

財団法人日中医学協会  
2004年度共同研究等助成金－調査・共同研究－報告書

2005 年 3 月 3 日

財団法人 日中医学協会 御中

貴財団より助成金を受領して行った研究テーマについて報告いたします。

添付資料： 研究報告書



受給者氏名： 瀬戸 加大  
所属機関名： 愛知県がんセンター  
所属部署： 遺伝子医療研究部 職名： 部長  
〒 464-8681  
所在地： 名古屋市千種区鹿子殿 1-1  
電話： 052-762-6111 内線： 7080

1. 助成金額： 900,000 円

2. 研究テーマ

日本-中国における悪性リンパ腫の細胞遺伝学的比較研究

3. 成果の概要 (100字程度)

日本人濾胞性リンパ腫と CD10 陽性びまん性大細胞型 B 細胞性リンパ腫 (CD10+DLBCL) と中国人 DLBCL を CGH 法と組織 FISH 法で解析し、CD10+DLBCL は濾胞性リンパ腫とは異なる由来であることを明らかにした。

4. 研究組織

日本側研究者氏名： 瀬戸 加大 職名： 部長  
所属機関： 愛知県がんセンター 部署： 遺伝子医療研究部  
中国側研究者氏名： Zhang Xiaohua 職名： 講師  
所属機関： 延安大学医学部 部署： 病理学教室

## 日本-中国における悪性リンパ腫の細胞遺伝学的比較研究

研究者氏名	瀬戸 加大
日本研究機関	愛知県がんセンター遺伝子医療研究部
中国共同研究機関	延安大学医学部病理学教室
中国研究者氏名	Zhang Xiaohua 講師
指導責任者 部長	瀬戸 加大
共同研究者氏名	田川博之、シバスンダラム・カルナン、 Jinfen Wang, Zinfen Gao

### 要旨

悪性リンパ腫は地理学的地域や人種により、病型ごとの発生頻度が異なる。この差異は、病理診断上の人的差異によるのか、真にリンパ腫の病型による発生頻度そのものが異なるのか明確ではなかった。近年、新 WHO 分類が導入され、日本、韓国から 3000 症例近くの報告がなされ、地域により、リンパ腫の病型による発症頻度が明らかに異なることが示された。新 WHO 分類は、さまざまな抗体、細胞遺伝学的解析、臨床病態などが取り入れられ、客観性が増したものの、これらの解析ができないところでは、比較研究することが困難である。本共同研究により、Zhang Xiaohua 博士に細胞遺伝学的手技、すなわち Comparative genomic hybridization (CGH) 法を取得してもらい、共同研究を進める基盤を作ることができた。それらの細胞遺伝学的手技を用いて、日本人濾胞性リンパ腫 (FL) と同じ分化段階の CD10+びまん性大細胞型 B 細胞性リンパ腫 (DLBCL) を CGH 解析ならびに、パラフィンブロックを用いた組織 FISH 法で解析したところ、両者には明確なゲノム異常の差があることを解明し、CD10+DLBCL は濾胞性リンパ腫から由来したものではないことを報告した。

**Key Words:**悪性リンパ腫、CGH、Tissue FISH、濾胞性リンパ腫、びまん性大細胞型 B 細胞リンパ腫

### 緒言

悪性リンパ腫は地理学的地域や人種により、病型ごとの発生頻度が異なることが指摘されているが、この差異は、病理診断上の人的差異によるのか、真にリンパ腫の病型による発生頻度そのものが異なるのか明確ではなかった。近年、新 WHO 分類が導入され、日本、韓国から 3000 症例近くの報告がなされ、地域により、リンパ腫の病型による発症頻度が異なることが示されてきた。新 WHO 分類は、さまざまな抗体、細胞遺伝学的解析、臨床病態などが取り入れられ、客観性が増したものの、これらの解析ができないところでは、比較研究することが困難である。

また、悪性リンパ腫の中でも DLBCL は複数の疾患単位を含むことが明らかになっているものの、それらを区別するための優れた標準となるマーカーはない。DLBCL はこれまで細胞表面マーカーが有用であり、CD5 抗原を発現するグループ、CD10 抗原を発現するグループが異なる病態を取ることが我々のグループにより最初に報告され、その後、いくつかの大規模研究で確認されている (Seto M., Cancer Science, 2004)。

現在、CD10 陽性の DLBCL については、同じマーカーを有する濾胞性リンパ腫から進展して形成されたという考えと、濾胞性リンパ腫とはまったく異なるリンパ腫であるという考え方がある。これらを明らかにするためには、CGH 法や FISH 法を用いて、染色体転座の頻度ならびにゲノム異常様式を調べることで、明らかにできる可能性が高い。本研究は、この点を明らかにすることを目的として行ったが、同時に Zhang Xiaohua 博士にその手技を学んでもらい、今後、中国人悪性リンパ腫症例の解析をさらに進展させるための基盤を形成することを目的とした。

### 対象と方法

日本人濾胞性リンパ腫 40 症例、CD10+DLBCL 19 例を用いた。また、中国人 DLBCL 10 症例 (CD10 の情報なし) を、比較のため用いた。また、中国人病理組織の免疫染色性を確認するため、マントル細胞症例 2 例を用いて免疫染色を試

行した。日本人症例はすべて、初発時の検体を用いた。今回の調査研究で、細胞遺伝学的な手法や種々の抗体を用いて規定される新 WHO 分類は、中国では、ごく一部の専門病院でしか実施が困難であることが判明した。今回、日本人症例で細胞遺伝学的手法を用いて解析を進め、その後、中国人症例を検討した。日本人症例は CGH 法を施行できたが、中国人症例からは DNA が得られなかったため、Tissue FISH 法だけを施行した。

CGH 法と FISH 法の詳細については発表論文に記載してあるとおりである (Zhang ら, Cancer Science, 2004)。簡単に記載すると、CGH 法はリンパ腫由来の DNA を FITC、正常由来の DNA を Texas Red で標識し、等量混ぜて、スライドガラスに貼り付けられた正常男性染色体に反応させ、リンパ腫由来の DNA の増幅や欠失をコンピュータでスキャンし判定する。各染色体それぞれ、少なくとも 10 個以上のデータを集積する。組織 FISH は、パラフィン包埋切片 (6 μm 厚) を脱パラフィン後、Proteinase K 処理後、通常の FISH 法と同様の処理をする。少なくとも各検体 200 個以上の細胞につきシグナルを数える。用いたプローブは、LSI IGH/BCL2 Dual Color, Dual Fusion Translocation probe (Vysis: [http://www.vysis.com/LSIIGHBCL2DualColorDualFusionTranslocationProbe\\_4988.asp?bhcp=1](http://www.vysis.com/LSIIGHBCL2DualColorDualFusionTranslocationProbe_4988.asp?bhcp=1)) である。詳細な実験方法は、Vysis 社のプロトコールに従った。

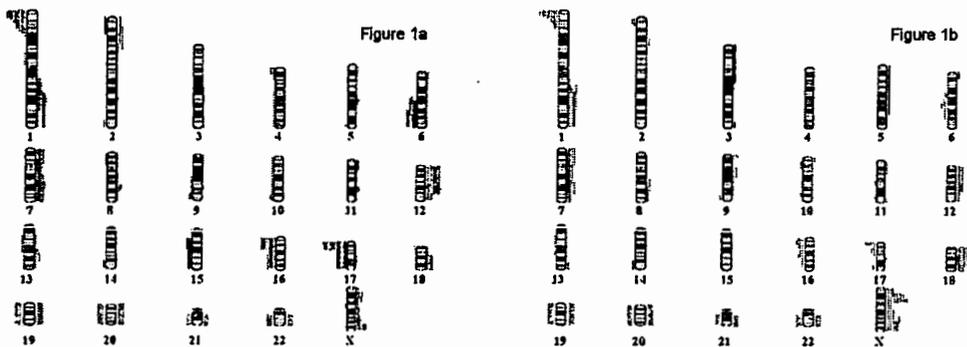
## 結果

### 1. CGH 解析の結果 (図 1)

濾胞性リンパ腫は CGH 法により、40 症例中 27 例でゲノム異常が認められたのに対し、CD10+DLBCL は 19 症例中 19 症例すべてに、ゲノム異常が認められた。異常の認められたものを図にまとめて示す (Figure 1a と 1b)。DLBCL 症例と濾胞性リンパ腫症例では、ゲノム異常の頻度と異常領域の場所が異なることが明らかになった。各領域について、有意差検定も行った (表 1)

### 2. 組織 FISH による BCL2 転座の頻度 (表 1)

BCL2 転座は CD10+DLBCL では組織 FISH が試行できた 17 例中 5 症例 (29%) に認められたが、濾胞性リンパ腫は 37 例中 27 症例 (73%) に BCL2 転座が認められ、両者の頻度に有意差 ( $p=0.0035$ ) を認めた。10 症例の中国人検体のは組織 FISH では、明確な結果が認められなかった。マンテル細胞リンパ腫 2 症例で cyclin D1 の免疫染色を試行したところ、明瞭な陽性反応が得られたので、組織の処理法に問題があるのではなく、切片の厚さ及びスライドガラスが無蛍光でないことが、組織 FISH 像が明瞭でない一因かもしれない。



脚注：CD10+DLBCL 19 症例 (1a) と濾胞性リンパ腫 40 症例 (1b) のまとめ。各染色体の左にあるバーは DNA 欠失領域を示し、右側のバーは DNA 増幅領域を示す。

表1. t(14;18) 転座とCGH法によるDLBCLと濾胞性リンパ腫の比較

Chromosomal aberration	CD10+DLBCL	Follicular lymphoma	P
<b>Gains</b>			
1q	6/19 (31%)	4/40 (17%)	
2p	3/19 (16%)	1/40 (2%)	
7q	7/19 (36%)	5/40 (13%)	0.0417
8q	3/19 (16%)	2/40 (5%)	
9p	1/19 (5%)	4/40 (10%)	
11q	3/19 (16%)	1/40 (2%)	
12	10/19 (52%)	3/40 (7%)	0.0002
13q	3/19 (16%)	1/40 (2%)	
18	4/19 (21%)	10/40 (25%)	
xp11-p21	4/19 (21%)	13/40 (32%)	
Xq25-qter	5/19 (26%)	9/40 (22%)	
<b>Losses</b>			
1p	12/19 (63%)	10/40 (25%)	0.0086
4p	3/19 (16%)	0/40 (0%)	
6q	7/19 (36%)	4/40 (10%)	0.0277
15q	3/19 (16%)	0/40 (0%)	
16p	9/19 (47%)	4/40 (10%)	0.0023
16q	5/19 (26%)	3/40 (7%)	
17p	16/19 (84%)	7/40 (17%)	0.0001
17q	7/19 (36%)	3/40 (7%)	0.0089
<b>t(14;18)</b>	<b>5/17 (29%)</b>	<b>27/37 (73%)</b>	<b>0.0035</b>

DLBCL, diffuse large B-cell lymphoma

## 考察

悪性リンパ腫はこれまで、種々の分類法が用いられてきた。それぞれの分類法には優れた面と十分でない面が存在し、実際、ヨーロッパとアメリカでは用いられてきた分類が異なっていた。近年、アメリカとヨーロッパを中心とする病理学者たちによる新たな分類 (REAL 分類) が提唱され、それが新 WHO 分類へと発展した。この新しい分類法は、いろいろな情報、すなわち、病理組織学、免疫組織学、細胞遺伝学、臨床病態などを総合的に判断し、分類するものである。この分類法は、多くの賛同が得られ、日本や韓国から大規模な解析結果が報告され、全世界的に受け入れられている。しかし、分類法としては優れていても、実践できるかどうかということになれば、一定の規模以上の医療機関でなければできない項目を多く含んでいる。染色体転座の解析法である FISH や CGH 法は有力な補助診断の一つであるが、すべての医療機関で行うことは難しい。日本では、複数の臨床検査会社で試行可能であるが、中国においては、FISH や CGH 法のような臨床検査を行う会社が全土的にはまだ普及するにいたっていないようである。これら種々の検査法の中で、組織 FISH 法は、試薬とプローブさえ入手すれば、比較的簡単に確立することのできる手法である。また、従来の病理組織診断に用いるホルマリン固定パラフィン包埋切片を用いて試行できるのが大きな特徴の一つである。

Zhang らは、CGH 法と組織 FISH 法を用いて、濾胞性リンパ腫とそれから由来すると考えられていた CD10+DLBCL が、遺伝子異常の観点からみると、異なった遺伝子変化により発生する、異なった種類の悪性リンパ腫であることを明確にし論文報告した (Zhang et al., 2004)。本共同研究の大きな成果の一つである。この手法により、同様に中国人症例を 50 例程度解析することで、人種差、地域差の問題についても明らかにすることができると考えている。また、北京大学医学部病理学教室や山西省がんセンターにおける議論では、新 WHO 分類がなかなか普及していない点について、理解することができた。実際、山西省がんセンター病理学部長の Wang 教授は、自ら検体を持って外国 (南カリフォルニア大学) に出かけ、必要な免疫染色を行っている。外国と匹敵する検査が行われている北京大学では、新 WHO 分類が用いられているが、選択された症例があつまるので、悪性リンパ腫の病型の調査には適当ではない。その点では、山西省がんセンターは悪性リンパ腫症例数も年間 300 症例近くあるので、サイズも妥当であり、現在、Wang 教授が免疫組織学的研究を自検例で進めていることは、きわめて重要で悪性リンパ腫研究にとっては意義が高い。同様のそのような機関からの複数の報告を待ちたい。

今回、中国人症例 10 症例について、組織 FISH 解析を行ったにもかかわらず、明瞭な結果が得られなかったのは、残念であったが、その原因は組織の固定法や保存状態などの根本的なところにあるのではなく、切片の厚さを変え、組織 FISH 用のスライドグラスを用いることで改善が期待できる。マントル細胞リンパ腫の免疫組織法で、明瞭な染色結果が得られたので、固定法などには問題なく、十分な検討ができることを意味している。

悪性リンパ腫のゲノム異常の検査には、ごく最近確立された array CGH 法という方法があり、我々の研究室で安定した結果が得られ始めている (Ota et al., 2004; Tagawa et al., 2004; Tagawa et al., 2005)。これらの技術は、現在、質のよい DNA を用いてしか実行されていないが、将来、病理組織由来の DNA を用いても、そのような検討ができるようにする必要がある。すなわち、病理組織用の組織片から抽出した array CGH 法を試みる時期が来つつあるのかもしれない。

診断技術や診断方法は次々と新しく導入されているが、悪性リンパ腫にとって病理診断はきわめて重要な診断的役割を果たしている。従来の病理組織学だけではなく、次々と導入される新たな抗体による免疫組織学的検査を取り入れる必要があるものの、試薬や抗体があれば比較的容易に導入できること、かつ、場所を変えても、十分に検査を行うことができることが明らかとなった。次の段階として、中国人血液病理学者が日本人あるいは欧米の血液病理学者と連携し、中国人悪性リンパ腫の新 WHO 分類による悪性リンパ腫像を明らかにしてほしいと願っている。また、実際にそのような試みが山西省がんセンターの Jifen Wang 教授により試み始められているのは特記すべきことである。今後は病理診断の確定した症例について、本研究のような細胞遺伝学的比較研究を進めていく必要があると考えている。また、悪性リンパ腫の地域集積性を考えると、中国の広大さとその膨大な人口を考えると、国内でも地理的に異なった地域にある研究機関との共同研究が今後必要となってくると考えている。

## 謝辞

本研究は日中医学協会助成金の補助をうけて行われたものである。北京大学医学部 Zifen Gao 教授の教室員の方々には中国滞在中に大変お世話になった。ここに感謝申し上げます。北京大学医学部特別招請講演、第二回太原国際リンパ腫研究会では、数多くの聴衆の先生方による熱心な討議に大変励まされた。また、延安大学医学部での講義にも多くの聴衆の方々にきていただいたことを感謝します。

## 参考文献

1. Seto, M.: Genetic and epigenetic factors involved in B-cell lymphomagenesis. *Cancer Sci.*, 95: 704-710, 2004.
2. Zhang, X., Karman, S., Tagawa, H., Suzuki, R., Tsuzuki, S., Hosokawa, Y., Morishima, Y., Nakamura, S., Seto, M.: Comparison of genetic aberrations in CD10<sup>+</sup> diffused large B-cell lymphoma and follicular lymphoma by comparative genomic hybridization and tissue-fluorescence in situ hybridization. *Cancer Sci.*, 95: 809-814, 2004.
3. Ota, A., Tagawa, H., Karman, S., Suzuki, Y., Karpas, S., Kira, S., Yoshida, Y., Seto, M.: Identification and Characterization of

A Novel Gene, C13orf25, as A Target for 13q31-q32 Amplification in Malignant Lymphoma *Cancer Res.*, 64: 3084-3095, 2004.

4. Tagawa, H., Tsuzuki, S., Suzuki, R., Karnan, S., Ota, A., Matsuo, K., Yamaguchi, M., Morishima, Y., Nakamura, S., Seto, M.: Genome-Wide Array-based Comparative Genomic Hybridization of Diffuse Large B-Cell Lymphoma: Comparison between CD5-Positive and CD5-Negative Cases. *Cancer Res.*, 64: 5948-5955, 2004.
5. Tagawa, H., Karnan, S., Suzuki, R., Matsuo, K., Zhang, X., Ota, A., Morishima, Y., Nakamura, S., Seto, M.: Genome-wide array-based CGH for mantle cell lymphoma: Identification of homozygous deletions of the proapoptotic gene BIM. *Oncogene*, 2005, in press.

注) 北京大学医学部特別講演、第二回太原国際悪性リンパ腫シンポジウム、延安大学医学部講義(2004年、5月18-22日)で本研究の一部を発表した。また、本原稿の主要なデータは論文および総説の一部として発表した(Seto M., *Cancer Sci.*, 95: 704-710, 2004; Zhang et al., *Cancer Sci.*, 95: 809-814, 2004)。

財団法人日中医学協会  
2004年度共同研究等助成金－調査・共同研究－報告書

2005年 2 月 28 日

財団法人 日中医学協会 御中

貴財団より助成金を受領して行った研究テーマについて報告いたします。

添付資料： 研究報告書

受給者氏名： 米田 栄吉 

所属機関名： 東北大学大学院

所属部署： 総合歯科診療部 職名： 教授

所在地： 〒980-8575 仙台市青葉区全陵町4-1

電話： 022-717-8430 内線： \_\_\_\_\_

1. 助成金額： 900,000 円

2. 研究テーマ

歯周病と全身疾患の関連性に関する調査研究

3. 成果の概要 (100字程度)

歯周疾患と関連性が深いといれる糖尿病、心疾患、誤嚥性肺炎、妊娠のトラブルについて、歯周病関連リスクファクターを明らかにすることができた。その結果、歯周病はそのらの全身疾患の誘因となる可能性が示された。

4. 研究組織

日本側研究者氏名： 米田 栄吉 職名： 教授

所属機関： 東北大学大学院 部署： 総合歯科診療部

中国側研究者氏名： 唐 立峰 職名： 病院長

所属機関： 四平中心医院 部署： 耳鼻咽喉科

—日中医学協会助成事業—

## 歯周病と全身疾患の関連性に関する調査研究

研究者 氏名 米田栄吉  
 日本研究機関 東北大学大学院歯学研究科  
 中国所属期間 吉林省四平市中心医院  
 指導責任者 教授 米田栄吉  
 共同研究者氏名 駒井伸也 遠藤直樹  
 唐立峰、孫亜新、孫 逸超

### 要 旨

歯周炎局所では嫌気性グラム陰性桿菌群から蛋白分解酵素、白血球毒、LPSなどの病原因子が遊離される。歯周組織に炎症を惹起し、歯槽骨の吸収を起こすのみならず、これらの病原因子は他の臓器にも病原因子となる。最近になって、歯周病原細菌や病原因子が全身疾患と関与しているというエビダンスが示され初めてきた。多くの入院患者を抱える中国

の病院において、糖尿病、心血管系疾患、誤嚥性肺炎、妊娠時のトラブルの患者について歯周疾患関連の要因をアンケート調査した。また、それらの疾患を有する患者の歯周疾患罹患状態を調査した。

Key Words 歯周病、全身疾患、CPI、アンケート調査、入院患者

### 緒 言

口腔は消化器や呼吸器へのアクセスであり、決して独立した器官ではない。口腔の二大疾患である歯周病は口腔内の細菌群による感染症であり、歯周ポケット内に生息する細菌群は口腔内のみならず、気管を経由して誤嚥性肺炎を誘発したり、血行を介して身体の各種臓器に疾患を起こす可能性が指摘されている。古くから口腔内の慢性病変が、遠隔臓器へ病変を起こす、いわゆる遷延感作が知られており、また、糖尿病と歯周病との有意な相関は知られているが、その他の全身疾患との関係については、完全なエビダンスは得られていない。2002年にジュネーブで開催されたWHO, AAP, JAP, EFP共催の"Periodontal Medicine : Health Policy Implication"で歯周病は全身疾患に重要な影響を与えることが認識された。歯周治療がHbA1cを低下させるというGrossiの報告<sup>1)</sup>や、歯周病原菌感染は心血管系疾患でのリスクファクターであるとのMattila et alの報告<sup>2)</sup>などがあるが、まだ、疫学調査は十分ではない。

本調査研究は、多くの入院患者を擁する中国の病院で歯周病と全身疾患の関連性の検討を行った。

### 対象と方法

#### 1. 対象者

中国吉林省四平中心医院に入院している患者を本調査研究の対象者とした。

#### 2. 歯周疾患調査

糖尿病患者 11名(男性8名、女性3名、平均59.1歳)、肺炎患者4名(男性4名、平均73.5歳)、動脈硬化症患者16名(男性12名、女性4名、平均67.3歳)、心筋梗塞患者14名(男性11名、女性3名、平均67.1才)、妊娠のトラブル5名(平均27歳)の計50名を歯周病検診の対象者とした。

歯周疾患の調査はCPI (WHO) に従い、6 1|6  
6|16の6歯を診査した。それぞれに以下のコードを与えた。0 ; 健全、1 ; 歯肉出血、2 ; 歯石、3 ; 浅いポケット、4 ; 深いポケット

#### 3. 口腔内マクロ写真撮影

デジタルカメラ (EOS KISS, Canon) で入院患者のベッドサイドで撮影した。

#### 4. アンケート調査

入院患者3,000名から、了承の得られた406名について歯周病に関する以下の要因のアンケートからコホート調査を行った。

1. 歯磨きの回数 (0回/日 2~3回/日)
2. 歯磨き時間 (3分以内 3~5分)
3. 歯石除去の有無 (Yes No)
4. 動揺歯の有無 (Yes No)
5. 歯周病の家族歴 (Yes No)
6. 歯肉からの出血 (Yes No)
7. 歯並びが悪くなったかどうか (Yes No)
8. 口臭の有無 (Yes No)
9. 歯軋りの有無 (Yes No)
10. 歯周病の罹患 (Yes No わからない)
11. 喫煙本数 (0本 1-10本 11-20本 20本以上)

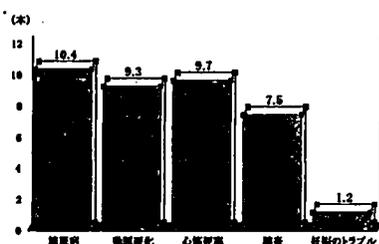
### 5. 統計学的分析

アンケート調査のリスクファクターは疾患毎にSPSS<sup>TR</sup> (Ver.12, Japan Inc, 東京) 統計ソフトにより、有意確立、オッズ比を求めた。

## 結 果

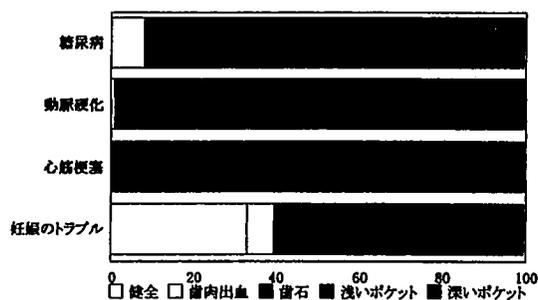
### 1. 各疾患患者の欠損歯数

下図に示したように欠損歯が最も多かったのは糖尿病患者で、平均10.4本であった。次に心筋梗塞症患者で9.7本、動脈硬化症患者9.3本でほとんど同じであった。肺炎患者は7.5本、妊娠トラブル患者は年齢が若いことから、1.2本と少なかった。



### 2. 各疾患におけるCPIスコア有病部位数

疾患毎のCPIスコアの平均部位数 (%) を下図に示した。全疾患で‘歯石’が最も多かった。たは‘浅いポケット’‘深いポケット’は心疾患で多く、糖尿病でも‘出血’と同程度であった。妊娠のトラブルは年齢が若いことから、‘健全’が多く、‘ポケット’はなかった。



### 3. 歯周病要因と各疾患との相関

疾患毎に歯周病の要因との相関をオッズ比で求め、大きい順に表した。

#### 1) 糖尿病

要因	有意確立	オッズ値(95%信頼限界)
歯軋り	0.06	4.8 (0.2-0.7)
喫煙	0.05	2.8 (0.7-2.2)
口臭	0.18	2.0 (0.8-2.7)
歯周病	0.64	1.5 (0.5-1.9)
歯磨き時間	0.334	1.5 (0.4-1.1)
歯磨き回数	0.58	8.1 (0.3-1.0)
歯肉出血	0.515	1.4 (0.8-2.8)
歯石除去	0.929	1.0 (0.4-1.1)

#### 2) 心筋梗塞

要因	有意確立	オッズ値(95%信頼限界)
家族歴	0.08	10.2 (0.1-0.8)
口臭	0.04	4.6 (0.3-1.1)
歯肉出血	0.21	2.8 (0.1-0.4)
歯列異常	0.33	2.3 (0.1-0.4)
歯磨き時間	0.5	2.2 (1.3-5.9)
動揺歯	0.41	1.8 (0.2-1.1)

#### 3) 心内膜炎

要因	有意確立	オッズ値(95%信頼限界)
歯軋り	0.066	2.4 (0.6-2.1)
歯肉出血	0.249	1.6 (0.9-2.6)
口臭	0.364	1.5 (0.7-2.4)
動揺歯	0.502	0.8 (1.1-3.2)

## 4) 動脈硬化

要因	有意確立	オッズ値(95%信頼限界)
歯列異常	0.05	3.0 (0.6-2.6)
歯磨き回数	0.04	2.4 (0.8-2.4)
歯磨き時間	0.13	1.8 (0.8-2.4)
喫煙	0.29	1.5 (0.6-1.7)
歯周病	0.59	1.4 (0.9-3.8)
歯石除去	0.977	1.0 (0.9-2.4)

## 5) 肺炎

要因有意確立オッズ値(95%信頼限界)

歯周病 0.05 3.8 (1.0-4.3)

要因	有意確立	オッズ値(95%信頼限界)
家族歴	0.24	2.8 (0.4-3.7)
喫煙	0.02	2.5 (0.4-1.0)
歯石除去	0.22	1.6 (0.6-1.5)
口臭	0.36	1.5 (0.4-1.3)
歯磨き時間	0.46	1.4 (0.8-2.7)
歯磨き回数	0.68	1.2 (0.6-1.8)
歯軋り	0.74	1.2 (1.0-4.3)

## 6) 妊娠のトラブル

要因	有意確立	オッズ値(95%信頼限界)
歯肉出血	0.04	13.4 (0.1-1.9))
歯磨き時間	0.15	6.5 (0.1-1.7)
歯列異常	1	4.1 (0.1-0.1)
口臭	0.98	1.0 (0.1-11.7)

## 4. 入院患者の口腔内所見

各疾患の典型的な口腔内所見とアンケート調査および診査の結果を示す。

## 糖尿病



男性 77歳 血糖値 259mg/dl  
歯磨き (-)、動揺歯 (+)、口臭 (+)

## 肺炎



72歳 男性 歯磨き (-) 動揺歯 (+)  
歯肉出血 (+) 口臭 (+) 喫煙 20本

## 心筋梗塞



78歳 男性 歯肉出血 (+) 喫煙 (-)  
歯石除去 (-)

### 動脈硬化



女性 79 歳

動揺歯 (+) 歯石除去 (-) 歯肉出血 (+)

### 妊娠のトラブル



22 歳 妊娠 9 ヶ月

2 回妊娠したが流産

### 考 察

平成 15 年に視察を行い、有効を深めた中国吉林省四平中心医院において、今回、我々は全身疾患と歯周病の関連性の調査研究を行った。本病院はベッド数約 1000 床を有する総合病院である。歯周病と関連が深いとされる疾患を有する患者が多数入院していた。糖尿病、心筋梗塞、動脈硬化、肺炎、妊娠中のトラブル患者は写真で示したように重度の歯周病であった。糖尿病を誘発する関連物質として、歯周病により、マクロファージから分泌される  $TNF-\alpha$ 、 $IL-1\beta$ 、 $IL-6$  などが、インスリンレセプターのインヒビターとして、インスリン抵抗性を高めることが知られている<sup>9)</sup>。本病院ではこれらの血中サイトカインの測定を行っていないので、関連性を分析できなかった。

寝たきり老人などの易感染性患者は口腔常在菌を誤嚥し、肺の日和見感染を起こし<sup>4)</sup>、また、*A.a*が肺のアポト

ーシスを起こすことが知られている<sup>10)</sup>が、今回は細菌検出を行うことは出来なかった。心内膜炎を起こす歯周病原菌は数多く知られており、入院患者でこの歯周病原菌を検出すること、さらにサイトカインの検出などの臨床検査は今後の課題である。アンケート調査では歯周病に関する要因が各疾患と高い関連性を有することが示された。喫煙は糖尿病、肺炎、動脈硬化との関連性、歯肉出血は肺炎以外の全ての疾患で関連性がみられた。歯磨きに関しては心内膜炎以外の疾患で関連性がみられた。口臭は動脈硬化以外の疾患で関連性がみられた。歯周病の家族歴に関しては、心筋梗塞と肺炎で高いオッズ比を示したが、‘不明’の回答が多く、信憑性が薄いと思われた。‘歯周病があると思うか’についても同様に本人の認識に問題があったと思われる。アンケート調査に関しては本病院の中国人歯科医師が面接形式で行ったものであり、信頼性は大きいと思われる。

### 参考文献

- 1) Grossi SG: Treatment of Periodontal Disease and Control of Diabetes: An Assessment of the Evidence and Need for Future Research. *Ann Periodontol* 2001、6:138-145.
- 2) Mattila KJ, Valle MS, Nieminen MS, Valtonen VV, Hietaniemi KL: Dental infections and coronary atherosclerosis. *Atherosclerosis* 3: :205-11,1993.
- 3) Salvi GE, Beck JD, Offenbacher S: PGE2, IL-1 beta, and TNF-alpha responses in diabetics as modifiers of periodontal disease expression. *Ann Periodontol*. 3:40-50, 1998.
- 4) Kikuchi R, Watabe N, Konno T, Mishina N, Sekizawa K, Sasaki H: High incidence of silent aspiration in elderly patients with community-acquired pneumonia. *Am J Resp Cri Care Med*, 150:251-3, 1994.
- 5) Nonaka K, Ishisaki A, Okahashi N, Koseki T, Kato S, et al: Involvement of caspases in apoptotic cell death of murine macrophages infected with *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *J Periodont Res*, 2001, 36:40-47, 2001.

財団法人日中医学協会  
2004年度共同研究等助成金－調査・共同研究－報告書

2005 年 3 月 8 日

財団法人 日中医学協会 御中

貴財団より助成金を受領して行った研究テーマについて報告いたします。

添付資料： 研究報告書

受給者氏名： 松葉 剛 

所属機関名： 順天堂大学医学部

所属部署： 衛生学講座 職名： 助手

〒 113-8421

所在地： 東京都文京区本郷 2-1-1

電話： 03-5802-1047 内線： \_\_\_\_\_

1. 助成金額： 1,000,000 円

2. 研究テーマ

雲南省における少数民族および流動人口のエイズに関する知識、態度、行動に関する調査

3. 成果の概要 (100字程度)

HIV/AIDS 症例が急増している中国雲南省で、HIV 感染に対してハイリスク・グループと目される少数民族や流動人口を対象に、エイズに関する知識、態度、行動に関して調査し、健康教育等の介入に有用なデータを得た。

4. 研究組織

日本側研究者氏名： 松葉 剛 職名： 助手

所属機関： 順天堂大学医学部 部署： 衛生学講座

中国側研究者氏名： 梁志松 職名： 副処長

所属機関： 雲南省第一人民医院 部署： 科学教育処

## 雲南省における少数民族および流動人口のエイズに関する知識、態度、行動に関する調査

日本側研究者	松葉 剛
所属機関	順天堂大学医学部衛生学
中国側共同研究者	梁志松
所属機関	雲南省第一人民医院科学教育処

### 要旨

今日、中国では雲南省や河南省を中心に HIV 感染者が急激に増加しているが、感染予防対策については遅れや問題点が指摘されている。HIV 感染予防では IEC (Information, Education and Communication) の拡充による情報の提供と正しい知識の普及が主要な対策となるが、少数民族や流動人口はこういった情報源へのアクセスが制限されていることから HIV のみならず全ての感染症対策上のハイリスク・グループと目されている。今回このような集団を対象にエイズや HIV や HIV 感染予防に関する知識、態度、行動について調査を行った。2004 年 6 月～11 月、雲南省内各地で少数民族や流動人口を含む集団を対象に質問紙による調査を行い 693 例から回答が得られた。データを分析したところ、情報源についてはテレビを選択したものが最も多かった。ただしテレビについては漢族のほうが少数民族より多く情報源として活用されており統計学的に有意差を認めた。また文字によるメディアでは年齢、学歴、職業による差が認められた。感染予防の知識について、コンドームの予防効果については性、年齢では有意差は見られないものの、民族では少数民族より漢族に、学歴では高学歴なものに正しい回答が多く有意な差が見られた。HIV 感染や AIDS の予防についての知識、態度、行動については民族や職業による差は認められたものの、年齢や学歴といった因子がより大きく影響していることが明らかになった。

**Key Words** AIDS, 雲南省, 少数民族, 流動人口, 共分散構造分析

### 緒言:

今日、中国では雲南省や河南省を中心に HIV 感染者が急激に増加している。中国衛生部や UNAIDS、WHO などによる A Joint Assessment of HIV/AIDS Prevention, Treatment and care in China (2004) によると 2003 年の中国における推定 HIV/AIDS 症例数は 84 万人であった。しかしその後 2004 年 9 月までの間に 50% という急激な増加が見られている。すべての省で症例数の増加が見られるが、地域別では雲南、河南、広西では 2004 年 9 月までの累積患者数が 1 万人を超えている。感染様式では IDU (Injection Drug User) が 44% と最も多く、次に多いのは売血による注射針共用による感染で 24% を占めている。雲南省での流行は主に IDU によるものとされ、河南省では売血によることが指摘されている。

雲南省ではすでに 1990 年代よりミャンマーと国境を接する徳宏州での HIV 感染増加が認められ、先に流行がみられ、地理的に隣接する東南アジア諸国からの流入が指摘されていた。この地域はゴールドトライアングルとして有名な世界的な麻薬生産地であり、少数民族の間に IDU が多く当時はこのような集団内に限局した流行と認識されていた。しかしこの間の経済発展により農村人口の都市への流入など人口の流動化が活発になり、また都市部ではあらたに性産業が現れるようになった。このような短期間での社会構造の変化が雲南省内での HIV の蔓延に大きく影響したことが推測される。

エイズ対策の中で中核を占めるのは、IEC (Information, Education and Communication) であるが中国政府のこれらのプログラムの実行や効果などについては UNAIDS から改善と拡充が要求されている。これを受けて中国国務院エイズ予防委員会より 2004 年～2008 年にかけてのエイズ予防に関する行動計画が提出された。雲南省においても目標値を設定したエイズ予防に対する行動計画を策定している。

前述のとおり雲南省では保健行動的に少数民族や流動人口の人々は感染症対策上ハイリスク・グループであるが、更に IEC へのアクセスについても不利な側面が指摘されている。本研究は、これらハイリスク・グループのエイズに関する知識・態度・予防行動を調査することにより、予防行動または健康的行動変容に影響を与える過程における要因を分析することによって、健康情報や健康教育へのアクセス状況の現状とあわせ、保健プログラムの介入が必要な点や優先順位を明示し、ハイリスク・グループへの効果的な感染予防対策に資するデータを提供することを目的に行われた。

## 対象と方法：

雲南省に居住する HIV 感染のハイリスク・グループと目される少数民族、流動人口、CSW (Commercial Sex Worker) を調査対象に、HIV/AIDS に関する知識・態度・行動について質問紙を用いインタビュー調査を行った。2004 年 6 月～11 月、雲南省内各地のバスターミナルや市場、ダンスホールなど対象者が多く集まる場所で、15 歳以上の男女に対し質問者が質問紙の内容について質問を行った。少数民族についてはいくつかの農村においても同様に調査を行った。対象者の抽出についてはなるべく調査施設内で均等になるように配慮された。693 例より回答が得られ、クロス集計や多変量解析などのデータ分析については統計分析ソフト SPSS および HALWIN、共分散構造分析については Amos 4 を使用した。

## 結果：

### 1) 個人特性分布

年齢は 20 歳代が最も多く 318 名 (45.9%)、次に 30 歳代が 138 名 (19.9%) を占めた。性別では女性が 386 名 (55.7%) とやや女性が多かった。民族別では漢族が 392 名 (58.4%) と半数以上で、少数民族は 18 の民族からの回答が見られた。民族別ではペー族、イ族、ダイ族、ハニ族はそれぞれ全体の 5% 以上を占めた。学歴は中卒以下が 107 名 (15.8%)、中卒～中専卒が 349 名 (51.6%)、大卒以上が 220 名 (32.5%) であった。職業では学生が 170 名 (24.8%) と最も多く、農業が 126 名 (18.4%)、流動人口では一般の労働者が 95 名 (13.9%) であった。その他は管理職や技術者などであった。

これら個人特性分布を踏まえ、以下クロス集計を行う上で、年齢は 30 歳未満と 30 歳以上、性別は男女、民族は漢民族と少数民族、学歴は中卒以下・中卒～中専・大卒以上、職業を管理職や技術職・一般の労働者・農業従事者の各カテゴリーに分類し分析を行った。

### 2) HIV/AIDS に関する情報源

情報源ではテレビの利用が最も多く 456 名 (65.8%)、次に新聞 (298 名、43.1%)、ラジオ (221 名、32.0%) が多かった。パンフレット (65 名、9.4%) や掲示板 (94 名、13.6%) を利用したと答えたものは少なかった。性別では情報源の種類に差は見られなかった。年齢別ではテレビ、健康教育、掲示板、パンフレットで有意差がみられ ( $p < 0.01$ ) 30 歳未満でこれらのメディアの利用度が高いことがわかった。学歴ではテレビ、ラジオ、新聞・雑誌、パンフレット、掲示板、健康教育で有意差が認められ ( $p < 0.01$ )、学歴が高いほどこれらのメディアの利用度が高いことがわかった。民族別ではテレビの利用に有意差が認められ ( $p < 0.01$ ) 漢民族の利用度が少数民族より高かった。職業別ではテレビ、ラジオ、新聞・雑誌、掲示板で有意差を認め ( $p < 0.01$ )、テレビでは農業従事者の利用度が低く、その他では一般の労働者、農業従事者が管理職や技術職に比べて利用度が低いことが明らかになった。

### 3) HIV 感染予防に関する知識

コンドームの HIV 感染予防効果について聞いた質問では、318 名 (48.5%) が「予防できない」と回答した。「予防可能」「感染の機会を減少させる」と答えたものはそれぞれ 166 名 (25.3%)、171 名 (27.1%) であった。性別、年齢別、民族別で有意差は認められなかった。学歴別では学歴が高いほど「予防できない」との回答が多く ( $p < 0.01$ )、職業別では管理職や技術者に「予防できない」との回答が多かった ( $p < 0.01$ )。

HIV 感染経路については「性行為」によると答えたものが 556 名 (85.4%) と最も多く、「注射針の共有」が 527 名 (81.0%)、「母子感染」が 480 名 (73.7%)、「HIV 非チェックの血液製剤」が 478 名 (73.5%) と 7 割以上の者は正しく理解していることがわかった。しかし、「蚊にさされる」を選択したのも 358 名 (55.0%) おり、「握手」、「一緒に食事する」、「オフィス用具の共用」、「一緒にプールに入る」などを選択したのも 10% 前後みられた。性別ではこの分布に有意差は認められなかった。年齢では「母子感染」では 30 歳未満の回答が多く ( $p < 0.05$ )、「蚊にさされる」、「一緒にプールに入る」など誤った回答は 30 歳以上に多くみられた ( $p < 0.01$ )。学歴別では、「性行為」、「注射針の共有」、「母子感染」、「HIV 非チェックの血液製剤」といった正しい解答について学歴が高いほど多くなり ( $p < 0.01$ )、「握手」や「オフィス用具の共用」などは学歴が低いほど多くなる ( $p < 0.01$ ) 傾向が見られた。職業別では「HIV 非チェックの血液製剤」を選択した者の割合は一般の労働者と農業従事者で低く ( $p < 0.01$ )、「母子感染」では農業従事者で低かった ( $p < 0.01$ )。「一緒にプールに入る」を選択したものは一般の労働者で多かった ( $p < 0.01$ )。また「蚊にさされる」を結果変数に、個人特性を説明変数にして林の数量化 2 類により、各カテゴリーアイテムの重み係数を求めた (図 1)。その結果年齢で 30 歳以上、学歴で中卒未満、職業で一般の労働者などが「蚊にさされる」の選択と関連があることが示された。

HIV 感染後の予後についての質問では、「7 年から 10 年の潜伏期がある」、「治らないが一生薬を飲み続ければコントロールが可能」といった正しい解答を選択したものはそれぞれ 312 名 (45.1%)、254 名 (36.7%) であった。「すぐに

発症し1年以内に死亡」や「治療を受けさえすれば治る」を選択したものは少なく、それぞれ28名(4.0%)、72名(10.4%)であった。性別や年齢別ではこれらの知識に有意差は認められなかった。学歴別では「7年から10年の潜伏期がある」を選択したものが大卒以上の群で群全体の57.3%と多く( $p<0.01$ )、民族別では漢民族に「治らないが一生薬を飲み続けければコントロールが可能」を選択したものが少数民族にくらべて多かった( $p<0.01$ )。職業別では「7年から10年の潜伏期がある」を選択したものは有意差がみられ( $p<0.01$ )管理職や技術職で高く(50.6%)一般の労働者で低かった(27.4%)。また「治らないが一生薬を飲み続けければコントロールが可能」を選んだものは農業従事者では低かった( $p<0.01$ )。

#### 4) HIV/AIDSに対する態度

「自分がHIVに感染するか」という問いに対して、338名(51.2%)は「ない」、237名(35.9%)は「可能性が低い」と回答した。また「可能性は大きい」、「非常に大きい」と回答したものはそれぞれ51名(7.7%)、34名(5.2%)であった。性別では男性より女性に「可能性は大きい」、「非常に大きい」と答えた者が多く( $p<0.01$ )、年齢では30歳以上で、また学歴別では中卒未満のもので同様に回答したものが多かった( $p<0.01$ )。民族別、職業別で有意差は認められなかった。

次に身近なHIV感染者に対する態度についての質問では、「親戚にAIDS患者がいたら付き合うか」との問いに対して162名(24.5%)が「はい」と回答した。性別では有意差は認められなかったが、年齢別では30歳以上の者に「はい」と回答したものが多く( $p<0.05$ )、学歴では中卒未満の者に( $p<0.01$ )、民族別では漢民族に( $p<0.05$ )、職業別では一般の労働者や農業従事者に( $p<0.05$ )同様の回答が有意に多かった。また、「近所にAIDS患者がいたらその地域に住みたいか」との質問に対しては、性別、年齢別、民族別で有意差は認められなかったが、職業別では中卒～中専卒および大卒以上のもので「はい」と回答したものの割合が多かった( $p<0.01$ )。

#### 5) HIV感染に対する予防行動

「麻薬を用いない」が最も多く539名(83.4%)が選択した。以下「輸血や注射の機会を減らす」が482名(74.5%)、「性行為の際には正しくコンドームを使う」が453名(70.0%)であった。「感染した女性は胎児に感染させるので妊娠しない」、「売血などでの伝播を断ち切る」、「性病を早く治療する」を選択したものは、それぞれ372名(57.4%)、297名(46.0%)、282名(43.6%)であった。また誤った予防行動として、「蚊にさされないようにする」を選択したものは299名(46.2%)おり、以下「AIDS患者と一緒にプールに入らない」が172名(26.6%)、「AIDS患者と一緒に食事しない」が109名(16.8%)、「AIDS患者を隔離しみんなを守る」が106名(16.4%)であった。性別では女性より男性で「性行為の際には正しくコンドームを使う」と答えたものが有意に多く( $p<0.05$ )、年齢別では30歳以上で「売血などでの伝播を断ち切る」と回答したものが有意に多かった( $p<0.01$ )。学歴別では「麻薬を用いない」、「性行為の際には正しくコンドームを使う」、「感染した女性は胎児に感染させるので妊娠しない」、「売血などでの伝播を断ち切る」、「性病を早く治療する」については大卒以上の者の回答が有意に多かった( $p<0.01$ )。また「蚊にさされないようにする」、「AIDS患者と一緒に食事しない」については中卒以下のものの回答が有意に多かった( $p<0.01$ )。民族別では「感染した女性は胎児に感染させるので妊娠しない」( $p<0.05$ )、「売血などでの伝播を断ち切る」( $p<0.01$ )について漢民族の回答が有意に多かった。職業別では「輸血や注射の機会を減らす」、「感染した女性は胎児に感染させるので妊娠しない」、「性行為の際には正しくコンドームを使う」を選択したものは管理職や技術職で高く( $p<0.05$ )、「性病を早く治療する」( $p<0.05$ )、「売血などでの伝播を断ち切る」( $p<0.01$ )を回答したものは一般の労働者で多かった。誤った回答では、「AIDS患者と一緒に食事しない」、「AIDS患者を隔離しみんなを守る」を選択した者は一般の労働者で多く( $p<0.05$ )、「AIDS患者と一緒にプールに入らない」を選択したものは管理職や技術職で高かった( $p<0.01$ )。

予防に対する自信については、400名(62.2%)が「ある」、191名(29.7%)が「まあまあある」と答え、「ない」と答えたものは52名(8.1%)であった。性別、年齢別、学歴別、民族別では分布に有意差は認められなかったが、職業別では管理職や技術職で「ある」と答えたものが有意に多かった( $p<0.05$ )。

#### 6) 情報源、知識、態度のまとめ

共分散構造分析を用い情報源、知識、態度についての関係をモデル化し分析を行った(図2)。健康情報が誤った知識に比べ正しい知識との間に高い関連を認め(関連係数0.32)、正しい知識はHIV感染に対しての自信のある態度と正の相関があることが、また誤った知識は負の相関があることが分析の結果明らかになった。

## 考察:

当調査は少数民族や流動人口といった感染症対策上でハイリスク・グループとされる集団の特性について明らかにすることを目的に行われた。少数民族については調査対象者の約 40%を占め、それぞれの測定因子について漢民族との比較を行った。ただし少数民族と言っても都市部に居住するものから農村に暮らすもの、その教育水準など一様ではなく、このような因子による影響を考慮する必要があった。また流動人口については一般に民工と呼ばれる建設労働者や CSW などがいわゆるハイリスク・グループを構成する集団として認識されているが、これらの人々の中には流動人口でない者も含まれ、また流動人口の中には管理職や技術職に就いている者も含まれている。このようなことから当調査では職業を管理職や技術職、一般の労働者、農業従事者のカテゴリーに分け分析を行った。一般の労働者のカテゴリー内にいわゆる流動人口が多く含まれる。

HIV/AIDS に関する情報源については、テレビの利用が多いことがわかった。但し年齢では 30 歳未満、学歴では大学以上、民族では漢民族、職業では学生など、情報へのアクセシビリティについて有利な者とそうでない者との差が認められた。パンフレットや掲示板的利用は限られていた。住民にとって身近な媒体なので、今後拡充が望まれる。文字による媒体についても学歴や職業などで情報へのアクセシビリティについて有利な者とそうでない者との差が認められた。

HIV 感染予防に関する知識については、感染経路では「性行為」、「静注」、「母子感染」、「血液製剤」などについては 70%以上の者が理解していた。ただし雲南省の HIV/AIDS 症例の有病数からみると決して高い値とはいえない。更に「蚊にさされる」を選択したものが半数以上を占めるなど、まだ HIV 感染予防について十分に正しい知識が伝えられていないことが明らかになった。

態度については正しい知識が感染予防の自信に関連することが共分散構造分析により認められた。また HIV と共に生きる人との付き合いに関する態度については、全般的に受け入れる気持ちが低く、こういった態度が症例の潜伏などの問題を生じることから、態度を変容させるための知識の向上に関する IEC プログラムの導入および強化が望まれる。予防行動については麻薬に関しては HIV 感染のリスクを高めるとの認識が高いことが明らかになった。雲南省における HIV/AIDS の蔓延を許した要因であることから認識度が高いことが推測される。コンドームの使用については男女差が認められ、使う側に有利な結果を示している。また知識について問題が指摘された中卒以下の者や一般の労働者に誤った行動を選択しているものが多かった。今回の調査では少数民族かどうかということよりも、学歴や職業が感染予防対策上重要なファクターであることが認められた。ただし、今回は少数民族でも都市部に居住するものも多く対象となっており、実際農村に暮らす者には学歴や職業上でのリスクを併せ持つケースが多いと考えられる。今後、こういった集団に対する詳細な調査が望まれる。

## 参考文献:

1. State Council AIDS Working Committee Office and UN Theme Group on HIV/AIDS in China: A Joint Assessment of HIV/AIDS Prevention, Treatment and Care in China (2004)
2. Lu L. et al. : Analysis of epidemiology trend of acquired immunodeficiency syndrome in Yunnan Province of China, Zhonghua Yufang Yixue Zazhi, 38(5) 309-12 (2004)
3. Watts J. , Chinese province leads the way in facing up to HIV/AIDS. Yunnan Province's radical approach makes a new openness to HIV/AIDS in China., Lancet, 363(9425) 1964 (2004)
4. AIDS epidemic update: 2004, WHO, UNAIDS(2004)
5. Thomas J., HIV/AIDS in China: migrant population, drug injection responsible for increased transmission. AIDSlink, (49): 12-4 (1998)
6. Zheng X. et al., The natural history of HIV infection among IDUs in Ruili, Yunnan province, China., Zhonghua Liuxingbingxue Zhazhi, 21(1): 17-8 (2000)

注：本研究は、2005年3月29日『第75回日本衛生学会総会』にて発表予定。

作成日：2005年3月1日

図1 HIV感染経路「蚊にさされる」の選択：数量化2類による重み係数

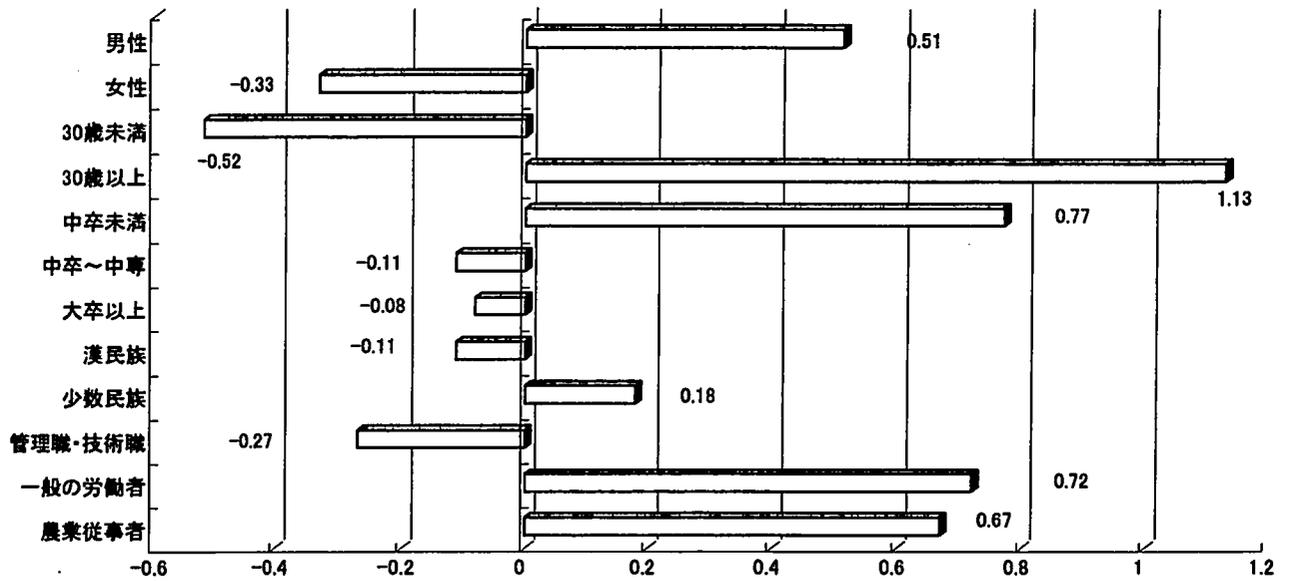
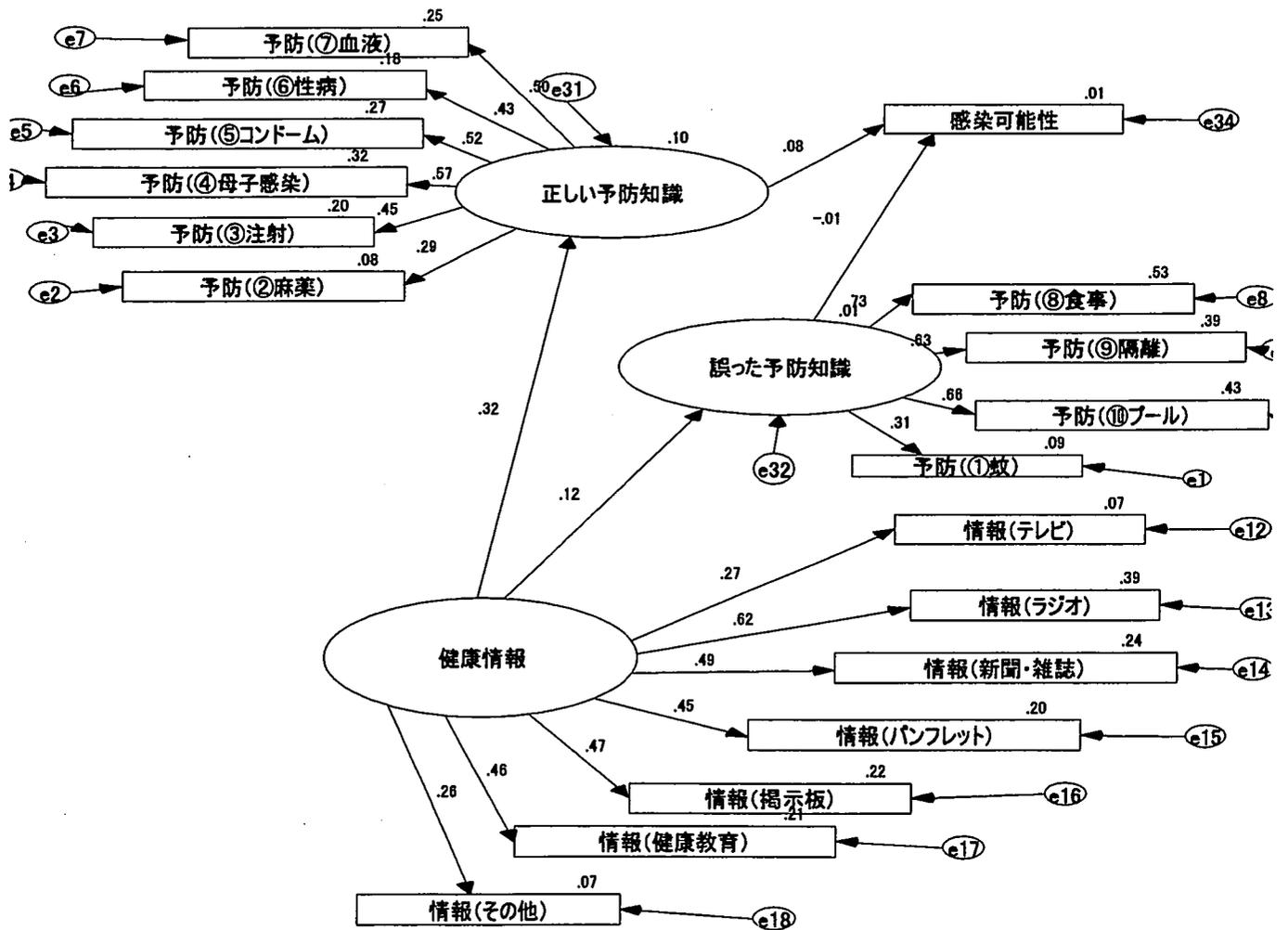


図2 HIV/AIDSの情報源、知識、態度



財団法人日中医学協会  
2004年度共同研究等助成金—調査・共同研究—報告書

2005年 3月 15日

財団法人 日中医学協会 御中

貴財団より助成金を受領して行った研究テーマについて報告いたします。

添付資料： 研究報告書

受給者氏名： 成瀬 達 

所属機関名： 名古屋大学大学院医学系研究科

所属部署： 病態修復内科学 職名： 助教授

〒 466-8550

所在地： 名古屋市昭和区鶴舞町65

電話： 052-744-2170 (直通) 内線： \_\_\_\_\_

1. 助成金額： 1,000,000 円

2. 研究テーマ

中国における慢性膵炎の調査とその遺伝的背景ならびに食習慣に関する研究

3. 成果の概要 (100字程度)

中国における慢性膵炎の発症頻度と発症に関与する遺伝ならびに環境因子の調査研究を企画した。慢性膵炎の診断基準(案)を作成した。食生活の関与を調べるため、栄養調査票を作成した。遺伝的背景を調査するため、健常人を対象とした遺伝子解析を行った。

4. 研究組織

日本側研究者氏名： 成瀬 達 職名： 助教授

所属機関： 名古屋大学大学院医学系研究科 部署： 病態修復内科学

中国側研究者氏名： 金 春香 職名： 教授

所属機関： 吉林大学白求恩医学部 部署： 第二臨床学院

## 中国における慢性膵炎の調査とその遺伝的背景ならびに食習慣に関する研究

研究者氏名 成瀬 達  
所属研究機関 名古屋大学大学院病態内科 助教授  
共同研究者氏名 名古屋大学総合保健体育科学センター  
近藤孝晴、石黒 洋、藤木理代、中莖みゆき、宋 海珍  
坂田麻衣、高木佐知子  
吉林大学 第二臨床学院・第一臨床学院  
金 春香、慕 徳林、王 冠軍  
南京医科大学 第一附属病院  
魏 陸新  
南京中医薬学大学 第三附属病院  
張 蘇門、李 儉、金 小晶

### 要旨

中国における慢性膵炎の発症頻度と発症に関与する遺伝ならびに環境因子の調査研究を企画した。慢性膵炎の診断基準（案）を作成した。食生活の関与を調べるため、栄養調査票を作成した。更に、遺伝的背景を調査するため、健常人を対象とした遺伝子解析を行った。

**Key Words** 慢性膵炎、診断基準、栄養調査票、CFTR 遺伝子

### 緒言：

慢性膵炎は膵炎発作を反復し、膵腺房細胞の脱落と線維化をきたし、膵石が生じる進行性の炎症疾患である。アルコールの多飲が主な成因とされているが、多飲者が全て慢性膵炎を発症するわけではない。従って、本症は何らかの遺伝的素因と生活習慣が関与する多因子疾患であると推定される。嚢胞線維症の原因である *cystic fibrosis transmembrane conductance regulator* (CFTR) 遺伝子の変異・多型は、飲酒習慣のない女性などに発症する特発性膵炎の発症リスクを高めると言われている。嚢胞線維症は白人に多く（出生 2500 人に 1 人）、日本人や中国人では極めて稀な疾患である。最近、私どもは日本人の慢性膵炎患者の遺伝的背景因子の研究を進めており、CFTR 遺伝子が日本人の慢性膵炎の発症に関与している証拠が得られつつある(1-3)。一方、中国では経済の発展に伴い、飲酒習慣、高カロリー摂取の増加など食生活の西洋化が進むと予想される。今後、我が国と同様に、生活習慣病が増加することが予想され、慢性膵炎もそのひとつと考えられる。

現在、中国では慢性膵炎の統一診断基準はなく、本症の発症頻度などの疫学的データもない。そこで、まず日本膵臓学会の診断基準(4)を参考に、中国の慢性膵炎診断基準（案）を作成し、この基準に合致する症例の調査とその遺伝的背景と食習慣など環境因子の解析を吉林大学、南京医科大学、南京中医薬学大学と名古屋大学が共同で行うことを企画した。

### 方法と成績：

#### 1. 慢性膵炎診断基準（案）の作成

中国における共通の慢性膵炎診断基準がないので、日本膵臓学会の診断基準（1995年）(4)に準じた診断基準、1) 画像診断（腹部単純X線写真、エコー、CT）にて膵管内に膵石を認める、2) 膵管像に異常を認める、3) 膵外分泌・内分泌機能に異常を認める、を参考にして診断基準案（図1）を作成した。この案を基に症例を集積し、診断基準案の妥当性ならびに診断法の詳細を検討し、最終の診断基準を作成する。

#### 2. 慢性膵炎患者の食習慣に関する調査

慢性膵炎の発症要因を調べ、本症を予防するためには、食習慣を調査する必要がある。中国における食事内容、摂取栄養量、飲酒量などの経年的変化と慢性膵炎の発症頻度の推移を調査し、日中間で比較することは、本症の病因の解明だけでなく、将来の予防法の開発に重要な役割を果たすことが期待される。日本の疫学調査で作成された、食事調査表を基に、中国の食習慣にあった調査表（図2）を作成した。

### 3. CFTR 遺伝子解析

慢性膵炎の遺伝的背景因子を同定するため、まず、健康人のCFTR 遺伝子多型の検索を進めた。健康人（長春；男性30名、女性34名、南京；男性36名、女性17名）の末梢白血球よりDNAを抽出し、(TG)repeat、poly T、M470V多型を直接シーケンス法ならびに制限酵素法を用いて解析を進めている。DNAの抽出は2004年7月に完了した。検体の日本送付に関する中国政府の許可を得るため、日本への送付が2005年3月となったため、現在、名古屋大学にて解析中である。

#### 考案：

慢性膵炎は、各個人の膵炎に成り易さを決める遺伝的素因に、飲酒などの生活習慣が加わることにより発症する、多因子疾患であると考えられる。現在、中国では共通の慢性膵炎診断基準がない。今後、症例を集積し、長期の経過観察を行うためには、各施設で共通の診断基準により診断することが、必要である。そこで、とりあえず日本膵臓学会が作成した診断基準（1995年）に準じた診断基準（案）を作成した。本基準案の骨子は、(1)膵石の存在、(2)膵管像の異常、(3)膵外分泌・内分泌機能異常、の3点である。今後、この案を基に症例調査を行い、診断基準案の妥当性について検討を行う必要がある。

経済の発展は食ならびに生活習慣に大きな変化をもたらす。生活習慣の変化は、罹患率など疾病構造の変化をもたらすことが知られている。本研究では、食生活の変化と慢性膵炎発症の関連を、長期に解析することを目的としている。そこで、平成10年度に厚生省特定疾患消化器系疾患調査研究班、難治性膵疾患分科会により行われた症例対照研究に用いられた栄養調査表を参考に、その中国語版を作成した。この調査により、中国における喫煙、飲酒ならびに栄養状態の変化と慢性膵炎の関連が明らかになることが、期待される。

CFTR 遺伝子変異および多型、特に exon 9 の欠損が高まる (TG)repeat と poly T および Cl<sup>-</sup>チャネル機能を低下させる M470V 多型を中心に解析を進めている。私どもの研究から日本人のCFTR 遺伝子は白人とは異なる独自の進化を遂げていることが分かってきた(2)。即ち、日本人には正常のCFTR 蛋白の合成が減る多型(TG12)の頻度が高く、嚢胞線維症の原因となるCFTR 蛋白機能が消失するような変異は認めなかった。中国人のCFTR 遺伝子多型は、日本人に類似していると推定される。今後、健康人の多型パターンを解析することにより、名古屋大学で開発された慢性膵炎関連遺伝子多型スクリーニングシステムが、中国の慢性膵炎患者に応用できるかが確認できると思われる。

#### 参考文献

1. Naruse S, et al. *Pancreas* 28, e80-85 (2004). A finger sweat chloride test for the detection of a high-risk group of chronic pancreatitis.
2. Fujiki K, et al. *J Med Genet* 41, e55 (2004). Genetic evidence for CFTR dysfunction in Japanese: background for chronic pancreatitis
3. Naruse S. *Intern Med.* 43, 1093-4 (2004). Do CFTR gene polymorphisms determine the susceptibility to alcoholic chronic pancreatitis?
4. 慢性膵炎診断基準委員会 膵臓 9, 180 (1994). 膵炎の分類と臨床診断基準（案）.
5. 玉腰暁子、他 厚生省特定疾患消化器系疾患調査研究班、難治性膵疾患分科会 平成10年度報告書 48-55, (1998) 症例対照研究による慢性膵炎発症要因の検討.

