

日本財団補助金による

1996年度財団法人日中医学協会助成報告書

—調査並びに研究に対する助成—

1997年2月27日

財団法人 日中医学協会

理事長 中島章 殿

研究代表者氏名 下條信弘



所属機関名 筑波大学

職名 教授 年齢 57 才

所在地 〒305 茨城県つくば市天王台1-1-1

電話 0298-53-3133 内線

1. 研究課題

中国海南省少数民族におけるGIST遺伝子欠損率および癌発症率の研究  
調査研究

2. 研究期間 自 1996年4月15日 ~ 至 1997年3月15日

3. 研究組織

日本側研究者氏名 下條信弘 (57才)

所属機関 筑波大学

職名 教授

中国側研究者氏名 孫貴範 (50才)

所属機関 中国医科大学

職名 教授

4. 研究目的、方法、成果と考察、結論の形式で、A4版にて4,000字以上で報告し、研究成果の発表予定についても記載して下さい。尚、論文発表に当っては、日本財団補助金による旨を明記して下さい。

5. 収支決算報告

中国海南島少数民族におけるGSTα遺伝子欠損率および癌発生率の調査研究

1996年4月11日交付通知のあった研究課題

についての収支決算を行ないました。関係書類を添えて、次のとおり報告します。

交付を受けた金額	支 出 内 訳				
	消耗品費	謝 金	旅 費	その他	合 計
900,000 円	296,000 円	150,000 円	454,000 円	0 円	900,000 円

支出費内訳（消耗品、謝金、旅費、その他の項目別に記載・別紙可）

区 分	金 額	使 用 目 的
消耗品費	296,000,-	GSTα遺伝子酵素測定用試薬, ガラス器具 実験補助, 資料整理
謝 金	150,000,-	
旅 費	454,000,-	
		1. 航空代(沈陽⇒海口)癌患者4人分 2. 予備調査(海南島4人分) 3. 宿泊代(4人×6泊) 4. 車代(5日肉, 1台) 5. 人件費(8人×7日肉)

# 中国海南島少数民族におけるGST $\mu$ 遺伝子欠損率および癌発生率の調査研究

日本側研究者代表  
下條信弘  
筑波大学 教授

中国側研究者代表  
孫貴範  
中国医科大学 教授

## 1. 目的

グルタチオンS-トランスフェラーゼ(GST  $\mu$ )は肝を初め、広く生体に存在し、生体解毒機構に關与する多機能酵素である。GSTは等電点、蛋白の一次構造、免疫及び基質特異性によってGST Alpha、GST  $\mu$ 、GST Pi、GST Thetaに分類される。この中で、GST  $\mu$ とGST Thetaは癌原物質の解毒抱合に対して重要な役割を担っている。今までの研究<sup>(1,2)</sup>によるとGST  $\mu$ 遺伝子の欠損、非欠損には人種差が見られ、その欠損率は40-60%の範囲である。本研究は中国海南島に居住する四つの民族の健常者についてGST  $\mu$ 遺伝子を測定し、民族分布の特異性について検討した。

## 2. 対象及び方法

2.1 研究対象：被験者は中国海南島省通什市、三亜市、陵水県、京中県に居住する四つの民族338人で、各民族間で混血は認められなかった。各民族の年齢構成及び性は表1に示す如くであった。即ち、年齢構成は13-83才、平均 $38.83 \pm 13.43$ 才；その内、男性194人の平均年齢は $35.43 \pm 13.40$ 才、女性144人の平均年齢は $31.69 \pm 13.18$ 才であった。また、職種、職歴、既往歴及び生活、飲酒、喫煙等の習慣を調査し、採血してGST  $\mu$ 測定試料とした。

2.2 DNA抽出：DNA Extractor WB Kitを使ってDNAを抽出し、 $2.5 \mu\text{l}$ 上清をPCRの測定に用いた。

2.3 PCR条件： $25 \mu\text{l}$ 反応系でPCRを行う。反応液は $200 \mu\text{l}/1$  dNTP、 $1 \mu\text{mol/l}$ プライマー、 $2.5 \mu\text{l}$  DNA、 $2\text{uTaq}$ であった。増幅条件は $94^\circ\text{C}$ で1分間変性、 $58^\circ\text{C}$ で1.5分間複性、 $72^\circ\text{C}$ で1分間延長、30サイクル反応させた。

2.4 電気泳動：電流80mA、電圧110v、TAE buffer(pH 8.12)で電気泳動し、300nmの紫外線透射器で観察し現像した。2%アガロース上で250bpにGST  $\mu$ 遺伝子増幅産物がない検体は欠損と判定した。

表1 研究対象の年齢構成及び性

	漢民族	回族	り族	苗族	合計
年齢	$45.45 \pm 11.42$	$34.70 \pm 13.08$	$32.35 \pm 14.78$	$32.37 \pm 10.33$	$33.83 \pm 13.43$
男性 (人)	15	59	75	45	194
女性 (人)	5	41	59	39	144
総計 (人)	20	100	134	84	338

## 3. 結果

四つの民族間におけるGST  $\mu$ 遺伝子欠損率を表2に示した。男性では、苗族、り族、回族がほぼ50%で漢族が最も低く33.33%であった。一方、女性の欠損率はり族、回族、漢族が60-63.42%の範囲であるのに対し、苗族は51.3%で10%程度他の民族より欠損率が低

%であるのに対し、苗族50.00%、漢族40.00%であった。GST Muの欠損率を民族間で比較し、表3に示した。男性、女性およびその合計それぞれにおける民族間の欠損率はいずれも有意の差は見られなかった。しかし、全民族を合計して男女間で比較した場合は有意な性差 (P=0.040) が認められた (表2)。

表2 海南島少数民族のGST Mu欠損率

民族	GST Mu									
	male			female			male:female	total		
	+	-	%	+	-	%	P value	+	-	%
苗族	23	22	48.89	19	20	51.28	0.827	42	42	50.00
リ族	37	38	50.67	22	37	62.71	0.163	59	75	55.97
回族	30	29	49.15	15	26	63.42	0.159	45	55	55.00
漢族	10	5	33.33	2	3	60.00	0.292	12	8	40.00
合計	100	94	48.45	58	86	59.75	0.040	158	180	53.25

表3 海南島少数民族のGST Muの有意差検定

比較組	male		female		total	
	X <sup>2</sup> test	P value	X <sup>2</sup> test	P value	X <sup>2</sup> test	P value
苗族とリ族	0.0356	0.750	1.2606	0.250	0.7401	0.250
苗族と回族	0.0007	0.900	1.2039	0.250	0.4579	0.500
苗族と漢族	1.0999	0.250	0.1350	0.750	0.0039	0.900
リ族と回族	0.0303	0.950	0.7129	0.500	0.0218	0.750
リ族と漢族	1.9120	0.250	0.0788	0.750	1.7862	0.100
回族と漢族	1.2051	0.500	0.1165	0.250	0.5475	0.250

#### 4. 考察

本研究では、PCR分析法で中国海南島の四民族338人を対象としてGST Mu遺伝子分布を調べた。その結果、リ族のGST Mu遺伝子欠損率が一番高く (55.97%)、次は回族(55.00%)、苗族 (50.00%) で一番低いのが漢民族 (40.00%) であった。四つの民族338人のGST Mu欠損率は53.25%で、その内、男性は48.45%、女性が59.75%で性差が認められた。Laisneyの報告<sup>(2)</sup>によるとフランス人のGST Mu遺伝子欠損率は40.8%で、Haradaら<sup>(3)</sup>は日本人のGST Mu欠損率は48.0%、英国人の欠損率は40.8%としている<sup>(4)</sup>。今回の調査結果で海南島少数民族のGST Mu遺伝子欠損率はアフリカ系アメリカ人 (33.0)、ヨーロッパ人 (40.8) よりも高く、日本人に近いことが明らかになった。海南島漢民族のGST Mu遺伝

子欠損率は40.00%で、孫らの中国漢民族のGST Mu欠損率51.9%に比べて低い。この主な原因は、人種の生体遺伝子の背景が異なるというよりも、むしろ今回調査した例数が少ないことによるものと考えられる。

GST Muは発癌物質の代謝に重要な役割がある。一般に癌原性物質は生体内のチトクロームP450によって代謝活性化を受け、核染色体DNAを攻撃し、細胞の変異と組織の癌化を促進する。GST Mu遺伝子欠損は宿主因子として発癌の可能性を知るうえで重要である。従ってGST Muの民族、地域分布の調査研究は各民族、地域発癌率及び腫瘍感受性との関係を解明する上に重要な意味がある。今後、GST Mu遺伝子欠損と少数民族地域の腫瘍との関係について研究していく予定である。

## 5. まとめ

中国海南島四つの民族の健常者338人のGST Mu遺伝子をPCR分析法で測定し、民族間の分布を比較した。その結果、GST Mu遺伝子欠損率は53.25%であった。この内、男性48.45%、女性59.72%で、男女間に差が認められた。各少数民族のGST Mu遺伝子欠損率は回族55.97%、苗族50.00%、漢民族40.00%であり、民族間には有意差は認められなかった。

## 参考文献

1. Brockmoller J. Genotype and phenotype of glutathione s-transferase class  $\mu$  isoenzyme  $\mu$  and  $\phi$  in lung cancer and controls. *Cancer Res.*, 1993; 53: 1004.
2. Lafuente A., Pujol, F., Carretero, P., Villa, J.P. and Cuchi, A. Human glutathione s-transferase  $\mu$  (GST  $\mu$ ) deficiency as a marker for the susceptibility to bladder and larynx cancer among smokers. *Cancer Letters.*, 1993; 68: 49.
3. Harada, S., Abei, M., Tanaka, N., Agarwal, D.P. and Goedde, H.W. Liver glutathione S-transferase polymorphism in Japanese and its pharmacogenetic importance. *Hum. Genet.*, 1987; 75: 322-325.
4. Strange, R. C., Faulder, G.C., Davis, B.A., Hume, R., Brwn, J.A.H., Cotton, N. and Hopkinson, D.A. The human glutathione S-transferases: studies on the tissue distribution and genetic variation of GST1, GST2 and GST3 isoenzymes. *Ann. Hum. Genet.*, 1984; 48: 11-20.

1996年度日中医学学术交流助成金収支決算

年 月 日	収支	支出	残高
平成8年 6月 6日	400,000		400,000
6月10日		184,000	216,000
8月23日	300,000		516,000
8月30日		50,000	466,000
11月12日		454,000	12,000
11月25日	150,000		162,000
11月27日		112,000	50,000
11月29日		50,000	0
平成9年 1月24日	50,000		50,000
2月 7日		50,000	0

筑波大学・社会医学系・下條信弘

日本財団補助金による


1996年度財団法人日中医学協会助成報告書

—調査並びに研究に対する助成—

1996年 3月 7日

財団法人 日中医学協会

理事長 中島章 殿

研究代表者氏名 真柳 誠   
所属機関名 茨城大学人文学部  
職 名 教授 年齢 46 才  
所 在 地 〒310 水戸市文京 2-1-1  
電話 029-228-8194 内線 (直通)

1. 研究課題

中国で散佚し日本に伝存する明代古医籍の系統的調査研究

2. 研究期間 自 1996 年 4 月 11 日 ~ 至 1997 年 3 月 15 日

3. 研究組織

日本側研究者氏名 小曾 洋 (46才)  
所属機関 北里研究所東洋医学総合研究所 職名 部長

中国側研究者氏名 王 鉄 策 (45才)  
所属機関 黑竜江中医药大学医史教研室 職名 副教授

4. 研究目的、方法、成果と考察、結論の形式で、A4版にて4,000字以上で報告し、研究成果の発表予定についても記載して下さい。尚、論文発表に当っては、日本財団補助金による旨を明記して下さい。

5. 収支決算報告

1996年4月11日交付通知のあった研究課題 中国で散佚し日本に伝存する明代古医籍の系統的調査研究 についての収支決算を行ないました。関係書類を添えて、次のとおり報告します。

交付を受けた金額	支 出 内 訳				
	消耗品費	謝 金	旅 費	そ の 他	合 計
1,000,000 円	268,315 円	11,600 円	896,854 円	76,795 円	1,253,564 円

支出費内訳（消耗品、謝金、旅費、その他の項目別に記載・別紙可）

区 分	金 額	使 用 目 的
消耗品費	93,602 円	中国内宿泊費
	46,605 円	中国内食費
	39,520 円	首届海峡两岸中医基文献—研讨会登録宿泊費(真柳・王)
	2,582 円	中国内医療費・検査費
謝金	86,006 円	日本内調査宿泊費
	11,600 円	礼品代
旅費	446,000 円	真柳・王の日中往復、上海→黄山(学会)の飛行機代、旅行保険
	131,224 円	真柳・王の中国内移動費、成田往復
	319,630 円	真柳・王・小曾戸の日本国内調査移動費
その他	63,789 円	貴重文献複写、購入費
	12,806 円	日中間通信費、中国内通信費



## 中国で散佚し日本に伝存する明代古医籍の系統的調査研究

研究代表者	真柳 誠（茨城大学教授）
日本側共同研究者	小曾戸 洋（北里研究所部長）
中国側共同研究者	王 鉄策（黒龍江中医薬大学副教授）

### 研究目的

中国伝統医学の研究に古典籍を欠くことはできないが、中国に現存する明代以前の古医籍は種々の原因で清代以後の古医籍よりはるかに少ない。一方、江戸幕府は長崎で渡来書を優先的に購入し、幕府の江戸医学館でも中国医書を積極的に収集していた。両者の多くは明治政府に引き継がれ、現在の国立公文書館内閣文庫に到っている。また江戸期の大名や民間人も中国の古医籍を多数収集し、現在それらの多くが国公私立の図書館等に所蔵されている。それゆえ日本に現存する明以前の古版本や古写本は相当な数に達し、中には中国で散佚した書が少なからず発見される。これを佚存書と呼ぶ。

これまでの調査から佚存古医籍のうち明代の書は宋元以前の書をはるかに上回り、その数は恐らく百をくだらないと予想された。ただし日本に現存する明医書の系統的研究はいまだなされておらず、とりわけ伝統医学書は現在も臨床に利用されうる実用書ゆえ、全貌の早急な解明が望まれている。これを中国現存書と慎重に比較検討するなら、内容的にも貴重な佚存医書が多数発掘されるのは疑いなく、その一部は今後の研究と臨床にも決定的意義を持つだろう。

### 対象と方法

対象とする明医書は、明代に成立した医書で、のち清代・李氏朝鮮時代・江戸時代までの復刻本・写本とし、近代以降の復刻本や写本はその範囲に入れない。また明代に成立した医書とは、明代に著述ないし加注・増補・編集された書までをいい、内容に本質的な変化を及ぼさない校正・加点は成立の範囲から除外した。

調査はまず真柳・王・小曾戸が日本と中国（台湾を含む）の蔵書目録ないし蔵書カードを対比し、中国になくて日本にある明医書、またそれと疑わしき文献を抽出した。さらにその蔵書数が多い国立公文書館内閣文庫（内閣）・宮内庁書陵部（宮内）・武田科学振興財団杏雨書屋（杏雨）・龍谷大学大宮図書館（龍谷）・京都大学附属図書館（京大）・前田育徳会尊経閣文庫（尊経）・国立国会図書館（国会）・大阪府立図書館石崎文庫（石崎）、それと疑わしき文献が見出された静嘉堂文庫・名古屋市立大学図書館・旭中央病院資料室にて実地調査し、貴重と判断されたものは許可が得られた範囲内でマイクロフィルム

・コピー・写真などの方法で必要部分や目録を複写した。また九州大学医学図書館（九大）と東北大学附属図書館（東北）の目録調査でも佚存と疑わしき明医書が見出された。

しかしこれらは即座に佚存書と確定できないので、目録上で書名・著者・成立年・出版年などが同一ないし近似した中国の蔵書について閲覧と調査の申請書を提出し、許可が得られた上海中医薬大学図書館・上海市中医文献館・南京図書館・南京中医薬大学図書館・重慶市図書館・北京図書館・北京大学図書館・中国中医研究院図書館において真柳と王が実地調査し、日本の調査記録と照合して佚存書の是非を判断した。現地で判断不能な書については、許可が得られた範囲内でマイクロフィルム・コピー・写真などの方法で必要部分や目録を複写し、帰国後に日本の図書館にて再度実地調査を行い、最終的に佚存書の是非を判断した。この調査資料に基づき、佚存の明医書について著者・成立年代・出版筆写年代の解明、および日本における伝承経緯について考察を行った。

### 結果と考察

佚存の明医書は明刊本・明写本・清刊本・清写本・朝鮮刊本・室町写本・江戸刊本・江戸写本の形態で、日本の10図書館に計 188点が所蔵されていた。この伝存形態別に所蔵先を上掲図書館の略称で表1に示す。これらの中には同版本や同版本に基づく模写本があり、そうした書目の重複を除くと計 119書目の佚存書が発見されたことになる。

表1より佚存明医書の半数強は明刊本で、ついで江戸写本・江戸刊本の順となり、それらだけで90%以上を占めることが分かる。その一方、朝鮮刊本・明写本・清写本が少ないのは江戸時代までの貿易からして当然だが、多量に輸入されていた清刊本には佚存明医書があまりにも少ない。これは佚存明医書が明代に刊行されたのち、清代ではほとんど復刻されなかったためと考えられる。また中国で価値が認められずに失われてしまうような明刊本・明写本・清刊本・清写本が、日本には計 104点も伝承された史実も知られた。他方、清代とほぼ重なる江戸時代ではそれら明医書の価値が認められて筆写され、あるいは復刻されたため、江戸写本・江戸刊本として計78点も現存している。これら明医書が日本にのみ伝承された背景を分析するため、佚存明医書の明刊本・江戸写本・江戸刊本ともに圧倒的多数を所蔵する内閣文庫本について、その来歴を伝存形態別に表2に示した。

内閣文庫は総1632点・956書目・11591冊の中国医書を所蔵するが、これまでの調査により宋・元・明・清の各時代にわたる佚存医書が総 204点・146書目あり、うち明医書は表1のように 154点と大多数を占めることが明らかとなった。これを表2で来歴別にみると、幕府の江戸医学館旧蔵書が過半数を占め、幕府の紅葉山文庫と同文庫に献納された豊後佐伯藩主・毛利高標の旧蔵書がこれに次ぎ、それらで佚存明医書ほぼ全体を形成している。幕

府両機関の蒐集と保存なくして、かくも多量の佚存明医書はありえなかったのである。ただし紅葉山文庫と毛利高標の旧蔵書は明刊本が主体であるのに、江戸医学館旧蔵書には明刊本もさることながら、それ以上に江戸写本が多く、医学館旧蔵だけで江戸写本全体ほほすべてを占める。それらには医学館を主宰した多紀元簡・元胤・元堅ら父子の手跋が少なからず書き込まれており、彼らがきわめて積極的に筆写・蒐集したことを物語っている。内閣文庫につぐ宮内庁書陵部所蔵の佚存明医書10点中にも多紀氏旧蔵書が4点あり、まさしく佚存中国医書の過半は多紀氏の功といわねばならない。

### 結論

本調査研究により、中国で失われたが日本に伝存する佚存の明医書が10図書館に計188点・119書目発見された。それらは明刊本・明写本・清刊本・清写本・朝鮮刊本・室町写本・江戸刊本・江戸写本の形態で伝承されていたが、重複を除く少なからぬ書は世界に1点しか存在が知られていない孤本であった。これらの中国伝統医療と医学文化における貴重性は高く評価されねばならない。また佚存明医書の大多数は国立公文書館内閣文庫の蔵書で、さらにその多くは江戸幕府の医学館と紅葉山文庫の旧蔵書だった。とくに江戸医学館の旧蔵書は過半を占め、その蒐集と保存に努めた多紀元簡・元胤・元堅ら父子の功績は大きい。今後これら佚存中国医書の存在が日中ともに認識され、さらに復刻され、日本の伝統医療・医学が永年にわたり享受してきた中国医学の恩恵に、幾許たりとも報いることが期待される。

なお本研究の成果は、すでに1996年8月に中国・黄山市で連続開催された中医薬文献学会・医古文研究会共催の「首届海峡兩岸中医薬文献・医古文及中医薬文化学術研討会」と中国薬学会主催の「第八届全国薬学史本草学術研討会」にて真柳と王がその一部を報告<sup>1)</sup>・<sup>2)</sup>しており、小曾戸も一部をすでに報告<sup>3)</sup>した。真柳は別に報告<sup>4)</sup>を投稿しており、印刷中である。研究の全体は真柳・王・小曾戸の連名で『中華医史雑誌』に投稿を準備している。

### 既報論文

- 1) 真柳誠「関于幻雲引用的『東垣十書』」、『中医薬文献研究論叢』、北京・中医古籍出版社、47-49頁(1996、8)。
- 2) 王鉄策・張建偉「馬蒔著述研究」、『中医薬文献研究論叢』、北京・中医古籍出版社、116-119頁(1996、8)。
- 3) 小曾戸洋「明代の医薬書(18)」、『現代東洋医学』17巻2号、228-233頁(1996、6)。

4) 真柳誠「江戸時期渡来の中国医書とその和刻」、『歴史の中の病と医学』、京都・思文閣出版、頁未定(1997、3、20刊行予定)。

表1 佚存明医書の所蔵点数

	内閣	宮内	龍谷	杏雨	尊経	京大	石崎	九大	国会	東北	小計 (%)
明代刊	81	6	3	2	3	2	1	1			99 (52.7)
明代写		1									1 (0.5)
清代刊	1	1	3								5 (2.7)
清代写	1										1 (0.5)
朝鮮刊	1	2									3 (1.6)
室町写							1				1 (0.5)
江戸刊	14			2				1	1	1	19 (10.1)
江戸写	56		1	1		1					59 (31.4)
総点数	154	10	7	5	3	3	2	2	1	1	188 (100.0)

表2 内閣文庫所蔵佚存明医書の来歴

	江戸医学館	紅葉山文庫	毛利高標	昌平費	不詳	林家	小計 (%)
明代刊	35	30	14	1	1		81 (52.6)
清代刊			1				1 (0.7)
清代写		1					1 (0.7)
朝鮮刊		1					1 (0.7)
江戸刊	8	1		2	2	1	14 (9.0)
江戸写	49	3	2	2			56 (36.3)
総点数	92	36	17	5	3	1	154 (100)

日本財団補助金による


1996年度財団法人日中医学協会助成報告書

—調査並びに研究に対する助成—

1997年3月7日

財団法人 日中医学協会

理事長 中島章 殿

研究代表者氏名 香川 順 

所属機関名 東京女子医科大学(衛生学公衆衛生学)

職名 教授 年齢 59 才

所在地 〒162 東京都新宿区河田町8-1

電話 03-3353-8111 内線 22911

1. 研究課題

中国と日本における気管支喘息の発症・増悪因子の比較研究

2. 研究期間 自 1996 年 4 月 1 日 ~ 至 1997 年 3 月 15 日

3. 研究組織

日本側研究者氏名 香川 順 (59才)

所属機関 東京女子医科大学 職名 教授

中国側研究者氏名 潘 国 伟 (33才)

所属機関 遼寧省衛生防疫站環境流行病科 職名 副主任

4. 研究目的、方法、成果と考察、結論の形式で、A4版にて4,000字以上で報告し、研究成果の発表予定についても記載して下さい。尚、論文発表に当っては、日本財団補助金による旨を明記して下さい。

5. 収支決算報告

1996年4月11日交付通知のあった研究課題 中国と日本における気管支喘息の発症・増悪因子の比較研究 についての収支決算を行ないました。関係書類を添えて、次のとおり報告します。

交付を受けた金額	支 出 内 訳				
	消耗品費	謝 金	旅 費	その 他	合 計
円	円	円	円	円	円

支出費内訳（消耗品、謝金、旅費、その他の項目別に記載・別紙可）

区 分	金 額	使 用 目 的

# 1996年度日中医学協会助成報告書

東京女子医科大学 衛生学公衆衛生学教室 香川 順  
中国遼寧省衛生防疫研究所 環境流行病科 潘 國偉

## 1. 研究課題

中国と日本における気管支喘息患児の発症・増悪因子の比較研究

## 2. 研究計画

### 1) 研究目的・意義

1991年から1992年にかけて四川省成都市の学童およびその両親、約2万人の調査を行った結果では、学童の男児の持続性セキの有症率は10.9%、持続性ゼロゼロ・タンの有症率は6.8%、および喘息様症状・現在の有症率は2.9%であった。それに対し、同じ質問票を使用して環境庁が全国的に行なった調査結果では、男児の各々の有症率の平均値（範囲）は、1.8%（0.7～3.5%）、1.2%（0.1～2.1%）および4.6%（2.9～8.7%）であった。つまり、セキやタンの有症率は成都市の学童の方が非常に高く、それに対して、喘息様症状・現在の有症率は、日本の学童の方が高かった。二酸化硫黄を指標とした大気汚染度は、成都市の値は、1970年代の東京の値に相当し、当時東京などで行われた疫学調査結果の成人の持続性セキ・タン症状の有症率は、成都市の学童の両親の有症率と類似していた。

成都市が、もし、我が国と同じ道を歩むとしたら、つまり、エネルギー源が石炭から石油へ移行、自動車の普及による自動車排気ガス汚染、食生活習慣や住居環境の欧米化などが進行すると、持続性セキや持続性ゼロゼロ・タンの有症率は減少し、喘息様症状・現在の有症率が増加すること予測される。

本研究は、現在でもなお、気管支喘息の発症・増悪因子が十分解明されていないので、中国の成都市とは地理的、社会経済的要因の異なる遼寧省の鞍山市の学童の気管支喘息の有症率に影響を与える諸因子を調査し、日本の学童調査の結果と対比することにより、その差の原因を追求し、その差の原因因子を明らかにすることにより、中国の気管支喘息の有症率の増加を防止するための施策を提案することを目的としている。

### 2) 研究計画・研究方法

当教室（東京女子医科大学・衛生学公衆衛生学教室）では、気管支喘息の発症・増悪因子の解明のために、疫学調査と実験的研究を行なっている。疫学調査では、保育園児（女子医大付属）、3歳児健診（保健所）および小学生学童（横浜市内の10小学校：学童総数約4000名）を対象に、質問票調査、肺機能検査、窒素酸化物への個人暴露量、尿中コチニン（受動喫煙の程度を評価）、および協力者

の血液中の総IgEとRAST値（ダニとスギ）を測定している。同じ手法を、中国の遼寧省の鞍山市を中心に在住する学童を対象に行い、比較検討を行うことにより気管支喘息の発症・増悪因子を確定し、その寄与度を評価する。

さらに、現在、協力する家庭内の環境調査（家庭内の汚染物質の濃度、室内塵中のダニ量、真菌の測定など）および学童の栄養調査を実施するための準備を進めている。

### 3. 鞍山市の調査結果

#### 1) 調査対象地域の大气汚染濃度

汚染度	1986年～1995年の平均値		
	SO <sub>2</sub>	TSP	NO <sub>x</sub>
高汚染 地区	0.096mg/m <sup>3</sup> (0.037ppm)	0.516mg/m <sup>3</sup>	0.084mg/m <sup>3</sup>
中汚染 地区	0.069mg/m <sup>3</sup> (0.027ppm)	0.239mg/m <sup>3</sup>	0.049mg/m <sup>3</sup>
低汚染 地区	0.037mg/m <sup>3</sup> (0.014ppm)	0.165mg/m <sup>3</sup>	0.032mg/m <sup>3</sup>

SO<sub>2</sub> 1ppm=2.6mg/m<sup>3</sup>

#### 2) 調査対象者数、回答率と解析対象者数

	対象者数	回答者数 (回答率)
高汚染の2小学校	1518	1473 (97.0%)
中汚染の1小学校	1142	1104 (96.7%)
低汚染の1小学校	1640	1594 (97.2%)
合計	4318	4173 (96.6%)

#### 3) 学童の調査結果

##### 3)-1 各種呼吸器症状の有症率 (%)



男児

調査地区	調査学校 対象者数	持続性セキ	持続性ゼロゼロ ・タン	ぜん鳴	喘息様症状 ・現在
高汚染 地区	A校 1030	5.8	4.2	1.4	0.4
	B校 443	6.4	7.2	1.2	3.0
	計 1473	6.0	5.2	1.3	1.2
中汚染 地区	C校 1104	6.9	5.1	2.1	1.0
低汚染 地区	D校 1594	6.5	5.3	2.7	0.5
合計 4173		6.4	5.2	2.1	0.9

女児

調査地区	調査学校 対象者数	持続性セキ	持続性ゼロゼロ ・タン	ぜん鳴	喘息様症状 ・現在
高汚染 地区	A校 1030	5.2	4.6	3.0	0.1
	B校 443	6.2	5.2	1.9	1.4
	計 1473	5.5	4.8	2.6	0.5
中汚染 地区	C校 1104	5.7	3.2	1.6	0.3
低汚染 地区	D校 1594	4.0	2.6	1.0	0.1
合計 4173		5.0	3.5	1.7	0.3

3)-2 暖房器具のクリーン型とダーティ型別の各種呼吸器症状への影響

男児

	その他	クリーン型	ダーティ型
持続性セキ	7.3	6.5	6.4
持続性ゼロゼロ・タン	9.4	5.0	5.4
ぜん鳴	--	2.4	1.4
喘息様症状・現在	3.1	0.6	1.8

女兒

	その他	クリーン型	ダーティ型
持続性セキ	3.9	4.6	7.5
持続性ゼロゼロ・タン	1.9	3.4	5.4
ぜん鳴	2.9	1.6	2.1
喘息様症状・現在	--	0.1	1.4

3)-3 家族の喫煙者の有無別と各種呼吸器症状

	男児			女兒		
	家族の喫煙者			家族の喫煙者		
	有	無	計	有	無	計
持続性セキ	7.0	5.7	6.4	5.3	4.5	5.0
持続性ゼロゼロ・タン	6.1	3.8	5.2	3.6	3.4	3.5
ぜん鳴	2.2	1.9	2.1	2.2	1.0	1.7
喘息様症状・現在	1.1	0.6	0.9	0.5	--	0.3

3)-4 喘息の家族歴、アレルギー性疾患の既往およびアレルギー素因の有無別の各種呼吸器症状

男児

	喘息の家族歴		アレルギー性疾患の既往		アレルギー素因	
	あり	なし	あり	なし	あり	なし
持続性セキ	11.5	6.0	12.6	5.8	11.5	5.4
持続性ゼロゼロ・タン	8.7	4.8	10.2	4.6	9.2	4.3
ぜん鳴	3.2	2.0	5.8	1.7	4.5	1.6
喘息様症状・現在	3.2	0.6	2.4	0.7	2.8	0.5

女児

	喘息の家族歴		アレルギー性疾患の既往		アレルギー素因	
	あり	なし	あり	なし	あり	なし
持続性セキ	7.5	4.7	9.5	4.5	8.2	4.3
持続性ゼロゼロ・タン	5.3	3.3	7.5	3.1	6.2	3.0
ぜん鳴	4.3	1.5	4.0	1.5	3.9	1.3
喘息様症状・現在	1.0	0.2	0.5	0.3	0.8	0.2

4) 成人の調査結果

4)-1 対象者数	8636	→ 有効回答者	8256
高汚染地区	3072		2868
中汚染地区	2284		2147
低汚染地区	3280		3243

4)-2 喫煙習慣別の各種呼吸器症状

男子

	非喫煙	前喫煙	現喫煙	合計
持続性セキ	1.3	5.4	4.5	3.6
持続性タン	1.3	7.6	4.9	3.9
持続性セキ・タン	0.7	4.0	2.6	2.1
ぜん鳴	0.6	0.9	0.9	0.8
喘息様症状・現在	0.0	0.4	0.1	0.1

女子

	非喫煙	前喫煙	現喫煙	合計
持続性セキ	3.2	9.5	9.3	8.0
持続性タン	2.4	11.9	11.1	9.2
持続性セキ・タン	1.6	9.5	6.5	5.7
ぜん鳴		2.3	2.2	1.7
喘息様症状・現在	0.8	2.3	0.8	0.8

4)-3 粉塵作業経験の有無別と喫煙習慣別の各種呼吸器症状有症率

男子

	粉塵作業経験					
	あり			なし		
	非喫煙	前喫煙	現喫煙	非喫煙	前喫煙	現喫煙
持続性セキ	3.2	9.5	9.3	1.1	4.4	3.6
持続性タン	2.4	11.9	11.1	1.2	6.7	3.8
持続性セキ・タン	1.6	9.5	6.5	0.6	2.7	1.9
ぜん鳴		2.3	2.2	0.7	0.5	0.7
喘息様症状・現在	0.8	2.3	0.7			0.0

4)-4 喫煙本数別の各種呼吸器症状有症率

男子

	非喫煙者	喫煙者（本/日）			
		1-10	11-20	21-30	>31
持続性セキ	1.3	2.3	7.8	18.0	5.8
持続性タン	1.3	2.5	8.8	22.0	11.7
持続性セキ・タン	0.7	1.1	5.5	12.0	5.8
ぜん鳴	0.6	0.6	1.4	6.0	
喘息様症状・現在	0.0	0.1	0.1		5.8

4)-5 粉塵暴露作業経験のない非喫煙者の地区別の各種呼吸器症状

男子

	持続性 セキ	持続性 タン	持続性 セキ・タ	ぜん鳴	喘息様症状 ・現在
低汚染	1.4	1.4	0.8	0.8	
中汚染	0.3	1.1	0.3	0.7	
高汚染	1.3	1.0	0.5	0.5	
合計	1.1	1.2	0.6	0.7	

女子

	持続性 セキ	持続性 タン	持続性 セキ・タ	ぜん鳴	喘息様症状 ・現在
低汚染	0.9	1.0	0.3	0.1	0.1
中汚染	1.0	1.1	0.5	0.3	0.1
高汚染	0.9	1.3	0.5	0.5	0.1
合計	0.9	1.1	0.4	0.3	0.1

4. 今後の課題

鞍山市の調査結果も、成都市の学童と同様に、我が国の学童に比し明らかに喘息様症状・現在の有症率は低いことが示され、現在、解析中の山西省の大原市の学童の有症率も低いので、中国の学童の喘息様症状・現在の有症率は、明らかに我が国の学童の有症率より低いことは確かなことであることが示された。喘息の発症～増悪に係る因子は多数あり、日本の学童と中国の学童の気管支喘息の有症率の違いが、何に起因しているかは、現在のところよく分かっていない。本年1月に、窒素酸化物の個人暴露量調査を行い、現在解析中である。本年度は、中国

と日本の学童の症例-対照研究を予定しており、症例-対照研究から、有症率の違いの仮説を設定する予定である。また、経験的に最も考えられている危険因子の一つである栄養の違いの解明のために、現在、栄養調査の計画を立案中である。

日本財団補助金による

1996年度財団法人日中医学協会助成報告書

—調査並びに研究に対する助成—

年 月 日

財団法人 日中医学協会

理事長 中島章 殿

研究代表者氏名 青山 喬

所属機関名 滋賀医科大学

職 名 滋賀医科大学 名誉教授 年齢 66 才

所 在 地 〒520-21 大津市瀬田月輪町

電話 0775(48)2111 内線 \_\_\_\_\_

1. 研究課題

中国医療放射線作業従事者の受けた職業被曝線量の染色体異常測定(FISH法)による検証

研究計画では、DNAプローブを4番染色体のみとし総計100名の安定型染色体異常測定を予定したが、検討の結果、染色体異常を初率よく検出するためにDNAプローブを4番と7番染色体の2種類にした。そのために検査個体数は、医療放射線作業従事者19名と対照8名に減少した。さらに、末梢血をin vitroでX線照射(0.4Gyと1Gy)を行い、同様に染色体異常を調べた。この結果を利用して19名の医療放射線作業従事者の線量推定を行い、線量効果関係を明らかにする。

現在、実験はすべて終了しており、最終的な取りまとめと解析を行っている。

2. 研究期間 自 1996 年      月      日 ~ 至 1997 年 3 月 15 日

3. 研究組織

日本側研究者氏名 法村 俊之 (51才)

所属機関 産業医科大学 職名 教授

中国側研究者氏名 王 继先 (59才)

所属機関 中国医学科学院放射医学研究所 職名 教授



4. 研究目的、方法、成果と考察、結論の形式で、A4版にて4,000字以上で報告し、研究成果の発表予定についても記載して下さい。尚、論文発表に当っては、日本財団補助金による旨を明記して下さい。

5. 収支決算報告

1996年4月11日交付通知のあった研究課題 中国産放射線作業従事者の放射線被曝量の定量評価法(FISH法)による検証  
 についての収支決算を行ないました。 関係書類を添えて、次のとおり報告します。

交付を受けた金額	支 出 内 訳				
	消耗品費	謝 金	旅 費	その他	合 計
974,000 円	84,500 円	0 円	129,000 円	0 円	974,000 円

支出費内訳 (消耗品、謝金、旅費、その他の項目別に記載・別紙可)

区 分	金 額	使 用 目 的
(This table is crossed out with a large X, indicating no data is provided for this section.)		

## Projects Report on FISH Study

### 1. Rapid-translocation frequency analysis in medical diagnostic x-ray workers and dose estimation.

Epidemiological investigation revealed the incidence and mortality of leukemias, cancers of skin and female breast increased significantly among medical diagnostic x-ray workers. It is very important to estimate the level of radiation exposure for evaluating the cancer risk of the x-ray workers. However, the accumulative doses received by x-ray worker are unknown before 1985. For estimating dose of x-ray workers by biodosimetry, the most promising assay is frequency of translocation in human blood lymphocytes by using chromosome painting.

19 medical diagnostic x-ray workers and 8 controls were selected from cohort and their peripheral blood were sampled for chromosome painting by FISH. Prepare metaphase chromosome spread on slide according to standard cytogenetic procedures currently in use in our laboratory. Whole chromosome probes 4,7 and Kits were purchased from Oncor Inc. with minor modification. PAINT<sup>[1]</sup> has been used to identify aberrations.

The results showed that the frequency of translocation among x-ray workers were significantly higher than control values. (table 1.). Estimated doses from both biological and physical methods for x-ray workers were listed in tables 2 and Figure 1. According to the equation recommended by Straume<sup>[2]</sup>:  $H = [(Y-K)/\alpha]Q$ , H-dose(Gy). Y-translocation/cell measured in blood lymphocytes of x-ray workers. K-background frequency of translocations.  $\alpha$ -linear coefficient of translocation obtained from linear-quadratic dose-response relationship in vitro. Q-radiation quality factor.  $\alpha$  value from Lucas<sup>[3]</sup> and Fernandez<sup>[4]</sup> are 0.025(for  $\gamma$ -rays) and 0.028(for x-rays) translocation/cell-Gy. So, with the equation  $H = [(Y-K)/\alpha]Q$  and  $\alpha, K$  and Q values, biological doses were calculated. In general, the doses estimated are in good agreement for most samples, except for a few samples. Intercomparisons of translocation frequency measured by FISH and G-banding for x-ray workers were listed in table 3.

### References

1. J.D. Tucker et al. Cytogenet Cell Genet 68:211 ~ 221, 1995
2. T. Straume et al. Health Phys 62(2):122 ~ 130, 1992
3. J.N. Lucas et al. Health Phys 68(6):761 ~ 765, 1995
4. J.L. Fernandez et al. Int J Radiat Biol 67(3):295 ~ 302, 1995

### 2. X-ray-induced translocations analysed by FISH with whole chromosome probes 4 and 7 in vitro.

Peripheral blood was obtained from two healthy males (one aged 24 years, another aged 31 years) and irradiated with 180KV x-rays, (15mA, 1.0mm Cu filter) dose rate 0.40Gy/min for a total dose of 0.4 and 1.0Gy. A 0.5ml aliquot of x-ray irradiated whole blood was added to 5.0ml of RPMI 1640 medium supplemented with 10% fetal serum and moderate PHA, colcemid(final concentration 0.004 $\mu$ g/ml) was add before cultures.

Cells were cultured for 50h at 37 °C in 5% CO<sub>2</sub> in air.

FISH procedures was performed as described first part. PAINT was applied to identify aberrations.

References

1. M.Bauchinger et al, Int J Radiat Biol 64(2): 179~184, 1993
2. J.N.Lucas et al, Health Phys 68(6):761 - 765,1995
3. J.L.Pernandez et al, Int J Radiat Biol 67(3): 295~302, 1995

Table 1: Chromose rearrangements in medical diagnostic x-ray workers and controls by FISH for chromosomes probes 4 and 7

Subjects	Calendar year of entry	Cells <sup>a</sup>	No. of aberrations			
			t	dic	ins	acc
C-01	1984	94 ( 427)	1	1		3
C-02	1963	484(2202)	3			1
C-03	1968	187 ( 850)	0			
C-04	1965	1011(4594)	5	1		7
C-05	1970	372(1689)	3			1
C-06	1956	114 ( 517)	1			
C-07	1964	813(3695)	2			
C-08	1966	397(1803)	4	1		3
X-01	1963	249(1130)	2			
X-02	1960	248(1125)	2			
X-03	1966	171 ( 778)	2			2
X-04	1953	269(1223)	4			1
X-05	1957	464(2108)	4			
X-06	1970	508(2311)	9			2
X-07	1956	159 ( 722)	1			2
X-08	1970	229(1039)	4			1
X-09	1971	227(1033)	5			1
X-10	1970	337(1530)	7		1	2
X-11	1960	538(2446)	6	1		3
X-12	1969	577(2622)	14	1		2
X-13	1962	314(1427)	9		2	3
X-14	1958	310(1410)	8			1
X-15	1958	178 ( 809)	1			
X-16	1969	646(2936)	12			1
X-17	1970	200 ( 910)	3			1
X-18	1958	236(1072)	9	1		1
X-19	1961	418(1899)	6	3		4

a: Genomic-equivalents, cells scored in parentheses, t-translocation, dic-dicentrica, ins-insertion, ins-insertion, ace-acentric aberrations.

Table 2: Dose estimated by FISH and physical model  
for medical diagnostic x-ray workers

Subjects	Calendar year of entry	Translocations /cell	Biological dose(cGy)		physical dose(cGy)
			Lucas <sup>[2]</sup>	Fernandez <sup>[4]</sup>	
X-01	1963	0.008	12	10.714	9.679
X-02	1960	0.008	12	10.714	20.402
X-03	1966	0.012	28	25.000	26.844
X-04	1953	0.015	40	35.714	63.634
X-05	1957	0.009	16	14.268	24.972
X-06	1970	0.018	52	46.429	31.609
X-07	1956	0.006	4	3.571	0.092
X-08	1970	0.017	48	42.857	7.689
X-09	1971	0.022	68	60.714	24.851
X-10	1970	0.021	64	57.143	24.861
X-11	1960	0.011	24	21.429	35.988
X-12	1969	0.024	76	67.857	11.120
X-13	1962	0.029	96	85.714	19.131
X-14	1958	0.026	84	75.000	43.335
X-15	1958	0.006	4	3.571	21.128
X-16	1969	0.019	56	50.000	21.317
X-17	1970	0.015	40	35.714	14.254
X-18	1958	0.038	132	117.857	131.094
X-19	1961	0.014	36	32.143	140.940

Table 3: Comparison of translocation frequencies  
in medical diagnostic x-ray workers measured by FISH and by G-banding

Subjects	FISH			G-banding		
	Genomic- equivalents	Translocations	Trans/G-c <sup>2</sup>	Cells	Translocations	Trans/cell
X-01	249	2	0.008	100	0	0.000
X-02	248	2	0.008	100	0	0.000
X-03	171	2	0.012	100	1	0.010
X-04	269	4	0.015	100	0	0.000
X-05	464	4	0.009	100	1	0.010

Table 4: Translocations induced by in vitro exposure to  $\gamma$ -rays

Dose(Gy)	Cells	Genomic-equivalents	Translocation	Translocation/cell/genomic	
				Mean	SE
0.4	10093	2220	41	0.0185	0.0029
1.0	1602	352	22	0.0625	0.0133

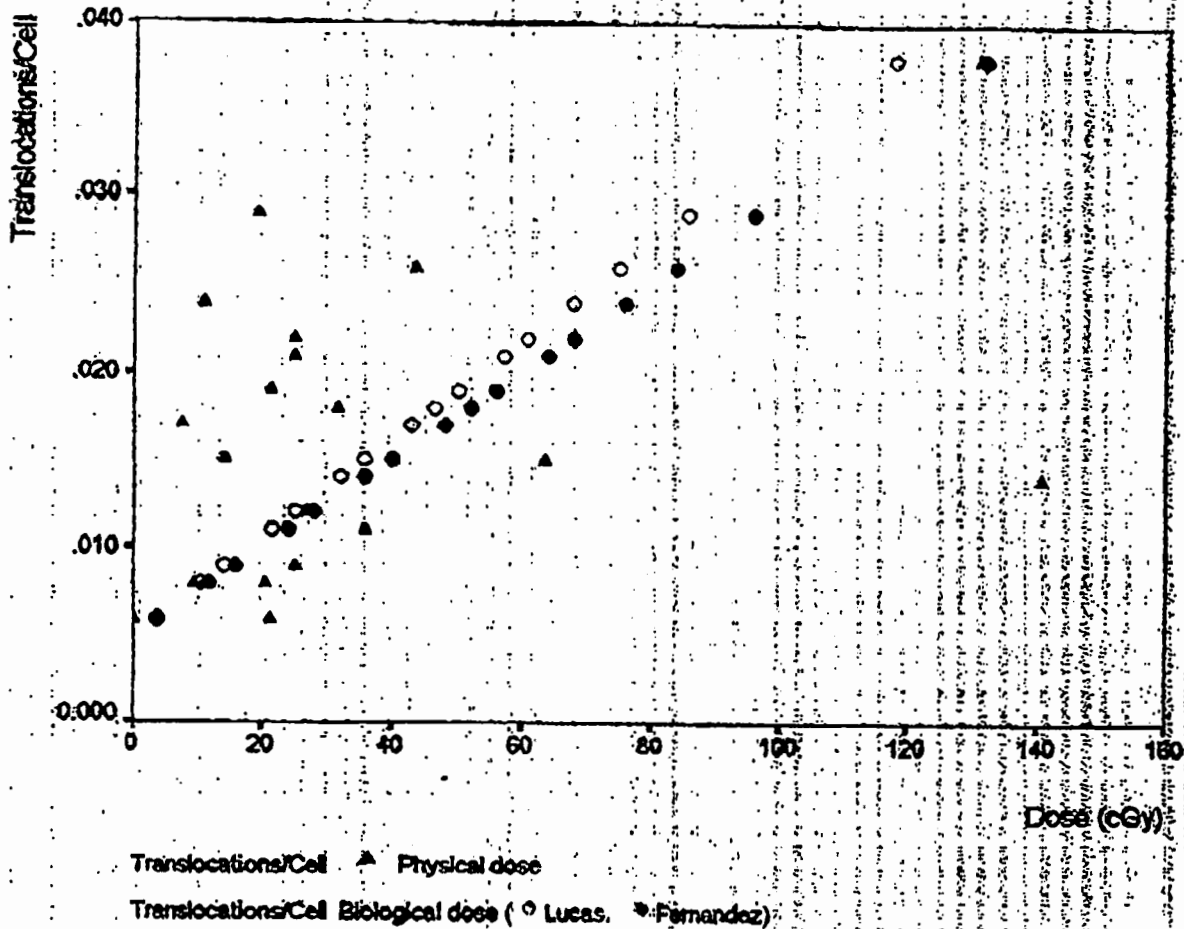


Fig 1: Comparison the results from the two biological Models with physical model

51

### FAX 送信票

1997 年 3 月 26 日 時 分	
宛先:	日中医学協会 川口棟
FAX 番号	03-3291-9164
件名:	中国医療放射線作業従事者の染色体異常測定 (FISH法) 報告書
発信者:	青山喬
FAX 番号	0775-79-2731 Fax モードで送信して下さい
枚数 (本票を含む) 6	

貴協会の助成を以ておこなった「中国医療放射線作業従事者の染色体異常測定 (FISH法) に係る検証」は無事終了し、本日 Fax にて報告書を送付いたしました。

最初計画した標本数の少くはなりましたが、学術的十分評価での結果を得たと考えっております。

本報告書の論文として完成したものであります。3月20日に送付した報告書の参考資料としてお送りいたします。今後、国際学会で発表し、国際的学術誌にて投稿する予定であります。

とり成す。報告と御礼です。有難うございました。

日本財団補助金による


1996年度財団法人日中医学協会助成報告書

—調査並びに研究に対する助成—

1997年 2月 24日

財団法人 日中医学協会

理事長 中島章殿

研究代表者氏名 朔 敬   
所属機関名 新潟大学歯学部  
職 名 教授 年 齢 46 才  
所 在 地 〒951 新潟市学校町通二番町5274  
電 話 025-223-6161 内 線 4170

1. 研究課題

中国における唾液腺癌のエプスタイン・バーウィルス感染に関する病理学的検索

2. 研究期間 自 1996 年 4 月 1 日 ~ 至 1997 年 3 月 15 日

3. 研究組織

日本側研究者氏名 朔 敬 (46才)

所属機関 新潟大学歯学部 職名 教授

中国側研究者氏名 林 漢良 (59才)

所属機関 中山医科大学医学部 職名 教授

4. 研究目的、方法、成果と考察、結論の形式で、A4版にて4,000字以上で報告し、研究成果の発表予定についても記載して下さい。尚、論文発表に当っては、日本財団補助金による旨を明記して下さい。

5. 収支決算報告

中国における唾液腺癌のエプスタイン・バー  
ウィルス感染に関する病理学的検索

1996年4月11日交付通知のあった研究課題

についての収支決算を行ないました。関係書類を添えて、次のとおり報告します。

交付を受けた金額	支 出 内 訳				
	消耗品費	謝 金	旅 費	そ の 他	合 計
1,000,000 円	307,178 円	50,000 円	642,822 円	0 円	1,000,000 円

支出費内訳（消耗品、謝金、旅費、その他の項目別に記載・別紙可）

区 分	金 額	使 用 目 的
消耗品費	194,954 50,273 57,783 4,168	試薬およびガラス・プラスチック器具（金子薬品） 写真材料（カメラのデンデン社） 写真材料（カメラの六本木） 事務用品（菊池事務機）
小計	307,178	
謝金	50,000	研究試料の調整（楊連甲教授・第四軍医大）
小計	50,000	
旅費	292,822 350,000	1996年8月 中国訪問（朔 敬） 1997年3月 新潟招聘（楊連甲教授・第四軍医大）
小計	642,822	



# 中国における唾液腺癌のエプスタイン・バーウィルス感染に関する病理学的研究

朔 敬 新潟大学歯学部口腔病理学講座  
林 漢良 中山医科大学医学部病理学教研室（前同大腫瘍病院病理科）

## 1. 研究目的

リンパ上皮腫様の病理組織像を呈する癌腫の発生にエプスタイン・バーウィルス（EBV）感染の関与が注目されている。本研究課題では、中国で多発するリンパ球間質をともなう唾液腺未分化癌（以下、リンパ上皮腫）について、中国で蓄積された組織標本を材料にして、EBV感染の実態を主に in-situ ハイブリダイゼーション（ISH）やポリメラーゼ連鎖反応（PCR）の技法を中心に組織化学的また分子生物学的に検索し、さらに同病変の発生に関する中国での疫学的調査をおこない、他の唾液腺病変と比較検討し、唾液腺発癌におけるEBV感染の意義を明らかにしたいとかがえた。

## 2. 方法

①症例収集：平成6年度以来、上海市上海第二医科大学、四川省成都市華西医科大学、雲南省昆明市昆明医学院、広東省広州市中山医科大学、吉林省長春市白求恩医科大学、陝西省西安市第四軍医大学、北京市北京医科大学および首都医科大学、湖北省武漢市湖北医科大学中国各地の医科大学、台湾台北市台湾国立大学、台中市中山医学院、山東省済南市山東医赤大学と共同で唾液腺リンパ上皮腫症例の収集をおこなってきた。今年度は、日本財団補助金によって8月に四川省成都市華西医科大学、新疆ウイグル自治区烏魯木齊市新疆医学院をそれぞれ訪問し、唾液腺リンパ上皮腫症例を各地の研究分担者および協力者と共同で病理組織学的な評価をおこなったうえで抽出した。同時に、その他の唾液腺腫瘍（ワルチン腫瘍、扁平上皮癌、腺癌ほか）といわゆる良性リンパ上皮性病変を示すシェーグレン症候群等の慢性唾液腺炎の症例についても検討した。中国側からは、平成9年3月に第四軍医大学の楊が新潟大学を訪問し、持参した追加症例の組織学的評価を相互に検討するとともに分子生物学的ならびに免疫組織化学的にEBVの検出をおこない、最終的なリンパ上皮腫症例の採否を朔と共同でおこなった。

②疫学調査：リンパ上皮腫およびその他の病変の患者の氏名、年齢、性、住所、初診時期、症状、経過、処置、予後等の調査方法の解析用コンピュータ入力様式をさだめ、調査を中国側研究分担者・研究協力者に依頼した。とくに患者の民族、出身地の確認を強調した。

③免疫組織化学的実験：①で収集した症例のパラフィンブロックから連続切片を作製し、ヘマトキシリン・エオジン染色はじめ各種組織染色をおこない、病理組織学的に再検討した。癌細胞の上皮性格は、免疫組織化学的に上皮膜抗原（EMA）、細胞膜糖鎖抗原CA15-3、UEA-Iレクチン結合性の免疫反応性で判定し、間質リンパ球サブクラスは、UCHL-1およびL26抗体をもちいてT細胞およびB細胞をそれぞれ判別した。また、EBV関連分子の潜在膜抗原LMA-1と同核抗原EBNA-2等についても検討をくわえた。そのほか組織化学としては、PAS染色、マッソン三重染色、アルシアン青染色等をおこない、HE所見と対比させた。

④分子生物学的実験：③と同様に作製したパラフィン切片について、EBVのコードするsmall RNA(EBER-1)の発現を検索するためにその相補的なRNAプローブ（30 bps）をもちいて、ディゴキシゲニンラベリングと抗ディゴキシゲニン抗体およびアルカリフォスファターゼ発色によるISHをおこなった。さらに、切片を脱パラフィン後、プロテイナーゼKで除タンパク質をおこなってDNA

を抽出し、PCR法によってEBVの*Bam*HI W領域の増幅される断片（123 bps）をアガロースゲル電気泳動で検出した。

### 3. 成果と考察

①症例：唾液腺リンパ上皮腫症例は、平成6年度よりの調査以来、上海第二医科大学で42例、華西医科大学で40例、昆明医学院で3例、中山医科大学で42例、白求恩医科大学で4例、第四軍医科大学で3例、北京医科大学で7例、首都医学院で2例、湖北医科大学で4例、台湾国立大学で36例、中山医学院で3例、新疆医学院で2例抽出し、合計159例となった。山東省では済南および青島両市の施設からは本癌腫症例をみいだすことはできなかった。各施設は各地域の主要な病院の症例を掌握しており、各施設ごとのリンパ上皮腫症例数の総唾液腺癌／唾液腺腫瘍総症例数に対するそれぞれの割合は、相対的な発生率とみなすことができよう。したがって、癌腫に占める割合では、広州で13%、上海で4.4%、北京で1.2%、良悪性をふくめた全唾液腺腫瘍にしめる割合では、上海で1.7%、西安で0.15%であった。上海から広州へかけての沿海地域でのリンパ上皮腫の発生は北京、西安など内陸北方地域の4-10倍となった。したがって、本癌腫の発生には地域的な要因があることがしめされた。

以下は臨床記録が確認された症例で検索した結果である。男女比は1:1であった。平均年齢は43歳、最年少は9歳で、39歳以下が35%をしめ、若年発生が特徴的であった。臓器部位では、耳下腺が70%でもっとも多くをしめたが、顎下腺11%に対比しても小唾液腺14%の発生は高率で、とくに口蓋10%には注目された。また、耳下腺顎下腺同時発生例が1例みいだされた。民族はこれまで判明している範囲ではほぼ漢族で、新疆ウイグル自治区ではウイグル族と錫伯族がそれぞれ一例ずつみられた。四川省での多発は広東省から四川省への移民の歴史と関連している可能性がある。グリーンランド、アラスカ等の極地ではアジア系少数民族での発生がいられているが、中国症例では、少数民族での発生は少ないことがわかった。ちなみに、ロシア・カムチャツカ地域でも少なからず発生があるが、すべて白色人種であるという結果を私聞している。

②病理組織化学的解析：リンパ上皮腫は大胞巣型と小胞巣型に大別された。前者は小唾液腺に多発する傾向があり、後者は耳下腺に多発し間質の線維化が亢進してリンパ球反応が低下する傾向をしめた。③免疫組織化学的検索：約20%の症例のLMA-1陽性がえられたが、EBNA-2はごく少数の症例でのみ明確な陽性反応が得られた。癌細胞は上皮膜抗原陽性、DF-3抗体陽性、UEA-I結合陽性をしめし、唾液腺導管様性格が確認された。また、癌胞巣を取り囲む浸潤リンパ球はT細胞優勢が確認された。これは良性リンパ上皮性病変の反応リンパ球がB細胞であるのと対照的であった。④分子生物学的解析：ISHによって検索したリンパ上皮腫症例のほぼ全例で癌細胞はEBER-1陽性であった。反応は細胞核上、とくに核膜にそって、あるいは核小体周囲に濃縮する傾向があがが。リンパ球やその他の細胞には陽性反応はみいだされなかった。PCR法によってもEBVのDNA断片が増幅されることを確認した。対照とした良性リンパ上皮性病変およびワルチン腫瘍、多形性腺腫、粘表皮癌、腺様嚢胞癌、腺癌そのほかの唾液腺腫瘍や非特異性唾液腺炎では陽性シグナルはえられなかった。したがって、唾液腺ではリンパ上皮腫におけるEBV感染はきわめて特異的であるという結果になる。われわれの検討では、同一試料量であればPCR法はISH法よりも感度が高いことが判明しており、われわれの得た結果には信頼性は高いと考えている。他の研究グループから報告されている正常唾液腺あるいは良性唾液腺病変でのEBV陽性はその検索材料や方法の違いがあるが、今後検討されなければならない。

### 4. 結論

今年度までの中国各地における調査で、唾液腺リンパ上皮腫に特異的にEBV遺伝子の存

在が確認された。したがって、この癌腫の発生にEBV感染が重要な関与をしていることが判明した。しかし、EBV感染が癌化のどの過程にかかわっているかはなお不明である。今後は、中国のほか、アジアおよび環太平洋諸国に調査を拡大し、本癌腫発生背景の特異性を把握するとともに、各種癌関連遺伝子の検索をすすめ、EBV感染癌細胞株樹立などの新計画を実施して、EBV感染の発癌への関与のしくみを究明していきたい。

## 5. 研究業績

1. Saku T, Cheng J, Tokunaga M, et al. Epstein-Barr virus infection in salivary lymphoepitheliomas in China. *Journal of Oral Pathology & Medicine* 1996; 25: 270.
2. Saku T, Cheng J, Tokunaga M, et al. EBV infection in salivary lymphoepitheliomas in China. *Proceedings of the 2nd China-Japan Joint Conference on Oral Biology*, 1996, p.62.
3. 朔 敬ほか. 中国の唾液腺リンパ上皮腫におけるEBウイルス感染. *日本病理学会会誌* 1996; 85: 149.
4. 朔 敬. EBV関連唾液腺癌. *新潟歯学会雑誌* 1996; 27: 73.
5. 吳 蘭雁ほか. 涎腺悪性リンパ上皮病損的臨床病理研究. *華西口腔医学雑誌* 1996; 14: 13.
6. 張 偉国ほか. 淋巴節転移性癌中EBウイルス表現在頭頸部腫瘤診断中意義. *第四届全国口腔病理学術会議論文適用匯編* 1996, p.15.

