

2001年度日中医学協会共同研究等助成事業報告書

－調査・共同研究に対する助成－

平成14年 3月 1日

財団法人 日中医学協会
理事長 殿

研究代表者氏名 市川 秀 隆



所属機関名 金沢医科大学

部署・役職 医動物学・講師

920-0293

所在地 〒石川県河北郡内灘町大学1丁目1番地

電話 076-286-2211 内線 3935

1. 研究テーマ 一有鉤囊虫症 (Cysticercus cellulosae) 診断のための抗原の分離精製並びに、
それを用いて中国東北地方の同症感染状況の調査

2. 研究期間 自 2001 年 4 月 1 日 ～ 至 2002 年 3 月 15 日

3. 研究組織

日本側研究者氏名 市川 秀 隆

所属機関 金沢医科大学 職名 講師

中国側研究者氏名 徐 之傑

所属機関 哈爾濱医科大学 職名 教授

4. 研究報告書

別紙報告書作成要領に従い、添付の用紙で研究報告書を作成して下さい。

※研究成果を発表する場合は、発表原稿・抄録集等も添付して下さい。

※発表に当っては、日中医学協会助成金による旨を明記して下さい。

5. 収支決算報告

—有鉤囊虫症 (Cysticercus cellulosae) 診断のための抗原の分離精製

2001年4月4日交付通知のあった研究課題 並びに、それを用いて中国東北地方の同症感染状況の調査—

についての収支決算を行ないました。領収書コピーを添えて、次のとおり報告します。

交付を受けた金額	支 出 内 訳			
	消耗品費	旅 費	そ の 他	合 計
1,000,000 円	1,000,000 円	0 円	0 円	1,000,000 円

支出明細（消耗品・旅費・その他の科目別に記載、別紙可）

科目区分	金 額	備考（用途・内訳）
消 耗 品	1,000,000	抗ヒト血清 IgG(α) ヤギ HRP 抗ヒト血清 IgG [F(ab') ₂] ヤギ HRP 抗ヒト血清 IgM(μ) ヤギ HRP 抗ヒト血清 IgE(ϵ) ヤギ HRP 抗ブタ全血清ウサギ HRP シルバーステイン SDS-PAGE キット ABTS DAB BSA TEMED アクリルアミド ビス 過硫酸アンモニウム フレーム モジュール マイクロピペット P-200 マイクロピペット P-100 マイクロピペット P-10 ダイヤモンドチップ ドラモンドピペットエンド PA-300 エッペンドルフピペット 4780 その他

—有鉤囊虫症 (Cysticercosis cellulosae) 診断のための抗原の分離精製並びに、それを用いて中国東北地方の同症感染状況の調査—

研究者氏名	市川秀隆
日本研究機関	金沢医科大学医動物学
共同研究者	伊藤洋一*1・保阪幸男*1・小松俊彦*1・ 長瀬啓三*3・徐 之傑*4 *1 バイオメディカルサイエンス研究会 *3 藤田保健衛生大学短期大学医動物学教授 *4 中国・哈爾濱医科大学寄生虫学教授

ABSTRACT:

Immunoserological study of cysticercosis carried out on sera from patients, healthy Chinese, endemic inhabitant and non-endemic inhabitant, using the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and enzyme-linked immunotransfer blot assay (EITB) in Jilin, China.

For the evaluate of suitable antigen, we prepared the 2 materials designated as cyst fluid (CF) and whole cyst (WC) obtained from pig. A total 430 sera, including 134 healthy sera, 86 patients sera, 115 non-endemic inhabitants, 95 endemic inhabitants sera obtained from Changchun in China. In patients (clinically suspected) sera, 82 (95.4%) out of 86 sera were positive. On the other hand, 4 (3.0%) of 134 healthy Chinese sera showed positive. Sixteen (13.9%) out of 115 sera from non-endemic area were positive. On the other hand, 33 (34.7%) of 95 sera of endemic area showed positive. In comparison with ELISA value among sera from healthy Chinese, non-endemic and endemic area inhabitants, clearly significant difference were observed.

Key Words : Cysticercosis, seroimmunodiagnosis, ELISA, Immunoblot

INTRODUCTION:

Cysticercosis, caused by larval stage of *Taenia solium*, is a serious problem to human health. The disease is endemic in a few countries of Latin America, South-east Asia, and Central Africa and is becoming increasingly prevalent in the United States and Europe. The larvae migrate into central nervous system (CNS) of human and were induced reveal severe neurological disorders. Diagnosis study evaluating the cysticercosis lesions with nuclear magnetic resonance imaging (MRI) and computed tomography (CT) is proposed. Recently, Plancerte et. al. (1994) demonstrated that enzyme linked immunosolvent assay (ELISA) and immunoblot assay was a good diagnostic tool for cysticercosis. But specific diagnosis of this disease is difficult until now.

Seroepidemiological survey has been carried out in several endemic countries by using with ELISA. In Central America, especially in Mexico, there are many reports of serodiagnostic survey of cysticercosis. However, as far as we

know, there are few from China, despite its endemicity.

The prevalence of cysticercosis was investigated among non-endemic and endemic area in Jilin of China. The availability of ELISA with enough sensitivity and specificity to be applied in the field setting, permitted to perform a series of populational studies aimed to know the epidemiological characteristic of cysticercosis in endemic populations in China.

MATERIALS AND METHODS:

Preparation of antigens

The cysticerci were obtained from infected pigs and separated the 2 parts of cyst fluid (CF) and whole cyst (WC). Each material was homogenized in 3 volumes of 0.85% NaCl solution using a Teflon-glass homogenizer in ice. The homogenates were centrifuged at 15,000 G for 30 min, and the supernatants were used as antigen.

Protein concentrations were determined by the Bio-Rad protein assay kit (Bio-Rad Lab., Richmond, CA) using a bovine serum albumin as standard.

Sera

Eighty-six sera from clinically suspected case of cysticercosis and 134 sera, from healthy individuals without history of neurological disorders were obtained in Changchun, China. Ninety-five sera from inhabitants in endemic area of Shaangyang and 115 sera from non-endemic area of Nongan, China were also obtained. Sera from 134 healthy Chinese were used as control.

ELISA studies

The protocol for ELISA method followed Engvall and Peter (1971) and Weekmen and Schcrus (1971). Briefly, microtiter plates (NUNC, Intermed, Denmark) were coated with 100 μ l (10 μ g/ml protein) of antigen solution (0.5M carbonate-bicarbonated buffer, pH 9.6) and incubated for one hour at 38°C and left overnight at 4°C. The excess antigen was washed away using 0.05% Tween-20 in PBS (PBS/T). Blocking was done with 100 μ l of PBS/T containing 1% bovine serum albumin (BSA) for one hour at 38°C. After the washing, 100 μ l of diluted serum samples was added to wells. The last well of each plate received serum-free PBS/T and served as negative control or blank well. The plate was incubated for one hour at 37°C and was washed several times with PBS/T. Peroxidase-labeled goat anti-human immunoglobuline G Fc-Fragment (Organon Tekhica N.V.-Cappel Productes, USA) at dilution 1:500 in PBS/T was added to all wells (100 μ l per well) and the plate were incubated for one hour. After washing, we added the 100 μ l substrate, 0.03% 2,2'-azino-bis(3-ethyl-benzthiazolin-6-sulfonic acid) in 0.05M citric acid and 0.01M sodium phosphate buffer containing 0.003% H₂O₂, to each well. The enzyme-substrate reaction was allowed to occur at room temperature for 60 minutes. The reaction was stopped by adding 50 μ l of 1.25% sodium fluoride to each well. The optical density (OD) of each well was measured at 405-595 nm against the blank using Model 3550 microplate reader (Bio-Rad Laboratories, USA).

SDS-PAGE and Immunoblotting

SDS-PAGE was performed according to the procedure of Laemmli (1970) in 12.5% polyacrylamid gels. In some experiments, disulfide bonds were reduced with 5% β -mercaptoethanol. The protocol of electrophoretic transfer onto nitrocellulose followed Burnet (1981). The samples were separated with SDS-PAGE under reducing conditions, then electrotransferred to a nitrocellulose membrane (GVHP 304FO, Nihon Millipore Kogyo Co., Yonezawa, Japan). Some membrane strips were stained with Indian ink for protein profiles (Hancock and Tsang, 1983). The remaining strips were immunostained with peroxidase conjugated anti-human IgG antibody as follows; the strips were washed, incubated in blocking solution (1% BSA/T), then reacted with sample sera diluted 1/100 in PBS/T. After incubation in peroxidase-conjugated anti-human antibody solution diluted 1/500 in PBS/T, the nitrocellulose strips were incubated with the substrate, 0.7 mM 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride, 0.01% H_2O_2 , 50mM Tris-HCl buffer, pH 7.2. The reaction was stopped by rinsing the strips with tap water.

A molecular standard (M 4038, Shigma Chem. Co., St Louis, USA) was run with each gel.

Statistics

Statistical differences was analyzed by the t-test. A p-value of less than 0.01 was considered to be significant.

RESULTS AND DISCUSSION:

The diagnosis of CNS cysticercosis is often difficult. Palpation for subcutaneous nodules and roentgenograms for calcified cysts in muscles occasionally aid the diagnosis. In the past, indirect hemagglutination and complement fixation tests has been utilized, but in our experience, neither has been sufficiently reliable to permit the desired degree of confidence in serological diagnosis. Recently, CT scans have been employed with considerable success and are especially helpful in determining the need for surgery .

We carried out to know the optimum concentration of serum by ELISA test, which reacted with 1 μ l of WC antigen from Guatemalan cysticerci. The results showed 1024 times or more dilution of healthy Chinese sera has only a few background response (Fig. 1). As a result of these data, 1000 times dilution of sera were used to detect antibodies by ELISA.

Fig.2 showed the ELISA using with WC and CF antigens in sera from healthy, patient, non-endemic and endemic area inhabitants. Scatter plots showed the result of ELISA value measured in using WC and CF antigens. A few strong reactions with WC antigen than CF ($y=0.287x + 0.032$) were observed on healthy Chinese sera (Fig. 2-A). But patient, non-endemic inhabitant and endemic inhabitant sera showed almost equivalent reaction with WC and CF as $y=0.924x - 0.029$, $y= 0.854x +0.049$, $y=0.699x + 0.048$, respectively.

The mean OD values with SD at a dilution of 1:1000 in 134 Chinese sera were 0.108 ± 0.063 and 0.064 ± 0.027 , respectively (Table 1). We were defined means \pm 3SD as the cut-off value between positive sera and negative. According to cut-off value of both antigens, 82 (95.4%) out of 86 sera from clinically suspected were positive, but 4 (3.0%) out of 134 healthy sera showed also positive (Table 2). In endemic area, 33 (34.7%) out of 95 sera were positive, but 16 (13.9%) out of 115 sera from non-endemic area showed positive (Table 2).

ELISA value between WC and CF antigens were shown Fig. 2, and sera from patient, non-endemic and endemic

inhabitants were almost same value. On the other hand, the ELISA value of WC antigen were higher than CF antigen in healthy Chinese sera (Fig. 2-A).

In order to characterize WC and CF antigen fraction, with 84 sera (22 were healthy persons, 22 were patients, 18 were non-endemic area persons and 22 were endemic area persons) showing a high OD value against WC and CF antigens fraction by ELISA were examined by immunoblot assay (Fig. 3,4,5,6).

In patient sera, 22 of them reacted with 15.5, 17.5, 18.5, 20, 22, 26.5, 27, 28, 32, 35, 37, 40, 48, 56, 62, 82, 97, and 115 kDa MW on WC antigen and 35 of them (Fig. 4) were reacted with 15.5, 17.5, 18.5, 22, 26.5, 27, 28 and 97 kDa MW on CF antigen, respectively. But, some of them showed nothing reaction whether it showed higher OD value with two antigens by ELISA.

Similarly, in non-endemic area, which sera showed positive reaction on the ELISA were reacted with 15.5, 17.5, 18.5, 20.5, 22.5, 26.5, 27, 28, 32, 35, 37, 40, 48, 56, 62, 82 and 97kDa MW on WC antigen and were reacted with 27 and 39 kDa MW on CF antigen (Fig. 5), respectively.

In endemic area, which sera showed positive reaction on the ELISA were reacted with 15.5, 17.5, 18.5, 20.5, 22.5, 26.5, 27, 28, 35, 37, 40, 48, 56, 62, 82, 97 and 115 kDa MW on WC antigen and were reacted with 35, 37, 40, 80 and 97kDa MW on CF antigen (Fig. 6), respectively.

Guerra et al. (1982) described antigen B to be composed of 2 protein subunits with molecular weights of 105 and 95 kDa. Analysis of the antigenic profiles obtained by us reveals polypeptides with the similar molecular weight (95 and 115kDas). We found that the smaller of these antigens (97 kDa) reacted with IgG. In addition, it is also clear from our results that antigens with molecular weights of 62,65, 48, 40, 37, 35, 28, 27, 26.5 kDa were immunodominant.

REFERENCES:

- 1) Burnet, W.N. (1981) : "Western Blotting" : Electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamid gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal. Biochem.*, 112, 195-203.
- 2) Engvall, E. and Peter P. (1971) : Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) Quantitative assay of immunoglobuline G. *Immunochemistry*, 8, 871-874.
- 3) Guerra, G., A. Flisser, L. Canedo, and J. P. Laclette. (1982) : Biochemical and immunological characterization of antigen B purified from cysticerci of *Taenia solium*. In *Cysticercosis present state of knowledge and perspectives*, A. Flisser, K. Willms, J. P. Laclette, C. Larralde, C. Ridaura, and F. Beltran (eds.). Academic Press, New York, pp. 437-451.
- 4) Laemmli, U. K. (1970) : Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4. *Nature*. 227, 680-685.
- 5) Hancock, K. and Tsang, V. C. W. (1983) : India ink staining of proteins on Nitrocellulose paper. *Analytical Biochemistry*. 133, 157-162.
- 6) Placente, A., Fexas, A. and Flisser, A. (1994) : Reactivity in ELISA and dot blot of purified GP24, an immunodominant antigen of *Taenia solium*, for the diagnosis of human neurocysticercosis. *International J. Parasitol.*, 2, 733-738.

7) Van Weekmem, B. K. and Schcrurs, A.H.W.M. (1971) : Immunoassay using antigen-enzyme conjugates. FEBS Letter, 15, 232-236.

Table 1.

OD value with serological test by ELISA using WC and CF antigens of cysticercus cellulosae

Serum		Normal	Non-endemic area	Endemic area	Patient
No. of person		134	115	95	86
ELISA OD value (means \pm SD)	WC	0.108 \pm 0.063	0.146 \pm 0.165	0.205 \pm 0.232	0.621 \pm 0.191
	CF	0.064 \pm 0.027	0.114 \pm 0.184	0.224 \pm 0.288	0.704 \pm 0.197

WC: whole cyst

CF: cyst fluid

Table 2.

Number of positive sera with ELISA using WC and CF antigens of cysticercus cellulosae

Serum		Normal		Non-endemic area		Endemic area		Patient	
No. of person		134		115		95		86	
No. of positive person* (%)	WC	2 (1.5%)	4 (3.0%)	12 (10.4%)	16 (13.9%)	25 (26.3%)	33 (34.7%)	80 (93.0%)	82 (95.4%)
	CF	2 (1.5%)		13 (11.3%)		32 (33.7%)		82 (95.4%)	

* Positive limit by control data (means \pm 3SD) of Chinese on WC and CF antigens

WC: whole cyst

CF: cyst fluid

Fig. 1. Optimum concentration of normal chinese person sera which measured absorbance of ELISA using on WC antigen

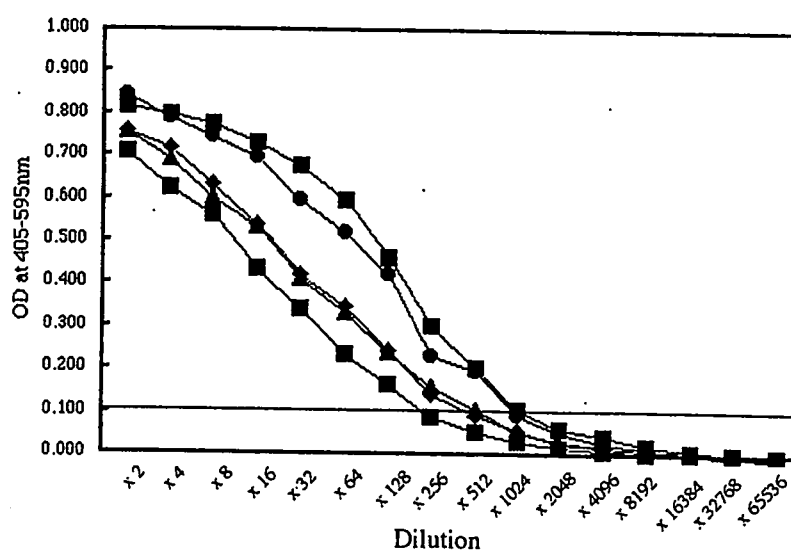


Fig 2

Correlation of ELISA value between WC and CF antigens in healthy, patient, Non-endemic area and endemic area sera

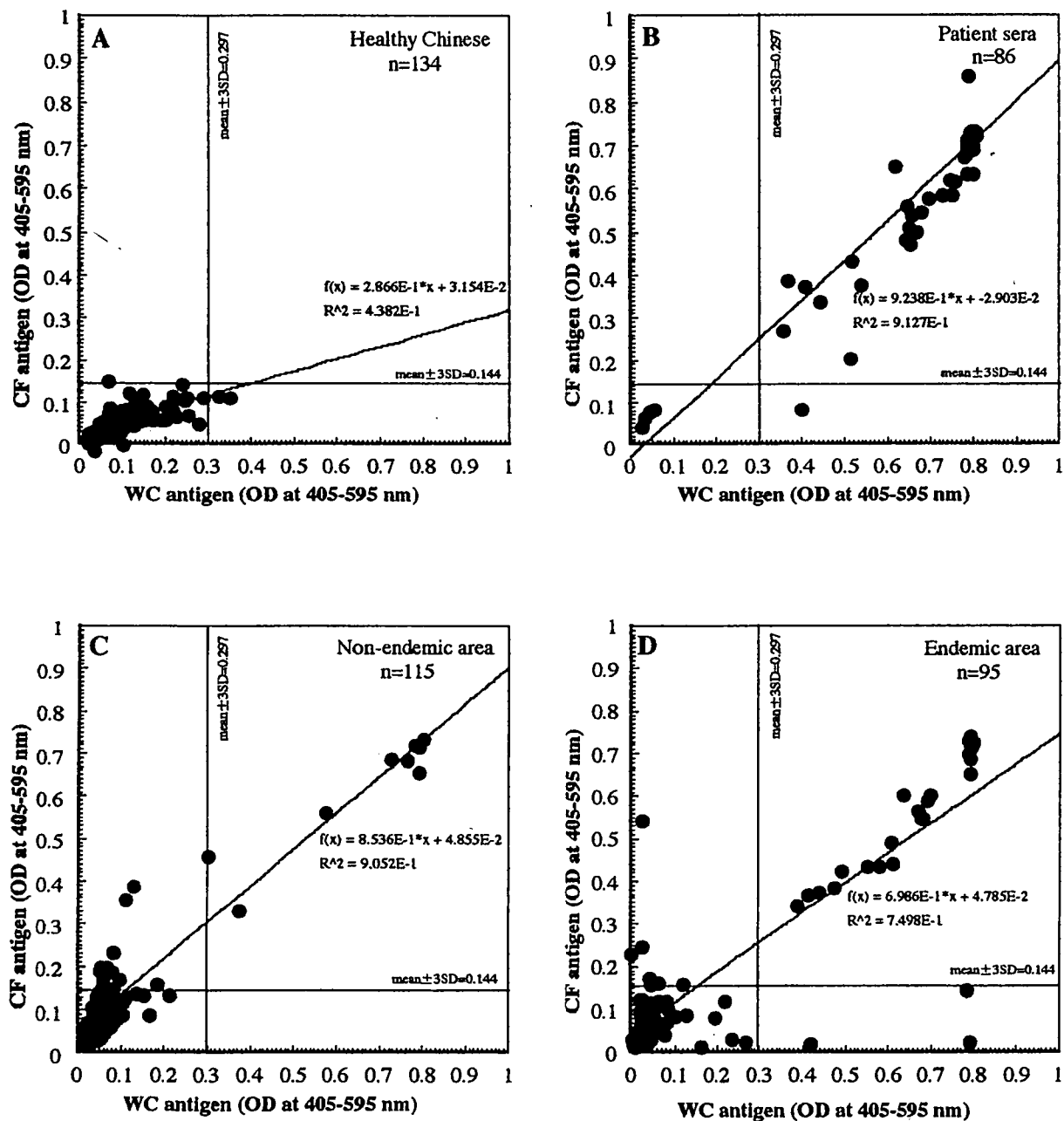


Fig. 3 Immunoblot analysis of whole cyst and cyst fluid antigens of *cysticercus cellulosa* with healthy Chinese sera

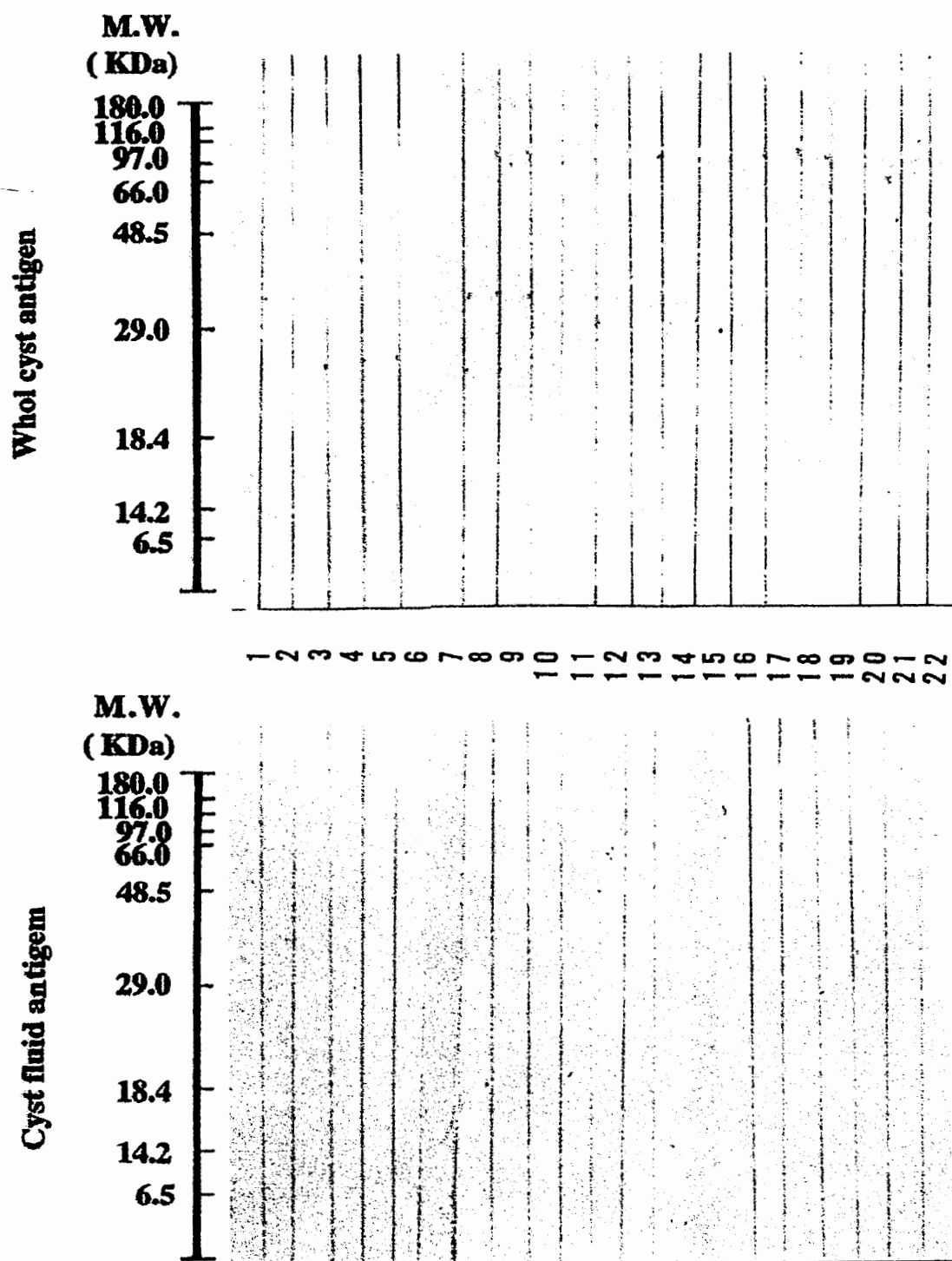


Fig. 4 Immunoblot analysis of whole cyst and cyst fluid antigens of cysticercus cellulosa with patient sera

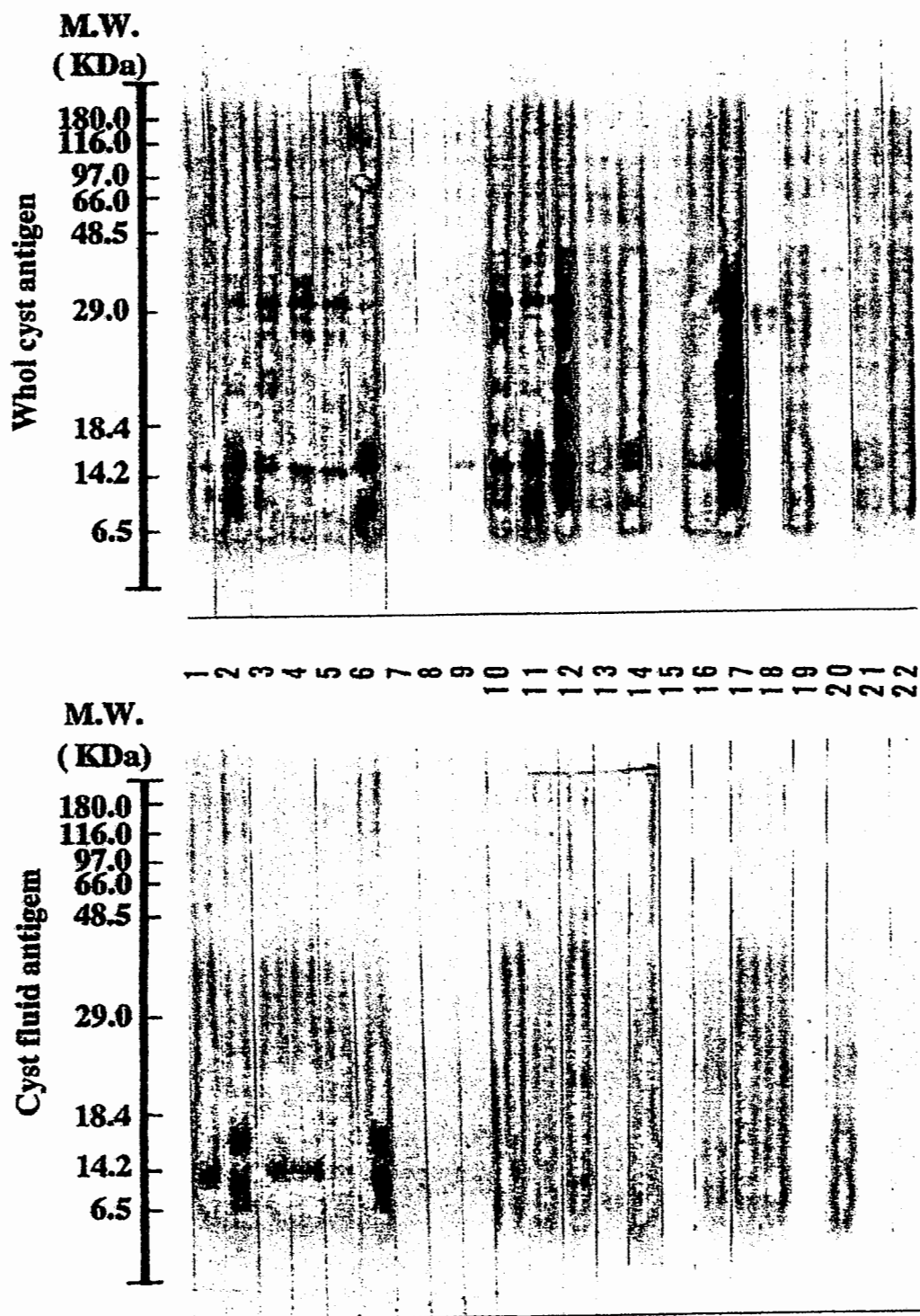


Fig. 5 Immunoblot analysis of whole cyst and cyst fluid antigens of *cysticercus cellulosa* with non-endemic inhabitant sera

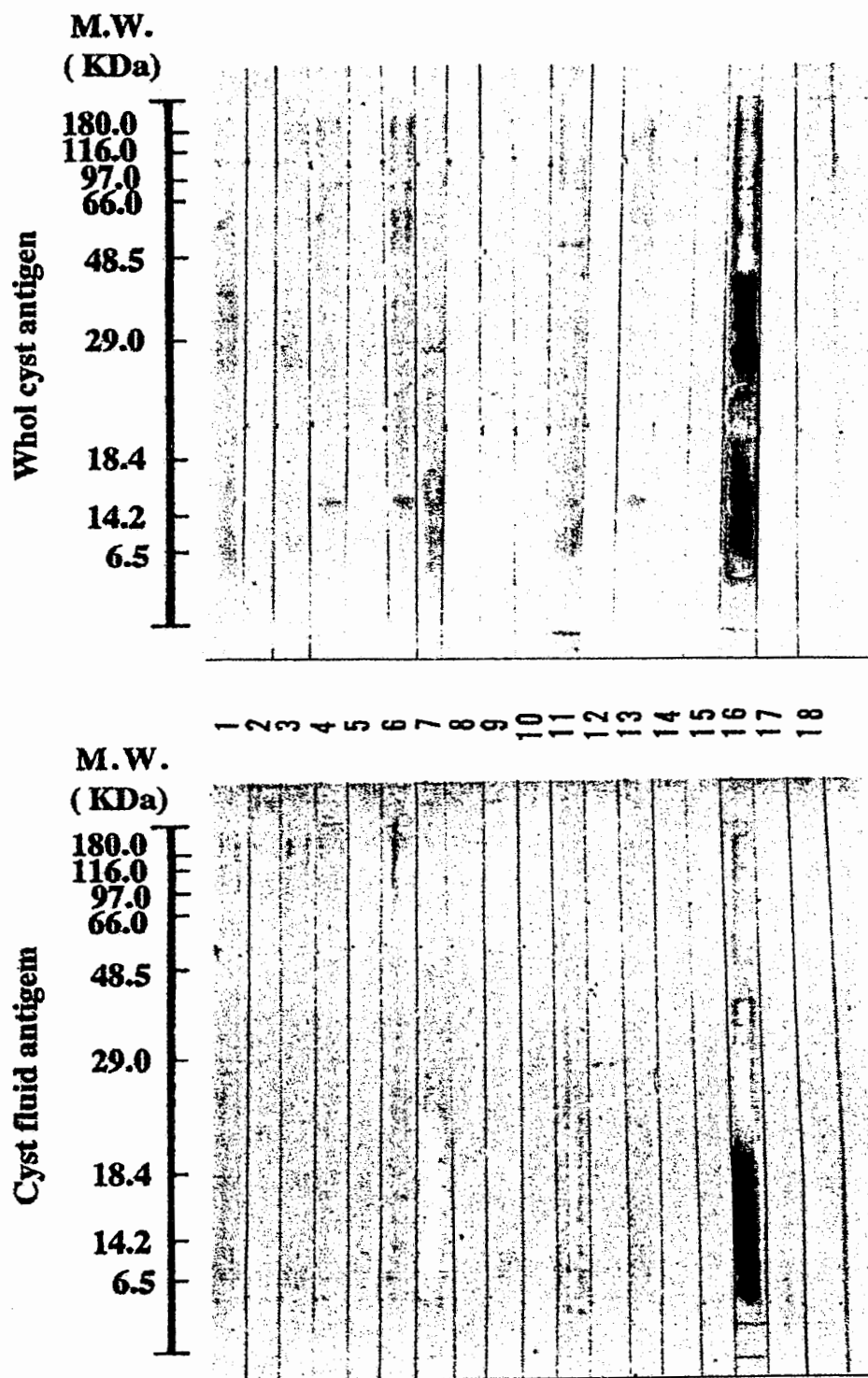
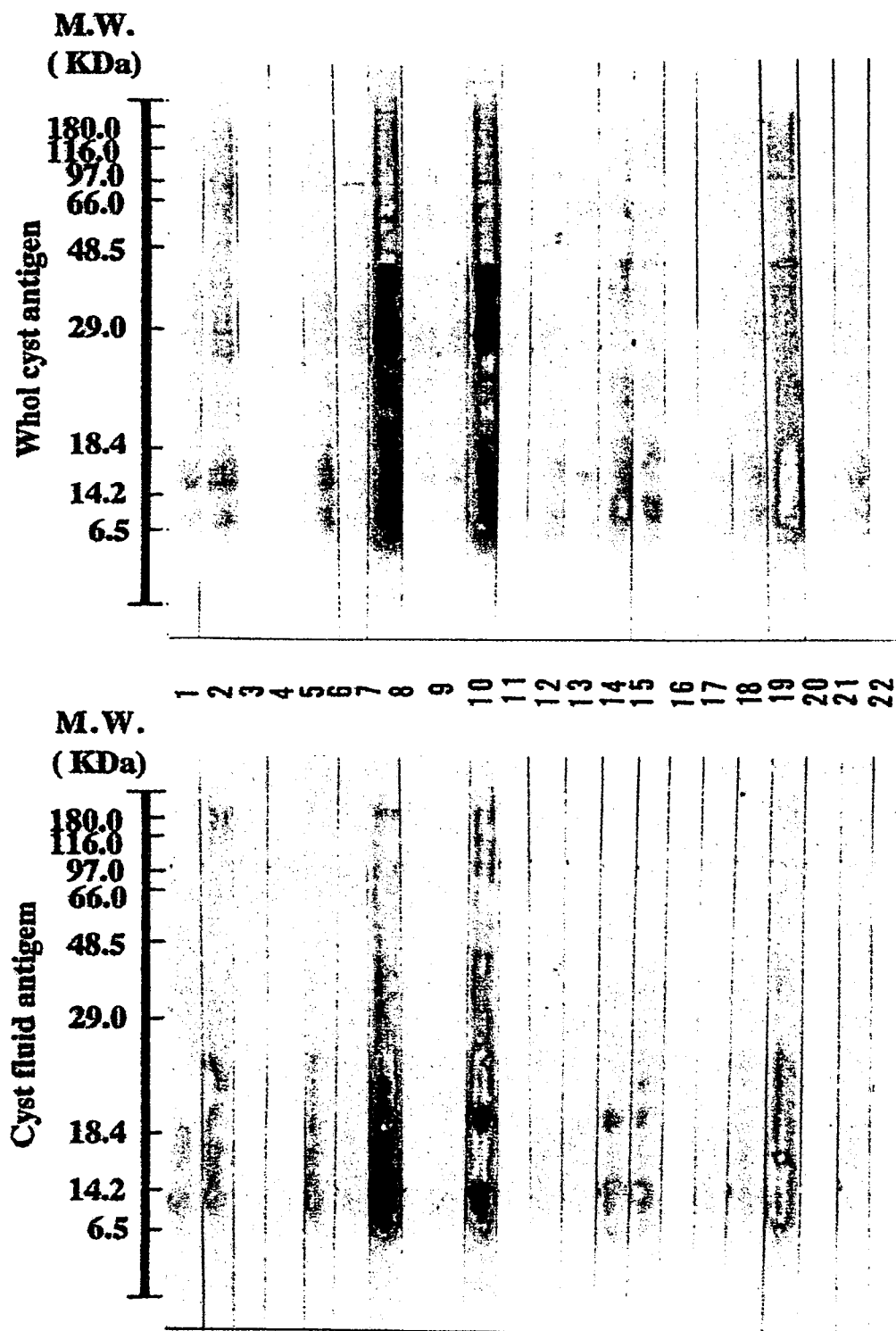


Fig. 6 Immunoblot analysis of whole cyst and cyst fluid antigens of *cysticercus cellulosa* with endemic inhabitant sera




2001年度日中医学協会共同研究等助成事業報告書

－調査・共同研究に対する助成－

2002年 3月 20日

財団法人 日中医学協会
理事長 殿

研究代表者氏名 河野 保子  印

所属機関名 愛媛大学

部署・役職 医学部看護学科 教授

所在地 〒791-0295 愛媛県温泉郡重信町志津川

電話 089 (960) 5402 内線 直通

1. 研究テーマ 家族介護者のQOLに関する日中比較
－介護実態と介護肯定感の分析－

2. 研究期間 自 2001年 4月 15日 ～ 至 2002年 3月 15日

3. 研究組織

日本側研究者氏名 河野保子

所属機関 愛媛大学医学部看護学科 職名 教授

中国側研究者氏名 邓国兰

所属機関 広東医学院看護学校 職名 教務科長

4. 研究報告書

別紙報告書作成要領に従い、添付の用紙で研究報告書を作成して下さい。

※研究成果を発表する場合は、発表原稿・抄録集等も添付して下さい。

※発表に当っては、日中医学協会助成金による旨を明記して下さい。

家族介護者の QOL に関する日中比較 －介護実態と介護肯定感の分析－

研究者氏名 河野 保子
日本所属機関 愛媛大学医学部看護学科
共同研究者 加藤基子、陶山啓子、野本ひさ、吉井紀子、赤松公子
中国研究機関 広東医学院看護学校
共同研究者 邓国兰、朱美玉、杨 村、邱丽清、方 文

要旨

本研究の目的は、家族介護者の QOL に関連する要因を日本と中国との比較において明らかにした。

調査対象者は日本（愛媛県 M 市）と中国（広東省 T 市）の介護者及び要介護高齢者の 200 ケースである。調査項目は介護実態と介護に対する認識（介護肯定感、生活満足感、家族機能、介護対処行動）であり、データは差の検定、相関係数、 χ^2 検定を行い統計的に分析した。その結果、介護者の平均年齢は、日本 63.1 歳、中国 48.8 歳で、要介護高齢者の平均年齢は日本 80.4 歳、中国 72.4 歳であった。厚生省の寝たきり判定基準では、C ランクが日本 52.8%、中国 36.1%で、介護期間は中国より日本の方が長期にわたっていた。さらに家族の平均人数は日本 3.2 人、中国 4.8 人で日本、中国ともに女性介護者が多かった。しかし中国では男性介護者が多く約 40%を占めていた。介護者の健康状態は中国に比べて日本の方が悪かった。介護者の介護肯定感、生活満足感、介護対処行動は両国間に有意差はなかったが、家族機能は中国の方が日本より有意に高かった。これらのことより、日本の介護は長期化、重介護化、老老介護化していること、中国は家族機能を生かした役割分担の中で介護が行われていることがわかった。

Key Words 家族介護、生活満足度、介護肯定感、介護対処行動、家族機能、日・中比較

緒言：

人口の高齢化は世界的な現象であり、日本は他国に比べて類をみない速さで高齢化率が上昇しており、2000 年は 17.5%であったのが 2005 年には 26.5%になると推計されている¹⁾。加齢は慢性疾患や後遺症など種々の健康問題を惹起させ、介護を要する状況に陥りやすくなる。今日、日本は高齢者介護が大きな問題となっており、政策的、行政的および家族・個人的対応が問われている。

本来、介護は家族機能の一部であり家族の役割であった。しかし、経済発展や産業構造の社会的変化は家族変動をもたらし、さらには少子高齢化という人口学的要因とともに核家族化の趨勢が強まり、家族観や結婚観、家族機能に対する意識の変化がおこっている。それゆえ、今まで家族が果たしてきた扶助機能：高齢者介護は、家族だけでは十分に維持できない状況となっており、介護が社会的責任のもとで専門職によって補われつつある。要介護高齢者や家族に対するサービス提供は、よりよい質や量のあり方が求められている。家族介護者の QOL に関する研究は、1980 年代以降、介護負担の実態やその軽減に視点が向けられてきた²⁾。その反面、1990 年代からは介護経験には負担以外にも多様な側面があると考えられ、介護によって得られる喜びや満足感、充実感などの肯定的側面³⁾に研究が及ぶようになった。

本研究は、介護実態や介護の肯定的側面を測定し、家族介護者の生活の質を検討する。

また本研究は、同じアジア圏に位置し、宗教・文化的に深いつながりをもつ近隣国家：中国との比較研究において、国際的視野で家族介護の課題を追究するものである。中国もすでに高齢化社会に突入しており（1990 年、60 歳以上の高齢化率 8.58%⁴⁾）、この研究成果は両国間に多大な貢献をもたらすと考える。

対象と方法：

調査は日本：愛媛県 M 市とその周辺地区、中華人民共和国（以下中国と表す）：広東省 T 市とその周辺地区の要介護高齢者と主介護者に実施した。調査対象は、日本：M 市 89 ケース、中国：T 市 111 ケースの合計 200 ケースであった。両地域ともに市部は都市化しているが周辺地区には農村地域が含まれている。愛媛県

M市は訪問看護ステーション、在宅介護支援センターの利用者に調査を依頼した。広東省T市では病院を退院した患者のなかから自宅介護が必要と看護婦が判断した者に対して調査を依頼した。調査表は介護者用と要介護高齢者用で構成した。介護者に対する項目は介護実態、家族機能、介護対処行動、介護肯定感、生活の満足度である。家族機能は Smilkstein G⁵⁾ の家族機能尺度を用いた。介護対処行動は和気、岡林の介護対処行動を参考に^{6) 7)}、また介護肯定感は櫻井の尺度³⁾、生活満足度はVAS法を用いた⁸⁾。これらの尺度はすでに信頼性・妥当性が明らかにされている。要介護高齢者用は性、年齢、疾病・症状、厚生省の寝たきり判定基準⁹⁾を調査項目とした。中国版の調査表は日本語版を中国語に訳し、さらにそれを日本語訳し、両調査表の表現内容が同一となることを確認した。この検討は中国語を母国語とする中国側調査者とともにを行った。調査は面接による聞き取り調査を実施した。日本での調査は大学院生と研究者でおこなった。中国側の調査は現地での説明会を2回開催し、そのうち1回は調査する看護職11名に対して調査目的と方法、調査項目について説明した。調査方法は病院勤務の看護職が居宅訪問し、聞き取り調査した。両国共に調査に要した時間は1ケース100分であった。調査期間は平成13年9月～平成14年2月である。分析はSPSS 10.0Jを用いた。

結果：

1. 介護者と要介護高齢者の背景

表1に日本と中国の介護者と要介護高齢者の背景を示す。介護者の性別は両国ともに女性が有意に多かったが、中国では男性介護者が38.5%であり、日本の13.5%に比べて多かった。介護者年齢は日本63.1(±13.2)歳、中国48.8(±15.7)歳で、日本は中国に比べて有意に高かった。年齢分布では日本の介護者は60～79歳が約60%を占め、中国では50歳未満が59%と最も多く、60～79歳は約31%であった。介護期間の平均は、日本6年1ヶ月で、中国の1年10ヶ月よりも有意に長期化していた。介護がおこなわれる家族の構成人数は日本が3.2(±1.5)人であり、中国は4.8(±2.7)人で、日本に比べて中国の家族人数が有意に多かった。

介護者に介護を受けている要介護高齢者の性別の割合は両国ともほぼ同率であった。介護を受けている高齢者の年齢は日本が80.4(±9.0)歳で、中国の72.4(±6.3)歳に比べて有意に高かった。年齢分布では日本は80歳以上が56.3%で最も多く、中国は70歳台が44.5%で最も多かった。厚生省の寝たきり判定基準による比較では日本はCランクが52.8%を占め、中国の36.1%より多く、日本の要介護高齢者の寝たきり度は中国に比べて有意に高かった。また、日本はJ、a、bランクが19～10%であったのに比べて、中国は各ランクがほぼ20%の同一割合であった。さらに、高齢者が要介護状態となった主な疾患の第1位は両国とも脳卒中であった。第二位は日本では痴呆、中国では高血圧であった。

2. 介護の内容及び介護者に対するサポート状況

表2に介護内容と介護者へのサポート状況を示す。排泄介助では日本のオムツ介助率(59.3%)が中国に比べて有意に高く、また中国のトイレ介助率(54.3%)は日本に比べて有意に高かった。戸外散歩介助は中国の介助率(37.3%)が日本に比べて有意に高かった。また、中国では介護者の94.6%が要介護高齢者の話し相手をしており、日本より有意に高かった。家事は両国とも介護者がおこなっていたが、中国では介護者が家事をしていない割合が27%あり、日本に比べて有意に高かった。介護内容で両国間に差がなかった項目は食事介助、入浴・身だしなみ介助、歩行介助、車椅子介助であった。介護者へのサポート状況は、中国では介護代替者を約95%が持っており、日本の75%より有意に多かった。また自由時間があると応えた介護者の割合は中国が76.6%で、日本の介護者の47.7%より有意に高かった。介護情報の提供者の有無、相談相手の有無、経済的余裕の有無は両国に差はなかった。

3. 介護者の健康状態

介護者の健康状態を表3に示す。現在、病気を持っている介護者は日本が55.1%と中国に比べて高く、また腰痛や肩こり、関節痛など何らかの症状があると応えた介護者も、日本が68.5%と中国に比べて高かった。介護者の受診率は約50%～60%程度で、両国とも同様な傾向を示した。健康状態の比較では、両国に差がみられ、健康状態をよいと応えている介護者は中国に多く、悪いと応えている介護者は日本に有意に多かった。

4. 介護サポート資源

介護資源の利用は、日本では60名(70.1%)が何らかの社会資源を利用していると応えており、中国は

利用していないと応えている者が 63 名 (56.8%) で、両国に有意な差がみられた。中国は介護サポート資源として親族及び家族が雇用している家政婦をあげており、看護婦を利用している者もわずかにみられた。日本では在宅ケアサービス資源が介護代替者としてあげられており、その種類は訪問看護、ディケア、ホームヘルプなど約 10 種類に及んだ。

5. 介護者対処行動の比較

介護者対処行動とは、「家族介護者が要介護高齢者の介護を在宅で引き受けていることで生じる介護上の様々なストレスに対して介護者がとっている意図的な行動」を言う。対処行動にいたるプロセスには「介護」をどのように認知するかが影響する。両国の介護を取り巻く社会・文化的要因がこの認知に影響すると考えた。そこで、介護者対処行動の因子分析から両国の介護者の対処行動を比較検討した。その結果を表 4 に示す。日本では介護者対処行動として 3 因子が抽出された (負荷量.40 以上を採用)。第一因子は優しく真心をこめて接するなどの 11 項目からなり、「接近」因子とした (α 係数 =.84)。第二因子は意識的に自分の時間を持つ、気晴らしや気分転換をするなどの 4 項目からなる「回避」因子で (α 係数 =.82)、第三因子はお世話に役立つ情報を集める、家族や周りの人たちに協力をたのむなどの 4 項目からなる「問題解決」因子であった (α 係数 =.66)。中国の介護者対処行動も日本と同様に 3 因子が抽出された。第一因子はとにかく精一杯頑張ってお世話する、お年よりの気持ちを尊重するなど 11 項目からなる「接近」因子であった (α 係数 =.92)。第二因子はお年よりを世話する人達と励まし合う、お世話に役立つ情報を集めるなどの 5 項目からなる「問題解決」因子である (α 係数 =.77)。第三因子は友人とあって気分転換を図るなどの 4 項目からなる「回避」因子であった (α 係数 =.85)。

介護者の介護対処行動は両国ともに同様の因子が抽出され、介護対処行動は「接近」、「回避」、「問題解決」であり、この結果は和気の先行結果とも一致していた⁶⁾。抽出された介護者の対処行動因子は国をこえて一致していたが、因子の順位は日本が「接近」、「回避」、「問題解決」であったのに比べて中国は「接近」、「問題解決」、「回避」であった。

6. 介護肯定感と介護生活の満足度 (QOL) との関連

表 5 は両国の介護肯定感、生活満足度、家族機能、介護対処行動の平均値の比較である。介護肯定感は両国に差はなかった。生活満足度は中国より日本がやや高い傾向を示したが有意ではなく、介護対処行動も両国に差はなかった。家族機能は中国が日本より有意に高かった。また、表 6 は介護肯定感と各項目との相関をみたもので、介護肯定感に関連する要因は両国共に生活満足度と介護対処行動であった。

考察：

1) 日本の M 市と中国の T 市における介護状況の比較

本調査で特徴的であったのは第一に要介護高齢者の状態であった。中国の要介護高齢者の年齢は日本より若く、日本に比べ寝たきり度の C ランクが少なく、介護期間が日本の約 6 年であることに比べて約 2 年と短かった。このことは中国では「1 日中ベットで過ごし、排泄、食事、着替えにおいて介助を要する段階」にまで介護を必要としていない状況、いいかえれば介護が長期化、重介護化していない状況にあることが推察された。また、要介護状態となった要因の第一位は脳血管障害であることは共通していたが、日本では痴呆が第二位で要介護高齢者の超高年齢化とともに、寝たきり、痴呆が日本における介護問題であることが確認された。この要介護高齢者の状況は介護内容にも反映されていた。表 2 に示すように日本に比べて中国では排泄介助はトイレ誘導が主な内容であり、戸外散歩や話し相手が高くあがっており、介護内容は比較的軽度であった。両国の介護内容はかなり異なっている状況にあった。

次の特徴は介護者と介護者を取り巻く状況である。介護者の年齢は中国が若く、男性介護者が日本に比べて多かった。介護の代替者や自由時間は日本に比べて中国の介護者の多くがもっており、介護の代替者やサポート資源として中国では親族をあげていた。この状況は家族構成人数が日本の 3 人に比べて約 5 人と多いことによる¹⁰⁾ものと考えられ、中国では家族内で男性も含めて介護者役割を緩やかに分担をしながら介護を行っているのではないかと推察された。

さらに、中国と日本の介護を取り巻く状況で異なる点は介護者の家事担当である。中国の介護者の 3 割が家事をしていなかった。また介護サポート支援として私的に雇用している家政婦があがっていた。これらの

ことから、家族機能の考え方など社会・文化的な違いがみられ、中国では家族人数も多いことから、介護者が家事と介護の両立負担から解放されていると推測できた。日本の介護者が家事と介護を両立させるなかで、心身の負担感が増大していく状況とは大きく異なっていた。このことは介護者の健康状態の比較の中にも現れている。日本の介護者の有病率や症状の出現率は中国に比べて高く、介護者の健康状態が悪いことから伺える。

2) 介護の認識 ― 肯定感・生活満足度・介護対処行動・家族機能 ―

介護者の介護への対処行動は両国の社会状況や文化的要因の影響をうけると予測したが、抽出された対処行動は両国とも同じであった。しかし、対処行動の出現順位は異なっていた。「接近」が第一因子であることは両国に共通していたが、日本では第二因子が気分転換などの「回避」、そして「問題解決」であった。中国では第二位に「問題解決」、そして「回避」であった。このことは日本の介護者が気分転換の対処行動を中国の介護者より多く行っており、その背景には介護の長期化・重介護化による介護状況の厳しさがあり、そのための対処行動と言える。

介護肯定感、介護対処行動、生活満足度、介護対処行動は両国に差はなかった。家族機能は中国が高かった。家族機能の高さは中国の家族構成人数が多いこと、男性も介護担当していること、さらに介護代替者や介護者の自由な時間、相談相手が多いなどの結果から説明することができる。介護肯定感に関連する要因は生活の満足度と介護対処行動であった。両国ともに介護対処行動は介護肯定感と高い関連を示していた。両国の介護者の QOL を高める支援として介護肯定感、介護対処行動に対する働きかけが有効であることが示された。

以上の比較検討から中国の介護状況はまだ介護が社会問題化する以前の状況にあり、家庭の中で家族機能を十分に活用していることがわかった。一方日本では、今後ますます超高齢化による介護の長期化・重介護化や老々介護の時代を迎える。家族介護者の疲弊した状況に対する社会的サポートの必要性が示された。しかし、中国もまた、家族形態や家族機能が現状のまま維持されていくとはいえない。したがって、家族の介護機能を補うためにも社会的な介護支援政策¹¹⁾が必要となってくるであろう。

日本は 2000 年から介護保険をスタートさせ、介護の社会化に先鞭をつけている。まだ、試行錯誤の状態であるがこの経過を共有化し、中国の在宅介護政策に貢献できることを願っている。

参考文献：

- 1) 国立社会保障人口問題研究所編：日本の将来推計人口（平成 9 年 1 月推計）、4：137、厚生統計協会発行、1999.
- 2) 中谷陽明、東條光雅：家族介護者の受ける負担－負担感の測定と要因分析－、社会老年学、29：27-36、1989.
- 3) 櫻井成美：介護肯定感がもつ負担軽減効果、心理学研究、70（3）：203-210、1999.
- 4) 仲村優一、一番ヶ瀬康子編：世界の社会福祉 アジア③：326、旬報社、1998.
- 5) Smilkstein G, Ashworth C, Montano D. : Validity and Reliability of the Family APGAR as a test of Family function. J Fam Pract, 15 : 303-311, 1982.
- 6) 和気純子、矢富直美、中谷陽明、冷水豊：在宅障害老人の家族介護者の対処（コーピング）に関する研究－規定要因と効果モデルの検討：社会福祉援助への示唆と課題、社会老年学、39：23-34、1994.
- 7) 岡林秀樹、杉澤秀博、高梨薫、中谷陽明、柴田博：在宅障害高齢者の主介護者における対処方略の構造と燃えつきへの効果、心理学研究、69（6）：486-493、1999.
- 8) McCormac, HM., et, al: clinical applications of visual analogue scales. A clinical review, Psychological Medicine, 18 : 1007-1019, 1998.
- 9) 国民衛生の動向、42（6）：126、厚生統計協会、1995.
- 10) 比較家族史学会：事典 家族、952、1996.
- 11) 吳小玉：中国の地域中核病院における高齢者への退院指導の現状と課題、日中医学、16(4)：27-31、2001.

表1 介護者と要介護高齢者の背景

特 性		日本(%)	N	中国(%)	N	P
介護者 性別	男	12 (13.5)	89	42 (38.5)	109	***
	女	77 (86.5)		67 (61.5)		
要介護介 護者年齢	平均±標準偏差	63.1±13.2		48.8±15.7		***
	50歳未満	15 (16.9)	89	65 (58.6)	111	—
	50～59歳	15 (16.9)		10 (9.0)		
	60～69歳	28 (31.4)		22 (19.8)		
	70～79歳	24 (26.9)		12 (10.8)		
	80歳以上	7 (7.9)		2 (1.8)		
介護期間	平均±標準偏差	6年1月±73ヶ月		1年10月±34ヶ月		***
	1年未満	9 (10.1)	88	61 (55.0)	109	—
	1年以上～5年未満	39 (43.8)		35 (31.5)		
	5年以上～10年未満	21 (23.6)		8 (7.2)		
	10年以上	19 (21.4)		5 (4.5)		
家族人数	平均±標準偏差	3.2±1.5		4.8±2.7		
	1人	2 (2.2)	89	0	83	—
	2人	35 (39.3)		13 (15.7)		
	3人	26 (29.2)		11 (13.3)		
	4人	11 (12.4)		20 (24.1)		
	5人以上	15 (16.9)		39 (47.0)		
要介護高 齢者性	男	45 (50.6)	89	61 (55.0)	111	n.s.
	女	44 (49.4)		50 (45.0)		
要介護高 齢者年齢	平均±標準偏差	80.4±9.0		72.4±6.3		n.s.
	60～69歳	6 (6.6)	86	42 (38.2)	111	—
	70～79歳	30 (33.8)		49 (44.5)		
	80歳以上	50 (56.3)		20 (18.0)		
寝たきり度	J	17 (19.5)	87	24 (21.6)	111	***
	a	9 (10.3)		26 (23.4)		
	b	15 (17.2)		21 (18.9)		
	c	46 (52.8)		40 (36.1)		
要介護状態に なった主疾患 (複数回答)	1位	脳卒中 (50.0)		脳卒中 (27.0)		—
	2位	痴呆 (26.1)		高血圧 (14.4)		
	3位	高血圧 (17.0)		癌 (14.4)		

*** P<.001

表2 介護内容とサポート状況

介護内容		日本(%)	N	中国(%)	N	P
食事介助	有	52 (58.4)	89	53 (47.7)	111	n.s.
	無	37 (41.6)		58 (52.3)		
おむつ介助	有	51 (59.3)	86	35 (31.5)	111	***
	無	35 (40.7)		76 (68.5)		
トイレ介助	有	28 (32.6)	86	57 (54.3)	105	***
	無	58 (67.4)		48 (45.7)		
入浴介助	有	63 (70.8)	89	81 (73.0)	111	n.s.
	無	26 (29.2)		30 (27.0)		
身だしなみ	有	64 (71.9)	89	70 (63.1)	111	n.s.
	無	25 (28.1)		41 (36.9)		
歩行介助	有	23 (25.8)	89	29 (26.1)	111	n.s.
	無	66 (74.2)		82 (73.9)		
車椅子	有	22 (25.6)	86	18 (16.4)	110	n.s.
	無	64 (74.4)		92 (83.6)		
戸外散歩	有	22 (24.7)	89	41 (37.3)	110	***
	無	67 (75.3)		69 (62.7)		
話相手	有	74 (83.1)	89	105 (94.6)	111	**
	無	15 (16.9)		6 (5.4)		
家事	有	87 (97.8)	89	81 (73.0)	111	***
	無	2 (2.2)		30 (27.0)		
情報提供者	有	80 (89.9)	89	93 (83.8)	111	n.s.
	無	9 (10.1)		18 (16.2)		
介護を交わっ てくれる人	有	66 (75.0)	88	105 (94.6)	111	**
	無	22 (25.0)		6 (5.4)		
自由な時間	有	42 (47.7)	88	85 (76.6)	111	***
	無	46 (52.3)		26 (23.4)		
相談相手	有	79 (88.8)	89	99 (89.2)	111	n.s.
	無	10 (11.2)		12 (10.8)		
経済的余裕	有	60 (67.4)	89	85 (78.7)	111	n.s.
	無	29 (32.6)		23 (21.3)		

** P<.01 *** P<.001

表3 介護者の健康状態

特性		日本(%)	中国(%)	P
現在病状にか かっている	有	49 (55.1)	36 (32.4)	***
	無	40 (44.9)	75 (67.6)	
症状	有	61 (68.5)	39 (35.1)	***
	無	28 (31.5)	72 (64.9)	
	1位	腰痛 (24.7)	関節痛 (32.5)	
	2位	肩こり (20.2)	腰痛 (27.5)	
	3位	関節痛 (19.1)	頭痛 (20.0)	
受診	有	52 (58.4)	53 (51.0)	n.s.
	無	37 (41.6)	51 (49.0)	
健康状態	良い	32 (35.9)	59 (53.1)	**
	普通	40 (44.9)	41 (36.9)	
	悪い	17 (19.1)	11 (9.9)	

** P<.01 *** P<.001

表4 介護者対処行動の因子分析

項 目	日 本		中 国	
	第1因子	$\alpha=.8357$ 接近	第1因子	$\alpha=.9185$ 接近
1. お年寄りのお世話を役立つ情報を集める	20	0.723	22	0.801
2. 同じようなお年寄りを世話する人と励まし合う	25	0.683	19	0.770
3. 役所や医師・看護婦など専門家に相談する	15	0.656	20	0.767
4. 在宅のサービスを積極的に利用する	19	0.624	21	0.738
5. お年寄りの状態が急変した場合に備えて対応策を立てる	18	0.542	23	0.705
6. 1人で何でもやろうとしないで家族や周りの人たちに協力を頼む	22	0.527	25	0.650
7. できる範囲で無理をしないようにお世話をする	21	0.493	7	0.648
8. 自分が倒れては困るので自分自身の健康状態に気をつける	16	0.476	18	0.622
9. 気晴らしや気分転換に役立つことをする	23	0.447	8	0.616
10. 先のことはあまり深く考えないようにする	5	0.435	24	0.525
11. お年寄りのお世話の大変さを家族や周りの人に伝える	24	0.416	17	0.440
12. つらくて人知れず泣いている				
13. お世話を振り回されずに意欲的に自分の時間をもつ				
14. 友人と会ったり自分の好きなことをして気分転換する	第2因子	$\alpha=.8202$ 回避	第2因子	$\alpha=.7733$ 問題解決
15. 希望を捨てずに毎日明るく過ごす	13	0.809	2	0.757
16. 自分で自分を励ます	14	0.776	3	0.738
17. お年寄りを世話する体験から学ぶことがあると思う	9	0.711	6	0.583
18. お年寄りの状態や変化をよくみて、対応を考える	17	0.479	1	0.500
19. 医師の疎通を図りお年寄りの気持ちを尊重する				
20. お年寄りに対して優しく真心をこめて接する	第3因子	$\alpha=.6574$ 問題解決	第3因子	$\alpha=.8462$ 回避
21. お年寄りの頼まれたことは後回しにせずすぐに実行する	1	0.608	14	0.778
22. とにかく精一杯頑張ってお世話する	6	0.604	15	0.774
23. お年寄りの世話をすることは自分の役割だと思う	3	0.522	13	0.687
24. 介護に対する考え方ややり方を変えられるようになった	8	0.407	9	0.651
25. お年よりも頑張っていると思う				

表5 家族機能、対処行動、介護肯定感、生活満足度の差

		N	平均値	標準偏差	P
現在の満足度	日本	84	59.881	25.245	n.s.
	中国	111	65.919	20.791	
過去の満足度	日本	84	74.524	23.614	n.s.
	中国	111	73.378	23.357	
家族機能	日本	89	9.202	3.432	***
	中国	111	7.036	2.132	
対処行動	日本	89	96.674	15.275	n.s.
	中国	111	98.000	9.577	
介護肯定感	日本	89	42.843	9.821	n.s.
	中国	111	43.018	5.679	

*** $P<.001$

表6 介護肯定感と現在の満足度、家族機能、対処行動の相関

		日 本			中 国		
		現在の満足度	家族機能	対処行動	現在の満足度	家族機能	対処行動
肯定感	Pearson の相関係数	.503**	-.088	.743**	.190*	-.028	.739**
	有意確率 (両側)	.000	.410	.000	.046	.772	.000
	N	83	89	89	111	111	111

* $P<.05$ ** $P<.01$

2001年度日中医学協会共同研究等助成事業報告書

－調査・共同研究に対する助成－

2002 年 3 月 20 日

財団法人 日 中 医 学 協 会
理 事 長 殿

研究代表者氏名 横澤 隆子



所属機関名 富山医科大学

部署・役職 知漢薬研究所・助教授

所 在 地 〒930-0194 富山市杉谷2630

電話 076-434-7631 内線

1. 研究テーマ

糖尿病性腎症に有効な伝統薬物の探索

2. 研究期間 自 2001 年 5 月 1 日 ～ 至 2002 年 3 月 15 日

3. 研究組織

日本側研究者氏名 横澤 隆子

所属機関 富山医科大学 職名 助教授

中国側研究者氏名 何 立群

所属機関 上海中医药大学 職名 教授

4. 研究報告書

別紙報告書作成要領に従い、添付の用紙で研究報告書を作成して下さい。

※研究成果を発表する場合は、発表原稿・抄録集等も添付して下さい。

※発表に当っては、日中医学協会助成金による旨を明記して下さい。

5. 収支決算報告

2001年4月4日交付通知のあった研究課題 糖尿病性腎症に有効な伝統薬物の探索

についての収支決算を行ないました。領収書コピーを添えて、次のとおり報告します。

交付を受けた金額	支 出 内 訳			
	消耗品費	旅 費	そ の 他	合 計
1,000,000 円	339,658 円	50,000 円	610,342 円	1,000,000 円

支出明細（消耗品・旅費・その他の科目別に記載、別紙可）

科目区分	金 額	備考（用途・内訳）
消耗品費	325,000 円	試薬等（並木薬品株式会社）
	14,658	フィルム、現象（写真の大森）
旅 費	50,000	学会参加費（中川孝子）
その他	250,719	パソコン・バック代（株式会社 コジマ）
	30,912	プリンタ代（株式会社 コジマ）
	250,000	研究協力謝金（Eun-Ju Cho）
	78,502	論文校正代と送料（ダグラス科学英文校正サービス）
	209	切手代

糖尿病性腎症に有効な伝統薬物の探索

研究者氏名 助教授 横澤隆子

日本研究機関 富山医科薬科大学和漢薬研究所

中国共同研究者氏名 教授 何 立群

中国所属機関 上海中医薬大学附属曙光病院

共同研究者名 中川孝子 (博士課程学生)

要旨

advanced glycation endproducts (AGEs) は糖尿病性腎症の成因に大きく関与しており、AGEs 生成の抑制が腎症発症・進展防止に重要であることが知られている。このことから、本研究では AGEs 阻害薬の可能性を伝統薬物に求め、まず *in vitro* の評価系で検討した。使用した漢方方剤 12 種類のうち、最も AGEs 生成を抑制した漢方方剤は温脾湯で、次いで桃核承気湯、桂枝茯苓丸、大黃牡丹皮湯の順であった。実験に供した 21 種類の構成生薬では大黃、桂皮、牡丹皮、芍薬に強い抑制作用を認め、大黃剤、駆お血剤ならびにタンニン生薬が AGEs の生成を抑制しているものと考えられた。またこれらは陽性対照物質のアミノグアニジンより強い活性を示した。一方、糖尿病性腎症モデル動物を用いた実験では、温脾湯、八味地黄丸、桂枝茯苓丸、柴苓湯はそれぞれ異なった作用機序で、糖尿病性腎症の進展を抑制している可能性が示唆された。

Key Words advanced glycation endproducts、糖尿病性腎症、温脾湯、桂枝茯苓丸、大黃

緒言：

わが国の透析患者数は年々増加し、現在日本では約 20 万人が透析療法を受けている。しかし原疾患の約 1/4 は糖尿病性腎症が占め、最近の維持透析患者数の増加の最大の原因となっている。このような状況下、糖尿病性腎症の発症、進展を規定する因子の解明とともに、治療薬の開発が急がれている。

糖尿病性腎症の成因の源は持続する高血糖であることが Diabetes Control and Complications Trial (DCCT) study の結果からも示され、厳格な血糖コントロールを長期間にわたり維持できれば、発症および進行を著明に抑制することが明らかになっている。しかし臨床的には實際上厳格なコントロールを達成することは、副作用としての低血糖とのからみもあり必ずしも容易ではなく、これは DCCT study でも指摘されている問題点である。そこで血糖コントロールを厳格に維持できないために生ずる糖質代謝異常を是正して、合併症の発症防止に少しでも貢献できる薬剤の開発が望まれ、現在その代表的な流れとして、ポリオール代謝異常改善薬と蛋白糖化反応阻害薬があり、ポリオール代謝異常の改善については、糖尿病におけるグルコースからソルビトールに至る代謝経路の亢進を是正するために、その触媒酵素であるアルドース還元酵素を阻害する薬剤が開発され、糖尿病性神経障害を適応として市販されている。これに対して蛋白糖化反応阻害薬の方は、アミノグアニジンのみの開発が進められているが、他の薬剤についてはほとんど知られていない。アミノグアニジンにしても、臨床的には糖尿病性腎症を対象に大規模な第 3 相試験が進行中であるが、安全性については慎重な治験が望まれている。一方、漢方方剤や生薬のあるものは糖尿病や腎疾患などに対して一定の成績を挙げており、多角的な治療薬剤としての可能性の高いことが示唆されている。

本報ではこの可能性をさぐる手始めに、糖尿病合併症に頻用されている大黄剤、柴胡剤、駆お血剤、八味地黄丸などの地黄剤を選び、その病因の AGEs 生成抑制作用を指標に、まずスクリーニング試験を行った。さらに 4 方剤について糖尿病性腎症モデル動物を用い検討した。

方法:

in vitro 評価系:牛血清アルブミン (10 mg/ml) にグルコース、フルクトース、あるいは漢方方剤を加え、37℃で 2 週間インキュベーション後、AGEs 生成量を蛍光検出器 (Ex=350 nm, Em=450 nm) で測定した。動物実験:Wistar 系雄性ラットに 3/4 腎摘を施し、次いでストレプトゾトシン (35 mg/kg 体重) を腹腔内投与し、糖尿病性腎症モデルを作製した。次いで温脾湯、八味地黄丸、桂枝茯苓丸、柴苓湯エキスをそれぞれ 150 mg/kg 体重/日経口投与し、5 週目の血中、尿中の生化学的パラメーターとチオバルビツール酸反応物質、腎組織中のソルビトール、AGEs を測定した。

結果:

表 1 に示したように、AGEs 生成抑制作用は、大黄含有方剤で強く ($IC_{50} < 20 \mu\text{g/ml}$)、駆お血剤、地黄剤も強い作用を示したが、柴胡剤は陽性対照物質のアミノグアニジンより弱かった。実験に供した 21 種類の構成生薬では大黄、桂皮、牡丹皮、芍薬に強い抑制作用を認めた。次に温脾湯 (大黄含有方剤)、八味地黄丸 (地黄剤)、桂枝茯苓丸 (駆お血剤)、柴苓湯 (柴胡剤) について、糖尿病性腎症モデルを用い検討した結果、血中グルコース、中性脂肪がいずれの方剤においても有意に低下したが、クレアチニンクリアランスと尿蛋白量は桂枝茯苓丸、八味地黄丸投与群で改善作用が認められた。一方、血中チオバルビツール酸反応物質は桂枝茯苓丸、温脾湯、柴苓湯投与群で有意に低下したが、腎組織中のソルビトールは八味地黄丸、柴苓湯、桂枝茯苓丸投与群で、AGEs は 4 方剤いずれにおいても有意に低下していた。なお腎機能に好影響を及ぼした桂枝茯苓丸、八味地黄丸について現在、長期動物実験を進行中である。

表 1. IC_{50} values of prescriptions tested against AGEs formation

方剤名	IC_{50} ($\mu\text{g/ml}$)
温脾湯	7.85 \pm 0.15
桃核承気湯	10.96 \pm 0.16
桂枝茯苓丸	11.56 \pm 0.14
大黄牡丹皮湯	18.18 \pm 0.44
真武湯	31.43 \pm 0.14
当帰芍薬散	41.22 \pm 1.38
八味地黄丸	45.55 \pm 1.10
牛車腎気丸	47.03 \pm 1.12
柴胡桂枝湯	54.82 \pm 1.44
小柴胡湯	80.81 \pm 0.90
柴苓湯	81.44 \pm 1.96
補中益気湯	127.35 \pm 1.13
アミノグアニジン	59.20 \pm 1.47

考察:

食品の加熱調理ほど急速ではないが、蛋白糖化反応が生体内でも進行していることが判明し、糖尿病性腎症などの病態との関係が示唆されている。蛋白糖化反応は大略するとアマドリ転位産物を生成する前期反応と、その後 AGEs へと変化する後期反応に分けて考えることができ、AGEs は蛍光性、褐色化、分子架橋形成などの物理化学的な性状を有しており、また、血管内皮細胞やマクロファージなどに発現する細胞膜レセプターによって、リガンドとして認識されるという生物学的な特徴も有している。前期反応は、蛋白質のアミノ基とグルコースとの非酵素的な二分子反応であるため、反応を促進するためには蛋白質あるいはグルコースの濃度を上げる必要があるが、生体内でグルコース濃度が高くなるという病態は糖尿病状態にあてはまる。また、生体内蛋白質は個々の寿命が異なるので、当然、短寿命のものより長寿命の方が蛋白糖化反応が後期まで進行すると考えられている。一方、アマドリ転位産物の形成には酸化反応が関与しないのに対し、AGEs の特徴の 1 つである蛍光性、架橋構造の形成には酸化反応が関与すること、またアマドリ転位産物は、活性酸素によって酸化されて AGEs 化する反面、活性酸素の発生源でもあることが桜井ら (1988)、Smith ら (1992)、Fu ら (1994) によって報告されている。従って、蛋白糖化反応の進行は、アマドリ転位産物からの活性酸素の発生により、酸化ストレスを増加させると考えられている。しかし AGEs はその反応の性質上、単一の物質ではなく、多種なものと考えられており、本研究では AGEs に対する評価系を Vinson と Howard (1996) が報告している蛍光特性を用いた比色定量法で検討した。

実験に供した 12 種類の漢方方剤の中では、AGEs 生成を最も抑制したのは温脾湯であり、次いで桃核承気湯、桂枝茯苓丸、大黄牡丹皮湯と、大黄剤ならびに駆お血剤に強い活性を認めた。これに対し、柴胡桂枝湯、小柴胡湯、柴苓湯、補中益気湯のような柴胡剤は弱い結果を示していた。先に引網ら (2000) は糖尿病合併症患者 141 例を対象に和漢薬治療の効果を報告しているが、その中で厚生省糖尿病調査研究班の病期分類に従って糖尿病性腎症に用いられている漢方方剤の使用頻度を各病期別に検討し、駆お血剤や地黄剤は各病期に亘ってほぼ同程度に用いられているのに対し、柴胡剤は腎症の病期が進むにつれて減少する傾向にあること、また罹患歴で見た場合、柴胡剤は罹病年数が短い時期に多く用いられている傾向があり、駆お血剤はほぼ全ての罹病年数に亘り用いられていることを示している。本研究では地黄剤として八味地黄丸と牛車腎気丸を用いているが、これら方剤は大黄剤よりは弱かったが、柴胡剤よりは強い作用を示し、糖尿病合併症患者に用いられている場合と、この地黄剤については異なっていた。

一方、漢方方剤を構成している生薬 21 種類の AGEs 生成に及ぼす効果を検討したところ、大黄が最も強い活性を示し、大黄剤で認められた作用は、大黄によることが推測された。また桂皮、牡丹皮、芍薬などのタンニン含有生薬が強い活性を示し、タンニンが蛋白糖化反応抑制に関与していることが示唆された。

桜井ら (1988)、Bucala ら (1991) はアマドリ化合物より AGEs が生成される過程で O_2^- が生じること、また O_2^- は NO と反応し、ONOO⁻ さらには $\cdot OH$ が生成されることを報告しているが、タンニンにこのようなラジカルを消去することを我々はすでに明らかにしており、AGEs 生成の抑制に影響を及ぼしているものと考えられた。これに対し地黄剤、柴胡剤の根幹をなしている地黄、柴胡には AGEs 生成を抑制する作用は認められず、地黄剤、柴胡剤で認められた作用がどのように発現しているのか、今後の検討課題である。

蛋白糖化反応阻害剤としてアミノグアニジンの開発が進められ、現在糖尿病性腎症を対象に、大規模な二重盲検試験が進行中であるが、本剤の有効性もさることながら安全性については特に慎重な治験が望まれている。このような状況下、アミノグアニジン以外の新たな蛋白糖化反応阻害剤の登場が望まれているが、現在までの所、メチルグアニジンやアミノグアニジン誘導体について糖尿病動物を用いた報告がなされているが、伝統薬物を用いた報告はほとんど見られない。しかし本実験結果より、漢方方剤と生薬にアミノグアニジンより強力な AGEs 生成抑制作用を見出し、伝統薬物からの糖尿病性腎症治療薬の開発の可能性が示

唆された。また動物実験から、温脾湯、八味地黄丸、桂枝茯苓丸、柴苓湯はそれぞれ異なった作用機序で、糖尿病性腎症の進展を抑制している可能性が示唆された。

注:本研究は、2001 年 8 月 18 日『第 18 回和漢医薬学会大会』のミニシンポジウムにて口演発表、
『Journal of Traditional Medicines』(Vol. 18, p. 107-112, 2001 年; Vol. 18, p. 161-168, 2001)
に掲載。


作成日:2002 年 3 月 15 日

2001年度日中医学協会共同研究等助成事業報告書

－調査・共同研究に対する助成－

14年3月13日

財団法人 日中医学協会
理事長 殿

研究代表者氏名 藤盛 啓成 
所属機関名 東北大学大学院腫瘍外科
部署・役職 助教授
所在地 〒980-8574 仙台市青葉区早稲田1-1
電話 022(717)7214 内線

1. 研究テーマ

チベット自治区山南地区における甲状腺疾患の実態調査

2. 研究期間 自 2001年4月19日 ～ 至 2002年3月15日

3. 研究組織

日本側研究者氏名 藤盛 啓成
所属機関 東北大学大学院腫瘍外科 職名 助教授

中国側研究者氏名 張 徳恒
所属機関 吉林医学院中聯誼病院基本外科 職名 教授

4. 研究報告書

別紙報告書作成要領に従い、添付の用紙で研究報告書を作成して下さい。

※研究成果を発表する場合は、発表原稿・抄録集等も添付して下さい。

※発表に当っては、日中医学協会助成金による旨を明記して下さい。

5. 収支決算報告

アベット自治区山南地区における甲状腺疾患の実態調査

2001年4月4日交付通知のあった研究課題 —ヨトアタ地域におけるヨト化食塩導入に伴う甲状腺疾患
 の変化について
 についての収支決算を行ないました。領収書コピーを添えて、次のとおり報告します。

交付を受けた金額	支 出 内 訳			
	消耗品費	旅 費	そ の 他	合 計
1,000,000円	38,999円	627,500円	333,501円	1,000,000円

支出明細（消耗品・旅費・その他の科目別に記載、別紙可）

科目区分	金 額	備考（用途・内訳）
消耗品	24,150	エコーゼン代（アロカ株式会社）
〃	14,849	MOディスク、ストックファイル代
旅費	627,500	仙台-ラサール航空ホテル代 125,500 × 5人分
その他	332,766	TSH, FT4, Tイロドテスト、ミクソゲンテスト測定費
〃	785	上記振込手数料（佐金バイオサイエンス）

チベット自治区山南地区における甲状腺疾患の実態調査

—ヨード欠乏地域におけるヨード化食塩導入に伴う甲状腺疾患の変化について

研究者氏名	藤盛 啓成
中国所属機関	吉林大学医学部中日聯誼病院基本外科
日本研究機関	東北大学大学院腫瘍外科学分野
指導責任者	教授 大内 憲明
共同研究者	中島 範昭、渡辺 道雄、大友 浩志、 森 隆弘、福田 かおり、陳 瑞新、 張 徳恒

要旨

1970年代からのヨード化塩導入により中華人民共和国チベット自治区ではヨード不足は解消され、地域性甲状腺腫も減少したと言われているが、実態は不明である。そこで、我々は2000年から2001年にかけてチベット自治区山南地区において触診、超音波検査を用いた甲状腺検診をおこない、同時に甲状腺機能および尿中ヨード排泄量の測定を行なった。学童242例（男児126例、女児114例）のうち触診にて甲状腺腫を指摘した学童は男子、女児それぞれ44.5%、44.6%であった。また、超音波検査にて甲状腺腫を指摘した学童は男児、女児それぞれ51.3%、37.9%であり、触診、超音波検査とも高率であった。一方、尿中ヨード排泄量測定の結果からは181例中16.0%で欠乏を示すのみでヨードは比較的充足していると考えられた。成人237名（男性95例、女性142例）にも同様の検診を行なった。甲状腺腫瘍性病変は25%に見られ、年齢とともに増加していた。しかし、30歳以下では有病率が3%であるのに対し、30歳以上では34%にみられ、この地域で1975年から導入されたヨード化塩の成果によるものと考えられた。尿中ヨード量測定からは学童と同じく13.8%で欠乏状態であったが、全体としては充足していると考えられた。この研究で現在チベット自治区山南地区においてヨードは比較的充足しているが、かつては不足しており30歳以上に地域性甲状腺腫が多く見られることが判明した。しかし、学童にも甲状腺腫が多く見られ、その原因を明らかにすることはできなかった。

Key Words 地域性甲状腺腫、甲状腺検診、ヨード欠乏、ヨード化塩、超音波検査

緒言：

地域性甲状腺腫は WHO 疾患分類中世界でもっとも罹患数の多い疾患であり、今日でも世界中には約1億人以上の罹病者がいるとみられている。かつて、中華人民共和国チベット自治区の大部分は地域性甲状腺腫の多発地帯として知られ、住民の約50%に甲状腺腫が発生し、クレチン症も稀ならずにみられていたとされている。中国の他の地域が1960年代よりヨード化食塩が導入され、新規の地域性甲状腺腫が激減したのに対し、チベット自治区では1970年代から導入されたが、その効果は不明であった。Moreno-Reyes (1) らは1995年にチベット自治区ラサ市近郊にて調査を行い、5～15才の住民のうち46%に甲状腺腫がみられ、尿中ヨード排泄量からは約2/3がヨード欠乏の状態であると推定されたと報告している。この報告からチベット自治区においてはヨード化塩導入にもかかわらず、依然としてヨ

ード欠乏状態にあり、特異な甲状腺疾病形態をとっていると考えられた。今回我々は、1975年にヨード化塩が導入されたチベット自治区山南地区において山南地区人民病院の協力を得、2000年の予備調査の後、2001年6月に日中医学協会の助成の下で超音波検査を用いた甲状腺検診、甲状腺ホルモンおよび自己抗体の測定、尿中ヨード排泄量測定を行い、山南地区における甲状腺疾患の状態、およびヨード摂取の現状につき明らかにしたので報告する。

対象と方法：

2000年8月、チベット自治区山南地区人民病院にて107人の甲状腺検診を行い、2001年6月山南地区人民病院にて103人、山南地区澤当完小学校にて242人、山南地区澤当鎮郊外の公民館にて42人の検診を行なった。性別、年齢は表1に示した。

検診は現地山南病院のスタッフの協力のもとで、①既往歴、家族歴などの問診、②身長体重の測定、③尿中ヨード排泄量測定のための採尿、④甲状腺ホルモン、自己抗体測定のための採血、⑤甲状腺の触診、⑥甲状腺の超音波検査、の順に行なった。触診と超音波は全例に施行、採血・採尿は被験者の同意が得られた症例（採血は小学校では一部のみ）に行なった。頸部の触診は被験者の前方より行い、特に小学校での検診においてはWHO分類に沿って判断した（2）。超音波検査は、日本より持参した超音波画像診断装置（ALOKA echo camera SSD-121TM）を用い7.5MHzプローブを使用、被験者をベッドに仰臥位にし頸部伸展位で行なった。超音波検査は、まず甲状腺各葉の縦径、横径、深さを計測、その後腫瘍性病変の有無を調べ、4mm以上の病変があった場合これを結節性病変としその大きさを測定した。

甲状腺容積は超音波検査での各葉の測定値から葉の容積（ml）＝0.479×縦径×横径×深さ（cm）の式を用いて各葉の容積を算出、両葉の容積を合計し甲状腺容積とした。甲状腺腫大の診断はDelangeら（3）が報告したヨーロッパにおける年齢および体表面積をもとに算出した甲状腺容積の正常上限を基準に行なった。

血液サンプルは現地で遠心し血清を分離、日本で遊離サイロキシン（FT4）、TSH、自己抗体（サイロイドテスト、マイクロゾームテスト）の測定を行なった（FT4、TSHは化学発光免疫測定法、自己抗体はゼラチン凝集反応により測定）。FT4の正常値は0.9～1.8 ng/dl、TSHの正常値は0.35～3.73 μIU/ml、サイロイドテスト、マイクロゾームテストは100倍未満を正常、それ以上を自己抗体陽性とした。

尿中ヨード排泄量の測定は検診時の随時尿を用いて行い、Sandell-Kolthoff反応を利用した簡易尿中測定キット（日立化成）（4）を使用した。また、同時に尿中のクレアチニン値（酵素法）も測定した。ヨード欠乏の解析には小児の場合は尿中ヨードの測定値をそのまま利用し、成人では尿中ヨードと尿中クレアチニンとの比（iodine nM/ creatinine mM）を算出し、WHOのヨード欠乏のガイドラインに沿って判断を行なった（2）。

表1 検診場所と年齢中央値（範囲）

	2000年山南病院		2001年山南病院		2001年完小学校		2001年澤当近郊	
	検診者数	年齢（才）	検診者数	年齢（才）	検診者数	年齢（才）	検診者数	年齢（才）
男	39	36 (8～79)	41	33 (13～62)	126	(6～14)	22	55 (20～77)
女	68	36.5 (6～66)	62	37 (17～68)	116	(6～15)	20	57.5 (28～81)
計	82	36 (6～79)	103	36 (13～68)	242	(6～15)	42	56 (20～81)

結果：

学童（6～15才）242名の検診において超音波検査で腫瘍性病変を認めた例はなかった。2例は触診所見で結節性病変を認めたが超音波検査では所見がなかった。この2例は触診所見の解析から除外した。甲状腺触診において WHO の分類上 Grade 1 以上の甲状腺腫を認めた例は107例（44.6%）と著しく高い頻度を示した（表2）。しかし、Grade 2の甲状腺腫はわずか3例（1.2%）であった。

表3に超音波検査により計測した甲状腺容積の平均を年齢ごとに示した。男女とも年齢とともに甲状腺容積も増加している。この容積を報告されているヨーロッパ白人の年齢および体表面積ごとの甲状腺容積の正常上限（3）と比較した。年齢をもとに比較を行なったところ、甲状腺腫大の割合は男児10例（7.9%）、女児10例（8.6%）であったのに対し、体表面積をもとに比較したところ甲状腺腫大の割合は男児119例中61例（51.3%）、女児103例中39例（37.9%）と高率であった。なお、対表面積が0.8m²未満で比較できない例が20例あった。

242例のうち181例に尿中ヨード排泄量の測定を行なった。平均は男児、女児それぞれ184.0 μg/L、198.7 μg/L であった。181例のうち尿中ヨード排泄量が100 μg/L 未満のヨード欠乏例は29例（16.0%）、20 μg/L 未満の極めてヨードが不足していると思われる学童は2例（1.1%）であった。

11から14歳の26名に採血を行なったが、FT4 は正常範囲内ながらも TSH がわずかに（正常上限の2倍以内）上昇する潜在性機能低下症を2例認めるのみで、機能亢進の学童はいなかった。また、自己抗体も前例陰性であった。

表2 触診所見

	例数	Grade 0	Grade 1	Grade 2
男児	126	70 (55.5 %)	54 (42.9 %)	2 (1.6 %)
女児	114	63 (55.3 %)	50 (43.8 %)	1 (0.8 %)
計	240	133 (55.4 %)	104 (43.3 %)	3 (1.3 %)

表3 年齢毎の甲状腺容積（平均±標準偏差）

年齢（才）	男児		女児	
	例数	容積（ml）	例数	容積（ml）
6～7	16	3.9±1.4	16	3.9±1.6
8～9	17	4.4±1.2	20	4.5±1.5
10	17	5.2±1.6	8	4.3±1.0
11	21	6.2±2.0	25	7.0±2.1
12	29	6.7±2.2	25	8.9±3.2
13～15	26	8.8±2.7	22	10.8±5.3

2000年および2001年に山南地区人民病院ならびにその近郊で、16歳以上の成人237名（男性95例、女性142例）に対し甲状腺検診を行なった。超音波検査で腫瘍性病変が発見された例は60例（25%）で、年齢とともに有病率は増加していた（表4）。腫瘍性病変は30歳まではほとんど認められないものの（3%）、30歳以上では34%（58/171）と高率に認められた。超音波画像上これらはすべて腺腫様甲状腺腫の変化と思われた。

男性75名の随時尿の尿中ヨード排泄量は143.2 μg/L、女性115例では147.7 μg/L であった。これらと尿中クレアチニン値との比を算出し、WHO のヨード欠乏のガイドラインに従ってヨード欠乏の状態を分類した（表5）。189例中（190例中1例は尿中クレアチニン値が測定できなかった）

26例（13.8％）にヨード欠乏が存在し、さらに8例（4.2％）は中等度から高度のヨード欠乏の状態であった。ただし、尿中ヨード排泄量と甲状腺腫瘍性病変の間には何らかの関係を見出すことはできなかった。

甲状腺ホルモンや自己抗体などの採血を行なったのは男性88例、女性122例の計210例であった。このうち男性1例、女性3例は TSH 低値、FT4 高値であり、甲状腺機能亢進状態であった。一方、男性4例、女性19例は TSH が正常上限より高く機能低下が示唆されたが、FT4 も低値であったものは、女性2例のみで、他は潜在性の機能低下症と考えられた。自己抗体は男性5例（5.7％）、女性15例（12.3％）に認められ、TSH が正常上限より高値であった23例中10例が自己抗体陽性であった。

表4 性・年齢ごとの甲状腺腫瘍性病変有病率

年齢（才）	男性		女性		計	
	例数	有病者数（率）	例数	有病者数（率）	例数	有病者数（率）
16～30	26	0（0％）	40	2（50％）	66	2（3％）
31～40	25	4（16％）	39	9（23％）	64	13（20％）
41～50	19	6（32％）	27	9（33％）	46	15（33％）
51～60	11	7（64％）	21	6（29％）	32	13（41％）
61～	14	7（50％）	15	10（67％）	29	17（59％）
計	95	24（25％）	142	36（25％）	237	60（25％）

表5 尿中ヨード量／尿中クレアチニン比とヨード欠乏

Iodine deficiency atatus	Ratio	男性（例）	女性（例）	計（例）
Normal	>89	62	101	163
Mild deficiency	45～89	8	10	18
Moderate deficiency	22～45	5	2	7
Sever deficiency	<22	0	1	1
Total		75	114	189

Ratio = Iodine (nM) / Creatinine (mM)

考察：

ヨード欠乏は現在でも世界において重要な問題の1つであり、多くの地域で地域性甲状腺腫やクレチン病が発生している。ヨード欠乏の調査の方法として学童の甲状腺腫の有病率によってヨード摂取の状態を把握するという手法が多く用いられている（5，6）。今回我々が、チベット自治区山南地区において学童の甲状腺腫について調べたところ、触診で男児および女児にそれぞれ、44.0％、44.6％。超音波検査では体表面積をもとにヨーロッパの甲状腺体積の正常上限と比較したところ、それぞれ51.3％、37.9％と高率にみとめられた。これは、Moreno-Reyes ら（1）がラサ市近郊で行なった調査での甲状腺腫の割合—49％とほぼ同じ値を示している。WHO は触診で甲状腺腫が10％以上に認められる場合その地域はヨード欠乏があると定義している。この定義によれば、チベット山南地区においてもいまだヨード欠乏が存在していることになる。一方、尿中ヨード排泄量は WHO が設定している閾値（2）である100 μ g/L 未満の例は16.0％であり、また極度の欠乏が推定される20 μ g/L 未満は2例（1.1％）であり、Moreno-Reyes ら（1）が10 μ g/L 未満が36％としているのに比べ大きな差がある。尿中ヨード排泄量の結果を見る限りでは、現在の山南地区において、ヨードは比較的充足していると考えられた。このように、尿中ヨードが比較的充足しているにもかかわらず甲状腺腫の有病率が高くなっている原因としては、90年代のヨード欠乏の影響、ゴイトロゲンの摂取の影響、また、リチウムやセレンウム

などの重金属の影響などにより甲状腺腫が発生したと考えられるが、今回の調査では明らかにすることができなかった。

成人の検診では腫瘍性病変の発見を中心に検診を行なったが、種々の報告（7，8）に見られるように年齢とともに腫瘍性病変の有病率が上昇する結果が得られた。チベット自治区山南地区においては男女ともほぼ同じ率を示していた。甲状腺腫瘍性病変の有病率が男性にも高いことは、これまでの報告に反する結果であり、何らかの人種的な問題によって生じている可能性があることが示唆された。また、1975年にヨード化食塩が導入される以前に生まれた31歳から40歳の成人の甲状腺腫瘍性病変の有病率が20%であるのに対し、ヨード化食塩導入前後に生まれた成人（16から30歳）の有病率が2%であった。このように有病率が急激に変化することは、年齢の要因だけでは説明が難しく、ヨード化食塩導入の成果によるものだと考えられた。成人の尿中ヨード量測定の結果からも学童と同じようにヨード欠乏の割合は低いことが判った。この結果から、現在では山南地区においてはヨード化食塩導入により、ヨード欠乏状態はほぼ改善されていると考えられた。このことは、自己抗体の陽性率が9.5%と高率であることから示唆された。

文献：

1. Rodrigo Moreno-Reyes, et al.: Kashin-Back osteoarthropathy in rural Tibet in relation to selenium and iodine status. The New England Journal of Medicine 1998; 339: 1112-20.
2. WHO, UNICEF & ICCIDD: Indication for Assessing Iodine deficiency Disorders and their Control through Salt Iodization. Geneva: World Health Organization. 1994.
3. F Delange, et al.: Thyroid volume and urinary iodine in European schoolchildren: standardization of values for assessment of iodine deficiency. European Journal of Endocrinology 1997; 136: 180-187.
4. T Ohashi, et al.; Simple Microplate Method for Determination of Urinary iodine. Clinical Chemistry 2000; 46:4: 529-536
5. M Zimmermann et al.; Thyroid ultrasound compared with World Health Organization 1960 and 1994 palpation criteria for determination of goiter prevalence in region of mild and severe iodine deficiency. European Journal of Endocrinology 2000; 143: 727-731.
6. W M Wiersinga, et al; A survey of iodine intake and thyroid volume in Dutch schoolchildren: reference values in an iodine-sufficient area and the effect of puberty. European Journal of Endocrinology 2001; 144: 595-603
7. T Takahashi, et al.: An investigation into the prevalence of thyroid disease on Kwajalein atoll, Marshall Islands. Health Physics 1997; 73(1): 199-213.
8. H Miki et al.; Incidence of ultrasonographically-detected thyroid nodules in healthy adults. Tokushima J. exp. Med. 1993; 40: 43-46.

