遠心鋳造機（Ti cast super R，Selec）でチタンの鋳造を行った．鋳造後，リングは室温まで冷却してから鋳造試験片は埋没材の中から取り出した．試験片は 50 μm のアルミナでサ

ンドブラストを行った．また，サンドブラストによるマイクロリテンションの効果を調べるため板状パターン 0.5（D）×5.0（W）×25.0（L）㎜ を用意し，マグネシア系埋没材で埋没を行って，鋳造後，50 μm，125 μm，250 μm の 3 種類サイズのアルミナでサンドブラスト処理を施した．サンドブラスト処理条件は 4kgf/㎠の空気圧，2 cm の距離，20 sec の設定で行った．対照として，白金加金金合金を用い 200 μm のリテンションビーズを施した板状パターンとリテンションビーズを施さない 50 μm のサンドブラスド処理だけを施した鋳造体パターンをリン酸塩系埋没材（Snow white, SHOFU, Kyoto, Japan）で埋没した．その鋳型はメーカー指示に従い焼却し，高周波遠心鋳造機(Argon Caster T, SHOFU, Kyoto, Japan)で鋳造した．鋳造後，リングは室温まで冷却してから鋳造試験片は埋没材の中から取り出した．試験片は 50 μm のアルミナでサンドブラストを行った．それぞれの鋳造体はアセトン中で 10 分間の超音波洗浄を行った．全部鋳造体は鋳造体の内部に気泡があるかどうか確認するため X-線(Coronis 90, Asahi Rentgen Inc. Co.Ltd,Kyoto,Japan)の検査を行った．内部気泡のある鋳造体は除外した．メーカー指示に従い陶材焼成前の酸化処理を施した．各種サイズのアルミナでサントブラスド処理したチタン鋳造体では，酸化処理による影響を調べるために酸化処理を施さないものも用意した．酸化処理，つまり焼成前にデギャッシング処理を施した．金型を用い各板状鋳造体中央部（8.0×5.0 ㎜）に陶材を焼成した．チタンにはスーパーポーセレン TITAN（ノリタケ）を用い，白金加金金合金には VITA Omaga900（VITA）を使用した．焼成は各メーカー指示に従った．チタン用陶材には，薄くボンディングポーセレンを塗布して焼成後にオペークポーセレンも一層（約 200 μm）塗布

してから焼成した．ボディポーセレン焼成後に厚さ 1.2 mm になった．焼成収縮による形態の修正を行うため，ボディポーセレンに一回の追加築盛，焼成を行った．全部で４回の焼成を行った．白金加金金合金用陶材には，パウダーウォッシュオペークを塗布してから焼成した．その後チタン用陶材と同じにようにオペークポーセレンと二回のボディポーセレンを築盛，焼成した．焼成後の陶材はその厚さが 1.0 ㎜になるように研磨した．3 点曲げ焼付強度試験（n＝5）は万能試験機を用い，ヘッドスピート 1.5 ㎜/min，支点間距離 20 ㎜の条件で行った．試験片の中央を負荷し，陶材破壊時の Fracture force（N）を記録した．その時 Deflection（㎜）を求めた．各条件で５個ずつの試験片を作製し，試験を行い，その平均値と SD を求めた．また，50 μm サントブラスト処理した試験片から得られた結果より DIN13927 の規格に従い Ti と Au 合金に対する陶材の焼付強度を求めた．陶材の焼付強度は $\tau_b = \sigma_{xy} \times F_f$　τ_b(MPa)で，σ_{xy}は定数で，Schwarz et al[2] から参照した．　F_fは陶材破壊時の Fracture force（N）である．

結果

チタンではサンドブラスドを施した試験片で酸化した試験片は酸化しないものよりに有意に（P>0.05）高い Fracture　force 値と Deflexion 値を示した．酸化したチタン試験片と酸化しない試験片ともに粒径の異なるアルミナによるサンドブラスド処理の Fracture　force 値と Deflexion 値に有意な差が認められなかった．

リテンションビーズによるチタン試験片に対する Fracture　force 値はリテンションビーズの径が大きくなるに従い Fracture　force 値と Deflexion 値が高くなった．600 μm リテンションビ

ーズ Fracture force 値と Deflexion 値が一番高く，有意差があった．200 μm リテンションビーズは 150μmリテンションビーズより Fracture force 値と Deflexion 値が高かったが，有意差は認められなかった．

この試験のチタンと陶材の３点曲げ焼付強度にはそれぞれ厚さ 0.5 mmで 50 μm のアルミナサントブラスト処理した試験片より求めたチタンと白金加金合金に対する陶材の焼付強度は（50.34±1.75MPa），（52.59±2.09MPa）であった．チタンと陶材の焼付強度は白金加金金合金と陶材の焼付強度に匹敵する焼付強度であった．

三点曲げ試験後，試験片の破壊像を観察して，サンドブラストだけ処理した試験片には陶材はすべて剥離し，リテンションビーズを付与した試験片には陶材が部分的に剥離やミクロなクラックが観察された．リテンションビーズのサイズが大きくなれば，陶材のミクロなクラックが増加した．

考察

本研究の結果から見るとデギャッシングで酸化被膜が形成したために．チタンと陶材の焼付強度が高くなったと考えられる．しかしながら，チタンでは予備酸化すると表面に酸化チタンが生成され，焼付強が減少するとの報告もされている [3]．Adachi et al[4]研究ではチタンの 750℃熱処理時，32 nm の酸化層が形成し，1000℃熱処理時，1 μm の酸化層が形成したと報告された．本研究では低温の酸化処理による有意な差が認められた．チタンの過度の酸化は Fracture force 値を低下させるが，適度の酸化では Fracture force 値を向上させることが示唆された．つまり，

チタンでは適度の酸化で焼付強さが増加したことが示唆された．サンドブラスト処理に用いるアルミナ粒径が大きくなることにより，表面粗さが増加した [5]．本試験ではアルミナ粒径が大きくなってもチタンと陶材の Fracture force 値は増加しなかった．つまり，表面粗さが増加しても，チタンと陶材の焼付強度は増加しなかった．チタンと陶材の焼付強度が主に機械的な結合で，サンドブラスト処理ではアンダーカットがなかったので，いくら荒くても機械的な維持装置がないチタンと陶材焼付強度が上がらないと考えられる．リテンションビーズのサイズが増加すれば，チタンと陶材の Fracture force 値が高くなる．リテンションビーズを付与した場合にはアンダーカットがあるので，リテンションビーズのサイズが増加すれば，アンダーカットも大きくなり，機械的な維持によりチタンと陶材の Fracture force 値が高くなって，チタンと陶材の焼付強度が高くになったと思われる．

三点曲げ試験後，試験片の破壊像を観察して，サンドブラストだけ処理した試験片には陶材はすべて剥離し，リテンションビーズを付与した試験片には陶材が部分的に剥離やミクロなクラックは観察された．リテンションビーズのサイズの大きくすれば，陶材のミクロなクラックが増加した．以上の結果から見ると，陶材の焼付けは主に機械的な嵌合力や陶材の圧縮力によると考えられる．

リテンションビーズを付与した試験片の破壊力は大きく，リテンションビーズの効果が認められた．ISO 規格による陶材焼付強度最小値は 25 MPa だ．この試験ではチタンと白金加金合金に対する陶材の焼付強度は（50.34±1.75MPa），（52.59±2.09MPa）であった．チタンと陶材の

焼付強度は白金加金金合金と陶材の焼付強度と比べて匹敵な程度の焼付強度になった．それぞれの処理条件で25 MPa以上の焼付強度を示し，ISO規格値を満たすものと考えられる．

参考文献

1) 三浦維四，井田一夫編，チタンの歯科利用，198－212，クインテッセンス出版，東京，1988.

2) Schwarz S,Lenz J,Schwickerath H.Zur Festigkeit desmetallkeramischen Verbundes bei der Biegeprüfung.Dtsch Zahnärztl Z 1988:43:1152-1158.

3) Kimura,H.,Horng,C-J.and Okazaki,M.:Oxidation effects on porcelain-titanium interface reactions and bond strength,Dent Mater J,9:91-99,1990.

4) Adachi M, Mackert JR Jr, Parry EE, Fairhurst CW. Oxideadherenceandporcelainbonding to titanium and Ti-6Al-4V alloy. J Dent Res 1990;69:1230-5.

5) 藤島　昭宏，宮崎　隆，藤島　由香里，芝 燁彦：チタンの表面性状及ぼすアルミナサンドブラスト処理の影響，歯材器，16（3）218－226，1997.

Japan Prosthodontic Society

44巻104回特別号
平成12年11月

日本補綴歯科学会雑誌

補　綴　誌
J Jpn Prosthodont Soc
ISSN 0389－5386

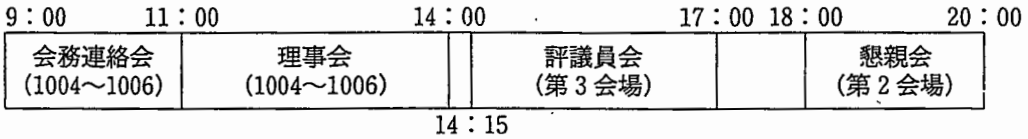
大阪市：大阪国際会議場　2000 November
Vol.44·104th Special Issue

日　　程

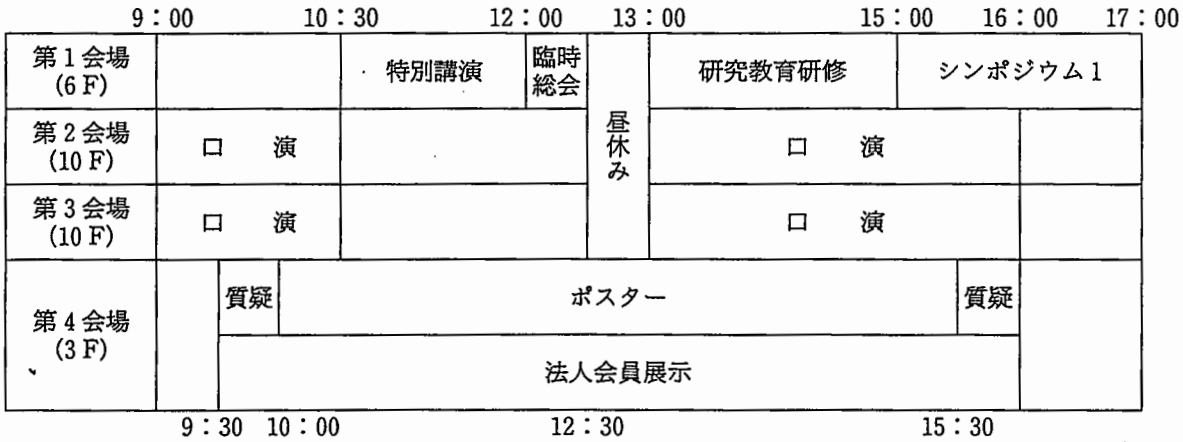
開 催 日：平成12年11月10日（金），11日（土）
会　　場：大阪国際会議場（グランキューブ大阪）（大阪市北区中之島5-3-51　TEL：06-4803-5555）
大 会 長：川添堯彬（大阪歯科大学有歯補綴咬合学講座）

大会日程：

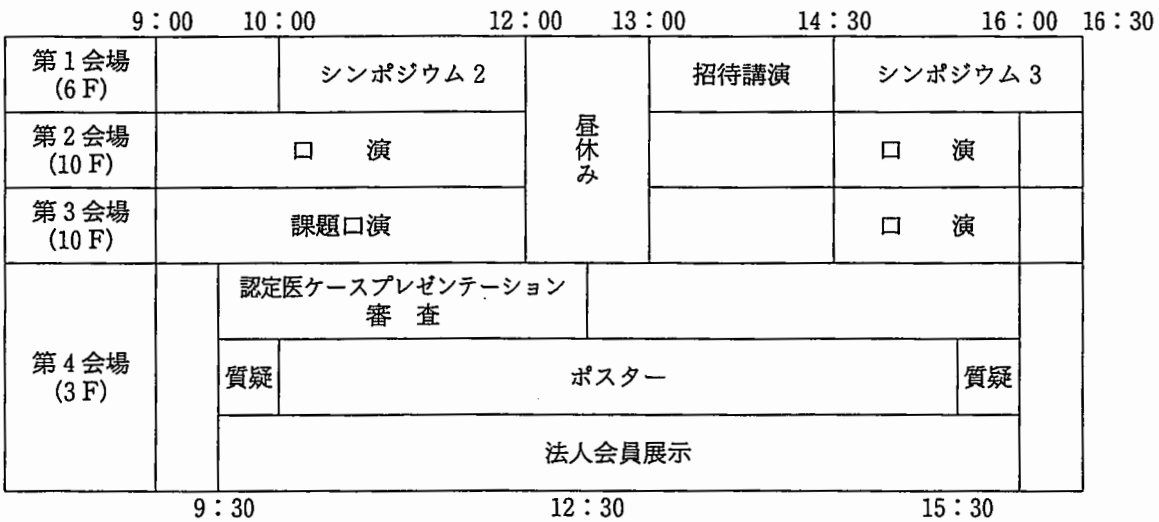
11月9日（木）



11月10日（金）



11月11日（土）



1-4-20　咀嚼の想像による大脳皮質の賦活状態
○馬場俊輔，吉友有祐，廣田明人，田中昌博*，川添堯彬*，堀　亘孝（京府医大附属病院歯科，*大歯大）
1-4-21　習慣性咀嚼側の評価法に関する研究
○内藤　元，林　幸男，浅野　隆，宗　邦雄，浜野勝巳，小林喜平（日大松戸歯）
1-4-22　硬性線維性食品の大きさが最大咀嚼力に及ぼす影響
○袖山亜紀，篠ヶ谷龍哉，松元　誠（東医歯大歯）
1-4-23　遊離端義歯装着による咬合支持回復能力に関する検討
○篠ヶ谷龍哉，田中泰弘，松元　誠（東医歯大歯）
1-4-24　超音波診断装置による舌運動と嚥下音を指標とする嚥下機能の評価法
○松実珠千，越野　寿，平井敏博，横山雄一，服部真幸，石島　勉（北医大歯）
1-4-25　咬頭嵌合時の下顎は動いている　第2報　新しいセンサシステムの開発と検討
○呉本晃一，前田照太，嶋村清次，井上　宏（大歯大）
1-4-26　咬頭嵌合時の下顎は動いている　第3報　各種咬合採得材による影響
○前田照太，呉本晃一，嶋村清次，井上　宏（大歯大）

審美歯科
1-4-27　ハイブリッド高分子材料のクラスプへの応用　—機械的性質についての基礎的検討—
○木下智恵，濵野　徹，井上朋美，水流和徳，西　恭宏，藤井孝一*，井上勝一郎*，長岡英一（鹿大歯，*鹿大歯理工）

理　工
1-4-28　ペースト・ペーストタイプアルジネート印象材の組成が石膏模型の表面性状に及ぼす影響
○川村真弓，村田比呂司，浜田泰三，田口則宏，土岐一仁，洪　光，楢崎泰史，地守宏紀（広大歯）
1-4-29　新しい合着用セメントの硬化初期の物性と接着性について
○入江正郎，鈴木一臣（岡大歯理工）
1-4-30　牛歯歯冠・歯根象牙質と各種レジンセメントとの接着性に関する研究　—加熱処理の影響—
○五十嵐　郁，高橋徹也，増田美樹子，北川剛至，富田亜希子，早川　徹*，會田雅啓（日大松戸歯，*日大松戸歯理工）
1-4-31　歯面レジンコーティング後の各種表面処理が接着性レジンとの接着に与える影響
○木下晴代，金島拓史，峯　篤史，渡辺和美，藤田栄伸，矢谷博文（岡大歯）
1-4-32　即時重合レジンの耐摩耗性の向上について　フィラー混入が表面粗さと摩耗量に与える影響
○新倉賢治，毛房弓子，古谷成悟，蓮池敏明，新倉久市，宮田　隆，天野秀雄（明海大歯）
1-4-33　テンポラリークラウン用レジンから溶出するMMAの溶出動態
○川口　稔，高橋　裕*，宮崎光治，羽生哲也*（福歯大理工，*福歯大）
1-4-34　高フィラー型コンポジットレジンの耐摩耗性　—加熱重合の影響について—
○永井栄一，鈴木司郎*，佐藤吉則，寺本浩平，村上　学，太田彰人，中島伸一郎，中臺一介，滝本博至，秋山逸馬，大谷賢二，森谷良彦（日大歯，*アラバマ大）
1-4-35　コンポジットレジン前装セラミッククラウンの破壊性状　第6報　In-Ceram Zirconiaフレーム
○渥美美穂子，浜野奈穂*，井野　智，新谷　忠，田村年彦，藤田忠寛，豊田　實（神歯大，*神歯大保存）
1-4-36　一体型電鋳バーアタッチメントに関する研究　—インプラント上部構造への応用—
○林　昌二，山田直樹，澤田智慈，豊田　實（神歯大）
1-4-37　金コーティングされた磁性アタッチメントキーパーの鋳接
○日比野　靖，倉持健一，鳥田泰弘*，中嶌　裕（明海大歯歯科材料，*松風）
1-4-38　歯科技工用Nd：YAGレーザ溶接機のNC自動化に関する基礎的研究　—溶接変形の抑制—
○李　元植，前原　聡，堀田康弘，宮崎　隆（昭和大歯理工）
1-4-39　マグネシア系転写型コーティング法を用いたCPチタン鋳造床
○上西研二，小正　裕，権田悦通（大歯大）
1-4-40　焼結鋳型を用いたCPチタン鋳造冠の適合精度および寸法変化
○井上太郎，森口　愛，浅井加雄，上西研二，小正　裕，権田悦通（大歯大）
1-4-41　チタンの陶材焼付強度に関する研究　—マイクロリテンションの効果—
○劉　杰，渡邊郁哉，大久保力廣*，吉田圭一，松村英雄，熱田　充（長大歯，*鶴見大歯）
1-4-42　研磨による焼付用陶材の強度に関する研究
○中村善治，佐藤秀明*，安味貞正*，生田奈緒子，福島俊士（鶴見大歯，*武蔵工大工）

Japan Prosthodontic Society

44巻104回特別号
平成12年11月

日本補綴歯科学会雑誌

第104回日本補綴歯科学会学術大会抄録集

補綴誌
J Jpn Prosthodont Soc
ISSN 0389－5386

大阪市：大阪国際会議場　2000 November
Vol.44・104th Special Issue

日　　程

開 催 日：平成12年11月10日（金），11日（土）
会　　場：大阪国際会議場（グランキューブ大阪）（大阪市北区中之島5-3-51　TEL：06-4803-5555）
大 会 長：川添堯彬（大阪歯科大学有歯補綴咬合学講座）

大会日程：

11月9日（木）

9：00	11：00	14：00	17：00	18：00	20：00
会務連絡会（1004～1006）	理事会（1004～1006）		評議員会（第3会場）		懇親会（第2会場）

14：15

11月10日（金）

	9：00	10：30	12：00	13：00	15：00	16：00	17：00
第1会場（6F）		特別講演	臨時総会	昼休み	研究教育研修	シンポジウム1	
第2会場（10F）	口　演				口　演		
第3会場（10F）	口　演				口　演		
第4会場（3F）		質疑	ポスター			質疑	
		法人会員展示					

9：30　10：00　12：30　15：30

11月11日（土）

	9：00	10：00	12：00	13：00	14：30	16：00	16：30
第1会場（6F）		シンポジウム2		昼休み	招待講演	シンポジウム3	
第2会場（10F）	口　演					口　演	
第3会場（10F）	課題口演					口　演	
第4会場（3F）		認定医ケースプレゼンテーション審　査					
		質疑	ポスター			質疑	
		法人会員展示					

9：30　12：30　15：30

1-4-20 咀嚼の想像による大脳皮質の賦活状態
○馬場俊輔，吉友有祐，廣田明人，田中昌博*，川添堯彬*，堀　亘孝（京府医大附属病院歯科，*大歯大）
1-4-21 習慣性咀嚼側の評価法に関する研究
○内藤　元，林　幸男，浅野　隆，宗　邦雄，浜野勝巳，小林喜平（日大松戸歯）
1-4-22 硬性線維性食品の大きさが最大咀嚼力に及ぼす影響
○袖山亜紀，篠ヶ谷龍哉，松元　誠（東医歯大歯）
1-4-23 遊離端義歯装着による咬合支持回復能力に関する検討
○篠ヶ谷龍哉，田中泰弘，松元　誠（東医歯大歯）
1-4-24 超音波診断装置による舌運動と嚥下音を指標とする嚥下機能の評価法
○松実珠千，越野　寿，平井敏博，横山雄一，服部真幸，石島　勉（北医大歯）
1-4-25 咬頭嵌合時の下顎は動いている　第2報　新しいセンサシステムの開発と検討
○呉本晃一，前田照太，嶋村清次，井上　宏（大歯大）
1-4-26 咬頭嵌合時の下顎は動いている　第3報　各種咬合採得材による影響
○前田照太，呉本晃一，嶋村清次，井上　宏（大歯大）

審美歯科
1-4-27 ハイブリッド高分子材料のクラスプへの応用　—機械的性質についての基礎的検討—
○木下智恵，濵野　徹，井上朋美，水流和徳，西　恭宏，藤井孝一*，井上勝一郎*，長岡英一（鹿大歯，*鹿大歯理工）

理　工
1-4-28 ペースト・ペーストタイプアルジネート印象材の組成が石膏模型の表面性状に及ぼす影響
○川村真弓，村田比呂司，浜田泰三，田口則宏，土岐一仁，洪　光，楢崎泰史，地守宏紀（広大歯）
1-4-29 新しい合着用セメントの硬化初期の物性と接着性について
○入江正郎，鈴木一臣（岡大歯理工）
1-4-30 牛歯歯冠・歯根象牙質と各種レジンセメントとの接着性に関する研究　—加熱処理の影響—
○五十嵐　郁，高橋徹也，増田美樹子，北川剛至，富田亜希子，早川　徹*，會田雅啓（日大松戸歯，*日大松戸歯理工）
1-4-31 歯面レジンコーティング後の各種表面処理が接着性レジンとの接着に与える影響
○木下晴代，金島拓史，峯　篤史，渡辺和美，藤田栄伸，矢谷博文（岡大歯）
1-4-32 即時重合レジンの耐摩耗性の向上について　フィラー混入が表面粗さと摩耗量に与える影響
○新倉賢治，毛房弓子，古谷成悟，蓮池敏明，新倉久市，宮田　隆，天野秀雄（明海大歯）
1-4-33 テンポラリークラウン用レジンから溶出するMMAの溶出動態
○川口　稔，高橋　裕*，宮崎光治，羽生哲也*（福歯大理工，*福歯大）
1-4-34 高フィラー型コンポジットレジンの耐摩耗性　—加熱重合の影響について—
○永井栄一，鈴木司郎*，佐藤吉則，寺本浩平，村上　学，太田彰人，中島伸一郎，中臺一介，滝本博至，秋山逸馬，大谷賢二，森谷良彦（日大歯，*アラバマ大）
1-4-35 コンポジットレジン前装セラミッククラウンの破壊性状　第6報　In-Ceram Zirconiaフレーム
○渥美美穂子，浜野奈穂*，井野　智，新谷　忠，田村年彦，藤田忠寛，豊田　實（神歯大，*神歯大保存）
1-4-36 一体型電鋳バーアタッチメントに関する研究　—インプラント上部構造への応用—
○林　昌二，山田直樹，澤田智慈，豊田　實（神歯大）
1-4-37 金コーティングされた磁性アタッチメントキーパーの鋳接
○日比野　靖，倉持健一，鳥田泰弘*，中嶌　裕（明海大歯歯科材料，*松風）
1-4-38 歯科技工用Nd：YAGレーザ溶接機のNC自動化に関する基礎的研究　—溶接変形の抑制—
○李　元植，前原　聡，堀田康弘，宮崎　隆（昭和大歯理工）
1-4-39 マグネシア系転写型コーティング法を用いたCPチタン鋳造床
○上西研二，小正　裕，権田悦通（大歯大）
1-4-40 焼結鋳型を用いたCPチタン鋳造冠の適合精度および寸法変化
○井上太郎，森口　愛，浅井加雄，上西研二，小正　裕，権田悦通（大歯大）
1-4-41 チタンの陶材焼付強度に関する研究　—マイクロリテンションの効果—
○劉　杰，渡邊郁哉，大久保力廣*，吉田圭一，松村英雄，熱田　充（長大歯，*鶴見大歯）
1-4-42 研磨による焼付用陶材の強度に関する研究
○中村善治，佐藤秀明*，安味貞正*，生田奈緒子，福島俊士（鶴見大歯，*武蔵工大工）

1—4—41

チタンの陶材焼付強度に関する研究
—マイクロリテンションの効果—

○劉　杰，渡邊郁哉，大久保力廣*，吉田圭一，松村英雄，熱田　充

長崎大学歯学部歯科補綴学第1講座，*鶴見大学歯学部歯科補綴学第1講座

Study on Bond Strength of Porcelain to Titanium
- Effect of Mechanical Micro Retension on Bond Strength -

Liu J, Watanabe I, Ohkubo C*, Yoshida K, Matsumura H, Atusta M
Dept. of Fixed Prosth. Nagasaki Univ. School of Dentistry
*The 1st Dept. of Prosthetic Dent. Tsurumi Univ. School of Dental Medicine

Ⅰ．目的

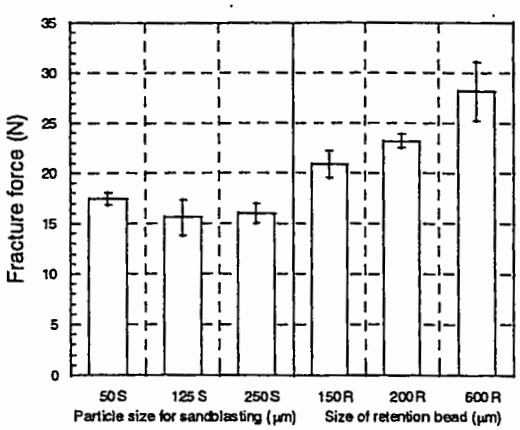
純チタンは高温での活性が非常に高いということと熱膨張係数が従来の焼付用合金に比較して小さいことから，陶材との結合強度に難点があり，陶材の破折がチタンとの界面で起こることが多い．本研究ではチタンの表面に附与した機械的な維持装置が陶材との焼付強さに及ぼす影響について調べた．また，焼付用金合金と陶材の焼付強さとの比較検討を行った．

Ⅱ．方法

本研究ではタイプIIの純チタンと白金加金金合金(Degudent Universal)を使用した．陶材はチタン用にスーパーボーセレンTITAN（ノリタケ），金合金用にVITA Omega 900(VITA)を用いた．チタンの3点曲げ試験片用に板状パターン(0.5×5.0×25.0 mm)を用意し，中央部(8.0×5.0 mm)に3種類のリテンションビーズ(150，200，600 μm)をそれぞれのパターンに振り掛け，マグネシア系埋没材(Selevest CB, Selec)で埋没を行った．鋳型はメーカー指示に従い焼却し，アルゴンアーク遠心鋳造機(Ticast Super R, Selec)でチタンの鋳造を行った．鋳造後，試験片は50 μmのアルミナでサンドブラスト（以下，SB）処理を施した．また，SBによるマイクロリテンションの効果を調べるため3種類のアルミナ(50，125，250 μm)を用意し，SB処理（空気圧:4 kgf/mm，距離:2 cm，時間:20 sec）だけを施した板状鋳造体を作製した．対照として，金合金を用い200 μmのリテンションビーズを施した板状鋳造体と50 μmのSB処理だけを施した鋳造体をリン酸塩系埋没材と高周波遠心鋳造機により作製した．金型を用い各板状鋳造体中央部（8.0×5.0 mm）に陶材を築成し，オペーク（厚さ約200 μm）とボディポーセレンで合計4回の焼成を行った．焼成後の陶材はその厚さが1.0 mmになるように研磨した．3点曲げ焼付強度試験(n=5)は万能試験機を用い，クロスヘッドスピード1.5 mm/min，支点間距離20 mmの条件で行い，陶材破壊時のFracture force (Ff; N)およびDeflection(De; mm)を求めた．また，50 μmアルミナでSB処理した試験片から得られた結果よりDINの規格[1]に従い，チタンと金合金の弾性係数からそれぞれの金属に対する陶材の焼付強度を求めた．さらに，チタン鋳造体で酸化処理（ディギャッシング）の影響を調べるため，アルミナでSB処理した試験片で酸化処理を施さない試験片も用意し，3点曲げ試験に供した．

Ⅲ．結果と考察

チタンでは酸化処理した試験片が酸化処理しないものより有意に高いFf値を示した．図に陶材破壊時のFf値を示す．粒径の異なるアルミナによるSB処理のFf値に有意な差（$p > 0.05$）は認められなかった．リテンションビーズではその径が大きくなるに従いFf値が有意に高くなった．チタンと金合金に対する陶材の焼付強度はそれぞれ50.3，52.6 MPaで両者に有意な差はなかった．チタンの過度の酸化はFf値を低下させるが，適度の酸化ではFf値を向上させることと，リテンションビーズによる機械的な焼付強度の強化が示唆された．



図．陶材破壊時のFracture force

Ⅳ．文献

1) Schwickerath H. Zur verbundfestigkeit von metallkeramik. Dtsch Zahnärztl Z 35:910-12, 1980.

1—4—41

チタンの陶材焼付強度に関する研究
—マイクロリテンションの効果—

○劉　杰，渡邊郁哉，大久保力廣*，吉田圭一，松村英雄，熱田　充

長崎大学歯学部歯科補綴学第1講座，*鶴見大学歯学部歯科補綴学第1講座

Study on Bond Strength of Porcelain to Titanium
- Effect of Mechanical Micro Retension on Bond Strength -

Liu J, Watanabe I, Ohkubo C*, Yoshida K, Matsumura H, Atusta M
Dept. of Fixed Prosth. Nagasaki Univ. School of Dentistry
*The 1st Dept. of Prosthetic Dent. Tsurumi Univ. School of Dental Medicine

Ⅰ．目的

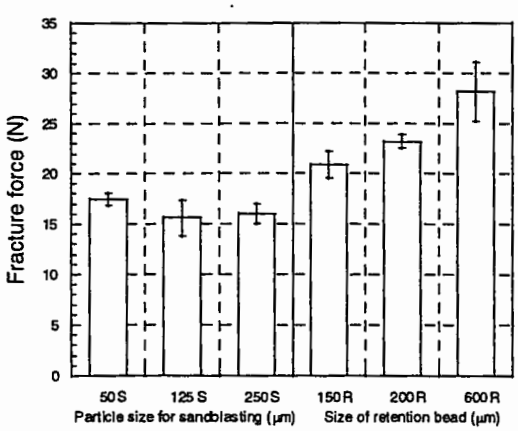
純チタンは高温での活性が非常に高いということと熱膨張係数が従来の焼付用合金に比較して小さいことから，陶材との結合強度に難点があり，陶材の破折がチタンとの界面で起こることが多い．本研究ではチタンの表面に附与した機械的な維持装置が陶材との焼付強さに及ぼす影響について調べた．また，焼付用金合金と陶材の焼付強さとの比較検討を行った．

Ⅱ．方法

本研究ではタイプIIの純チタンと白金加金金合金(Degudent Universal)を使用した．陶材はチタン用にスーパーポーセレンTITAN（ノリタケ），金合金用にVITA Omega 900(VITA)を用いた．チタンの3点曲げ試験片用に板状パターン(0.5×5.0×25.0 mm)を用意し，中央部(8.0×5.0 mm)に3種類のリテンションビーズ(150，200，600 μm)をそれぞれのパターンに振り掛け，マグネシア系埋没材(Selevest CB, Selec)で埋没を行った．鋳型はメーカー指示に従い焼却し，アルゴンアーク遠心鋳造機(Ticast Super R, Selec)でチタンの鋳造を行った．鋳造後，試験片は50 μmのアルミナでサンドブラスト（以下，SB)処理を施した．また，SBによるマイクロリテンションの効果を調べるため3種類のアルミナ(50，125，250 μm)を用意し，SB処理（空気圧:4 kgf/mm，距離:2 cm，時間:20 sec）だけを施した板状鋳造体を作製した．対照として，金合金を用い200 μmのリテンションビーズを施した板状鋳造体と50 μmのSB処理だけを施した鋳造体をリン酸塩系埋没材と高周波遠心鋳造機により作製した．金型を用い各板状鋳造体中央部（8.0×5.0 mm）に陶材を築成し，オペーク（厚さ約200 μm）とボディポーセレンで合計4回の焼成を行った．焼成後の陶材はその厚さが1.0 mmになるように研磨した．3点曲げ焼付強度試験(n=5)は万能試験機を用い，クロスヘッドスピード1.5 mm/min，支点間距離20 mmの条件で行い，陶材破壊時のFracture force (Ff; N)およびDeflection(De; mm)を求めた．また，50 μmアルミナでSB処理した試験片から得られた結果よりDINの規格[1]に従い，チタンと金合金の弾性係数からそれぞれの金属に対する陶材の焼付強度を求めた．さらに，チタン鋳造体で酸化処理(ディギャッシング)の影響を調べるため，アルミナでSB処理した試験片で酸化処理を施さない試験片も用意し，3点曲げ試験に供した．

Ⅲ．結果と考察

チタンでは酸化処理した試験片が酸化処理しないものより有意に高いFf値を示した．図に陶材破壊時のFf値を示す．粒径の異なるアルミナによるSB処理のFf値に有意な差（$p > 0.05$）は認められなかった．リテンションビーズではその径が大きくなるに従いFf値が有意に高くなった．チタンと金合金に対する陶材の焼付強度はそれぞれ50.3，52.6 MPaで両者に有意な差はなかった．チタンの過度の酸化はFf値を低下させるが，適度の酸化ではFf値を向上させることと，リテンションビーズによる機械的な焼付強度の強化が示唆された．



図．陶材破壊時のFracture force

Ⅳ．文献

1) Schwickerath H. Zur verbundfestigkeit von metallkeramik. Dtsch Zahnärztl Z 35:910-12, 1980.

日本財団補助金による
２０００年度日中医学学術交流促進事業

⑤．在留中国人研究者研究助成

(18)プラークー感受性(SUS)と抵抗性(RES)ラット三大唾液腺に於けるアドレナリン性受容体サブタイプ遺伝子の発現動態

プラーク一感受性 (SUS) と一抵抗性 (RES) ラット三大唾液腺におけるアドレナリン性受容体サブタイプ遺伝子の発現動態

研究者氏名
南　曉利
中国での所属・役職
中国黒龍江省佳木斯大学口腔医学院口腔病理学教研室助手・口腔医学院附属病院病理科医師
日本での所属先・研究室名・
日本福岡歯科大学口腔生化学講座

要旨（日本語）

アドレナリン受容体（AR）は哺乳類の唾液腺における唾液成分の分泌を調節することに関わる。ARには分子クーロンニングにより3種類のα_1 ARs (α_{1a}, α_{1b} and α_{1d})，3種類のα_2 ARs (α_{2A}, α_{2B} and α_{2C}) 及び3種類のβ ARs (β_1, β_2 and β_3)の合計9種類のサブタイプの存在が報告されている。今までの研究では、ODUラット(SUSとRES)の三大唾液腺におけるARサブタイプ遺伝子mRNAとHouse-keeping gene—G3PDHの発現を検索した。更に耳下腺におけるARサブタイプ遺伝子mRNAとG3PDHの発現量を詳細に検討してきた。その結果は：

1. RT-PCRにより5種類のARサブタイプ-- α_{1a}, α_{1b}, α_{2A}, β_1 及び β_2 とG3PDHの増幅産物がODUラット（SUSとRES）の顎下腺、耳下腺及び舌下腺の全てに検出された。なお、α_{1d}, α_{2B}, α_{2C}及びβ_3サブタイプについてもRT-PCRを行ったがその増幅産物は三大唾液腺にいずれも検出されなかった。
2. SUSとRESラットの耳下腺におけるARサブタイプ遺伝子発現量のCompetitive RT-PCRによる比較:
   （1） G3PDHに対する相対値：SUSとRESとで比較すると、α_{1a}, α_{2A} 及びβ_1 ARサブタイプmRNAの発現量はRESより、SUSが顕著に低く、α_{1b} ARサブタイプmRNAの発現量はRESより、SUSが顕著に高く、有意差が認められた。β_2 ARでは両者に有意差が認められなかった。
   （2） 総 AR ($\alpha_{1\alpha}+\alpha_{1\beta}+\alpha_{2A}+\beta_1+\beta_2$) に対する相対値：SUSとRESとで比較すると、α_{1a}, α_{2A}及びβ_1 ARサブタイプmRNAの発現量はRESより、SUSが顕著に低く、α_{1b}及び β_2 ARサブタイプmRNAの発現量はRESより、SUSが顕著に高く、両者に有意差が以上の5種類のARサブタイプ遺伝子mRNA全てに認められた。
   （3） SUSとRESの総 ARの発現量：総 ARの発現量を両者で比較すると、RESよりSUSが顕著に低く、有意差が認められた。
   （4） SUSとRESのARサブタイプの遺伝子mRNA発現量の順位： SUS；$\beta_2 > \alpha_{1\alpha} > \alpha_{1b} > \beta_1 > \alpha_{2A}$, RES； $\alpha_{1a} > \beta_2 > \beta_1 > \alpha_{1b} > \alpha_{2A}$ であり， 両者の順位は異なっていた。

以上のことから，ARサブタイプ遺伝子の発現量はSUSとRESとの遺伝子レベルでの鑑別に重要な役割を果たす可能性が示唆された。

Key words: Adrenergic receptor subtype, Quantitative competitive reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR), three major salivary glands, ODU plaque-susceptible (SUS) and -resistant (RES) rats,

mRNA Expression of Adrenergic Receptor Subtypes in ODU Rat Salivary Glands

X. Nan*, T. Nishiura, C. Gao, K. Ishibashi, K. Abe

Department of Oral Biochemistry, Fukuoka Dental College, 2-15-1 Tamura, Sawara-ku, Fukuoka 814-0193, Japan

Key words: Adrenergic receptor subtype, Quantitative competitive reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR), three major salivary glands, ODU plaque-susceptible (SUS) and -resistant (RES) rats, mNRA expression

*Corresponding author. Tel.: 81-92-801-0411; fax: 81-92-801-4909.

E-mail address: nanxl@yahoo.com (X. Nan)

Running title: mRNA expression of AR subtypes

Abbreviations: dNTP, deoxynucleoside triphosphate; G3PDH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; RT-PCR, reverse transcription-polymerase chain reaction; ODU, Osaka Dental University; SUS, ODU plaque-susceptible rat; RES, ODU plaque-resistant rat; SG, salivary gland.

Abstract

Adrenergic receptors (ARs) are involved in mediating saliva secretion in mammalian salivary glands (SGs). Nine AR subtypes, including three α_1-ARs (α_{1a}-, α_{1b}- and α_{1d}-ARs), three α_2-ARs (α_{2A}-, α_{2B}- and α_{2C}-ARs) and three β-ARs (β_1-, β_2- and β_3-ARs), have been identified through molecular cloning. The five subtype genes, α_{1a}-, α_{1b}-, α_{2A}-, β_1-, and β_2-ARs, were expressed in the three major SGs of ODU Plaque-susceptible (ODUS/Odu/SUS) and plaque-resistant (RES) rats. In contrast, the other four subtype mRNAs, α_{1d}-, α_{2B}-, α_{2C}- and β_3-ARs, were not detected by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). The steady-state mRNA expression for the five AR subtypes in the Parotid glands (PGs) of the ODU rats at 12 weeks of age was measured by quantitative competitive RT-PCR used synthetic DNA fragment (subtype-specific DNA competitor) as an exogenous internal standard. The intensities of the mRNA expression of AR subtypes in the PG were significantly different between SUS and RES groups-- the levels of transcripts for α_{1a}-, α_{2A}- and β_1-AR subtypes were significantly lower, whereas that for α_{1b}-AR subtype mRNA was significantly higher in SUS group in relation to that for a housekeeping gene, glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (G3PDH), and to that for the total AR (α_{1a}+ $\alpha_{1\beta}$+ α_{2A}+ β_1 + β_2). On the other hand, the level of transcript for the β_2-AR subtype mRNA was not significant between SUS and RES in relation to that for G3PDH, but not to that for the total AR. Moreover, the levels of transcripts for total AR subtypes were significantly lower in SUS than in RES. And the relative rank order of AR subtype mRNA expression in SUS and RES was different as: β_2- > $\alpha_{1\alpha}$- > α_{1b}- > β_1- > α_{2A}-AR and α_{1a}- > β_2- > β_1- > α_{1b}- > α_{2A}-AR, respectively. It is revealed although the three major SGs of ODU rat contain the five AR subtype mRNAs, distinct subtype-specific expression is evident between the SUS and RES group in the PGs, and also suggested that some of the AR subtypes in the PGs might especially be involved in discriminating both SUS and RES groups.

1. Introduction

Adrenergic receptors (ARs) are involved in mediating saliva secretion in mammalian salivary glands (SGs). The ARs, as the two types of three classical autonomic neurotransmitter receptors (α-adrenergic, α-AR, β-adrenergic, β-AR, muscarinic-cholinergic, mAChR), are clarified to be a family of G protein-linked signaling proteins and can be functionally and structurally divided into three main subfamilies, designated as α_1-, α_2- and β-ARs, which are generally coupled to evoking a Ca^{2+} signal (α_1-ARs), inhibiting adenylylate cyclase (α_2-ARs) and triggering a G-protein-mediated cAMP signal (β-ARs), respectively (Garrett *et al.*, 1999). Furthermore, multiple subtypes have been identified through molecular cloning within each subfamily: three α_1-ARs (α_{1a}-, α_{1b}- and α_{1d}-ARs) (Voigt *et al.*, 1990; Lomasney *et al.*, 1991; Laz *et al.*, 1994), three α_2-ARs (α_{2A}-, α_{2B}- and α_{2C}-ARs) (Zeng *et al.*, 1990; Lanier *et al.*, 1991) and three β-ARs (β_1-, β_2- and β_3-ARs) (Buckland *et al.*, 1990; Machida *et al.*, 1990; Muzzin *et al.*, 1991).

The strain of ODU Plaque-susceptible (ODUS/Odu/SUS) rats has been breeding, identifying and developing at Osaka Dental University (ODU) of Japan since 1972 (Ito *et al.*, 1975a), which was originally derived from Wistar-kyoto strain and exhibited markedly heavy plaque formation in the lower incisors and developed both periodontal pocket and gingivitis after being fed with commercially available powder diet (MF, Oriental Yeast Co., Tokyo, Japan) per day with water *ad libitum*. Whereas those not forming plaque and gingivitis under the same dietary condition are known as ODU plaque-resistant (RES) rats. It has been demonstrated that ODU SUS rat is a very suitable and useful experimental model for studying plaque formation, naturally occurring gingivitis (Ito *et al.*, 1975) and experimental periodontitis (Ohura *et al.*, 1995) and thought that plaque formation depended more on the hereditary characteristic of the strain of ODUS rats than on the diet (Ito *et al.*, 1976). The some data about the changes of amount and PH of saliva, IgA in the saliva, salivary kallikrein, silalic acid and fibrinolytic activities in saliva were reported in ODU SUS rats (Ohura *et al.*, 1984 and 1986; Takai *et al.*, 1985; Ieiri, 1982; Shinohara *et al.*, 1994; Ohura *et al.*, 1985). The differences of allelic distribution – cell surface alloantigen RT1.A and RT2 between ODU SUS and RES rats in red blood cell were shown and suggested that forming plaque and gingivitis in the lower incisors might account for allelic distribution (Shinohara *et al.*, 1991). But in

the entities of the SGs, especially in that of the three major SGs, the differences of gene expression between SUS and RES rats have not been completely elucidated yet, so in this study we decided the beginning of our experiment from mRNA expression of AR subtypes in the three major SGs of ODU rats, including ODU SUS and RES rats.

Therefore, it is very important to study the differences in the gene expression and levels of AR subtypes in the SGs of ODU rats to elucidate the mechanisms of AR subtypes' mediating saliva secretion in ODU rats and whether there are certain correlations or not between the gene expression of AR subtypes and each of both dental plaque formation in SUS and dental plaque inhibition in RES in the aspect of the hereditary characteristic of the two strains. However, little information is available on the gene expression and levels, the distribution and their functions of the AR subtypes in the SGs, especially in ODU rats' SGs. The present study was thus designed to determine whether there were some differences in the mRNA expression for AR subtypes in the three major SGs between ODU SUS and RES rats. Furthermore, the steady-state expression of mRNA for AR subtypes were studied in ODU rat parotid glands (PGs) by quantitative competitive RT-PCR, which is a accurate and highly sensitive technique for quantifying small amounts of mRNA (Gilliland *et al.*, 1990; Siebert and Larrick, 1993; Nishiura and Abe, 1999).

2. Materials and methods

2.1. Total RNA preparation from three major SGs

Male ODU SUS and RES rats (at least 3 rats/group) at 12 weeks of age were killed by exsanguination and the PG, submandibular (SMG) and sublingual (SLG) glands were rapidly excised. Total cellular RNA was isolated by the extraction with guanidinium thiocyanate-acidic-phenol-chloroform according to the procedure of Chomczynaski and Sacchi (1987). After precipitation with isopropanol, the RNA was washed with 75 % ethanol and then resuspended and dissolved in RNase-free water. Subsequently the RNA was purified for complete removal of DNA contamination from RNA by MessageClean kit (GenHunter Co., TN, USA) according to the manufacturer's protocol. The yields of RNA were measured by absorbance at 260 nm.

2.2. Design and synthesis of oligonucleotide primer

Gene-specific oligonucleotide primers for α_{1a}-, β_2- and β_3-AR subtypes, and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (G3PDH), were designed from the reported cDNA sequences using the nucleotide-sequence analysis software (DNASIS: Hitachi Software Engineering Co., Yokohama, Japan), and synthesized by Lifetech Oriental Co. (Tokyo, Japan) or Amersham Pharmacia Biotech (Tokyo, Japan). Also, the primers for α_{1b}- and α_{1d}-ARs, and for α_{2A}-, α_{2B}- and α_{2C}-ARs, and β_1-AR subtype, which were designed by Scofield *et al.* (1995), Gold *et al.* (1997) and Elalouf *et al.* (1993), respectively, were synthesized similarly and utilized. Meanwhile, a portion of the composite primers, relevant to gene-specific primers, for the constitution of corresponding DNA competitor, were designed to be made up of two parts as described in *2.4*, synthesized similarly and utilized. The sequences of gene-specific oligonucleotide primers and relevant composite primers are shown in Table 1.

2.3. RT-PCR

RT-PCR analysis was performed under the conditions showed in Table 2, as well as described previously (Nishiura and Abe, 1999). First-strand cDNA was synthesized in a RT reaction mixture containing 50 ng / μl total cellular RNA, PCR buffer (10 mM Tris-HCl (pH 8.3), 50 mM KCl), 5 mM $MgCl_2$, 1 mM of each dNTP (dATP, dCTP, dGTP and dTTP), 1 unit/μl ribonuclease inhibitor, 2.5 μM random 9-mers and 0.25 unit/μl avian myeloblastosis virus reverse transcriptase (Life Science, FL, USA). The reaction was incubated at 30 ℃ for 10 min and at 42 ℃ for 30 min, and the reverse transcriptase was inactivated by heating to 99 ℃ for 5 min. DNA amplification was performed in a PCR mixture containing cDNA, PCR buffer, 4 mM $MgCl_2$, 0.2 mM of each dNTP, 0.2 μM of each gene-specific forward or sense and reverse or antisense primer and 0.025 unit/μl recombinant Taq DNA polymerase (Takara shuzo, Tokyo, Japan). The PCR for the AR subtypes and the G3PDH amplification reactions was performed with a Program Temp Control System PC-700 (Astec Co., Fukuoka, Japan) with the following cycle parameters: one pre-denaturation cycle for 2 min at 94 ℃; in succession the every PCR cycle included 1 min of denaturation at 94 ℃, 1 min of annealing at 60 ℃ and 2 min of extension at

72 ℃.

2.4. Construction of competitor for competitive RT-PCR

The DNA competitors for quantifying the mRNA of AR subtypes and G3PDH by competitive RT-PCR were constructed with a MIMIC DNA fragment (574 bp, *Bam*HI/*Eco*RI fragment of the v-*erb*B gene) using a PCR MIMIC Construction Kit (Clontech, CA, USA) according to the manufacturer's protocol or the procedure of Siebert and Larrick (1993). The illustrative construction of DNA competitor is shown as Fig. 1. In order to construct the DNA competitors, two rounds of PCR amplification were performed. In the first PCR reaction, two composite primers were utilized, transcribed as well in Table 1. Each of one set of composite primers including forward and reverse primers, was designed to contain the corresponding target gene-specific primer sequence attached to a short, 20-nucleotide stretch of sequence designed to hybridize to opposite strand of the MIMIC DNA fragment. The desired primer sequences were thus incorporated during the first PCR amplification in the reaction mixture containing 1 ng MIMIC DNA fragment, 0.2 μM of each forward and reverse composite primer, PCR buffer, 4 mM $MgCl_2$, 0.2 mM of each dNTP and 0.025 unit/μl recombinant Taq polymerase. The products were diluted 1:100 in DEPC-treated water and 2 μl was added to 98 μl of PCR mixture containing PCR buffer, 4 mM $MgCl_2$, 0.2 mM of each dNTP, 0.025 unit/μl recombinant Taq polymerase and 0.2 μM of each forward and reverse target gene-specific primer. Both the first and the second PCR were incubated at 94 ℃ for 1 min, at 50 ℃ for 1 min and at 72 ℃ for 2 min and the numbers of the two PCR cycles were 17 and 18, respectively. The amplified DNA competitor was then passed through a CHROMA SPIN+TE-100 column (Clontech, CA, USA) to remove primers and reaction components and was separated on agarose gel electrophoresis. The yield of the competitor was estimated by image analysis as described in the latter *2.6*, and diluted to 100 amol (10^{-18} mol) /μl in 10 μg/ml glycogen and stored at -20 ℃ for use as a stock solution for the competitor dilutions. The competitors gained are non-homologous DNA, which remained complete target gene-specific primer sequences. The size of the competitor differed from the target gene product and could range from 425-606 bp by choosing the appropriate sequence of the MIMIC DNA fragment for the composite primers.

2.5. Assay of amplification kinetics

On the basis of DNA competitor and it target manuscript sharing the same set of primers and containing the same sequence DNA fragment, meanwhile also containing the different sequence fragment resulting in the different size products, it was therefore necessary to achieve the assay of amplification kinetics (amplification efficiency identity) before conducting competitive RT-PCR, by a target cDNA and its competitor amplifying simultaneously in equal molar quantities and under same conditions in respective PCR tubes at various cycle numbers from 19 to 36. The curves of amplification kinetics were drawn in accordance with the band intensities from image analysis after agarose gel electrophoresis by using the calibration standard (Fig. 3). The results of amplification kinetics assay were shown in *3.2.* and Fig. 5. Only after passing through the assay, the harvested competitors could be adopted in competitive RT-PCR.

