

日本財団補助金による


1997 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—

1998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 太田伸生  ㊞

所属機関名 名古屋市立大学

職名 教授 年齢 47 才

所在地 〒467-8601 名古屋市瑞穂区瑞穂町字川澄1

電話 052-853-8184 内線

1. 研究課題

揚子江水系の環境変化に伴う日本住血吸虫症の流行動態の調査

2. 研究期間 自 1997 年 4 月 1 日 ~ 至 1998 年 3 月 15 日

3. 研究組織

日本側研究者氏名 太田伸生 (47才)

所属機関 名古屋市立大学 職名 教授

中国側研究者氏名 劉桂初 (47才)

所属機関 湖南省寄生虫病防治研究所 職名 課長

揚子江水系の環境変化に伴う日本住血吸虫症の流行動態の調査

名古屋市立大学医学部医動物学教室 太田伸生

中国湖南省寄生虫病防治研究所 劉 桂初

研究協力者 国立感染症研究所寄生動物部 二瓶直子

I 研究の目的

日本住血吸虫をはじめとする寄生吸虫はその生活史に必ず貝を中間宿主として必要とするので、その疾病流行には自然環境の影響が大きく、その多くが風土病的な様態を示すのが特徴である。中国湖南省、湖北省、江西省一帯の揚子江中流域に存在する日本住血吸虫病流行地では「湖沼型住血吸虫病 (Marshland-type schistosomiasis)」と呼ばれるいくつかの特徴的な流行因子が関与している。その中で最も重要なものは揚子江水系の自然条件である。季節間の水位変化は最大で 10m 以上になり、それによる環境変化は中間宿主貝であるミヤイリガイ (*Oncomelania hupensis hupensis*) の棲息環境に大きく影響する。このような貝の棲息環境の季節ごとのドラステックな変化が中間宿主貝対策の困難な原因にもなっている。特に渇水期に湖岸に広がる草地が貝の繁殖の場を提供している。この地域では今世紀最大級の開発事業として三峡ダムの建設が進められており、その目的の一つに揚子江流域の水位調節があげられている。すなわち揚子江水系の環境変化によって日本住血吸虫の中間宿主貝の生態条件に影響が出る可能性があることを意味しており、国の内外から三峡ダム建設後の本症の流行状況の変化を予測する試みが始まっている。

この研究は中国国内で日本住血吸虫症の流行が最も深刻な湖南省の洞庭湖周辺地区で、三峡ダム建設後に中間宿主貝の棲息分布等にどのような変化が起こるかを予測し、流行拡大を未然に防ぐための対応策の構築をめざした湖南省寄生虫病防治研究所との日中共同研究の一貫として始まった。日中医学協会の研究補助の下で、今年度は人工衛星画像を用いた地理情報システムを住血吸虫症の疫学研究に初めて応用した。洞庭湖周辺の流行地から 2 地区を選定して、その地理的特徴の解析と実際の中間宿主貝の分布状況の調査とをあわせて行い、その地域での揚子江の水位変動が与えるミヤイリガイ棲息環境への影響を考察する手段として実用的な価値があるものかどうかについて検討した。

II 方法

1. 洞庭湖周辺の2地区の選定と人工衛星画像による地理情報解析

洞庭湖周辺はいわゆる「湖沼型住血吸虫病」流行地であるが、その中でも低湿地と幾分丘陵地帯となっている地区とがある。今回は揚子江の増水期と渇水期における衛星画像が両方入手できて、しかも湖南省の研究所が疫学情報を把握している2地点（低湿地と丘陵地）を選定した。そしてその2地点でのミヤイリガイの棲息環境の特徴を地理疫学的に比較解析した。現地調査が1997年11月下旬の渇水期であったので、衛星画像としては1996年4月16日（渇水期）撮影のHRV2データのCD-Romをリモートセンシング技術センターで購入し、そのデータをもとにした現地調査から開始した。画像情報の解像度は約10m以下の誤差で読み取る精度のものとした。選定した2地区は(1) 湖南省華容県新安村：東洞庭湖の西岸から少し離れた低湿地にあり、人口約600人の農漁村、(2) 華容県洪山村：揚子江本流に近い丘陵地に位置し、人口1500人の農村、である。

2. 新安村と洪山村の現地調査と土壌解析

人工衛星画像の解析のために現地調査を行い、画像情報が実際に何を表わしているのかの検証を行った。衛星画像データをパソコンを用いてフォトショップRGBカラー値で表示すると基本的にはR（近赤外）、G（赤）、B（緑）の三色で情報が得られるが、その各パラメーターの意味する地形、植生、土地利用などを現地検証によって確認する必要があったからである。同時にGPS内臓カメラで調査地点の現地撮影を行い、画像から読み取る位置と実際の現地でのGPSによる緯度経度のズレの有無を検証した。貝の生息条件を解析するために、各検査地区の土壌のpHと水のCODおよび硬度をポータブルの測定装置を用いて計測を試みた。また、同地区内の住民の日本住血吸虫感染についての検便の結果と、感染陽性および陰性者の居住地などの資料整理を湖南省寄生虫防治研究所の1995-7年度の調査結果をもとに行った。

3. 湖南省華容県産のミヤイリガイの環境適応に関する屋内実験

調査地区のミヤイリガイを採取して、それを日本に持ち帰った。採取した貝の感染状況を確認するとともに、実験室内で中国または日本のミヤイリガイ生息地の土壌を用いて飼育し、その飼育環境を変化させることによって繁殖能にどのような影響があるのかについての検討をした。

Ⅲ 結果と考察

1. 調査 2 地点の日本住血吸虫症の実態

(1) 新安村は 1995 年の調査で 590 名中、虫卵陽性率は 6.27% (男性 8%、女性 4.5%) である。職業別では漁民の陽性率が 25.9% で最も高く、農民の 7.2%、学生・児童の 1.4% が続く。ヒト以外では水牛が最も重要な保虫宿主で、感染率は 16% である。調査した 10 部落ではミヤイリガイの感染率は 0.33% で、堤防に近い地点ほど貝の生息数、感染率ともに高い。しかし堤防から内側に 600m 離れた地点からも感染貝が見ついている。このような状況から、貝は堤防の近傍で最もよく繁殖し、同時に感染率も高いことが確認された。これは堤防近辺で終宿主⇄中間宿主への感染が起こることを示しており、水との接触が盛んで堤防近辺に近寄ることの多い漁民において最も感染率が高いことと良く一致する。堤防外の土地利用は国営の放牧場となっており草地 (苔草帯、図-1) が広がっている。そこでは農閑期の水牛の放牧の他には特別の土地利用は行われておらず、住血吸虫感染の可能性のある水牛が集まり、その糞が点在する状況となっている。したがって、新安村では渇水期の堤防近辺の草地が感染の場であり、このような状況が何時まで続くのか、あるいは揚子江水系の水位差が顕著でなくなった場合、貝の生息環境にどのような変化が生ずるのかを、この草地を中心に検討すればよいと判定した。

(2) 洪山村は 383 戸、1557 人の村で主要産業は農業であるが、養魚池で魚や蓮根の生産・栽培なども行っている。村民の居住区域は洪水の脅威もあってか揚子江本流から 1-2km 離れた丘陵地帯にある。全面積 612 万 m² のうち、貝の生息面積は 14.1 万 m² (2.3%) で、その約 1/3 は揚子江堤防外の荒れ地である。衛星画像でこの地区を見たときに堤防外の一帯が一面に R (近赤外) 表示となっていたため、それは何であるかが疑問であった。今回それは苔草帯または抽水植物帯 (図-1) であると確認されたが、衛星画像の撮影日である 4 月中旬が同様の状況であるかどうかの判断はできない。住民の日本住血吸虫感染率は 1956 年には 35.5% であったものが 1997 年の検診で 5.2% まで減少した。血中の抗体陽性者は 9.57% で、その大半は 20-50 才の中老年男性であるため、今後の選択的治療薬投与などの対策事業の継続で流行が終息していくことも期待されている。ただ、ミヤイリガイの生息地は揚子江の河川敷で渇水期には高級な中国紙の材料となるヨシが繁茂し、その採取のために地区外から季節労働者が多数集まって、貝の生息地域で野営生活をしている。これらの人達は湖南省の研究所でも「樵民」として要監視のハイリスクグループとしている。この地区においても揚子江河川敷の荒れ地の状況が今後どのように変わっていくのかを予測評価することの重要性が確認された。

2. 調査地区のミヤイリガイ生息土壌の分析

調査地区で土壌を1地点あたり約100~1,000gを採取し、同時に採取状況をGPS内臓カメラで撮影して、帰国後に正確な緯度と経度を求めた(表1)。新安村では9ヶ所、洪山村では6ヶ所で採取した。採取地点のpHをポータブルpHメーターで測定しようとしたが、計測針が故障したため現地での測定は今回は行えなかった。採取土壌について、日本に持ち帰った後に含有ミネラル、pH、土色を測定した(表2)。この解析の結果で特徴的であったのは、中国のミヤイリガイ生息地のpHが5.2~7.6で日本の生息地の土壌に比べて酸性度が強いこと、およびカルシウム含量が高く、全硬度が200~1000mg/土100gであることであった。しかしこの数値はミヤイリガイの生息地点と非生息地点の両方に共通して観察されるものであったため、貝の生息条件を決定する因子ではないと考えられた。

3. 中国産ミヤイリガイの生息土壌環境への適応について

調査地区から702個のミヤイリガイを持ち帰った。日本住血吸虫の感染が確認されたのは新安村の貝576個中8個(1.4%)であった。湖南省産のミヤイリガイを日本の生息地である甲府盆地の土壌で飼育した場合、華容県の土壌を使った時と比べて産卵・孵化率が1/6~1/7程度であり、繁殖地の土壌環境に貝がかなり適応していることが推定された。

以上の調査結果から、湖南省の住血吸虫流行を規定する因子として最も重要なミヤイリガイの分布は土壌の成分によって規定されるのではなく、地形や土地利用などの因子が重要である可能性が考えられた。このことから中国の住血吸虫病流行地の疫学解析には衛星画像を用いた検討がたいへん有効であると思われる。今回の研究では画像のコンピュータ解析データが実際の土地利用や地形をどの程度正確に反映しているのかを整理することができた。特にミヤイリガイの生息地である湖・河岸の草地の情報をある程度正確に評価する見通しを得た。そして今後の問題である揚子江水系の予想される変化と、それに伴う現在のミヤイリガイ生息環境の変動の評価にもこのスポット画像解析が威力を発揮すると期待される。揚子江の問題については、年間の水位変化が現在よりも小さくなるという議論があるが、これが洞庭湖周辺地域の貝の生息面積を拡大するのか減少するのかの予測はついていない。水位変化の変動幅縮小が渇水期のレベルに近づくと想定するならば、揚子江や洞庭湖沿岸部の草地や荒地の面積拡大を意味し、ミヤイリガイの生息面積が拡大することになる。その場合、土壌成分は洞庭湖周辺で大きな違いはないので貝の生息個体数も増加するであろう。反面、貝の繁殖地の自然条件が1年を通じて比較的安定することは、各

種殺貝対策が実施できる面積が増え、殺貝対策の実効が上がることも期待できる。その場合には対策実施対象となる貝の生息面積によって事業規模や予算が決まることになるので、ある程度の正確度を持ったシュミレーションが必要である。

人工衛星画像を利用した地理情報システムの疫学研究への応用はマラリアなど媒介昆虫が関係する感染症の場合に新しい情報をもたらし、近年注目されるようになってきた。日本住血吸虫病も中間宿主貝の分布の地理的因子が患者の発生と密接に関連しており、この種のアプローチによる疫学研究に期待が集まるものの一つである。洞庭湖周辺の場合は、揚子江の増水期と渇水期の2つの端的な環境条件下の地形を衛星画像から把握することによって、様々なシュミレーションが可能になるはずである。現在の土地利用の状況をベースに、貝の生息面積、生息分布、感染者の居住区域などの変動を推測することが今後の課題である。今回検討した人工衛星のスポット画像の情報が日本住血吸虫症の流行の解析に有用であることが示され、今後の中国国内の対策事業の1指標となるなど行政面への貢献が期待されるとともに、わが国の住血吸虫研究に新しい可能性をもたらすものと考えられる。今回は十分な結論を得るところまでは至っていないため、さらに研究調査を継続中である。

IV 結論

揚子江中流域の湖沼型住血吸虫病の流行に及ぼす揚子江水系の今後の環境変化とその中間宿主貝の生態に与える影響を予想する手段として、人工衛星画像を用いた地理情報システムを日本住血吸虫病の疫学解析に応用し、同時に調査対象地区の現地調査を行った。複雑な自然環境条件が流行に影響する日本住血吸虫病の疫学調査と流行予測には今回のスポット画像解析から様々な情報が得られることがわかり、今後のより広範な応用の可能性が確認された。

研究成果の発表予定

1. 学会発表予定：

第67回日本寄生虫学会大会、1998年4月、神戸

日本地理学会大会、1998年4月、東京

第9回国際寄生虫学会、1998年8月、千葉

2. 学術雑誌発表予定：

現在、投稿準備中につき確定した予定はない。

表-1 湖南省 *O. hupensis* 生息地周辺土壤採集地の経緯度

土壤採集地点	緯度	経度
新安村		
(1) 注滋口1渡し幸福	29° 19. 261'	112° 41. 851'
(2) 新安貝2	29 16 341	112 47 042
(3) 新安貝柳3	29 16 261	112 47 152
(4) 新安貝湖草4	29 16 137	112 47 207
(5) 新安貝枯草5鼠穴	29 16 081	112 47 338
(6) 新安6	29 16 226	112 47 001
(7) 柿7	29 18 958	112 41 578
(8) 田8	29 19 833	112 40 437
(9) 柿9	29 19 832	112 40 458
洪山村		
(1) 丘陵内田13	29 28 483	112 34 812
(2) 江州よし1	29 38 322	112 54 502
(3) 江山建州草地2	29 38 532	112 54 424
(4) 洪山貝溝渠3	29 42 681	112 53 825
(5) 洪山3近く田3-4	29 42 429	112 53 879
(6) 洪山田元貝4	29 42 034	112 53 969

表-2 湖南省*O. hupenssis*生息地周辺土壌の諸性質

土壌採集地点	P ₂ O ₅ ^{3m}	Fe ^{2p}	Mn ^{2p}	K ₂ O ^{2m}	CaO ^{2m}	NO ₃ -Nm	NH ₄ -Nm	MgO ^{2m}	pH	土色	重量 (g)
(1) 注滋口1	5	100	100	70	600	1>	1	10	7.05	10YR3/2	159
(2) 新安貝2	5	25	25	20	400	1>	1<	25	6.60	2.5Y3/2-3/3	580
(3) 新安貝柳3	5	50	10	35	200	1>	1<	10<	7.05	10YR3/4	890
(4) 新安貝湖草4	5>	10	0	20	100	1>	1<	10	6.60	10YR3/3	940
(5) 新安貝枯草5鼠穴	5	10	5	150	200	1	1	10	6.48	10YR4/3	970
(6) 新安6	5	10-25	5	35	400	1	1	1	6.95	10YE4/4-1/2	74
(7) 柿7	25	5-10	25<	150	1000<	1>	1	10	6.94	10YE3/4-4/4	583
(8) 田8	5	25	25	20	600	1>	1	10	7.06	10YR4/3	503
(9) 柿9	25	5	50	70	1000<	1>		50	7.59	10YR3/4	134
(1) 丘陵内田13	5>	10	5	20	50	1>	1-5	10	5.16	2.5Y4/4	239
(2) 江州よし1	5	50	50	35	1000	1>	1-5	50	6.87	2.5Y4/2	895
(3) 江山建州草地2	5	100	75	70	1000<	1>	1-5	50	7.08	10YR4/3	718
(4) 洪山貝溝渠3	5	100	10	20	200	1>	1	1	6.84	10YR4/3	790
(5) 洪山3近く田3-4	5	10	25	35	600	1>	0-1	10	6.73	10YR4/4	270
(6) 洪山田元貝4	5>	100	25	20	600	1>	0-1	25	7.59	10YR4/2	472

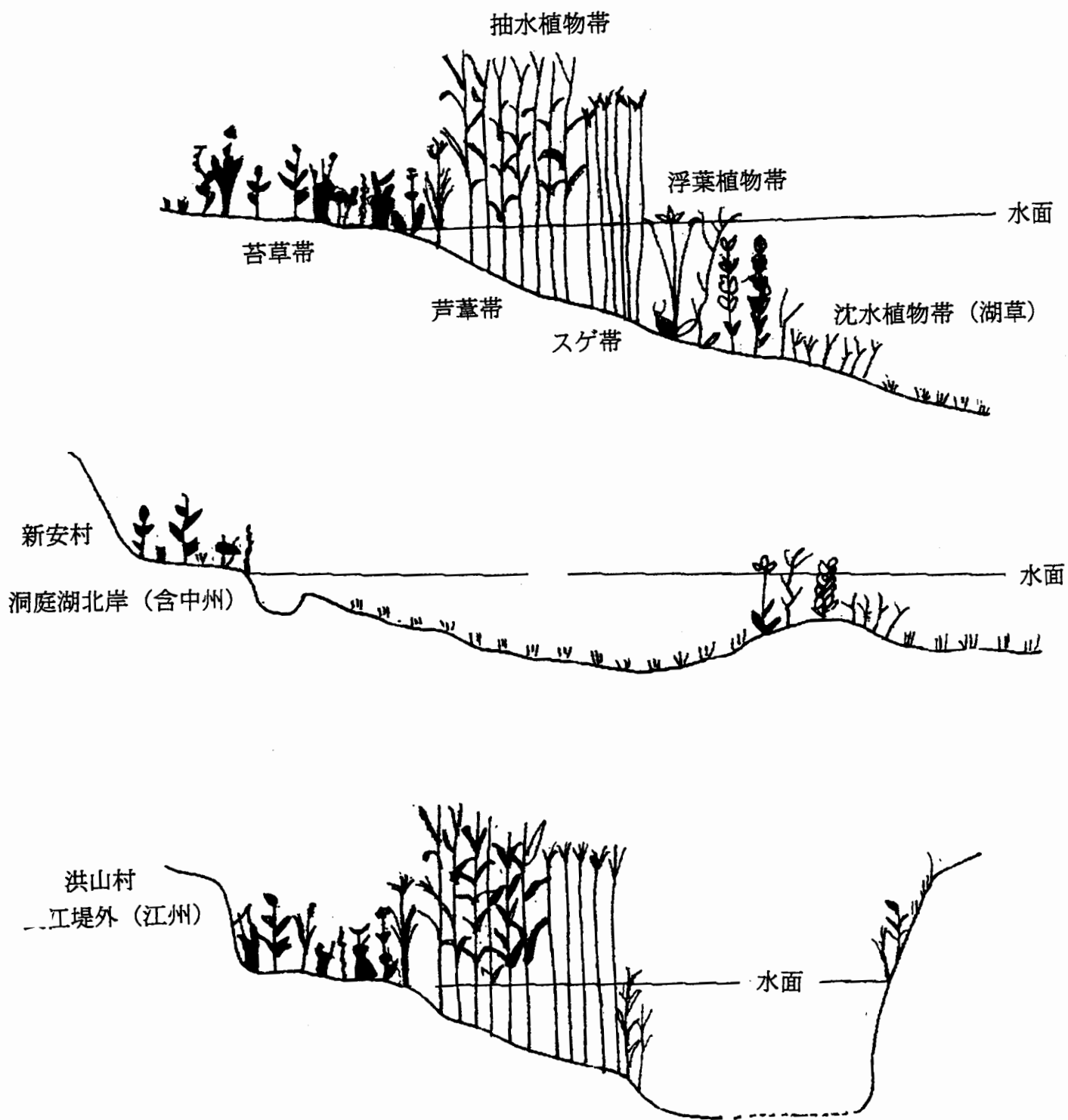


図-1 東洞庭湖周辺の水生植物群落の変移

日本財団補助金による

1997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10年3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 藤盛啓成
所属機関名 東北大学医学部第2外科
職名 助手 年齢 40 才
所在地 〒980-8574 仙台市青葉区
星野町1-1
電話 022-717-7214 内線 7214