作成日：2002年3月13日

2001年度日中医学協会共同研究等助成事業報告書

ー調査・共同研究に対する助成ー

2002 年 3 月 15 日

財団法人 日中医学協会
理 事 長 殿

研究代表者氏名 山西 弘一



所属機関名 大阪大学・医学系研究科

部署・役職 微生物学講座・教授

所在地 〒565-0871 大阪府吹田市山田丘2-2

電話 06-6877-5111 内線 3321

1. 研究テーマ

原因不明の血液疾患に関するウイルスの同定

2. 研究期間 自 2001 年 5 月 24 日 ～ 至 2002 年 3 月 15 日

3. 研究組織

日本側研究者氏名 山西 弘一

所属機関 大阪大学 職名 教授

中国側研究者氏名 沈 建箴 (Shen Jian-Zhen)

所属機関 福建医科大学 職名 助教授

4. 研究報告書

別紙報告書作成要領に従い、添付の用紙で研究報告書を作成して下さい。

※研究成果を発表する場合は、発表原稿・抄録集等も添付して下さい。

※発表に当たっては、日中医学協会助成金による旨を明記して下さい。

5. 収支決算報告

2001年4月4日交付通知のあった研究課題 原因不明の血液疾患に関するウイルスの同定
 についての収支決算を行いました。領収書コピーを添えて、次のとおり報告します。

交付を受けた金額	支 出 内 訳			
	消耗品費	旅 費	その他	合 計
1,000,066 円	662,821 円	334,410 円	2,835 円	1,000,066 円

支出明細（消耗品・旅費・その他の科目別に記載、別紙可）

科目区分	金 額	備考(用途・内訳)
研究事業費	1,000,066	利息 66円
旅 費	191,830	研究打合 関西空港⇄厦門 1名×@191,830×1回=191,830円 厦門⇄関西空港
	82,824	研究打合 厦門⇄関西空港 関西空港⇄厦門 1名×@82,824×1回=82,824円
宿 泊 代	59,756	ホテル オオサカ サンパレス 1名（沈 建箴）×@7,500×7泊×1.05=59,756円
消 耗 品	269,897	ナカライテスク株式会社 品名 ストレフトABCベルオキシダーゼ キット ヘルオキシターゼセンシヨクDABキット × 1 = 11,200 HPA 2 NEB0171S 2000U × 1 = 10,640 MSP 1 NEB0106S 5000U × 1 = 10,545 インターロイキン6（ヒトリコンピナント）× 1 = 11,700 AMV REVERSE TRANSCRIPTASE × 1 = 32,400 DEADEND COLORIMETRIC APOPTOSIS DETEC×1= 26,600 TAQ DNA POLYMERASE IN STORAGE BUFFER×1= 8,820 TAQ DNA POLYMERASE IN STORAGE BUFFER×1= 9,000 QIAAMP DNA BLOOD MIDI KIT(100) × 1 = 81,000 QIAPREP SPIN MINIPREP KIT(50) × 1 = 9,900 5-AZA-2-DEOXYCYTIDINE × 1 = 8,640 ダルベツヘンボウイーグルバツイチ（2）× 1 = 4,500 GENO PURE フラスミドミディキット × 1 = 8,500 消費税 12,852
	58,590	三和理研株式会社 品名 iピペット キャンペーンセット × 1 = 19,800 ミスターフロスティ1.2/2.0ml × 1 = 36,000 消費税 2,790

科目区分	金 額	備考(用途・内訳)
雑 費	334,334	八洲薬品株式会社
		品名 コウVP16 × 1 = 38,700
		Plasmid Maxi Kit × 1 = 54,000
		プレートキット × 1 = 16,914
		消費税 15,920
	840	銀行振込手数料（東急観光株式会社大阪中央支店）
	525	銀行振込手数料(ナカライテスク)
	525	銀行振込手数料(三和理研)
	525	銀行振込手数料(ホテルオオサカサンパレス)
	420	銀行振込手数料(八洲薬品株式会社)

原因不明の血液疾患に関するウイルスの同定

研究代表者氏名：山西弘一

所属：大阪大学大学院医学研究科微生物学

役職：教授

要旨

ヒトに感染するヘルペスウイルスは現在までに8種類報告されているが、初感染の後、体内に潜伏感染し、宿主の免疫不全状態に伴い種々の疾患を引き起こすことが知られている。ヘルペスウイルスのなかでも β ヘルペスウイルスに属するHHV6は初感染の後、血小板減少性紫斑病を引き起こす症例も報告されており、また骨髄移植後の免疫不全状態では再活性化に伴い、骨髄抑制が認められる症例も数多く経験されている。このようなことから、血液系の原因不明の疾患にヘルペスウイルスが病因として関わっている可能性が深く示唆される。ヘルペスウイルスに保存性の高い領域にヘルペスウイルスを共通増幅できるプライマーを設計し、PCR法を用いて、複数のヘルペスウイルスを同時に検出できる系を開発した。原因不明の血液疾患の患者検体に応用し既知及び未知のヒトヘルペスウイルスがその発症原因である可能性について検討した。

Key Words: ヘルペスウイルス, 原因不明血液疾患, PCR法

目的や研究背景

ヘルペスウイルスとして分類されるウイルスは100種類以上知られている。魚類、両生類、鳥類など、またほ類のサル、ヒトに及ぶ生物種に広く分布している。ヒトヘルペスウイルス(HHV)としては、単純ヘルペスウイルス1型(HSV-1)、2型(HSV-2)、帯状疱疹ウイルス(VZV)、ヒトカイトメガロウイルス(HCMV)、Epstein-Barrウイルス(EBV)の5種と、最近発見されたヒトヘルペス6型(HHV-6)7型(HHV-7)及び8型(HHV-8)の8種類が知られており、その生物学の性状から α 、 β 、 γ の3群に分けられている。ヘルペスウイルス粒子はいずれもが類似し、被膜を持つ直径200nmの粒子で、細胞の核内には直径100nmの被膜のないヌクレオカプシドが存在する。感染標的細胞は、 α ヘルペスでは多くの細胞に、 β ヘルペスでは主に血液細胞(リンパ球や単球/マクロファージ)と上皮細胞、そして γ ヘルペスではリンパ球や上皮細胞などである。ヒトヘルペスウイルスは初感染後体内に潜伏感染し、宿主の免疫力の低下に伴い様々な疾患の原因になることが知られている。ヘルペスウイルスのなかでも β ヘルペスウイルスに属するHHV6は初感染の後、血小板減少性紫斑病を引き起こす症例も報告されており、また骨髄移植後の免疫不全状態では再活性化に伴い、骨髄抑制が認められる症例も数多く経験されている。このようなことから、血液系の原因不明の疾患にヘルペスウイルスが病因として関わっている可能性が深く示唆される。我々はこれまでにHHV-6が突発性発疹の原因ウイルスであることを明らかにした。また、HHV-6のHST株の全塩基配列(160Kbp)を決定した。ヘルペスウイルスに保存性の高い領域にヘルペスウイルスを共通増幅できるプライマーを設計し、PCR法を用いて、複数のヘルペスウイルスを同時に検出できる系を開発した。現在までに開発し得た系は、ヘルペスウイルスの中でも β 、 γ ヘルペスを共通増幅できる系に加え、さらに、より高感度に、 β ヘ

ルベスウイルスを共通増幅する系である。後者の系は、ヒトβヘルペスウイルスのみならず、サルサイトメガロウイルスも含め、βヘルペスウイルスを広く共通増幅できる系で、既知のウイルスに加え未知のヘルペスウイルスも検出できる系と考えている。これらのヒトヘルペスウイルスを同時に検出可能なPCR系を開発し、原因不明の血液疾患の患者検体に応用し既知及び未知のヒトヘルペスウイルスがその発症原因である可能性について検討することを目的とした。

研究方法

1) βヘルペスウイルス標準株として、U1102(HHV-6A), HST(HHV-6B), 7-KHR(HHV-7), Towne(CMV)感染細胞をproteinase K処理して得たDNAを100ng、臨床検体は患者末梢血または骨髓血より単核球を分離してproteinase K処理を行い、 10^5 個細胞から得られたDNAをテンプレートとして用いた。血漿は20μlから抽出したDNAをテンプレートとして用いた。

2) 共通増幅プライマーは、βヘルペスウイルスに保存性の高いlate spliced gene領域にforward側2種、reverse側2種の2組を設定し、nested PCR法を施行した。得られた増幅産物はサザンハイブリダイゼーション法によりウイルスを特定した。特定されないものについてはdirect sequencing法を用いて塩基配列を調べた。

3) 対象は特発性血小板減少症(ITP) 18症例23例(骨髓5検体、血漿2検体、末梢血単核球16検体)、再生不良性貧血(AA)末梢血9検体、急性白血病患者28症例の末梢血単核球検体。

(倫理面への配慮)

患者からの検体の採取(末梢血2ml、骨髓血1ml)はインフォームドコンセントをとった上で行った。検体から抽出したDNAはヘルペスウイルスの検出以外の目的には使用せず、患者に不利益を生じることはないと判断した。

研究結果

1) 共通増幅プライマーはβヘルペスウイルス感染細胞(HHV-6、HHV-7、HCMV)、臨床検体において既知のβヘルペスウイルスを特異的に共通増幅することが可能であった。

2) 特発性血小板減少症(ITP)患者18症例23検体(骨髓5検体、血漿2検体、末梢血単核球16検体)でのヘルペスウイルスのスクリーニング結果は、骨髓からHHV-6が3検体(60%)、末梢血単核球からHHV-6が10検体(62.5%)、HCMVが1検体(6.3%)、血漿からHHV6が1検体(50%)検出された。未知のヘルペスウイルスの検出には至らなかった。

3) 再生不良性貧血(AA)患者においては、末梢血9検体中、HHV-7が1検体(11.1%)で検出された。再生不良性貧血患者の症例中、2症例が肝炎症状後に再生不良性貧血を発症し、ウイルス感染が契機として疑われていたが、2症例ともにβヘルペスウイルスは検出されなかった。このうちの1症例は骨髓移植が施行され、移植後経時的にヘルペスウイルスについて調べたところ、移植後第9週にHHV-6が100-1000copies/sample検出された。未知のヘルペスウイルスの検出には至らなかった。

4) 急性白血病患者検体を用いてこの系を応用したところHHV-6が3検体、HHV-7が5検体、HCMVが2検体検出されたが、未知ウイルスは検出されなかった。未知のヘルペスウイルスの検出には至らなかった。

考察

ヘルペスウイルスの中でもβヘルペスウイルスに属するHHV-6、HCMVは再活性化時に骨髓抑制を認める症例や、初感染時に血小板減少症を発症する症例が報告されている。現在は、症例を集めてスクリーニングを施行しており、特発性血小板減少症患者の末梢血、骨髓からHHV-6が高率に検出された。肝炎症状後に再生不良性貧血を発症し、ウイルス感染が契機として疑われていた再生不良性貧血患者検体における検討ではヘルペスウイルスの関与は否定的であった。未知のヘルペスウイルスが原因不明の血液疾患の原因である可能性を考え、特発性血小板減少症(ITP)、再生不良性貧血(AA)と急性白血病患者の患者検体を用いたスクリーニングも同時に施行したが未知ウイルスの検出には

いたらなかった。我々の開発した HHV 共通増幅システムは患者検体からのウイルスの検出が簡便に行なえ、スクリーニングに有効であった。特発性血小板減少症 (ITP) 患者検体から、高率に HHV-6 が検出された。骨髄移植後の造血障害に、HHV-6 が HCMV と同様に関与するとの報告がされた。In vitro で、HHV-6 顆粒球系の CFU-GM、赤芽球系の BFU-E のコロニー数の減少を認めた。HHV-6 の造血系の影響が示唆された。今回の結果がその意義については現在検討中である。

参考文献

1. Roizman B. and Pellett P.E.. The Family Herpesviridae: A Brief Introduction. 2001. Fields Virology (Fourth Edition) 2381-2398.
2. Yamanishi K.. Human Herpesvirus 6 and Human Herpesvirus 7. 2001. Fields Virology (Fourth Edition). 2785-2802.
3. Drobyski, W. R., W. M. Dunne, E. M. Burd, K. K. Knox, R. C. Ash, M. M. Horowitz, N. Flomenberg, and D. R. Carrigan. 1993. Human herpesvirus-6 (HHV-6) infection in allogeneic bone marrow transplant recipients: evidence of a marrow-suppressive role for HHV-6 in vivo. J. Infect. Dis. 167:735-739.
4. Isegawa Y, Mukai T, Nakano K, Kagawa M, Chen J, Mori Y, Sunagawa T, Kawanishi K, Sashihara J, Hata A, Zou P, Kosuge H, Yamanishi K. Comparison of the complete DNA sequences of human herpesvirus 6 variants A and B. J Virol 1999 Oct;73(10):8053-63
5. Inverse relationship between human herpesvirus-6 and -7 detection after allogeneic and autologous stem cell transplantation. H. Miyoshi et al. Bone Marrow Transplantation 2001 (27)1065-1070
6. Carrigan DR, Knox KK. Human herpesvirus 6 (HHV-6) isolation from bone marrow: HHV-6-associated bone marrow suppression in bone marrow transplant patients. Blood 1994 Nov 15;84(10):3307-10.
7. Isomura H, Yoshida M, Namba H, Fujiwara N, Ohuchi R, Uno F, Oda M, Seino Y, Yamada M. Suppressive effects of human herpesvirus-6 on thrombopoietin-inducible megakaryocytic colony formation in vitro. J Gen Virol 2000 Mar;81(Pt 3):663-73

2001年度日中医学協会共同研究等助成事業報告書

－調査・共同研究に対する助成－

2002年 3月 15日

財団法人 日中医学協会
理事長 殿

研究代表者氏名

神田 重信



所属機関名 九州大学大学院歯学研究院

部署・役職 口腔画像情報科学教室、教授

所在地 〒812-8582 福岡市東区馬出3-1-1

電話 092-642-6407 内線

1. 研究テーマ

中国、内蒙古のモンゴロイドにおける顎関節機能異常発症の民族的差異と関連病学的研究

2. 研究期間 自 2001 年 4 月 4 日 ～ 至 2002 年 3 月 15 日

3. 研究組織

日本側研究者氏名 神田 重信

所属機関 九州大学大学院歯学研究院 職名 教授

中国側研究者氏名 馬 諸 臣

所属機関 北京大学口腔医学院 職名 教授

4. 研究報告書

別紙報告書作成要領に従い、添付の用紙で研究報告書を作成して下さい。

※研究成果を発表する場合は、発表原稿・抄録集等も添付して下さい。

※発表に当っては、日中医学協会助成金による旨を明記して下さい。

5. 収支決算報告

中国内蒙古のモンゴロイドとアフリカ系顔面筋機能異学発症

2001年4月4日交付通知のあった研究課題 の月夜の差異に關する學的研究

についての収支決算を行ないました。領収書コピーを添えて、次のとおり報告します。

交付を受けた金額	支 出 内 訳			
	消耗品費	旅 費	そ の 他	合 計
1,000,000円	202,776 円	521,764 円	275,978 円	1,000,518 円

支出明細（消耗品・旅費・その他の科目別に記載、別紙可）

科目区分	金 額	備考（用途・内訳）
消耗品費	88,431 107,100 7,245	咬合力計 コンピュータ 消耗品
旅費	521,764	国際航空運賃
輸送費	20,785	咬合力計・中国へ
修理費	15,540	、
人件費	45,600	データー入力
交通費	34,270	中国人研究者送迎
会議費	95,803	会議室使用料
滞在宿泊費	63,440	中国側研究者滞在宿泊
手数料	540	振込手数料

中国・内蒙古のモンゴロイドにおける 顎関節機能異常発症の民族的差異に関する疫学的研究

日本側研究者代表 九州大学大学院歯学研究院 教授 神田重信、講師 中山英二

中国側研究者代表 北京大学口腔医学院 教授 馬 緒臣、大学院生 曹 利

要旨

日本人と内蒙古自治区に居住するモンゴル族の健常者に対して共通のアンケート調査票による検診を行ない、両民族の健常人における顎関節機能状態と食習慣、生活習慣、社会的環境の差を明らかにし、顎関節機能異常と生活習慣や社会的環境との関連性を考察することを目的とした。

方法として内蒙古自治区に居住するモンゴル族成人健常者 113 名（男性 62 名、女性 51 名）と日本人 369 名（男性 151 名、女性 218 名）の成人健常者に顎関節機能状態と食習慣、生活習慣、社会的環境に関するアンケート調査を実施した。そして両民族間の各項目の差を χ^2 検定により危険率 5% で有意差検定した。

その結果、（１）何らかの顎関節機能異常を有するものは日本人と比較してモンゴル人では有意に低かった。（２）社会的環境については、日本人はあせりや不満を自覚する割合が高いのに対して、モンゴル人では現状に対する満足度が高い傾向がみられた。

以上より、日本人とモンゴル族成人のアンケート調査による比較により、顎関節機能と生活習慣や社会的環境との関連性が示唆されたが、その関連性を明らかにするにはより詳細な診察が必要と考えられた。

Key words:

Temporomandibular, joint dysfunction, Japanese, Mongolian, ethnicity, epidemiology

研究報告

目的

顎関節機能異常を訴える患者は世界的に年々増加する一途である。その要因として顎骨の成長発育の退化、咀嚼習慣の変化、咬合異常、社会的心理的ストレスの増加などがあげられている。しかし未だはっきりした因果関係や作用機構は明らかにされておらず、現在、顎関節機能

異常症の診断および治療における最重要課題である^{1)~7)}。そこで我々は顎機能異常の発症要因の解明は重要な課題であるという認識のもとに、まず一般健常人の顎機能状態と食習慣、咀嚼習慣、社会環境との関連を調査してきた。

第一段階として社会環境が異なる日本人と中国人の二群間でアンケートによる生活環境の差異と顎機能状態の差異の関連性を分析した。これは江西省南昌市民を中国側対象とした(日中医学協会、調査ならびに研究に対する助成、1991年~1992年)。

その結果、中国における顎機能の傾向が明らかになったが、それは日本人と同様の傾向を示し、また食習慣や生活習慣にも大きな差がない結果であった⁸⁾。そこでその結果をふまえ、社会的環境や食習慣、咀嚼習慣が日本人と大きく異なる内蒙古自治区に居住するモンゴル族の健常者と日本人の顎関節部に明らかな病変を自覚しない健常人に対して統一的なアンケート調査を行い、その異同を明らかにすることにより、顎関節機能異常症の発症に関与する要因を解析することを計画した。この研究の目的は日本人と内蒙古自治区に居住するモンゴル族の健常者に対して共通のアンケート調査票による検診を行ない、両民族の健常人における顎関節機能状態と食習慣、生活習慣、社会的環境の差を明らかにし、顎関節機能異常と生活習慣や社会的環境との関連性を考察することである。

方法

内蒙古自治区に居住するモンゴル族成人健常者 113 名(男性 62 名、女性 51 名)と日本人 369 名(男性 151 名、女性 218 名)の成人健常者に顎関節機能状態と生活習慣、食習慣、社会的環境に関するアンケート調査を実施した。顎機能異常と医療機関で診断された既往の者や、顎関節部の外傷、炎症、腫瘍などの既往のある者、または顎機能に影響を及ぼす可能性のある全身疾患の既往のある者は対象からはずした(表1)。対象者の内訳を表2に示す。

調査方法として、顎機能状態とそれに関連する調査項目を含むアンケート調査票を用意し、それに各自記入してもらう方法をとった。調査期間は 2001 年 4 月から 2001 年 12 月である。なお日本人へのアンケート調査は 1994 年 4 月から 1995 年 10 月に収集したデータを使用した。質問票の項目は、1. 年齢、性別、健康状態、疾病の有無や種類、2. 顎機能状態、咬合状態、3. 食習慣、食事の嗜好、咀嚼習慣、4. 社会生活習慣、精神状態などの項目で、全 36 項目である。

これらの回答項目を集計し、各項目の日本人とモンゴル人における回答傾向について集計した。そして両民族間の各項目の差を χ^2 検定により危険率 5% で有意差検定した。

結果

各項目の日本人とモンゴル人における回答傾向の差の集計結果を表3以下に示す。

1. 顎機能状態について (表3～9、12、13)

顎機能状態については、開口度に関しては有意に男女ともモンゴル人のほうが日本人より大きい傾向にあった。また開口障害についても、モンゴル人のほうが日本人より自覚する率が有意に低かった。開閉口時不規則運動を自覚する率はモンゴル人のほうが日本人より低い傾向にあった。左右顎関節の運動時痛を自覚する率はモンゴル人と日本人の間で明らかな有意差はなかった。また左右顎関節雑音に関しては、雑音を自覚する率は、既往を含めてモンゴル人のほうが日本人より低い傾向にあった。

これらを総合すると、モンゴル人のほうが日本人より顎関節症状の発現率が低く、顎機能状態が良好であることが示唆された。

2. 不正咬合と臼歯喪失状況について (表10、11)

不正咬合と臼歯喪失状況に関しては、はいずれもモンゴル人のほうが日本人より有意に悪い状況にある。

3. 食生活について (表14～17)

食生活に関する項目では、食物の固さの好みについては、モンゴル人と日本人の間でその分布に有意差がみられたが両群とも「どちらでもない」と回答した者が多く、明らかな傾向は指摘しがたい結果であった。間食傾向については、モンゴル人のほうが日本人より有意に間食を多くとる傾向があった。また、よく噛んで食べるかどうかについては、モンゴル人のほうが日本人より有意によく噛む傾向があった。偏咀嚼については日本人では偏咀嚼の割合が高いのに対して、モンゴル人では偏咀嚼の割合が低く有意差があった。

4. 生活環境、精神状態について (表18～20)

総じてモンゴル人のほうが日本人より現状に満足し、ストレスなく生活していることが示唆された。

考察

咀嚼機能異常を有する者は、世界的に年々増大してきており、種々の民族における実態が報告されている¹⁻⁷⁾。咀嚼機能異常症の発症原因は咬合状態⁹⁾、咀嚼様式、口腔悪習癖^{10),11)}、頭蓋顔面の骨格型¹²⁾などの局所要因や精神的ストレス¹³⁾などの心身医学的要因などの多因子が関与していると考えられているが、いまだ見解の統一をみない。一方で、食習慣、社会生活習慣や民族などの生活環境要因も発症要因として注目されている¹⁴⁾。そこで我々は多数集団に対して咀嚼機能状態と上記各多因子との関連性を疫学調査する方法により発症要因の解明を試みて

きた。日本人を対象とした同様の疫学調査は従来数多く報告されているが^{15),16)}、我々の疫学調査は多民族間の国際疫学調査であり、ほとんど報告がない。

今回の質問表による顎機能状態および食生活、関連症状、口腔状態、その他の項目について、モンゴル人と日本人の回答傾向に両者間でかなりの差が認められて興味深い。

まず、顎機能状態では、モンゴル人は、顎関節症状の出現率が低く、顎機能が保たれていることが示唆された。これに対して、日本人は、顎関節症状の出現率が高く、顎機能が障害されていることが示唆された。しかし顎機能状態については質問票による主観的自己評価ではなく、再度、専門医による検診を通した客観的評価をおこなったうえで、確かめる必要がある。

つぎに、不正咬合の状態と臼歯の喪失状況であるが、どちらもモンゴル人のほうが日本人よりも有意に悪い咬合状態であることが示唆された。この2つの要因が、モンゴル人の顎機能に影響を与えていることは十分考えられる⁹⁾が、それにもかかわらずモンゴル人の顎機能は障害されていないことは興味深い。

食生活については、やはりモンゴル人と日本人の回答傾向に差がみられ、モンゴル人は、間食をあまりとらず、食物をよく噛んで食べるのに対して、日本人は、間食をとり、あまり食物をよく噛んで食べない傾向にあった。これらの食習慣が顎機能に影響を与えていることは十分考えられ^{10),11)}、今回の質問票による調査においても顎機能と食習慣との相関の可能性が示唆される結果であった。

生活習慣では、モンゴル人のほうが日本人より現状に満足し、ストレスなく生活していることが示唆された。このことはストレスが顎機能に悪影響を与える可能性があるとの研究¹³⁾を考慮すると、今回の結果もその説を支持する結果であると考えられた。

以上まとめると、日本人 369 名とモンゴル人 113 名に共通のアンケート質問票による調査を行い、顎機能状態や咬合状態、食生活などの両群の回答傾向の差を統計学的に検定した。その結果、両群間で、顎機能状態に統計学的に有意の差が認められ、かつ、咬合状態、食生活の状況にも、統計学的に差が認められた。

この結果より示唆される顎機能状態と咬合状態、食生活との因果関係を確認するためには、さらに専門医による詳細な検診調査が必要と思われた。

参考文献

- 1) Agerberg, G. and Carlsson, G.E.: Functional disorders of the masticatory system. I. Distribution of symptoms according to age and sex as judged from investigation by questionnaire. Acta Odontol Scand 30: 597-613, 1972.
- 2) Helkimo, M.: Studies on function and dysfunction of the masticatory system. I. An

- epidemiological investigation of symptoms of dysfunction in Lapps in the north of Finland. *Proc Finn Dent Soc* 70: 37-49, 1974.
- 3) Helkimo, M.: Studies on function and dysfunction of the masticatory system. II. Index for anamnestic and clinical recordings of dysfunction and occlusal state. *Swed Dent J* 67: 101-121, 1974.
 - 4) Helkimo, M.: Studies on function and dysfunction of the masticatory system. III. Analyses of anamnestic and clinical recordings of dysfunction with the aid of indices. *Swed Dent J* 67: 165-182, 1974.
 - 5) Helkimo, M.: Studies on function and dysfunction of the masticatory system. IV. Aged and sex distribution of symptoms of dysfunction of the masticatory system in Lapps in the north of Finland. *Acta Odont Scand* 32: 255-267, 1974.
 - 6) Ingervall, B. and Hedegard, B.: Subjective evaluation of function disturbances of the masticatory system in young Swedish men. *Community Dent. Oral Epidemiol* 2: 149-152, 1974.
 - 7) Molin, C., Carlsson, G.E., friling, B. and Hedegard, B.: Frequency of symptoms of mandibular dysfunction in young Swedish men. *J. Oral Rehabil* 3: 9-18, 1976.
 - 8) Zhang, Y., Wang, J., Kanda, S., Nakayama, E., Kai, S., Xu, J.: An epidemiological study of temporomandibular joint disorders in 1005 Chinese population *Acta Academiae Medicinae Jiangxi* 39: 85-90, 1999 (in Chinese)
 - 9) 藍 稔：顎機能異常・咬合からのアプローチ。医歯薬出版、東京、1983、1-329.
 - 10) 都 温彦、福田仁一、佐藤晴枝、古賀 勉、権籐好弘、津田武明、高橋省治：顎関節症患者における咀嚼指導とリスクファクターとしての生活様式について。日顎誌 3: 75-87, 1991
 - 11) 西原克成：顎関節症の診断と機能療法。日口診誌 6: 86-104, 1993
 - 12) 西原克成：習慣性顎関節脱臼の診断と治療。日口診誌 6: 313-325, 1993
 - 13) 北 進一：顎関節とストレス。臨床環境医学、1: 104-107, 1992
 - 14) 大西正俊：顎関節下顎頭形態の変化と適応についての検討。文部省特定研究総括班編「咀嚼システムの形成と適応」、風人社、東京、1998、257-266
 - 15) 竹之下康治、平野裕士、河野勝寿、鳥越康彦：歯科検診時に調査した顎関節症と歯牙の状態について。日口外誌 30: 1378-83, 1984
 - 16) 平澤純子、石井昌子、黒田敬之、藤崎臣弘、坂本光徳、加藤嘉之：女子大学生における顎関節症の疫学的研究。日顎誌 7: 97-106, 1995

表1 対象者から除外した既往疾患

対象者から除外した既往疾患
自己免疫疾患（関節リュウマチ、SLE、シェーグレン症候群など）
顎顔面骨外傷
下顎骨骨髓炎
慢性中耳炎
糖尿病
腎透析を伴う腎不全
肝機能障害
出血傾向を示す血液疾患（血友病、血小板減少性紫斑病など）
顎関節部の外傷、炎症、腫瘍、奇形、顎関節症

表2 対象者

対象者数と年齢			
日本人	総数	369名、	平均年齢 20.4±2.3才（18～39才）
	男性	151名、	平均年齢 21.2±2.8才（18～39才）
	女性	218名、	平均年齢 19.7±1.7才（18～29才）
モンゴル人	総数	113名、	平均年齢 40.6±14.6才（17～83才）
	男性	62名、	平均年齢 38.7±13.7才（19～83才）
	女性	51名、	平均年齢 43.2±15.3才（17～76才）

表3 開口度（男性）

開口度	4cm以下	4-5cm	5cm以上	計
日本人	19	56	73	148
モンゴル人	1	33	28	62
総数	20	89	101	210

p<0.05

表4 開口度（女性）

開口度	4cm以下	4-5cm	5cm以上	計
日本人	57	115	37	209
モンゴル人	5	32	14	51
総数	62	147	51	260

p<0.05

表5 開口障害

開口障害	ある	ない	不明	計
日本人	26	312	29	367
モンゴル人	2	109	2	113
総数	28	421	31	480

p<0.01

表6 開口時不規則顎運動

不規則顎運動	ない	右にある	左にある	両方にある	不明	計
日本人	262	31	25	28	22	368
モンゴル人	113	0	0	0	0	113
総数	375	31	25	28	22	481

p<0.01

表7 閉口時不規則顎運動

不規則顎運動	ない	右にある	左にある	両方にある	不明	計
日本人	292	12	23	16	24	367
モンゴル人	113	0	0	0	0	113
総数	405	12	23	16	24	480

p<0.01

表8 右顎関節の運動時痛

運動時痛	ある	ない	不明	計
日本人	23	331	12	366
モンゴル人	4	108	1	113
総数	27	439	13	479

p=0.32

表9 左顎関節の運動時痛

運動時痛	ある	ない	不明	計
日本人	11	346	6	363
モンゴル人	4	108	1	113
総数	15	454	7	476

p=0.81

表10 不正咬合の有無

不正咬合	ある	ない	不明	計
日本人	191	130	47	368
モンゴル人	79	31	0	110
総数	270	161	47	478

p<0.01

表 1 1 臼歯喪失状況

臼歯喪失	ない	片方ある	両方ある	不明	計
日本人	321	34	11	2	368
モンゴル人	65	25	22	0	112
総数	386	59	33	2	480

p<0.01

表 1 2 右顎関節雑音

顎関節雑音	ない	昔あった	今ある	不明	計
日本人	262	23	54	26	365
モンゴル人	107	1	4	1	113
総数	369	24	58	27	478

p<0.01

表 1 3 左顎関節雑音

顎関節雑音	ない	昔あった	今ある	不明	計
日本人	268	19	51	22	360
モンゴル人	102	2	6	1	111
総数	370	21	57	23	471

p<0.01

表 1 4 食物の硬度の好み

食物の硬度	硬食が好き	軟食が好き	どちらでもない	不明	計
日本人	44	77	230	15	366
モンゴル人	26	31	56	0	113
総数	70	108	286	15	479

p<0.01

表 1 5 間食

間食	しない	ほぼ毎日する	毎日する	不明	計
日本人	107	170	33	56	366
モンゴル人	59	38	10	3	110
総数	166	208	43	59	476

p<0.01

表 1 6 精咀嚼

精咀嚼	よく噛む	よく噛まない	どちらでもない	計
日本人	118	140	104	362
モンゴル人	83	23	1	107
総数	201	163	105	469

p<0.01

表 1 7 偏咀嚼

咀嚼側	右で噛む	左で噛む	両方で噛む	不明	計
日本人	97	67	146	53	363
モンゴル人	17	11	81	1	110
総数	114	78	227	54	473

p<0.01

表 1 8 寝付きがよいか

	よい	悪い	不明	計
日本人	287	48	29	364
モンゴル人	94	14	5	113
総数	381	62	34	477

p=0.41

表 1 9 仕事上あせりがあるか

	ない	ある	不明	計
日本人	234	73	56	363
モンゴル人	99	7	7	113
総数	333	80	63	476

p<0.01

表 2 0 日常生活に不満があるか

	ない	ある	不明	計
日本人	194	112	57	363
モンゴル人	85	23	1	109
総数	279	135	58	472

p<0.01

2001年度日中医学協会共同研究等助成事業報告書

－調査・共同研究に対する助成－

14年 3月 23日

財団法人 日中医学協会
理事長 殿

研究代表者氏名 正山 征洋
所属機関名 九州大学大学院
部署・役職 薬学研究院薬用資源制御学・教授
〒812-8582
所在地 〒福岡市東区馬出三丁目一番一号
電話 092-642-6580 内線

1. 研究テーマ 漢方薬の活性成分に関する共同研究

2. 研究期間 自 2001年 4月 / 日 ～ 至 2002年 3月 15日

3. 研究組織

日本側研究者氏名 正山 征洋
所属機関 九州大学大学院 職名 教授

中国側研究者氏名 徐 強
所属機関 中国薬科大学中薬学院 職名 教授

4. 研究報告書

別紙報告書作成要領に従い、添付の用紙で研究報告書を作成して下さい。

※研究成果を発表する場合は、発表原稿・抄録集等も添付して下さい。

※発表に当っては、日中医学協会助成金による旨を明記して下さい。

5. 収支決算報告

2001年4月4日交付通知のあった研究課題 漢方薬の活性成分に関する共同研究

についての収支決算を行ないました。領収書コピーを添えて、次のとおり報告します。

交付を受けた金額	支 出 内 訳			
	消耗品費	旅 費	そ の 他	合 計
1,000,000 円	999,500 円	0 円	500 円	1,000,000 円

支出明細（消耗品・旅費・その他の科目別に記載、別紙可）

科目区分	金 額	備考（用途・内訳）
消耗品 エッペンドルフ 可変ピペット	納品書に記載	抗体分析に使用
ハミルトン マイクロシリンジ	納品書に記載	HPLC分析用
凍結乾燥瓶	納品書に記載	抗体タンパクの凍結乾燥用
ナスフラスコ	納品書に記載	抗体タンパクの凍結乾燥用
クオリティーチップ	納品書に記載	抗体分析用（ディスプレイ）
チューブラック	納品書に記載	チューブの保存用
ホキメディカル	納品書に記載	抗体分析用
スクリュー キャップ マイクロ チューブ	納品書に記載	抗体タンパクの保存用
組織培養用 マイクロチューブ	納品書に記載	ハイブリドーマの培養
その他	500	データ整理等

漢方薬の活性成分に関する共同研究

研究者氏名	徐 強
中国所属機関	中国薬科大学中薬学院
日本研究機関	九州大学大学院薬学研究院
指導責任者	正山征洋

要旨

生薬や漢方薬の主要成分の定量分析にモノクローナル抗体を用いた酵素免疫学的手法(ELISA)の開発を目的として、人参のジンセノシド類、甘草のグリチルリチン、柴胡のサイコサポニン類、大黄のセンノシド類に対するモノクローナル抗体を作成した。本抗体を用いた定性的な手法として世界に先駆けてイースタンブローディング法を開発した。さらに本研究ではモノクローナル抗体装着イムノアフィニティーカラムにより人参の有効成分の一つであるジンセノシドR b 1の濃縮とワンステップ精製を行い単離することに成功した。また、ジンセノシドR b 1のみを除去したエキスの調整にも成功した。

Key Words 漢方薬, 生薬, モノクローナル抗体, ELISA, イースタンブローディング, イムノアフィニティーカラム

緒言：

漢方薬や生薬の力価を評価する場合、活性成分をマーカーとして分析することが多い。この場合特定の化合物をターゲットとする分析と、類似した化合物群をトータルで分析する場合がある。我々は簡便な分析のツールとして、モノクローナル抗体を選び研究を展開している。即ち、生薬や漢方薬の主要成分の定量分析にモノクローナル抗体を用いた酵素免疫学的手法(ELISA)を開発してきた。また、定性的な手法として膜に転写してモノクローナル抗体により染色する新しい手法を開発し、イースタンブローディング法と命名した。また、漢方薬には数種の生薬が配合されるため、真の活性成分についての研究は殆ど手が付けられていないのが現状である。これは生薬に多種多様な成分を含有するため、特定の成分だけを除去して薬理活性を検討することは不可能と考えられてきた。このため本研究ではモノクローナル抗体装着イムノアフィニティーカラムを作成し、ワンステップでターゲット成分を単離出来る方法を開発し、この結果により生薬エキスからターゲット成分のみを除去したエキスの調整を目指している。

方法：

1. モノクローナル抗体の作製とELISAの開発

1) 生薬成分の内タンパクや多糖類を除いては抗原と成りえないので、生薬成分にキャリアタンパクを結合して抗原性を付与する。通常は牛や人の血清アルブミンを用いる。結合体の中の生薬成分の分子数を確認後、マウスに免疫する。免疫値が上昇した後、脾臓細胞を摘出して、培養ミエローマ細胞と融合する。選択培地で培養し、融合細胞（ハイブリドーマ）のみを、また、目的とするモノクローナル抗体のみを分泌する単一のハイブリドーマをクローニングする。

2) 96穴のマイクロプレートに、生薬成分と抗原を作製したキャリアタンパクとは異なるタンパクを結合した固相化抗原を吸着し、得られたモノクローナル抗体とフリーの抗原を加えて抗原抗体反応を行う。洗浄後酵素でラベルした2次抗体を加え、酵素の基質を加えて反応し、発色の度合いを吸光度計で測定する。

別に標品を用いて検量線を作製して成分含量を算出する。

2. イースタンブローディングの開発と生薬の鑑定と漢方薬の定性

TLCで展開後P V D F膜をカバーしブローディング液を噴霧、120°C、5秒間加熱。膜をNaIO₄

溶液で処理後、モノクローナル抗体、2次抗体、基質の順に添加、反応して染色する。

3. モノクローナル抗体装着イムノアフィニティーカラムの作製とワンステップ単離

モノクローナル抗体の糖鎖部分をNaIO₄で開環し、ヒドラジン修飾アガロースゲルと反応してモノクローナル抗体装着イムノアフィニティーカラムを作製。洗浄溶液にて夾雑物を除去、溶出溶液にてターゲット化合物を溶出。

結果：

1. モノクローナル抗体の作成とELISAの開発

人参のジンセノシドR B 1, R G 1, 柴胡のサイコサポニン類, 大黃のセンノシド類, 甘草のグリチルリチン, サフランのクロシン, 芍薬のペオニフロリン等各種の配糖体に対するモノクローナル抗体の作成に成功した。これらの内人参のジンセノシドR b 1について詳細に説明する。

図1が抗ジンセノシドR b 1モノクローナル抗体を用いたジンセノシドR b 1に対する検量線である。2 ng - 100 ng / ml の範囲で良好な直線性を示すことから、この範囲内で精度の高い分析が可能となった。

表1は抗ジンセノシドR b 1モノクローナル抗体のクロスリアクションを示す。この結果類似化合物であるジンセノシドR c とR d にわずかにクロスリアクションが認められるものの、その他の成分に対してはクロスリアクションは認められなかった。このことから抗ジンセノシドR b 1モノクローナル抗体は極めて特異性の高い抗体と言える。

表2は各種の漢方薬中のジンセノシドR b 1含量を分析した結果である。全ての人参配合漢方薬からはジンセノシドR b 1が検出された。一方、人参を配合していない漢方薬にはジンセノシドR b 1は検出出来なかった。

2. イースタンブロテイングの開発と生薬と漢方薬の鑑定

図2は抗ジンセノシドR b 1モノクローナル抗体を用いて各種人参エキスのイースタンブロテイングを行ったものである。左のTLCでは全ての化合物が発色しているが、右のイースタンブロテイングではジンセノシド類のみが発色しており、本法が各種人参の鑑定に極めて有用であることが明らかになった。

3. モノクローナル抗体装着イムノアフィニティーカラムの作製とワンステップ単離

図3は人参エキスを抗ジンセノシドR b 1モノクローナル抗体装着イムノアフィニティーカラムに付し、洗浄液で洗浄し続いて溶離液で溶出したもので、ELISAによりモニターしたものである。洗浄液では過剰のジンセノシドR b 1と他の化合物が溶出している。洗浄後溶離液によりジンセノシドR b 1が溶出している。この状況を先のイースタンブロテイングにより確認したのが図4である。左がTLCで、右がイースタンブロテイングである。洗浄液には過剰のジンセノシドR b 1と色々な成分が溶出している。一方溶離液によりジンセノシドR b 1のみが溶出している。この結果モノクローナル抗体装着イムノアフィニティーカラムによりワンステップでジンセノシドR b 1を単離することが可能なことを明らかにした。

考察：

生薬成分として人参のジンセノシドR B 1, R G 1, , 柴胡のサイコサポニン類, 大黃のセンノシド類, 甘草のグリチルリチン, Solanum属のソラソジン配糖体, サフランのクロシン, 芍薬のペオニフロリン, ウマノスズクサ科の副作用成分であるアリストロキア酸, イチョウ葉の副作用成分, ギンコリン酸等に対するモノクローナル抗体を作製し、ELISAによる高感度定量法を樹立した。これらハイブリドーマは半永久的に保存が可能で、一度作製すれば長年月同一の力値を持つMAbを供給出来る利点がある。また、本法は何等前処理は必要なく、HPLCのような高価な装置も必要とせず、装置としては安価なプレートリーダーのみである。さらに通常のHPLCに比べ数十倍から数百倍の感度である。また、HPLCが有機溶媒を必要とするが、本法では有機溶媒を必要とせず、環境に優しい分析法と考えている。また、一度に沢山のサンプルを分析出来る利点もあり、次世代の手法と言えよう。

一方イースタンブロテイング法は世界で最初の例で、特に配糖体に特異的な手法である。通常は生

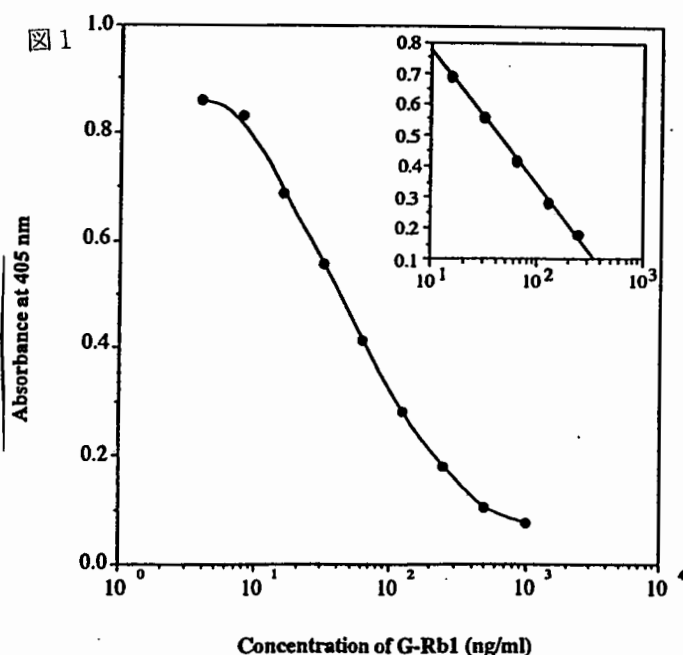
薬の配糖体含量が低く、分析の主体をなすTLC分析には種々の前処理を必要とするが、本法は何等処理せずに感度良く配糖体パターンを表現出来る。また、本法は生薬中の分析のみならず、生体における生薬成分の動態をも検出出来る簡便な手法として多くの分野で取り入れられるものと推察される。

モノクローナル抗体装着イムノアフィニティーカラムはワンステップ単離を可能にすることが明らかとなった。図5は人参エキスを精製したものである。エキスをカラムに添加するとジンセノシドRb1のみがカラムに結合する(1)。完全にジンセノシドRb1を除去したエキス(2)を再度カラムで精製すると、ジンセノシドRc, Rdがカラムに結合する(5)。このように繰り返しカラムにて精製することで3位に糖を持つ20S-パナクサジオール系ジンセノシドの単離が可能と考える。また、アフィニティーカラムを用いて特定のジンセノシドを除去したエキス(2, 4)を得ることに成功した。この分離エキスは元のエキスの薬理活性と比較することにより、生薬中での除去した成分単独の薬理活性が明らかになるものと期待したい。

発表論文：

- 1 W.Putalun, H.Tanaka, Y.Shoyama, TLC immunostaining of steroidal alkaloid glycosides, *Encyclo.Chromatog.*, 849-851(2001)
- 2 H.Tanaka, Y.Shoyama, Forskolin purification using an immunoaffinity column combined with an anti-forskolin monoclonal antibody, *Encyclo. Chromatog.*, 352-354(2001)
- 3 S.J.Shan, H.Tanaka, J.Hayashi, Y.Shoyama, Western blotting of glycyrrhetic acid glucuronides using anti-glycyrrhizin monoclonal antibody, *L.Liq.Chrom.Rel.Technol.*, 24(10), 1491-1499(2001)
- 4 N.Fukuda, H.Tanaka, Y.Shoyama, Double staining of ginsenosides by western blotting using anti-ginsenoside Rb1 and Rg1 monoclonal antibodies, *Biol.Pharm.Bull.*, 24(10), 1157-1160(2001)
- 5 H.Tanaka, L.J.Xan, S.Morimoto, Y.Shoyama, R.Isobe, K.Nojima, Direct determination of naturally occurring biologically active compound-serum albumin conjugate by MALDI-Mass, Spectroscopy, 15, 1-18(2001)
- 6 O.Morinaga, S.Nakajima, H.Tanaka, Y.Shoyama, Production of monoclonal antibodies against a major purgative component, sennoside B, their characterization and use in ELISA, *Analyst*, 126, 1372-1376(2001)
- 7 S.J.Shan, H.Tanaka, Y.Shoyama, Enzyme-linked immunosorbent assay for glycyrrhizin using anti-glycyrrhizin monoclonal antibody and a new eastern blotting for glucuronides of glycyrrhetic acid, *Anal.Chem.*, 73 (24), 5784-5790(2001)
- 8 W.Putalun, H.Tanaka, Y.Shoyama, Distribution of solasodine glycosides in *Solanum khasianum* fruiting stage determined by ELISA and western blotting, *Natural Med.*, 55(5), 243-246(2001)

表 1



Compound	Cross-reactivities (%)
Ginsenoside Rb1	100
Ginsenoside Rc	0.024
Ginsenoside Rd	0.020
Ginsenoside Re	<0.005
Ginsenoside Rg1	<0.005
Glycyrrhizin	<0.005
Gigitonin	<0.005
Tigogenin	<0.005
Tigonin	<0.005
Gitogenin	<0.005
Digitonin	<0.005
Solamargine	<0.005
Solasonine	<0.005
Cholesterol	<0.005
Ergosterol	<0.005
Ursolic acid	<0.005
β -Sitosterol	<0.005
Cholic acid	<0.005
Deoxycholic acid	<0.005

表 2

Sample No	Sample	Composition ratio ^a	Measured amount (mg/g dry wt.)	Expected amount ^b (mg/g dry wt.)
1	柴苓湯	3/40	0.42±0.03	0.41
2	釣藤散	2/28	0.38±0.01	0.39
3	白虎加人參湯	1.5/31.5	0.25±0.01	0.26
4	半夏瀉心湯	2.5/18.5	0.71±0.01	0.74
5	小柴胡湯	3/24	0.64±0.01	0.69
6	補中益氣湯	4/24	1.14±0.10	0.92
7	柴朴湯	3/34	0.60±0.01	0.48
8	四君子湯	4/15	1.71±0.08	1.46
9	六君子湯	4/21.5	0.90±0.07	1.02
10	人參湯	3/12	0.93±0.04	1.37
11	柴胡桂枝湯	2/22	0.34±0.02	0.50
12	溫經湯	2/27	0.28±0.01	0.41
13	大黃甘草湯	0/6	ND	ND
14	桔梗湯	0/5	ND	ND

Data were mean±SE from triplicate determinations. ND= not detectable.

^a Composition ratio expresses the contents of ginseng(g) used in each prescription.

^b The amounts of G-Rb1 were calculated from the composition of ginseng and the standalized G-Rb1 content (5.49 mg/g dry wt. in ginseng) determined by ELISA.

図 2

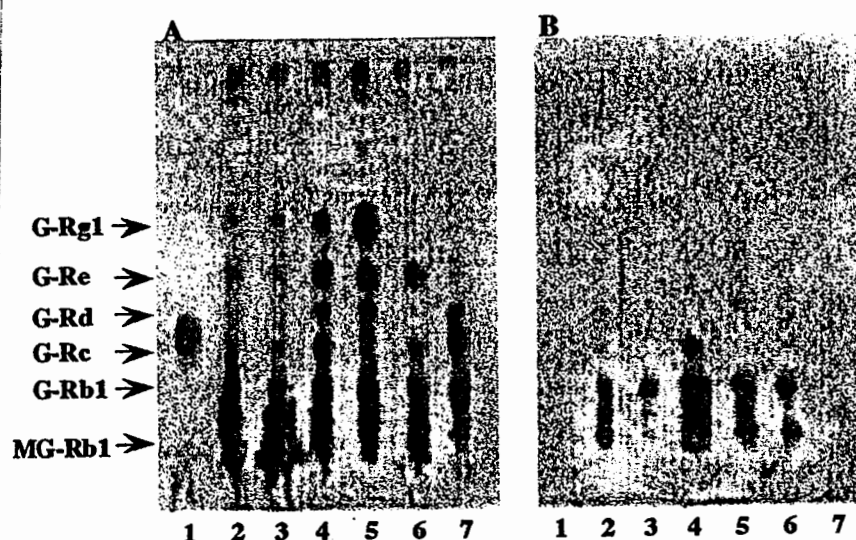


図 3

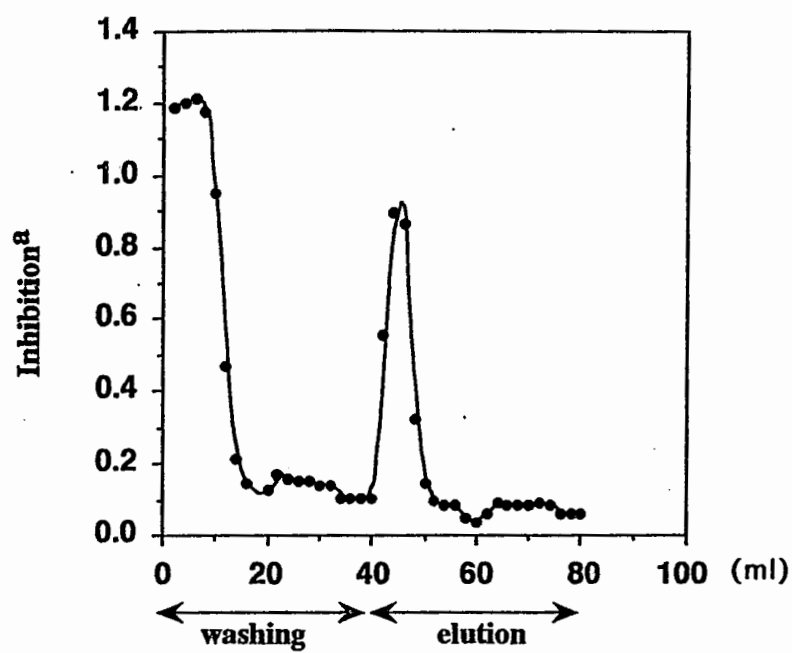


図 4

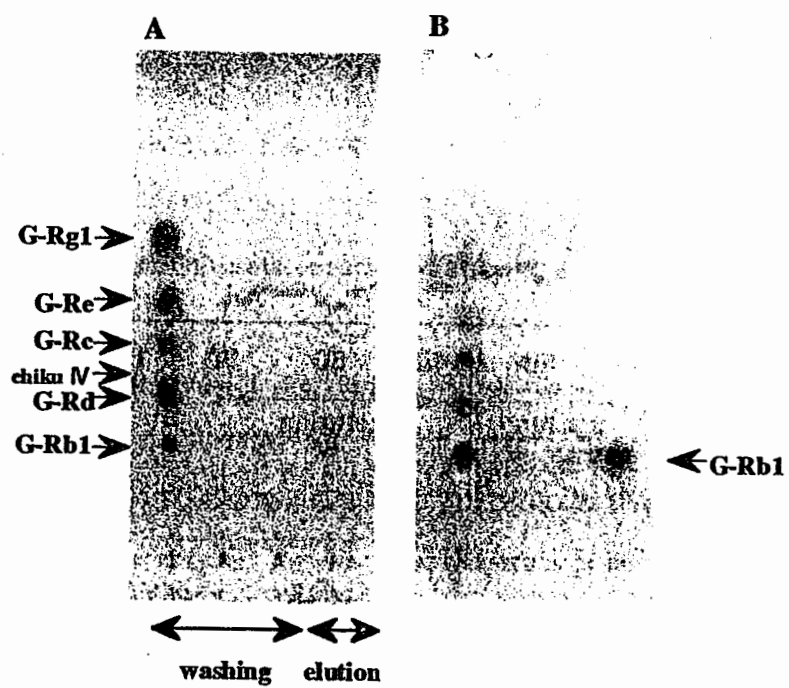
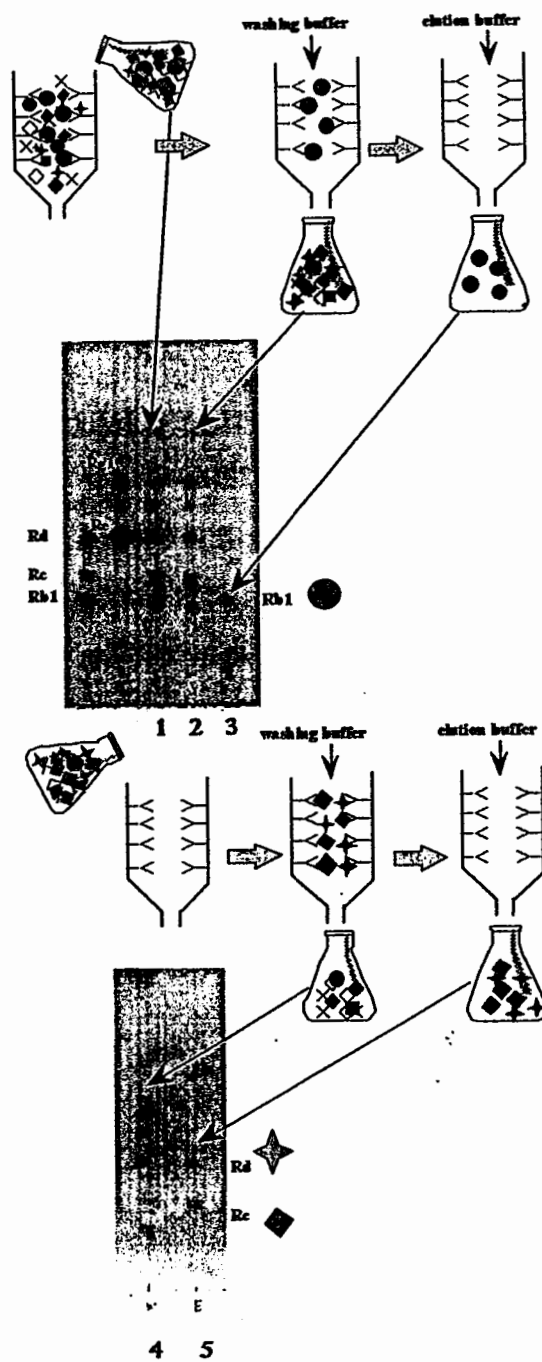


图 5



2001年度日中医学協会共同研究等助成事業報告書

－中国人研究者・医療技術者招聘助成－

2002年3月15日

財団法人 日中医学協会
理事長 殿

招聘責任者氏名 金子武嗣 
所属機関名 京都大学大学院医学研究科
職 名 教授
所 在 地 〒606-8501 京都市左京区吉田近衛町
電話 075-753-4331 内線 4331

1. 招聘研究者氏名 李 雲慶
所属機関 解放軍第四軍医大学解剖学教研室 職名 主任教授

2. 研究テーマ 中枢神経系の局所神経回路の解析：特に三叉神経の痛覚入力に関する研究。

3. 日本滞在日程

2002年1月10日、名古屋空港着
2002年1月10日～4月10日（下記日時以外）
京都大学医学研究科高次脳形態学教室にて研究に従事。
2002年3月27日～28日
東京都神経研に研究打ち合わせ旅行。
2002年3月29日～31日
第107回解剖学会総会・全国学術集会に出席。
2002年4月10日、名古屋空港発

4. 研究報告書

別紙報告書作成要領に準じ、添付の用紙で研究報告書を作成して下さい。

研究発表中または研究中の本人のスナップ写真を添付して下さい。

※決算報告書（書式自由）を添付して下さい。

※研究成果を発表する場合は、発表原稿・抄録集等も添付して下さい。

※発表に当っては、日中医学協会助成金による旨を明記して下さい。

中枢神経系の局所神経回路の解析：特に三叉神経の痛覚入力に関する研究

研究者氏名	李 雲慶
中国所属機関	解放軍第四軍医大学解剖学教研室 主任教授
日本研究機関	京都大学医学研究科高次脳形態学
指導責任者	教授 金子 武嗣
共同研究者名	陶 発勝

要 旨

By using immunohistochemical staining technique, retrograde neuronal tracing methods and electron microscopy, we investigated the local circuitry of the medullary dorsal horn (MDH), which is a brainstem center for pain information transmission.

1) The distribution of preprotachykinin B (PPTB)-, neurotensin (NT)-immunoreactive neuronal cell bodies in the MDH was examined. PPTB-LI neuronal cell bodies were mainly found in lamina II and less frequently in laminae I and III, and NT-LI neuronal cell bodies were mainly found in lamina II and, to a lesser extent, in lamina I. Most of PPTB- or NT-producing lamina II neurons were considered to be local circuit or intrinsic neurons in the MDH. 2) About 30% of PPTB-immunoreactive neurons showed immunoreactivity for calretinin, or calbindin, but not for parvalbumin. More than 50% of PPTB-immunoreactive neurons in lamina I displayed immunoreactivity for neurotensin. No PPTB-immunoreactive neurons expressed substance P receptor, but some PPTB-immunoreactive neurons in laminae I and II displayed NK3 receptor, which is a receptor for neurokinin B, the mature product of PPTB. This suggests the autoreceptor-like function of NK3 in PPTB-producing neurons. 3) Most PPTB-positive neurons responded to the painful stimulation by FOS expression after formalin injection into the oro-facial region, indicating that the PPTB-positive neurons in the MDH were involved in nociceptive information transmission. 4) About 50% of NT-positive neurons in lamina I expressed substance P receptor. Formalin stimulation in the oro-facial region induced FOS in most NT-positive lamina I neurons. 5) Under electron microscopy, the majority of the NT-containing terminals made symmetric synapses with the substance P receptor-expressing neuronal cell bodies and dendrites in lamina I. 6) Some NT-immunoreactive terminals in lamina I formed symmetric type of synapses on the dendrites of lamina I projection neurons to the thalamus or lateral parabrachial nucleus. The results of 5 and 6 indicate that NT-producing neurons have inhibitory effects on MDH projection neurons. 6) Under the electron-microscopic level with double immunolabeling methods, we observed that glutamic acid decarboxylase-, glycine transporter 2-, or serotonin-containing axonal terminals formed symmetric synapses with substance P receptor-expressing neuronal cell bodies and dendrites in lamina I of the MDH.

All these findings revealed the involvement of PPTB- or NT-producing neurons in local or intrinsic regulation of nociceptive information transmission in the MDH. Although the exact roles of PPTB- and NT-producing local circuit neurons have not been clarified yet, the present morphological analysis of those local circuit neurons will help the understanding of the mechanism for nociceptive information transmission in the MDH.

Key Words: Nociception, Medullary dorsal horn, Local circuit, Preprotachykinin B, Neurotensin

緒 言：

Medullary dorsal horn (MDH), which is also called the caudal subnucleus of the spinal trigeminal nucleus (Vc), receives both primary afferent fibers that transmit noxious information from the oro-facial region and projection fibers from the middle-line structures of the brainstem which regulate the nociceptive information. Unlike the spinal dorsal horn, which

is structurally and functionally identical to the MDH, the chemical architecture of the MDH has not been systemically investigated yet. This time, we have done some research works on the chemical architecture of the MDH by using immunohistochemical staining combined with neuronal tracer methods, and by double or triple immunofluorescence labeling method.

対象と方法：

Male Wistar rats were used in the present studies. Under deep anesthesia, some rats were injected with neuronal tracers for retrograde labeling, or formalin for painful stimulation. The rats were fixed and immunostained as described in the references (参考文献参照).

結 果 および 考 察：

1. Chemical architecture of the medullary dorsal horn

(1) Preprotachykinin B (PPTB)

By using immunohistochemical staining technique, we observed a quite special distribution pattern of PPTB-like immunoreactive (PPTB-LI) neuronal cell bodies. PPTB-LI neuronal cell bodies were mainly found in lamina II, especially in its inner part (IIi) where sparsely distributed PPTB-LI neurons formed a line which separates laminae II and III. In laminae I and III, only few PPTB-LI neuronal cell bodies were seen. PPTB-LI terminals were densely observed in laminae II and I.

By using double immunofluorescence staining method, about 30% of PPTB-LI neurons in IIi were found also showing immunoreactivities for calcium binding proteins, e.g. calbindin D-28k (CB) and calretinin (CR), but not for parvalbumin (PV). A few CB- and CR-immunoreactive neurons showed PPTB-like immunoreactivity. Over half of the PPTB-LI neurons in lamina I exhibited neurotensin (NT)-like immunoreactivity. Since neurokinin B, a mature peptide produced from PPTB, is the endogenous agonist of NK3 receptor, the relationship between PPTB and NK3 receptor was also investigated. Some PPTB-LI neurons in both lamina I and IIi were found to co-localize with NK3 receptor. PPTB-LI neurons did not show substance P receptor (SPR)-like immunoreactivity and only a few large neurons in the trigeminal ganglion showed PPTB-LI. After noxious stimulation induced by injecting formalin into the oro-facial region, c-fos gene expression products FOS protein were located in the nuclei of the majority of the PPTB-LI neurons, suggesting that PPTB-LI neurons might be mainly involved in the regulation of the oro-facial nociception. Now, the ultrastructural localizations of PPTB and NK3 receptor, e.g. auto-receptors of NK3 receptor on the pre-synaptic terminals, the distribution of NK3 receptor on the post-synaptic elements, the relationship and synaptic connections between NK3 receptor- and PPTB-immunopositive structures, have been carried out. We will soon get significant results.

(2) Neurotensin

Neurotensin (NT) is a previously found neuropeptide in the nervous system. Recently, it has been found that NT is closely related to the nociception. By using immunohistochemical staining technique, NT-LI neuronal cell bodies were mainly found in lamina II, especially in its inner part (IIi). In lamina I, a few quite large NT-LI neuronal cell bodies were observed. NT-LI neuronal cell bodies were hardly seen in lamina III. NT-LI terminals were densely observed in laminae I and II, especially in lamina II.

By using double immunofluorescence staining method, about half of the NT-LI neurons in lamina I were colocalized with substance P receptor (SPR). After noxious stimulation applied by injecting formalin into the oro-facial region, FOS protein were also located in the nuclei of the most of the NT-LI neurons in lamina I. Under the electron microscopic level, we observed that over 85% of the synapses formed by NT-immunopositive terminals were symmetric ones. By double-labeling technique, we also found that the majority of the NT-LI terminals made symmetric synapses with the neurons in lamina I which were labeled by injecting WGA-HRP in to the ventral posteromedial thalamic nucleus (VPM)

or lateral parabrachial region, including the Koellicker-Fuse nucleus. These results suggest that NT-LI neurons might be also mainly involved in the regulation of the oro-facial nociception, but not transmission.

2. Fiber connections

By using fluorescence retrograde tracing combined with immunofluorescent histochemical staining, we previously found that some preprodynorphin (PPD)-LI neurons in the MDH sent projection fibers to the VPM (ref. 90). This time, we have observed that FOS immunopositive PPD-LI neurons induced by oro-facial noxious stimulation projected to the lateral parabrachial region. This result suggests that PPD-LI neurons in the MDH are involved in the oro-facial noxious information transmission from the MDH to the lateral parabrachial region.

Neurons in the supratrigeminal nucleus (SupV) have been demonstrated belonging to the brainstem pre-motor neuron pool for the oro-facial motor nuclei, especially for the motor neurons in the trigeminal motor nucleus (Vm). In the Vm, we found that GABA and glycine (Gly) coexisted in some terminals which made close contacts with Vm motor neurons labeled by injecting WGA-HRP into the masseter muscle or masseter nerve. After injecting BDA into the SupV where some GABA- and Gly-containing neurons have been encountered, BDA anterogradely labeled axonal terminals have been found in Vm on both sides. By using immunofluorescent triple-staining technique, a few BDA-labeled terminals also showed immunoreactivities for both GABA and Gly. The present results indicate that GABA and Gly might coexist in some neurons within the SupV which project to the Vm on both sides. These results indicate that GABA and Gly might coexist in the neurons of the SupV and these GABA/Gly co-immunoreactive neurons might innervate the motor neurons in the Vm. Under the electron microscopic level, we have observed that GABA- or Gly-LI terminals constituted symmetric synaptic connections with the motor neurons in the Vm labeled by injecting WGA-HRP into the masseter nerve or masseter muscle. The synaptic connections between GABA/Gly coexisted terminals and Vm motor neurons are being investigated now.

According to their chemical natures, GABA neurons in the globus pallidus (GP) including interneurons and projection neurons could be divided into several subgroups. Among them, GABA/PV co-immunoreactive neurons belong to projection neurons. This time, we have studied the PV-containing projection from the GP to the reticular thalamic nucleus or subthalamic nucleus/entopeduncular nucleus. After injecting fluoro-gold (FG) into the reticular thalamic nucleus or subthalamic nucleus/entopeduncular nucleus, respectively, we observed that about 35% and 20% FG retrogradely labeled neurons in the GP showed PV-like immunoreactivities. No CB- and CR-containing GP neurons projecting to the reticular thalamic nucleus or subthalamic nucleus/entopeduncular nucleus.

3. Electron-microscopic (EM) studies

Under the EM level, we have observed that GAD-, glycine transporter 2 (GlyT2)-, serotonin (5-HT)-containing axonal terminals labeled by DAB reaction products formed symmetric synapses with SPR-LI neuronal cell bodies and dendrites labeled by 1.4 nm nano-gold enhanced by silver in lamina I. By the same double-labeling technique, we also found that the majority of the NT-LI terminals made symmetric synapses with the SPR-LI neuronal cell bodies and dendrites in lamina I. These results suggest that GABA, Gly, 5-HT and NT might have inhibitory effects on the SPR-LI neurons which receive noxious information from oro-facial region and transmit it to the higher centers of the central nervous system.

参考文献：(番号は http://www.mbs.med.kyoto-u.ac.jp/~kaneko/TK_PublicationList に従う)

59. Li Y.-Q., Takada M., Kaneko T., and Mizuno N., Premotor neurons for trigeminal motor nucleus neurons innervating the jaw-closing and jaw-opening muscles: Differential distribution in the lower brainstem of the rat. *The Journal of Comparative Neurology* vol. 365 (no. 4), pp. 563-579, January 22, 1995.

73. Li Y.-Q., Takada M., Kaneko T., and Mizuno N., GABAergic and glycinergic neurons projecting to the trigeminal motor nucleus: a double labeling study in the rat. *The Journal of Comparative Neurology*, vol. 373 (no. 4), pp. 498-510, September 30, 1996.

76. Li Y.-Q., Takada M., Kaneko T., and Mizuno N., Distribution of GABAergic and glycinergic premotor neurons projecting to the facial and hypoglossal nuclei in the rat. *The Journal of Comparative Neurology*, vol. 378 (no. 2), pp. 283-294, February 10, 1997.
79. Li J.-L., Kaneko T., Nomura S., Li Y.-Q., and Mizuno N., Association of serotonin-like immunoreactive axons with nociceptive projection neurons in the caudal spinal trigeminal nucleus of the rat. *The Journal of Comparative Neurology*, vol. 384 (no. 1), pp. 127-141, July 21, 1997.
85. Li J.-L., Ding Y.-Q., Li Y.-Q., Li J.-S., Nomura N., Kaneko T., and Mizuno N., Immunocytochemical localization of μ -opioid receptor in primary afferent neurons containing substance P or calcitonin gene-related peptide. A light and electron microscope study in the rat. *Brain Research*, vol. 794 (no. 2), pp. 347-352, June 1, 1998.
90. Li J.-L., Li Y.-Q., Kaneko T., and Mizuno N., Preprodynorphin-like immunoreactivity in medullary dorsal horn neurons projecting to the thalamic regions in the rat. *Neuroscience Letters*, vol. 264 (no.1-3), pp. 13-16, April 2, 1999
92. Li Y.-Q., Li H., Kaneko T., and Mizuno N., Substantia gelatinosa neurons in the medullary dorsal horn: an intracellular labeling study in the rat. *The Journal of Comparative Neurology*, vol. 411(no.3), pp. 399-412, August 30, 1999.
93. Li Y.-Q., Li H., Kaneko T., and Mizuno N., Local circuit neurons showing calbindin D28k-immunoreactivity in the substantia gelatinosa of the medullary dorsal horn of the rat. An immunohistochemical study combined with intracellular staining in slice preparation. *Brain Research*, vol. 840 (no.1-2), pp. 179-183, September 4, 1999.
95. Li J.-L., Li Y.-Q., Li J.-S., Kaneko T., and Mizuno N., Calcium-binding protein-immunoreactive projection neurons in the caudal subnucleus of the spinal trigeminal nucleus of the rat. *Neuroscience Research*, vol. 35 (no.3), pp. 225-240, December 1, 1999.*click*
101. Kaneko T., Cho R.-H., Li Y.-Q., Nomura S., and Mizuno N., Predominant information transfer from layer III pyramidal neurons to corticospinal neurons. *The Journal of Comparative Neurology*, vol. 423 (no.1), pp. 52-65, July 17, 2000.
102. Li J.-L., Xiong K.-H., Li Y.-Q., Kaneko T., and Mizuno N., Serotonergic innervation of mesencephalic trigeminal nucleus neurons: a light and electron microscopic study in the rat. *Neuroscience Research*, vol. 37 (no.2) , pp. 127-140, June, 2000.
103. Li Y.-Q., Wu S.-X., Li J.-L., Li J.-S., Kaneko T., and Mizuno N., Co-existence of calcium-binding proteins in neurons of the medullary dorsal horn of the rat. *Neuroscience Letters*, vol. 286 (no.2), pp. 103-106, June 2, 2000.
104. Wang D., Li Y.-Q., Li J.-L., Kaneko T., Nomura S., and Mizuno N., γ -Aminobutyric acid- and glycine-immunoreactive neurons postsynaptic to substance P-immunoreactive axon terminals in the superficial layers of the rat medullary dorsal horn. *Neuroscience Letters*, vol. 288 (no.3), pp. 187-190, July 21, 2000.
105. Li Y.-Q., Li H., Yang K., Kaneko T., and Mizuno N., Morphologic features and electrical membrane properties of projection neurons in the marginal layer of the medullary dorsal horn of the rat. *The Journal of Comparative Neurology*, vol. 424 (no.1), pp. 24-36, August 14, 2000.
111. Li Y.-Q., Kaneko T., Mizuno N., Collateral projections of nucleus raphe dorsalis neurones to the caudate-putamen and region around the nucleus raphe magnus and nucleus reticularis gigantocellularis pars α in the rat. *Neuroscience Letters*, vol.299 (no.1-2), pp. 33-36, February 16, 2001.
113. Nakamura K., Li Y.-Q., Kaneko T., Katoh H., and Negishi M., Prostaglandin EP3 Receptor protein in serotonin and catecholamine cell groups: A double immunofluorescence study in the rat brain, *Neuroscience* 103, no.3, pp.763-775, March 21, 2001.
114. Li Y.-Q., Li H., Kaneko T., and Mizuno N., Morphological features and electrophysiological properties of serotonergic and non-serotonergic projection neurons in the dorsal raphe nucleus. An intracellular recording and labeling study in rat brain slices. *Brain Research*, vol.900 (no.1), pp. 110-118, May 4, 2001.
117. Li Y.-Q., Li J.-L., Li H., Kaneko T., and Mizuno N., Protein kinase C gamma-like immunoreactivity of trigeminothalamic neurons in the medullary dorsal horn of the rat. *Brain Research*, vol.913 (no.2), pp.159-164, September 21, 2001.
121. Li J.-L., Li Y.-Q., Nobura S., Kaneko T., and Mizuno N., Protein kinase C gamma-like immunoreactivity in the substantia gelatinosa of the medullary dorsal horn of the rat. *Neuroscience Letters*, vol.311 (no.3), pp.185-188, October 5, 2001.

作成日：2002年3月14日

2001年度日中医学協会共同研究等助成事業報告書

－中国人研究者・医療技術者招聘助成－

2002年 3月 14日

財団法人 日中医学協会
理事長 殿

招聘責任者氏名 吉木 敬



所属機関名 北海道大学

職 名 教授

所 在 地 〒060-8638 札幌市北区北15条西7丁目

電話 011-706-5050 内線

1. 招聘研究者氏名 温 旺 荣

所属機関 福建医科大学臨床微生物学講座 職名 副教授

2. 研究テーマ ヒトレトロウイルス感染症のウイルス・宿主相互作用の解析

3. 日本滞在日程

平成13年 8月22日	来日。
8月23日	同日より北海道大学大学院医学研究科外国人客員研究員として、病態制御学専攻病態解析学講座分子病理学分野に所属。
8月27日	同日より約2ヶ月間、基本的分子生物学的実験手技の習得と研究テーマに関する最近の研究についての調査。
10月22日	研究テーマに関する実験を開始。
平成14年 3月29日	当該分野でのすべての本招聘助成事業に関する研究を終了予定。
3月31日	北海道大学大学院医学研究科外国人客員研究員を終了し、帰国予定。

4. 研究報告書

別紙報告書作成要領により、添付の用紙で研究報告書を作成して下さい。

研究発表中または研究中の本人のスナップ写真を添付して下さい。

※研究成果を発表する場合は、発表原稿・抄録集等も添付して下さい。

※発表に当っては、**日中医学協会助成金**による旨を明記して下さい。

ヒトレトロウイルス感染症のウイルス・宿主相互作用の解析

研究者氏名	温 旺榮
中国所属機関	福建医科大学臨床微生物学講座 副教授
日本研究機関	北海道大学大学院医学研究科分子病理
指導責任者	教授 吉木 敬
共同研究者	池田 仁, 趙 旭東, 山本友希代, 陳 晶, 鈴木 昭, 辻 隆裕, 立野正敏

要旨

エイズの原因ウイルスであるヒト免疫不全ウイルス (HIV) 感染におけるウイルスと宿主の相互作用を理解するため、ヒト T 細胞株へ HIV を感染させ、感染後早期での宿主遺伝子の発現の変化について約 600 種類の免疫関連遺伝子を中心に DNA アレイによって検討した。その結果、熱ショック蛋白や CD3、FAS など 24 種類の遺伝子は感染後 2 から 3 日で有意に発現の増加を示した。一方、IL-16 は抑制気味であったが、その他に発現が有意に抑制されていた宿主遺伝子は確認されなかった。各遺伝子発現の変化の意義は現在のところ必ずしも明らかではないものの、HIV は感染早期から宿主遺伝子の発現に大きく影響を及ぼしているものと考えられた。また、HIV 感染ラットモデルの作製に向けた HIV 関連ヒト遺伝子導入ラット用の発現コンストラクトの作製も行なった。

Key Words エイズ, ヒト免疫不全ウイルス, 遺伝子発現, cDNA array, トランスジェニック

緒言

HIV 感染によるエイズやヒト T 細胞白血病ウイルス (HTLV) 感染による成人 T 細胞白血病 (ATL) および脊髄症 (HAM/TSP) は代表的なヒトレトロウイルス感染症であり、重篤な疾患としてよく知られている。特に HIV の感染者は依然として増加を続けており、東南アジア・アフリカ諸国では垂直感染のため既に次世代にまで感染拡大がおこっている。HIV もレトロウイルスの特徴として宿主ゲノム内に組み込まれることから、感染後発症まで比較的潜伏期間が長く、発症に至るまでにはさまざまなウイルス・宿主間の相互作用が関与していることが知られている。したがって、ウイルス感染から疾患の発症機構を理解するためには、単に感染細胞と宿主免疫系の解析にとどまらず、感染細胞におけるウイルス遺伝子と宿主遺伝子間の相互作用の解析も必要である。一方、疾患の発症過程での解析には動物モデルを用いた *in vivo* での解析も重要である。しかし、HIV の感染には種特異性があり、その受容体からウイルス活性化に至るまでいくつかのヒト遺伝子が必要なため、現在のところ適切で汎用型の小動物モデルは樹立されていない。

このような状況を踏まえ、最近その有用性が注目されている一度に多数の遺伝子の発現を検索できる cDNA array を用いた HIV 感染による感染細胞での宿主遺伝子の変化を解析した。また、HIV 感染モデルの樹立を目標に、HIV 感染から感染性ウイルスの複製に必要な HIV 関連ヒト遺伝子のトランスジェニック用発現コンストラクトを作製した。

材料と方法

1) 細胞株

ヒト T 細胞株 HUT78 を用いた。培養には 10% 牛胎児血清添加 RPMI1640 培養液を用い、37℃5%CO₂ インキュベーター内で細胞培養した。

2) HIV 感染

3X10⁷ の HUT78 細胞を 2 µg/ml の polybrene を含む 2 ml RPMI1640 を加え 37°C 5% CO₂ インキュベーター内で前処理し、リン酸緩衝生理食塩水で洗浄後、1 ml の T 細胞好性 HIV である SF33 [1] (TCID₅₀: 100) 液を加え、37°C で 2 時間感染させた。感染後はリン酸緩衝生理食塩水で 3 回洗浄後、10% 牛胎児血清添加 RPMI1640 培養液にて培養した。コントロールとしては前処理した HUT78 を用いた。感染実験は HIV 専用の感染実験室のバイオハザード内で行った。

3) RNA 抽出と標識 cDNA の作製

感染後 2 日と 3 日目の感染 HUT78 細胞およびコントロール HUT78 細胞それぞれから MagExtractor[®]-mRNA-抽出キット (TOYOBO) を用いて mRNA を抽出した。抽出した mRNA 各 2 µg から Gene Navigator[™] cDNA Amplification System -Biotin- (TOYOBO) を用いて biotin 標識 cDNA を作製した。

4) ハイブリダイゼーションとその検出:

10 ml の PerfectHyb[™] によって Gene Navigator[™] cDNA Array Filter -human immunology- (TOYOBO) を 68°C 20 分間プレハイブリダイゼーション後、100°C 5 分間で変性させた 100 µl 標識 cDNA を加えた 10 ml の PerfectHyb[™] 内で 68°C 12 時間反応させた。反応後 0.1% SDS 添加 2XSCC (0.3M NaCl, 30mM クエン酸ナトリウム, pH7.0) で 68°C 5 分間 3 回洗浄、さらに 0.1% SDS 添加 0.1XSCC で 3 回洗浄した。洗浄後のフィルターの反応した biotin 標識 cDNA を Imaging high -Chemilumi- Gene Navigator[™] ver (TOYOBO) によって発光後、CCD カメラ搭載イメージアナライザー (Fluo-S[™] MultiImager, BIO-RAD) で検出し、Quantity One[®] (BIO-RAD) ソフトウェアによって定量化、解析した。

5) 遺伝子導入用発現コンストラクトの作製

ヒト末梢血単核球から CD4、CXCR4、CCR5、cyclin T1、CIITA 遺伝子の cDNA および CD4 プロモーターをポリメラーゼ鎖反応 (PCR) にてクローニングした。クローニングしたそれぞれの遺伝子は DNA シークエンスでその塩基配列を確認した後、CXCR4、CCR5、cyclin T1、CIITA 遺伝子はそれぞれマウス H-2Kd プロモーターを持つ発現コンストラクト [2] に導入した。一方、CD4 プロモーターをマウス H-2Kd プロモーターと置換したベクターに CD4 遺伝子を導入した。出来上がった計 5 種類の発現コンストラクトからそれぞれプロモーターから poly A シグナルまでを含む発現ユニットを制限酵素で切り出し、pUC119 に CXCR4 あるいは CCR5 と cyclin T1、CIITA と CD4 のそれぞれ 2 種類の発現ユニットを持つコンストラクトを作製した。作製した発現コンストラクトは、ラット線維芽細胞株 W31 にトランスフェクションし、逆転写酵素 (RT)-PCR によってそれぞれの発現を確認した。

結果

1) cDNA array を用いた HIV 感染による宿主遺伝子の発現の変化

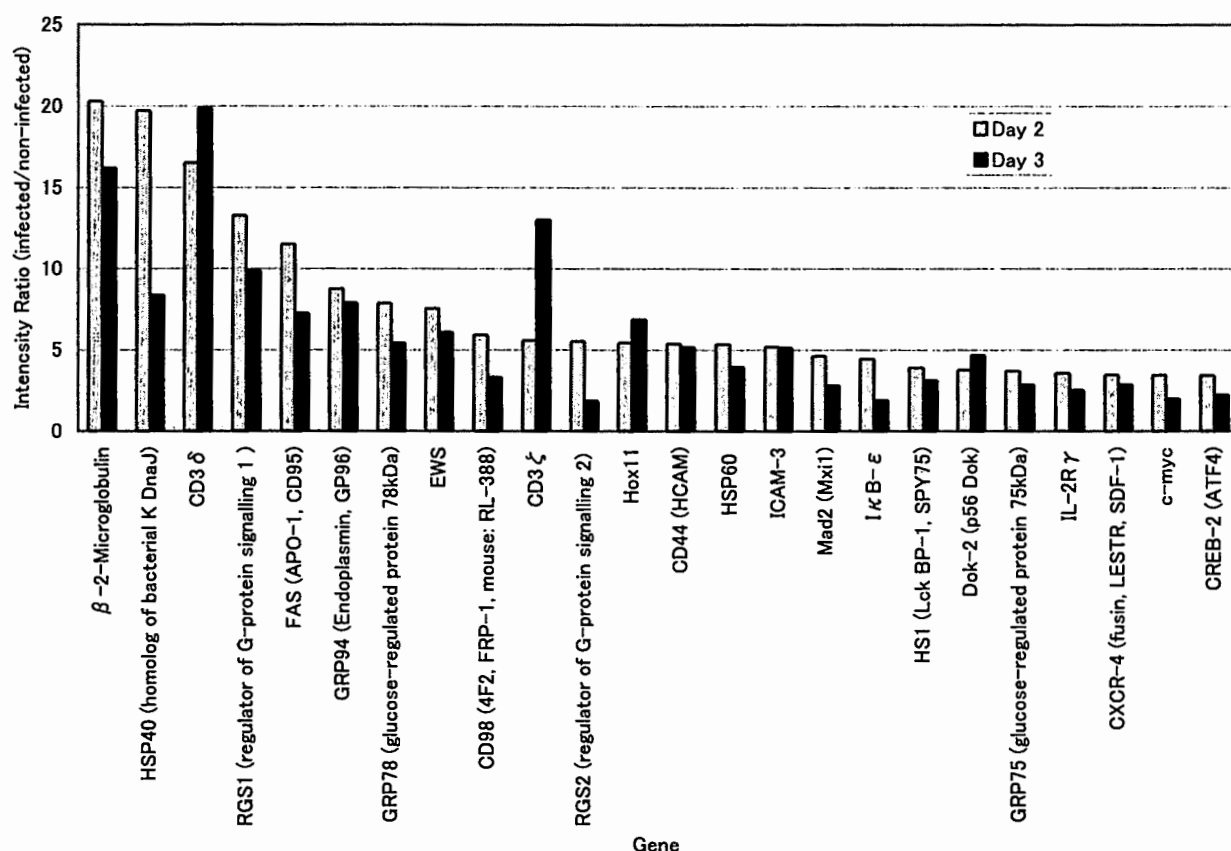
HIV 感染 2 日後 (図 1B) および 3 日後 (図 1C) での感染 HUT78 細胞における宿主遺伝子の発現の変化を非感染 HUT78 細胞 (図 1A) と cDNA array によって比較した。

図 1



図1の結果をイメージアナライザーで定量化し、非感染時の結果に比較してその発現量が感染2日後および3日後の両方で2倍以上であったもの、あるいは1/2以下であったものを有意とし、判定した。なお、ネガティブコントロールとした luciferase の値 (intensity: 8) を最低値として、それ以下は判定から省いた。その結果、図2に示す24種類の遺伝子において感染後有意に発現が増強していた。一方、有意に発現の抑制のある遺伝子は確認されなかったものの、IL-16の発現は抑制傾向にあった。

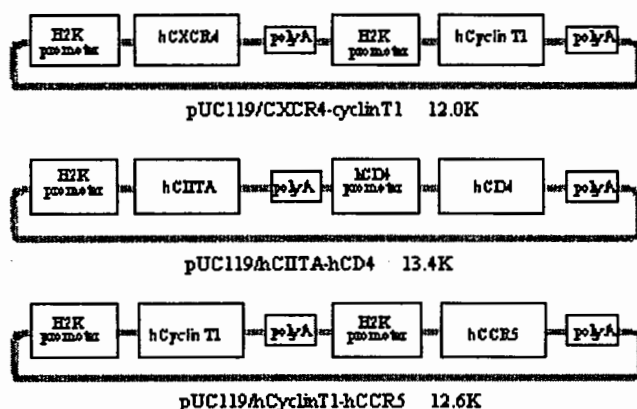
図2



2) 遺伝子導入用発現コンストラクトの作製

いままでの *in vitro* の結果から、ラット細胞に HIV を感染させ、感染性あるウイルスを産生させるためには少なくとも4種類のヒト遺伝子が必要であった。T細胞好性 HIV に対しては CD4、CXCR4、cyclin T1、CIITA、マクロファージ好性 HIV では CD4、CCR5、cyclin T1、CIITA である。したがって、これらそれぞれ4種類のヒト遺伝子を同時に発現するトランスジェニック動物作製用のコンストラクトが必要となる。この条件を満足させるため、それぞれ2種類の遺伝子発現ユニットを持つコンストラクト pUC119/CXCR4-CyclinT1、pUC119/CIITA-CD4、pUC119/CyclinT1-CCR5 を作製した(図3)。まず、CD4以外のそれぞれの遺伝子についてはマウス H-2Kd プロモーターを持つ発現ベクターに組み込んだ。CD4 遺伝子については、あらかじめマウス H-2Kd プロモーターを新たにクローニングしたヒト CD4 プロモーターに置換した発現ベクターに組み込んだ。次にそれぞれから発現ユニット(プロモーターから poly A シグナルまで)を適当な制限酵素で切り出し、pUC119 ベクターに図3のような組み合わせで組み込んだ。できあがった各発現コンストラクトをラット細胞に遺伝子導入した結果、各遺伝子の mRNA 発現が RT-PCR によって確認された。

図 3



考察

HIV 感染細胞について、ウイルスとそれに関連する個別の宿主遺伝子との相互作用についての報告は多数あるものの、cDNA array を用いたような多数の宿主遺伝子について、HIV 感染に伴う発現の定量的変化を検討した報告は少ない。Geiss らはヒト T 細胞株 CEM を用いて、HIV 感染を行い無作為に抽出された約 1500 種類の遺伝子についての cDNA microarray を行った[3]。T 細胞受容体 α 鎖 (TCR α) や receptor-interacting protein 140 (RIP140)、CD8- α precursor など 9 種類の遺伝子の発現増加と prothymosin- α や type IV protein tyrosine phosphatase (PTP) など 10 種類の遺伝子の発現抑制を示したが、1.5 倍以上あるいは 2/3 以下を有意としている点や感染 2 日後あるいは 3 日後のどちらか一方でもその値を越えていれば有意としている点が今回の我々の基準と異なる。我々の結果で有意と判定できたのは 24 遺伝子の発現増強で、有意に抑制された遺伝子は確認されなかった。また我々で有意と判定した遺伝子内に Geiss らの報告と一致した遺伝子は見られなかったが、TCR α や CD8- α では感染 3 日後でそれぞれ 2 倍、3.5 倍と増加しており、使用したウイルス株や細胞さらに方法は異なるものの彼らと同様な結果となった。したがって、cDNA array 法はある一定の基準でおこなえば、かなり再現性の高い方法であると考えられた。その他の遺伝子については同一の遺伝子の結果が無く、比較できなかった。今回の我々の研究ではプロットしてある遺伝子数は 600 種類と Geiss らの使用した array の約 1/3 と少なく、且つ我々の判定基準の方が厳しかったにも関わらず、有意な発現増強を示した遺伝子数は約 2.5 倍と多く、HIV 感染では感染細胞の免疫関連遺伝子がより多くまた強い影響を受けている可能性が示唆された。それぞれの遺伝子発現の変化の意義は現在のところ必ずしも明らかではないものの、HIV は感染早期から宿主免疫関連遺伝子の発現に大きく影響を及ぼしており、今後の詳細な解析が必要である。

HIV に感染感受性のあるラットを作製するためには、少なくとも 4 種類の HIV 感染関連ヒト遺伝子を同時に発現するトランスジェニックラットを樹立しなければならない。したがって、その作製にはそれぞれの発現コンストラクトをそれぞれ別個に導入したトランスジェニックラットを樹立し、各トランスジェニックラットを掛け合わせて作製する方法と一つのコンストラクト中に 4 種類の発現ユニットを入れ、遺伝子導入する方法が考えられる。しかし、前者ではメンデルの遺伝の法則から考えて安定的に供給できるラットを樹立するのは困難で、後者の方法では技術的に克服しなければならない点が多い。そこで我々はそれぞれ 2 種類の発現ユニットを持つ 2 つの発現コンストラクトを作製し、その両方を同時にマイクロインジェクションすることとした。作製した発現コンストラクト pUC/CXCR4/CyclinT1、pUC/CIITA/CD4、pUC/CyclinT1/CCR5 はいずれもラット細胞へのトランスフェクションでそれぞれ 2 種類の遺伝子発現が確認され、同時にマイクロインジェクションすることにより 4 種類のヒト遺伝子を発現するトランスジェニックラットの作製が可能と考えられた。

参考文献

1. Tateno M, and Levy JA: MT-4 plaque formation can distinguish cytopathic subtypes for the human immunodeficiency virus (HIV). *Virology* 1988, 167:299-301.
2. Yamada S, Ikeda H, Yamazaki H, Shikishima H, Kikuchi K, Wakisaka A, Kasai N, Shimotohno K, and Yoshiki T: Cytokine-producing mammary carcinomas in transgenic rats carrying the pX gene of human T-lymphotrophic virus type I. *Cancer Res* 1995, 55:2524-2527.
3. Geiss GK, Bumgarner RE, An MC, Agy MB, van't Wout AB, Hammersmark E, Carter V, Upchurch D, Millins JJ, and Katze MG: Large-scale monitoring of host cell gene expression during HIV-1 infection using cDNA microarray. *Virology* 2000, 266:8-16.