2.6. Competitive RT-PCR

The competitive RT-PCR experiment was performed by the addition of increasing amount of DNA competitor to a fixed amount of cDNA synthesized by reverse transcription (RT) reaction, and both a target and its competitor were co-amplified in the presence of the same set of appropriate or corresponding gene-specific primers as well as RT-PCR as described previously (Nishiura and Abe, 1999). So the competitor competes with the target for the same primers and materials for synthesizing respective PCR products in the same one PCR reaction system and thus acted as an exogenous internal standard. The concise illustrative instructions for competing process and quantitative method of target manuscript — identifying the amount of target manuscript in PCR samples by the competitor 1:1 with target with NIH-Image and a linear regression analysis are shown as Fig. 2. The practical operation of competitive RT-PCR techniques was in accordance with the detailed protocol of PCR MIMIC™ Construction Kit (Clontech Lab. Inc., USA). The initial levels of the target mRNA (an absolute amounts) were determined by calculating how much of the competitor was required to achieve equal molar amounts of products (Gilliland *et al.*, 1990). The log of the number of molecules of DNA competitor added to the sample before starting amplification was plotted against the log of the ratio of the

molar amounts of the target and its competitor. The lines were drawn from a linear regression analysis and the number of molecules of the target manuscript was calculated by extrapolating from the intersection of the line, the equivalence point, *i.e.*, in which the molar ratio of target and competitor was 1.0 (log = 0). The mRNA levels for AR subtypes and G3PDH in the same cDNA sample were determined by utilizing competitive RT-PCR. The G3PDH is a housekeeping gene and reflects constitutive activity ubiquitous to eukaryotic cells. The amounts of mRNA were expressed as a percentage of transcript relative to G3PDH or other genes in order to correct the efficiency differences of total RNA extraction or/and reverse transcription from RNA to cDNA.

2.7. Agarose gel electrophoresis and determination of DNA band intensities by image analysis

An aliquot of each PCR product, including that of RT-PCR and competitive RT-PCR was separated by horizontal gel electrophoresis at 50 V for 1.2 h on 1.5 % SeaKem GTG agarose gel (FMC BioProducts, ME, USA) in 1xTBE buffer and visualized under UV light after staining with 0.5 mg/ml ethidium bromide (EtBr) for 30 min as described previously (Nishiura and Abe, 1999). In the meanwhile, the DNA molecular weight markers (ϕX 174/*Hae*III digest, Toyobo, Osaka, Japan) with distinct gradient-concentration dilutions were subjected to electrophoresis to utilize as calibration standards for determination of the size or the intensities of the PCR-product bands (Fig. 3). The gels were photographed using a Polaroid MP-4 Land camera with Type 667 film, scanned and digitized on an EPSON digital scanner and preserved as TIFF files. The intensity of PCR products' bands from the scanned images was analyzed by adopting a gel plotting macro of NIH-Image program (Version 1.57) on an Apple Macintosh computer and acquired relative data of the products from RT-PCR and Competitive RT-PCR.

2.8. Statistical analysis

Statistical analyses employed the unpaired Student's *t*-test with a computerized program "StatView". The significant and remarkably significant differences between data were evaluated through $p < 0.05$ and $p < 0.01$.

3. Results

3.1. RT-PCR analysis of the expression of AR subtype and G3PDH mRNAs in three major SGs of ODU SUS and RES rats (Fig. 4.1-3)

Figs. 4.1-3 show the patterns of amplified RT-PCR products after electrophoresis and staining, the patterns of mRNA expression for five AR subtypes, α_{1a}-, α_{1b}-, α_{2A}-, β_1- and β_2-ARs, and G3PDH gene were observed in both SUS and RES groups of the three major SGs, but in the PG of SUS group, β_1-AR subtype mRNA was detected under the condition of 48 PCR cycles. These results verified that every band for the five AR subtype genes, α_{1a}-, α_{1b}-, α_{2A}-, β_1- and β_2-ARs, and G3PDH gene corresponded to the size expected from the primer design (Table 1). In contrast, the other three subtype mRNAs, α_{2B}-, α_{2C}- and β_3-ARs, were not detected by RT-PCR, whereas α_{1d}-AR subtype mRNA was not clearly observed in both SUS and RES groups of the three major SGs (data not shown).

3.2. Amplification efficiency of target cDNA and its competitor (Fig. 5)

The amplification kinetic analysis indicated that the target cDNAs (α_{1a}-, α_{1b}-, α_{2A}-, β_1- and β_2-AR subtypes, and G3PDH) and its competitor pairs amplified with very similar efficiencies.

3.3. Expression levels of AR subtype mRNAs in the PGs of ODU SUS and RES rats

3.3.1. Relative expression of α_{1a}-, α_{1b}-, α_{2A}-, β_1- and β_2-AR mRNAs to G3PDH (Fig. 6)

The amounts of transcripts for, relative to that for G3PDH, α_{1a}-, α_{2A}- and β_1-AR subtypes were significantly lower in SUS group, whereas that for α_{1b}-AR subtype mRNA was higher. On the other hand, the β_2-AR subtype mRNA was not significant between SUS and RES.

3.3.2. Relative expression of α_{1a}-, α_{1b}-, α_{2A}-, β_1- and β_2-AR mRNAs to total AR (α_{1a}+ $\alpha_{1\beta}$+ α_{2A}+ β_1 + β_2) (Fig. 7)

The amounts of transcripts for, relative to that for total AR (α_{1a}+ $\alpha_{1\beta}$+ α_{2A}+ β_1 + β_2), α_{1a}-, α_{2A}- and

β_1-AR subtypes were significantly lower in SUS group, whereas those for α_{1b}- and β_2-AR subtypes were higher.

3.3.3. Comparison of total AR mRNA levels between SUS and RES (Fig. 8A)

The amounts of transcripts for total AR subtypes were significantly lower in SUS than in RES.

3.3.4. The relative rank order of expression of AR subtype genes (Fig. 8)

The relative rank order of AR subtype mRNA expression in SUS and RES was β_2- > α_{1a}- > α_{1b}- > β_1- > α_{2A}-AR and α_{1a}- > β_2- > β_1- > α_{1b}- > α_{2A}-AR, respectively, at both to the levels of G3PDH and total AR mRNA.

4. Discussion

Up to date, the expressions for many AR subtypes, containing the various analyses of gene, RNA, protein expression, receptor and second messenger, transactivator and microscopy, have been investigating and identifying in many various mammalian tissues by adopting various biochemical, parmacological and molecular biological techniques (Machida, 2000). Three distinct α_1-AR subtype genes [α_{1a}- (previously also given an α_{1c}- nomenclature), α_{1b}- and α_{1d}- (previously also given an α_{1A}- or $\alpha_{1a/d}$- nomenclature) ARs] and corresponding proteins have been identified by molecular cloning and pharmacological studies, respectively. Only α_{1A}-AR subtype protein has been identified in rat SMG membranes by receptor binding assay (Michel *et al.*, 1989), whereas it has been demonstrated the presence of α_{1A}- and α_{1B}-AR subtype proteins in rat PG acinar cell membrances by ^{125}IBE binding experiments for subtype selective α_1-AR antagonists (Porter *et al.*, 1992). α_{1a}- and α_{1b}-AR subtype genes were expressed in rat SGs, but α_{1d}-AR subtype mRNA was not discovered by using Northern blot analysis and pharmacological profiles of [^{3}H] prazosin binding (Faure *et al.*, 1994). Moreover, Rokosh *et al.* (1994) mentioned that α_{1a}-AR subtype mRNA was abundant in SMG and at lower levels in PG, and α_{1b}-AR subtype gene was expressed at lower levels, approximately 1:1, but α_{1d}-AR subtype mRNA was

not detected in both SMG and PG of adult rat by RNase protection assay. In the present study, we showed similarly that two α_{1a}- and α_{1b}-AR subtype genes were expressed among SMGs, PGs and SLGs of ODU SUS and RES rats (Figs.4.1-3), but α_{1d}-AR subtype mRNA was not detected among them by using RT-PCR (data not shown). Furthermore, in the PGs, the amounts of transcript for α_{1a}-AR subtype were significantly lower in SUS than those in RES, whereas those for α_{1b}-AR subtype were significantly higher in SUS than those in RES, at both relative to G3PDH and to total AR mRNA by competitive RT-PCR (Figs. 6 and 7). The levels of transcript for α_{1a}-AR subtype were highest in the RES, were second order in the SUS of PGs; those for α_{1b}-AR subtype were lower than those for α_{1a}-AR subtype, respectively fourth and third order in the RES and SUS to both the levels of G3PDH and total AR mRNA. Bylund *et al.* (1982) and Nishiura *et al.* (2001) individually reported the changes of α_1-AR protein and α_1-AR mRNA in the developing SMGs of Sprague-Dawley rats, respectively. However, the expression patterns of α_1-AR protein (Bylund *et al.* 1982) were similar to those of α_{1a}-AR mRNA (Nishiura *et al.*, 2001), different merely in the time of approaching adults levels or reaching a maximum.

α_2-AR can now be divided into three AR subtypes, α_{2A}- (previously also given an α_{2D}-nomenclature), α_{2B}- and α_{2C}-AR subtypes. In our present studies, α_{2A}-AR subtype gene was expressed (Figs. 4.1-3), but α_{2B}- and α_{2C}-AR subtypes were not detected (data not shown) in both SUS and RES groups of three major SGs by RT-PCR. The result was identical to that of mRNA expression for α_2-AR subtypes in the SMGs of Sprague-Dawley rats (Nishiura *et al.*, 2001). In the PGs, the amounts of transcript for α_{2A}-AR subtype were significantly lower in SUS than those in RES. Bylund *et al.* (1982) showed that the density of α_2-AR protein in SMGs was nearly undetectable by 6 weeks and Nishiura *et al.* (2001) also showed mRNA expression of α_{2A}-AR subtype in SMGs was a constant low level after 6 weeks of age. But in the PGs of SUS and RES, mRNA expression of α_{2A}-AR subtype was in a lowest level among those for α_{1a}-, β_2-, β_1- and α_{1b}-AR subtype in both SUS and RES groups.

β-AR is divided into β_1-, β_2- and β_3-AR subtypes, of which β_1- and β_2-AR subtype mRNAs were expressed in both SUS and RES groups of three major SGs by RT-PCR (Figs. 4.1-3). In the PGs, the amounts of transcript for β_1-AR subtype were significantly lower in SUS than those in RES at both relative to G3PDH and to total AR mRNA (Figs. 6 and 7); Those for β_2-AR subtype were higher in SUS

than those in RES only relative to total AR mRNA (Fig. 7), not relative to that for G3PDH (Fig. 6). Moreover, the levels of transcript for β_2-AR subtype were higher than those for β_1-AR subtype regardless of in SUS or in RES. The rank order of β_2-AR subtype in the PGs, was first and second in SUS and in RES, respectively. Schneyer and Humphreys-Beher (1987) showed that rat SMG had both β_1- and β_2-AR proteins, with the percentages of each being 90 % and 10 %, respectively, by [^{3}H] DHA binding studies. However, Nishiura *et al.* (2001) showed that the amounts of transcript for β_2-AR subtype in rat SMG were about 1.7—3.6 times higher than those for β_1-AR subtype from 2 to 12 weeks of age by competitive RT-PCR. And then we also found that the levels of mRNA expression for β_2-AR subtype were higher than those for β_1-AR subtype in the PGs of both SUS and RES. Nishiura *et al.* (2001) attributed the expression differences of mRNAs and proteins for β_1- and β_2-AR subtypes to the translation efficiency, half-life or instabilities of them.

The relative rank order of AR subtype mRNA expression in SUS and RES was β_2- > α_{1a}- > α_{1b}- > β_1- > α_{2A}-AR and α_{1a}- > β_2- > β_1- > α_{1b}- > α_{2A}-AR, at both to the levels of G3PDH and total AR mRNA, respectively (Fig. 8). In the relative rank orders of AR subtype expression, we could find that two reversion and one identification between SUS and RES, that is, the rank order of β_2- > α_{1a}-AR in SUS was reversed into that of α_{1a}- > β_2- AR in RES; similarly, that of α_{1b}- > β_1- AR in SUS was reversed into that of β_1- > α_{1b}- AR in RES; However, the levels of transcript for α_{2A}-AR subtype was identically ultimate in both SUS and RES groups. Moreover, the relative rank order of AR subtype mRNA expression in RES: α_{1a}- > β_2- > β_1- > α_{1b}- > α_{2A}-AR, is completely identical to that of SD rats of the same age (12 weeks of age) from Nishiura *et al.* (2001) except that rank order: α_{1b}- > α_{2A}-AR is reverse. On the other hand, the amounts of transcripts for total AR subtypes were significantly lower in SUS than in RES.

Besides, α_{1d}-AR subtype mRNA was not clearly observed in both SUS and RES groups of the three major SGs, not detected in rat liver (data not shown) either by RT-PCR, which corresponded to the results of Rokosh *et al.* (1994) by RNase protection assay, Faure *et al.* (1994) by Northern blot analysis and pharmcological profiles of [^{3}H] prazosin binding and Scofield *et al.* (1995) by using Reverse Transcription and a competitive RT-PCR. Up to now, neither study have been found any detectable

mRNA of the α_{1d}-AR subtype in rat liver, but α_{1d}-AR subtype protein in rat liver had been discovered in 1-week-old and adult rats by western analysis using receptor subtype specific polyclonal antibodies (Shen *et al.*, 2000). Thus this appearance fully proved that there were certain differences of expressions in abundance between for AR subtype proteins and for corresponding AR subtype mRNAs found previously. Rokosh *et al.* (1994) also put forward the differences of expressions for β_1- and β_2-AR subtypes, the similar as ours. On the basis of the differences of expressions described as above, we thus doubt in the expression of AR subtypes, whether reverse-transcription efficiency is completely identical to transcription efficiency or not, that is, whether reverse-transcription *in vitro* is precisely reverse to transcription *in vivo* or not, and whether a spurious translation from mRNA to protein might be contained in the protein expression of AR subtypes?! Therefore, further researches are needed to elucidate these knotty problems and determine the extent and level of translation of AR subtype mRNA into corresponding AR subtype proteins in the SGs.

It is not clear now how much, what proportion and functional differences in AR subtype expressions both the parenchyma (including acinar and ductal cells) and stroma of the SGs possess, thus the cellular localization of AR subtype mRNAs and corresponding proteins in the SGs is also a challenge for future work. Furthermore, it is not definite now for each of AR subtypes in SUS and RES rats how to mediate saliva secretion and whether there is a certain correlation or not with dental plaque information or inhibition. Therefore, it is also very important to elucidate the mechanisms of AR subtypes' mediating saliva secretion in ODU rats and the differences of the two strains in the aspect of the hereditary characteristic.

5. Conclusions

In our present study, the five subtype mRNAs, α_{1a}-, α_{1b}-, α_{2A}-, β_1- and β_2-ARs, were expressed in the three major SGs of both SUS and RES groups by RT-PCR. The intensities of the mRNA expression of AR subtypes in the PG were significantly different between SUS and RES groups by competitive RT-PCR and NIH-Image analysis. It is revealed although the three major SGs of ODU

rats contain the five AR subtype mRNAs, distinct subtype-specific expression is evident between the SUS and RES groups in the PG, and also suggested that some of the AR subtypes in the PG might especially be involved in discriminating both SUS and RES groups.

Acknowledgement

This research was supported in part by a grant-in-aid from the Subsidy for Chinese Researchers of Japan-China Medical Association (JCMA).

References

Buckland, P. R., Hill, R. M., Tidmarsh, S. F., McGuffin, P., 1990. Primary structure of the rat beta-2 adrenergic receptor gene. Nucleic Acid Research 18, 682.

Bylund, D. B., Martinez, J. R., Camden, J., Jones, S. B., 1982. Autonomic receptors in the developing submandibular glands of neonatal rats. Archives of Oral Biology 27, 945-950.

Chomczynski, P., Sacchi, N., 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. Analytical Biochemistry 162, 156-159.

Elalouf, J.-M., Buhler, J.-M., Tessiot, C., Bellanger, A.-C., 1993. Predominant expression of β_1-adrenergic receptor in the thick ascending limb of rat kidney. Absolute mRNA quantitation by reverse transcription and polymerase chain reaction. Journal of Clinical Investigation 91, 264-272.

Faure, C., Pimoule, C., Arbilla, S., Langer, S. Z., Graham, D., 1994. Expression of α_1-adrenoceptor subtypes in rat tissues: implications for α_1-adrenoceptor classification. European Journal of Pharmacology 268, 141-149.

Garrett, J.R., Ekstrom, J., Anderson, L.C., 1999. Neural mechanisms of salivary gland secretion: Receptors in salivary glands. Frontiers of Oral Biology 11, 44-58.

Gilliland, G., Perrin, S., Blanchard, K., Bunn, H. F., 1990. Analysis of cytokine mRNA and DNA: Detection and quantitation by competitive polymerase chain reaction. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 87, 2725-2729.

Gold, M. S., Dastmalchi, S. D., Levine, J. D., 1997. α_2-Adrenergic receptor subtypes in rat dorsal root and superior cervical ganglion neurons. Pain 69, 179-190.

Ieiri, M., 1982. Studies on salivary kallikrein in experimental gingivitis of rats. Journal of Osaka Odont. Soc. 45, 652-662.

Ito, N., Azuma, Y., Mori, M., 1975. Experimental gingivitis: Development of a new strain of plaque-susceptible rat. Journal of Dental Research 54, 425.

Ito, N., Azuma, Y., Mori, M., 1976. Experimental gingivitis: Development of a new strain of plaque-susceptible rat. Year Book of Dentistry 1976, 237-238.

Lanier, S. M., Downing, S., Duzic, E., Homcy, C. J., 1991. Isolation of rat genomic clones encoding subtypes of the α_2-adrenergic receptor. Identification of a unique receptor subtype. Journal of Biological Chemistry 266, 10470-10478.

Laz, T. M., Forray, C., Smith, K. E., Bard, J. A., Vaysse, P. J.-J., Branchek, T. A., Weinshank, R. L., 1994. The rat homologue of the bovine α_{1C}-adrenergic receptor shows the pharmacological properties of the classical α_{1A} subtype. Molecular Pharmacology 46, 414-422.

Lomasney, J. W., Cotecchia, S., Lorenz, W., Leung, W.-Y., Schwinn, D. A., Yang-Feng, T. L., Brownstein, M., Lefkowitz, R. J., Caron, M. G., 1991. Molecular cloning and expression of the cDNA for the α_{1A}-adrenergic receptor. Journal of Biological Chemistry 266, 6365-6369.

Machida, C. A., Bunzow, J. R., Searles, R. P., Van Tol, H., Tester, B., Neve, K. A., Teal, P., Nipper, V., Civelli O., 1990. Molecular cloning and expression of the rat β_1-adrenergic receptor gene. Journal of Biological Chemistry 265, 12960-12965.

Machida, C. A., 2000. Adrenergic receptor protocols. Methods in Molecular Biology 126, 1-168.

Michel, A. D., Loury, D. N., Whiting, R. L., 1989. Identification of a single alpha 1-adrenergic corresponding to the alpha 1A-subtype in rat submaxillary gland. British Journal of Pharmacology 98, 883-889.

Muzzin, P., Revelli, J.-P., Kuhne, F., Gocayne, J. D., McCombie, W. R., Venter, J. C., Giacobino, J.-P., Fraser, C. M., 1991. An adipose tissue-specific β-adrenergic receptor. Molecular cloning and down-regulation in obesity. Journal of Biological Chemistry 266, 24053-24058.

Nishiura, T., Abe, K., 1999. Postnatal changes of gene expression for tissue inhibitors of metalloproteinase-1 and -2 and cystatins S and C, in rat submandibular gland

demonstrated by quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction. Archives of Oral Biology 44, 15-26.

Nishiura, T., Gao, C., Nan, X., Abe, K., 2001. mRNA Expressions and postnatal changes of adrenergic receptor subtypes in rat submandibular glands. Archives of Oral Biology 46, .

Ohura, K., Shinohara, M., 1995. Experimental periodontitis in rats. Nippon Yakurigaku Zasshi 105, 319-329.

Ohura, K., Shinohara, M., Mori, M., Takai, N., Yoshida, Y., Kakudo, Y., 1984. Studies on saliva in ODU plaque-susceptible rats having experimental gingivitis: 1. Amount of saliva. Journal of Periodontal Research 19, 21-25.

Ohura, K., Shinohara, M., Mori, M., 1986. Properties of saliva in rats with naturally occurring gingivitis. Editions Medecine at Hygiene-Geneve 1986, 201-207.

Ohura, K., Shinohara, M., Mori, M., 1985. Fibrinolytic activities in saliva and gingival tissue of rats with experimental gingivitis. Japanese Journal of Oral Biology 27, 1246-1248.

Porter, J. E., Dowd, F. J., Abel, P. W., 1992. Atypical *alpha*-1 adrenergic receptors on the rat parotid gland acinar cell. Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics 263, 1062-1067.

Rokosh, D. G., Bailey, B. A., Stewart, A. F. R., Karns, L. R., Long, C. S., Simpson, P. C., 1994. Distribution of α1C-adrenergic receptor mRNA in adult rat tissues by RNase protection assay and comparison with α1B and α1D. Biochemical and Biophysical Research Communications 200, 1177-1184.

Schneyer, C. A., Humphreys-Beher, M. G., 1987. β Adrenergic and muscarinic receptor densities of rat submandibular main duct. Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine 185, 81-83.

Scofield, M. A., Liu, F., Abel, P. W., Jeffries, W. B., 1995. Quantification of steady state expression of mRNA for *alpha*-1 adrenergic receptor subtypes using reverse

transcription and a competitive polymerase chain reaction. Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics 275, 1035-1042.

Shen, H., Peri, K. G., Deng, X-F., Chemtob, S., Varma, D. R., 2000. Distribution of α_1-adrenoceptor subtype proteins in different tissues of neonatal and adult rats. Journal of Physiology and Pharmacology 78, 237-243.

Shinohara, M., Ohura, K., Ogata, K., Inoue, H.; Miyata, T., Yoshioka, M., 1994. The relationship between the sialic acid concentration in the serum and whole saliva in rats with naturally occurring gingivitis. Jpn. J. Pharmacol. 64, 61-63.

Shinohara, M., Ohura, K., Ogata, K., Mori, M., 1991. A new strain with naturally occurring gingivitis, "ODUS/Odu". Rat News Letter 24, 4-6.

Siebert, P. D. and Larrick, J. W., 1993. PCR MIMICS: Competitive DNA fragments for use as internal standards in quantitative PCR. Biotechniques 14, 244-249.

Takai, N., Shinohara, M., Yoshida, Y., Mori, M., Kakudo, Y., 1985. Studies on saliva in ODU plaque-susceptible rats having experimental gingivitis: 2. IgA in the saliva. Journal of Periodontal Research 20, 317-320.

Voigt, M. M., Kispert, J., Chin, H., 1990. Sequence of a rat brain cDNA encoding an alpha-1B adrenergic receptor. Nucleic Acid Research 18, 1053.

Zeng, D., Harrison, J. K., D'Angelo, D. D., Barber, C. M., Tucker, A. L., Lu, Z., Lynch, K. R., 1990. Molecular characterization of a rat α_{2B}-adrenergic receptor. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 87, 3102-3106.

Table 1 Sequences, lengths and cDNA localization of oligonucleotide primers, and PCR product size of cellular mRNA and its competitor

Primer		Sequence	Length (mer)	Location[a]	Product size (bp)	
					mRNA	Competitor
a_{1a} and competitor	Forward (F)	5'-AGCCGGCTCCAGAGGATGAGACCA-3'	24	500-523[b]	282	425
	Reverse (R)	5'-GCCTCACTGAGAAGTGAGTCTTATT-3'	25	707-781		
Construction of a_{1a} competitor	F	5'-AGCCGGCTCCAGAGGATGAGACCATGTTATACAGGGAGATGAAA-3'	44			
	R	5'-GCCTCACTGAGAAGTGAGTCTTATTTTGAGTCCATGGGGAGCTTT-3'	45			
a_{1b} and competitor	F	5'-GCTCCTTCTACATCCCGCTCG-3'	21	629-649[c]	300	428
	R	5'-AGGGGAGCCAACATAAGATGA-3'	21	908-928		
Construction of a_{1b} competitor	F	5'-GCTCCTTCTACATCCCGCTCGCAAGTTTCGTGAGCTGATTG-3'	41			
	R	5'-AGGGGAGCCAACATAAGATGAATTTGATTCTGGACCATGGC-3'	41			
a_{1d}	F	5'-CGTGTGCTCCTTCTACCTACC-3'	21	759-779[d]	304	
	R	5'-GCACAGGACGAAGACACCCAC-3'	21	1042-1062		
a_{2A} and competitor	F	5'-GCGCCCCAGAACCTCTTCCTGGTG-3'	24	196-219[e]	338	484
	R	5'-CCAGCGCCCTTCTTCTCTATGGAG-3'	24	510-533		
Construction of a_{2A} competitor	F	5'-GCGCCCCAGAACCTCTTCCTGGTGCAAGTTTCGTGAGCTGATTG-3'	44			
	R	5'-CCAGCGCCCTTCTTCTCTATGGAGTTGAGTCCATGGGGAGCTTT-3'	44			
a_{2B}	F	5'-AAACGCAGCCACTGCAGAGGTCTC-3'	24	613-636[f]	456	
	R	5'-ACTGGCAACTCCCACATTCTTGCC-3'	24	1045-1068		
a_{2C}	F	5'-CTGGCAGCCGTGGTGGGTTTCCTC-3'	24	160-183[g]	426	
	R	5'-GTCGGGCCGGCGGTAGAAAGAGAC-3'	24	562-585		
β_1 and competitor	F	5'-CGCTCACCAACCTCTTCATCATGTCC-3'	26	272-297[h]	376	557
	R	5'-CAGCACTTGGGGTCGTTGTAGCAGC-3'	25	623-647		
Construction of β_1 competitor	F	5'-CGCTCACCAACCTCTTCATCATGTCCCGCAAGTGAAATCTCCTCCG-3'	46			
	R	5'-CAGCACTTGGGGTCGTTGTAGCAGCATTTGATTCTGGACCATGGC-3'	45			
β_2 and competitor	F	5'-AAGTTCGAGCGACTACAAACCGT-3'	23	178-200[i]	406	602
	R	5'-TGAAGAAGTCACAGCAAGTCTCC-3'	23	561-583		
Construction of β_2 competitor	F	5'-AAGTTCGAGCGACTACAAACCGTCGCAAGTGAAATCTCCTCCG-3'	43			
	R	5'-TGAAGAAGTCACAGCAAGTCTCCTTGAGTCCATGGGGAGCTTT-3'	43			
β_3	F	5'-ACAGACCATAACCAACGTGTTCG-3'	23	195-217[j]	481	
	R	5'-GAACACTCGAGCATAGACGAAGA-3'	23	653-675		
G3PDH	F	5'-TGAAGGTCGGTGTCAACGGATTTGGC-3'	26	5-30[k]	983	606
	R	5'-CATGTAGGCCATGAGGTCCACCAC-3'	24	964-987		
Construction of G3PDH competitor	F	5'-TGAAGGTCGGTGTCAACGGATTTGGCCGCAAGTGAAATCTCCTCCG-3'	46			
	R	5'-CATGTAGGCCATGAGGTCCACCACTTGAGTCCATGGGGAGCTTT-3'	44			

[a]Location of the 5' ends of the primers are numbered from the ATG initiation codon of the ARs and G3PDH.

[b]The sequence for rat a_{1a} (Laz et al., 1994); [c]the sequence for rat a_{1b} (Voigt et al., 1990); [d]the sequence for rat a_{1d} (Lomasney et al., 1991); [e]the sequence for rat a_{2A} (Lanier et al., 1991); [f]the sequence for rat a_{2B} (Zeng et al., 1990); [g]the sequence for rat a_{2C} (Lanier et al., 1991); [h]the sequence for rat β_1 (Machida et al., 1990); [i]the sequence for rat β_2 (Buckland et al., 1990); [j]the sequence for rat β_3 (Muzzin et al., 1991); [k]the sequence for rat G3PDH (Tso et al., 1985).

Table 2 Reagents and conditions for reverse transcription and polymerase chain reaction (PCR)

	Reverse Transcription	PCR
PCR buffer (10xbuffer:100mM Tris/500mM KCl, pH8.3)	1 x	1 x
$MgCl_2$	5 mM	4 mM
dNTP	1 mM each	0.2 mM each
RNase inhibitor (human placenta)	1 unit/μl	
random 9 mers	2.5 pmol/μl	
AMV reverse transcriptase (Avian Myeloblastosis Virus)	0.25 unit/μl	
forward primer		0.2 pmol/μl
reverse primer		0.2 pmol/μl
Taq DNA polymerase		0.025 unit/μl

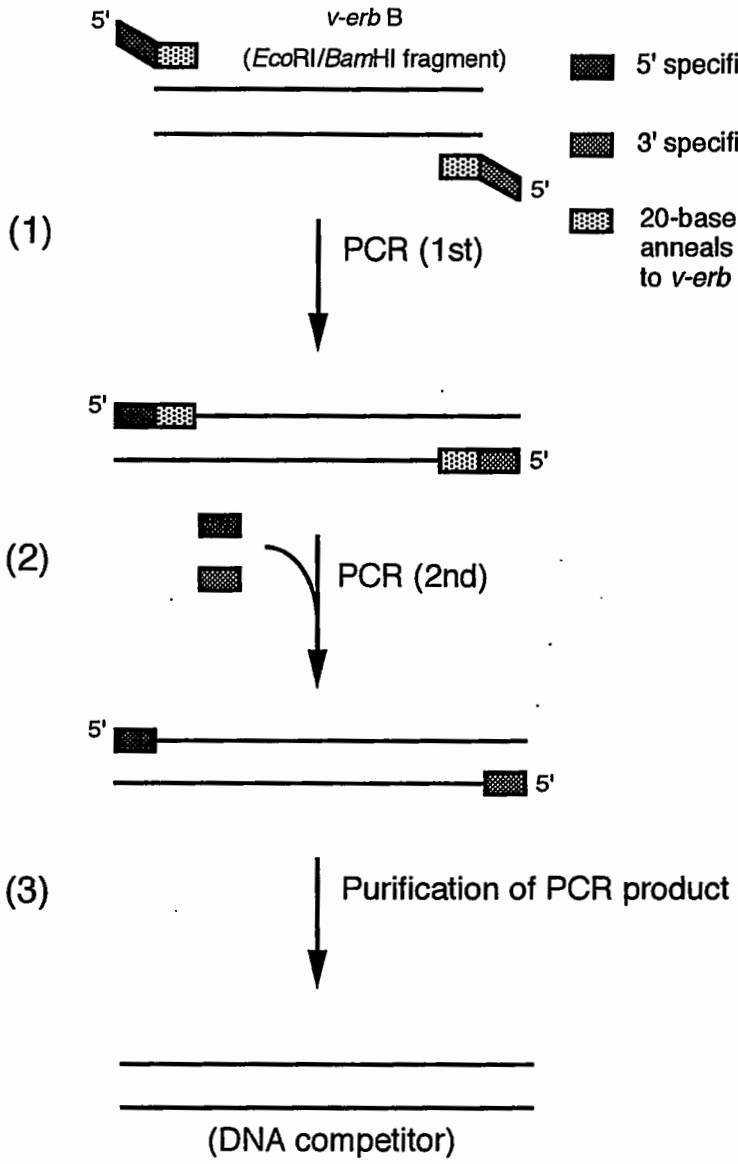


Fig. 1
Construction of DNA competitor.

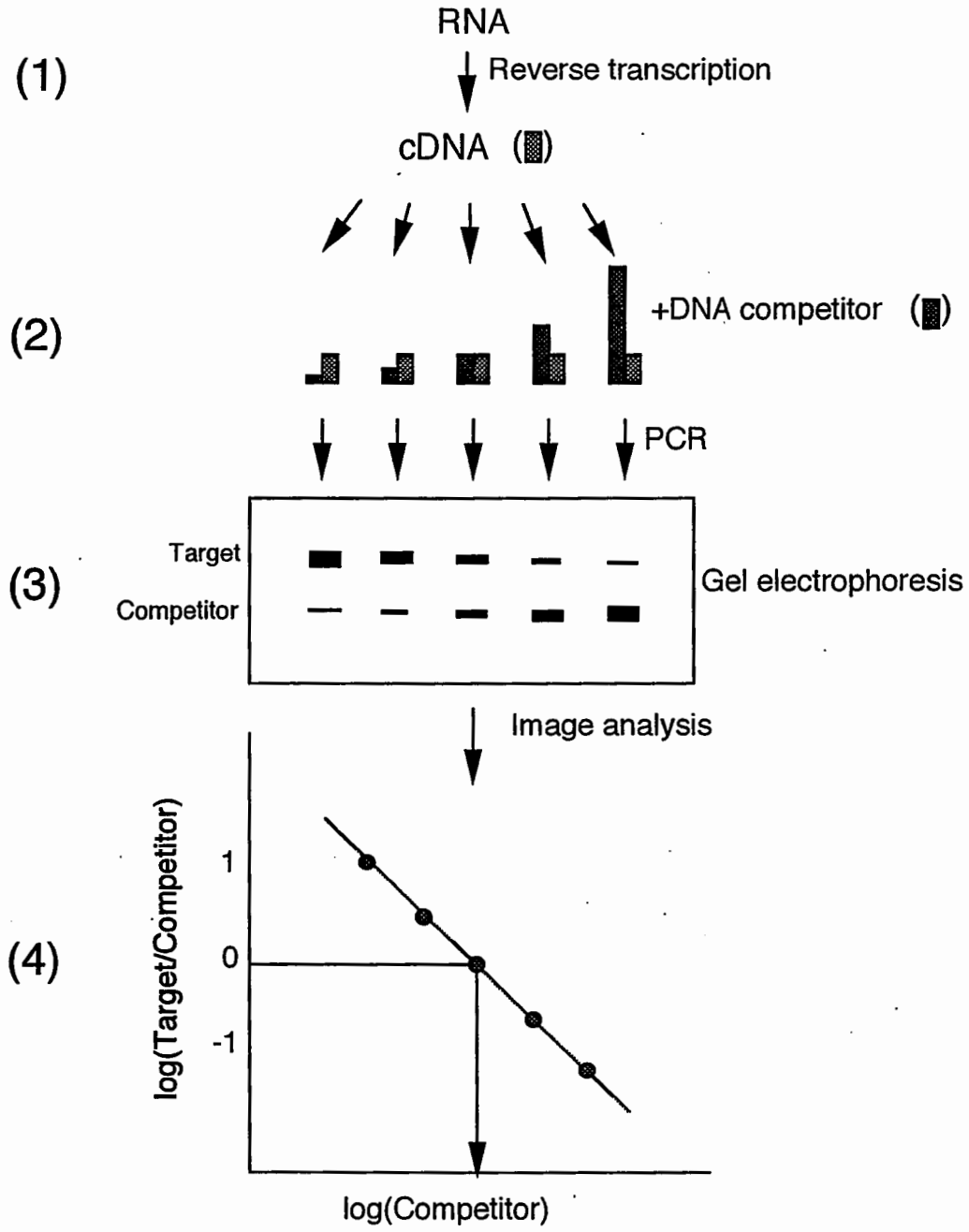


Fig. 2
Competitive RT-PCR.

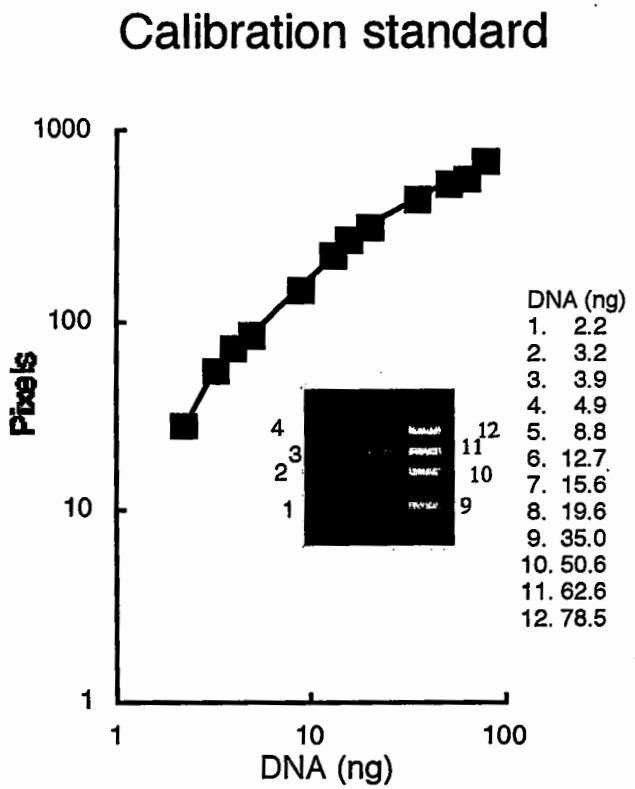


Fig. 3
Calibration standard curve. DNA size marker (*ϕX174/Hae* III digest) was used as a calibration standrad.

PG

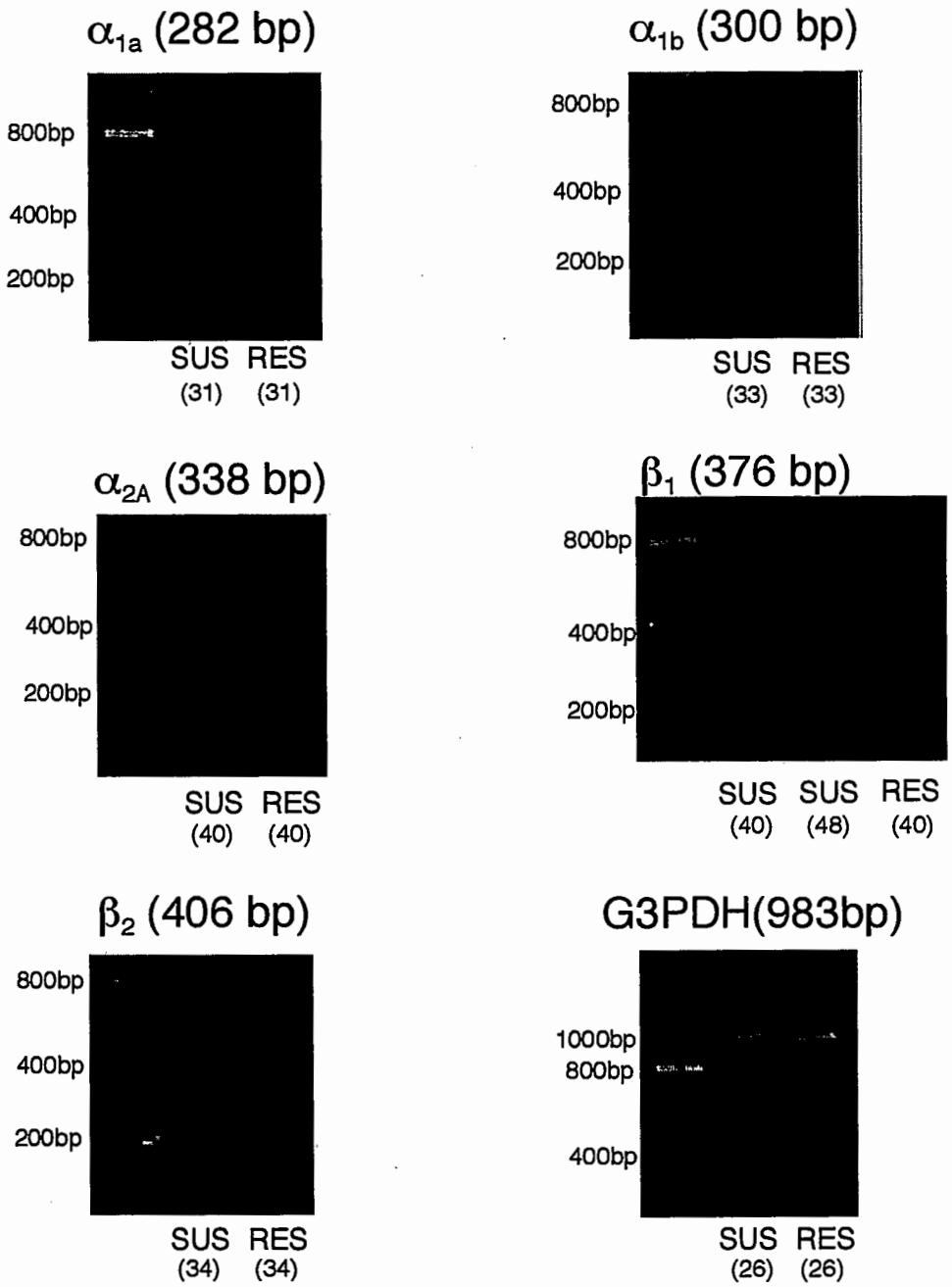


Fig. 4.1
RT-PCR analysis of the expression of α_{1a}, α_{1b}, α_{2A}, β_1 and β_2 AR subtype and G3PDH mRNAs in PGs of ODU SUS and RES rats. Cycle numbers of PCR are shown in parentheses on the bottom of the electrophoretograms.

SMG

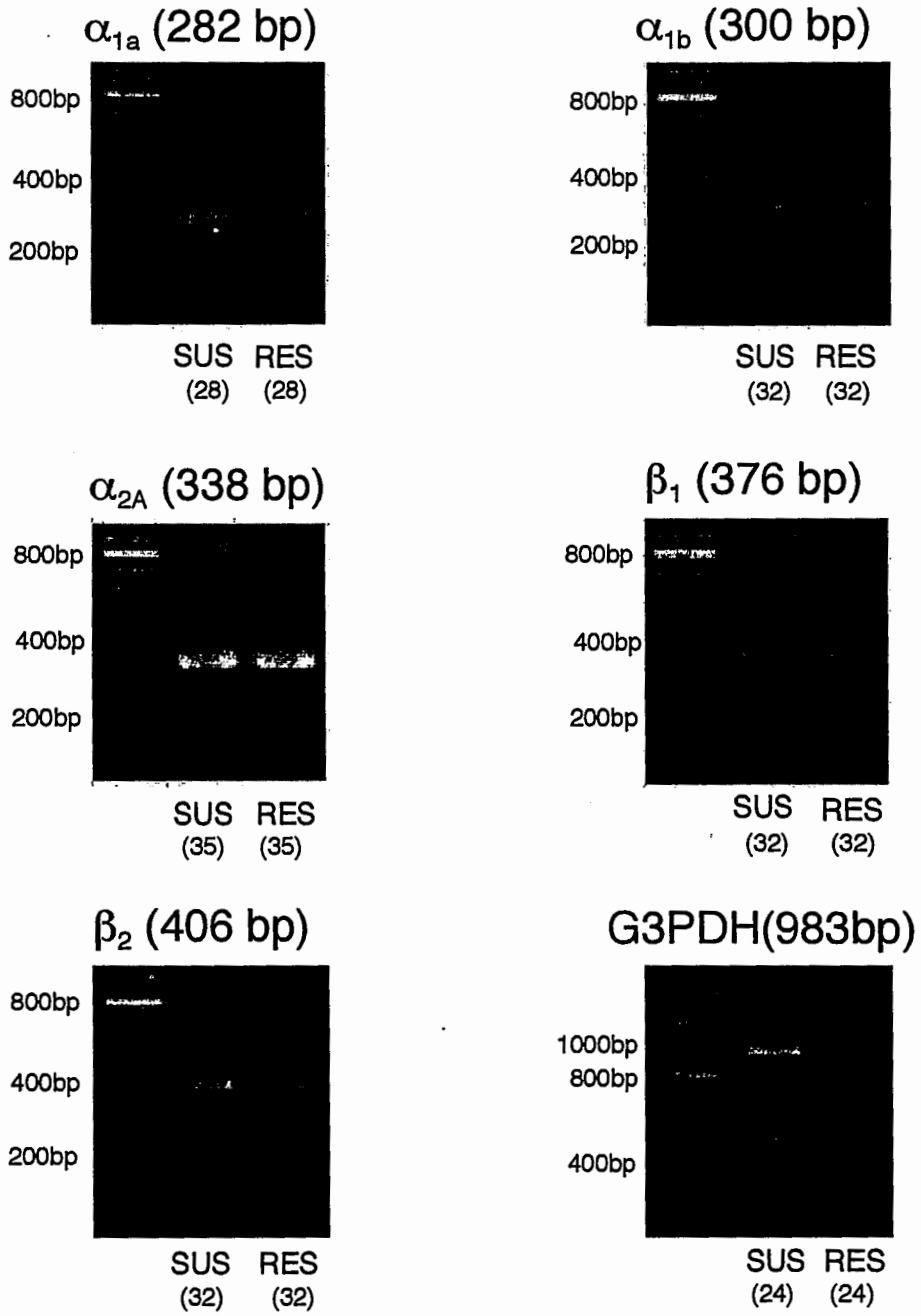


Fig. 4.2
RT-PCR analysis of the expression of α_{1a}, α_{1b}, α_{2A}, β_1 and β_2 AR subtype and G3PDH mRNAs in SMGs of ODU SUS and RES rats. Cycle numbers of PCR are shown in parentheses on the bottom of the electrophoretograms.

SLG

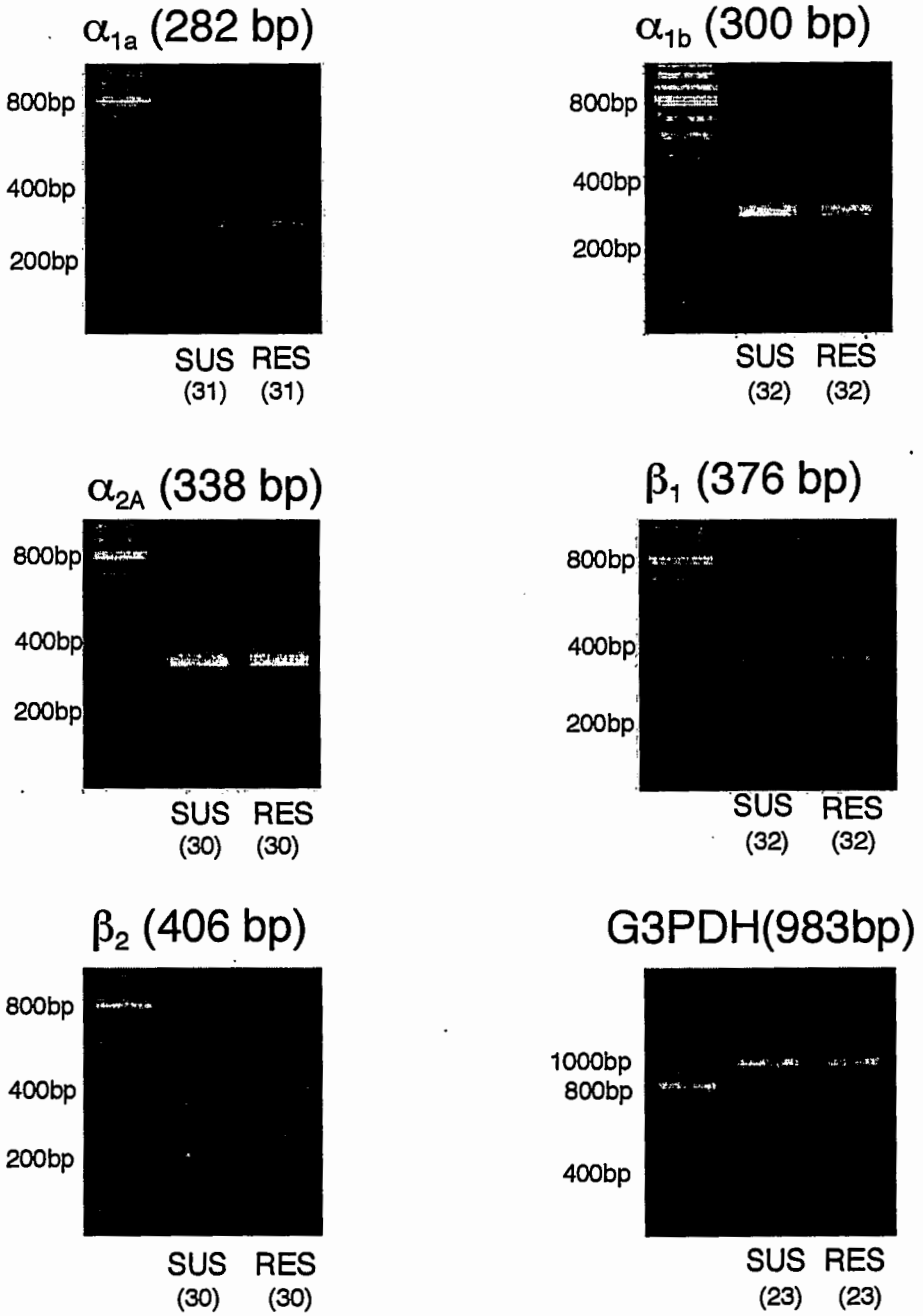


Fig. 4.3
RT-PCR analysis of the expression of α_{1a}, α_{1b}, α_{2A}, β_1 and β_2 AR subtype and G3PDH mRNAs in SLGs of ODU SUS and RES rats. Cycle numbers of PCR are shown in parentheses on the bottom of the electrophoretograms.

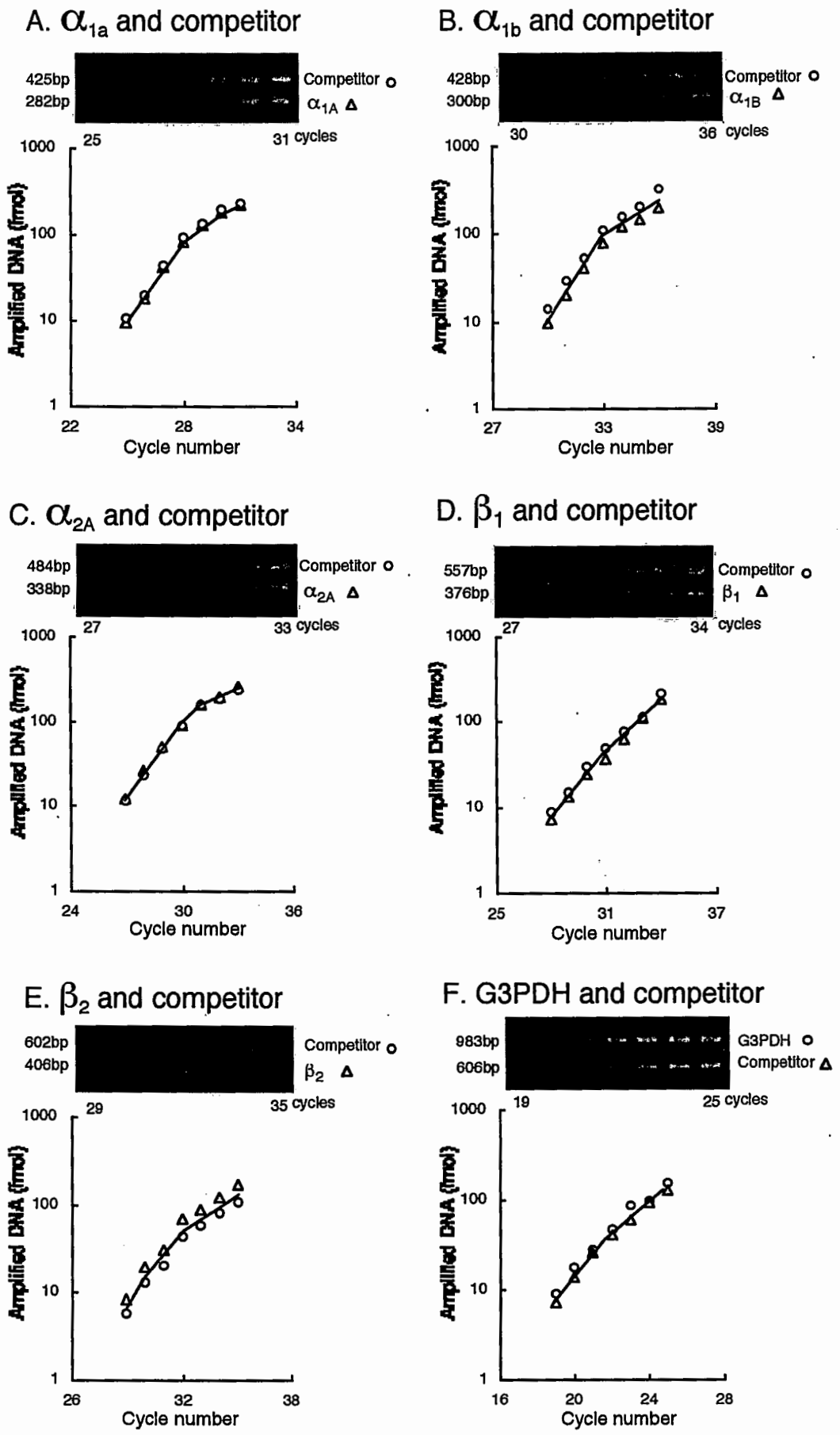


Fig. 5
Kinetics of amplification of α_{1a} (A), α_{1b} (B), α_{2A} (C), β_1 (D), β_2 (E) and G3PDH (F) cDNAs and their competitors . Approximately equal molar quantities of a target cDNA and its competitor were coamplified in a single PCR tube at various cycle numbers and separated on agarose gel. The band intensities were determined by image analysis.