## 6. 共同研究者

廬 勇、吳 蘭雁、周 志瑜（華西医科大学口腔医学院口腔病理学）、饒 慧蘭、李 汝瑶（中山医科大学腫瘍病院および口腔医学院口腔病理学）、欧陽 皆（白求恩医科大学口腔医学院口腔病理学）、于 世鳳（北京医科大学口腔医学院口腔病理学）、婁 鉄成（首都医科大学口腔医学院口腔病理学）、張 偉国、劉 愛如、何 栄根（上海第二医科大学口腔医学院口腔病理学）、陳 朝倫、帛提曼 斯德克（新疆医学院病理学）、凌 滌生（山東医科大学口腔系口腔病理学）、楊 連甲（第四軍医科大学口腔医学院口腔病理学）、李映芳（昆明医学院口腔医学系口腔病理学）、汪 説之（湖北医科大学口腔医学院口腔病理学）、陳 志栄（台湾国立大学医学院医院病理科）、蔡 崇弘（中山医学院口腔病理学）

日本財団補助金による


1996年度財団法人日中医学協会助成報告書

- 調査並びに研究に対する助成 -

平成9年3月15日

財団法人 日中医学協会

理事長 中島章 殿

研究代表者氏名 長谷川 紘司   
所属機関名 昭和大学歯学部第3保存学教室  
職 名 教授 年齢 58 才  
所 在 地 〒145 東京都大田区北千束2-1-1  
電話 03-3787-1151 内線 253

1. 研究課題

中国におけるリスクコントロールを考慮した歯科  
疾患予防システムの構築 —— 中華人民共和国をモデル  
として ——

2. 研究期間 自 1996年4月1日 ~ 至 1997年3月15日

3. 研究組織

日本側研究者氏名 鈴木基之 (45才)  
所属機関 昭和大学歯学部第3保存学教室 職名 助教授

中国側研究者氏名 曹采方 (60才)  
所属機関 北京医科大学口腔医学院牙周科 職名 教授

4. 研究目的、方法、成果と考察、結論の形式で、A4版にて4,000字以上で報告し、研究成果の発表予定についても記載して下さい。尚、論文発表に当っては、日本財団補助金による旨を明記して下さい。

5. 収支決算報告

1996年4月11日交付通知のあった研究課題 中国におけるリスクコントロールを考慮した科疫送予防システムの構築 についての収支決算を行ないました。関係書類を添えて、次のとおり報告します。

交付を受けた金額	支 出 内 訳				
	消耗品費	謝 金	旅 費	その他	合 計
1,000,000 円	81,840 円	0 円	602,000 円	316,383 円	1,000,223 円

支出費内訳（消耗品、謝金、旅費、その他の項目別に記載・別紙可）

区 分	金 額	使 用 目 的
消耗費	81,840	検診用消耗器材、文房具。
輸送費	316,383	検診器材、予防器材の輸送（往反倉庫）
旅費	602,000	中国渡航費（6人分）

「中国におけるリスクファクターを考慮した  
歯科疾患予防システムの構築」

研究報告書

昭和大学

長谷川 純司.

## 「研究目的」

中国は現在、市場経済の導入により著しく発展し、地方中小都市も急速に都市化が進行している。

中国国内におけるnational oral health surveyによれば、北京など大都市において急速な都市化に伴い、齲蝕の急増が報告されている。一方、我々の1992年よりの中国地方都市における歯周炎罹患状況調査によれば、歯周病の発症は10代後半より認められ、30代以降では、ほぼ全員に歯周炎の罹患が認められた。また、その進行状況は増齢とともに悪化していた。このような現状では近い将来中国人の歯科疾患が急増する懸念が大きい。

一方中国における歯科医療需給状況は単位人口あたりの歯科医師数は日本の約30分の1であり、適正な治療活動を行うには不十分である。以上の状況より中国において、適切かつ効果的な予防システムの構築は急務である。

歯科疾患の予防システムに関しては、従来より集団教育による口腔衛生指導が行われてきたが、集団教育では指導内容が個別に行き渡らず、かつ疾病の進行因子などへの対処がなされないためその効果があまり期待できない。

本研究では口腔衛生指導を個別に行い、対象者に直接的に口腔衛生習慣の必要性や方法を指導することで指導効果を高める。特に、歯周炎については、単に口腔清掃の改善だけでなく、歯周炎の進行に関するリスクファクターに関するコントロール方法についても併せて検討する。

## 「研究方法」

### 対象地域および対象者

対象地域は中国河北省の地方都市である承德市郊外の農村とした。本対象地域は無歯科医村であり、歯科受診が困難な地域であった。

対象者は同村の住民で、主に同村内にて就業、居住し、本研究参加に同意の得られ、全身疾患などのない健康人486名（男女）年齢1

4歳～44歳とした。

#### 調査方法

歯周炎の進行に関与すると考えられるリスクファクターを調査するために、以下の臨床診査を行った。

#### 臨床診査

歯周ポケット深さ（以下PD）、アタッチメントレベル（以下AL）についてNIDRプローブにて1歯6点計測、歯肉炎指数（Loe & Silness 以下GI）、プラークスコア（Quingley & Hein 以下PI）、歯石指数（Green & Vermillion 以下CI）についても1歯6点計測、動揺度測定（ミラーの分類）、およびオルソパントモグラフィーにてX線撮影を行った。

臨床診査については既に我々が行ったデータと1996年に行ったデータを比較検討し、歯周炎の進行様式とリスクファクターの分析を行った。

#### 予防システムの作成

上記臨床診査より、歯周炎の進行様式およびリスクファクターに関して、以下の分析を行い、予防システムを作成した。

歯周炎の進行状況については同一患者の2年間における同一部位のPD、ALの差を変位量とし、この変位量が3mmを越えて悪化した部位の出現状況とリスクファクターとして初診時PDとの関連を分析した。この結果をもとに、予防システムを作成した。

予防システムは歯周病の進行時期に適切に効果を発揮するように、対象年齢、初診時ポケット深さなどにてそれぞれのシステムを作成した。

#### 「結果」

##### 初年度検診結果

##### 1. 歯周病の罹患率

すべての年代の対象者において何らかの病的所見が認められ、有病率は100%であった。

##### 2. 原因に関する診査



PIは平均 $3.50 \pm 0.47$ と全年代において高かった。また、GIも $2.21 \pm 0.70$ と高い値を示していた。

### 3. 歯周組織の破壊程度

PDは平均 $2.57 \pm 0.57$ で10代より認められ、増齢につれ深化する傾向が認められた。

ALは10代で、その喪失が認められ、20代以降で付着の喪失が著明に認められた。

### 4. 個人別PD.ALの分布

10歳代は約80%がすべての部位においてPD5mm以内だったのに大抵、40歳代では60%以上の対象者が1部位以上に5mm以上のPDの割合は特に30歳代になると急激な増加を示し、男性の方が若干高い傾向にあった。

ALに関しては10歳代においてもその半数近くが1部位以上AL3mm以上を示していたが15%以上占めることはなく、また、5mm以上のAttachment Loss (A-Loss)は存在しなかった。1部位以上に5mm以上のA-Lossを示す対象者は20歳代で約20%であったのに対し30歳代では約55%と2倍近い増加を見せた。

さらに30歳代以上ではPDが全体的に浅いにもかかわらず重度のA-Lossを示す対象者が存在した。

### 5. 歯種別PD.ALの分布

PDの分布はどの歯種でも約95%が5mm以内だったが、大白歯部では3mm以上のPDを占める割合が多くなった。

ALにおいては大白歯部のほか、下顎切歯部において約30%が3mm以上のA-Lossを示していた。

### 6. 部位別PD.ALの分布

5mm以上のPDを有する割合は中央部より隣接面に多く、最低が10歳代上顎頬側中央0%、最高が40歳台上顎舌側近心11.91%であった。年齢的には20歳代から30歳代にかけて約2倍の増加を示した。

3mm以上のA-Lossを起こしている割合は最低が10歳代の上顎頬側近心0.40%で最高40歳代の下顎頬側中央72.80%であった。また、AL

においても20歳代から30歳にかけてPD以上に急激に増加した。

## 経年調査結果

先に行った同一調査対象者の同一部位を2年後に調査を行い、歯周病の進行状況を分析した。

### 1.再診率

Baseline時485名の対象者に対し、2年後、再召集し再審査したところ450名が応じ、再診率は92.59%であった。

### 2.PDの変化

全年齢を通じ、3mm以上の変化のあった部位は2年間で、202部位(0.53%)であり、大多数の部位は変化を示さなかった。

### 3.ALの変化

PDと比較すると3mm以上のアタッチメントロスを示した部位は多く(2年間で918部位2.51%)認められ、増齢とともに増加した。

アタッチメントロスを示した部位は25歳以降になると急激にその部位が増加し、部位別では下顎前歯頬側隣接面、上下顎大白歯、特に中央部に多く認められた。

### 4.PDとALの関係

アタッチメントロスが急激に増加した25~34歳において、Baseline時のPDを4mm未満と4mm以上に分けた場合、どの部位でも4mm以上のPDを有する部位の方がアタッチメントロスを起こす割合が高かった。しかし、下顎頬側面は浅いPDでもアタッチメントロスを起こす割合が他の部位に比べて高かった。一方、上顎前歯頬側はPDが浅いときはほとんどアタッチメントロスを起こさなかったが4mm以上になるとロスを起こす割合が他の部位に比べて多かった。

## 予防システムの作成

### 1.生活習慣の調査

共同研究者である北京医科大学歯科医師により、対象者全員に口腔清掃習慣、口腔衛生知識の有無、生活状況などについて個別に聞き取

り調査を行った。

## 2. 集団指導

一般的な口腔清掃指導（歯ブラシの使用法、使用回数など）と口腔清掃の必要性についての口腔衛生教育を行った。

## 3. 個別指導

上記の臨床診査結果より、歯周病は25歳以降に急激に進行し、大白歯部および下顎前歯頬側隣接面、4mm以上のポケットを有する部位での進行が著しいため、これらに対し、以下の個別指導を行った。

1.) 25歳以降の対象者に対する重点的な口腔衛生指導。

2.) 対象者の口腔内での実地指導。

## 4. スケーリング

4mm以上のポケット部位ではポケット内細菌叢を処置清掃するために保有対象者の対象部位のスケーリングを行った。

## 「考察」

本調査結果より、本対象地域ではすべての対象者に歯肉炎または歯周炎の罹患が認められた。

以前に行った調査結果および本年度の結果より、歯周炎の進行様式について、その一部が明らかとなった。

25歳以降の成人、ポケットが4mm以上の部位、大白歯部などにおいては歯周炎の進行する割合が他の条件に比べ高率に認められた。これらの条件に当てはまる対象者および対象部位に、個別の指導やスケーリングなどを行うことは有効であると考えられる。

これは、疾病の進行が予測される特定集団に徹底した指導を行うことや、同様な部位に対しスケーリングを行い口腔内環境を改善することは疾病の進行を抑制する上できわめて有効であり、かつ予防活動を行う上で労力や経済性の観点から特に効率的である。

本調査では進行様式の分析と予防システムの作成、予防システムの初回実施のみで、予防システムの効果判定は期間的に実施不可能であった。しかし、歯周病罹患状況は極度に劣悪であり、現在の保健教育お

よび保健行政のままでは、近い将来、口腔状況が悲惨な状況になると考えられる本対象集団にて予防システムを実施したことは口腔衛生教育の普及にとどまらず広く口腔保健に寄与するものと考えられる。

「研究成果の発表」

1997 International Association for Dental Research  
22nd March 1997 にて成果発表。

日本財団補助金による


1996年度財団法人日中医学協会助成報告書

— 調査並びに研究に対する助成 —

1997年3月5日

財団法人 日中医学協会

理事長 中島章 殿

研究代表者氏名 町田幸雄 

所属機関名 東京歯科大学

職名 副学長 年齢 65 才

所在地 261 千葉市美浜区真砂 1-2-2

電話 043-270-3703 内線

1. 研究課題

黒(褐)色性色素沈着を有する日中両國小児の齲蝕罹患状態の相違に関する比較研究

歯面に黒色性色素沈着を認める小児は、色素沈着が無い小児に比較し、齲蝕感受性が低いとされている。1995年に上海医科大学付属幼稚園園児を対象に実施した調査で、同園園児は、黒色性色素沈着保有者が、過去の報告に示されている日本人小児より多いことが判明した。そこで、貴協会の研究助成を受け、1996年10月に日本側研究者3名が訪中し、上海医科大学付属幼稚園園児464名を対象に、乳歯の黒色性色素沈着の有無及び齲蝕罹患状況の調査を実施し、さらに、色素沈着の有無別に2群に分け、3種の齲蝕活動性試験を行い、両群間の齲蝕活動性の差違について検討した。また、対照群として船橋市立保育園6園の園児573名について同様の調査を実施した。

その結果、黒色性色素沈着乳歯の保有者の割合は、上海19.6%、船橋4.4%で、中国人小児が高率であり、 $p < 0.01$ で有意差が認められた。齲蝕罹患状況では、黒色性色素沈着歯保有者の齲蝕罹患傾向は、非保有者に比べ低いとする従来の報告とは異なり、日中両国の小児とも両群間の齲蝕罹患状況に大きな差違が認められず、さらに、齲蝕活動性試験による齲蝕ハイリスク者の比較においても、同様に両群間に殆ど差がみられなかった。

2. 研究期間 自 1996年4月1日 ~ 至 1997年3月15日

3. 研究組織

日本側研究者氏名 町田幸雄 (65才)

所属機関 東京歯科大学 職名 副学長

中国側研究者氏名 石四箴 (57才)

所属機関 上海鉄道大学口腔医学院 職名 院長

上海市小児に認められた乳歯の黒色性色素沈着と齲蝕罹患状況について

○林 芳裕, 辻口 敦, 薬師寺 仁, 町田幸雄

石 四歳\*

(東京歯科大学小児歯科学講座)

(上海鉄道大学歯学部小児歯科学教室\*)

【目的】東京歯科大学小児歯科学講座と上海鉄道大学歯学部小児歯科学教室との共同研究の一環として行った上海医科大学付属幼稚園の口腔内診査<sup>1)</sup>において、著者らは、対象小児の乳歯歯面に黒色の、帯状あるいは連続する点状の色素沈着を有する症例を多数認めた。

従来、欧米あるいは我が国における調査報告<sup>2-4)</sup>では、黒色性色素沈着を有する小児は、これを有さない小児に比べ齲蝕罹患率が明らかに低いとされている。しかしながら、今回の調査過程において、色素沈着を認めた小児の齲蝕罹患率は、色素沈着のない小児に比べ、過去の調査結果ほどは低いようにはみられず、両者間に顕著な差が無いように思われた。

そこで著者らは、調査対象園児について、歯面に黒色性色素沈着を認める小児の年齢別発現頻度、並びに、それら小児の齲蝕罹患状況が、認めない小児より低いか否かを確認するため、両者の齲蝕罹患状況の比較を行った結果、興味ある知見を得たので報告する。

【対象及び方法】調査対象は、上海医科大学付属幼稚園の園児534名(男児:270名,女児:264名)である。齲蝕罹患状況の診査は、WHOの診査基準に基づいて行った。また、乳歯歯面の黒色性色素沈着の診査は、明らかに黒色を呈している色素沈着物のみを対象とし、その他の色素沈着物は除外した。さらに、歯科用探針にて擦過し、フッ化ジアンミン銀との鑑別を行った。

その後、得られた結果はパーソナルコンピューター(PC-9801DA:NEC社製)に入力、統計学的検索を行った。

【結果】乳歯歯冠部に黒色性色素の沈着を認めた小児は、表1に示す如く、調査対象534名中72名(13.4%)であった。年齢別発現頻度は、5歳児で203名中37名(18.2%)であり、5歳児を頂点に年齢と共に増加する傾向にあった。また、男女間で有意な差は認められなかった( $\chi^2$ 検定:  $p < 0.05$ )。

黒色性色素沈着を有するもの(保有群)と沈着を認めないもの(非保有群)間の齲蝕有病者率を比較すると、

表2に示すように、2歳及び3歳児では、非保有群の方が高率であったが、4歳及び5歳児では、逆に保有群の方がやや高い値を示した。しかし、両群間の差はわずかであり、統計学的に有意な差は認められなかった( $\chi^2$ 検定  $p < 0.01$ )。

また、いずれの年齢群とも保有群の一人平均dftは、非保有群に比べわずかに低い傾向を示したが、統計学的には、5歳児を除く他の年齢では有意な差が認められなかった(Student's t-test:  $p < 0.01$ )。

【考察】上海市小児の黒色性色素沈着の発現率は13.4%であり、年齢別発現状況を調査した他の報告と比較し、上海市小児は、黒色性色素沈着歯保有者の割合が高いことが判明した。これは、本色素沈着の発現に何らかの環境的要因が関連しているものと考えられる。

また、本調査においては、齲蝕有病者率では、保有群、非保有群間に殆ど差がみられなかったこと、一人平均dft、dt及びdfsは、全ての年齢群で、保有群が非保有群に比較しわずかに低い値を示したものの、非保有者に比較して明らかに低いとはいえなかったことから、黒色性色素沈着が齲蝕抑制因子として、直接的に関与していると結論づけることはできないものと考えられた。

従って、今後は、齲蝕罹患抑制に関与する環境的因子と黒色性色素沈着の発現との関連性を検討する必要があると思われた。

【文献】

- 1) 林 芳裕, 他: 歯科学報, 96: 577~584, 1996.
- 2) Bibby, B. G.: J. dent. Res., 11: 855~872, 1931.
- 3) 今井 章: 臨床歯科, 19: 35~39, 1952.
- 4) 和田勝夫: 口腔衛生会誌, 9: 166~183, 1959.

表1 年齢別対象者数及び黒色性色素沈着歯の保有状況 人(%)

年 齢	調査対象者数	色素沈着歯保有者数
2 歳 児	65	4 ( 6.2 )
3 歳 児	90	13 ( 14.4 )
4 歳 児	149	17 ( 11.4 )
5 歳 児	203	37 ( 18.2 )
6 歳 児	27	1 ( 3.7 )
全調査対象者	534	72 ( 13.4 )

表2 色素沈着保有群及び非保有群の年齢別齲蝕有病者数 人(%)

年 齢	保 有 群		非 保 有 群	
	対象者数	齲蝕有病者数	対象者数	齲蝕有病者数
2 歳 児	4	2 ( 50.0 )	61	25 ( 41.0 )
3 歳 児	13	10 ( 76.9 )	77	50 ( 64.9 )
4 歳 児	17	13 ( 76.5 )	132	103 ( 78.0 )
5 歳 児	37	28 ( 75.7 )	166	144 ( 86.7 )
6 歳 児	1	1 ( 100 )	26	21 ( 80.8 )
合 計	72	54 ( 75.0 )	462	343 ( 74.2 )

4. 研究目的、方法、成果と考察、結論の形式で、A4版にて4,000字以上で報告し、研究成果の発表予定についても記載して下さい。尚、論文発表に当っては、日本財団補助金による旨を明記して下さい。

5. 収支決算報告

黒(褐)色性色素沈着を有する日中両国小児の齲蝕罹患状態の相違に関する比較研究  
1996年4月11日交付通知のあった研究課題

についての収支決算を行ないました。関係書類を添えて、次のとおり報告します。

交付を受けた金額	支 出 内 訳				
	消耗品費	謝 金	旅 費	そ の 他	合 計
1,000,000 円	270,000 円	円	650,000 円	80,000 円	1,000,000 円

支出費内訳 (消耗品、謝金、旅費、その他の項目別に記載・別紙可)

区 分	金 額	使 用 目 的
旅 費	716,600	薬師寺 仁共同研究のため、中華人民共和国上海市出張 (本学の海外出張規定に基づき研究実施責任者が旅費申請を行い、支給額を出張者3名の旅費・滞在費に充当した。)
消耗品費	253,000	デントカルトSM, 他 (255,852円のうち2,452円は小児歯科研究費にて支払う。)
その他	30,000	光熱水費

大学事務部会計課  
会計課長 滝 沢 和 夫

日本財団補助金による


1996年度財団法人日中医学協会助成報告書

—調査並びに研究に対する助成—

年 月 日

財団法人 日中医学協会

理事長 中島章殿

研究代表者氏名 晶山好雄   
所属機関名 国立衛生試験所  
北海道薬用植物栽培試験場  
職 名 場 長 年齢 56 才  
所 在 地 〒096 北海道名寄市字大橋108番地  
電話 01654-2-3605 内線

1. 研究課題

「中国青海省における、生薬資源の品質・供給・開発に関する研究。  
大黃及び甘草の基原植物ならびに品質について。」

1996年8月3日～14日まで中国青海省東部地域～甘肃省西部地域において、アイウ・カンゾウの自生種および環境調査を行なった。同仁から南へ30Km下からた麦秋林場の山中、標高3200mの西北斜面では、アイウの自生を発見、その形態的特徴から *Rheum tanguticum* と同定した。

その形態と品質は、写真およびTable IIに示した。同仁北部の隆務川沿い、標高1910mの東南斜面に約250m<sup>2</sup>の野生カンゾウの群落を発見した。形態から *Glycyrrhiza uralensis* と推定したが、帰国後の分析結果から成分パターンが異なることが判り、さらに検討を要する。詳細については別紙の通り。

2. 研究期間 自 1996年 8月 1日 ～ 至 1997年 3月 15日

3. 研究組織

日本側研究者氏名 柴田敏郎 (46才)  
所属機関 国立衛生試験所  
筑波薬用植物栽培試験場 職名 研究室長

中国側研究者氏名 高延林 (44才)  
所属機関 中国青海省科学技術委員会 職名 科学技術情報研究所長



4. 研究目的、方法、成果と考察、結論の形式で、A4版にて4,000字以上で報告し、研究成果の発表予定についても記載して下さい。尚、論文発表に当っては、日本財団補助金による旨を明記して下さい。

5. 収支決算報告

「中国青海省における、生薬資源の品質・供給・開発に関する研究、

1996年4月11日交付通知のあった研究課題 大黃及び甘草の基原植物ならびに品質について。」

についての収支決算を行ないました。関係書類を添えて、次のとおり報告します。

交付を受けた金額	支 出 内 訳				
	消耗品費	謝 金	旅 費	その他	合 計
1,000,000. 円 + 111 (利息)	124,184円	一 円	703,205 円	172,722円	1,000,111 円

支出費内訳（消耗品、謝金、旅費、その他の項目別に記載・別紙可）

区 分	金 額	使 用 目 的
消耗品費	124,184 <sup>円</sup>	分析費
旅 費	703,205	交通費
その他	24,926	土産代
	2,450	通信費
	67,758	飲食代
	77,588	宿泊代
合 計	1,000,111	

### 【研究目的】

青海省には、わが国で漢方製剤原料として繁用されている大黃・甘草及び麻黄等の重要生薬が産出すると言われているが、日本においては情報量が少ないこともあり、基原植物・品質及び潜在的供給量等々について不明な点が多い。薬用大黃の優良な種類は、青海省東南部の黄河源流地帯を中心に産すると言われ、また、青海省同仁一帯に産するものが品質的に良好と言われてきた。中国には45種類の大黃 (*Rheum*) 属植物が確認され、その内、青海省及びチベット自治区には23種が分布していることが報告されている。第十三改正日本薬局方において、生薬大黃の活性物質の一つであるセンノシドA含量が新たに規定され(0.25%以上)た結果、古くから良品とされてきた錦紋大黃の中にはセンノシド含量値がこれを満たさないものも認められ、その原因として、基原植物や産地及び収穫後の調製方法等々が考えられるが、今なお解明されていない。一方、青海省東部地域には *Glycyrrhiza uralensis* を基原とする甘草が産出することが予備調査で明らかとなっているが、その詳細や品質については明確でない。日本における漢方製剤原料生薬の安定供給と品質の安定化を目的に、青海省東部地域における大黃・甘草の基原植物やその自生環境ならびにそれらの成分について現地調査を行った。

### 【研究方法】

両国スタッフの参加のもとで、1996年8月3日～14日、青海省東部地域～甘肅省西部地域(貴南藏族自治州、標高2,900～3,400m)にて、大黃・甘草について、原植物の自生地でのサンプルの収集と外部形態による分類、ならびに自生地環境の調査(自生地土壌、植生)を行った。また、同地域に産する同生薬の市場品の収集を行い(主に中国側スタッフ)、自生株及び市場品の成分分析・品質評価を行った(日本側スタッフ)。現地調査は、西寧市(標高2,150m)から南東へ下り、同仁(2,400m)、麦秀林場(2,800m)を経て甘肅省夏河(2,780m)に至り、北上して臨夏(1,950m)から蘭州に至る道路に沿って行った。麦秀林場では標高2,800mから3,300mにおける山中にて徒歩による調査を行った。

### 【研究成績】

1) 大黃：同仁の町から南へ約30km下がった麦秀林場の山中、標高約3,200mの西北斜面において野生ダイオウを確認し(Fig. 1)、それらの葉身の裂刻及び葉の毛の有無から判断して(葉は卵形で深裂、葉柄に疎らに白色の柔毛、葉裏脈上に白色の柔毛と突起状の毛、葉表は白色の柔毛)、*Rheum tanguticum* と同定した。自生地の土壌は暗褐色～栗色でpH6.7と微酸性を示し(Table I)、エゾマツやトウヒ属の高木やスイカヅラ科 *Lonicera* 属及びヤナギ科 *Salix* 属の低木が点在するやや湿った明るい草原で、草原には9種類のリンドウ科、3種類のマメ科 *Astragalus* 属、数種類のゴマノハグサ科 *Pedicularis* 属、*Bupleurum* 属はじめ数種のセリ科、*Leontopodium* 属や *Ligularia* 属はじめ数種のキク科、オミナエシ科 *Valeriana* 属及びキンボウゲ科、ラン科植物等々多種類の亜高山性植物が見られた。同仁から東へ進み、青海省境付近に位置する甘肅省夏河のチベット仏教寺院の庭において、明らかに *R. tanguticum* と思われるダイオウが植栽されているのを見つけたが、同寺院の僧の話で、近くの山で採取したものであることが判った。同地域で見られた株はいずれも、青海省東南部で見られた株に比べ葉の裂刻がより深いことが特徴的であった。同仁の野生株のセンノシドA含量は同地域の市場で流通している生薬とほぼ同等であったが、灰分は著しく高かった(Table II)。青海省の市場流通生薬は、センノシド含量及び灰分のバラツキが著しく、また、甘肅省の市場流通生薬のセンノシド含量は、いずれもJPの規格値を下回るものであったが、これらが基原植物や収穫後の調製条件等に起因するか不明である。なお、野生株の希エタノールエキス含量は市場流通生薬と比べ著しく低かったが(Table II)、これは収穫時期の相違によるものと考えられる。

2) 甘草：同仁北部の黄河支流隆務川に沿った標高1910mの東南斜面において、約250m<sup>2</sup>にわたる野生カンゾウの群落を確認した(Fig. 2)。羽状複葉の小葉数、小葉の形(卵形～広卵形、基部は円形、先端は円～急尖形)や腺毛の特徴、花のがくの腺毛の特徴及び豆果の形や腺毛の特徴、等々から *Glycyrrhiza uralensis* と推定したが、内蒙古地域に分布する同種とやや特徴が異なり、さらに検討を要する。自生地の土壌は砂土でpH8.3とアルカリ性を示し(Table I)、草丈の低い草がまばらに生えるゆるやかな斜面には、キク科の *Echinops* 属、キョウチクトウ科の草本、ハマビシ科、アカザ科等々の砂漠植生を特徴づける植物が見られた。地表下15cmにおける直径5mm程度の根を採取し、グリチルリチン含量を測定した結果、いずれの個体も2%以下と低かったが、同地域の市場で流通している生薬における同成分の含量は5%以上を示し(Table III)、根の部位やageまたは収穫時期により同成分の含量が変化することが示唆された。

### 【結論】

青海省東部の同仁地域には、大黃の基原種の1つである *R. tanguticum* が自生していることが判明し、また、甘肅省夏河地域にも同種が自生していることが推定された。同地域には甘草の基原種の1つである

*Glycyrrhiza uralensis* と推定される種が自生していることが判明し、それらの自生地環境を明らかにした。  
 【研究成果の発表, 発表計画】  
 1) 日本生薬学会関西支部平成8年度秋季講演会にて口頭発表 (1996年12月12日, 大阪, 講演要旨集pp.1-10). 2) 調査報告書の作成実施中. 3) Natural Medicine への投稿準備中.

Table I Soil pH of the place where *Rheum* and *Glycyrrhiza* plants were grown naturally.

Soil samples	H <sub>2</sub> O	KCl
Glycyrrhiza plants were grown* (青海省黄南藏族自治州德千寺) (35° 48' N, 102° 6' E, Alt. 1910m)	8.32	7.83
Rheum plants were grown** (青海省黄南藏族自治州麦秋林場) (35° 16' N, 101° 55' E, Alt. 3200m)	6.74	5.59

\*Sandy soil, \*\*Dark-brown soil

Table III Glycyrrhizin content of roots of *Glycyrrhiza* plants naturally grown and *Glycyrrhiza Radix* in market in Qinghai.

Samples	Glycyrrhizin content (%)	Fresh root diameter (mm)
Roots of <i>Glycyrrhiza</i> plants*		
A	1.59	4.43
B	1.56	6.30
C	1.99	6.08
D	1.58	5.36
E	1.73	3.03
F	1.32	5.98
Average	1.62±0.22	5.20±1.26
Glycyrrhiza Radix in market		
1st grade(1級)	5.10	10.0<
2nd grade(2級)	5.08	10.0<
JP Ⅷ	more than 2.5%	

\*Samples for analysis were collected at 15 cm in depth from soil surface on August 10, 1996.

Table II Results of general tests of JP and sennosides contents of roots of *Rheum* plants naturally grown in Qinghai and *Rhei Rhizoma* (大黃) collected in markets of Qinghai and Kansu provinces.

Samples	Total ash (%)	Acid-insoluble ash (%)	Delute ethanol-soluble extract (%)	Loss on drying (%)	Raponticin	Sennoside (%)	
						A	B
Roots of <i>Rheum</i> plants naturally grown in Qinghai*							
Sample A	20.9	1.0	26.9	18.3	—	0.59	0.26
Sample B	18.2	0.7	27.9	10.7	—	0.59	0.25
Rhei Rhizoma collected in market of Qinghai Province (青海省)							
Produced in Dorren (同仁)	7.3	0.6	44.0	8.3	—	0.26	0.12
Produced in Yushu (玉樹)	14.4	0.3	45.9	7.7	—	0.16	0.07
Produced in Baima (班瑪)	10.5	0.4	48.7	7.6	—	0.95	0.41
莫蓋大黃	20.4	1.0	51.5	4.9	—	1.03	0.44
Rhei Rhizoma collected in market of Kansu Province (甘肅省)							
六成中吉	8.5	1.0	44.3	5.8	—	0.08	—**
六成片	8.5	0.7	40.9	7.0	—	0.03	—**
小小吉	9.0	0.3	38.1	6.9	—	0.07	—**
八成小吉	13.2	0.6	40.2	7.9	—	—**	—**
黃渣	9.2	0.9	34.5	9.5	—	0.06	—**
JP Ⅷ	Not more than 13.0%		Not less than 30.0%	Not more than 13.0%	—	Not less than 0.25%	

\*: 青海省黄南藏族自治州同仁 \*\*; not analyzed.



#### IV. 主な滞在日程

	9月3日	4日	5日	6日	7日	8日
貴田 嘉一	西安到着 シンポジウム準備	”	シンポジウム		中華医学会と第 6回シンポジウ ム打合せ	帰国
三村 悟郎		西安到着 シンポジウム準備				
村上 啓治		西安到着 シンポジウム準備				

貴田が9月3日に西安到着、シンポジウムの準備、その他中華医学会と打合せ、資料不足の場合、三村、村上が持参する予定とした。5日、6日はシンポジウム開催、7日はシンポジウムの後片付けと中華医学会、中国糖尿病学会の委員と次回第6回のシンポジウム開催について合議した。開催年は1999年（2年間隔で開催することとした）、日本で開催することとした。日本側代表世話人は三村、第6回シンポジウム開催責任者は貴田とすることとなり、8日帰国した。

#### V. 学術交流報告

中国糖尿病学会の第7回の学術集会在9月1日～3日西安市で開催され、ひきつづいて第5回のシンポジウムが5日、6日の両日ハイヤットホテルで開催した。開会式は中国糖尿病学会の朱禧星会長、中華医学会の尚粹仁副会長、

秘書長の挨拶および日本側から三村代表世話人の挨拶が行なわれ、シンポジウムが開催された。

特別講演は日本側から貴田嘉一教授、野中共平教授、中国側からXixing Ehu, Xian-Ren Pan教授によって行われた

が講演内容は日本、中国の糖尿病の成因についての研究成果および日本の糖尿病治療の現状、中国の糖尿病の疫学について格調のある最新の研究成果が発表され、極めて有意義な特別講演であった。招待講演として日本側から竹

田亮祐名誉教授から興味深い肝臓病についての講演が行なわれた。一般演題は日本側から30題、中国側から31題（うち2題は欠）であり、ポスターは中国側から31題であった。本シンポジウムは発表は英語で行ない、質疑応答

は日中両国語を用いたが、今回のシンポジウムの講演内容は糖尿病の基礎的研究と臨床研究であり、中国の研究水準の向上が顕著に認められた。また両国の研究者による質疑応答が今回は極めて活発であり、大巾にシンポジウム

の終了時間がおくれた。更に今回の学術交流を通じて両国間の親善関係がより強固となり、両国の研究者の交流の輪が更に広まったことも今回のシンポジウムの成果の一つといえる。

招聘派遣研究者

1) 氏名 三村 悟郎 英文名 Mimura Goro (男) 女

所属機関 学校法人尚綱学園 尚綱短期大学  
職名 学長 生年月日 1924年5月7日  
所在地 ㊟862 熊本市九品寺2-6-78  
電話 096-362-2011 内線307  
研究課題 日中間の糖尿病研究推進

2) 氏名 貴田 嘉一 英文名 Kida Kaichi (男) 女

所属機関 愛媛大学医学部小児科  
職名 教授 生年月日 1947年7月8日  
所在地 ㊟791-02 愛媛県温泉郡重信町大字志津川29  
電話 0899-64-5111 内線2119  
研究課題 日中間の小児糖尿病の学術交流

3) 氏名 村上 啓治 英文名 Keiji Murakami (男) 女

所属機関 須磨赤十字病院  
職名 副院長 生年月日 1947年4月3日  
所在地 ㊟654 神戸市須磨区妙法寺字菅之池684-1  
電話 078-741-2611 内線  
研究課題 日中間の糖尿病の疫学

日本財団補助金による

1996年度日中医学協力事業助成報告書

— 中国人研究者・医療技術者招聘助成 —

財団法人 日中医学協会

理事長 中 島 章 殿

9 年 3 月 9 日

- I. 招へい責任者 成瀬光栄 (成瀬) (成瀬)
- 所属機関 東京女子医科大学第二内科科学教室 職名 助教授
- 所在地 〒162 東京都新宿区河田町8-1 電話 03-3353-8111
- 招へい研究者氏名 曾正陪
- 所属機関 中国医学科学院协和医科大学协和医院内分科
- 職 名 教授

II. 日本滞在日程

平成9年2月3日来日後、平成9年6月中旬まで招聘責任者である東京女子医大第二内科 成瀬光栄助教授のもとに滞在し研究に従事する。

1カ月目は組織からのRNA抽出、RNAase protection assayを用いて高血圧ラットの各種組織におけるET-1 mRNA発現量を検討する。

2カ月目は各種ラット組織中NO合成酵素遺伝子定量のためのRNAase protection assayを確立、修得する。

3カ月目は高血圧ラット、糖尿病ラットにおける薬物投与がET-1とNOS mRNA発現に及ぼす影響を検討する。

4カ月目は得られたデータの解析と論文作成を行う。

この間、日程の調整がつけば京都大学第二内科（中尾一和教授）の教室を訪問する予定である。

また、平成9年6月1日から3日間、第70回日本内分泌学会（東京）に参加予定である。

### Ⅲ. 研究報告

**【背景】** エンドセリン (ET) は強力な血管平滑筋収縮作用、昇圧作用に加えて、中枢性の交感神経活性亢進、下垂体後葉からのバゾプレシン分泌促進、心臓における陽性変時、変力作用、副腎からのアルドステロン、カテコールアミン分泌促進、腎血漿流量の減少など多様な向昇圧性の生物作用を示す事から、高血圧における病態生理学的意義が注目される。しかしながら主に局所因子として作用する事から、その血中動態から病態生理学的役割を評価するのは困難で、組織中での動態が重要であると考えられる。今回私達は、高血圧ラットにおいて組織中のET-1 mRNAの発現量を検討した。

**【方法】** 易卒中高血圧自然発症ラットの副腎、大動脈、肺、腎臓、脳、心臓からAGPC法にてtotal RNAを抽出、逆転写反応後ラットpreproET-1遺伝子とGAPDH遺伝子のプライマーを用いPCRを施行した。得られたPCR産物をSouthern blotting後オートラジオグラフィーを施行し、デンシトメーターにて定量、前者を後者にて補正し比較した。また、血中ET-1濃度をEIAにて測定した。

**【結果】** SHR-SPの副腎、腎臓、脳、肺、心臓各組織中ET-1mRNA発現は各々WKYの3倍、2倍、1.7倍、1.2倍、1.5倍の高値を示したが、大動脈におけるET-1mRNA発現は対照ラットに比べてむしろ減少を認めた。更に、高血圧発症前の4週齢においてもSHR-SP/IzmにおけるET-1mRNAの発現は、同週齢のWKY/Izmに比べて明らかに高値であった。一方、血中ET-1濃度は両群間で差を認めなかった。

**【結論】** これらの結果から、高血圧自然発症ラットでは、高血圧の発症以前から組織中のET-1遺伝子の発現増加があり、高血圧の発症、進展に関与する事が示唆された。

### Ⅳ. 助成金の使途内訳

助成金額 700,000 円

交通費 190,000 円 宿泊費 40,000 円 食費 300,000 円

雑費 110,000 円 他 通信費 30,000  
手続料 30,000 円



日本財団補助金による


1996年度日中医学協力事業助成報告書

- 中国人研究者・医療技術者招聘助成 -

財団法人 日中医学協会

理事長 中 島 章 殿

1997年5月26日

I. 招へい責任者 近藤 達也   
所属機関 国立国際医療センター 職名 手術部長  
所在地 新宿区戸山1-21-1 〒162 電話 3202-7181  
招へい研究者氏名 杜 謙  
所属機関 遼寧省人民醫院  
職 名 主治医師 講師

II. 日本滞在日程

別記

Ⅲ. 研究報告

別記

Ⅳ. 助成金の使途内訳

助成金額 900,000 円

交通費 200,000 円 宿泊費 300,000 円 食費 300,000 円

雑費 100,000 円 他 \_\_\_\_\_ 円

[日本滞在日程]

1996年11月 4日 来日

1997年 5月 4日 帰国

- (1) 国立国際医療センター脳神経外科における脳神経外科診療のシステムの把握と顕微鏡下での脳神経外科手術の見学及びその器具の取扱の実習。

我が国の脳神経外科の診療システムは、一般に患者が来院して神経学的検査や神経放射線学的検査などで診断される過程から、さらに手術や化学療法などの治療を受け、退院後の経過観察に至るまで非常にいくつもの過程を脳神経外科医が責任をもって行う診療システムであり、どうしても Quality が重んじられる所です。またこれが科学的な医学を推進する大きな要素となるものであります。中国では大きな病院の数が少なく、患者が一ヶ所に集中し、ある意味では診療は能率的に行われますがどうしてもベルトコンベア式となり Quality よりも Quantity を重んじる所となります。そこで、杜先生には当院で我々が神経学的診察を経て、CT、MRI、血管撮影を行って診断を深めていく過程をよく理解してもらい、さらに顕微鏡下の手術をみて、折にふれ我々と診断、治療における問題点等を討議して、これらから Quality の必要性を認識してもらいました。

また彼の為に、古い手術用顕微鏡を用いてその器具の操作の実習を行ってもらいマイクロサージャリーの操作を身につけてもらいました（彼の所属する病院では顕微鏡下の脳手術は行っていない）。

- (2) 脳腫瘍に対する放射線照射の治療効果の観察（神経放射線学的観察と脳腫瘍組織の観察の実習）

当初より当科で開発した脳腫瘍に対する術前照射療法の研修が大きな目的でありました。2例についてこの治療法の一部始終をこの研修期間に見学する事ができ、その効果を確認できました。そして同時に脳腫瘍の病理組織学的観察という実習を十分に行う事ができ、それによる診断の技術の向上をはかることもできました。また、放射線による腫瘍の病理学的変化を十分に理解することができました。帰国後にこの治療法を実施する技術と知識を身につけることができたと理解します。

## 脳腫瘍に対する術前照射療法

中国 遼寧省人民醫院 脳神経外科 杜言兼

悪性脳腫瘍に限らず、悪性脳腫瘍の治療の根幹をなすものは、早期発見、早期切除である。ところが、悪性脳腫瘍では、ほとんどの場合、いかに早期発見は難しく、治療は基本的に、後手にまわって治療療法となっているのが実情である。国立国際医療センターは脳腫瘍に対し、術前照射法を採用してきたが、これにより、全切除不可能となり、予後の改善に寄与することから大なることを認められた。放射線照射は、Lineacにより、3-5週間におたり、初発例では40~50 Gy、再発例では、30~40 Gy 投与し、この間、脳腫瘍による脳室系の圧排による水頭症を来している症例には、あらかじめ持続脳室ドレナージを設け、脳浮腫の強い症例に対しては、比較的大量のステロイドの投与を続けた（prednisolone 30-80mg）。そして、放射線照射後は、CT Scanの結果をみて、約2週間以内に、外科的切除を行った。また、放射線照射は、基本的に局所に対して行い、Medulloblastoma, Germ cell Tumorでは、術後に全脳・全脊髄照射を加えた。

術前照射治療の効果をCT scan、血管造影での評価を示す。腫瘍が小さくなったもの49.0%、変りなかつたもの49.0%であった。また、脳腫瘍内の低吸収域の変化をみると、増加したものの62.7%。変化のなかつたもの35.2%であった。一方、血管造影での効果をみると、腫瘍新生血管の退縮したものの78.9%で、変化のなかつたもの21%であった。後者は、全てHaemangioblastoma例であった。つきに外科的切除時における評価をみると、全切除は41.1%、亜全切除は35.2%、部分切除は23.5%であった。全切除以外の例は、部分的にそれか不可認であったためである。病理組織学的検討を行うと、94.1%に悪性を認め、あす<sup>58%</sup>のみ悪性を認めなかった。後者は、全例、Haemangioblastomaであった。腫瘍の種類による手術結果を示す。Glioblastoma, Astrocytoma Grade IIIでは、全切除21.7%、亜全切除30.4%であった。一方、Astrocytoma Grade I-II, Mixed Glioma, Ependymomaでは、全切除25%、亜全切除50%であった。Medulloblastomaでは100%に全切除できた。Germ Cell Tumor (二重では、主として混合型)では、75%に全切除であった。転移性脳腫瘍では、全切除は44.4%であった。

脳腫瘍に対する集学的治療は、現在のところ、外科的剔出、放射線療法、化学療法、免疫療法、BRMをとり合おせで行われている。今日、悪性腫瘍の治療の上でその治療率を高めるためには、早期発見と外科的全剔である。脳腫瘍の日本における全国統計では外科的全剔例における Glioblastoma の5年生存率29.9%と高く、これから判断する通り、基本的に脳腫瘍の治療率を高める方法は、この外科的全剔である。CT scanの発達により、腫瘍の広がりも正確に把握できるようになり、手術的全剔の機会が増大した。放射線照射による腫瘍への影響は、腫瘍の周辺部に強く、これは、その部分がより Oxygenation が強いからであるという。そして術前照射は剔出不能な腫瘍を剔出可能とし、さらに手術時の癌の転移も防止する働きもあるとしている。Gliomaでは、この腫瘍周辺における境界が一般には非常に不明瞭である。ところが放射線照射後は、この部分が変性し、腫瘍は黄色に変色し硬度を増し出血性も減少し、そのため、Gliomaにおける en bloc 剔出も可能となったと考える。

術前照射における問題点として、その他、照射部の皮膚の変化がある医療センターの採用している linear による、皮膚潰瘍はなく、術後の縫合不全はみられていない。また、放射線中の脳浮腫は大量のステロイドで制御可能である。水頭症については、持続脳室ドレナージで十分コントロールされる。これは、1か月以上におた、継続されるわけであるが、正しく管理すれば、まったく感染をさせることはない。

術前照射療法のほかにも現時点では中国でまだ実施されていない脳内視鏡手術、頸動脈弾性硬化剝離術など技術も身に付け、大変勉強になったと思います。特に日本の先生方のマイクロ脳神経外科手術のすばらしさにより、感心しました。残念なことには私の日本語能力はまだその足りないし、研修期間も限られているので、習得すべきものがまたまた多くなります。これからチャンスがあらましたら、また何回も日本に行きたいと思っております。



### Ⅲ. 研究報告

まず私に対する研究助成金交付につきまして御礼を申しあげたい  
と思ひます。研究テーマにつきましては指導担当の関口守衛教授が  
る研究期間に適合する題目を選んでいただきました。

それは「高血圧性心疾患における重症度と左右心室筋の超  
微形態病変との関連—心内膜心筋生検所見による検討—」で  
あります。そこで、高血圧症における重症度を病期にわけ、  
各病期に概当する症例について左右心室の同時心内膜心筋生検  
を行い得た20症例の標本の電子顕微鏡(電顕)的観察、分析を  
1996年11月から開始しております。またその研究結果については  
未知であります。左右心室筋共に高血圧症の重症度が増加す  
と共に超微形態の病変度が増大するのではないかとこの印象を得て  
おります。そこで病変度を定量的に評価できないかどうかについての  
検討も加えております。本研究は20症例の左右心筋の生検標  
本の電顕的評価を行うものであり、多くの努力と時間を要する事  
のであります。内外でこの様な研究報告は無いので研究遂行  
を目指して努力を続けております。成るべく早く研究成果の学会  
ないし英文論文発表が出来ることを望んでおります。

### Ⅳ. 助成金の使途内訳


助成金額 600,000 円

交通費 100,000 円 宿泊費 60,000 円 食費 250,000 円

雑費 60,000 円 他 130,000 円  
(研究費)

月	研 究 実 施 内 容
3 月	<p>高血圧性心臓病症例の重症度3段階における左右心室の生検心筋細胞の超微形態所見の定量的解析。高血圧症における重症度を3病期にわけ、各病期に該当する症例について左右心室の同時心内膜心筋生検を行い得た20症例の標本の電子顕微鏡（電顕）的観察、分析を1997年1月から開始している。まだその結果については未知であるが、左右心室筋共に高血圧症の重症度が増加すると共に超微形態の病変度が増大するのではないかとの印象を得ている。そこで病変度を定量的に評価出来ないかどうかについての検討も加えている。本研究は20症例の左右心筋の生検標本の電顕的評価を行うものであり、多くの努力と時間を要するものであるが、内外でこの様な研究報告はないので、研究遂行を目指して努力を続けている。成るべく早く研究成果の学会ないし、英文論文発表が出来ることを望んでいる。当面、1997年11月28、29日に大阪で開催予定の心筋生検研究会において、第一報を報告予定である。なお、本研究の遂行には6ヶ月では無理なので、他の奨学金による援助を加えることとし、信州医学研究振興財団より6ヶ月間の研究滞在資金を得て、1997年末迄に完成予定と計画している。</p>

〒390 松本市旭3丁目1の1  
信州大学医学部第一内科

関口守徳 



日本財団補助金による

1996年度日中医学協力事業助成報告書

— 中国人研究者・医療技術者招聘助成 —

財団法人 日中医学協会

理事長 中 島 章 殿

1997年 2月 20日



I. 招へい責任者 戸田 善久

所属機関 日本大学歯学部解剖学教室第II講座

職名 教授

所在地 101 千代田区神田駿河台1-8-13

電話 03-3219-8111

招へい研究者氏名 王 培榮

所属機関 日本大学歯学部解剖学教室第II講座

職名 歯学部助手

II. 日本滞在日程

I arrived in Japan in 3 July, 1996 and entered immediately the Department of Anatomy, Nihon University School of Dentistry. Under the leadership of Prof. Y. Toda, I have engaged in the study of extracellular matrix (ECM) of heart in the early embryonic development. I have learned and mastered some basic technique of laboratory and theoretical knowledge since I came here, and have completed a subject of study and written a thesis "Histochemical investigation on the distribution of sulfated glycosaminoglycans and proteoglycans in the early embryonic hearts". At the present, I have designed a plan of investigation and continue to investigate the components of ECM on kidney within remain time. The glomerular basement membrane (GBM) and mesangium contain abundant ECM. Under certain pathological conditions, the accumulation of excessive ECM may cause glomerulosclerosis and interstitial fibrosis resulting in end-stage kidney disease. Next study is to investigate the production and distribution of ECM in normal and experimental glomerunephritis. First, experimental models of glomerulonephritis will be made and experimental method will be sought in tow months. Second, the process of ECM components (such as collagen I, III, IV, HSPGs, Fibronectin, Lamin) deposition in the diseased kidney in vivo will be studied by using the methods of molecular biology, which demands at least 4 months.

### Ⅲ. 研究報告

Glycosaminoglycans (GAGs) and proteoglycans (PGs) are important components of extracellular matrix (ECM) and have an important effect on heart morphogenesis. Particularly in the regions of the atrioventricular (AV) canal and the outflow tract (OT), in which the endothelial cells undergo a normal transition to form cushion tissue. Abnormal development of cushion tissue can be correlated with the majority of congenital heart defects. Although some studies on the nature and distribution of GAGs and PGs within ECM in the early embryonic heart have been reported. However, previous studies have been mainly focused on some stages of heart's development. A systematic observation of distribution and alterations of GAGs and PGs within ECM in the chick heart of a series stages during the early embryo has not been done. Thus, the study was performed.

Chick embryos at 12-26 stages were analyzed histochemically by alcian blue staining at PH 1.0 to determine presence and distribution of sulfated GAGs and PGs during early cardiac development. The results showed that there were some differences in the distribution pattern and the intensity of the alcian blue positive stained material in these embryonic chick hearts. Alcian blue stained material in the regions of atrioventricular (AV) canal and outflow tract (OT) was well-distributed in these specimens of embryonic hearts from stage 12 to 26, but the intensity of the staining in embryos older than stages 13 was markedly stronger. In the region of the ventricle it still remained markedly positive at stage 12-14, and gradually lessened at the latter stage 15-18 and lost in the later stages. No staining was observed in the regions of the atrium. The result indicated that extracellular matrix (ECM) in the region of AV and OT is rich in GAGs/PGs in the early embryo, this may be correlated with the migration of cushion tissue mesenchyme, whereas in the region of ventricle the GAGs/PGs in the ECM became less and less, this may be correlated with the endothelium remains unactivated.

### Ⅳ. 助成金の使途内訳

助成金額 1,000,000 円

交通費 100,000 円 宿泊費 500,000 円 食費 350,000 円

雑費 50,000 円 他 0 円

日本財団補助金による


1996年度日中医学協力事業助成報告書

— 中国人研究者・医療技術者招聘助成 —

財団法人 日中医学協会

理事長 中 島 章 殿

1997 年 3 月 14 日

I. 招へい責任者 二階 宏昌  ④  
所属機関 広島大学歯学部 職名 教授  
所在地 広島市南区霞1-2-3 電話 082-257-5631  
招へい研究者氏名 盧 勇  
所属機関 華西医科大学口腔医学院  
職 名 助教授（口腔病理教研室主任）

II. 日本滞在日程

1996年9月13日 広島空港に到着、同日より広島市に居住

広島大学歯学部外国人客員研究員として口

腔病理学教室において研究と研修に従事

1997年1月19日-22日 新潟大学歯学部口腔病理学教室を

訪問、共同研究の打ち合わせ

1997年2月4日 広島空港より帰国

### Ⅲ. 研究報告

主として下記の共同研究を進めるとともに、教室の病理診断検討会ならびに研究セミナーに定期的に参加しながら、口腔病変に関する組織診断基準や免疫組織化学を中心とした実験研究手技の習得に努め、所期の目標を達成することができた。

#### 「歯原性腫瘍に関する共同研究」

本研究は廬勇助教授の広島滞在を契機に開始されたが、同人は近々トロント大学（カナダ）にも留学を予定しており、3国3機関の共同研究として今後長期にわたり遂行することが合意に達している。

#### (1) 歯原性腫瘍の疫学的研究

華西医科大学の759症例をWHO国際分類に従って分類し、北米等におけるデータとの文献的比較のもとに、中国人における同腫瘍の発現頻度を統計学的に検討した。その結果、白人に比してエナメル上皮腫や悪性型の頻度が有意に高く、歯牙腫が少ないなどの特徴を明らかにできた（論文作成中）。なお日本人の歯原性腫瘍については現在疫学的調査を行っている。

#### (2) 歯原性腫瘍の免疫組織化学的ならびに分子病理学的研究

i) 石灰化歯原性嚢胞における腫瘍細胞のPCNA発現に基づき本腫瘍型の多様性を検討した結果、細胞増殖活性の面からみたその亜型分類の妥当性ならびにPCNA指数の悪性型識別への有用性を証明できた（第86回日本病理学会総会に発表、論文投稿中）。

ii) エナメル上皮線維肉腫の肉腫成分を解析した結果、その線維芽細胞への分化と高い増殖活性（エナメル上皮線維腫の間葉成分と比較）を確認できた（論文作成中）。

iii) 各種歯原性悪性腫瘍を対象に癌抑制遺伝子(p53)の異常発現を検討した結果、免疫組織化学的にはp53タンパクの過剰発現が、PCR-SSCP法ではその遺伝子レベルでの変異が証明され、同遺伝子が歯原性腫瘍においても悪性化に関与していることが示唆された。

### Ⅳ. 助成金の使途内訳

助成金額 600,000 円

交通費 80,000 円 宿泊費 120,000 円 食費 280,000 円

雑費 120,000 円 他 \_\_\_\_\_ 円

抄録用紙

(本用紙以外の用紙を使用しないで下さい)

コード No. 002965

コード No. をご記入下さい。  
(受領証ハガキに印刷してあります)

「演題名はここからプリントして下さい。」

増殖活性からみた石灰化歯原性嚢胞の多様性

盧 勇\*, 高田 隆, 小川郁子, 宮内睦美, 工藤保誠, 伊東博司, 二階宏昌 (広島大・口腔病理, \*華西医大・口腔病理)

石灰化歯原性嚢胞(COC)は多様な組織像を示し、その本態や亜型分類などに問題が残されている。本研究ではCOCにおけるPCNAの発現指数(PCNA-LI)を免疫組織学的に検索し、細胞増殖能の面からCOCの多様性と亜型分類について検討した。対象としたCOC25例中21例が良性型、4例が悪性型であった。前者をさらにHongら(1991)の分類に準じて解析した結果、いずれも嚢胞型に属し、非増殖型(NPT)4例、増殖型(PT)8例、歯牙腫随伴型(OAT)9例に亜分類された。PCNA-LIは悪性COCの65.2に対し良性型では13.4で明らかな有意差がみられた。良性型ではNPT(6.8)とPT(17.2)の間に有意差があったが、OAT(8.8)と他の2亜型の間にはなかった。OATのPCNA-LIは広範囲にわたっていたが、嚢胞部上皮に肥厚を伴うものではPTにおける値と近く、肥厚のないものとの間に有意差を示した。また、12例のCOC(NPT1, PT7, OAT4)で、上皮にエナメル上皮腫様の所見が観察され、このような変化のない症例より有意に高いPCNA-LIを示した。以上の結果より、①PCNA-LIは悪性型を鑑別する指標として有用である。②NPTとPTを亜型分類することは細胞増殖活性の面からも有意義である。③エナメル上皮腫様組織像と増殖活性の間に高い相関が示されたことから、これを亜型分類基準に加味する必要がある。④歯牙腫の有無と増殖活性とは直接関係がなく、OATは細胞増殖能の面からは亜型としての意義に乏しいことなどが示唆された。

別紙へ作成上の注意に従って作成して下さい。

記入後、A4判コピーを3部添付して下さい。

ワクからはみださないように、横幅いっぱいプリントして下さい。

分類群	A群	B群	C群
	10	⑤	1

演題分類表の中から希望発表  
てはまる項目番号をご形式の番  
記入下さい。さらにそ号をご記  
入下さい。  
中でも発表の主題と  
なる項目に必ず〇をし  
て下さい。

キーワード	石灰化歯原性嚢胞
	PCNA
	歯原性腫瘍

日本財団補助金による


1996年度日中医学協力事業助成報告書

- 中国人研究者・医療技術者招聘助成 -

財団法人 日中医学協会

理事長 中 島 章 殿

97年3月21日

I. 招へい責任者 奥山 徹 

所属機関 明治薬科大学 職名 教授

所在地 〒154 世田谷区野沢 1-35-23 電話 3424-0496

招へい研究者氏名 匡 海 学

所属機関 中国黑龍江中薬科大学

職 名 教授

II. 日本滞在日程

1996年11月4日 日本入国

11月5日 明治薬科大学で研究の打ち合わせ; 論文博士口頭説明会準備; 実験開始: a) 黒竜江産黄耆葉のトリテルペン配糖体の構造決定 (酵素, アルカリ加水分解, 各種スペクトル測定と解析), b) 黒竜江産タラノ木葉のトリテルペン配糖体の単離と構造決定。

12月5日 論文博士口頭説明会

1997年1月9日 論文博士口頭発表会; 博士論文作成

2月19日 東京デズニール見学

2月24日~27日 京都府立医科大学西野輔翼教授と共同研究の打ち合わせ; 兵庫県尼崎病院東洋医学研究所見学・共同研究打ち合わせ; 広島大学薬学部総合薬学研究所山崎和男教授の教室、鈴鹿女子短期大学田中治学長、尾道市丸善製薬会社へ見学; 九州大学薬学部正山経済教授の生薬学教室へ訪問・見学。

3月4日 薬学博士学位合格; 3月17日 博士学位記授与式;

3月26~28日 第17回薬学年会出席、論文2篇発表

3月30日 帰国

### III. 研究報告

日中医学協会からご助成をいただき、客員研究員の身分として明薬生薬学教室に5ヶ月間滞在し、次のように共同研究をした。

#### 1. タラノギ葉の配糖体に関する研究

抗腫瘍活性を有するサポニン画分から単離した6種のサポニンについて、各種のスペクトルおよび化学反応の結果により、これらの構造を決定あるいは同定した。この中に4種の新規サポニンであることが明らかになった。

この画分について、さらにHPLCにより3種のサポニンと1種のフラボノイド配糖体を単離した。これらの構造は今検討中である。

#### 2. 黄耆葉の配糖体に関する研究

膜黄耆(キバノ黄耆)の葉から単離した7種のサポニンについて、酵素加水分解、アルカリ加水分解および各種のスペクトルにより、これらの構造を決定した。この7種のサポニンはすべて新規化合物で、特に Huangqiyanin E~J と命名したサポニンは天然物に稀なB環に7員環を有するサポゲニンを持つ配糖体であることを明らかにした。

3. Chem. Pharm. Bull. に掲載した研究論文2篇; Natural Medicines に掲載決定した研究論文は1篇; また、日本第117回薬学会に発表した研究論文は2篇である。

4. 明治薬科大学から、薬学博士号を取得した。

5. 京都府立医科大学、鈴鹿女子短期大学、広島大学、九州大学、兵庫県尾崎病院、尾道市丸善製薬株式会社などを見学し、今後の共同研究の打ち合わせを行った。

### IV. 助成金の使途内訳

助成金額 800,000 円

交通費 150,000 円 宿泊費 50,000 円 食費 300,000 円

雑費 100,000 円 他 200,000 円

# 1996年度日中医学協力事業助成報告書

—日本人研究者派遣助成—

1996年 5月 15日

財団法人 日中医学協会  
理事長 中 島 章 殿



I. 訪中研究者氏名 若松秀俊  
所属機関名 東京医科歯科大学医学部 職名 教授  
所在地 〒113 東京都文京区湯島1-5-45 電話 03-5803-5366  
招へい受け入れ機関名 上海交通大学;天津大学;首都医科大学;北京航空航天大学;華中理工大学  
所在地 上海 天津 北京 北京 武漢  
招へい責任者 蔣線武(副学長);王明時(主任教授);徐群淵(学長);沈士团(学長);楊叔子(学長)