1. 研究課題

中国東北地方王-ド欠乏地帯における甲状腺癌の
発生
- 王-ド摂取による地域性甲状腺腫の癌化に
関する研究 -

2. 研究期間 自 1997年 4月 1日 ~ 至 1998年 3月 15日

3. 研究組織

日本側研究者氏名 藤盛啓成 (43才)
所属機関 東北大学医学部第2外科 職名 文部教官助手

中国側研究者氏名 張徳恒 (58才)
所属機関 白求恩医科大学第臨床学院 職名 教授
基本外科

研究課題

中国東北地方ヨード欠乏地帯における甲状腺癌の発生 —ヨード摂取による地域性甲状腺腫の癌化に関する研究—

【目的】

ヨード欠乏性甲状腺腫はWHO疾患分類中、世界で最も罹患数の多い疾患であり、ヨード化食塩が容易に手に入る今日でも世界中には約1億人以上の悩病患者がいるとみられている。吉林省は中国東北地方の地域性甲状腺腫の多発地帯として知られ、特に長白山系では住民の約50%に甲状腺腫が発生し、神経性クレチン症も希ならずみられていた。1960年代よりヨード化食塩が中国の国家事業として導入され、その結果、甲状腺腫の新規発生は激減した。しかし、30才以上のすでに甲状腺腫を有する壮年層において、近年甲状腺癌の発生が増加する傾向にあり、ヨード欠乏性甲状腺腫に対するヨード投与が甲状腺癌の発生を促進している可能性が示唆されている。そこで、吉林省ヨード欠乏地帯の甲状腺腫の実態調査、ヨード欠乏性甲状腺腫の培養細胞の特性の検討およびラット甲状腺腫モデルにおける実験研究からヨード欠乏性甲状腺腫の発がん機構の解明を本研究の目的とした。

【方法】

1991年から1994年までに、ヨード欠乏地帯にある吉林省豊満地域住民1799名とヨード非欠乏地帯にある四井子村住民714名、超音波断層装置を用いて甲状腺検診を行った。これらの調査では、豊満地域30才以上の女性の甲状腺腫は52.4%に認められ、画像診断では2%に悪性が疑われた。一方、ヨード非欠乏地帯にある四井子村住民の30才以上女性では14.9%に甲状腺腫が認められたのみであった。これらの検診を受けた住民をコホートとして検診を行い、5年間の甲状腺腫の変化を検討する予定であったが、現地との交渉が成功せず、調査検診を行うことはできなかった。

そこで、甲状腺癌発生の実態調査として白求恩医科大学の手術症例の臨床病理学的検討ならびに切除標本の癌抑制遺伝子p53の検索を行った。また、甲状腺腫瘍の培養法の開発と細胞株の作成、さらにラットヨード欠乏性甲状腺腫のモデル作成とヨード摂取の影響について検討を加えた。

1) 白求恩医科大学における手術症例の検討

(1) 対象

1986年1月より1996年12月白求恩医科大学第三臨床学院基本外科において入院治療を受けた甲状腺癌症例296例中手術を施行した250例を対象とした。内訳は女性186例、男性64例。男女比は1対2.91。平均年齢は38.6才(10-70)であり、40才以下は全症例の54.8%であった。症例のUICCのTNM分類(1987)は、stage I 144例(57.6%)、stage II 40例(16%)、stage III 47例(18.8%)、stage IV 19例(7.6%)であった。癌抑制遺伝子p53異常の検索は同期間の切除標本中組織学的に乳頭癌低分化型と診断された15例を対象とし、パラフィン封埋標本を用いて行った。この対照として東北大学第二外科、および仙台市立病院にて切除された甲状腺低分化癌29例を用いた。組織学的診断はいずれもWHO基準(Hedinger CE, ed. International histological classification of tumours. 1988)に基づいて行った。

(2) p53遺伝子異常の検索

p53蛋白の検索は免疫組織学的に抗p53モノクローナル抗体(D07、Novocastra Newcastle, England)を用い、ABC法で行った。p53蛋白の免疫染色性の判定は、腫瘍細胞の核が強く染色された場合を陽性とし、腫瘍の一部の領域で10%以上の腫瘍細胞が染色された場合をp53蛋白陽性と判定した。p53遺伝子異常の検索は、未染標本を顕微鏡下で当該の細胞を採取し、PCRにてDNA増幅した後、exon5-8についてcold-SSCP法で行った。シーケンスはABI 373を用いた。

2) 甲状腺腫瘍継代培養法の開発

甲状腺腫瘍組織を1mm角にメスで細切し、デスパーゼ1000U/mlあるいは0.1%コラゲナーゼtypeVIIで37℃、20-30分間インキュベーションした後、Cell Strainer 40μmで濾過し、1000rpmで5分間遠心。沈殿物をウイリアムズE(Life Technologies inc. NY)で洗浄し、48wellの培養皿(Falcon, 0.75cm²)で培養した。24時間後にウイリアムズEに10%FBSを加えた培養液を交換した。以後、3日毎にこの培養液を交換し、細胞を維持した。

3) ラット甲状腺腫モデルにおけるヨード摂取の影響

Wister系ラット4週令80匹に5週間、抗甲状腺剤propylthiouracil(PTU)を投与し、瀰漫性甲状腺腫ラットを作成した。他にPTUを投与しない10匹を正常対照群とした。PTU投与終了後ラットを無作為に5群に分け、普通食、普通食1gあたり無機ヨードを0.289μg、1.733μg、14.676μgおよび29.178μg添加したヨード添加食を与え、7カ月後屠殺し、血中甲状腺ホルモンおよびTSHの測定と甲状腺腫の病理組織学的検討を加えた。

【結果および成果】

1) 白求恩医科大学における手術症例の病理学的内訳

手術症例の病理学的分類頻度はそれぞれ乳頭癌156例(62.4%)、濾胞癌65例(26.0%)、髄様癌13例(5.2%)、未分化癌16例(6.4%)であった。予後は平均6.1年の観察期間(1-10年)で死亡例が35例あり、病理組織分類別では乳頭癌9例、濾胞癌5例、髄様癌8例、未分化癌13例であった。死亡原因は肺転移・呼吸不全24例、肝転移3例、骨転移3例、他因死5例であった。

2) p53遺伝子異常の検索

p53蛋白染色陽性例は、吉林省では15例中14例(93%)に対し仙台の例では29例中16例(55%)であり、両群に有意差が認められた(P=0.025)。一方、cold-SSCPとシーケンスの結果には有意差は認められなかった。すなわち、ミューテーションは中国では46.7%(15例中5例; exon5-4例、exon7-1例、exon8-2例)に認められ、日本では42.3%(26例中11例; exon5-9例、exon7-2例、exon8-0例)に認められた。

3) 甲状腺腫瘍培養法の開発と細胞株の作成

日本において甲状腺未分化癌6例、乳頭癌2例に培養を試みた。コラゲナーゼを用いた未分化癌3例中3例に細胞株が樹立され、免疫染色でサイログロブリン陰性、サイトケラチン陽性、ピメンチン陽性所見となることから甲状腺未分化癌細胞株と判断した。またヌードマウスへの移植により腫瘍形成が認められた2例では組織学的に未分化癌と診断さ

れた。乳頭癌では増殖速度が極めて緩徐であるが、サイログロブリン分泌が確認された細胞が維持されている。一方、デスパーゼを用いた方法では、3例中3例ともに細胞は継代できなかった。この方法を白求恩大学基本外科において試み、甲状腺未分化癌1例が継代に成功した。

4) ラット甲状腺腫モデルにおけるヨード摂取の影響

PTU 5週間の投与でラットでは濾胞上皮が腫大する実質性の甲状腺腫が作成された。普通食、ヨード添加食を摂食させたラットではいずれも甲状腺腫重量は正常群に比して有意に増加していた。血中甲状腺ホルモン値、およびTSH値はいずれも正常範囲であった。組織学的にはどの群も甲状腺全体の濾胞が拡大し、腺腫様甲状腺腫に似た甲状腺腫となったが、濾胞の強い大小不同、濾胞上皮の増生、炎症細胞の浸潤増加などの強度の過形成が認められる例があった。これは、普通食群(n=7)、ヨード添加0.289 μ g群(n=16)、1.733 μ g群(n=18)、14.676 μ g群(n=17)および29.178 μ g群(n=16)のうち、それぞれ28.6%、56.3%、27.8%、58.8%および12.5%に認められた。濾胞上皮細胞の高さと濾胞腔の面積を画像分析装置にて計測したところ、普通食群では正常群に比して差はなかったが、ヨード添加食群ではヨード量依存性に上皮の扁平化と面積の拡大が認められた。濾胞上皮細胞核内平均AgNOR顆粒数は正常群0.51 \pm 0.08に比していずれも増加していたが、ヨード添加0.289 μ g群が1.25 \pm 0.20でもっとも多く、ヨード添加量が増加するに従って減少した。また、強度の過形成を示した部位では1.63 \pm 0.27と高値であった。

【考察および今後の展望】

1970年より白求恩医科大学第三臨床学院基本外科での甲状腺手術例を10年毎に区切って、その変遷を見ると甲状腺癌手術のしめる割合は1970年代の5.4%から、90年代には16.1%まで増加し、組織学的分類では70年代が乳頭癌47.4%、濾胞癌20.5%から90年代には乳頭癌58.6%、濾胞癌23.3%で、乳頭癌の比率が上昇しているように思われる。1959年から89年までの長春市5病院（白求恩医科大学第一院、第二院、第三院、吉林省人民医院、長春市中心医院）の手術例608例では乳頭癌51%、濾胞癌31%であり、今回の検討では乳頭癌62.4%、濾胞癌26.0%に比較すると、やはり乳頭癌が増加している印象がある。しかし、今回の検討にはヨード非欠乏地帯の患者も含まれており、ヨード欠乏地帯で増加しているかどうか結論づけることはできない。当初目的としていたヨード欠乏地帯にある吉林省豊満地域住民とヨード非欠乏地帯にある四井子村住民をコホートとして調査研究を行うことが必要であり、平成10年度も引き続き、現地との交渉を行い、実現を図りたい。

p53遺伝子の検索では、中国吉林省の低分化型乳頭癌で高率にp53蛋白の異常集積が認められ、吉林省における特殊性が示唆される結果であった。しかし、採取した標本の固定方法が同一でない可能性があり、標本固定条件等の検討を行ったうえで、標本数をさらに増やし検索を進める予定である。

甲状腺癌の細胞株からの検討は、癌細胞の特性を理解する上で非常に有用な方法と思われる。今回開発した方法で、中国吉林省における未分化癌の細胞株が樹立され、さらにヨード欠乏地帯で発生した乳頭癌、濾胞癌で樹立を試みている。まだ、これらの細胞の特性の検索結果ができていないが、仙台において樹立された細胞株との比較検討が可能となった。

ヨード欠乏性甲状腺腫に対するヨード添加量の影響のモデル研究においては、完成された甲状腺腫に対しては、むしろ少量のヨード添加で上皮細胞の増殖性が増し、甲状腺腫癌化の危険性の増加を示唆する結果であった。吉林省ヨード欠乏地帯においては1960年代から食塩1kgあたりヨード30mg添加された食塩が用いられており、我々の1994年の調査では30才以下の若年層では甲状腺体積がヨード非欠乏地帯と差がないこと、超音波診断で若年層の甲状腺病変頻度に差がないことより、このヨード量は生理的には適正量と思われた。しかし、すでに甲状腺腫を有する年齢層においてはこの量が適切かどうか。この実験結果からあらためて検討を要するものと思われた。

【結論】

甲状腺手術例の検討から、中国吉林省において甲状腺癌とくに乳頭癌の発生頻度が増加している可能性が示唆された。甲状腺癌低分化型のp53遺伝子の検索では、中国吉林省において異常頻度が高い可能性を示唆する結果であったが、さらなる検討が必要である。白求恩大学において甲状腺癌の細胞株が樹立され、今後、日中における癌細胞の比較検討が可能となった。ラットモデル実験においてヨード欠乏性甲状腺腫に対し、少量ヨード添加は癌化を引き起こす可能性が示された。

本研究のp53遺伝子の検索、細胞株樹立の開発およびヨード欠乏性甲状腺腫ラット実験モデルについては、それぞれ白求恩医科大学第三臨床学院基本外科陳瑞新博士、孫輝女史および金田仲氏の協力により行われた。研究成果は甲状腺外科検討会、中国東北外科学会に報告する予定である。

日本財団補助金による


1997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—

10年3月13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 田中俊弘 
所属機関名 岐阜薬科大学 華草園
職名 助教授 年齢 53 才
所在地 〒502-8525 岐阜市三田町東5-6-1
電話 058-237-3931 内線 258

1. 研究課題

参茸鞭丸等中成薬の顕微鏡的鑑定研究

1) 参茸鞭丸に配合されている29種類の粉末生薬を顕微鏡的に鑑定する
ことができた。とくに鑑別が難しいといわれていた動物生薬や鉱物生薬の鑑別を
可能にした。従来困難といわれてきた本製剤の品質の管理を容易にした。

2) とくに鑑定が困難といわれていた猪鞭、狗鞭、馬鞭、牛鞭、小海马
干家雀の6種類の動物生薬粉末の鑑定を可能にした。

3) さらに海馬類生薬の種類とその偽品1種については、形態と粉末鑑定の
研究を継続中で、この参茸鞭丸の研究を契機に新しく海馬の研究に取りかかった。
以上所期の目的である参茸鞭丸の顕微鏡的鑑定を完成し満足する事ができた。

2. 研究期間 自 1997年6月28日 ~ 至 1998年3月15日

3. 研究組織

日本側研究者氏名 田中俊弘 (53才)

所属機関 岐阜薬科大学

職名 助教授

中国側研究者氏名 康廷国 (43才)

所属機関 遼寧中医学院 中薬系

職名 系副主任、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

1997年4月1日交付通知のあった研究課題 参茸類丸等中成薬の顕微鏡鑑定研究

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	232,944円	円	167,056円	600,000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
消耗品費	232,944-	実験用消耗品（木製ミッパ20枚用、スライドグラスS-2111、10-106x18 BOS.等）
旅費	167,056	大連⇄名古屋間航空旅費
その他	600,000	康楽物生活諸費 $60,000 \times 10^4 = 600,000.-$

中成薬・参茸鞭丸の顕微鏡分析

康 廷国^a, 大場 幸次^b, 翟 延君^a, 田中 俊弘^c
^a遼寧中医学院, ^bアスゲン製薬株式会社, ^c岐阜薬科大学

Microscopic Analysis of Chinese Patent Medicine Shenrong Bian Wan

TING-GUO KANG,^a KOJI OHBA,^b YAN-JUN ZHAI^a and TOSHIHIRO TANAKA^c

^a Liaoning College of Traditional Chinese Medicine, Shenyang 110032, China

^b Asgen Pharmaceutical Co., Ltd., 28-8, Izumi 2 chome, Higashiku, Nagoya 461, Japan

^c Gifu Pharmaceutical University, 5-6-1, Mitahora-Higashi, Gifu 502, Japan

Keywords — Shenrong Bian Wan, Chinese patent medicine, powdered crude drug, microscopic analysis

目 的

参茸鞭丸は中国東北地方では貴重な保健薬で『遼寧省薬品標準』(1987年版)¹⁾に収載されており、補腎壯陽、強精増髓の効能があるため、性欲衰退、腎虚、気弱、陽痿、早泄、遺精の諸証に用いられている。この薬はすでに中国香港地区およびシンガポール、マレーシアなどの国で販売されているが、応用範囲は今後さらに拡大する可能性がある。したがって参茸鞭丸の品質の管理は非常に重要であるが、組成が比較的複雑で7種の動物薬(狗鞭、驢鞭、干家雀など)、18種の植物薬(人参、鎖陽、淫羊藿、公丁香、枸杞子、菟絲子、地骨皮など)および4種の鉱物薬を含んでおり、合計29種の粉末生薬からなっているため、その品質管理基準の確立は非常に困難である。このような多種類の粉末生薬を含む中成薬の品質管理には鏡検による鑑定が応用されている^{2~17)}が、参茸鞭丸の顕微鏡分析はまだ行われていない。したがってこの中成薬の品質を保証するために顕微鏡分析基準を確立することは意義のあることである。また現在、貂鞭、狗鞭、驢鞭、牛鞭、鹿鞭および海狗鞭などの鞭類生薬は比較的広範に応用され多くの中成薬に含まれているが、鞭類生薬含有の中成薬の顕微鏡鑑定研究は極めて少ない。本処方には4種の鞭類生薬が含まれており、今回の顕微鏡分析はこの4種の鞭類生薬を含有するその他の中成薬の顕微鏡鑑定の基礎になると考えられる。また干家雀、鹿茸などの動物性生薬についても同様である。

実験材料および方法

1. 中成薬・参茸鞭丸

本品は遼寧省薬品標準1987年版¹⁾の記載によると以下の生薬の粉末にデンプンを加えて水丸としたものである。

鹿茸 12.5kg, 紅参 10kg, 巴戟天 2kg, 補骨脂(塩炒) 1.5kg, 菟絲子(炒) 9kg, 枸杞子 5kg, 陽起石(煨) 9kg, 桂皮 9kg, 黒順片 9kg, 熟地黄 5kg, 砂仁 1kg, 石燕(煨) 5kg, 地骨皮 2kg, 杜仲(炭) 1kg, 甘草 0.5kg, 公丁香 1.25kg, 干家雀 1.5kg, 天門冬 2kg, 淫羊藿(制) 1kg, 小海馬(制) 1kg, 鎖陽 1.5kg, 川牛膝 2kg, 大青塩 4kg, 硫黄(制) 0.15kg, 韭菜子 1.5kg, 驢鞭(燙制) 0.067kg, 狗鞭(燙制) 0.017kg, 牛鞭(燙制) 0.133kg, 貂鞭(燙制) 0.014kg.

