

2003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－

2004 年 2 月 23 日

財団法人 日中医学協会
理事長 殿

研究代表者氏名 菅 原 勇 

所属機関名 (財)結核予防会結核研究所

部署・役職 抗酸菌レプリカセンター・センター長

所在地 〒204-0022 東京都清瀬市松山3-1-24

電話 0424 93 5075 (直) 内線

1. 研究テーマ

中国河南省における多剤耐性結核の分子病理学的研究－リファンプリン耐性：カ点
もあいて

2. 研究期間 自 2003 年 4 月 1 日 ～ 至 2004 年 3 月 15 日

3. 研究組織

日本側研究者氏名 菅 原 勇

所属機関 (財)結核予防会結核研究所 職名 センター長

中国側研究者氏名 王 国 斌

所属機関 河南省胸科医院 職名 主任医師

4. 研究報告書

別紙「研究報告書の作成について」の体裁に倣い、指定の用紙で作成し添付して下さい。

※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。

中国河南省における多剤耐性結核の分子病理学的研究—リファンピシン耐性に力点を置いて

研究者氏名	菅原 勇
日本所属機関	(財) 結核予防会結核研究所
研究者氏名	王 国斌
中国所属機関	河南省胸科医院

要旨：

中国河南省胸科医院で、2001年1月1日から同12月31日までに集められた結核菌188検体のリファンピシン耐性を調べた。136検体がリファンピシン耐性で、そのうち125検体に *rpoB* 遺伝子の突然変異が、DNA シークエンス法で、見つかった。*rpoB* 遺伝子のクラスター領域に変異を有し、531, 526番目の変異が多かった。これをHPLCを用いたヘテロデュプレックス法で解析しても、結果が一致した。これらの解析結果は、リファンピシン耐性率が非常に高いことを意味し、リファンピシン耐性を減少させる結核対策を取る必要がある。

Key Words： リファンピシン耐性、河南省、*rpoB*, 多剤耐性結核

緒言：

中国河南省は、安徽省と同じく農業労働者が多い。農業労働者の収入も低いことから結核の治療も不十分だと考えられている。それ故、抗結核剤耐性結核の頻度も高いと考えられる。今回、薬剤感受性試験で、耐性と診断されたリファンピシン耐性結核菌を、95℃30分加熱処理した後、結核研究所に送ってもらい、遺伝子レベルでどのくらいリファンピシン耐性が存在するかを共同研究することにした。リファンピシン耐性に関する *rpoB* 遺伝子突然変異をDNA シークエンス法とHPLCを利用したヘテロデュプレックス法を用いて解析した。

対象と方法：

対象は、2001年1月1日から同12月31日まで中国河南省胸科医院外来を受診した結核患者から採取した結核菌188検体を用いた。この中には、結核再発例と初診例が混じっている。詳しい情報は、手に入っていない。これをLowenstein-Jensen培地で培養した後、95℃、30分間加熱処理した後、結核研究所に検査のため送られた。結核感受性試験は、リファンピシン40μg/mlの濃度で、Lowenstein-Jensen培地を用いた比率法で感受性、耐性を判定した。送られた検体から、型のごとく、DNAを抽出し、*rpoB* 遺伝子βunitのクラスターI領域をカバーするようにプライマを設計した。PCRで増幅したPCR産物を精製した。その後、精製産物を用いてDNAシークエンサ(ABI PRISM Model377)にて増幅産物の塩基配列を決定した。増幅産物の遺伝子突然変異の有無を別の方法(HPLCを用いたヘテロデュプレックス法)で解析した。対象として感受性結核菌H37Rvから得られたDNAを用いた。変性条件は、66.4℃を用いた。

結果：

リファンピシンを用いた薬剤感受性試験では、188検体中136検体(72.3%)が、リファンピシン耐性であった。そのうち125検体で *rpoB* 突然変異が認められた(92%)。これらの以上は、すべていわゆる *rpoB* 遺伝子のクラスターIの領域に入っていた。最も多かったのは、531番目の突然変異で、次に多いのが526番目の突然変異だった。この突然変異が、本当に正しいかどうかを別の方法(HPLCを用いたヘテロ

デュプレックス法、Transgenomics 社製) で検討した。図 1 にそのうちの数例を示している。感受性株である H37Rv (一番上) には、異常な波形が見られないが、突然変異がある結核菌では、矢印で示したように、異常な波形が見られた。この方法での、突然変異検出率は、完全に、DNA シークエンス法と一致した。

考察：

我々の予想に反して、リファンピシン耐性検出率が、以前の報告値より低かった。この症例には、再発例と初発例が混じっている。大部分は農業労働者で、年齢は、16 歳から 74 歳までであった。詳しい情報が、聞けない例もあった。それでも、どうしてこのようにリファンピシン耐性頻度が高いのか。共同研究者である王先生と話し合った結果、1) 売薬を飲んでいて、病院に行かない患者がいる、2) 結核の治療を受けていたが、医療代が払えず、途中で退院した患者が、悪化して再び外来に来た、3) 抗結核薬を、規則正しく飲まない患者がいる、が主な原因と考えられた。我々のデータは、多剤耐性結核を減少させる対策を立てる上で、有用な情報を与えてくれる。結核対策には、このようなデータベースの構築が必要である。

地方に行くと、十分に抗結核薬が供給されていないことが多い。従って、日本政府が既に行っているが、薬物の無償援助がもっと必要である。結核に他する意識を高めて、規則正しく薬物を服用させねばならない。WHO が薦めている DOTS(directly observed therapy short-course)を出来るだけ早く採用すべきである。

rpoB 突然変異を検出するのに用いた HPLC を用いた Heteroduplex 法は、簡便で、再現性がある。しかも、増幅産物を精製する必要がないので、DNA シークエンス法よりコストが安く済む。途上国での多剤耐性結核菌の診断に、非常に有用である。

リファンピシン耐性結核菌は、他の抗結核薬物にも耐性な結核菌が多い。次の、課題は、イソニアジッド耐性結核菌の頻度を調べることである。

参考文献：

1. Telenti A, Philipp WJ, Sreevatsan S, Bernasconi C, Stockbauer KE, Wiele B, Musser JM, and Jacobs WR. The *emb* operon, a gene cluster of *Mycobacterium tuberculosis* involved in resistance to EMB. Nature Med 1997; 3: 567-570.
2. Telenti A et al. Detection of rifampicin-resistance mutations in *Mycobacterium tuberculosis*. Lancet 1993; 342: 647-650.
3. Cooksey RC, Morlock GP, Holloway BP, Limor J, and Hepburn M. Temperature-mediated heteroduplex analysis performed by using denaturing high-performance liquid chromatography to identify sequence polymorphisms in mycobacterium tuberculosis complex organisms. J. Clin Microbiol 2002; 40: 1610-1616.

作成日： 2004年 2月 23日

2003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－

2004 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 新田 裕史
所属機関名 国立環境研究所
部署・役職 総合研究官
所在地 〒305-8506 つくば市小黒川16-2
電話 029-850-2497 内線 _____

1. 研究テーマ

中国における大気汚染とぜん息との関連性に関する研究

2. 研究期間 自 2003 年 4 月 16 日 ～ 至 2004 年 3 月 15 日

3. 研究組織

日本側研究者氏名 新田 裕史
所属機関 国立環境研究所 職名 総合研究官

中国側研究者氏名 郭 新彪
所属機関 北京大学公共卫生学院 職名 教授

4. 研究報告書

別紙「研究報告書の作成について」の体裁に倣い、指定の用紙で作成し添付して下さい。

※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。

中国における大気汚染とぜん息との関連性に関する研究

研究者氏名	新田 裕史
所属機関	国立環境研究所 総合研究官
共同研究者	郭 新彪
所属機関	北京大学公共衛生学院

要 旨

Key Words 大気汚染、PM_{2.5}、喘息、自動車排ガス

緒 言：

中国では急速な経済発展に伴って、大気汚染状況の悪化が見られたが、一方で大気汚染防止対策も進められて改善傾向も見られてきている。しかしながら、大都市部ではモータリゼーションが進行して、石炭燃焼を中心とした固定発生源からのSO₂や粉じんによる大気汚染からNO_xや微小粒子、光化学スモッグを中心とした大気汚染へ質的に変化しつつあると考えられる。

近年、従来から日本で大気環境基準が設定されていた浮遊粒子状物質よりもさらに粒径の小さい微小粒子の健康影響に関する関心が世界的に高まってきている。日本では微小粒子はディーゼル排ガス中の粒子や光化学反応等による二次生成粒子が主体と考えられているが、中国における微小粒子に関するデータは非常に少ないのが現状である。中国ではこれまで総粉じん(TSP)、PM₁₀についての規制やモニタリングが行われてきたが、微小粒子とぜん息との関連性に関する検討は行われていなかった。本研究ではより詳細な室内汚染状況の測定、大気汚染データの解析によって、微小粒子状物質への曝露状況についてさらに解析検討を加えるとともに、中国各地で実施されている大気汚染の健康影響に関する疫学的知見を収集・整理して、中国におけるぜん息と大気汚染の関連性を検討した。

対象と方法：

①微小粒子状物質の屋内・屋外測定

北京市中心部の一般家庭の屋内・屋外において、PM_{2.5}（50%カットオフ径2.5μm）およびPM₁₀（50%カットオフ径10μm）濃度の測定を実施した。対象世帯は幹線道路沿道を含む10世帯である。測定は2003年11月の非暖房期と2004年2月の暖房期の2回実施した。測定対象世帯の属性は表1に示した。対象世帯は幹線道路に面した家屋と後背地に位置する家屋が概ね半数ずつになるように選んだ。対象世帯は全て鉄筋集合住宅で、暖房は集中暖房による温水ヒーターであった。

PM_{2.5}濃度はミニポンプ（柴田科学(株)製MP-Σ3）に単孔式多段インパクターのホルダー（柴田ATPS-20H）を接続し、1.5LPMで24時間捕集した。濾紙はTX40HI20（PALLFLEX）を用い、捕集前後に恒温恒湿の秤量室内に24時間以上放置後、精密電子天秤（メトラ・トレドUM2）で秤量し、その重量差を捕集量とした。

②その他

北京市の大気汚染常時監視局の測定データを収集した。なお、日平均値等のデータは一般に公表されていないため、月平均値ないし年平均値のみ収集した。また、本研究に先立って実施された呼吸器症状調査（公健協会）データに基づき、北京市における喘息罹患状況を解析した。

表 1. 測定対象世帯の属性

世帯 番号	家屋構造	階数	世帯員 数	暖房方式	燃料の種類	家族内喫 煙	幹線道路か らの距離 (m)
1	鉄筋集合住宅	4	3	集中暖房	天然ガス	あり	50
2	鉄筋集合住宅	1	4	集中暖房	天然ガス	あり	10
3	鉄筋集合住宅	2	3	集中暖房	天然ガス	あり	4
4	鉄筋集合住宅	4	3	集中暖房	天然ガス	なし	200
5	鉄筋集合住宅	3	6	集中暖房	天然ガス	なし	4
6	鉄筋集合住宅	2	3	集中暖房	天然ガス	あり	15
7	鉄筋集合住宅	4	5	集中暖房	天然ガス	あり	80
8	鉄筋集合住宅	3	4	集中暖房	天然ガス	なし	6
9	鉄筋集合住宅	5	3	集中暖房	天然ガス	なし	14
10	鉄筋集合住宅	4	3	集中暖房	天然ガス	あり	20

結 果：

①微小粒子状物質の屋内・屋外測定

測定結果を表 2 に示した。なお、世帯 4 の第一回目の屋外測定は機器故障のため欠測となった。全体的にみると、非暖房期である第一回目の測定では PM2.5 濃度、PM10 濃度ともに屋外濃度が屋内濃度よりも高い傾向が見られた。暖房期である第二回目の測定では PM2.5 濃度は屋内が高く、PM10 濃度では両者に大きな差は見られなかった。また、第一回目で高濃度を示した世帯 5、6、7、8 は測定日が 11 月 5 日および 6 日に集中しており、さらに第二回目の測定で高濃度を示した世帯 1、2 は測定日が 2 月 9 日であった。

表 2. PM2.5 および PM10 濃度の測定結果 ($\mu\text{g}/\text{m}^3$)

世帯番号	第一回					第二回				
	測定日	PM2.5		PM10		測定日	PM2.5		PM10	
		屋外	屋内	屋外	屋内		屋外	屋内	屋外	屋内
1	2003.11.3	53.3	110.8	97.0	131.6	2004.2.9	163.3	251.4	249.3	283.9
2	2003.11.3	64.7	202.5	118.8	232.6	2004.2.9	170.7	249.2	255.0	272.2
3	2003.11.4	37.3	27.0	73.5	49.2	2004.2.11	108.4	70.2	157.5	88.3
4	2003.11.4	-	154.5	-	179.4	2004.2.11	83.2	94.9	133.0	126.4
5	2003.11.5	300.4	185.6	453.4	218.0	2004.2.4	22.2	20.7	39.4	36.4
6	2003.11.5	317.4	272.9	479.8	309.6	2004.2.4	20.7	126.5	34.9	145.3
7	2003.11.6	244.2	195.7	389.5	239.2	2004.2.5	57.2	49.6	90.8	58.2
8	2003.11.6	262.3	114.3	440.9	129.8	2004.2.5	43.3	24.3	68.6	34.0
9	2003.11.7	139.0	73.5	232.1	96.6	2004.2.13	88.2	52.8	147.7	66.1
10	2003.11.7	140.5	131.6	234.6	154.7	2004.2.6	12.4	57.9	34.3	64.4
平均値		173.2	146.8	279.9	174.1		76.9	99.8	121.0	117.5

屋外濃度と屋内濃度の散布図を図 1 に示した。第一回目および第 2 回目の測定共に屋外濃度と屋内濃度との関連性がみられたが、その特性はかなり異なっていた。すなわち、第一回目の測定では PM2.5 濃度および PM10 濃度ともに回帰直線の傾きは 1 よりも小さく、屋内濃度が屋外濃度の影響を受けていることが示唆された。一

方、第二回目の測定では回帰直線の傾きは1を越えており、屋内汚染源の寄与を示唆していた。次に、PM2.5濃度とPM10濃度の比を表3に示した。これを見ると屋内では屋外よりも比が大きく、より微小な粒径の粒子が多いことを示していた。また、幹線道路からの距離と濃度の関連性は明確ではなかった。

第一回目の測定で回帰直線の上側にプロットされていた世帯、すなわち屋内濃度がやや高い傾向にある世帯の属性(表1)をみると全体として、家庭内喫煙があった世帯がほとんどであり、屋内濃度に対する喫煙の影響が示されていた。

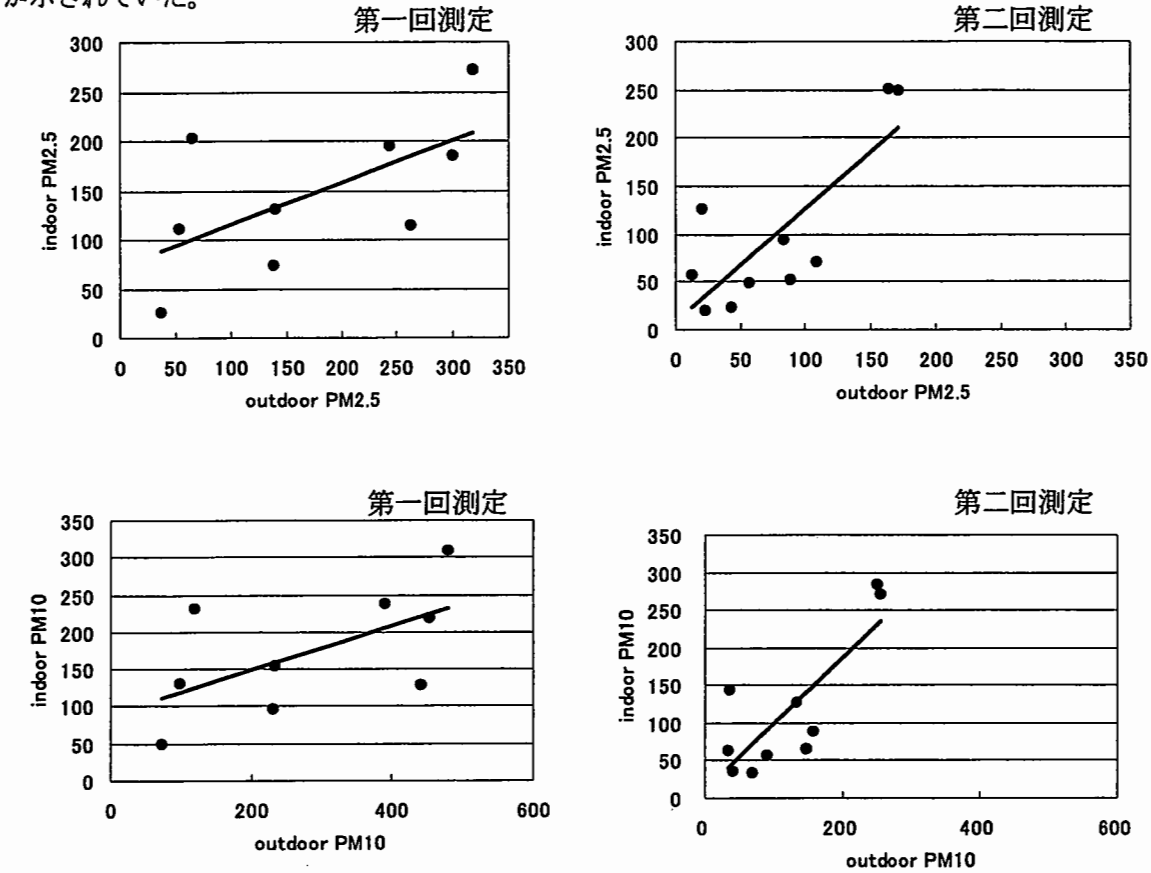


図 1. 屋外濃度と屋内濃度の関連性

表 3. PM2.5 と PM10 濃度比

世帯番号	第一回目		第二回目	
	PM2.5/PM10		PM2.5/PM10	
	屋外	屋内	屋外	屋内
1	0.55	0.84	0.66	0.89
2	0.54	0.87	0.67	0.92
3	0.51	0.55	0.69	0.80
4	-	0.86	-	0.75
5	0.66	0.85	0.56	0.57
6	0.66	0.88	0.59	0.87
7	0.63	0.82	0.63	0.85
8	0.60	0.88	0.63	0.71
9	0.60	0.76	0.60	0.80
10	0.60	0.85	0.36	0.90

考 察：

中国における大気汚染状況は近年大きく変化している。図 2 に 1996 年～2000 年までの SO₂、NO_x、TSP 濃度の北京市全体の月別平均値を示した。全体として季節変動が大きく、冬季暖房期の濃度上昇が顕著である。SO₂ 濃度は近年低下傾向にあるが、NO_x 濃度には大きな変化はみられていない。しかし、このデータにはごく最近の自動車交通量の増加による NO_x 濃度上昇の有無は反映されていない。これまで、粒子状物質としては TSP（総粉じん）が測定されてきたが、これは数十 μm までの粒径の粒子状物質を含むものである。北京市では 1999 年から PM₁₀ 濃度の測定が開始されており、2002 年の PM₁₀ 濃度年平均値は $166 \mu\text{g}/\text{m}^3$ であった。PM_{2.5} 濃度の常時測定は実施されていないために測定データは得られなかった。

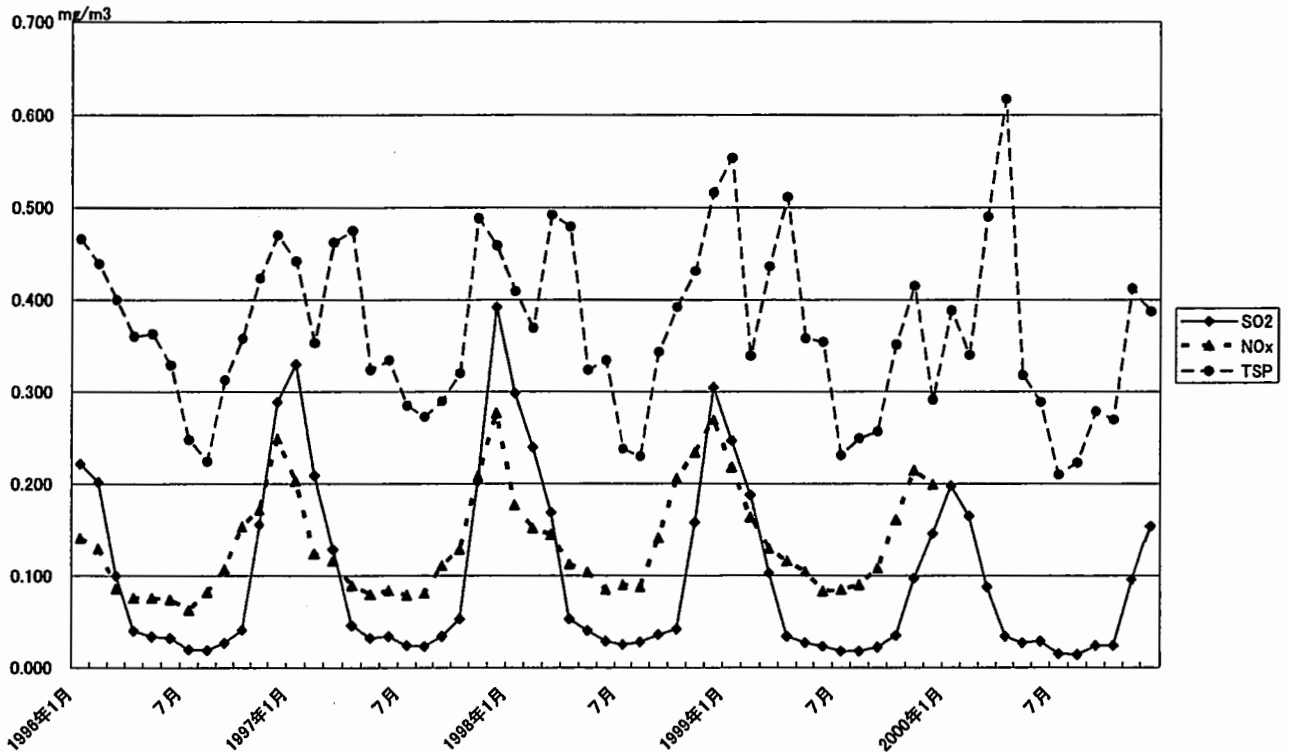


図2. 北京市の大気汚染状況

公害健康被害補償予防協会の研究事業（2001～2003 年度）で我々が実施した北京市および太原市における呼吸器症状調査結果のうち喘息症状有症率をみると、SO₂ や TSP など石炭燃焼由来の大気汚染がひどい太原市よりも、北京市の方が喘息有症率が高い傾向にあった。TSP や PM₁₀ よりも健康影響が懸念され、また自動車排ガスの影響をより強く反映すると考えられる PM_{2.5} 濃度に関する今回の測定結果をみると、家庭内喫煙や暖房期における他の屋内汚染による影響がみられるものの、屋外濃度と屋内濃度の関連性が一貫してみられた。このことは、中国国内における喘息有症率の地域差を説明する要因として微小粒子を無視できないことを示唆している。今後は、ディーゼル排気粒子の指標と考えられている微小粒子中元素炭素量などの分析を進めるなど、自動車排ガスへの曝露量を詳細かつ長期的にモニタリングを行うとともに、喘息の罹患状況についても長期的に追跡することによって両者の関係を明らかにしていく必要がある。

参考文献：

- 1) 常俊義三、他（2002）：気管支ぜん息等の動向に関する詳細フィールド調査と関連要因の検討に関する研究報告書（公害健康被害補償予防協会委託業務）、（社）環境情報科学センター
- 2) 北京市統計局編（2001）：北京統計年鑑、中国統計出版社


作成日：2004 年 3 月 15 日

2003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－

2004 年 01 月 21 日

財団法人 日中医学協会
理事長 殿

研究代表者氏名 長 野 功 
所属機関名 岐阜大学 医学部
部署・役職 感染制御学分野・助教授
所在地 〒500-8705 岐阜市司町 40 番地
電話 (058) 265-1241 内線 2252

1. 研究テーマ

肝吸虫免疫診断用組換え蛋白抗原の検討と中国における肝吸虫症患者診断への応用

2. 研究期間 自 2003 年 8 月 1 日 ～ 至 2004 年 3 月 15 日

3. 研究組織

日本側研究者氏名 長 野 功
所属機関 岐阜大学医学部感染制御学分野 職名 助教授

中国側研究者氏名 方 悦 怡
所属機関 広東省疾病予防控制
中心寄生虫病防治研究所 職名 副所長

4. 研究報告書

別紙「研究報告書の作成について」の体裁に倣い、指定の用紙で作成し添付して下さい。

※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。

肝吸虫免疫診断用組換え蛋白抗原の検討と中国における肝吸虫症患者診断への応用

日本側研究者氏名 長野 功

所属機関 岐阜大学医学部感染制御学分野助教授

中国側研究者氏名 方 悦怡

所属機関 広東省疾病予防控制中心寄生虫病防治研究所副所長

要旨

肝吸虫症は、中国東南部においては極めて重要な感染症のひとつである。一方、肝吸虫症の免疫学的診断は肝吸虫成虫抗原に対する抗体を検出する方法が広く行われているが、抗体価は一般に低い場合が多く、また、他の吸虫類との交差反応も問題となっている。我々は肝吸虫の cysteine proteinase をクローニングし、その組換え蛋白を合成して ELISA 用の抗原としての有用性の検討を行った。

大腸菌で発現させた肝吸虫の cysteine proteinase を抗原として Western blot を行った結果、肝吸虫患者血清と強く反応した。また、抗 cysteine proteinase 血清を用いて肝吸虫成虫の免疫染色を行った結果、cysteine proteinase 抗原は主に成虫の腸管上皮に認められた。

肝吸虫の cysteine proteinase および肝吸虫成虫抗原を ELISA 用の抗原として用いるための条件設定を行った後、肝吸虫感染患者血清、肝吸虫以外の寄生虫感染患者血清について ELISA での抗体価の検討を行った。その結果、cysteine proteinase を用いた ELISA 法の感度は高く、また他の寄生虫感染患者血清との交差反応もほとんど認められず、cysteine proteinase は ELISA 用の抗原として十分有用であると考えられた。

Key Words 肝吸虫症、cysteine proteinase、組換え蛋白、ELISA

緒言

肝吸虫感染症はモツゴ、コイ、フナなどの淡水魚の生食で感染し、多数感染では最終的に肝硬変や肝ガンに移行することもある極めて危険な寄生虫感染症である。日本においては衛生環境の整備、衛生教育の充実等によって患者発生数はここ数十年でかなり減少しているが、中国東南部においてはまだ肝吸虫感染症は極めて重要な感染症のひとつである(1)。肝吸虫感染症の確定診断は糞便検査で虫卵を検出することであるが、一匹あたりの虫卵産生数が少なく集卵法を用いても虫卵が検出されないことも多い(2)。一方、免疫学的診断法として肝吸虫成虫抗原に対する抗体価を検出する方法が行われているが、肝吸虫は組織内に侵入することが少ないために抗体価は一般に低い場合が多い。肝吸虫感染症に対しては、現在では非常に有効な治療薬があり、早期に患者を発見できれば治療は困難ではない。

広東省寄生虫防治研究所では最近の肝吸虫症患者発生数の増加により、一度に多数の検体を処理することが求められるようになってきた。そのため、肝吸虫感染症の診断は手間のかかる糞便検査ではなく肝吸虫成虫抗原を用いた免疫学的診断によって行われているのが現状である。しかし、低抗体価感染者における診断の問題、および当地方はかつては日本住血吸虫侵淫地でもあり、日本住血吸虫抗原と肝吸虫抗原との交差反応も大きな問題点のひとつである。よって、肝吸虫の確実な免疫学的診断には特異性が高く、かつ感度の高い肝吸虫由来抗原を用いる必要がある。今回、吸虫類

の免疫学的診断に有用な抗原と考えられている cysteine proteinase の組換え蛋白を合成して ELISA 用の抗原とし、その有用性の検討を行った。

研究対象と方法

1. 報告されている肝吸虫の cysteine proteinase の DNA 塩基配列に基づいて、その DNA を増幅するように PCR primer を設計した。中国の患者より採取した肝吸虫虫体から作製した cDNA を鋳型として DNA の増幅を行い、中国産肝吸虫 cysteine proteinase の塩基配列を決定した。
2. 増幅された cysteine proteinase DNA を大腸菌発現ベクターに組み込み大腸菌内で蛋白を発現させ、アフィニティー精製した。
3. 発現蛋白とプール肝吸虫症患者血清との反応性を Western blot にて確認した。また、精製蛋白はマウスに免疫してその抗血清を得、それを用いて肝吸虫内の cysteine proteinase の分布を Western blot および成虫虫体の免疫染色にて確認した。
4. 組換え蛋白の診断における有用性を、肝吸虫感染患者血清 10 検体、日本住血吸虫感染患者血清 5 検体および健常者血清 5 検体を用いて、Western blot にて検討した。
5. 組換え蛋白を ELISA 用の抗原として用いるための条件設定を行い、組換え蛋白の抗原としての至適濃度を決定した。また、健常者血清 48 検体を用いて ELISA 吸光度の cut-off 値を設定した。条件設定後、広東省寄生虫防治研究所において中国人の肝吸虫感染患者血清 50 検体、肝吸虫以外の寄生虫感染患者血清 26 検体の ELISA 吸光度を測定した。また、比較として肝吸虫成虫抗原についても同時に検討を行った。

成績

1. 中国産肝吸虫の cysteine proteinase の塩基配列はすでに報告されているものとほとんど同一であったが、一部に違いが見られた。また、肝吸虫と肺吸虫、日本住血吸虫および肝蛭の cysteine proteinase のアミノ酸ホモロジーはそれぞれ 58%、48% および 40% であった。
2. 肝吸虫の cysteine proteinase は大腸菌体内で多量に発現し、アフィニティー精製した蛋白は SDS-PAGE においてシングルバンドとして認められた (図 1)。
3. 肝吸虫の cysteine proteinase はプール肝吸虫症患者血清と強く反応して Western blot にて予想される位置にバンドが確認された。また、プール日本住血吸虫症患者血清とも弱く反応した (図 2A)。
4. 肝吸虫成虫抗原と抗 cysteine proteinase 血清との反応では予想される位置および成熟蛋白であろうと考えられる位置とに計 2 本のバンドが観察された (図 2B)。また、成虫の免疫染色を行った結果、cysteine proteinase の特異抗原が成虫の腸管上皮および虫卵に認められた (図 3)。
5. 肝吸虫の cysteine proteinase と肝吸虫感染患者血清、日本住血吸虫感染患者血清および健常者血清との反応性を Western blot にて検討した結果、肝吸虫感染患者血清では強く反応が認められた。また、日本住血吸虫感染患者血清においても弱く反応が観察された (図 4)。
6. 肝吸虫の cysteine proteinase および肝吸虫成虫抗原を ELISA 用の抗原として用いるための条件設定を行った結果、使用抗原の蛋白濃度を $5 \mu\text{g/ml}$ 、血清希釈は 200 倍、cut-off 値を cysteine proteinase では 0.126、肝吸虫成虫抗原では 0.234 と決定した。その条件で肝吸虫感染患者血清 50 検体、肝吸虫以外の寄生虫感染患者血清 26 検体の吸光度を測定した (図 5)。その結果 cysteine proteinase では肝吸虫感染患者血清 50 検体中 2 検体が陰性 (4%)、肝吸虫以外の寄生虫感染患者血清においては、26 検体中顎口虫感染患者血清の 1 検体が陽性 (3.8%) を示した。また、肝吸虫成虫抗原では 50 検体中 6 検体が陰性 (12%)、肝吸虫以外の寄生虫感染患者血清においては、26 検体中陽性を示した検体はなかった。

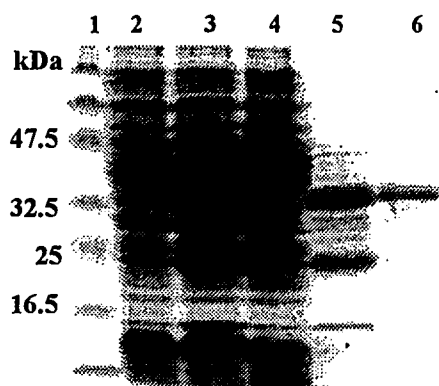


図 1. 肝吸虫組換え cysteine proteinase の SDS-PAGE 電気泳動解析

(2. 誘導前の大腸菌菌体、3. 誘導後の大腸菌菌体、4. 大腸菌破碎サンプルの上清、5. 大腸菌破碎サンプルの沈渣、6. アフィニティー精製後のサンプル)

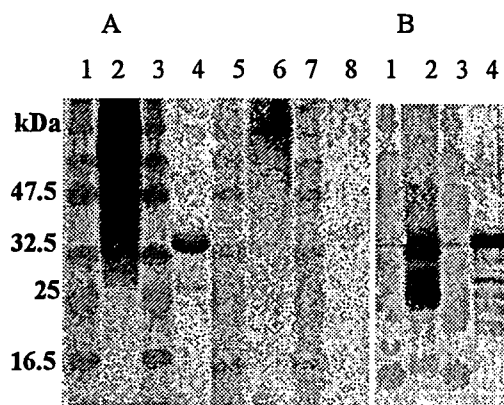


図 2. 肝吸虫組換え cysteine proteinase の Western blot 解析

(A2.肝吸虫患者血清と肝吸虫成虫抗原との反応、A4. 肝吸虫患者血清と肝吸虫組換え cysteine proteinase との反応、A6.日本住血吸虫患者血清と肝吸虫成虫抗原との反応、A8. 日本住血吸虫患者血清と肝吸虫組換え cysteine proteinase との反応、B2. 抗 cysteine proteinase 血清と肝吸虫成虫抗原との反応、B4. 抗 cysteine proteinase 血清と肝吸虫組換え cysteine proteinase との反応)

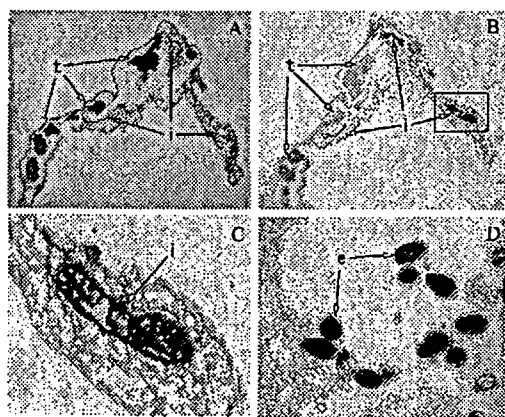


図 3. 肝吸虫 cysteine proteinase の成虫虫体内分布

(A. ヘマトキシリン・エオジン染色、B. C. D. 抗肝吸虫 cysteine proteinase 血清による免疫染色) i:腸管; e:虫卵; t: 精巣

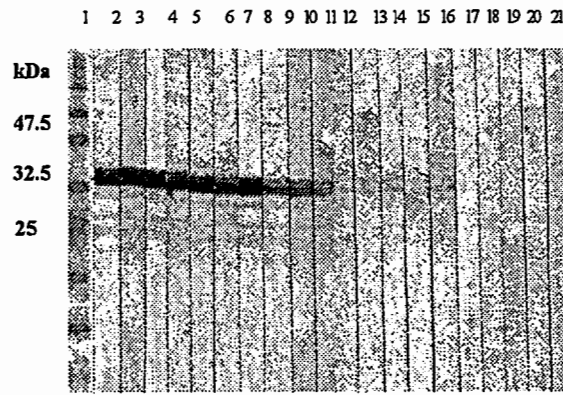


図 4. 肝吸虫 cysteine proteinase の肝吸虫患者血清、日本住血吸虫患者血清および健常者血清との Western blot における反応性

(2-11.肝吸虫患者血清、12-16.日本住血吸虫患者血清、17-21. 健常者血清)

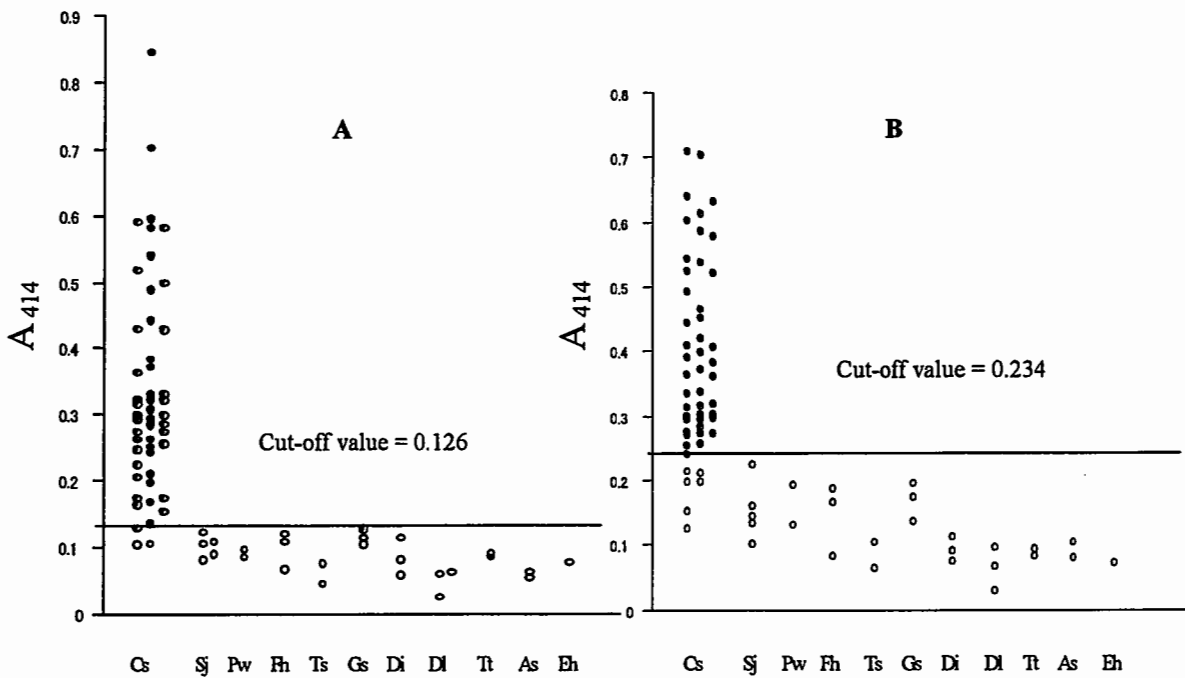


図 5. 各寄生虫感染患者血清の cysteine proteinase 抗原(A)および肝吸虫成虫抗原(B)における ELISA 吸光度の分布、[*Clonorchis sinensis* (Cs), *Schistosoma japonicum* (Sj), *Paragonimus westermani* (Pw), *Fasciola hepatica* (Fh), *Taenia solium* (Ts), *Gnathostoma spinigerum* (Gs), *Dirofilara immitis* (Di), *Dipyllobothrium latum* (Dl), *Trichuris trichiura* (Tt), *Anisakis simplex* (As), and *Entamoeba histolytica* (Eh)]

考察

近年、種々の寄生虫感染症の診断において、免疫学的診断法が多く用いられるようになってきた。今回、肝吸虫 cysteine proteinase の ELISA 用抗原としての有用性を中国広東省の肝吸虫症患者血清を用いて検討した。

Cysteine proteinase は多くの寄生虫において持続的に分泌されるプロテアーゼであり、寄生虫感染患者では cysteine proteinase に対して、一般に高い抗体価を示す。そのために cysteine proteinase

は種々の寄生虫感染症において免疫診断用抗原として極めて有用であると報告されている(3.4.5)。また、肝吸虫においてもメタセルカリア、成虫の各発育段階において cysteine proteinase が分泌されることが報告されている(6)。今回行った成虫の免疫染色でも cysteine proteinase の特異抗原が成虫の腸管上皮および虫卵に認められた。肝吸虫 cysteine proteinase は腸管上皮で生成され、腸管内に分泌されて、感染宿主に高い抗原性が付与されるものと考えられる。

肝吸虫 cysteine proteinase のアミノ酸配列と肺吸虫、日本住血吸虫および肝蛭 cysteine proteinase のアミノ酸配列のホモロジーは低く、このことは、肝吸虫 cysteine proteinase は肺吸虫、日本住血吸虫および肝蛭感染患者血清とは交差反応が少ない可能性を示唆している、実際に、肝吸虫の組換え cysteine proteinase を用いた ELISA において、これらの感染患者血清とは交差反応は見られず、顎口虫感染患者血清の 1 検体のみが陽性を示したのみであった。一方、対照として用いた肝吸虫成虫抗原は偽陽性を示した検体はなかったが、肝吸虫感染患者血清において 12% が陰性であり、感度において問題点が多かった。

以上の結果から肝吸虫の cysteine proteinase は ELISA 用の診断用抗原として十分に使用可能であると考えられた。しかし、感度において cysteine proteinase は肝吸虫成虫抗原よりも優れているものの偽陽性があったこと、供試検体が少数であったことなどの課題が残された。今後は cysteine proteinase の診断用抗原としての有用性をさらにサンプル数を増やして検討していきたい。

参考文献

1. Crompton, D. W. 1999. How much human helminthiasis is there in the world? J. Parasitol. 85:397-403.
2. Rim, H. J. 1986. The current pathology and chemotherapy of clonorchiasis. Korean J. Parasitol. 24 (suppl.):78-85.
3. Chappell, C. L., M. H. Dresden, B. Gryseels, and A. M. Deelder. 1990. Antibody response to *Schistosoma mansoni* adult worm cysteine proteinases in infected individuals. Am. J. Trop. Med. Hyg. 42:335-341.
4. Ikeda, T., Y. Oikawa, and T. Nishiyama. 1996. Enzyme-linked immunosorbent assay using cysteine proteinase antigens for immunodiagnosis of human paragonimiasis. Am. J. Trop. Med. Hyg. 55:435-437.
5. Carnevale, S., M. I. Rodriguez, E. A. Guarnera, C. Carmona, T. Tanos, and S. O. Angel. 2001. Immunodiagnosis of fasciolosis using recombinant procathepsin L cystein proteinase. Diagn. Microbiol. Infect. Dis. 41:43-49.
6. Song, C. Y., and A. A. Rege. 1991. Cysteine proteinase activity in various developmental stages of *Clonorchis sinensis*: a comparative analysis. Comp. Biochem. Physiol. B. 99:137-140.

発表論文

Nagano, I., F. Pei, Z. Wu, J. Wu, H. Cui, T. Boonmars, and Y. Takahashi. 2004. Molecular expression of a cysteine proteinase of *Clonorchis sinensis* and its application to enzyme-linked immunosorbent assay for immunodiagnosis of clonorchiasis. Clin. Diagn. Lab. Immunol. (in press)

2003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－

2004 年 3 月 10 日

財団法人 日 中 医 学 協 会
理 事 長 殿

研究代表者氏名 溝上 雅史 ㊞

所属機関名 名古屋市立大学大学院医学研究科

部署・役職 臨床分子情報医学分野・教授

所 在 地 〒467-8601 名古屋市瑞穂区瑞穂町川澄1

電話 052-853-8292 (直通)内線

1. 研究テーマ

日中におけるB型肝炎ウイルス genotypeの違いとその臨床的意義の検討

2. 研究期間 自 2003 年 4 月 1 日 ～ 至 2004 年 3 月 15 日

3. 研究組織

日本側研究者氏名 溝上 雅史

所属機関 名古屋市立大学大学院医学研究科 職名 教授

中国側研究者氏名 蔣 音

所属機関 上海市伝染病医院 職名 上海市伝染病医院肝臓症科、
肝炎第三科・主任医師兼行政主任

4. 研究報告書

別紙「研究報告書の作成について」の体裁に倣い、指定の用紙で作成し添付して下さい。

※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。

日中における B 型肝炎ウイルス genotype の違いとその臨床的意義の検討

研究者氏名	溝上 雅史
所属機関	名古屋市立大学大学院医学研究科
役職	教授
共同研究者氏名	蔣 音
所属機関	上海市伝染病医院
役職	肝臓症科肝炎第三科主任医師 兼行政主任

要 旨

これまでに中国における HBV genotype の地理的分布及びその臨床的意義に関する報告がなく、その検討をする必要があると考え、今回上海市伝染病病院肝臓科主任医師である蔣音先生と HBV genotype に関する日中の共同研究をすることになった。蔣音先生に來日して頂き、当研究室にて HBV genotype の測定を中国国内で可能にするために、測定法を教授した。帰国後も集積した検体の測定を行っており、その測定結果と臨床データを共同で検討し論文化する。

Key Words

HBV、Genotype、肝炎、測定法

研究目的

B 型肝炎ウイルス (HBV) は世界中で約 4 億 2 千万人の感染者が存在し、その内 1 億 5 千万人が中国人であり世界中で年間百万人が HBV による肝細胞癌で死亡している。このように中国は世界の肝細胞癌多発地域の一つでそのほとんどは HBV が原因である。一方、本邦は肝細胞癌の 80% は C 型肝炎ウイルスが原因であり東アジアに位置する日本と中国で大きな違いがある。

中国の肝細胞癌の主な原因である HBV は従来血清学的反応の違いから 4 つの血清型に分類されてきたが、我々はそれらの遺伝子配列を分子進化学的に解析し世界で初めて HBV は 5 つの遺伝子型 (genotype) に分類可能であることを明らかにした。その後南米とアメリカから新しい genotype が報告され現在世界中に A から G までの 7 つの genotype が確認されている。さらに、これら HBV の genotype の臨床像が各々の genotype により異なっていることで明らかになった。

そこで、我々はこれら HBV の genotype の簡単な測定法を開発し、中国や日本に多い genotype B, C について検討した。その結果、日本では genotype C が B より明らかに肝細胞癌に進展し易いことを明らかにし、その理由として genotype B は C に比し若年で HBe 抗原から HBe 抗体への seroconversion をするためであることを明らかにした。この現象は HBV の core promoter の変異の有無が原因であることを明らかにした。さらに、genotype B は中国に多いアジア型 (genotype Ba) と日本に多い日本型 (genotype Bj) に分類され、本来の genotype B は Bj であり、中国に多い genotype Ba は Bj のコア領域が予後不良である genotype C と recombination していることを明らかにした。一方、これまでに中国における HBV genotype の地理的分布及びその臨床的意義に関する報告はなく、Ba, Bj を含めた HBV genotype の関連を検討する必要があると思われる。

そこで、今回上海市伝染病病院教授であります Wu Shan Ming (善明) 先生の御好意により上海市伝染病病院肝臓科主任医師である蔣音先生をご紹介いただき、HBV genotype に関する日中の共同研究をすることとなった。

研究結果

上海市伝染病病院 肝臓科 主任医師である蔣音先生が、上海市伝染病病院で肝生検にて確定診断した無症候性 HBV carrier 且つ HBeAg 陽性 10 名、無症候性 HBV carrier 且つ HBeAb 陽性 10 名、慢性肝炎 10 名、肝硬変 10 名、肝細胞癌 10 名の計 50 名の血清とその臨床データを昨年 11 月までに集積した。予定では我々が上海に行き測定法を教授する予定であったが、SARS の問題で行けなかったので代わりに蔣音先生に 2 月 20 日から 3 月 10 日迄の間当研究室に来ていただいたき、持参した検体を使用し、分注作業、試薬の調製等を含め、HBV genotype 測定を具体的に指導した。その結果、無症候性 HBV carrier 且つ HBeAg 陽性 10 名は、genotype A 1 例、genotype B 4 例、genotype C 5 例であった。また、無症候性 HBV carrier 且つ HBeAb 陽性 10 名は、genotype B 8 例、genotype C が 2 例であった。慢性肝炎 10 名は、genotype B 5 例、genotype C が 5 例であった。肝硬変 10 名は、genotype B 1 例、genotype C が 9 例であった。肝細胞癌 10 名は、全例が genotype C であった。また、これら指導を行った結果、蔣音先生自身が中国に於いて、HBV genotype 測定することが可能と考え、帰国の際に HBV genotype 測定試薬と必要な研究用資材を持参していただいた。その試薬を使用して 12 月以降に集積された検体の測定を行っていただき、来月には溝上が上海に行き、日本での測定結果も含め検討する予定である。SARS の問題で研究の遂行が大きく遅れたが、何とか今年中その結果を論文化する。

上海市伝染病病院患者の HBV genotype 測定結果

	無症候性 HBV carrier 且つ HBeAg 陽性	無症候性 HBV carrier 且つ HBeAb 陽性	慢性肝炎	肝硬変	肝細胞癌
genotype A	1	0	0	0	0
genotype B	4	8	5	1	0
genotype C	5	2	5	9	10

2003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16年3月12日

財団法人 日中医学協会
理事長 殿

研究代表者氏名 大槻 勝紀



所属機関名 大阪医科大学

部署・役職 医学部・教授

所在地 〒569-8686 大阪府高槻市大学町2-7

電話 072-684-6411 内線

1. 研究テーマ

婦人科腫瘍における天龍合剤の治療効果について —基礎的および臨床的研究—

2. 研究期間 自 2003 年 5 月 1 日 ～ 至 2004 年 3 月 15 日

3. 研究組織

日本側研究者氏名 大槻 勝紀

所属機関 大阪医科大学 職名 教授

中国側研究者氏名 唐 勁天

所属機関 中日友好医院 中日友好臨床医学研究所 職名 所長

4. 研究報告書

別紙「研究報告書の作成について」の体裁に倣い、指定の用紙で作成し添付してください。

※ 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。

婦人科腫瘍における天龍合剤の治療効果について —基礎的および臨床的研究—

日本側研究者氏名	大槻 勝紀
所 属 機 関	大阪医科大学 教授
中国側研究者氏名	唐 勁天
所 属 機 関	中日友好医院中日友好臨床医学研究所 所長

要旨：

天龍合剤（本合剤）は、肝癌の治療のために白英・龍葵など複数の薬草によって構成された新たな漢方薬であり、中日友好病院では臨床的に治療効果が認められている。大槻らはこれまで子宮内膜における病態をアポトーシスの観点から研究してきた。そこで子宮内膜癌や子宮頸癌における本合剤の有用性を基礎（大阪医科大学：大槻ら）および臨床的（中日友好病院臨床研究所：唐ら）に明らかにすることを目的としている。基礎研究はエストロゲン反応性を有する子宮内膜腺癌細胞（Ishikawacells）を用いて、天龍合剤の抗癌作用・機序について調べた。天龍合剤をステロイドフリーの培地に添加して、形態的に Ishikawa 細胞の細胞死が濃度依存的に誘発することを観察した。WST-1 アッセイで検索した結果、ミトコンドリアの代謝機能が阻害され、細胞の増殖が有意に低下したことが判明した。また、JC-1 というミトコンドリアの膜電位変化によって異なる波長の蛍光を発する色素を用いて、蛍光顕微鏡で観察した結果、ミトコンドリア膜の脱分極によって発する緑蛍光が強くなったと同時に、正常な膜電位依存的に発する紅い蛍光が弱くなっていった。さらに、Flow-Cytometry で分析してみると、正常な膜電位を持つ細胞数が濃度依存的に減少した。これらの結果に一致して、天龍合剤投与によって細胞の DNA 合成能が著しく阻害されたことが BrdU 取り込みアッセイで明らかになった。さらに、天龍合剤によるミトコンドリア代謝の阻害・膜電位の脱分極および DNA 合成の抑制がエストロゲン投与によって拮抗されたことから、天龍合剤は抗エストロゲン作用を有すると考えられる。以上のことから、天龍合剤は子宮内膜腺癌などの悪性腫瘍に有効な治療薬であるといえる。臨床面での本研究は、中国での SARS の流行によりほとんど進んでおらず、今回は残念ながら基礎的研究に限って報告する。

Key Words : estrogen, endometrium, adenocarcinoma, herbs

結言：

臨床に投与される抗癌剤の多くは強い副作用のため、その抗癌作用を十分に発揮できないことがある。しかし、長い歴史の間に洗練された漢方薬の殆どは複数の薬草によって構成される合剤で、治療作用を発揮すると同時に、副作用を軽減するといった特性を有する。そこで我々は、中国で他の系統の癌の治療に既に投与されている薬草を幾つか精選し、産婦人科領域における新たな漢方合剤（天龍合剤）を調合した。本研究はエストロゲン反応性を有する子宮内膜腺癌細胞を用いて、天龍合剤の抗癌作用・機序について調べたものである。

対象と方法：

対象 エストロゲン反応性を有する子宮内膜腺癌細胞——Ishikawa 細胞株、

材料 天龍合剤、エストロゲン、ステロイドフリーの牛血清、MEM 培地、
培養器具、Chamber-Slides

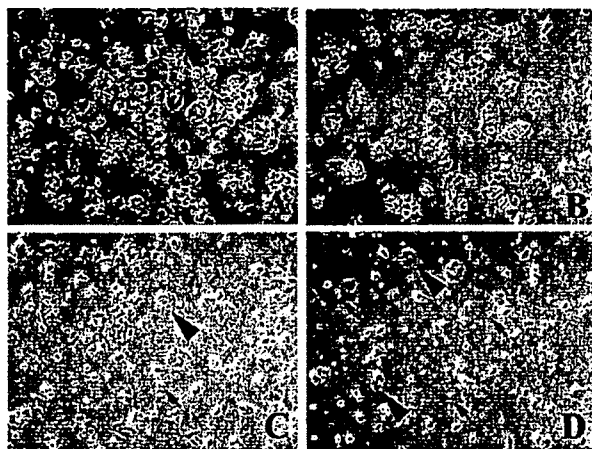
WST-1 アッセイキット、JC-1、BrdU アッセイキット、Annexin アッセイキット、
免疫組織化学染色用試薬・器具、Flow-Cytometry 用試薬・器具

- 方法
1. 通常の細胞培養法で細胞を増やしたのち、天龍合剤を含むステロイドフリーの培地で以下の実験を行う。
 2. 培養細胞のミトコンドリアの代謝機能を検討する目的で、96穴のプレートで培養した細胞に WST-1 を添加し、450 nm 波長の発光量を ELISA Reader で読み取る。
 3. 96穴のプレートで培養した細胞に DNA 合成能を検討する目的で BrdU、HRP で標識した抗 BrdU 抗体、および発光基質を順次に添加し、405 nm 波長の発光量を ELISA Reader で読み取る。
 4. Chamber-Slides で培養した細胞にミトコンドリアの膜電位の変化を検討する目的で JC-1 を、
或いはアポトーシス細胞における細胞膜変化を検討する目的で蛍光標識した Annexin を添加し、
蛍光顕微鏡で観察する。
 5. F75 フラスコで培養した細胞に JC-1 或いは蛍光標識した Annexin を添加し、
Flow-Cytometry で解析する。
 6. 天龍合剤とエストロゲンを同時に投与し、その相互作用を以上の方法で観察する。

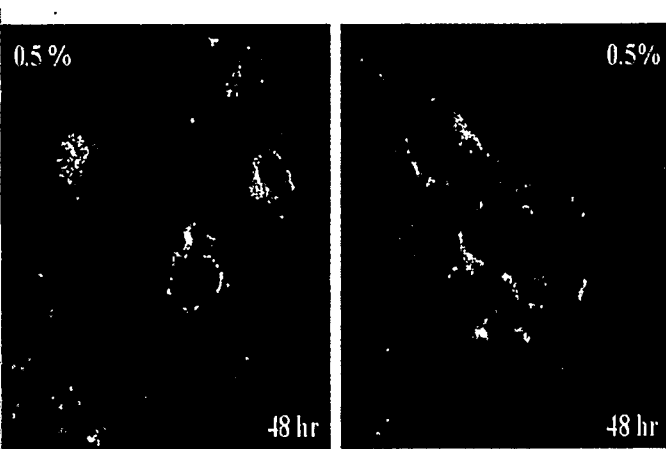
結果：

略語：Cont, コントロール；%, TL compound の投与量(v/v)；nM E, extrogen の投与量 (nM)。

1. 天龍合剤は濃度依存的に細胞死(arrows)を誘発した (図1)。コントロール(A)と比べると、天龍合剤投与群では正常な細胞 (arrowheads) が濃度依存的に減少した(B, C, D)。
2. Annexin V-FITC/PI 二重染色で示すように天龍合剤投与によって、アポトーシス早期の細胞では phosphatidyl serine(PS)は細胞表面に露出し、Annexin V-FITC と特異的に結合し、緑色に発色する。アポトーシス後期あるいはネクローシスに陥った細胞は PI で赤く染まる (図2)。

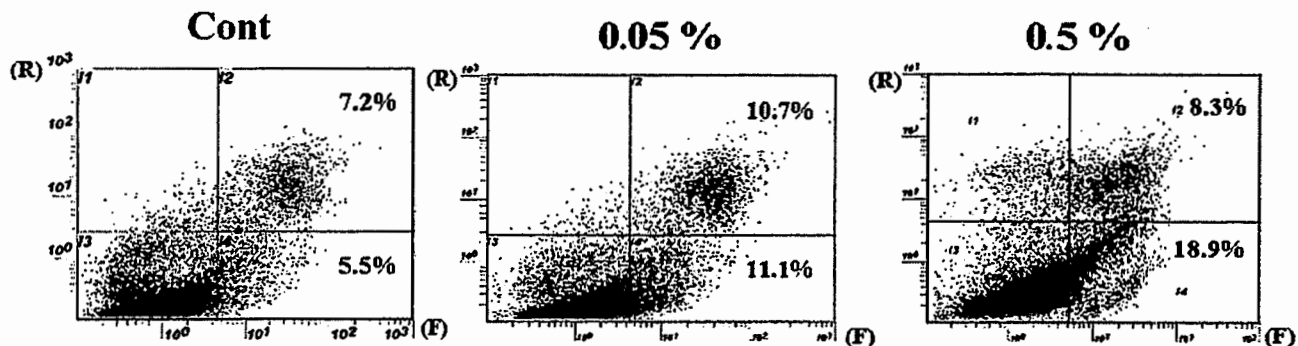


(図1)



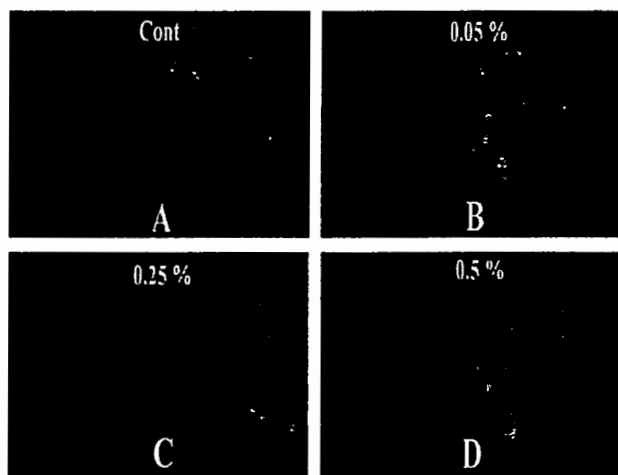
(図2)

3. Annexin V-FITC/PI 二重染色による Flow Cytometry. 図3のごとく、天龍合剤投与群ではPI(縦軸)、Annexin V-FITC(横軸)陽性の細胞がコントロール群より濃度依存的に増加した。

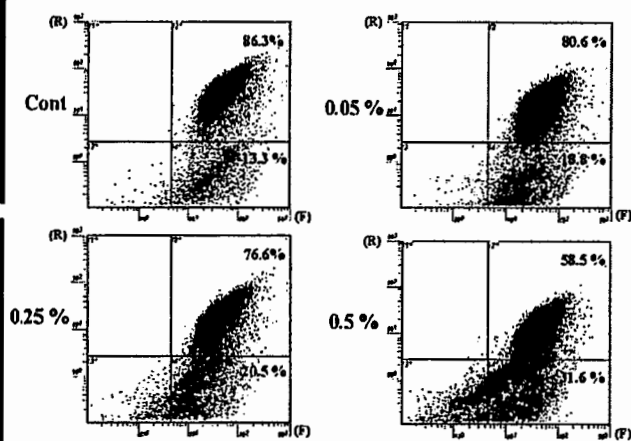


(図3)

4. JC-1 によるミトコンドリア膜電位の変化 (図4, 5)。膜電位が正常な時に JC-1 の赤/緑蛍光は一定に保たれているが (図4A)、天龍合剤投与によって濃度依存的に膜電位が低下し、赤/緑蛍光の比率が低下した (図4B, C, D)。Flow Cytometry (図5) のごとく、天龍合剤投与群では濃度依存的にミトコンドリア膜電位が低下した細胞が増加した。

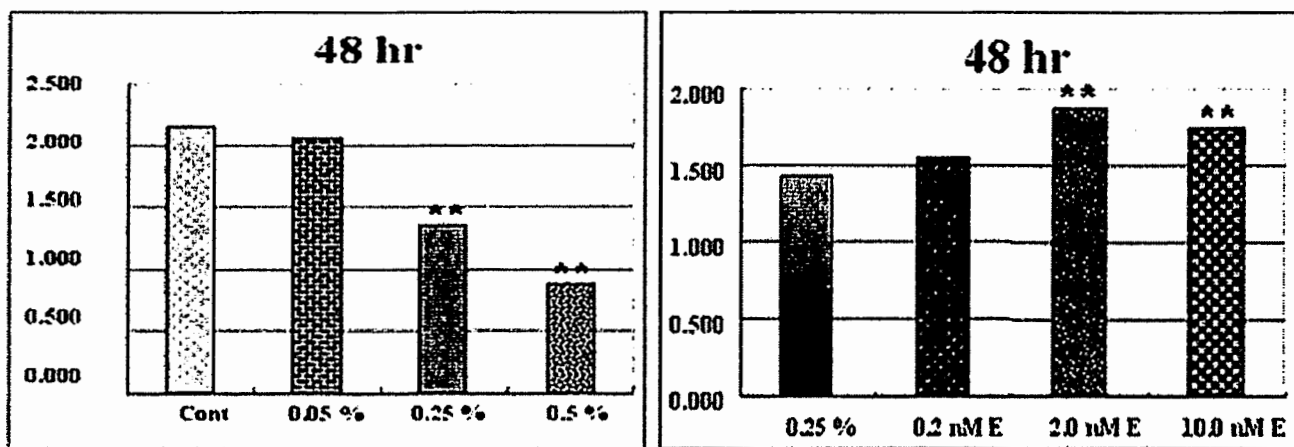


(図4)