## II. 中国滞在日程

3月8日 東京発—上海着  
3月8日～3月13日 上海交通大学  
眼球運動および画像処理と認識に関する研究打ち合わせ。  
関連研究およびその他の成果の講演  
上海医療器械会社との人工呼吸装置の共同開発に関する協議  
3月14日～3月17日 天津大学  
人工呼吸管理システムの麻酔への応用に関する研究打ち合わせ  
検定および検査の自動化技術と応用に関する研究  
関連研究およびその他の成果の講演  
中国航天工業総公司三院八三五八研究所との共同開発の可能性を協議  
3月18日～3月28日 首都医科大学 北京航空航天大学  
痴呆老人の保護・介護に関する研究打ち合わせ(首都医科大学)  
関連研究およびその他の成果の講演  
生体システムの制御に関する研究打ち合わせ(北京航空航天大学)  
関連研究およびその他の成果の講演  
3月28日～4月6日 華中理工大学  
グレイシステム理論の医学への応用に関する研究打ち合わせ  
4月8日上海発—東京着

## III. 助成金の使途内訳

助成金額 300,000 円  
交通費 140,000 円 宿泊費 40,000 円 食費 90,000 円  
雑費 20,000 円 他 10,000 円



#### IV. 学術交流報告

今般の中国の訪問は医用理工学専門分野における日中大学間の共同研究と意見交換を広範囲に行うことを目的としたものであった。具体的には医用生体計測制御と医用機器の開発と実用化について大学および現地企業との協力の可能性を相互に見いだすことであった。訪問者は本研究者と張曉林博士で、大学では以下に示す研究成果の講演とこれに関する国際共同研究プロジェクトの遂行計画を立案した。また、国営企業との医用機器開発の可能性に関する協議を行った。

[1] 人工呼吸管理システムの開発と実用化：首都医科大；北京航空航天大学；天津大；華中理工大

[2] 痴呆性徘徊老人の電子保護システムの開発：首都医科大；天津大；上海交通大；華中理工大

[3] 反射性眼球運動の可能なロボットの開発：上海交通大；北京航空航天大学；天津大

[4] 薬品などの生物検定自動化システムの開発：首都医科大；天津大

[5] 個人自動識別可能な尿成分の自動検査システムの開発：首都医科大；天津大

[6] バーチャルパレシオンに関する研究と教育への応用：上海交通大；天津大；北京航空航天大学；華中理工大

日程の順に説明する。まず、上海交通大学の施鵬飛教授(電子情報学部副学部長, 画像処理研究所所長)とは脳のMRI画像から精密な三次元画像を構築し、抵抗感を伴う手術シュミレータの共同研究の立案と具体的な人材の選定を行った。なお、国営上海医療器械会社との人工呼吸装置の共同開発の可能性を探った。天津大学の王明時教授(精密機械工学部生物医学科科長)とは人工呼吸管理システムによる麻酔深度の客観的自動制御に関する共同研究計画を立案した。なお、天津の中国航天工業総公司三院八三五八研究所との人工呼吸装置の共同開発の可能性を協議した。北京航空航天大学ではロボットに関する研究協力について王田苗教授(ロボット研究所所長)と協議した。首都医科大学では生物検定自動化システムの開発に関して姜遠海教授(生物医学工学部部長)との共同研究および東京医科歯科大学の医学部との正式交流の予備交渉を学長らと行った。武漢の華中理工大学では従来から行っていたグレイシステム理論に関する研究を推進するとともに、医用分野への応用の可能性を協議した。

#### V. 感想及び意見、希望等


今般の中国訪問は具体的には1年前から計画し、国際会議で知り合った科学者や中国の知人を仲介として招待されたものと10年来の研究協力者からの招待によるものであった。過去の中国訪問では十分に現地の科学者や民間人との交流が諸事情のため困難であったが、社会情勢もすっかり変わり人々の表情も明るく活気を至るところで感じる事ができた。大学も設備が整いつつあり、学生も勉学に熱心で、研究のレベルも以前に比べ年々向上している。とくに中国人研究者の張曉林博士が行動共にしたので、言語の壁を越えることができ、相互に交流と理解を深める事ができた。

日本財団補助金による  
1996年度日中医学協力事業報告書

-日本人研究者派遣-

96年 8月 19日

財団法人 日中医学協会殿

I. 訪中代表者氏名 岡本暉公彦 

所属機関名 花王株式会社 知財・法務部門 職名 理事、統括

所在地 〒131 東京都墨田区文花 2-1-3 電話 03-5680-9243

訪中研究者氏名 川合修次

所属機関名 花王株式会社 生物科学研究所 職名 主席研究員

所在地 〒328-34 栃木県芳賀郡市貝町赤羽 2606 電話 0285-68-7400

招へい受け入れ機関名 中華予防医学会

所在地 北京市東城区新中街19号

招へい責任者 秘書長 黄永昌

II. 中国滞在日程

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---



## II. 中国滞在日程

- 7月29日 広州市より中国に入国し、珠海市に移動  
16:00 中国衛生部衛生監督司高國強処長との懇談
- 30日 9:00-11:30 中華予防医学会 公衆衛生管理セミナー  
岡本暉公彦による講演  
13:00-14:30 中国衛生部化粧品安全性評価班長 秦鈺慧教授との懇談  
(珠海市衛生局長林鴻烈氏同席)  
14:30-17:00 川合修次による講演
- 31日 珠海市から肇慶市へ移動  
14:00 肇慶市日用品マーケット視察  
15:00 肇慶市漢高化粧品有限会社工場を視察  
周四新工場長、劉博士と中国での化粧品生産について意見交換
- 8月 1日 11:00 広東省徳慶県 日用品個人商店を視察  
15:00 広東省徳慶県衛生局長 徐炎光氏との懇談
- 2日 10:00 肇慶市衛生防疫站 程世祥站長と懇談後、広州市に移動
- 3日 午前 中華予防医学会と懇談  
午後 広州市より日本へ帰国

## III. 学術交流報告

中国の化粧品生産は1989年10億元であったものが、1995年には195億元とここ数年急速に増加している。これは金額のみならず、製造される化粧品の種類についても同様である。また、これに伴い、製造メーカー数も100社程度であったものが3000社へと急増しており、その発展ぶりが伺われる。1990年には化粧品管理に関する法規なども整備し、その管理を進めている。しかし、小メーカーが多く衛生管理がまだまだ不十分であり、出荷製品の5%、市場製品の10%近くが不合格となっており、今後の大きな課題となっている。

これらのことを背景にして、中国での今後の本分野に於ける衛生管理の参考として頂く為に、公衆衛生管理セミナーでは、日本側から「化粧品の衛生・安全管理」について講演を行った。

まず、岡本が日本に於いては約50年前から問題視されたため、種々改善されて来た結果、約15年前にほぼ完成されたとされる化粧品の安全性管理システムについて、以下の詳細な内容で講演を行った。

- ・最近30年間の化粧品の障害例(主な禁止、制限物質)
- ・最近の安全性に係わる規制 —— 化粧品品質基準、化粧品原料基準、表示成分と追加市販後調査制度、種別許可制度、配合基準制度、配合制限
- ・安全性評価の考え方 —— 毒物評価の基本的な考え方、薬事法対応の安全性項目
- ・国際的な科学物質の安全性の動き —— レスポンズブルケアー活動、既存科学物質と新規科学物質登録、動物実験と代替法とヒトへの外挿

続いて、川合が化粧品の微生物汚染防止の観点から、以下の内容について話した。

- ・化粧品と微生物 —— 微生物に関する基本的事項、製品の微生物汚染

- ・微生物制御のための管理要素
- ・化粧品用防腐剤と防腐処方、及び微生物抵抗性試験
- ・製造設備に関連する事項 —— タンク類、配管類、充填機、製造環境について
- ・製造管理に関連する事項 —— 原材料の管理、洗浄及び滅菌方法
- ・製品出荷時の菌検査
- ・まとめ —— 微生物汚染への対応など

約80名の参加者に熱心に聴講して頂いた。前半及び後半の講演共に、活発な質問が多く、本分野に対する関心の高さが伺われた。

#### IV. 感想及び意見、希望等

急激な経済発展に見合った形で、化粧品の分野に於いても衛生・安全管理のための各種の法規や、それを遵守させるためのシステム作りを行っている中国の実情を伺い知る貴重な機会を得た。

公衆衛生管理セミナーでは、実際に多くの中小メーカーを指導する立場にある衛生防疫担当者のお役に立つように、なるべく分かり易く、具体例を交えながら講演を行ったつもりであるが如何だったのだろうか。準備時間等の都合の為か、講演要旨が部分訳（中国語）となっており、図表等も添付されていなかったため、理解し難かったのではないかとと思われる。通訳を介しての講演であり、OHPまでは中国語訳できないので、せめて要旨くらいは全訳された方が良かったのではないかと考えられた。質疑応答の中で、化粧品の衛生・安全管理に於いて日本とは留意している点があり、異なっている面もある様に感じられたが、このような点については、私共の講演の趣旨を理解されて、応用して頂ければと願っている。

また、肇慶市では実際に化粧品工場を視察し、工場長や研究担当部長のお話を伺い、製造現場の状況を見聞させて頂いた。

更に、中国衛生部、中華予防医学会の先生方を始めとして、訪問地の衛生局の方々と色々と交流できたことも有意義であった。今後共、何らかの形で御協力できればと考えている。

# 中日化妆品卫生管理培训班

## 代表名单

(1996年7月30日--8月1日 珠海)

姓名	性别	职务	工作单位	电话	邮编	房间
许桂华	女	副司长	卫生部卫生监督司			
张家喜	男	副秘书长	中华预防医学会	64154422-310		
林鸿烈	男	局长	珠海市卫生局			
林贤泰	男	副局长	珠海市卫生局			
高国强	男	处长	卫生部卫生监督司	64015606	100725	601
陈锐	男	副处长	卫生部卫生监督司	64023352	100725	601
宗音	女	副处长	卫生部办公厅秘书处	64033121	100725	605
张秀云	女	助理调研员	卫生部卫生监督司	64013352	100725	604
滕立新	女	干部	卫生部卫生监督司	64013352	100725	604
岡本暉公彦	男	醫學博士	日本花王株式會社	(03)5630-9243		
川合修次	男	工學博士	日本花王株式會社	(0285)68-7400		
川口雄二郎	男		日中醫學協會	(03)3291-9161		
秦钰慧	女	研究员	中国预防医学科学院环监所	67719390	100021	716
李双黎	女	助研	中国预防医学科学院环研所	67719390	100021	716
辛美哲	女	干部	中华预防医学会	64155638	100027	627
郭新彪	男	副教授	北京医科大学	62091173	100083	
杨明金	男	副主任医师	福建省卫生防疫站	7512340	350001	606
盛金妹	女	主任医师	北京市卫生防疫站	64212461	100013	627
朱春林	男	副站长	吉林省卫生防疫站	5919429	130021	607
李凯	女	科主任	吉林省卫生防疫站	5919490	130021	602
金志玉	女	科主任	云南省卫生防疫站	4144220	650022	602
刘吉昌	男	科主任	广西省卫生防疫站	5320553	530021	614
李伟	男	主管医师	天津市卫生防病中心	4321545	300011	614
邵晓君	女	主管医师	天津市卫生局			613
万丽葵	女	主管医师	黑龙江省卫生防疫站	5664031	150036	603
袁韧	女	主任医师	黑龙江省卫生防疫站	5664031	150036	603
刘霞	女		安徽省卫生厅	2642427	230001	625
孙玉东	男		安徽省卫生防疫站	3633364	230061	616
孔凡玲	女		山东省卫生防疫站	2962128-214	250014	625
葛卫东	男		辽宁省卫生厅	3391170	110005	611
闫中集	男		辽宁省卫生防疫站	3382933		611
裴凤霞	女	科主任	辽宁省卫生防疫站	3390066		619
吴红辉	男		江苏省卫生厅	7712526	210008	525
诸元生	男		江苏省卫生防疫站	3723362	210009	525
温伟群	男	科长	广东省卫生防疫站	84452247	510300	514
钟汉光	男	主管医师	广东省卫生防疫站	84452247	510300	515
黄善盛	男	副科长	广东省江门市卫生防疫站	3325385	529051	512
李锦慧	男	副科长	汕头市卫生防疫站	8279110	515000	514
于伟民	男		广东省卫生防疫站	84452247	510300	515


姓名	性别	职务	工作单位	电话	邮编	房间
汪祖陆	男	副主任医师	湖北省卫生防疫站	7806695	430070	616
方有宗	男	副主任	上海市卫生局	64713627		721
王惠芳	女	主管医师	上海市卫生防疫站	62758710	200335	513
吕华东	男	室主任	福建省卫生防疫站	3707042	350001	606
茹世联	男	主任科员	甘肃省卫生厅	8828710	730030	
弋守章	男	所长	四川省卫生防疫站	6635107	610031	628
卢蕊枝	女		山西省卫生厅	3079464	030013	605
粟文元	男	副站长	山西省卫生防疫站	4043303	030012	626
曹朝晖	男	主管医师	湖南省卫生防疫站	4441770	410005	721
黄显志	男	助理调研员	海南省卫生厅	5343668	570203	720
骆侃俊	男	主任科员	浙江省卫生厅	7077551	310002	511
韩关根	男	副主任医师	浙江省卫生防疫站	7046224	310001	511
宋静萍	女	主任科员	陕西省卫生厅	7224483	710003	508
张博	男	医师	河北省卫生防疫站	5064911	071000	526
邢荣琦	男	副主任医师	河北省卫生防疫站	5064911	071000	526
祝刚	男	主管医师	河南省卫生防疫站	5951908-226	450003	404
付家华	女	副科长	贵州省环境卫生监测站	6822327	550001	608
卢玉英	女	副科长	贵州省环境卫生监测站	6822327	550001	608
刘松青	男	站长	珠海市卫生防疫站	2265671	519000	213
黄渝扬	男	副站长	珠海市卫生防疫站	2265675	519000	213
黄彪	男	主任	珠海市卫生防疫站	2264432	519000	213
陈金娟	女	副主任	珠海市卫生防疫站	2264432	519000	214
陈永铿	男	副主任	珠海市卫生防疫站	2264744		213
孔庆娟	女	部长	大连三株生态化妆品公司	4671665	116023	214
孙波	女		辽宁桑莫化妆品公司	4842926		619
罗玲	女		珠海姗拉娜化妆品公司	8878687		
庄志勇	男		顺德市现代保健用品厂	2222765	528300	620
孟汴波	女		顺德丝厂	8887243	528305	623
陈慧良	女	主任	上海家化大连有限公司	6652858	60021	623
赵五二	男	总经理	广东台山高富日用化工有限公司	5538868	529200	516
黄伟成	男	总经理	台山金辉美发美容用品有限公司	5525899	529200	516
伍文	男	主管	广州雅芳有限公司	81896541	510370	
高瑞欣	女	经理	广州保洁有限公司	82218828-转	510730	
李炼	男	项目经理	广州保洁有限公司	82218828-转	510730	
周利明	男	科长	苏州亚美日用化工厂	6281363	215107	626
陆建华	男	干部	珠海市东洋之花化妆品有限公司	8885963	519020	
陆祥生	男	项目经理	上海郑明明化妆品有限公司	59763869	201702	507
潘与国	男	副总工程师	上海凤凰日化公司	62410500	200062	507
姜筱燕	女	品质部主管	上海花王有限公司	64091210	201111	506
陈雅芳	女	法规部经理	上海家化有限公司	65456400	200082	506
焦晨星	女	品质部经理	上海旁氏有限公司	62414480	200062	505
张爱华	女		上海日化(集团)有限公司	62769615	200040	505

# 年度日中医学協力事業助成報告書

—在留中国人研究者研究助成—

平成8年 9月 30日

財団法人 日中医学協会  
理事長 中 島 章 殿

I. 研修医・研究者氏名 劉 永茂   
研究機関名 国立精神・神経センター 研究指導者名 高坂新一 職名 部長  
所在地 東京都小平市小川東町4-1-1 電話 0423-41-2711 内線 5232

## II. 研 修 歴

平成7年5月9日、国立精神・神経センター、神経研究所、代謝研究部の客員研究員として従事した。

## III. 研修の研究業績

ミクログリアの生理的役割を探る研究の一環としてミクログリア分泌性プラスミノゲンのアストロサイト  
に対する役割を検討した。

## IV. 研 究 業 績

(1) 学会、研究会等における口頭発表 (学会名・内容)

平成8年4月4日 第73回日本生理学会：ラット脳ミクログリアのプラスミノゲン産生調節因子に  
ついて

(2) 学会誌等に発表した論文 無 ・ 有 (雑誌名・論文名)

Microglia-derived plasminogen is a regulator in plasminogen activator-plasminogen activator inhibitor system of  
astrocytes : J. Neurochem. に投稿準備中

## V. 今後の研究計画及び希望

平成8年9月28日帰国予定



## VI. 研 究 報 告 (日本語、又は英語で書いて下さい。2,000字程度で記載下さい。)

中枢神経系のグリア細胞のひとつであるミクログリアは他のグリア細胞では産生しない特徴的な因子を産生する。そのひとつに当研究室で同定されたプラスミノーゲンがある。まずミクログリア-ニューロン間の相互作用の観点から、この物質のニューロンに対する影響を検討した結果、皮質ニューロンや中脳ニューロンに対し神経栄養因子作用を示すことが明らかになった。一方この物質はニューロンのみならずアストロサイトの機能にも影響を与えられと考えられたが、これまでその作用に関する知見はなかった。そこでプラスミノーゲンを介したミクログリア-アストロサイトの相互作用を想定し、培養アストロサイトを使用してプラスミノーゲンの作用を検討した。特にアストロサイトの形態、移動性、増殖性に重要な働きのあるプラスミノーゲンアクチベーター(PA)系に対する影響に焦点を絞った。

培養アストロサイトにプラスミノーゲンを添加し、培養上清中のPA活性を分析すると、無刺激時に比べ、tPA及びuPA活性が著しく減少する現象を見出した。この原因のひとつにプラスミノーゲンがtPA、uPAの産生を抑制する可能性が推測された。実際、プラスミノーゲン刺激後、アストロサイト内のPA活性を調べると、tPA活性は検出されずuPA活性も減少していた。またプラスミノーゲン刺激によりPAの生体内インヒビターであるPAIが産生されることも推測された。プラスミノーゲン刺激後、培養上清中のPAIを分析したところ、活性なPAIが増産されてくることが明らかになった。抗体による反応性からそれはPAI-Iであった。PAI-Iの産生は刺激反応時間(～3日)またはプラスミノーゲンの濃度(～200nM)に依存して増加した。またプラスミノーゲン刺激時、分子量130kDa付近に新たなPA活性バンドが検出された。このバンドはPAI-I抗体に認識されることからPA/PAI-I複合体と推測された。この複合体のPAは、インヒビターに対する感受性と分子量の関係からtPAと推測された。

上記のように、プラスミノーゲンはアストロサイトに対しPAI-Iの産生を増加させ、PA活性の低下をもたらす作用が明らかにされた。特徴的なことはtPA/PAI-Iが形成されることであった。プラスミノーゲンは中枢神経系の細胞の中ではミクログリアで産生されることを考えると、アストロサイト由来のPA-PAI系の活性がミクログリアとの相互作用により調節されることが示唆された。

## VII. 指 導 教 官 の 意 見

温厚な人柄で、注意事項もよく守り、研究室にもとけ込んで研究を進めることが出来た。研究ではプラスミノーゲンのアストロサイトに対する作用について先駆的な仕事をまとめることが出来た。この経験を今後の研究に役立てて欲しい。少し残念なことは日本語が不自由であったことである。

日本財団補助金による

1996年度日中医学協力事業助成報告書

－在留中国人研究者研究助成－

1997年 3月 13日

財団法人 日中医学協会

理事長 中島 章 殿

I. 研究者氏名 李為民

研究機関 東京都老人総合研究所 研究指導者 佐藤昭夫 職名 副所長

所在地 〒173 東京都板橋区栄町 35-2 電話 03-3964-3241 内線 3087

II. 過去の研究歴

1994年4月～現在: 東京都老人総合研究所、自律神経部門、研究生

III. 過去の研究実績

1. Li, W.M., Sato, A. and Suzuki, A. (1995) The inhibitory role of nitric oxide (NO) in the somatocardiac sympathetic C-reflex in anesthetized rats. Neuroscience Research, 22, 375-380.

2. Nagata, O., Li, W.M. and Sato, A. (1995) The effect of intravenous and intrathecal application of MK-801, an NMDA antagonist, on the somato-sympathetic A- and C reflexes in rats. Pain Research, 10, 77-80.

3. Nagata, O., Li, W.M. and Sato, A. (1995) Glutamate N-methyl-D-aspartate (NMDA) and non-NMDA receptor antagonists administered into the brain stem depress the renal sympathetic reflex discharges evoked by single shock of somatic afferents in anesthetized rats. Neuroscience Letters, 201, 111-114.

IV. 本年度の研究業績

(1) 学会、研究会等における口頭発表 (学会名・内容)

なし

(2) 学会誌等に発表した論文 無 ・  (雑誌名・論文名)

Li, W.M., Sato, A., Suzuki, A. and Trzebski, A. (1996) Systemic hypoxia facilitates somato-cardiac sympathetic A- and C-reflexes in anesthetized rats. Neuroscience Letters, 216, 175-178.

V. 今後の研究計画及び希望

1997年度においては、圧受容器からの入力体が体性-心臓交感神経反射におよぼす影響とその神経経路を調べる研究を行う予定です。将来には日本で学んだ知識と技術を生かし、この分野での研究を続け、医学の発展に貢献したいと思います。また今後は、中国から日本にきている多くの後輩を指導したり、日本から中国へいく人を援助したりなど、日本と中国の相互理解と相互協力の架け橋になりたいと思います。

VI. 研 究 報 告 (日本語、又は英語で書いて下さい。 2,000字程度で記載して下さい。)

In the current year of the grant of Japanese-Chinese medical association, we studied effect of activation of chemoreceptors on somatosympathetic reflex under the guidance of Dr. Sato, vice-director of Tokyo Metropolitan Institute of Gerontology. Here is the report as follows:

An electrical stimulation of somato-afferent, tibial nerve for example can produce responsive electrical discharge in sympathetic efferent such as renal nerve, cardiac nerve, etc. and this discharge is termed as somatosympathetic reflex. There are two discharge components mainly, i.e. the A- and C-reflexes in somatosympathetic reflex resulting from eliciting myelinated A and unmyelinated C fibers in the somatic nerve respectively by electrical stimulation.

Our past studies demonstrated that some neurotransmitters such as nitro oxide (NO) and glutamate involved in modulation of the somatosympathetic reflex. It is very interesting to know whether other factors such as chemoreceptor and baroreceptor central input information could also modulate somatosympathetic reflex. With this purpose, we tested effects of activation of chemoreceptors on somatosympathetic cardiac reflex in anesthetized rats. For activating chemoreceptors, hypoxia was produced with its end-tidal oxygen 10% FETO<sub>2</sub> and 6% FETO<sub>2</sub> respectively. During 6% FETO<sub>2</sub> hypoxia, the amplitude of the somato-cardiac sympathetic A-reflex increased significantly to 138 + 13% of the control, and that of the C-reflex increased to 186 + 18% of the control. During 10% FETO<sub>2</sub> hypoxia, the A-reflex increased insignificantly to 117 + 8%; the amplitude of the C reflex was augmented significantly to 149 + 11% of the control. Peripheral carotid chemoreceptor denervation abolished the facilitatory effects of systemic hypoxia. It is concluded that carotid chemoreceptor stimulation enhances the responsiveness of somato-cardiac sympathetic excitatory reflexes originating in the hind limb receptors.

This result has been published in the journal of Neuroscience Letters (Vol. 216, 175-178, 1996).

VII. 指導教官の意見

李為民氏は当研究所自律神経部門において昨年から本日まで、日中医学協力事業の研究助成をうけその援助のもとに、麻酔ラットを用いて後肢の侵害性刺激で誘発される体性-交感神経反射を電気生理学的手法を用いて記録した。この反射が呼吸困難時に見られる化学受容器の興奮で増強する事実を見出し、その増強の神経性メカニズムの解明を行った。その結果は昨年末、神経科学の国際専門誌である Neuroscience Letters に発表された。この業績は国際的に高い評価を得るものである。この研究がきっかけとなり李氏は現在、血圧をモニターする生体内の圧受容器がこの体性-交感神経反射に及ぼす影響について研究を継続しつつあり、すでに圧受容器がこの反射を抑制するという興味深い結果が一部得られつつある。

この様な李氏の過去一年間の研究上の素晴らしい成果は貴財団の研究助成によるところが大きい。

日本財団補助金による

1996年度日中医学協力事業助成報告書

—在留中国人研究者研究助成—

9年 1月 29日

財団法人 日中医学協会

理事長 中島 章 殿

I. 研究者氏名 蘇慶寧

研究機関 大阪大学 研究指導者 木山博資 職名 助教授

所在地 〒565 吹田市山田丘2-2 電話 06-879-3581 内線 \_\_\_\_\_

II. 過去の研究歴

1978年-1982年 中山大学生物系 大学生 1982年-1985年 武漢大学生物系 助手

1985年-1988年 武漢大学生物工程センター 大学院生

1988年-1994年 武漢大学生物工程センター 講師

III. 過去の研究実績

Su Q., et al. Cytoskeleton reconstruction in HE-p-2 Cell caused by ConA. J.Cell Biol.(China)78(1990)

Fans,L.,Su Q., Secretion of pearl matter by freshwater mussel and culture of its epidermal cells of the outer mantle.FEBL(1990)165

Su Q.,et al The pharmacology of chlorpromazine and its effect on cytoskeletons.Paper Compilation of the 5th Biomembrane

Symposium of Chinese Biochemistry and Cell Biology Association:148(1993)

IV. 本年度の研究業績

(1) 学会、研究会等における口頭発表 (学会名・内容)

なし

(2) 学会誌等に発表した論文 無 ・  (雑誌名・論文名)

Su Q.N., Namikawa K., Toki H., Kiyama H., Differential display reveals transcriptional up-regulation of the motor molecules for both anterograde and retrograde axonal transport during nerve regeneration

投稿中

V. 今後の研究計画及び希望

研究報告書中に記載

貴財団の助成をもう一度申請したい。

## VI. 研 究 報 告 (日本語、又は英語で書いて下さい。 2,000字程度で記載して下さい。)

神経再生機序の解明は、虚血や外傷に起因する神経細胞死から神経を守り、これをもとのように再生し機能修復をはかるためには不可欠である。我々は、損傷に強い末梢神経系の再生のメカニズムを分子レベルで解明することによって、損傷に脆弱である中枢神経系を損傷からまもり、再生へと導く手法の開発を目指している。このためには、最初にいかなる分子の発現が損傷後に見られそれらの機能相関がどのようになっているのかを明らかにしなければならない。そこで、神経損傷時に特異的に発現が促進する分子群をディファレンシャルディスプレイ法を用いることにより検索した。

ラット約100匹の片側舌下神経を切断し、切断側の舌下神経核と健常側の舌下神経核をそれぞれ延髄から顕微鏡下で切り出す。これらからRNAを精製し、ランダムプライマーをもちいてディファレンシャルディスプレイ法を行った。その結果神経損傷後に発現上昇するいくつかの候補遺伝子断片を得ることが出来た。これらの遺伝子を解析した結果、既知の遺伝子や未知の遺伝子が含まれていることが明らかになった。既知の遺伝子としては、神経軸索内の物質輸送に関係するキネシンやダイニンがあり、これらは神経軸索が再生するにあたって軸索材料の輸送や、末梢で取り込まれた成長因子の逆行性輸送に関与する分子群で、神経再生時にその発現が上昇することは極めて容易に想像できる。この結果は現在欧文雑誌に投稿中である。また、未知の分子のなかで興味深いものとしては、細胞膜を7回貫通するいわゆるG蛋白結合型受容体の構造を取るものが得られ、しかも興味深いことにこの分子のN端側にはロイシンジッパー様構造が存在することが明らかになった。この分子の遺伝子塩基配列は既知のいかなる分子ともホモロジーが見られず。新たな受容体分子であると考えられる。また、通常この分子は運動ニューロンには発現しておらず、軸索損傷が与えられたときにのみ運動ニューロンに発現することから、損傷後に何らかの情報を受け取るために発現が促進すると考えられる。また、N末端にロイシンジッパー様構造を有することから、この分子はポリマー構造を有する可能性が考えられる。現在本分子の機能を明らかにするために以下の研究を行っている。

(1) GFP (蛍光蛋白) 蛋白との融合蛋白を作成し、細胞内に導入することによって、実際に細胞膜上に存在することの確認

(2) 通常の神経系の細胞株に遺伝子導入することによって細胞の形態変化が見られるかどうかの検討。

(3) ファージディスプレイ法などを用いることによりリガンドを探索する。

以上の研究をさらに押し進めることにより今回得られた未知分子の神経軸索再生における機能的な意義が明らかになると考えられる。

## VII. 指導教官の意見

蘇慶寧君のここ1年間の研究は飛躍的に展開いたしました。特に神経再生に関連する新たな分子の探索では、きわめて興味深い遺伝子を見つけてまいりました。この分子の機能解析には、まだしばらくかかるとは思いますが、蘇君は毎日深夜に至るまで大変熱心に研究室で実験を続けております。蘇君が以前から持っている細胞培養の技術は、これから十分役立つと考えられますし、彼の研究の今後の発展が大変楽しみです。このように本年度彼の研究が進展いたしましたのも、貴財団からの御援助があったからであり、貴財団に心より感謝致します。蘇君はあと2年間大学院での研究期間を残しておりますので、今後とも機会がございましたらよろしくお願いいたします。

日本財団補助金による

1996年度日中医学協力事業助成報告書

- 在留中国人研究者研究助成 -

9年 3月 4日

財団法人 日中医学協会  
理事長 中島 章 殿

I. 研究者氏名 李 玲

研究機関 名古屋大学総合保健体育科学研究指導者 佐藤 友造 職名 教授 部長  
所在地 〒466 名古屋市千種区不老町 電話 052-789-3949 内線 3949

II. 過去の研究歴

1987年8月~1991年3月 中国医科大学第一附属医院内分泌科 助手、講師  
1991年4月~1992年3月 琉球大学医学部第二内科 笹川奨学金 研修生  
1993年10月~1995年3月 兵庫医科大学臨床病理学 研究員  
1995年4月~現在に至る 名古屋大学医学研究科 大学院生

III. 過去の研究実績

「急性運動負荷者の糖尿病患者血漿βTG Vバルンの影響」《中葉内分泌代謝雑誌》4:79 (1988)  
「STZ量頻回投与マウスにおける triptolide の膵島β細胞に及ぼす影響」《日本生理学雑誌》56:47 (1993)  
「Effect of triptolide on the development of insulinitis in low-dose streptozotocin induced diabetes in mice and on the Bete-cells of normal mice」《Chinese Journal of Diabetes》2(2):7 (1994)

IV. 本年度の研究業績

(1) 学会、研究会等における口頭発表 (学会名・内容)

第39回日本糖尿病学会年次学術集会で、「C-peptide の L-212 作用に及ぼす影響 (第5報) - randomly scrambled C-peptide との比較 -」という演題で口頭発表した。

(2) 学会誌等に発表した論文 無 ・ (有) (雑誌名・論文名)

① Acta Physiol Scand. Effect of C-peptide administration on whole body glucose utilization in STZ-induced diabetes rats. 1996. 157. 253-258  
② 名古屋大学総合保健体育科 19(1) 67~70 1996. 覚醒時と麻醉下における L-212 感受性の比較検討

V. 今後の研究計画及び希望

C-peptide に関する研究を77年に行き予定で、L-212 感受性が低下している糖尿病患者に C-peptide の投与により、L-212 感受性が健常よりも高まることメカニズムを解明したいのである。

## VI. 研 究 報 告 (日本語、又は英語で書いて下さい。 2,000字程度で記載して下さい。)

【目的】糖尿病とはインスリンが絶対的または相対的に不足状態による体内代謝異常である。日本の死因統計に第一位である心疾患と第三位の脳血管障害に関与している増悪要因の一つとして、糖尿病が挙げられる。生体には、インスリンと同モル濃度で同時に分泌されているCペプチドはこれまでインスリン依存性糖尿病患者の残存するインスリン分泌能の指標としてのみ利用され、内分泌代謝的・生物学的活性を有しないとみなされていた。しかしながら、最近、IDDM患者のインスリン治療の際、C-peptide (CP)を併用投与することで、短期的にはミクログルブリン尿の消失やhyperfiltrationの改善が、長期的にはHbA1cの低下がみとめられ、CPの臨床的有用性が注目されている。我々はすでに糖尿病ラットにヒトCPを投与し、血中濃度が生理的レベルの10倍以上に達した際に、インスリン抵抗性が改善された成績を報告した。今回は、生理的濃度のラットCPを糖尿病ラットに投与し、in vivoでのインスリン作用に及ぼす影響について、検討を加えた。【方法】対象はSTZ(60mg/kg)糖尿病(DM)ラット21匹および健常(HC)ラット7匹であり、インスリン注入率3.0(L)および30.0(H) mU/kg/minのsequential euglycemic clamp法を各90分、連続的に無麻酔下で実施した。ラットCP IとIIを各々DMラット7例に持続注入し(0.05nmol/kg/min)、他のラットは生食投与とした。clamp後半30分間のglucose metabolic clearance rate(MCR)を算出し、個体のインスリン作用(sensitivity and/or responsiveness)の指標とした。なお、ラットCP濃度はenzyme immuno-assay法にて測定した。【成績】1.血糖値(BS;mg/dl)、血漿インスリン濃度(IRI;μU/ml):DM群において空腹時レベルは236±17であり、clamp中のBSはCP投与の有無にかかわらず、DM群は140前後に維持され、一方、HC群は空腹時レベルに保たれた(67±4)。LおよびH-clamp中のIRIは各々40、400前後に達した。2.血清CP濃度(ng/ml):DM群の空腹時レベルは0.6±0.1であり、HC群の1.7±0.2に比して、有意に低値であった(p<0.05)。DM群にCP IあるいはIIを持続投与した結果、1.3±0.3とHC群のレベルに至った。3. MCR(ml/kg/min):L-clamp法より得られたDM群のMCRは7.6±0.9であり、HC群の16.3±2に比して有意に低値であった(p<0.05)。CP IあるいはIIの投与により、各々16.9±3.3、15.0±1.7に有意に増大し(p<0.05)、HC群のレベルまでに至った。H-clamp法では、DMラットのMCR(34.2±3.6)は、HC群(62.0±1.5)に比して有意に低値であった(p<0.01)。CP IあるいはIIの投与により、DM群のMCRは各々44.9±4.2、38.3±4.0と有意に増大したが(p<0.05)、HC群のレベルまでには至らなかった。【結語】CPはこれまで内分泌代謝学的に不活性の物質とみなされていた。しかしながら、今回の検討成績によれば、生理的レベルまでに達したCPはIDDMにみられる減弱したインスリン作用を増大させる可能性を有する。

## VII. 指導教官の意見

李玲君は中国では、臨床的な研究を行っていた。現在は、名古屋大学大学院医学研究科大学院生として、「C-peptideのインスリン作用に及ぼす影響に関する検討」というテーマを中心に研究活動を行っている。このテーマはスウェーデンのカロリンスカ研究所との共同研究であり、私共の分野でのトピックスの一つであり、一日も早い李玲君の研究の成就を希望している。李君は勉学意欲は極めて強く、好奇心が旺盛で、医学研究を行う基礎的な能力は十分に有していることを確認している。同君は実験担当者として、重要な役割を果たし、これまでに、生物学的に不活性な物質とみなされていたC-peptideが糖尿病にみられる減弱したインスリン作用を増大させる可能性を有することを明らかにした。李君はすでに3回トップネームで、日本糖尿病学会で研究成果を発表している。また、研究内容の一部は共著ですでに発表されている(Acta Physiol Scand 1996, 157, 253-258)。さらに、トップネームで外国雑誌に投稿論文作成中である。中国帰国後、関係方面の中国有数の研究指導者となりうる可能性が大きいことを確信している。

日本財団補助金による

1996年度日中医学協力事業助成報告書

- 在留中国人研究者研究助成 -

1997年1月30日

財団法人 日中医学協会  
理事長 中島 章 殿

I. 研究者氏名 庾海燕  
研究機関 東大医科学研究所細胞生物化学 研究指導者 竹縄忠臣 教授 職名 教授  
所在地 〒108 東京都港区白金台 4-6-1 電話 5449-5508 内線

II. 過去の研究歴  
1988.8 ~ 1992.1 中国深圳市宝安区人民医院 内科 医者  
1993.1 ~ 1994.3 日本東京大学医科学研究所 研究生  
1994.4 ~ 現在 日本東京大学医学部 博士課程在学中

III. 過去の研究実績  
1994. 第67回日本生化学会大会. <<New PIP<sub>2</sub> binding protein - Histone H1 and H3>>. 1995. 第68回日本生化学会大会 <<PIP<sub>2</sub> bound to histone H1 decreased when histone H1 was phosphorylated by PKC>>.

IV. 本年度の研究業績

(1) 学会、研究会等における口頭発表 (学会名・内容)

第69回日本生化学会大会. 第19回日本分子生物学会年会 合同年会

3-P-1078. <<Interaction of PIP<sub>2</sub> and histone H1 reversed the transcription repression by histone H1>>.

(2) 学会誌等に発表した論文 無 ・ 有 (雑誌名・論文名)

<<A New Phospholipase C  $\delta_4$  is induced at S-phase of the cell cycle and appears in the nucleus>> J. Biol. Chem. 271. 355-360.

<<Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate reverses the inhibition of RNA transcription caused by histone H1>>. J. Biol. Chem. 投稿中

V. 今後の研究計画及び希望

1. 系細胞骨格系における phospholipase C $\gamma_1$  の機能解析. 論文書中.

2. phospholipase C $\delta_1$  の機能解析. 実験中.



VI. 研 究 報 告 (日本語、又は英語で書いて下さい。 2,000字程度で記載して下さい。) (別紙)

VII. 指導教官の意見

原海彦氏から送られてきた細胞膜のイシ-リン脂質代謝に関する論文、核内の脂質代謝に関する論文は、非常に独創的な点です。また、種々の病態や細胞増殖に関わる点が示唆されるところ、解析の進められているホスホリパーゼCの作用については、興味深い点があると思います。また、原氏は動物学全般に渡っての知識を身につけ、大変勤怠が、種々の実験に積極的に取り組まれます。今後、大きな成果が出ると確信しています。



Yu. 97.1.23.

## **Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate reverses the inhibition of RNA transcription caused by histone H1**

Haiyan Yu\*, Kiyoko Fukami\*, Yutaka Watanabe\*\*, Choichiro Ozaki\*\*, and Tadaomi Takenawa\* †

\*Department of Biochemistry, Institute of Medical Science, University of Tokyo, Shirokanedai, Minato-ku, Tokyo 108, Japan, \*\*Faculty of Technology, University of Ehime, Matsuyama-shi, Ehime 790, Japan

Running title: PIP2-binding protein, histone H1

† Correspondence should be addressed to T. Takenawa  
(Tel:81-3-5449-5510, Fax:81-3-5449-5417)

The abbreviations used are: PIP3, phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate; PIP2, phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate; PIP, phosphatidylinositol 4-phosphate; PI, phosphatidylinositol; IP3, inositol 1,4,5-trisphosphate; PS, phosphatidylserine; PA, phosphatidic acid; PC, phosphatidylcholine; CL, cardiolipin; PG, phosphatidylglycerol; PLC, phospholipase C; PKC, protein kinase C; PKA, protein kinase A; PH domain, pleckstrin homology domain; ARF, ADP-ribosylation factor; EGTA, [ethylenebis(oxyethylenenitrilo)]tetraacetic acid; PMSF, phenylmethanesulphonyl fluoride; DIFP, diisopropyl fluorophosphate; Hepes, 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid; Mes, 4-morpholineethanesulfonic acid; TFA, trifluoroacetic acid

## Introduction

PIP2 is recognized as the source of the bioactive second messenger inositol trisphosphate(IP3) for intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  mobilization and diacylglycerol(DG) for PKC activation. In addition to its role as a signal-generating lipid, PIP2 has been shown to modulate the functions of various proteins such as PKC(1,2),  $\mu$ -calpain(3), ADP-ribosylation factor(ARF) 1(4), and phospholipase D(5). PIP2 also binds to actin-regulating proteins such as profilin(6), cofilin(7), gelsolin(8), gCap(9), and  $\alpha$ -actinin(10) and regulates the functions of these proteins. It has been reported that a decrease in the amount of PIP2 bound to  $\alpha$ -actinin and vinculin correlates with the depolymerization of actin *in vivo*(11). Recently, it has been also demonstrated that the interaction of PIP2 with PH domains(12) and the PTB domain(13) is important for anchoring proteins at the membrane surface. All these data suggest that PIP2 not only generates second messengers, but also modulates the function of PIP2-binding proteins.

Increasing evidence indicates that PIP2 is present in the nuclear membrane and nuclear matrix as well as in the plasma membrane and cytoplasmic cytoskeleton. Likewise, the isolated membrane-free nuclei from Friend erythroleukemia cells have enzymes that produce both PIP and PIP2(14), and a decrease in nuclear PIP and PIP2 was observed in Swiss 3T3 cells in the early stages of the response to insulin like growth factor(IGF-1)(15) and in HeLa cells during S-phase(16). In addition, PIP2 hydrolysis activity has been demonstrated in nuclei. Martelli *et al.* have reported that the purified nuclei of 3T3 cells contain PLC $\beta$  and that IGF-1 treatment stimulates the activity of nuclear PLC(17). Furthermore, a PLC isoform confined to the nuclei has been

## Materials and Methods

*Materials*---Histone H1, H3, staphylococcus aureus V8(V8 protease), and PKA were purchased from Boehringer Mannheim. PKCs purified from rat brain were a kind gift from Dr. Inagaki(Aichi Cancer Center, Japan), and Cdc2 kinase was from Upstate Biotechnology Incorporated. [<sup>3</sup>H]PIP2(7.6 Ci/mmol) and [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP were purchased from Du Pont-New England Nuclear and Amersham, respectively. *Drosophila* Embryo Nuclear Extract *in vitro* Transcription System was from Promega. The peptide gel filtration column(Superdex Peptide HR 10/30), protein gel filtration column(Superose 6) and reverse phase C18 column(TSKgel ODS-80TMCTR) were from Pharmacia Biotech and TOSOH(Japan), respectively. DEAE-cellulose(Whatman), cellulose phosphate(Whatman), and Hi-Trap heparin column(Pharmacia) were purchased as indicated. PIP2 and PIP was prepared from bovine spinal cords by the method previously reported(27), PI, phosphatidylcholine(PC), phosphatidylserine(PS), and CL were purchased from Sedary, PG was from Sigma. Diparmitoyl PIP3 was chemically synthesized.

*Preparation of antibodies*---Polyclonal antibodies to histone H1 and H3 were prepared by injecting purified histone H1 or H3 into New Zealand white rabbits. Thereafter, booster injections were administered every two weeks for two months. The antibody was purified by 20-38 % ammonium sulfate fraction. Monoclonal antibody to PIP2 was prepared as described before(24,25).

with 0.1 N HCl. A part of the treated histone H1 was subjected to SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose filters, and then immunostained with anti-PIP2 antibody. To show that the association of PIP2 affect the apparent molecular weight of histone H1, the other parts of the treated histone H1 were applied to gel filtration column(Superose 6) previously equilibrated with the buffer containing 20 mM Tris-HCl(pH, 7.5) and 0.1 M NaCl, and eluted with the same buffer. For dot-blot analysis, peptides and proteins were spotted on a nitrocellulose filter and stained with anti-PIP2 antibody.

*Extraction of PIP2 from histone H1 and histone H3*---200 µg of purified histones H1 and H3 were extracted with 2 ml chloroform/methanol(2/1) and 0.5 ml 1N HCl. The chloroform layer was evaporated under a N<sub>2</sub> stream and the residue was spotted onto a thin-layer chromatography(TLC) plate. The plate was developed in chloroform/methanol/ammonia/H<sub>2</sub>O(14/20/3/5, v/v) and immunostained with anti-PIP2 antibody.

*Preparation and analysis of peptides from histone H1*---50 µg Histone H1 was digested overnight with 50 µg/ml V8 protease in 50 mM phosphate buffer, pH 7.8. The peptides from the digest were separated by high performance liquid chromatography(HPLC) on a C18 column with a linear gradient of 0-60 % acetonitrile in 0.091% trifluoroacetic acid(TFA) as described before(28).

Each eluted peptide was lyophilized and then solubilized in water. The molecular mass of the peptide was determined by HPLC on a peptide gel filtration column equilibrated and eluted with 10% acetonitril in 0.1% TFA. The amino acid sequencing was performed by a protein sequencer(Shimadzu, Japan).

plasmid(32), and the supercoiled pKr plasmid was used for *in vitro* transcription. RNA synthesis was performed as described in the Technical Bulletin(Promega) using a *Drosophila* embryo nuclear extract in the presence or absence of histone H1 or phospholipid vesicles. Phospholipid/histone H1 vesicles were prepared as follows. Lipids in organic solution were dried under a N<sub>2</sub> stream, suspended in histone H1-containing solution by sonication. The quantity of cDNA obtained from a specific primer extension reaction(reverse transcription) shows the amount of the specific mRNA. The primer for reverse transcription is 5'TATTACTCGCGGTTGTGTGTGGCACAAC, which hybridizes to the *Kruppel* mRNA from +45 to +73. The primer extension reaction was performed at 37 °C for 60 min in the buffer described in the Technical Bulletin. The predominant products, 72 and 68 bases in length, were separated on a denaturing gel containing 8 % acrylamide, 7 M urea, and TBEX1 buffer. The gel was subjected to autoradiography.

of PIP2 with histone H1 and H3 did not occur during preparation of histones.

To clarify the specificity of PIP2-binding to histone H1 further, histone H1 was incubated with various amounts of PIP2 and western blot was carried out. As shown in Fig. 1d, exogenously added PIP2 was detected on histone H1 in dose dependent manner, suggesting that this binding is specific and very strong. To confirm that anti-PIP2 antibody does not crossreact with histone H1, PIP2 bound to histone H1 was removed by the incubation with 0.1 N NaOH. Though histone H1 protein was stable under this treatment, it was no more stained with anti-PIP2 antibody(Fig. 1e), suggesting that anti-PIP2 antibody did not react with histone H1 protein by itself. Furthermore, gel filtration study showed that 0.1 N NaOH-treated histone H1 eluted more slowly than non-treated histone H1(Fig. 1f), showing that apparent molecular weight of histone H1 was reduced by removal of bound PIP2.

It appears to be important to understand the interaction between PIP2 and histone H1. Therefore, we next determined the PIP2-binding site in histone H1. When histone H1 was digested by V8 protease and subjected to C18 reverse column chromatography, seven peptides were obtained(No 1-7 in Fig. 2a). Among these peptides, peptide 1 was identified as containing the PIP2-binding site by dot-blot analysis with anti-PIP2 antibody in addition to original histone H1(No. 0)(Fig. 2b). PIP2 bound to peptide 1 was still remained after HPLC as seen in  $\alpha$ -actinin(28). The molecular mass of peptide 1 was

of PKC(34), PKA(35), and cdc2 kinase(36) in rat H1d, human H1b, and bovine H1, we recognized that all the phosphorylation sites are nearly conserved among the subtypes and that the PKC phosphorylation site is close to the PIP2-binding site. Thus, we assume that the phosphorylation of serine-104 by PKC induces the decrease in PIP2 binding to histone H1.

Since histones have been known to suppress the transcription by RNA polymerase II, we were interested in the effect of inositolphospholipids on the transcriptional inhibition mediated by histone H1 in eukaryotic cells. We next examined whether PIP2 can counteract the repression of RNA polymerase II transcription by histone H1 using a *drosophila* embryo transcription system. Transcription by RNA polymerase II was inhibited 90-95% by 1  $\mu$ M H1 and completely inhibited by 4  $\mu$ M H1 in the absence of phospholipid(second lanes from left in Fig. 4a, b, and c). The addition of PIP2 to the reaction mixture in the ratio of 10 mol PIP2 to 1 mol histone H1(1  $\mu$ M) reversed the transcriptional inhibition by histone H1 to 62 % of the basal transcription level(lane 4 compared to lane 1 in Fig. 4a). Antirepression caused by PIP3 or PIP was also found, but these effects were much weaker than that of PIP2. The degree of transcriptional activity was about 12 % in the presence of PIP3(10  $\mu$ M) and 6% in the presence of PIP(10  $\mu$ M). And a slightly effect of CL and PG at 10  $\mu$ M were observed as Hirai *et al*(23) have reported(Fig. 4b). On the other hand, PI, PS, and PC had no effect at all at 40  $\mu$ M(Fig. 4c). In addition, we found that IP3 does not affect the transcriptional inhibition by histone H1(data not shown). All these data suggest that inositolphospholipids, especially PIP2, interact with histone H1 and are involved in regulation of the RNA transcription.



## References

1. Huang, F. L., and Huang, K. P. (1991) *J. Biol. Chem.* **266**, 8727-8733
2. Chauhan, A., Brockerhoff, H., Wismiewski, H.M., and Chauhan, V. P. S. (1991) *Arch. Biochem. Biophys.* **287**, 283-287
3. Saido, T. C., Suzuki, H., Yamazaki, H., Tanoue, K., and Suzuki, K. (1993) *J. Biol. Chem.* **268**, 7422-7426
4. Randazzo, P.A., and Kahn, R. A. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 10758-10763
5. Liscovitch, M., Chalifa, V., Pertile, P., Chen, C. S., and Cantley, L. C. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 21403-21406
6. Lassing, I., and Lindberg, U. (1985) *Nature* **314**, 472-474
7. Yonezawa, N., Homma, Y., Yahara, I., Sakai, H., and Nishida, E. (1991) *J. Biol. Chem.* **266**, 17218-17221
8. Janmey, P. A., and Stossel, T. P. (1987) *Nature* **325**, 362-364
9. Yu, F. X., Johnston, P. A., Sudhof, T. C., and Yin, H. L. (1990) *Science* **250**, 1413-1415
10. Fukami, K., Furuhashi, K., Inagaki, M., Endo, T., Hatano, S., and Takenawa, T. (1992) *Nature* **359**, 150-152
11. Fukami, K., Endo, T., Imamura, M., and Takemawa, T., (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 1518-1522
12. Harlan, J. E., Hajduk, P. J., Yoon, H. S., and Fesik, S. W. (1994) *Nature* **371**, 168-170
13. Zhou, M. M., Ravichandran, K. S., Olejniczak, E. T., Petros, A. M., Meadows, R. P., Sattler, M., Harlan, J. E., Wade, W. S., Burakoff, S. J. and

27. Schacht, J. (1978) *J. Lipid Res.* **19**, 1063-1067
28. Fukami, K., Sawada, N., Endo, T., and Takenawa, T. (1996) *J. Biol. Chem.* **271**, 2646-2650
29. Homma, Y., Emori, Y., Shibasaki, F., Suzuki, K., and Takenawa, T. (1990) *Biochem. J.* **269**, 13-18
30. Sohn, R.H., Chen, J., Koblan, K.S., Bray, P.F., and Goldschmidt-Clermont, P. J. (1995) *J. Biol. Chem.* **270**, 21114-21120
31. Inagaki, M., Watanabe, M. and Hidaka, H. (1985) *J. Biol. Chem.* **260**, 2922-2925
32. Kadonaga, J. T. (1990) *J. Biol. Chem.* **265**, 2624-2631
33. Gurley, L. R., Valdez, J. G., and Buchanan, J. S. (1995) *J. Biol. Chem.* **270**, 27653-27660
34. Jakes, S., Hastings, T. G., Reimann, E. M., and Schlender, K. K. (1988) *FEBS Lett.* **234**, 31
35. Pearson, B. P. and Kemp, B. E. (1991) *Meth. Enzym.* **200**, 62-81
36. Maller, J. L. (1990) *Biochemistry* **29**, 3157-3166
37. Divecha, N., Banfic, H., and Irvine, R.F. *Cell* **74**, 405-407, 1993
38. Hocevar, B. A., and Fields, A. P. *J. Biol. Chem.* **266**, 28-33
39. Koiv, A., Palvimo, J., and Kinnunen, P. K. J. (1995) *Biochemistry* **34**, 8018-8027

non-treated histone H1 and the lower one shows that of the NaOH-treated histone H1.

**Fig. 2. Identification of the PIP2 binding site of histone H1.**

(a) Peptides from histone H1 digested with V8 protease were applied to a C18 reverse-phase column and eluted with a linear gradient of 0-60% acetonitrile in 0.091 % TFA. (b) The eluted peptides (peptides 1-7) in (a) were lyophilized and spotted onto a nitrocellulose membrane along with authentic histone H1(0), and then immunostained with anti-PIP2 antibody. (c) The molecular mass of the PIP2 binding peptide was identified by peptide gel filtration column chromatography using standard proteins including cytochrome C(12.5 kDa), aprotinin(6.5 kDa), insulin B-chain(3.5 kDa), substance P(1.3 kDa). (d) The first N-terminal 29 amino acid residues were determined by protein sequencing.

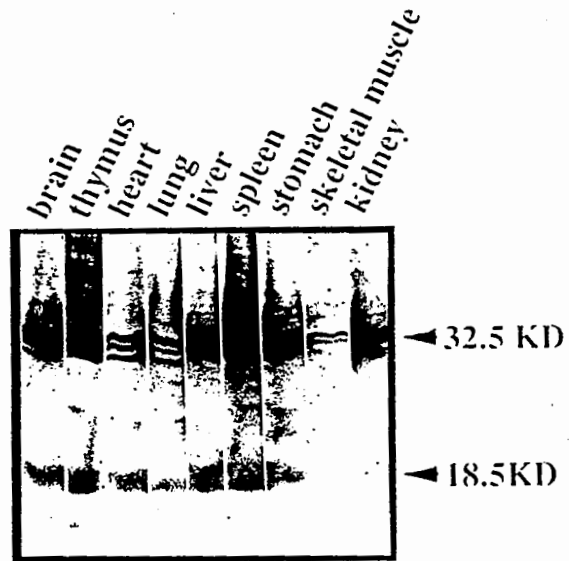
**Fig. 3. Effect of the phosphorylation of histone H1 on PIP2-binding.**

(a) 0.1  $\mu$ g of Histone H1 phosphorylated for 60 min by PKC, PKA, or cdc2 kinase was subjected to 10% SDS-PAGE and transferred to a nitrocellulose filter. The filter was immunostained with anti-PIP2 antibody and autoradiographed. (b) The time course for the change in PIP2 level during the phosphorylation of histone H1 by PKC is shown. Histone H1 phosphorylated by PKC for 0, 5, 15, 30, and 60 min was subjected to 10% SDS-PAGE, transferred to a nitrocellulose filter, immunostained with anti-PIP2 antibody,

**Table 1. The PIP2 binding ability of the peptides was analyzed by the inhibition of PLC $\delta$ 1 activity.**

The activities of PLC $\delta$ 1 were measured in the absence of peptide, or in the presence of 500  $\mu$ M full length histone H1, or 500  $\mu$ M histone H1 peptides 1-7 from V8 protease digestion.