実験材料は大連中薬廠提供品 3 種および沈陽東風薬房にて 1995 年 9 月と 1996 年 3 月に購入した市場品 2 種を使用した。丸剤は直径約 6.6mm, 重さ約 0.23g, 味はわずかに塩辛く苦い (Fig.1)。

2. 比較材料

比較に用いた 29 種類の生薬材料は大連中薬廠, 遼寧中医学院中薬標本館および沈陽市薬品検査所から提供されたものであり, 貂鞭を除いて中国薬典¹⁸⁾, 中国衛生部薬品標準¹⁹⁾ および遼寧省薬品標準¹⁾ の規定に適合するものを使用した。貂鞭はミンク (水貂) *Mustera vison* SCHREBER の雄性外生殖器²⁰⁾ を乾燥して製したものであり, これを使用した。これらを粉末にし 100 メッシュの篩を通過したものを比較材料にした。

3. 観察方法

中成薬の顕微鏡鑑定に用いられる通常の方法^{3, 8, 12)} に従って操作し観察した。ただし大青塩は参茸鞭丸 3 丸に水 40ml を加え乳鉢で研磨し静置した後, 上清液をとり水浴上で濃縮乾固したときに析出する結晶について観察した¹⁵⁾。なお, 本品から大青塩を除いた盲検体で同様な操作を行うとき, このような結晶が析出しないことを確認している。

結 果

以下の組織片を各生薬の特徴として観察することができた。

動物性生薬 (Fig.2)

1. 干家雀: 骨碎片, 不定形でほとんど無色あるいは淡灰黄色, 表面は顆粒性, 骨小腔は長条形あるいは長裂縫状で径 1~4 μ m, 長さ 8~20 μ m, 同一方向に配列し, 骨細管は不明瞭; 羽毛の毛茸, 竹節状, 節間長 16~43 μ m, 径 4~10 μ m, 節部の多くは黒褐色あるいは赤褐色物を含んでいる。2. 小海馬: 骨碎片, 不定形でほとんど無色, 表面の模様はきわめて少ないかあるいはない。骨小腔は裂縫状, 長円形あるいは円形で径 1~6 μ m, 長さ 6~20 μ m。骨細管は不明瞭。3. 貂鞭: 陰茎骨碎片, 不定形で淡灰色あるいは淡黄色, 表面には細密な縦方向の模様が見られ, かつ細かい横向きの模様も観察される。骨小腔は長椋形あるいは類多角形で径 2~8 μ m, 長さ 8~30 μ m, 同一方向に配列, 骨細管は比較的明瞭。4. 狗鞭: 陰茎骨碎片, 不定形で淡灰色あるいは灰黄色, 表面には極めて細かくて緻密な波状の縦紋があり, 骨小腔は長条形で同一方向に配列し, 大きさは比較的一定で径 2~6 μ m, 長さ 18~25 μ m, 骨細管は明瞭。5. 驢鞭: 柱形結合組織, ほとんど無色あるいは淡黄色で径 31~77 μ m, 表面には断続的な縦紋と径 1~5 μ m, 長さ 4~16 μ m の長楕円形あるいは裂縫状の陥窩がありこの陥窩は顆粒状物を含んでいる。6. 牛鞭: 横紋筋繊維, ほとんど無色あるいは淡黄色, 径 22~70 μ m, 横紋は波状あるいはわずかに平直, 横紋の間隔は 3~6 μ m。7. 鹿茸¹⁶⁾: 骨碎片, 淡黄褐色~褐色, 表面には細密で縦方向の模様と点状孔隙がある。骨小腔の多くは類円形あるいは類椋形, 配列は不規則で径 3~11 μ m, 長さ 8~21 μ m。骨細管は明瞭。

鉱物性生薬 (Fig.2)

8. 陽起石: 晶塊, 繊維柱状あるいは柱晶束様を呈し, 大きさは不均一, 無色透明, 縦方向に直線状の紋様がある。9. 石燕: 晶塊, 不定形で大きさは不均一, 無色半透明, 表面には赤褐色あるいは橙赤色斑あるいは顆粒状物が見られる。10. 硫黄: 晶塊, 不定形で大きさは不均一, ほとんど無色で半透明,

辺縁は角がはっきりしており、表面には黒色の顆粒状突起物あるいは紋様があり、層状構造が見られる。11. 大青塩¹⁵⁾：晶塊，長方形，類方形あるいは柱状形，無色，径 6~39 μm ，長さ 10~146 μm ，表面には線状あるいは顆粒状の紋様が見られた。

結晶を特徴とした生薬 (Fig.3)

12. 紅参^{3, 11, 16)}：鋭尖頭の集晶，径 45~86 μm 。 13. 公丁香^{14, 16)}：集晶，径 4~20 μm ，直線状に配列あるいは集合体。 14. 川牛膝¹⁶⁾：砂晶，径約 8 μm ，木部繊維（非木化）に存在する。 15. 地骨皮¹⁶⁾：砂晶，径約 2 μm ，柔細胞および放射組織に存在する。

石細胞を特徴とした生薬 (Fig. 3)

16. 巴戟天^{10, 16)}：石細胞，細胞壁の層紋は明瞭，膜孔が分枝していることもある。 17. 天門冬^{10, 16)}：石細胞，孔紋は密で多く，膜孔は細く短い。 18. 黒順片^{10, 16)}：石細胞，類方形あるいは長方形，孔紋は円形で少なく膜孔は粗くて比較的太く深い。 19. 枸杞子^{11, 14, 16)}：種皮石細胞，細胞壁が波状に湾曲しており層紋は比較的明瞭，膜孔は不明瞭。 20. 桂皮^{4, 16)}：石細胞，丸みを帯びた類方形で細胞壁の一边が薄く他の辺は肥厚している。 21. 杜仲^{10, 16)}：石細胞，ゴム質の団塊を含む。

種皮を特徴とした生薬 (Fig. 3, 4)

22. 菟絲子^{10, 16)}：種皮柵状細胞，2列で黄褐色，光輝帯は明瞭。 23. 補骨脂^{14, 16)}：種皮柵状細胞，1列で淡褐色~赤褐色，光輝帯は不明瞭。 24. 韭菜子¹⁵⁾：黒褐色の種皮表皮細胞。 25. 砂仁^{8, 16)}：内種皮杯状細胞，赤褐色，ケイ質塊を含む；赤褐色の下皮細胞と種皮表皮細胞。

柔組織を特徴とした生薬 (Fig. 4)

26. 熟地黄^{2, 7, 16)}：柔組織，圧縮され皺になっており核状物を含む。 27. 鎖陽^{10, 16)}：柔細胞片，褐色をしておりデンプン粒を含む。

その他の生薬 (Fig.4)

28. 甘草^{4, 9, 16)}：結晶細胞列を含む繊維。 29. 淫羊藿¹⁷⁾：葉表皮細胞および気孔；黄褐色物を含む非腺毛。

考察およびまとめ

1. 29種の粉末生薬中，干家雀，小海馬，貂鞭，狗鞭，驢鞭，牛鞭，陽起石，石燕，硫黄および大青塩の10種については顕微鏡鑑定に関する文献がほとんどない。したがって本研究によりこれら粉末生薬の顕微鏡鑑定基準を作成し，本処方中の該当生薬について顕微鏡分析の指標を確立した（大青塩の検測方法と特徴は文献¹⁵⁾の記載と一致）。

2. 7種の動物性生薬の顕微鏡特性は非常に類似しており鑑別が難しいが，今回顕微鏡分析の指標を確定することができ，速やかに鑑別が可能になった。驢鞭および牛鞭を除く5種の動物性生薬は骨組織^{21~23)}を具えており，その碎片が認められる。鹿茸の骨碎片は淡黄褐色~褐色，骨小腔は類円あるいは類梭形，直径が11 μm に達するものもあり，骨細管は多くかつ明瞭であった。骨小腔の配列は不規則である。また表面には縦紋と点状の孔隙がある；貂鞭と狗鞭の骨碎片は鹿茸に比べて色が薄く骨細管は比較的明瞭ではあるが鹿茸ほど多くはない。ただし貂鞭の骨小腔の多くは長梭形あるいは類多角形で直径2~8 μm ，長さ8~30 μm であるが，狗鞭の骨小腔は長条形，直径2~6 μm ，長さ18~25

μm で大きさは比較的均等である。両者の骨小腔は同一方向に配列している。これ以外に貂鞭の骨碎片の表面には細かい縦紋に加え横紋が見られるが、狗鞭では細かい縦紋が見られるのみである；小海馬と干家雀の骨碎片は色が最も薄く骨細管は不明瞭であるが、小海馬の骨小腔は裂縫状あるいは長円形～円形で直径 $1\sim 6\mu\text{m}$ 、長さ $6\sim 20\mu\text{m}$ 、干家雀の場合は長条形あるいは長裂縫状で直径 $1\sim 4\mu\text{m}$ 、長さ $8\sim 20\mu\text{m}$ である。また小海馬の骨碎片表面にはほとんど紋様がないが、干家雀では顆粒状の紋様が見られる；驢鞭の柱形結合組織は 7 種動物性生薬の中で比較的特有な性質を有している。狗鞭と牛鞭でも類似の柱形結合組織が見られるが、これらは顆粒状物を含む楕円形あるいは裂縫状の陥窩は見られない；鹿茸を除く 6 種の動物性生薬では横紋筋繊維が観察されるが、牛鞭の横紋筋繊維の横紋幅は $3\sim 6\mu\text{m}$ 、その他は $3\mu\text{m}$ 以内であることから横紋幅が $3\mu\text{m}$ より大きいものは牛鞭の特有な顕微鏡特性である。

3. 4 種の鉱物性生薬の中で大青塩は鑑定方法が特徴的であり他と区別できる；陽起石の晶塊は無色透明で繊維性柱状あるいは柱晶束状である；硫黄と石燕の晶塊は半透明であるが、前者の表面には黒色顆粒状物および紋様があり、後者の表面には赤褐色～黄赤色斑および顆粒状物がありこれらの特徴で容易に鑑別可能である。

4. 紅参の集晶は鋭尖頭で直径が $45\mu\text{m}$ 以上のものがあり公丁香の集晶（直径 $4\sim 20\mu\text{m}$ ）と区別ができる。

5. 川牛膝の砂晶の形態は多様で類方形、三角形あるいは不定形で比較的大きい（直径約 $8\mu\text{m}$ ）；地骨皮の砂晶は極めて微細（直径約 $2\mu\text{m}$ ）で矢じり形をしており、以上のことから両者は区別可能である。また前者は非木化した木部繊維に、後者は柔細胞および放射組織に含まれていることがあり、この点からも鑑別の正確性を高くしている。

6. 巴戟天、天門冬、黒順片、枸杞子、桂皮および杜仲の石細胞は非常に特徴的であり、本研究ではこれらの特徴を取り上げるにより容易に鑑別可能である。地骨皮にも石細胞が含まれるが、極めて少なく、壁は薄くて孔紋は少なく膜孔は見られない。したがって上記粉末生薬で見られる石細胞と区別できる。

7. 繊維は甘草の他に桂皮、川牛膝、公丁香、地骨皮、巴戟天、天門冬および淫羊藿に見られるが、甘草の場合結晶細胞列を含む点で他と区別できる。

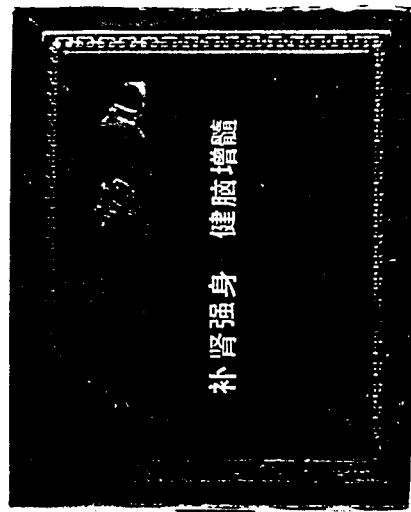
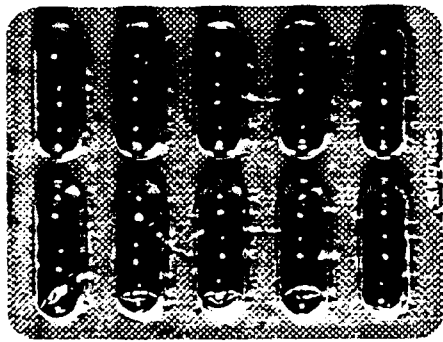
8. 種皮柵状細胞は菟絲子と補骨脂に見られるが、菟絲子の柵状細胞は黄褐色を呈し 2 列で光輝帯が明瞭である；補骨脂の場合は淡褐色～赤褐色で 1 列、光輝帯が不明瞭な点で区別できる。種皮表皮細胞は韭菜子の場合は色調が黒褐色である；砂仁の種皮表皮細胞は赤褐色である。また砂仁はケイ質塊を含む赤褐色の内種皮杯状細胞が見られ他と区別できる。

9. 熟地黄では顆粒状物を含む柔組織、鎖陽ではデンプン粒を含む褐色の柔細胞片、淫羊藿では葉の表皮細胞と気孔および黄褐色物を含む非腺毛が見られ、これらの組織片で鑑定可能である。

謝 辞：本研究は日中医学協会助成事業－日本財団補助金を受けて実施したものであり深く謝意を表す。

参 考 文 献

- 1) 遼寧省衛生庁編, “遼寧省藥品標準 1987 年版”, 遼寧省衛生庁出版, 沈陽, 1987.
- 2) 徐国鈞, 徐絡柵, 田中俊弘, 生薬学雑誌, 38(4), 287 (1987)
- 3) 田中俊弘, *Pharm. Tech. Jpn.*, 3(9), 893 (1987)
- 4) 田中俊弘, 伊藤寿美, 堤典子, 水野瑞夫, 徐絡柵, 徐国鈞, 生薬学雑誌, 42(2), 105 (1988)
- 5) 田中俊弘, 酒井英二, 堤典子, 水野瑞夫, 佐久島明世, 西部三省, 生薬学雑誌, 42, 28 (1988)
- 6) 田中俊弘, 酒井英二, 加藤信子, 高田敦士, 生薬学雑誌, 43(3), 242 (1989)
- 7) 劉学平, 徐国鈞, 徐絡柵, 南京薬学院学报, 17(1), 4 (1986)
- 8) 劉学平, 徐絡柵, 張紅, 徐国鈞, 中成薬, 18(12), 14 (1996)
- 9) 康廷国, 馮夏紅, 孙家祥, 中成薬, 12(2), 13 (1990)
- 10) 康廷国編, “常用中成薬頭微鑑定”, 遼寧大学出版社, 沈陽, 1990.
- 11) 康廷国, 李剛, 馮夏紅, 高志, 中成薬, 14(10), 13 (1992)
- 12) 甘青海, 左振常, 中成薬, 15(2), 11 (1993)
- 13) 張麗娟, 田虹, 馬祖強, 趙繼肖, 中草薬, 26(1), 51 (1995)
- 14) 徐国鈞, 徐絡柵, 王強, 南京薬学院学报, 16(1), 7 (1987)
- 15) 徐国鈞, 劉学平主編, “中成薬頭微分析”, 人民衛生出版社, 北京, pp. 459~463, 1997; 劉学平, 徐国鈞, 中成薬, 20(1), 12 (1998)
- 16) 徐国鈞主編, “中薬材粉末頭微鑑定” 人民衛生出版社, 北京, 1986.
- 17) 徐国鈞主編, “生薬学”, 人民衛生出版社, 北京, 1987.
- 18) 中華人民共和国衛生部薬典委員会編, “中華人民共和国薬典 1995 年版 1 部”, 広東科技出版社, 化学工業出版社, 広州, 1995.
- 19) 中華人民共和国衛生部編, “中華人民共和国衛生部藥品標準 (中薬成方製剤第 1 冊) 1989 年版”, 出版, 北京, 1989.
- 20) 張貴君, 葛正華, 金哲雄, 梁雪芹, 中草薬, 27, 422 (1996); 薰万超, 張秀達, 中薬材, 19, 409 (1996); 韩雅莉, 譚竹鈞編, “薬用動物養殖大全”, 中国農業出版社, 北京, pp. 245-253 (1996).
- 21) 陳代賢, 任玮, 胡荣, 中国薬学雑誌, 26, 270 (1991)
- 22) Von J. Hartung, U. D. Wenzel, *Monatsh. Veterined.*, 22, 337 (1967)
- 23) 田嶋嘉雄編著, “実験動物学 (各論)”, 朝倉書店, 東京, p. 129, 1972.