图1 慢性胰腺炎诊断基准(案)

中国慢性胰腺炎诊断指标(案)

慢性胰腺炎是以胰腺腺泡细胞的脱落坏死,小叶间的纤维化及胰管结石为主体的进行性的炎性疾病。典型的慢性胰腺炎可见,腹痛、恶心、呕吐、消化不良及腹部压痛等的临床症状,或者以胰腺内、外分泌功能不全为基础的临床表现。慢性胰腺炎的临床诊断指标是适合于具有如上临床症状或临床征候的病例。但是,慢性胰腺炎中也有在观察期间无腹痛性或无症状性的病例。对于这种病例,应适用更加严格的临床诊断指标,及隔期多次检查所见为据。

慢性胰腺炎的确诊例(definite chronic pancreatitis)

1. 腹部超声波检查(US),胰腺内可见伴有声影的强回声病灶。
2. X线(CT)检查,可见胰腺内的钙化灶。
3. 逆行性胆道胰管内窥镜造影(ERCP)显示以下所见:
  - 1) 胰腺胰管分支不均匀不规则性扩张。
  - 2) 主胰管因结石、蛋白栓等而闭塞、狭窄,使胰头侧的主胰管或胰管分支不规则性扩张。
4. 切除的胰腺组织,其实质减少,纤维化散在于整体。胰腺纤维化是不规则的,主要观察在小叶间。

此外,伴有蛋白栓、胰腺结石、胰管扩张及囊肿形成。

慢性胰腺炎准确诊例(probable chronic pancreatitis)

1. US显示,胰腺内呈亮点较粗,分布不均的实质性强回声,胰管不规则性

慢性胰腺炎准确诊例(probable chronic pancreatitis)

1. US显示,胰腺内呈亮点较粗,分布不均的实质性强回声,胰管不规则性

- 体重减少 1. 每日 2. 有时 3. 无
3. 合并症、基础疾病: 糖尿病 1. 每日 2. 有时 3. 无  
胃·十二指肠溃疡 1. 每日 2. 有时 3. 无  
胆结石 1. 每日 2. 有时 3. 无  
高脂血症 1. 每日 2. 有时 3. 无
  4. 父母、兄弟姐妹、祖父母中有慢性胰腺炎者 1. 每日 2. 有时 3. 无

吸烟习惯(请回答此次发病前的情况)

1. 几乎没有吸烟
2. 发病前禁烟
  - 1) 抽烟的种类 1. 香烟 2. 卷烟 3. 其它
  - 2) 日平均量 ( )根
  - 3) 抽烟的起始年龄 ( )岁
  - 4) 禁烟的年龄 ( )岁, ( )年前
  - 5) 吸烟年限、合计 ( )年间
  - 6) 禁烟的理由是 1. 患病 2. 为了今后的健康  
3. 被家人或友人劝阻 4. 其它
3. 发病时吸烟
  - 1) 抽烟的种类 1. 香烟 2. 卷烟 3. 其它
  - 2) 日平均量 ( )根
  - 3) 抽烟的起始年龄 ( )岁
  - 4) 吸烟年限、合计 ( )年间
  - 5) 以前有无禁烟史 1. 有 2. 无

饮酒习惯(1)(请回答此次发病前的情况。选择1-4.的请进行其次的健康食品项目。选择2.3.的也请回答饮酒习惯(2).)

1. 习惯性的几乎不喝
2. 发病前禁酒了 (1) 饮酒起始年龄 ( )岁  
(2) 饮酒年限、合计 ( )年间  
(3) 禁酒的理由是 1. 患病 2. 为了今后的健康  
3. 被家人或友人劝阻 4. 其它
3. 发病时饮酒 (1) 饮酒起始年龄 ( )岁  
(2) 饮酒年限、合计 ( )年间  
(3) 有无禁酒史 1. 有 2. 无

图2 慢性胰腺炎の栄養調査表

慢性胰腺炎营养调查表

姓名 \_\_\_\_\_ 性别 \_\_\_\_\_

生年月日 \_\_\_\_\_ 年 月 日

记录日期 \_\_\_\_\_ 年 月 日

发病日期 \_\_\_\_\_ 年 月 日

上次记录日期 \_\_\_\_\_ 年 月 日

基本情况

身高 ( ) cm 体重 ( ) kg

地址 ( ) 省 ( ) 市

现在的职业 1. 有 ( ) 2. 无

同居者 1. 妻子或丈夫 2. 父母 3. 子女 4. 兄弟姐妹  
5. 其他 ( ) 6. 无

最终学历 1. 小学 2. 中学 3. 高中 4. 大学 7. 大学本科  
8. 硕士 9. 博士 10. 其它

现病史、既往史、家族史

1. 此次症状出现的时间 ( ) 年 ( ) 月 ( ) 日
2. 自觉症状(发病时段)
  - 腹痛、背部痛 1. 每日 2. 有时 3. 无
  - 食欲不振 1. 每日 2. 有时 3. 无
  - 恶心、呕吐 1. 每日 2. 有时 3. 无
  - 腹泻 1. 每日 2. 有时 3. 无

饮酒习惯(2)(请回答发病前一个月和每隔10岁的情况)以上的酒精饮料以何种吨数饮酒?请在吻合的数字上画圈。另外也请记录饮酒时,二次饮酒的平均量

	一次平均量									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
20代(1)白酒	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
(2)啤酒	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
(3)葡萄酒	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
(4)威士忌	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
(5)其他( )	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
30代(1)白酒	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
(2)啤酒	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
(3)葡萄酒	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
(4)威士忌	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
(5)其他( )	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
40代(1)白酒	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
(2)啤酒	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
(3)葡萄酒	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
(4)威士忌	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
(5)其他( )	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
50代(1)白酒	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
(2)啤酒	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
(3)葡萄酒	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
(4)威士忌	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
(5)其他( )	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
60代(1)白酒	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
(2)啤酒	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
(3)葡萄酒	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
(4)威士忌	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
(5)其他( )	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10

健康食品(就发病前一年的情况请给与回答)

定期服用了维生素类及钙制剂了吗?

(1) 复合维生素类	1. 是	2. 否
(2) 维生素C	1. 是	2. 否
(3) 维生素E	1. 是	2. 否
(4) 钙剂	1. 是	2. 否

饮料

日常喝咖啡及茶吗?

(1) 咖啡	1. 喝(1日( )杯)	2. 不喝
(2) 麦茶	1. 喝(1日( )杯)	2. 不喝
(3) 红茶	1. 喝(1日( )杯)	2. 不喝
(4) 乌龙茶	1. 喝(1日( )杯)	2. 不喝
(5) 绿茶	1. 喝(1日( )杯)	2. 不喝
(5) 其他( )	1. 喝(1日( )杯)	2. 不喝

饮食习惯(1) (请回答发病前一年的情况)

(1) 用多大的碗吃米饭?

1. 小碗      2. 中碗      3. 大碗

(2) 周平均吃几天米饭?

早餐( )日 中餐( )日 晚餐( )日 其它( )日

(3) 吃饭时, 约一次平均吃几碗? (0.5杯为单位记入)

早餐( )杯 中餐( )杯 晚餐( )杯 其它( )杯

饮食习惯(2) (请回答发病前一年的情况)

早餐 1. 中华料理 2. 西餐 3. 粥 4. 其它 5. 几乎不吃

晚餐 1. 每天吃 2. 有时吃 3. 几乎不吃

中餐 1. 每天吃 2. 有时吃 3. 几乎不吃

外食 1. 每天吃 2. 有时吃 3. 几乎不吃

日终餐前入睡时间 ( ) 小时

饮食习惯 1. 基本按时 2. 只有晚餐不规律 3. 几乎不规律 4. 其它

含糖多的食物 1. 嗜好 2. 一般 3. 因嗜好常吃 4. 虽嗜好但控制

甜食 1. 嗜好 2. 一般 3. 因嗜好常吃 4. 虽嗜好但控制

多脂类食物 1. 嗜好 2. 一般 3. 因嗜好常吃 4. 虽嗜好但控制

控制饮食 1. 是 2. 否 3. 断续

控制时其内容(可回答数次) 1. 热量 2. 食盐 3. 糖 4. 脂肪 5. 其它

饮酒习惯(2) (请回答发病前一个月和每间隔10天的情况) 以下的酒精饮料以何种程度饮用?请在相应的数字上画圈。另外也请记录饮酒时, 一次饮酒的平均量

	月		月		月		月		平均
	1	2	1	2	1	2	1	2	
发酒 (1) 白酒	1	2	3	4	5	6	7	8	一次平均量
	次	次	次	次	次	次	次	次	
	不	不	不	不	不	不	不	不	
	程	程	程	程	程	程	程	程	
	度	度	度	度	度	度	度	度	
1日酒 (2) 啤酒	1	2	3	4	5	6	7	8	一次平均量
	次	次	次	次	次	次	次	次	
	不	不	不	不	不	不	不	不	
	程	程	程	程	程	程	程	程	
	度	度	度	度	度	度	度	度	
3日酒 (3) 葡萄酒	1	2	3	4	5	6	7	8	一次平均量
	次	次	次	次	次	次	次	次	
	不	不	不	不	不	不	不	不	
	程	程	程	程	程	程	程	程	
	度	度	度	度	度	度	度	度	
4日酒 (4) 威士忌	1	2	3	4	5	6	7	8	一次平均量
	次	次	次	次	次	次	次	次	
	不	不	不	不	不	不	不	不	
	程	程	程	程	程	程	程	程	
	度	度	度	度	度	度	度	度	
5日酒 (5) 其他( )	1	2	3	4	5	6	7	8	一次平均量
	次	次	次	次	次	次	次	次	
	不	不	不	不	不	不	不	不	
	程	程	程	程	程	程	程	程	
	度	度	度	度	度	度	度	度	

健康食品(就发病前一年的情况请给与回答)

定期服用了维生素类及钙制剂了吗?

(1) 复合维生素类	1. 是	2. 否
(2) 维生素C	1. 是	2. 否
(3) 维生素E	1. 是	2. 否
(4) 钙剂	1. 是	2. 否

饮料

日常喝咖啡及茶吗?

(1) 咖啡	1. 喝(1日( )杯)	2. 不喝
(2) 麦茶	1. 喝(1日( )杯)	2. 不喝
(3) 红茶	1. 喝(1日( )杯)	2. 不喝
(4) 乌龙茶	1. 喝(1日( )杯)	2. 不喝
(5) 绿茶	1. 喝(1日( )杯)	2. 不喝
(5) 其他( )	1. 喝(1日( )杯)	2. 不喝

饮食习惯(1) (请回答发病前一年的情况)

(1) 用多大的碗吃米饭?

1. 小碗      2. 中碗      3. 大碗

(2) 周平均吃几天米饭?

早餐( )日 中餐( )日 晚餐( )日 其它( )日

(3) 吃饭时, 约一次平均吃几碗? (0.5杯为单位记入)

早餐( )杯 中餐( )杯 晚餐( )杯 其它( )杯

饮食习惯(2) (请回答发病前一年的情况)

早餐 1. 中华料理 2. 西餐 3. 粥 4. 其它 5. 几乎不吃

晚餐 1. 每天吃 2. 有时吃 3. 几乎不吃

中餐 1. 每天吃 2. 有时吃 3. 几乎不吃

外食 1. 每天吃 2. 有时吃 3. 几乎不吃

日终餐前入睡时间 ( ) 小时

饮食习惯 1. 基本按时 2. 只有晚餐不规律 3. 几乎不规律 4. 其它

含糖多的食物 1. 嗜好 2. 一般 3. 因嗜好常吃 4. 虽嗜好但控制

甜食 1. 嗜好 2. 一般 3. 因嗜好常吃 4. 虽嗜好但控制

多脂类食物 1. 嗜好 2. 一般 3. 因嗜好常吃 4. 虽嗜好但控制

控制饮食 1. 是 2. 否 3. 断续

控制时其内容(可回答数次) 1. 热量 2. 食盐 3. 糖 4. 脂肪 5. 其它

饮食习惯(3) (请回答发病前一年周平均摄取的程度)

	月		月		月		月		平均
	1	2	1	2	1	2	1	2	
米饭·面包	1	2	3	4	5	6	7	8	一次平均量
	次	次	次	次	次	次	次	次	
	不	不	不	不	不	不	不	不	
	程	程	程	程	程	程	程	程	
	度	度	度	度	度	度	度	度	
米饭·面包 (1) 大米饭	1	2	3	4	5	6	7	8	一次平均量
	次	次	次	次	次	次	次	次	
	不	不	不	不	不	不	不	不	
	程	程	程	程	程	程	程	程	
	度	度	度	度	度	度	度	度	
(2) 五谷杂粮饭	1	2	3	4	5	6	7	8	一次平均量
	次	次	次	次	次	次	次	次	
	不	不	不	不	不	不	不	不	
	程	程	程	程	程	程	程	程	
	度	度	度	度	度	度	度	度	
(3) 面包类(含点心面包·三明治)	1	2	3	4	5	6	7	8	一次平均量
	次	次	次	次	次	次	次	次	
	不	不	不	不	不	不	不	不	
	程	程	程	程	程	程	程	程	
	度	度	度	度	度	度	度	度	
蔬菜	1	2	3	4	5	6	7	8	一次平均量
	次	次	次	次	次	次	次	次	
	不	不	不	不	不	不	不	不	
	程	程	程	程	程	程	程	程	
	度	度	度	度	度	度	度	度	
(1) 馒头(含花卷、口沙包)	1	2	3	4	5	6	7	8	一次平均量
	次	次	次	次	次	次	次	次	
	不	不	不	不	不	不	不	不	
	程	程	程	程	程	程	程	程	
	度	度	度	度	度	度	度	度	
(2) 面条	1	2	3	4	5	6	7	8	一次平均量
	次	次	次	次	次	次	次	次	
	不	不	不	不	不	不	不	不	
	程	程	程	程	程	程	程	程	
	度	度	度	度	度	度	度	度	
(3) 油豆腐类(含油条、油豆腐、油印干)	1	2	3	4	5	6	7	8	一次平均量
	次	次	次	次	次	次	次	次	
	不	不	不	不	不	不	不	不	
	程	程	程	程	程	程	程	程	
	度	度	度	度	度	度	度	度	
(4) 意大利面条	1	2	3	4	5	6	7	8	一次平均量
	次	次	次	次	次	次	次	次	
	不	不	不	不	不	不	不	不	
	程	程	程	程	程	程	程	程	
	度	度	度	度	度	度	度	度	
牛奶·鸡蛋料理	1	2	3	4	5	6	7	8	一次平均量
	次	次	次	次	次	次	次	次	
	不	不	不	不	不	不	不	不	
	程	程	程	程	程	程	程	程	
	度	度	度	度	度	度	度	度	
(1) 鸡蛋(煮鸡蛋、生鸡蛋)·鸡蛋料理	1	2	3	4	5	6	7	8	一次平均量
	次	次	次	次	次	次	次	次	
	不	不	不	不	不	不	不	不	
	程	程	程	程	程	程	程	程	
	度	度	度	度	度	度	度	度	
(3) 牛奶(单独作为饮料时)	1	2	3	4	5	6	7	8	一次平均量
	次	次	次	次	次	次	次	次	
	不	不	不	不	不	不	不	不	
	程	程	程	程	程	程	程	程	
	度	度	度	度	度	度	度	度	
(4) 酸奶	1	2	3	4	5	6	7	8	一次平均量
	次	次	次	次	次	次	次	次	
	不	不	不	不	不	不	不	不	
	程	程	程	程	程	程	程	程	
	度	度	度	度	度	度	度	度	
(5) 奶酪	1	2	3	4	5	6	7	8	一次平均量
	次	次	次	次	次	次	次	次	
	不	不	不	不	不	不	不	不	
	程	程	程	程	程	程	程	程	
	度	度	度	度	度	度	度	度	
大豆制品	1	2	3	4	5	6	7	8	一次平均量
	次	次	次	次	次	次	次	次	
	不	不	不	不	不	不	不	不	
	程	程	程	程	程	程	程	程	
	度	度	度	度	度	度	度	度	
(1) 豆腐	1	2	3	4	5	6	7	8	一次平均量
	次	次	次	次	次	次	次	次	
	不	不	不	不	不	不	不	不	
	程	程	程	程	程	程	程	程	
	度	度	度	度	度	度	度	度	
(2) 腐乳豆腐	1	2	3	4	5	6	7	8	一次平均量
	次	次	次	次	次	次	次	次	
	不	不	不	不	不	不	不	不	
	程	程	程	程	程	程	程	程	
	度	度	度	度	度	度	度	度	
(3) 豆腐干·油豆腐	1	2	3	4	5	6	7	8	一次平均量
	次	次	次	次	次	次	次	次	
	不	不	不	不	不	不	不	不	
	程	程	程	程	程	程	程	程	
	度	度	度	度	度	度	度	度	
(4) 豆浆	1	2	3	4	5	6	7	8	一次平均量
	次	次	次	次	次	次	次	次	
	不	不	不	不	不	不	不	不	
	程	程	程	程	程	程	程	程	
	度	度	度	度	度	度	度	度	
肉·肉料理	1	2	3	4	5	6	7	8	一次平均量
	次	次	次	次	次	次	次	次	
	不	不	不	不	不	不	不	不	
	程	程	程	程	程	程	程	程	
	度	度	度	度	度	度	度	度	
(1) 煎	1	2	3	4	5	6	7	8	一次平均量
	次	次	次	次	次	次	次	次	
	不	不	不	不	不	不	不	不	
	程	程	程	程	程	程	程	程	
	度	度	度	度	度	度	度	度	
(2) 饺子·肉包	1	2	3	4	5	6	7	8	一次平均量
	次	次	次	次	次	次	次	次	
	不	不	不	不	不	不	不	不	
	程	程	程	程	程	程	程	程	
	度	度	度	度	度	度	度	度	
(3) 汉堡包·肉丸等肉料理	1	2	3	4	5	6	7	8	一次平均量
	次	次	次	次	次	次	次	次	
	不	不	不	不	不	不	不	不	
	程	程	程	程	程	程	程	程	
	度	度	度	度	度	度	度	度	
(3) 牛排·烤肉	1	2	3	4	5	6	7	8	一次平均量
	次	次	次	次	次	次	次	次	
	不	不	不	不	不	不	不	不	
	程	程	程	程	程	程	程	程	
	度	度	度	度	度	度	度	度	
(4) 烤肉串·烤美罗牛肉串	1	2	3	4	5	6	7	8	一次平均量
	次	次	次	次	次	次	次	次	
	不	不	不	不	不	不	不	不	
	程	程	程	程	程	程	程	程	
	度	度	度	度	度	度	度	度	
(5) 炸鸡	1	2	3	4	5	6	7	8	一次平均量
	次	次	次	次	次	次	次	次	
	不	不	不	不	不	不	不	不	

財団法人日中医学協会  
2004年度共同研究等助成金－調査・共同研究－報告書

2005年3月15日

財団法人 日中医学協会 御中

貴財団より助成金を受領して行った研究テーマについて報告いたします。

添付資料： 研究報告書

受給者氏名： 梨井 康 

所属機関名： 国立成育医療センター研究所

所属部署： 移植・外科研究部 職名： 室長  
〒157-8535

所在地： 東京都世田谷区大蔵2-10-1

電話： 03-3146-181 内線： 4421

1. 助成金額： 1,000,000 円

2. 研究テーマ

幹細胞システムを用いた神経幹細胞の分化・同定・分離および再生医療への応用方法の確立

3. 成果の概要 (100字程度)

本研究は神経幹細胞分離・分化誘導システムを用いて、脊髄損傷の機能修復およびリソソーム蓄積病脳の病理所見の改善、酵素量の維持および聴性脳幹反応検査、海馬機能の評価の改善を明らかにした。移植・再生医療における新しい技術として期待できる。

4. 研究組織

日本側研究者氏名： 梨井 康 職名： 室長

所属機関： 国立成育医療センター研究所 部署： 移植・外科研究部

中国側研究者氏名： 陳 乃宏 職名： 教授

所属機関： 中国医学科学院 部署： 薬物研究所

-日中医学協会助成事業-

## 幹細胞システムを用いた神経幹細胞の分化・同定・分離および 再生医療への応用方法の確立

研究者氏名	梨井 康
所属機関	国立成育医療センター研究所 移植・外科研究部 室長
共同研究者氏名	陳 乃宏
所属機関	中国医学科学院・協和医科大学 薬物研究所 教授

### 要 旨

従来、損傷を受けた成体の中枢神経系は、ニューロン自身に分裂能がないために機能再生は不可能であることと考えられた。しかし、最近の研究成果から神経幹細胞成体脳内存在することが分かり、また、胚性幹細胞の中枢神経系を構成する細胞への分化することが明らかになり、様々の神経疾患の再生医療研究が積極的に進められている。神経幹細胞は増殖し継代を繰り返すことができるという自己複製能力と同時に、ニューロン、アストロサイト、オリゴデンドロサイトという中枢神経系を構成する細胞を作り出すことができる多分化能を有する。本研究は再生医学研究分野に最も進んでいる神経幹細胞分離・分化誘導システムの構築および移植の実施によって、(1) ラット脊椎損傷動物モデルでの脊髄損傷の機能修復；(2) ムコ多糖症 VII 型リソソーム蓄積病マウスモデルに対する脳の病理所見の改善、酵素量の維持および聴性脳幹反応検査、海馬機能の評価の改善；(3) ヒト胎児脳幹細胞に存在するガングリオシドの誘導分化作用効果等を明らかにした。これら幹細胞を用いる再生医学の研究成果は臨床応用へ向けた技術基盤の確立に大きく寄与すると思われる。また、移植・再生医療における新しい技術として期待できる。

### Key Words

再生医学、神経幹細胞、脊髄損傷、ムコ多糖症 VII 型リソソーム蓄積病、細胞移植

### 結 言

従来、損傷を受けた成体の中枢神経系は、ニューロン自身に分裂能がないために機能再生は不可能であることと考えられた。しかし、最近の研究成果から神経幹細胞成体脳内存在するこ

とが分かり、また、胚性幹細胞の中樞神経系を構成する細胞への分化することが明らかになり、様々の神経疾患の再生医療研究が積極的に進められている。神経幹細胞は増殖し継代を繰り返すことができるという自己複製能力と同時に、ニューロン、アストロサイト、オリゴデンドロサイトという中樞神経系を構成する細胞を作り出すことができる多分化能を有する。本研究は再生医学研究分野に最も進んでいる神経幹細胞分離・分化誘導システムの構築を確実出来た上、ラットの脊髄損傷動物モデルを樹立し、このモデルを用いて、In vitro で胎児幹細胞から分化・誘導した神経前駆細胞、あるいは神経細胞などを移植することによってニューロンの新生と、その損傷治癒効果について検討する。それにより脊髄損傷のみでなく、さまざまな神経変性疾患の機能修復を目指した再生療法の基盤的技術が確立できると考えられる。一方、ムコ多糖症 VII 型（以下 MPSVII と略す）はリソソーム蓄積病の一つで、リソソームの酵素である  $\beta$ -glucuronidase の活性が欠如している。MPSVII は、全身のリソソーム内に  $\beta$ -glucuronidase の基質であるグリコサミノグリカンが蓄積し、骨の発達異常・肝脾腫・精神発達遅滞をきたす。これまで MPSVII のマウスモデルに対し、酵素補充療法・ウイルスベクターを用いた遺伝子導入療法などが行われている。今回我々は、神経幹細胞を MPSVII マウスの新生児期に移植することにより、中樞神経においても同様にクロスコレクションを介した生化学的・組織学的改善が認められるか検討を行い、同疾患に対する神経幹細胞移植の有効性を考察した。移植後マウスに対する脳の病理所見の改善、酵素量の維持および聴性脳幹反応検査、海馬機能の評価の改善を明らかにした。

## 対象と方法

### 1. 脊椎損傷動物モデル：

1) 脊椎損傷動物モデルの樹立：自作の器具で圧迫法により脊髄損傷を引き起こし、同時に損傷及び回復の測定器具を開発した。

2) 胎児脳幹細胞分離培養・分化システムの構築：妊娠 14 日目のラットから胎児を取り出し、測脳室壁から神経幹細胞を分離した。上皮増殖因子の存在下で、neurosphere 法で培養した。さらに、神経幹細胞への遺伝子導入について検討を行った。

3) 脊椎損傷動物モデルを用いた胎児脳幹細胞移植の効果の検討：In vivo 局所移植後損傷ラットの全身症状、中樞神経系症状及び病理組織上の改善を検討した。さらに、胎児脳幹細胞の経静脈投与による脊椎損傷ラットの治療にも試みた。

### 2. ムコ多糖症 VII 型マウスモデル：

1) MPSVII マウスの皮膚の線維芽細胞である 3521 細胞を 2 群に分け、一方には神経幹細胞の培養に使用したメディウムのみを、もう一方にはメディウムと 1mM のマンノース 6 リン酸を加えた。

24 時間後の  $\beta$ -glucuronidase 活性（以下 GUSB 活性）を比較した。

2) C3H マウスの神経細胞を 65°C1 時間湯浴させることにより、内因性の GUSB 活性を不活化させ、MPSVII マウスの神経細胞の代用とした。これも①と同様に 2 群に分け、クロスコレクションを介し細胞外から取り込まれた GUSB 活性の比較を行った。

3) GFP トランスジェニックマウスの受精後 14 日目の胎児の脳から神経幹細胞を選択的に培養した。MPSVII マウスの新生児の側脳室に、神経幹細胞を移植し、生後 3 週時の GUSB 活性を測定するとともに、組織所見の比較検討を行った。

4) 海馬機能の評価として Novel object test を用いて、MPS 非治療群、治療群、コントロール群三群に分け検討を行った。装置は 65 x 65 x 27 cm の open field (black) で、全てプラスチック製の黄色のものを使用 (Proc Natl Acad Sci USA 2003, 100:1723-1728 を modify した)。

## 結 果：

### 1. 脊椎損傷動物モデル：

ラットを用いて、自作の器具で圧迫法により脊髄損傷を引き起こし、脊椎損傷動物モデルを樹立したと同時に損傷及び回復の測定器具を開発し、その測定方法を確立した。妊娠 14 日目のラットから胎児を取り出し、測脳室壁から神経幹細胞を分離した。上皮増殖因子の存在下で、neurosphere 法で培養し、胎児脳幹細胞分離培養・分化システムを構築した。また、神経幹細胞は増殖し、継代を繰り返すことができるという自己複製能と同時に、ニューロン、アストロサイト、オリゴデンドロサイトといった中枢神経系を構成する細胞にもなる多分化能を有していることを免疫染色法によって確認した。さらに、神経幹細胞への遺伝子導入について検討を行い、lentivirus ベクターを用いた方法が最も有効であることを明らかにした。脊椎損傷動物モデルを用いた胎児脳幹細胞移植の効果について検討したところ、In vitro での神経幹細胞のニューロン、アストロサイト、オリゴデンドロサイトへの分化を免疫染色法にて確認できた。以上の結果を踏まえ、ラット胎児由来の神経幹細胞を用いて移植実験を行った。In vivo 局所移植後損傷ラットの全身症状、中枢神経系症状及び病理組織上の改善で治療の有効性を明らかにした。さらに、胎児脳幹細胞の経静脈投与による脊椎損傷ラットの治療にも試みた。非治療群よりは有意な治療効果があることを確認できた。

### 2. ムコ多糖症 VII 型マウスモデル：

リソゾーム蓄積症の病態解明と新規治療法の開発に関する基礎的検討神経幹細胞は移植ドナー細胞としての適性を評価するため、先ず FACS による神経幹細胞の細胞表面マーカーの検討および、神経幹細胞の内因性のリソゾーム酵素活性の測定を行った。神経幹細胞表面には MHC class II, CD80, CD86, ICAM-1 分子の発現が認められず、MHC class I 分子も低発現であり、移植後の急性拒絶反応を起こしにくい細胞であることが明らかとなった。また、神経幹細胞は内因性リソゾーム酵素活性値が高く、中でも GUSB 活性値は 200-800 U/mg protein

と、骨髄間葉系幹細胞と比較すると10倍程度高いことが判明した。3521細胞及び、C3H神経細胞において、マンノース6リン酸を加えた群では、GUSB活性は有意に低かった。加えない群では、メディアムのGUSB活性程度までGUSB活性の上昇を認めた。さらに、GFPによりマーキングされた細胞は、移植後脳全体に広がっていることが確認された。生後3週時に移植したマウスでは、GUSB活性の著明な増加と組織所見の改善を認めた。海馬機能の改善について検討では三群ともに、A vs B, A' vs Cの探索行動時間の割合(%)は有意差がない。ただし、三群ともに、A'よりCへ探索する時間の長い傾向にある。探索時間(sec)の長さは、MPS非治療群、治療群ともに、コントロール群との有意差はみられない。非治療群で探索時間減少の傾向がみられた。次に、GFPトランスジェニックマウスの受精後14日目の胎児の脳から神経幹細胞を選択的に培養後、MPSVIIマウスの新生児の側脳室に、神経幹細胞を移植し、生後3週時のGUSB活性を測定するとともに、組織所見の比較検討を行った。さらに、海馬機能の評価としてNovel object testを用いて、MPS非治療群、治療群、コントロール群三群を分け検討を行った。1日目と3日目に5分間ずつobjectのない状態のfieldにマウスを入れて慣らす。4日目(対象物呈示1日目)に、2つの新奇な対象物(A, B)をfield内の対角隅のそれぞれ壁から15cmの所に設置し、10分間探索させる。24時間後(5日目=対象物呈示2日目)、Aをreplica(A' = familiar)に、またBを新しい物体(C = novel)に置きかえ、10分間探索させる。対象物呈示1日目および2日目の行動をビデオ記録し、10分間中の各object(A, B, A', C)への探索行動時間を計測した。Objectへの鼻もしくは前肢による接触を探索行動とみなした。

#### 考 察:

本研究は神経幹細胞の二つの動物疾患モデルにおける再生医療への応用に向けた基礎研究を行った。神経幹細胞への遺伝子導入について遺伝子導入後の発現効率、発現期間及び細胞の毒性lentivirusベクターが神経幹細胞への遺伝子導入には有用であることを明らかにした。また、神経幹細胞は移植ドナー細胞としての適性を評価するため、FACSによる神経幹細胞の細胞表面マーカーの検討を行い、神経幹細胞表面にはMHC class II, CD80, CD86, ICAM-1分子の発現が認められず、MHC class I分子も低発現であり、移植後の急性拒絶反応を起こしにくい細胞であることが明らかとなった。上記in vitro検討の結果を踏まえて、ラット脊髄損傷モデルを用いて、In vivo局所移植後損傷ラットの全身症状、中枢神経系症状及び病理組織上の改善で治療の有効性を明らかにした。さらに、胎児脳幹細胞の経静脈投与による脊椎損傷ラットの治療にも試みた。非治療群よりは有意な治療効果があることを確認できた。一方、ムコ多糖症VII型マウスモデルを用いた検討において、神経幹細胞は移植後の急性拒絶反応を起こしにくく、内因性のGUSB活性値も高いことから、MPSVIIの中枢神経病変に対する細胞療法のドナー細胞にふさわしい細胞であることを明らかにした。また、移植後神経幹細胞は速やかに脳全体に

広がり、少なくとも移植後 3 週間にわたり、脳の病理所見を改善させるに足る酵素量を維持できた。MPSVII マウスの中樞神経病変に対する神経幹細胞の移植療法は極めて有用である。また、新生児期 MPSVII マウスの神経幹細胞移植後、聴性脳幹反応検査において軽度ながら改善を認めた。海馬機能の評価として行った Novel object test では、未治療のマウスでは全探索行動時間自体が極端に短かったのに比し、移植後のマウスでは、全探索行動時間・探索行動様式が、正常コントロールと差が無いことが示された。さらに、ヒト中絶胎児の脳組織や初代培養神経細胞を用いて、アセチルコリンやドーパミンなどのリリース促進作用を調べたところ、アセチルコリンやドーパミンのリリース促進作用が見られなかった。

以上の研究より、脊髄損傷や神経変性疾患の機能修復を目指した再生治療法の開発の基礎研究を進め、幹細胞を用いる再生医学の研究成果を臨床応用へ向けた技術基盤確立に大きく寄与すると思われる。また、移植・再生医療における新しい技術として期待される。

#### 参考文献：

1. Y. Kamata, A. Tanabe, A. Kanaji, M. Kosuga, Y. Fukuhara, X-K. Li, S. Suzuki, M. Yamada, N. Azuma, T. Okuyama. Long-term normalization in the central nervous system, ocular manifestations, and skeletal deformities by a single systemic adenovirus injection into neonatal mice with mucopolysaccharidosis VII. *Gene Ther* 10(5): 406-14, 2003.
2. Kanaji M. Kosuga, X-K. Li, Y. Fukuhara, A. Tanabe, Y. Kamata, N. Azuma, M. Yamada, T. Sakamaki, Y. Toyama, T. Okuyama. Improvement of skeletal lesions in mice with mucopolysaccharidosis type vii by neonatal adenoviral gene transfer. *Mol Ther* 8(5):718-25, 2003.
3. H. Higashi and N. Chen. Ganglioside/protein kinase signals triggering cytoskeletal actin reorganization. *Glycoconjugate. J.* Vol,20(1), 49-58. 2004.
4. 小林庸次、奥山虎之： 特集編集「先天代謝異常症」病理と臨床 2003；22：1-102.

注：本研究の一部は2005年3月1-2日「第4回日本再生医療学会総会」にてポスター発表、「再生医療」（2005年2月 Vol.4 Suppl）に掲載

作成日：2005年3月15日

財団法人日中医学協会  
2004年度共同研究等助成金－調査・共同研究－報告書

2004年 3月 11日

財団法人 日中医学協会 御中

貴財団より助成金を受領して行った研究テーマについて報告いたします。

添付資料： 研究報告書

受給者氏名： 伊藤 博夫   
所属機関名： 鹿児島大学  
所属部署： 大学院医歯学総合研究科 職名： 助教授  
〒 890-8544  
所在地： 鹿児島市桜ヶ丘8-35-1  
電話： 099-275-6182 内線： 6182

1. 助成金額： 1,000,000 円

2. 研究テーマ

**感染病原体付着抑制物質の調査研究**

3. 成果の概要 (100字程度)

細菌を殺すのではなく組織への定着を抑制することに基づく感染症予防薬の開発を目指し、中医学文献を精査してそのような物質を含む伝統薬原料を探索した結果、赤芍、青蒿、牛膝の3種の原材料が選択された。各原材料から得た粗抽出成分の細菌定着抑制活性を測定し、新規な感染症予防薬探索のための天然物ライブラリー原料として有望性が示唆された。粗抽出物を逆相HPLCで分画し、各々94～100のコンポーネント・フラクションを得て、各物質についての成分ライブラリーを構築することに成功した。

4. 研究組織

日本側研究者氏名： 伊藤 博夫 職名： 助教授

所属機関： 鹿児島大学 部署： 大学院医歯学総合研究科

中国側研究者氏名： 魏 睦新 職名： 主任教授

所属機関： 南京医科大学第1附属病院 部署： 中医科

— 日中医学協会助成事業 —  
感染病原体付着抑制物質の調査研究

日本側研究代表 伊藤 博夫  
鹿児島大学大学院医歯学総合研究科助教授  
中国側研究代表 魏 睦新  
南京医科大学第一附属病院教授  
共同研究者 軒原 清史  
南京医科大学客員教授、ハイペップ研究所 CEO

### 要旨

細菌を殺すのではなく、細菌の組織への定着抑制というメカニズムに基づく感染症予防薬の創製を目指し、中医学文献を精査して候補物質を含むと推定される伝統薬原料を探索した。その結果、赤芍 (*radix paeoniae rubra*)、青蒿 (*herba artemisiae annuae*)、牛膝 (*radix cyathulae*) の3種の原材料を選定し、研究に必要な量を収集した。ついで、投与形態を考慮した抽出を行い、粗抽出成分の細菌定着抑制活性を測定した。いずれの抽出物においても、心内膜炎原因菌のひとつである *Granulicatella adiacens* のヒト・フィブロネクチンへの付着に対し、一定レベルの抑制が示された。この結果は、新規な感染症予防薬探索のための天然物ライブラリー原料の有望性と中医学的考察に基づくスクリーニング法の可能性を示唆するものであった。粗抽出物から活性物質を純化・単離し、さらに構造解析へと進めるために、粗抽出物を逆相セミ分取カラムを用いた高圧液体クロマトグラフィーで分画し、各々100前後の天然物由来成分ライブラリーの構築に成功した。

**Keywords :** 天然物質ライブラリー, 感染性心内膜炎, 口腔細菌, 付着, フィブロネクチン

### 緒言 :

抗生剤の発達した現代の先進諸国においても、細菌感染症は依然として人々の脅威であり続けている。特に抗生剤耐性細菌の蔓延は大きな社会的問題となっており、新しい着想に基づく感染症対策が求められている。日本側代表研究者の伊藤と軒原は、一般に多用される抗生物質のような病原体を殺すというメカニズムではなく、ヒト組織への定着だけを抑制することに基づく感染症予防薬の開発を目指し、細菌の宿主細胞外基質タンパク質に対する付着能と病原性の関連に注目した。そしてフィブロネクチン付着を抑制するモノクローナル抗体の樹立と、そのモノクローナル抗体をプローブとして合成ペプチドライブラリーの検索を行ってきた<sup>(1-3)</sup>。しかし、化合物ライブラリーとしては、合成品のみではなく、天然物質由来のものも有用性にも注目すべきである。古来より用いられてきた中医薬(漢方薬)は、まさしく天然物薬効性化合物ライブラリーであり、効果と安全性に関しては中医学の長年の経験に裏付けられている。本共同調査研究では、中国側代表研究者の魏らが、中医学臨床の専門知識を駆使して多くの中医学文献を調査し、数多くの伝統薬の中から細菌の定着抑制を作用機序とする可能性のある薬剤原料を精査した。次いでそれらの原材料から天然物由来化合物ライブラリーを構築した。

### 材料と方法 :

中医学臨床の専門知識に基づき文献を精査し、考察・文献的スクリーニングを行うことによって、以下の3種類の中国伝統医薬用植物が原材料候補として選択された。選択作業の過程は、結果の項に詳述する。

① 赤芍 (英名 : *radix paeoniae rubra*、中国名 : Chi Shao 以下 CS) : 内モンゴル産、2004年11月採取

② 青蒿 (英名 : rherba artemisiae annuae、中国名 : Qing Hao 以下 QH) : 広西省桂林地区産、2004 年 10 月採取

③ 川牛膝 (英名 : cythula officinalis kuan 中国名 : Niu Xi: 以下 NX) : 四川省産、2004 年 1 月採取

以上の原材料は江蘇省薬材会社に委託し購入した。

各原料植物は蒸留水中に 60 分浸漬した後、80 kPa の圧力下で 30 分、3 回煎じて水溶性画分を抽出した。固形物を遠心除去後、直ちに凍結保存した。得られた粗抽出物は、ハイペップ研究所京都ラボにおいて、アセトニトリルと 10mM 塩酸の直線濃度勾配による逆相セミ分取カラムによる高圧液体クロマトグラフィー (HPLC) で UV 吸収を指標とし、成分ライブラリーとした。

粗抽出物の細菌の組織付着に対する阻害活性の評価は、伊藤が確立した細胞外基質タンパク質フィブロネクチン上の細菌体結合エピトープを認識するモノクローナル抗体によるアッセイ系<sup>(3)</sup>を用いて行った。

## 結果 :

### 1. 中医学的考察に基く原材料の選択

#### 1) 感染症の伝統中医学的認識<sup>(4,5)</sup>

感染症は、中医学の立場では、熱性の外邪 (邪熱) の体内への侵入によって生じた陰陽のバランスの崩れと、気血運行異常を示す疾病と認識される。邪熱の性質の違いと患者の体質の違いによって、感染症における宿主の生体反応が特徴付けられる。中医学では、その反応状態の違いを把握し、適切な“証”を診断し、その証に対応する治療方針・処方を、長い経験の知識庫 (種々の古典) の中から選択することを治療原則としている。

一般に感染症は熱性証であり、陰陽弁証のもとに、解熱作用のある清熱剤を選んで対症療法的に治療されることが多い。病原体の種類によって、あるいは体質によって、治癒の困難な症例が存在するが、そのようなタイプの疾患に対する解析診断方法として、衛気営血弁証 (えいきえいけつべんしょう) が 2~300 年前に確立された。これは傷寒論の六経弁証を基礎に発展した弁証方法で、温熱性の病気の過程を 4 つの段階に分類する。

衛気営血弁証の基本的な考え方は、感染症は最初、衛分証 (えぶんしょう ; 感染源の勢いがそれほど強くなく、患者の抵抗力もあるもの) より、次の気分証 (きぶんしょう ; 熱が高く炎症反応も強い) に進行する。さらに進むなら宿主の身体の抵抗力が損なわれ、体液 (陰液) も不足し、さらに中枢神経系や内臓にも障害が及んだり、あるいは播種性血管内凝固症候群 (DIC) による凝血障害を伴うような場合は、営分証 (えいぶんしょう) から血分証 (けつぶんしょう) と診断される (脚注参照)。

中医学の感染学説の中に、重症化あるいは慢性化の場合に熱邪が去らない重要な病理メカニズムは、熱が血と結合して、血熱或いは瘀熱が形成される故であるとするものがある<sup>(6)</sup>。こうなると単純な解熱、清熱剤などの効果は期待できない。涼血清熱剤、あるいは清熱剤と涼血化瘀剤の組合せが不可欠となる。この治療法の原理には、従来の西洋医学の抗生剤とは全く異なり、宿主の身体状態を調節して邪熱との複合を阻害するか、もしくは結合した後でも解離しやすいようにさせるなどの機序が含まれていると考えられる。このように、臨床的には既に 2000 年以上、特に明清時代以来、長期間の実践によってその有効性が立証されてきた中医学の治療原理に基づいて、斬新な感染症治療薬の創薬に向けた仮説を立てることが可能となった。

#### 脚注)

「営」の意味について : 気分の病毒が解除されなければ、人体の正気は虚弱となり、津液は不足する。病毒は人体の虚に乗じて営分に侵入するか熱が血分に入るため、舌質絳、心煩不寝、時にうわ言、身熱が夜間にはなははだしい。口渴はそれほどひどくない。見え隠れする斑疹、脈細数などの証候が現れる。「血」の証はさらに重症の場合を指す。

## 2) 感染性心内膜炎の中医学的考察に基づく病原細菌の組織定着抑制性中薬（漢方薬）の推定

感染性心内膜炎、なかでも亜急性細菌性心内膜炎（Subacute bacterial endocarditis; SBE）の症状と発症機序は、前述したように中医学的立場では、営分証あるいは血熱（熱性の病原が血液と結合して発症する病気）と診断される。SBEは潜在性に始まり、他の全身性疾患と類似しており、微熱（39℃以下）、寝汗、易疲労性、倦怠感、体重減少、および弁の機能不全を伴う。心臓における微生物の循環器内病巣は、傷害された内皮細胞から組織因子が放出されたときに形成される無菌性のフィブリンと血小板からなる疣贅に、偶然に血流中に侵入した細菌が定着することで形成が開始される。疣贅を形成する微生物は、フィブリンや血小板の層で囲まれたバイオフィルムを形成し、好中球、免疫グロブリン、および補体の接触を受けにくくなることで、宿主の防御機構に対して抵抗性を示す。SBEには次の典型症状が見られる。

- 心症状（心雑音、動悸、鬱血性心不全）
- 炎症症状（WBC↑、赤沈↑、CRP+、脾腫）
- 感染症状（ $\gamma$ グロブリン↑、フィブリノーゲン↑）
- Osler 結節（指先に現れる有痛性紅斑、圧迫で出現）
- Janeway 斑（手足に現れる無痛性紅斑、圧迫で消失）
- Roth 斑（眼底の出血性梗塞、中心が白色、周囲が赤色）

以上のような病理と症状は、中医学の血熱証あるいは瘀熱証と一致する。血熱証に効果のある薬物は「涼血清熱薬」であるが、残念ながら日本の漢方薬理論には本薬はほとんどみられない。一方中国においては、心内膜炎に対する研究はまだ無いが、SLEをはじめ、皮膚科、内科、婦人科、外科等の慢性感染症の治療によく利用される薬剤である<sup>(7,8)</sup>。

上記の中医学的考察に基づき、血熱あるいは瘀熱証に効く薬物で、なお薬理的な研究成果でも病原微生物の組織定着抑制作用のある可能性が高い、① 赤芍（CS）、② 牛膝（NX）、③ 青蒿（QH）の3種類の中薬原料を選択した。なお、牛膝には懷牛膝と川牛膝の2種類が存在するが、今回は川牛膝を選定した。

## II. 抽出物の細菌付着阻害活性

3種の中薬原料の粗抽出物はいずれも、高濃度においてヒト・フィブロネクチンの細菌結合エピトープに対するモノクローナル抗体の結合を競合的に阻害した（図1）。すなわち、いずれの物質についても、新規な感染症予防薬探索のための天然物ライブラリー原料としての可能性が示された。なかでもCSは5%濃度で60%抑制、50%濃度で97%抑制と、他の2種よりも有意（ $p<0.01$ ）に高い効果が示された。

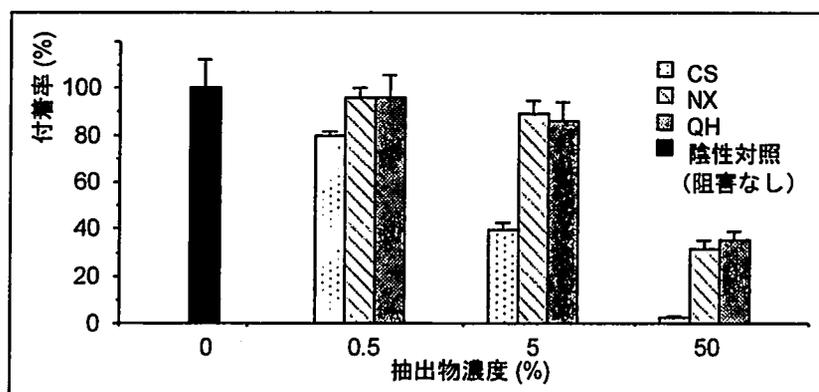


図1. 中薬原料粗抽出物の細菌付着阻害活性

## III. 成分ライブラリーの構築

中薬原料の3種の粗抽出物は、セミ分取逆相 HPLC により吸光度のモニタによって成分ライブラリー化し

た。各ピークを分取し、おのおの CS では 94、NH では 96、QH では 100 画分からなるコンポーネント・フラクションを得て、成分ライブラリーの構築に成功した。QH の逆相 HPLC による分画のクロマトグラムを図 2 に例示する。各ライブラリーは生物アッセイに供した後、活性成分をさらに物理化学的な検定へすすめ、その化学構造を突き止める予定である。

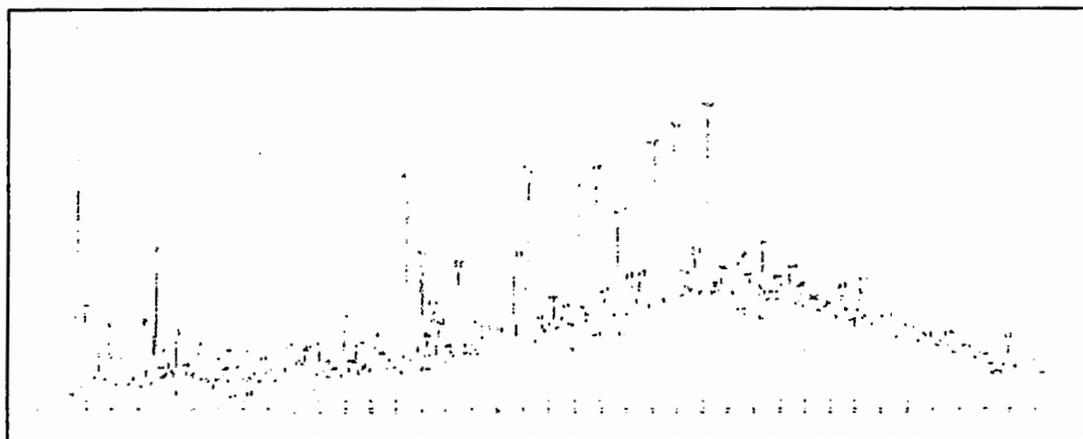


図 2. QH の成分ライブラリー (逆相 HPLC によるプロファイル)

#### 考察：

東西医学の知識と技術を融合させる独創的な当該研究は、全く新しい、安全で使い易い感染症予防薬の開発へ向けた基盤となるものである。また本共同研究を通じて、日本側が保有する特定の先端技術を中国側の研究者が習得することができ、今後は中国において自立的に分画・機能解析が出来るようになり、中国における、中医学を基盤とした新薬の自主開発力の整備・拡充に寄与することが期待される。また魏は、本共同研究のために鹿児島大学を訪れた際、最新中医学臨床に関する特別講義を行い、日本の医師・歯科医師・医歯学大学院生らの中医学に対する大いなる関心を集め、また多方面からの活発な討論が行われた。

#### 参考文献：

- (1) Ito, H.-O., Nokihara, K., Soutome, S., Yamamoto, S., Sato, S., Ohyama, T., Inoue, M. Development of lead compounds focusing on prevention of infective endocarditis using combinatorial peptide libraries. *In: Benedetti, E., Pedone, C. (Eds.) Peptides 2002*, Wiley, U.K. p. 518-519 (2002)
- (2) Nokihara, K., Ito, H.-O., Ohyama, T., Soutome, S., Yasuhara, T., Inoue, M. Application of combinatorial peptide libraries, as an example for prevention against infective endocarditis. *In: Yamada, T. (Ed.) Peptide Science 2002, the Japanese Peptide Society*, p. 77-80 (2003)
- (3) Ito, H.-O., Soutome, S., Nokihara, K., Inoue, M. Identification and characterization of bacterial-binding property in the type III repeat domain of fibronectin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 320: 347-353 (2004)
- (4) 蘭 茂. 滇南本草 (中国古典、15世紀)
- (5) 李 時珍. 本草綱目 (中国古典、16世紀)
- (6) 魏 睦新ら. 医科大学教科書“中医学”, 東南大学出版社, 2004; p. 148
- (7) 李 荣成. 中医药对感染性全身炎症反应综合征作用的研究与思考 (中医学の全身感染性炎症反応総合症に対するの効用検討) 中国中西医结合急救杂志 6: 243-244 (1999)
- (8) 譚 余庆, 赵 一, 林 启云, 等. 青蒿提取物抗内毒素实验研究 (青蒿提取物の内毒素抑制についての実験研究) 中国中药杂志 24: 166-171 (1999)

作成日：2005年3月8日

財団法人日中医学協会  
2004年度共同研究等助成金－調査・共同研究－報告書

平成17年 3月 11日

財団法人 日中医学協会 御中

貴財団より助成金を受領して行った研究テーマについて報告いたします。

添付資料： 研究報告書

受給者氏名： 加藤 宏 司



所属機関名： 山形大学 医学部

所属部署： 神経機能統御学分野 職名： 教授  
〒 990-9585

所在地： 山形市飯田西2丁目2番2号

電話： 23-628-5217 内線： 直通

1. 助成金額： 1,000,000 円

2. 研究テーマ

調査・共同研究助成

砂ネズミの海馬脳虚血モデルを用いた漢方薬の治療効果

3. 成果の概要 (100字程度)

砂ネズミの海馬虚血モデルを作成し、行動実験と海馬の組織および電気生理学実験を行った。その結果の報告にもとづき、李建民先生には博士(医学)号の授与が決定した。また、若手の付愛軍先生が来日し勉強した。一方、加藤宏司が中国に行き研究指導等を行った。これらにより、今後の共同研究の基礎を築くことができた。

4. 研究組織

日本側研究者氏名： 加藤 宏 司 職名： 教授

所属機関： 山形大学医学部 部署： 神経機能統御学分野

中国側研究者氏名： 李 建 民 職名： 教授

所属機関： 華北煤炭医学院 部署： 脳神経外科

## 砂ネズミの海馬脳虚血モデルを用いた漢方薬の治療効果

研究者氏名	加藤宏司, 李建民
日本研究機関	山形大学医学部 神経機能統御学分野
中国所属機関	華北煤炭医学院脳神経外科, 教授
指導責任者	教授 加藤宏司
共同研究者	藤井聡, 山崎良彦, 金子健也, 付愛軍

本報告書では、I) 砂ネズミの海馬虚血モデルを用いた学習行動と海馬CA1ニューロンの研究と題した結果と、II) 助成事業の援助を受けて達成された共同事業との二つに、内容を分けて報告する。I) は漢方薬の治療効果を検証するための基礎になる実験結果である。II) については概要を報告する。

### I) 砂ネズミの海馬虚血モデルを用いた学習行動と海馬CA1ニューロンの研究

#### 要旨

高齢化社会で最も問題になっている疾病の一つは、脳梗塞を代表とする脳の虚血性疾患である。これに対する予防と治療に関する漢方薬の有効性を検証するためには、適切な脳の虚血モデルを作成し、虚血によりニューロンの機能がどうなるか、また個体の行動がどうなるかをまず明らかにする必要がある。その上で漢方薬の投与の有無で効果を検証しなければならない。本研究は、両側頸動脈を一過性に閉塞した砂ネズミを用いて、海馬ニューロンの組織と電気生理学的な性質および学習行動とを調べた結果であり、砂ネズミの一過性虚血モデルが漢方薬の効果を検証するのに適したモデルであることを明らかにしたものである。

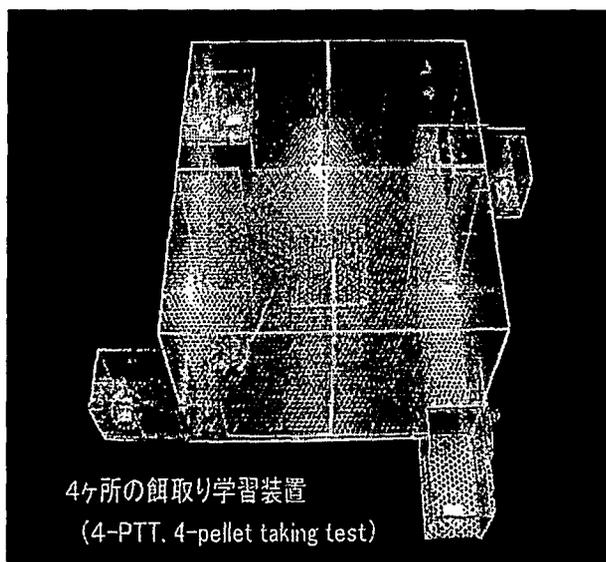
**Key Words** 砂ネズミ, 両側頸動脈閉塞, 海馬遅発性神経細胞死, 4ヶ所からの餌取り学習, 海馬薄切標本, 海馬CA1ニューロンのシナプスの可塑性 (長期増強と脱長期増強)

#### 諸言

脳の神経細胞は血流障害に脆弱である。なかでも、陳述記憶や場所記憶に深く関係する海馬CA1領域の神経細胞は、一過性の虚血により特異な遅発性神経細胞死がおこることが知られている。砂ネズミはウィリス動脈輪で内頸動脈系と椎骨動脈系との間の連絡がないため、両側の総頸動脈を閉塞するだけで確実に前脳虚血をおこす

ことができる。一方、ラットは海馬ニューロンの性質や学習実験によく用いられているが、頸動脈閉塞による虚血前脳モデルを一定に作ることは難しい。椎骨・脳底動脈系がウィリス動脈輪に入り、単に両側頸動脈を閉塞しただけでは一定した前脳虚血を得るのが難しいからである。

本研究では実験動物として砂ネズミを採用することにした。両側の頸動脈の閉塞時間を加減することで、容易に一定レベルの前脳虚血モデルを作ることが出来るからである。しかし、砂ネズミの学習行動の観察には工夫が必要であった。ラットなどの学習実験として用いられている、周囲の視覚情報を手がかりとしたモリスの水迷路や八方迷路は、砂ネズミには適切でない。砂ネズミは泳ぎが得意でないからである。



4ヶ所の餌取り学習装置  
(4-PTT, 4-pellet taking test)

図 1

そこで、本実験では砂ネズミの場所学習に適した学習装置、「4ヶ所からの餌取り学習装置 4-pellet taking test apparatus, (4-PTTA)」(図1)を作り学習行動を観察した。4-PTTAは透明なアクリ製の50 cm四方の中央の箱と、脇の4ヶ所に付けた餌場から出来ている。砂ネズミを床の中央の台に載せ実験を開始する。餌場には小さなペレットを置いて、これを取ることを学習する。毎日1回の試行を午後6時にスタートし、試行は20分間とした。摂食ドライブのために朝9時から飼育ケージの餌を取り外した。砂ネズミの学習中の行動はコンピュータに記録した。これらには、餌を取った場所と時間、毛づくろいや立ち上がり行動のタイミングなどであった。

本研究では虚血に対する漢方薬の効果を検討するための基礎実験であり：1) 海馬 CA1 の神経細胞死の程度と4-PTTA を用いた学習行動との関係、2) 術後の過剰運動と学習行動との関係、3) 学習障害の回復の有無の検討、4) 海馬 CA1 の残存神経細胞の電気生理学的な性質、について検討した。

### 対象と方法

実験には13-16週齢のオスの砂ネズミ (mongolian gerbil, 60-80 g) を用いた。動物舎から実験室に動物を移し、少なくとも5日間1匹ずつケージに入れて飼育し、まず一般的な行動を観察した。餌箱への接触、餌の摂取

量、体重の変化を自動的に観察出来る装置を作り、それらのデータをコンピュータに記録した(図2)。その後、ネブタール麻酔下で両側総頸動脈の閉塞手術を施した。動物を2群に分け、5分間 (five-min, F群) あるいは10分間 (ten-min, T群) 閉塞群とした。砂ネズミは術後の過剰運動が消失する10日目 (-10群) および20日目 (-20群) から学習実験をスタートした (F-20群は、F-10群とほぼ同じ結果であったため、今回は、F-10, T-10, および T-20の3群に分けて報告する)。それぞれの群について、

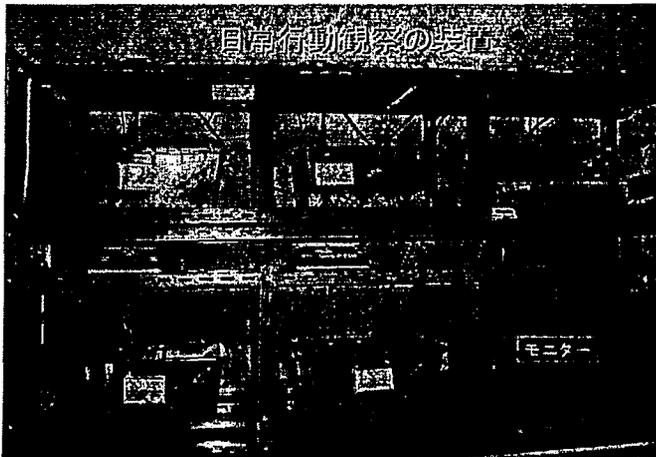
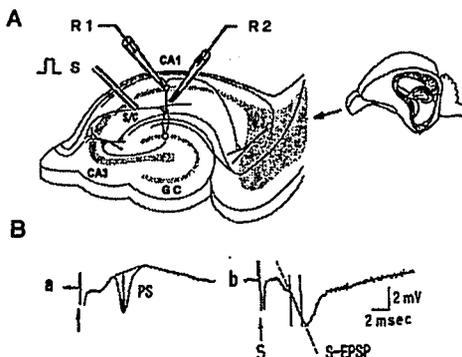


図 2 (上) 図 3 (下)