**a**



**b**

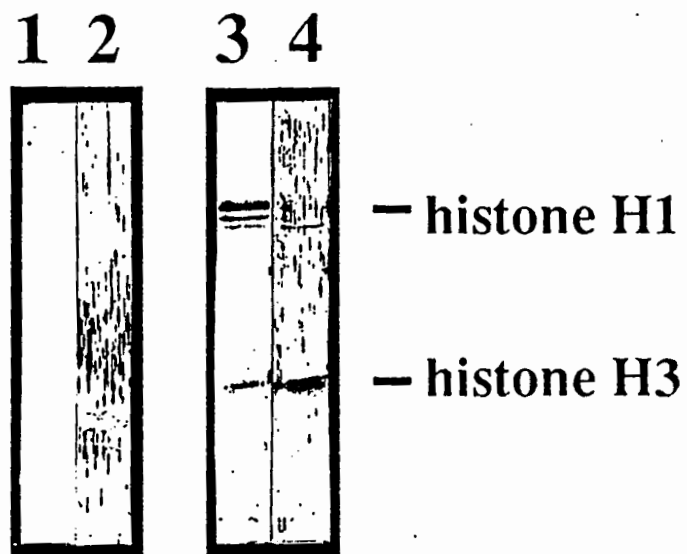
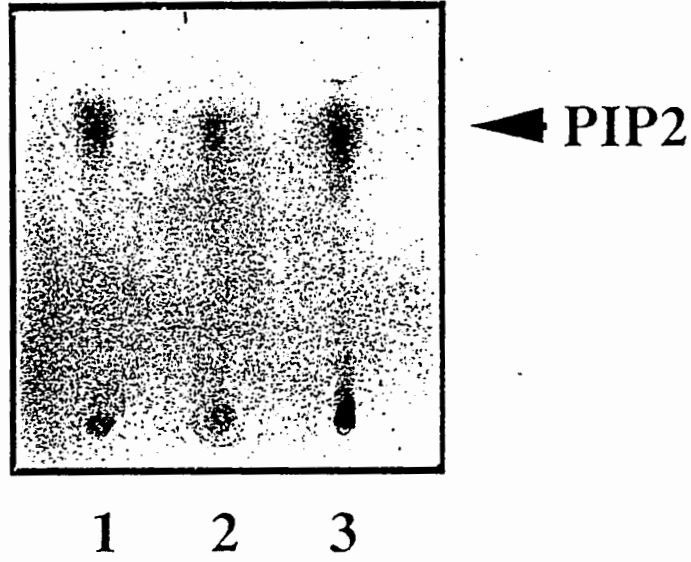


Fig. 1 Yu et al

**c**



**d**

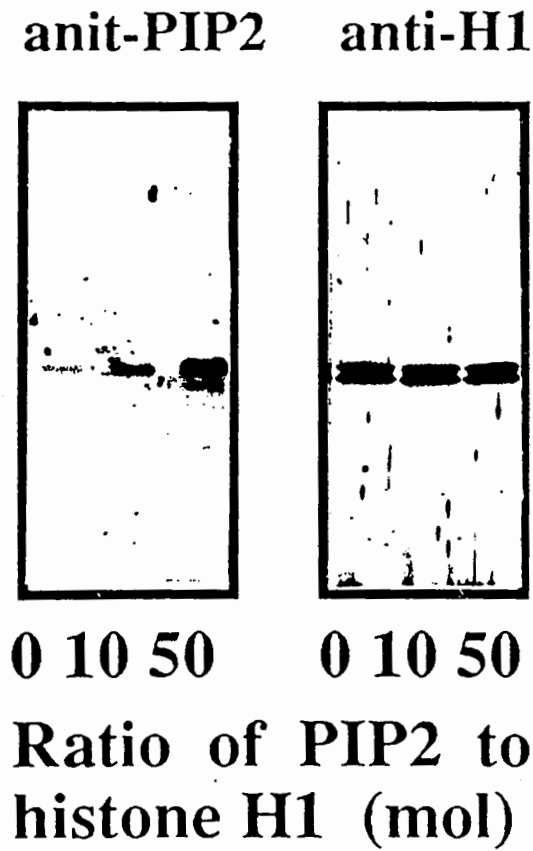
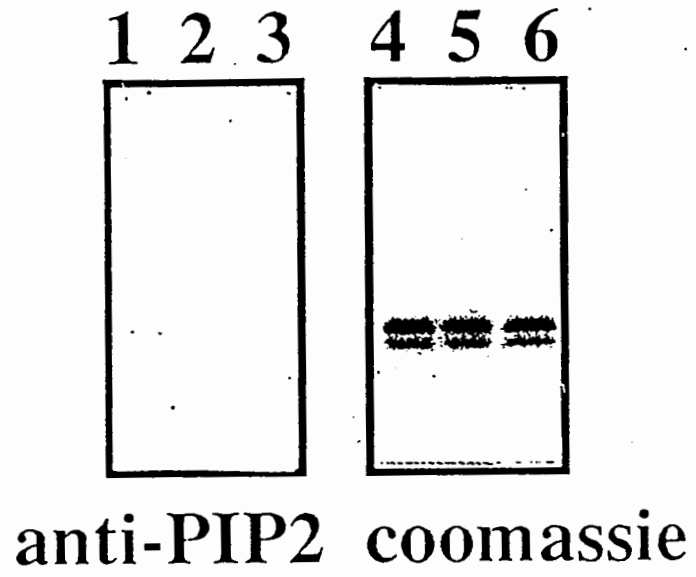


Fig. 1 Yu et al

e



f

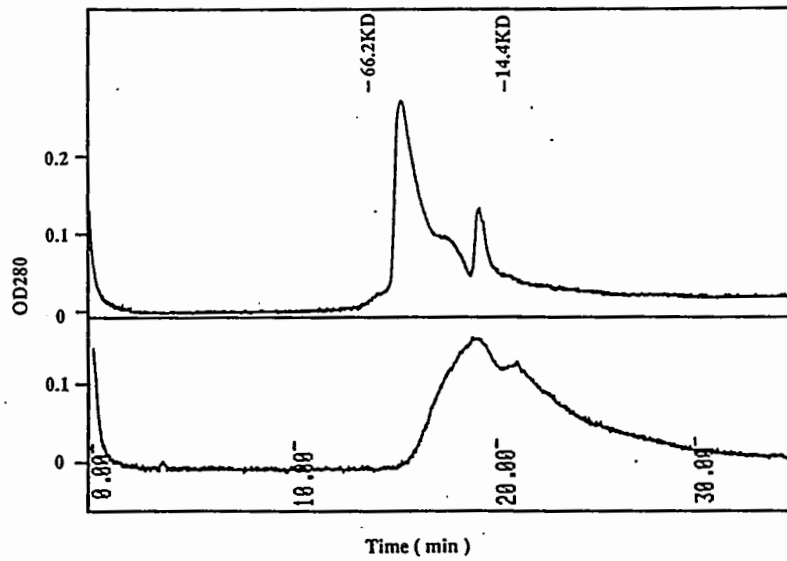
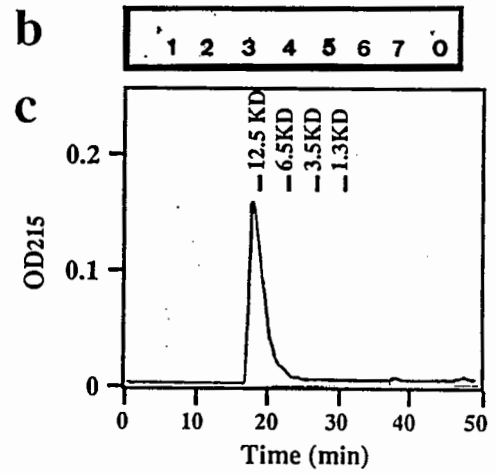
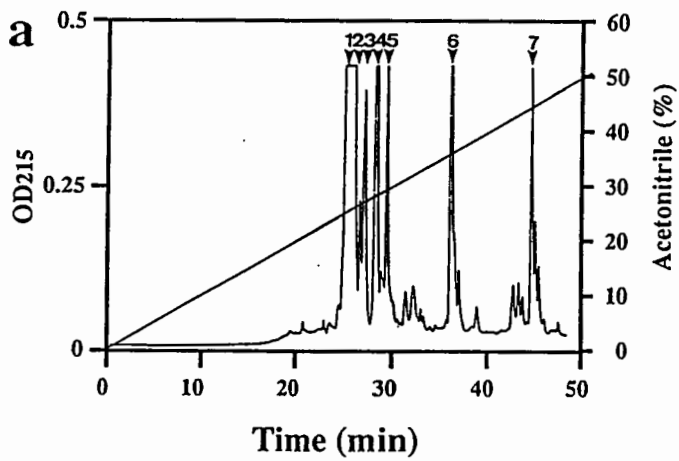


Fig. 1 Yu et al

11  
10  
10  
10



**d** AKPKAKKAGAAKPKKAAGAAKKTCKATGA

Fig. 2 Yu et al



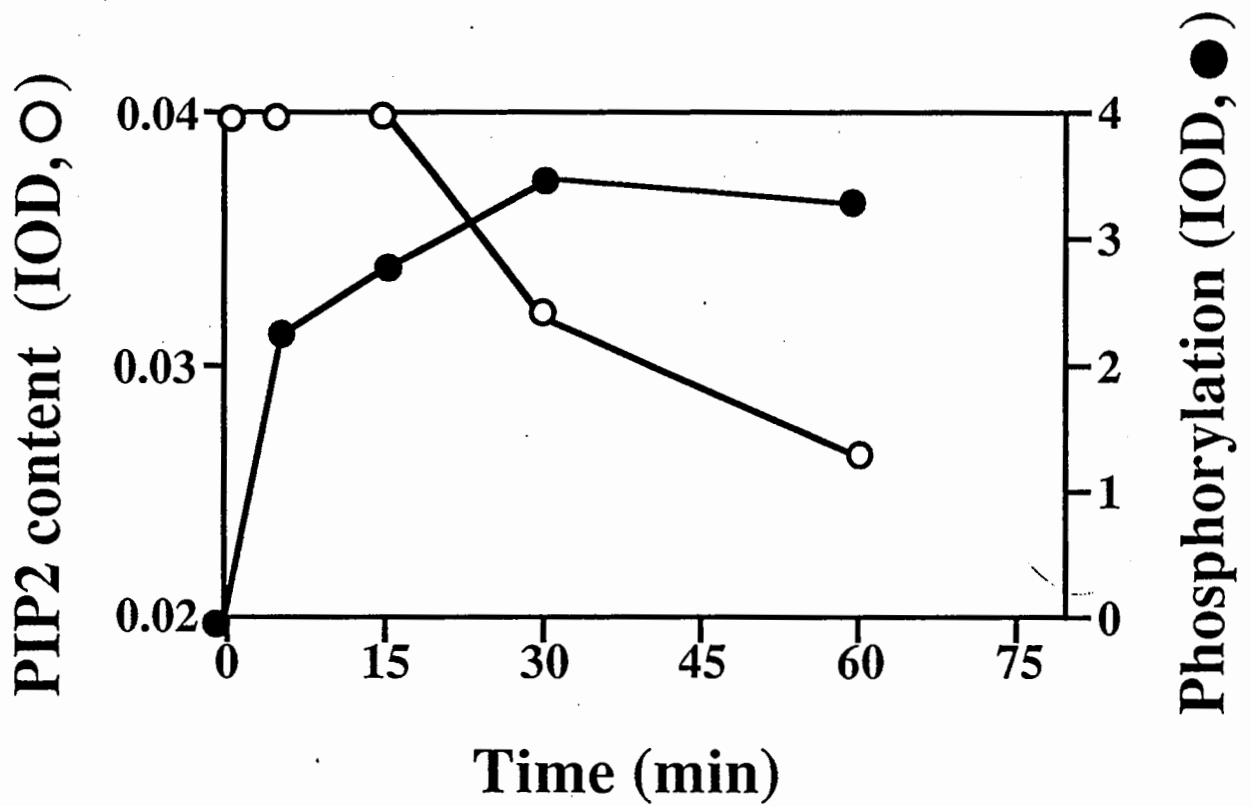
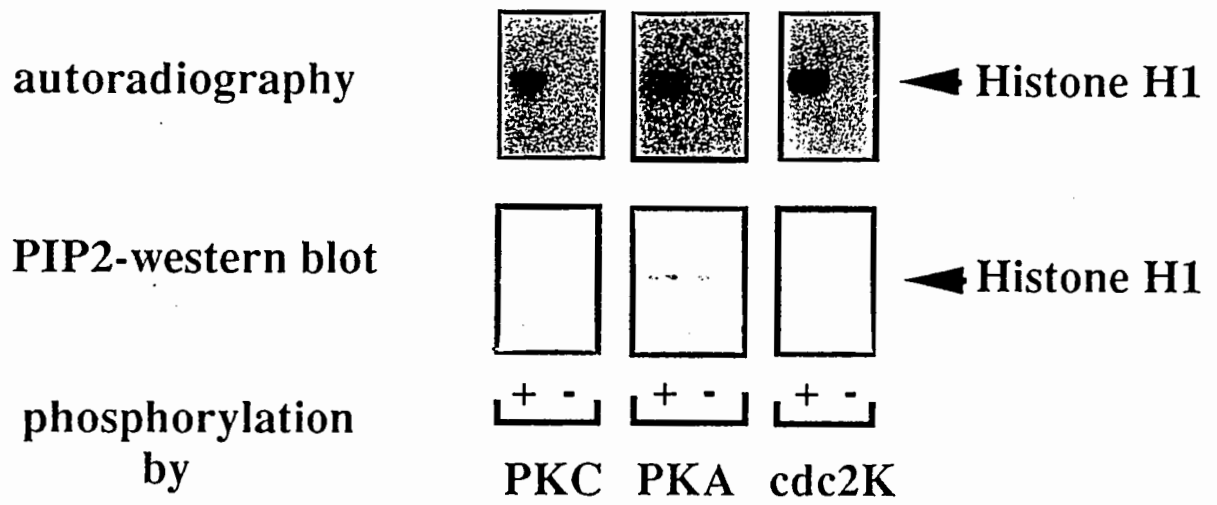


Fig. 3 Yu et al

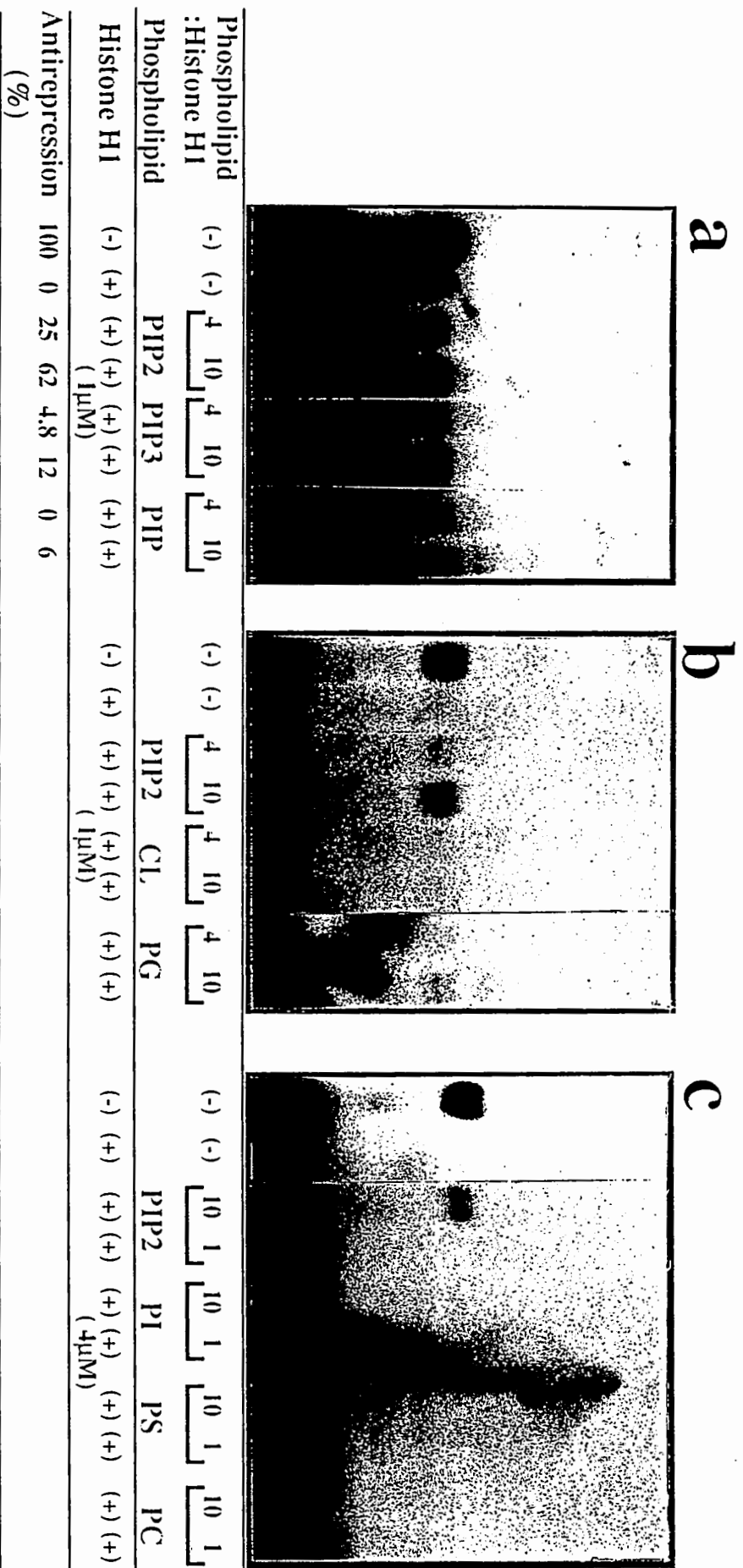


Fig. 4 Yu et al

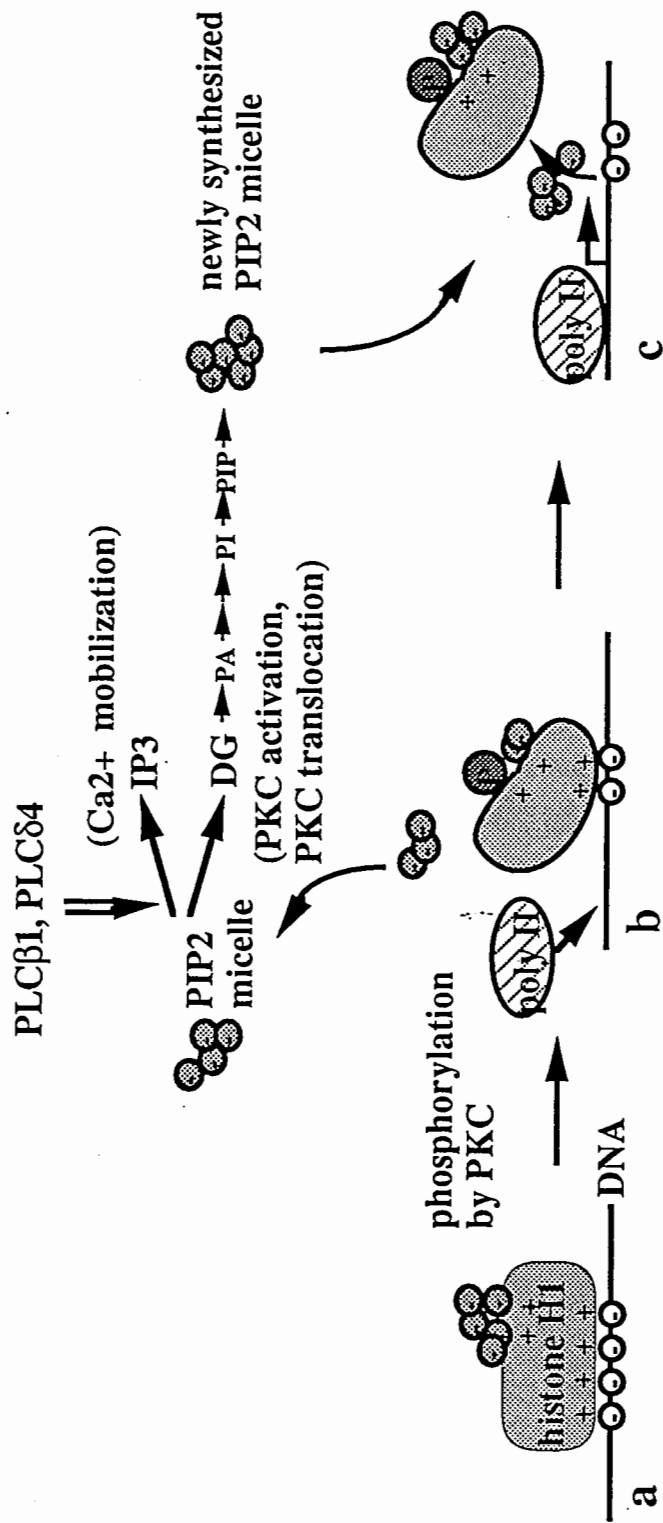


Fig. 5 Yu et al

protein(peptide)	PLC activity		
	500 $\mu$ M	$\mu$ mol /min /mg	%
(-)	9.0 $\pm$ 0.4	100.0 $\pm$ 4.4	
HI in full length	4.3 $\pm$ 0.2	47.8 $\pm$ 2.2	
peptide 1	4.0 $\pm$ 0.4	44.4 $\pm$ 4.4	
peptide 2	8.4 $\pm$ 0.5	93.3 $\pm$ 5.6	
peptide 3	8.5 $\pm$ 0.2	94.4 $\pm$ 2.2	
peptide 4	7.4 $\pm$ 0.2	82.2 $\pm$ 2.2	
peptide 5	8.4 $\pm$ 0.4	93.3 $\pm$ 4.4	
peptide 6	9.2 $\pm$ 0.3	102.2 $\pm$ 3.3	
peptide 7	9.3 $\pm$ 0.4	103.3 $\pm$ 4.4	

Table 1 Yu et al

日本財団補助金による  
1996年度日中医学協力事業助成報告書

- 在留中国人研究者研究助成 -

49年3月13日

財団法人 日中医学協会  
理事長 中島 章 殿

I. 研究者氏名 曹 堃 (イウゴン) Kwu Cao  
研究機関 名古屋市第二内科消化器グループ 研究指導者 溝上 雅夫 職名 講師  
所在地 〒467 名古屋市瑞穂区川澄1 電話 853-8216 内線 \_\_\_\_\_

II. 過去の研究歴  
別紙

III. 過去の研究実績  
別紙

IV. 本年度の研究業績  
(1) 学会、研究会等における口頭発表 (学会名・内容)  
別紙

(2) 学会誌等に発表した論文 無 ・ 有 (雑誌名・論文名)  
別紙

V. 今後の研究計画及び希望  
HBV、HGVなど取り込めて研究していきたい。お返しをお願いします。

VI. 研 究 報 告 (日本語、又は英語で書いて下さい。 2,000字程度で記載して下さい。)

別紙

VII. 指導教官の意見

別紙

# 研究報告

インターフェロン治療に対するC型肝炎ウイルス遺伝子変異の研究

---E2/NS1 超可変領域塩基配列置換パターンの分析

はじめに

C型肝炎ウイルスは1989年に発見同定され、その遺伝子の全体像が明らかになって以来、HCVの遺伝子解析も盛んに行われてきた。HCVは約9.5kbのプラス鎖としてもち、ペステイウイルス近縁のRNAウイルスである。一般にRNAウイルスが複製する際には、RNAポリメラーゼが修復機構を持たないため高頻度に塩基置換 (nucleotide substitution) をきたす。この結果として、多様な遺伝子変異を有する多数の変異株 (quasispecies) が混在した状態が形成される。このようにして形成された宿主内の変異株は、免疫監視機構からの逃避や抗ウイルス療法への抵抗性など、さまざまな生物学的特性に関与していると考えられる。

HCV遺伝子のエンベロープ領域には塩基配列の多様な領域が存在し、超可変領域 (hypervariable region; HVR)と呼ばれている。HVRには中和抗体のエピトープが存在すると思われる、宿主の免疫監視機構から逃避するためにHCVが変異を繰り返す結果として、HVRの多様性が生じる可能性が考えられている。

臨床的にC型慢性肝炎を治療するのにインターフェロン(IFN)を使うのは的確な効果が認められているが、著効例 (持続的肝機能の正常化とHCV-RNAの陰性化) の頻度は30%前後に過ぎない。治療効果を左右する因子としてVIRUS量、HCVゲノタイプ、肝組

織進展度などの関与が指摘されているが、HCVゲノムの中にHypervariable region (HVR)の塩基多様性及び治療前後塩基配列の変化(塩基置換)はIFN治療効果との関係が特に深いと思われる。

今回我々はIFN(sumiferon)での初回治療に無効を示したC型慢性肝炎6例の保存血清を使ってHCVRNAを抽出し、HVR塩基配列の変化を分析し、その変異のパターンを観察したので報告する。

#### 材料と方法：

C型慢性肝炎と診断したIFN (sumiferon) 治療施行し、無効を示した6例、IFN投与する直前(before)、投与完了(after)、投与完了から6ヵ月(6M) 三つのポイントで採取した血清より、HCVRNAを抽出、RT-PCR法にてHVRを含めたE2/NS1領域 (Fig.1)のcDNAを作製、増幅した。ついで、そのPCR産物をサブクローニング後、各々8クローンをpick upし、ABI社の373A DNAシーケンシングシステムにより塩基配列を決定し、各ポイントのクローン間に6-parameter法にてND (nucleotide diversity)を算出し、クローンごとに同方法にて塩基置換数を推定した、Neighbor-joining法で分子系統樹を書き、IFN治療前後にHCVHVR遺伝子の塩基置換パターンを分析した。

#### 結果：

今回研究したIFN (sumiferon) 療法で無効例のC型慢性肝炎6例の臨床データはTable 1に示した。Genotypeの分類は1例(MN)を除けば皆1bであった。組織進展度から見ると、SEだけはCAH2Bで、他の症例がCAH2Aであった。各症例を三つのポイント[IFN (sumiferon) 投与前(before)、投与完了(after)、投与完了6ヵ月(6M)]の保存血清を使って分析



した。

各症例のIFN投与前後のND変化はTable 1 に示した様にOK, KK二症例以外の四症例が投与期間中に各クローン間の相違度が一旦収められたが投与中止後にRebound 傾向も観察された。OK, KK二症例にOKは投与完了6ヵ月時点でReboundが見られなかったけれども、IFN耐性株は確かに存在していると考えられる；KKはIFN投与後にクローン間の相違(heterogeneity)が一旦大きくなった様に見えるが、投与完了6ヵ月時点で再び投与前のレベルに戻っていた、これもIFN耐性株が選択されたと言える。

さらに全症例のIFN投与前後の塩基置換パターンをまとめて比べました：A→Gへの置換以外は一定の増減傾向は見られなかったが、A→Gへの置換は全症例のIFN投与前後で減少していた ( $P < 0.05$ )。T→C、C→Tへの置換が多いことが観察されたが、統計的有意差は出なかった (Table2, Fig. 2)。

考案：

- 1.ほとんどの症例はIFN投与中にHVRの塩基多様度(ND)の減少が見られたが、投与中止後のReboundも観察された、これは臨床的結果と一致した。
- 2.C型肝炎ウイルスではC→T、T→Cへの置換が多いことが観察された。C型肝炎ウイルスは+strandから-strandとなり、-strandを増殖系として多量のウイルスvirionを複製するためmiss readingは-strandからウイルスvirionを複製するとき起こりやすいと考えられる (Fig. 3)。C→Tへの置換が多いとは正常ではCからG、GからCになる、ところがmutationではCからG、GからCの代わりにTが取り込まれたと考えられた。一方、TからCへの置換が多いとはTからA、AからTになるところが、T、Cが間違っ取り込まれた結果だと思われる、従って、T、CのanalogueがC型慢性肝炎に有効と思われる。文献的にはTsutsumiらがC

型肝炎ウイルスに対するTのanalogueであるAZTの有効性について報告しており、我々の観察結果と一致している。

3. IFN 投与中にA→Gへの置換の減少が観察された。A→Gへの置換が減少し、A→T、A→Cへの置換には増減がなかったため、Aはそのまま置換をおこさずAになる確率を高めたと考えられる。IFN 投与中にはAが取り込まれ易くなり、Aのanalogueが有効と思われる。

Ribavirinはnucleoside analogueとしての作用機序を持ち、体内でATP,GTPのanalogueに変化する。KakumuらはC型肝炎ウイルスに対するリバビリンとIFNの併用療法の有効性について報告しており、我々の観察結果と一致している。

結語：

IFN 投与前後にHCVゲノムの中にHypervariable region (HVR)の塩基配列の変化（塩基置換）はIFN治療効果との関係が深いと思われる。C→T、T→Cへの置換が多いことやA→Gへの置換の減少することが塩基置換パターン分析によって明らかになり、臨床的にも意義があると思われる。

主な文献：

1. M. Mizokami, T. Gojobori, and J. Y. N. Lau: Molecular evolutionary virology: its application to hepatitis C virus. *Gastroenterology* 1994; 107:1181-2.
2. E. N. Moriyama, Y. Ina, K. Ieko, N. Shimizu, and T. Gojobori: Mutation pattern of human immunodeficiency virus genes. *J Mol Evol.*(1991) 32:360-3.
3. T. Imanichi and T. Gojobori: Patterns of nucleotide substitutions inferred from the phylogenies of the class I major histocompatibility complex genes. *J Mol Evol.*(1992) 35:196-204.

4. N. Ogata, et al: Nucleotide sequence and mutation rate of the H strain of hepatitis C virus. Proc Natl Acad Sci USA(1991) 88:3392-96.

5.溝上雅史、大羽健一：C型肝炎ウイルスの分子進化学—分子系統樹と分岐時間—  
日本臨床第693号（分子肝炎ウイルス病学）（1995）P57—63。

**Table 1. Clinical characteristics of patients studied**

patient	age/sex	history	genotype	serum sample	before and after IFN (sumiferon) treatment	duration	IFN (sumiferon) response	no. of clones sequenced	ALT level (IU/ml)	ND (nucleotide diversity)
MN	51/M	CAH2A	2a	MIN 1	before	6M	NR	8	92	0.05905
				MIN 2	after			8	61	0.00725
				MIN 3	6 M			8	112	0.07927
OK	49/F	CAH2A	1b	OK 1	before	6M	NR	8	47	0.14829
				OK 2	after			8	80	0.02471
				OK 3	6 M			8	35	0.00315
KK	30/M	CAH2A	1b	KK 1	before	6M	NR	8	136	0.01516
				KK 2	after			8	46	0.13521
				KK 3	6 M			8	142	0.01397
SA	63/M	CAH2A	1b	SA 1	before	6M	NR	8	232	0.10177
				SA 2	after			8	153	0.00991
				SA 3	6 M			8	197	0.01574
NJ	59/M	CAH2A	1b	NJ 1	before	6M	NR	8	166	0.01268
				NJ 2	after			8	490	0.00182
				NJ 3	6 M			8	136	0.01083
SE	64/M	CAH2B	1b	SE 1	before	6M	NR	8	187	0.01091
				SE 2	after			8	54	0.00466
				SE 3	6 M			8	46	0.0237

**Table 2. Change of relative substitution frequency by IFN therapy**

Case 1	From   To	A	T	C	G
	A	-	15.83 ; 36.29 ; 11.49	0.00 ; 0.00 ; 0.00	26.39 ; 0.00 ; 15.32
	T	0.00 ; 0.00 ; 3.58	-	18.13 ; 32.90 ; 14.30	0.00 ; 0.00 ; 0.00
	C	0.00 ; 0.00 ; 2.83	11.25 ; 0.00 ; 33.92	-	11.25 ; 0.00 ; 8.48
	G	4.29 ; 0.00 ; 6.73	8.57 ; 30.81 ; 3.36	4.29 ; 0.00 ; 0.00	-

Case 2	From   To	A	T	C	G
	A	-	3.35 ; 14.63 ; -	10.04 ; 0.00 ; -	16.73 ; 0.00 ; -
	T	2.72 ; 0.00 ; -	-	24.46 ; 42.06 ; -	2.72 ; 0.00 ; -
	C	2.08 ; 10.43 ; -	12.48 ; 20.87 ; -	-	10.40 ; 0.00 ; -
	G	6.45 ; 12.02 ; -	2.15 ; 0.00 ; -	6.45 ; 0.00 ; -	-

Case 3	From   To	A	T	C	G
	A	-	11.70 ; 6.28 ; 0.00	0.00 ; 9.42 ; 0.00	11.70 ; 6.28 ; 0.00
	T	0.00 ; 7.12 ; 0.00	-	19.97 ; 7.12 ; 0.00	9.99 ; 0.00 ; 0.00
	C	7.50 ; 9.54 ; 0.00	22.49 ; 21.46 ; 0.00	-	7.50 ; 2.38 ; 0.00
	G	0.00 ; 24.89 ; 100.00	9.16 ; 2.77 ; 0.00	0.00 ; 2.77 ; 0.00	-

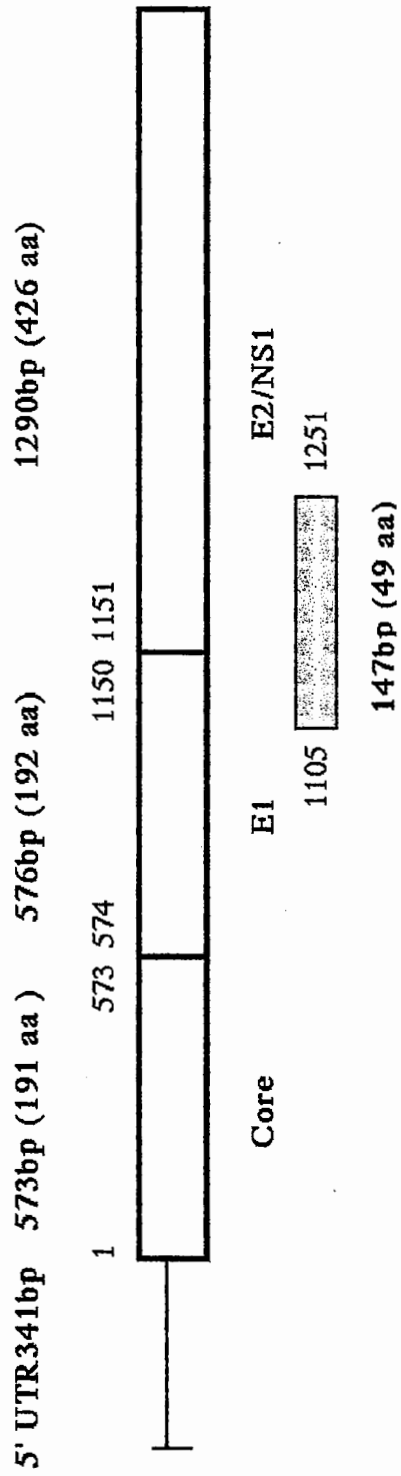
Case 4	From   To	A	T	C	G
	A	-	12.93 ; 0.00 ; 6.88	4.31 ; 0.00 ; 0.00	17.24 ; 13.52 ; 41.29
	T	0.00 ; 0.00 ; 0.00	-	15.65 ; 34.84 ; 14.50	3.91 ; 0.00 ; 0.00
	C	0.00 ; 10.07 ; 6.12	23.56 ; 20.14 ; 18.37	-	3.37 ; 10.07 ; 6.12
	G	15.22 ; 11.36 ; 6.71	0.00 ; 0.00 ; 0.00	3.80 ; 0.00 ; 0.00	-

Case 5	From   To	A	T	C	G
	A	-	0.00 ; 0.00 ; 0.00	0.00 ; 0.00 ; 0.00	16.67 ; 0.00 ; 0.00
	T	0.00 ; 0.00 ; 0.00	-	29.22 ; 0.00 ; 45.56	0.00 ; 0.00 ; 0.00
	C	7.73 ; 0.00 ; 0.00	38.85 ; 100.00 ; 36.64	-	7.73 ; 0.00 ; 0.00
	G	0.00 ; 0.00 ; 17.80	0.00 ; 0.00 ; 0.00	0.00 ; 0.00 ; 0.00	-

Case 6	From   To	A	T	C	G
	A	-	0.00 ; 0.00 ; 0.00	0.00 ; 0.00 ; 0.00	30.89 ; 29.77 ; 16.76
	T	0.00 ; 0.00 ; 0.00	-	27.25 ; 19.33 ; 22.60	0.00 ; 9.66 ; 0.00
	C	0.00 ; 0.00 ; 25.02	25.66 ; 21.31 ; 12.51	-	0.00 ; 0.00 ; 0.00
	G	16.20 ; 19.93 ; 23.11	0.00 ; 0.00 ; 0.00	0.00 ; 0.00 ; 0.00	-



**Figure 1. HCV sequence position in E2/NS1 HVR region in the study**

		IFN (sumiferon)		
		Before	After	6M
A	T	6.9	6.7	7.2
	C	3.5	5.0	0.0
	G	18.1	8.3 *	19.9
T	A	0.9	3.5	1.9
	C	23.8	19.4	19.2
	G	2.8	1.8	0.0
C	A	2.1	7.9	5.7
	T	19.1	21.0	25.7
	G	7.5	2.6	5.7
G	A	8.5	19.3	12.9
	T	3.1	3.0	1.6
	C	3.9	1.5	0.0

\* P < 0.05

**Figure 2. Pattern of nucleotide substitutions observed in the study**

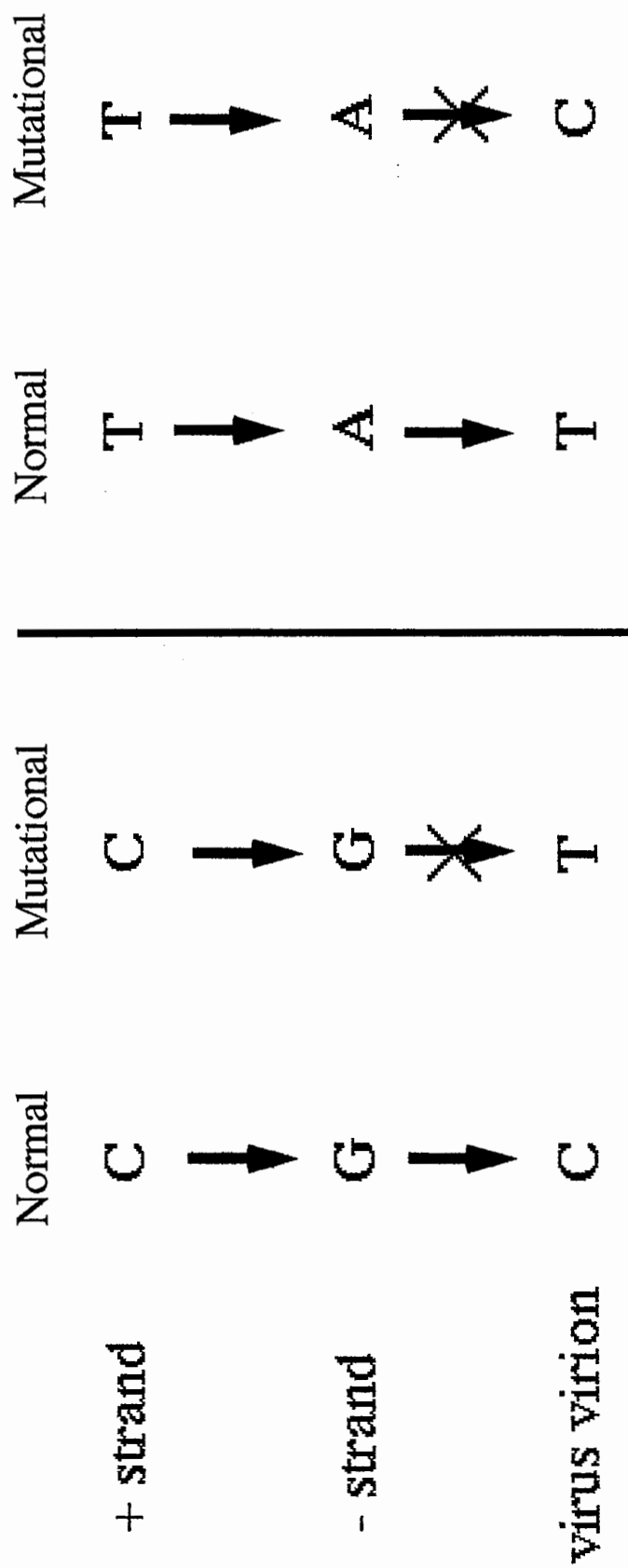


Figure 3. model of mutational changes of HCV virion



## 業績録：

### 1. 学会発表：

#### 【平成6年】

溝口直人、溝上雅史、折戸悦朗、鈴木馨、大羽健一、大野智義、寺島久博、中野達徳、  
Ron-Ron Wu, 曹 苒, Kui-Xian Wang  
ポーランドのC型慢性肝疾患患者におけるC型肝炎ウイルスserotypeの測定と本邦との比較検討  
第30回日本肝臓学会総会、平成6年7月8、9日、旭川  
肝臓 35(suppl):322, 1994.

鈴木馨、溝上雅史、折戸悦朗、大羽健一、大野智義、溝口直人、寺島久博、中野達徳、  
曹 苒、金井正三  
インターフェロンによるC型肝炎ウイルスの遺伝子変異  
第30回日本肝臓学会総会、平成6年7月8、9日、旭川  
肝臓 35(suppl):108, 1994.

大野智義、溝上雅史、鈴木馨、溝口直人、折戸悦朗、Ron-Ron Wu, 曹 苒,  
Kui-Xian Wang、大羽健一、寺島久博、中野達徳、小原道法  
世界各国のC型慢性肝疾患におけるC型肝炎ウイルスserotypeとgenotypeの測定及びその意義  
第30回日本肝臓学会総会、平成6年7月8、9日、旭川  
肝臓 35(suppl):103, 1994.

Ron-Ron Wu, 溝上雅史、大野智義、溝口直人、折戸悦朗、鈴木馨、大羽健一、  
寺島久博、中野達徳、曹 苒, Kui-Xian Wang、小原道法  
日本人C型慢性肝疾患患者におけるserotypeおよびgenotypeの比較と日本人第六型genotypeの存在  
第30回日本肝臓学会総会、平成6年7月8、9日、旭川  
肝臓 35(suppl):91, 1994.

#### 【平成7年】

呉蓉蓉、溝上雅史、大野智義、折戸悦朗、鈴木馨、大羽健一、溝口直人、寺島久博、  
中野達徳、曹 苒、徳留信寛、向出雅一  
C型肝炎ウイルスの新しいGenotyping法とその有用性の検討  
第31回日本肝臓学会総会、福岡、平成7年7月21日  
肝臓 36巻(suppl) (1): 156, 1995.

曹 苒、鈴木馨、折戸悦朗、大羽健一、溝口直人、小出常雄、寺島久博、中野達徳、  
溝上雅史  
C型肝炎ウイルスE2/NS1領域の塩基多様度とインターフェロン治療効果との関係  
第31回日本肝臓学会総会、福岡、平成7年7月22日  
肝臓 36巻(suppl) (1): 261, 1995.

葛憲民、王樹声、吳蓉蓉、曹 玟、黄果勇、王櫻、潘海東、大羽健一、鈴木馨、  
折戸悦朗、溝上雅史  
中国広西チワン族自治区の麻薬常用者におけるB型およびC型肝炎ウイルスの  
感染状況  
第31回日本肝臓学会総会、福岡、平成7年7月21日  
肝臓 36巻(suppl) (1): 154, 1995.

Mizokami M, Ge XM, Hotta H, Wang SS, Wnag Y, Pan HD, Huang GY, Wu RR, K Cao,  
Ohba KI, Orito E, Lau JYN.  
Hepatitis C virus genotypes 7, 8, and 9 should be classified as genotype 6 subtypes.  
46th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases  
Chicago, USA. Nov 3-7, 1995.

Mizokami M, Ge XM, Wang SS, Wang Y, Pan HD, Huang GY, Wu RR, K Cao, Orito E,  
Lau JYN.  
Molecular epidemiology of hepatitis C infection among intravenous drug users in Guangxi  
province, southern China.  
46th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases  
Chicago, USA. Nov 3-7, 1995.

#### 【平成8年】

鈴木馨、溝上雅史、曹 玟、折戸悦朗、大羽健一、小出常雄、寺島久博、中野達徳、  
吳蓉蓉  
RFLP法によるHCV genotypingの試み  
第32回 日本肝臓学会総会、神戸、平成8年4月20日  
肝臓、37巻(Supplement 1): 141, 1996.

T Kato, M Mizokami, RR Wu, K Cao, T Nakano, XM Ge, Y Kondo, K Ohba, M Mukaide, E  
Orito, S Iino.  
High prevalence of HGV/GBV-C infection in Southern China.  
10th Asian-Pacific Congress of Gastroenterology, Yokohama, September 21, 1996.  
Proceeding of 10th APCGA, 291, 1996.

K Ohba, M Mizokami, E Orito, T Nakano, RR Wu, K Cao, T Kato, Y Kondo, R Ueda, T  
Ohno, JYN Lau, T Gojobori.  
Evolutionary relationship between hepatitis C virus, pestiviruses, flaviviruses, GB agents and  
hepatitis G virus.  
47th Annual Meeting of the American Association of the Study of Liver Diseases. Chicago,  
Nov. 8-12, 1996. Hepatology 24(4): 227A, 1996.

- E Orito, M Mizokami, T Nakano, RR Wu, K Cao, T Kato, Y Kondo, K Ohba, R Ueda, M Mukaide, K Hikiji, JYN Lau.  
Quantitative changes of serum GB virus C/hepatitis G virus (HGV) RNA in Japanese patients with HCV/HGV coinfection treated with interferon-alfa.  
47th Annual Meeting of the American Association of the Study of Liver Diseases. Chicago, Nov. 8-12, 1996. Hepatology 24(4): 228A, 1996.
- E Orito, M Mizokami, T Nakano, RR Wu, K Cao, Y Kondo, T Kato, K Ohba, R Ueda, M Mukaide, K Hikiji.  
GB virus C/hepatitis G virus infection among Japanese patients with chronic liver diseases and blood donors.  
47th Annual Meeting of the American Association of the Study of Liver Diseases. Chicago, Nov. 8-12, 1996. Hepatology 24(4): 287A, 1996.
- M Mizokami, RR Wu, K Cao, T Nakano, X Din, E Orito, XM Ge, SS Wang, M Mukaide, K Hikiji, JYN Lau, S Iino.  
GB virus C/hepatitis G virus infection in Southern China.  
47th Annual Meeting of the American Association of the Study of Liver Diseases. Chicago, Nov. 8-12, 1996. Hepatology 24(4): 292A, 1996.
- 大羽健一、溝上雅史、向出雅一、Naoky C Tsai、折戸悦朗、中野達徳、RR Wu、曹 堃、加藤孝宣、近藤豊、上田龍三  
ハワイのC型慢性肝炎患者のHCV genotype分布とHGV RNAの検出  
第31回日本肝臓学会西部会、四日市市、平成8年11月29、30日  
肝臓 37(suppl 3):70, 1996.
- RR Wu、溝上雅史、XM Ge、曹 堃、近藤豊、加藤孝宣、折戸悦朗、大羽健一、中野達徳、上田龍三  
中国広西チワン族自治区のGBV-C/HGV感染  
第31回日本肝臓学会西部会、四日市市、平成8年11月29、30日  
肝臓 37(suppl 3):160, 1996.
- 加藤孝宣、溝上雅史、折戸悦朗、大羽健一、中野達徳、RR Wu、曹 堃、近藤豊、上田龍三、向出雅一  
ウズベキスタンにおけるGBV-C/HGV感染の疫学的検討  
第31回日本肝臓学会西部会、四日市市、平成8年11月29、30日  
肝臓 37(suppl 3):161, 1996.
- 近藤豊、溝上雅史、折戸悦朗、大羽健一、中野達徳、RR Wu、曹 堃、加藤孝宣、上田龍三、向出雅一、矢野右人  
モンゴルにおけるGBV-C/HGV感染の分子生物学的および疫学的検討  
第31回日本肝臓学会西部会、四日市市、平成8年11月29、30日  
肝臓 37(suppl 3):161, 1996.
- 向出雅一、大羽健一、中野達徳、RR Wu、曹 堃、折戸悦朗、山内寿靖、引地一昌、溝上雅史  
GBV-C/HGVのgenotyping法の開発と地域特異性の検討  
第31回日本肝臓学会西部会、四日市市、平成8年11月29、30日  
肝臓 37(suppl 3):162, 1996.

折戸悦朗、溝上雅史、中野達徳、RR Wu、曹 竑、大羽健一、近藤豊、加藤孝宣、  
向出雅一、引地一昌、上田龍三  
Competitive RT-PCR法を用いたC型慢性肝炎に合併したG型肝炎ウイルスのインター  
フェロン治療に対する反応性についての検討  
第31回日本肝臓学会西部会、四日市市、平成8年11月29、30日  
肝臓 37(suppl 3):167, 1996.

中野達徳、溝上雅史、折戸悦朗、大羽健一、近藤豊、加藤孝宣、RR Wu、曹 竑、  
上田龍三、向出雅一  
各種血液疾患患者中のGBV-C/HGV感染  
第31回日本肝臓学会西部会、四日市市、平成8年11月29、30日  
肝臓 37(suppl 3):168, 1996.

### 【平成9年】

Y Kondo, M Mizokami, K Cao, T Nakano, T Kato, R Ueda, M Mukaide, K Hikiji, T Oyunsuren,  
D Dorjsuren, JYN Lau.  
Prevalence and molecular epidemiology of GBV-C/hepatitis G virus infection in Mongolia.  
4th international meeting on hepatitis C virus and related viruses. March 7, 1997 Kyoto  
Japan.

### 2. 論文発表：

Etsuro Orito, Masashi Mizokami, Tatsunori Nakano, Rong-Rong Wu, Kun Cao, Ken-Ichi Ohba,  
Ryuzo Ueda, Motokazu Mukaide, Kazumasa Hikiji, Yoshifuji Matsumoto, Shiro Iino.  
GB virus C/hepatitis G virus infection among Japanese patients with chronic liver diseases  
and blood donors.  
*Virus Research* 46: 89-93, 1996.

Rong-Rong Wu, Masashi Mizokami, Kun Cao, Tatsunori Nakano, Xian-Min Ge, Su-Seng  
Wang, Etsuro Orito, Ken-Ichi Ohba, Motokazu Mukaide, Kazumasa Hikiji, Johnson YN  
Lau, Shiro Iino.  
GB virus C/hepatitis G virus infection in Southern China.  
*Journal of Infectious Disease* 175: 168-171, 1997.

Kun Cao, Masashi Mizokami, Etsuro Orito, Ken-Ichi Ohba, Tatsunori Nakano, Yutaka Kondo,  
Takanobu Kato, Ding Shin, Ryuzo Ueda, Shinkan Tokudome,  
Shun-Zhang Yu.  
GB virus C/hepatitis G virus infection in patients with primary hepatocellular carcinoma in H-  
city, China- a case controlled study  
(submitted to International Hepatology Communications)

日本財団補助金による

1996 年度日中医学協力事業助成報告書

- 在留中国人研究者研究助成 -

1997年 3 月 10 日

財団法人 日中医学協会

理事長 中島 章 殿

I. 研究者氏名 ヨウ ヴィ ハ 楊 麗 波

研究機関 山梨医科大学臨床検査医学講座 研究指導者 久米章司 職名 教授

所在地 〒409-38 山梨県中巨摩郡五穂町下河東110 電話 0552-73-1111 内線 2578

II. 過去の研究歴

III. 過去の研究実績

1. 楊 麗波、服部 晃ら：黄連解毒湯の血小板凝集・放出能、形態、活性化血小板の発現に及ぼす影響。臨床と研究・69巻9号：314-316, 1992.
2. 楊 麗波、服部 晃ら：黄連解毒湯の血小板の形態、機能、活性化血小板の発現に及ぼす影響。第54回日本血液学会，平成4年4月9-11日・東京。
3. 楊 麗波、布施一郎、服部 晃ら：黄連解毒湯の血小板機能に及ぼす影響—続報—。第34回 日本臨床血液学会，平成4年11月5-7日・大阪。
4. 楊 麗波、布施一郎、服部 晃ら：血小板の adrenalin potentiation に関する形態学の研究—第一報—。第56回 日本血液学会，平成6年5月11-13日・新潟。
5. Libo Yang, Akira Hattori et al: Studies on Platelet Adrenalin Potentiation. The Third Japanese-Chinese Symposium on Coagulation, Fibrinolysis, and Platelets. Held in Kobe, Japan, from October 4-6, 1994.
6. 楊 麗波、服部 晃：散乱光による血小板測定の見直し。第一報。第57回 日本血液学会，平成7年6月29-7月1日・名古屋。
7. 楊 麗波、服部 晃：散乱光を利用した血小板凝集計 PA-100の見直し。第二報。第18回 日本血栓止血学会，平成7年11月30-12月1日・福岡。

IV. 本年度の研究業績

(1) 学会、研究会等における口頭発表 (学会名・内容)

1. 楊 麗波、矢富 裕ら：血小板活性化反応における Sphingosine 1-Phosphate と Lysophosphatidic acid の相互作用。第58回日本血液学会，平成8年4月17-19日・宇都宮。
2. 楊 麗波、矢富 裕ら：血小板におけるスフィンゴ脂質の代謝。第19回 日本血栓止血学会，平成8年11月6-7日・甲府。
3. 楊 麗波、矢富 裕、尾崎由基男ら：血小板におけるセロトニンとエピネフリンの相乗作用。第二回関東甲信越セロトニン研究会、平成9年1月18日・東京。

(2) 学会誌等に発表した論文 無 ・ (有) (雑誌名・論文名)

別紙参照

V. 今後の研究計画及び希望

山梨医科大学大学院に入学してより二年間、活性化血小板の検出と血小板活性化機構という、血栓止血学の重要テーマに関して研究を行い、英文誌発表を含め、着実に成果をあげている。大学院卒業までの残り2年間も、同テーマに関し、精力的に研究を続けていきたい。

VI. 研 究 報 告 (日本語、又は英語で書いて下さい。2,000字程度で記載して下さい。)

1. 活性化血小板の検出：散乱光を用いた血小板凝集能測定

動脈硬化症や血栓症の発症における、血小板の重要な役割は広く認識されている。その点で、生体内の活性化血小板を客観的に評価することが、きわめて重要と考えられている。従来より使用されている、透過光を用いた血小板凝集測定法は、感度が悪く、血栓形成傾向症例においても、血小板機能の亢進を評価することは困難であった。

当教室では、散乱光を用いた新しい血小板凝集計を開発し、その臨床応用を試みている。この方法を用いると、非常に感度良く血小板凝集塊の生成を検知することができ、活性化血小板の検知、抗血小板剤の評価等にたいへん有効であることが確認されている。

今回、我々は、この鋭敏な方法を用い、作用は弱いものの生理的アゴニストとして重要であるセロトニンとエピネフリンの相乗作用の機序を解析した(研究会発表3)。

さらに現在、各種抗血小板剤の血小板凝集能に対する影響を、散乱光法と透過光法の両者で、詳細に比較検討を行っている。

2. 血小板活性化機構

a. 血小板蛋白質チロシンリン酸化反応の解析

血小板における、蛋白質チロシンリン酸化反応の重要性は広く認められているものの、具体的な機能との関連については不明の部分が多く、血小板研究の重要な課題である。当教室では、非受容体型チロシンキナーゼである Syk に関して詳細な検討を続けている。今回、我々は、リゾリン脂質である、スフィンゴシン1リン酸とリゾフォスファチジン酸による Syk の活性化を初めて報告した(別紙発表論文1)。

現在、Syk と Src の無傷血小板における結合様式を、GST 融合蛋白質を用いて検討している。

b. 血小板におけるスフィンゴ脂質の代謝

スフィンゴ脂質は、細胞増殖・分化やアポトーシスにおける重要な作用が報告されているが、血小板における機能・代謝には不明の点が多い。

今回、我々は、スフィンゴシン、セラミド、ジメチルスフィンゴシンの代謝を、アイソトープ標識化合物を用いて検討した。スフィンゴシンは、血小板活性化の有無にかかわらず、速やかにスフィンゴシン1リン酸に代謝される。ジメチルスフィンゴシンは、血小板をトロンビン等で刺激した時のみ、リン酸化される。C<sub>2</sub>-セラミドは安定で、代謝を受けなかった(学会発表2)。

以上の研究を行うにあたり、日本財団補助金による1996年度日中医学協力事業助成のご援助をいただきました。厚く、御礼申し上げます。

VII. 指導教官の意見

本研究者(楊麗波)は、現在、山梨医科大学臨床検査医学大学院2年生である。これまで、活性化血小板の検出、血小板活性化機構の解明という、血栓止血学の重要テーマに取り組んできた。研究態度は良好であり、連日、実験・勉強に励んでいる。既に、一流英文誌に5報(うち筆頭者として1報)の論文を発表し、現在も新たに論文投稿準備を進めている。残り2年間に於いて、さらに研究者としての発展が期待できる。

1. Satoh, K., Ozaki, Y., Asazuma, N., Yatomi, Y., Qi, R., Kuroda, K., Yang, L., and Kume, S. Differential mobilization of tyrosine kinases in human platelets stimulated with thrombin or thrombin receptor agonist peptide. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 225: 1084-1089, 1996.
2. Satoh, K., Ozaki, Y., Qi, R., Yang, L., Asazuma, N., Yatomi, Y., and Kume, S. Factors that affect the size of platelet aggregates in epinephrine-induced activation: a study using the particle counting method based upon light scattering. *Thromb. Res.* 81: 515-523, 1996.
3. Qi, R., Ozaki, Y., Satoh, K., Yang, L., Asazuma, N., Yatomi, Y., and Kume, S. Intracellular levels of cAMP and cGMP differentially modify platelet aggregate size in platelets activated with epinephrine or ADP. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 28: 215-222, 1996.
4. Yang, L., Yatomi, Y., Hisano, N., Qi, R., Asazuma, N., Satoh, K., Igarashi, Y., Ozaki, Y., and Kume, S. Activation of protein-tyrosine kinase Syk in human platelets stimulated with lysophosphatidic acid or sphingosine 1-phosphate. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 229: 440-444, 1996.
5. Yatomi, Y., Igarashi, Y., Yang, Y., Hisano, N., Qi, R., Asazuma, N., Satoh, K., Ozaki, Y., and Kume, S. Sphingosine 1-phosphate, a bioactive sphingolipid abundantly stored in platelets, is a normal constituent of human plasma and serum. *J. Biochem.* 1997 (in press).

## Activation of Protein-Tyrosine Kinase Syk in Human Platelets Stimulated with Lysophosphatidic Acid or Sphingosine 1-Phosphate

Libo Yang, Yutaka Yatomi,<sup>1</sup> Nobuo Hisano, Ruomei Qi, Naoki Asazuma, Kaneo Satoh, Yasuyuki Igarashi,\* Yukio Ozaki, and Shoji Kume

*Department of Laboratory Medicine, Yamanashi Medical University, Yamanashi, Japan; and  
\*Fred Hutchinson Cancer Research Center, Seattle, Washington 98104*

Received August 26, 1996

It has been reported that not only lysophosphatidic acid (LPA) but also its sphingolipid counterpart, sphingosine 1-phosphate (Sph-1-P), induce platelet functional responses. We report here Syk activation in human platelets stimulated with these lysophospholipids. LPA rapidly induced platelet protein-tyrosine phosphorylation, including that of Syk, and Syk activation, assessed by immunoprecipitation kinase assay. Sph-1-P, although rather weaker, mimicked LPA in inducing these tyrosine kinase-related events. Pretreatment of platelets with staurosporine, a potent protein kinase inhibitor, diminished LPA-induced Syk phosphorylation and activation, but not intracellular  $Ca^{2+}$  mobilization. These results demonstrate that, in platelets, the bioactive lysophospholipids induce Syk activation, which, however, may not be related to  $Ca^{2+}$  mobilization. © 1996 Academic Press, Inc.

Blood platelets play a central role in hemostasis, while overactive platelets are implicated in the pathogenesis of thrombosis and atherosclerosis. Investigation of the mechanism(s) for platelet activation is important for therapeutic purposes and is expected to have general implications for other cell types, as a model system for working out stimulus-response coupling pathways. Platelets can be activated by a variety of agonists, and lysophosphatidic acid (LPA), the simplest natural glycerophospholipid, is one of the established platelet agonists (1, 2). Furthermore, this bioactive phospholipid is released from activated platelets and is present in serum at physiologically relevant concentrations (3). Therefore, LPA is assumed to act as a local mediator, following discharge from platelets, to regulate cellular functions in an autocrine (or paracrine) fashion (3). Recently, sphingosine 1-phosphate (Sph-1-P), a lysosphingolipid structurally similar to LPA, has also been added to the list of bioactive lipids, capable of activating platelets and released from activated platelets (4, 5). Although the role of these lysophospholipids as autocrine stimulators of platelet aggregation has been proposed (1, 3, 4), the signaling pathway(s) by which they activate platelets are ill-defined.

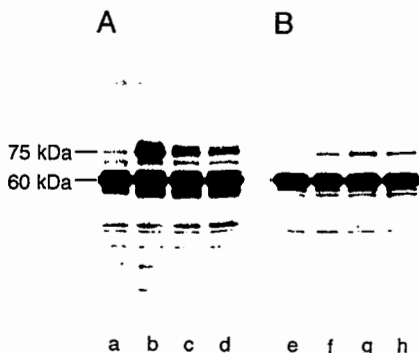
In this study, we investigated the biochemical mechanisms of platelet activation induced by these lysophospholipids with reference to tyrosine phosphorylation-related events, especially Syk activation, since an increasing body of evidence has suggested an important role of Syk for platelet activation (6, 7).

### MATERIALS AND METHODS

*Materials.* Sph-1-P was prepared from sphingosylphosphocholine with bacterial phospholipase D as described previously (8). The following materials were obtained from the indicated suppliers: LPA and enolase (Sigma, St. Louis, MO); staurosporine (Kyowa Medex, Tokyo, Japan); prostaglandin  $E_1$  ( $PGE_1$ ) (Funakoshi, Tokyo, Japan);

<sup>1</sup> Corresponding author: Department of Laboratory Medicine, Yamanashi Medical University, Tamaho-cho, Nakakoma-gun, Yamanashi 409-38, Japan. Fax: +81-552-73-6713.





**FIG. 1.** Platelet protein-tyrosine phosphorylation induced by LPA or Sph-1-P. Human platelets were stimulated with 40  $\mu$ M LPA (A) or Sph-1-P (B) for 0 s (a and e), 15 s (b and f), 1 min (c and g), and 5 min (d and h). Platelet protein lysates were separated by SDS-PAGE, and tyrosine-phosphorylated proteins were detected by Western blotting using anti-phosphotyrosine MoAb (4G10).

monoclonal antibody (MoAb) against phosphotyrosine (4G10) (Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY); MoAb against Syk (Wako Chemicals, Tokyo, Japan); fura2-AM (Dojin Chemicals, Kumamoto, Japan).

Human platelets were isolated from the blood of healthy adult volunteers and handled as described previously (7).

**Immunoblot analysis.** Platelet proteins were separated, electroblotted, and probed with MoAb against phosphotyrosine or Syk as described previously (7).

**Immunoprecipitation kinase assay.** Immunoprecipitation of platelet lysates with MoAb against Syk was performed as described previously (7). The immunoprecipitates were used for immunoblotting, as described above, or processed further for *in vitro* kinase assay. *In vitro* kinase assay, using acid-treated enolase as exogenous substrate, was performed as described previously (7).

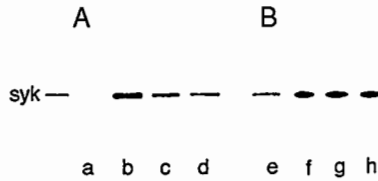
**Measurement of intracellular  $Ca^{2+}$  concentration ( $[Ca^{2+}]_i$ ).**  $[Ca^{2+}]_i$  measurement was performed with the use of  $Ca^{2+}$ -sensitive fluorophore fura2 as described previously (7), except that fluorescence measurements were made using a FS100 (Kowa, Tokyo, Japan). The  $[Ca^{2+}]_i$  values were determined from the ratio of fura2 fluorescence intensity at 340 and 380 nm excitation (9). The data shown in this study are those obtained from platelets supplemented with 1 mM EGTA to abolish the influx of extracellular  $Ca^{2+}$ .

## RESULTS

We first examined platelet protein-tyrosine phosphorylation induced by LPA or Sph-1-P (Fig. 1). Among a set of tyrosine-phosphorylated proteins which appeared upon stimulation with LPA, a 75 kDa protein was most heavily and rapidly tyrosine-phosphorylated one (Fig. 1A). Its tyrosine phosphorylation reached maximum as early as 15 s, and then decreased in intensity thereafter. Sph-1-P also induced tyrosine phosphorylation mainly of a 75 kDa protein, but with a slower time course (Fig. 1B). Since the 75 kDa protein band had been suggested to include Syk (and cortactin), based on our previous study using collagen-induced platelets (10), we investigated whether Syk was phosphorylated on tyrosine residues upon stimulation with these phospholipids. Syk was immunoprecipitated with anti-Syk MoAb and analyzed on immunoblots using anti-phosphotyrosine MoAb (Fig. 2). As expected, tyrosine phosphorylation of Syk increased after stimulation of platelets with LPA (Fig. 2A) or Sph-1-P (Fig. 2B). The level of tyrosine phosphorylation paralleled that of a 75 kDa protein observed in Fig. 1.