PG

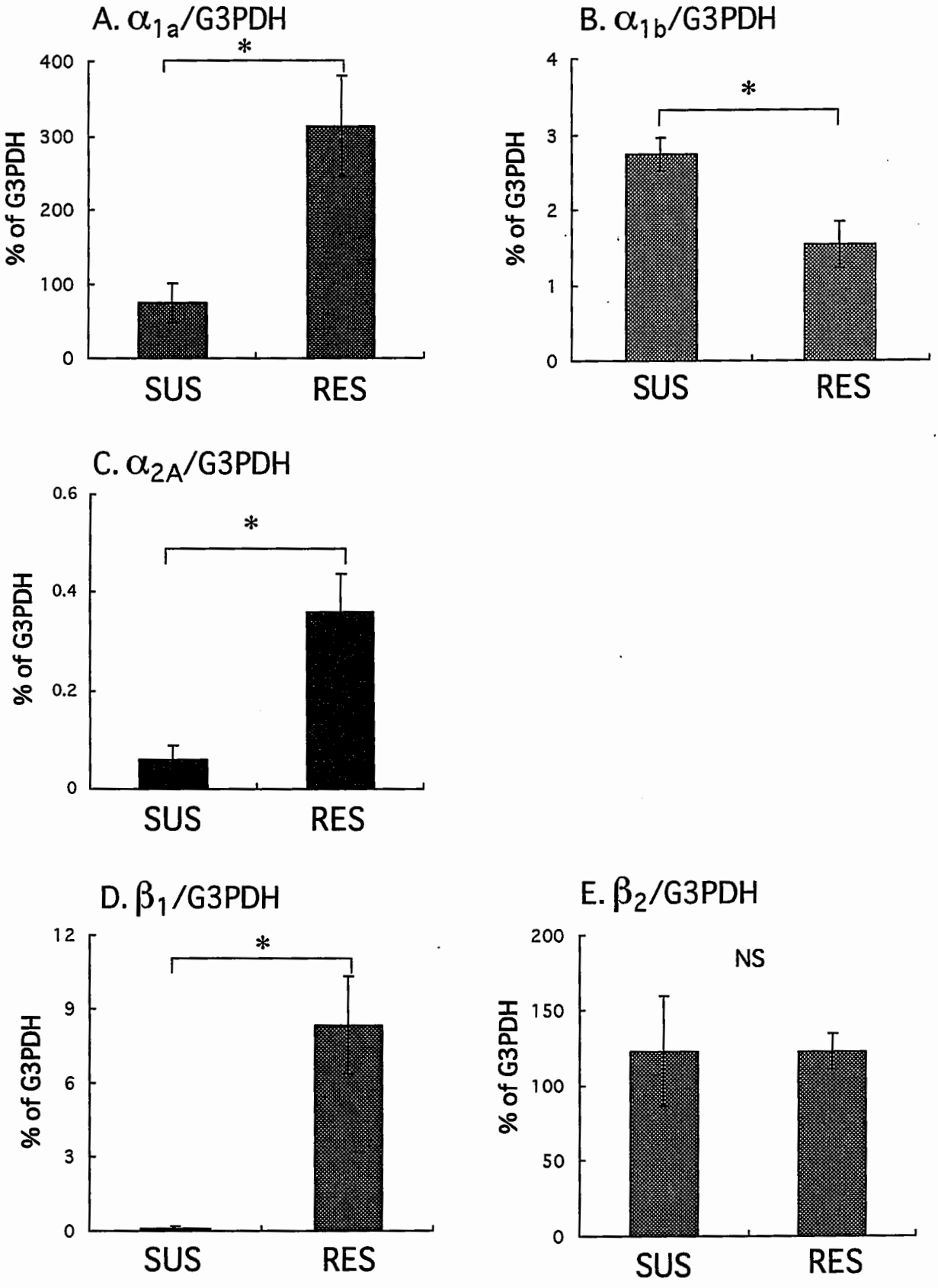


Fig. 6

Relative expression of α_{1a}, α_{1b}, α_{2A}, β_1 and β_2 AR subtype mRNAs to G3PDH in ODU rat PGs at 12 weeks of age. All values are expressed as mean±SEM percentage of transcript concentrations relative to G3PDH. * $p < 0.05$ by unpaired *t*-test between SUS and RES groups. NS, not significant.

PG

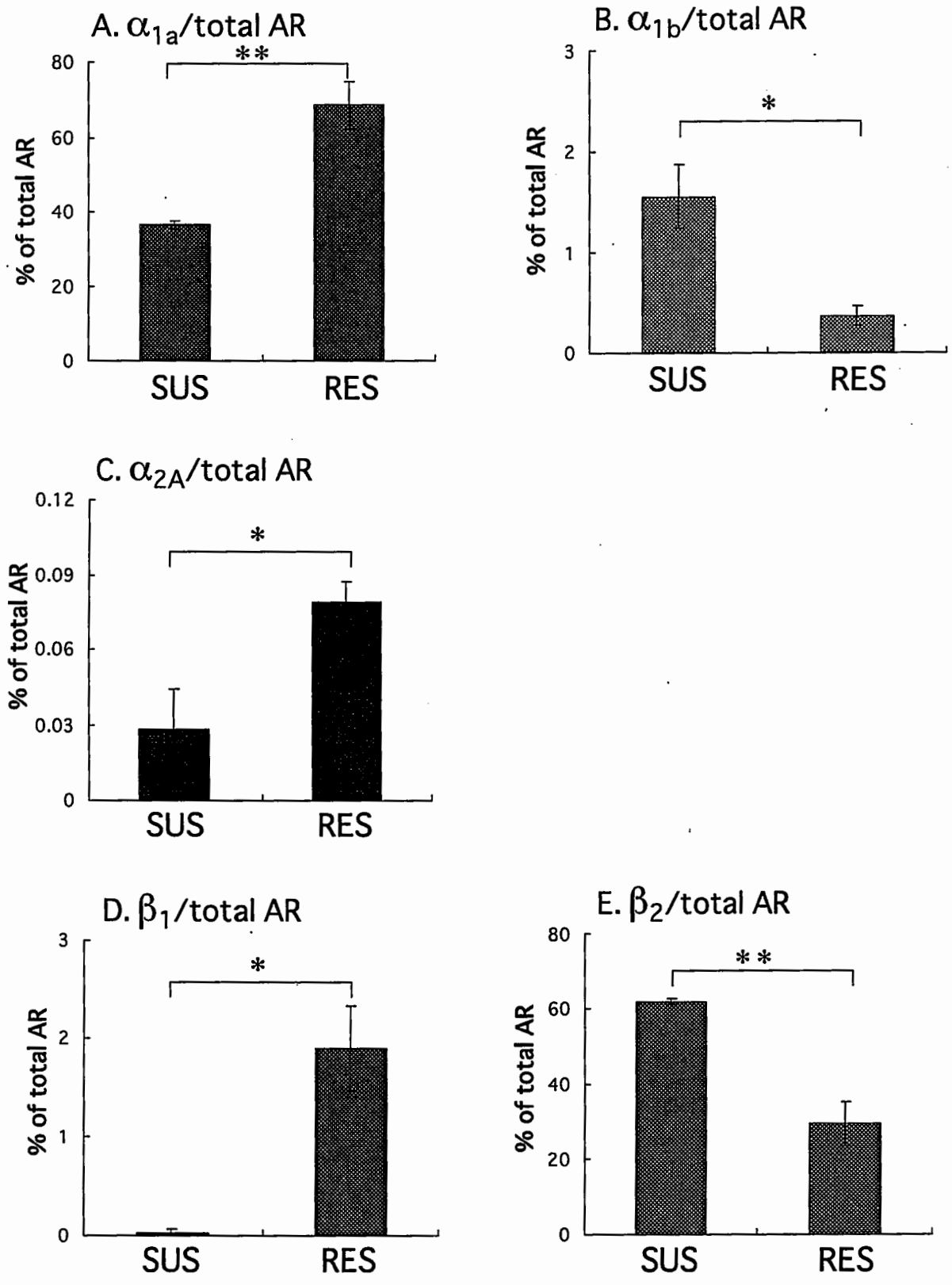


Fig. 7

Relative expression of α_{1a}, α_{1b}, α_{2A}, β_1 and β_2 AR subtype mRNAs to total AR in ODU rat PGs at 12 weeks of age. All values are expressed as mean±SEM percentage of transcript concentrations relative to total AR ($\alpha_{1a}+\alpha_{1b}+\alpha_{2A}+\beta_1+\beta_2$). * $p < 0.05$ and * * $p < 0.01$ by unpaired *t*-test between SUS and RES groups.

PG

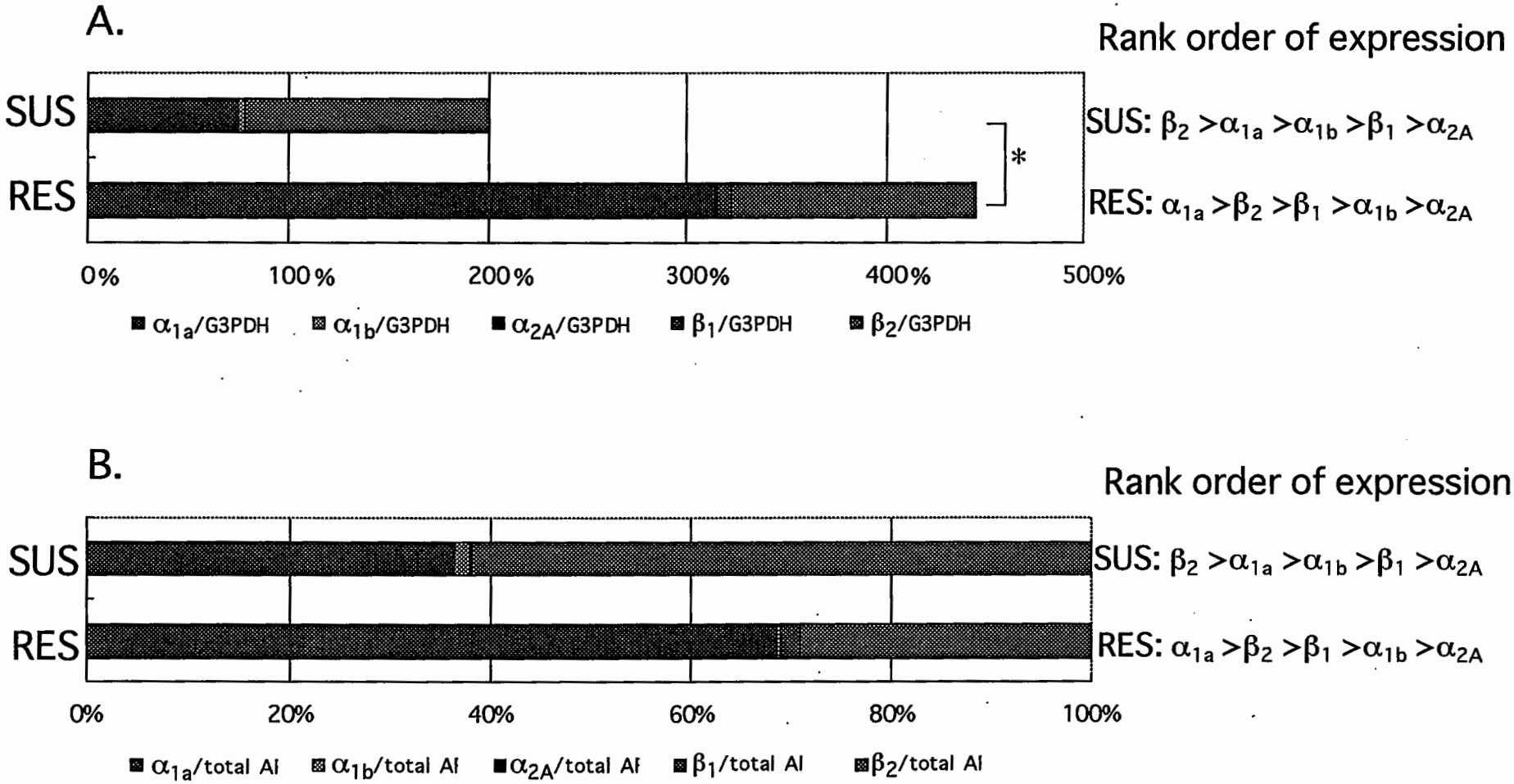


Fig. 8

Relative expression of α_{1a}, α_{1b}, α_{2A}, β_1 and β_2 AR subtype mRNAs to G3PDH (A) and total AR (B) in ODU rat PGs at 12 weeks of age and rank order of expression. All values are expressed as mean±SEM percentage of transcript concentrations relative to G3PDH and total AR ($\alpha_{1a}+\alpha_{1b}+\alpha_{2A}+\beta_1+\beta_2$). * $p<0.05$ by unpaired *t*-test between SUS and RES groups.

日本財団補助金による
２０００年度日中医学学術交流促進事業

⑤．在留中国人研究者研究助成

(5) 水性バクテリアより新規なシアル酸を含まない抗インフルエンザウイルス活性物質の分離及びその化学構造の同定

水性バクテリアより新規なシアル酸を含まない抗インフルエンザウイルス活性物質の分離およびその化学構造の同定

氏名：郭　潮潭

中国での所属・役職：浙江中医学院附属病院・講師

日本での所属先・研究室名：静岡県立大学薬学部生化学教室

要旨

バクテリアは、日本の各地から取った2000種の水サンプル(samples)の中から、分離された257株のうち、増殖能のよい27株を選び、大量培養を行いました。それから、クロロホルム・メタノール（1:1)で総脂質を抽出して、TLC/virus-binding assayを用いて、抗インフルエンザウイルス物質の探索を行いました。そこで、これら一つ株水性バクテリア*Rhodococcus equi* S_{420}株より活性物質を分離精製して、NMRやMASSよりその化学構造を明らかにしました。構造はC-14にメチル化された分枝した脂肪酸(14-methylocatadecanic acid) (palmitic acid)を含むユニークなホスファチジルイノシトールでした。このホスファチジルイノシートルが、ヒト、トリやブタから分離されたの１８種インフルエンザウイルスとの結合性をTLC/virus-binding assayで示唆されました。さらに、この物質の抗インフルエンザウイルスの活性を赤血球凝集、溶血及び細胞感染の阻害アッセイで確認しました。この物質の赤血球凝集、溶血および細胞感染に対する阻害活性の結果より、この物の赤血球凝集阻害活性は、シアル酸誘導体（Neu5Ac-PE)に比べて低いけれども、ウイルス感染や溶血阻害活性は、いずれのウイルス株でも、３倍から８倍の強いことが認められました。

一方、この物質がウイルスのどの部位に結合するかを調べるため、ブロメライン（bromelain)で分解したヘマグルチニンを用いて、TLC/binding assayを行いました。その結果より、このホスファチジルイノシートルはNeu5AcnLc4Cerと同じように結合することが確認できました。したがって、この物質はヘマグルチニンに結合することがわかりました。

また、生物化学的にＴＬＣで検出する結果より、このホスファチジルイノシートルは菌体の総脂質の中に多く存在していました（普通のバクテリア中より４倍高いでした）。したがって、この物質は抗インフルエンザ剤として、利用することが可能と思われます。さらに、シアリダーゼの水解に対しても抵抗性を有することが分かりました。この物質はインフルエンザの化学療法剤として有用であると考えられます。

KEY WORDS: influenza virus; phosphatidylinositol; branched-chain fatty acid; Rhodococcus equi

INTRODUCTION

Influenza virus initiates infection through a receptor-ligand interaction and subsequent receptor-mediated endocytosis. After entry[1,2], the components of the viral particle are disassembled in the endosome where a low pH induces the irreversible conformational change of hemagglutinin (HA), resulting in fusion of the viral and endosomal membranes [3-6]. The viral genome is then released from the endosome and transported into the nucleus where replication occurs [7]. After replication, viral genomes leave the nucleus and progeny virus particles assemble and bud from the cellular membrane of the infected cells [6,8].

Viral proteins, which provide essential functions during the life cycle of influenza virus, are potential targets for the development of antiviral agents. Several agents involved in the infectious cycle have already been documented [9-14]. It is known that the sialic acid-containing glycoproteins or glycolipids on cell surfaces are receptors for influenza viruses [15-20]. Two major virus glycoproteins, HA and sialidase, mediate the interaction between influenza viruses and cellular receptors. They are responsible for the attachment to target cells and for release of progeny viruses from the surface of infected cells, respectively [1,8]. Therefore, many inhibitors of influenza viruses have been developed against virus HA or/and sialidase [14,21-24]. Several studies reported that neoglycoprotein or a synthetic co-polymer containing sialic acid residue strongly inhibited the HA and sialidase activities, resulting in prevention of influenza virus infection [24-30]. However, the effects of most inhibitors are usually restricted to HA subtypes of influenza virus isolates, and their stability has been influenced by the hydrolysis of sialic acid-linkage by viral sialidase. Influenza virus vaccines are also dependent on viral specific antigen [31].

Recent studies have shown that a desialylated glycolipid sulfatide also has receptor-like activity [47] and that two desialylated glycoglycerolipids from *Coryneform* bacteria have binding and neutralizing activities against influenza virus [32]. As desialylaled glycolipids are not substrates for sialidase [64,65], which is a receptor-destroying enzyme and is integrated into the influenza virus envelope, they might be useful as anti-influenza drugs.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Preparation of lipids from *R. equi* strain S420: Two thousand aquatic soil samples were selected in Japan and 257 bacteria were isolated, producing more than detectable levels of glycolipids, of which 27 strains were selected because of their high productivity. In *R. equi* strain S420 (Table I), we found virus-binding substance, which was screened by a thin layer chromatography (TLC)/virus-binding immunostaining method.

R. equi strain S420 was cultivated in a 250-ml Erlenmeyer flask containing 30 ml of YMPG medium. The incubated-aliquot (0.7 ml) was added to a 500-ml Erlenmeyer flask containing 70 ml of YSGG mediumand cultivated for 96 hr at 28° C. The culture was extracted with an equal volume of a chloroform/methanol (1:1, v/v) solvent. The extract was used for this experiment.

Total lipids from strain S420 were fractionated by Q-Sepharose column chromatography [36]. The developing solvent was a mixture of chloroform/methanol/water (60:35:8, v/v/v). Lipids were separated on a TLC plate. The virus-binding substance was purified with LH-20 column chromatography [63].

Structure of the virus-binding substance: The virus-binding substance: colorless oil. [α]D +8° (c 0.37, $CHCl_3$). Figure 2A shows ^1H NMR ($CD_3OD/CDCl_3$, 10:1, v/v): δH 0.84 (3H, d, *J* = 6.4 Hz, CH_3), 0.88 (6H, t, *J* = 6.9 Hz, CH_3 x 2), 1.10 (2H, m, CH_2), 1.27 (41H, m, CH and CH_2 x 20), 1.30 (2H, m, CH_2), 1.35 (4H, m, CH_2 x 2), 1.59 (4H, m, CH_2 x 2), 2.30 (2H, t, *J* = 7.3 Hz, CH_2-C=O), 2.33 (2H, t, *J* = 7.3 Hz, CH2-C=O), 3.20 (1H, t, *J* = 9.4 Hz, 5'-H), 3.37 (1H, dd, *J* = 9.4 and 3.0 Hz, 3'-H), 3.62 (1H, t, *J* = 9.4 Hz, 4'-H), 3.76 (1H, t, *J* = 9.4 Hz, 6'-H), 3.89 (1H, br t, *J* = 9.4 Hz, 1'-H), 4.06 (2H, m, 3-H2), 4.17 (1H, t, *J* = 3.0 Hz, 2'-H), 4.20 (1H, dd, *J* = 12.2 and 7.0 Hz, 1-H), 4.45 (1H, dd, *J* = 12.2 and 3.1 Hz, 1-H), 5.24 (1H, m, 2-H). Figure 2B shows 13C NMR ($CD_3OD/CDCl_3$, 10:1, v/v): δC 15.3 (2C), 21.0, 24.4 (2C), 26.7 (2C), 30.9-31.8 (19C), 33.8 (2C), 34.6, 35.9 (2C), 38.9 (2C), 64.5 (C-1), 65.6 (J_{C-P} = 5.7 Hz, C-3), 72.6 (J_{C-P} = 7.6 Hz, C-2), 73.5 (C-3'), 73.7 (br, C-2'), 73.9 (J_{C-P} = 5.7 Hz, C-6'), 74.7 (C-4'), 76.9 (C-5'), 79.0 (br, C-1'), 175.4, 175.7. (+)FABMS m/z: 875 $[M+Na]^+$, 593. (-)FABMS m/z: 851 $[M-H]^-$, 689. (-)HRFABMS m/z 851.5666 $[M-H]^-$ (Calcd. For $C_{44}H_{84}O_{13}P$: 851.5650). Fatty acid analysis: 10% sodium methylate (0.6 m) was added to the sample (0.1 mg) in 0.2 ml benzene and the reaction mixture was held at 60° C for 20 min. After the addition of a few drops of 1 N AcOH to stop the reaction followed by 2 ml of distilled water, the reaction mixture was extracted with 2 ml of n-hexane. The n-hexane extract was evaporated to dryness and was then followed by fatty acid analysis by gas chromatographic mass (GC-MS). The conditions for GC were: column, J & W Scientific DB-1 (0.25 mm-by-15 m); column temperature, 100-270° C, raised at 20° C/min; injection temperature, 280° C; carrier gas, He, 1.2 kg/cm. ^1H and ^{13}C NMR spectra were recorded on a JEOL GSX500 (500 MHz for ^1H NMR and 125 MHz for ^{13}C NMR). FABMS and HRFABMS were obtained on a JEOL SX102A spectrometer (glycerol as matrix). Optical rotation was measured on a JASCO DIP-370 digital polarimeter.

Virus-binding immunostaining assay: Lipids were spotted on the Silica gel plastic plates (Polygram Sil G; Macherey-Nagel, Germany). Immunochemical detection of virion or BHA on the TLC plates was performed. In the inhibition assay for virus binding, viruses were preincubated with inhibitors for 1 hr at 4° C and were then used on the binding assay.

Anti-influenza virus assay: The inhibition activity of the PtdIns to influenza virus was detected with hemagglutination, hemolysis inhibition assays and neutralization assay.

RESULTS

Presence of a substance that binds to influenza viruses in *R. equi* strain S420: Two thousand aquatic soil samples were selected in Japan and 257 bacteria were isolated, producing more than detectable levels of glycolipids, of which 27 strains were selected because of their high productivity. The TLC-separated glycolipids were assayed for binding activity to human influenza viruses. *R. equi* strain S420 showed one active spot on all H1 (A/PR/8/34 strain), H2 (A/Singapore/1/57 strain) and H3 (A/Aichi/2/68 strain) subtypes of human influenza A viruses (Fig. 1).

Structure of the virus-binding substance: The virus-binding substance gave a positive sign for Dittmer's test [51], indicating the presence of a phosphate group. The compound showed a pseudomolecular ion peak at *m/z* 851, matching $C_{44}H_{85}O_{13}P$ (HRFABMS: *m/z* 851.5666 $[M-H]^-$, calcd. for $C_{44}H_{85}O_{13}P$: 851.5650). Both ^1H and ^{13}C NMR spectra (Fig. 2A and Fig. 2B), together with a DEPT spectrum, revealed that the substance contains two long-chain acyl groups, two oxygenated methylenes, and seven oxygenated methines. The ^1H-^1H COSY and 1D homonuclear Hartman-Hahn (HOHAHA) spectra indicated the presence of a cyclitol moiety and a glycerol unit. The cyclitol was shown to be myo-inositol on the basis of the 1H vicinal coupling constants of H-1' to H-6' [*J*(1'/2') = 3.0 Hz, *J*(2'/3') = 3.0 Hz, *J*(3'/4') = 9.4 Hz, *J*(4'/5') = 9.4 Hz, *J*(5'/6') = 9.4 Hz, *J*(6'/1') = 9.4 Hz]. The phosphate was determined to be attached at C-3 and C-1' on the basis of the 13C-P coupling constants of C-2 (7.6 Hz), C-3 (5.7 Hz), C-1' (< 2 Hz), C-2' (< 2 Hz), C-6' (5.7 Hz). The ^1H chemical shifts of H_2-1 (δ 4.45 and 4.20) and H-2 (δ 5.24) signals indicate that both the C-1 and C-2 positions of the glycerol moiety are acylated.

Treatment of the compound with MeOH/MeONa afforded 16:0 and 19:0 fatty acid methyl esters which showed molecular ion peaks at m/z 270 and 312, respectively, in the gas chromatography-electron impact mass spectrum (GC-EIMS) (Fig. 2C). The 16:0 fatty acid methyl ester showed GLC retention time and mass spectrum identical to those of authentic palmitic acid methyl esters. On the other hand, the EIMS of 19:0 fatty acid methyl ester showed relatively intense peaks at *m/z* 255 $[M-C_4H_9]^+$, originating from a-cleavages with respect to the methine carbon atom carrying the methyl branch, and the absence of a peak at *m/z* 241, corresponding to the ion $[M-C_5H_{11}]^+$. These findings indicated that the 19:0 fatty acid is 14-methyloctadecanoic acid. Thus, the structure of the virus-binding substance was determined to be a PtdIns bearing a branched-chain fatty acid (Fig. 3).

By chemical staining analyses, it was shown that the purified PtdIns was the main lipid (16.5% of total lipids) and further is present as a major phospholipid (about 55% of phospholipids) in *R. equi* strain S420 (Fig. 2D, 2E). Purification rate of PtdIns was approximate 60%.

The binding specificity of the purified PtdIns to influenza viruses: The binding specificity of the purified PtdIns to influenza viruses was determined by a TLC/virus-binding immunostaining assay. As shown in Table II, all the isolates tested from human (A and B types) and animal (avian and swine) species bound to the purified PtdIns. The binding specificity of various influenza viruses to the purified PtdIns was different from their viral sialic acid-linkage specificity. These findings indicate that the binding of purified PtdIns to virus were not dependent on the different isolates or HA types of influenza viruses.

Inhibition activity of the purified PtdIns on the virus-mediated hemolysis and the cell infection by influenza viruses: To determine the anti-viral activity of the purified PtdIns, we carried out hemagglutination inhibition, hemolysis inhibition and neutralization assays. As shown in Table III, the purified PtdIns potently reduced the releasing LDH activity of virus-infected MDCK cells in a dose dependent manner. The IC_{50}s of the purified PtdIns (a concentration of purified PtdIns for 50% infection being inhibited) to A/PR/8/34 (H1N1), A/Singapore/1/57 (H2N2) and A/Aichi/2/68 (H3N2) strains were 20.1±2.3, 14.7±3.2 and 10.4±4.1 μM

(n = 3 experiments), respectively. The inhibition activity of purified PtdIns was about 6-fold stronger than that of Neu5Ac-PE which was indicated previously a potent inhibitor against human influenza virus. Similarly, the inhibition activity of the purified PtdIns to virus-mediated hemolysis of erythrocytes was also stronger than that of Neu5Ac-PE. However, the purified PtdIns exhibited weaker inhibition of viral hemagglutination relative to Neu5Ac-PE. These findings show that the purified PtdIns significantly prevented both virus-mediated hemolysis and infection by human influenza A virus in vitro, and was effective against influenza A viruses regardless of subtypes.

Inhibition activities of PtdInses containing different fatty acid residues: To examine the influence of species of fatty acid residues to viral infection, we tested PtdInses containing three types of fatty acid residues as inhibitors of influenza viruses. As shown in Table IV, the inhibition activities of PtdInses each other were significantly different. The effect of the PtdIns from R. equi strain S420 on virus-mediated hemolysis and cell infection by influenza virus in vitro were 15-fold and 40-fold stronger than those of PtdInses from bovine liver or soybean, respectively. We also used a fatty acid-free PtdIns (GPI) in these experiments. Although the GPI inhibited viral hemagglutination at a concentration of 1 mM, it did not inhibit either the virus-mediated hemolysis or viral infection of MDCK cells even at a concentration of 2 mM (data not shown). These findings indicate that the fatty acid residue on PtdIns might be an indispensable part of their inhibition of viral hemolysis and viral replication.

Binding of the purified PtdIns to bromelain-cleaved hemagglutinin: The above findings indicate that the purified PtdIns prevents influenza virus infection. In order to clarify the mechanism of its anti-influenza activity, we used the bromelain-cleaved hemagglutinin (BHA) of A/Aichi/2/68 (H3N2) virus instead of virus particles for TLC/virus-binding assay. The binding specificity of PtdIns to BHA on plates was examined using mouse monoclonal anti-HA (H3) antibody and HRP-conjugated goat anti-mouse IgG+IgM (H+L) (Jackson Immunoresearch Laboratories). As shown in Fig. 4, the BHA clearly bound to the purified PtdIns as well as IV6Neu5AcnLc4Cer. This experimental finding indicates that HA of influenza virus is a component in the binding to purified PtdIns.

DISCUSSION

In this study, we isolated and purified a unique type of phosphatidylinositol (PtdIns) from *R. equi*, bearing a branched-chain fatty acid (14-methyloctadecanoic acid). Furthermore, we first found that it strongly inhibited the virus-induced hemolysis and the infection of influenza virus in vitro. The discovery evidently indicates existence of new type anti-influenza compounds in microorganisms. Otherwise, it is shown PtdIns in R. equi strain S420 is the main phospholipid and accounts for about 55% of total phospholipids, because the ratio of PtdIns in Corynebacteria is usually lower than 10% of total phospholipids. This creates favorable condition for opening up new agents against influenza.

Phosphatidylinositol is usually present in the inner layer of the cellular membrane lipid bilayer and is a precursor for several prominent intracellular signaling molecules [35,57-59]. In this study we have first studied phosphatidylinositol regard as an inhibitor against influenza virus.

The binding of influenza virus to sialic acid has been shown to depend on the molecular species of sialic acid, the sialic acid-Gal linkage and the carbohydrate core structure of ganglioside [18]. Therefore, the anti-influenza effects of the sialic acid-containing inhibitors are usually restricted by these factors. It is a novel finding that the PtdIns from *R. equi* strain S420 binds to influenza viruses and that it significantly inhibits the influenza virus infection in vitro. The inhibitory activity of the purified PtdIns on influenza viruses is not restricted to animal species or types (or subtypes) of viral HA. The purified PtdIns from strain S420 may be considered a new type of anti-influenza virus agent, widely effective against human and animal influenza A viruses.

The finding show that purified PtdIns from strain S420 strongly inhibited the virus-mediated hemolysis in comparison with sialic acid-containing inhibitors, or other PtdInses from different materials. We also confirmed that the purified PtdIns attached to viral HA and that the binding position of PtdIns differs from the sialic acid-binding pocket and may be close to the pocket on the head of the HA trimer. The finding on HAI also indicated that the effect of purified PtdIns on the sialic acid-binding pocket of viral HA is weaker. Regarding the anti-influenza virus mechanism of the purified PtdIns, one possibility is that PtdIns adheres to the viral HA and then enters the endosome together with the virion, resulting in interference with the fusion of viral and endosomal membranes.

We also used other phospholipids in the same experiment to compare their effects against influenza viruses (data not shown). Bovine liver PtdIns, phosphatidylserine (PS, from bovine brain, Sigma P-7769) and phosphatidylenthanolamine (PE, from bovine brain, Sigma P-7693), all of which carry a negative charge, bound to influenza viruses, but neutral glycophospholipids such as phosphatidylcholine (PC, from bovine liver, Sigma P-6638) and sphingomyelin (SM, from bovine brain, Sigma S-7004) did not. None of PC, PE and SM showed inhibition activities of virus-induced hemolysis at a concentration of 2 mM. Both bovine liver PtdIns and PS showed inhibition activities, but their effects were much lower than that of the purified PtdIns. Adhesion of phospholipids to viral HA may be an indispensable step in preventing influenza virus infection. It is noteworthy that the virus binding activity of bovine liver PtdIns to influenza viruses was similar to that of purified PtdIns, however the inhibitory activity of bovine liver PtdIns on the influenza virus-mediated fusion was lower than that of the purified bacterial PtdIns. The structural difference between the purified PtdIns and bovine liver PtdIns is that it bears a branched-chain fatty acid. L-α-glycerophospho-D-myo-inositol from soybean, which has no fatty acid residue, showed no inhibitory activity of virus-mediated hemagglutination and hemolysis. These findings indicate that the phosphatidylinositol and branched fatty acid residue may be important for the binding of viral HA and for interfering with membrane fusion, respectively, leading to inhibition of infection by influenza viruses.

Some sialic acid-containing derivatives usually inhibit the attachment of viral HA to target cells and/or the enzymatic activity of viral sialidase, thus preventing infection by influenza virus. In contrast, the purified PtdIns preferentially targets virus-mediated cellular membrane fusion. Our hypothesis is that PtdIns binds near the fusion loop of HA, resulting in interference with the fusogenic function of viral HA, thus preventing the growth of human influenza A virus.

REFERENCE

1. Weis, W., Brown, J.H., Cusack, S., Paulson, J.C., Skehel, J.J., and Wiley, D.C. (1988) Nature 333, 426-431
2. Wilson, I.A., Skehel, J.J., and Wiley, D.C. (1981) Nature 289, 366-373
3. Helenius, A. (1992) Cell 69, 577-578
4. White, J.M. (1990) Viral and cellular membrane fusion proteins. Annu. Rev. Physiol. 52, 675-697
5. White, J.M. (1992) Science 258, 917-924
6. Wiley, D.C., and Skehel, J.J. (1987) Annu. Rev. Biochem. 56, 365-394
7. Krug, R.M., Alonso-Caplen, F.V., Julkunen, I., and Katze, M.G. (1989) In "The Influenza Viruses" (R. M. Krug, Ed.), pp89-152. Plenum Press, NY
8. Roth, M.G., Genthing, M.-J., and Sambrook, J. (1989) In "The Influenza Viruses" (R. M. Krug, Ed.), pp219-267. Plenum Press, NY
9. Pinto, L.H. and Lamb, R.A. (1995) Trends Microbiol. 3, 271
10. Pinto, L.H., Holsinger, L.J., and Lamb, R.A. (1992) Cell 69, 517-528
11. Hayden, F.G., and Hay, A.J. (1992) Curr. Top. Microbiol. Immunol. 176, 119-130
12. Hayden, F.G., Atmar, R.L., Schilling, M., Johnson, C., Poretz, D., Paar, D., Huson, L., Ward, P., and Mills, R.G. (1999) N. Engl. J. Med. 341, 1336-1343
13. Hayden, F.G., Treanor, J.J., Fritz, R.S., Lobo, M., Betts, R.F., Miller, M., Kinnersley, N., Mills, R.G., Ward, P., and Straus, S.E. (1999) JAMA 282, 1240-1246
14. von Itzstein, M., Wu, W.Y., Kok, G.B., Pegg, M.S., Dyason, J.C., Jin, B., Van Phan, T., Smythe, M.L., White, H.F., Oliver, S.W., Colman, P.W., Varghese, J.N., Ryan, D.M., Woods, J.M., Bethell, R.C., Hotham, V.J., Cameron, J.M., and Penn, C.R. (1993) Nature 363, 418-423
15. Suzuki, Y., Nagao, Y., Kato, H. Matsumoto, M., Nerome K, Nakajima, K., and Nobusawa, E. (1986) J. Biol. Chem. 261, 17057-17061
16. Suzuki, Y., Kato, H., Naeve, C.M., and Webster, R.G. (1989) J. Virol. 63, 4298-4302
17. Suzuki, Y., Nishi, H., Hidari, K., Hirabayashi, Y., Matsumoto, M., Kobayashi, T., Watarai, S., Yasuda, T., Nakayama, J., Maeda, H., Katsuyama, T., Kanai, M., Kiso, M., and Hasegawa, A. (1991) J. Biochem. 109, 354-360
18. Suzuki, Y., Nakao, T., Ito, T., Watanabe, N., Toda, Y., Xu, G.Y., Suzuki, T., Kobayashi, T., Kimura, Y., Yamada, A., Sugawara, K., Nishimura, H., Kitame, F., Nakamura, K., Deya, E., Kiso, M., and Hasegawa, A. (1992) Virology 189, 121-131
19. Suzuki, Y. (1994) Prog. Lipid. Res. 33, 429-445
20. Suzuki, Y., Matsunaga, M., and Matsumoto, M. (1985) J. Biol. Chem. 260, 1362-1365
21. Tiralongo, J., Pegg, M.S., and von Itzstein, M. (1995) FEBS Lett. 372, 148-150
22. von Itzstein, M., Wu, W.Y., and Jin, B. (1994) Carbohydr. Res. 259, 301-305
23. von Itzstein, M., Dyason, J.C., Oliver, S.W., White, H.F., Wu, W.Y., Kok, G.B., and Pegg, M.S. (1996) J. Med. Chem. 39, 388-391
24. Guo, C.-T., Wong, C.-H., Kajimoto, T., Miura, T., Ida, Y., Juneja, L. R., Kim, M.-J., Masuda, H., Suzuki, T., and Suzuki, Y. (1998) Glycoconjugate J. 15, 1099-1108
25. Muniruzzaman, S., Pan, Y.T., Zeng, Y., Atkins, B., Izumori, K., and Elbein, A.D. (1996) Glycobiology 6, 795-803
26. Ryan-Poirier, K.A., and Kawaoka, Y. (1991) J. Virol. 65, 389-395
27. Ryan-Poirier, K.A., and Kawaoka, Y. (1993) Virology 193, 974-976
28. Sidwell, R.W., Huffman, J.H, Barnard, D.L., Bailey, K.W., Wong, M.H., Morrison, A., Syndergaard, T., and Kim, C.U. (1998) Antiviral Res. 37, 107-120
29. McKimm-Breschkin, J.L., Sahasrabudhe, A., Blick, T.J., McDonald, M., Colman, P.M., Hart, G.J., Bethell, R.C., and Varghese, J.N. (1998) J. Virol. 72, 2456-2462
30. Ikeda, K., Kimura, F., Sano, K., Suzuki, Y., and Achiwa, K. (1998) Carbohydr. Res. 312, 183-189
31. Braun, R., Babiuk, L.A., and van Drunen Littel-van den Hurk, S. (1998) J. Gen. Virol. 79, 2965-2970
32. Nakata, K., Guo, C.-T., Matsufuji, M., Yoshimoto, A., Inagaki, M., Higuchi, R., and Suzuki Y. (2000) J. Biochem. 172, 191-198
33. Fang, C.T., Hung, C.C., Chang, S.C., Hsueh, P.R., Chang, Y.L., Chen, M.Y., and Luh, K.T. (2000) J. Formos. Med. Assoc. 99, 123-127
34. Gallen, F., Kernaonet, E., Foulet, A., Goldstein, A., Lebon, P., and Babinet, F. (1999) Nephrologie 20, 383-386
35. Wang, P.-Y., Kitchens, R.L., and Munford, R.S. (1998) J. Biol. Chem. 273, 24309-24313
36. Hirabayashi, Y., Nakao, T., Matsumoto, M., Obata, K., and Ando, S. (1988) J. Chromatography 445, 377-384
37. Suzuki, Y., Suzuki, T., and Matsumoto, M. (1983) J. Biochem. 93, 1621-1633
38. Suzuki, Y., Morioka, T., and Matsumoto, M. (1980) Biochem. Biophys. Acta. 619, 632-639
39. Cianci, C., Yu, K.L., Dischino, D.D., Harte, W., Deshpande, M., Luo, G., Colonno, R.J., Meanwell, N.A., and Krystal, M. (1999) J. Virol. 73, 1785-1794
40. Brand, C.M., and Skehel, J.J. (1972) Nature New Biology 238, 145-147
41. Yamada, A., Brown, L.E., and Webster, R.G. (1984) Virology 138, 276-286
42. Kohler, G., and Milstein, C. (1975) Nature 256, 495-497
43. Wherrett, J.R. (1973) Biochem. Biophs. Acta. 326, 63-73

44. Nilsson, O., Mansson, J.E., Tibblin, E., and Svennerholm, L. (1981) FEBS Lett. 133, 197-200
45. MacDonald, R.C., Dalle Ore, V., and MacDonald, R.I. (1984) Virology 134, 103-117
46. Portner, A., Scroggs, R.A., and Metzger, D.W. (1987) Virology 158, 61-68
47. Suzuki, T., Sometani, A., Yamazaki, Y., Horiike, G., Mizutani, Y., Masuda, H., Yamada, M., Tahara, H., Xu, G.Y., Miyamoto, D., Oku, N., Okada, S., Kiso, M., Hasegawa, A., Ito, T., Kawaoka, Y., and Suzuki, Y. (1996) Biochem. J. 318, 389-393
48. Watanabe, W., Sudo, K., Asawa, S., Konno, K., Yokota, T., and Shigeta, S. (1995) J. Virol. Methods 51, 185-191
49. Suzuki, T., Horiike, G., Yamazaki, Y., Kawabe, K., Masuda, H., Miyamoto, D., Matsuda, M., Nishimura, S.I., Yamagata, T., Ito, T., Kida, H., Kawaoka, Y., and Suzuki, Y. (1997) FEBS Lett. 404, 192-196
50. Morita, K., and Igarashi, A. (1989) J. Tissue Culture Methods 12, 35-37
51. Wells, M.A., and Dittmer, J.C. (1966) J. Biol. Chem. 241, 2103-2105
52. Svennerholm, L. (1956) J. Neurochem. 1, 42
53. Matrosovich, M., Miller-Podraza, H., Teneberg, S., Robertson, J., and Karlsson, K.A. (1996) Virology 223, 413-416
54. Miller-Podraza, H., Larsson, T., Nilsson, J., Teneberg, S., Matrosovich, M., and Johansson, L. (1998) Acta. Biochem. Pol. 45, 439-449
55. Barton, M.D., Goodfellow, M., and Minnikin, D.E. (1989) Zentralbl Bakteriol. 272, 154-170
56. Roth, J., Kempf, A., Reuter, G., Schauer, R., and Gehring, W.J. (1992) Science 256, 673-675
57. Yague, G., Segovia, M., and Valero-Guillen, P.L. (1997) FEMS. Microbiol. Lett. 151, 125-130
58. Niepel, T., Meyer, H., Wray, V., and Abraham, W.R. (1998) J. Bacteriol. 180, 4650-4657
59. Sha, B., and Luo, M. (1999) Biochim. Biophys. Acta. 1441, 268-277
60. Martin, T.F. (1998) Annu. Rev. Cell Dev. Biol. 14, 231-264
61. Zhang, X., and Majerus, P.W. (1998) Semin. Cell Dev. Biol. 9, 153-160
62. Zieler, H., Nawrocki, J. P., and Shahabuddin, M. (1999) J. Exp. Biol. 202, 485-495
63. Kanda, T., Akiyama, H., Yanagida, A., Tanabe, M., Goda, Y., Toyoda, M., Teshima, R., and Saito, Y. (1998) Biosci. Biotechnol. Biochem. 62, 1284-1289
64. Sato, K., Hanagata, G., Kiso, M., Hasegawa, A., and Suzuki, Y. (1998) Glycobiology 8, 527-532
65. Lambre, C.R., Terzidis, H., Greffard, A., and Webster, R.G. (1990) J. Immunol. Methods 135, 49-57

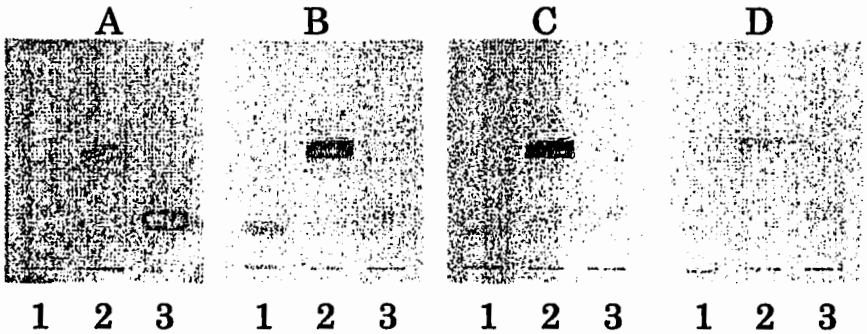


Fig. 1. Binding specificity of the purified PtdIns to human influenza A viruses. The binding specificity of the PtdIns isolated from aquatic bacteria R. equi strain S420 (2 nmol) (lane 2) to human influenza A viruses [A/PR/8/34 (H1N1) (a), A/Singapore/1/57 (H2N2) (b), and A/Aichi/2/68 (H3N2) (c)] was determined by TLC/virus-binding immunostaining assay as described under "Experimental Procedures". TLC Plate was visualized with orcinol-H2SO4 reagent (d). IV6Neu5AcnLc4Cer (lane 1) and IV3Neu5AcnLc4Cer (lane 3) (1 nmol) were used as positive controls.

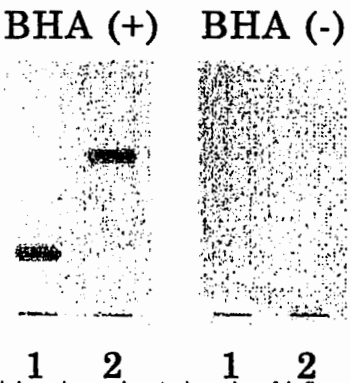


Fig. 4. Binding of the purified PtdIns to bromelain released ectodomain of influenza hemagglutinin from A/Aichi/2/68 (H3N2) strain. The binding of purified PtdIns (2 nmol) (lane 2) to bromelain-released ectodomain of influenza HA (BHA) from A/Aichi/2/68 (H3N2) strain was determined using a TLC/HA-binding immunostaining assay as described under "Experimental Procedures". IV6Neu5AcnLc4Cer (1 nmol) (lane 1) was used as a positive control.

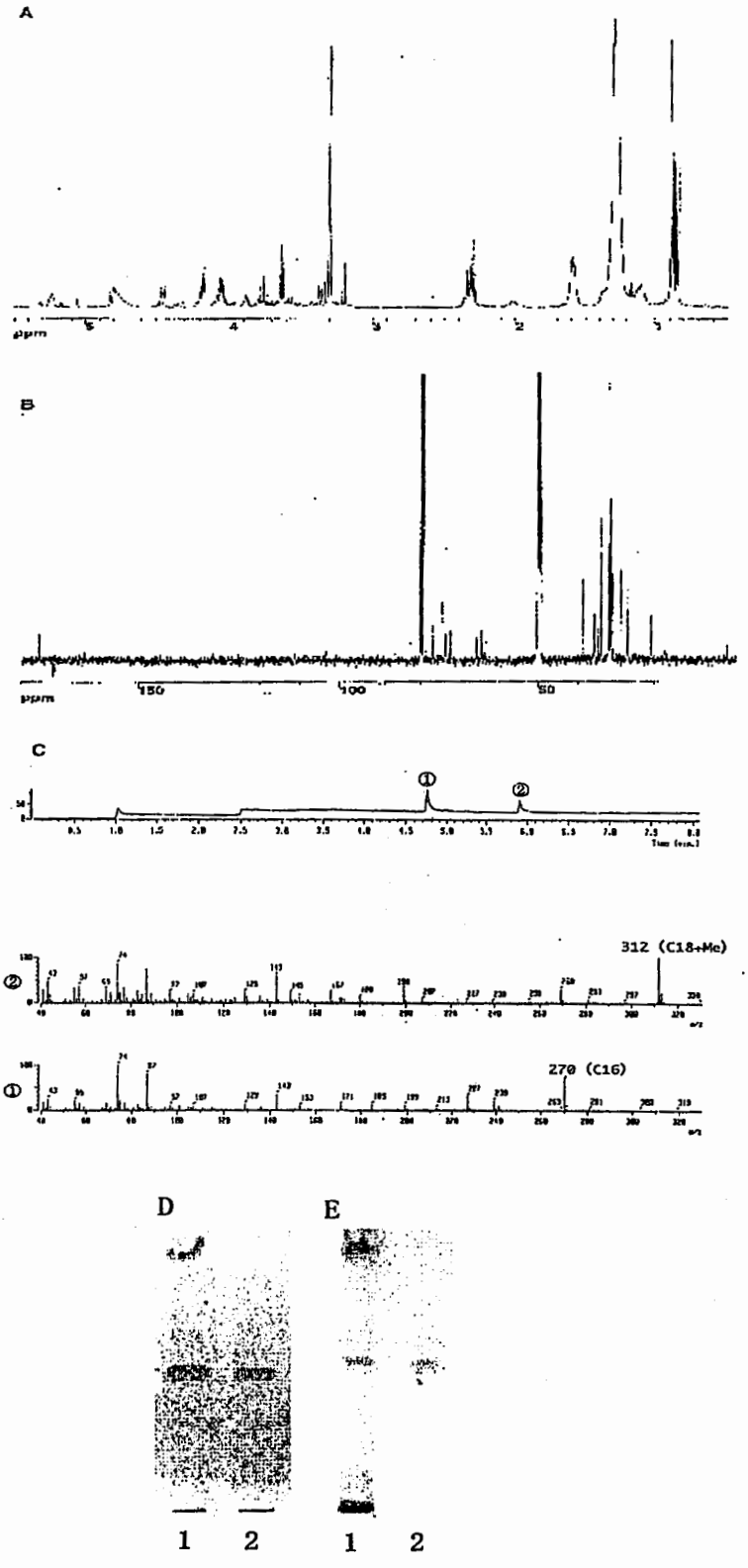


Fig. 2. A: An ^{1}H-detected multiple-bond heteronuclear multiple quantum coherence spectrum of the PtdIns from R. equi strain S420.

B: A ^{13}C-detected multiple-bond heteronuclear multiple quantum coherence spectrum of the PtdIns from R. equi strain S420.

C: A gas chromatography-electron impact mass spectrum of the PtdIns from *R. equi* strain S420.

D and E: Profile of phospholipids and total glycolipids from *R. equi* strain S420. Profiles of phospholipids (plate D) and glycolipids (plate E) were visualized with Dittmer's reagent and orcinol-H_2SO_4 reagent, respectively. Lane 1 is total lipids and lane 2 is the purified PtdIns (2 nmol).