2001年度日中医学協会共同研究等助成事業報告書

－ 中国人研究者・医療技術者招聘助成－

平成14年 3 月 25 日

財団法人 日中医学協会
理事長 殿

招聘責任者氏名 柏村 征一 ㊞

所属機関名 福岡大学医学部法医学

職 名 主任教授

所 在 地 〒814-0180 福岡市城南区七隈7-45-1

電話 092-801-1011 内線 3335

1. 招聘研究者氏名 劉 俊亭

所属機関 中国医科大学基礎医学院法医学化学教室 職名 教授

2. 研究テーマ 誘導化の自動固相マイクロ抽出ガスクロマトグラフィー質量分析法の薬物中毒検査への応用化

3. 日本滞在日程

2001年10月3日～2002年7月3日(予定)

4. 研究報告書

別紙報告書作成要領に準じ、添付の用紙で研究報告書を作成して下さい。

研究発表中または研究中の本人のスナップ写真を添付して下さい。

※決算報告書(書式自由)を添付して下さい。

※研究成果を発表する場合は、発表原稿・抄録集等も添付して下さい。

※発表に当たっては、日中医学協会助成金による旨を明記して下さい。

誘導化の自動固相マイクロ抽出ガスクロマトグラフィー質量分析法 の薬物中毒検査への応用化

研究者 氏名	劉 俊亭
中国所属機関	中国医科大学 基礎医学院 教授
日本研究機関	福岡大学医学部 法医学教室
指導 責任者	教授 柏村 征一
共同研究者名	原 健二

要旨

本課題ではサンプル自動化抽出と揮発性誘導の二つ方面から、ヘッドスペース法 (Head-Space, HS) / 固相マイクロ抽出 (Solid Phase Microextraction, SPME) / ガスクロマトグラフィー (GC) / 質量分析法 (MS) (HS-SPME-GC-MS) における機能を広げてきた。本教室で独自に合成した重水素標識 MDMA (3,4-methylenedioxymethamphetamine-d5) を内部標準物質として用いて、救命救急センターから依頼された中毒試料、当教室の解剖試料、及び中国における覚醒剤使用者の毛髪試料を対象として、SPME 自動分析装置とサンプル揮発性誘導開発を行った。本法は臨床と法中毒の分野において実用であると考えられる。

Key Words 乱用薬物, MDMA-d5, HS-SPME-GC-MS, 自動分析法

緒言

固相マイクロ抽出法 (Solid Phase Microextraction, SPME) は新しいガスクロマトグラフィー (GC) 用の試料抽出、濃縮、導入法であり、従来用いられてきた試料調節法に比べ、有機溶媒を使用せず、短時間で簡単に試料調節ができるという特徴を持っている。現在までに、多くの研究者が幅広い分野での応用などについて報告をしており、SPME 法はクロマトグラフィーにおける試料前処理と導入の重要な手法の一つとして定着したと言える。

SPME の装置はホルダー (手柄) とファイバー (針) で構成されている。試料の抽出と濃縮はファイバーの表面に付いている固定相で行われる。SPME の抽出過程は試料 (血液や尿など) を入れたバイアル瓶の中にファイバーを露出させて、直接浸漬法、或いはヘッドスペース法 (Head-Space, HS) の形で行う。後者はもっと簡便迅速の利点を持たれているので、最近 SPME 法の主流として、薬毒物の法医、臨床検査の分野で活躍するようになった。われわれも、今までの研究結果がこの方法 (HS-SPME) を踏まえて得られていたものである [1,2]。

さらに、HS-SPME の固相マイクロ抽出法はガスクロマトグラフィー (GC) / 質量分析法 (MS) と連用すれば (SPME-GC-MS)、抽出、定量、定性が一体化になると考えられた。今までこのような連合で作られて

いる文献が多い。しかし、二つの問題が残っている。一つは SPME 抽出法自体が時間を厳密にしなければならないところが何カ所か存在している。時間に厳密にしないと、再現性が問題になる恐れがある。したがって、SPME 抽出法の各段階を特定の自動装置に託せれば良いのではないかと考えられた。もう一つは HS-SPME 法の必要条件として、目的分析物が多少揮発性でなければ分析できないことである。臨床と法中毒の分野には、大量の無揮発性の分析物質が存在している。HS-SPME 法をそれらの物質にまで応用させるために、揮発性を誘導するように工夫する必要がある。この点について、我々はいろいろな試みを行った[3,4,5,6]。

この研究では以上の二つ方面から HS-SPME—GC-MS 分析法を展開し、充分に業者と相談の上、改造された新型の SPME の自動分析装置を開発した。それを用いて、分析を行ったところ、いろいろな所見が得られた。

対象と方法

対象； 1、最近、本教室では覚醒剤分析関係の内部標準物質として重水素標識 MDMA (3,4-methylenedioxymethamphetamine-d5) を日本で初めて合成し[7]、覚醒剤の中間代謝物も分析対象とした。2、救命救急センターから依頼された除草剤であるパラコートと幾つかの農薬の分解産物としてのジクロロアニリン (Dichloroanilines) の検査に利用した。3、解剖例及び依頼された試料 (毛髪、血液、各臓器組織) でも検討した。4、さらに、中国では覚醒剤使用者の毛髪 4 6 例 (女 1 8, 男 2 8) を使って分析した。

装置：島津 QP-5000 質量分析装置。カラム：XTI-5 (Restek 社, 30 m x 0.25 mm, 膜厚 0.25 μ m)。温度：注入口 250°C, カラムオープン初期 70°C (1 min), 290°Cまで 20°C/min の昇温プログラム, インターフェース 260°C, キャリアーガス：He 1.7 ml/min (一定)。測定はスキャンモード (50-650 amu /0.35 s cycle) で行った。

試薬：誘導化反応試薬、塩化ヘプタフルオロ-n-ブチリル (HFB-Cl), 内部標準物質 (IS) methamphetamine-d₅。SPME の fiber：100- μ m polydimethylsiloxane (PDMS)。自動 SPME 抽出装置：オートインジェクタ AOC-5000, HS-SPME：気化平衡瓶の中に、試料約 0.2 ml 及び IS 10 ng を入れ、分析物によって、リン酸緩衝液を加えたり、pH を調整したり、反応試薬を (10 μ l) 添加したりしてから、ゴム栓で密封し、オートインジェクタの装置に与える。オートインジェクタの自動抽出条件は、試料瓶を 60°C 設定し、1 分間静止して、fiber をその気相に 20 分間露出させ、GC-MS に導入する。注入口に 3 分間静止する。

結果

1、最終合成産物 MDMA-d5 は上記の誘導化 HS-SPME-GC-MS 自動分析の結果、分子イオン m/z 394, 及びフラグメントイオン m/z 258, m/z 213, m/z 164, m/z 163, m/z 136 の特徴イオンを示すマススペクトルを観察した。MDMA の分析のため、理想な定量用内部標準物質であることが明らかとなった。

2、ジクロロアニリンは幾つかの農薬の分解産物として、急性中毒の原因物質である。6 種異性体 (2,3-,2,4-,2,5-,2,6-,3,4-,3,5-) の中に 3,4-,3,5-の毒性一番強い。HFB 誘導体の SPME 自動分析法を検討した結果、強い塩基性の条件で、尿中 HFB 誘導体の HS—SPME 分析は可能であると認めた。3,4-ジクロロアニリンの場合、特徴イオンは m/z 359, m/z 357, m/z 190, m/z 188, m/z 162, m/z 133, m/z 109, m/z を示すように観察した。救命救急の農薬中毒の診断に応用可能である。一方、血漿と尿中の除草剤であるパラコートの分析法は誘導化の代わり、従来の還元法を採用してから、その揮発性を誘導した。HS—SPME 自動分析にも導入可能になった。

3、解剖例及び依頼された試料の中、各臓器組織中の覚醒剤定量はH F B誘導体の SPME 自動分析法を検討した。試料を簡単に調整し、抽出条件を調節して、自動分析装置に導入した。無人で徹夜で運転させ、朝データが揃っている。安定性もすぐれていて、人力面にも時間面にも節約できる。煩雑の試料を分析処理するのは最適であると証明した。

4、 中国安康病院入院患者（覚醒剤使用者）の毛髪、46例のH F B誘導体のH S—SPME 分析結果、殆ど MDMA が検出した。中国では特定の染毛剤も多数検出した。かえって、覚醒剤（amphetamine と methamphetamine）は殆ど含有してなかった。従って今中国の乱用者は MDMA を中心としていることが明らかとなった。

考察

平成8年から、福岡大学法医学教室で本格的に毛髪鑑定を開始した[8,9]。分析方法自体も絶えずに改良してきた。しかし、毛髪の横断分析の場合、毛髪が長すぎると、いくら簡単な分析法しても、サンプルの数が増えるため、煩雑の仕事になってしまう。今回自動分析装置を導入して、もっと短いセグメントで分析しても（今までは1cmずつ）、連続の薬毒物体内経過の歴史分布曲線が獲得できるようになる。

H F B誘導体の SPME 法は優れた結果を得たが、還元法の方は時間がちょっと長すぎるとか、バイアル瓶の中、水素の泡が出るため、すぐに密封できないとか、同時に還元できる内部標準物を探すとか、まだ問題が残っている。 今後分析物を揮発性の性質を持たせる誘導法の開発を目指して、努力していく。

参考文献

1. Juntong Liu, Kenji Hara, Seiichi Kashimura, Tomoko Hamanaka, Shigeki Tomojiri, Keiichi Tanaka, Gas chromatographic-mass spectrometric analysis of dichlorobenzene isomers in human blood with headspace solid-phase microextraction, Journal of Chromatography B, 731, 217-221, 1999.
2. Juntong Liu, Kenji Hara, Seiichi Kashimura, Masayuki Kashiwagi, Tomoko Hamanaka, Aya Miyoshi, Mitsuyoshi Kageura, Headspace solid-phase microextraction and gas chromatographic-mass spectrometric screening for volatile hydrocarbons in blood. J. Chromatogr B Biomed Sci 748 (2):401-406, 2000
3. Juntong Liu, Kenji Hara, Seiichi Kashimura, Masayuki Kashiwagi, Mitsuyoshi Kageura, New method of derivatization and headspace solid-phase microextraction for gas chromatographic-mass spectrometric analysis of amphetamines in hair. J Chromatogr B, Biomed Sci Appl, 758 (1): 95-101, 2001
4. 劉俊亭、原健二、柏村 征一、柏木 正之、影浦 光義、毛髪中覚醒剤 GC—MS 分析のための誘導体化並びにその気化平衡—固相マイクロ抽出、第25回日本医用マススペクトル学会年会、広島、2000年、9月

5. 劉俊亨、原健二、柏村 征一、影浦 光義、柏木 正之、三好 綾、濱中 倫子、 体液中無機陰イオンのペンタフルオロベンジル化気化平衡 SPME/GC-MS 法の検討、第85次日本法医学総会、久留米、2001年、4月
6. 劉俊亨、原健二、柏村 征一、影浦 光義、柏木 正之、濱中 倫子、高本 睦夫、尿中覚醒剤スクリーニング分析の簡素化の検討、第84次日本法医学総会、和歌山、2000年、4月
7. 原健二、柏村 征一、劉俊亨、柏木 正之、影浦 光義、濱中 倫子、藤井 広志、GC-MS 分析のためのMDMAの内部標準物質、第86次日本法医学総会、岡山、2002年、4月
8. 柏村征一、毛髪検査の新しい展開—毛髪に快感の残渣を探る、日本法医学雑誌、55(3),2001,310-320
9. 柏村征一、原健二、柏木 正之、三好 綾、高本 睦夫、影浦 光義、 棚田 徳彦、毛髪試料中チラミンの検出について、第83次日本法医学総会、広島、1999年、4月

作成日： 2002年3月15日

2001年度日中医学協会共同研究等助成事業報告書

－ 中国人研究者・医療技術者招聘助成－

平成14年 3月22日

財団法人 日中医学協会
理事長 殿

招聘責任者氏名 河野 正三

所属機関名 新潟大学大学院医歯学総合研究科

職 名 教授 (摂食機能再建学分野)

所 在 地 〒951-8514 新潟市学校町通2-5274

電話 025-227-2889 内線

1. 招聘研究者氏名 李 忠

所属機関 中国 哈尔滨市 哈尔滨医科大学口腔医学院 職名 副教授

2. 研究テーマ 側方滑走運動記録時の運動カイトの相連が
下顎頭運動に及ぼす影響について

3. 日本滞在日程 2001年8月20日 ～ 2002年5月30日 予定

4. 研究報告書

別紙報告書作成要領に準じ、添付の用紙で研究報告書を作成して下さい。

研究発表中または研究中の本人のスナップ写真を添付して下さい。

※決算報告書（書式自由）を添付して下さい。

※研究成果を発表する場合は、発表原稿・抄録集等も添付して下さい。

※発表に当っては、日中医学協会助成金による旨を明記して下さい。

側方滑走運動記録時の運動ガイドの相違が下顎頭運動に及ぼす影響について

研究者 氏 名	李 虹
中国所属機関	ハルビン医科大学口腔医学院
日本研究機関	新潟大学大学院 歯学総合研究科 摂食機能再建学分野
指 導 責任者	教授 河野 正司
共 同 研究者	池田圭介, 村田はるか, 田中みか子, 松井理恵

要 旨

側方滑走運動は咀嚼機能時の下顎運動と類似しており、咬合治療において考慮すべき大きな要件となっている。健常有歯顎歯列の側方滑走運動は、犬歯部周囲の上下顎歯の接触によってガイドされている運動であるが、咬合治療の対象症例においては、この歯のガイドが喪失していることがある。

このような症例においては上下顎歯列に口内描記装置を装着して、描記装置の描記針と描記板の接触とに誘導される側方滑走運動経路を測定している。しかし、描記装置に誘導される運動経路と、有歯顎における歯のガイドにより記録される運動経路には、差異が生じている可能性が考えられる。

そこで本研究では、口内描記装置の描記板と描記針に誘導される側方滑走運動と、天然歯の歯のガイドに誘導される側方滑走運動との差異について、下顎頭点の運動を評価指標として追求した。

その結果、描記板と描記針に誘導される側方滑走運動は、歯のガイドに誘導される側方滑走運動に比較して後方へ偏位して記録されることが明らかとなった。

Key Words 下顎運動, 歯のガイド, 側方滑走運動, 下顎頭運動, 口内描記装置

緒 言：

滑走運動は、顎関節内の下顎頭の運動と上下顎歯列内の歯の接触によって指導されており、この2つの指導要素のうち、歯の接触は咬合治療によって可変な要素であり、「歯のガイド」と呼ばれている。歯のガイドの機能としては、咬頭嵌合位で臼歯部が咬合力を負担して、偏心位では犬歯あるいは前歯部がガイドすべきであるという mutually protected guidance の考え方が Gnathology グループにあったが、歯周組織の保護といった面から概念的に言われていたものであった。最近になって歯のガイドは、顎関節や咀嚼筋をも含めた顎口腔系の種々な機能と、密接な関連を有することが明らかとなってきた。さらに6自由度顎運動測定装置により、運動量の小さな作業側下顎頭の運動についても測定が可能となったことで、歯のガイドの歯列内の位置が、下顎頭の運動とくに作業側下顎頭の運動機能に大きな影響を及ぼすことが明確となってきた。しかし、歯のガイドが喪失している症例について使用されている口内描記装置が、下顎頭運動の記録にどのような影響を与えているかは、全く不明である。

歯にガイドされた側方運動時の下顎頭運動経路と、歯にガイドされず、口内描記装置の平板にガイドされた下顎頭運動経路とでは、経路に相違があるのではないかと。さらには、歯のガイドが喪失すると、側方滑走運動時の下顎頭の運動範囲は後方へ広がるのではないかとということも考えられる。これらの現象が明らかになると、下顎頭運動経路を規制している解剖学的要素が明らかになり、ガイドの持つ意義もさらに明確になると考えられる。

そこで本研究では、口内描記装置の描記板と描記針に誘導される側方滑走運動と天然歯の歯のガイドに誘導される側方滑走運動との差異について、下顎頭点の運動を評価指標として追求することとした。

対象と方法：

被検者として顎口腔機能に異常を認めない、健康な男性2名（28歳と40歳）を選択した。各被験者について、天然歯のガイドによる側方滑走運動と、口内描記装置の誘導による側方滑走運動を、6自由度顎運動記録装置によって記録した。分析点は切歯点と作業側下顎頭点とした。

1. 歯のガイドについて

被験者A（28歳）は、側方滑走運動時のガイドが左右側犬歯および第1小臼歯に存在しする健常者の型に分類される咬合を持っていた。また一方、被験者B（40歳）は、側方滑走運動時のガイドは歯列の前方には存在せず、左右側大臼歯部に存在する、いわゆる顎機能障害者予備軍の範疇に入るものであった。

2. 口内描記装置

上顎口蓋部と上顎歯列によって定位されるレジン製描記装置を製作し、その上面に描記板を固定した。また、下顎歯列に定位するレジン製描記装置に描記針を取り付けられるように設計し、描記針の位置は、両側下顎第一大臼歯間の中央として、描記板に垂直に設定することとした。

また、上顎に装着する口内描記板は傾きの異なる2種類を製作した。すなわち、口内描記板の傾きは、ゴシックアーチ描記時に一般的に使用されている咬合平面と平行に設定したもの（以後 Horizontal 型とする）と下顎頭と描記針先端を結んだラインと咬合平面で成形された傾斜角度の半分の傾き（Inclined 型）の2種類とした。

3. 下顎運動記録法

下顎運動の測定には、6自由度顎運動測定装置 TRIMET（東京歯材社製）を用いた。下顎運動の測定は、測定標点である LED を左右側にそれぞれ2個ずつ、計4個配置したフェイスボウを被験者の上下顎に装着し、この標点の運動を、大地座標系上に配置した左右側3台ずつ、計6台の CCD カメラで記録した。下顎の記録データから上顎の記録データを除して、頭部運動の含まれない下顎運動について、下顎切歯点と作業側下顎頭中央点を分析点として、解析幾何学的手法により運動経路を算出して評価した。

4. 測定条件

下顎運動測定時には、被験者は頭部の拘束のない楽な姿勢で測定装置に着座し、カンペル平面を大地に対してほぼ水平に保った頭位において、設定した種々のガイドによる側方滑走運動を測定した。

運動の記録にあたっては、側方滑走運動の出発点の位置を明確にするため次のような手法を採用した。すなわち、天然歯列においては、楽にタッピング運動を数回行い、咬頭嵌合状態がとれた後、側方滑走を指示した。

また口内描記装置を使用する場合には、楽にタッピング運動を数回行い、その位置からの前方滑走運動と前方位からの後方滑走運動を3回連続的に行わせて、自力でゴシックアーチの尖頭位が得られた状態から、指定した側への側方滑走運動を行わせ、運動測定を遂行した。

5. 分析方法

下顎運動の記録は、サンプリング周波数100Hzにて量子化を行い、すべてをデジタルデータとして分析を行った。座標系は下顎運動は上顎座標系（x_y座標系）を用い、また、天然歯の咬頭嵌合位における上下顎切歯点および下顎頭中央点をそれぞれの原点とした。

結 果

1. 側方滑走運動の出発点の位置について

天然歯ガイドを基準として、平面板および斜面板ガイドにおける出発点の位置の差異を切歯点と下顎頭点において測定し、表 1 に示した。

ガイドが変化すると側方滑走運動の出発点の位置も変化してきた（表 1）。すなわち、切歯点において観察すると、前方から後方に向かって、天然歯ガイド、傾斜した描記板によるガイド(Inclined 型)、平面の描記板によるガイド(Horizontal 型)の順に位置していた（図 1 A）。

また、作業側下顎頭点における観察によると、切歯点における観察結果と同様に、前方から天然歯ガイド、傾斜した描記板によるガイド(Inclined 型)、平面の描記板によるガイド(Horizontal 型)の順に位置していた。

	天然歯-平面板	天然歯-斜面板
被験者 1 (切歯点・右)	0.54	1.07
(右顎頭点)	0.43	0.59
(切歯点・左)	0.52	0.63
(左顎頭点)	0.15	0.65
被験者 2 (切歯点・右)	1.85	1.82
(右顎頭点)	0.28	0.15
(切歯点・左)	1.52	1.79
(左顎頭点)	0.30	0.30

表 1 ガイドの相違による側方滑走運動出発点の差異 単位：mm

2. 側方滑走運動経路について

1) 切歯路について

ガイドの種類により出発点の位置に前述した相違があるものの、運動経路はそれぞれのガイドによって大きな相違はみられなかった（図 1-A）。

2) 作業側下顎頭運動経路について

ガイドの種類により出発点の位置に相違が認められ、さらに下顎頭の運動経路においてもそれぞれのガイドで、次に示すような差異が観察された（図 1-B）。

①被験者 1

・右側方滑走運動について：

- ・天然歯ガイド：外側へ 0.7mm 長のヘアピン様（外側で前方で屈曲しやや戻る）
- ・平面板ガイド：後方へ彎曲しながら 0.4mm
- ・斜面板ガイド：外側へ 0.7mm 長のヘアピン様（外側で後方で屈曲しやや戻る）

・左側方滑走運動について：

- ・天然歯ガイド：後方へ 0.6mm 行き、前外方にやや戻る
- ・平面板ガイド：後外方へ 0.6mm
- ・斜面板ガイド：外方へ 0.5mm 行き、後外方へ 0.4mm 戻る

②被験者 2

・右側方滑走運動について：

- ・天然歯ガイド：外側へ 0.8mm 行き、後内方へ 0.4mm
- ・平面板ガイド：外側へ 0.6mm 行き、後内方へ 0.2mm
- ・斜面板ガイド：外側へ 0.8mm 行き、後内方へ 0.2mm

・左側方滑走運動について：

- ・天然歯ガイド：外側へ 0.6mm
- ・平面板ガイド：外側へ 0.7mm
- ・斜面板ガイド：外側へ 0.6mm

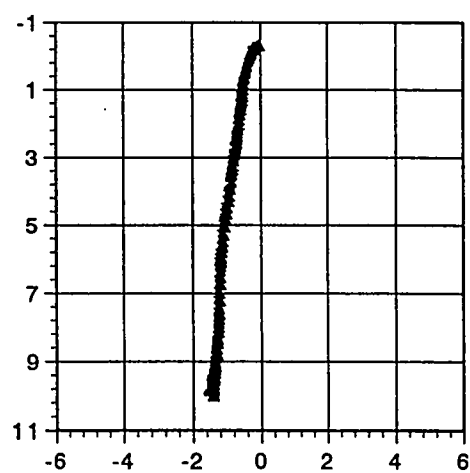
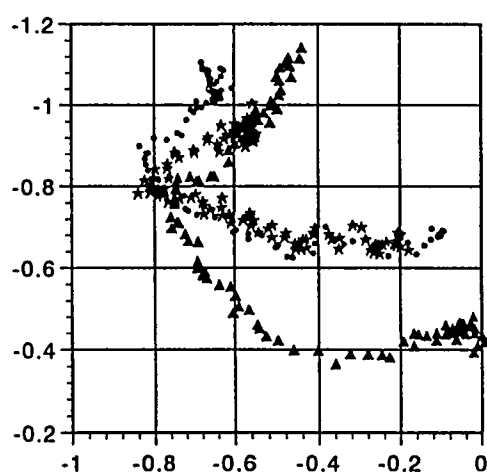
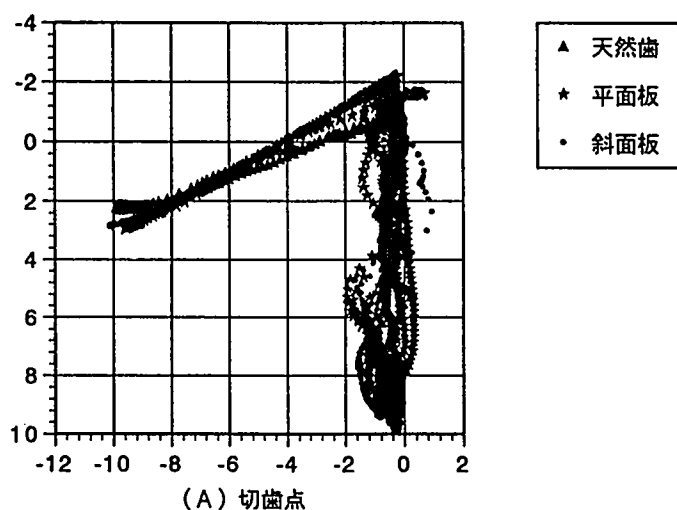


図1 被験者2の右側方滑走運動における
左.右 顎頭点および切歯点の水平面運動記録

結 論

側方滑走運動の記録にあたっては、運動を誘導するガイドの種類によって、運動の出発点の位置が大きく変化すると共に、作業側下顎頭の運動経路にも大きな差異が見られた。

特に、天然歯のガイドに比較して口内描記装置のガイドによると、描記板が平面であっても斜面であっても、側方滑走運動の出発点において下顎頭が大きく後方へ偏位し、その位置から下顎頭運動が開始している点に注目したい。すなわち、歯のガイドが失われると、側方滑走運動時には作業側下顎頭は後方変位して、その位置から回転様運動をすることになり、健常者の下顎頭運動経路とは大きく異なってくることになる。

この結果を臨床術式に振り返ると、咬合治療においてはまず最初に咬頭嵌合する下顎位を適正な位置に定めて、その後咬頭嵌合位から側方滑走運動を行わせて、下顎運動の記録を行う必要があることを意味していよう。

李研究者は、まだ数ヶ月間日本に滞在するので、その間にさらに被験者を増して研究を継続したい。

参考文献

1. 栗山 実：歯牙指導要素が平衡側顎路に及ぼす影響について，補綴誌 23：126-147，1979.
2. Coffey JP, Mahan PE, Gibbs CH et al: A preliminary study of effects of tooth guidance on working-side condylar movement. J Prosthet Dent 62: 157-162, 1989.
3. Nishigama K. Nakano M. Rando E: Effect of altered occlusal guidance on lateral border movement of the mandibule. J Prosthet Dent 68: 965-969, 1992.
4. Gross MD, Nemcovsky CE: Investigation of the effects of a variable lateral guidance incline on the pantographic registration of mandibular border movement. part II. J Prosthet Dent 70: 336-344, 1993.

作成日：2002年3月22日

2001 年度日中医学協会共同研究等助成事業報告書

—中国人研究者・医療技術者招聘助成—

平成 14 年 3 月 15 日

財団法人 日中医学協会

理 事 長 殿

招聘責任者氏名 諏訪 文彦

所属機関名 大阪歯科大学

職 名 教 授

所 在 地 〒573-1121 枚方市楠葉花園町 8-1

電話 072-864-3012 内線



1. 招聘研究者氏名 金 岩

所属機関 中国西安第四軍医大学・口腔医学院組織病理教研室 職名 教 授

2. 研 究 テ ー マ 組織工学的骨移植の血管再生についての研究

3. 日本滞在日程

① 自平成 13 年 6 月 24 日
至平成 13 年 7 月 1 日

② 自平成 13 年 11 月 12 日
至平成 13 年 11 月 19 日

4. 研究報告書

別紙報告書作成要領により、添付の用紙で研究報告書を作成して下さい。

研究発表中または研究中の本人のスナップ写真を添付して下さい。

*研究成果を発表する場合は、発表原稿・抄録集等も添付して下さい。

*発表に当っては、日中医学協会助成金による旨を明記して下さい。

Revascularization of Transplanted Bone Constructed through Tissue Engineering

Researcher: Yan Jin(金岩),

Cooperation Institute(Chine): Department of Oral Histology &
Pathology, Stomatological College, the Fourth Military
Medical University, Xi'an, PR Chine

Cooperation Institute(Japan): Department of Anatomy, Osaka
Dental University

Supervisor: Prof. Fumihiko Suwa

Collaborator: Yuan Liu(刘源)

Abstract:

The aim of this study was to investigate bone formation, by employing a tissue engineering method, and the effects of a combined pattern of biomaterials and bone marrow stem cells on osteogenetic ability. The project consisted of four sections: Bone formation potentiality of bone marrow stem cells (MSCs) in vitro; biological behavior of MSCs in three different complexes combined with biomaterials; in vivo bone formation induced by rhMBP-2 and TGF- β combined with CBB and PEO-PPO-PEO complexes; observations of the bone healing and revascularization, which was enhanced by tissue engineered bone in vivo. Our results showed that: SD rat MSCs have great bone formation potentiality; seeding MSCs on the mixed CBB and PEO-PPO-PEO various complexes were the best for the construction of tissue engineered bone; observations of the bone healing and revisualization enhanced by tissue engineered bone in vivo. Our results showed that the CBB and PEO-PPO-PEO complexes are best for in vitro bone construction and rhBMP-2, TGF- β can greatly enhance the speed and quantity of bone formation.

Keywords: Revascularization, Tissue Engineering, Bone, rhBMP-2, TGF- β

Introduction:

The aim of tissue engineering is to investigate and restore tissue and organ

substitutes. In this study, bone formation was investigated by employing a tissue engineering method. The effects of a combined pattern of biomaterials and bone marrow stem cells on osteogenetic ability were also studied.

Materials and method:

1. SD rat MSCs were cultured in vitro by an explant method, then were cultured in mineralization-conditioned medium for 5~10 days. Cell proliferation ability and alkaline phosphatase (ALP) activity were observed. The bone formation potentiality of MSCs in mineralization-conditioned medium was investigated by von-Kossa staining. The secretion of collagen type I was investigated by an immunocytochemistry method;
2. SD rat MSCs were subcultured to 3rd passage and cultured in mineralization-conditioned medium for 5 days. Three different kinds of complexes were constructed; ① ceramic bovine bone (CBB) and poly(ethylene oxide)-poly(propylene oxide)-poly(ethylene oxide) (PEO-PPO-PEO) were mixed together, and the MSCs were then seeded on the complex; ② MSCs were resuspended in liquid PEO-PPO-PEO and then mixed with CBB. ③ MSCs were combined with CBB and then mixed with PEO-PPO-PEO; ④ MSCs were mixed with CBB as a control. The biological behavior of the MSCs in the different groups were investigated at 5 and 10 days. The proliferation ability of the MSCs was investigated by cell counting. The attachment and growth of MSCs on the materials were studied by SEM. ALP activity and the expression of collagen type I were measured by an immunocytochemistry method;
3. MSCs were cultured, expanded and induced in vitro, as mentioned above. CBB was ground and sieved. Cells were resuspended with PEO-PPO-PEO and then mixed with CBB. There were two groups; ① combined with rhBMP-2 50 μ g/ml and TGF- β 50ng/ml, and ② combined with rhBMP-2 50 μ g/ml. Then the complexes were implanted subcutaneously in the backs of nude mice and investigated histologically at 2w, 4w and 6w intervals;
4. An SD rat model of critical size calvarial defects will be established and artificial bone made of MSCs-ceramic-PEO-PPO-PEO will be used to repair these defects (study still in progress).

Results:

1. After 5 days of culture in mineralization-conditioned medium, the cell proliferation ability was greatly decreased, the ALP activity was enhanced, and collagen type I staining was positive. When cultured up to 10 days, von-Kossa staining showed there were calcium depositions with a nodule shape;
2. These results clearly demonstrated that at the same time interval, the proliferation abilities of groups ① and ③ were better than groups ② and ④. The results of the

SEM study showed that the attachment, growth and secretion of collagen in group ① were better than it was in the other groups. The results of the immunocytochemistry showed that the expression of collagen type I in group ① was better than the other groups, and there were no differences within the other group. In regard to the ALP activity, there were no obvious changes between group ① and ③, and no differences between group ② and ④, but there was more positive staining demonstrated in group ① and ③ than in group ② and ④. The cell numbers, attachment and growth, the expression of collagen type I and the ALP activity at 10 days were all better than those at 5 days.

3. At 2w, the implantations were white, smooth and flexible, about 1.0-1.5 μm thick, surrounded by fibrous membrane and had irregular disc-like shapes. Histological results showed that there were bone matrix-like tissues formed inside the complexes, and blood capillaries were seen inside the tissue. The tissue formations in group ① were better than those in group ②. At 4w, the results were almost the same as those at 2w, except that there was more bone matrix-like tissue formation. The investigation of the 6w groups is still in progress. At each time point, all of the groups combined with rhBMP-2 50 $\mu\text{g/ml}$ and TGF- β 50 ng/ml had more bone formation than those combined with rhBMP-2 50 $\mu\text{g/ml}$ only.

Conclusions:

1. SD rat MSCs have great bone formation potentiality and can be used in the formation of bone constructed by tissue engineering;
2. Seeding MSCs on the mixed CBB and PEO-PPO-PEO complexes were the best for construction of tissue engineered bone;
3. Adding rhBMP-2 50 $\mu\text{g/ml}$ and TGF- β 50 ng/ml can greatly enhance the bone formation ability of the mixed CBB and PEO-PPO-PEO complexes.

References:

- 1.Li Shi-Bao, Yang Wei-Dong, Tang Li-Hui, et al. Preparation and application of temperature dependent hydrogel. J Fourth Mil Med Univ 2001 ; 22(4) : 306-308.
- 2.Minamide A, Tamaki T, Kawakami M, et al. Experimental spinal fusion using sintered bovine bone coated with type I collagen and recombinant human bone morphogenetic protein-2. Spine 1999 ; 24(18) : 1863-70.
- 3.Lin FH, Liao CJ, Chen KS, Sun JS. Preparation of a biphasic porous bioceramic by heating bovine cancellous bone with Na4P207.10H2O addition. Biomaterials 1999 Mar ; 20(5) : 475-84.
- 4.Cao YL, Rodriguez A, Vacanti M et al. Comparative study of the poly(glycolic acid), calcium alginate and pluronic in engineering of autologous porcine cartilage [J]. J

Biomater Sci Polymer Edn. 1998 ; 9(5) : 475-487.

5. Yang Weidong, Chen Fulin, Mao Tianqiu, et al. Fabrication of cartilage with injectable synthetic hydrogel. J Pract Stomatol 1999(Sept) ; 15(5) : 378-380.

6. Lee YM, Park YJ, Lee SL, et al. Tissue engineering bone formation using chitosan/tricalcium phosphate sponges. J Periodontol 2000 ; 71(3) : 410-7.

7. Minamide A, Tamaki T, Kawakami M, et al. Experimental spinal fusion using sintered bovine bone coated with type I collagen and recombinant human bone morphogenetic protein-2. Spine 1999 ; 24(18) : 1863-70.

8. Despina D. Deligianni, Nikoleta D. et al. Effect of surface roughness of hydroxyapatite on human bone marrow cell adhesion, proliferation, differentiation and detachment strength. Biomaterials 2001 ; 22(1) : 87-96.

Anticipate completion date: March 15th, 2002.

2001年度日中医学協会共同研究等助成事業報告書

－日本人研究者派遣－

2001 年 11 月 20 日

財団法人 日中医学協会
理事長 殿

訪中者氏名 佐々木 一之
所属機関名 金沢医科大学
部署・役職 眼科・名誉教授
所 在 地 〒920-0293 石川県河北郡内灘町大学1-1
電話 076-286-2211 内線 3956



1. 中国側招請機関名 中国医科大学
所 在 地 中華人民共和国遼寧省瀋陽市和平区南街
招請責任者氏名 金 魁和 職名 学長

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)

遼寧省瀋陽市 中国医科大学 眼科学教室

第1回訪問：2001年4月1日～4月8日
第2回訪問：2001年6月5日～6月12日
第3回訪問：2001年7月20日～7月27日
第4回訪問：2001年9月21日～9月28日
第5回訪問：2001年10月22日～10月27日

3. 交 流 報 告 書

別紙報告書作成要領に準じ、講演・指導内容、訪問地の状況・課題、今後の交流計画等を報告して下さい。

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、**日中医学協会助成金**による旨を付記して下さい。

※決算報告書(書式自由)を添付して下さい。

交流報告書内容

交流報告は以下の項目に従って記載する。

1. 中国医科大学長期（連続）訪問意図の背景
2. 訪問地での活動内容
 - I、 医学部学生への眼科学講義
 - II、 眼科学大学院学生への研究指導
 - III、 眼科学レジデントへの臨床教育
 - IV、 眼科医師全般への臨床教育
 - V、 眼科教室と金沢医科大学・国立環境研究所との共同研究準備
 - VI、 地域（遼寧省、瀋陽市）眼科医への指導{講演を含む}

1. 中国医科大学長期（連続）訪問意図の背景

中国医科大学と私自身の交流は 1980 年代初めにさかのぼる。現中国医科大学は戦前の旧満州医科大学の施設を母体として発足した大学であったこと、私の亡父がその旧満州医科大学の眼科教授であったこと、また私が瀋陽生まれで小学時代の半ばまで瀋陽市で過ごしたことなどから、亡父または私自身を知る多くの眼科関係者が中国医大を含めた中国各地におられたこともあり、日中医学交流が始まった初期の頃から中国医大をはじめとする幾つかの中国の大学眼科関係者の方々と交流を始め現在に到っている。これまでに 10 数名の中国人眼科医を私の主宰する金沢医科大学眼科学教室に招き、主に私の研究テーマである水晶体・白内障の研究につき指導をしてきた。初期の留学生の中には既に何名かが眼科教授として中国の眼科学会で活躍している。今回長期の滞在を予定した中国医大眼科学主任の張 勁松教授もその一人である。

私は 2001 年 3 月末をもって金沢医科大学眼科学教室主任の席を退くのを機会に、中国医科大学 金 学長および眼科学講座の張 主任教授より、これまでの客員教授とは異なる立場で長期滞在し、臨床領域に比べ未だ進歩の遅れている研究領域の指導と、同大学日本語コース学生に生の日本語での授業を担当して欲しいとの要請を受けた。

日中医学協会の評議員も長く勤めさせていただいてはいるが、実質、協会の仕事もこれまではしていなかったこともあり、特殊なケースであることは承知の上で協会事業の一つである日本人研究者派遣助成事業に応募させていただいた。

訪問地での活動内容は、私自身の研究継続の目的もあり多岐にわたっているが、報告規定に従い各項につきその概略を以下に報告する。

2、訪問地での活動内容

I、医学部学生への講義

眼科学の講義は学部4年生の学生（日本語コースの学生は、1年次は日本語のみの授業を受けるため実際は5年生）が対象である。講義内容は12コマで、3月末までには既に大部分が終わっていたため、3コマ（緑内障、ぶどう膜疾患、水晶体疾患）を行った。1コマは途中休憩を入れて実質120分、時間的には充分であった。学生のもつ教科書は中国語で書かれたもので、現在日本の医学生が使う教科書を持つ者はおらず、授業担当者が作ったプリントを教科書としていた。講義はできる限りゆっくりとわかりやすい言葉でOHPを使いながら行ったがそこで使用した教材はすべて学生に残してきた。中国教科書には疾患を示す画像が非常に少ないことも聞いていたので、できる限り疾患の画像も供覧した。日本語コースの学生とはいえ講義もこみいった内容になると理解し難いようであったため、そのような事項は同席してもらった中国人教員に中国語で補足してもらう方法を採用した。また、医学生としては必要な英語の医学用語は可能な限り日本語と併用して覚えてもらった。休憩時間は学生との雑談を含めた質問時間にあてた。最初は学生も緊張していたせいか会話ははずまなかったが、2回、3回目の授業では学生からの積極的な接触があった。総じて日本の学生とくらべ講義の時間内に多くを学び取ろうとする意欲はこちらにもよく伝わってきた。授業開始は朝8:00であったが、開始時間には全ての学生が揃っていたこと、授業中学生の私語を聞かなかったこと、当然のことではあろうが久しく経験しなかったことだけに、授業する私も普段以上熱がはいったような気がした。間もなく今年度の授業もはじまるので、前回以上の準備で学生に応えたいと思っている（写真1、2、3）。

II、眼科学専攻大学院学生への研究指導

卒業した学生が直接母校の眼科学教室で研修することは出来ないと聞く。毎年何名かの大学院生（修士課程、博士課程）が選拔され、この学生のみが大学での研究、研修を許されるが、日常臨床は研究テーマが臨床疾患を対象とするものでない限り、各自のあき時間で外来診療の見学、指導医のもとで検査の助手などを行っている。

長期指導の必要な博士課程指導は時間的にも無理なため、3名の修士コースの学生を指導することとした。日本の医科系大学ではない修士課程ということもこのコースの学生を引き受けた理由の一つである。

中国医大では同じ修士課程にも3種類のコースがある。一つは全く基礎研究をテーマとするもの、他に基礎研究30%~40%、残りが関連する臨床研究を行うコースと100%臨床研究のコースがある。私は3名には全て水晶体ないしは白内障に関する基礎・臨床の境界領域の研究課題を与えている。中国では全く新しい研究領域の一つである前眼部生体計測に関する課題を臨床研究が可能な二人に与えた。この目的には特殊な前眼部解析装置が必要なためこれまで私が使用していた装置の一つを再整備し、金沢医科大学より中国医大へ研究機器としての寄贈手続きをしていただき持ち込みが実現した。装置使用は熟練を要することもあり、予め昨年度内に同大学眼科の水晶体研究者（当時講師）を金沢医科大学眼科に招き十分な経験を積ませた。それでも研究を目的とした装置の稼動には時間を要し、第4回目の訪問時から正式な研究がスタートした。時間的にはまだ充分な余裕があるため1年後には、

私にとっても魅力ある幾つかの新知見が得られるものと確信している。

重要眼疾患の一つに「閉塞隅角緑内障」という適切な治療時期を失すると失明につながる疾患がある。白人に比べ東洋人（殊に女性）に多いとされ、事実私自身もここ数年の国際共同調査（アイスランド、シンガポール）でこれを確認してきた。同じ東洋人でも日本人と中国系シンガポール人間でも本疾患の頻度が明らかに異なる（シンガポール人＞日本人）データも既に得ているが、今回からの訪中でこれまで経験した限り、その頻度は更に高そうな印象をもっている。加齢白内障発現も日本人との間には差がありそうである。研究は始まったばかりであるが発展が期待される。

基礎研究は中国医大眼科教室には私自身が直接指導する設備は全くない。これまでの中国医科大学の規定では修士課程の海外留学は認められていなかったが、学長、大学院担当責任者に金沢医科大学に学生を連れて行きそこでの研究をさせたいと申し出たところ、金沢医科大学とは姉妹大学でもあると言うことで特別の許可を頂いた。本年9月から金沢医科大学の私の元でヒト培養水晶体上皮を用いた紫外線関連の白内障研究を開始したところである。

中国医大側からの望まれたことは、研究者としての基礎教育をどのような形でもよいから3年の過程の中でして欲しいと言うことであった。3年後には3種のコースについては私なりの修士課程学生教育への提言をしてみたい（写真4、5、6）。

Ⅲ、眼科学レジデントへの臨床教育 及び Ⅳ、眼科医師全般への臨床教育

当初は臨床教育としては研修医、一般医を分けた教育を考え、研修医へはこれまで私自身が金沢医科大学眼科で行ってきた眼科入門コース用の内容を、眼科医全般へは眼科教室員との間で行ってきたと同質の臨床検討会をしてみようと準備もし、実際何回か行ってみたが両コースでの反応はどちらかと言うと私が中心の一方通行的なものであった。

訪中計画の段階では全く予定していなかったものに日常外来診療がある。以前とは異なり現在の中国では外国人の医療行為は極端に制限されており、日常外来での患者診察・診断などを中国人医師と同レベルでは行えないことになっている。ところが二度目の訪中時に大学当局学から「外国人特別医師免許証」を渡された。大学の要望は一般外来で通常診断を行い、そこで診断を含めた医師、患者への指示、説明は勿論のこと、眼科医師、研修医の教育も同時にしたいとのことであった。少なくとも眼科領域では中国衛生部で初めて免許証が交付されたとのこと、そこまで準備も整えられていると最早お断りすることも出来ず、診療患者は大学で選択せず時間内の受診希望者は全て同等に受け付けて欲しい旨だけを私の希望条件として1回目の診療にのぞんだ。

それでも予め準備をしていたらしく初回診療日（8：00 開始）には10 数名の受診者があった。診療器具は性能の悪い細隙灯顕微鏡と直像鏡のみ、後は何を要求してもほとんど基本的な検査器具の使用はできず、日本の保健所で検診をしているような状況であった。

しかし、そこで診察できた疾患内容は私の予想とは大きく異なるものであった。糖尿病患者は驚くほど多く、少ないと言われていたある種のぶどう膜炎、あるいは多くの閉塞隅角緑内障症例等々、研修医の指導、臨床検討の材料には事欠かないものがあることを知り、方法次第では期待にそえる臨床教育ができる手ごたえをもった。眼科医の多くは疾患そのものについての知識は充分もっているが、それを検出する診断の基本機器があまりにも貧弱なため単なる耳学問にとどまっていることも改めて

知った。しかし、日本でも全ての大学が未だもたないような高価な検査機器、手術機器を既に有していることにも驚きをおぼえた。早速次回の訪問から可能な限りの基本診断機器、薬品類を持参し続け現在に到っているが、未だしばらくは日本で行われているような診療システム準備には時間を要するものと思う。幸い、金沢医科大学をはじめ、周囲の多くの方々のご援助、ご協力を頂き予想以上の速さで目的達成に近づいており徐々に私の目指す臨床教育体制は整いつつある。

第5回目の訪中時に到り TV 画像を通して直接私の診察している外眼部、眼底その他の観察内容をその場で研修医、臨床実習を行っている学生に見せることができるようになり予定していた現場での臨床教育がほぼ可能となってきた。このような教育システムは中国では最初の試みとのことで、この意味では中国医大側の要望に多少は近づけたかと思っている。

4回目の訪問時あたりから私とともに患者診察にかかわる医師の患者を診る目、疾患への考え方も多少変わってきた感がある。医師の中から自分のかかえている問題の症例を積極的に提示する者が出始め、臨床検討の時間も必然的に増え、今回（5回目）の訪問から本来の目的とした研究指導に割く時間も少なくなり多少予定の変更を余儀なくされている。しかし、これも広い意味では長期滞在の目的の一つでもあるのでなおしばらくの間は訪中の度に様々な試みをしてみたい。未だ訪問の回数、臨床指導の回数も多くはないが、それでも大学内では多少変わった試みが始まったとの風評が広がっているようで、現場を見学に来られる大学関係者が増えている。私自身医学教育の専門家でないので多少のプレッシャーも感じ始めてきたことも否めないがこのままで続けてみたい。

今私がかかわっている大学が先進国並の眼科学レベルに達するまでには正直まだ高い壁が残されている。また、最新医学情報を容易に知る術を知る若手の医師の中にはこの遅れ、壁の高さを理解し、苛立ちを訴える者もいる。これらについては本来の事業報告と離れるので別の機会にでも述べてみたい（写真7、8）。

V、中国医科大学眼科教室と金沢医科大学・環境研究所との共同研究準備

今年度から中国医大と頻回の交流を始めようと意図したことの一つに私自身が現在も継続中の研究課題（大気汚染と白内障に関する疫学的研究：国立環境研究所と合同で行っている国際共同研究）を中国でも行う予定であり、その準備を2001年度内に終了したいと考えている。

中国側の主研究グループは中国医大眼科学教室白内障研究グループと中国医大公衆衛生学教室で、目下その準備は順調に進んでおり、2002年度内には予備調査が瀋陽市内で行われる予定である。

VI、地域（遼寧省、瀋陽市）眼科医への指導（講演を含む）

中国医大関係者、金沢医科大学眼科への留学経験のある医師が遼寧省をはじめ中国東北各地の大学、主要病院で活躍している。私も中国医大客員教授として可能な限り、これらの施設での眼科医研修の催しに協力しようと思っている。

これまでに遼寧省省立眼病センター（張 同センター所長も金沢医科大学眼科同門）主催の白内障研修会に私も講師として参加した。週末2日にわたる研修会ながら約300名の参加者があった。話題の中心は白内障手術（超音波手術＋眼内レンズ挿入術）でその熱気はわが国の12、3年前を思わせる

ものであった。現在全中国で眼内レンズ挿入術を施行できる術者は300名に満たないそうである。超音波手術までできる術者はその中でも限られている。本手術の普及は早いと予測するが、未熟な術者による重篤併発症の数も私の外来診療経験から推測すると中国全土には相当数いるのではないかと思う。眼科医に対する手術教育より海外の器械、人工レンズ業者のマーケット争いが先行している。日本での眼内レンズ挿入手術の導入から発展までの経過を実体験しているだけに、本手術の中国における正しい普及に求められる限り助言はしたいと思っている（写真9、10）。

お わ り に

恐らく私の助成金の使用内容はこれまで本助成を受けた方々とは異なる特殊なものであったかと思う。可能な限り訪中回数を増やし本年度に限らず明年度、更にはその後も前記の目標を大方達成するまで続けるつもりでいる。第1回目訪中時は助成金使用の詳細についての連絡を頂いてなかったため、第2回目訪中以降は航空券代金のみに使用させていただいた。第5回目訪中時は航空券代金全額の支払いまでは助成金の残額はなかったが、5回の訪中の援助をしていただいたことに改めて謝意を表したい。

なお本報告は助成金使用終了の第5回目までのものであることをご了解願いたい。

2001年度日中医学協会共同研究等助成事業報告書

－日本人研究者派遣－

2002年 3月 15日

財団法人 日中医学協会
理事長 殿

訪中者氏名 近藤 雅雄
 所属機関名 国立公衆衛生院
 部署・役職 栄養生化学部 室長
 所在地 〒108-8638 東京都港区白金台4-6-1
 電話 03-3441-7111 内線 243

1. 中国側招請機関名 中国貴州省貴陽医学院
 所在地 中国貴州省貴陽市北京路4号
 招請責任者氏名 貴陽医学院 謝 亞 雄 職名 予防医学系 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）

日 日	訪問都市	機関名	主な交流内容
7月25日	北京	特に無し	中国風土病の現状について意見交換
7月26日	貴陽市	貴陽医学院	研究打ち合わせ
7月27日	〃	貴州省食品衛生研究所	講演、研究交流、施設見学
7月28日	〃	〃	研究交流、調査研究
7月29日	〃	〃	〃 〃 研究指導
7月30日	貴陽市、本里	食品衛生研究所 県衛生局、防疫隊	フィールド調査の実施
7月31日	北京	特に無し	研究交流、研究評価

3. 交流報告書

別紙報告書作成要領に準じ、講演・指導内容、訪問地の状況・課題、今後の交流計画等を報告して下さい。

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、日中医学協会助成金による旨を付記して下さい。

※決算報告書（書式自由）を添付して下さい。

貴州省におけるヒ素中毒の発症機序解明と健康リスク評価およびその手法の開発に関する日中共同研究

研究者氏名	近藤雅雄
所属機関	国立公衆衛生院、栄養生化学部
共同研究者名	謝亜雄、汪思順、劉雲宝、宮本廣、大道正義 千葉百子、稲葉 裕、柘植光代、饗場直美 佐藤加代子

要 旨

ヒ素中毒による臨床症状は皮膚症状をはじめとし、がんとの関係など実に多彩であるが、いまだにヒ素の生体内での作用機序およびその毒性発現機序は不明である。そこで、これらの解明を目的として、高濃度ヒ素を含む石炭が原因で発症した極めて珍しい型の慢性ヒ素中毒患者の健康障害について検討した。その結果、①慢性ヒ素中毒患者群では尿中のヒ素濃度は対照群に比べ有意に高値を示したが、皮膚症状進行度との関係は認められなかった。尿中の他元素(24種)についてはAl, Ba, Mn, Ni, Seが検出されず、その他の元素にも著明な変動を認めたが、ヒ素との相関関係は見られなかった。②ヒ素の代謝への影響としてポルフィリン代謝を検討したところ、尿中ポルフィリンの著明な変動を見出した。特に糞便中では29種類のポルフィリン誘導体が見出され、この内、脂溶性ポルフィリンが大量検出された。また、ポルフィリンによってはヒ素との有意な関係を認めた。③ヒ素中毒多発地域近郊の住民の身体的特徴と摂取栄養素量を調査し、日本人の栄養所要量と比較したところ、Se, Ca, レチノール、ビタミンB₁, B₂, Eおよび脂肪摂取量の低下が著しかった。また、石炭などの生活環境因子中の元素量を一部測定したが、現時点では評価するに十分な検討にまではいたらなかった。

以上の結果から、ヒ素は生体内多元素攪乱因子であること、また、ポルフィリンの代謝に著明な影響を惹き起すことがわかった。これらはヒ素による生体曝露影響の指標、ヒ素中毒の毒性発現機序解明および中毒の予防と治療検討での基礎的資料として有用であると思われる。

Key Words ヒ素中毒、微量元素、栄養、代謝、ポルフィリン、生物学的モニタリング、リスク評価

結 言 :

人為的な汚染によらないヒ素中毒の多くは井戸水に混在するヒ素が原因である。中国でも新疆、内蒙古、山西、寧夏などでは地下水による慢性ヒ素中毒(飲用水型)が問題となっており、多くの研究が行なわれている。しかし、貴州省西南部のある地域では高濃度ヒ素を含む石炭を排煙設備のないかまどを使用して炊飯や暖房および調理する結果、屋内の空気や食物が汚染され、吸入と経口とによって曝露されるという極めて珍しい型の慢性ヒ素中毒(石炭燃焼型)が社会問題となっている¹⁾。これらの一部地域ではフッ素-ヒ素複合型中毒も見られる²⁾。また、同省ではヒ素曝露者が全人口の約10%越え、興仁県の慢性ヒ素中毒患者約4千人をはじめとして西南部に広がり、日増しに深刻化しているという。現在ではヒ素中毒の拡大を防止するための各種政策が検討されているが、石炭燃焼型のヒ素中毒は、潜伏期間が短く、急性発症し、症状が重いなど、飲用水型と多少異なっていることが報告されており、早急にヒ素中毒の早期発見、健康影響・評価・曝露影響指標の作成、予防、治療法の確立が望まれている。これまでに、ヒ素による生体影響に関する研究は多く見られるが、未だにヒ素の生体内での作用及びその毒性発現機序については不明の部分が多い。そこで、本研究ではヒ素中毒の発症機序解明と健康リスク評価及びその手法の開発を目的として、①貴州省の石炭由来による慢性ヒ素中毒患者の尿中各種微量元素排泄に及ぼす影響および②生体影響評価を目的として、公衆衛生上重要なポルフィリン代謝について、尿中への排泄パターンを追及し、さらに③貴州省のヒ素中毒発症地域の近郊で、ヒ素中毒をまったく起こしていない地域の石炭、飲用水や食物などの生活環境試料中および住民(健康人)の毛髪、尿などの生体試料中の各種微量元素濃度の測定および身体的特徴や栄養摂取状況について聞き取り調査を行った。

対象と方法

対象：①貴州省の西南部に居住し、ヒ素曝露期間8～25年の慢性ヒ素中毒患者16名（男性7名、女性9名、平均年齢37.1歳）および対照者16名（患者と同一地域に住む健康な男性8名、女性8名、平均年齢40.1歳）から、同意を得て、尿尿材料の提供を受けた³⁾。尿は早朝に現地で採取し、日本で測定するまで冷凍保存した。

②同省近郊に居住し、石炭を主に生活燃料としているが、ヒ素中毒症状がまったく認められない地域に居住する健康人30名（0～9歳14名：男6名、女8名；10～19歳5名：男2名、女3名；20～29歳6名：男3名、女3名；30歳以上5名：男1名、女4名）を対象に問診、身長、体重、血圧などの一般検診と、あらかじめ作成していった身体表面・病状調査、家族歴、食生活環境調査、生活習慣と健康調査の各票に基いて聞き取り調査を行った。同時に、村民が摂食している食品、石炭、土壌、湧水、家畜の糞、草木、さらに、毛髪、尿などを村民の同意を得て採取した。

微量元素分析: 尿尿及び生活環境試料に濃硝酸と過酸化水素加え、マイクロウェーブオーブン (MLS-1200MEGA, Milestone, Italy) にて、密閉加圧式湿式分解し、mil-Q 水にて一定量に溶解し、ICP-MS (PMS-2000, 横河アナリティカルシステム) または ICP-AES (SPS1500V, セイコー電子工業) を用いて元素濃度を測定した⁴⁾。

ポルフィリン分析：著者が開発した高速液体クロマトグラフィー法によって、尿中のポルフィリンをパターン分析した⁵⁾。

δ -アミノレブリン酸 (ALA) の測定: Dowex 1 および Dowex 50 イオン交換樹脂を用いた著者らの方法によって測定した⁶⁾。

調査項目：身体表面・病状調査、家族歴、食生活環境調査および栄養調査表をあらかじめ作成し、現地にで聞き取り調査を行った（調査内容は資料として本報告書の最後に添付した）。

結果:

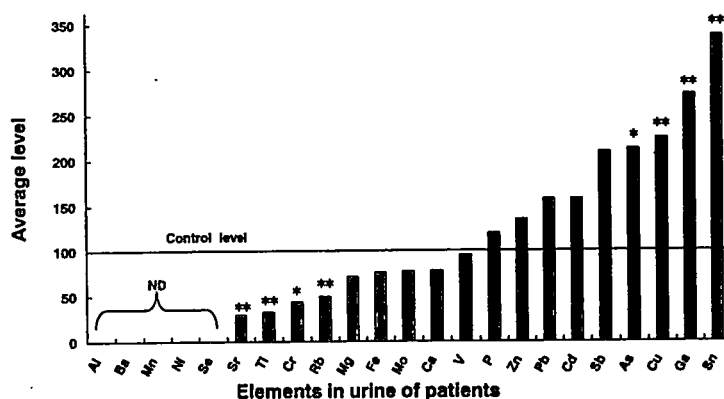
1) 石炭燃焼型と素中毒患者の尿尿中微量元素排泄に関する検討:

尿中ヒ素濃度の mean±SD は患者群では 184.4±200.0 μg/g creatinine (平均 160 μg/L) に対して対照群では 86.8±64.20 μg/g creatinine (平均 64 μg/L) であり、両群間に統計的に有意な差が見られた(p<0.05) (表

表 1. Element concentrations in urine

Patients (n=16)			Controls (n=16)			Patients (n=16)			Controls (n=16)		
Al	ND		419(ND-7.96X103)a			Mo	255±158		332±328		
As	184.4±200.0*		86.8±64.2			Ni	ND		29.5(0.6-805.6)b		
Ba	ND		3.5(ND-1.09X103)a			P	(5.49±2.18)X105		(4.60±2.35)X105		
Be	ND		ND			Pb	31.0±29.4		19.7±35.5		
Bi	ND		ND			Rb	945±382**		1,916±838		
Ca	(1.25±0.57)X105		(1.62±0.94)X105			Sb	4.8(1.2-97.3)b		2.3(0.5-6.4)b		
Cd	5.2±6.6		3.3±2.3			Se	ND		26.3±16.4		
Cr	35.2±32.9*		81.0±64.7			Sn	43.7±39.8**		12.9±9.6		
Cu	94.7±67.8*		42.3±19.2			Sr	131±67*		448±216		
Fe	(1.10±0.44)X103		(1.45±0.69)X103			Ti	7.5±8.4**		23.2±14.8		
Ga	4.2±3.3**		1.6±1.1			V	14.9±9.7		15.7±10.7		
Mg	(0.90±0.48)X105		(1.27±0.63)X105			Zn	(5.85±6.54)X103		(4.33±4.41)X103		
Mn	ND		12(ND-295)a								

ND, not detectable. All values are expressed in $\mu\text{g/g}$ creatinine; the data are mean \pm S.D., except for the ones marked with "a" or "b".



⊠ 1 Relative levels of the elements in the patient's urine. The average values of the controls were fixed at 100 (units), and then relative values of the average concentrations of the patients were calculated. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ as compared with the controls. ND, not detectable.

相関関係は見出されなかった。また、Sr,Cr,Ti,Rb が患者群で有意に低下し、Al,Ba,Mn,Ni,Se の各元素濃度は検出限界以下であったが、ヒ素濃度との間に有意な関係は見られなかった。

糞便中ヒ素濃度は患者群では $2.07 \pm 1.75 \mu\text{g/g}$ of dry feces (mean \pm SD) に対して対照群では $0.83 \pm 0.46 \mu\text{g/g}$ であり、有意な差が見られた ($p < 0.05$)。

2) 石炭燃焼型ヒ素中毒患者の尿中ポルフィリン代謝産物に関する検討：

尿中ポルフィリン異性体、総ポルフィリン量および ALA 濃度には患者群と対照群の平均値には有意な差はなかった (表 2)。しかし、表 3 に示した様に、被験者を性別で 2 群に分け、ヒ素濃度と各種ポルフィリン濃度との相関関係を算出したところ、患者群男性のコプロポルフィリンⅢ型異性体、女性のヘキサーおよびペンター

表2 Urinary porphyrins and ALA of arsenic poisoning patients and controls ($\mu\text{g/g}$ creatinine)

	Arsenism Patients (n=16)	Controls (n=16)
URO (I + III)	23.23 \pm 11.4	24.82 \pm 13.13
HEPTA (I + III)	8.01 \pm 5.57	7.94 \pm 6.34
HEXA (I + III)	0.90 \pm 1.95	1.61 \pm 4.66
U-peak 1 (Rt=9.81)	2.19 \pm 2.19	1.67 \pm 2.18
U-peak 2 (Rt=11.42)	0.43 \pm 0.64	0.60 \pm 0.86
PENTA I	0.81 \pm 0.64	0.87 \pm 1.15
PENTA III	0.11 \pm 0.46	0.34 \pm 0.45
U-peak 3 (Rt=14.37)	2.36 \pm 1.98	3.13 \pm 1.74
COPRO I	16.25 \pm 7.40	19.52 \pm 7.26
COPRO III	24.68 \pm 22.30	20.50 \pm 14.74
U-peak 4 (Rt=15.77)	0.20 \pm 0.35	0.14 \pm 0.31
Total porphyrins	79.18 \pm 39	81.16 \pm 36.14
COPRO III/COPRO I ratio	1.68 \pm 1.58	1.07 \pm 0.70
COPRO /URO ratio*	2.01 \pm 1.46	1.83 \pm 1.11
ALA	1221.5 \pm 266.7	1273.8 \pm 303.0

Values represent mean \pm SD
ALA: δ -aminolevulinic acid
HEPTA: heptacarboxylporphyrin
PENTA: pentacarboxylporphyrin
Rt: retention time (min)
*: COPRO /URO ratio: COPRO (I + III) /URO (I + III) ratio
“Porphyrin” amount of an unknown peak was calculated according to the formula that was used for the nearest porphyrin peak.

女性の方が高値であり、患者群のウロー、対照群のウロー、コプロⅠーポルフィリンについては有意な差が見られた。

糞便では、尿に比べて 29 種類のポルフィリンが検出され (図 2)、そのうち 17 種類が未知のポルフィリンであった。総ポルフィリン量は、患者群では $76.56 \pm 64.48 \mu\text{g/g}$ of dry (mean \pm SD) に対して、対照群では $41.67 \pm 36.03 \mu\text{g/g}$ of dry であり、有意な差が見られた ($p < 0.05$)。特に、ペンタカルボキシルポルフィリンと 6 種類の未知ポルフィリンの増量が著しく、この内、4 種類は脂溶性ポルフィリンであった。

3) 非ヒ素曝露地域の生活習慣および生活環境試料中の微量元素に関する検討：

表 4 に調査対象地域住民の男女別及び年齢別に分けた身体的特徴と摂取栄養素量を示した。表より、0~9 歳

表3 Correlation analysis between urinary As and urinary porphyrins along with ALA in arsenic poisoning patients and controls

	Coefficient of correlation with urinary arsenic (r)			
	Male		Female	
	Patients n=7	Controls n=8	Patients n=9	Controls n=8
URO (I + III)	-0.4818	0.9875*	0.1329	0.3099
HEPTA (I + III)	-0.4863	0.8866*	0.1230	0.0975
HEXA (I + III)	-0.0533	ND	0.7725*	-0.1614
U-peak 1 (Rt=9.81)	-0.2841	-0.1219	-0.0121	0.7273*
U-peak 2 (Rt=11.42)	-0.4023	-0.2217	-0.0405	-0.2748
PENTA I	-0.1436	-0.5011	0.7253*	-0.1784
PENTA III	ND	0.7849*	-0.2045	-0.2551
U-peak 3 (Rt=14.37)	0.8617*	-0.4538	0.0083	-0.2435
COPRO I	0.4698	-0.0820	0.1061	0.1265
COPRO III	0.8290*	-0.3444	-0.2721	-0.2590
U-peak 4 (Rt=15.77)	-0.2248	0.0266	0.2297	0.8868*
Total porphyrins	0.9893*	-0.4734	-0.4304	-0.3555
COPRO /URO ratio	0.8778*	-0.4436	-0.3913	-0.5181
ALA	0.7504 ^Δ	0.0451	0.0208	0.7585*

Δ: P < 0.05

ND: under detection limit

カルボキシルポルフィリンⅠ型異性体、対照群男性のウロー、ヘプター、ペンタⅢーポルフィリンに有意な正の相関が観察された。また、各種ポルフィリンは男性より

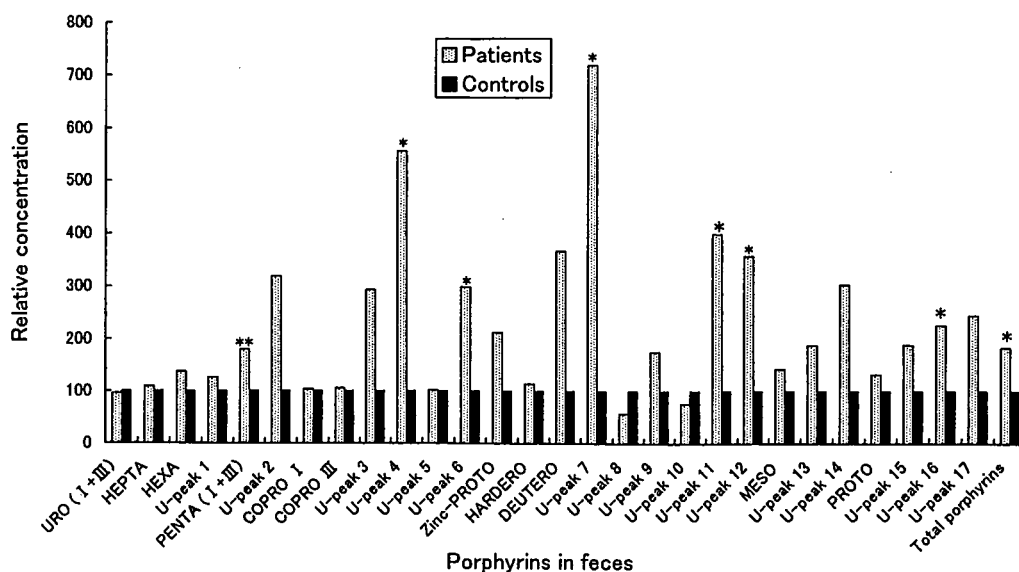


図 2 Comparison of the average fecal porphyrin concentrations between the patients and controls. The average values for the controls were fixed at 100 (units), and then the corresponding relative values for the patients were calculated. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ as compared with the controls.

表4 中国貴陽市郊外高峰村住民の身体的特徴及び摂取栄養素量

1 男女別

	人数	年齢(歳)	身長(cm)	体重(kg)	BMI
全体	30	16.89 ± 15.5	123.8 ± 25.2	29.3 ± 16.0	17.95 ± 2.94
男	12	13.69 ± 11.2	124.2 ± 30.3	28.7 ± 18.5	17.86 ± 18.46
女	18	19.03 ± 17.8	123.6 ± 22.4	29.8 ± 14.7	18.01 ± 3.192

	人数	熱量(kcal)	蛋白質(g)	脂肪(g)	食物繊維(g)	炭水化物(g)	灰分(g)
全体	30	1080 ± 600	31.56 ± 18.5	20.2 ± 18.3	8.406 ± 7.885	187.01 ± 111.9	5.462 ± 4.03
男	12	1271 ± 838	33.79 ± 19.2	18.1 ± 10.9	8.745 ± 7.827	225.34 ± 156.7	6.462 ± 5.15
女	18	953.5 ± 344	30.07 ± 18.4	21.7 ± 22.1	8.18 ± 8.141	161.45 ± 61.33	4.794 ± 3.05

	人数	ビタミンA(μg)	ビタミンB1(μg)	ビタミンB2(μg)	ビタミンC(mg)	ビタミンE(mg)	βE+γE(mg)	δE(mg)
全体	30	33.41 ± 50.4	745.8 ± 787	147 ± 132	0.495 ± 0.319	0.4451 ± 0.308	11.77 ± 159	10.6 ± 10.2
男	12	36.36 ± 32.8	997.6 ± 1082	198 ± 172	0.575 ± 0.426	0.5575 ± 0.401	13.91 ± 10.8	16.5 ± 10.1
女	18	31.44 ± 80.2	577.9 ± 502	114 ± 87.5	0.442 ± 0.219	0.3702 ± 0.203	10.52 ± 8.2	85.1 ± 94.2

	人数	カリウム(mg)	ナトリウム(mg)	カルシウム(mg)	マグネシウム(mg)	鉄(mg)	マンガン(mg)	亜鉛(mg)	銅(mg)	セレン(μg)
全体	30	1392 ± 1213	184.4 ± 179	229 ± 188	218.2 ± 152.5	14.146 ± 8.985	4.792 ± 2.89	7.327 ± 4.29	1.18 ± 0.78	553 ± 313
男	12	1627 ± 1586	237.2 ± 240	282 ± 230	250.5 ± 190.7	16.894 ± 11.21	5.588 ± 3.79	8.575 ± 5.48	1.28 ± 0.91	627 ± 367
女	18	1236 ± 928	149.3 ± 120	193 ± 147	196.6 ± 122.2	12.314 ± 6.894	4.262 ± 2.06	6.495 ± 3.18	1.12 ± 0.71	503 ± 270

2 年齢別

	人数	年齢(歳)	身長(cm)	体重(kg)	BMI
0~9歳	14	5.45 ± 2.49	99.85 ± 11.4	14.9 ± 4.06	15.47 ± 0.932
10~19歳	5	11.9 ± 1.95	126.6 ± 6.19	27.3 ± 3.45	16.97 ± 0.761
20~29歳	6	26.33 ± 1.21	152.1 ± 8.5	49.6 ± 3.56	21.48 ± 1.746
30歳以上	5	42.6 ± 16.3	149.4 ± 7.51	47.3 ± 5.37	21.14 ± 0.952

	人数	熱量(kcal)	蛋白質(g)	脂肪(g)	食物繊維(g)	炭水化物(g)	灰分(g)
0~9歳	14	805.2 ± 451	26.51 ± 21.9	19.6 ± 19.0	8.229 ± 9.761	130.02 ± 71.81	5.037 ± 4.11
10~19歳	5	1156 ± 310	35.08 ± 11.2	18.9 ± 6.42	7.369 ± 5.296	209.89 ± 65.46	6.055 ± 3.13
20~29歳	6	1596 ± 937	40.86 ± 19.1	12.7 ± 11.5	11.46 ± 8.157	299.85 ± 169.2	7.538 ± 5.83
30歳以上	5	1157 ± 285	31.01 ± 10.3	32.5 ± 27.9	6.268 ± 2.948	188.27 ± 53.4	4.149 ± 1.29

	人数	ビタミンA(μg)	ビタミンB1(μg)	ビタミンB2(μg)	ビタミンC(mg)	ビタミンE(mg)	βE+γE(mg)	δE(mg)
0~9歳	14	30.61 ± 36.1	633.2 ± 679	136 ± 112	0.40 ± 0.30	0.3856 ± 0.264	10.28 ± 10.5	10.83 ± 137
10~19歳	5	38.21 ± 51.9	760.4 ± 667	165 ± 113	0.504 ± 0.319	0.4265 ± 0.261	11.55 ± 6.87	109.4 ± 141
20~29歳	6	7.12 ± 9.75	1145 ± 1311	198 ± 226	0.738 ± 0.393	0.6402 ± 0.488	14.65 ± 11.5	202.3 ± 259
30歳以上	5	67.98 ± 93.7	567.6 ± 276	103 ± 43.8	0.462 ± 0.462	0.3964 ± 0.117	13.35 ± 5.01	50.84 ± 45.9

	人数	カリウム(mg)	ナトリウム(mg)	カルシウム(mg)	マグネシウム(mg)	鉄(mg)	マンガン(mg)	亜鉛(mg)	銅(mg)	セレン(μg)
0~9歳	14	1354 ± 1218	182.2 ± 161	223 ± 172	190.2 ± 165.3	10.99 ± 8.76	3.858 ± 3.01	5.714 ± 4.18	1.02 ± 0.89	464 ± 339
10~19歳	5	1184 ± 1012	201.1 ± 144	255 ± 140	216.0 ± 107.4	16.32 ± 6.32	5.191 ± 2.08	8.222 ± 3.04	1.26 ± 0.50	588 ± 192
20~29歳	6	2005 ± 1750	237.2 ± 298	315 ± 288	305.3 ± 199.6	17.03 ± 11.79	6.726 ± 3.81	9.511 ± 5.96	1.72 ± 0.83	727 ± 403
30歳以上	5	972 ± 394	166.6 ± 101	116 ± 50.2	194.1 ± 61.24	17.36 ± 7.46	4.536 ± 0.79	8.328 ± 2.12	0.91 ± 0.36	557 ± 146

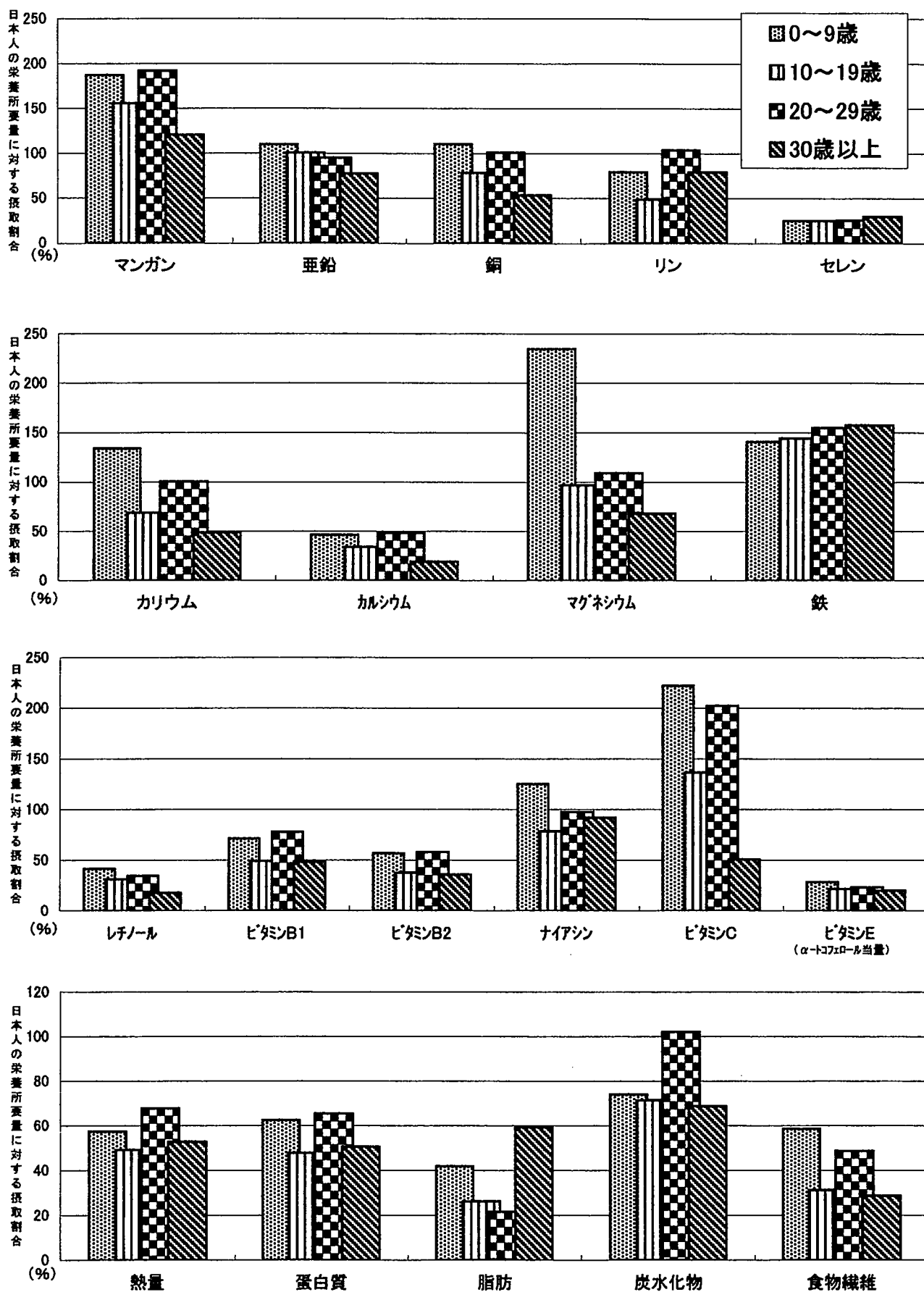


図3 調査地区の栄養素等の摂取状況

までは男女ともに日本人の身長と体重の平均値はほぼ同じであったが、10歳以降から低身長、低体重が認められた。特に第2次成長期である10～19歳にその影響が著しかった。図3は摂取栄養素状況を日本人の栄養所要量と比較した。図より、殆どの栄養素において、著明な変動が見られ、特にセレン、カルシウム、レチノール、ビタミンEはすべての世代で日本人の栄養所要量の50%以下であった。また、10～19歳の各栄養素の摂取量が他世代に比べて低下していた。一方、マンガン、鉄は日本人に比べて摂取量が1.5～2倍多かった。

表5は現地で採取した石炭、馬糞、豚肉、灰および野菜中の微量元素を示した。豚肉および野菜については比較として日本の食品成分表に記載されている豚肉及びホウレンソウをあげた。表より、石炭中のヒ素濃度は少なく、Al, Feが比較的多く、一般的に用いられている石炭と同じであった。馬糞については比較するデータがないが石炭と同じ傾向であった。豚肉ではMg, Mn, Baが日本と比較して少なく、Ni, Cu, Mo, Snが多く含有していた。野菜ではMg, Mn, Cu, Mo, As, Sr, Baの含有量が著明に高値であった。

考 察：

石炭燃焼型のヒ素中毒では、住民が排煙設備の備わっていない簡易型のかまどを使用し、ヒ素含有量の高い石炭を燃焼させ、炊飯、暖房、調理した結果、室内の空気や食物が汚染され、消化器や呼吸器が障害される慢性の中毒であるが、現在ではヒ素含有量の高い鉱山が閉鎖され、炉、かまどの改良などの予防措置が初歩的にはあるが実現されているという。しかし、対照群の尿中ヒ素濃度が10年前に調査された文献値 $70 \mu\text{g/L}^{6)}$ とほぼ同じ結果であったのに反して、患者群のヒ素濃度は $400 \mu\text{g/L}^{6)}$ に対して、今回は163.6と約40%に減少しているが、それでもなお患者群で有意に高値であり、ヒ素汚染の早急な改善策が期待される。また、他の微量元素との関係では、対照群に比し患者群ではCu, Ga, Snの濃度が有意に高い結果を得たが、これはおそらく、石炭の燃焼産物としてヒ素とともに摂取され、尿中排泄が増加するものと思われるが、ヒ素濃度との間に有意な相関関係は見出されなかった。同時にSr, Cr, Ti, Rbが患者群で有意に低下し、Al, Ba, Mn, Ni, Seの各元素濃度は検出限界以下であったが、ヒ素濃度との間に有意な関係は見られなかった。Seは体内でHg, Ga, Pb, Snなどの有害元素との毒性を抑制すると同時にSe自身のもつ毒性も緩和されるという相互作用を持つことが広く知られているが、患者群の尿中排泄が減少していることは重要である。現在ヒ素中毒の有効な治療法はなく、これまでに体内にヒ素が侵入した場合のヒ素の除去薬としてBAL(2,3-dimercapto-1-propanol)が利用されているが、我々が行った動物実験ではBAL投与によって肝ポルフィリン・ヘム代謝に著明な影響を与えることがわかっている(未発表)。そこで、我々はマウスを用いた急性および亜急性ヒ素中毒モデルを作成し、これにSe欠乏食を与えた場合と過剰投与した場合の多元素動態を現在追及しているところであり、今後の結果に期待したい。

一方、生体重要色素であるヘムの合成およびその代謝には多くの薬物、金属などの化学物質の影響を受けることがわかっており、ヒ素においてもポルフィリン・ヘム代謝が鋭敏に影響を受けることが動物実験⁷⁻¹⁰⁾および日本国内のヒ素曝露歴のあるヒト¹¹⁾で証明されているが、それによると、ヒ素中毒には動物種差、曝露方法の違い、性差、マウスでは系統による違いなどがあることがわかっている。今回の研究においても尿中ポルフィリン代謝産物の排泄異常があり、生体影響の指標として有用であることがわかった。また、糞便中の

表5. 各種生活環境試料中の微量元素濃度 ($\mu\text{g/g}$)

	石炭	馬糞	豚肉	日本の豚肉 ^{a)}	灰	野菜	日本のホウレンソウ ^{a)}
Li	350.7	21.4	0.93	0	0.12	0.15	0
Be	8.51	0.45	0.00	0.01	0.00	0.00	0.00
Mg	2487.7	2209.6	459.1	0.29	2211.4	8136.4	0.87
Al	9380.3	2955.5	12.48	3.2	12.54	13.65	9.7
Sc	18.56	1.58	0.77	0	0.80	0.21	0
Ti	6.69	14.52	1.79	0.25	1.22	1.20	0.58
V	61.02	12.11	0.58	0	0.16	0.19	0
Cr	35.46	6.77	0.58	0.41	0.36	0.34	0.11
Mn	60.61	301.04	9.53	0.24	48.80	54.31	2.5
Fe	9518.9	6956.2	127.4	18	89.9	180.4	37
Ni	33.03	6.44	0.37	0.49	0.45	2.34	0
Cu	39.35	12.62	2.19	3.6	8.20	10.80	0.98
Zn	12.21	75.44	65.82	38	19.59	40.74	7.3
Ga	13.54	2.26	0.31	0	0.06	0.06	0
Ge	3.65	0.91	0.36	0	0.05	0.06	0
Mo	0.42	2.59	0.04	0.2	1.63	8.62	0.08
As	7.88	5.99	0.88	0.4	0.26	0.83	0.05
Se	12.89	3.46	1.59	0.4	0.29	0.80	0
Rb	7.65	38.30	12.42		20.14	23.05	
Sr	60.64	20.76	2.04	0.28	3.18	62.64	0.29
Ag	0.32	0.05	0.00		0.00	0.01	
Cd	0.299	0.899	0.095	0.000	0.350	0.076	0
In	0.58	0.41	0.38		0.38	0.38	
Sn	1.27	0.78	0.59	1.6	0.44	0.46	0
Sb	0.186	0.250	0.119	0.000	0.231	0.907	0.400
Cs	2.49	0.99	0.09		0.11	0.07	
Ba	8.65	17.70	0.71	0.06	2.27	5.98	0.01
Ce	74.52	19.35	0.61		0.30	0.59	
Pb	35.55	12.02	1.78	0	0.89	1.56	0
Bi	2.11	0.44	0.25	0	0.19	0.19	0
U	7.23	0.89	0.04		0.00	0.03	

^{a)}日本食品成分表に記載されている数値。(July, 2001, 貴陽市郊外にて採取)

ポルフィリン排泄の異常については、ヒ素中毒によって腸内細菌に変化が生じ、各種ポルフィリンが過剰生産されたものと推測され、ヒ素中毒による皮膚がんや消化器がんの発生と何らかの因果関係があることが推測される。

以上の結果は、生体に取り込まれたヒ素はポルフィリン代謝の主要臓器である肝臓や骨髄、さらに腸内細菌叢や体内の微量元素の代謝に何らかの影響を及ぼしている事がわかったが、ヒ素と他金属との相互影響を追及するには、これまでの多くのデータを詳細に検討すると必要がある。現在、我々は急性、亜急性ヒ素中毒並びにセレン欠乏・過剰との組み合わせなどの動物実験を行っており、ヒ素と他金属の相互影響を追及することによって、ヒ素の生体影響および治療への応用が可能となるよう検討しており、ヒ素中毒の早期診断法の確立を含め、本研究課題を遂行するための基礎・臨床を含めた総合的・科学的アプローチが行われている。

さらに、ヒ素の健康影響解明として栄養・食生活など公衆栄養上の問題は極めて重要であることから、今回、ヒ素中毒患者の多発地帯である興仁地区などの慢性ヒ素中毒発生地（興仁県、興義市、安龍県、開陽県、織金県など）の食生活を中心とした生活習慣調査を企画したが、外国人の立入は今回は禁止ということで、急遽場所を変更し、貴陽市内から車で約5時間の友里県高峰村¹²⁾を調査対象とした。ここでは、湧水による慢性フッ素中毒に加え、生活燃料は石炭が中心であり、1995年に簡単な栄養及び健康調査が行なわれているが、その後は行われていない。そこで今回の調査では表4、5および図3に示した様に、栄養上の多くの問題を抱えていることが明白となった。今後、個別的に毛髪中の元素(未測定)濃度変動を含めて摂取栄養素との関係を追及することが重要であり、それによって各種体内元素の挙動を環境・栄養学的に追及し、これまでに未知の分野であった微量元素の栄養学的、生化学的基礎資料作成に十分貢献できることを期待している。

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 15：2-21 (2001).
- 2) Finkelman RB et al.: Health impact of domestic coal use in China. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96:3427-3431 (1999).
- 3) Xie Y, Kondo M et al.: Urinary porphyrins in patients with endemic chronic arsenic poisoning caused by burning coal in China. Env. Health. Prev. Med. 5(4):180-185 (2001).
- 4) Xie Y, Kondo M et al.: Element concentrations in urine of patients suffering from chronic arsenic poisoning. Tohoku J. Exp. Med. 193:229-235 (2001).
- 5) 近藤雅雄：ポルフィリン、ポルフィリン前駆体の測定法. 特集ポルフィリン症、日本臨牀社 (1995).
- 6) Zhou YS et al.: Investigation of chronic arsenic poisoning caused by high arsenical coal pollution. Chinese J. Prev. Med (in Chinese). 27:147-150 (1993).
- 7) Kondo M, Ichikawa I: Different acute effects of oral and intratracheal of disodium arsenate and gallium arsenide on heme synthesis in rats. Appl. Organomet. Chem. 8:215-221 (1994).
- 8) Kondo M et al.: Acute effects of orally administered gallium arsenide, gallium nitrate and disodium arsenate on the heme synthesis in male and female mice. Appl. Organomet. Chem. 10:689-696 (1996).
- 9) Kondo M et al.: Changes in porphyrin metabolism in the liver, kidney and spleen following a single oral dose of an inorganic arsenic compound in mice. Porphyrins 7:452-457 (1998).
- 10) Kondo M, Ichikawa I: Acute effects of orally administered sodium arsenate on heme biosynthetic enzymes in the tissues of mice of three strains. Appl. Organomet. Chem. 13:1-6 (1996).
- 11) 近藤雅雄他：慢性ヒ素被曝経験者のポルフィリン代謝異常、ポルフィリン 7：51-57 (1998).
- 12) 近藤雅雄：貴州省におけるヒ素中毒の発症機序解明と健康リスク評価およびその手法の開発などに関する日中共同研究. 日中医学 16：34 (2001).

作成日：2002年3月15日

資料：栄養調査表（食事摂取量状況）

イニシャル（ ） 性別（男・女） 年齢（ ） 身長（ cm） 体重（ kg）

調 食 物	査 食 物 種 類		食 事 記 録			
	早(朝)	中(昼)	夜(夜)	早(朝)	中(昼)	夜(夜)
主食	(1) 大米	(2) 高粱	(3) 苞米	(4) 面包		
	(5) 饅頭	(6) 面条	(7) 小米粥			
	(8) 大米粥	(9) 地瓜	(10) 小米			
	(11) 油条	(12) 其他				
	(1) 猪肉	(2) 牛肉	(3) 羊肉	(4) 羊肉		
肉類	(5) 狗肉	(6) 蛇肉	(7) 鴨肉	(8) 鷄鳥肉		
	(9) 馬肉	(10) 其他				
	(1) 雞蛋	(2) 鴨蛋	(3) 鷄鳥蛋	(4) 其他		
蛋類	(1) 鯉魚	(2) 帶魚	(3) 蝦	(4) 蝦米		
	(5) 貝	(6) 其他				
水產	(1) 大豆	(2) 豆腐	(3) 油豆腐	(4) 豆漿		
	(5) 干豆腐	(6) 其他				
豆類	(1) 牛乳	(2) 羊乳	(3) 乳粉	(4) 其他		
	(1) 白菜	(2) 土豆	(3) 大根	(4) 韭菜		
乳類	(5) 青椒	(6) 大蒜	(7) 黃瓜	(8) 豆角		
	(9) 茄子	(10) 菠菜	(11) 芹菜			
	(12) 大頭菜	(13) 西紅柿	(14) 胡羅卜			
	(15) 玉蔥	(16) 海藻	(17) 其他			
	(1) 豆油	(2) 猪油	(3) 菜油	(4) 其他		
油類	(1) 平菓	(2) 梨	(3) 桔子	(4) 香蕉		
	(5) 波羅	(6) 櫻桃	(7) 西瓜	(8) 花生		
	(9) 香瓜	(10) 其他				
	(1) 茶	(2) 咖啡	(3) 桔水	(4) 汽水		
水果	(5) 其他					
	(1) 砂糖	(2) 果糖	(3) 紅糖	(4) 其他		
飲料	(1) 中國酒	(2) 外國酒	(3) 果酒			
	(4) 啤酒	(5) 米酒	(6) 其他			

仁シヤル () 性別 (男・女) 年齡 () 身長 (cm) 體重 (kg)

1. 身体表面・病状態調査表

体 型	<input type="checkbox"/> 浮腫 <input type="checkbox"/> 低体重 <input type="checkbox"/> 腹部過肥 <input type="checkbox"/> 肥満 <input type="checkbox"/> 正常 <input type="checkbox"/> 其他 ()
骨 格	<input type="checkbox"/> 軟骨 <input type="checkbox"/> 松骨質 <input type="checkbox"/> 四肢變形 <input type="checkbox"/> 側彎症 <input type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> 其他 ()
皮 膚	<input type="checkbox"/> 乾燥 <input type="checkbox"/> 出血 <input type="checkbox"/> 色素沈着 <input type="checkbox"/> 色素脫失 <input type="checkbox"/> 無彈力 <input type="checkbox"/> 角化斑 <input type="checkbox"/> 肥厚 <input type="checkbox"/> 日光過敏症 <input type="checkbox"/> 爪・指變形・萎縮 <input type="checkbox"/> 癬痕 <input type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> 其他 ()
肌 肉	<input type="checkbox"/> 松弛 <input type="checkbox"/> 疼痛 <input type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> 其他 ()
口 唇	<input type="checkbox"/> 口角潰瘍 <input type="checkbox"/> 干裂 <input type="checkbox"/> 口內炎 <input type="checkbox"/> 無 其他 ()
齒 部	<input type="checkbox"/> 斑狀齒 <input type="checkbox"/> 齒銀出血 <input type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> 其他 ()
舌 頭	<input type="checkbox"/> 水腫 <input type="checkbox"/> 龜裂 <input type="checkbox"/> 過紅 <input type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> 其他 ()
顏 部	<input type="checkbox"/> 蒼白 <input type="checkbox"/> 出油 <input type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> 其他 ()
眼 部	<input type="checkbox"/> 眼球乾燥 <input type="checkbox"/> 充血 <input type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> 其他 ()
毛 發	<input type="checkbox"/> 無光澤 <input type="checkbox"/> 過細 <input type="checkbox"/> 過薄 <input type="checkbox"/> 多毛 <input type="checkbox"/> 落發 <input type="checkbox"/> 色素異常 <input type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> 其他 ()
內分泌	<input type="checkbox"/> 甲状腺腫 <input type="checkbox"/> 糖尿 <input type="checkbox"/> 其他 <input type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> 其他 ()
神 經	<input type="checkbox"/> 精神錯亂 <input type="checkbox"/> 運動麻痺 <input type="checkbox"/> 知覺障害 <input type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> 其他 ()
循環器	<input type="checkbox"/> 高血壓 <input type="checkbox"/> 低血壓 <input type="checkbox"/> 頻脈 <input type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> 其他 ()
腹 部	<input type="checkbox"/> 腹痛 <input type="checkbox"/> 嘔吐 <input type="checkbox"/> 便秘 <input type="checkbox"/> 下痢 <input type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> 其他 ()
本人病症	<input type="checkbox"/> 心臟病 <input type="checkbox"/> 糖尿病 <input type="checkbox"/> 腎炎 <input type="checkbox"/> 肝病 <input type="checkbox"/> 肺炎 <input type="checkbox"/> 胃病 <input type="checkbox"/> 癌 () <input type="checkbox"/> 腸炎 <input type="checkbox"/> 結核 <input type="checkbox"/> 風濕 <input type="checkbox"/> 貧血 <input type="checkbox"/> 皮膚病 <input type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> 其他 ()
既往症	<input type="checkbox"/> 心臟病 <input type="checkbox"/> 糖尿病 <input type="checkbox"/> 腎炎 <input type="checkbox"/> 肝病 <input type="checkbox"/> 肺炎 <input type="checkbox"/> 胃病 <input type="checkbox"/> 癌 () <input type="checkbox"/> 腸炎 <input type="checkbox"/> 結核 <input type="checkbox"/> 風濕 <input type="checkbox"/> 貧血 <input type="checkbox"/> 皮膚病 <input type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> 其他 ()

2. 家族歴

○祖父 ☆祖母 △姥爺 ※姥姥	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> 高血壓 <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> 心臟病 <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> 糖尿病 <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> 腎炎 <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> 貧血 <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> 肝病 <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> 肥満 <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> 肝癌 <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> 肺癌 <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> 胃癌 <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> 子宮癌 <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> 乳癌 注：請把親屬的符 號添入方格內 <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> 食道癌 <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> 大腸癌 <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> 直腸癌 <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> 結核 <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> 皮膚癌 <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> 其他病 <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> 死亡年齡 ()
○父 △母 注：請把親屬的符 號添入方格內	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> 高血壓 <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> 心臟病 <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> 糖尿病 <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> 腎炎 <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> 貧血 <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> 肝病 <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> 肥満 <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> 肝癌 <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> 肺癌 <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> 胃癌 <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> 子宮癌 <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> 乳癌 <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> 食道癌 <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> 大腸癌 <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> 直腸癌 <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> 結核 <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> 皮膚癌 <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> 其他病 <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> 死亡年齡 ()
○兄 △姉 ☆妹 ※弟 注：請把親屬的符 號添入方格內	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> 高血壓 <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> 心臟病 <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> 糖尿病 <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> 腎炎 <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> 貧血 <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> 肝病 <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> 肥満 <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> 肝癌 <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> 肺癌 <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> 胃癌 <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> 子宮癌 <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> 乳癌 <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> 食道癌 <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> 大腸癌 <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> 直腸癌 <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> 結核 <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> 皮膚癌 <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> 其他病 <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> 死亡年齡 ()

3. 食生活環境調査表

問 題	回 答
職業	<input type="checkbox"/> 工人 <input type="checkbox"/> 農民 <input type="checkbox"/> 軍人 <input type="checkbox"/> 商人 <input type="checkbox"/> 事務 <input type="checkbox"/> 技術 <input type="checkbox"/> 學生 <input type="checkbox"/> 主婦 <input type="checkbox"/> 無業
同居人口	<input type="checkbox"/> 祖父 <input type="checkbox"/> 祖母 <input type="checkbox"/> 父 <input type="checkbox"/> 母 <input type="checkbox"/> 夫 <input type="checkbox"/> 妻 <input type="checkbox"/> 兒 <input type="checkbox"/> 兄 <input type="checkbox"/> 姊 <input type="checkbox"/> 其他 ()
有工作的	<input type="checkbox"/> 祖父 <input type="checkbox"/> 祖母 <input type="checkbox"/> 父 <input type="checkbox"/> 母 <input type="checkbox"/> 夫 <input type="checkbox"/> 妻 <input type="checkbox"/> 兒 <input type="checkbox"/> 兄 <input type="checkbox"/> 姊 <input type="checkbox"/> 其他 ()
本人職業勞働強度	<input type="checkbox"/> 重 <input type="checkbox"/> 中 <input type="checkbox"/> 輕 <input type="checkbox"/> 無
室內上下水	上水： <input type="checkbox"/> 有 <input type="checkbox"/> 無， 下水： <input type="checkbox"/> 有 <input type="checkbox"/> 無 家庭總居住面積： 平方米
常用飯鍋種類	<input type="checkbox"/> 電飯鍋 <input type="checkbox"/> 鉄鍋 <input type="checkbox"/> 呂鍋 <input type="checkbox"/> 其他
常用作飯能源	<input type="checkbox"/> 煤 <input type="checkbox"/> 電 <input type="checkbox"/> 煤氣 <input type="checkbox"/> 油 <input type="checkbox"/> 木柴 <input type="checkbox"/> 植物叶 <input type="checkbox"/> 其他
常用燃料源	<input type="checkbox"/> 煤 <input type="checkbox"/> 電 <input type="checkbox"/> 煤氣 <input type="checkbox"/> 油 <input type="checkbox"/> 木柴 <input type="checkbox"/> 植物叶 <input type="checkbox"/> 其他

4. 生活習慣和健康調査表

問 題	回 答
每星期都安排食譜	<input type="checkbox"/> 有 <input type="checkbox"/> 無
烹 調	<input type="checkbox"/> 愛好 <input type="checkbox"/> 不愛好 <input type="checkbox"/> 生活被迫
家庭食事	<input type="checkbox"/> 講究 <input type="checkbox"/> 一般 <input type="checkbox"/> 不講究 <input type="checkbox"/> 吃飽即可
每週烹調回数	() 回
最喜歡的味	<input type="checkbox"/> 酸 <input type="checkbox"/> 甘 <input type="checkbox"/> 辛 <input type="checkbox"/> 塩 <input type="checkbox"/> 淡 <input type="checkbox"/> 油貳 <input type="checkbox"/> 清淡
平時零食	<input type="checkbox"/> 一般 <input type="checkbox"/> 經常 <input type="checkbox"/> 不經常 <input type="checkbox"/> 喜歡 <input type="checkbox"/> 不喜歡
睡眠時間	起床時間 () 入眠時間 ()
酒類最喜歡	<input type="checkbox"/> 高度白酒 <input type="checkbox"/> 低度酒 <input type="checkbox"/> 果酒 <input type="checkbox"/> 脾酒 一日几兩 ()
香煙最喜歡	<input type="checkbox"/> 辛煙 <input type="checkbox"/> 中度 <input type="checkbox"/> 輕度 <input type="checkbox"/> 不吸 一日几支 ()
担心發胖	<input type="checkbox"/> 担心 <input type="checkbox"/> 一般 <input type="checkbox"/> 喜歡
過敏體質	<input type="checkbox"/> 有 <input type="checkbox"/> 無

2001年度日中医学協会共同研究等助成事業報告書

－在留中国人研究者研究助成－

2002 年 3 月 14 日

財団法人 日中医学協会
理事長 殿

研究者氏名 関 新
所属機関名 信州大学医学部附属加齢研究センター
指導責任者氏名 谷口 俊一郎
職 名 大学院生
所 在 地 〒390-8621 松本市延 3-1-1
電 話 0263-372722 内線

1. 研究テーマ

ヒトメラノーマにおいて ASC の発現低下と異常メチル化

2. 本年度の研究業績

(1) 学会・研究会等における発表 ☒ 有 ・ ☐ 無 (学会名・演題)

1. 2002.04.6-10 「The adapter protein ASC is down-regulated in human melanoma」
を発表。(American Association for Cancer Research 93rd, Annual Meeting)
2. 2001.9.26 「メラノーマにおけるアポトーシス関連遺伝子 ASC の発現抑制」
(第 60 回日本癌学会総会)
3. 2001.9.26 「ヒト大腸癌における ASC の発現及び methylation との相関」
(第 60 回日本癌学会総会)

(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

- 一. 今までの研究を続けて、ASC の遺伝子を ASC 発現しない Melanoma cell line の中に transfection して、In vitro で、ASC 遺伝子導入後の細胞の形質変化、増殖などを観察すると同時に、nude mouse の体に注射して、ASC は腫瘍の形成と増殖に対しての in vivo の作用も観察する。ASC の機能を更に明確にすることです。
- 二. 現在、私が所属する研究室で開発している in situ methylation PCR の方法を利用して、Human melanoma 組織切片上、ASC の発現と methylation との関係を調べます。

4. 指導責任者の意見

関さんは私達の研究室で見い出したアポトーシス、炎症などに関わる新規の遺伝子 ASC の機能解析、ASC 遺伝子の発現調節機序の研究に携っています。機能についてはノックアウトマウスの作成、発現についてはメチレーションの有無の検討を具体的に進展させています。いずれも非常に重要な課題であります。関さんはその研究を着実に進めています。

語学、論文の理解が極めて優れており、稀にみる優秀な院生です。性格も穏やかで、協調性もあり、将来においても非常に期待できる人材と思います。

指導責任者氏名

谷口 俊一郎



5. 研究報告書

別紙報告書作成要領により、添付の用紙で研究報告書を作成して下さい。

研究発表中または研究中の本人のスナップ写真を添付して下さい。

※研究成果を発表する場合は、発表原稿・抄録集等も添付して下さい。

※発表に当っては、日中医学協会助成金による旨を明記して下さい。

ヒトメラノーマにおいて ASC の発現低下と異常メチル化

研究者氏名	関 新
中国所属機関	中国北京中日友好医院産婦人科レジデント
日本研究機関	信州大学医学部付属加齢研究センター環境適応分野
指導責任者	教授 谷口 俊一郎
共同研究者	相良 淳二、増本 純也、横山 太郎、小金平 容子

Abstract

ASC (Apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD) is an adapter protein containing two interaction domains, a pyrin homology domain and a caspase-recruitment domain (CARD). ASC forms filament-like aggregates during apoptosis induced by various anti-tumor drugs in HL-60 cells (Masumoto et al. JBC.1999). It is reported that aberrant CpG methylation is involved in ASC gene silencing in breast cancers (Conway et al. Cancer Res. 2000). To investigate whether ASC also lost function in other cancers, we surveyed ASC expression and its methylation status of CpG island in human melanoma. First, in 12 human melanoma cell lines, western blot analysis shows that 7 of 12 express lower or little ASC protein. According to methylation specific PCR, 2 of 12 cell lines were completely methylated and failed to express ASC. 5 of 12 cell lines were partially methylated, 2 of 5 methylation positive cell lines express lower or little ASC levels. Furthermore, immunohistochemical staining showed that in 28 cases of human melanoma tissues, 21 cases (70%) ASC expression density was lower than that in normal pigment and benign tumor tissues. In addition, fifty percent (5 of 10) of primary melanoma tissues exhibited hypermethylation in the CpG island of ASC gene. Thus, our data suggest that ASC is down regulated in melanomas and the suppression is partially mediated by hypermethylation.