### 電気生理の実験: 刺激と記録



### 行動・感覚の観察装置

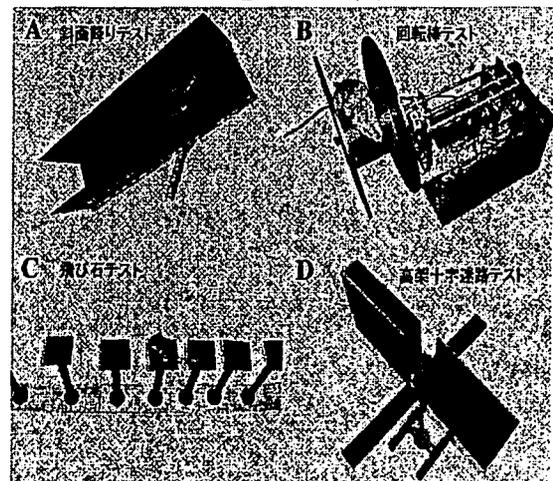


図 4 (下)

学習実験の他に、1)海馬 CA1 に残存するニューロンの数を染色して組織学的に数え、2)海馬薄切片を作り残存ニューロンの電気生理学的な性質を検討した (図3)。

学習実験の間およびその後、日常行動を続けて観察すると共に、砂ネズミに適当な装置（斜面降りテスト、回転棒テスト、飛び石テスト、高架十字迷路テスト）を作成して、感覚および運動機能をチェックした（図4）。

なお、本実験は山形大学医学部動物実験指及び動物愛護及び管理に関する指針に従って行った。

結果 結果をまとめると以下のようであった。

- 1) T群では術後剰な運動行動が見られたが、これは数日以内におさまった。ごく小数例であるが、左・右の海馬、あるいは背・腹側の海馬でCA1領域の残存神経細胞数に25%以上の差の見られる固体があった。これらの個体については今回の解析から除外した。
- 2) CA1領域の平均残存ニューロンは対照群（閉塞手術を施さない群）を100%とすると、F-10群では $69.1 \pm 3.0\%$  (n=6)、T-10およびT-20群ではそれぞれ、 $12.4 \pm 3.0$  (n=6) および  $10.9 \pm 2.9\%$  (n=6)であった（図5）。

### 海馬CA1領域の残存ニューロン

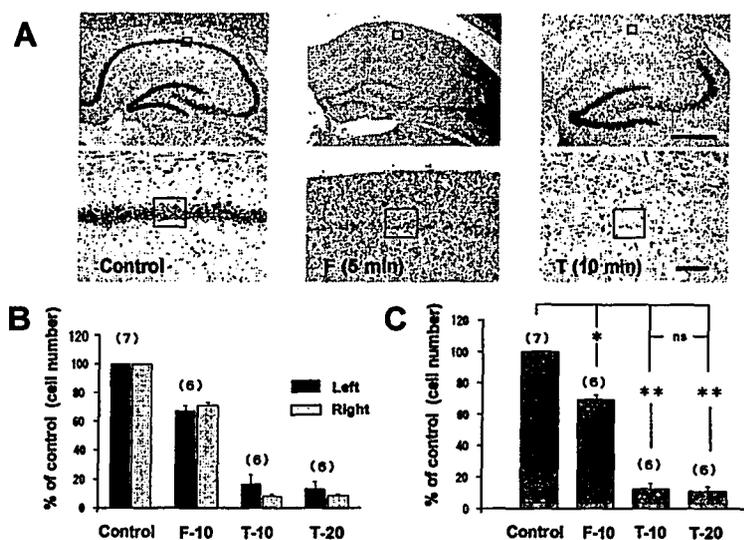


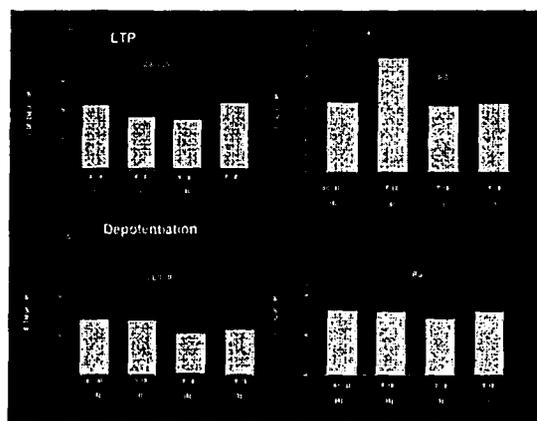
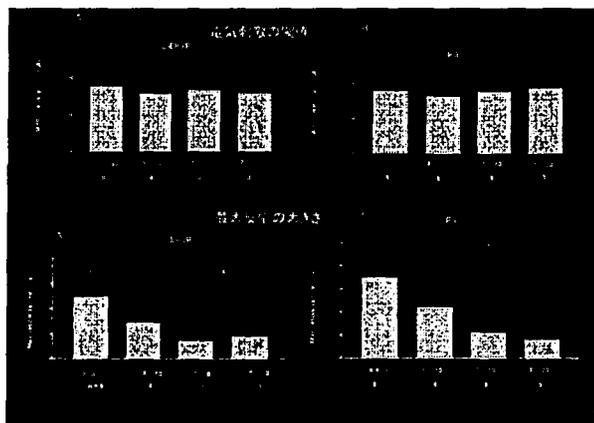
図 5

- 3) 4-PTTA を用いた学習行動では、T-10 群で、対照群 (n=7) と比較して有意の障害が見られ、さらにこの群は作業記憶が障害されていた。有意差は、①学習をスタートしてから4個の餌を取り終わるまでにかかった時間、②学習完成日（4ヶ所の餌を3分間以内に、続けて3日間取り終わる場合の第1日目）で見られ、作業記憶の障害は、③一度餌を取り終わった餌場に再度入る回数（エラー、作業記憶）で見られた。

- 4) T-20 群では、生存神経細胞数は T-10 群とほぼ同程度であるにもかかわらず、4-PTT 学習行動は対照群と有意差がなく、学習障害の回復が起っていた。
- 5) いずれの群も、海馬スライスの残存神経細胞の性質は対照群と有意差はなかった。つまり、①反応を起こす電気刺激の閾値（図6上段）、②シナプスの長期増強 LTP、および③脱長期増強 Depotentiation の程度（図7）

図 6

図 7



には対照群との差はなかった。しかし、③反応の振幅はT群では有意に減少していた(図6下段)。

6) 各種の運動と感覚のテストでは、F群、T群共に対照群と有意な差はなかった。

## 考察

砂ネズミの両側経動脈閉塞を10分間行くと、海馬CA1神経細胞の約90%が限局的に破壊された(遅発性神経細胞死)。それにもかかわらず、砂ネズミは4-PTTAによる場所学習が可能であった。海馬が場所学習に重要であることが知られていることから、もっと強く障害が起こるのではないかと予想していたが、意外な結果であった。これにはいくつかの可能性が考えられるが、最も可能性のあるのはこの学習を達成するのに脳のいくつかの複数の部位が関わっており、海馬はそのうちの一つで、これのみの破壊では学習にある程度の障害が見られるものの学習遂行は可能であるとする考え方である。そこで注目されるのは、この学習障害が約3週間で回復する点である。海馬の残存神経細胞の数は増えておらず、また神経細胞の性質も対照群と変化が見られないという今回の実験結果からすると、この学習に関わっている脳の他の部位、例えば嗅皮質 rhinal cortex や前頭葉による代償作用が起こっている可能性が高い。他の可能性としては、この学習遂行にはいくつかの手がかりを利用して、海馬の破壊で失われる手がかりをすばやく他の手がかりに変えて学習を可能にするということも考えられる。

学習実験を脳を破壊した動物で行う際には、運動や感覚そのものが障害されていないか細心の注意が必要である。今回の実験ではそれをチェックしたが、対照群とは有意な変化は見られなかった。また海馬破壊の術後に過剰運動が起こりこれが学習行動を障害する可能性が指摘されている。今回も過剰運動が見られたがこれは術後数日で止み、これが学習障害の主要な原因ではないと結論した。

以上のことから、砂ネズミを用いた前脳虚血モデルは、①組織学的な神経細胞の数、②電気生理学的な反応の大きさ、さらには③4-PTT装置を用いた学習障害の程度の3点から、今後各種の漢方薬の検証に使えるモデルであると結論した。

## 参考文献他

李建民先生は本実験の結果を英文の論文にして博士(医学)論文として提出し、審査を受けて合格した。現在雑誌に投稿する準備を進めている。

## 11) 助成事業の援助を受けて達成された共同事業

1. 李先生は3回来日し、追加実験、論文作成、および学位論文の発表を行った。その間、華北煤炭医学院の付愛軍先生(脳神経外科講師)が来日し、李先生からも指導を受け実験技術等を勉強して帰国した。
2. 李建民先生の滞在中の平成16年6月に蘭州医学院の景玉宏先生(解剖組織学)が国際協力銀行と中国西部六省との円借款協定の援助で来日した。教室で彼を受け入れたので、同時期に中国の別々の大学の先生が我々と実験する機会に恵まれた。そこで、煤炭医学院と蘭州医学院が、将来この様な方法で脳虚血に対する漢方薬の効果というテーマで共同実験に取り組むことになりその計画が中国で進んでいる。
3. 加藤は平成16年9月15日から1週間華北煤炭医学院を訪問した。そこで行われている砂ネズミの学習実験について脳神経外科の若手と4回にわたり討論をした。またその機会に、医学院の学生に“Functions of glial cells studied in CA1 area of the sliced hippocampus of rat”と題して講演し、さらに看護学科の学生に対して“日本語学習”と題して2回の講義を行った。
4. 訪中の際に、4-PTTAを中国で作製して実験することについて、および他の案件についての協議をし、華北省および華北煤炭医学院(袁聚祥院長)と協定を結んだ。

作成日：2005年3月13日

財団法人日中医学協会  
2004年度共同研究等助成金－調査・共同研究－報告書

2005年 3月 15日

財団法人 日中医学協会 御中

貴財団より助成金を受領して行った研究テーマについて報告いたします。

添付資料： 研究報告書

受給者氏名： 片岡 亨   
所属機関名： 大阪市立大学大学院医学研究科  
所属部署： 循環器病態内科学 職名： 研究医  
〒 545-8585  
所在地： 大阪市阿倍野区旭町1-4-3  
電話： 06-6645-3801 内線： \_\_\_\_\_

1. 助成金額： 700,000 円

2. 研究テーマ

冠動脈造影、血管内超音波を用いた至適な Drug-eluting stent 留置方法の検討

3. 成果の概要 (100字程度)

Drug-eluting stent は新生内膜増殖を抑制する薬剤をステントから溶出する事により再狭窄を従来の stent と比べ約半分以下に減らすことが明らかになっている。しかし冠動脈造影と血管内超音波を併用した至適な Drug-eluting stent 留置方法はいまだに詳細に検討されておらず、本研究の成果から至適方法の目安とその有用性が明らかになると思われる。

4. 研究組織

日本側研究者氏名： 片岡 亨 職名： 研究医

所属機関： 大阪市立大学大学院医学研究科 部署： 循環器病態内科学

中国側研究者氏名： 朱 毅 職名： 副主任

所属機関： 華東病院 部署： 心内科

## 冠動脈造影、血管内超音波を用いた至適な Drug-eluting stent 留置方法の検討 ：日中共同研究

研究者名 片岡 亨  
日本研究機関 大阪市立大学大学院医学研究科 循環器病態内科学  
共同研究者 副主任 朱 毅  
中国研究機関 上海市華東病院心内科

### 要旨

冠動脈疾患の治療としてステント留置術は、中核をなす治療となっているが、内膜増殖による再狭窄は、20～40%の頻度で出現し、未解決な問題である。drug-eluting stent は内膜増殖を抑制する薬剤をステントから溶出し局所的に薬剤を病変部に投与するデバイスであり、最近の研究でその有効性が証明され、再狭窄を半分以下に減らしている。しかしながら、drug-eluting stent を冠動脈内にどのように至適に留置すればよいかは未だ詳細に検討されていない。

今回の研究では drug-eluting stent 留置時に冠動脈造影と血管内超音波を用いて至適なステントサイズを決定し急性期、慢性期の効果を検討する。またステント治療は中国で行いデータ解析は独立して日本で行い結果の客観性を持たせる。

中国における血管内超音波の使用に医療保険の関係上制限があること、更に解析に有用な血管内超音波の診断装置の中国での使用許可が出るのに当初予定していた時間より遅くなりようやく平成 17 年 2 月の時点で使用可能となった。このため、患者の登録は現時点で開始出来ていないが本年中に登録を完了し急性期の結果については本年中に報告予定である。結果の出していない現時点で考察は難しいが血管内超音波の併用により、急性期ならびに慢性期の有用性が見いだせるものと思われる。

### Key Words:

冠動脈造影、血管内超音波、Drug-eluting stent

### 緒言

冠動脈疾患は日本並びに中華人民共和国において主要な成人疾患であり、高齢化や食生活の欧米化に共ない今後もその重要性が高まって行くと考えられている。冠動脈疾患の治療として経皮的冠動脈形成術、特に冠動脈内 stent 留置術は、特別な用具やテクニックを必要とせず、急性期に十分な血管内腔を確保する事が出来、また慢性期の再狭窄をバレーンによる血管形成術に比べ約半分に減少させる事が出来るため、経皮的冠動脈形成術の中核をなす治療となっている。しかしながらステント留置後の新生内膜増殖による再狭窄は、約 20～40%の頻度で出現し、未解決な問題である。

drug-eluting stent は従来の金属ステントが血管保持機能を持つ事に合わせ、新生内膜増殖を抑制する薬剤をステントから溶出する事により長時間にわたり局所的に薬剤を病変部に投与する事を可能にする画期的なデバイスである。最近2年間の基礎および臨床研究においてその有効性と安全性が証明され、再狭窄を従来の stent と比べ約半分以下に減らすことが明らかになっている。

しかしながら、drug-eluting stent をどのように冠動脈内に留置すれば最大の効果が得られるのかを検討することは、未だに明らかな結果がなく今後の冠動脈疾患の治療に関して非常に重要な検討であると思われる。また従来の stent の 2 倍から 3 倍かかるとされるコストを考えれば、この検討の持つ意味も更に増すと考えられる。

### 対象と方法

上海 東病院における虚血性心疾患（急性心筋梗塞を除く）に対し、Drug-eluting stent の使用が可能な患者を対象とする。冠動脈造影だけでなく血管内超音波を用いて使用する stent の直径と長さをより正確にサイズ決定する。更に stent

留置後も冠動脈造影と血管内超音波を用いて十分に stent が拡張出来ているのかも検討する。これらの事から至適な stent 留置方法を検討する事とその結果が慢性期効果にも影響を及ぼすかも評価する。更に stent 留置前の血管内超音波所見から前拡張の balloon を使用の必要性も検討し医療経済効果も評価する。また結果の客観性を維持するため、冠動脈造影、血管内超音波等のデータ解析は、大阪市立大学にて独立して行う。

## 結果

中国における血管内超音波の使用に医療保険の関係上制限があること、更に解析に有用な血管内超音波の診断装置（アメリカ製）の中国での使用許可が出るのに当初予定していた時間より遅くなりようやく平成 17 年 2 月の時点で使用可能となった。このため、患者の登録は現時点で開始出来ていないが本年中に登録を完了し急性期の結果については本年中に報告予定であります。

## 考察

結果の出ていない現時点では難しいが血管内超音波の併用により、急性期ならびに慢性期の有用性が見いだせるものと思われる。

作成年月日 2005年 3月31日

財団法人日中医学協会  
2004年度共同研究等助成金－調査・共同研究－報告書

17年 3月 13日

財団法人 日中医学協会 御中

貴財団より助成金を受領して行った研究テーマについて報告いたします。

添付資料： 研究報告書

受給者氏名： 熊谷 嘉人   
所属機関名： 筑波大学  
所属部署： 社会医学系 職名： 教授  
〒 305-8575  
所在地： 茨城県つくば市天王台 1-1-1  
電話： 029-853-3133 内線：

1. 助成金額： 900,000 円

2. 研究テーマ

中国の慢性ヒ素汚染地域における中毒症状の個体差とヒ素体外排泄関連遺伝子多型との関係

3. 成果の概要 (100字程度)

中国内モンゴル自治区のヒ素汚染地域において、ヒ素曝露患者の中毒症状および血液中ヒ素濃度と GSTM1 の遺伝子多型との関係を調べたところ、男性において GSTM1 野生型群の血中ヒ素濃度は GSTM1 欠損型群のそれと比較して約 2 倍の高い値を示した。しかし中毒症状の発症率に差は認められなかった。

4. 研究組織

日本側研究者氏名： 熊谷 嘉人 職名： 教授  
所属機関： 筑波大学 部署： 社会医学系  
中国側研究者氏名： 孫 貴範 職名： 院長 (教授)  
所属機関： 中国医科大学 部署： 公衆衛生院

## 中国の慢性ヒ素汚染地域における中毒症状の個体差と

### ヒ素体外排泄関連遺伝子多型との関係

研究者氏名 熊谷嘉人  
所属機関 筑波大学大学院人間総合科学研究科 教授  
共同研究者 孫貴範

#### 要旨：

1980年代以降、中国では地域性のヒ素中毒が多発している。慢性ヒ素中毒は皮膚疾患、末梢血管障害や種々の癌などを引き起こすが、その症状には個人差が見られる。最近、ヒ素の解毒排泄にはそのグルタチオン抱合化が重要であることが明らかにされた。一般に、異物のグルタチオン抱合反応にはグルタチオン S-転移酵素 (GST) が触媒として働く。興味有ることに、GST の分子種 M1 の遺伝子にはホモ欠失変異が知られており、アジア人の約半数が欠損型である。そこで本研究では、中国内モンゴル自治区のヒ素汚染地域において、ヒ素曝露患者の中毒症状および血液中ヒ素濃度と GSTM1 の遺伝子多型との関係を調べた。その結果、男女共に GSTM1 野生型群と欠損型群では中毒症状の発症率に差は認められなかった (GSTM1 の欠損率は全体の 41%)。しかし女性より男性の方がヒ素中毒症状の発症率が高く、血液中ヒ素濃度も男性の方が高い傾向にあった。また男性においてのみ、GSTM1 野生型群の血中ヒ素濃度は GSTM1 欠損型群のそれと比較して約 2 倍の高い値を示した。これはメチル化ヒ素およびジメチル化ヒ素の濃度が高いことに由来していたことから、男性の場合 GSTM1 野生型は欠損型よりヒ素のメチル化能が高いのかもしれない。今後は GSTM1 以外のヒ素解毒遺伝子の多型を解析して、ヒ素中毒症状の個体差との関係を明らかにすることが期待される。

#### Key Words：

慢性ヒ素中毒症、個体差、性差、遺伝子多型、GSTM1

#### 目的：

ヒ素は地球上に普遍的に存在する元素であり、その環境汚染による地域性のヒ素中毒が世界各地で生じ問題となっている。特に中国における地域性慢性ヒ素中毒は深刻であり、その曝露人口は 300 万人を超えるとされ、数万人を超える中毒患者が認定されている<sup>1)</sup>。中国のヒ素中毒の原因は、ヒ素に汚染された井戸水の摂取に起因する飲水型とヒ素を含有した石炭を燃やすことに起因する石炭燃焼型の 2 つに大別される。内モンゴル自治区、ウイグル自治区、山西省などでは飲水型の汚染が多く、貴州省では石炭燃焼型の汚染が多い。一般にヒトが慢性的にヒ素に曝露されると、色素沈着や色素脱落、手のひら・足の裏の角質変性などの皮膚疾患、レイノー症候群のような末梢血管障害、循環器疾患や種々の癌などが生じるが、それぞれの発症機序は明らかにされていない。しかしながら我々は内モンゴル自治区で行ったフィールド調査において、ヒ素に汚染された同じ水源の井戸水を飲んでいる患者でもその中毒症状に個体差があることを見出した。このことは、ヒ素中毒の発症には遺伝子多型が少なからず関与していることを示唆している。

ところで、生体にとって毒であるヒ素を速やかに解毒・排泄する生体防御のメカニズムが近年明らかになりつつある。先行研究により、ヒ素の解毒には GST によるグルタチオン抱合化、ヒ素メチルトランスフェラーゼ (CYT19) によるメチル化、並びに異物排泄トランスポーターである多剤耐性関連タンパク質 (MRP) による細胞外へのくみ出しが重要であることが示唆されている<sup>2)</sup>。またこれらの遺伝子には多型が存在する事も知られており、特に GST 分子種の変異型は野生型より発癌のリスクが高いなどの報告がなされている<sup>3)</sup>。

そこで我々は「ヒ素の中毒症状の個体差は、ヒ素解毒遺伝子の多型に起因するのではないか」との作業仮説を構築

した。本研究ではヒ素解毒遺伝子の中でも特に、アジア人において約半数の人がホモ欠失変異を示す GSTM1 遺伝子に着目し、飲水型慢性ヒ素汚染地域として知られている内モンゴル自治区包頭市缸房営 (Gangfangying) 村の住民を対象にして、中毒症状の個体差並びに生体内ヒ素濃度との因果関係を明らかにすることを目的とした。

#### 対象と方法：

**対象：**中国内モンゴル自治区包頭市の飲水型慢性ヒ素汚染地域である缸房営村の住人に対してインフォームドコンセントを行い、慢性ヒ素曝露患者として 56 名（男性 25 名、女性 31 名）を抽出した。年齢は 8-65 歳（平均年齢 36.8 歳）で、彼らを使用している井戸水のヒ素濃度は  $180 \pm 60$  ( $\mu\text{g/L}$ ) ( $n=37$ ) と中国の飲料水基準値を上回っていた。井戸の使用期間は平均 18 年程度である。**症状：**手足の痺れ等の末梢血管障害に関しては問診票より、皮膚疾患は検診により調査した。**サンプル：**前日午後 9 時から絶食を行い、翌朝 9 時に採血および採尿した。**血液中及び尿中ヒ素濃度：**超低温-還元気化-原子吸光法を用いて決定した。**遺伝子多型解析：**Wako 社より市販されている DNA 抽出キットを用いて血液サンプルより DNA を採取後、TaKaRa 社より市販されている GSTM1 欠失多型タイピングキットを使用して決定した。

#### 結果：

ヒ素曝露患者において色素沈着（全体の 17.3%）、色素脱落（全体の 17.3%）、手の角質変形（全体の 42.3%）、足の角質変形（全体の 28.8%）、末梢血管障害（全体の 3.6%）等の症状が認められた。これらのヒ素中毒症状は男性（色素沈着、34.8%；色素脱落、30.4%；手の角質変形、69.6%；足の角質変形、39.1%；末梢血管障害、8%）の方が女性（色素沈着、3.5%；色素脱落、6.9%；手の角質変形、20.7%；足の角質変形、20.7%；末梢血管障害、0%）と比べて顕著であった。この結果に一致して、血液中および尿中のヒ素濃度は男性（血液中ヒ素濃度、 $9.8 \pm 1.9$  ng/ml；尿中ヒ素濃度、 $440 \pm 149$   $\mu\text{g/g} \cdot \text{Cr}$ ）の方が女性（血液中ヒ素濃度、 $6.2 \pm 0.7$  ng/ml；尿中ヒ素濃度、 $290 \pm 82$   $\mu\text{g/g} \cdot \text{Cr}$ ）と比較して高い傾向を示した。GSTM1 の遺伝子多型を調べたところ、男性で 10 名（全体の 40%）、女性で 13 名（全体の 42%）が欠損型を示した。GSTM1 の欠損比率には男女差は見られなかった。また、男女共に GSTM1 野生型群と欠損型群では中毒症状の発症率に差はほとんど認められなかった。しかし興味深いことに、男性における GSTM1 野生型群の血中ヒ素濃度は GSTM1 欠損型群のそれと比較して約 2 倍の高い値を示した（全ヒ素、 $12.1 \pm 2.9$  ng/ml vs.  $6.3 \pm 1.0$  ng/ml）。このような GSTM1 野生型群での血中ヒ素濃度増加は無機ヒ素ではなく、その解毒代謝物であるメチル化ヒ素やジメチル化ヒ素の濃度に由来していた（メチル化ヒ素、 $5.4 \pm 1.6$  ng/ml vs.  $1.9 \pm 0.6$  ng/ml；ジメチル化ヒ素、 $3.8 \pm 1.1$  ng/ml vs.  $1.8 \pm 0.3$  ng/ml）。しかしながら男性で認められた差異は女性においては観察されなかった（全ヒ素、 $5.3 \pm 0.6$  ng/ml vs.  $7.5 \pm 1.5$  ng/ml）。また男女共に、GSTM1 野生型群と欠損型群の尿中ヒ素濃度にはあまり変化は見られなかった（結果はすべて mean  $\pm$  SEM）。

#### 考察：

今回の結果より、ヒ素の中毒症状の発症に GSTM1 遺伝子の多型は関与していない事が明らかとなった。しかし、女性より男性の方が臨床症状の発症が顕著であったことから、ヒ素の中毒症状には性特異性が存在することが示唆された。この結果に一致して、血液中のヒ素濃度も女性より男性の方が高い傾向を示した。更に、男性においてのみ GSTM1 野生型群の血中ヒ素濃度は欠損型群のその約 2 倍高い値だった。それにも関わらず臨床症状に差がなかったのは、無機ヒ素より毒性の低いメチル化ヒ素やジメチル化ヒ素の濃度が高かったためであると思われる。これまでの報告によると、井戸水を介して生体内に摂取されたヒ素は消化管から効率良く吸収され肝臓等に分布される。哺乳類では AQP9 のような浸透圧に係るトランスポーターを介して組織中に取込まれた無機ヒ素は CYT19 によりメチル化を受ける<sup>4,5)</sup>。一方、無機ヒ素はグルタチオン抱合され、それが CYT19 によるメチル化の中間体になるという事実も最近明らかにされている<sup>6)</sup>。この知見と今回の研究結果から判断すると、男性において GSTM1 野生型であることは、解毒反応と考えられているヒ素のメチル化を促進することを示唆している。この仮説と良く一致して、GSTM1 野生型の方はその欠損型より血中ヒ素のメチル化代謝物量が多かった。

GST 分子種の遺伝子多型には GSTM1 の他にも GSTP1、GSTT1 などがよく知られている。また最近 CYT19 にも遺伝子多型が存在することが報告された<sup>7)</sup>。組織中に取込まれた無機ヒ素を胆汁中や血液を介して腎臓を経て尿中に排泄されるには、細胞外への掃出しポンプとして知られている MRP が無機ヒ素ではなくそのグルタチオン抱合体として認識することが報告されている<sup>8)</sup>。すなわち、無機ヒ素の体外排泄に係る解毒反応にはメチル化だけでなく GST 分子種によるグルタチオン抱合が重要であるといえる。したがって、今後は GSTM1 以外のこれらの遺伝子多型を解析し、ヒ素の中毒症状の個体差との因果関係を調べる研究が要求される。

#### 謝辞：

本研究は臨床医を含めて中国医科大学公衆衛生院孫貴範教授の研究グループと内モンゴル地方病研究所の支援により行った。また、聖マリアンナ大学医学部予防医学と旭川医科大学医学部健康科学の研究グループの協力に感謝する。

#### 参考文献：

- 1) Sun Guifan et al. ENDEMIC ARSENICOSIS a clinical diagnostic manual with Photo illustrations. 2004
- 2) Rosen BP. Biochemistry of arsenic detoxification. FEBS Lett. 2002; 529: 86-92
- 3) Strange RC et al. The glutathione S-transferases: influence of polymorphism on cancer susceptibility. IARC Sci. Publ. 1999; 148: 231-49.
- 4) Liu Z et al. Arsenite transport by mammalian aquaglyceroporins AQP7 and AQP9. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2002; 99: 6053-8.
- 5) Lin S et al. A novel S-adenosyl-L-methionine:arsenic(III) methyltransferase from rat liver cytosol. J. Biol. Chem. 2002; 277: 10795-803.
- 6) Hayakawa T et al. A new metabolic pathway of arsenite: arsenic-glutathione complexes are substrates for human arsenic methyltransferase Cyt19. Arch. Toxicol. 2004; 4.
- 7) Drobna Z et al. Interindividual variation in the metabolism of arsenic in cultured primary human hepatocytes. Toxicol. Appl. Pharmacol. 2004; 201: 166-77.
- 8) Kala SV et al. The MRP2/cMOAT transporter and arsenic-glutathione complex formation are required for biliary excretion of arsenic. J. Biol. Chem. 2000; 275: 33404-8.

作成日：2005年3月11日

財団法人日中医学協会  
2004年度共同研究等助成金－調査・共同研究－報告書

2005 年 2 月 28 日

財団法人 日中医学協会 御中

貴財団より助成金を受領して行った研究テーマについて報告いたします。

添付資料： 研究報告書

受給者氏名： 若林 則幸   
所属機関名： 東京医科歯科大学  
所属部署： 歯学部附属病院 職名： 助手  
〒 113-8549  
所在地： 東京都文京区湯島1-5-45  
電話： 03-5803-5842 内線： 5842

1. 助成金額： 780,000 円

2. 研究テーマ

機能性生体用チタン合金の開発と歯科臨床への実用化

3. 成果の概要 (100字程度)

チタン合金リングバーによる床下粘膜へのストレスを有限要素力学解析により明らかにした。粘膜中のストレスを制御するためには、チタン合金リングバーの断面形態に十分な配慮をするべきである。

4. 研究組織

日本側研究者氏名： 若林 則幸 職名： 助手  
所属機関： 東京医科歯科大学 部署： 歯学部附属病院  
中国側研究者氏名： 姜 亭 職名： 助教授  
所属機関： 北京大学口腔医学院 部署： 修復科

## Ti-6Al-7Nb および Co-Cr によるリンガルバーの形態が粘膜の応力集中に及ぼす影響

研究者氏名 若林 則幸  
所属研究機関 東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科  
共同研究者 姜 亭  
所属研究機関 北京大学口腔医学院修復科

### Abstract

Three-dimensional finite element models of nine lingual bars with different dimensions (thickness: 1.5, 2.0, or 2.5 mm; height: 4, 5, or 6 mm) with underlying mucosa were produced for a Kennedy Class II case. These models were used to study the effects of cross-section dimension in lingual bars on deflections of Ti-6Al-7Nb and Co-Cr removable partial denture frameworks. The stress distributions in the structures and underlying mucosa were also investigated. Each framework included occlusal rests on the first premolars of both arch sides. The bottom surface of the mucosa and rest on the edentulous side were fixed in a vertical direction. The rest on the tooth-supported side was fixed in all directions. The elastic moduli of 200 and 123 GPa were input into the program to simulate the Co-Cr and Ti-6Al-7Nb alloys, respectively. A 30 ° buccally oblique biting force of 20 Newtons was directed towards each of the three missing teeth locations. Ti-6Al-7Nb frameworks exhibited approximately 1.2 times the maximum stress in the mucosa than in Co-Cr frameworks with the same cross-section dimensions. The framework displacement and stress in the mucosa reduced as the thicknesses or heights of the bars increased. The maximum principal compressive stress of 1.84 MPa within the mucosa was estimated at the posterior ridge crest when the smallest cross-section Ti-6Al-7Nb bar was used. In conclusion, the Ti-6Al-7Nb lingual bar had a rigidity comparable to the Co-Cr lingual bar if the former had a cross-section dimension 0.5 mm thicker or 2.0 mm higher than the latter.

### Key words

Finite analysis, stress, denture, lingual bar, mucosa, titanium, dental alloy

### Introduction

Ti-6Al-7Nb alloy has recently been developed to pose excellent biocompatibility, resistance to abrasion and other advantages that put it as an alternative to the existing removable partial denture (RPD) alloys<sup>1</sup>. Like other titanium alloys, Ti-6Al-7Nb has a modulus of elasticity that is approximately half that of Co-Cr, which increases its resiliency and makes it suitable for flexible clasps<sup>2</sup>. However, the flexibility may become disadvantageous when used in the other components such as lingual bars, occlusal rests and minor connectors. Flexible major connectors can cause stress concentration in the framework structures, injury to the periodontal tissues and residual ridges, and discomfort to the patients. Previous studies explored the effect of cross section shape on rigidity of lingual bars by means of in-vitro cantilever bending tests<sup>3</sup>. However, optimal dimensions in lingual bar to ensure favorable stress transmission to the abutments and supporting oral mucosa, has not been well assessed in relation to the rigidity of the alloys.

This study examined the effect of cross-sectional dimension in lingual bars on deflection of Ti-6Al-7Nb and Co-Cr RPD frameworks and stress distribution both in the framework structure and oral mucosa under simulated occlusal loadings. It was hypothesized that lingual bar made of the Ti-6Al-7Nb alloy with an increased thickness and width has comparable rigidity to that made of the Co-Cr alloy, which was claimed to be the most rigid partial denture alloy.

## Materials and Methods

We created three-dimensional finite element models of mandibular RPD frameworks designed for the edentulous area distal to the right first premolar (ANSYS 7.0, ANSYS Inc., Canonsburg, PA). Each framework included an extension denture saddle, two occlusal rests on the first premolars on both sides of the arch, minor connectors, and one of the nine lingual bars with different cross-sectional dimensions (Fig. 1). Vertical distance from the lower edge of the lingual bar to the edentulous ridge was 12 mm, and that to the occlusal plane was 17 mm. The distance between both sides of the mandibular ridge crests at the distal ends was 55 mm. Sagittal length from the anterior to right posterior end of the bar along the midline was 36 mm. The thickness and height of the nine lingual bars (Fig. 2) were; 1.5 mm / 4 mm, 2.0 mm / 4 mm, 2.5 mm / 4 mm, 1.5 mm / 5 mm, 2.0 mm / 5 mm, 2.5 mm / 5 mm, 1.5 mm / 6 mm, 2.0 mm / 6 mm, and 2.5 mm / 6 mm. Clasps, artificial teeth, and the resin denture base were excluded from the model.

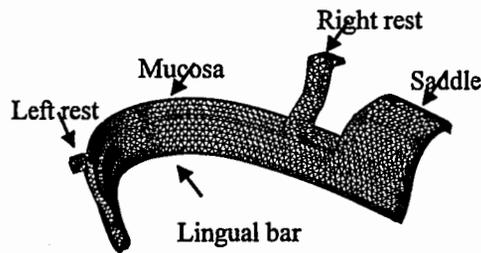


Fig. 1. A meshed finite element model of a framework includes an extension denture saddle, two occlusal rests, lingual bar, and the underlying oral mucosa.

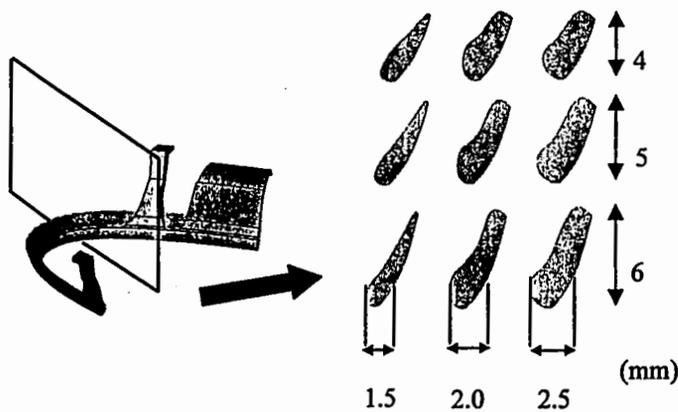


Fig. 2. Cross-sections of the lingual bars designed in this study. Each bar had one of the thicknesses of 1.5 mm, 2.0 mm, or 2.5 mm; and one from the heights of

Each model was meshed by elements defined by eight nodes with three degrees of freedom in tetrahedral bodies. Poisson's ratio of 0.3 and a modulus of elasticity of 200 GPa were input into the program to simulate Co-Cr alloy<sup>3</sup>, while those of 0.3 and 135 GPa were for Ti-6Al-7Nb alloy. Poisson's ratio of 0.45 and a modulus of elasticity of  $3.4 \times 10^3$  GPa were used for the mucosa<sup>4</sup>. The loading and boundary condition (Fig. 3) was based on a previous studies<sup>5</sup>. The rest on the left (tooth-supported) side was fixed in all directions. This complete fixation was based on an assumption that the clasps placed on healthy abutments were rigid enough to retain this part of the framework unmovable. The rest on the right (edentulous) side was fixed only in a vertical direction to allow for horizontal movements of this component. The bottom surface of the oral mucosa was also vertically fixed based on an assumption that the bone was a rigid structure but it allowed horizontal distortion of the overlying mucosa. A 30° buccally oblique biting force of 20 N was directed simultaneously towards the center of each of the three missing posterior teeth locations (total 60 N). Under the simulated occlusal loading, the framework displacements and the principal stress distribution both in the framework and the mucosa were calculated.

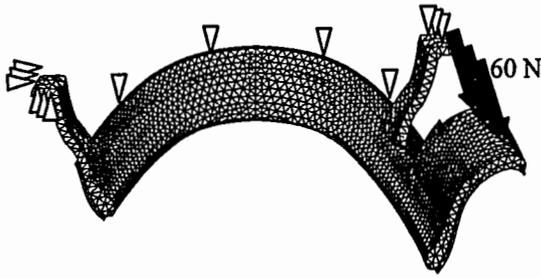


Fig. 3. A 30 ° buccally oblique biting force was directed simultaneously towards each of the three missing posterior teeth locations on the saddle (total 60 N).

## Results

The maximum stresses in the supporting oral mucosa were shown in Fig. 4. The maximum vertical displacement was observed at the posterior edge of the saddle for all the frameworks.

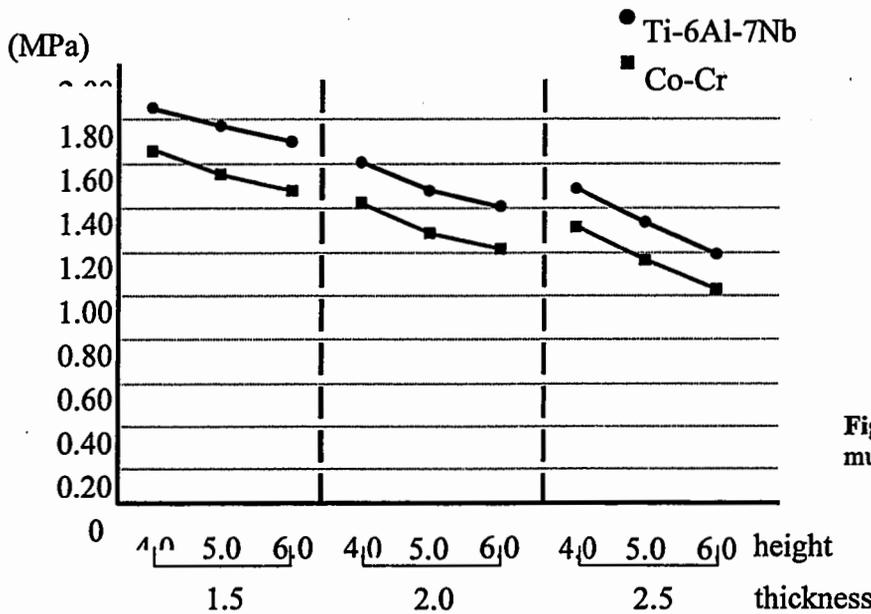


Fig. 4. The maximum stress in mucosa shown in each model.

The maximum displacements reduced as the thickness or the height of lingual bar increased. They ranged from 86.6  $\mu\text{m}$  to 148.4  $\mu\text{m}$  for the Ti-6Al-7Nb bars and from 73.4  $\mu\text{m}$  to 127.2  $\mu\text{m}$  for the Co-Cr bars. The maximum stress in the framework was recorded at the midline on the polishing surface of each lingual bar. The maximum stress reduced as the thickness or the height of the bar increased. The stresses ranged from 233.2 MPa to 628.5 MPa for the Ti-6Al-7Nb bars and from 230.3 MPa to 632.8 MPa for the Co-Cr bars. The maximum stress in the oral mucosa was shown on its bottom surface right above the posterior edentulous ridge crest (Fig. 5). The maximum stress reduced as the thickness or the height of lingual bar increased, ranging from 1.14 MPa to 1.80 MPa for the Ti-6Al-7Nb bars and from 0.97 MPa to 1.61 MPa for the Co-Cr bars. The lowest maximum displacement and the stresses were recorded in the model with the largest cross-section (2.5 mm-thickness and 6.0-mm height) for each alloy.

## Discussion

The Ti-6Al-7Nb framework caused the largest vertical deflection of approximately 150  $\mu\text{m}$  and the peak stress of 1.80 MPa. They were both close to the physiological limitations of the mucosa and the supporting alveolar bone, therefore likely to cause a detrimental effect on the alveolar bone. The result of this study suggests that the increase of the thickness be recommended in designing the lingual bars because it was clearly effective in reducing the peak stress in mucosa under the oblique occlusal loadings. From studying all data, it was indicated that the Ti-6Al-7Nb lingual bar had rigidity comparable to the Co-Cr lingual bar if the former had a cross-section dimension 0.5 mm thicker than the latter with a same height, or 2.0 mm greater height with a same thickness. The result supported our

hypothesis that the lingual bar made of the Ti-6Al-7Nb alloy with an increased thickness and width has comparable rigidity to that made of the Co-Cr alloy.

The maximum principal stress within the lingual bar considerably decreased as the thickness or the height of the bar increased; however, it was insensitive to the elastic moduli of the alloys. The result was reasonable in the linear elastic models in this study. The location of the peak stress in all the models indicated that the bars are likely to fail at the midline. Failure probability of the prostheses is often estimated by comparison of the peak stress in the materials with their strength values. The highest maximum principal stress within the Ti-6Al-7Nb and Co-Cr bars (628.5 MPa and 632.8 MPa, respectively) were slightly below the reported yield strengths of corresponding alloys (890 MPa and 710 MPa, respectively). If principal tensile stresses that are close to the yield or tensile strengths are considered in the finite element models, the deformation or the fracture of the lingual bar of smaller cross-section dimension might occur in the loading condition in this study.

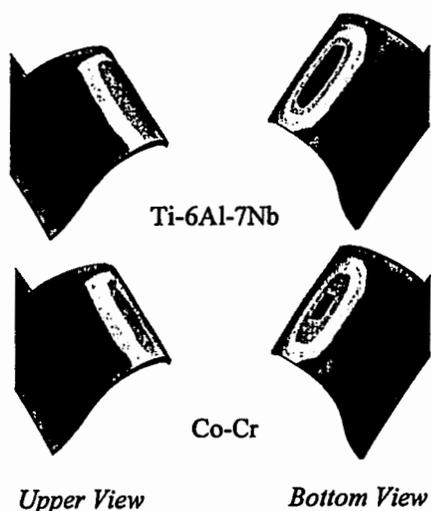
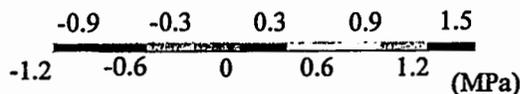


Fig. 5. Stress contours in the mucosa for the Ti-6Al-7Nb (left) and Co-Cr (right) frameworks with the lingual bar of 2.0 mm-thickness / 5 mm-height, viewed from above and bottom. For each model, the maximum compressive stress was shown in the bottom surface of the mucosa right above the top of the posterior edentulous ridge crest.



### References

1. Iijima D, Yoneyama T, Doi H, Hamanaka H, Kurosaki N. Wear properties of Ti and Ti-6Al-7Nb castings for dental prostheses. *Biomaterials* 2003;24 :1519-24.
2. Vallittu PK, Kokkonen M. Deflection fatigue of cobalt-chromium, titanium, and gold alloy cast denture clasp. *J Prosthet Dent* 1995; 74 , 412-19.
3. O'Brien WJ. *Dental Materials and Their Selection*. 2nd ed. Chicago: Quintessence; 1997.
4. Yamada T. Basic studies on Kounuskronen by using the finite element method, part 2: Stress analysis of mandibular distal-extension removable partial denture. *J Jpn Prosthodont Soc* 1987;31 ,186-99.
5. Eto M, Wakabayashi N, Ohyama T. Finite Element Analysis of Deflections in Major Connectors for Maxillary RPDs. *Int J Prosthodont* 2002; 15:433-8.

注：本研究は、*Prosthodontic Research and Practice* (2004年5月VOL3巻)に掲載。

作成日：2005年2月28日

財団法人日中医学協会  
2004年度共同研究等助成金—中国人研究者・技術者招聘—報告書

平成17年3月15日

財団法人 日中医学協会 御中

貴財団より助成金を受領して行った中国人研究者・技術者招聘について報告いたします。

添付資料： 研究報告書

受給者氏名： 遠藤 政夫   
所属機関名： 山形大学  
所属部署： 医学部 職名： 教授  
〒990-9585  
所在地： 山形市飯田西 2-2-2  
電話： 023-628-5234 内線： \_\_\_\_\_

1. 助成金額： 1,000,000 円

2. 研究テーマ

心室筋細胞エンドセリン受容体を介する情報伝達機構の解明

3. 成果の概要 (100字程度)

哺乳類(イヌおよびウサギ)心室筋におけるエンドセリン(ET)とET/ヒルエロネリンのフロストークによる収縮性およびCa<sup>2+</sup>シグナルの調節に関する細胞内シグナル伝達過程の解析について5編の論文を完成し、イタリ(1)、ヨーロッパ(2)、日本(2)の薬理学の英文専門誌に受理され全てすでに出版または印刷中の状態にあり成果は充分に上った。

4. 被招聘者

氏名： 樊立 職名： 教授  
所属機関： 中国河北医科大学 部署： 薬理学

5. 滞在日程概要 (日付、主な活動・工程等)

平成16年5月20日～平成16年8月18日 論文作成

平成17年2月10日～平成17年2月23日 論文作成

## 心室筋細胞エンドセリン受容体を介する情報伝達機構の解明

研究者氏名	楚 立
中国所属機関	中国河北医科大学薬理学
日本研究機関	日本山形大学医学部循環薬理学
指導責任者	教授 遠藤 政夫
共同研究者名	石井 邦明, 蓬田 伸一, 西丸 和秀, 野呂田 郁夫

### 要 旨

Endothelin-1 (ET-1) induces a positive inotropic effect (PIE) due to a combination of an increase in intracellular  $Ca^{2+}$  transients (CaT) and myofilament  $Ca^{2+}$  sensitivity in rabbit ventricular myocardium, but it alone does not elicit significant inotropic effect in dog ventricular myocardium. However, in the presence of norepinephrine (NE), it induces a PIE and/or negative inotropic effect (NIE) depending on the concentrations of NE coexisting with ET-1. The roles of kinases such as protein tyrosine kinase (PTK), Rho kinase (ROK) and myosin light chain kinase (MLCK) in the regulation of cardiac contractility and  $Ca^{2+}$  signaling remains unclear. The present studies were undertaken to examine the effects of PTK inhibitor genistein, ROK inhibitor Y-27632 and MLCK inhibitor wortmannin to elucidate the potential role of PTK in the inotropic effects induced by crosstalk of ET-1 and NE in dog, and that of MLCK and Rho kinase in regulation of cardiac contractility and CaT in rabbit. Experiments were carried in isolated dog and rabbit ventricular myocardium and indo-1/AM-loaded single myocytes.

In isolated dog ventricular trabeculae and myocytes, genistein elicited a concentration-dependent PIE in association with an increase in the amplitude of CaT. Genistein potentiated the NE-induced PIE and an increase in the amplitude of CaT in a concentration-dependent manner, but inhibited the ET-1-induced PIE and increase in the amplitude of CaT in the presence of NE at low concentrations, as well as the ET-induced NIE and decrease in amplitude of CaT in the presence of NE at high concentrations, whereas genistein did not affect the NIE of carbachol, that elicits anti-adrenergic effect via activation of  $G_i$  proteins.

In isolated rabbit papillary muscles and myocytes, Y-27632 inhibited significantly the baseline contractility and the amplitude of CaT, suppressed the ET-1-induced PIE and increase in the amplitude of CaT in a concentration-dependent manner. On the other hand, wortmannin decreased basal contractile force without affecting the amplitude of CaT, markedly inhibited the ET-1-induced PIE, but did not suppress the increase in the amplitude of CaT induced by ET-1. Neither Y-27632 nor wortmannin affected the PIE and the increase in the amplitude of CaT induced by isoproterenol (ISO) via  $\beta$ -adrenoceptor stimulation.

Our findings in the dog indicate that both the PIE and NIE of ET-1 in the presence of NE require the activation of PTK, and the NIE induced by ET-1 and muscarinic receptor stimulation involve different pathways in dog ventricular myocardium and myocytes. The findings in rabbit imply that the activation of ROK and MLCK contributes to the ET-1-induced increase in contractility: ROK primarily elevates increase in the amplitude of CaT, while MLCK mainly increases the myofilament  $Ca^{2+}$  sensitivity in rabbit ventricular myocardium and myocytes.

**Key words:** Endothelin-1, protein tyrosine kinase, Rho kinase, myosin light chain kinase, inotropic effect

**緒 言 :**

Endothelin-1 (ET-1) is a potent vasoactive peptide of 21 amino acids that was originally isolated from the culture medium of porcine aortic endothelial cells. It exerts a positive inotropic effect (PIE) in most mammalian species but not in dog ventricular myocardium. Our recent studies in the dog heart showed that in the presence of low concentrations of  $\beta$ -adrenoceptor agonists, such as norepinephrine (NE) and isoproterenol (ISO), ET-1 induced a PIE, whereas it elicited a negative inotropic effect (NIE) in the presence of high concentrations of  $\beta$ -adrenoceptor agonists.

Protein tyrosin kinase (PTK) mediates the actions of a various types of cells including the cardiovascular systems. Recent studies revealed that the PTK inhibitor genistein enhanced an increase in L-type  $\text{Ca}^{2+}$  current ( $I_{(\text{Ca})L}$ ) induced by  $\beta$ -adrenoceptor stimulation. In contrast, however, we recently found that genistein exerted an inhibitory action on the ET-1-induced PIE and an increase in  $\text{Ca}^{2+}$  transients in rabbit ventricular myocytes, but little is known about the role of activation of PTKs in the crosstalk of ET-1 and NE in the dog heart.

The intracellular signaling pathway for cardiac regulation has been shown to involve monomeric G protein (RhoA) and its direct target Rho kinase (ROK). RhoA is activated by binding guanosine triphosphatase (GTPase), stimulates ROK, which phosphorylates and inhibits the myosin light chain (MLC) phosphatase and/or MLC itself. In smooth muscle cells, MLC kinase (MLCK) and ROK act in concert to increase phosphorylation of MLC-2. While MLC-2 is phosphorylated by MLCK also in the heart, the role of MLC-2 phosphorylation in cardiac muscle has been studied relatively less because unlike smooth muscle, cardiac muscle contraction is primarily regulated by thin filament modulation, the experiments were carried out to elucidate whether the activation of ROK and MLCK is involved in the ET-1-induced contractility and cytosolic  $\text{Ca}^{2+}$  signaling.

In the present study, we investigated the influence of PTK inhibitor genistein to elucidate the role of PTK signaling in regulation of the inotropic effects induced by crosstalk of ET-1 and NE in isolated dog ventricular trabeculae. We also applied ROK inhibitor Y-27632 and MLCK inhibitor wortmannin to isolated rabbit papillary muscles, examined their effects on inotropic responses to ET-1. For comparison the influence of these inhibitors on the PIE mediated by  $\beta$ -adrenoceptor stimulation by ISO or NE was also studied. Our previous reports have indicated that the effects of ET-1 and receptor antagonists on single ventricular myocytes are quantitatively different from but qualitatively similar to those in papillary muscle. Therefore, the present experiments were also carried out in ventricular myocytes loaded with a fluorescent dye, acetoxymethylester of indo-1 (indo-1/AM).

**対象と方法 :**

1. Preparation of dog ventricular trabeculae and rabbit papillary muscles
2. Measurements of inotropic effects in dog and rabbit ventricular myocardium.
3. Isolation of dog and rabbit cardiac ventricular myocytes.
4. Loading of myocytes with indo-1/AM.
5. Simultaneous measurements of cell shortening and indo-1 fluorescence ratio.

## 結果:

### 1. Effects of genistein on dog ventricular trabeculae and myocytes:

- (1) The PTK inhibitor genistein elicited a concentration-dependent PIE in association with an increase in the amplitude of CaT, while daidzein, an inactive analogue of genistein, elicited a NIE.
- (2) Genistein but not daidzein inhibited the ET-1-induced PIE and increase in amplitude of CaT in the presence of NE at low concentrations.
- (3) Genistein as well as daidzein antagonized the ET-induced NIE in association with a decrease in amplitude of CaT in the presence of NE at high concentrations, but genistein did not affect the anti-adrenergic effect of carbachol.
- (4) Genistein but not daidzein enhanced the PIE in association with an increase in CaT induced by NE via the activation of  $\beta$ -adrenoceptors, which was abolished by the protein tyrosine phosphatase inhibitor vanadate.

### 2. Effects of Y-27632 and wortmannin on rabbit papillary muscles and ventricular myocytes:

- (1) Y-27632 (3-30  $\mu$ M) inhibited significantly the baseline contractility and the amplitude of CaT, but wortmannin decreased the basal contractile force without affecting the amplitude of CaT.
- (2) Y-27632 suppressed the ET-1-induced increases in contractility and the amplitude of CaT in a concentration-dependent manner, but wortmannin only inhibited the ET-1-induced PIE, with no influence on the ET-1-induced changes in the amplitude of CaT.
- (3) Y-27632 and wortmannin did not affect the effect of ISO elicited by  $\beta$ -adrenoceptor stimulation.

## 考察:

The important findings in the present study are that the PTK inhibitor genistein elicited the action as the PTK inhibitor and non-specification that is unrelated to PTK inhibition. The action as the PTK inhibitor involves 1) an inhibition of the PIE and  $\text{Ca}^{2+}$  signal induced by crosstalk of ET-1 and NE; 2) an enhancement of the PIE and CaT induced by NE via activation of  $\beta$ -adrenoceptors; and 3) a direct facilitatory action on basal contractility and  $\text{Ca}^{2+}$  transients. In addition, genistein inhibited the NIE of ET-1 in the presence of high concentrations of NE, which was mimicked by an inactive analog, daidzein.

In rabbit ventricular myocardium and myocytes, ROK inhibitor Y-27632 decreased the basal force of contraction and  $\text{Ca}^{2+}$  transients, inhibits the ET-1-induced PIE and increase in  $\text{Ca}^{2+}$  transients in a concentration-dependent manner. MLCK inhibitor wortmannin at concentrations of  $\mu$ M decreased the basal force of contraction and inhibited the ET-1 induced PIE and the increase in cell shortening, but did not affect the amplitude of CaT, suggesting that MLCK may be involved in the increase in myofilament  $\text{Ca}^{2+}$  sensitivity. The concentration of wortmannin applied in the current study was sufficient to inhibit MLCK activity, as shown in smooth muscle. Although the potential role of PI3 kinase in the effect of wortmannin could not be completely excluded, the observations that wortmannin up to 0.3  $\mu$ M did not affect the basal force and the ET-1-induced response support the view that wortmannin primarily acted as a specific inhibitor of MLCK in current experimental conditions. Neither Y-27632 nor wortmannin affected the PIE of ISO.

These observations suggest that the activities of PTK ROK and MLCK pathways may play crucial roles in cardiac function by modulation of the basal as well as receptor-mediated control of cardiac contractility and  $\text{Ca}^{2+}$  signaling under physiological and pathophysiological conditions. The activations of PTK, ROK and MLCK play differential roles in the ET- and  $\beta$ -adrenoceptor-mediated positive inotropic and increase in  $\text{Ca}^{2+}$

transients in dog and rabbit ventricular myocardium.

参考文献：

1. Yanagisawa, M., Kusumoto, H., Kimura, S., Tomobe, Y., Kobayashi, M., Mitsui, Y., Yazaki, Y., Goto, K., Masaki, T., 1988. A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature* 332, 411-415.
2. Endoh, M., Fujita, S., Yang, H.T., Talukder, M.A., Maruya, J., Norota, I., 1998. Endothelin: receptor subtypes, signal transduction, regulation of  $Ca^{2+}$  transients and contractility in rabbit ventricular myocardium. *Life Sci.* 62, 1485-1489.
3. Chu, L., Takahashi, R., Norota, I., Miyamoto, T., Takeishi, Y., Ishii, K., Kubota, I., Endoh, M., 2003. Signal transduction and  $Ca^{2+}$  signaling in contractile regulation induced by crosstalk between endothelin-1 and norepinephrine in dog ventricular myocardium. *Circ. Res.* 92, 1024-1032.

注：研究発表

一、英文誌に発表：

1. Chu L, Zhang JX, Norota I, Endoh M: Differential action of a protein tyrosine kinase inhibitor, genistein, on the positive inotropic effect of endothelin-1 and norepinephrine in canine ventricular myocardium. *Br J Pharmacol.* 2005;144:430-42.
2. Chu L, Endoh M: Wortmannin inhibits the myofilament  $Ca^{2+}$  sensitization induced by endothelin-1. *Eur J Pharmacol.* 2005;507:135-43.
3. Chu L, Norota I, Yomogida S, Ishii K, Endoh M: Differential inotropic effects of endothelin-1, angiotensin II, and phenylephrine induced by crosstalk with cAMP-mediated signaling process in dog ventricular myocardium. *J Pharmacol Sci.* 2004;96:199-207.
4. Chu L, Endoh M: Inhibition by the Rho kinase inhibitor Y-27632 of the increases in contractility and  $Ca^{2+}$  transients induced by endothelin-1 in rabbit ventricular myocytes. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 2005 (in press)
5. Chu L, Norota I, Endoh M: Endothelin receptors mediated inotropic effects induced by crosstalk with norepinephrine in canine ventricular myocardium. *J Pharmacol Sci.* 2005 (in press)

二、学会に発表：

1. Selective inhibition by wortmannin of myofilament  $Ca^{2+}$  sensitization induced by endothelin-1 in rabbit ventricular myocardium. 第22回国際心臓研究学会日本部会, 2004年11月24日, 日本山梨
2. The Rho kinase inhibitor Y-27632 antagonizes the positive inotropic effect and increase in  $Ca^{2+}$  transients induced by endothelin-1 in rabbit ventricular myocardium. 第2回日中薬理学会 2004年9月19日, 日本静岡
3. ウサギ心室筋細胞における ET-1 による  $Ca$  感受性増強機構とミオシン軽鎖キナーゼ 第55回日本薬理学会北部会 2004年9月24日, 日本北海道
4. イヌ心室筋における ET-1 と NE の crosstalk による変力作用に關与する ET 受容体サブタイプの同定 第55回日本薬理学会北部会 2004年9月24日, 日本北海道

財団法人日中医学協会

2004年度共同研究等助成金—中国人研究者・技術者招聘—報告書

平成 17 年 3 月 14 日

財団法人 日中医学協会 御中

貴財団より助成金を受領して行った中国人研究者・技術者招聘について報告いたします。

添付資料： 研究報告書

受給者氏名： 片山 容一 

所属機関名： 日本大学医学部

所属部署： 脳神経外科 職名： 教授

所在地： 〒東京市板橋区大谷口上町30-1

電話： 03-3972-8111 内線： 2461

1. 助成金額： 900,000 円

2. 研究テーマ

パーキンソン病に対する深部脳刺激療法に関する臨床研究

3. 成果の概要 (100字程度)

パーキンソン病や頭痛などに対する深部脳刺激療法に関する機能的神経外科の臨床研修(外科手術、術前術後管理など)を行った。基本的手技を習得し、さらに脳機能イメージングに関する論文を共著にて作成した。

4. 被招聘者

氏名： 馮 璞 職名： 総副主任

所属機関： 清華大学附属玉泉病院 部署： 内科

5. 滞在日程概要 (日付、主な活動・工程等)

2004年6月21日—2004年9月16日

研修スケジュール

①DBSの手術(毎週月曜日、水曜日、金曜日)、

②外来診察(毎週火曜日、金曜日)

③抄読会(毎週木曜日)

④研究室カンファレンス(毎週木曜日)

・その他、神経内科、ペインクリニックにて研修。

・2004年9月13日中国神経内科医訪日団に対する講演

## fMRI と fNIRS を用いたブレインマッピング

研究者氏名	馮 璞
中国所属機関	精華大学付属玉泉病院内科総副主任
共同研究者	酒谷 薫、星野達哉、藤原徳生、村田 佳宏、深谷 親、山本隆充、片山容一
共同研究者所属	日本大学医学部脳神経外科

### Abstract

BOLD contrast functional MRI (BOLD-fMRI) has been employed to brain mapping in the patients with brain disorders; however, it is not known whether the normal brain and pathological brain exhibit similar evoked-cerebral blood oxygenation (CBO) changes. We compared the BOLD imaging and the evoked-CBO changes measured by functional near infrared spectroscopy (fNIRS) in the motor cortex of the patients with cerebral ischemia and brain tumors. BOLD-fMRI demonstrated clear activation areas in the motor cortex on the non-lesion side of all patients; fNIRS showed a decrease of deoxyhemoglobin associated with increases of oxyhemoglobin and total hemoglobin. However, BOLD-fMRI revealed only a small activation area or no activation on the lesion side in some patients. Intraoperative brain mapping in glioma patients identified the motor cortex on the lesion side which was not demonstrated by BOLD-fMRI. The results indicate that BOLD-fMRI may overlook the activation area in the pathological brain due to the atypical evoked-CBO changes (i.e. an increase in deoxyhemoglobin).