We next studied Syk tyrosine kinase activity using acid-treated enolase as an exogenous substrate. The enolase phosphorylation activity of Syk increased upon stimulation with LPA (Fig. 3A) or Sph-1-P (Fig. 3B). In these experiments, the amounts of immunoprecipitated Syk were not affected by stimulation of platelets with LPA or Sph-1-P (data not shown). Thus, it is likely that the increase in the enolase phosphorylation activity in the immunoprecipitates was due to an increase in the specific activity of Syk.

From the results described above, platelets were confirmed to undergo Syk phosphorylation

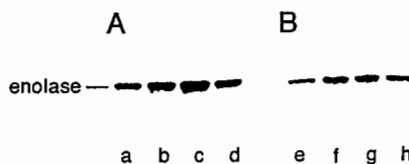


**FIG. 2.** Tyrosine phosphorylation of Syk in platelets stimulated with LPA or Sph-1-P. Platelets were stimulated with  $40 \mu\text{M}$  LPA (A) or Sph-1-P (B) for 0 s (a and e), 15 s (b and f), 1 min (c and g), and 5 min (d and h). Platelet protein lysates were immunoprecipitated with anti-Syk MoAb. Immunoprecipitates were then subjected to Western blotting using anti-phosphotyrosine MoAb.

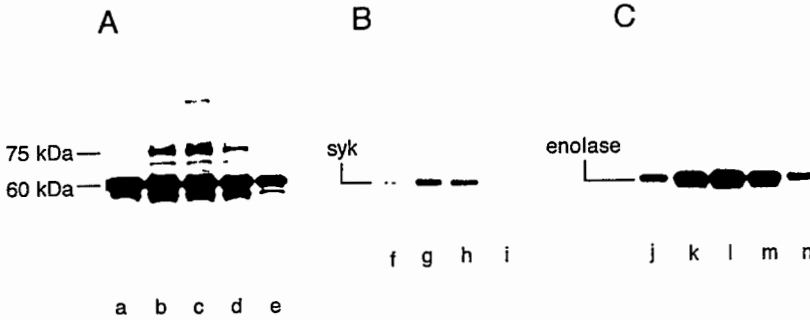
and activation upon stimulation with the lysophospholipids (LPA and Sph-1-P). It is well established that intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  mobilization plays a pivotal role in platelet activation induced by most agonists, including LPA (2) and Sph-1-P (4). Since the effect of LPA was stronger than that of Sph-1-P, we evaluated the involvement of Syk activation in intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  mobilization, using LPA-stimulated platelets. For this purpose, we used staurosporine, a very powerful inhibitor of protein kinases (including tyrosine kinases) (11); we previously found that staurosporine was the strongest inhibitor of tyrosine kinase(s) in platelets, although its effect was not so specific (12). LPA-induced whole platelet tyrosine phosphorylation (Fig. 4A), Syk tyrosine phosphorylation (Fig. 4B), and Syk kinase activation (Fig. 4C) were all inhibited by pretreatment of platelets with staurosporine ( $1 \mu\text{M}$ ). In contrast, intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  mobilization induced by LPA was only slightly inhibited by this treatment (Fig. 5). This protein kinase inhibitor inhibited the  $\text{Ca}^{2+}$  mobilization by  $36.9 \pm 1.2\%$  (mean  $\pm$  SD,  $n = 3$ ), while  $\text{PGE}_1$ , which inhibits platelet activation by elevating intracellular cAMP (13), completely inhibited LPA-induced intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  mobilization (Fig. 5, lower panel).

## DISCUSSION

The lysophospholipids LPA and Sph-1-P, as bioactive lipids, are attracting much interest. Recently, their role as autocrine stimulators of platelets has been proposed, since they are released from activated platelets and their exogenous addition results in platelet activation (1-5). However, the mechanism by which these lipids activate platelets is ill-defined. In this study, we found that Syk, the non-receptor tyrosine kinase which is selectively expressed in hematopoietic cells (6), is tyrosine-phosphorylated and activated by LPA and Sph-1-P. To our knowledge, this is the first to show Syk involvement in the LPA- or Sph-1-P-mediated cell signal transduction. This is probably because elucidation of the cell signaling induced by these lysophospholipids has been performed mainly in non-hematopoietic cells such as fibroblasts and smooth muscle cells (where Syk is not expressed) (1, 14). It is now considered that LPA acts on its cognate G protein-coupled receptor(s), apparently present in many different cell

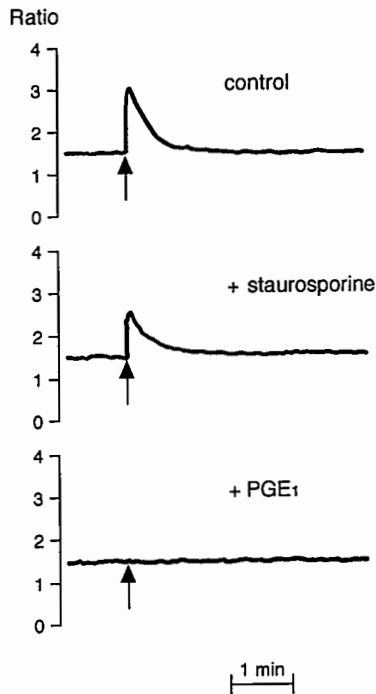


**FIG. 3.** Activation of Syk in platelets stimulated with LPA or Sph-1-P. Platelets were stimulated with  $40 \mu\text{M}$  LPA (A) or Sph-1-P (B) for 0 s (a and e), 15 s (b and f), 1 min (c and g), and 5 min (d and h). Platelet protein lysates were immunoprecipitated with anti-Syk MoAb. Immunoprecipitates were then subjected to *in vitro* kinase assay using enolase as exogenous substrate.



**FIG. 4.** Inhibition by staurosporine of LPA-induced platelet protein-tyrosine phosphorylation, Syk tyrosine phosphorylation, and Syk activation. Platelets were preincubated for 5 min in the absence (a, b, f, g, j, and k) or presence of 10 nM (c and l), 100 nM (d, h, and m) and 1 μM (e, i, and n) staurosporine and then stimulated without (a, f, and j) or with (b-e, g-i, and k-n) 40 μM LPA. Lysate samples were processed for protein-tyrosine phosphorylation (A), Syk tyrosine phosphorylation (B), and Syk activation (*in vitro* kinase assay using enolase as exogenous substrate) (C). Incubation times of LPA were 15 s in (A) and (B), and 1 min in (C).

types (1). Based on cross-linking experiments, a putative LPA receptor with an apparent molecular mass of 38-40 kDa has been reported in LPA-responsive cells and mammalian brain (15). As for Sph-1-P, the site of action is controversial; some researchers have postulated the existence of cell surface receptor for this phosphorylated Sph (16, 17), while others have proposed Sph-1-P as an intracellular second messenger (18, 19). Elucidation of the mechanism



**FIG. 5.** Effects of staurosporine or PGE<sub>1</sub> on LPA-induced intracellular Ca<sup>2+</sup> mobilization. Fura2-loaded platelets were preincubated for 5 min in the absence (upper panel) or presence of 1 μM staurosporine (middle panel) or PGE<sub>1</sub> (lower panel), and stimulated with 20 μM LPA. Changes in intracellular Ca<sup>2+</sup> concentration were measured as described under Materials and Methods. Arrows indicate the addition of LPA.

for Syk activation in signal transduction initiated by cell surface receptors for LPA (and Sph-1-P) may provide an insight into the signaling mediated by these lysophospholipids, which would have general implications for other cell types.

Although the information on Syk-mediated downstream signaling has been fragmentary, Syk involvement in intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  mobilization has been suggested in platelets (6, 20). This has been demonstrated using platelets stimulated with PAF (platelet-activating factor) (20), which is also an important lipid mediator, as well as LPA and Sph-1-P, involved in physiological platelet activation (13). In this context, it should be noted that staurosporine failed to abolish  $\text{Ca}^{2+}$  mobilization induced by LPA in spite of its inhibition of Syk phosphorylation and activation, suggesting the discrepancy between Syk activation and  $\text{Ca}^{2+}$  mobilization in LPA-stimulated platelet activation. It seems that various lipid mediators activate platelets in their own ways.

### ACKNOWLEDGMENT

This work was supported in part by a Grant-in-Aid for Scientific Research from the Ministry of Education, Science, and Culture, Japan.

### REFERENCES

1. Moolenaar, W. H. (1995) *J. Biol. Chem.* **270**, 12949–12952.
2. Watson, S. P., McConnell, R. T., and Lapetina, E. G. (1985) *Biochem. J.* **232**, 61–66.
3. Eichholtz, T., Jalink, K., Fahrenfort, I., and Moolenaar, W. H. (1993) *Biochem. J.* **291**, 677–680.
4. Yatomi, Y., Ruan, F., Hakomori, S., and Igarashi, Y. (1995) *Blood* **86**, 193–202.
5. Yatomi, Y., Ruan, F., Ohta, H., Welch, R. J., Hakomori, S., and Igarashi, Y. (1995) *Anal. Biochem.* **230**, 315–320.
6. Yanagi, S., Kurosaki, T., and Yamamura, H. (1995) *Cell. Signalling* **7**, 185–193.
7. Ozaki, Y., Satoh, K., Kuroda, K., Qi, R., Yatomi, Y., Yanagi, S., Sada, K., Yamamura, H., Yanabu, M., Nomura, S., and Kume, S. (1995) *J. Biol. Chem.* **270**, 15119–15124.
8. Van Veldhoven, P. P., Foglesong, R. J., and Bell, R. M. (1989) *J. Lipid Res.* **30**, 611–616.
9. Gryniewicz, G., Poenie, M., and Tsien, R. Y. (1985) *J. Biol. Chem.* **260**, 3440–3450.
10. Asazuma, N., Yatomi, Y., Ozaki, Y., Qi, R., Kuroda, K., Satoh, K., and Kume, S. (1996) *Thromb. Haemostas.* **75**, 648–654.
11. Tamaoki, T. (1991) *Methods Enzymol.* **201**, 340–347.
12. Yatomi, Y., Ozaki, Y., Satoh, K., and Kume, S. (1994) *Biochim. Biophys. Acta* **1212**, 337–344.
13. Siess, W. (1989) *Physiol. Rev.* **69**, 58–178.
14. Spiegel, S., and Milstien, S. (1995) *J. Membrane Biol.* **146**, 225–237.
15. van der Bend, R. L., Brunner, J., Jalink, K., van Corven, E. J., Moolenaar, W. H., and van Blitterswijk, W. J. (1992) *EMBO J.* **11**, 2495–2501.
16. van Koppen, C. J., zu Heringdorf, D. M., Laser, K. T., Zhang, C., Jakobs, K. H., Bunemann, M., and Pott, L. (1996) *J. Biol. Chem.* **271**, 2082–2087.
17. Postma, F. R., Jalink, K., Hengeveld, T., and Moolenaar, W. H. (1996) *EMBO J.* **15**, 2388–2395.
18. Olivera, A., and Spiegel, S. (1993) *Nature* **365**, 557–560.
19. Choi, O. H., Kim, J.-H., and Kinet, J.-P. (1996) *Nature* **380**, 634–636.
20. Rezaul, K., Yanagi, S., Sada, K., Taniguchi, T., and Yamamura, H. (1994) *Thromb. Haemostas.* **72**, 937–941.

日本財団補助金による

1996年度日中医学協力事業助成報告書

- 在留中国人研究者研究助成 -

1997年 3 月 4 日

財団法人 日中医学協会  
理事長 中島 章 殿

I. 研究者氏名 潘 静  
研究機関 慶応義塾大学呼吸循環器内科 研究指導者 福田 恵一 職名 助手  
所在地 〒160 東京都新宿区信濃町 35 番地 電話 03-3353-1211 内線 2310

II. 過去の研究歴

過去数年間、ラットなどの心筋梗塞モデル及びラット新生児の培養細胞を用いて、CO<sub>2</sub> Laser Transmyocardial revascularization により、虚血心筋への保護作用を研究してきた。1995年6月から心筋細胞において Angiotensin II などのサイトカインと JAK-STAT シグナル伝達経路の関与について研究を始めた。

III. 過去の研究実績

1. Laser Transmyocardial revascularization により、虚血心筋への保護作用を明らかにした。これらの成果は学会誌等に発表した。
2. 心筋細胞では、in vitro において Angiotensin II は JAK-STAT シグナル伝達系を介して、心筋細胞を肥大させることを明らかにした。研究成果は日本循環器学会、アメリカ心臓病学会にて報告した。

IV. 本年度の研究業績

(1) 学会、研究会等における口頭発表 (学会名・内容)

- I. 1997年日本循環器学会 1. ラット圧負荷肥大心における JAK-STAT シグナル伝達系の活性化と Angiotensin II の関与 2. ラット圧負荷肥大心における Cardiotrophin-1 の発現亢進と JAK-STAT シグナル伝達系の活性化  
II. 1996年、69th アメリカ心臓病学会: 1. Angiotensin II directly stimulates JAK/STAT pathway through AT-1 receptor in rat cardiomyocyte. 2. LIF, a potent Cardiac Hypertrophic cytokine, Activates JAK/STAT pathway in Cardiac Myocyte.

(2) 学会誌等に発表した論文 (無) ・ 有 (雑誌名・論文名)

V. 今後の研究計画及び希望

in vitro の培養細胞を用いて、実験的心肥大において JAK-STAT 系を活性化する経路として何の因子が関与しているかを研究する予定です。希望としては、日本でもっと勉強して、いろいろな技術を身につけて、中国へ帰ると、これらの技術をいかして、つづけて循環器疾患の研究をすること。

VI. 研究報告 (日本語、又は英語で書いて下さい。2,000字程度で記載して下さい。)

心筋細胞にとって肥大現象は重要な生理学的適応現象であるが、その機序はいまだ完全には明らかになっていない。最近の研究により Angiotensin II や、種々のサイトカインによって心筋細胞肥大を受けることが推測されている。これらのサイトカインは JAK-STAT pathway を介してシグナル伝達を行うことが知られている。しかし in vivo の心臓でこれらのサイトカインが実際に心肥大の形成に関与するかどうかは明らかではない。in vivo の心臓で JAK-STAT 系が心肥大の形成に重要な働きを持つのか否かを明らかにすることを目的として本研究を開始した。ラットの大動脈結紮による圧負荷心肥大モデルを作成し、JAK-STAT 系のシグナル伝達の活性化を分子生物学の方法や、免疫組織学的方法により研究した。圧負荷刺激を受けた心筋組織をホモジネートし、JAK、STAT の抗体を使って免疫沈降し、そして SDS-PAGE および Western blotting を行って、p-酸化チロシンの抗体でこれらの p-酸化の状態を検出した。また肥大刺激された心筋の核蛋白質を抽出し、Gel mobility shift assay を用いて、STAT が細胞質から核内に移動するのを、および STAT の転写活性化を検出した。さらに Angiotensin 転換酵素阻害剤や、Angiotensin II 受容体 II 型 blocker を使用して、Angiotensin II が圧負荷際の JAK-STAT シグナル伝達系の活性化との関与を明らかにした。その結果、ラットの大動脈結紮による圧負荷心肥大モデルでは JAK1、JAK2、Tyk2 がチロシリンと酸化されること、および STAT1、STAT2、STAT3 がチロシリンと酸化されることを明らかにした。この活性化に伴い GAS/ISRE および SIE の Gel shift が観察され、心肥大時には JAK-STAT シグナル伝達系が関与していることを明らかにした。さらに Angiotensin II 受容体 II 型 blocker などを用いて研究した結果、圧負荷肥大心における JAK kinase の活性化には Angiotensin II-dependent と independent の経路があることが示された。これらの成果は日本循環器学会、アメリカ心臓病学会にて報告した。今後、心肥大における JAK-STAT シグナル伝達系の活性化は Angiotensin II 以外、ほかのサイトカイン (Cardiotrophin-1, leukemia inhibitory factor など) がどの程度関与しているかを研究する予定である。

VII. 指導教官の意見

潘静君は我々の研究グループにおいて精力的に研究を続けてこられ、以下の研究を成就した。すなわち、潘静君はラットの心臓が圧負荷を受けた時に各種シグナル伝達系が活性化されるがこの際に JAK1, JAK2, Tyk2 の3種の JAK kinase family が活性化されること、その下流の STAT1, STAT2, STAT3 がリン酸化されること、さらにこれらの転写因子が活性化され、SIE および GAS/ISRE の転写活性が上昇することを gel shift assay により証明した。さらにこれらの因子の活性化には、angiotensin II dependent と angiotensin II independent の pathway が有ることを明らかにした。この間遺伝子工学の各種研究手法に習熟し、短期間に目覚ましい成長をされた。本研究の成果と潘静君の努力は賞賛に値するものであると確信している。

## ラット圧負荷肥大心におけるJAK-STATシグナル伝達系の活性化と Angiotensin II (Ang II) の関与

慶應義塾大学呼吸循環器内科 潘 静

福田恵一・小玉博明・牧野伸司・馬場彰泰・高橋暁行・

佐野元昭・楠原正俊・堀進悟・小川聡

【目的】我々は培養心筋細胞でAng IIがJAK2, Tyk2, STAT1, STAT2を介したシグナル伝達を行うことを前回報告した。本研究の目的は大動脈結紮によるラット圧負荷肥大心においてJAK-STAT系が活性化されるか否かとこれにAng IIが関与するか否かを明らかにすることである。【方法】ラット(300g)の腹部大動脈を結紮し0, 5, 15, 30, 60分後に心臓を摘出した。(1)JAK1, 2, Tyk2, STAT1-4の抗体により免疫沈降しチロシンリン酸化を観察した。(2)左室心筋の核分画を抽出し, GAS/ISREに対するゲルシフトアッセイを行った。(3)圧負荷後JAK kinaseとAT1受容体の結合が増強するか否かを共免疫沈降法により観察した。(4)AT1受容体拮抗薬E4177およびACE阻害薬cilazapril存在下に(1)の実験を行った。【結果】(1)圧負荷5分後よりJAK1, JAK2, Tyk2のチロシンリン酸化を認めた。STAT1, 3, 4は結紮後5分よりリン酸化を認め, 15分で最大となった。(2)結紮後5分のサンプルよりGAS/ISREのゲルシフトを認め, 30分で最大となった。(3)AT1受容体とJAK2, Tyk2の共免疫沈降は安静時より認められたが, 圧負荷後5分より増強し15分で最大約20倍となった。JAK1との共免疫沈降は認められなかった。(4)E4177およびACE阻害薬cilazapril存在下では圧負荷刺激によるJAK1のリン酸化の抑制は認めなかった。JAK2のリン酸化は部分的に抑制され, Tyk2のリン酸化は著しく抑制された。

【総括】圧負荷肥大心ではJAK-STATを介したシグナル伝達系が活性化された。Ang IIはこのうちTyk2の活性化と一部のJAK2の活性化に関与していた。圧負荷肥大心におけるJAK kinaseの活性化にはAng II-dependentと-independentの経路があることが示された。

## ラット圧負荷肥大心におけるCardiotrophin-1 (CT-1) の発現亢進とJAK-STATシグナル伝達系の活性化

慶應義塾大学呼吸循環器内科 潘 静

福田恵一・小玉博明・牧野伸司・馬場彰泰・高橋暁行・  
佐野元昭・堀進悟・小川聡

【目的】CT-1は培養心筋細胞に対し強力な心肥大作用を持つサイトカインであるが、in vivoにおける生理学的・病態生理学的役割は解明されていない。本研究の目的はラット圧負荷肥大心においてCT-1の発現が亢進するか否かとCT-1のシグナル伝達系であるJAK-STATが活性化されるか否かを明らかにすることである。【方法】(1)ラット(300 g)の腹部大動脈を結紮後0分,30分,1,3,6時間目に心臓を摘出した。RNAを抽出し、CT-1のNorthern Blotを行った。(2)大動脈を結紮後0,5,15,30,60分後に心臓を摘出し、JAK1,2,Tyk2,STAT1,3に対し各抗体により免疫沈降しチロシンリン酸化を観察した。(3)圧負荷後にJAK kinaseとgp130受容体の結合が増強するか否かを共免疫沈降法により観察した。(4)左室心筋より核分画を抽出し、SIEに対するgel shift/super shift assayを行った。【結果】(1)CT-1mRNAは結紮前より発現を認めたが結紮後1時間をpeakとして著しく上昇した。(2)圧負荷5分後よりJAK1,2,Tyk2のリン酸化を認め、60分で最大となった。STAT1,3は結紮後5分よりリン酸化を認めたが、30分で一度減弱しその後60分で再び上昇し最大となった。(3)gp130受容体とJAK1,2,Tyk2の共免疫沈降は安静時より認められたが、圧負荷後5分より増強し15分で最大となった。(4)結紮後15分のサンプルよりSIEのゲルシフトを認め、60分で最大となり以後減少した。【総括】圧負荷肥大心では圧負荷後1時間をpeakとしてCT-1mRNAの発現亢進が観察された。JAK-STAT系のリン酸化およびSIEのgel shiftは圧負荷後早期より活性化が認められたが、peakは1時間でCT-1の発現と一致しており、圧負荷肥大心においてCT-1の関与が示唆された。



# 日本財団補助金による

## 1996年度日中医学協力事業助成報告書

—在留中国人研究者研究助成—

1997年 3月 10日

財団法人 日中医学協会

理事長 中島 章 殿

I. 研究者氏名 虞 穎 (グ エイ)

研究機関 昭和大学医学部第一生理学教室 研究指導者 久光 正 職名 主任教授

所在地 〒142品川区旗の台1-5-8 電話 03-3784-8000 内線 8110

### II. 過去の研究歴

1990年7月-1993年6月 中国輻射防護研究院放射生物効応研究室 助手

1993年6月-1994年3月 昭和大学医学部第一生理学教室 研修生

1994年4月 昭和大学医学部第一生理学教室 特別研究生 現在にいたる

### III. 過去の研究実績

1. Ying Chen, Changju Li, Yuzhong Guo, Baohe Mu, Mellan Cui, Ying Yu, Study on Preventive and Therapeutic Effects of Placenta Factor on Radiation-Induced Damage of Hematopoietic Function (In Chinese), Radiation Protection, Vol 14, No.3, 184-189 (1994)
2. 山本竜隆, 虞 穎, 青木孝志, 日下史章, 瀬戸 明, 郭 試瑜, 佐藤孝雄, 笠原多嘉子, 久光正: 磁気および石英単結晶・筋振波動によるマウス・マクロファージ食食能の増加, 「磁気と生体」研究会誌, Vol.21, No.1, 41-46, 1994
3. 虞 穎, 山本竜隆, 瀬戸 明, 郭 試瑜, 佐藤孝雄, 笠原多嘉子, 久光正: 磁気刺激により上昇したマウス脾臓NK細胞活性および腹腔マクロファージ食食能—磁気の治療効果の免疫生理学的解明を求めて, 日本生体磁気学会誌, Vol 8, No.1, 254-257, May 1995
4. 花川一郎, 山本 竜隆, 郭 試瑜, 虞 穎, 笠原多嘉子, 久光 正, 泉澤 二郎, 松本 清: 交流磁気と血中セロトニン—頭痛症例から—, 「磁気と生体」研究会誌 Vol 22: 19-34, 1995

### IV. 本年度の研究業績

#### (1) 学会、研究会等における口頭発表 (学会名・内容)

1. 虞 穎, 佐藤孝雄, 郭 試瑜, 笠原多嘉子, 久光 正, 1996, 4月 (福井) 第73回日本生理学会大会、ラット足三里相当部位鍼刺激による脾臓NK細胞活性上昇作用。
2. 虞 穎, 山本竜隆, 瀬戸 明, 郭 試瑜, 佐藤孝雄, 笠原多嘉子, 久光正, 1996, 6月 (東京大学) 第11回日本生体磁気学会大会、静磁場曝磁によるマウス生体防御能の増強: Biological Response Modifierとの協力作用の観察。

#### (2) 学会誌等に発表した論文 無 ・ (有) (雑誌名・論文名)

1. Ying Yu, Takako Kasahara, Takao Sato, Shi-Yu Guo, Yan-Qing Liu, Kazuhiro Asano and Tadashi Hisamitsu: Enhancement of Splenic Interferon- $\gamma$ , Interleukin-2 and NK cytotoxicity by S36 Acupoint Acupuncture in F344 Rats, Jpn. J. Physiol. 47, in press (1997)
2. T. Sato, Y. Yu, S.Y. Guo, T. Kasahara and T. Hisamitsu, Acupuncture Stimulation Enhanced the Splenic Natural Killer Cell Cytotoxicity in Rats, Jpn. J. Physiol. Vol.46, 131-136 (1996).
3. 虞 穎, 山本竜隆, 瀬戸 明, 郭 試瑜, 佐藤孝雄, 笠原多嘉子, 久光正: 静磁場曝磁によるマウス生体防御能の増強: Biological Response Modifierとの協力作用の観察, 日本生体磁気学会誌, Vol.9, No.1, 82-83, May 1996
4. 久光正, 笠原多嘉子, 虞 穎, 瀬戸明, 浅野和仁: 交流磁気(50Hz)によるヒト前骨髄性白血病細胞アポト-シス(細胞のプログラム死)の特異的誘導 —in vitro HL-60細胞DNAの断片化促進— 日本生体磁気学会誌, Vol.9, No.1, 86-89, May 1996

### V. 今後の研究計画及び希望

免疫系に神経系の活動が影響をおよぼすことが明らかになっているが、その詳細な機序については多くの疑問点が残されている。今後、特に中枢神経系や自律神経の活動経路や興奮伝達物質についての研究を継続して行いたい。

VI. 研 究 報 告 (日本語、又は英語で書いて下さい。2,000字程度で記載して下さい。)

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

VII. 指導教官の意見

廣 穎 君は 本学第一生理学教室で神経と免疫に関連した多くの研究プロジェクトに参加し、非常に熱心に研究を行なった。この分野の研究は世界的にもまだ数少なく、今後さらに研究テーマがひろがるものと思われる。廣 穎 君が活躍する機会も多いと信じている。本年度の助成に感謝すると共に、今後も可能な援助をお願いしたい。今後の廣 穎 君の発展が中医学の進歩に大いに役立つものと信じている。

昭和大学医学部第一生理学教室

主任教授

久光 正



日本財団補助金による

1996年度日中医学協力事業助成報告書

－在留中国人研究者研究助成－

年 月 日

財団法人 日中医学協会

理事長 中島 章 殿

I. 研究者氏名 \_\_\_\_\_

研究機関 \_\_\_\_\_ 研究指導者 \_\_\_\_\_ 職名 \_\_\_\_\_

所在地 〒 \_\_\_\_\_ 電話 \_\_\_\_\_ 内線 \_\_\_\_\_

II. 過去の研究歴

---

---

---

III. 過去の研究実績

---

---

---

---

IV. 本年度の研究業績

(1) 学会、研究会等における口頭発表 (学会名・内容)

---

---

---

---

(2) 学会誌等に発表した論文 無 ・ 有 (雑誌名・論文名)

---

---

---

---

V. 今後の研究計画及び希望

---

---

---

## 研 究 報 告

本年度、日中医学協力事業助成を受けることができ大変に感謝しております。本助成を有効に使用し、昭和大学医学部第一生理学教室において、次のような多くの研究成果をあげることができました。

### A. 論文

1、Ying Yu, Takako Kasahara, Takao Sato, Shi-Yu Guo, Yan-Qing Liu, Kazuhito Asano and Tadashi Hisamitsu: Enhancement of Splenic Interferon- $\gamma$ , Interleukin-2 and NK Cytotoxicity by S36 Acupoint Acupuncture in F344 Rats, *Jpn. J. Physiol.* Vol 47(2), in press (1997)

別刷ができ上がり次第提出。

2、T. Sato, Y. Yu, S.Y. Guo, T. Kasahara and T. Hisamitsu: Acupuncture Stimulation Enhanced the Splenic Natural Killer Cell Cytotoxicity in Rats, *Jpn. J. Physiol.* Vol.46(2), 131-136 (1996).

3、虞 穎, 山本竜隆, 瀬戸 明, 郭試瑜, 佐藤孝雄, 笠原多嘉子, 久光正: 静磁場曝磁によるマウス生体防御能の増強: Biological Response Modifierとの協力作用の観察, *日本生体磁気学会会誌*, Vol.9, No.1, 82-83, May 1996

4、久光正, 笠原多嘉子; 虞 穎, 瀬戸明, 浅野和仁: 交流磁気(50Hz)によるヒト前骨髄性白血病細胞アポトーシス(細胞のプログラム死)の特異的誘導 -in vitro HL-60細胞DNAの断片化促進- *日本生体磁気学会会誌*, Vol.9, No.1, 86-89, May 1996

5、成田和広, 虞 穎, 瀬戸 明, 浅野和仁, 朝比奈茂, 佐原正明, 笠原多嘉子, 久光正: 超低周波交流磁気の非熱効果による白血病細胞のアポトーシス誘導, 「磁気と生体」研究会誌 Vol 23 : 3-9, 1996

### B. 学会抄録

1、Yu, Y., Sato, T., Kasahara, T., Guo, S.Y., & Hisamitsu, T: Enhancement of Splenic Natural Killer(NK) Cytotoxicity by Tsusanli (S36) Acupuncture Point Stimulation in Rats. *Jpn J Physiol* 46 ( Suppl ) s222, 845, 1996

2、郭 試瑜、佐藤孝雄、虞 穎、笠原多嘉子、久光 正(1996)水浸拘束ストレスのラット脾臓NK細胞活性抑制作用に対する脾臓交感神経の関与、*ストレス科学* (第11回 日本ストレス学会学術総会 抄録集) Vol. 11, No.2, 86, 1996

3、T. Hisamitsu, Ying Yu, Takako Kasahara, Takao Sato, Shi-Yu Guo, Yan-Qing Liu and Kazuhito Asano: Roles of Interleukin-2 and Interferon- $\gamma$  on the Enhancement of Splenic Natural Killer (NK) Cytotoxicity by Acupuncture Stimulation in F344 Rats. the 4th World Conference on Acupuncture (W.F.A.S.), Program & Abstracts 332, 1996

研究テーマ: **Enhancement of Splenic Interferon- $\gamma$ , Interleukin-2 and NK Cytotoxicity by S36 Acupoint Acupuncture in F344 Rats**

研究内容:

### **Introduction**

Acupuncture is well known as one of the Chinese traditional medical treatments and it is used for health maintenance throughout the world. In recent years, it has been reported that acupuncture stimulation applied to a specific location of the human body, such as the Tsusanli acupoint (S36 acupoint), favorably modulates the immune function of HBsAg carrier and decreases the HBsAg positive rates. Combined acupuncture and moxibustion on supplementary acupoints inhibits the development of cancer cells and results in a prolonged survival of cancer patients.

There is an established concept that NK cells are important as the first line of host defense and as one of the final effector cells against certain tumors, viruses and infections. Several cytokines have been shown to affect NK cell proliferation or cytolytic activity. Of these, IL-2 and IFN- $\gamma$  have been the most extensively studied. They have been proved to augment the cytolytic activity of NK cells to attach to tumor cells and viruses and kill these organisms. These reports may suggest that acupuncture enhances NK cell activities and results in favorable modification of the clinical conditions in the patients described above.

Our previous report and unpublished data revealed that successive acupuncture treatment applied to S36 acupoint (but not to the abdominal muscle) for three days enhanced splenic NK cytotoxicity, which peaked ( $p < 0.01$ ) on the first day after final treatment and gradually declined thereafter in Wistar rats. However, the mechanism of acupuncture on NK cell activities is unknown. The present study was designed to examine the possible mechanism of acupuncture on NK cell activities in an inbred strain of F344 rats.

### **Materials and Methods**

#### *Experimental design:*

Electro-acupuncture stimulation was carried out between 3:00 P.M. and 5:00 P.M. for three days. Non-acupunctured control rats were restrained in acrylic rectangular boxes with no special treatment. On the first day after the final treatment, rats were anesthetized by intraperitoneal injection with 50 mg/kg pentobarbital sodium. The spleens were removed aseptically, divided into two portions and weighed. One portion was used to measure splenic NK cytotoxicity and the remainder was dissolved, weighed, immersed in 500  $\mu$ l cold RPMI 1640 medium, and homogenized by glass tissue homogenizer in an ice cold water bath. The homogenates were then centrifuged at 8000 $\times$ G for 1h at 4 $^{\circ}$ C and the supernatants were collected, sterilized by passing through a 0.22  $\mu$ m filter and stored at -80 $^{\circ}$ C until used for cytokine assay

#### *Acupuncture on S36 acupoint and abdominal muscle in Inbred F344 rats*

Electro-acupuncture stimulation was applied to S36 acupoint and abdominal muscle.

Briefly, two sterilized acupuncture needles were inserted perpendicularly about 5 mm into the anterior tibial muscle at the S36 point and the external oblique abdominal muscle. Electrical stimulation pulse with voltage ranging from 1 to 5V, duration of 1 msec and frequency of 1 Hz delivered from an acupuncture stimulator, was applied by two outlets through the two needles. The intensity of electrical stimulation was determined to be the minimum voltage to cause moderate muscle contraction. Electro-acupuncture stimulation of S36 acupoint was applied to the left S36 acupoint for 1h, followed by one 1h stimulation to the right in the same rat. Electro-acupuncture stimulation of abdominal muscle was applied bilaterally for 2h. The stimulation protocol was repeated each day for three consecutive days to rats under restriction in acrylic rectangular boxes.

#### *NK cytotoxicity assay*

Splenic NK cytotoxicity was measured in a standard 4-h  $^{51}\text{Cr}$  release assay.

#### *Cytokine assays*

**IL-2 assay:** IL-2 in extracts was analyzed according to the ability to support the growth of IL-2 dependent T-cell line (CTLL-2 cell line).

**IFN- $\gamma$  assay:** IFN- $\gamma$  in extracts were measured by the Mouse IFN- $\gamma$  ELISA Test Kit (Genzyme).

## **Results**

#### *The effect of acupuncture applied to the S36 acupoint on splenic NK cytotoxicity*

The present experiments were designed to examine splenic NK cytotoxicity affected by acupuncture applied to the S36 acupoint in F344 rats. NK cells were prepared from rats on the first day after final treatment and cultured with target cells at E:T ratios of 100:1, 50:1, 25:1 and 12.5:1. The experiments were repeated five times with similar results. The data expressed in Fig.1 represents the mean  $\pm$  S.E.M. of combined LU data from all rats. The splenic NK cytotoxicity of the S36 acupoint acupunctured group ( $17.7 \pm 0.5 \text{LU}/10^7$  effector cells) was significantly higher ( $p < 0.001$ ) than that of the abdominal muscle acupunctured group ( $13.4 \pm 0.9 \text{LU}/10^7$  effector cells) and the non-acupunctured control group ( $13.7 \pm 0.6 \text{LU}/10^7$  effector cells). In contrast, there was no difference between abdominal muscle acupunctured group and non-acupunctured control group.

#### *The effect of acupuncture applied to the S36 acupoint on IL-2 and IFN- $\gamma$ levels of splenic aqueous extracts*

Since T cell cytokines IL-2 and IFN- $\gamma$  are generally believed to be responsible for enhancement of NK cytotoxicity, These experiments were carried out to examine whether or not acupuncture on S36 acupoint enhances T cell cytokine productions and result in an increase in NK cytotoxicity. To do this, extracts were prepared from acupunctured and control F344 rats on the first day after the final treatment and endogenous cytokine activities were examined. As shown in Table 1, the IL-2 level in the extracts of S36 acupoint acupunctured rats ( $31.5 \pm 2.3 \text{ U/g}$ ) was significantly higher than that of abdominal muscle acupunctured rats ( $18.5 \pm 3.3 \text{ U/g}$ ,  $p < 0.001$ ) and non-acupunctured control rats ( $21.3 \pm 1.1 \text{ U/g}$ ,  $p < 0.001$ ). The level of IFN- $\gamma$  in S36 acupoint acupunctured rats ( $617 \pm 39 \text{ pg/g}$ ) also showed a significantly higher level than that of abdominal

muscle acupunctured rats ( $460 \pm 37$  pg/g,  $p < 0.01$ ) and non-acupunctured control rats ( $419 \pm 19$  pg/g,  $p < 0.001$ ). However, there was no difference between abdominal muscle acupunctured and non-acupunctured control rats.

To determine whether the increase in splenic NK cytotoxicity after acupuncture treatment of S36 acupoint was related to the increase in the levels of IL-2 and IFN- $\gamma$ , the splenic NK cytotoxicity was plotted against the IL-2 and IFN- $\gamma$  production for individual rat. As shown in Fig. 2, the shift from splenic NK cytotoxicity correlated not only with the shift of the IL-2 level (simple linear regression,  $r = 0.62$ ,  $p < 0.01$ ), but also with the increase in IFN- $\gamma$  production (simple linear regression,  $r = 0.49$ ,  $p < 0.01$ ). In addition, as shown in Fig.3, the increase in IFN- $\gamma$  production was accompanied by an increase in the IL-2 level (simple linear regression,  $r = 0.53$ ,  $p < 0.01$ ).

### Discussion

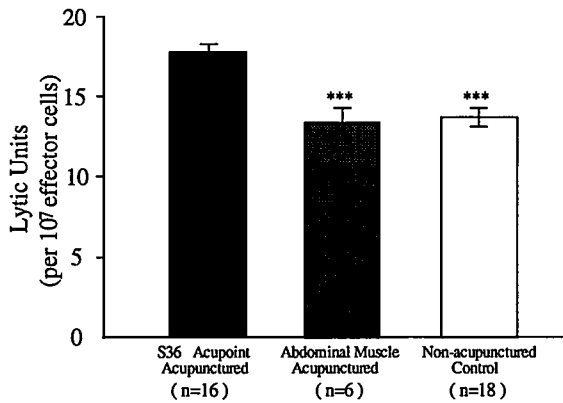
Traditional Chinese acupuncture, especially on S36 acupoint, is used as one type of supplementary therapy for the treatment of acute and chronic diseases such as viral infectious disease and cancer in China. Several mechanisms have been proposed to explain the therapeutic effect of acupuncture. These include 1) regulation of the endocrine control system in the body (hormone regulation); 2) regulation of nervous control system (neurotransmitter regulation) and 3) increase in function of the immune system. However, the mechanism(s) by which acupuncture favorably modify the clinical conditions of these diseases is not well known. The present results clearly showed that electro-acupuncture stimulation on bilateral S36 acupoint once a day (1h) for three days significantly increased splenic NK cytotoxicity as compared to that of abdominal muscle stimulated and non-stimulated control rats (Fig.1). It is also showed that acupuncture of the S36 acupoint enhanced the levels of IL-2 and IFN- $\gamma$  in the spleen (Table1). There are significantly positive correlations between the levels of cytokines and their splenic NK cytotoxicity (Fig.2,3).

IL-2 is primarily released by activated helper T cells and acts as the central role in the regulation of NK cell activities. IFN- $\gamma$  is released not only by helper T cells but also by IL-2 activated NK cells and serves as one of the important factors in the up-regulation of NK activities. Together with these reports and the present results, it is a possible that enhancement of NK cytotoxicity by acupuncture on S36 acupoint is owing to, in part, the increase in both IL-2 and IFN- $\gamma$  production.

The conclusions from this study can be restated as follows: 1) acupuncture on S36 acupoint increases splenic NK cytotoxicity. 2) At least, as one of the mechanism(s), IL-2 and IFN- $\gamma$  play important roles in the regulation of immune functions especially splenic NK cytotoxicity in S36 acupoint acupunctured animals.

#### 研究成果の発表

得られた研究成果は第74回日本生理学会大会(3月25-27日、浜松)にて発表予定である。また、5月発行のJapanese Journal of Physiology (Vol.47, No.2)に掲載予定である。

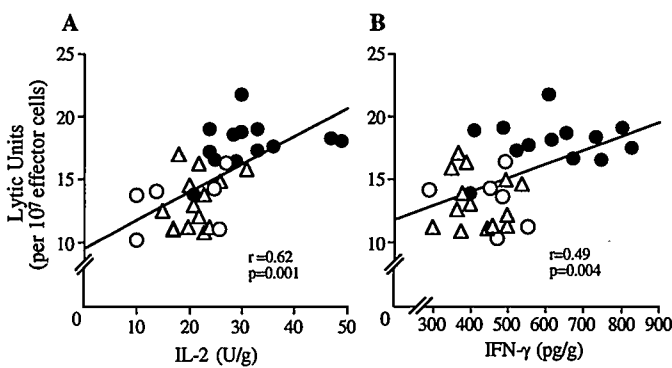


**Figure 1. Effect of acupuncture on splenic NK cytotoxicity in F344 rats**  
 Results are presented as the mean  $\pm$  S.E.M. of LU, where 1LU presents the number of effector cells per  $10^7$  mediating 50% target cells lysis. S36 acupoint acupunctured group displayed a significantly higher NK cytotoxicity compared to the abdominal muscle acupunctured group and non-acupunctured control group. One-way ANOVA followed by Fisher's PLSD test revealed that  $F(2, 37)=16.02, p<0.0001$ . \*\*\*,  $p<0.001$  for S36 acupoint acupunctured group vs. abdominal muscle acupunctured group and non-acupunctured control group.

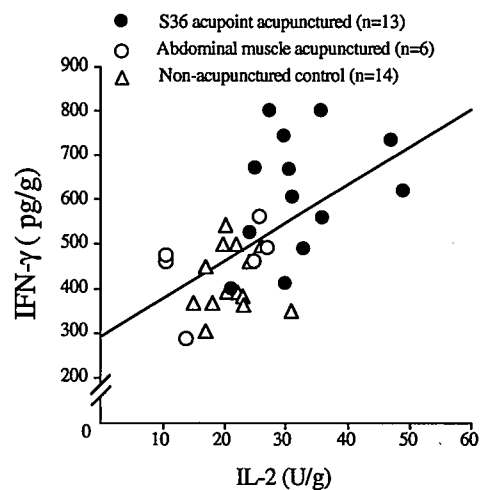
**Table 1. Effect of Acupuncture on the IL-2 and IFN- $\gamma$  Levels of Splenic Aqueous Extracts in F344 Rats**

Group	IL-2 (U/g)	IFN- $\gamma$ (pg/g)
S36 acupoint Acupunctured (n=13)	31.5 $\pm$ 2.3	618 $\pm$ 39
Abdominal Muscle Acupunctured (n=6)	18.5 $\pm$ 3.3***	460 $\pm$ 37**
Non-acupunctured Control (n=14)	21.3 $\pm$ 1.1***	419 $\pm$ 19***

Extracts of spleen were taken from acupunctured and control rats. The levels of IL-2 and IFN- $\gamma$  in these extracts were detected. Data presented here are mean  $\pm$  S.E. M. of three of four different experiments which gave reproductive results. One-way ANOVA followed by Fisher's PLSD test revealed significant effect of acupuncture of S36 acupoint on IL-2 level ( $F(2, 30)=10.6, p<0.001$ ) as well as IFN- $\gamma$  level ( $F(2, 30)=12.2, p<0.001$ ). \*\*  $p<0.01$  for S36 acupoint acupunctured group vs. abdominal muscle acupunctured group. \*\*\*  $p<0.001$  for S36 acupoint acupunctured group vs. abdominal muscle acupunctured group and non-acupunctured control group.



**Figure 2. Correlation of the splenic NK cytotoxicity with two cytokine levels in individual S36 acupoint acupunctured (●; n=13), abdominal muscle acupunctured (○; n=6) and non-acupunctured control (△; n=14) rats**  
 A: the splenic NK cytotoxicity plotted against the IL-2 level ( $r=-0.62, p=0.001$  by simple linear regression analysis). B: the splenic NK cytotoxicity plotted against the IFN- $\gamma$  production ( $r=0.49, p=0.004$  by linear regression analysis).



**Figure 3. Correlation of the production of IFN- $\gamma$  and IL-2 level in the extracts of individual acupunctured and control rats.** Results presented are the production of IFN- $\gamma$  plotted against IL-2 level ( $r=0.53, p=0.002$  by simply linear regression analysis).



日本財団補助金による

1996年度日中医学協力事業助成報告書

—在留中国人研究者研究助成—

9年3月4日

財団法人 日中医学協会  
理事長 中島 章 殿

I. 研究者氏名 姜 国芝  
研究機関 徳知医科大学 研究指導者 横地高志 職名 教授  
所在地 〒480-11 徳知県長久手町 電話 0561-62-3311 内線 2109

II. 過去の研究歴  
1989. 1. 1 ~ 10. 1 中国軍事医学科学院放射生物所助手  
1989. 10. 1 ~ 中華人民共和国最高人民検察院技術局科長  
1992. 4. 1 ~ 徳知医科大学微生物・免疫学

III. 過去の研究実績  
別紙にします。

IV. 本年度の研究業績  
(1) 学会、研究会等における口頭発表 (学会名・内容)  
① 第69回日本細菌学会総会 LPS投与マウスにおけるCD86(B7-2)の発現  
② 第26回日本免疫学会総会

③ 7th international endotoxin society fourth conference: ① expression of CD86 on murine B cells in response to LPS ② Binding of mannose-binding protein to .....

(2) 学会誌等に発表した論文 無 ・  (有) (雑誌名・論文名)

過去の研究実績の NO. 9 ~ NO. 13 (共同研究)

V. 今後の研究計画及び希望  
LPS投与マウスにおけるCD86(B7-2)の発現のメカニズム及び機械能などについて、研究したいと思っております。

VI. 研 究 報 告 (日本語、又は英語で書いて下さい。2,000字程度で記載して下さい。)

別紙にします。

VII. 指導教官の意見

姜国芝さんは、愛知医科大学大学院研究生として4年間、外国人研究員として1年間の経歴があります。研究テーマは「細菌内毒素の免疫学的作用」であり、特に内毒素による補体活性化の研究に従事してきました。マニースホモ多糖体をもつ内毒素が古典的経路を介して補体を活性化すること世界に先駆けてみつけました。この成果は *Infect. Immun.* という国際的な雑誌に発表しました。

姜さんは極めて研究熱心で新しい技術を学ぼうとする意欲的な研究者であり、今後さらにすぐれた研究者になることを期待しています。

VI. 研 究 報 告 (日本語、又は英語で書いて下さい。 2,000字程度で記載して下さい。)

In this study, we isolated from human sera MBP which binds *Klebsiella* O3 LPS. Several lines of evidence suggested that the protein isolated was MBP. First, its molecular mass was higher than 200 kDa in SDS-PAGE under nonreducing conditions, and it was dissociated into the subunits with an apparent molecular mass of 32 kDa in SDS-PAGE under reducing conditions; second, it definitely reacted with the anti-MBP MAb in immunoblotting; third, its partial NH<sub>2</sub>-terminal amino acid sequence was completely consistent with that of human serum MBP; finally, it was bound specifically to LPS possessing the mannose homopolysaccharide.

The present study has demonstrated that LPS possessing the polysaccharide structure may activate the complement system through the lectin pathway by using MBP. Previously we found that LPS possessing mannose homopolysaccharides as O-specific polysaccharides exhibited an extraordinarily high anticomplement activity, and its activity was heteropolysaccharide. This extraordinarily high anticomplement activity can be easily explained by the binding of MBP to the mannose homopolysaccharide moiety of LPS. In fact, *Klebsiella* O3 LPS did not exhibit a strong anticomplement activity in MBP-dependent serum. We also reported that LPSs possessing mannose homopolysaccharides as O-specific polysaccharides, such as LPSs from *Klebsiella* O3 and O5 and *E. coli* O8 and O9, exhibited a strong adjuvant action on the immune response to nonimmunogenic autoantigens in mice and triggered the production of autoimmune lesions. The strong adjuvant action of LPSs possessing mannose homopolysaccharides was closely associated with their strong complement-activating ability. MBP might also play a crucial role in expression of a strong adjuvant action of LPS possessing mannose homopolysaccharides.

日本財団補助金による  
1996年度日中医学協力事業助成報告書

—在留中国人研究者研究助成—

9年2月23日

財団法人 日中医学協会  
理事長 中島 章 殿

I. 研究者氏名 張 旦  
研究機関 兵庫医科大学泌尿器科学 研究指導者 牛馬文彦 職名 教授  
所在地 西宮市武庫川町1番1号 電話 0798-45-6366 内線 \_\_\_\_\_

II. 過去の研究歴  
1988年撫順市立大学医学部卒業。同年撫順鉅務局総合病院に就職、外科に配属。同外科の職務負担は次の通りです。整形外科(骨外傷、骨病、及び頭微外科を含む)、腹部外科、月経外科、胸外科、小児外科、火傷外科、泌尿器科学。

III. 過去の研究実績  
創傷性頰骨骨折168例臨床分析(東北石炭医学)、開放性前立腺摘出術後の併発症処置(実用外科)、小児胸壁良性血管内皮瘤臨床病理特点(全国煤炭医学)、小児肛門造設位置の選擇について(中華小児外科)、この期間中に数編の論文を作成し、専門の学術向上のための交流を進めました。

IV. 本年度の研究業績

(1) 学会、研究会等における口頭発表(学会名・内容)

(2) 学会誌等に発表した論文  無 ・ 有 (雑誌名・論文名)

V. 今後の研究計画及び希望

牛馬先生の小児尿道下裂手術の術式を中国の病院で実行できるように自分の力を貢献したい。将来は小児泌尿器科の領域で成果をあげるつもりです。

VI. 研究報告 (日本語、又は英語で書いて下さい。2,000字程度で記載して下さい。)

尿道下裂の修復にあたり、まず索切除を施行して陰莖の腹側面への屈曲をなくし陰莖をまっすぐにする必要がある。次の尿道形成術が成功するかどうかは、この索切除術の如何にかかっていると言つてよい。索切除が最も重要な手技であることを考えると、種々のTwo stage法およびone stage法があるが、生駒先生らは原則としてTwo stage方式。予後成績は非常に良いです。臨床でもよく観察で手術効果が明確で合併症も少ない事が事実で、すなわち、Byars-Burian変法による索切除術を施行し6か月から1年後にDenis-Browne法を基石出した尿道形成術を施行する。

生駒法索切除術の手術手技: 1. 外尿道口を正常尿道海绵体部まで後退させる。その位置迄外尿道口に縦切開を加える。2. 陰莖腹側面にU字型の切開を加え、陰莖腹側面の皮膚切開を環状溝に沿つて外方に延長、陰莖皮膚を背側面迄剥離する。3. 陰莖皮膚を左右剥離したのち、索状組織(粘膜様皮膚、線維性索状物およびその左右の低形成尿道海绵体)を切除する。陰莖海绵体が膨隆してくる。白膜に傷をつけないように注意し、それから鋭利なメスで取り除く。4. 亀頭部の尿道を過剰包皮を使ったskin-rollを用いて形成している。この方法の利点は、第2段階である尿道形成術を施行する時に既に亀頭部尿道ができていたために、外尿道口の形成の必要がないことである。5. 尿道カテーテルを留置した後、陰莖皮膚縫合ののち陰莖を嚥部に牽引する。

尿道形成術 (Crowford-Ikoma法) 1. 陰莖の腹側面の皮膚中央帯の幅が0.8-1cmになるように楕円形に皮膚切開を加えて、皮膚帯作成を行う。2. 中央皮膚帯の外側陰莖皮膚を充分に剥離する。3. カテーテル亀頭部尿道を通じ臍腔内に留置し、亀頭にかけた支持糸を用いてカテーテルを固定し、6-0 Vicrylを用いて皮膚帯を管状にする。4. 刃針付き5-0 prolene糸による両側陰莖皮膚の皮下連続2層縫合を行い管状皮膚帯を被覆する。5. 第3層目は両側陰莖皮膚縁の接着であり同じ5-0 proleneを用いる連続縫合である。3層の連続縫合が終了した時点で3本別々に亀頭を貫通させる。

6. 糸の固定にはスポンジとアルミニウム球を用いる。

VII. 指導教官の意見

尿道下裂、TURの手術などを中心とした小児泌尿器科の手術

一好泌尿器科手術の手術にたいして、この手術を学ぶと、手術の意義が

特殊な中、この手術には、尿道下裂の手術の一人が、この手術にたいして、又

泌尿器科の指導者は、この手術にたいして、

日本財団補助金による

1996年度日中医学協力事業助成報告書

- 在留中国人研究者研究助成 -

平成9年3月6日

財団法人 日中医学協会

理事長 中島 章 殿

I. 研究者氏名 楊淑華

研究機関 明海大学歯周病学講座 研究指導者 池田克己 職名 教授

所在地 〒350-02 埼玉県坂戸市けちぎ台1-1 電話 0492-85-5511 内線 431

II. 過去の研究歴

1985.7~1988.9 中国白求恩医科大学で口腔微生物と免疫学の研究について

1988.9~1991.7 中国白求恩医科大学の大学院で唾液腺癌腫中c-myc原癌遺伝子の発現について

1991.7~1995.2 頭頸部癌腫の分子遺伝学の研究について

III. 過去の研究実績

I. 291例粘液表皮癌. 臨床病理の分析. 診断病理学雑誌, 1:81-84, 1994.

II. 1類提高PCR. 敏感性と特異性の方法. 診断病理学雑誌, 4:239-241, 1995.

III. Lipopolysaccharide stimulates osteoclast-like multinucleate cell formation in CFU-GM-derived cell cultures. J. Meikai Univ. Sch. Dent 24: 413-421, 1995.

IV. 本年度の研究業績

(1) 学会、研究会等における口頭発表 (学会名・内容)

Eighteenth Annual Meeting of the American Society for Bone and Mineral Research. 1996

The cDNA of h. BMP mature region was cloned into Pkt223.3. SDS-PAGE revealed a new protein band about 14kD. it was dissolved in denaturing solvent and purified by using heparin sepharose.

(2) 学会誌等に発表した論文 無・ (雑誌名・論文名)

Lipopolysaccharide Stimulates Osteoclast-like Multinucleate Cell Formation in CFU-GM-derived Cell Cultures  
Tsunichi TATSUMI, Noriyoshi KURIHARA, Shukua YANG, Masanichi SHIMOYAMA, Fumio ARAI  
and Katsunori IKEDA department of Periodontology, Meikai University School of Dentistry,  
Sakado, Saitama, Japan 明海大学歯学雑誌, 24(2) 1995

V. 今後の研究計画及び希望

東北大学歯学部大学院口腔微生物学講座にて大学院生として研究に従事. 研究終了後は中国に帰国し, 中国の大学の発展に寄与したい.

来日後、明海大学歯学部歯周病学講座 池田克己教授ならびに教室員の配慮のおかげで私の研究活動は円滑に開始できた。また、実験に必要な機械・器具で教室内に不足していたものは、速やかに購入していただくことができた。一年目の私の研究テーマはヒト破骨細胞の培養方法の習得と破骨細胞形成に関わる菌体内毒素の作用機序を主に行った。また、中国にて研究をしていたヒト BMP-4 についての新しい精製方法についての研究も同時に進行させた。ヒト破骨細胞形成における LPS の作用については以前より本講座栗原徳善講師ならびに辰巳順一講師らが中心となって研究を継続していたことから、私はこの実験系については途中から参加した。その結果、破骨細胞前駆細胞に LPS を作用させるとこの前駆細胞が IL-1 $\alpha$  および  $\beta$  を産生しこれがオートクラインに働いて破骨細胞形成を促進する結果を見出した。本研究内容については、すでに論文発表されている (別刷り添付)。さらに私は、上記先生らと共にヒト BMP-4 の精製に精進した。大腸菌内に導入した BMP-4 発現遺伝子は順調に BMP-4 を含むタンパク質を産生したが、本タンパクの性質上その精製には困難を極めた。現在ダイマーの状態までは精製が可能となったが、精製効率、モノマーへの転換が現在の課題として残った。この段階での研究内容は、日本骨代謝学会、アメリカ骨代謝学会で演題発表したが、より優れた論文発表のためにも研究内容を完結したいと考えている。(この研究内容については別添資料の通りである。)本教室での研究活動は、私を中国から招いていただいた池田教授の御定年もあり、困難となってきた。私は現在、東北大学歯学部大学院を受験し入学の内諾を得ている。、今後私の研究は東北大学で継続し、初期の目的を達成したいと考えている。

---

## VII. 指導教官の意見

まず、このたびは、本研究に対し貴協会から有益な研究助成金を賜り、本人はもとよりわたくしも心から深く感謝致しております。

ところで、本研究のメインである「BMP-4」の精製については、本人も上述のように、今後の課題を残す結果となっておりますが、できれば現在入学の内諾を得ている東北大学でこれが継続できればと念じています。省みて、本研究で本人は直接の指導教員からの助言・示唆等にはよく応え、所期の成果を求め、たえず熱心に日夜努力を続けたことに小生「概ね良好」といえる評価を与えたい。別添に第14回日本骨代謝学会(平成8年7月)で公表した内容等についてであります。この点よろしく願いあげます。

Construction of Recombinant Mature Region of Human Bone Morphogenetic Protein-4 in *Escherichia coli* by use of the Polymerase Chain Reaction

Shuhua YANG\*1,2, Junichi TATSUMI\*1, Noriyoshi KURIHARA\*1, Jiangxiang QU,  
and Katsumi IKEDA\*1

\*1 Department of Periodontology, Meikai University School of Dentistry, Japan

*Address correspondence to; Shuhua YANG D.D.S.*

*Department of Periodontology, Meikai University School of Dentistry*

*1-1 Keyakidai, Sakado, Saitama 350-02, Japan*

*Telephone : 0492-85-5511*

*Facsimile : 0492-87-6657*

Key Words : human osteosarcoma cells, BMP-4, recombinant



Escherichia coli における RT-PCR をもちいたヒト BMP-4 成熟領域のクローニングについて

明海大学歯学部歯周病学講座

楊 淑華、辰巳順一、栗原徳善、曲 建香、池田克己

抄録：本研究においてわれわれはまず、ヒト骨原性細胞株(OS-732)より得られたヒト Bone morphogenetic protein-4 (BMP-4)を含む mRNA を採取し、プライマーを作成し RT-PCR 法を用いて成熟活性領域を含む BMP-4 の cDNA を作製した。つぎに BMP-4 成熟活性領域 cDNA をプラスミドベクター pKK223.3 の 48 クローンに挿入し、その中の 8 クローンにリコンビナント cDNA の発現が restriction enzyme analysis によって確認できた。以上の結果から、われわれは原核細胞(Escherichia coli)からヒト BMP-4 の成熟活性領域を含むタンパクを産生させる可能性をみいだした。

## ABSTRACT

In this study, we amplified the complementary DNA of the mature region of human bone morphogenetic protein-4 (hBMP-4) from a human osteogenetic cell line (OS-732), using the reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) method with two specific primers flanking the mature region . The cDNA of hBMP-4 mature region was cloned into the expression plasmid vector-pKK223.3. Forty-eight clones were selected, and eight of them were identified to be recombinants contains cDNA of the mature region by restriction enzyme analysis. Human bone morphogenetic protein-4 mature region recombinants were thus established. This study may lead to availability of mature region peptide of recombinant BMP for study bioactive hBMP from *Escherichia coli*.

## Introduction

Bone has a remarkable potential for a continuous balance between its resorption and formation. Bone growth and establishment depend upon bone formation. Urist *et al.* demonstrated that extracts from demineralized bone could induce bone formation if implanted into ectopic sites in rodents (1). The factor responsible for bone formation was named bone morphogenetic protein (BMP). The bone-inducing activity of demineralized bone matrix suggested the possibility of using it to treat large bony defects caused by trauma, surgical resection, or periodontal disease and led to a search for macromolecules possessing bone-inducing activity. The purification of BMPs from bone matrix is rather cumbersome and difficult (2), but high-grade purified BMP was obtained in 1988 when Wozney *et al.* cloned and expressed human full-length BMP cDNA in a eukaryotic cell vector (3).