2 cm

Fig. 1 参茸鞭丸

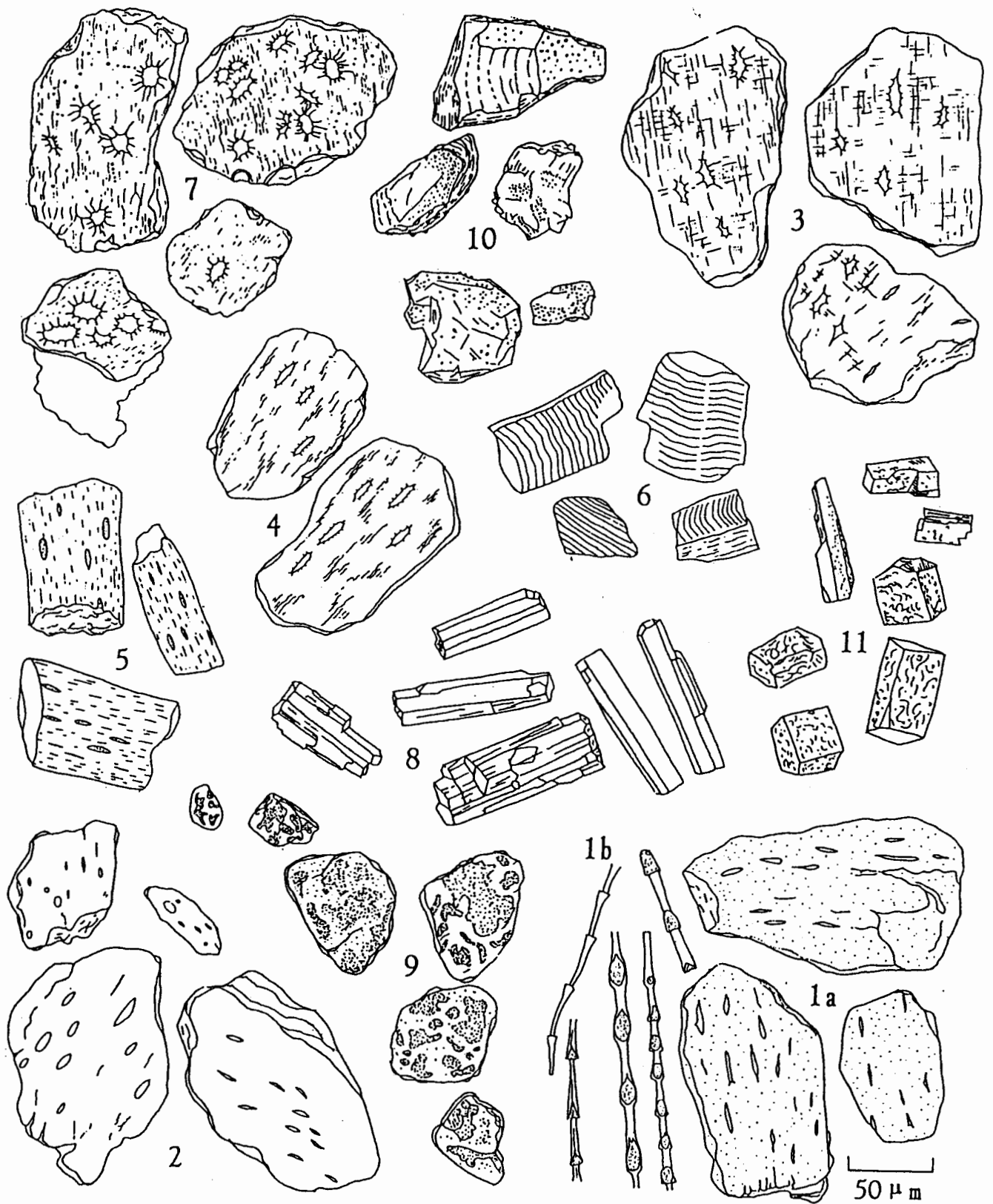


Fig. 2 参茸鞭丸に配合される粉末生薬

1: 干家雀 (a 骨碎片, b 羽毛の毛茸), 2: 小海马 (骨碎片), 3: 貂鞭 (陰茎骨碎片), 4: 狗鞭 (陰茎骨碎片), 5: 驢鞭 (柱形結合組織), 6: 牛鞭 (横紋筋纖維), 7: 鹿茸 (骨碎片), 8: 陽起石 (晶塊), 9: 石燕 (晶塊), 10: 硫黄 (晶塊), 11: 大青鹽 (晶塊)

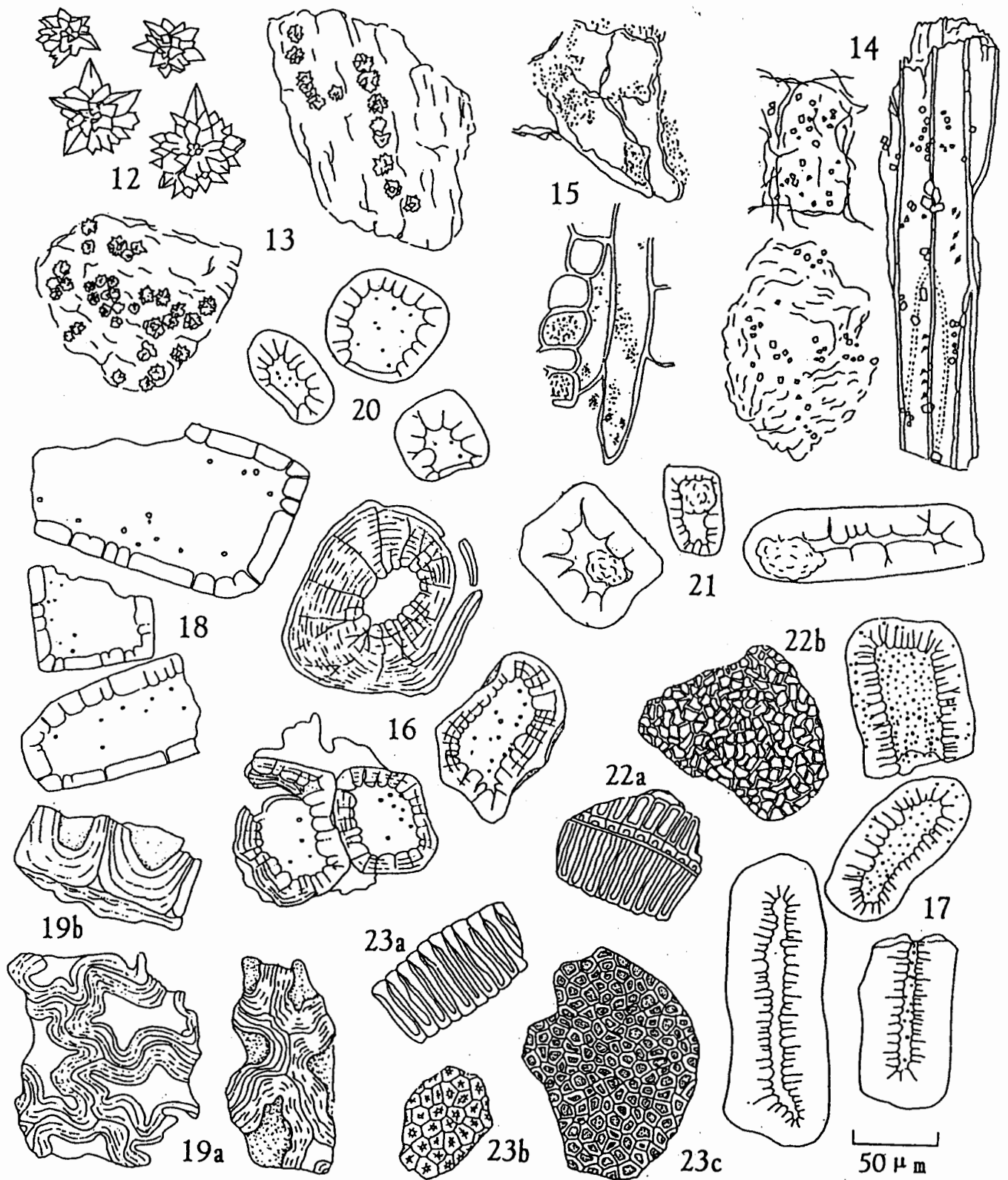


Fig. 3 参茸鞭丸に配合される粉末生薬

12: 紅参 (集晶), 13: 公丁香 (集晶), 14: 川牛膝 (砂晶), 15: 地骨皮 (砂晶), 16: 巴戟天 (石細胞), 17: 天門冬 (石細胞), 18: 黒順片 (石細胞), 19: 枸杞子 (種皮石細胞, a 表面視, b 側面視), 20: 桂皮 (石細胞), 21: 杜仲 (石細胞), 22: 菟絲子 (種皮柵状細胞, a 側面視, b 表面視), 23: 補骨子 (種皮柵状細胞, a 側面視, b 表面視, c 底面視)

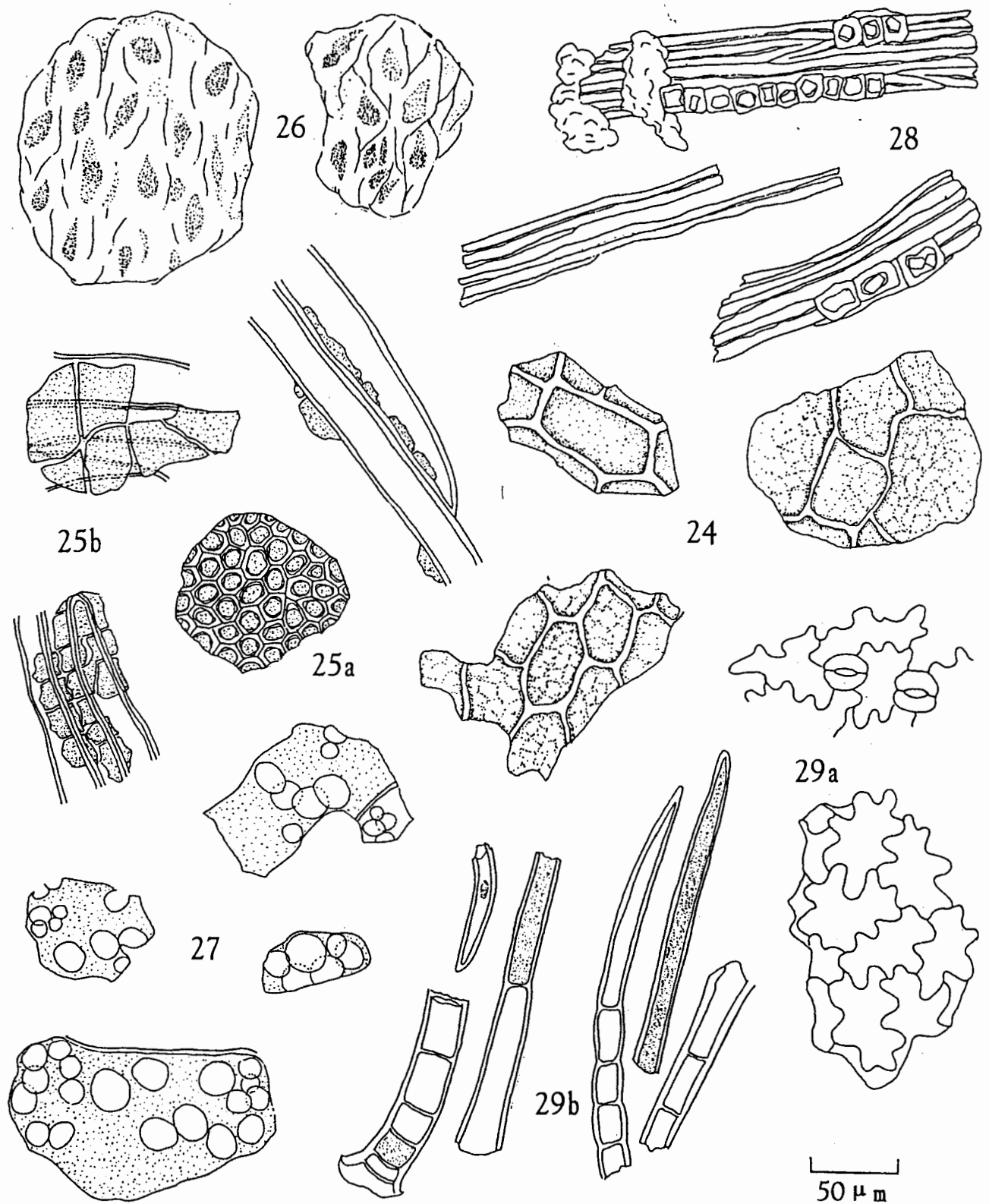


Fig. 4 参茸鞭丸に配合される粉末生薬

24 : 韭菜子 (種皮表皮細胞), 25 : 砂仁 (a 内種皮杯状細胞, b 下皮細胞と種皮表皮細胞), 26 : 熟地黄 (柔組織), 27 : 鎖陽 (柔細胞), 28 : 甘草 (結晶細胞列), 29 : 淫羊藿 (a 葉表皮細胞と気孔, b 非腺毛)


日本財団補助金による

1997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—

1998年3月11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 森永謙二 
所属機関名 大阪府立成人病センター 調査部
職名 主幹 年齢 49 才
所在地 〒537-8511 大阪市東成区中道1-3-3
電話 06-972-1181 内線 2308

1. 研究課題

浙江省寧波近辺地区における元石綿作業従事者の健康影響調査

2. 研究期間 自 1997 年 4 月 7 日 ~ 至 1998 年 3 月 15 日

3. 研究組織

日本側研究者氏名 森永謙二 (49才)
所属機関 大阪府立成人病センター 職名 主幹

中国側研究者氏名 張幸 (37才)
所属機関 浙江省医学科学院衛生学研究所 職名 所長

1997年度日中医学学術交流促進事業助成金による調査研究報告書

研究課題：浙江省寧波近辺地区における元石綿作業従事者の健康影響調査

研究代表者：森永 謙二
(大阪府立成人病センター調査部 主幹)
〒537-8511 大阪市東成区中道1-3-3
TEL:06-972-1181 内線2308
FAX:06-978-3046
e-mail:xmorinag@iph.pref.osaka.jp

研究目的

浙江省寧波・紹興地区（特に余姚、慈溪、上虞）近辺では1970年代に、石綿工場が約120あり、従業員数は約6万人であった。また家庭で開綿をはじめとする石綿紡織作業に従事していた住民は約4万人いたが、1985年頃より衰退し、現在では家庭石綿作業はほとんどなくなっている。現在、石綿工場に働く労働者は600人前後であり、これまでに判明している石綿肺患者は約230人である。

石綿による健康影響としては、石綿肺、肺癌、中皮腫、胸膜プラークなどの胸膜疾患があるが、胸部レントゲンによる胸膜プラークは、石綿曝露の良い指標とされている。

本調査研究は、過去に石綿曝露を受けた住民について、石綿作業歴、喫煙歴等をアンケートで把握するとともに、胸部レントゲン検査を行い、石綿肺及び胸膜プラーク有所見者の有無を調べる。なお、今後の疫学調査のベースラインデータを作成し、肺癌ハイリスク者に対しては、将来の肺癌発生予防としての喫煙者への禁煙指導を行うための基礎資料とする。

方法

1) 慈溪市衛生防疫站の協力を得て、1997年2月から11月末までに慈溪市鶴鳴鎮の地域住民にアンケート調査（参考資料1及び2）を行った。

2) アンケート回答者のうちの希望者に対して、1997年5月及び9月に胸部レントゲン撮影を行い、6月及び10月に読影した。じん肺の診断についてはILO及び中国のじん肺X線診断標準を用いた。なお、読影に際しては現及び元浙江省じん肺診断組医師及び現及び元日本地方じん肺診査医が担当した。

胸膜有所見者（疑い例を含む）については、中国側医師と日本側医師がともに読影し、疑わしき例については、第3者の医師の意見を求め、胸膜プラークについては、definite, probable, possibleの3段階に分け、definite及びprobableを所見あり、possibleを疑いとした。

成果と考察

1) アンケート調査

1997年に慈溪市鶴鳴鎮の地域住民を対象にアンケートを6,142名から回収したが、年齢不明、性不詳、石綿曝露開始時年齢不詳を除いた5,880人について集計を行った。

男女別内訳は、男323人、女5,557人で、男女とも40歳代が最も多く36.5%、39.1%であった（図1）。喫煙率は男では48.9%、女1.8%であった（表1）。石綿作業の従事期間は男では1～2年が最も多く36.2%であったが、女では1年未満が最も多く48.8%であった（表2）。

石綿作業の種類としては、男女ともに手紡織が最も多く90.4%、94.0%であった（表3）。防塵施設の有無については男では96.3%が「あり」と答えたが、女では74.1%とやや低かった（表4）。石綿作業への従事開始年代は、1970-74年が最も多く48.3%、次いで1975-79年の41.8%であったが、女では1965-69年が最も多く31.7%、次いで1970-74年の30.3%であった（表5）。石綿作業開始年齢は、男では20歳未満が28.8%、次いで20-24歳の20.1%、25-29歳の15.5%であったが、女では20歳未満が43.1%で最も多く、次いで20-24歳の

25.0%、25-29歳の10.0%であった(表6)。石綿作業開始からの期間(潜伏期間)は男では20年以上は70.5%、女では同じく87.5%であったが、30年以上は男1.2%、女36.9%であった(表7)。

2) 胸部レントゲン検査

上記アンケート回答者5,879名(男323,女5557)のうち、男4,女795名が胸部レントゲン検査を受けた。男性については石綿肺、胸膜プラークいずれの所見を有する者はいなかった。以下、女性についてのみ成績を述べる。

胸膜プラークの所見が「あり」の者は10名(1.3%)、「疑い」は9人(1.1%)いた。年齢は「あり」の10人の年齢分布は50-54歳5人(3.1%)、65-69歳4人(8.5%)、35-39歳1人(1.1%)で、平均年齢は56.9歳(39～69)であった。「疑い」の9人は65-69歳2人(4.3%)、55-59歳1人(2.0%)、50-54歳2人(1.3%)、45-49歳2人(1.2%)、40-44歳1人(0.8%)、35-39歳1人(1.1%)、平均年齢は52.4歳(39～67)であった。これらの者の石綿作業開始年代をみると、「あり」では1950年代が1人、1960年代が8人、で残る1人は1973年であった。「疑い」では1960年代が5人、1970年代が4人で、1974年以降の者はいなかった。職種をみると、「あり」のうち9人は手紡織、「疑い」9人のうち7人が手紡績に従事していた。喫煙者は「あり」では1人、「疑い」では2人いた。

石綿肺有所見者は女性に3人いた。うち1期が2人、0+期が1人で、胸膜プラーク疑いの所見もあった。石綿肺1期の2人はそれぞれ69歳、52歳で、従事期間はそれぞれ24年、15年、従事開始は1968年と1973年で、ともに喫煙歴はない。

胸部レントゲン検査を受診した女性795名の喫煙率は5.9%と、アンケート回答者に比べてやや高かった。石綿作業の従事期間は10～14年が最も多く27.3%で、次いで15～19年の20.1%、20-24年の15.5%で、25年以上も19.6%あった。石綿作業の種類としては、手紡織が最も多く86.2%であった。防塵施設の有無については88.8%が「あり」と答えた。石綿作業への従事開始年代は、1965-69年が最も多く34.3%、次いで1970-74年の31.4%であった。石綿作業開始年齢は、20歳未満が46.8%で最も多く、次いで20-24歳の23.1%、25-29歳の11.2%であった。石綿作業開始からの期間(潜伏期間)は20年以上は85.8%、30年以上は34.2%であった。