Key Words CARD, PYRIN, Methylation, Apoptosis, ASC

Introduction

ASC is an adapter protein that is composed of two interaction domain, a N-terminal PYRIN-domain (PYD) and a caspase-recruitment domain (CARD), forms filament-like aggregates during apoptosis induced by anti-tumor drugs in HL-60 cells (9). The PYRIN domain belongs to the death domain-fold superfamily that also includes the CARD domain, and death effector domain (12, 15, 16, 21, 22). The PYRIN family members function in both inflammatory and apoptotic signaling (9, 19, 23, 24). Pyrin was initially identified as the product of the MEFV gene, which is mutated in patients with familial Mediterranean fever (5,6), a hereditary periodic fever syndrome characterized by episodic fever and serosal or synovial inflammation. CARD (caspase recruitment domain) was identified as the region with significant similarity to the RAIDD and ICH-1 N-terminal domains. ICH-1, Ced-3, and Mch6, all proteins containing the CARD, have been reported to act in apoptotic signal (7).

DNA methylation occurring in cytosine residues in CpG dinucleotide sequences is a characteristic feature of many vertebrate genomes (1). It is crucial for development and differentiation (2,3). ASC was reported by Vertino et al (called *TMS1*) that aberrant CpG methylation is involved in ASC gene silencing in breast cancers, and suggested perhaps in other cancers (6). In this study, we investigated ASC expression in both human melanoma cell lines and melanoma tissues. We found that expressed low or little protein levels in some melanoma cell lines and tissues, we also examined the methylation status in these melanoma cell lines and some melanoma tissues, some of them showed methylation. The lower

expression of ASC in cancer maybe an evidence that ASC is a tumor suppressor, and the aberrant methylation in the CpG island of ASC is one of the reason of ASC. This result is consistent with the result reported in breast cancer (6).

Materials and Methods

Cell line and Primary Tissue.

C32TG, WM35, WM793, MEWO, VMRC-MELG and A4/Fuk were obtained from RIKEN cell bank and maintained in RPML1640 plus 10% FBS. A2058 and GAK were obtained from Japan Health Science Foundation, A2058 was maintained in MEDM plus 10% FBS, GAK was maintained in Harm 12 plus 10% FES. HMV-I, HMV-II, SK-Mel-28 and G361 were obtained from the University of Tohoku, HMV-I was maintained in DMEM plus 10% FBS, G361 and SK-Mel-28 were maintained in RPML 1640 plus 10% FBS. HMV-II was maintained in Ham's 12 plus 10% FES. Primary tissues from melanoma were obtained immediately after surgical resection at dermatology department of Shinshu University, school of Medicine and frozen at -80°C .

Bisulfite Modification, MSP and Sequence.

Genome DNA was extracted from Melanoma cell lines using the PUREGENE DNA Isolation Kit (USA, Minneapolis). 1 μg of DNA was treated with sodium bisulfite, using CpGenome DNA Modification Kit (Intergene, USA, NW), according to the manufacture's instruction. Following conversion, the bisulfite-treated DNA was resuspended in a total volume of 25 μl of distilled water. Approximately 50ng of bisulfite modified DNA was amplified by PCR, based on sequence differences resulting from bisulfite modification, with the following reaction condition: 2mM MgCl_2 , 0.2 mM each dNTP, 0.5 μM each primer, 1 units of AmpliTaq Gold (Perkin-Elmer, Foster City, CA) in a 50 μl reaction. The reaction was started with 9 min, 95°C , followed by 43 cycles of PCR (95°C , 30 s; 60°C 60s). Reaction products were separated by electrophoresis on a 3% agarose gel, stained with ethidium bromide, and photographed. Primers were designed as described by Vertinal et al (5). The PCR products were purified with Geneclean II kit (USA, CA), and processed to sequence using ABI PRISM TM 310 Genetic Analyzer.

Western blotting analysis

The human melanoma cells were homogenized with an ultrasonicater, mixed with the same volume of double-strength laemmli sample buffer (laemmli 1970), and then boiled for 15 min at 65°C . These samples were subjected to electrophoresis in 14% SDS-polyacrylamide gels. Proteins were transferred onto nitrocellulose membrane (Immobilon-P, Millipore, Bedford, MA) with an electroblotter (2mA/cm², 1.0h). Blots were blocked in TBS with 0.1% Tween 20, 1% bovine serum albumin (BSA), 5% skimmed milk for 60 min, followed by incubation with primary anti-ASC mono-clone Ab (1:1000) diluted in TBS containing 5% FBS and 0.1% Tween20 for 1 h at room temperature. After several washes, blots were incubated with horseradish peroxidase-conjugated anti-mouse IgG Ab (Amersham International, UK) for 1 h at room temperature and washed again. Immunoblots were developed using the ECL Western blotting system (Amersham).

Immunohistochemical staining

Immunohistochemical analysis of ASC was carried out using the anti-ASC monoclonal antibody developed in our previous study (4). Paraffin-embedded blocks of human melanoma tissues was performed immunohistochemical staining using the anti-ASC monoclonal Ab and a universal DAKO LSAB (Dako, Carpenteria, CA) followed by hematoxylin or Giemsa counterstainig. Omitting the primary antibody from the staining procedure performed a control experiment, and no specific staining was found.

Result

We examined ASC expression in a series of 12 cell lines derived from metastatic melanomas. As determined by

protein immunoblotting, 5 of 12 human melanoma cell lines expressed ASC levels comparable to those of normal melanocytes, seven showed intermediate or little ASC levels, even of them lost the expression of ASC (Fig. 1a). RT-PCR (Fig. 1 b) showed similar result to the Western Blotting analysis. The genome DNA of ASC in these melanoma cell lines was sequenced, no mutations in ASC were detected (Data not shown), which suggest the remaining ASC allele is transcriptionally repressed. Gene silencing that arises from methylation is an important epigenetic mechanism of tumor-suppressor inactivation (12, 13). Recent studies has shown that hypermethylation of CpG island in gene promoter region is associated with loss transcription (6, 7, 8). Methylated CpGs are recognized by proteins that recruit histone deacetylases, leading to stable transcriptional repression, which can often be reversed by methylation inhibitor 5-aza-2'-deoxycytidine or by the histone deacetylase inhibitor trichostatin A (TSA) (4). To determine whether loss of ASC expression in the melanoma cell lines are related to methylation, we analyzed the methylation status of the ASC CpG island of the melanoma cell lines by a sensitive MSP technique in which methylated and unmethylated alleles can specifically amplified after chemical modification of DNA with sodium bisulfite (11) (Fig. 2). The C32TG and HMV-I melanoma cell lines exhibited complete methylation in the CpG island of ASC and failed to express the ASC protein. MEWO, WM35, SK-Mel-28, A2058, G361 et al exhibited partially methylation. Sequencing the product of MCP (data not shown) coincided with the result of MCP. If loss of ASC expression is related to methylation of the CpG island, then expression of ASC should be restored after treatment with a demethylating agent. Treatment all of the melanoma cells with DNA methyltransferase inhibitor 5-aza-2'-deoxycytidine resulted in the partial demethylation of the ASC CpG island and strongly expression of ASC. Conversely, among the cell lines of neither ASC expression nor ASC promoter region methylation, 5-aza-2dC treatment failed to recover the ASC expression. These data suggest that methylation status of the 5' CpG island in ASC promoter region is partially associated with ASC expression levels in Melanoma cell lines, but the exception indicated that there are other mechanisms that transcriptionally repress ASC expression in melanoma cell lines other than aberrant methylation.

We also investigated the ASC expression in 28 cases of melanoma tissues as showed in Fig (). Compared with the normal pigment, we found 21 (70%) cases of the melanoma cancer tissues expressed lower ASC gene. Interestingly, we found in the region where ASC was expressed, the macrophage cells were founded, this indicated that ASC maybe involved in the tumor immunity.

To determine whether aberrant methylation of ASC also played a role in primary tumors, we examined melanoma tissues for ASC methylation. The CpG island of ASC was unmethylated in normal melanocyte tissues derived from reduction mammoplasty (provided by department of dermatology, medical school of Shinshu University). 5 of 10 (50%) primary melanomas showed aberrant de novo methylation of the ASC CpG island. In some cases, the methylation degree is substantial, it is considered two reasons, the first is that the resected melanoma tissues consists of a heterogeneous mixture of tumor cells and normal cells, the second is that the methylation even in cancer cells is partially.

Discussion

ASC is an adapter protein that is composed of two interaction domain, a pyrin N-terminal homology domain (PYD) and a caspase-recruitment domain (CARD), forms filament-like aggregates during apoptosis induced by anti-tumor drugs in HL-60 cells (9). The CARD is found within the prodomain of a number of caspases, and oligomerization with upstream CARD-containing regulatory proteins mediates their cleavage and activation (8). Other CARD-containing proteins with known roles in apoptosis include the *Caenorhabditis elegans* CED-3 and CED-4, the human homologue of CED-4, apoptotic protease activating factor-1, the cellular and viral inhibitors of apoptosis, the cellular homologue of herpesvirus EHV2 E10 protein, BCL 10, and several proteins involved in the activation of NF- κ B (9). ASC was reported to be a proapoptotic factor (9,10) The PYD domain has been referred to as the PYRIN, DAPIN, PAAD and pyrin domain, and a

number of PYD-containing proteins were reported (12, 14-16). The recently identified-proapoptotic molecule DEFCAP/NAC/NALP1/CARD7 (12, 16-18), a member of the mammalian Ced-4 protein family that includes Apaf-1 and Nod1, which contain an N-terminal PYD domain and leucine-rich repeats (LRR), binds to ASC, referred to as pycard by martinin et al, via the PYD (16). The PYD domain was reported to be present in the N-terminus of zebrafish caspases, Caspy and caspy2 (19). The PYD domains of Caspy and Caspy2 correspond to CARD or DED, which are involved in protein-protein interactions that result in effector proximity (8). Recently it is reported that ASC and caspase-1 are putative signaling partners of CARD12, which function as a critical activator of specific apoptotic and proinflammatory signaling pathway (20). Bertin et al reported that ASC is activated by PYPAF, a novel PYRIN-containing NBS/LRR family member that interacts selectively with the PYRIN domain of ASC. PYPAF (also called cryopyrin) causes Muckle-Wells syndrome and familial cold urticaria (25). Thus, the ASC maybe a key adapter molecule that plays important roles in interaction with other PYD-containing molecules through its PYD and CARD domains in the upstream of NF-kappaB.

Although ASC is drawing more and more attention as a critical activator of apoptotic and inflammatory signaling pathway. But its real function is still unclear, especially its role in tumor immunity and carcinogenesis. Our study first showed ASC silenced in human melanoma, and one of the reason of ASC silencing is due to abnormal methylation which is consist with result in breast cancer (6). In addition, apoptosis is easier to introduce in ASC expression cell lines than the one in which ASC is silenced, and also the ASC expression restored by methylation inhibitor 5aza treatment promoted apoptosis induction (data not shown) support the speculation that ASC maybe function as a tumor suppressor gene.

But we also noticed that no methylation was found in 3 melanoma cell lines although the cell lines showed little ASC levels. This result indicate that other mechanisms such as loss of heterozygosity (LOH), Histone hypoacetylation maybe also can result in tumor suppress gene inactivation (26). We also analyzed the expression of ASC mRNA in purified hematopoietic cells by RT-PCR. We found CD14, and eosinophils expressed high levels of ASC mRNA. In contrast CD34⁺ and CD3⁺ expressed low level of ASC mRNA. CD20⁺ and neutrophils did not or expressed low levels of ASC mRNA. But all subsets of hematopoietic cells examined were unmethylated. (Unpublished data). So we speculate that methylation in the CpG island of ASC can result in the silencing of ASC but not necessary, and the methylation may tumor specific.

References

1. E. Li, T.H. Bestor, R. Jaenisch, Cell 69, 915 (1992).
2. M. Okano, D. W. Bell, D.A. Haber, E. Li, Cell 99, 247 (1999).
3. Bird, A. P. & Wolffe, A. P. Cell 99, 451-454 (1999).
4. The International FMF Consortium. Cell 1997, 90: 797-807.
5. The French FMF Consortium. Nat Genet 1997, 17:25-31
6. Conway K.E., McConnell B. B., Bowring C.E., Donald C.D., Warren S. T. & Vertino P. M. Cancer Res. 60; 6236-6242 (2000)
7. Hofmann, K., Bucher, P., and Tschopp, J. Trends Biochem. Sci., 22: 155-156 1997
8. Hofmann, K. Cell Mol. Life Sci., 55: 1113-1128, 1999.
9. Masumoto, J., Taniguchi, S., Ayukawa, K., Sarvotham, H., Kishino, T., Niikawa, N., Hidaka, E., Katsuyama, T., Higuchi, T., and Sagara, J. J. Biol. Chem., 274: 33835-33838, 1999.
10. McConnell B. B., and Vertino P. M. (2000) Cancer Res. 60, 6243-6247.
11. Herman, J.G., Graff, JR., Myohanen, s., Nelkin, B.D., and Baylin, S.B. Proc. natl. Acad. Sci. USA, 93:9821-9826, 1996.
12. Bertin J, DiStefano PS (2000). Cell 81: 505-512.

13. Robertson, K.D. & Jones, P.A. *Carcinogenesis* 21 461-467 (2000).
14. Staub E, Dahl E, Rosenthal A (2001). *Trends Biochem Sci* 26:83-85
15. pawlowski K, Pio F, Chu Z, Reed JC, Godzik (2001) *Trends Biochem Sci.* 26:85-87
16. Martinon F, Hofmann K., Tschopp J (2001) *Curr biol* 11: R 118-120
17. Hlaing T, Guo RF, Dilley KA, Loussia JM. Morrish TA, Shi MM., Vincenz C., Ward PA (2001). *J Biol Chem.* 276: 9230-9238.
18. Chu ZL, Pio F., Xie Z., Welsh K., Krajewska M., Krajewski S., Godzik A., Reed JC. (2001). *J Biol. Chem.* 276: 9239-9245.
19. Inohara N, Nunez G (2000). *Cell Death Differ* 7:509-510.
20. Geddes BJ, Wang L, huan WJ, Lavellee M, Manji G A, Brown Melissa, Jurman Mark, Cao J, Morgenstern J, Merriam S, Glucksmann M A, DiStefano PS, and Bertin john. And biophy. *Rea. Commu.* 284 77-82 (2001).
21. Staub, E., Dahl, E., and Rosenthal, A. (2000) *Trends Biochem. Sci.* 26, 83-85
22. Fairbrother, W. J., Gordon, N., Humke, E. W., O'Rourke, K.M., Starovasnik, M. A., Jian-Ping, Y., and Dixit, V. M. (2001) *Prot. Sci.* 10, 1911-1918.
23. Richards, N., Schaner, P., Diaz, A., Stuckey, J., Shelden, E., Wadhwa, A., gumucio, D. L. *J. bio. Chem.* In press. (epub ahead of print)
24. Centola, m., Wood, G., Frucht, D. M., Galon, J., Aringer, M., farrell, C., Kingma, D. W., Horwitz, M. E., mansfield, E., Holland, S. M., O'Shea, J. J., Rosenberg, H. F., Malech, H. L., and kastner, D. L. (2000) *blood* 95, 3223-3231.
25. Hoffman, H.M., Muller, J. L., Broide, D.H., Wanderer, A.A., and Kolodner, R. D. (2001) *Nat. Genet.* 29 301-305.
26. Stimson, K.M. and Vertino P.M. (2002) *J. Bio. Chem.* 277, 4951-4958.

注：本研究は2001年9月26日「第60回日本癌学会総会」にてポスター発表。2002年4月10日「American Association for Cancer Research 93rd, Annual Meeting」にてポスター発表。

作成日：2002年3月15日

2001年度日中医学協会共同研究等助成事業報告書

－在留中国人研究者研究助成－

2002 年 2 月 28 日

財団法人 日中医学協会
理事長 殿

研究者氏名 王 婷 **王婷**
 所属機関名 東京大学大学院医学系研究科 生物医化学教
 指導責任者氏名 土 三 繁
 職 名 東京大学大学院医学系研究科 教授
 所 在 地 〒113-0033 東京都文京区本郷 7-3-1
 電話 03-5841-3526 内線 _____

1. 研究テーマ

線虫 *Caenorhabditis elegans* 短寿命変異株 mev-1 のコハク酸-γピキノニ還元酵素に関する生化学的解析

2. 本年度の研究業績

(1) 学会・研究会等における発表 有 ・ 無 (学会名・演題)

無

(2) 学会誌等に発表した論文 有 ・ 無 (雑誌名・論文名)

無

3. 今後の研究計画

As in *mev-1* complex II, SQR activity decreased and ROS production increased, I plan to concentrate to study the electron transferring system. I will try to know exactly at where electrons leak and produce ROS in the *mev-1* complex II. And, go on studying on how these produced ROS affect on complex II electron transferring system which results in *mev-1* ROS hypersensitivity and short life span.

As the mutation in CybL subunit in *mev-1* mutant, may cause perturbation in protein structure directly, I plan to confirm the existence and properties of heme in cytochrom *b* subunits. After that, I plan to purify cytochrome *b* and determine its structure and properties, especially its function in the way of electron transferring.

In addition, mutation in CybL subunit may not only cause cytochrome perturbation, but also in other two subunits Fp and Ip. I will go on the study on Fp and Ip subunits, and try to know the perturbation that may affect in electron transferring in function.

Then, next plan is try to elucidate the mechanism how the disorder in *mev-1* complex II leads to its short life span. The study will focus on ROS which cause oxidative stress in mitochondria. I will try to know exactly site of ROS production and how ROS affect metabolic system.

At last, in conclusion of my study, I expect to elucidate the mechanism of oxygen hypersensitivity and short life span in *mev-1* by biochemical methods. That will be very helpful to the study of the pathogenic mechanism of aging and age-related diseases.

4. 指導責任者の意見

王さんはこれまで臨牀医としての経験のうち、生化学や分子生物学的なアプローチによる研究ははじめてのことでした。

しかし非常に努力と工夫の裏に、すでに私の研究室の下学歴生の中に的を得ておられます。

研究も寿命に関する遺伝子と系を詳細に解析し、ミトコンドリア呼吸鎖の脱水素酵素の変異に伴う活性酸素の発生が上昇し寿命と相関している事を明らかにしました。

修士・評価も高く、大変に良い成績が4月より博士課程へ進学する予定です。

今後ともさらに、ご支援のほど、お願い致します。

指導責任者氏名 土岐 三郎

㊞

5. 研究報告書

別紙報告書作成要領により、添付の用紙で研究報告書を作成して下さい。

研究発表中または研究中の本人のスナップ写真を添付して下さい。

※研究成果を発表する場合は、発表原稿・抄録集等も添付して下さい。

※発表に当っては、日中医学協会助成金による旨を明記して下さい。

—日中医学協会助成事業—

**線虫 *Caenorhabditis elegans* 短寿命変異株 *mev-1* の
コハク酸-ユビキノ還元酵素に関する生化学的解析**

研究者 氏 名	王 女亭
中国所属機関	中国河南省鄭州鉄路局中心医院
日本研究機関	東京大学大学院医学系研究科生物医化学教室
指導 責任者	教授 北 潔
共同研究者名	宮寺浩子, 網野比佐子, 長内理大, etc.

Abstract

To elucidate the mechanism of ageing, generation of reactive oxygen species (ROS) and the corresponding response to oxidative stress are considered as key factors in ageing.

The majority of intracellular ROS production is derived from mitochondria. Complex II is an important enzyme in inner membrane of mitochondria. *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) is a good model animal for the study of ageing, because it possesses a system for oxidative metabolism which is quite similar to mammalian species. The *mev-1* (*kn1*) mutant is short life span mutant of *C. elegans* which is hypersensitive to oxygen. The mutation in *mev-1* encodes complex II CybL subunit and succinate-ubiquinone reductase (SQR) activity decreased.

Here, I focused on the study of the catalytic properties of *mev-1* complex II, and try to elucidate the mechanism of short life span in *mev-1* mutant.

E. coli strains and plates were compared to obtain a suitable culture condition of *C. elegans*. Several kinds of detergents were tested for the solubilization of *C. elegans* complex II from mitochondria. By DEAE-Sepharose column, complex II with high SQR activity was partially purified and characterized biochemically. Kinetic parameters of *C. elegans* complex II were determined by ubiquinone-2 as electron acceptor. Then, ROS generation was measured using the chemiluminescent probe MCLA.

Complex II of N2 and *mev-1* show very similar properties except SQR activity. This conclusion comes from following data. First, N2 and *mev-1* complex II eluted at same salt concentration during ion-exchange chromatography. Second, both complexes have similar enzymatic activities of SDH. Although SQR activity in *mev-1* was lower than N2, their SDH activities were always comparable. The most important is their similar kinetic parameters of *K_m* for ubiquinone which indicate their similarity in the spatial arrangement of the quinone binding site in cytochrome *b* subunits.

In ROS assay, the *mev-1* mutation results in high levels of ROS production at complex II. It suggests that mutation in CybL subunit could affect electron flow in the complex and electrons leaked from complex are transferred directly to molecular oxygen. From the result of enzymatic analysis, it seems there is no functional difference in quinone binding site between N2 and *mev-1*. That indicates perhaps quinone binding site is not the site where electrons transfer directly from complex II to molecular oxygen. Increased ROS generation in complex II ultimately results in *mev-1* short life span.

Key Words *Caenorhabditis elegans*, *mev-1*, ageing, ROS, succinate-ubiquinone reductase

Introduction

The mechanism of ageing is likely to be a multifactorial process. Now, there is significant evidence implicating the generation of reactive oxygen species (ROS) and the corresponding response to oxidative stress as key factors in determining longevity (Ku, et al., 1993). ROS is metabolites of molecular oxygen. Mitochondria play a critical role in ageing because they are the major source and the most proximal target of ROS (Finkel, T. and Holbrook, N. J., 2000).

To investigate the molecular mechanisms of aging and etiology of oxidative damage, *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) is a good model animal. The most important advantage is because *C. elegans* possess a system for oxidative metabolism which is quite similar to mammalian species (Murfitt, et al., 1976).

The *mev-1* (*kn1*) mutant is methyl viologen (paraquat)-sensitive mutant of *C. elegans*. It is hypersensitive to oxygen and has short life span than that of wild type (N2). The *mev-1* mutant is also hypersensitive to raised oxygen concentration. Its life span was increased and decreased under low and high concentrations of oxygen, respectively (Ishii, et al., 1990). The difference between *mev-1* and wild type is in gene *cyt-1* which encodes large subunit of cytochrome (CybL) in succinate-ubiquinone reductase (SQR, also referred as complex II). At the DNA sequence, position 323, G is substituted by A, which resulting in glycine-to-glutamic acid substitution (Gly71Glu) in protein sequence (Ishii, et al., 1998). The ability of SQR to catalyse electron transport from succinate to ubiquinone is decreased in *mev-1* animal (80%)(Ishii, et al., 1998).

Complex II is an important enzyme complex in TCA cycle and the aerobic respiratory chain of mitochondria and prokaryotic organisms (Kita, et al., 1989). Under aerobic conditions, complex II catalyzes the oxidation of succinate to fumarate and transfers its reducing equivalent to ubiquinone (SQR) (Kita, et al., 2002) In cells, complex II appears to contribute to the basal production of ROS (McLennan, H. R. and Esposti, M. D., 2000). Those imply complex II has important function in oxidative stress damage on ageing.

Here, I focused on the study of the catalytic properties of *mev-1* complex II, and try to elucidate the mechanism of short life span in *mev-1* mutant. That will be very helpful to understand of the pathogenic mechanism of aging and age-related diseases.

Materials and Methods

Materials -- The wild type (N2) was Bristol strain. The *mev-1* mutant was *kn1*.

Optimum culture conditions -- *E. coli* strains and plates were compared. *E. coli* MK3 which lacks the *sdh* and *frd* operons (*sdhc:: Km^R, Δfrd ABCD*), NM522 *Δsdh::spc* which lacks the *sdh* operon, and OP50. *E. coli* were cultured overnight. Two types of LB plates and three types of NGA plates were compared. After incubated at 37°C overnight, numbers of *E. coli* on the plates were counted. N2 and *mev-1* were grown at 20°C on five types of plates with the supplement of three types of *E. coli*. Worms were harvested after 3-5 days when the quantity of adults reached to the peak population.

Isolation of mitochondria -- Worms were collected in M9 buffer (Brenner, S. 1974). The sedimented worms were washed with M9 buffer until the buffer become clear. Worms were further purified by centrifugation. After polytron, worms were homogenized in MSE containing 1 mM phenyl methyl sulfonyl fluoride (PMSF) using glass-glass homogenizer (Iwaki) with the inclusion of glass beads (B. Brown Melsungen AG, 0.10-0.11mm). The homogenates were then centrifuged at 960 x g for 10 min at 4°C, twice. The supernatant was then centrifuged at 19,200 x

g for 10 min, and the precipitated mitochondrial fraction was resuspended in MSE and homogenized.

Extraction and separation of complex II – The detergents tried include 1%, 5% dodecyl maltoside (DOSIN); 1%, 5% Lubrol (NACALAI TESQUE INC.); 1%, 5% C12E9 (SIGMA); 1%, 5% C12E8 (TOKYO KASEI INC.) and 0.05%, 0.1%, 0.2%, 0.3%, 0.5% sucrose monolaurate (SML) (MITSUBISHI-KAGAKU FOODS Co.) (all in W/V).

All the steps were carried out at 0-4°C. Mitochondria were solubilized with 0.2% (W/V) SML. The suspension was stirred at 0°C (ice-water) for 30 min. After centrifugation at 200,000 x g for 60 min at 4°C, the supernatant was applied to DEAE-Sepharose (Pharmacia) column (0.8 cm² x 4 cm) equilibrated with 10 mM Tris-HCl pH 7.5, 5% sucrose, 1 mM malonate, 0.05% SML. The column was washed with the same buffer (15 ml) and then complex II was eluted with the same buffer containing a 60 ml gradient of 0-150 mM NaCl at a flow rate of 30 ml/h. Peak fractions were used for enzymatic analysis or stored at -80°C. All conditions were the same for both N2 and *mev-1* complex II.

SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) was performed using 2-15% gel (PAG mini DAIICHI)(Weber, 1969). The gels were stained with coomassie brilliant blue (CBB). For Western Blotting, 1D9/1A which is monoclonal antibody against *A. suum* complex II Fp subunit and KM 2408 which is polyclonal antibody against *C. elegans* cyt-1 were used.

Enzyme assay – Succinate dehydrogenase (SDH) and SQR assay were determined by Spectrophotometric measurement was performed at 25 °C with a Shimadzu UV-3000 dual wavelength spectrophotometer.

ROS generation was measured using the chemiluminescent probe MCLA (Cypridina luciferin analog, 2-methyl-6-(*p*-methoxyphenyl)-3,7-dihydroimidazo[1,2- α]pyrazin-3-one). Chemiluminescence assays were conducted at 37°C on a Hamamatsu C1230 photo counter with a H-R 550 photomultiplier (Hamamatsu photonics). The quantity of N2 and *mev-1* complex II was normalized by total SDH activity.

Results

Optimum culture conditions of N2 and *mev-1* – To elucidate accurate SDH and SQR activity in *C. elegans* and determine its *Km* value, I wanted to eliminate *E. coli* SDH and SQR activity. MK3 should be the best choice because it has neither SDH nor SQR activities itself. Finally, the optimum conditions for the mass culture of N2 and *mev-1* has been found as follows. As food source, MK3 is grown on LB medium with 0.2% (W/V) glucose and is spread on to the plates. Then, worms are cultured on NGA plate (pH 7.0) with 8-fold Bacto-peptone and 0.2% (W/V) glucose; and 50 μ g/ml of kanamycine.

Isolation of mitochondria from N2 and *mev-1* – To elucidate the enzymatic properties and get purified complex II, I prepared quantities of N2 and *mev-1* mitochondria.

Extraction and separation of complex II from N2 and *mev-1* mitochondria – For purification, complex II which is membrane-bound proteins, should be solubilized by detergent in undispersed form. From the results, 0.2% (W/V) SML is the best detergent for solubilizing complex II. It can solubilize almost all complex II in the membrane according to its highest specific activity.

Elution from a DEAE-Sepharose column further increased SDH and SQR specific activities. The specific activity of SDH was similar in both N2 and *mev-1*, though SQR was lower in *mev-1*.

This result is consistent with low SQR activity of *mev-1* mitochondrial membrane reported previously (Ishii, et al., 1998). Salt concentrations (101 mM) of the peak fraction were same in N2 and *mev-1*. The stability of N2 and *mev-1* complex II was kept at least 80% when left in -80°C freezer.

To know the purity of the purified enzyme, SDS-PAGE analysis was performed and shows complex II from DEAE-Sepharose column was great increase.

To investigate the subunit composition, Western Blotting analysis was performed as shown in Antibody against *A. suum* Fp subunits recognized the corresponding subunits of *C. elegans* complex II. One protein band with molecular weight about 14.8 kDa was observed corresponding to the CybL subunit of *C. elegans* complex II.

Enzymatic properties of N2 and *mev-1* complex II – SQR kinetic values (K_m and V_{max}) of purified enzymes were measured using ubiquinone-2 as electron acceptor, and enzymatic properties of mitochondria and complex II from N2 and *mev-1* were compared. Complex II samples were the peak fraction in chromatography. The K_m of purified enzymes for ubiquinone-2 was 10.2 μM (N2) and 8.77 μM (*mev-1*) which were similar to those of mitochondria, 6.25 μM in N2 and 8.5 μM in *mev-1*.

ROS assay of N2 and *mev-1* complex II – To examine the effects of the *mev-1* mutation on complex II ROS production, complex II purified from *mev-1* and wild type were analyzed. The levels of ROS production were found to be approximately 4.6 fold higher in purified complex II from *mev-1* as compared with wild type (Fig.1). This result suggests that *mev-1* mutant in complex II contributes to ROS production. Succinate stimulated ROS production greatly and *mev-1* was 1.6 fold higher than wild type. It may indicate that electrons cannot be transferred to ubiquinone and are leaked from the complex. This elevates ROS level in *mev-1* mutant.

Discussion

*Purification of complex IIs from N2 and *mev-1* mitochondria*

In this study, *E. coli* MK3 was used as food source for *C. elegans* mass culture because it has neither SDH nor SQR activity. There was no influence of *E. coli* SDH and SQR in *C. elegans* mitochondria samples, because MK3 lacks both SDH and SQR activity.

My data showed that SML is a very useful detergent for solubilizing integral membrane proteins, especially complex II in *C. elegans*. Almost total complex II in inner membrane were solubilized and kept high activity during the purification by column chromatography. Finally, a highly active SQR preparation has been purified for the first time from *C. elegans* mitochondria.

Complex II in N2 and *mev-1* eluted at same salt concentration during ion exchange chromatography. This indicates that there is no significant difference in net charge of complex IIs from wild type and *mev-1* mutant.

*Comparison of enzymatic properties of N2 and *mev-1* complex II*

Comparing SQR K_m and V_{max} value between N2 and *mev-1*, I found that K_m for ubiquinone was not apparently different from that of the wild type, while its V_{max} was far lower than wild type. Therefore, in *mev-1* complex II, affinity between complex II and ubiquinone has no significant difference with the wild type, although rate of electron transfer from the enzyme to ubiquinone is greatly reduced. My work indicates for the first time that the mutation in *mev-1* does not affect quinone-binding site. Substitution of Gly-71 to Glu in CybL may disturb electron transfer from Ip subunit to ubiquinone in the complex, although this does not affect electron transfer from

succinate to artificial electron acceptor such as PMS.

The data presented here clearly demonstrate complex II in N2 and *mev-1* has very similar protein structures. This conclusion is based upon three definitive observations. First, N2 and *mev-1* complex II eluted at same salt concentration during ion-exchange chromatography. Second, both complexes have similar enzymatic activities of SDH. Although SQR activity in *mev-1* was lower than N2, their SDH activities were always comparable. The most important is their similar kinetic parameters of K_m for ubiquinone which indicate they are similar in the spatial arrangement of the quinone binding site in cytochrome *b* subunits.

ROS assay of N2 and mev-1 complex II

It has been known that oxidants and oxidative stress are connected to ageing. ROS production and corresponding responses to oxidative stress act as key factors in determining longevity (Finkel, T. and Holbrook, N. J. 2000). Mitochondria are the major source of ROS, and are also the first compartment in the cell that is damaged by these ROS. It has been widely known that complex I and III produce ROS in mitochondria (Finkel, T. and Holbrook, N. J. 2000). There is still no evidence in the literature to suggest that complex II contributes directly to ROS production.

The *mev-1* mutant is hypersensitive to exogenous oxygen and short life span. The levels of superoxide anion production were found higher in *mev-1* intact mitochondria than wild type. Furthermore, cell damage and precocious ageing are caused by endogenous generation of ROS in mitochondria rather than by the direct toxicity of exogenous oxygen (Matsuda, et al., 2001). But, the mechanism of a complex II deficiency causes oxygen hypersensitivity and short life span is still unknown.

In this work, I demonstrated that ROS production was significantly higher in *mev-1* than wild type. My data provide the biochemical connection that links the molecular defect in complex II to ROS hypersensitivity and short life span of the *mev-1* mutant. More importantly, my data may be helpful to study the mechanism of where and how ROS is generated.

From my data, the *mev-1* mutation results in high levels of ROS production at complex II. It suggests that the complex II defect could affect electron flow, that electrons probably transfer directly from complex II to molecular oxygen. And ROS overproduction in *mev-1* complex II might be major reason for its short life span.

The mechanism of ROS production in *mev-1* complex II is still unclear. Kinetic data shows there is no difference in quinone-binding site between N2 and *mev-1*. That indicates perhaps quinone-binding site is not the position where electrons transfer directly from complex II to molecular oxygen.

It seems that some ROS generation may occur at complex II even in wild type. In fact, with the addition of succinate, a complex II substrate, ROS production is increased in wild type complex II. This may suggest that complex II may be a secondary source of ROS generation in the mitochondrial respiratory chain.

In summary, I have shown that *mev-1* complex II has similar quinone-binding site structure with N2 and produces increased level of ROS from complex II. This ROS ultimately results in *mev-1* short life span.

References

1. Brenner, S. (1974) The genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* **77**, 71-94.

2. Finkel, T. and Holbrook, N. J. (2000) Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature* **408**, 239-247.
3. Ishii, N., Takahashi, K., Tomita, S., Keino, T., Honda, S., Yoshino, K. and Suzuki, K. (1990) A methyl viologen-sensitive mutant of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Mutation Res.* **237**, 165-171.
4. Ishii, N., Fujii, M., Hartman, P. S., Tsuda, M., Yasuda, K., Matsuda, N. S., Yanase, S., Ayusawa, D. and Suzuki, K. (1998) dehydrogenase cytochrome *b* causes oxidative stress and ageing in nematodes. *Nature* **394**, 694-697.
5. Kita, K., Cecile R., Vibat, C. R. T., Meinhardt, S., Guest, J. R. and Gennis, R. B. (1989) One-step purification from *Escherichia coli* of complex II (Succinate: Ubiquinone Oxidoreductase) associated with succinate reducible cytochrome *b*556. *J. Biol. Chem.* **264**, 2672-2677.
6. ita, K., Hirawake, H., Miyadera, H., Amino, H., Takeo, S. (2002) Role of complex II in anaerobic respiration of the parasite mitochondria from *Ascaris suum* and *Plasmodium falciparum*. *Biochim. Biophys. Acta.* **1553**, 123-139.
7. Ku, H. H., Brunk, U.T and Sohal, R.S. (1993) Relationship between mitochondrial superoxide and hydrogen peroxide production and longevity of mammalian species. *Free Radical Biol. Med.* **15**, 621-627.
8. Matsuda, N. S., Yasuda, K., Tsuda, M., Ohkubo, T., Yoshimura, S., Nakazawa, H., Hartman, P. S. and Ishii, N. (2001) A defect in the cytochrome *b* large subunit in complex II causes both superoxide anion overproduction and abnormal energy metabolism in *Caenorhabditis elegans*. *J. Biol. Chem.* **276**, 41553-41558.
9. McLennan, H. R. and Esposti, M. D. (2000) The contribution of mitochondrial respiratory complexes to the production of reactive oxygen species. *J. Bioenerg. Biomembr.* **32**, 153-162.
10. Murfitt, R. R., Vogel, K. and Sanadi, R. (1976) Characterization of the mitochondria of the free-living nematode, *Caenorhabditis elegans*. *Comp. Biochem. Physiol.* **53B**, 423-430.

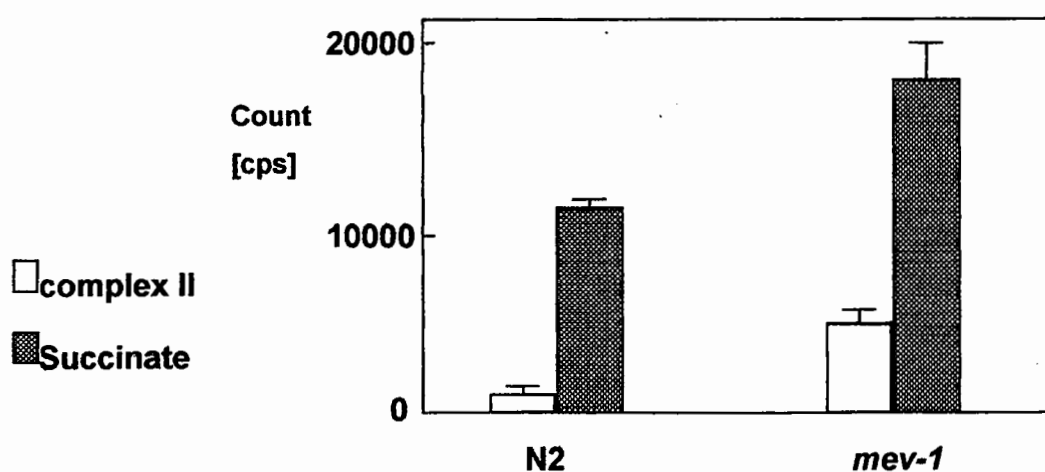


Fig. 1 ROS production in purified N2 and *mev-1* complex II

2002 年 2 月 28 日

2001年度日中医学協会共同研究等助成事業報告書

－在留中国人研究者研究助成－

2002 年 2 月 27 日

財団法人 日 中 医 学 協 会
理 事 長 殿

研究者氏名 范 文英



所属機関名 浜松医科大学公衆衛生学

指導責任者氏名 竹内 宏一

職 名 教授

所 在 地 〒 431-3192 浜松市半田山1丁目20-1

電話 053-435-2329 内線

1. 研 究 テ ー マ

NC/Nga マウスにおけるヒトアトピー類似皮膚炎におよぼす食餌制限の影響

2. 本年度の研究業績

(1) 学会・研究会等における発表 有 ・ ☒ 無 (学会名・演題)

(2) 学会誌等に発表した論文 ☒ 有 ・ 無 (雑誌名・論文名)

雑誌名: Experimental Biology and Medicine (226: 1045-1050, 2001)

論文名: Effects of dietary restriction on spontaneous dermatitis in NC/Nga mice.

3. 今後の研究計画

これまでに我々は、ヒトのアトピー性皮膚炎モデルである NC/Nga マウスに食餌制限（全栄養素制限）を行い、皮膚炎の発症、臨床症状、IgE、炎症細胞、炎症サイトカインが食餌制限により抑制されることを学術誌（Exp Biol Med 226: 1045-1050, 2001）に発表した。しかしながら、ヒトのアトピー性皮膚炎は、遺伝的要因、住居や食品等の環境要因、さらには心理的要因などが複雑に関連して発症、増悪するため、ヒトにおいて食事と症状の関係を明確に証明することは困難である。今後我々は、NC/Nga マウスを用い食餌制限や抗酸化食品の添加等による皮膚炎の発症抑制の有無や皮膚組織の酸化的障害、腸の絨毛細胞の変化、腸内細菌の変化等について検討する。腸の絨毛細胞、皮膚組織の酸化的障害、皮膚組織の病態評価は、computer-assisted image analysis を用いて行う。組織標本の光顕像をデジタル化し、視野内の目標物の hue、light、and saturation values (HLS) を自動設定し、目標物質を自動抽出する。この方法により細胞の数のみならず、免疫組織染色像における染色強度も連続変数として表現することが可能となる。腸内細菌のパターン（量的）変化について検討する。

4. 指導責任者の意見

アレルギー疾患のなかでもアトピー性皮膚炎はわが国で急増している。以前は小児期に発症して成長するにつれて軽快する例が多かったが、最近は軽快しないばかりか成人期に発症してしかも難治性が多くなり深刻な状況を呈しているいわゆる現代文明病である。

中国の都市部でもこのようなアレルギー疾患が増加しているという。このような状況において、范氏はアトピー性皮膚炎の基礎的研究において、報告書に記載しているように極めて有意義な研究をした。この研究は長時間にわたって地道な努力を要する実験と観察であったが、それを持ち前の根気と冷静な判断で克服した。この成果は既に専門家によって評価されており、この領域の基礎的研究に大きく貢献した。さらに、上に記述しているように、これからの研究計画も興味深いものがある。

指導責任者氏名

竹内 亮一 

5. 研究報告書

別紙報告書作成要領により、添付の用紙で研究報告書を作成して下さい。

研究発表中または研究中の本人のスナップ写真を添付して下さい。

※研究成果を発表する場合は、発表原稿・抄録集等も添付して下さい。

※発表に当っては、**日中医学協会助成金**による旨を明記して下さい。

-NC/Ngaマウスにおけるヒトアトピー類似皮膚炎におよぼす食餌制限の影響-

研究者氏名	范 文英
中国所属機関	中国北京化工医院 医師
日本研究機関	日本浜松医科大学公衆衛生学教室
指導責任者	教授 竹内 宏一
共同研究者名	甲田勝康, 中村晴信, 竹内宏一

ABSTRACT

In laboratory animals, dietary restriction prolongs lifespan, improves physiologic function, and prevents or lessens severity of several diseases including some experimental inflammatory states. We investigated the effect of dietary restriction on a spontaneously occurring mouse model of atopic dermatitis, an inflammatory skin disease. NC/Nga mice were assigned to group fed ad libitum or to restricted-diet group receiving 60% of the amount of food consumed by the other group. Dermatitis was characterized according to extent, intensity, and scratching time. We then used computer-assisted image analysis to quantify immunologic findings in skin sections. Extent, intensity score, and scratching time in mice with restriction increased more gradually than in mice fed ad libitum. Infiltrating inflammatory cells (CD4-positive T cells, CD8-positive T cells, eosinophils, and mast cells) as well as interleukin-4 and -5 secreted into tissue were reduced in mice with restriction. In conclusion, dietary restriction delayed onset and progression of spontaneous dermatitis in NC/Nga mice, an effect possibly involving inhibition of inflammatory infiltration cell and cytokine secretion.

Key Words dietary restriction, atopic eczema, allergy, inflammation

INTRODUCTION

Dietary restriction is acknowledged to prolong lifespan in laboratory animals (1, 2). Experimental studies have shown that such restriction can improve declining physiologic functions (3), and also prevent or lessen severity of spontaneously occurring (1), chemically induced (4), and radiation-induced neoplasia (5); and autoimmune diseases (6). Dietary restriction has also been reported to attenuate carrageenan-induced footpad inflammation (7), protect against ozone-induced lung inflammation (8), and alleviate chemically induced ulcerative dermatitis (9).

Atopic dermatitis (AD) is a human inflammatory skin disease triggered by interactions between genetic, immunologic, and environmental factors including diet (10). Previous studies concerning dietary management of AD, focused on elimination of allergenic proteins such as cow's milk or eggs (11). Recently we reported that a calorically restricted diet was associated with remarkable improvement in AD patients in an open-label trial (12); a positive correlation was evident between improvement of dermatitis and decrease in body weight. Accordingly, we hypothesized that dietary restriction can suppress AD.

The NC/Nga mouse has recently been established as an animal model for human AD (13, 14). This strain of mouse spontaneously develops dermatitis associated with excessive IgE production when animals are raised under conventional conditions. And the dermatitis in male mice is relatively severe than that in female mice (13). This skin disorder was proposed to result from a combination of genetic propensity and environmental triggers (15).

In the present study, we investigated the effect of 40% dietary restriction involving calories, protein, vitamins, and minerals on AD-like dermatitis in NC/Nga mice.

MATERIALS AND METHODS

Animals and Diets. Male and female NC/Nga mice purchased from Japan SLC (Hamamatsu, Japan) were bred and housed at the animal facility in the Institute for Experimental Animals at Hamamatsu University School of Medicine. Mice were maintained individually in plastic cages in a room with a conventionally regulated environment including temperature of 23 to 25°C, relative humidity of 50 to 60%, and a light/dark cycle of 12 h/12 h. All mice received care in compliance with the Guidelines for Animal Experimentation of the Hamamatsu University School of Medicine. Mice were randomly divided into ad libitum (AL) groups and dietary restriction (DR) groups. All mice were given a standard rodent laboratory diet. Each AL mouse consumed 4.9 to 5.5 g of diet per day. Each DR mouse received the same diet, but the amount of food provided was adjusted daily to represent 60% of the prior day's food consumption for a paired AL mouse. Both AL and DR mice had free access to water throughout the study. The regimen was initiated at 6 weeks of age and terminated at 15 weeks of age.

Evaluation of Dermatitis Severity. For objective evaluation of severity of dermatitis, we defined 3 indices: extent (ratio of involved skin area to total body skin area); intensity score (sum of intensity scores of all skin regions surveyed), and scratching time (cumulative time spent scratching over a period of 10 min). Extent and intensity score were defined referring to the Scoring Atopic Dermatitis (SCORAD) system (16). For calculation of intensity score we assessed three items: erythema; edema or papulations; and oozing, crusts or hemorrhage. Each of the three items was graded on a scale of 0 to 3 (0, absent; 1, mild; 2, moderate; 3, severe) for the right ear, left ear, scalp, rostral back, caudal back, chest, and abdomen. The intensity score was the sum of individual item scores obtained for these seven areas. Severity of dermatitis was assessed once weekly in all mice.

Measurement of Serum IgE. Blood samples were collected at 15 weeks of age. Serum IgE concentrations were measured using a mouse IgE enzyme immunoassay kit.

Histochemical and Immunohistochemical Staining. All mice were killed by cervical dislocation at 15 weeks of age, and skin samples from scalp located centrally between the ears were obtained as previously described (17). Samples were fixed in 10% formalin, embedded in paraffin, and sectioned perpendicular to the skin surface at a thickness of 3 μ m. Sections were stained with hematoxylin and eosin (HE), acidic toluidine blue, or Congo red.

For immunohistochemistry, sections were stained with monoclonal antibody (mAb) against CD4, CD8, interleukin (IL)-4, or IL-5. Deparaffinized sections were treated for 15 min with 3% hydrogen peroxide (Wako, Osaka, Japan) in distilled water. After nonspecific binding of antibody was blocked with 10% normal goat serum (Immuno-biological Laboratories, Fujioka, Japan) diluted in Tris-buffered saline with 0.1% Tween 20 (TBST; Dako, Carpinteria, CA), sections were incubated overnight at 4°C with the primary mAb. The mAb used were rat anti-mouse CD4 mAb (RM4-5; PharMingen, San Diego, CA), rat anti-mouse CD8 mAb (53-6.7; Becton Dickinson, Mountain View, CA), rat anti-mouse IL-4 mAb (11B11;

PharMingen) and rat anti-mouse IL-5 mAb (TRFK5; PharMingen). Subsequently the sections were washed in TBST and then incubated with horseradish peroxidase-conjugated goat anti-rat IgG (PharMingen) at room temperature for 30 min. Reaction products were visualized with 3-3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (Wako) with hematoxylin counterstaining.

Computer-assisted Histomorphometry. We used a computer-assisted image analysis system that permits automatic extraction and measurement. Light microscopic images of skin sections were captured and then transformed into 32-bit color images with 945×738 resolution. For transformation, a digital camera attached to a light microscope was used together with software run on a computer. To determine the number or area in regions of interests, MacSCOPE Image Analysis was used.

Epidermal area was measured in five fields in each HE section. Results are expressed as the mean epidermal area in square micrometer for the five fields.

Densities of inflammatory cells in the dermis (toluidine blue-positive mast cells, Congo red-positive eosinophils, CD4-positive ($CD4^+$) T cells, and CD8-positive ($CD8^+$) T cells) were determined in five fields per section and expressed as the mean number of cells per square millimeter. Mast cells were categorized into three types: granulated cells associated with less than 5 granules outside the cell, slightly degranulated cells with 5 to 15 granules outside the cell, and markedly degranulated cells with more than 15 granules outside the cell.

Portions stained with brown reaction product for IL-4 and IL-5 were extracted automatically based on hue, light, and saturation values, and were highlighted in green. Areas of these extracted portions were measured in five fields per section, and the results are expressed as the mean stained area in square micrometers.

RESULTS

Body Weight. Body weights in DR mice decreased between 6 and 9 weeks of age, after which the animals maintained stable body weight.

Appearance. AL mice spontaneously developed dermatitis characterized by erythema, papulation, hemorrhage, erosion, and alopecia. With time, dermatitis worsened and spread over most of the body surface. Involvement was most intense in the scalp and dorsal skin. In contrast, dermatitis in DR mice appeared to be relatively mild.

Severity of Dermatitis. During the study AL mice showed increases in the severity indices of dermatitis, including extent, intensity score, and scratching time. In contrast, DR mice showed more gradual increases in these severity indices. At the end of the study, the extent, intensity score, and scratching time in DR mice were significantly suppressed compared with corresponding values in gender-matched AL mice.

Histologic Examination. In AL mice the epidermis showed remarkable hyperkeratosis and marked acanthosis; severe inflammatory cell infiltration was seen in the dermis. In contrast, these histologic findings were mild in DR mice.

Image Analysis. Mean epidermal area in DR mice was significantly smaller than in gender-matched AL mice. Mean densities of mast cells, eosinophils, $CD4^+$ T cells, and $CD8^+$ T cells in DR mice were significantly lower than in gender-matched AL mice. Moreover, mean area of IL-4 was significantly smaller in DR female mice and tended to be smaller in DR male mice than in gender-matched AL mice. Mean area of IL-5 tended to be smaller in DR female mice than in AL female mice. And there were significant difference between total DR mice and total AL mice in both IL-4 and IL-5.

Serum IgE. The mean of serum IgE concentration in DR mice was lower than in AL mice at 15 weeks of age.

Relationships between Severity Indices for Dermatitis and Laboratory Findings. Scratching time showed a significant positive correlation with laboratory variable (CD4⁺ T cells, CD8⁺ T cells, eosinophils, mast cells, IL-4, IL-5, and IgE). Extent and intensity score also showed a significant positive correlation with all laboratory variables. Of all laboratory data, density of markedly degranulated mast cells was most closely correlated with scratching time.

DISCUSSION

Dietary restriction, which is synonymous with such terms as calorie restriction and food restriction, has been well studied in laboratory animals. Dietary intake restriction can be accomplished with avoidance of malnutrition by a 40% reduction from average unrestricted food intake, including a balanced decrease in calories, protein, vitamins, and minerals (1-3). This regimen results in a limited period of weight loss, after which the animals maintain stable body weight or gradually regain some of the weight originally lost despite continued dietary restriction (1, 18, 19). Our results as to changes in body weight were consistent with previous observations.

Our mice with dietary restriction showed lower serum IgE concentrations and less severe dermatitis than other ad libitum fed mice. Further, mice with restriction showed only mild epidermal thickening, mild dermal inflammatory cells infiltration, and mild degranulation of mast cells. Dermal staining for inflammatory cytokines was also suppressed.

In NC/Nga mice, dermatitis has been reported to be closely associated with excessive IL-4 and IL-5 production as well as inflammatory cell infiltration in the dermis (13, 14). IL-4 induces IgE synthesis, while IL-5 promotes IL-4-dependent IgE synthesis and stimulates eosinophils (10). In most previous studies, intensity of cytokine immunostaining in local skin lesions was evaluated by subjective observation or a morphologic scoring system based upon microscopic examination (13, 17). Observer bias cannot be completely avoided with those methods. Recently, computer-assisted image analysis has been used increasingly for quantitative histopathologic examination (20, 21). We used such a method to quantify both histologic findings and cytokine secretion as continuous variables, and could demonstrate that dietary restriction suppresses production of inflammatory cytokines in NC/Nga mice.

We also obtained good correlations of microscopic and blood assay results with severity of dermatitis. Interestingly, the number of degranulated mast cells was the laboratory finding best correlated with scratching time. Degranulation of mast cells releases histamine and other mediators associated with itching (pruritus).

The precise mechanism responsible for suppression of dermatitis by dietary restriction is unclear. In previous studies, dietary restriction has been reported to reduce T cell function (such as IL-4 and IL-5 production), and to suppress lymphocyte proliferation and serum IgE response in infected mice (22, 23). Also dietary restriction causes elevation of circulating cortisol in normal rodents (24-26). Thus, interrelationships are likely among immunologic, endocrinologic, and other responses to allergic conditions in combination with dietary restriction. It is also unclear if dietary restriction can improve AD once the disease has begun in this model, and if the effect of dietary restriction persists after the termination of this regimen. Further studies are needed to more fully explain these questions.

In conclusion, dietary restriction delayed onset and suppressed progression of AD-like dermatitis in NC/Nga mice, an effect possibly involving inhibition of inflammatory infiltration cell and cytokine secretion.

REFERENCES

1. Weindruch R, Walford RL. The retardation of aging and disease by dietary restriction. Springfield, IL: Charles C Thomas, 1988.
2. Yu BP. Aging and oxidative stress: modulation by dietary restriction. *Free Radic Biol Med* 21:651-668, 1996.
3. Frame LT, Hart RW, Leakey JEA. Caloric restriction as a mechanism mediating resistance to environmental disease. *Environ Health Perspect* 106:313-324, 1998.
4. Birt DF, Yaktine A, Duysen E. Glucocorticoid mediation of dietary energy restriction inhibition of mouse skin carcinogenesis. *J Nutr* 129:571-574, 1999.
5. Yoshida K, Inoue T, Nojima K, Hirabayashi Y, Sado T. Calorie restriction reduces the incidence of myeloid leukemia induced by a single whole-body radiation in C3H/He mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:2615-2619, 1997.
6. Kubo C, Gajjar A, Johnson BC, Good RA. The effects of dietary restriction on immune function and development of autoimmune disease in BXSB mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:3145-3149, 1992.
7. Klebanov S, Diais S, Stavinoha WB, Suh Y, Nelson JF. Hyperadrenocorticism, attenuated inflammation, and the life-prolonging action of food restriction in mice. *J Gerontol Biol Sci Med Sci* 50:B78-B82, 1995.
8. Kari F, Hatch G, Slade R, Crissman K, Simeonova PP, Luster M. Dietary restriction mitigates ozone-induced lung inflammation in rats: a role for endogenous antioxidants. *Am J Respir Cell Mol Biol* 17:740-747, 1997.
9. Perkins SN, Hursting SD, Phang JM, Haines DC. Calorie restriction reduces ulcerative dermatitis and infection-related mortality in p53-deficient and wild-type mice. *J Invest Dermatol* 111:292-296, 1998.
10. Leung DYM. Atopic dermatitis: new insights and opportunities for therapeutic intervention. *J Allergy Clin Immunol* 105:860-876, 2000.
11. Sicherer SH, Sampson HA. Food hypersensitivity and atopic dermatitis: pathophysiology, epidemiology, diagnosis, and management. *J Allergy Clin Immunol* 104:S114-S122, 1999.
12. Kouda K, Tanaka T, Kouda M, Takeuchi H, Takeuchi A, Nakamura H, Takigawa M. Low-energy diet in atopic dermatitis patients: clinical findings and DNA damage. *J Physiol Anthropol* 19:225-228, 2000.
13. Matsuda H, Watanabe N, Geba GP, Sperl J, Tsudzuki M, Hiroi J, Matsumoto M, Ushio H, Saito S, Askenase PW, Ra C. Development of atopic dermatitis-like skin lesion with IgE hyperproduction in NC/Nga mice. *Int Immunol* 9:461-466, 1997.
14. Matsumoto M, Ra C, Kawamoto K, Sato H, Itakura A, Sawada J, Ushio H, Suto H, Mitsuishi K, Hikasa Y, Matsuda H. IgE hyperproduction through enhanced tyrosine phosphorylation of Janus kinase 3 in NC/Nga mice, a model for human atopic dermatitis. *J Immunol* 162:1056-1063, 1999.
15. Tsudzuki M, Watanabe N, Wada A, Nakane Y, Hiroi J, Matsuda H. Genetic analyses for dermatitis and IgE hyperproduction in the NC/Nga mouse. *Immunogenetics* 47:88-90, 1997.
16. European Task Force on Atopic Dermatitis. Severity scoring of atopic dermatitis: The SCORAD index.

- Consensus report of the European Task Force on Atopic Dermatitis. *Dermatology* 186:23-31, 1993.
17. Hiroi J, Sengoku T, Morita K, Kishi S, Sato S, Ogawa T, Tsudzuki M, Matsuda H, Wada A, Esaki K. Effect of tacrolimus hydrate (FK506) ointment on spontaneous dermatitis in NC/Nga mice. *Jpn J Pharmacol* 76:175-183, 1998.
 18. Hishinuma K, Nishimura T, Konno A, Hashimoto Y, Kimura S. Augmentation of mouse immune functions by dietary restriction: an investigation up to 1 year of age. *Ann Nutr Metab* 34:76-84, 1990.
 19. Matsuzaki J, Yamaji R, Kiyomiya K, Kurebe M, Inui H, Nakano Y. Implanted tumor growth is suppressed and survival is prolonged in sixty percent of food-restricted mice. *J Nutr* 130:111-115, 2000.
 20. Kouda K, Ha-Kawa SK, Tanaka Y. Increased technetium-99m-GSA uptake per hepatocyte in rats with administration of dimethylnitrosamine or hepatocyte growth factor. *J Nucl Med* 39:1463-1467, 1998.
 21. Nakamura H, Kouda K, Fan WY, Watanabe T, Takeuchi H. Suppressive effects on allergic contact dermatitis by short-term fasting. *Toxicol Pathol* 29:200-207, 2001.
 22. Shi HN, Scott ME, Stevenson MM, Koski KG. Energy restriction and zinc deficiency impair the functions of murine T cells and antigen-presenting cells during gastrointestinal nematode infection. *J Nutr* 128:20-27, 1998.
 23. Koski KG, Su Z, Scott ME. Energy deficits suppress both systemic and gut immunity during infection. *Biochem Biophys Res Commun* 264:796-801, 1999.
 24. Leakey JEA, Chen S, Manjgaladze M, Turturro A, Duffy PH, Pipkin JL, Hart RW. Role of glucocorticoids and "caloric stress" in modulating the effects of caloric restriction in rodents. *Ann NY Acad Sci* 719:171-194, 1994.
 25. Han ES, Evans TR, Nelson JF. Adrenocortical responsiveness to adrenocorticotrophic hormone is enhanced in chronically food-restricted rats. *J Nutr* 128:1415-1420, 1998.
 26. Sabatino F, Masoro EJ, McMahan CA, Kuhn RW. Assessment of the role of the glucocorticoid system in aging processes and in the action of food restriction. *J Gerontol Biol Sci Med Sci* 46:B171-B179, 1991.

注：本研究は *Experimental Biology and Medicine* (226:1045-1050, 2001) に掲載。


作成日:2002 年 2 月 28 日

2001年度日中医学協会共同研究等助成事業報告書

－在留中国人研究者研究助成－

2002年2月7日

財団法人 日中医学協会
理事長 殿

研究者氏名 王 岩 
所属機関名 東北大学加齢医学研究所 遺伝子情報部門
指導責任者氏名 田村 真理
職 名 教授
所 在 地 〒980-8575 宮城県 仙台市青葉区星陵町 4-1
電 話 022-717-8471 内線

1. 研 究 テ ー マ

ガングリオシドシアリダーゼのカベオラ膜ドメインにおける局在とカベオリンとの相互作用

2. 本年度の研究業績

(1) 学会・研究会等における発表 有 ・ 無 (学会名・演題)

第74回 日本生化学会大会

シグナル伝達経路における形質膜シアリダーゼ

(2) 学会誌等に発表した論文 有 ・ 無 (雑誌名・論文名)

Eur.J.Biochem. 268, 2201-2208 (2001)

Site-directed mutagenesis of human membrane-associated ganglioside sialidase:

Identification of amino-acid residues contributing to substrate specificity

3. 今後の研究計画

Neu3 はカベオラ膜ドメインに局在し、そこでカベオリンと相互作用することがわかった。Neu3 遺伝子にあるカベオリン結合モチーフによって、本酵素は他のシグナル伝達分子のように、カベオリンと相互作用しながら活性制御を受けている可能性が推察された。これらの結果は Neu3 がガングリオンドの発現を調節して、シグナル伝達分子としての役割を果たしていることを示す。Neu 3 はカベオリンシグナル伝達経路にての役割及びそのメカニズムを今後の計画として研究を進めようと計画している。

4. 指導責任者の意見

動物シアリダーゼについては近年、細胞質性、リソソーム性、形質膜性シアリダーゼの cDNA が相次いでクローン化され、分子レベルの研究が端緒についたところである。それらの機能の重要性については推察されているものの、明らかな実験的証拠はほとんど挙がっていない。本研究は、先に宮城県立がんセンター研究所でクローン化されたヒト Neu3 遺伝子および同研究所で作成された単クローン抗体を用いて蛋白分子レベルで、本酵素の機能の一端を明らかにしたものである。本酵素がカベオラ膜ドメインに存在し、シグナル伝達分子カベオリンと相互作用することを示した最初の報告である。本研究の成果を第 74 回日本生化学学会にて発表した。

指導責任者氏名 田村 真理



5. 研究報告書

別紙報告書作成要領により、添付の用紙で研究報告書を作成して下さい。

研究発表中または研究中の本人のスナップ写真を添付して下さい。

※研究成果を発表する場合は、発表原稿・抄録集等も添付して下さい。

※発表に当っては、日中医学協会助成金による旨を明記して下さい。

ガングリオシドシアリダーゼのカベオラ膜 ドメインにおける局在とカベオリンとの相互作用

研究者氏名	王 岩
中国所属機関	中国白求恩医科大学病理生理学講座 講師
日本研究機関	東北大学加齢研遺伝子情報部門
指導責任者	教授 田村 真理
共同研究者	宮城 妙子, 和田 正

(Summary)

The ganglioside-specific sialidase, Neu 3, has been suggested to play essential roles in regulation of cell surface functions, because of its major localization in the plasma membrane and strict substrate preference for gangliosides involved in signal transduction. Here we show that human Neu 3 sialidase is enriched in caveolae microdomains and interacts with caveolin, like other caveolin-binding signaling molecules. Using HeLa cells and Neu 3-transfected COS-1 cells, endogenous and exogenous Neu 3 was found to concentrate together with caveolin-1 in low density Triton X-100 insoluble membrane fractions on sucrose density gradients of the respective cell extracts, as assessed by enzyme activity assays and immunoblotting with a monoclonal antibody to human Neu 3. The presence of a putative caveolin-binding motif within Neu 3 prompted us to determine whether Neu 3 interacts directly with caveolin-1. In transfectants expressing a polyhistidine-tagged form of Neu 3, caveolin-1 co-eluted with Neu 3 on affinity column chromatography. A mutation with a single amino acid change in the caveolin-binding motif led to inhibition of recruitment of the sialidase to the microdomain, accompanied by loss of the enzyme activity. Interaction of Neu 3 with caveolin-1 was supported further by co-immunoprecipitation of Neu 3 by anti-caveolin-1 antibody. These results indicate that Neu 3 functions as a caveolin-interacting protein within caveolin-rich microdomains.

Key Words Neu 3, Sialidase, Ganglioside, Caveolin, Lipid raft

(Introduction)

Sialidase catalyzes the removal of sialic acids from glycoproteins and gangliosides, an initial step of the degradation of these molecules. Mammalian forms have been demonstrated to differ from microbial sialidases in various aspects, especially in the presence of multiple types even in a single cell and in strict substrate specificity, this suggesting participation not only in lysosomal degradation but also in many cellular processes (1, 2). Although the functional roles of mammalian sialidases are not fully understood, recent progress in sialidase gene cloning has allowed partial clarification. Among three mammalian sialidases so far cloned (abbreviated to Neu 1, 2 and 3), ganglioside-specific sialidase (Neu 3) is a key enzyme for ganglioside hydrolysis and is unique in specifically hydrolyzing gangliosides and in its localization in the plasma membrane. To obtain functional evidence regarding Neu 3, we previously cloned and characterized the sialidase cDNAs of mammalian origin (3-6), and have employed a human Neu 3 cDNA (4) in the present work.

Gangliosides, sialic acid-containing glycosphingolipids, are present in surface membranes of cells and are thought to play important functional roles in regulating a wide range of biological processes, including cell surface interactions, cell differentiation and transmembrane signaling (7-9). The ganglioside-specific sialidase Neu 3 may thus have many functions. Accumulating evidence suggesting functional importance for plasma membrane-attached vesicular organelles called detergent-insoluble glycosphingolipid-enriched complexes (DIGs) or lipid rafts (10-13). DIGs are closely related to caveolae, 50-100 nm invaginations of the plasma membrane, in their lipid composition and resistance to detergent solubilization. A major structural protein of caveolae is caveolin, known to act as a scaffold for various signaling molecules (14). Recent studies have indicated that caveolin recruits transducer molecules into caveolae and regulates their functions by direct interaction with these proteins, including G protein α subunits, H-ras, Src family tyrosine kinases, MAP kinase, and endothelial nitric oxide synthase, which recognize a short cytosolic domain derived from the N-terminal region of caveolin-1, termed the caveolin scaffolding domain, by caveolin-binding common motifs present within their molecules (14). In addition, interaction of the caveolin scaffolding domain with caveolin-binding motifs of EGF-R (15) and protein kinase C (16) is known to inhibit their kinase activity. We now present evidence that Neu 3 is closely associated with caveolin-1 within caveolae microdomains, probably acting as a transducer molecule. Neu 3 is the first example of a carbohydrate-metabolizing enzyme to be shown to interact with caveolin. In this context it is of interest that, in the course of the present study, a paper (17) appeared describing ganglioside sialidase activity cofractionating with rafts from a

neuroblastoma cell line.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Cells and DNA Transfection--- HeLa cells and COS-1 cells were obtained from The Cell Bank of Tohoku University and RIKEN Cell Bank, respectively, and maintained in Dulbecco's modification of Eagle's minimum medium (DMEM) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) in 5% CO₂. Sialidase expression vectors were constructed by subcloning a cDNA fragment containing the open reading frame (ORF) of human membrane-associated ganglioside sialidase (human Neu 3) or the mutated DNA into the EcoRI site of pME18S, an eukaryote expression vector under control of the SR α promoter, a generous gift from Dr. T. Maruyama, Tokyo Medical and Dental University. Introduction of mutations on human Neu 3 cDNA was performed by recombination PCR (18) with the following mutation primers: for the Y181A mutation 5'-GCGTATACCGCGTACATCCCTTCCTGG-3' and 5'-GGGATGTACGCGGT ATACGCAGGGATG-3', and for the F187R mutation, 5'-CCTTCCTGGCGCTTTT GCTTCCAGCTAC-3' and 5'-AAGCAAAAGCG CCAGGAAGGGATGTAG-3'. PCR reactions were carried out using the primers, a plasmid containing the wild type human Neu 3 ORF (pME-HmSD) as a template, and LA-Taq polymerase (Takara, Japan) under the conditions of 95°C for 5 min, followed by 25 cycles of 95°C for 30 sec, 60°C for 30 sec, 72 °C for 5 min. Mutated DNAs, with sequences confirmed by the dideoxy chain termination method using an AutoRead Sequencing kit, were finally subcloned into the EcoRI site of the pME18S vector. As a control, a cytosolic sialidase expression plasmid was constructed by subcloning a cDNA fragment covering the ORF into pME18S and used for transfection.

COS-1 cells were transfected by electroporation by the procedures previously described (5). After 48 h of transfection, cells were collected and stored -80°C until use. To correct for transfection efficiency, a luciferase expression plasmid was co-transfected with the sialidase plasmid and the sialidase activity was then normalized to the luciferase activity as detailed earlier (19).

Sucrose density gradient analysis ---Low density Triton X-100-insoluble membrane domains were isolated from cultured cells by slight modifications of the method described (20). Briefly, cultured cells (3×10^7) were collected in 1 ml of ice-cold lysis buffer containing 25 mM MES, pH6.5, 0.15 M NaCl, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 10 μ g/ml aprotinin, 10 μ g/ml leupeptin, and 1% Triton X-100. After homogenization, the cell lysate was adjusted to 40% sucrose by addition of 1 ml of the above lysis buffer without Triton X-100 containing 80% sucrose. A linear sucrose gradient (5-30%) in the buffer without Triton X-100 was layered over the lysate and centrifuged at 190, 000 \times g (39, 000 rpm) for 16-20 h at 4 °C in an SW-41 rotor. Ten fractions were collected as 1 ml-aliquots.

Construction, Expression, and Purification of Polyhistidine Tagged Human Neu3---The polyhistidine tag was incorporated into the C terminus of the wild type and Y181A mutants of the human Neu 3 cDNA, respectively, using the PCR primers and pME-HmSD as a template. The final construction was subcloned into the EcoRI site of the pME18S vector and used for transient expression in COS-1 cells. The transfectants were homogenized in the lysis buffer described above, assayed the sialidase activity, and dialyzed against the start buffer (20 mM phosphate buffer, pH 7.5, 10 mM imidazole, 0.5 M NaCl, and 1% Triton X-100) for 3 h at 4 °C. The dialyzed fraction was applied to 1 ml of affinity column for histidine-tagged proteins (HisTrap column; Pharmacia Biotech) pre-equilibrated with the start buffer. After washing with 10 ml of the buffer, bound proteins were eluted with 5 ml of the elution buffer (20 mM phosphate buffer, pH 7.5, 500 mM imidazole, 0.5 M NaCl and 1% Triton X-100). Washes and eluates were then subjected to immunoblot analysis.

Sialidase Assays---The cell lysate and the fractions from the sucrose density gradient were used for sialidase assays routinely using gangliosides as the substrate. The reaction mixture contained 50 nmol of substrate as bound sialic acid, 0.2 mg of bovine serum albumin, 10 μ mol of sodium acetate (pH 4.6) and 0.2 mg of Triton X-100. After incubation at 37°C for 10-60 min, released sialic acid was determined by the thiobarbituric acid method after passing through an AG1X-2 mini-column, as described elsewhere (6). Protein was determined by dye-binding assay (Bio-rad). One unit of sialidase was defined as the amount of enzyme which catalyzed the release of 1 nmol of sialic acid/h.

Preparation of Monoclonal Antibody to Human Neu 3 --- The foot pads of 6 week-old female BALB/c mice were injected every week with 2 mg protein of the particulate fraction of human Neu 3-transfected COS cells, emulsified with incomplete adjuvant. After five successive injections followed by a booster injection, spleens and bilateral inguinal and parietal abdominal lymphnodes of immunized mice were harvested, and B cells were fused with the mouse myeloma X 63 Ag8.653 (The Cancer Cell Repository, Tohoku University, Sendai, Japan) in 50% polyethylene glycol 1000 (Wako). Screening of hybridomas was carried out by examining the specific immunoreactivity with the particulate fraction of the Neu 3 transfectants in ELISA system (ZYMED) and with the membrane-permeabilized Neu 3 transfectants for FACS analysis. The particulate fractions from vehicle-transfected COS cells were also used to exclude false positives due to reactions with parent COS cell proteins. The positive clones were screened by dilution to obtain single specific clones. The subclass of monoclonal antibody (mAbs) was determined to be IgG₁ with a Mouse isotyping kit.

Immunoblotting and immunoprecipitation --- Cell lysates, sucrose density gradient fractions or fractions from HisTrap affinity columns were separated on SDS-polyacrylamide electrophoresis gels (10%) under reducing conditions. Proteins were transferred to PVDF membranes and immunoblotted with antibodies specific to respective proteins. The individual bands were detected with peroxidase-conjugated goat anti-mouse IgG or -rabbit IgG (Promega) and development was

achieved with an enhanced chemiluminescence system (ECL Plus Western blotting reagent; Amersham Pharmacia Biotech.), according to the manufacturer's recommendations. In immunoprecipitation experiments, cell lysates were incubated overnight at 4°C with Protein A Sepharose (Amersham Pharmacia Biotech.) and polyclonal anti-caveolin-1 (Santa Cruz Biotech.) or monoclonal anti-human Neu 3 antibody and the precipitates after washing were applied to SDS-polyacrylamide electrophoresis, and then immunoblotted as described above. Antibodies and their sources were as follows: anti-caveolin-1 IgG (mAb 2297, Transduction Labs) and anti-caveolin-1 (Santa Cruz Biotech.); anti-cSrc (Santa Cruz Biotech.); anti-MAPK (New England Biolabs); anti-14-3-3 (Santa Cruz Biotech.).

RESULTS

Co-fractionation of human Neu 3 with caveolin-1---To examine whether endogenous ganglioside-specific sialidase is associated with caveolin-1, we used HeLa cells having relatively high sialidase activity. Cell lysates were fractionated on a sucrose density gradient and the fractions were analyzed for protein concentration, caveolin-1 immuno-reactivity, and sialidase activity with gangliosides as substrates. Fig. 1a shows ganglioside sialidase activity to co-fractionate in low density fractions 4-6 with caveolin-1 and cSrc, a signal transducer, as assessed by immunoblot analysis, while greater than 90% of the total protein loaded on the gradient was recovered in high density fractions 9-10. To obtain evidence that Neu 3 protein is present in the caveolin-rich fraction, we prepared mAb specific to human Neu 3 and observed the protein distribution by immunoblotting. The antibody was evaluated to be only reactive with Neu 3 (48 kD protein), from HeLa cells (in the experiments with homogenates in Fig. 1b) as well as from Neu 3-transfected COS-1 cells. On sucrose gradient Neu 3 protein from HeLa cells was detected mainly in fractions 5-6, in parallel with sialidase activity together with caveolin-1. We then examined COS-1 cells transiently transfected with human Neu 3 cDNA. More than 70% of the ganglioside activity was found in fractions 4-6, rich in caveolin-1, and approximately 30% of the activity remained in the fractions 9-10 (Fig. 2a). The activity detected in the high density fractions was not due to overloading, because re-loading on the gradient resulted in recovery of the activity in the same fractions. Neu 3 proteins were detected in the fractions having high activity in a manner similar to the case of HeLa cells. On the other hand, when we tested cytosolic sialidase (Neu 2)-transfected COS-1 cells by measuring sialidase activity at pH 6.0 with 4MU-NeuAc, all of the sialidase was found in the high density fractions (Fig. 2b). In addition, endogenous lysosomal sialidase (Neu 1) in COS-1 cells, assayed with 4MU-NeuAc as substrate at pH 4.6, showed a nearly identical pattern to that of the exogenously expressed cytosolic sialidase (data not shown). These results indicate human Neu 3 to indeed be localized in the caveolin-rich microdomains, in contrast to Neu 2 and Neu 1 sialidases.

Interaction of Human Neu 3 with Caveolin-1---To examine the possibility that Neu 3 interacts with caveolin in the microdomain, we searched for a functional binding site for caveolin-1 in the Neu 3 molecule. Caveolin binding motifs were recently deduced (Φ X Φ XXXX Φ and Φ XXXX Φ XX Φ , where Φ is an aromatic residues W, F, or Y) (14). These motifs are present in most caveolae-associated proteins, including PKCa, MAP kinase, and EGFR. In the human Neu 3, we identified a possible region (YTTYIPSW, 179-186 residues) within the hydrophobic stretch of the putative transmembrane domain sequence (4). To determine whether the binding site in Neu 3 is functional, the following strategies were employed: introduction of mutations into Neu 3, affinity purification of polyhistidine (His)-tagged Neu 3 forms, and immunoprecipitation with antibody to either caveolin-1 or Neu 3.

Two mutants were expressed and the cell lysates were analyzed by fractionation on a sucrose density gradient (Fig. 3). Mutant F187R with one amino acid change next to the motif sequence demonstrated reduction of ganglioside activity in the cell lysate to only 45% of the wild type level, and mutant Y181A with a single amino acid change within the motif showed complete loss of ganglioside activity, although Neu 3 protein level was similar to the wild type (Fig. 3a). On sucrose gradient fractionation, mutant F187R exhibited only a low amount of Neu 3 protein in fraction 5 with low sialidase activity, much more protein and activity being evident in fractions 9-10. In mutant Y181A, Neu 3 protein was hardly recovered in the fractions 4-6 where caveolin was still concentrated. These results suggest that the predicted caveolin-binding motif in Neu 3 may be involved in binding to caveolin-1, loss of the binding ability leading to failure of recruitment to caveolae and subsequently to reduction of the enzyme activity.

To obtain further evidence for the direct interaction between Neu 3 and caveolin-1, we next used His-tagged forms of Neu 3 constructed by introducing the His-tag epitope into the C-terminus (Fig. 4a and b). On transient expression in COS-1 cells, the His-tagged form could be purified by Ni²⁺ ion-charged HiTrap Chelating column chromatography, the bound proteins being specifically eluted by affinity elution with imidazole (21). As a control for non-specific binding, human Neu 3 without the tag epitope was also expressed. Both Neu 3 forms showed sialidase activity at the same level. After affinity purification on HiTrap column, fractions were analyzed by immunoblotting with antibodies to human Neu 3 and caveolin-1 (Fig. 4a). His-tagged Neu 3 was specifically eluted by affinity elution with imidazole, while no binding to the column was observed with Neu 3 lacking the His-tag. Under these conditions endogenous caveolin-1 and MAP-kinase co-eluted with His-tagged Neu 3, but 14-3-3 protein in the washing effluents. When the cell lysates from mutant Y181A with His-tag epitope were applied on a HiTrap column, most of caveolin-1 protein was detected in the washings, even though all of the Neu 3 protein in the affinity eluates (Fig. 4b). We further examined direct association of Neu 3 with caveolin-1 by immunoprecipitation with antibody to either caveolin-1 or Neu 3 (Fig. 4c). Under the conditions where almost equal amount of endogenous caveolin-1 was applied for immunoprecipitation (in the lower panel), wild type Neu 3

was co-immunoprecipitated with caveolin-1 by anti-caveolin-1 antibody, whereas much less amount of mutant Neu 3 protein was recovered compared to wild type level. Consistent with the sucrose gradient data described above, the protein level in the immunoprecipitates was higher in mutant F187R retaining some activity than in mutant Y181A. Caveolin-1 was not detected in anti-Neu 3 immunoprecipitates. These data together indicate that the predicted caveolin-binding motif sequence in human Neu 3 can serve as a ligand for the caveolin scaffolding domain and that loss of the capacity for binding to caveolin and subsequent failure of recruitment to caveolae results in reduced enzyme activity.

DISCUSSION

Ganglioside-specific sialidase Neu 3 is a unique glycosidase in its localization within the plasma membrane and the strict substrate specificity. Unlike lysosomes, the membranes do not contain a set of glycosidases to degrade glycoproteins and glycolipids (22), suggesting that Neu 3 is involved in cell surface events other than catabolism of glycoconjugates. In fact, there are several observations suggesting important functional roles of sialidase in processes like cell differentiation (5, 23), apoptosis (24), and malignant transformation (25-28). However, no clear evidence for the physiological functions of Neu 3 has hitherto been presented, to our knowledge.

In this study, we demonstrated that this sialidase interacts directly with caveolin-1 and that its activity is likely to be regulated by caveolin-mediated recruitment to caveolae-microdomains. Many caveolin-associated proteins are now known to contain caveolin-binding motifs and this is considered to be a general mechanism for caveolin-mediated sequestration and subsequent inactivation within caveolae. In the case of Neu 3, mutation of the putative caveolin-binding site led to not only blocking of the recruitment to caveolae but also suppression of the sialidase activity. This indicates that Neu 3 is a unique member of caveolin associated proteins which is activated rather than inactivated by caveolin-mediated sequestration, similar to the case of the insulin receptor promoting IRS-1 phosphorylation (29). To activate Neu 3 *in vitro*, detergents such as Triton X-100 are required. There is no endogenous activator located in the plasma membrane known at present which can be replaced by the detergent. Since we have observed that phospholipids can stimulate the Neu 3 sialidase activity (Wada, T. and Miyagi, T., manuscript in preparation), it is most feasible that phospholipids constituting caveolae may activate Neu 3 after recruitment.

We previously demonstrated that Neu 3 contains a hydrophobic but non- α -helical stretch as a putative transmembrane domain which faces the extracytoplasmic side at the N-terminus (3). On the other hand, our recent work showed possible active site amino acid residues to be distributed all over the Neu 3 molecule (4). These two results make uncertain whether this sialidase is catalytic in the membrane-anchored state or rather on the cytosolic side of the membrane, as it may be necessary for an appropriate tertiary structure for activity (30). In this regard, based on the observation that caveolin is a cytoplasmically oriented integral protein, the human Neu 3 molecule may function on the cytosolic site of the membrane by interacting with caveolin, and cross-talk with other signal transducers. The regulation mechanisms require further analysis.

REFERENCES

- Schauer, R. (1985) *Trends Biochem.Sci.* 10, 357-360.
- Pilatte, Y., Bignon, J. and Lambré, C.R. (1993) *Glycobiology* 3, 201-217.
- Miyagi, T., Wada, T., Iwamatsu, A., Hata, K., Yoshikawa, Y., Tokuyama, S. and Sawada, M. (1999) *J. Biol. Chem.* 274, 5004-5011.
- Wada, T., Yoshikawa, Y., Tokuyama, S., Kuwahara, M., Akita, H., and Miyagi, T. (1999) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 261, 21-27.
- Hasegawa, T., Yamaguchi, K., Wada, T., Takeda, A., Itoyama, Y., and Miyagi, T., (2000) *J. Biol. Chem.* 275, 8007-8015.
- Hasegawa, T., Camero, C. F., Wada, T., Itoyama, Y. & Miyagi, T. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 280, 762-732 (2001).
- Hakomori, S., Yamamura, S., and Handa, K. (1998) *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 845, 1-10.
- Yates, A., J., and Rampersaud, A. (1998) *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 845, 57-71.
- Wu, G., Lu, Z.H., Wei, T., J., Howells, R., & Ledeen, R., W. (1998) *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 845, 126-138.
- Harder T., and Simons, K. (1997) *Curr. Opin. Cell Biol.* 9, 534-542.
- Anderson, R. G. W. (1998) *Annu. Rev. Biochem.* 67, 199-225.
- Brown, D. A., and London, E. (1998) *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 14, 111-136.
- Kurzchalia, T. V., and Parton, R. G. (1999) *Curr. Opin. Cell Biol.* 11, 424-431.
- Okamoto, T., Schlegel, A., Schrer P.E., and Lisanti, M. P. (1998) *J. Biol. Chem.* 273, 5419-5422.
- Couet, J., Sargiacomo, M., and Lisanti, M. P. (1997) *J. Biol. Chem.* 272, 30429-30438.
- Oka, N., Yamamoto, M., Schwencke, C., Kawabe, J., Ebina, T., Ohno, S., Couet, J., Lisanti, M. P., and Ishikawa, Y. (1997) *J. Biol. Chem.* 272, 33416-33421.
- Kalka, D., von Reitzenstein, Kopitz, J., and Cantz, M. (2001) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 283, 989-993.

18. Jones, D. H. and Howard, B. H. (1991) *BioTechniques* 10, 62-66
19. Wang, Y., Yamaguchi, K., Shimada, Y., Zhao X., and Miyagi, T. (2001) *Eur. J. Biochem.* 268, 2201-2208.
20. Czamy, M., Lavie, Y., Fiucci, G., and Liscovitch, M. (1999) *J. Biol. Chem.* 274, 2717-2724.
21. Janknecht, T., de Martynoff, G., Lou, J., Hipskind, R. A., Nordheim, A., and Stunnenberg, H. G., (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 88, 8972-8976 (1996)
22. Miyagi, T. and Tsuike, S. (1986) *FEBS Lett.* 206, 223-228.
23. Kopitz, J., von Reitzenstein, C., Mühl, C., and Cantz, M. (1994) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 199, 1188-1193
24. Kopitz, J., von Reitzenstein, C., Burchert, M., Cantz, M., and Gabius, H. J. (1998) *J. Biol. Chem.* 273, 11205-11211.
25. Schengrund, C.-L., Lausch, R.N. & Rosenberg, A. (1973) *J. Biol. Chem.* 248, 4424-4428.
26. Yogeeswaran, G. and Hakomori, S. (1975) *Biochemistry* 14, 2151-215
27. Miyagi, T., Konno, K., Sagawa, J., and Tsuike, S. (1990a) *Jpn. J. Cancer Res.* 81, 915-919.
28. Miyagi, T., Sagawa, J., Kuroki, T., Matsuya, Y. and Tsuike, S. (1990b) *Jpn. J. Cancer Res.* 81, 1286-1292.
29. Yamamoto, M., Toya, Y., Schwencke, C., Lisanti, M. P., Myers, Jr., M. G., and Ishikawa, Y. (1998) 273, 26962-26968.
30. Crennell, S.J., Garman, E. F., Laver, W.G., Vimir, E.R. and Taylor, G.L. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 9852-9856.

Fig.1. Localization of Neu 3 of HeLa cells in low density sucrose gradient fractions rich in caveolin-1. Triton X-100 lysates of HeLa cells were fractionated on a sucrose density gradient as described in the "EXPERIMENTAL PROCEDURES", and the fractions were tested for ganglioside sialidase activity (a) and for caveolin-1 (a), cSrc (a), and Neu 3 (b) proteins by immunoblot analysis. The specificity of the mAb anti-human Neu 3 was evaluated using homogenates (fraction H) from HeLa cells and only a 48 kD band corresponding to the Neu 3 was detected by immuno blot analysis (b).

Fig.2. Localization of human Neu 3 expressed in COS-1 cells in caveolin-rich fractions. The fractions on a sucrose density gradient were assayed for ganglioside sialidase activity and immunoblotted for Neu 3 and caveolin proteins with mAb anti-human Neu3 and anti-caveolin-1, respectively (a). As a control, cytosolic sialidase expressed in COS-1 cells was assayed the activity for 4MU-Neu Ac as a substrate(b).

Fig. 3. Failure of recruitment to caveolae and reduction of sialidase activity by mutation of the caveolin-binding motif within Neu 3. Mutants (F187R and Y181A) and wild type were expressed in COS-1 cells and each Neu 3 protein was detected by immuno blot analysis (a). Cell lysates of the transfectants were fractionated on a sucrose density gradient. Suppression of sialidase activity and Neu 3 protein level was observed in caveolin-rich fractions from mutant cell lysates, irrespective of enrichment of caveolin -1 in low density sucrose gradient fractions (b).

Fig. 4. Co-purification of polyhistidine-tagged human Neu 3 with caveolin-1 by Ni²⁺ chelating column chromatography and co-immunoprecipitation of Neu 3 and caveolin-1. Human Neu 3 with or without a His-tag was expressed in COS-1 cells and purified by affinity chromatography as described in the "EXPERIMENTAL PROCEDURES"(a). In the upper panel, washings and eluates were tested for Neu 3, caveolin-1, MAP-kinase and 14-3-3 proteins by immunoblot analysis with respective antibodies. In the lower panel, the protein concentrations of the fractions from the column are shown and arrows indicate start of affinity elution with 50 mM imidazole. A His-tag form of mutant Y181A was subjected to affinity chromatography, and Neu 3 and caveolin-1 proteins were analyzed by immunoblotting (b). Cell lysates were collected for immunoprecipitation with anti-caveolin antibody (polyclonal), and Neu 3 or caveolin-1 in the immunoprecipitates was detected with antibody to human Neu 3 or caveolin-1 (monoclonal) (c).

Fig.5. Reduced Neu 3 sialidase activity by dissociation of Neu 3 from caveolin-1 with β -cyclodextrin treatment. Cells were treated with 10 mM β -cyclodextrin for 50 min at 37°C, and the lysates of collected cells were assayed for sialidase activity (a), and fractionated on a sucrose density gradient for detection of Neu 3 activity and the protein (b).

注：本研究は、2001年10月25日『第74回日本生化学会大会』にてポスター発表。

作成日：2002年2月7日

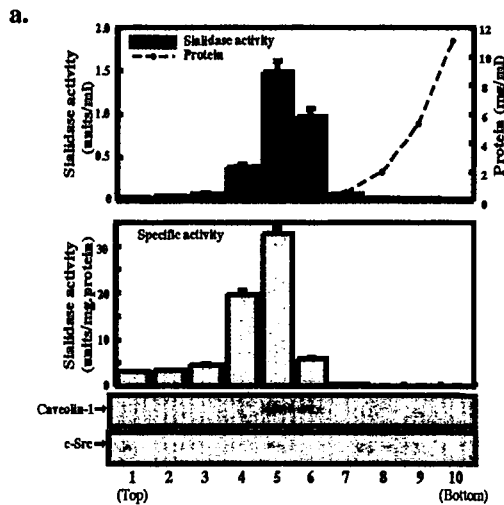


Fig.1

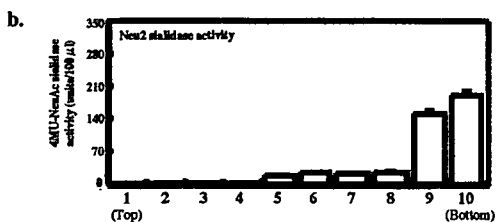
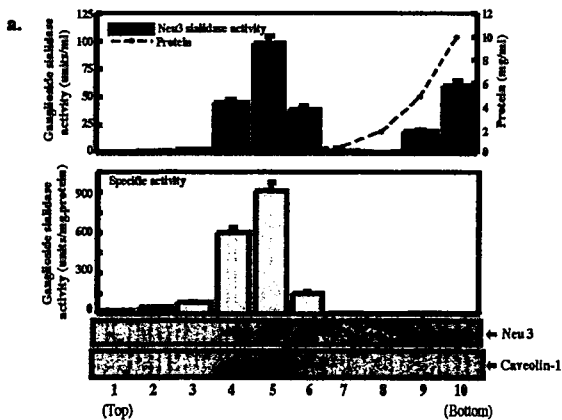
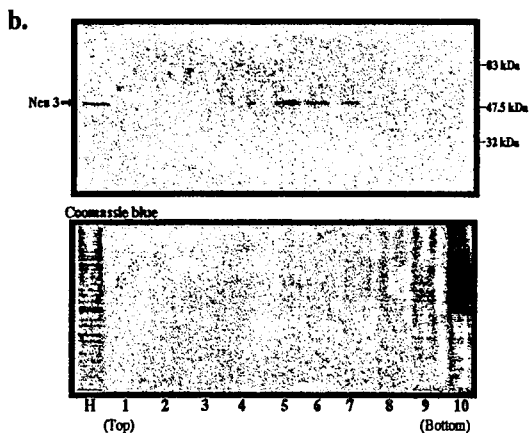


Fig.2

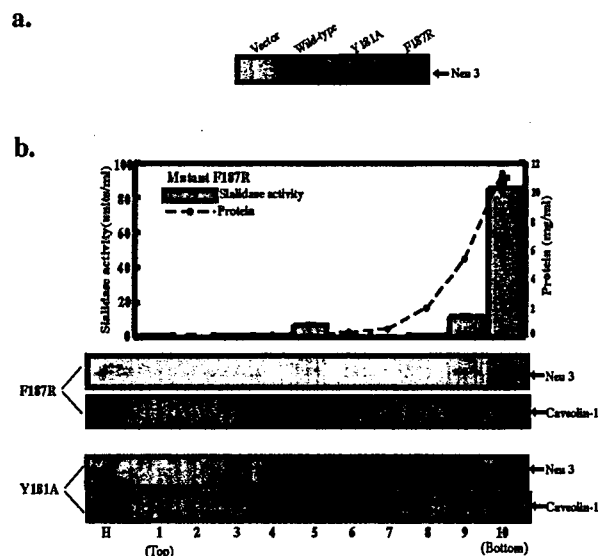
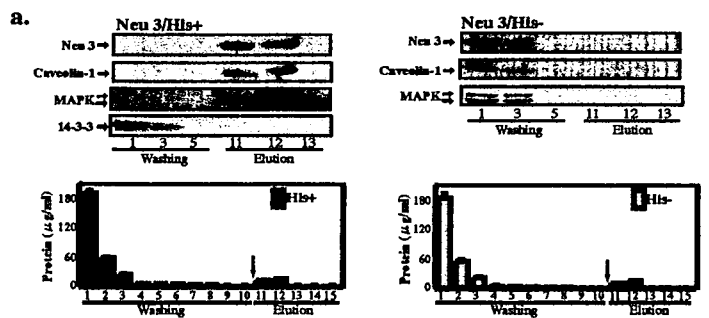


Fig.3



b.

c.