Several laboratories have cloned and expressed BMP in mammalian cells (4,5). The reports have indicated, however, that considerable expense, time and effort are required to purify the recombinant protein due to a relatively low efficiency of production of BMP in eukaryotic cells(6). Thus, one of the difficulties of studying the biological activities of BMP in basic research and therapeutic application is the deficiency of pure BMP.

To research the possibility of engineering *Escherichia coli* to produce biologically active BMP, we decided to clone the cDNA of the mature region of hBMP-4 alone instead of its full-length cDNA and to apply a denaturation-renaturation protocol to reconstitute the dimer *in vitro* as a novel approach to the production of bioactive BMP from *E.coli*. As a first step toward this goal, we report here in the method and strategy for cloning the cDNA of the mature region of hBMP-4 into a *E.coli* vector by PCR. This study will aid in meeting the basic requirement for researching the biological activity of this protein from *Escherichia coli*.

## MATERIALS AND METHODS

### *Culture of human osteogenetic sarcoma cells and RNA preparation*

Cells of a human osteogenetic sarcoma cell line (OS-732) were cultured in RPMI 1640 medium (GIBCO, Grand Island, NY, USA) containing 10% heat-inactivated fetal calf serum (FCS ; GIBCO) and 10 mM HEPES, and incubated at 37°C. After a monolayer had formed, the cells were washed *in situ* with cold PBS and lysed in lysis buffer (0.5% Nonidet P-40, 0.14M NaCl, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM Tris-HCl, 1 mM dithiothreitol, and 100 units/ml placental RNase inhibitor). After digestion with 50µg/ml proteinase K and extraction with phenol/chloroform, the RNA was precipitated by ethanol. The RNA concentration and purity were calculated by absorption at 260 and 280 nm. One µl RNA was subjected to reverse transcription.

### *cDNA synthesis*

cDNA from total RNA of human osteogenetic sarcoma cell was synthesized by AMV reverse transcriptase with oligo(dT)12-18 as a primer. Briefly, 1 µg of total RNA from human osteogenetic sarcoma was added to the reverse transcription reaction buffer to make a final volume of 20 µl (50 mM Tris-HCl, pH 8.3; 50 mM KCl, 10 mM concentration of each of DTP, 10 pM of oligo(dT) 12-18, 20 units of AMV reverse transcriptase), and the mixture was incubated at 37°C for 45 minutes. A 5-µl volume of the reaction mixture was subjected to the PCR.

### *Primer Synthesis*

A pair of primers flanking the mature region of hBMP-4 was designed and synthesized according to the cDNA sequence of human BMP-4 (GenBank, Los Alamos National Laboratory, Los Alamos, NM.). An additional sequence ATAG for quarantining the restriction enzyme recognition ; the restriction enzyme *EcoRI* recognition sequence GAATTC ; and a starting codon, ATG, were added to the upstream of the 5'-primer codon sequence (Fig. 1), 5'-primer sequence (P1) : 5'-ATAGGAATTCATGCCTAAGCATCACTCACAGC-3'. An additional sequence TAAT, Hind III recognition sequence AAGCTT, and anti-stop codon TCA were added upstream

of the 3'-primer. Whose sequence was : 5'-TAATAAGCTTTCAGCAGCGGCACCCACATCC  
CTCT-3'.

#### *Polymerase Chain Reaction (PCR)*

The cDNA of hBMP-4 mature region from osteogenetic sarcoma cells was amplified mediated by the primers. In a 100- $\mu$ l reaction, 5  $\mu$ l of total cDNA was amplified in 10 mM Tris-HCl (pH 8.3), 50 mM KCl , 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.001% gelatin, 200 mM concentration of each dNTP, 50 pM concentration of each primer, and 2.5 units of Taq DNA polymerase (Primega, Madison,WI,USA). The mixture was overlaid with 50  $\mu$ l of mineral oil and subjected to 30 cycles of amplification in a thermal cycler (Program Temp Control System PC-700 ; ASTEC Co., Fukuoka, Japan), according to the following cycle parameters : denaturation for 60 sec. at 93°C, reannealing for 30 sec. at 54°C and extension for 30 sec. at 72°C. A denaturation step of 60 sec at 93°C and an extension for 5 min. at 72°C were added at the initial and final cycle, respectively. The PCR products were precipitated by ethanol and digested with restriction enzyme.

← 図 1 挿入

#### *Preparation of plasmid*

Expression plasmid pKK 223.3 was chosen as the vector (Fig. 2). pKK223.3 DNA isolation was carried out by the standard alkaline extraction method (7).

← 図 2 挿入

#### *Digestion of DNA with EcoRI and Hind III restriction enzyme*

Twenty micrograms of plasmid DNA and PCR-products were digested respectively for 2 hr at 37°C with 40 units of restriction endonuclease Hind III in a 100- $\mu$ l reaction volume consisting of 100 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl (pH 8.5), 5 mM MgCl<sub>2</sub>, and 1 mM 2-mercaptoethanol. About 5 $\mu$ l of the digestion mixture was electrophoresed on a 1% agarose gel to confirm the complete digestion of the plasmid DNA. The digested DNA was extracted with phenol/chloroform, and then the aqueous phase was extracted twice with chloroform and precipitated with ethanol. The pellet was washed with 70% ethanol and was dissolved in 20  $\mu$ l of TE buffer. The EcoRI reaction to cleave the DNA was performed for 3 hr at 37°C in a 100- $\mu$ l reaction volume comprising 100 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl (pH 7.5), and 10 mM DTT. The

DNA fragments were precipitated with ethanol and purified by electrophoresis on a low-melt temperature agarose gel.

#### *Gel purification of DNA fragment*

The digested plasmid DNA and PCR-product DNA were electrophoresed on 1% low-melt temperature agarose gel at 4°C. The gel was stained with ethidium bromide (Sigma, St. Louis, MO, USA). The desired DNA was identified and excised in the smallest possible volume of agarose. The agarose containing the band was diluted 5 fold with Tris-HCl buffer and liquified by heating to 65°C for 5 min. The DNA was isolated by phenol-chloroform extraction and then concentrated by ethanol precipitation.

#### *Ligation and transformation*

DNA ligation was performed in a 20 µl reaction volume consisting of 1 unit of T<sub>4</sub> DNA ligase, 0.5 µg cDNA of BMP-4, and 1 µg plasmid DNA added to the ligation buffer to make final concentrations of 50 mM Tris-HCl (pH 7.9), 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 20 mM DTT, and 1 mM ATP, and the mixture was incubated at 16°C for 4 hr. The ligation mixture was used to transfect *E. coli* JM105 [supE endA sbcB15 hsdR4 rpsL thi $\Delta$  (lac-proAB)] by the standard CaCl<sub>2</sub> procedure. The transfected bacteria were spread on ampicillin-containing LB plates and incubated at 37°C for 16 hr. The ampicillin-resistant colonies were selected and analyzed with restriction enzymes.

#### *Assays of recombinant by restriction enzyme maps*

Three kinds of restriction endonucleases, EcoR I, Hind III, and Sty I, were selected to analyze the recombinants according to recombinant plasmid restriction enzyme map (Fig. 2). The plasmid DNA was prepared from the cloned bacteria by rapid lysis for minipreparation of DNA by the alkaline extraction method. The method of EcoRI and Hind III digestion was performed as above, and Sty I mediated cleavage of the DNA was done in 100 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 10 mM MgCl<sub>2</sub>, and 1 mM DTT. Samples of plasmid DNA were digested respectively with Hind III, EcoRI + Hind III, or Sty I. After digestion by the restriction enzymes, the DNA was electrophoresed on an ethidium bromide-agarose gel.

## RESULT

### *cDNA of human BMP-4 mature region amplified by PCR*

For amplifying the cDNA of the hBMP-4 mature region from human osteosarcoma cells, we designed and synthesized a pair of primers that flanked the mature region (Fig 1). To ensure cloning efficiency, restriction enzyme EcoRI and Hind III recognition sequences were incorporated into the primers. Because the sequence at terminal region is difficult to be recognized by restriction enzymes, four basic pairs 5'-ATAG-3' and 5'-TAAT-3' were added upstream of the restriction enzyme recognition sequence. A starting codon and stop anti-codon were designed in the primers for future research on for the expression of hBMP-4. The PCR was performed on cDNA synthesized from the RNA of human osteogenetic sarcoma. The PCR product with the desired length of 348 bp, corresponding to the C-terminal 116 amino acids of the hBMP-4 mature region, was obtained (Fig. 3, line B). To confirm the nature of the PCR product, we treated the product with Sty I, as there is a Sty I recognition sequence covering base pairs 131 to 136 of the hBMP-4 mature region. Two fragments with length of about 130 bp and 210 bp were obtained, after the PCR product had been cleaved with the Sty I restriction enzyme (Fig. 3, Line C). The result of restriction enzyme analysis demonstrated that the 384-bp PCR product is the specific cDNA of the hBMP-4 mature region.

← 图 3 插图

### *Cloning cDNA of hBMP-4 mature region into plasmid vector*

The plasmid pKK 223.2 was selected as the vector, and the cloning strategy was shown on Fig. 2. After the cDNA of the hBMP-4 mature region and pKK 223.3 were cleaved by EcoRI and Hind III, the cDNA was ligated into pKK 223.3. Three kinds of restriction enzyme maps were prepared to analyze the recombinants. The DNA cleavage by Hind III was used to detect the length of recombinants. Hind III and EcoRI cooperative digestion detected the cDNA of the hBMP-4 mature region insert. The restriction enzyme Sty I recognition sequence present in pKK 223.3 (1249) and hBMP-4 mature region (131) was used to identify the specific cDNA of hBMP mature region to be inserted cDNA. Eight of 48 clones were identified to be recombined with cDNA of the hBMP-4 mature region by restriction enzyme analysis (Fig 4).

← 图 4 插图

## DISCUSSION

Progress in using BMP to treat bone defect disease and in our understanding of bone metabolism has been limited by lack of large amounts of purified, biologically active protein. BMPs could be purified from demineralized bone (8), but only 40  $\mu$ g of BMP could be obtained from 40 kg of bovine bone powder, indicating this approach to be rather cumbersome. The purification of recombinant protein BMP from eukaryotic cells has been hampered by inefficient expression in eukaryotic cells. The expression rate of BMP, which protein is related to the TGF superfamily, was rather low compared with that of other proteins, unrelated to the TGF- $\beta$  family proteins, produced by use of the same eukaryotic vector (9). The inefficiency of expression is probably due to the fact that biosynthesis of TGF-related proteins involves post-translational modification, such as dimerization of polypeptides and processing of large precursors into their mature form.

The method of expressing protein from a cloned gene in *E. coli* has proven invaluable in the purification and functional analysis of eukaryotic proteins (10,11). A high level of protein expressed in *E. coli* often results in cytoplasmic granules that can be separated from crude cell lysates by centrifugation (12,13). But so far there have been no reports of BMP with bone-inducing activity, produced by prokaryotic cells. For this reason we cloned the cDNA of the hBMP-4 mature region into the prokaryotic *E. coli*.

Recently, the study of TGF- $\beta$ -related protein biosynthesis has shown that the polypeptides of the TGF- $\beta$  superfamily are synthesized as part of large secretory precursors. The precursor polypeptide chains consist of a signal sequence, a proregion of several hundred amino acids, and a highly conserved C-terminal region of approximately 100 amino acids. These protein in C-terminal domain of the precursor are generally cleaved to form the mature bioactive dimers (14). The association between the mature region and the proregion of TGF- $\beta$  masks the biological activity of the mature dimers, resulting in the formation of an inactive latent form (15). BMP-4 alone can induce bone formation without addition of related growth factors (16). Human BMP-4 is a 33 kDa protein that is a glycosylated, disulfide-linked homodimer of the mature region. The mature region of hBMP-4 comprises the COOH-terminal 116 amino acids of a 408-amino acid precursor. Because accurate proteolytic processing to form the mature region from



the precursor is not feasible in *E.coli*, we chose to clone the cDNA of the mature region of hBMP-4 instead of its full-length cDNA into *E.coli* as a novel approach to obtain biologically active BMP from *E. coli*.

BMP in osteosarcoma have been identified by immunohistochemical studies (17). BMP immunostaining was restricted predominantly to the cytoplasm of malignant cells with a primitive mesenchymal appearance. Particularly, the extraction of a protein fraction with bone morphogenetic activity from human osteosarcoma implies that BMP might be secreted by osteosarcoma cells (18). Thus we selected a human osteosarcoma cell line (OS-732) as a source of hBMP-4 mRNA. For cloning the precise fragment of the hBMP-4 mature region into *E. coli*, we took advantage of the speed and efficiency of the polymerase chain reaction. The PCR is the method not only for directly amplifying minute quantities of genomic DNA from a complex background, but also for amplifying specific cDNA molecules by reverse transcription of complex mixtures of mRNA. The specific fragment amplified is determined by the primers used to anneal to a part of the target sequence. We designed a pair of primers flanking the mature region of hBMP-4. Cloning a blunt-ended of PCR product is often less efficient than that of the other blunt-end DNA fragment (19). The inefficient cloning might result from the addition to the end of PCR product of an A nucleotide by the intrinsic terminal transferase activity of Taq polymerase. To avoid this problem, we introduced the restriction sites of EcoRI and Hind III at the 5' end of the oligonucleotide. Four additional nucleotides were added to ensure the efficient cleavage of the PCR product by restriction enzymes. After the mature region of hBMP was amplified by the PCR method, the specific product could be identified by restriction enzyme analysis. The human BMP-4 recombinant was thus constructed by use of reverse transcriptase-polymerase chain reaction technology.

The disulfide-linked dimer of BMP, which is related to the TGF- $\beta$  superfamily, is essential for the biological activity of bone formation as loss of induction activity occurs upon reduction of the active dimer (20). But dimerization can not take place in the reducing environment of *E. coli*. However, many proteins expressed in *E.coli* have been reconstructed *in vitro* by reduction and reoxidation method to show biological activity (21). McNally *et al.* demonstrated that *E.coli* could express and assemble of individual component to polymer without

the requirement of a specific eukarotic cell mechanism (22). Currently we are attempting to apply denaturation-renaturation to reconstruct dimer *in vitro* to produce the bioactive BMP.

The authentic bioactive BMP is a glycosylated protein, but the carbohydrate moiety of BMP is not necessary for the induction of bone formation, as evidenced by the fact that deglycosylated BMP could induce bone formation *in vivo* (23). Presumably, BMP without glycosylation from *E.coli* would have effective biological activity. Bioactive, non-glycosylated, disulfid-linked BMP may thus be expected to be obtained from BMP produced by *E. coli*.

As an early stage of our study, we have completed the strategy for cloning the BMP-4 mature region and are now examining this recombinant for protein expression and for biological activity achieved by the *in vitro* denaturation-renaturation approach.

## REFERENCES

- 1) Urist, M.R. : Bone:formation by autoinduction. *Science*. 150:893-899, 1965.
- 2) Urist, M.R., Huo, Y.K. and Browell, A.G. : Purification of bovine morphogenetic protein by hydroxyapatite chromatography. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81 : 371-373, 1984.
- 3) Wozney, J.M., Rosen, V. and Celeste, A.J. : Novel regulators of bone formation : molecular clones and activities. *Science* 242 : 1528-1533, 1988.
- 4) Takaoka, K., YoshiKawa, H. and Hasimoto, J. : Gene cloning and expression of a bone morphogenetic protein derived from a murine. *Clinical Orthopaedics and Related Research* 294 : 344-352, 1993.
- 5) Hammonds, R.G., Schwall, J.R. and Dudley, A. : Bone-inducing activity of mature BMP-2B produced from a hybrid BMP-2a/2b precursor. *Molecular Endocrinology* 4 : 149-155, 1990.
- 6) Suzuki, A., Nishimatsu, S.I. and Shoda, A. : Biochemical properties of amphibian bone morphogenetic protein-4 expressed in CHO cells. *Biochem. J.* 291 : 413-417, 1993.
- 7) Birn Boim, H.C. : A rapid alkaline extraction method for the isolation of plasmid DNA. *Method in Enzymology*. 100 : 243-255, 1983.
- 8) Wang, E.A., Rosen, V. and Cordes, P. : Purification and characterization of other distinct bone-inducing factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 85 : 9484 -9489, 1988.
- 9) Wang, E.A., Rosen, V. and Alessandro, J.S. : Recombinant human bone morphogenetic protein induces bone formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 87 : 2220-2224, 1990.
- 10) Mark, D.F., Lu, S.D. and Creasey, A.A. : Site-specific mutagenesis of the human fibroblast interferon gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 81 : 5662-5666, 1984.
- 11) Frankel, S., Condeelis, J. and Leinwand, L. : Expression of actin in *Escherichia coli*. *J. Bio. Chem.* 29 : 17980-17987, 1990.
- 12) Sano, T. and Cantor, C.R. : Expression of a cloned streptavidin gene in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 87 : 142-146, 1990.
- 13) Fraser, P.D., Linden, H. and Sandmann, G. : Purification and reactivation of recombinant *synechococcus* phytoene desaturase from an overexpressing strain of *Escherichia coli*. *Biochem. J.* 291 : 687-692, 1993.
- 14) Massague, J. : The TGF- $\beta$  family of growth and differentiation factors. *Cell* 49 : 437-438, 1987.

- 15) Wakefield, L.M., Smith, D.M. and Flanders, K.C.: Latent transforming growth factor- $\beta$  from human platelets. *J. Biol. Chem.* 263:7647-7654, 1988.
- 16) Chen, P., Carrington, J.L. and Hammonds, R.G. : Stimulation of chondrogenesis in limb bud mesoderm cells by recombinant growth factor  $\beta$  1 and  $\beta$  2. *Exp. Cell. Res.* 195 : 509-515, 1991.
- 17) Yoshikawa, H., Retting, J.W. and Lane, J.W. : Immunohistochemical detection of bone and soft tissue sarcoma. *Cancer* 74 : 842-847, 1994.
- 18) Henrik Bauer, F.C. and Urist, M.R. : Human osteosarcoma-derived soluble bone morphogenetic protein. *J. Orthop. Res.* 145 : 291-195, 1981.
- 19) MacFerrin, K.D., Chen, L. and Terranova, M.P. : Overproduction of protein using expression cassette polymerase chain reaction. *Method in Enzymology.* 217 : 79-102, 1993.
- 20) Urist, M.R., Mikulski, A. and Contreas, C.N. : Reversible extinction of the morphogen in bone matrix by reduction and oxidation of disulfide bonds. *Calcif. Tiss. Res.* 19 : 73-84, 1975.
- 21) Nagai, K., Perutz, M.F. and Poyart, C. : Oxygen binding properties of human mutant hemoglobins synthesized in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 82 : 7252-7255, 1985.
- 22) McNally, E.M., Goodwin, E.B. and Spudich, J.A. : Coexpression and assemble of myosin heavy chain and myosin light chain in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 85 : 7270-7273, 1988.
- 23) Kuber Sampath, T., Coughlin, J.E. and Whetstone, R.M. : Bovine osteogenic protein is composed of dimers of OP-1 and BMP-2A ; Two members of transforming growth factor- $\beta$  superfamily. *J. Bio. Chem.* 265 : 13198-13205, 1990.

## Figure Legends

### **Fig.1 Amino acid sequence of human bone morphogenetic protein-4 and the pair of oligonucleotide primers used**

Schematic diagram of domain structure of hBMP-4.

Signal peptide, pro-region, and mature region are shown. Two oligonucleotide primers for PCR were synthesized.

### **Fig.2 Strategy for cloning of hBMP-4 mature region cDNA into pkk223.3**

hBMP mature region cDNA was amplified by PCR after reverse transcription of OS-732 cell mRNA. Two gene-specific primers containing the restriction sites were used. After cutting the PCR product and the vector with EcoRI and Hind III restriction enzymes, ligation of the molecules was carried out to obtain the recombinant vector pkk223.3-BMP.

### **Fig.3 Agarose gel (2.5%) electrophoresis of PCR products and PCR products digested by Sty I**

Line A: DNA marker[PQEM-7Zf(+)]

Line B: PCR products

Line C: PCR products cleaved by StyI

### **Fig.4 Restriction enzyme pattern of recombinant pKK223.3-BMP**

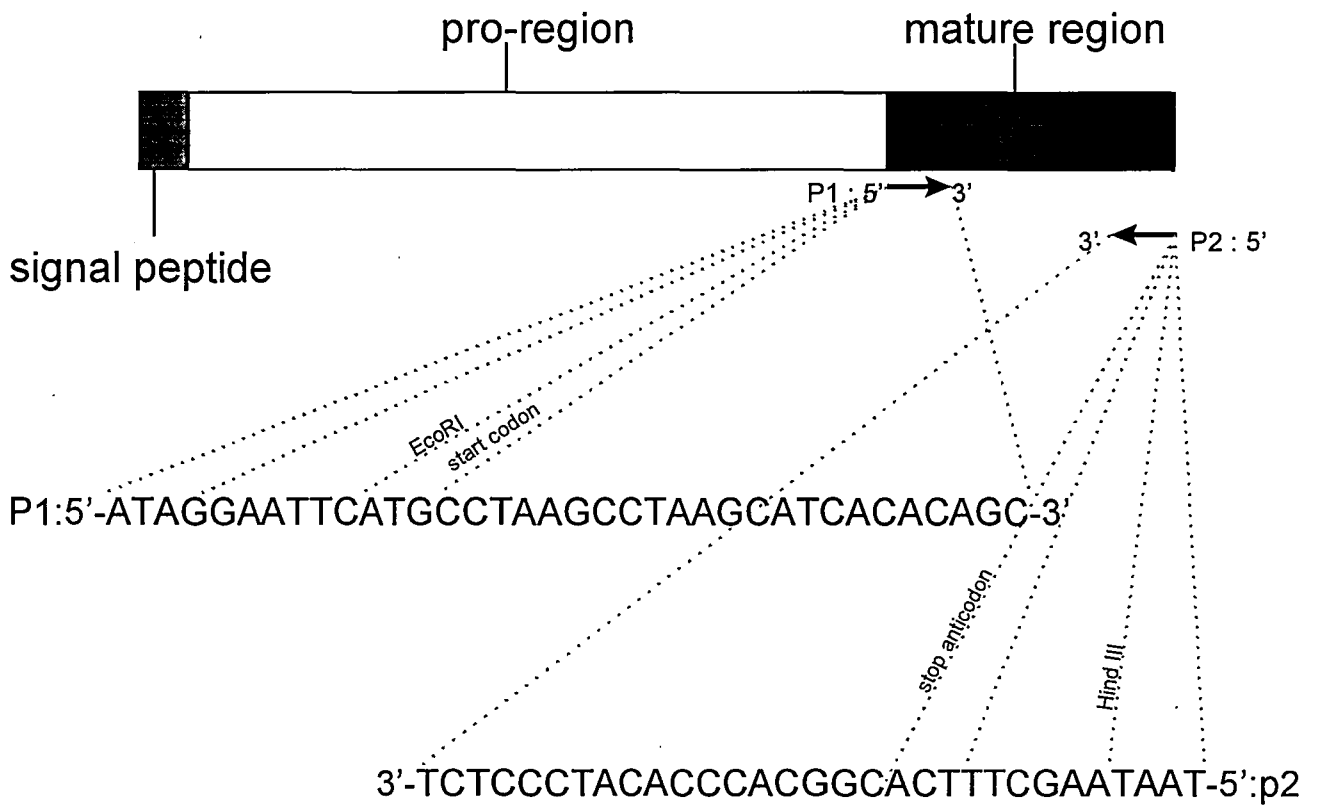
Line A: pkk223.3-BMP digested with HindIII [4900bp fragment]

Line B: pkk223.3-BMP digested with StyI [1300bp and 3500bp fragments]

Line C: pkk223.3-BMP digested with EcoRI +HindIII[340bp and 4500bp fragment]

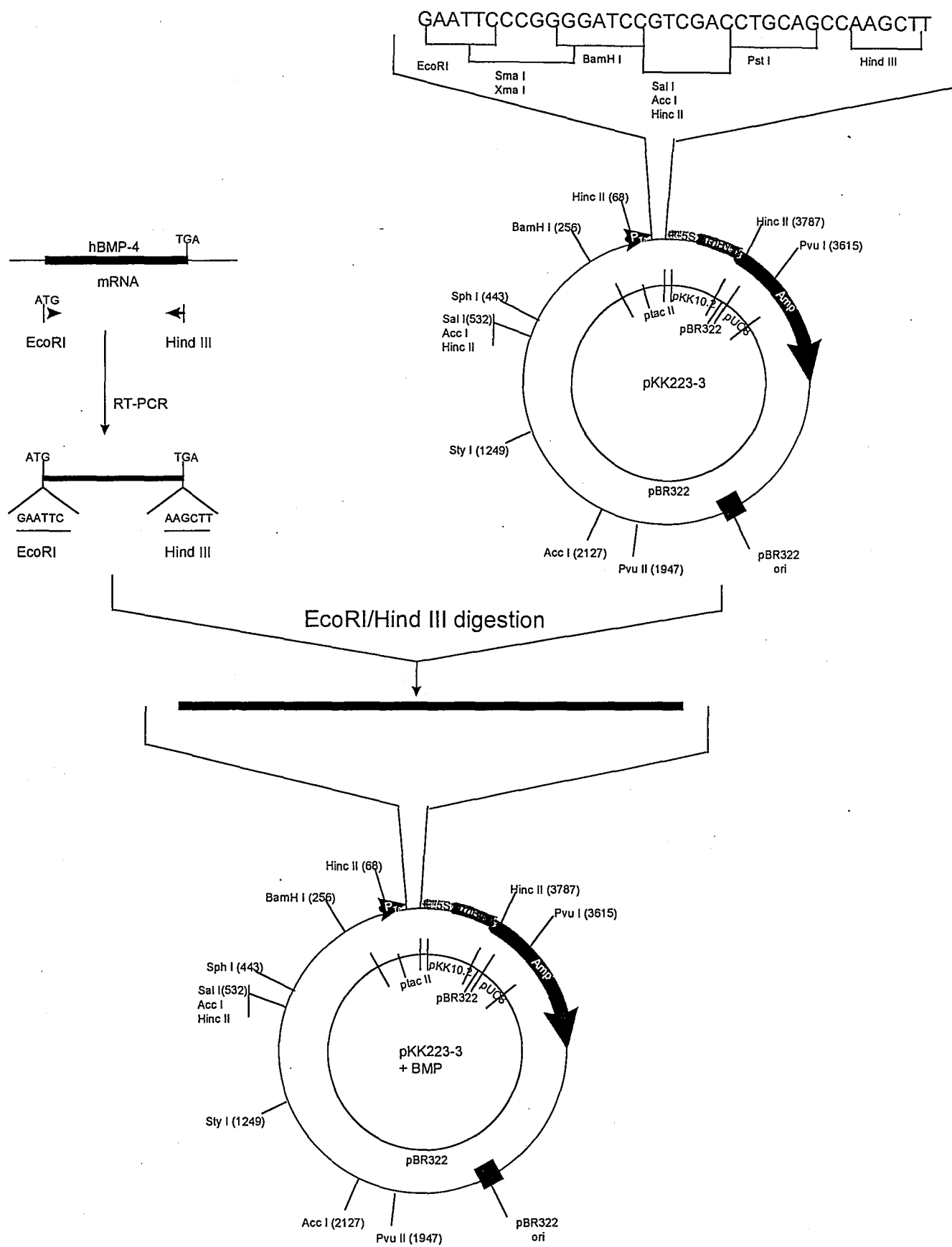
Line E: pkk223.3-BMP plasmid DNA

Line D: DNA marker [ DNA / Hind III]

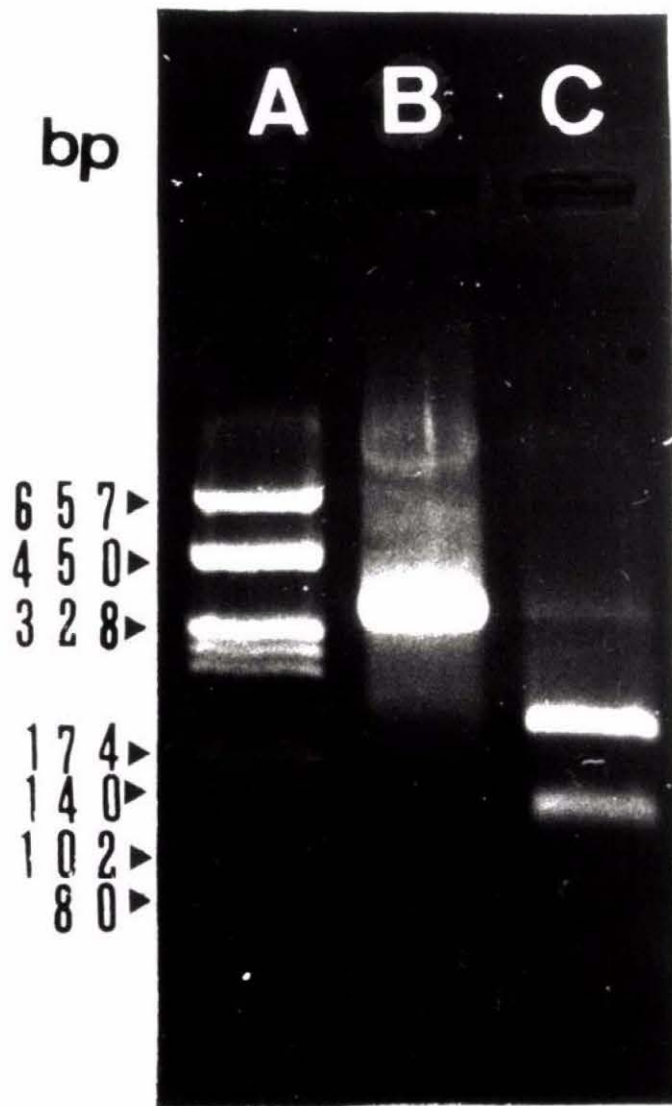


楊論文

图1



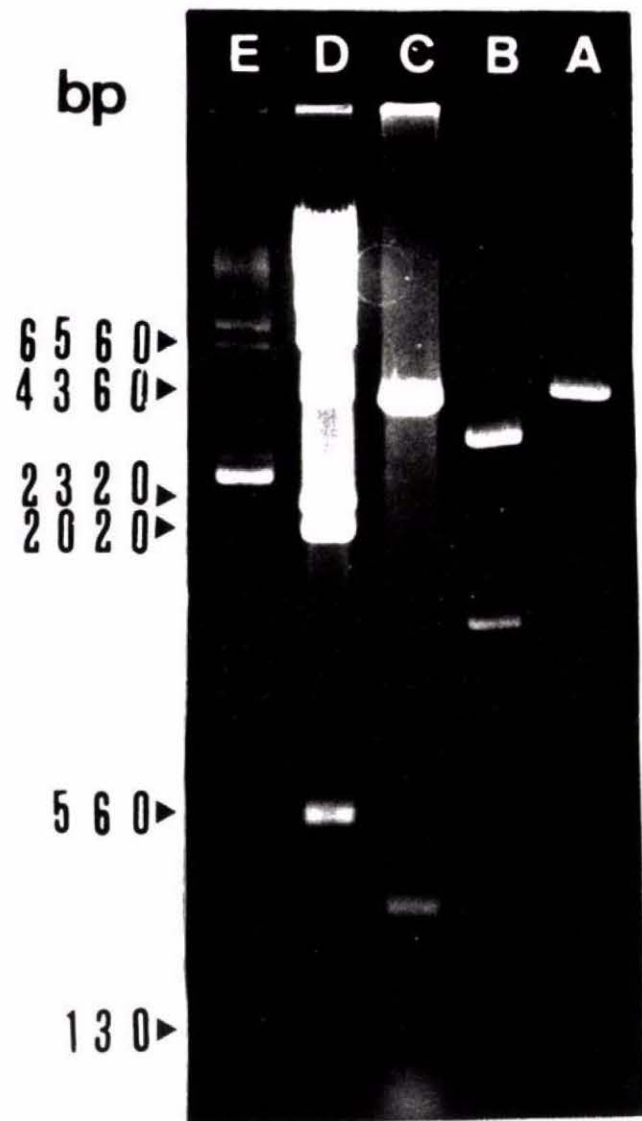
楊論文  
圖 2



楊 敏

圖 3





楊論文

圖4

日本財団補助金による

1996年度日中医学協力事業助成報告書

— 在留中国人研究者研究助成 —

1997年3月10日

財団法人 日中医学協会

理事長 中島 章 殿

I. 研究者氏名 趙 虎

研究機関 日本大学歯学部生化学教室 研究指導者 大塚吉兵衛 職名 教授

所在地 〒101 東京都千代田区神田駿河台1-8-13 電話 03-3219-8123 内線 \_\_\_\_\_

II. 過去の研究歴

1985.9 - 1988.7 中国第二軍医大学大学院修士課程, 嫌気細菌致病机理の研究

1988.9 - 1990.7 中国上海市長征医院助理研究員, 臨床微生物速達診断の研究

1990.9 - 1993.7 中国第二軍医大学大学院博士課程, DCX抗腫瘍作用の研究

III. 過去の研究実績

第一著者として執筆論文12篇, 中国の「中华微生物和免疫学」, 「上海免疫学雑誌」等で発表しました。そのなかで, 5篇論文, 「第一届中国医学分子生物学学会」と, 「第六屆, 第七届中国免疫学年会」で, 口頭発表しました。

「医学分子生物学進展」を編集しました(1993年, 中国医学科学出版社)。

IV. 本年度の研究業績

(1) 学会、研究会等における口頭発表 (学会名・内容)

① 3rd Pan Pacific Connective Tissue Societies Symposium (1996.11.30 ~ 12.6, Hawaii, U.S.A)

"Characteristics of Proteoglycans in Matrix Phase of Human Alveolar Bone"

② 75th General Session of International Association for Dental Research (1997.3.19-23, Orlando, U.S.A)

"Characteristics of Mineral-Binding Keratan Sulfate-containing Proteoglycans in Bone"

(2) 学会誌等に発表した論文 無 ・ (有) (雑誌名・論文名)

Journal of Hard Tissue Biology, 5(3):178-187, 1996.

"Characteristics of Proteoglycans Containing Chondroitin and Dermatan Sulfates in the Mineral and Matrix Phases of Rabbit Bone"

V. 今後の研究計画及び希望

今年五月中国へ帰ったあとで, あの分野(Proteoglycans in Bone)を続けて研究するつもりです。

VI. 研究報告 (日本語、又は英語で書いて下さい。2,000字程度で記載して下さい。)

研究題目: ウサギ骨のミネラル相およびマトリックス相のコンドロイチン硫酸含有プロテオグリカンの相違について

目的: 骨のミネラル相およびマトリックス相のコンドロイチン硫酸含有プロテオグリカン(CS-PG)を別々に抽出・部分精製し、CS-PGを構成するグリコサミングリカン(GAG)鎖およびコアタンパク質の分子量の違いをWestern Blottingによって調べる。

方法: 材料には、ウサギの四肢の長骨の皮質骨部を用いた。骨のミネラル相およびマトリックス相からのコアタンパク質の抽出は、グアニジン、EDTA、グアニジンを順次用いて行うGoldberg's (J. Biol. Chem. 1988)の方法に準じて行った。CS-PGの部分精製は、陰イオン交換クロマトグラフィーによって行った。コアタンパク質に結合するGAG鎖の種類の確認は、以下に記すように、糖鎖を切断する各種酵素とコアタンパク質上の切断された糖鎖の切り株を認識する各種モノクローナル抗体の組み合わせによるwestern blottingによって調べた。

①コンドロイチン4-硫酸鎖(C4-S)の確認は、chondroitinase (Ch) ACII消化後、2B6抗体によって、  
②テリマン硫酸鎖(DS)の確認は、ChB消化後、2B6抗体によって、③コンドロイチン6-硫酸鎖(C6-S)の確認は、ChABC消化後、3B3抗体によって、また④コンドロイチン鎖(CO-S)の確認は、ChABC消化後、1B5抗体によって調べた。

結果および考察: GAG鎖の種類では、ミネラル相では、DSとC6-Sが多く含まれており、DSをもつPGは45-kDa、C6-Sを含むPGは45-kDaと200-kDaのコアタンパク質を有していた。一方、マトリックス相ではDS、C6-SのほかC4-S、CO-Sも含まれており、DSおよびC4-SをもつPGは45-kDa、C6-SおよびCO-SをもつPGは200-kDaのコアタンパク質を有していた。また、未消化のCS/DS-PGはミネラル相で120-200-kDaの範囲に少なくとも4種、マトリックス相では140-180-kDaの範囲に2種存在していた。ミネラル相およびマトリックス相のCS/DS-PGの分布の違いは、骨基質における石灰化物の形成および成長の過程において、PGが調節因子の一つとして重要な意味を有していることを示していると思われる。

VII. 指導教官の意見

来日以来2年の研究生生活が経過し、この間に前記のような実績を挙げています。当教室では、教室員とも融和し、新しい研究分野にも積極的に取り組んでおられますので、さらに実績を挙げることを期待される。

貴財団の援助によって日常生活も安定化し、夫人と同居していることから精神的にも充実した日本での研究活動が続けられております。

日本語についても上達が著しく、教室内での研究面での会話も日本語でおこなえるようになってきています。英語力は来日前から高いことから、今後の研究活動は益々さかんになることが期待されている。

**研究題目：**ウサギ骨のミネラル相およびマトリックス相のコンドロイチン硫酸含有プロテオグリカンの相違について

**目 的：**骨のミネラル相およびマトリックス相のコンドロイチン硫酸含有プロテオグリカン(CS-PG)を別々に抽出・部分精製し、CS-PGを構成するグリコサミノグリカン(GAG)鎖およびコアタンパク質の分子量の違いをwestern blottingによって調べること。

**方 法：**材料には、ウサギの四肢の長骨の皮質骨部を用いた。骨のミネラル相およびマトリックス相からの骨タンパク質の抽出は、グアニジン、EDTA、グアニジンを順次用いて行うGoldbergら(J. Biol. Chem., 1988)の方法に準じて行った。CS-PGの部分精製は、陰イオン交換カラムクロマトグラフィーによって行った。コアタンパク質に結合するGAG鎖の種類の確認は、以下に記すように、糖鎖を切断する各種酵素とコアタンパク質上の切断された糖鎖の切り株を認識する各種モノクローナル抗体の組み合わせによるwestern blottingによって調べた。①コンドロイチン4-硫酸鎖(C4-S)の確認は、chondroitinase(Ch) ACⅡ消化後、2B6抗体によって、②デルマタン硫酸鎖(DS)の確認は、Ch B消化後、2B6抗体によって、③コンドロイチン6-硫酸鎖(C6-S)の確認は、Ch ABC消化後、3B3抗体によって、また④コンドロイチン鎖(C0-S)の確認は、Ch ABC消化後、1B5抗体によって調べた。

**結果および考察：**GAG鎖の種類では、ミネラル相には、DSとC6-Sが多く含まれており、DSをもつPGは45-kDa、C6-Sを含むPGは45-kDaと200-kDaのコアタンパク質を有していた。一方、マトリックス相にはDS、C6-SのほかC4-S、C0-Sも含まれており、DSおよびC4-SをもつPGは45-kDa、C6-SおよびC0SをもつPGは200-kDaのコアタンパク質を有していた。また、未消化のCS/DS-PGはミネラル相で120~200-kDaの範囲に少なくとも4種、マトリックス相では140-180-kDaの範囲に2種存在していた。ミネラル相およびマトリックス相のCS/DS-PGの分布の違いは、骨基質における石灰化物の形成ならびに成長の過程において、PGが調節因子の一つとして重要な意味を有していることを示していると思われる。

**ORIGINAL**

*Journal of Hard Tissue Biology* 5[3] (1996) pp178-pp187  
© 1996 The Japanese society of Hard Tissue  
Research & Technology  
Printed in Japan, All rights reserved. 1341-7649/96

## Characteristics of Proteoglycans Containing Chondroitin and Dermatan Sulfates in the Mineral and Matrix Phases of Rabbit Bone

Masao MAENO<sup>1)</sup>, Hu ZHAO<sup>2)</sup>, Naoto SUZUKI<sup>1)</sup>, Yoshihiko HASUMI<sup>1)</sup>,  
Yukitsugu KASAMO<sup>3)</sup> and Kichibee OTSUKA<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup> *Department of Biochemistry, Nihon University School of Dentistry, 1-8-13, Kanda-surugadai, Chiyoda-ku, Tokyo 101, Japan*

<sup>2)</sup> *Department of Clinical Laboratory, ChangZheng Hospital, 415 Feng Yang Road, Shanghai 200003, P.R.China*

<sup>3)</sup> *Division of Clinical Research, Dental Research Center, Nihon University School of Dentistry, 1-8-13, Kanda-surugadai, Chiyoda-ku, Tokyo 101, Japan*

(Accepted for publication: August 10, 1996)

# Characteristics of Proteoglycans Containing Chondroitin and Dermatan Sulfates in the Mineral and Matrix Phases of Rabbit Bone

Masao MAENO<sup>1)</sup>, Hu ZHAO<sup>2)</sup>, Naoto SUZUKI<sup>1)</sup>, Yoshihiko HASUMI<sup>1)</sup>,  
Yukitsugu KASAMO<sup>3)</sup> and Kichibee OTSUKA<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup> Department of Biochemistry, Nihon University School of Dentistry, 1-8-13, Kanda-surugadai, Chiyoda-ku, Tokyo 101, Japan

<sup>2)</sup> Department of Clinical Laboratory, ChangZheng Hospital, 415 Feng Yang Road, Shanghai 200003, P.R.China

<sup>3)</sup> Division of Clinical Research, Dental Research Center, Nihon University School of Dentistry, 1-8-13, Kanda-surugadai, Chiyoda-ku, Tokyo 101, Japan

(Accepted for publication: August 10, 1996)

**Abstract :** Rabbit long bone proteoglycans (PGs) were extracted with guanidine-HCl (GdnCl), EDTA and then with GdnCl to demonstrate their localization. The PGs in the EDTA extract (E-extract) and second GdnCl extract (G2-extract) were concentrated on an anion-exchange column, and their characteristics were determined by Western blot analysis after electrophoresis. Chondroitin 4-sulfate (C4S), chondroitin 6-sulfate (C6S), chondroitin (C0S) and dermatan sulfate (DS) were identified by three monoclonal antibodies (2B6, 3B3 and 1B5) after chondroitinase ABC, B or AC II digestion. These antibodies recognized C4S, C6S, C0S and DS stubs remaining on the core proteins of the PGs after enzyme digestion. The DS- and/or C6S-containing PGs were identified both in the E- and G2-extracts; the molecular masses of the core proteins of DS-PGs were approximately 45 kDa in both extracts, whereas two bands of the digested C6S-PGs (approximately 45 and 200 kDa) were present in the E-extract and only one C6S-PG band (approximately 200 kDa) was observed in the G2-extract. On the other hand, C4S- and C0S-PGs were identified only in the G2-extract; the molecular mass of the digested C4S-PG was approximately 45 kDa, and that of the digested C0S-PGs was approximately 200 kDa.

**Key words :** rabbit, bone proteoglycan, glycosaminoglycan, chondroitin sulfate, dermatan sulfate, mineral and matrix phases

## Introduction

During osteogenesis, some proteoglycans (PGs) have the potential to act as a kind of initiating factor for calcification, or may regulate the formation and growth of mineral crystals<sup>1,2)</sup>.

In previous studies, prominent mineral-binding PGs have been isolated from the bones of several animal species, such as the bovine<sup>3-5)</sup>, porcine<sup>6)</sup>, and rat groups<sup>7-9)</sup> and humans<sup>10,11)</sup>, since the presence of PGs was first established in the bovine bone by Herring<sup>12)</sup>. The major PGs associated with the

mineralized matrix of bovine bone are two small glycoconjugates (molecular mass 80-120 kDa) containing one or two chondroitin sulfate (CS) chains<sup>9)</sup>. These two PGs have core proteins of similar molecular mass (45 kDa), with clear differences in their NH<sub>2</sub>-terminal sequences, and one or two CS chains (40 kDa each), the nature of which have not been determined<sup>9)</sup>. In addition, a large proteoglycan (approximately 1,000 kDa) has been isolated from newly-forming bovine bone located in the soft connective tissue between growing trabeculae, but not within the mineralized matrix<sup>9)</sup>.

With regard to PGs containing the CS chains in rabbit bone, although the glycosaminoglycan and amino acid compositions of a core protein have been determined<sup>11)</sup>, the relationship between the types of CS chain and the core proteins with which they are associated have not been determined so far.

In the present study, we have isolated PGs containing CS chains from the mineralized and demineralized bone matrix of rabbit midshaft subperiosteal bone, and partially purified them using anion exchange column chromatography. The characteristics of the extracted PGs were determined by gel electrophoresis and Western blotting, using a combination of three monoclonal antibodies (MAbs) and different types of chondroitinase digestion.

## Materials and Methods

### *Bone protein extraction*

Fresh midshaft subperiosteal bones were obtained from rabbit femora, tibiae and humeri. Bone blocks were prepared and cleared of adherent soft connective tissue, and were carefully dissected into small pieces with bone-cutting forceps. Rabbit bone proteins were extracted by a modification of the method<sup>6,13)</sup> described by Termine et al<sup>14)</sup>. All extraction steps were carried out at 4 °C. The bone fragments (total weight 10 g) were rinsed in PBS containing protease inhibitor (PI), (0.1 M 6-aminohexanoic acid, 5 mM benzamidine

hydrochloride and 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride), pH 7.3. The ratio of tissue weight to extractant volume was 1 g : 200 ml for each extraction. In order to remove organic materials bound to the non-mineralized phase of the bones, they were immersed in 4.0 M guanidine-HCl (GdnCl) in 50 mM Tris-HCl containing PI (pH 7.4) with constant stirring for 8 days, with the solution changed every 2 days. The solution was centrifuged and the supernatant was recovered (G1-extract). The residues were subsequently rinsed with PBS-PI and then extracted with 0.4 M EDTA in 50 mM Tris-HCl containing PI (pH 7.4). The supernatant, which included mineral-binding proteins from the mineral phase, was recovered after centrifugation (E-extract). The demineralized collagenous residues were rinsed with PBS-PI and then re-extracted with 4.0 M GdnCl in 50 mM Tris-HCl containing PI (pH 7.4) in the same manner. The supernatant was recovered after centrifugation (G2-extract). Each extract was concentrated up to 100-fold by ultrafiltration on PM-10 Diaflo membrane filter (Amicon, Danvers, MA, USA) and then dialyzed exhaustively against 0.1 M ammonium bicarbonate containing 0.005% Brij (Sigma; St Louis, MO, USA); the dialyzed materials were freeze-dried for use as the G1-, E- and G2-extracts of rabbit bone.

### *Enzyme digestion*

The lyophilized samples (10 mg each) from the above extracts were separately digested with the following enzymes: 10 mU of protease-free chondroitinase ABC<sup>15)</sup>, 20 mU of chondroitinase B<sup>16)</sup> or 100 mU of chondroitinase AC II<sup>7)</sup> (Seikagaku Corp., Tokyo, Japan). In each case the appropriate buffer described was used at a final volume of 20 ml. Enzyme digestion was performed at 37°C for 60 min except for chondroitinase B, which was digested at 30°C, and the reaction was terminated by freezing at -70°C. Samples with or without each enzyme digestion were freeze-dried, and subjected to sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE).

Table 1. Conditions for use of the monoclonal antibodies for immunoblotting of rabbit bone

enzymes used before immunostaining	antibody designation and class	second antibodies	specifically identified GAG types
Chondroitinase ABC	2B6, IgG1	biotin-F(ab') <sub>2</sub> fragment goat anti-mouse IgG(H+L)	C4S/DS
Chondroitinase ACII	2B6, IgG1	biotin-F(ab') <sub>2</sub> fragment goat anti-mouse IgG(H+L)	C4S
Chondroitinase B	2B6, IgG1	biotin-F(ab') <sub>2</sub> fragment goat anti-mouse IgG(H+L)	DS
Chondroitinase ABC	3B3, IgM	biotin-F(ab') <sub>2</sub> fragment goat anti-mouse IgM	C6S /COS
Chondroitinase ABC	1B5, IgG1	biotin-F(ab') <sub>2</sub> fragment goat anti-mouse IgG(H+L)	COS

#### SDS-PAGE

SDS-PAGE was carried out using a 5-20% gradient cross-linked polyacrylamide gel with a discontinuous Tris-glycine system previously described by Laemmli<sup>18)</sup>. The freeze-dried samples were dissolved in 10 ml of sample buffer containing 2% SDS, 2.0 M urea and bromophenol blue marker to which dithiothreitol 15 mg/ml (w/v) was added. Subsequently, they were heated at 95°C for 5 min. A 6-cm minilab system (Mighty Small II; Hoefer Scientific Instruments, San Francisco, CA, USA) was used to make gradient polyacrylamide gels with a thickness of 0.75 mm. Electrophoresis was carried out at 150 V for 60 min. After electrophoresis, the gels were stained with 0.025% (w/v) silver nitrate<sup>19)</sup>. The gels were washed three times with 25% (v/v) isopropyl alcohol for 60 min each and stained with 0.0025% (w/v) Stains-all<sup>20)</sup>. The Stains-all solution was freshly made prior to use as follows: 30 mM Tris, pH 8.8, containing 7.5% (v/v) formamide and 25% (v/v) isopropyl alcohol, with the volume made up to 100 ml to which was added 2.5 mg of Stains-all in the dark, with stirring. The Stains-all staining was performed overnight at 22°C with gently shaking.

#### Western blotting

The characteristics, specificity, and designation of the MAbs used, as well as the protocols, are listed in Table 1. MAbs 2B6, 3B3 and 1B5<sup>21)</sup> were obtained from Seikagaku Corp. Immunoreaction of these MAbs relies on prior enzyme digestion of specimens with either chondroitinase ABC, B or AC II. These MAbs recognize the oligosaccharide stubs which remain on the PG core proteins after each enzymatic digestion.

Immunotransfer analysis was performed using Horizon Blot (ATTO, Tokyo, Japan) with 39 mM glycine and 48 mM Tris in a 20% (v/v) methanol solution (continuous buffer system) at a constant current of 1.5 mA per cm<sup>2</sup> of the gel for 90 min. At the completion of the transfer, the excess protein binding sites on the transfer membrane (Immobilon PVDF Transfer Membrane; Millipore, Bedford, MA, USA) were blocked with a blocking reagent (Block Ace; Snow Brand Milk Products, Tokyo, Japan) for 18 h at 4°C. The sheet was then washed three times with 10 mM Tris-145 mM NaCl (TBS) containing 0.05% Tween 20 (TBS-Tween), pH 7.4, and incubated for 60 min at 22°C with MAb 2B6, 1B5 or 3B3 diluted 1:100 in 10% (v/v) Block Ace. The sheet



was washed three times with TBS-Tween and incubated for 60 min at 22°C with biotin-conjugated second antibodies (Zymed Laboratories, San Francisco, CA, USA) as listed in Table 1; the antibodies were diluted 1:200 in 10% Block Ace prior to use. The sheets were then washed three further times in TBS-Tween and once in PBS, and then incubated for 30 min at 22°C with horseradish peroxidase-conjugated streptavidin (Gibco BRL Life Technologies, Grand Island, NY, USA) diluted to 15 ml/ml with PBS. The sheets were immersed three more times in TBS-Tween and once in TBS, and then incubated in 0.06% 4-chloro-1-naphthol in methanol 0.04% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in TBS, pH 7.5, for 5-30 min at room temperature.

#### *Anion-exchange column chromatography of E- and G2-extracts*

Approximately 500 mg of the freeze-dried E- and G2-extracts were separately dissolved 1.0 ml of 7.0 M urea in 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4), and filtered with a column guard (mesh size: 0.45 µm, Millipore, Bedford, MA, USA). Each filtered solution was applied to an analytical column (4.6 mm x 10 mm; PerSeptive Biosystems, Cambridge, MA, USA) filled with Poros 20 HQ resin (PerSeptive Biosystems). The column was equilibrated with the above urea-containing buffer, and eluted with a linear gradient of NaCl (0-2.0 M) in the same buffer at a flow rate of 1.0 ml/min using high-performance liquid chromatography (Pharmacia LKB Biotech, Uppsala, Sweden). The eluant was collected in 1.0 ml fractions and protein concentrations were measured using values of absorbance at 230 nm. Each fraction was desalted using a PD-10 column (Pharmacia Biotech) and freeze-dried to determine the levels of PG in the fraction using Western blotting. Enzyme-linked Immunosorbent Assays (ELISA)

Aliquots (10 µl) from each fraction eluted from Poros 20 HQ column were placed in each well of a flat-bottomed microtiter plate (Becton Dickinson Labware, Oxnard, CA, USA), and mixed with 100 ml of Voller buffer (35 mM NaHCO<sub>3</sub>, 15 mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 3 mM NaN<sub>3</sub>, pH 9.6). The plates were left

for at least 48 h at 4°C to coat the wells with PGs eluted in the fractions. The coated plates were then washed three times with PBS containing 0.05% (v/v) Tween-20 (PBS-Tween), and then once with 0.1 M Tris-HCl buffer, pH 8.0. The PGs were digested with chondroitinase ABC (1 mU/well) for 1 h at 37°C. They were then washed three more times with PBS-Tween, and the microtiter wells were then blocked using Block Ace at 22°C for 60 min. The plates were washed three more times with PBS-Tween prior to immunoassay, and incubated with 2B6 antibody diluted 1 : 500 in 10% Block Ace at 22°C for 60 min. After the wells had been washed three more times with PBS-Tween, the second antibody, diluted 1 : 500 in 10% Block Ace, was added to each well, and then incubated for 60 min at 22°C. Unbound antibody was rinsed out by washing three times with PBS-Tween, and horseradish peroxidase-conjugated streptavidin, diluted to 7.5 ml/ml with PBS, was added to each well. The plates were incubated for 30 min at 22°C. Unbound streptavidine was washed out by rising five times with PBS-Tween, and then once more with PBS. The enzyme activity bound to the antibody was measured using o-phenylenediamine solution as a substrate (10 mg o-phenylenediamine dissolved in 100 ml of 1 % methanol, and 10 µl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> added prior to use). After appropriate color development following 5-20 min of enzyme reaction, the reaction was terminated adding 25 µl H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, and the color intensity was measured at 492 nm on a spectrophotometer (Titertek Multiskan Plus; Flow Laboratories, McLean, VA, USA).

## Results

#### *Stains-all staining and antibody reaction of each extract*

Aliquots of the G1-, E- and G2-extracts were electrophoresed on 5-20% gradient minislab gels and stained with Stains-all. As shown in Fig. 1a, several blue-stained bands appeared for the E-extract, while the other two extracts stained pink except for a few blue-stained bands with the G2-

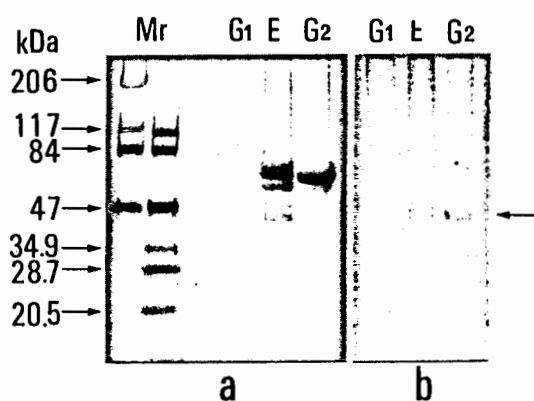


Fig. 1. SDS-PAGE and Western blotting of rabbit bone extracts. (a) Stains-all staining of the G1-, E- and G2-extracts of rabbit bone; (b) Western blotting of those extracts by 2B6 antibody after chondroitinase ABC digestion.

extract.

On Western blotting, the PGs digested with chondroitinase ABC gave 2B6-reactive bands, indicating C4S/DS stubs on PG core proteins, corresponding to molecular masses of approximately 200 and 45 kDa in the E- and G2-extracts, and approximately 200 kDa in the G1-extract, as shown in Fig. 1b.

*Partial purification of CS-PGs in E-extract*

The proteins in the E-extract were separated using a Poros 20 HQ column under denaturing conditions. The elution profile is shown in Fig. 2. To determine CS-PGs in all the fractions eluted

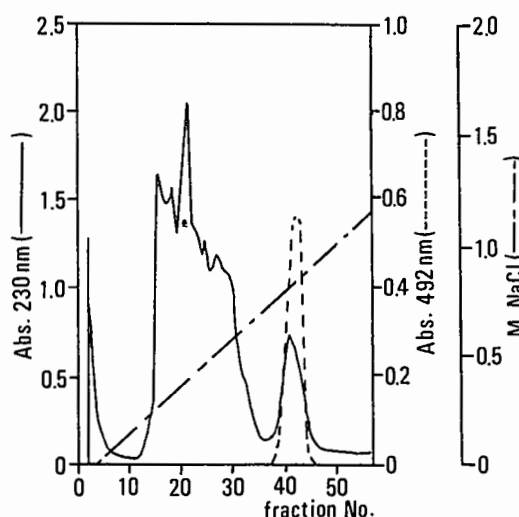


Fig. 2. Poros 20 HQ column chromatogram of the E-extract and ELISA using 2B6 antibody of the eluates. The protein concentrations were monitored using absorbance at 230 nm. The eluents containing C4S/DS-PGs were determined by ELISA using 2B6 antibody after chondroitinase ABC digestion. The assay was performed using 96-microplates and the results were read at 492 nm.

from the Poros 20 HQ column, aliquots of each fraction were added to the wells of the microtiter plate. After chondroitinase ABC digestion, the PGs in each well were analyzed by ELISA using 2B6 antibody. 2B6-reactive PGs in the E-extract were identified in fraction nos 38 to 45, which eluted with 0.8-0.9 M NaCl coinciding with the third peak of the protein profile.

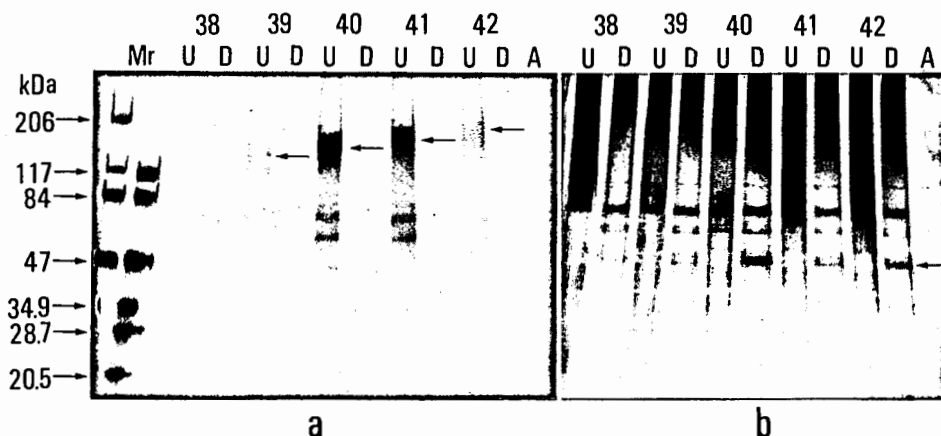


Fig. 3. Stains-all and silver staining of fraction nos 38 to 42 of Fig. 2. (a) Stains-all staining; (b) silver staining; lanes U, undigested; lanes D, chondroitinase ABC-digested.

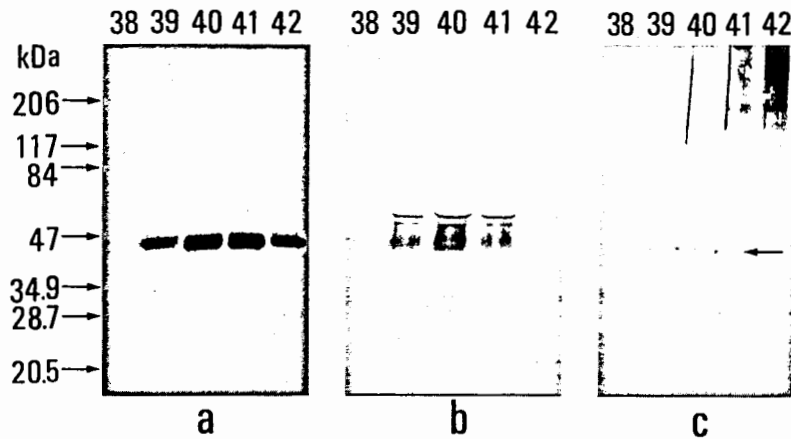


Fig. 4. Western blotting of fraction nos. 38 to 42 of Fig. 2. (a) Reactivity of 2B6 antibody against PGs digested with chondroitinase ABC; (b) reactivity of 2B6 antibody against PGs digested with chondroitinase B; (c) reactivity of 3B3 antibody against PGs digested with chondroitinase ABC.