**Key words:** BOLD, NIRS, cerebral blood oxygenation

### 【はじめに】

BOLD コントラスト functional MRI (BOLD-fMRI) は、神経活動時の血管内の脱酸素化ヘモグロビン (Hb) 濃度の変化 (低下) を検出することにより活動部位をイメージングしている [1]。この賦活脳循環代謝変化は正常成人の神経活動部位で認められるものであるが [2]、脳疾患例も同様の变化を示すとの前提に立ち、脳腫瘍の術前ブレインマッピングや脳卒中後の神経機能再生の研究等に幅広く応用されるようになった。しかしながら、脳卒中患者の賦活脳酸素代謝は正常成人と異なるとの報告もあり [3]、脳疾患例における賦活脳循環代謝変化には不明な点が少なくない。

BOLD-fMRI は空間分解能に優れるが、詳細な賦活脳酸素代謝は判定できない。一方、functional NIRS (機能的近赤外分光法) は空間分解能が低い、脱酸素化 Hb 以外に酸素化 Hb と総 Hb の濃度変化などより詳細な賦活脳酸素代謝の情報が得られる利点がある [3]。我々は fMRI と fNIRS を併用し、両者の欠点を補完しながらブレインマッピングを行ってきた [4, 5]。本研究では、脳虚血例や脳腫瘍例における運動野の BOLD イメージングと fMRI で計測した賦活脳酸素代謝の関係を検討した。

### 【対象・方法】

対象は正常成人 10 例、運動麻痺を認めない脳虚血 10 例と脳腫瘍 15 症例 (Glioma 10 例、meningioma 5 例) である。脳腫瘍例では、運動野近傍に glioma や meningioma が存在していたが、計測時には明らかな麻痺を認めていない。脳虚血例では、発作後 5 ヶ月から 12 ヶ月後に計測しており、SPECT で病側運動野の安静時脳血流および血管予備能の低下を認めた。

運動野賦活時の BOLD イメージは、1.5T MRI (Symphony, シーメンス社製) を用いてエコープランナー法により撮像し、SPM (Statistical Parametric Mapping) により Activation map を作成した。fNIRS には、2 チャンネル NIRS (NIRO-300、浜松ホトニクス社製) もしくは多チャンネル NIRS (OMM2000、島津製作所社製) を使用し、運動野における賦活酸素代謝変化を計測した。運動タスクには離握手を用いた。

## [結果]

正常成人の BOLD-fMRI では、運動負荷時に対側運動野に活動領域が明瞭にイメージングされた(図 1 A)。fNIRS では、賦活時に運動野の酸素化 Hb、総 Hb の上昇、脱酸素化 Hb の低下を認めた(図 1 B)。

脳虚血例の健常側運動野は、BOLD-fMRI により明瞭に活動領域がイメージングされた。一方、病側運動野では、4 例において健常側と同様にイメージングされたが、6 例ではイメージング領域は健常側より著しく小さいか、あるいは全くイメージングされなかった(図 1 C)。これらの症例の fNIRS では、賦活時に酸素化 Hb、総 Hb の上昇に伴って脱酸素化 Hb は変化しないか、あるいは上昇した(図 1 D)。

脳腫瘍例においても、全例の健常側運動野は BOLD-fMRI により明瞭に活動領域がイメージングされた。病側運動野では、8 例において健常側と同様にイメージングされたが、7 例(Glioma 4 例、Meningioma 3 例)では病側運動野のイメージング領域は健常側より著しく小さいか、あるいは全くイメージングされなかった(図 2 A)。このような Glioma 例の術中皮質マッピングでは、運動野は正常機能を示していた(図 2 B)。また fNIRS では、賦活時に酸素化 Hb、総 Hb の上昇に伴って脱酸素化 Hb は変化しないか、あるいは上昇した(図 2 C)。

## [考察]

脳波や脳磁図などは、神経活動による電気的信号(1次信号)を測定しているが、BOLD-fMRI や fNIRS は神経活動に伴った血流変化や脳酸素代謝変化、すなわち神経活動の2次信号を測定している。Fox らは PET を用いて2次信号発生メカニズムを検討し、神経活動時には局所脳血流が50%程度上昇するが、酸素消費率は5%程度の上昇に留まることを明らかにした[2]。これは脳が必要とする以上の酸素が神経活動部位に送り込まれる Luxury perfusion の状態にあることを意味しており、このため静脈側の血管内では酸素化 Hb が増加し、脱酸素化 Hb は washout されて低下する。

このような神経活動部位の Luxury perfusion は、BOLD-fMRI による機能イメージングの生理学的基礎になっている。脱酸素化 Hb は常磁性体であり、神経活動時に低下すると BOLD 信号が上昇するが、BOLD-fMRI はこの変化を計測することにより神経活動部位をイメージングしているのである[1]。一方、fNIRS は神経活動部位の脱酸素化 Hb の変化だけでなく、酸素化 Hb および両者の和である総 Hb (血液量を示す) の変化も計測することができる[3]。このように fNIRS は BOLD-fMRI と比較して神経活動部位の酸素代謝や血行動態をより詳細に検討することができる。

本研究では、脳虚血や脳腫瘍例における BOLD-fMRI のイメージングと fNIRS による賦活酸素代謝変化を比較した。その結果によると、これらの病的脳では健常側の運動野は正常例と同様に活動領域がイメージングされるが、病側運動野ではイメージング領域が実際の神経活動領域より小さくなる false-negative activation を示す症例が存在することが示された。さらに fNIRS により、このような症例の病側運動野の賦活脳酸素代謝は正常例と異なり脱酸素化 Hb が低下せず、変化しないか上昇することが明らかとなった。

脳疾患例における神経活動時の脱酸素化 Hb 上昇のメカニズムは明らかではないが、神経活動時の酸素供給の不足もしくは酸素消費の上昇が考えられる[3-5]。いずれのメカニズムにしろ、BOLD-fMRI では脱酸素化 Hb が低下しない活動部位をイメージングすることは困難であるが、fNIRS では酸素化 Hb や総 Hb の変化から神経活動を捉えることが可能である。神経活動時に非定型的脳酸素代謝を示す可能性のある脳疾患例のブレインマッピングには、fMRI と fNIRS の併用が有用と思われる。

## 文献

- 1) Fox PT, et al. Nonoxidative glucose consumption during focal physiologic neural activity. *Science* 241: 462-464, 1988.
- 2) Ogawa S, et al. Brain magnetic resonance imaging with contrast dependent on blood oxygenation. *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 9868-9872, 1990
- 3) Sakatani K, et al. Language-activated cerebral blood oxygenation and hemodynamic changes of the left prefrontal cortex in poststroke aphasic patients. A near infrared spectroscopy study. *Stroke* 29: 1299-1304, 1998
- 4) Murata Y, et al. Increase in focal concentration of deoxyhemoglobin during neuronal activity in cerebral ischemic patients. *J Neurol, Neurosurg, Psychiatry* 73:182-184, 2002
- 5) Fujiwara N, et al. Evoked cerebral blood oxygenation changes in false-negative activations in BOLD contrast functional MRI of patients with brain tumors. *NeuroImage* 21: 1464-1471, 2004

## 図説明

Fig. 1

A: BOLD imaging of motor function in the normal adult (right motor task). B: Evoked-CBO changes in the activated motor cortex measured by fNIRS in the normal adult. The ordinate indicates concentration changes of Deoxy-Hb, Oxy-Hb and Total-Hb. Horizontal thick bar indicates the period of the motor task. Deoxy-Hb decreased associated with increases of Oxy-Hb and Total-Hb. C: BOLD imaging of motor function in the patient with cerebral ischemia. The asterisk indicates a lesion of infarction. Note that BOLD-fMRI demonstrated only small activation area. D: Evoked-CBO changes in the activated motor cortex measured by fNIRS in the patient with cerebral ischemia. Note that Deoxy-Hb increased associated with increases of Oxy-Hb and Total-Hb during activation.

Fig. 2

A: BOLD imaging of motor function in the patient with glioma. The asterisk indicates the tumor. BOLD-fMRI demonstrated no activation area during motor task. B: Operative view of the cortical mapping of the glioma patient. The motor cortex on the lesion side was functioning (surrounded by the white line). C: Evoked-CBO changes in the activated motor cortex measured by fNIRS in the glioma patient. The ordinate indicates concentration changes of Deoxy-Hb, Oxy-Hb and Total-Hb. Horizontal thick bar indicates the period of the motor task. Deoxy-Hb increased associated with increases of Oxy-Hb and Total-Hb during activation.

Fig. 1

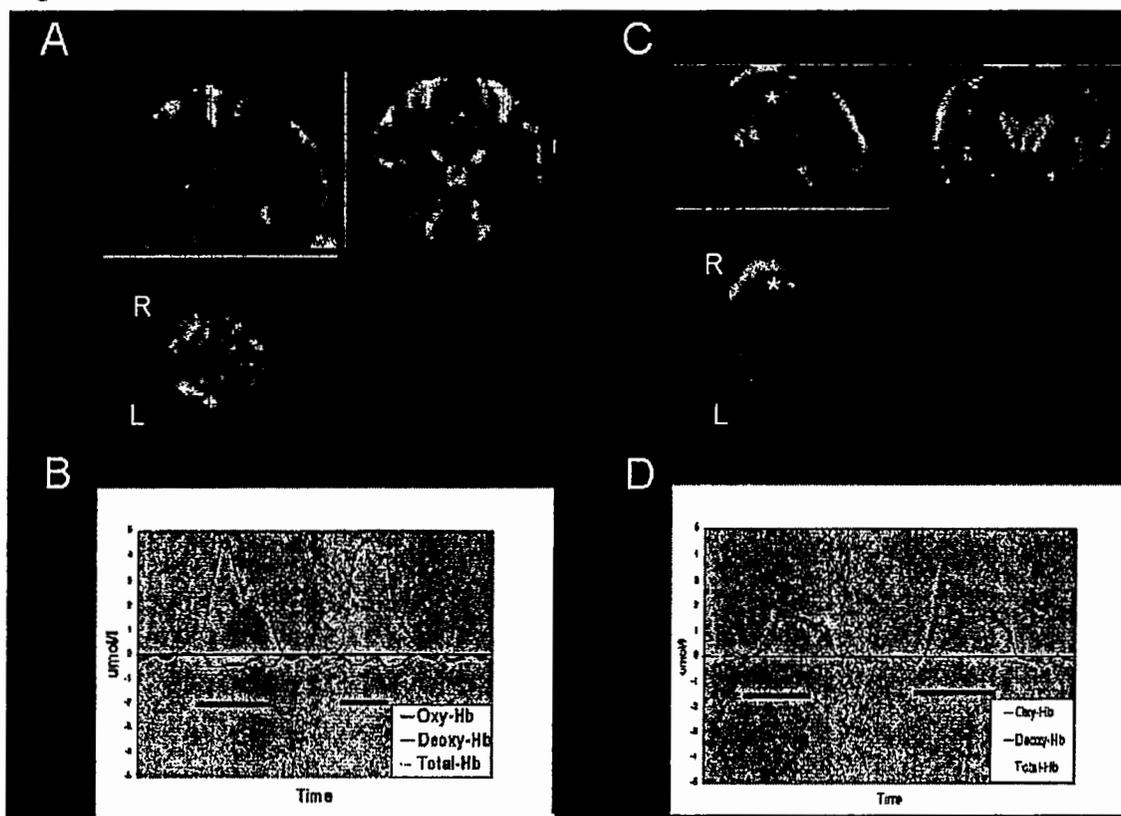
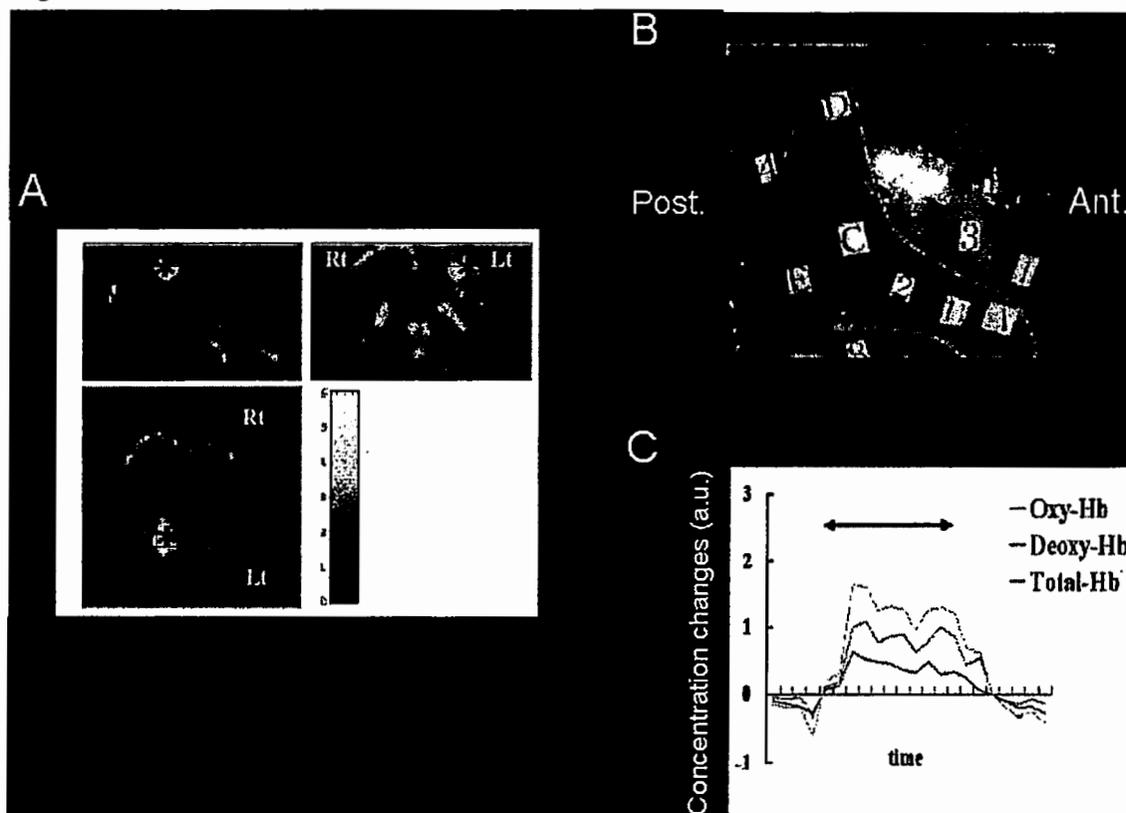


Fig. 2



# 財団法人日中医学協会

## 2004年度共同研究等助成金－日本人研究者派遣－報告書

2004年 9月 5日

財団法人 日中医学協会 御中

貴財団より助成金を受領して行った訪中交流について報告いたします。

添付資料： 訪中報告書

受給者氏名： 竹内登美子



所属機関名： 岐阜大学

所属部署： 医学部 職名： 教授

〒501-1193

所在地： 岐阜市柳戸1-1

電話： 058-293-3244 直通 内線： 3244

1. 助成金額： 20 万 円

2. テーマ

Evidence Based Nursingに基づいた呼吸理学療法

3. 成果の概要（100字程度）

北京首都医科大学附属朝陽病院と北京呼吸器疾病研究所主催の、第3回全国「気道管理および人口呼吸器装着患者のケア学習会」にける招聘講演を行った。100名を超える参加者との質疑応答や、北京首都

医科大学附属朝陽病院の看護師・理学療法士らとの意見交換会等を通して、お互いの国の看護事情や専門的知識等を深めることができた。

4. 招聘機関

機関名： 北京首都医科大学附属朝陽病院 代表者名： 王辰 職名： 院長

所在地： 北京市朝日区白家庄路8号

5. 滞在日程概要（日付、主な旅程・行事等）

8月23日 北京到着

8月24日 同時通訳者との打合せ、プレゼンテーション資料作成（中国語版）

8月25日 講演 病院見学 病院看護部との意見交換会・懇親会

8月26日 万里の長城 北京市内の見学

8月27日 北京出国

## Evidence Based Nursing に基づいた呼吸理学療法

招聘講演者氏名 竹内 登美子

所属 岐阜大学医学部看護学科

### 要旨

肺理学療法から呼吸理学療法という用語が使われるようになった経緯と、用語の定義について説明し、新しい呼吸理学療法としての「体位呼吸療法」を紹介した。また、根拠に基づいた看護 (EBN) とは何か、EBN を看護実践に活用するための方法について紹介した。

Key Words ICU、呼吸理学療法、EBN

### 緒言：

本内容は、北京首都医科大学附属朝陽病院と北京呼吸器疾病研究所主催の、第3回全国「気道管理および人口呼吸器装着患者のケア学習会」における招聘講演の概要である。

### 対象：

中国全土から集まった中国人ナース約 100 名

### 開催場所：

北京市京東ホテル

### 講演概要：

#### 1. 学習目標

- ① 新しい呼吸理学療法の概念について理解する
- ② 根拠に基づいた看護 (EBN) を実践する意義を理解する
- ③ 根拠に基づいた排痰法 (咳・体位変換等) を理解する
- ④ 呼吸理学療法の基礎を理解する (ビデオ映像)

#### 2. ICUにおける呼吸理学療法とは

「意識低下があっても、人工呼吸器を装着していても、日常的で自然な肺と身体の動きを持続させ、肺胞換気を良好な状態に維持すること」

肺理学療法→胸部理学療法→呼吸理学療法 RPT : Respiratory Physical Therapy

1996年 呼吸療法認定士制度の確立

#### 3. ICU (急性疾患・術後患者) における呼吸理学療法の特徴

- ① 支援的な治療法
- ② 患者の忍耐や努力を強要しない
- ③ 全ての患者が対象

#### 4. 根拠に基づいた看護 (EBN) とは

- EBN : Evidence Based Nursing  
「最善の根拠を患者の価値観・意向、臨床経験等と統合する事」  
医学・科学文献の批判的検証評価法を発展させたもの
  
- EBN 実践時の 4 要素
  - ①利用可能な最善の科学的根拠 (研究結果)
  - ②患者の価値観や意向
  - ③臨床家の専門的な技術や知識
  - ④コストや人的資源など

#### 5. EBN の実践法

- ①看護上の疑問を明確にする  
「誰に、何をしたら、何と比べて、どうなのか」
- ②最善の根拠を文献から探す
- ③根拠 (研究結果) の妥当性と有用性について吟味する
- ④吟味した結果を EBN 実践時の 4 要素に基づいて看護実践に適応する
- ⑤実践結果を評価する

#### 6. EBN のレベル

AHCPR : Agency for Health Care Policy and Research

米国保健政策局によるエビデンスレベル (1989 年, 1996 年)

- I a : 複数のランダム化比較試験のメタ分析による
- I b : 少なくとも 1 つのランダム化比較試験による
- II a : 少なくとも 1 つのよくデザインされた非ランダム化比較試験による
- II b : 少なくとも 1 つの他のタイプのよくデザインされた準実験的研究による
- III : 比較研究や相関研究, 症例対照研究など, よくデザインされた非実験的記述的研究による
- IV : 専門委員会の報告や意見, あるいは権威者の臨床試験による

#### 7. 文献検討の例 (例 1 の表 参照)

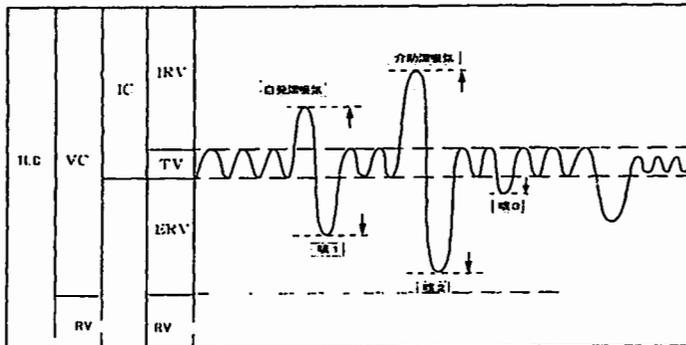
#### 8. 根拠に基づいた排痰法 (咳・体位呼吸療法の図 参照)

**【例1】呼吸理学療法を実施した群と実施しなかった群との比較研究**

筆者	EBN	目的	研究方法	測定項目	結果
Fagevik (1997)	I a	腹部手術を受ける患者の呼吸理学療法の効果を評価	・術前呼吸訓練と早期離床の指導 ・術後1時間毎の咳と深呼吸	SaO <sub>2</sub> 体温 肺音 胸部X-ray	実施群の合併症発生率が有意に減少
Chumillas (1998)	II a	同上	・術前呼吸訓練 15分/日 ・術後呼吸訓練 4回/日 ・体位ドレナージ	SaO <sub>2</sub> 術後スパイロメトリー 胸部X-ray	同上

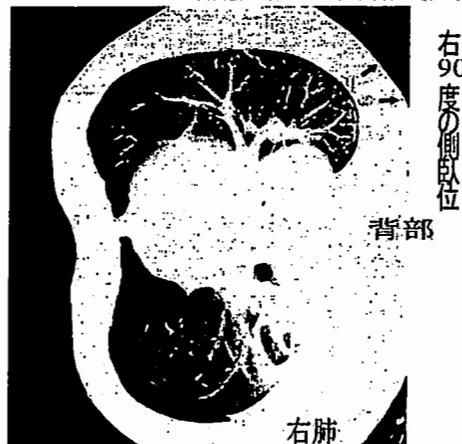
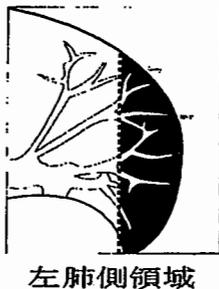
**参考：排痰法（咳）の呼気流速**

\* 気道の分泌物移動を促進することができる呼気流速は、時速40km～90km 丸川征四郎著「ICUにおける新しい肺理学療法」から引用



**【例2】下側肺障害のある患者を腹臥位にする呼吸管理法は有効か？**

丸川征四郎著「ICUにおける新しい肺理学療法」から引用



## 9. 研修会日程表

### 第3回全国「気道管理および人工呼吸器装着中患者のケア学習会」講義予定表

日付	時刻	講義内容	講義者
1日目	9:00-11:30	呼吸器ICUの運営と管理	王 辰 (院長)
	13:00-16:30	慢性呼吸不全の治療原則	張洪玉 (医長)
2日目	8:30-11:30	人工呼吸器の設定	王 辰 (院長)
	13:00-16:30	気道確保法及び管理	李春燕 (看護部長)
3日目	8:30-11:30	ICU病棟における感染予防	鈴
	13:30-16:00	ICUで用いる呼吸理学療法とEBN	竹内 (教授)
	16:00-16:40	蘇生バックの使い方	夏
4日目	8:30-10:00	非侵襲的換気療法	詹庆元
	10:10-11:30	人工呼吸器装着中患者のケア	李
	13:30-15:00	非人工気道の吸引法	崔
	15:10-16:30	ネプライザー方法	崔
5日目	8:30-10:00	動脈採血の技術及び血液ガス分析	劉
	10:10-11:40	人工呼吸器の準備、点検	夏

#### 主な参考文献

- 1) 丸川征四朗著:ICUにおける新しい肺理学療法 メディカ出版 2001
- 2) 福井次矢編集:EBNと臨床研究 中山書店 2003

作成日:2004年9月5日

財団法人日中医学協会  
2004年度共同研究等助成金－在留中国人研究者－報告書

2005 年 3 月 25 日

財団法人 日中医学協会 御中

貴財団より助成金を受領して行った研究テーマについて報告いたします。

添付資料： 研究報告書

廬 山



中国人研究者名： \_\_\_\_\_  
尾崎 由基男 職名： 教授  
指導責任者名： \_\_\_\_\_  
所属機関名 山梨大学医学工学総合研究部臨床検査医学  
〒 409-3898  
所在地： 山梨県中巨摩郡玉穂町下河東 1110-  
電話： 055-273-9884 内線： \_\_\_\_\_

1. 助成金額： 600,000 円

2. 研究テーマ 血小板上コラーゲン受容体を介する活性化経路

3. 成果の概要 (100字程度)

血栓形成における血小板活性化のメカニズムの検討を行った。初期反応に von Willebrand 因子の受容体である GPIb とコラーゲン受容体である GPVI が重要であるが、本研究により、この2つの受容体が血小板微小膜領域(GEMs)において会合していることを明らかにすることができた

4. 研究業績

第25回日本血栓止血学会学術集会 (平成15年東京)

(1) 学会における発表

血小板膜上における GPIb 複合体とコラーゲン受容体 GPVI の連関

第26回日本血栓止血学会学術集会 (平成16年奈良)

VWF-GPIb を介した血小板活性化信号伝達はコレステロールに富む細胞膜微小領域 (GEMS) に依存している

第2回日英血小板研究会 (平成16年オックスフォード, 英国)

Interaction of the glycoprotein (GP)Ib complex with the platelet collagen receptor GPVI

(2) 発表した論文

無

有 (雑誌名・題名)

## 血小板上コラーゲン受容体を介する活性化経路

研究者氏名	廬 山
中国所属機関	中日友好病院検査部
日本研究機関	山梨大学医学工学総合研究部臨床検査医学講座
指導責任者	教授 尾崎 由基男
共同研究者名	講師 浅妻 直樹

### 要旨

心筋梗塞や脳梗塞などの動脈硬化性疾患の発症には血小板機能亢進が大きく関与することが明らかになっている。血栓形成における血小板活性化機構が解明されれば動脈硬化の進展を抑制することも可能になることが期待できる。血栓形成の初期反応には、血小板膜糖蛋白 GPIb と血中 von Willebrand 因子 (VWF) との結合と、GPVI と血管内皮下組織であるコラーゲンとの結合、の2つの反応が重要である。この2つの系はこれまで独立して作用すると考えられていた、しかし本研究により、血小板膜上のコレステロールやスフィンゴ脂質に富んだ領域 (GEMs または raft) に GPIb と GPVI の会合が認められた。また大部分の GPVI は GEMs 領域に局在しているのに対して、GPIb は血小板に発現している全 GPIb の約 10% の GPIb が GEMs に分布しているにすぎないが、VWF-GPIb、または GPVI を介した血小板活性化により GEMs に存在する GPIb が活性化時間依存的に増加することが明らかになった。これらの結果より、GPVI と GPIb は血小板膜上の GEMs を通じて共役して血小板活性化反応を引き起こし血栓形成反応を促進させることが示唆された。また、VWF-GPIb を介した血小板活性化により Btk が刺激依存的にチロシンリン酸化され、この Btk のチロシンリン酸化が PI3-Kinase 阻害剤によって抑制されないことを見いだした。GPIb を介した血小板信号伝達においては、Btk が PI3-Kinase に依存していないか、上流に位置している可能性が示唆された。

### Key Words

血小板、VWF、GPIb、GPVI、シグナル伝達、GEMs

### 緒言

血小板は血管損傷部位における止血栓形成において中心的な役割を果たすことは以前から知られているが、近年、血小板機能亢進が心筋梗塞や脳梗塞などの動脈硬化性疾患の発症にも大きく関与することが明らかになってきた。従って血小板活性化のメカニズムを明らかにすることは、動脈硬化の発症機構の解明や、その治療薬の発見にもつながる可能性をも期待でき、現代医学の重要なテーマの1つとして注目されている。

血栓形成の初期反応には、血小板と血中 von Willebrand 因子(VWF)の結合と、血小板と血管内皮下組織であるコラーゲンとの結合が重要である。前者の結合においては血小板膜 (GP) Ib が VWF の受容体として働いており、後者の結合においてはコラーゲン受容体の1つである GPVI が特に重要であることが最近の研究から明らかになっている。GPIb、GPVI はともに血小板受容体であり、VWF-GPIb を介して血管内で血小板凝集が形成されることや、内皮下組織に GPVI が結合して血栓形成が開始されることなどが明らかになってきており、近年、GPIb、または GPVI を介した血小板内信号伝達の解明が盛んになされている。

GPVI は 1999 年にクローニングされたコラーゲン受容体であり、Fc 受容体 $\gamma$ 鎖と恒常的に結合している<sup>1</sup>。コラーゲンと血小板 GPVI の結合により、Src ファミリーチロシンキナーゼ (Fc 受容体 $\gamma$ 鎖の ITAM (immunoreceptor tyrosine-based activation motif) 領域がチロシンリン酸化を引き起こし、細胞内シグナルの活性化に繋がっていく<sup>2</sup>。GPIb は VWF に対する受容体であり、血小板に 25,000 copy 発現しており、GPIX-V とともに複合体を形成している。血中 VWF との結合により血小板活性化が生じ、血小板凝集が形成される。先天的に GPIb が欠損している Bernard-Soulier 症候群では出血傾向がみられることから、GPIb が止血栓に重要であることがわかる。我々のこれまでの

研究から、VWF と GPIb の結合により Fc 受容体鎖がチロシンリン酸化されることがわかり、GPIb と Fc 受容体鎖が刺激依存的に結合してくることが明らかになった<sup>3</sup>。また、VWF-GPIb による血小板活性化により Src ファミリーキナーゼある Src が GPIb に結合してくることも判明した<sup>4</sup>。また、元来 GPIb に結合し血小板活性化を招くと考えられていた蛇毒 alboaggregin A が GPVI にも結合し、血小板活性化を生じていることが明らかになった<sup>5</sup>。これは GPIb と GPVI が近傍で共役する可能性を示唆したものである。このようにこれまで独立して血栓形成に関与していると考えられている GPVI、あるいは VWF-GPIb を介した細胞内情報伝達が、実は非常にクロストークしている可能性が示唆された。

T 細胞や B 細胞などの免疫細胞においては、Fc 受容体鎖を介した信号伝達系は細胞膜上に存在するスフィンゴ脂質、コレステロールや信号伝達物質に富んだ細胞膜微小領域 (GEMs: glycosphingolipid-enriched microdomains, または raft) に局在することが報告されている<sup>6</sup>。本研究では、我々は血小板膜上で GPIb と GPVI が会合している可能性を検討し、さらにこの GPIb と GPVI の結合が血小板膜上の GEMs でみられるか解明するとともに、VWF-GPIb を介した血小板活性化メカニズムの検討を進めた。

#### 方法：

(1) 薬を内服していない健康健全人よりクエン酸ナトリウム加採血した血液を 100  $\mu$ g 12 分遠心し、多血小板血漿 (platelet rich plasma, PRP) を得、さらに Tyrode Buffer, ACD を用いて洗浄血小板浮遊液を調整した。この洗浄血小板に VWF と、VWF 結合蛇毒蛋白である botrocetin, または GPVI 刺激蛇毒蛋白である convulxin を加えた。Botrocetin が結合した VWF は活性化型 VWF に構造変化し、GPIb に結合し、GPIb を介した血小板活性化が生じる。一定時間反応後、Triton X-100 を加えて可溶化させた。可溶化血小板を抗各種抗体により免疫沈降した。試料を SDS-PAGE で展開し、PVDF 膜に転写後、抗リン酸化チロシン抗体、抗 GPIb 抗体などにより Western blot してチロシンリン酸化の状態や GPIb と GPVI の会合の変化を検討した。

(2) GEMs の調整：無刺激血小板、あるいは VWF-botrocetin による刺激血小板を Triton X-100 で可溶化後、等量の 80% スクロースを加えた (スクロース終濃度は 40%)。この上層に 25% スクロースを重層し、さらにその上層に 0% スクロース液を重層し、これを 200,000g 2.5 時間 4°C の条件で超遠心を行った。GEMs 領域は上層 1/4 程の液層に白い不溶性の層として得ることができる。また非 GEMs として、最下層の液層を GEMs と等量回収した。これらを SDS で可溶化して、SDS-電気泳動により蛋白を分離して目的の抗体を用いて Western blot して蛋白の検出を行った。また GEMs 層と非 GEMs 層を抗体抗 GPVI 抗体を用いて免疫沈降し、抗 GPIb 抗体を用いて GEMs における GPIb と GPVI の会合を検討した。

#### 結果、考察：

(1) 抗 GPVI 抗体を用いた免疫沈降により、無刺激血小板において GPVI と GPIb が複合体を形成していることが認められた。GEMs における各々の受容体の分布は無刺激血小板において GPIb の一部が GEMs 領域に分布しており、VWF-botrocetin 刺激、あるいは convulxin 刺激により GEMs に分布する GPIb が増加した。GPVI はその大部分が GEMs に局在していた。このことは VWF に結合した GPIb が血小板膜上で GEMs に移動し GEMs 領域の GPIb がクラスタリングすることにより血小板活性化することが示唆された。また GPIb と GPVI の会合が GEMs 領域に特異的に見られ、非 GEMs 領域では認められなかった。また GEMs 構造を破壊するコレステロール吸着剤である methyl  $\beta$  cyclodextrin を添加した血小板では GEMs に分布する GPIb や GPVI は認められず、GPIb と GPVI の会合も消失した。これらの結果より、血栓形成において、GPVI と GPIb が血小板膜上の GEMs 領域で会合を増すことにより血小板活性化が生じる可能性が考えられ、GEMs 領域が GPVI と GPIb の共役の場として重要な役割を担っていることが示唆された。活性化血小板において非 GEMs 領域の GPIb が GEMs 領域に移動するメカニズムはまだ解明できていない。Shrimp らは GEMs 領域にある GPIb は palmitoylation されていることを報告しているが<sup>7</sup>、我々は GEMs 領域にある GPIb と非 GEMs 領域にある GPIb が VWF によりクラスタリングされて非 GEMs 領域の GPIb が GEMs 領域に移動する可能性を考えている。今後はこの仮説を検証していく予定である。

(2) VWF-GPIb を介した血小板活性化において血小板活性化蛋白である Btk, Phospholipase C  $\gamma$ -2 (PLC  $\gamma$ -2) の変化を検討した。PLC  $\gamma$ -2 は細胞の活性化によるカルシウム上昇に重要な酵素であり、これまでに VWF-GPIb を介した血小板活性化

により PLC  $\gamma$ -2 のチロシンリン酸化が生じることが確認されている。VWF-GPIb を介した活性化血小板を PLC  $\gamma$ -2 を免疫沈降しチロシンリン酸化を調べたところ、PLC  $\gamma$ -2 とともに 75kDa 付近に PLC  $\gamma$ -2 に共沈するチロシンリン酸化蛋白を認めた。一方、Btk は Tec ファミリーに属するチロシンキナーゼの 1 つであり、PLC  $\gamma$ -2 とともに血小板細胞内カルシウム増加に重要な蛋白である、今回、VWF-GPIb を介した血小板活性化により Btk (Bruton's tyrosine kinase, 78 kDa) がチロシンリン酸化されることを見だし、PLC  $\gamma$ -2 に共沈する 75 kDa のチロシンリン酸化蛋白に Btk が含まれ、Btk も VWF-GPIb を介した血小板活性化に重要である可能性が示唆された。これまで他の細胞系では、Btk は Phosphoinositide 3-kinase (PI3-kinase) の下流で作用し、PI3-K 活性阻害剤により抑制されると報告されている 8。ところが今回の検討では、VWF-GPIb による Btk のチロシンリン酸化は PI3-kinase の酵素活性阻害剤により抑制されなかった。この結果より、血小板においては Btk は既報のように PI3-Kinase の下流ではなく、PI3-Kinase の上流に位置しているか、あるいは Pi3-kinase と独立した活性化経路がある可能性が示唆された。Btk と PI3-kinase の相互作用については今後、Btk、あるいは PI3-kinase 欠損マウス血小板を用いた実験をおこなう。また、Tec ファミリーの Btk 以外のチロシンキナーゼの関与についても検討を加える。

#### 引用文献：

1. Clemetson JM, Polgar J, Magnenat E, Wells TNC, Clemetson KJ. *J Biol. Chem.* 274: 29019-29024, 1999
2. Asazuma N, Wilde JL, Berlanga O, et al. *J. Biol. Chem.* 275: 33427 - 33434, 2000
3. Wu Y, Inoue K, Satoh K, Asazuma N, Yatomi Y, Berndt MC, Ozaki Y. *Blood* 97: 3836-3845, 2001
4. Wu Y, Asazuma N, Satoh K, Yatomi Y, Takafuta T, Berndt MC, Ozaki Y. *Blood* 101: 3469-3476, 2003
5. Asazuma N, Marshall S, Berlanga O, Snell D, Poole A, Berndt MC, Watson SP. *Blood* 97: 3989-3991, 2001
6. Wonerow P, Obergfell A, Wilde J, Bobe R, Asazuma N, et al. *Biochem J.* 364: 755-765, 2002
7. Shrimpton C, Borthakur G, Larucea S, Cruz MA, Dong JF, Lopez JA. *J Exp Med* 196: 1057-1066, 2002
8. Suzuki H, Matsuda S, Terauchi Y, Fujiwara M, Ohteki T, Asano T, Behrens TW, Kouro T, Takatsu K, Kadowaki T, Koyasu S. *Nature Immun.* 4: 280-286, 2003

#### 学会発表

第 25 回日本血栓止血学会学術集会 (平成 15 年東京)

血小板膜上における GPIb 複合体とコラーゲン受容体 GPVI の連関

浅妻 直樹, 林 香春, 佐藤 金夫, 廬山, 井上 克枝, 高蓋 寿朗, 諸井 将明, 半田 誠, 尾崎 由基男

第 26 回日本血栓止血学会学術集会 (平成 16 年奈良)

VWF-GPIb を介した血小板活性化信号伝達はコレステロールに富む細胞膜微小領域 (GEMS) に依存している

浅妻 直樹, 廬山, 佐藤 金夫, 井上 克枝, 半田 誠, 尾崎 由基男

第 2 回日英血小板研究会 (平成 16 年オックスフォード, 英国)

Interaction of the glycoprotein (GP)Ib complex with the platelet collagen receptor GPVI

Asazuma N, Suzuki-Inoue K, Lu S, Satoh K, Handa M, Moroi M, Berndt MC, Ozaki Y.

財団法人日中医学協会  
2004年度共同研究等助成金－在留中国人研究者－報告書

2004 年 11 月 2 日

財団法人 日中医学協会 御中

貴財団より助成金を受領して行った研究テーマについて報告いたします。

添付資料： 研究報告書

中国人研究者名： 王 曉宏   
指導責任者名： 柿木 隆介 職名： 教授  
所属機関名： 生理学研究所統合生理研究系  
〒444-8585  
所在地： 岡崎市明大寺町字西郷中 38 番地  
電話： 0564-55-7814 内線： \_\_\_\_\_

1. 助成金額： 300,000 円

2. 研究テーマ

痛覚刺激に対する脳反応の睡眠中の変化

3. 成果の概要 (100字程度)

表皮内電気刺激法を使って、痛覚関連体性感覚誘発脳磁場に対する睡眠の影響について検討した。痛覚刺激により誘発された SI、SII、島、帯状回と MT の脳活動は、睡眠時に小さくなったから、これらの活動は痛覚認知に関連することと考えられる。

4. 研究業績

(1) 学会における発表 無 ・  (学会名・演題)

The 8<sup>th</sup> International evoked potentials symposium・Cortical responses to noxious stimuli during sleep.

(2) 発表した論文 無 ・  (雑誌名・題名)

Neuroscience 2004;128:177-86. ・ Cortical responses to noxious stimuli during sleep.

## 痛覚刺激に対する脳反応の睡眠中の変化

研究者氏名	王 曉宏
中国所属機関	中国医科大学神経内科
日本研究機関	生理学研究所統合生理研究系
指導責任者	柿木 隆介
共同研究者名	乾 幸二, 秋 雲海

### Abstract

We used magnetoencephalography (MEG) to study effects of sleep on cortical responses to noxious stimuli and to clarify the mechanisms underlying pain perception. For a noxious stimulus, painful intra-epidermal electrical stimulation (ES), which selectively activates A-delta fibers, was applied to the dorsum of the left hand. While awake, subjects were asked to count the number of stimuli silently (Attention) or ignore the stimuli (Control). During sleep, magnetic fields recorded in stage 1 sleep and stage 2 sleep were analyzed. One main component at a latency around 140-160 ms was identified in the awake condition. Multiple source analysis indicated that this main component was generated by activities in the contralateral primary somatosensory cortex (SI), bilateral secondary somatosensory cortex (SII) and insular cortex. The medial temporal area (MT) and cingulate cortex were activated later than the main component. Cortical responses in the contralateral SI, ipsilateral SII and MT, bilateral insula and cingulate cortex were significantly enhanced in Attention as compared with Control. The main component 1M as well as later magnetic fields were markedly attenuated during sleep, suggesting that all these cortical areas are involved in pain cognition.

**Keywords:** Attention, Magnetoencephalography (MEG), Pain, Sleep, Somatosensory

### Introduction

Mechanisms underlying pain perception have been examined in many studies but are still not well understood. Since cerebral responses to noxious stimuli are affected by the subject's attentional and arousal levels, several studies have investigated the effects of distraction on pain-related somatosensory evoked potentials (SEPs) [1,2] to clarify the mechanism of pain perception. These studies found a decrease of pain-related SEP amplitude during distraction tasks. Examining the effects of sleep on cerebral responses to noxious stimuli is another useful way of understanding nociceptive processing. However, up to now, only a few studies have attempted to investigate the cortical responses to noxious stimuli during sleep [3, 4, 5]. Beydoun et al. [1] reported that pain-related SEPs were markedly decreased during sleep stages, which was confirmed later by Naka and Kakigi [6] and Wang et al. [7]. In the present study, we recorded magnetic fields following ES to investigate the effects of sleep on cortical responses to noxious stimuli.

## Methods

Ten healthy subjects participated in this study, and informed consent was obtained from all subjects. Intra-epidermal electrical stimulation (ES), a method we recently developed [8, 9], was used in the present study. The intensity ranged 0.1–0.3 mA. The inter-stimulus interval was varied at random between 0.1–0.3 Hz. The stimulus duration was 0.5 ms. First we obtained data in the awake state. Subjects were instructed to mentally count the number of (Attention) or ignore (Control) the stimuli. After the collection of data in the awake state, subjects were left to fall asleep. We analyzed SEFs only during stage 1 sleep and stage 2 sleep in the present study. Each session was made up of an average of 60 trials.

SEFs were measured with a dual 37-channel biomagnetometer (Magnes, BTi, San Diego, CA). The two probes were centered around positions C3 and C4 according to the International 10–20 System. SEF responses were filtered with a 0.1–100 Hz bandpass filter and digitized at a sampling rate of 2083 Hz. The analysis time was 100 ms before and 400 ms after the application of each stimulus. First, the root mean square (RMS) of the evoked magnetic fields was calculated at each sampling point in order to compare the amplitude of the response among the four conditions. Second, since several cortical activities following noxious stimulation overlapped temporally, we used the brain electric source analysis (BESA) software package (NeuroScan, Inc, Mclean, VA) for the analysis of theoretical multiple source generators as described elsewhere [9]. Data were expressed as the mean  $\pm$  standard deviation (SD). A paired t-test was used to compare RMS between the control and each task condition every 0.48 ms. A P value less than 0.05 was considered significant. The source strength of each cortical activity was compared between attention and control using a two-way analysis of variance (ANOVA) (condition and source as the two factors). P values less than 0.05 were considered significant.

## Results

In the recorded magnetic fields, one consistent component was identified in both Attention and Control from each hemisphere. We termed it 1M and 1M (i), recorded from the hemisphere contralateral and ipsilateral to the stimulation, respectively (Fig. 1). As shown in Fig. 1, evoked magnetic fields were enhanced in Attention as compared with Control. No clear activity was identified during sleep. The RMS in Attention was significantly larger than that in Control in both hemispheres at a latency of 130–180 ms (paired t-test,  $P < 0.05$ ). During sleep, the RMS around 110–270 ms in stage 1 and stage 2 sleep was significantly smaller than that in Control (paired t-test,  $p < 0.05$ ).

BESA analysis indicated multiple cortical regions including the SI, SII, insula, MT and cingulate cortex were activated by noxious stimuli (Fig 3). The peak latencies of the contralateral SI, SII, and insular activities were 152, 149 and 145 ms, respectively, in Control (Table 1), which corresponded approximately to the peak latency of 1M (148 ms). The peak latencies of the ipsilateral SII and insular activities were 159 and 155 ms, respectively, which were longer than the respective latency in the contralateral hemisphere by approximately 10 ms, and also corresponded to the peak latency of 1M (i) (157ms). To explain the magnetic fields later than 1M and 1M (i) components, sources in MT or cingulate cortex were necessary. Since evoked magnetic fields during sleep were markedly attenuated, we could not find any source activity in them. Therefore, the source strength of each source activity was compared

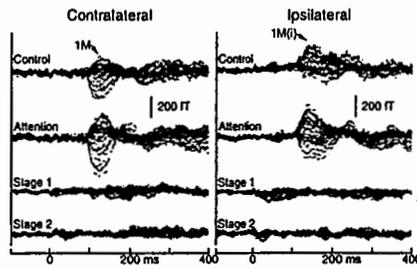


Fig 1. Magnetic fields following noxious epidermal stimulation of the dorsum of the left hand in the awake state, stage 1 sleep and stage 2 sleep in subject 1. (Attention, Stage 1 and Stage 2). The scale for the paired t-test is a common logarithm.  $P < 0.05$  was considered to be significant.

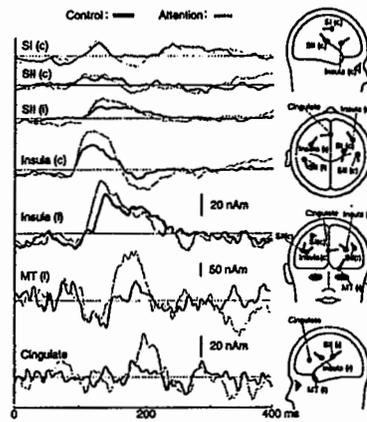


Fig. 2 The group-averaged RMS of all subjects in the four conditions and the paired t-test values at each sampling point between the control and each task condition (Attention, Stage 1 and Stage 2). The scale for the paired t-test is a common logarithm.  $P < 0.05$  was considered to be significant.

	Control	Attention
SI(c) (ms)	151.6±18.2	146.7±13.3
SII(c) (ms)	148.7±17.3	142.0±12.1
SII(i) (ms)	158.6±12.8	156.6±12.8
Insula(c) (ms)	144.9±16.8	138.9±15.3
Insula(i) (ms)	154.9±14.3	152.3±17.3
MT(c) (ms)	186.7±15.4	186.9±13.9
MT(i) (ms)	192.6±15.1	190.2±10.2
Cingulate (ms)	192.7±16.1	198.1±14.2

Table 1. The source latencies and strengths of each component in the awake state. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  compared with Control (Fisher' s PLSD procedure).

between Attention and Control (Table 1). The activities in the contralateral SI, bilateral insula, ipsilateral SII and MT, and cingulate cortex were significantly enhanced in Attention as compared with

Control ( $p < 0.05$ ), whereas the change of the contralateral SII did not reach the significant level ( $p = 0.12$ ) (Table 1).

## Discussion

Multiple cortical regions including the SI, SII, insula, MT and cingulate cortex were activated by noxious stimuli. All these activities were clearly modulated by the subjects' attentional and arousal levels, suggesting that they are involved in nociceptive recognition.

Noxious stimuli applied to the skin activate cutaneous-nociceptors. The signals are conveyed through peripheral nociceptive afferents and the spinothalamic tract to reach the thalamus and then cerebral cortices. During sleep, a subject does not feel any pain after receiving the noxious stimuli, indicating the nociceptive pulses may be blocked at certain points along the neural pathway. Our results showed that all cortical activations were significantly reduced during sleep. Bushnell et al [10] reported that nociceptive neurons in the medial thalamus were modulated by changes in attentional state, suggesting that changes to cortical activities during sleep or attentional tasks are due to changes in thalamic activities. This hypothesis can explain our results that all activities of the SI, SII, insula, cingulate cortex and MT were decreased during sleep at least in part. In conclusion, the main component 1M as well as later magnetic fields were markedly attenuated during sleep, suggesting that all these cortical areas are involved in pain cognition.

## References

- [1] Beydoun A, Morrow TJ, Shen JF, Casey KL. Variability of laser-evoked potentials: attention, arousal and lateralized differences. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 1993;88:173-181.
- [2] Yamasaki H, Kakigi R, Watanabe S, Hoshiyama M. Effects of distraction on pain-related somatosensory evoked magnetic fields and potentials following painful electrical stimulation. *Brain Res Cogn Brain Res* 2000;9:165-175.
- [3] Kakigi R, Naka D, Okusa T, Wang X, et al., Sensory perception during sleep in humans: A magnetoencephalographic study. *Sleep Med* 2003;4:493-507.
- [4] Wang X, Inui K, Qiu Y, Hoshiyama M, Tran TD, Nguyen TB, Kakigi R. Effects of sleep on pain-related somatosensory evoked magnetic fields in humans. *Brain Res Cogn Brain Res*. 2003;17:388-99.
- [5] Wang X, Inui K, Qiu Y, Kakigi R. Cortical responses to noxious stimuli during sleep. *Neuroscience*. 2004;128:177-86.
- [6] Naka D, Kakigi R. Simple and novel method for measuring conduction velocity of A delta fibers in humans. *J Clin Neurophysiol*. 1998;15:150-153.

- [7] Wang X, Inui K, Qiu Y, Hoshiyama M, Tran TD, Kakigi R. Effects of sleep on pain-related somatosensory evoked potentials in humans. *Neurosci Res.* 2003; 45:53-57.
- [8] Inui K, Tran TD, Hoshiyama M, Kakigi R. Preferential stimulation of Adelta fibers by intra-epidermal needle electrode in humans. *Pain.* 2002;96:247-252.
- [9] Inui K, Tran TD, Qiu Y, Wang X, Hoshiyama M, Kakigi R (2003) A comparative magnetoencephalographic study of cortical activations evoked by noxious and innocuous somatosensory stimulations. *Neuroscience.* 2003;120:235-248.
- [10] Bushnell MC, Duncan GH (1989) Sensory and affective aspects of pain perception: is medial thalamus restricted to emotional issues? *Exp Brain Res.* 1989;78:415-418.

注：本研究は、2004年10月6日「The 8<sup>th</sup> International evoked potentials symposium」にて  
ポスター発表、「Neuroscience」(2004年8月VOL128巻)に掲載。

作成日：2004年11月1日

財団法人日中医学協会  
2004年度共同研究等助成金－在留中国人研究者－報告書

2005年 3月 15日

財団法人 日中医学協会 御中

貴財団より助成金を受領して行った研究テーマについて報告いたします。

添付資料： 研究報告書

中国人研究者名： 趙旭  

指導責任者名： 佐々木 克典 職名： 教授

所属機関名： 信州大学医学部組織発生講座

〒  
所在地： 390-8621 長野県松本市旭3丁目1-1

電話： 0263-37-2590 内線： 5162

1. 助成金額： 600,000 円

2. 研究テーマ

胚性幹細胞由来下垂体細胞の分化および細胞生物学的解析

3. 成果の概要 (100字程度)

回転浮遊胚様体において、性腺刺激ホルモン分泌細胞の発生、分化に関連する遺伝子Hesx1、Lhx3、Prop1、GATA2、FSH $\beta$ 、LH $\beta$ のmRNAを発現し、またFSH $\beta$ 、LH $\beta$ の蛋白も発現した。蛍光免疫染色により、FSH $\beta$ のみ陽性、LH $\beta$ のみ陽性及びFSH $\beta$ とLH $\beta$ 二重陽性の細胞が見られた。一方、胚様体を腎臓被膜下に移植すると、4週間後にテラトーマの形成とその内部にFSH $\beta$ とLH $\beta$ 二重陽性の細胞群が認められた。

4. 研究業績

(1) 学会における発表 無 ・  (学会名・演題)

1. 16<sup>th</sup> International Congress of the IFAA, Kyoto, August 2004: Differentiation of mouse embryonic stem cells into gonadotrope-like cells in vitro. X. Zhao, R. F. Teng, K. Asanuma, Y. Okouchi, K. Johkura, N. Ogiwara, K. Sasaki.

2. 第4回日本再生医療学会総会、大阪、2005年3月：胚性幹細胞由来の性腺刺激ホルモン分泌細胞について。趙旭、膝瑞峰、麻沼和彦、大河内康光、城倉浩平、荻原直子、佐々木克典。

(2) 発表した論文 無 ・  (雑誌名・題名)

J Soc Gynecol Investig, (in press): Differentiation of mouse embryonic stem cells into gonadotrope-like cells in vitro. X. Zhao, R. Teng, K. Asanuma, Y. Okouchi, K. Johkura, N. Ogiwara, K. Sasaki.

## 胚性幹細胞由来の性腺刺激ホルモン分泌細胞について

研究者氏名 趙 旭  
中国所属機関 中国医科大学附属第二臨床学院産婦人科  
日本研究機関 信州大学医学部組織発生講座  
指導責任者 教授 佐々木 克典  
共同研究者 滕瑞峰, 麻沼和彦, 大河内康光, 城倉浩平, 荻原直子

### Abstract:

This research was conducted to investigate the potential of mouse embryonic stem (ES) cells to differentiate into gonadotropes. In vitro studies used RT-PCR, Western blotting and immunohistochemistry to analyze gene expression of gonadotrope markers in developing embryoid bodies (EBs) derived from ES cells. *Hesx1*, *Lhx3*, *Prop1*, *GATA2*, follicle stimulating hormone beta (FSH $\beta$ ) and luteinizing hormone beta (LH $\beta$ ) mRNAs were detected at Day 6 and maintained throughout the culture to Day 56. FSH $\beta$  and LH $\beta$  proteins were expressed in EBs from Day 6 onward. Immunofluorescent labeling of FSH $\beta$  and LH $\beta$  showed that specific staining was restricted to the cytoplasm of some differentiated EB cells. With EB development, the number of positive cells increased significantly. They aggregated mainly within EBs and sparsely distributed among the outermost cells surrounding EBs. In vivo studies with implanting Day 6 EBs under the kidney capsule of 5-week-old male BALB/c nude mice exhibited clusters of cells positive for FSH $\beta$  and LH $\beta$  in the graft at 4 weeks post-transplantation. These results indicate that mouse ES cells can give rise to mature gonadotrope-like cells following their differentiation into EBs. It also shows that EBs may serve as an excellent model system to study the development and function of gonadotropes.

### Key words:

Embryonic stem cell, embryoid body, gonadotrope, follicle-stimulating hormone, luteinizing hormone

### Introduction:

The anterior pituitary consists of six specific hormone-producing cell types derived from a common primordium [1, 2]. Gonadotropes, one of the principle groups of cells, synthesize and secrete FSH and LH, both of which act in synergy to regulate reproduction and are structurally related glycoproteins composed of a common  $\alpha$  subunit and a hormone-specific  $\beta$  subunit [3, 4]. Gonadotropin production requires the normal development and function of the pituitary gonadotropes. Many genes are involved in gonadotrope development [5]. Although abnormalities in these genes are known to result in gonadotropin deficiency, the cellular and molecular mechanisms for gonadotropin deficit remains unclear due to the lack of good model systems to study gonadotrope development and differentiation. Establishing a developmental model able to understand these mechanisms is imperative for the correct diagnosis and better treatment of reproductive disorders. ES cells are expected to become a powerful model system due to their capability of self-renewal and totipotency and the ability of EBs derived from ES cells to mimic a developing embryo [6, 7]. In this study, we investigated the potential of ES cells to undergo gonadotrope differentiation.

### Materials and Methods:

#### Cell culture

Undifferentiated mouse ES cells (129/sv strain, Cell and Molecular Technologies, Philipsbrug, NJ, USA) were maintained on mitomycin C-inactivated STO fibroblasts in ES cell media. To induce formation of EBs after dissociation with 0.05% trypsin-EDTA (GIBCO), ES cells were suspended in differentiation media by the hanging drop method (600 cells/30  $\mu$ l-drop). After 5 days (indicated as Day 6), EBs were transferred

to non-treated dishes and cultured with gentle shaking to prevent attachment for another 3-50 days.

#### ***RT-PCR***

Total RNA was extracted from mouse ES cells, EBs, STO cells, pituitaries at embryonic day 12 (E12), and week 6 using RNeasy Mini Kit (QIAGEN, Valencia, CA, USA). The RNA was reverse transcribed into cDNA using SuperScript II first-strand synthesis system with oligo (dT) (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). PCR was performed using Ex Taq DNA polymerase (Takara, Otsu, Shiga, Japan) in a MyCycler™ Thermal Cycler (Bio-Rad, USA).

#### ***Western blotting***

EBs, mouse adult pituitary and liver were lysed on ice in lysis buffer with protease inhibitors. Proteins (10 µg) were separated by 5-15% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis, and then transferred to a nitrocellulose membrane. The membrane was blocked in phosphate-buffered saline (PBS, PH 7.4) containing 3% serum (Funacoshi, Tokyo, Japan) of the same species as secondary antibodies, and then probed with rabbit anti-mouse FSHβ polyclonal immunoglobulin (Ig) (1:3000, Biogenesis, Kingston, NH, USA) or goat anti-rat LHβ polyclonal IgG (1:1000, Santa Cruz Biotechnology, California, USA). Primary antibodies were visualized by the addition of horseradish peroxidase (HRP) goat anti-rabbit IgG (1:1000) or rabbit anti-goat IgG (1:500, Bio-Rad, Hercules, CA, USA) and developed by 3,3' diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB, Wako, Tokyo, Japan).

#### ***Transplantation of EBs under kidney capsule***

20 EBs were harvested from hanging drop cultures after 5 days and then transplanted under the kidney capsule of 5-week-old male BALB/c nude mice (Charles River Japan, Yokohama, Japan). The recipients were examined for donor EB survival and differentiation in vivo using immunofluorescence at 4 weeks post-transplantation. All animal experiments were conducted in accordance with Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (National Institutes of Health, 1996).

#### ***Immunocytochemistry***

##### ***Single immunofluorescent label of gonadotropes***

EBs and control mouse pituitary were routinely fixed in 4% paraformaldehyde and embedded in paraffin. After deparaffinization and rehydration, 5-µm thick sections were microwaved in 10 mM sodium citrate buffer (pH 6.0) for antigen retrieval, blocked with 3% host serum of secondary antibodies in PBS (pH 7.4) to reduce non-specific binding, then incubated with rabbit anti-mouse FSHβ polyclonal Ig (1:2000) or goat anti-rat LHβ polyclonal IgG (1:100). Primary antibodies were detected using Alexa fluor 488 conjugated with goat anti-rabbit IgG or donkey anti-goat IgG (1:200, Molecular Probes, Eugene OR, USA).

##### ***Double label of gonadotropes***

In the colocalization experiment of FSHβ and LHβ, first, paraffin-embedded sections were reacted with goat anti-rat LHβ polyclonal IgG (1:100) and detected using donkey anti-goat IgG conjugated with Alexa fluor 488 (1:200). Then, they were subjected to rabbit anti-mouse FSHβ polyclonal Ig (1: 2000) and visualized by goat anti-rabbit IgG conjugated with Alexa fluor 568 (1:200, Molecular Probes, Eugene OR, USA). Specimens were examined using a confocal laser scanning microscope.

#### **Results:**

EB differentiation was recorded by phase-contrast microscope (Fig1). EBs in A, B, C and D were harvested at Day 6, 9, 12, and 56 respectively. With the prolongation of EB culture, there was an obvious increase in EB size due to cell multiplication, although the degree of multiplication among EBs varied. The period of EBs' expansion continued for 12-14 days after they were collected from hanging drops and the volume of EBs remained unchanged thereafter. The out layer of EB was the visceral endoderm indicated as arrows.

### *RT-PCR analyses*

$\beta$ -Actin was employed as the endogenous control and detected in all the samples. Fetal pituitary was used as the positive control for *Hesx1*, *Lhx3* and *Prop1*, while adult pituitary provided positive control for *GATA2*, *FSH $\beta$* , *LH $\beta$*  and *Pit1*. Undifferentiated ES cells expressed only *Hesx1*, but EBs from Day 6 onward expressed all of these gene transcripts except *Pit1*. No bands were exhibited in STO cells [Fig. 2].

### *Western blot analyses*

Both *FSH $\beta$*  (mass 14919) and *LH $\beta$*  (mass 15028) proteins were detected in western blots of all EB samples and adult pituitary, but not in liver (Fig 3).

### *Immunocytochemical analyses*

Few cells were found to be positive for both *FSH $\beta$*  and *LH $\beta$*  on Days 6, 9, 15, and 21. Only a small number of *FSH $\beta$*  (Fig. 4A) or *LH $\beta$*  (Fig. 4B) positive cells were detected at this stage. Cells labeled for *FSH $\beta$*  only (Fig. 4C) or *LH $\beta$*  only (Fig. 4D) significantly increased in Day 35 and 56 EBs. Cells double-stained for *FSH $\beta$*  and *LH $\beta$*  similarly increased during the same period (Fig. 4E and F). These positive cells were clustered together within the EBs or were sparsely scattered in the outermost cells surrounding them. In control pituitary, positive staining was only observed in those specific cells of the anterior lobe, but not in the posterior (neural) lobe at all (Fig. 4G). Control EBs failed to show specific labeling when primary antibodies were omitted (Fig. 4H). Teratoma formed and exhibited clusters of cells positive for *FSH $\beta$*  and *LH $\beta$*  (Fig. 5) at 4 weeks post-transplantation.

### **Conclusion:**

These results indicate that mouse ES cells can give rise to mature gonadotrope-like cells in EBs. It also shows that EBs may serve as a novel model system to study the development and function of gonadotropes.

### **References:**

- 1 Scully KM, Rosenfeld MG. Pituitary development: regulatory codes in mammalian organogenesis. *Science* 2002; 295: 2231-5.
- 2 Rosenfeld MG, Briata P, Dasen J, et al. Multistep signaling and transcriptional requirements for pituitary organogenesis in vivo. *Recent Prog Horm Res* 2000; 55:1-13.
- 3 Pernasetti F, Vasilyev VV, Rosenberg SB, et al. Cell-specific transcriptional regulation of follicle-stimulating hormone- $\beta$  by activin and gonadotropin-releasing hormone in the L $\beta$ T2 pituitary gonadotrope cell model. *Endocrinology* 2001; 142: 2284-95.
- 4 Childs GV. Cytochemical studies of multifunctional gonadotropes. *Microsc Res Tech* 1997; 39: 114-30.
- 5 Achermann JC, Weiss J, Lee EJ, Jameson JL. Inherited disorders of the gonadotropin hormones. *Mol Cell Endocrinol* 2001; 179: 89-96.
- 6 Keller GM. In vitro differentiation of embryonic stem cells. *Curr Opin Cell Biol* 1995; 7: 862-9.
- 7 Doetschman TC, Eistetter H, Katz M, Schmidt W, Kemler R. The in vitro development of blastocyst-derived embryonic stem cell lines: Formation of visceral yolk sac, blood islands and myocardium. *J Embryol Exp Morphol* 1985; 87: 27-45.