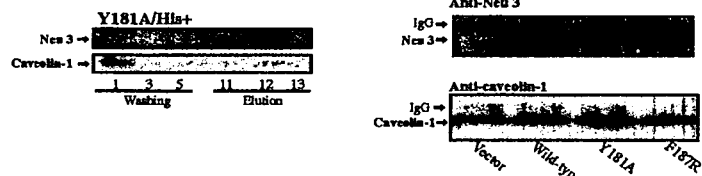


Fig.4

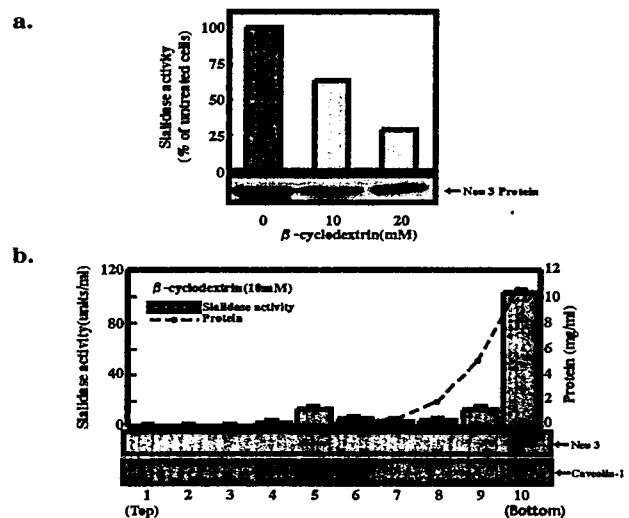


Fig.5

2001年度日中医学協会共同研究等助成事業報告書

－在留中国人研究者研究助成－

2002 年 2 月 7 日

財団法人 日中医学協会
理事長 殿

研究者氏名 李 冰 ㊟

所属機関名 新潟大学医学部附属腎研究施設機能制御分野

指導責任者氏名 追手 巍

職 名 教 授

所 在 地 〒951-8510 新潟市旭町通1-757

電話 025-227-2158 内線 2158

1. 研究テーマ

新しい糸球体及び腎間質の血行動態測定法・糖尿病モデルの検討

2. 本年度の研究業績

- (1) 学会・研究会等における発表 ☒ 有 ・ 無 (学会名・演題)

第34回米国腎臓学会, San Francisco, 2001, 10.

Real-time observation of renal hemodynamic changes in diabetic rats

Bing Li, Tetsuo Morioka, Jian Yao, Takashi Oite

第34回米国腎臓学会, San Francisco, 2001, 10.

Corordination of mesangial cell contraction by gap junction-mediated intercellular Ca wave

Jian Yao, Tetsuo Morioka, **Bing Li**, Takashi Oite

第44回日本腎臓学会学術総会, 東京, 2001, 5.

高血糖状態における培養ヒト糸球体内皮細胞のNO産生能

Mari hoshiyama, **Bing Li**, Tetsuo Morioka, Jian Yao, Takashi Oite

第44回日本腎臓学会学術総会, 東京, 2001, 5.

Endothelin is a potent inhibitor of MMP-2 secretion and activation in rat mesangial cells

Jian Yao, Tetsuo Morioka, **Bing Li**, Takashi Oite

- (2) 学会誌等に発表した論文 ☒ 有 ・ 無 (雑誌名・論文名)

Bing Li, Jian Yao, Tetsuo Morioka, Takashi Oite

Nitric oxide increases albumin permeability of isolated rat glomeruli via a phosphorylation-dependent mechanism

Journal of the American society nephrology 12: 2616-2624, 2001

Jian Yao, Tetsuo Morioka, **Bing Li**, Takashi Oite

Endothelin is a potent inhibitor of MMP-2 secretion and activation in rat mesangial cells

Am J Physiol Renal Physiol 280: F628-F635, 2001

3. 今後の研究計画

1. 前期には Streptozotocin 投与によるラット糖尿病モデルを用いて、その糸球体微小循環系動態をリアルタイムで画像解析してきた。その結果、経過とともに糸球体輸入・輸出動脈の拡大、血流速度の増大が確認された。後期は、その成因を糸球体輸入・輸出動脈の血管作動性物質に対する反応性の変化にあると仮定して研究を進める。
2. 血管収縮作用を持つアンギオテンシン II, エンドセリンを投与して、糖尿病初期、完成熟期における糸球体輸入・輸出動脈の直径、同部位の血流速度をリアルタイム測定して、収縮反応に対する糖尿病の影響を解析する。
3. 血管弛緩作用を持つ一酸化窒素ドナーを投与して、2と同様の時期のラットで、同様の検索を行う。
4. アンギオテンシン II 受容体阻害剤、エンドセリン受容体阻害剤、一酸化窒素合成阻害剤の短期多量投与により、2, 3の影響の各血管作動性物質特異性について検討する。
5. 4の薬剤とアンギオテンシン転換酵素阻害剤を継続投与し、糖尿病における糸球体微小循環系変化に対する治療効果を検索する。
6. 上述の実験結果を元に、糖尿病性腎症の発症機構に腎糸球体での微小循環動態の変化が大きく関与しているか否かを検証し、その結果を原著論文にまとめる。

4. 指導責任者の意見

李氏は、微小血管血行動態実時間観察のために私どもの教室で開発した、共焦点レーザー顕微鏡・高速冷却 CCD ビデオ撮影装置 (Y. Oyanagi-Tanaka et.al. *Kidney International* 59:252, 2001) を用いて、この半年間、精力的な研究を行い、成果をあげてきた (研究業績の項、参照)。特に貴財団の支援によった研究テーマは昨年末の米国腎臓学会 (サンフランシスコ) で発表され、注目された。現在、上述の研究計画に従い研究を進め、原著論文にまとめるための作業を進めている。

李氏の研究意欲、業績に関しては申し分無く、是非とも貴財団の研究助成の継続をお願いし、最終的な原著論文作成の実現に対してご支援をお願いしたい。

李氏は、新潟大学医学部腎研究施設での先端医学研究プロジェクトの一員として研究・研修のキャリアを積んできた。大学院博士課程終了後は、国際的な腎臓学者を目指してさらに研究・研修を続け、将来の中国・日本の医学・医療の発展に貢献しうる人材と信じている。

指導責任者氏名

追手 親

印

5. 研究報告書

別紙報告書作成要領により、添付の用紙で研究報告書を作成して下さい。

研究発表中または研究中の本人のスナップ写真を添付して下さい。

※研究成果を発表する場合は、発表原稿・抄録集等も添付して下さい。

※発表に当っては、日中医学協会助成金による旨を明記して下さい。

新しい糸球体及び腎間質の血行動態測定法・糖尿病モデルの検討

研究者氏名 李 氷

中国所属機関 ハルビン医科大学第二附属病院小児科

日本所属機関 新潟大学医学部附属腎研究施設機能制御学分野

指導責任者 教授 追手 巍

共同研究者名 姚 建, 森岡 哲夫

要 旨:

Diabetic nephropathy is the leading cause of end-stage renal diseases. The progression of diabetic nephropathy is closely related to disturbance of glomerular hemodynamics, such as renal hyperperfusion and/or glomerular hyperfiltration. Therefore, the aim of this study is to observe and analyze the alteration of renal hemodynamics in diabetic rats in vivo using confocal laser scan microscope (CLSM). Experiments were performed in Munich-Wistar rats on days 4 and 28 after streptozotocin (STZ) injection. Blood and urinary glucose levels, urinary protein excretion and creatinin clearance were estimated. Microalbuminuria level was also examined by radioimmunoassay. A polyethylene catheter was inserted into the carotid artery to allow blood pressure measurement. The left kidney weight (KW) was also estimated. We measured the glomerular size using the isolated glomeruli from control and diabetic groups. On days 4 and 28 after STZ injection, we examined hemodynamic changes by an intravital microscope equipped with real-time CLSM in combination with a high-speed CCD video camera. To measure vessel diameter and erythrocyte velocity, rats were injected with fluorescein isothiocyanate (FITC)-labeled dextran and FITC-labeled red blood cells (RBCs). The diabetic rats on days 4 and 28 after STZ injection had a significantly higher ratio of kidney/body weight than control rats. Also, glomerular size in diabetic rats was significantly larger than that in control groups. There was not significant difference in mean arterial pressure (MAP) between diabetic and control rats. On days 4 and 28, the diameters of afferent arterioles (AA) and efferent arterioles (EA) significantly increased in diabetic rats as compared with control rats. Moreover, erythrocyte velocities within glomeruli appeared to be faster in diabetic rats than in control rats. In addition, glomerular blood flow (GBF) was significantly higher in diabetic rats on days 4 and 28 after STZ injection as compared with control rats. Our real-time observations demonstrated that renal hypertrophy and glomerular hyperperfusion had started as early as at 4 days of diabetes. The noninvasive procedure, using CLSM in combination with high-speed video camera, allowed us to evaluate the glomerular microcirculation in diabetic condition in vivo, and to reconfirm the significance of hemodynamic changes in diabetic nephropathy.

Key words: CLSM, diabetes, glomerular hemodynamics, AA, EA

結 言

Diabetic nephropathy is the leading cause of end-stage renal disease. Intrarenal hemodynamic alterations, as manifest by glomerular hyperfiltration and hyperperfusion, are thought to be the foremost factors responsible for the onset and progression of diabetic nephropathy. Experimentally, glomerular hyperfiltration has been shown to result from elevations in the glomerular capillary blood flow and the glomerular capillary hydraulic pressure. Glomerular circulation is mainly regulated by two resistance arterioles, the afferent arteriole and efferent arteriole. The afferent and efferent arterioles normally constrict and dilate in response to changes in systemic blood pressure to maintain

glomerular filtration while protecting the glomerulus from excessive pressure. Therefore, real-time observation of glomerular hemodynamic changes would allow us to deepen our understanding of progressive mechanisms in diabetic nephropathy.

Recently, glomerular function has been directly evaluated with the use of the isolated perfused glomerulus, juxtamedullary nephrons, hydronephrotic kidneys and needle-probe charge-coupled device (CCD) videomicroscope. These approaches, however, invasive manipulations that might alter the renal vascular responsiveness, and may thus confound the characterization of these renal vessels. We have developed a new technique to directly visualize the glomerular microcirculation with the CLSM in combination with a high-speed CCD video camera. The particular advantage of this system over other methods is to avoid nonphysiological effects of invasive operative procedures, and permit the direct evaluation of renal microcirculation in vivo under physiological and pathological conditions. In this present study, we directly observed the alteration of hemodynamics in diabetic rats using our newly developed videomicroscopic technique.

対象と方法

Animals

Studies were performed in male Munich Wistar rats of six- to seven-week-old, which purchased from Simonsen Laboratories, Inc. Diabetes were induced by intraperitoneal injection of streptozotocin (sigma) (65mg/kg body wt) dissolved in 0.1M sodium citrate buffer, PH 4.5. Diabetic and control rats were followed for 4 and 28 days. All rats received standard chow and tap water.

Intravital observation of the renal microcirculation

Observations of microcirculation blood flow were made with an intravital microscope system (Nikon, Tokyo, Japan), equipped with a real-time confocal scanner unit model CSU10 and image processing devices. Differing from conventional CLSM, the real-time CLSM system used in this study CSU10 (YOKOGAWA Electric Corporation, Tokyo, Japan) has two disks: microlens array and pinhole array. The CSU10 unit is designed to attain a high signal to noise ratio by minimizing the background light inside the scanner, thus making observation of weak fluorescent specimens possible. Rotation speed of the scanner motor is 1800 rpm. The scanner actually captures 360 frames of confocal images which one can observe at the eyepiece of the scanner, and sends 30 frames of confocal images per second to an ICCD camera (Model C2400-89; HAMAMATSU PHOTONICS K.K., Shizuoka, Japan), to synchronize with the scanning rate of the camera and be video-recorded (Model SVO-9600; Sony, Tokyo, Japan) for later analysis by using of a recording lens and salt water immersion objectives.

The Munich Wistar rats were anesthetized by intraperitoneal injection of thiobutabarbital sodium salt (100mg/kg). The body temperature of animals was kept 37.0 °C on a heating pad. Polyethylene catheters (PE50) were inserted into the carotid artery for blood pressure measurements and into the femoral vein for administering labeled plasma component and autologous red blood cells (RBCs). The left kidney was exposed by a flank incision and split longitudinally. To analyze the microcirculation from the surface of kidney, the kidney was placed under the CLSM. The kidney was immersed in a bath of physiological saline (Na^+ 154mEq/L, Cl^- 154mEq/L) in which the temperature was kept at 37 ± 1 °C.

Measurement of microhemodynamic parameters in glomerular tufts

Measurement of vessel diameter. To measure vessel diameter, enhancement of the contrast of microvessel images against a dark background was made by intravenous injection (10 mg ml^{-1} , 2 ml kg^{-1}) of a solution of FITC-labeled dextran (FITC-Dx, MW 150,000; Sigma Chemical Co., St. Louis, MO). This fluorescent staining procedure produced bright fluorescent images of the vascular lumen, and enabled adequate mapping of the luminal diameter. Diameters of microvessels were measured with a vernier caliper on individual frames of the video-recorded images.

Erythrocyte Velocity. To measure erythrocyte velocity, a batch of erythrocytes labeled with FITC was injected intravenously. Briefly, washed erythrocytes obtained from an experimental rat were incubated with a PBS (137mM NaCl, 6.4mM Na₂HPO₄, 2.7mM KCl, 1.5mM KH₂PO₄, pH 7.8) solution containing 1mg/ml FITC (ICN Pharmaceutical, Inc., Cleveland, OH, USA). The labeled cells were then washed twice with a saline solution containing 1% bovine serum albumin (BSA; Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) to remove unconjugated fluorescent dye. The final volume percent of the labeled cells was adjusted approximately to 50% by adding an isotonic saline solution, and an aliquot of these suspensions was injected (1ml/Kg) through the tail vein of the rat to measure centerline erythrocyte velocity. The rate of the labeled RBC in total RBC was about 1% by a single calculation. From the video-recorded images, erythrocyte velocity was calculated by frame-by-frame analysis, more than five different areas were measured, and averaged for at least five measurements.

Measurement of Glomerular Volume

After measurement of kidney weight, the outer 1 to 2 mm of the renal cortex in left kidney was excised and cut into fine fragments. The glomeruli were then isolated in DMEM by standard sieving techniques as described previously. The PH of the medium was adjusted to 7.4 before use. The whole procedure for isolation of glomeruli was carried out within 15 minutes at room temperature. Isolated glomeruli were allowed to adhere to an observation chamber coated with poly-L-lysine (1 mg/ml) for 5 to 10 seconds. Unattached glomeruli were removed by gentle washing with fresh isolation medium. Adherent glomeruli were viewed in a microscope, and then the image was captured by computer. The area of each glomerulus was automatically measured using NIH software. The volume of each glomerulus was calculated from the area (S) using the formula $V = 4/3\pi(S/\pi)$. At least 120 glomeruli from three or more rats were studied in each experiment.

Statistical analysis

All measured values are given as mean \pm standard deviation (SD). The nonparametric Mann -Whitney U test was used for comparison of the measured values of erythrocyte velocities, since these parameters are known to have a distribution which deviates considerably from the Gaussian. A P value less than 0.05 was considered significant in all statistical tests.

結 果

Determination of baseline characteristics of experimental animals

At 4 and 28 days after STZ injection, determination of baseline characteristics differed significantly between the investigated groups as showed in Table 1. Blood and urinary glucose levels, urinary protein excretion and creatin in clearance were estimated. Microalbuminuria level was also examined by radioimmunoassay. Blood glucose, urine glucose and albuminuria were markedly elevated in diabetes animals. Hyperglycemia (> 300 mg/dl) has already started at day 4, and lasted at day 28. Heavy proteinuria (>100 mg/day) started at day 4, and reached at maximum (mean = 500 mg/day) at day 28. Mean arterial pressure of the carotid artery in the control rats was 107 ± 3 mmHg. On days 4 and 28 after injection with STZ, mean arterial pressure was 106 ± 4 mmHg and 101 ± 9 mmHg, respectively, not significant difference with control.

Kidney weight and ratio of kidney/ body weight

Although body weight was less in diabetic rats after 4 and 28 days injection, diabetic kidneys weighed more than control kidneys. The ratio of Kidney/body weight in 4-day diabetic rats was significantly higher than that in control rats, and it was more pronounced in 28-day diabetic group.

The effect of diabetes on erythrocyte velocity

The left kidneys of Munich Wistar rats were observed by intravital microscopy. On day 4 after STZ injection, erythrocyte velocities within glomeruli were slightly faster in diabetic rats (676.1 ± 209.6 μ m/sec) than in control

rats ($496.1 \pm 134.1 \mu\text{m/sec}$), similarly, erythrocyte velocities within microvasculature around Bowman's capsule were also slightly faster in diabetic rats ($446.1 \pm 223.8 \mu\text{m/sec}$) than in control rats ($238.8 \pm 122.4 \mu\text{m/sec}$). On day 28 after STZ injection, erythrocyte velocities within glomeruli were significantly faster in diabetic rats ($859.3 \pm 192.1 \mu\text{m/sec}$) than in control rats ($495.4 \pm 110.7 \mu\text{m/sec}$). Therefore, erythrocyte velocities within glomeruli appeared to be faster in diabetic rats than in control rats as early as on day 4. Similarly, on day 28 erythrocyte velocities within microvasculature around Bowman's capsule were also markedly faster in diabetic rats ($516.3 \pm 114.0 \mu\text{m/sec}$) than in control rats ($351.3 \pm 91.6 \mu\text{m/sec}$).

The effect of diabetes on diameters of AA and EA

On days 4 and 28 after STZ injection, we measured the diameters of AA and EA in control and diabetic rats. The afferent and / or efferent arterioles within the glomeruli were identified by observation of the microvascular branches and the direction of movement of labeled red blood cells. On day 4 after STZ injection, the diameters of AA in diabetic rats ($10.39 \pm 1.43 \mu\text{m}$) significantly increased, comparison with control rats ($8.43 \pm 0.52 \mu\text{m}$). In addition, the diameters of EA in diabetic rats ($10.43 \pm 1.70 \mu\text{m}$) significantly increased as compared with control rats ($8.00 \pm 0.68 \mu\text{m}$). On day 28 after STZ injection, the diameters of AA in diabetic rats ($11.68 \pm 0.79 \mu\text{m}$) further enlarged, significantly greater increased than that in controls ($8.88 \pm 1.22 \mu\text{m}$). However, the diameters of EA in diabetic rats ($10.49 \pm 1.16 \mu\text{m}$) did not further increased, but there was significant difference with controls ($8.33 \pm 0.96 \mu\text{m}$).

Measurement of glomerular volume

Using isolated glomeruli from diabetic and control groups, we observed directly glomerular size and calculated the volume of glomeruli. We demonstrated that the volume of glomeruli were markedly larger in diabetic rats as compared with control rats.

The effect of diabetes on glomerular blood flow (GBF)

In order to deepen understanding the importance of hemodynamic alteration in diabetes, we calculated the change of blood flow using the equation $BF = \pi (D/2)^2 \cdot GBV$. GBF were significantly higher in 4-day diabetic rats as compared with control rats, and it more pronounced in 28-day diabetic group.

考 察

In the present study, we evaluated the glomerular microcirculation in diabetic rats by intravital microscope equipped with real-time CLSM in combination with a high-speed CCD video camera. This system visualizes AA, EA, and the movement of labeled-RBCs within glomeruli and microvessels around Bowman's capsule. Therefore, GBV, BBV and GBF can be calculated. This research demonstrated that a basal vasodilation of afferent arterioles and efferent arterioles and an increased glomerular blood flow in diabetic rats, consistent with previous studies. This phenomenon appeared as early as on day 4 after STZ injection. It deepened our understanding on hyperperfusion and hyperfiltration in early phase of diabetes, and to reconfirm the significance of hemodynamic abnormalities in diabetic nephropathy.

The CLSM intravital videomicroscopic technique appears to exceed other methodological approaches in following several points: (1) This technique avoids nonphysiological effects of invasive operative procedures. (2) This system can real-time observe and record the continuous images of movement of FITC-labeled RBCs and calculate the erythrocyte velocities within glomeruli and microvessels around Bowman's capsule, because this system can capture 360 frames of confocal images, and sends 30 frames of confocal images per second to an ICCD camera (3) The diameters of afferent arterioles, efferent arterioles and glomerular blood flow can be evaluated. (4) Systemic hemodynamics (e.g., blood pressure) can be measured simultaneously. (5) The technique and experimental preparation are simpler than other approaches of direct visualization of the renal microcirculation.

Using this newly developed videomicroscopic technique, we evaluated the glomerular microcirculation in normal and diabetes in Munich Wistar rats. The unique characteristic of this rat strain is that many glomeruli are located near the surface of the kidney and easy to visualizing the renal microcirculation by intravital microscopy. We have observed differences of renal hemodynamics between two groups in several points. Firstly, the diabetic rats on days 4 and 28 after STZ injection had a significantly higher ratio of kidney/ body weight than control rats. Also, glomerular volume predominantly enlarged in diabetes as compared with controls. Secondly, on days 4 and 28, the diameters of afferent and efferent arterioles significantly increased in diabetic rats as compared with control rats. Thirdly, on day 28, erythrocyte velocities within glomeruli and vessels around Bowman's capsule were significantly faster in diabetic rats than in control rats. Moreover, on day 4, erythrocyte velocities within glomeruli were significantly faster in diabetic rats than in control rats. Finally, GBF was significantly higher in diabetic rats on days 4 and 28 after STZ injection as compared with control rats.

Although body weight was less in the diabetic rats, diabetic kidneys weighed 22% more than control kidneys in 4-day group. There is a higher ratio of kidney/ body weight in 4-day groups (diabetes 6.00 ± 0.55 , control 4.43 ± 0.36) and more pronounced in 28-day groups (diabetes 7.36 ± 0.73 , control 4.27 ± 0.50). Moreover, we also directly observed that glomerular volume significantly increased in diabetes as compared with control rats. While kidney weight was a strong predictor of glomerular filtration rate as previous report. Glomerular hyperfiltration in early diabetes correlates with increased kidney size. On the other hand, we demonstrated that GBV and GBF in diabetic rats of 4 and 28 days had significantly increased as compared with control rats. Therefore, our evidence suggested that diabetes of 4 day had appeared not only renal hypertrophy, but also hyperperfusion and hyperfiltration simultaneously.

The glomerular microcirculation regulates glomerular filtration and renal hemodynamics by altering the vascular resistance of afferent arterioles and efferent arterioles. Therefore, their behavior is the most important determinant of glomerular blood flow and the glomerular filtration rate. In this present study, we observed that the diameters of afferent and efferent arterioles significantly increased in diabetic rats of 4 and 28 days as compared with control rats. Actually, basal diameters of all vessel types were wider in diabetic rats than that in control rats. Diabetic rats showed a reduced renal vascular resistance, which may be caused by increased NO production in the renal microcirculation. We demonstrated that the EA also dilated in the early phase of diabetes besides of AA. However, the dilation capacity of EA was lower than AA. Therefore, the diameters of AA further enlarged with time, while the diameters of EA on day 28 had no difference with that on day 4. In addition, we demonstrated that the AA/EA ratio increased in diabetes of 28 days, indicating a pronounced increased internal glomerular pressure.

This newly developed technique can analyze acute changes induced by some factors in glomerular microcirculation in vivo. To shed some light on this area, the effects of some vasodilator and vasoconstrictor on renal microcirculation should be investigated under direct intravital microscopic observation. That is our important forthcoming work.

The noninvasive procedure, using CLSM in combination with high-speed videocamera, allowed us to evaluate the renal microcirculation in vivo. It is useful to analyze directly mediators of diabetic hyperfiltration and other experimental models. This technique for directly studying afferent and efferent arterioles changes and glomerular filtration rate in vivo may provide important insights into the actions of drugs and into renal diseases. Clinicians are beginning to be able to select drugs that have desired effects on the renal microcirculation.

参考文献

1. Anderson, S., and J.P. Vora. 1995. Current concepts of renal hemodynamics in diabetes. *J Diabetes Complications*. 9:304-7.

2. De Vriese, A.S., M.S. Stoenoiu, M. Elger, O. Devuyst, R. Vanholder, W. Kriz, and N.H. Lameire. 2001. Diabetes-induced microvascular dysfunction in the hydronephrotic kidney: role of nitric oxide. *Kidney Int.* 60:202-10.
3. Hostetter, T.H. 1994. Mechanisms of diabetic nephropathy. *Am J Kidney Dis.* 23:188-92.
4. Hostetter, T.H. 2001. Hypertrophy and hyperfunction of the diabetic kidney. *J Clin Invest.* 107:161-2.
5. Ito, S., and O.A. Carretero. 1990. An in vitro approach to the study of macula densa-mediated glomerular hemodynamics. *Kidney Int.* 38:1206-10.
6. Loutzenhiser, R., M. Epstein, K. Hayashi, and C. Horton. 1990. Direct visualization of effects of endothelin on the renal microvasculature. *Am J Physiol.* 258:F61-8.
7. McMillan, D.E. 1984. The microcirculation in diabetes. *Microcirc Endothelium Lymphatics.* 1:3-24.
8. Miura, K., and M. Minamiyama. 1998. [In vivo visualization of renal microcirculation using hydronephrotic rat kidney]. *Nippon Yakurigaku Zasshi.* 112:251-6.
9. O'Bryan, G.T., and T.H. Hostetter. 1997. The renal hemodynamic basis of diabetic nephropathy. *Semin Nephrol.* 17:93-100.
10. Ogasawara, Y., K. Takehara, T. Yamamoto, R. Hashimoto, H. Nakamoto, and F. Kajiya. 2000. Quantitative blood velocity mapping in glomerular capillaries by in vivo observation with an intravital videomicroscope. *Methods Inf Med.* 39:175-8.
11. Ohishi, K., and P.K. Carmines. 1995. Superoxide dismutase restores the influence of nitric oxide on renal arterioles in diabetes mellitus. *J Am Soc Nephrol.* 5:1559-66.
12. Oyanagi-Tanaka, Y., J. Yao, Y. Wada, T. Morioka, Y. Suzuki, F. Gejyo, M. Arakawa, and T. Oite. 2001. Real-time observation of hemodynamic changes in glomerular aneurysms induced by anti-Thy-1 antibody. *Kidney Int.* 59:252-9.
13. Roman, R.J., P.K. Carmines, R. Loutzenhiser, and J.D. Conger. 1991. Direct studies on the control of the renal microcirculation. *J Am Soc Nephrol.* 2:136-49.
14. Saito, M., S. Homma, I. Yamatsu, M. Sato, and N. Ohshima. 1994. Visualization of renal microcirculation in isolated Munich-Wistar rat kidneys: effects of endothelin-1 on renal hemodynamic activity. *Jpn J Pharmacol.* 66:221-9.
15. Schnackenberg, C.G., and C.S. Wilcox. 2001. The SOD mimetic tempol restores vasodilation in afferent arterioles of experimental diabetes. *Kidney Int.* 59:1859-64.
16. Thomson, S.C., A. Deng, D. Bao, J. Satriano, R.C. Blantz, and V. Vallon. 2001. Ornithine decarboxylase, kidney size, and the tubular hypothesis of glomerular hyperfiltration in experimental diabetes. *J Clin Invest.* 107:217-24.
17. Veelken, R., K.F. Hilgers, A. Hartner, A. Haas, K.P. Bohmer, and R.B. Sterzel. 2000. Nitric oxide synthase isoforms and glomerular hyperfiltration in early diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol.* 11:71-9.
18. Yamamoto, T., K. Hayashi, H. Matsuda, Y. Tomura, Y. Ogasawara, R. Hashimoto, T. Tada, H. Tanaka, and F. Kajiya. 2000. Direct in vivo visualization of glomerular microcirculation by intravital pencil lens-probe CCD videomicroscopy. *Clin Hemorheol Microcirc.* 23:103-8.
19. Yamamoto, T., Y. Tomura, H. Tanaka, and F. Kajiya. 2001. In vivo visualization of characteristics of renal microcirculation in hypertensive and diabetic rats. *Am J Physiol Renal Physiol.* 281:F571-7.

注：本研究は、2001年10月16日『第34回米国腎臓学会』と2002年5月24日『第45回日本腎臓学会』にて発表。



作成日：2002年2月7日

2001年度日中医学協会共同研究等助成事業報告書

－在留中国人研究者研究助成－

2002年 3 月 8 日

財団法人 日中医学協会
理事長 殿

研究者氏名 ユウ ヒロ 
 所属機関名 順天堂大学皮膚科
 指導責任者氏名 小川 秀興 
 職 名 教授
 所 在 地 〒113-8421 東京都文京区本郷2-1-1
 電 話 03-3813-3111 内線 4448

1. 研究テーマ

日本人乾癬患者におけるレトロウイルス様粒子の発現とその局在について

2. 本年度の研究業績

(1) 学会・研究会等における発表 ☒ 有 ・ 無 (学会名・演題)

日本研究皮膚科学会第26回年次学術大会・総会
 2001年9月7-8日、愛媛県・松山市

演題：日本人乾癬患者におけるレトロウイルス様粒子の発現と
 その局在について

(2) 学会誌等に掲載した論文 ☒ 有 ・ 無 (雑誌名・論文名)

« The Journal of Investigative Dermatology » Vol. 117, No. 6
 Dec. 2001. 1654-6.

Mutations of ATP2C1 in Japanese Patients with Hailey-Hailey Disease: Intrafamilial and Interfamilial Phenotype Variations and Lack of Correlation with Mutation Patterns.

3. 今後の研究計画

1) 本抗体 (anti pso p27) が乾癬患者中のレトロウイルス様粒子に反応することを確認する。そのために、乾癬患者尿を採取し、密度勾配遠心分離法とウエスタンブロット法により、レトロウイルス様粒子を分離精製する。その後免疫電顕にて確認を行う。


2) 本抗体が squamous cell carcinoma antigen (SCCA) と交差反応性を有するか検討する。pso p27 の部分アミノ酸配列が SCCA と相同性を有するためである。方法は、SCCA の mRNA を RT-PCR にて増幅、pCMV expression vector に挿入する。それを COS1 細胞に遺伝し導入し、Flag つきリコンビナント蛋白を回収し、anti pso p27 抗体で染色する。

3) 最終的に、pso p27 をコードする遺伝子を同定する。本レトロウイルス様粒子は表皮肥満細胞に発現しているため、肥満細胞セルライン (本大学アトピー疾患研究センター) に本レトロウイルス様粒子を感染さ、それより cDNA ライブラリーを作製する。本抗体を用いて、expression スクリーニングを行う。

4. 指導責任者の意見

乾癬は、罹患率が国民の約 0.2 ~ 0.3 % と推定されており、数百万人の患者が存在すると考えられている。また原因不明で、根本的治療がないため、患者の QOL のみならず、医療経済的にも社会的問題となっている。本症の一因としてレトロウイルスの関与とその対策方法が明らかになれば、新治療法開発につながるだけでなく、社会的にも大変有意義と考えられる。愈医師は、勤勉かつ積極的に研究を行っており、今後上記に予定されている課題を早急にまとめることが可能と思われる。

指導責任者氏名

小川 秀興 

5. 研究報告書

別紙報告書作成要領により、添付の用紙で研究報告書を作成して下さい。

研究発表中または研究中の本人のスナップ写真を添付して下さい。

※研究成果を発表する場合は、発表原稿・抄録集等も添付して下さい。

※発表に当っては、日中医学協会助成金による旨を明記して下さい。

日本人乾癬患者におけるレトロウイルス様粒子の発見とその局在について

研究者氏名	俞 雪氷
中国所属機関	北京航天医学研究所
日本研究機関	順天堂大学皮膚科
指導責任者	教授 小川 秀興
共同研究者名	池田 志孝

Abstract

Retrovirus-like particles Pso p27 in psoriatic skin lesion were initially discovered in 1983. A monoclonal antibody (moAb) against internal protein, pso p27, of the particles was established in 1988. And the antibody has been reported to react to the stratum comeum cells, some spinous cells and some tryptase-positive dermal infiltrating cells of the psoriatic skins. In this study, we examined the reactivity of the moAb to the skins from Japanese patients with psoriasis by immun-fluorescent (IF) and immuno-electron microscopy (IEM). Frozen sections and paraffin sectiona were prepared from the lesion skins of 24 unrelated Japanese psoriatic patients, then proceeded by standard IF procedure. The skin reacted to the moAb by IF was immersed into paraformaldehyde and serially diluted sucrose solutions, then proceeded for IEM by standard procedure using gold conjugated goat anti mouse IgG. The results showed that positive reactivity was detected on the stratum comeum cells in 12 out of 24 patients lesion skins. By IEM, vesicles-like structure and surface of stratum comeum cells, as moAb, however, further confirmation by using immuno-gold labeled antibody should be required to exclude the effect of endogenous peroxidase from the cells such as neutrophils and mast cells. Conclusion: retrovirus-like particles present in the skin of some Japanese patients with psoriasis. And the retrovirus-like particles may participate in the pathophysiology of the disease.

Key words: psoriasis; pso p27 antigen; immunofluorescence; IEM.

Introduction

The psoriasis-associated antigen, pso p27, can be isolated from psoriasis scale and is present in complement-activating immune complexes in psoriatic scale, and in serum from patients with psoriasis. pso p27 antigen was localized to a sub-fraction of dermal cells and in the endothelial lining of some of dermal vessels. The antigen is produced by tryptase-positive cells in the skin lesions and is shown to be a major antigen in the immune reactions in psoriasis.

The infiltration of inflammatory cells, which is an initial event in the development of skin lesions in psoriasis, strongly suggests that immune reaction play a major role in the pathogenesis of this condition.

Immunological analyses have shown that a protein present in psoriatic scale, pso p27, participates in the generation of complement-activating immune complexes, both in the psoriatic plaques (1 ^ 3) and in synovial liquid of patients with psoriasis arthritis (1). Recently, we presented evidence that the pso p27 antigen is expressed by mast cells in the skin lesion (4). The expression of the antigen was reduced or omitted when the lesions were in remission, even if the mast cells were still present. Indicating a direct correlation between the inflammatory and the expression of pso p27 antigen.

In this study we followed 24 patients with extensive psoriasis in order to investigate the percent of the expression of pso p27 antigen at the psoriasis patients and to observe the expression by immuno-electron microscopy (IEM).

-----The main pathological changes in psoriasis are a hyperproliferation of epidermal keratinocytes and an inflammatory reaction in the dermis with infiltration of lymphocytes and macrophages. In established lesions polymorphonuclear leukocytes are regularly noted in the epidermis, often present in the characteristic Munro micro abscesses.

Material and method

Specimens

Punch biopsies (3-4mm) were obtained from skin lesions of 24 patients suffering from static chronic plaque psoriasis and 4 normal persons. The specimens were frozen with Tissue-Tek O.C.T. Compound in liquid nitrogen and stored at -80C or embedded in paraffin after fixation in ethanol. [1] [2]. Thin sections (4 - 5 mm) of the skin biopsies were analyzed with respect to pso p27 antigen using monoclonal anti-pso p27 antibodies.

Immunofluorescence analysis

Frozen sections (4-5 um thick) and deparaffined sections (5-6um) were prepared for immunofluorescence staining. Sections were fixed in 70% methyl alcohol plus 0.3%

hydrogen peroxide for ten minutes and blocked with 1% BSA, 5% skim milk and 0.1% Tween 20 of PBS for 30 minutes. Then, sections were incubated with mouse monoclonal anti-pso p27 antibodies (10ug/ml) 50ul each section overnight at 4°C. (monoclonal anti-pso p27 antibodies was provided by Pro. Ole-Jan Iversen. Departments of Microbiology, University Hospital, Norway.). After 5 times washes in 0.1% Tween 20 of PBS, sections were incubated with anti-mouse immunoglobulins FICT kaninchen F (ab') 2 IgG (DAKO. Denmark) for 1 hour at 37C. Normal skin sections following another 5 washes in PBS, sections were overlapped using antifade solution - FluoroGuard ant fade reagent (Bio-Red Laboratories. CA.USA.). Finally, sections were examined using a Leitz fluorescence microscope. Normal skin sections were as negative control and same psoriatic sections were omitted anti pso p27 antibody as positive control.

Detection pso p27 antigen by Immunological electric microscopy

Immunogold method:

1. Prepare sections for EM

Dissect the skin specimens to the smallest possible size for handling and good penetration. Lightly fix tissue in 2% paraformaldehyde 0.1% glutaraldehyde for 30 minutes. Wash tissue in PBS 30 minutes. Then tissues were cut to thin sections. [3]

2. Immunological staining

Then pre-embedding sections of skin tissue were blocked by 2% BSA-PBS for 1 hour. After washing in PBS, sections were incubated with the primary antibody-- mouse monoclonal anti-pso p27 antibodies (10ug/ml) 50ul each section overnight at 4°C. Following 5 washes in PBS, sections were incubated with-- anti mouse IgG: Gold conjugated (dilution to 1:50 and 1:25) for 3 hours at room temperature. Sections were washed in PBS with 1% --serum, 1% BSA, 0.1% Tween 20 and 0.1% sodium azide thoroughly and then washed in PBS for 5 times. Fixing sections in 1% glutaraldehyde for 10 minutes and washing in water 30 minutes. [4] [12].

RESULTS

Fluorescence was extension in the stratum corneum and in the scale. Fig.1. And bright fluorescence localized to a subfraction of dermal cells and at the endothelial lining of some of the dermal vessels. Fig.2. There were not meaningful fluorescence was detected both at normal skin sections and the control psoriatic sections. Fig. 3,4. The positive expression ratio of the pso p27 antigen at skin lesions of psoriasis was 50%.

Conclusion

1. Retrovirus-like particles present in the half of the skins from Japanese patients with psoriasis.
2. The retrovirus-like particles may participate in the patho-physiology of the disease.

References

1. Morten Dalaker, Trond Jacobsen, Hilde Lysvand, Iversen O-J. Expression of the Psoriasis-associated Antigen, Pso p27, is inhibited by Cyclosporin A. *Acta Derm Venereol.* 1999; 79: 281-284.
2. Iversen OJ.K. Bergh and H. Lysvand. Use of scale antibodies for the detection of antigens in psoriatic lesions. *Acta Derm Venereol.* 1993; 73:31-34.
3. Humbel BM, de Jong MD, Muller WH, Verkleij AJ. Pre-embedding immunolabeling for electron microscopy: an evaluation of permeabilization methods and markers. *Microsc Res Tech.* 1998 Jul 1; 42 (1):43-58.
4. Zwart JA, Iversen OJ, Sand T, Dale LG, Unsgard G. Higher levels of antibodies against the psoriasis-associated antigen pso p27 in cerebrospinal fluid from patients with low back pain and sciatica. *Spine.* 1999 Feb 15;24(4):373-7.
5. Jacobsen T, Lie BA, Lysvand H, Wiig M, Pettersen HB, Iversen OJ. Detection of psoriasis-associated antigen pso p27 in sarcoidosis bronchoalveolar lavage fluid using monoclonal antibodies. *Clin Immunol Immunopathol.* 1996 Oct;81(1):82-7.
6. Iversen OJ, Lysvand H, Bergh K, Eriksen J, Elsayed S. The N-terminal amino acid sequence of the psoriasis-associated antigen, pso p27. *Arch Dermatol Res.* 1995;287(8):761-3. No abstract available.
7. Iversen OJ, Lysvand H, Jacobsen T, Bergh K, Lie BA. The psoriasis-associated antigen, pso p27, is expressed by tryptase-positive cells in psoriatic lesions. *Arch Dermatol Res.* 1995;287(5):503-5. No abstract available.
8. Iversen OJ, Bergh K, Lysvand H. Use of scale antibodies for the detection of antigens in psoriatic lesions. *Acta Derm Venereol.* 1993 Feb;73(1):31-4.
9. Asbakk K, Rodahl E, Lysvand H, Iversen OJ. An antigenic determinant is shared by psoriasis-associated p27 antigen and the Fc part of human IgG. *APMIS.* 1991 Jun;99(6):551-6.
10. Iversen OJ. The expression of retrovirus-like particles in psoriasis. *J Invest Dermatol.* 1990 Nov;95(5):41S-43S. Review.

11. Asbakk K, Bergh K, Iversen OJ. The psoriasis-associated antigen, pso p27, participates in the formation of complement activating immune-complexes in psoriatic scale. APMIS. 1990 Feb;98(2):143-9.
12. Rodahl E, Asbakk K, Iversen OJ. Participation of antigens related to the psoriasis associated antigen, pso p27, in immune complex formation in patients with ankylosing spondylitis. Ann Rheum Dis. 1988 Aug;47(8):628-33.

注：本研究は、2001年9月8日“日本研究皮膚科学会第26回学術大会総会”にて発表。

作成日：2002年3月8日

2001年度日中医学協会共同研究等助成事業報告書

－在留中国人研究者研究助成－

2002年3月2日

財団法人 日中医学協会
理事長 殿

研究者氏名 華 見
 所属機関名 順天堂大学医学部生化学第二
 指導責任者氏名 長岡 功
 職 名 教授
 所 在 地 〒113-8421 東京都文京区本郷 2-1-1
 電話 03-5802-1033 内線 3516



1. 研究 テーマ

好酸球の成熟過程における活性酸素生成酵素の発現の検討

2. 本年度の研究業績

(1) 学会・研究会等における発表 (有) ・ 無 (学会名・演題)

1. 華 見、岩渕和久、秋元智博、坂本廣司、長岡 功 好中球機能におよぼすグルコサミンの影響 第74回日本生化学会大会抄録集 1044, 京都, 2001.
2. 華 見、岩渕和久、秋元智博、坂本廣司、長岡 功 グルコサミンの好中球機能におよぼす影響の検討 第22回日本炎症・再生医学会プログラム予稿集 358, 東京 2001.
3. Nagaoka I., Hua J.(華 見), Iwabuchi K., Tsutsumi-Ishii Y., Niyonsaba F., Sakamoto K. Inhibitory actions of glucosamine, a therapeutic agent for osteoarthritis, on the functions of neutrophils. Society for leukocyte biology 35th Annual Meeting Maui, Hawaii, USA 2001
4. 長岡 功、華 見、坂本廣司 グルコサミンの好中球機能におよぼす影響 キチン・キトサン研究第15回シンポジウム特集 108-109, 米子 2001

(2) 学会誌等に発表した論文 (有) ・ 無 (雑誌名・論文名)

1. Hua J.(華 見), Hasebe T., Someya A., Nakamura S., Sugimoto K., Nagaoka I.: Evaluation of the expression of NADPH oxidase components during maturation of HL-60 clone 15 cells to eosinophilic lineage. Inflamm. Res. 50, 156-167, 2001.
2. Hasebe T., Hua J.(華 見), Someya A., Morain P., Checler F., Nagaoka I.: Involvement of cytosolic prolyl endopeptidase in the degradation of a splice variant protein of p40-phox, an NADPH oxidase component, in myeloid cells. J. Leukoc. Biol. 69, 963-968, 2001.
3. 長岡 功、華 見、坂本廣司 グルコサミンの好中球機能抑制作用とそのメカニズム キチン・キトサン研究 7, 261-265, 2001.

3. 今後の研究計画

グルコサミンは、グルコサミノグリカン（ムコ多糖）の主成分として結合組織や軟骨組織に多く分布し、各器官の強度、柔軟性、弾力性に寄与している。そして、グルコサミンは変形性関節症の治療薬あるいは栄養補助食品として近年注目を集めている。一方、好中球は炎症反応において重要な役割を担っており、炎症反応が惹起されると、組織に浸潤し、活性酸素やプロテアーゼなどの種々の活性物質を放出して組織障害を引き起こすことが知られている。われわれは、グルコサミンが活性酸素生成能、食食、遊走能、接着分子の発現、アクチンの重合、粘着能など好中球機能を影響するかどうかを検討する。さらに、グルコサミンには血流速度の改善効果があるので、グルコサミンが血小板凝集などの機能に影響するかどうかを検討する。


4. 指導責任者の意見

華見さんは上海第二医科大学を1987年に卒業した後、上海紡一病院で血液内科を9年間専攻してきました。1997年から一年間私どもの教室の研究生として、さらに、1998年からは大学院生として生化学の研究に従事してきました。

昨年、「2001年度日中医学協力事業・在留中国人研究助成」をいただいて、「好酸球の分化成熟過程における活性酸素生成酵素の研究」を行い、その成果を昨年生化学会に発表しました。その内容は昨年Inflammation Researchに掲載されるに至りました。

彼は研究熱心で、毎日研究室で朝早くから夜遅くまで自分の研究に没頭しています。大変優秀な研究者で、性格もまじめで、積極性があり、かつ身心ともに健康な人物です。

我々は今後の彼の学問的発展に大いに期待しているところです。

指導責任者氏名 長岡 功 

5. 研究報告書

別紙報告書作成要領により、添付の用紙で研究報告書を作成して下さい。

研究発表中または研究中の本人のスナップ写真を添付して下さい。

※研究成果を発表する場合は、発表原稿・抄録集等も添付して下さい。

※発表に当っては、日中医学協会助成金による旨を明記して下さい。

一日中医学協会助成事業—
好酸球の成熟過程における活性酸素生成酵素の発現の検討—

研究者氏名 華 見
中国所属機関 中国上海普陀区人民医院内科
日本研究機関 順天堂大学医学部生化学第二
指導責任者 教授 長岡 功
共同研究者 長谷部武, 中村眞二, 杉本耕一

要 旨

我々はこれまでに活性酸素生成酵素であるNADPHオキシダーゼが好中球成熟過程の骨髓球の段階で発現し、活性酸素生成能を獲得することを明らかにしている。しかし、好中球と同様、顆粒球の仲間であり、活性酸素生成能を持つ好酸球の成熟過程におけるNADPHオキシダーゼ構成成分(gp91phox, p22phox, p67phox, p47phox, p40phox, rac-2)の発現時期については全く調べられていない。そこで、今回我々は、ヒト前骨髓性白血病細胞HL-60 clone15をモデル系として用いて、好酸球系細胞への成熟過程におけるNADPHオキシダーゼ構成成分の発現を調べた。[方法と結果] HL-60 clone15細胞を0.5 mM butyrate存在下で培養して、好酸球へ成熟させたところ、major basic protein (MBP)が発現されることがわかった。そして、活性酸素生成能をニトロブルーテトラゾリウムで測定した結果、好酸球の成熟過程において、骨髓球の段階から活性酸素生成能が獲得されることがわかった。また、NADPHオキシダーゼ構成成分の発現をNorthern blot およびWestern blot法で解析したところ、gp91phox, p22phox, p67phox, p47phox, p40phox, rac-2の発現量が成熟に伴って増加することがわかった。さらに、これらのオキシダーゼ構成成分の発現を免疫組織染色で解析したところ、各構成成分が骨髓球以降の細胞で強く発現することがわかった。[結論] 好酸球成熟過程の骨髓球の段階でNADPHオキシダーゼ構成成分の発現量が増加し、活性酸素生成能が獲得されることがわかった。

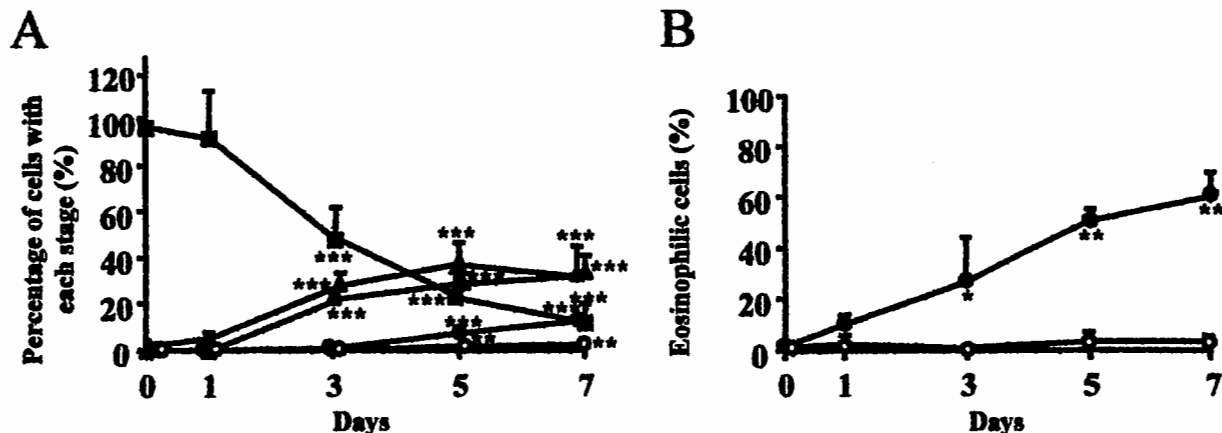
Key words: NADPHオキシダーゼ、活性酸素、好酸球、HL-60 clone 15株

緒 言

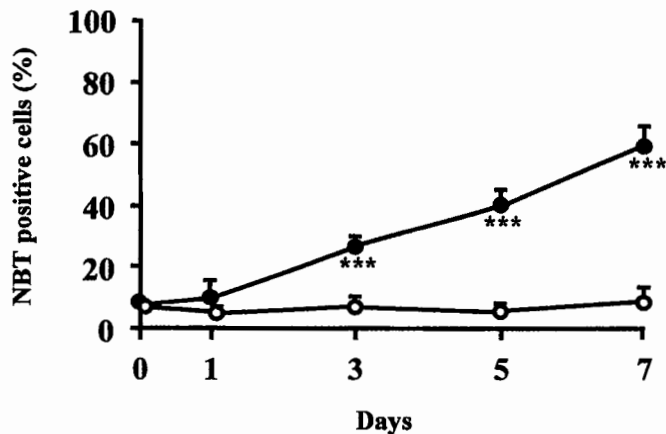
顆粒球の活性酸素は、NADPHオキシダーゼにより産生され、微生物や寄生虫に対する感性防御に重要な役割を担っている。NADPHオキシダーゼは膜タンパクシクロムb558と細胞質因子から構成されている。そして、膜タンパクシクロムb558はgp91phox, p22phoxから、細胞質因子はp47phox, p67phox, p40phoxおよびrac-1/2からなっており、顆粒球細胞が活性化されると、これらが会合して複合体が形成される。われわれはこれまでにNADPHオキシダーゼが好中球成熟過程の骨髓球の段階で発現し、活性酸素生成能を獲得することを明らかにしている(J. Leukoc. Biol. 68, 216-224, 2000)。しかし、好中球と同様、顆粒球の仲間であり、活性酸素生成能を持つ好酸球の成熟過程におけるオキシダーゼ構成成分の発現時期については全く調べられていない。そこで本研究では、ヒト前骨髓性白血病細胞HL-60 clone 15株をモデル系として用い、好酸球の成熟過程におけるNADPHオキシダーゼ構成成分の発現を調べた。

方法と結果

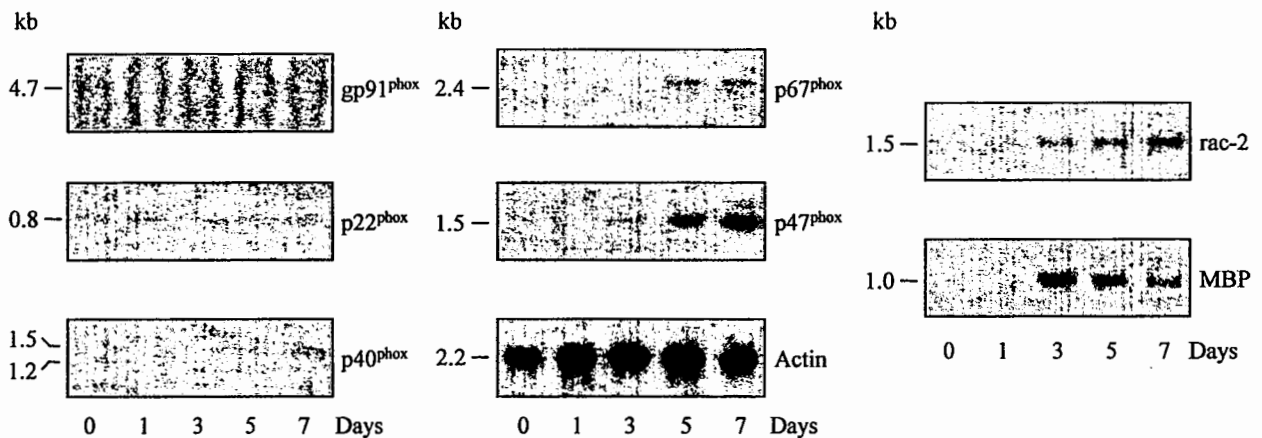
1) Butyrate (0.5 mM)存在下でHL-60 clone 15細胞を0-7日間処理して細胞を好酸球へ分化成熟させた後、May/Grünwald/Giemsa染色を行い、細胞の形態変化を顕微鏡で観察した。その結果、Butyrate処理によって前骨髓細胞は減少し、好酸球系細胞の増加が見られた。7日目の細胞は、前骨髓球(PM)が11.5%、好酸球系骨髓球(E-MC)が31.7%、好酸球系後骨髓球(E-MM)が33.2%、好酸球系桿状細胞(E-Band)が12%、好酸球系分葉細胞(E-Seg)が1.6%となった(A)。さらに、Discombe染色も合わせて行なった結果、7日目では約60%の細胞が好酸球系細胞に分化成熟していることがわかった(B)。



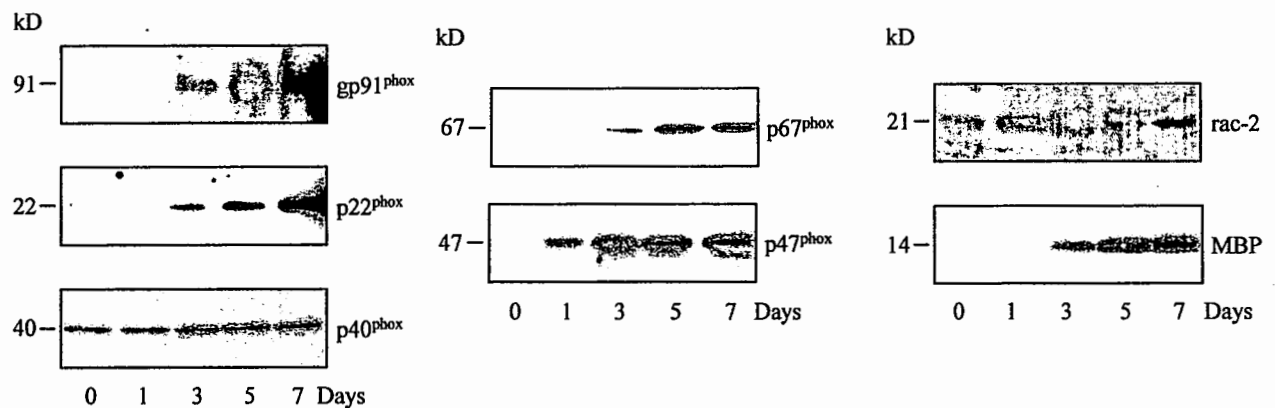
2) Butyrate処理したHL-60 clone 15細胞における活性酸素生成能の変化をNBT還元法で検討した。その結果、未誘導の細胞あるいはButyrate処理後1日の細胞はほとんど活性酸素を生成しなかったが(それぞれ7.3%、9.5%)、それ以降、活性酸素生成細胞が徐々に増加し、7日目では57.6%になることがわかった。



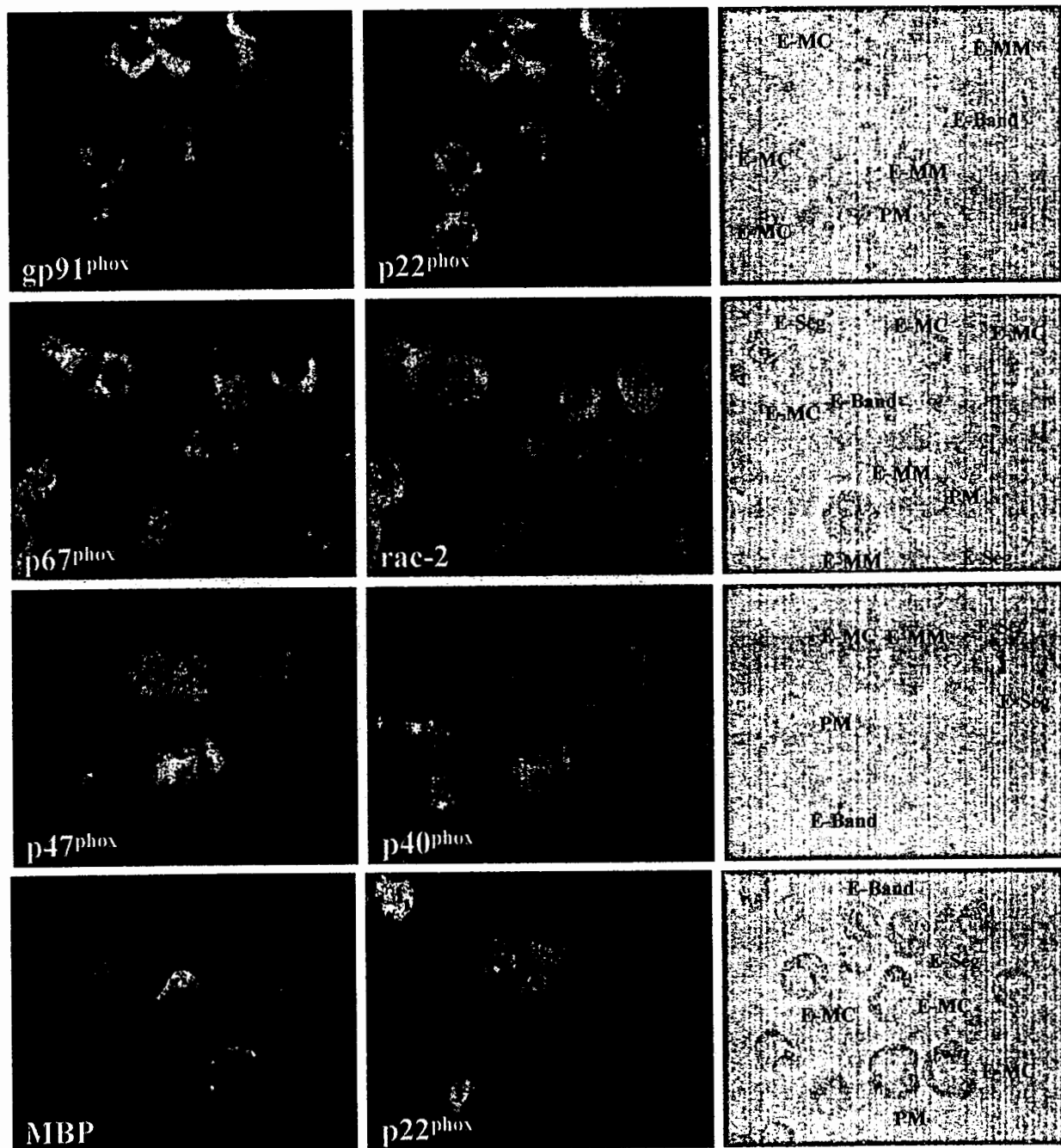
3) HL-60 clone 15細胞の好酸球成熟過程におけるNADPHオキシダーゼのmRNAの発現をNorthern blot法で解析した。その結果、p40phox, p22phox, rac-2は0日で少し発現し、それ以降、それらの発現量が増加することがわかった。一方、gp91phox, p67phox, p47phoxが0日で発現しなかったが、gp91phoxでは1日以降で、p67phox, p47phoxでは3日以降で発現量が増加することがわかった。なお、好酸球の顆粒タンパク質であるMajor Basic Protein (MBP)のmRNAの発現量はButyrate処理によって増加することがみられた。



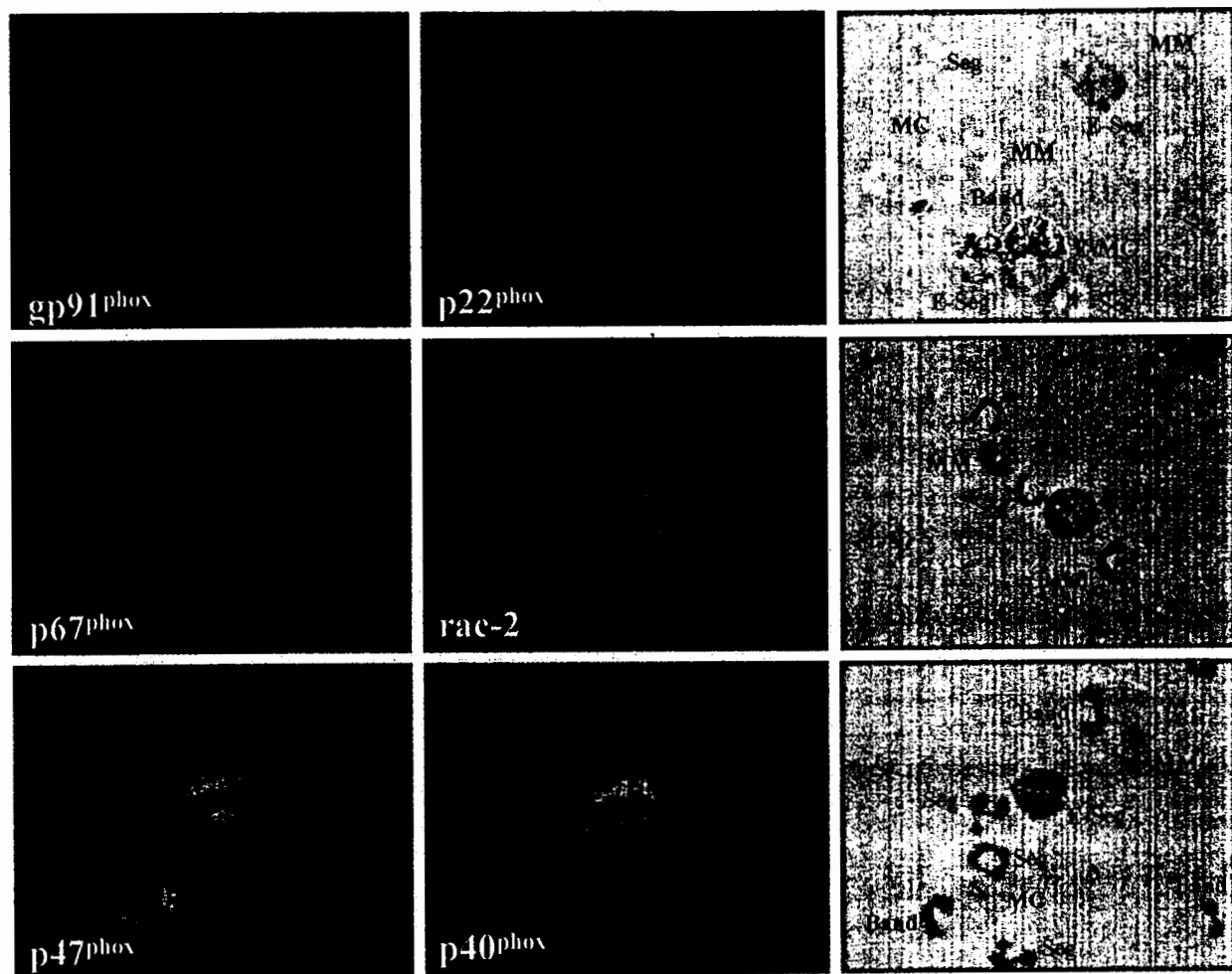
4) HL-60 clone 15細胞の好酸球成熟過程におけるNADPHオキシダーゼのタンパク質の発現をWestern blot法で解析した。その結果、p40phoxおよびrac-2は0日でも少量ながら発現がみられたが、分化成熟に伴って発現量が増加することがわかった。一方、gp91phox, p22phox, p67phox, p47phoxは0日において発現が見られなかったが、3日以降で発現が誘導され、その後さらに発現量が増加することがわかった。なお、MBPの発現量はButyrate処理によって増加することがみられた。



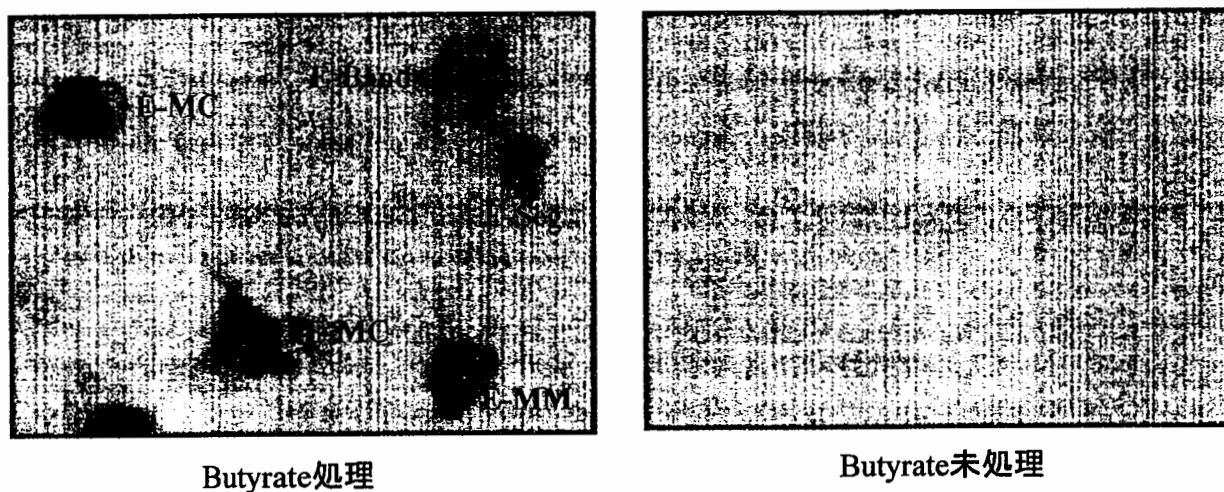
5) Butyrate処理したHL-60 clone 15細胞を免疫組織染色し、NADPHオキシダーゼ構成成分の発現を解析した。その結果、p40phox, rac-2は前骨髄球(PM)で発現していたが、gp91phox, p22phox, p67phox, p47phoxは前骨髄球(PM)で発現していないことがわかった。また、すべての構成成分(gp91phox, p22phox, p67phox, p47phox, p40phox, rac-2)が発現するのは、好酸球系骨髄球(E-MC)と後骨髄球(E-MM)および、好酸球系桿状細胞(E-Band)と分葉細胞(E-Seg)であることがわかった。なお、MBPの発現は好酸球系骨髄球(E-MC)以降で見られた。



6) ヒト骨髓細胞を用いて免疫組織染色でNADPHオキシダーゼ構成成分の発現を解析した。HL-60 clone 15細胞で得られた結果と同様に、p40phox, rac-2は前骨髓球(PM)で発現していたが、gp91phox, p22phox, p67phox, p47phoxは前骨髓球(PM)で発現していなかった。また、すべての構成成分(gp91phox, p22phox, p67phox, p47phox, p40phox, rac-2)が発現するのは、好酸球系骨髓球(E-MC)と後骨髓球(E-MM)および、好酸球系桿状細胞(E-Band)と分葉細胞(E-Seg)であることがわかった。なお、免疫組織染色で染色された細胞はHansel染色で好酸球系細胞であることが確認された。



7) Butyrate処理したHL-60 clone 15細胞を用いてNBT還元法で染色し、顕微鏡で観察した。活性酸素生成能は好酸球の成熟過程の骨髓球(E-MC)と後骨髓球(E-MM)および、好酸球系桿状細胞(E-Band)と分葉細胞(E-Seg)で現れることがわかった。



考 察

われわれはこれまでにNADPHオキシダーゼが好中球成熟過程の骨髓球の段階で発現し、活性酸素生成能を獲得することを明らかにしている (J. Leukoc. Biol. 68, 216-224, 2000)。

今回われわれは、好中球と同様、顆粒球の仲間であり、活性酸素生成能を持つ好酸球の成熟過程におけるNADPHオキシダーゼ構成成分(gp91phox, p22phox, p67phox, p47phox, p40phox, rac-2)の発現時期を調べるために、ヒト前骨髓性白血病細胞HL-60 clone15をモデル系として用いて、好酸球系細胞への成熟過程におけるNADPHオキシダーゼ構成成分の発現や活性酸素生成を検討した。

まず、Northern blot, Western blotおよび免疫組織染色の結果によって、gp91-phoxとp22phoxが好酸球成熟過程の骨髓球の段階で観察され、その後、その発現量は分化成熟に従って増加することがわかった。また、gp91-phoxとp22phox両方ともに細胞膜に局在し、gp91phoxやp22phoxの欠損患者ではgp91phoxとp22phoxの両方が発現しないことがわかっている。以上のことから、gp91-phoxとp22phoxともに好酸球成熟過程の骨髓球の段階で発現し、その後、その発現量は分化成熟に従って増加することが明らかになった。膜タンパク質gp91phoxとp22phoxのほかに、細胞質因子であるp67phoxとp47phoxも活性酸素生成に重要な役割を果たしている。

細胞系で顆粒球を活性化すると、p47phoxとp67phoxが膜に移行し、膜タンパク質 (gp91phoxとp22phox) と会合してNADPHオキシダーゼが活性化されることが報告されている。われわれのデータから、gp91phoxとp22phoxと同様に、p47phoxとp67phoxも好酸球成熟過程の骨髓球の段階で発現され、その後、その発現量は分化成熟に従って増加することが明らかになった。また、骨髓球の段階では、好酸球が活性酸素生成能を獲得することもわかった。

一方、細胞質因子rac-1とrac-2は低分子GTP-binding タンパク質であり、92%の相同性があることがわかっている。さらに、ヒトでは、rac-2のタンパク質はrac-1より96%以上多いこともわかっている。われわれの研究結果から、rac-2は未分化細胞から発現し、分化成熟にしたがって増加することが見出されたが、rac-1は分化成熟によって減少することがわかった(データは示していない)。したがって、ヒトでは、rac-2は好酸球の分化成熟にしたがってその発現量が増加することによって、活性酸素生成に関与していると考えている。また、同じ細胞因子であるp40phoxは、rac-2と同様に未分化細胞で発現し、分化成熟に従って増加しているから、NADPHオキシダーゼ構成成分に重要な因子になっていると考えられる。

以上のことから、好酸球のNADPHオキシダーゼ構成成分(gp91phox, p22phox, p67phox, p47phox, p40phox, rac-2)は、好中球と同様に、分化成熟過程において骨髓球の段階で発現量が増加し、活性酸素生成能が獲得されることがわかった。

参考文献

1. Kita H, Adolphson CR, Gleich GJ. Biology of eosinophils. In: Middleton E Jr, Reed CE, Ellis EF, Adkinson NF Jr, Yunginger JW, Busse WW, editors. Allergy: principles and practice. 5th ed. St Louis: Mosby, 1998: 242-60.
2. Gleich GJ. J Allergy Clin Immunol 2000; 105: 651-63.
3. Segal AW, Garcia R, Goldstone AH, Cross AR, Jones OTG. Biochem J 1981; 196: 363-7.
4. Yazdanbakhsh M, Eckmann CM, Roos D. J Immunol 1985; 135: 1378-84.
5. Yamashita T, Someya A, Hara E. Arch Biochem Biophys 1985; 241: 447-52.
6. Bolscher BJM, Koenderman L, Tool ATJ, Stokman PM, Roos D. FEBS Lett 1990; 268: 269-73.
7. Someya A, Nishijima K, Nunoi H, Irie S, Nagaoka I. Arch Biochem Biophys 1997; 345: 207-13.
8. DeLeo FR, Quinn MT. J Leukoc Biol 1996; 60: 677-91.
9. Babior BM. Blood 1999; 93: 1464-76.
10. Thrasher AJ, Keep NH, Wientjes F, Segal AW. 1994; 1227: 1-24.
11. Roos D, de Boer M, Kuribayashi F, Meischl C, Weening RS, Segal AW, et al. Blood 1996; 87: 1663-81.
12. Hua J, Hasebe T, Someya A, Nakamura S, Sugimoto K, Nagaoka I. J Leukoc Biol 2000; 68: 216-24.
13. Miyamoto D, Someya A, Nunoi H, Nagaoka I, Yamashita T. Biochim Biophys Acta 1994; 1224: 11-6.
14. Imajoh-Ohmi S, Tokita K, Ochiai H, Nakamura M, Kanegasaki S. J Biol Chem 1992; 267: 180-4.
15. Nakamura M, Murakami M, Koga T, Tanaka Y, Minakami S. Blood 1987; 69: 1404-8.
16. Tsunawaki S, Kagara S, Yoshikawa K, Yoshida LS, Kuratsuji T, Namiki H. J Exp Med 1996; 184: 893-902.
17. Popken-Harris P, Checkel J, Loegering D, Madden B, Springett M, Kephart G, et al. Blood 1998; 92: 623-31.
18. Fischkoff SA. Leukemia Res 1988; 12: 679-86.
19. Fischkoff SA, Condon ME. Cancer Res 1985; 45: 2065-9.
20. Discombe G. Lancet 1946; 1: 195-6.
21. Bainton DF. Developmental biology of neutrophils and eosinophils. In: Gallin JI, Goldstein IM, Snyderman R, editors. Inflammation: Basic Principles and Clinical Correlates. 2nd ed. New York: Raven Press, 1992: 303-24.
22. Lee NA, McGarry MP, Larson KA, Horton MA, Kristensen AB, Lee JJ. J Immunol 1997; 158: 1332-44.
23. Chomczynski P, Sacchi N. Anal Biochem 1987; 162: 156-9.

24. Royer-Pokora B, Kunkel LM, Monaco AP, Goff SC, Newburger PE, Baehner RL, et al. *Nature* 1986; 322: 32-8.
25. Parkos CA, Dinanuer MC, Walker LE, Allen RA, Jesaitis AJ, Orkin SH. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; 85: 3319-23.
26. Leto TL, Lomax KJ, Volpp BD, Nunoi H, Sechler JMG, Nauseef WM, et al. *Science* 1990; 248: 727-30.
27. Volpp BD, Nauseef WM, Donelson JE, Moser DR, Clark RA. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86: 7195-9.
28. Hasebe T, Someya A, Nagaoka I. *FEBS Lett* 1999; 455: 257-61.
29. Didsbury J, Weber RF, Bokoch GM, Evans T, Snyderman R. *J Biol Chem* 1989; 264:16378-82.
30. Li M, Sun L, Satoh T, Fisher LM, Spry CJF. *Biochem J* 1995; 305: 921-7.
31. Filley WV, Ackerman SJ, Gleich GJ. *J Immunol Methods* 1981; 47: 227-38.
32. Gruart V, Truong MJ, Plumas J, Zandecki M, Kusnierz J, Prin L, et al. *Blood* 1992; 79: 2592-7.
33. Parkos CA, Dinanuer MC, Jesaitis AJ, Orkin SH, Curnutte JT. *Blood* 1989; 73: 1416-20.
34. Heyworth PG, Bohl BP, Bokoch GM, Curnutte JT. *J Biol Chem* 1994; 269: 30749-52.
35. Quinn MT. *J Leukoc Biol* 1995; 58: 263-76.
36. Dorseuil O, Reibel L, Bokoch GM, Camonis J, Gacon G. *J Biol Chem* 1996; 271: 83-8.
37. Roberts AW, Kim C, Zhen L, Lowe JB, Kapur R, Petryniak B, et al. *Immunity* 1999; 10: 183-96.
38. Rinckel LA, Faris SL, Hitt ND, Kleinberg ME. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; 263: 118-22.
39. Rotrosen D, Yeung CL, Leto TL, Malech HL, Kwong CH. *Science* 1992; 256: 1459-62.
40. Abo A, Boyhan A, West I, Thrasher AJ, Segal AW. *J Biol Chem* 1992; 267: 16767-70.
41. Levy R, Rotrosen D, Nagauker O, Leto TL, Malech HL. *J Immunol* 1990; 145: 2595-601.
42. Someya A, Nagaoka I, Yamashita T. *FEBS Lett* 1993; 330: 215-8.
43. Wientjes FB, Hsuan JJ, Totty NF, Segal AW. *Biochem J* 1993; 296: 557-61.
44. Tsunawaki S, Mizunari H, Nagata M, Tatsuzawa O, Kuratsuji T. *Biochem Biophys Res Commun* 1994; 199: 1378-87.
45. Someya A, Nagaoka I, Nunoi H, Yamashita T. 1996; 1277: 217-25.
46. Cross AR. *Biochem J* 2000; 349: 113-7.
47. Sathymoorthy M, de Mendez I, Adams AG, Leto TL. *J Biol Chem* 1997; 272: 9141-6.
48. Suzuki S, Kumatori A, Haagen I, Fujii Y, Sadat MA, Jun HL, et al. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 6085-90.
49. Ou X, Pollock J, Dinanuer MC, Gharehbaghi-Schnell E, Skalnik DG. *DNA Cell Biol* 1999; 18: 253-63.
50. Zhan S, Vazquez N, Zhan S, Wientjes FB, Budarf ML, Schrock E, et al. *Blood* 1996; 88: 2714-21.
51. Yang D, Suzuki S, Hao LJ, Fujii Y, Yamauchi A, Yamamoto M, et al. *J Biol Chem* 2000; 275: 9425-32.

注：本研究は、「Inflammation Research」(2001年, Vol :50、pages :156-167)に掲載

作成日：2002年3月2日

2001年度日中医学協会共同研究等助成事業報告書

－在留中国人研究者研究助成－

平成 14 年 3 月 15 日

財団法人 日中医学協会
理事長 殿

研究者氏名 許 欣
 所属機関名 大阪大学大学院
 指導責任者氏名 笠山 宗正
 職 名 講 師
 所 在 地 〒 565-0871 大阪府吹田市山田丘 2-2
 電話 06-6879-3837(直通)

1. 研 究 テ ー マ 核内受容体による血管内皮細胞のサイトカンや接着分子発現制御

2. 本年度の研究業績

(1) 学会・研究会等における発表 (有) ・ 無 (学会名・演題)

1. 笠山宗正、許 欣、大月道夫：性ホルモンによる血管内皮細胞の接着分子発現制御。第 74 回日本内分泌学会学術総会シンポジウム、2001 年、横浜市。
2. 許 欣、大月道夫、山本浩靖、斎藤博、住谷哲、幸原晴彦、笠山宗正：グルコルチコイドレセプター (GR) による標的遺伝子特異的 NF- κ B 活性阻害とその機構。第 74 回日本内分泌学会学術総会、2001 年、横浜市。
3. 合屋佳世子、大月道夫、許 欣、笠山宗正：2 型糖尿病患者の頸動脈硬化進展と血清可溶性 VCAM-1 に与えるベラプロストナトリウムの作用。第 16 回日本糖尿病合併症学会、2001 年、大阪市。
4. 合屋佳世子、許 欣、大月道夫、笠山宗正：血管内皮細胞の VCAM-1 発現に及ぼすベラプロストナトリウムの作用。第 38 回日本糖尿病学会近畿地方会、2001 年、大阪市。

(2) 学会誌等に発表した論文 (有) ・ 無 (雑誌名・論文名)

1. Otsuki, M., Saito, H., Xu, X., Sumitani, S., Kouhara, H., Kurabayashi, M., and Kasayama, S.: Cilostazol represses vascular cell adhesion molecule-1 gene transcription via inhibiting NF- κ B binding to its recognition sequence. *Atherosclerosis*, 158: 121-128, 2001.
2. Otsuki, M., Saito, H., Xu, X., Sumitani, S., Kouhara, H., Kishimoto, T. and Kasayama, S.: Progesterone, but not medroxyprogesterone, inhibits vascular cell adhesion molecule-1 expression in human vascular endothelial cells. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 21: 243-248, 2001.

3. 今後の研究計画

我々は内皮細胞における核内受容体による IL-6、VCAM-1 などの炎症性因子の遺伝子発現制御に関する研究を行っています。これまでの検討結果では、核内受容体によって炎症性因子の転写抑制作用には、核内受容体 - 遺伝子間に特異性が存在することを明らかにしました。これまでに、炎症性分子の遺伝子転写抑制に対する核内受容体の特異性とそのメカニズムを明らかにした報告はありません。我々は、このような特異性が、標的遺伝子のプロンモーター構造の微細な差異によって、また核内受容体 - 転写因子間相互作用に關与する転写共役因子の特異性によってもたらされるとの仮説を立てています。今現在と今後、核内受容体の発現量の変化また転写共役因子の発現量の変化によって、核内受容体による VCAM-1 および IL-6 遺伝子の転写抑制作用の強度が変化するかどうかを検討致したいです。

4. 指導責任者の意見

許 欣 君は、現在大阪大学大学院医学系研究科分子病態内科学講座の大学院 2 年生であり、日夜医学研究に勤しんでいる。主要な研究テーマは、血管壁に生じる炎症性疾患の発症メカニズムを解明しその有効な抑止的治療法を開発することである。許 君はその研究態度たるや非常に真面目でかつ勉学意欲の高い優秀な学生である。これまでは、特に血管内皮細胞における接着分子の発現制御に関する研究を進めており、核受容体リガンドやプロスタサイクリン誘導体が抗動脈硬化的に作用する分子機構を明らかにしてきた。これらの研究成果は、筆頭研究者あるいは共同研究者として既にいくつかの学会や論文で発表しており、他機関の研究者ともディスカッションできるようになっている。性格も明るく、日々の生活においても教室の他の医学研究者や事務職員とも協調してうまくやっている。これほどまで優秀な留学生をいまだかつて見たことがない、というのが私の正直な感想である。

指導責任者氏名 山 宗 正 印

5. 研 究 報 告 書

別紙報告書作成要領により、添付の用紙で研究報告書を作成して下さい。

研究発表中または研究中の本人のスナップ写真を添付して下さい。

※研究成果を発表する場合は、発表原稿・抄録集等も添付して下さい。

※発表に当っては、日中医学協会助成金による旨を明記して下さい。

血管内皮細胞における IL-6・VCAM-1 プロモーター活性 に及ぼす PPAR α の作用

研究者氏名： 許 欣
中国所属機関 中国医科大学付属第三病院内科
日本研究機関 大阪大学医学系研究科分子病態内科学
指導責任者 講師 笠山 宗正
共同研究者名 大月 道夫, 斉藤 博, 住谷 哲, 幸原 晴彦

要旨

血管内皮細胞におけるサイトカインや接着分子発現の増強は、血管壁における炎症の分子基盤のひとつと考えられている。PPAR α が血管平滑筋細胞における IL-6 産生と血管内皮細胞における VCAM-1 発現を抑制することが報告されているが、その作用機構は不明であった。我々は、培養血管内皮細胞において、Feno の処理により IL-6 産生および VCAM-1 発現が低下することを判明しました。レポーター遺伝子を用いた解析により、これら炎症性分子の発現低下は少なくとも一部は遺伝子の転写レベルでの抑制に基づくことが判明した。また、EMSA による解析結果より、Feno は IL-6 遺伝子および VCAM-1 遺伝子のプロモーター領域に対する NF- κ B の結合を阻害することが明らかとなった。Feno は、TNF- α 刺激時の NF- κ B p65 蛋白の核内移行に対しては影響を与えなかったことから、NF- κ B の活性化阻害における Feno の作用点は NF- κ B の核内移行後のステップにあると考えられた。PPAR γ のリガントである Pio は IL-6 遺伝子および VCAM-1 遺伝子のプロモーター領域に対する NF- κ B の結合に影響を及ぼさなかったことから、Feno の作用は PPAR α を介したものであると考えられた

Key Words Endothelial cells, PPAR-alpha, IL-6, VCAM-1, .

緒言：

種々の炎症性疾患においては、血管内皮細胞におけるサイトカインや接着分子の発現が増強し、これらは血管壁における炎症の分子基盤のひとつと考えられている。したがって、これら炎症性分子の発現抑制は抗炎症薬のターゲットとして有用であると思われる。実際に、強力な抗炎症薬のひとつであるグルココルチコイドは種々のサイトカインや接着分子の発現を抑制することが報告されている^{1,2}。このようなグルココルチコイドの作用は、グルココルチコイドレセプター(GR)を介した標的遺伝子の転写抑制によると考えられている³。最近では、GR 以外の他の核レセプターのリガントによるこれら炎症性分子の発現抑制も明らかにされている⁴⁻⁶が、その分子機構の詳細については不明の点が多い。

Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) α は核レセプタースーパーファミリーに属する受容体であり、種々の脂肪酸やフィブラート剤により活性化される。すでに、PPAR α が血管平滑筋細胞における IL-6 産生と血管内皮細胞における VCAM-1 発現を抑制することが報告されている^{5,7}が、その作用機構は不明であった。今回、我々は血管内皮細胞における IL-6 と VCAM-1 遺伝子のプロモーター活性に及ぼす PPAR α の作用についての解析を行った。

対象と方法：

細胞培養：ウシ大動脈由来内皮細胞(BAEC)は 10%FCS を含む DMEM 培養液で、ヒト臍帯静脈由来内皮細胞(HUVEC)は 10%FCS、2 ng/ml bFGF を含む MCDB131 培養液で培養した。

レポーターアッセイ：IL-6 レポーター遺伝子(-179/+12 hIL-6-LUC：大阪大学審良静男博士より供与)または VCAM-1 レポーター遺伝子(-258/+40 hVCAM-1-LUC：群馬大学倉林正彦博士より供与)を、SuperFect (QIAGEN)を用いて BAEC に移入した。2 時間後に細胞をフェノプラート(Feno)で 24 時間処理し、その後 TNF- α (20 ng/ml)で刺激した。刺激 4 時間後(VCAM-1 レポーター)または 8 時間後(IL-6 レポーター)に細胞を溶解し、ルシフェラーゼ活性を測定した。

EMSA (electrophoretic mobility-shift assay) : HUVEC を Feno またはピオグリタゾン(pio)で 24 時間処理した後 TNF- α で刺激し核蛋白を抽出した。ヒト IL-6 プロモーターおよびヒト VCAM-1 プロモーター領域の NF- κ B 結合配列を含む標識オリゴヌクレオチドを作成し、これに対する結合を解析した⁸⁾。

免疫染色 : HUVEC を 2%パラホルムアルデヒドで固定した後 200 倍希釈の抗 NF- κ B p65 抗体(Santa Cruz)を加え、ビオチン化 IgG 抗体で処理した後 Vectastain 社 ABC kit を用いて免疫染色を行った。

結 果

BAEC に IL-6 レポーター遺伝子を移入し、IL-6 プロモーター活性に及ぼす Feno の効果について検討した(図 1A)。TNF- α の刺激により IL-6 のプロモーター活性は 16 倍に増加した。Feno はこの活性を濃度依存性に抑制した。Feno 単独では IL-6 プロモーター活性に影響しなかった。また、TNF- α は VCAM-1 プロモーター活性を約 20 倍に増加させたが、Feno の処理によりこの活性は有意に抑制された(図 1B)。

IL-6 遺伝子と VCAM-1 遺伝子のプロモーター領域には、各々 1 ヶ所および 2 ヶ所の NF- κ B 結合配列が存在する^{9,10)}。そこで、Feno がこれらプロモーター領域への NF- κ B の結合を阻害するか否かについて EMSA による解析を行った(図 2)。その結果、Feno は IL-6 遺伝子および VCAM-1 遺伝子のプロモーターに対する NF- κ B の結合を阻害した。Pio はこの NF- κ B 結合を阻害しなかった。

NF- κ B の活性化には細胞質から核への移行が必須であることが明らかにされている¹¹⁾ため、NF- κ B p65 蛋白の細胞内局在に対する Feno の作用について解析した(図 3)。免疫染色法では、TNF- α の刺激によって p65 の核内移行が観察されたが、これは Feno の処理によって影響を受けなかった。

考 察

我々は、培養血管内皮細胞において、Feno の処理により IL-6 産生および VCAM-1 発現が低下することを報告した⁸⁾。レポーター遺伝子を用いた解析により、これら炎症性分子の発現低下は少なくとも一部は遺伝子の転写レベルでの抑制に基づくことが判明した。また、EMSA による解析結果より、Feno は IL-6 遺伝子および VCAM-1 遺伝子のプロモーター領域に対する NF- κ B の結合を阻害することが明らかとなった。Feno は、TNF- α 刺激時の NF- κ B p65 蛋白の核内移行に対しては影響を与えなかったことから、NF- κ B の活性化阻害における Feno の作用点は NF- κ B の核内移行後のステップにあると考えられた。PPAR γ のリガントである Pio は IL-6 遺伝子および VCAM-1 遺伝子のプロモーター領域に対する NF- κ B の結合に影響を及ぼさなかったことから、Feno の作用は PPAR α を介したものであると考えられた。

PPAR α が NF- κ B の活性を阻害する分子機構の詳細は不明である。最近 Delerive ら¹²⁾は、過剰発現実験系において PPAR α が p65 蛋白と結合することを証明している。したがって、血管内皮細胞においても実際に PPAR α が p65 と結合し、標的遺伝子のプロモーターへの NF- κ B の結合を阻害しているのかもしれない。あるいは、PPAR α が NF- κ B と転写共役因子(coactivator)との結合を競合的に阻害することにより、NF- κ B の活性を低下させている可能性も想定される。

参考文献

- 1) Collart MA, et al: Mol Cell Biol, 10: 1498, 1990.
- 2) Cronstein BN, et al: Proc Natl Acad Sci USA, 89: 9991, 1992.
- 3) Caldenhoven E, et al: Mol Endocrinol, 9: 401, 1995.
- 4) Caulin-Glaser T, et al: J Clin Invest, 98: 36, 1996.
- 5) Marx N, et al: Circulation, 99: 3125, 1999.
- 6) Otsuki M, et al: Arterioscl Thromb Vasc Biol, 21: 243, 2001.
- 7) Staels B, et al: Nature, 393: 790, 1998.

- 8) Xu X, et al: Endocrinology, 印刷中.
- 9) Simizu H, et al: Mol Cell Biol, 10: 561, 1990.
- 10) Neish AS, et al: J Exp Med, 176: 1583, 1992.
- 11) Thanos D, Maniatis T: Cell, 80: 529, 1995.
- 12) Delerive P, et al: J Biol Chem, 274: 32048, 1999.

注：本研究は『ホルモンと臨床』（Vol.49 2001）に掲載。

作成日：2002年3月15日

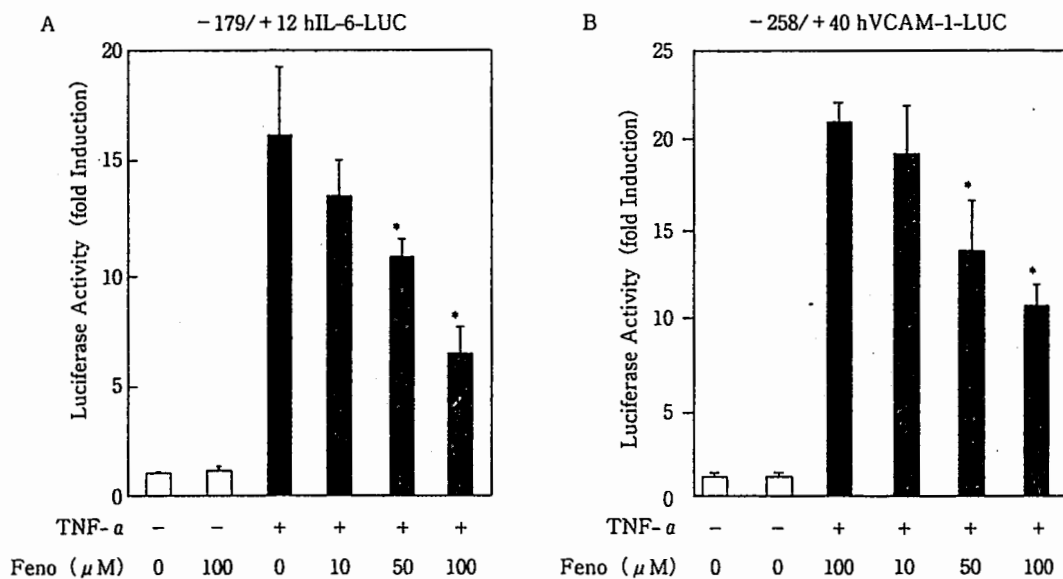
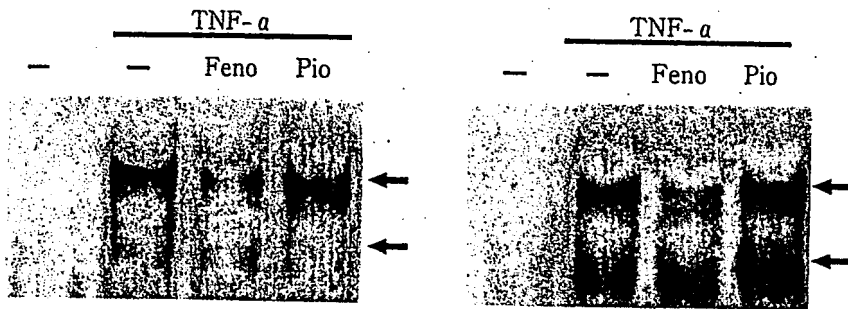


図1 IL-6プロモーター (A) および VCAM-1プロモーター (B) の活性に及ぼすフェノフィブラートの作用
BAECにIL-6レポーター遺伝子 (-179/+12 hIL-6-LUC) または VCAM-1レポーター遺伝子 (-258/+40 hVCAM-1-LUC) を移入しフェノフィブラート (Feno) で24時間処理した後, TNF-α (20 ng/ml) で刺激し8時間 (A) または4時間 (B) 後のルシフェラーゼ活性を測定した。

A. IL-6 gene

B. VCAM-1 gene



5'-AAATGTGGGATTTTCCCATG

5'-CTGCCCTGGGTTTCCCTT-
-GAAGGGATTTCCCTCCGCC

図2 IL-6 プロモーター (A) および VCAM-1 プロモーター (B) への NF- κ B の結合に及ぼすフェノフィブラートの作用

HUVEC をフェノフィブラート (Feno) またはピオグリタゾン (Pio) で処理した後, TNF- α (20 ng/ml) で刺激し 4 時間後に核蛋白を抽出し EMSA を行った.