*1) Stains-all and silver staining*

Aliquots of fraction nos. 38 to 42 and those digested with chondroitinase ABC were separated by SDS-PAGE, and proteins stained with Stains-all and silver (Fig. 3).

The broad Stains-all stained band between 120 and 200 kDa in fractions nos. 38 to 42 disappeared after chondroitinase ABC digestion (lanes U and D in Fig. 3a), and intact CS/DS-containing PGs were stained blue with Stains-all. After the PGs had been digested with chondroitinase ABC, a band appeared at approximately 45 kDa with silver staining after digestion, which could be core proteins of CS/DS-PGs (lane D in Fig. 3b).

*2) Antibody reaction*

Aliquots of fraction nos. 38 to 42 were electrophoresed after chondroitinase ABC, B or AC II digestion, and transferred onto the membranes for immunoblotting with 2B6, 3B3 or 1B5 antibody. After PGs had been digested with chondroitinase ABC and B, the 2B6-reactive bands were identified at approximately 45 kDa in fraction nos. 39 to 42, and several bands appeared in the 45 to 50 kDa region in fraction nos. 39 to 41, as shown in Figs. 4a and 4b, respectively. On the other hand, the 3B3-reactive bands of PGs digested with chondroitinase ABC were identified at approximately 45 kDa in

fraction nos 39 to 41 and approximately 200 kDa in fraction nos 40 to 42, as shown in Fig. 4c. However, 2B6- and 1B5-reactive bands against PGs digested with chondroitinase AC II and chondroitinase ABC were not detected in all fractions.

*Partial purification of CS-PGs in G2-extract*

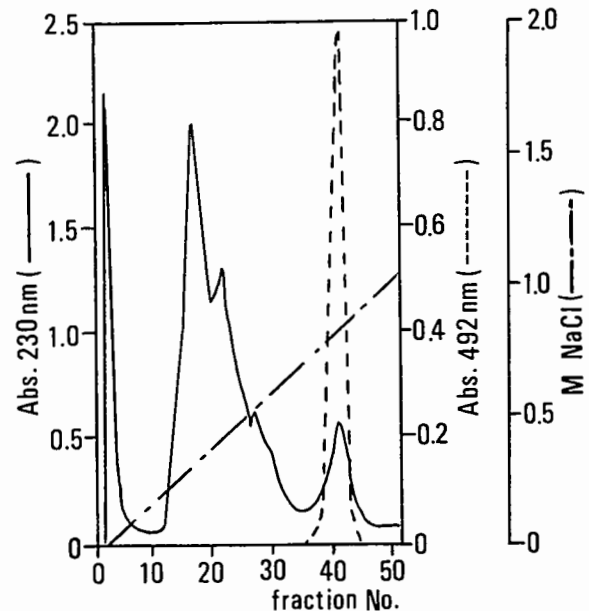


Fig. 5. Poros 20 HQ column chromatogram of the G2-extract and ELISA using 2B6 antibody. Protein concentrations and ELISA using 2B6 were carried out as described in Fig. 2

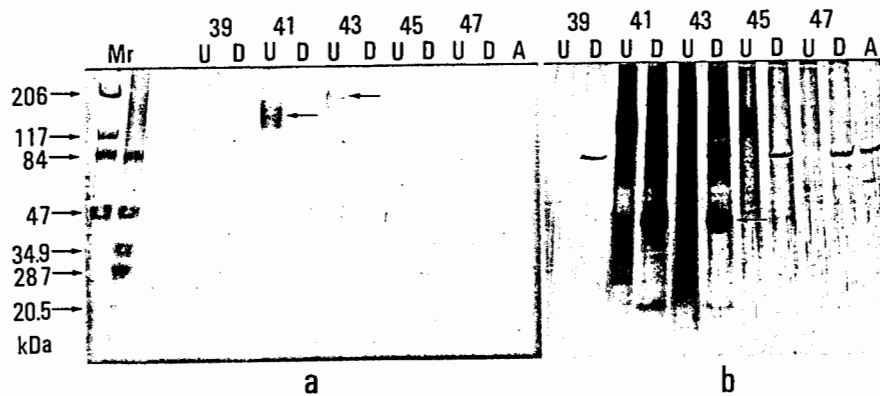


Fig. 6. Stains-all and silver staining of fraction nos. 39 to 47 of Fig. 5. (a) Stains-all staining; (b) silver staining; lanes U, undigested; lanes D, chondroitinase ABC-digested.

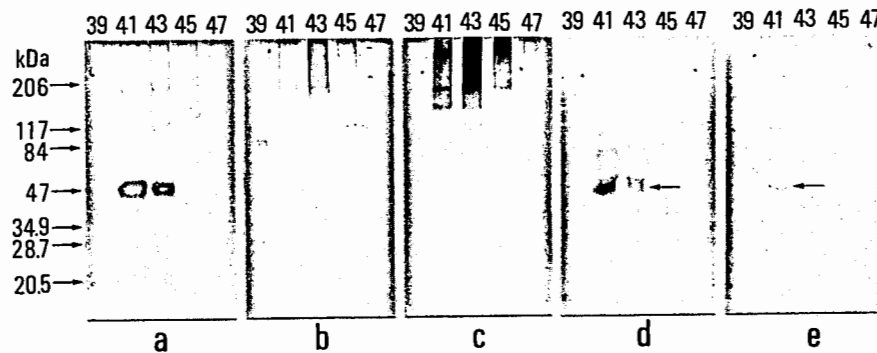


Fig. 7. Western blotting of PGs in fraction nos 39 to 47 of Fig. 5. (a) 2B6 reactivity after chondroitinase ABC digestion; (b) 1B5 reactivity after chondroitinase ABC digestion; (c) 3B3 reactivity after chondroitinase ABC digestion; (d) 2B6 reactivity after chondroitinase B digestion; (e) 2B6 reactivity after chondroitinase AC II digestion.

Proteins in the G2-extract were separated using a Poros 20 HQ column under denaturing conditions. The protein elution profile was similar to those of the E-extract, as shown in Fig. 5. PGs were digested with chondroitinase ABC, and analyzed by ELISA using 2B6 antibody, for the E-extract. The 2B6-reactive PGs in the G2-extract were identified in fraction nos 38 to 45 eluted with 0.8-0.9 M NaCl, which were quite broad fractions compared with the profile of the PGs in the E-extract.

#### 1) Stains-all and silver staining

Aliquots of fraction nos 39 to 47 and those digested with chondroitinase ABC were electrophoresed and stained with Stains-all and silver (Fig. 6). The Stains-all stained broad bands

between 140 and 180 kDa in fraction nos 41 and 43 disappeared after chondroitinase ABC digestion, indicating intact CS-containing PGs stained blue with Stains-all (Fig. 6a). After the PGs were digested with chondroitinase ABC, a band of approximately 45 kDa appeared with silver staining, indicating it could be core proteins of CS-PGs (lanes 41 D and 43 D in Fig. 6b).

#### 2) Antibody reaction

Aliquots of fraction nos. 39 to 47 were electrophoresed after chondroitinase ABC, B or AC II digestion, and transferred onto the membranes for immunoblotting with 2B6, 1B5 or 3B3 antibodies. 2B6-reactive bands, after digestion with chondroitinase ABC, were identified at

approximately 45 kDa in fraction nos 41 and 43, as shown in Fig. 7a. 1B5-reactive bands were identified at approximately 200 after chondroitinase ABC digestion, indicating core proteins of C0S-PG, in fraction nos 41 and 43, as shown in Fig. 7b. 3B3-reactive bands, against PGs digested with chondroitinase ABC, indicating core proteins of C6S/C0S-PG, were identified at approximately 200 and 180 kDa in fraction nos. 41, 43 and 45, as shown in Fig. 7c. On the other hand, 2B6-reactive bands after chondroitinase B and AC II digestion, indicating respectively core proteins of DS and C4S-PGs, were identified at approximately 45 kDa in fraction nos. 41, and 43, and at approximately 45 kDa in fraction No. 41, as shown in Figs. 7d and 7e, respectively.

**Discussion**

Previous biochemical and analytical studies have identified several types of glycosaminoglycan (GAG) chains in rabbit bone proteoglycans<sup>9,11</sup>. However, the types of GAG could not be confirmed because the immunological techniques employed have yet to be fully developed. This study demonstrates the different types of GAG associated with PGs in the mineral and matrix phases of rabbit subperiosteal bone, using three MAbs, 2B6, 3B3 and 1B5, which are specific for the recognition of C4S and DS, C6S and C0S, and C0S chains on core proteins of PGs after certain enzyme digestions, respectively.

Although a procedure for the sequential extraction of bone proteins, involving the use of 4.0 M GdnCl followed by 0.4 M EDTA with 4.0 M GdnCl, has frequently been used to isolate mineral-

binding proteins<sup>3-5,14</sup>, all solubilized materials present in both the mineral and matrix phases are extracted at the same time by this method. In the present study, therefore, a three-step extraction procedure<sup>6,13</sup> was used which was performed with 4.0 M GdnCl (G1-extract), and then 0.4 M EDTA without GdnCl (E-extract), followed by 4.0 M GdnCl (G2-extract), to separate the mineral- and matrix-binding proteins.

By utilizing the former, two-step method, it has been reported that prominent mineral-binding PGs, isolated from several animal species, are a small PG family which appear to consist of two types of PG with 45 kDa core proteins; one has two GAG chains (120 kDa; PG I) and the other has one GAG chain (80 kDa; PG II)<sup>3-5</sup>. On the other hand, Goldberg et al.<sup>16</sup> using the three-step protocol demonstrated that at least two types of small CS-PG were present in the mineral phase of fetal porcine calvaria; one class of PG (120 kDa) has a core protein (45 kDa) homologous to the l-iduronic acid-rich proteodermatan sulfate, and the other PG (110 kDa) possessed two other classes of CS chain. Takagi et al.<sup>7,8</sup> also demonstrated PGs containing C4S and/or DS, having core proteins with a molecular mass of 45 kDa, in the mineral and matrix phases of rat midshaft subperiosteal bone using the three-step method.

In the present study, we showed that in the E- and G2-extracts of rabbit bone, there were four and two broad 120-200 kDa bands, respectively, which appeared to be intact CS-PGs. On Western blot

Table 2. Differences the GAG chains between E- and G2-extracts

Extract	
mineral-binding PG	DS, C6S,
G2-extract	
matrix-binding PG	DS, C6S, C4S, COS,

Table 3. Molecular masses of core proteins of CS-PGs

Mineral-binding PGs		Matrix-binding PGs
DS-PG	45 KDa	45 KDa
C6S-PG	45 KDa	
	200 KDa	200 KDa
C4S-PG	N.D.	45 KDa
CoS-PG	N.D.	200 KDa

N.D.: not detected

analysis, the intact CS-PG in the E-extract were found to be predominantly DS- and C6S-PGs; C4S- and C0S-PGs were not detected. The molecular masses of the core proteins of the DS- and C6S-PGs were approximately 45 and 200 kDa, respectively, after chondroitinase ABC digestion. The DS- and C6S-PGs found in the E-extract may be different from the mineral-binding PGs found in recent biochemical studies of fetal porcine calvaria<sup>6)</sup> and rat subperiosteal bone<sup>7,8)</sup> using the three-step extraction technique; these studies demonstrated the presence of C4S-PG in the E-extract. The present study also demonstrated C4S- and/or DS- (mostly DS), C0S and C6S-PGs in the G2-extract; a major one is DS-PG and others are C4S-, C6S- and C0S-PGs. The molecular masses of the core proteins of these PGs after chondroitinase ABC digestion are approximately 45 kDa (DS- and C4S-PGs) and 200 kDa (C6S- and C0S-PGs), respectively.

Takagi et al.<sup>7)</sup> demonstrated immunocytochemically that C4S and/or DS-PGs were present in the wall of osteocyte lacunae and bone canaliculi in the mineralized matrix, as well as in the unmineralized matrix, such as pre-bone (osteoid), vascular canals and pericellular matrix surrounding the osteocytes. Therefore, the observation of a significant difference in molecular mass between the two core proteins, 45 and 200 kDa, may indicate that the former population corresponds to the small PGs of bone not closely associated with the mineral phase, such as pre-bone and the pericellular matrix surrounding the osteocytes, and that the latter may correspond to a high molecular mass PG found in soft connective tissue.

In conclusion, the GAG chains and molecular masses of the core proteins of CS/DS-PGs in the mineral and matrix phases of rabbit bone are summarized in Tables 2 and 3. We have shown that the mineral-binding PGs contained mostly DS and C6S chains on the core proteins of 45 and/or 200 kDa but not C4S chains, which were different from the results for CS chains of bovine<sup>3,5)</sup> and porcine<sup>6)</sup> bones and C4S/DS chains of rat bone<sup>7,8)</sup>. On the other hand, the matrix-binding PGs contained mostly DS, C6S, C4S and C0S chains. Moreover, we have

identified the presence of small number of intact mineral- and matrix-binding CS/DS-Pgs with molecular masses of 120-200 and 140-180 kDa, respectively. The differences in the distribution of several CS-containing PGs in rabbit bone may be important for the regulation of the bone matrix assembly upon initiation of calcification and crystal growth.

### Acknowledgment

This study was supported in part of by the Sato Fund, Nihon University School of Dentistry.

### References

- 1) Weight T.N., Heinegard D.K., and Hascall V.C.: Proteoglycans: structure and function. Cell biology of extracellular matrix. Second edition. (Hay E.D. ed). Plenum press, New York, 1991, pp 45-78.
- 2) Yanagishita M.: Function of proteoglycans in the extracellular matrix. Acta Pathol Jap, 43:283-293, 1993.
- 3) Fisher L.W., Termine J.D., Dejter S.W. Jr., Whitson S.W., Yanagishita M., Kimura J.H., Hascall V.C., Kleinman H.K., Hassel J.R. and Nilsson B.: Proteoglycans of developing bone. J Biol Chem, 258:6588-6594, 1983.
- 4) Fisher L.W.: The nature of the proteoglycans of bone. (Butler W.T. ed). The chemistry and biology of mineralized tissues. Ebsco Media, Birmingham, 1985, pp188-196.
- 5) Fisher L.W., Termine J.D., and Young M.F.: Deduced protein sequence of bone small proteoglycan I (biglycan) shows homology with proteoglycan II (decorin) and several nonconnective tissue proteins in a variety of species. J Biol Chem, 264:4571 -4576, 1989.
- 6) Goldberg H.A., Domenicucci C., Pringle G.A., and Sodek J.: Mineral-binding proteoglycans of fetal porcine calvarial bone. J Biol Chem, 263:12092-12102, 1988.
- 7) Takagi M., Maeno M., Kagami A., Takahashi Y., and Otsuka K.: Biochemical and immunocytochemical characterization of mineral binding proteoglycans in rat bone. J Histochem Cytochem, 39:41-50, 1991.

- 8) Takagi M., Maeno M., Takahashi Y., and Otsuka K.: Biochemical and immuno- and lectin-histochemical studies of solubility and retention of bone matrix proteins during EDTA demineralization. *Histochem J*, 24:78-85, 1992.
- 9) Maeno M., Taguchi M., Kosuge K., Otsuka K. and Takagi M.: Nature and distribution of mineral-binding, keratan sulfate-containing glycoconjugates in rat and rabbit bone. *J Histochem Cytochem*, 40: 1779 -1788, 1992.
- 10) Engfeldt, B. and Hjerpe, A.: Glycosaminoglycans and proteoglycans of human bone tissue at different stages of mineralization. *Acta Pathol Microbiol Scand*, 84:95-106, 1976.
- 11) Bartold, P.M.: A biochemical and immunohistochemical study of the proteoglycans of alveolar bone. *J Dent Res*, 69:7-19, 1990.
- 12) Herring G.M.: Studies on the protein-bound chondroitin sulphate of bovine cortical bone. *Biochem J*, 107:41-49, 1968.
- 13) Domenicucci C., Goldberg H.A., Hofmann T., Isenman D., Wasi S., and Sodek J.: Characterization of porcine osteonectin extracted from foetal calvariae. *Biochem J*, 253:139-151, 1988.
- 14) Termine J.D., Belcourt A.B., Conn K.M., and Kleinman H.K.: Mineral and collagen-binding proteins of fetal calf bone. *J Biol Chem*, 256:10403-10408, 1981.
- 15) Oike Y., Kimata K., Shinomura T., Nakazawa K., and Suzuki S.: Structural analysis of chick-embryo cartilage proteoglycan by selective degradation with chondroitin lyases (chondroitinases) and endo-b-D-galactosidase (keratanase). *Biochem J*, 191:193-203, 1980.
- 16) Michelacci Y.M. and Dietrich C.P.: A comparative study between a chondroitinase B and a chondroitinase AC from *Flavobacterium heparinum*. Isolation of a chondroitinase AC-susceptible dodecasaccharide from chondroitin sulphate B. *Biochem J*, 151:121-129, 1975.
- 17) Hiyama K. and Okada S.: Crystallization and some properties of chondroitinase from *Arthrobacter aurescens*. *J Biol Chem*, 250:1824-1828, 1975.
- 18) Laemmli U.K.: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227:680-685, 1970.
- 19) Merrill C.R., Goldman D., Van Keuren M.L.: Simplified silver protein detection and image enhancement method in polyacrylamide gels. *Electrophoresis* 3:17-23, 1982.
- 20) Campbell K.P., MacLennan D.H., and Jorgensen A.O.: Staining of the Ca<sup>2+</sup>-binding proteins calsequestrin, calmodulin, troponin C, and S-100, with the cationic carbocyanine dye "Stains-all". *J Biol Chem*. 258:11267-11273, 1983.
- 21) Couchman J.R., Caterson B, Christner J.E., Baker J.R.: Mapping by monoclonal antibody detection of glycosaminoglycans in connective tissue. *Nature* 307:650-652, 1984.

日本財団補助金による

1996年度日中医学協力事業助成報告書

- 在留中国人研究者研究助成 -

1997年3月7日

財団法人 日中医学協会

理事長 中島 章 殿

I. 研究者氏名 凌 慶東

研究機関 東京歯科大学 研究指導者 野間弘康 職名 主任教授

所在地 〒261 千葉市美浜区真砂 1-2-2 電話 043-270-3973 内線 \_\_\_\_\_

II. 過去の研究歴

1984.9~1989.9 中国 杭州市第一医院 口腔科

1991.4~1992.3 東京歯科大学 口腔外科学 第一講座 第一専修科生

1992.4~1996.3 東京歯科大学 大学院 口腔外科学 第一講座 大学院生

III. 過去の研究実績

凌慶東, 他: 凍結乾燥神経移植の臨床応用に関する実験的研究 - 第1報. 神経の再生限界について - (第47回 日本口腔科学会総会, 1993年5月13日, 弘前)

凌慶東, 他: 凍結乾燥神経移植の臨床応用に関する実験的研究 - 第2報. 長い神経移植片内の残遺基底膜について - (第48回 日本口腔科学会総会, 1994年4月22日, 別府)

IV. 本年度の研究業績

(1) 学会、研究会等における口頭発表 (学会名・内容)

凍結乾燥神経移植の臨床応用に関する実験的研究 - 第4報. 総合的な神経再生の評価について - (第50回 日本口腔科学会総会, 1996年4月5日, 鹿児島)

末梢神経欠損の修復における再生神経線維の形態計測および評価 (第258回 東京歯科大学 学会例会, 1996年6月1日 千葉)

(2) 学会誌等に発表した論文 無 ・ 有 (雑誌名・論文名)

凌慶東・野間弘康: ウサギ大耳介神経における凍結乾燥同種神経移植に関する実験的研究 - 長距離神経欠損に対する同種神経移植についての検討 - 「日本口腔外科学会雑誌」 第43巻 第1号 (平成9年)

凌慶東・野間弘康, 他: 凍結乾燥同種神経移植に関する電子顕微鏡的観察 - 特に Schwann 細胞基底膜構造の変化と再生神経との関連について - 歯科学報 投稿中

V. 今後の研究計画及び希望

今後、凍結乾燥神経移植の臨床応用のために、神経再生の促進因子の発見と人工材料による神経架橋術などの開発を目的とし、さらに研究を行う必要があると考えらる




VI. 研 究 報 告 (日本語、又は英語で書いて下さい。2,000字程度で記載して下さい。)

VII. 指導教官の意見

凍度東留学生は1991年4月より、当教室に入局し、1992年4月、大学院研究科に入学した。彼は研究テーマ「凍結乾燥神経における神経再生」が与えられたとすぐに研究を開始し、わずか1年余で学会発表可能な結果を報告した。これは、同年度の大学院生に比し最も早い研究進行状況である。(彼の旺盛な探究心と努力の結果と考えられる。) その後、コンピューターを用いた統計処理法や高倍率電子顕微鏡の技術習得に努め、これらの手法を応用し今までとは違った視点からの結果を導き出した。本結果は、従来の研究結果の裏付けをばりだけでなく、凍結乾燥同種神経移植をより可能なものとし、その神経再生のメカニズムを説明するといった新発見も見いだすものであった。以上の結果の一部は博士論文としてまとめられているが、更に、副論文「凍結乾燥同種神経移植に関する電子顕微鏡的観察」も提出している。

以上の如く、彼は優秀な研究業績を残しているが、当教室員との交流も深く、後輩の相談に乗ったり、サッカー、バドミントン等のスポーツを通じ多くの友人を持っていた。これは、彼の温厚で優しい人柄や、試練によるものと考えられた。

野間 弘康 

## 研究報告

### 凍結乾燥神経移植に関する実験的研究

#### 一長距離神経欠損に対する同種神経移植についての検討一

本研究は腫瘍切除手術などによる長距離神経欠損に対して神経修復を目的とし、従来に無い長さ40mmの凍結乾燥同種神経移植において、再生神経線維がSchwann細胞基底膜の消失後も進展できるのか、進展し回復するとすればどの様になるのかについて検討した。

実験はニュージーランドホワイ種ウサギより坐骨神経を採取し、凍結乾燥処理を行った後、日本白色種ウサギの左側大耳介神経の欠損部に長さ40mmの凍結乾燥神経片を用いて同種移植した。対照として右側に自家の坐骨神経を採取し、新鮮自家神経移植片を用いて移植した。手術後12, 18, 24, 30, 48週に刺激電極は移植部の末梢端縫合部より10mmの末梢側に、記録電極は中枢端縫合部より10mmの中枢側に設置し、神経複合活動電位を導出し、神経最大伝導速度

(S.C.V.) を算出した。測定後、移植片を摘出し、通方より固定を行い、spurr resin に包埋した後、薄切切片を作成した。その後、光学顕微鏡による観察を行い、画像をコンピューターに入力し、単位面積あたりの有髄神経線維数を計測した。続いて電子顕微鏡による観察を行い、これらの画像をコンピューターに入力し、髄鞘厚径、有髄線維の髄鞘外形周囲長と軸索周囲長などを計測した。さらに形態学計測結果とS.C.V.との相関係数を求め、両者の関連を解析した。その結果：1.凍乾移植群および自家移植群において両群ともに移植12週後に活動電位が導出された。再生神経の伝導速度は、移植後12週において凍乾移植群は平均  $24.96 \pm 1.37 \text{ m/sec}$  で、自家移植群は平均  $30.86 \pm 5.64 \text{ m/sec}$  であり、凍乾移植群は自家移植群より遅かった。その後、両群ともに伝導速度が増大し、移植後48週において凍乾移植群は平均  $36.13 \pm 3.80 \text{ m/sec}$  で、自家移植群は平均  $42.07 \pm 3.91 \text{ m/sec}$  であり、両群間の差は減少している傾向が認められた。

2. 光学顕微鏡所見では両群ともに、経日的に単位面積あたりの有髄神経線維数が増加した。また、自家移植群と比較して凍乾移植群では小神経線維束を形成しているのが認められた。

3. 透過型電子顕微鏡所見では、凍乾移植片内においては再生有髄神経線維が円形あるいは楕円形の形態を呈しているのが認められた。さらに再生神経線維を取り囲む再生周膜様細胞およびこれらにより小区画を形成しているのが多数観察され、経日的に大きくなるのが認められた。これに対し、自家移植片内においては再生有髄神経線維は楕円、馬蹄形などさまざまな形態を呈し、再生過程に小区画化は認められなかった。

4. 自家移植群において神経伝導速度と高い相関係数を示したのは神経線維の髄鞘外形周囲長、髄鞘厚径、有髄軸索周囲長と髄鞘外形内面積であった。凍乾移植群においては神経伝導速度と高い相関係数を示したのは神経線維の有髄軸索周囲長、髄鞘外形周囲長、髄鞘外形内面積と有髄軸索面積であった。

以上のことより，長さ 40 mm の凍結乾燥同種神経移植においても形態学および電気生理学的に良好な神経再生が認められた。また，再生神経線維における有髄神経線維の軸索周囲長および髓鞘外形周囲長の計測は機能評価にもっとも近似していることが示唆された。

日本財団補助金による

1996年度日中医学協力事業助成報告書

—在留中国人研究者研究助成—

1997年 3月 12日

財団法人 日中医学協会

理事長 中島 章 殿

I. 研究者氏名 吳 建

研究機関 昭和大学歯学部 研究指導者 久光 久 職名 教授

所在地 〒145 大田区北千束 2-1-1 電話 03-3787-1151 内線 251

II. 過去の研究歴

III. 過去の研究実績

IV. 本年度の研究業績

(1) 学会、研究会等における口頭発表 (学会名・内容)

① 日本歯科保存学会 1996年度秋季学会 (第105回)

10%リン酸水溶液を用いた「ティンクリーニング」後のCa残存量と象牙質接着性の相関

② 昭和歯学会

Total-etch wet-bonding techniqueの接着性能について

(2) 学会誌等に発表した論文 無 ・ 有 (雑誌名・論文名)

V. 今後の研究計画及び希望

歯学博士の学位を取得するために大学院入学を希望し、1997年1月昭和大学大学院歯学研究科を受験して合格しました。4月からは大学院生として、4年間の研究生活がスタートします。大学院修了後には中国に帰って、お世話になった日本と母国である中国の両国の役に立つよう頑張ろうと決意を新たにしています。

**Objectives:** The effect of conditioning using 10 % phosphoric acid both in the Ca-content on the dentine surface and in the efficacy of the dentin bonding system was examined.

**Methods:** The Ca-content on the dentine surface was measured with an energy dispersion electron microanalyser (EDS) mounted on a scanning electron microscope and the residual Ca-content after conditioning was presented in per cent to that on the unconditioned dentine. The efficacy of the dentine bonding system composed of a dentine primer of glyceryl methacrylate (GM) or a 2-hydroxyethyl methacrylate (2-HEMA) solution and a commercial dentine bonding agent containing methacryloxydecyl dihydrogen phosphate was examined by measuring the wall-to-wall polymerization contraction gap width of a commercially available light-activated resin composite restored into the cylindrical dentine cavity in an extracted human tooth.

**Results:** The Ca-content in the dentine was rapidly reduced to 62.12 % of the unconditioned dentine by the 10 % phosphoric acid conditioning even when the conditioning time was as short as five seconds. Complete marginal adaptation was obtained only in the positive control group in which the cavity was conditioned by the 0.5mol/L ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) for 60 sec and primed with the GM solution. In addition, the contraction gap width increased in corporation with the reduction of the Ca-content both in the GM and 2-HEMA priming groups.

**Conclusion:** The dentine conditioning using the 10 % solution should be avoided clinically because the dentine cavity wall rapidly decalcifies and the resin composite paste is apt to separate from the decalcified dentine cavity wall easily.

VII. 指導教官の意見

吳さんは、1995年4月から 普通研究生として昭和大学歯学部 保存修復学教室に所属し、コンポジットレジンと象牙質との接着に興味を持ち、熱心な研究に取り組んで業績を積み重ね、自らその成果を学会で発表してきた。勉学熱心で研究意欲も旺盛であり、人格的にも温厚で他の教室員とも打ちとけ、協調性に優れている。

今年1月に大学院入学を希望し、受験を許可したが、入学試験には優秀な成績で合格した。今後の大学院での研究成果が大いに期待される。

10%リン酸水溶液を用いたデンティンクリーニング後のCa残存量と  
象牙質接着性の相関

昭和六・歯・保存II

○吳建、山下隆史、伊藤和雄、和久本貞雄、久光 久

Effect of decalcification of dentin on the efficacy of dentin adhesive

- Cleaning time with 10% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> solution vs contraction gap width of resin composite in dentin cavity -

○J.WU, T.YAMASHITA, K.ITOH, S.WAKUMOTO and H.HISAMITSU

(Showa University)

【緒言】回転切削器具によって形成された窩壁にはスメア層が付着し、これがレジン材料の接着を阻害するために接着操作に先立って除去すべきであるという理論はすでに広く認識されている。すなわち、エナメル質窩壁に付着したスメア層は40%リン酸によって除去すると同時に小柱構造に基づくマイクロアンダーカットを形成して、機械的嵌合効力による接着効果を期待する手法が臨床的にも広く実践されている。一方、象牙質窩壁に付着するスメア層の処理法についてはいまだに諸説が入り乱れており、統一された理論は見られない。我々はすでにスメア層除去に用いられる酸や酸性モノマーによって象牙質窩壁が軟化される程度に比例して接着性が劣化していく事実を確認し、報告した。すなわちEDTAによってスメア層が過不足なく除去された場合にのみコンポジットレジンと象牙質窩壁との間に完全な適合性が観察され、酸によって不必要に窩壁が脱灰されると、コンポジットレジンペーストは重合時に窩壁から離れて収縮し、窩壁とコンポジットレジンとの間にはコントラクションギャップが形成される。さらに、このような接着の不成立は常に両者の接着界面にのみ形成され、被着体に関する限り接着の成否は象牙質窩壁の物理化学的表面性状にのみ影響されていると考えられる。本研究では、このような相関をさらに化学的に確認するためにクレンザーとして10%リン酸水溶液を用い、象牙質表層Ca量と接着性の相関を検討した。

【材料と方法】象牙質窩壁の脱灰が接着性に与える影響は、10%リン酸によって5秒から60秒間清掃された象牙質円柱窩洞内に35% glyceryl methacrylate (GM) または35% HEMA水溶液によるブライミングを施し、Clearfil Photo Bondを塗布して填塞された可視光線重合型コンポジットレジンSilux Plusのコントラクションギャップ幅を比較計測することによって評価した。また、象牙質窩壁のCa量の変化はヒト抜去大臼歯咬合面を平坦に削除して作成した象牙質平面の半分を粘着テープで被覆し、同様に10%リン酸を用いて5秒から60秒間処理した後にアルコール脱水、カーボン蒸着を施し、走査型電子顕微鏡に装着したエネルギー分散型X線マイクロアナライザーによって清掃面、非清掃面のCa比を計測することによって評価した。

【結果および考察】EDTAによって60秒間処理された象牙質面のCa濃度は未処理面に比較して83.6%のCaが残存し、続いてGMによって窩洞をブライミングした場合にのみ完全な辺縁適合性が確認された。しかしながら、10%リン酸によって窩洞を処理した場合には5秒間の処理でCa量はすでに約60%にまで減少し、さらにこの残存Ca量は処理時間の延長とともに一次相関的に減少した。さらにこのようなCa量の減少とともにコントラクションギャップの幅も有意に増大し、60秒間の処理ではGMおよびHEMAブライミングでそれぞれ窩洞直径に対して0.145および0.073%の幅のギャップが認められた。したがってコンポジットレジンと象牙質窩壁との完全な適合性を獲得するためには象牙質面のCa量を出来るだけ減少させることなくスメア層のみを除去することが重要であり、たとえ短時間でも10%リン酸による処理は不適切であると考えられた。



第2日 B会場 (ヒマワリ)

9:00~10:00 研究発表

座長 寺下正道 (九歯大)

- B22-0900. 修復材料の象牙質/歯髄試験における陰性対照としての酸化亜鉛ユージノールセメントの再評価  
.....○野津慶太, 富士谷盛興, 藤井理史, 木村菜穂子, 古部秀徳  
佐藤尚毅, 新谷英章 (広歯大・保存I)  
猪越重久, 田上順次 (東医歯大歯・保存I)
- B23-0910. コンポジットレジン前処理剤の各種成分がヒト歯髄由来線維芽細胞に及ぼす影響  
.....○山本憲廣, 河野善治, 平山聡司, 金杉紀明, 池見宅司 (日大松戸歯・保存修復)  
早川 徹, 根本君也 (日大松戸歯・歯科理工)

座長 高橋一祐 (東歯大)

- B24-0920. 各種接着性レジンの直接覆髄材としての評価  
.....○北迫勇一, 園田秀一, 猪越重久, 田上順次 (東医歯大歯・保存I)  
富士谷盛興 (広歯大・保存I)
- B25-0930. 試作水酸化カルシウム含有レジン系直接覆髄材の研究  
.....○新沼敦子, 中沼邦欣, 高瀬俊彦, 山崎宗与 (日大松戸歯・歯内療法)  
早川 徹, 根本君也 (日大松戸歯・歯科理工)
- B26-0940. 歯髄の修復能に与える修復材料の影響  
.....○木村健治郎, 金崎伸幸, 北村知昭, 小川孝雄, 寺下正道 (九歯大・保存I)

9:50~10:00 休憩

10:00~11:00 研究発表

座長 奥田禮一 (東北大歯)

- B27-1000. Er:YAGレーザーを用いて齶蝕除去を行ったヒト象牙質に対するレジンの接着  
.....○片海正明, 山田敏元, 佐野英彦, 猪越重久, 田上順次 (東医歯大歯・保存I)
- B28-1010. 象牙質レジン接着界面微細構造の観察  
.....○山内美由紀, 千木良尚志, 伊藤和雄, 久光 久, 和久本貞雄 (昭和大歯・保存II)  
立川哲彦 (昭和大歯・口腔病理)  
中村吉男 (東工大工・金属工学)
- ▶ B29-1020. 10%リン酸水溶液を用いたデンティンクリーニング後のCa残存量と象牙質接着性の相関  
.....○呉 建, 山下隆史, 伊藤和雄, 和久本貞雄, 久光 久 (昭和大歯・保存II)



座長 恵比須繁之 (阪大歯)

- B30-1030. Portable Adhesion Testerによるレジン接着システムのう蝕象牙質に対する接着強さ  
.....○中山賢一, 奈良陽一郎, 田中久義 (日歯大・保存II)
- B31-1040. フッ化炭素鎖を含む表面処理剤の歯科への応用 (VII)  
—イソシアナト系シランカップリング剤によるエナメル質の表面改質—  
.....○二瓶智太郎, 荻原早紀子, 寺中敏夫 (神歯大・保存修復)  
熊田秀文, 梅本俊夫 (神歯大・口腔細菌)  
好野則夫 (東理大工・工業化学)

日本財団補助金による  
1996年度日中医学協力事業助成報告書  
-在留中国人研究者研究助成-

平成9年3月10日

財団法人 日中医学協会  
理事長 中島 章 殿

I. 研究者氏名 沈 凌   
研究機関 日本大学歯学部 研究指導者 西山 實  職名 教授  
所在地 〒101 東京都千代田区神田駿河台 1-8-13 電話 03-3219-8127 内線 \_\_\_\_\_

II. 過去の研究歴

   H2.10.21 来 日 \_\_\_\_\_  
   H4.4.1 ~ H5.3.31 日本大学歯学部 聴講生 (歯科理工学教室) \_\_\_\_\_  
   H5.4.1 ~ 現在 日本大学歯学部助手 (歯科理工学教室) \_\_\_\_\_

III. 過去の研究実績

- 1. 石こう模型の表面精度に関する研究 — アルジネート印象材と硬質石こうとの組み合わせによる石こう模型の表面アラサの光学式測定器による測定 — 歯科材料・器械 Vol. 11, No. 5, 1992
- 2. 鋳造体の表面性状に及ぼす鋳造用埋没材の影響について 日大歯学 Vol. 67, No. 1, 1993
- 3. チタンのろう付けに関する研究 第I報 市販ろう材の組成とろう付け引張強さについて 歯科材料・器械 Vol. 14, No. 2, 1995

IV. 本年度の研究業績

(1) 学会、研究会等における口頭発表 (学会名・内容)

- 1. 第27回日本歯科理工学会 H8.4.21~22  
チタン鋳造用埋没材に関する研究 —埋没材の熱伝導率について— \_\_\_\_\_
- 2. 第28回日本歯科理工学会 H8.9.22~23  
チタン鋳造体の研磨に関する研究 —粒子の形状と研磨面について— \_\_\_\_\_
- 3. 日本大学歯学会平成8年度大会 H8.11.30~12.1  
チタンと各種セメントとの接着強さに関する研究 \_\_\_\_\_
- (2)    4. 第10回歯科チタン研究会 H9.1.9~10  
鋳造体反応層に関する研究 —埋没材とグラファイト鋳型との比較— 特性— \_\_\_\_\_  
日大歯学 Vol. 70, No. 5, 1996 \_\_\_\_\_
- 2. チタンのろう付けに関する研究 第II報 市販ろう材の電気化学的挙動 \_\_\_\_\_  
日大歯学 Vol. 70, No. 5, 1996 \_\_\_\_\_

V. 今後の研究計画及び希望

   ニッケルを含まないTi-Zr-Cu合金系の歯科用チタンろう材の開発を行っている。ろう材の作製には、赤外線照射器を用いたが、試作ろう材中に微細な気泡などが観察された。そこで、現在ろう材の作製方法として、プラズマ放電焼結機 (PAS) を用いる方法やチタン鋳造機のルツボを改良してアーク放電による方法などについて検討中である。さらに、ろう材組成を大きく変化させた場合についても検討する予定である。

VI. 研 究 報 告 (日本語、又は英語で書いて下さい。 2,000字程度で記載下さい。)

別紙

VII. 指導教官の意見

チタンは、軟質なものと硬質なものとあり、口腔内の金属修復物をすべてチタンで作製することが可能な金属である。さらに、現在のところ金属アレルギーの報告もないことから、生体に対して安全な材料であると考えられる。チタンを歯科用金属材料として広く普及させるためには、多方面からの検討が必要であるが、クラウン・ブリッジに利用するためにはろう付などによる加工技術が必要条件である。

沈凌さんの取り組んでいる新しい歯科チタン用ろう材の開発には、多くの期待が寄せられている。すなわち、現在市販されているチタン用ろう材は、構造、ろう付引張強さ、耐食性および融解拡散後の状態の測定・観察結果から、ろう付引張強さは十分であるがニッケルを含有することや積層ろう材による不均一性などの問題点がある。そこで、ニッケルを含まないろう材を試作しているが、高温で活性なチタンを基材とするため、ろう材の作製には、酸化防止、減圧およびろう材の拡散などが必要なのが判明した。そこで、今後、沈凌さんの益々の研鑽によって、所期の目的に叶ったろう材の作製方法の確立と本研究が早期に完結されることを期待したい。

## 研究報告書

平成9年3月10日

沈 凌

### 新しい歯科用ろう材の開発

#### 1. はじめに

チタンは、耐食性、機械的性質および生体適合性などに優れ、歯科修復用材料として有望な金属である。しかし、歯科領域にチタンが応用されてからまだ日が浅く、この材料をさらに広く普及させるには、鑄造時にチタンとの反応性の低い鑄造用埋没材の開発や鑄造修復物の接合方法すなわち、ろう付の検討などが必要で、前者については、マグネシア系、グラファイト系などを基材とした検討が行われているが、後者については検討が始まったばかりである。

現在、チタンのろう付に使用されているろう材は、TiとNi-Cu合金を積層したろう材が用いられている<sup>1)</sup>が、構成成分のNiは皮膚や粘膜に対してアレルギーの問題<sup>2)</sup>があり、また、積層ろう材は、短時間の融解では拡散が不十分でろう材が不均一となる場合があった<sup>3)</sup>。さらに、0.1 M 塩化ナトリウム溶液中における電気化学的挙動からの検討では、Ni含有ろう材で、Niの溶出が疑われた<sup>4)</sup>。そこで、Niを含まないTi-Cu-Zr合金によるろう材を試作し、そのろう付引張強さおよびろう材の反射電子像について検討した。

#### 2. 実験材料および方法

試作ろう材は、工業用ろう材T-5000（東京ブレーズ）を基準に図1に示す6種類とした。ろう材の作製には、試薬の粉末Ti、CuおよびZrを既定の割合で混合し、アルゴン雰囲気の内熱線ろう付器（LIGHT SOLDER：コベルコ科研）を用いた。

試作ろう材のろう付引張強さは、純チタン棒（ $\phi 2.4 \times 20\text{mm}$  JIS 3種：神戸製鋼）を用いて突き合わせろう付を行い、その引張試験から求めた。すなわち、純チタン棒を、精密切断機にて切断したのち、切断片を超音波洗浄器によって洗浄して、ろう付用母材とした。ろう付は、母材をクリップにて固定し、ろう付間隙 $0.05\text{mm}$ とし、試作ろう材 $10\text{mg}$ を置き赤外線ろう付器を用いて行った。ろう付後、母材に流れた過剰なろう材を旋盤にて除去したのち、ろう付試験体を万能試験機（TCM-5000A：ミネベア）を用いてクロスヘッドスピード $1\text{mm}/\text{min}$ の条件で引張り、その平均値を求め、ろう付引張強さとした。

### 3. 結果および考察

図2に試作ろう材のろう付引張強さを示した。引張強さは、試作ろう材No.3が $315.7\text{MPa}$ （最大値： $382.8\text{MPa}$ ）と最も高い値を示した。その他の試作ろう材では、 $230\sim 255\text{MPa}$ であった。

現在、使用されている歯科用チタンろう材のろう付引張強さが、 $510\sim 430\text{MPa}$ <sup>1)</sup>であることから、試作ろう材の引張強さは低い値であった。この理由として、次のことが考えられた。すなわち、基準とした工業用ろう材T-5000のろう付引張強さが、 $381\text{MPa}$ <sup>5)</sup>であるのに対して、同一組成の試作ろう材No.0が $250\text{MPa}$ であったことから、試作ろう材の作製方法に問題があるものと考えられた。そこで、試作ろう材を樹脂に包埋して、空隙の有無や金属組成について反射電子像から検討した。

図3に試作ろう材の反射電子像を示した。これらの写真から試作ろう材には、多くの空隙が観察された。また、No.3では、明確な濃淡差が観察された。これらの濃淡部をX線マイクロアナライザーによって定量分析した結果、Aの部分は純チタンであることが判明した。すなわち、今回作製した試作ろう材では、チタンが完全に拡散せず、さらに、作製中におけるアルゴンガスの巻き込みや酸化物などによると考えられる多くの空隙がみられた。

以上から、チタンろう材の作製に当たっては、作製時より酸化防止および減圧などの環境条件について詳細に検討する必要があると考えられた。

#### 4. 結論

Ti-Zr-Cu合金からなる6種類の試作ろう材を作製し、そのろう付引張強さを測定した結果、次のような結論を得た。

1. ろう付引張強さが最も強いろう材は、No. 3のTi, ZrおよびCuをそれぞれ、45, 25および35wt%とした組成であった。
2. 上記ろう材を用いたろう付引張強さは、315.7MPaであった。
3. 試作ろう材には、多くの空隙が観察された。

#### 文献

- 1) 菊地久二, 沈 凌, 湯田雅士, 松平修一, 西山 實, チタンのろう付に関する研究 第1報 市販ろう材の組成とろう付引張強さについて, 歯科材料・器械, 14巻2号, 213-218, 1995
- 2) 井上昌幸, 中山秀夫, 歯科と金属アレルギー, デンタルダイヤモンド, p 76-85, 1993
- 3) 菊地久二, 湯田雅士, 西山 實, チタン用ろう材の形状および組成について, QDT, 19巻1号, 87-91, 1994
- 4) 菊地久二, 野元成晃, 沈 凌, 小野内 真, 黒谷知子, 太田 肇, 池谷正洋, 西山 實, チタンのろう付に関する研究 第2報 市販ろう材の電気化学的挙動, 日大歯学, 70巻5号, 712-719, 1996
- 5) 菊地久二, 西山 實: ろう付用ろう材の研究, 第7回チタン研究会講演抄録集, 31-32, 1994

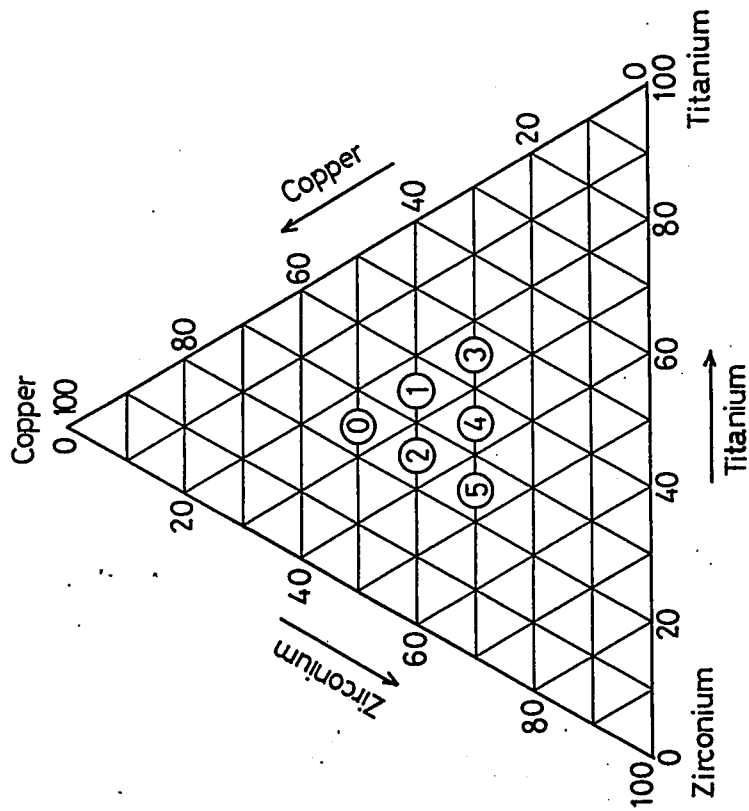


図1 試作ろう材の組成

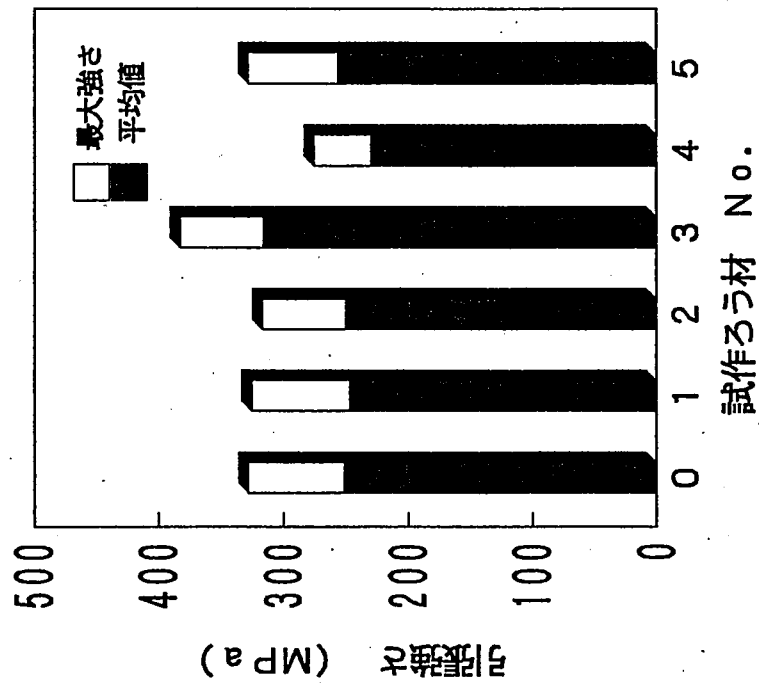


図2. 試作ろう材のろう付引張強さ

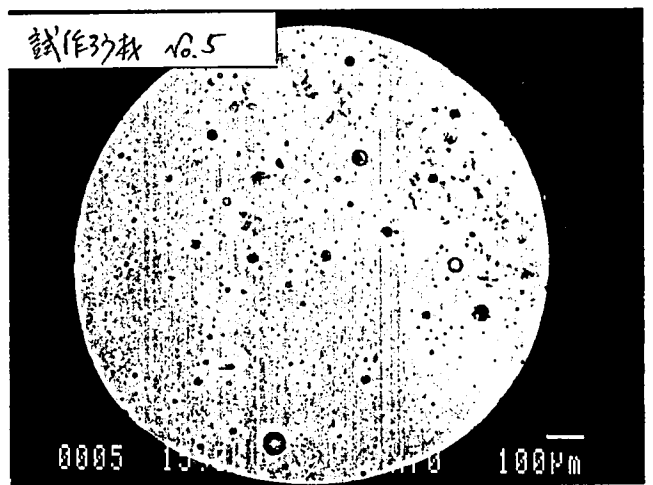
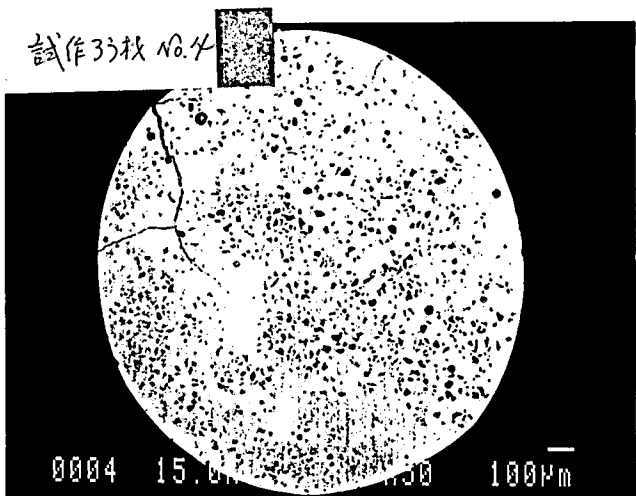
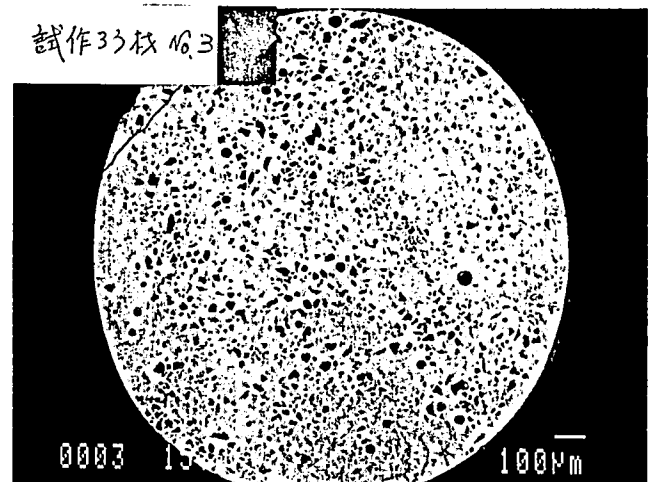
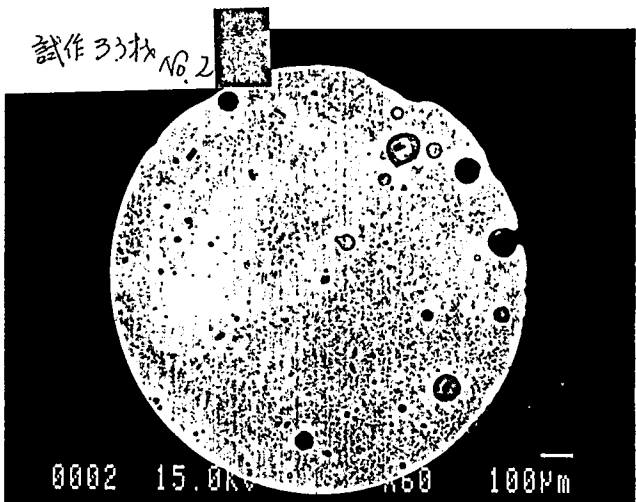
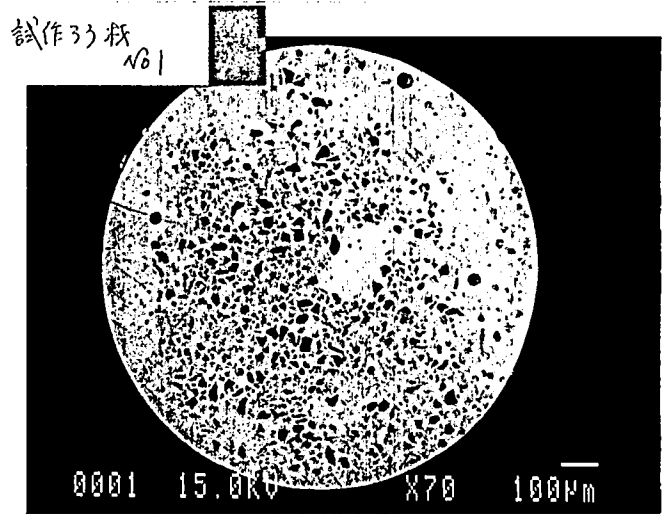
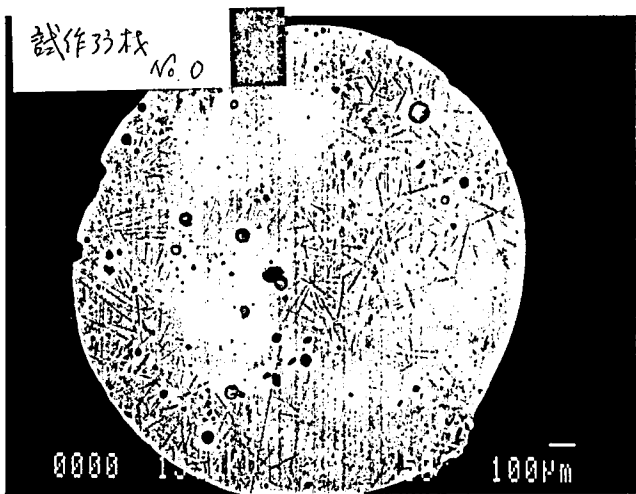


図3. 試作ろう材の反射電子像



日本財団補助金による

1996年度日中医学協力事業助成報告書

—在留中国人研究者研究助成—

1996年 3月 12日

財団法人 日中医学協会

理事長 中島 章 殿

I. 研究者氏名 海米提 斯地克

研究機関 杏林大学病理学教室 研究指導者 松尾 英一 職名 研究生

所在地 三鷹市新川 6-20-2 電話 0422-47-5511 内線 3426

II. 過去の研究歴

中国新疆医学院病理生理教研室に勤めてから、エンドトキシン4生ショックについて研究を行った事があります。

III. 過去の研究実績

雑誌で論文発表した事があります。

海米提 (ハミト) : 肺源性休克产生因素的研究

新疆医学院学报 (ウイグル語) 1: 91~94, 1987

IV. 本年度の研究業績

(1) 学会、研究会等における口頭発表 (学会名・内容)

学会名: 第25回杏林医学会総会

内容: らい腫から分離し、培養を続けている抗酸菌 M.HI-75 をマウスに静脈や腹腔内皮下に注射して、末梢神経において菌の侵入を確認した結果を発表しました。

(2) 学会誌等に発表した論文 無 ・  (有) (雑誌名・論文名)

雑誌名: 杏林医学会雑誌 28 (1)

論文名: らい腫に由来する培養可能抗酸菌 M.HI-75 接種による末梢神経病変の実験的作製

V. 今後の研究計画及び希望

今までの研究方法を改良して、末梢神経において抗酸菌の侵入頻度を高め、もっとも短い時間で、おともよいモデルを作り出し、分子生物学的研究の道も広がる為頑張りますつもりです。

財団法人日中医学学会に報告書

杏林大学医学部病理学教室松尾英一教授等が人癩腫より分離し以後21年間継代培養されてきた抗酸菌M.HI-75 (HI-75) を用い、教授の指導のもとに一作年来動物実験を行ってきた。これは抗酸菌感染による末梢神経病変はハンセン病に特有とされされ、しかもらい菌は培養出来ない菌とされている事の正誤を明らかにせんがためである。つまりらい菌は培養不可能の菌とされているので培養された抗酸菌によってらい菌によるものと同様の病変が起こせばすなわち唯一らい菌のみが神経病変を起こす抗酸菌であるとする定説、あるいはHI-75とらい菌が無関係とする報告のいずれかに修正をせまるものだからである。従ってヌードマウスに接種された今回用いた菌と同じHI-75の末梢神経での増殖と神経炎発症に関する佐々木等の報告はらい菌による病変の理解の上で重大な意義を有するものであるが以後顧みられる事に乏しかったため今回その重大性を鑑み追試とその実験方法の改良を試みたわけである。つまりSkinsnes、Matsuo等によりらい腫から分離され、らい菌として報告され、Stanford等によりM.scrofulaceum(MS)とされた抗酸菌HI-75が上記佐々木の報告以後10年を経現在も神経病変を起こす能力を有する事を確認し、上記の問題点について今後検討すべき手段の改良を試みたわけである。実験はマウスにHI-75を静脈注射した群とこの菌をヒアルロン酸と混じて上口唇部に皮下注射した群の2群のマウス組織について経時的に組織学的検討を加える事により行った。以上の結果前者では末梢神経の大部分には目立った病変は生じなかったが後者ではHI-75接種後3ヶ月目の上口唇部に末梢神経を巻き込むマクロファージの増生とその胞体内並びに神経周膜からその内鞘に侵入し、シュワン細胞内で増生する抗酸菌を認めた。以上により培養可能抗酸菌による末梢神経病変の短期実験的作製には成功したと言え、本菌のマウス体内増殖前後における生物学的性状変化の有無、らい菌、本菌並びにMSの相互関係、並びにらい菌以外の末梢神経病変惹起抗酸菌の有無等についての疑問を解く手がかりを得たと考えられる。現在さらに本実験によって得られた病変の電子顕微鏡的解析をすすめています。

この間の就学に伴う経費のために貴財団からの助成金を使用いたしました。貴財団の御援助にたいし、深甚なる謝意を表します。

VII. 指導教官の意見

海米提君は1994年4月以後杏林大学医学部病理学教室にて研究生として業務や研究を体験して来ましたが、その中で興味を示したのは前記の実験と研究に関するものでした。彼が体験した研究とは我々の教室で培養を続けている抗酸菌HI-75を用いるものでこの実験的末梢神経病変はらい菌のみでしか起こせないとされていた病変を培養された抗酸菌によっておこしたものでハンセン病の病因理解の上で極めて重要な研究と言えます。彼の故郷ウイグル自治区はいまだにハンセン病患者が少なくはないところでありますから、彼の研究は故郷でも続行が可能と考えています。彼は人格、研究心、ともに優れた一面をもつ人物であることは勿論、既に卒業校において10年間実験病理学の研究と教育の実績を持っておりますのでこの研究をもとにして学位を取得し帰国後昇進の道が開かれるならば必ず母国における有為の人材の育成に寄与すると確信しています。(松尾)

日本財団補助金による

1996年度日中医学協力事業助成報告書

- 在留中国人研究者研究助成 -

1997年3月5日

財団法人 日中医学協会

理事長 中島 章 殿

I. 研究者氏名 高 潮

研究機関 福岡歯科大学 研究指導者 阿部 公生 職名 教授

所在地 〒814-01 福岡市早良区田村 2-15-1 電話 092-801-0411 内線 670

II. 過去の研究歴

- 1987.9-1994.9 吉林省中医中薬研究院で働いていました。(歯科医師)
- 1994.9-1995.3 福岡歯科大学口腔生化学講座で客員研究員として共同研究しました。
- 1995.4 - 現在 福岡歯科大学口腔生化学講座の大学院生として勉強しております。

III. 過去の研究実績

- 口頭発表: 全国第2回漢方外用治療大会で口腔外用漢方解毒薬の臨床観察と研究(中国・南京)
- 日本第9回唾液談話会で唾液のCaとPiの分泌動態. 第39回歯科基礎学会から総会でカルシウムイオンチャンネルと唾液分泌との相関
- 論文: 歯科ジャーナル1995.141巻163-172頁 最近の中国の歯学部と歯科事情.