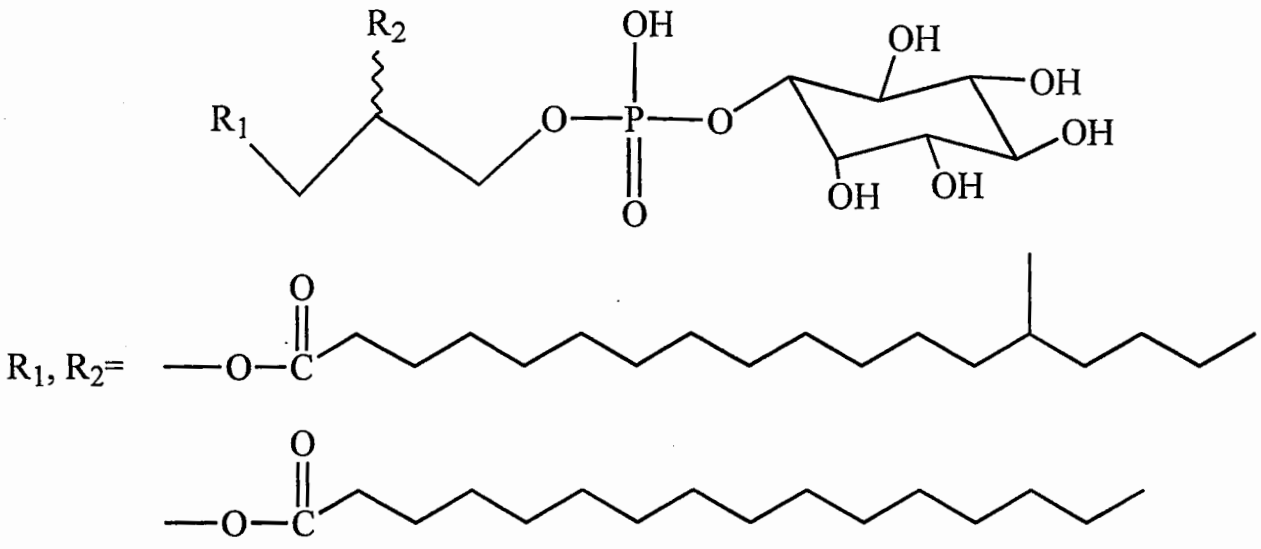


Fig. 3. Structure of the PtdIns from *R. equi* strain S420.

TABLE I. **Microbiological property of *Rhodococcus equi* strain S_{420}.**

	Strain S_{420}
Colony	
Shape	Flat and round
Tone	Buttery, opaque, and beige
Cell shape	
Shape	Long-rod
Width	0.8 μm
Moving	-
Gram-staining	+
Spore formation	-
Enzymatic properties	
Pyrazinamidase	+
Pyrrolidonearylamidase	-
Alkaline phosphatase	+
Catalase	+
β-Glucuronidase	-
β-Galactosidase	-
β-Glucosidase	+
N-Acetyl-β-glucosaminidase	-
Urease	+
Esculin hydrolyzation	+
Gelatin hydrolyzation	-
Nitrate reduction	-
Fermentation ability	
Glucose	-
Ribose	-
Xylose	-
Mannitol	-
Maltose	-
Lactose	-
Sucrose	-
Glycogen	-

TABLE II. **Binding reactivities of human, avian and swine isolates of influenza virus to the purified PtdIns from *R. equi* strain S_{420}.**

Influenza virus	Relative binding reactivity (%)		
	IV^3Neu5AcnLc4Cer	IV^6Neu5AcnLc4Cer	PtdIns
Human isolates			
A/PR/8/34 (H1N1)	100	12±6	26±6
A/Singapore/1/57 (H2N2)	21±4	100	43±5
A/Aichi/2/68 (H3N2)	26±5	100	48±7
B/Lee/40	16±2	100	28±5
B/Bangkok/163/90	18±8	100	31±6
Avian isolates			
A/duck/HK/36/76 (H1N1)	100	42±8	51±8
A/duck/HK/273/78 (H2N2)	100	13±5	19±6
A/duck/HK/24/76 (H3N2)	100	10±3	38±6
A/duck/HK/849/76 (H4N1)	100	16±8	34±7
A/duck/HK/313/76 (H5N3)	100	56±6	31±6
A/duck/HK/13/76 (H6N1)	100	15±6	36±5
A/duck/HK/47/76 (H7N2)	100	22±9	33±7
A/duck/HK/86/76 (H9N2)	100	32±6	40±5
A/duck/HK/33/76 (H10N1)	100	28±5	33±5
A/duck/HK/44/76 (H11N3)	100	21±4	30±8
A/duck/HK/862/80 (H12N5)	100	14±2	37±7
Swine isolates			
A/swine/Hokkaido/2/81 (H1N1)	13±5	100	33±5
A/swine/Italy/309/83 (H3N2)	15±3	100	31±7

The binding activities of human, avian and swine isolates of influenza virus to purified PtdIns were determined with a TLC/virus-binding immunostaining assay as described under "Experimental Procedures". IV^3Neu5AcnLc4Cer and IV^6Neu5AcnLc4Cer were used as positive controls. The data are expressed as mean±SD of three independent experiments and as a percentage of that of IV^3Neu5AcnLc4Cer and IV^6Neu5AcnLc4Cer.

TABLE IV. **Influence of fatty acid residues of PtdIns to viral hemagglutination, virus-induced hemolysis and influenza virus infection.**

Phosphatidylinositols	Fatty acid residue	Binding activities	Inhibition activities		
			HA	Hemolysis (IC_{50},μM)	Cell infection (IC_{50},μM)
PtdIns from strain S420	14-Methylocatadecanoic acid and palmitic acid	43±5	500	38.9±4.9	10.4±4.1
PtdIns from bovine liver	Stearic acid and arachidonic acid	41±6	500	578.4±5.6	360.7±5.2
PtdIns from soybean	Palmitic acid and linoleic acid	39±7	500	616.4±9.7	396.1±8.3
Glycerophosphatidylinositol from soybean	No fatty acid residue	ND	>1000	>1000	>1000

Inhibition activities of PtdIns containing different fatty acid residues on viral hemagglutination, virus-induced hemolysis and infection of MDCK cells by human influenza A virus (A/Aichi/2/68 strain) to MDCK cells were detected as described under "Experimental Procedures". The maximum dilutions of samples (starting concentration, 1 mM) showing complete inhibition of hemagglutination (HAI) are defined as the hemagglutination inhibition titer. The inhibition activities of samples against viral hemolysis or infection of MDCK cells are expressed as IC_{50} (the concentration at which the hemolysis or the infection was inhibited by 50% or 50% infection cells being inhibited). The data are expressed as mean±SD of three independent experiments. Each experiment was carried out in duplicate.

TABLE III. **Inhibition of the purified PtdIns from *R. equi* strain S_{420} on viral hemagglutination, virus-induced hemolysis and infectivity by human influenza A viruses.**

Viruses	Inhibition activity of purified PtdIns			Inhibition activity of Neu5Ac-PE		
	HA (μM)	Hemolysis (IC_{50}, μM)	Cell infection (IC_{50}, μM)	HA (μM)	Hemolysis (IC_{50}, μM)	Cell infection (IC_{50}, μM)
A/PR/8/34	500	50.3±7.2	20.1±2.3	>1000	>1000	>1000
A/Singapore/1/57	500	42.4±5.6	14.7±3.2	32	158.5±7.4	94.7±5.2
A/Aichi/2/68	250	38.9±4.9	10.4±4.1	16	142.3±8.2	64.3±7.8

Inhibition activity of the purified PtdIns on viral hemagglutination, virus-induced hemolysis and infectivity of human influenza A viruses was detected as described under "Experimental Procedures". The maximum dilution of the PtdIns (starting concentration, 1 mM) showing complete inhibition of hemagglutination (HAI) is defined as the hemagglutination inhibition titer. The inhibition activity of the PtdIns against viral hemolysis or infection of MDCK cells by viruses is expressed as IC_{50} (the concentration at which the hemolysis or the infection was inhibited by 50% or 50% infection cells being inhibited). The data are expressed as mean±SD of three independent experiments. Each experiment was carried out in duplicate. Neu5Ac-PE, which is a sialylphosphatidylenthanolamine derivative (*24*), was used as a control.

A Phosphatidylinositol Bearing a Novel Branched-chain Fatty Acid from *Rhodococcus equi* Binds to Viral Hemagglutinin and Inhibits the Infection of Cells*

Chao-Tan Guo†, Shinji Ota‡, Akihiro Yoshimoto§, Kuniho Nakata¶, Kennedy Francis Shortridge£, Tadanobu Takahashi†, Takashi Suzuki†, Daisei Miyamoto†, Kazuya I.-P. Jwa Hidari† and Yasuo Suzuki†¦

From the †Department of Biochemistry, University of Shizuoka School of Pharmaceutical Sciences, 52-1 Yada, Shizuoka-shi 422-8526, the ‡Instrument Center for Chemical Analysis, Hiroshima University, 1-3-1 Kagamiyama, Higashi-Hiroshima 739-8526, the §Faculty of Biological Science, Hiroshima University, 1-4-4 Kagamiyama, Higashi-Hiroshima 739-0046, the ¶Central Research Laboratories, Mercian Corporation, 4-9-1 Johnan, Fujisawa 251-0057, Japan, and the £Department of Microbiology, The University of Hong Kong, Queen Mary Hospital, Hong Kong.

Running title: PtdIns inhibits infection by human influenza virus

SUMMARY

From aquatic bacteria *Rhodococcus equi* strain S_{420}, we isolated a substance that strongly binds to influenza virus. Structural analyses revealed that it is a unique type of phosphatidylinositol (PtdIns) bearing a branched-chain fatty acid (14-methyloctadecanoic acid). Using a TLC/virus-binding immunostaining assay, this PtdIns bound to all subtypes of hemagglutinin (HA) of influenza A viruses tested, isolated from humans, ducks and swine, and also to human influenza B viruses. Furthermore, the PtdIns significantly prevented the infection of MDCK cells by influenza viruses, and also inhibited the virus-mediated hemagglutination and low pH-induced hemolysis of human erythrocytes. We also used purified hemagglutinin instead of virions to examine the interaction between viral HA and PtdIns, showing that the PtdIns binds to hemagglutinin. These findings indicate that the inhibitory mechanism of PtdIns on the influenza virus infection may be through its binding to HA and then enter the host cells membrane together with virus, following inhibition the fusion between cell and virus membrane.

INTRODUCTION

Influenza virus initiates infection through a receptor-ligand interaction and subsequent receptor-mediated endocytosis (*1*, *2*). After entry, the components of the viral particle are disassembled in the endosome where a low pH induces the irreversible conformational change of hemagglutinin (HA)[1], resulting in fusion of the viral and endosomal membranes (*3-6*). The viral genome is then released from the endosome and transported into the nucleus where replication occurs (*7*). After replication, viral genomes leave the nucleus and progeny virus particles assemble and bud from the cellular membrane of the infected cells (*6*, *8*).

Viral proteins, which provide essential functions during the life cycle of influenza virus, are potential targets for the development of antiviral agents. Several agents involved in the infectious cycle have already been documented (*9-14*). It is known that the sialic acid-containing glycoproteins or glycolipids on cell surfaces are receptors for influenza viruses (*15-20*). Two major virus glycoproteins, HA and sialidase, mediate the interaction between influenza viruses and cellular receptors. They are responsible for the attachment to target cells and for release of progeny viruses from the surface of infected cells, respectively (*1*, *6*). Therefore, many inhibitors of influenza viruses have been developed against virus HA or/and sialidase (*14*, *21-24*). Several studies reported that neoglycoprotein or a synthetic co-polymer containing sialic acid residue strongly inhibited the HA and sialidase activities, resulting in prevention of influenza virus infection (*24-30*). However, the effects of most inhibitors are usually restricted to HA subtypes of influenza virus isolates, and their stability has been influenced by the hydrolysis of sialic acid-linkage by viral sialidase. Influenza virus vaccines are also dependent on viral specific antigen (*31*).

Recent studies have shown that a desialylated glycolipid sulfatide also has receptor-like activity (*49*) and that two desialylated glycoglycerolipids from *Coryneform bacteria* have binding and neutralizing activities against influenza virus (*32*). As desialylaled glycolipids are not substrates for sialidase (*58*, *59*), which is a receptor-destroying enzyme and is integrated into the influenza virus envelope, they might be useful as anti-influenza drugs.

Coryneform bacteria are gram-positive microorganisms, which are widely distributed in the environment. Aquatic bacteria *Rhodococcus equi* (*R. equi*), a strictly aerobic gram-positive co-bacillus belonging to the *Corynebacterium* family, is a facultative intracellular bacterium that can cause pneumonia in both young horses and immunocompromised patients (*33*, *34*). We purified a unique phosphatidylinositol (PtdIns) bearing a novel branched-chain fatty acid from *R. equi* strain S_{420}, which binds to all subtypes of HA of influenza virus tested. Furthermore, it was demonstrated that significantly inhibits virus-mediated hemolysis and viral growth in tissue culture.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Preparation of lipids from R. equi strain S_{420}—Two thousand aquatic soil samples were selected in Japan and 257 bacteria were isolated, producing more than detectable levels of glycolipids, of which 27 strains were selected because of their high productivity as described previously (*32*). In *R. equi* strain S_{420} (Tab. I), we found virus-binding substance, which was screened by a thin layer chromatography (TLC)/virus-binding immunostaining method as described previously (*24*).

R. equi strain S_{420} was cultivated in a 250-ml Erlenmeyer flask containing 30 ml of YMPG medium [0.3% yeast extract (Difco), 0.3% malt extract (Difco), 0.5% polypepton (Nihon Pharmaceutical Co.), 1% glucose, pH 7.0] for 20 hr at 28°C in a rotary shaker (220 rpm with a 50-mm stroke). The incubated-aliquot (0.7 ml) was added to a 500-ml Erlenmeyer flask containing 70 ml of YSGG medium [0.4% yeast extract, 0.1% soy flour, 1% glucose, 2% glycerol, 0.1% K_2HPO_4, 0.1% $MgSO_4$-$7H_2O$, 0.2% NaCl, 0.2% $CaCO_3$] and cultivated for 96 hr at 28°C. The culture was extracted with an equal volume of a chloroform/methanol (1:1, v/v) solvent. The extract was used for this experiment.

Total lipids from strain S_{420} were fractionated by Q-Sepharose column chromatography (*36*). The developing solvent was a mixture of chloroform/methanol/water (60:35:8, v/v/v). Lipids were separated on a TLC plate. The virus-binding substance was purified with LH-20 column chromatography (*57*).

Structure of the virus-binding substance—The virus-binding substance: colorless oil. $[\alpha]_D$ +8° (c 0.37, $CHCl_3$). Figure 2A shows ^1H NMR ($CD_3OD/CDCl_3$, 10:1, v/v): δ_H 0.84 (3H, d, J = 6.4 Hz, CH_3), 0.88 (6H, t, J = 6.9 Hz, CH_3 x 2), 1.10 (2H, m, CH_2), 1.27 (41H, m, CH and CH_2 x 20), 1.30 (2H, m, CH_2), 1.35 (4H, m, CH_2 x 2), 1.59 (4H, m, CH_2 x 2), 2.30 (2H, t, J = 7.3 Hz, CH_2-C=O), 2.33 (2H, t, J = 7.3 Hz, CH_2-C=O), 3.20 (1H, t, J = 9.4 Hz, 5'-H), 3.37 (1H, dd, J = 9.4 and 3.0 Hz, 3'-H), 3.62 (1H, t, J = 9.4 Hz, 4'-H), 3.76 (1H, t, J = 9.4 Hz, 6'-H), 3.89 (1H, br t, J = 9.4 Hz, 1'-H), 4.06 (2H, m, 3-H_2), 4.17 (1H, t, J = 3.0 Hz, 2'-H), 4.20 (1H, dd, J = 12.2 and 7.0 Hz, 1-H), 4.45 (1H, dd, J = 12.2 and 3.1 Hz, 1-H), 5.24 (1H, m, 2-H). Figure 2B shows ^{13}C NMR ($CD_3OD/CDCl_3$, 10:1, v/v): δ_C 15.3 (2C), 21.0, 24.4 (2C), 26.7 (2C), 30.9-31.8 (19C), 33.8 (2C), 34.6, 35.9 (2C), 38.9 (2C), 64.5 (C-1), 65.6 ($J_{C\text{-}P}$ = 5.7 Hz, C-3), 72.6 ($J_{C\text{-}P}$ = 7.6 Hz, C-2), 73.5 (C-3'), 73.7 (br, C-2'), 73.9 ($J_{C\text{-}P}$ = 5.7 Hz, C-6'), 74.7 (C-4'), 76.9 (C-5'), 79.0 (br, C-1'), 175.4, 175.7. (+)FABMS *m/z*: 875 $[M+Na]^+$, 593. (-)FABMS m/z: 851 $[M-H]^-$, 689. (-)HRFABMS m/z 851.5666 $[M-H]^-$ (Calcd. For $C_{44}H_{84}O_{13}P$: 851.5650).

Fatty acid analysis: 10% sodium methylate (0.6 m) was added to the sample (0.1 mg) in 0.2 ml benzene and the reaction mixture was held at 60°C for 20 min. After the addition of a few drops of 1 N AcOH to stop the reaction followed by 2 ml of distilled water, the reaction mixture was extracted with 2 ml of *n*-hexane. The *n*-hexane extract was evaporated to dryness and was then followed by fatty acid analysis by gas chromatographic mass (GC-MS). The conditions for GC were: column, J & W Scientific

DB-1 (0.25 mm-by-15 m); column temperature, 100-270°C, raised at 20°C/min; injection temperature, 280°C; carrier gas, He, 1.2 kg/cm.

^{1}H and ^{13}C NMR spectra were recorded on a JEOL GSX500 (500 MHz for ^{1}H NMR and 125 MHz for ^{13}C NMR). FABMS and HRFABMS were obtained on a JEOL SX102A spectrometer (glycerol as matrix). Optical rotation was measured on a JASCO DIP-370 digital polarimeter.

Viruses and antibodies—Influenza viruses from human isolates [A/PR/8/34 (H1N1), A/Singapore/1/57 (H2N2), A/Aichi/2/68 (H3N2), B/Lee/40 and B/Bangkok/163/90 strains], swine isolates [A/swine /Hokkaido/2/81 (H1N1) and A/swine/Italy/309/83 (H3N2) strains] and avian isolates [A/duck/HK/36/76 (H1N1), A/duck/HK/273/78 (H2N2), A/duck/HK/24/76 (H3N2), A/duck/HK/849/80 (H4N1) A/duck/HK/313/78 (H5N3) A/duck/HK/13/76 (H6N1) A/duck/HK/47/76 (H7N2), A/duck/HK /86/76 (H9N2), A/duck/HK/33/76 (H10N1), A/duck/HK/44/76 (H11N3) and A/duck/HK/862/80 (H12N5) strains] were used for this study. Virus strains were propagated in the allantoic cavity of 11-day-old chicken eggs for 48 h at 35°C and purified by sucrose density gradient centrifugation (*24*, *37*, *38*). To obtain bromelain-cleaved HA (BHA), purified virus (A/Aichi/2/68 (H3N2) strain) was digested with bromelain and purified as described previously (*39*, *40*). Rabbit anti-influenza virus antibodies were raised by immunization with various strains grown in eggs as described previously (*18*, *41*). Monocolonal anti-HA (H3 subtype) antibody (MAb 2E10) was propagated as described previously (*42*).

Phospholipids and glycolipids—L-α-PtdIns [1,2-diacyl-sn-glycero-3-phospho-(1-D-myo-inositol)] from bovine liver (Sigma P-8443) or from soybean (Sigma P-5954), L-α-glycerophospho-D-myo-inositol from soybean (Sigma G-1891) and sialylphosphatidylethanolamine derivative (Neu5Ac-PE) (*24*) were used this study as controls. IV^{3}Neu5AcnLc4Cer (Neu5Acα2-3Galβ1-4GlcNAcβ1-3Gal-β1-4Glc-β1-ceramide) and IV^{6}Neu-5AcnLc4Cer (Neu5Acα2-6Galβ1-4GlcNAcβ1-3Galβ1-4Glcβ1-ceramide) were prepared from human erythrocytes (*43*) and from human meconium (*44*), respectively.

Virus-binding immunostaining assay—Lipids were spotted on the Silica gel plastic plates (Polygram Sil G; Macherey-Nagel, Germany). Immunochemical detection of virion or BHA on the TLC plates was performed as described previously (*18*, *24*). In the inhibition assay for virus binding, viruses were preincubated with inhibitors for 1 hr at 4°C and were then used on the binding assay.

Hemagglutination and hemolysis inhibition assays—Hemagglutination and hemolysis inhibition assays were performed as described previously (*24*, *38*, *45*, *46*).

Neutralization assay—The neutralization of the PtdIns on human influenza A virus infection to Madin Darby canine kidney (MDCK) cells was detected as described previously (*47*, *48*).

RESULTS

Presence of a substance that binds to influenza viruses in R. equi strain S_{420}—Two thousand aquatic soil samples were selected in Japan and 257 bacteria were isolated, producing more than detectable levels of glycolipids, of which 27 strains were selected because of their high productivity. The TLC-separated glycolipids were assayed for binding activity to human influenza viruses. *R. equi* strain S_{420} showed one active spot on all H1 (A/PR/8/34 strain), H2 (A/Singapore/1/57 strain) and H3 (A/Aichi/2/68 strain) subtypes of human influenza A viruses (Fig. 1).

Structure of the virus-binding substance—The virus-binding substance gave a positive sign for Dittmer's test (*50*), indicating the presence of a phosphate group. The compound showed a pseudomolecular ion peak at *m/z* 851, matching $C_{44}H_{85}O_{13}P$ (HRFABMS: *m/z* 851.5666 $[M-H]^-$, calcd. for $C_{44}H_{85}O_{13}P$: 851.5650). Both ^1H and ^{13}C NMR spectra (Fig. 2A and Fig. 2B), together with a DEPT spectrum, revealed that the substance contains two long-chain acyl groups, two oxygenated methylenes, and seven oxygenated methines. The ^1H-^1H COSY and 1D homonuclear Hartman-Hahn (HOHAHA) spectra indicated the presence of a cyclitol moiety and a glycerol unit. The cyclitol was shown to be *myo*-inositol on the basis of the ^1H vicinal coupling constants of H-1' to H-6' [J(1'/2') = 3.0 Hz, J(2'/3') = 3.0 Hz, J(3'/4') = 9.4 Hz, J(4'/5') = 9.4 Hz, J(5'/6') = 9.4 Hz, J(6'/1') = 9.4 Hz]. The phosphate was determined to be attached at C-3 and C-1' on the basis of the ^{13}C-P coupling constants of C-2 (7.6 Hz), C-3 (5.7 Hz), C-1' (< 2 Hz), C-2' (< 2 Hz), C-6' (5.7 Hz). The ^1H chemical shifts of H_2-1 (δ 4.45 and 4.20) and H-2 (δ 5.24) signals indicate that both the C-1 and C-2 positions of the glycerol moiety are acylated.

Treatment of the compound with MeOH/MeONa afforded 16:0 and 19:0 fatty acid methyl esters which showed molecular ion peaks at *m/z* 270 and 312, respectively, in the gas chromatography-electron impact mass spectrum (GC-EIMS) (Fig. 2C). The 16:0 fatty acid methyl ester showed GLC retention time and mass spectrum identical to those of authentic palmitic acid methyl esters. On the other hand, the EIMS of 19:0 fatty acid methyl ester showed relatively intense peaks at *m/z* 255 $[M-C_4H_9]^+$, originating from α-cleavages with respect to the methine carbon atom carrying the methyl branch, and the absence of a peak at *m/z* 241, corresponding to the ion $[M-C_5H_{11}]^+$. These findings indicated that the 19:0 fatty acid is 14-methyloctadecanoic acid. Thus, the structure of the virus-binding substance was determined to be a PtdIns bearing a branched-chain fatty acid (Fig. 3).

By chemical staining analyses (*50*, *51*), it was shown that the purified PtdIns was the main lipid (16.5% of total lipids) and further is present as a major phospholipid (about 55% of phospholipids) in *R. equi* strain S_{420} (Fig. 2D, 2E). Purification rate of PtdIns was approximate 60%.

The binding specificity of the purified PtdIns to influenza viruses—The binding specificity of the purified PtdIns to influenza viruses was determined by a TLC/virus-binding immunostaining assay. As

shown in Table II, all the isolates tested from human (A and B types) and animal (avian and swine) species bound to the purified PtdIns. The binding specificity of various influenza viruses to the purified PtdIns was different from their viral sialic acid-linkage specificity. These findings indicate that the binding of purified PtdIns to virus were not dependent on the different isolates or HA types of influenza viruses.

Inhibition activity of the purified PtdIns on the virus-mediated hemolysis and the cell infection by influenza viruses—To determine the anti-viral activity of the purified PtdIns, we carried out hemagglutination inhibition, hemolysis inhibition and neutralization assays. As shown in Table III, the purified PtdIns potently reduced the releasing LDH activity of virus-infected MDCK cells in a dose dependent manner. The IC_{50}s of the purified PtdIns (a concentration of purified PtdIns for 50% infection being inhibited) to A/PR/8/34 (H1N1), A/Singapore/1/57 (H2N2) and A/Aichi/2/68 (H3N2) strains were 20.1±2.3, 14.7±3.2 and 10.4±4.1 μM ($n = 3$ experiments), respectively. The inhibition activity of purified PtdIns was about 6-fold stronger than that of Neu5Ac-PE which was indicated previously a potent inhibitor against human influenza virus (*24*). Similarly, the inhibition activity of the purified PtdIns to virus-mediated hemolysis of erythrocytes was also stronger than that of Neu5Ac-PE. However, the purified PtdIns exhibited weaker inhibition of viral hemagglutination relative to Neu5Ac-PE. These findings show that the purified PtdIns significantly prevented both virus-mediated hemolysis and infection by human influenza A virus *in vitro*, and was effective against influenza A viruses regardless of subtypes.

Inhibition activities of PtdInses containing different fatty acid residues—To examine the influence of species of fatty acid residues to viral infection, we tested PtdInses containing three types of fatty acid residues as inhibitors of influenza viruses. As shown in Table IV, the inhibition activities of PtdInses each other were significantly different. The effect of the PtdIns from *R. equi* strain S_{420} on virus-mediated hemolysis and cell infection by influenza virus *in vitro* were 15-fold and 40-fold stronger than those of PtdInses from bovine liver or soybean, respectively. We also used a fatty acid-free PtdIns [*sn*-glycero-3-phosphatidylinositol (GPI)] in these experiments. Although the GPI inhibited viral hemagglutination at a concentration of 1 mM, it did not inhibit either the virus-mediated hemolysis or viral infection of MDCK cells even at a concentration of 2 mM (data not shown). These findings indicate that the fatty acid residue on PtdIns might be an indispensable part of their inhibition of viral hemolysis and viral replication.

Binding of the purified PtdIns to bromelain-cleaved hemagglutinin---The above findings indicate that the purified PtdIns prevents influenza virus infection. In order to clarify the mechanism of its anti-influenza activity, we used the bromelain-cleaved hemagglutinin (BHA) of A/Aichi/2/68 (H3N2) virus instead of virus particles for TLC/virus-binding assay. The binding specificity of PtdIns to BHA on plates

was examined using mouse monoclonal anti-HA (H3) antibody and HRP-conjugated goat anti-mouse IgG+IgM (H+L) (Jackson Immunoresearch Laboratories). As shown in Fig. 4, the BHA clearly bound to the purified PtdIns as well as IV^6Neu5AcnLc4Cer. This experimental finding indicates that HA of influenza virus is a component in the binding to purified PtdIns.

DISCUSSION

In this study, we isolated and purified a unique type of phosphatidylinositol (PtdIns) from *R. equi*, bearing a branched-chain fatty acid (14-methyloctadecanoic acid). Furthermore, we first found that it strongly inhibited the virus-induced hemolysis and the infection of influenza virus *in vitro*. The discovery evidently indicates existence of new type anti-influenza compounds in microorganisms. Otherwise, it is shown PtdIns in *R. equi* strain S_{420} is the main phospholipid and accounts for about 55% of total phospholipids, because the ratio of PtdIns in *Corynebacteria* is usually lower than 10% of total phospholipids (*52*, *56*). This creates favorable condition for opening up new agents against influenza.

Phosphatidylinositol is usually present in the inner layer of the cellular membrane lipid bilayer and is a precursor for several prominent intracellular signaling molecules (*35*, *53-55*). In this study we have first studied phosphatidylinositol regard as an inhibitor against influenza virus.

The binding of influenza virus to sialic acid has been shown to depend on the molecular species of sialic acid, the sialic acid-Gal linkage and the carbohydrate core structure of ganglioside (*19*). Therefore, the anti-influenza effects of the sialic acid-containing inhibitors are usually restricted by these factors. It is a novel finding that the PtdIns from *R. equi* strain S_{420} binds to influenza viruses and that it significantly inhibits the influenza virus infection *in vitro*. The inhibitory activity of the purified PtdIns on influenza viruses is not restricted to animal species or types (or subtypes) of viral HA. The purified PtdIns from strain S_{420} may be considered a new type of anti-influenza virus agent, widely effective against human and animal influenza A viruses.

The finding show that purified PtdIns from strain S_{420} strongly inhibited the virus-mediated hemolysis in comparison with sialic acid-containing inhibitors, or other PtdInses from different materials. We also confirmed that the purified PtdIns attached to viral HA and that the binding position of PtdIns differs from the sialic acid-binding pocket and may be close to the pocket on the head of the HA trimer. The finding on HAI also indicated that the effect of purified PtdIns on the sialic acid-binding pocket of viral HA is weaker. Regarding the anti-influenza virus mechanism of the purified PtdIns, one possibility is that PtdIns adheres to the viral HA and then enters the endosome together with the virion, resulting in interference with the fusion of viral and endosomal membranes.

We also used other phospholipids in the same experiment to compare their effects against influenza

viruses (data not shown). Bovine liver PtdIns, phosphatidylserine (PS, from bovine brain, Sigma P-7769) and phosphatidylenthanolamine (PE, from bovine brain, Sigma P-7693), all of which carry a negative charge, bound to influenza viruses, but neutral glycophospholipids such as phosphatidylcholine (PC, from bovine liver, Sigma P-6638) and sphingomyelin (SM, from bovine brain, Sigma S-7004) did not. None of PC, PE and SM showed inhibition activities of virus-induced hemolysis at a concentration of 2 mM. Both bovine liver PtdIns and PS showed inhibition activities, but their effects were much lower than that of the purified PtdIns. Adhesion of phospholipids to viral HA may be an indispensable step in preventing influenza virus infection. It is noteworthy that the virus binding activity of bovine liver PtdIns to influenza viruses was similar to that of purified PtdIns, however the inhibitory activity of bovine liver PtdIns on the influenza virus-mediated fusion was lower than that of the purified bacterial PtdIns. The structural difference between the purified PtdIns and bovine liver PtdIns is that it bears a branched-chain fatty acid. L-α-glycerophospho-D-myo-inositol from soybean, which has no fatty acid residue, showed no inhibitory activity of virus-mediated hemagglutination and hemolysis. These findings indicate that the phosphatidylinositol and branched fatty acid residue may be important for the binding of viral HA and for interfering with membrane fusion, respectively, leading to inhibition of infection by influenza viruses.

Some sialic acid-containing derivatives usually inhibit the attachment of viral HA to target cells and/or the enzymatic activity of viral sialidase, thus preventing infection by influenza virus. In contrast, the purified PtdIns preferentially targets virus-mediated cellular membrane fusion. Our hypothesis is that PtdIns binds near the fusion loop of HA, resulting in interference with the fusogenic function of viral HA, thus preventing the growth of human influenza A virus.

FOOTNOTES

* This work was supported in part by Grants-in-aid 06454211, 05274101, 08457098, 07044286, 07557166 (Y. S.) for Scientific Research from the Ministry of Education, Science and Culture of Japan, and for Japan-Chain Medical Association.

[1] The abbreviations used are: HA, HA; MDCK, Madin Darby canine kidney; Neu5AcnLc4Cer, Neu5Ac-Galβ1-4GlcNAcβ1-3Galβ1-4Glcβ1-ceramide; PtdIns, phosphatidylinositol; TLC, thin layer chromatography; YMPG medium, 1% glucose, 0.3% yeast extract, 0.3% malt extract, 0.5% polypepton, pH 7.0; YSGG medium, 1% glucose, 2% glycerol, 0.4% yeast extract, 0.1% soy flour, 0.1% K_2HPO_4, 0.1% $MgSO_4$-$7H_2O$, 0.2% NaCl, 0.2% $CaCO_3$.

REFERENCE

1. Weis, W., Brown, J.H., Cusack, S., Paulson, J.C., Skehel, J.J., and Wiley, D.C. (1988) Structure of the influenza virus hemagglutinin complexed with its receptor, sialic acid. *Nature* **333**, 426-431
2. Wilson, I.A., Skehel, J.J., and Wiley, D.C. (1981) Structure of the hemagglutinin membrane glycoprotein of influenza virus at 3 A resolution. *Nature* **289**, 366-373
3. Helenius, A. (1992) Unpacking the incoming influenza virus. *Cell* **69**, 577-578
4. White, J.M. (1990) Viral and cellular membrane fusion proteins. *Annu. Rev. Physiol.* **52**, 675-697
5. White, J.M. (1992) Membrane fusion. *Science* **258**, 917-924
6. Wiley, D.C., and Skehel, J.J. (1987) The structure and function of the hemagglutinin membrane glycoprotein of influenza virus. *Annu. Rev. Biochem.* **56**, 365-394
7. Krug, R.M., Alonso-Caplen, F.V., Julkunen, I., and Katze, M.G. (1989) In "The Influenza Viruses" (R. M. Krug, Ed.), pp89-152. Plenum Press, NY
8. Roth, M.G., Genthing, M.-J., and Sambrook, J. (1989) In "The Influenza Viruses" (R. M. Krug, Ed.), pp219-267. Plenum Press, NY
9. Pinto, L.H. and Lamb, R.A. (1995) Understanding the mechanism of action of the anti-influenza virus drug amantadine. *Trends Microbiol.* **3**, 271
10. Pinto, L.H., Holsinger, L.J., and Lamb, R.A. (1992) Influenza virus M2 protein has ion channel activity. *Cell* **69**, 517-528
11. Hayden, F.G., and Hay, A.J. (1992) Emergence and transmission of influenza A viruses resistant to amantadine and rimantadine. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **176**, 119-130
12. Hayden, F.G., Atmar, R.L., Schilling, M., Johnson, C., Poretz, D., Paar, D., Huson, L., Ward, P., and Mills, R.G. (1999) Use of the selective oral neuraminidase inhibitor oseltamivir to prevent influenza. *N. Engl. J. Med.* **341**, 1336-1343
13. Hayden, F.G., Treanor, J.J., Fritz, R.S., Lobo, M., Betts, R.F., Miller, M., Kinnersley, N., Mills, R.G., Ward, P., and Straus, S.E. (1999) Use of the oral neuraminidase inhibitor oseltamivir in experimental human influenza: randomized controlled trials for prevention and treatment. *JAMA* **282**, 1240-1246
14. von Itzstein, M., Wu, W.Y., Kok, G.B., Pegg, M.S., Dyason, J.C., Jin, B., Van Phan, T., Smythe, M.L., White, H.F., Oliver, S.W., Colman, P.W., Varghese, J.N., Ryan, D.M., Woods, J.M., Bethell, R.C., Hotham, V.J., Cameron, J.M., and Penn, C.R. (1993) Rational design of potent sialidase-based inhibitors of influenza virus replication. *Nature* **363**, 418-423
15. Suzuki, Y., Nagao, Y., Kato, H. Matsumoto, M., Nerome K, Nakajima, K., and Nobusawa, E. (1986) Human influenza A virus hemagglutinin distinguishes sialyloligosaccharides in membrane-

associated gangliosides as its receptor which mediates the adsorption and fusion processes of virus infection. Specificity for oligosaccharides and sialic acids and the sequence to which sialic acid is attached. *J. Biol. Chem.* **261**, 17057-17061

16. Suzuki, Y., Kato, H., Naeve, C.M., and Webster, R.G. (1989) Single-amino-acid substitution in an antigenic site of influenza virus hemagglutinin can alter the specificity of binding to cell membrane-associated gangliosides. *J. Virol.* **63**, 4298-4302
17. Suzuki, Y., Nishi, H., Hidari, K., Hirabayashi, Y., Matsumoto, M., Kobayashi, T., Watarai, S., Yasuda, T., Nakayama, J., Maeda, H., Katsuyama, T., Kanai, M., Kiso, M., and Hasegawa, A. (1991) A new monoclonal antibody directed to sialyl alpha 2-3 lactoneotetraosylceramide and its application for detection of human gastrointestinal neoplasms. *J. Biochem.* **109**, 354-360
18. Suzuki, Y., Nakao, T., Ito, T., Watanabe, N., Toda, Y., Xu, G.Y., Suzuki, T., Kobayashi, T., Kimura, Y., Yamada, A., Sugawara, K., Nishimura, H., Kitame, F., Nakamura, K., Deya, E., Kiso, M., and Hasegawa, A. (1992) Structural determination of gangliosides that bind to influenza A, B, and C viruses by an improved binding assay: strain-specific receptor epitopes in sialo-sugar chains. *Virology* **189**, 121-131
19. Suzuki, Y. (1994) Gangliosides as influenza virus receptors. Variation of influenza viruses and their recognition of the receptor sialo-sugar chains. *Prog. Lipid. Res.* **33**, 429-445
20. Suzuki, Y., Matsunaga, M., and Matsumoto, M. (1985) *N*-Acetylneuraminyllactosylceramide, GM_3-NeuAc, a new influenza A virus receptor which mediates the adsorption-fusion process of viral infection. Binding specificity of influenza virus A/Aichi/2/68 (H3N2) to membrane-associated GM_3 with different molecular species of sialic acid. *J. Biol. Chem.* **260**, 1362-1365
21. Tiralongo, J., Pegg, M.S., and von Itzstein, M. (1995) Effect of substrate aglycon on enzyme mechanism in the reaction of sialidase from influenza virus. *FEBS Lett.* **372**, 148-150
22. von Itzstein, M., Wu, W.Y., and Jin, B. (1994) The synthesis of 2,3-didehydro-2,4-dideoxy-4-guanidinyl-*N*-acetylneuraminic acid: a potent influenza virus sialidase inhibitor. *Carbohydr. Res.* **259**, 301-305
23. von Itzstein, M., Dyason, J.C., Oliver, S.W., White, H.F., Wu, W.Y., Kok, G.B., and Pegg, M.S. (1996) A study of the active site of influenza virus sialidase: an approach to the rational design of novel anti-influenza drugs. *J. Med. Chem.* **39**, 388-391
24. Guo, C.-T., Wong, C.-H., Kajimoto, T., Miura, T., Ida, Y., Juneja, L. R., Kim, M.-J., Masuda, H., Suzuki, T., and Suzuki, Y. (1998) Synthetic sialylphosphatidylethanolamine derivatives bind to human influenza A viruses and inhibit viral infection. *Glycoconjugate J.* 15, 1099-1108
25. Muniruzzaman, S., Pan, Y.T., Zeng, Y., Atkins, B., Izumori, K., and Elbein, A.D. (1996) Inhibition

of glycoprotein processing by L-fructose and L-xylulose. *Glycobiology* **6**, 795-803

26. Ryan-Poirier, K.A., and Kawaoka, Y. (1991) Distinct glycoprotein inhibitors of influenza A virus in different animal sera. *J. Virol.* **65**, 389-395
27. Ryan-Poirier, K.A., and Kawaoka, Y. (1993) Alpha 2-macroglobulin is the major neutralizing inhibitor of influenza A virus in pig serum. *Virology* **193**, 974-976
28. Sidwell, R.W., Huffman, J.H, Barnard, D.L., Bailey, K.W., Wong, M.H., Morrison, A., Syndergaard, T., and Kim, C.U. (1998) Inhibition of influenza virus infections in mice by GS4104, an orally effective influenza virus neuraminidase inhibitor. *Antiviral Res.* **37**, 107-120
29. McKimm-Breschkin, J.L., Sahasrabudhe, A., Blick, T.J., McDonald, M., Colman, P.M., Hart, G.J., Bethell, R.C., and Varghese, J.N. (1998) Mutations in a conserved residue in the influenza virus neuraminidase active site decreases sensitivity to Neu5Ac2en-derived inhibitors. *J. Virol.* **72**, 2456-2462
30. Ikeda, K., Kimura, F., Sano, K., Suzuki, Y., and Achiwa, K. (1998) Chemoenzymatic synthesis of an *N*-acetylneuraminic acid analogue having a carbamoylmethyl group at *C*-4 as an inhibitor of sialidase from influenza virus. *Carbohydr. Res.* **312**, 183-189
31. Braun, R., Babiuk, L.A., and van Drunen Littel-van den Hurk, S. (1998) Compatibility of plasmids expressing different antigens in a single DNA vaccine formulation. *J. Gen. Virol.* **79**, 2965-2970
32. Nakata, K., Guo, C.-T., Matsufuji, M., Yoshimoto, A., Inagaki, M., Higuchi, R., and Suzuki Y. (2000) Influenza A virus-binding activity of glycoglycerolipids of aquatic bacteria. *J. Biochem.* **172**, 191-198
33. Fang, C.T., Hung, C.C., Chang, S.C., Hsueh, P.R., Chang, Y.L., Chen, M.Y., and Luh, K.T. (2000) Pulmonary infection in human immunodeficiency virus-infected patients in Taiwan. *J. Formos. Med. Assoc.* **99**, 123-127
34. Gallen, F., Kernaonet, E., Foulet, A., Goldstein, A., Lebon, P., and Babinet, F. (1999) Pulmonary infection from *Rhodococcus equi* after renal transplantation. *Nephrologie* **20**, 383-386
35. Wang, P.-Y., Kitchens, R.L., and Munford, R.S. (1998) Phosphatidylinositides bind to plasma membrane CD14 and can prevent monocyte activation by bacterial lipopolysaccharide. *J. Biol. Chem.* **273**, 24309-24313
36. Hirabayashi, Y., Nakao, T., Matsumoto, M., Obata, K., and Ando, S. (1988) Improved method for large-scale purification of brain gangliosides by Q-sepharose column chromatography. Immunochemical detection of *C*-series polysialogangliosides in adult bovine brains. *J. Chromatography* **445**, 377-384
37. Suzuki, Y., Suzuki, T., and Matsumoto, M. (1983) Isolation and characterization of receptor

sialoglycoprotein for hemagglutinating virus of Japan (Sendai virus) from bovine erythrocyte membrane. *J. Biochem.* **93**, 1621-1633

38. Suzuki, Y., Morioka, T., and Matsumoto, M. (1980) Action of ortho- and paramyxovirus neuraminidase on gangliosides. Hydrolysis of ganglioside GM_1 by Sendai virus neuraminidase. *Biochem. Biophys. Acta.* **619**, 632-639
39. Cianci, C., Yu, K.L., Dischino, D.D., Harte, W., Deshpande, M., Luo, G., Colonno, R.J., Meanwell, N.A., and Krystal, M. (1999) pH-dependent changes in photoaffinity labeling patterns of the H1 influenza virus hemagglutinin by using an inhibitor of viral fusion. *J. Virol.* **73**, 1785-1794
40. Brand, C.M., and Skehel, J.J. (1972) Crystalline antigen from the influenza virus envelope. *Nature New Biology* **238**, 145-147
41. Yamada, A., Brown, L.E., and Webster, R.G. (1984) Characterization of H2 influenza virus hemagglutinin with monoclonal antibodies: influence of receptor specificity. *Virology* **138**, 276-286
42. Kohler, G., and Milstein, C. (1975) Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* **256**, 495-497
43. Wherrett, J.R. (1973) Characterization of the major ganglioside in human red cells and of a related tetrahexosyl ceramide in white cells. *Biochem. Biophs. Acta.* **326**, 63-73
44. Nilsson, O., Mansson, J.E., Tibblin, E., and Svennerholm, L. (1981) Gangliosides of human meconium-detection of a possible fetal antigen. *FEBS Lett.* **133**, 197-200
45. MacDonald, R.C., Dalle Ore, V., and MacDonald, R.I. (1984) Inhibition of sendai virus-induced hemolysis by long chain fatty acids. *Virology* **134**, 103-117
46. Portner, A., Scroggs, R.A., and Metzger, D.W. (1987) Distinct functions of antigenic sites of the HN glycoprotein of Sendai virus. *Virology* **158**, 61-68
47. Suzuki, T., Sometani, A., Yamazaki, Y., Horiike, G., Mizutani, Y., Masuda, H., Yamada, M., Tahara, H., Xu, G.Y., Miyamoto, D., Oku, N., Okada, S., Kiso, M., Hasegawa, A., Ito, T., Kawaoka, Y., and Suzuki, Y. (1996) Sulphatide binds to human and animal influenza A viruses, and inhibits the viral infection. *Biochem. J.* **318**, 389-393
48. Watanabe, W., Sudo, K., Asawa, S., Konno, K., Yokota, T., and Shigeta, S. (1995) Use of lactate dehydrogenase to evaluate the anti-viral activity against influenza A virus. *J. Virol. Methods* **51**, 185-191
49. Suzuki, T., Horiike, G., Yamazaki, Y., Kawabe, K., Masuda, H., Miyamoto, D., Matsuda, M., Nishimura, S.I., Yamagata, T., Ito, T., Kida, H., Kawaoka, Y., and Suzuki, Y. (1997) Swine influenza virus strains recognize sialylsugar chains containing the molecular species of sialic acid predominantly present in the swine tracheal epithelium. *FEBS Lett.* **404**, 192-196

50. Wells, M.A., and Dittmer, J.C. (1966) The identification of glycerophosphorylglycerol phosphate as the deacylation product of a new brain lipid. *J. Biol. Chem.* **241**, 2103-2105

51. Svennerholm, L. (1956) *J. Neurochem.* **1**, 42

52. Barton, M.D., Goodfellow, M., and Minnikin, D.E. (1989) Lipid composition in the classification of *Rhodococcus equi. Zentralbl Bakteriol.* **272**, 154-170

53. Yague, G., Segovia, M., and Valero-Guillen, P.L. (1997) Acyl phosphatidylglycerol: a major phospholipid of Corynebacterium amycolatum. *FEMS. Microbiol. Lett.* **151**, 125-130

54. Niepel, T., Meyer, H., Wray, V., and Abraham, W.R. (1998) Intraspecific variation of unusual phospholipids from *Corynebacterium spp.* containing a novel fatty acid. *J. Bacteriol.* **180**, 4650-4657

55. Sha, B., and Luo, M. (1999) PI transfer protein: the specific recognition of phospholipids and its functions. *Biochim. Biophys. Acta.* 1441, 268-277

56. Zhang, X., and Majerus, P.W. (1998) Phosphatidylinositol signalling reactions. *Semin. Cell Dev. Biol.* **9**, 153-160

57. Zieler, H., Nawrocki, J. P., and Shahabuddin, M. (1999) *Plasmodium gallinaceum* ookinetes adhere specifically to the midgut epithelium of *Aedes aegypti* by interaction with a carbohydrate ligand. *J. Exp. Biol.* **202**, 485-495

58. Kanda, T., Akiyama, H., Yanagida, A., Tanabe, M., Goda, Y., Toyoda, M., Teshima, R., and Saito, Y. (1998) Inhibitory effects of apple polyphenol on induced histamine release from RBL-2H3 cells and rat mast cells. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **62**, 1284-1289

59. Sato, K., Hanagata, G., Kiso, M., Hasegawa, A., and Suzuki, Y. (1998) Specificity of the N1 and N2 sialidase subtypes of human influenza A virus for natural and synthetic gangliosides. *Glycobiology* **8**, 527-532

Table and Figures

TABLE I. **Microbiological property of *Rhodococcus equi* strain S_{420}.**

TABLE II. **Binding reactivities of human, avian and swine isolates of influenza virus to the PtdIns from *R. equi* strain S_{420}.** The binding activities of human, avian and swine isolates of influenza virus to purified PtdIns were determined with a TLC/virus-binding immunostaining assay as described under "Experimental Procedures". IV^3Neu5AcnLc4Cer and IV^6Neu5AcnLc4Cer were used as positive controls. The data are expressed as mean±SD of three independent experiments and as a percentage of that of IV^3Neu5AcnLc4Cer and IV^6Neu5AcnLc4Cer.

TABLE III. **Inhibition of the purified PtdIns from *R. equi* strain S_{420} on viral hemagglutination,**

virus-mediated hemolysis and cell infection by human influenza A viruses. Inhibition activity of the purified PtdIns on viral hemagglutination, virus-mediated hemolysis and cell infection by human influenza A viruses was detected as described under "Experimental Procedures". The maximum dilution of the PtdIns (starting concentration, 1 mM) showing complete inhibition of the hemagglutination (HAI) is defined as the hemagglutination inhibition titer. The inhibition activity of the PtdIns against viral hemolysis or viral infection of MDCK cells is expressed as IC_{50} (the concentration at which hemolysis was inhibited by 50% or 50% infection cells being inhibited). The data are expressed as mean±SD of three independent experiments. Each experiment was carried out in duplicate. Neu5Ac-PE, which is a sialylphosphatidyl-enthanolamine derivative (*24*), was used as a control.

TABLE IV. **Influence of fatty acid residues of PtdIns on viral hemagglutination, virus-mediated hemolysis and cell infection by influenza virus.** Inhibition activities of PtdInses containing different fatty acid residues on viral hemagglutination, virus-mediated hemolysis and infection of MDCK cells by A/Aichi/2/68 (H3N2) strain were detected as described under "Experimental Procedures". The maximum dilutions of samples (starting concentration, 1 mM) showing complete inhibition of the hemagglutination (HAI) are defined as the hemagglutination inhibition titer. The inhibition activities of samples against viral hemolysis or viral infection of MDCK cells are expressed as IC_{50} (the concentration at which hemolysis was inhibited by 50% or 50% infection cells being inhibited). The data are expressed as mean ± SD of three independent experiments. Each experiment was carried out in duplicate.

Fig. 1. **Binding specificity of the purified PtdIns to human influenza A viruses.** The binding specificity of the PtdIns isolated from aquatic bacteria *R. equi* strain S_{420} (2 nmol) (lane 2) to human influenza A viruses [A/PR/8/34 (H1N1) (a), A/Singapore/1/57 (H2N2) (b), and A/Aichi/2/68 (H3N2) (c)] was determined by TLC/virus-binding immunostaining assay as described under "Experimental Procedures". TLC Plate was visualized with orcinol-H_2SO_4 reagent (d). IV^6Neu5AcnLc4Cer (lane 1) and IV^3Neu5AcnLc4Cer (lane 3) (1 nmol) were used as positive controls.

Fig. 2. **A: An ^{1}H-detected multiple-bond heteronuclear multiple quantum coherence spectrum of the PtdIns from *R. equi* strain S_{420}.**

B: A ^{13}C-detected multiple-bond heteronuclear multiple quantum coherence spectrum of the PtdIns from *R. equi* strain S_{420}.

C: A gas chromatography-electron impact mass spectrum of the PtdIns from *R. equi* strain S_{420}.

D and E: Profile of phospholipids and total glycolipids from *R. equi* strain S_{420}. Profiles of

phospholipids (plate D) and glycolipids (plate E) were visualized with Dittmer's reagent and orcinol-H_2SO_4 reagent, respectively. Lane 1 is total lipids and lane 2 is the purified PtdIns (2 nmol).

Fig. 3. **Structure of the PtdIns from *R. equi* strain S_{420}.**

Fig. 4. **Binding of the purified PtdIns to bromelain released ectodomain of influenza hemagglutinin from A/Aichi/2/68 (H3N2) strain.** The binding of purified PtdIns (2 nmol) (lane 2) to bromelain-released ectodomain of influenza HA (BHA) from A/Aichi/2/68 (H3N2) strain was determined using a TLC/HA-binding immunostaining assay as described under "Experimental Procedures". IV^{6}Neu5AcnLc4Cer (1 nmol) (lane 1) was used as a positive control.