(図5)

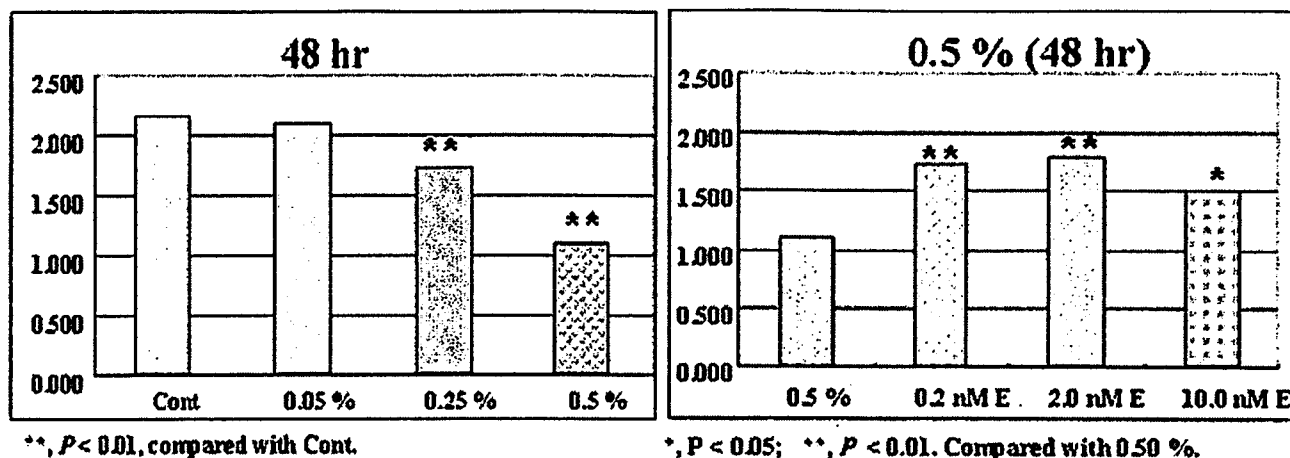
5. WST-1 アッセイで検索した結果 (図6)、天龍合剤の投与により有意に低下した細胞の増殖能はエストロゲン投与で拮抗された。同様の結果は BrdU アッセイ (図7) でも観察された。



**, $P < 0.01$, compared with Cont

**, $P < 0.01$, compared with 0.25 % and 0.5 %, respectively.

(図6)



(図 7)

考察 :

天龍合剤投与により子宮内膜細胞癌にアポトーシスが誘導されるが、そのシグナル伝達経路はミトコンドリア経路によることが明らかになった。さらにエストロゲン投与によって天龍合剤によるアポトーシスの誘導が抑制されたことから、天龍合剤の抗腫瘍効果は、抗エストロゲン作用も関与することが示唆された。

今後は子宮悪性腫瘍における本合剤の治験例を増やし、臨床的效果を検討してこれまでの基礎的研究から本合剤の作用機序ならびに有効成分を明らかにしてゆきたい。

作成日 : 2004 年 3 月 12 日

2003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－

2004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 加我 君彦
所属機関名 東京大学医学部附属病院
部署・役職 耳鼻咽喉科 教授
所在地 〒113-8655 文京区本郷7-3-1
電話 03-5800-8924 内線

1. 研究テーマ

新生児聴覚スクリーニング後の追跡研究

2. 研究期間 自 2003年 9月 1日 ～ 至 2004年 3月 15日

3. 研究組織

日本側研究者氏名 加我 君彦
所属機関 東京大学医学部附属病院 職名 教授

中国側研究者氏名 黄 麗輝
所属機関 中国北京同仁病院 職名 講師

4. 研究報告書

別紙「研究報告書の作成について」の体裁に倣い、指定の用紙で作成し添付して下さい。

※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。

新生児聴覚スクリーニング後の追跡研究

研究者名 黄 麗輝
中国所属機関 首都医科大学付属北京同仁病院耳鼻咽喉科講師
北京市耳鼻咽喉科研究所
共同研究者 加我君孝, 新正由紀子

要 旨

目的： 難聴児の早期発見と早期診断のシステム、早期療育の体制を確立させる。

対象と方法： 2001年2月から2003年12月に新生児聴覚スクリーニングの検査を2回受け、不合格とされた新生児と乳幼児96名を対象にして、難聴の確定診断はABRで行った。

結果： 初回ABR検査で、正常とされたのは29名(30%)、異常とされたのは67名(70%)であった。
最終ABRの結果では、正常とされたのは30名、初回正常の29名を含め、計59名で、全体の61%で、
難聴と確定診断されたのは37名(39%)であった。

結論： 新生児聴覚スクリーニング後不合格とされる新生児と乳幼児は軽度難聴と中等度難聴とされるものは正常化されるものが多いことがわかった。

Key Words 新生児聴覚スクリーニング, 耳音響放射(OAE), 聴性脳幹反応(ABR)

緒 言：

新生児聴覚スクリーニングは中国でも導入されつつある。どのように新生児科、小児科、耳鼻科および難聴教育の専門家の協力を得られ、効果的に難聴児の早期発見、早期診断のシステム、早期療育の体制を確立させるかについて、中国側がまだ立ち遅れるため、日本の経験を生かすことによって、この共同研究を行った。

新生児聴覚スクリーニング後不合格とされた乳幼児の聴覚のフォローは極めて重要であることとされているが、実に難しいことである。本研究は新生児聴覚スクリーニング後不合格とされた新生児と乳幼児96名の聴力をフォローして、その結果を検討して報告する。

対象と方法：

北京同仁病院耳鼻咽喉科外来に紹介され、新生児聴覚スクリーニング後不合格とされた新生児と乳幼児96名を対象とする。対象児は2001年2月から2003年12月に北京市産婦人科病院と北京市海淀区産婦人科病院で生まれ、生後3-7日に初回聴覚スクリーニングを受け、Referとされた場合、生後1ヶ月または42日に二回目の検査を受ける。初回と二回目の検査は耳音響放射(TEOAE)とティンパノメトリーを用いた。北京同仁病院耳鼻咽喉科外来に紹介されたのはすべて二回の検査ともReferとされたものである。難聴の診断において、まず保護者に田中の作成した聴覚発達テストリスクを記入してもらって、聴性行動反応(BOA)または条件詮索聴性反応(COR)を観察した。難聴の確定診断は聴性脳幹反応(ABR)を行った。確定診断のため、1回目ABR異常とされたものは2-3ヶ月に1回ABR検査を行った。

結 果：

新生児聴覚スクリーニングで不合格とされた96名のうち、男児63名、女児33名。96名192耳のうち、

左 82 耳、右 65 耳、片耳 45 名（左 14 耳、右 31 耳）、両耳 51 名（102 耳）。受診月齢は 1 ヶ月から 11 ヶ月までであったが、2 ヶ月と 3 ヶ月に集中し、全体の 55%（53/96）を占めている（図 1）。難聴の程度は次のように ABR の閾値で分類した。正常は 20–30 dB HL、軽度難聴は 31–50 dB HL、中等度難聴は 51–70 dB HL、中一高度難聴は 71–90 dB HL、高度難聴は 91 dB HL 以上であった。初回 ABR の検査で、正常とされたのは 29 名（30%）、異常とされたのは 67 名（70%）であった（図 2）。異常の 67 名の内訳は、軽度難聴 38 名（全体の 40%）、片耳 23 名、両耳 15 名；中等度難聴 17 名（全体の 18%）、片耳 8 名、両耳 9 名；中一高度難聴 6 名（全体の 6%）、片耳 2 名、両耳 4 名；高度難聴 6 名（全体の 6%）、片耳 4 名、両耳 2 名であった。異常の 67 名のうち、片耳 37 名（55%）、両耳 30 名（45%）であった。

初回 ABR 異常とされた 67 名は、2 回または 3 回 ABR の検査を行った。最終 ABR の結果では、正常とされたのは 30 名、初回正常の 29 名を含め、計 59 名で、全体の 61% で、難聴と確定診断されたのは 37 名（39%）であった（図 3）。難聴の 37 名の内訳は軽度難聴 13 名（全体の 14%）、片耳 3 名、両耳 10 名；中等度難聴 13 名（全体の 14%）、片耳 6 名、両耳 7 名；中一高度難聴 5 名（全体の 5%）、片耳 2 名、両耳 3 名；高度難聴 6 名（全体の 6%）、片耳 4 名、両耳 2 名であった。難聴の 37 名のうち、片耳 15 名（40.5%）、両耳 22 名（59.5%）であった。

初回 ABR と最終 ABR の結果を比べて見ると、正常化されたのは多いことが図 4 で示している。正常とされたのは初回 ABR の検査で 29 名、最終 ABR の検査では 30 名、全部で 59 名であった。その内訳は初回 ABR の検査で軽度難聴の 38 名は最終 ABR の検査で、15 名が正常で 13 名とされ；初回 ABR の検査で中等度難聴の 17 名のうち 4 名が正常で 13 名とされ、中一高度難聴の 6 名が 1 名が正常で 5 名とされ、高度難聴 6 名は不変であった（図 5）。

考 察：

新生児聴覚スクリーニングで Refer とされるものが、その後の精密聴力検査で、正常化した例が多いと報告している¹⁾。松本らの報告では、精密検査を行った 155 例のうち 87 例が正常聴力であった²⁾。われわれの研究では、最終 ABR の検査で、正常とされたのは 59 名で、全体 96 名の 61% を占めている。特に初回 ABR 検査で、軽度難聴と中等度難聴とされるものは正常化されることが多く、中一高度難聴と高度難聴はほとんど不変であった。このことから新生児聴覚スクリーニング後不合格とされる新生児と乳幼児は ABR を 1 回受けても、難聴の確定診断のため、2 回または 3 回 ABR を受け、長期的なフォローが必要であることを示唆している。難聴が疑われ、検査結果を家族に説明する場合、慎重に行うことが大事なことと思われる。難聴の早期発見、早期診断において、中一高度難聴と高度難聴とされる場合、聴力の変化が少なく、早期に補聴器を装用して、早期療育を受けた方が良いと考えられる。

軽度～中等度難聴と診断され、6 ヶ月に補聴器を装用させ、発達とともに正常化して、1 歳半または 2 歳頃補聴器を外した報告がある¹³⁾。なぜ新生児聴覚スクリーニングで Refer とされるものが結果的に正常するものが多いのか、その原因は、①スクリーニングの異常とされるスクリーニング器の閾値は 35–40 dB と低く設定されている、②精密聴検の異常とされる ABR の閾値は 50–60 dB と中等度のレベルに設定されていることにあるという¹⁴⁾。聴覚伝導路で考えて見ると、新生児の中耳空に間葉組織の残存頻度は 19%、1 歳までに吸収されるという¹⁴⁾。ABR の I 波の潜時は新生児期ではやや延長して、1 歳になって成人と同じ潜時になることから 新生児では髄鞘化は完成していない¹⁵⁾。新生児と乳幼児は聴力が正常化される原因は中耳空に間葉組織の残存と髄鞘化が完成していないことによるものと考えられる。

結 論：

新生児聴覚スクリーニング後不合格とされる新生児と乳幼児は初回の検査で軽度難聴と中等度難聴とされるものは正常化されることが多く、確定診断のため、精密 ABR の検査でも 1 回だけではなく、2 回または 3 回を受ける必要がある。難聴の早期発見、早期診断において、中一高度難聴と高度難聴とされる場

合、聴力の変化が少なく、早期に補聴器を装用して、早期療育を受けた方が良いと考えられる。

参考文献：

1. 加我君孝：「難聴が疑われた新生児の聴覚・言語獲得のための長期追跡研究」厚生労働科学研究費補助金，感覚器障害事業，平成 14 年度総括・分担研究報告書，2003.
2. 松本恭子，佐野光仁，岡田優：大阪府における新生児聴覚スクリーニング体制の構築と当科における新生児聴覚スクリーニング後精密検査の現況．小児耳，24：58-62，2003.
3. Kaga M, Ohuchi M, Kaga K, et al. Normalization of poor auditory brainstem response in infants and children. Brain Dev, 6:458-66, 1984.
4. 加我君孝，新庄由紀子：新生児の聴覚一形態と機能の基礎一．MB ENT, 33:1-8, 2004.
5. Kaga K, Tanaka Y: Auditory brainstem response and behavioral audiometry. Developmental Correlates. Arch Otolaryngol, 106:564-567, 1980.

作成日：2004 年 3 月 8 日

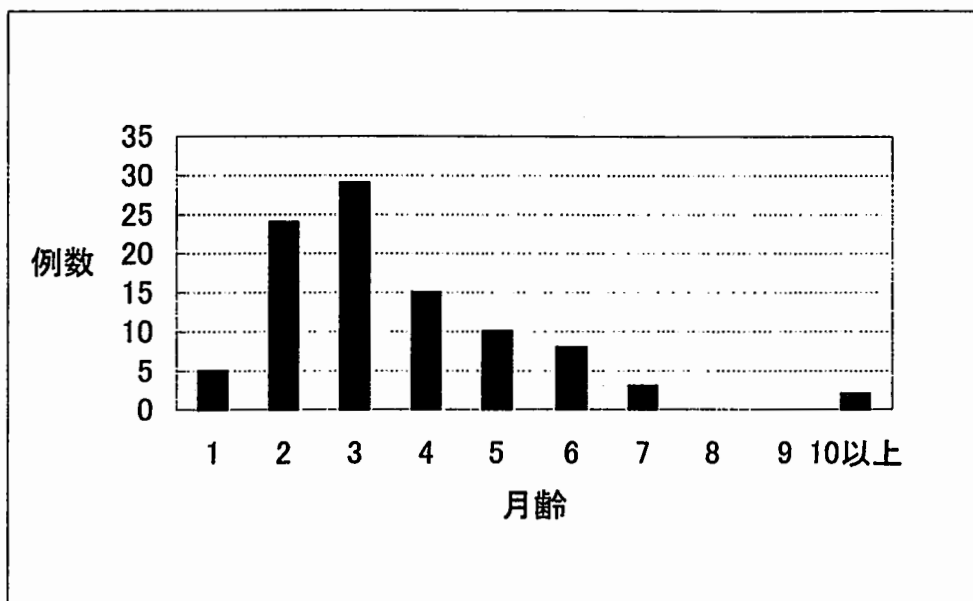


図1 受診月齢

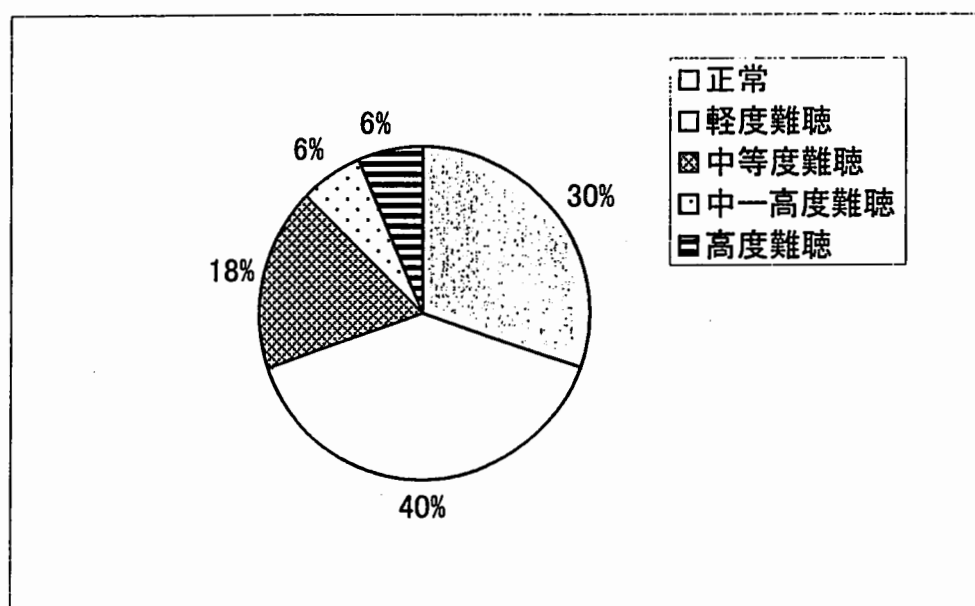


図2 初回ABRの結果

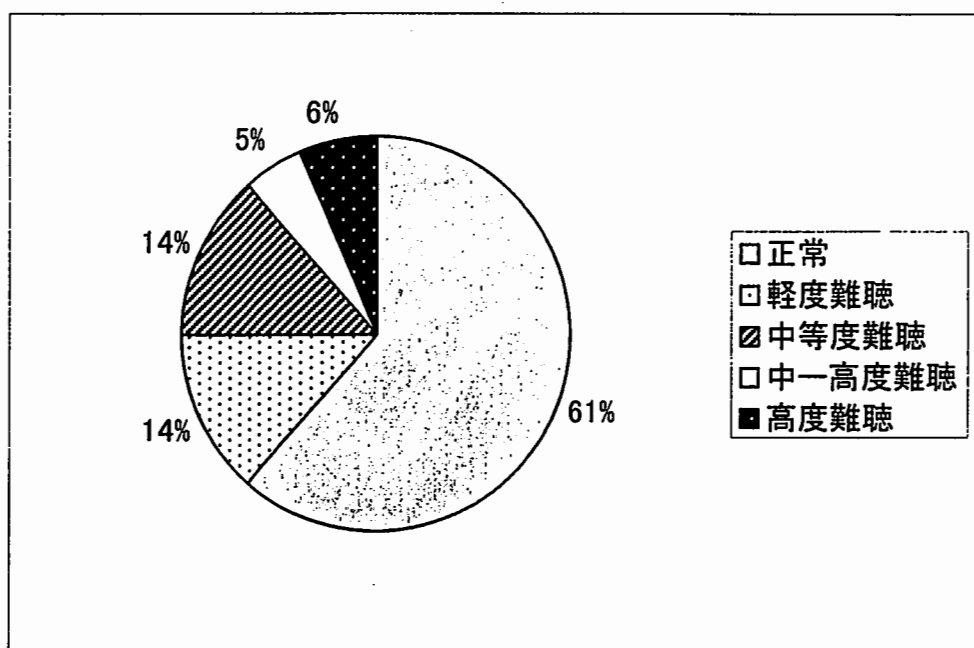


図3. 最終ABRの結果

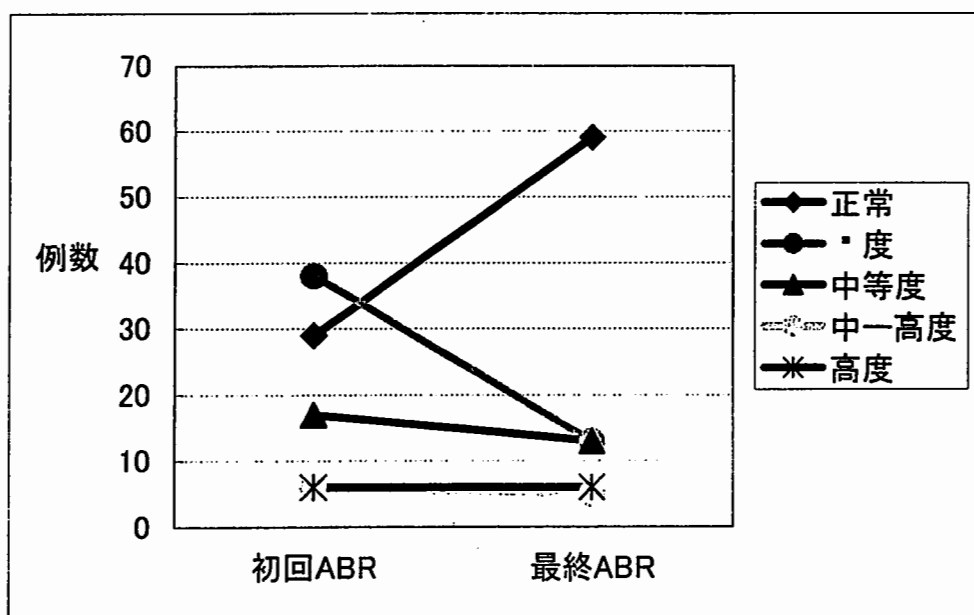


図4. 初回と最終ABRの変化

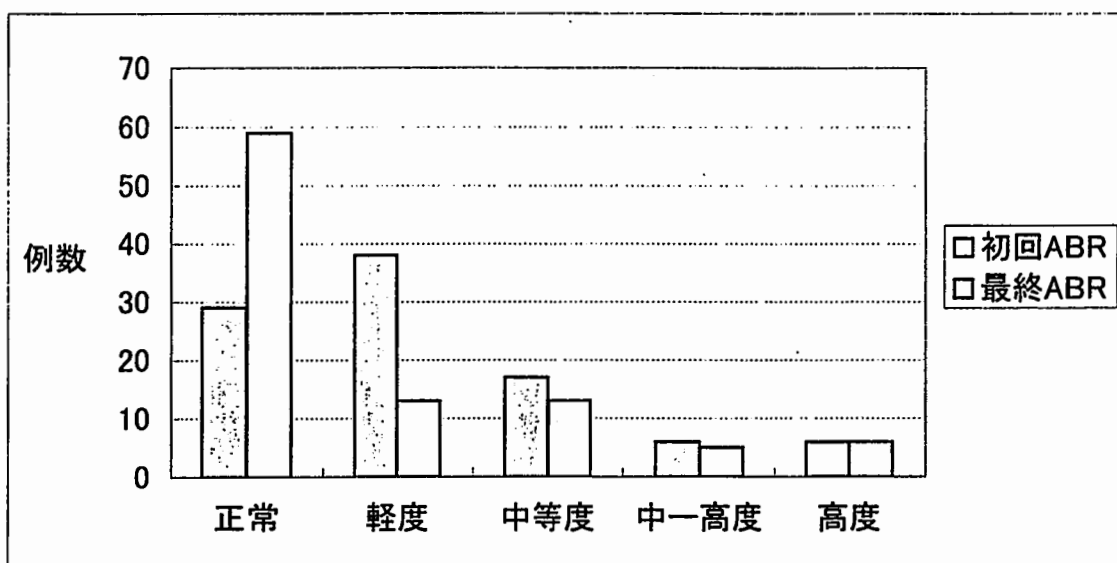


図5. 初回と最終ABR結果の比較

2003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－

2004 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 川 口 陽 子
所属機関名 東京医科歯科大学 大学院
部署・役職 健康推進歯学分野 教授
所 在 地 〒 113-8549 東京都文京区湯島 1-5-45
電話 03-5803-5475 内線



1. 研究テーマ

中華人民共和国における口臭および歯周疾患予防プログラム構築のための疫学調査

2. 研究期間 自 2003 年 5 月 1 日 ～ 至 2004 年 3 月 15 日

3. 研究組織

日本側研究者氏名 川 口 陽 子
所属機関 東京医科歯科大学 職名 教授

中国側研究者氏名 張 博 学
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「研究報告書の作成について」の体裁に倣い、指定の用紙で作成し添付して下さい。

※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。

中華人民共和国における口臭および歯周疾患予防プログラム構築のための疫学調査

日本側研究者氏名	川口陽子
所属機関・職名	東京医科歯科大学大学院 教授
中国側研究者氏名	張博学
所属機関・職名	北京大学口腔医学院 教授

Abstract:

The purpose of this study was to estimate the distribution of halitosis in a general Chinese population and assess the relationship between halitosis and oral health status, social status and other behaviours. The number of subjects was 2,000 (1,000 males and 1,000 females), aged from 15 to 64 years living in Beijing. Questionnaire survey and oral examination was conducted. To assess the malodor level, volatile sulphur compounds (VSC) concentration in mouth air was evaluated by the Halimeter®. The caries status, periodontal status and oral hygiene was examined using DMFT index, pocket depth (PD), modified sulcus bleeding index (mSBI), plaque index (PI), calculus index (CI), and tongue coating score (TCS). The following results were obtained. The prevalence of halitosis (75 ppb VSC and above) was 35.4% for the total population. On the other hand, the rate of persons who concerned about their own oral malodor was 27%. They often tried to use brushing, mouthrinse or chewing gum to reduce malodor level, but only 7% said they visited medical or dental clinic to receive halitosis treatment. Almost half of the subjects did not know that halitosis was caused by oral disease and poor oral hygiene. There were no significant differences between the mean values of VSC for urban and rural areas or among age groups. The VSC measurement time was related with VSC values. In the late morning, VSC values were found to be significantly higher than other period. In all age groups, significant correlation was found between VSC and TCS. Significant correlation was observed between VSC and PI in all age groups except 25-34-year-old group. For periodontal status, there were significant relationships between mSBI and VSC, CI and VSC, PD and VSC. However caries status was not related with VSC in any age groups. Logistic regression analysis revealed that TCS, gender, CI and mSBI were significantly related with VSC. TSC showed the highest odds ratio among them, followed by mSBI, gender and CI. From the results of this study, it was revealed that the prevalence of halitosis was high, and that poor oral hygiene and poor periodontal status might be the cause of halitosis. It was concluded that preventive programs for periodontal disease and halitosis are definitely necessary. Combined with clinical preventive and treatment program, community-based preventive program should be planned and implemented in China.

Key Words: Halitosis, VSC, Periodontal disease, Tongue coating, Chinese population

Introduction:

Few studies have been reported the prevalence of halitosis in the general population with classical epidemiological methods. The prevalence rate of halitosis has been previously determined from 2.4% to 58.8% with utilising a sulphide monitor (Halimeter®, Interscan CA), organoleptic measurement or the subjects' self-judgement for assessing oral malodor¹⁻³⁾.

However without the standardisation, data will lack accuracy and reliability in the examination process, the diagnosis of halitosis and ultimately the value of the data itself. The availability of the Halimeter® has led to an unprecedented increase in oral malodor research because of its convenience, portability and reproducibility.

The purpose of this study was to estimate the distribution of halitosis in a general Chinese population and assess the relationship between halitosis and oral status, social status and other behaviours with employing the standardised procedure for measurement of halitosis.

Methods:

The subjects in this study were 1,000 males and 1,000 females, aged from 15 to 64 years living at 4 districts/counties of Beijing, China. These subjects were sampled by a stratified, cluster method by same proportion, from urban and rural areas, and from five age groups; 15-24, 25-34, 35-44, 45-54 and 55-64. Before the study, all the subjects were informed the purpose of the survey and participated voluntarily. Data analysis was conducted anonymously.

First, subjects were asked to fill in a questionnaire which included 7 main items: socio- economic status (income, education etc), oral habits (brushing etc), knowledge for oral health, dental visit pattern, life habits (smoking etc), medical history and self-judgement of halitosis.

Prior to the oral examination, subjects were instructed to refrain from eating, drinking, smoking, brushing and mouth rinsing for 2 hours. To assess malodor level, volatile sulphur compounds (VSC) concentration in mouth air were evaluated as well as organoleptic measurements (OM). VSC was measured by the Halimeter®. Every morning before the survey, the Halimeter® was calibrated with standard 250 in parts per billion (ppb) H₂S produced by the Permeater® (PD-1B, Gastec, Japan). For OM subjects were instructed to exhale briefly through the mouth, at a distance of approximately 10 cm from the nose of the examiner. A privacy screen with a hole was placed between the subjects and the examiner. Data were recorded on a scale of 0 to 5⁴⁾.

Oral examination was conducted with dental mirror and CPI explorer under the artificial light. The caries status, periodontal status and oral hygiene was examined using DMFT index, pocket depth (PD), modified sulcus bleeding index (mSBI), plaque index (PI), calculus index (CI), and tongue coating score (TCS). PD and mSBI were assessed at 6 teeth (#16, #21, #24, #36, #41 and #44). For CI the highest score of at the 6 sites was record. TCS was evaluated in 4 grades by inspection of the distribution of tongue coating area.

Statistical analysis by SPSS 10.0E was carried out for independent-samples t test and one way ANOVA (Student-Newman-Keuls) for the mean value of VSC. Pearson correlation and logistic regression were used to assess the association between VSC and other factors.

Results:

VSC was found to be related with OM in all age groups. As 75 ppb of VSC was reported socially acceptable level of halitosis¹⁾, the prevalence of halitosis that was scores above this level was 35.4% for the total population. There were no significant differences between the mean values of VSC for urban and rural

areas or among age groups.

The VSC measurement time was related with VSC values. In the 15-24, 25-34 and 55-64-year-old groups, the VSC values were found to be significantly higher in the 10:01-12:00 period, but no differences among 8:00-10:00, 13:00-15:00 and 15:01-17:00 were noted. In 35-44 and 45-54-year-old group, there were no statistically significant differences.

Table 1 shows the relationship between VSC values and oral health status by age groups. In all age groups, significant correlation was found between VSC and TCS. Significant correlation was observed between VSC and PI in all age groups, except the 25-34-year-old group. For periodontal status, there were significant relationships between mSBI and VSC, CI and VSC, PD and VSC. However DMFT was not related with VSC in any age groups.

According to the questionnaire, the subjects who brushed teeth in the evening showed lower VSC scores (78.54 ± 71.14) than those who did not (86.44 ± 81.11). The difference was significant. However, other items such as social conditions, oral habits, knowledge of oral health, frequency of dental visit, life habits, or medical history had no relationship with VSC values.

Twenty-seven percent of the subjects reported that they concerned about their own oral malodor, but this figure was lower than the prevalence of Halimeter® assessment. Only 14.6% of them thought that halitosis was a problem that affected their daily life. The subjects who concerned their own malodor often tried to use brushing, mouthrinse or chewing gum to reduce malodor level, but only 7% said they visited medical or dental clinic to receive halitosis treatment. Almost half of the subjects did not know that halitosis was caused by oral disease and poor oral hygiene. They believed that some systemic diseases produced halitosis. Among the subjects whose VSC values were 75 ppb and above, 67.5% reported they had no systemic disease. There was no statistical difference of VSC values between those with and without systemic disease.

On the basis of the results of ANOVA, logistic regression analysis was conducted (Table 2). TCS, gender, CI and mSBI were significantly related with VSC. TSC showed the highest odds ratio (OR) value among them, followed by mSBI, gender and CI.

Discussion:

In this study, the prevalence of halitosis was higher than the previous epidemiological reports¹⁻³⁾. The reason might be due to the poor oral hygiene and poor periodontal status of the present samples. The mean PI was 2.65, and 94.5% of the subjects had gingivitis. Age factor did not contribute to the occurrence of halitosis. However the correlation between gender and VSC was observed in the logistic regression analysis. VSC of females was higher than that of males. Tonzetich et. al.⁵⁾ previously reported VSC in mouth air was found to be elevated during mid-cycle and around menstruation, therefore females might show high prevalence of halitosis.

VSC scores varied by the measurement time, the mean value was highest at 10:01 – 12:00, followed by 8:00 – 10:00, 15:01 – 17:00 and 13:00 – 15:00. The VSC values decrease obviously after oral activity,

especially after meals. This may be because that oral activities can stimulate amount of saliva and then reduce the level of bacteria on tongue and in saliva which is the source of the VSC.

In this study, the correlation between VSC and TCS was significant in all age groups. TCS showed the highest odds ratio value in the all factors. The tongue coating is comprised of epithelial cells from the oral mucosa, microorganisms, and leukocytes from periodontal pockets. The dorsal surface of the tongue therefore is the favourite site for the growth of the anaerobic bacteria responsible for halitosis. It should be necessary to remove tongue coating to reduce VSC level and improve halitosis.

Periodontal disease is regarded as another important contributing factor of halitosis. This study also supports this association. The more severe periodontal disease the person had, the higher value of VSC was recorded. Periodontal pathogenic bacteria, such as *B. fosythus*, *P. gingivalis* and *P. intermedia* influenced the production of VSC. In this study, VSC was associated with bleeding index. Blood decomposition products themselves can also produce sulphur-containing peptides and amino acids, which are the source for VSC. It was also reported VSC itself might also damage the periodontal tissues⁶. These are the reasons of the relationship between VSC and periodontal disease.

No correlation was found between VSC and dental caries or dental plaque. In this study, we found no relationship between VSC and smoking habits. This result was different from previous papers¹). Usually smoking has a negative effect on periodontal disease and saliva flow, which may result in halitosis. The male smoking rate in China is the highest in the world. Further research on smoking and halitosis is necessary in the Chinese population. Other factors on social or economic status, oral habits, knowledge of oral health, frequency of dental visit, or other life habits had no relationship with VSC. Further no difference was found in VSC between the subjects who have good oral behaviours or not in this study population.

This study was the oral epidemiological survey on Chinese population in urban and rural area. From the results of this study, it was revealed that the prevalence of halitosis was high, and that poor oral hygiene and poor periodontal status were related with halitosis. It was concluded that preventive programs for periodontal disease and halitosis are definitely necessary. Combined with preventive and treatment program in the clinical settings, community-based preventive program should be planned and implemented in China.

Reference:

- 1) Miyazaki H, Sakao S, Katoh Y, Yakehara T: Correlation between volatile sulphur compounds and certain oral health measurements in the general population. *J Periodontol* 66: 679-684 1995.
- 2) Frexinos J, Denis P, Allemand H, Allouche S, Los F, Bonnelye G: Descriptive study of digestive functional symptoms in the French general population. *Gastroenterol Clin Biol* 22: 785-791 1998.
- 3) Söder B, Johansson B, Söder PO. The relation between oral hygiene and periodontal disease. *Swed Dent J* 24: 73-82 2000.
- 4) Rosenberg M, Septon I, Eli I, Bar-Ness R, Gelernter I, Brenner S, et al. Halitosis measurement by an industrial sulphide monitor. *J Periodontol* 62: 487-489 1991.
- 5) Tonzetich J, Preti G, Huggins GR: Changes in concentration of volatile sulphur compounds of mouth air

during the menstrual cycle. J Int Med Res 6: 245-254 1978.

- 6) Johnson P, Yaegaki K, tonzetich J: Effect of volatile thiol compounds on protein metabolism by human gingival fibroblasts. J Peiodontal Res 27: 553-561 1992.

Table 1 : Pearson correlations between VSC and oral health status by age group

Age Number	VSC				
	15-24 (year) n=400	25-34 (years) n=400	35-44 (years) n=400	45-54 (years) n=400	55-64 (years) n=400
TCS	0.216 **	0.241 **	0.236 **	0.147 **	0.202 **
PI	0.210 **	0.081	0.107 *	0.122 *	0.115 *
mSBI	0.106 *	0.302 **	0.220 **	0.207 **	0.020
CI	0.203 **	0.206 **	0.156 **	0.200 **	0.035
PD	0.118 *	0.251 *	0.162 **	0.149 **	0.018
DMFT	0.037	0.035	-0.014	-0.071	0.045
OM	0.510 **	0.234 **	0.438 **	0.476 **	0.483 **

*: p<0.05 **: p<0.01

Table 2 : The results of logistic regression

	B	S.E.	OR
PD	-0.062	0.09	0.94
mSBI **	0.318	0.096	1.375
CI *	0.163	0.074	1.177
PI	0.102	0.085	1.107
Brushing in the evening	-0.148	0.104	0.862
Gender **	0.298	0.104	1.347
Time	-0.035	0.044	0.966
TCS **	0.6	0.068	1.823

*: p<0.05 **: p<0.01

注：本研究は、2003年9月27日「第52回日本口腔衛生学会・総会」にてポスター発表、「口腔衛生会誌」（2003年8月 第53巻 第4号 461頁）に掲載。


作成日：2004年3月1日

2003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－

2004年3月11日

財団法人 日中医学協会
理事長 殿

研究代表者氏名 岡田 嘉仁 
所属機関名 明治薬科大学
部署・役職 天然薬物学教室 助教授
所在地 〒204-8588 東京都清瀬市野塩2-522-1
電話 0424-95-8906 内線 _____

1. 研究テーマ

糖尿病合併症に有効な中国産薬用資源の新薬への応用開発

2. 研究期間 自 2003年4月1日 ～ 至 2004年3月15日

3. 研究組織

日本側研究者氏名 奥山 徹 他
所属機関 明治薬科大学 職名 教授

中国側研究者氏名 匡海学 他
所属機関 黑龙江中医药大学 職名 学長、理事長

4. 研究報告書

別紙「研究報告書の作成について」の体裁に倣い、指定の用紙で作成し添付して下さい。

※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。

糖尿病合併症に有効な中国産薬用資源の新薬への応用開発

研究者氏名 岡田嘉仁
所属機関 明治薬科大学 天然薬物学教室 助教授
共同研究者名 奥山 徹、馬場正樹、鈴木龍一郎、石丸亜貴子
匡海学、程 偉、王 威、李 帥、常海濤

要 旨

当研究室において、すでにタンパク糖化反応（メイラード反応）抑制作用が認められていた生薬の南蛮毛（ナンバンモウ）について、さらなる分画および成分検索を行い、活性成分を含め 11 種の化合物を単離した。NMR をはじめとする各種スペクトルデータなどの解析により、1 を新規フラボノイド配糖体 chrysoeriol-6-C- β -fucopyranoside と決定した。2 は類似の chrysoeriol-2''-O- α -rhamnopyranonyl-6-C- β -fucopyranoside と、また、3~11 については後述のように同定した。今回、中国で新たに採集した各種の海藻について、活性評価のためのアルドース還元酵素（Aldose Reductase : AR）阻害活性試験等を行い、いくつかに活性を認めた。特に *Symphycarpha latiuscula* (Harvey) Yamada (日本名:イソムラサキ) は高い活性を示した。また、アラメからは新規化合物 1-(3',5'-dihydroxyphenoxy)-7-(2'',4'',6''-trihydroxyphenoxy)-2,4,9-trihydroxydibenzo-1,4-dioxin (12)を含む3種のフロログルシノール誘導体を単離した。これらはいずれも Table 4 に示したように強い活性を示した。STZ 糖尿病モデル動物による南蛮毛の有効性の評価については現在進行中である。

Key Words 糖尿病合併症、南蛮毛、海藻、アラメ、グリケーション阻害、アルドース還元酵素阻害

結 言：

日中両国において、現代の多様化する食習慣をはじめとする生活習慣の中、増加傾向にある糖尿病合併症の予防を指標に、近代的な手法によるあらたな観点からの評価を行い有用な素材を発掘することは急務である。糖尿病合併症の発症要因としていくつかのことが考えられているが、その中で当研究室では主として、機能タンパクのグリケーション（非酵素的糖化反応）阻害とポリオール代謝経路の律速酵素であるアルドース還元酵素阻害効果に着目して研究を行っている。生体内ではあらゆるタンパクがグルコース存在下でグリケーションを受けて、後期糖化反応生成物（Advanced glycation end products: AGE）になりうる。この生成した AGE あるいは AGE 化の過程が糖尿病合併症に関与していると考えられている。事実、AGE は糖尿病性腎症などでも多く認められている。一方、糖尿病状態ではポリオール代謝経路とくにアルドース還元酵素が亢進し、特に糖の取り込みがインスリン非依存的におこる、神経、腎糸球体、水晶体、網膜などの組織はソルビトールが過剰蓄積し、結果として合併症を招来することが知られている。しかしながら、合併症に有効な薬剤はほとんどなく、AR 阻害剤としてキネダックなどがあるのみである。このような背景のもと、我々は近年急増している糖尿病、またその合併症の予防に有効な天然素材の探索を目的として研究に着手した。

方法と結果：

Glycation 阻害活性を有する南蛮毛（ナンバンモウ）の成分検索

南蛮毛は、トウモロコシ *Zea mays* L. (イネ科) の新鮮花の花柱と花頭を乾燥したものであり、一般的にはトウモロコシの毛のことである。当研究室で行っている糖尿病合併症の予防に関する研究の一環として行ったグリケーション阻害活性試験において活性が認められ、活性成分の一部として2種のフラボノイド C-配糖体を単離した。¹⁾ さらなる活性成分の単離と構造決定、ならびに糖尿病ラットにおけ

る有用性を評価するため以下の研究に着手した。

紀伊国屋漢薬局から購入した中国吉林省産南蛮毛 1kg をメタノールで抽出し、得られたエキスを引き続き分画し、既に単離したフラボノイド2種の他、さらに2種のフラボノイド C-配糖体 (1、2) を、また、水抽出エキスより6種の化合物 (3~8) を得た。別途抽出した水エキスの酢酸エチルで分配して得られた酢酸エチル層 20g を分画し、化合物 9~11 を得た。

南蛮毛から単離した成分の構造研究

南蛮毛を熱メタノールで抽出して得られた抽出液を減圧下濃縮後、Diaion HP-20、TOYOPEARL-HW-40F および逆相 HPLC を組み合わせて新規化合物 (1) と既知化合物 (2) を単離した。1 は FAB-MS より分子量 446 であり ^1H -、 ^{13}C -NMR さらに COSY、HMQC、HMBC などの 2D-NMR の解析からフラボンの C-配糖体であることが推測された。次にデカップリング、差 NOE 実験の結果から糖は β -フコースであることが明かとなった。また、フラボン5位の水酸基からのプロトンおよび糖のアノマープロトンからの HMBC によりフコースはフラボンの6位に結合していることが明らかとなった。以上のことから 1 を新規化合物 chrysoeriol-6-C- β -fucopyranoside と決定した。2 の ^1H -NMR は 1 とよく似ており、1 にさらに糖が結合した化合物であることが推測された。2D-NMR を詳細に検討した結果、2 は chrysoeriol-2''-O- α -rhamnopyranonyl-6-C- β -fucopyranoside と同定した。また、この化合物は 1995 年に Maurice E. Snook らによって南蛮毛からの単離が報告されているが、 ^{13}C の帰属が不完全であったので完全に帰属した。²⁾ これらの化学構造は各種スペクトルデータの解析を中心に行い、1 および 2 は図 (Fig. 1) に示したように決定した。また、3~11 は以下のように同定した。

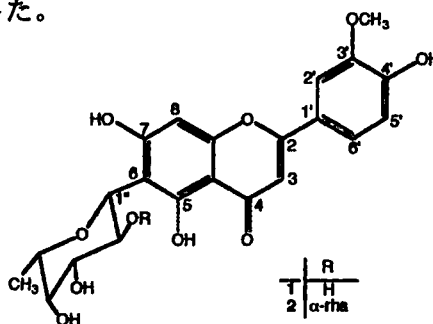
3: adenosine, 4: guanosine, 5: urasil, 6: vanillin,

7: acetovanillone, 8: vanillic acid,

9: stigmast-4-en-3-one, 10: stigmastanone,

11: 7 α -hydroxysitosterol

Fig. 1



CML 形成阻害活性

Bovine serum albumin (BSA) 4mg/mL と glucose 100mM を phosphate buffer pH 7.4 に溶解し、検体の存在下および非存在下において 37℃ で 7 日間インキュベーションを行った。検体は phosphate buffer あるいは MeOH に溶解し、反応液に添加した。陽性検体として、aminoguanidine を用いた。インキュベーション終了後、反応液をコーティングバッファー (50ml カルボネートバッファー) で希釈し、その希釈液を 96 穴プレートに添加して室温で 1 時間インキュベーションした。1 時間後、各 well を洗浄バッファー (PBS/0.05% Tween, pH7.4) で洗浄した。以降、各段階で 1 時間インキュベーション後に、各 well を洗浄バッファーで洗浄した。次にブロッキングバッファー (コーティングバッファーの 0.5% w/v でゼラチンを溶解したもの) を添加して再び、室温で 1 時間インキュベーションした。その後、抗 AGE (CML) 抗体を加え、同様にインキュベーションした後、horse radish peroxidase 標識二次抗体を添加して 1 時間インキュベーションした。インキュベーション後、1,2-phenylenediamine dihydrochloride を含む基質バッファーを添加した。20 分後、1M H_2SO_4 溶液で反応を停止させ、マイクロプレートリーダーで 492nm の吸光度を測定した。

阻害率は次のように計算した。

$$\text{阻害率 (\%)} = \{1 - (\text{Sample} - \text{blank}) / (\text{control} - \text{blank})\} \times 100$$

2 種のフラボノイド、3 種の核酸、3 種のバニリン誘導体と 3 種のステロール類を単離した。

これらのうち、2 種のフラボノイドと 4 つの化合物についてグリケーション阻害活性試験を行ったところ、フラボノイド 1 に活性が見られた。(Table. 2) また、グアノシンにも阻害活性が認められたことから、グアニジン基が阻害活性に重要な役割をしていることが示唆された。

Table 1 Inhibition (%) of Extract of Style of *Zea mays* L. on CML Formation

	1 mg / mL	0.5 mg / mL	0.1 mg / mL
Methanol extract	98.6	91.8	89.4
Water extract	100	94.1	95.3
Aminoguanidine	98.2	91.8	89.4

Table 2 Inhibition (%) of Compounds Isolated from *Zea mays* L. on CML Formation

1 (1mM)	2 (1mM)	Aminoguanidine (1mM)
80.7	1.7	61.3

中国産海藻のアルドース還元酵素阻害活性

緩衝液 0.2 M Na Phosphate buffer (pH 6.2)

基質溶液 100 mM DL-glyceraldehyde

補酵素溶液 1.5 mM NADPH

AR 溶液 3.0×10^{-2} units*/mL (final conc. 3.0×10^{-3} units/mL)

試料溶液 quercetin 1.0 mg/mL (final conc. $3 \mu\text{g/mL}$) extract 3.3 mg/mL (final conc. $9.9 \mu\text{g/mL}$)

* one unit of the enzyme activity was defined as the amount of enzyme reducing 1 μmol on NADPH per min. under the above assay conditions.

● 阻害率 (%) = $\{1-(\Delta\text{As}-\Delta\text{Ab})/\Delta\text{Ac}-\Delta\text{Ab}\} \times 100$

ΔAs Sample $\Delta\text{ABS}/\text{min}$; ΔAb Blank $\Delta\text{ABS}/\text{min}$; ΔAc Control $\Delta\text{ABS}/\text{min}$;

試料溶液 $3 \mu\text{L}$, 緩衝液 $700 \mu\text{L}$, 補酵素溶液 $100 \mu\text{L}$, 酵素溶液 $100 \mu\text{L}$ に基質溶液 $100 \mu\text{L}$ を加えて 25°C で反応を開始する。反応開始時 30 秒後から 3 分後までの波長 340 nm における NADPH の吸光度変化を測定し、吸光度変化率を求め、上式によって阻害率を求める。測定はすべて duplicate で行った。

Table 3 Aldose Reductase Inhibitory Effects (%) of Sea weeds

Samples	MeOH extr.	H ₂ O extr.
<i>Codium fragile</i> (Suringar) Hariot	-1	6
<i>Gymnogongrus flabelliformis</i> Harver	28	3
<i>Sargassum thunbergii</i> (Mertens) O.Kuntze	21	8
<i>Symphycladia latiuscula</i> (Harvey) Yamada	93	75
<i>Ulva pertusa</i> Kjellman	14	7
Quercetin	66	

アラメの活性成分の検索およびグリケーション阻害活性

本研究課題の一つである各種海藻類の糖尿病合併症予防効果に関する研究の一環として行った褐藻類海藻のアラメ（今回は日本産を用いた）より 3 種のフロログルシノール誘導体を単離した。³⁾ それらの構造は各種スペクトルデータの解析などにより図 (Fig. 2) のように決定した。これらの化合物について CML 形成阻害活性試験を行った。

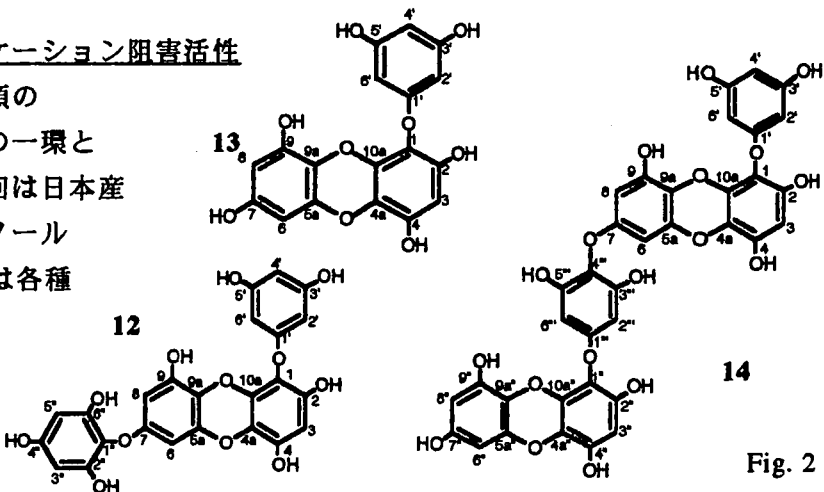


Fig. 2

Table 4 Inhibition (%) of Compounds on CML Formation

Compounds(0.1mM)	Inhibition (%)
12	91.1
13	96.2
14	86.7
Aminoguanidine	76.0

STZ 糖尿病モデル動物による南蛮毛の有効性の評価

南蛮毛の水エキスに *in vitro* においてグリケーション阻害活性が見られたことから、本生薬が動物に投与した場合でもその効果が認められるかどうかを検討するため以下の実験を行った。

8 週齢の Wister 系雄性ラットを無作為に糖尿病生薬投与群 (n=6)、糖尿病生薬非投与群 (n=6) および健常対照群 (n=6) の 3 群に分け、糖尿病ラットは STZ 40 mg / kg を尾静脈より静注し、随時血糖 400 mg / dL 以上をもって糖尿病とする。生薬投与群は糖尿病発症直後から、0.05 % の濃度に調製した生薬エキスをを自由摂取させる。生薬非投与群には水道水を自由摂取させる。3 週間ごとに体重測定し、眼静脈叢からの採血と 24 時間蓄尿法により血糖、フルクトサミン、尿中アルブミン排泄量、内因性クレアチニンクリアランスを測定する。投与 3 ヶ月目の実験終了時にラットを屠殺後、腎臓を摘出して重量を測定し、10 % 緩衝ホルマリンで固定後 PAM 染色を施した腎光顕標本を作成する。この標本上で 1 個体につき 50 糸球体の平均糸球体面積と平均メサンギウム領域面積を自動解析装置を用いて計測する。また、ELISA 法により、腎組織中の AGE 量を測定する。

これらの生化学的および組織学所見から生薬エキスの糖尿病合併症進展抑制効果について検討する。現在、動物実験は進行中である。

考 察：

予防は薬により疾病の発症、増悪を予防しようという考え方であるが、予防は一生続く。そのような長期投与あるいは連用を考えたとき、問題となる副作用の有無を考えると、日常食する素材で無理なく予防することがもっとも重要であると考えられる。糖尿病性腎症は透析導入原疾患の第 1 位である。また、近年著しく増加傾向にある。この疾患は一旦発症すると抵抗性であり、予後もよくないことから予防および新たな治療法の開発が必要とされている。南蛮毛、アラメにグリケーション阻害活性が、また、Table 3 に示したように、イソムラサキにアルドース還元酵素阻害活性が認められたことから、日常食する素材あるいは食されてなくとも多量に存在する天然資源による予防効果が期待できる。現在これら 3 種についてさらに活性成分の探索を行っている。進行中の動物実験の結果を踏まえさらなる有用性を検討したい。その他の素材についても活性試験を行う予定である。

参考文献：

- 1) Ryuichiro Suzuki, Yoshihito Okada, Toru Okuyama, *J. Nat. Prod.*, **66**(4), 564-565 (2003)
- 2) Ryuichiro Suzuki, Yoshihito Okada, Toru Okuyama, *Chem. Pharm. Bull.*, **51**(10) 1186-1188 (2003)
- 3) Yoshihito Okada, Akiko Ishimaru, Ryuichiro Suzuki, Toru Okuyama, *J. Nat. Prod.*, **67** (1) 103-105 (2004)

作成日：2004 年 3 月 10 日

2003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－

2004年 3 月 14 日

財団法人 日 中 医 学 協 会
理 事 長 殿

研究代表者氏名 長谷川 紘司 ㊞

所属機関名 昭和大学歯学部歯周病学教室

部署・役職 歯周病学教室・教授

所在地 〒145 東京都大田区北千歳2丁目1番1号

電話 03-3787-1151 内線 354

1. 研究テーマ

中国人の歯周病罹患状況調査と中国人歯科医師への歯周治療学教育

2. 研究期間 自 2003 年 4 月 1 日 ～ 至 2004 年 3 月 15 日

3. 研究組織

日本側研究者氏名 鈴木 基之

所属機関 昭和大学歯周病学教室 職名 助教授

中国側研究者氏名 曹 采方

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「研究報告書の作成について」の体裁に倣い、指定の用紙で作成し添付して下さい。

※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。

中国人の歯周病罹患状況調査と中国人歯科医師への歯周治療学教育

研究代表者名 長谷川紘司 昭和大学歯周病学講座
共同研究者名 鈴木基之 昭和大学歯学部
曹 采方 北京大学口腔医学院

要旨：

近年、急速な中国社会の発展に伴い、齲蝕と歯周疾患が増加していると報告されている。しかし中国における歯科医療事情は、単位人口あたりの歯科医師数で日本の約 30 分の 1 にあたり、このような状況を放置することは、中国国民にとって、極めて不幸な状況であり、今後の中国国民の健康を著しく阻害するばかりでなく、医療経済学的にも多大な損失となる事は明白である。

このような観点から、中国人歯科医師に対する歯周病治療の普及活動を行うことと現在の中国人の歯周病罹患状況を正確に把握し、このデータをもとに、効果的な予防プログラム立案・施行するためには中国人歯科医師に対し歯周病罹患状況調査の指導を行うことが重要であると考え本計画を立案・施行した結果良好な結果が得られた。

Key Words 歯周疾患罹患状況調査指導、歯周治療教育、歯周治療普及指導、

緒言：

日本人による中国における歯科疾患実態調査は、1990 年代より多数行われており、齲蝕についてはその低罹患率が、報告されている。しかし、近年の齲蝕罹患状況比較報告では大都市郡における齲蝕の増加が報告され、今後、都市化の進行に伴い、急増すると考察されている。

一方歯科 2 大疾患のうちの歯周病についての実態調査報告は中国衛生部による第二次全国口腔健康流行病学抽样調査(全国歯科疾患罹患状況抽出調査 1995 - 1998 施行)と、我々が 1993 年より 5 年間中国河北省承德市にて行った歯周炎自然史調査と歯周炎予防プログラム(日中医学協会 1996 年度調査・共同研究助成)の実施のみである。これらの結果より 10 歳代の小児に歯肉炎および初期歯周炎が認められ 20 歳代後半より歯周炎が発生し、40 歳代では 90%以上の罹患率であった。

歯周病は抜歯原因の第 1 位であり、この歯周病治療の普及と歯周病予防対策を早期に行う必要がある。

また一昨年 11 月北京市にて開催された「日中医学大会 2002」において基礎歯学分野での中国歯科界の目覚ましい発展を目の当たりにすることができたが、臨床歯学分野や予防歯学分野(特に歯周病学領域)での立ち遅れが顕著であった。

特に中国における歯科医療事情は、単位人口あたりの歯科医師数で日本の約 30 分の 1 にあたり、このような状況を放置することは、中国国民にとって、極めて不幸な状況であり、今後の中国国民の健康を著しく阻害するばかりでなく、医療経済学的にも多大な損失となる事は明白である。

我々は、このような観点から、中国人歯科医師に対する歯周病治療の普及活動を行うことと現在の中国人の歯周病罹患状況および中国人の口腔保健行動を正確に把握し、このデータをもとに、効果的な予防プログラム立案・施行するためには中国人歯科医師に対し歯周病罹患状況調査および口腔保健行動調査につい

て指導を行うことが重要であると考え本計画を立案・施行した。

対象と方法：

対象は、北京大学口腔医学院・吉林大学口腔医学院に在籍する歯科医師および口腔医学院に在学中の歯科学生と承德市口腔医院に在籍する歯科医師とした。

方法は、以下に記す歯周病治療の普及教育と歯周病罹患状況調査についての指導教育を講義、実習を行った。また吉林大学口腔医学院にては小児の口腔保健行動調査を質問紙法(アンケート)により実習した。

結果：

1. 歯周病治療の普及教育について

歯周基本治療・歯周外科治療の意義とその治療効果について、歯周病予防の必要性和具体的な予防法について法についてスライド・ビデオなどの視聴覚器材を用いた教育を行った。(1回3時間各地区2回ずつ行った)

① 北京大学口腔医学院

歯科医師 30 名、歯科学生 30 名系 60 名が参加し、活発な質疑応答がなされ、十分な開発教育がなされた。

② 吉林大学口腔医学院

歯科医師 20 名、歯科学生 30 名系 50 名が参加し、活発な質疑応答がなされ、十分な開発教育がなされた。

③ 承德市口腔医院

歯科医師 10 名が参加し、活発な質疑応答がなされ、十分な開発教育がなされた。

2. 歯周病罹患状況調査と齲蝕調査方法の指導教育について

承德市口腔医院にて歯科医師 10 名に対し下記診査法について行った。

① 歯周組織調査

歯肉炎指数 (Loe & Silness) 歯周ポケット深さ 歯肉出血指数

アタッチメントレベル 歯周炎関連細菌検査

PCR 法を用いて、対象者ブランク中の細菌検査を行う。

以上について、代表歯、6 歯の検診を行う。

② 齲蝕および現在歯調査

WHO の歯科疾患調査基準に従い、齲蝕罹患状況と現在歯数の調査法。

上記診査について承德市口腔医院来院患者の協力を得て実地実習を行い、基本的診査について満足のいく結果が得られた。

3. 質問紙法 (アンケート) による口腔保健行動調査について

吉林大学口腔医学院にて吉林大学附属幼稚園および自強小学校の児童および学童を対象として (表 1)、図 1 に示す 15 項目からなる口腔保健に関するアンケートを中国語に訳した質問紙にて調査を中国人歯科医師が行い、集計および分析を行った。

その結果食習慣として、ジュース・コーラ・乳酸飲料などの口腔健康に対し問題となる飲料の摂取が増加しており、また間食についても同様に甘味食品の摂取が増加していた。

歯肉の腫脹に関する自覚については幼稚園児で低いものの、小学生では 52.3%と増加していた。ブラ

ッシング時の出血についても同様に幼稚園児で低いものの、小学生で44%と増加していた。ブラッシング習慣について起床時および就寝前に行うものが多く、食後または間食後に行うものは少なかった(図2)。

考察：

本計画実施にあたり2003年6月より中国国内にて活動開始の予定であったが、SARS流行により昭和大学側の渡航制約により、中国国内での共同作業の開始が約3ヶ月遅れたがこの間中国側共同研究者らとe-mail、FAXなどの通信手段の利用により十分事前準備を行った。その結果2回にわたる訪中時の研究活動は良好に行うことが可能となった。

SARS流行のような問題は今後も十分その可能性が考えられ、このような事態に対する対処法について十分検討しておく必要性があり、また通信手段の活用が重要であると考えられた。

中国国内での活動は約3ヶ月の遅れがあったにもかかわらず、歯周疾患の治療および、疫学的調査法および予防法についての教育活動に参加した中国人歯科医師らへの教育効果は十分達成された。

また、質問紙法による口腔保健行動調査結果から飲料を含む食品の摂取に関する指導の必要性和歯肉における症状が質問紙法により小学生で増加している事とブラッシング習慣調査結果よりブラッシングについて指導する必要性が示唆された。

また今後、これらの教育活動のアップデートを計るための継続教育の必要性がある。

参考文献

1. 中国衛生部：第2次全国口腔健康流行病学抽調査。1998。人民衛生出版社。北京
2. 中田 稔：中国人小児の歯科疾患と歯科的特質に関する実態調査。1992。文部省科学研究費報告書

作成日 2004年3月15日

アンケート用紙

このアンケートは保護者の方がお子さんの事について書いていただきます。

氏名 男・女 生年月日 年齢 民族

- 同居している家族にレ点をつけてください。
☐父, ☐母, ☐祖父, ☐祖母, ☐その他 ()
- 幼稚園(学校)終了後の養育者は誰ですか。
☐父, ☐母, ☐祖父, ☐祖母, ☐その他 ()
- 睡眠時間はどれくらいですか。
☐3時間以下, ☐3時間~5時間,
☐5時間~7時間, ☐7時間以上
- 大体決まった時間に食事をしていますか。
 朝食 ☐している
☐していない
 夕食 ☐している
☐していない
- 食事にかかる時間はどれくらいですか。
 朝食 ☐15分以内, ☐16~30分, ☐31~60分, ☐61分以上
 夕食 ☐15分以内, ☐16~30分, ☐31~60分, ☐61分以上
- おやつ時間を決めていますか。
☐決めている, ☐自由に与えている(食べている),
☐食べていない
- 水以外に多く飲むものは何ですか。
☐お茶(加糖), ☐お茶(無糖), ☐牛乳, ☐果汁,
☐ジュース, ☐コーラ, ☐乳酸飲料,
☐その他 (), ☐水以外飲まない
- おかしはどんなものを食べますか(あてはまるものすべて)。
☐アイスクリーム, ☐ビスケット, ☐ゼリー, ☐ケーキ
☐ガム, ☐氷菓, ☐チョコレート, ☐キャンデー
☐食べない, ☐その他 ()
- いつ歯みがきをしますか。(あてはまるものすべて)。
☐起床後 ☐おやつ後
☐朝食後 ☐夕食後
☐昼食後 ☐就寝前
- 歯を磨くときに歯茎から血がでることがありますか
☐ある ☐ない
- 歯茎が腫れることがありますか。
☐ある ☐ない
- 口臭が気になることがありますか。
☐ある ☐ない
- 口を大きく開けたり閉じたりした時に顎がかかくなりますか
 (小学生のみ)。
☐よくある ☐時々ある ☐ない
- ☐口を大きく開けたり, 食事をする時に顎が痛い事がありますか
 (小学生のみ)。
☐よくある ☐時々ある ☐ない