IV. 本年度の研究業績

(1) 学会、研究会等における口頭発表(学会名・内容)

- 1. SECOND CHINA-JAPAN JOINT CONFERENCE ON ORAL BIOLOGY: Effects of calcium-ion channel on fluid and protein secretion by the submandibular.
- 2. 第38回歯科基礎学会から総会: 強酸性水の臨床応用上の関係点.
- 3. 第7回日本老年歯科医学会: 唾唾ペプト"の関与.

(2) 学会誌等に発表した論文 無 (雑誌名・論文名)

- 1 歯科基礎医学会雑誌: The effects of the chemical sympathectomy with reserpine on salivary flow rates and protein secretion by rat submandibular glands in response to various agonists
- 2 産界展望: インターロイキン(IL)7-16の最近の研究動向(1) 歯と17-12キ>(IL)7-16の最近の研究動向(2)
- 3 Experiment physiology: The effects of 5-Hydroxydopamine on salivary flow rates and protein secretion by the submandibular and parotid glands

V. 今後の研究計画及び希望

重要な結果が2年間で明らかになったので、今年はこれらの成果から実験しやすい系(促進系: Ca阻害剤(CdCl<sub>2</sub> + フェニリン 3mg/kg) 抑制系: Ca阻害剤(ベラパミル+P-オクトシン 10mg/kg)をEPMIL 水のメカニズムを明らかにする予定である。すなわち次元電流泳動法によるメカニズムの検索、セルレベルとCa阻害剤の併用実験。Ca投与後顎下腺をオキシジズシカテジミン(ドパミンノルアトケリ=オキシアトケリ)量の変化を測定する。さらにカドケリ+性α2 対応α2-レセプターサブタイプαの遺伝子発現は、おもしろいCa阻害剤の影響を明らかにする予定である。

VI. 研 究 報 告 (日本語、又は英語で書いて下さい。2,000字程度で記載して下さい。)

Caイオンと自律神経性レプター(Re)あるいはペプチド性Reとの機能相関に関する研究は非常にすくない。そこで、私は4つのCaイオンチャネル阻害剤(CdCl<sub>2</sub>、ベラパミルニフェジピン、ジルチセム)と12種類の分泌刺激薬(ドーパミン、アドレナリン、アドレチン、テラミン、M-及びP-オクトパミン、メキサミン、フェニレリン、イソプロテリールピロカルピン及びブサミン)を色々な投与量にて併用投与しCaイオンチャネルと各種のReの機能相関を明らかにすることを目的に実験を実施した。

実験動物は12-16週齢のSD系成熟雄性ラットを用いた。顎下腺唾液は従来から報告しているカニエーシエ法に依り採取した。分泌唾液量は重量測定、タンパク濃度はLowry法、タンパク成分はIEFと二次元電気泳動法に依り測定した。また3種類のカタコル量を東ソー全自動カタコルアミン分析計で測定した。

色々な投与量にてアゴニストとCa阻害剤とを併用投与し分泌刺激薬単独の場合の対照群と比較するに依りセルロゲン(5mg/kg一回 2日間ip投与)投与実験も行い、Ca阻害剤と比較した。得られた結果は以下のとおりである。1. Ca阻害剤は低投与量時のテラミン、M-オクトパミン、メキサミン、ブサミンの催唾作用を完全に抑制した。2. Ca阻害剤は各アゴニストの投与量を増加すると解除されたので、競争的阻害と考えられた。3. Ca阻害剤は分泌刺激薬との組み合わせに依り水分泌やタンパク分泌に促進的に働く場合と抑制的に働く場合が認められる。4. アゴニストの作用が促進する場合タンパク成分の分泌型をβ型からα型に変換した。抑制する場合はα型からβ型に変換した。5. CdCl<sub>2</sub>と分泌刺激薬フェニレリンと組み合わせた場合とセルロゲンの場合と同様に促進作用を示しています。6. CdCl<sub>2</sub>は顎下腺と副腎のカタコルアミン量をセルロゲンと異なり、低下させなかった。

以上のことからCaイオンチャネルは唾液腺の水分泌やタンパク分泌に重要な働きをしているだけでなく、各種のバイオアミンの生理作用の調節にも重要な働きをしていると考えられた。

VII. 指導教官の意見

日本に来てから既に2年半が過ぎました。ようやく日本語にも慣れきました。しかし、日本で生活していくのは大変なようです。土、日のお祭日には夜遅くまでアルバイトをしています。その為、休日がなく、段々と体力を消耗しているようにみえます。公費留学生は大変恵まれていますが、私費留学生は大変苦労しています。研究の方面も失敗を重ねながら、なんとか前進しているようです。主人や子供と別離し、生活している姿勢には、何とエネルギーにしているのか、私にはよくわかりませんが、参考にしたいところです。

今回、奨学金を頂き大変役立つのでは存じてはいますが、私はタツタしていないのでよくわかりませんが、役立つようです。後2年間の大学院生活、病気になるないように良く管理したいと考えています。どうも有難うございました。

日本財団補助金による

1996年度日中医学協力事業助成報告書

- 在留中国人研究者研究助成 -

1997年2月10日

財団法人 日中医学協会  
理事長 中島 章 殿

I. 研究者氏名 顧 健  
研究機関 名古屋市立大学薬学部 研究指導者 渡辺 淳 職名 教授  
所在地 〒467 名古屋市瑞穂区田辺通3-1 電話 (052) 836 内線 3425

II. 過去の研究歴

1983年8月-1990年7月 中国北京中日友好病院薬剤部薬剤師

1990年8月-1993年6月 中国北京中日友好病院薬剤部臨床薬学研究室主管薬剤師

1994年4月-1996年3月 名古屋市立大学薬学部研究員

III. 過去の研究実績

1. 顧健: Acetylspiramycin錠剤の溶出率及び生物学的利用率に関する検討. 第1回全国病院若い薬剤師優秀論文報告学術会議, 1991年11月, 北京. (二等賞)

2. 顧健, 湯浅博昭, 松田憲治, 林弥生, 渡辺淳: ラットにおける5-フルオロウラシルの生物学的利用率の変動性に関する検討. 第5回日本病院薬学会年会, 1995年7月22日-23日, 東京.

IV. 本年度の研究業績

(1) 学会、研究会等における口頭発表 (学会名・内容)

顧健, 湯浅博昭, 渡辺淳: ラット小腸における5-フルオロウラシルの初回通過代謝. 日本薬学会第117年会, 1997年3月26日-28日 (予定).

(2) 学会誌等に発表した論文 無 ・  (雑誌名・論文名)

Yuasa, H., Matsuda, K., Gu, J., Suzuki, E., Yokouchi, I. and Watanabe, J.: Dose-dependent gastrointestinal absorption of 5-fluorouracil in rats *in vivo*. *Biol. Pharm. Bull.*, 19, 1494 - 1498, 1996.

V. 今後の研究計画及び希望

5-フルオロウラシルの初回通過代謝における肝臓と小腸の相対的寄与および投与量依存性を明らかにし、生物学的利用率および薬効の変動との関係を探りたい。また、修士課程終了後、博士課程に進学し、さらに研究経験を積むと共に、先端的学問の修得に努めたい。

## VI. 研 究 報 告 (日本語、又は英語で書いて下さい。2,000字程度で記載して下さい。)

5-フルオロウラシル(5-FU)は経口抗癌剤として利用されているが、生物学的利用率(消化管から血漿中への移行率)の低さと変動性に起因していると考えられる個体間および個体内での薬効の変動が問題とされている。生物学的利用率にこのような問題を生じる原因としては、(1)腸管からの吸収性(腸管膜透過性)の問題と(2)循環血に到達するまでの代謝分解(初回通過代謝)による消失の問題が考えられる。我々は、その原因を明らかにし、5-FUを用いた経口療法の改善のための基礎情報を得るために研究を進めてきている。

我々は、ラット腸管灌流法を用いた検討により、5-FUの腸管吸収は良好である可能性が高いことを既に報告している。本年度、in vivo実験法を用いてさらに詳細な検討を続けた結果、能動輸送の関与により若干の投与量依存性があるが、治療域を含む広い投与量範囲で5-FUの吸収は良好で、吸収率はほぼ100%に達することを示すことができた(*Biol. Pharm. Bull.*, 19, 1494 - 1498, 1996)。したがって、5-FUの生物学的利用率の問題は、主に、初回通過代謝の問題に起因しているものと考えられる。

一方、初回通過代謝の問題についても平行して検討を進めてきており、先の第5回病院薬学会年会(1995年7月22日-23日、東京)において、肝臓だけでなく腸管組織においても5-FUの代謝が起こっている可能性があることを指摘したが、本年度、腸管灌流法を用いた実験により腸管での代謝について検討した。実験にはWistar系雄性ラット(約260g、非絶食)を用い、urethane麻酔下で、小腸中央部10cmを0.15 ml/minの流速で一回灌流しながら腸管膜静脈血を採取した。また、採血による失血を補うため、大腿静脈より輸血した。定常状態での灌流液中及び血漿中5-FU濃度をHPLC法(UV検出)により測定し、吸収率(管腔からの消失率)と血中への出現率を求めた。その結果、腸管膜静脈血中には腸管腔から消失した5-FUの約50%しか出現しないことが明らかとなった。残りの約50%は腸管組織内で代謝により消失しているものと考えられる。現在、5-FUの腸管での代謝の濃度(投与量)依存性などについて、さらに詳細な検討を続けており、日本薬学会第117年会(1997年3月26日-28日)にて発表予定である。

以上のように、5-FUの腸管での利用率(代謝されずに通過する割合)は50%程度であることが明らかとなったが、生物学的利用率(循環血中への到達率)は25%程度であり、肝臓での初回通過代謝も無視できないと考えられる。今後、5-FUの初回通過代謝における肝臓と小腸の相対的寄与および投与量依存性等について検討し、生物学的利用率および薬効の変動との関係を明らかにしていくことが必要であると考えられる。

## VII. 指導教官の意見

願健さんは、学習、研究意欲が豊かであり、また非常に勤勉である。日本人の若い学生が研究室に現れない午前中の時間に、すでに実験を開始している姿もしばしば見られる。研究員時代から通算して3年近く当研究室で研究に従事しているが、最近、日本語も格段に上達し、日本人学生ともよく協調、協力して、上記の研究報告にあるように、着実に成果を上げつつある。何より自分の実験のテーマをよく理解し、直接の指導している湯浅博昭助教授とよく打ち合わせを行っているのがよい結果を生んでいる原因であるとみられる。また、本年度は、貴協会からの助成が頂けたことも本人にとって大きな励みとなったものと思われる。今後も変わらず努力を重ねて研究を实らせると共に、将来、日中の友好、協力を貢献できる人材に育つことを期待する次第である。

## Dose-Dependent Gastrointestinal Absorption of 5-Fluorouracil in Rats *in Vivo*

Hiroaki YUASA,\* Kenji MATSUDA, Jian GU, Emiko SUZUKI, Itsuko YOKOUCHI, and Jun WATANABE

Faculty of Pharmaceutical Sciences, Nagoya City University, 3-1 Tanabe-dori, Mizuho-ku, Nagoya 467, Japan.

Received April 25, 1996; accepted July 29, 1996

Dose-dependent gastrointestinal absorption of 5-fluorouracil (5-FU) was kinetically evaluated in rats *in vivo* by analyzing gastrointestinal disposition after oral administration, where a linear model assuming first-order gastric emptying followed by first-order intestinal absorption was fitted to remaining fraction *versus* time profiles for the stomach and small intestine to estimate the rate constants of gastric emptying ( $k_g$ ) and intestinal absorption ( $k_a$ ). With an increase in dose from 1.5 nmol/rat (low dose) to 15  $\mu$ mol/rat (high dose), the  $k_a$  decreased from 5.95 to 0.55  $\text{min}^{-1}$ , suggesting the involvement of carrier-mediated transport. This study is the first to demonstrate the dose-dependent gastrointestinal absorption of 5-FU *in vivo*, though it has long been suggested *in situ* and *in vitro*. Meanwhile, at both the low and high doses, the  $k_g$  values, which were unaffected by dose (0.069 and 0.082  $\text{min}^{-1}$ , respectively, for the low and high doses), were smaller than the  $k_a$  values by an order of magnitude or more and the recovery of 5-FU was negligible, compared with that of inulin (a nonabsorbable marker), in the most distal segment of ileum. These results suggest that, regardless of dose, 5-FU is highly absorbable in a gastric emptying-limited manner. Thus, well-publicized bioavailability problems (low and erratic) of 5-FU may be attributable to extensive and variable first-pass metabolism rather than poor and variable gastrointestinal absorption.

**Key words** intestinal absorption; 5-fluorouracil; dose dependency; rat; carrier-mediated transport; gastrointestinal disposition analysis

5-Fluorouracil (5-FU) has been widely used in the treatment of solid tumors, such as breast and gastrointestinal cancers, and is clinically available in oral dosage forms.<sup>1</sup> However, the bioavailability of orally administered 5-FU in humans is reportedly low and erratic (0–74%).<sup>2</sup> Carrier-mediated transport, which can cause dose-dependent variability in gastrointestinal absorption (absorption rate constant and fraction absorbed), has long been suggested to be involved in the intestinal absorption of 5-FU and suspected to be at least in part a source of the problems.<sup>3–12</sup> However, this remains unconfirmed with little information about 5-FU absorption *in vivo*.

In an effort to determine the sources of the bioavailability problems of 5-FU, we kinetically evaluated the dose-dependent gastrointestinal absorption of the drug in rats *in vivo* by gastrointestinal disposition analysis.<sup>13</sup>

### MATERIALS AND METHODS

**Chemicals** [<sup>3</sup>H]5-FU (555.0 GBq/mmol), [<sup>14</sup>C]inulin (96.0 MBq/g) and Scintisol, a scintillation cocktail, were purchased from Dupont-NEN Co. (Boston, MA, U.S.A.). Soluene-350, a tissue solubilizer, was purchased from Packard Instrument Co. Inc. (Meriden, CT, U.S.A.). Unlabeled 5-FU (Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Osaka, Japan) was commercially obtained. All other reagents were of analytical grade and commercially obtained.

**Dosing Solutions** The dosing solutions, containing 0.01 (low dose) or 10 (high dose) mM 5-FU with a trace amount (404 kBq/0.728 nmol/ml) of [<sup>3</sup>H]5-FU and a trace amount (33.7 kBq/0.4 mg/ml) of [<sup>14</sup>C]inulin, a nonabsorbable marker, were prepared in saline (0.9% NaCl solution).

**Gastrointestinal Disposition Experiments** Male Wistar

rats, weighing about 300 g and fasted overnight, were given an oral dose of 1.5 nmol/0.15 ml/rat (low dose) or 15  $\mu$ mol/1.5 ml/rat (high dose) of 5-FU using a gastric tube. The rats were then left free in a metabolic cage at the ambient temperature of 25 °C, and sacrificed at 5, 10, 20, 40, or 60 min after dosing by puncturing the heart under ether anesthesia to sample the gastrointestinal contents and tissues of stomach, duodenum and three equal lengths of small intestinal segments (jejunum, midgut and ileum) as described in our previous report.<sup>13</sup> After adding the appropriate amount of saline, the gastrointestinal contents and tissues were homogenized, and a portion of each homogenized sample was solubilized for the determination of radioactivity as also described previously,<sup>13</sup> using Soluene-350 (1 ml) as a tissue solubilizer and Scintisol EX-H (5 ml) as a scintillation cocktail.

The remaining fraction (*FR*) of 5-FU in the gastrointestinal tract of each segment was estimated to be the sum of that in the contents sample and that in the fluid adhering to the tissue. The volume of adherent fluid was estimated from the amount of inulin associated with the tissue.

As discussed earlier,<sup>13</sup> assuming that the apparent intestinal membrane permeability clearance ( $CL_{app}$ ) and the average intestinal lumen volume for unit length ( $V_{av}$ ) are constant along the small intestine, the intestinal absorption can be described as a first-order process with a rate constant of  $k_a$ . Therefore, further assuming that the gastric emptying is described by a first-order rate constant of  $k_g$ , and that the gastric absorption and the transfer from the small intestine to the large intestine are negligible, the same model equation as those for a linear compartment model consisting of the stomach and small intestine compartments can be used to describe the remaining fraction of dose in the stomach ( $FR_s$ ) and small

\* To whom correspondence should be addressed.

intestine ( $FR_{si}$ ) as follows:

$$FR_s = e^{-k_e t} \quad (1)$$

$$FR_{si} = (e^{-k_a t} - e^{-k_e t}) / (1 - k_a / k_g) \quad (2)$$

Equations 1 and 2 were simultaneously fitted to  $FR_s$  and  $FR_{si}$  data, which were corrected for (normalized by) the total fraction of inulin recovered from the gastrointestinal tract, for 5-FU to estimate  $k_a$  and  $k_g$ , using a nonlinear regression program, PCNONLIN (Scientific Consulting Inc., Apex, NC), and weighted according to the reciprocal of the variance.

**Pharmacokinetic Analysis of Plasma Concentration Data** Male Wistar rats, weighing about 300 g and fasted overnight, were cannulated in the right jugular vein under light ether anesthesia. After regaining consciousness and allowing a recovery period of 1 h, each rat was orally (through a gastric tube) or intravenously (through the cannula) given a low dose (1.5 nmol/0.15 ml/rat) of [ $^3\text{H}$ ]5-FU, and left free in a metabolic cage at an ambient temperature of 25°C; 100  $\mu\text{l}$  of blood was taken periodically through the cannula and placed in a centrifuge tube containing 5 units of heparin and centrifuged for 3 min with a Microfuge E (Beckman Instruments, Inc., Palo Alto, CA, U.S.A.) to obtain plasma. The plasma (20  $\mu\text{l}$ ) was placed in a counting vial to which was added 3 ml Scintisol, to determine the radioactivity with a liquid scintillation counter (LSC-1000, Aloka Co., Tokyo, Japan).

Plasma concentration ( $C$ ) versus time ( $t$ ) profiles of 5-FU were analyzed by a one-compartment model with first-order absorption, where the plasma concentrations after oral and intravenous administration are described by Eqs. 3 and 4, respectively,

$$C = A \cdot e^{-k_{el} t} \quad (3)$$

$$C = \frac{A \cdot F_a \cdot k'_a}{(k'_a - k_{el})} \cdot (e^{-k_{el} t} - e^{-k'_a t}) \quad (4)$$

where  $k_{el}$ ,  $k'_a$  and  $F_a$  are the elimination rate constant, the apparent absorption rate constant and the fraction absorbed, respectively, and  $A$  is a constant. The values of  $A$  and  $k_{el}$  were estimated by fitting Eq. 3 to the concentration versus time profiles after intravenous administration using a nonlinear regression program, PCNONLIN. With the values of  $A$  and  $k_{el}$  fixed, the values of  $k'_a$  and  $F_a$  were estimated by fitting Eq. 4 to the concentration versus time profiles after oral administration.

**Gastric Absorption** Male Wistar rats, weighing about 300 g and fasted overnight, were anesthetized with urethane (1.25 g/kg, i.p.), and a low dose of 5-FU was administered to the stomach, which was ligated at the cardia and the pylorus. 5-FU remaining in the gastric contents was determined 60 min after administration as described previously.<sup>14)</sup>

**Biliary Excretion** Male Wistar rats, weighing about 300 g and without fasting, were anesthetized with urethane (1.25 g/kg, i.p.). The common bile duct was cannulated with PE-10 tubing, and bile was collected for 60 min after injection (0.5 ml) of [ $^3\text{H}$ ]5-FU solution (0.01 mM), which was prepared in phosphate buffer (20.1 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ,

12H<sub>2</sub>O, 47.0 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 101.0 mM NaCl, pH 6.4) and added with [ $^{14}\text{C}$ ]inulin as a nonabsorbable marker, into a 5-cm intestinal (midgut) loop. Fifty microliters of the bile sample was placed in a counting vial, to which 5 ml of Scintisol was added for radioactivity determination. At the end of experiments, 5-FU remaining in the intestinal lumen was also determined to evaluate 5-FU absorption (disappearance) from the loop.<sup>15,16)</sup>

**Stability in the Gastrointestinal Contents** Male Wistar rats, weighing about 300 g and fasted overnight, were sacrificed by puncturing the heart under ether anesthesia. Gastric and midgut contents were collected and added with citrate buffer (30.0 mM HCl, 32.8 mM citric acid, 60.0 mM NaOH, 71.8 mM NaCl, pH 2.0) and phosphate buffer (pH 6.4), respectively, to make 20% homogenates. [ $^3\text{H}$ ]5-FU solutions (0.001 mM or 555 kBq/ml) were also prepared in the buffers of pH 2.0 and 6.4. The experiments were initiated by adding 0.65 ml of a 5-FU solution to 0.65 ml of a homogenate in a centrifuge tube (0.5  $\mu\text{M}$  [ $^3\text{H}$ ]5-FU in 10% homogenate). After 60 min of incubation at 37°C, the mixture was centrifuged at 4°C and 15000  $g$  for 10 min with a MRX-150 centrifuge (Tomy Seiko Co., Tokyo, Japan), and the supernatant was filtrated with a disposable filter (DISMIC-25CS 0.45  $\mu\text{m}$ , ADVANTEC Co., Tokyo, Japan). The filtrate was analyzed with a HPLC system (LC-10A, Shimadzu Co., Kyoto, Japan) equipped with a radio analyzer (RLC-700, Aloka Co., Tokyo, Japan) under previously reported conditions<sup>17)</sup> with slight modifications for the column (Wakopak, Wakosil 10C18-200 4.0 mm i.d.  $\times$  250 mm, Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Tokyo, Japan) and injection volume (200  $\mu\text{l}$ )

## RESULTS

**Gastrointestinal Distribution Profiles** The recovery of 5-FU was, regardless of dose and sampling time, comparable with that of inulin in the stomach, but far lower than that of inulin in the small intestine (Fig. 1). The gastric absorption of 5-FU was, as estimated in the closed stomach of rats under urethane anesthesia,  $18 \pm 2\%$  (mean  $\pm$  S.E.;  $n=3$ ) in 60 min, giving an absorption rate constant of  $0.0034 \pm 0.0004 \text{ min}^{-1}$ , which was negligible compared with 20 to 30 times larger gastric emptying rate constants described later. 5-FU was quite stable in gastric and intestinal (midgut) contents, where the fractions recovered were 96 and 99%, respectively, after 60 min of incubation in 10% homogenate at the 5-FU concentration of 0.5  $\mu\text{M}$ . These results suggest that 5-FU is, regardless of dose, rapidly absorbed in the small intestine without gastric absorption or degradation in the gastrointestinal tract. The total recovery of inulin from the stomach and small intestine was about 100% throughout the experimental period of 60 min, assuring that its distribution was restricted within the region of the gastrointestinal tract and transit from the small intestine to the large intestine can be neglected. It was also confirmed that the biliary excretion of 5-FU was negligible: only  $0.37 \pm 0.08\%$  (mean  $\pm$  S.E.;  $n=3$ ) of dose was excreted in 60 min after administration to the closed midgut loop, as estimated in rats under urethane anesthesia, where the absorption



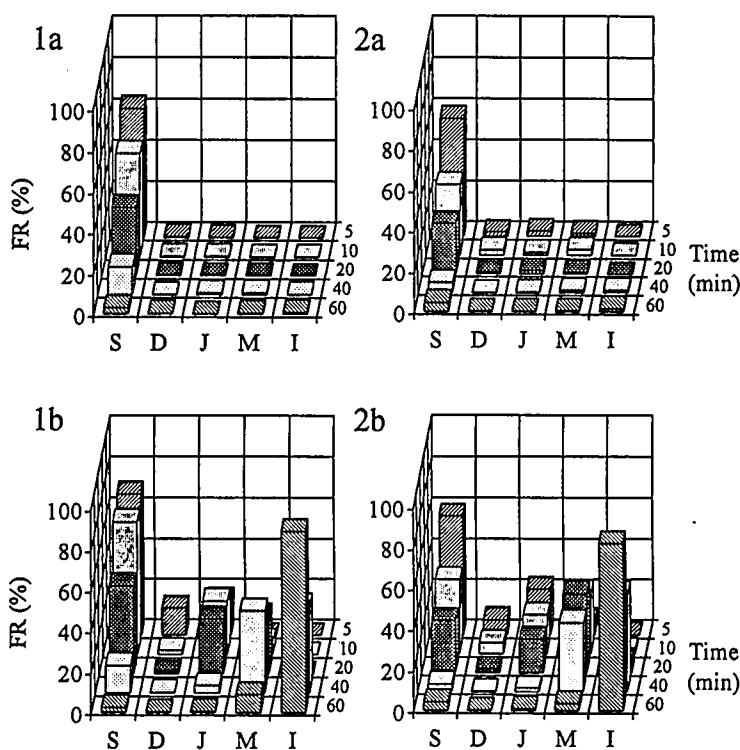


Fig. 1. Gastrointestinal Disposition of [ $^3\text{H}$ ]5-FU and Coadministered [ $^{14}\text{C}$ ]Inulin after Oral Administration of Varied Doses of 5-FU in Rats

Results are represented as the mean ( $n=4$ ). Panels 1a (5-FU) and 1b (inulin) are for the low dose (1.5 nmol/rat), and panels 2a (5-FU) and 2b (inulin) are for the high dose (15  $\mu\text{mol/rat}$ ). Keys: S, stomach; D, duodenum; J, jejunum; M, midgut; I, ileum.

from the loop was almost complete (98%). All these results meet the assumptions in the model analysis incorporated with only gastric emptying and intestinal absorption (Eqs. 1 and 2).

**Kinetic Analysis of Gastrointestinal Disposition** The remaining fractions of 5-FU from all intestinal segments were summed for each time to obtain the total fraction of the drug remaining in the small intestine for model analysis. The profiles of remaining 5-FU *versus* time for stomach and small intestine were successfully described by the model (Eqs. 1 and 2) up to 20 min (Fig. 2), though the model appeared to fit the data somewhat poorly for the low dose. The parameters are summarized in Table 1. After 20 min, the remaining fractions of 5-FU in the small intestine were independent of dose and time, and could not be explained by the proposed model. Because the plasma concentrations of total radioactivity were also independent of time after 20 min as shown in Fig. 3 for the low dose, the luminal radioactivity may be equilibrated with the plasma radioactivity, representing not only 5-FU but also its metabolites (dihydro-5-fluorouracil, 5-fluoroureaidopropionic acid and  $\alpha$ -fluoro- $\beta$ -alanine).<sup>1)</sup>

While the gastric emptying was not affected by dose, intestinal 5-FU absorption was reduced with dose, as reflected by larger fractions remaining in the small intestine and a smaller  $k_a$  value for the higher dose. Because the  $k_a$  value was associated with a large S.E. for the low dose, additional simulations were performed for  $k_a$  values of 1 and 10  $\text{min}^{-1}$  to further confirm the dose dependency in  $k_a$ . The data points for small intestine were within the range of the simulation lines for the  $k_a$  values of 1 and 10  $\text{min}^{-1}$ , suggesting that  $k_a$  for the low dose would not

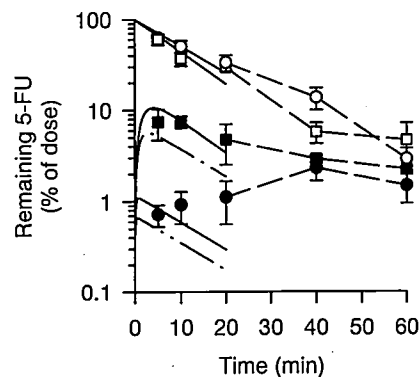


Fig. 2. Remaining [ $^3\text{H}$ ]5-FU *versus* Time Profiles for the Stomach and Small Intestine after Oral Administration of Varied Doses of 5-FU in Rats

Results are represented as the mean  $\pm$  S.E. ( $n=4$ ). The solid lines represent the computer-fitted profiles up to 20 min. For the data after 20 min, where the model was not applicable, each series of data were connected by broken lines for clarity. Keys:  $\circ$  (stomach) and  $\bullet$  (small intestine) for low dose (1.5 nmol/rat), and  $\square$  (stomach) and  $\blacksquare$  (small intestine) for high dose (15  $\mu\text{mol/rat}$ ). The lines of — and — · — are simulation lines using  $k_a$  of 1 and 10  $\text{min}^{-1}$ , respectively, for the low dose.

Table 1. Kinetic Parameters of Gastrointestinal Disposition of 5-FU in Rats

Dose	$k_g$ ( $\text{min}^{-1}$ )	$k_a$ ( $\text{min}^{-1}$ )	$CL_{app}$ ( $\mu\text{l/min/cm}$ )
1.5 nmol/rat	$0.069 \pm 0.008$	$5.95 \pm 27.53$	143
15 $\mu\text{mol/rat}$	$0.082 \pm 0.010$	$0.55 \pm 0.29$	13

Values of  $k_g$  (gastric emptying rate constant) and  $k_a$  (intestinal absorption rate constant) are represented as the computer-fitted parameter with S.E.;  $CL_{app}$ , apparent membrane permeability clearance as  $k_a \cdot V_{av}$ , where  $V_{av}$  is the average intestinal lumen volume (24  $\mu\text{l/cm}$ ).<sup>13)</sup>

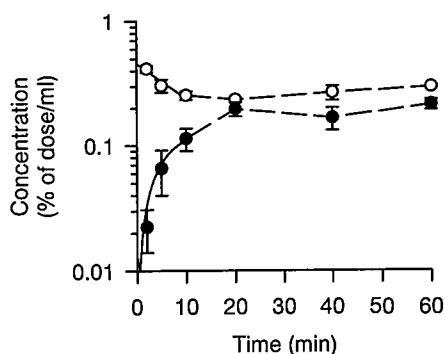


Fig. 3. Plasma Concentrations of Radioactivity after Intravenous and Oral Administration of [ $^3\text{H}$ ]5-FU in Rats

Results are represented as the mean  $\pm$  S.E. ( $n=3$ ). The solid lines represent the computer-fitted profiles. A low dose of 5-FU (1.5 nmol/rat) was administered intravenously (O) and orally ( $\bullet$ ).

be smaller than  $1 \text{ min}^{-1}$  and at least 2 times larger than that for the high dose ( $0.55 \text{ min}^{-1}$ ). This is the first demonstration of dose dependency in intestinal 5-FU absorption *in vivo*, though carrier-mediated transport has long been suggested *in situ* and *in vitro*.<sup>3-12</sup>

The  $k_a$  values were larger than  $k_g$  values by an order of magnitude or more at both the low and high doses, suggesting that the gastrointestinal absorption of 5-FU is gastric emptying-limited regardless of dose. It should also be noted that, for both the low and high doses, the recovery of 5-FU from the most distal segment of ileum was negligibly lower than that of inulin (a nonabsorbable marker), as observed at 40 and 60 min (Fig. 1). Thus 5-FU was strongly suggested to be rapidly and completely absorbed regardless of dose.

**Pharmacokinetic Analysis of Plasma Concentration** To further confirm the gastric emptying-limited absorption of 5-FU, the plasma concentrations of total radioactivity for the low dose were analyzed. Although these concentrations, presumably representing 5-FU and its metabolites,<sup>1</sup> were maintained at a quasi-steady state after 20 min for both intravenous and oral administration, the initial phase of concentrations up to 10 min was successfully described by the one-compartment model with first-order absorption (Eqs. 3 and 4). The kinetic parameters (mean  $\pm$  S.E.;  $n=3$ ) were obtained as follows:  $A=0.457 \pm 0.033\%$  of dose/ml,  $k_{el}=0.0649 \pm 0.0031 \text{ min}^{-1}$ ,  $k'_a=0.041 \pm 0.012 \text{ min}^{-1}$  and  $F_a=1.00 \pm 0.0001$ . The  $k'_a$  was comparable with the  $k_g$  of  $0.069 \text{ min}^{-1}$ . Although  $k'_a$  may be modified by the potential involvement of first-pass metabolism, the appearance rate of [ $^3\text{H}$ ]5-FU-derived radioactivity in plasma should not exceed the absorption (disappearance) rate of [ $^3\text{H}$ ]5-FU from the gastrointestinal lumen. Thus this result suggests that 5-FU absorption is rapid enough to be gastric emptying-limited.

## DISCUSSION

With the estimate of the average intestinal lumen volume ( $V_{av}$ ), intestinal membrane permeability clearance ( $CL_{app}$ ) can be estimated as the product of  $k_a$  and  $V_{av}$ .<sup>13,18</sup> Although dosing volume was larger for the high dose (1.5 ml/rat or 5 ml/kg) than the low dose (0.15 ml/rat or

0.5 ml/kg), our earlier studies showed that  $V_{av}$  of  $24 \mu\text{l}/\text{cm}$  in fasted rats is not affected by dosing volume up to 5 ml/kg. Using the predetermined  $V_{av}$  value,  $CL_{app}$  values were estimated and listed in Table 1.

The intestinal carrier-mediated transport of 5-FU has been extensively characterized *in situ* and *in vitro*,<sup>3-12</sup> where, with the Michaelis constant of 20 to  $100 \mu\text{M}$ , the membrane permeability clearance is maximized (30 to  $70 \mu\text{l}/\text{min}/\text{cm}$ ) at concentrations below  $10 \mu\text{M}$  with carrier-mediated transport predominant, and minimized (2 to  $6 \mu\text{l}/\text{min}/\text{cm}$ ) at concentrations above 1 mM with passive transport predominant.<sup>11,12</sup> On the other hand, 5-FU concentrations in the dosing solutions in this study were 0.01 and 10 mM, respectively, at the low and high doses, and can be lower in the intestinal lumen because of dilution by luminal fluid and absorption. For the low dose, luminal 5-FU concentrations should be lower than  $10 \mu\text{M}$ , suggesting that carrier-mediated transport would be predominant. For the high dose, since 5 to 10% of dose ( $15 \mu\text{mol}/\text{rat}$ ) was distributed in the duodenum to midgut region, of which luminal volume is about 1 ml,<sup>13</sup> luminal 5-FU concentrations would be comparable with or higher than 1 mM, suggesting that passive transport would be predominant. Thus it seems reasonable that  $CL_{app}$  at the low dose is an order of magnitude larger than that at the high dose, in agreement with results *in vitro* and *in situ*. However,  $CL_{app}$  values *in vivo* are an order of magnitude larger than those for corresponding conditions *in situ* and *in vitro* (30 to 70 and 2 to  $6 \mu\text{l}/\text{min}/\text{cm}$ , respectively, for low and high concentrations). This remains unexplained and is a subject for future investigation.

As suggested for D-xylose absorption, which is intestinal absorption-limited,<sup>18,19</sup> the rate and extent of intestinal absorption by passive transport is comparable between rats and humans. Gastric emptying rate constants reported in humans ( $0.02\text{--}0.2 \text{ min}^{-1}$ )<sup>20</sup> are, although variable, also comparable with those in rats in this study (Table 1), suggesting that the two species are comparable for the rate limiting process in the gastrointestinal absorption (gastric emptying or intestinal absorption). Since 5-FU was suggested to be rapidly and completely absorbed even at the high dose, where passive transport is presumably predominant, the same is expected in humans at high doses and also at low doses, where its absorption can be more efficient. Thus, the present study successfully demonstrated dose dependency in intestinal 5-FU absorption in rats *in vivo*, but also suggested that the gastrointestinal 5-FU absorption can be practically independent of dose, being completely absorbed in a gastric emptying-limited manner in rats, and also in humans. The bioavailability problems (low and erratic) of 5-FU may be attributable to extensive and variable first-pass metabolism rather than to poor and variable absorption.

**Acknowledgment** This study was supported in part by a Grant-in-Aid for Scientific Research from the Ministry of Education, Science, Sports and Culture of Japan.

## REFERENCES

- 1) Diasio R. B., Harris B. E., *Clin. Pharmacokinet.*, **16**, 215—237 (1989).
- 2) Christophidis N., Vajda F. J. E., Lucas I., Drummer O., Moon W. J., Louis W. J., *Clin. Pharmacokinet.*, **3**, 330—336 (1978).
- 3) Schanker L. S., Tocco D. J., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **128**, 115—121 (1960).
- 4) Schanker L. S., Jeffrey J. J., *Nature (London)*, **190**, 727—728 (1961).
- 5) Schanker L. S., Jeffrey J. J., *Biochem. Pharmacol.*, **11**, 961—966 (1962).
- 6) Schanker L. S., Tocco D. J., *Biochim. Biophys. Acta*, **56**, 469—473 (1962).
- 7) Muranishi S., Yoshikawa H., Sezaki H., *J. Pharmacobio-Dyn.*, **2**, 286—294 (1979).
- 8) Sasaki H., Nakamura J., Konishi R., Shibasaki J., *Chem. Pharm. Bull.*, **34**, 4265—4272 (1986).
- 9) Bronk J. R., Hastewell J. G., *J. Physiol. (London)*, **382**, 475—488 (1987).
- 10) Smith P., Mirabelli C., Fondacaro J., Ryan F., Dent J., *Pharm. Res.*, **5**, 598—603 (1988).
- 11) Yuasa H., Matsuda K., Watanabe J., *Biol. Pharm. Bull.*, **18**, 747—752 (1995).
- 12) Yuasa H., Matsuhisa E., Watanabe J., *Biol. Pharm. Bull.*, **19**, 94—99 (1996).
- 13) Yuasa H., Numata W., Ozeki S., Watanabe J., *J. Pharm. Sci.*, **84**, 476—481 (1995).
- 14) Yuasa H., Iga T., Hanano M., Watanabe J., *J. Pharmacobio-Dyn.*, **12**, 264—271 (1989).
- 15) Yuasa H., Kuno C., Watanabe J., *J. Pharm. Pharmacol.*, in press.
- 16) Yuasa H., Sekiya M., Ozeki S., Watanabe J., *Biol. Pharm. Bull.*, **17**, 756—758 (1994).
- 17) Watanabe J., Hayashi Y., Iwamoto K., Ozeki S., *Chem. Pharm. Bull.*, **33**, 1187—1194 (1985).
- 18) Yuasa H., Kawanishi K., Watanabe J., *J. Pharm. Pharmacol.*, **47**, 576—580 (1995).
- 19) Yuasa H., Kawanishi K., Watanabe J., *J. Pharm. Pharmacol.*, **47**, 373—378 (1995).
- 20) Oberle R. L., Chen T.-S., Lloyd C., Barnett J. L., Owyang C., Meyer J., Amidon G. L., *Gastroenterology*, **99**, 1275—1282 (1990).



IV. 主な滞在日程

	9月3日	4日	5日	6日	7日	8日
貴田 嘉一	西安到着	シンポジウム準備	シンポジウム		中華医学会と第6回シンポジウム打合せ	帰国
三村 悟郎		西安到着 シンポジウム準備				
村上 啓治		西安到着 シンポジウム準備				

貴田が9月3日に西安到着、シンポジウムの準備、その他中華医学会と打合せ、資料不足の場合、三村、村上が持参する予定とした。5日、6日はシンポジウム開催、7日はシンポジウムの後片付けと中華医学会、中国糖尿病学会の委員と次回第6回のシンポジウム開催について合議した。開催年は1999年（2年間隔で開催することとした）、日本で開催することとした。日本側代表世話人は三村、第6回シンポジウム開催責任者は貴田とすることとなり、8日帰国した。

V. 学術交流報告

中国糖尿病学会の第7回の学術集会在9月1日～3日西安市で開催され、ひきつづいて第5回のシンポジウムが5日、6日の両日ハイヤットホテルで開催した。開会式は中国糖尿病学会の朱禧星会長、中華医学会の尚粹仁副会長、秘書長の挨拶および日本側から三村代表世話人の挨拶が行なわれ、シンポジウムが開催された。特別講演は日本側から貴田嘉一教授、野中共平教授、中国側からXixing Ehu, Xian-Ren Pan教授によって行われたが講演内容は日本、中国の糖尿病の成因についての研究成果および日本の糖尿病治療の現状、中国の糖尿病の疫学について格調のある最新の研究成果が発表され、極めて有意義な特別講演であった。招待講演として日本側から竹田亮祐名誉教授から興味深い肝臓病についての講演が行なわれた。一般演題は日本側から30題、中国側から31題（うち2題は欠）であり、ポスターは中国側から31題であった。本シンポジウムは発表は英語で行ない、質疑応答は日中両国語を用いたが、今回のシンポジウムの講演内容は糖尿病の基礎的研究と臨床研究であり、中国の研究水準の向上が顕著に認められた。また両国の研究者による質疑応答が今回は極めて活発であり、大市にシンポジウムの終了時間がおくれた。更に今回の学術交流を通じて両国間の親善関係がより強固となり、両国の研究者の交流の輪が更に広まったことも今回のシンポジウムの成果の一つといえる。

# 8 年度財団法人日中医学協会助成報告書

— 学術交流に対する助成 —

1996 年 6 月 19 日

財団法人 日中医学協会  
理事長 中 島 章 殿

報告者氏名 青 木 孝  
所属機関名 順天堂大学医学部  
職 名 教 授  
所 在 地 〒113 文京区本郷2-1-1  
電 話 03-5802-1042

◎添付書類：講演集等学会に関する資料

学会・学術交流の名称 第10回日中寄生虫病学セミナー  
テ ー マ 第10回記念：特別講演「本セミナーの15年と展望」、シンポジウム「分子寄生虫学」  
主 催 団 体 第10回日中寄生虫病学セミナー委員会  
代 表 者 委員長・安羅岡一男（筑波大学名誉教授） 事務局：順天堂大学医学部・青木 孝  
期 間 ・ 開 催 地 1996年6月7日～8日、 東京都文京区本郷・順天堂大学有山記念館  
招 へ い ・ 派 遣 目 的

本セミナーは日中両国の学術交流の中でも最も歴史の長いものであり、第1回は1981年に上海で、第2回は1982年に東京で開催され、以来、奇数回は中国で、偶数回は東京で行われてきた。今回は第10回を記念して、内容・開催方法を工夫し、従来の2倍の12名の中国代表団を招聘し、特別講演「本セミナーの15年と展望」、シンポジウム「分子寄生虫学」を企画・実施した。招聘研究者はこれらの講演および学術交流に積極的に参加した。

I. 招へい・派遣研究者 人 数 12 人

1) 氏 名 (漢字) 別紙1 英文名 \_\_\_\_\_ 男・女 \_\_\_\_\_  
所属機関、職名 \_\_\_\_\_ 生年月日 \_\_\_\_\_  
所在地 \_\_\_\_\_  
電話 \_\_\_\_\_ 内線 \_\_\_\_\_

研究課題 \_\_\_\_\_

II. 滞 在 期 間 自 1996 年 6 月 5 日 至 1996 年 6 月 11 日 ( 7 日間)

III. 助成金の使途内訳

助成金額 500,000 円  
交通費 \_\_\_\_\_ 円 宿泊費 500,000 円 食 費 \_\_\_\_\_ 円  
雑 費 \_\_\_\_\_ 円 他 \_\_\_\_\_ 円

・ 招聘派遣研究者記入欄が不足の場合は別紙に追加添付して下さい。



別紙 1

第10回日中寄生虫病学seminar中国代表团名簿

團 長：

肖 梓仁 Xiao Ziren 男 中華医学会・副会長 (北京)

團 員：

賀 聯印 He Lianyin 男 北京医科大学人民医院寄生虫学・教授  
(北京)

沈 一平 Shen Yiping 男 南京医科大学寄生虫病学・教授 (南京)

石 佑恩 Shi Youen 男 同济医科大学寄生虫病学・教授 (武漢)

馮 正 Feng Zheng 男 中国予防医学科学院・寄生虫病研究所  
・所長 (上海)

薛 燕萍 Xue Yanping 女 北京熱帯医学研究所・副所長 (北京)

林 建銀 Lin Jianyin 男 福建医学院寄生虫学・教授 (福州)

陳 雅棠 Chen Yatang 男 重慶医科大学伝染病寄生虫病・教授  
(重慶)

諸 欣平 Zhu Xinping 女 首都医科大学寄生虫病学・講師 (北京)

呂 芳麗 Lu Fangli 女 華西医科大学寄生虫病学・講師 (成都)

周 心寬 Zhou Xinkuan 男 中華医学会上海分会对外連絡部・主任  
(上海)

于 彬 Yu Bin 女 中華医学会对外連絡部日本室・通訳  
(北京)

-----  
連絡先：中国 北京 東四西大街42号  
中華医学会对外連絡部・日本室  
FAX：86-10-512 3754




# 1996年度財団法人日中医学協会助成報告書

— 学術交流に対する助成 —

1996年6月13日

財団法人 日中医学協会  
理事長 中 島 章 殿

報告者氏名 山西 弘一   
所属機関名 大阪大学医学部 細菌学  
職 名 教授  
所 在 地 〒565 吹田市山田丘2-2  
電話 06-879-3311 内線 \_\_\_\_\_

◎添付書類：講演集等学会に関する資料

学会・学術交流の名称 第2回日中ウイルス学会  
テ ー マ 日中ウイルス学交流  
主 催 団 体 中国微生物学会 日中ウイルス学会  
代 表 者 朱 関 福 (中国側) 山西 弘一 (日本側)  
期 間 ・ 開 催 地 1996年6月1日 ~ 6月8日 中国四川省成都  
招 へ い ・ 派 遣 目 的 \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

I. 招へい・派遣研究者 人数 \_\_\_\_\_人

1) 氏 名 (漢字) \_\_\_\_\_ 英文名 \_\_\_\_\_ 男・女  
所属機関、職名 \_\_\_\_\_ 生年月日 \_\_\_\_\_  
所在地 \_\_\_\_\_  
電話 \_\_\_\_\_ 内線 \_\_\_\_\_

研究課題 \_\_\_\_\_

II. 滞 在 期 間 自 \_\_\_\_\_年 \_\_\_\_\_月 \_\_\_\_\_日 至 \_\_\_\_\_年 \_\_\_\_\_月 \_\_\_\_\_日 ( \_\_\_\_\_日間)

III. 助成金の使途内訳

助成金額 300,000 円  
交通費 \_\_\_\_\_ 円 宿泊費 \_\_\_\_\_ 円 食費 \_\_\_\_\_ 円  
雑費 \_\_\_\_\_ 円 他 300,000 円 (学会助成金)

・ 招聘派遣研究者記入欄が不足の場合は別紙に追加添付して下さい。

#### IV. 主な滞在日程

1996年6月1日 日本出発  
6月2日 成都着  
成都市内視察・学会準備  
6月3日  
↓ 学会出席  
6月5日  
6月6日  
↓ 桂林市内視察 桂林医学院附属病院等  
6月7日  
6月8日 広州市内視察 中山医科大学  
帰国

#### V. 学術交流報告

今回は第2回の日中ウイルス学会で中国四川省成都に  
両国利約110名の参加で行われた。前々日の6月1日に  
関西空港に集合し総勢40人の日本側参加者が広州経由で  
成都に到着した。実際の学術交流は6月3日の午前9時  
より開会式が始まった。続いてworkshop 1の「インフルエンザ」  
ウイルスのセッションより日中両国の座長の司会で講演が行われた。  
全体では10セッション、103演題が行われた。  
4年前の前回の学会に比べ両国の科学的レベルの向上が  
感じられた。特にエイズの研究は前回にはあまり盛んでは  
なかったが今回は盛況であった。  
二日目の夜には両国のプログラム委員の懇談及び  
懇親会が行われ、今後は両国で更にプログラムを練り  
特に若手の交流を持ちたいとの提案が行われた。  
次回、第3回日中ウイルス学会は3年後に中国で行われる  
予定である。

日本財団補助金による

1996年度財団法人日中医学協会助成報告書

— 学術交流に対する助成 —

年 月 日

財団法人 日中医学協会  
理事長 中島章殿

報告者氏名 平野 寛  
所属機関名 杏林大学医学部  
職 名 教授 年齢 62 才  
所 在 地 〒181 三鷹市新川6-20-2  
電話 0422-47-5511 内線 3416



◎添付書類：講演集・シンポジウム写真等学会に関する資料

第4回日中合同組織細胞化学セミナー

学会・学術交流の名称 (The Fourth China-Japan Joint Histochemistry and Cytochemistry Seminar)  
テ ー マ 組織細胞化学に於ける最近の進歩と展望  
主 催 団 体 日本及び中国組織細胞化学会  
代 表 者 平野 寛 (日本側代表世話人：日本組織細胞化学会理事)  
期 間 ・ 開 催 地 1996年9月11日～14日, 中国重慶市第三軍医大学

~~招へい~~ 派遣目的 組織細胞化学は、組織や細胞、或いは細胞下レベルの機能的な構造をin situで検討する。組織細胞化学に於ける最近の進歩・発展には目覚ましいものがある。医学・生物学の各分野にわたる研究法として、また汎用される一般的な技術として広く受け入れられている。本合同セミナーは、組織細胞化学に関わる日中の学術交流を積極的に図る目的で1989年発足し、原則として隔年に中国各地で開催、とりわけ中国の組織細胞化学の啓蒙・普及に大きく貢献してきた。1996年9月重慶で開催された合同セミナーは、会を重ねて第4回となる。前回までは、日本側は学会会員有志が任意参加する形式をとってきたが、今回からは日本組織細胞化学会に於ても公式事業の一環として運営することとなった。本事業は、かかる合同セミナーに主要な課題を踏まえた専門家を派遣して、一般講演参加者と共に人物交流をより一層促進し、さらなる学術的な水準向上を図ることを目的とする。

I. 招へい・派遣研究者 人数 5 人

1) 氏 名 (漢字) 平野 寛 英文名 HIRANO, Hiroshi (男)・女  
所属機関、職名 杏林大学医学部教授 (解剖学) 生年月日 1934年5月12日  
所在地 東京都三鷹市新川6-20-2  
電話 0422-47-5511 内線 3416  
研究課題 生体膜に関する組織細胞化学的研究

II. 滞 在 期 間 自 1996年9月8日 至 1996年9月19日 (11 日間)

III. 助成金の使途内訳

助成金額 500,000 円  
交通費 270,000 円 (含参加費) 宿泊費 0 円 食 費 0 円  
雑 費 7,295 円 他 222,705 円  
(運営費補助金)

・ 招聘・派遣研究者記入欄が不足の場合は別紙に追加添付して下さい。

#### IV. 滞在日程

1996年9月9日(月) 出発(成田または関西新空港)、中国到着(上海).  
 9月10日(火) 上海より重慶に移動.  
 9月11日(水) 重慶:参加登録、役員会.  
 9月12日(木)  
 ~14日(土) 重慶:会議(下記「会議次第」参照)及び視察(第三軍医大学).  
 9月16日(月) 重慶より武漢に移動.  
 9月17日(火)  
 ~18日(水) 武漢:会議(下記「会議次第」参照)及び視察(湖北医科大学).  
 9月19日(木) 現地解散、各自適宜帰国.

#### 会議次第(添付資料参照)

##### 1) 重慶:於第三軍医大学

1996年9月11日(水) 午後 参加登録(Registration)  
 15:30~17:00 役員会(Organizing Committee).  
 18:00~20:00 歓迎会>Welcome Party: Reception)  
 9月12日(木) 8:30~9:00 開会式  
 9:00~9:30 記念写真(参加者全員)撮影.  
 9:30~9:50 休憩.  
 9:50~12:20 特別講演(Plenary Lectures).  
 (5席) 日本側:中根一穂(長崎大)  
 平野 寛(杏林大)  
 川生 明(山梨医大)  
 中国側:CHENG Lingzhong  
 成 令忠(上海医大)  
 GUO Wanhua  
 郭 婉華(中山医大)  
 12:20~13:30 昼食  
 13:30~17:00 一般講演(Devison Symposium). 2会場.  
 17:00~18:20 視察(第三軍医大学研究室)  
 18:20~21:00 晩餐会  
 (日本側:参加者全員、  
 中国側:役員及び第三軍医大首脳部)

9月13日(金) 9:30~12:20 一般講演(Devison Symposium). 2会場.  
 12:20~13:30 昼食  
 13:30~15:30 一般講演(Devison Symposium). 2会場.  
 15:30~18:00 示説(Poster Session). 1会場.  
 18:30~20:30 晩餐会(Farewell Party).  
 9月14日(土) 早朝 研究室視察.  
 日中 日中参加者交歓(Excursion:大足).  
 2) 武漢:於湖北医科大学.  
 9月17日(火) 14:00~17:00 湖北医科大学視察.  
 18:00~20:30 歓迎晩餐会.  
 9月18日(水) 8:30~9:00 湖北医科大学(首脳部)表敬訪問.  
 9:00~9:30 開会式  
 9:30~12:00 講演会.  
 (3席) 日本側:平野 寛(杏林大)  
 中根一穂(長崎大)  
 中国側:PIAO Yingjie  
 朴 英杰(第一軍医大)  
 12:00~13:30 昼食  
 13:30~17:00 湖北医科大学視察.

#### V. 学術交流報告

第4回日中合同組織細胞化学セミナー(The 4th Japan-China Joint Histochemistry and Cytochemistry Seminar)は、上記日程に従い、重慶市第三軍医大学(世話人:蔡文琴教授、声原司教授、平野寛教授)及び武漢市湖北医科大学(世話人:周新華教授、平野寛教授)に於て開催された。

1) 主たる会議は重慶で催され、日本側より総勢約30名、中国側より約250名が参加した。特別講演(5席)を含めて日本側は約20題、中国側は約80題の発表があり、活発な情報交換が行われた。内容も酵素組織細胞化学、免疫組織細胞化学、複合糖質組織細胞化学、in situ hybridization、画像処理法、共焦点レーザー顕微鏡法など多岐にわたり、多彩であった。講演及び討議は全て英語で行われた。(但し、質疑応答の一部が途中より中国語に随時通訳乃至解説されることもあった。)

日本側の個々の発表に対して中国側から多大な興味を示され、とりわけ技術面、或いは技法について熱心な質問が寄せられた。一方、中国側の発表内容も、多少の不揃いはあるとはいえ、従前に比し格段の向上がみられた。一部には、抗体など使用する試薬が海外から自由に入手し難い事情を反映した内容の演題もあったが少数に止まった。口頭発表や示のうらかなりの演題では、用いたスライドや展示の表現にパソコン処理を最大限に活用した色彩豊かなプレゼンテーションが目立った。しかし、技術面での進歩の割には、学問的な新知見に乏しかったと判断せざるを得なかった。今回、小規模とはいえ、初めて商業展示がなされ、中国側参加者の多大なる関心を集めた。

第三軍医大学のうち、主として組胚教研室、解剖教研室、病理教研室を中心に視察した。蔡教授主宰の組胚教研室は、神経系を取扱う組織化学的な研究室としてそれなりに整備されていた。また肉眼解剖学標本室もかなり充実していた。但し、研究室によってはひどく貧弱であった。大学構内に自由に立入ることは、学会会場や特定の研究室を除いてやはり制限を受けた。また構内でのスナップ写真撮影も、軍医大学の故か事実上当局の監視下にあり、制約を蒙った。

多少の齟齬はあったとはいえ、現地の主催者側は最大限の努力を傾けていた。会は全体として円滑に運営されていた。参加者が互いに顔を合わせて討議を重ね、友好を暖めたことの持つ意義は大きい。これは日本側参加者も等しく感じたことであった。

2) 武漢 湖北医科大学では、postcongress形式で啓蒙的な講演会を催し、日本側より7名、中国側では約60名がそれぞれ参加した。試みに一部を日本語で講演し、主催者が中国語に通訳したところ好評であった。英語のみでは難解な向きもあった。中国側からの講演は中国語を中心に行われた。質疑応答は活発であったが、手技に関する内容が多かった。

研究室の整備状況は重慶の場合に比し遅れていた。現在の中国では、北京など一部を除いて軍医大学がより恵まれているのは否めないと感じた。

重慶に於けると同様、歓迎会をはじめ学術的な催しを含めて、現地の受入側は極めて友好的で能う限りの配慮を示した。武漢では湖北医科大学のみならず同濟医科大学も加わって実行委員会を構成、運営にあたった。

3) 学術交流の功績により、重慶 第三軍医大学で中根一穂(長崎大)に、また武漢 湖北医科大学では平野 寛(杏林大)にそれぞれ名誉教授の称号が授与された。

4) 第5回日中合同組織細胞化学セミナー(The 5th Japan-China Joint Histochemistry and Cytochemistry Seminar)は、1999年夏上海で開催予定となった。尚、世話人として中国側より成 令忠(上海医大)、日本側より平野 寛(杏林大)がそれぞれ選任された。


日本財団補助金による

1996 年度財団法人日中医学協会助成報告書

—学術交流に対する助成—

平成 8 年 9 月 20 日

財団法人 日中医学協会  
理事長 中島章殿

報告者氏名 岩山幸雄   
所属機関名 朝日大学 歯学部  
職 名 教授 年齢 60 才  
所 在 地 〒501-02 岐阜県本巣郡穂積町穂積 1851  
電話 058-329-1451 内線 \_\_\_\_\_  
(フックスイン)

◎添付書類：講演集・シンポジウム写真等学会に関する資料

学会・学術交流の名称 日中歯周病シンポジウム (Sino-Japanese Periodontal Symposium)  
テ マ 歯周病のリスクファクターほか  
主 催 団 体 日本歯周病学会・中国牙周病学会  
代 表 者 本シンポジウム組織委員長 曹采方 (北京医科大学教授) 副委員長 岩山幸雄 (朝日大学教授)  
期 間 ・ 開 催 地 1996 年 9 月 7 日 ~ 9 日 中国北京医科大学口腔医学院 報告庁  
招 へ い ・ 派 遣 目 的 \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

I. 招へい・派遣研究者 人数 \_\_\_\_\_人

1) 氏 名 (漢字) \_\_\_\_\_ 英文名 \_\_\_\_\_ 男・女  
所属機関、職名 \_\_\_\_\_ 生年月日 \_\_\_\_\_  
所在地 \_\_\_\_\_  
電話 \_\_\_\_\_ 内線 \_\_\_\_\_  
研究課題 \_\_\_\_\_

II. 滞 在 期 間 自 \_\_\_\_\_年 \_\_\_\_\_月 \_\_\_\_\_日 至 \_\_\_\_\_年 \_\_\_\_\_月 \_\_\_\_\_日 ( \_\_\_\_\_日間)

III. 助成金の使途内訳

助成金額 \_\_\_\_\_円  
交通費 \_\_\_\_\_円 宿泊費 \_\_\_\_\_円 食 費 \_\_\_\_\_円  
雑 費 \_\_\_\_\_円 他 \_\_\_\_\_円

・ 招聘・派遣研究者記入欄が不足の場合は別紙に追加添付して下さい。

#### IV. 主な滞在日程

#### V. 学術交流報告

本シンポジウムは、第5回中国牙周科学会と連携に行われた。初日の開会式では中国  
政府衛生部 曹榮桂副部長、北京医科大学副学長 林志彬氏、口腔医学院 張震康院長  
日本歯周病学会理事長 長谷川 紘司教授、主催者である 曹采方北京医科大学教授がそれぞれ  
歓迎の挨拶があった。基調講演は初日に 昭和大学 長谷川教授、華西医科大学 張教授  
が行い、2日目には 大阪大学 岡田教授、北京医科大学 曹教授が行った。

一般発表は中国側と日本側から1人ずつの座長を出し、6題を担当する形式  
で行われた。公式言語は英語であるが中国牙周学会会員の便宜をはかるため  
中国側の発表は左右のスライドが常に英語と中国語というセットで報告された。  
一般演題は50題のうち日本からは14題であったが中国牙周病学会(関連演題  
が67題)献上発表された。

参加者は中国側が約120名、日本側からは39名(同伴者含む)であった。  
今回は現在日本の大学に留学している中国の研究者3名、何濤氏(東医歯大)、徐  
俊呈氏(九州歯科大)、楊秋波氏(鹿児島大)が発表し故郷に錦を飾った感があった。

2日目の閉会式には開会式と同じメンバーの参列を得て組織委員長 曹采  
方氏 日本側からは 岩山 幸雄氏が謝辞を述べた。

3日目は中国牙周病学会会員とともに医学院手配のバスで長城ほか  
を訪問 友好を結んだ。