Fig. 1

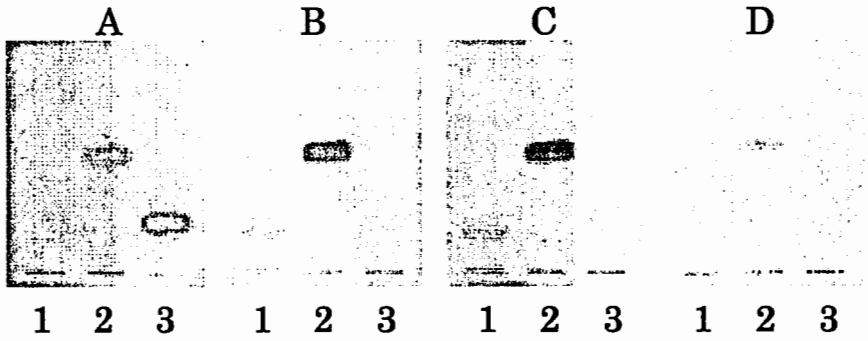


Fig. 3

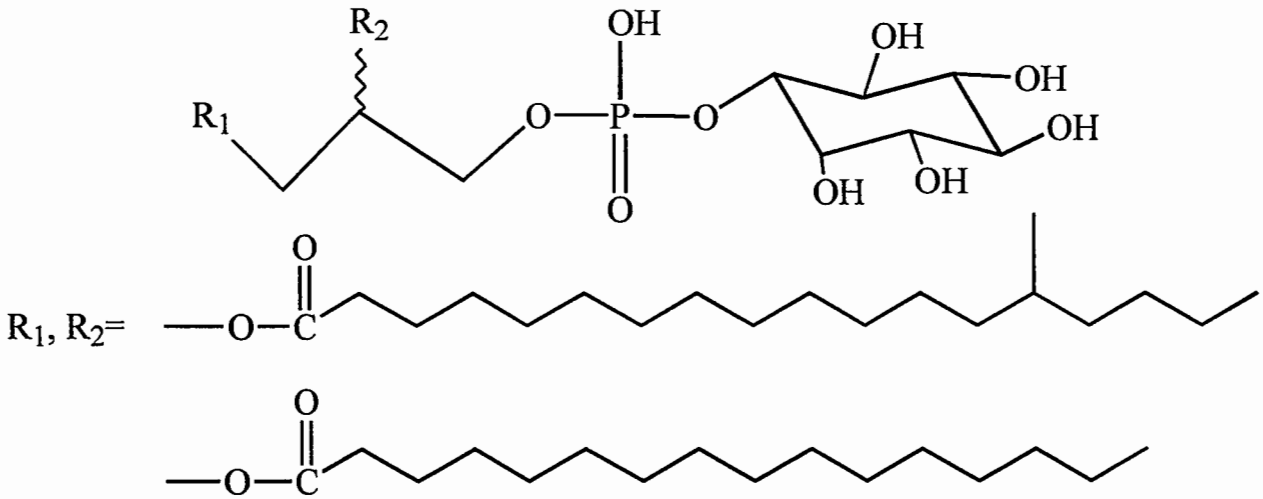


Fig. 4

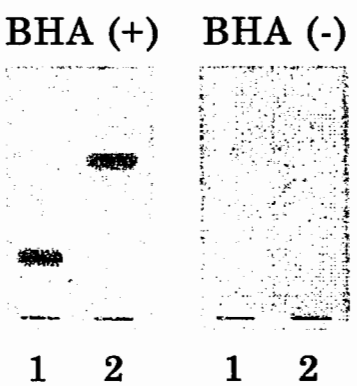


Fig. 2

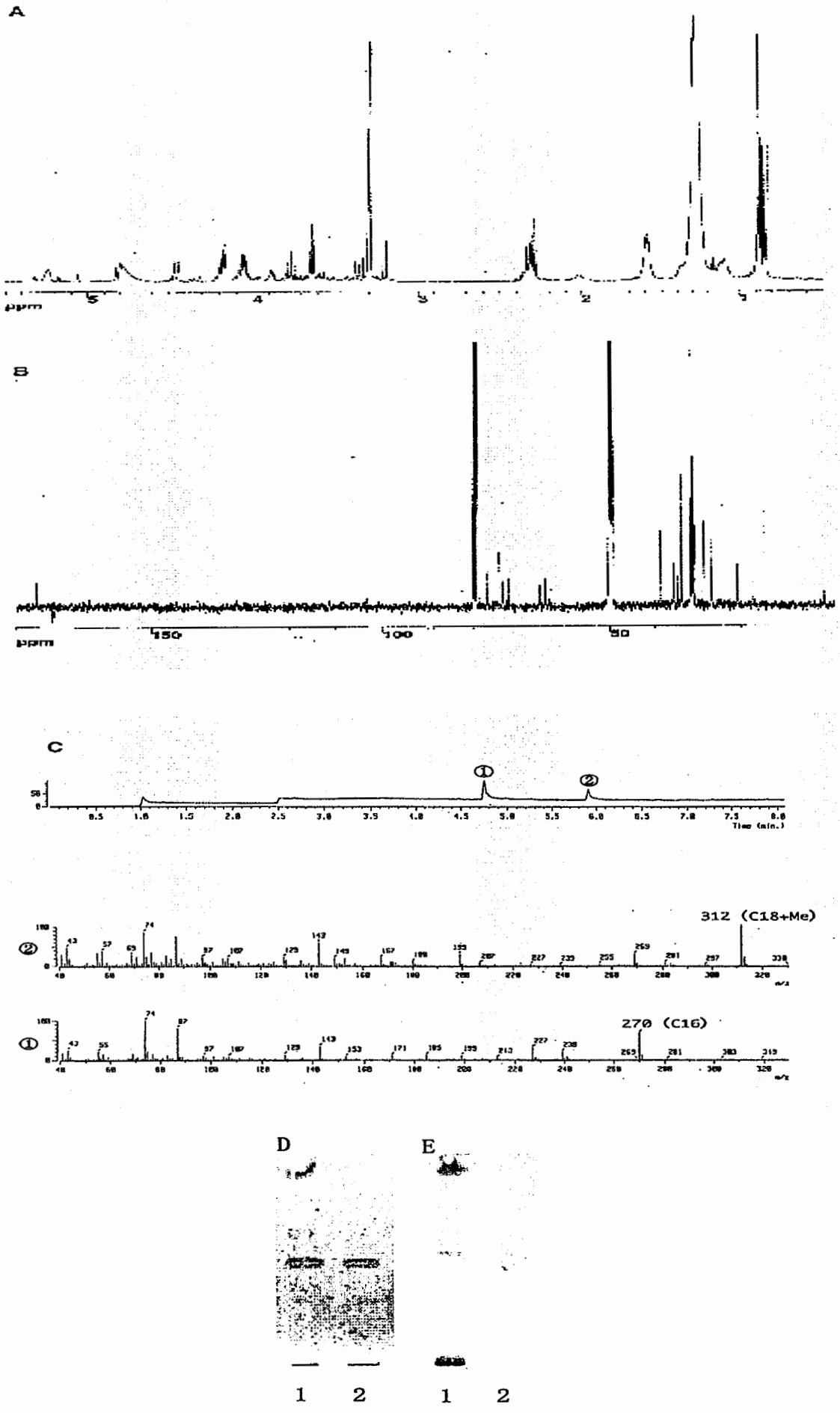

A
ppm
5
4
3
2
1
B
ppm
150
100
50
C
①
②
Time (min.)
312 (C18+Me)
270 (C16)
D
E
1
2
1
2

TABLE I. **Microbiological property of *Rhodococcus equi* strain S_{420}.**

	Strain S_{420}
Colony	
Shape	Flat and round
Tone	Buttery, opaque, and beige
Cell shape	
Shape	Long-rod
Width	0.8 μm
Moving	-
Gram-staining	+
Spore formation	-
Enzymatic properties	
Pyrazinamidase	+
Pyrrolidonearylamidase	-
Alkaline phosphatase	+
Catalase	+
β-Glucuronidase	-
β-Galactosidase	-
β-Glucosidase	+
N-Acetyl-β-glucosaminidase	-
Urease	+
Esculin hydrolyzation	+
Gelatin hydrolyzation	-
Nitrate reduction	-
Fermentation ability	
Glucose	-
Ribose	-
Xylose	-
Mannitol	-
Maltose	-
Lactose	-
Sucrose	-
Glycogen	-

TABLE III. **Inhibition of the purified PtdIns from *R. equi* strain S_{420} on viral hemagglutination, virus-induced hemolysis and infectivity by human influenza A viruses.**

Viruses	Inhibition activity of purified PtdIns			Inhibition activity of Neu5Ac-PE		
	HA (μM)	Hemolysis (IC_{50}, μM)	Cell infection (IC_{50}, μM)	HA (μM)	Hemolysis (IC_{50}, μM)	Cell infection (IC_{50}, μM)
A/PR/8/34	500	50.3±7.2	20.1±2.3	>1000	>1000	>1000
A/Singapore/1/57	500	42.4±5.6	14.7±3.2	32	158.5±7.4	94.7±5.2
A/Aichi/2/68	250	38.9±4.9	10.4±4.1	16	142.3±8.2	64.3±7.8

Inhibition activity of the purified PtdIns on viral hemagglutination, virus-induced hemolysis and infectivity of human influenza A viruses was detected as described under "Experimental Procedures". The maximum dilution of the PtdIns (starting concentration, 1 mM) showing complete inhibition of hemagglutination (HAI) is defined as the hemagglutination inhibition titer. The inhibition activity of the PtdIns against viral hemolysis or infection of MDCK cells by viruses is expressed as IC_{50} (the concentration at which the hemolysis or the infection was inhibited by 50% or 50% infection cells being inhibited). The data are expressed as mean±SD of three independent experiments. Each experiment was carried out in duplicate. Neu5Ac-PE, which is a sialylphosphatidylenthanolamine derivative (*24*), was used as a control.

TABLE II. **Binding reactivities of human, avian and swine isolates of influenza virus to the purified PtdIns from *R. equi* strain S_{420}.**

Influenza virus	Relative binding reactivity (%)		
	IV^3Neu5AcnLc4Cer	IV^6Neu5AcnLc4Cer	PtdIns
Human isolates			
A/PR/8/34 (H1N1)	100	12±6	26±6
A/Singapore/1/57 (H2N2)	21±4	100	43±5
A/Aichi/2/68 (H3N2)	26±5	100	48±7
B/Lee/40	16±2	100	28±5
B/Bangkok/163/90	18±8	100	31±6
Avian isolates			
A/duck/HK/36/76 (H1N1)	100	42±8	51±8
A/duck/HK/273/78 (H2N2)	100	13±5	19±6
A/duck/HK/24/76 (H3N2)	100	10±3	38±6
A/duck/HK/849/76 (H4N1)	100	16±8	34±7
A/duck/HK/313/76 (H5N3)	100	56±6	31±6
A/duck/HK/13/76 (H6N1)	100	15±6	36±5
A/duck/HK/47/76 (H7N2)	100	22±9	33±7
A/duck/HK/86/76 (H9N2)	100	32±6	40±5
A/duck/HK/33/76 (H10N1)	100	28±5	33±5
A/duck/HK/44/76 (H11N3)	100	21±4	30±8
A/duck/HK/862/80 (H12N5)	100	14±2	37±7
Swine isolates			
A/swine/Hokkaido/2/81 (H1N1)	13±5	100	33±5
A/swine/Italy/309/83 (H3N2)	15±3	100	31±7

The binding activities of human, avian and swine isolates of influenza virus to purified PtdIns were determined with a TLC/virus-binding immunostaining assay as described under "Experimental Procedures". IV^3Neu5AcnLc4Cer and IV^6Neu5AcnLc4Cer were used as positive controls. The data are expressed as mean±SD of three independent experiments and as a percentage of that of IV^3Neu5AcnLc4Cer and IV^6Neu5AcnLc4Cer.

TABLE IV. **Influence of fatty acid residues of PtdIns to viral hemagglutination, virus-induced hemolysis and influenza virus infection.**

Phosphatidylinositols	Fatty acid residue	Binding activities	Inhibition activities		
			HA	Hemolysis (IC_{50},μM)	Cell infection (IC_{50},μM)
PtdIns from strain S_{420}	14-Methylocatadecanoic acid and palmitic acid	43 ± 5	500	38.9 ± 4.9	10.4 ± 4.1
PtdIns from bovine liver	Stearic acid and arachidonic acid	41 ± 6	500	578.4 ± 5.6	360.7 ± 5.2
PtdIns from soybean	Palmitic acid and linoleic acid	39 ± 7	500	616.4 ± 9.7	396.1 ± 8.3
Glycerophosphatidylinositol from soybean	No fatty acid residue	ND	>1000	>1000	>1000

Inhibition activities of PtdIns containing different fatty acid residues on viral hemagglutination, virus-induced hemolysis and infection of MDCK cells by human influenza A virus (A/Aichi/2/68 strain) to MDCK cells were detected as described under "Experimental Procedures". The maximum dilutions of samples (starting concentration, 1 mM) showing complete inhibition of hemagglutination (HAI) are defined as the hemagglutination inhibition titer. The inhibition activities of samples against viral hemolysis or infection of MDCK cells are expressed as IC_{50} (the concentration at which the hemolysis or the infection was inhibited by 50% or 50% infection cells being inhibited). The data are expressed as mean ± SD of three independent experiments. Each experiment was carried out in duplicate.

日本財団補助金による
２０００年度日中医学学術交流促進事業

⑤．在留中国人研究者研究助成

(21)ラットにおける糖尿病治療薬ビグアニドの体内動態、排泄機構及び乳酸アシドーシスとの関連

ラットにおける糖尿病治療薬ビグアニドの体内動態、排泄機構および乳酸アシドーシスとの関連

王　徳勝

東京大学大学院薬学研究科製剤設計学教室

要旨：経口糖尿病治療薬 biguanide 剤の再評価は近年進まれている。本研究では metformin, buformin, phenformin などを biguanide モデル化合物とし、ラットにおける i.v. infusion 系で体内動態を検討し、biguanide 化合物の重篤な副作用である乳酸アシドーシスのラット評価系を作った。体内動態の検討時に用いた最小 dose において腎クリアランス（CLrenal）はイヌリンのクリアランスよりはるかに大きいため、ビグアニド化合物は腎において能動的に排泄を受けることが示唆された。またラット oct1（roct1）をクローニングし、CHO 細胞を用いて発現細胞を作成し、取込み輸送実験を行った。速度論解析した結果、Km 値は metformin, buformin, phenformin それぞれ 513、46.1、5.20μM であった。また OCT ファミリーの典型基質である tetraethylammonium (TEA) の roct1 発現細胞の取込みに対する阻害実験を行った結果、阻害定数 Ki はそれぞれ 393、52.7、15.9μM と Km に近い結果を得た。これにより、三つのビグアニド化合物はいずれも oct1 の基質であることが明かとなった。rOct1 は主に肝臓の血管側に発現し、ビグアニド化合物は roct1 により肝臓に積極的に取り込まれることが示唆された。またビグアニド投与により血中乳酸濃度の上昇は主に肝臓でのミトコンドリア呼吸鎖の阻害によるもので、roct1 を介する肝臓への取込みは乳酸アシドーシスとの関連も示唆された。しかし、in vivo 実験から得た腎固有クリアランス（CLint）は metformin>buformin>phenformin の順であり、roct1 の輸送能力の指標である Vmax/Km 値は phenformin>buformin>metformin であり、腎固有クリアランスと逆でした。従って、roct1 以外のメカニズムがこれら化合物の腎排泄能力の違いを決定することが示唆された。

キーワード　ビグアニド、乳酸アシドーシス、有機カチオントランスポーター（OCT）

【目的】

ビグアニドはインスリン非依存性糖尿病（NIDDM）の経口治療薬として古くから使われてきたが、臨床上乳酸アシドーシスなど重篤な副作用を引き起こすため、その使用は制限されている。しかし近年、metformin をはじめビグアニド剤の再評価が進まれている。ビグアニドはヒトにおいて腎排泄型であることが知られているが、ラットにおける動態は不明である。また乳酸アシドーシスの機序および腎排泄機構に関する情報もほとんど得られていない。本研究は各ビグアニド剤のラットにおける体内動態と乳酸値上昇作用の違いおよび腎排泄機構を明らかにすることを目的とした。

【方法】

【動物】SD ラット、雄性、8 週令、体重 250-280g

【Infusion】大腿静脈カニューレー、infusion for 4hr, 1.5 ml/250g rat/hr, inulin 20mg/kg/hr, mannitol 500 mg/kg/hr co-infusion

【HPLC 条件】Column: mBondapak (10 mm, 300×3.9 mm I.D.), mobile phase: 0.01 M phosphate buffer (pH6.5):acetonitrile=30:70, UV detection: 236 nm, flow rate: 1.0 ml/min

【乳酸値測定】ラット尾静脈から採血し、8%の $HCLO_4$ で処理した後、乳酸測定キット（Sigma）で乳酸値を測定した。

【rOct1 発現細胞の作製】ラット oct1 (roct1) cDNA を RT-PCR 法により肝臓から cloning し、発現ベクター pcDNA3.1 に組み込み、CHO 細胞に transfection した。

【基質の定量】TEA は 14C-TEA を用い、取込み量をシンチレーションカンターで定量した。ビグアニド化合物は HPLC で定量した。

【結果および考察】Metformin は 25、50、100、175、250 mg/kg/hr、buformin は 2.5、5.0、12.5、25、50 mg/kg/hr、phenformin は 1.0、2.5、5.0、12.5、25 mg/kg/hr の dose において infusion 定常状態下経時的に採血し、血中乳酸値を測定した。各化合物は濃度依存的に乳酸値が上昇し、IC50 はそれぞれ 118、9.5、2.5 μg/ml であった。また Metformin と buformin はそれぞれ 2.5、5.0、12.5、25、50mg/kg/hr、phenformin は 1.0、2.5、5.0、12.5、25mg/kg/hr の dose において infusion 定常状態下での各化合物の血中濃度、1 時間ごとに尿、胆汁排泄量を測定した。その結果、各化合物において非線形体内動態が示し、それぞれの最小 dose において尿排泄量は metformin 80.8%, buformin 72.3%, phenformin 25.9%であり、胆汁中の排泄は測定限度以下であった。この結果は今まで報告されたヒトにおける検討結果はほぼ一致である。また最小 dose における腎クリアランス（CLrenal）はそれぞれ 1497、1381、1078 ml/kg/hr であり、腎固有クリアランスはそれぞれ 2088、1752、642 ml/kg/hr であった。腎クリアランスは糸球体濾過率（GFR）の指標であるイヌリンクリアランスの 520 ml/kg/hr よりはるかに高く、腎で能動的な排泄を受けることが分かった。 ヒトにおいて metformin と cimetidine との併用により metformin 血中濃度が上昇すると報告されたので、そこでラットにおいても検討した。0.9 mg/kg/hr の infusion dose において metformin だけ投与時の CLrenal の 2780 ml/kg/hr に対し、cimetidine 50 mg/kg/hr の共投与下の CLrenal は 576 mg/kg/hr と約 1/5 に低下した。Cimetidine はラットにおいて有機アニオントランスポーター 3（oat3）と有機カチオントランスポーター 1（oct1）により輸送されると報告され、metformin は roct1 により輸送される可能性が示唆された。そこでラット肝臓から RT-PCR 法により roct1 をクローニングし、発現ベクター pcDNA3.1 に組み込んで chinese hamster ovary (CHO) 細胞に transfection した。rOct1 の発現は northern blot により確認し、取込み活性は oct ファミリーの典型基質である tetraethylammonium (TEA) の取込みにより確認した。速度論的解析により、Km 値は 84 μM で今までの報告を大差はなかった。そこで roct1 発現細胞を用い、ビグアニド各化合物の取込みを行った。Metformin、buformin、

phenformin において Km はそれぞれ 393、52.7、15.9 μM で、Vmax は 1424、294、152 pmol/min/mg protein であった。さらに TEA と同じトランスポーターによる輸送されるかを検討するため、各化合物の roct1 に対する TEA 取込みの阻害効果を検討した。Ki 値はそれぞれ 513、46.1、5.20 μM と Km 近い値であった。これで三つの化合物とも roct1 の基質であり、roct1 により細胞中に取り込まれることが明かとなった。ビグアニドの投与により血中乳酸値の上昇は主に肝ミトコンドリアでの呼吸鎖の阻害により嫌気性産物の乳酸の蓄積によると近年報告されている。Oct ファミリーは肝臓において oct1 の発現が一番高く、roct1 の輸送能力を表す Vmax/Km 値はそれぞれ 3.62、5.59、9.55 μl/min/mg protein で、phenformin>buformin>metformin の順である。この結果は乳酸値上昇の結果と一致しており、roct1 血管側からの能動的な輸送によりビグアニドは血中から肝臓に入って、呼吸鎖を阻害し乳酸アシドーシスを引き起こす可能性が示唆された。

しかし、roct1 Vmax/Km の順は腎固有クリアランスとの順が逆であり、ビグアニド化合物の腎での排泄機構は roct1 で完全に説明できなくなり、roct1 以外のメカニズムがこれら化合物の腎排泄能力の違いを決定することが示唆された。ラット腎臓では、roct1 だけでなく、roct2、roct3 も近位尿細管に発現し、カチオン性の内因性および外因性物質の腎排泄を司ると報告されており、しかも roct2 の発現量は roct1 より多く、roct2 and/or roct3 がビグアニド化合物の腎排泄に主に関与する可能性が考えられる。また、管腔側に roctn1 と roctn2 により分泌および再吸収を受ける可能性も否定できない。今後ラット腎スライス、遊離肝細胞を用いた取込み輸送実験、roct1 ノックアウトマウス、roct2 ノックアウトマウスおよび roct1 and roct2 ダブルノックアウトマウスの検討によりさらに検討を加え、ビグアニド系化合物の体内分布、排泄機構を明らかにし、さらに human OCT1 (hOCT1)、hOCT2、hOCT3 細胞発現系、ヒト遊離肝細胞、ヒト腎スライスなどの in vitro 実験系の検討により動物からヒトへと bridging し、新規経口糖尿病治療薬の開発に貢献したい。

日本財団補助金による
２０００年度日中医学学術交流促進事業

⑤．在留中国人研究者研究助成

(20)一過性虚血及び抗コリン薬スコポラミン誘発の学習障害に対する釣藤散の改善作用

一過性虚血及び抗コリン薬スコポラミン誘発の学習障害に対する釣藤散の改善作用

張紹輝

富山医科薬科大学
和漢薬研究所
生物試験部門

要旨

最近、二重盲検法の臨床試験では、脳血管性痴呆患者に対して釣藤散が有効であることが報告された。今回、我々は両側総頚動脈を一時的に結紮後再開通（2VO）あるいは scopolamine を前処置したマウスにみられる学習障害に対する釣藤散及びその構成生薬釣藤鈎の作用について検討した。釣藤散及び釣藤鈎の水エキスは2VOまたはscopolamineにより誘発した学習障害を改善した。また、両側総頚動脈を一時的に結紮後再開通により誘発した空間学習障害に対して日本市場に流通している中国江西省産、貴州省産及び広西自治区の釣藤鈎のメタノールエキスの作用についても検討した。江西省産の釣藤鈎には改善作用は認められなかったが、貴州省産及び広西自治区の釣藤鈎のメタノールエキスは空間学習障害を改善した。

Key words: 釣藤散、釣藤鈎、水エキス、メタノールエキス、2VO、 scopolamine、受動的回避学習障害、空間学習障害、

目的

釣藤散は『普済本事方』に記載され、石膏5g、菊花3g、釣藤鉤3g、陳皮3g、人参3g、麦門冬3g、防風3g、茯苓3g、半夏3g、甘草1g、生姜1gの11種類の生薬から構成される。肝の邪気が盛んなことによって生じる頭痛、めまい、肩こり、神経症などの症状の治療に用いられる。最近、二重盲検法の臨床試験では、脳血管性痴呆患者に対して釣藤散が有効であることが報告された（1, 2）。そこで、今回、 両側総頚動脈を一時的に結紮後再開通あるいはスコポラミンを前処置したマウスにみられる学習障害に対する釣藤散及びその構成生薬釣藤鉤の作用について検討した。また、日本市場に流通している江西省産、貴州産及び江西省の釣藤鉤の作用についても検討した。

実験材料と方法

使用動物

実験にはICR系雄性マウス（7週齢）を日本エスエルシー（株）（静岡）より購入し、約1週間、飼育室の飼育環境に慣らした。マウスは1ケージ当たり9-10匹を同居させ、12時間の明暗周期、恒温（25±1℃）恒湿（55±5%）で飼育した。

生薬の調製

釣藤散および釣藤鉤をそれぞれ10倍の蒸留水中で、100℃、1時間加熱抽出し、棉栓で濾過した。濾液は液体窒素で凍結し、凍結乾燥した。3種類釣藤鉤のメタノールエキスはツムラ会社から提供された。

両側総頚動脈の結紮と再開通（2VO）

Urethane（1.5 g/kg、東京化成、東京）麻酔下で、マウスの頸部を切開し、切開口より左右の総頚動脈を注意深く露出し、両動脈を同時に絹製縫合糸で結紮した。また、マウスの尾部の先端より1cmを切開し、0.3mlを瀉血した。結紮20分後に、結紮を解放して、血流を再開した。両側総頚動脈を結紮後再開通したマウスを2VO群とした。また、結紮及び瀉血は行わずに同様の手術を施したマウスをshamとした。釣藤散の水エキス、釣藤鉤の水及びメタノールエキス等は2VO処置の1時間前に経口投与した。2VO処置の2日後に訓練試行、さらに1日後に保持試行を行った。

受動的回避学習課題（Step-down）

装置（30×25×25 cm）は床グリットとその一角に設置した円形プラットホーム（直径4.5 cm 、高さ4.5 cm）からなり、グリットは電気刺激を与えるための刺激装置に接続した。

訓練試行では先ずマウスを装置のプラットホーム上に置き、最初の3分間は慣らし時間とした。続く5分間を訓練試行とし、マウスが床グリットに降りる毎に、プラットホームに上がるまで連続的な電気ショック（0.4 mA）を与えた。訓練試行の24時間後に保持試行を行った。マウスをプラットホームに置き、床におりるまでの潜時（Step-down latency）を記録した。

Morris water maze

直径70 cm、高さ28 cmの円形プールに高さ13 cmまで水（水温25±1 ℃）をいれた。プールは4象限に分けられ、直径5 cmのプラットフォームは、そのうちの一つの象限の水面下1 cmに固定した。60秒の訓練試行では、マウスを壁に向け、プールの中へ静かに投入し、プラットフォームに逃避するまでの遊泳時間（Escape latency）を記録した。1日4試行（1 Blockとした）、合計5日間行った。マウスが水迷路学習を獲得したら、

プラットフォームをプールから取り出し、マウスを再度プールに60秒程度入れ、プラットフォームの存在した象限における遊泳時間（Swimming time in the platform section）を測定した。本試行開始前および終了後に、プラットホームを見える状態（水面上1 cm）に設定して偽試行（Probe trial 1, 2）を行った。

薬物処置

釣藤散の水エキス、釣藤鉤の水及びメタノールエキスはそれぞれ 2VO の 1 時間前に経口投与した。Scopolamine hydrobromide (Sigma Chemical Co., St. Louis, 米国) は訓練試行の15分前に腹腔内投与した。Tacrine (9-smino-1,2,3,4-tetrahydroacridine HCl; Sigma Chemical Co., St, Louis, 米国）は訓練試行または2VOの60分前に腹腔内投与した。

統計処理

受動的回避学習課題で得られた Step-down latency は Mann-Whitney's U-test で群間の比較を行った。Morris water maze で得られた Escape latency は Two-way repeated measure ANOVA で群間の比較を行い、Swimming time in the platform section は Mann-Whitney's U-test で群間の比較を行った。有意水準は $P<0.05$ とした。

結果

1、2VO 及び Scopolamine 誘発の受動的回避学習障害に対する釣藤散及び釣藤鉤の作用

両側総頚動脈を一時的に結紮後再開通したマウスにおいては Step-down latency が sham 群に比べ有意に減少した（$P<0.01$）。釣藤散（750- 6000 mg/kg）を2VO処置の1時間前に経口投与しておくと、 Step-down latency の減少が抑制された（Fig. 1）。釣藤鉤（75- 600 mg/kg）も Step-down latency の減少を有意に改善した（Fig. 2）。一方、 Scopolamine の投与により認められる Step-down latency の有意な減少は釣藤散（750- 6000 mg/kg）の前処置により抑制された（Fig. 3）。釣藤鉤（150- 600 mg/kg）も Scopolamine 誘発した Step-down latency の減少を改善した（Fig. 4）。標準薬（2.5 mg/kg）は Scopolamine 誘発した Step-down latency の減少を有意に改善した（Fig. 5）。

2、2VO 誘発の学習障害に対する釣藤散及び釣藤鉤の水エキスの作用

2VO処置したマウスにおいては Escape latency が sham 群に比べ有意に増加し、逆に Swimming time in the platform section は低値を示した。釣藤散（750- 6000 mg/kg）を2VO処置の1時間前に経口投与しておくと、Escape latency の増加と Swimming time in the platform section の減少共に抑制した（Fig. 6）。釣藤鉤（75- 600 mg/kg）も Escape latency の増加を有意に回復し、Swimming time in the platform section の減少を抑制した（Fig. 7）。

3、2VO 誘発の学習障害に対する釣藤鉤メタノールエキスの作用

2VO処置したマウスにおいては Escape latency が sham 群に比べ有意に増加し、逆に Swimming time in the platform section は低値を示した。S-Type の釣藤鉤のメタノールエキス（60 mg/kg）及び SR-Type の釣藤鉤のメタノールエキス（60 mg/kg）は Escape latency の増加と Swimming time in the platform section の減少を共に抑制した（Fig. 8, 9）。R-Type の釣藤鉤のメタノールエキスの改善作用が認められなかった（Fig. 10）。標準薬（2.5 mg/kg）は2VO誘発した Escape latency の増加と Swimming time in the platform section の減少を有意に改善した（Fig. 11）。

考察

偽試行１、２においては、マウスがプラットホームに上るまでの潜時においては、各群の間では、有意な差は認められなかったため、虚血一再開通手術または薬の前処置はマウスの自発運動に影響を及ぼさないと考えられた。Block 1においては、プラットホームを水面下1 cmに設定し、偽試行1のプラットホームが見える状態と比較すると、マウスはプラットホームに上るまでの潜時が有意に延長したため、プラットホームが完全に見えないと考えられた。

本実験では、虚血マウスにみられる学習障害に対する釣藤散の効果を検討した。虚血により、訓練試行においては、プラットホームに上る潜時が有意に増加された。6日目においては、プラットホームを設けた象限で水泳時間が減少された。釣藤散は虚血一再開通手術の1時間前に経口投与しておくと、これらの障害を有意に抑制し、釣藤散及釣藤鉤水エキスが予防作用を有することが認められた。

一時的な脳虚血異常状態になると、酸素とグルコースの供給が絶たれるためエネルギー枯渇に陥った結果、脳機能は一時的あるいは永久的に障害を受け（3-5）、学習障害をおこす。虚血性脳血管障害では、赤血球集合能亢進、赤血球変形能低下、白血球変形能低下などが観察され、釣藤散の投与することにより、これらの現象が抑制され、血流速度や血流量が増加し、虚血性脳血管障害を改善すると考えられる（6）。一過性脳虚血の処置により、マウス脳内のアセチルコリンの含量は低下することが報告されており（7）、2VOマウスの学習行動障害に対する予防作用にはコリン神経系の役割が大きいと推測される。一方、中枢神経系においては、グルタミン酸は重要な神経伝達物質として学習記憶に重要な役割を果たしているが、一過性脳虚血の状態では、細胞外グルタミン酸濃度が著しく上昇し、シナプス後膜ニューロンでは、グルタミン作動性のイオンチャネルや膜電位依存性イオンチャネルが開口し、細胞外からCa^2の流入と細胞内の小胞体からCa^2の流出が起こり、遅発性神経死に至ることが知られている（8, 9, 10）。このグルタミン酸誘導神経細胞死に対して、釣藤散は抑制する傾向がみられた。釣藤散の構成生薬のうち、釣藤鉤のみ、グルタミン酸によるカルシウムの細胞内への流入を有意に阻害し、この細胞死に対する保護作用が認められた（11）。また、釣藤鉤は抗酸化作用ならびにフリーラジカル除去作用を持ち（12）、学習障害を改善すると推測される。

日本市場で鉤藤（*Uncaria rhynchophylla*）、華鉤藤（*U, sinensis*）、大葉鉤藤（*U. macrophylla*）3種類の釣藤鉤が流通しており、その薬効は含まれるアルカロイド成分の違いに関与していると報告された。これらの釣藤鉤は含有する成分を統計的に3種類のケモタイプ（S-Type, SR-Type R-Type）に分類された（13, 14, 15）。そこで、一過性脳虚血による学習障害に対するこの3種類釣藤鉤のメタノールエキス（トータルアルカロイド）の効果について検討した。 S-Type, SR-Type 釣藤鉤のメタノールエキスには、一過性脳虚血による学習障害に対する釣藤散および釣藤鉤水エキスと同様に改善作用が認められたが、R-Typeのメタノールエキスには、改善効果は見られなかった。今後、 一過性虚血による学習障害に対するS-Type, SR-Typeの釣藤鉤に含まれるインドール型叉はオキシインドール型アルカロイドの効果についての検討、作用機序の解明が必要と考えられる。

Reference

1) Shimada Y., Terasawa K, et al.: A well-controlled study of Choto-san and placebo in the treatment of vascular dementia.

J. Traditional Medicine. 11: 246-255, 1994.

2) Terasawa K, et al.: Choto-san in the treatment of vscular dementia: a double-blind, placebo controlled study. Phytomedicine. 4: 15-22, 1997.

3) Gorelick PB. Status of risk factors for dementia associated with stroke. Stoke. 28: 459-463, 1997.

4) Nyenhuis DL., Gorelick PB. Vascular dementia: a contemporary review of epidemiology, diagnosis, prevention and treatment. Journal of the American Geriatrics Society. 46: 1437-1448, 1998.

5) Tatemichi TK., Desmond DW., Paik M., Figueroa M., Gropen TI., Stern Y., Sano M., Remien R., Williams JB ., Mohr JP. Clinical determinants of dementia related to stroke. Annals of Neurology. 33: 291-298, 1990.

6) Yang Q., Kita T., Hikiami H., Shimata Y., Itou T., Terasawa K.: Effects of Choto-san on microcirculation of the bulbar conjunctiva and hemorheological factors in the patients with asymptomatic cerebral infarction. J. Traditional medicine. 15: 412-413, 1998.

7) Xu J., Murakami Y., Matsumoto K., Tohda M., Watanabe H., Zhang s., Yu Q., Shen J.: Protective effect of Oren-gedoku-to (Huang-Lian-Jie-Du-Tang) against impairment of learning and memory induced by transient cerebral ischemia in mice. J. Ethnopharmacol. 73 (3): 405-413, 2000.

8) Meldrum B, Garthwaite J. Excitatory amino acid neurotoxicity and neurodegenerative disease. Trends Pharmacol Sci.11 (9): 379-87, 1990.

9) Benveniste H., Drejer J., Schousboe A., Diemer NH.: Elevation of the extracellular concentrations of glutamate and aspartate in rat hippocampus during transient cerebral ischemia monitored by intracerebral microdialysis. J Neurochem. 43 (5): 1369-74, 1984.

10) Rothman SM, Olney JW. Glutamate and the pathophysiology of hypoxic--ischemic brain damage. Ann Neurol. 19 (2): 105-11, 1986.

11) Shimada Y., Hashiba M., Goto H., Kogure T., Shibahara N., Itoh T., Terasawa K.: Protective effect of *Uncaria sinensis* on glutamate-induced acute neuronal death in cultured rat cerebellar granule cells. J. Traditional medicine. 15: 241-244, 1998.

12) Liu J, et al.: Oretreatment with Tenma and chotoko extracts on striatal monoamines and lipid peroxides in iron-induced acute epileptic rats. J. med. Pharm. Soc. WAKAN-YAKU. 9: 202-208, 1992.

13) Sakakibara I., Takahashi H., Yuzurihara Y., Katoh T., Kubo M., Hayashi K., Ishige A., Amagaya S., Okada M., Maruno M.: Pharmacognostical and pharmacological evaluations of *Uncaria sinensis* (Rubiaceae). Natural Medicines. 51 (2): 79-83, 1997.

14) Sakakibara I., Takahashi H., Terabayashi S., Yuzurihara Y., Kubo M., Higuchi M., Ishige A., Komatsu Y., Maruno M., Okada M.: Chemical and pharmacological ecalutions of Chinese crude drug "Gou-teng". Natural Medicines 52 (4):

353-359, 1998.

15) Sakakibara I., Terabayashi S., Kubo M., Higuchi M., Ishige A.,Sasaki H., Okada M.: Evaluation of Gou-teng (Hook and stems of Uncariae plants) III. Hypotensive principle from *uncaria rhychophylla* and alteration of its content on extraction process. Natural Medicines 53 (6): 308-312, 1999.

Choto-san improves acquisition impairment caused by transient cerebral ischemia in the step-down test

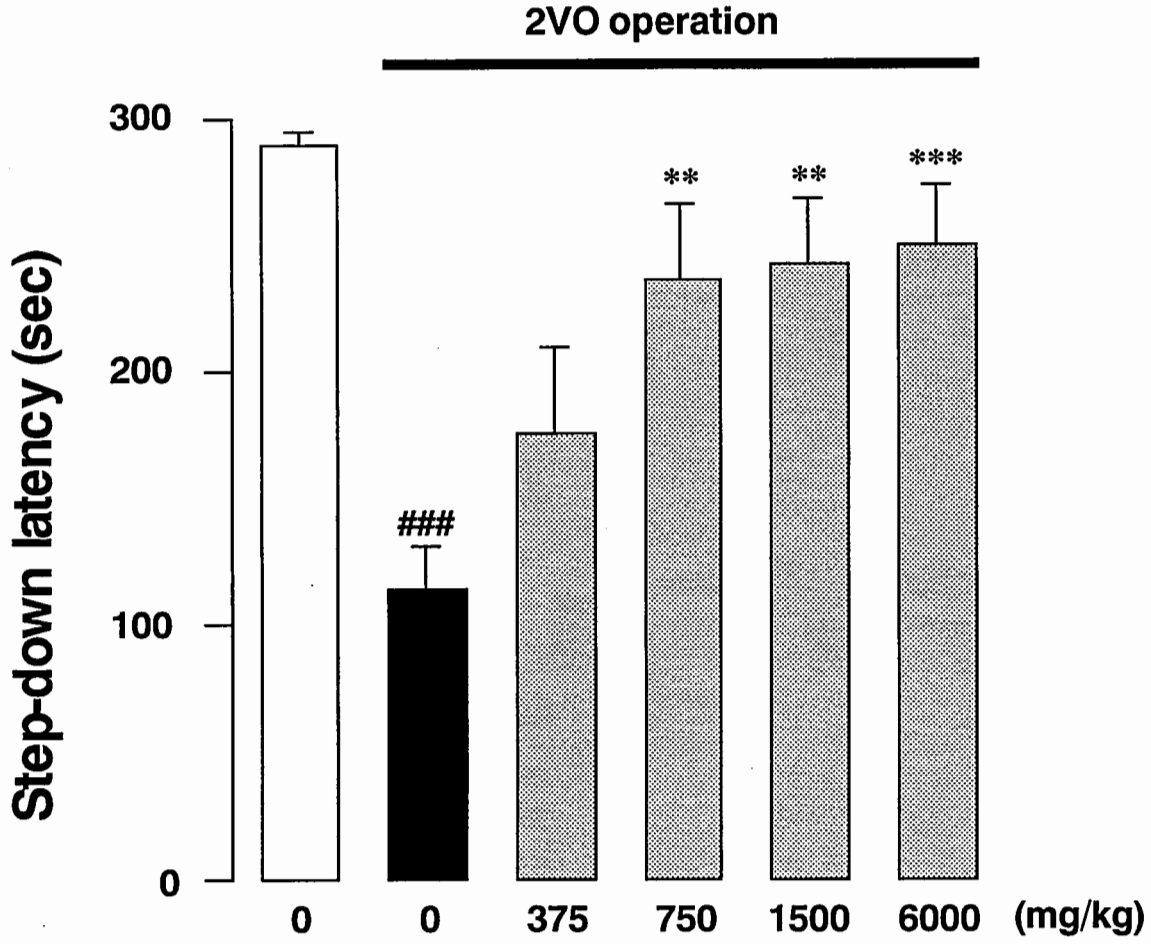


Fig. 1. Effect of Choto-san on acquisition impairment caused by transient cerebral ischemia in the step-down test in ICR mice. Maze training was started 2 days after 2VO. Choto-san was administered 60 min before 2VO. Each column represents the mean+S.E.M. (n= 9-19). ### P< 0.001 vs. sham group; ** P< 0.01 *** P< 0.001 vs. 2VO alone.

Chotoko improves acquisition impairment caused by transient cerebral ischemia in the step-down test

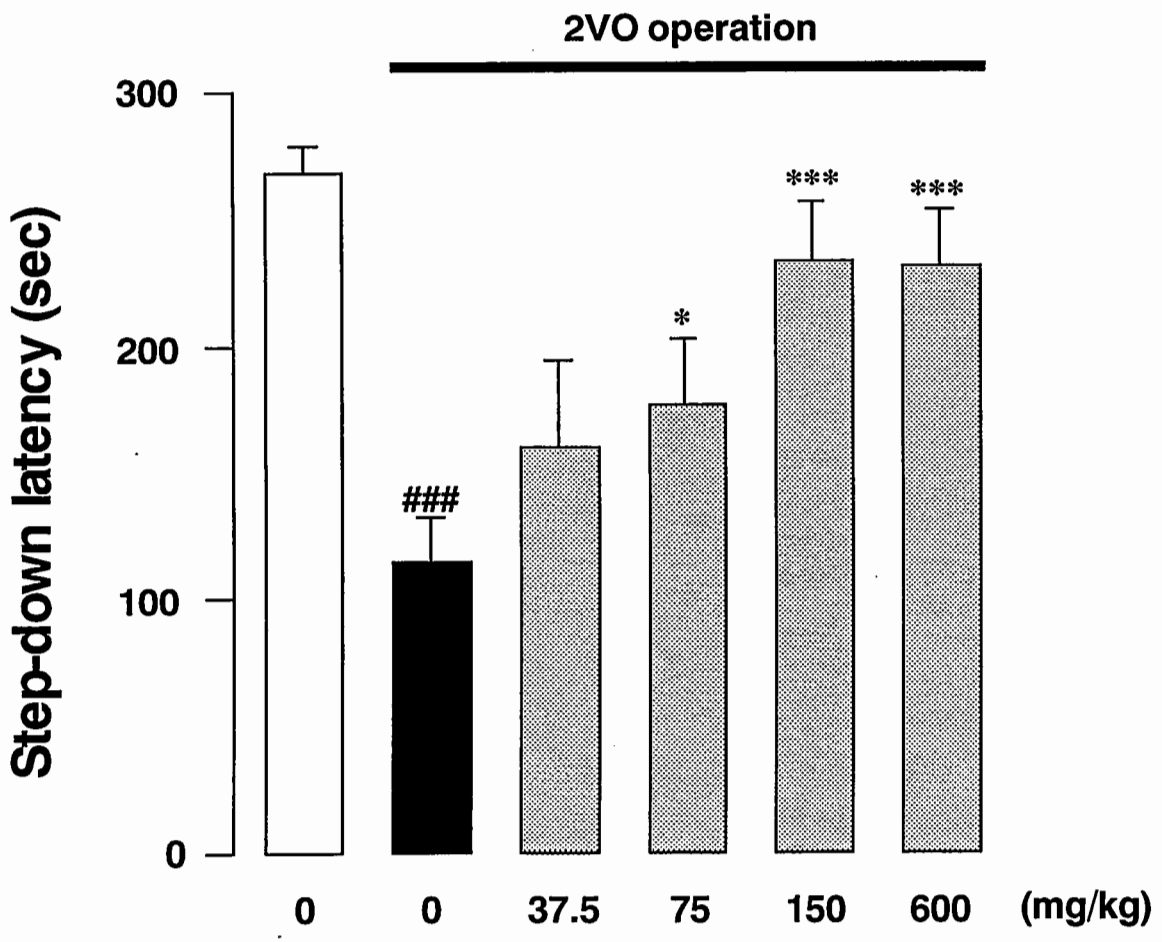
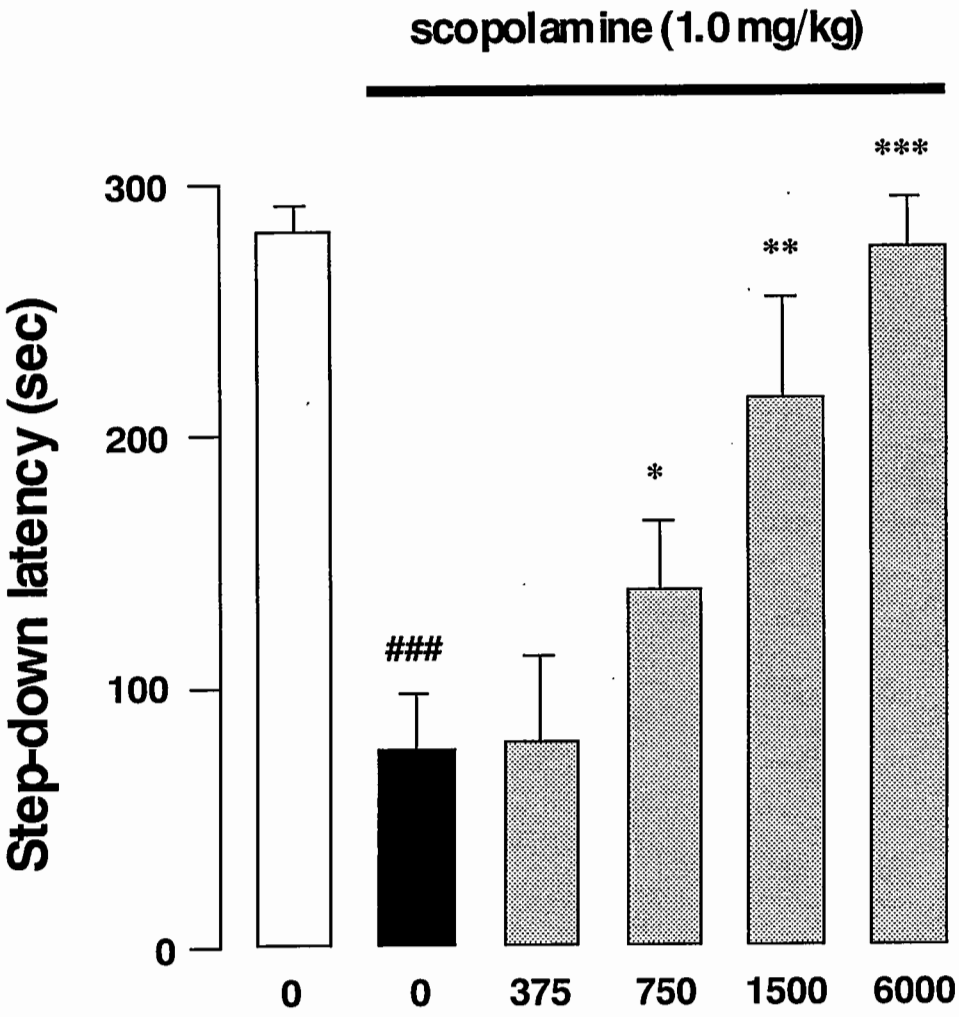


Fig. 2. Effect of Chotoko on acquisition impairment caused by transient cerebral ischemia in the step-down test in ICR mice. Maze training was started 2 days after 2VO. Chotoko was administered 60 min before 2VO. Each column represents the mean+S.E.M. (n= 9-20). ### P< 0.001 vs. sham group; * P< 0.05, * P< 0.05, *** P< 0.001 vs. 2VO alone.

Choto-san improves acquisition impairment caused by scopolamine in the step-down test



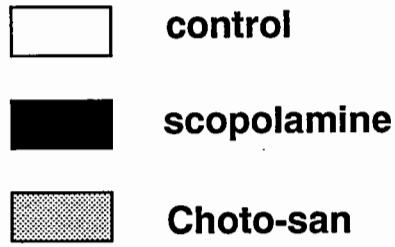


Fig. 3. Effect of Choto-san on scopolamine-induced amnesia in the step-down test in ddY mice. Choto-san was administered 60 min prior to the training trial. Scopolamine was injected 15 min prior to the training trial. Each column represents the mean+S.E.M. (n= 9-16). ### $P < 0.001$ vs. control group; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs. scopolamine alone.

Chotoko improves acquisition impairment caused by scopolamine in the step-down test

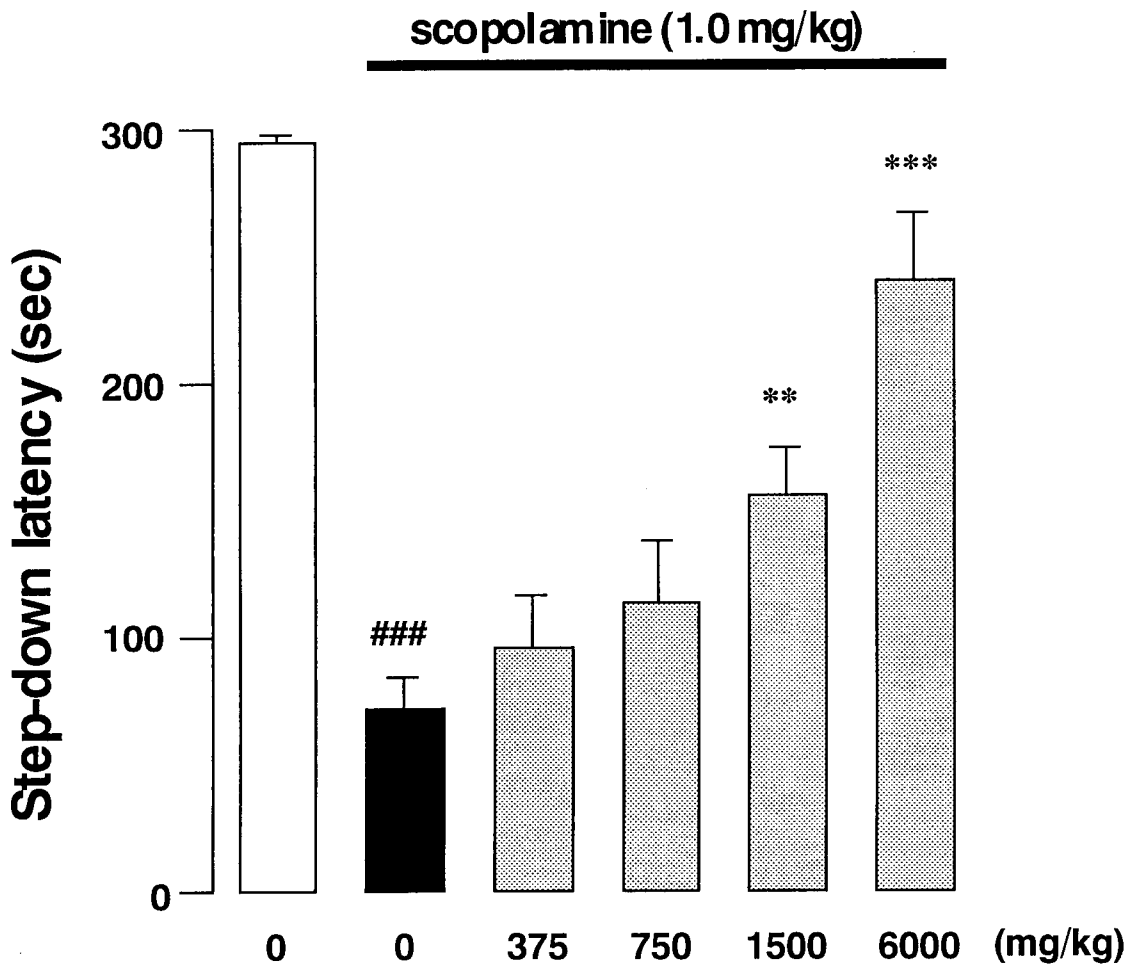


Fig. 4. Effect of Chotoko on scopolamine-induced amnesia in the step-down test in ddY mice. Chotoko was administered 60 min prior to the training trial. Scopolamine was injected 15 min prior to the training trial. Each column represents the mean+S.E.M. (n= 9-16). ### P< 0.001 vs. control group; ** P< 0.01 *** P< 0.001 vs. scopolamine alone.