図1 アンケート用紙

表1 年齢別人数分布

学年	幼稚園			小学校			計
	中 (年少)	大 (年中)	学前 (年長)	2年	4年	6年	
年齢	3歳	4歳	5歳	7~8歳	9~10歳	11~12歳	
男	18	29	42	36	29	37	191
女	24	17	30	29	46	39	185
計	42	46	72	65	75	76	376

(名)

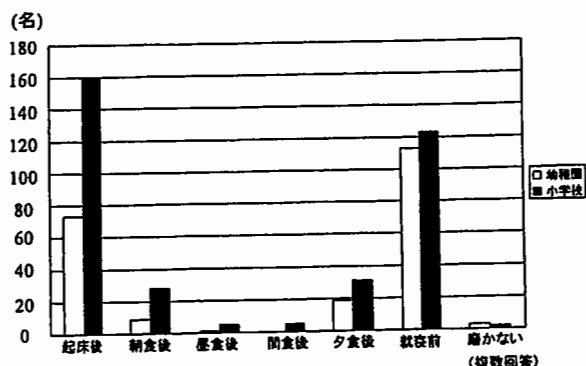


図2 歯磨きの時間帯

2003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 —

年 月 日

財団法人 日 中 医 学 協 会
理 事 長 殿

招聘責任者氏名 内 倉 和 雄



所属機関名 日本大学薬学部

職 名 教 授

所 在 地 〒 274-8555 船橋市習志野台 7-7-1

電話 047-465-6573 内線

1. 招聘研究者氏名 王 衛

所属機関 天津市薬品検験所

職名 主管薬師

薬品分析に関する研究

2. 研 究 テ ー マ —ルテニウム錯体発光法を用いた HPLC によるジソピラミドの分析—

3. 日本滞在日程

平成 15 年 10 月 10 日 来日

平成 15 年 10 月 13 日～、

日本大学ゲストハウスに宿泊

日本大学薬学部で共同研究の実施

平成 16 年 6 月 2 日 帰国予定

4. 研 究 報 告 書

別紙「研究報告書の作成について」の体裁に倣い、指定の用紙で作成し添付して下さい。

被招聘者の研究発表または研究状況を記録した写真を添付して下さい。

※研究成果を発表した場合は、発表原稿・抄録集等も添付して下さい。

※研究成果発表に当っては、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—
薬品分析に関する研究
—錯体化学発光法を用いた HPLC によるジソピラミドの分析—

研究者氏名	王 衛
中国所属機関	天津市薬品検験所
日本研究機関	日本大学薬学部
指導責任者	教授 内倉 和雄

要 旨

ジソピラミド (DP) の分析には、紫外部の光吸収を利用した吸光度検出法を用いた高速液体クロマトグラフィー (HPLC) が多用されているが、感度・選択性等に十分でなく煩雑な前処理操作等が要求されている。一方、DP には二種の光学異性体 (R,S) が存在し、異性体間では薬理作用、薬物代謝等に差異が認められているが詳細については十分ではない。このことは、DP の実際的な分析法が見当たらないことも一因と思われる。

著者らは、第三アミンの選択的で高感度な検出が可能であるルテニウム錯体電解化学発光 (ECL) 検出法を考案し種々の薬物、生体成分の分析法を開発した。本研究は、DP が有する第三アミンであるジイソプロピルアミノ基に着目し、カラムで分離後 ECL 検出する HPLC-ECL 法を検討した結果、目的に応じた三つの方法確立した。第一法は ODS カラムを用いたシングルカラム HPLC-ECL 法で、DP 製剤の分析に適用可能である。第二法は ODS カラムと Shim-pack MAYI-ODS カラムの二本を用いたカラムスイッチング HPLC-ECL 法で、血清中の DP を直接分析可能であり、TDM に適用できる。第三法はスミキラル ACP カラムと Shim-pack MAYI-ODS カラムを組み合わせたカラムスイッチング HPLC-ECL 法で、DP の光学異性体である R(-) 体と S(+) 体の分離分析が可能である。

今回開発した方法は製剤や血清試料に適用でき、試料を前処理すること無く、直接 HPLC に注入することが可能な簡便で高感度な分析法であり、種々の試料中の DP 分析に適用可能であり、実試料への適用が期待される。

Key Words 薬物分析、HPLC、錯体化学発光検出法、血液、異性体分析

緒 言

ジソピラミド (DP) は抗不整脈薬として現在広く使用され、市販の DP 製剤は光学異性体を含んだラセミ体で投与されている。DP の光学異性体間では薬理学的特長は互いに大きく異なることが知られており、たとえば、抗不整脈効果は主に S(+) 体に由来すること、体内動態、蛋白結合率に差異があること等が報告されている¹⁾。また、DP は TDM の対象医薬品ともなっているがその実施については十分とは思われない。

DP の分析法には、紫外部吸収 (UV) を利用した高速液体クロマトグラフィー (HPLC) が多用されているが、感度・選択性について十分ではなく実試料への適用には煩雑な前処理操作が要求されている。また、光学異性体を分離分析する方法も見られるが相互分離等十分とは思われない^{2, 3)}。著者らは、トリスビピリジンルテニウム錯体 (Ru(bpy)₃²⁺) を用いた電解化学発光 (ECL) 検出法の開発を行ってきた^{4, 5)}。その中で、第三アミンが強く発光することを見出した。今回、汎用されている HPLC 検出法では十分な感度と選択性が得られない DP について Ru(bpy)₃²⁺ECL 検出法を適用し、カラムスイッチング HPLC と組み合わせることで、簡便で高感度な製剤、血清中の DP の分析法を開発したので報告する。

実 験

1. 試薬及び溶液

DP は市販製剤から抽出・単離・精製した後、各種機器分析で純度を確認したものを用いた。標準血清、オクタンスルホン酸ナトリウム、アセトニトリル (CH₃CN)、その他の試薬は和光純薬工業社製を用いた。Ru(bpy)₃Cl₂ はアルドリッチ社製を用い、水は蒸留水を用いた。

DP 溶液：100mM KH_2PO_4 (pH6.0)- CH_3CN (1:1) に溶解して 10mM としたものを標準溶液とし、用事 100mM KH_2PO_4 (pH6.0) で希釈して用いた。

DP 添加標準血清：標準血清に水を加えて溶解した後、用事 DP 水溶液を加えて調製し用いた。

2. 装置及び操作

シングルカラム HPLC：カラムには Chemcopak-SPHERISORB ODS-5, 150 x 4.6 mm I. D.) を用いた。移動相には 100mM KH_2PO_4 (pH6.0)- CH_3CN (1:1) を用い、毎分 1.0ml で送液した。ECL 検出には電解化学発光検出器 (COMET3000KANAGAWA、コメット製) を用いた。検出試薬には、0.3 mM $\text{Ru}(\text{bpy})_3\text{Cl}_2$ を含む 10 mM H_2SO_4 を用い、毎分 0.30 ml で送液した。電解電流密度は 80 μA で定電流電解した。

カラムスイッチング HPLC：二本のカラム (C-1, C-2) と 6 方流路切り替えバルブを用いて基本流路を構成した。C-1 には、除蛋白及び夾雑物の除去及び DP の単離・濃縮を行う前処理用に Shim-pack MAYI-ODS カラム (10 x 4.6 mm, 島津製) を用い、C-2 には、薬物分離用として CAPCELL PACK C18 (150 x 4.6 mm, 資生堂製) 或いは SUMIKIRAL AGP (150x4.6 mm, 住化分析センター製) を用いた。前処理用及び分離用に二種の移動相 (E-1, E-2) を用いた。E-1 には 10 mM KH_2PO_4 (pH6.0) と CH_3CN との混液 (90:10, v/v) を用い、ポンプ (L-6000, 日立製) を用いて毎分 0.5 ml で送液した。E-2 には用いるカラムによって異なる移動相を用いた。ODS カラムに於いては 100 mM KH_2PO_4 (pH6.0) と CH_3CN との混液 (50:50, v/v) を用い、ポンプ (LC-6A, 島津製) を用いて毎分 1.0 ml で送液した。AGP カラムには 100 mM KH_2PO_4 (pH6.2) と CH_3CN との混液 (80:20, v/v) をポンプ (LC-6A, 島津製) を用いて毎分 0.3ml で送液した。検出器には電解化学発光検出器 (COMET3000KANAGAWA、コメット製) を用いた。検出試薬には、0.3 mM $\text{Ru}(\text{bpy})_3\text{Cl}_2$ を含む 10 mM H_2SO_4 を用い、毎分 0.30 ml で送液した。AGP カラムを用いるときは良好な分離を得るために E-2 の流量を大きく出来ず、0.3ml/min で用いるために分離カラムと検出器の間の流路から流量調節用液 100 mM KH_2PO_4 (pH6.0) と CH_3CN との混液 (50:50, v/v) を毎分 0.7ml で送液しカラム流出液と混合した。

カラムスイッチング操作：C-1 に E-1 を導く流路とした後、試料注入する。5 分後に流路を切り替えて C-1 と C-2 を接続し、E-2 を用いて DP を C-1 から C-2 に導入する。2 分後 (ODS カラム)、5 分 (AGP カラム) 後に再び流路を切り替え E-2 と C-2 により DP を分離検出する。これと同時に C-1 は E-1 によって、次の試料注入のための準備を行った。

結果及び考察

1. 検出条件の最適化

本 ECL 系で DP を検出するとき、ECL 強度は種々の条件に影響される。DP の ECL 検出時の最適条件は同時に C-2 での DP の分離を満足する必要がある。そこで E-2 及び C-2 を用いて DP の ECL 強度 (ピーク面積) 及びノイズ (バックグラウンドの高さ) を指標として検出条件の最適化を検討した。はじめに、pH の影響について検討した。pH3.0 から 7.0 の範囲で検討したところ、pH の上昇に伴って pH5.0 までは緩やかに ECL 強度は増大し、それ以上では大きく増大した。一方、ノイズは pH の上昇に伴って直線的に増大した。次に、分離を調節する目的で添加される CH_3CN の影響について 25 から 50% の範囲で検討した。 CH_3CN 含量を増加させると ECL 強度は減少したが、ノイズは増大した。その他、緩衝液に用いるリン酸塩の影響についても 25 から 100mM の範囲で検討したところ ECL 強度は増大したが、ノイズには影響しないことがわかった。更に、ECL 検出時の電解酸化電流値の影響について 50 から 300 μA の範囲で検討した。0 のときは検出されなかった。40 から 140 μA では大きく増大したがそれ以上 300 μA までは緩やかに減少した。一方、ノイズは直線的に増大した。次に試薬溶液のルテニウム錯体の濃度の影響について 0.1 から 0.4mM の範囲で調べたところ、濃度の増加に伴って ECL 強度は増大した。そこで s/n 比を考慮して電解酸化電流値は 80 μA を採用した。次に試薬溶液の流量を 0.45 ml/min と一定にして、E-2 の流量の影響について、0.5 から 1.7 ml/min の範囲で調べた。流量の増加に伴って ECL 強度及びノイズは若干上昇した。また、E-2 を 1.0 ml/min として試薬溶液の流量を 0.3 から 0.7 ml/min の範囲でと変化させたところ、0.4—0.5 ml/min で ECL 強度はほぼ一定となった。

以上の結果から上記、装置及び操作の条件を採用した。

2. 分離条件の最適化

シングルカラム HPLC-ECL 法：ODS カラムによる DP の保持挙動について移動相条件を検討した。はじめに CH_3CN 含量の影響について 50 から 80% の範囲で調べたところ、含量の増加に伴って保持時間は減少し早く溶出した。次に用いる KH_2PO_4 の濃度の影響についても 25 から 100mM の範囲で調べた。濃度が増大するとき、保持は弱くなり早く溶出した。最後に pH の影響について pH3 から 6.0 の範囲で調べた。pH の上昇に伴って DP は強く保持され遅く溶出した。その他条件検討の結果から上記、装置及び操作の条件を採用した。

カラムスイッチング HPLC-ECL 法：血清の前処理の自動化を目的に、HPLC にはカラムスイッチング法を採用した。はじめに、C-1 を用いて試料中の DP の単離抽出を計画し、DP を C-1 に保持させ、夾雑物を E-1 で流出除去する方法を採用して検討した。DP は C-1 に対して逆相分配的保持挙動を示し、 CH_3CN 含量を減少させると強く保持された。試料注入後 E-1 で 5 分溶出することで血漿蛋白質等夾雑物は溶出除去され、DP の流失が無いことが分かった。そこで上記の E-1 組成を採用した。次に E-2 と C-1 を用いて DP の溶離条件について検討した。C-1 における DP の保持は逆相分配的であり CH_3CN 濃度を増加させ、pH を減少させることによって素早く溶離流出させることが出来た。更に、E-2 を用いて C-2 で有効な分離を達成することが必要である。そこで、カラムスイッチングシステムを用いて、C-2 における分離についても併せて検討した。はじめに C-2 に ODS カラムを用いる場合を検討した。E-2 の CH_3CN 濃度を 20 から 35 % の範囲で変化させ検討したところ、 CH_3CN 濃度の減少に伴って保持容量も増大した。 CH_3CN 含量を 50% とするとき、シャープで対称性の良い DP の分離が得られた。E-2 組成は、DP の ECL 検出時の最適条件を考慮する必要がある、両者を考慮勘案して上記 E-2 を採用した。次に AGP カラムを用いる場合について検討した。E-2 を 8mM KH_2PO_4 (pH6.2) : CH_3CN の混液で CH_3CN 含量を 15 から 40% の範囲で検討した。含量の増大に伴って R 体、S 体共に早く溶出した。次に CH_3CN 含量を 15% に固定して KH_2PO_4 濃度の影響について 15 から 100mM の範囲で検討した。濃度の上昇に伴って保持は減少した。最後に pH の影響について検討した。100mM KH_2PO_4 : CH_3CN (80 : 20) の移動相を用いた。pH4.0 から 6.2 と上昇するに伴って保持は増大した。これらの実験結果から R 体と S 体の相互分離を考慮して上記、装置及び操作の条件を採用した。

3. シングルカラム HPLC による DP 製剤分析

上記で検討し最適化した実験条件下での DP のクロマトグラムを図 1 に示す。混在が予測される第二アミン体との分離も良好で、1 検体約 10 分で分離検出出来た。市販の DP 製剤 8 品目について含量測定した結果を表 1 に示す。いずれの製剤についても満足できる結果であった。本法の精度等について検討したところ、検量線は $0.198 \mu\text{g/mL} \sim 4.96 \mu\text{g/mL}$ ($r=0.9997$) の良好な直線関係が得られた。再現性は 1.8% であり、回収率は 99.63% で、検出下限は 0.06pmol ($S/N=3$) と満足するものであった。

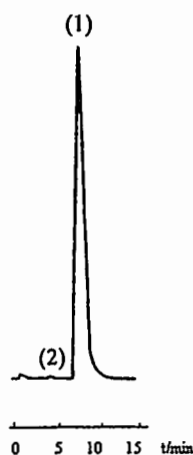


Fig.1. HPLC chromatogram obtained from disopyramide Phosphate in Tablets (1)disopyramide (2)unknown impurity

4. カラムスイッチング HPLC-ECL

4-1 ODS カラムを用いた分析系

最適化した HPLC 条件で測定したときの、DP 添加標準血清から得られたクロマトグラムの一例を図 2 に示す。血清中の狭雑物からの分離も良好で妨害ピークは認めなかった。本法の精度等について検討したところ、検量線は $0.341 \mu\text{g/mL}$ ~ $5.11 \mu\text{g/mL}$ ($r=0.9997$) で良好な直線関係が得られた。再現性は 3.32% ($2.73 \mu\text{g/mL}$ 血清、 $n=5$) であり、回収率は 99.91% ($2.73 \mu\text{g/mL}$ 血清、 $n=5$)、と満足するものであった。また、検出下限は 5.89pmol ($S/N=3$) と満足するものであった

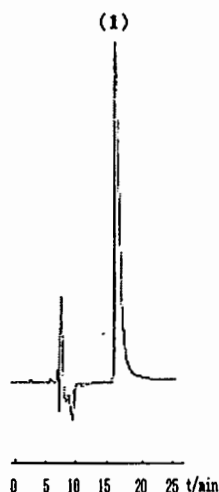


Fig. 2 Chromatogram obtained from disopyramide in serum
by column switching HPLC system (1)disopyramide

4-2 AGP カラムを用いた分析系

最適化した HPLC 条件で測定したときの、DP 添加標準血清から得られたクロマトグラムの一例を図 3 に示す。R 体と S 体は分離され、血清中の狭雑物からの分離も良好で妨害ピークは認めなかった。本法での再現性について調べた結果に示す。本法の精度等について検討したところ、検量線は $0.341 \mu\text{g/mL}$ ~ $5.11 \mu\text{g/mL}$ ($R(-)$, $r=0.9997$; $S(+)$, $r=0.9990$) で良好な直線関係が得られた。再現性は $R(-)$ は 4.12% ($2.73 \mu\text{g/mL}$ 血清、 $n=5$) $S(+)$ は 4.07% ($2.73 \mu\text{g/mL}$ 血清、 $n=5$) であり、回収率は $R(-)$ 98.6% ($2.73 \mu\text{g/mL}$ 血清、 $n=5$)、 $S(+)$ は 98.1% ($2.73 \mu\text{g/mL}$ 血清、 $n=5$) と満足するものであった。また、検出下限は $R(-)$ 、 $S(+)$ それぞれ 5.89pmol ($S/N=3$) と満足するものであった

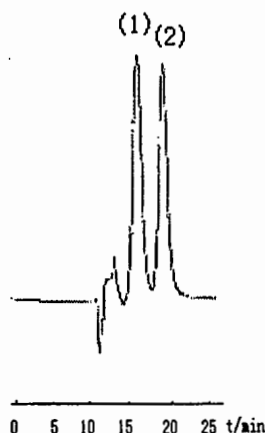


Fig. 3 Chromatographic separation of Enantiomers obtained from disopyramide
in serum by column switching HPLC system. (1) $R(-)$ DP, (2) $S(+)$ DP

考 察

DP の簡便で高感度な分析法を開発した。本法の検出系はルテニウム錯体を発光物質としたもので第三アミンの選択的な検出が可能であり、感度、選択性に優れていると言える。また、分離法として用いた HPLC は生体試料等への適用が容易であり、再現性、操作性等に優れているものである。両者の組み合わせによって、より優れた分析法が開発できたものと考えられる。今後更に実試料への適用について検討することによって広く使用できる実用的な方法となることが期待される。

参考文献

- 1) M. J. Mirro, A. M. Watanabe, J. C. Bailey, *Circ. Res.*, 48, 867(1981).
- 2) J. Hermansson and M. Eriksson, *J. Chromatogr.*, 336, 321(1984).
- 3) H. Takahashi, A. Tamura and H. Ogata, *J. Chromatogr.*, 529, 347(1990).
- 4) K. Uchikura and M. Kirisawa, *Anal. Sci.*, 7, 803(1991).
- 5) K. Uchikura, M. Kirisawa and A. Sugii, *Anal. Sci.*, 9, 121(1993).


注：本研究の一部は、2004 年 5 月 20-21 日の第 11 回クロマトグラフィーシンポジウムで発表の予定である。

2003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－

2003 年 11 月 17 日

財団法人 日 中 医 学 協 会
理 事 長 殿

訪中者氏名 棚田修二 
所属機関名 放射線医学総合研究所
部署・役職 画像医学部・部長
所 在 地 〒263-8555 千葉県稲毛区穴川 4-9-1
電話 043-206-3180 内線

1. 中国側招請機関名 山西医科大学第一医院

所 在 地 中国山西省太原市解放南路 85

招請責任者氏名 李思進 職名 核医学科主任教授

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）
2003 年 10 月 13 日～16 日 山西医科大学第一医院（山西省太原市）

2003 年 10 月 17 日～18 日 中国協和医科大学阜外心血管病医院・中国医学科学院心血管病研究所
及び中国医学会核医学分会（北京）

3. 交 流 報 告 書

別紙「研究報告書の作成について」の体裁に倣い、講演・指導内容、訪問地の状況・課題、今後の交流計画等を指定の用紙で作成し報告して下さい。

講演・指導等の状況を記録した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。

日本人研究者派遣助成

ポジトロン断層撮影 (PET) と分子イメージング研究に関する研究交流及び指導

研究者氏名 棚田 修二

日本研究機関 独立行政法人放射線医学総合研究所
画像医学部・部長

要旨

山西医科大学第一医院（山西省太原市）核医学科李思進主任教授の招請により、同医院を訪問しポジトロン断層撮影 (Positron Emission Tomography: PET) に係わる研究・医療について講演を行うとともに、PET が今後の医療や臨床研究に如何に有用であるか、如何に活用すべきかについて意見交換を行った。また、同医院院長杜永成教授より客員教授の称号が贈呈された。次いで、中国協和医科大学阜外心血管病医院・中国医学科学院心血管病研究所（北京）核医学科主任何作祥教授の招請により、同院を訪問し講演を行うとともに、中国医学会核医学分会常務理事で第 8 回アジアオセアニア核医学会 (Asia-Oceania Federation of Nuclear Medicine and Biology: AOFNMB) 会長でもある劉教授及び核医学分会主任委員で AOFNMB 事務局長でもある陳盛祖教授とも会談し、核医学の役割、特に PET の役割や普及、さらに 2004 年北京市にて開催される AOFNMB 第 8 回大会に関連して、両国のみならずアジア全体の核医学の普及促進についても意見交換を行った。

講演・指導内容

(1) 山西医科大学第一医院（山西省太原市）

中国において、核医学分野での研究・医療が急速に発展・普及しており、特に PET を用いた研究・医療は大きな関心事であるが、その経験は未だ乏しく、PET 研究・医療分野での先進国である日本からの知識・経験の導入は、速やかな PET 研究・医療の推進に不可欠と考えられ、今回、山西医科大学の招聘に応じ、10 月 14 日から 16 日にかけて以下の 4 講演を行った。即ち、

講演題名：

1. Overview of Nuclear Medicine as Molecular Imaging

PET に代表される核医学画像は、血流・代謝といった生体機能の画像化が可能であり、分子画像 (Molecular imaging) と呼ばれる。講演の中で、その基礎概念から日本に留まらず欧米諸国での研究の現状を紹介して、分子画像の利点を概説すると共に将来への展望について解説した。

2. PET Oncology in NIRS

放射線医学総合研究所（放医研：NIRS）では、約 20 年前に我国で初めて PET 研究が開始されて以来、本分野での指導的立場にあり、PET 研究を推進してきたが、1994 年から開始された難治性がんに対する重粒子線治療への PET 研究の貢献が大であり、特にがん診断には欠かせない技術となりつつある。その中で、PET に X 線 CT を組み合わせた PET-CT という装置が近年開発され、急速に世界中に普及しつつある。しかしながら日本では、放医研にしか設置されておらず、その貴重な使用経験を解説した。それによって漸く PET-CT が普及し始めた中国において、有効且つ迅速な活用が期待される。

3. Present and Future of Nuclear Imaging in Neurotransmission Function

放医研では、脳の働きを PET を用いた神経伝達機能の画像化によって長年研究しているが、特に統合失調症、感情障害等の精神疾患、アルツハイマー病、パーキンソン病等の神経疾患において病態解明の研究を推進しており、これらの最新の知見を紹介するとともに、PET 研究の進め方について概説した。

4. Overview of Molecular Imaging in Nuclear Cardiology

循環器疾患における PET を始めとした核医学研究・医療は、脳、がんに関わる重要な分野であるが、PET に留まらず、通常の単光子断層撮影 (Single photon emission computed tomography: SPECT) の役割から PET 研究に至る現状と将来展望を分子画像としての観点から解説した。

(2) 中国協和医科大学阜外心血管病医院・中国医学科学院心血管病研究所 (北京市)

10 月 17 日から 18 日にかけて、中国協和医科大学阜外心血管病医院・中国医学科学院心血管病研究所核医学科主任何作祥教授の招請により同院を訪問し、放医研の紹介を兼ねて PET 研究を中心とした講演を行ったが、時間的な制約もあり要約した内容を解説した。即ち、

講演題名：

Introduction of NIRS and PET Researches

放医研は、医学分野においてがんの放射線治療を中心に行っている施設なので、訪問先のような循環器疾患の専門研究・医療施設には相対的に知られていないので、詳しい紹介を行った後、循環器領域を中心として、分子画像の観点から世界の動向について解説すると共に将来展望についても言及した。また、放医研で現在取り組んでいる心筋細胞障害の新しい診断技術であるテネイシン-C 抗体による画像診断技術の動物実験データを紹介して、心筋の再生 (Regeneration) と自然死 (Apoptosis) が同時に画像評価できる可能性を解説した。

なお、この講演には、北京大学第一医院核医学科主任王荣福教授を始めとした多数の外部研究者も参加しており、熱心な意見交換を行った。

(3) 中国医学会核医学分会及び第 8 回アジアオセアニア核医学会 (AOFNMB) 会長との会談

同研究所の教授でもあり、中国医学会核医学分会常務理事で第 8 回アジアオセアニア核医学会 (AOFNMB) 会長でもある劉教授及び核医学分会主任委員で AOFNMB 事務局長でもある陳盛祖教授を始めとした中国における核医学指導層と引き続き会談を行い、核医学の役割、特に PET の役割や普及、さらに 2004 年北京にて開催される AOFNMB 第 8 回大会に関連して、両国のみならずアジア全体の核医学の普及促進についても意見交換を行った。特に、本大会を成功させるためには、日本の積極的な参加協力が不可欠と考えられるので、劉会長にはできるだけ早期に来日して日本からの積極的な参加を期待するようメッセージを発信した方がよいと思われることを説明した。劉会長は幸いにも来年 5 月に開催される日本・韓国・中国核医学会議 (石川県金沢市) に出席を予定しているとのことであった。本大会の成功は、アジア全体の核医学研究・医療のレベルを押し上げる絶好の機会と考えられる。

訪問地の状況・課題

中国核医学会の会員数は、5,000 名余りであり (因みに日本核医学会会員数は 3,500 名)、人的資源は豊富であり、欧米・日本等から帰国した留学生も多数活躍しており、中国における核医学研究・医療は今後ますます盛んになることは間違いないと思われる。しかしながら、検査機器を始めとしたインフラストラクチャは未だ十分とは言えず、漸く PET-CT の普及を契機として北京、上海といった大都市では整備されつつある。一方、太原市等の地方都市では、人的資源には素晴らしいものがあるが、装置整備といったインフラの整備は、やや立ち遅れた部分があると感じられた。インフラ整備について、日本が積極的に関与できる部分はあまり多くはないと思われるが、日本で長年に渡って培われた核医学研究、特に PET に関連したノウハウは、今後 PET を積極的に導入推進して行こうとする中国にとっても大いに貢献できることは間違いないと実感した。

今後の交流計画等

訪問した施設は勿論のこと、他の核医学関連施設との連絡を密にして、条件が整えば積極的に交換留学

生を受け入れて行く体制を整備するつもりである。また、中国において、PET の普及促進に関連して、放医研で培われた技術やノウハウが要求される場合も積極的に訪問、あるいは最適なエキスパートを派遣することを考慮している。ただし、唯一と言ってよい問題点は、資金であり日中医学協会への期待は大きいことを申し添えたい。



写真1. 山西医科大学第一医院核医学科スタッフと。



写真4. 山西医科大学第一医院の核医学診療施設。整備されているが、かなり古いものであることを伺わせる。

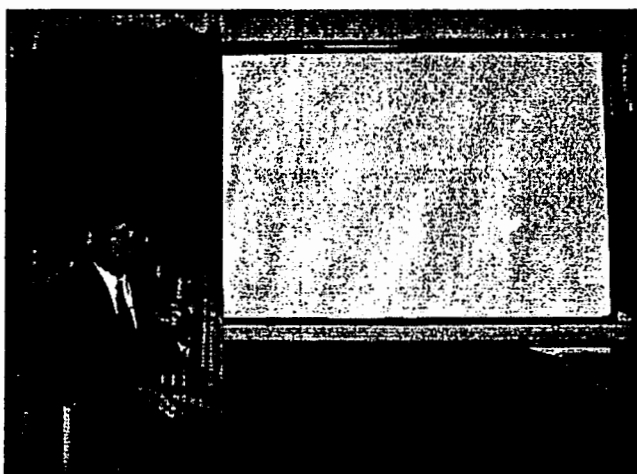


写真2. 山西医科大学第一医院での講義風景。



写真5. 中国協和医科大学阜外心血管病医院の正門前で。



写真6. 中国協和医科大学阜外心血管病医院の最新型核医学診療装置。



写真3. 山西医科大学第一医院院長杜永成教授より客員教授の称号を授与される。



写真7. 中国医学会核医学分会常務理事で AOFNMB 会長でもある劉教授との会談。

2003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－

2004年 3月15日

財団法人 日中医学協会
理事長 殿

訪中者氏名 室 生 卓

所属機関名：大阪市立大学大学院医学研究科

部署・役職：循環器病態内科・助手

所 在 地 〒545-8585大阪市阿倍野区旭町1-4-3

電話：06-6645-3801 内線



1. 中国側招請機関名 黒龍江省医院

所 在 地 中国黒龍江省哈爾濱市香坊区中山路82号

招請責任者氏名 于 治 州 職名 院長

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）

2004年1月30日 大阪－北京

2月2日 北京－哈爾濱

黒龍江省医院にて講義

3日 黒龍江省医院にて講義・実技指導

4日 哈爾濱－北京

5日 北京－大阪

3. 交 流 報 告 書

別紙「研究報告書の作成について」の体裁に倣い、講演・指導内容、訪問地の状況・課題、今後の交流計画等を指定の用紙で作成し報告して下さい。

講演・指導等の状況を記録した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。

最新の臨床心エコー図—黒龍江省医院を訪れて

報告者氏名	室生 卓
所属機関	大阪市立大学大学院医学研究科循環器病態内科学
共同報告者	中尾 満
所属機関	大阪市立大学医学部附属病院中央臨床検査部
招請者	于 治洲院長
招請機関	黒龍江省医院

今回、我々は日中医学協会の援助を受け、中国黒龍江省医院で心エコー図の講義および実技の講習を行ったのでその概要を報告したい。

黒龍江省医院は同省では1、2を争う大病院で、ハルビンはじめ黒龍江省の医療の中心的存在でリーダー的な役割を果たしているとのことある。ハルビンの中心部から程近い市内南部に位置し、外来部門と入院部門に分かれ、外来部門は通りに面して各科が独立してならば、その奥に入院部門がある。講義はこの入院部門の最上階の講義室で行われた。

講演に先立ってまず最初に触れたいのは今回の講演で通訳をしてくれた朱紅先生についてである。朱紅先生は黒龍江省医院の超音波部門の主任医師であり、心臓超音波の専門家である。4年前には我々の施設で研修され、超音波造影剤や冠動脈疾患に対する心エコーの有用性に関してともに研究した仲間である。今回は準備期間が短かったせいもあり、事前に詳しい打ち合わせができず、講演直前に打ち合わせをせざるを得なかった。いくら朱紅先生が日本に留学経験があり、かつ心臓超音波の専門家であるといっても超音波の基礎理論や造影剤の性質などを日本語で聞いてその場で中国語に翻訳するというのは相当大変なことである。

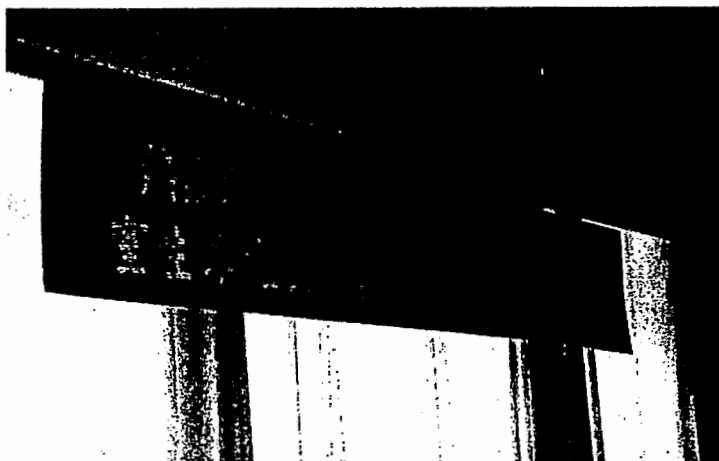


写真1. 黒龍江省医院の講義室に掲げられた歓迎の横断幕

ことを思えば、通訳が内容を理解していることほど有益なことではない。我々と講義をうける黒龍江省医院の先生方には最適な通訳がついていたというわけである。

講義室でまず目に入ったのは講義室に掲げられた赤い横断幕であった(写真1)。広告などではときにお目にかかるがやはり本場で見ると『熱烈歓迎』の文字は感動的であった。さて、最初の講義として『超音波造影剤の新たな展開とその臨床応用』をおこなったわけであるが(写真2)、黒龍江省医院の陳副院長、李副院長はじめ循環器内科、超音波科の医師の多くが参加して和やかな雰囲気であった。筆者の講義の主題である超音波造影剤を用いた心エコー図検査はまだ中国では超音波造影剤の使用が開始されていないため、

とである。通訳、特に医学のような専門性の高い領域での通訳というのは非常に難しく、また講義の成否をにぎる極めて重要な役割である。打ち合わせは我々が思ったよりもはるかに大変な作業であった。しかし、説明を続けるうち、徐々に日本語を思い出し、また当時の研究内容がよみがえってきたのか、次第にスムーズに理解できるようになった。その甲斐あって、朱紅先生は講演内容をほとんど完璧に理解し、単なる通訳というよりは演者の分身として講義に臨むことができた。外国語で講義受ける側の

理解困難な部分もいくらかあったと思われるが、最後までほとんど全員が熱心に聴取してくれた。一方では講義中にポケットベルが鳴ることもしばしばで、医師たちが電話をかけに外へ出てはまた戻るという作業の繰り返しに、国は変わっても方々から呼び出しがかかる医師の仕事には違いがないのだと、妙なところで感心してしまった。

講義の内容は超音波造影剤の基礎理論と臨床応用に関するものであった。超音波造影は超音波と造影剤の相互関係により規定されるものであり、装置側の因子としては音波の強さ、送信回数、送受信周波数などが挙げられ、他方、超音波造影剤の因子としてはその本態である微小気泡の大きさ、硬さ、分子量などがその規定因子となる。最近超音波造影が臨床でも可能となった背景にはこれら双方の著しい発展がある。超音波装置の進歩としてはハーモニクイメージの搭載、送受信方法のさまざまな工夫、造影剤の進歩としては安全で超音波反射の大きい微小気泡の開発が挙げられる。これらの実現なくして現在の超音波造影はありえないし、今後施行する場合、これらの原理や原則をよく了解した上で臨床応用しないと目的とする造影検査はできないわけである。臨床応用では主に超音波造影剤を用いた左室腔造影についての我々の経験を述べた。特に左室内血栓や心尖部肥大型心筋症の診断には超音波造影剤による左室腔造影が極めて有用で不可欠であることを強調した。この左室造影はこれまで心エコー図で詳細まで観察できなかった部位の観察にすぐれており、特に心尖部の異常の検出には最適である。講演では朱紅先生が留学中に学会発表し、論文として医学雑誌に掲載された心電図上の陰性T波と心尖部の異常についても触れた。講演後、さまざまな質問がだされた。心尖部肥大型心筋症の病態について、あるいは陰性T波の成因について等々、討議は文字通りエンドレスに続いた。これも黒龍江省医院の先生方の医学に対する関心の高さ、臨床に対する真剣な態度のあらわれであろうと感心した。我々は中国語がわからないので議論が活発になるとついていけないのだが朱紅先生の通訳のおかげで議論の要点を知ることができた。

翌日は朝から二つ目の講義『経胸壁心エコー図による冠動脈の評価』を行った。前日同様、朱紅先生に通訳をお願いした（写真3）。

冠動脈はこれまではカテーテルを挿入して冠動脈に直接造影剤を注入する冠動脈造影でないと感じることができなかった。しかし、最近の超音波技術の進歩により、探触子を胸壁に当てるだけで冠動脈血流を観察することができるようになったわけである。特に左前下行枝の血流は9割以上で観察が可能である。心筋梗塞や狭心症などの冠動脈疾患は時に致死的なイベントに進展することもあり、循環器の中でも最も重要視されている疾患群の一つである。

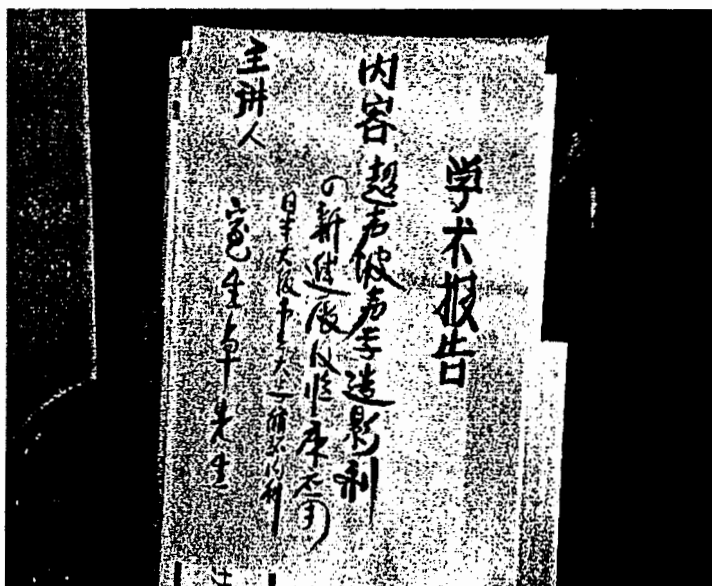


写真2. 講演の開催を知らせる立て看板



写真3. 講義の様子

朱紅先生（右）の身振り手振りを入れての通訳のおかげで参加者の理解は深まった。

冠動脈疾患は中国でも近年増加しているとのことであり、冠動脈疾患が心エコーで簡単に診断できればきわめて意義深い。冠動脈を心エコーで観察する場合、プローベの位置がまず重要である。前下行枝の位置をよく理解し、その心尖部よりをねらってスキャンするのが肝要である。また、前下行枝は左室と右室の間の前室間溝を走行するという解剖は是非理解しておかなければならない。また、冠動脈循環評価するためには冠動脈予備能を計測することが極めて肝要である。冠動脈予備能とは安静時に対して最大冠動脈拡張時に何倍の血流量が得られるかということである。冠動脈に狭窄があると狭窄部で血流が障害されるため、安静時の血流は低下しないが最大冠動脈拡張時の血流は低下し、その結果として冠動脈予備の能は低下する。この冠動脈予備能は経胸壁心エコー図を用いて計測可能である。すなわち、経胸壁エコー図によって冠動脈血流が観察されるだけでなく、冠動脈狭窄の診断ができるわけである。講義のあとにはさまざまな質問が出された。冠動脈造影と心エコーによる冠動脈の評価の違い、臨床的な適応疾患、さまざまな薬物や食品の冠動脈予備能に対する効果や影響などなどである。ディスカッションには心



写真4. 講義後のディスカッションの風景

議論百出、たいへん盛り上がったため予定時間を大幅に超過した。右で立っているのは副院長であり、循環器部長の陳先生。

臓外科のこう先生も加わり、さながら循環器内科対心臓外科の様相も呈したが、熱い討論の中でも雰囲気終始和やかであり、本当にこの黒龍江省医院の先生方のチームワークのよさを実感させられた。ディスカッションがあまりにも盛り上がったために予定の時間を大幅に過ぎてしまったが(写真4)、引き続き『経静脈性心筋コントラストエコー』の講義をした。この講義も同じように心臓超音波の冠動脈疾患への応用に関するものであり、今後の臨床応用が期待される分野である。参加者も疲れを全く見せず、講義を熱心に聞いてくれた。心筋コントラストエコー法は循環器医の一つの理想である心筋微小循環の可視化を現実にしたものである。それが装置の設や超音波造影剤の投与方法の工夫などで、実際に臨床で応用されている。心筋コントラストエコー法を理解するためには単に超音波造影剤に関する知識があればよいかというそうではない。それと同等あるいはそれ以上に心筋微小循環に関する知識が必要である。超音波造影剤の本態である微小気泡は経静脈的に投与されると冠動脈を介して心筋へ灌流するが、血管外には漏出しない。心筋内の血液はそのほとんどが毛細血管に分布しているとされている。すなわち、超音波造影剤は赤血球のトレーサーであり、心筋コントラストエコー法で見ている心筋染色は心筋内毛細血管のイメージなのである。また、この毛細血管は極めて決流速が遅いことが知られており、充填するのに数~10秒を要する。このような特徴を持つ心筋微小循環系の画像化にはそれなりの工夫が必要なわけで、単に造影剤を投与すれば誰でも簡単に心筋灌流像が見られるわけではない。心筋コントラストエコーを施行する上ではこのような基礎知識がどうしても必要なのである。中国でも近い将来、この心筋コントラストエコー法は盛んになると思われるが、臨床で活用し、定着させるためにはこのような基礎知識が不可欠なわけである。いずれにせよ、午前中の2つの講義は参加者の意欲的な態度に触発され、大変盛り上がり、また、楽しい講義となった。

昼食をはさんで、午後からは心エコーの実際のテクニックを中尾技師が指導した。それに先立ち、ベッドサイドで患者紹介があり、実際に患者を診察する機会を得た。これは講義予定に入っていなかったが、筆者自身はひそかに望んでいたことなのでよい教育の機会と思い、少しベッドサイドティーチングを行った。

昼食をはさんで、午後からは心エコーの実際のテクニックを中尾技師が指導した。それに先立ち、ベッドサイドで患者紹介があり、実際に患者を診察する機会を得た。これは講義予定に入っていなかったが、筆者自身はひそかに望んでいたことなのでよい教育の機会と思い、少しベッドサイドティーチングを行っ

た。患者を実際に診察することは洋の東西を問わず医療の原点であり、そこには言語を超えた一つの世界がある。患者は心不全であったが、理学的所見による心不全のアセスメントとして、触診による心拡大の可能性、低心拍出量状態の把握、心音による肺静脈圧の推定などを手短かに行った。これらの手技は極めて重要であり、医師として習得しておくべきものであるが、残念なことに日本では高度医療機器が氾濫しているためか、必ずしもこれらの基本的な診察手技が十分行われているとは思えない。中国でも高度医療はどんどん導入されていくであろう。しかし、医の原点である診察を忘れないようにしていただきたいものである。黒龍江省医院の若い循環器内科医たちの熱いまなざしは期待を抱かせるのに十分であった。

心エコーの実習は超音波検査室で行われたが、多くの参加者のために足の踏み場もないほどの盛況であった。まず我々を驚かせたのは黒龍江省医院の超音波断層装置である。日本でもあまり導入されていない最新鋭の高級機種である。こんなところにも中国が医療、経済その他あらゆる面で急速に成長しているのがうかがわれる。講師の中尾技師により、冠動脈血流の検出、拡張能の評価とかなりレベルの高い内容の実技が行われたが、黒龍江省医院の先生方はとても熱心で、講師の一挙手一投足も見逃すまいとするかのごとく食い入るようなまなざしで見入っていた。中尾講師も当初やや緊張の面持ちであったが、程なく慣れ、症例ごとに検査上のポイントとなるところを丁寧に解説しながら画像で示した。

こうして我々の講演、実習は無事終わったわけであるが、黒龍江省医院の先生方の心からの歓待と熱心に学ぶ姿勢は、どこか我々日本人が失いかけている『情熱』や『愛情』を思い起こさせ、我々の方が心を洗われる思いであった。

最後に、この貴重な機会を与えていただいた日中医学協会ならびに朱紅先生はじめ黒龍江省医院の先生方にあらためて謝意を表して筆を置きたい。


作成日：2004年3月15日

2003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－

2004 年 3 月 1 日

財団法人 日 中 医 学 協 会
理 事 長 殿

研究者氏名 韓桂萍 
所属機関名 浜松医科大学 病院病理部
指導責任者氏名 三浦克敏
職 名 助教授
所 在 地 〒431-3192 浜松市半田山1-20-1
電話 053-435-2725 内線

1. 研 究 テ ー マ

腎移植患者と腎結石患者における BK ウイルス亜型の感染率と臓器内分布

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92回日本病理学会総会

BK virus infection in renal transplant recipients

(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

To detect BK virus in carcinomas because BK virus is a potential oncogenic tumor virus.


To detect JC virus in urine samples from the renal transplant recipients and urinary lithiasis patients, and then analyze the sequence of JC virus genome of positive cases.

To collect urine samples of the renal transplant recipients from China and detect BK virus and JC virus, and compare whether there are differences between in China and in Japan.

4. 指導責任者の意見

韓先生は日本に来てから間もない期間に片言ながら日本語が話せるようになり、大学の雰囲気にも慣れてきています。BK ウイルスの研究のきっかけは移植後の患者で尿細胞診の中に封入体が見つかったことが契機でした。形態的にポリオーマウイルスと考えられ、BK ウイルスと同定されました。韓先生はこの症例をきっかけとして、他の移植例やコントロールとして結石症患者の尿沈さや組織を用いて BK ウイルスの検出を試みました。さらに陽性例についてはウイルスの型を RFLP 法や配列を直接決定して詳細な検討をおこないました。短期間の割には着実な成果を挙げられ、現在別のポリオーマウイルスである JC ウイルスにも研究が広がっています。さらには論文の抄読会や病理診断の検討にも加わって精力的に仕事をこなしています。

指導責任者氏名

三浦克敏 

5. 研究報告書

別紙「研究報告書の作成について」に倣い、指定の用紙で作成して下さい。

研究発表または研究状況を記録した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。

腎移植患者と腎結石患者における BK ウイルス亜型の感染率と臓器内分布—

氏 名 韓 桂萍

中国所属機関 ハルビン医科大学第二病院病理部

日本研究機関 浜松医科大学病院病理部

指導責任者 助教授 三浦克敏

Abstract

We collected urine samples of renal transplant recipients and urinary lithiasis patients and tissue specimens from autopsy individuals received renal transplantation. 327 base pairs of VP1 region and 149 base pairs of large T antigen were amplified by PCR and nested-PCR, respectively. The infective rates of BK virus are high compared to normal population. BK virus subtype is predominantly type I. Immunohistochemistry can identify BK virus location combining with histopathologic changes, but its specificity is questionable. PCR is a sensitive and rapid method for detecting BK virus after renal transplantation before the histopathological demonstration and provides a useful opinion for monitoring immunosuppressive therapy.

Key words BK virus renal transplantation urinary lithiasis

Purpose

Primary BK virus infection occurs during childhood. After the primary infection, the virus remains latent in blood cells and in the urinary tract, and can be reactivated in some conditions such as immunocomprised state, pregnancy, and diabetes. In recent studies, BK virus and JC virus have been implicated as a cause of interstitial nephritis in renal transplant recipients. Immunosuppressive treatment with tacrolimus and mycophenylate mofetil appears to increase the risk of viral reactivation in renal transplant recipients. Four BK virus genotypes with characteristic amino acid at VP1 gene product are identified. In our research, we revealed BK virus infection in renal transplant recipients and urinary lithiasis patients, resolved BK virus subtype and determine DNA sequence of VP1 region, and showed localization of BK virus in tissues by immunohistochemistry and in situ hybridization.

Materials and methods

1. Collecting urine samples and autopsy paraffin sections.

241 and 113 urine samples from renal transplant recipients and urinary lithiasis patients. 12 kidney sections, 12 lung sections, and 3 brain sections from 13 autopsy individuals.

2. Purification of DNA from these samples.

3. Checking DNA status by beta-globin amplification using PCR.

4. Amplify BK virus genome by PCR.

For beta-globin positive DNA, 327 base pairs from BK virus VP1 region was amplified using urine DNA. 149 base pairs from BK virus large T region was amplified using autopsy specimens by nested-PCR.

5. Determining BK virus subtype from VP1 genome by restriction endonucleases digestion using XmnI, RsaI, AvaII, and AluI.

6. DNA sequencing.

PCR products were separated by 3% agarose gel electrophoresis. Bands corresponding to BK virus viral capsid protein VP1 products were cut and dissolved using GeneClean kit. Sequencing reactions were carried out by sequencing kit.

7. Immunohistochemical detection of BK virus by anti-SV40 T antibody.

8. Detection of BK virus genome by in situ hybridization with BK virus whole probe.

Results

1. twelve of 71 β -globin positive renal transplant cases were positive for BK virus VP1 region, in which 11 cases were type I and 1 case is type IV. Two of 20 β -globin positive urinary lithiasis cases expressed BKV VP1 region, which were type I. In 13 autopsy cases of renal transplantation, 7/13 were positive for BK virus, 7/12 in the kidney, 5/12 in the lung, and 1/3 in the brain. (These results were shown in Table 1,2,3 and Figure 1,2,3).

2. The sequences of one renal transplant recipient are consistent with BK virus.

3. Immunohistochemistry showed that BK virus was located in the nuclei of tubular epithelium and interstitial cells, but non-specific staining is conspicuous. True positive cells showed enlarged nuclei with ground-glass appearance. (Figure 4)

4. BK virus cannot be detected in situ hybridization

Conclusion

1. Rate of BK virus infection in renal transplantation recipients (16.90%) and in urinary lithiasis (10%) is higher than that of normal population (0.3%). For autopsy cases, the infective rate of BK virus (53.8%) is more than half cases.

2. The BK virus subtype in renal transplant recipients was predominantly type I.

3. Immunohistochemistry is a useful method for detecting BK virus location, but its specificity is questionable. Evaluation with histological changes is necessary.

Discussion

BK virus as a human polyomavirus has been associated with urinary tract stenosis in renal transplant patients and hemorrhage cystitis in bone marrow transplant patients, virus isolation and Southern hybridization analysis demonstrate the kidney is the main site of BK virus latency in healthy population. However PCR analysis indicates that BK virus establishes latent infection in multiple organs. Latent BK virus infection of the renal epithelium is reactivated by immunosuppressive state, leading to viruria. Asymptomatic viruria with BK virus occurs in 0.3% of non-immunosuppressed patients and 10-45% of renal transplant recipients. Our results are consistent with these results. The high infective rates of autopsy cases after renal transplantation demonstrate that BK virus may cause graft failure.

Literature

1. Nickeleit V., Klimkait T., Binet IF, et al. Testing for polyomavirus type BK DNA in plasma to identify renal-allograft recipients with viral nephropathy. *N Engl J Med* 2000;342:1309-15.
2. Hirsch H.H., Knowles W., Dickenmann M., et al. Prospective study of polyomavirus type BK virus replication and nephropathy in renal transplant recipients. *N Engl J Med* 2002;347:488-96.

3. Nickeleit V., Hirsch H.H., Binet I.,etal . Polyomavirus infection of renal allograft recipients: from latent infection to manifest disease. J AM SOC Nephrol 1999;10:1080-1089.

4. Li Jin. Molecular methods for identification and genotyping of BK virus. Methods in molecular Biology, vol. 165: SV40 protocols. L. Raptis Humana Press Inc., Totowa.NJ. pp. 33-48.

注：本研究は、 2003年4月24日「第92回日本病理学会総会」にて示説発表しました。

作成日：2004年3月 5日

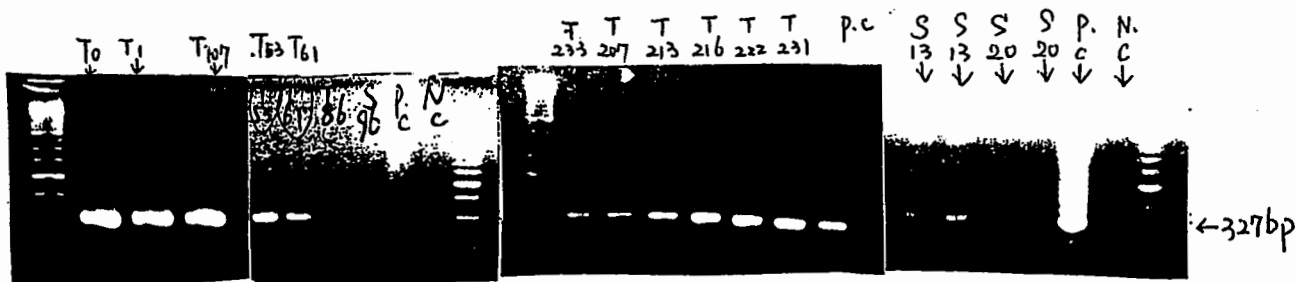


Figure 1

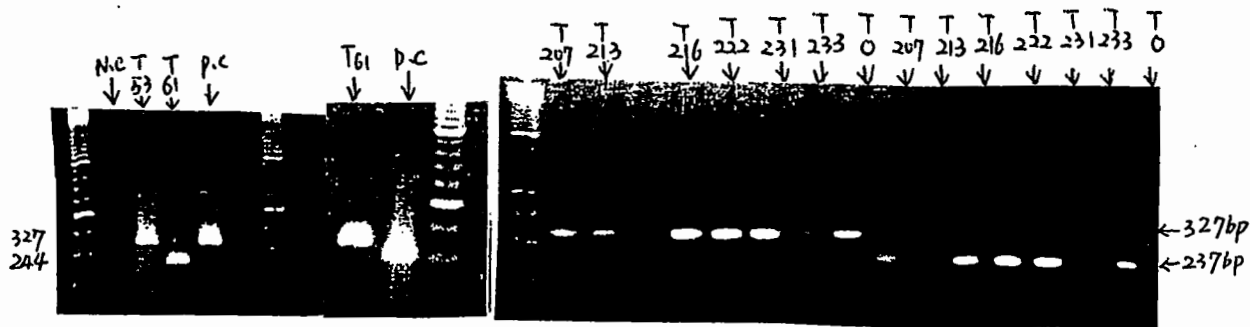


Figure 2A

Figure 2B

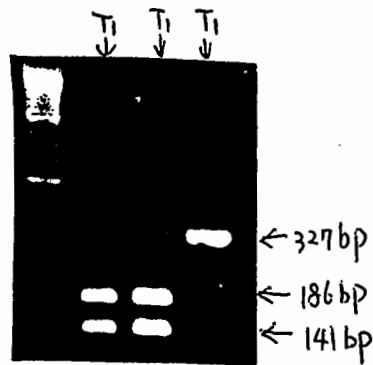


Figure 2C

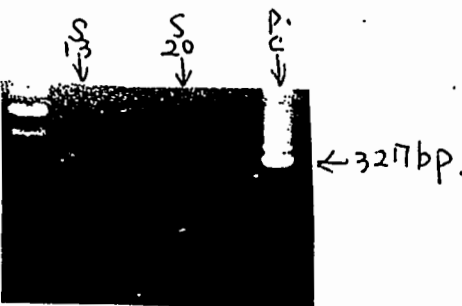


Figure 2D

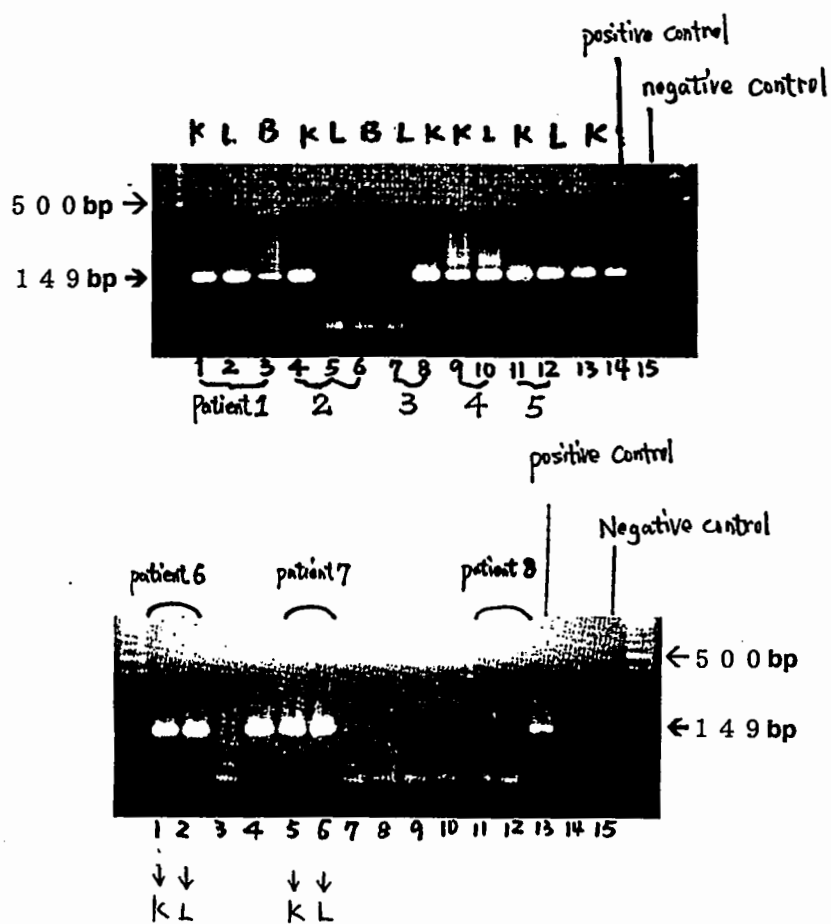


Figure 3

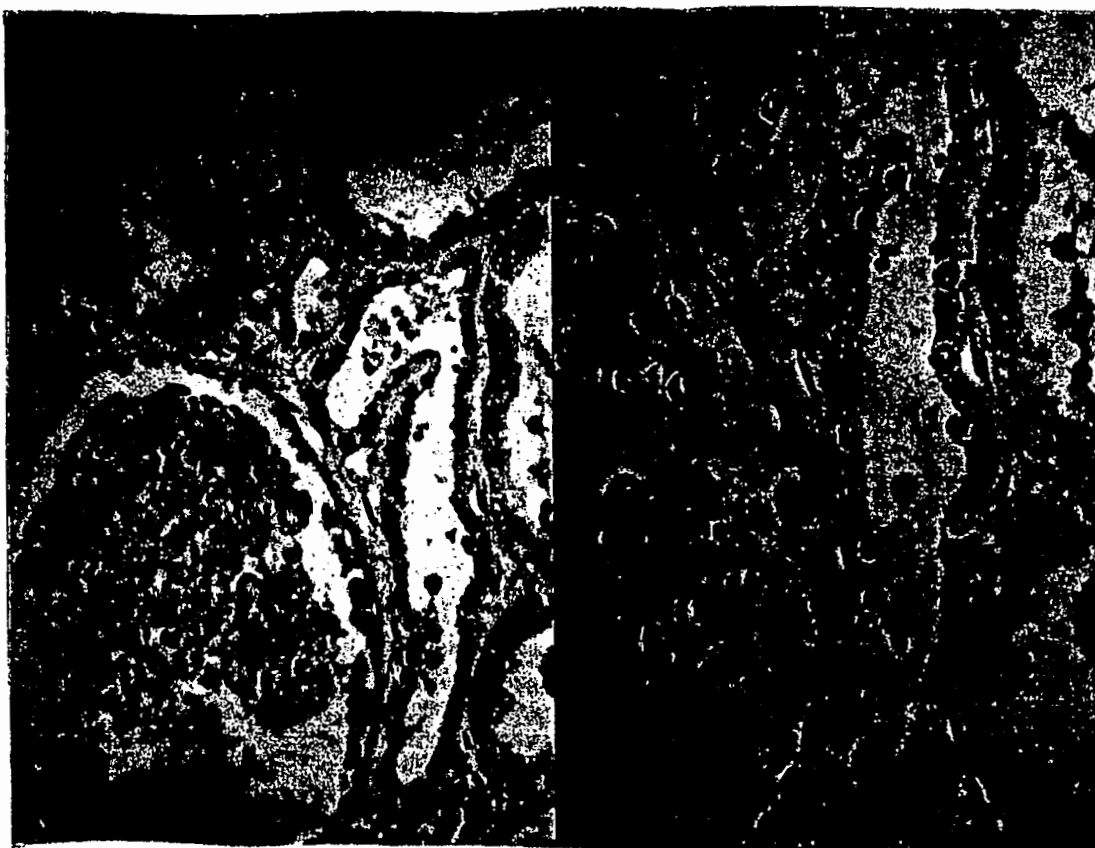


Figure 4

Figure legend

Figure 1. The electrophoresis results of PCR products in renal transplant recipients and renal lithiasis patients. 327 base pairs of BK virus VP1 region was amplified in BK virus positive cases. The numbers on the images stand for the number of patients. T: renal transplant recipients. S: urinary lithiasis. P.C: positive control. N.C: negative control

Figure 2. The electrophoresis results show restriction endonucleases digestion of PCR products for subtyping. Left image of 2A, left half of 2B and 2D. Digest VPI region of BK virus with XmnI showed that the BK virus subtype I was uncut, and the BK virus subtype IV of T61 patient was cleaved to develop 244 and 83 base pairs. The right image of 2A shows that BK virus subtype IV of T61 patient was uncut with RsaI. The right half of 2B showed that the 327 base pairs bands were cleaved with AvaII to develop 237 and 90 base pairs. 2C. Digest 327 base pairs of PCR products with AluI show that the BK virus subtype I was cleaved to form 186 base pairs and 141 base pairs.

The numbers on the images stand for the number of patients. T: renal transplant recipients. S: urinary lithiasis. P.C: positive control. N.C: negative control.

Figure3. The electrophoresis results of nested-PCR products in autopsy cases of renal transplantation by BK virus large T antigen. 149 base pairs were amplified in positive cases. The symbols on and under the images stand for names of organ. K: kidney. L: lung. B: brain.

Figure 4. Immunohistochemistry showed that some nuclei of tubular epithelial cells are positive for SV-40 large T antigen expressed by BK virus.