以上のことから、胸部レントゲン検査の受診者はアンケート回答者に比べて喫煙率がやや高く、作業従事期間もやや長い者が多いことがわかる。

慈溪市鳴鶴鎮の地域住民の女性には、石綿手紡織に従事していたものが多いが、従事期間は短い者が多い。胸部レントゲン検査で胸膜プラーク及び石綿肺有所見者の発見率はそれぞれ1.3%、0.4%と低かったが、その理由としては、比較的短期間従事者が多かったこと、より健康な人が受診する偏りがあったこと、胸膜プラークがレントゲンで把握できるとされる潜伏期間が30年以上のものの割合が多くなかったこと、などが考えられる。

結論

アンケート調査で慈溪市鳴鶴鎮には過去に少なくとも6,000人以上石綿作業に従事し、石綿曝露を受けた住民がいる。その大半は女性(95.8%)で、手紡績に従事していた。以下女性について述べる。彼女らの曝露開始時期は1979年以前が95.5%と大半であった。従事期間は48.8%が1年未満で、20年以上は16.9%であった。

胸部レントゲン調査では、胸膜プラーク有所見者は受診した女性 795 名中 10 名、1.3%、疑いを入れても 19 名、2.4%であった。また石綿肺の有所見者は 3 名、0.4%であった。従事期間が 20 年以上の者は 35.2%であった。胸膜プラーク及び石綿肺の有所見者 12 人は 1 人を除いて潜伏期間は 30 年以上であった。石綿曝露開始からの年数（潜伏期間）が 30 年以上の者は 272 人(34.2%)であるから、これらの者の胸膜有所見者発見率は 3.3%(9/272)と計算された。

石綿関連疾患の多くは、潜伏期間が 30 年以上ののちに発生することが知られていることから、これら石綿曝露集団の健康管理は今後とも重要である。

研究成果の発表予定

現在のところ発表予定はない。今後、中国側研究代表者と相談の上、発表する予定。

中国側研究代表者

張幸（浙江省医学科学院衛生学研究所所長）

研究協力者

慈溪市衛生局：葉黎明、孫沛霖

慈溪市衛生防疫站：施南峰、孫統達、沈敏敏

杭州市職業病防治院：陳瑞伍

浙江省衛生防疫站：丁孝惇

浙江省医学科学院衛生学研究所：張朝和

国立療養所近畿中央病院：横山邦彦

国立療養所宮崎病院：平岡武典

カロリンスカ病院：Gunnar Hillerdal (Sweden)

なお、聞き取り調査票の日本語訳については、馮雅芳の協力を得た。

参考文献

- 1) 丁孝惇、他（1985）1,886 名石綿工人胸片分析、労働医学 2(4):11-12
- 2) 孫統達、他（1992）農村家庭手紡績石綿危害的研究、労働医学 9(3):1-2

図1 アンケート回答者の性・年齢分布

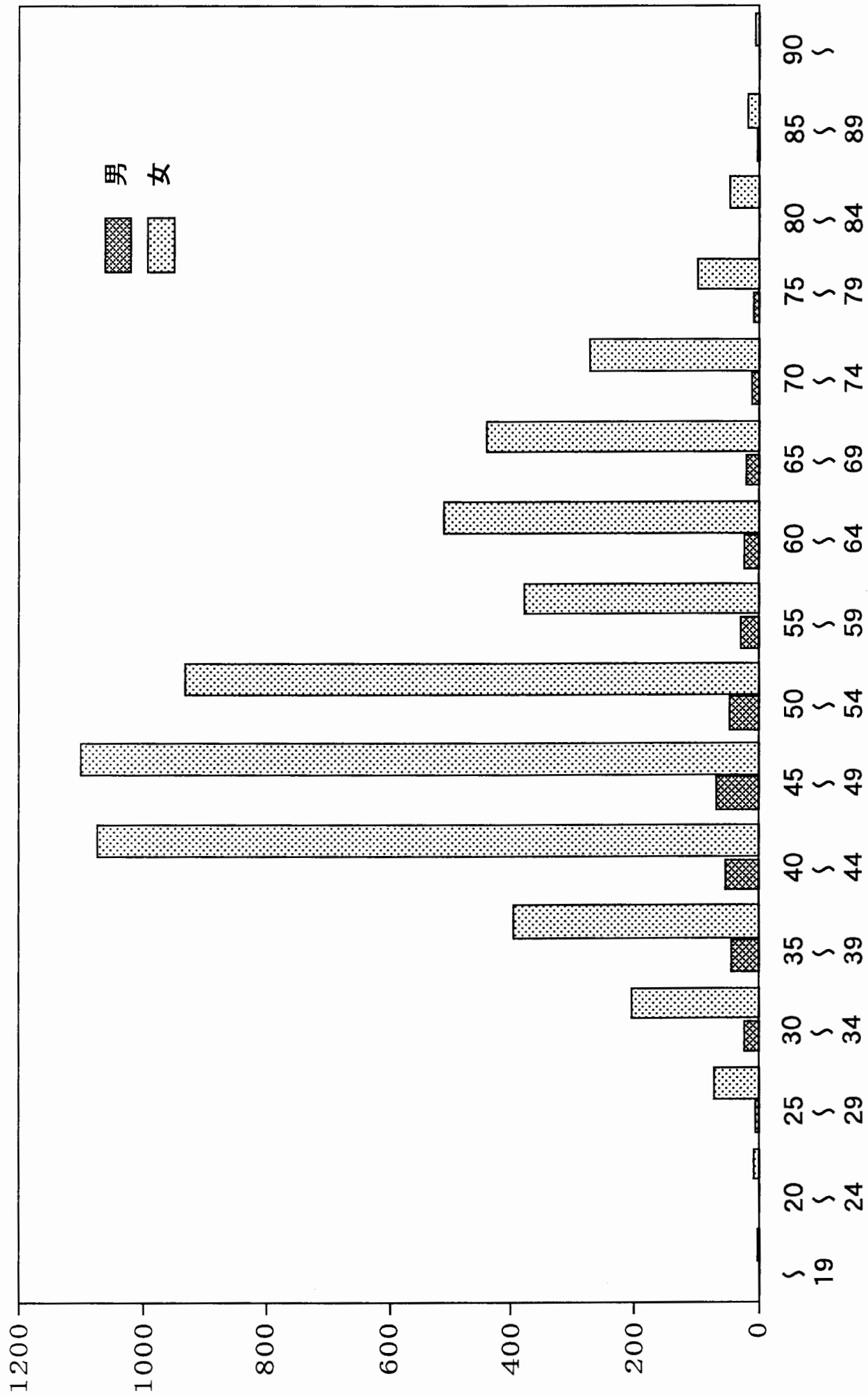


表1 性・年齢階級別喫煙歴

性	喫煙/年齢	0-19	20-24	25-29	30-34	35-39	40-44	45-49	50-54	55-59	60-64	65-69	70-74	75-79	80-84	85-89	90歳以上	全年齢
男	吸う	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.3)	12 (3.7)	18 (5.6)	29 (9.0)	27 (8.4)	21 (6.5)	13 (4.0)	13 (4.0)	12 (3.7)	6 (1.9)	4 (1.2)	0 (0.0)	2 (0.6)	0 (0.0)	158 (48.9)
	たまたに吸う	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
	吸わない	0 (0.0)	0 (0.0)	4 (1.2)	9 (2.8)	27 (8.4)	23 (7.1)	39 (12.1)	25 (7.7)	15 (4.6)	8 (2.5)	6 (1.9)	4 (1.2)	5 (1.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	165 (51.1)
	計	0 (0.0)	0 (0.0)	5 (1.5)	21 (6.5)	45 (13.9)	52 (16.1)	66 (20.4)	46 (14.2)	28 (8.7)	21 (6.5)	18 (5.6)	10 (3.1)	9 (2.8)	2 (0.6)	2 (0.6)	0 (0.0)	323 (100)
女	吸う	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	6 (0.1)	6 (0.1)	14 (0.3)	11 (0.2)	17 (0.3)	14 (0.3)	16 (0.3)	7 (0.1)	4 (0.1)	0 (0.0)	0 (0.0)	95 (1.7)
	たまたに吸う	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.0)
	吸わない	1 (0.0)	9 (0.2)	71 (1.3)	204 (3.7)	396 (7.1)	1,068 (19.2)	1,096 (19.7)	919 (16.5)	369 (6.6)	492 (8.9)	426 (7.7)	258 (4.6)	90 (1.6)	43 (0.8)	15 (0.3)	4 (0.1)	5,461 (98.3)
	計	1 (0.0)	9 (0.2)	71 (1.3)	204 (3.7)	396 (7.1)	1,074 (19.3)	1,102 (19.8)	933 (16.8)	380 (6.8)	509 (9.2)	441 (7.9)	274 (4.9)	97 (1.7)	47 (0.8)	15 (0.3)	4 (0.1)	5,557 (100)
男女計	吸う	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.0)	12 (0.2)	18 (0.3)	35 (0.6)	33 (0.6)	35 (0.6)	24 (0.4)	30 (0.5)	26 (0.4)	22 (0.4)	11 (0.2)	4 (0.1)	2 (0.0)	0 (0.0)	253 (4.3)
	たまたに吸う	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.0)
	吸わない	1 (0.0)	9 (0.2)	75 (1.3)	213 (3.6)	423 (7.2)	1,091 (18.6)	1,135 (19.3)	944 (16.1)	384 (6.5)	500 (8.5)	432 (7.3)	262 (4.5)	95 (1.6)	43 (0.7)	15 (0.3)	4 (0.1)	5,626 (95.7)
	計	1 (0.0)	9 (0.2)	76 (1.3)	225 (3.8)	441 (7.5)	1,126 (19.1)	1,168 (19.9)	979 (16.6)	408 (6.9)	530 (9.0)	459 (7.8)	284 (4.8)	106 (1.8)	47 (0.8)	17 (0.3)	4 (0.1)	5,880 (100)

表2-1 男・年齢階級別石棉作業期間(年)

年/年齢	0-19	20-24	25-29	30-34	35-39	40-44	45-49	50-54	55-59	60-64	65-69	70-74	75-79	80-84	85-89	90歳以上	全年齢
1年	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.3)	8 (2.5)	18 (5.6)	15 (4.6)	19 (5.9)	11 (3.4)	11 (3.4)	9 (2.8)	2 (0.6)	3 (0.9)	5 (1.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	102 (31.6)
2年	0 (0.0)	0 (0.0)	2 (0.6)	7 (2.2)	14 (4.3)	22 (6.8)	28 (8.7)	17 (5.3)	13 (4.0)	5 (1.5)	7 (2.2)	2 (0.6)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	117 (36.2)
3年	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	5 (1.5)	10 (3.1)	7 (2.2)	10 (3.1)	9 (2.8)	2 (0.6)	4 (1.2)	2 (0.6)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	49 (15.2)
4年	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	2 (0.6)	3 (0.9)	1 (0.3)	3 (0.9)	1 (0.3)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.3)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	11 (3.4)
5年	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	2 (0.6)	1 (0.3)	3 (0.9)	0 (0.0)	1 (0.3)	5 (1.5)	4 (1.2)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.3)	0 (0.0)	17 (5.3)
6年~9年	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.3)	2 (0.6)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	3 (0.9)
10年~14年	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.3)	0 (0.0)	0 (0.0)	2 (0.6)	1 (0.3)	2 (0.6)	0 (0.0)	1 (0.3)	0 (0.0)	7 (2.2)
15年~19年	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	2 (0.6)	0 (0.0)	1 (0.3)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.3)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	4 (1.2)
20年~24年	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
25年~29年	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
30年~34年	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
35年以上	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
不明	0 (0.0)	0 (0.0)	2 (0.6)	1 (0.3)	1 (0.3)	2 (0.6)	5 (1.5)	0 (0.0)	1 (0.3)	1 (0.3)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	13 (4.0)
計	0 (0.0)	0 (0.0)	5 (1.5)	21 (6.5)	45 (13.9)	52 (16.1)	66 (20.4)	46 (14.2)	28 (8.7)	21 (6.5)	18 (5.6)	10 (3.1)	9 (2.8)	0 (0.0)	2 (0.6)	0 (0.0)	323 (100)

表 2-2 女・年齢階級別石綿作業期間 (年)

年/年齢	0-19	20-24	25-29	30-34	35-39	40-44	45-49	50-54	55-59	60-64	65-69	70-74	75-79	80-84	85-89	90歳以上	全年齢
1年	0 (0.0)	6 (0.1)	18 (0.3)	51 (0.9)	50 (0.9)	36 (0.6)	24 (0.4)	19 (0.3)	9 (0.2)	8 (0.1)	18 (0.3)	18 (0.3)	6 (0.1)	3 (0.1)	4 (0.1)	0 (0.0)	270 (48.8)
2年	0 (0.0)	2 (0.0)	14 (0.3)	34 (0.6)	74 (1.3)	117 (2.1)	89 (1.6)	68 (1.2)	34 (0.6)	38 (0.7)	31 (0.6)	30 (0.5)	13 (0.2)	6 (0.1)	0 (0.0)	0 (0.0)	550 (9.9)
3年	0 (0.0)	1 (0.0)	10 (0.2)	19 (0.3)	35 (0.6)	55 (1.0)	40 (0.7)	22 (0.4)	6 (0.1)	19 (0.3)	9 (0.2)	8 (0.1)	2 (0.0)	4 (0.1)	0 (0.0)	0 (0.0)	230 (4.1)
4年	0 (0.0)	0 (0.0)	4 (0.1)	7 (0.1)	27 (0.5)	67 (1.2)	38 (0.7)	28 (0.5)	10 (0.2)	14 (0.3)	2 (0.0)	7 (0.1)	2 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	206 (3.7)
5年	0 (0.0)	0 (0.0)	6 (0.1)	12 (0.2)	32 (0.6)	188 (3.4)	39 (0.7)	24 (0.4)	10 (0.2)	16 (0.3)	14 (0.3)	10 (0.2)	1 (0.0)	2 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	354 (6.4)
6年~9年	0 (0.0)	0 (0.0)	7 (0.1)	36 (0.6)	56 (1.0)	250 (4.5)	149 (2.7)	76 (1.4)	27 (0.5)	20 (0.4)	21 (0.4)	6 (0.1)	3 (0.1)	2 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	653 (11.8)
10年~14年	1 (0.0)	0 (0.0)	5 (0.1)	26 (0.5)	80 (1.4)	192 (3.5)	425 (7.6)	180 (3.2)	46 (0.8)	60 (1.1)	46 (0.8)	21 (0.4)	11 (0.2)	8 (0.1)	2 (0.0)	1 (0.0)	1,104 (19.9)
15年~19年	0 (0.0)	0 (0.0)	2 (0.0)	13 (0.2)	24 (0.4)	127 (2.3)	190 (3.4)	346 (6.2)	123 (2.2)	143 (2.6)	128 (2.3)	81 (1.5)	30 (0.5)	19 (0.3)	8 (0.1)	3 (0.1)	1,237 (22.3)
20年~24年	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.0)	3 (0.1)	11 (0.2)	27 (0.5)	70 (1.3)	116 (2.1)	105 (1.9)	163 (2.9)	146 (2.6)	88 (1.6)	26 (0.5)	2 (0.0)	1 (0.0)	0 (0.0)	759 (13.7)
25年~29年	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	4 (0.1)	11 (0.2)	27 (0.5)	21 (0.4)	6 (0.1)	14 (0.3)	8 (0.1)	1 (0.0)	1 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	93 (1.7)
30年~34年	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.0)	2 (0.0)	10 (0.2)	27 (0.5)	4 (0.1)	13 (0.2)	11 (0.2)	3 (0.1)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	71 (1.3)
35年以上	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	3 (0.1)	0 (0.0)	1 (0.0)	6 (0.1)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	10 (0.2)
不明	0 (0.0)	0 (0.0)	4 (0.1)	3 (0.1)	2 (0.0)	2 (0.0)	1 (0.0)	3 (0.1)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.0)	1 (0.0)	2 (0.0)	1 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	20 (0.4)
計	1 (0.0)	9 (0.2)	71 (1.3)	204 (3.7)	396 (7.1)	1,074 (19.3)	1,102 (19.8)	933 (16.8)	380 (6.8)	509 (9.2)	441 (7.9)	274 (4.9)	97 (1.7)	47 (0.8)	15 (0.3)	4 (0.1)	5,557 (100)

表2-3 男女計・年齢階級別石綿作業期間(年)

年/年齢	0-19	20-24	25-29	30-34	35-39	40-44	45-49	50-54	55-59	60-64	65-69	70-74	75-79	80-84	85-89	90歳以上	全年齢
1年	0 (0.0)	6 (0.1)	19 (0.3)	59 (1.0)	68 (1.2)	51 (0.9)	43 (0.7)	30 (0.5)	20 (0.3)	17 (0.3)	20 (0.3)	21 (0.4)	11 (0.2)	3 (0.1)	4 (0.1)	0 (0.0)	372 (6.3)
2年	0 (0.0)	2 (0.0)	16 (0.3)	41 (0.7)	88 (1.5)	139 (2.4)	117 (2.0)	85 (1.4)	47 (0.8)	43 (0.7)	38 (0.6)	32 (0.5)	13 (0.2)	6 (0.1)	0 (0.0)	0 (0.0)	667 (11.3)
3年	0 (0.0)	1 (0.0)	10 (0.2)	24 (0.4)	45 (0.8)	62 (1.1)	50 (0.9)	31 (0.5)	8 (0.1)	23 (0.4)	11 (0.2)	8 (0.1)	2 (0.0)	4 (0.1)	0 (0.0)	0 (0.0)	279 (4.7)
4年	0 (0.0)	0 (0.0)	4 (0.1)	7 (0.1)	29 (0.5)	70 (1.2)	39 (0.7)	31 (0.5)	11 (0.2)	14 (0.2)	2 (0.0)	7 (0.1)	3 (0.1)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	217 (3.7)
5年	0 (0.0)	0 (0.0)	6 (0.1)	12 (0.2)	32 (0.5)	190 (3.2)	40 (0.7)	27 (0.5)	10 (0.2)	17 (0.3)	19 (0.3)	14 (0.2)	1 (0.0)	2 (0.0)	1 (0.0)	0 (0.0)	371 (6.3)
6年~9年	0 (0.0)	0 (0.0)	7 (0.1)	36 (0.6)	56 (1.0)	251 (4.3)	151 (2.6)	76 (1.3)	27 (0.5)	20 (0.3)	21 (0.4)	6 (0.1)	3 (0.1)	2 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	656 (11.2)
10年~14年	1 (0.0)	0 (0.0)	5 (0.1)	26 (0.4)	80 (1.4)	192 (3.3)	425 (7.2)	181 (3.1)	46 (0.8)	60 (1.0)	48 (0.8)	22 (0.4)	13 (0.2)	8 (0.1)	3 (0.1)	1 (0.0)	1,111 (18.9)
15年~19年	0 (0.0)	0 (0.0)	2 (0.0)	13 (0.2)	24 (0.4)	127 (2.2)	190 (3.2)	348 (5.9)	123 (2.1)	144 (2.4)	128 (2.2)	81 (1.4)	31 (0.5)	19 (0.3)	8 (0.1)	3 (0.1)	1,241 (21.1)
20年~24年	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.0)	3 (0.1)	11 (0.2)	27 (0.5)	70 (1.2)	116 (2.0)	105 (1.8)	163 (2.8)	146 (2.5)	88 (1.5)	26 (0.4)	2 (0.0)	1 (0.0)	0 (0.0)	759 (12.9)
25年~29年	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	4 (0.1)	11 (0.2)	27 (0.5)	21 (0.4)	6 (0.1)	14 (0.2)	8 (0.1)	1 (0.0)	1 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	93 (1.6)
30年~34年	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.0)	2 (0.0)	10 (1.2)	27 (0.5)	4 (0.1)	13 (0.2)	11 (0.2)	3 (0.1)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	71 (1.2)
35年以上	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	3 (0.1)	0 (0.0)	1 (0.0)	6 (0.1)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	10 (1.2)
不明	0 (0.0)	0 (0.0)	6 (0.1)	4 (0.1)	3 (0.1)	4 (0.1)	6 (0.1)	3 (0.1)	1 (0.0)	1 (0.0)	1 (0.0)	1 (0.0)	2 (0.0)	1 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	33 (0.6)
計	1 (0.0)	9 (0.2)	76 (1.3)	225 (3.8)	441 (7.5)	1,126 (19.1)	1,168 (19.9)	979 (16.6)	408 (6.9)	530 (9.0)	459 (7.8)	284 (4.8)	106 (1.8)	47 (0.8)	17 (0.3)	4 (0.1)	5,880 (100)