注：本研究は、2002年8月26日『6<sup>th</sup> International Congress of the IFAA』と2003年3月2日『第4回日本再生医療学会総会』にてポスター発表、in vitroの実験に関しては『J Soc Gynecol Investig』誌に掲載予定。

作成日：2003年3月15日

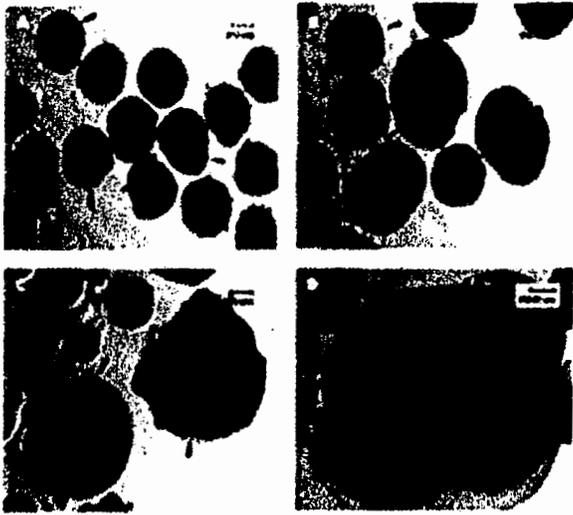


Figure 1

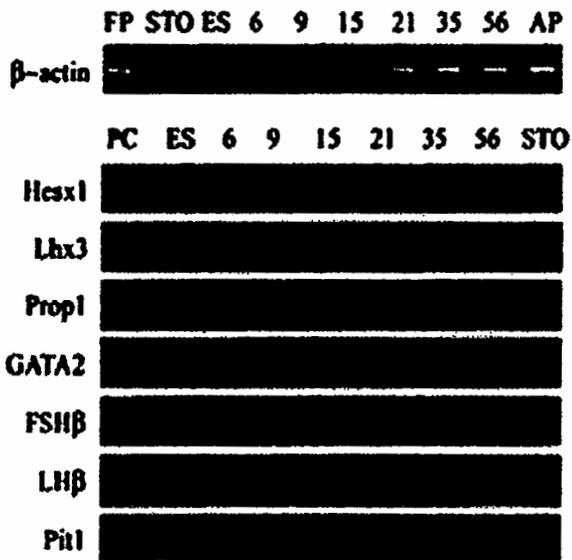


Figure 2

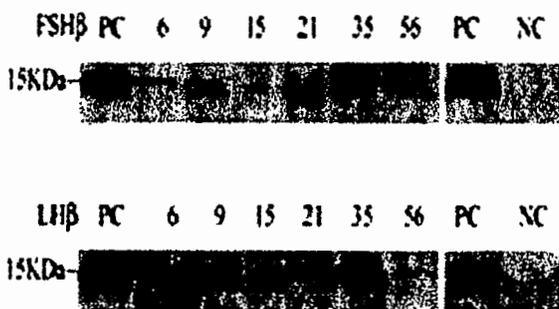


Figure 3

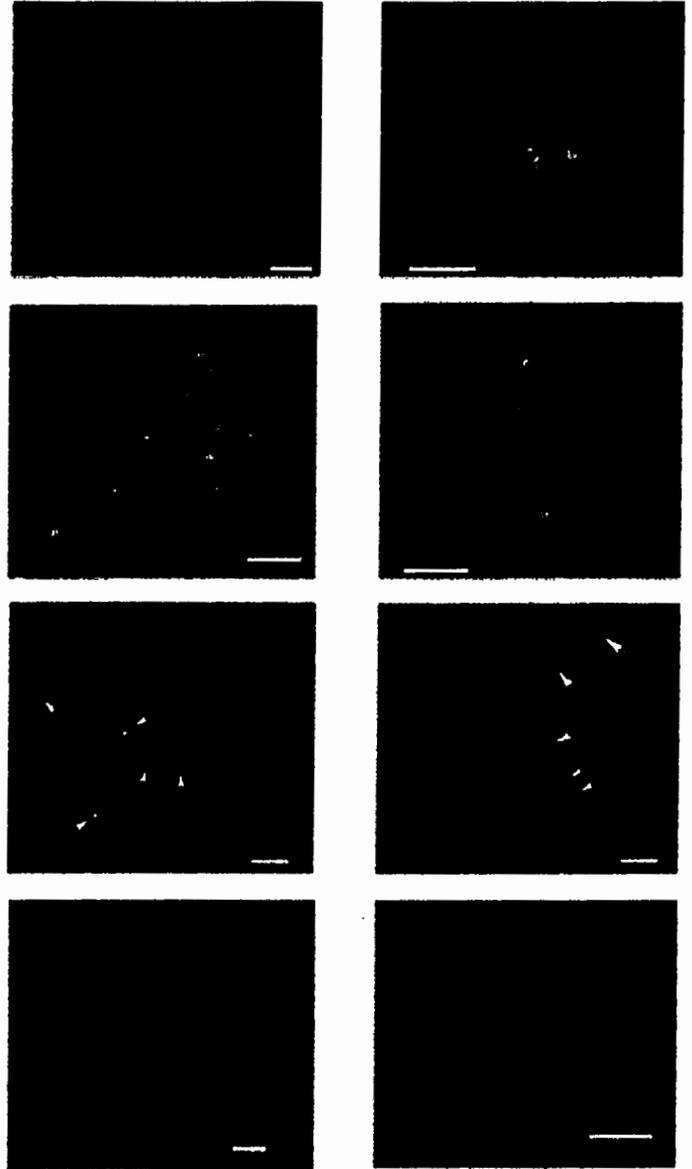


Figure 4



Figure 5

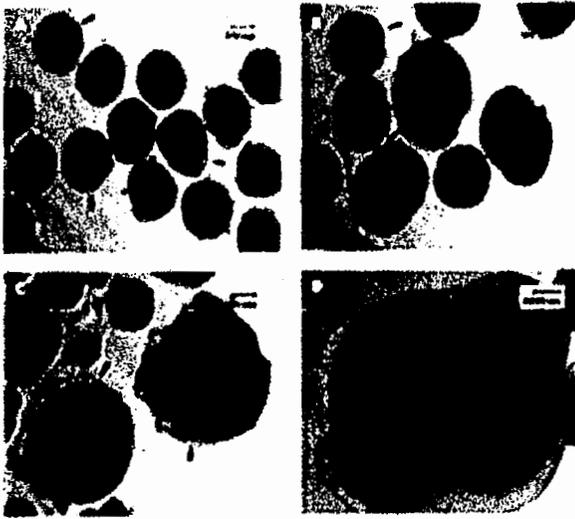


Figure 1

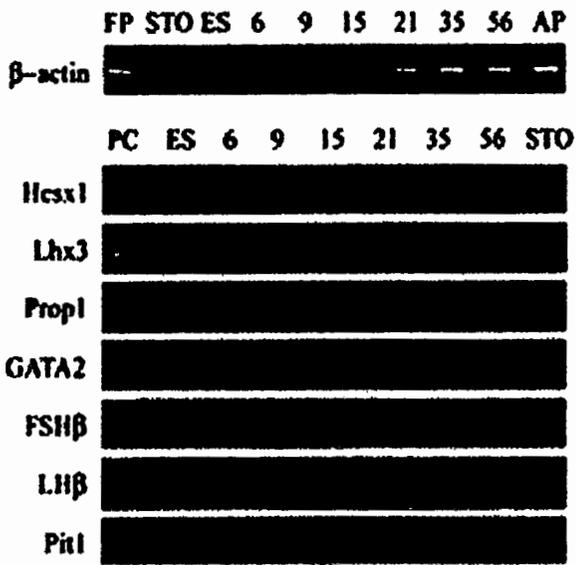


Figure 2

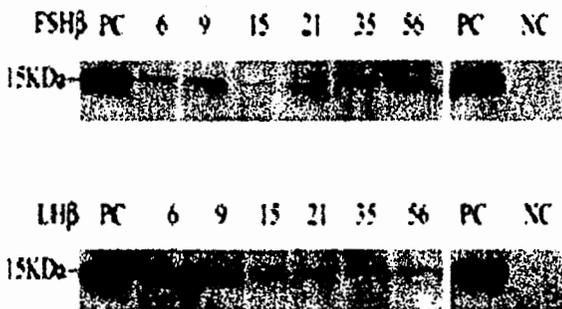


Figure 3

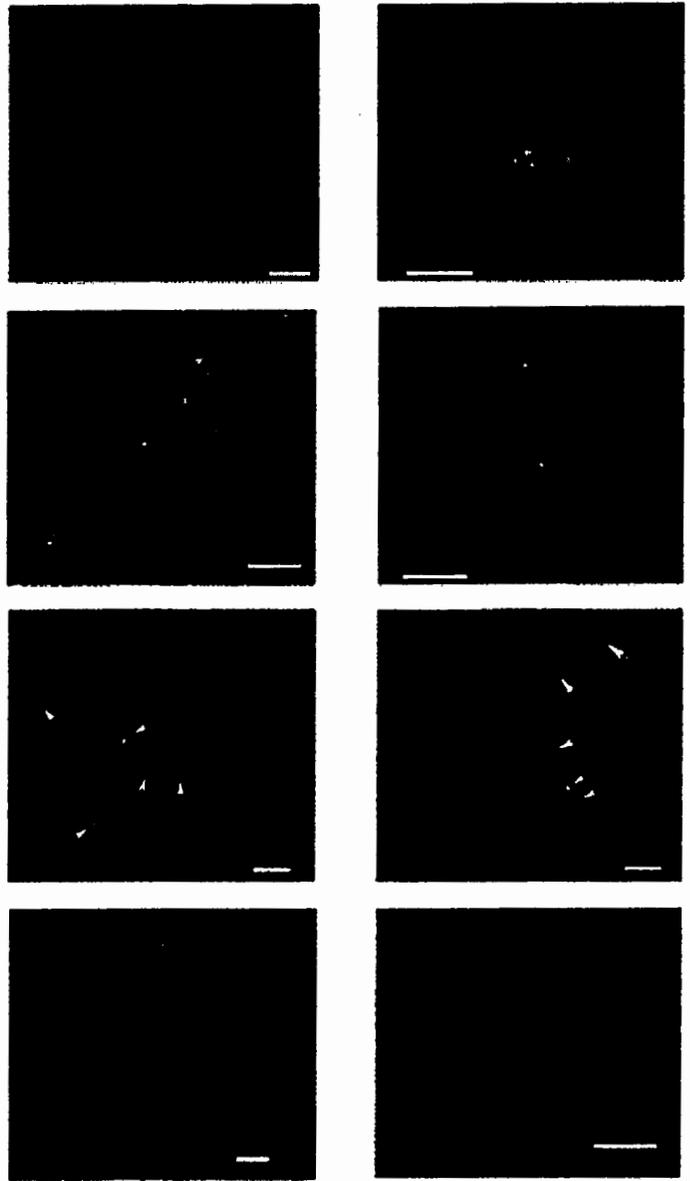


Figure 4



Figure 5

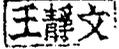
財団法人日中医学協会  
2004年度共同研究等助成金－在留中国人研究者－報告書

2005 年 3 月 15 日

財団法人 日中医学協会 御中

貴財団より助成金を受領して行った研究テーマについて報告いたします。

添付資料： 研究報告書

中国人研究者名： 王 静文  

指導責任者名： 徳留 信寛 職名： 教授

所属機関名： 名古屋市立大学

〒 467-8601

所在地： 名古屋市瑞穂区瑞穂町字川澄1

電話： 853-8176 内線： 8176

1. 助成金額： 600,000 円

2. 研究テーマ

中国人の肺腺がんの感受性とGSTZ1遺伝子多型の関連

3. 成果の概要（100字程度）

この研究において、II相代謝酵素GSTZ1の遺伝子多型と肺腺がんの関連を明らかにするため中国人の肺腺がんの症例対照研究を行った。遺伝子型の分布についてGSTZ1 Lys32Glu AA、AG、GG genotypeの頻度は症例群のなかでそれぞれに17.0、51.8、31.2%、対照群のなかで26.1、40.3、33.6%であった。変異したGSTZ1Lys32Glu G 遺伝子は有意に肺腺がんのリスクと関連がなかったが（OR=1.64、95%CI 0.86-3.19）、GSTM1 null genotypeとまたはGSTP1 Val allele との共存が有意に肺腺がんのリスクと関連していた（OR=2.91、95%CI 1.06-8.91；OR=3.95、95%CI 1.46-11.47）。

4. 研究業績

(1) 学会における発表  無 ・  有（学会名・演題）

(2) 発表した論文  無 ・  有（雑誌名・題名）

## 中国人の肺腺がんの感受性と GSTZ1 遺伝子多型の関連

研究者氏名	王 静文
中国所属機関	開蘭範各荘鉞病院内科
日本研究機関	名古屋市立大学健康増進・予防医学
指導責任者	教授 徳留 信寛
共同研究者名	とう 一夫, 丁 建民, 姜 晶

### Abstract

The glutathione transferases (GST) zeta class is recently identified and found in a range of species from plants to humans. GSTZ1 catalyze the metabolism of a series of alpha-haloacids including dichloroacetate (DCA) and fluoroacetate. GSTZ1 also plays an important role in the catabolism pathway of phenylalanine and tyrosine. The human GSTZ1 locus has some polymorphic sites, which were located at nucleotides 23, 94, 124 and 245. Some allelic variants showed significant functional variation with a number of substrate. In our previous studies, the associations between GSTM1, GSTT1 and GSTP1 genetic polymorphisms and lung adenocarcinoma (lung AC) in a Chinese population have been evaluated. In order to assess the effects of GSTZ1 genetic polymorphisms on the development of lung AC, we conducted this case-control study. The frequencies of GSTZ1 Lys32Glu AA, AG and GG genotype were 17.0, 51.8 and 31.2% among cases and 26.1, 40.3 and 33.6% among controls. GSTZ1 Lys32Glu G allele was found to be associated with an elevated lung AC risk (OR=1.64, 95% CI 0.86-3.19). Moreover, GSTZ1 Lys32Glu G allele showed significantly increased lung AC risk when in combination with either GSTM1 null genotype or mutant GSTP1 Val allele (OR=2.91, 95% CI 1.06-8.91; OR=3.95, 95% CI 1.46-11.47, respectively). GSTZ1 Lys32Glu G allele demonstrated a 5.9-fold increased lung AC risk among heavy smokers compared with non-smokers with GSTZ1 Lys32Glu AA genotype.

### Key Words

GSTZ1, Genetic Polymorphisms, Dichloroacetate (DCA), Lung Adenocarcinoma (lung AC)

### Introduction

It has been well established that glutathione transferases (GSTs), as a large multigene family encoding phase II drug-metabolizing enzymes, catalyze the conjugation of glutathione with a wide variety of hydrophilic and electrophilic substrates.<sup>1)</sup> The GSTs are categorized into Alpha, Mu, Pi, Theta and Zeta classes.<sup>2-4)</sup> The Zeta class is recently identified, and found in a range of species, including plants, animals and microorganisms.<sup>4)</sup> Compared with other GSTs, members of the Zeta class have a distinct range of substrates and functions, which catalyze the metabolism of a series of alpha-haloacids, including dichloroacetate (DCA) and fluoroacetate.<sup>5, 6)</sup> DCA is a common contaminant of chlorinated drinking water,<sup>7)</sup> and is hepatocarcinogenic in rodents.<sup>8-11)</sup> It has been observed that maleylacetoacetate isomerase (MAAI), which converts maleylacetoacetate (MAA) to fumarylacetoacetate (FAA), the penultimate step in the phenylalanine and tyrosine catabolism pathway, has an identical sequence to that of GSTZ1, therefore GSTZ1 also plays a significant role in the pathway of the catabolism of phenylalanine and tyrosine.<sup>12)</sup> Several polymorphic alleles of the human GSTZ1 locus have been reported, and some allelic variants showed significant functional variation with a number of substrates.<sup>13)</sup> Polymorphic sites of GSTZ1 were located at nucleotides 23, 94, 124 and 245.<sup>14)</sup> The T-to-C transition at nucleotide 23 results in a Leu8Pro substitution. A or G

was variably found at nucleotide 94, and A or G was also variably noted at nucleotide 124, these nucleotide changes lead to Lys32Glu and Arg42Gly substitution, respectively. The C-to-T transition at nucleotide 245 causes Thr82Met substitution. These amino acid alterations are known to affect the activities of the GSTZ1 enzyme for different substrates, and affecting the efficiency of removal for these substances.

In our previous studies in a Chinese population, the associations between GSTM1, GSTT1 and GSTP1 genetic polymorphisms and lung adenocarcinoma (lung AC) have been evaluated.<sup>15,16</sup> But no relationship between lung AC and the GSTT1 genotypes was observed, either separately or in combination with the GSTM1 or GSTP1 genotypes. Although separate GSTM1 and GSTP1 polymorphisms were not statistically related to lung AC risk, the coexistence of GSTM1 null genotype and GSTP1 Val allele was significantly associated with an elevated lung AC risk (OR=2.4, 95% CI 1.1-5.1). To date, the role of GSTZ1 in the development of lung AC has not been investigated in our study, and studies about GSTZ1 genetic polymorphisms with susceptibility to lung cancer are limited. In order to assess the effects of GSTZ1 polymorphisms on lung AC, we conducted this case-control study.

### Subjects and methods

This case-control study included 112 cases with lung ACs and 119 cancer-free healthy controls. Detailed descriptions of the subjects have been presented previously.<sup>16</sup>

The GSTZ1 Lys32Glu and Arg42Gly polymorphisms were detected by PCR-RFLP using primers 5'-TTCCCTACTGGTCCTCACATCTC-3' and 5'-TCACCGGATCATGGCCA GCA-3', the PCR product was digested with BsmAI for Lys32Glu and FokI for Arg42Gly, respectively.<sup>4</sup> But the Arg42Gly genotypes failed to be detected, because bands could not be identified after digested by FokI.

The difference in distribution of genotypes between cases and controls was examined with the  $\chi^2$  test. For measuring association between GSTZ1 genotypes and lung AC, ORs and 95% CIs were estimated from unconditional logistic regression using the software package SAS (version 8.2) and adjusted for age, sex and smoked pack-years. The combined effects of GSTZ1 genotypes with GSTM1, GSTT1 and GSTP1 polymorphisms were estimated, and gene-environment interactions in terms of cigarette smoking were also evaluated.

### Results

The distribution of GSTZ1 Lys32Glu genotypes is presented in Table 1. The frequency of GSTZ1 Lys32Glu AA genotype was elevated among controls (26.1%) than among cases (17.0%), while heterozygote AG was less in controls as compared to the cases (40.3 and 51.8%, respectively), the frequency of GSTZ1 Lys32Glu GG genotype among cases (31.2%) was similar to controls (33.6%). No significant difference in the distribution of GSTZ1 Lys32Glu genotypes was found between cases and controls ( $P=0.14$ ). The frequencies of three GSTZ1 Lys32Glu genotypes among controls were not different from those expected from the Hardy-Weinberg equilibrium.

The ORs for lung AC by GSTZ1 polymorphism separately and in combination with GSTM1, GSTT1 and GSTP1 polymorphisms are summarized in Table 2. Either GSTZ1 Lys32Glu AG or GG genotype was associated with an elevated risk of Lung AC (OR=1.84, 1.40; respectively), but not statistically significant. With respect to combined genotypes, although respective polymorphism of GSTM1, GSTP1 or GSTZ1 was not statistically associated with lung AC, when the allele G of GSTZ1 Lys32Glu was combined with GSTM1 null genotype, GSTT1 null genotype and GSTP1 Val allele, significantly increased risks were found for combined GSTZ1 Lys32Glu G allele and GSTM1 null genotype (OR=2.91, 95%CI 1.06-8.91) or mutant GSTP1 Val allele (OR=3.95, 95%CI 1.46-11.47).

Interactions of gene and cigarette smoking are presented in Table 3. The combination of smokers and GSTZ1 Lys32Glu G allele was not found significantly increased lung AC risk (OR=1.88, 95% CI 0.80-4.59) as compared to combined non-smokers

and GSTZ1 Lys32Glu AA genotype. However, when smoked pack-years were stratified, ORs of light smokers ( $0 < \text{pack-years} < 20$ ), moderate smokers ( $20 \leq \text{pack-years} < 40$ ) and heavy smokers ( $\text{pack-years} \geq 40$ ) were respectively 0.70 (95% CI 0.29-1.65), 1.04 (95% CI 0.50-2.15) and 4.04 (95% CI 1.42-13.41) as compared to non-smokers. Moreover, among heavy smokers, GSTZ1 Lys32Glu G allele was found to be associated with a 5.9-fold increased lung AC risk (OR=5.93, 95% CI 1.65-25.41).

## Discussion

GSTs are widely distributed and expressed in many mammalian tissues, the expression of GSTs is regulated in a tissue-specific manner resulting in quantitatively different protein products in different tissues.<sup>17-19)</sup> The highest amount of total GSTs protein has been found to express in liver, followed by brain, pancreas, adrenals, heart and lung,<sup>20,21)</sup> where are the major sites for drug and chemical metabolism. GSTZ1 is expressed in multiple tissues in human.<sup>4)</sup> GSTZ1 is mainly expressed in liver, testis and prostate, and moderately expressed in brain, heart, pancreatic islets, adrenal medulla, and the epithelial lining of the gastrointestinal tract, airway, and bladder in rats.<sup>22)</sup>

As described above, GSTZ1 catalyse the metabolism of a series of alpha-haloacids, including DCA and fluoroacetate.<sup>5,6)</sup> GSTZ1 also plays an important role in the pathway of the catabolism of phenylalanine and tyrosine.<sup>12)</sup> Humans are exposed to DCA by environmental and medical ways. DCA is a by-product of chlorination of drinking water, may be consumed every day.<sup>23,24)</sup> DCA is also a metabolite of trichloroethylene and chloral hydrate, the former is found in industrial solvents and degreasing agents, and the latter is a sedative.<sup>25,26)</sup> DCA is also used clinically for the treatment of congenital lactic acidosis.<sup>27,28)</sup> Although the mechanism by which DCA exerts its toxicity has been unclear, studies have shown that DCA perhaps induce GSTZ1 inactivate,<sup>29,30)</sup> and the DCA-induced inactivation of GSTZ1 perturbs tyrosine metabolism in rats,<sup>31)</sup> and these perturbations may result in the multiorgan toxicity of DCA, in accordance with the multiple tissues expression of GSTZ1. In the present study, the varied GSTZ1 Lys32Glu G allele showed elevated lung AC risk (OR=1.64, 95% CI 0.86-3.19). Moreover, coexistence of GSTZ1 Lys32Glu G allele with either GSTM1 null genotype or mutant GSTP1 Val allele was found significantly increased lung AC risk (OR=2.91, 95% CI 1.06-8.91; OR=3.95, 95% CI 1.46-11.47, respectively), which also explained the coordinated effects of GSTs detoxifying enzymes.

Tobacco exposure is clearly associated with the development of lung cancer, and individual susceptibility has been investigated in terms of the ability to activate and detoxify carcinogens. Many studies have analyzed the influence of tobacco smoking on lung cancer risk with association with GSTs polymorphisms, but results are contradictory. Some studies have reported a stronger association between lung cancer risk and GSTM1 null genotype or GSTP1 Val allele among heavy smokers,<sup>32,33)</sup> and several studies showed similar associations for low or moderate doses of smoking.<sup>34,35)</sup> In our previous study, GSTM1 null genotype was found to be associated with a 5.9-fold increased lung AC risk among light smokers,<sup>15)</sup> and GSTP1 Val allele was found no significantly elevated risk among smokers.<sup>16)</sup> In this study, heavy smokers were associated with an increased lung AC risk (OR=4.04, 95% CI 1.42-13.41) as compared with non-smokers. Furthermore, GSTZ1 Lys32Glu G allele showed significantly increased lung AC risk among heavy smokers (OR=5.93, 95% CI 1.65-25.41), even though interactions between GSTZ1 Lys32Glu G allele and smokers were not obvious.

In conclusion, although the distribution of GSTZ1 Lys32Glu genotypes among lung AC cases was not significantly different from controls, GSTZ1 Lys32Glu G allele was found to be associated with an elevated lung AC risk. Moreover, GSTZ1 Lys32Glu G allele showed significantly increased lung AC risk when in combination with either GSTM1 null genotype or mutant GSTP1 Val allele. Among heavy smokers, GSTZ1 Lys32Glu G allele was found to be associated with a 5.9-fold increased lung AC risk.

## References

1. Hayes JD, Pulford DJ. The glutathione S-transferase supergene family: regulation of GST and the contribution of the isoenzymes to cancer chemoprotection and drug resistance. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 1995; **30**: 445-600.
2. Mannervik B, Alin P, Guthenberg C, Jensson H, Tahir MK, Warholm M, Warholm H. Identification of three classes of cytosolic glutathione transferase common to several mammalian species: correlation between structural data and enzymatic properties. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1985; **82**: 7202-6.
3. Meyer DJ, Coles B, Pemble SE, Gilmore KS, Fraser GM, Ketterer B. Theta, a new class of glutathione transferases purified from rat and man. *Biochem J* 1991; **274**: 409-14.
4. Board PG, Baker RT, Chelvanayagam G, Jermini LS. Zeta, a novel class of glutathione transferases in a range of species from plants to humans. *Biochem J* 1997; **328**: 929-35.
5. Tong Z, Board PG, Anders MW. Glutathione transferase zeta catalyses the oxygenation of the carcinogen dichloroacetic acid to glyoxylic acid. *Biochem J* 1998; **331**: 371-4.
6. Tong Z, Board PG, Anders MW. Glutathione transferase zeta-catalyzed biotransformation of dichloroacetic acid and other alpha-haloacids. *Chem Res Toxicol* 1998; **11**: 1332-8.
7. Krasner SW, McGuire MJ, Jacangelo JG, Patania NL, Reagan KM, Aieta EM. The occurrence of disinfection by-products in US drinking water. *J Am Water Works Assoc* 1989; **81**: 41-53.
8. Bull RJ, Sanchez IM, Nelson MA, Larson JL, Lansing AJ. Liver tumor induction in B6C3F1 mice by dichloroacetate and trichloroacetate. *Toxicology* 1990; **63**: 341-59.
9. DeAngelo AB, Daniel FB, Most BM, Olson GR. The carcinogenicity of dichloroacetic acid in the male Fischer 344 rat. *Toxicology* 1996; **114**: 207-21.
10. Harrington-Brock K, Doerr CL, Moore MM. Mutagenicity of three disinfection by-products: di- and trichloroacetic acid and chloral hydrate in L5178Y/TK +/-(-)3.7.2C mouse lymphoma cells. *Mutat Res* 1998; **413**: 265-76.
11. Tao L, Kramer PM, Ge R, Pereira MA. Effect of dichloroacetic acid and trichloroacetic acid on DNA methylation in liver and tumors of female B6C3F1 mice. *Toxicol Sci* 1998; **43**: 139-44.
12. Fernandez-Canon JM, Penalva MA. Characterization of a fungal maleylacetoacetate isomerase gene and identification of its human homologue. *J Biol Chem* 1998; **273**: 329-37.
13. Blackburn AC, Tzeng HF, Anders MW, Board PG. Discovery of a functional polymorphism in human glutathione transferase zeta by expressed sequence tag database analysis. *Pharmacogenetics* 2000; **10**: 49-57.
14. Blackburn AC, Coggan M, Tzeng HF, Lantum H, Polekhina G, Parker MW, Anders MW, Board PG. GSTZ1d: a new allele of glutathione transferase zeta and maleylacetoacetate isomerase. *Pharmacogenetics* 2001; **11**: 671-8.
15. Wang J, Deng Y, Li L, Kuriki K, Ding J, Pan X, Zhuge X, Jiang J, Luo C, Lin P, Tokudome S. Association of GSTM1, CYP1A1 and CYP2E1 genetic polymorphisms with susceptibility to lung adenocarcinoma: a case-control study in Chinese population. *Cancer Sci* 2003; **94**: 448-52.
16. Wang J, Deng Y, Cheng J, Ding J, Tokudome S. GST genetic polymorphisms and lung adenocarcinoma susceptibility in a Chinese population. *Cancer Lett* 2003; **201**: 185-93.
17. Tu CP, Weiss MJ, Li NQ, Reddy CC. Tissue-specific expression of the rat glutathione S-transferases. *J Biol Chem* 1983; **258**: 4659-62.
18. Rozell B, Hansson HA, Guthenberg C, Tahir MK, Mannervik B. Glutathione transferases of classes alpha, mu and pi show selective expression in different regions of rat kidney. *Xenobiotica* 1993; **23**: 835-49.
19. Rowe JD, Nieves E, Listowsky I. Subunit diversity and tissue distribution of human glutathione S-transferases:

- interpretations based on electrospray ionization-MS and peptide sequence-specific antisera. *Biochem J* 1997; **325**: 481-6.
20. DePierre JW, Morgenstern R. Comparison of the distribution of microsomal and cytosolic glutathione S-transferase activities in different organs of the rat. *Biochem Pharmacol* 1983; **32**: 721-3.
21. Listowsky I, Rowe JD, Patskovsky YV, Tchaikovskaya T, Shintani N, Novikova E, Nieves E. Human testicular glutathione S-transferases: insights into tissue-specific expression of the diverse subunit classes. *Chem Biol Interact* 1998; **111-112**: 103-12.
22. Lantum HB, Baggs RB, Krenitsky DM, Board PG, Anders MW. Immunohistochemical localization and activity of glutathione transferase zeta (GSTZ1-1) in rat tissues. *Drug Metab Dispos* 2002; **30**: 616-25.
23. Uden PC, Miller JW. Chlorinated acids and chloral in drinking water. *J Am Water Works Assoc* 1983; **75**: 524-7.
24. Weisel CP, Kim H, Haltmeier P, Klotz JB. Exposure estimates to disinfection by-products of chlorinated drinking water. *Environ Health Perspect* 1998; **107**: 103-10.
25. Henderson GN, Yan Z, James MO, Davydova N, Stacpoole PW. Kinetics and metabolism of chloral hydrate in children: identification of dichloroacetate as a metabolite. *Biochem Biophys Res Commun* 1997; **235**: 695-8.
26. Merdink JL, Gonzalez-Leon A, Bull RJ, Schultz IR. The extent of dichloroacetate formation from trichloroethylene, chloral hydrate, trichloroacetate, and trichloroethanol in B6C3F1 mice. *Toxicol Sci* 1998; **45**: 33-41.
27. Stacpoole PW, Harman EM, Curry SH, Baumgartner TG, Misbin RI. Treatment of lactic acidosis with dichloroacetate. *N Engl J Med* 1983; **309**: 390-6.
28. Stacpoole PW, Henderson GN, Yan Z, Cornett R, James MO. Pharmacokinetics, metabolism and toxicology of dichloroacetate. *Drug Metab Rev* 1998; **30**: 499-539.
29. Tzeng HF, Blackburn AC, Board PG, Anders MW. Polymorphism- and species-dependent inactivation of glutathione transferase zeta by dichloroacetate. *Chem Res Toxicol* 2000; **13**: 231-6.
30. Anderson WB, Board PG, Gargano B, Anders MW. Inactivation of glutathione transferase zeta by dichloroacetic acid and other fluorine-lacking alpha-haloalkanoic acids. *Chem Res Toxicol* 1999; **12**: 1144-9.
31. Cornett R, James MO, Henderson GN, Cheung J, Shroads AL, Stacpoole PW. Inhibition of glutathione S-transferase zeta and tyrosine metabolism by dichloroacetate: a potential unifying mechanism for its altered biotransformation and toxicity. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; **262**: 752-6.
32. Persson I, Johansson I, Lou YC, Yue QY, Duan LS, Bertilsson L, Ingelman-sundberg M. Genetic polymorphism of xenobiotic metabolizing enzymes among Chinese lung cancer patients. *Int J Cancer* 1999; **81**: 325-9.
33. Hirvonen A, Husgafvel-Pursiainen K, Anttila S, Vainio H. The GSTM1 null genotype as a potential risk modifier for squamous cell carcinoma of the lung. *Carcinogenesis* 1993; **14**: 1479-81.
34. Ryberg D, Skaug V, Hewer A, Phillips DH, Harries LW, Wolf CR, OGREID D, Ulvik A, Vu P, Haugen A. Genotypes of glutathione transferase M1 and P1 and their significance for lung DNA adduct levels and cancer risk. *Carcinogenesis* 1997; **18**: 1285-9.
35. Garcia-Closas M, Kelsey KT, Wiencke JK, Xu X, Wain JC, Christiani DC. A case-control study of cytochrome P450 1A1, glutathione S-transferase M1, cigarette smoking and lung cancer susceptibility (Massachusetts, United States). *Cancer Causes Control* 1997; **8**: 544-53.

Table 1. Distribution of GSTZ1 genotypes in cases and controls

Genotype	Cases (%)	Controls (%)	P value <sup>1)</sup>
GSTZ1 Lys32Glu			
AA	19 (17.0)	31 (26.1)	0.14
AG	58 (51.8)	48 (40.3)	
GG	35 (31.2)	40 (33.6)	

<sup>1)</sup> P value by  $\chi^2$  test

Table 2. ORs for lung AC by GSTZ1 polymorphism, separately and in combination with GSTM1, GSTT1 and GSTP1 polymorphisms

Genotypes		Cases/Controls <sup>1)</sup>	ORs (95% CI) <sup>2)</sup>
GSTZ1 genotypes			
AA		19/31	1.00 (ref)
AG		58/48	1.84 (0.92–3.74)
GG		35/40	1.40 (0.67–2.97)
AG+GG		93/88	1.64 (0.86–3.19)
Combined genotypes			
GSTZ1	GSTM1		
AA	present	6/14	1.00 (ref)
AG or GG	present	37/45	1.79 (0.64–5.56)
AA	null	13/17	1.78 (0.54–6.36)
AG or GG	null	56/43	2.91 (1.06–8.91)
GSTZ1	GSTT1		
AA	present	7/16	1.00 (ref)
AG or GG	present	52/49	2.23 (0.86–6.35)
AA	null	12/15	1.76 (0.54–5.97)
AG or GG	null	41/39	2.28 (0.86–6.61)
GSTZ1	GSTP1		
AA	Ile/Ile	8/19	1.00 (ref)
AG or GG	Ile/Ile	59/65	2.22 (0.91–5.91)
AA	Ile/Val or Val/Val	11/12	2.69 (0.82–9.20)
AG or GG	Ile/Val or Val/Val	34/23	3.95 (1.46–11.47)

<sup>1)</sup> Numbers of Cases/Controls.

<sup>2)</sup> Adjusted for age, sex and smoked pack-years.

Table 3. Assessments of interaction of GSTZ1 genotypes and smoking status

Smoking status	GSTZ1 Lys32Glu	Cases/Controls <sup>1)</sup>	OR (95% CI) <sup>2)</sup>
Non-smokers	AA	12/19	1.00 (ref)
Non-smokers	AG or GG	52/52	1.55 (0.69–3.62)
Smokers	AA	7/12	0.95 (0.28–3.13)
Smokers	AG or GG	41/36	1.88 (0.80–4.59)
Pack-years <sup>3)</sup>			
>0, <20	AA	1/5	0.31 (0.02–2.24)
>0, <20	AG or GG	9/12	1.28 (0.40–4.05)
>=20, <40	AA	4/6	1.10 (0.24–4.78)
>=20, <40	AG or GG	18/20	1.53 (0.57–4.19)
>=40	AA	2/1	4.12 (0.33–104.45)
>=40	AG or GG	14/4	5.93 (1.65–25.41)

<sup>1)</sup> Numbers of Cases/Controls.

<sup>2)</sup> Adjusted for age and sex.

<sup>3)</sup> Also referenced to non-smokers with GSTZ1 Lys32Glu AA genotype.

財団法人日中医学協会  
2004年度共同研究等助成金－在留中国人研究者－報告書

17年3月15日

財団法人 日中医学協会 御中

貴財団より助成金を受領して行った研究テーマについて報告いたします。

添付資料： 研究報告書

中国人研究者名： 張海清   
指導責任者名： 黒川 聖 職名： 救急救急部 教授  
所属機関名： 日本医科大学付属第二病院救命救急部  
〒 211-8533  
所在地： 神奈川県川崎市中原区小杉町 1-396  
電話： 044-733-5181 内線： 511

1. 助成金額： 600,000 円

2. 研究テーマ

日本と中国の救急医療体制の比較

3. 成果の概要 (100字程度)

日本と中国の救急医療の歴史、prehospital care、hospital care及び救急医療情報システムの比較を行い、救急体制の面で極めて大きな差があると感じた。しかし、互いに長所、短所があり、国家の経済、都市の規模、地域社会の救急需要と供給体制等に見合った最善の方式となるべく、経済効率の良い救急体制を構築するべきと考える。

4. 研究業績

(1) 学会における発表 無 ・  (有) (学会名・演題)

A 第15回日本医科大学外国人講演会 日本と中国の救急医療体制の比較

B 第55回東京地方救急医学会 日本と中国の救急医療体制の比較

(2) 発表した論文 無 ・  (有) (雑誌名・題名)

— 日本医科大学雑誌

— 日本救急医学会関東地方会雑誌 (投稿中) 日本と中国の救急医療体制の比較

## 日本と中国の救急医療体制の比較

研究者氏名	張 海濤
中国所属機関	中国山西省長治市第二人民病院救命救急部
日本研究機関	日本医科大学付属第二病院救命救急部
指導責任者	教授 黒川 顕
共同研究者名	上田康晴, 唐木千晶, 牧真彦, 望月徹, 畝本恭子

### 要旨

日本と中国の救急医療の Pre hospital care, hospital care 及び救急医療情報システムの比較を行い、経済効率の良い救急体制を構築する方策を模索した。結果日本では救急業務が paramedic 方式にて救急隊による選別層別化搬送確立は 1963 年に法制化、中国では救急業務が 70 年代末に発足して doctor car 方式にて多種多様な救急体制で運用；日本では一次、二次、三次の救急医療施設が日本の救急医療システムの根幹、そして質の面で全く異なる、中国ではすべての救急傷病者を引き受ける 24 時間オープン救急外来である。大都市の診療は、研修医が主力となりトリアージを行い、小都市の診療は救急専従医により治療を完結する；日本では各機関は広域災害・救急医療情報システムを検索して利用できる救急情報網である、中国では救急センターを中心として小さい局域で情報システムを設置している、救急医療の実状に見合ったシステムの構築に向け現在整備中されつつある。

**Key Words** 日本と中国、救急医療体制、Pre hospital care、hospital care、救急医療情報システム

### 【はじめに】

救急医療体制は各国の社会制度や文化的、歴史的背景、疾病構造などの違いに根差しているといえるだけでなく、経済や都市の規模、全国民の救急に対する意識が密切に関連している。先進国である日本と発展途上国である中国は、救急医療体制の面で極めて大きな差があると感じられる。

### 【目的】

日本と中国の救急医療体制の歴史、Pre-hospital care、hospital care、救急医療情報システムの比較を行う。

### 【対象及び方法】

救急医療体制の発足（日本 1963 年中国 1970 年代末）以降の流れを中国での医療及び日本での留学経験をもとに文献資料などによって比較検討した。

### 【結果】

#### 一：救急医療の歴史

日本では救急業務（救急隊による搬送の確立）が昭和 38 年（1963 年）に法制化された。昭和 52 年（1977 年）から厚生省は一次、二次、三次救急医療体制の層別化を確立し、救急医療情報センターからなる救急医療体制の体系的な整備を推進してきた<sup>1)</sup>。平成 3 年（1991 年）救急救命士法が制定され、1996 年 1 月 2 日に全国の住民の信頼に応える航空消防、防災体制が運用された。平成 15 年 4 月 1 日から medical control system の下に救急救命士に除細動が認可され（いわゆる指示なし除細動）た、気管挿管と薬物の使用は近い将来認可されることとなった。

中国では救急業務が 1970 年代末～80 年代初めに発足し、救命救急委員会がようやく成立した。経済成長は交通事故と労災事故の増加をもたらした。これに対応するため、1982 年から衛生部（厚生労働省）は各病院に

における救命救急部の確保と大都市に救命救急センターを設置することを推進した。三級救急体制（農村は一級、小都市は二級、大都市は三級）を実行して、救急医療がかなり大きな発展をみた。1986年で第一回救急医学の学術シンポジウムが召集されて、その年の12月に救急医学は独立した医学分野として認可された。90年代から中国の人口（特に大都市）の急激な増加に伴い救急患者の発生も増加した。大都市で多様な救急体制を出現したが、代表的には独立型（北京）や、pre-hospital型（上海）、依頼型（重慶）などがある<sup>2)</sup>。90年代末から赤十字社付属の救急医療が導入された。2001年8月21日から北京でドクターヘリコプター業務の運行が始まった。目下、中国は積極的に救急医療体制の改革を行っているところである。

## 二:Pre hospital care

### 1)搬送システム

日本では119番の通報を受け救急車で搬送を行っている（paramedic方式）が、平成5年4月から船橋市ではプレホスピタルケアの充実を目的に開始された現場に出動する船橋式 doctor car システムを運用している。日本における救急搬送は制度的には消防救急隊の業務として位置付けられているが、もちろん救急隊の業務独占ではなく、ドクターカーとドクターヘリコプターを救急車と同様に使用している。<sup>3)</sup>年間で救急車の総出動件数は400万件ドクターヘリの搬送数は950件を超え、搬送システムは快速し完璧である。

中国では救急電話120番を使用しているが、90年代末より赤十字社付属の救急医療（999番）が導入されて以来、交通事故が起こった場合、消防隊（119番）や交通事故センター（122番）も参与する。2001年から北京でドクターヘリコプター業務の運用が始まった。海南や西安など大都市も相次いで運用している。発達途上国としての中国は福祉事業が不十分であり、市民の救急搬送を無料で実施することは財政上困難であり、すなわち、救急車の費用は地域によって異なるが、回数と路程の基づいて請求される。そのうえ西部と小都市には車両と機材の不足問題がまだ存在する。<sup>2)</sup>

### 2) プレホスピタルケアシステム

救急搬送に際し必要な初療処置体制を行う。日本では平成3年（1991年）救急救命士制度が発足した。一次、二次、三次の選別搬送は重症者直送システムにより少ない医療資源を最大限に活かした患者・医療機関の双方にメリットをもたらすシステムであり、日本が世界中に誇れるシステムである。しかし日本の救急救命士はアメリカの paramedics と大きな差がある（除細動や気道確保や薬剤使用など）。日本で救命率向上のため平成13年からMC体制（medical control system）が浸透し始まっている。平成15年4月1日からMC体制の指示下で救急救命士の除細動が認可された<sup>4)</sup>。

中国ではプレホスピタルケアは医師が救急車に同乗して現場で医療行為を行う（doctor car方式）。車両と機材及び経費の不足は救急現場で救急時間を延長させる可能性がある。すなわち、大都市における実際的救急状況に基づいて自治体が行う、たとえば、独立型と呼ばれる北京の救急体制はプレホスピタルケアから傷病者の退院までが1つの救命救急センターでなされる。pre-hospital型と呼ばれる上海の救急体制は日本の救急体制と同じで、傷病者を近い総合病院へ運ぶ。依頼型と呼ばれる重慶の救急体制は、日本の救急情報センターや消防局はなく、総合病院に付属する救急救命部に搬送を依頼し、その doctor car が出かけて傷病者を自分の病院に連れて帰るという方式である。指揮型と呼ばれる広州の救急体制は各都市で統一的に救急医療情報センターが傷病者の重症度別に病院を選定指揮し、その病院から doctor car が出る方式である。これら以外の都市で現在まで三級救急体制（農村は一級、小都市は二級、中都市は三級）がとられているが救急半径過長により搬送時間が長くなってしまふ。先ごろ、中国の救急医学会でどの形が最もよいか激しい論議を呼んだが、結論には至らなかった。

## 三:hospital care

### 1)救急医療施設

日本では一次、二次、三次の救急医療施設が日本の救急医療システムの根幹といえる。しかし、このシステムを支えるには救急医療機関の量的（特に三次救急医療機関）、質的問題（救急患者のたらい回し）と救急専門医が不足しているという問題もある<sup>5)</sup>。このような救急医療の現状に対し、厚生労働省は新型救命救急センター

(すなわちベッド数 10 数床、救急医 10 人程度のいわばミニ救命救急センター) の設置を構想中である。<sup>6)</sup>

中国では農村に住んでいる人が公的診療所あるいは私的クリニックで軽症患者に処置・投薬及びトリアージされる。都市で救急医療施設は主に総合病院の救命救急部 (救急部中に内科医師と外科医師によって担当する) にて担っている。一次、二次、三次救急医療の区別がなくすべての救急傷病者を引き受ける 24 時間オープンな救急外来である。近年来外来救急患者の増加に従って、元々の救急外来の規模と機能は現在の需要に合わない。また、今一番の大きな問題は一部の農村地区 (尤も西部と山岳地帯) における医療資源の不足がある。衛生部は、都市総合病院の医者が定期的に農村へでいたりあるいは農村へ勤務したりして巡回医療サービスを提供するシステムの導入をしている。<sup>7)</sup>

## 2) 院内救急の手順

日本では一次・二次救急と三次救急とは質の面で全く異なる。前者は外来に来院した傷病者 (まさに千差万別の傷病者) を対象とし、まずナースがトリアージしあと専門医を呼んで (各科縦割りの医療体制) 傷病者に対して診断と処置する。後者はすでにトリアージされたあるいは診断のついた重症患者の病棟管理である。三次救急医療は救急傷病者への的確で迅速な対応のためには、傷病者の有無にかかわらず、24 時間体制の (スタッフ救急医を主とする) 人員配置、十分に整備された医療機器、救急処置物品や医薬品、いつでも使用可能な検査室や手術室などを必要とする。<sup>8)</sup>

中国では大都市の総合病院の救命救急部での診療は、研修医が主力となりトリアージを行い、自分の知識で診断と治療できることは自分が判断で行い、自分の知識を超える受診者によっては院内に当直している上級医にコンサルトをする。また、小都市の総合病院の救命救急部は救急専従医により治療を完結する。ほかの領域に遭ったら、当直している各科の専門家にコンサルトをする。この診療体制は救急疾患を幅広くカバーできるが、多科との連携に深い溝をつくりかねない<sup>9)</sup>。

## 四: 救急医療情報システム

救急医療情報とは救急医療の一環として救急医療が適切に行えるよう医療関係者や市民に提供する情報であり、システムとして活動しているのは救急医療センターと中毒情報センターである。日本では救急医療機関と救急搬送機関を有機的に結びつける情報システムが円滑に運用されている。各機関は広域災害・救急医療情報システムを検索して利用できる救急情報網である。日本中毒情報センターは 1986 年より整備されている、一日平均約 100 件問い合わせに対応しており、<sup>10)</sup> 中毒情報の集積が世界中で最も多いと思われる。<sup>11)</sup> 中国ではいままですべて広域な救急医療情報センターが構築できなかったが、小さい局域で (例えば: 同大学の付属病院中、指揮型の救急医療情報センターがある大都市) 情報システムを設置している。2003 年新型コロナウイルスによる SARS が医療情報不足により感染拡大が重大な問題となった。救急医療情報システムは、先進国システムを参考とし、中国の救急医療の実状に見合ったシステムの構築に向け現在整備されつつある。

### 【考察】

日本の救急医療は 40 年にわたり、高度に発達した救急医療体制を築き上げたが、近年メディカルコントロールの下で現場処置の範囲が拡大している。中国では 70 年代末に発足し、90 年代救急医療体制の改善が本格的に始まり、まだ発達していないが進歩が驚くほどである。

搬送システムで社会福祉事業が相対的に完璧な経済大国の日本では大部分が無料で、円滑な搬送制度は世界中で類稀な恩恵を国民にもたらしている。一方、タクシー代わりの利用などが横行し結果として過度搬送と赤字財政をもたらすと思う。将来的には、民間患者搬送車や有料搬送システムの導入が検討されている。中国では救急電話が混乱に使用なので緊急救急処置の点から見て集団災害時に重大な役割を果たすが、救急の場面では救急医療情報センターが設置されてないため、混乱と無秩序な状況を起こすことがあると思う。救急資源を有効に活用する上で、今後の大きな課題になっている。政府管理の下で搬送システムを如何に総合的に運用するか、いわゆる「work station 方式」も模索されている。福利事業が不十分な中国で搬送の有料化、機材の不足化など問題が未来のしばらくあると思う。

現在、世界中でプレホスピタルケアは大きく分けて 2 種類の体制をとっている。一つは paramedic 方式 (アメ

リカやイギリスなど)であり、特別なトレーニングを受けた人たちが現場で傷病者に緊急に処理して病院へ搬送されるものである、もう一つはdoctor car方式(フランスやドイツなど)すなわち救命救急医師が救急車に同乗して現場で傷病者にいろいろな医療行為を行うものである。(表1)

表1

	Paramedic方式	Doctor car方式
概念	早期病院搬送	早期治療開始
医療行為	制限あり	制限なし
法的規制	あり	なし
治療原則	対症処置が主体	高度な処置が可能
薬物投与	制限あり	制限なし
現場時間	短い(30分以下)	長い(大体30分以上)
経費	安い、経済	高い、不経済
出動	簡単	難しい

プレホスピタルケアシステムで選別搬送として日本は経済的で安上がりだが、救命救急士が現場で心停止の確認(死亡確認)が不能や、救急救命士が行う医療行為に対する責任は誰が負うか、医療技術水準の維持など、現場で選別搬送(triage)の質的内容の判定(無意味だったり、免罪符的な搬送だったり)などは解決すべき課題であると思う。尚救急医療体制のコントロール下で如何に傷病者を一刻も早く「適切」な救急医療機関に搬送することと、救命のための搬送ではなく自己免責のための病院間搬送を減少することを課題として検討中である。中国のDoctor car方式は人的資源の費用が相対的に低いので、総合的なコストは低く他国より優位である。しかし、都市によって多種多様なプレホスピタルケアシステムを持って現状から今後如何にこれらの異なるシステムを有機的に連携させる救急医療体制を構築が課題である。そして、小都市及び農村の救急医療体制問題はなかなか難しいと思う。

プレホスピタルケアシステムに関しては、日本では尤も三次救急医療は設備、人員などの配備がほぼ完璧である、これも日本救急医療の最後の砦である。こちらは救急というよりはむしろICU管理というイメージ(ある程度パターン化)が強い。中国は公立病院であるため救急部は常に軽視され孤立している状態で、設備と医師の増加はもちろん、他の方面でもほとんど整備されない(よろず屋といわれる)。(日本では私立大学が経済利益のため積極的に救急センターを設立し、国立大学の救急部より発達している原因ともおもわれる)。このような状態で高度な診療の提供は不可能であり、救急医療へのICUのバックアップ体制が必要と思う。及び研修医の診療制度は、救急医療が複数科にまたがる事が多く各分野の専門医が自分の領域に関与してほしくないこともあり、研修医がジレンマに陥ると思う。多発外傷に対して複数科の専門医による総合診療が必要であるが各診療科の優秀な技術が発揮できなくなり、系統化された治療に到達できない。救急患者を多角的に診られるよう目下全科医師(総合診療科の医師)を養成している。

救急医療情報システムは日本で広域情報網と中毒情報センターを応用して有機的に円滑に連携運用されている;中国では今まで局域救急網あるのみ、中国の救急医療の実状に合った広域救急システムの整備を進めている。

#### 【結語】

以上、日中の救急医療体制の現状を比較しながら、将来中国で救急医療体制が徹底的改革が行われるであろう、医療体制の不足面に関する私見を述べてみた。実は救急医療体制の問題は医療全体の体制の縮図といってもよい。医療システムは各国それぞれ異なり、それぞれの医療システムが問題を抱えている。救急医療は救命第一であるが、如何に経済効率の良い救急体制を構築するかは重要な課題であり、今後実り多い議論が行われることを期待している。いずれも一つの体制が固定化しているものではなく、いずれも救急業務の拡大が必要であることが明らかになった、国家の経済、都市の規模、地域社会の救急需要と供給体制に見合って最善の方式となるべく、常に変化、進歩していくべきものと考えられる。

## 【参考文献】

- 1) 厚生省：救急医療対策事業実施要綱、1997
- 2) 李国慶：我国医療救済体制存在の問題、中国急救網 10.14.2003
- 3) 救急業務高度化推進委員会：救急業務高度化推進委員会報告書、2001
- 4) 救急救命士の業務のあり方等に関する検討会：救急救命士の業務のあり方等に関する検討会報告書、2002
- 5) 厚生科学研究報告、「三次救急医療施設における医療情報データベースの基盤整備と二次医療体制の確立と評価方法の開発に関する研究」平成13年度版、2002
- 6) 島崎修次ら：「わが国の救急医療体制」診断と治療 91：3～9 2003
- 7) 邵孝鉄、蔣朱明：「急診医学」第3版上海、上海科学技術出版社、2002
- 8) 厚生科学研究報告、「三次救急医療施設における医療情報データベースの基盤整備と二次医療体制の確立と評価方法の開発に関する研究」平成13年版、2002
- 9) 陳国偉：現代急診内科学、第3版、広州：広東科技出版社、1999
- 10) 吉岡敏治：「救急医療システムと情報」総合臨床 53：623～626 2004
- 11) 日本中毒情報センター：1992年度受信報告、中毒研究、6：295～314、1993

注：本研究は、『第15回日本医科大学外国人講演会』と『第55回東京地方救急医学会』にて口演発表、『日本医科大学雑誌』と『日本救急医学会関東地方会雑誌』（投稿中）に掲載

作成日：2005年3月10日

—日中医学協会助成事業—  
日本医科大学付属第二病院救命救急部における  
一年間病院外心肺停止症例の検討

研究者氏名 張 海濤  
中国所属機関 中国山西省長治市第二人民病院救命救急部  
日本研究機関 日本医科大学付属第二病院救命救急部  
指導責任者 教授 黒川 顕  
共同研究者名 上田康晴, 唐木千晶, 牧真彦, 望月徹, 畝本恭子

#### Abstract

病院外心肺停止症例 (Out-of-Hospital Cardiopulmonary Arrest : OHCPA) の心拍再開率と完全社会復帰率の向上の方策を検討した。2003年10月1日～2004年9月31日までOHCPA症例に至った74例につき、bystander CPR (bystander Cardiopulmonary Resuscitation)、除細動器使用の有無、搬送時間と心拍再開率、完全社会復帰率及び死因 (病因) 推測を調査した。結果は循環器疾患が55.4%と最多であり、bystander CPR 施行した症例が心拍再開率57.1%、完全社会復帰率14.3%;未施行の症例が心拍再開率20%、完全社会復帰率0%、有意差は認められた;除細動器使用した心拍再開率62.5%、未使用の症例が心拍再開率21.2%、有意差は認められた;搬送時間は心拍再開率と有意差が認められた。

**Key Words : OHCPA bystander CPR 除細動器 心拍再開率 完全社会復帰率**

#### はじめに

近年医学短年月の間に驚く進歩と発展を遂げてきたが、生活環境の変化は疾病構造を大きく変えてしまう、なかでも突然死の増加が注目を引き起される、同時に大きな社会問題である、尤も働き盛りを失う家族の悲しみも言葉でも話せない。1999年アメリカにCPAは約22万5千人で、総死亡率の12%<sup>2)</sup>。それに対する蘇生成功率は2~5%しかない、なかでも社会復帰率は非常に低いと言われている。だからOHCPAの社会復帰率を改善することは救急医療の重要な分野である。今回文献の検索と日本医科大学付属第二病院救命救急部の症例に通じて検討したい、症例を作成し記録はUtstein様式で使用している。本検討の目的は当救命救急部の来院時心肺停止症例を対象としてretrospective studyを行い、心拍再開率と完全社会復帰率の向上の道を摸索することにする。

#### 対象及び方法

2003年10月1日から2004年9月31日まで一年間にOHCPAを当院救命救急部に受診した症例とした、Utstein様式記録を採用して各症例救急医師によるOHCPAを判断した。なお記録事項はA:氏名、性別、生年月日、来院日期、B:覚知、現着、現発、病着の時間、C:現場、搬送中及び病着後のバイタルサイン、D:bystander CPRと除細動器使用の有無、E:現病歴、既往歴、病因推測など。検定は $\chi^2$ -test及びU-testを用い、 $P<0.05$ をもって有意差が認められた。

#### 結果

今回の検討対象は74例

1)性別:男性44例(57.1%) 女性30例(42.9%)

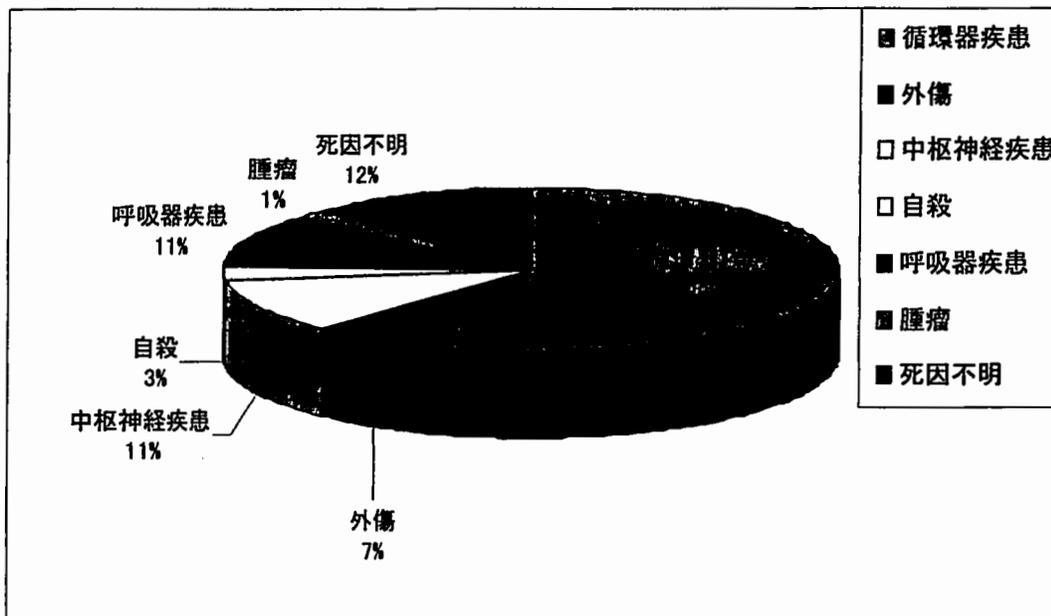


図1 OHCPAの原因傷病

2)年齢：10ヶ月～98歳、平均年齢は68歳

3) bystander CPRの有無：bystander CPR 施行した14例のうち8例心拍再開 (57.1%)、2例完全社会復帰 (14.3%)、bystander CPR 施行しなかった60例のうち心拍再開12例 (20%)、完全社会復帰 (0%)、有意差が認められた ( $0.005 < P < 0.01$  ;  $P < 0.005$ )

4)除細動器使用の有無：除細動器を使用した8例のうち心拍再開5例 (62.5%)、除細動器未使用66例のうち心拍再開14例 (21.2%)、有意差が認められた ( $0.01 < P < 0.025$ )

5)搬送時間：搬送時間は23.86±7.42分であった、心拍再開率搬送時間と有意差が認められた ( $P < 0.05$ )、経時的に心拍再開率は低下である。

6)病因(死因)推測(図1)：循環器疾患は41例 (55.4%)、外傷5例 (6.75%)、中枢神経系疾患8例 (10.8%)、自殺2例 (2.7%)、呼吸器疾患8例 (10.8%)、腫瘍1例 (1.35%)、死因不明9例 (12.2%)

**考察：**

1. bystander CPRの有無：OHCPAの予後に対し検討はbystander CPRの重要性を示唆する。心原性疾患有無にかかわらず、bystander CPRは早ければ早いほどCPRの反応は良好である。2000年8月22日、米国心臓協会(AHA)は心臓蘇生法(CPR)に関するAHA Guidelinesを発表した、一般市民に対して心停止半断には簡単化になり(例えば：頸動脈触知が廃止など)、短時間のうちに心肺蘇生術が行える<sup>2)</sup>。ニューヨーク市では目撃のあるOHCPAに対してbystander CPRが施行される率は32.0～40.0%であり<sup>3)4)</sup>。本検討はbystander CPRの有効性が認められた。
2. 除細動の有無：突然死の多くは心臓の不整脈によって起こる、80%以上の突然死者は非医療機関で発生するので、非医師によるAED使用が重要不可欠であると同時に最も効率的でさえある<sup>1)</sup>。AHAはどんな場所でも心肺停止に陥ってから、除細動までの時間が4～5分以内になるよう計画されるのが望ましいとしている<sup>2)</sup>。除細動が1分間遅れることに、除細動の成功率は7～10%ずつ低下します。こういった、AEDの普及結果、心停止が目撃されて3分以内に除細動が行えた患者の74%が助けたったという報告がある<sup>5)</sup>。本検討は完全社会復帰2症例がCPR5分以内で除細動をした。
3. 病因(死因)：監察医務院で検死された326例を含めたOHCPA症例431例での心疾患は47.1%を占め、また検死症例の臨床診断との不一致は40.5%に及ぶと報告している<sup>6)</sup>。本検討では循環器疾患の占める割合が監察医務院で検死されたより高い結果となったが、理由としては本検討での診断が臨床診断(間接推測)していた。

**結論：**

当救命救急部における一年間OHCPA74症例を統計的に検討した、bystander CPRと除細動による心拍再開率と社会復帰率改善は認められた。搬送時間は心拍再開率と有意差が認められて時間因子の重要性が示唆された。

**参考文献：**

- 1). 循環器病の診断と治療に関するガイドライン (2001~2002 年度合同研究班報告) : 自動体外式除細動器 (AED) 検討委員会報告書、日本における非医師への AED 導入実施に向けた検討報告、
- 2). American Heart Association in Collaboration with ILCOR: The automated external defibrillator: Key link in the chain of survival. *circulation* 10r:I-60-I-70. 2000
- 3). Lombardi G, Gallagher J, Gennis P: Outcome of out-of-hospital cardiac arrest in New York city. *JAMA*, 1994;271:678~683
- 4). Kass LE, Eitel DR, Sabulsky NK, et al: One-year survival after prehospital cardiac arrest : the Utstein style applied to a rural-suburban system. *Am J Emerg Med*, 1994;12:17-20
- 5). Kloeckw, Cummins Ro, Chamberlain D, et al: Early defibrillation: An advisory statement from the advanced life support working group of the international liaison committee on resuscitation. *circulation* 95:2183~2184. 1997
- 6). 松田環 : 救急救命士制度運用後の病院外心肺停止例の検討. *JJAAM* ; 1995 : 240~252

作成日 : 2005 年 3 月 10 日

財団法人日中医学協会  
2004年度共同研究等助成金—在留中国人研究者—報告書

2005 年 3 月 10 日

財団法人 日中医学協会 御中

貴財団より助成金を受領して行った研究テーマについて報告いたします。

添付資料： 研究報告書

中国人研究者名： 譚 新



指導責任者名： 内山 真 職名： 部長

所属機関名： 国立精神・神経センター 精神保健研究所  
〒 272-0827

所在地： 千葉県市川市国府台1-7-3

電話： 047-375-4756 内線： \_\_\_\_\_

1. 助成金額： 60万 円

2. 研究テーマ

ヒト睡眠生体リズム障害の病態と治療予防法開発に関する基盤研究

3. 成果の概要 (100字程度)

今回の結果から、特に睡眠の問題を持たない健康成人32名において、朝型傾向群と夜型傾向群によって、概日リズムと睡眠との位相関係が異なることが示唆された。これはヒトの睡眠覚醒リズム障害の病態と治療法開発に非常に役に立つ基礎な所見である。

4. 研究業績

(1) 学会における発表  無 ・  有 (学会名・演題)

日本睡眠学会で、「暗条件下のメラトニン分泌リズムと睡眠習慣の関係」

日本時間生物学会で、「概日リズムと睡眠との位相関係」

(2) 発表した論文  無 ・  有 (雑誌名・題名)

## ヒト睡眠生体リズム障害の病態と治療予防法開発に関する基盤研究

### 概日リズムと睡眠との位相関係

研究者氏名 譚 新

中国所属機関 西安交通大学 第一付属病院 精神科

日本研究機関 国立精神・神経センター 精神保健研究所 精神生理学

指導責任者 部長 内山 真

共同研究者 田ヶ谷浩邦<sup>1)</sup>、尾崎章子<sup>1)</sup>、渋井佳代<sup>1)</sup>、鈴木博之<sup>1)</sup>、  
李嵐<sup>1)</sup>、有竹清夏<sup>1)</sup>、亀井雄一<sup>2)</sup>