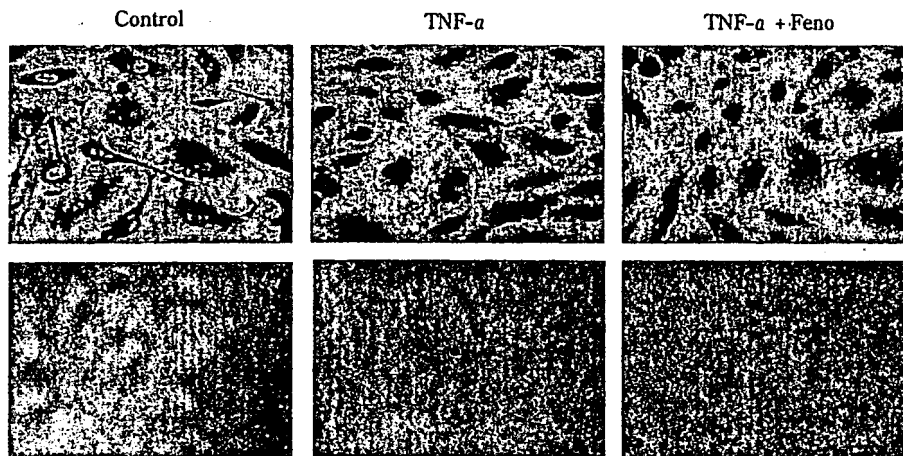


図3 TNF- α による NF- κ B p65 蛋白の核内移行に及ぼすフェノフィブラートの作用

HUVEC を 100 μ M のフェノフィブラート (Feno) で処理した後 TNF- α (20 ng/ml) で刺激した. 抗 NF- κ B p65 抗体を用いた免疫染色を行った. 上段: blocking peptide (-), 下段: blocking peptide (+)

2001年度日中医学協会共同研究等助成事業報告書

－在留中国人研究者研究助成－

2002 年 3 月 6 日

財団法人 日中医学協会
理事長 殿



研究者氏名 吳 超然

所属機関名 新潟大学医学部麻酔学講座

指導責任者氏名 馬場 洋

職 名 教授

所 在 地 〒951-8510 新潟市旭町通 1-757

電話 (025)227-2328 内線 2328

1. 研 究 テ ー マ

軽度前脳虚血による C57BL/6 マウスの虚血耐性発現に関する研究

2. 本年度の研究業績

(1) 学会・研究会等における発表 ☒ 有 ・ 無 (学会名・演題)

第54回新潟麻酔懇話会

軽度前脳虚血による C57BL/6 マウスの虚血耐性発現に関する研究

新潟大学麻酔科学教室 ・ 吳 超然、富士原秀善、戚 思華、多賀紀一郎、馬場 洋

(2) 学会誌等に発表した論文 ☒ 有 ・ 無 (雑誌名・論文名)

1. Chaoran Wu, Ren-zhi Zhan, Sihua Qi, Hideyoshi Fujihara, Kiichiro Taga, Koki Shimoji. A forebrain ischemic preconditioning model established in C57Black/Crj6 strain mice. J Neuroscience Methods 107 (2001) 101-106.
2. Renzhi Zhan, Chaoran Wu, Hideyoshi Fujihara, Kiichiro Taga, Sihua Qi, Makoto Naito, Koki Shimoji. 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 21:529-540.
3. Renzhi Zhan, Sihua Qi, Chaoran Wu, Hideyoshi Fujihara, Kiichiro Taga, Koki Shimoji. Intravenous anesthetics differentially reduce neurotransmission damage caused by oxygen-glucose deprivation in rat hippocampal slices in correlation with NMDA receptor inhibition. Crit Care Med. 2001.Vol.29.No.4(808-813).

3. 今後の研究計画

脳虚血により起きる神経細胞死に対し、BDNF,FGF,EGF に代表される神経栄養因子がどのような細胞保護効果をもたらすか、そして、その効果が cytochrome c の放出と Bcl-2 とどのように関連しているかを探求する計画である。免疫組織化学や生化学的手法を駆使して、ミトコンドリアを介したアポトーシスを中心に評価する。加えて、BDNF 遺伝子、EGF 受容体遺伝子のノックアウトマウスを利用して、内在性のこれら神経栄養因子の役割についても考察したい。

4. 研究指導者の意見

呉超然氏は1999年に来日し、本学医学部麻酔学教室に客員研究員として入局しました。翌年4月には本学医学研究科博士課程（外科系・麻酔学専攻）に入学し、麻酔学教室に大学院生として在籍しています。

現在、脳虚血に関する病態生理及びその蘇生について昼夜も問わず、研究に取り組んでおります。2年生として、すでに論文も英文誌に採用され、学会口演の経験もあります。本学に入学後の学習態度は真剣であり、強い向学心を有していることが窺えます。呉超然氏は大学院生としてのふさわしい学力に加えて、日本語に関しても、日常生活はもとより研究を行う上でも十分に高い語学力を有していると判断されます。

以上のように呉超然氏は今後優れた研究を行うことが期待される人物であります。

研究指導者氏名 馬場 洋 印

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。

軽度前脳虚血による C57BL/6 マウスの虚血耐性発現に関する研究

呉 超然

中国 大連医科大学附属第四病院 麻酔科 医師

日本 新潟大学医学部 麻酔学講座 大学院生

要旨

脳虚血前処置分子機序の研究は、虚血性脳損傷のメカニズムの解明だけではなくて脳虚血治療法の開発にも役立つと思われる。今回、我々はまず遺伝子操作の分野でよく使われる C57BL/6 マウスを用いて、マウス脳虚血前処置モデルを作成し、そして神経細胞の生と死と関連する Bcl-2 family タンパクの発見について経時・定量的に検索する。

雄性 C57BL/6 マウスを用いた。前脳虚血は、両側の総頸動脈を閉塞することによって行った。対照群 (sham コントロール)、虚血群 (18 分間虚血) と前処置群 (6 分間虚血後 48 時間後 18 分間虚血) に分けた。線条体損傷は凍結切片に行われる MAP-2 染色によって評価した。Bcl-2 タンパクを定量的に測定するために、6 分間虚血後再灌流 4 時間、24 時間、48 時間、72 時間、1 週間ごとに脳を取り出して、皮質、海馬、線条体をそれぞれ剥離し、western blot の方法を用いて、Bcl-2 タンパクを定量的に測定し、バンドの光学密度を評価する。

虚血後の残存神経細胞数は虚血群に比較して前処置群で有意に多かった。虚血群においては、MAP-2 免疫染色はほぼ完全に脱落した。前処置群では対照群に比べて MAP-2 免疫染色は若干減弱したが、かなり正常に近い状態で染色された。6 分間虚血後、線条体において Bcl-2 タンパクの量が増える一方で 48 時間の時点でピークに達した。

C57BL/6 マウスにおいて、軽度前脳虚血はその後の致死性脳虚血に対して保護作用があることが示唆された。この保護作用は短期間虚血による Bcl-2 タンパクの増加と関連があると示唆する。

Key word: C57BL/6 mice; Bcl-2; Ischemic preconditioning; Striatum; Sublethal ischemia

Introduction

The bcl-2 proto-oncogene is first discovered in b-cell lymphoma and a variety of other cancers (Tsujimoto et al., 1985). It is also observed in the central nervous system (CNS) during embryonic development (LeBrun et al., 1993; Novack and Korsmeyer, 1994), but levels are greatly downregulated in the majority of postmitotic CNS neurons of adult brain (Merry et al., 1994). The bcl-2 family of oncogenes encodes specific proteins that regulate apoptosis induced by a variety of stimuli (Vaux et al., 1988; Davies 1995). Among these related proteins, Bcl-2 and Bcl-x1 suppress apoptotic cell death, whereas Bax promote it (Oltvai et al., 1993). Changes in the bcl-2 family genes levels have been observed as early as 6 to 8 hours after ischemia (Krajewski et al., 1995; Chen et al., 1996; Antonawich et al., 1996). Therefore, it has attracted the most attention that the counterregulated expression of Bcl-2 family proteins determines whether neurons toward survival or apoptosis (Yang E et al., 1996; Kroemer G., 1997).

Most evidence indicated that apoptotic cell death may occur after transient cerebral ischemia and that dysregulation of Bcl-2 and related proteins accelerates ischemic neuronal injury. Furthermore, a forebrain ischemic preconditioning model in C57Black/Crj6 (C57BL/6) mice developed recently in our laboratory has shown that striatal neuronal injury after transient bilateral common carotid artery occlusion (BCCAO) can be strongly reduced by a sublethal ischemic episode (Wu CR et al., 2001). To address the question of whether these Bcl-2 family proteins participate in the occurrence of ischemic preconditioning protection induced by sublethal forebrain ischemia, we examined Bcl-2, Bcl-xl, and Bax expression by immunohistochemistry and immunoblot assays in the normal striatum and following 6 min of sublethal forebrain ischemia in C57BL/6 mice.

Objective

We developed an ischemic preconditioning model in C57BL/6 mice. And then aimed to address the question of whether Bcl-2 family proteins participate in the induction of ischemic tolerance. As a preliminary experiment, we examined if ischemic preconditioning alters expression of apoptosis inhibitor Bcl-2, Bcl-xl, and apoptosis promoter Bax by using western blot.

Materials and Methods

Induction of forebrain ischemia

Experiments were carried out in adult male C57BL/6 mice weighing 19 to 23 g (8-10 weeks old). Animals were allowed free access to food and water and housed in a climate-controlled environment (25°C). Forebrain ischemia was induced by bilateral common carotid artery occlusion (BCCAO) for 18 min under 1.0% halothane/oxygen anesthesia via a face mask. During the procedure, the rectal temperature was maintained between 36.7 and 37.5°C. After reperfusion, the animals were cared in a warm, humidified chamber (32-33°C) for another 3 hours before being returned to their cages. For preconditioning, animals were subjected to a 6-min BCCAO 48 h before the 18-min ischemia. The animals underwent exposure of bilateral common carotid arteries without BCCAO were used as sham-controls.

Transcardiac perfusion and brain tissue preparation

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 12 h each) and then rapidly frozen in 2-methylbutane chilled at -80°C. Consecutive coronal sections (16 µm) were prepared on a microtome and used for microtubule-associated protein-2 (MAP-2) immunohistochemistry staining. For in situ

detection of DNA fragmentation, another set of animals were perfused with 0.1 M PBS containing heparin (4 units/ml) followed by 20% sucrose in 0.1 M PBS at 72 h after reperfusion. The brains were then removed from the skull, and rapidly frozen in 2-methylbutane chilled at -80°C.

Assessment of neuronal damage

Ischemic neuronal damage was visualized by MAP-2 immunohistochemistry. Briefly, sections were post-fixed with 4% paraformaldehyde in 0.1 M PBS for 10 min and washed three times with 0.1 M PBS. Endogenous peroxidase was inactivated by incubating the sections with 30% methanol containing 0.1% H₂O₂ (v/v) for 45 min. Sections were then followed by sequential incubations in 1) 2.5% horse serum in 0.1 M PBS containing 0.2% Tween-20 and 1.5% BSA for 60 min, 2) anti-MAP-2 monoclonal antibody (Boehringer Mannheim, Mannheim, Germany) diluted in 0.1 M PBS at 4°C overnight, 3) biotinylated horse anti-mouse IgG for 60 min, and 4) avidin-biotin-peroxidase complex in 0.1 M PBS for 60 min. The biotinylated secondary antibody and the avidin-biotin-peroxidase were purchased from Vector Laboratories (Burlingame, CA). The MAP-2 immunoreaction was visualized by incubating the sections with 0.05% 3,3'-diaminobenzidine and 0.002% H₂O₂.

In situ labeling of DNA fragmentation

By using an apoptosis in situ detection kit (Wako Pure Chemical Industries, Osaka, Japan), terminal deoxytransferase-mediated dUTP-nick end labeling (TUNEL) was carried out on non-fixed sections (16 µm). Sections were post-fixed with 4% paraformaldehyde in 0.1 M PBS for 15 min at room temperature, followed by ethanol/acetic acid (2:1) for 5 min at -20°C, and then penetrated with 3% Triton X-100 in 0.1 M PBS for 60 min at room temperature. The sections were then incubated in TUNEL reaction solution for 60 min at 37°C. After washing, sections were incubated in 30% H₂O₂ in 0.1 M PBS for 10 min to quench endogenous peroxidase and incubated with anti FITC-conjugated peroxidase for 60 min at 37°C. TUNEL-positive cells were visualized with diaminobenzidine. Identical to the assessment of intact neurons, TUNEL-positive cells were counted in five assigned subregions.

Western blot analysis

Immediately after decapitation at 4, 24, 48, 72 h, and 7 day following 6 min ischemia (n = 12 per group), mouse striatum was dissected, and homogenized in RIPA buffer containing protease inhibitors on ice. After centrifugation at 14,000 g for 30 minutes, the serum was collected. The protein levels were quantified by spectrophotometry, and the lysate was boiled at 95 in sodium dodecyl sulfate loading buffer (100 mmol/l Tris-HCl, 200mmol/l dithiourea, 4% sodium dodecyl sulfate, 0.2% bromophenol blue, and 20% glycerol) for 5 minutes. Then, 40 µg protein samples were loaded onto a 12% SDS-polyacrylamide gel. The transferred polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane was incubated in either mouse anti Bcl-2 (1:1000, Transduction Laboratories.) or rabbit anti Bcl-XL, Bax antibody (1:500, Santa Cruz Biotechnology Inc.) for 2 hours at room temperature. After washing three times in PBS containing 0.1% Tween-20, the appropriate secondary antibody was applied at a 1:3000 dilution for 1 h. The membrane was washed in PBS containing 0.1% Tween-20 three times over 30 min, then incubated in

ECL Plus western blotting detection reagents (Amersham Pharmacia Biotech) and exposed to Fuji RX film (Fuji, Tokyo, Japan). Autoradiogram signals were quantified by a gel densitometric scanning program. The relative protein levels were determined from the relative optical densities of the corresponding protein bands and were normalized to background values obtained on the same lane.

Statistical analysis

Quantitative data are expressed as mean \pm standard deviation (SD) and analyzed by one-way ANOVA after normality of distribution was proved. ANOVA was followed by Dunnett's post hoc test for multiple comparisons. A p-value less than 0.05 is considered statistically different.

Result

On the seventh day after 18-min ischemia, neuronal loss could be found in the striatum, hippocampal CA1, CA2 and CA3 regions, and the cortex as well as other regions, as visualized by MAP-2 immunostaining. In the hippocampus, neuronal loss always occurred in the dorsal CA1 region, CA2 as well CA3 region. In 3 out of 6 animals, CA1 neuronal damage was asymmetric after 18-min ischemia. In contrast, striatal neuronal damage in the bilateral striatum was symmetric and more consistent.

Since neuronal damage in the striatum was more consistent after the 18-min ischemia, the extent of protection by ischemic preconditioning was examined in the striatum by MAP-2 immunohistochemistry staining. In the sections obtained from sham-control animals, both soma and dendrites were intensively stained. Ischemia for 6 min resulted in no detectable loss of MAP-2 immunoreactivity in the bilateral striatum. An 18-min ischemia caused near complete loss of MAP-2 immunoreactivity in 4 out of 6 animals. A 6-min ischemic episode performed 48 h before the 18-min ischemia strongly reduced the loss of MAP-2 immunoreactivity due to the 18-min ischemia.

There were no TUNEL-positive cells to occur in sections obtained from sham-control animals. TUNEL-positive cells intensely existed at 72 h after reperfusion in animals subjected to 18-min ischemia but not 6-min ischemia. Again, the 6-min ischemia performed 48 h before the 18-min ischemia significantly reduced the number of TUNEL-positive cells caused by the 18-min ischemia.

The levels of Bcl-2 and Bcl-xl proteins expression were increased from 4h to 7 days after 6 min of BCCAO with a maximum intensity occurred in the 48h time point. Bax immunoreactivity was very faint in the above mentioned time points.

Discussion

The major finding of the present study is that transient bilateral common carotid artery occlusion produces a consistent striatal injury that can be strongly attenuated by a sublethal ischemic episode. And also we demonstrate that the Bcl-2 family proteins participate in the process of this ischemic protective effect.

Currently, almost all available ischemic preconditioning models have been developed in rats or gerbils,

but this is not corresponding to that most genetic alterations have been performed in mice. Among different strains, the C57BL/6 strain has been shown to be most susceptible to transient ischemia induced by BCCAO (Barone et al., 1994; Fujii et al., 1997; Yang et al., 1997). Additionally, studies have shown that injury to the striatum in C57BL/6 mice is more consistent in comparison with injury to the hippocampal CA1 region (Terashima et al., 1998).

In preliminary experiments, we had examined neuronal damage induced by BCCAO for 3, 4, 6 and 8 min. Although there was no striatal and hippocampal neuronal damage to be found after 3 or 4 min ischemia, their protections against the subsequent 18-min ischemia were weaker. In contrast, ischemia for 8 min sometimes caused serious striatal and hippocampal neuronal damage. We thus chose a duration of 6 min as the conditioning ischemic insult. While the 6-min ischemia did not cause noticeable striatal neuronal damage as demonstrated by both MAP-2 immunohistochemistry staining, it rendered strong protection against ischemic neuronal damage induced by the subsequent 18-min ischemia. The extents of protection are comparable with that reported in hippocampal CA1 neurons in a gerbil ischemic preconditioning model (Kirino et al., 1991; Kitakawa et al., 1990). In addition, we also found that ischemia-induced DNA fragmentation was attenuated by the conditioned ischemia, indicating that anti-apoptotic actions may be induced by the conditioning ischemic episode.

There may be several mechanisms by which Bcl-2 and Bcl-xl exerts their protective effects on ischemic neurons. Bcl-2 plays a key role in regulating initiation of programmed cell death by preventing egress of cytochrome C into cytoplasm. Cytochrome C, in turn, complexes with apaf-1 activating caspase 9, an important triggering event in apoptosis. Bcl-2 may also play a role in stabilizing the mitochondria and maintaining its membrane potential, thus preventing the generation of free radicals. So that, the expression of Bcl-2 in neurons that are stressed may be an important event that ensures neuronal survival.

References

- Antonawich FJ, Federoff HJ, Krajewski S, Reed JC, Davis JN (1996) Ischemic CA1 hippocampal neurons express bax and can be rescued by bcl-2 induction with a herpes simplex virus (HSV) amplicon (Abstract). Soc Neurosci Abstr 22:1179
- Barone FC, Knudsen DJ, Nelson AH, Feuerstein GZ, Willette NR (1993) Mouse strain differences in susceptibility to cerebral ischemia and related to cerebral vascular anatomy. J Cereb Blood Flow Metab 13:683-92.
- Chen J, Zhu RL, Nakayama M, Kawaguchi K, Jin KL, Stetler RA, Simon RP, Graham SH (1996) Expression of the apoptosis effector gene, bax, is up-regulated in vulnerable hippocampal CA1 neurons following global ischemia. J Neurochem 67:64-71
- Davies JC (1995) The Bcl-2 family of proteins, and the regulation of cell survival. Trends Neurosci 18:355-358
- Fujii M, Hara H, Meng W, Vonsattel JP, Huang Z, Moskowitz MA (1997) Strain-related differences in

susceptibility to transient forebrain ischemia in SV-129 and C57Black/6 mice. *Stroke* 28:1805-11.

Kirino T, Tsujita Y, Tamura A (1991) Induced tolerance to ischemia in gerbil hippocampal neurons. *J Cereb Blood Flow Metab* 11:299-307.

Kitakawa K, Matsumoto M, Tagaya M, Hata R, Ueda H, Niinobe M, Handa N, Fukunaga R, Kimura K, Mikoshiba K, Kamada T (1990) "Ischemic tolerance" phenomenon found in the brain. *Brain Res* 528:21-24.

Krajewski S, Mai JK, Krajewska M, Sikorska M, Mossakowski M, Reed JC (1995) Upregulation of bax protein levels in neurons following cerebral ischemia. *J Neurosci* 15:6364-6376

Kroemer G (1997) The proto-oncogene bcl-2 and its role in regulating apoptosis. *Nature Med* 3:614-620

LeBrun DP, Wanke RA, Cleary ML (1993) Expression of bcl-2 in fetal tissues suggests a role in morphogenesis. *Am J Pathol* 142:745-753

Merry DE, Veis DJ, Hickey WF, Korsmeyer SJ (1994) Bcl-2 protein expression is widespread in the developing nervous system and retained in the adult PNS. *Development* 130:301-311

Novack DV, Korsmeyers SJ (1994) Bcl-2 protein expression during murine development. *Am J Pathol* 145:61-73

Oltvai ZN, Milliman CL, Korsmeyer SJ (1993) Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell* 74: 609-619

Terashima T, Namura S, Hoshimaru M, Uemura Y, Kikuchi H, Hashimoto N (1998) Consistent injury in the striatum of C57BL/6 mice after transient bilateral common carotid artery occlusion. *Neurosurgery* 43:900-08.

Tsujimoto Y, Cossman J, Jaffe E, Croce CM (1985) Involvement of the bcl-2 gene in human follicular lymphoma. *Science* 228:1440-3

Vaux DL, Cory S, Adams JM (1988) Bcl-2 gene promotes haemopoietic cell survival and cooperates with c-myc to immortalize pre-B cells. *Nature* 335:440-442

Wu CR, Zhan R-Z, Qi SH, Fujihara H, Taga K, Shimoji K (2001) A forebrain ischemic preconditioning model established in C57Black/Crj6 mice. *J Neurosci Meth* 107:101-106

Yang E, Korsmeyer SJ (1996) Molecular thanatopsis: a discourse on the bcl-2 family and cell death. *Blood* 88: 386-401

Yang G, Kitakawa K, Matsushita K, Mabuchi T, Yagita Y, Yanagihara T, Matsumoto M (1997) C57BL/6 strain is most susceptible to cerebral ischemia following bilateral common carotid occlusion among seven mouse strains: selective neuronal death in the murine transient forebrain ischemia. *Brain Res* 752:209-18.

2001年度日中医学協会共同研究等助成事業報告書

—在留中国人研究者研究助成—

2002年 2月 28日

財団法人 日中医学協会
理事長 殿

研究者氏名 曹 永彤
所属機関名 愛知医科大学第二外科
指導責任者氏名 永田 昌久
職 名 教授
所在地 〒480-1195 愛知県愛知郡長久手町
電話 0561-62-3311 内線 2141

1. 研究テーマ

虚血再灌流心筋障害に対するNOの心筋保護作用について
— NO供与体FK401添加心筋保護液の検討 —

2. 本年度の研究業績

(1) 学会・研究会等における発表 有 ・ ☒ (学会名・演題)

(2) 学会誌等に発表した論文 有 ・ ☒ (雑誌名・論文名)

3. 今後の研究計画

モルモット虚血再灌流障害に対するNOの心筋保護作用のメカニズムについて

- ①ランゲンドルフ心臓を作成して、ESR器械で虚血と再灌流中の酸素ラジカルを測定する。
- ②NO供与体FK409をランゲンドルフ心臓に投用して、ESR器械で虚血と再灌流中の酸素ラジカルを測定して、酸素ラジカルを減少させることが確認する。
- ③通常電顕でのミトコンドリアの形態学観察。
- ④凍結切片のcytochrome c, caspase 3, caspase 9, bcl-2, bax等apoptosis関連蛋白の免疫組織化学染色して、心筋細胞apoptosisとの関連を調べる。

4. 指導責任者の意見

研究者は愛知医科大学当講座に籍を置いて以来、外科臨床をやりながら積極的に研究活動を行って来ました。すでに研究成果を上げており、特にモルモットLangendorff心臓モデルを用いて心筋細胞虚血再灌流障害に対するNOの心筋保護作用が明らかにしております。現在、さらに研究を進展させており、NO供与体を含む心筋保護液分野での新たな成果が大いに期待できます。

指導責任者氏名 永田 昌久



5. 研究報告書

別紙報告書作成要領により、添付の用紙で研究報告書を作成して下さい。

研究発表中または研究中の本人のスナップ写真を添付して下さい。

※研究成果を発表する場合は、発表原稿・抄録集等も添付して下さい。

※発表に当っては、日中医学協会助成金による旨を明記して下さい。

虚血再灌流心筋障害に対するNOの心筋保護作用について

— NO 供与体 FK409 添加心筋保護液の検討 —

研究者氏名	曹 永彤
中国所属機関	中国北京中日友好病院
日本研究機関	日本愛知医科大学第二外科
指導責任者	教授 永田 昌久
共同研究者名	堀田芳弘, 塩井健介, 永田昌久, 川井範夫, 石川直久

Summary

Effects of FK409 were investigated in perfused guinea-pig Langendorff hearts subjected to ischemia and reperfusion. Nitric oxide electrode, fluorometry and ^{31}P -NMR were used to monitor the changes in the cellular high phosphorous energy and NO and Ca^{2+} content in the heart together with simultaneous recordings of left ventricular developed pressure. An NO electrode was placed in the right atrium of a fura-2 loaded heart. After cardioplegic arrest with St. Thomas' Hospital solution, normothermic (37°C) global ischemia was induced for 40 min, and the hearts were reperfused for 40 min. FK409 at 10^{-8}M , which has a minimum inotropic effect on nonischemic hearts, was added to the cardioplegic solution. Treatment with FK409 reduced the left ventricular end-diastolic developed pressure during and after the ischemia and improved the post-ischemic recovery of LVDP from 55.4% at 40 min of reperfusion in FK409-free hearts up to 80.4% in hearts treated with FK409 ($p < 0.01$). The flow rate (ml/min) at 1.5 min after treatment with STS was 27.7 in hearts treated with FK409 compared with 21.2 in drug-free hearts ($p < 0.01$). Treatment with FK409 had a significant preservation effect on the tissue level of β -ATP at the end of ischemia or reperfusion. During ischemia, arrested with STS, the intracellular Ca^{2+} accumulation and NO release were reduced. At the end of the 40 min period of ischemia in FK409-treated hearts, NO release was 86% greater than in drug-free hearts without reference to the Ca^{2+} concentration. In cardiac surgery, normothermic arrested hearts are subject to damage by oxygen-free radicals in reperfusion-injury. Therefore, NO exogenously supplied by FK409 was responsible for the cardioprotective action, presumably by acting directly as an oxygen radical scavenger during reperfusion. It is suggested that a specific NO-donor, like FK409, has potential therapeutic use as an NO-mediated vasorelaxer and additional protective action of the NO-donor for reperfusion-injury hearts if added before ischemia.

Keywords: FK409, nitric oxide electrode, Ca^{2+} -fluorometry, ^{31}P -NMR, ischemia-reperfusion.

目 的

一酸化窒素 (NO) は冠血管平滑筋を弛緩、ATP の減少を抑制し、心筋細胞内 Ca^{2+} レベル低下や酸素ラジカルを減少することによって心筋保護できる一方、スーパーオキシド ($\text{O}_2^{\cdot -}$) と共存するとパーオキシナイトライト (ONOO^-) を産生し、むしろ細胞障害を引き起こす可能性がある。本研究ではNO供与体FK409 (藤沢薬品K.Kより供与) を用いてモルモット摘出心臓に対する虚血再灌流心筋保護作用を検討した。ランゲンドルフ心臓にSt. Thomas液と薬液を注入して心臓を停止させ、再灌流を行い、虚血前 (100%) と再灌流後の左室内圧の変化 (left ventricular developed pressure : LVDP, left ventricular end diastolic developed pressure : LVEDP)

冠血流量(FR)の回復率(%)を求めると同時に、 ^{31}P -NMRを測定し、高エネルギーPの動態について、薬物投与群と比較した。また、NO-meterとFluorometerを用いて、虚血再灌流中のコントロール、St.Thomas液のみ、St.Thomas+FK409投与群の Ca^{2+} 、NO動態について経時的に測定し比較検討した。

方 法

A. モルモット摘出心灌流

摘出モルモット(♂♀、400g前後)心臓の大動脈にカニューレを挿入し、Krebs-Henseleit液(KH液、 Ca^{2+} 2.0mM、pH7.4、37℃、95% O_2 +5% CO_2 混合ガス飽和)で灌流(75cmH₂O)し、Langendorff (LN) 心臓を作成した。コントロール(C group, n=8)として、KH液で30分間灌流安定化させた後、40分間灌流停止し、40分間KH液で再灌流した。また、一群のモルモットLN心臓(T group, n=8)をKH液で30分間安定化した後St.Thomas液を注入して、心臓を停止させて、40分間灌流停止し、40分間KH液で再灌流した。また、別の一群のモルモットLN心臓(F group, n=8)をNOの供与体FK409を含むSt.Thomas液で心臓を停止させて、40分間灌流停止し、40分間FK409含有しない新しいKH液で再灌流した。各群のモルモットのLN心臓の左心室にバルーンを挿入し、左室内圧(LVDP)と左室拡張期圧(LVEDP)を経時的に測定した。大動脈に連結したカニューレに電磁流量計を付けて、冠血流量(FR)を経時的に測定した。下のプロトコールに従い、各群の再灌流後のLVDPの回復率(%)を虚血前100%として求めた。

B. ^{31}P -NMRの測定方法

上に述べた群のモルモットのLN心臓はGSX400 FT-NMR装置(JEOL)の直径20mmのP核種専用プローブ中に設置し、虚血前、虚血再灌流中の高エネルギーPの動態を経時的に同時に測定した。

C. NO・とFura-2 Ca^{2+} signalの測定

1) NO電極の設置とFura-2の負荷

摘出モルモット(♂♀、400g前後)心臓の大動脈にカニューレを挿入し、KH液を流量7~9ml/minの速度でポンプを用いて送液し、Langendorff心臓を作成した。収縮力は左心室にバルーンを挿入し、左室内圧(LVDP)を測定した。NO選択電極は心臓の右心房(冠状静脈洞)に挿入され心臓から流出するNO \cdot の変化を測定した。対照カーボン電極は心臓の外の外液中に置き、NO電極を安定化させながら心臓にfura-2 AM 5 μM (25% Cremophore EL)含有KH液を30min間灌流しfura-2を心臓に負荷した。負荷後に新しいKH液で洗浄して、心筋細胞外のfura-2 AMを完全に除去し、20min間安定化させた後、実験を行った。(Eur J Pharmacol. 1995; 282: 121.) 2) NO測定法 NO選択電極は心臓の右心房(冠状静脈洞)に挿入され、電磁波の影響を受けない環境下で測定した。NO電極は、直径0.2mmでplatinumとiridiumの合金(Pt 90%, Ir 10%)よりなり、KCl膜、NO選択性セルロースレジン膜、ガス透過性シリコン膜の3層より構成されている。NO選択電極と対照カーボン電極のpAレベルの還元電流をNO-meter (NO-501, Inter Medical Co.)を用いて50/60Hz Noise eliminator (Hum Bug Quest Scientific Instrument, Canada)を介してノイズを除去して測定した。NOレベルは、定流量灌流で基礎値が安定した電流値(pA)をゼロとした。

3) 蛍光測定

Fura-2を負荷した摘出心臓はFluorometer (CAF-100, JASCO)の測定ユニットの恒温槽の中に心臓の左心室表面部分に光が当たるように設置した。KH液を灌流しながら心筋に340と380nmの励起光を当て、蛍光波長500nmでの蛍光強度の比(ratio)340/380を記録計に心臓内 Ca^{2+} 濃度変化として記録させた。C group, T group, F group, 各n=8についてFura-2 Ca^{2+} signal、NO signalおよびLVDPを同時に記録した。

D. 虚血再灌流後の心筋のミトコンドリアの電顕観察 各組モルモットのLN心臓の虚血直前、虚血40分間後、再灌流40分間後に左心室から心筋組織を摘出して、超薄切片を作製し、酢酸ウラン電子染色とクエン酸鉛染色を行い、乾燥して透過電顕でミトコンドリアを観察した。

結 果

1 ATP、LVDP回復率とFRの変化率

虚血再灌流40分後のLVDPの回復率はF:81% T:55% C:33%の順に有意に存在を認めた。虚血40分後のATP回復率はF:91% T:74% C:57%の順に有意 ($p<0.05$) に存在を認めた。

St.Thomas 液注入直後のFRの増加率はF:187% T:145% C:100%の順に有意 ($p<0.05$) に増加し、再灌流40分後のFRの回復率もF:81.4% T:64.8% C:41.7%の順に有意 ($p<0.05$) に増加した。

2 虚血再灌流中のNOとCa²⁺の濃度

T groupはC groupより虚血後半のCa²⁺濃度を低下させた (C: ratio 1.09→ T: ratio 0.94 $p<0.05$)。

F group (ratio 0.88) は虚血後半のCa²⁺濃度がT groupと同程度 (TとN.S.) で示されたが、NOのみ上昇していた (T: 302 pA→ F: 533 pA $p<0.05$)。再灌流後のNO、Ca²⁺濃度は各群有意差は認めなかった。

3 心筋細胞のミトコンドリアの電顕観察

F groupは再灌流40分後にC group、T groupに比べ、ミトコンドリアの膨化拡大、ミトコンドリア内の障害が軽度で、虚血前の心筋電子顕微鏡像と同様、ミトコンドリアの大きさ、扁平形態、クリスタ、マトリックス、および内外膜構造は良好に保たれていた。

考 察

1. NO供与体FK409は³¹P-NMRの測定においてコントロール、St.Thomas液のみに比べて虚血後半にATPの存在を認め、虚血後の再灌流によりLVEDP、LVDP、FRおよびATP、PCrなどの高エネルギーPの回復を示し心筋保護作用が認められた。

2. これに加えて、FK409投与後の虚血再灌流後の心臓の電顕所見においてもATPを産生するミトコンドリアの保持が認められた。

3. St.Thomas液停止心臓においてコントロールよりも再灌流後の収縮力の回復は良くなるが虚血後半のCa²⁺およびNO[•]を低下させた。これにFK409を加えた心臓では虚血後半にCa²⁺はほぼ同程度であるがNO[•]のみ上昇し、更に再灌流による収縮の回復を高めた。

4. FK409投与群は再灌流直後にもNOの大きなトランジェントを示した。

以上より、虚血中のNO増大は、ミトコンドリアにおいて再灌流時に発生し、障害を起こす $\cdot O_2^-$ に作用し、ミトコンドリア機能を保持し、心筋の保護作用を示すと思われる。

REFERENCES

1. Neely JR, Grotyoharn LW. Role of glycolytic products in damage to ischemic myocardium: dissociation of adenosine triphosphate levels and recovery of function of reperfused ischemic hearts. *Circ Res* 1984; 55: 816-24.
2. Hendriks M, Mubagwa K, Verdonck F, Overloop K, Hecke PV, Vanstapel F, Lommel AV, Verbeken E, Lauweryns J, Flemeng W. New Na⁺-H⁺ exchange inhibitor HOE 694 improves postischemic function and high-energy phosphate resynthesis and reduces Ca²⁺ overload in isolated perfused rabbit heart. *Circulation* 1994; 89: 2787-98.
3. Hotta Y, Fujita M, Nakagawa J, Ando H, Takeya K, Sakakibara J. Contribution of cytosolic ionic and energetic milieu change to ischemia- and reperfused-induced injury in guinea-pig heart: Fluorometry and nuclear magnetic resonance studies. *J Cardiovasc Pharmacol* 1998; 31: 146-56.
4. Hotta Y, Otsuka-Murakami H, Fujita M, Nakagawa J, Yajima M, Ishikawa N, Kawai N, Masumizu T, Kohno M. Protective role of nitric oxide synthase in myocardial mitochondria against ischemia-reperfusion injury in guinea pigs. *Eur J Pharmacol* 1999; 380: 37-48.
5. Hotta Y, Nakagawa J, Wakida Y, Ishikawa N, Ando H, Takeya K, Ohashi N, Matsui K. Protective effect of SM-20550, a selective Na⁺-H⁺ exchange inhibitor, on ischemia-reperfusion injured hearts. *J*

Cardiovasc Pharmacol in press.

6. Crompton M, Heid I. The cycling of calcium, sodium, and protons across the inner membrane of cardiac mitochondria. *Eur J Biochem* 1978; 91: 599-608.
7. Duan J, Karmazyn M. Relationship between oxidative phosphorylation and adenine nucleotide translocase activity of two populations of cardiac mitochondria and mechanical recovery of ischemic hearts following reperfusion. *Can J Physiol Pharmacol* 1989; 67: 704-9.
8. Karmazyn M. Ischemic and reperfusion injury in the heart. Cellular mechanisms and pharmacological interventions. *Can J Physiol Pharmacol* 1991; 69: 719-30.
9. Ruß U, Balser C, Scholz W, Albus U, Lang HJ, Weichert A, Schölkens BA, Gögele H. Effects of the Na^+/H^+ -exchange inhibitor Hoe 642 on intracellular pH, calcium and sodium in isolated rat ventricular myocytes. *Pflügers Arch-Eur J Physiol* 1996; 433: 26-34.
10. Flaherty JT, Weisfeldt ML, Bulkley BH, Gardner TJ, Gott VL, Jacobus WE. Mechanisms of ischemic myocardial cell damage assessed by phosphorus-31 nuclear resonance. *Circulation* 1982; 65: 561-71.
11. Kirkles JH, Ruigrok TJC, Van Echteld CJA, Meijler FL. Low Ca^{2+} reperfusion and enhanced susceptibility of the postischemic heart to the calcium paradox. *Circ Res* 1989; 64: 1158-64.
12. Hotta Y, Ishikawa N, Ohashi N, Matsui K. Effects of SM-20550, a selective Na^+/H^+ exchange inhibitor, on the ion transport of myocardial mitochondria. *Mol Cell Biochem* in press.
13. Dhalla NS, Elmoselhi AB, Hata T, Makino N. Status of myocardial antioxidants in ischemia-reperfusion injury. *Cardiovasc Res* 2000; 47: 446-56.
14. Kaneko M, Matsumoto Y, Hayashi H, Kobayashi A, Yamazaki N. Oxygen free radicals and calcium homeostasis in the heart. *Mol Cell Biochem* 1994; 139: 91-100.
15. Ide T, Tsutsui H, Kinugawa S, Utsumi H, Kang D, Hattori N, Uchida K, Arimura K, Egashira K, Takesita A. Mitochondrial electron transport complex I is a potential source of oxygen free radicals in the failing myocardium. *Circ Res* 1999; 85: 357-63.
16. Kita Y, Hirasawa Y, Yoshida K, Maeda K. Antiplatelet activities of FK409, a new spontaneous NO releaser. *Br J Pharmacol* 1994; 113: 385-88.
17. Isono T, Sato N, Yamamoto T, Sawada T, Yamazaki S, Miura S, Furuichi A, Ozaki R, Koibuchi Y, Ohtsuka M. Tolerance to the vascular effect of a novel nitric oxide-donating vasodilator, FK409. *Eur. J. Pharmacol* 1994; 260: 163-68.
18. Hotta Y, Ando H, Takeya K, Sakakibara J. Direct measurement of increased myocardial cellular ^{23}Na NMR signals in perfused guinea-pig heart induced by dihydroouabain and grayanotoxin-I. *Mol cell Biochem* 1994; 139: 59-70.
19. Koike A, Abe T, Hotta Y, Takeya K, Kodama I, Toyama J. Protective effects of dimethyl amiloride, a potent Na^+/H^+ exchange inhibitor, against post-ischemic myocardial dysfunction: ^{31}P -NMR measurements of pH_i and cellular energy in isolated perfused rabbit hearts. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1996; 112: 765-75.
20. Moon RB, Richards JH. Determination of intracellular pH by ^{31}P magnetic resonance. *J Biol Chem* 1973; 248: 7276-78.

注: 本研究を英文に書き直して、年末或いは来年の春に投稿します。

作成日 : 2002 年 2 月 28 日

2001年度日中医学協会共同研究等助成事業報告書

－在留中国人研究者研究助成－

2002 年 3 月 12 日

財団法人 日中医学協会
理事長 殿

研究者氏名 繆 江 永 ④
 所属機関名 大阪大学医学部小児外科
 指導責任者氏名 岡田 正
 職 名 教 授
 所 在 地 大阪府吹田市山田丘 2-2
 電話 06-6879-3753 内線 3756

1. 研究テーマ

小児腎腫瘍における Axin 異常に関する検討

2. 本年度の研究業績

(1) 学会・研究会等における発表 有 ・ (無) (学会名・演題)

(2) 学会誌等に発表した論文 (有) ・ 無 (雑誌名・論文名)

1. Mutation Analysis of the PTEN/MMAC1 Gene in Pediatric Solid Malignancies
Asian J. Surgery 2001; 24(4): 357-361
2. Axin, the main component of the Wnt signaling pathway, is not mutated in kidney tumors in children
International Journal of Molecular Medicine 9: ~ 2002 (In press)

3. 今後の研究計画

今年度に得られた成果をもとにさらに研究を継続する予定である。

すなわち、Axin の関与はウイルムス腫瘍を含めた小児固形腫瘍では小さいと思われるが、Axin が関与するWnt 伝達系路の他の因子として、 β カテニンの異常がウイルムス腫瘍を含め、肝芽腫などで効率に見られることが、明らかになってきた。現在はこの β カテニン異常を腫瘍細胞の中で抑制することを考えている。つまりアンチセンス配列を腫瘍細胞に組み入れることにより、 β カテニン異常が抑制されるか否かを検討中であり、この研究計画を今後も推進していく予定である。

4. 指導責任者の意見

繆 江永君は、平成11年6月に大阪大学外国人客員研究員として、小児外科教室において小児悪性腫瘍に対する分子生物学的研究に着手した。平成12年4月よりは大学院生としての身分を得て、現在に至るまで一貫して同研究を継続している。研究態度は極めて熱心であり、積極的に研究分野の知識の獲得、実験技術の習熟に努力し、さらに研究方針・計画の決定にも参画する能力も発揮している。

また現在までに繆君は、小児固形腫瘍の一部をなす肝芽腫、腎芽腫例において β カテニン遺伝子変異が高率に発生していることを見だし、論文投稿を行うなどの研究成果を挙げている。

このように繆君は、研究への取り組みに見るべきところがあり、またその努力に応じた成果も挙げている。これらのことは円滑に研究生生活が維持されたお陰であるが、今回支給された助成金に負うところが大きかったと考える。

指導責任者氏名

田 正 印

5. 研究報告書

別紙報告書作成要領により、添付の用紙で研究報告書を作成して下さい。

研究発表中または研究中の本人のスナップ写真を添付して下さい。

※研究成果を発表する場合は、発表原稿・抄録集等も添付して下さい。

※発表に当っては、日中医学協会助成金による旨を明記して下さい。

小児腎腫瘍における Axin 異常に関する検討

研究者氏名	繆 江永
中国所属機関	中国上海市医科大学附属児科医院
日本研究機関	大阪大学医学部 小児外科
指導責任者	教授 岡田 正
共同研究者名	草深竹志、宇田津有子

Abstract :

The Wnt signaling pathway is essential for embryonic development and can be involved in tumorigenesis when aberrantly activated. This signaling stabilizes β -catenin, which accumulates in the cytoplasm, binds to T-cell factor (TCF) and then upregulates transcription of downstream genes. In a subset of Wilms tumors, β -catenin mutations have been identified, and this suggested that abnormally activated Wnt signaling may contribute to tumorigenesis of this tumor. Because Axin has been recognized as a main component of Wnt signaling, and its mutations were reported in several types of malignancies, we analyzed Axin gene mutations in 22 pediatric renal tumors. Twenty-four sets of the primers, which cover the whole coding region of the Axin gene, were used for PCR-SSCP analyses. Samples revealing aberrant band patterns were further analyzed for sequencing. PCR-SSCP analysis found differently migrating bands in samples amplified for exons 2, 5, 6, 10 and their flanking introns. After sequencing these samples with migrating bands, the nucleotide changes were determined. Three of these variants were intronic nucleotide substitutions, and other four variants were substitutions in the exons which did not result in amino acid change. Frequency of each nucleotide change ranged from 2% to 48%, accordingly no pathogenetic gene mutations were detected. Our results indicated that mutations of Axin gene as a mechanism of tumorigenesis are not associated with pediatric renal tumors including Wilms tumors. For better understanding of Wilms tumor carcinogenesis, further investigations on the other components of Wnt signaling such as APC, GSK-3 β , and PP2A will be helpful.

Key words: Axin gene, mutation, PCR-SSCP, Wilms tumor.

Introduction:

The Wnt signaling pathway plays critical roles in embryonic development and tumorigenesis (1,2). This signaling stabilizes β -catenin, which accumulates in the cytoplasm, binds to T-cell factor (TCF) and then upregulates transcription of downstream genes (3-5). In a number of human cancers, different genetic defects which aberrantly activate Wnt signaling through β -catenin stabilization have been demonstrated (1). These include alterations of adenomatous polyposis coli (APC), β -catenin, and serine/threonine protein phosphatase 2A (PP2A). Axin is recently discovered as a main component of Wnt signaling pathway, and different domains of Axin have been shown to interact with other components of Wnt signaling such as APC, glycogen synthase kinase-3 β (GSK-3 β), β -catenin, PP2A and Axin itself

(6-8). Axin is thought to have a critical role in degrading cytoplasmic β -catenin. Consistently, in SW480 cells, a human colon-cancer cell line that accumulates β -catenin in nuclei, overexpression of Axin reduces the level of β -catenin and suppresses TCF-dependent transcription (7, 9).

The molecular pathways involved in Wilms tumor development are largely unknown. Many genes have been identified as being putatively regulated by WT1 gene. However, the cellular pathways abrogated as a result of WT1 mutations have yet to be identified (10). On the other hand, the recent identification of β -catenin mutations in 15% of Wilms tumors implies that alteration of Wnt signaling pathway is important in the genesis of at least a subset of Wilms tumors (11). Because Axin is now regarded as an important component of Wnt signaling and its gene mutations have been detected in several kinds of malignancies (12,13), we performed this study to determine whether Axin mutations are involved in Wilms tumors and other pediatric renal tumors.

Materials and methods:

Tumor Specimens

Tumor specimens were collected from 22 patients during tumor resection at Osaka University Hospital and its affiliated hospitals. This series include 16 Wilms tumors, 3 malignant rhabdoid tumors of the kidney (MRTKs), 2 clear cell sarcomas of the kidney (CCSKs) and 1 congenital mesoblastic nephroma (CMN). All tumor samples were examined microscopically prior to DNA extraction. All these samples were frozen in liquid nitrogen and kept at -80°C. DNA was extracted from frozen tumor tissues according to standard protocol involving proteinase K digestion, serial phenol and chloroform extractions, and ethanol precipitation.

Polymerase Chain Reaction - Single strand Conformation Polymorphism Analysis

The complete coding region of the Axin gene was amplified in 24 different polymerase chain reaction (PCR). The 23 primer sets were prepared according to primer sequences reported by Satoh et al (12). To analyze exon 10, we designed a set of primer 5'-GTTCCCTAGGTATGTGCAGG-3' (forward primer) and 5'-CTGCTTCTGAGCGTGGTA-3' (reverse primer). PCR reaction was performed in a volume of 50 μ l containing 100 ng of DNA, 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl, 2 mM of each dNTP, 10 pmol of each primer, 1.0~1.5 mM MgCl₂ and 0.25U Taq polymerase. Initial denaturation at 94°C for 5 min was followed by 35 cycles on an automated thermal cycler (Takara PCR Thermal Cycler, Japan). These included denaturation at 94°C for 30sec, annealing at 60~64°C for 30sec. and extension at 72°C for 1 min. A final extension step at 72°C for 10 min was added.

PCR amplified products were applied for single-strand conformation polymorphism analysis (SSCP). One~two μ l of each PCR product was electrophoresed on a 15% nondenaturing polyacrylamide gel (Clean Gel, Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden) in a Multiphor II system (Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden) with constant temperature at either 5, 10, 15 or 20°C. The gel was stained by silver staining to visualize single strand DNAs, and band patterns were examined.

DNA Sequencing

Specimens showing abnormal SSCP patterns in the initial screening were reexamined by further duplicate SSCP analyses of PCR products derived from two additional separate PCR reactions.

Those showing reproducible results were subjected to DNA sequencing. Cycle sequencing was performed using the ABI PRISM Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Applied Biosystems). Sequencing products were applied to an ABI prism 310 Genetic Analyzer, and detail of mutations was determined.

Results:

PCR-SSCP analysis found differently migrating bands in samples amplified for exons 2, 5, 6, 10 and their flanking introns. After sequencing these samples with migrating bands, the nucleotide changes were determined. Three of these variants were intronic nucleotide substitutions, and other four variants were substitutions in the exons which did not result in amino acid change. Frequency of each nucleotide change ranged from 2% to 48% (Table I). Abnormal band was not detected in other sets of primers.

Discussion:

The human Axin gene locates at 16p13.3 and encodes a 900-amino acid polypeptide with 87% identity to the mouse protein (14). Axin protein is a component of the Wnt signaling pathway which might be involved in tumor formation when aberrantly activated. The final effector of the signaling, β -catenin, binds TCF/LEF to act as transcriptional activator (3-5,15). When degradation of β -catenin through specific phosphorylation by GSK-3 β is blocked, β -catenin is stabilized and stimulates the statement of genes including c-myc, c-jun, fra-1, and cyclin D1 (16).

Axin binds and interacts with b-catenin, GSK-3b and other several components involved in the Wnt signaling. Because Axin has been proposed to facilitate the phosphorylation of b-catenin by GSK-3b (17,18), loss of Axin function may lead to oncogenic effect through b-catenin stabilization. Indeed, biallelic inactivation of the Axin have been found in human hepatocellular carcinomas (HCCs) and cell lines (12), which lack other causes for b-catenin stabilization such as mutation of b-catenin gene. All these findings strongly indicate the tumor suppressor property of Axin and its contribution to the development of human malignancies through aberrant activation of Wnt signaling.

In our present study, we have only detected several silent mutations in the coding region and intronic polymorphisms of Axin gene in childhood renal tumors including Wilms tumor, MRTK, CCSK and CMN. All these nucleotide alterations detected were not tumor specific, because the same alterations were observed in the other kinds of tumors such as hepatocellular carcinomas (12), breast and colon cancers (13), and neuroblastomas (our recent data). Furthermore, some of these alterations appear to occur at relatively common frequencies. Our results suggest that Axin gene mutations as a mechanism of tumorigenesis are not associated with the tumors originated from the kidney in children.

However, β -catenin gene mutations have been recently demonstrated in 15% of Wilms tumors investigated, suggesting an important involvement of aberrantly activated Wnt signaling in this pediatric renal tumor. Interestingly, these β -catenin mutations are highly associated with occurrence of WT1 gene mutations. Both of mutations affect two different cellular mechanisms, and may be necessary to obtain clinically malignant property. For better understanding of Wilms tumor carcinogenesis, further

investigations on the other components of Wnt signaling such as APC, GSK-3 β , and PP2A will be helpful.

References:

1. Polakis P: Wnt signaling and cancer. *Genes Dev* 14:1837-1851, 2000.
2. Peifer M and Polakis P: Wnt signaling in oncogenesis and embryogenesis--a look outside the nucleus. *Science* 287:1606-1609, 2000.
3. Sakamoto I, Kishida S, Fukui A et al: A novel beta-catenin-binding protein inhibits beta-catenin-dependent Tcf activation and axis formation. *J Biol Chem* 275:32871-32878, 2000.
4. Labbe E, Letamendia A and Attisano L: Association of Smads with lymphoid enhancer binding factor 1/T cell-specific factor mediates cooperative signaling by the transforming growth factor-beta and wnt pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:8358-8363, 2000.
5. Jho EH, Lomvardas S and Costantini F: A GSK3beta phosphorylation site in axin modulates interaction with beta-catenin and Tcf-mediated gene expression. *Biochem Biophys Res Commun* 266:28-35, 1999.
6. Ikeda S, Kishida M, Matsuura Y, Usui H, Kikuchi A: GSK-3beta-dependent phosphorylation of adenomatous polyposis coli gene product can be modulated by beta-catenin and protein phosphatase 2A complexed with Axin. *Oncogene* 19:537-545, 2000.
7. Nakamura T, Hamada F, Ishidate T et al: Axin, an inhibitor of the Wnt signalling pathway, interacts with beta-catenin, GSK-3beta and APC and reduces the beta-catenin level. *Genes Cells* 3:395-403, 1998.
8. Farr GH, Ferkey DM, Yost C, Pierce SB, Weaver C, Kimelman D: Interaction among GSK-3, GBP, axin, and APC in *Xenopus* axis specification. *J Cell Biol* 148:691-702, 2000.
9. Hart MJ, de los Santos R, Albert IN, Rubinfeld B, Polakis P: Downregulation of beta-catenin by human Axin and its association with the APC tumor suppressor, beta-catenin and GSK3 beta. *Curr Biol* 8:573-581, 1998.
10. Maiti S, Alam R, Amos CI, Huff V: Frequent association of beta-catenin and WT1 mutations in Wilms tumors. *Cancer Res* 60:6288-6292, 2000.
11. Koesters R, Ridder R, Kopp-Schneider A et al: Mutational activation of the beta-catenin proto-oncogene is a common event in the development of Wilms' tumors. *Cancer Res* 59:3880-3882, 1999.
12. Satoh S, Daigo Y, Furukawa Y et al: AXIN1 mutations in hepatocellular carcinomas, and growth suppression in cancer cells by virus-mediated transfer of AXIN1. *Nat Genet* 24:245-250, 2000.
13. Webster MT, Rozycka M, Sara E, Davis E, Smalley M, Young N, Dale TC, Wooster R. Sequence variants of the axin gene in breast, colon, and other cancers: an analysis of mutations that interfere with GSK3 binding. *Genes Chromosomes Cancer* 2000;28:443-53.
14. Zeng L, Fagotto F, Zhang T et al: The mouse Fused locus encodes Axin, an inhibitor of the Wnt signaling pathway that regulates embryonic axis formation. *Cell* 90:181-192, 1997.
15. Akiyama T: Wnt/beta-catenin signaling. *Cytokine Growth Factor Rev* 11:273-282, 2000.
16. Kikuchi A: Modulation of Wnt signaling by Axin and Axil. *Cytokine Growth Factor Rev* 10:255-265, 1999.
17. Behrens J: Control of beta-catenin signaling in tumor development. *Ann N Y Acad Sci* 910:21-33,

2000.

18. Ikeda S, Kishida S, Yamamoto H, Murai H, Koyama S, Kikuchi A: Axin, a negative regulator of the Wnt signaling pathway, forms a complex with GSK-3 β and β -catenin and promotes GSK-3 β -dependent phosphorylation of β -catenin. EMBO J 17:1371-1384, 1998.

* This paper has been accepted by International Journal of Molecular Medicine and will be published in this year.

2002.3.12

2001年度日中医学協会共同研究等助成事業報告書

－在留中国人研究者研究助成－

2002年 2 月 15 日

財団法人 日中医学協会
理事長 殿

研究者氏名 蘇 偉 (蘇) 印
所属機関名 大阪大学 臓器制御外科学(第1外科)
指導責任者氏名 伊藤 壽記
職 名 助教授
所 在 地 〒565-0871 吹田市山田丘2-2 E1
電 話 06-6879-3153 内線 3153

1. 研 究 テ ー マ 大腸癌肝転移の制御に関する実験的研究

2. 本年度の研究業績

(1) 学会・研究会等における発表 (有) ・ 無 (学会名・演題)

Su W., Ito T., Kitagawa T., Oyama T., et al: Immuno-gene therapy using IL-12 transduced fibroblasts in murine liver metastasis models. 第7回日本遺伝子治療学会総会, 東京, 2001年7月7日。

Su W., Ito T., Kitagawa T., Oyama T., et al: Immuno-gene therapy using IL-12 transduced fibroblasts in murine liver metastasis models. 第56回日本消化器外科学会総会, 秋田, 2001年7月26日。

(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

私は今年3月に大阪大学大学院医学研究科臓器制御外科学(第一外科)博士課程を卒業し、博士学位を取得し、5月に中国北京医院普通外科に帰るつもりです。北京に帰りましたら、日本で研究した大腸癌肝転移の免疫治療、遺伝子治療を続けてやりたいと思います。中国でこの研究に関する動物実験を立ち上げます、臨床応用の可能性を検討します。

4. 指導責任者の意見

蘇偉君は、平成10年4月 大阪大学大学院医学研究科(臓器制御外科学)に入学し、消化器腫瘍に対する遺伝子免疫療法についての研究に従事した。研究態度はじめから4年間で3編の英文論文(1編は published, 2編は投稿中)を作成した。研究内容は、消化器癌の肝転移の制御にむいて、自己線維芽細胞に強力な抗腫瘍サイトカインと遺伝子導入して、血管経路で投与するというもので、臨床応用にむいて実現性の高いものを評価している。

指導責任者氏名 久野 藤 壽 記 印

5. 研究報告書

別紙報告書作成要領により、添付の用紙で研究報告書を作成して下さい。

研究発表中または研究中の本人のスナップ写真を添付して下さい。

※研究成果を発表する場合は、発表原稿・抄録集等も添付して下さい。

※発表に当っては、日中医学協会助成金による旨を明記して下さい。

The Anti-tumor Effects of Intra-portal Injection of Fibroblasts Genetically Engineered to Secrete IL-12 in Murine Liver Metastasis Models

研究者氏名 蘇 偉
中国所属機関 北京医院普通外科
日本研究機関 大阪大学臓器制御外科学 (第一外科)
指導責任者 助教授 伊藤壽記
共同研究者 北川 透、大山 司、李 千万

Abstract

Augmentation of the hepatic immune system with IL-12 administration can prevent and treat liver metastasis. Fibroblasts genetically engineered to secrete IL-12 have been shown to possess anti-tumor activity in the subcutaneous tumor models. In this study, the anti-tumor effect of intra-portal injection of fibroblasts genetically engineered to secrete IL-12 was investigated in murine liver metastasis models. Transfected fibroblasts (3T3-IL-12, 3T3-neo) were obtained from NIH-3T3 cells transfected with retroviral vectors. Intra-portal administration of 3T3-IL-12 cells on day 0 suppressed the tumor establishment in MC-38 liver metastasis models. In cell tracking experiment, the red fluorescent cells were mainly detected in the liver after intra-portal injection of PKH-26-labeled 3T3-IL-12 cells, but few in other organs. And these cells remained in the liver even after 7 days. IL-12 and IFN- γ levels in the serum and in the liver extracts were up-regulated by the intra-portal injection of 3T3-IL-12 cells. Intra-portal administration of 3T3-IL-12 cells suppressed the establishment of liver metastasis in a dose-dependent manner. Intra-portal administration of 3T3-IL-12 cells on day 5 suppressed the growth of established tumors in MC-38 liver metastasis model. The intra-portal injection of 3T3-IL-12 cells induced lymphocytic infiltration in MC-38 tumors. After the treatment with 3T3-IL-12 cells, IFN- γ production by splenocytes re-stimulated with irradiated parental tumor cells *in vitro* was significantly increased. Specific cytotoxicities of splenocytes against parental tumor cells *in vitro* also were induced by intra-portal injection of 3T3-IL-12 cells. These findings suggested that intra-portal injection of IL-12-producing fibroblasts would be an effective strategy for the treatment of liver metastasis.

Key Words IL-12, fibroblast, liver metastasis, gene therapy

Introduction

IL-12, a disulfide-linked heterodimer consisting of 40-kDa and 35-kDa subunits, is originally produced by macrophages, dendritic cells and granulocytes. IL-12 presents marked therapeutic effects in a wide variety of tumor models¹⁻⁷, involving NK cells, T cells, macrophages, dendritic cells and tumor cells. IL-12 stimulates NK cells to produce IFN- γ , induces Th1 development, enhances CTL to kill tumor cells, activates macrophages, modulates activity of dendritic cells and inhibits angiogenesis²⁻⁷. However, systemic administration of IL-12 has caused dose-dependent and schedule-related toxicity in clinical trials. In the first clinical trial, systemic therapy of IL-12 resulted in the death of 2 patients and led to severe toxic effects in other 15 patients⁸.

Tahara *et al* started a clinical trial for melanoma, head and neck cancer, and breast cancer by weekly injections of IL-12-producing fibroblasts at the site of palpable tumors⁹. We thought that intro-portal administration of IL-12-transduced fibroblasts should be effective to induce production and localization of IL-12 in the liver. Though there are several reports about systemic administration of IL-12 for liver metastasis in murine models^{10, 11}, to our knowledge, there are few reports about intro-portal administration of IL-12-transduced cells for liver metastasis. In this study, we investigated the anti-tumor effect of intro-portal administration of IL-12-producing fibroblasts to prevent and treat the liver

metastasis in the murine models.

Material and methods

Cell lines and mice MC-38, a poorly immunogenic C57BL/6 murine colon adenocarcinoma cell line, was kindly provided by Dr. Steven A. Rosenberg (Nation Cancer Institute, USA). Female 6- to 10-weeks-old C57BL/6 mice were purchased from Clea Japan (Tokyo, Japan). Mice were fed in the Institute of Experimental Animal Sciences of Osaka University Graduate School of Medical, and routinely screened and found to be specific pathogen free.

In vivo tumor experiments Under the anesthesia of ketamine hydrochloride (Sankyo Co., Tokyo, Japan), C57BL/6 mice underwent laparotomy. In the liver metastasis models, tumor cells were injected into the portal vein on day 0. After the mice were sacrificed on day 21, the liver was weighed and cut to slices each 3 mm thick. The number of metastatic nodules was counted using a dissecting microscope. In intracutaneous tumors, mice were shaved over the right flank and were injected intracutaneously with a tumorigenic dose of tumor cells. The growth of the intracutaneous tumors was monitored in the next 21 days, and the tumor sizes (square millimeters) were shown as the products of the perpendicular diameters of each tumor.

In vivo cell tracking experiment PKH-26 (Sigma Chemical Co, USA) is a red fluorescent cell linker, which was used *in vitro* and *in vivo* cell tracking application¹². 3T3-IL-12 cells were labeled with PKH-26 as described previously¹². PKH-26-labeled 3T3-IL-12 cells were injected into the portal vein. After 2hr, 1, 2, 3, 5, or 7 days, the mice were sacrificed and harvested organs were embedded in OCT compound (Sakura Funetechnical Co., Ltd., Tokyo, Japan), and stored at -80°C stored. PKH-26-labeled cells were observed through a fluorescent microscope.

Statistical analysis Statistical analysis of experiments was performed using Student's t-test and ANOVA test when involved growth of intracutaneous tumors. Data are presented as mean \pm SD. P values less than 0.05 were considered as statistically significant.

Results

IL-12 production by genetically engineered fibroblasts *in vitro*. To determine IL-12 production by 3T3-IL-12 cells, 1×10^6 transfected fibroblasts were cultured in a 75-cm² culture dishes for 48 hr, then supernatants were collected. IL-12 production by 3T3-IL-12 cells was 45.5 ± 6.8 ng/ 10^6 cells/24 hr. IL-12 production by 3T3-neo cells or non-transfected MC-38 cells was not detected, <0.05 ng/ 10^6 cells/24 hr.

Intra-portal administration of 3T3-IL-12 cells on day 0 suppressed the tumor establishment in MC-38 liver metastasis models. After intra-portal injection of MC-38 cells, 1×10^5 of 3T3-IL-12 cells were injected intra-portal or intraperitoneally on day 0, and the same amount of 3T3-neo cells or HBSS were injected into the portal vein as controls at same time. The livers were removed on day 21, and the liver weight and the number of metastatic nodules were examined. The liver weight of the mice treated with 3T3-IL-12 intraperitoneally significantly less than those of mice treated with 3T3-neo cells ($P=0.0441$), and the liver weight of the mice treated with 3T3-IL-12 intra-portal also significantly less than those of mice treated with 3T3-neo cells ($P=0.0006$). The numbers of metastatic nodules in the 3T3-IL-12 intraperitoneal treatment group or in the 3T3-IL-12 intra-portal treatment group were significantly less than that in the 3T3-neo group ($P<0.05$).

Intra-portal injected 3T3-IL-12 cells remained in the liver, and up-regulated IL-12 and IFN- γ levels in the sera and the liver extracts. To trace intra-portal injected 3T3-IL-12 cells, 1×10^5 of PKH-26-labeled 3T3-IL-12 cells were injected into the portal vein, while unlabeled 3T3-IL-12 cells were used as controls. The red fluorescent cells were observed in the liver 2hr after the injection, but few in the lung, the brain, the kidney, the spleen and the muscle. Further, these cells were continually observed in the liver in the next 7 days, but not in the other organs at all.

Sera and liver extracts were collected after the intra-portal injection of 3T3-IL-12 cells from day 1 to day 14. The IL-12 levels in the serum or in the liver extracts peaked 5 days after intra-portal injection of 3T3-IL-12 cells and

gradually decreased until 14 days. The peak of IFN- γ levels in the serum or in the liver extracts occurred 7 days after the injection, delayed a few days compared with those of IL-12. Elevations of IL-12 or IFN- γ levels were not observed in the mice injected with 3T3-neo cells into the portal vein.

Intra-portal administration of 3T3-IL-12 cells suppressed the establishment of MC-38 liver metastasis in a dose-dependent manner. After intra-portal injection of MC-38 cells, 3×10^3 , 1×10^4 , 3×10^4 or 1×10^5 of 3-IL-12 cells were injected into the portal vein on day 0. The significant decrease was observed at the dose of 1×10^4 3T3-IL-12 cells/mouse, compared with those of the 3T3-neo group ($P < 0.05$). The strongest anti-tumor effect was obtained in the groups using 1×10^5 3T3-IL-12 cells/mouse. Intra-portal injection of 3T3-IL-12 cells suppressed the establishment of liver metastasis in a dose-dependent manner.

Intra-portal administration of 3T3-IL-12 cells on day 5 suppressed the growth of established tumors in MC-38 liver metastasis models. The established liver metastasis of MC-38 was treated with 3T3-IL-12 cells. After 5 days of intra-portal inoculation of MC-38 cells, 1×10^5 of 3T3-IL-12 cells were injected into the portal vein. After 21 days, the liver weight and the number of metastatic nodules examined. The liver weight and the number of metastatic nodules in the 3T3-IL-12-treatment group significantly less than those in the 3T3-neo group ($P < 0.05$). Intra-portal injection of 3T3-IL-12 cells on day 5 suppressed the growth of established tumors in MC-38 liver metastasis models.

Histological expression of liver with MC-38 metastasis showed that lymphocytes slightly infiltrated in the MC-38 tumors of the HBSS group or the 3T3-neo group. There were, however, lymphocytes markedly infiltrated in the MC-38 tumor of the 3T3-IL-12-treatment group. The intra-portal injection of 3T3-IL-12 cells induced lymphocytic infiltration in MC-38 tumors.

IFN- γ production by splenocytes re-stimulated with irradiated parental tumor cells was increased after the treatment with 3T3-IL-12 cells. Splenocytes harvested from mice with liver metastasis of MC-38 in each treatment group were re-stimulated *in vitro* for 48 hr with 20 Gy irradiated parental tumor cells or YAC-1 cells to evaluate their ability to produce IFN- γ and IL-4. IFN- γ production by splenocytes from mice with liver metastasis of MC-38 was significantly increased in the 3T3-IL-12-treatment group as compared with in the 3T3-neo group ($P < 0.05$). After these splenocytes were re-stimulated with irradiated YAC-1 cells that were used as non-specific controls, IFN- γ production by these splenocytes was not significantly increased. No significant difference of IL-4 production was observed among these treatment groups. These results suggest that the treatment of 3T3-IL-12 cells induced a Th1 immune response specific to the parental tumor cells.

Specific cytotoxicities against parental tumor cells were induced by intra-portal injection of 3T3-IL-12 cells. Splenocytes were harvested from mice with liver metastasis on 14 days after implantation of tumor cells in each treatment group. Splenocytes from mice with liver metastasis of MC-38 presented a trend of increased cytotoxicities against parental cells after the treatment of 3T3-IL-12 cells, and a significant difference was observed between 3T3-IL-12 cells and 3T3-neo cells treatment groups ($P < 0.05$). Cytotoxicities against MC-38 cells were higher than that against YAC-1 cells that were used as non-specific controls. There was a significant difference between cytotoxicities against MC-38 cells and against YAC-1 cells. Similar results were obtained using liver mononuclear cells derived from mice with liver metastasis. These results suggest that the treatment of 3T3-IL-12 cells induced specific cytotoxicities to the parental tumor cells.

Discussion

According to the previous observations in animal models, it is suggest that IL-12 is a promising candidate reagent using in the tumor immunotherapy^{2-7, 13-15}. In our study, micro-foci of liver metastases were detected histologically and grossly on day 3 after intra-portal injection of MC-38 cells. We injected rIL-12 from day 3 to confirm that intraperitoneal or intrasplenic injection of rIL-12 was efficient on suppress MC-38 tumor growth of liver metastasis. Moreover, intraperitoneal or intra-portal administration of 3T3-IL-12 cells on day 0 also caused an anti-tumor effect to

suppress liver metastasis of MC-38. Though there was not a significant difference between the anti-tumor effects of intraperitoneal administration and intra-portal administration of 3T3-IL-12 cells, intra-portal administration of 3T3-IL-12 cells seemed to be better.

After intra-portal injection of 3T3-IL-12 cells, 3T3-IL-12 cells were observed in the liver, but few in other organs. These cells remained in the liver in the next 7 days. Further, intra-portal injection of 3T3-IL-12 cells maintained the higher levels of IL-12 and IFN- γ in the serum and the liver extract at least during two weeks. These results suggested intra-portal injection of 3T3-IL-12 cells induced a selective localization of 3T3-IL-12 cells and these cells produced IL-12 in the liver.

The anti-tumor effect of intra-portal injection of 3T3-IL-12 cells was confirmed in several liver metastasis models. At first, intra-portal injection of 3T3-IL-12 cells on day 0 suppressed the establishment of MC-38 liver metastasis. In B16-BL6 (murine melanoma) or Panc-02 (murine pancreas adenocarcinoma) liver metastasis models, intra-portal injection of 3T3-IL-12 cells on day 0 also suppressed the tumor establishment (data not shown). Then we showed that intra-portal administration of 3T3-IL-12 cells suppressed the establishment of MC-38 liver metastasis in a dose-dependent manner. It was suggested that the amounts of IL-12 produced in the liver was important for this anti-tumor effect. Moreover, after 5 days of intra-portal injection of tumor cells, when the micro-foci of liver metastases had formed, intra-portal administration of 3T3-IL-12 cells was also effective in the established liver metastasis of MC-38. Intra-portal administration of 3T3-IL-12 not only suppressed the establishment of liver metastasis, but also suppressed the growth of established micro-foci of liver metastases.

Localization of IL-12 production at the tumor site could have an advantage over systemic treatments by inducing an immune response against regressing tumor without the need for circulating high levels of IL-12¹⁶. Regional application of IL-12 has been examined in subcutaneous tumor models using the peritumoral injection of fibroblasts engineered to secrete IL-12 to activate a local anti-tumor immune response which also promoted systemic immune protection specific to the tumor cells^{14, 15}. It was reported that IL-12 directly effect on tumor cells^{17, 18} and the amount of IL-12 made available at the tumor site is critical for tumor regression¹⁹, so this strategy appears to have greater advantage over systemic administration for liver metastasis. Systemic administration of IL-12 has caused dose-dependent and schedule-related toxicity in the clinical trials^{8, 20}. The local administration of IL-12 producing cells at tumor site is believed to be effective in minimizing side effects, because there is with lower systemic concentration of IL-12^{15, 21}. Recently, a phase I clinical trial showed that peritumoral injection of IL-12-transduced fibroblasts was feasible in patients with advanced breast cancer²². Clinically significant toxicities were not encountered, and transient but clear reductions of tumor sizes were observed in four of nine cases²².

As a summary, intra-portal injection of IL-12-producing fibroblasts into liver may be an effective strategy for the treatment of liver metastasis.

Reference

1. Trinchieri G. Interleukin-12: a cytokine at the interface of inflammation and immunity. *Adv Immunol.* 1998; 70: 83-243.
2. Shurin MR, Esche C., Peron JM, et al. Antitumor activities of IL-12 and mechanisms of action. *Chem Immunol.* 1997; 68: 153-173.
3. Cavallo F, Di Carlo E., Butera M, et al. Immune events associated with the cure of established tumors and spontaneous metastases by local and systemic interleukin 12. *Cancer Res.* 1999; 59: 414-421.
4. Brunda MJ, Luistro L., Warriar RR, et al. Antitumor and antimetastatic activity of interleukin 12 against murine tumors. *J Exp Med.* 1993;178: 1223-1230.
5. Yu WG, Ogawa M., Mu J, et al. IL-12-induced tumor regression correlates with in situ activity of IFN-gamma produced by tumor-infiltrating cells and its secondary induction of anti-tumor pathways. *J Leukoc Biol.* 1997; 62:

6. Gately MK, Renzetti LM, Magram J, et al. The interleukin-12/interleukin-12- receptor system: role in normal and pathologic immune responses. *Annu Rev Immunol.* 1998; 16: 495-521.
7. Duda DG, Sunamura M., Lozonschi L, et al. Direct in vitro evidence and in vivo analysis of the antiangiogenesis effects of interleukin 12. *Cancer Res.* 2000; 60: 1111-1116.
8. Leonard JP, Sherman ML, Fisher GL, et al. Effects of single-dose interleukin-12 exposure on interleukin-12-associated toxicity and interferon-gamma production. *Blood* 1997; 90: 2541-2548.
9. Tahara H, Lotze MT, Robbins PD, et al. IL-12 gene therapy using direct injection of tumors with genetically engineered autologous fibroblasts. *Hum Gene Ther.* 1995; 6: 1607-1624.
10. Okuno K, Hirai N., Lee YS, et al. Involvement of liver-associated immunity in hepatic metastasis formation. *J Surg Res.* 1998; 75: 148-152.
11. Shin T, Nakayama T, Akutsu Y, et al. Inhibition of tumor metastasis by adoptive transfer of IL-12-activated Valpha14 NKT cells. *Int J Cancer,* 2001; 91: 523-528.
12. Samlowski WE, Robertson BA, Draper BK, et al. Effects of supravital fluorochromes used to analyze the in vivo homing of murine lymphocytes on cellular function. *J Immunol Methods.* 1991; 144: 101-115.
13. Iwazawa T, Chau GY, Mori T, et al. Potent antitumor effects of intra-arterial injection of fibroblasts genetically engineered to express IL-12 in liver metastasis model of rat: no additional benefit of using retroviral producer cell. *Cancer Gene Ther.* 2001; 8: 17-22.
14. Tahara H, Zeh HJ 3rd, Storkus WJ, et al. Fibroblasts genetically engineered to secrete interleukin 12 can suppress tumor growth and induce antitumor immunity to a murine melanoma in vivo. *Cancer Res.* 1994; 54: 182-189.
15. Zitvogel L, Tahara H, Robbins PD, et al. Cancer immunotherapy of established tumors with IL-12. Effective delivery by genetically engineered fibroblasts. *J Immunol.* 1995; 155: 1393-1403.
16. Siders WM, Wright PW, Hixon JA, et al. T cell- and NK cell-independent inhibition of hepatic metastases by systemic administration of an IL-12-expressing recombinant adenovirus. *J Immunol.* 1998; 160: 5465-5474.
17. Su W, Ito T, Oyama T, et al. The direct effect of IL-12 on tumor cells: IL-12 acts directly on tumor cells to activate NF-kappaB and enhance IFN-gamma-mediated STAT1 phosphorylation. *Biochem Biophys Res Commun.* 2001; 280: 503-512.
18. Yue FY, Geertsens R, Hemmi S, et al. IL-12 directly up-regulates the expression of HLA class I, HLA class II and ICAM-1 on human melanoma cells: a mechanism for its antitumor activity? *Eur J Immunol.* 1999; 29: 1762-1773.
19. Colombo MP, Vagliani M, Spreafico F, et al. Amount of interleukin 12 available at the tumor site is critical for tumor regression. *Cancer Res.* 1996; 56: 2531-2534.
20. Car BD, Eng VM, Lipman JM, et al. The toxicology of interleukin-12: a review. *Toxicol Pathol.* 1999; 27: 58-63.
21. Furumoto K, Arai S, Yamasaki S, et al. Spleen-derived dendritic cells engineered to enhance interleukin-12 production elicit therapeutic antitumor immune responses. *Int. J. Cancer.* 2000; 87: 665-672.
22. Kang WK, Park C, Yoon HL, et al. Interleukin 12 gene therapy of cancer by peritumoral injection of transduced autologous fibroblasts: outcome of a phase I study. *Hum Gene Ther.* 2001; 12: 671-684.


注：本研究は、2001年7月26日「第56回日本消化器外科学会総会」にて発表いたしました。

2001年度日中医学協会共同研究等助成事業報告書

－在留中国人研究者研究助成－

2002 年 3 月 6 日

財団法人 日中医学協会
理事長 殿

研究者氏名 趙 建武  ㊟
所属機関名 東北大学大学院医学研究科整形外科教室
指導責任者氏名 国分 正一
職 名 教 授
所 在 地 〒 980-8574 仙台市青葉区星陵町 1-1
電 話 717-7245 内 線 7245

1. 研 究 テ ー マ 実験的慢性脊髄圧迫における神経細胞死の観察

2. 本年度の研究業績

(1) 学会・研究会等における発表 有 ・ ☒ 無 (学会名・演題)

(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

apoptosisの顕著な生化学特徴はクロマチンDNAのヌクレオソーム単位の切断, すなわち, DNA断片化である. 細胞より抽出したDNAをアガロースゲル電気泳動で分離するDNA ladder検出法は, apoptosisのもう一つ確実な証明法である.

同じ実験系で第4、5、6頸椎高位の脊髄組織を分別に摘出し, 組織より断片化DNAを抽出し, アガロースゲル電気泳動を行い, apoptosis特徴的なDNA断片化を検出する.

4. 指導責任者の意見

頸髄の慢性圧迫実験における神経細胞のapoptosisを証明することに成功した本研究は、画期的である。研究者趙建武氏は次に挙げる技術的困難を解決して達成したものである。①兎の頸椎は人のそれと比べると極めて小さく、その右側に脊髄を一側性に圧迫することは至難である、②圧迫率の異なる脊髄圧迫を作る、③兎の脊髄麻痺を観察する、④繊細なTUNEL法染色の適切な条件を発見する、⑤神経細胞とグリア細胞を区別する、である。

結果は予想以上のものであった。単にapoptosisを証明するに留まらず、圧迫率の違い、経過期間の違いによってapoptosisに陥った細胞の種類の違いを明らかにした。すなわち、48%未満の圧迫率ではapoptosisが生じず、48%～55%の圧迫率、36～48時間の圧迫時間ではグリア細胞が、55%～70%の圧迫率、36～48時間の圧迫時間では神経細胞がapoptosisが生じた。加えて、上・下位椎の高さでの脊髄に同様のapoptosisを確認した。今後、脊髄圧迫に対する脊髄内のapoptosisの3次元的分布を明かにすることが可能である。

最後に、本研究遂行に払った趙氏の頑張りに敬意を表する。

指導責任者氏名 国分正一 印

5. 研究報告書

別紙報告書作成要領により、添付の用紙で研究報告書を作成して下さい。

研究発表中または研究中の本人のスナップ写真を添付して下さい。

※研究成果を発表する場合は、発表原稿・抄録集等も添付して下さい。

※発表に当っては、日中医学協会助成金による旨を明記して下さい。

実験的慢性脊髄圧迫における神経細胞死の観察

研究者氏名 趙 建武
中国所属機関 中日聯誼医院
日本研究機関 東北大学大学院医学研究科
外科病態学講座体性外科学分野
指導責任者 教授 国分 正一
共同研究者名 小澤 浩司 椿野 巧 庄司 克吉

要 旨 : Abstract

本実験では, JW ウサギを用い, 全身麻酔下に第5頸椎椎体前方より硬膜外腔に達する孔を穿ち, 直径 3mmの金属スクリューを挿入することで様々な程度に脊髄の片側を圧迫するモデルを作製した. 圧迫開始後 12 時間から 72 時間まで経時的に圧迫された脊髄を摘出し, TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling (TUNEL 法) 染色標本作製した. 圧迫開始後 36 時間, 圧迫率 55% ~ 70% の標本において, 灰白質の神経細胞に necrosis, 白質の glia 細胞に多数の apoptosis 陽性細胞が認められた, 第4, 6頸椎椎体高位の脊髄神経細胞に apoptosis 陽性細胞がみられた.

Key Words : apoptosis; spinal cord; neuronal death; TUNEL

緒 言 : Introduction

1972 年 Kerr により提唱された apoptosis の概念は, いまや生物学から医学, さらに農学, 水産学を含めた生命科学の広い領域にわたって最も注目される研究分野となっている¹⁾²⁾. Apoptosis とは, 発生過程や組織細胞の交代期において役目を終えた細胞の“予定された死”で, 細胞の特有な形態学的変化と生化学的変化によって特徴づけられている. 電子顕微鏡で観察すると, Apoptosis 細胞では細胞表面の微絨毛が消失し, 平滑になり, 細胞が縮小する. 核内ではクロマチンが凝縮し, 核が断片化する. そして細胞自体が断片化して apoptosis body が形成され, マクロファージなどの食細胞や隣接する細胞によって貪食除去される. 生化学的な特徴としては³⁾⁴⁾, 形態学的変化に先立って, 細胞内 Ca^{++} 濃度の上昇や特定タンパク質のリン酸化, Caspase ファミリーの活性化と特定タンパク質の限定分解が見られる. そして, apoptosis の顕著な特徴であるクロマチン DNA のヌクレオソーム単位での断片化が起こる.

近年, 脊髄の神経細胞の apoptosis が注目されている. 宮内ら⁵⁾は Wister Rat を用い, 重錘で 2 分間胸髄を圧迫し, 急性脊髄損傷後の神経細胞死に apoptosis が存在する可能性を示唆した. Katoh ら⁶⁾は, 実験的急性脊髄損傷モデルにおいての DNA の断片化を認め apoptosis の存在を明らかにした. Liu ら⁷⁾は重錘落下法を用いた急性脊髄損傷モデルでの神経細胞と glia 細胞の apoptosis を調べた. しかし, 慢性圧迫脊髄の apoptosis についての研究は少ない. その主な理由は, 脊髄の慢性圧迫実験モデルの作製が難しいことにある. 慢性圧迫実験モデルとして, 骨形成因子の投与⁸⁾ とスクリューを用いた脊髄の漸増圧迫法⁹⁾ 等が報告されている. 筆者はスクリューを用いた頸髄の慢性圧迫モデルを作製し, 脊髄神経の apoptosis について TUNEL 法で検討した.

対象と方法 : Materials and Methods

18 匹の JW ウサギ (生後 12~16 週, 体重 2.100~2.700kg, オス) を用いた, ネンブタール (25~30mg/kg) 全身麻酔下に頸椎前方を展開し, 第5頸椎椎体正中右側に硬膜外腔に達する孔を穿ち, 直径 3mmの金属スクリューを挿入し, 3 分間で脊柱管の前後径の 50%~80% を占めるまでゆっくり

スクリューを進め、脊髄の片側圧迫モデルを作製した。(Fig. 1, Fig. 2)

手術の翌日に歩容を観察し、脊髄麻痺を記録した。手術後 12 時間後、24 時間後、36 時間後 48 時間後、72 時間後に、ネブタール 100mg を静注し、頸椎を摘出した。第 5 頸椎横断レントゲン像より、圧迫率を脊柱管内スクリュー長/脊柱管前後径として計算した。第 4、5、6 頸椎高位の脊髄組織を 100%ホルマリン固定 3 日間、パラフィンに包埋し、5 μ m のパラフィン切片を作製した。DNA の断片化の検索は TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling (TUNEL 法)¹⁰⁾ に準じ、Apoptosis in situ detection kit (Wako, Japan) を用いた。切片を脱パラフィン、親水化処理し、Protein Digestion Enzyme で 37°C、5 分間タンパク分解処理し、TdT 反応液 37°C、45 分間で DNA 3' 末端を標識し、H₂O₂ 溶液で内因性 POD を不活性処理し、POD-Conjugated Antibody を標識抗体反応し、室温に 5 分間 DAB で発色させ、光学顕微鏡で観察し、digital camera で記録した。

結 果 : Results

1. 運動機能の評価

圧迫率は 48%~82% であった。圧迫率 70% 以上は明らかな (立位不可能) 脊髄麻痺を生じた。

2. 組織学的検討

圧迫率 48%~55%、圧迫 36 時間以上の場合、圧迫部位の脊髄白質で多数の apoptosis 陽性の glia 細胞が認められた。神経細胞の apoptosis は観察されなかった。

圧迫率 55%~70%、圧迫時間 36~48 時間の場合、圧迫部位の脊髄灰白質の神経細胞の necrosis が認められた (Fig. 3)。圧迫部位から頭側、尾側に 10mm 離れた部位を (第 4、6 頸椎レベル) 中心に神経細胞の apoptosis が認められた (Fig. 4)。

圧迫率 70% 以上の場合、神経細胞と glial 細胞に necrosis が認められた。

考 察 : Discussion

桐野¹¹⁾は一過性全脳虚血モデルで、海馬 CA1 錐体細胞に虚血 2 日後に細胞死が生じることを認め、DND (delayed neuronal death) と名づけた。似鳥は電子顕微鏡、免疫組織化学、TUNEL 法や DNA ladder などで、DND は apoptosis であることを報告した¹²⁾。宮内らはラットの胸髄を重錘で 2 分間圧迫し、急性脊髄損傷モデルを作製した。HE 染色と TUNEL 法で観察した結果、損傷 12 時間後から 72 時間後に損傷中心部より 12mm 頭・尾側に離れた機械的圧迫が加わっていない部位に necrosis とは異なる遅発性の神経細胞死を認めた。筆者らのウサギの頸髄をスクリューで長時間に圧迫する慢性脊髄圧迫モデルでは、圧迫 36 時間から 48 時間後、圧迫率 55%~70% の case で、圧迫された頸髄の灰白質の神経細胞に necrosis と白質の glia 細胞に多数の apoptosis 陽性細胞が認められた。圧迫部位より頭、尾側に 1 椎体離れた部位の神経細胞に apoptosis 陽性細胞がみられた。神経細胞の apoptosis は、損傷から十数時間後にみられると報告されており、十数時間は神経細胞の G1-S-G2-M 期までの時間と考え、apoptosis は G1 期に細胞死へと決定され、G2 期に執行される¹³⁾とする報告がある。

Apoptosis の誘因としては 1) death ligand と death receptor の結合、2) サイトカインの欠乏、3) ストレス応答があげられている。この数年の間に精力的に進められた Apoptosis の分子機構の研究によると、Apoptosis の誘因となる signal の多くは細胞膜上の death receptor を介して伝達される、例えば Fas (fatty acid synthase 脂肪酸合成酵素) ligand や TNF (tumor necrosis factor 腫瘍壊死因子) は細胞外領域に β シートを 3 つ折りにして丸めたようなコンパクトな共通の death ligand 構造をもち、death receptor とに結合する¹⁴⁾、death receptor の細胞外領域はコンパクトな球状 domain の繰り返し構造を持ち、細胞内には特徴的なアミノ酸配列のモチーフ death domain を見出される。death ligand が death receptor に結合すると、SODD (silencer of death

domains)は速やかに death receptor から解離し, FADD と呼ばれる adapter 分子が結合する. FADD の N 端の DED(death effector domain)は Caspase-8(cysteiny aspartic acid-protease)と結合し DISC が形成され, Caspase-8 を切断されて活性化し, Caspase-8 が下流 Caspase-3, 6, 7 を活性化し, Caspase-3 が DFF(DNA fragmentation factor)¹⁵⁾の DFF45 を分解し, 分解された DFF45 の断片が DFF40 から離れると, DFF40 が DNase domain が活性化され, DNA を分解し, Apoptosis を引き起こす. Apoptosis の他の誘因として, 紫外線(UV), 放射線, 浸透圧, 活性酸素, 重力などによって, 酸化ストレスが生じると, ROS(reactive oxygen species)やRNS(reactive nitrogen species)が産生され, cytochrome c ¹⁶⁾がミトコンドリアから遊離し, Caspase を活性化し, apoptosis を引き起こす. さらに, apoptosis 誘因として, サイトカイン欠乏による apoptosis 誘導も明らかになった. 神経成長因子(NGF)など神経栄養因子はサイトカイン receptor と結合し, PI3-K(phosphatidylinositol 3-kinase)を活性化し, 更に apoptosis に抑制的な Bcl-2 ファミリーメンバーを活性化し, apoptosis が抑制される. このためサイトカインが欠乏にすると apoptosis が誘導される. 本実験において観察された神経細胞の apoptosis は脊髄外部からの物理作用ため, 酸化ストレスが生じ, 更に圧迫による脊髄虚血のため, サイトカインの欠乏によって apoptosis を起こった可能性が考えられる.