表3-1 男 年齢階級別石綿作業の種類

種類/年齢	0-19	20-24	25-29	30-34	35-39	40-44	45-49	50-54	55-59	60-64	65-69	70-74	75-79	80-84	85-89	90歳以上	全年齢
手紡織	0 (0.0)	0 (0.0)	5 (1.5)	19 (5.9)	40 (12.4)	52 (16.1)	60 (18.6)	41 (12.7)	25 (7.7)	19 (5.9)	17 (5.3)	7 (2.2)	5 (1.5)	0 (0.0)	2 (0.6)	0 (0.0)	292 (90.4)
機械紡織	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
原料攪拌	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
朝花	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.3)	0 (0.0)	1 (0.3)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	2 (0.6)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	4 (1.2)
布織	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
包装	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.3)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.3)
石綿製品	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.3)	0 (0.0)	1 (0.3)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	2 (0.6)
その他	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	2 (0.6)	3 (0.9)	0 (0.0)	2 (0.6)	3 (0.9)	0 (0.0)	1 (0.3)	1 (0.3)	1 (0.3)	1 (0.3)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	14 (4.3)
不明	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	2 (0.6)	0 (0.0)	2 (0.6)	1 (0.3)	1 (0.3)	1 (0.3)	0 (0.0)	2 (0.6)	1 (0.3)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	10 (3.1)
計	0 (0.0)	0 (0.0)	5 (1.5)	21 (6.5)	45 (13.9)	52 (16.1)	66 (20.4)	46 (14.2)	28 (8.7)	21 (6.5)	18 (5.6)	10 (3.1)	9 (2.8)	0 (0.0)	2 (0.6)	0 (0.0)	323 (100)

表3-2 女 年齢階級別石綿作業の種類

種類/年齢	0-19	20-24	25-29	30-34	35-39	40-44	45-49	50-54	55-59	60-64	65-69	70-74	75-79	80-84	85-89	90歳以上	全年齢
手紡織	1 (0.0)	9 (0.2)	66 (1.2)	192 (3.5)	369 (6.6)	1,010 (18.2)	1,033 (18.6)	877 (15.8)	355 (6.4)	474 (8.5)	419 (7.5)	261 (4.7)	94 (1.7)	46 (0.8)	15 (0.3)	4 (0.1)	5,225 (94.0)
機械紡織	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.0)	0 (0.0)	5 (0.1)	19 (0.3)	11 (0.2)	9 (0.2)	2 (0.0)	4 (0.1)	2 (0.0)	2 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	55 (1.0)
原料攪拌	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.0)	2 (0.0)	1 (0.0)	1 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	6 (0.1)
朝花	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.0)	2 (0.0)	7 (0.1)	15 (0.3)	18 (0.3)	11 (0.2)	10 (0.2)	9 (0.2)	3 (0.1)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	76 (1.4)
布織	0 (0.0)	0 (0.0)	3 (0.1)	2 (0.0)	0 (0.0)	7 (0.1)	2 (0.0)	2 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	17 (0.3)
包装	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
石綿製品	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
その他	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.0)	2 (0.0)	5 (0.1)	10 (0.2)	8 (0.1)	5 (0.1)	2 (0.0)	4 (0.1)	1 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	38 (0.7)
不明	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	7 (0.1)	15 (0.3)	20 (0.4)	31 (0.6)	21 (0.4)	9 (0.2)	16 (0.3)	10 (0.2)	7 (0.1)	3 (0.1)	1 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	140 (2.5)
計	1 (0.0)	9 (0.2)	71 (1.3)	204 (3.7)	396 (7.1)	1,074 (19.3)	1,102 (19.8)	933 (16.8)	380 (6.8)	509 (9.2)	441 (7.9)	274 (4.9)	97 (1.7)	47 (0.8)	15 (0.3)	4 (0.1)	5,557 (100)

表 3-3 男女計 年齢階級別石綿作業の種類

種類/年齢	0-19	20-24	25-29	30-34	35-39	40-44	45-49	50-54	55-59	60-64	65-69	70-74	75-79	80-84	85-89	90歳以上	全年齢
手紡織	1 (0.0)	9 (0.2)	71 (1.2)	211 (3.6)	409 (7.0)	1,062 (18.1)	1,093 (18.6)	918 (15.6)	380 (6.5)	493 (8.4)	436 (7.4)	268 (4.6)	99 (1.7)	46 (0.8)	17 (0.3)	4 (0.1)	5,517 (93.8)
機械紡織	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.0)	0 (0.0)	5 (0.1)	19 (0.3)	11 (0.2)	9 (0.2)	2 (0.0)	4 (0.1)	2 (0.0)	2 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	55 (0.9)
原料攪拌	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.0)	2 (0.0)	1 (0.0)	1 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	6 (0.1)
朝花	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.0)	2 (0.0)	7 (0.1)	16 (0.3)	18 (0.3)	12 (0.2)	10 (0.2)	9 (0.2)	3 (0.1)	2 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	80 (1.4)
布織	0 (0.0)	0 (0.0)	3 (0.1)	2 (0.0)	0 (0.0)	7 (0.1)	2 (0.0)	2 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	17 (0.3)
包装	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.0)
石綿製品	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	2 (0.0)
その他	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.0)	4 (0.1)	8 (0.1)	10 (0.2)	10 (0.2)	8 (0.1)	2 (0.0)	5 (0.1)	2 (0.0)	1 (0.0)	1 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	52 (0.9)
不明	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	7 (0.1)	17 (0.3)	20 (0.3)	33 (0.6)	22 (0.4)	10 (0.2)	17 (0.3)	10 (0.2)	9 (0.2)	4 (0.1)	1 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	150 (2.6)
計	1 (0.0)	9 (0.2)	76 (1.3)	225 (3.8)	441 (7.5)	1,126 (19.1)	1,168 (19.9)	979 (16.6)	408 (6.9)	530 (9.1)	459 (7.8)	284 (4.8)	106 (1.8)	47 (0.8)	17 (0.3)	4 (0.1)	5,880 (100)

表-1 性・年齢階級別防塵施設の有無

性	施設	0-19	20-24	25-29	30-34	35-39	40-44	45-49	50-54	55-59	60-64	65-69	70-74	75-79	80-84	85-89	90歳以上	全年齢	
男	あり	0 (0.0)	0 (0.0)	5 (1.5)	20 (6.2)	41 (13.6)	51 (15.8)	64 (19.8)	44 (13.6)	27 (8.4)	20 (6.2)	17 (5.3)	10 (3.1)	7 (2.2)	0 (0.0)	2 (0.6)	0 (0.0)	311 (96.3)	
	たまたまあり	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.3)	1 (0.3)	0 (0.0)	2 (0.6)	2 (0.6)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	6 (1.9)	
	なし	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.3)	1 (0.3)	1 (0.3)	0 (0.0)	1 (0.3)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	4 (1.2)	
	不明	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.3)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.3)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	2 (0.6)	
	計	0 (0.0)	0 (0.0)	5 (1.5)	21 (6.5)	45 (13.9)	52 (16.1)	66 (20.4)	66 (20.4)	46 (14.2)	28 (8.7)	21 (6.5)	18 (5.6)	10 (3.1)	9 (2.8)	0 (0.0)	2 (0.6)	0 (0.0)	323 (100)
	女	あり	0 (0.0)	2 (0.0)	61 (1.1)	187 (3.4)	366 (6.6)	827 (14.9)	795 (14.3)	672 (12.1)	262 (4.7)	347 (6.2)	289 (5.2)	173 (3.1)	75 (1.3)	43 (0.8)	14 (0.3)	4 (0.1)	4,117 (74.1)
		たまたまあり	1 (0.0)	6 (0.1)	5 (0.1)	6 (0.1)	20 (0.4)	219 (3.9)	288 (5.2)	239 (4.3)	110 (2.0)	147 (2.6)	144 (2.6)	96 (1.7)	21 (0.4)	4 (0.1)	0 (0.0)	0 (0.0)	1,306 (23.5)
		なし	0 (0.0)	1 (0.0)	4 (0.1)	5 (0.1)	6 (0.1)	15 (0.3)	12 (0.2)	12 (0.2)	12 (0.2)	3 (0.1)	9 (0.2)	4 (0.1)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	71 (1.3)
		不明	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.0)	6 (0.1)	4 (0.1)	13 (0.2)	7 (0.1)	10 (0.2)	5 (0.1)	6 (0.1)	4 (0.1)	5 (0.1)	1 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.0)	0 (0.0)	63 (1.1)
		計	1 (0.0)	9 (0.2)	71 (1.3)	204 (3.7)	396 (7.1)	1,074 (19.3)	1,102 (19.8)	933 (16.8)	380 (6.8)	509 (9.2)	441 (7.9)	274 (4.9)	97 (1.7)	47 (0.8)	15 (0.3)	4 (0.1)	5,557 (100)
男女計		あり	0 (0.0)	2 (0.0)	66 (1.1)	207 (3.5)	410 (7.0)	878 (14.9)	859 (14.6)	716 (12.2)	289 (4.9)	367 (6.2)	306 (5.2)	183 (3.1)	82 (1.4)	43 (0.7)	16 (0.3)	4 (0.1)	4,428 (75.3)
		たまたまあり	1 (0.0)	6 (0.1)	5 (0.1)	7 (0.1)	21 (0.4)	219 (3.7)	290 (4.9)	241 (4.1)	110 (1.9)	147 (2.5)	144 (2.4)	96 (1.6)	21 (0.4)	4 (0.1)	0 (0.0)	0 (0.0)	1,312 (22.3)
		なし	0 (0.0)	1 (0.0)	4 (0.1)	5 (0.1)	6 (0.1)	15 (0.3)	12 (0.2)	12 (0.2)	4 (0.1)	10 (0.2)	5 (0.1)	0 (0.0)	1 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	75 (1.3)
		不明	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.0)	6 (0.1)	4 (0.1)	14 (0.2)	7 (0.1)	10 (0.2)	5 (0.1)	6 (0.1)	4 (0.1)	5 (0.1)	2 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.0)	0 (0.0)	65 (1.1)
		計	1 (0.0)	9 (0.2)	76 (1.3)	225 (3.8)	441 (7.5)	1,126 (19.1)	1,168 (19.9)	979 (16.6)	408 (6.9)	530 (9.0)	459 (4.8)	284 (4.8)	106 (1.8)	47 (0.3)	17 (0.3)	4 (0.1)	5,880 (100)

表 5-1 男 年齡階級別從事開始年代

西曆/年齡	0-19	20-24	25-29	30-34	35-39	40-44	45-49	50-54	55-59	60-64	65-69	70-74	75-79	80-84	85-89	90歲以上	全年齡
~'49	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
'50~'54	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.3)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.3)
'55~'59	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
'60~'64	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.3)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.3)
'65~'69	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.3)	2 (0.6)	1 (0.3)	2 (0.6)	1 (0.3)	2 (0.6)	0 (0.0)	1 (0.3)	1 (0.3)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	11 (3.4)
'70~'74	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	3 (0.9)	14 (4.3)	22 (6.8)	32 (9.9)	29 (9.0)	18 (5.6)	14 (4.3)	12 (3.7)	6 (1.9)	4 (1.2)	0 (0.0)	2 (0.6)	0 (0.0)	156 (48.3)
'75~'79	0 (0.0)	0 (0.0)	2 (0.6)	15 (4.6)	22 (6.8)	27 (8.4)	29 (9.0)	15 (4.6)	9 (2.8)	4 (1.2)	6 (1.9)	3 (0.9)	3 (0.9)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	135 (41.8)
'80~'84	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.3)	3 (0.9)	7 (2.2)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	11 (3.4)
'85~'89	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
'90~'94	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
'95年以降	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
不明	0 (0.0)	0 (0.0)	2 (0.6)	0 (0.0)	1 (0.3)	1 (0.3)	4 (1.2)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	8 (2.5)
計	0 (0.0)	0 (0.0)	5 (1.5)	21 (6.5)	45 (13.9)	52 (16.1)	66 (20.4)	46 (14.2)	28 (8.7)	21 (6.5)	18 (5.6)	10 (3.1)	9 (2.8)	0 (0.0)	2 (0.6)	0 (0.0)	323 (100)

表 5-2 女 年齡階級別從事開始年代

西曆/年齡	0-19	20-24	25-29	30-34	35-39	40-44	45-49	50-54	55-59	60-64	65-69	70-74	75-79	80-84	85-89	90歲以上	全年齡
~'49	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	24 (0.4)	22 (0.4)	2 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	-49 (0.9)
'50~'54	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	26 (0.5)	27 (0.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	53 (1.0)
'55~'59	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.0)	0 (0.0)	11 (0.2)	29 (0.5)	1 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	43 (0.8)
'60~'64	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	5 (0.1)	3 (0.1)	32 (0.6)	177 (3.2)	123 (2.2)	131 (2.4)	113 (2.0)	75 (1.3)	19 (0.3)	4 (0.1)	0 (0.0)	0 (0.0)	682 (12.3)
'65~'69	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	5 (0.1)	12 (0.2)	77 (1.4)	381 (6.9)	506 (9.1)	153 (2.8)	227 (4.1)	196 (3.5)	109 (2.0)	54 (1.0)	30 (0.5)	10 (0.2)	4 (0.1)	1,764 (31.7)
'70~'74	1 (0.0)	0 (0.0)	6 (0.1)	15 (0.3)	116 (2.1)	519 (9.3)	575 (9.8)	173 (3.1)	71 (1.3)	71 (1.3)	64 (1.2)	49 (0.9)	12 (0.2)	9 (0.2)	3 (0.1)	0 (0.0)	1,684 (30.3)
'75~'79	0 (0.0)	1 (0.0)	7 (0.1)	117 (2.1)	214 (3.9)	450 (8.1)	97 (1.7)	63 (1.1)	17 (0.3)	23 (0.1)	16 (0.3)	15 (0.3)	9 (0.2)	4 (0.1)	1 (0.0)	0 (0.0)	1,034 (18.6)
'80~'84	0 (0.0)	5 (0.1)	46 (0.8)	57 (1.0)	41 (0.7)	14 (0.3)	11 (0.2)	11 (0.2)	2 (0.0)	2 (0.0)	0 (0.0)	3 (0.1)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.0)	0 (0.0)	193 (3.5)
'85~'89	0 (0.0)	2 (0.0)	5 (0.1)	6 (0.1)	4 (0.1)	3 (0.1)	1 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	22 (0.4)
'90~'94	0 (0.0)	1 (0.0)	4 (0.1)	3 (0.1)	2 (0.0)	4 (0.1)	1 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	15 (0.3)
'95年以降	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.0)
不明	0 (0.0)	0 (0.0)	3 (0.1)	0 (0.0)	2 (0.0)	3 (0.1)	3 (0.1)	3 (0.1)	2 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	17 (0.3)
計	1 (0.0)	9 (0.2)	71 (1.3)	204 (3.7)	396 (7.1)	1,074 (19.3)	1,102 (19.8)	933 (16.8)	380 (6.8)	509 (9.2)	441 (7.9)	274 (4.9)	97 (1.7)	47 (0.8)	15 (0.3)	4 (0.1)	5,557 (100)

表 5-3 男女計 年齡階級別從事開始年代

西曆/年齡	0-19	20-24	25-29	30-34	35-39	40-44	45-49	50-54	55-59	60-64	65-69	70-74	75-79	80-84	85-89	90歲以上	全年齡
~'49	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	24 (0.4)	22 (0.4)	2 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	-19 (0.8)
'50~'54	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	26 (0.4)	27 (0.5)	0 (0.0)	1 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	5-1 (0.9)
'55~'59	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.0)	0 (0.0)	11 (0.2)	29 (0.5)	1 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	43 (0.7)
'60~'64	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	5 (0.1)	3 (0.1)	32 (0.5)	177 (3.0)	123 (2.1)	132 (2.2)	113 (1.9)	75 (1.3)	19 (0.3)	4 (0.1)	0 (0.0)	0 (0.0)	683 (11.6)
'65~'69	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	5 (0.1)	13 (0.2)	79 (1.3)	382 (6.5)	508 (8.6)	154 (2.6)	229 (3.9)	196 (3.3)	110 (1.9)	55 (0.9)	30 (0.5)	10 (0.2)	4 (0.1)	1,775 (30.2)
'70~'74	1 (0.0)	0 (0.0)	6 (0.1)	18 (0.3)	130 (2.2)	541 (9.2)	607 (10.3)	202 (3.4)	89 (1.5)	85 (1.4)	76 (1.3)	55 (0.9)	16 (0.3)	9 (0.2)	5 (0.1)	0 (0.0)	1,840 (31.3)
'75~'79	0 (0.0)	1 (0.0)	9 (0.2)	132 (2.2)	236 (4.0)	477 (8.1)	126 (2.1)	78 (1.3)	26 (0.4)	27 (0.5)	22 (0.4)	18 (0.3)	12 (0.2)	4 (0.1)	1 (0.0)	0 (0.0)	1,169 (19.9)
'80~'84	0 (0.0)	5 (0.1)	47 (0.8)	60 (1.0)	48 (0.8)	14 (0.2)	11 (0.2)	11 (0.2)	2 (0.0)	2 (0.0)	0 (0.0)	3 (0.1)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.0)	0 (0.0)	204 (3.5)
'85~'89	0 (0.0)	2 (0.0)	5 (0.1)	6 (0.1)	4 (0.1)	3 (0.1)	1 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	22 (0.4)
'90~'94	0 (0.0)	1 (0.0)	4 (0.1)	3 (0.1)	2 (0.0)	4 (0.1)	1 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	15 (0.3)
'95年以降	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.0)
不明	0 (0.0)	0 (0.0)	5 (0.1)	0 (0.0)	3 (0.1)	4 (0.1)	7 (0.1)	3 (0.1)	2 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	25 (0.4)
計	1 (0.0)	9 (0.2)	76 (1.3)	225 (3.8)	441 (7.5)	1,126 (19.1)	1,168 (19.9)	979 (16.6)	408 (6.9)	530 (9.0)	459 (7.8)	284 (4.8)	106 (1.8)	47 (0.8)	17 (0.3)	4 (0.1)	5,880 (100)