1) 国立精神・神経センター 精神保健研究所 精神生理学

2) 国立精神・神経センター 国府台病院 精神科

#### 要旨

規則正しい生活を送っている健常成人 32 名(男性 21 名, 女性 11 名, 平均年齢  $22.56 \pm 0.62$  歳)を対象とした。活動量測定より習慣的起床・就床時刻を求めた。24 時間の断眠後、10 分間の睡眠区間と 20 分間の覚醒区間を繰り返す超短時間睡眠覚醒スケジュール法 52 回(26 時間)を行い、客観的眠気の日内変動を求めた。この 26 時間の間、30 分毎に唾液中のメラトニン分泌量を測定し、メラトニンリズムを求めた。客観的眠気出現時刻は被験者各個人のピークの 50%、10%を上回る時刻とした。朝型—夜型質問紙により朝型群(11 人)、中間型(10 人)と夜型(11 人)三群に分けた。

習慣的起床時刻、メラトニン分泌終了時刻、メラトニン分泌開始時刻、客観的眠気出現時刻、習慣的就床時刻ともに朝型は夜型と比べて有意に早かった。夜型の習慣的起床時刻からメラトニン分泌開始時刻までの時間 ( $15.2 \pm 0.3$  時間)ならびに客観的眠気出現時刻までの時間 ( $16.2 \pm 0.5$  時間)ともには朝型(各  $14.3 \pm 0.3$  時間、 $14.4 \pm 0.4$  時間)より有意に長かった。夜型の習慣的就床時刻はメラトニン分泌開始時刻後  $1.6 \pm 0.3$  時間で、客観的眠気出現時刻後  $0.6 \pm 0.5$  時間であった、両方ともに朝型(各  $2.9 \pm 0.3$  時間、 $2.8 \pm 0.4$  時間)より有意に短かった。

今回の結果から、特に睡眠の問題を持たない健常成人においても朝型と夜型によって、概日リズムと睡眠との位相関係が異なることが示唆された。

**Key word:** メラトニンリズム, 朝型—夜型, 習慣起床時刻, 客観的眠気

#### 緒言:

ヒトは他の哺乳類と同様に、生物時計によるおよそ 24 時間周期の睡眠覚醒サイクルを繰り返す。夜暗くなると自然と眠気が出現して就床し、そして眠り、朝明るくなると自然と目覚め起床するリズムを持つ。ひとの 1 日の中の行動特性は昼行性哺乳類に共通したものであるが、早寝早起きで心身の活動のピークが 1 日の早い時刻にあるもの、と宵っぱりの朝寝坊で心身活動のピークが 1 日の遅い時刻にあるものがあり、こうした特性を朝型、夜型、又は時間特性と呼ぶ。こうした朝型—夜型の特性を調べるために、Home と Ostberg は 19 の具体的質問により朝型—夜型の傾向を抽出する朝型—夜型質問紙(MEQ)を開発した(1)。

メラトニンは概日リズムの指標としてよく用いられる。朝型ではメラトニンの分泌開始終了時刻とも夜型よりも早いと報告されている(2, 3)。さらに、いくつかの自覚的覚醒度や作業課題遂行能力を用いた研究では(4)、朝型で

はこれらのピークが1日の早い時期にあることが報告されている。しかし、こうした朝型-夜型における睡眠時間帯の違いの背景には、職業に就いているかなどの社会的な因子や性格などの関与も当然考えられる。例えば、職業的に早く起きる必要のある人は朝型になりやすい可能性がある。また、朝型には内向的性格の人が多く、夜型には外向的性格の人が多いという報告もある(5)。

一方で、日常生活における習慣的起床・就床時刻、すなわち睡眠習慣は、個人の時間特性の違いに関わらず、仕事や学校などの社会的スケジュールにより従って、通常は決められている。

今回我々は、著しい朝型または夜型傾向を示さない健康成人において、睡眠習慣と、メラトニンリズムおよび客観的眠気の日内変動を測定した。これらの関係を明らかにするとともに、朝型-夜型傾向がこれらの指標に与える影響を検討した。

#### 研究対象と方法：

規則正しい生活を送っている健康成人32名(男性 21名, 女性 11名, 平均年齢 22.56±0.62 歳, 朝型夜型スコア(MEQ)30-70)を対象とした。研究に参加するにあたり、十分な説明を行い、書面による同意を得た。睡眠習慣が規則的であることを確かめるため、問診により不眠などの睡眠障害がないこと、中枢神経に作用する薬物を服用していないことを確認した。さらに、2週間以上にわたる睡眠日誌(毎日の就寝、入眠、覚醒、離床時刻を記入)と携帯型活動量測定装置(アクチグラフ、AMI 社製)を用いた連続的な活動量測定により睡眠習慣を確認した。

実験の1週間前より規則正しい生活を送らせた。携帯型活動量測定装置を用いて、毎日の就床・起床時刻を求めた。実験1日目は自宅において各人の習慣的起床時刻に起床させ、16時までに研究室に集合させた。簡単な健康に関する問診の後、携帯型活動量測定装置を用いて、1分間ごとの非利き手の活動量を連続的に測定し始めた。21時より、10lux以下の暗条件で実験実施者による監視のもと、座位で安静覚醒を保持させ翌朝まで断眠させた。この時、液晶テレビ、読書、手作業などは許可した。

2日目の朝、電極装着を行い、午前9時から3日目の午前11時まで26時間にわたる超短時間睡眠・覚醒スケジュール法(10分-20分法:30分を1試行とし、10分間シールドルーム内で安静臥床させる睡眠区間と、20分間実験室において座位安静を保持させる覚醒区間とに分けた)で脳波(O1、C3、C4)を測定した。睡眠区間の10分間の脳波記録は睡眠段階の国際分類に従って30秒ごとに段階判定を行い、睡眠段階2, 3, 4, REMの合計をもって1試行の睡眠傾向とした。実験中、室温は24℃で一定とし、実験室内は10lux以下の低照度に、脳波測定中のシールドルーム内は1lux以下に保った。2時間ごとに150kcalの食事と約100-150mlのカフェインを含まないノンカロリーの飲み物を与えた。30分間隔で唾液を採取した。Radiomunoassayキット法でメラトニン値を測定し、各個人のピークを100%とする相対値に変換した。なお女性では、黄体期に昼間の睡眠傾向が上昇するという、性周期的変化を考慮して、卵胞期に実験を行った。

睡眠日誌を参考に、実験直前までの5日間の活動量測定結果から、日ごとの就床及び起床時刻を求め、中央値をその対象者の習慣的起床及び起床時刻とした。同様にして、入眠時刻と覚醒時刻から5日間の睡眠時間を求め、その中央値を習慣的睡眠時間とした。実験中のメラトニン分泌量のピークを100%とし、分泌量が10%を上回る時刻をメラトニン分泌開始時刻とし、10%を下回る時刻をメラトニン分泌終了時刻とした。10-20分法における客観的眠気出現時刻は、各試行ごとで得られた睡眠傾向の値とその前後の試行で得られた睡眠傾向の値を平均し、移動平均のカーブを求め、カーブが低値を示した後、5分を超えた時刻を客観的眠気出現時刻とした(図1)。

MEQの得点により朝型(51-70点, n=11)、中間型(46-50点, n=10)、夜型(31-45点, n=11)を3群に分けた。習慣的起床および起床時刻、メラトニン分泌開始および終了時刻、客観的眠気出現時刻はMann-WhitneyのU検定を行った。習慣的起床および起床時刻からメラトニン分泌開始、終了時刻、客観的眠気出現時刻までの間隔に

についても Mann-Whitney の U 検定を行った。有意水準は  $p < .05$  とした。

図 1

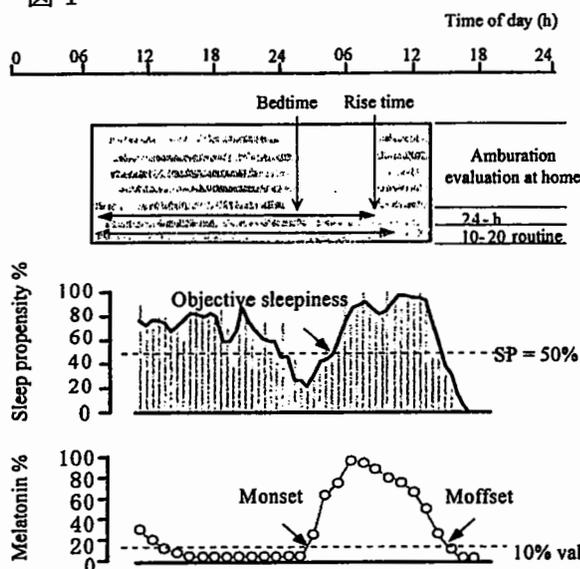
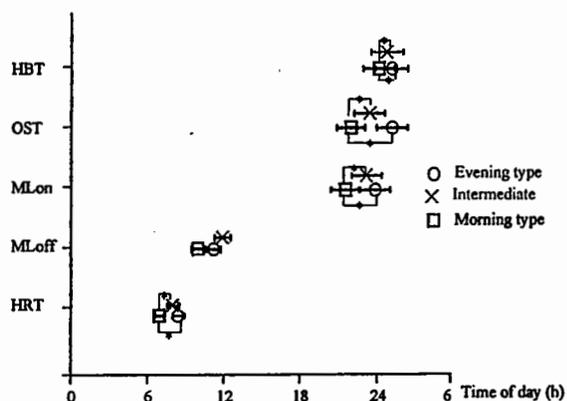


図 2



**結果:**

習慣的起床時刻(HRT)、メラトニン分泌終了時刻(MLOff)、メラトニン分泌開始時刻(MLon)、客観的眠気出現時刻(OST)、習慣的就床時刻(HBT)ともに朝型は夜型と比べて有意に早かった(図2)。

表を示したように、習慣的起床時刻からメラトニン分泌開始時刻までの時間と客観的眠気出現時刻までの時間間隔ともに夜型は朝型より有意に長かった。メラトニン分泌開始時刻及び客観的眠気出現時刻から習慣的起床時刻までの時間間隔は、夜型は朝型より有意に短かった。

睡眠の長さは、3群間に有意差は認められなかった。メラトニン分泌の持続時間(分泌開始から終了までの時間)について、平均  $12.0 \pm 0.2$  時間であった、夜型は中間型、朝型より有意に短かった。

	全員平均	夜型	中間型	朝型	
HRT-MLon	$14.69 \pm 0.18$	$15.19 \pm 0.25$	$14.70 \pm 0.33$	$14.31 \pm 0.31$	E > M
MLOff-HRT	$2.69 \pm 0.26$	$2.31 \pm 0.43$	$3.32 \pm 0.50$	$2.50 \pm 0.43$	
HRT-OST	$15.15 \pm 0.30$	$16.16 \pm 0.46$	$14.88 \pm 0.54$	$14.38 \pm 0.44$	E > M
MLon-HBT	$2.12 \pm 0.24$	$1.56 \pm 0.34$	$1.92 \pm 0.50$	$2.85 \pm 0.34$	E < M
HBT-MLOff	$14.16 \pm 0.32$	$14.44 \pm 0.48$	$13.30 \pm 0.73$	$14.65 \pm 0.40$	
HBT-OST	$1.70 \pm 0.35$	$0.59 \pm 0.54$	$1.74 \pm 0.71$	$2.78 \pm 0.44$	E < M
ML duration	$11.96 \pm 0.23$	$11.12 \pm 0.30$	$12.62 \pm 0.48$	$12.20 \pm 0.30$	E < I, E < M
Sleep duration	$7.15 \pm 0.17$	$7.25 \pm 0.31$	$7.38 \pm 0.36$	$6.84 \pm 0.19$	

**考察:**

今回の研究で、極端な朝型・夜型を含まない健康成人において、朝型、中間型と夜型三群間の、社会的スケジュールに基づく習慣的就床および起床時刻、メラトニン分泌リズム、客観的眠気の日内変動との位相関係を調べた。

朝型は夜型よりメラトニン分泌開始及び終了時刻、習慣的就床及び起床時刻、客観的眠気出現時刻が早かった。これは先行研究と一致した。さらに、習慣的就床および起床時刻からメラトニン分泌開始までの間隔については先行研究では起床時の高照度光暴露からメラトニン分泌開始までおよそ 14 時間と報告されている(7)、今回の結果は習慣的起床時刻からメラトニン分泌開始時刻まで平均 14.69 時間であったが、夜型は朝型より長かった。夜型は朝型より起きる時間が遅く、もっと照度の高い太陽光が浴びられるし、メラトニンリズムの前進程度は朝光の強さに従うならば(8, 9)、夜型での間隔は短くなるはずである。今回の結果から、この朝型—夜型における就床・起床時刻の違いはメラトニンリズムの位相の違い、すなわち体質的な特性を表すものと考えられる。

習慣的就床時刻はメラトニン分泌開始時刻平均 2.12 時間後で、朝型は夜型よりもこの間隔が長かった。つまり、朝型は夜型よりさらにメラトニンリズムの遅い時間帯に就床していることになる、これはメラトニンリズムに比べて、ライフスタイルなどの社会的な要因の影響が強いことを示唆するものである。社会的なスケジュールをあわせる為に、朝型ほど自分の睡眠時間帯を大きく調整していることが明らかになった。

朝型—夜型に関して自覚的覚醒度や作業課題遂行能力を用いた研究によると朝型ではこれらのピークが1日の早い時期にあることが報告されている。我々の知見は朝型—夜型特性に応じて、有効な睡眠時間や、作業時間を予測する、個人のことに非常に役立つと思われる。

#### 参考文献:

- 1) Horne JA, Ostberg O. A self-assessment questionnaire to determine morningness-eveningness in human circadian rhythms. *Int J Chronobiol* 1976;4:97-110.
- 2) Lavie, P. and Scherson, A., Twenty-four-hour structure of sleepiness in morning person investigated by ultrashort sleep-wake cycle. *Sleep*, 12 (1989) 522-528.
- 3) Gibertini, M., Graham, C and Cook, M.R., Self-report of circadian type reflects the phase of the melatonin rhythm. *Biol. Psychol.*, 50 (1999) 19-33.
- 4) Duffy JF, Dijk DJ, Hall EF, Czeisler CA(1999): Circadian Rhythms and Morningness-Eveningness. *Journal of Investigative Medicine* Vol.47, No.3, 1999 Marth, 141-150.
- 5) Colquhoun and Folkard,1978; Ishihara et al., 1987; Patkai, 1971 b: 朝型と夜型、千葉喜彦ら編、時間生物学ハンドブック、朝倉書店
- 6) Lavie P and Scherson A (1981) Ultrashort sleep-walking schedule. I. Evidence of ultradian rhythmicity in "sleepability". *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 52(2):163-74.
- 7) Alfred J Lewy, Saeeduddin Ahmed, Jeanne M. Latham Jackson, et al (1992) Melatonin shifts human circadian rhythms according to a phase-response curve. *Chronobiology International*, Vol9 No5: 380-392.
- 8) Boivin DB, Duffy JF, Kronauer RE, Czeisler CA. Dose-response relationships for resetting of human circadian clock by light. *Nature* 1996, 379: 540-2.
- 9) Christian Cajochen, Jamie M. Zeitzer, Charles A. Czeisler, Derk-Jan Dijk. Dose-response relationship for light intensity and ocular and electroencephalographic correlates of human alertness. *Behavioural Brain Research* 2000, 115: 75-83.

注: 本研究は、2004年7月2日「日本睡眠学会」、と2004年11月12日「日本時間生物学会」で発表しました。  
2005年3月3日

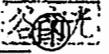
財団法人日中医学協会  
2004年度共同研究等助成金－在留中国人研究者－報告書

平成 17 年 3 月 10 日

財団法人 日中医学協会 御中

貴財団より助成金を受領して行った研究テーマについて報告いたします。

添付資料： 研究報告書

中国人研究者名： 谷 文光   
指導責任者名： 遠藤 直人 職名： 教授  
所属機関名： 新潟大学大学院医歯総合研究科  
〒951-8510  
所在地： 新潟県新潟市旭町通 1-757  
電話： 025-227-2272 内線： \_\_\_\_\_

1. 助成金額： 60万 円

2. 研究テーマ

悪性線維性組織球腫における新しい細胞株の樹立と遺伝子異常の検索

3. 成果の概要 (100字程度)

悪性線維性組織球腫 (MFH) は組織発生不明であるが、軟部肉腫の中で最多でありかつ高率に転移をきたす予後不良の疾患である。本腫瘍の遺伝子異常検討し、診断・治療に有用なデータを得ることが研究の目的である。私達は新たな粘液型 MFH 細胞株を樹立した。染色体分析による 17 番染色体と 22 番染色体の相互転座を解明した、隆起性皮膚線維肉腫 (DFSP) でこのような染色体の相互転座が報告されている。CGH 法を用いて 1q12-23 と 8q13-qter 領域にコピー数の増加を検出した。9p21 と 13q10-q31 の欠失を見出した。RT-PCR 法を用いて DFSP にみられる融合遺伝子 (COL1A1-PDGFB) の存在を検討したが、検出不能であった。従って、NMFH-1 細胞の組織発生は DFSP とは異なっていると考えられる。

4. 研究業績

(1) 学会における発表 無 ・  (学会名・演題)

学会名： 51st Annual Meeting of the Orthopaedic Research Society (ワシントン DC)

演題： EXPRESSION OF THE COXSACKIEVIRUS AND ADENOVIRUS RECEPTOR IN  
SOFT TISSUE TUMORS

(2) 発表した論文  無 ・ 有 (雑誌名・題名)

## 悪性線維性組織球腫における新しい細胞株の樹立と遺伝子異常の検索

研究者氏名 谷 文光  
中国所属機関 ハルビン医科大学附属第一病院整形外科  
日本研究機関 新潟大学大学院医歯総合研究科整形外科学分野  
指導責任者 教授 遠藤 直人  
共同研究者名 生越 章、川島 寛之、工藤 尚子

### 要 旨：

悪性線維性組織球腫 malignant fibrous histiocytoma (MFH) は発生組織不明であるが、軟部肉腫の中で最多でありかつ高率に転移をきたす予後不良の疾患である。本腫瘍の遺伝子異常検討し、診断・治療に有用なデータを得ることが研究の目的である。私達は新たな粘液型 MFH 細胞株を樹立した。染色体分析による 17 番染色体と 22 番染色体の転座を解明した。隆起性皮膚線維肉腫 dermatofibrosarcoma protuberance (DFSP) でこのような染色体の転座が報告されている。CGH 法を用いて 1q12-23 と 8q13-qter 領域にコピー数の増加を検出した。9p21 と 13q10-q31 の欠失を見出した。RT-PCR 法を用いて DFSP にみられる融合遺伝子 (COL1A1-PDGFB) の存在を検討したが、検出不能であった。従って、NMFH-1 細胞の組織発生は DFSP とは異なっていると考えられる。

**キーワード：**粘液型、悪性線維性組織球腫、細胞株、隆起性皮膚線維肉腫、融合遺伝子、COL1A1-PDGFB

### 結 言：

悪性線維性組織球腫 malignant fibrous histiocytoma (MFH) は組織発生不明であるが、軟部肉腫の中で最多でありかつ高率に転移をきたす予後不良の疾患である。腫瘍を特徴づけている組織成分によって、花むしろ多形型、粘液型、巨細胞型、炎症型に分類される。今まで多くの MFH 細胞株が樹立されてきたが、その多くは花むしろ多形型であり、粘液型 MFH 細胞株はきわめて少なく、かつ遺伝子異常の詳細な検討もきわめて少ないである<sup>1-3</sup>。我々は 粘液型 MFH 細胞株の樹立に成功し、この細胞の遺伝子異常について検討した。

### 対象と方法：

#### 1：症例

89 歳男性の左側膝部に発生した粘液型 MFH から手術時に組織を採取し、培養系に移した。10%牛胎仔血清添加した RPMI1640 培養液を用い培養した。全ての培養は 37 度、5%CO<sub>2</sub> インキュベータ中で行い、培地は三日毎交換した。

#### 2：RNA 抽出と RT-PCR

NMFH1 細胞株から TRIzol (Gibco BRL, Rockville, MD) 試薬を用いて total RNA を抽出した。抽出した RNA から Oligo(dT)15 プライマー (Promega, Madison, WI) を用いて逆転写酵素により cDNA を作製した。既報の融合遺伝子 (COL1A1-PDGFB) のプライマーで PCR を行った<sup>4</sup>。

### 3 : Spectral Karyotyping (SKY) 核型分析

SKY は Applied Spectral Imaging (ASI) 社の SKY キットを用いて解析した。プローブカクテルを 37 度で 2 日間、分裂期の細胞にハイブリダイズし、SKY のフィルターを通して観察、Spectracube (ASI 社) で解析した。同時に DAPI 染色の画像も取り込み、得られるバンドパターンにより切断点も同定した。

### 4 : Comparative Genomic Hybridization (CGH) 核酸分析

NMFH1 細胞からゲノム DNA を抽出して、CGH 法は既報の方法で行った<sup>5</sup>。腫瘍 DNA は fluorescein-12-dUTP (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) でニックトランスレーション法を用いて標識した。正常リファレンス DNA は Spectrum Red direct-labeled male total human DNA (Vysis, Downers Grove, IL, USA) です。標識した腫瘍 DNA と正常 DNA は同量 (800 ng) ずつ Cot-1 DNA (20 ug) (GIBCO-BRL, Gaithersburg, MD, USA) と共にエタノール沈殿し、ハイブリダイゼーションバッファーに溶解した。ハイブリダイゼーション後洗浄し、染色体を同定するために 4', 6' -diamino-2-phenylindole (DAPI; Sigma, St. Louis, MO, USA) を用いて対比染色をした。蛍光ハイブリダイゼーションシグナルと DAPI 染色パターンは高感度 MCD (monochrome charge-coupled device) カメラを装着した顕微鏡で取り込み、automated CGH analysis software (MetaSystems, Altusheim, Germany) を用いて解析を行った。

### 5 : ノードマウスへの移植

RPMI1640 培養液に浮遊している  $5 \times 10^6$  の NMFH1 細胞を 7 週齢の雌性ノードマウス (CB-17/Icr scid; Jel Clea, nInc., Osaka, Japan) の背部に皮下注射した。

## 結 果

### 1 : NMFH1 細胞株の樹立

初代培養から三週間に腫瘍細胞は単層に分布して、小紡錘形の単核細胞と多核巨細胞の二つ種類の細胞によって構成された。

### 2 : RT-PCR

NMFH1 細胞株で COL1A1-PDGFB 融合遺伝子を検出されなかった。

### 3 : SKY 法による解析

10 個核分裂中期 NMFH1 細胞を用いて SKY 分析を行った。染色体数は 84-94 であり、複雑な構造異常が見られた。染色体異常は以下のとおりである。

84-94 <4n>, XXY,-X[9], -Y[10], +1[6],add(1)(p11)[4],add(1)(q11)[2],add(1)(q11)[5], del(1)(q11)[3],-2[9],add(2)(q37)[10],add(2)(q37)[4],del(2)(q37)[2],-3[9],-3[4],add(3)(p11)[10],add(3)(p11)[9],add(3)(p11)[6],-4[10],-4[9],add(4)(q31)[7],-5[10],-5[10],del(5)(q11)[8],der(5)t(3;56)(p11;p15)[9],-6[10],-6[10],add(6)(p11)[6],del(6)(p12)[4],-7[10],der(7

)add(7)(p22)add(7)(q36)[10],-8[7],add(8)(p11)[10],add(8)(p11)[8],add(8)(q24)[10],add(8)(q24)[2],-9[9],del(9)(p11)x2[10],del(9)[8],-10[10],-11[10],-11[10],-11[3],-12[5],-13[9],add(13)(p11)[2],add(13)(p11)[4],add(13)(q34)[2],-14[10],-14[10],-14[9],+15[2],-15[4],i(15)(q10)[5],-16[10],-16[7],add(16)(q13)[8],del(16)(p11)[8],-17[8],add(17)(p11)[8],add(17)(p11)[2],del(17)(p11)[10],del(17)(p11)[9],del(17)(p11)[2],-18[10],-18[10],add(18)(q23)[8],add(18)(q23)[2],add(18)(q273)[7],-19[7],add(19)(p13)[9],add(19)(p13)[2],add(19)(q13)[8],add(19)(q13)[5],add(19)(q13)[4],-20[6],add(20)(q13)[9],add(20)(q13)[4],add(20)(q13)[2],-21[7],add(21)(q22)[10],+22[10],+22[2],+der(?)t(?;3)(?;p11)t(?;3)(?;p11)[6],+mar1[10],+mar2[10],+mar3[9],+mar4[10],+mar5[10],+mar6[10],+mar7[10],+10-14mar.

SKY 分析で mar7 は派生染色体 der(22)t(17;22)であると判明した。この染色体の転座変化は DFSP の染色体異に類似していた。

#### 4 : CGH 法による解析

NMFH1 細胞のコピー数の変化を検出した。有意な過剰を検出した領域は the p12-p22, 1q12-23, 5p, 7, 8q13-qter, 9q12-32, 11q13, 15, 17q23-qter, 18, 19p13.1, 20 であった。有意な欠失を検出した領域は 2q36-qter, 4q22-qter, 6q12-q16, 9p21-pter, 10p13-pter, 11q23, and 13q12 であった。しかし、高レベルのゲノム増幅の変化を検出しなかった。

#### 5 : ノードマウスの体内で腫瘍形成

NMFH1 細胞はノードマウスの体内で移植腫瘍を形成した。接種後の三週に触知可能な小結節を見られた、八週後に腫瘍の直径は 2cm になった。形成した腫瘍は、組織学的には典型的な粘液型 MFH の特徴を示した。

## 考 察

粘液性 MFH は粘液線維肉腫として成人軟部肉腫瘍群へ分類され、最も発生率が高い。組織学的には、樹立した細胞株は粘液性 MFH の特徴を示した。

MFH を含めて肉腫は 1q21-q22 と 8q 領域のコピー数の増加を認められることが多い<sup>6</sup>。今回の研究で用いた NMFH1 細胞株には 1q12-23 と 8q13-qter 領域にコピー数の増加を検出した。9p21 と 13q10-q31 の欠失は MFH の顕著なゲノム不均衡であることがわかった。

CGH 分析の結果は、NMFH-1 腫瘍細胞には MFH の典型的な分子特性があったのを明らかにした。この細胞株は、人間の粘液性 MFH について腫瘍起源の分子メカニズムに関する研究のために有益な材料となる。

COL1A1-PDGFB 遺伝子融合は隆起性皮膚線維肉腫(DFSP)でしばしばみられる。このキメラ遺伝子は 17q22 での COL1A1 と 22q13 での PDGFB が溶融したものであり、腫瘍の発生で重要な役割を果たすと信じられている<sup>4,7</sup>。現在まで若干の症例報告で、DFSP を母体として MFH が発生する例が知られている<sup>8,9</sup>。DFSP と MFH の両方が同じ発生組織を共有するとの仮説がなりたつわけである。SKY 分析は、NMFH-1 腫瘍細胞には t(17;22)があったのを明らかにした、しかし、RT-PCR を

用いて COL1A1-PDGFB 遺伝子融合の発現を調べが、腫瘍細胞には、この特定の融合遺伝子を検出なかった。この結果は、NMFH-1 細胞の組織発生は DFSP とは異なっていると考えられる。

**参考文献：**

- [1] Kanzaki T, Kitajima S, Suzumori T, Biological behavior of cloned cells of human malignant fibrous histiocytoma in vivo and in vitro. *Cancer Res* 1991;51: 2133-2137.
- [2] Iwasaki H, Isayama T, Ohjimi Y, Kikuchi M, Yoh S, Shinohara N, Yoshitake K, Ishiguro M, Kamada N, Enjoji M, Malignant fibrous histiocytoma: a tumor of facultative histiocytes showing mesenchymal differentiation in culture cell lines. *Cancer* 1992: 69: 437-447
- [3] Nakatani T, Marui T, Yamamoto T, Kurosaka M, Akisue T, Matsumoto K, Establishment and characterization of cell line TNMY1 derived from human malignant fibrous histiocytoma. *Pathol Int* 2001; 51: 595-602.
- [4] Wang J, Hisaoka M, Shimajiri S, Morimitsu Y, Hashimoto H: Detection of COL1A1-PDGFB fusion transcripts in dermatofibrosarcoma protuberans by reverse transcription-polymerase chain reaction using archival formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. *Diagn Mol Pathol* 1999, 8:113-119
- [5] Nishio J, Iwasaki H, Ishiguro M, Ohjimi Y, Nishimura N, Koga T, Kawarabayashi T, Kaneko Y, Kikuchi M. Establishment of a new human malignant fibrous histiocytoma cell line, FU-MFH-1: cytogenetic characterization by comparative genomic hybridization and fluorescence in situ hybridization. *Cancer Genet Cytogenet* 2003; 144: 44-51.
- [6] Nilsson M, Meza-Zepeda LA, Mertens F, Forus A, Myklebost O, Mandahl N. Amplification of chromosome1 sequences in lipomatous tumors and other sarcomas. *Int J Cancer* 2004; 109: 363-369.
- [7] Sandberg AA, Bridge JA. Updates on the cytogenetics and molecular genetics of bone and soft tissue tumors: dermatofibrosarcoma protuberans and giant cell fibroblastoma. *Cancer Genet Cytogenet* 2003; 140: 1-12.
- [8] Lopes JM, Paiva ME. Dermatofibrosarcoma protuberans. A histological and ultrastructural study of 11 cases with emphasis on the study of recurrences and histogenesis. *Path Res Pract* 1991; 187: 806-813.
- [9] Zámečník M, Michal M, Mukenšnábl P. Composite tumor consisting of dermatofibrosarcoma protuberans and myxofibrosarcoma. *J Cutan Pathol* 1998; 25: 445-449.

財団法人日中医学協会  
2004年度共同研究等助成金-在留中国人研究者-報告書

2005年02月25日

財団法人 日中医学協会 御中

貴財団より助成金を受領して行った研究テーマについて報告いたします。

添付資料： 研究報告書

中国人研究者名： 呂 剛 

指導責任者名： 牧野田 知 職名： 教授

所属機関名： 金沢医科大学産婦人科

〒 920-0293 石川県河北郡内灘町  
所在地： 大学字1丁目3番地

電話： 076-286-2211 内線： 3334

1. 助成金額： 600,000 円

2. 研究テーマ

卵巣局所でのインターロイキン-6の変動と黄体退行との関連について

3. 成果の概要 (100字程度)

本研究では、ヒト自然卵巣周期における IL-6 の卵巣内局在やその動態を詳細に検討するとともに、IL-6 のレセプターである gp130 および IL-6R $\alpha$  の局在部位を明らかにすることにより、IL-6 は退行期黄体においてオートクライン/パラクライン的に作用することで、卵巣機能調節に主要な役割を果たしている可能性が示唆された。

4. 研究業績

(1) 学会における発表 無 ・  (学会名・演題)

1 : 第56回日本産科婦人科学会総会学術講演会  
ヒト正常性周期における血清各種サイトカイン濃度の変動について  
—Stem cell factor (SCF)の重要性  
2 : 第57回日本産科婦人科学会総会学術講演会  
黄体の退行 interleukin-6 (IL-6)の関連性についての研究

(2) 発表した論文 無 ・  (雑誌名・題名)

金沢医科大学雑誌 第29巻第3号

卵巣局所でのインターロイキン-6の変動と黄体退行との関連について

## 卵巣局所でのインターロイキン-6の変動と黄体退行との関連について

研究者氏名 呂 剛  
中国所属機関 華中科技大学同済医科大学産婦人科  
日本研究機関 金沢医科大学産婦人科  
指導責任者 教授 牧野田 知  
共同研究者名 藤井 亮太, 楊賀来恵, 吉田 勝彦

### 要旨

【目的】 ヒト自然月経周期において卵巣局所でのインターロイキン-6 (IL-6) およびそのレセプター発現を分析することにより、卵巣機能調節における IL-6 の役割、特に黄体退行との関連について検討することを本研究の目的とした。

【方法】 正常月経周期を有する婦人科手術施行予定患者のうち、十分な説明のもと同意を得られた女性 37 名から卵巣組織の一部と血清を採取して以下の検討を各卵巣周期で行った。1. 血清中 IL-6 濃度の変動を ELISA 法により測定・検討した (n=37)。2. 卵巣組織中の IL-6 蛋白および mRNA の相対的発現量変化を、TaqMan RT-PCR 法 (n=37) および Western blot 法 (n=21) により検討した。3. 卵巣組織中の IL-6、gp130 および IL-6R $\alpha$  の局在を免疫組織染色法により検討した (n=8)。

【結果】 血清中 IL-6 濃度は、卵巣周期中に有意な変動を認めなかった。IL-6 mRNA の相対的発現量は、卵胞期卵巣組織 ( $1.547 \pm 0.937$ , n=18) および黄体期前中期黄体組織 ( $2.125 \pm 0.921$ , n=11) に比べ、黄体期後期黄体組織 ( $4.46 \pm 2.045$ , n=8) において有意に高かった (p<0.05)。さらに IL-6 蛋白の相対量も、卵胞期の卵巣組織 ( $0.751 \pm 0.049$ , n=8) や黄体期前中期の黄体組織 ( $0.752 \pm 0.104$ , n=6) と比較して、黄体期後期の黄体組織 ( $0.935 \pm 0.070$ , n=7) で有意に高値であった (p<0.05)。免疫組織染色において、IL-6 は主に黄体細胞と卵胞顆粒膜細胞で染色され、莢膜細胞の一部でも染色陽性であった。gp130 は黄体細胞、顆粒膜細胞および卵巣間質の血管内皮細胞で染色されていた。IL-6R $\alpha$  は黄体細胞、顆粒膜細胞および莢膜細胞で染色陽性であった。

【結論】 自然周期中のヒト卵巣において、IL-6 はおもに退行期黄体で産生されていることから、黄体退行機序に深く関与しているものと推測された。

### Key Words

サイトカイン (cytokine), インターロイキン-6 (interleukin-6; IL-6), 黄体退行 (luteolysis), 月経周期 (menstrual cycle), 卵巣 (ovary)

### 緒言

卵巣機能の制御には、視床下部-下垂体-卵巣系による内分泌的な調節機構以外に、卵巣局所におけるオートクライン/パラクラインなどの調節様式が知られるようになってきている。サイトカインは、この卵巣局所調節機構の中でも最も重要な因子の一つと考えられている(1-3)。サイトカインファミリーの一員であるインターロイキン-6 (IL-6) は、免疫担当細胞や線維芽細胞、血管内皮細胞など様々な部位で産生される(4)とともに、多様な機能を発揮する、いわゆる“多機能サイトカイン”の代表として知られている(5-7)。近年、IL-6 は内分泌系組織に対しても作用することが報告されている。卵巣においても、IL-6 が卵胞顆粒膜細胞培養系で産生されること(8-10)や、顆粒膜細胞のエストロゲン分泌能を抑制すること(11-13)、過排卵刺激ラットの卵胞顆粒膜細胞でアポトーシスを促進する(14)など、おもに卵胞顆粒膜細胞において IL-6 と卵巣機能調節との関与が示唆されている。さらに、IL-6 が作用発現するために必要なレセプターである gp130 および IL-6R は、ラット卵巣顆粒膜細胞(12)や妊娠黄体細胞(15)とともに発現が確認されている。これらの報告から、IL-6 は卵巣機能調節において重要な役割を担っているものと推測されるが、ヒト自然周期卵巣における IL-6 の主要な発現時期や部位は未だ明らかではない。

本研究では、ヒト自然卵巣周期における IL-6 の卵巣内局在やその動態を詳細に検討するとともに、IL-6 のレセプターである gp130 および IL-6R の局在部位を明らかにすることで、卵巣機能調節における IL-6 の主要な作用時期および役割を解明することを目的とした。

## 対象と方法

正順な月経周期 (28-35 日型) を有する婦人科手術施行予定患者のうち、十分な説明のもと同意を得られた女性 37 名から卵巣組織の一部と血清を採取して以下の検討を行い、IL-6 の卵巣周期による変化を解析した。

1. まず卵巣周期を患者の通常月経周期と最終月経開始日から推定される日数を基準に、ELFA 法で測定した患者血清中エストラジオール ( $E_2$ )、プロゲステロン (P)、卵胞刺激ホルモン (FSH)、黄体形成ホルモン (LH) 濃度を用いて、卵胞期 (n=18)、黄体期前中期 (n=11)、黄体期後期 (n=8) の 3 グループに区分した。卵胞期と黄体期の境界時期に関して、血清 P 値が 2.0 ng/ml 未満を卵胞期、それ以上を黄体期前期に分類し、黄体期中期と後期の区分は、血清  $E_2$  値が 80 pg/ml 以下の場合に黄体期後期へ分類した。さらに血清中 IL-6 濃度の変動を ELISA 法により測定・検討した (n=37)。
2. 卵巣組織中の IL-6 mRNA の相対的発現量および相対蛋白量変化を、TaqMan RT-PCR 法 (n=37) および Western blot 法 (n=21) により検討した。
3. 卵巣組織中の IL-6、gp130 および IL-6R $\alpha$  の局在を免疫組織染色法により検討した (n=8; 卵胞期卵巣 4 例、黄体期前中期卵巣 2 例、黄体期後期卵巣 2 例)。

尚、全てのデータは平均±標準偏差で表記し統計学的処理にはノンパラメトリック検定を使用した。多群間の比較には、Kruskal-Wallis test で群間差の有無を検定した後、Post-hoc test (Scheffe's F) で有意差検定を行った。2 群間の相関については、各群の正規性の有無を検定した後、Spearman's rank correlation coefficient で相関係数および有意差の有無を検定し、 $p < 0.05$  で有意差ありと判定した。

## 実験成績

卵胞期 (n=18, 39.4±8.8 歳)、黄体期前中期 (n=11, 40.2±9.5 歳) および黄体期後期 (n=8, 36.1±8.1 歳) の各卵巣周期における血清中 IL-6 濃度の平均はそれぞれ、卵胞期 5.221±1.746 pg/ml、黄体期前中期 5.105±1.735 pg/ml、黄体期後期 6.056±0.945 pg/ml であり、全卵巣周期期間において有意な濃度変化は認められなかった。

卵胞期、黄体期前中期および黄体期後期の各卵巣周期における卵巣組織 (卵胞または黄体組織) 中 IL-6 mRNA 相対的発現量の平均はそれぞれ、卵胞期 1.547±0.937、黄体期前中期 2.125±0.921、黄体期後期 4.464±2.045 であった。黄体期後期での IL-6 mRNA の発現は、他の卵巣周期での発現に比べて有意に高かった ( $p < 0.05$ )。一方、卵胞期と黄体期前中期との間には IL-6 mRNA の発現に有意な較差は認められなかった。尚、黄体期に属する 19 例全例について、黄体から産生される血清中  $E_2$  濃度と黄体組織中の IL-6 mRNA 発現量との相関を調べた結果、両者の間には強い負の相関が認められた ( $r = -0.7145$ ,  $p < 0.005$ )。

免疫沈降法および Western blot 法による解析の結果、対象とした卵巣組織検体全例で IL-6 に特異的な 20 kDa のバンドが検出された。このバンドは陽性対照として使用した recombinant human IL-6 で検出されたものと一致していた。また、滅菌水を用いた陰性対照では、この特異的バンドは検出されなかった。卵胞期 (n=8)、黄体期前中期 (n=6) および黄体期後期 (n=7) の各卵巣周期における卵巣組織 (卵胞または黄体組織) 中の相対的 IL-6 蛋白量の平均はそれぞれ、卵胞期 0.751±0.049、黄体期前中期 0.762±0.104、黄体期後期 0.935±0.070 であり、黄体期後期での IL-6 蛋白の発現は、他の卵巣周期での発現に比べて有意に高かった ( $p < 0.05$ )。一方、卵胞期と黄体期前中期の間には IL-6 蛋白の発現に有意な較差は認められなかった。尚、対象とした全例の IL-6 蛋白量と mRNA の相対的発現量を比較した結果、有意な正の相関が認められていた (n=21;  $r = 0.4909$ ,  $p < 0.05$ )。

免疫組織染色法による検討の結果、IL-6 はおもに卵胞顆粒膜細胞と黄体細胞に局在し、卵胞莖膜細胞でも一部染色陽性であった。さらに IL-6 の作用機序を調べるためにレセプター染色をおこなったところ、gp130 は卵胞顆粒膜細胞、黄体細胞および卵巣間質の毛細血管内皮細胞に局在していた。一方、IL-6R は卵胞顆粒膜細胞、莖膜細胞および黄体細胞で染色陽性であった。すなわちヒト卵胞顆粒膜細胞および黄体細胞には、IL-6、gp130、IL-6R $\alpha$  のいずれも全てが発現していた。

## 考察

ヒト卵巣機能調節における IL-6 の役割を解明するために、本研究では卵巣局所の IL-6 の動態について検討を進めた。その結果、IL-6 は卵胞期や黄体期前中期と比較して、黄体期後期に mRNA や蛋白の発現が最も活発であることが判明し、さらに IL-6 とそのレセプターである gp130 および IL-6R $\alpha$  の局在は、卵胞顆粒膜細胞と黄体細胞で一致していることが明らかとなった。

IL-6 がシグナル伝達をおこないその機能を発揮するためには、gp130 および IL-6R $\alpha$  という二種類のレセプターの存在が必須となる。IL-6 は IL-6R $\alpha$  が N 末端に結合し複合体を形成することで、細胞膜レセプターである gp130 を活性化することが可能となる。活性化された gp130 は、STAT3 (signal transducer and activator of transcription 3) /APRF (acute-phase response factor) 系と MAPK (mitogen-activated protein kinase) 系の二つの経路を介してシグナル伝達をおこなうことで、核内の標的遺伝子転写を調節し作用を発現すると考えられている(16-18)。これまで卵巣組織中の IL-6 レセプターに関する報告は、ラットなどの動物において顆粒膜細胞(12)や妊娠黄体細胞(15)で gp130 および IL-6R $\alpha$  の発現が示されていた。しかしヒト卵巣では、顆粒膜細胞で両レセプターの存在は指摘されていた(19)ものの、黄体細胞については、黄体化顆粒膜細胞で IL-6R $\alpha$  の発現が報告されている(8)だけであった。従って、黄体期後期のヒト退行期黄体細胞にも gp130 や IL-6R $\alpha$  が存在していることは、本研究によって新たに示されたといえる。

IL-6 と卵巣機能との関連を述べた既存の報告は、例えばヒト培養顆粒膜細胞で IL-6 添加により E<sub>2</sub> 産生能が抑制されること(19)や、ラット顆粒膜細胞培養系での IL-6 によるアロマトーゼ活性の阻害(12)、LH レセプター発現の減弱(20)、アポトーシスの誘導(14)など、主として卵胞顆粒膜細胞や黄体化顆粒膜細胞に対する抑制作用、すなわち卵胞期から黄体期前期にかけての卵巣機能抑制に言及したものが多数を占めている。しかし、本研究の結果から卵巣周期中で最も活発に IL-6 が発現しているのは黄体期後期の黄体細胞すなわち退行期黄体であり、そこにはレセプターの gp130 と IL-6R $\alpha$  がともに存在していることも確認された。このことは、IL-6 が卵巣機能に対して示す抑制的作用からも推察される通り、黄体細胞に対する機能抑制、すなわち黄体退行に IL-6 が関与している可能性を強く示唆する。

ヒト月経黄体の寿命は約 14 日間と一定しており、このことが月経周期の規則性に対する説明や、婦人科内分泌診療の基本として広く認識されてきた。ヒト月経周期の過程において、もし妊娠が成立した場合には絨毛組織から産生されるヒト絨毛性ゴナドトロピン(hCG)のシグナルにより、黄体は存続し妊娠黄体として維持されると考えられている。一方、妊娠が成立しなかった通常の月経周期では、子宮由来のプロスタグランジン F<sub>2</sub> (PGF<sub>2</sub>) が黄体退行のイニシエータとして働き、黄体は退縮して月経をむかえるとされている(21)。黄体培養細胞に PGF<sub>2</sub> の analog 薬を加えると、gp130 のシグナル伝達経路である STAT3 の発現が速やかに増強すること(22)や、骨芽細胞(23)や歯肉線維芽細胞(24)で、PGF<sub>2</sub> が IL-6 産生を促進することが報告されていることから、黄体期後期の IL-6 発現の増加は PGF<sub>2</sub> のシグナルによる可能性がある。またラット卵巣では、妊娠期間中に IL-6 mRNA の発現が著しく減弱しているが、出産により妊娠黄体の退行が開始すると、その発現は増強する(19)。このことは、月経黄体が退行を開始する黄体期後期に IL-6 の発現が増強していた本研究の結果とも合致している。

IL-6 により導かれる黄体退行のメカニズムは必ずしも明らかではないが、先に示した E<sub>2</sub> 産生能の低下、LH レセプター発現の減弱、アポトーシスの誘導といった IL-6 の一連の機能は、いずれも黄体機能抑制を説明するに十分な事象と考えられる。このうち E<sub>2</sub> については、黄体細胞自体が分泌することから黄体機能を反映するマーカーとしても重要であるが、本研究の対象の中で卵巣周期が黄体期に属する 19 例全例について、血清中 E<sub>2</sub> 濃度と黄体組織中の IL-6 mRNA 発現量との相関を調べた結果、両者の間には強い負の相関が認められていた。以上に述べた事象から推察される、黄体退行における IL-6 作用機序の仮説を図 6 に示した。

血清中 IL-6 濃度については、卵巣周期による変動は認められなかったが、IL-6 の短い血中半減期(約 1.5 時間)や卵巣局所の生理的変化であることを考慮すると妥当な結果と思われた。

本研究における、ヒト退行期黄体での IL-6 発現増強とレセプター発現の証明は、黄体退行機序における IL-6 の関連を強く示唆するものであった。今後、卵巣周期によるレセプター発現の変化や、黄体退行機序における IL-6 の機能解析など探求すべき課題は多いが、さらに黄体退行の基礎的メカニズムを解明していくことが、黄体機能異常に基づく不妊・不育症などを中心とした様々な病態の原因究明に寄与するものと考えている。

## 参考文献

1. Bornstein SR, Rutkowski H, Vrezas I: Cytokines and steroidogenesis. *Mol Cell Endocrinol* 2004; **215**: 135-41.
2. Machelon V, Emilie D: Production of ovarian cytokines and their role in ovulation in the mammalian ovary. *Eur Cytokine Netw* 1997; **8**: 137-43.
3. Tabibzadeh S: Cytokines and the hypothalamic-pituitary-ovarian-endometrial axis. *Hum Reprod* 1994; **9**: 947-67.
4. Kishimoto T, Akira S, Narazaki M, et al.: Interleukin-6 family of cytokines and gp130. *Blood* 1995; **86**: 1243-54.
5. Van Snick J: Interleukin-6: an overview. *Annu Rev Immunol* 1990; **8**: 253-78.
6. Kishimoto T, Akira S, Taga T: Interleukin-6 and its receptor: a paradigm for cytokines. *Science* 1992; **258**: 593-7.
7. Hirano T: Interleukin-6. In Thomson AW (Eds), *The Cytokine handbook* (2nd ed), Academic Press, London ; San Diego, 1994: 145-68.
8. Keck U, Rajabi Z, Pfeifer K, et al.: Expression of interleukin-6 and interleukin-6 receptors in human granulosa lutein cells. *Mol Hum Reprod* 1998; **4**: 1071-6.
9. Gorospe WC, Hughes FM, Jr, Spangelo BL: Interleukin-6: effects on and production by rat granulosa cells in vitro. *Endocrinology* 1992; **130**: 1750-2.
10. Gorospe WC, Spangelo BL: Interleukin-6 production by rat granulosa cells in vitro: effects of cytokines, follicle-stimulating hormone, and cyclic 3',5'-adenosine monophosphate. *Biol Reprod* 1993; **48**: 538-43.
11. Machelon V, Emilie D, Lefevre A, et al.: Interleukin-6 biosynthesis in human preovulatory follicles: some of its potential roles at ovulation. *J Clin Endocrinol Metab* 1994; **79**: 633-42.
12. Tamura K, Kawaguchi T, Hara T, et al.: Interleukin-6 decreases estrogen production and messenger ribonucleic acid expression encoding aromatase during in vitro cytodifferentiation of rat granulosa cell. *Mol Cell Endocrinol* 2000; **170**: 103-11.
13. 三国 雅人: 排卵期卵巣に対するインターロキン-2ならびにインターロキン-6の作用. *北海道医学雑誌* 1995; **70**: 561-72.
14. Hughes JFM, Y. FY, Gorospe WC: Interleukin-6 stimulates apoptosis in FSH-stimulated rat granulosa cells in vitro: development and utilization of an in vitro model. *Endocrine* 1994; **2**: 997-1002.
15. Telleria CM, Ou J, Sugino N, et al.: The expression of interleukin-6 in the pregnant rat corpus luteum and its regulation by progesterone and glucocorticoid. *Endocrinology* 1998; **139**: 3597-605.
16. Taga T, Kishimoto T: Gp130 and the interleukin-6 family of cytokines. *Annu Rev Immunol* 1997; **15**: 797-819.
17. Kishimoto T: The biology of interleukin-6. *Blood* 1989; **74**: 1-10.
18. Heinrich PC, Behrmann I, Haan S, et al.: Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation. *Biochem J* 2003; **374**: 1-20.
19. Salmassi A, Lu S, Hedderich J, et al.: Interaction of interleukin-6 on human granulosa cell steroid secretion. *J Endocrinol* 2001; **170**: 471-8.
20. Tamura K, Kawaguchi T, Kogo H: Interleukin-6 inhibits the expression of luteinizing hormone receptor mRNA during the maturation of cultured rat granulosa cells. *J Endocrinol* 2001; **170**: 121-7.
21. Niswender GD, Juengel JL, Silva PJ, et al.: Mechanisms controlling the function and life span of the corpus luteum. *Physiol Rev* 2000; **80**: 1-29.
22. Curlewis JD, Tam SP, Lau P, et al.: A prostaglandin F<sub>2α</sub> analog induces suppressors of cytokine signaling-3 expression in the corpus luteum of the pregnant rat: a potential new mechanism in luteolysis. *Endocrinology* 2002; **143**: 3984-93.
23. Tokuda H, Kozawa O, Uematsu T: Interleukin (IL)-17 enhances prostaglandin F(2 alpha)-stimulated IL-6 synthesis in osteoblasts. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2002; **66**: 427-33.
24. Noguchi K, Endo H, Kondo H, et al.: Prostaglandin F<sub>2α</sub> upregulates interleukin-6 production in human gingival fibroblasts. *J Periodontal Res* 2001; **36**: 80-7.

財団法人日中医学協会  
2004 年度共同研究等助成金—在留中国人研究者—報告書

2005 年 3 月 8 日

財団法人 日 中 医 学 協 会 御 中

貴財団より助成金を受領して行った研究テーマについて報告いたします。

添付資料：研究報告書

中国人研究者名：..... 韓 娟 韓娟印

指導責任者名：..... 前田 隆秀..... 職名：..... 教授.....

所属機関名：日本大学松戸歯学部小児歯科 大学院生  
〒 271-8587

所在地：..... 千葉県松戸市栄町西 2-870-1.....

電話：..... 047 (360) 9430..... 内線：.....

1. 助成金額：..... 60 万..... 円

2. 研究テーマ

マウス口唇裂、唇顎口蓋裂発症に関与する染色体領域と候補遺伝子の特定

3. 成果の概要 (100 字程度)

本研究は、A/WySn 系統マウスにおけるコルチゾン投与による唇顎口蓋裂の発症に関与する候補染色体および原因遺伝子の検出を目的に、連鎖マッピングを行った。その結果、コルチゾン投与による A/WySn 系統マウス唇顎口蓋裂の原因遺伝子がマウス染色体 11 番と 14 番上に存在することが示唆された。

4. 研究業績

(1) 学会における発表 無 ・  (学会名・演題)

- ① 82nd General Session and Exhibition of the IADR/AADR/CADR・Genetic Analysis of Orofacial Cleft in Mouse Model
- ② 第 42 回日本小児歯科学会大会および総会・マウスにおける唇顎口蓋裂原因遺伝子の連鎖マッピング
- ③ 第 43 回日本小児歯科学会大会および総会・A 系マウス唇顎口蓋裂の原因遺伝子が存在する染色体の再検討

(2) 発表した論文 無 ・  (雑誌名・題名)

- ① 日本小児歯科学雑誌・A/WySn マウスと C3H/He マウスにおける口唇裂、唇顎口蓋裂および口蓋裂の発症率の検討
- ② 日本小児歯科学雑誌・コルチゾン投与によるマウス唇顎口蓋裂の遺伝形式の検討
- ③ PEDIATRIC DENTAL JOURNAL・Detection of informative markers for searching a causative gene(s) of cleft lip with palate in A/WySn mice (in press)
- ④ 日本小児歯科学雑誌・A/WySn 系統マウスにおけるコルチゾン投与による唇顎口蓋裂発症の候補染色体の検出 (印刷中)

## A/WySn 系統マウスにおけるコルチゾン投与による唇顎口蓋裂発症の候補染色体の検出

研究者氏名	韓 娟
中国所属機関	中国天津市口腔医院
日本研究機関	日本大学松戸歯学部小児歯科
指導責任者	教授 前田 隆秀
共同研究者名	清水武彦, 清水邦彦, 松永利恵

### 要 旨

A/WySn 系統マウスにおけるコルチゾン投与による唇顎口蓋裂の発症が常染色体劣性遺伝性であることを著者らは過去に報告している。本研究の目的は、コルチゾン投与による A/WySn 系統マウス唇顎口蓋裂発症に関与する遺伝子が存在する候補染色体を検出することである。唇顎口蓋裂を発現する A/WySn 系統と唇顎口蓋裂を発現しない C3H/He 系統間で遺伝学的な交配より得られた  $N_2$  マウス胎仔 1031 匹から 37 匹の唇顎口蓋裂を有するマウス胎仔を用意した。A/WySn 系統と C3H/He 系統間で多型を有する常染色体上に配置した 82 個の Mit マーカーを用い、遺伝子型の判定によるインターバルマッピングを行った。結果はマウス染色体 11 番上の D11Mit298, D11Mit145, D11Mit10 および D11Mit104 と、14 番上の D14Mit113, D14Mit34 において有意に A ホモ接合体の高い遺伝子型比が得られた。このことよりコルチゾン投与により A/WySn 系統マウス唇顎口蓋裂を発症する感受性遺伝子がマウス染色体 11 番と 14 番に存在することが示唆された。

**Key Words** マウス, 唇顎口蓋裂, 候補染色体, インターバルマッピング, コルチゾン

### 緒 言:

ヒトにおいて口唇裂, 口蓋裂 (以下口唇口蓋裂) は最も発生頻度の高い先天顔面奇形であり, その発症率は人種によって差異があるが, 約 1~2/1000 である<sup>1-3)</sup>。妊娠期間にコルチコステロイドの全身また局所の使用により新生児の口唇口蓋裂を発症する危険率が増加することが報告されている<sup>4,5)</sup>。様々な環境要因と複数の遺伝因子と相互作用により, 口唇口蓋裂を発症することは知られているが, 原因遺伝子は未だ解明されていない<sup>6,7)</sup>。また, 口唇裂は単独発症と, 口蓋裂との合併発症があり, すなわち唇顎口蓋裂である。口唇裂, 唇顎口蓋裂, 口蓋裂の各裂型別頻度では, 唇顎口蓋裂が約 50%と最も高い<sup>8,9)</sup>。唇顎口蓋裂児の機能的, 審美的, 心理的問題は大変強く, それらの発生機序と発生原因を解明することは極めて重要である。

マウスとヒトの高い遺伝的相同性より, マウスモデルにおいて疾患の責任遺伝子を同定できれば, ヒトにおける相同疾患の候補遺伝子を見出せる可能性がある<sup>10,11)</sup>。従って, ヒトの口唇口蓋裂の発生原因および発生機序を解明するために, マウスを用いた研究が数多く行われている。

著者ら<sup>12)</sup>は過去の研究にて, 近交系の A/WySn 系統マウスと C3H/He 系統マウスを用い, 2 系統間の遺伝学的な交配を行い, 妊娠マウスにコルチゾンを投与し, その胎仔を観察したところ, A/WySn 系マウスと  $N_2$  バッククロスマウスにおいて唇顎口蓋裂が認められ, C3H/He 系マウスと交雑  $F_1$  マウスにおいて唇顎口蓋裂の発症は認められなかった。また, 唇顎口蓋裂を有する胎仔において性差は認められなかった。その結果より, A/WySn 系統マウスにおけるコルチゾン投与による唇顎口蓋裂の発症は常染色体劣性遺伝性であることが報告されている。

本研究では著者らは, A/WySn 系統と C3H/He 系統マウスの 2 系統間の遺伝学的な交配より得られた唇顎口蓋裂を有する  $N_2$  マウスの常染色体の遺伝子型について, DNA マーカーを用いたインターバルマッピングを行い, コ

ルチゾン投与による A/WySn 系統マウスにおける唇顎口蓋裂の発症に関与する遺伝子が存在する候補染色体について検討を行った。

#### 材料および方法：

##### 1. 唇顎口蓋裂を有する N<sub>2</sub> マウス胎仔

国立遺伝学研究所および三協ラボサービス株式会社より供与された A/WySn 系統と C3H/He 系統を交配し、交雑 F<sub>1</sub> マウスを得た。そして F<sub>1</sub> マウスを A/WySn 系統マウスに戻し交配し、妊娠 11 日目から 14 日目までの 4 日間、妊娠マウスにリン酸緩衝生理食塩水に溶解した 25mg/ml の酢酸コルチゾン懸濁液、100mg/kg/day を腹部に皮下投与した。妊娠 18 日目に妊娠マウスを頸椎脱臼により安楽死させ、N<sub>2</sub> バッククロスマウス胎仔を子宮から摘出し、生存胎仔の 1031 匹を得た。それらを実体顕微鏡下で観察したところ、37 匹<sup>12)</sup>に唇顎口蓋裂を確認し、今回の実験で用いた。

##### 2. DNA マーカー

A/WySn 系統マウス、C3H/He 系統マウスおよび F<sub>1</sub> マウスについて、Mouse Genome Database (<http://www.jax.org/>) のデータを基準にし、マウス全常染色体上に配置された遺伝的距離が可及的に 35 センチモルガン (cM) を超えないように、136 個の Mit (Massachusetts Institute of Technology) マーカーを選択した。そのうち A/WySn と C3H/He の 2 系統マウス間で多型を有する 82 個<sup>13)</sup>の Mit マーカーを確認し、今回の実験で用いた。

##### 3. 唇顎口蓋裂を有する N<sub>2</sub> マウス胎仔の DNA の抽出

Laird ら<sup>14)</sup>の方法に従って、唇顎口蓋裂を有する 37 匹の N<sub>2</sub> マウス胎仔の皮膚から DNA を抽出した。

##### 4. 唇顎口蓋裂を有する N<sub>2</sub> マウス胎仔の遺伝子型の判定によるインターバルマッピング

TaKaRa 480 thermal cycler (TaKaRa 社) を使用し、唇顎口蓋裂を有する 37 匹の N<sub>2</sub> マウス胎仔の DNA を 82 個の Mit マーカーの特定領域について PCR 法を用いて増幅した。PCR 産物を 4%アガロースゲルにて電気泳動後、エチジウムブロマイドにて 25 分間染色し、UV ライト下で撮影した後、A ホモ (A=A/WySn) あるいは A/C3H ヘテロ (A=A/WySn, C3H=C3H/He) の遺伝子型を判定し、インターバルマッピングを行った。

##### 5. コントロール群 (正常な口唇口蓋を有するマウス胎仔) における遺伝子型の判定

上記の方法に従い、正常な口唇口蓋を有する 30 匹の N<sub>2</sub> マウス胎仔の DNA を抽出し、唇顎口蓋裂を有する N<sub>2</sub> マウス胎仔において A ホモ接合体遺伝子型の発現値の有意に高いところの Mit マーカーを用い、正常な口唇口蓋を有する N<sub>2</sub> マウス胎仔の遺伝子型を判定した。

##### 6. 連鎖解析による候補染色体の検出

DNA マーカーと原因遺伝子が連鎖していないと仮定すると、N<sub>2</sub> マウスの遺伝子型比は A ホモ接合体 : A/C3H ヘテロ接合体が 1 : 1 になる。この理論値と実際に得られた個々マーカー座位の N<sub>2</sub> マウス胎仔の遺伝子型発現値との差の検定には  $\chi^2$  検定を用い、危険率 0.5% を有意水準として DNA マーカーと原因遺伝子が存在する領域との連鎖を評価した。

なお、本実験は日本大学松戸歯学部動物実験倫理規定に従った。

#### 結果：

表 1 に常染色体上に配置した 82 個 Mit マーカーにおける唇顎口蓋裂を有する 37 匹の N<sub>2</sub> マウス胎仔の遺伝子型および連鎖解析の結果を示す。表 2 に正常な口唇口蓋を有する 30 匹の N<sub>2</sub> マウス胎仔における染色体 11 番と 14 番上の連鎖解析の結果を示す。

染色体 11 番において  $\chi^2$  値が有意であったのは、40.0cM [69.1Mbp (M base pair)] に位置するマーカーの D11Mit298, 57.5cM (97.4Mbp) に位置するマーカーの D11Mit145, 63.0cM (104.3Mbp) に位置するマーカーの D11Mit10 および 79.0cM (119.0Mbp) に位置するマーカーの D11Mit104 であった。特に D11Mit10 においてはすべての唇顎口蓋裂を有する N<sub>2</sub> マウス胎仔の遺伝子型は A ホモ接合体であり、最も高い A ホモ接合体の遺伝子型

比が得られた (A ホモ接合体 : A/C3H ヘテロ接合体 = 37 : 0,  $\chi^2 > 33.11$ ,  $p < 0.00001$ ).