参考文献 : References

1. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR: Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 1972 Aug; 26(4): 239-57
2. Wyllie, A. H., Kerr, J. F. R., Macaskill, I. A. M. and Currie, A. R. (1973) *J Pathol.* 111, 85-94.
3. Wyllie. A. H. (1980) *Nature* 284, 555-556.
4. Arends, M. J., Morris, R. G. and Wyllie, A. H. (1990) *Am. J. Pathol.* 136, 593-601.
5. 宮内 裕史, 米 和徳など: 実験的脊髄損傷における神経細胞死の観察. *臨床整形外科* 31(4): 361-367,
6. Kenji Katoh. : 1996 Induction and its spread of apoptosis in rat spinal cord after mechanical trauma. *Neuroscience Letters*, 316(1996)9-12
7. Xiao Z. Liu, Xiao M. Xu. Neuronal and Glial Apoptosis after Traumatic Spinal Cord Injury. *J Neuroscience*, July 15, 1997, 17(14): 5395-5406
8. 岸 精一ほか: 家兎の実験的脊柱靱帯骨化による脊髄障害について. 厚生省特定疾患脊柱靱帯骨化症調査研究班昭和62年度研究報告書、98～100頁、1988
9. 黒川高秀: 頸部脊椎症性脊髄症の成因に関する研究(第1報) —慢性漸増圧迫動物実験. *日整会誌* 49: 769～771, 1975
10. Yael Gavrieli, Yoav Sherman, and Shmuel A. Ben-Sasson : Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol.*, 119: 493-501, 1992
11. Krino, T, et al: Delayed neuronal death in the gerbil hippocampus following ischemia. *Brain Research* 239: 57-69, 1982
12. Nitatori, T. et al. : *J. Neurosci.*, 15: 1001-1011, 1995
13. 吉田 功. : アポトーシスと細胞周期. *神経精神薬理* 17: 373-378, 1995
14. Nagata, S. : Apoptosis by death factor. *Cell*, 88: 355-365, 1997
15. Liu X, Zou H, Slaughter C, Wang X. : DFF, a heterodimeric protein that functions Apr 18; 89

16. Liu, X. et al. : Induction of apoptotic program in cell-free extract: requirement for dATP and cytochrome c. *Cell*, 86: 147-157, 1996

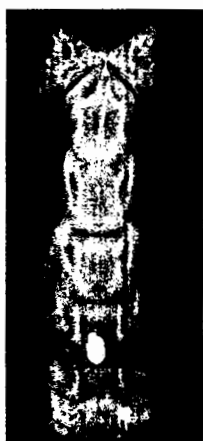


Fig.1

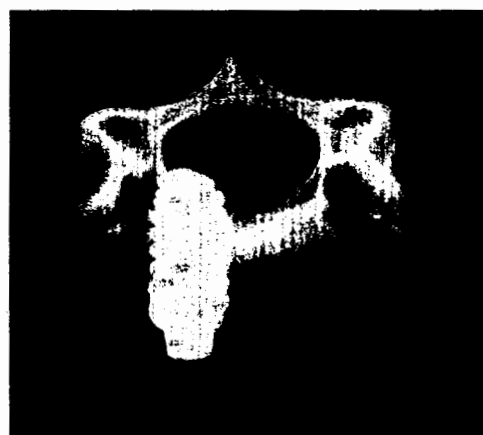


Fig.2

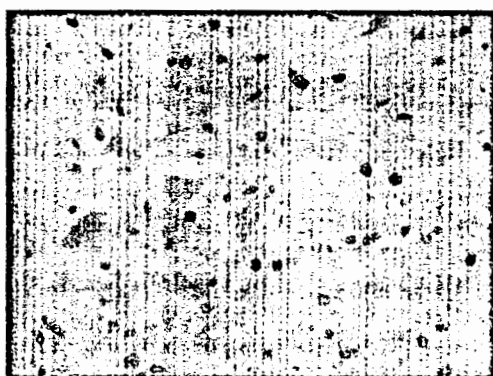


Fig.3

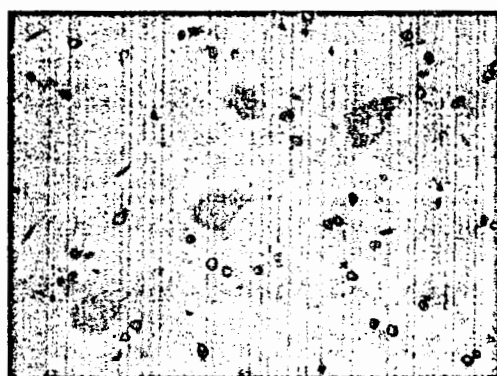




Fig.4

2001年度日中医学協会共同研究等助成事業報告書

－在留中国人研究者研究助成－

2002年 2月 13日

財団法人 日中医学協会
理事長 殿

研究者氏名 李麗淑 
 所属機関名 日本医科大学 耳鼻咽喉科教室
 指導責任者氏名 八木聡明 
 職 名 耳鼻咽喉科教室 主任教授
 所在地 東京都文京区千駄木 1-1-5
 電話 3822 2131 内線 6746

1. 研究テーマ

COCH 遺伝子発現の2つの特異性の検討

2. 本年度の研究業績

(1) 学会・研究会等における発表 ☒ 有 ・ 無 (学会名・演題)

厚生労働省特定疾患対策研究事業

前庭機能異常調査研究班 平成13年度報告書

・ 内耳プロテオーム解析－今後の展望－ 八木聡明、池園哲郎、新藤晋、李麗淑ら

・ COCH 遺伝子発現の異質性とプロモーター解析の有用性 八木聡明、池園哲郎、新藤晋、李麗淑ら

・ 外リンパ特異的音回PLP6Kの機能解析と臨床応用 八木聡明、池園哲郎、新藤晋、李麗淑ら

(2) 学会誌等に掲載した論文

有 ・ ☒ 無 (雑誌名・論文名)

3. 今後の研究計画

内耳性難聴に対する遺伝子治療が近年注目を集め、国内外で研究されている。内耳に遺伝子を発現させてそれを治療に応用する際には最も重要な点は、その標的的特異性にある。遺伝子が周囲組織の中枢神経系、内耳、咽頭などに発現した場合予想できない副作用が生ずる。

そこで、今回は内耳特異的に遺伝子を発現させるか、という技術の開発が不可欠である。標的的特異性は一般に2つの方法によって与えられる。一つは特定の細胞に遺伝子を発現させる方法(転写調節によるターゲティング)、一つは特定の細胞に遺伝子を導入する方法(細胞ターゲティング)である。今回我々はCCH遺伝子プロモーターを用いて転写調節による内耳ターゲティングをおこなうことを最終目標にしている。

内耳特異的なプロモーターを用いた遺伝子治療用のベクターは未だ開発されていないことから本研究により内耳遺伝子治療に新たな展開がもたらされる。

李麗淑は大学院在学中の4年間に下記の研究を予定している。1. CCH遺伝子発現の2つの特性は、つね組織特異性、発現過程の時期特異性の検討。2. CCH遺伝子転写の制御エレメント、プロモーター、エンハンサーを解析する; 3. このプロモーターを内耳遺伝子治療に応用する。

4. 指導責任者の意見

李麗淑は、当教室に留学以来臨床・研究面で日々研鑽を積んでいる。李麗淑は中国下の初期臨床研修並びに本院での研修の結果、耳鼻咽喉科医としての要領知識と技術を修得しつつある。日頃の勤務態度も非常に良好で、我々医師、病院スタッフの信頼を勝ち得ている。日本語能力は卓越しており仕事上会話に支障は全く無い。

研究面の勉強意欲も非常に旺盛で、自ら実験計画を立て、指導医の意見を聞きに来る。実験技術も優秀で安定した成果を得ている。また、遺伝子に関する基礎的な知識を得るべく日々学術書、英文の論文を読んでいる。今後の彼女の研究の発展が非常に楽しみである。

この度、日中医学協会共同研究等助成事業から研究助成金をいただくことは、我々日本医科大学耳鼻咽喉科教室にとって非常に名誉なことであり、改めて感謝申し上げたい。

今後とも日中医学研究発展のために努力する所存である。

指導責任者氏名

八木 稔 明

5. 研究報告書

別紙報告書作成要領により、添付の用紙で研究報告書を作成して下さい。

研究発表中または研究中の本人のスナップ写真を添付して下さい。

※研究成果を発表する場合は、発表原稿・抄録集等も添付して下さい。

※発表に当っては、日中医学協会助成金による旨を明記して下さい。

遺伝性難聴DFNA9病因遺伝子 COCHのアイソフォーム

研究者氏名	李麗淑
中国所属機関	延辺第二人民病院
日本研究機関	日本医科大学医学部耳鼻咽喉科
指導責任者	教授 八木聡明
共同研究者名	池園哲郎、新藤晋

要旨

我々は遺伝性難聴病因遺伝子、COCH遺伝子の蛋白レベルでの研究を行っている。COCH遺伝子産物(Cochlin)のp40蛋白のN末端配列に対して作成したp40-anti-cochlin抗体を用いて、ラットの内耳と内臓における、Cochlinのアイソフォームを検討した。その結果Cochlin様反応は内耳以外では大脳、小脳、脾臓、胸腺に認められた。この結果、Cochlinはごく微量ではあるが内耳以外の組織にも発現していることが解った。又内臓でのCochlinは内耳とは異なる数種の分子量のアイソフォームであり臓器特異的選択的スプライシングにより調整されているものと推測する。内耳以外の臓器に発見するCOCH遺伝子のアイソフォームの解析は、将来COCH遺伝子のプロモーターを用いた難聴の遺伝子治療法を開発する際に非常に重要な意味を持っている。

Key Words 非症候性遺伝性難聴、COCH 遺伝子、ウェスタンブロッティング、アイソフォーム、内耳、スプライシング

緒言

非症候性遺伝性難聴は、先天性難聴の大多数を占めると言われている。難聴・めまいと言った内耳障害に起因する症状以外に目立った異常所見が見られない(非症候性)この種の難聴の原因遺伝子を同定するのは非常に困難であった。しかし、近年の分子生物学の発展によりこの分野はここ4年間に急速に進歩し、現在、40個以上の非症候性遺伝性難聴の遺伝子座が明らかになっており、このうち9個の原因遺伝子が同定されている(<http://www.okayama-u.ac.jp/user/med/oto/oto/HHihome.htm>)。一方、これらの難聴病因遺伝子の蛋白レベルでの研究はほとんどなされていない。2次元電気泳動による難聴原因蛋白の同定の報告は我々の報告が最初である。

COCH遺伝子は1998年に発見された新しい遺伝子で、その機能は十分に解明されていない。しかしCOCHのミューテーションは常染色体優性難聴の一つであるDFNA9を発症させ、さらにメニエール病の発症に関わる可能性があると予測されている(1, 2)。

我々はすでに2次元電気泳動法を用いた内耳蛋白のプロテオーム解析をおこない、Cochlinに関して以下のことを明らかにした(3, 4)。

1. 内耳の構成蛋白の70%を占めること
2. Cochlinは3つの異なったN末端を持ち、分子量がそれぞれ63kDa, 44kDa, 40kDaの3種類のアイソフォームp63, p44, p40に分類される(図1)
3. それらのアイソフォームはさらに等電点が異なる合計で16個の蛋白から構成されている(図1)
4. ヒトDFNA9患者にみられる突然変異部位は全てp63にのみ含まれておりp44, p40には含まれていなかった(図2)
5. さらに、この突然変異部位はCOCH遺伝子のLCCL領域のみに行われている(図2)

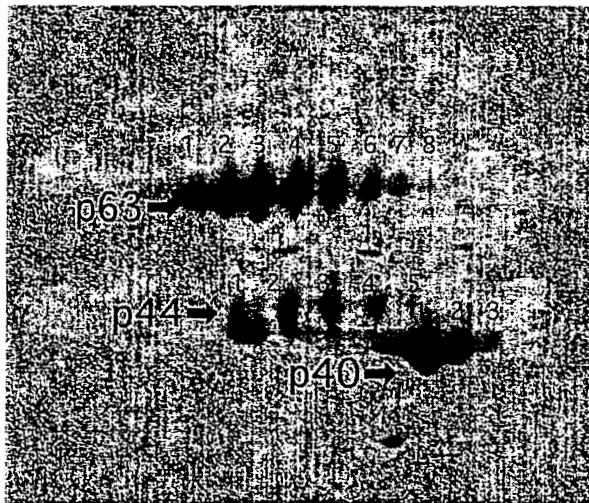


図 1

ウシ内耳蛋白の2次元電気泳動結果
Cochlin のアイソフォームを表示

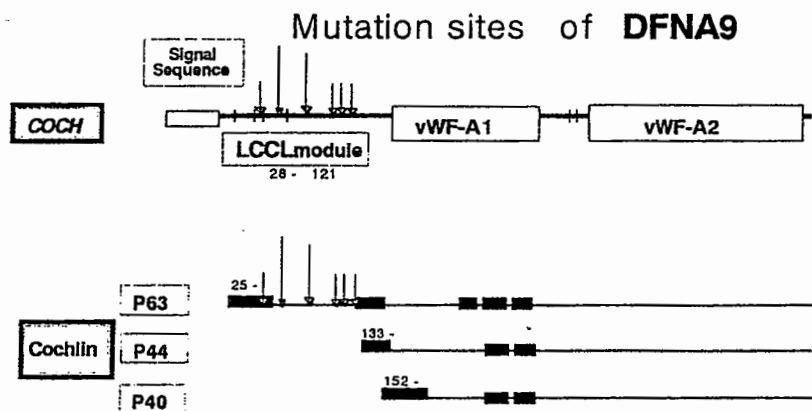
p 63 1-8

p 44 1-5

p 40 1-3

図2 COCH遺伝子とCochlin蛋白アイソフォームの模式図

Schematic representation of the *COCH* gene mutation and Cochlin



現在、COCH遺伝子はほぼ内耳特異的に発現していると考えられている。今回我々は、COCH蛋白のアイソフォームが内耳以外に発現しているか否かを確認する目的で実験を行った。COCH蛋白特異的抗体を作成しラット内臓のウェスタンブロッティングを行った。

対象と方法

p40蛋白のN末端の配列に対する抗ペプチドポリクローナル抗体 (p40-anti-cochlin 抗体) はあらかじめ作成した。ラットの内耳、大脳、小脳、眼球、心臓、肝臓、腎臓、肺、胸腺、腸から得られた組織をホモジナイズした。10% polyacrylamide slab gel を用いて SDS-PAGE を行った。27 mA、1 時間泳動した後ニトロセルロース膜へ転写した。gel の1レーンあたりに内耳組織は1.7 μ g、内臓組織は1440 μ g を泳動した。転写終了後、ニトロセルロース膜をブロッキング緩衝液 (5% skim milk、0.2% Tween 20、PBS) で、ブロッキングした (over night、4 度)。次に室温で2000 倍希釈の1次抗体 (p40 - anti - cochlin 抗体) と2時間反応させ、次に1000 倍希釈の2次抗体 (anti - Rabbit IgG antibody) と1時間反応させた。2次抗体の検出はDAB 染色法と ECL 染色法を用いた。

結果

- 1、Cochlin 様反応は内耳だけでなく大脳、小脳、目、脾臓、肝臓、胸腺に発見された。
- 2、Cochlin 様反応は肝臓、腎臓、肺、腸には発見されなかった。
- 3、内耳と比較して100 倍量の内臓蛋白を泳動したが、内臓の Cochlin 様反応は非常に弱く、DAB 染色法では検出できなかった。ECL 染色法で検出した内臓の Cochlin 様反応は内耳の約100分の1の強さで検出され、サンプル量が1/100であることを考えると内耳以外の臓器での発見は約1/10000 であると考えられた。
- 4、内臓では内耳の蛋白と異なる数種のアイソフォームが検出された。

大脳と小脳： 200 kda、90 kda、

脾臓： 40 kda、37 kda、34 kda、

胸腺： 40 kda、38 kda、37 kda、34 kda

- 5、脾臓と胸腺に共通して見られた40 kda、37 kda、34 kda のアイソフォームは全く同じサイズであった。

考察

COCH はヒト、マウス、ウシ、ラットでの発見が確認されており、79% から90% の高い相同性があることが明らかになった (3、4)。

今回我々は内耳と内臓各臓器の Cochlin アイソフォームを p40 - anti - cochlin 抗体を用いた western blotting で検討した。その結果 COCH 遺伝子のアイソフォームは目、肝臓、腎臓、肺、腸には存在しないことが判明した。また大脳、小脳、脾臓、胸腺の発見量は非常に微量 (1/10000) であり COCH 遺伝子は内耳にほぼ特異的に発現していた。極微量に発現している大脳、小脳、脾臓、胸腺のアイソフォームは内耳のアイソフォームとはまったく異なる分子量であった。これらは臓器別の splicing、もしくは翻訳後修飾、異なるプロモーター cap 作用により生じている可能性がある。

非症候性遺伝性難聴、DFNA9 は COCH 遺伝子の突然変異により発症する。難聴以外には明らかな異常所見は無いが、今回の我々の研究によって大脳、小脳、脾臓、胸腺には極微量ながら Cochlin が発現していた。これらの臓器における Cochlin は不明であるが、今後 DFNA9 の発症メカニズム、治療法を考える上で重要な所見である。現在我々は COCH 遺伝子のプロモーターを用いた内耳特異的遺伝子治療法を開発中である (5)。全身臓器における Cochlin 発現の検討は、COCH 遺伝子発現の制御機構、内耳における機能と突然変異による発症のメカニズム検討に非常に重要な課題である。今後、我々は COCH 遺伝子発現について、DNA、RNA レベルで検討を加えていく方針である。

文 献

1. Robertson, N.G., Lu, L., Heller, S., Merchant, S.N. et al.

Mutations in a novel cochlear gene cause DFNA9, a human nonsyndromic sensorineural deafness with vestibular dysfunction. *Nature Genet.*, 20, 299-303. (1998)

2. Fransen E, Verstreken M, Verhagen WI et al.

High prevalence of symptoms of Meniere's disease in three families with a mutation in the COCH gene. *Hum Mol Genet* 1999 Aug;8(8):1425-9

3. Ikezono T, Omori A, Ichinose S, Pawankar R, Watanabe A, Yagi T

Identification of the protein product of the Coch gene - hereditary deafness gene - as the major component of bovine inner ear protein. *Biochimica Biophysica Acta-Molecular Basis of Disease* 2001;1535(3):258-265

4. 内耳プロテオーム解析 ―今後の展望―

八木聰明、池園哲郎、新藤晋、李麗淑、齋藤明彦、ルビーパワンカール、大久保公裕（日本医科大学耳鼻科）、大森彬（三菱化学生命科学研究所）、渡辺淳（日本医科大学第2生化学）厚生労働省特定疾患研究対策事業 前庭機能異常に関する調査研究班 平成13年度報告書

5. COCH遺伝子発現の異質性とプロモーター解析の有用性

八木聰明、池園哲郎、新藤晋、李麗淑、ルビーパワンカール（日本医科大学耳鼻科）、石崎正通（日本医科大学第1病理）、渡辺淳（日本医科大学第2生化学）、水田邦博（浜松医科大学耳鼻科）、小林俊光（東北大学耳鼻咽喉科）、ラスク・アンダーセン（ウプサラ大学）、工田昌也（広島大学耳鼻科）厚生労働省特定疾患研究対策事業 前庭機能異常に関する調査研究班 平成13年度報告書

作成日 平成14年3月13日

2001年度日中医学協会共同研究等助成事業報告書

－在留中国人研究者研究助成－

2002年2月28日

財団法人 日中医学協会
理事長 殿

研究者氏名 王 傑 ④
 所属機関名 東京医科大学大学院分子細胞機能分野
 指導責任者氏名 室田 誠通
 職 名 教授
 所 在 地 東京都文京区湯島1-5-45
 電話 03-5803-5576 内線

1. 研究テーマ

血管内皮細胞におけるK2コンベニによる誘導されたCOX-1遺伝子のSP1発現の解

2. 本年度の研究業績

(1) 学会・研究会等における発表 (有) ・ 無 (学会名・演題)

XIIth International Vascular Biology Meeting
 (2002年5月12日～16日・軽井沢プリンスホテル)

(2) 学会誌等に発表した論文 (有) ・ 無 (雑誌名・論文名)

Transcription Factor Sp1 Is Essential for
 COX-1 Gene Expression Upregulated By
 Thrombin (投稿中)

3. 今後の研究計画

いままでの研究ではまだ解決しなかったことが残っていますので引き続きしたいと思っています。今後も助成金をお願い申し上げます。

4. 指導責任者の意見

留学生王傑は外科医であるが、向学心が強く、当研究室において血管新生における Sp1 のメカニズムに関して基礎的な研究に従事している。人一倍研究熱心で、連日連夜真摯に研究に取り組んでいる。常に一流の国際雑誌に目を通し、関連ある研究論文を集めて勉強し、教室内のセミナーで紹介するなど積極性が見られる。大学院の研究に関してもすでに細胞培養や遺伝子工学の技術、特に RNA, DNA の精製、PCR による遺伝子の増幅、シーケンス解析、ベクターの作製、遺伝子発現の検出法（ノーザンブロット、ウエスタンブロット、ゲルシフト）などを完全に習得し、興味深い成果を挙げつつある。本年、大学院の最高学年に達したこともあって、研究者、指導者としての自覚も多少出てきた。明るい性格で協調性もあるので、下級生の面倒を見させているが、熱心に研究指導にも精を出している。

指導責任者氏名 室田 誠 逸



5. 研究報告書

別紙報告書作成要領により、添付の用紙で研究報告書を作成して下さい。

研究発表中または研究中の本人のスナップ写真を添付して下さい。

※研究成果を発表する場合は、発表原稿・抄録集等も添付して下さい。

※発表に当っては、日中医学協会助成金による旨を明記して下さい。

血管内皮細胞におけるトロンビンによる誘導された

Cyclooxygenase-1 遺伝子の Sp1 の役割解明

(Transcription Factor Sp1 Is Essential For Cyclooxygenase-1

Gene Expression Upregulated By Thrombin)

研究者 王 傑

日本研究機関 東京医科歯科大学大学院分子細胞機能制御学分野

指導責任者 教授 室田 誠逸

共同研究者 森田 育男

Abstract

Transcriptional factor Sp1 has been implicated in the expression of many genes. Moreover, it has been suggested that Sp1 is linked to the maintenance of methylation-free CpG island, the cell cycle, and the formation of the active chromatin structures. We investigated the effects of thrombin on the expression of the Cyclooxygenase-1 in the Bovine Arterial Endothelial Cell. Treatment with thrombin induced synthesis of PGI₂. Thrombin induced a transient increase of Cyclooxygenase-1 mRNA accumulation in BAE cells, without affecting cox-2 mRNA level. The accumulation of cox-1 mRNA peaked at 30 min and decreased to control levels by 3 hours, which was associated with a time-dependent increase of cox-1 protein expression in response to thrombin. Both increase in cox-1 mRNA and protein expression in response to thrombin were inhibited by Hirudin, a thrombin receptor antagonist. In addition, the luciferase assay showed that thrombin induced an about 10-fold increase in the cox-1 promoter activity compared with the control. This enhanced KDR promoter activity was also abolished by Hirudin. The deletion analyses indicated that a sp1-containing region (from -115 to -97 bp) within the cox-1 promoter gene was required for the enhanced cox-1 expression induced by thrombin. Band shift assays confirmed specific binding of Sp1 to the segment. Mutation of either Sp1 binding site significantly reduced the promoter activity. These findings suggest that thrombin could induce cox-1 activity and increase PGE₂ synthesis. Binding of Sp1 to Sp1 site on the promoter region activates the cox-1 gene transcription induced by thrombin.

Key words thrombin, PGI₂, cox-1 promoter activity, Sp1

Introduction

Prostaglandins are important mediators of a wide variety of physiological processes (1). There are two isozymes, Cox-1 and Cox-2, that initiate prostaglandin synthesis (2-3). Both enzymes catalyze the production of prostaglandins (PGs) from arachidonic acid (AA), generated by phospholipases A₂ (PLA₂s), a family of acyl esterases that cause the release of AA from cellular phospholipids. Although indistinguishable in their biosynthetic catalytic activities, the two isozymes appear to have different physiological functions. Cox-1 is thought to be a constitutively expressed enzyme (4), and the expression of Cox-2 is inducible by cytokines or other stimuli in a variety of cell types (5).

Cox-1 expression might also be regulated through extracellular signaling mechanism. Although Cox-1 has been described as a constitutive enzyme (whereas synthesis of Cox-2 has been shown to be inducible), it has now become clear that Cox-1 can be induced by cytokines under appropriate circumstances. For example c-kit ligand, either alone or in combination with IL-3, IL-9, or IL-10, was able to induce expression of Cox-1 in mouse mast cells (6). Similarly, stem cell factor, especially when combined with dexamethasone, can induce Cox-1 expression in these cells (7). A recent study also demonstrated induction of Cox-1 synthesis in cells following treatment with basic FGF, although with a prolonged time course compared to induction of Cox-2 expression (8).

Cox-2-overexpression cells produce prostaglandins, proangiogenic factor, and stimulate both endothelial migration and tube formation, while control cells have little activity. The effect is inhibited by antibodies to combinations of angiogenic factor, by NS-398 (a selective Cox-2 inhibitor), and by aspirin. NS-398 does not inhibit production of angiogenic factor or angiogenesis induced by Cox-2-negative cells. Treatment of endothelial cells with aspirin or a Cox-1 antisense oligonucleotide inhibits Cox-1 activity/expression and suppresses tube formation. Cyclooxygenase regulates colon carcinoma-induced angiogenesis by two mechanisms: Cox-2 can modulate production of angiogenic factor by colon cancer cells, while Cox-1 regulates angiogenesis in endothelial cells (9).

Cox-1 overexpressing expressed high levels of functional Cox-1 polypeptide in the endoplasmic reticulum and the nucleus. In vitro proliferation of these cells was reduced compared with vector-transfected ECV cells. Cox-1 overexpression also enhanced the tumor necrosis factor- α -induced apoptosis of ECV cells 2-fold. In contrast to in vitro behavior, ECV cells proliferated aggressively and formed tumors in athymic "nude" mice, the growth of Cox-1-induced tumors was inhibited by indomethacin, suggesting that Cox-1 overexpression in immortalized ECV endothelial cells results in nuclear localization of the polypeptide and tumorigenesis (10).

Mice homozygous for a disrupted Cox-1 gene had no gross or microscopic pathological changes in the gastrointestinal tract, and showed less gastric ulceration than wild-type mice after gavage with indomethacin (11). Similarly, mice deficient in Cox-2 also showed no spontaneous gastric ulceration or accompanying histopathological abnormalities of the intestinal epithelium (12). These studies demonstrate that neither Cox-1 or Cox-2 are essential for the maintenance of gastrointestinal integrity in basal unstressed condition.

Thrombin is generated from prothrombin in places with injury or inflammation. Thrombin exhibits its effects through activation of the G protein-coupled receptor PAR-1 that belongs to a new family of protease activated receptor (13). Binding to its receptor results in intracellular signal transduction, including the G protein-stimulated phosphatidylinositol metabolism via phospholipase C- β (PLC- β) (14), protein kinase C (PKC) activation (15-16), intracellular calcium (Ca^{2+}) mobilization, and calcium-dependent protein kinase activation (15). Intracellular protein tyrosine kinases are also activated, thereafter leading to the tyrosine phosphorylation. Downstream components of thrombin-activated signaling cascades include Raf-1 and MAP kinase (17). These signaling events lead to nuclear protooncogene transcription activation (c-fos, c-jun, c-myc) (18) and increased expression of endogenous mitogenic factors, which subsequently cause cell proliferation and migration. The recent study had indicated that thrombin induced the expression of Cox-1 (19), however, the mechanism(s) of transcriptional regulation of the Cox-1 gene expression is as yet clearly understood. In this study, we attempt to identify which thrombin regulates Cox-1 gene expression and specific transcriptional factor that play a critical role in the regulation of thrombin-mediated transcriptional activation of the Cox-1 gene.

Material and Method

Cell culture

Bovine arterial endothelial cells (BAE cells) were isolated from bovine carotid artery and maintained as previously described (20). The cells were seeded in 100-mm culture dishes with MEM Medium (Life Technologies Grand Island, NY) containing 10% fetal bovine serum (FBS, JRH Biosciences, Lenexa, KS) and subcultured with 5% FBS-MEM. At confluence, BAE cells were harvested with 0.05% trypsin and 0.05% EDTA in PBS and resuspended in 5% FBS-MEM for further experiments. All cells were incultured at 37°C in 5% CO₂ and 95% air. The medium were changed every 2-3 days. BAE cells between passages 10-20 were used for this study.

PGI₂ production by cells

BAE cells (1×10^4) were plated in six-well dishes and grown to 60% confluence in growth medium. The cells were then treated as described below. Levels of 6-keto PGI₂ released by the cells were measured by enzyme immunoassay. Amounts of 6-keto PGI₂ production were normalized to protein concentration.

Extraction of total cellular RNA and RT-PCR of Cox-1 and Cox-2

When cells reached subconfluency, they were washed once with PBS and cultured in the absence or presence of 5U/ml of thrombin for indicated times. For the isolation of RNA, cells were washed once with PBS, and RNA was isolated by using the ISOGENE reagent (clontic) according to the protocol. RT-PCR was performed with the SuperScript One-Step RT-PCR system (GIBCO-BRL) according to the manufacture's instructions. To detect the Cox-1 and Cox-2, the following primers were used as previously reported: sense primer 5'-CAGCGGCTTTTGTGGAAGACTCAC-3' and antisense primer 5'-ACTTCTCGGTGTCACTTCTTGGAC-3' for *flt-1*, and sense primer 5'-CAACAAAGTCGGGAGAGGAG-3' and antisense primer 5'-ATGACGATGGACAAGTAGCC-3' for Cox-1 (21). As an internal control, mRNA of glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) was amplified by using the sense primer 5'-CCACCCATGGCAAATTCATGGCA-3' and the antisense primer 5'-TCTAGACGGCAGGTCAGGTCACC-3' (21). PCR was performed with 35 cycles of the following amplification protocol: 94°C for 1 minute, 48°C for 1.5 minutes, and 72°C for 1 minute. Ten µl of the amplified PCR products were electrophoresed on a 1% agarose gel (Sigma), stained with ethidium bromide and photographed with a Polaroid camera under UV light.

Immunofluorescence staining of Cox-1 and image analysis

BAE cells (1×10^4) were seeded into 24-well culture plates, thrombin was added at the indicated days in 0.5% FBS-MEM and cultured for 2 days. Cells were washed twice with PBS, fixed with 1.9% formaldehyde, and rinsed three times with PBS. After blocking with PBS containing 0.2% bovine serum albumin (blocking buffer), the cells were incubated with affinity-purified anti- Cox-1 and Cox-2 antibody (Santa Cruz, CA) (1:20 diluted in blocking solution) for 45 min at room temperature and then with the FITC-conjugated goat antirabbit IgG (Sigma) (1:40 solution) for 45 min. The fluorescence image analysis was performed using an interactive laser cytometer ACAS-570 (Meridian, Okemos, MI) and the fluorescence intensities of individual cells were measured. For each condition, three wells were prepared and four areas per well were assayed.

Construction of the Cox-1 5'-flanking region, 5'-deletion and site-directed mutants.

A fragment of the Cox-1 promoter -1261 to +28 designated as wild-type promoter was obtained by PCR using genomic DNA (100 ng) isolated from human placenta (Clontic). It was digested by restriction degiestion by using 5'-Bgl II (Promega Corp) position -1261 and 3'-HindIII (Promega Corp) at position +28 and cloned into the pGL3 Basic plasmid, which was termed as Cox-1 -1261 to +28 according to the length of the fragment from the transcription start site in the 5'- and 3'- direction. Primers were synthesized according to the sequence relative to the ATG codon (A as +1): the upstream primers, -1261 ~ 1237, -916 ~ -899, -744 ~ -728, -565 ~ -547, -257 ~ -240; the downstream primers, +2~+28 Cox-1 -916 ~ +28, -744 ~ +28, -565 ~ +28, and -255 ~ +28 were created by PCR, Cox-1 -1261 ~ +28 was used as a template. The PCR productions were purified from agarose gel, digested by restriction degiestion by using 5'-Bgl II and 3'-HindIII (Promega Corp), and cloned into a promoterless luciferase expression vector, pGL3 basic plasmid. To generate the site-directed mutants where the two Sp1 sites were changed, a PCR-mediated site-directed mutagenesis was employed as described previously (22). All constructs were sequenced from the 5' and 3' end to confirm orientation and sequenced by sequence comparison to previously published deta(23).

Transfection and Luciferase Assay

Transient transfections were performed with FuGENE 6 transfection reagent (Boehringer) according to the manufacture's instructions. 1×10^4 Cells were seeded in 24-well tissue-culture plates one day prior to transfection. The pSVβ-Gal and pGL3 were co-transfected as negative control. Cells were incubated in transfection mixture (containing 0.18µg of the appropriate reporter constructs, 0.02µg pSVβ-Gal to correct the variability in transfection efficiency, and 0.4µl FuGENE 6 transfection reagent in a total volume of 1ml MEM per well) for 48h. Luciferase assays were performed using a Luciferase Assay System, and determined with the AML3000 microtiter plate luminometer. The transfection efficiency was normzlized to the β-Galactosidase production by the AURORA™ GAL-XE system (Chemiluminescent Receptor Assay for β-Galactosidase, ICN Pharmaceuticals, Inc. Costa Mesa, CA) according to the protocol.

Electrophoretic Mobility Shift Assay

The shift assay was performed by a previously described procedure (19). A double-stranded oligonucleotide used as Sp1 probe was composed of the sequence 5'-TTCAGGGGGCGGAGCCA-3' and 5'-TTCAGTTTGCGGAGCCA-3' (a mutant with mutated bases underlined), both synthesized in a Pharmacia oligonucleotide synthesizer (Piscataway, NY). The end-labeling was performed by using Klenow polymerase with [32P] dCTP. The probe contained a consensus Sp1 binding site and Sp1 mutant in the context of the human Cox-1 promoter from nucleotides -614 ~ 597 relative to the major transcription start site. Nuclear proteins were extracted with Nuclear protein extract kit according to the protocol. The binding reaction mixture contained 0.5 ng of double-stranded oligonucleotide probe, 2 µg of poly (dI).poly (dC), and 5 µg of protein in buffer C, supplemented with 35mM Mg2. After a 20 min incubation at 20°C, the mixture was electrophoresed through a 6% (w/v) polyacrylamide gel in 0.25X Tris borate-EDTA running buffer for 2h. The gel was then dried and subjected to autoradiography. In competition experiments, nuclear extracts or purified Sp1 were incubated for 5 min with unlabeled oligonucleotide or DNA fragment in a 50-fold molar excess prior to the addition of the labeling probe. Super-shift assays were carried out by adding 2 µg of rabbit polyclonal anti-Sp1 body to the DNA/protein mixture for 30 min at 4°C. The band was analyzed on gel electrophoresis as described above. An unrelated rabbit polyclonal anti-Cox-1 antibody was included as negative control.

Statistical analysis

All experiments were performed three times in triplicate. All values are expressed as mean±SE, unless otherwise indicated. Comparison of the effects of different inhibitors, and time points were performed by ANOVA. Multigroup comparisons were carried out using Bonferroni-modified *t*-test. *P* < 0.05 is considered to be statistically significant.

Results

Cox-1 mRNA expression

The effects of thrombin on Cox-1 mRNA are shown in Figure 1. The cells were treated with control medium or medium with thrombin for different time. Single PCR products were obtained for Cox-1 mRNA at the expected size of 355bp. The effect was evident by 30min, and persisted for at least 24h. Thrombin had no effect on Cox-2 mRNA abundance at any time point.

Cox-1 protein expression

The effects of thrombin on Cox-1 protein expression are shown in Figure 2. We measured the KDR protein expression using a immunofluorescence staining assay. The data in Fig. 2 showed a similar increase in the level of Cox-1 proteins as that of the Cox-1 mRNA, and it is quite clear that thrombin caused an enhancement in the expression of Cox-1 proteins.

Next, to understand whether the thrombin-induced increase in the Cox-1 mRNA and proteins was mediated through transcriptional regulation or not, we examined the effect of thrombin on the Cox-1 promoter activity using a reporter gene assay. A smallest construct containing the full Cox-1 promoter activity (-996 to +68) was inserted upstream of a luciferase reporter gene was transfected into BAE cells, and the luciferase activities were evaluated. As shown in Figure 3, Thrombin increased the Cox-1 promoter activity, which changed in a time- and dose-dependent manner. These data indicate that thrombin enhanced up-regulation of the Cox-1 promoter activity.

Deletion analysis of the human Cox-1 promoter

To identify the essential regions for the promoter activity increased by thrombin, we generated various mutants, in which the 5'-end from -1261 ~ -255 was gradually deleted, while the common 3'-end from -225 to +28 was kept unchanged. Then they were inserted into the luciferase reporter plasmid pGL3 and transfected into BAE cells together with pSVβ-Gal (to correct the differences derived from transfection efficiency). The luciferase activity was normalized to that of the pGL3 Control vector. As shown in Fig. 4, the promoter region from -1261 to +28 showed a 10-fold induction of the luciferase activity upon thrombin stimulation as compared with the untreated cells. Deletion of the region from -1261 to -565 did not affect both the basal and the thrombin induced transcriptional activity of the Cox-1 promoter. However, when the construct was further deleted to -255, an about 80% reduction in the transcriptional activity was observed,

and the basal promoter activity was also reduced. This suggests that the region from -565 to -255 is required for the full response of the Cox-1 promoter gene to thrombin; what's more, it is important for the basal transcription of the Cox-1 gene.

Analysis by band shift assays of Sp1 binding to the Cox-1 gene

Binding of BAECs nuclear proteins to this region was investigated. Fig 4 shows band shift when nuclear extracts of BAECs were incubated with -565/-255 probe containing the distal action region. Two bands were noted with this probe. Since this region comprise putative binding sites for Sp1 and AP2, a 150-fold molar excess of consensus oligonucleotide containing Sp1 and AP2 sequence was preincubated with nuclear extracts prior to the addition of the probe. Both bands were specifically competed by Sp1 or unlabeled probes but not by AP2 oligonucleotide. Furthermore, a 50-fold molar excess of -565/-255 in which the canonical Sp1 site was mutated failed to inhibit the formation of the two DNA-protein complexes. The band was supershifted with antibody directed against Sp1 but not with unrelated antibody such as anti-Cox-1 antibody. These results indicate that Sp1 closely related proteins bind to the Sp1 site. To further explore the ability of the Sp1 binding site to function as a thrombin response element, we examined whether it could confer thrombin inducibility to a heterologous, minimal pGL3 vector that lacks enhance sequences. An enhanceless pGL3 vector was unresponsive to thrombin. However, when three copies of the Sp1 binding site were inserted into the promoter, thrombin induced promoter activity by 4-fold ($p < 0.05$). Furthermore, insertion of mutated Sp1 sites failed to confer thrombin responsiveness, and base-line promoter activity also was increased by insertion of both Sp1 and mutated Sp1 binding sites. These results indicate that the addition of Sp1 binding sites into a heterologous promoter can convert it from thrombin unresponsive to responsive. Collectively, our finding demonstrate that the 8-bp Sp1 (5'-CCCCGCCC-3') can function as an essential part of a thrombin response element in the cox-1 promoter.

Effects of cellular expression of Sp1 on Cox-1 promoter activity

To determine if elevated Sp1 expression is sufficient to increase Cox-1 promoter activity, BAEC cells were transiently transfected with Cox-1 promoter vector and expression plasmids for Sp1 (Figure 5). Overexpression of Sp1 increased Cox-1 promoter activity nearly 3-fold in BAECs.

Mechanism of Cox-1 induction by thrombin

Finally, to elucidate the mechanism of Cox-1 by thrombin, we measured the level of the major AA metabolite, PGI₂, secreted by BAECs. We observed a dose-dependent induction of PGI₂ synthesis by thrombin (fig 6).

Discussion

It has been realized that thrombin has many functions distinct from the activation of the coagulation cascade. It is capable of transmitting intracellular signals and appears to participate in metastasis and the tumor-associated angiogenesis (24). Involvement of thrombin in angiogenesis has been reported to be associated with Cox-1 in the endothelial cells. For this reason, we were attempting to investigate the molecular mechanisms by which thrombin led to angiogenesis in endothelial cells. In the present study, we investigated the effects of thrombin on the Cox-1 expression, which is thought to be a major pathological change in tumor cells. The results demonstrated that thrombin potentiated cell growth and increased expression of the Cox-1 in cultured BAE cells.

Cyclooxygenase (Cox-1), also known as prostaglandin (PG) H synthase, catalyzes the rate-limiting steps in the formation of prostaglandin endoperoxide (25). The Cox enzyme possesses oxygenase and peroxidase activities and thus catalyzes the formation of PGH₂ from arachidonic acid (9). Two Cox isoenzymes, designated as Cox-1 and -2 (26), exhibit similar enzymatic properties; however, the Cox-1 enzyme is ubiquitously expressed, whereas the Cox-2 isoenzyme is expressed as an immediate-early gene after stimulation by a wide variety of extracellular stimuli (27). Gene knock-out studies have suggested that Cox-1 and -2 isoenzymes possess distinct function (28-30). In addition, the Cox-2 enzyme is localized in the endoplasmic reticulum (ER) as well as the nuclear envelope, whereas the Cox-1 enzyme is localized primarily in the ER (31). It had been demonstrated that the rate-limiting enzyme in vascular PGI₂ synthesis in newborn lung is cyclooxygenase (Cox), and that the capacity for vascular PGI₂ production increase markedly during the early postnatal period. This is due to an upregulation in the expression of the

type 1 isoform of Cox (Cox-1) (32). Cox-1 plays an important role in angiogenesis and endothelial growth. But the mechanisms underlying its expression are not well understood. As the best we know, this is the first report to characterize the Cox-1 promoter activity induced by thrombin. We identified the regions containing a positive regulatory element within the 5'-flanking region of the human Cox-1 gene. By deletion analysis, a 18-bp fragment within the 5'-flanking region of the Cox-1 promoter was identified, which appears to be essential for the Cox-1 expression induced by thrombin. No significant changes were noted after deletion of the element from -1261 to +28, whereas deletion between -1261 ~ -565 reduced the promoter activities to 77% that of the whole promoter fragment. However, the promoter activity was reduced significantly when elements from -565 to -255 was removed. This region of the Cox-1 promoter only contains a putative Sp-1 binding site. Sp1 belongs to a zinc finger family of transcription factors that can activate transcription of a subset of genes containing Sp1 sites, including human tissue factor (33), human VEGF gene (34), and human 12 (s) lipoxygenase (35). Analysis by band shift assays of Sp1 binding to the Cox-1 gene had shown two bands were specifically competed by Sp1 or unlabeled probes but not by AP2 oligonucleotide. Furthermore, a 50-fold molar excess of -565/-255 in which the canonical Sp1 site was mutated failed to inhibit the formation of the two DNA-protein complexes. The band was supershifted with antibody directed against Sp1 but not with unrelated antibody such as anti-Cox-1 antibody. The present data suggest that Sp-1 may be necessary for up-regulation of the Cox-1 promoter activity induced by thrombin.

Thrombin is an important growth factor and immuno-regulator for the tissue injury. Highly purified thrombin stimulates proliferation of chick embryo and mammalian fibroblasts under serum-free culture condition, and it activates monocytes, NK cells, T cells, and endothelial cells. Early studies showed that action at cell surface is sufficient for thrombin to stimulate cell proliferation by initiating transmembrane signals. Several laboratories have cloned members of a proteolytically active seven-transmembrane G-protein-linked receptor family that include PAR1, PAR2, PAR3, and PAR4 (36). These receptors are proteolytically activated by thrombin to generate a new NH2 terminus, which acts as a tethered ligand and promotes the interaction between the receptor and the G-proteins at the intracellular side of the membrane. To understand whether the thrombin-induced Cox-1 up-regulation was also through these pathways, we investigated effects of various inhibitors of the thrombin receptor. Here, we show that induction of Cox-1 by thrombin was inhibited by pretreatment with Hirudin, a thrombin receptor antagonist. This suggests that thrombin acts via activation of the receptor.

In summary, our studies firstly demonstrate that thrombin up-regulated of Cox-1 via a transcriptional level mechanism. We further demonstrated the critical role of the region from -115 to -97 of the Cox-1 promoter in mediating up-regulation of Cox-1 induced by thrombin, and in the basic Cox-1 promoter activity. The exact mechanisms by which the region from -115 to -97 exerts its activity on the expression of Cox-1 remains unclear and is therefore the focus of our future study.

Acknowledgments

This work was supported by grants from Japan China Medical Association

References

1. Richardson, C., Emery, P. 1996. *Drug Saf.* 15:249-260.
2. Herschman, H.R. 1994. *Cancer Metastasis Rev.* 13:241-256.
3. Seibert, K., Masferrer, J.L. 1994. *Receptor.* :17-23.
4. Gierse, J.K., Hauser, S.D., Creely, D.P., Koboldt, C., Rangwala, S.H., Isakson, P.C., Seibert, K., 1995. Expression and selective inhibition of the constitutive and inducible forms of cyclo-oxygenase. *Biochem. J.* 305:479-484.
5. Dewitt, D.L., Smith, W.L., 1995. Yes, but do they still get headaches. *Cell.* 83:345-348.
6. Murakami, M., Matsumoto, R., Urade, Y., Austen, K.F., Arm, J.P. 1995. cKIT ligand mediates increased expression of cytosolic phospholipase A2, prostaglandin endoperoxide synthase-1, and hematopoietic prostaglandin D2 synthase and increased IgE-dependent Prostaglandin D2 generation in immature mouse mast cells. *J. Biol. Chem.* 270:3239-3249.

7. Samet, J.M., Fasano, M.B., Foneth, A.N., Chilton, F.H. 1995. Selective induction of Prostaglandin G/H synthase I by stem cell factor and dexamethasone in mast cells. *J. Biol. Chem.* 270:8044-8049
8. Kawaguchi, H., Pilbeam, C.C., Gronowicz, G., Abreu, C., Fletcher, B.S., Herschman, H.R., Rasiz, L.G., Hurley, M.M. 1995. Transcriptional induction of prostaglandin G/H synthase-2 by basic fibroblast growth factor. *Am. Soc. Clin. Invest.* 96:923-930.
9. Tsujii, M., Kawano, S., Tsuji, S., Sawaguchi, H., Hori, M., Dubois, R.N. 1998. Cyclooxygenase regulates angiogenic induced by colon cancer cells. *Cell.* 93:705-716. 10.
10. Narko, K., Ristimäki, A., Macpherson, M., Smith, E., Haudenschild, C.C., Hla, T. 1997. Tumorigenic transformation of immortalized ECV endothelial cells by Cyclooxygenase-1 overexpression. *J. Biol. Chem.* 272:21455-21460.
11. Langenbach, R., Morham, S.G., Tian, H.F., Loftin, C.D., Ghanayem, B.I., Chulada, P.C., Mahler, J.F., Lee, C.A., Goulding, E.H., Kluckman, K.D., Kim, H.S., Smithies, O. 1995. Prostaglandin G/H synthase I gene disruption in mice reduces arachidonic acid-induced inflammation and indomethacin-induced gastric ulceration. *Cell.* 83:483-492.
12. Morham, S.G., Langenbach, R., Loftin, C.D., Tian, H.F., Vouloumanos, N., Jennette, J.C., Mahler, J.F., Kluckman, K.D., Ledford, A., Lee, A., Kluckman, K.D., Smithies, O. 1995. Prostaglandin G/H synthase 2 gene disruption causes severe renal pathology in the mouse. *Cell.* 83:473-482.
13. Vu TK, Hung DT, Wheaton VI, Coughlin SR. 1991. Molecular cloning of a functional thrombin receptor reveals a novel proteolytic mechanism of receptor activation. *Cell* 64:1057-1068
14. Van Obberghen-Schilling E, Pouyssegur J. 1993. Signaling pathways of the thrombin receptor. *Thromb Haemostasis* 70:163-167
- Vergnolle N, Hollenberg MD, Wallace JL. 1999. Pro- and anti-inflammatory actions of thrombin: a distinct role for proteinase-activated receptor-1 (PAR1). *British Journal of Pharmacology* 126:1262-1268
15. Webb ML, Taylor DS, Molloy CJ. 1993. Effects of thrombin receptor activating peptide on phosphoinositide hydrolysis and protein kinase C activation in cultured rat aortic smooth muscle cells: evidence for "tethered-ligand" activation of smooth muscle cell thrombin receptors. *Biochem Pharmacol* 45:1577-1582
16. Berk BC, Taubman MB, Cragoe EJ JR, Fenton JW 2d, Griendling KK. 1990. Thrombin signal transduction mechanisms in rat vascular smooth muscle cells. Calcium and protein kinase C-dependent and -independent pathways. *J Biol Chem* 265:17334-1735016.
17. Vane, J.R. Towards better aspirin. 1994. *Nature.* 367:215-216.
18. Berk BC, Taubman MB, Griendling KK, Cragoe EJ Jr, Fenton JW, Brock TA. 1991. Thrombin-stimulated events in cultured vascular smooth-muscle cell. *Biochem J* 274:799-805
19. Xu, X.M., Tang, J.L., Chen, X.M., Wang, L.H., Wu, K.K.Y., 1997. Involvement of two Sp1 elements in basal endothelial Prostaglandin H synthase-1 promoter activity. *J. Biol. Chem.* 11:6943-6950.
20. Morita I, Kanayasu T, Murota S. 1984. Kallikrein stimulates prostacyclin production in bovine endothelial cells. *Biochem Biophys Acta* 792:304-309
21. Wilson Y, Keyvan M., Asifa H., Irene L., Nicholas RF. 2000. Cox-2 is required for TNF and Angiotensin 2-mediated proliferation of VSMCs. *Circulation Research* 86: 906-914
22. Xu XM., Tang JL., Chen XM., Wang LH., Wu KK. 1997. involvement of two Sp1 element in basic endothelial prostaglandin H synthase-1 promoter activity. *J. Biol. Chem* 271: 6943-6950
23. Xu XM., Tang JL., Chen XM., Wang LH., Wu KK. 1997. involvement of two Sp1 element in basic endothelial prostaglandin H synthase-1 promoter activity. *J. Biol. Chem.* 271: 6943-6950
24. Nierodzik ML, Kajumo F, Karpatkin S. 1992. Effect of Thrombin treatment of tumor cells on adhesion of tumor cells to platelets in vitro and tumor metastasis in vivo. *Cancer Res* 52:3267-3272
25. Smith, W.L., Garavito, R.M., Dewitt, D.L. 1996. *J. Biol. Chem.* 271:33157-33160.
26. Smith, W.L., Dewitt, D.L. 1996. in *Advances in immunology* (Dixon, F.J., ed) Vol. 62, pp. 167-215, Academic Press, Orlando, FL.
27. Herschman, H.R. 1994. *Cancer Metastasis Rev.* 13:241-256.
28. Dinchuk, J.E., Car, B.D., Focht, R.J., Johnston, J.J., Jaffee, B.D., Covington, M.B., Contel, N.R., Eng,

- V.M., Collin, R.J., Czerniak, P.M., Gorry, S.A., Trzaskos, J.M. 1995. *Nature*. 378:406-409.
29. Langenbach, R., Morham, S.G., Tian, H.F., Vouloumanos, N., Jennette, J.C., Mahler, J.F., Kluckman, K.D., Ledford, A., Lee, C.A., Smiththies. 1995. *Cell*. 83:473-482.
30. Morita, S.G., Schindler, M., Regier, M.K., Otto, J.C., Hori, T., Dewitt, D.J., Smith, O. 1995. *J. Biol. Chem.* 270:10920-10908.
31. Coleman, R.A., Smith, W.L., Narumiya, S. 1994. *Pharmacol. Rev.* 46:205-229.
32. Brannon, T.S., North, A.J., Wells, L.B., Shaul, P.W. 1994. prostacyclin synthesis in ovine pulmonary artery is developmentally regulated by changes in cyclooxygenase-1 gene expression. *J. Clin. Invest.* 93:2230-2235.
33. Cui MZ, Parry GC, Oeth P, Larson H, Smith M, Huang RP, Adamson ED, Mackman N. 1996. Transcriptional regulation of the tissue factor gene in human epithelial cells is mediated by Sp1 and EGR-1. *J Biol Chem* 271:2731-2739
34. Finkenzeller G, Sparacio A, Technau A, Marme D, Siemeiter G. 1997. Sp1 recognition sites in proximal promoter of the human vascular endothelial growth factor gene are essential for platelet-derived growth factor-induced gene expression. *Oncogene* 15:669-676
35. Qin H, Sun Y, Benveniste EN. 1999. The transcription factors Sp1, Sp3, and AP-2 are required for constitutive matrix metalloproteinase-2 gene expression in astrogloma cells. *J Biol Chem* 274:29130-29137
36. Vu TK, Hung DT, Wheaton VI, Coughlin SR. 1991. Molecular cloning of a functional thrombin receptor reveals a novel proteolytic mechanism of receptor activation. *Cell* 64:1057-1068
37. Karim S., Habib A., Levy-Toledano S., Macclouf J. 1996. Cyclooxygenases-1 and -2 of Endothelial Cells Utilize Exogenous or Endogenous Arachidonic Acid for Transcellular Production of Thromboxane. *J. Biol. Chem.* 271:12042-12048
38. Sato, T., Sawada, S., Tsuda, Y., Komatsu, S., Akamatsu, N., Kono, Y., Higaki, T., Imamura, H., Tada, Y., Yamasaki, S., Tamagaki, T., Nakagawa, K., Tsuji, H., Nakagama, M. 1999. The mechanism of thrombin-induced prostacyclin synthase in human endothelial cells with reference to the gene transcription of prostacyclin-related enzymes and Ca²⁺ kinetic. *Journal of pharmacological & Toxicological Methods*. 41(4):173-182.

2001 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－

平成14年 3 月 20 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 吳 軍
研究機関 日本大学歯学部 研究指導者 角野 隆二 職名 教授
所 在 地 〒101-8310 千代田区神田駿河台 1-8-13 電話 03-3219-8122 内線

研究テーマ 三叉神経損傷時に発現する痛覚過敏発現の中枢機構の解明

2. 本年度の研究業績

(1) 学会・研究会等における口頭発表 有 ・ ☒ 無 (学会名・内容)

(2) 学会誌等に発表した論文 ☒ 有 ・ 無 (雑誌名・論文名)

眼窩下神経 CCI モデルラットに対する gabapentin 投与の
有効性に関する研究

日本歯科麻酔学会雑誌 第29巻第1号 14－22 (2001年)


3. 今後の研究計画

今回報告書に記載した神経障害時の中枢神経内での神経回路網の可塑的变化については、その機構に不明な点が多く以下の説がある。1) 神経切断後、まず C 神経線維の萎縮、さらにシナプスの欠落が起り、その後に損傷を受けた C 神経線維が A β 神経線維の発芽を誘因すると考えられる。2) 神経切断後に、有髄神経線維のみならず無髄の神経線維も CTB を取り込むようになるため、無髄神経線維がより多く存在する II 層にも CTB 陽性神経線維およびその終末が認められるようになる可能性がある。これらの疑問に対し、C 神経線維の分布を IB4 などのトレーサーを用いて確かめていき、三叉神経節細胞体に、有髄神経に対する CTB と無髄神経に対するトレーサー (IB4) の二重染色を施し観察し調べていく予定である。

4. 指導責任者の意見

呉 軍君は、三叉神経系においての神経障害時の疼痛発現機構の解明と言う大変な命題を、免疫組織学的方法を駆使し、三叉神経脊髄路核内での神経線維の発芽があることを証明した。さらには、c-Fos 蛋白質を指標にし、神経障害時に興奮性を高めている中枢神経細胞の分布を調べた。これらの研究は神経障害時の疼痛発現機構の解明の一翼をになっていると考えられる。今後は、研究を発展させ学位論文にまで仕上げて頂きたい。

指導責任者氏名

角野隆二 

5. 研究報告書

別紙報告書作成要領により、添付の用紙で研究報告書を作成して下さい。

研究発表中または研究中の本人のスナップ写真を添付して下さい。

※研究成果を発表する場合は、発表原稿・抄録集等も添付して下さい。

※発表に当っては、日中医学協会助成金による旨を明記して下さい。

三叉神経損傷時に発現する痛覚過敏の中枢機構の解明

研究者氏名	呉 軍
中国所属機関	中国上海第二医科大学歯学部所属第九人民医院
日本研究機関	日本大学歯学部生理学教室
指導責任者	教授 角野 隆二
共同研究者名	坪井美行, 野村洋文

要旨

三叉神経領域では、下顎第三大臼歯抜歯後などの神経損傷時に発現する疼痛は、慢性化し、有効な治療薬もないために難治化することがあり、臨床上大きな問題となっている。その発現機構として、損傷を受けた神経の切断端に神経腫ができることなど末梢神経側に原因があるだけではなく、中枢神経の可塑的变化が関与していることが示唆されている。

そこで、ラットの下歯槽神経 (IAN) 切断後に、眼下窩神経 (ION) 支配領域に惹起される知覚過敏 (allodynia) 発現の機構としての中枢神経系内での神経回路網の変化を調べることを目的とし、IAN 切断後に IAN が投射している三叉神経感覚核群での一次求心性有髄神経線維・軸索の分布を調べた。その結果、三叉神経脊髄路核尾側亜核 (SPVC) では、非切断動物の II 層には CTB 陽性神経線維・終末は認められなかったが、切断動物の SPVC の II 層には CTB 陽性神経線維・終末が多く認められた。SPVC の II 層は痛覚情報処理に関係している領域とされており、SPVC の II 層への有髄神経線維の発芽が、知覚過敏発現に関与している可能性が示唆された。

さらに、ION を拘扼し allodynia が惹起されたモデル動物を用い、中枢神経の興奮性を c-Fos 様蛋白発現を指標にし、神経損傷時の疼痛に対する新しい治療薬 gabapentin の有効性を調べた。その結果、SPVC の表層に発現する c-Fos 様蛋白陽性細胞が ION 拘扼モデル動物では増加したが、gabapentin 投与によりその数は有意に減少した。

これらのことより、神経損傷時の痛覚過敏発現に中枢神経の回路網の変化と中枢神経の興奮性の増加が関与することが示唆された。

Key Words

神経損傷, CTB, gabapentin, c-Fos, ラット

緒言:

末梢感覚神経が損傷を受けると、正常では痛みを引き起こさない触刺激に対しても痛みを感じるアロディニア (allodynia) と言われる知覚過敏を生じることが知られている。この知覚過敏の発現メカニズムとして、1) 神経切断端に神経腫ができること、2) 交感神経線維が発芽し神経節細胞体にシナプス

を形成すること、3) 損傷を受けた求心神経内で A 神経線維と C 神経線維間に活動電位の ‘cross-talk’ が生じること、さらに 4) 神経節細胞体で種々の物質の産生亢進や減退が起こることなどが考えられており、これらの変化によって、一次求心神経に不規則な自発活動の過興奮が生じると考えられている

一方、末梢神経（坐骨神経）切断を施した動物の脊髄後角において一次求心性神経の終末を含む領域に神経回路網の再構築が起り、これが知覚過敏発現の一因になっていると推察されている。それによると、正常動物では主に脊髄後角の III-VI 層に終末する A β 神経線維が、神経切断 2 週間後には軸索発芽（sprouting）を起し、電気生理学的に痛覚情報の伝達に重要な役割を果たしていると考えられており、本来 A β 神経線維の終末が認められない II 層にまで延びる。さらに、後根をつけた脊髄のスライスパッチクランプ法を用いた研究により、正常動物の後角の II 層の細胞ではほとんどのものが A δ 神経線維由来のもので、A β 神経線維由来のものはごく少数であるが、坐骨神経が切断された動物の II 層の細胞ではほとんどが A β 神経線維由来のものであることを報告している。これらのことを考え併せると、神経が切断された動物では、A β 神経線維を伝導してきた触刺激により誘発された活動電位が脊髄で痛覚伝達に関与するニューロンを興奮させることによって、結果的に触刺激で疼痛すなわち allodynia が誘発されると推察される。

近年、野村はラットで三叉神経第 3 枝、すなわち下歯槽神経（inferior alveolar nerve、以下 IAN と略す）切断後に、三叉神経第 2 枝すなわち眼下窩神経（infraorbital nerve、以下 ION と略す）支配領域である口ひげ部の 1g 以下の触刺激に対して逃避行動を示す知覚過敏（allodynia）が生じることを示し、この allodynia が神経切断のあと 2 日後より 15 日まで惹起されると報告している。この野村が報告した末梢神経切断後の知覚過敏（allodynia）の発現のメカニズムとしての中樞神経系内での神経回路網の変化を調べることを目的とし、IAN 切断後に IAN が投射している三叉神経感覚核群での一次求心性有髄神経線維の軸索発芽の有無とその分布を調べた。

さらに、末梢神経の侵害刺激により中樞神経系内で活性化する細胞を標識する方法として c-Fos 様蛋白免疫組織化学染色法が確立された。その方法によって、中樞神経系内で刺激によって活性化細胞の数と分布を調べることが可能となった。そこで、神経障害のモデルとして ION を拘扼し、chronic constriction injury (CCI) を施し、動物に allodynia を惹起させ、この動物の三叉神経脊髄路核尾側亜核で非侵害刺激によって発現する c-Fos 様蛋白陽性細胞の数と分布を調べ、さらに抗てんかん薬として使用され近年、神経損傷時の疼痛発現を抑制するとされる gabapentin の効果を行動学的、c-Fos 様蛋白発現細胞の数と分布を調べることによる免疫組織化学的に調べた。

これらの研究により、神経損傷時の疼痛発現機構の中樞神経系の役割を考察する。

研究対象と方法：

神経切断と軸索発芽の実験には 7 週齢の SD 系雄性ラット（180-200g）を 6 匹用い、切断動物として 5 匹、非切断動物として 4 匹を用いた。

1. 神経切断の方法（切断動物）

ラットを pentobarbital sodium（ネンブタール、大日本製薬、40mg/kg）で麻酔後、左側顔面皮膚の毛を剃った。左側頬部皮膚を切開し、さらに咬筋の筋線維をできるだけ傷つけないように一部剥離し、

下顎突起の中央部で骨を露出した。下顎骨の表面を歯科用エンジンで切削除去し、左側下歯槽神経を約3mm露出した。その後、左下歯槽神経の近遠心側の2箇所を、6.0の絹糸で、2mmの間隔で結紮し、その間で神経を切断した。その後、切開部を6.0の絹糸で4糸縫合した。

2. コレラ毒サブユニットBの注入方法

神経切断1週間後に再度 pentobarbital sodium (ネンブタール, 大日本製薬, 40mg/kg, i.p.) で麻酔し、左側皮膚を切開し、咬筋をできるだけ傷つけないように下歯槽神経の中枢側の切断端を露出した。神経切断端より2~3mm中枢の神経束に、有髄神経に特異的に取り込まれ、逆行性に運ばれ、神経節を越えて中枢の神経線維およびその終末まで運ばれる0.5mgのコレラ毒Bサブユニット (cholera toxin B subunit, 以下 CTB と略す, LIST BIOLOGICAL LABORATORIES) を1mlの注射用蒸留水 (大塚製薬) に溶解したものを60 μ l注入した。

3. 灌流および切片の作成法

CTB 注入1週間後に、pentobarbital sodium (ネンブタール, 大日本製薬, 80mg/kg) で深く麻酔し、0.1M phosphate buffer (PB, pH=7.4) で緩衝した4% paraformaldehyde で灌流固定した。中脳と延髄を含む脳を取り出し、上記の固定液を用い、4°Cで72時間後固定した。その後、30%シヨ糖含有0.01M phosphate buffer saline (PBS, pH=7.4) 内に48時間浸漬した。摘出した脳を厚さ20 μ mまたは50 μ mの前額断連続凍結切片を作成した。

4. CTB に対する免疫反応

標本は4切片おきに2組CTBに対する免疫反応を行い、残りは予備とした。免疫反応は、以下に示すように浮遊法にて行った。1) 切片を0.01MPBSで10分間洗浄し、0.3%のTriton-Xを加えた0.01MPBS 200mlに15mlのnormal rabbit serum (NRS) と0.2gのアジ化ナトリウム (NaN_3) を加えた緩衝液 (ブロッキング液) に4°Cにて24時間浸漬した。2) 0.3%のTriton-Xを加えた0.01M PBS 200mlに10mlのNRSと0.5gの NaN_3 を加えた緩衝液 (1次抗体溶解液) で10000倍に希釈した polyclonal goat anti-cholera toxin B subunit 抗体 (LIST BIOLOGICAL LABORATORIES) に4°Cで72時間浸漬した。3) 0.3%のTriton-Xを加えた0.01M PBSで5分間洗浄した後、0.01M PBSで5分間3回洗浄した。4) 0.01MPBS 200mlに3mlのNRSと0.2gの NaN_3 を加えた緩衝液 (2次抗体溶解液) で10000倍に希釈したビオチン化 anti-goat IgG (H+L) (BA-5000, Vector Lab.) で37°Cで1時間浸漬した。5) 0.3%のTriton-Xを加えた0.01MPBSで5分間洗浄した後、0.01MPBSで5分間3回洗浄した。6) 0.3%のTriton-Xを加えた0.01MPBSで100倍希釈した avidin-biotin peroxidase complex (Vector Lab.) で室温で2時間浸漬した。7) 0.01M PBSで5分間3回、0.05M Tris buffer (TB, pH=7.6) で洗浄した。8) 0.05M TB (pH=7.6) 200mlに0.08gの3,3'-diaminobenzidine tetra hydrochloride (DAB, 東京化成) と4gの ammonium nickel sulfate を加えた溶液に、hydrogen peroxide (H_2O_2) を30 μ l加えた液に室温で5分間浸漬し、CTB陽性神経線維および終末を黒く発色させた。

5. CTB の分布の検索

光学顕微鏡下で、標本をスワンソンの脳図譜を参考に核分けし、神経切断動物の三叉神経感覚核群内のCTB陽性神経線維およびその終末の分布を非切断動物のものと比較検討した。厚さ20 μ mに切った標本でCTB陽性神経線維およびその終末の密度について検索を行った。厚さ50 μ mに切った標本で三叉

神経の求心性感覚線維が直接投射する種々の感覚核群（上三叉神経核：supratrigeminal nucleus，以下 SUT と略す，三叉神経主知覚核，principal sensory nucleus of the trigeminal 以下 SPV と略す，三叉神経脊髄路核吻側亜核：oral part of the spinal nucleus of the trigeminal，以下 SPVO と略す，三叉神経中間亜核：interpol part of the spinal nucleus of the trigeminal，以下 SPVI と略す，三叉神経脊髄路核尾側亜核：caudal part of the spinal nucleus of the trigeminal，以下 SPVC と略す）での CTB 陽性神経線維およびその終末の分布範囲について調べた。

ION の CCI モデル動物の c-Fos の実験では，SD 系雄性ラット（200～250g）を使用した。4 1匹の動物に CCI を施し，sham 手術群をとして 5 匹使用した。

1. 神経切断の方法（切断動物）と行動観察法

ラットを pentobarbital sodium（ネンブタール，大日本製薬，40mg/kg）で麻酔後，Imamura の方法により右側 ION に chromic gut(4-0)を用い CCI を施した。

ラットの行動観察として，すべてのラットに対し ION の CCI 施行当日までに，口髭部をケージの穴から突出させたままの状態，侵害機械刺激（von Frey hair 28.84g を使用）に対し，頭部の引っ込み行動を起こさないように訓練した。CCI を施した翌日より，ケージ穴から突出した状態の右側口髭部に von Frey hair で定量的機械刺激を与え，頭部の引っ込み行動誘発刺激値（head withdrawal threshold，

以下 HWT）を測定した。CCI 施行日より 10 日から 14 日目にかけて，HWT が非侵害機械刺激である 3.63g 以下の動物を CCI-ION ラットとみなした。

2. 刺激方法と灌流固定法

CCI-ION ラットを 1.saline 2.carbamazepine(17, 50mg/kg) 3. gabapentin(10, 30, 100mg/kg)投与する 6 群に分けた。urethan（SIGMA，1000mg/kg，i.p.）で麻酔し，各薬物を腹腔内に投与した後 3.63g の刺激を口髭部に 1Hz，15 分間与えた。刺激終了 2 時間後，再度麻酔し（urethan，80mg/kg），4%paraformaldehyde で灌流固定した。第一頸髄（first segment of the spinal cord: C1）および三叉神経脊髄路核尾側亜核（medullary dorsal horn: MDH）を含む脳を取り出し，上記の固定液で 48 時間後固定した後，30%ショ糖含有 0.01MPBS 内に 48 時間浸漬した。

3. Fos-LI cells の免疫染色法

摘出した脳から MDH および C1 を含む領域を切り出し，厚さ 50 μ m の連続前頭断切片を作製した。標本は 4 切片おきに浮遊法を用いた。0.01MPBS で洗浄後，1.5%normal goat serum (NGS)，0.1%bovine serum albumin (BSA，和光)に 0.3%Triton-X を加えた 0.01MPBS 液に 4℃にて 24 時間浸漬した。10000 倍に希釈した affinity purified polyclonal rabbit anti human c-Fos antibody (Ab-5，Oncogene Science) に

4℃，72 時間浸漬した。その後，洗浄後，200 倍に希釈した biotinylated goat anti-rabbit IgG(H+L)（BA-1000，Vector Lab.）に 37℃2 時間浸漬した。100 倍に希釈した avidin-biotin peroxidase complex（Vector Lab.）に室温で 2 時間浸漬した。その後，切片を 0.05M Tris buffer (TB，pH7.6) にて洗浄し，0.04%3,3'-diaminobenzidine tetra hydrochloride (DAB，東京化成)，0.2%ammonium nickel sulfate に 0.03%hydrogen peroxide を加えた 0.05%MTB(pH7.6)緩衝液に，室温で 5～8 分浸漬することにより，Fos-LI cells を発色させた。

結果：

1. CTB 陽性神経線維および終末の分布範囲

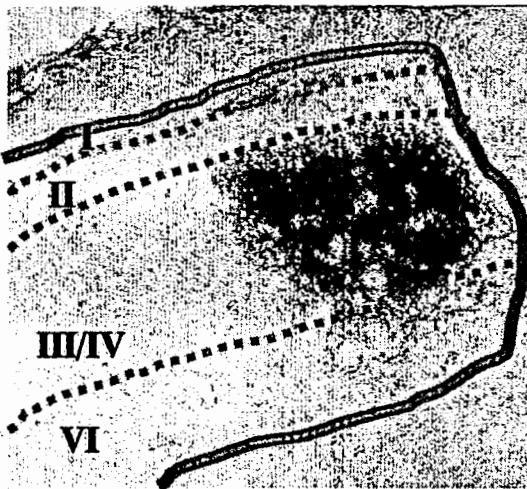
三叉神経の求心性感覚神経線維が直接投射する種々の感覚核群での CTB 陽性神経線維およびその終末

の分布について調べた。厚さ $50\mu\text{m}$ の標本を用いて検索を行った。SUT, PSV, SPVO および SPVI での CTB 陽性神経線維および終末の分布範囲は、密度の高い部分の分布範囲は切断動物で縮小していた。しかし、密度の低い部分を含めた全体の CTB 陽性神経線維およびその終末の分布範囲には非切断動物および切断動物で分布範囲には大きな違いなく SPVI の背内側部に限られていた。

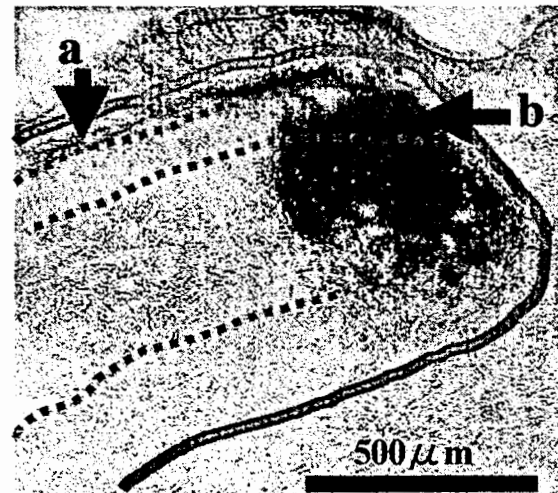
2. SPVC での CTB 陽性神経線維および終末の分布範囲

非切断および切断動物で SPVC の背内側部に CTB 陽性神経線維およびその終末が認められた。非切断動物において SPVC の内背側部の III 層, IV 層に多くの CTB 陽性神経線維およびその終末が多く認められた。さらに, I 層にも CTB 陽性神経線維およびその終末がわずかに認められた。一方, 切断動物では, SPVC の背内側部の III 層, IV 層だけではなく, I 層 (矢印 a), II 層 (矢印 b) にも多くの CTB 陽性神経線維およびその終末が認められた。さらに, I 層での CTB 陽性線維および終末は, 外側に拡がっていた。

非切断動物の SPVC



切断動物の SPVC



4. CCI-ION ラットの allodynia の発生率

4 1匹中 3 1匹においてのラットにおいて右側の HWT が 3.63g 以下となった。sham 群では HWT が 28.84g に戻り, allodynia は認められなかった。

5. 薬物投与群の Fos-LI cells の分布

saline 投与群と各薬物投与群と Fos-LI cells 数を比較すると carbamazepine 50mg/kg 投与群と gabapentin $30, 100\text{mg/kg}$ 投与群では, CCI 同側の表層および深層の両層において有意な減少が認められた ($p < 0.01$) が, 特に表層においてその傾向は強く現れた。各群での CCI 反対側の, 表層および深層において発現した Fos-LI cells 数の投与量依存的な減少は観察できなかった。

考察:

四肢においては, sural nerve を切断後 1 週間から 9 週間の内に, CB-HRP の注入または単一軸索内染色を行い, 有髄の $A\beta$ 神経線維および終末が正常動物では $A\beta$ 神経線維の入力が無いといわれている脊髄後角 II 層と, 一部 I 層に認められると報告している。その要因として次のような可能性が考えらる。

1) 神経切断後, まず C 神経線維の萎縮, さらにシナプスの欠落が起り, その後に損傷を受けた C 神経線維が $A\beta$ 神経線維の発芽を誘因すると考えられる。逆に, 切断後, C 神経線維が萎縮しないように神経

成長因子（以下 NGF と略す）を投与したときには、II 層に有髄神経線維およびその終末の発芽が起らないことが報告されている。2) 神経切断後に、有髄神経線維のみならず無髄の神経線維も CTB を取り込むようになるため、無髄神経線維がより多く存在する II 層にも CTB 陽性神経線維およびその終末が認められるようになる可能性がある。今回の研究でも、切断動物では、SPVC の背内側部の III 層、IV 層だけではなく、I 層（矢印 a）、II 層（矢印 b）にも多くの CTB 陽性神経線維およびその終末が認められた。この三叉神経系での I、II 層の CTB 陽性神経線維およびその終末の発現においても、sural nerve 切断時に考えられている上記のような要因が関与していると推察される。

近年、野村は IAN 切断後、ION 支配領域の口ひげ部皮膚に定量的機械刺激を与え、逃避行動を誘発する刺激閾値を経時的に測定した。その結果、神経切断側においてラットが逃避行動を起こす機械刺激の閾値は、手術前と比較すると、手術後 2 日目より対側の sham 手術側と比べ有意に低下し、15 日目まで 1g 以下の刺激で逃避行動が起る状態（allodynia）が続いた。今回の研究では、I 層での CTB 陽性神経線維およびその終末は、外側に拡がっていた（矢印 a）。この拡がった領域は、上記に述べたように ION 支配領域からの入力が発射する部位である。今回の研究で、神経切断後に起る I 層での CTB 陽性神経線維およびその終末の外側への拡がり、切断神経の支配領域を越えた知覚過敏に重要な働きをしていると考えられる。

Gabapentin の抗侵害受容機構については不明な点があるが、作用部位として gabapentin 結合蛋白である電位依存性カルシウムチャネルのサブユニット ($\alpha 2\delta$) が考えられている。このサブユニットは脊髄後角表層に分布していることが明らかになっている。今回の実験で、allodynia を惹起した動物の三叉神経脊髄路核尾側亜核や C1 に認められた Fos-LI cells の数が増加し、さらには saline 投与群と gabapentin 30, 100mg/kg 投与群では、CCI 同側の表層および深層の両層において有意な減少が認められた ($p < 0.01$)。これらのことを考えあわせると、CCI を施すことにより、これら中枢神経細胞の細胞内カルシウムイオンの上昇により、各種の細胞内伝達系反応が起こり、その結果として神経核内の Fos 蛋白が産生されることが推察できる。細胞内伝達系には、慢性疼痛モデルで脊髄表層に対側と比較して有意に発現する PKC γ などが知られている。

以上、神経切断時に中枢神経内での神経回路網の可塑的变化と神経拘扼時の中枢神経細胞の興奮性の増加を報告した。実際の臨床では、この二つのモデルの複雑な組み合わせで神経障害時の痛覚過敏が引き起こされていると考えられる。

参考文献：

1. 野村洋文：下歯槽神経切断ラットの口ひげ部に対する機械刺激により誘発される逃避行動と Fos 様蛋白陽性細胞の発現との関係，日大歯学 vol 73, 541-550 (1999)。
2. Woolf, C. J., Shortland, P. & Coggeshall, R. E. : Peripheral nerve injury triggers central sprouting of myelinated afferents, Nature vol 355, 75-78 (1992)。
3. 吉村 恵：神経因性疼痛と可塑性；(赤池紀夫，東英穂，藤原道弘編：脳機能の解明-21世紀に向けて-，九州大学出版会，福岡)，175-184 (1998)。

注：本研究の一部は、『日本歯科麻酔学会雑誌』（2001 年 VOL29 巻）に掲載。

作製日：2002 年 3 月 15 日

2001年度日中医学協会共同研究等助成事業報告書

－在留中国人研究者研究助成－

2002年2月27日

財団法人 日中医学協会
理事長 殿

研究者氏名 劉 佳
 所属機関名 東京歯科大学歯科理工学講座
 指導責任者氏名 小田 豊
 職 名 主任教授
 所 在 地 〒261-8502 千葉県葉浜区真砂1-2-2
 電話 043-270-3778 内線

1. 研究テーマ

破折歯の接着強度に関する研究
(Bond Strengths of Adhesively Reattached Root Fracture)

2. 本年度の研究業績

(1) 学会・研究会等における発表 ☒ 有 ・ 無 (学会名・演題)

1. 第37回日本歯科理工学会、演題A-16、破折歯の接着強度に関する研究
(第3報)：4META/HMA-TBB系接着性レジンは、歯根象牙質の接着強度に及ぼす間隙、形状の
2. 第38回日本歯科理工学会、演題P-4、破折歯の接着強度に関する研究
(第4報)：4META/HMA-TBB系接着性レジンは、歯根象牙質の接着強度に与える
サーマルサイクルの影響

(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

今回、『破折歯の接着強度に関する研究』を博士論文試験のテーマとし、三年間の研究実験を進め、よい結果を得た。臨床では成功例が多く発表されている破折歯の接着技法について、歯科理工学の立場から、研究データおよび治療根拠を提供することができた。微小引張試験法を破折歯研究に用いることにより、成功な臨床治療法を確信され、さらに健康な歯質と接着修復した破折歯の接着強度を比較できることが認められた。


歯科医学は理工材料学よって発展し、これからも理工学によって支えられていく』とよく言われている。歯科研究者と歯科医師に対して、基礎知識が歯科材料の使用や治療方針の決定などにより非常に重要な物である。今後さらに本研究の結果を生かし、微小面積分析の手法を用い、歯根部だけではなく、歯冠部破折の症例にも試み、各種歯科臨床接着治療方法の理論的根拠を明らかにしたい。

4. 指導責任者の意見

劉佳君は、1998年4月に専修科生として本学に入学し、翌年より本学大学院博士課程に進学し、3年次を終了するに至っております。この間に、「歯科用銀合金の疲労特性についての研究」「支台歯とされる歯牙の破折と再接着に関する研究」を行い、学会発表5回、原著論文1編の報告を行っております。貴協会の助成金により、在学中の経済的困難が軽減され、研究に専念できたものと考えます。

現在、博士論文として「歯牙の破折と再接着に関する研究」を完成させたいと実験をほぼ終了し、データ整理と博士論文の作成に取り組んでおります。

また、学生教育にも積極的に協力し、学生実習の指導に当たっております。現在はその着実に勤勉な態度、真摯な研究態度と勉学意欲からして、十分な成果を期待できるものと確信しております。

指導責任者氏名 小 田 豊 

5. 研究報告書

別紙報告書作成要領により、添付の用紙で研究報告書を作成して下さい。

研究発表中または研究中の本人のスナップ写真を添付して下さい。

※研究成果を発表する場合は、発表原稿・抄録集等も添付して下さい。

※発表に当っては、日中医学協会助成金による旨を明記して下さい。

破折歯の接着強度に関する研究

(Bond Strengths of Adhesively Reattached Root Fracture)

研究者氏名 劉 佳(Jia LIU)

中国所属機関 (私費留学生：無所属)

日本研究機関 東京歯科大学歯科理工学講座

指導責任者 教授 小田 豊

共同研究者名 服部雅之, 長谷川晃嗣, 吉成正雄, 河田英司, 小田 豊

ABSTRACT: An investigation of the bond strength of bovine root dentin was conducted with purpose to provide mechanical evidence for the successive treatment of adhesively reattached vertical root fracture. The microtensile dumbbell specimens were fractured as a vertical root fracture with a tensile force and bonded by 4-META/MMA-TBB adhesive resin. It was found that the better bonding (above 10MPa) to the parallel tubules on the bonding interface of butt joint was due to the compacted gap space and the positive effect of etching treatment. The adhesive treatment in a wedge joint, with oblique tubules on the bonding interface, was revealed that it contributed to the strongest bond strength (about 19MPa) and good durability (after 3000 thermocycling). The test method in this study was proved that it allowed of comparing the fracture and re-fracture resistance of root dentin by reusing the same specimen.

Key Words: Vertical root fracture, Microtensile bond strength, Adhesive resin, Root dentin

INTRODUCTION

Vertical root fracture (VRF) in endodontically treated teeth occurs frequently. As we all known, the selection of treatment often depends on the extent of the fracture lines. The conservation of VRF, a vertical fracture down to the root, is particularly difficult. Tooth extraction is necessary to end treatment at last. Several conventional techniques have been used to repair fractured teeth by tightened wire on the grooves around the tooth crown or by glass ionomer cement. Over the years, due to the advances of dental adhesive systems, the new clinical operation have been challenged for bonding fractured teeth, including the use of cyanoacrylate cement, composite resins, and even fusion of the fracture line by laser. Especially, significant advances have led to a relatively high bonding strength to dentin. The conservational treatment of VRF by adhesively repairing method with 4-META/MMA-TBB resin was reported with a long-term clinical succession¹.

4-META/MMA-TBB resin has a long research and clinical history. Nakabayashi² addressed its use on extracted bovine dentin substrates, and introduced firstly the concept of hybrid layer from formation by 4-META/MMA-TBB resin in the demineralized dentin of extracted bovine teeth³. It was investigated in vivo research⁴ that process good biocompatibility and little cytotoxicity to the periodontal tissue. But no evaluation on the micro-bond strength of repaired VRF was reported. In addition, as for the root dentin, Fogel et al.⁵ showed that the permeability of root dentin is much lower than that of coronal dentin.

In order to reveal adhesion mechanism of root dentin and make a mechanical evidence for the bonding treatment of VRF, the purpose of this study was to investigate the effect of surface treatment (polishing and etching), gap space, and the shape of bonding joints (butt joint and wedge joint) on the microtensile bond strengths of 4-META/MMA-TBB adhesive resin to the vertically fractured bovine root dentin, and the durability of adhesion was also evaluated on effect of thermal cycling.

MATERIALS & METHODS

Twelve freshly extracted bovine lower central incisors in frozen storing were used within 6 months following extraction.

Specimen preparation of with parallel tubules on the fractured surface

The roots were sectioned longitudinally in bucco-lingual direction with a low-speed diamond saw (No.11-4254, Buehler Ltd., USA) under copious water. Two pieces of dentin-slices (distal and mesial) in 1.0mm thickness were obtained from each root. Within two dentin-slices of each root, 10 pieces of dentin specimens could be obtained. (Fig.1)

The span between the plastic jig was decided on 3.0mm. The rectangular cross-section (1.0×1.5mm) of micro-tensile dumbbell specimen was carefully shaped and trimmed with a diamond bur (Diabur, SF-12, Mani Inc., Japan) in a dental handpiece under copious air-water spray. Specimens were subjected to a tensile load at a crosshead speed of 1.0 mm/min until failure to obtain the ultimate tensile force, and then the microtensile strength was calculated by dividing by the area of rectangular cross-section of dumbbell specimens. The fractured specimens were stored in 0.9% normal saline solution at 37°C for 24hrs prior to reattachment.

Reattachment and measurement of bond strength

Followed by thorough rinsing of the fractured surfaces for 30 seconds with distilled water, the fractured specimens were randomly divided into 10 groups ($n=12 \times 10$), and the fractured surfaces were conditioned according to different criteria such as polishing treatment, etching treatment, gap spaces, and joint types (Tab.1). 4-META/MMA-TBB adhesive resin (Super-Bond, Sun Medical Ltd., Japan) was used.

The bonded specimens were stored in 0.9% normal saline solution at 37°C for 24hrs prior to micro-tensile bond test. The half of specimens ($n=6 \times 10$) were fractured under tensile force (RTC-1150, Orientec, Japan) at a crosshead speed of 1.0mm/min, and the microtensile bond strength (MTBS: MPa) was recorded.

Evaluation on the durability of adhesion

The other half of specimens ($n=6 \times 10$) was use for investigating the durability of bond strengths in the test of thermal cycling. The bonded specimens were also stored in 37° C 0.9% saline solution for 24 hours prior to loading on the thermal cycling (TC: 4-60° C for 3000cycles, dwell time 20 s). The microtensile bond strengths were also measured.

Statistical analysis

One-way analysis of variance (ANOVA) was used to assess the effect of surface treatments and thermal cycling on microtensile bond strength of root dentin. Data differences between each group were analyzed with the Fisher PLSD (protected the least significant difference).

SEM observations (the bonding interfaces)

The interfaces of various conditioned specimens were ground with a series of increasingly finer silicon carbide abrasive papers up to 1200-grit, and polished with diamond pastes down to a 0.03 μ m particle size (Buehler). And then, the specimens were immersed into 6 mol/L HCl solution (30s) and 1% NaClO solution (10min) with rinsing interval, in order to partially remove the inorganic and organic parts of the dentin. The specimens were rinsed thoroughly with the distilled water, air-dried slightly, and stored in silica gel for 24hrs prior to the gold sputter-coated for SEM observation (JEOL, JSM-6340F, Tokyo, Japan).

RESULTS

Bond strength measurement.

According to the result within the same butt joint before the employment of thermal cycling: 1) Bond strengths of both non-treated groups (N, NT) and etched groups (E, ET) were about 10MPa. There were no statistically significant differences, regardless of a wide or narrow gap-space. 2) Bonding of the polished specimens (P, PT and PW) showed significant weak in a result of pre-fracture, without data, before setting up to the test machine. 3) The significant improvement ($p<0.01$) of bond strength (about 5-6MPa) was found due to the additional etching treatment after the polishing (PE, PET). 4) As for the effect of gap space (50 μ m and 500 μ m) on butt joint specimens, the significant differences were not obtained ($p>0.05$). 5) Between the butt joint and wedge joint, the specimens of wedge joint (PEW) showed the highest value (about 17MPa) with statistically significant difference ($p<0.01$). (Fig.2)

Due to the influence of 3000 thermal cycles, the bond strength of a wide gap-space (500 μ m) in butt joint decreased significantly ($p<0.01$) within non-treated group (about 6MPa), etched group (about 5MPa),

and polished-etched group (about 2MPa), respectively. The specimens with a narrow gap-space ($50\mu\text{m}$) of butt joint had no significance exchanges ($p>0.05$). On the contrary, the wedge joint (PEW) was still on stable bond strength with the highest level (about 19MPa).

SEM investigation on a side view of the bonding interface

An image of closed mechanical connection between the resin and dentin surface is showed, even though there is an absence of the hybrid layer (Fig. 4: N and E); the combination seemed not be closely and the extending of resin is not actively because of the absence of resin tags. The absence of connection between resin and dentin was remarkable, regardless of tubule orientation (Fig. 4: P and PW); most of the smear layer and smear-plugs in tubule were removed. The superficial layer of dentin was shown a demineralized image; the layer of resin-infiltrated seems alike the texture named as the hybrid layer (Fig. 4: PE); the hybrid layer occurred in oblique to the tubule orientation. It seems be more regular, entirely than that of PE specimens bonded parallel to the tubules. And much more resin tags and their lateral branches were appeared. Observations of this bonding interface with the oblique tubules seem give a show of well bonding. (Fig. 4: PEW)

There is no any evidently different appearance of bonding situation for each pair of conditioned groups by comparing before-TC and after-TC respectively.

DISCUSSION

In our previous study⁶, it was indicated that multiple specimens (about 8-10 specimens) were be prepared from one root with the nearly similar tensile strength (36MPa) and parallel tubules on the segment as the fractured surface of VRF. In addition, it was not found the significant influence of dentin locations from the cervical to the apical root on the tensile strength. It was contributed to imitating practically the fractured surface of VRF, and standardizing correctly the original conditions of specimens. On the other way, it makes a possible to measure the stress on different detailed locations that is different with the conventional study by a tapered tip tool inserted into the whole root canal^{7,8}. It is better suitable for imitating local situation of a reattached VRF. In addition, this method allows the presence of obtaining a percentage data to compare the fracture resistance (about 36MPa⁶) of intact root dentin and the bond strength of a bonded VRF by the same one specimen at one testing load. In order to determine the correlation of the bond strength with tubule orientations and other surface treatments, bovine dentin was used in this study, although it have a lower resistance compared to human dentin⁹.

In this study, we obtained an interesting result in the group of non-treatment (N/NT), a just-fractured situation after tensile force. The bond strength was not showed significant difference to the etched groups (E/ET), and showing an image of closed mechanical connection at side view of the bonded interface even without the appearance of the hybrid layer. In this case of non-treated group, there was no the collapse of the superficial layer of collagen at where the minute networks of collagen fibers was shown on the bonding surface, (Fig. 3). This bonding surface had higher surface energy and surface roughness for the easier spreading of adhesive materials and better interfacial contact. It was also proposed that it is possible to contribute the well adhesion by micromechanical interlocking between the freshly fractured surfaces. And it is considerable for refitting the fractured segment accurately because of less deformation of the fractured surface. Since the good reattachment of fractured segments is also a critical point for successful treatment of teeth fracture.

In this study, the bond strengths retained with the smear layer (P/PT and PW) were very weak, which is contrary with the report of Watanabe¹⁰. The smear layer has been defined as any debris calcific in nature produced by reduction or instrumentation of dentin, enamel or cementum¹¹. The smear layer is composed of hydroxyapatite and altered collagen with an external surface formed by gel-like denatured collagen. As the SEM picture in this study, the smear layer revealed a uniform layer of cutting debris that covered the dentin and obscured the tubules orifices. Because of their inherent weakness, the existing of smear layer can interfere with good dentin adhesion.

The stronger bond strength was improved in the etched group (E/ET and PEW) with a comparing to the polished group (P/PT and PW). The dentin impregnation by applied adhesive monomers was realized only

after removing the weak smear layer. Etching method is commonly used as this actor. The acidic agents remove the smear layer, demineralized the dentin surface, open the dentin tubules, and increase the micro porosity of the intertubular dentin¹². In this study, the 4-META/MMA-TBB adhesive resin was used due to its good biocompatibility and little cytotoxicity⁴ and its successive clinics of the repaired VRF¹. The 4-META/MMA-TBB resin was unable to adhere to dentine until the development of 10%critic acid and 3%feric chloride solution to remove the smear layer. It was found that 4-META promoted diffusion of MMA into the dentin and Fe²⁺ in 10-3 solution was also effective in increasing the permeability of demineralized dentin. The 10-3 solution, a kind of shallow etching, tends to prevent collapse of the collagen fibril network and may provide a stiffer interface due to non of over-collapse of collagen fibrils¹³. The achievement of the bond between adhesive resin and dentin depends on the penetration of the primer and adhesive resin into the conditioned dentine surface in order to create micromechanical interlocking between the dentin collagen and resin.

But, the depths and quality of hybrid layer and infiltration of resin tag into the conditioned dentin surfaces were showed different for the perpendicular and parallel tubules¹⁴. As for the bond strength of adhesion, it was revealed that the value of wedge joint group (PEW: about 13° to tubules) was significantly higher than that of butt joint groups (PE: 0°). The exchangers of bonding areas in two kinds of bond joints can be abbreviated (Cos13° ≈ 0.97). The cause of different bond strength was thought that it was the different influence of tubule orientation on the bonding surfaces between both bonding joint. At a right angle to dentinal tubules, relative to parallel tubule, the rate of etched dentin has been shown to be higher when the acids can diffuse down dentinal tubules¹⁵. On the other way, it was described by Griffiths and Watson¹⁶ that the lateral diffusion can only occur in areas where open dentinal tubules are available for a fast penetration of the acids and following dissolution of the peritubular dentin lining the tubule walls. Resin penetration into tubules can effectively seal the tubules and contribute to bond strength if the resin bonds to the tubules wall¹⁷. The oblique orientation between the tubules and bonding surface in the case of PEW specimen of this study make it possible to represent.

As for the durability of adhesion, in this study, we invested the effect of 3000 thermal cycles on the root dentin with a thermal change of 4-60° C. Loyd et al.¹⁸ suggested that several thousand thermal cycles might occur *in vivo* in several years. The storage period was 15-30 seconds in each dwelling bath. Noguchi et al.¹⁹ concluded that the desirable thermal cycling temperatures were between 5° C and 60° C that could simulate *in vivo* conditions closely. The situation of root around in the periodontal tissue is different with that of crown, at where it is thought there is little frequent thermal change. But the mechanical stresses can be occurred directly by thermal change through bonded interfaces. Therefore, it is permitted to accelerate a long resting periods by a simulation of the mechanical stresses *in vivo*.

The significant difference of bond strength was not found after 24hrs ether in the groups of 50 μm or 500 μm. But the significant decreasing of bond strength was revealed in the groups of 500 μm after 3000 thermal cycling with temperature exchange from 4° C to 60° C, regardless of various etching or polishing surface treatments. The decreasing of bond strength in the 500 μm groups was thought the mixture action of two factors. One is larger linear thermal expansion of PMMA resin in the 500 μm of gap space than that of 50 μm space. Another reason is the larger water absorption of the mass resin in the 500 μm gap space. At a combined result, the adhesive material between a wide gap spaces is easier to be influenced by the thermal stress.

The results were shown that the durability of the wedge joint (PEW) was stable with the mean value of bond strength about 19MPa, which was different to the specimens with parallel tubules on the bonding surface of butt joint. The force of about 19MPa of the reattached specimens in the wedge joint of this study, which is about 50% of the fractured strength of intact root dentin⁶, seems be enough to resist the re-fracture force. Due to the report of Friedman S et al.⁷ that the force required re-fracturing the bonded roots was at the most 20% of what it was for intact roots. This percentage was lower than 50% calculated when crowns of teeth were horizontally fractured. In addition, such reinforcement in the case of repaired VRF may have to include an intracanal resistance with adhesive resin used as a root canal filling. The actions of composite resin as root canal fillings or as core materials are being taken

a large regard not only in the fractured root but also as a endodontically treatment of integral root canal to prevent the occurrence of VRF.

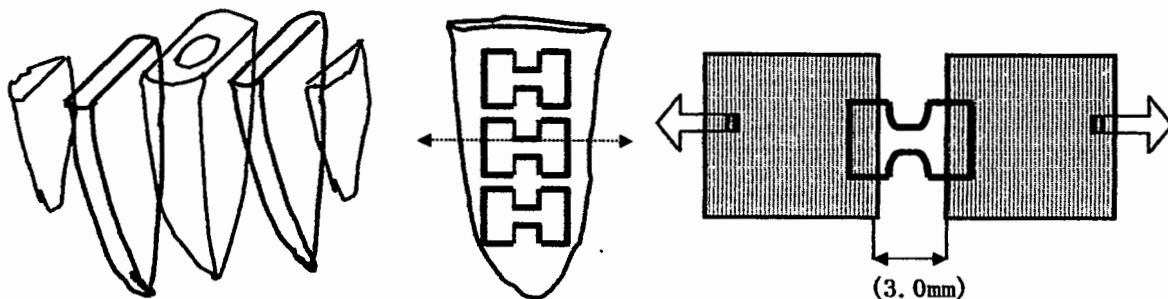


Fig.1: Specimen preparing

Tab.1: Assignment and abbreviations of different groups

Joint Types (Gap Space: μ m)	Butt Joint (50)	Butt Joint (500)	Wedge Joint (50-500)
Surface Treatments			
Non-treated	N	NT	
Etched (10-3 Solution)	E	ET	
Polished	P	PT	PW
Polished and Etched	PE	PET	PEW

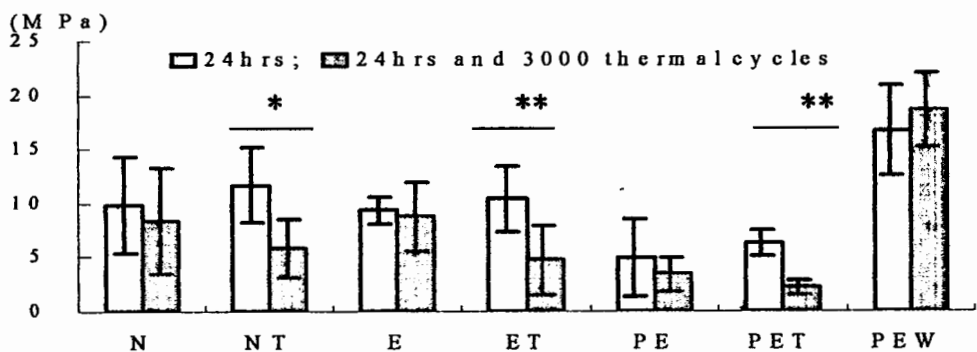


Fig.2: Bond strength of reattached root dentin before and after thermal cycles. (The bonding of some specimens in the 3 groups of P, PT and PW were too weak to become failures at a pre-fracture before the finishing of thermal cycling test. *: $p<0.05$; **: $p<0.01$)

REFERENCES

- Masaka N. Long-term observation of fractured tooth preserved by adhesion. *Adhesive Dentistry* 1995; 13: 156-170.
- Nkabayashi N, Watanabe A Ikeda W. Intra-oral bonding of 4-META/MMA-TBB resin to vital human dentin. *American Journal of Dentistry* 1995;8:37-42.

3. Nakabayashi N, Kojima K, Masuhara E. Promotion of adhesion by the infiltration of monomers into tooth substrates. *Journal Biomed Mater Res* 1982;16:265-273.
4. Nocuchi H, Sugaya T, Kato H. Treatment of vertically fractured root by cohesion. Part 1. Evaluations of cytotoxicity of adhesive resin cement with cultured periodontal ligament cells. *J Jpn Oper Dent* 1997;40:1445-1452.
5. Fogel JM, Marshall FJ and Pashley DH. Effect of distance from the pulp and thickness on hydraulic conductance of human radicular dentine. *J Dent Res* 1987;67:1381-1385.
6. Liu J, Harori M., Hasegawa K, Yoshinari M., Kawada E, and ODA Y. Bond strength of adhesively repaired fracture root (Part 1)—Micro-tensile strengths of bovine root dentine and bond strengths with 4-META/MMA- TBB adhesive resin. Vol.19 Special Issue 35 : 30, 2000
7. Friedman S, Moshonov M, Trope M. Resistance to vertical fracture of roots, previously fractured and bonded with glass ionomer cement, composite resin and cyanoacrylate cement. *Endodontics and Dental Traumatology* 1993; 9: 101-105.
8. Monaghan P, Bajalcaliev JG, Kaminski EJ, Lautenschlager EP. A method for producing experimental simple vertical root fractures in dogteeth. *Journal of Endodontics* 1993; 19(10): 512-515.
9. Kiyomura M. Bonding strength to bovine dentin with 4-META/MMA-TBB resin: Long-term stability and influence of water. *J Jpn Dent Mater* 1987;6:860-872.
10. Watanabe I. Photocure bonding agents to ground dentin. *J Jpn Dent Mater* 1992;11:955-973.
11. Ishioka S, Caputo AA. Interaction between the dentinal smear layer and composite bond strengths. *J Prosthet Dent* 1989;61:180-185.
12. Van Meerbeek B, Inokoshi S, Braem M, Lambrechts P, Banherle G. Morphological aspects of the resin-dentin interdiffusion zone with different dentin adhesive systems. *Journal of Dental Research* 1992;71:1530-1540.
13. Phrukkanon S, Burrow MF, Tyas MJ. The effect of dentine location and tubule orientation on the bond strengths between resin and dentine. *Journal of Dentistry* 1999; 27: 265-274.
14. Marshall GW, Balooch M, Tench RJ, Kinney JH, Marshall SJ. Atomic force microscopy of acid effects on dentin. *Dent Mater* 1993;9:265-268.
15. Marshall GW. Dentin: Microstructure and characterization. *Quintessence of International* 1993; 24: 606-617.
16. Griffiths BM, Watson TF. Resin-dentin interface of scotchbond multipurpose dentin adhesive. *Am J Dent* 1995;8:212-216.
17. Ayad MF. Effects of rotary instrumentation and different etchants on removal of smear layer on human dentin. *The Journal of Prosthetic Dentistry* 2001;85:67-72.
18. Lloyd BA, McGinley MB, Brown WS. Thermal stress in teeth. *J Dent Res* 1978;57:571-582.
19. Noguchi H, Nakamura K, Akama Y et al.. Endurance of adhesive strength of dental adhesives. 1. creation on the testing condition of adhesive strength deterioration. *J Jap Dent Mater* 1986;5:660-665.