Tacrine improves acquisition impairment caused by scopolamine in the step-down test

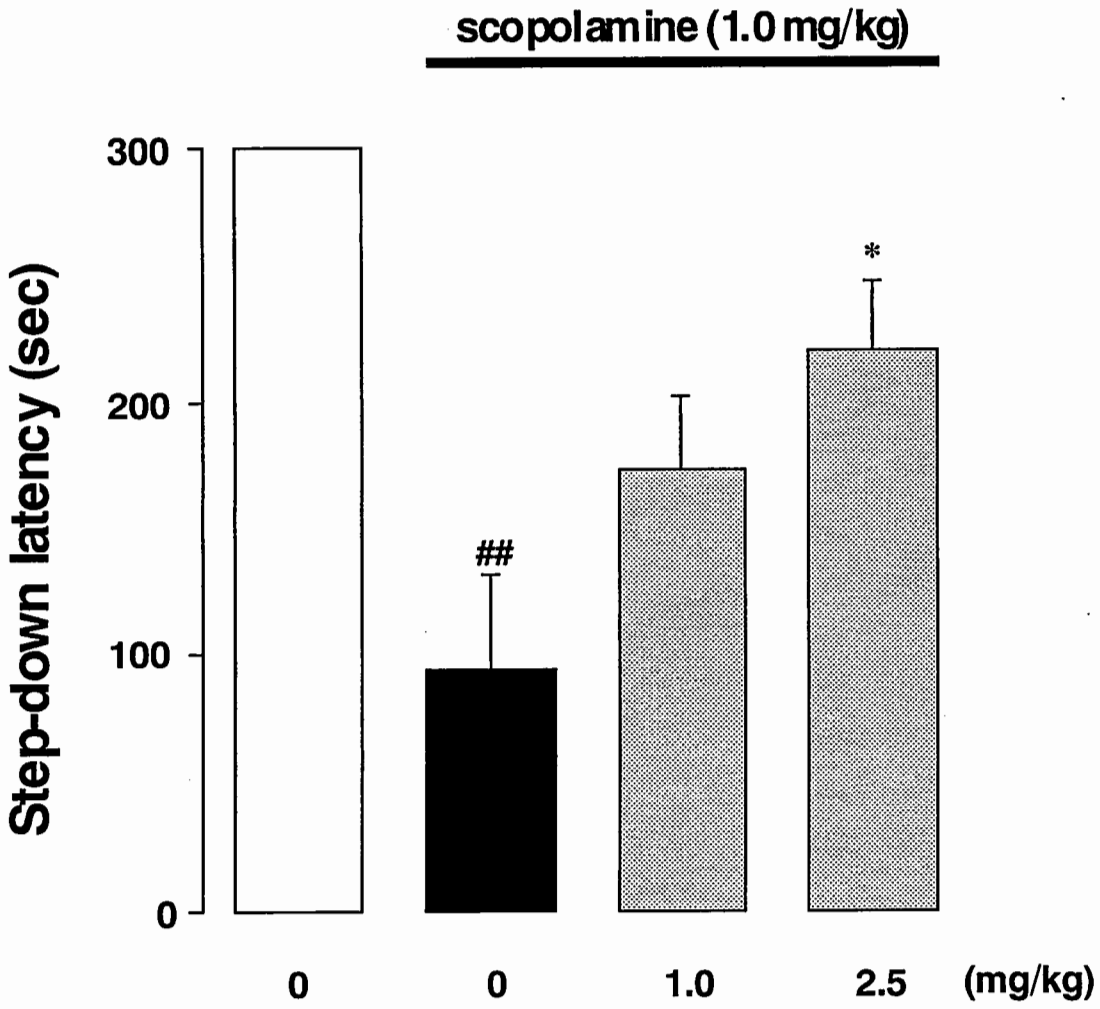


Fig. 5. Effect of Tacrine on scopolamine-induced amnesia in the step-down test in ddY mice. Tacrine was administered 60 min prior to the training trial. Scopolamine was injected 15 min prior to the training trial. Each column represents the mean+S.E.M. (n= 8-9). ## P< 0.001 vs. control group; * P< 0.05 vs. scopolamine alone.

Choto-san improved transient cerebral ischemia-induced impairment of Morris water maze performance

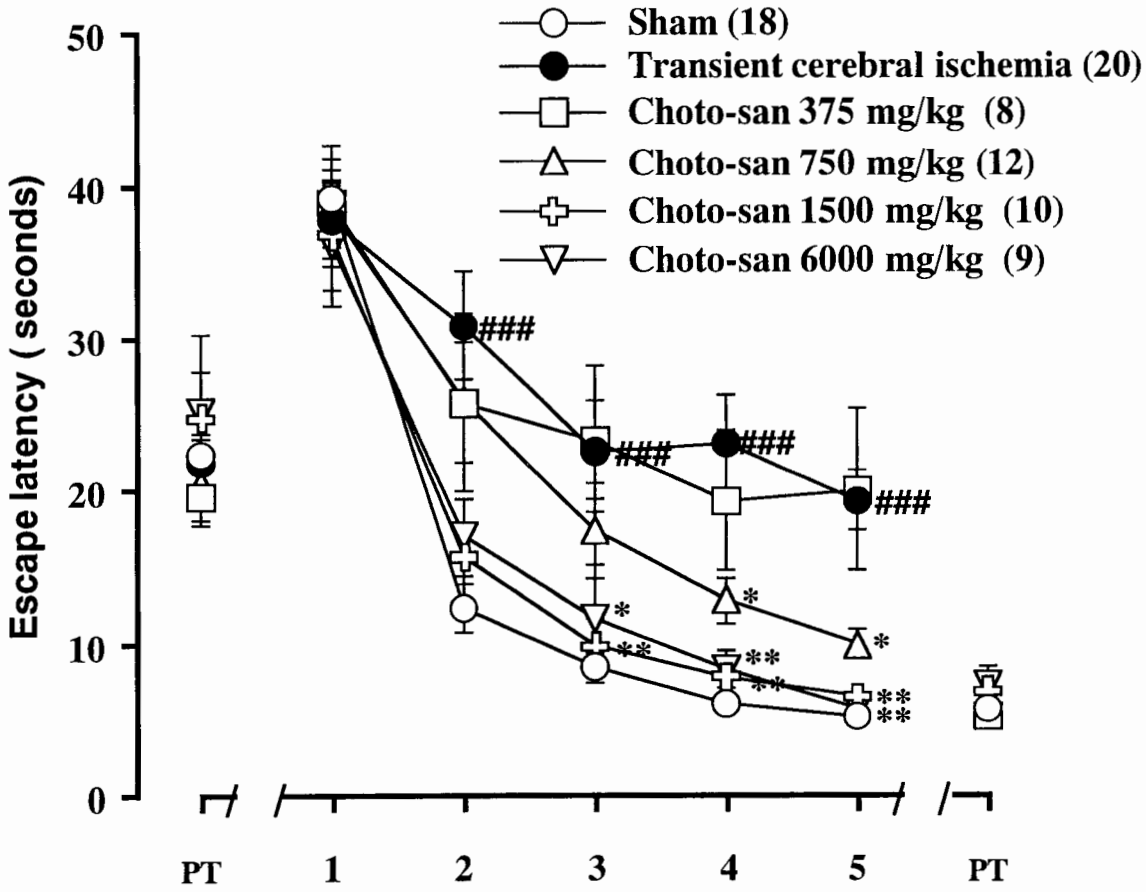
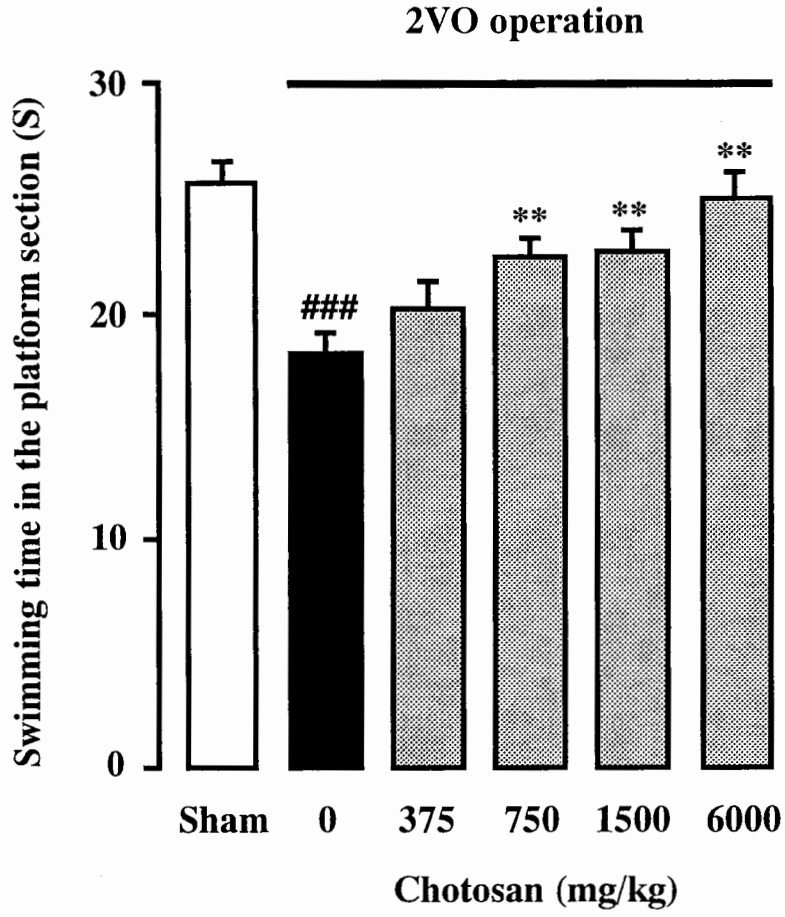


Fig. 6. Effect of Chotosan on transient cerebral ischemia- induced impairment on Morris water maze performance in ICR mice. Chotosan (0-6000 mg/kg) was administered 60 minutes before the operation. 2 days after the operation, the trial test was performed. Each point represented the mean of mice. ### P<0.01 vs. sham group. * P< 0.05, ** P< 0.01 vs. 2VO alone. PT: probe trial.



On the 6th days, the platform was removed. Mice were allowed to swimming in the water maze for 1 minute. The swimming time in the platform section were recorded. Each column represents the mean+ S. E. M. ### P<0.001 vs. sham group. * P< 0.05, ** P< 0.01 vs. transient cerebral ischemia.

Chotoko improves transient cerebral ischemia-induced impairment of Morris water maze performance

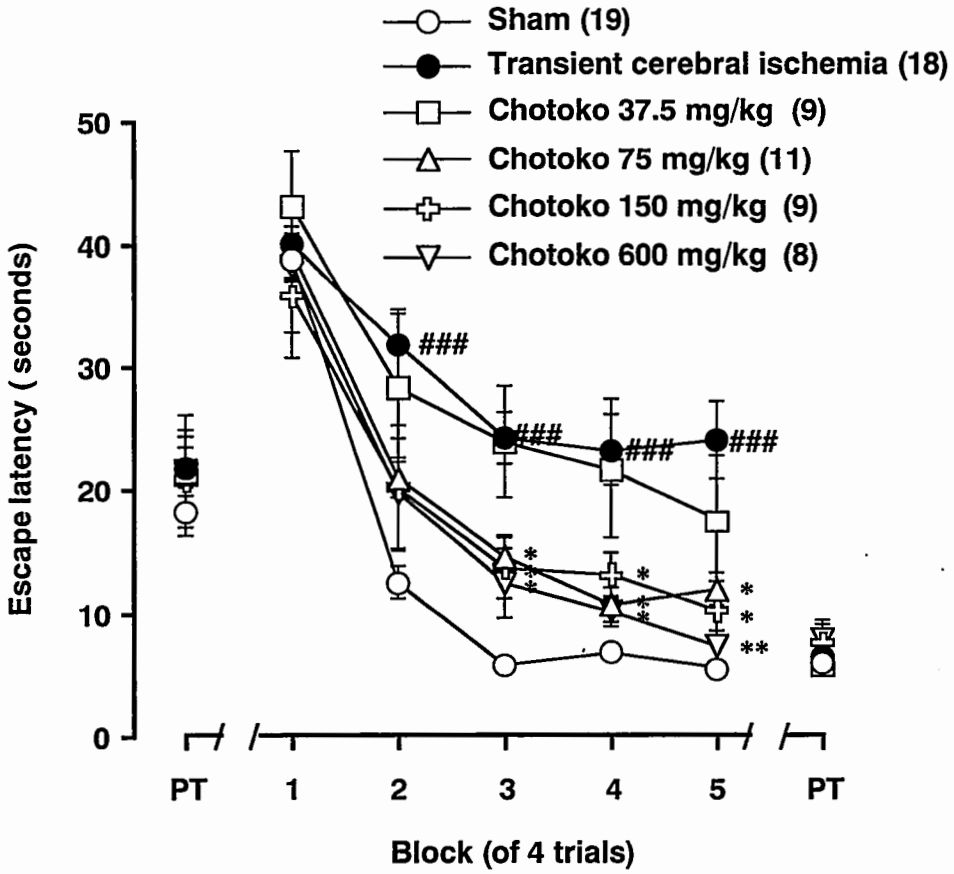
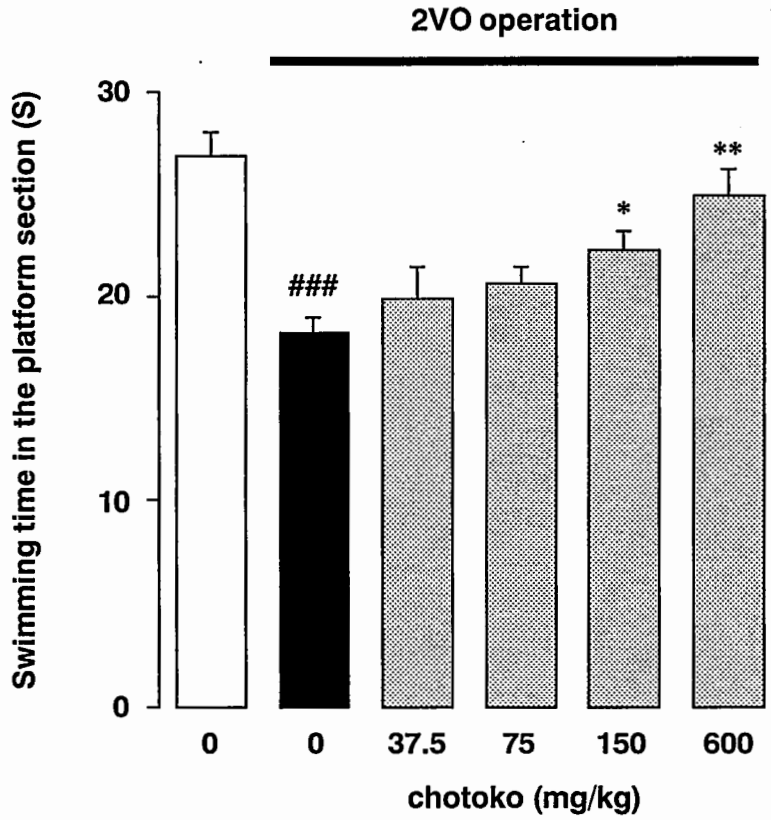


Fig. 7. Effect of Chotoko on transient cerebral ischemia (2VO)-induced impairment on Morris water maze performance in ICR mice. Chotoko was administered 60 minutes before the operation. 2 days after the operation, the trial test was performed. Each point represented the mean of mice. ### P<0.01 vs. sham group. * P< 0.05, ** P< 0.01 vs. 2VO alone. PT: probe trial.



On the 6th days, the platform was removed. Mice were allowed to swimming in the water maze for 1 minute. The swimming time in the platform section were recorded. Each column represents the mean+S. E. M. ### P<0.001 vs. sham group. * P< 0.05, ** P< 0.01 vs. 2VO alone.

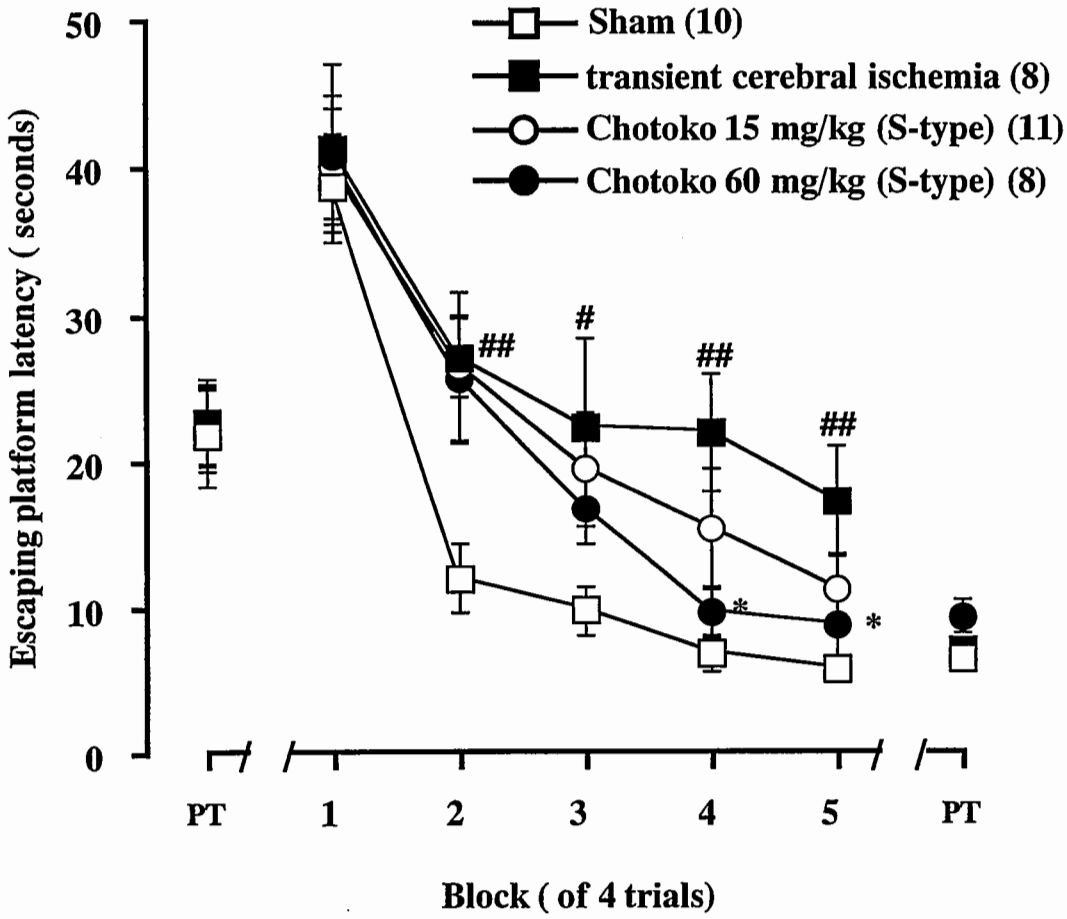
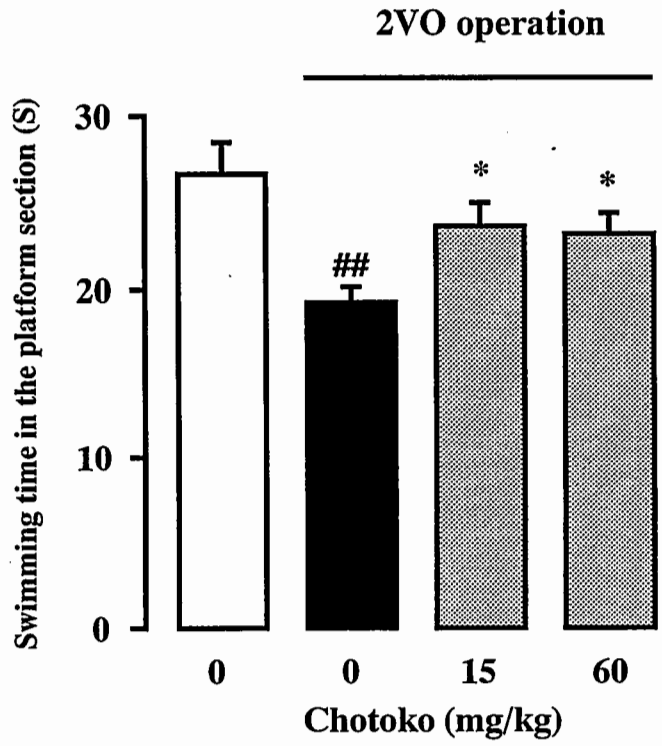


Fig. 8. Effect of Chotoko extract (S-Type) on transient cerebral ischemia- induced impairment on Morris water maze performance in ICR mice. Chotoko (0, 15, 60 mg/kg) was administered 60 minutes before the operation. 2 days after the operation, the trial test was performed. Each point represented the mean of 8-11 mice. # P<0.05, ## P<0.01 vs. sham group, * P<0.05 vs. transient cerebral ischemia group. PT: probe trial.



On the 6th days, the platform was removed. Mice were allowed to swimming in the water maze for 1 minute. The swimming time in the platform section were recorded. Each column represents the mean+ S. E. M. ## P<0.01 vs. sham group, * P<0.05 vs. 2VO group.

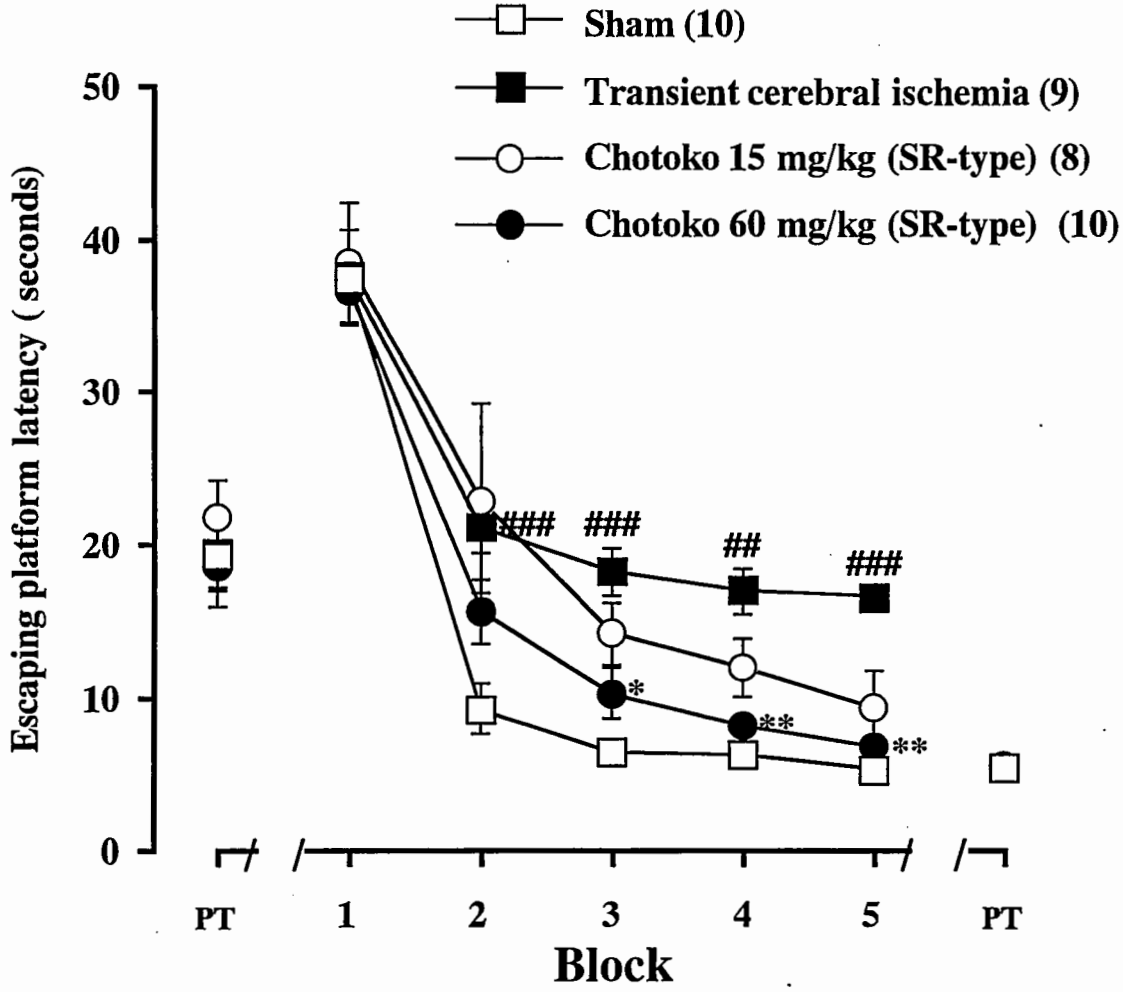
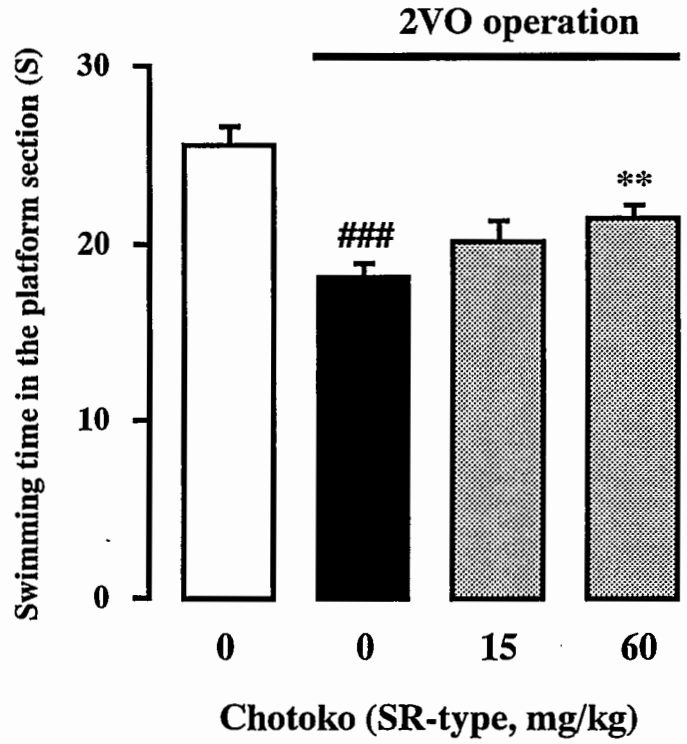


Fig. 9. Effect of Chotoko extract (SR-Type) on transient cerebral ischemia- induced impairment on Morris water maze performance in ICR mice. Chotoko (0, 15, 60 mg/kg) was administered 60 minutes before the operation. 2 days after the operation, the trial test was performed. Each point represented the mean of 8-10 mice. ## P<0.01, ### P<0.001 vs. sham group. ** P<0.01 vs. transient cerebral ischemia group. PT: probe trial.



On the 6th days, the platform was removed. Mice were allowed to swimming in the water maze for 1 minute. The swimming time in the platform section were recorded. Each column represents the mean+ S. E. M. ### P<0.001 vs. sham group, ** P<0.01 vs. transient cerebral ischemia group.

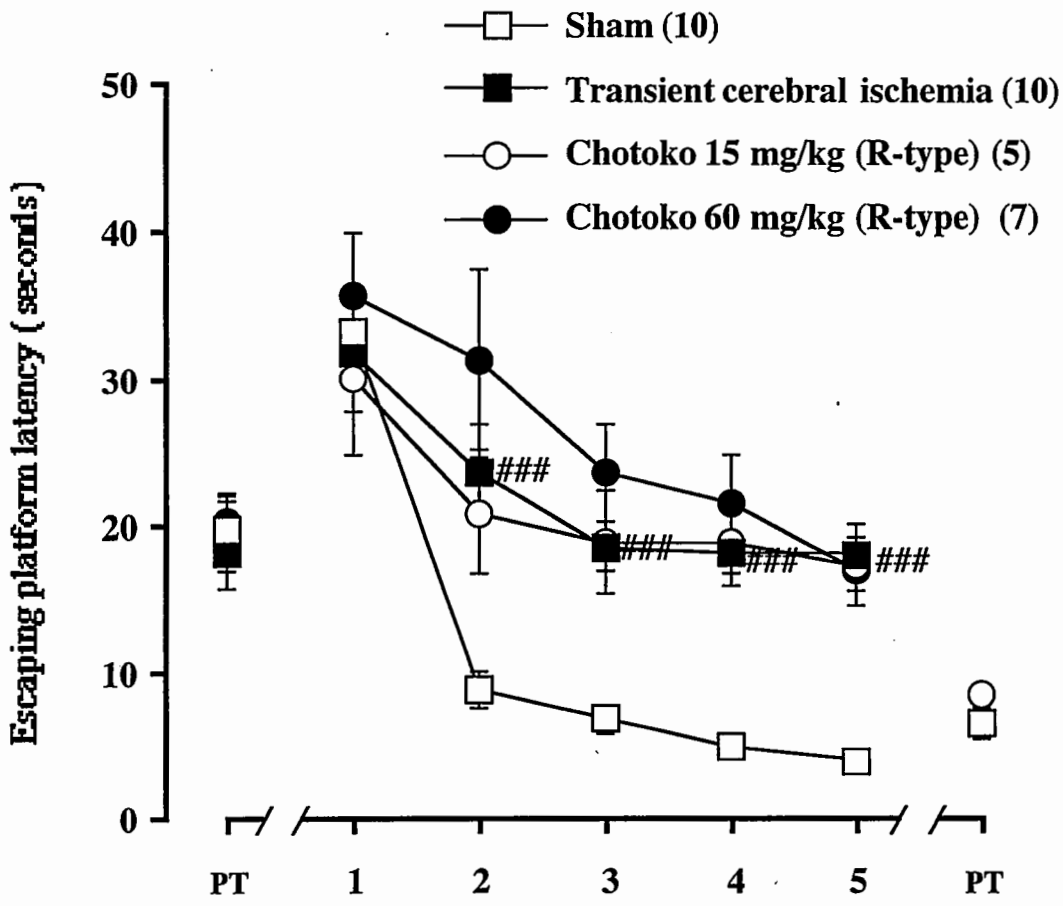
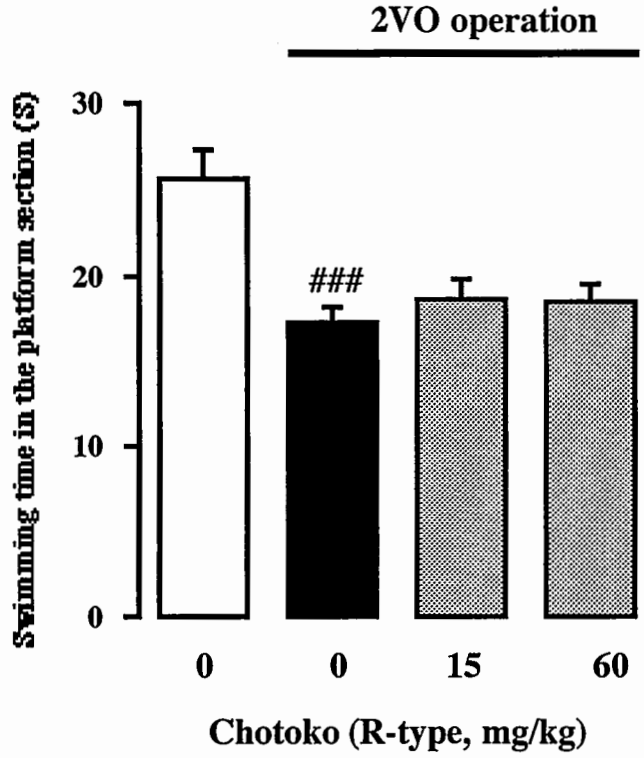


Fig. 10. Effect of Chotoko extract (R-Type) on transient cerebral ischemia- induced impairment on Morris water maze performance in ICR mice. Chotoko (0, 15, 60 mg/kg) was administered 60 minutes before the operation. 2 days after the operation, the trial test was performed. Each point represented the mean of 5-10 mice. ### P<0.01 vs. sham group. PT: probe trial.



On the 6th days, the platform was removed. Mice were allowed to swimming in the water maze for 1 minute. The swimming time in the platform section were recorded. Each column represents the mean+ S. E. M. ### P<0.001 vs. sham group.

Tacrine improves transient cerebral ischemia-induced impairment of Morris water maze performance

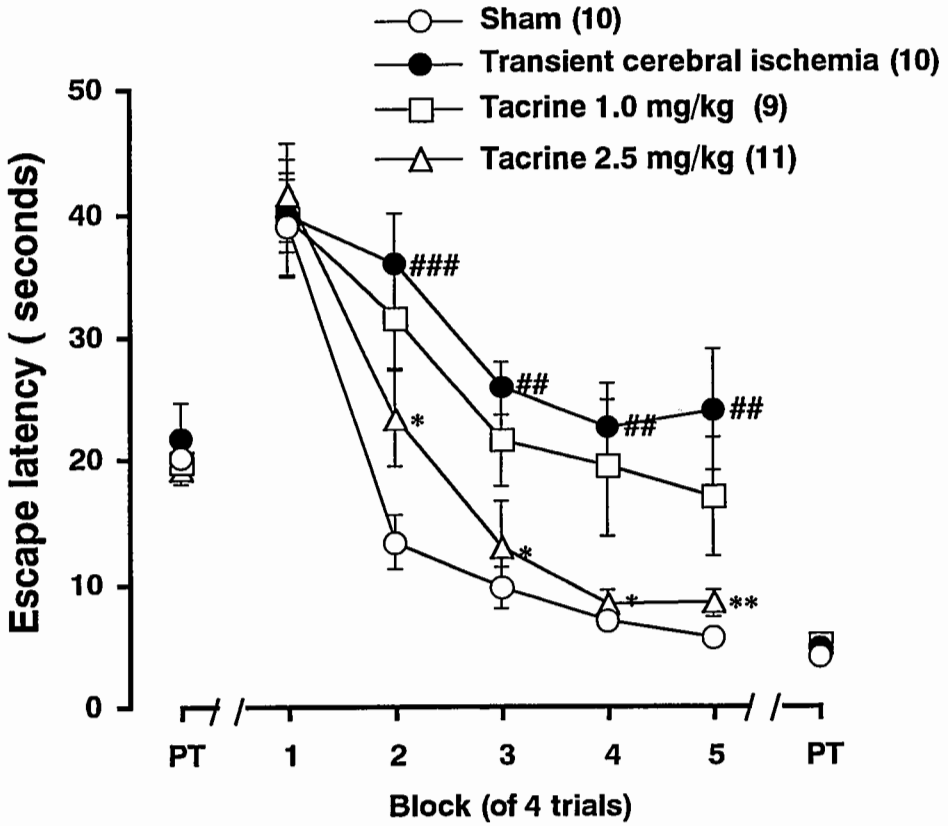
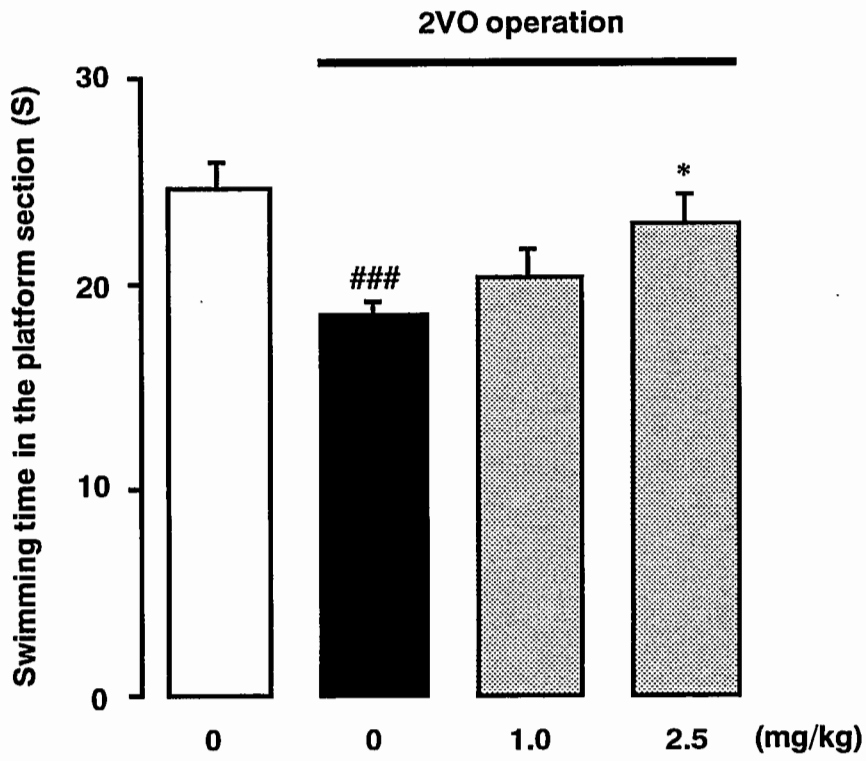


Fig. 11. Effect of Tacrine on transient cerebral ischemia (2VO)-induced impairment on Morris water maze performance in ICR mice. Tacrine was injected 60 minutes before the operation. 2 days after the operation, the trial test was performed. Each point represented the mean of 9-11 mice. ### P<0.01 vs. sham group. * P< 0.05, ** P< 0.01 vs. 2VO alone. PT: probe trial.



On the 6th days, the platform was removed. Mice were allowed to swimming in the water maze for 1 minute. The swimming time in the platform section were recorded. Each column represents the mean+S. E. M. ### P<0.001 vs. sham group. * P< 0.05 vs. 2VO alone.

日本財団補助金による
２０００年度日中医学学術交流促進事業

⑤．在留中国人研究者研究助成

(22) ＢＡＩ１遺伝子の抗腫瘍機能に対する基礎研究

BAI1 遺伝子の抗腫瘍機能に対する基礎研究

康　熙雄

白求恩医科大学第三附属病院検査部主任

東京大学医科学研究所附属先端医療研究センター

分子療法研究分野 客員研究員

要旨（日本語）

当センターで最近新しくクロニンクされた脳特異的発現する新生血管抑制因子-brain-specific angiogenesis inhibitor 1（BAI1）は in vivo の実験で非常に強い血管新生抑制機能を現し、さらに動物の腫瘍モデルで血管新生抑制による抗腫瘍効果が観察された。現在抗腫瘍遺伝子治療の候補として研究を進めている。

KEY WORDS

BAI1 遺伝子　　抗腫瘍機能

研究報告

目的

↓

方法

↓

結果

↓

考察

↓

参考文献

Antiangiogenic potency of BAI1 in vivo: Implication of gene therapy for human glioblastoma

X.KANG,[1] K. TANI, [1] S. NISHIMORI,[2] M.SUNAMURA,[3] . L.LUCIAN, [3] I.SAITOH,[4] T.TOKINO, [2] Y.NAKAMURA, [2] S. ASANO. [1]

Department of Hematology/Oncology[1], Human genome center[2], genome analysis [4] The Institute of Medical science,The University of Tokyo; Department of Surgery 1st, Tohoku university, School of Medicine[3]

ABSTRACT

BAI1(brain-specific angiogenesis inhibitor 1) is an 1584-amino-acid product containing five thrombospondin type 1 repeats and is specifically expressed in the brain. This BAI1 gene is now considered as one of novel p53-inducible genes. As angiogenesis is required for the growth and progression of malignancies. we investigated the in vivo antiangiogenic and antitumor effects of the wild-type BAI1 gene transfer on five humans glioblastoma cells. We constructed BAI1-expressing glioblastoma cells after the transduction with the BAI1 cDNA using a recombinant adenoviral vector (BAI1 cDNA inserted into pAdex1Cawt at Swa1 site). The Northern blot analysis and Western blot analysis demonstrated respectely the mRNA and protein of BAI1 in the transduced tumor cells. In vivo neovascularization assay of adenoBAI1 infected cells was then performed using a transparent skin fold chamber model implanted in SCID mice. In this assays, BAI1 gene transduced glioma cells significantly inhibited angiogenesis in vivo. In tumor inhibition assay, transduced or untransduced human glioma cells were implanted intradermally to the right flank of SCID mice. The presence of detectable tumor was confirmed by palpation and the tumor size was measured periodically. In vivo antitumor assay demonstrated the inhibited tumor growth after the direct injection of BAI1 adenovirus into tumors. Morphologically, tumor showed signs of impaired angiogenesis, such as extensive necrosis and reduced tumor vascular density. Our data demonstrated that a recombinant adenovirus expressing the BAI1 gene had antiangiogenic role for glioma cells and this virus also inhibited the growth of glioma cells in vivo. BAI1 was considered to be one of the potent candidate genes for cancer gene therapy.

Overview summary

Recombinant adenovirus carrying the human BAI1 cDNA (AdBAI1) was constructed using COS-TPC method. In vivo growth inhibition and antiangiogenic effects were observed with BAI1 gene transducced U373MG tumor cells. using Skin fold transparent chamber angiogenesisnmodel, our results also suggested that a AdBAI1 had antitumor effects due to antiangiogenic function of BAI1 protein in human glioblastoma cells carrying codon 237 cgt(Arg)-cat(His)mutation of p53 gene. The coexpression of BAI1 and p53 gene did not enhance the antitumor effects of BAI1 gene. BAI1 was considered to be promising candidate gene for human cancer gene therapy targeting glioblastoma cells with p53 gene mutations.

Introduction

Angiogenesis is considered to be regulated by a net become of positive and negative regulators of blood vessel growth. Recent discoveries of endogenous negative regulators of angiogenesis, thrombospondin (TSP), endostatin, angiostatin and glioma-derived angiogenesis inhibitory factor, all associated with neovascularized tumors, suggest a new paradigm of tumorigenesis(Folkman,1989,1995). Negative regulators would predict how a primary tumor grows and whether metastases appease. Gliomas, particularly glioblastomas are a prominent target of cancer gene therapy because of their poor prognosis despite all current conventional therapies. Intratumoral transplantation of HSV-TK retrovirus producer cells has been under clinical investigation. Gene therapy strategies developed to interfere with the normal function of vascular endothelial growth factor receptor is another new theraputic approach and have been successfully used in different experimental models to block tumor angiogenesis and the growth (Marcia,1999). Tumor cell transduced with the wild type p53 gene inhibited the in vivo tumor growth of adjacent non transduced cells. This data suggest that a recombinant adenovirus expressing the wild type-p53 gene is antiangiogenic, which may explain, in part, the mechanism of the bystander effect induced by the wlid type-p53 gene transfer on adjacent tumor cells (NISHIZAKI, 1999) . Recently, novel P53 inducible gene that encode a 1584-amino acid product containing five thrombospondin type1 repeats has been cleared by one group and has been demonstrated to be specifically expressed in the brain. A recombinant protein corresponding to the TSP- type 1 repeats of this gene product inhibitied in vivo neovascularization induced by bFGF on the rat cornea. The expression of this gene, designated BAI1 (brain-specific angiogenesis inhibitor 1) was absent or significantly reduced in eight of nine glioblastoma cell line, suggesting BAI1 played a significant role of angiogenesis inhibition, as a mediator of p53. (HIROYUKINISHIMORI.,1997)
cancer BAI1 expression was significantly reduced in colorectal cancers as compared to the extra neoplastic tissues. BAI1 expresson was inversely correlated with vascular invasion and metastasis. Moreover, vaeculaty in the colorectal cancer was inversery correlated with BAI1 gene expression. BAI1 expression was seggested to inhibit angiogenesis and metastasis of colorectal cancer (YOSHITAKA FUKUSHIMA., 1998) But whether it has direct inhibit tumor in vivo effect and mechanism remains unclear.
In this study we studied the in vivo growth inhibitory potency of BAI1 gene in using human glioblastoma implanted to SCID mice.

MATERIALS AND METHODS

Construction of recombinant adenovirus

We used the COS-TPC method to construct recombinant adenovirus carrying the human BAI1 cDNA. Briefly, the human BAI1 cDNA was inserted into the cassette cosmid, pAdexlw, which is an 11kb charomid vector bearing an adenovirus 5 genome with deletions of E1 and E3. The recombinant adenovirus was generated by in vivo homologous recombination in 293 cells between the cosmid cassette and Nsil-digested adenovirus DNA tagged with viral terminal proteins. The recombinant adenovirus carrying a LacZ expression unit also controlled by the CAG promoter (AxCALacZ). For in vivo transfer, The adenovirus was purified and concentrated through CsCl step gradients followed by dialysis against phosphate-buffered saline (PBS)-10% glycerol buffer. Titration of recombinant adenoviruses was performed by 50% tissue culture infectious dose (TCID50). Lack of contamination by replication-competent adenovirus (RCA) was confirmed by an inability to amplify a fragment of the E1B region by polymerase chain reaction (PCR). All viruses were purified and expanded on 293 cells by the standard technique. Each viral inoculum was purified by a CsCl step gradient followed by a CsCl equilibrium gradient. The final viral band was diluted 1:1 with sterile glycerol and stored at –80°C. Concentration of the virus was determined by measuring their optical density at 260 nm. The multiplicity of infection (MOI) was calculated on the basis of the ratio of functional virus as assayed on 293 cell is reported before(reference).

Animals .

The experiments were perfomed using SCID mice (SPF/VAF mause, C•B−17/Icr Crj-scid), purchased from Nippon charles River co. Yokohama, bred and maintained in a specific pathogenic germ-free environment in our laboratory. For the surgical procedure, mice (females, 25~30 g body weight). Formulas of the antimicrobial reagents added to the drinking water of the animals were Oxytetracycline 0.3g, Ampicillin 0.3g, Cloxacillin 0.2g and Potassium sorbate 1.35g in one litre , by HCl to pH 2.5.(Knut ,1984)。 A 2μl aliquot of a suspended U373MG cells ($4X10^5$) was injected into the brain of male and female SCID mice under sodium pentobarbital (Nembutal) anesthesia 50mg/kg, i.p.

Cell lines

Five glioblastoma cell lines were used in this study. YKG1 was purchased from HSRRB (Tokyo); U87MG, U373MG, SW1783 and DBTRG05MG were from ATCC. YKG1, U87MG,U373MG and DVTRG05MG cell lines were maintained in Eagle`s . MEM medium with non-essential amino acids, sodium pyruvate, 1mM and Earle`s BSS, (10% fetal bovine serum, 2mM L-glutamine, streptomycin [100μg/ml], and penicillin [100U/ml]). SW1783 was

maintained in Leibovitz`s L-15 medium, 10% fetal bovine serum. In a free gas exchange with at mospheric air. The kidney embryonic cell line 293 was obtained from Microbix Biosistems (TORONTO, Ontario, Canada) were maintaned in complete Dulbecco's medium (DMEM).

Western blot analysis

Western blot analysis was essentially performed following standard method. Briefly, cells were homogenized and the centrifuged supernatant was electrophoreses in 7% gel and blotted onto a nitrocellulose membrane. The membrane was locked with 3% bovine serum albumin (BSA) in PBS, and incubated for 2 hr with rabbit anti-human BAI1 serum diluted to 1:2000 in 1% BSA-0.05% Tween 20 in PBS. After several washings, the membrane was incubated for 1 hr with horseradish peroxidase-labeled goat anti-rabbit IgG (Jackson Immuno Research Laboratories. INC) diluted to 1:5000 in 1% BSA-0.05% Tween 20 in PBS. For detection, enhanced chemiluminescence (ECL; Amersham , Arlington Heights , IL) was used and the membrane was exposed to Fuji (Tokyo, Japan) RX-U film for 10-30 sec.

Northern blot analysis

Northern blot analysis of BAI1 transduced glioblastoma cells showed BAI1 mRNA expressed properly. RNA was extracted from cultured cells with TRIzol (Life Technologies). RNA from tumor cell lines and tumor tissue was separated on formaldehyde-agarose gels and blotted onto nitrocellulose filter (Micron Separations, Westboro, MA). BAI1 mRNA was detected by hybridization of membranes with ^{32}p labelled BAI1 cDNA. As previously reported (Nishimori,1997). As control for quality and loding of mRNA, blots were also hybridized with a ^{32}p labeled ß actin cDNA. This cDNA probes were labeled with [^{32}p] dCTP (Amersham life Sciences) by the random-primer method to a specific activity of >2x10^{9} dpm/μg. Blots were hybridized in QuickHyb solution (Stratagene) at 68°C for 1 hr followed by washing in 0.1xSSC-0.1% SDS at 65°C and autoradiography (1xSSC is 0.15M NaCl plus 0.015M sodium citrate).

The radioactivity of each band was quantitated with a Fuji Bas 1000 bioimaging analyzer and MacBas software. For experiments designed to determine mRNA , Glioblastoma tumor cells were grown to confluence in a six-well plate and infected with 5x10^{8} PFU/ml AdBAI1 or any infection virus. Twenty-four hours after infection, cells were harvested at indicated times, and the RNA was extracted and subjected to Northern analysis, as described above.

Dorsal skin fold transparent chamber

Dorsal skin fold transparent chamber (DSFTC) was composed of two titanium frames and the total weight was 1.8g. The frame was implanted to mice so as to sandwich the extended double layers of skin perpendicularly to the animal's back. One layer of skin was completely

removed circulaly with the diameter of 15mm, and the remaining layer composed of epidermis, subcutaneous tissue and muscle was covered with a cover slip incorporated in one of the frames. Using stainless steel nuts as spacers, frame-to-frame distance of 400~450um was maintained to prevent the compression of nutritional blood vessels. Fine polyethylene catheters were inserted into the jugular vein and the caroid artery, respectively, passed subscutaneously to the dorsal side of the neck, closed, and sutured to the titanium frames. The animals tolerated to the chambers and showed no signs of discomfort. In particular, no effect on sleeping and feeding habit was observed. The chamber implantation time was about 20 min per mouse. For intravital microscopy, unanesthetized animals were immobilized in polyethylen tubes attached to the stage of a microscope (OPTIPHOTO 66, Nikon, Tokyo, Japan). Observations were made with the following objectives: Nikon X2 (numerical aperture, 0.05), Nikon X4 (numerical aperture, 0.10), Nikon X10 (numerical aperture, 0.25) and Nikon X20 (numerical aperture,0.40) using transillumination and a filter for converting artificial light into daylight. Observations were captured with an intensified CCD camera TEC-470 Optronics Co., Chelmsford, MA, USA), attached to the microscope and serially connected to a TV monitor (BM-1400S Vitor Co., Tokyo, Japan) and recorded on a S-VHS video tape recorder (HR-X1 Video Co., Tokyo, Japan). During off-line analysis of the video tape recordings, stil video frames (680x480 pixels) were captured at a resolution of 72 pixele/inch with Avid Video Shop 3.0 (Avid Technology, Inc., Tewksbury, MA, USA) on a Power Macintosh 7100/80AV computer (Apple Computer, Inc., Cupertino, CA, USA). The video frames taken with X10 objective were subsequently processed in order to obtain vascular parameters. The vessel out line of each of the frame was carefully drawn in a separate transparent layer using Adobe Photoshop 4.0 (Adobe systems, Inc., Mountain View, CA, USA) with the pencil tool of one pixel line width after the defective channels of the RGB color images of the video captured frame were eliminated and the image transformed to the grey scale mode. In this study, observations were perfomed at days 0, 3, 6, 9 and 12 after tumor inoculation.