Table 1. BK virus positive cases of urine

disease	number	Total numbers of urine samples	BK virus positive cases/ β -globin positive cases (%)	BK virus posttive case			
				I	II	III	IV
renal transplantation		243	12/71 (16.9)	11			1
renal lithiasis		113	2/20 (10)	2			

Table 2. BK virus subtypes of positive urine samples

Patient number	BK virus subtype
T0	I
T1	I
T53	I
T61	IV
T107	I
T149	I
T207	I
T213	I
T216	I
T222	I
T231	I
T233	I
S13	I
S20	I

T: transplantation S:Urinary lithiasis

Table 3. BK virus positive cases in renal transplant autopsy on paraffin blocks with PCR amplification

Organs detected	Positive percentage of BK virus
Kidney	7/12
Lung	5/12
Brain	1/3

2003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－

2004 年 03 月 15 日

財団法人 日中医学協会
理事長 殿

研究者氏名 彭 敦 發 ⑩
所属機関名 滋賀医科大学病理学第一講座
指導責任者氏名 杉 原 洋 行
職 名 助 教 授
所 在 地 〒 520-2192 大津市瀬田月輪町
電話 077-548-2168 内線

1. 研 究 テ ー マ

Diffuse 型胃癌の発生と進展に重要な遺伝子を絞り込むための分子細胞遺伝学的研究

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)

第92回日本病理学会総会(福岡)・Comparative CGH and histological analyses in diffuse-type gastric carcinoma.

第62回日本癌学会総会(名古屋)・Comparative CGH analyses of diffuse-type gastric carcinomas with and without tubular adenocarcinoma component.

(2) 学会誌等に発表した論文 有 ・ (無) (雑誌名・論文名)

但し、現在論文(Peng et al. Genetic lineage of poorly differentiated gastric carcinoma with tubular component analyzed by comparative genomic hybridization)を国際誌The Journal of Pathologyに投稿し、revise中。

3. 今後の研究計画

今回の研究では、diffuse型胃癌の発生と進展に重要な染色体レベルの異常や、染色体異常の標的候補遺伝子を明らかにした。またtubular componentのある低分化型腺癌とdiffuse型の胃癌では染色体異常のパターンがかなり異なり、両者の発生の系譜が異なることも明らかにした。今後、この研究で絞り込まれた標的候補遺伝子に注目し、cDNAマイクロアレイなどを用いて、発現異常を伴うことを証明したい。また発現異常が、ゲノムの変化を伴わずepigeneticな変化によって起こる側面についても研究したい。

4. 指導責任者の意見

彭 敦發先生は、これまで研究の困難さからデータの乏しかったdiffuse型胃癌のゲノム変化をCGHとアレイCGHを用いて明らかにすることに成功されました。これはきわめてlaboriousな研究で、並みはずれた根気と努力の成果であります。今回の助成を受ける前の彭先生のデータは、既に（インパクトファクター5.06の国際誌である）The Journal of Pathology(201: 439-450, 2003)に掲載されており（Peng et al. Alterations of chromosomal copy number during progression of diffuse-type gastric carcinomas: metaphase- and array-based comparative genomic-hybridization analyses of multiple samples from individual tumours.）、高い評価を得ております。この論文が学位論文となり、昨年医学博士の学位を授与されました。今回のデータも前回と同じ雑誌に投稿し（Peng et al. Genetic lineage of poorly differentiated gastric carcinoma with tubular component analyzed by comparative genomic hybridization）、revision後 acceptableであるとの評価を得、現在 revisionを行っている所です。彭先生は、研究に対する情熱もさることながら、夜遅くまで黙々と実験する集中力と体力、きちんと対照の取れたデータを出すことのできる科学的なセンスを持ち合わせておりましたが、それが今回日中医学協会の助成を得た研究によって益々磨かれ、研究者として大きく成長されたことに対し、指導させていただいた私どもは、日中医学協会に対して深い感謝の意を表するものであります。

指導責任者氏名 杉原 洋行



5. 研究報告書

別紙「研究報告書の作成について」に倣い、指定の用紙で作成して下さい。

研究発表または研究状況を記録した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。

Diffuse 型胃癌の発生と進展に重要な遺伝子を絞り込むための分子細胞遺伝学的研究

研究者氏名 彭 敦發
中国所属機関 中国皖南医学院病理学講座
日本研究機関 滋賀医科大学病理学第一講座
指導責任者 助教授 杉原 洋行
共同研究者名 向所 賢一, 服部 隆則

Abstract

Gastric carcinoma (GC) has been classified into the diffuse and the intestinal types. Diffuse-type GCs at advanced stages are thought to derive from intestinal-type as well as diffuse-type early GCs. In the present study, we focused on diffuse type GCs with minor tubular components (TC) to clarify their derivation. We applied comparative genomic hybridization (CGH) and array CGH to the DNAs that were taken by microdissection from multiple portions in individual tumors and amplified by degenerate oligonucleotide-primed PCR, and compared the results with those in diffuse-type GCs without TC. We found that the occurrence of the tumors with TC inclined to older, male patients. Frequent stemline changes common to the samples in each tumor were 8q+, 7p+, 3q+, 20q+ and 10p+, being basically different from those in the tumors without TC. The number of chromosomal changes was greater and 6p+, 10p+, 10q+, Xp+ and 4q- were more frequently detected in the tumors with TC than in those without TC. Within individual tumors, no significant difference was found in the frequency pattern of chromosomal changes between the samples of TC and the others, suggesting their derivation from the common precursor. We noticed that there were two subgroups in the tumors with TC: one with 5p+, 6p+, 7p+, and 10p+ and the other without them. The latter had the cytogenetic and clinicopathological aspects common to those in the tumors without TC. The analysis of clonal evolution process by constructing dendrograms in each tumor gave the results consistent with the notion that the latter subgroup may derive from diffuse-type GC without TC and the former from tubular adenocarcinoma.

Key Words Gastric carcinoma: diffuse type, CGH, array CGH, Laser microdissection

Introduction

During the past decades, progresses have been made in understanding of the molecular events in the tumorigenesis and progression of GC [1]. Cytogenetic data have also been rapidly accumulated recently since the advent of comparative genomic hybridization (CGH), which is proved as a powerful screening method for detecting cytogenetic alterations in solid tumors [2, 3]. Despite these progresses, the reports on genetic and chromosomal aberrations in GCs were not consistent with each other.

We have recently developed the method that enables us to limit earlier events from many chromosomal changes detected by CGH [4]. Applying this method to early and advanced diffuse-type GCs, we demonstrated that advanced GC of this type may have progressed from early GCs of the same type by acquiring additional chromosomal changes [4].

In clinical practice, however, diffuse-type GC with TC is not uncommon, the cytogenetic characteristics and its relationships with intestinal type GC and diffuse-type GC without TC remain to be clarified. In the present study, we thus focused on diffuse-type GC with TC.

Materials and methods

Tumor samples

A total of 123 tumor samples were taken from 27 cases with gastric carcinomas, including 8 cases with minor tubular component (TC) (cases 20-27) and 19 cases of diffuse-type cancers without TC (cases 1-19). In the tumors with TC we examined, the tubular component accounted for less than 30 % of the tumor.

Laser capture microdissection and DNA preparation

We carried out microdissection of tumor cells from tissue section as described previously [4]. In individual tumors, we took about 500 to 5000 tumor cells from each of 2 to 8 different parts, in which tumor cells accounted for 70% or more. The films containing tumor cells were digested in 40 μ l of proteinase K solution at a concentration of 200 μ g/ml for about 70 hours at 42 °C.

Whole genome amplification by DOP-PCR

We amplified sample DNAs by DOP-PCR in two phases as described previously [4], which gave the PCR products of more than 2 Kb in size, being suitable for nick-translation labeling.

Probe DNA labeling, CGH and digital image analysis

DOP-PCR amplified tumor and normal DNAs were labeled with fluorescein-12-dUTP and tetramethylrhodamine-5-dUTP, respectively, by nick translation [5]. Hybridization and image analyses were carried out as described previously [4]. Gains and losses in DNA copy number were defined by green to red ratios (G/R) > 1.2 and < 0.8, respectively [4]. High-level gains (amplifications) were defined by a $G/R \geq 1.5$. Chromosomes 1p32-pter, 16p, 19, 22 and Y were excluded in the analyses.

Random priming labeling and array CGH analysis

We labeled tumor DNA and reference DNA of the same sex (100 ng each) with Cy 3-dCTP and Cy 5-dCTP respectively, by random priming reaction, and carried out array CGH following the manufacturer's protocol. GenoSensor Array 300 (Vysis) which spotted with 287 target DNA clones including locus markers, proto-oncogenes and tumor suppressor genes were used. Target spots were automatically identified and analyzed by the built-in software. The loci with amplification were defined as a mean T/R ratio > 2.0, and the loci with a T/R ratio < 0.6 were considered as losses [4].

Temporal analysis of CGH results

In order to assess clonal consistency, we compared the positions of breakpoints among the samples as reported previously [4]. We defined the common alterations shared by all the samples in each tumor as stemline changes, those shared by multiple but not all the samples in each tumor were described as recurrent sideline changes, while the other changes unique to each sample as single sideline changes.

Results

1. Cytogenetic alterations detected by metaphase CGH

The chromosomal copy number aberrations detected in 54 samples of the 8 tumors with TC were summarized in Figure 1 and Table 1. The total number of chromosomal aberrations per sample was significantly higher ($P = 0.006$) in the tumors with TC (14.02 ± 7.65 (SD)) than those without TC (10.57 ± 5.80).

High level gains (amplifications) were detected in totally 26 chromosomal regions in 7 of the 8 tumors with TC (Table 1, Figure 1). The mean number of amplified regions in the tumors with TC (6.00 ± 5.45) was much higher than in those without TC (1.11 ± 1.24) ($P = 0.0009$). The recurrent amplified regions in the tumors with TC were at 8q24 (5/8), 7p (4/8), 20q (4/8), 5p (3/8), and 13q (3/8). Copy number gains at 6p, 10p, 10q and Xp and copy number loss of 4q were significantly more common in the tumors with TC than those without TC ($P < 0.05$) (Figure 2A). In individual tumors with TC, there was no significant difference in the frequencies of any chromosomal changes between the samples of TC and those of SIG/POR (Figure 2B).

2. Array CGH analyses

The array CGH results of the tumors with TC are presented in Table 1 and those without TC were shown in Table 2 in Ref.4. The most frequent amplicons were at 8q24 (5/8), 7p (4/8) and 20q (4/8), followed by 5p (3/8) and 13q (3/8). In the tumors with TC, *CMYC* was involved in the amplicon at 8q24 in 4 cases, but in case 27, *PTK2* instead of *CMYC* was proved to be responsible for this amplicon. *EGFR* gene at 7p12.3-p12.1 was amplified in both groups with and without TC. In the 20q amplicons in our series, amplifications of *STK15*, *CAS*, and *ZABC1* were involved.

3. Temporal analysis of CGH results

In the tumours without TC, 8q+ (5/19), 8p+ (4/19), and 17p- (6/19) were picked up as frequent stemline changes [4]. In the individual tumours with TC examined, we also detected the stemline changes, such as gains of 8q (6/8), 7p (4/8) and 10p (2/8).

Gains at 8p and 10p were not frequent but appeared to be specific to the tumours without and with TC, respectively (Table 2).

Table 1. Frequencies of Chromosomal Aberrations of Total, Stemline and Sideline Changes in Diffuse GCs with TC

Copy number gains/AMP	Array CGH Candidate genes†	Metaphase CGH				Copy number losses	Array CGH Candidate genes‡	Metaphase CGH				
		The number of cases with aberration/AMP	Stemline changes	Sideline changes				The number of cases with aberrations	Stemline changes	Sideline changes		
				Recurrent	Single					Recurrent	Single	
8q+/q24	MYC* #, PTK2*, E2F5*, EXT1	8 (100%)	5	6	2	0	4q-	?	5 (62.5%)	0	4	1
3q+/q25-26	TERC, PIK3CA* #, EIF5A2	8 (100%)	2	2	4	2	14q-	?	5 (62.5%)	1	4	0
20q+/q12-13	TOP1, STK15, CAS, ARL1, ZAR1	7 (85.7%)	4	2	4	1	3p-	MLH1, FHIT, VHL	4 (50.0%)	0	2	2
Xp+/p22	?	7 (85.7%)	1	0	5	2	17p-	TP53, LIGL1 #	4 (50.0%)	1	3	0
Xq+/q25	AR3*	7 (85.7%)	1	0	3	4	21q-	?	4 (50.0%)	0	3	1
1q+/q31-34	LAMC2 #, AKT3	6 (75.0%)	1	4	1	1	5q-	APC, (MCC), MSH3	3 (37.5%)	0	3	0
2q+/q11.3-21.2	CASP8, HER-4	6 (75.0%)	1	1	2	3	9q-	PTCH #, TSC1	3 (37.5%)	0	2	1
6p+/p22-25	CCND3, PIM1	6 (75.0%)	2	0	5	1	16q-	CDH1 #, CDH13, CYLD	3 (37.5%)	0	3	0
7p+/p14-22	EGFR #	6 (75.0%)	4	1	1	1	18p-	?	3 (37.5%)	0	1	2
10p+/p12.1-14	?, D18S249, GATA3, D10S1260	6 (75.0%)	2	3	3	1	7q-	?	3 (37.5%)	0	2	1
13q+/q32-34	DPE?	6 (75.0%)	1	4	1	1	9p-	p16, ATAP	3 (37.5%)	0	1	2
20p+/20p	?	6 (75.0%)	1	1	4	1	18q-	ICC, DPC4, (MADR2)	3 (37.5%)	1	1	1
5p+/5p	(SKP2, CDH6, PC41, DSS21 #, DSS2064	5 (62.5%)	3	1	4	0	2q-	(PMS1)	2 (25.0%)	0	1	1
8p+/p22-23	FGFR1, CTSB*	5 (62.5%)	2	1	4	0	4p-	?	2 (25.0%)	0	2	0
2p+/p15-16	MYCN, REL	5 (62.5%)	1	1	1	3	10q-	PTEN, DMBT1	2 (25.0%)	0	2	0
10q+/q24.3-26	FGFR2* #	5 (62.5%)	0	4	1	1	11p-	p53, WT1 #, KAI1	2 (25.0%)	0	1	1
11q+/q23-24	CCND1, FGF3, (BCL1)	5 (62.5%)	2	0	3	2	11q-	ATM, MEN1, RDX	2 (25.0%)	0	2	0
11p+/p12-14	HRAS* #	4 (50.0%)	1	0	4	0	12q-	?	2 (25.0%)	0	2	0
12p+/p11.2-12.3	CCND2, KRAS	4 (50.0%)	1	1	1	2	17q-	BRCA1, NF1	2 (25.0%)	1	1	0
15q+/q24-26	FES*, IGF1R, (R0GAP1)	4 (50.0%)	2	1	2	1	Xp-	?	2 (25.0%)	0	1	1
18q+/q21	BCL2: ?	4 (50.0%)	0	3	3	1	Xq-	?	2 (25.0%)	0	1	1
5q+	?	3 (37.5%)	0	0	1	2	6q-	?	2 (25.0%)	0	1	0
6q+	MYB #	3 (37.5%)	0	0	3	0	8p-	?	2 (25.0%)	0	0	1
7q+/q21.3-22	MET, CDK6*, MDR1	3 (42.9%)	1	1	1	1	2p-	MSH2	1 (14.3%)	0	0	1
9q+	ABL1	3 (37.5%)	1	1	1	1	15q-	?	1 (14.3%)	0	1	0
12q+/q15-25	WNT1, CDK2, MDM2, GLI, CDK4	3 (37.5%)	0	2	1	1						
14q+	AKT1 #	3 (37.5%)	0	1	1	2						
18p+/18p	YES1, TYMS	3 (37.5%)	0	2	1	1						
1p+	FGF, MYCL1, NRAS #	2 (28.6%)	0	0	2	0						
9p+	?	2 (28.6%)	0	0	2	0						
16q+	?	2 (28.6%)	0	1	1	1						
17q+/q14-21	HER-3* #, PBP*, TOP2A*, THRA*	2 (14.3%)	1	1	0	0						
3p+/p13-14	RAF1	1 (14.3%)	0	1	0	0						
4p+	?	1 (14.3%)	0	1	0	0						
4q+	PDGFRA, EIF4E	1 (14.3%)	0	1	0	0						
21q+	?	1 (14.3%)	0	1	0	0						

† See web site http://www.helsinki.fi/~lgl_www.html. The bold letters indicate the genes that showed amplifications in array CGH. The genes with # indicate they were detected in more than 35 % of the cases. The genes with asterisks are the putative target gene (s) corresponding to the amplifications in CGH analyses (at the loci shown in bold letters in the left end column). ¶ See web site http://www.helsinki.fi/~lgl_www/CMG.html. The bold letters indicate the genes that showed losses in array CGH. Genes in parentheses are not included in the Genosensor array 300 chip. AMP= amplification; TC= tubular adenocarcinoma component.

Table 2. Frequent Stemline Changes between the tumors with and without TC

	N	8q24+	8p22-23+	17p12-ter-	7p14-22+	3q26-ter+	20q+	10p+
Tumors without TC	19	5 (26.3 %)	4 (21.1 %)	6 (31.6 %)	3 (15.8 %)	2 (10.5 %)	2 (10.5 %)	0
Tumors with TC	8	6 (75 %)	1 (12.5 %)	1 (12.5 %)	4 (50 %)	2 (25 %)	2 (25 %)	2 (25 %)
Cases 21, 22	2	2 (100 %)	1 (50 %)	0	0	0	0	0
Cases 20, 23-27	6	4 (66.7 %)	0	1 (16.7 %)	4 (66.7 %)	2 (33.3 %)	2 (33.3 %)	2 (33.3 %)

We picked up the minimal overlapping regions of the chromosomal changes which were detected as stemline changes in 20 % or more of either tumor group with or without TC, as indicated in bold letters. TC = tubular component, GC = gastric cancer.

Discussion

Within individual diffuse-type GC with TC, there was almost no difference in the pattern of chromosomal copy number aberrations between the samples of SIG/POR and those of TC (Figure 2B). This finding and the presence of stemline changes common to TC and SIG/POR indicate that these components are of the same lineage and that this group of GC is also monoclonal despite its marked histological heterogeneity. Between the tumours with TC and without TC, however, the genetic lineage appeared to be different because the patients bearing the tumours with TC showed significantly higher male/female ratio and age than those without TC. This notion was supported by the findings in CGH analysis that the frequent stemline changes of the tumours with TC were 8q+, 7p+, 3q+,

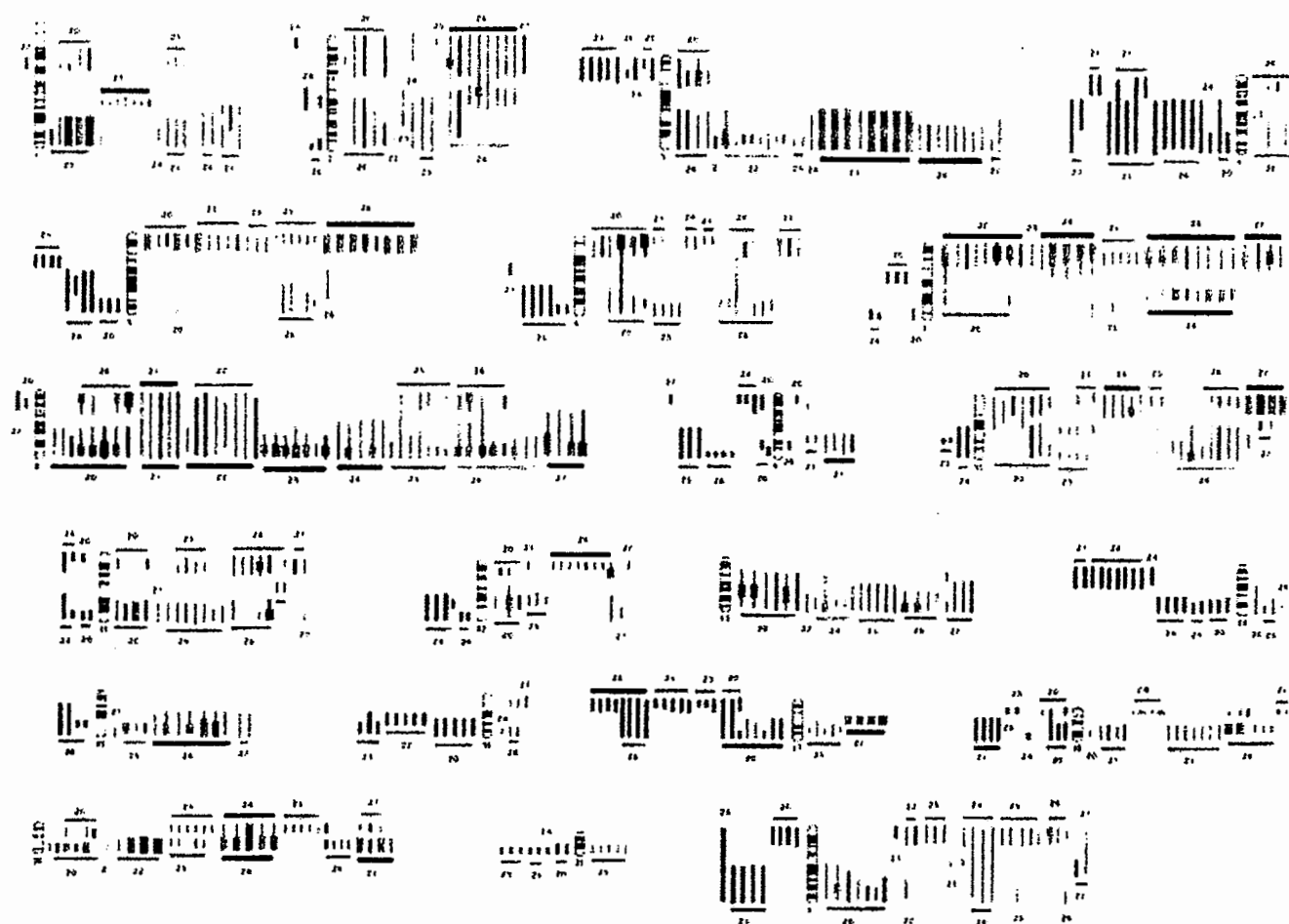


Figure 1. Metaphase CGH results in 54 samples of 8 tumours with TC. The regions of copy number gains and losses in all the samples are shown as the bars on the right and left sides of each ideogram, respectively. The thick bars mean amplifications. The results of the same case are marked with horizontal bars with case number. Black and grey bars represent stemline and sideline changes, respectively.

20q+ and 10p+, which were different from those of the tumours without TC (8q+, 8p+ and 17p-) (Table 2). Although 8q+ was included in the recurrent stemline changes in both groups, array CGH disclosed that the target genes were different; *C-MYC* was involved in the amplicon at 8q24 in 4 of the 5 tumours with TC bearing this amplicon and *PTK2* was in the other one, whereas neither *C-MYC* nor *PTK2* was involved in the amplicon of 8q in the tumours without TC [4].

Among the common sideline changes, gain of 10p was detected in 75 % of the tumours with TC as stemline changes or recurrent sideline changes (Figures 1, Table 1) but in none of the tumours without TC we examined [4]. In both intestinal and diffuse types of GC, however, 10p + was reported infrequently. At 10p, no oncogenes have been reported so far. However, *GATA3* and two loci, *D10S249* and *D10S1260*, were amplified in case 27.

Based on the chromosomal constitution, diffuse type GCs with TC examined were further classified into two subgroups: the one with 5p+, 6p+, 7p+ and 10p+ (6 cases) and the other without them (2 cases). All of the patients of the former subgroup were male. Their tumours did not show a layered structure in their mucosa lesions that is considered to be a remnant of the growth pattern in an incipient phase. Moreover, these tumours had numerous chromosomal alterations including 3 or more loci of amplification. The patients of the latter subgroup were female. Their tumours showed a layered structure and a spreading growth in the mucosa, and had fewer chromosomal alterations and amplifications than those of the former subgroup. The analysis of clonal evolution process by constructing dendrograms in each tumor gave the results consistent with the notion that the latter subgroup may derive from diffuse-type GC without TC and the former from the intestinal-type GC.

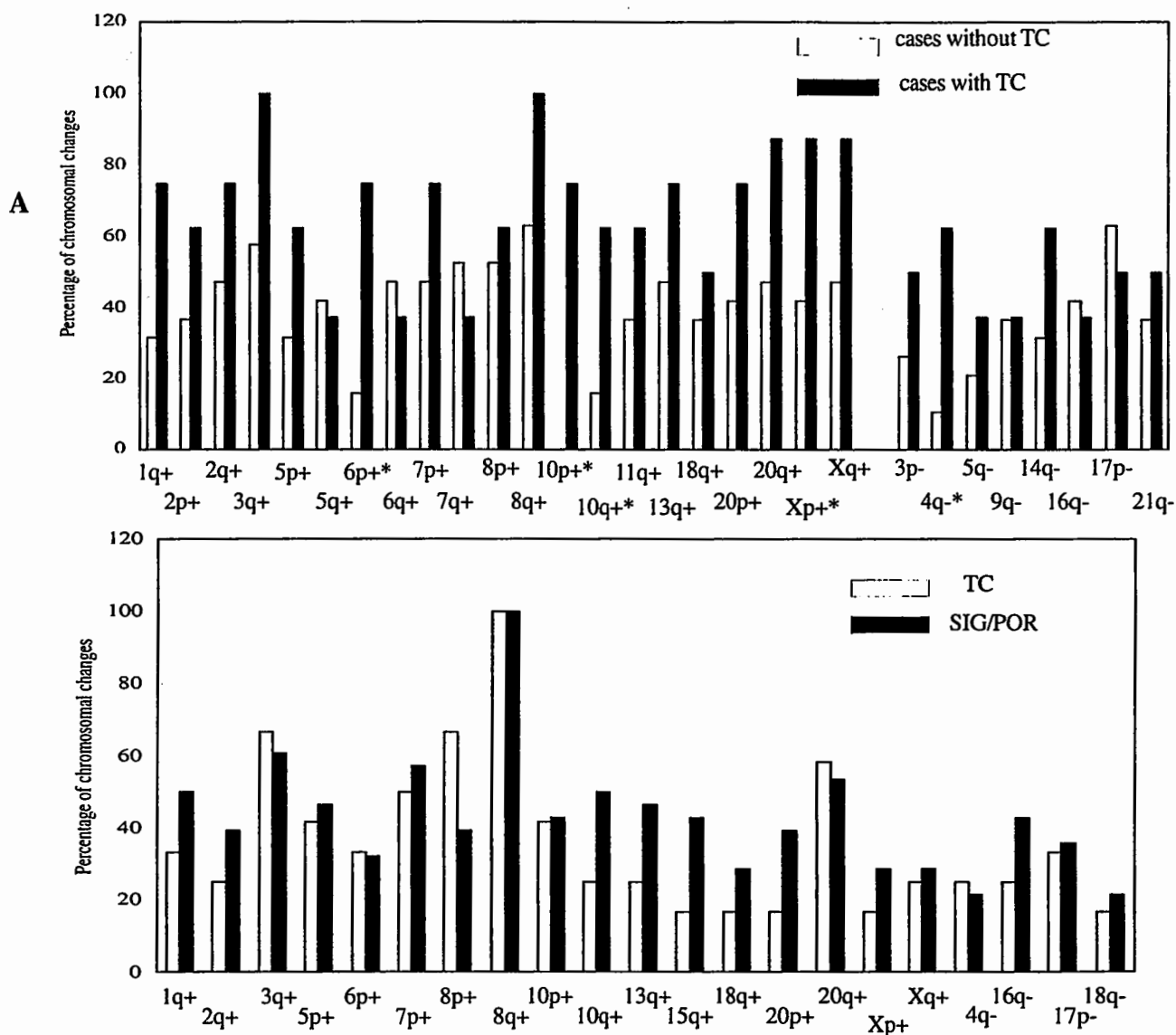


Figure 2. The pattern of frequencies of chromosomal copy number changes. The pattern was compared between the diffuse GCs with and without TC (A) and between the samples from POR/SIG components and from TC (B). The asterisks indicate statistically significant differences ($P < 0.05$).

References

1. Tahara E. Molecular biology of gastric cancer. *World J Surg* 1995; 19: 489-490.
2. Kallioniemi A, Kallioniemi O-P, Sudar D, Rutovitz D, Gray JW, Waldman F, Pinkel D. Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors. *Science* 1992; 258: 818-821.
3. James LA. Comparative genomic hybridization as a tool in tumor cytogenetics. *J Pathol* 1999; 187: 385-395.
4. Peng DF, Sugihara H, Mukaisho K, Tsubosa Y, Hattori T. Alterations of chromosomal copy number during progression of diffuse-type gastric carcinomas: metaphase- and array-based comparative genomic hybridization analyses of multiple samples in individual tumors. *J Pathol*, 2003; 201:439-450.
5. Kallioniemi O-P, Kallioniemi A, Piper J, Isola J, Waldman FM, Gray JW, Pinkel D. Optimizing comparative genomic hybridization for analysis of DNA sequence copy number changes in solid tumors. *Genes Chromosome Cancer* 1994; 10: 231-243.

2003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－

2004年02月16日

財団法人 日中医学協会
理事長 殿

研究者氏名 曹 鵬 宇



所属機関名 新潟大学大学院医歯学総合研究科

指導責任者氏名 赤澤 宏平

職 名 教授

所在地 〒951-8520 新潟市旭町通 1-754

電話 (025)227-2471 内線

1. 研究テーマ 病院情報データベースを活用した経営戦略立案の手法に関する研究

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)

- 1) 第10回新潟大学主催医学研究会
病院におけるコスト計算法の研究
曹鵬宇
2003.08.20 新潟大学有壬会館

(2) 学会誌等に発表した論文 ☒ 有 ・ 無 (雑誌名・論文名)

- 1) **Pengyu Cao, Masao Hashiba, Kouhei Akazawa, Tomoko Yamakawa, Takayuki Matsuto**
An Integrated Medical Image Database and Retrieval System Using a Web Application Server.
International Journal of Medical Informatics 71(1)51-55 2003.
- 2) 赤澤宏平, 鳥谷部真一, **曹鵬宇**
臨床疫学統計の基礎—統計解析のプロセスとその応用。
PharmStage, 2003, 82-89

3) 赤澤宏平, 鳥谷部真一, 曹鵬宇

医療情報学テキスト「病院経営指標の見方、考え方、その応用」(分担執筆)
篠原出版 (印刷中)

4) Pengyu Cao, Shinichi Toyabe, Sachiko kurashima, Kohei Akazawa

An introduction of the restrictive reimbursement systems for health care in Japan, American, Germany and France.

Chinese Journal of Hospital Administration. (投稿中)

5) Pengyu Cao, Shinichi Toyabe, Sachiko kurashima, Kohei Akazawa

An alternative method for estimating costs of practice in Japanese hospital
Journal of Health Economics (投稿中)

6) Tomoko Yamakawa, Masao Hashiba, Pengyu Cao, Kohei Akazawa

The trial of streaming via the Internet medical programs to MPEG4 multimedia contents

International Journal of Medical Informatics (投稿中)

3. 今後の研究計画

- 1) 今回の研究を基にしてコスト按分ルールを決定し、疾患群分類 (DPC) ごとの診療コストを計算する。
さらに分類ごとの診療コストに影響を与える因子、それと分類ごとの LOS (Length of stay 在院日数) に影響を与える因子の解析を行う。「コスト」と「影響因子」の分析で DPC 分類および診療報酬点数の決め方の妥当性を検討する。
- 2) CBC コスト分析に基づいたコスト計算システムの作成
具体的には、各診療行為別に列挙したコスト項目と分配指標をデータベース化する。各分配指標に応じたコストは病院情報システムから自動的に抽出できるように設計する。1 患者あたりのコストは、その患者に対しておこなった診療行為をシステムから自動的に抽出することで算出できるように設計する。診療コストは、疾患群別・診療科別にも自動的に計算できるようにデザインする。このようにして作成したシステムは、マスターテーブルに登録したコスト項目や分配指標を調整することで、他院でも汎用的に使用が可能となる。病院間で診療原価を比較し、医療の費用対効果を高めることが可能となる。
- 3) コスト管理、さらに病院経営に適したデータウェアハウスの構築法を研究し、河北医科大学病院でシミュレーションする。

4. 指導責任者の意見

曹さんが行った研究は、客観的な病院経営情報を創出するための実践的方法を開発したという点で、大きな意義があると考えます。今回の研究は、病院内で実施されている検査コストを詳細に推定するものでしたが、本手法は他の病院業務にも応用できます。たとえば、手術部の消耗品のコスト、病棟業務における処置、治療のコストなどの算出です。今回の研究結果は、英文雑誌 *Journal of Health Economics* に投稿しましたが、他の部門でのコスト計算結果、コスト計算の近似式の導入、シミュレーション研究など、継続性のある研究が可能となりました。

これらの方法は、中国の病院経営においてもより科学的な分析を可能とすると思います。曹さんの河北医科大学第4病院でのポジションから考えても病院長を補佐し CIO として活躍するための実力を身につけることができたと考えます。このように有益な研究をさせていただきましたことに深く感謝申し上げます。

指導責任者氏名 赤澤 宏平



5. 研究報告書

別紙「研究報告書の作成について」に倣い、指定の用紙で作成して下さい。

研究発表または研究状況を記録した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。

病院情報データベースを活用した経営戦略立案の手法に関する研究

研究者氏名 □□曹 鵬宇

中国所属機関 □□河北医科大学第四病院病院長室

日本研究機関 □□新潟大学大学院医歯学総合研究科

指導責任者 □□教授 赤澤 宏平

共同研究者名 □□鳥谷部真一, 倉島幸子

要 旨

本研究では、病院経営戦略において、コスト管理における診療コスト算定法の VBC (Volume-Based Costing) 法、ABC (Activity-Based Costing) 法および本研究にてオリジナル提唱とする CBC (Classification-based costing method) コスト算定法を説明する。それぞれのコスト算定法の特徴、そして正確性および実用性を検証するために、大学病院の実データを用いて比較計算を行った。その結果、VBC 法による単純なコストドライバを用いたコスト計算が簡便だが計算結果として歪曲であった。ABC 法によるコスト計算が正確だが診療行為ごとにコストドライバの確定が必要し、かつ数多くのコストドライバにあたるデータの収集が煩雑し、コストをかかりすぎるので、実際の医療現場では実用ではなかった。CBC 法による計算は、プロセスおよび計算結果から VBC 法と ABC 法と比較すると次のメリットが分かった: 1、VBC 法の計算上の大きな歪曲が解消できる。計算偏差の比較から見れば、CBC 計算の結果は ABC 法の計算値と近似で、VBC 法の致命的な欠点である計算の歪曲を解消することができた。2、ABC 法のコスト計算自体にかかるコストの削減。コストドライバの数およびデータ収集にかかる時間と人件費からみると、CBC 法が ABC 法よりもより迅速、より低い代価でコストの計算ができることが分かった。

Key Words VBC コスト計算法, ABC コスト計算法, CBC コスト計算法, オリジナル, 検査コスト, 診療コスト算定法比較

緒 言

ヘルスケアの分野において、良質な医療サービスがより強く求められている。同時に、欧米各国で実施されている定額払い制度、例えば、米国の DRG/PPS、英国での HRG、ドイツでの AR-DRG、フランスでの GHM 及び日本における入院患者を対象とした包括評価制度 (Diagnosis Procedure Combination DPC) に対しては、病院経営戦略として、収入管理型経営からコスト管理型経営への転換をしなければならない。その下で、診療コストの削減が急務となされている [1-4]。

病院経営において、診療コストの削減策を立案するためには、客観的でかつ迅速なコスト算定が必要である。病院診療コストのうち直接人件費、材料費の算定は比較的容易に行えるが、総コストの 20～30% に及ぶ間接コスト [5-7] (本病院では 2001 年は 43.6 億の経費で、全体コスト 168.8 億の 26% を占めた) の各診療科への配分する計算は容易ではない [7, 8]。例えば、病院の診療報酬の請求を管理する医事係のコストを、各診療科にどのように配分するかは難しい。従来では、間接コストの分配において時間・収入・患者数など量に基づく分配法と、診療行為または業務行為 (これを activity と呼ぶ) の各々をベースにした分配法 (Activity-Based Costing, ABC) などの方法がある。しかし、従来法による単純なコストドライバを用いたコスト計算が簡便だが歪曲であり、ABC 法によるコスト計算が正確だがコストドライバの確定および

データ収集が煩雑であった。正確かつ簡便実用な間接コストの分配法は不確定であるのが現状である。本研究では、上述の問題を解決するために、オリジナルである CBC (Classification-based costing method) コスト計算法を開発した。その上、ABC 法によるコスト計算の実用性および新しい CBC 法の正確性を検証するため、検査コストの算定を実例として病院の実データに基づき、ABC 法と CBC 法と、従来の直接労働時間によるコスト計算を行う VBC (Volume-Based Costing) 法と 3 つのコスト計算法の比較を行った。

対象と方法

初めに、間接コストの計算でよく使われるコストドライバを定義する。コストドライバとは、間接コストを分配するための指標のことである。例えば、ある「検査 a」に対して病院材料管理部門が、検査材料を提供するためにコストを発生する。検査 a にとってこのコストは間接コストである。計算には、病院全体の診療行為に対する材料提供請求の総伝票数 (total Numbers of material request bills of hospital, $Nt\cdot mrbs$) と、材料部門におけるこの「提供」業務行為による発生したコストの総額 (total amount Costs of the material department of hospital, $Ct\cdot md$)、そして検査 a による材料提供請求の伝票数 (Numbers of material request bills for test "a", $Na\cdot mrbs$) がわかればよい。

$$(\text{Material supply costs to test "a"}) \quad Ca\cdot md = \frac{Ct\cdot md}{Nt\cdot mrb} \times Na\cdot mrbs$$

検査 a に分配すべき材料提供コストが、検査 a による材料提供請求の伝票数によって決められるから、この伝票数が材料提供コストを分配するコストドライバにあたる。

従来にある量に基づいた間接コストの分配法では、コストドライバの設定の仕方によって 3 つの方法がある。(1) 収入割合をコストドライバとして計算する RCC (Ratio of Costs to Charges Method) 法、(2) 患者/日数をコストドライバとする Per-Diem Approach (PDA) 計算法、(3) それ以外の量、たとえば、直接労働時間や機器利用時間などをコストドライバとする VBC (Volume-Based Costing) 法 [9]。これら方法は、簡便な方法として知られているが、病院で行われる診療行為はかなり複雑性を持っているから、どれの 1 つコストドライバで間接コストを分配するのは、コスト分配法として必ずしも適切ではないことが指摘している [9-12]。たとえば、診療科に対して間接コストである管理部門コストや警備・環境整備コストなどを医師や看護師の診療業務時間によって診療科へ分配とするとときに、該当診療科における医師や看護師の診療時間が 10% を増やせれば、上述の間接コストは本当の消耗状況にかかわらず 10% を増やしてその診療科に分配される。こういう不適當に対して、コスト計算対象 (例えば検査 a など) にかかわるひとつひとつの診療行為または業務行為 (activities) ごとのコスト消耗の計算によって、コストを分配する ABC 法がある。ABC 法では、まずコスト計算対象に関わる activities を明確にする必要がある。そして、それぞれの activities にどれくらいコストをかかったかを資源コストドライバを用いて計算する (第一段階の計算)。続いてコスト計算対象には、これら activities をどれだけ利用したかを、各々の activities に対応する activity コストドライバを適用して計算する (第二段階の計算) という方法である (図 1)。この方法は、間接コストを配分するにはより正確に計算できるが、activities とコストドライバがあまり多すぎると、コスト計算に用いるデータの収集に労力を要し、結果を得るために時間・コストもかかるので実践的ではない。さらに、管理の焦点を絞る要素が曖昧になる危険性があるという反論も存在する [13-14]。

3. 新しい間接コストの分配法

本研究で提唱とする CBC 法は、ABC 法の第二段階の計算を簡素化するものである。具体的には、計算された activities のコストをカテゴリー化する。というのは、病院機能の観点から、activities コスト変動の同質性を持つ activities のコストをカテゴリー化、いわゆるプール化する上でより数少ないコストドライバで配賦する (図 2)。コスト変動の同質性とは、activity 別のコストをどの要素に従って変動するのか、その要素が同一である activities コストはコスト変動の同質性を持つ activities コストのことである。

る。たとえば先の例では、activities コストが変動を起こる従属関係に従って、採血管、ヘパリンなど検査材料の入手コスト・検査試薬の入手コスト・検査受付コスト・採血コスト・診療報酬の請求コスト・検査機器の維持コストは、コスト変動の同質性(これらは検査件数によって変化する)を持つものであるので、コストを発生部門や種類に限らず、検査件数系というカテゴリーに分類できる。結局に、各カテゴリーのコスト変動要素は各カテゴリーのコストドライバとなる。

CBC 法によるコスト計算の正確性を検証するためには、生化学検査、血液検査、免疫検査を対象にして病院検査部の実データを用いて、実例コスト計算を行った。具体的な方法は次のようである。

コストは、直接コストと間接コストに分けられる。直接コストには、検査直接人件費は給与データとタイムスタディーデータを用いて計算された。検査試薬費・直接検査材料費などを物品管理データベースに基づき調べた。検査機器の費用はそれぞれの検査に直接使われる機器の納入価格と限定利用年数を調べ定額法によって年間費用を算定した。間接コストの計算は、ABC 法・CBC 法・VBC 法の 3 つの方法で求め、その差異を比較することにした。計算結果の比較には、ABC 法の計算結果を標準値と設定した。

間接コスト計算の全過程は次の 3 つに分けられた：1) 検査ワークフローに基づく業務行為の抽出。2) 各業務行為におけるデータの収集。3) コスト計算。

(1) 業務行為の抽出(IDENTIFYING ACTIVITIES)

検査ワークフローに基づき業務行為を抽出した(図 3)。検査業務を遂行するために、次の業務行為が含まれている：(1) 受付 (2) 採血 (3) 検査の実施 (4) 診療科への検査結果の配布 (5) 診療報酬の請求 (6) 採血管、ヘパリンなど検査材料の入手 (7) 試薬の入手 (8) 検査機器の維持 (9) 病院の運営(病院全体に共有するコスト：管理部門費用・建物・電気・水道費など)。

(2) データ収集

データは、医事会計データ、物品管理データ、人事管理データ、施設管理データ、診療データについては、データ調査員にて収集した。具体的には、検査技師、検査業務に関係する看護師、医師、事務員の直接労働時間と設備・材料の利用状況を検査部内に 3 週間常駐して調査を行った。直接労働時間データはタイムスタディーを用いて分間単位で測定された。材料の消耗実績を記録した。検査材料の提供・試薬の提供・機器維持管理など事務的な業務行為については、管理部門から年間コスト総額を調べ、請求伝票数を目的別で数えた。機器修理費・情報システム費・病院運営に関した費用データについては、各部門または病院会計システム、病院財務報告書から抽出された。

(3) コスト計算

コストを、直接人件費・材料費・試薬費・機器減価償却費を含む直接コストとその以外の間接コストと 2 つに分けて計算した。

1. 直接コストの計算

それぞれの検査の直接コストは、検査別に直接人件費、直接材料費、検査別に試薬費、直接検査機器費用を算出し、それらを合算して求めた。

2. 間接コストの計算

間接コストの計算については、基本数式として ABC、CBC と VBC とともに、コストドライバの単位コストをコスト計算対象に含まれるコストドライバの量とかけ算とするため、この研究では間接コストの計算が次の 3 つに分けられた：

2.1 コストドライバの決定

Table1 では、3 つの方法におけるコストドライバの決定が示された。ポイント線以上の部分は、直接業務行為、すなわち直接コストとして計算する。以下の部分は、間接業務行為、業務行為に対応するコスト項目、そして各コスト項目に対応するコストドライバをそれぞれ ABC 法、CBC 法、VBC 法の別で決定した。ABC 法では、それぞれのコスト項目は対応するコストドライバを持つ。CBC では、括弧の通にコストドライバは、コストの変動要因の同質性に従ってそれぞれのコスト項目を 4

つのコストプール(Table2)に分類して決定された。VBC では、すべての間接コスト項目をまとめて、直接労働時間の1つのコストドライバにした。

2.2 コストドライバにおける単位コストの算出

ABC 法、CBC 法、VBC 法のそれぞれのコストドライバに対して、単位コスト(cost-driver Rate, Rcd)の算出方法は次の算式で示された。

$$\text{コストドライバの単位コスト Rcd} = \frac{\text{対応するコスト項目の総コスト}}{\text{コストドライバにあたる指標の総量}}$$

コスト項目についてはTable2にリストされた通りである。ABCでは14個のコスト項目がある。CBCでは、ABCの14個のコスト項目を分類して、検査件数系・端末系・面積系・人数系という4つのコストプールにまとめた。VBCでは、すべてのコスト項目を「間接コスト」という1つの項目しかなかった。

2.3 コスト計算

間接コストを検査への計算は、ABC, CBC, VBC 3つ方法によってそれぞれに計算した。

・ABC

ABCでは、それぞれのコストドライバにあたるRcdを、それぞれの3つの検査に含まれた対応するコストドライバの量とかけ算した。

$$\text{検査別・コスト項目別の分配コスト} = \text{項目別 Rcd} \times \text{検査別コストドライバの量}$$

・CBC

CBCでは、分類された各コストプールのコストの合計が検査別に含まれたプールコストドライバの量に基づいて各検査に分配された。

$$\text{検査別・コストプール別の分配コスト} = \text{コストプール別 Rcd} \times \text{検査別プールドライバの量}$$

・VBC

直接労働時間の単位時間の費用Rcdを、検査別それぞれの直接労働時間数とかけ算する。

$$\text{検査別・間接コスト} = \text{直接労働時間 Rcd} \times \text{検査別直接労働時間数}$$

結 果

Table3は検査別・3つの方法のコスト計算結果を示した。表の上段にある4つの項目とそれに対応する数値は、直接コスト項目および計算結果である。下段は、ABC法、CBC法、VBC法の順番で、検査別・コスト項目別の間接コストを計算した結果である。計算法ごとに検査別のトータルコストの部分は直接コストと間接コストの合計である。計算法による計算偏差値が、パーセンテージのプラスあるいはマイナスの形で表示された。マイナスとは、ABCの結果より少なく計算されたことである。全体からみると、CBC法の結果では生化学検査の最小0.63%から血液学検査の最大2.82%まで、平均で1.66%の計算偏差があった。VBC法の結果では、免疫学検査の最小7.01%から血液検査の最大52.97%まで、平均で22.85%の計算偏差があった。以上の結果で、CBC法と標準値と設定されたABC法の結果との近似性が分かった。一方、VBC法の計算偏差は、平均22.85%の有意差があった上で、コスト計算対象(ここでは3つの検査)によって激

しい変動していたこと、さらに 50%を越えた誤りもあることが明らかであった。

考 察

Table4 では 3 つのコスト計算法について、いずれかの面から比較を行った。**コストドライバとデータの収集範囲**：コストを計算するために、データ収集範囲と収集方法を決めなければならない。コストドライバの数によって、データの収集範囲が違って来る。コストドライバの数が多ければ多いほどデータ収集範囲が幅広げられる、コスト計算の正確性を高まると共に経済性と利便性、いわゆる実用性が悪くなる[14]。間接コストの計算における 3 つ方法のデータ収集では、**範囲**について VBC には、直接労働時間データを入手する必要がある。CBC には、検査別に年間検査件数・HIS(Hospital Information System)端末数・面積・職員数が必要である。ABC では、それぞれの activity に対して、共通機器別・検査別に年間検査件数、真空管など材料別に年間検査件数、そして材料請求伝票数、検査別に試薬請求の伝票数・HIS 端末数・面積・電話配線数・職員数および機器修理について機種別の伝票数、検査別に医事課による検査の診療報酬を請求するための労働時間が必要である。**時間経過**：データ調査にかかる時間を比較するためには、ひとりの調査員によるすべてのデータを入手するまで要する延べ時間を推測した。VBC のデータ収集に要する時間は、検査別に直接労働時間を得るために 45 日がかかれた。CBC のデータ調査には、検査件数と HIS 端末数及び面積データの入手に 2 日がかかった。職員数の調べるには検査別直接労働時間によって確定される。プラス 45 日の直接労働時間の調査日数、あわせて 47 日が必要と考えられる。ABC の場合は、その必要な 45 日の期間以外には、材料請求の伝票数・試薬請求の伝票数・機種別機器修理の請求伝票数を調べるには、15 日が経過された。真空管の使用に対応する検査件数の調査には、3 日間がかかった。検査別・医事課の業務時間を調査するためのタイムスタディーには、医事部門において 29 の各診療科の担当にそれぞれ 10 日をかけて、すべての業務時間データを入手するまで 350 日の延べ日数が必要と推測できる。以上の時間経過データは、今回の比較計算の記述に限る。

Table3 と Table4 からまとめると、CBC 法は次の 2 つ大きなメリットがある：1、VBC 法による計算上の大きいな歪曲が解消できる。2、ABC 法のコスト計算自体にかかるコストの削減。コストドライバの数と Table4 からみると、CBC 法が ABC 法よりもより低い代価、より迅速でコストを計算できることが分かる。DRG または DPC が導入されている欧米または日本の病院においては、患者からもらえる診療報酬が定額となっている。どうやって不必要な診療コストを削減するかが病院経営上で、さらに重要な課題となる。そこで、正確かつ迅速なコスト計算が不可欠。CBC 分析は、このような包括評価制度における病院コスト分析に有用である。CBC 分析によって、疾患群分類 (DRGs, DPC) ごとのコスト計算が容易にできるようになるし、その結果、経営立案、経営改善に役立つ。

病院機能の観点からみると、大学病院、中核病院とも、一般病院とも、個人開業医院とも、診療業務行為がかなり一致性を持っているから、CBC 法の計算が汎用的である。従来では、間接コストにおける算定法の不確定は、病院コスト管理上でひとつ大きいな問題となっている。CBC 分析は ABC 分析より簡便で、従来の方法よりも正確で、時々刻々と変化する病院経営に対応するためには、CBC 分析による迅速な病院コスト分析が有用である。

近く将来では、各診療行為別に列挙したコスト項目と分配指標をデータベース化し、各分配指標に応じたコストは病院情報システムから自動的に抽出できるようにするによって、1 患者あたりのコストは、その患者に対しておこなった診療行為をシステムから自動的に抽出することで算出する。このようにして作成したシステムは、マスターテーブルに登録したコスト項目や分配指標を調整することで、疾患群別・診療科別の診療コストにも計算できるし、他院でも汎用的に使用が可能となる。病院間で診療原価を比較し、医療の費用対効果を高めることが可能となるであろう。

注：本研究は「Journal of Health Economics」に投稿中

作成日：2004 年 2 月 16 日

図 1. Activity-Based Costing system のコスト計算モデル

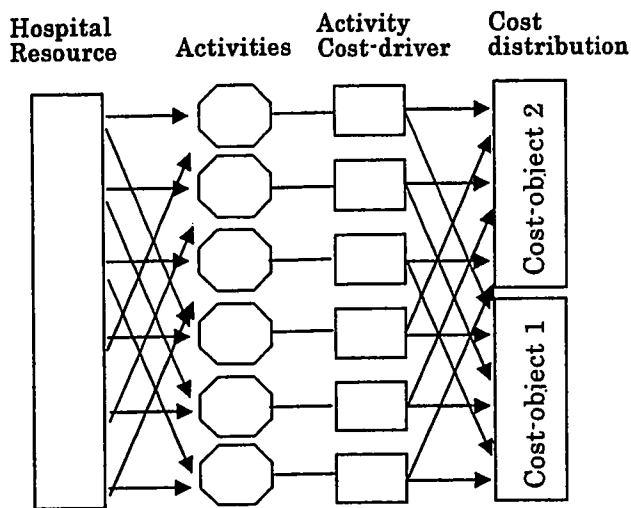


図 2. Classification-Based Costing system のコスト計算モデル

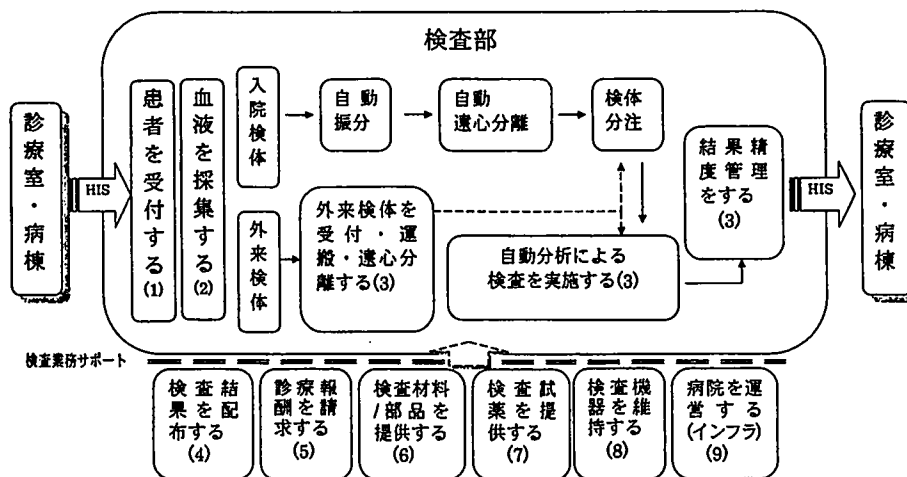
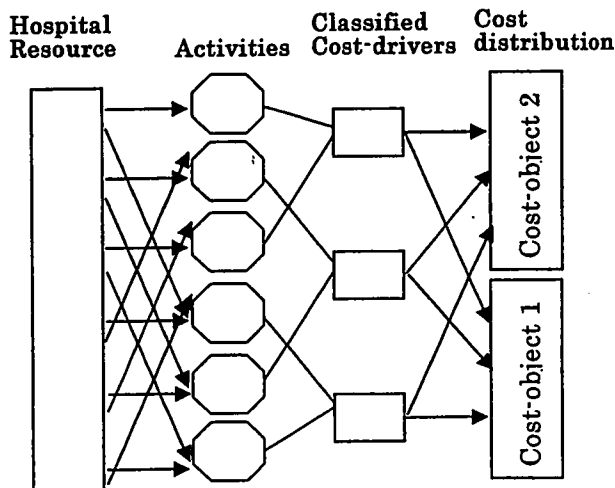


図 3. 検査におけるワークフロー及び業務行為の抽出。点線矢印および実線矢印は人工または自動による処理を示す。HIS は、病院情報システムのことである

Table1. ABC・CBC・VBCにおけるコストドライバの決定

業務行為	コスト項目	生化学検査	血液検査	免疫検査
検査を実施する	直接人件費	W1	W2	W3
	材料	X1	X2	X3
	試薬費	Y1	Y2	Y3
	機器減価償却費	Z1	Z2	Z3
		ABC	CBC	VBC
業務行為	コスト項目	コストドライバ	コストドライバ	コストドライバ
受付をする	受付費用	受付件数*	検査件数	直接労働時間
採血をする	採血費用	真空管件数*		
材料を提供する	提供部門費用	材料伝票数		
試薬を提供する	提供部門費用	試薬伝票数		
機器維持を管理する	管理費用	請求伝票数	端末数	
機器を修理する	修理費用	機器別件数		
診療報酬を請求する	医事会計費用	利用時間		
HISを維持する	情報部門費用	端末数		
病院を運営する (病院共通間接費)	建物減価償却費	面積	検査別・面積	
	消防・空調費	(面積)		
	電気・水・ガス	(面積)		
	共同委託	(面積)		
	電話費	配線数	(検査件数)	
	その他間接人件費	職員数	職員数	
コストドライバ数		11	4	1

* 真空管件数＝真空採血管を利用した検査の件数

* 受付件数＝受付を通した検査の件数

Table2. コスト項目の分類

ABC コスト項目		CBC コストプール	VBC コスト項目
受付費用(1)]	検査件数系(1)	間接コスト
採血費用(2)			
提供部門費用(3)			
提供部門費用(4)			
管理費用(5)]	端末系(2)	
修理費用(6)			
医事会計費用(7)			
電話費(8)			
情報部門費用(9)]	面積系(3)	
建物減価償却費(10)			
消防・空調費(11)			
電気・水・ガス(12)			
共同委託(13)]	人数系(4)	
その他間接人件費(14)			

Table3. ABC, CBC, VBC による3つの検査のコスト計算

(U.S. \$)	3 つ検査における項目別総計間接コスト	生化学検査	血液検査	免疫学検査
<u>ABC</u>				
直接人件費		83,695	52,575	13,247
材料		72,454	2,279	7,582
試薬費		652,165	148,381	211,110
機器減価償却費		514,396	5,655	9,844
受付費用(1)	45,620	43,360	1,577	684
採血費用(2)	207,639	197,351	7,176	3,112
材料提供部門費用(3)	51,233	49,955	759	519
試薬提供部門費用(4)	46,695	29,933	11,973	4,789
機器管理費用(5)	42,157	41,204	303	650
機器修理費用(6)	42,734	41,849	225	660
医事会計費用(7)	8,387	8,001	269	117
情報部門費用(8)	25,670	12,795	7,474	5,400
建物減価償却費(9)	17,486	7,494	4,247	5,746
消防・空調費(10)	2,853	1,223	693	937
電気・水・ガス(11)	7,200	3,086	1,749	2,366
共同委託(12)	3,527	1,511	856	1,159
電話費(13)	1,293	823	192	278
その他間接人件費(14)	12,168	6,950	4,121	1,097
合計		1,768,244	250,502	269,297
偏差率 (%)		0.00%	0.00%	0.00%
<u>CBC</u>				
直接人件費		83,695	52,575	13,247
材料		72,454	2,279	7,582
試薬費		652,165	148,381	211,110
機器減価償却費		514,396	5,655	9,844
検査件数系(1)	445,757	423,671	15,404	6,681
端末数系(2)	25,670	12,795	7,474	5,400
面積系(3)	31,066	13,314	7,545	10,207
職員数系(4)	12,168	6,950	4,121	1,097
合計		1,779,440	243,433	265,169
偏差率 (%)		0.63%	-2.82%	-1.53%
<u>VBC</u>				
直接人件費		83,695	52,575	13,247
材料		72,454	2,279	7,582
試薬費		652,165	148,381	211,110
機器減価償却費		514,396	5,655	9,844
間接コスト	55,429,297	293,961	174,301	46,399
合計		1,616,670	383,190	288,182
偏差率 (%)		-8.57%	52.97%	7.01%

Table4. 計算法の比較

	コストドライバ数	データ入手に経過日数*	計算偏差 (平均)
VBC	1	45	7.01%~52.97% (22.85%)
ABC	11	350	0.00
CBC	4	47	0.63%~2.82% (1.66%)

*1人の調査員で、コストドライバに利用するデータを入力するまで要する日数

参考文献




- [1] Ferraris VA, Ferraris SP. Cutting costs of heart surgery: "FAST-TRACKING" versus intervention for major morbidity. Heart Surg Forum. 6(4):201. 2003
- [2] Scott Gottlieb, B.A. And Thomas A. Einhorn, M.D., New York, N.Y. Current Concepts Review - Managed Care: Form, Function, and Evolution. The Journal of Bone and Joint Surgery 79:125-36 (1997)
- [3] Noah D. Glick, C. Craig Blackmore, William N. Zelman. Extending Simulation Modeling to Activity-Based Costing for Clinical Procedures. Journal of Medical Systems 24(2):77-89, 2000
- [4] Krentz HB, Auld MC, Gill MJ; HIV Economic Study Group. The changing direct costs of medical care for patients with HIV/AIDS, 1995-2001. CMAJ. 169(2):106-10. 2003 Jul 22;
- [5] Shah BR, Reed SD, Francis J, Ridley DB, Schulman KA. The cost of inefficiency in US hospitals, 1985-1997. J Health Care Finance. 30(1):1-9. 2003 Fall
- [6] Tremper KK, Barker SJ, Gelman S, Reves JG, Saubermann AJ, Shanks AM, Greenfield ML, Anderson ST. A demographic, service, and financial survey of anesthesia training programs in the United States. Anesth Analg. 96(5):1432-46, 2003 May
- [7] Christine A. Brosnan, Dr.P.H., R.N.C., J. Michael Swint, Ph.D. Cost Analysis: Concepts and Application. Public Health Nursing 18(1):13-18. 2001
- [8] Linder CA. Using the micro to accurately allocate a hospital's departmental overhead. Healthc Financ Manage. 40(2):56-61. 1986
- [9] Suneel Udpa. Activity Cost Analysis: A Tools to Cost Medical Services and Improve Quality of Care. Managed Care Quarterly 9(3):34-41 2001
- [10] Yee-Ching Lilian Chan. Improving hospital cost accounting with activity-based costing. Health Care Manage Rev, 18(1):71-77 1993
- [11] Judith J. Baker, Georgia F. Boyd. Activity-Based Costing in the Operating Room at Valley View Hospital. Journal of Health Care Finance/Fall 1997
- [12] Suneel, Udpa. Activity-based costing for hospitals. Health Care Management Review 21(3): 83-96 1996.
- [13] Robin Cooper (1990) : " Implementing an Activity-Based Costing System. " , Journal of Cost Management, Spring, pp.33-42
- [14] Robin Cooper (1988) : " The Rise of Activity-Based Costing-Part Two : When do I need Activity-Based Cost system?" , Journal of Cost Management , Fall, pp.41-48

2003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—

2004年 3月 10日

財団法人 日中医学協会
理事長 殿

研究者氏名 崔 麗 
所属機関名 信州大学 医学部解剖学第一講座 
指導責任者氏名 佐々木 克典 
職 名 教授
所 在 地 〒390-8621 日本長野県松本市旭3-1-1
電 話 (0263) 37-2590 内線 5162

1. 研究テーマ 胚性幹細胞 (ES 細胞) の細胞生物学解析

—マウス ES 細胞における細胞接着分子の3次元局在及び分化による初期的変化

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)

2004年3月24日第3回日本再生医療学会総会にて第一演者として発表する。

演題: Spatial Distribution and Initial Changes of SSEA-1 and Other Cell Adhesion-Related Molecules on Mouse Embryonic Stem Cells Before and During Differentiation

(マウス ES 細胞における細胞接着分子の3次元局在及び分化による初期的変化)

- (2) 学会誌等に掲載した論文 ☒ (有) ・ 無 (雑誌名・論文名)

欧文雑誌<Journal of Histochemistry and Cytochemistry>に投稿して、今 revise 中。

Title: Spatial Distribution and Initial Changes of SSEA-1 and Other Cell Adhesion-Related Molecules on Mouse Embryonic Stem Cells Before and During Differentiation

(マウス ES 細胞における細胞接着分子の3次元局在及び分化による初期的変化)

3. 今後の研究計画

これまで体得した手法をもちいながら ES 細胞の動態、特に細胞間相互作用を細胞生物学的に研究しております。ES 細胞は、外、中、内胚葉すべての細胞に分化する能力（多分化能）を持っています。ES 細胞はさらに、特定条件下ではほぼ無限に増殖する能力（自己複製能）を有することから、各種細胞の発生メカニズムの解明に有用であるのみならず、再生医学への応用が期待されています。今後は、ES 細胞を心筋細胞に分化誘導する方法を研究し、心筋梗塞等の心臓疾患に対する細胞療法への応用を図りたいと考えております。この分野の研究は、将来中国でも盛んに行われるようになると考えられますので、しっかり研究してまいりたいと思っております。

4. 指導責任者の意見

Cui さんは本講座の ES 細胞研究の立ち上げより関わり、その基盤を我々とともに築いてきた研究者の一人です。卓抜した ES 細胞培養のテクニックを持ち、マウス、サル ES 細胞培養法を確立し、教室への技術継承を極めて速やかに行ってくれました。本講座の ES 細胞研究のレベルはまさに彼女の情熱的な努力により高い状態に維持されていると思います。

一方、本人自らは、ES 細胞のもっとも基本的な、そしてあまり注目されなかった細胞表面の抗原表出を詳細に検討しました。その結果細胞サイクルとある表面抗原表出がパラレルに連動することをつき止め、一般に信じられている ES 細胞のマーカーが必ずしも適切でないことを明らかにしました。本講座の研究者の中でも、研究への志向、テクニック、まとめあげていく能力には図抜けてすばらしいものがあります。さらに後輩に対する指導も的確で思いやりがあり、安心してまかせられます。今回得た助成金により、さらに彼女の能力は引き出されました。深く感謝いたします。Cui さんはもうしばらく助手として本講座にとどまり、研究、大学院生の指導に専念する予定です。

指導責任者氏名

佐々木克典



5. 研究報告書

別紙「研究報告書の作成について」に倣い、指定の用紙で作成して下さい。

研究発表または研究状況を記録した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。

胚性幹細胞 (ES 細胞) の細胞生物学解析

—— マウス ES 細胞における細胞接着分子の 3 次元局在及び分化による初期的変化

研究者氏名	崔 麗
中国所属機関	中国承德医学院組織胚胎学講座
日本研究機関	日本信州大学医学部組織発生学講座 (旧解剖学第一講座)
指導責任者	教授 佐々木 克典
共同研究者名	城倉 浩平, 荻原 直子, 岳 鳳鳴, 大河内 康光, 麻沼 和彦

Abstract (要旨)

Surface molecules play an important role in a wide range of cellular functions. To develop an understanding of the role for cell adhesion-related molecules (CAMs) in undifferentiated ES cells, we examined the distribution of cell adhesion-related molecules (CAMs) among mouse ES cells. We also observed the spatial distribution on cell surfaces before and during differentiation. Flow cytometry showed that 51% of the undifferentiated cells were positive for SSEA-1, while PECAM-1 and ICAM-1 were present on 75% and 81% of the undifferentiated ES cells respectively. In contrast, 98% of the cells were positive for CD9. The cell-cell heterogeneity of SSEA-1, PECAM-1 and ICAM-1 among the undifferentiated cells in the ES colonies was evident by immunohistochemistry and immuno-SEM, supporting the flow cytometry findings. In contrast, microscopy showed that nearly all undifferentiated ES cells strongly expressed CD9. SSEA-1 was located preferentially on the edge of low protuberances and microvilli and formed clusters or linear arrays of 3-20 particles. PECAM-1 and ICAM-1 were randomly localized on the free cell surfaces, whereas CD9 was preferentially localized on the microvilli or protuberances, especially in the cell periphery. The SSEA-1⁺ fraction of magnetic cell sorting (MACS) formed undifferentiated colonies 2 days after plating. Flow cytometry showed that SSEA-1 negative cells emerged again in these colonies. Differentiation induced by retinoic acid down-regulated the expression of all CAMs mRNAs as determined by RT-PCR, and their reduction or disappearance was also evident by flow cytometry. Immuno-SEM showed decreases of SSEA-1 in the differentiated ES cells, though some clustering still remained. Our findings help to elucidate the significance of these molecules in ES cell maintenance and differentiation, and suggest that cell surface antigens may be useful for defining the phenotype of undifferentiated and differentiated ES cells.