注：本研究は平成 12 年 04 月 27 日、10 月 15 日；平成 13 年 04 月 01 日、10 月 19 日
『日本歯科理工学会学術講演会』にて発表、『歯科材料、器械』VOL19；VOL20 に掲載。


作成日：2002 年 2 月 27 日

2001年度日中医学協会共同研究等助成事業報告書

－在留中国人研究者研究助成－

2002年 3月 11日

財団法人 日中医学協会
理事長 殿

研究者氏名 金 玉蘭 
所属機関名 高知医科大学 第一病理学教室
指導責任者氏名 円山 英昭
職 名 大学院生
所 在 地 〒783-8505 高知県南国市岡豊町小蓮
電話 088-880-2331 内線 2632

1. 研究テーマ

肝星細胞(HSC)の壊死脱落巣における線維化機序と組織の再構築について

2. 本年度の研究業績

(1) 学会・研究会等における発表 ☒ (有) ・ 無 (学会名・演題)

第2回 細胞病理談話会: Dimethylnitrosamine (DMN) 1回大量投与ラットにおける壊死肝組織の再構築、とくに血管再形成と髄外造血の相関について

第33回日本臨床電子顕微鏡学会: 肝星細胞(HSC)の壊死脱落巣における線維化機序について

第15回肝臓洞壁細胞研究会: 肝星細胞(HSC)の壊死脱落巣における線維化機序と組織の再構築について－Dimethylnitrosamine (DMN) 1回大量投与ラット肝の病理学的観察

第91回日本病理学会総会: Dimethylnitrosamine (DMN) 1回大量投与ラットにおける壊死肝組織の再構築、とくに血管の再形について

(2) 学会誌等に発表した論文 ☒ (有) ・ 無 (雑誌名・論文名)

Virchows Archiv

Tissue remodelling following submassive hemorrhagic necrosis in rat livers induced by an intraperitoneal injection of dimethylnitrosamine

投稿中

3. 今後の研究計画

1. 肝壊死後の再構築の際、血管新生と線維化における mast cell の免疫反応と肝組織内での分布を統計学的にまとめ、mast cell と組織変化間の関係に対して病理学的に検討を行う。
2. 同モデルでの肝星細胞初代培養上で分子病理学観察を行い、肝星細胞の活性化と線維化機序に関わるサイトカインの network を調べる。
3. 今までの研究結果をもとにして、同実験モデルで観察した亜広範性肝壊死後の血管新生についてまとめを行い、論文を完成させる。

4. 指導責任者の意見

金玉蘭殿は現在、本学の大学院生命医学専攻、病理病態制御部門の二年生（私費留学生）です。貴協会より平成13年度研究助成をいただき、とくに本年度の研究テーマである『DMN によるラット肝組織の傷害とその再構築機序』について新知見を見出し、『Dimethylnitrosamine (DMN) 1 回大量投与ラットにおける壊死肝組織の再構築、とくに血管再形成と髄外造血の相関』、『肝星細胞 (HSC) の壊死脱落巣における線維化機序と組織の再構築について—Dimethylnitrosamine (DMN) 1 回大量投与ラット肝の病理学的観察』などについて、それぞれ研究会（東京大学、埼玉医科大学）、および学会（長崎）で発表を行い、内容は『Tissue remodelling following submassive hemorrhagic necrosis in rat livers induced by an intraperitoneal injection of dimethylnitrosamine』としてまとめ、Virchows Archiv に投稿しました。なお、分子生物学的実証に欠けていますが壊死巣内の血管新生についても angiogenesis や vasculogenesis 以外の“幹細胞”的細胞による類洞形成が示唆されており、研究の意義は大きく、研究の一層の進展が期待されます。優れた研究資質を有する金玉蘭殿の指導者として、適切な指導と研究環境の設備についてさらに責任を果たしたいと考えます。

指導責任者氏名 円山 英昭



5. 研究報告書

別紙報告書作成要領により、添付の用紙で研究報告書を作成して下さい。

研究発表中または研究中の本人のスナップ写真を添付して下さい。

※研究成果を発表する場合は、発表原稿・抄録集等も添付して下さい。

※発表に当っては、日中医学協会助成金による旨を明記して下さい。

肝星細胞(HSC)の壊死脱落巣における線維化機序と

組織の再構築について

研究者氏名	金玉蘭
中国所属機関	延边大学医学院附属病院病理科
日本研究機関	高知医科大学第一病理学教室
指導責任者	教授 円山 英昭
共同研究者	黒田直人、張彦虎、戸井慎、林芳弘、宮崎恵利子、郭麗梅

要 旨

肝線維化では成因の如何を問わず、肝細胞傷害局所で活性化した HSC が線維化の進展、増強に中心的役割を果たす。一方、これまで、HSC が壊死、脱落した急性亜広範性肝壊死後の線維化機序についての報告はない。今回、DMN 大量 1 回投与による HSC 壊死脱落巣における線維化機序を病理学的に観察した。7 週齢の Wistar 系雄性ラット 30 匹に、1%DMN 50mg/kg を腹腔内に 1 回注射し急性 DMN 肝傷害モデルを作成した。注射後 6, 12, 24, 30, 36 時間及び 2, 3, 5, 7, 14 日に肝臓を摘出し、10%中性緩衝ホルマリン固定後、各実験群及び無処置対照群とも HE、鍍銀染色及び α -SMA、BrdU の免疫染色を行い、また、全例肝組織の一部を電顕観察した。肝臓は投与 12 時間より小壊死巣が生じ、36 時間後には亜広範性出血性肝壊死の像（全域 α -SMA 陰性）を呈する。 α -SMA 陽性の活性化 HSC は 5 日目になり、初めて、壊死部と遺残した実質の境界部に出現し、不完全に残存した鍍銀線維に沿って壊死部内に伸展する。7 日目、実質内には瀰漫性に筋線維芽細胞の増生が見られる。BrdU と α -SMA の二重染色では実質内で BrdU 陽性の筋線維芽細胞が散見された。投与 14 日後には線維化がさらに進展、増強する一方で、炎症細胞浸潤は消褪し、細束状の C-C bridging fibrosis の像を呈する。HSC の壊死脱落を伴う亜広範性肝壊死では遺残部の肝組織内の HSC および壊死巣内の中心静脈周囲の間質細胞が活性化され、筋線維芽細胞化し、壊死巣内に遺残した鍍銀線維の網工に沿って移動、伸展して、壊死後性線維化に関与し再生肝細胞と共に組織の再構築にあずかる。

Key Words 肝星細胞、組織再生、肝線維化、Dimethylnitrosamine、ラット

緒 言：

肝線維化では成因の如何を問わず、肝細胞傷害局所でサイトカインの相互作用により活性化した HSC が線維化の進展、増強に中心的役割を果たす(1-5)。一方、これまで、HSC が壊死、脱落した急性亜広範性肝壊死後の線維化機序についての報告はない。今回、DMN 大量 1 回投与による HSC 壊死脱落巣における線維化を伴う肝組織の再構築の機序を病理学的に観察した。

対象と方法：

7 週齢の Wistar 系雄性ラット 30 匹(180-200g)に、1%DMN 50mg/kg を腹腔内に 1 回注射し急性 DMN 肝傷害モデルを作成した。注射後 6, 12, 24, 30, 36 時間及び 2, 3, 5, 7, 14 日 (n=3) に肝臓を摘出し、10%中性緩衝ホルマリン固定後、各実験群及び無処置対照群 (n=3) とともに HE 染色、鍍銀染色、PAS 染色、D-PAS

染色、鉄染色、Naphthol AS-D chloroacetate (N AS-D CA) esterase 染色及び α -平滑筋アクチン (α -SMA; 1A4, DAKO)、rat macrophage (ED-1, ED-2, Serotec, oxford, England)、bromodeoxyuridine (BrdU; Bu20a, DAKO)の免疫染色 (SAB 法) を行い、また、全例肝組織の一部を電顕観察した。

結 果：

DMN 投与6時間より、(N AS-D CA) esterase 染色陽性の好中球が肝類洞内および類洞内皮に付着する形で認められ、次後、次第に数を増す。肝壊死巣は投与12時間より zone 3 及び 2 に散在する径約50 μ m、境界不整の小壊死巣として生じ、好中球および ED-1 陽性の macrophage の浸潤も増強する。36 時間後には肝壊死の強さと範囲は最大となり Zone 3-2 に広がる亜広範性壊死の像をする (図1)。壊死巣では肝細胞のみならず類洞内皮や HSC も一様に壊死して、鍍銀線維網のみが不完全に遺残した状態で、多量の壊死肝細胞、浸潤した ED-1 陽性 macrophage、好中球、リンパ球や血小板などが認められる出血性壊死の像を示し、壊死巣は全域 α -SMA 陰性である (図2)。壊死部では、次後、ED-1 陽性 macrophage の数量の増加と対照的に壊死肝細胞や赤血球が減少し、壊死組織の処理が進行する。DMN 投与 5 日目になると壊死巣は macrophage の他には部分的に残存した細い鍍銀線維片と少数の赤血球などをいれた形状不整な組織空隙 (punched-out lesion) となり、壊死巣と肝実質の境界は明瞭となる。この時期になり、壊死巣に接する肝実質の辺縁部に実質の表面を被うように α -SMA 陽性の活性化 HSC (筋線維芽細胞) が初めて出現し、以後、壊死巣内に残存した鍍銀線維に沿って芽出状に伸展する (図3)。7 日目では壊死巣内の中心静脈周囲や肝実質内 (BrdU 陽性肝細胞の数が増加) に α -SMA 陽性筋線維芽細胞の増生が認められる。肝実質内の α -SMA 陽性細胞の分布は瀰漫性であり、一部は BrdU 陽性の像を示す (図4)。

以後、壊死巣は再生肝細胞により次第に置換されるが Zone 3 には筋線維芽細胞や増生した鍍銀線維、膠原線維、siderophage, ceroid macrophage を含めた炎症細胞の浸潤像を伴う肉芽組織が形成され、その後、線維束が伸展し、DMN 投与 14 日後には隣接する中心静脈域をつなぐ細索状の C-C bridging fibrosis が形成される (図5)。

考 察：

DMN 1 回大量投与による亜広範性出血性壊死では壊死巣内の HSC はすべて壊死、脱落している。この事実は壊死部の HSC が肝細胞の壊死後、短時間内に、筋線維芽細胞化 (α -SMA 強陽性) するヒトの massive and submassive hepatic necrosis 例 (6) や四塩化炭素の急性肝傷害実験モデル例とは著しく異なっている (7)。DMN による HSC の壊死脱落巣では壊死組織の処理後、中心静脈周囲や壊死巣に接する肝実質の表面に α -SMA 陽性筋線維芽細胞が出現し、遺残した鍍銀線維に沿って伸展する。一方、肝実質内の HSC のような α -SMA 陽性像や α -SMA⁺, BrdU⁺ 細胞の散在像は壊死巣内に伸展する α -SMA 陽性細胞の由来を考える際、示唆に富む所見であり、壊死巣内の α -SMA 陽性筋線維芽細胞は遺残肝実質内の HSC に由来し、活性化して、壊死巣内に遺残した鍍銀線維の網工に沿って移動、伸展して肝細胞の再生に必要な類洞壁の再構築の関与する一方で、不完全再生部では C-C bridging fibrosis の形成にあずかると考えられる。なお、従来の四塩化炭素や DMN などの化学物質の反復頻回投与による線維化モデルでは新旧の病変が混在し、投与期間が長い場合細胞や組織に適応現象が生じるなど、病理組織像の性状や成立機序が複雑であったが、DMN 1 回大量投与モデルでは肝壊死から線維化を伴う肝組織の再構築までの変化が時間の経過につれて一元的に観察される利点がある。

参考文献：

1. Friedman SL : The cellular basis of hepatic fibrosis-Mechanisms and treatment strategies. N Engl J

Med 24 : 1828-1835, 1993

- 2 . Tsukamoto H : Cytokine regulation of hepatic stellate cells in liver fibrosis. *Alcohol Clin Exp Res* 23 : 911-916, 1999
- 3 . Olaso E, Friedman SL : Molecular regulation of hepatic fibrogenesis. *J Hepatol* 29 : 836-847, 1998
- 4 . Failli P, Defranco RMS, Caligiuri A, Gentilini A, Romanelli RG, Marra F, Batignani G, Guerra CT, Laffi G, Gentilini P, Pinzani M : Nitrovasodilators inhibit platelet-derived growth factor-induced proliferation and migration of activated human hepatic stellate cells. *Gastroenterol* 119 : 479-492, 2000
- 5 . Fibbi G, Pucci M, Grappone C, Pellegrini G, Salzano R, Casini A, Milani S, Rosso MD : Functions of the fibrinolytic system in human Ito cells and its control by basic fibroblast and platelet-derived growth factor. *Hepatol* 29 : 868-878, 1999
- 6 . Enzan H, Himeno H, Iwamura S, Saibara T, Onishi S, Yamamoto Y, Miyazaki E, Hara H: Sequential changes in human Ito cells and their relation to postnecrotic liver fibrosis in massive and submassive hepatic necrosis. *Vichows Archiv* 426: 95-101, 1995
- 7 . Pritchard DJ, Wright MG, Sulsh S, Butler WH: The assessment of chemically induced liver injury in rats. *J Appl Toxicol* 7: 229-236, 1987

図の説明

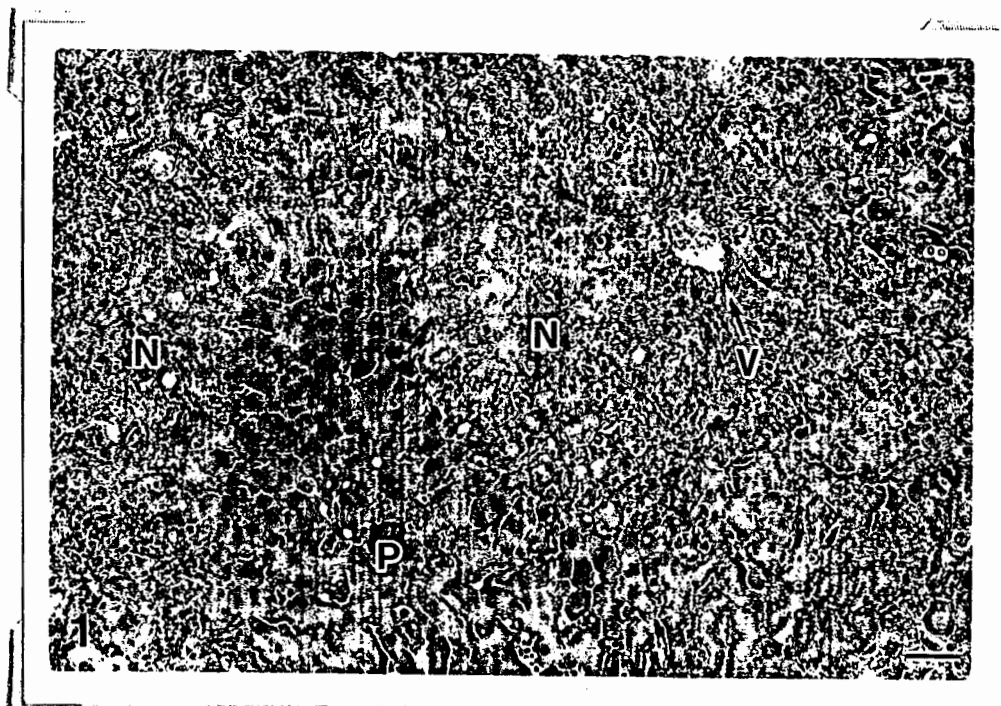


図1. DMN 投与 36 時間. HE 染色. 36 時間目には投与 12 時間目より生じた Zone 3 を中心とした出血や好中球浸潤を伴う形状不整、境界不明瞭な肝細胞凝固壊死巣が最高の強さと広がりを示すようになり、壊死巣内にはマクロファージが多数浸潤し、壊死組織や赤血球を食食する。N: 壊死巣、P: 門脈域、V: 中心静脈 Bar=40 μ m

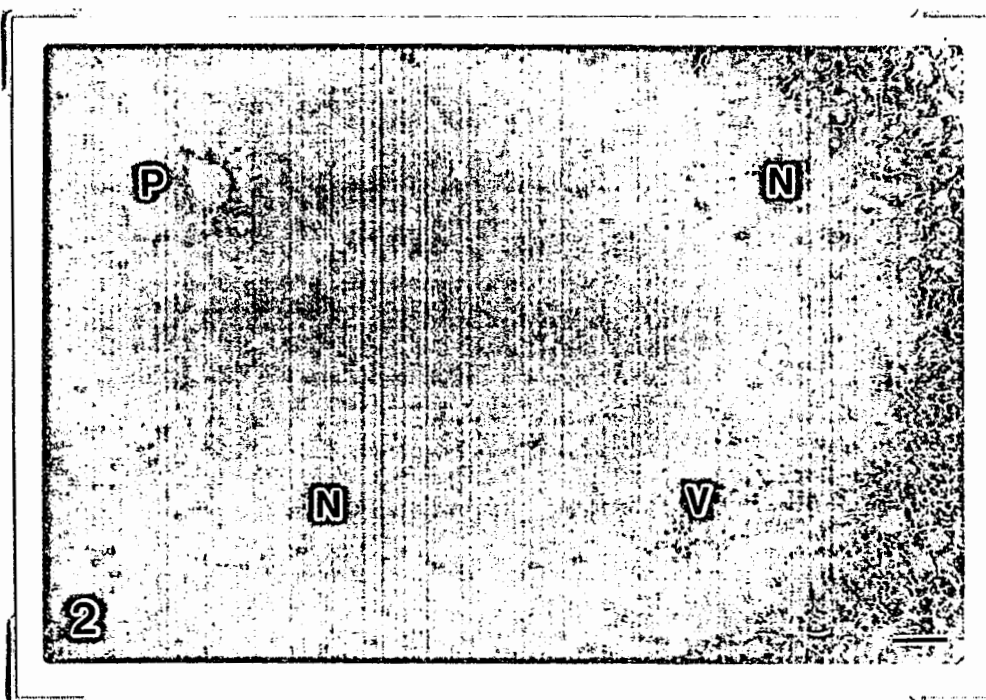


図2. DMN 投与 36 時間目. α -平滑筋アクチン (α -SMA) 免疫染色. 筋線維芽細胞に形質を転換した α -SMA 陽性肝星細胞は壊死巣内 (N) には認められない。P: 門脈域、V: 中心静脈 Bar=40 μ m



図3. DMN 投与 5 日目. 鍍銀染色（黒色）と α -平滑筋アクチン（茶色）2重染色. α -平滑筋アクチン陽性の筋線維芽細胞は（矢印）壊死と遺残した実質の境界部に出現し、不完全に残存した鍍銀線維に沿って壊死部に伸展する。H：肝実質、V：中心静脈 Bar=80 μ m

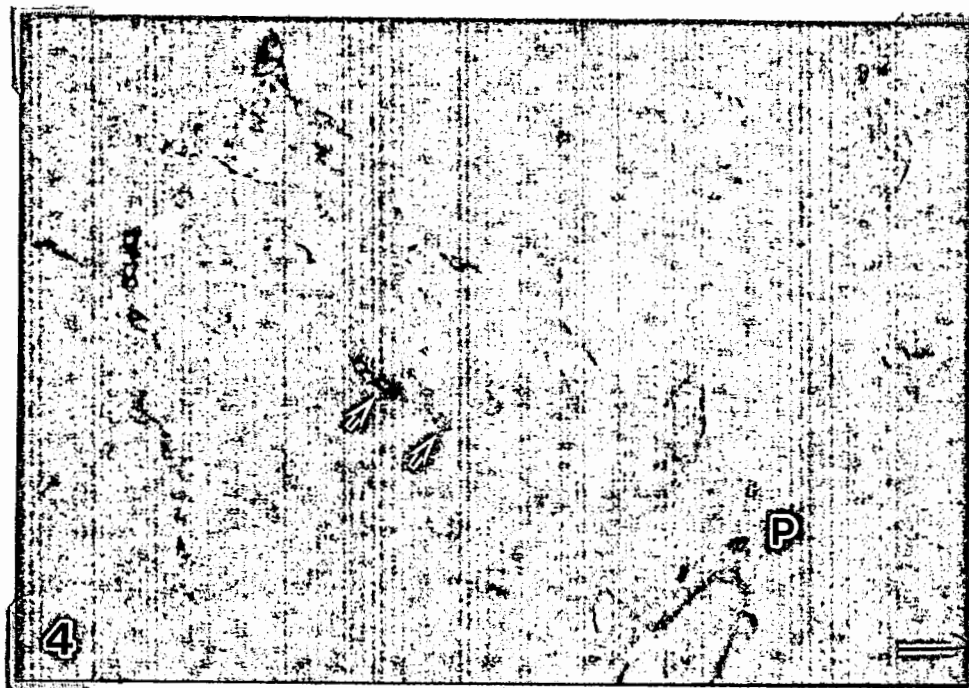


図4. DMN 投与 7 日目. BrdU（茶色）と α -平滑筋アクチン（ブルー）2重染色. 壊死巣周囲の肝実質内では α -平滑筋アクチンと BrdU 陽性の筋線維芽細胞（矢印）が散見される。P: 門脈域 Bar=40 μ m

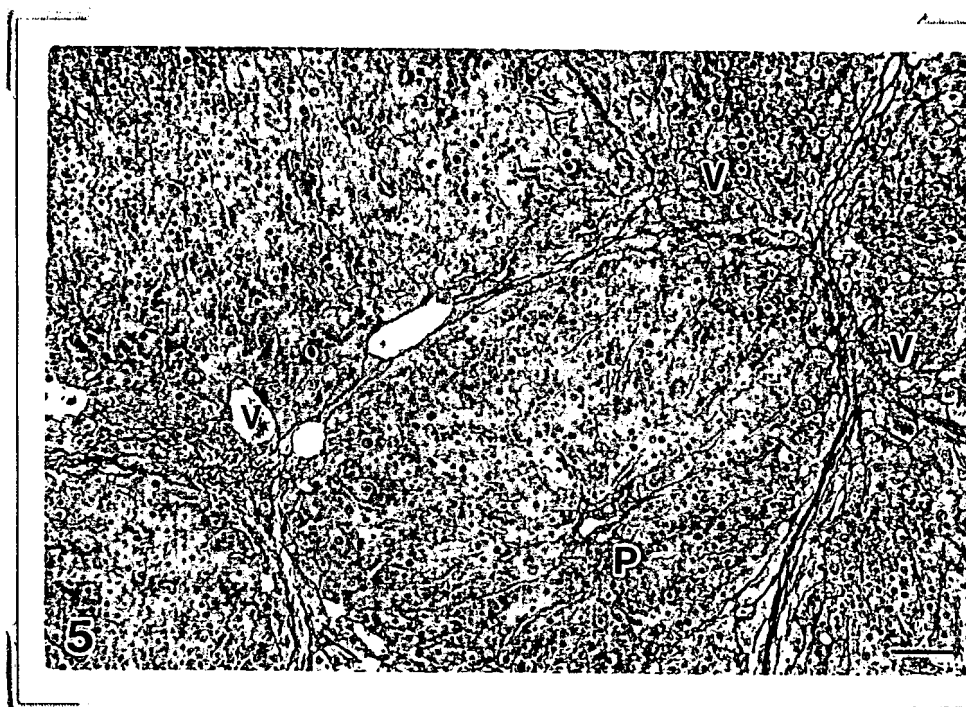


図5. DMN 投与 14 日目. α -平滑筋アクチン陽性筋線維芽細胞は中心静脈周囲、およびその部分から伸展する細い新生線維化束で認められる。P: 門脈域、V: 中心静脈 Bar=80 μ m

注：本研究は、2001 年 8 月 4 日「第 2 回 細胞病理談話会」、2001 年 9 月 28 日「第 3 3 回日本臨床電子顕微鏡学会」、2001 年 12 月 15 日「第 15 回肝臓洞壁細胞研究会」にて口演発表。

作成日：2002 年 3 月 11 日

2001年度日中医学協会共同研究等助成事業報告書

－在留中国人研究者研究助成－

2002 年 3 月 1 日

財団法人 日中医学協会
理事長 殿

研究者氏名 趙 冰樵 ⑩
 所属機関名 浜松医科大学薬理学講座
 指導責任者氏名 梅村 和夫
 職 名 教授
 所 在 地 〒 431-3192 浜松市半田山 1 丁目 20-1
 電話 053-435-2271 内線

1. 研 究 テ ー マ

抗血栓薬における脳出血のメカニズム解明と脳出血抑制法の探索

2. 本年度の研究業績

(1) 学会・研究会等における発表 (有) ・ 無 (学会名・演題)

(1) 学会名：第 74 回日本薬理学会総会.

演題：ヘパリンによる脳出血をラジカルスカベンジャーが抑制する一ウサギ中大脳動脈血栓モデルを用いて一.

(2) 学会名：XXth International Symposium on Cerebral Blood Flow, Metabolism and Function & Vth International Conference on Quantification of Brain Function with PET.

演題：The Combination of EPC-K1 and Heparin Enhances Neuroprotection in the Rabbit MCA Occlusion Model.

(3) 学会名：第 75 回日本薬理学会総会.

題名：ヘパリンによる脳出血における内因性 tPA および matrix metalloproteinases の役割：tPA ノックアウトマウス中大脳動脈閉塞モデルでの検討.

(2) 学会誌等に発表した論文 (有) ・ 無 (雑誌名・論文名)

(1) Combination of a Free Radical Scavenger and Heparin Reduces Cerebral Hemorrhage After Heparin Treatment in a Rabbit Middle Cerebral Artery Occlusion Model. Stroke 32 (9): 2157-2163, 2001.

(2) Cerebral hemorrhage due to heparin limits its neuroprotective effects: studies in a rabbit model of photothrombotic middle cerebral artery occlusion. Brain Res. 902 (1): 30-39, 2001.

(3) A novel MCA occlusion model of photothrombotic ischemia with cyclic flow reductions: development of cerebral hemorrhage induced by heparin. Brain Res Prot. In press.

(4) Tissue-type plasminogen activator has paradoxical roles in focal cerebral ischemic injury by thrombotic middle cerebral artery occlusion with mild or severe photochemical damage in mice. J Cereb Blood Flow Metab. In Press.

3. 今後の研究計画

脳梗塞の治療薬である抗血栓薬の大きな問題は副作用としての脳出血である。しかし、脳出血のメカニズムはほとんど解明されておらず、臨床での使用の際には脳出血を予知することは不可能である。そこで、我々は抗血栓薬の脳梗塞縮小効果と副作用である脳出血のリスク評価を一緒にできるモデルを確立した。

さらに、我々は t-PA (tissue-type plasminogen activator) と MMP (matrix metalloproteinases) という蛋白は脳出血に大きく関与していることを見つけて、それらの発現を分子薬理学的に経時的に追っていくことで局所の病態を詳細に検討する。

いまは、ヘパリンによる脳出血における t-PA と MMP-9 および MMP-2 の関連を in situ hybridization による mRNA レベルで検討している。さらに、抗酸化剤と抗血栓薬との併用で脳出血が抑制できることを我々は見つけたので、抗酸化剤を用いて t-PA と MMP の活性がどのように修飾されるか検討する。

4. 指導責任者の意見

趙氏は当薬理学、大学院博士課程3年生です。彼のテーマは、脳梗塞治療薬における脳出血のメカニズム解明とその予防方策の探索です。13年度には、日中医学協会から助成を頂きこのテーマで最も重要となる動物モデルの確立を成し遂げました。学会にも演者として積極的に発表し、有名英文雑誌にファーストオーサーとして掲載されました。現在、更に詳細なメカニズムを分子生物学的手法を用いて検討中です。大学院生としての研究期間は後1年ですが、さらなる発展が期待できる大変優秀な研究者と評価しております。

指導責任者氏名

田村 和夫

5. 研究報告書

別紙報告書作成要領により、添付の用紙で研究報告書を作成して下さい。

研究発表中または研究中の本人のスナップ写真を添付して下さい。

※研究成果を発表する場合は、発表原稿・抄録集等も添付して下さい。

※発表に当っては、日中医学協会助成金による旨を明記して下さい。

-血栓性脳梗塞モデルにおいてヘパリン投与により引き起こされる脳出血の検討-

研究者氏名	趙 冰樵
中国所属機関	首都医科大学 講師
日本研究機関	日本浜松医科大学薬理学講座
指導責任者	教授 梅村 和夫
共同研究者名	河野賢一、鈴木康裕 近藤一直、池田康彦

ABSTRACT

Intracerebral hemorrhage is the major complication associated with antithrombotic and thrombolytic therapy. Despite efforts directed toward achieving hemorrhagic infarction, an ideal animal model of cerebral hemorrhage has not yet to be established. Using the photothrombotic technique in rabbits, we developed a model of cerebral hemorrhage by inducing cyclic flow reductions in the middle cerebral artery (MCA). Furthermore, the hemorrhage increased 4-fold after infusion of heparin at a dose prolonging activated partial thromboplastin time by about 3 times that of control animals. The photothrombotic occlusion of the MCA is based on a thrombosis induced by endothelial injury through singlet oxygen produced by Rose Bengal injection and green light irradiation. Using a pulse Doppler flowmeter, spontaneous reperfusion of the MCA after the thrombotic occlusion following cyclic flow reductions was observed within 2 h in the majority of animals. This model is unusual with respect to the development of clinical stroke, because of the MCA cyclic flow reductions. Thus it is different from permanent or ischemia/reperfusion MCA occlusion in rodents and may be suitable for studying hemorrhagic risks associated with the use of antithrombotic agents.

Key Words Cerebral hemorrhage, heparin, photothrombotic occlusion, antithrombotic agents, cerebral ischemia, cyclic flow reductions

INTRODUCTION

Intracerebral hemorrhagic transformation are feared events that may follow antithrombotic and thrombolytic therapy in acute stroke, so high dose use of these agents has been limited [1].

To investigate the efficacy and safety of antithrombotic agents for treatment of stroke, ideal animal models of cerebral infarction with a good reproducibility, which are similar to the clinical situation, are required. Up to date, a variety of methods have been developed for this purpose by many investigators, but they are not yet satisfactory [2].

Based on photothrombotic technique, we developed a new model of intracerebral hemorrhage induced by antithrombotic agents after the rabbit MCA thrombotic occlusion [3].

Heparin is routinely used to prevent recurrent embolism and deep venous thrombosis [4]. Therefore, in the present study, we investigated the efficacy of heparin on cerebral ischemic damage in a rabbit model of MCA photothrombosis and in the same model, cerebral hemorrhage induced by heparin as its side effect was also investigated.

MATERIALS AND METHODS

1. Animals

Male Japanese white rabbits weighting 2.0–3.0 kg. Animals were housed individually in a cage with access to food and water on a 12 h light–dark cycle for one week.

2. Animal preparation

The experimental protocol was approved by the Hamamatsu University School of Medicine Committee on Ethics of Animal Experimentation, and extra care was taken to avoid animal suffering.

Male Japanese white rabbits weighting 2.0–3.0 kg were used. After one week of acclimation, the animals were anesthetized with 1–2% isoflurane (Dainihon Pharmaceutical, Tokyo, Japan) in 30% O₂ and 70% N₂O using a face mask. Body temperature was maintained at 38°C with a heating pad (K-module model K-20, American Pharmaseal Company). The right femoral artery was cannulated for blood sampling and the continuous recording of artery blood pressure and heart rate. Artery blood gases were monitored using a gas analyzer (model 860, Ciba-corning, MA, USA) just before and 2 h after the occlusion of the MCA.

A curved skin incision along the rim of the left orbital bone was made, the temporalis muscle was removed with a bipolar electric coagulator (model 80–1160, Valley Forge Scientific Corp., USA) and thermoknife. Under an operating microscope (model KOM 300, Konan Inc., Japan), a oval bony window was opened using a dental drill (model PAL-7, Morita, Japan); the dura mater was intact. With the help of the operating microscope, the MCA and the olfactory tract were identified. The irradiation with green light was directed by a 3-mm-diameter optic fiber mounted on a micromanipulator. The head of the optic fiber was placed on the dura matter just above the MCA where it passes over the olfactory tract, providing an irradiation dose of 0.170 W/cm² (wavelength, 540 nm). Intravenous injection of Rose Bengal (10 mg/kg body weight for 3 min through a peripheral ear vein) and photo-irradiation were started simultaneously. The photo-irradiation was continued for 60 min. The local blood flow in MCA was monitored continuously for 2 h after the injection of Rose Bengal using a pulse Doppler flowmeter (PVD-20, Crystal Biotech). The time taken from the start of photo-irradiation to the cessation of blood was regarded as the MCA occlusion time. After the closing of surgical wounds, animals were allowed to recover from the anesthesia.

After the scoring of clinical outcome at 24 h after photothrombosis, animals were anesthetized with an overdose of pentobarbital sodium and then immediately perfused transcardially with normal saline. Twelve consecutive coronal sections were cut from each cerebrum using a slicing apparatus (RBM-7000C, Activational Systems INC., Michigan, USA). All coronal sections were photographed immediately. Thereafter, the brain slices were stained with 1% triphenyltetrazolium chloride (TTC) for 30 min, fixed with buffered formaldehyde (pH 7.2) for 24 h and photographed again. The cerebral hemorrhage size and the infarct volume were measured using a computerized image analysis system (NIH Image 1.62 Program, Internet).

3. Administration of heparin and analysis of activated partial thromboplastin time

Heparin was diluted with saline and infused by infusion pump (model KDS-230, USA) at a delivery rate of 0.5 ml/kg/hr. In heparin-treated animals (n = 7), heparin was administered intravenously by injection as a bolus of 100 IU/kg followed by continuous infusion at 75 IU/kg/hr to 24 h, starting 2 h after the start of photo-irradiation. The vehicle-treated animals (n = 14) were infused continuously with saline.

Activated partial thromboplastin time (aPTT) was determined using an automatic Coagulometer KC 4 A (Heinrich Amelung, Germany) as previously described [3].

4. Examination of neurological deficits

At 24 h after photothrombosis, the neurological deficits of each animal were evaluated in a blind manner:

- Wryneck test: the animal was placed in a cage and the torsion of the neck was observed. Behavior was scored as follows: 0, normal; 1, twist of the neck.
- Righting reflex test: the animal was placed on its back, and scored as follows: 0, righted within 1 s; 1, righted within 5 s; 2, did not right within 5 s.
- Dysfunction of paws: the fore paw or hind paw was pulled toward the body. The time to re-extend the paw was scored as follows: 0, achieved within 1 s; 1, achieved within 5 s; 2, not achieved within 5 s.
- Postural reflex test: the animal was pushed in the contralateral direction and scored as follows: 0, normal; 1, reduced resistance to lateral push; 2, fell down on the contralateral side.

5. Data analysis

Data are represented as the mean \pm S.E.M. Parameters of cerebral blood flow and cerebral hemorrhage were analyzed by the two-tailed unpaired Student's t-test. The correlation between infarct volume and neurological score was analyzed using linear regressions. A *P* value < 0.05 was considered significant.

RESULTS

1. Experimental Conditions

All physiological parameters were within the normal range after the photothrombotic occlusion of the MCA.

In heparin-treated animals, aPTT was prolonged markedly at 24 h and about 3 times that of the vehicle group.

The green light irradiation system used in this study is a short-arc type xenon lamp (wavelength 540 nm, bandwidth 80 nm) which has a heat-absorbing filter and a green filter. The xenon lamp irradiation system did not heat the irradiated tissue near the MCA during photo-irradiation.

2. Blood flow in the MCA

The blood flow in the MCA was reduced to zero by the formation of a thrombus at 9.23 ± 0.58 min after Rose Bengal injection. Spontaneous reperfusion of the occluded MCA was observed within 2 h in 95.2% of animals. Spontaneous reperfusion of the MCA after the thrombotic occlusion following cyclic flow reductions was observed.

3. Cerebral hemorrhage volume as well neurological deficit

Infarct volume was 219.0 ± 14.1 mm³ in vehicle-treated animals and 226.6 ± 19.2 mm³ in heparin-treated animals. Hemorrhage was mainly observed in the basal ganglia in almost of animals. Heparin-treated animals had a 4-fold increase in cerebral hemorrhage compared with the vehicle-treated controls ($p < 0.0001$). Gross hemorrhage in the ventriculus lateralis and the basal ganglia was observed in 3 of 7 heparin-treated animals, while no gross hemorrhage was observed in the vehicle-treated animals.

In the control group, wryneck and contralateral forelimb flexion were frequently observed. A correlation between infarct volume and neurological score was observed ($r = 0.539$, $n = 21$, $p < 0.01$).

Heparin treatment tended to worsen neurological deficits at 24 h compared with the control group.

DISCUSSION

We have described a simple and reproducible model of heparin-induced cerebral hemorrhage achieved by spontaneous reperfusion of the occluded MCA following cyclic flow reductions. This photothrombotic occlusion model results in a platelet- and fibrin-rich thrombus in the MCA at the irradiated site [3,5]. In this study, the photochemical approach to inducing thrombotic occlusion is based on the injection of Rose Bengal and green light from a xenon lamp irradiation system. Rose Bengal is a photosensitive dye, and its photoactivation produces reactive oxygen species, mainly singlet oxygen by a 'photodynamic Type II' energy transfer [9]. Reactive oxygen species cause endothelial injury followed by the adhering and aggregating of platelets to fibrin nets, and the formation of a platelet- and fibrin-rich thrombus at the irradiated site [10].

The advantages of this model include occlusion of the MCA by a nonmechanical approach, and an intact dura mater to maintain normal intracranial pressure. Another important feature is the continued cyclic flow reductions in the MCA. Therefore, the present system represents a new approach to the occlusion of the MCA different from previously described models of permanent occlusion or ischemia/reperfusion [6-8]. In sixty percent of patients, the middle cerebral artery is spontaneously recanalized in the early phase of ischemic stroke without receiving thrombolytic therapy [11], and rethrombosis after thrombolysis is also frequently observed in the cerebral artery [12,13]. This suggests that cyclic flow reductions occur in the acute phase of human stroke. However, in permanent models [6], suture MCA occlusion models [8,14], and embolic MCA occlusion models [15,16], spontaneous reperfusion has not been observed. Therefore, this model is unusual with respect to the development of clinical stroke, because of the cyclic reductions in blood flow in the MCA.

The other advantages of the proposed model include: (1) A light source that is prefiltered and concentrated by an elliptical reflector that has a special coating for efficient absorption of infrared and ultraviolet radiation. (2) In this model, not only platelet but also fibrin is involved in the formation of the thrombus [10]. Therefore, in this model, a tissue plasminogen activator caused reopening of the occluded MCA and reduced cerebral infarction [10]. Recently, we established a thrombotic occlusion model in which spontaneous recanalization with cyclic flow reductions was observed [17]. Moreover in this model, we have demonstrated that a GPIIb/IIIa antagonist reduced cerebral infarction without enhancing cerebral hemorrhage [18], and a delayed administration of heparin initiated 2 h after thrombosis aggravated significantly cerebral hemorrhage [3]. More recently, we demonstrated that the combination of a free radical scavenger (EPC-K1) and heparin reduced heparin-induced cerebral hemorrhage and enhanced neuroprotection from cerebral ischemic damage in this model [19]. It is therefore suggested that the MCA occlusion model of thrombotic ischemia with cyclic flow reductions developed and reported from our laboratory is useful for investigating efficacies and hemorrhagic risks associated with antithrombotic agents for stroke research.

Our previous results showed that the longer the irradiation, the more continuous the cyclic flow reductions in guinea pig [17], and infarct volume was reduced when cyclic flow reductions through the MCA were prevented in rabbit [18]. In contrast, animals that had more cyclic flow reductions had a significantly larger cerebral hemorrhage volume. Therefore, in this study, we sought to establish a model in which cyclic flow reductions continued after reperfusion of the occluded MCA. Based on our preliminary studies, we used a low dose of Rose Bengal and low intensity irradiation, but a longer

irradiation time to produce a gradual vascular injury; under these conditions, cyclic flow reductions continued and cerebral hemorrhage also occurred.

In conclusion, based on photothrombotic occlusion of rabbit MCA, we have developed a new model of cerebral hemorrhage induced by heparin therapy. Spontaneous reperfusion of the MCA after the thrombotic occlusion following cyclic flow reductions is an important characteristic of this system. This model can be extended to determine the hemorrhagic risks associated with the use of antithrombotic agents.

REFERENCES

- [1] G. J. del Zoppo, Antithrombotic treatments in acute ischemic stroke, *Thromb Haemost.* 82 (1999) 938-946.
- [2] E.Z. Longa, P.R. Weinstein, S. Carlson, R. Cummins, Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats, *Stroke* 20 (1989) 84-91.
- [3] B.-Q. Zhao, Y. Suzuki, K. Kondo, K. Kawano, Y. Ikeda, K. Umemura, Cerebral hemorrhage due to heparin limits its neuroprotective effects: studies in a rabbit model of photothrombotic middle cerebral artery occlusion, *Brain Res.* 902 (2001) 30-39.
- [4] P.W. Majerus, G.J. Broze Jr., J. P. Miletich, D.M. Tollefsen, Anticoagulant, thrombolytic, and antiplatelet drugs, In: J.G. Hardman, L.E. Limbird, P.B. Molinoff, R.W. Ruddon, A.G. Gilman (Eds.), *Goodman and Gilman's The pharmacological basis of therapeutics*, 9th Edition, The McGraw-Hill Companies, Inc., New York, 1996, pp. 1343-1346.
- [5] A.R. Saniabadi, K. Umemura, N. Matsumoto, S. Sakuma, M. Nakashima, Vessel wall injury and arterial thrombosis induced by a photochemical reaction, *Thromb. Haemost.* 73 (1995) 868-872.
- [6] A. Tamura, D.I. Graham, J. McCulloch, G.M. Teasdale, Focal cerebral ischemia in the rat: 1. Description of technique and early neuropathological consequences following middle cerebral artery occlusion, *J. Cereb. Blood. Flow. Metab.* 1 (1981) 53-60.
- [7] S.T. Chen, C.Y. Hsu, E.L. Hogan, H. Maricq, J.D. Balentine, A model of focal ischemic stroke in the rat: reproducible extensive cortical infarction, *Stroke* 17 (1986) 738-743.
- [8] Y. Matsuo, T. Kihara, M. Ikeda, M. Ninomiya, H. Onodera, K. Kogure, Role of platelet-activating factor and thromboxane A₂ in radical production during ischemia and reperfusion of the rat brain, *Brain Res.* 709 (1996) 296-302.
- [9] G. Vandeplasseche, M. Bernier, F. Thone, M. Borgers, Y. Kusama, D.J. Hearse, Singlet oxygen and myocardial injury: ultrastructural, cytochemical and electrocardiographic consequences of photoactivation of rose bengal, *J. Mol. Cell. Cardiol.* 22 (1990) 287-301.
- [10] K. Umemura, K. Wada, T. Uematsu, M. Nakashima, Evaluation of the combination of tissue type plasminogen activator, SUN9216, and a thromboxane A₂ receptor antagonist, vapiprost in rat middle cerebral artery thrombosis model, *Stroke* 24 (1993) 1077-1081.
- [11] A.V. Alexandrov, C.F. Bladin, J.W. Norris, Intracranial blood flow velocities in acute ischemic stroke, *Stroke* 25 (1994) 1378-1383.
- [12] R. von Kummer, R. Holle, L. Rosin, M. Forsting, W. Hacke, Dose arterial recanalization improve outcome in carotid territory stroke? *Stroke* 26 (1995) 581-587.
- [13] R.C. Wallace, A.J. Furlan, D.J. Moliterno, G.H. Stevens, T.J. Masaryk, J. Perl, Basilar artery rethrombosis: successful treatment with platelet glycoprotein IIB/IIIA receptor inhibitor, *Am. J. Neuroradiol.* 18 (1997) 1257-1260.

- [14] D.J. Cowley, L. Lukovic, M.A. Petty, MDL 74,180 reduces cerebral infarction and free radical concentrations in rats subjected to ischaemia and reperfusion, *Eur. J. Pharmacol.* 298 (1996) 227-233.
- [15] P.A. Lapchak, D.F. Chapman, J.A. Zivin, Pharmacological effects of the spin trap agents N-t-butyl-phenylnitron (PBN) and 2,2,6,6-tetramethylpiperidine-N-oxyl (TEMPO) in a rabbit thromboembolic stroke model: Combination studies with the thrombolytic tissue plasminogen activator, *Stroke* 32 (2001) 147-153.
- [16] Y. Yang, Q. Li, H. Miyashita, W. Howlett, M. Siddiqui, A. Shuaib, Usefulness of postischemic thrombolysis with or without neuroprotection in a focal embolic model of cerebral ischemia, *J. Neurosurg.* 92 (2000) 841-847.
- [17] K. Kawano, Y. Ikeda, K. Kondo, K. Umemura, Increased cerebral infarction by cyclic flow reductions: studies in the guinea pig MCA thrombosis model, *Am. J. Physiol.* 275 (1998) R1578-R1583.
- [18] K. Kawano, K. Fujishima, Y. Ikeda, K. Kondo, K. Umemura, ME3277, a GPIIb/IIIa antagonist reduces cerebral infarction without enhancing intracranial hemorrhage in photothrombotic occlusion of rabbit middle cerebral artery, *J. Cereb. Blood. Flow. Metab.* 20 (2000) 988-997.
- [19] B.-Q. Zhao, Y. Suzuki, K. Kondo, Y. Ikeda, K. Umemura, Combination of a free radical scavenger and heparin reduces cerebral hemorrhage after heparin treatment in a rabbit middle cerebral artery occlusion model, *Stroke* 32 (2001) 2157-2163.

注: 本研究は Brain Research Protocols に掲載予定である。

作成日: 2002 年 3 月 1 日

2001年度日中医学協会共同研究等助成事業報告書

－在留中国人研究者研究助成－

2002年 3月 3日

財団法人 日中医学協会
理事長 殿

研究者氏名

李燕

印

所属機関名

東京大学薬学系研究科薬生薬理細胞化学教室

指導責任者氏名

岡本和久

職名

教授

所在地

〒113-0033 東京都文京区本郷7-3-1

電話

03-5841-2820 内線

1. 研究テーマ

*Characterization of replication genes of *Staphylococcus aureus**

2. 本年度の研究業績

(1) 学会・研究会等における発表

有

無

(学会名・演題)

(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

The *Bacillus subtilis* DnaD protein was reported to interact with the famous DNA replication initiation protein DnaA by Yeast Two-hybrid assay. And it also was reported to be a component of replication primosome, both in DnaA-dependent DNA replication initiation at *oriC* and in PriA-dependent DNA replication restart at a stalled replication fork. However, the functions of the *dnaD* gene remains unknown. From now, I will engage to clarify the functions of the *dnaD* gene. Firstly, to identify the mutation site of the *dnaD* gene in the *dnaD*^{TS} mutants. Secondly, over-production and purification of *S. aureus* DnaD protein. Thirdly, to establish the *oriC*-replication complementation analysis system *in vitro*. Fourthly, to determine the effect of DnaD on the DnaA protein activity.

4. 指導責任者の意見

李燕さんは、黄色ブドウ球菌の複製タンパクに関する研究に従事し、いくつかの重要な業績を挙げました。まず初めに李さんは、黄色ブドウ球菌の温度感受性変異株を分離し、その温度感受性を相補するいくつかの遺伝子の同定に成功しました。さらに、李さんは、2つの温度感受性変異株について、*dnaD* という遺伝子により温度感受性の増殖が相補されることを見出しました。*dnaD* 遺伝子は枯草菌で同定された遺伝子ですが、黄色ブドウ球菌での報告はなく、李さんの研究が初めてであります。また、この遺伝子の研究は、大腸菌では全く例がありません。さらに李さんは、放射標識したチミジンの取り込みで見た DNA 合成がこの変異株では高温で低下していることを示しました。この結果は、黄色ブドウ球菌の *dnaD* 遺伝子が DNA 複製に必須の役割を果たしていることを示すものであります。さらに李さんは、*dnaD* 変異株が高温条件下では速やかに死滅することを発見しました。この結果は、この遺伝子の産物である DnaD タンパクの活性が失われると、細胞死がおこることを示しており、DnaD タンパク質が殺菌性を有する抗菌剤のよいターゲットとなり得ることを示唆するものです。以上の研究成果は、細菌の分子遺伝学における研究業績として、国際的にも高く評価されるべきものであり、近い将来、研究論文として学会誌に発表できると考えられます。したがって私は、李燕さんが、当初の期待通り、立派な研究成果を挙げたと高く評価しています。

指導責任者氏名

関水 和久



5. 研究報告書

別紙報告書作成要領により、添付の用紙で研究報告書を作成して下さい。

研究発表中または研究中の本人のスナップ写真を添付して下さい。

※研究成果を発表する場合は、発表原稿・抄録集等も添付して下さい。

※発表に当っては、日中医学協会助成金による旨を明記して下さい。

2001年度日中医学協会共同研究等助成事業報告書

—学会開催に対する助成—

2001年11月12日

財団法人 日中医学協会
理事長 殿

報告者氏名 小濱一弘
 所属機関名 群馬大学 医学部
 職 名 教授
 所 在 地 〒371-8511 前橋市昭和町3-22
 電話 027(220)7960 内線 9400

1. 学術会議の名称 大連医科大学・群馬大学医学部・大学改革フォーラム
 テーマ 大学改革フォーラム
 主催者 群馬大学 医学部 国際交流委員会 代表者氏名 小濱一弘
 期 間 2001年 9 月 20 日 ~ 9 月 21 日 開催地 前橋市
 参加者数 日本側 151 名 中国側 2 名
 招聘・派遣の目的 大連医科大学より代表を招聘し、両校の間に共通する
大学改革の問題と協議すると共に、学術の交流、留学生の
交流、市民との交流を図る

2. 招聘・派遣研究者 人数 2 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
姜 潮	大連医科大学・学長	臨床心理学
李 昌臣	大連医科大学・主任教授	内科(糖尿病学)

3. 主な滞在日程

滞在期間 自 2001 年 9 月 18 日 至 2001 年 9 月 21 日

9月18日 成田着 (成田泊)

9月19日 前橋着 前橋市民との交流と研究

9月20日 北関東医学会 学術講演と研究

群馬大学と関係者による大学改革に関する研究会

留学生との交流と研究

9月21日 群馬大学・信州大学 ←→ 長春中医药大学・大連医科大学にて
テレビ回線を利用して、相互研究の生活習慣病
に関するフォーラムと研究会

9月22日 前橋発・国内旅行に帰国

4. 学術会議報告書

別紙報告書作成要領に準じ、添付の用紙で成果・今後の課題等を報告して下さい。

抄録集・プログラム・写真等、学会に関する資料を添付して下さい。

5. 収 支 報 告

交付を受けた金額 46万 円

支出内訳 (旅費・宿泊費・印刷費その他の科目別に記載、別紙可) 領収書コピーを添付すること。

科 目	金 額	備考 (用途・内訳)
旅費	234,912	航空代金 (大連・成田)
"	25,000	国内移動 (JR等他)
宿泊費	200,088	ホテル代金 (グリーン)

大連医科大学・群馬大学医学部・大学改革フォーラム

研 究 者	姜 潮 教授、李 昌臣 教授
中国所属機関	大連医科大学・校長
日本研究機関	群馬大学医学部
指 導 責任者	教授 小濱 一弘

要 旨：大連医科大学と群馬大学医学部は共に国家計画としての大学改革にまき込まれているが、大連医科大学より姜 潮学長と李 昌臣教授をお招きして、意見を交換した。この内容はテレビ中継で中国にも伝えた。研究者の学術交流ならびに市民との親睦の機会を持った。

Key Words：学術交流、大学改革

緒 言：大連医科大学との交流は平成元年に笹川医学研修生として林 原君を群馬大学医学部にあずかったことから始まります。林 原君はその後何回か来日し、努力の結果、本学で医学博士の学位を得ています。また、これまで両大学間のパイプ役として交流に協力してくれました。おかげで、お招きできた役職のある教授方は10名をこえ、あずかった大学院生が15名以上。そのほとんどが国費留学生であります。受け入れ側の教室も私が担当する薬理学教室のみならず、7つの講座・研究施設にまたがっています。一方、群馬大学側からは私が年に1～2回何らかの機会をとらえて訪問していますが、最近では前学部長や現学部長を含む何人かの教授が出張しセミナーや講義を行っています。当然のことながら学術交流協定は平成9年に締結し、現在は2期目に入っています。この様な研究者間の交流ばかりでなく、もっと若い世代に何十年にもわたる交流をしてもらうべく、平成10年からは毎年2人ずつ医学生を短期的に派遣しています。今年(平成13年度)からは群馬大学医学部に小さな資金ができ、派遣ばかりでなく、大連医科大学より医学生を受け入れる事ができるようになりました。市民との交流も活発に行っており、平成12年前橋市ユネスコ協会のメンバーが大連医科大学を訪問した。平成13年には大連市より同協会が市民マラソン参加者を招待しました。

成果内容：日中医学協会のサポートにより平成13年9月に大連医科大学の姜校長と内科主任教授の李先生を群馬大学医学部にお招きする事ができました。学術交流では群馬大学医学部が主催する北関東医学会に併合して開かれました。お2人の先生の専門分野(姜教授は自殺問題、李教授は糖尿病問題)を中国の国情に照し合せて話をしてもらいました。特筆すべきことは、群馬大学医学部・酒巻教授のお骨折りで衛星回線と電話回線を利用して群馬大学・信州大学 \longleftrightarrow 長春中医学院・大連医科大学とでテレビ中継された事です。

群馬大学・学長室のある荒牧キャンパスを訪問し、両大学の学長並びに関係者によるフォーラムでは大学改革の問題が話されました。大連医科大学では総合大学化の問題、群馬大学では独立法人化の問題があり、大学改革の必要性和同時に困難性について意見が一致したようでした。中国でのひとりっ子政策、日本での少子化という若年者の数の減少も共通した話題となりました。同キャンパスにある留学生センターを訪問し、所長との懇談、及び現在建設中の留学生会館見学を行いました。また夕方には一昨年に大連を訪問した前橋ユネスコ協会のメンバーと親睦の機会をもちました。

今後に残された問題と発展：大学の改革のフォーラムは大連医科大学が他の大連市の大学と合併し、総合大学化するという昨年来の計画が失敗した事もあり、正面に出して行えませんでした。姜学長によれば、サルはサルでヒトはヒト、両者が一緒になるのは困難であるということでした。幸いに群馬大学はすでに総合大学化しているということで合併問題はないこと、そして、むしろ独立法人化して社会との対応を広げてゆく事が要求されていることを説明しました。後者に関しては、大連医科大学におけるスポーツ・ジムの開設計画が披露されました。この計画に対し、前橋市民との交流のもとで協力することを約束しました。

学術交流とテレビ会議に関しては成果欄に記入した通りですが、群馬大学側において中国に対する関心が深まり、引いては留学生招待、市民交流の推進に役立つと思われます。両先生が帰国されその一週間後に大連医科大学より2人の医学生が来日しました。

作成日2001年11月12日

2001年度日中医学協会共同研究等助成事業報告書

－学会開催に対する助成－

2002年 2月 / 日

財団法人 日中医学協会
理事長 殿

報告者氏名 大田 仁 史

所属機関名 茨城県立医療大学付属病院

職 名 院長

所 在 地 〒 300-0331 茨城県稲敷郡阿見町阿見4733

電話 0298-88-9210 (直通) 内線

1. 学術会議の名称 リハビリテーション・ケア合同研究大会沖縄2001

テ ー マ 新世紀を迎えてより身近なところで御万人 (ウマンチュ・みんなで)
主 催 者 リハビリテーション・ケア合同研究大会沖縄 2001事務局 代表者氏名 宮里 好一

期 間 13 年 10 月 25 日 ~ 10 月 26 日 開催地 沖縄県那覇市

参 加 者 数 日本側 2300 名 中国側 2 名

招聘・派遣の目的

リハビリテーション・ケア合同研究大会沖縄2001の学会で上海の地域リハビリテーション
の現状を話してもらうため

2. 招聘・派遣研究者 人数 2 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
楊 柯 君	上海市石門地域衛生サービスセンター 助教授	「上海市脳卒中防止計画」 「慢性病地域リハビリ研究」
大西 幸子	蘇州大学国際文化交流学院 学生 (語学留学)	通訳

3. 主な滞在日程

滞在期間 自 13 年 10 月 23 日 至 13 年 10 月 28 日

13年10月23日 上海から福岡着 沖縄泊
 10月24日 沖縄 病院施設視察
 10月25日 沖縄 学会参加・発表
 10月26日 沖縄 学会参加
 10月27日 沖縄 病院施設視察
 10月28日 沖縄から上海着

4. 学術会議報告書

別紙報告書作成要領に準じ、添付の用紙で成果・今後の課題等を報告して下さい。

抄録集・プログラム・写真等、学会に関する資料を添付して下さい。

5. 収 支 報 告

交付を受けた金額 240,000 円

支出内訳（旅費・宿泊費・印刷費その他の科目別に記載、別紙可）領収書コピーを添付すること。

科 目	金 額	備考（用途・内訳）
旅費	137,280円 8,280円	往路 上海→福岡→沖縄, 復路 沖縄→上海 航空券2人分 空港から会場までのタクシー代
宿泊費	140,000円	10月23日～28日までの2人分の宿泊費

上海市中心地区における地域リハビリテーションの模索と実践

研究者氏名 楊柯君
中国所属機関 中国上海市石門地域衛生サービスセンター 助教授
日本研究機関
指導責任者
共同研究者名

要旨

地域における、衛生、サービス、予防、保健、計画出産指導、健康教育の6機能のうち、調査によると、地域リハビリテーション（以下リハと略す）は、現在相対的に遅れているが、その原因は概ね、国内の地域リハが草創期の段階であり、完全なレベルにいたる経験とモデルケースがないこと、社会民生部、障害者連合会、医療衛生などのリハ部門間の協力関係がないこと、地域リハ技術の開発・研究に人材が不足していること、などによる。われわれは、上海市の衛生業務の特性を充分に活用するとともに、地域でリハ医療を必要とする人たちに系統的なシステムに基づいてサービスが提供されるようにすることを提言する。例として、脳卒中による障害者に地域でリハサービスが受けられるようにするために地域リハにかかわる組織を創設し、地域におけるリハ医療の流れの管理モデルを作った。数年にわたって試行しながら、リハにかかわる専従の人材グループの養成を行った。同時に機能評価システムを作成した。その結果、地域衛生サービスの全体的な向上がみられた。

Key Words : 地域リハビリテーション、上級下級病院の連携、ネットワークづくり、全科医師養成

緒言

上海市は、「中国人民共和国国民経済と社会発展第十5ヶ年計画要綱」に基づきリハ医療が国家政策の一つとして展開されつつある。事業は、1) 国民経済全体計画にリハ医療を組み込む、2) 地域リハの展開の原則と方法を提示、3) 全科医師養成を中心にした地域リハの展開、の3つの大きな枠組みの中で行われる。

リハ医療の中でも脳卒中の占める割合は大きく、発病の予防、治療、リハ医療に至る系統的な対策が望まれる。上海市の調査によると、近年、脳卒中の発症年齢が早まり、発病率も増加の傾向にある。上海の某センターの住民区における調査では、地域人口7.8万に対し、60歳以上の高齢者人口は18.65%を占め、2028年には35.6%に達すると予測されている。主要な疾病と死因の統計では心臓及び脳血管疾患が首位を占め、35-74歳の2万人の調査では25%が高血圧である。

上海市の脳卒中の年間発病率は10万人対256例、過去3年間の合計は630例、そのうち死亡したものが247例で発病総数の39.21%を占め、生存者は383例60.79%であった。生存患者のうち、67.8%は全介助または部分介助を要する。脳卒中の身体障害は患者の日常生活の自立及び社会的なコミュニケーション機能に影響し、本人および家庭、社会の生産性に影響を与える。家族のみならず社会の介護を必要とするからである。調査によると、脳卒中障害者の介護は、38%が配偶者、12%が子供、32%家政婦、8%が社会援助、10%が病院もしくはナースিংホームで行われ、社会、家庭、個人の負担が増えている。

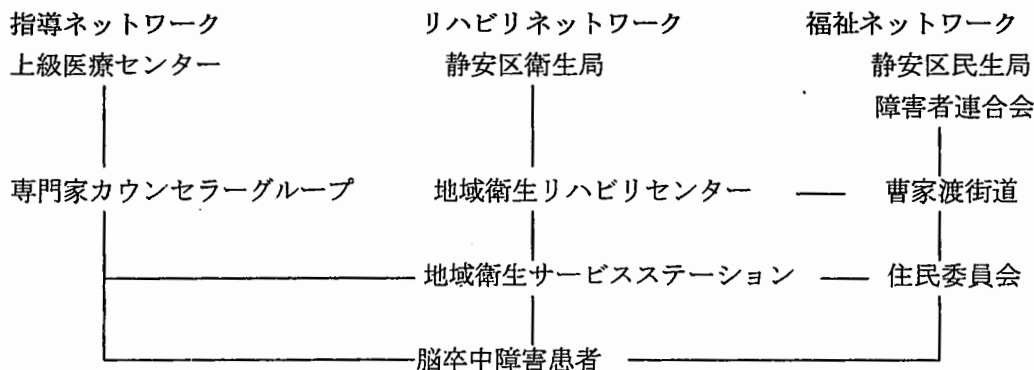
上海市はこれらの諸状況の中で、国の示した事業の枠組みに基づきながら独自の施策を模索し実践しているその概要を整理し報告する。

結果

1 組織

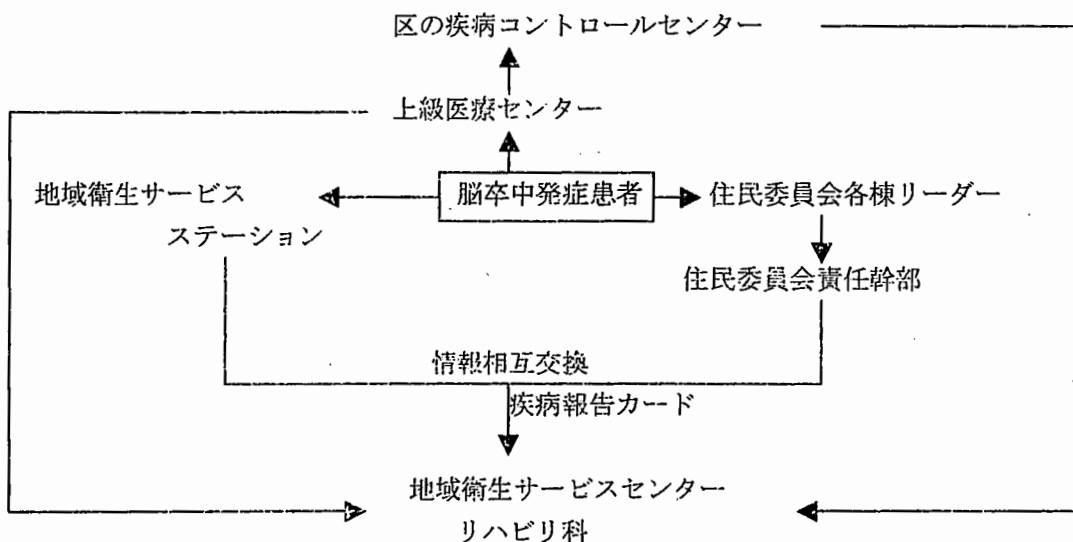
現在、地域リハは、行政、民政、医療でそれぞれに行われ統一されていない。したがって、脳卒中患者は退院後、地域でのリハ訓練に関して有効かつ系統的に管理されておらず、脳卒中後の患者も十分に身体の残存能力の改善や再建がなされていなかった。中国の状況に合った地域リハ組織と訓練手法を確立し、発病直後から総合的な取り組みをどのように行うかは、重要な検討課題といえよう。そのような観点から、現在地域の組織化と実情に見合ったリハの提供内容について総括的な構想をたて、地域衛生サービスステーションのネットワークを構築し、管理者グループ及び専門家指導グループの組織化を図っている。

(1) 脳卒中者のための地域衛生ネットワーク



(2) 疾病報告ネットワーク

脳卒中は早期リハを行うことで、患者の機能回復率を高めるだけでなく急性期の入院周期を短縮できる。地域のリハ組織が、患者の疾病情報やリハ訓練の情報を持っていなければ患者が地域に戻ってきた際に地域リハは適切に行われない。住民疾病報告は「病院による疾病報告を主とし、住民による疾病報告を従とする」という基本方針で行っている。区衛生局は区域内の医療センター（現在2級病院に限定、2002年には3級病院まで拡大）に疾病報告カードを区の疾病コントロールセンターに提出させ、区の疾病コントロールセンターは毎月2回地域の衛生サービスセンターに情報を伝達する。これは経済的かつ効率的な地域疾病報告ネットワークシステムといえる。



(3) 管理者グループの設立

地域の民政、障害者連合会、住民委員会、地域衛生サービスセンターから構成される組織である。定期的に会議を開き、当該地域の地域リハのために方針決定と協同業務の責任を負う。また定期的に専門家の意見を聞き、地域リハの技術的な方向性を検討し振興に努める。

(4) 専門家指導グループの設立

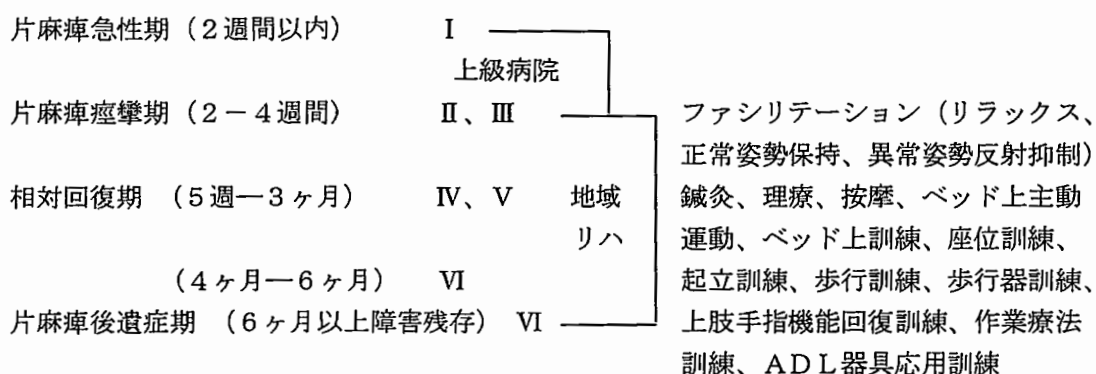
2, 3 級病院のリハ医学の専門家を技術顧問として招き、関係する人々の研修・養成を担う。リハ訓練士は定期的に臨床指導を行い、リハ技術のレベルを維持向上させる職責を担う。双方から意見を出し研究する。

2 人材養成グループ設立

地域リハが展開できるかどうかは、地域リハに携わる者のレベルが鍵となる。レベルの保証には人材グループの教育が保証されていなければならない。そこで我々は地域リハの人材養成計画を制定した。卒後教育や職場研修の長期計画を十分に活用し、現任の全科医師、按摩、鍼灸、理療の医師に対して、地域リハ訓練の系統的な研修を強化した。また毎年実習に来るその年の優秀な本科生に地域リハの課題研究を義務づけ、地域リハ領域に若い彼らが才能と創造性を発揮できるようなはからうなど、一歩ずつ地域リハ医療従事者の主力人材を養成している。

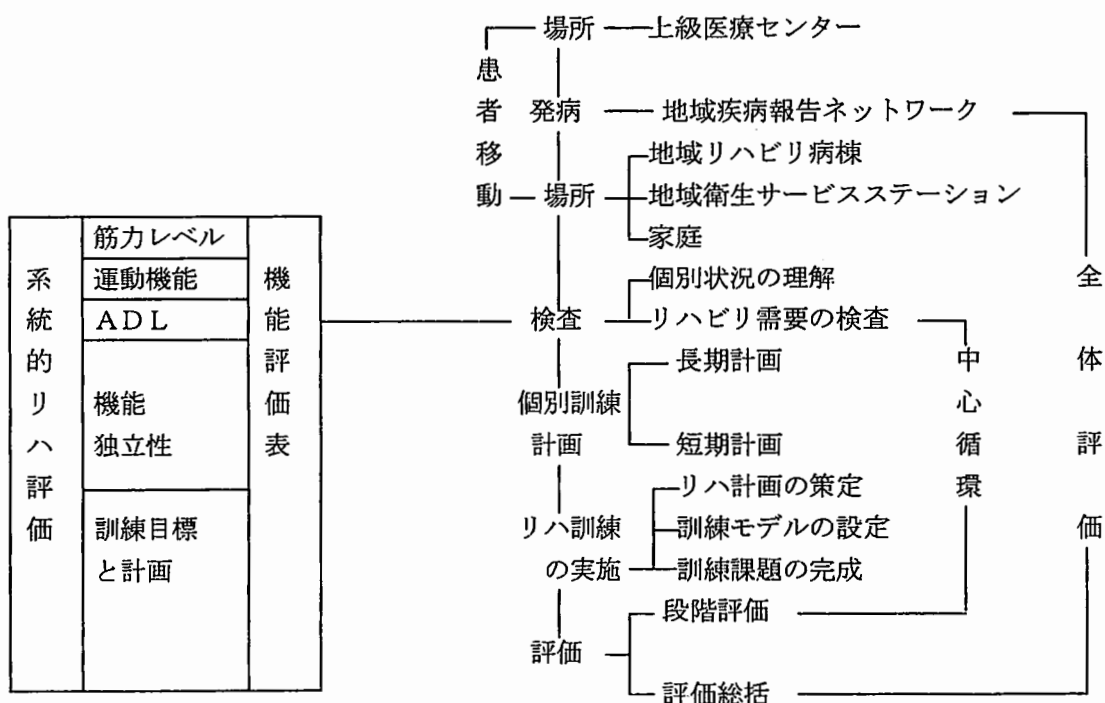
3 地域リハの適切なテクニック

(1) 国内外のリハテクニックを参考にし、片麻痺のリハ手法に加え、物理療法、按摩鍼灸を合せ、地域医療に適した方法を用いる。また、経済的なリハ器具を使用して、各家庭の環境に応じた訓練を行う。



(2) 地域にはリハ専門治療士が不在であり、地域リハに適した訓練もないため、急性期後、上級医療センターから地域に戻ってきた患者は、どの患者に対しても継続して有効なリハ訓練が系統的に指導できるという保証はない。PT、OT等の専門技術が提供されないことは、地域リハの発展の障害となっており、優先して解決しなければならない課題である。我々はBrunnstromの各期と対応するリハ医療徒手体操を作り、リハ治療士の人材不足に暫時対応すると共に、地域で個別訓練や集団療法の実践として活用している。さらにデータ分析を行い、完成度の高い地域リハに適した訓練にしていきたい。

(3) 国内外におけるリハ医学でよく使用される身体機能、ADL評価表を取り入れ、定期的にリハ評価を行う。また、個人の訓練カルテを作成し、個々に合ったリハ計画を作成し訪問指導を行ってきた。訓練前後の機能評価を行い、訓練計画、運動処方等の修正する。



(4) 身体機能の改善の程度によって患者のADL能力はかなりの影響を受けるが、リハの過程では住居についても注意すべき背景因子になる。リハ工学的な原理に基づいて個別にニーズに合わせた経済的なADL自助具を開発して日常生活の自立能力が最大限発揮されるようにし、患者のQOLを高める。

4 地域リハを推進する環境

地域リハを進めるにあたっては、地域住民の社会的連帯感と相互扶助精神を啓発し、障害者と健常者間の垣根をとりはらい、相互に理解しあえるような地域のボランティアを養成しなければならない。

(1) 地域ボランティアグループの活動内容

- ① ボランティア活動を開始、組織する。
- ② ボランティア、家族、介護士、家政婦を組織し、研修の機会を設ける。
- ③ 障害者を支援し、文化・スポーツ活動を行う。
- ④ 障害者と健常者の相互交流活動を組織する。

脳卒中身体障害の地域リハは、在宅療養だけをいうのではない。とくに患者の積極性を引き出すことが必須で、そのために主体的な社会参加を促し、脳卒中身体障害リハ倶楽部の活動を推進する必要がある。

(2) 脳卒中身体障害リハ倶楽部の活動内容

- ① 疾病克服への自信をもつ。
- ② 自分に合ったリハビリの方法を習得する。
- ③ 家庭でのリハビリ計画を設定する。
- ④ 自己管理能力を養う。
- ⑤ 相互交流において技能を高める。

考察

- ・地域リハで利用可能な社会資源

WHOは地域リハの定義として「地域の資源のレベルに応じたリハアプローチがなされ、これらのアプローチは地域資源を活用するためこれらに依存するものである。全体として、これらの過程は障害者自身及びその家族と社会を包括するものである」としている。我々は、適切な時期に脳卒中身体障害者が地域リハのネットワークに参入できるようにし、適切な技術研究を検討し、地域資源を利用した。地域で新たに発病した脳卒中患者に対し住民委員会疾病報告ポストや、地域衛生サービスセンター、上級医療センターなど複数の発病報告方式を活用して、地域の衛生サービスの特性を生かし、発病から地域リハにいたる総合的な流れに乗れるようにした。

急性期が過ぎ上級医療センターを退院して地域に帰ってきた患者に対しては、段階的かつ選択的に地域の衛生サービスセンター（地区病院）のリハビリ病棟、地域衛生サービスステーション、家庭及び地域リハ健康センターなど多様な施設を利用して医療及び総合的なリハアプローチを行っている。これにより患者及び障害者の潜在能力を引き出し、喪失した身体機能の再建と改善および生活自立能力を高め、「病はあれど障害を残さず、障害はあれど廃人とはせず」をめざした。また、国内外でよく使われる運動機能障害及び生活能力評価表を用いて得た成果に基づき適切な地域リハのネットワーク、サービスマニュアルを作成、脳卒中後遺症者の地域リハにふさわしい訓練を行える人材グループの育成を行った。これらによって、地域全体のリハシステムの構築が促進され、障害者数を把握するデータバンク、地域リハビリの評価システムが作られた。また行政による医学、教育、職業といった各方面が共同責任で行う環境が整い、地域における障害者の心身の改善ならびに家庭、社会における全体的な健康が促進されることとなった。

・地域リハの展望

近年、先進国、発展途上国を問わず地域リハは等しく関心を集め、WHOも大々的に提唱している。地域リハは、高齢化社会、疾病状況の変化、また都市家庭の小規模化、核家族化に対応するものである。我が国においては、地域リハが発展する上で多くの有利な条件がある。つまり2級政府による3級管理、また政府の大衛生管理体制は、地域リハにとっては組織を構築していく保証が得られているといつてよい。そのため着手されはじめた地域衛生サービスネットワークも、すでに初期段階を経ようとしている。上層部のリハ医学の専門家が21世紀にむけて戦略を練り、地域リハの領域に積極的に参加すれば地域リハに適した技術研究と地域リハの人材養成が可能になり、地域リハを支持する環境を作り上げることができるだろう。

地域リハは、我が国ではまだ草創期段階であり、地域リハにあった技術は実践の中で一步一步検証している。しかしすでにその厚き氷は打ち破られ、道は通じているといえよう。我々は絶えざる試行錯誤をしながら地域サービスにおけるリハ機能を強化し、特徴を打出し地域衛生サービスの優れて持続的発展を実現していきたい。

参考文献

1. 卓大宏 21世紀の地域リハビリ 中国リハビリ医学雑誌、2000. 6(15):327

本研究は、2001年10月25日「リハビリテーション合同大会沖縄・2001」のシンポジウムで口頭発表された。財団法人日中医学協会の助成を受けた。

作成日：2002年2月1日

（翻訳：大西幸子、監訳・文責：大田仁史）

2001年度日中医学協会共同研究等助成事業報告書

—学会開催に対する助成—

2002年 1月 7日

財団法人 日中医学協会
理事長 殿

報告者氏名

白東七七五

所属機関名

日本医科大学 形成外科

職 名

主任教授

所 在 地

〒113-8603 文京区千石1-1-5

電話 03 5814 6208 内線

1. 学術会議の名称

第12回 日中形成外科学術交流会

テ マ

日本と中国に於ける形成外科学の学術交流

主 催 者

白東七七五

代表者氏名

白東七七五

期 間

113年 11月 9日 ~ 11月 11日

開催地

東京

参 加 者 数

日本側 95名

中国側

47名

招聘・派遣の目的

日中形成外科学術交流

2. 招聘・派遣研究者

人数 47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
魯 開化	西安市西京医院整形外科中心・教授	形成外科学
高 建華	第一軍医大学南方医院・教授	
梁 建	深圳市福田区香密湖医院・副主任医师	
蔡 景龍	山東大学済魯医院・副教授	
宋 修軍	青島大学医学院市立医院・教授	
黄 金井	中国医学科学院整形外科医院・教授	
章 慶国	南京大学附属中大医院・副教授	
王 玉新	中国医科大学附属第一医院・教授	
林 子豪	上海第二軍医大学長征医院・教授	
薛 瑞蓉	呼和浩特教育科学研究所・副主任医师	
他 38名		

3. 主な滞在日程

滞在期間 自 1913 年 11 月 9 日 至 1913 年 11 月 12 日

11月9日 夕 来日。
11月10日 学会。
11月11日 学会。
御光(午後)

4. 学術会議報告書

別紙報告書作成要領に準じ、添付の用紙で成果・今後の課題等を報告して下さい。

抄録集・プログラム・写真等、学会に関する資料を添付して下さい。

5. 収 支 報 告

交付を受けた金額 400,000 円

支出内訳(旅費・宿泊費・印刷費その他の科目別に記載、別紙可)領収書コピーを添付すること。

科 目	金 額	備考(用途・内訳)
学会業者(事務、 人件費、材料 など)	3,540,000	メヂカルコンベンション。
会場費	1490,000	東京弥生会館。
宴会御光費	2,410,000	東天紅, はとバスなど。
印刷費	890,000	プログラムなど。
その他	4,940,000	招待費用, 人件費, 通信費, 雑費など。

第12回日中形成外科学術交流会を主催して

主催者氏名	百束比古
日本所属機関	日本医科大学形成外科学講座（主任教授） 学校法人日本医科大学国際交流センター（長）
後援	社団法人日本形成外科学会

要旨

第12回日中形成外科学術交流会は、日中医学協会の助成のもとに2001年11月10、11日の両日、東京は上野の弥生会館において成功裡に開催された。参加者は日本から95名、中国から53名、他に日本から2名、中国から2名、またスイスから2名、豪州から1名の著明な形成外科医を講演者として迎えた。今回の特別講演は、東京女子医大野崎幹弘教授に食道癌手術後の発声再建まで考慮した遊離空腸移植術について、また中国側からは上海のZhong Gang（宋業光）先生には気管の同種移植の可能性について御講演頂いた。さらに、岡山大学の光嶋勲教授を招いて、トピックスである穿通枝皮弁について講演して頂いた。対応して、広州第一軍医大学のGao Jian-hua（高建華）教授に世界に先駆けて開発した大腿部の穿通枝皮弁の解剖と臨床について多くの症例を供覧し教示して頂いた。招待講演としては豪州ローヤルプリンスアルフレッド王子病院形成外科主任であるDavid G. Pennington博士を招き、遊離腹直筋皮弁を用いた乳房再建の卓越した成績や、最新の血管吻合技術を供覧してもらった。またスイスはローザンヌ大学からDaniel V. Egloff先生とPatricia Roggero先生を招いて、欧州の熱傷形成外科や美容外科の趨勢について御講演頂いた。その他多くのパネルや特別企画を設け、日中が世界をリードしている分野の学術交流を行い、極めて有意義な学会であった。

Key Words 形成外科、学術交流、国際学会

緒言

本会は、1990年以来、毎年日中両国交互に開催されているもので、かつて日本では長崎（第2回：難波雄哉会長）、金沢（第4回：塚田貞夫会長）、東京（第6回：鬼塚卓弥会長）、盛岡（第8回：奈良卓会長）、大阪（第10回：上石弘会長）において開催された。また、中国では順に西安、上海、瀋陽、広州、重慶、済南で開催された。今回6年ぶりのわが国の首都開催とあって、中国の形成外科医の関心が非常に高く、予想を遙かに超える参加者であったことは主催者としては喜ばしい限りであった。

形成外科学における中国の進歩は瞠目すべきものがあり、かつて世界を驚嘆させた切断指再接着に見る卓越した手技のみならず豊富な症例から得られた洗練された手術結果を供覧させられ、今や世界における中国形成外科の水準が欧米やわが国と比較しても決して遜色がなく、寧ろその発展の加速度は経済と同様に孰れ世界をリードするであろうという予感さえ与えるものであった。さらに、今回からスライドも発表も英語を公用語としたことで、本交流会の国際学会としての意義も高まったと思われた。

概要と結果

本学会のテーマは、形成外科分野で日中が果たす役割を再認識し、その結果得られる成果を世界に向けて発信することである。実際これまでに特に皮弁外科の領域では日中の形成外科が世界をリードしてきたと言っても過言ではない。

今回の特別講演は、東京女子医大形成外科野崎幹弘教授に食道癌手術後の発声再建まで考慮した遊離空腸

移植術について、また中国側からは上海のZhon Gang（宋業光）先生には気管の同種移植の可能性について御講演頂いた。世界的に未だ再建方法が確立されていない領域であり、日中の形成外科が世界をリードしていることを再認識させられた。

さらに、現在世界的にみて若手形成外科医のトップリーダーといっても過言ではない岡山大学形成外科の光嶋勲教授を招いて、トピックスである穿通枝皮弁について講演して頂いた。対応して、広州第一軍医大学形成外科のGao Jian-hua（高建華）教授に世界に先駆けて開発した大腿部の穿通枝皮弁の解剖と臨床について多くの症例を供覧し教示して頂いた。いずれも、この分野では日中が常に世界に先鞭を付けてきたことを証明した。

招待講演としては 豪州シドニー大学ローヤルプリンスアルフレッド王子病院形成外科主任であるDavid G. Pennington博士を招き、遊離腹直筋皮弁を用いた乳房再建の卓越した成績や、最新の血管吻合技術を供覧してもらった。またスイスはローザンヌ大学からDaniel V. Egloff 先生とPatricia Roggero先生を招いて、欧州の熱傷形成外科や美容外科の趨勢について御講演を頂いた。アジア人以外の形成外科学の最新情報を得ることも本学会の極めて重要な目的であり、これら3人の先生には本学会の成功に対して多大な寄与を頂いた。

そのほかに、トピックスとして日中合作の世界的成果の一つである「超薄皮弁」とその血管解剖および血管束付加による発展について、また「生体充填用異物の新展開」について新しい材料の紹介と課題について検討と情報交換がなされた。さらに、組織工学(Tissue Engineering)のパネルでは米国留学経験者を含めた日中の新進気鋭の研究者5名が集い、世界のトップレベルの討論がなされた。さらに、性同一性障害(Gender Identity Disorder)のパネルも設けられ、両国での性転換手術の技術と社会的問題について討論された。性同一性障害の治療は、我が国の医療において臓器移植とともに国際的水準から遅れを取っている分野であり、同じアジア人であり我が国の10倍の人口を有する中国の実状を知ることは極めて有意義であり、かつ対策の急務を知らされた。

考察

本交流会は、日本形成外科学会および中国整形外科学会の後援のもと、毎年両国交互に開催されているものである。会を重ねて今回が第12回目となったが、その規模及び内容は発展の一途を辿っており、そこで得られた成果が世界に発信されて新たな技術開発の端緒となった例は暇がない。今回も例に漏れず、多くの新技術や新概念の披露がなされ、その成果は更なる進展を期待するものであった。とくに、今回の特徴としては、中国側の発表の殆どがコンピュータプレゼンテーションであったことである。従来中国側から示されたスライドは学術発表には不適当な粗雑なものが垣間見られたが、今回は寧ろ日本側のスライドより優れたものが多かったのは瞠目に値した、とともに隔世の感があった。また、今回よりスライドの発表も公用語を英語に統一したので、中国の若手の医師が多数発表されることができ、また発表の内容についても互いによく理解することができた。質疑討論のみ日中の通訳を入れたが、これは相互の理解と円滑な学会運営のためやむを得ない措置であったといえる。しかし、孰れはすべて英語で行うべきと考える。また、日中のみならず日中の形成外科に由縁のある豪欧の著名な形成外科医も交えた学術交流を行ったことも、アジアに偏らない情報を得ることで有意義であった。

学会以外では歓迎パーティーや総合懇親会においても、互いの旧交を温めたり新たな親交を深めたりと活発な交歓風景が繰り広げられた。また学会終了後、中国側の参加者を都内半日ツアーに招待した。折しも雨上がりの真空かと見まごう秋天の下、浅草雷門仲見世、東京塔、銀座と周回し、古い歴史を温存しつつ再生を繰り返す世界的大都会が全貌に亘って眼下にそして車窓にと大展開し、最後は銀座での晩餐と参加者には学会の締めくくりに相応しい極めて満足のゆくツアーであったとたいへんに好評を頂いた。

因に次回は2002年9月下旬、中国の六朝古都である美都南京において開催されることが内定しており、会長のJiang Huiqing（姜会康）先生においては、日本からできる限り多数の参加があることを熱望され、併せて熱烈歓迎の意向を示された。

謝辞：最後に本交流会を開催するために貴重な助成を頂いた、日中医学協会に深謝致します。

参考文献：

Situ,P: Pedicled flap with subdermal vascular network. Academic J. First Medical College of PLA. (Chinese) 6:60,1986.

Hyakusoku,H. & Gao,JH.: The super thin flap.Br.J.Plast.Surg.,47:457-464,1994.

Gao,J-H.,Hyakusoku,H., Akimoto,M. et al.:Experiences in using the super-thin flap. Jap.J.Plast.Reconstr.Surg.,35:1097-1103,1992.

Wang,YJ.,Chang,FQ.,Chen,WF. et al.: Experimental study and clinical application of subdermal vascular network flaps. J.Aesth.Plast.Surg.(Chinese),2:63~66,1992.

Hyakusoku,H.,Pennington,DG. & Gao,JH.: Microvascular augmentation of the super-thin occipito-cervico-dorsal flap. Br.J.Plast.Surg. 47:465-469,1994.

Gao,JH.,Hyakusoku,H.,Aoki,R. et al: An experimental study on the survival of random pattern flaps with a narrow skin pedicle in pigs;Comparison of survival and blood supply in thick flaps with various pedicle widths. J.Jpn. P.R.S,19:553-559,1999.

Gao,JH,Hyakusoku,H.,Aoki,R. et al.: A study of survival on random pattern flaps with narrow pedicle; Comparison in the thinned flaps with various pedicle width and between thinned flap and conventional thick flap. J.Jpn. P.R.S.20:233~238,2000.

Koshima,I, Fukuda,H., Yamamoto,H. et al.:Free anterolateral thigh flaps for reconstruction of head and neck defects. Plast. Reconstr. Surg.,92:421-428,1993.

Kuran,I.,Turan,T.,Sadikoglu,B et al.:Treatment of a neck burn contracture with a super-thin occipito-cercico-dorsal flap:a case report.Burns,25:88-92,1999.

Pennington D.G., Lai M. and Pelly A.D: The rectus abdominis myocutaneous free flap. Br. J. Plast.Reconstr.Surg., 33,277-282,1980.

Koshima,I., Higaki,H., Kyou,J. & Yamasaki,M.: Free or pedicled rectus abdominis muscle perforating artery flap. Jpn.J.Plast.Reconstr.Surg.,32:715~719,1989.

Koshima,I,Moriguchi,T.,Soeda,S. et al.:Free thin paraumbilical perforator-based flaps: Ann.Plast.Surg.,29:12-17,1992.

Nakajima,H.,Fujino,H,Adachi,S.:A new concept of vascular supply to the skin and classification of skin flaps according to their vascularisation. Ann. Plast.Surg. 16:1-17,1986.

第12回日中形成外科学術交流会抄録集

3. 主な滞在日程

滞在期間 自 2001年 9 月 11 日 至 2001年 9 月 15 日

月 日	実 施	時刻	備考
9 月 11 日 (火)	関西空港発 香港着 香港発 珠海着	10:00 12:50 16:00 17:10	JAL 701 便 フェリー利用
9 月 12 日 (水)	学会開会式 特別講演 全体会出席 懇親会	09:00 09:40 13:00 18:00	開会挨拶担当 講演「変革期における日本の看護の展望」
9 月 13 日 (木)	分科会出席 答礼会	09:00 18:00	
9 月 14 日 (金)	分科会出席 閉会式 香港へ移動	09:00 11:30 13:00	閉会挨拶担当
9 月 15 日 (土)	香港発 関西空港着	10:05 14:45	JAL 700 便

4. 学術会議報告書

別紙報告書作成要領に準じ、添付の用紙で成果・今後の課題等を報告して下さい。

抄録集・プログラム・写真等、学会に関する資料を添付して下さい。

5. 収 支 報 告

交付を受けた金額 500,000 円

支出内訳（旅費・宿泊費・印刷費その他の科目別に記載、別紙可）領収書コピーを添付すること。

科 目	金 額	備考（用途・内訳）
旅行代金	337,150	南裕子会長分（内訳別紙①）
論文翻訳料	162,850	中国語論文和訳 総額 369,000 円の一部 （内訳別紙②、領収書に代えて振込明細書別紙③）

－ 日中医学協会助成事業 －
第7回日中看護学会出席報告

日 時：2001年9月12日（水）～14日（金）
場 所：中国広州珠海市
会 場：華駿大酒店会議室、珠海衛生学院講堂
主 催：中華護理学会
共 催：日本看護学会
テ ー マ：変革期における日中看護の展望
本 会 代 表：南裕子会長、小野光子理事
学会出席者：日本側 84名（含・代表者2名）、中国側 約100名
事 務 局：廣瀬佐和子学会部長、輪湖史子国際部長、内田恵美子中央ナースセンター業務部長

主要なプログラム

- 1) 開 会 式：中華護理学会 王春生理事長挨拶
日本看護協会 南裕子会長挨拶

2) 特別講演：

中華護理学会 王春生理事長 「変革期における中医看護の現状と考察」

【要旨】中国における病院看護管理体系、中国看護の基本的考え方と看護モデル、看護技術の発展、看護教育の状況を紹介し、看護と医学の不可分性に基づき、中医と西医の統合を図りながら、臓器別ではなく生命全体を診る看護の一層の展開が課題であることを示した。

日本看護協会 南裕子会長 「変革期における日本の看護の展望」

【要旨】21世紀は、グローバリゼーション（世界化）をさらに超えて、宇宙規模の視点が求められる時代である。看護職は、そこで生じる「人與人」「人と社会」の関係の変化を鋭敏に捉えながら、かつ一個人・一市民としての健全な理念と感覚に基づき、政策の場にも積極的に声を挙げながら、安全で質の高い看護の提供を目指す必要がある。

3) 全 体 会：

- ①看護倫理 首都医科大学附属宣武病院 楊 萼 「老年性痴呆における情緒障害の看護」
長野県看護大学 小西恵美子 「日本における看護倫理の教育」
②看護教育 西南女学院大学 小田正枝 「日本における看護教師の資質の発展への取り組み」
成都軍区総合病院 盧 敏 「専門看護婦の養成システム設立の研究」
③訪問看護 北京中医葯科大学附属東方病院 劉香弟 「糖尿病に対する中医健康教育の実施と効果」
日本看護協会 内田恵美子 「日本における高齢社会と訪問看護の評価」
④中日看護の関心事
神戸大学医学部附属病院 吉田智美 「専門看護師の実際的な活動」
中国協和医科大学中国協和病院 史冬雷 「婦長の選抜採用基準システムの確立」

4) 分 科 会：

- ① 日本側演題：33題、②中国側演題：33題（取り下げ・差し替えあり）

5) 交 歓 会

- ①中華護理学会主催懇親会：9月12日（水）夜一日本側の学会出席者全員招待される
- ②日本看護協会主催答礼会：9月13日（木）夜一中華護理学会関係者を11名招待

6) 閉会式：中華護理学会 王春生理事長挨拶、 日本看護協会 南裕子会長挨拶

7) 施設見学：中医医院（スケジュールの都合により、学会出席者一部が参加）

8) そ の 他：来年度以降の交流プログラム実施計画について相談

成果と今後の課題

1) 成果

1. 本学会ならびに相手国の看護に対する関心の高まり

- ① 日本側：一般演題の応募総数67題と、過去最高を数えた（うち33題採択）。また、参加者数（84名）は、1994年の北京大会に次いで最高であった。また、継続参加者もあり、両国の親善と情報交換に重要な役割を果たしている。
- ② 中国側：とくに、日本の専門看護師・認定看護師制度に対する関心が強く、その点について多々、質問や問い合わせが寄せられた。

2. 演題発表内容の充実

- ① 適切な研究デザインおよび科学的な調査研究手法に基づく発表が増えている。
- ② 日本で勉学・教育に従事する中国人看護職ならびに中国で看護活動（国際協力）に従事する日本人看護職による応募と発表が増えており、日頃の交流が生かされた学会内容となっている。

3. 両国の看護の共通点と相違点の明確化

全体会において、共通テーマのもとに両国から発表を行う形式にしたことによって、両国の看護における共通点と相違点が把握しやすく、相互理解を深めることができた。

2) 課題

1. 両国看護職による共同研究・共同企画の試み

現在は、日中両国の演題発表による情報交換を主目的として学会を開催しているが、今後は、両国の交流の上に立脚し、共同研究や共同企画を通じて両国の看護に貢献するプロダクトを産み出してゆることが望まれる。

2. 日中両国の看護や保健の状況に関する基本的な情報の把握と広報

発表演題の背景となっている保健医療看護制度（教育も含めて）や社会状況を、参加者がより理解することによって、交流が深まると考えられる。現在、そうした理解は個々人の努力によっているが、今後、学会主催者・共催者がシステムティックに情報を取得・整理して、関係者に広報できるような仕組みの整備が望まれる。

3. 日中の看護の橋渡し役となる人材の確保と育成

日本において就学・就労経験のある中国人看護職および、中国において就学・就労経験のある日本陣看護職の名簿を作成し、今後の両国の交流促進をはかる上で貴重な人材として活用することが望まれる。

作成日：2001年10月5日