染色体 14 番において  $\chi^2$  値が有意であったのは, 25.0cM (51.8Mbp) に位置するマーカーの D14Mit113 および 40.0cM (63.4Mbp) に位置するマーカーの D14Mit34 であった。

一方, コントロール群として正常な口唇口蓋を有する 30 匹の  $N_2$  マウスにおいて, 染色体 11 番と 14 番上に唇顎口蓋裂を有する  $N_2$  マウス胎子の遺伝子型が有意に A ホモ接合体の高い遺伝子型を得たところの Mit マーカーを用い, 遺伝子型を判定した。結果はいずれも  $\chi^2$  検定にて有意な検定値は認められなかった。

表 1 唇顎口蓋裂を有する  $N_2$  マウスにおけるマーカーとの連鎖解析

染色体	マーカー	マーカーの位置		遺伝子型比		$\chi^2$	染色体	マーカー	マーカーの位置		遺伝子型比		$\chi^2$
		cM	Mbp	A	A/C3H				cM	Mbp	A	A/C3H	
1	D1Mit294	8.3	11.8	24	13	3.27	10	D10Mit180	64.0	117.9	19	18	0.03
	D1Mit251	38.1	70.8	19	18	0.03	11	D11Mit71	1.1	6.8	17	20	0.24
	D1Mit48	54.0	88.5	20	17	0.24		D11Mit306	12.0	20.1	23	14	2.19
	D1Mit26	62.1	112.1	19	18	0.03		D11Mit298	40.0	69.1	29	8	11.92 <sup>b</sup>
	D1Mit227	81.6	158.3	15	22	1.32		D11Mit145	57.5	97.4	36	1	33.11 <sup>c</sup>
2	D1Mit151	101.0	181.1	15	22	1.32		D11Mit10	63.0	104.3	37	0	>33.11 <sup>c</sup>
	D2Mit80	10.0	21.1	20	17	0.24		D11Mit104	79.0	119.0	28	9	9.76 <sup>a</sup>
	D2Mit323	31.7	55.3	22	15	1.32	12	D12Mit58	6.0	17.2	18	19	0.03
	D2Mit381	42.6		24	13	3.27		D12Mit233	52.0		16	21	0.68
	D2Mit272	47.5	90.4	27	10	7.81		D12Mit8	58.0	108.2	16	21	0.68
3	D2Mit132	52.5	115.7	25	12	4.57	13	D13Mit16	10.0	19.7	15	22	1.32
	D2Mit451	73.2	155.7	22	15	1.32		D13Mit64	30.0	44.5	13	24	3.27
	D2Mit200	107.0	179.5	19	18	0.03		D13Mit122	36.0	59.0	15	22	1.32
	D3Mit185	29.5	57.6	13	24	3.27		D13Mit231	39.0	73.6	17	20	0.24
	D3Mit254	64.1	132.6	16	21	0.68		D13Mit108	45.0	91.4	18	19	0.03
4	D4Mit291	5.0	21.2	24	13	3.27		D13Mit226	59.0	99.9	20	17	0.24
	D4Mit84	37.6	75.5	22	15	1.32		D13Mit78	75.0	115.8	19	18	0.03
	D4Mit146	53.6	108.1	24	13	3.27	14	D14Mit207	5.5	18.4	23	14	2.19
	D4Mit233	75.5	143.6	21	16	0.68		D14Mit113	25.0	51.8	28	9	9.76 <sup>a</sup>
5	D5Mit419	18.0	31.7	17	20	0.24		D14Mit34	40.0	63.4	29	8	11.92 <sup>b</sup>
	D5Mit201	42.0	73.9	14	23	2.19	15	D15Mit175	9.9	9.2	21	16	0.68
	D5Mit406	64.0	114.7	12	25	4.57		D15Mit267	10.9	24.4	21	16	0.68
	D5Mit292	80.0	138.1	10	27	7.81		D15Mit154	18.8	43.8	17	20	0.24
6	D6Mit223	19.0	45.3	20	17	0.24		D15Mit144	32.2	68.6	17	20	0.24
	D6Mit184	26.4	53.2	18	19	0.03	16	D16Mit165	10.3	13.7	21	16	0.68
	D6Mit322	35.2		19	18	0.03		D16Mit4	27.3	36.1	24	13	3.27
	D6Mit132	40.0	97.0	19	18	0.03		D16Mit203	55.0		22	15	1.32
7	D6Mit366	50.5	115.6	20	17	0.24	17	D17Mit213	9.3	15.4	17	20	0.24
	D7Mit76	3.4	10.5	22	15	1.32		D17Mit173	11.8		20	17	0.24
	D7Mit247	16.0	25.6	19	18	0.03		D17Mit33	18.8	33.2	19	18	0.03
	D7Mit91	28.1	46.1	16	21	0.68		D17Mit49	23.2	43.5	20	17	0.24
	D7Mit181	37.0	66.7	17	20	0.24		D17Mit238	34.3		20	17	0.24
	D7Mit126	50.0		19	18	0.03		D17Mit96	54.6	89.7	22	15	1.32
	D7Mit186	64.0	118.2	19	18	0.03	18	D18Mit64	2.0	6.3	21	16	0.68
8	D8Mit224	17.0	32.0	18	19	0.03		D18Mit12	17.0		20	17	0.24
	D8Mit65	22.5	42.1	18	19	0.03		D18Mit51	37.0	61.6	19	18	0.03
	D8Mit242	47.0	101.1	21	16	0.68		D18Mit154	47.0	76.1	14	23	2.19
	D8Mit91	67.0	123.8	24	13	3.27	19	D19Mit69	6.0	13.2	17	20	0.24
10	D10Mit3	21.0	28.9	17	20	0.24		D19Mit80	22.0	22.6	16	21	0.68
	D10Mit115	38.4	70.1	16	21	0.68		D19Mit46	24.0	32.2	15	22	1.32
	D10Mit230	49.0	89.9	15	22	1.32		D19Mit70	51.0	50.1	17	20	0.24

A : A ホモ接合体遺伝子型 ; A/C3H : A/C3H ヘテロ接合体遺伝子型

a :  $p < 0.005$  ; b :  $p < 0.001$  ; c :  $p < 0.00001$

表 2 正常な口唇口蓋を有する  $N_2$  マウスにおける染色体 11 番と 14 番上のマーカーとの連鎖解析

染色体	マーカー	マーカーの位置		遺伝子型比		$\chi^2$	染色体	マーカー	マーカーの位置		遺伝子型比		$\chi^2$	
		cM	Mbp	A	A/C3H				cM	Mbp	A	A/C3H		
11	D11Mit298	40.0	69.1	14	16	0.13	14	D14Mit113	25.0	51.8	15	15	0.00	
	D11Mit145	57.5	97.4	16	14	0.13			D14Mit34	40.0	63.4	14	16	0.13
	D11Mit10	63.0	104.3	17	13	0.53								
	D11Mit104	79.0	119.0	16	14	0.13								

## 考 察：

本研究得られた唇顎口蓋裂を有する  $N_2$  マウス胎仔の遺伝子型の A ホモ接合体：A/C3H ヘテロ接合体の発現値は理論値との有意な差が認められ、さらに正常な口唇口蓋を有する  $N_2$  マウス胎仔の遺伝子型の A ホモ接合体：A/C3H ヘテロ接合体の発現値が理論値との有意差は認められなかった。このことから、マウス染色体 11 番および 14 番上に A ホモ接合体の有意に高い遺伝子型比が得られたマーカーは、A/WySn 系統マウスにおけるコルチゾン投与による唇顎口蓋裂発症の感受性遺伝子との連鎖が存在することが示唆された。

Juriloff ら<sup>15)</sup>は、A/WySn 系統マウスにおいて自然発生の口唇裂（唇顎口蓋裂を含める）の遺伝子がマウス染色体 11 番と 13 番に存在し、遺伝子座位として 11 番に存在する主な *clf1* と 13 番に存在する *clf2* であることを報告している。本研究では、最も高い A ホモ接合体遺伝子型比を得たところはマウス染色体 11 番上の D11Mit10 (63.0cM, 104.3Mbp) が位置するところであり、自然発生日唇裂の主な遺伝子座位の *clf1* が存在する領域と相同であることを示した。ステロイドの投与 (E12) によりマウス口蓋裂は高頻度に誘発されるが、口唇裂の発症率はステロイドにより有意な変化がないことが報告されている<sup>16)</sup>。また著者ら<sup>17)</sup>は、マウス口唇の形成完成する（約 E11.5）直前の E11 目から妊娠マウスにコルチゾンを投与し、高頻度の口蓋裂を誘発したが、口唇裂発症率の増加は認められなかったことを報告している。従って、本研究の結果から得られた A/WySn 系統マウス口唇裂の発症はコルチゾンの影響でなく、口唇裂発症の関連遺伝子がマウス染色体 11 番に存在することが考えられた。

一方本研究では、自然発生日唇裂の遺伝子座位の *clf2* との連鎖を示したマーカーの D13Mit231 を用い、唇顎口蓋裂を有する 37 匹の  $N_2$  マウス胎仔の遺伝子型を判定したところ、有意な検定値が得られなかった。即ちコルチゾン投与による A/WySn 系統マウス唇顎口蓋裂の感受性遺伝子が D13Mit231 との連鎖は認められず、*clf2* はコルチゾン投与による A/WySn 系統マウス唇顎口蓋裂発症の候補遺伝子座位として認められなかった。コルチゾン投与による A/WySn 系統マウス唇顎口蓋裂の発症に関与する感受性遺伝子がマウス染色体 14 番に存在することが示唆された。A/WySn 系統マウスにおいて染色体 11 番と 14 番上に存在する遺伝子の相互作用により唇顎口蓋裂を発症すると推測された。

マウスの口唇口蓋裂に関する他の研究では、*Tcfap2a*<sup>18)</sup>（マウス染色体 13 番, 25.0cM）、*Tbx10*<sup>19)</sup>（マウス染色体 19 番, 2.0cM）が口唇裂の候補遺伝子として報告されている。*Tgfb2*<sup>20)</sup>（マウス染色体 1 番, 101.5cM）、*Dlx2*<sup>21)</sup>（マウス染色体 2 番, 44.0cM）、*Msx1*<sup>22)</sup>（マウス染色体 5 番, 21.0cM）、*Gabrb3*<sup>23)</sup>（マウス染色体 7 番, 28.6cM）、*Pax9*<sup>24)</sup>（マウス染色体 12 番, 26.0cM）、*Tgfb3*<sup>25)</sup>（マウス染色体 12 番, 41.0cM）および H-2 領域<sup>26)</sup>（マウス染色体 17 番, H-2S/H-2D 領域）が口蓋裂の候補遺伝子として報告されている。また、ヒトの口唇口蓋裂に関する研究のうち、*MSX1*<sup>27)</sup>、*TGFB2*<sup>28)</sup>、*TGFB3*<sup>27)</sup>、*GABRB3*<sup>29)</sup>、*MTHFR*<sup>30)</sup>（ホモロジーがマウス染色体 4 番, 76.4cM）、*TGFA*<sup>31)</sup>（ホモロジーがマウス染色体 6 番, 35.8cM）、*BCL3*<sup>32)</sup>（ホモロジーがマウス染色体 7 番, 6.5cM）および *RARA*<sup>33)</sup>（ホモロジーがマウス染色体 11 番, 57.8cM）が候補遺伝子として報告されている。本研究では、それらの遺伝子の近傍に位置する Mit マーカーを用い、唇顎口蓋裂を有する  $N_2$  マウス胎仔の遺伝子型を判定した。その結果 Rara の近くに位置するマーカーの D11Mit145 において A ホモ接合体と A/C3H ヘテロ接合体の遺伝子型比が 36 : 1 であり、有意に A ホモ接合体の高い遺伝子型比が得られたが、最も高い連鎖を示す領域に含まれなかった。さらに他のマーカーにおいて、得られた A ホモ接合体と A/C3H ヘテロ接合体の遺伝子型比が 1 : 1 の理論値と比較し、有意な検定値は認められなかった。即ちコルチゾン投与による唇顎口蓋裂の発症は、上記の遺伝子との関連性は少ないものと思われた。口唇裂の発症、また口蓋裂の発症は遺伝的な異質性が存在することが考えられ、そしてコルチゾン投与により発症する唇顎口蓋裂は、口唇裂、また口蓋裂と違う遺伝子間の相互作用により発症する可能性も考えられた。

## 文 献：

- 1) Natsume N, Suzuke T, Kawai T (1988). The prevalence of cleft lip and plate in Japanese. *Br J Oral Maxillofac Surg* 26:232-236.

- 2) Leck I, Lancashire RJ (1995). Birth prevalence of malformations in members of different ethnic groups and in the offspring of matings between them, in Birmingham, England. *J Epidemiol Community Health* 49:171-179.
- 3) Cooper ME, Stone RA, Liu YE, Hu DN, Melnick M, Marazita ML (2000). Descriptive epidemiology of nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate in Shanghai, China, from 1980 to 1989. *Cleft Palate Craniofac J* 37:274-280.
- 4) Park-Wyllie L, Mazzotta P, Pastuszak A, Moretti ME, Beique L, Hummisett L, Friesen HM, Jacobson S, Kasapinovic S, Chang D, Diav-Citrin O, Chitayat D, Nulman I, Einarson TR, Koren G (2000). Birth defects after maternal exposure to corticosteroids: Prospective cohort study and meta-analysis of epidemiological studies. *Teratology* 62:385-392.
- 5) Edwards MJ, Agho K, Attia J, Diaz P, Hayes T, Illingworth A, Roddick LG (2003). Case-Control Study of Cleft Lip or Palate After Maternal Use of Topical Corticosteroids During Pregnancy. *Am J Med Genet* 120(A):459-463.
- 6) Murray JC (2002). Gene/environment causes of cleft lip and/or palate. *Clin Genet* 61:248-256.
- 7) Batra P, Duggal R, Parkash H (2003). Genetics of cleft lip and palate revisited. *J Clin Pediatr Dent* 27:311-320.
- 8) 大倉興司 (1991). 口唇裂・口蓋裂. 大倉興司編, 遺伝性疾患への対応. 東京: 講談社. pp. 86-87.
- 9) 森口隆彦, 中川皓文, 森 寿子 (1998). 口唇裂口蓋裂の総合治療—成長に応じた諸問題の解決—. 東京: 克誠堂. pp. 11-14.
- 10) Searle AG, Peters J, Lyon MF, Hall JG, Evans EP, Edwards JH, Buckle VJ (1989). Chromosome maps of man and mouse. IV. *Ann Hum Genet* 53:89-140.
- 11) Searle AG, Edwards JH, Hall JG (1994). Mouse homologues of human hereditary disease. *J Med Genet* 31:1-19.
- 12) 韓 娟, 清水武彦, 清水邦彦, 前田隆秀(2004). コルチゾン投与によるマウス唇顎口蓋裂の遺伝形式の検討. 小児歯誌 42:512-517.
- 13) Han J, Shimizu T, Shimizu K, Matsunaga R, Maeda T (2005). Detection of informative markers for searching a causative gene(s) of cleft lip with palate in A/WySn mice. *Ped Dent J* (in press)
- 14) Laird PW, Zijderveld A, Linders K, Rudnicki MA, Jaenisch R, Berns A (1991). Simplified mammalian DNA isolation procedure. *Nucleic Acids Res* 19:4293.
- 15) Juriloff DM, Harris MJ, Brown CJ (2001). Unravelling the complex genetics of cleft lip in the mouse model. *Mamm Genome* 12:426-435.
- 16) Biddle FG, Fraser FC (1986). Major gene determination of liability to spontaneous cleft lip in the mouse. *J Craniofac Genet Dev Biol Suppl* 2:67-88.
- 17) 韓 娟, 清水武彦, 前田隆秀 (2003). A/WySn マウスと C3H/He マウスにおける口唇裂, 唇顎口蓋裂および口蓋裂の発症率の検討. 小児歯誌 41:887-892.
- 18) Nottoli T, Hagopian-Donaldson S, Zhang J, Perkins A, Williams T (1998). AP-2-null cells disrupt morphogenesis of the eye, face, and limbs in chimeric mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:13714-13719.
- 19) Bush JO, Lan Y, Jiang R (2004). The cleft lip and palate defects in Dancer mutant mice result from gain of function of the Tbx10 gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:7022-7027.
- 20) Sanford LP, Ormsby I, Gittenberger-de Groot AC, Sariola H, Friedman R, Boivin GP, Cardell EL, Doetschman T (1997). TGFbeta2 knockout mice have multiple developmental defects that are non-overlapping with other TGFbeta knockout phenotypes. *Development* 124:2659-2670.
- 21) Qiu M, Bulfone A, Ghattas I, Meneses JJ, Christensen L, Sharpe PT, Presley R, Pedersen RA, Rubenstein JL (1997). Role of the Dlx homeobox genes in proximodistal patterning of the branchial arches: mutations of Dlx-1, Dlx-2, and Dlx-1 and -2 alter morphogenesis of proximal skeletal and soft tissue structures derived from the first and second arches. *Dev Biol* 185:165-184.
- 22) Satokata I, Maas R (1994). Msx1 deficient mice exhibit cleft palate and abnormalities of craniofacial and tooth development. *Nat Genet* 6:348-356.
- 23) Homanics GE, DeLorey TM, Firestone LL, Quinlan JJ, Handforth A, Harrison NL, Krasowski MD, Rick CE, Korpi ER,

- Makela R, Brilliant MH, Hagiwara N, Ferguson C, Snyder K, Olsen RW (1997). Mice devoid of gamma-aminobutyrate type A receptor beta3 subunit have epilepsy, cleft palate, and hypersensitive behavior. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:4143-4148.
- 24) Peters H, Neubüser A, Kratochwil K, Balling R (1998). Pax9-deficient mice lack pharyngeal pouch derivatives and teeth and exhibit craniofacial and limb abnormalities. *Genes Dev* 12:2735-2747.
  - 25) Kaartinen V, Voncken JW, Shuler C, Warburton D, Bu D, Heisterkamp N, Groffen J (1995). Abnormal lung development and cleft palate in mice lacking TGF-beta 3 indicates defects of epithelial-mesenchymal interaction. *Nat Genet* 11:415-421.
  - 26) Gasser DL, Yadavish KN, Trammell MA, Goldman AS (1988). Recombinants in the H-2S/H-2D interval of mouse chromosome 17 define the map position of a gene for cleft palate susceptibility. *Teratology* 38:571-577.
  - 27) Vieira AR, Orioli IM, Castilla EE, Cooper ME, Marazita ML, Murray JC (2003). MSX1 and TGFB3 contribute to clefting in South America. *J Dent Res* 82:289-292.
  - 28) Tanabe A, Taketani S, Endo-Ichikawa Y, Tokunaga R, Ogawa Y, Hiramoto M (2000). Analysis of the candidate genes responsible for non-syndromic cleft lip and palate in Japanese people. *Clin Sci* 99:105-111.
  - 29) Scapoli L, Martinelli M, Pezzetti F, Carinci F, Bodo M, Tognon M, Carinci P (2002). Linkage disequilibrium between GABRB3 gene and nonsyndromic familial cleft lip with or without cleft palate. *Hum Genet* 110:15-20.
  - 30) Martinelli M, Scapoli L, Pezzetti F, Carinci F, Francioso F, Baciliero U, Padula E, Carinci P, Tognon M (2001). Linkage analysis of three candidate regions of chromosome 1 in nonsyndromic familial orofacial cleft. *Ann Hum Genet* 65:465-471.
  - 31) Ardinger HH, Buetow KH, Bell GI, Bardach J, VanDemark DR, Murray JC (1989). Association of genetic variation of the transforming growth factor-alpha gene with cleft lip and palate. *Am J Hum Genet* 45:348-353.
  - 32) Gaspar DA, Matioli SR, Pavanello RC, Araujo BC, Andre M, Steman S, Otto PA, Passos-Bueno MR (2002). Evidence that BCL3 plays a role in the etiology of nonsyndromic oral clefts in Brazilian families. *Genet Epidemiol* 23:364-374.
  - 33) Shaw D, Ray A, Marazita M, Field L (1993). Further evidence of a relationship between the retinoic acid receptor alpha locus and nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate (CL+/-P). *Am J Hum Genet* 53:1156-1157.

注：本研究は、2004年3月11日『82nd IADR/AADR/CADR』にて展示発表、2004年5月20日『第42回日本小児歯科学会大会』にて口演発表、2005年5月27日『第43回日本小児歯科学会大会』にて展示発表、『小児歯科学雑誌』（2003年12月VOL41巻）、『小児歯科学雑誌』（2004年9月VOL42巻）、『小児歯科学雑誌』（2005年3月VOL43巻）および『PEDIATRIC DENTAL JOURNAL』（2005年3月VOL15）に掲載。

作成日：2005年3月8日

## 財団法人日中医学協会

### 2004 年共同研究等助成金—在留中国人研究者—報告者

2005 年 3 月 12 日

財団法人 日中医学協会 御中

貴財団より助成金を受領して行った研究テーマについて報告致します。

添付資料：研究報告書

中国人研究者名： 潘 宣超



指導責任者： 幕内 雅敏 職名： 教授

所属機関名： 東京大学附属病院人工臓器移植外科  
〒113-8655

所在地： 東京都文京区本郷7-3-1

電話： 03 (3815) 5411 内線： 33321

1. 助成金額： 600000 円
2. 研究テーマ

**anti-ICOS antibody inhibited the recall response of long-term accepted  
heart following skin grafting**

#### 3. 成果の概要

The authors investigated the effect of blockade of the ICOS pathway on recall response in rat with cardiac allograft model. The authors report here that the treatment with blockade of ICOS can enhance cardiac allograft survival after following secondary donor type skin grafting, and Anti-ICOS antibody inhibited the immigration of activated memory T cells for target organ but not the function of memory T cells.

#### 4. 研究業績

- (1) 学会における発表 無
- (2) 発表した論文 無  
今 投稿の準備

## anti-ICOS antibody inhibited the recall response of long-term accepted heart following skin grafting

研究者氏名	潘 宣超
中国所属機関	中国ハルビン医科大学消化器外科 医師
日本研究機関	日本東京大学附属病院人工臓器移植外科
指導責任者	教授 幕内 雅敏
共同研究者名	郭 镭

### Abstract

**Background:** The inducible co-stimulatory molecule (ICOS), a member of CD28/CTLA4 family, is expressed on activated T-cells and effector/memory T cells.

**Methods:** Hearts from DA (RT1a) rats were transplanted into Lewis (RT1 l) recipients with intravenously single dose of AdCTLA-4Ig at  $10^9$  plaque-forming units (pfu) immediately after transplantation. The recipients with long-term accepted primary cardiac allografts (over 100 days) were received secondary donor-type skin grafting. Anti-ICOS antibody was injected (1mg/kg intravenously every other day for two weeks) after skin grafting.

Immunohistochemistry, mixed lymphocyte reaction (MLR), and flow cytometry were performed.

**Results:** AdCTLA-4Ig treated recipients rejected primary accepted cardiac allografts following secondary donor type skin grafting. The rejected cardiac allografts appear to be high ICOS positive lymphocytes infiltration. In vitro secondary MLR showed that anti-ICOS antibody could not inhibit recall T cell proliferation response.

**Conclusions:** our findings suggest that the treatment with blockade of ICOS can enhance cardiac allograft survival, indicating costimulator molecular ICOS signaling plays an important role in the recall response of long-term accepted heart following skin grafting in vivo and vitro. Anti-ICOS antibody inhibited the immigration of activated memory T cells for target organ but not the function of memory T cells.

**Keywords** Costimulator molecular, memory T lymphocytes, recall, CTLA4Ig

### INTRODUCTION

A novel costimulatory molecule, inducible costimulator (ICOS), was identified as the third member of the CD28 family and only express at very low levels on naïve T-cells. ICOS-mediated signal is thought to contribute mainly to regulation of activated T-cells and to effector T-cells functions similar to CD28 [5] [6]. The authors previously reported that administration of cytotoxic T-lymphocyte antigen 4(CTLA4) Ig combined with anti-ICOS antibody yielded long-term anti-specific allograft survival in a rat heart and liver transplantation model [3] [4]. When a previous antigen is encountered, memory T lymphocytes are rapidly mobilized to deliver a recall response that surpasses a primary response to new antigen in speed, magnitude and efficacy [11] [12] [13]. This enhanced memory response is often beneficial, and can provide protective immunity against recurrent pathogens; however, in transplantations the presence of memory immunity is potentially deleterious. Some studies

suggest that the presence of alloreactive memory T cells may impact survival of an allograft. Recent studies have provided evidence that certain newly recognized costimulatory pathways could be involved in the recall of memory T cells but have little effect on naïve T cells. ICOS costimulatory pathways could be a potential approach to inhibiting the recall of alloreactive memory T cells.

In present study, the authors investigated the effect of blockade of the ICOS pathway on recall response in rat with cardiac allograft model. The authors report here that the treatment with blockade of ICOS can enhance cardiac allograft survival after following secondary donor type skin grafting, and Anti-ICOS antibody inhibited the immigration of activated memory T cells for target organ but not the function of memory T cells.

## MATERIALS AND METHODS

Hearts from DA (RT1a) rats were transplanted into Lewis (RT1 l) recipients with intravenously single dose of AdCTLA-4Ig at  $10^9$  plaque-forming units (pfu) immediately after transplantation. The recipients with long-term accepted primary cardiac allografts (over 100 days) were received secondary donor-type skin grafting. Anti-ICOS antibody was injected (1mg/kg intravenously every other day for two weeks) after skin grafting. Immunohistochemistry, mixed lymphocyte reaction (MLR), and flow cytometry were performed.

## RESULTS

### *Prolongation of allograft survival after secondary donor type skin grafting*

Treatment with anti-ICOS antibody prolonged cardiac allograft survival (median survival time [MST], > 50 days; n=15) significantly in comparison with no-treatment (MST, 12 days; n=12;  $p < 0.05$ ) (Fig. 1).

### *Histological studies*

No-treatment group of cardiac allograft at 10 days after secondary donor type skin grafting showed myocyte necrosis and infiltration of mononuclear in comparison with heart grafts treatment with anti-ICOS antibody (Fig. 2).

## DISCUSSION

Blockade of CD28-CD80 interaction by CTLA-4Ig prolonged survival of vascularized grafts and frequently led to permanent graft acceptance in animal model including kidney and islet allotransplantations. However, in rat heart transplantation model, an administration of CTLA-4Ig alone did not induce a stable tolerance, only 20% heart allograft survival more than 100 days. Costimulation blockade of the CD154/CD40 pathway in the presence of donor-specific transfusion (DST) has been remarkably successful in promoting permanent survival of heart and islet allograft [9]. However, this same strategy is wholly ineffective if the recipient has been previously primed with donor-specific antigen [10]. The other pathway is the interaction of inducible costimulator (ICOS) on the T cells with B7RP-1 on APC [6]. Blockade of the ICOS/B7RP-1 costimulatory pathway prolongs allograft survival in rodents at a delayed time point after transplantation, suggesting that it interferes with the recall of primed T cells [7]. Those findings suggest that targeting ICOS costimulatory pathways could be a potential approach to inhibiting the recall of alloreactive memory T cells. Recent studies have provided evidence that certain newly recognized costimulatory pathways could be involved in the recall of memory T cells but have little effect on naïve T cells.

Treatment with anti-ICOS antibody prolonged cardiac allograft survival significantly in comparison with no-treatment. Anti-ICOS antibody blocked primary accepted cardiac allograft rejection follow skin grafting. Flow cytometry analysis revealed that the majority of infiltrating T cells express ICOS in peripheral blood and spleen cells, which was also confirmed by immunohistochemical staining after

secondary donor type skin grafting. The findings were consistent with those of a previous study showing that ICOS is expressed strongly on activated T cells at the site of inflammation. When skin transplants were performed, memory T lymphocytes changed to effector phase, but this proliferative response was not inhibited by blockade of the ICOS pathway. The findings suggest that ICOS which regulates immune responses independently as a costimulatory molecule have no function with memory T cells. Treatment with anti-ICOS antibody only inhibited naïve T cells expanding but not division. The blockade of anti-ICOS antibody prevents activated T cells associated with ICOS-Ligand. The activated T cells could not immigrate the target organ. Our results suggested that anti-ICOS antibody plays critical roles in the phase of recall response. In other experiment, we found that anti-ICOS antibody is might to be function with developing of memory T cells, but could not interfere with developed memory T cells function (data not published).

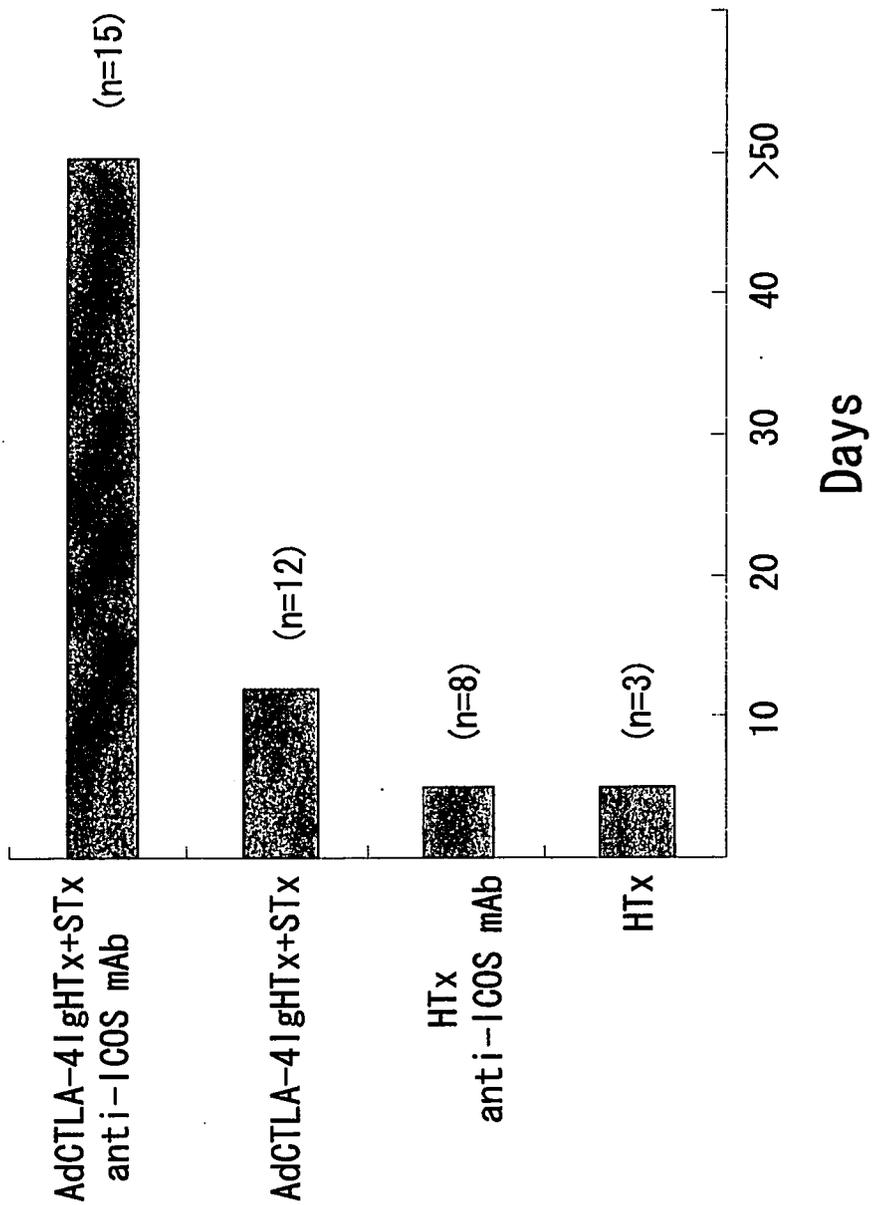
In summary, our findings suggest that the treatment with blockade of ICOS can enhance cardiac allograft survival, indicating costimulator molecular ICOS signaling plays an important role in the recall response of long-term accepted heart following skin grafting in vivo and vitro. Anti-ICOS antibody inhibited the immigration of activated memory T cells for target organ but not the function of memory T cells. In transplantation, it is very important to consider recall response of the memory T cells in understanding the pathogenesis of graft rejection and in designing new and more effective immunosuppression strategies.

#### REFERENCES

1. Kass-Eisler A, Falck-Pedersen E, Alvira M, et al. Quantitative determination of adenovirus-mediated gene delivery to rat cardiac myocytes in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90 (24):11498–11502.
2. Ono KL, Lindsey ES et al. Improved technique of heart transplantation in rats. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1969; 57 (2): 225–229.
3. Guo L, Fujino M, et al. Simultaneous blockade of co-stimulatory signals, CD28 and ICOS, induced a stable tolerance in rat heart transplantation. *Transpl Immunol*. 2003 Oct-Nov;12(1):41-8
4. Guo L, Li XK, et al. Prolonged survival in rat liver transplantation with mouse monoclonal antibody against an inducible costimulator (ICOS). *Transplantation*. 2002 Apr 15; 73(7):1027-32.
5. Hutloff A, Dittrich AM, Beier KC, et al. ICOS is an inducible T-cell co-stimulator structurally and functionally related to CD28. *Nature* 1999; 397: 263.
6. Yoshinaga SK, Whoriskey JS, Khare SD, et al. T-cell co-stimulation through B7RP-1 and ICOS. *Nature* 1999; 402; 827.
7. Harada H, Salama AD, Sho M, et al. The role of the ICOS-B7h T cell costimulatory pathway in transplantation immunity. *J Clin Invest*. 2003 Jul; 112(2):234-43.
8. Bingaman AW, Farber DL, et al. Memory T cells in transplantation: generation, function, and potential role in rejection. *Am J Transplant*. 2004 Jun; 4(6):846-52.
9. Larsen CP, Elwood ET, Alexander DZ, et al. Long-term acceptance of skin and cardiac allografts after blocking CD40 and CD28 pathways. *Nature* 1996; 381: 434-438.
10. Valujskikh A, Pantenburg B, Heeger PS, et al. Primed allospecific T cells prevent the effects of costimulatory blockade on prolonged cardiac allograft survival in mice. *Am J Transplant* 2002; 2: 501-509.
11. Kaech SM, Wherry EJ, Ahmed R, et al. Effector and memory T cell differentiation: implications for vaccine development. *Nat Rev Immunol* 2002; 2: 251-262.
12. Sprent J, Surh C, et al. T cell memory. *Annu Rev Immunol* 2002; 20: 551-579.

作成日 : 2005 年 3 月 12 日

### Survival of primary heart grafts



財団法人日中医学協会  
2004年度共同研究等助成金－在留中国人研究者－報告書

2005年 3月 14日

財団法人 日中医学協会 御中

貴財団より助成金を受領して行った研究テーマについて報告いたします。

添付資料： 研究報告書

中国人研究者名： 佟 晓波 佟晓波

指導責任者名： 鈴木 信夫 職名： 教授

所属機関名： 千葉大学大学院 医学研究院 環境影響生化学  
〒 260-8670

所在地： 千葉市中央区亥鼻 1-8-1

電話： 043-226-2041 内線： 5133

1. 助成金額： 300,000 円

2. 研究テーマ

ヒト細胞におけるシャペロン HSP27 と相互作用する分子の検索

3. 成果の概要（100字程度）

HSP27 を GST 融合タンパク質として大腸菌で大量に発見する系を構築して、大量に精製した。次に、HSP27 を結合したアフィニティーカラムを作製した。このカラムにヒト細胞の細胞溶解液を流して、カラムに結合する分子だけを回収した、回収された HSP27 結合分子を SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動で分離し、クーマシーブルー染色により 4 種類存在することが確認された。今後、この HSP27 結合分子について、LC/MS/MS を用いて蛋白質を同定する予定である。

4. 研究業績

(1) 学会における発表  無 ・  有（学会名・演題）

(2) 発表した論文  無 ・  有（雑誌名・題名）

## ヒト細胞におけるシャペロン HSP27 と相互作用する分子の検索

研究者氏名 佟 曉波  
中国所属機関 承德医学院  
日本研究機関 千葉大学大学院 医学研究院 環境影響生化学  
指導責任者 教授 鈴木 信夫  
共同研究者 喜多和子, 唐田清伸, 朱長林, 吳雅琼

### Abstract

HSP27, a member of the small heat shock protein family, is implicated in diverse biological function. Cytoprotective roles of Hsp27, as a molecular chaperon, include inhibition of caspase activation, prevention from stress-induced disruption of cytoskeleton, and modulation of intracellular redox potential. We recently found that HSP27 is involved in the protective role against UVC-induced cell death in human UVAP-2 cells, possibly via function in DNA repair. In the present study to elucidate the molecular mechanisms of the UVC resistance, we searched for HSP27-interacted proteins in the human cells, by affinity column chromatography using HSP27 protein-binding Sepharose. The HSP27 proteins of wild type and mutated type, in which the residues Ser15, 78 and 82 were substituted for aspartic acids to mimic the phosphorylated HSP27, were expressed as fusion protein with GST in *E. coli*. GST, the wild type (GST-HSP27) and the mutated type (GST-HSP27/3D) of HSP27 fused with GST were purified from *E. coli* using GSH-Sepharose column and then conjugated with NHS-activated Sepharose. Cytosolic and nuclear fractions from cell lysates were prepared from human UVAP-2 cells mock-irradiated and irradiated with UVC (10 J/m<sup>2</sup>). Up to now, the cytosolic fraction from the mock-irradiated cells was applied to the affinity columns and eluted with high salt solution. The eluted fraction was subjected to SDS-PAGE analysis, and four protein bands bound to the GST-HSP27 and GST-HSP27/3D columns but not to the GST column were detected in the comparative SDS-PAGE analysis. Identification of the four proteins appeared to specifically bind to HSP27 is now in progress by mass spectrometry.

**Keywords** HSP27, UVC, HSP27-interacted protein, molecular chaperone, human cells

### Introduction

Stress events induce the expression of a set of highly conserved proteins called heat shock proteins (HSPs) in prokaryotes and eukaryotes. The expression of these proteins is induced not only by elevated temperature but also other types of stress like heavy metals, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, arsenite or alcohols, and increased expression is involved in the protection against stress-induced cellular injury [1-5]. Thus, the more general term 'stress proteins' has been introduced for HSPs, which belong to molecular chaperones. Ultraviolet light (UV) induces significant cellular damage, primarily producing DNA lesions such as thymine dimers and (6-4)photoproducts [6, 7]. Human cells have defense mechanisms to survive UV-induced injury. HSPs may play roles in defense mechanisms since cells preconditioned by heat shock were reported to be resistant to UVB (principally 290- 320 nm in wavelength) irradiation [8-11]. However, the kind of HSP involved in the resistance and the mechanisms underlying the HSP-induced resistance are still elusive. HSP27, a member of the small heat shock protein family, is implicated in diverse biological

function. Cytoprotective roles of Hsp27, as a molecular chaperon, include inhibition of caspase activation, prevention from stress-induced disruption of cytoskeleton, and modulation of intracellular redox potential. [12]. We have established human cell lines differing in their sensitivity to UVC, Rsa and UVAP-2 [13-14]. From the comparative studies of these cell lines, we recently found that HSP27 is involved in the protective role against UVC-induced cell death in human UVAP-2 cells, possibly via function in nucleotide excision repair [15]. In the present study to elucidate the molecular mechanisms of the UVC resistance, we searched for HSP27-interacted proteins in the human cells. We first constructed plasmids to express wild type and mutated type of HSP27, in which the residues Ser15, 78 and 82 were substituted for aspartic acids to mimic the phosphorylated HSP27, as fused proteins with glutathione-S-transferase (GST). These fusion proteins were expressed in *E. coli*. and purified and then conjugated with Sepharose. Next, we searched for HSP27-interacted proteins in UVAP-2 cells by affinity column chromatography using Sepharose binding those fusion proteins, and detected several proteins appeared to specifically bind to HSP27.

## Materials and methods

### *Plasmids*

pBluescript-HSP27, which contain cDNA sequence of *hsp27* gene, was gift from H. Hosoya. (Hiroshima University, Japan)

pBluescript..KS(+)-HSP27/3D mutant, in which 15-Ser, 78-Ser and 82-Ser of *hsp27* were substituted for aspartic acids, was gift from Dr. Weber and Dr. Hicky (University of Nevada, USA). The sequence of the cDNAs of *hsp27* and *hsp27/3D* were inserted to GST fusion protein expression vector using proper sites for restriction enzymes.

### *Purification of protein*

Pellets of *E. coli*. expressing GST, the wild type (GST-HSP27) and the mutated type (GST-HSP27/3D) of HSP27 fused with GST were lysed with a buffer (50mM Tris /HCl, pH 7.5, 10mM 2-ME, 1mM EDTA, 50 mM NaCl, 10% Glycerol) containing 0.1% NP-40, 1 mM PMSF, 0.01mM pepstatin A, 0.08 mg/ml lysozyme, and the lysates were incubated for 1 hour at 37° C and then centrifuged at 10,000 x g for 1 hour at 4° C. The supernatants were applied to Glutathione Sepharose 4 Fast Flow (Amersham biosciences AB SE-751 84 Uppsala Sweden) followed by a wash in the lysis buffer, then eluted with 40mM glutathione. The purified proteins were confirmed by SDS-PAGE analysis.

### *Coupling of proteins with NHS-activated sepharose*

GST, GST-HSP27 and GST-HSP27/3D proteins were dialyzed with a buffer (0.2M NaHCO<sub>3</sub>, pH 8.3, 0.2M NaCl), concentrated by Amicon Ultra-4 (Milipore Corporation Bedford, MA01730 U.S.A) according to the manufacturer's recommendations. The concentrated proteins were coupled with NHS-activated Sepharose (Amersham Pharmacia Biotech AB SE-751 84 Uppsala Sweden) for 2 hours at room temperature and blocked with 0.5 Tris-HCl, pH 8.3, containing 0.5 M NaCl and then washed with 0.1 M CH<sub>3</sub>COONa, pH 4.0, containing 0.5 M NaCl. The blocking and washing were repeated 6 times and finally washed with 50 mM Tris-HCl, pH 7.5, containing 50 mM NaCl.

### *Cells and culture condition*

UVAP-2 cells were established from human RSa cells [13], as a UVC-resistant cell line, by mutagenization with ethyl methanesulfonate followed by UVC irradiation [14]. UVAP-2 cells were cultured in Eagle's MEM (EMEM) (Nissui, Tokyo, Japan) medium supplemented with 10% (v/v) calf serum (CS) (Biosciences PTY Ltd, A. C. N., Australia) at 37° C in a humidified atmosphere containing 5% CO<sub>2</sub>.

### *UVC irradiation*

UVC was generated from a 6-W National germicidal lamp (Matsushita Electronic Industrial Co., Osaka, Japan). The intensity of UVC was 1 J/m<sup>2</sup>/s, which was measured by a UV radiometer, UVR-254 (Tokyo Kogaku Kikai Co., Tokyo, Japan). Cells were seeded in a 100-mm dish and grown to a confluent condition. The cells were irradiated with UVC at an indicated dosage immediately after the medium was removed and then reincubated for an appropriate time as previously described [20]. Mock-irradiated cells were treated in the same manner but without irradiation

### *Preparation of cytosolic and nuclear fraction from human UVAP-2 cells*

#### *Affinity chromatography*

The affinity column was pre-washed with the cell lysis buffer. Cytosolic and nuclear fractions of cell lysates from human UVAP-2 cells mock-irradiated were applied successively to the three affinity column, GST, GST-HSP27 and GST-HSP27/3D binding Sepharose, in their order, washed with the lysis buffer, and then eluted sequentially with a buffer (10mM Tris-HCl, pH 7.5, 10 mM NaCl, 2.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 mM NaF, 2 mM Na<sub>2</sub>VO<sub>4</sub>) containing 1 M NaCl, then the buffer containing 1 M MgCl<sub>2</sub>, and finally 0.1 M glycine - HCl, pH 3.0. Eluted protein were concentrated using a TCA precipitation method, separated by SDS-PAGE, and then detected by CBB or silver staining.

## **Results**

We purified about 7.2mg GST, 6.1mg GST-Hsp27 and 6.44mg GST-Hsp27/3D from 16L, 16L and 14L L-broth culture *E. coli*, respectively (figure1). Cytosolic fractions of cell lysates from human UVAP-2 cells mock-irradiated were applied successively to the two affinity column, GST, GST-HSP27 binding Sepharose. There are four proteins appeared to specifically bind to HSP27 (figure2).

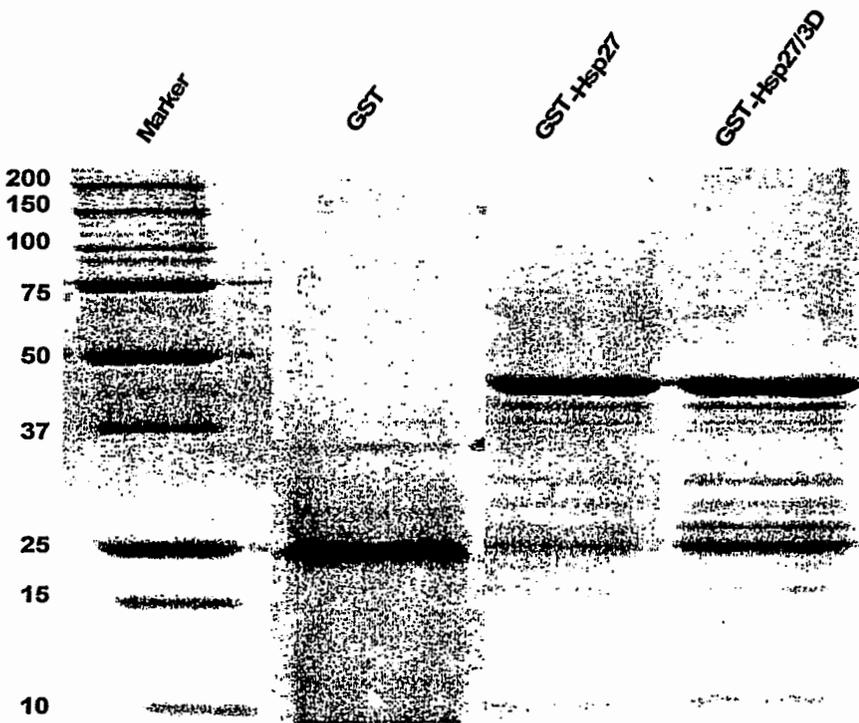


Figure1 The purified proteins were confirmed by SDS-PAGE analysis and stained by CBB

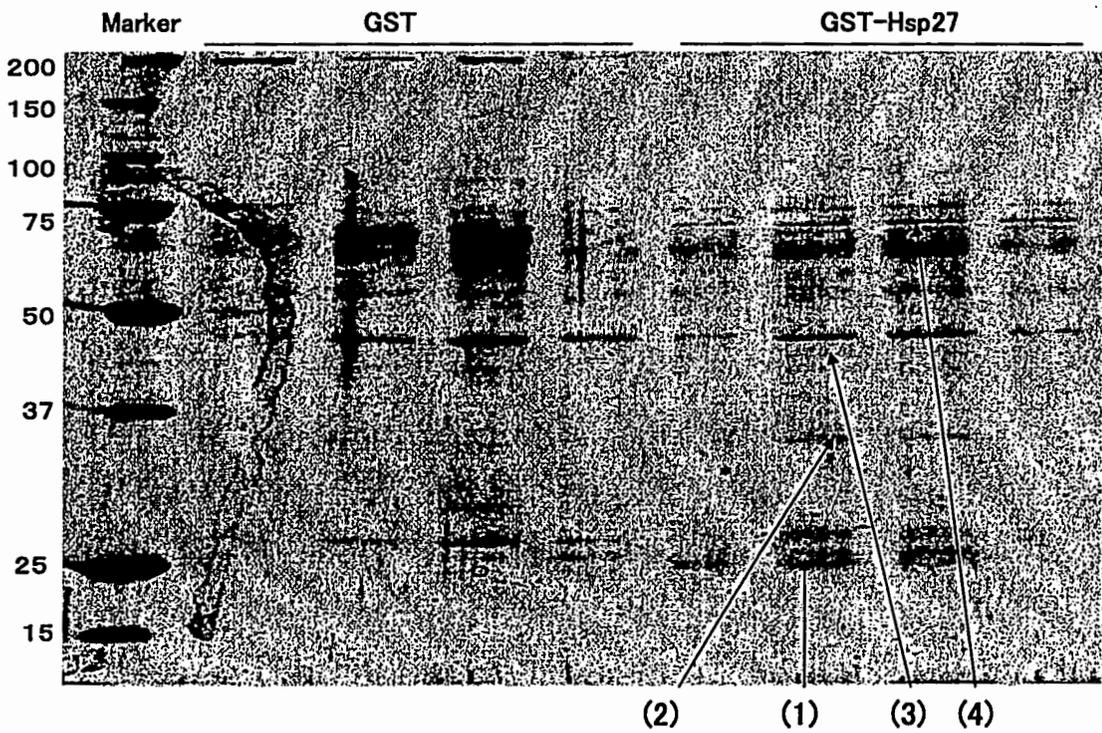


Figure2 Proteins interact with HSP27

## Discussion

It was reported that human cells tolerate damage caused by UVB irradiation if they have been preconditioned for heat treatment [7-9], and it was suggested that inducible HSPs play roles in cellular responses after UV irradiation [10]. However, Trautinger et al. [20-21] reported that overexpression of HSP27 did not confer resistance to UVA (principally 320-380 nm in wavelength)- and UVB-induced cell death in a human squamous cell carcinoma cell line. On the other hand, we recently found that HSP27 has the protective role against UVC-induced cell death in UVC-resistant human UVAP-2 cells, possibly via function in nucleotide excision repair [16]. UVC is a useful tool as a DNA damaging agent for investigating DNA repair mechanisms and stress responses in human cells [22-23]. We used UVC as a DNA damaging stressor and found previously the involvement of some other molecules, such as NPM [15] and syndecan 1 [25], in resistance to UVC in human cells.

HSP27, a member of the small heat shock protein family (sHSP), is expressed constitutively at low levels in many cells and tissues. HSP27 expression increases following heat shock or other type of stress and enhances the cellular resistance to different types of stress, including heat shock, oxidative stress [16-17], and cancer chemotherapy agents [19]. It has been previously reported that HSP27 play roles in the cytoprotective role as a molecular chaperone via inhibition of caspase activation, prevention of stress-induced disruption of the cytoskeleton, and the modulation of the intra-cellular redox potential [13].

The molecular mechanisms of the protective roles of HSP27 against UVC via function in the DNA repair is unknown. If HSP27 also functions in the roles as a molecular chaperone, it is expected to interact with other protein. Zhu *et al.* [26] and Kindas-mugge et al. [27] used immuno-precipitation method to search for HSP27-interacted protein; Zhu *et al.* reported that a small amount of actin is co-precipitated by anti-HSP27 antibody in resting platelets, and Kindas-mugge *et al.* found that HSP27 interacts with actin, p53, HSP70 and HSP90, respectively, in a human epidermal carcinoma cell line transfected with *hsp27* cDNA. In this study, we used an affinity column chromatography method using HSP27-binding Sepharose to search for HSP27- and phosphorylated HSP27- interacted proteins in human UVAP-cells mock-irradiated and irradiated with UVC. For the purpose, mutated type of HSP27, in which 15-Ser, 78-Ser and 82-Ser of *hsp27* were substituted for aspartic acids, as well as wild type of HSP27 was expressed in *E. coli*. as fused proteins with GST, and purified. The mutated type was reported to be mimic phosphorylated HSP27. Up to now, we identified four proteins appeared to specifically bind to HSP27 in cytosolic fraction in the mock-irradiated cells. The identification of the proteins is now in progress by mass spectrometry.

## References

1. F.M. Richards, A. Watson and J.A. Hickman, *Cancer Res.* 48 (1998), 6715- 6720.
2. U. Neuhaus-Steinmetz, C. Xu, F. Fracella, B. Oberheitmann, C. Richter-Landsberg and L. Rensing, *Mol. Pharmacol.* 45 (1994), 36- 41.
3. B.S. Polla, S. Kantengwa, D. Francois, S. Salvioli, C. Franceschi, C. Marsac and A. Cossarizza, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93 (1996), 6458- 6463
4. A.T. McDuffee, G. Senisterra, S. Huntley, J.R. Lepock, K.R. Sekhar, M.J. Meredith, M.J. Borrelli, J.D. Morrow and M.L. Freeman, *J. Cell. Physiol.* 171 (1997), 143- 151.
5. S. Lindquist and E.A. Craig, *The heat-shock proteins.* *Annu. Rev. Genet.* 22 (1988), 631- 677.
6. R.P. Sinha and D.P. Hader, *Photochem. Photobiol. Sci.* 1 (2002), 225- 236.
7. F.R. de Gruijil, H.J. van Kranen and L.H.F. Mullenders, *J. Photochem. Photobiol., B: Biol.* 63 (2001), 19- 27.

8. E.V. Maytin, L.A. Murphy and M.A. Merrill, *Cancer Res.* 53 (1993), pp. 4952- 4959.
9. E.V. Maytin, J.M. Wimberly and K.S. Kane, *J. Invest. Dermatol.* 103 (1994), 547- 553.
10. K.S. Kane and E.V. Maytin, *J. Invest. Dermatol.* 104 (1995), 62- 67.
11. F. Trautinger, I. Kindas-Mugge, R.M. Knobler and H. Honigsmann, *J. Photochem. Photobiol., B: Biol.* 35 (1996), 141- 148.
12. CG. Concannon, A.M Gorman, A. Samali, *Apoptosis*, 8(2003), 61-70
13. T. Kuwata, T. Oda, S. Sekiya, N. Morinaga, *J. Natl. Cancer Inst.* 56 (1976), 919-926
14. N. Suzuki, A. Fuse, *Mutat. Res.* 84 (1981) 133-145
15. C. Wano, K. Kita, S. Takahashi, S. Sugaya, M. Hino, H. Hosoya, N. Suzuki, *Experimental Cell Research*, 298 (584-592)
16. Y. Higuchi, K. Kita, H. Nakanishi, X.L. Wang, S. Sugaya, H. Tanzawa, H. Yamamori, K. Sugita, A. Yamamura and N. Suzuki, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 248 (1998), 597- 602.
17. A.P. Arrigo and J. Landry, Expression and function of the low-molecular-weight heat shock proteins. In: R.I. Morimoto, NY (1994), 335.
18. A.P. Arrigo, *Pathol. Biol. (Paris)* 48 (2000), 280- 288.
19. J. Hout, G. Roy, H. Lambert, P. Chretien and J. Landry, *Cancer Res.* 51 (1991), 5245- 5252.
20. I. Kindas-mügge, I. Herbacek, C. Jantschitsch, M. Micksche and F. Trautinger, *Cell Growth Differ.* 7 (1996), 1167- 1174.
21. F. Trautinger, C. Kokesch, I. Herbacek, R.M. Knobler and I. Kindas-mügge, *J. Photochem. Photobiol., B: Biol.* 39 (1997), 90- 95.
22. P. Herrlich, H. Ponta and H.J. Rahmsdorf, *Rev. Physiol., Biochem. Pharmacol.* 119 (1992), 187- 223.
23. R. M. Tyrrell, *BioEssays* 18 (1996), 139- 148.
24. E.C. Friedberg. In: *DNA Repair*, Freeman, New York (1985), 505- 574.
25. K. Kikuno, K. Kazuko, J. Nomura, T. Hiwasa, H. yYonemithu, N. Suzuki, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 253(1998), 519-523
26. Y. Zhu, S. O'Neill, J. Saklatvala, L. Tassi, *Blood* 84 (1994), 3715-3723.
27. I. Kindas-mügge, C. Riedler, I. Frohlich, M. Micksche, F. Trautinger, *Cell Bio. Inter.* 26 (2002), 109-116.

Finished 10 March 2005

財団法人日中医学協会  
2004年度共同研究等助成金－在留中国人研究者－報告書

2005 年 3 月 3 日

財団法人 日中医学協会 御中

貴財団より助成金を受領して行った研究テーマについて報告いたします。

添付資料： 研究報告書

中国人研究者名： 秦 穎潔   
指導責任者名： 小室 一成 職名： 教授  
所属機関名： 千葉大学大学院医学薬学教育部  
所在地： 〒 260-0856 千葉市中央区亥鼻 1-8-1  
電話： 043-222-7171 内線： 5267

1. 助成金額： 600,000 円

2. 研究テーマ コロニー刺激因子 (G-CSF) における心筋梗塞の治療効果の検討

3. 成果の概要 (100字程度)

我々は、最近 G-CSF が心筋梗塞後心筋リモテリングや、心機能の低下を抑制することを報告した。本研究では、心臓を構成する細胞の中で最も細胞数が多い線維芽細胞に対する G-CSF の作用を検討した。G-CSF は線維芽細胞内のシグナル伝達を惹起し、線維芽細胞が産生する collagen を減少することにより心臓リモテリングを抑制することが認められた。

4. 研究業績

(1) 学会における発表  無 ・  有 (学会名・演題)

(2) 発表した論文  無 ・  有 (雑誌名・題名)

## コロニー刺激因子 (G-CSF) における心筋梗塞の治療効果の検討

研究者氏名	秦 穎潔
中国所属機関	中国河北省承德医学院附属病院老年病科
日本研究機関	千葉大学大学院医学薬学教育部
指導責任者	教授 小室 一成
共同研究者	高野 博之

### Abstract

**Background:** Many cytokines have been reported to be increased in human and animal models with cardiovascular diseases. Myocardial infarction (MI) is accompanied with an inflammatory reaction that induces cardiac dysfunction. The inflammatory reaction has been investigated in animal models of MI or myocardial ischemia reperfusion injury. Several hematopoietic growth factors including granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) have been reported to be positive regulators of granulopoiesis and act at different stages of myeloid cell development. Recently, it has been reported that the treatment with G-CSF promotes mobilization of bone marrow stem cells to the injured heart and induces myocardial regeneration after MI. We also examined the beneficial effects of G-CSF after MI in the mice and large animal models. Our data show that G-CSF prevents left ventricular remodeling and dysfunction after MI but no evidence indicting that G-CSF induces cardiac homing of bone marrow cells in the infarcted heart. Therefore, it is very important to elucidate whether G-CSF acts directly on cardiomyocytes and cardiac fibroblasts and the mechanism of how G-CSF prevents remodeling after MI.

**Methods and results:** In the present study, we first detected G-CSF receptor (G-CSFR) by the method of reverse transcriptional-polymerase chain reaction (RT-PCR) or immunofluorescence staining on cardiomyocytes and cardiac fibroblasts. We examined the effect of G-CSF on intracellular signalings in cultured neonatal rat cardiac fibroblasts by using of western blot method. We also examined the protein level of matrix metalloproteinases (MMPs), collagen type I, and smooth muscle (SM)  $\alpha$ -actin by western blot analysis. Our data showed that G-CSFR was detected on cultured cardiomyocytes and cardiac fibroblasts both by RT-PCR and immunofluorescence staining. Incubation of cardiac fibroblasts with G-CSF (100ng/ml) significantly downregulated the protein level of MMPs, collagen type I, and SM  $\alpha$ -actin. Western blot analysis also revealed that Jak2/Stat3, PKC $\zeta$ , ERK 1/2, and Akt1 were significantly activated in a time-dependent manner by G-CSF treatment.

**Conclusion:** G-CSFR also to be expressed on cardiomyocytes and cardiac fibroblasts. G-CSF exerts directly on cardiac fibroblasts through G-CSFR and induces activations of the Jak2/Stat3, PKC $\zeta$ , ERK 1/2, and Akt1 signaling pathways, resulting in down-regulation of MMPs, collagen, and SM  $\alpha$ -actin protein expression in the cultured cardiac fibroblasts.

**Key words:** G-CSF, cardiac fibroblasts, signaling pathway, MMPs, collagen.

### Introduction

Myocardial infarction (MI) is the most common cause of cardiac morbidity and mortality in many countries. Left ventricular remodeling after MI causes progression to heart failure and leads to death ultimately. Therapeutic advances have been mainly targeted at restoring antegrade perfusion in the infarct-related artery, but there seems to be a ceiling of benefit [1]. It has been recently reported that some cytokines including granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF), erythropoietin (EPO), and leukemia inhibitory factor (LIF) are beneficial on the cardiac remodeling after MI [2-5]. Accordingly, an alternative approach by cytokines maybe promise therapy of MI.

Combination therapy of stem cell factor (SCF) and G-CSF has been reported to improve cardiac dysfunction and reduces mortality after MI in mice [2]. We also observed G-CSF prevents left ventricular remodeling and dysfunction after MI in the mice and large animal models [6-7]. Therefore, it is of particular importance to determine the molecular mechanism of how G-CSF exerts beneficial effect on the heart. Previous studies show that G-CSFR only to be expressed on blood cells such as myeloid leukemic cells, leukemic cell lines [8]. But it has not been elucidated whether G-CSFR is expressed on cardiomyocytes and cardiac fibroblasts.

The healing process after MI begins from absorption of necrotic tissues, moves into granulation with numerous myofibroblasts, rich microvessels, and collagen, and then forms scar tissues consisting

primarily of collagen, with rare vessels via apoptosis of granulation cells [9]. Several studies demonstrated that G-CSF prevented cardiac remodeling and dysfunction at least in part, by improving early post-infarct ventricular expansion through promotion of reparative collagen synthesis in the infarcted area [10-11]. Accordingly, we hypothesized that maybe the degradation of extracellular matrix (ECM) by MMPs contributed to the beneficial effects of G-CSF on MI wounds healing.

In the present study, we demonstrate G-CSF exerts directly on cardiac fibroblasts via G-CSFR that is also expressed on cardiomyocytes and cardiac fibroblasts. G-CSF downregulates the MMPs and type I collage, and smooth muscle (SM)  $\alpha$ -actin protein levels and activates Jak2/Stat3, PKC $\zeta$ , ERK 1/2, and Akt1 signaling pathways.

## Methods

### Cell Culture

Cardiac fibroblasts were prepared from one-day-old Wistar rats as described [12]. Cardiac fibroblasts were obtained from adherent cells on the preplating dish. The cells were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) and 1% penicillin/streptomycin solution, plated 10 ml onto 100-mm plastic culture dishes and cultured at 37 °C in 95% air / 5% CO<sub>2</sub>. Cells from the second passage were used for all of the experiments and the culture medium was changed to serum-free DMEM for 48 hours before stimulation.

### Percoll enrichment of adult mouse cardiomyocytes and non-cardiomyocytes

Adult mouse cardiomyocytes and cardiac fibroblasts were prepared from 10-week-old C57BL6 male mouse by the isolation of adult mouse cardiac myocytes from one heart AfSC procedure protocol [13]. After digestion, cells were dissociated, resuspended in differentiation medium, and loaded onto a discontinuous Percoll gradient as described previously [14]. Cardiomyocytes and noncardiomyocytes, which were mainly consisted of cardiac fibroblasts were separately collected, washed, and used for reverse transcriptional-polymerase chain reaction (RT-PCR).

### RNA Extraction and RT-PCR Analysis

Total RNA was isolated by the guanidinium thiocyanate-phenol chloroform method. A total of 4 mg RNA was transcribed with MMLV reverse transcriptase and random hexamers. For PCR, the following primers from exon 15 and 17 of the murine G-CSFR were used: sense 5'-GTACTCTTGCCACTACCTGT -3'; antisense, 5'-CAAGATACAAGGACCCCAA -3' [15]. PCR was performed under the conditions included an initial denaturation at 94 °C for 2 minutes, followed by a cycle of denaturation at 94 °C for 1 minute, annealing at 58 °C for 1 minute, and extension at 72 °C for 1 minute. Sample was subjected to 40 cycles followed by a final extension at 72 °C for 3 minutes. The product was analyzed on a 1.5% ethidium bromide stained agarose gel.