Key words: embryonic stem cells, SSEA-1, cell adhesion-related molecules, immuno-SEM and TEM, flow cytometry

Introduction (緒言)

Embryonic stem (ES) cells are derived from the inner cell mass of blastocyst stage early embryos and have both pluripotency and capacity of self-renewal. Thus ES cells can serve as experimental models for studying early embryo development and differentiation, and may serve as sources for cell therapy of various tissues and organs. Mouse ES cells can be maintained in an undifferentiated state for long periods under given conditions and be induced to differentiate along various pathways, depending on culture condition. A common feature of mouse ES cells following induction of differentiation is a change of cell colony morphology from dome-shape to monolayer. This change in the cell-cell and cell-substratum interactions suggests that the expression of intercellular or cell/extracellular matrix adhesion molecules on these cells changes upon differentiation.

Embryonic cell surface molecules have been viewed generally as lineage markers and regulators of cell-cell interactions. Cell surface carbohydrates are implicated in a number of membrane-modulated phenomena such as cell aggregation and adhesion. They play a role in the cellular interactions of the immune system and in normal cell interactions during the embryogenesis of pre-implantation mouse embryos. Expression patterns of cell adhesion related molecules such as SSEA-1, ICAM-1, PECAM-1 and CD9 occur in undifferentiated and differentiated ES cells.

In the present study, we examined the surface ultrastructure of mouse ES cells, and the spatial distribution of SSEA-1, ICAM-1, PECAM-1, and CD9 on the cells. In addition, we further investigated the changes in the morphology and the expression of these CAMs upon the initiation of ES cell differentiation. We report for the first time the spatial distribution and expression levels of the above molecules on mouse ES cells.

Materials and Methods (材料と方法)

Murine ES cell lines and cell culture

Five karyotypically normal ES cell lines were used in the study. They are ES cell lines developed from 129/sv and DBA1 strain mice, ES cell lines AB1 and AB2.2 and ES cell line ES-D3. They were cultured as described previously (Johkura et al., 2003) with LIF, and subcultured every 3 days at a density of 2×10^4 cells/cm² to maintain an undifferentiated phenotype.

Alkaline phosphatase staining and immunofluorescence labeling

For alkaline phosphatase staining ES cells were incubated with NBT/BCIP solution. For immunofluorescence double-staining, the following primary antibodies were used: rat anti-mouse ICAM-1, PECAM-1 and CD9, and mouse monoclonal antibody SSEA-1 (IgM). Specimens were incubated with DAPI for nucleic acid stain.

Double-labeling immunoelectron microscopy

The second antibody conjugated with 10 nm and 20 nm gold particles respectively, were used to detected the distribution of CAMs and SSEA-1.

Preparation for scanning electron microscopy

The specimens were post-fixed with 1% OsO₄ for 4 h, dehydrated, and dried with the CO₂-critical point drying method, coated to 3 nm thickness with an osmium plasma coater, and observed with SEM with a backscatter electron (BSE) detector.

Preparation for transmission electron microscopy

The cells on coverslips were post-fixed with 1% OsO₄ for 1 h, dehydrated, and embedded into epoxy resin with a standard method. Sections 1.5 μm thick were stained with 0.1% toluidine blue solution. Ultra-thin sections were stained with uranyl acetate and lead citrate solution, and observed with a TEM.

RT-PCR analysis

Total RNA was extracted from undifferentiated ES cells and from differentiated ES cells at various stages of differentiation using TRIzol[®] reagent. DNase-treated total RNA was used to prepare the first-strand cDNA with SuperScript II (Invitrogen). cDNA samples were subjected to PCR amplification with specific primers.

Magnetic cell sorting (MACS) separation

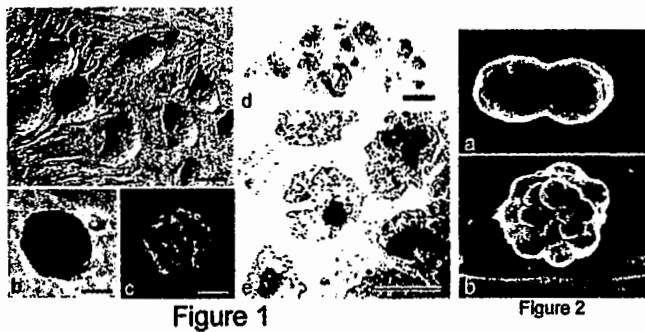
SSEA-1 positive cells were enriched using the magnetic cell sorting (MACS) system. The separated SSEA-1⁺ fraction was cultured at a density of 2×10^4 cells/cm² on feeder layers in ES culture medium with LIF.

Flow cytometry

Fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated goat anti-mouse IgM (Chemicon, Temecula, CA) or PE-Cy5-conjugated goat anti-rat IgG (Cederlane, Hornby, Ontario, Canada) were used to marked SSEA-1 and CAMs, respectively. The stained cells were analyzed on a FACS Calibur (Becton Dickinson).

Results (結果)

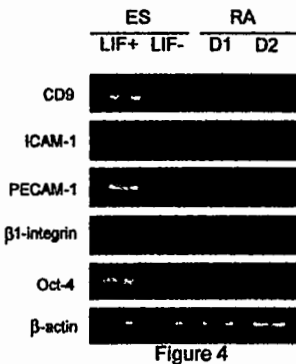
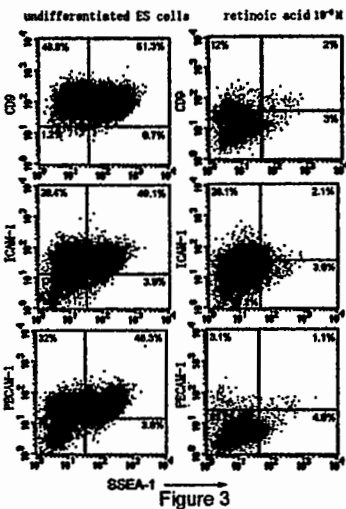
Characterization of undifferentiated mouse ES cells



Hoffman modulation contrast microscopy showed high, dome-shaped ES colonies (Fig. 1a). Within the colonies, the undifferentiated ES cells have indistinct margins and were positive for ALP and SSEA-1 (Fig. 1 b, c). The undifferentiated ES cells typically had high nucleus/cytoplasm ratios, prominent nucleoli, and were firmly and closely packed together in the colony (Fig. 1d,

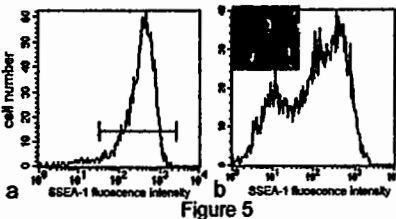
e). Dividing cells were present 12 h after plating (Fig. 2a), and many also displayed filopodia or lamellipodia. On Day 2 of culture, typical three-dimensional, tightly packed undifferentiated colonies were present (Fig. 2b).

Cell adhesion-related molecules on ES cells



Cell adhesion-related molecules that may be involved in the maintenance of undifferentiated ES cells were assessed by flow cytometry (Fig. 3). Nearly all undifferentiated ES cells, $98.5 \pm 0.6\%$ (mean \pm SD), expressed high levels of CD9 antigen. The fluorescence intensity for SSEA-1, PECAM-1 and ICAM-1 varied from low to high. PECAM-1 and ICAM-1 patterns of distribution were similar to one another, i.e.,

expressed PECAM-1, ICAM-1 and CD9. Following differentiation for 2 days, flow cytometry showed that the expression level of SSEA-1 and cell adhesion-related molecules decreased or disappeared (Fig. 3). Fluorescence intensity was also generally reduced when viewed by CLSM (not shown). RT-PCR also confirmed the synthesis in undifferentiated ES cells of mRNA for PECAM-1, ICAM-1 and CD9 and the rapid decline in the expression levels of CD9, ICAM-1 and PECAM-1 mRNAs during initial cell differentiation in reference to β-actin expression (Fig. 4).



To further characterize SSEA-1 positive cells, we purified them from the undifferentiated ES colonies using MACS. By flow cytometry analysis, SSEA-1 positive cells were enriched to about 98% after MACS from 51% beforehand (Fig. 5a), whereas the percentage of CD9 positive cells before and after sorting was the same (not shown). Two days after plating, the

morphology of colonies obtained from SSEA-1⁺ fraction was the same as that of standard undifferentiated culture (Fig. 5b inset). SSEA-1 negative cell population emerged again in undifferentiated ES colonies derived from SSEA-1⁺ fraction (Fig. 5b).

Spatial localization of cell adhesion-related molecules on the undifferentiated ES cells

When viewed by confocal laser scanning microscopy (CLSM), antibodies to SSEA-1, CD9, ICAM-1 and PECAM-1 were localized at the contact regions of undifferentiated ES cells as well as on the free surfaces (not shown), though the fluorescence intensity varied greatly from cell to cell. Cells stained for both CD9 and SSEA-1 showed that most were CD9-positive, but some of the same cells were SSEA-1 positive while others were SSEA-1 negative, consistent with the results from flow cytometry. SSEA-1 exhibited dot-like appearance on the surfaces of

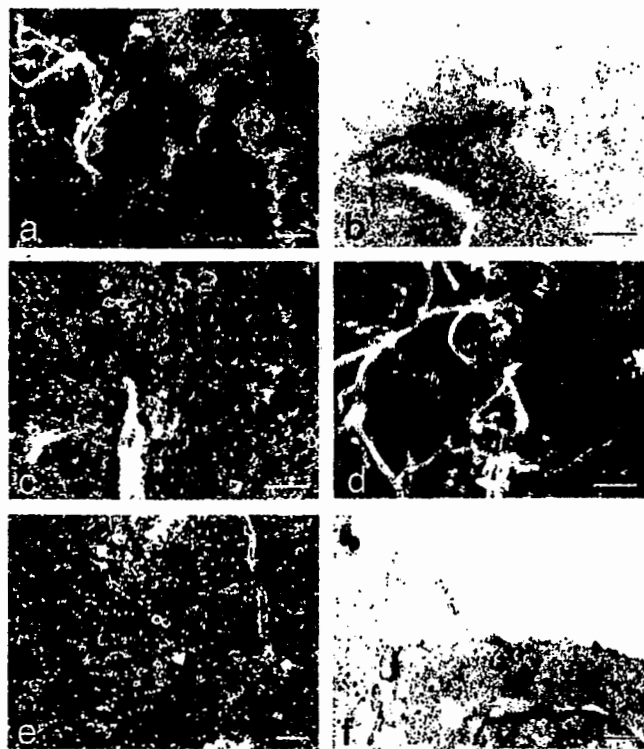


Figure 6

expressed during initial differentiated ES cells.

Discussion (考察)

In this study we have demonstrated the intercellular heterogeneity of SSEA-1, ICAM-1 and PECAM-1 distribution and ubiquitous expression of CD9 in the undifferentiated mouse ES cells. The range of SSEA-1, ICAM-1 and PECAM-1 expression varied from low to high levels. Based on these observations, we hypothesize that SSEA-1 is involved in the formation of multilayered and tightly compacted colonies of mouse ES cells through highly specific Le^x - Le^x interaction.

Despite the discernible expression of ICAM-1, ligands for this molecule, i.e., LFA-1 and Mac-1, were not present in the ES cells (Tian et al., 1997). Thus the function of this molecule in the mouse ES cells remains unclear. Distribution of PECAM-1 in cell boundaries suggests that PECAM-1 may play a role in ES cell aggregation via its homophilic adhesion. SEM showed random distribution of PECAM-1 on the free surface of ES cells, but its accumulation at the cell-cell borders could not be verified because they are inaccessible to observation by immuno-SEM. The random distribution of PECAM-1 observed by immuno-SEM may reflect the diffusion of molecules not involved in homophilic binding.

Because most undifferentiated ES cells are positive for CD9, and it quickly disappeared following initial differentiation, CD9 may be a more suitable marker of undifferentiated ES cells than SSEA-1. CD9 is a cell adhesion-related molecule and may play a role in cell-extracellular matrix or cell-cell interactions as a cofactor of integrin. The preferential localization of CD9 on microvilli and protrusions of the cellular periphery suggest that it is associated with attachment of adjacent cells. It may also regulate cytoskeletal organization, thus affecting the cell-ECM or cell-cell interactions.

The association of cell surfaces containing microdomains of adhesion molecules plays an important role in the three-dimensional cell-cell interactions that affect differentiation of ES cells. The data presented here allow us to further understand the roles of these cell adhesion-related molecules in cell-cell interactions and in self-renewal of ES cells. In addition, the present study indicates that these antigens may be used as markers of cell status to test the phenotypic stability of long-term ES cell cultures. Simultaneous use of immunoreactivity for multiple surface antigens will assist in the identification of positive or negative selection of target cells derived from ES cells.

ES cells.

Immuno-SEM and TEM showed that CD9 was preferentially localized at cell boundaries, where the gold particles were mainly restricted to the microvilli or low protuberances and often formed clusters (Fig. 6a, b). In contrast, the gold particles for PECAM-1 and ICAM-1 were randomly distributed on the cell free surface (Fig. 6c, d, e, f). In the undifferentiated ES cells, the distribution of SSEA-1 varied greatly from cell to cell (Fig. 6d). On SSEA-1 positive cells, the 10-nm gold particles were located preferentially on the edge of low protuberances and microvilli, forming clusters ranging from 3-20 particles or in linear arrays (Fig. 6c, d, e, f). β 1-integrin was also highly expressed in the undifferentiated ES cells and did not significantly change throughout the time course of initial differentiation. Oct-4, a marker of undifferentiated ES cells, was also

References (参考文献)

1. Bird JM, Kimber SJ (1984) Oligosaccharides containing fucose linked alpha(1-3) and alpha(1-4) to N-acetylglucosamine cause decompaction of mouse morulae. *Dev Biol* 104:449-460.
2. Cook GA, Longhurst CM, Grgurevich S, Cholera S, Crossno JT Jr, Jennings LK (2002) Identification of CD9 extracellular domains important in regulation of CHO cell adhesion to fibronectin and fibronectin pericellular matrix assembly. *Blood* 100:4502-4511.
3. Cui L, Johkura K, Liang Y, Teng R, Ogiwara N, Okouchi Y, Asanuma K, Sasaki K (2002) Biodefense function of omental milky spots through cell adhesion molecules and leukocyte proliferation. *Cell Tissue Res* 310:321-330.
4. Draper JS, Pigott C, Thomson JA, Andrews PW (2002) Surface antigens of human embryonic stem cells: changes upon differentiation in culture. *J Anat* 200:249-258.
5. Eggens I, Fenderson B, Toyokuni T, Dean B, Stroud M, Hakomori S (1989) Specific interaction between Lex and Lex determinants. A possible basis for cell recognition in preimplantation embryos and in embryonal carcinoma cells. *J Biol Chem* 264:9476-9484.
6. Fox N, Damjanov I, Knowles BB, Solter D (1983) Immunohistochemical localization of the mouse stage-specific embryonic antigen 1 in human tissues and tumors. *Cancer Res* 43:669-678.
7. Johkura K, Cui L, Suzuki A, Teng R, Kamiyoshi A, Okamura S, Kubota S, Zhao X, Asanuma K, Okouchi Y, Ogiwara N, Tagawa Y, Sasaki K (2003) Survival and function of mouse embryonic stem cell-derived cardiomyocytes in ectopic transplants. *Cardiovasc Res* 58:435-443.
8. Kanatsu-Shinohara M, Toyokuni S, Shinohara T (2003) CD9 is a surface marker on mouse and rat male germline stem cells. *Biol Reprod* Sep 3 [Epub ahead of print]
9. Kojima N, Fenderson BA, Stroud MR, Goldberg RI, Habermann R, Toyokuni T, Hakomori S (1994) Further studies on cell adhesion based on Le(x)-Le(x) interaction, with new approaches: embryoglycan aggregation of F9 teratocarcinoma cells, and adhesion of various tumour cells based on Le(x) expression. *Glycoconj J* 11:238-248.
10. Oka M, Tagoku K, Russell TL, Nakano Y, Hamazaki T, Meyer EM, Yokota T, Terada N (2002) CD9 is associated with leukemia inhibitory factor-mediated maintenance of embryonic stem cells. *Mol Biol Cell* 13:1274-1281.
11. Redick SD, Bautch VL (1999) Developmental platelet endothelial cell adhesion molecule expression suggests multiple roles for a vascular adhesion molecule. *Am J Pathol* 154:1137-1147.
12. Robson P, Stein P, Zhou B, Schultz RM, Baldwin HS (2001) Inner cell mass-specific expression of a cell adhesion molecule (PECAM-1/CD31) in the mouse blastocyst. *Dev Biol* 234:317-329.
13. Shambloott MJ, Axelman J, Wang S, Bugg EM, Littlefield JW, Donovan PJ, Blumenthal PD, Huggins GR, Gearhart JD (1998) Derivation of pluripotent stem cells from cultured human primordial germ cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:13726-13731. Erratum in: *Proc Natl Acad Sci USA* 1999 96:1162.
14. Tian L, Catt JW, O'Neill C, King NJ (1997) Expression of immunoglobulin superfamily cell adhesion molecules on murine embryonic stem cells. *Biol Reprod* 57:561-568.

注：本研究は、2004年3月24日日本再生医療学会にて発表する予定、<Journal of Histochemistry and Cytochemistry>に論文 revision 中。


作成日： 2004年 3月 10日

2003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－

2004年 3 月 10 日

財団法人 日中医学協会
理事長 殿

研究者氏名 張 弘 
所属機関名 大阪大学医学部病態情報内科学
指導責任者氏名 堀 正二
職 名 教 授
所 在 地 〒565-0871 吹田市山田丘2-2
電話 06-6879 内線 3635

1. 研 究 テ ー マ

心臓の形態形成におけるセマフォリン分子 Sema6D の役割

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68回日本循環器学会総会

Novel Transmembrane Type Class VI Semaphorin, Sema6D Regulates Cardiac Morphogenesis Through PlexinA1

(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

セマフォリン分子 Sema6D の欠損マウスを作成して、哺乳動物で Sema6D は心臓の形態形成に関わることを検討します。

4. 指導責任者の意見

張弘は北京医科大学を 1993 年卒業し、6 年間北京医科大学附属病院において循環専門医として診療と臨床研究に取り組んできた。1999 年より大阪大学医学部多田教授として心筋細胞の再生を目標に、心臓の発生に関与する因子の同定を開始した。増殖因子の機能解析のために自らニワトリ胎児胚を用いた実験系を構築した。最近、神経発生に重要なセマフォリン分子に着目した研究により、分子群の新しいセマ 6 D が心臓の形態形成に冠よすることを発見した。これらの成果は生物現象を蛋白質間相互作用や細胞(細胞集団)レベルに再構成して追求せんとする彼女独特の研究姿勢に帰するところが大きいといえます。彼女の研究能力はポストゲノム、再生医学へと展開しつつある 21 世紀に向けての新しい循環器学の発展に資するものと期待されます。

指導責任者氏名 堀 正二



5. 研究報告書

別紙「研究報告書の作成について」に倣い、指定の用紙で作成して下さい。

研究発表または研究状況を記録した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。

心臓の形態形成におけるセマフォリン分子 Sema6D の役割

研究者氏名	張 弘
中国所属機関	北京郵電医院心内科
日本研究機関	大阪大学医学部第一内科
指導責任者	教授 堀 正二
共同研究者名	豊福利彦, 矢吹正典, 亀井順子

要旨

Semaphorins, originally identified as axon guidance factors in the nervous system, play integral roles in organogenesis. Here, we demonstrate a critical involvement of Sema6D in cardiac morphogenesis. Ectopic expression of Sema6D or RNA interference against Sema6D induces expansion or narrowing of the ventricular chamber, respectively, during chick embryonic development. Sema6D also exerts region-specific activities on cardiac explants: a migration-promoting activity on outgrowing cells from the conotruncal segment and a migration-inhibitory activity on those from the ventricle. Plexin-A1 mediates these activities as the major Sema6D-binding receptor. Plexin-A1 forms a receptor complex with vascular endothelial growth factor receptor type 2 in the conotruncal segment or with Off-track in the ventricle segment; these complexes are responsible for the effects of Sema6D on the respective regions. Thus, the differential association of Plexin-A1 with additional receptor components entitles Sema6D to exert distinct biological activities at adjacent regions. This is crucial for complex cardiac morphogenesis.

Key Words Sema6D, plexinA1, OTK, VEGFR2, Cardiac morphogenesis

緒言

The semaphorin family of proteins is characterized by a phylogenetically conserved “sema domain” in the extracellular region. Based on additional structural features, such as the presence or absence of transmembrane domains, Ig-like domains, thrombospondin repeats, and glycosylphosphatidylinositol linkage sites, the family has been subdivided into eight groups, which also include virally derived proteins. Semaphorins were originally identified as axon guidance factor in the nervous system, including fasciculation, axon branching and target selection. Increasing evidence indicates that semaphorins play developmental and regulatory roles in organogenesis outside of the nervous system, such as angiogenesis, tumor growth and metastasis, and immune response. In this study, we isolated a class VI semaphorin,

Sema6D, from the mouse heart and assessed the role of Sema6D in organogenesis, utilizing the whole chick embryo culture system. Ectopic expression of Sema6D as well as RNA interference (RNAi) against Sema6D induced malformations in cardiac tube. Furthermore, Sema6D was found to participate in cardiac morphogenesis by exerting distinct biological activities through its receptor, Plexin-A1, that formed receptor complexes with OTK and vascular endothelial growth factor receptor type 2 (VEGFR2) in adjacent regions of the cardiac tube.

対象と方法:

1. *Chicken embryo cultures.* Fertilized chicken eggs were incubated at 38°C in high humidity. Embryos, staged according to the Hamburger and Hamilton method, were removed from eggs and placed ventral side up in culture dishes.
2. *Construction of cDNAs.* To isolate mouse cDNAs encoding semaphorin and plexins from total mouse heart cDNAs, we used a RT-PCR method using degenerative oligonucleotide primers.
3. *In situ hybridization.* Chick and mouse embryos at the desired stages were fixed and then hybridized with DIG-labeled antisense RNA probes. The cDNA sequences of cSema6D, cPlexin-A1, VMHC1, AMHC1, Sema6D, and Plexin-A1 were used to transcribe cRNAs for in situ hybridization probes.
4. *Gain of function assay of Sema6D.* control or sema6D-expressing cells were implanted into HH stage 4 chick embryos. These embryos were allowed to develop up to HHstage32. Ectopic expression of Sema6D resulted in abnormal cardiac tube formation, an expansion of the ventricle.
5. *Loss of function assay of Sema6D.* siRNAs for control, chick Sema6D and chick Plexin-A1 were chemically synthesized, then electroporated into precardiac mesoderm of HHstage7 chick embryo. Knockdown of the Sema6D and PlexinA1 reduced cardiac ventricle size, the narrowing of ventricle.
6. *Identification of receptor for Sema6D.* RT-PCR identified Plexin-A1, Plexin-A2, Plexin-A4, Plexin-B1 and NP1 mRNAs from mouse heart mRNAs. HEK293 cells were transfected with these DNAs and then incubated with alkaline phosphatase (AP) fused truncated Sema6D-Fc domain. AP-Sema6D-Fc specifically bound to Plexin-A1 indicating that Plexin-A1 is the major receptor for Sema6D.
7. *Collagen gel culture assay of cardiac explants.* The conotruncal (CT) segment and the ventricle of the heart from HH stage 14 chick embryos were dissected and placed onto collagen gels next to the transfectants that secreted sema6D. The outgrowths of the CT segment and the ventricle were measured. Sema6D enhanced the outgrowth from CT segment, but decreased that from ventricle segment..
8. *Identification of co-receptor for plexinA1.* RT-PCR indentified unique expression of VEGFR2 in CT segment, and Off-track in ventricle. RNAi against VEGFR2 and off-track inhibited sema6D effect on outgrowth from CT segment and ventricle explant, respectively.

結果:

1. Sema6D mRNA is expressed in the developing neural and cardiac tubes.
2. Ectopic expression of Sema6D and RNAi against cSema6D result in abnormal cardiac tube formation.
3. Sema6D induces distinct effects on the outgrowth from explants of different regions of cardiac tube.
4. Plexin-A1 binds to Sema6D and its mRNA is expressed in the developing neural and cardiac tubes and mediates the effect of Sema6D on chick embryo.
5. Truncated Plexin-A1 and RNAi against cPlexin-A1 block the effect of Sema6D on cardiac explants.
6. Plexin-A1 interacts with OTK and VEGFR2.
7. Differential association of Plexin-A1 with OTK and VEGFR2 conveys the opposite effects of Sema6D on ventricle and CT segment.

考察:

Sema6D exerts region-specific activities on cardiac explants: a migration-promoting activity on outgrowing cells from the CT segment and a migration-inhibitory activity on those from the ventricle. Plexin-A1 mediates these activities as the major Sema6D-binding receptor. Plexin-A1 is associated with VEGFR2 in the CT segment and off-track in the ventricle explant. These receptor complexes determine the regional specific effect on cardiac morphogenesis by Sema6D. Thus, our findings present the clear evidence that the semaphorin system is critical in cardiac morphogenesis by regulating cell migration. Furthermore, the finding that the region-specific association of its canonical receptor with various receptor-type tyrosine kinases determines pleiotropic activities of Sema6D provides a new insight into the molecular basis of semaphorin signals.

参考文献:

- Behar, O., Golden, J.A., Mashimo, H., Schoen, F.J., and Fishman, M.C. 1996. Semaphorin III is needed for normal patterning and growth of nerves, bones and heart. *Nature* **383**: 525–528.
- Brown, C.B., Boyer, A.S., Runyan, R.B., and Barnett, J.V. 1999. Requirement of type III TGF- β receptor for endocardial cell transformation in the heart. *Science* **283**: 2080–2082.
- Carmeliet, P., Ferreira, V., Breier, G., Pollefeyt, S., Kieckens, L., Gertsenstein, M., Fahrig, M., Vandenhoek, A., Harpal, K., Eberhardt, C., et al. 1996. Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele. *Nature* **380**: 435–439.
- Castellani, V., De Angelis, E., Kenwright, S., and Rougon, G. 2002. Cis and trans interactions of L1 with neuropilin-1 control axonal responses to semaphorin 3A. *EMBO J.* **21**: 6348–6357.
- Elbashir, S.M., Martinez, J., Patkaniowska, A., Lendeckel, W., and Tuschl, T. 2001. Functional anatomy of siRNAs for mediating efficient RNAi in *Drosophila melanogaster* embryo lysate. *EMBO J.*

20: 6877–6888.

Hamburger, V. and Hamilton, H.L. 1951. A series of normal stages in the development of the chick embryo. *J. Morph.* **88**: 49–92.

Johnson, E.N., Lee, Y.M., Sander, T.L., Rabkin, E., Schoen, F.J., Kaushal, S., and Bischoff, J. 2003. NFATc1 mediates vascular endothelial growth factor-induced proliferation of human pulmonary valve endothelial cells. *J. Biol. Chem.* **278**: 1686–1692.

Miquerol, L., Gertsenstein, M., Harpal, K., Rossant, J., and Nagy, A. 1999. Multiple developmental roles of VEGF suggested by a LacZ-tagged allele. *Dev. Biol.* **212**: 307–322.

Miquerol, L., Langille, B.L., and Nagy, A. 2000. Embryonic development is disrupted by modest increases in vascular endothelial growth factor gene expression. *Development* **127**: 3941–3946.

Nieto, M.A., Patel, K., and Wilkinson, D.G. 1996. In situ hybridization analysis of chick embryos in whole mount and tissue sections. *Methods Cell. Biol.* **51**: 219–235.

Pasterkamp, R.J. and Kolodkin, A.L. 2003. Semaphorin junction: Making tracks toward neural connectivity. *Curr. Opin. Neurobiol.* **13**: 79–89.

Qu, X., Wei, H., Zhai, Y., Que, H., Chen, Q., Tang, F., Wu, Y., Xing, G., Zhu, Y., Liu, S., et al. 2002. Identification, characterization, and functional study of the two novel human members of the semaphorin gene family. *J. Biol. Chem.* **277**: 35574–35585.

Sharpe, P.T. and Mason, I. 1998. Immunohistochemistry on whole embryo. In *Molecular embryology: Methods and protocols* (ed. I. Mason), pp. 663–666. Humana Press, Inc.

Takahashi, T., Fournier, A., Nakamura, F., Wang, L.H., Murakami, Y., Kalb, R.G., Fujisawa, H., and Strittmatter, S.M. 1999. Plexin–neuropilin-1 complexes form functional semaphorin3A receptors. *Cell* **99**: 59–69.

Winberg, M.L., Noordermeer, J.N., Tamagnone, L., Comoglio, P.M., Spriggs, M.K., Tessier-Lavigne, M., and Goodman, C.S. 1998. Plexin A is a neuronal semaphorin receptor that controls axon guidance. *Cell* **95**: 903–916.

Zhou, L., White, F.A., Lentz, S.I., Wright, D.E., Fisher, D.A., and Snider, W.D. 1997. Cloning and expression of a novel murine semaphorin with structural similarity to insect semaphorinI. *Mol. Cell. Neurosci.* **9**: 26–41.

注：本研究は、2004年3月29日『第68回日本循環器学会総会』にて口演発表。

作成日：2004年3月10日

Cloning and expression of the novel class VI

semaphorin, Sema6D

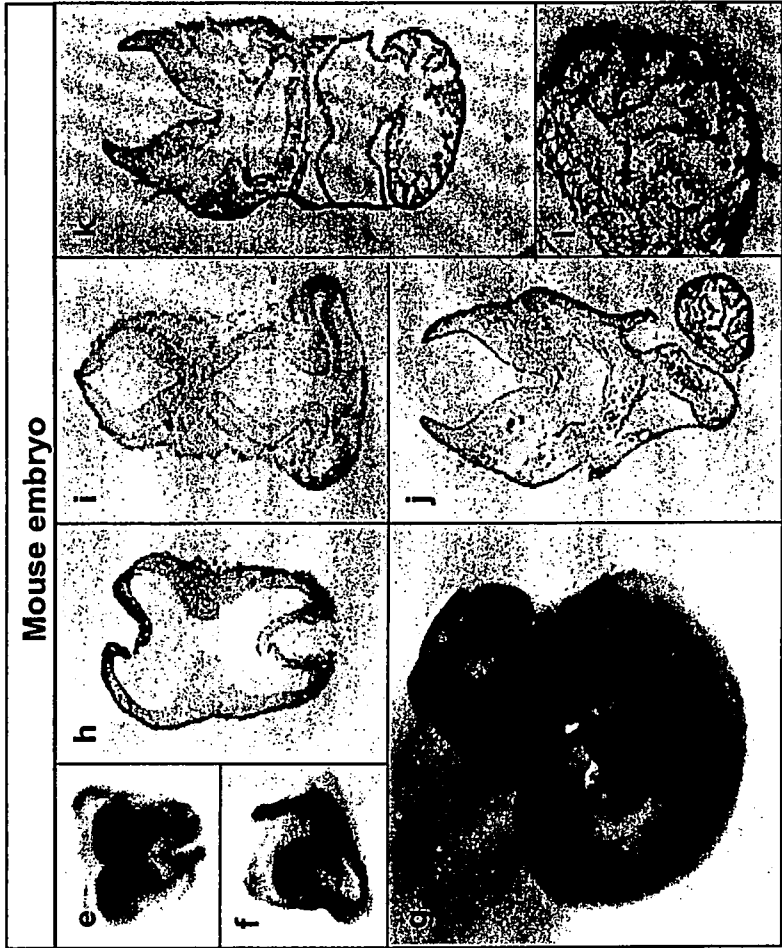
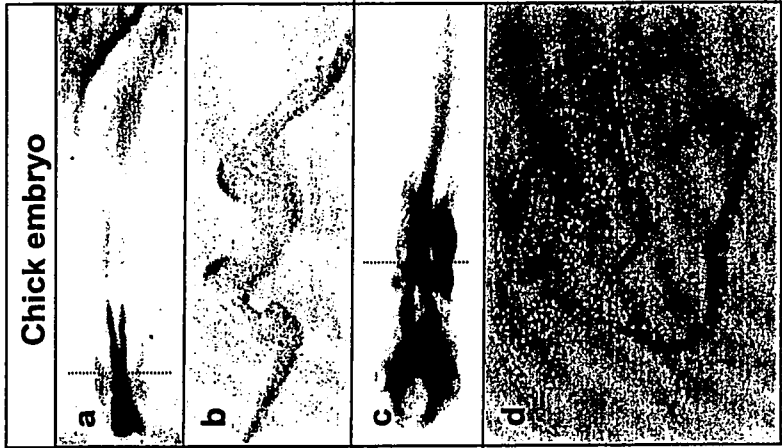
A Amino acid comparison

	Extra.	TM	Cyto.
M. Sema6D	100 %		100 %
H. Sema6D	98 %		95 %
C. Sema6D	96 %		95%
M. Sema6A1	52 %		34 %

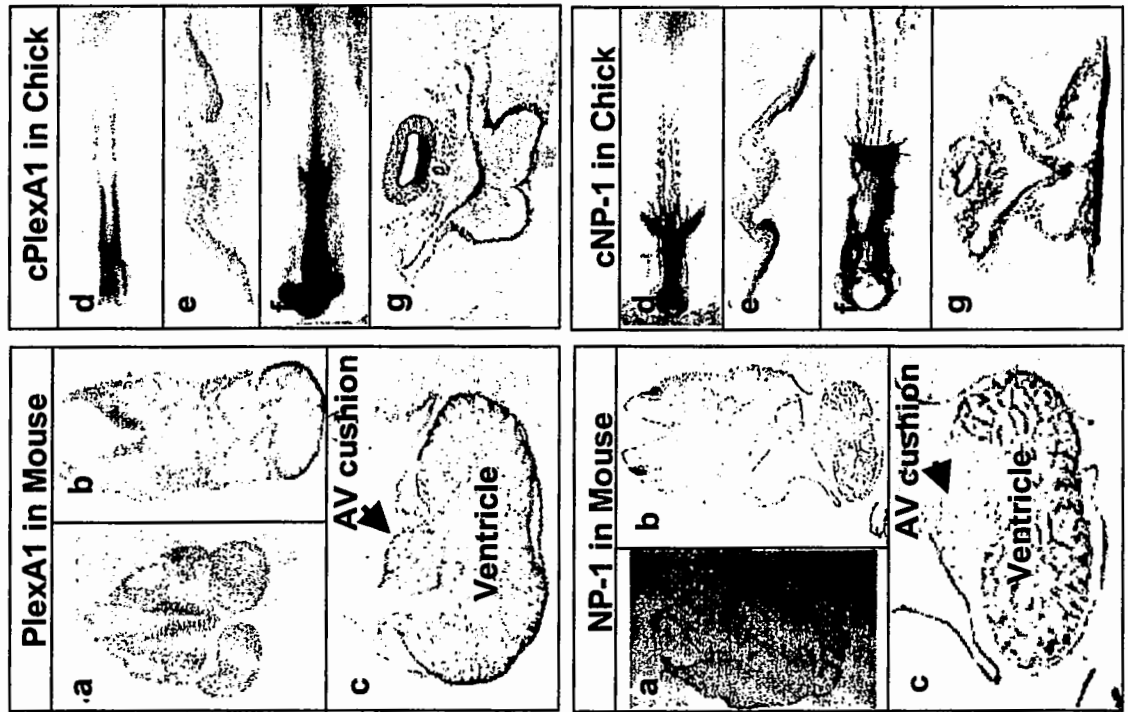
B Sema6D mRNA in mouse adult tissues



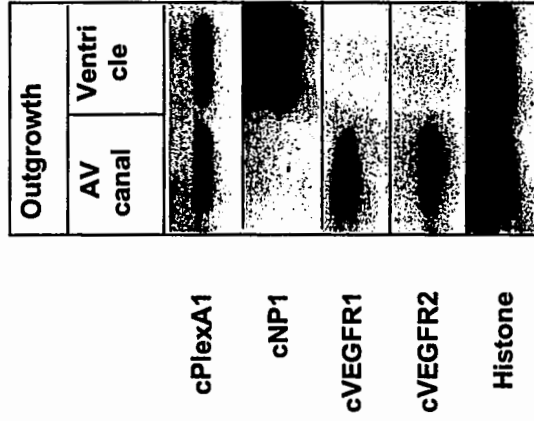
C In situ hybridization of Coll6D and mouse Sema6D mRNAs



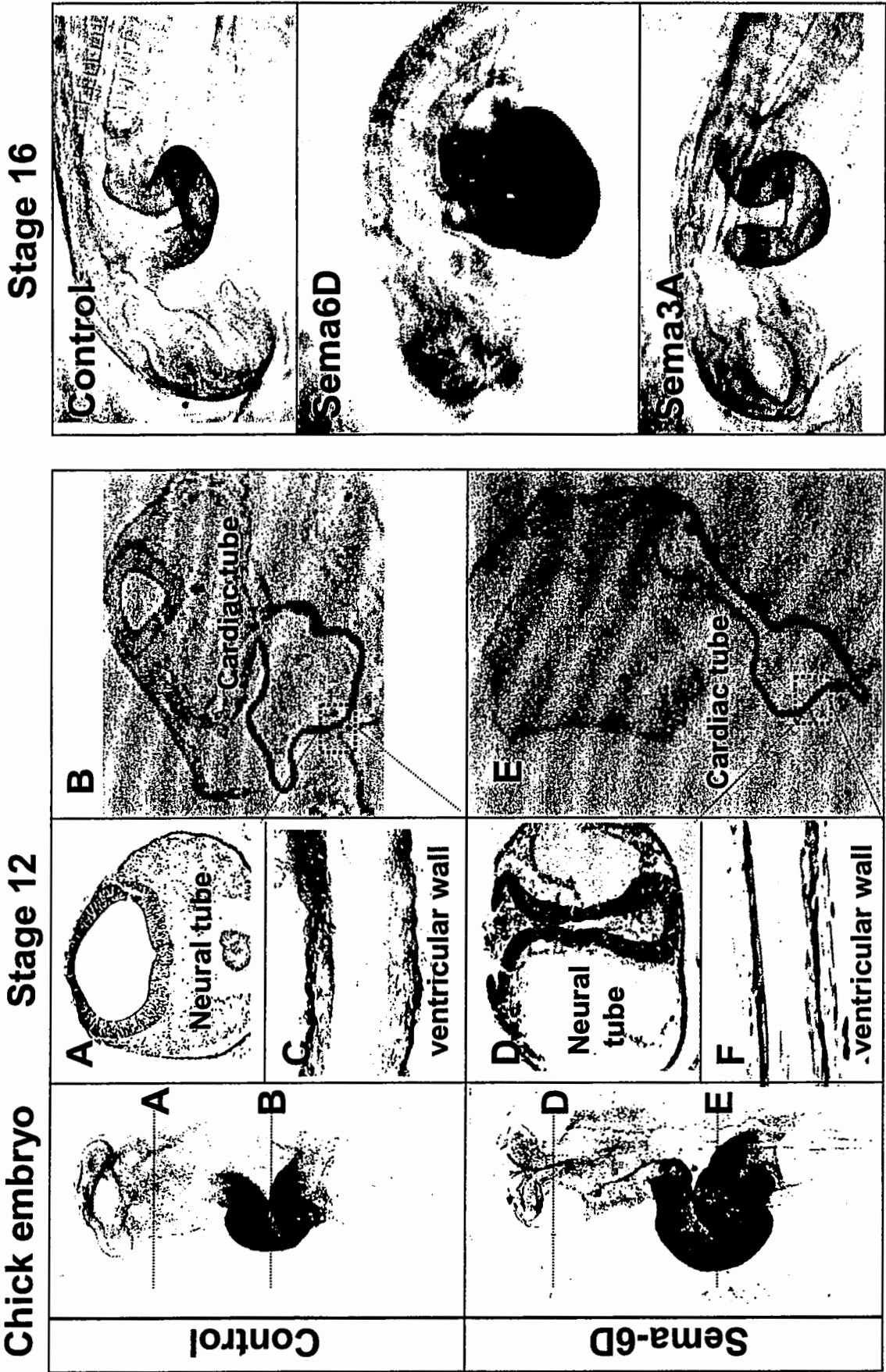
Expression of PlexinA1 and NP1



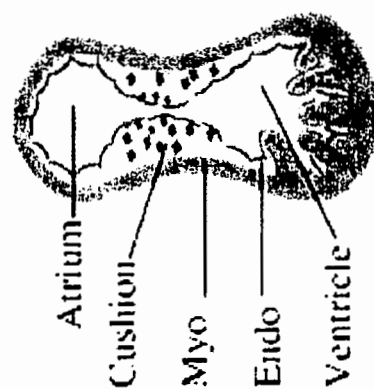
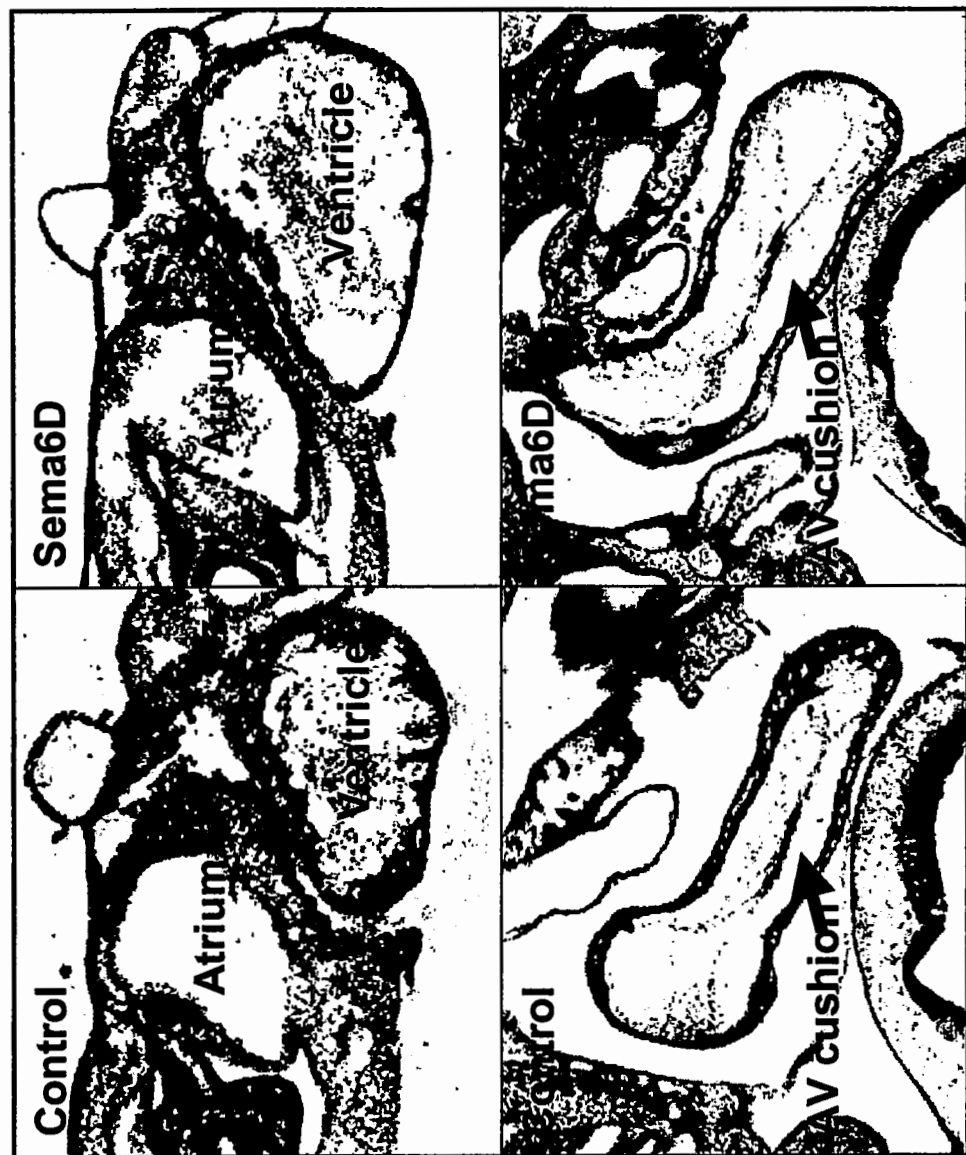
Expression of receptors
in cardiac explants



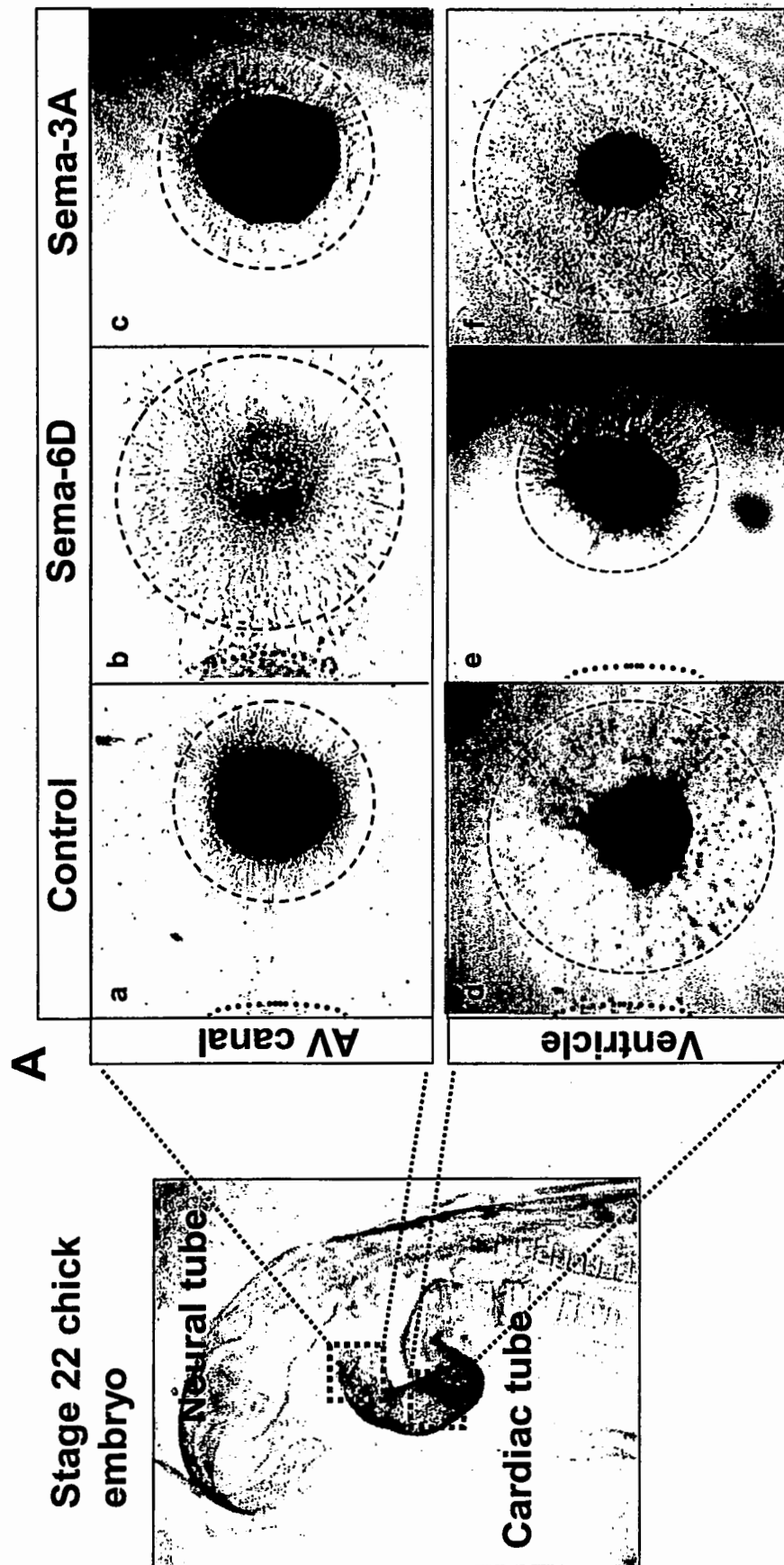
Ectopic expression of Sema6D suppresses neural tube formation and cardiogenesis



Sema6D suppresses myocardial trabeculation

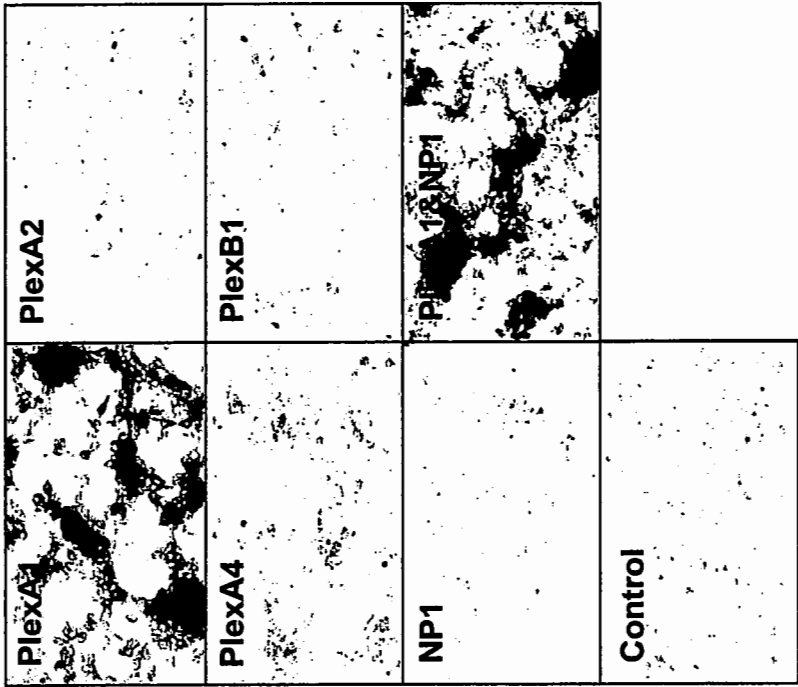


Sema6D regulates epithelial outgrowth from atrio-ventricular canal and ventricle

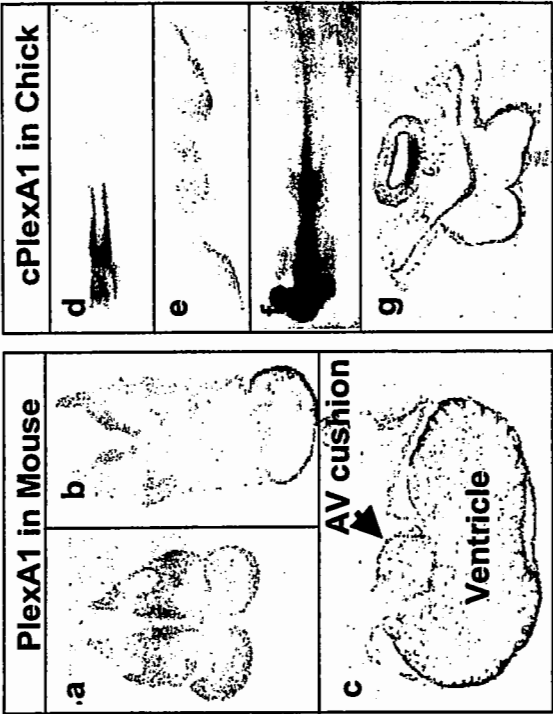


Sema6D binds to Plexin A1

A AP-Sema6D binds to PlexA1



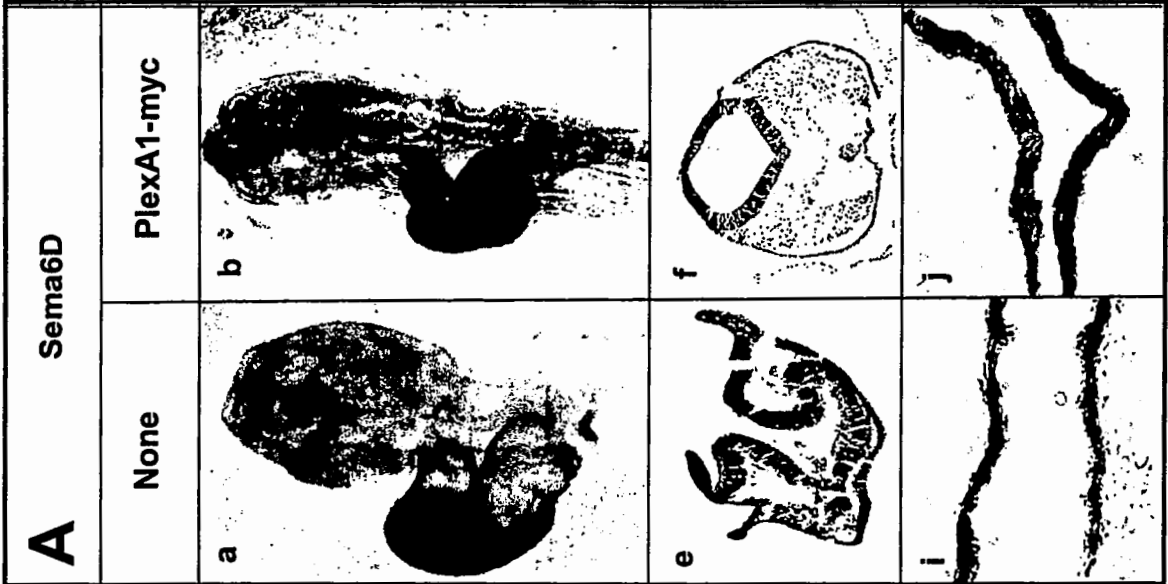
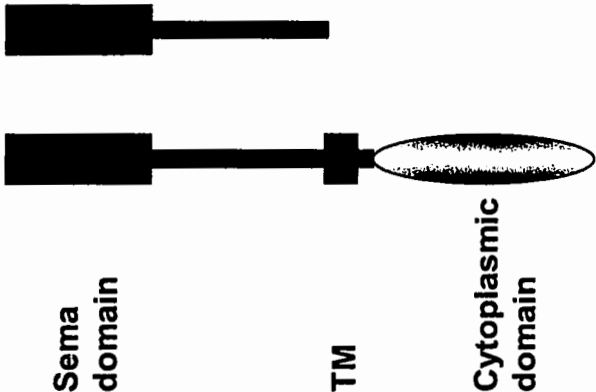
B Expression of PlexA1