表6-1 男 石綿作業開始時年齡

年齡	0-19	20-24	25-29	30-34	35-39	40-44	45-49	50-54	55-59	60-64	65-69	70-74	75-79	80-84	85-89	90歲以上	全年齡
~19歲	0 (0.0)	0 (0.0)	3 (0.9)	21 (6.5)	40 (12.4)	26 (8.0)	3 (0.9)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	93 (28.8)
20~24歲	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	4 (1.2)	21 (6.5)	34 (10.5)	6 (1.9)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	65 (20.1)
25~29歲	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	4 (1.2)	24 (7.4)	20 (6.2)	1 (0.3)	1 (0.3)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	50 (15.5)
30~34歲	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.3)	19 (5.9)	17 (5.3)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.3)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	38 (11.8)
35~39歲	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.3)	9 (2.8)	14 (4.3)	2 (0.6)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	26 (8.0)
40~44歲	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.3)	5 (1.5)	11 (3.4)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	17 (5.3)
45~49歲	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.3)	5 (1.5)	7 (2.2)	1 (0.3)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	14 (4.3)
50~54歲	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	3 (0.9)	4 (1.2)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	7 (2.2)
55~59歲	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	3 (0.9)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	3 (0.9)
60~64歲	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	2 (0.6)	0 (0.0)	2 (0.6)
65~69歲	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
70~74歲	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
75~79歲	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
80歲以上	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
不明	0 (0.0)	0 (0.0)	2 (0.6)	0 (0.0)	1 (0.3)	1 (0.3)	4 (1.2)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	8 (2.5)
計	0 (0.0)	0 (0.0)	5 (1.5)	21 (6.5)	45 (13.9)	52 (16.1)	66 (20.4)	46 (14.2)	28 (8.7)	21 (6.5)	18 (5.6)	10 (3.1)	9 (2.8)	0 (0.0)	2 (0.6)	0 (0.0)	323 (100)

表6-2 女 石綿作業開始時年齡

年齡	0-19	20-24	25-29	30-34	35-39	40-44	45-49	50-54	55-59	60-64	65-69	70-74	75-79	80-84	85-89	90歲以上	全年齡
1~19歲	1 (0.0)	9 (0.2)	63 (1.1)	193 (3.5)	330 (5.9)	707 (12.7)	615 (11.1)	323 (5.8)	54 (1.0)	44 (0.8)	41 (0.7)	15 (0.3)	2 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	2,397 (43.1)
20~24歲	0 (0.0)	0 (0.0)	5 (0.1)	9 (0.2)	57 (1.0)	349 (6.3)	399 (7.2)	391 (7.0)	117 (2.1)	45 (0.8)	10 (0.2)	8 (0.1)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1,390 (25.0)
25~29歲	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.0)	6 (0.1)	9 (0.2)	67 (1.2)	152 (2.7)	131 (2.4)	154 (2.8)	37 (0.7)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	557 (10.0)
30~34歲	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.0)	4 (0.1)	15 (0.3)	57 (1.0)	55 (1.0)	178 (3.2)	130 (2.3)	36 (0.6)	1 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	477 (8.6)
35~39歲	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.0)	2 (0.0)	7 (0.1)	15 (0.3)	59 (1.1)	151 (2.7)	66 (1.2)	14 (0.3)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	315 (5.7)
40~44歲	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.0)	1 (0.0)	0 (0.0)	4 (0.1)	26 (0.5)	56 (1.0)	85 (1.5)	20 (0.4)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	193 (3.5)
45~49歲	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	2 (0.0)	2 (0.0)	14 (0.3)	47 (0.8)	42 (0.8)	14 (0.3)	0 (0.0)	0 (0.0)	121 (2.2)
50~54歲	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.0)	2 (0.0)	13 (0.2)	11 (0.2)	22 (0.4)	0 (0.0)	0 (0.0)	50 (0.9)
55~59歲	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	3 (0.1)	7 (0.1)	5 (0.1)	11 (0.2)	2 (0.0)	28 (0.5)
60~64歲	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	6 (0.1)	2 (0.0)	2 (0.0)	10 (0.2)
65~69歲	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.0)
70~74歲	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.0)
75~79歲	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
80歲以上	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
不明	0 (0.0)	0 (0.0)	3 (0.1)	0 (0.0)	2 (0.0)	3 (0.1)	3 (0.1)	3 (0.1)	2 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	17 (0.3)
計	1 (0.0)	9 (0.2)	71 (1.3)	204 (3.7)	396 (7.1)	1,074 (19.3)	1,102 (19.8)	933 (16.8)	380 (6.8)	509 (9.2)	441 (7.9)	274 (4.9)	97 (1.7)	47 (0.8)	15 (0.3)	4 (0.1)	5,557 (100)

表6-3 男女計 石綿作業開始時年齡

年齡	0-19	20-24	25-29	30-34	35-39	40-44	45-49	50-54	55-59	60-64	65-69	70-74	75-79	80-84	85-89	90歲以上	全年齡
1~19歲	1 (0.0)	9 (0.2)	66 (1.1)	214 (3.6)	370 (6.3)	733 (12.5)	618 (10.5)	323 (5.5)	54 (0.9)	44 (0.7)	41 (0.7)	15 (0.3)	2 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	2,490 (42.3)
20~24歲	0 (0.0)	0 (0.0)	5 (0.1)	9 (0.2)	61 (1.0)	370 (6.3)	433 (7.4)	397 (6.8)	117 (2.0)	45 (0.8)	10 (0.2)	8 (0.1)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1,455 (24.7)
25~29歲	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.0)	6 (0.1)	13 (0.2)	91 (1.5)	172 (2.9)	132 (2.2)	155 (2.6)	37 (0.6)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	607 (10.3)
30~34歲	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.0)	4 (0.1)	16 (0.3)	76 (1.3)	72 (1.2)	178 (3.0)	130 (2.2)	36 (0.6)	2 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	515 (8.8)
35~39歲	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.0)	2 (0.0)	8 (0.1)	24 (0.4)	73 (1.2)	153 (2.6)	66 (1.1)	14 (0.2)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	341 (5.8)
40~44歲	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.0)	1 (0.0)	0 (0.0)	5 (0.1)	31 (0.5)	67 (1.1)	85 (1.4)	20 (0.3)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	210 (3.6)
45~49歲	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	2 (0.0)	3 (0.1)	19 (0.3)	54 (0.9)	43 (0.7)	14 (0.2)	0 (0.0)	0 (0.0)	135 (2.3)
50~54歲	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.0)	2 (0.0)	16 (0.3)	15 (0.3)	22 (0.4)	0 (0.0)	0 (0.0)	57 (1.0)
55~59歲	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	3 (0.1)	10 (0.2)	5 (0.1)	11 (0.2)	2 (0.0)	31 (0.5)
60~64歲	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	6 (0.1)	4 (0.1)	2 (0.0)	12 (0.2)
65~69歲	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.0)
70~74歲	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.0)
75~79歲	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
80歲以上	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
不明	0 (0.0)	0 (0.0)	5 (0.1)	0 (0.0)	3 (0.1)	4 (0.1)	7 (0.1)	3 (0.1)	2 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	25 (0.4)
計	1 (0.0)	9 (0.2)	76 (1.3)	225 (3.8)	441 (7.5)	1,126 (19.1)	1,168 (19.9)	979 (16.6)	408 (6.9)	530 (9.0)	459 (7.8)	284 (4.8)	106 (1.8)	47 (0.8)	17 (0.3)	4 (0.1)	5,880 (100)

表7-1 男 年齢階級別石綿作業開始からの期間 (潜伏期間)

年/年齢	0-19	20-24	25-29	30-34	35-39	40-44	45-49	50-54	55-59	60-64	65-69	70-74	75-79	80-84	85-89	90歳以上	全年齢
~4年	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
5~9年	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
10年~14年	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
15年~19年	0 (0.0)	0 (0.0)	2 (0.6)	17 (5.3)	22 (6.8)	16 (5.0)	13 (4.0)	9 (2.8)	3 (0.9)	1 (0.3)	2 (0.6)	0 (0.0)	2 (0.6)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	87 (26.9)
20年~24年	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.3)	3 (0.9)	18 (5.6)	25 (7.7)	33 (10.2)	23 (7.1)	19 (5.9)	11 (3.4)	11 (3.4)	8 (2.5)	4 (1.2)	0 (0.0)	1 (0.3)	0 (0.0)	157 (48.6)
25年~29年	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.3)	4 (1.2)	10 (3.1)	16 (5.0)	13 (4.0)	6 (1.9)	8 (2.5)	5 (1.5)	2 (0.6)	1 (0.3)	0 (0.0)	1 (0.3)	0 (0.0)	67 (20.7)
30年~34年	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.3)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.3)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	2 (0.6)
35年~39年	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.3)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.3)
40年以上	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.3)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.3)
不明	0 (0.0)	0 (0.0)	2 (0.6)	0 (0.0)	1 (0.3)	1 (0.3)	4 (1.2)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	8 (2.5)
計	0 (0.0)	0 (0.0)	5 (1.5)	21 (6.5)	45 (13.9)	52 (16.1)	66 (20.4)	46 (14.2)	28 (8.7)	21 (6.5)	18 (5.6)	10 (3.1)	9 (2.8)	0 (0.0)	2 (0.6)	0 (0.0)	323 (100)

表7-2 女 年齢階級別石綿作業開始からの期間（潜伏期間）

年/年齢	0-19	20-24	25-29	30-34	35-39	40-44	45-49	50-54	55-59	60-64	65-69	70-74	75-79	80-84	85-89	90歳以上	全年齢
～4年	0 (0.0)	0 (0.0)	2 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.0)	3 (0.1)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	6 (0.1)
5～9年	0 (0.0)	1 (0.0)	5 (0.1)	4 (0.1)	1 (0.0)	2 (0.0)	1 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	14 (0.3)
10年～14年	0 (0.0)	6 (0.1)	30 (0.5)	16 (0.3)	19 (0.3)	6 (0.1)	7 (0.1)	4 (0.1)	1 (0.0)	1 (0.0)	0 (0.0)	2 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.0)	0 (0.0)	93 (1.7)
15年～19年	0 (0.0)	2 (0.0)	23 (0.4)	133 (2.4)	149 (2.7)	150 (2.7)	38 (0.7)	29 (0.5)	9 (0.2)	10 (0.2)	7 (0.1)	5 (0.1)	4 (0.1)	3 (0.1)	1 (0.0)	0 (0.0)	563 (10.1)
20年～24年	0 (0.0)	0 (0.0)	6 (0.1)	41 (0.7)	175 (3.1)	584 (10.5)	251 (4.5)	116 (2.1)	34 (0.6)	43 (0.8)	38 (0.7)	33 (0.6)	10 (0.2)	5 (0.1)	2 (0.0)	0 (0.0)	1,338 (24.1)
25年～29年	1 (0.0)	0 (0.0)	2 (0.0)	8 (0.1)	39 (0.7)	297 (7.1)	593 (10.7)	224 (4.0)	92 (1.7)	69 (1.2)	62 (1.1)	49 (0.9)	21 (0.4)	12 (0.2)	2 (0.0)	0 (0.0)	1,471 (26.5)
30年～34年	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.0)	9 (0.2)	27 (0.5)	204 (3.7)	496 (8.9)	143 (2.6)	248 (4.5)	193 (3.5)	93 (1.7)	41 (0.7)	23 (0.4)	9 (0.2)	4 (0.1)	1,491 (26.8)
35年～39年	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.0)	2 (0.0)	5 (0.1)	61 (1.1)	97 (1.7)	90 (1.6)	89 (1.6)	69 (1.2)	18 (0.3)	4 (0.1)	0 (0.0)	0 (0.0)	436 (7.8)
40年以上	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	2 (0.0)	48 (0.9)	52 (0.9)	22 (0.4)	3 (0.1)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	128 (2.3)
不明(99)	0 (0.0)	0 (0.0)	3 (0.1)	0 (0.0)	2 (0.0)	3 (0.1)	3 (0.1)	3 (0.1)	2 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	17 (0.3)
上記以外	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
計	1 (0.0)	9 (0.2)	71 (1.3)	204 (3.7)	396 (7.1)	1,074 (19.3)	1,102 (19.8)	933 (16.8)	380 (6.8)	509 (9.2)	441 (7.9)	274 (4.9)	97 (1.7)	47 (0.8)	15 (0.3)	4 (0.1)	5,557 (100)

表7-3 男女計 年齢階級別石綿作業開始からの期間（潜伏期間）

年/年齢	0-19	20-24	25-29	30-34	35-39	40-44	45-49	50-54	55-59	60-64	65-69	70-74	75-79	80-84	85-89	90歳以上	全年齢
～4年	0 (0.0)	0 (0.0)	2 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.0)	3 (0.1)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	6 (0.1)
5～9年	0 (0.0)	1 (0.0)	5 (0.1)	4 (0.1)	1 (0.0)	2 (0.0)	1 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	14 (0.2)
10年～14年	0 (0.0)	6 (0.1)	30 (0.5)	16 (0.3)	19 (0.3)	6 (0.1)	7 (0.1)	4 (0.1)	1 (0.0)	1 (0.0)	0 (0.0)	2 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.0)	0 (0.0)	93 (1.6)
15年～19年	0 (0.0)	2 (0.0)	25 (0.4)	150 (2.6)	171 (2.9)	166 (2.8)	51 (0.9)	38 (0.6)	12 (0.2)	11 (0.2)	9 (0.2)	5 (0.1)	6 (0.1)	3 (0.1)	1 (0.0)	0 (0.0)	650 (11.1)
20年～24年	0 (0.0)	0 (0.0)	7 (0.1)	44 (0.7)	193 (3.3)	609 (10.4)	284 (4.8)	139 (2.4)	53 (0.9)	54 (0.9)	49 (0.8)	41 (0.7)	14 (0.2)	5 (0.1)	3 (0.1)	0 (0.0)	1,495 (25.4)
25年～29年	1 (0.0)	0 (0.0)	2 (0.0)	9 (0.2)	43 (0.7)	307 (5.2)	609 (10.4)	237 (4.0)	98 (1.7)	77 (1.3)	67 (1.1)	51 (0.9)	22 (0.4)	12 (0.2)	3 (0.1)	0 (0.0)	1,538 (26.2)
30年～34年	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.0)	9 (0.2)	27 (0.5)	204 (3.5)	497 (8.5)	143 (2.4)	248 (4.2)	193 (3.3)	93 (1.6)	42 (0.7)	23 (0.4)	9 (0.2)	4 (0.1)	1,493 (25.4)
35年～39年	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.0)	2 (0.0)	5 (0.1)	61 (1.0)	97 (1.6)	91 (1.5)	89 (1.5)	69 (1.2)	18 (0.3)	4 (0.1)	0 (0.0)	0 (0.0)	437 (7.4)
40年以上	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	2 (0.0)	48 (0.8)	52 (0.9)	22 (0.4)	4 (0.1)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	129 (2.2)
不明(99)	0 (0.0)	0 (0.0)	5 (0.1)	0 (0.0)	3 (0.1)	4 (0.1)	7 (0.1)	3 (0.1)	2 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	25 (0.4)
上記以外	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
計	1 (0.0)	9 (0.2)	76 (1.3)	225 (3.8)	441 (7.5)	1,126 (19.1)	1,168 (19.9)	979 (16.6)	408 (6.9)	530 (9.0)	459 (7.8)	284 (4.8)	106 (1.8)	47 (0.8)	17 (0.3)	4 (0.1)	5,880 (100)

粉尘作业职工健康情况卡

手
紡
石
綿
業

手
紡
石
綿
業

镇、乡、村或集中手纺石棉厂名称:

编号:

1. 姓名:

住址:

电话:

邮编:

2. 性别: 男①、女②

3. 婚姻: 未①、已②

4. 出生年月:

5. 文化程度: 文盲①、小学②、中学③、中专④、大学⑤

6. 接触石棉工种: 手纺①、机纺(初捻、复捻)②、原料拌和③、梳棉④、轧花⑤、
织布⑥、修剪⑦、包装⑧、制动材料等石棉制品工⑨、其他⑩ (说明具体名称)

7. 接触石棉工龄: <5年①、5—10年②、10—20年③、20—30年④、30—40年⑤,

(自_____年_____月至_____年_____月; 如间断接触, 需写明时间
段: _____年_____月, _____年_____月, 先后共_____年_____月)

8. 手纺石棉时, 纺机: 经常有防尘罩①、偶有②、无③

9. 是否被诊断为石棉肺: 否①、是②

首次确诊时间:

期别诊断时间: I期

II期

III期

10. 是否患肿瘤: 否①、是②

肿瘤名称:

编号:

11. 肿瘤有无转移: 否①、有②

转移部位: 肺①、肝②、脑③、胃④、骨⑤、其他⑥(名称)

12. 确诊日期:

13. 确诊医院: 一级①、二级②、三级③、四级④

门诊号:

住院号:

14. 诊断级别: 一级①、二级②、三级③

15. 现况：存活①、死亡②
16. 死亡日期： ， 死亡年龄：
17. 死亡原因： 编号：
18. 直系亲属三代中无肿瘤患者：无①、有②
- 肿瘤名称： 编号：
19. 曾患或现患何种疾病： 编号：
20. 现在是否健在：健在①、死亡②
21. 吸烟①、不吸或偶吸②、1—支/日③、10—支/日④、20—支/日⑤ ，
22. 吸烟持续时间：(年)
- 如间断吸烟，需写明时间段：_____年_____月，_____年_____月，
 先后共_____年_____月
23. 戒烟开始时间：_____年_____月，持续时间：
24. 饮酒①、不饮或偶饮②、黄酒③、白酒④、啤酒⑤
25. 酒量：<0.5斤/日①、0.5—斤/日②、1—斤/日③、2—斤/日④
26. 手纺石棉时，有无将小孩放在同一环境中：无①、有②
- 放在同一环境中小孩姓名：_____
27. 手纺石棉时，你的小孩(或弟、妹等)放在同一环境中看管时间约几年：
 <2年①、2—4年②、4—6年③、6—10年④
28. 学龄前，你跟随母亲等家人在纺机旁接触石棉：否①、是②
29. 学龄前，曾跟随母亲等家人间接接触石棉，写明家人姓名：
 _____，接触时间：
30. 提供情况者与石棉接触者关系：(夫妻、子女、其他_____)

调查者：

调查日期： 年 月 日

参考資料2 聞き取り調査票（日本語訳）

粉塵作業職員健康カード

鎮、郷、村、或いは集中手紡績石綿工場名称：

No.