Histology

Specimens were fixed in phospho-lysine-paraformadehyde solution at 4°C over night, embedded in Tissue-Tek O.C.T. Compound (Sakura Finetechnical Co., Ltd., Tokyo, Japan) and stored at -80°C. Five μm sections were cut for immuno histochemical staining. Expression of von Willebrand factor was detected using rabbit polyclonal antibodies, 8mg/ml (Dako, Tokyo, Japan). After the standard protocol from Dako Sheet. Tissue sections were incubated with 3% hydrogen peroxide in distilled water for 5minutes and rinsed with distilled water and placed in Tris –buffered saline (TBS) for 5 minutes. After the rinse , the specimen were covered with 2-3drops of DAKO EPOS

Anti-Von Willebrand Factor/HRP (one drop equals 50μ l) and Incubated about 60 minutes at room temperature. As negative control, DAKO EPOS Negative Control (code No.U 0951) was used following manufactures protocal,The specimen were than rinse in TBS for 5 minutes, incubated with DAB for 5-15 minutes, rinssed with distilled water, counterstained and mounted with coverslip as reported before.

BAI1 protein immuno histochemical staining as described above.

X-gal staing

Cells were spinned down and fixed with a methanol-formaldehyde mixture for 1 hr and 0.2% gllutaraldehyde in PBS for 30min, stained for β -galactosidase activity by incubating in PBS including 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta- D-galactopyranoside (X-Gal, 400 mg/ml), 5 mM potassium ferricyanide, 5 mM potassium ferocyanide, and 2mM MgCl2 for 4 hr at 37℃, and lightly counter stained with eosin. Section were immersed briefly in 4% paraformaldehyde, washed extensively with PBS and immersed in a solution containing 1mg/ml X-gal, 2 mM $MgCl_2$, 5mM $K_3Fe(CN)_6$ and 5 mM $K_4Fe(CN)_6$ in PBS overnight at 37C. Sections were rinsed in PBS and counterstained with hematoxylin/eosin and coverslipped in PBS/glycerol for microscopic observation.

Human Glioma Therapy Model in SCID Mice

$1x10^7$ each of human glioma cells were implanted intradermally to the right flank of SCID mice. Tumor with diameters of 5-10mm developed in 14 days and 25mm in 56 days after transplantation. $2X10^{9-10}$ pfu in 50-100μl volume of either AdBAI1, AdLacZ, AdV-RR5 were injected into tumor using a 26-gauge needle. The injection was repeated every other day (Figure5). The presence of detectable tumor was confirmed by palpation and the tumor size was followed periodically.

Data Analysis

The significance of differences between two groups was determined by unpaired t test. Statistical analyses were performed on a mocrocomputer with the aid of the SigmaStat program(Jandel Scientific, San rafael,CA). Data are prosented as mean ±SEM.

Results

BAI1 expression

Northern blot analysis of BAI1-transduced SW1783, YKG1, DBTRG05MG, U87MG and U373MG glioblastoma cells showed BAI1 mRNA expressed properly. But non transduced wild type cells did not expressed BAI1 mRNA (Figure 2).

Western blot analysis showed BAI1 transduced YKG1, DBTRG05MG, U87MG and U373MG glioblastoma cells expressed BAI1 protein. But non transduced wild type cells did not expressed BAI1 protein (Figure 3).

In vivo transduced AdBAI1 after 48hour U373MG cell were immunochamistry stained with the antibody for anti BAI1 antigen as an expressed the cell marker. The staining revealed that MOCK and AdLacZ transduced cell was negative result(Figuer8 A and B). and BAI1 transduced cell is positive(Figuer8 C, D, E and F)., demonstrated the inserted BAI1gene expressed protein .

Angiogenesis inhibition effect

Transplanted BAI1 transduced U373MG cells were observed to have significantly inhibited tumor cell-induced angiogenesis in vivo with DSFTC. Angiogenesis network was observed in mice transplanted with in wildtype and AdLacZ transduced cells mice over all tumor area at day 12. But angiogenesis was completely inhibited in dorsal skinfold chamber of SCID mice transplanted with AdBAI1 transduced cells at Day12 (Figure 4) .

In injected DMEM and AdLacZ tumors showed blood vessel infiltration (Fig8 H and I), immunohistochemical staining showed normal capillaries in AdLacZ injected mice tumor(16.0+_3.2 blood vessels per 200X field) but stained vessels in the AdBAI1 injected tumor (1.6+_2.5 blood vessels per 200x frame) displayed very few and extremely small bloodvessels. (Fig8 G),

Tumor inhibition effect

The U373MG tumor bearing SCID mice mean tumor sizes of WT and Adeno were statistically larger than those of the other 3 groups of P53, BAI1 or P53+BAI1 35days after injection ($P<0.05$, Figure 6) tumor.

The suppressed tumor growth was observed in mice group transplanted with AdBAI1 transduced cells in contrast to controls(*$p<0.05$,Figure 6).

The in vivo antitumoral effects of intratumorolly injected AdLacZ , AdBAI1 or DMEM were analyed in SCID mice bearing U-373 MG tumors. Tumolals injected with AdBAI1 regressed significantly compared with the tumors injected with AdLacZ (Fig.5;N=20;P=0.003)and DMEM(Fig.5 ;N=18;P=0.003). The experiments were repeated twice, and the results were reproducible. Representative data are included the Fig 8.

Combination Therapy

Combined use of AdBAI1 and AdP53 did not potentiate U373MG tumor growth nhibition by AdBAI1 or AdP53. the mean tumor sizes of DMEM and Adeno were statistically larger than

those of the other 3 groups of P53, BAI1 or P53+BAI1 35 days after injection ($p<0.05$, Figure6)

Survival

The survival of mice after in vivo transduction of AdBAI1 vector or control vector at U373MG tumor was shown in Fig7. Mean survival time of mice transplanted with U373MG ranged between 42 and 70 day and the survival rate was 20%. Mice transplanted with U373MG cells and treated with AdBAI1 survived much longer in 80 day in 80%($p<0.05$). Mice treated with AdLacZ and DMEM survived similarly.The U373MG tumor bearing SCID mice survival curves of animals injected with AdLacZ or DMEM($p<0.05$,Figure 6).

Discussion

angiogenesis is crucial for the growth of tumors and metastasis diffusion. The beginning of tumor angiogenesis is caused by the selection of a cancer cell clone which induces an unbalance between inducers and inhibitors of angiogenesis.

In this study, we examined the efficacy of the novel p53-inducible genes BAI1 alon or BAI1 and p53 combination for antitumor response. Both genes were intrgrated into adenoviral vectors and transferred alone or in combination directly into human glioblastoma, Analysis the antiangiogenesis and antitumor effect.

The BAI1 protein are a family of three related protein, each gene designated BAI1, BAI2 and BAI3, were specifically expressed in brain, and are likely to be expressed in the same type of cells, members of this novel gene family considered to be a member of the secretin receptor family (Shiratuchi,1998). This novel gene family may play important roles in suppression of glioblastoma Progression of a glioma to its more malignant form, glioblastoma, is associated with dramatic neovascularization. The most frequently altered gene in human glioblastomas is p53. Neovascularization might be a direct consequence of inactivation of p53, possibly due to loss of transactivation of one or more target genes regulated by p53 (Van,1994). p53 produced a secretory inhibitor of capillary endothelial cell migration designated glioma-derived angiogenesis inhibitory factor Isolated a novel brain-specific gene BAI1(Nishimori,1997). BAI1 contained at least one "fuctional" p53-binding site within an intron, and its expression was shown to be induced by wild type p53. The BAI1 protein includes a 7-span transmembrane region similar to that of the secretin receptor. The axtracellular region of BAI1 possesses a single arg-gly-asp motif recognized by integrins, and 5 sequences corresponding to the thrombospondin type I repeats that can inhibit experimental angiogenesis induced by basic fibroblast growth factor. in spite of similar

tissue specificity among the 3 BAI gene, only BAI1 was transcriptionally regulated by p53. this novel gene may play important roles in supperession of glioblastoma by fluorescence in situ hybridization, (shiratruchi et al.1997).

we used BAI1 have evaluated the potential of gene therapy of human glioblastoma cells, using viral vectors encoding human BAI1 cDNA.

First was BAI1 transduction rate in glioblastoma cell line. Fortunately, 5 human glioblastoma cell lines all was high level expressed BAI1 gene. Futher analysis transduced BAI1 gene cell lines BAI1 protein expresse function also performed 4glioblastoma cell lines was detected. In curture transduced BAI1 cell lines, BAI1 protein were partially released solubility protein, moreover multi of infection (MOI) dependent increased this release in perfomed between MOI 1to 20.

BAI1 in vivo have a anti angiogenesis effect. In this study, transparent chamber model and implanted intradermally to the right flank of SCID mice model were used to study the effect of BAI1 on antiangiogenesis and antitumor function in U373MG glioblastoma. Transparent chamber is a model particularly useful to study the temporal sequence of events occurring during early stages of angiogenesis. In the present studies, BAI1 suppressed tumor growth apparently by preventing efficient vascularization of U373MG inoculation within the dorsal skinfold chamber of SCID mice. Two week after tumor inoculation, functionl vascular networks, that consistently covered all tumor areas, developed in animals treated with AdLacZ and DMEM as vehicle. Showed significantly lager vessles, but not showed in Ad BAI1.

BAI1 have a direct antiangiogenesis effect and through this ability inhibit tumor growth. In this study A substantial reduction of tumor volume was present in mice injected with the AdBAI1. exogenous human BAI1 can be efficiently transduced and expressed in human glioblastoma cells by an Ad-vector. High level of wild-type BAI1 protein detected at least 3 days after infection in vitro. and significantly inhibited growth of AdBAI1 injected tumor compared to MOCK injected mice in vivo tumor, suggesting that the growth-inhibiting effect is not mediated by the virus itself and this tumor inhibition effect from anti angiogenesis result.

BAI1 have a extension of life effect in carried tumor mice. Mean survival time of mice transplanted with U373MG ranged between 42 and 70 day, the survival rate was 10% in day 80 . Mice transplanted with U373MG cells and treated with AdBAI1 survived much longer in 80 day in 80%. Mice treated with AdLacZ and DMEM survived similarly. Suggest BAI transduced tumor carried mice extensied of life.

BAI1 antitumor effect was direct producted from the lower reaches(下流), and not induced by p53. We study observed in vivo a same to invitro of lesult. Introduction of BAI1 or p53

alone each was induce growth retardation in the majority of mice. the combination of Adp53 with AdBAI1 expressing Ad-vector induced a greater antitumor response. But, where as it was not showed combination group than either BAI1 or p53 vector alone more stronger a syngenic effect. We considered that was because in vivo between p53 and BAI1 in the express process be extent feedback mechanism, when the BAI1 starting express or concentration arrive at high level, conversely inhibition p53 to keep up appearance tumor inhibition function. It was different with physiological phenomenon, BAI1 induced by upper reacher p53. BAI1 was direct display antiangiogenesis and antitumor effect in the lower reaches. Therefore in p53 and BAI1 combination treated tumor effect keep with any BAI1 or p53 alone treated tumor antitumor effect level.

A previous study has shown that p53 inhibition of human tumors closely correlates with a reduction of blood vessel density in the tumor, suggesting that p53 effect are mediated, at least in part, by an antiangiogenesis mechanism (Xu,1997). Maybe BAI1 was one of among this madia of p53 antiangiogenesis more over antitumor.

these findings and specifically discuss their implications for brain tumor genesis, molecular diagnosis and prognosis. Of clinical importance are the findings that brain tumors with wild type (wt) or mutant p53 status may respond differently to radiation therapy and that novel therapeutic strategies using TP53 gene transfer or specifically targeting tumor cells with mutated p53 are being evaluated in clinical trials. (Fulci G, 1998). We result suggested BAI1 directly have a antiangiogenesis and antitumor effect. And in p53 antibodies were detected case, BAI1 may substitute P53 treatment. p53 antibodies were detected in the serum in 2 of 14 patients but never in the cerebrospinal fluid (CSF). Soluble p53 protein was detected neither in serum nor in CSF of the glioma patients. CSF levels of the immunosuppressive cytokine, transforming growth factor (TGF)-beta, were elevated in the glioma patients, including those with a humoral response to p53. These preliminary findings raise the possibility of systemic humoral immune responses to antigens, including mutant p53, expressed by glioma cells in the central nervous system (Weller M, 1998). Hypoxia-mediated selection for p53 mutant cells with diminished apoptotic potential in solid tumors may account for the high prevalence of p53 mutations in human cancers. Our increasing understanding of the role of p53 mutations and apoptosis in human cancers has also provided some insights into strategies for anticancer therapy. Studies reconstituting the wild-type p53 through gene therapy have been encouraging. More importantly, further elucidation of the mechanisms of therapy-induced p53-independent apoptosis in cancer cells will facilitate the development of more efficient, less toxic anticancer therapy. (Wang TH,. 1996)。 The BAI1 gene may be important new media for antiangiogenic gene therapy. As stated above, simply add BAI1 protein or AdBAI1 treatment seems to have a profound

effect on the ability of tumors to growth and/or metastasize. This molecule inhibitors might therefore be useful as anti-angiogenic drugs or targets gene in the treatment of human cancers or angiogenesis disease as with many new anti angiogenesis methods (Lyden,1999.,Napoleone,1999). In this case need diagnosis by association experiment, especially check p53 gene mutation in glioblastoma patient.

In the future tumor clinical is quantification of microvessel density in tumor specimen correlates either metastasis or recurrence in many malignancies such as breast cancer and lung cancer. Therefore, assessment of tumor angiogenesis may serve as prognostic factors. Therapeutic applications include the development of new agents with antiangiogenic properties, vascular targeting drugs, antibody-based therapy, and BAI1gene therapy. Combination of antiangiogenic therapy with cytotoxic drugs may enhance antitumor activity. Moreover, the role of antiangiogenic therapy in adjuvant setting may provide and alternative approach to better cancer treatment in the near future.(Voravud N, 1999) therapy-induced independent factor "BAI1 "in cancer cells will facilitate the development of more efficient, less toxic anticancer therapy. (Wang TH,. 1996)

Fig.1. Constructs of BAI1 Adenovirus vector. BAI1 cDNA was inserted to Swa1 site of pAdex1Cawt.

Fig.2. Northern blot analysis of BAI1 transduced glioblastoma cell. Five glioblastoma cell lines(YKG1, U87MG, U373MG, SW1783 and DBTRG05MG) were transduced with AdBAI1 vector and Northern blot analysis was performed All of the BAI1 transduced glioblastoma cells expressed BAI1 mRNA. But non transduced wild type cells did not.
(+) means transduced BAI1 adeno vector, (-) means untransduced BAI1 adeno vector

Fig.3. Western blot analysis of BAI1 transduced glioblastoma cells. Four glioblastoma cell lines(YKG1 , U87MG, U373MG and SW1783 were transduced with AdBAI1 vector and Western blot analysis was perfoemed. All of the BAI1 transduced glioblastoma cells expressed BAI1 protein band a placed in 17Kd. But non transduced wild type cells did not expressed BAI1 protein. (+) means transduced BAI1 adeno vector, (-) means untransduced BAI1 adeno vector

Fig.4. The observation of in vivo angiogenetic effects AdLacZ or BAI1 transduced U373MG

tumor cell using DSFTC in SCID mice. $2x10^5$ of transduced or non tranduced U373MG tumor cells were inoculated. Functional angiogenesis network was seen in all of the mice transplanted with WT U373MG cell(n =5) and AdLacZ transduced cells(n =5) at day 12. Angiogenesis inhibition was observed in all (n=6)mice transplanted with AdBAI1 transduced cells at Day12.

Fig.5. The in vivo inhibit or effect of AdBAI1 to growth of U373MG tumor. $1x10^7$ of U373MG cells were intradermally implanted. To the right flank of SCID mouse. AdBAI1 vector, AdLacZ or DMEM were injected every three days for 5 times then every 7 days for 3 times. Each group consisted of 10 mice. The diameters of tumors were determined palpation by every 3-4 days. The AdBAI1 group showed remarkable reduction of tumor growth inhibition in contrast to controls groups($P<0.05$)

Fig.6. Comparison of the tumor forming effects of BAI1,P53 and BAI1+P53 transduced U373MG cell. $1x10^7$ of BAI1, P53 and BAI1+P53 transduced U373MG cells were implanted to the right flank of SCID mouse. The product of bisecting diameters of U373MG cells was estimated by palpation every 3-4 days. The mean tumor sizes of WT and Adeno groups were statistically lager than those of the other p53, BAI1 and P53+BAI1 3 groups in 35days after the observation period ($p<0.05$).

Fig.7. The BAI1 gene therapeutic effects on SCID mice established with U373MG tumor. Survival was compared among the SCID mice treated with AdBAI1 virus, AdLacZ virus or DMEM. The SCID mice with BAI1 significantly ($p<0.05$) showed longe while survival than those treated with LacZ or medium. While injection with LacZ did not length then the survival time compared to that of DMEM control.

Fig.8. in vitro transduced AdBAI1, AdLacZ and MOCK with U373MG cell after 48Hr stained by anti BAI1 rabbit antibody and anti rabbit HRPgoat antibody. A and B was MOCK and AdLacZ transduced U373MG cell, C,D,Eand F was BAI1 transduced U373MG cell.A,B and C was 80X folder,D,E and F was 400X folder , G,H and I was 40X folder.
Decreased Vascularization of xenografts in AdBAI1 compared with AdLacZ and DMEM treated U373MG with SCID mouse. G was injected AdBAI1 U373MG formed tumor. H and I was injected DMEM and AdLacZ injected U373MG formed tumor section.

REFFERENCES

FOLKMAN, J.,(1995). Angiogenesis in cancer,vascular, rheumatoid and other disease. Nat Med Jan. **1**,27-31

FOLKMAN, J.,(1989). What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent?. J. Nat.Cancer Inst. **82**.4-6

NISHIZAKI, M., HUJIWARA, T., NAKAMURA, Y., TANIO,T., HIZUTA,A., NISHIMORI,H., TOKINO,T., NAKAMURA,Y., MICHAEL,B., ROTH,J.A. AND TANAKA,N. (1999). Recombinant Adenovirus Expressing Wild－type p53 Is Antiangiogenic: A Proposed Machanism for Bystander Effect. Clinical Cancer Reserch. **5** , 1015-1023.

DAMICO, T.A., MASSEY, M., HERNDON ,J.E., MOORE, M.B., and HARPOLE, D.H., (1999). A biologic risk model for stage I lung cancer: immunohistochemical analysis of 408 patients with the use of ten molecular markers. J. thorac Cardiovasc Surg **117,** 736-743

MARCIA, R., MACHEIN, W. R., and KARL H.P., (1999). Antiangiogenitic Gene Therapy in a Dominant-Negative Vascular Endothelial Growth Factor Receptor2. Hum.Gene Ther.**10**, 1117-1128.

. NISHIMORI,H., SHIRATSUCHI,T., URANO,T.,KIMURA,Y., KIYONO,K., TATSUMI,K., YOSHITA,S.,ONO,M.,KUWANO,M., NAKAMURA,Y., and TOKINO,T. (1997).Anovel brain-specific p53-target gene, BAI1,containing thrombospondin Type 1 repeats inhibitas experimental angiogenesis. Oncogene. **15**,2145-2150.

FUKUSHIMA, Y., OSHIKA, Y.,TSUCHITA,T., TOKUNAGA,T., HATANAKA,H., KIJIMA,H., YAMAZAKI,H., UEYAMA,Y., TAMAOKI,N., AND NAKAMURA,M. (1998). Brain-specific angiogenesis inhibitor 1 expression is inversely correlated with vascularity and distand metastasis of colorectal cancer. Intern. J. oncology **13**,967-970.

DARLAND,D.C.(1999) Blood vessel maturation : vascular developmen comes of age. J. Clin. Invest.,**103**:157-158,

SHIRATSUCHI,T., NISHIMORI,H., ICHISE,H., NAKAMURA,Y.,AND TOKINO, T., (1998) Cloning and characterization of BAP3, a C2 domain-containing protein that interacts with BAI1. Biochem Biophys Res commun **251**. 158-165

VAN MEIL, E, G., POLVERINI,P.J., CHAZIN,V.R., HUANG, H,J., DETRIBOLET, N AND CAVENEE,W,K., (1994) :Release of an inhibitor of angiogenesis upon induction of wild type p53 expression in glioblastoma cells. Nature Genes. **8**. 171-176

SHIRATSUCHI,T., NISHIMORI,H., ICHISE,H., NAKAMURA,Y., TOKINO, T.,(1997) Cloning and characterization of BAI1 and BAI3, novel genes homologous to brain-specific angiogenesis inhibitor 1 (BAI1). Cytogenet. Cell Genet. **79**.103-108

LYDEN,D.,(1999) Idl AND ID3 are required for neurogenesis, angiogenesis and vascularization of tumor xenografts. Nature. Med.**12**. 1359-1364

NAPOLEONE.F(1999). Clinical applications of angiogenic growth factors and their inhibitors. Nature Med. **12**. 1359-1364

KNUT, H. F., EINAR, K., ROFSTAD, BRUSTAD , T., MARTON,P (1984) .A Rransparent Chamber for the Dorsal Skin Fold of Athymic Mice. Expl Cell Biol. **52**: 260-268

F

FLUCI.G, ISHII N, VAN MEIR EG (1998) p53 and brain tumors: from gene mutations to gene therapy. Brain Pathol Oct;**8**.599-613

WELLER M, BORNEMANN A, STANDER M, SHABET M, DICARB J, MEYERMANN R(1998) Humoral immune response to p53 in malignant glioma J Neurol .**245**.169-72

WANG TH, WANG HS (1996) p53, apoptosis and human cancers. J Formos Med Assoc **95** 509-22

日本財団補助金による
２０００年度日中医学学術交流促進事業

②．学会開催助成

（1）第６回日本－中国皮膚科学合同学術会議

日本財団助成金による

2000 年度日中医学学術交流促進事業報告書

－学会開催に対する助成－

平成13年 3月29日

財団法人 日中医学協会

理事長中島章殿

報告者氏名 吉川邦彦 (印)

所属・役職 大阪大学医学部皮膚科、教授

所在地 〒565-0871 吹田市山田丘 2-2

電話 06-6879-3031 内線 3031

講演集・シンポジウム写真等学会に関する資料を添付

学会・学術交流の名称 第6回 日本-中国合同皮膚科学術会議

テーマ 特になし

主催団体 日本側：日本皮膚科学会 代表 原田昭太郎 中国側：中華医学会皮膚科分会 代表 鎮洪鐸

代表者 日本側：原田昭太郎 中国側：鎮洪鐸

期間・開催地 2000年9月15日～17日・西安市香格里拉金花飯店中華人民共和国陝西省

参加者数 日本側 107 名 中国側 92 名

招へい・派遣目的 この項 該当せず

1．招へい・派遣研究者 人数＿＿＿人 記入欄不足の場合は別紙を添付。

氏名	所属・役職	研究分野

滞在期間 自平成12年 9月 15日 至平成12年 9月 17日

2．主な滞在日程

9月15日　開会式　午前8:30～9:00（西安香格里拉金花飯店）
学会発表　午前9:10～午後5:00（　　）
総親会　午後6:00～午後8:00（シャングリラホテル）
ビジネスパーティ　午後8:00～　（　　）

9月16日　学会発表　午前8:00～午後7:00（西安香格里拉金花飯店）
スポンサード、レセプションパーティー　午後7:30～　（　　）

9月17日　学会発表　午前8:30～9:45（　　）
臨床病例討論　午前10:00～11:30（　　）
閉会式　午後12:00～（20、30分程度）（　　）

3．学術会議報告

別紙書式により、成果・今後の課題等2000字以上で報告して下さい。（ワープロ使用）
使用文字は開催学会名１３ポイント、その他は１０ポイント、明朝体を使用して下さい。

学会名称　第６回日本ー中国合同皮膚科学術会議
第６届中国ー日本聯合皮膚科學術會議

学会テーマ　特になし

日本側主催代表者　吉川邦彦・大阪大学大学院医学系研究科分子病態医学専攻
皮膚科学講座・教授
中国側代表者　徐　文厳・中国医学科学院皮膚病研究所・教授

学会報告

報告者　吉川邦彦　大阪大学大学院医学系研究科分子病態医学専攻
皮膚科学講座・教授

第６回の日本ー中国合同皮膚科学術会議は日本皮膚科学会並びに中華医学会皮膚科分会の主催により、２０００年９月１５から１７日までの３日間、中国西安市の香格里拉金花飯店において開催された。本学会は１９８８年に第１回を北京で開催、以後２年毎に上海、大連、成都、北京と回を重ね、今回は事情により４年振りの開催となったものである。報告者は第１回より連続してこの学会に参加し、３回目以降は日本側役員として本学会の運営にも関わってきたが、６回１２年間における変化と進歩には実に目覚ましいものがある。今回の役員は日本側　組織委員長（会長）兼　財務委員長：吉川邦彦（大阪大学教授）、事務局長：西川武二（慶應義塾大学教授）、学術委員長：玉置邦彦（東京大学教授）、中国側　大会主席：徐　文厳（中国医学科学院教授）、秘書長：馬　経清（北京大学教授）、学術委員会主席：王　家壁（中国協和医科大学教授）の各氏が担当した。

会議は３会場において口演とポスター展示で進められた。特別講演は５題で日本側からアンドロゲン代謝と毛の生長（大分医大皮膚科　高安　進）、ざ瘡の発症病理（富山医薬大皮膚科　諸橋正昭）、強皮症の成因（金沢大皮膚科　竹原和彦）の３題が講演され、好評であった。中国側からは　Urticaria pigmentosa is a systemic disease（北京協和医院　Gerald Lazarus）、Characteristic and function of natural antikeratin autoantibody（第４軍医大学　李　承新）の２題が講演された。臨床症例討論ＣＰＣが企画され、日中双方から各２例の症例が呈示されて活発な討議が行われた。出席者も多く初めての試みとして成功であったと思われる。一般演題は口演として７４題（内日本から２７題）、ポスター展示として６９題（内日本から３７題）が発表された。この他にメーカーの提供によるランチョンセミナー２，シンポジウム１が開催された。全ての発表の要旨は　PROCEEDINGS　The Sixth China－Japan Joint Meeting of Dermatology　Xi'an , Sept . 15-17, 2000 として英文で印刷、発行されている。日本からの出題は６８題とほぼ半数を占め、日本側参加者も同伴者２６名を含めて１３５名と、名実共に合同学術会議に相応しい構成であったと言うことができる。

相憎台風の接近で上海空港が一時使用不能となり、上海経由参加者の到着が第１日目の夕方となった。その為プログラムにはいくつかの変更を余儀なくされたが、担当者の努力により、大過なくプログラムを消化することが出来たのは何よりであった。

今回最大の特徴は英語を公用語とした点である。第５回までは日本語、中国語を共に公用語とし、通訳を介して意志の疎通を図ったため、準備に多大のエネルギーを要し、進行にも多大の時間を使って、国際会議としての効率は決して良いと言えなかった。英語を共通の公用語としたことにより、これらの点が多いに改善された。未だ未だ英語による意志の疎通が十分とは言えないが、従来の日本語と中国語を併用した会議に比べれば大きな進歩である。展示会場では留学生や留学経験者の協力を得、討論をよりスムースに行う努力もなされた。内容的にも中国側の進歩は目覚ましく、興味深い発表が多数見られた。この学会も過去５回１２年の歴史を経て真の国際学会に向かって大きく進歩したと言える。

２日目の午後は学術セッションを休憩し、学会主催の兵馬俑観光ツアーを実施した。従来、参加者が観光のため学会場を抜け出し、出席者が少なくなるのを防止する意味での試みであり、或る程度成功したのではないかと考えている。今学会の有力なスポンサーであったベルギーの製薬会社が秦代の遺跡兵馬俑の保存に抗真菌薬を大量に寄付され、その贈呈式と記念講演が実施された。焼き物もカビに侵されるため、抗真菌薬が保存に有用とのことであった。皮膚科と抗真菌薬とは不可分の関係にあり、その意味で今学会は結果として世界的歴史遺産の保存にも多少とも貢献したのではないかと思っている。他にも多数のメーカーによる華やかな商品展示やサービスが提供された。従来この学会には見られなかったものであり、中国社会の時代の変化を如実に実感した。会場に使用した金花飯店は近代的なホテルであり、設備、スペース、サービスの面で特に問題は感じなかった。実際の運行は地元の西安第４軍医大学が担当された。ご努力に謝意を表したい。

以上、第６回の日本ー中国合同皮膚科学術会議は規模並びに学術発表や参加者の構成面からも、日中国際会議に相応しいものであり、大成功であったと思われる。会期中に両国組織委員による組織委員会が持たれ、今後も引き続きこの学会を開催すること、当面あと２～３回は中国において開催することで合意がなされた。次回の日程や開催地は未定である。日本側は組織委員長西川武二、事務局長玉置邦彦の両教授に学術委員長宮地良樹教授（京大）が加わった３人で担当していただく予定となっている。

第六届中日聯合皮膚科學術交流會

第六回日中合同皮膚科學術シンポジウム

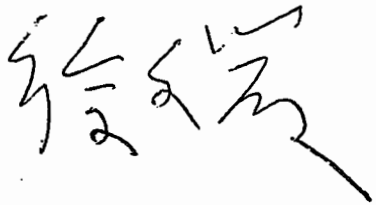
出 席 證 明 書

出席了二零零零年九月十五日至十七日在中國陝西省西安市由中華醫學會皮膚科分會和日本皮膚科學會主辦、中華醫學會和日中醫學協會協辦的第六届中日聯合皮膚科學術交流會。

特此證明

第六届中日聯合皮膚科學術交流會

中國方面主席：　徐　文嚴

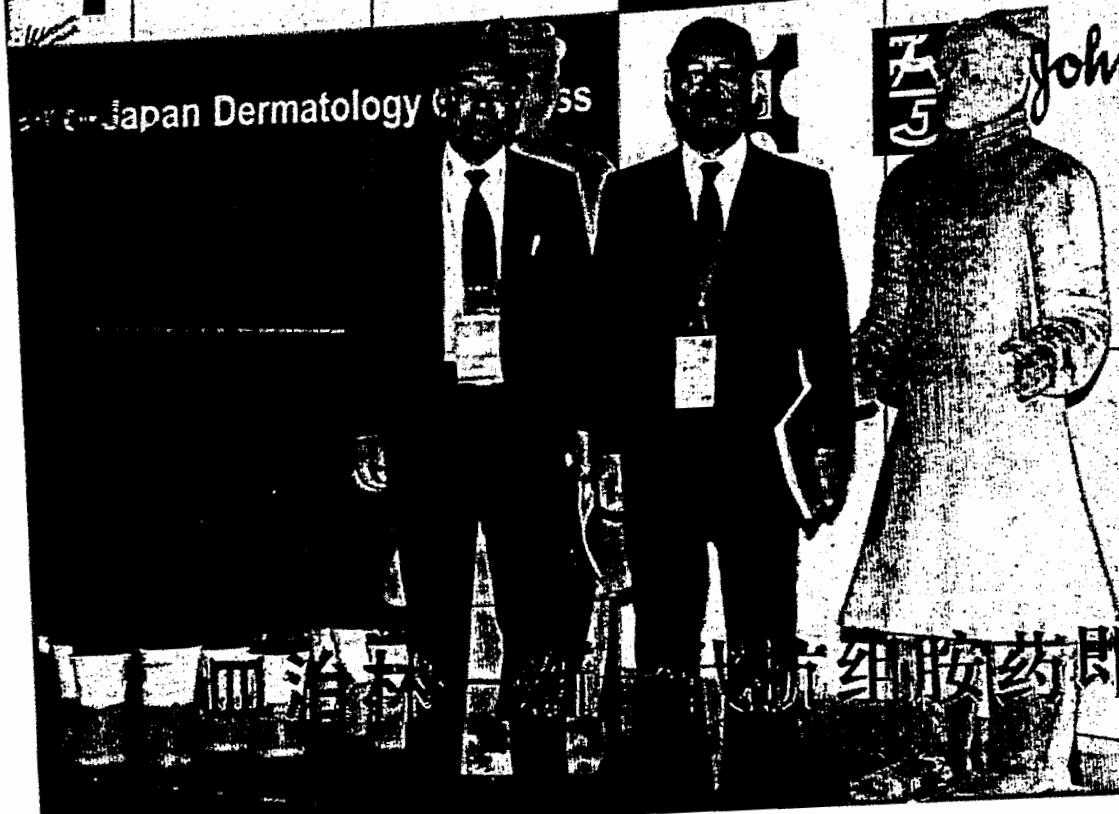


二零零零年九月十五日から十七日にかけて中国陝西省西安市にて中華医学会皮膚科分会と日本皮膚科学会を主催とし、中華医学会と日中医学協会を後援とする第六回日中合同皮膚科学術シンポジウムにご出席されたことを証明致します。

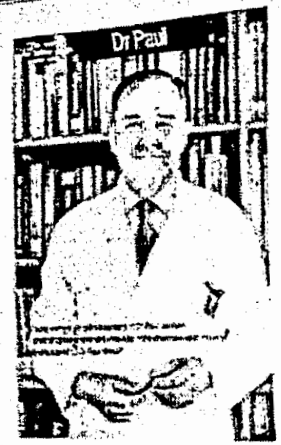
第六回日中合同皮膚科学術シンポジウム

日本側主席：　吉川　邦彦

sporanox 第六届中日皮肤科大会



Johnson & Johnson



抗细胞药即将上市

2000.9.15—17·西安

日本財団補助金による
２０００年度日中医学学術交流促進事業

②．学会開催助成

(2) 「第１回日中循環器病シンポジウム」

日本財団助成金による
2000年度日中医学学術交流促進事業報告書

—学会開催に対する助成—

財団法人　日中医学協会　殿
理事長　中島　章　殿

平成12年 7 月 31 日

報告者氏名　柳本　広二　㊞
所属・役職　国立循環器病センター研究所
脳血管障害研究室　室長
所在地　〒565-8565　吹田市藤白台5丁目
電話　06-6833-5012　内線　2711

講演集・シンポジウム写真等学会に関する資料を添付

学会・学術交流の名称　第1回日中循環器病シンポジウム
テーマ　日本及び中国での循環器病および福祉施策の現状と将来
主催団体　国立循環器病センター
代表者　菊池　晴彦
期間・開催地　平成12年7月12日～7月14日　大阪府　吹田市
参加者数　日本側　60名　　中国側　15名
招聘・派遣の目的　上記シンポジウムへの参加

1．招聘・派遣研究者　人数　15　人　記入欄不足の場合は別紙を添付。

氏名	所属・役職	研究分野
左　煥琼	中日友好病院　副院長，脳外科主任教授	脳外科
史　載祥	中日友好医院　心腎内科主任教授	心腎内科
金　恩源	中日友好医院臨床医学研究所中西医結合研究室教授	中西医結合
程　蘭英	中日友好病院臨床医学研究所　病理生理室教授	病理生理
庄　逢源	中日友好病院臨床医学研究所　血流変室主任教授	血流生理
馬　長生	中日友好病院　心臓カテーテル室助教授	心臓生理
石　效平	中日友好医院　中医処処長，小児科教授	小児科
柯　元南	中日友好病院　心臓内科主任教授	心臓内科
周　宝玉	中日友好病院　脳神経内科教授	脳神経内科
劉　鵬	中日友好医院　心臓外科副主任	心臓外科
王　武	中日友好医院　CT室助教授	画像診断
王　鳳林	中日友好病院　心臓外科主任教授	心臓外科
買　乃光	中日友好医院　麻酔科主任教授	麻酔科
于　殿文	中日友好医院　外事処	通訳
蔡　福軍	中日友好医院　外事処長副処長	事務

滞在期間　自　平成　12年　7　月　12日　　至　平成　12年　7　月　15日

2.主な滞在日程

月　日	日　程	宿泊先
2000年 7月12日（水）	ＣＡ921便にて北京出発、14：05関西空港着 小型バスにて大阪へ移動 第１回日中循環器病シンポジウム参加 会場：大阪サンパレス	大阪サンパレス泊 TEL：06-6878-3804
7月13日（木）	第１回日中循環器病シンポジウム参加 会場：千里ライフサイエンスセンター	大阪サンパレス泊 TEL：06-6878-3804
7月14日（金）	第１回日中循環器病シンポジウム参加 会場：千里ライフサイエンスセンター	大阪サンパレス泊 TEL：06-6878-3804
7月15日（土）	小型バスにて関西空港へ移動 ＣＡ922便にて関西空港より15：35北京へ出発， 帰国	

学会名称　第一回日中循環器病シンポジウム

学会テーマ
循環器病制圧と日中両国の医学および医療技術の交流と進歩

日本側主催者代表者氏名　国立循環器病センター名誉総長　菊池　晴彦
中国側代表者氏名　左　煥琛

学会報告
報告者氏名　国立循環器病センター研究所脳血管障害研究室長　柳本　広二

時代とともに益々重要性を増してきた循環器病全般にわたるテーマを対象とし、新たな日中合同のシンポジウムを立ち上げました。　今までの中日友好病院および国立循環器病センターの合同シンポジウムで取り上げられてきた動脈硬化、血栓、一次予防に加え、循環器病疾患全領域にわたる予防、診断、治療の現状と将来に関して、会期の２日間、各分野のそれぞれの精鋭である日中の先生方が発表しました。

以下には本シンポジウムで報告された演題名を記載します。まず、動脈硬化症、予防医学、疫学領域では、病理学からみた日本人若年者の動脈硬化の変遷（由谷　親夫）、生活習慣改善による高血圧治療：効果と限界（河野　雄平）、非侵襲診断による動脈硬化の長期観察における変化（都島　基夫)、Development of Blood Stasis Syndrome in Diagnosis and Treatment（史載祥）、Study of Korea Red Ginseng's Preventive Effect on Hypertensive Retinal Arteriosclerosis in Rabbits （金　恩源)。

動脈硬化、血管病変の基礎研究の領域では、拍動心臓の収縮特性、酸素消費、カルシウム動態（菅　弘之）、酸化 LDL 受容体 LOX-1 の病態生理学的意義（沢村　達也)、脳組織の血管新生と微小循環動態（新見　英幸)、血管内皮細胞の機械刺激受容機構（藤原　敬己)、Nitric Oxide Synthase Activity Change of Cerebral Microvessel and Some Brain Areas during Focal Cerebral Ischemia / Reperfusion in Rats (程　蘭英)、Dynamic Studies on The Interaction of Lymphocyte Function-Associated Antigen-1 (LFA-1) and Intercellular Adhesion Molecule-1 (ICAM-1) (庄　逢源)。

心臓血管疾患の内科的治療に関しては、不安定狭心症に対する内科的治療（野々木　宏)、小児における心筋炎，心筋症の治療（越後　茂之)、特発性心室頻拍に対するカテーテルアブレーション（鎌倉　史郎)、Electrophysiological Characteristics and Effect of Radiofrequency Ablation of Paroxysmal Atrial Fibrillation Originating from The Pulmonary Veins (馬　長生)、Clinical Treatment of Pediatric Myocarditis by Integration of Traditional and Modern Medicine （石　効平）、The Efficacy and Safety of Atorvastatin in Treatment of Hyperlipidemia (柯　元南)。

脳血管疾患に関しては、日本における脳梗塞診療の実態（山口　武典）、心原性脳塞栓症の診断と治療（峰松　一夫)、脳梗塞に対する脳低温療法（成冨　博章)、閉塞性脳血管障害に対

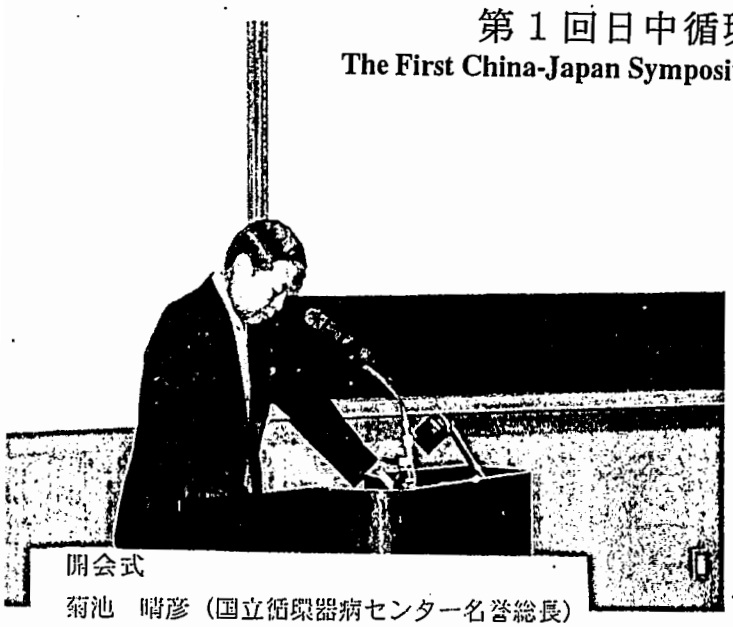
する血行再建術（永田　泉)、A Study on the Prognosis of Patients after Stroke during Early Rehabilitation（周　宝玉)、The Surgical Treatment and Prevention of Cerebral Stroke by Carotid Endarterectomy　(劉　鵬)、Clinic Experience in CABG of 400 Cases（王　武)、Changes of Cerebral Oxygen Metabolism Induced by Nimodipine in Subarachnoid Hemorrhage Measured by Near Infrared Spectroscopy（左　煥王宗)。

心臓血管疾患の外科治療に関しては、日本における心臓外科の現況（川島　康生）、冠動脈バイパス手術（小林　順二郎)、胸部大動脈瘤の外科治療（安藤　太三)、心臓外科手術における脳障害（畔　政和)、Surgical Treatment of Coronary Disease（王　鳳林)、Application of Thoracic Epidural Anesthesia to Cardiac Surgery（賈　乃光）等の講演がありました。

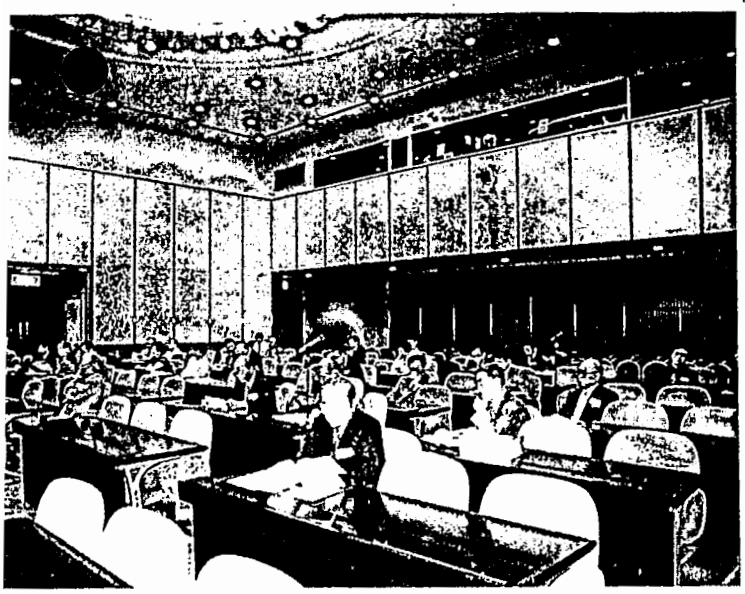
現在（平成９年）、日本では、死因の第一位は、悪性新生物でありますが、これに続いて死亡原因の第２位が心疾患であり、統計学的には10万人あたり、112人が年間死亡しています。そして、第３位の死亡原因が脳血管疾患であり、10万人あたり、年間111人がその原因で死亡しています。すなわち、現在の日本では、（悪性新生物）癌疾患で全死亡の３分の１が、そして、他の３分の１が心臓と脳の疾患が原因で死亡していることになります。さらに心臓疾患と脳疾患といういわゆる循環器病は、死亡原因のみならず、その有病者数の多さでも知られ、クオリティオブライフの低下が、社会生活を脅かします。今後、日本における人口構成の高齢化シフトや食生活の欧米化などを背景として、21世紀における重大な社会的問題であることは間違いありません。現在すでに日本が迎えた、また今後進んでいく長寿社会の中で，その予防，診断，治療においてまだまだ解決されるべき問題は未だ山積しています。また，中華人民共和国においても循環器病は、間違いなく重要な疾患であり、その有病者の増加においては、今後、日本と同様の傾向を辿っていくものと考えられます。　すなわち、中国国内においても循環器病全般の社会的重要度はますます増加していくことと思われます。現在のまた、今後の循環器病施策のリーダーである中日友好病院への期待は非常に大きくなっています。

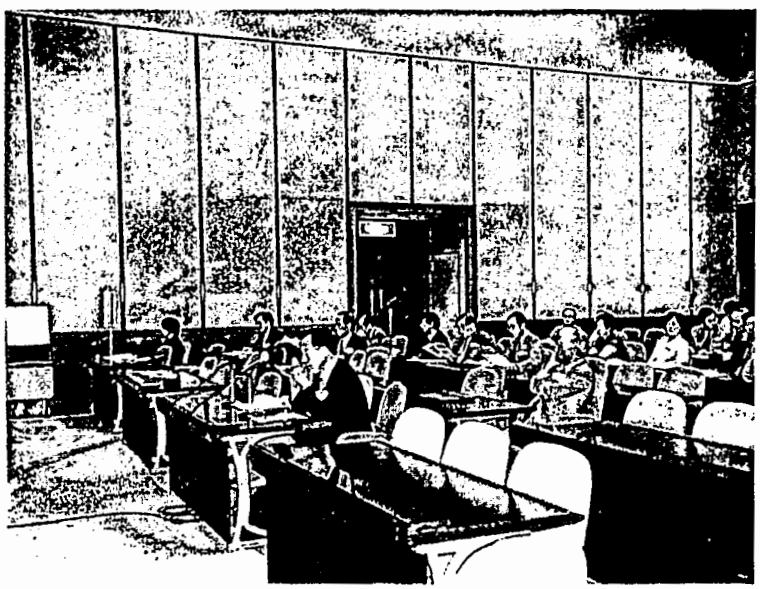
本シンポジウムは、日中の両循環器病センターをさらに発展させるため、また、循環器疾患全般における今後の日中両国の幅広い人的交流および学術交流の新たな芽生えとして機能することを目指し、盛会裏に終わりましたことをご報告申し上げます。

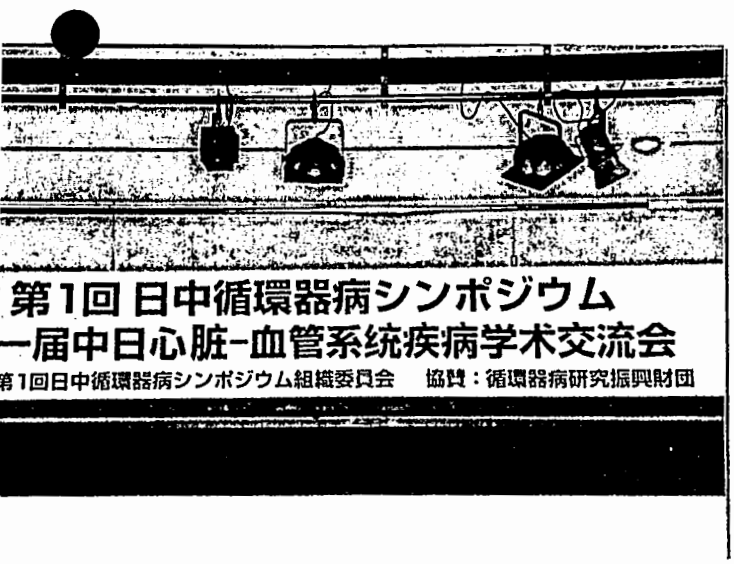
第１回日中循環器病シンポジウム
The First China-Japan Symposium on Cardio-Vascular Diseases