Truncated PlexinA1 blocks the effect of

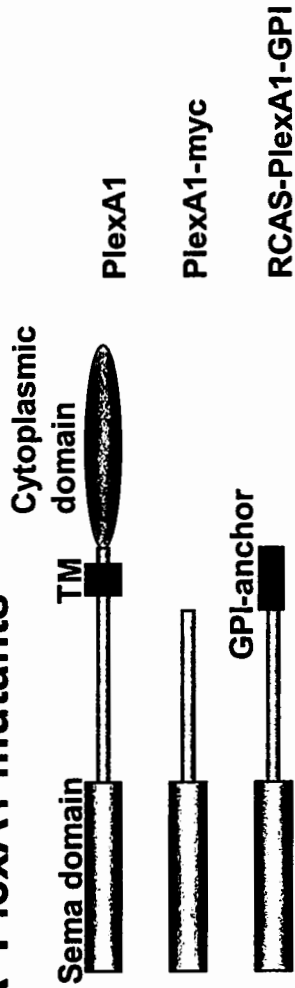
Sema6D

A PlexA1 mutants B Truncated PlexA1 suppresses Sema6D effects

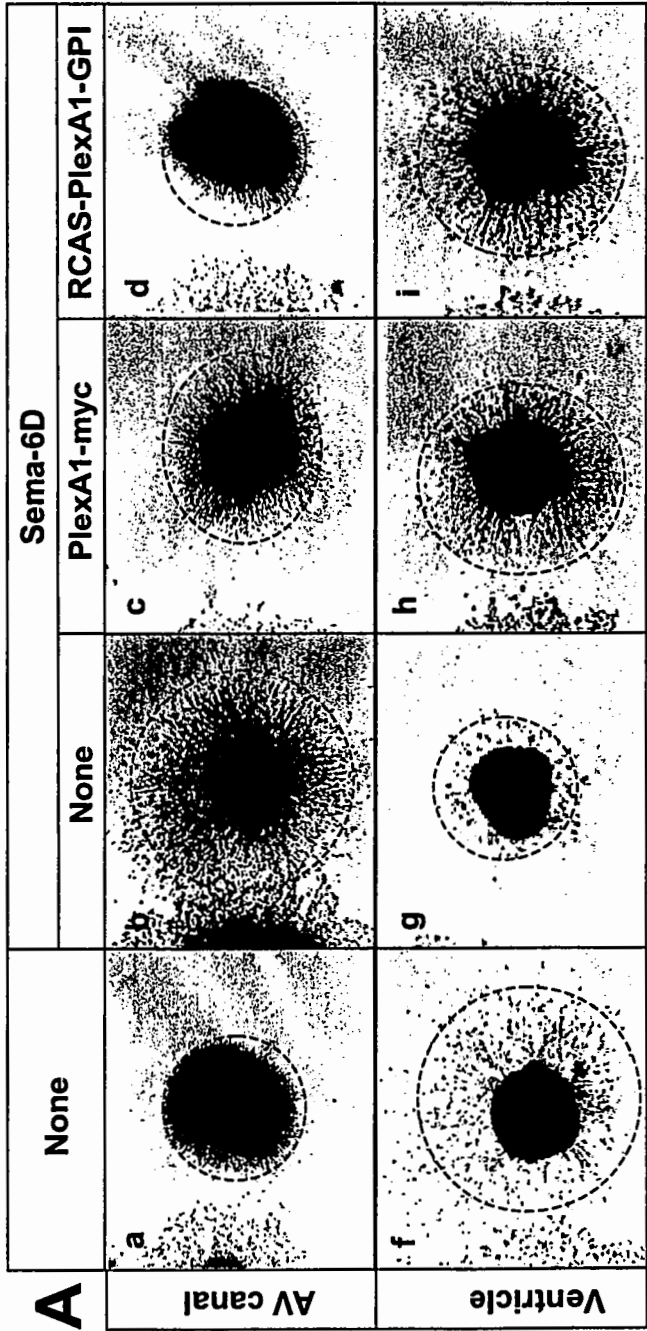


Truncated forms of Plexin A1 block effects of Sema6D on cardiac explants











A PlexA1 mutants

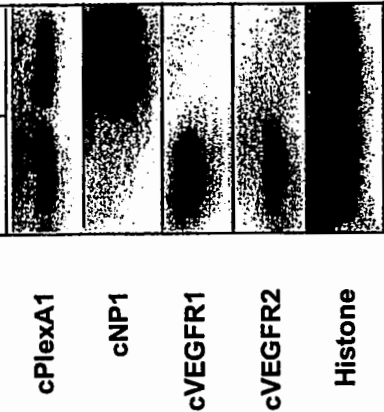


B PlexA1 mutants regulates Sema6D-induced diverse effects



VEGR2

	Outgrowth	
	AV canal	Ventricle
cPlexA1		
cNP1		
cVEGFR1		
cVEGFR2		
Histone		



	+	+	+	+	+
PlexA1-FLAG	+	+	+	+	+
VEGFR1-V5	-	-	-	-	+
VEGFR2-V5	-	+	+	+	-

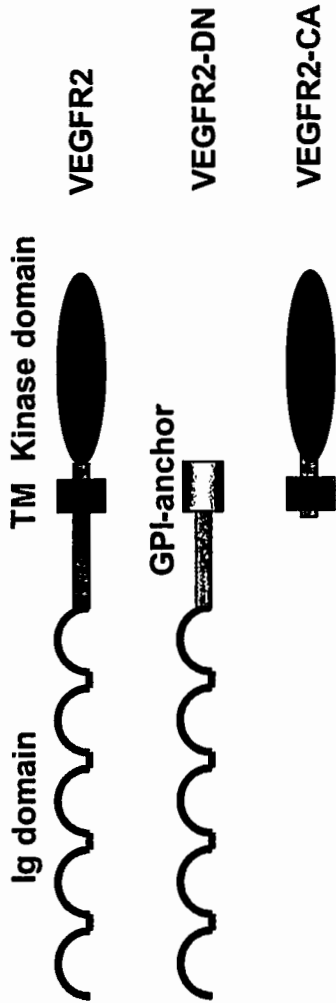
220 kD

97.4 kD

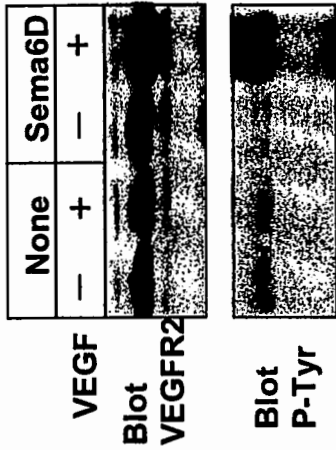
	FLAG	V5	-	V5
IP	+	+	+	+
Blot	+	+	+	+

VEGFR2 is involved in Plexin A1 signals in AV canal

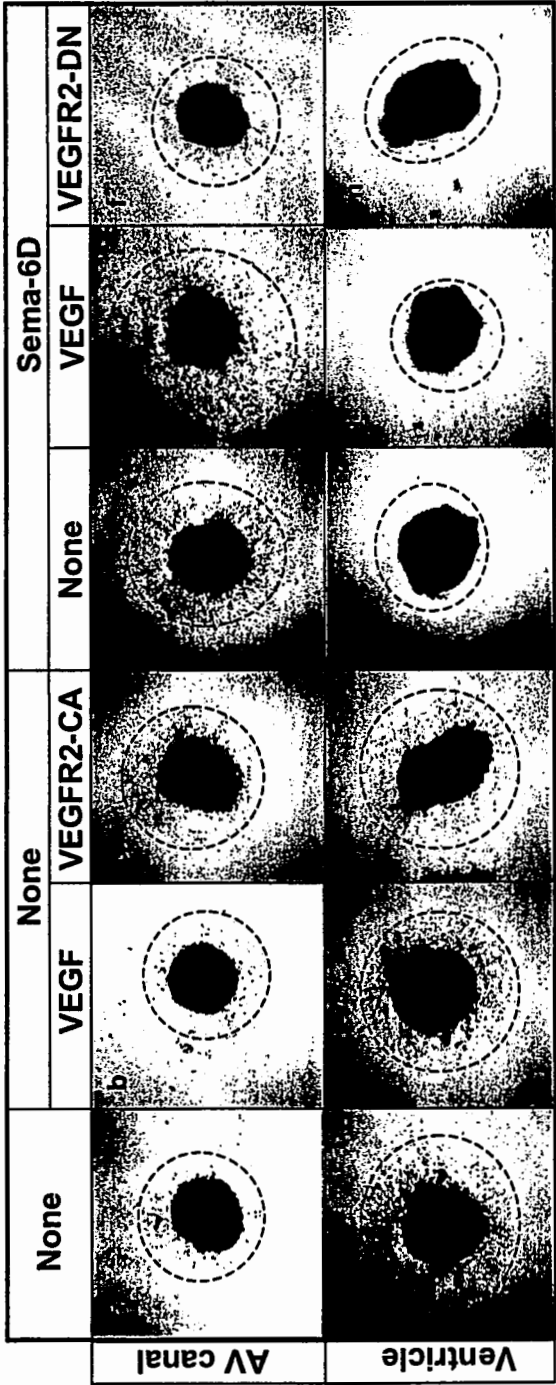
A VEGFR2 mutants



C Sema6D enhances VEGFR2 phosphorylation



B VEGFR2 mutants regulate Sema6D-induced Chemoattraction in AV canal



2003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－

2004年 3 月 1 日

財団法人 日中医学協会
理事長 殿

研究者氏名 賈楠 

所属機関名 北海道大学大学院医学研究科循環病態内科学

指導責任者氏名 北畠 顕

職 名 教授

所 在 地 〒60-8638 札幌市北区北15条西7丁目

電話 011-7066973 内線

1. 研 究 テ ー マ

細胞接着分子による心筋構造の制御に関する研究

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)

1. International Symposium: Cardiomyopathy and Heart Failure・Osteopontin is Essential for Cardiac Fibrosis and Remodeling in Angiotensin II-Induced Cardiac Hypertrophy
2. 第7回日本心不全学会学術総会・Osteopontin is Essential for Cardiac Fibrosis and Remodeling in Angiotensin II-Induced Cardiac Hypertrophy
3. 第7回日本心血管内分泌代謝学会学術総会・Osteopontin is Essential for Cardiac Fibrosis and Remodeling in Angiotensin II-Induced Cardiac Hypertrophy

(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

細胞は、細胞外マトリックスと接着し、マトリックス空間を移動し、自らの増殖や分化を能動的に制御すると考えられている。細胞の増殖分化や恒常性維持に不可欠な細胞接着は、いくつかのレセプター・ファミリーによって、巧妙に調節されている。中でも、細胞と細胞、細胞と細胞外マトリックス双方の接着にインテグリンとオステオポンチンが重要であることが示されている。一方、不全心筋では、心筋梗塞、心肥大、拡張型心筋症など原因となる疾患に関わらず、心筋リモデリングと呼ばれる機能的、構造的変化が起きる。再構築した心筋では、心筋細胞数が減少し、残存した心筋細胞への負荷が増えるため、心筋細胞は肥大し、細胞間結合が緩む。また、線維芽細胞増殖及び、細胞外マトリックス増加により、線維化が進展する。この過程に、アンジオテンシンⅡ、エンドセリンや各種サイトカインが関与することが知られている。心肥大・線維化において、レニン-アンジオテンシン系がオステオポンチンとインテグリンの発現修飾の関与をあきらかにする必要がある。これから、オステオポンチン遺伝子欠損マウスを用い、液性因子による心筋細胞肥大・線維化モデルを作成し、野生型マウスと比較し、インテグリンとオステオポンチンの関係を明らかにする。

4. 指導責任者の意見

賈楠君は、平成12年4月から当循環病態内科学分野の大学院生として在籍し、細胞接着分子による心筋構造の制御に関する研究に励んでいます。線維化の形成におけるオステオポンチンの役割を検討し、日本心不全学会学術総会などの三つの会議において研究の結果を発表しました。これから、論文を作成し、投稿する予定です。将来に彼が日本に留学の経験を生かして、日中医学の交流を深めていくことを期待できると思っています。今後とも、ご支援の程よろしくお願いいたします。

指導責任者氏名 北 畠 顕 

5. 研究報告書

別紙「研究報告書の作成について」に倣い、指定の用紙で作成して下さい。

研究発表または研究状況を記録した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。

アンジオテンシン II による心肥大において オステオポンチンは心臓の線維化と再構築に重要である

研究者氏名 賈 楠
中国所属機関 ハルビン医科大学付属病院内科
日本研究機関 北海道大学医学部循環病態内科学
指導責任者 教授 北畠 顕
共同研究者名 岡本 洋, 松井 裕

ABSTRACT

Objective: Osteopontin (OPN) is reported to be up-regulated in several experimental models of cardiac fibrosis and remodeling however, its direct effects on those still remained unclear. In the present study, we examined the hypothesis that OPN is important for the development of cardiac fibrosis and remodeling in AII infusion model, using OPN deficient mice (OPN^{-/-}). Moreover, we examined whether the effect of Eplerenone (Ep), a novel aldosterone receptor blocker, on the prevention of cardiac fibrosis and/or remodeling was mediated through the inhibition of OPN.

Methods and Results: WT or OPN^{-/-} mice (OPN^{-/-}/AII) were treated with AII, infused at a rate 2 µg/kg/min for 4 weeks. WT mice received AII were also divided into two groups, control group (WT/AII) and Ep treatment group (WT/AII/Ep). While AII significantly elevated blood pressure (BP) in WT mice, BPs in OPN^{-/-}/AII and WT/AII/Ep mice were significantly lower than that in WT/AII mice. AII caused both cardiac hypertrophy that was reflected by the increase of the left ventricular/body weight ratios, the myocyte areas, and the cardiac ANF mRNA expression, and cardiac fibrosis that was reflected by the increase of the perivascular fibrotic areas and the cardiac collagen I mRNA in WT mice. Ep and chronic depletion of OPN equally ameliorated the development of cardiac fibrosis, while only Ep abolished the development of cardiac hypertrophy. Interestingly, despite the reduced fibrosis, cardiac systolic function was significantly deteriorated in OPN^{-/-}/AII mice by AII infusion.

Conclusions: These results suggest that OPN has a pivotal role in the development of AII induced cardiac fibrosis and remodeling. Moreover, the effect of Ep on the prevention of not cardiac hypertrophy but cardiac fibrosis might be partially mediated through the inhibition of OPN.

Key Words OPN, cardiac fibrosis, hypertrophy, remodeling, AII, aldosterone receptor blocker

INTRODUCTION

Osteopontin (OPN) is a recently discovered mediator of the profibrotic effects of AII.⁵ Although first isolated from mineralized bone matrix, OPN has since been shown to be synthesized by several cell types, including cardiac myocytes, microvascular endothelial cells, and fibroblasts.⁶ OPN appears capable of mediating diverse biological functions, including cell adhesion, chemotaxis, and signaling.⁷ OPN has also been shown to interact with fibronectin and collagen, suggesting its possible role in matrix organization and/or stability.⁸ AII strongly upregulates the expression of OPN in rat and human cardiac fibroblasts.^{5,9} Monoclonal antibody directed against OPN completely blocked the mitogenic effect of AII on cultured rat cardiac fibroblasts.⁵ Recently, the expression of OPN in heart was reported to increase coincidentally with the development of heart failure.¹⁰ Moreover, recent report demonstrated that myocardial infarction caused exaggerated left ventricular dilation and reduced collagen deposition in OPN deficient mice. These results suggest that OPN has a pivotal role in the cardiac fibrosis and cardiac remodeling.

MATERIALS AND METHODS

Mice The creation of the OPN deficient mouse (OPN^{-/-}) used in this study has been described previously. Eight-week-old male OPN KO (n=20) after 8 backcrosses to C57BL/6 and age-matched C57BL/6 male WT (n=50) mice were used. Mice were housed under climate-controlled conditions with a 12-hour light/dark cycle and were provided with standard food and water ad libitum. All protocols were approved by local institutional guidelines.

Chronic Administration of Pressor Dose of AII An osmotic minipump (model 2004, Alza Corp) was implanted subcutaneously into each mice. Pressor doses of AII (2 µg/kg/min) and saline were administered for 4 weeks. WT and OPN^{-/-} mice (group OPN^{-/-}/AII) were treated with AII. WT mice received AII were also divided into two groups, control group (group WT/AII) and Ep treatment group (group WT/AII/Ep). Ep treatment was done as previously described. Briefly, mice received rodent chow containing 0.32% Na⁺ and 0.83% K⁺ (No. 7012, Harland Teklad), and Ep was administered by chow supplemented with Ep at 2 mg/g (Research Diets).

Echocardiographic Analysis Transthoracic echocardiography was performed at the end of the study using an EUB 8000 echocardiographic instrument (Hitachi-Medico, Tokyo, Japan) with our originally developed 10-MHz imaging transducer as described previously. Mice were anesthetized with pentobarbiturate (70mg/kg IP). After a good-quality two-dimensional image was obtained, M-mode images of the left ventricle were recorded. Intraventricular septum thickness, end-diastolic left ventricular internal diameter (EDD), end-systolic left ventricular internal diameter (ESD), and left ventricular posterior wall thickness were measured. All measurements were performed by use of the leading edge-to-leading edge convention adopted by the American Society of Echocardiography. Percent fractional shortening (%FS) was calculated as $\%FS = [(EDD - ESD) / EDD] \times 100$ to estimate the cardiac systolic function. Isovolumic relaxation time (IRT) was measured to estimate the cardiac diastolic function. IRT was corrected by each RR interval time to compensate for the HR variance.

RT-PCR Analysis Total RNA isolated from left ventricular myocardium was used for first-strand cDNA synthesis. The reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) with selected primers was used for amplification of ANF, collagen-I (Col-I), OPN, and GAPDH mRNA. ANF primers used were 5'-CTCTGAGAGACGGCAGTGCT-3' (forward) and 5'-ACGGAGAGGGTGAGACGTAT-3' (reverse). Col-I primers used were 5'-AAACCCGAGGTATGCTTGATCTGTA-3' (forward) and 5'-GTCCCTCGACTCCTACATCTTCTGA-3' (reverse). OPN primers used were 5'-ATGAGATTGGCAGTGATTGCTT-3' (forward) and 5'-TTAGTTGACCTCAGAAGATGCACTCT-3' (reverse). GAPDH primers used were 5'-ATGTTCCAGTATGACTCCACTCAG-3' (forward) and 5'-GAAGACACCAGTAGACTCCACGACA-3' (reverse). ANF, Col-I, and OPN sequences were amplified in a thermal cycler (Perkin-Elmer) for optimal cycles. The quality of RNA preparation and cDNA synthesis was verified by amplifying DNA coding GAPDH, a housekeeping protein, under the same conditions. RT-PCR products were visualized on 2% agarose gels with ethidium bromide. Signals were digitized and evaluated with an optical scanner (GT-9500, Seiko) with density measured with the use of an NIH image program in the public domain (Research Services Branch, NIH).

RESULTS

In this study, we demonstrated that:

1. Administration of AII induced the development of hypertension, cardiac hypertrophy, and cardiac fibrosis in WT mice.
2. Chronic loss of OPN by gene targeting abolished the development of not cardiac hypertrophy but cardiac fibrosis in mice with AII-induced hypertension
3. On the other hand, Ep abolished the development of both cardiac hypertrophy and cardiac fibrosis in mice with AII-induced hypertension.

4. When cardiac function was measured by echocardiography, WT mice developed prominent concentric cardiac hypertrophy and diastolic dysfunction but not systolic dysfunction after AII infusion. Ep inhibited the progression of both concentric cardiac hypertrophy and diastolic dysfunction. However, chronic loss of OPN by gene targeting leads to significant systolic dysfunction after AII infusion.

These results suggest that OPN has a pivotal role in the development of AII induced cardiac fibrosis and remodeling. Moreover, the effect of Ep on the prevention of not cardiac hypertrophy but fibrosis might partially be mediated through the inhibition of OPN.

DISCUSSION

OPN and Cardiac Fibrosis Increasing evidences suggested that OPN has a pivotal role in the progression of cardiac fibrosis. First, it had been reported that AII upregulates expression of OPN mRNA in cardiac fibroblasts and that monoclonal antibody directed against OPN completely blocks the mitogenic effect of AII on cultured rat cardiac fibroblasts, and blocks AII induction of cardiac fibroblast collagen gel contraction.⁵ These findings suggest OPN may be an important mediator of AII induced cardiac fibrosis. Moreover, it had been reported that the collagen accumulation in heart after AMI was markedly decreased in OPN deficient mice as compared with that in WT mice. OPN has also been shown to interact with fibronectin and collagen, suggesting its possible role in matrix organization and/or stability in other model. These results were consistent with our results that the chronic depletion of OPN by gene targeting markedly prevented the progression of cardiac perivascular fibrosis by AII infusion. Furthermore, some reports demonstrated the underlying mechanism by which OPN regulate the myocardial fibrosis. In cardiac fibroblast model, it had been reported that monoclonal antibody against β_3 integrin blocked both AII and OPN-induced collagen gel contraction, suggesting that OPN acts via an integrin-dependent pathway.⁵ More recently, it had been reported that OPN regulate the collagen accumulation by modulating IL-1 β -stimulated increases in MMP-2 and -9 activity via the PKC-zeta. Thus, it was conceivable that OPN regulate the myocardial fibrosis in AII induced cardiac remodeling through the involvement of integrin, IL-1 β , and MMPs.

OPN and Cardiac Hypertrophy Recent reports also showed that the expression of OPN in heart was elevated in LVH and LV failure.¹⁰ Graf et al. demonstrated that the expression of OPN was upregulated with the development of LVH and that the cardiomyocyte was a major source of OPN expression in the heart.¹⁸ On the other hand, Singh et al. reported that the expression of OPN in LVH heart was markedly increased only with heart failure and that a major source of OPN expression was nonmyocytes in the interstitium and perivascular space.¹⁰ A possible explanation for differences in findings between these reports may relate to the markedly different time periods studied. Taken together, it seems reasonable to think that OPN have a pivotal role in the process of development of cardiac hypertrophy and/or subsequent remodeling. Moreover, these results suggest that the source of OPN may be myocytes early in LV hypertrophy but shifts to interstitial cells in late hypertrophy with the development of heart failure. However, it is not known whether the elevated OPN expression is a cause or result of cardiac hypertrophy and/or subsequent remodeling. In this study, we clearly demonstrated that the chronic depletion of OPN by gene targeting did not inhibit but rather progress cardiac hypertrophy in some parameter, and deteriorated cardiac systolic function by AII infusion. These results suggested that OPN may have an important role in not preventing cardiac hypertrophy but compensating AII induced cardiac hypertrophy and remodeling.

OPN and Cardiac Remodeling and Underlying Mechanism The precise mechanism by which OPN deficiency affects the cardiac remodeling after AII infusion was not known. However, we have some speculations to explain it. Cardiac remodeling involves the production and destruction of extracellular matrix proteins, cell proliferation and migration, and apoptotic and necrotic cell death. Cardiac fibroblasts are crucially involved in these processes, producing growth factors and cytokines that act as autocrine and paracrine factors, as well as extracellular matrix proteins and proteinases. Moreover, the

interactions between cardiac fibroblasts and cardiomyocytes are thought to be essential for the progression of cardiac remodeling.

References

1. Daemen MJ, Lombardi DM, Bosman FT, Schwartz SM. Angiotensin II induces smooth muscle proliferation in the normal and injured rat arterial wall. *Circ Res*. 1991; 68: 450-456.
2. Sadoshima J, Xu Y, Slayter HS, Izumo S. Autocrine release of angiotensin II mediates stretch-induced hypertrophy of cardiac myocytes in vitro. *Cell*. 1993; 75: 977-984.
3. Weber KT, Brilla CG. Pathological hypertrophy and cardiac interstitium: fibrosis and renin-angiotensin-aldosterone system. *Circulation*. 1991; 83: 1849-1865.
4. Brilla CG, Janicki JS, Weber KT. Impaired diastolic function and coronary reserve in genetic hypertension: role of interstitial fibrosis and medial thickening of intramyocardial coronary arteries. *Circ Res*. 1991; 69: 107-115.
5. Ashizawa N, Graf K, Do YS, Nunohiro T, Giachelli CM, Meehan WP, Tuan TL, Hsueh WA. Osteopontin is produced by rat cardiac fibroblasts and mediates A(II)-induced DNA synthesis and collagen gel contraction. *J Clin Invest*. 1996; 98: 2218-2227.
6. Singh K, Balligand JL, Fischer TA, Smith TW, Kelly RA. Glucocorticoids increase osteopontin expression in cardiac myocytes and microvascular endothelial cells: role in regulation of inducible nitric oxide synthase. *J Biol Chem*. 1995; 270: 28471-28478.
7. Giachelli CM, Schwartz SM, Liaw L. Molecular and cellular biology of osteopontin: potential role in cardiovascular disease. *Trends Cardiovasc Med*. 1995; 5: 88-95.
8. Kaartinen MT, Pirhonen A, Linnala-Kankkunen A, Maenpaa PH. Cross-linking of osteopontin by tissue transglutaminase increases its collagen binding properties. *J Biol Chem*. 1999; 274: 1729-1735.
9. Kupfahl C, Pink D, Friedrich K, Zurbrugg HR, Neuss M, Warnecke C, Fielitz J, Graf K, Fleck E, Regitz-Zagrosek V. Angiotensin II directly increases transforming growth factor beta1 and osteopontin and indirectly affects collagen mRNA expression in the human heart. *Cardiovasc Res*. 2000; 46: 463-475.
10. Singh K, Sirokman G, Communal C, Robinson KG, Conrad CH, Brooks WW, Bing OH, Colucci WS. Myocardial osteopontin expression coincides with the development of heart failure. *Hypertension*. 1999; 33: 663-670.
1. International Symposium: Cardiomyopathy and Heart Failure • Osteopontin is Essential for Cardiac Fibrosis and Remodeling in Angiotensin II-Induced Cardiac Hypertrophy 2003 年 10 月 17 日
2. 第 7 回日本心不全学会学術総会 • Osteopontin is Essential for Cardiac Fibrosis and Remodeling in Angiotensin II-Induced Cardiac Hypertrophy 2003 年 10 月 23 日
3. 第 7 回日本心血管内分泌代謝学会学術総会 • Osteopontin is Essential for Cardiac Fibrosis and Remodeling in Angiotensin II-Induced Cardiac Hypertrophy 2003 年 11 月 25 日


2004 年 3 月 1 日

2003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－

16 年 3 月 10 日

財団法人 日中医学協会
理事長 殿

研究者氏名 吳 桂榮 
所属機関名 東京女子医科大学
指導責任者氏名 中西敏雄
職 名 助教授
所 在 地 〒162-8666 東京都新宿区河田町 8-1
電 話 03-3353-8111 内線 28482

1. 研 究 テ ー マ

血管平滑筋の酸素による収縮弛緩機序

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) American Heart Association Scientific Sessions 2003,

November 9-12, 2003, Orlando, Florida

Decreases in intracellular H2O2 cause contraction of the rabbit ductus arteriosus.

2) 第68回日本循環器学会

Oxygen causes contraction of the ductus arteriosus by decreasing intracellular H2O2 generation.

(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

本研究では酸素による動脈管収縮の機序を調べた。今後はさらに研究を発展させ、肺動脈や動脈管に存在する酸素感受性カリウムチャンネルのクローニングを行い、その遺伝子発現や、分子生物学的な特徴を明らかにする予定である。またそのカリウムチャンネルの酸素への感受性をアフリカツメガエル卵母細胞を用いて電気生理学的に調べる予定である。

4. 指導責任者の意見

呉 桂栄は、未熟な血管、ことに動脈管の平滑筋や内皮細胞の機能の研究を行ってきた。特に、平滑筋細胞が酸素を感受する機構についての研究を行ってきた。研究態度も真面目で、日夜、寸暇を惜しんで研究を行った。本研究は日本国内はもちろん世界的にもすぐれた独創的な研究となった。特に、アメリカ心臓病学会の発表論文に採択され、発表し、高い評価を得た。臨床的にも重要な研究であるので、今後ますます研究を発展させていって欲しい。

指導責任者氏名

中西 敬之  印

5. 研究報告書

別紙「研究報告書の作成について」に倣い、指定の用紙で作成して下さい。

研究発表または研究状況を記録した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。

血管平滑筋の酸素による収縮弛緩機序 —特に動脈管の収縮弛緩におけるカリウムチャンネルの役割—

研究者氏名 吳 桂榮

中国所属機関 首都医科大学付属北京心臓血管中心安貞医院

日本研究期間 東京女子医科大学

指導責任者 助教授 中西敏雄

Abstract

The ductus arteriosus (DA) constricts after birth when blood O₂ levels increase in mature newborns. Its mechanism is unknown. As an O₂ sensor of DA, O₂-sensitive Kv and KATP have been implicated. The purpose of the present study was to investigate the role of O₂-sensitive Kv and KATP in the contraction of the smooth muscle cells of the DA. DA was isolated from the fetal rat at 19 or 21 days of gestation (term: 22 days). The force of isometric contraction of intact rings was measured. Kv and KATP currents were measured using single smooth muscle cells and patch clamp techniques. The vessel contraction and K currents were measured by changing solution from an anoxic (PO₂ 35 mmHg) to an oxygenated solution (PO₂ 150 mmHg) or to a solution containing Kv channel inhibitor 4-aminopyridine (4AP, 5mM), KATP channel opener pinacidil (300uM), or the KATP blocker glybenclamide (Glyb, 4 uM). In the DA, O₂, 4AP, and Glyb caused significant contraction in the mature (21 day) fetus. In the DA of the premature (19 day) fetus, O₂ and Glyb did not induce significant contraction and only 4AP caused contraction. KATP, which was activated by pinacidil and inhibited by Glyb, was detected in the DA. KATP was present in the DA of mature fetus and the value was greater than in the DA of premature fetus. The data suggest that 1) In the DA, both O₂-sensitive K channels, which close with O₂, and KATP are underdeveloped in the premature fetus, 2) in addition to O₂-sensitive Kv, KATP may also be important as an O₂-sensor in the DA.

Key Words Ductus arteriosus, K channel, Oxygen, Ductal contraction

Introduction:

The ductus arteriosus (DA) normally closes after birth. The rise in arterial Po₂ that occurs after birth following initiation of respiration is important in causing ductal constriction. Oxygen has been shown to cause ductal constriction in the isolated ductal preparation. The

mechanisms of the O₂-induced ductal constriction remain unclear. We showed previously that glybenclamide, an inhibitor of the ATP-dependent K channel (K_{ATP}), caused ductal contraction and that cromakalim, an opener of K_{ATP}, antagonized the O₂-induced ductal contraction (1). We hypothesized that O₂ might close the K_{ATP}, resulting in the membrane depolarization. Tristani-Firouzi et al (2), however, showed that there was a voltage-dependent K channel in the DA, which closed with O₂, and they hypothesized that the voltage-dependent K channel might be an O₂ sensor. Physiological importance of ATP-sensitive K channel (K_{ATP}) and voltage-dependent K channel (Kv) in the constriction of the ductus arteriosus (DA) remains unclear. In the present study, we investigated developmental changes in K_{ATP} in smooth muscle cells of the DA in the rat fetus.

Materials and methods:

Experiments were performed using rat fetuses at either 19 or 21 days of gestation. Contractile force of the DA was examined, as described previously (3, 4). Voltage-clamp experiments were performed in the whole-cell configuration of the patch-clamp techniques using freshly isolated single cells. The pipette (internal) solution contained (in mM) KCl 20, KOH 120, MgCl₂ 2, EGTA 10, HEPES 5, Mg-ATP 1, and aspartate 60 (pH 7.4). The holding potential was set to -70 mV and K currents were evoked either by a series of voltage steps ranging from -80 to +60 mV with a duration of 200 ms at a rate of 0.1 Hz or by a ramp pulse from -120 mV to 60 mV with a duration of 225 ms. K currents activated by 1-10 mM pinacidil, an opener of K_{ATP} channels, and that inhibited by 4 mM glybenclamide were considered to be K_{ATP} currents (5).

Results:

Membrane depolarization caused by high KCl induced ductal contraction in all age groups studied. In the 21-day fetuses, O₂ did cause contraction and increases in [Ca]_i. In the 19-day fetus, however, O₂ did not cause significant contraction nor changes in [Ca]_i. These data suggested that in the premature fetus, the contractile system, including membrane depolarization, [Ca]_i increase and its activation of contractile proteins, is already functioning, but the O₂-sensing mechanism is underdeveloped. We then investigated developmental changes in K_{ATP} in smooth muscle cells of the DA in the rat fetus. Glybenclamide caused significant contraction in the DA of the 21-day fetal rat, but not in the 19-day fetus. Glybenclamide significantly decreased the membrane potential by 33 mV in the fetus at 21 days of gestation and the decrease was greater than in the fetus at 19 days of gestation (by 8 mV). Voltage-clamp experiments were performed in the whole-cell configuration of the

patch-clamp techniques. Pinacidil, an opener of K_{ATP} channels, and glybenclamide, an inhibitor of K_{ATP} channels, were used to detect K_{ATP} currents. K currents activated by 10 μ M pinacidil in the fetus at 21 days of gestation was significantly greater than in the fetus at 19 days of gestation. The glybenclamide-inhibited K current density after activation by 10 μ M pinacidil was similar to the pinacidil-activated K current. The glybenclamide-inhibited K current density was significantly greater in the fetus at 21 days than in the fetus at 19 days of gestation. These data support the hypothesis that K_{ATP} is one of the O_2 sensors in the DA and that O_2 -induced contraction of the DA may not occur because K_{ATP} is underdeveloped in the premature fetus.

We next studied voltage-gated, O_2 -sensitive K channels (Kv) in the DA. 4-aminopyridine (4AP), a blocker of Kv, caused ductal contraction both in the 19-day and 21-day fetus. Under hypoxic conditions (PO_2 35 mmHg), K currents sensitive to 4-AP were present both in the 19-day and 21-day fetus.

In the PA, Kv 1.2, Kv1.5, Kv2.1, and/or Kv3.1 may open with O_2 . Beta-subunits may modulate gating properties of the alpha-subunits. The DA and the main pulmonary artery were isolated from the fetal rat at 21- day of gestation. mRNA levels of Kv alpha-subunits (Kv1.2, Kv1.5, Kv2.1, Kv9.3) and beta-subunits (Kvbeta1.1, Kvbeta2, Kvbeta3) were estimated using RT-PCR. No significant differences in the levels of mRNA of Kv 1.2, 1.3, 1.5 and 2.1, nor in the levels of beta-subunits among DA and PA were observed.

Discussion:

The present study showed that K_{ATP} was underdeveloped in the DA of the premature fetus. The data support the hypothesis that K_{ATP} is one of the O_2 sensors in the DA and that O_2 -induced contraction of the DA may not occur because K_{ATP} is underdeveloped in the premature fetus. In the DA, K_{ATP} is an important O_2 sensor in the DA. Kv is present in the DA. Although alpha and beta units of Kv specifically expressed in the DA have not been detected, Kv may be also important for ductal contraction.

References:

- 1) Nakanishi T, Gu H, Hagiwara N, Momma K 1993 Mechanisms of oxygen-induced contraction of ductus arteriosus isolated from the fetal rabbit. *Circ Res* 72 : 1218-28
- 2) Tristani-Firouzi M, Reeve HL, Tolarova S, Weir EK, Archer SL 1996 Oxygen-induced constriction of rabbit ductus arteriosus occurs via inhibition of a 4-aminopyridine-, voltage-sensitive potassium channel. *J Clin Invest* 98 : 1959-65
- 3) Wu G, Jing S, Momma L, Nakanishi T 2001 The effect of vitamin A on contraction of the

ductus arteriosus in fetal rat. *Pediatr Res* 49: 747-754

4) Nakanishi T, Gu H, Abe K, Momma K 1997 Developmental changes in contractile system of the mesenteric small artery of rabbit. *Pediatric Research* 41:65-71

5) Clapp LH, Gurney AM 1992 ATP-sensitive K channels regulating potential of pulmonary arterial smooth muscle cells. *Am J Physiol* H916-H920

作成日 2004年 3 月 10 日

2003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－

2004 年 3 月 11 日

財団法人 日 中 医 学 協 会
理 事 長 殿

研究者氏名 阿吾提 伊地力斯

所属機関名 東京医科大学病院外科第一講座

指導責任者氏名 加藤治文

職 名 主任教授

所 在 地 〒 160-0023 東京都新宿区西新宿6-7-1

電話 03-3342-6111 内線 5830



1. 研 究 テ ー マ

肺癌患者末梢血液リンパ球におけるチトクローム系代謝酵素 mRNA 発現量の解析

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)

第10回世界肺癌学会

肺癌患者末梢血液リンパ球におけるチトクローム系代謝酵素 mRNA 発現量の解析

第44回日本肺癌学会総会

肺癌患者末梢血液リンパ球におけるチトクローム系代謝酵素 mRNA 発現量の解析

第10回日本癌病態研究会

肺癌患者末梢血液リンパ球におけるチトクローム系代謝酵素 mRNA 発現量の解析

(2) 学会誌等に発表した論文 ☒ 有 ・ 無 (雑誌名・論文名)

1. Annals of Cancer Research and Therapy 2003.11. Vol 11

The mRNA Expression of Cytochrome P450 Enzymes in Peripheral Blood Lymphocytes in Patients with Lung Cancer.

2. Clinical Cancer Research 2003.6. Vol 2294(9)

Chromosomal Instability Detected by Fluorescence *in Site* Hybridization in Surgical Specimens of Non- Small Cell Lung Cancer is Associated with Poor Survival.

3. Oncology Reports 2003.11. Vol 11

An increase in the percentage of HLA-DR-positive peripheral leukocytes predicts a poor prognosis in patients with squamous cell carcinoma of the lung.

4. Oncology Reports 2003.10. Vol 10

Comparison of immunohistochemistry and real-time reverse transcription-polymerase chain reaction to detect expression of carcinoembryonic antigen in lung cancer.

5. Annals of Thoracic and Cardiovascular Surgery 2003.10. Vol 9(5)

Significance of expression of TGF- β in pulmonary metastasis in non-small cell lung cancer tissues.

3. 今後の研究計画

博士生課程終了後、日本の大学、或いは他の研究機関で生物遺伝子学的、蛋白の分析など分野で研究を続けたいです。新疆ウイグル自治区は中国の内陸地方に位置し、経済的、技術的にも大変遅れている地域でありますから新分野で研究する条件はございません。上記の希望が得られなかった場合は日本で学んだ肺癌に対する早期診断、早期治療の新しい方法を身につけ、将来、帰国してから本国の医療事業に貢献したいと思います。

4. 指導責任者の意見

阿吾提 伊地力斯君は学術面で肺癌の遺伝子素因の最新の研究を精力的に行なうとともに、人格面でも極めて円満且つ真面目で協調性に富んだ生活態度で日常をすごしております。基礎研究の面においては「肺癌患者末梢血液リンパ球におけるチトクローム系代謝酵素 mRNA 発現量の解析」を研究テーマとして、肺癌患者及び対象とした健常者の末梢血有核細胞のRNAを抽出し、検討した。本研究の目的は肺癌の易罹患性に関与する遺伝的背景の解析で、発癌物質の代謝に関与する多種類のチトクローム系酵素の遺伝子発現量の定量から個人の肺癌感受性を解析しようとするものであります。すでに多くのデータを蓄積し、第10回日本癌病態治療研究会、第42回日本肺癌学会総会、第10回世界肺癌学会で発表行い、英文の論文をAnnals of Cancer Research and Therapy雑誌で発表した。このように、立派な業績を残してきており、更に熱心に勉学と技術修得、新しい分野の研究に励んでおります。彼は日本文化へ順応も優れており、本学で学んだ医療技術を生かして日中医学交流の発展に貢献し、良い指導者をなりうることを確信しております。

指導責任者氏名 加藤治文



5. 研究報告書

別紙「研究報告書の作成について」に倣い、指定の用紙で作成して下さい。

研究発表または研究状況を記録した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 mRNA Expression of Cytochrome P450 Enzymes in Peripheral Blood Lymphocytes in Patients with Lung Cancer

(肺癌患者末梢血液リンパ球におけるチトクローム系代謝酵素 mRNA 発現量の解析)

研究者氏名	阿吾提 伊地力斯(Awuti Yidilisi)
中国所属機関	新疆医科大学第一附属医院胸部外科講師
日本研究機関	東京医科大学病院外科第一講座
指導責任者	主任教授 加藤治文
共同研究者名	中村治彦、佐治 久、坪井 正博

Abstract :

Several mutagens including benzo(a)pyrene (B[a]P) and 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK) in tobacco smoke are known to be metabolized by cytochrome P450 enzymes (CYPs). These mutagens may induce airway carcinogenesis. We measured the mRNA expression of CYPs 1A1, 1A2, 2A6/7, 2B6, 4B1, 2C, 2D6 and 2E1 the peripheral blood lymphocytes from 30 patients with lung cancer and 30 healthy controls by semi-quantitative competitive reverse transcription polymerase chain reaction (QC-RT-PCR) in order to determine the expression levels of these CYPs in patients with lung cancer. The mRNA levels of CYPs 1A1 ($p < 0.001$), 4B1 ($p < 0.001$) and 2C ($p < 0.001$) were significantly higher and CYPs 2D6 ($p < 0.0001$) and 2E1 ($p < 0.0001$) were significantly lower in patients with lung cancer than in healthy controls. The same results were obtained when only smokers in both groups were compared. Our study revealed that the mRNA expression levels of CYPs in peripheral blood lymphocytes were different in patients with lung cancer and healthy controls. The elevated level of expression of some CYPs in the patients may reflect the risk of carcinogenesis of lung cancer.

Key Words: Cytochrome P450 enzymes, quantitative competitive reverse transcription polymerase chain reaction, lung cancer, smoking, carcinogenesis.

Introduction:

Since lung cancer is the most common cancer worldwide, it will probably remain the major cause of cancer deaths among both men and women at least in the initial period of the 21st century. The etiological factors are still unclear. However, it is clear that long-time cigarette smoking increases the risk of lung cancer. Benzo[a]pyrene (B[a]P) is one of the polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) found in tobacco smoke, and its metabolite benzo[a]pyrene diol epoxide (BPDE) is considered to be a classic DNA-damaging carcinogen (Denissenko, Pao *et al.*, 1996; Li, Wang *et al.*, 1996). In several recent studies have demonstrated that the cytochrome P450 enzyme (CYPs) family plays an important role in the metabolism of pro-carcinogens, for example B[a]P and 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK) to carcinogens (Hukkanen, Lassila *et al.*, 2000; Vanden Heuvel, Clark *et al.*, 1993; Hecht 1996; Rojas, Camus *et al.*, 1992). Several CYPs 1A1, 4B1, 2C, 2D6 and 2E1 are expressed in normal organs including the liver (Andersen, Farin *et al.*, 1998), lung (Li, Wang *et al.*, 1996; Hukkanen, Hakkola *et al.*, 1997), bronchoalveolar macrophages (Hukkanen, Hakkola *et al.*, 1997) and peripheral blood cells (Hukkanen, Hakkola *et al.*, 1997; Krovat, Tracy *et al.*, 2000). They are also expressed in malignant tissues, such as lung (Hukkanen, Lassila *et al.*, 2000; Goto, Yoneda *et al.*, 1996), esophagus (Itoga, Nomura *et al.*, 2002), larynx (Agundez, Gallardo *et al.*, 2001), liver (Sumida, Fukuen *et al.*, 2000), and breast cancer (Xiong, Bondy *et al.*, 2001). Several previous studies demonstrated that B[a]P is metabolized in the lung

microsomes and pulmonary alveolar macrophages by CYPs 1A1, 4B1, and 2C (Hukkanen, Hakkola *et al.*, 1997; Thompson, McCoy *et al.*, 1989; McLemore, Martin *et al.*, 1977). The suitability of using CYPs expression in human lymphocytes as a biomarker of metabolism of pro-carcinogens was demonstrated in other reports (Li, Wang *et al.*, 1996; Rojas, Camus *et al.*, 1992). Li, Wang *et al.*, (1996) demonstrated both a high degree of interindividual variability in CYP1A1 inducibility, and a correlation between the level of its inducibility in lymphocytes and the risk of smoking-related lung cancer. Other in vitro studies have suggested that B[a]P is metabolized in lymphocytes (Okano, Miller *et al.*, 1979; Gurtoo, Vaught *et al.*, 1980). Hukkanen, Hakkola *et al.*, (1997) used reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) to evaluate the expression of CYPs in human bronchoalveolar and peripheral lymphocytes to assess the potential utility of peripheral lymphocytes as a surrogate for lung tissue. Law (1990) reported that peripheral lymphocytes can be used as a surrogate for lung tissue to study susceptibility to lung cancer. He found aryl hydrocarbon hydroxylase (AHH) activity was significantly higher in lung cancer cases in 13 (65%) out of 20 studies examining peripheral lymphocytes in case-control studies. Those reports indicate the CYP mRNA expression in peripheral lymphocytes can be used as an indicator of activating or inactivating pro-carcinogens. The metabolism of B(a)P is known very well (Li, Wang *et al.*, 1996; Vanden Heuvel, Clark *et al.*, 1993). B(a)P is metabolized to DNA-binding diol epoxides by phase I CYPs and detoxified by phase II enzymes including glutathione S-transferase. The greater the activation of the phase enzymes and the lower the detoxification of the phase II enzymes, the more they might be involved in the development of lung cancer (Goto, Yoneda *et al.*, 1996; Rojas, Cascorbi *et al.*, 2000; Quinones, Lucas *et al.*, 2001; Hayashi, Watanabe *et al.*, 1992). Previous studies (Hayashi, Watanabe *et al.*, 1992; Okada, Kawashima *et al.*, 1994) demonstrated that the polymorphisms in CYP1A1, m1 and m2 mutations are risk factors in Japanese smoking-related lung cancer. In addition, Quinones, Lucas *et al.*, (2001) reported that the activated type polymorphism in CYP1A1 enzyme is frequently seen in Chilean lung cancer patients. Thus we hypothesized that CYPs enzyme mRNA level of peripheral lymphocytes could be used as a biomarker for the risk of lung cancer. The present study is the first report on mRNA expression profiles for a number of targeted CYPs in peripheral lymphocytes from patients with lung cancer in comparison with healthy controls.

The semi-quantitative competitive reverse transcription polymerase chain reaction (QC-RT-PCR) (Andersen, Farin *et al.*, 1998; Krovat, Tracy *et al.*, 2000; Sumida, Fukuen *et al.*, 2000) employed in the present study is a sensitive tool for semi-quantifying the amount of CYPs mRNA.

Materials and Methods:

Subjects: From February to October 2001, a consecutive series 30 previously untreated lung cancer patients with an average age of 60.9 years (range, 34-76 years) and an average smoking index (cigarettes/day \times years) of 1291.9 (range, 660-3040) were examined. Thirty healthy controls with an average age of 63.1 years (range, 31-83 years) with an average smoking index of 914.3 (range, 400-2500) were studied in the same period. All smokers in this study were current smokers and all non-smokers were defined as individuals who had never smoked. Age, gender and smoking states of lung cancer patients and healthy controls are listed in Table 1. All patients were given an explanation of the nature of the study and their fully informed consent was obtained prior to obtaining blood samples.

Isolation of total RNA from peripheral blood: Total RNA was extracted from 5 ml of peripheral blood from pretreated patients by the QIAamp[®] reagent (QIAGEN, Hilden, Germany) following the manufacturer's protocol. To remove contaminating genomic DNA, extracted mRNA preparations were treated with RNase-free DNase I (QIAGEN). The

isolated total RNA was stored at - 85°C until use.

Primer design and generation of RNA competitor: Gene-specific primers were designed to amplify the specific regions of CYPs 1A1, 1A2, 2A6/7, 2B6, 4B1, 2C, 2D6, 2E1 and glycerol- dehydes 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) genes. RNA competitors (1.0×10^8 copies/ μ l) were generated using reagents supplied in a commercial kit, Human Cytochrome P450 RT-PCR[®] (TaKaRa Biomedicals, Tokyo, Japan). The primer sequence of each gene is considered proprietary information by the TaKaRa company and is not made public.

Quantitative competitive RT-PCR: We first confirmed the presence of CYPs mRNA. In the second step, we assessed the levels of mRNA expression by QC-RT-PCR. Each cDNA was synthesized in a reaction mixture containing 200 ng of total RNA, 2 μ l of competitor RNA (CYPs; ranging from 1.0×10^4 to 1.0×10^8 copies/ μ l, GAPDH; ranging from 1.0×10^4 to 2.5×10^6 copies/ μ l), 4 μ l of 10 \times RNA PCR buffer, 8 μ l of 25 mM MgCl₂, 4 μ l of 10mM dNTPmix, 1 μ l of 40 U/ μ l Rnase inhibitor, 2 μ l of 5 U/ μ l avian myeloblastosis virus (AMV) reverse transcriptase, 2 μ l of 2.5 pmol/ μ l oligo dT-adaptor primer and finally diethyl-procarbonate (DEPC)-treated water up to total volume of 40 μ l. All reagents were included in a Human Cytochrome P450 Competitive RT-PCR[®] Set (TaKaRa). Reverse transcription reaction was performed for 10 min at 30°C, 30 min at 55°C, 5 min at 95°C and 5 min at 5°C. The competitive PCR was performed in a total volume of 20 μ l of reaction mixture containing 4 μ l of cDNA, 1.2 μ l of 25 mM MgCl₂, 1.6 μ l of 10 \times RNA PCR buffer, 0.4 μ l of 10 pmol/ μ l CYPs primers, 0.1 μ l of 5 U/ μ l Taq polymerase and 12.7 μ l of DEPC-treated water. The reaction mixture was heated to 95°C for 2 min and then cycled, denatured at 94°C for 30 sec, and annealed at 60°C (CYPs 1A1, 2C and 2E1), 62°C (CYP2B6 and GAPDH), 64°C (CYP4B1), and 65°C (CYP2D6) for 1 min and extended at 72°C for 1 min. Optimized competitive PCR comprised 35 cycles for CYPs 1A1, 2D6 and 4B1, 31 cycles for CYP2C, 30 cycles for CYP2B6 and GAPDH, and 28 cycles for CYP2E1, respectively. All samples were finally incubated at 72°C for 7 min. QC-RT-PCR products were separated by electrophoresis on 2.5% agarose gels and were stained with ethidium bromide. DNA bands were visualized with UV light (302 nm) and the gel images were photographed. We chose the equivalent or similar intensity bands of target mRNA and competitor RNA to determine the number of target mRNA copies. The good reproducibility of this method was confirmed in duplicate measurement of the first 10 samples.

Statistical analysis: The non-parametric Mann-Whitney U-test was used to test the difference in clinical factors between patients and healthy controls, and distribution of the mRNA expression of the enzymes between the classified two groups. The χ^2 test was used to test the distribution of gender between patients and healthy controls. A p-value of less than 0.05 was considered to indicate a statistically significant difference.

Results:

The representative findings of QC-RT-PCR are shown in Figure 1. The average values of mRNA expression of CYPs in the lung cancer group and the healthy control group are shown in Table 2. The transcription products of CYPs 1A1, 2B6, 4B1, 2C, 2D6 and 2E1 were detectable in both group all objects. However, since CYPs 1A2 and 2A6/7 were not expressed in peripheral blood lymphocytes in either patients or healthy control groups, these enzymes were excluded from the analyses. The mRNA levels of CYPs 1A1 ($p < 0.001$), 4B1 ($p < 0.001$) and 2C ($p < 0.001$) in the lung cancer group were higher than those in the healthy control group. However, CYPs 2D6 ($p < 0.0001$) and 2E1 ($p < 0.0001$) mRNA levels in the lung cancer group were lower than those in the healthy control group.

In smokers, the mRNA levels of CYPs 1A1 ($p < 0.01$), 4B1 ($p < 0.001$), and 2C ($p < 0.001$) were also higher, and

CYPs 2D6 ($p < 0.0001$) and 2E1 ($p < 0.001$) were also lower in the lung cancer group than healthy controls (Table 3). There were no differences in CYPs mRNA expression between adenocarcinomas and squamous cell carcinomas (data not shown) or between all studied smokers and non-smokers (Table 4).

Discussion:

Individual differences in susceptibility to chemically-induced cancers are ascribed partly to genetic differences in metabolic balance in the activation and detoxification of environmental pro-carcinogens. Human smoking-related lung cancer, especially squamous cell carcinoma and small cell carcinoma, requires exposure to the pro-carcinogens contained mainly in cigarette smoke. A number of investigators have examined the correlation between CYPs activity and induction of many carcinogens in mitogen-stimulated lymphocytes and lung tissue, especially the relationship between CYP1A1 induction by exposure to PAH in cigarette smoke and susceptibility to lung cancer (Denissenko, Pao *et al.*, 1996; Hecht 1996; Goto, Yoneda *et al.*, 1996). Recent genetic polymorphism studies demonstrated that CYP1A1 affects BPDE-DNA binding in human leukocytes, and exposure to PAH has a synergistic effect. High levels of BPDE-DNA adducts in leukocytes by specific phase I, phase II enzyme genotype combinations may relate to the increased risk for lung cancer (Rojas, Cascorbi *et al.*, 2000).

Specific polymorphism within the CYP1A1 gene was found to be associated with increased risk of lung cancer in Japanese smokers (Goto, Yoneda *et al.*, 1996; Hayashi, Watanabe *et al.*, 1992; Okada, Kawashima *et al.*, 1994), and similar results were obtained by other ethnic polymorphism studies (Rojas, Cascorbi *et al.*, 2000; Quinones, Lucas *et al.*, 2001; Alexandrov, Cascorbi *et al.*, 2002). Expression of CYP1A1 levels were significantly related to the hydrophobic DNA adduct levels, although a large interindividual variation was observed for both CYP1A1 expression and DNA adducts (Mollerup, Ryberg *et al.*, 1999). Several studies demonstrated a significant correlation between CYP1A1 expression and DNA adducts level (Vanden Heuvel, Clark *et al.*, 1993; Krovat, Tracy *et al.*, 2000; Mollerup, Ryberg *et al.*, 1999). Imaoka, Yoneda *et al.*, (2000) and Fujitaka, Oguri *et al.*, (2001) demonstrated that CYPs 4B1, 2C mRNA expression in bladder and lung cancer tissue is higher than in normal tissue. Their results resemble ours, although we used peripheral blood lymphocytes from patients, instead of bladder or lung cancer tissues. Our study suggests that high levels of mRNA expression of CYPs 1A1, 4B1 and 2C in peripheral blood lymphocytes might be potential biomarkers of the lung cancer risk. Of course, there are some other potential risk factors associated with development of primary lung cancer, as well as factor influencing the expression of these enzymes in lung cancer patients, such as chronic obstructive pulmonary disease, nutritional status, occupational and environmental pollution, and phase II enzyme activity.

In the present study, CYPs 2D6 and 2E1 were more highly expressed in healthy controls than in patients with lung cancer. Krovat, Tracy *et al.*, (2000) reported that these enzymes were typically expressed at the highest levels in peripheral lymphocytes from healthy donors. Genetic polymorphism of the human CYPs 2D6 and 2E1 genes are known to be associated with lung cancer risk in some reports (Agundez, Gallardo *et al.*, 2001; Quinones, Lucas *et al.*, 2001). Conversely, in other reports these polymorphisms are related to low risk for lung cancer (Ayes, Idle *et al.*, 1984). Kiyohara, Otsu *et al.*, (2002) mentioned that the relationship between CYP2D6 gene and lung cancer remains inconclusive and that no definitive link between the polymorphism of CYP2E1 and the risk of lung cancer has been identified. Expression levels of these two enzymes might relate to activation of carcinogens, but it is unclear whether carcinogens, such as B[a]P and NNK are activated by CYPs 2D6 and 2E1 in peripheral blood lymphocytes. Further

analyses are needed on this point, because we could not find other reports suggesting that CYPs 2D6 and 2E1 may promote the anti-carcinogenic processes. Interestingly, expression of all CYPs did not significantly differ between smokers and non-smokers. This suggests that these enzymes are not induced in peripheral blood lymphocytes by smoking. We believe, therefore, CYPs expression in peripheral lymphocytes can be used as biomarkers for the risk of lung cancer. This finding was previously confirmed by other reports. Thompson, McCoy *et al.*, (1989) found that smoking does not influence metabolism or DNA adduct formation in lymphocytes. Rojas, Camus *et al.*, (1992) found that metabolic activities for B[a]P-7,8-diol to tetrol conversion are similar in smokers and non-smokers.

In conclusion, increased expression of CYPs 1A1, 4B1 and 2C enzymes in peripheral blood lymphocytes was found in lung cancer patients in comparison with healthy controls. Therefore, increased expression of these enzymes may possibly be susceptibility biomarkers for human lung cancer.

References :

- Agundez, J.A., Gallardo, L., Ledesma, M.C., Lozano, L., Rodriguez-Lescure, A., Pontes, J.C. and Benitez, J. (2001). Functionally active duplications of the CYP2D6 gene are more prevalent among larynx and lung cancer patients. *Oncology*. 61:59-63.
- Alexandrov, K., Cascorbi, I., Rojas, M. and Bartsch, H. (2002). CYP1A1 and GSTM1 genotype affect benzo[a]pyrene DNA adducts in smokers lung: comparison with aromatic/hydrophobic adduct formation. *Carcinogenesis*. 23(12):1969-1977.
- Andersen, M.R., Farin, F.M. and Omiecinski, C.J. (1998). Quantification of multiple human cytochrome P450 mRNA molecules using competitive reverse transcriptase-PCR. *DNA. Cell. Biol.* 17: 231-238.
- Ayesh, R., Idle, J.R., Ritchie, J.C., Crothers, M.J. and Hetzel, M.R. (1984). Metabolic oxidation phenotypes as markers for susceptibility to lung cancer. *Nature*. 312(5990):169-170.
- Denissenko, M.F., Pao, A., Tang, M. and Pfeifer, G.P. (1996). Preferential formation of benzo[a]pyrene adducts at lung cancer mutational hotspots in P53. *Science*. 274(5286):430-432.
- Fujitaka, K., Oguri, T., Isobe, T., Fujiwara, Y. and Kohno, N. (2001). Induction of cytochrome P450 3A4 by docetaxel in peripheral mononuclear cells its expression in lung cancer. *Cancer. Chemother. Pharmacol.* 48:42-46.
- Goto, I., Yoneda, S., Yamamoto, M. and Kawajiri, K. (1996). Prognostic significance of germ line polymorphisms of the CYP1A1 and glutathione S-transferase genes in patients with non-small cell lung cancer. *Cancer Res.* 56(16):3725-3730.
- Gurtoo, H.L., Vaught, J.B., Marinello, A.J., Paigen, B., Gessner, T. and Bolanowska, W. (1980). High-pressure liquid chromatographic analysis of benzo(a)pyrene metabolism by human lymphocytes from donors of different aryl hydrocarbon hydroxylase inducibility and antipyrine half-lives. *Cancer. Res.* 40(4):1305-1310.
- Hayashi, S., Watanabe, J. and Kawajiri, K. (1992). High susceptibility to lung cancer analyzed in terms of combined genotypes of P450IA1 and Mu-class glutathione S-transferase genes. *Jpn. J. Cancer. Res.* 83(8):866-870.
- Hecht, S.S. (1996). Recent studies on mechanisms of bioactivation and detoxification of 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK), a tobacco-specific lung carcinogens. *Crit. Rev. Toxicol.* 26(2):163-181.
- Hukkanen, J., Hakkola, J., Anttila, S. and Raunio, H. (1997). Detection of mRNA encoding xenobiotic-metabolizing cytochrome P450s in human bronchoalveolar macrophages and peripheral blood lymphocytes. *Molecular. Carcinogenesis*. 20:224-230.
- Hukkanen, J., Lassila, A., Paivarinta, K., Valanne, S. and Raunio, H. (2000). Induction and regulation of xenobiotic-metabolizing cytochrome P450s in the human A549 lung adenocarcinoma cell line. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* 22:360-366.
- Imaoka, S., Yoneda, Y., Sugimoto, T., Hiroi, T. and Funae Y. (2000). CYP4B1 is a possible risk factor for bladder cancer humans. *Biochem. Biophys. Res. Com.* 277(3):776-780.

- Itoga, S., Nomura, F., Makino, Y., Tomonaga, T., Shimada, H., Ochiai, T. and Harada, S. (2002). Tandem repeat polymorphism of the CYP2E1 gene: an association study with esophageal cancer and lung cancer. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 26(8):15S-19S.
- Kiyohara C Otsu A, Shirakawa, T., Fukuda, S. and Hopkin, J.M. (2002). Genetic polymorphisms and lung cancer susceptibility: a review. *Lung Cancer.* 37(3):241-256.
- Krovet, B.C., Tracy, J.H. and Umiecinski, C.J. (2000). Fingerprinting of cytochrome P450 and microsomal epoxide hydrolase gene expression in human blood cells. *Toxicological. Sciences.* 55:352-360.
- Law, M.R. (1990). Genetic predisposition to cancer. *Br. J. Cancer.* 16:195-206.
- Li, D., Wang, M., Cheng, L., Spitz, M.R., Hittelman, W.N. and Wei, Q. (1996). In vitro induction of benzo[a]pyrene diol-epoxide-DNA adducts in peripheral lymphocytes as a susceptibility marker for human lung cancer. *Cancer Res.* 56:3638-3641.
- McLemore, T.L., Martin, R.R., Busbee, D.L., Richie, R.C. and Cantrell, E.T. (1977). Arly hydrocarbon hydroxylase activity in pulmonary macrophages and lymphocytes from lung cancer and noncancer patients. *Cancer Res.* 37: 1175-1181.
- Mollerup, S., Ryberg, D., Hewer, A., Phillips, D.H. and Haugen, A. (1999). Sex differences in lung CYP1A1 expression and DNA adduct levels among lung cancer patients. *Cancer Res.* 59(14):3317-3320.
- Okada, T., Kawashima, K., Fukushima, S., Minakuchi, T. and Nishimura, S. (1994). Association between a cytochrome P450 CYP1A1 genotype and incidence of lung cancer. *Pharmacogenetics.* 4(6):333-340.
- Okano, P., Miller, H.N., Robinson, R.C. and Gelboin, H.V. (1979). Comparison of benzo(a)pyrene and (-)-trans-7,8-dihydroxy-7,8-dihydrobenzo(a)pyrene metabolism in human blood monocytes and lymphocytes. *Cancer Res.* 39(8):3184-3193.
- Quinones, L., Lucas, D., Godoy, J., Caceres, D., Berthou, F. and Gil, L. (2001). CYP1A1, CYP2E1 and GSTM1 genetic polymorphisms. The effect of single and combined genotypes on lung cancer susceptibility in Chilean people. *Cancer Lett.* 174(1):35-44.
- Rojas, M., Camus, A.M., Alexandrov, K. and Bartsch, H. (1992). Stereoselective metabolism of (-)-benzo(a)pyrene-7,8-diol by human lung microsomes and peripheral blood lymphocytes: effect of smoking. *Carcinogenesis.* 13(6):929-933.
- Rojas, M., Cascorbi, I., Alexandrov, K., Kriek, E., Auburtin, G. and Bartsch, H. (2000). Modulation of benzo[a]pyrene diol-epoxide-DNA adduct levels in human white blood cells by CYP1A1, GSTM1 and GSTT1 polymorphism. *Carcinogenesis.* 21(1):35-41.
- Sumida, A., Fukuen, S., Yamamoto, I., Matsuda, H., Naohara, M. and Azuma J. (2000). Quantitative analysis of constitutive and inducible CYPs mRNA expression in the HepG2 cell line using reverse transcription competitive PCR. *Biochem Biophys. Res. Com.* 267: 756-760.
- Thompson, C.L., McCoy, Z., Lambert, J.M., Andries, M.J. and Lucier, G.W. (1989). Relationships among benzo[a]pyrene metabolism, benzo[a]pyrene-diol-epoxide: DNA adduct formation, and sister chromatid exchanges in human lymphocytes from smokers and nonsmokers. *Cancer Res.* 49:6503-6511.
- Vanden, H.J.P., Clark, G.C., Thompson, C.L., McCoy, Z., Miller, C.R., Lucier, G.W. and Bell, D.A. (1993). CYP1A1 mRNA levels as a human exposure biomarker: use of quantitative polymerase chain reaction to measure CYP1A1 expression in human peripheral blood lymphocytes. *Carcinogenesis.* 14(10):2003-2006.
- Xiong, P., Bondy, M.L., Li, D., Shen, H., Wang, L.E., Singletary, S.E., Spitz, M.R. and Wei, Q. (2001). Sensitivity to benzo(a)pyrene diol-epoxide associated with risk of breast cancer in young women and modulation by glutathione S-transferase polymorphisms. *Cancer Res.* 61(23):8465-8469.