### Immunocytochemistry

Cardiomyocytes and non-cardiomyocytes from neonatal rats cultured on glass cover slides in DMEM with 10% FBS for 48 hours were incubated with or without anti G-CSFR (Santa Cruz Biotechnology) for 1 hour, then incubated with Cy3-labeled secondary antibodies according to manufacturer's direction. After wash, the cells were double-stained with florescein phalloidin (Molecular Probes) for 1 hour at room temperature.

### Western blots

After appropriate treatments, cardiac fibroblasts were rinsed with ice-cold phosphate-buffered saline one time and frozen immediately in liquid nitrogen then stocked in -80 °C until use. Cells were by thawing in 150 ml of lysis buffer containing 25 mmol/L Tris-Hcl, 25 mmol/L NaCl, 0.5 mmol/L EGTA, 10 mmol/L Pyrophosphate, 1 mmol/L Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 10 mmol/L NaF, 10 nmol/L Okadic acid, 1 mmol/L PMSF, 10 mg/ml Aprotinin, and 10 mg/ml Leupeptin. The extracts were centrifuged at 14000 rpm at 4 °C for 30 minutes, and the total protein concentration was measured with the BCA protein assay kit (Pierce). Proteins (30  $\mu$ g) were separated in 8-10% SDS-PAGE and transferred onto a nitrocellulose transfer membrane (Schleicher & Schuell). After blocking in TBS-T (150 mmol/L NaCl, 50 mmol/L Tris, and 0.1% Tween 20, pH 7.4) containing 5% skim milk, membranes were probed with anti-phospho-PKC $\zeta$  anti-phospho-ERK1/2, anti-phospho-Akt1 (cell signaling), anti-ERK2, anti-Akt1 (Santa Cruz

Biotechnology). ECL system (Amersham Biosciences, Inc.) was used for the detection.

## Results

### **G-CSF Receptor Is Expressed on Cardiomyocytes and cardiac fibroblasts**

To test whether G-CSFR is expressed on cardiomyocytes and cardiac fibroblasts in the adult heart, we performed a RT-PCR experiment by using specific primers for mouse G-CSFR. G-CSFR mRNA was detected in the adult cardiomyocytes and cardiac fibroblasts. The PCR product showed the expected size of 628 bp (Figure 1a). We also examined the G-CSFR expression in cultured rat cardiomyocytes and cardiac fibroblasts by immunocytochemistry. In agreement with a previous study of G-CSFR in living cells by using of G-CSFR / EGFP (enhanced green fluorescent protein) fusion constructs [16], immunostaining for G-CSFR revealed that G-CSFR localized to the plasma and cell membrane under steady-state conditions in cardiomyocytes and cardiac fibroblasts which was detected by the anti G-CSFR antibody. On the other hand, the signaling was disappeared when the anti G-CSFR antibody was deprived (Figure 1b, c).

### **G-CSF Induces Activation of Jak2/Stat3, PKC $\zeta$ , ERK and Akt1 in Cultured Cardiac fibroblasts**

We further examined whether activations Jak2/Stat3, PKC $\zeta$ , ERK, and Akt1 were involved in G-CSF-induced signaling pathways in cultured cardiac fibroblasts. Cells were exposed to G-CSF (100 ng/ml) for 0, 0.5, 1, 2, 10, 15, and 30 minutes. Jak2/Stat3, PKC $\zeta$ , ERK 1/2, and Akt1 activation were quantified by Western blot analysis. As shown in Figure 2, G-CSF significantly induced phosphorylation of Jak2/Stat3, PKC $\zeta$ , ERK, and Akt1 in a time-dependent manner.

### **G-CSF downregulates protein levels of MMPs, collagen type I, and SM $\alpha$ -actin in Cultured Cardiac fibroblasts**

We next examined whether MMPs, collagen, and SM  $\alpha$ -actin protein levels were downregulated by G-CSF in cultured cardiac fibroblasts. We exposed the cells to G-CSF (100ng/ml) for 48 and 72 hours before preparation of whole cell protein lysates. Western blot analysis revealed that G-CSF significantly downregulated MMPs, collagen type I, and SM  $\alpha$ -actin protein levels especially at 72 hours after G-CSF administration (Figure 3, 4).

## Discussion

To our knowledge, we first demonstrated that G-CSFR was expressed on the cardiomyocytes and cardiac fibroblasts. G-CSF activated a series of kinase cascades including Jak2/Stat3, PKC $\zeta$ , ERK, and Akt1 through G-CSFR in cultured cardiac fibroblasts, leading to down-regulation of MMPs, collagen type I, SM  $\alpha$ -actin protein expression.

It has been recently reported that the combination therapy of G-CSF prevents cardiac dysfunction and remodeling after MI in mice [2]. The mobilization of bone marrow stem cells (BMSCs) to myocardium is considered to be a principal mechanism [17-19]. In this study, we showed that G-CSFR was expressed cardiomyocytes and cardiac fibroblasts. Suggesting that beneficial effects of G-CSF on the treatment of MI, at least in part, by direct exertion via G-CSFR on myocardium.

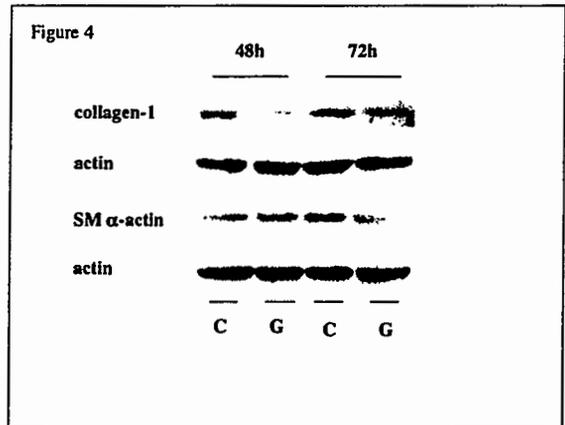
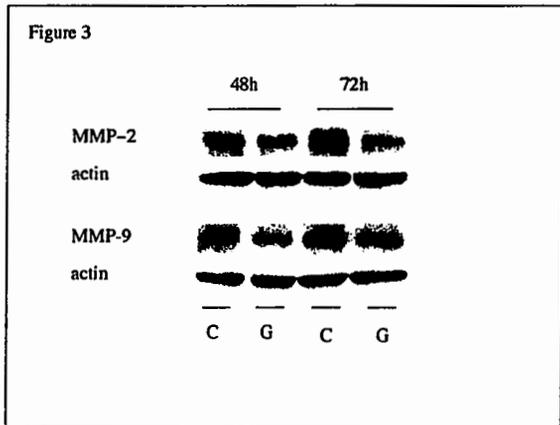
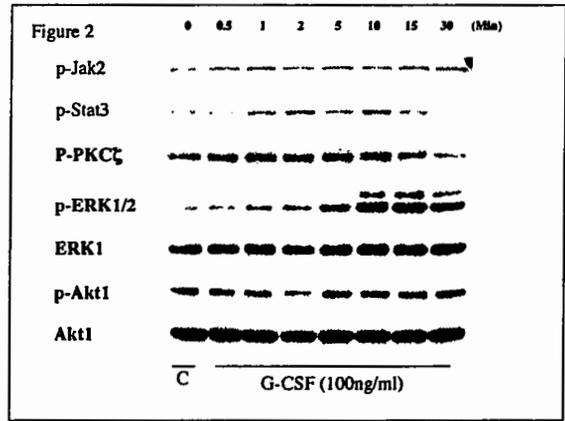
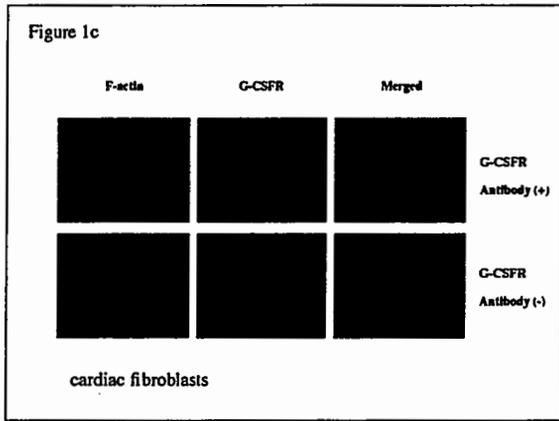
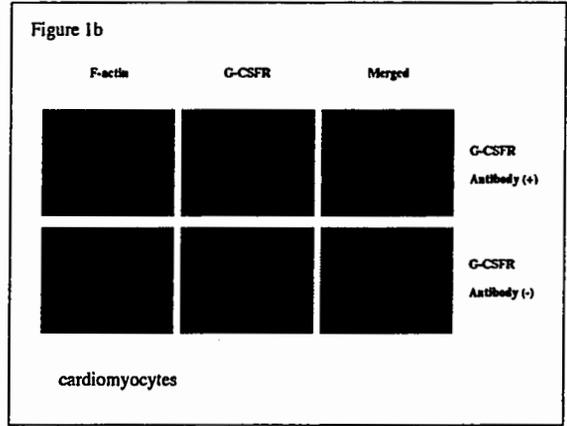
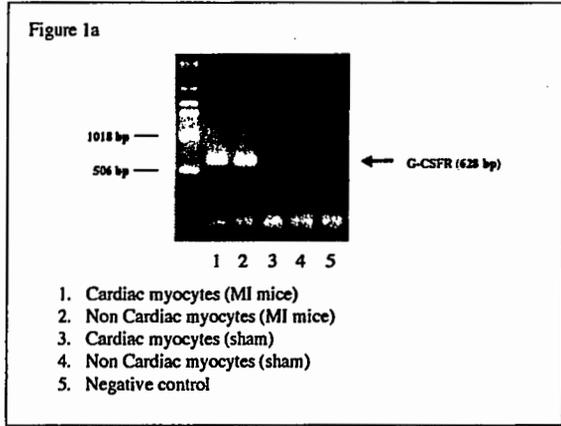
Previous studies reported that a MMP family was increased in the postinfarction heart failure models with permanent occlusion and large infarction and that the inhibitors beneficially affected cardiac remodeling and function [20-21]. It is suggested that an increase in MMP has an aggravating effect on heart failure via collagen degradation. In the present study, we showed that MMPs protein expression were downregulated in G-CSF treated cells, this maybe a chain reaction when collagen synthesis was inhibited by G-CSF. Thus, by some possibility, downregulation of MMPs was one of the protective mechanism of G-CSF prevent from cardiac remodeling after MI. Suggesting that the beneficial effects of G-CSF, at least in part, by regulating the collagen degradation after MI. Furthermore, activation of Stat3 has been reported to promote neovascularization in the myocardium through enhanced expression of VEGF [22] and Akt1 pathway has been reported to play a critical role in cell survival and angiogenesis [23]. Our data show that G-CSF activated Jak2/Stat3, PKC $\zeta$ , ERK 1/2, and Akt1 in a time-dependent manner.

In summary, we demonstrated for the first time of how G-CSF exerts its effect on cardiac fibroblasts in vitro. G-CSF may preserve cardiac function not only by promoting mobilization of BMSCs into the myocardium but also by acting directly on cardiomyocytes and cardiac fibroblasts through its receptor. But it remains unclear whether G-CSF induced increase in VEGF expression in cardiac fibroblasts indeed

contributes to the neovascularization of MI heart. Further studies are needed to elucidate whether G-CSF have the same effects in vivo.

#### Reference

1. Topol, E.J. &Gusto, V.I. Reperfusion therapy for acute myocardial infarction with fibrinolytic therapy or combination reduced fibrinolytic therapy and platelet glycoprotein IIb/IIIa inhibition: the GUSTO V randomised trial. *Lancet*. **357**, 1905-1914 (2001).
2. Orlic, D. *et al.* Mobilized bone marrow cells repair the infarcted heart, improving function and survival. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **98**, 10344-10349 (2001).
3. Moon, C. *et al.* Erythropoietin reduces myocardial infarction and left ventricular functional decline after coronary artery ligation in rats. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **100**, 11612-11617 (2003).
4. Parsa, C.J. *et al.* A novel protective effect of erythropoietin in the infarcted heart. *J. Clin. Invest.* **112**, 999-1007 (2003).
5. Zou, Y., *et al.* Leukemia inhibitory factor enhances survival of cardiomyocytes and induces regeneration of myocardium after myocardial infarction. *Circulation*. **108**, 748-753 (2003).
6. Ohtsuka, M. *et al.* Cytokine therapy prevents left ventricular remodeling and dysfunction after myocardial infarction through neovascularization. *FASEB. J.* **18**, 851-3 (2004).
7. Iwanaga, K. *et al.* Effects of G-CSF on cardiac remodeling after acute myocardial infarction in swine. *Biochem Biophys Res Commun*. **325**, 1353-9 (2004).
8. Avalos, B.R. Molecular analysis of the granulocyte colony-stimulating factor receptor. *Blood*. **88**, 761-777 (1996).
9. Takemura G. *et al.* Role of apoptosis in the disappearance of infiltrated and proliferated interstitial cells after myocardial infarction. *Circ Res*. **82**, 1130-8. (1998)
10. Minatoguchi S. *et al.* Acceleration of the healing process and myocardial regeneration may be important as a mechanism of improvement of cardiac function and remodeling by postinfarction granulocyte colony-stimulating factor treatment. *Circulation*. **109**, 2572-80. (2004)
11. Sugano Y. *et al.* Granulocyte colony-stimulating factor attenuates early ventricular expansion after experimental myocardial infarction. *Cardiovasc Res*. **65**, 446-56. (2005)
12. Zou Y. *et al.* Cell type-specific angiotensin II-evoked signal transduction pathways: critical roles of Gbetagamma subunit, Src family, and Ras in cardiac fibroblasts. *Circ Res*. **82**, 337-45. (1998)
13. O'Connell, T.D. *et al.* Isolation and culture of adult mouse cardiac myocytes for signaling studies. *AfCS. Research. Reports*. **1**, 1-8. (2003)
14. Ikeda K. *et al.* The effects of sarpogrelate on cardiomyocyte hypertrophy. *Life Sci*. **67**, 2991-6. (2000)
15. Semerad, C.L. *et al.* A role for G-CSF receptor signaling in the regulation of hematopoietic cell function but not lineage commitment or differentiation. *Immunity*. **11**, 153-161 (1999)
16. Aarts, L.H. *et al.* Receptor activation and two distinct COOH-terminal motifs control G-CSF receptor distribution and internalization kinetics. *Blood*. **103**, 571-579 (2003)
17. Orlic, D. *et al.* Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature*. **410**, 701-705 (2001)
18. Quaini, F. *et al.* Chimerism of the transplanted heart. *N. Engl. J. Med.* **346**, 5-15 (2002)
19. Jackson, K.A. *et al.* Regeneration of ischemic cardiac muscle and vascular endothelium by adult stem cells. *J. Clin. Invest.* **107**, 1395-1402 (2001)
20. Spinale FG. Matrix metalloproteinases: regulation and dysregulation in the failing heart. *Circ Res*. **90**, 520-30. (2002)
21. Creemers EE. *et al.* Matrix metalloproteinase inhibition after myocardial infarction: a new approach to prevent heart failure? *Circ Res*. **89**, 201-10 (2001)
22. Ferrara, N. *et al.* Heterozygous embryonic lethality induced by targeted inactivation of the VEGF gene. *Nature*. **380**, 439-442 (1996)
23. Shiojima I. *et al.* Role of Akt signaling in vascular homeostasis and angiogenesis. *Circ Res*. **90**, 1243-50 (2002)



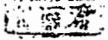
財団法人日中医学協会  
2004年度共同研究等助成金－在留中国人研究者－報告書

2005 年 2 月 22 日

財団法人 日中医学協会 御中

貴財団より助成金を受領して行った研究テーマについて報告いたします。

添付資料： 研究報告書

中国人研究者名： 谷 麗君  (印)

指導責任者名： 工藤 美樹 職名： 教授

所属機関名： 広島大学大学院医歯薬学総合研究科  
〒734-8551

所在地： 広島市南区霞 1-2-3

電話： 082-257-5262 内線： 5262

1. 助成金額： 600,000 円

2. 研究テーマ

cDNA アレイ技術を用いた卵巣癌細胞の浸潤、転移機構に係わる新規遺伝子異常の同定

3. 成果の概要 (100字程度)

患者の同意の下に採取した卵巣癌症例より cDNA アレイ技術を用いて、新規遺伝子異常の同定を行った。さらにそれらの mRNA の発現を semiquantitative PCR 法、蛋白の発現を Immunohistochemistry 法で検討し、臨床病理学的所見と遺伝子発現の相関を解析し、その遺伝子変化が卵巣癌の発生、進展に及ぼす役割やその臨床的意義について考察した。

4. 研究業績

(1) 学会における発表 無 ・ (有) (学会名・演題)

第 56 回日本産科婦人科学会学術講演会

上皮性卵巣腫瘍における IGF mRNA-binding Protein (IMP) の発現と予後因子としての有用性に関する検討

第 36 回日本婦人科腫瘍学会・学術集会

上皮性卵巣癌における セリンプロテアーゼ TADG-15 の発現と予後因子としての有用性に関する検討

(2) 発表した論文 無 ・ (有) (雑誌名・題名)

Br J Cancer. 2005 Jan 31;92(2):278-83.

Transmembrane serine protease TADG-15 (ST14/Matriptase/MT-SP1): expression and prognostic value in ovarian cancer.

## cDNA アレイ技術を用いた卵巢癌細胞の浸潤、転移機構に係わ

### る新規遺伝子異常の同定

研究者氏名： 谷麗君  
中国所属機関： 中国大連医科大学附属第一病院婦産科  
日本研究機関： 広島大学大学院医歯薬学総合研究科産科婦人科  
指導責任者： 教授 大濱 紘三（2004年4月退官）  
教授 工藤 美樹  
共同研究者名： 重政和志，谷本博利，Timothy J. O' Brien

#### 要旨

卵巢癌細胞の間質組織への浸潤能及び腹腔内の転移能に関与する遺伝子異常の同定を行うことに焦点を絞り、cDNA アレイ技術を用いて、間質浸潤能を欠く卵巢境界悪性腫瘍 VS 卵巢限局浸潤型悪性腫瘍及び腹腔内転移陽性型卵巢癌 VS 卵巢限局浸潤型卵巢癌の組み合わせで遺伝子変化の検索を行い、新規遺伝子異常の同定を行うことを目的とする。

患者の同意の下に採取した対象症例より抽出した mRNA を用いて、Spotlight chemiluminescent kit もしくは 32p 標識を行った cDNA プローブを作成し、Atlas Nylon cDNA Expression Array にハイブリダイズし、シグナルを検出する。Atlas image 1.5 を用いて結果を分析し、境界悪性腫瘍と卵巢限局浸潤型悪性腫瘍の間及び腹腔内転移陽性型卵巢癌と卵巢限局浸潤型卵巢癌の間でその発現に差異を認める遺伝子変化を抽出していく。同定された遺伝子変化を確認するために、さらに多数の卵巢腫瘍症例におけるそれらの mRNA の発現を semiquantitative PCR 法、蛋白の発現を Immunohistochemistry 法で検討し、臨床病理学的所見と遺伝子発現の相関を解析し、その遺伝子変化が卵巢上皮の癌化のどの段階で出現し、またその発現変化と腫瘍の浸潤、転移がどう関連しているか検討する。

**Key Words** 卵巢癌，cDNA アレイ，遺伝子，Semiquantitative PCR，Immunohistochemistry

#### 研究項目 I: 上皮性卵巢腫瘍における IGF mRNA-binding Protein (IMP) の発現と予後因子としての有用性に関する検討

#### 緒言:

卵巢腫瘍組織より得られた poly A<sup>+</sup> RNA を鋳型にして調製したプローブを用いて cDNA マイクロアレイを行い、卵巢癌組織で過剰発現する遺伝子を網羅的に検索し、その過程で同定された遺伝子のひとつである、IGF-II mRNA-binding protein (IMP) に着目した。IGF II mRNA-binding protein (IMP-1、-2、-3) は mRNA の安定性や局在また蛋白への翻訳を調節する機能を有し、特に癌遺伝子 c-myc の mRNA と結合してその発現を増加させる機能や細胞骨格蛋白  $\beta$ -actin の mRNA と結合して細胞の運動性を亢進させる機能を介して、各種の癌腫の発生や進展に関与するとされている。そこで、本研究では上皮性卵巢腫瘍における IMP mRNA の発現を検索し、卵巢癌の発生、進展に及ぼす役割やその臨床的意義について考察した。

#### 対象と方法:

患者の同意の下に得られた卵巢腫瘍組織 59 例 (悪性 46 例，境界悪性 5 例，良性 8 例) と正常卵巢組織 7 例を

対象として、Semi-quantitative PCR 法により IMP (IMP-1, -2, -3) mRNA 発現レベルを検索し、臨床病理学的因子との関連を検討した。また、卵巣以外の各種癌組織 7 例も対象に加えた。

#### 結果:

1. 各種癌組織における IMP mRNA の発現を検討した。IMP-1, 2, 3 はいずれも卵巣癌において発現することが確認された。卵巣癌を除く各種癌組織においても、乳癌、肺癌、大腸癌、前立腺癌、膵臓癌において各種 IMP の発現が認められ、IMP が多種類の癌に発現していることが示された。
2. Semi-quantitative PCR 法により、正常卵巣および卵巣腫瘍における各 IMP mRNA の発現レベルを検討した。IMP-1 の発現量は卵巣悪性腫瘍および良性腫瘍において正常卵巣での発現量と比較して有意に高値を示した( $P < 0.05$ )。一方、IMP-2 および IMP-3 の発現量は卵巣悪性腫瘍および境界悪性腫瘍において良性腫瘍もしくは正常卵巣での発現量と比較して有意に高値を示した( $P < 0.05$ )。
3. 卵巣癌における IMP mRNA の発現状況を臨床進行期別に検討した。IMP-1 の発現量は卵巣癌の進展に伴い発現上昇し( $P = 0.015$ )、一方、IMP-3 の発現量は卵巣癌の進展に伴い発現低下していることが認められた( $P = 0.016$ )。各 IMP の発現レベルと卵巣癌の組織学的分化度との関連を解析すると、IMP-1 の発現レベルは、高分化腺癌と比較して中、低分化腺癌において有意に高値となった( $P = 0.023$ )。IMP-2 および IMP-3 の発現レベルと分化度と間には有意な相関は認められなかった。
4. 卵巣癌における IMP mRNA の発現レベルと卵巣癌患者の臨床予後との関連を分析した。単変量解析では、IMP-1 の過剰発現( $P = 0.040$ )は臨床進行期( $P = 0.005$ )とともに卵巣癌予後不良因子となった。しかし、この 2 因子で多変量解析を行うと、IMP-1 の有意差は失われ、臨床進行期のみが独立予後因子となった。

#### 考察:

IMP は卵巣腫瘍の悪性化および進展に関連する発現状況を示し、卵巣癌の発生や進展に重要な役割を果たしているものと考えられた。

#### 参考文献:

1. Parker SL, et al: Cancer statistics. CA Cancer J Clin 46, 5-27(1996).
2. Yaniv K, et al: The involvement of a conserved family of RNA binding proteins in embryonic development and carcinogenesis. Gene 287, 49-54(2002).
3. Ross AF, et al: Characterization of a  $\beta$ -actin mRNA zipcode-binding protein. Mol Cell Biol 17, 2158-2165(1997).
4. Havin L, et al: RNA-binding protein conserved in both microtubule- and microfilament-based RNA localization. Genes Dev 12, 1593-1598(1998).
5. Doyle GA, et al: The c-myc coding region determinant-binding protein: a member of a family of KH domain RNA-binding proteins. Nucleic Acids Res 26, 5036-5044(1998).
6. Nielsen J, et al: A family of insulin-like growth factor II mRNA-binding proteins represses translation in late development. Mol Cell Biol 19, 1262-1270(1999).
7. Mori H, et al: Expression of mouse igf2 mRNA-binding protein 3 and its implications for the developing central nervous system. J Neurosci Res 64, 132-143(2001).
8. Mueller-Pillasch F, et al: Expression of the highly conserved RNA binding protein KOC in embryogenesis. Mech Dev 88, 95-99(1999).
9. Mueller-Pillasch F, et al: Cloning of a gene highly overexpressed in cancer coding for a novel KH-domain containing protein. Oncogene 14, 2729-2733(1997).
10. Ioannidis P, et al: C-myc and IGF-II mRNA-binding protein (CRD-BP/IMP-1) in benign and malignant

- mesenchymal tumors. *Int J Cancer* 94, 480-484(2001).
11. Doyle GA, et al: Amplification in human breast cancer of a gene encoding a c-myc mRNA-binding protein. *Cancer Res* 60, 2756-2759(2000).
  12. Wong KK, et al: Identification of differentially expressed genes from ovarian cancer cells by MICROMAX cDNA microarray system. *Biotechniques* 30, 670-675(2001).
  13. Wang T, et al: Identification of genes differentially over-expressed in lung squamous cell carcinoma using combination of cDNA subtraction and microarray analysis. *Oncogene* 19, 1519-1528(2000).
  14. Russel P: Surface epithelial-stromal tumors of the ovary. In: Blaustein' s Pathology of the Female Genital Tract. Kurman RJ (ed.) Springer-Verlag, New York, pp705-782(1995).
  15. International Federation of Gynecology and Obstetrics (FIGO) Committee on Gynecologic Oncology, Benedet JL, et al: FIGO staging classifications and clinical practice guidelines in the management of gynecological cancers. *Int J Gynecol Obstet* 70, 209-262(2000).
  16. Shigemasa K, et al: p16 overexpression: a potential early indicator of transformation in ovarian carcinoma. *J Soc Gynecol Invest* 4, 95-102(1997).
  17. Shigemasa K, et al: p21: a monitor of p53 dysfunction in ovarian neoplasia. *Int J Gynecol Cancer* 7, 296-303(1997).
  18. Shigemasa K, et al: Cyclin D1 overexpression and p53 mutation status in epithelial ovarian cancer. *J Soc Gynecol Invest* 6, 102-108(1999).
  19. Shigemasa K, et al: Overexpression of testisin, a serine protease expressed by testicular germ cells, in epithelial ovarian tumor cells. *J Soc Gynecol Invest* 7, 358-362(2000).
  20. Bernstein PL, et al: Control of c-myc mRNA half-life in vitro by a protein capable of binding to a coding region stability determinant. *Genes Dev* 6, 642-654(1992).
  21. Prokipcak RD, et al: Purification and properties of a protein that binds to the C-terminal coding region of human c-myc mRNA. *J Biol Chem* 269, 9261-9269(1994).
  22. Coulis CM, et al: Inhibition of c-myc expression in cells by targeting an RNA-protein interaction using antisense oligonucleotides. *Mol Pharmacol* 57, 485-494(2000).
  23. Chen YT, et al: Identification of multiple cancer/testis antigens by allogeneic antibody screening of a melanoma cell line library. *Proc Natl Acad Sci USA* 95, 6919-6923(1998).
  24. Shestakova EA, et al: The physiological significance of  $\beta$ -actin mRNA localization in determining cell polarity and directional motility. *Proc Natl Acad Sci USA* 98, 7045-7050(2001).
  25. Jones JI, et al: Insulin-like growth factors and their binding proteins: biological actions. *Endocr Rev* 16, 3-34(1995).
  26. Yu H, et al: Role of the insulin-like growth factor family in cancer development and progression. *J Natl Cancer Inst* 92, 1472-1489(2000).

注： 本研究は、2004年4月12日「第56回日本産科婦人科学会学術講演会」にて高得点演題として口演発表。

研究項目Ⅱ: 上皮性卵巣癌における セリンプロテアーゼ TADG-15 の発現と予後因子としての有用性に関する検討

緒言:

我々がクローニングした卵巣癌で過剰発現を示すセリンプロテアーゼ遺伝子 TADG-15 について、その発現と臨床的因子との関連を明らかにすることを目的とした。

#### 対象と方法:

患者の同意の下に得られた上皮性卵巣癌組織 89 例 (漿液性腺癌 39 例, 粘液性腺癌 19 例, 類内膜腺癌 17 例, 明細胞腺癌 14 例) を対象として、TADG-15 蛋白の免疫組織化学的発現を検索し、Semi-quantitative PCR 法により TADG-15 mRNA 発現レベルを検索し、臨床病理学的因子との関連を検討した。

#### 結果:

TADG-15 蛋白は卵巣癌 89 例中 50 例にその発現が検出された。臨床進行期別にみると、早期癌症例(I期:72.7%)で進行癌症例(II/III/IV期:46.4%)と比較してより高頻度に発現が認められた ( $p = 0.0157$ )。組織型では明細胞腺癌での発現がその組織型と比較して高頻度であった ( $p = 0.0035$ )。生存分析 (log-rank test) では TADG-15 陽性例は陰性例と比較して有意に予後良好であった ( $p = 0.0480$ )。TADG-15 発現と患者年齢、組織分化度との有意な関連は認められなかった。また、semi-quantitative PCR 法により TADG-15 の mRNA 発現レベルを検討した。Internal control として  $\beta$ -tubulin を用い、target gene の発現量を評価した結果、正常卵巣と比較して卵巣癌で過剰発現レベルが認められた。

#### 考察:

TADG-15 は早期卵巣癌症例において高頻度に発現が認められ、腫瘍の進展とともに発現の down-regulation が起こることが示唆された。また、TADG-15 発現は卵巣癌において良好な予後との関連があることが明らかとなった。

#### 参考文献:

1. Diamandis EP, et al: Human tissue kallikreins: a family of new cancer biomarkers. *Clin Chem* 48, 1198-1205(2002).
2. Duffy MJ: The role of proteolytic enzymes in cancer invasion and metastasis. *Clin Exp Metast* 10, 145-155(1992).
3. Friedrich R, et al: Catalytic domain structures of MT-SP1/matriptase, a matrix-degrading transmembrane serine proteinase. *J Biol Chem* 277, 2160-2168(2002).
4. Goyal J, et al: The role for NES-1 serine protease as a novel tumor suppressor. *Cancer Res* 58, 4782-4786(1998).
5. Hooper JD, et al: Type II transmembrane serine proteases. *J Biol Chem* 276, 857-860(2001).
6. Kim MG, et al: Cloning and chromosomal mapping of a gene isolated from thymic stromal cells encoding a new mouse type II membrane serine protease, epithin, containing four LDL receptor modules and two CUB domains. *Immunogenetics* 49: 420-428(1999).
7. Lee SL, et al: Activation of hepatocyte growth factor and urokinase/plasminogen activator by matriptase, an epithelial membrane serine protease. *J Biol Chem* 275, 36720-36725(2000).
8. Lin CY, et al: Molecular cloning of cDNA for matriptase, a matrix-degrading serine protease with trypsin-like activity. *J Biol Chem* 274, 18231-18236(1999).
9. Liotta LA, et al: Cancer metastasis and angiogenesis: an imbalance of positive and negative regulation. *Cell* 64, 327-336(1991).
10. Mignatti P, et al: Tumor invasion through the human amniotic membrane: requirement for a proteinase cascade. *Cell* 47, 487-498(1986).

11. Neurath H: The diversity of proteolytic enzymes. In *Proteolytic enzymes*, Beynon RJ, Bond JS (eds) pp 1 13(1989). Oxford, UK: IRL press
12. Oberst M, et al: Matriptase and HAI-1 are expressed by normal and malignant epithelial cells in vitro and in vivo. *Am J Pathol* 158, 1301 1311(2001).
13. Oberst MD, et al: Expression of the serine protease matriptase and its inhibitor HAI-1 in epithelial ovarian cancer: correlation with clinical outcome and tumor clinicopathological parameters. *Clin Cancer Res* 8, 1101 1107(2002).
14. Shi YE, et al: Identification and characterization of a novel matrix-degrading protease from hormone-dependent human breast cancer cells. *Cancer Res* 53, 1409 1415(1993).
15. Shigemasa K, et al: p21: a monitor of p53 dysfunction in ovarian neoplasia. *Int J Gynecol Cancer* 7, 296 303(1997).
16. Takeuchi T, et al: Reverse biochemistry: use of macromolecular protease inhibitors to dissect complex biological processes and identify a membrane-type serine protease in epithelial cancer and normal tissue. *Proc Natl Acad Sci USA* 96, 11054 11061(1999).
17. Takeuchi T, et al: Cellular localization of membrane-type serine protease 1 and identification of protease-activated receptor-2 and single-chain urokinase-type plasminogen activator as substrates. *J Biol Chem* 275: 26333 26342(2000).
18. Tanimoto H, et al: Hepsin, a cell surface serine protease identified in hepatoma cells, is overexpressed in ovarian cancer. *Cancer Res* 57, 2884 2887(1997).
19. Tanimoto H, et al: Cloning and expression of TADG-15, a novel serine protease expressed in ovarian cancer. *Proc Am Assoc Cancer Res* 39, 648(1998).
20. Tanimoto H, et al: The stratum corneum chymotryptic enzyme that mediates shedding and desquamation of skin cells is highly overexpressed in ovarian tumor cells. *Cancer* 86, 2074 2082(1999).
21. Tanimoto H, et al: Increased expression of protease M in ovarian tumors. *Tumor Biol* 22, 11 18(2001a).
22. Tanimoto H, et al: Ovarian tumor cells express a transmembrane serine protease: a potential candidate for early diagnosis and therapeutic intervention. *Tumor Biol* 22, 104 114(2001b).
23. Tryggvason K, et al: Proteolytic degradation of extracellular matrix in tumor invasion. *Biochem Biophys Acta* 907, 191 217(1987).
24. Underwood LJ, et al: Cloning of tumor-associated differentially expressed gene-14, a novel serine protease overexpressed by ovarian carcinoma. *Cancer Res* 59, 4435 4439(1999).
25. Underwood LJ, et al: Ovarian tumor cells express a novel multi-domain cell surface serine protease. *Biochim Biophys Acta* 1502, 337 350(2000).
26. Yousef GM, et al: Cloning of a new member of the human kallikrein gene family, KLK14, which is down-regulated in different malignancies. *Cancer Res* 61, 3425 3431(2001).
27. Zhang Y, et al: Assignment of human putative tumor suppressor genes ST13 (alias SNC6) and ST14 (alias SNC19) to human chromosome bands 22q13 and 11q24-q25 by in situ hybridization. *Cytogenet Cell Genet* 83, 56 57(1998).

注：本研究は、2004年7月16日「第36回日本婦人科腫瘍学会 学術集会」にて口演発表、「Br J Cancer」(2005年1月92巻)に掲載。

作成日： 2005年2月22日

財団法人日中医学協会  
2004年度共同研究等助成金-在留中国人研究者-報告書

2005年 2月 28日

財団法人 日中医学協会 御中

貴財団より助成金を受領して行った研究テーマについて報告いたします。

添付資料： 研究報告書

中国人研究者名： 曹 雪源 

指導責任者名： 立松 正衛 職名： 副所長

所属機関名： 愛知県がんセンター研究所腫瘍病理学部  
〒 464-8681

所在地： 名古屋市千種区鹿子殿1-1

電話： 052-762-6111 内線： 7066

1. 助成金額： 600,000 円

2. 研究テーマ

ヘリコバクターピロリ菌感染スナネズミ胃発がんモデルにおけるbeta-catenin遺伝子変異

3. 成果の概要 (100字程度)

H. pylori感染+MNU投与により発生したスナネズミ腺胃癌組織と周囲の非癌部粘膜について検討した。スナネズミbeta-catenin exon 3 cDNAは、ヒト、ラット、マウスとヌクレオチドレベルでそれぞれ、89.3%、95.5%、95.5%と非常に強い相同性を有した。スナネズミの胃癌では、beta-cateninの遺伝子変異、核内の集積はヒトやラットに比し低頻度であった。しかし、胃癌組織の一部で起こるbeta-cateninの活性化は、種を超えておこる現象と考えられた。

4. 研究業績

(1) 学会における発表  無 ・  有 (学会名・演題)

第63回日本癌学会学術総会

Helicobacter pylori感染による慢性炎症と胃粘膜細胞増殖がスナネズミ腺胃癌に影響する

(2) 発表した論文  無 ・  有 (雑誌名・題名)

1.Cancer Science vol 95(6), 487-90

"beta-Catenin gene alteration in glandular stomach adenocarcinomas in N-methyl-N-nitrosourea-treated and Helicobacter pylori-infected Mongolian gerbils"

2.Cancer Science vol 95(11), 872-7

"Eradication of Helicobacter pylori induces apoptosis and inhibits proliferation of Heterotopic Proliferative Glands in infected Mongolian gerbils"

## ヘリコバクターピロリ菌感染スナネズミ胃発がんモデルにおける β-catenin 遺伝子変異

研究者氏名	曹 雪源
中国所属機関	河北省職工医学院付属病院腫瘍外科
日本研究機関	愛知県がんセンター研究所腫瘍病理学部
指導責任者	副所長兼部長 立松 正衛
共同研究者名	塚本徹哉、野崎浩二

### Abstract

The goal of this study was to elucidate whether β-catenin gene mutations might contribute to glandular stomach carcinogenesis in *Helicobacter pylori* (*H. pylori*)-infected Mongolian gerbils. Firstly, exon 3 of gerbil β-catenin cDNA, a mutation hot spot, was cloned and sequenced and found to have 89.3% homology with the human form and 95.5% with the rat and mouse forms. Peptide sequence in this region was shown to be 100% conserved in these mammals. Then, 45 stomach adenocarcinomas induced with *N*-methyl-*N*-nitrosourea (MNU) plus *H. pylori* infection and 7 induced with MNU alone were examined for beta-catenin expression by immunohistochemistry and for DNA mutations using a combination of microdissection and PCR-single strand conformation polymorphism analysis. One gastric cancer in the MNU + *H. pylori* group (2.2%) displayed nuclear (N) β-catenin localization, 3 (6.7%) showed cytoplasmic (C) distribution in local regions, and 41 (91.1%) demonstrated cell membrane (M) localization. Tumors induced by MNU alone showed only membranous β-catenin localization (7/7). Analysis of exon 3 of the β-catenin gene demonstrated all tumors with membrane or cytoplasmic staining as well as surrounding normal mucosa (S) to feature wild-type beta-catenin. In contrast, the lesion with nuclear staining had a missense mutation at codon 34 [GAC (Gly) → GAA (Glu)] in exon 3 (1/1 = 100%, N vs. M,  $P < 0.05$ ; and N vs. S,  $P < 0.05$ ). In conclusion, these results suggest that β-catenin may not be a frequent target for mutation in stomach carcinogenesis in MNU + *H. pylori*-treated gerbils.

**Key Words** Mongolian gerbils, stomach cancer, β-catenin, *Helicobacter pylori*

### Introduction

Abnormal expression of E-cadherin and β-catenin results in loss of epithelial cell-to-cell adhesion leading to uncontrolled cell growth and may therefore participate in gastric cancer development.<sup>1, 2)</sup> However, studies of mutations relevant to Wnt/β-catenin signaling in human stomach tumors have yielded conflicting results.<sup>3-6)</sup> We previously reported the existence of β-catenin gene mutations in 18% of rat stomach cancers induced by *N*-methyl-*N*'-nitro-*N*-nitrosoguanidine (MNNG)<sup>7)</sup> In contrast, no mutations were found in *N*-methyl-*N*-nitrosourea (MNU)-induced rat gastric carcinomas in another study.<sup>8)</sup> Therefore, the clinicopathological significance of β-catenin gene mutation is unclear.

Recently, the *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) infected Mongolian gerbil has been established as an appropriate animal model for the study of gastric cancer development, with induction of adenocarcinomas by MNNG or MNU.<sup>9-12)</sup> However, little information has thus far been generated regarding molecular events occurring in gerbil model, partly reflecting the undefined genetic background.

In this study, stomach adenocarcinomas developing in *H. pylori*-infected or uninfected gerbils treated with MNU in the drinking water were utilized to examine β-catenin protein localization by immunohistochemistry and the mutational status of exon 3 of β-catenin gene using DNA extracted from histologically distinct regions.

## Subjects and methods

### Tumor samples

Fifty-two gastric adenocarcinomas were collected from fifty gerbils treated with one of three experimental protocols. In experiment I, twenty-eight 7 week-old male specific pathogen-free male Mongolian gerbils (*Meriones unguiculatus*; MGS/Sea, Seac Yoshitomi, Ltd., Fukuoka) were inoculated with *H. pylori* (ATCC 43504, American Tissue Culture Collection, Rockville, MD), then starting two weeks thereafter, were given drinking water ad libitum containing 10 ppm of MNU (Sigma Chemical Co., St Louis, MO) in light-shielded bottles for 20 weeks continuously. In experiment II, fifteen gerbils received MNU in water at a concentration of 20 ppm for alternate weeks for a total of 5 weeks exposure and inoculated with *H. pylori* one week after the completion of this carcinogen exposure. In experiment III, 7 gerbils received MNU only at a concentration of 10 ppm for 20 weeks continuously. All animals were sacrificed at the 70th experimental week. The excised stomachs were fixed in 10 % formalin in phosphate buffer for 24h and samples of tumors and background tissue were routinely processed for embedding in paraffin.

### Histopathological analysis

Tissue sections were stained with hematoxylin and eosin (H&E) for histological diagnosis. Immunohistochemical staining with monoclonal anti- $\beta$ -catenin antibody (clone 14, BD Transduction Laboratories, Lexington, KY) at 4 °C overnight followed by the avidin-biotin complex method (Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA) was performed as described earlier.<sup>13</sup> Immunoreactivity of  $\beta$ -catenin was classified into “membranous (M)”, “cytoplasmic (C)”, and “nuclear (N)” according to the intracellular localization of the protein. Tumors were then classified into “M” with only membranous  $\beta$ -catenin staining, “C” harboring tumor cells with cytoplasmic  $\beta$ -catenin at least in part but without nuclear staining, and finally “N” possessing tumor cells with nuclear accumulation of  $\beta$ -catenin anywhere within the tumor, as described previously.<sup>7</sup>

### Sequencing analysis of $\beta$ -catenin exon 3

A segment of 224 bp from the genomic DNA in the normal gastric mucosa of Mongolian gerbils was amplified. The PCR product was prepared as the template and the nucleotide sequence was analyzed using a BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit, v 3.1 (Applied Biosystems, Foster City, CA) with an ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Sequences of the forward (5'-GCTGACCTGATGGAGTTGGA-3') and reverse (5'-GCTACTTGCTCTTGCGTGAA-3') PCR primers were designed based on the similarity of those of human, mouse, and rat as described.<sup>13</sup>

### PCR-single strand conformation polymorphism (PCR-SSCP) analysis and direct sequencing

Tumor areas and surrounding stomach mucosa were microdissected from 10- $\mu$ m-thick unstained serial paraffin sections under a stereoscopic microscope, then, genomic DNA was extracted using the Pinpoint Slide DNA Isolation System (Zymo Research, Orange, CA) used in our previous work.<sup>7</sup> PCR-SSCP analysis of  $\beta$ -catenin exon 3 was performed with established methods.<sup>13,14</sup>

## Results

### $\beta$ -Catenin localization

Fifty-two animals were observed to have 45 differentiated and 7 undifferentiated gastric adenocarcinomas. In the MNU+*H. pylori* group, immunostaining of  $\beta$ -catenin revealed that 41 of the demonstrated tumors had only membranous localization (41/45, 91.1%) and 3 had (3/45, 6.7%) cytoplasmic  $\beta$ -catenin staining. The majority of differentiated

adenocarcinomas had preserved cellular and nuclear polarity showing homogeneous low-grade morphology. In contrast, one small lesion showed heterogeneity with high-grade cytological and structural atypia within the tumor masses, where nuclear  $\beta$ -catenin accumulation was observed (1/45, 2.2%, see Fig. 1). On the other hand, all samples (7/7, 100%) in MNU only group had membranous localization (Table 1).

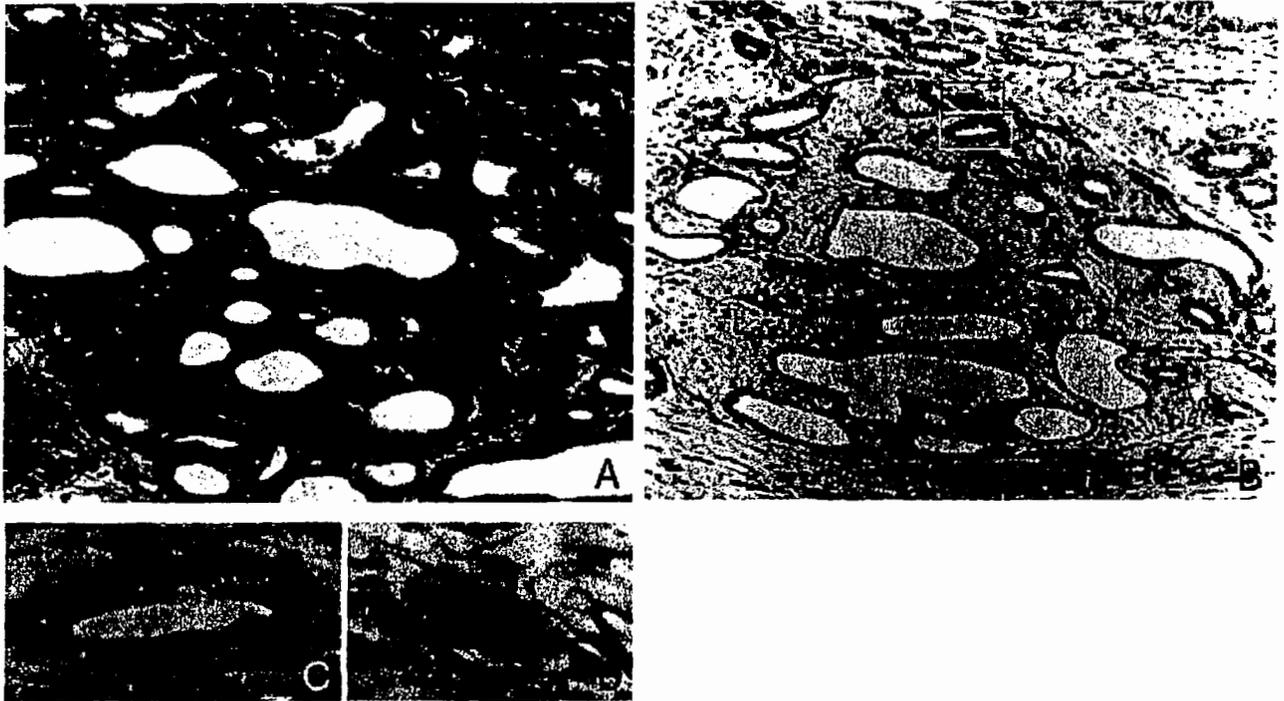


Fig. 1.

Mongolian gerbil glandular stomach cancers induced by MNU and *H. pylori* infection. (A) H&E staining of a differentiated adenocarcinoma induced by MNU and *H. pylori* infection (X80). (B) Immunohistochemical analysis of  $\beta$ -catenin protein (X80). (C) Magnified yellow box in (B), representative results for tumor cells with membranous localization of  $\beta$ -catenin (X 640). (D) Magnified red box in (B), representative results for tumor cells with nuclear accumulation of  $\beta$ -catenin (X 640).

Table 1.  $\beta$ -Catenin localization and exon 3 mutation in Mongolian gerbils' stomach tumors

		$\beta$ -Catenin Localization		$\beta$ -Catenin mutation	
		MNU+ <i>H. pylori</i>	MNU only	MNU+ <i>H. pylori</i>	MNU only
Gastric tumor	Nucleus	1/45 (2.2%)	0/7 (0%)	1/1 (100%) <sup>a</sup>	0/7 (0%) <sup>d</sup>
	Cytoplasm	3/45 (6.7%)	0/7 (0%)	0/3 (0%)	0/7 (0%)
	Membrane	41/45 (91.1%)	7/7 (100%)	0/41 (0%) <sup>b</sup>	0/7 (0%)
Surrounding normal tissue	Membrane	45/45 (100%)	7/7 (100%)	0/41 (0%) <sup>c</sup>	0/7 (0%)

a:  $P < 0.05$  vs. b and c;  $P = 0.13$  vs. d. (Fisher's exact test)

#### $\beta$ -catenin exon 3 sequence of normal gerbil

Sequences of the 224 bp portion of  $\beta$ -catenin exon 3 cDNA in various animals including a gerbil, human, rat, mouse, and xenopus were aligned (Fig. 2), and the nucleotide sequences of the Mongolian gerbil and human forms found to be demonstrated good homology (89.3%), the relation to the mouse and rat goes being even more close (95.5%). Peptide sequences in this region matched completely in the mammals, and almost perfectly (97.2%) with that of xenopus.

#### $\beta$ -Catenin gene mutations

Representative PCR-SSCP results are shown in Fig. 3. DNA samples from lesions with membranous and cytoplasmic staining showed similar DNA mobility as the surrounding normal tissues and a wild type control (lane 1). However,

the example with nuclear  $\beta$ -catenin staining (lane 2) harbored a band (a) with abnormal mobility. Sequencing analysis confirmed this to be due to a GAC (Gly)  $\rightarrow$  GAA (Glu) missense mutation at codon 34 (Fig. 4).

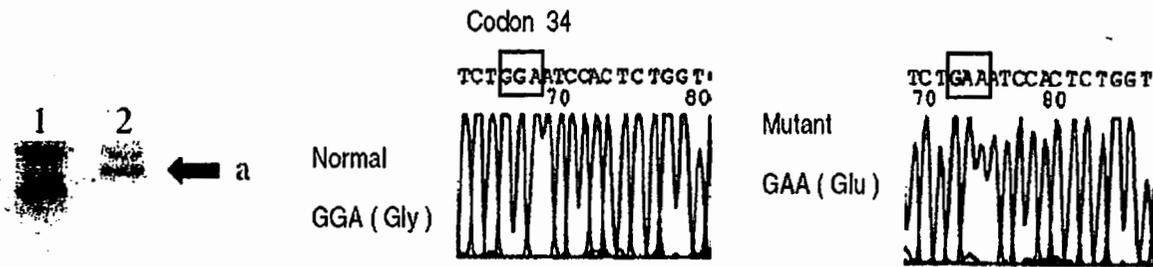


Fig. 3.

PCR-SSCP analysis of  $\beta$ -catenin exon 3 in gerbil stomach adenocarcinomas. Lane 1, wild type control. Lane 2, adenocarcinoma sample with nuclear  $\beta$ -catenin staining showing a mobility shift. "a", abnormal band.

Fig. 4.

Sequencing analysis of the  $\beta$ -catenin gene isolated from the gerbil stomach carcinoma illustrated in Fig. 3 showing codon 34. Top panel, wild type; bottom panel, mutant.

## Discussion

Our present data demonstrated only a single mutation at exon 3 of  $\beta$ -catenin gene observed in one of 45 cancers developing in Mongolian gerbils infected with *H. pylori* and treated with MNU, and 7 cancers developing in MNU only. To our knowledge, this is the first report of any such mutation of the  $\beta$ -catenin gene in a gastric cancer in a Mongolian gerbil. In human and rat lesions, mutations at exon 3 of  $\beta$ -catenin are usually localized at glycogen synthase kinase (GSK)-3 $\beta$  phosphorylation sites (codons 29, 37, 41, and 47) and the adjacent codons (28, 32, 34, 39, and 48), where serine and threonine residues are physiologically phosphorylated. The mutation spectrum of  $\beta$ -catenin in the Mongolian gerbil gastric cancer, although only one case in this study, was in line with the reports for rodent tumors located at codon 34 of exon 3.<sup>15,16</sup> Our mutation of  $\beta$ -catenin gene was limited to nuclear staining of the protein. We have previously demonstrated such mutations to correlate with the nuclear  $\beta$ -catenin in rat gastric cancers induced with MNNG.<sup>7</sup> Ikenoue et al.<sup>17</sup> have suggested that the  $\beta$ -catenin gene mutation status appears associated with a shift in the localization from the membrane to nucleus. It is well known that the mutations can prevent degradation of  $\beta$ -catenin protein in an APC (adenomatous polyposis coli) dependent manner and cause activation of the  $\beta$ -catenin / Tcf-4 signal transduction pathway in human and rodent models including rats and mice. Since sequences of  $\beta$ -catenin exon 3 were highly conserved among the mammals analyzed in this report, physiological role of  $\beta$ -catenin and oncogenic mechanism associated with its mutation could be quite similar in Mongolian gerbils as well.

In human stomach cancers, the incidences of mutations in exon 3 of  $\beta$ -catenin gene have ranged from 0 to over 30 percent, and loss of E-cadherin expression appears to correlate with poor differentiation and invasion into adjacent organs in adenocarcinomas.<sup>18-21</sup> We have previously revealed a timing of  $\beta$ -catenin mutation in the late stage progression in rat stomach cancers.<sup>7</sup> In addition, Saito et al.<sup>22</sup> detected no mutations in exon 3 of the  $\beta$ -catenin gene in 9 early-onset human gastric cancers while Clements et al.<sup>19</sup> found a significant number of stomach adenocarcinomas with  $\beta$ -catenin mutations and nuclear accumulation including advanced stage lesions. Therefore, we consider that  $\beta$ -catenin gene mutations might be important for late stage progression in gastric carcinogenesis.  $\beta$ -Catenin activation is usually confined to a small region within a stomach cancer, and thus using microdissection technique proved to allow sampling of pure populations of tumor cells for mutations, which may prevent false-negative results.<sup>19</sup> The discrepancy in frequency with previous reports could be due to techniques applied for extraction of DNA from tumor tissues.

In conclusion, mutation of the  $\beta$ -catenin gene exon 3 may not be a common event in generation of stomach cancers in

the Mongolian gerbil model with MNU exposure and *H. pylori* infection but uncontrolled activation of Wnt signaling pathway could contribute stomach carcinogenesis in certain tumors. In this study, one  $\beta$ -catenin mutation was detected from *H. pylori*-infected gerbils, showing no statistical significance between MNU+*H. pylori* and MNU only groups (1/45 vs. 0/7,  $P>0.05$ ). Thus, *H. pylori* infection may not enhance  $\beta$ -catenin gene alteration. It may help clarify the influence of *H. pylori* infection in stomach carcinogenesis to analyze more samples treated with MNU only and to compare the two groups in the future. *H. pylori* infection frequently causes chronic gastritis and long-term infection increases the risk of gastric cancer. Yu et al.<sup>23)</sup> earlier found that loss or downregulation of  $\alpha$ -catenin mRNA in the gastric mucosa was associated with *H. pylori* infection, which is also known to accelerate E-cadherin methylation.<sup>24)</sup> These results are suggestive of activation of the Wnt-catenin-Tcf signaling pathway with *H. pylori* infection in the stomach.  $\beta$ -Catenin was expressed on the membrane of the cancer cells in 48 of 52 (92%) gastric cancer tissues. Thus, other molecular mechanisms including downregulation of E-cadherin might be happened in our model. Whether other genetic or epigenetic alteration occur in gastric cancer cells in cases lacking  $\beta$ -catenin mutations is an intriguing possibility warranting further research.<sup>25, 26)</sup>

## References

1. Guilford P, Hopkins J, Harraway J, McLeod M, McLeod N, Harawira P, Taite H, Scoular R, Miller A, Reeve AE. E-cadherin germline mutations in familial gastric cancer. *Nature* 1998; 392: 402-5.
2. Shimoyama Y, Hirohashi, S. Expression of E- and P-cadherin in gastric carcinomas. *Cancer Res* 1991; 51: 2185-92
3. Candidus S, Bischoff P, Becker KF, Hofler H. No evidence for mutations in the alpha- and beta-catenin genes in human gastric and breast carcinomas. *Cancer Res* 1996; 56: 49-52.
4. Woo DK, Kim HS, Lee HS, Kang YH, Yang HK, Kim WH. Altered expression and mutation of beta-catenin gene in gastric carcinomas and cell lines. *Int J Cancer* 2001; 95: 108-13.
5. Tong JH, To KF, Ng EK, Lau JY, Lee TL, Lo KW, Leung WK, Tang NL, Chan FK, Sung JJ, Chung SC. Somatic beta-catenin mutation in gastric carcinoma--an infrequent event that is not specific for microsatellite instability. *Cancer Lett* 2001; 163: 125-30.
6. Lee JH, Abraham SC, Kim HS, Nam JH, Choi C, Lee MC, Park CS, Juhng SW, Rashid A, Hamilton SR, Wu TT. Inverse relationship between APC gene mutation in gastric adenomas and development of adenocarcinoma. *Am J Pathol* 2002; 161: 611-8.
7. Tsukamoto T, Yamamoto M, Ogasawara N, Ushijima T, Nomoto T, Fujita H, Matsushima T, Nozaki K, Cao X, Tatematsu M. beta-Catenin mutations and nuclear accumulation during progression of rat stomach adenocarcinomas. *Cancer Sci* 2003; 94: 1046-51.
8. Shimizu M, Suzui M, Moriwaki H, Mori H, Yoshimi N. No involvement of beta-catenin gene mutation in gastric carcinomas induced by N-methyl-N-nitrosourea in male F344 rats. *Cancer Lett* 2003; 195: 147-52.
9. Hirayama F, Takagi S, Yokoyama Y, Iwao E, Ikeda Y. Establishment of gastric *Helicobacter pylori* infection in Mongolian gerbils. *J Gastroenterol* 1996; 31: 24-28.
10. Tatematsu M., Yamamoto M., Shimizu N., Yoshikawa A., Fukami H., Kaminishi M., Oohara T, Sugiyama A, Ikeno T. Induction of glandular stomach cancers in *Helicobacter pylori*-sensitive Mongolian gerbils treated with N-methyl-N-nitrosourea and N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine in drinking water. *Jpn J Cancer Res* 1998; 89: 97-104.
11. Sugiyama A, Maruta F, Ikeno T, Ishida K, Kawasaki S, Katsuyama T, Shimizu N, Tatematsu M. *Helicobacter pylori* infection enhances N-methyl-N-nitrosourea-induced stomach carcinogenesis in the Mongolian gerbil. *Cancer Res* 1998; 58: 2067-9.
12. Shimizu N, Ikehara Y, Inada K, Nakanishi H, Tsukamoto T, Nozaki K, Kaminishi M, Kuramoto S, Sugiyama A, Katsuyama T, Tatematsu M. Eradication diminishes enhancing effects of *Helicobacter pylori* infection on glandular

- stomach carcinogenesis in Mongolian gerbils. *Cancer Res* 2000; 60: 1512-4.
13. Tsukamoto T, Tanaka H, Fukami H, Inoue M, Takahashi M, Wakabayashi K, Tatematsu M. More frequent beta-catenin gene mutations in adenomas than in aberrant crypt foci or adenocarcinomas in the large intestines of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP)-treated rats. *Jpn J Cancer Res* 2000; 91: 792-6.
  14. Yamamoto M, Tsukamoto T, Sakai H, Shirai N, Ohgaki H, Furihata C, Donehower LA, Yoshida K, Tatematsu M. p53 knockout mice (-/-) are more susceptible than (+/-) or (+/+) mice to N-methyl-N-nitrosourea stomach carcinogenesis. *Carcinogenesis* 2000; 21: 1891-7.
  15. Ebert MP, Fei G, Kahmann S, Muller O, Yu J, Sung JJ, Malfertheiner P. Increased beta-catenin mRNA levels and mutational alterations of the APC and beta-catenin gene are present in intestinal-type gastric cancer. *Carcinogenesis* 2002; 23: 87-91.
  16. Suzui M, Ushijima T, Dashwood RH, Yoshimi N, Sugimura T, Mori H, Nagao M. Frequent mutations of the rat beta-catenin gene in colon cancers induced by methylazoxymethanol acetate plus 1-hydroxyanthraquinone. *Mol Carcinog* 1999; 24: 232-7.
  17. Ikenoue T, Ijichi H, Kato N, Kanai F, Masaki T, Rengifo W, Okamoto M, Matsumura M, Kawabe T, Shiratori Y, Omata M. Analysis of the beta-catenin/T cell factor signaling pathway in 36 gastrointestinal and liver cancer cells. *Jpn J Cancer Res* 2002; 93: 1213-20.
  18. Sasaki Y, Morimoto I, Kusano M, Hosokawa M, Itoh F, Yanagihara K, Imai K, Tokino T. Mutational analysis of the beta-catenin gene in gastric carcinomas. *Tumor Biol* 2001; 22: 123-30.
  19. Clements WM, Wang J, Sarnaik A, Kim OJ, MacDonald J, Fenoglio-Preiser C, Groden J, Lowy AM. beta-Catenin mutation is a frequent cause of Wnt pathway activation in gastric cancer. *Cancer Res* 2002; 62: 3503-6.
  20. Park WS, Oh RR, Park JY, Lee SH, Shin MS, Kim YS, Kim SY, Lee HK, Kim PJ, Oh ST, Yoo NJ, Lee JY. Frequent somatic mutations of the beta-catenin gene in intestinal-type gastric cancer. *Cancer Res* 1999; 59: 4257-60.
  21. Chen HC, Chu RY, Hsu PN, Hsu PI, Lu JY, Lai KH, Tseng HH, Chou NH, Huang MS, Tseng CJ, Hsiao M. Loss of E-cadherin expression correlates with poor differentiation and invasion into adjacent organs in gastric adenocarcinomas. *Cancer Lett* 2003; 201: 97-106.
  22. Saito A, Kanai Y, Maesawa C, Ochiai A, Torii A, Hirohashi S. Disruption of E-cadherin-mediated cell adhesion systems in gastric cancers in young patients. *Jpn J Cancer Res* 1999; 90: 993-9.
  23. Yu J, Ebert MP, Miehke S, Rost H, Lendeckel U, Leodolter A, Stolte M, Bayerdorffer E, Malfertheiner P. alpha-catenin expression is decreased in human gastric cancers and in the gastric mucosa of first degree relatives. *Gut* 2000; 46: 639-44.
  24. Waki T, Tamura G, Tsuchiya T, Sato K, Nishizuka S, Motoyama T. Promoter methylation status of E-cadherin, hMLH1, and p16 genes in nonneoplastic gastric epithelia. *Am J Pathol* 2002; 161: 399-403
  25. Kaneko M, Morimura K, Nishikawa T, Wanibuchi H, Takada N, Osugi H, Kinoshita H, Fukushima S. Different genetic alterations in rat forestomach tumors induced by genotoxic and non-genotoxic carcinogens. *Carcinogenesis* 2002; 23: 1729-35.
  26. Hirohashi S, Kanai Y. Cell adhesion system and human cancer morphogenesis. *Cancer Sci* 2003; 94: 575-81.

注：本研究は「Cancer Science」(2004年6月VOL94巻)に掲載。

作成日：2005年2月28日