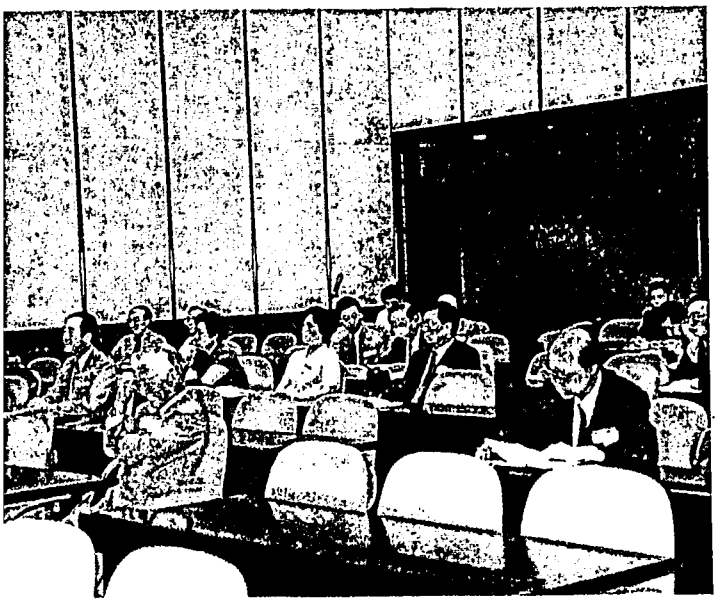


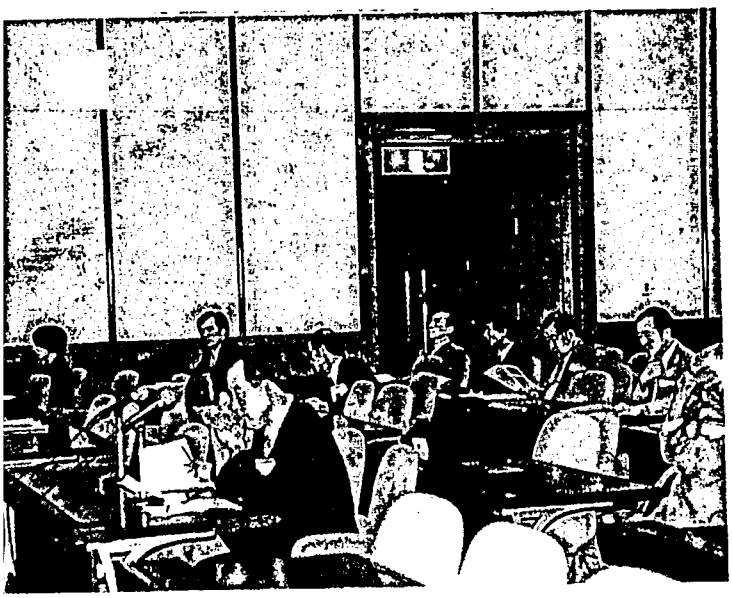
開会式
菊池　晴彦（国立循環器病センター名誉総長）











教育講演 1

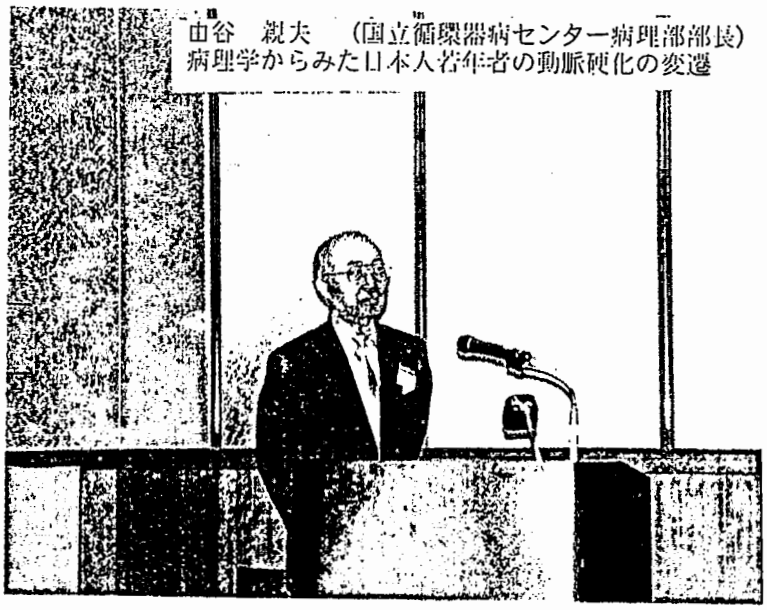
座長：菊池　晴彦（国立循環器病センター名誉総長）

川島　康生（国立循環器病センター名誉総長）

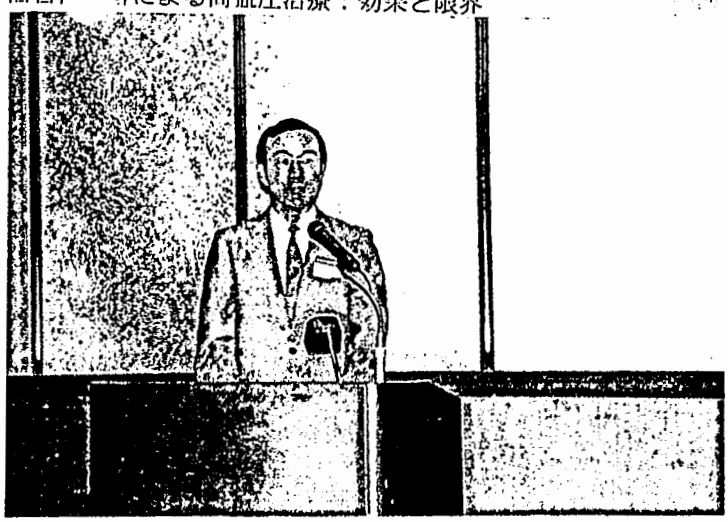
「日本における心臓外科の現況」

シンポジウム１：動脈硬化症・予防医学・疫学
座長：尾前　照雄（国立循環器病センター名誉総長）

由谷　親夫　（国立循環器病センター病理部部長）
病理学からみた日本人若年者の動脈硬化の変遷

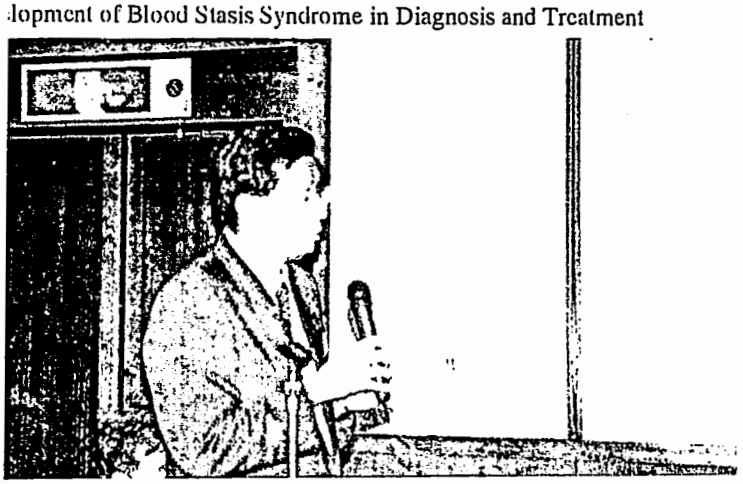


野　雄二　（国立循環器病センター高血圧腎臓内科医長）
活習[illegible]　等による高血圧治療：効果と限界



都島　基夫　（国立循環器病センター総合外来科医長）
非侵襲診断による動脈硬化の長期観察における変化

[illegible]祥（中日友好医院心腎内科主任教授）
lopment of Blood Stasis Syndrome in Diagnosis and Treatment



源（中日友好医院臨床医学研究所中西医結合研究室教授）
of Korea Red Ginseng's Preventive Effect on Hypertensive Retinal
sclerosis in Rabbits

教育講演２
菅　弘之（国立循環器病センター研究所長）
「拍動心臓の収縮特性、酸素消費、カルシウム動態」

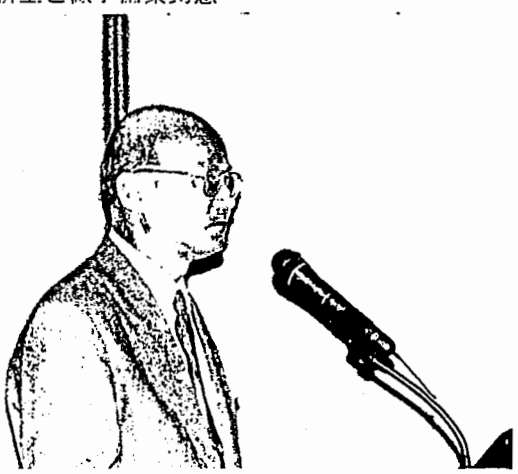
シンポジウム２：動脈硬化，血管病変の基礎研究

長：松尾　壽之（国立循環器病センター研究所名誉所長）

沢村　遠也（国立循環器病センター研究所細胞生物学研究室長）
酸化 LDL 受容体 LOX-1 の病態生理学的意義

：加　久雄（国立循環器病センター研究所病因部部長）

新見　英幸（国立循環器病センター研究所脈管生理部部長）
脳組織の血管新生と微小循環動態



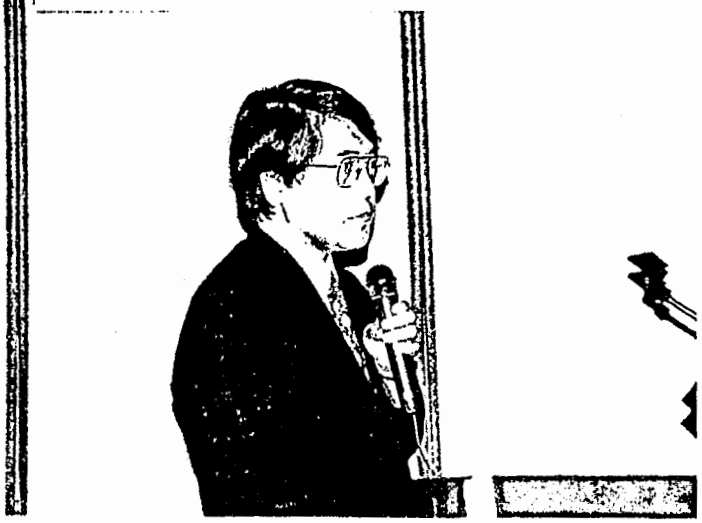
敬己（国立循環器病センター研究所循環器形態部部長）
内皮細胞の機械刺激受容機構

程　蘭英（中日友好医院臨床医学研究所病理生理室教授）
Nitric Oxide Synthase Activity Change of Cerebral Microvessel and Brain Areas during Focal Cerebral Ischemia / Reperfusion in Rats

逢源（中日友好医院臨床医学研究所血流変室主任教授）
nami　　lies on The Interaction of Lymphocyte Function-Associated tigen-1 (LFA-1) and Intercellular Adhesion Molecule-1 (ICAM-1)

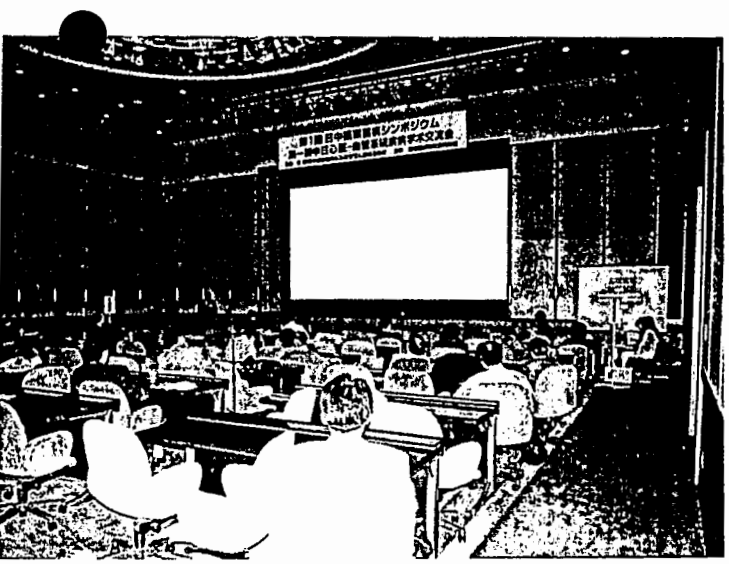
ンポジウム３：心臓血管疾患：内科的治療
長：宮武　邦夫（国立循環器病センター心臓内科部長）

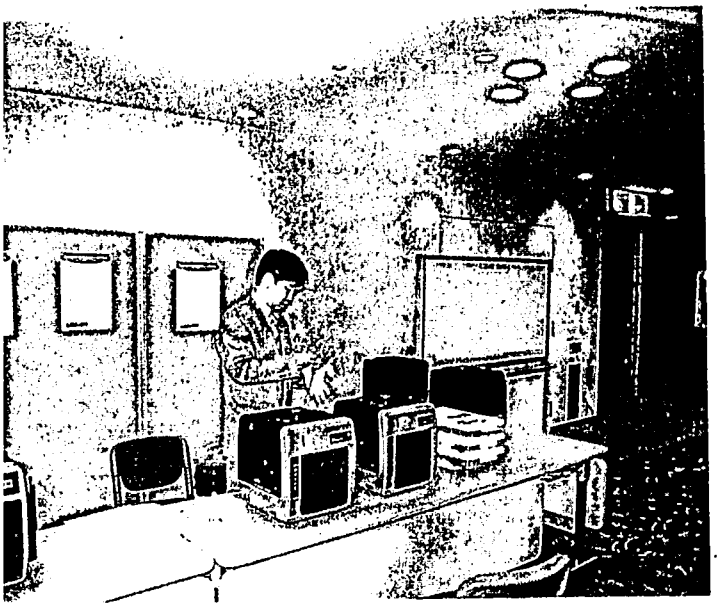
野々木　宏（国立循環器病センター心臓血管内科部長）
不安定狭心症に対する内科的治療



越仲　茂之（国立循環器病センター小児科部長）
小　　おける心筋炎，心筋症の治療

鎌倉　史郎（国立循環器病センター心臓血管内科医長）
特発性心室頻拍に対するカテーテルアブレーション

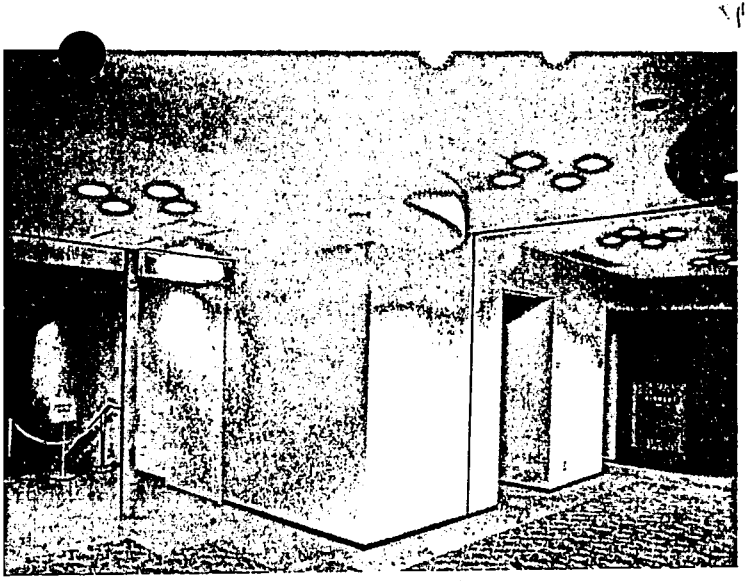




馬　長生（中日友好病院心臓カテーテル室助教授）
Electrophysiological Characteristics and Effect of Radiofrequency blat
of Paroxysmal Atrial Fibrillation Originating from The Pulmonary Vei

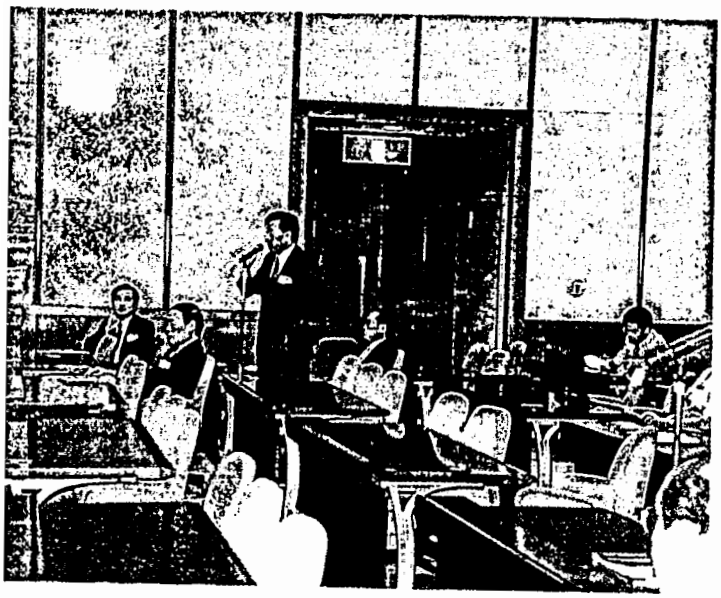
石　効平（中日友好医院中医処処長，小児科教授）
Clinical Treatment of Pediatric Myocarditis by Integration of
Traditional and Modern Medicine

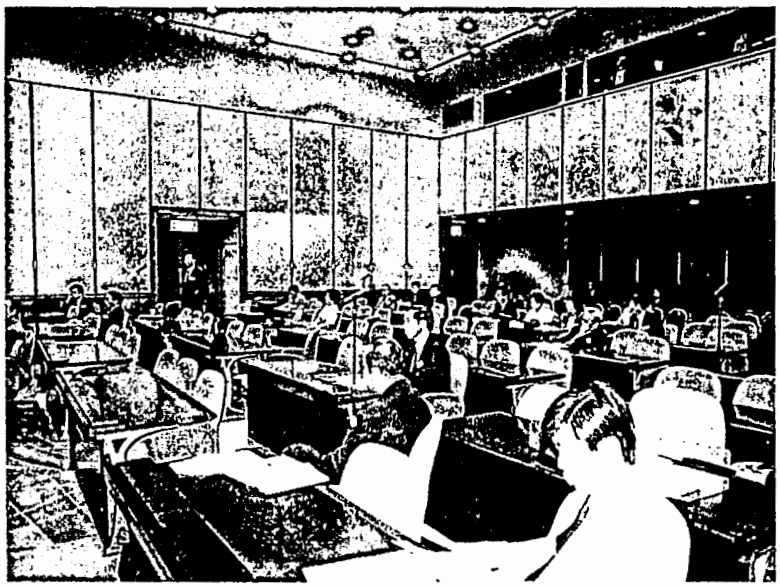
柯　元南（中日友好医院心臓内科主任教授）
The Efficacy and Safety of Atorvastatin in Treatment of Hyperlipidem



育講演３
口　武典（国立循環器病センター総長
日本における脳梗塞診療の実態」

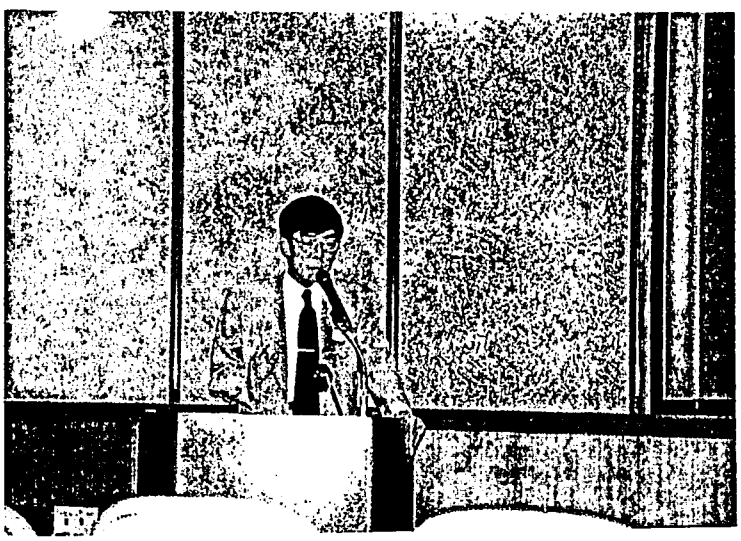
座長：左　煥琢、（中日友好医院副院長．脳外科主任教授）

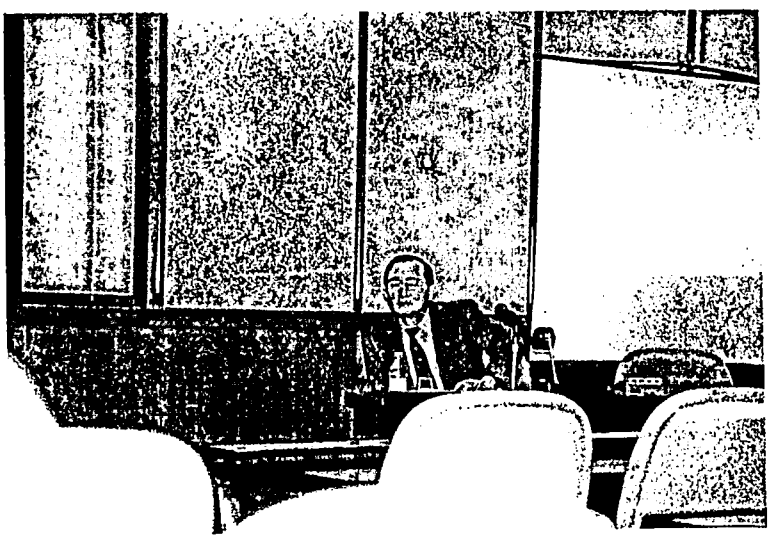




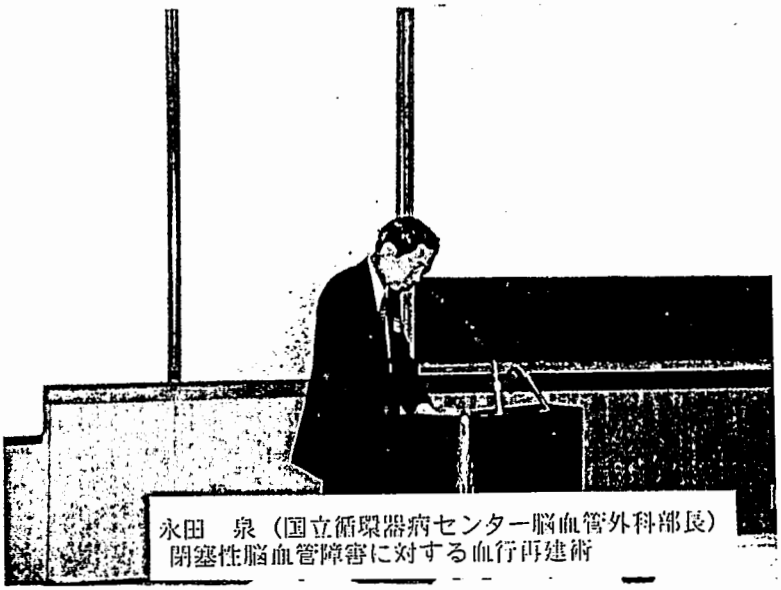
峰松　一夫（国立循環器病センター脳血管内科部長）
心原性脳塞栓症の診断と治療

座長：緒方　絢（国立循環器病センター集団検診部部長

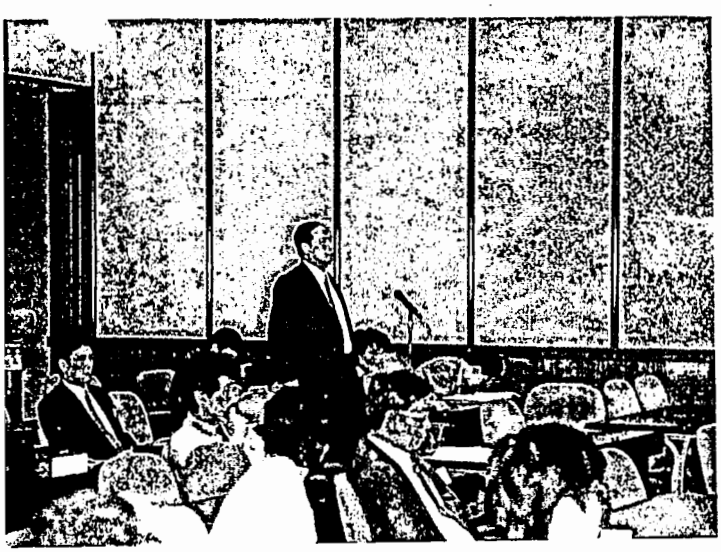


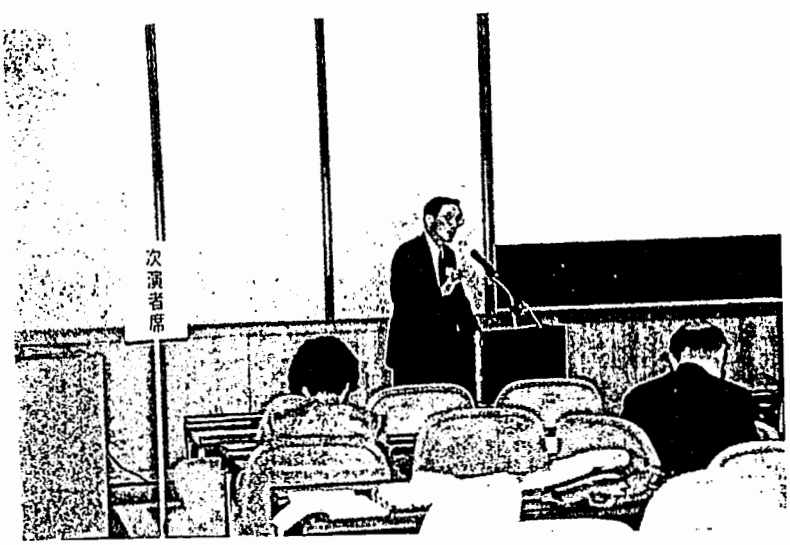


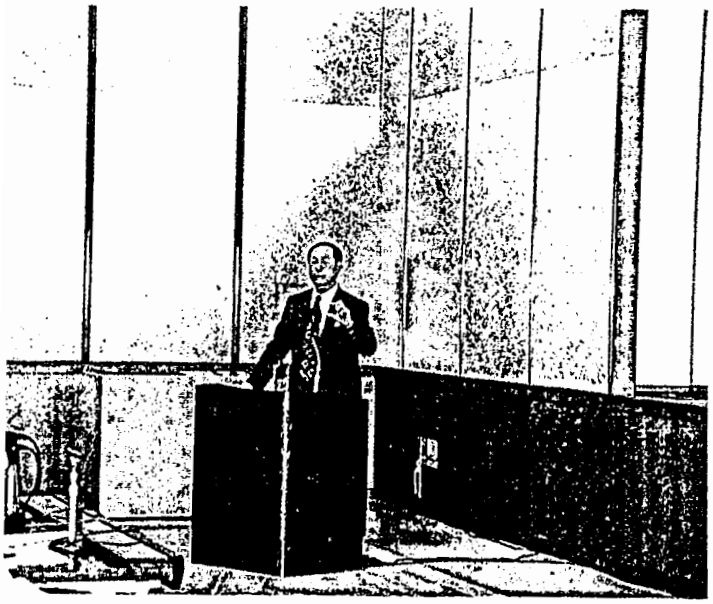
成冨　博章（国立循環器病センター脳血管内科部長）
脳梗塞に対する脳低温療法

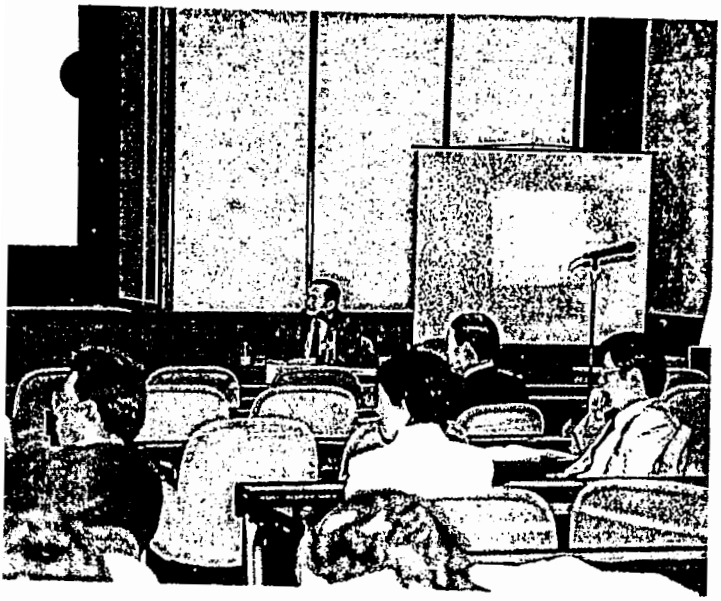


永田　泉（国立循環器病センター脳血管外科部長）
閉塞性脳血管障害に対する血行再建術



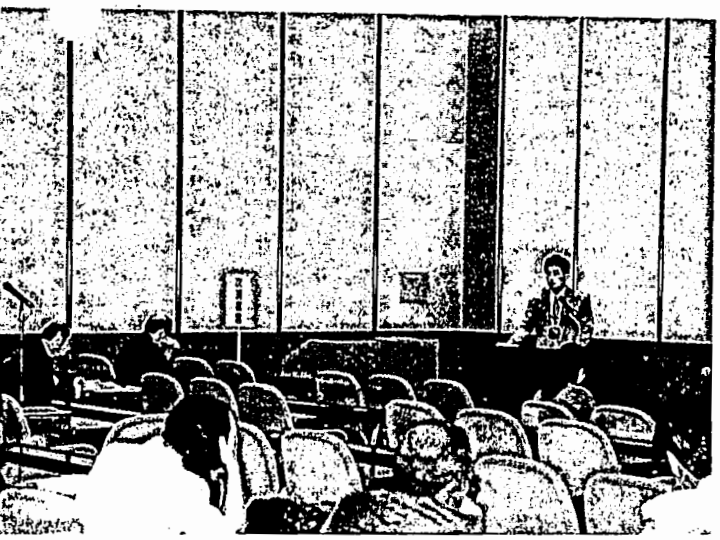


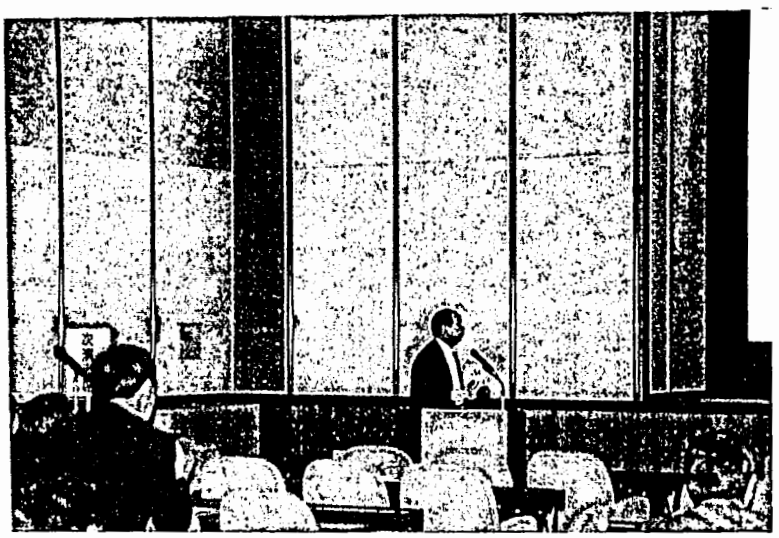




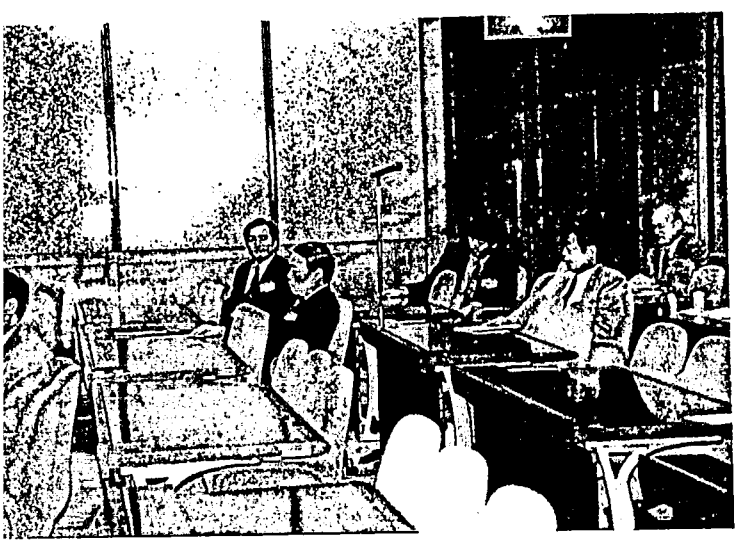
王　武（中日友好医院 CT 室助教授）

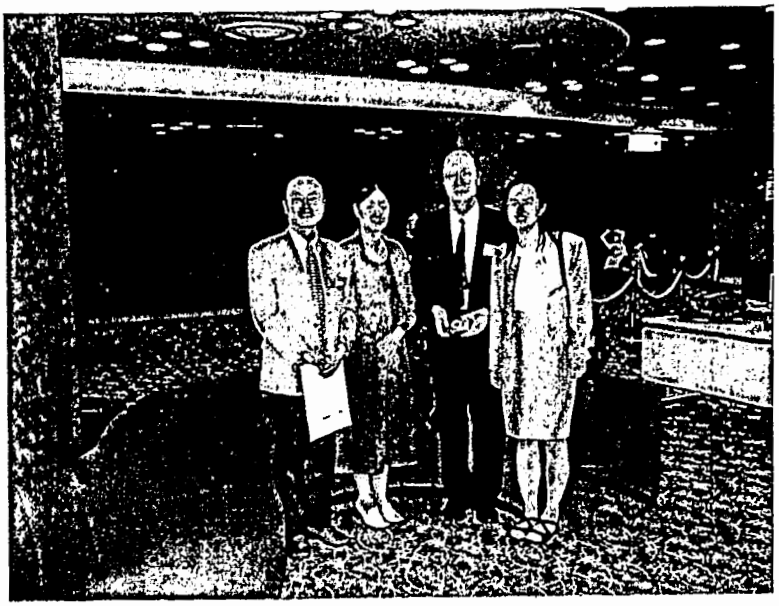
Spiral CT Angiography Detecting Cerebral Aneurysms





煥嵘（中日友好医院副院長，脳外科主任教授）
nges of Cerebral Oxygen Metabolism Induced by Nimodipine in
arachnoid Hemorrhage Measured by Near Infrared Spectroscopy

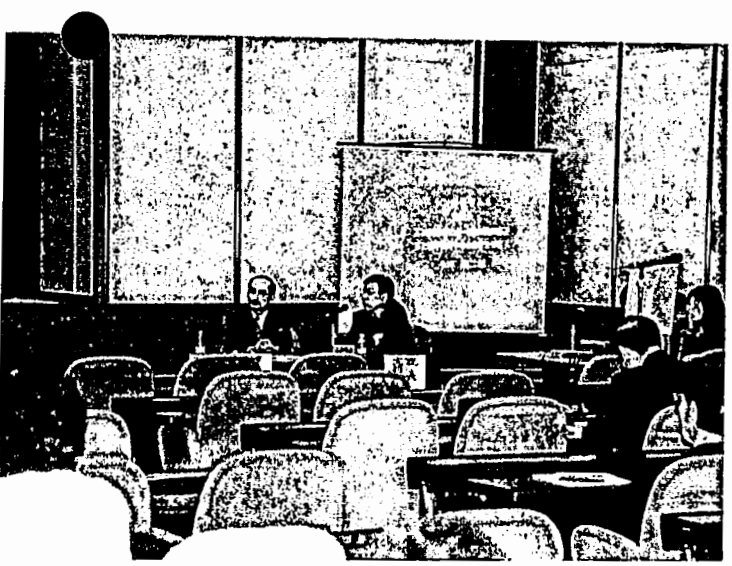


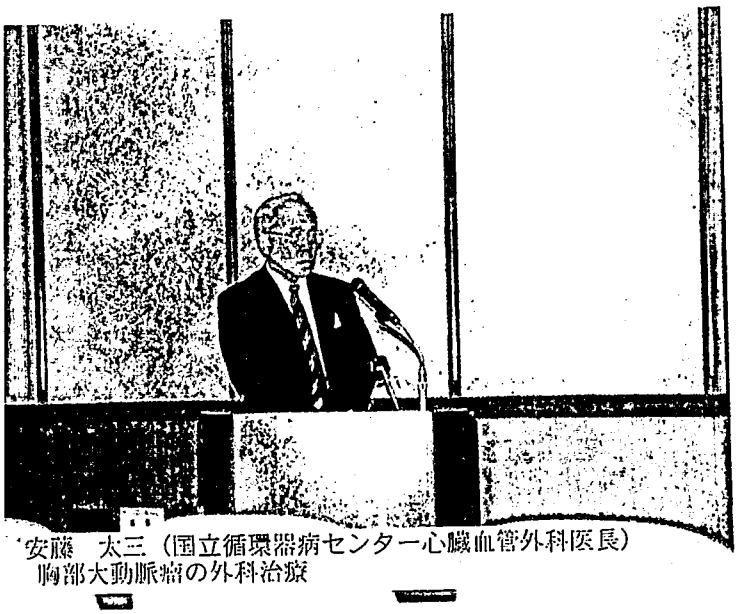


月１４日（金）第２日目（午後）

シンポジウム５：心臓血管疾患：外科的治療
座長：北村　惣一郎（国立循環器病センター副院長）
　　王　鳳林（中日友好医院心臓外科主任教授）

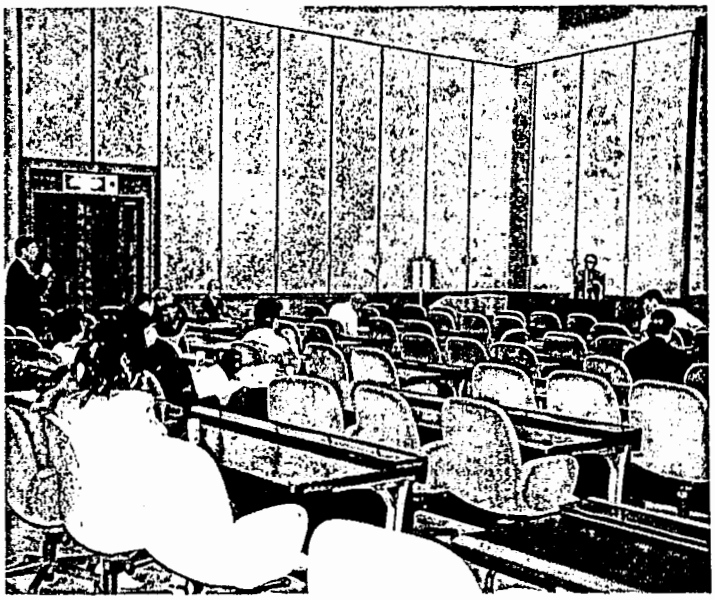
小林　順二郎（国立循環器病センター心臓血管外科医長）
冠動脈バイパス手術

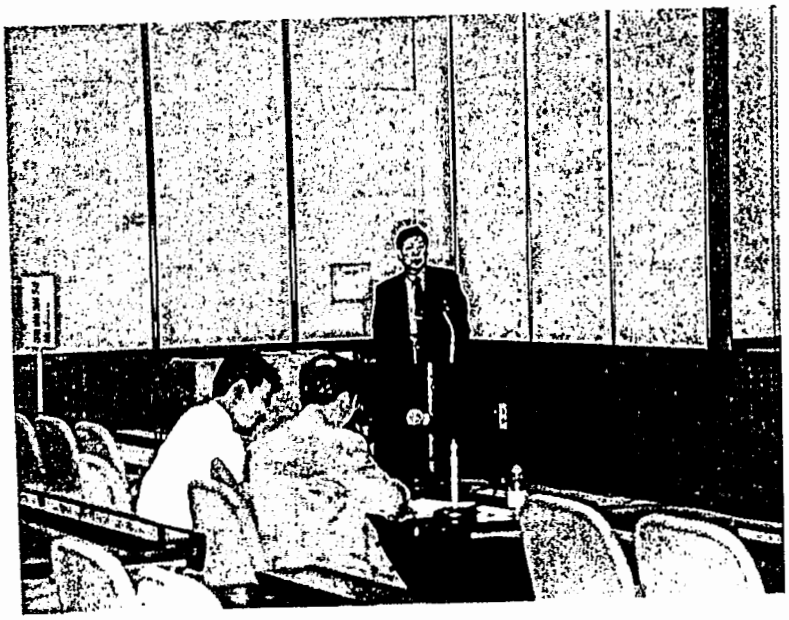




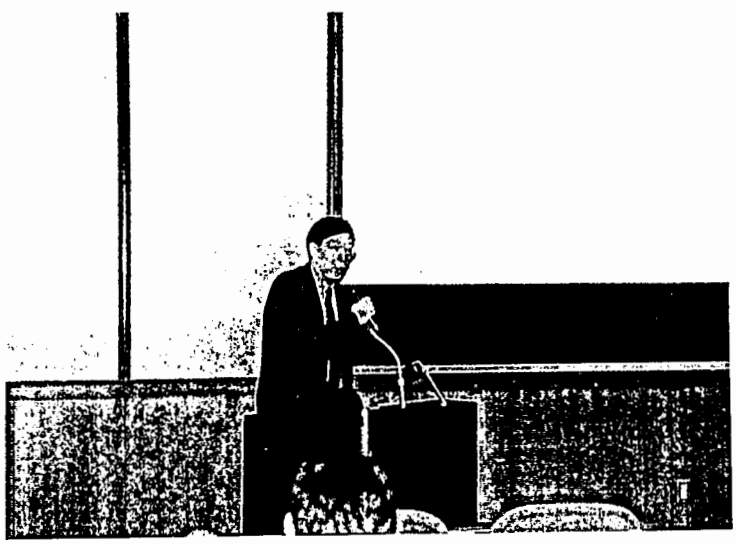
安藤　太三（国立循環器病センター心臓血管外科医長）
胸部大動脈瘤の外科治療

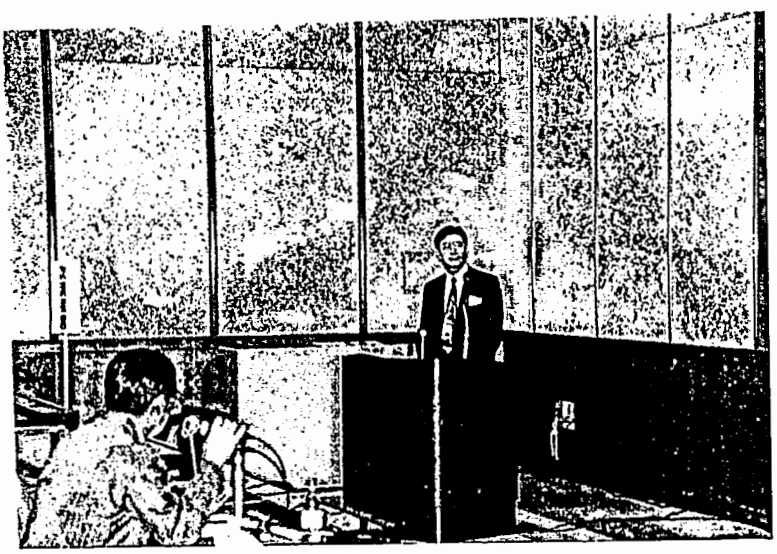
畔　政和（国立循環器病センター麻酔科部長）
心臓外科手術における脳障害



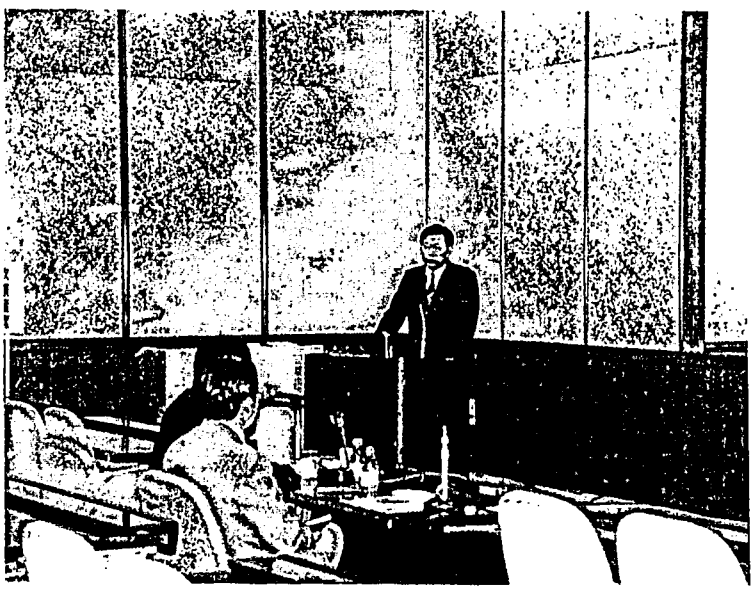


王　鳳林（中日友好医院心臓外科主任教授）
Clinic Experience in CABG of 400 Cases



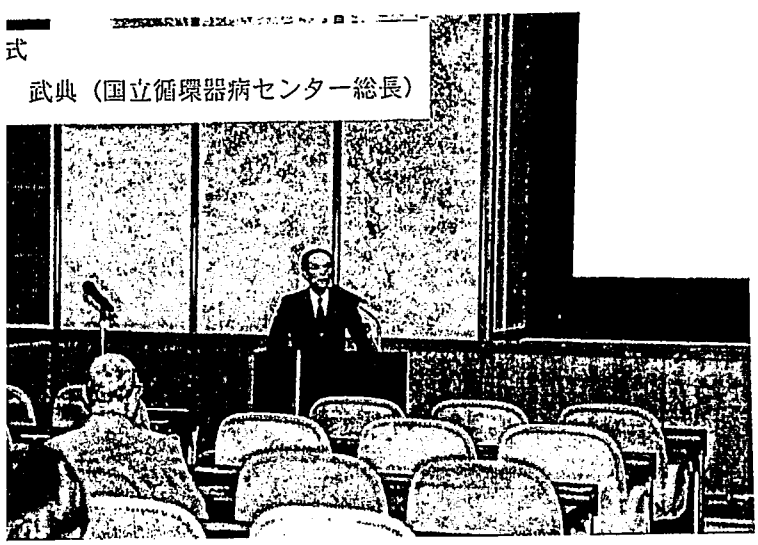


賈　乃光（中日友好医院麻酔科主任教授）
Application of Thoracic Epidural Anesthesia to Cardiac Surgery



式

武典（国立循環器病センター総長）



日本財団補助金による
２０００年度日中医学学術交流促進事業

②. 学会開催助成

(3) 「日本生薬学会第４７回(2000年)年会」

日本財団助成金による
2000 年度日中医学学術交流促進事業報告書

－学会開催に対する助成－

2000 年 10 月 27 日

財団法人 日中医学協会
理事長中島章殿

報告者氏名 奥山 徹 ㊞
所属・役職 明治薬科大学・教授
所在地 〒204-8588 清瀬市野塩 2-522-1
電話 0424-95-8904 内線

講演集・シンポジウム写真等学会に関する資料を添付

学会・学術交流の名称 日本生薬学会 第47回(2000年)年会
テーマ 「伝承薬物と代替医療を語る」、「中西医薬結合を目指して」
主催団体 日本生薬学会
代表者 年会会長 奥山 徹
期間・開催地 2000年(平成12年)9月7日(木)－9月8日(金) 所沢市民文化センター 所沢市並木1-9-1
参加者数 日本側 640 名 中国側 約 30 名
招へい・派遣目的 2つのシンポジウム「伝承薬物と代替医療を語る」と「中西医薬結合を目指して」で招待講演をしていただいた。

1．招へい・派遣研究者 人数 3 人 記入欄不足の場合は別紙を添付。

氏名	所属・役職	研究分野
匡 海学	黒竜江中医薬大学・教授、理事長	生薬学、天然物化学
王 峥涛	中国薬科大学教授・生薬学研究室主任	生薬学、天然物化学
蔡 少青	中国北京医科大学薬学院	生薬学、天然物化学

滞在期間 自 2000 年 9 月 6 日 至 2000 年 9 月 9 日

２．主な滞在日程

匡海学

平成１２年９月６、７日　　所沢パークホテル　宿泊

平成１２年９月８日　　成田エアポートワシントンホテル　宿泊

平成１２年９月７、８日　　日本生薬学会第４７回（２０００年）年会に参加

王崢涛

平成１２年９月６、７、８日　　所沢パークホテル　宿泊

平成１２年９月７、８日　　日本生薬学会第４７回（２０００年）年会に参加

蔡少青

平成１２年９月６、７、８日　　所沢パークホテル　宿泊

平成１２年９月７、８日　　日本生薬学会第４７回（２０００年）年会に参加

学会名称・日本生薬学会第47回（2000年）年会

学会テーマ：「伝承薬物と代替医療を語る」、「中西医薬結合を目指して」

日本側主催代表者氏名・奥山　徹・明治薬科大学天然薬物学・教授
中国側代表者氏名・匡海学　黒竜江中医薬大学・教授、理事長
王峥涛　中国薬科大学教授・生薬学研究室主任
蔡少青　中国北京医科大学薬学院

学会報告

報告者氏名・日本生薬学会第47回（2000年）年会会長・奥山　徹（明治薬科大学天然薬物学・教授）

日本生薬学会第47回（2000年）年会（東京）は、9月7日（木）、8日（金）の両日、2000年という節目の年に、埼玉県所沢市民文化センターMUSEで開催をさせていただきました。

日本生薬学の会長講演は会期の冒頭に持って参りました。三川潮会長には、会員、参加者一同に対する2000年の節目のメッセージを送る形で講演をいただきました。更に、本大会では“東洋医学・漢方診療の実践と天然薬物の日本における係わりと中国での現状”、並びに数年来話題になっている“代替医療”を取り上げました。この観点に立って、特別講演とシンポジウムを組みました。

特別講演は、「漢方診療の実際と課題」として、北里研究所東洋医学研究所・花輪壽彦所長、瀋陽薬科大学・姚新生学長には「中国で中薬および天然薬物についての研究動態」の演題で講演をしていただきました。花輪教授によると、“日本の医療機関の7-8割近くが漢方薬を診療に導入している。漢方が最も重視するのは「未病を治す」考えであり、西洋医学的病名がつく前に不調和を改善することにある。また、21世紀の医学の潮流は西洋医学と東洋医学のお互いの長短を補充・融合し、これを支える生薬学・漢方医薬学への期待は極めて大きい”と力説されました。姚新生教授は、中国における特許権の普及に長い間努めてこられました。姚先生と御一緒に中国国内を講演旅行した際にも、“中国が国際社会で取り残されないようにするためには特許の必要性がある”と力説されていた事が思い起こされます。化合物特許権が確立されて7年目ということでの中薬天然薬物の研究の現状をご紹介いただきましたが、中国人のエネルギーと大きな力を持って研究開発に取り組んでいる様子がヒシヒシと感じられました。

1日目のシンポジウムは、「伝承薬物と代替医療を語る」のテーマで、山崎幹夫先生にオーガナイザーとして、時流に乗った形で魅了していただきました。アメリカで台頭してきた背景と現状紹介を「アメリカにおける代替医療」として、糸川秀治先生（ノースカロライナ大学）に紹介していただきました。国立医薬品食品衛生研究所・佐竹元吉部長は、「食品薬区分の見直しと生薬分野からの提言」として、伝統医療に対するWHOの動き、代替医療に取り組む日本の行政上の対策、食薬区分の見直しの改正点と今後の課題、副作用に取り組む本格的な姿勢を述べられました。「中国における伝承薬物と代替医療」として、黒龍江中医薬大学副学長、理事長・匡海学教授は、56民族からなる中国でのそれぞれの民族独自の伝承医学・伝承薬物の発展とその使い方の紹介、更に、これらを基本にした現在の中医薬の利用状況について語っていただきました。

加えて、熊谷千津（アロマテラピスト）先生にアロマテラピーを活用して、チーム医療の一員として

医療現場で貢献している様子を紹介していただいたところ、会場からは実に大きな反響をいただきました。懇親会では言うまでもなく、学会終了後も何名かの方々からのお問い合わせと、多くの励ましのお手紙をいただきました。

2 日目の「中西医薬結合を目指して」のシンポジウムは、名古屋市立大学・荻原幸夫教授に担当していただきました。中国側のシンポジストとして、中国科学院上海薬物研究所・労愛娜教授には「中西医結合を目指した中薬研究の現状及び薬食同源としての韮（*Allium tuberosum*）の成分研究」、中国薬科大学・王峥涛教授には、「The Utilization, Chemical Constituents and Quality Evaluation of Roots and Leaves of *Lindera aggregata* (Wuyaku)」、北京大学薬学院・蔡少青教授には「漢方方剤により中西医薬結合ポイントを探す」のテーマで講演をしていただきました。次に、北里研究所　東洋医学総合研究所・山田陽城教授には「十全大補湯の腸管免疫系に対する作用と作用成分」のテーマで、腸管免疫系や全身免疫系におけるサイトカイン産生、肝免疫系に対する作用、造血系に対する作用、腸管免疫促進作用の作用成分と複合作用についてご講演をいただき、十全大補湯の有効性の裏付けを強調されました。

学術奨励賞受賞講演は第 5 回目を数えております。今回は、「高等植物におけるステロール及びトリテルペンの生合成研究」（東京大学大学院薬学研究科天然物化学教室・渋谷雅明）、「ムラサキ培養細胞におけるシコニン生合成遺伝子の解析とその光応答」（京都大学大学院生命科学研究所・矢崎一史）、「和漢薬の基源に関する研究―組織形態学、ケモタキソノミー、遺伝子解析の応用―」（富山医科薬科大学和漢薬研究所・小松かつ子）の 3 名の若き先生方が受賞講演されました。

一般参加者は 518 名で、生薬学会員以外の参加者は 83 名、学生会員は 95 名で、招待者と事務局関係者を合わせて 670 名程の参加者を数えました。一般講演は 165 演題（口頭発表 54 題・ポスター発表 111 題）で行われました。プログラムの編成は、従来とは少々異なるジャンルを取り入れ、幅広いエントリーが出来るように致しました。大・中・小分類に対応する項目を組み込ませる形で申し込んでいただき、これに合わせて編成いたしました。

日本生薬学会総会の開催、受賞者・新名誉会員・新永年会員の先生方の表彰式滞りなく進行させていただきました。また、総会に向けた前日の会長・副会長・三役会、役員会、並びに評議委員会は明治薬科大学で行われました。

懇親会は、会場への移動時間を出来るだけ短かにとの会員の方々からの要望に応えるべく、同じホールで開催させていただきました。予想以上のご好評をいただき感謝しております。

日本生薬学会は国内での学会でありますので、従来は外国から「特別講演」や「シンポジウム」に招待講演者として招へいされることはありませんでした。この度は、「日中医学協力事業　学会開催助成」を頂けたことにより、国際的な感覚で、日中の学術交流を遺憾なく発揮することが出来ました。学会参加者から大きな喜びをもって感謝されました。ここに、大会開催の責任者として、深く感謝申し上げます。