注：本研究は2003年8月14日【第10回世界肺癌学会】にて発表、『Annals of Cancer Research and Therapy』(2003年12月VOL11巻)掲載。

作成日：2004年3月11日

TABLE I
Clinical features of lung cancer patients and healthy controls.

	Lung cancer patients	Healthy controls	p-value
Object numbers	30	30	
Gender*			
Male	25	20	
Female	5	10	NS
Age (mean \pm S.E.)**	60.9 \pm 0.9	63.1 \pm 0.3	NS
Smoking index (mean \pm S.E.)**	1291.9 \pm 12.8	914.3 \pm 9.7	< 0.03
Histologic type			
Ad	14		
Sq	14		
Sm	2		
Stage	I-IV (I/7, II/2, III/18, IV/3)		

Ad: adenocarcinoma, Sq: squamous cell carcinoma, Sm: small cell carcinoma, S.E.: standard error. NS: not significant. * χ^2 -test. **Mann Whitney U-test.

TABLE II
Expression of CYPs mRNA of lung cancer patients and healthy controls.

Gene	Chromosomal location	Patients (n=30)	Healthy controls (n=30)	p-value
CYP1A1	15q22-q24	802.0 \pm 14.7*	264.0 \pm 3.9	< 0.001
CYP2B6	19q13.2	26.4 \pm 0.7	19.6 \pm 0.5	NS
CYP4B1	1p34-p12	27.2 \pm 0.4	6.5 \pm 0.2	< 0.001
CYP2C	10cen-q24.1	2970.8 \pm 70.4	491.0 \pm 4.2	< 0.001
CYP2D6	22q11.2-qter	1830.0 \pm 34.0	6438.0 \pm 70.9	< 0.0001
CYP2E1	10q24.3qter	1604.0 \pm 34.1	5634.0 \pm 77.1	< 0.0001

NS: not significant. *Mean \pm standard error [copies/ng].

TABLE III
Expression of CYPs mRNA in smoking lung cancer patients and smoking healthy controls.

Gene	Smoking patients (n=22)	Smoking healthy controls (n=23)	p-value
CYP1A1	863.6±1.7*	253.4±4.4	< 0.01
CYP2B6	28.9±0.8	16.0±0.5	NS
CYP4B1	25.1±0.4	9.5±0.4	< 0.001
CYP2C	3103.5±83.1	535.7±4.2	< 0.001
CYP2D6	1548.2±20.9	5760.9±79.3	< 0.0001
CYP2E1	1270.0±22.8	4712.2±84.2	< 0.001

NS: not significant. *Mean ± standard error [copies/ng].

TABLE IV
Expression of CYPs mRNA in all studied smokers and non-smokers.

Gene	Smokers (n=45)	Non-smokers (n=15)	p-value
CYP1A1	562.7±9.8*	476.1±1.5	NS
CYP2B6	21.6±0.4	18.4±1.2	NS
CYP4B1	18.2±0.6	16.1±0.3	NS
CYP2C	1652.1±4.1	946.7±3.0	NS
CYP2D6	4368.0±58.2	4808.0±115.4	NS
CYP2E1	3042.7±50.1	4724.0±116.7	NS

NS: not significant. *Mean ± standard error [copies/ng].

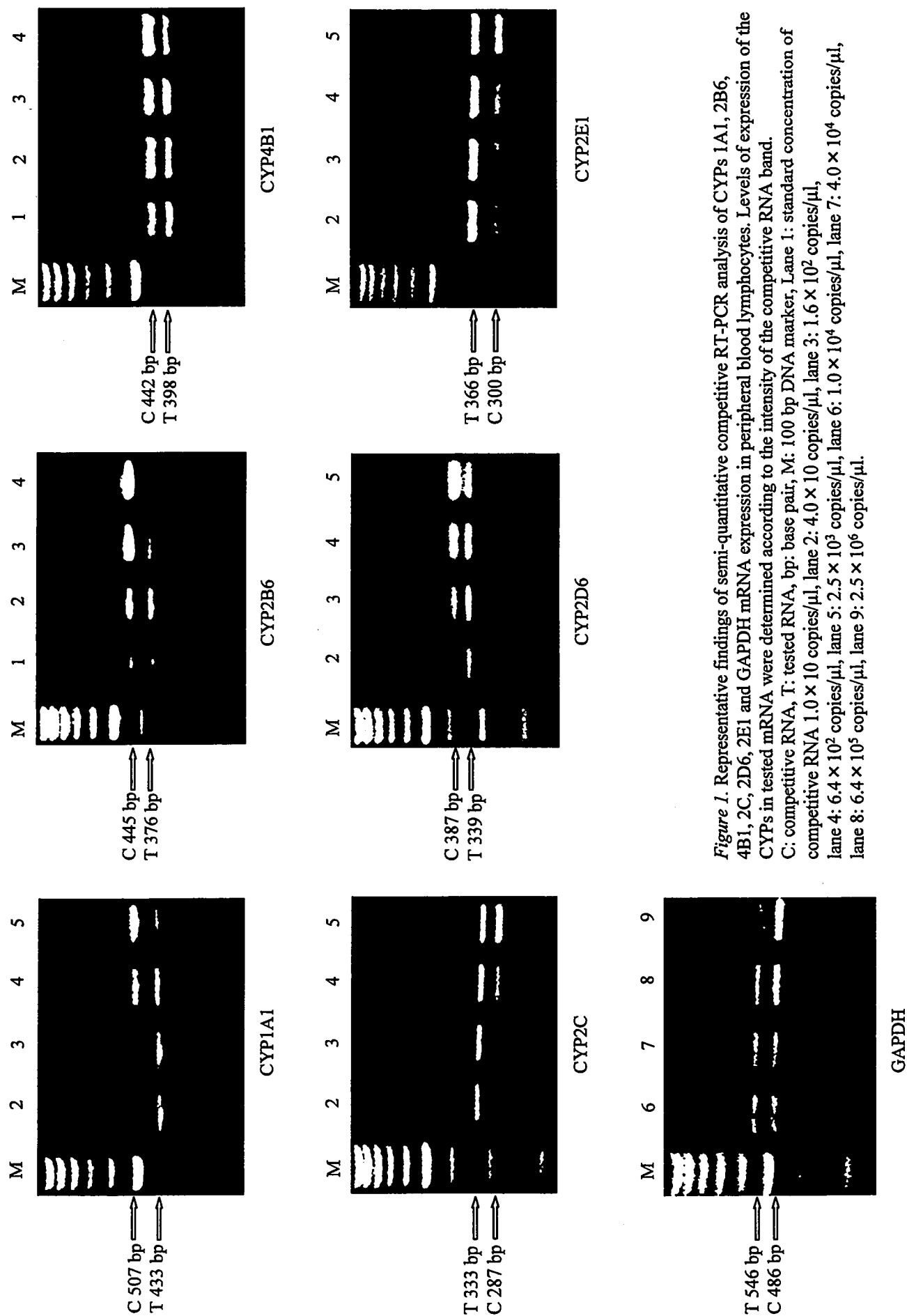


Figure 1. Representative findings of semi-quantitative competitive RT-PCR analysis of CYPs 1A1, 2B6, 4B1, 2C, 2D6, 2E1 and GAPDH mRNA expression in peripheral blood lymphocytes. Levels of expression of the CYPs in tested mRNA were determined according to the intensity of the competitive RNA band. C: competitive RNA, T: tested RNA, bp: base pair, M: 100 bp DNA marker, Lane 1: standard concentration of competitive RNA 1.0×10^2 copies/ μ l, lane 2: 4.0×10^3 copies/ μ l, lane 3: 1.6×10^2 copies/ μ l, lane 4: 6.4×10^2 copies/ μ l, lane 5: 2.5×10^3 copies/ μ l, lane 6: 1.0×10^4 copies/ μ l, lane 7: 4.0×10^4 copies/ μ l, lane 8: 6.4×10^5 copies/ μ l, lane 9: 2.5×10^6 copies/ μ l.

2003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—

2004 年 2 月 25 日

財団法人 日中医学協会
理事長 殿

研究者氏名 趙 勁松

所属機関名 愛知医科大学 眼科

指導責任者氏名 岩城正佳

職 名 教授

所在地 〒愛知県愛知郡長久手町大字岩作字雁又21番地

電話 0561-623311 内線 2181

1. 研究テーマ

視細胞外マトリックス分子SPACRのニフの形成と糖鎖結合活性の違い

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14回愛知眼科フォーラム

SPACRのニフの形成と糖鎖結合活性

(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

視細胞外マトリックス分子 SPACR は b-HA と b-Heparin 反応することはもう証明されました。SPACR には、b-HA、b-Heparin と反応する部位を証明することはこれから目標です。

反応する可能性が高い部位を template にして、fusion protein を融合して、反応部位を証明すること。

4. 指導責任者の意見

眼球IAのグリコグリカンの機能と局在、相互関係について、研究を続行している。こつこつと実験を重ねて結果を出して、論文にまとめる日も近いと信じておられる。

指導責任者氏名

岩城正佳

5. 研究報告書

別紙「研究報告書の作成について」に倣い、指定の用紙で作成して下さい。

研究発表または研究状況を記録した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。

視細胞外マトリックス分子 SPACR の二つのフォームと糖鎖結合

性の違い

研究者氏名	趙勁松
中国所属機関	吉林大学第二医院眼科
日本研究機関	愛知医科大学眼科
指導責任者	教授 岩城正佳
共同研究者名	雑喉正泰 米田雅彦 片岡卓也 井上洋子 大野安季子

Abstract

SPACR (sialoprotein associated with cones and rods) which has a molecular weight of 150kDa, is a glycoprotein around the photoreceptor in chick IPM(interphotoreceptor martrix). A new form of chick SPACR was identified by two antibodies O46-F and MY-174. O46-F is SPACR C-terminal peptide polyclonal antibody, MY-174 is a monoclonal antibody which can react to chick SPACR(1). The new form has a molecular weight of 100kDa. Both of 150kDa and 100kDa were labeled with biotin-hyaluronan and biotin-heparin. The activity binds to heparin of two forms were tested by heparin affinity chromatography, 100kDa binding to the heparin with low affinity, 150kDa binding to be of high affinity. Heparin inhibit hyaluronan binding to 150kDa, which suggests that heparin and hyaluronan binding site of SPACR are closely related.

Key Word SPACR, form, interphotoreceptor martrix, chick

Introduction

The IPM is located between the neural retina and the retinal pigment epithelium in the vertebrate eye(2). A number of activities of fundamental importance for vision are thought to be mediated by the IPM, including retinal adhesion, visual pigment chromophore exchange, metabolite trafficking, photoreceptor alignment and membrane turnover(3). The IPM consists of aqueous-extractable molecules, and fixed matrix that resists aqueous extraction. Glycoproteins, proteoglycans and hyaluronan(HA) are the major components in the fixed matrix(3,4,5).

SPACR was isolated and characterized in the insoluble IPM of human. Immunocytochemistry localizes SPACR to the matrix surrounding rods and cones(6). SPACR is a glycoprotein in human, monkey and chick (1,6,7,8) and a proteoglycan in mouse, rat and bovine(8,9). Functional studies demonstrate that SPACR bind hyaluronan, suggesting that these molecules may help stabilize the hyaluronan scaffold that forms the framework of the insoluble IPM(1,5,7).

Except for SPACR bind to hyaluronan, other properties or functional roles is not clear. To clarify the other biological functions of SPACR, we isolated, purified and characterized SPACR from adult chick IPM by DEAE sephacel column.

In Western blots of IPM extracts, O46-F immunoreactive bands were present at approximately 150kDa and 100kDa, the 150kDa is SPACR which we have identified(1). In Western blots probed with MY-174, immunoreactive bands were present like O46-F, both of 150kDa and 100kDa were labeled, leading us to postulate that may be this 100kDa protein is a different form from SPACR.

Materials and methods

Protein Isolation

The retina of adult white leghorns were prepared according to reported procedures(6,7).The insoluble samples from retina were suspended in 10× volume of 50mM Tris-HCL PH 8.0, 0.15M NaCL,10mM EDTA,1mM PMSF,after for 4 hr at 4°C with gentle agitation,the suspension was centrifuged at 8000g for 30 min at 4°C,the supernatant was immediately loaded at 0.5ml/min onto a DEAE sephacel column in the above solution,after thorough washing,the band proteins were eluted with a linear gradient 0.15M~1M NaCL in above solution,the elution of 0.4M ~0.6M were dialyzed against 50mM Tris-HCL PH 8.0, 0.15M NaCL.

Two-dimensional gel electrophoresis and western blot analyses

Samples were solubilized at a protein concentration of ~1mg/ml in 1.6% Bio-lyte 5/7 ampholyte,0.4% Bio-lyte 3/10 ampholyte,9.5M urea,2.0% Triton X-100,5% β -mercaptoethanol. Isoelectric focusing of 20 μl sample took place in 0.9×57mm tube gels,the first-dimension isoelectric focusing was performed at 500V for 10 min and then at 750V for 4h.after the isoelectric focusing,the tube gels were extruded and placed on top of a 7.5% polyacrylamide gel,the second-dimension took place at a 75V for 20 min,120V for 1h.The protein separated by polyacrylamide gel electrophoresis in the presence of sodium dodecylsulfate(SDS-PAGE) was then electrotransferred on to a nitrocellulose membrane,the transferred membrane was developed with MY 174(1/5000) antibody.The membrane was incubated at room temperature for 30 min in stripping buffer,and then wash with PBS-Tween for removing the reaction solution,the stripping membrane was developed with o46F(1/1000) antibody ,and b-hyaluronan(1/5000),b-Hep(1/5000).

Affinity chromatography on heparin- HiTrap column

The heparin binding abilities were tested by heparin affinity chromatography.3 ml sample after dialyzed were added 1mM PMSF and 10mM Ca²⁺ then applied to a heparin-HiTrap column (1ml) at a flow rate of 0.5ml/min,equilibrated with the same buffer and bond proteins were eluted with a 20ml linear gradient 0.15M~1M NaCL in above solution.The flow through and fraction were pooled and run on 7.5% SDS-PAGE gels,proteins were transferred to a nitrocellulose membrane,then developed with o46F antibody.

Inhibition of hyaluronan binding to SPACR by heparin

To test the effect of heparin on the b-hyaluronan binding ability of 150kDa, western blot analyses were performed,transferred membranes were blocked ,then incubated for 1h at room temperature with b-hyaluronan in the absence and presence of heparin(0.6mg/ml),after washing,membranes were further incubated with peroxidase conjugated streptavidin for 1h at room temperature.the membranes were washed and developed. The films were digitized with a image scanner then analysed using NIH image software.

Results

1.A new form of SPACR

Insoluble IPM extracts from the chick retina separated with two-dimensional gel electrophoresis,then developed with MY-174 antibody, the same membrane after stripping and developed with O46F antibody and b-HA respectively.Fig 1 show arrows located approximately at 150kDa

represent the location of SPACR(1). A new band appears at 100kDa (arrowheads) which react with MY-174, O46F and b-HA like 105kDa.

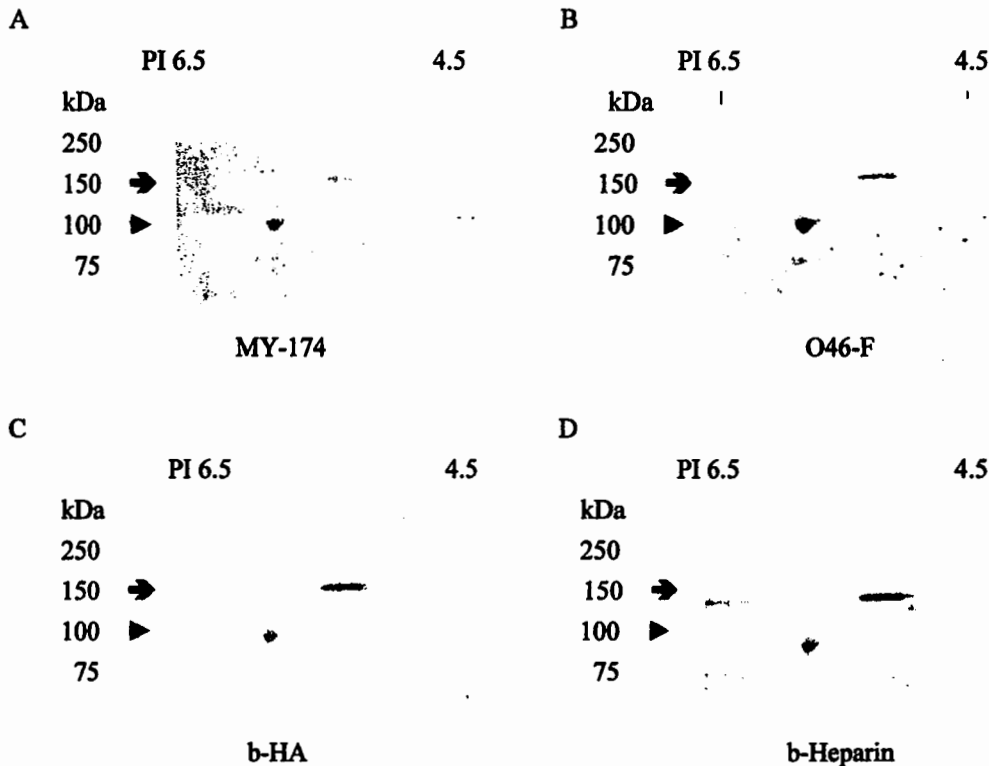


Fig 1 Insoluble IPM of chick retina extracts from the DEAE column separated with two-dimensional gel electrophoresis. Molecular mass marker positions are indicated on the left. PI is indicated at the top. Isoelectric focusing in the horizontal dimension with the anode is on the left. A, developed with MY-174 antibody diluted 1:5000. B, C, D the immunoblot of the same membrane in A after stripping and developed with O46F antibody (1:1000), b-HA (1:5000), b-Hep (1:5000) respectively.

2. SPACR binding heparin and compare the ability of two forms to bind heparin

Cell-substratum adhesion in chick neural retina depends upon protein-heparan sulfate interactions recently been shown (11), we queried whether SPACR functioned as a heparin binding protein.

Western blot analysis of purified SPACR that both the 150kDa and the 100kDa can react with b-heparin as can be seen in fig 1 D.

Elution of insoluble IPM from DEAE column were dialyzed, then applied to a heparin-column, after washing, proteins eluted with linear gradient 0.15M~1M NaCl were shown by SDS-PAGE (Fig 2), electrophoretically blotted to nitrocellulose, and developed with o46F antibody, 100kDa (arrowhead) could not be bound to column at 0.15M NaCl, but 150kDa (arrows) can be bound and eluted with 0.6M NaCl, indicating two forms have different affinities for heparin.

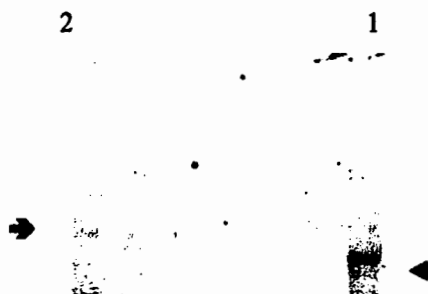
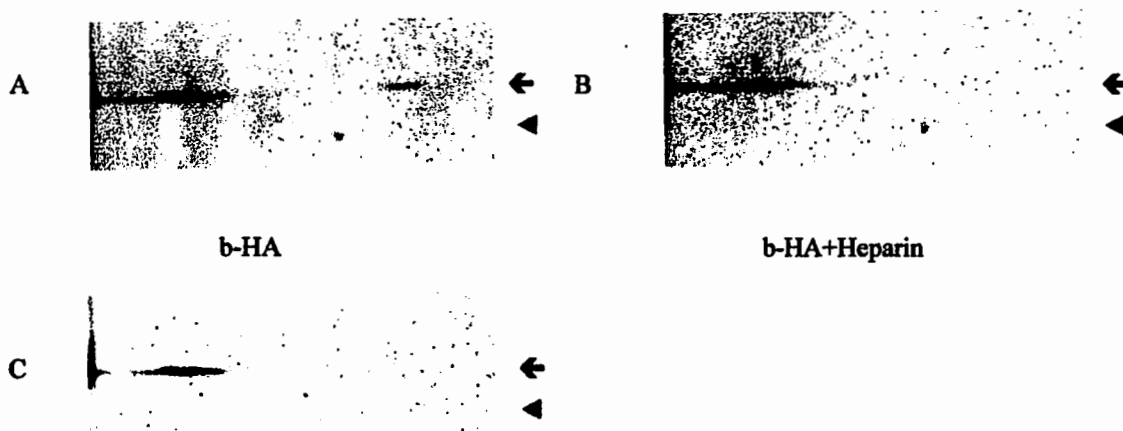


Fig 2.The immunoblot of fraction from heparin-column developed with o46F antibody. The elution from DEAE column were dialyzed,then applied to heparin-column,flow through (0.15M NaCl) (line 1),eluted with gradient NaCl(line 2,0.6M NaCl). Arrows represent 150kDa , arrowhead represent 100kDa.

3.inhibition of hyaluronan binding to SPACR by heparin

Insoluble IPM of chick retina extracts from the DEAE column separated with two-dimensional gel electrophoresis,the membrane developed with b-HA in the absence(A) and presence(B) of heparin(0.6mg/ml). Analysis the films using NIH image software,it was shown that the digital image retained 25%.



streptavidin-horseradish peroxidase conjugate

Fig 3.Effect of hyaluronan binding to SPACR by heparin. Insoluble IPM extracts from the chick retina separated with two-dimensional gel electrophoresis.A, developed with b-HA , arrows located 150kDa represent SPACR,arrowheads represent 100kDa.B, developed with b-HA in the presence of heparin shown decrease HA binding to 150kDa.C,developed with only streptavidin-horseradish peroxidase conjugate as control,no 150kDa and 100kDa band in the control.

Discussion

1.Two forms of SPACR

MY174 antigen in the chick IPM is identical to chick SPACR,the O46-F is a polyclonal antibody for

chick SPACR(1).Here we showed that there were two bands react with MY174, O46-F antibodies in the chick insoluble IPM.And one function of SPACR is to bind to hyaluronan in the IPM(1,7).The band was located about 150KDa which is SPACR(1), another located about 100KDa,the studies reported here that IPM in the chick retina express a protein having a molecular mass of 100KDa which immunostaining characterization similar to SPACR(150kDa).

SPACR may be consist of two different forms in chick IPM,the long form is 150KDa another short form which has a molecular weight of 100KDa,the short form may be resulted from the cleavage reaction of the long form of SPACR.

In many G-protein coupled receptors SEA modules are found proteolytic cleavage site,and were cleaved during them residence in the ER(10).SPACR contain two SEA modules,leading us to postulate that may be this is one cleavage site for SPACR.

The biological purpose of the cleavage is not understood,further studies will be required to establish whether SPACR undergoes a proteolytic cleavage.

2.Heparin binding assays

Heparin is a polysaccharide belonging to the GAG family,heparin has been implicated in modulating various biological processes,such as blood clotting,cell adhesion recognition migration ,growth factor signaling,and viral infection.The biological function of heparin is primarily mediated through its binding and regulation of various proteins,including enzymes growth factors,cytokines,and extracellular matrix proteins etc(12).

Chick SPACR is not a chondroitin-type proteoglycan(1),whereas there are some consensus sites for GAG in peptide sequences of chick SPACR.Our data showed chick SPACR can binding heparin.

Schubert indicated that retinal purpurin protein can interacts with heparin and heparan sulfate,plays a role in adhesive interactions of neural retina cells(13).

Because binding to heparin may serve to immobilize proteins in the extracellular matrix on cell surfaces or in the extracellular space,suggest may be this is ability to binding to retinal photoreceptor cells like hyaluronan.

3.Compare the ability of two forms to bind heparin

Two forms of SPACR can bind to heparin ,we next compared the ability of two forms to bind heparin.as is shown in fig 4.100kDa could not bind to this column when was carried out in the 0.15M NaCL in 50mM TrisHCL PH 8.0,1mM PMSF 10mM Ca^{2+} .150kDa was able to bind to this column and was eluted at about 0.6M NaCL in 50mM TrisHCL PH 8.0,1mM PMSF 10mM Ca^{2+} . Solubilized proteins may bind to heparin mainly electrostatically and could be dissociated by changing ionic strength.

The difference in NaCL concentration for elution from heparin column was indicated that 150kDa and 100kDa may have different binding abilities to heparin.100kDa binding to the heparin with low affinity,150kDa binding to be of high affinity.

4. Addressing the question of whether heparin effect the hyaluronan binding to 150kDa,we performed western blot analyses.It was shown that hyaluronan binding to 150kDa was decreased by added heparin,analysis the films using NIH image software,it was shown that the digital image retained 25%. heparin competes with hyaluronan for 150kDa binding.Chick SPACR has a 280KEIHVLGFK288 may be is a candidate for hyaluronan binding motif(1),and there are some consensus sites for GAG in peptide sequences of chick SPACR,and the nearest GAG binding site is 294 DGS296.may be this site involved in the binding of heparin.Our data imply that heparin and hyaluronan binding site of SPACR

are closely related.

In conclusion, the present data demonstrate

1. SPACR have two forms in chick retina, one have molecular mass of 150kDa another have 100kDa.
2. Two forms of SPACR can bind to heparin
3. The heparin binding ability of them is difference.
4. hyaluronan binding ability of SPACR can be inhibited by heparin.

References

1. Zako M, Iwaki M, Yoneda M, Miyaishi O, Jinsong Zhao, Suzuki Y, Takeuchi M, Miyake G, Ikagawa H, Kimata K.: Molecular cloning and characterization of chick sialoprotein associated with cones and rods, a developmentally regulated glycoprotein of interphotoreceptor matrix. *J Biol Chem.* 2002 Jul 12;277(28):25592-600. Epub 2002 May 03.
2. Röhlich, P.: The interphotoreceptor matrix: electron microscopic and histochemical observations on the vertebrate retina. *Exp Eye Res.* 1970 Jul;10(1):80-96
3. Hageman, G.S. and Johnson, L.V.: structure, composition and function of the retinal interphotoreceptor matrix. *Prog. Ret. Res.* 1991 10, 207-249
4. Mieziowska, K.: The interphotoreceptor matrix, a space in sight. *Microsc. Res. Tech.* 1996 35, 463-471
5. Hollyfield JG: Hyaluronan and the functional organization of the interphotoreceptor matrix. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1999 Nov;40(12):2767-2769.
6. Acharya, S., Rayborn, M.E. and Hollyfield, J.G.: Characterization of SPACR, a sialoprotein associated with cones and rods present in the interphotoreceptor matrix of the human retina: immunological and lectin binding analysis. *Glycobiology.* 1998 Oct;8(10):997-1006.
7. Acharya, S., Rodriguez IR, Moreira EF, Midura RJ, Misono K, Todres E, Hollyfield JG.: SPACR, a novel interphotoreceptor matrix glycoprotein in human retina that interacts with hyaluronan. *J Biol Chem.* 1998 Nov 20;273(47):31599-31606.
8. Hollyfield JG, Rayborn, M.E. Midura RJ, Shadrach KG, Acharya S.: Chondroitin sulfate proteoglycan core proteins in the interphotoreceptor matrix: a comparative study using biochemical and immunohistochemical analysis. *Exp Eye Res.* 1999 Sep;69(3):311-322.
9. Lee JW, Chen Q, Rayborn ME, Shadrach KG, Crabb JW, Rodriguez IR, Hollyfield JG.: SPACR in the interphotoreceptor matrix of the mouse retina: molecular, biochemical and immunohistochemical characterization. *Exp Eye Res.* 2000 Oct;71(4):341-352.
10. Bork, P., Patthy, L.: The SEA module: a new extracellular domain associated with O-glycosylation. *Protein Sci.* 1995 Jul;4(7):1421-1425.
11. Cole GJ, Schubert D, Glaser L.: Cell-substratum adhesion in chick neural retina depends upon protein-heparan sulfate interactions. *J Cell Biol.* 1985 Apr;100(4):1192-9.
12. Lindahl, U., Lidhold, K., Spillmann, D., Kjellen, L.: More to "heparin" than anticoagulation. *Thromb Res.* 1994 Jul 1;75(1):1-32. Review. No abstract available.
13. Schubert D, LaCorbiere M.: Isolation of an adhesion-mediating protein from chick neural retina adherons. *J Cell Biol.* 1985 Sep;101(3):1071-1077.

2003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－

2004 年 2 月 26 日

財団法人 日中医学協会
理事長 殿



研究者氏名 繆 剛

所属機関名 大阪大学 臓器制御外科

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

電話 06-6879-3153 内線

1. 研究テーマ

膵グラフトへの CTLA4Ig 遺伝子導入による拒絶反応の制御

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)

第 39 回日本移植学会 : Development of allorective T suppressor cells after local CTLA4Ig gene transfer to pancreatic allograft.

(2) 学会誌等に発表した論文 有 ・ 無 (雑誌名・論文名)

Transplantation 2004 (in press) : Development of donor-specific immunoregulatory T cells after local CTLA4Ig gene transfer to pancreatic allograft.

3. 今後の研究計画

Pancreas transplantation (PTx) is the most effective method of normalizing glucose control. In terms of temporal relationship between PTx and reversal of diabetic complications, it has been extremely difficult but quite important to determine a 'point of no return'. Thus, it is of great clinical interest to evaluate the efficacy of PTx on diabetic secondary complications. PTx is not commonly used in type 2 diabetes, however, experience is accumulating of transplantation in type 2 diabetic patients with end-stage renal disease. Outcomes for these individuals are as good as for type 1 diabetes. Therefore, whether PTx could protect islet from glucose toxicity (one of the etiologies in type 2 diabetes) remains to be clarified as an interesting hypothesis. The purpose of this research are 1) to evaluate the effectiveness of PTx in preventing the progression of diabetic nephropathy and ocular complications, and to further investigate the reversibility of diabetic secondary complications in SDT rat after successful PTx. 2) To evaluate the potency of PTx in protecting islets from glucose toxicity in type 2 diabetic SDT rat.

4. 指導責任者の意見

齋岡君は平成13年4月大阪大学大学院医学系研究科(臓器制御外科)に入学し、臓器移植、特に臓器移植における研究に従事した。研究態度はよいといえ、2編の英文論文(Transplantation)を accept しており、又、1編の論文を作成中である。研究内容は、糖尿病合併症に対する臓器移植の効果と、臓器移植に対する遺伝子導入による局所免疫抑制療法に用いるものであり、臨床応用が可能なものとして高く評価するものである。

指導責任者氏名

伊藤壽記 印

5. 研究報告書

別紙「研究報告書の作成について」に倣い、指定の用紙で作成して下さい。

研究発表または研究状況を記録した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。

膵グラフトへの CTLA4Ig 遺伝子導入による拒絶反応の制御

研究者氏名 繆 剛

中国所属機関 北京病院

日本研究機関 大阪大学医学系研究科

指導責任者 助教授 伊藤 壽記

共同研究者名 打越 史洋、赤丸 祐介、清本 徹馬、菰田 弘、
野澤 真澄、松田 暉

Abstract

CTLA4Ig gene transfer directly to graft tissue might have the potential to avoid the need for systemic immunosuppression. In our previous studies of BB rats, local adenovirus-mediated CTLA4Ig gene transfer protected the pancreas from autoimmune and alloimmune responses. This study investigated the potency of local CD28/B7 costimulatory blockade for induction of donor-specific tolerance and further examined the existing mechanisms. Methods. Brown Norway (BN; RT1ⁿ)-pancreaticoduodenal grafts transfected with Ad.CTLA4Ig via intra-arterial *ex vivo* perfusion were transplanted into streptozotocin-induced diabetic Lewis (LEW; RT1^l) rats. Results. Ad.CTLA4Ig transduced grafts combined with a short course of FK506 resulted in indefinitely prolonged survival (>156 days vs. 19.5 days with FK506 alone). CTLA4Ig was predominantly expressed in grafts on day 4. The expression was gradually diminished, and was only slightly detectable at day >100. The proliferative responses against BN antigen were remarkably enhanced among recipients with rejected grafts, but the T cells from tolerant recipients (>100 days) showed poor cytotoxic responses. On adoptive transfer assay, the splenic T cells of tolerant recipients were able to suppress the rejection of BN, but not third-party Wistar Furth (WF; RT1^u) heart in irradiated (480 cGy) LEW recipients. The percentage of CD4⁺CD25⁺ splenic T cells was significantly increased in tolerant recipients ($13.53 \pm 4.06\%$ vs. $6.06 \pm 0.56\%$ in naïve rats). Conclusions. CTLA4Ig gene transfer to the pancreaticoduodenal allograft combined with a short course of FK506 induces donor-specific tolerance. The mechanism of maintaining tolerance could be explained by development of splenic T suppressor cells.

Key Words Pancreas transplantation; Gene transfer; CTLA4Ig; T suppressor cell;

Introduction:

To prevent immunological rejection of allografts, it is necessary to administer systemic immunosuppressants to the recipients. However, these immunosuppressants have several side effects, including toxicity, an increased incidence of malignancy and susceptibility to opportunistic infections. However, CTLA4Ig gene transfer directly to the allografts has been found to inhibit immune responses in several organ transplantations by allowing production of immunomodulatory proteins in the donor grafts resulting in local rather than systemic immunosuppression (1-4). In the present study, we demonstrate that CTLA4Ig gene transfer combined with a short course of FK506 therapy consistently induced donor-specific tolerance in a rat pancreas allotransplant model. Furthermore, we document that immunoregulatory cells could be involved in the maintenance phase of tolerance induced by this strategy.

Materials and methods:

Male Brown Norway (BN; RT1ⁿ), Wistar Furth (WF; RT1^u), and Lewis (LEW; RT1^l) rats, 8-10 weeks of age, were utilized. BN and LEW rats were purchased from Charles River Japan, Inc. (Kanagawa, Japan). WF rats were bred and maintained at Osaka University Animal Facilities. LEW rats were used as recipients, BN rats as donors, and WF rats as third-party donors. Pancreaticoduodenal grafts were transplanted into streptozotocin (65mg/kg; Sigma, St. Louis, MO) –induced diabetic LEW recipients as described previously (5). Graft function was monitored by daily measurement of blood glucose during the first 2 weeks and at least twice a week thereafter. Rejection was considered when the blood glucose level was over 200mg/dl for two consecutive days. Graft rejection was further assessed by histological examination.

Results:

Ad.CTLA4Ig transduced grafts combined with a short course of FK506 resulted in indefinitely prolonged survival (>156 days vs. 19.5 days with FK506 alone). CTLA4Ig was predominantly expressed in grafts on day 4. The expression was gradually diminished, and was only slightly detectable at day >100. The proliferative responses against BN antigen were remarkably enhanced among recipients with rejected grafts, but the T cells from tolerant recipients (>100 days) showed poor cytotoxic responses. On adoptive transfer assay, the splenic T cells of tolerant recipients were able to suppress the rejection of BN, but not third-party Wistar Furth (WF; RT1^u) heart in irradiated (480 cGy) LEW recipients. The percentage of CD4⁺CD25⁺ splenic T cells was significantly increased in tolerant recipients ($13.53 \pm 4.06\%$ vs. $6.06 \pm 0.56\%$ in

naïve rats).

Discussion:

In this study, we first demonstrated that CTLA4Ig gene transfer to the pancreaticoduodenal allograft combined with a short course of FK506 could induce donor-specific tolerance related to an active suppression mechanism. CTLA4Ig, a recombinant fusion protein, binds to murine B7 with high avidity and blocks pancreatic islet rejection by directly affecting T cell recognition of B7⁺ antigen-presenting cells (APCs) (6). Indeed, CTLA4Ig gene therapy has been effectively applied in various transplantation models. The strategy of transferring genes that encode CTLA4Ig protein capable of suppressing immune responses within the local microenvironment of the graft is of advantage to avoid systemic immunosuppression, because B7 molecules expressed on APCs are more effectively blocked within the graft (7). Recently, Grohmann et al. (8) reported that CTLA4Ig induces indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) expression in CD11c⁺ dendritic cells (DCs) from the murine spleen. In a model of T cell adoptive transfer, Mellor et al. (9) showed that CTLA4Ig completely blocks CD8⁺ T cell clonal expansion in an IDO-dependent manner. This evidence suggests that CTLA4Ig can reasonably be expected to function in tolerance induction in which the IDO mechanism might be involved.

As an additional important finding, a mild lymphocytic infiltration was found in the long-term accepted pancreatic graft. In the CTLA4Ig gene transfer to cardiac allografts from LEW.1W to LEW.1A rats, Guillot et al. (7) reported that local expression of CTLA4Ig could modulate the expression of activation markers associated with graft rejection. In this study, the persistent mononuclear infiltrate without parenchymal damage indicates the persistence of cellular responses against the grafted tissue, most likely reflecting the establishment of tolerogenic mechanisms. We hypothesize that a portion of the alloreactive clones might have been deleted from these graft-infiltrating cells, and an additional aspect of the mechanism may be interference with the cytokine cascade. Moreover, it is possible that suppressor cells are not only generated in the spleen but also in the graft itself and that their late appearance in the spleens of tolerant animals is due to delayed migration from the graft to the spleen. To clarify these points, further studies, especially a detailed analysis of immune responses of graft-infiltrating cells and cytokine expression, or phenotypic and functional analysis of the lymphocyte subpopulation in the grafts are needed.

In conclusion, CTLA4Ig gene transfer to the pancreaticoduodenal allograft combined with a short course of FK506 induces donor-specific tolerance. CTLA4Ig, the

immunoregulatory reagent produced locally, protects pancreatic grafts from alloimmune destruction during the early stage of acceptance. Subsequently, the appearance of splenic T cells with donor-specific suppressive capacity plays a pivotal role in maintaining tolerance. This strategy may have clinical applications for tolerance induction in pancreatic transplantation.

References:

1. Olthoff KM, Chen XD, Gelman A, Turka L, Shaked A. Adenovirus-mediated gene transfer of CTLA4Ig to liver allografts results in prolonged survival and local T-cell anergy. *Transplant Proc* 1997; 29:1030.
2. Yang Z, Rostami S, Koeberlein B, Barker CF, Naji A. Cardiac allograft tolerance induced by intra-arterial infusion of recombinant adoviral CTLA4Ig. *Transplantation* 1999; 67:1517.
3. Tomasoni S, Azzollini N, Casiraghi F, Capogrossi MC, Remuzzi G, Benigni A. CTLA4Ig gene transfer prolongs survival and induces donor-specific tolerance in a rat renal allograft. *J Am Soc Nephrol* 2000; 11:747.
4. Uchikoshi F, Yang ZD, Rostami S, et al. Prevention of autoimmune recurrence and rejection by adenovirus-mediated CTLA4Ig gene transfer to the pancreatic graft in BB rat. *Diabetes* 1999; 48:652.
5. Uchikoshi F, Ito T, Kamiike W, et al. Restoration of immune abnormalities in diabetic BB rats after pancreas transplantation. *Transplantation* 1996; 61:1629.
6. Lenschow DJ, Zeng Y, Thistlethwaite JR, et al. Long-term survival of xenogeneic pancreatic islet grafts induced by CTLA4Ig. *Science* 1992; 257:789.
7. Guillot C, Mathieu P, Coathalem H, et al. Tolerance to cardiac allografts via local and systemic mechanisms after adenovirus-mediated CTLA4Ig expression. *J Immunol* 2000; 164:5258.
8. Grohmann U, Orabona C, Fallarino F, et al. CTLA-4-Ig regulates tryptophan catabolism in vivo. *Nat. Immunol* 2002; 3:1097.
9. Mellor AL, Baban b, Chandler P, et al. Cutting Edge: induced indoleamine 2,3 dioxygenase expression in dendritic cell subsets suppresses T cell clonal expansion. *J Immunol* 2003; 171: 1652.

注：本研究は、2003年10月27日、「第39回日本移植学会」にて口演発表。

2004年5月16日、「American Transplant Congress」にて発表。

The manuscript has been accepted for publication as an Article in *Transplantation* on Jan 30th 2004.


作成日：2004年3月3日

2003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－

2004 年 3 月 7 日

財団法人 日 中 医 学 協 会
理 事 長 殿

研究者氏名 董 博鳴 
所属機関名 東北大学加齢医学研究所
指導責任者氏名 近藤 丘
職 名 教 授
所 在 地 〒 980-8575 仙台市青葉区星陵町 4-1
電話 022-717-8521 内線 8521

1. 研 究 テ ー マ

オリゴマイクロアレイを用いた肺癌の発生進展に関わる遺伝子異常の網羅的解析

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)

1. 第44回日本肺癌学会総会

予後因子としてのCT腫瘍面積遺残率についての検討

2. 95th Annual Meeting of American Association for Cancer Research

Computed tomographic image of small lung adenocarcinoma is associated with cell proliferation and microvascularization

(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

1. 三回目のマイクロアレイの結果を詳細に分析し、正常気道上皮細胞と肺癌細胞の mRNA expression が違う gene を target gene として選定し、RT-PCR 法を用いて新しい肺癌に関連する癌遺伝子を同定する。
2. 当施設で切除された肺癌標本から癌細胞をマイクロダイセクションし、1 で同定された癌遺伝子を同じ方法で検証する。
3. 遺伝子を単離した後、細胞株に導入し、機能の解析を行う。

4. 指導責任者の意見

研究者は、立案した研究計画に従い、30種類の肺癌細胞株と2種類の正常気道上皮細胞の培養を行い、これらから順次 RNA の抽出を遂行した。抽出した RNA を共同研究機関である中外製薬に委託し、マイクロアレイ解析に供した。用いたマイクロアレイには 12,000 以上の遺伝子がチップ上に配置されており、また、それぞれの遺伝子について、20 のプローブが配置されている。既に、アレイのハイブリダイゼーションが終了し、現在、得られた各遺伝子の expression pattern を解析中である。また、研究者は本研究を遂行しつつ、一方で、肺癌患者の CT 腫瘍面積遺残率と予後の関係についてさらに研究を深め、CT 所見と血管新生因子や細胞増殖因子、p53 遺伝子の状態との相関、ならびに予後との関連について検討を行い、CT 所見と相関する分子機構を明らかにした。これらの業績は、助成により期待された研究成果として十分なものであると考えられ、また、将来の研究テーマとしての継続性も有することから、研究者および日中両国にとって有益な研究を遂行することができたものと評価する。

指導責任者氏名

丸藤 正 印

5. 研究報告書

別紙「研究報告書の作成について」に倣い、指定の用紙で作成して下さい。

研究発表または研究状況を記録した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。

オリゴマイクロアレイを用いた肺癌の発生進展に関わる遺伝子異常の網羅的解析

研究者氏名 董 博鳴

中国所属機関 中国医科大学第一附属病院胸部外科

日本研究機関 東北大学加齢医学研究所呼吸器再建研究分野

指導責任者 教授 近藤 丘

共同研究者名 佐藤 雅美、桜田 晃、堀井 明

要 旨

手術療法、化学療法、放射線療法など色々な治療方法はあるにもかかわらず、肺癌の治療成績特に進行癌の治療成績は良好とは言えない。遺伝子治療は肺癌の新しい治療法として期待されているが、肺癌に関する遺伝子異常に関しては、いまだ不明の点が多い。本研究においては、肺癌細胞株および肺癌切除標本から RNA を抽出し、オリゴマイクロアレイを用いて発現の状態を確認する。異常の認められる場合、RT-PCR と塩基配列法によって塩基配列の異常を検出する。さらに、遺伝子を単離した後、細胞株に導入することで、機能の解析を行う予定である。

Key Words lung cancer, oligo nucleotide array, cancer specific exon splicing

緒 言

肺癌の罹患率と死亡率はともに著しく増加している。21 世紀には、さらに増加することが推定されている。手術療法、放射線療法、化学療法などが行われるが、特に進行癌の治療成績は良好とは言えない。1996 年に Roth らがレトロウィルスベクターを用いて、正常 p53 遺伝子を 9 例の肺腫瘍に注入し、3 例で腫瘍が退縮したことを報告した。遺伝子治療は肺癌の新しい治療法として期待されている。しかし肺癌に関する遺伝子異常に関しては、いまだ不明の点が多い。肺癌で高頻度に見られるものは p53 と RB のみで他の遺伝子異常の頻度は低い。肺癌の組織型は多彩で、これら遺伝子異常もその組織型別に論じる必要がある。急速に進歩している遺伝子工学手法により、肺癌に関する遺伝子の同定も期待されるようになってきた。1998 年に Hibi らは SAGE 法(serial analysis of gene expression)を用いて、扁平上皮癌 2 検体と正常気道上皮 2 検体で約 16,000 種の unique mRNA の発現を確認し比較した。肺癌で過剰発現をされているものとして報告された 2 遺伝子 PGP9.5 と B-myb は他臓器癌に比べ肺癌での発現が亢進していた。一方正常気道上皮で優位に発現されているものの解析はまれで、扁平上皮癌以外の組織型についての報告も多く見られない。

cDNA マイクロアレイ技術の開発によって、同時に数千の cDNA あるいは RNA 断片が一枚のチップの上に同定されるようになってきた。今回我々は Oligo nucleotide array (Affymetrix Co.) を利用し、肺癌組織(培養細胞)と正常肺組織の約 1 万種の mRNA を調べた。従来の cDNA マイクロアレイ技術と異なっていて、一つの遺伝子の cDNA について 20 個の oligonucleotide を用いているから、肺癌と関係する exon splicing (遺伝子以上の様式の一つで、今までの文献報告は非常に少ない)の検索が可能になってきた(今まで、この手段で癌関連する exon splicing を検索することは世界でも報告されていない)。

対象と方法

(一) オリゴマイクロアレイ技術を用いて、正常肺組織と肺癌組織(肺癌切除標本)、肺癌培養細胞の gene expression の差をスクリーンする。正常肺組織、肺癌組織(手術切除標本)と肺癌培養細胞の mRNA を抽出

し、それぞれオリゴマイクロアレイにて、蛍光にラベルされたシーケンス既知の塩基配列（人類正常細胞に見られる全 mRNA の相補的な塩基配列）とハイブリダイゼーションさせる。蛍光色のパターンによって肺癌 mRNA と正常肺組織 mRNA の発現差を調べる。肺癌で過剰発現しているものと正常肺組織で優位に発現されているものを肺癌遺伝子領域と癌抑制遺伝子領域に仮想され、癌抑制遺伝子の候補としてステップ二に用いられる。

（二）目的遺伝子領域のエクソン スプライシング タイプの同定。

- （1） 各目的遺伝子領域の正常な cDNA 塩基配列を NCBI (National Center for Biotechnology Information) に検索し、全エクソン配列をカバーできるように RT-PCR プライマーを数 pair 設計する。
- （2） 肺腺癌、扁平上皮癌、大細胞癌、小細胞癌、膀胱癌（コントロール グループ）の培養細胞それぞれ五種類を選んで培養する。
- （3） Oligotex mRNA Midi kit (Qiagen Inc.) 法を用いて、癌培養細胞と正常肺組織の mRNA を抽出する。
- （4） （3）で得られた mRNA を鋳型として Superscript II RT (Life Technologies, Inc) 法を用いて各癌培養細胞と正常肺組織の cDNA を逆転写する。
- （5） （1）で設計したプライマーを使って（4）で得られた cDNA に RT-PCR をかける。
- （6） 電気泳動法により RT-PCR 産物のバンドを検出する。
- （7） 正常肺組織による RT-PCR 産物のバンドと異なる肺癌培養細胞の RT-PCR 産物バンドに対して、DNA シーケンスを施行する。

（三）当施設に手術切除された肺腺癌、扁平上皮癌、大細胞癌、小細胞癌の切除標本を（二）の同様な方法で、目的領域のエクソン スプライシングを検索する。

結 果

1. 初回オリゴマイクロアレイ：

肺癌 cell line A549、子宮内膜上皮癌 cell line Ishikawa 3-H-12、繊維芽細胞癌 cell line RB24KY および正常肺組織の mRNA を抽出し、Affymetrix 社が開発した oligonucleotide microarray にて、約 6500 個の sequence 既知の遺伝子の表現型を調べた。その中から表現型が異なる 23 個の遺伝子を可能な癌特別 exon splicing が存在する target 遺伝子として選択した。

2. 32 個の cell line を培養して、Oligotex mRNA Midi Kit 法を用いて whole RNA を抽出し、Superscript II RT 法で cDNA を合成しました。その中に、正常気道上皮細胞 2 種、肺腺癌 7 種、扁平上皮癌 7 種、大細胞癌 2 種、小細胞癌 5 種、膀胱癌 5 種、繊維芽細胞癌と子宮内膜上皮癌それぞれ 1 種が含まれている。

3. 一回目の oligonucleotide microarray の再現性も確認する目的で、20 例のヒト肺癌標本から癌細胞を micro dissection し、二回目の microarray を行った。heterogeneous Nuclear Ribonucleoprotein I の結果のように、probe 1,2,3,4,8,9 の表現の強さに差が認められない部分がある一方で、probe 5,6,7,10,11,12,13 のように表現の強さが異なっている部分も認められ、ある程度 exon splicing の情報を反映できると思われた。(Fig.)

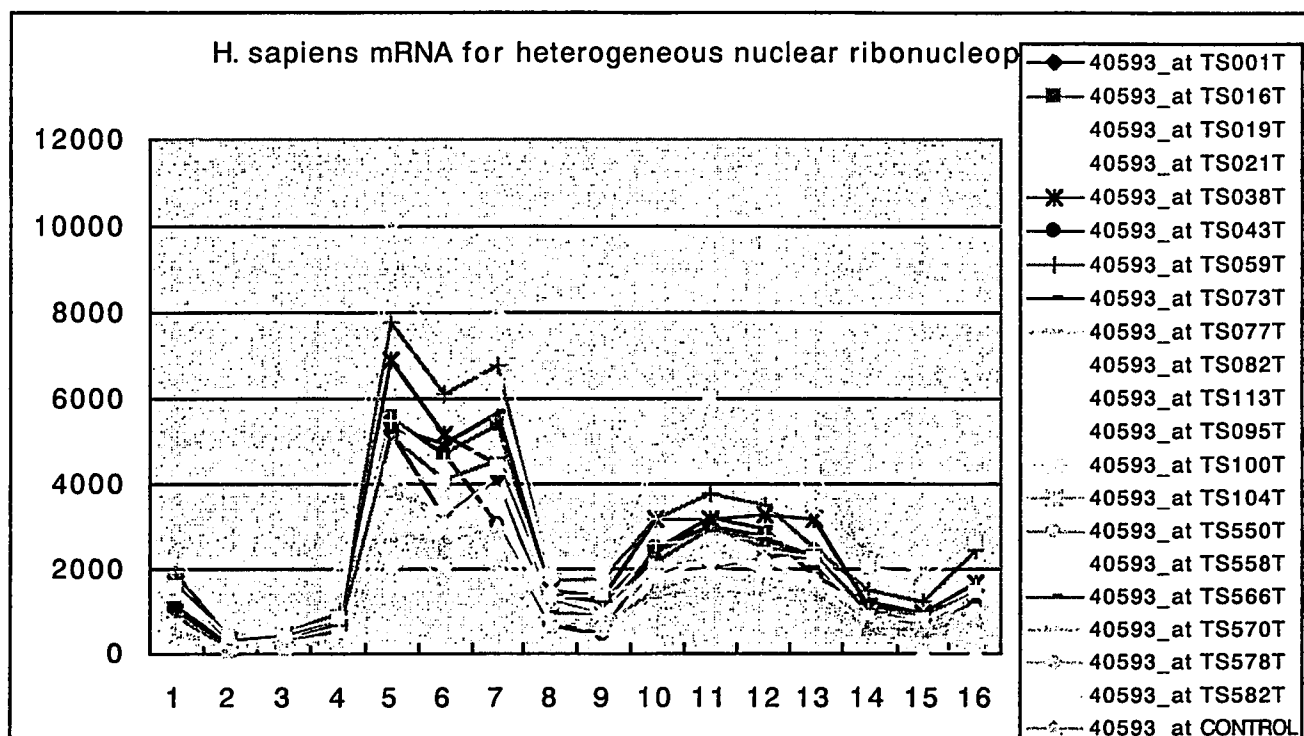


Fig. . Expression pattern of H. sapiens mRNA for heterogeneous nuclear ribonucleoprotein

4. しかし最近、Affymetrix 社より、今回実験に使われた probe set の配列と遺伝子上の場所が公表され、すべての遺伝子において probe set が均等に全配列をカバーしているわけではなく、ノーコーディング 3' 側の非常に狭い範囲に限っているものもあることが分ってきた。こうした結果を踏まえて、さらに多くの遺伝子の spot されたマイクロアレイを用いて、2 種の正常気道上皮細胞と 30 種の肺癌と膀胱癌の癌細胞から mRNA を抽出し、3 回目の oligo nucleotide microarray を行った。正常気道上皮細胞と癌細胞の遺伝子発現の差を直接比較することで、よりはっきりした結果がより多くの遺伝子において得られることが期待されている。現在は三回目のマイクロアレイの結果を分析している段階である。

教室内での研究発表のスライドのコピーも添付致します。

Identification of Cancer Specific Exon Splicing in Lung Cancer

Department of Thoracic Surgery, IDAC, Tohoku University

Department of Molecular Pathology, Tohoku University

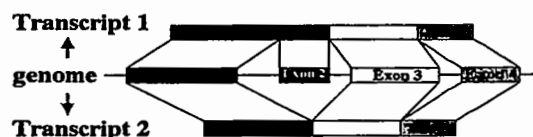
Background 1

1. The development and progression of lung cancer is a very complicated process that involves multiple genetic alterations.
2. Genetic alterations related to canceration
 - A. Oncogene activation (K-ras, myc family, etc.)
 - B. Inactivation of tumor suppressor gene (p53, RB, p16, DPC4, bcl-2, etc.)
- 3) Somatic mutation:
 - a) missense mutation, point mutation
 - b) non sense mutation.
 - c) frame shift mutation
- 4) Loss of chromosome
- 5) Epigenetic change of promoter
 - a) methylation
- 6) Genetic alteration caused by translocation of chromosome
- 7) Cancer specific exon splicing
- C. Mutation of gene of DNA repair enzyme

Objective for this study

To find out the lung cancer specific exon splicing based on a gene screening method using oligonucleotide microarray

Background 2



Materials and Methods 1

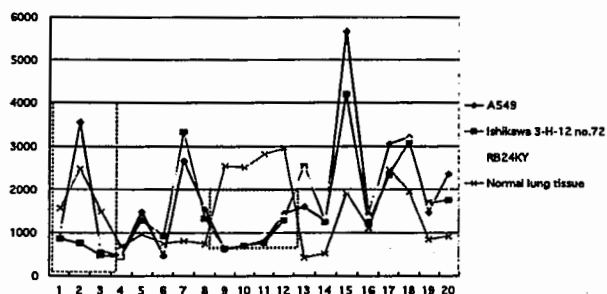
About 6,500 sequences known genes' expression patterns have been compared among the mRNAs of lung tumor cells line A549, endometrial cancer cell line Ishikawa 3-H-12, fibroblastic tumor cell line RB24KY and normal lung tissue using oligonucleotide microarray developed by Affymetrix.

23 genes who had different expression patterns were selected to be the candidates for cancer specific exon splicing searching undertaken in our experiment.

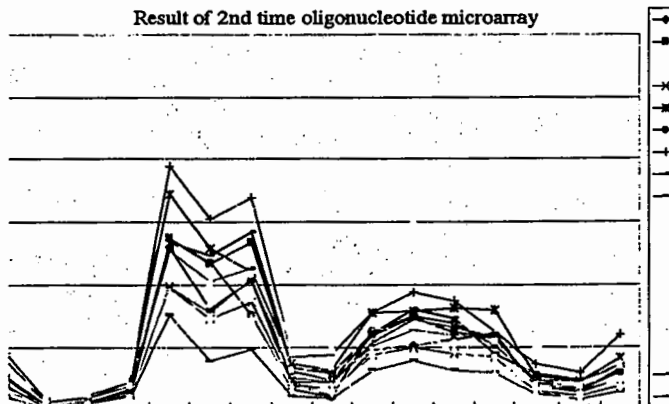
Materials and methods 2

- (1). Preparation for RT-PCR : primer design and PCR condition.
- (2). 32 cell lines (2 normal lung epithelial, 7 adenocarcinoma, 2 large cell carcinoma, 7 squamous cell carcinoma, 5 SCLC, 7 pancreatic cancer, 1 fibroblast, and 1 endometrial) are cultured and harvested when they were about 80% confluent.
- (3). The whole RNA was isolated from cell pellets using the Oligotex Direct mRNA kit and the cDNAs were reversed using random primers kit (Superscript II RT).
- (4). RT-PCR and DNA sequencing : cell lines

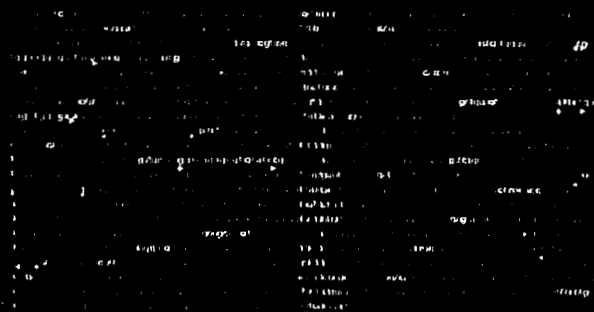
Heterogeneous Nuclear Ribonucleoprotein1



Result of 2nd time oligonucleotide microarray



Human transducin-like protein(HTLP) mRNA 16p13.3



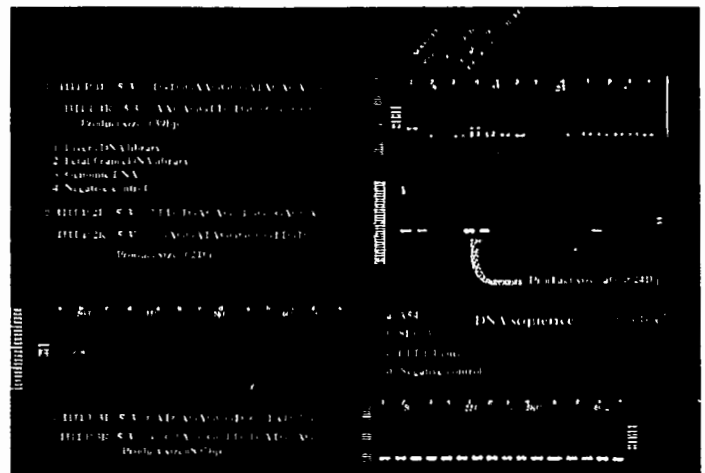
Probes used to identify Heterogeneous Nuclear Ribonucleoprotein

HQ-U95 Probe Set: HQ-U95 Probe Set: HQ-U95A2

ID: HQ-U95A2 40593 (Antisense) Probe Set Display

Probes

Order	Serial	Probe X	Probe Y	Probe Interrogation	Probe Sequence(5'-3')
1	604	466	3054		ATACCTGTGTGAGACCCGAGGGGC
2	219	436	3112		TATTTTGTCTAACAGCAATCCAGGC
3	218	436	3113		ATTTTGTCTAACAGCAATCCAGGC
4	466	469	3136		CTCAGTATTGTGACCCGGAGCCAC
5	548	437	3176		CATTCCGTTGCCCTACCCGATGGCT
6	497	511	3183		TTGCCCTACCCGATGGCTTGTGACG
7	294	369	3189		TACCGATGGCTTGTGACCGGAGA
8	497	191	3199		CTTGACCGCGGAGAGAACCGATTA
9	516	363	3201		TGTGACCGCGGAGAGAACCGATTA
10	276	433	3246		CTTGTCTAGCTCTGTGTTCTGTG
11	5	623	3249		GTCTAGCTCTGTGTTCTGTGAC
12	179	487	3250		TCTAGCTCTGTGTTCTGTGACG
13	629	75	3255		CTCTGTGTTCTGTGACCGCTGA
14	58	583	3283		GCAGTTGGCCAGTCTGTACCTGGA
15	550	547	3286		GGTTGGCCAGTCTGTACCTGGACT
16	543	551	3294		AGTCTGTACCTGGACTTGAATAAA



Human cDNA for HLA-D class II antigen DO beta chain
Length: 1322 BP, A Count:304, C Count:320, G Count:337, T Count:361

Characteristics	Sequence	Count
aa/tcattct	gaagagctg	60
gttcggg	gttcggg	120
ccatgctca	agccagagc	180
acttcacaa	cggagacaa	240
agtagtacg	tttcagagt	300
cgatgctga	gcagtgagc	360
atggagctg	tagacacaa	420
acccagagt	gacagtgac	480
acgtctctg	gacagtgac	540
agagagagc	agcagtgac	600
agacagagt	gacagtgac	660
atccatccg	cctcagagc	720
agagagagt	gcagtgagc	780
gactgctat	ccagtagag	840
ag agtctgac	agctctctc	900
ttcggagcct	gagagtgac	960
aggtcaagt	ttcggagac	1020
tacatcata	atccatccg	1080
ttccagccc	aatcatctt	1140
ttccagccc	aatcatctt	1200
agtcacagt	ttctttcac	1260
ca/	ttctttcac	1320

Question:

What information
can be provided by this kind of Probes?

To find:
Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs)?

Human cDNA for HLA-D class II antigen DO beta chain
Length: 1322 BP, A Count:304, C Count:320, G Count:337, T Count:361

Characteristics	Sequence	Count
aa/tcattct	gaagagctg	60
gttcggg	gttcggg	120
ccatgctca	agccagagc	180
acttcacaa	cggagacaa	240
agtagtacg	tttcagagt	300
cgatgctga	gcagtgagc	360
atggagctg	tagacacaa	420
acccagagt	gacagtgac	480
acgtctctg	gacagtgac	540
agagagagc	agcagtgac	600
agacagagt	gacagtgac	660
atccatccg	cctcagagc	720
agagagagt	gcagtgagc	780
gactgctat	ccagtagag	840
ag agtctgac	agctctctc	900
ttcggagcct	gagagtgac	960
aggtcaagt	ttcggagac	1020
tacatcata	atccatccg	1080
ttccagccc	aatcatctt	1140
ttccagccc	aatcatctt	1200
agtcacagt	ttctttcac	1260
ca/	ttctttcac	1320

RT-PCR and Sequences were performed on
15 human genomic DNA to find if SNPs exit
among the area of probe 11-probe 13



Result: No new SNP was found!!!!

More tests are necessary to verify the result
of oligo nucleotide microarray


- 2 normal lung epithelial cell lines and 30 cancer cell lines have been sent to the Roche company for the 3rd. Time Oligo nucleotide microarray test.
- Other RT-PCR and Sequence will be undertaken to prove the result of Oligo nucleotide microarray.

2003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－

2004年3月6日

財団法人 日中医学協会
理事長 殿

研究者氏名 徐 輝 
所属機関名 東北大学大学院歯学研究科
指導責任者氏名 大家 清
職 名 教授
所 在 地 〒980-8575 仙台市青葉区星陵町4-1
電 話 022-717-8303 内線 8303

1. 研究テーマ

口腔内インプラント材料の生体内安定性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)

12th EAO Annual Scientific Congress (October 9-11, 2003, Vienna, Austria)

Grafting of deproteinized bone particles inhibits bone resorption after maxillary sinus floor elevation.

(2) 学会誌等に発表した論文 ☒ 有 ・ 無 (雑誌名・論文名)

Journal of Oral Pathology & Medicine, 32 (8): 499-501, 2003.

Pleomorphic adenoma of the submandibular salivary glands with marked ossification.

Clinical Oral Implants Research, 15 (1): 126-133, 2004.


Grafting of deproteinized bone particles inhibits bone resorption after maxillary sinus floor elevation.

3. 今後の研究計画

インプラントの固定には、骨の調和を達成することが基本的要件の一つである。低密度の骨においては適切な固定を達成するのが難しいことが多い。これまでの長期経過の実験的研究で、再生骨は吸収され、補填材周囲組織に脂肪組織が多くなり、緻密骨はほとんど消失した、その原因に再生骨への栄養血管の育成の不十分さが考えられた。今後の研究目的として、再生骨の臨床的な長期安定性の保持に注目したい。VEGF はその増殖作用が血管内皮細胞に特異的であり、遺伝子治療を考えていくうえで理想的な因子であると考えられている。より早期に安定した骨形成と長期の骨の維持を目指すために、血管新生療法として、血管内皮増殖因子(VEGF)を用いて実験を行う。

4. 指導責任者の意見

徐輝君は、大学院では、文字通り休日返上で昼夜を問わず研究に取り組んで、同僚の日本人の院生以上の成果を納めている。2003 年度の貴協会の助成金を受け、研究に集中することを可能にし、平成15年度の「東北大学総長賞」を授与されることになった。現在投稿中の論文には、日中医学協会助成金によるところが多く、感謝しています。徐輝君の研究成果は、国際的にも認められ、2003 年には、インプラントでは世界で一番権威のあるヨーロッパ 12th EAO Annual Scientific Congress で発表し、徐輝君は既に研究者としての能力を身に付け、今後が期待される逸材です。

指導責任者氏名 大 家 清 

5. 研究報告書

別紙「研究報告書の作成について」に倣い、指定の用紙で作成して下さい。

研究発表または研究状況を記録した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。

口腔内インプラント材料の生体内安定性に関する実験的研究

研究者氏名	徐 輝
中国所属機関	吉林大学口腔医学院矯正科
日本研究機関	東北大学大学院歯学研究科口腔病理学
指導責任者	教授 大家 清
共同研究者名	清水 良央

Abstract

This experimental study evaluated the long-term outcome of deproteinized bone particles in a rabbit model for maxillary sinus augmentation. Histologically, 8 weeks after implantation, large amounts of newly formed bone showed many interconnections and appeared in most parts of the implant cavity. Sixty-four weeks after implantation, most of the newly formed bone in the augmented spaces had been resorbed. Only a few thin, and slender regions of newly formed bone were embedded in fatty tissue. Histomorphometric analysis revealed a significant decrease in bone area and a significant increase in bone marrow space area with time. There was no significant change in the deproteinized bone particle area. We conclude that deproteinized bone particles do not resorb with time and that the newly formed bone in the augmented space after implantation is not stable on a long-term basis in rabbits undergoing maxillary sinus augmentation.

Key Words sinus augmentation; deproteinized bone; particle; rabbit

Introduction

Sinus augmentation is an established method used to enhance vertical bone height in the posterior region of the maxilla, thereby increasing primary stability before implant insertion. Various materials have been used for bone grafts in sinus lift operations designed to increase vertical bone height and promote osteogenesis.

Deproteinized bone, one type of xenograft, has been shown to be a safe and biocompatible bone graft material with osteoconductive properties. It is frequently used for maxillary sinus lift procedures because of its natural morphologic characteristics, complete deproteinization of inorganic components, and lack of antigenicity. Several animal studies have shown this material to be promising as compared with other bone graft materials. However, the long-term outcome of deproteinized bone particles in the augmented maxillary sinus is not well understood.

We therefore histologically and histomorphometrically evaluated the long-term outcome of deproteinized bone particles in an experimental model of maxillary sinus augmentation.

Material and methods

Surgical procedures

Twenty adult male Japanese white rabbits (average weight, 3.0 kg) were used. The rabbits were anesthetized with pentobarbital sodium (0.5 mg/kg) intravenously, and 0.5 ml of 1% lidocaine with epinephrine (1:100,000) was injected subcutaneously in each surgical field for local anesthesia. The nasal bone and nasoincisor suture line were exposed via a perpendicular incision. With the use of a round bur, a nasal bone window was outlined and a fenestra was made by osteotomy during

continuous cooling with sterile saline solution. Care was taken during this procedure to avoid damaging the antral mucosa. Once the outline was completed, a Freer elevator was used to gently push the antral mucosa inward. The mucosa was then elevated from the floor, lateral walls, and medial wall of the antrum to provide a large compartment for graft placement. The space was filled with the deproteinized bone particles. The particles were gently packed into the cavity without compression. The defect was covered with a membrane (Bio-Gide, Geistlich, Wolhusen, Switzerland) to prevent fibrous connective tissue ingrowth into the augmented space.

Tissue preparation

The rabbits were anesthetized intravenously with pentobarbital sodium and were killed 4, 8, 16, 32, and 64 weeks after operation. For histological examination, the rabbits were exsanguinated and perfused via the jugular veins with 2% paraformaldehyde solution in 0.1 M cacodylate buffer (pH 7.4). The implant sites were dissected free, fixed in the same solution for 48 hours at 4°C, and decalcified with 10% ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) at 4°C. The specimens were then dehydrated in a graded series of ethanol, embedded in paraffin, and sliced into sections about 3 μ m thick. The sections were stained with hematoxylin-eosin and examined by light microscopy.

Histomorphometric analysis

Each image was copied on color reversal film, digitized as a 256 \times 256 array of 8-bit density values, and transferred to a microcomputer for histomorphometric analysis. The Cadkey Image (Cadkey System Corp., Tokyo, Japan) program was used for analysis. The following histomorphometric measurements were made: bone area (percentage of newly formed bone area to total measured area); bone marrow space area (percentage of bone marrow space area to total measured area); augmented height (maximal height of the augmented space); and particle area (percentage of particle area to total measured area).

Statistical analysis

The statistical significance of differences between implantation times was analyzed by analysis of variance (ANOVA) with Tukey's method. The level of statistical significance was defined as $p < 0.05$. All the data are expressed as means \pm standard deviation.

Results

Histological findings

4 weeks after implantation

Thick newly formed bone was observed adjacent to the cortical bone wall of the space. There was a tight interface between the newly formed bone and particles, without any gaps. In the center of the cavities, the particles were surrounded by fibrous connective tissue.

8, 16 weeks after implantation

Eight weeks after implantation, large amounts of newly formed bone showed many interconnections and appeared in most parts of the cavities. New formed bone was present between and around the deproteinized bone particles. Bone marrow was now developing in augmented space and sporadically communicated with the cortical bone wall of the cavity. Sixteen weeks after implantation, a larger bone marrow space was found in the augmented space.

32, 64 weeks after implantation

Thirty-two weeks after implantation, the thickness of the newly formed bone had decreased, and large bone marrow spaces were frequently seen. Sixty-four weeks after implantation, most of the newly formed bone in the augmented spaces had been resorbed. Only a few thin, slender regions of newly formed bone were embedded in fatty tissue. Bone marrow space containing many fat cells

was present in most parts of the cavities.

Histomorphometrical analysis

Bone area

Bone area significantly increased from 4 to 8 weeks, and then significantly decreased from 16 to 64 weeks. There was no significant difference between 8 and 16 weeks. Significant differences were observed between 4 and 8 weeks ($p < 0.01$), 4 and 16 weeks ($p < 0.01$), 4 and 64 weeks ($p < 0.001$), 8 and 32 weeks ($p < 0.001$), 8 and 64 weeks ($p < 0.001$), 16 and 32 weeks ($p < 0.001$), 16 and 64 weeks ($p < 0.001$), and 32 and 64 weeks ($p < 0.01$) after implantation.

Bone marrow space area

Bone marrow space area significantly increased with time. Significant differences were observed between 4 and 16 weeks ($p < 0.01$), 4 and 32 weeks ($p < 0.001$), 4 and 64 weeks ($p < 0.001$), 8 and 32 weeks ($p < 0.001$), 8 and 64 weeks ($p < 0.001$), 16 and 32 weeks ($p < 0.001$), 16 and 64 weeks ($p < 0.001$), and 32 and 64 weeks ($p < 0.001$) after implantation.

Augmented height and particle area

Augmented height and particle area did not change significantly with time.

Discussion

Deproteinized bone, a pure anorganic bone graft material, is safe and has been shown to have many advantages over other materials in experimental models. This material is thought to be resorbed with time. In our study, however, the deproteinized bone particles were apparently unaffected by remodeling. There was no significant change in particle area from 4 to 64 weeks. This finding suggests that deproteinized bone particles are not resorbed with time.

Biomechanical studies have found that the stability of implants is related to the mechanical properties of the surrounding bone. For instance, implant stability is better in lamellar bone than in cancellous bone. Therefore, an understanding of the different quantities and qualities of newly formed bone is important. Another important determinant of long-term outcome in patients who undergo sinus augmentation is maintenance of augmented height. This is particularly important if an implant is lost or further implant placement is considered in the future. In our study, there was an apparent early increase and subsequent decrease in bone area, but the augmented height was unchanged with time. The decrease in bone area was accompanied by an increase in marrow adipose tissue.

Bone loss associated with conditions such as osteoporosis, age-related osteopenia, or immobilization may be accompanied by an increase in marrow adipose tissue. The role of adipocytes in marrow is not yet understood, but an excess of marrow adipose tissue is considered to negatively affect the long-term mechanical strength of the skeleton. It is often difficult to obtain implant anchorage, in bone that is not very dense.

Biochemical studies have suggested a relation between mechanical stress and bone metabolism. Tissue is likely to mature after functional loading. However, information on the optimal time for implantation is scant. On the basis of bone remodeling, 8 weeks after grafting is regarded to be an appropriate time for implant placement in this experimental model.

Conclusion

Deproteinized bone particles are not resorbed with time. Newly formed bone in the augmented space after the deproteinized bone implantation is not stable on a long-term basis in rabbits

undergoing maxillary sinus floor elevation.

References

1. SMILER DG, JOHNSON PW, LOZADA JL, MISCH C, ROSENLIGHT JL, TATUM OH Jr, WAGNER JR. Sinus lift grafts and endosseous implants. Treatment of the atrophic posterior maxilla. *Dent Clin North Am* 1992; 36: 151-188.
2. WETZEL AC, STICH H, CAFFESSE RG. Bone apposition onto oral implants in the sinus area filled with different grafting materials. A histological study in beagle dogs. *Clin Oral Implants Res* 1995; 6: 155-163.
3. MATSUDA M, KITA S, TAKEKAWA M, OHTSUBO S, TSUYAMA K. Scanning electron and light microscopic observations on the healing process after sintered bone implantation in rats. *Histol and histopathol* 1995; 10: 673-679.
4. BERGLUNDH T, LINDHE J. Healing around implants placed in bone defects treated with Bio-Oss. An experimental study in the dog. *Clin Oral Implants Res* 1997; 8: 117-124.
5. HÄMMERLE CH, OLAH AJ, SCHMID J, FLÜCKIGER L, GOGOLEWSKI S, WINKLER JR, LANG NP. The biological effect of natural bone mineral on bone formation on the rabbit skull. *Clin Oral Implants Res* 1997; 8: 198-207.
6. JENSEN SS, AABOE M, PINHOLT EM, HJORTING-HANSEN E, MELSEN F, RUYTER IE. Tissue reaction and material characteristics of four bone substitutes. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1996; 11: 55-66.
7. HÜRZELER MB, QUINONES CR, KIRSCH A, GLOKER C, SCHÜPBACH P, STRUB JR, CAFFESSE RG. Maxillary sinus augmentation using different grafting materials and dental implants in monkeys. Part I. Evaluation of anorganic bovine-derived bone matrix. *Clin Oral Implants Res* 1997; 8: 476-486.
8. HAAS R, DONATH K, FÖDINGER M, WATZEK G. Bovine hydroxyapatite for maxillary sinus grafting: comparative histomorphometric findings in sheep. *Clin Oral Implants Res* 1998; 9: 107-116.

作成日：2004年2月19日

Grafting of deproteinized bone particles inhibits bone resorption after maxillary sinus floor elevation

Hui Xu, Yoshinaka Shimizu, Kiyoshi Ooya

Tohoku University Graduate School of Dentistry, Sendai, Japan

Introduction

Maxillary sinus floor augmentation is an established method for harvesting sufficient vertical bone from the posterior region of the maxilla to achieve good primary stability before implant insertion. Various graft materials, including autografts, allografts, alloplasts, and xenografts, have been used for sinus augmentation to increase bone volume and height. However, some materials, such as freeze-dried demineralized bone and autogenous bone, cannot withstand sinus pressure during the first several weeks and lose density and height over time. In recent years, sinus augmentation using deproteinized bone has been successful both in animal-based research work with monkeys, dogs, sheep and rabbits and in therapeutic applications in humans. The present study was designed to examine the value of deproteinized bone particles on bone resorption in rabbits undergoing maxillary sinus grafting.

Material and methods

Experimental animal

Adult male Japanese white rabbits (average weight, 3.0 kg)

Preparation of bone graft materials

The deproteinized bone was prepared according to the method described by Matsuda et al.

1. Removal of protein (1% NaOH, H_2O)
2. $600^\circ C$ (3.5hrs) \rightarrow $1,100^\circ C$ (3.5hrs)
3. Particle size: 300-500 μm

Histomorphometric analysis

Augmented height (the maximal height of the augmented space)

Bone area (percentage of newly formed bone area to total measured area)

Osteoclast number (average number of osteoclasts per millimeter of bone)

Particle area (percentage of particle area to total measured area)

Surgical Procedures

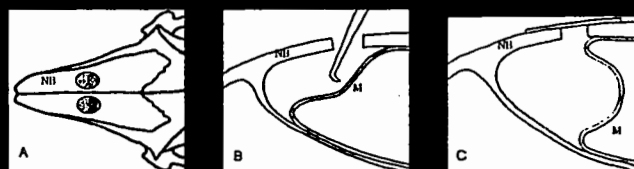


Figure 1. Schematic drawing of the surgical procedures. (A) The trephine is rotated on the dorsal surface of the rabbit skull. (B) The elevated sinus membrane. (C) The sinus cavity filled with materials. NB: nasal bone; L: lacrimal; M: maxilla.

Results

Histological findings

2w after implantation

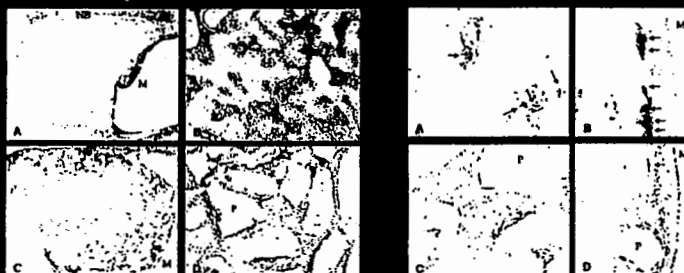


Figure 2. Histological findings at 2 weeks after implantation. A & C: hematoxylin-eosin (125 \times); B & D: 10 \times .

10w after implantation

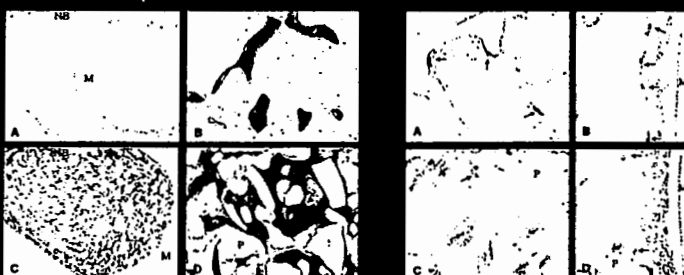


Figure 3. Histological findings at 10 weeks after implantation. A & C: hematoxylin-eosin (125 \times); B & D: 10 \times .

A & B: blood clots group; C & D: deproteinized bone particle group. NB: nasal bone; M: elevated sinus membrane; P: particle. Arrows: positive TRAP-stained osteoclasts.

Conclusion

Our results demonstrate that slowly resorbed deproteinized bone particles promote the stable augmentation of the maxillary sinus floor and inhibit the resorption of the newly formed bone.

Histomorphometric analysis

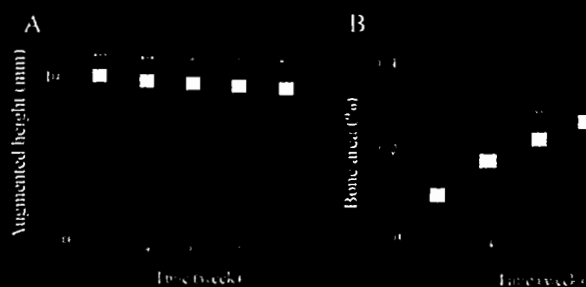


Figure 4. Histomorphometric measurement of augmented height (A) and bone area (B). \square : blood clots group; \blacksquare : deproteinized bone particle group. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; n = 10.

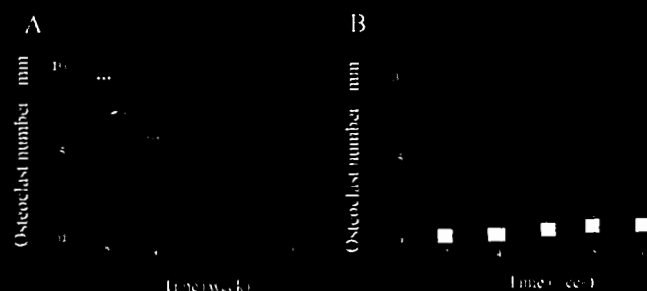


Figure 5. Histomorphometric measurement of osteoclast number. (A) blood clots group; (B) deproteinized bone particle group. \square & \blacksquare in the augmented space; \square & \blacksquare adjacent to the elevated sinus membrane side. * $p < 0.001$; n = 10.



Figure 6. Histomorphometric measurement of particle area (n = 10).

2003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－

2004年3月12日

財団法人 日中医学協会
理事長 殿

研究者氏名 宋 文群
所属機関名 神奈川歯科大学 口腔衛生学教室
指導責任者氏名 荒川 浩久
職 名 教授
所 在 地 〒238-8580 神奈川県横須賀市稲岡町 82
電 話 046-825-1500 内線 2462

1. 研 究 テ ー マ

調理による飲食品中フッ化物濃度および含有量の変化について

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52回 日本口腔衛生学会・総会にて ポスター発表

演題 調理による飲食品中フッ化物濃度および含有量の変化について

(2) 学会誌等に発表した論文 有 ・ ☒ 無 (雑誌名・論文名)

2004年3月中 神奈川歯学 投稿予定

3. 今後の研究計画


実験Ⅱと同様な調理方法で、食品を増やしてF濃度を測定する。実験Ⅲと同じ食材で沸騰させて煮た場合、焼く、蒸すという調理を行って総F量の変化を比較する。

4. 指導責任者の意見

日本人の一日フッ化物摂取量の推定は栄養所要量の見直しの上からも急務である。研究者が記しているように、現在では食品リストからの推定と陰膳法が行われているが、前者は調理によりフッ化物が消失する可能性が示唆されており、正確性を疑問視する意見もある。したがって、地道に各食品の生の状態でのフッ化物濃度測定を行うことの努力が意味を持たないのではと心配されていた。

今回の研究結果により、沸騰という極端な調理法でなければ、生の食品のフッ化物濃度と摂取重量からフッ化物摂取量を推定できることが示され、今後とも各食品中のフッ化物濃度の決定を進めていく価値が証明された。

ただし、今後の研究計画にもあるように、他の食品と調理法による追試と確認が必要である。

指導責任者氏名 荒川 浩久 

5. 研究報告書

別紙「研究報告書の作成について」に倣い、指定の用紙で作成して下さい。

研究発表または研究状況を記録した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。

調理による飲食品中フッ化物濃度および含有量の変化について

研究者氏名 宋 文群
日本研究機関 神奈川歯科大学口腔衛生学教室
指導者氏名 荒川浩久
共同研究者 戸田真司

要 旨

適切なフッ化物応用は齲蝕予防に大きな効果をもたらす。フッ化物応用に際しては、フッ化物一日摂取量が根拠となるため、現在は食品リストから見積もる方法と陰膳法により算定されている。前者は各食材の生の状態のフッ化物濃度と摂取重量からの見積もりで、後者は調理後の食餌中のフッ化物濃度と摂取重量からの見積もりである。本研究の目的は、調理による飲食品中フッ化物濃度と含有量の変化を調べ、より正確なF摂取量の推定法を検討することである。はじめに、沸騰および恒温維持による水中フッ化物濃度と含有量の変化を比較した。次に市販魚肉を材料に、生の魚肉中のフッ化物濃度と焼く、茹でる、電子レンジ加工、蒸すなどした後のフッ化物濃度を比較した。さらに、野菜、魚肉、牛乳などを食材として、煮込みおよび電子レンジ加工で調理前後のフッ化物濃度と含有量を測定した。その結果、沸騰により、水中フッ化物濃度は高くなるものの、総フッ化物含有量は低下した。魚肉中のフッ化物濃度は電子レンジ加工による変化がもっとも著しく、蒸すによる変化は少なかった。野菜、魚肉、牛乳を食材として煮込むまたは電子レンジで調理後の総フッ化物含有量と生から見積ったそれと比較したところ、有意な変化は認められなかった。このことから、食品リストからフッ化物摂取量を推定する方法の有用性が示唆された。しかしながら、今回の研究で用いた飲食品の種目は少なく、調理方法も少なかったため、今後更なる研究の必要がある。

Key Words フッ化物応用, フッ化物摂取量, 食品, duplicate diet (陰膳法), 調理

緒 言：

最近の齲蝕減少傾向にフッ化物（以下Fとする）応用が大きな貢献をした。一方、Fを過剰に摂取すると（1,2）歯のフッ素症が発生する可能性がある。F応用の理念は、不要な副作用を生じさせることなく、最大の齲蝕予防効果をもたらすことにある。それには、F摂取量をバランスよくコントロールする必要がある。Fの一日摂取至適量はWHOにより0.05-0.07mg/一日/kg体重とされている（3）。F一日摂取量の算定には調理前の各飲食品のF濃度と摂取重量から見積もる方法と摂取する食餌そのものから見積もる方法（4-7）がある。前者の場合は、F摂取量の見積もりが不正確になるおそれがある。Guha-Chowdhuryら（7）はduplicate-diet方式で3-4歳児の24時間F摂取量を測定したところ、小児の一日F摂取量は食品消費リストから推定した一日F摂取量より低いと報告した。今までの報告では、同じ材料を用いて調理前後のF含有量を測定したデータはほとんどない。そこで、本研究では、摂取F量を正確に推定する方法を検討することを目的に、調理方法が飲食品中F濃度に与える影響について検討した。

対象と方法：

実験Ⅰ：加熱による水のF濃度変化

家庭用ガスレンジと調理用鍋を用いて、F濃度1ppmの水1,000ml（総F含有量1,000 μ g）を強火で沸騰させた後、容器に蓋をしたまま（以下蓋付き）沸騰状態を60分間保ちながら5分ごとに2mlずつ、累計13のサンプルを採取した。同時に鍋中の残留水量を計測した。サンプルは室温まで徐冷後、F複合電極に

てF濃度を測定した。また、沸騰後に鍋の蓋をはずした状態（以下蓋なし）においても同様の実験を行った。続いて、F濃度 1ppm の水 500ml を恒温水槽にて 60℃まで加熱し、蓋なしで 60℃を維持しながら、前記同様に、60分まで累計 13 のサンプルを採取してF濃度を測定した。

実験Ⅱ： 調理による魚肉中F濃度の変化

市販のマグロ魚肉を5分間焼く、茹でる、電子レンジで加熱する、蒸すという調理を加えたものと、生の魚肉の計5つのグループ（各グループとも n=3）をつくり、それぞれ 80℃の恒温槽にて 72 時間乾燥後粉碎し、微量拡散法（8）にてF濃度を測定した。

実験Ⅲ： 調理前後のF含有量の比較

市販の玉葱、ジャガイモ、鮭を乾燥後粉碎して微量拡散法にてF濃度を測定した。牛乳は直接微量拡散法にてF濃度を測定した。次に、上記4つの飲食品を表1に示した分量で調理（蓋付きで1時間煮込むまたは電子レンジで20分加熱）した後、室温まで徐冷し、上記同様の微量拡散法にてF濃度を測定した。

結 果：

実験Ⅰ： 加熱による水のF濃度変化

100℃まで加熱後60分までの平均蒸発水量は、蓋付き（平均 46.9ml/5分）と蓋なし（平均 72.4ml/5分）で有意な差があった（ $p<0.01$ ）。5分ごとのサンプル中F濃度は、サンプル採取開始後徐々に上昇し、60分では蓋付きで平均 1.89ppm、蓋なしで平均 4.43ppm になり、統計学的に差があった（ $p<0.05$ ）。しかし、容器水中総F量は時間の経過とともに減少し、60分後にはそれぞれ 798.6 μ g（初期の 79.9%）と 487.8 μ g（初期の 48.8%）になり、蓋なしは蓋付きに比べて有意に減少した（ $p<0.001$ ）。

一方、F濃度 1ppm の水 500ml を 60℃で維持したものの平均蒸発水量は 2.25ml/5分であった。F濃度に大きな変化は認められず、30分後が 1.04ppm、60分後が 1.08ppm であり、容器水中総F含有量にもほとんど変化が認められなかった。

実験Ⅱ： 調理による魚肉中F濃度の変化

調理法により魚肉中F濃度に変化が認められた（図1）。生と比較して電子レンジ加熱により最も著しく上昇した（ $p<0.01$ ）。また、電子レンジと焼く（ $p<0.01$ ）ならびに茹でる（ $p<0.05$ ）との間にも有意な差を認めた（多重比較）。

実験Ⅲ： 調理前後のF含有量の比較

調理前の各飲食品中のF濃度と分量から見積もった総F量は 24.04 μ g であった。一方、1時間煮込んだ食品のF濃度から計算した総F量は 23.68 μ g、電子レンジで加工した食品のF濃度から計算した総F量は 23.08 μ g であり、ほぼ近似していた（表1）。

考 察：

加熱により水分は蒸発する。また、食材中のFは調理方法により消失の程度が異なる。本研究では、加熱、とくに沸騰を継続することにより水分が消失して水中のF濃度は高くなり、とくに蓋なしで水中総F含有量は大きく減少した。しかし、60℃で維持した場合は著明な変化はなかった。このことから、Fの一部は沸騰による水の消失とともに空气中に排出された可能性が示唆された。実験Ⅱの調理法によりF濃度は変化するものの、実験Ⅲの調理前後の総F含有量を比較したところ、生からの見積りと調理後ではそれほど差が認められなかった。Guha-Chowdhury ら（7）は duplicate-diet 方式で 3-4 歳児の 24 時間F摂取量を測定したところ、小児の一日F摂取量は水道水F添加地区でも 0.036 mg/day/kg であり、食品消費リストから推定した一日F摂取量より低かったと報告した。しかし、今回の研究では、生の飲食品から見積もったF含有量と調理後のF含有量との間に有意な差はみられなかった。これは、蓋付きでの1時間の煮込みおよび20分間の電子レンジによる加熱ではFはそれほど消失しないことを示すものである。したがって、沸騰またはそれに近い条件での調理の場合は、Fが消失することは考えられるものの、一般的な調

理法によって総F含有量はそれほど変化しないものと思われる。日本においても、乳児または成人における一日F摂取量に関する研究はいくつかある。友利ら（9,10）は市販乳児用食品を材料にそれらのF含有量から乳児の一日F摂取量を推定した。小宮山ら（4-6）は食事と同様なものを用意し、duplicate diet方式でそのF含有量から計算して一日F摂取量を得た。一方、Market baskets調査から食品リストを得て、F摂取量を推定する方法は、出生後2歳もしくは3歳未満の乳児の場合に多く使用されている（11-16）。しかし、食品加工過程中的F消失、加熱、水分の蒸発などが一日摂取F量の見積りに影響を与えることが考えられるため、陰膳法はより正確に摂取F量を見積ることができると思われる。しかし、本研究から、食品リストからの摂取F量の推定も正確であることが示され、各食品中のF濃度の決定のための研究も意義のあるものと思われた。今後は、種々な食品を材料に種々な調理法を試み、生からの見積りの妥当性を追試したい。

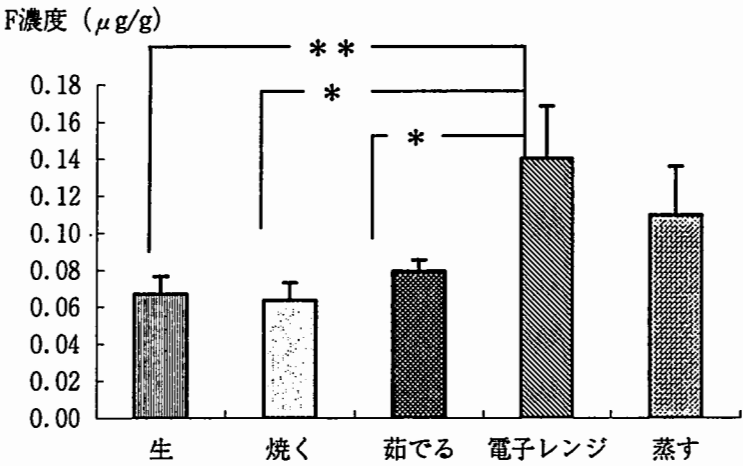


図1： 調理方法の違いによる魚肉中F含有量の変化 (n=3, mean±SE)
*: P<0.05, **: P<0.01

表 1： 飲食品からの見積りと調理後の F 量との比較

飲食品	分量 (g)	F 含有量 (μg/g)	F 量 (μg)
鮭	50	0.095	4.73
ジャガイモ	100	0.021	2.07
玉葱	122	0.010	1.22
牛乳	400	0.040	32.00
計	672		24.04
調理後			
煮る	373.8	0.063	23.68
電子レンジ加熱	641	0.036	23.08

参考文献：

1. Fejerskov, O., Stephen, K.W., Rechards, A., Speirs, S. Combined effect of systemic and topical fluoride treatment on human deciduous teeth –case studies. *Caries Res.* 21: 452-459(1987).

2. Burt, BA. The changing patterns of systemic fluoride intake. *J Dent Res.* 71: 1228-1237(1992).
3. World Health Organization. Fluoride and Oral Health. Geneva, WHO technical report series 846: 12-13(1994).
4. Kimura, T., Morita, M., Kinoshita, T. *et al.* Fluoride intake from food and drink in Japanese children aged 1-6 years. *Caries Res.* 35: 47-49(2001).
5. Komiyama, M., Song, w., Toda, S. Twenty-four hours fluoride intake and excretion of fluoride in urine in Japanese adults. *Bull. Kanagawa Dent. Col.* 31: 17-25(2003).
6. Murakami, T., Narita, N., Nakagaki, H., Shibata, T., Robinson, C. Fluoride intake in Japanese children aged 3-5 years by the duplicate-diet technique. *Caries Res.* 36: 386-390(2002).
7. Guha-Chowdhury, N., Drummond, B.K. and Smillie, A.C. Total fluoride intake in children aged 3 to 4 years -A longitudinal study. *J Dent Res.* 75: 1251-1457(1996).
8. Taves, D.R. Separation of fluoride by rapid diffusion using hexamethyldisiloxane. *Talanta.* 15: 969-974(1968).
9. 友利隆俊, 古賀 寛, 眞木吉信, 高江洲義矩: 乳児用食品中フッ化物分析と一日フッ化物摂取量の推定. 口腔衛生会誌 vol51, 156-167 (2001).
10. 副島 隆: 食品中のフッ素含有量に関する研究. 口腔衛生会誌 vol44, 342-353 (1994) .
11. Pang, D.T.Y., Phillips, C.L. and Bawden, J.W. Fluoride intake from beverage consumption in a sample of North Carolina children. *J Dent Res.* 71: 1382-1388(1992).
12. Levy, S.M., Kohout, F.J., Kiristy, M.C., Heilman, J.R. Wefel, J.S. Infants' Fluoride ingestion from water, supplements and dentifrice. *JADA.* 126: 1625-1632(1995).
13. Levy, S.M., Guha-Chowdhury, N. Total Fluoride intake and implications for dietary fluoride supplementation. *J Public Health Dent.* 59: 211-223(1999).
14. Levy, S.M., McGrady, J.A., Bhuridej, P., Warren, J.J., Heilman, J.R., Wefel, J.S. Factors affecting dentifrice use and ingestion among a sample of U.S. preschoolers. *Pediatr Dent.* 22: 389-394(2000).
15. Levy, S.M., Warren, J.J., Davis, C.S., Kirchner, H.L., Kanellis, M.J., Wefel, J.S. Patterns of fluoride intake from birth to 36 months. *J Public Health Dent.* 61: 70-77(2001).
16. Ekstrand, J., Hardell, L.I., Spak, C.J. Fluoride balance studies on infant in a 1-ppm-water-fluoride area. *Caries Res.* 18: 87-92(1984).

注：本研究は、2003 年 9 月 26 日『日本口腔衛生学会』にてポスター発表

作成日： 2004 年 3 月 10 日

3. 今後の研究計画

今回の調査結果から、中国は日本と比較して、「看護管理」、「専門職としての自律」に関する職務満足度が低かった。今後、どのように日本の水準まで、中国の看護管理を改善し、専門職としての自律を高めていくか、が検討課題といえる。

Stamps ら (1978) の開発した看護師の職務満足度尺度は欧米と日本で広く使用されている。今回、中国において初めてこの尺度を使用した。中国語版の信頼性について検討したところ、Cronbach's α 係数は 0.908 と高かった。この尺度は国際間の比較が可能であり、今後も活用していきたい。また、今回調査を行った中国の施設は北部の 3 級病院であったが、2 級病院、1 級病院に勤務する看護師の職務満足度についても調査を継続していく必要があると考える。さらに、看護師の職務満足度と、患者の満足度の関連性についても研究課題としたい。

4. 指導責任者の意見


看護師の職務満足度に関する中国と日本の比較研究から、研究目的に対する明確な資料と考察を提示することができた。中国の看護は、今、看護師個人々人を尊重し、専門職者としての自立を高め、それらが結果として看護サービスの質的・量的向上につながることを期待している。

本調査は、そうした中国看護の過渡期において、1) 職務満足度は重視すべき点であること、2) 職務満足度については客観的かつ国際的な観点から査定を行う必要性があること、を示唆している。

高玉琴さんは、日中医学協会助成金を得て本研究を行い、旭川医科大学大学院より修士号を授与される予定である（学位記授与式：平成 16 年 3 月 25 日）。学位論文発表会および学位論文審査では、非常に高い評価を受けた。さらに、平成 16 年度内に、研究成果を中国・日本両国の学会において、発表ならびに論文投稿を行う予定である。

日中医学協会助成にふさわしい研究活動であったと総括することができる。

高玉琴さんには、日中看護学術交流を促進する人物として、今後一層の活躍を期待するものである。

指導責任者氏名 松浦和代 

5. 研究報告書

別紙「研究報告書の作成について」に倣い、指定の用紙で作成して下さい。

研究発表または研究状況を記録した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。

— 日中医学協会助成事業 —
中国における看護師の職務満足度に関する研究
— 中国と日本との比較 —

研究者氏名 高 玉琴
中国所属機関 瀋陽中国医科大学附属口腔病院
日本所属機関 旭川医科大学医学部看護学科
指導責任者 教授 松浦 和代

要 旨：

本研究の目的は、1) 中国の看護師の職務満足度について日本との比較調査から実態を明らかにする、2) 両国の比較から中国の看護師における職務満足度の特性を分析することであった。看護師の職務満足度尺度は Stamps ら (1978) が開発した尺度を用いた。中国では304名に配布し、回収数は280、有効回答数は198であった (回収率92.1%、有効回答率70.7%)。日本では354名に配布し、回収数は342、有効回答数は267であった (回収率96.6%、有効回答率78.1%)。平均年齢は、中国では33.8±8.7歳、日本では29.5±7.7歳であった。平均経験年数は、中国では13.1±8.2年、日本では8.0±7.5年であった。結婚状況は、既婚者が中国では75%、日本では30%であった。主な結果は、以下の4点であった。1) 職務満足度の最も重要な構成要素は、中国では「給料」74%、日本では「職場の人間関係」76%であった。2) 職務満足度の平均得点は、中国では147.3±33.7点、日本では144.4±26.0点であり有意な差はなかった。これを構成要素別にみると、中国は、日本に比較して、「職業的地位」「医師・看護師間の関係」「看護師間相互の影響」の3構成要素において職務満足度が有意に高く、「看護管理」「専門職としての自律」の2構成要素において職務満足度が有意に低かった。3) 年齢別に職務満足度をみると、中国では30～34歳の職務満足度が低く、これを底辺とするU字型の曲線を示した。日本では年齢差は認められなかった。4) 職務満足度は、中国・日本に共通して、現在の勤務部署が自分に「適している」と回答した群で高く、物理的環境が良好であるほど高かった。

Key Words： 中国、 日本、 職務満足度、 適性、 物理的環境

結 言：

中国では、この20年間の改革開放政策によって、人々の生活水準が向上し、健康観も変化してきた。これに伴って、看護サービスの範囲も絶えず拡大している¹⁾²⁾。同時に看護師自身の職務に対する満足感も受動的なものから能動的なものへと変化し、自己実現の意欲も高まってきた。

こうした社会の動向から、看護管理者はかつて実行して有効であった伝統的な方法に固執しては、もはや管理の効果を発揮することはできず、今後の時代に対処できなくなると考えられている。呉³⁾は2002年、「管理活動において看護専門性の価値をどう発揮するか」という論文の中で、以下のように述べている。看護管理者はこれまでの看護の枠から飛び出し、医療先進国や、他の企業の先駆的な管理経験を吸収し、思考回路を広げ、意識を改革させる必要がある。また、看護管理者が看護師を主体として、管理心理学を重視し、看護師の要求を理解し、尊重し、満足させるような人間関係と仕事を有機的に結びつける全面的管理方式こそが現代管理学に求められているものである、としている。

中国の現状において、看護師の職務満足度に関する研究は極めて少ない。だが、日本では看護師の職務満足度の研究が1980年代から行われており、看護師の職務満足度は職業ストレスと関連があり、人間関係、サポートの有無、労働環境などによって影響を受けることが報告されている⁴⁾⁵⁾⁶⁾。

中国の看護師における職務満足度を把握し、日本と比較することは、先進国の看護を学ぶ中国の看護の質的向上に意義がある。

本研究では、1) 中国の看護師の職務満足度について日本との比較調査から実態を明らかにすること、

2) 両国の比較から中国の看護師における職務満足度の特性を分析すること、を目的とした。

対象と方法：

対象者は、中国瀋陽市にある3級A国立大学附属病院の看護師と日本北海道内のB国立大学医学部附属病院およびC国立病院の2施設に勤務する看護師であった。

研究方法は、無記名自記式質問紙法とし、調査票の配布および回収は、看護部長を通して、各部署の看護師長に依頼した。倫理的配慮として、対象者に研究目的と方法、プライバシー保護などを文書により説明し研究参加の同意を得た。

調査項目は、1)対象の一般的背景、2)勤務状況、3)看護師の職務満足度尺度、4)物理的環境測定尺度から構成した。

看護師の職務満足度尺度はStampsらによって1978年に開発された尺度であり、PartAとPartBの二部から構成されている⁷⁾⁸⁾。PartAは、職務満足度に影響を与える最も重要な要素を選ぶという内容であった。構成要素は「給料」、「職業的地位」、「職場の人間関係」、「看護業務」、「看護管理」、「専門職としての自律」6の要素であった。PartBは看護師の職務満足度に関する評価であった。この測定尺度は7つ下位尺度から構成されており、①給料 (pay) ; 9項目、②職業的地位 (professional status) ; 8項目、③医師・看護師間の関係 (doctor-nurse relationship) ; 3項目、④看護管理 (administration) ; 10項目、⑤看護業務 (task requirement) ; 6項目、⑥専門職としての自律 (autonomy) ; 5項目、⑦看護師間相互の影響 (interaction) ; の計48項目であった。

看護師の職務満足度尺度の日本語版については、PartAは研究者と指導教官が英語版を日本語に翻訳し、看護師5名にパイロットスタディを実施して、表面妥当性を検討した。PartBは尾崎(1987)が翻訳したものを使用した。中国語版については、中国人留学生2名と研究者1名の計3名が英語版を中国語に翻訳し、在日中国人留学生7名と中国の病院に勤務する看護師15名を対象として、2回のパイロットスタディを行い、表面妥当性の点検を受けた。

中国におけるパイロットスタディの際には、尺度の内容妥当性を確認する目的で、中国の看護師の職務満足に関する自由記述を求め、以下の18項目を抽出した。①収入(ボーナス手当)6名、②社会認知(地位、尊敬)8名、③成就感1名、④職場での人間関係2名、⑤職務内容の好み2名、⑥自律性1名、⑦看護管理者の水準2名、⑧人手不足2名、⑨昇進1名、⑩労働強度2名、⑪雑務(記録、面子)4名、⑫業務水準2名、⑬多忙さ1名、⑭上司との関係3名、⑮夜勤2名、⑯教育程度2名、⑰思想(モラル)3名、⑱職場の物理的環境1名であった。

①～⑭項目は看護師の職務満足度尺度に、また、⑮夜勤、⑯教育程度は「一般的背景」に含まれていることが確認した。⑰思想については、今回の調査では削除した。しかし、⑱職場の物理的環境については、職務満足度に影響を与える可能性のある項目と解釈し、新たに調査項目に加えた。

物理的環境尺度は、米国国立職業安全保健研究所が開発した物理的環境尺度(10項目)を使用した。この尺度は得点が低いほど、物理的環境は良好と評価する。日本語版は原谷(1999)が翻訳したものを使用した⁹⁾。中国語版については、研究者が日本語版を中国語に翻訳し、パイロットスタディを行い、表面妥当性を検討した。

調査期間は、平成15年5月であった。分析方法にはノンパラメトリック検定を用い、統計的有意水準は5%とした。

結 果：

中国では看護師304名に配布し、回収数は280、有効回答数は198であった(回収率92.1%、有効回答率70.7%)。日本では看護師354名に配布した。回収数は342、有効回答数は267であった(回収率96.6%、有効回答率78.1%)。

1. 一般的背景

平均年齢は、中国では33.8±8.7歳、日本では29.5±7.7歳であった。看護師としての平均経験年数は、中国では13.1±8.2年、日本では8.0±7.5年であった。

2. 職務満足度

1) PartA：職務満足の構成要素の重要度は、中国では最も重要な要素は「給料」74.0%であり、日本では「職場の人間関係」76.0%であった(表1)。

順位	構成要素	中国 (n=198)	構成要素	日本 (n=267)
		構成要素の割合 (%)		構成要素の割合 (%)
1	給料	74.0	職場の人間関係	76.0
2	職務的地位	56.0	給料	62.0
3	専門職としての自律	54.0	専門職としての自律	58.0
4	職場の人間関係	44.0	看護業務	56.0
5	看護管理	38.0	看護管理	26.0
6	看護業務	34.0	職務的地位	22.0

2) PartB：職務満足度の平均得点は、中国では 147.3 ± 33.7 点で、日本では 144.4 ± 26.0 点であり有意差はなかった。これを7つの構成要素別にみると、中国は、日本に比較して「職業的地位」「医師・看護師間の関係」「看護師間相互の影響」の3つの構成要素が有意に高く、「看護管理」「専門職としての自律」の2つの構成要素が有意に低かった(表2)。

表2 職務満足度の7構成要素の比較

構成要素	可能な最高スコア	中国 (n=198)			日本 (n=267)		P値
		平均値±SD	範囲		平均値±SD	範囲	
1. 給料	54	24.0±8.0	3~42		24.6±6.9	5~40	0.349
2. 職業的地位	48	32.2±6.4	12~46		29.0±6.1	12~45	0.000
3. 医師・看護師間の関係	18	12.4±3.1	2~18		8.6±3.4	0~17	0.000
4. 看護管理	60	26.0±10.4	1~50		29.3±6.9	7~47	0.000
5. 専門職としての自律	30	11.4±5.6	0~26		14.6±4.5	0~30	0.000
6. 看護業務	36	12.6±6.5	0~30		12.7±4.8	1~28	0.943
7. 看護師間相互の影響	42	28.7±6.7	8~40		25.6±6.1	1~41	0.000

Mann-Whitney の U 検定

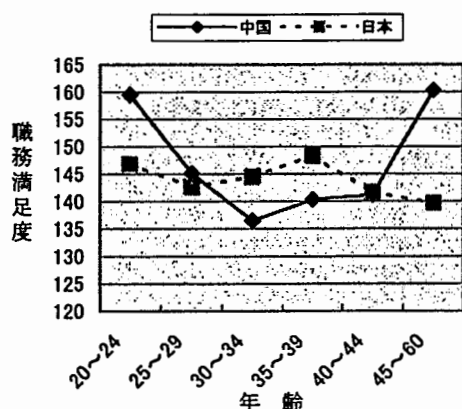


図1. 年齢別と職務満足度

3. 年齢と職務満足度

年齢別に職務満足度をみると、中国では30~34歳が 136.5 ± 34.4 点と低く、これを底辺とするU字型の曲線を示した(図1)。日本では職務満足度に年齢差は認められなかった。

4. 勤務状況と職務満足度

「現在の勤務部署」について、中国では、「適」が58.6%、「不適」が41.4%であった。日本では「適」が42.3%、「不適」が57.7%であった。中国・日本ともに、「適」と回答したものは「不適」と回答したものよりも職務満足度が有意に高かった(各 $p < 0.001$)。

「希望配置であったか」については、中国では「はい」25.3%、「いいえ」72.7%、「どちらともいえない」2.0%であった。日本では、「はい」51.3%、「いいえ」46.8%、「どちらともいえない」1.9%であった。中国・日本ともに、「はい」と「いいえ」の2群間の職務満足度に有意差はなかった。

5. 物理的環境と職務満足度

物理的環境の平均得点は、中国では13.6±2.7点、日本では15.2±2.7点で有意差があった($p < 0.001$)。両国ともに、物理的環境の得点と職務満足度の得点間には負の相関があった(中国: $r = -0.470$, $p < 0.001$ 、日本: $r = -0.399$, $p < 0.001$)。

考 察 :

Porter と Lawler (1968) の職務満足理論によれば、パフォーマンスによって報酬が決定され、その報酬が媒介変数として働き、さまざまな水準の職務満足が生まれることが解説されている¹⁰⁾。本調査前には、中国看護師の職務満足度に関する概念枠組みは明らかではなかったが、今回、PartAの結果から、中国の看護師にとって報酬は職務満足の程度を決める主要な要素であり、中国看護師の職務満足の概念枠組みは、日本よりもむしろ欧米に近いことが推察される。

PartBの結果から、中国と日本の職務満足度に有意差はなかった。しかし、職務満足度を構成要素別に分析すると、中国では「職業的地位」「医師・看護師間の関係」「看護師間相互の影響」の満足度が日本より有意に高く、職場の人間関係は良好と評価できる。一方、「看護管理」「専門職としての自律」の満足度の低さは、中国看護の過渡期において、看護管理と看護専門性の発揮が重要な課題であるとする呉の指摘を裏付ける資料として有用と考えられる。

職務満足度を年齢別にみると、経験年数11～15年に相当する30～34歳で最低となり、これは日本の10年前の研究報告と同様の結果であった。この時期の女性は通常、結婚後の妊娠、出産、育児といった個人生活の比重が高まる時期であり、それらが職務満足度の低下要因として作用していることが考えられる¹¹⁾。

勤務状況と職務満足度の分析結果から、看護師にとっては、希望配置か否かは重要ではなく、むしろ、勤務部署への適性が重要といえる。看護管理者は看護師が配置転換を希望する原因を調べ、部署に適しているかどうかを判断し、看護師の能力がどうすれば伸ばせるかを考慮すべきであり、これが職務満足度を高める上で重要であると考えられる。さらに、中国・日本ともに、物理的環境が良好であるほど職務満足度は高いという結果から、物理的環境は職務満足度に影響を与える要因であることが明らかとなった。

引用文献 :

- 1) 袁曉麗:中国の看護の現状と課題(上), (週刊) 社会保障, No.1777, 52-55, 1994.
- 2) 袁曉麗:中国の看護の現状と課題(下), (週刊) 社会保障, No.1778, 60-63, 1994.
- 3) 吴渭虹, 郑玲, 陈欣怡, 等:如何在管理活动中体现护理专业的价值, 中华护理杂志, 37(4), 280-281, 2002.
- 4) 尾崎フサ子:看護婦の仕事の満足度に関する研究—米国ICU・CCUで働いている看護婦と一般内科・外科病棟で働いている看護婦の比較—, 看護研究, 20(3), 54-63, 1987.
- 5) 小沢訓子, 日浦美保, 辻井しず, 他:看護婦のストレスに関する研究 第1報:看護婦の職場環境におけるストレスの実態, 日本看護研究学会雑誌, 20(2), 53-54, 1997.
- 6) 石松直子, 大塚邦子, 坂本洋子:看護婦のメンタルヘルスに関する研究—ストレス・職務満足度・自我状態相互の関連—, 日本看護研究学会雑誌, 24(4), 11-20, 2001.
- 7) Stamps, P.L., Piedmont, E.B., Slavitt, D.B., et al: Measurement of work satisfaction among health professionals, Medical care, 16 (4), 337-350, 1978.
- 8) Stamps, P.L.: Nurses and Work Satisfaction: An Index for Measurement, 2nd edn, Health Administration Press, Illinois, 1997.
- 9) 原谷隆史:NIOSH職業性ストレス, ストレス科学, 12(4), 160-164, 1998.
- 10) 西川一廉:職務満足の心理学の研究, 勁草書房, 60-71, 1984.
- 11) 深澤佳代子:看護婦の職務満足度に関する検討—1991年の実態について, 看護管理, 3(3), 199-202, 1993.

作成日:2004年3月11日

2003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－

2004 年 3 月 11 日

財団法人 日中医学協会
理事長 殿

研究者氏名 李 榴 柏
所属機関名 東京大学大学院医学系研究科 国際保健学専攻
指導責任者氏名 牛島 廣 治
職 名 教授 東京大学大学院医学系研究科
所 在 地 〒113-0033 東京都文京区本郷7-3-1
電 話 03-5841-3590 内線

1. 研 究 テ ー マ 中国北京市都市部における学童肥満の原因に関する調査

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 24 回日本肥満学会 2003 年 11 月 千葉 (幕張)

Cross Validation of the new Chinese body mass index cutoffs of children

(2) 学会誌等に掲載した論文 ☒ 有 無 (雑誌名・論文名)

Pediatrics International 2003; 45 (4),400-06.

Feeding practice of infants and their correlates in urban areas of Beijing, China

Liubai Li, Sujun Li, Moazzam Ali, Hiroshi Ushijima.

3. 今後の研究計画

本研究の結果から 北京市都市部における学童の肥満率は高いと見られる。肥満の発症には先天のおよび後天的要因が関与している。生活習慣などの後天的な要因は調節できるので 今後の研究の主な課題になる。現在の生活環境こそが子どもたちを過食と身体活動不足に追い込んでいることを十分に認識する必要がある。更に できれば今の生活環境を変えるか、今の生活環境の中でより良い生活ができて体重が減少する方向に向かうように社会全体で支援することが必要である。今後 介入研究を介して 地域や学校において 子どもの食事、運動、休養といった生活習慣に関わる健康教育を積極的に展開することが研究課題になると考えている。

4. 指導責任者の意見

近年、国際的に児童期からの肥満が問題となり、肥満対策や予防に対する関心が高い。その現状を調査し、栄養指導や教育を行うことは急務と考えられる。従って受領者の研究は重要と考えられる。受領者は研究態度がまじめで、研究は大幅に進んでいる。特に本研究で検討した子ども用身体活動量と食事調査のアンケートは、将来中国の肥満の研究にも貴重な基礎資料になる。本研究のデザイン、方法、得た研究結果等は、今後の中国の児童肥満の予防に貢献できると思われる。

指導責任者氏名

牛島廣治



5. 研究報告書

別紙「研究報告書の作成について」に倣い、指定の用紙で作成して下さい。

研究発表または研究状況を記録した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。

中国北京市都市部における学童肥満の原因に関する調査

研究者氏名 李 榴柏

中国所属機関 北京大学 公衆衛生学院 栄養と食品衛生学系

日本研究機関 東京大学 大学院医学系研究科

国際保健学専攻 発達医科学教室

指導責任者 教授 牛島 廣治

共同研究者名 李 可基 尹喜玲 屈宁宁

Abstract:

The present study aimed to examine the potential risk factors of childhood obesity in Beijing urban areas and elucidate the correlates of physical activity and healthy eating.

A cross-sectional study was conducted from July, 2003 to October 2003 in two primary schools in Beijing urban areas. A total of 1687 6-12 year old students were recruited. Mothers and some of the children in 4th-6th grades administered questionnaires relating to the potential correlates. Anthropometric measurement of weight, height and percentage of body fat (%BF) of the students were performed. Body mass index (BMI) [BMI = weight in kg/(height in metres)²] cutoff values recommended by the International Obesity Task Force (IOTF) were used to discriminate overweight and obesity. Multiple Logistic Regression Analysis was used to determine the independently associated risk factors. The results shows that the prevalence of overweight and obesity in 6-12 year old boys were 20.0% and 20.3%, and for girls were 19.0% and 13.0% respectively, according to the new BMI cutoffs for Chinese children. (Versus 19.9% and 13.3% for boys as well as 12.0% and 4.8% for girls respectively according to the BMI cutoffs recommended by IOTF). Overweight and obesity was significantly correlated to sex (for girls, Odds Ratios (OR)=0.3, and 95% confidence interval (CI): 0.15-0.58, $p<0.01$), height (OR=1.03, 95%CI: 1.00-1.07, $p<0.05$), and the average value of parents' BMI (OR=1.35, 95%CI: 1.15-1.60, $p<0.01$). The healthy lifestyles were significantly correlated to some psychosocial factors (Pearson coefficient r ranged from 0.20 to 0.37). The result suggested that health educations related to healthy eating and physical activity need to be implemented in the schools.

Key Words obesity, risk factor, healthy eating, physical activity

Introduction:

The prevalence of child obesity is increasing rapidly worldwide.¹ It is associated with several risk factors for later life^{2,3,4} In recent years, the prevalence of childhood obesity in China, especially in urban areas increased rapidly, and the factors that account for the rapid changes in prevalence remain unclear.⁵ The present study aimed to examine the potential risk factors of childhood obesity in Beijing urban areas and elucidate the correlates of physical activity and healthy eating, for providing baseline data for the accomplishment of disease control and prevention.

Subjects and Methods:

A cross-sectional study was conducted from July, 2003 to October 2003 in two primary schools in Beijing urban areas. A total of 1687 6-12 year old students were recruited. A self-administered questionnaire were used to obtain information relating to social economic status (SES), perinatal factors, and the present lifestyles of children. Mothers provided all the information for the children in 1st-3rd grades. Students in 4th-6th grades administrated a questionnaire relating to present lifestyle as well as its the correlates. Anthropometric measurement of weight, height and percentage of body fat (%BF) were performed while the children were wearing light clothing and no shoes. Weight and %BF were measured with a single-frequency tetrapolar plethysmograph (TBF-126, TANITA, Tokyo, Japan). Height was measured with a fixed height measuring board. Body mass index-calculated as weight in kilograms divided by the square of height in metres provides a measure of fatness [$BMI = \text{weight in kg} / (\text{height in metres})^2$]. BMI cutoff values recommended by IOTF were used to discriminate overweight and obesity. Statistical analyses were performed using SPSS version 10.0 for Windows (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Multiple Logistic Regression Analysis was used to determine which factors were mostly and independently associated with the outcomes of interest. $P < 0.05$ was the cut point for significance. The relative risks of possible risk factors were estimated by the calculation of Odds Ratios (OR) and 95% confidence intervals (CI).

Results:

The average age of the boys was 8.91 years (SD=1.52), and 8.82 years (SD=1.55) for girls. The age distribution was shown in Table 1. The prevalence of overweight and obesity in 6-12 year old boys were 19.9% and 13.3%, and for girls were 12.0% and 4.8% respectively, according to the new BMI cutoffs recommended by IOTF. For the correlates of childhood obesity, after adjusted for other potential correlates, the result of Multiple Logistic Regression Analysis shown that high height and high BMI value of parents were risk factors for predicting overweight and obesity; boys were more tend to become overweight than girls at this age group. Frequencies of cake intakes per week was not shown as a risk factor.

The results were shown in Table 2.

Table 1. Characteristics of the subjects (N=1687)

Age (Year)	Male (N=841)		Female (N=846)	
	n	(%)	n	(%)
6	32	3.8	40	4.8
7	158	18.8	162	19.1
8	150	17.8	178	21.0
9	184	21.9	155	18.3
10	162	19.3	161	19.0
11	138	16.4	138	16.3
12	17	2.0	12	1.5

The correlates for vegetable and fruit intakes and physical activity were found significantly correlated to some psychosocial factors. For vegetable and fruit intakes, the availability of vegetables and fruits at home was the most important determinants for intakes (Table 3). The intension and frequencies physically activities strongly correlated to self-efficacy, social support and health believes (Table 4).

Table 2. Risk factors correlated to being overweight and obesity (n=495)

Correlates	OR	95%CI
Gender (Female)	0.30	0.15-0.58 **
Height	1.03	1.00-1.07*
Average BMI of parents	1.35	1.15-1.60**
Sweet cake eating (times/week)	0.83	0.72-0.95**

* P<0.5; ** P<0.01

Table 3. The pycho-social correlates for healthy eating
(vegetable and fruit intakes)

Correlates	n	Pearson coefficient (r)	P Value
Availability	136	0.32	P<0.01
Self-efficacy for healthy eating	134	0.28	P<0.01
Perceived benefit	137	0.24	P<0.01
Taste preferences	134	0.24	P<0.01
Social support	137	0.20	P<0.05

Table 4. The psycho-social correlates for physical activity (n=228)

Psycho-social factors	Intension	Times/week
Self-efficacy	0.46**	0.37**
Social support	0.25**	0.35**
Health believes	0.24**	0.29**

** P<0.01

Summary:

The present study used the new BMI cutoffs of children recommended by the IOTF, this enabled the prevalence to be internationally comparable. The prevalence of overweight and obesity was relatively high in Beijing urban areas. Boys were more tend to be overweight and obese than girls in this age, and the height and parents' BMI were independently correlated to being overweight and obesity. This result was accordant to the previous study and the reason needs further study. Cake intakes did not show as a risk factor may be related to the behavior change after becoming obese.

The underlying psycho-social factors in healthy eating and physical activity was seldom reported in Chinese children. The present study shown that the self-efficacy of healthy eating and physical activity were moderately correlated to the lifestyle. This result suggested that the health education tend to increase self-efficacy may be effective among Chinese children. On the other hand, social support for healthy eating and physical activity need to be increased in the future.

References:

1. World Health Organisation . Obesity: Preventing and managing the global epidemic. Report of a WHO consultation, Geneva, 3-5 Jun 1997. Geneva: WHO, 1998. (WHO/NUT/98.1.)
2. Berenson GS, Srinivasan SR, Wattigney WA, Harsha DW. Obesity and cardiovascular risk in children. Ann NY Acad Sci 1993; 699: 93-103.
3. Mahoney LT, Burns TL, Stanford W. Coronary risk factors measured in childhood and young adult life are associated with coronary artery calcification in young adults: the Muscatine study. J Am Coll Cardiol 1996; 27: 277-284.
4. Hill AJ, Silver EK. Fat, friendless and unhealthy: 9-year old children' s perception of body shape stereotypes. International Journal of Obesity and Related Metabolic disorders, 1995, 19:423-30.
5. Progressing of Childhood Obesity in China ILSI, China Branch.

作成日 : 2004 年 3 月 10 日