1. 姓名： 住所： 電話 〒

2. 性別：①男 ②女

3. 婚姻：①未婚 ②既婚

4. 生年月日：

5. 学歴：①文盲 ②小学 ③中学 ④専門学校 ⑤大学

6. 石綿と接触する業種：

- ①手紡績 ②機械紡績（ファースツイスト、セカンドツイスト）
③原料攪拌 ④梳綿 ⑤軋花
⑥布織 ⑦カット ⑧包装
⑨ 制動材料等石綿製品の作業員 ⑩ その他（具体的な名称）

7. 石綿との接触歴

- ①5年以下 ②5年 ③10年 ④20年 ⑤30年
（ 年 月から 年 月迄：
断続的に その接触歴がある場合は、 年 月迄、
年 月迄、全部で 年 月）

8. 石綿を手紡績する時、紡績機械に防塵マスクが ①常にあり ②たまにあり ③なし

9. じん肺と診断されたこと： ①なし ②あり

初めて診断された時：

I期と診断された時：

II期と診断された時：

III期と診断された時：

10. 腫瘍： ①なし ②あり

腫瘍名称：

No.

11. 腫瘍転移： ①なし ②あり

転移部位： ①肺 ②肝臓 ③脳 ④胃 ⑤骨 ⑥その他

12. 診断された時：

13. 診断された医院： ①一級医院 ②二級医院 ③三級医院 ④四級医院
外来カルテ No. 入院カルテ No.

14. 診断されたランク： ①一級 ②二級 ③三級

日本財団補助金による


1997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—

1998年 3月 1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 神山宣彦 
所属機関名 労働省産業医学総合研究所
職名 部長 年齢 52 才
所在地 〒214-8585 川崎市幸区長尾6-21-1
電話 044-865-6111 内線 2340

1. 研究課題

JFM繊維状標準試料を用いたアスベスト代替
繊維の細胞毒性と物性との比較研究

2. 研究期間 自 1997年 4月 1日 ~ 至 1998年 3月 15日

3. 研究組織

日本側研究者氏名 神山宣彦 (52才)
所属機関 労働省産医研 職名 部長

中国側研究者氏名 劉世傑 (84才)
所属機関 北京医科大学公共卫生学院 職名 名誉院長

JFM繊維状標準試料を用いたアスベスト代替繊維の 細胞毒性と物性との比較研究

日本側研究代表者 神山宣彦
中国側研究代表者 劉世傑

1. はじめに

アスベスト曝露によって肺線維症、肺ガン、中皮腫等が引き起こされることが判明し、先進国ではアスベスト使用は厳しく管理・制限されている。しかし、発展途上国では、アスベストは依然として重要な工業材料・資源として採掘、加工及び製品生産が盛んに行なわれている。アスベスト関連疾患の予防の面から現在可能な対策としては、(1) 作業環境のアスベスト濃度の減少、(2) 使用可能な代替物質の開発、(3) アスベストの毒性軽減のための繊維表面性状の改質方法の研究、などがある。これらの点を日中両国の関係で見ると(1)については、日本や欧米の環境測定や管理の方法が良く知られており、今後は中国側の経済事情が環境改善の成否の多くを占めるであろう。(3)については、中国で種々の研究が進んでいる。まだ決め手になるような改質方法は完成していないようだが、今後も中国独自に進められるものと見られる。(2)については、最近、特に日本で多種多様な人造鉱物繊維 (Man made mineral fibers ; MMMF) がアスベスト代替繊維として製造されている。また、中国ではアスベスト代替繊維として人造鉱物繊維とは別に豊富な鉱物資源産出国として、アスベスト以外の種々の天然鉱物繊維を大量に採掘・生産・輸出しており、日本にもかなり輸出している。

日本も含めて欧米先進国では、製造物責任という観点からの法律整備がなされ、こうした人造鉱物繊維についても予め使用に先立つ有害性調査が重要視されている。アスベストに限らず繊維状物質の生体影響は、一般に細くて長い繊維サイズと体内耐久性が重要な因子と見られていることから、アスベスト代替繊維についても十分な生体影響研究の実施が必要である。しかし、それらの生体影響についてはまだ不明なものが多い。この状況は日中ともにまだその研究の端緒についたばかりで同様である。

本研究は、最近日本で新たに調整・準備された11種類のMMMFやウィスカークラス、有機繊維などから成るJFM標準試料とその他、アスベスト代替繊維試料として数種の天然鉱物繊維について、生化学および遺伝毒性的手法による *in vitro* の細胞毒性と繊維状物質の様々な物性とを比較検討して、個々の繊維状試料の毒性評価とともに毒性発現機序の解明にも迫ろうとするものである。

2. 研究の概要

本研究に用いた繊維状試料の調整とキャラクター化を日本側が行った。日本側の産医研では、過去にアスベストを始めとして種々の繊維状鉱物を調整し、それらの一部についてラットを用いた発癌試験と染色体異常試験などの *in vitro* 試験を行ってきたが、現在それらの試験を行える研究者はいない。今回は、中国側グループによって既に発癌性試験成績のある試料も含めてJFM試料について次のような細胞毒性試験や変異原性試験を行った。中国側の行った試験は、[I] 種々の細胞との反応性試験：1) 溶血性、2) 細胞膜透過性への影響、3) 細胞膜流動性への影響、4) アルカリ性染色剤の吸着、5) 細胞内Ca濃度に対する影響、6) 細胞内グルタチオン(GSH)濃度に対する影響、[II] 遺伝的損傷影響：1) A549細胞DNA鎖の断裂、2) HEL細胞染色体異常、[III] 表面改質の試み：くえん酸アルミニウムの溶血性抑制作用 などである。

3. 試料と方法

研究試料は、11種類のJFM標準繊維状試料を中心に、アスベスト、天然鉱物繊維、などである

(表1)。毒性評価のための細胞には、人の赤血球、モルモットの肺胞マクロファージ、人の血中リンパ球などを用いた。JFM標準繊維状試料についてのキャラクタリゼーション(物性解析)は、既にX線回折、熱分析、蛍光X線分析、サイズ分布測定、などが行われており、今回は、高分解能電子顕微鏡による繊維横断面観察を主に行った。

Table 1. List of JFM standard fibrous samples.

Sample name	Name of Fiber/whisker
GW1	Glass wool (Glass fiber)
RW1	Rock wool
MG1	Micro glass fiber
RF1	Refractory fiber (Ceramic fiber)
RF2	Refractory fiber (Ceramic fiber)
RF3	Refractory fiber (Mullite fiber)
PT1	Potassium titanate whisker
SC1	Silicon carbide whisker
TO1	Titanium oxide whisker (Rutile whisker)
WO1	Wollastonite (from China)
AR1	Aramid fiber

4. 結果

[I] 被検試料の物性解析と表面構造の観察

1) 被検試料のキャラクタリゼーション

JFM標準繊維状試料11種類の主な物性をまとめて表2に示した。繊維サイズについても、表2に示した。

Table 2. Some characteristics of JFM standard fibrous samples.

Sample name	Crystallinity	σ	ϵ	Width		Length		SR
				(g; μm)	SD(g)	(g; μm)	SD(g)	
GW1	Non-crystalline	2.6	-	0.88	3.10	20.0	2.58	-
RW1	"	2.7	-	1.80	2.32	16.5	2.51	-
MG1	"	2.6	-	0.24	2.35	3.0	2.22	-
RF1	"	2.7	-	0.77	2.53	12.0	2.36	-
RF2	"	2.7	-	1.10	2.00	11.0	1.96	-
RF3	Crystalline	2.7	-	2.40	1.37	11.0	1.75	-
PT1	Crystalline	3.5	-	0.35	1.51	6.0	2.04	+++
SC1	Crystalline	3.2	+	0.30	1.51	6.4	2.45	
TO1	Crystalline	4.3	-	0.14	1.53	2.1	2.00	++
WO1	Crystalline	3.0	-	1.00	1.72	10.5	2.03	+++
AR1	Crystalline	1.4		nm	nm	nm	nm	

s: specific gravity, e: surface charge, -: negative, +: positive, g: geometric mean, SD: standard deviation, nm: could not be measured, SR: surface roughness

2) 高分解能電子顕微鏡によるJFM試料の繊維横断面観察

赤血球の溶血性、マクロファージによる食食など、いずれも細胞膜と繊維表面の接触という局面が存在する。表面原子のパッキングが密なほど、すなわち原子オーダーでスムーズな表面を持つ粒子ほどある種の細胞毒性が低いという結果も報告されている。そういった観点から、実際の表面構造を直接原子オーダーで観察しその同一物質の詳細な細胞毒性試験との比較検討を行うことは、表面形状と毒性との関連製を探る上で大きな期待が持てる。表面構造の原子オーダー観察のための試料は、繊維を樹脂に包埋し、ウルトラマイクロームにより繊維横断面が電頭支持膜に並んだ超薄切片試料を作製した。観察は最新の高分解能電子顕微鏡により行った。

繊維を電頭支持膜に分散させて観察する通常の方法では、繊維の軸方向に沿った表面構造が見える。一般にどの繊維の表面も平滑である。一方、繊維の軸方向から繊維を見た場合、繊維横断面に現れた繊維表面が見える。この方向の繊維表面はその種類によって平滑（スムーズ）なものから凹凸（ジグザグ）の激しいものまでいろいろであった。そのジグザグ度（roughness）を定量的に表現するのは難しい問題である。そこで、ジグザグ度（roughness）を下記のような4段階に分けて表現した。

- +++ : 凹凸がかなり激しい
- ++ : 中くらい
- +: 少し凹凸がある
- : 原子レベルで全く平滑

結果を同じく表2に示した。幾つかの表面形態の様子を図1に示した。

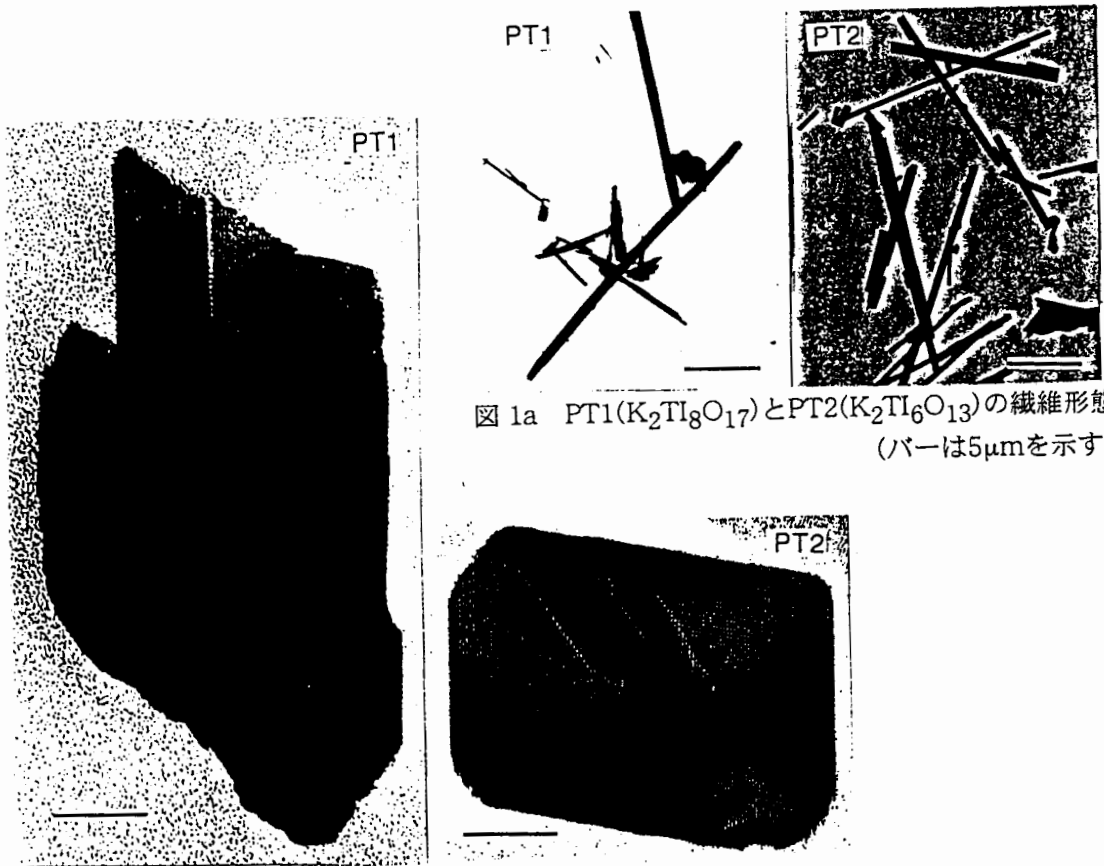


図 1a PT1($K_2Ti_8O_{17}$)とPT2($K_2Ti_6O_{13}$)の繊維形態
(バーは5 μ mを示す)

図 1b PT1($K_2Ti_8O_{17}$)とPT2($K_2Ti_6O_{13}$)の繊維断面の形態
(バーは20nmを示す)

[II] 種々の細胞に対する傷害性試験

1) JFM試料の溶血性

200 $\mu\text{g/ml}$ のWO1懸濁液と3%赤血球懸濁液を0、5、30、60分間作用させた。その結果、WO1の溶血性は時間の延長とともに強くなり(表3)、異なる量を加えて60分間作用させると表4のように量-反応関係が得られた。500 $\mu\text{g/ml}$ のJFM各試料と赤血球を60分間させた場合には、表5に示すように対照群クリソタイル(UICC Chrysotile B)に明らかに溶血性がある他、TO1、WO1、GW1、MG1なども弱い溶血性を示した。

Table 3 Hemolytic effect of 200 $\mu\text{g/ml}$ WO1 in time course (n=3)

Incubation time (min)	Hemolytic rate(%)
0	0.87
5	0.65
30	2.09
60	2.04

Table 4 Hemolytic effect of different dose of WO1(n=3)

Dose ($\mu\text{g/ml}$)	Hemolytic rate(%)
0	0.00
50	0.95
250	3.17
500	4.76

Table 5 Hemolytic effects of JFM fibers (n=3)

JFM samples	Hemolytic rate(%)
UICC B	52.54
WO1	4.76
PT1	3.17
TO1	1.37
GW1	1.06
MG1	1.06
SC1	0.74
RF2	0.53
RW1	0.32
RF3	0.21
RF1	0.21

2) JFM試料の細胞膜透過性に対する影響

(1) 赤血球からの K^+ の漏出

WO1とTO1の引き起こした赤血球 K^+ の漏出は、量-反応関係が認められた(表6)。しかも、500 $\mu\text{g/ml}$ のWO1とTO1の引き起こした赤血球 K^+ の漏出は、明らかにUICC Bより多かった。AR1とRF1も赤血球 K^+ の漏出が認められたが、対照群UICC Chrysotile Bより顕著に低かった。

Tab.6 Release of K^+ from erythrocytes induced by JFM fibers($\mu\text{g/ml}$, $\bar{x} \pm s$, n=3)

tested materials	concentration of K^+ in supernatant
TO1	227.4 \pm 8.2*#
WO1	208.0 \pm 8.7*#
UICC chrysotile B	185.8 \pm 16.8
AR1	173.8 \pm 16.8*#
RF1	159.6 \pm 11.6*#
MG1	149.6 \pm 5.8#
PT1	146.4 \pm 10.0#
SC1	138.4 \pm 5.2#
RF3	137.2 \pm 2.8#
RW1	135.2 \pm 3.6#
GW1	131.6 \pm 4.8#
RF2	131.0 \pm 8.2#
control group	128.3 \pm 6.4

vs control group, *: p<0.05

vs UICC chrysotile B, #: p<0.05

(2) 肺胞マクロファージ (AM) よりのK⁺の漏出

WO1とTO1の引き起こしたAMからのK⁺漏出は、赤血球と同様に明らかに量-反応関係が認められた(表7)。200μg/mlを用いた場合、全てのJFMにAMからのK⁺漏出が認められたが、その中でTO1の起こしたAMからのK⁺漏出は対照群UICC Chrysotile Bより更に顕著であった。

Tab.7 Release of K⁺ from AM induced by JFM fibers(μg/ml, x±s, n=3)

tested materials	K ⁺ in supernatant
TO1	141.25±3.73**
AR1	128.70±5.03*
WO1	128.55±7.03*
UICC Chrysotile B	127.40±5.84*
PT1	121.90±5.03*
RW1	120.90±1.68*
GW1	120.35±3.99*
SC1	116.50±3.07**
RF2	114.55±3.92**
RF3	114.10±7.01*
RF1	97.40±7.85*
MG1	94.30±5.06*
control group	60.65±17.88

*: vs control group, p<0.05

#: vs UICC chrysotile B, p<0.05

(3) AMからのLDH (乳酸脱水素酵素) の漏出

TO1の引き起こしたAMからのLDH漏出は、時間-反応と量-反応関係が共に認められた(表8、9)。200μg/mlのJFM試料をAMと60分間作用させると、RF1、MG1、GW1を除くその他のJFM全部にAMからのLDH漏出が見られた。そのうちAR1とPT1の値は対照群UICC Chrysotile Bにほぼ等しかった(表10)。

Tab.8 Release of LDH from AM induced by TO1

time(minutes)	LDH(U/100ml)
0	307.01±33.83
15	519.29±75.40*
30	445.81±38.00*
60	796.30±68.81*
120	913.91±55.61*

vs control group *: p<0.05 (x±s, n=3)

Tab.9 Release of LDH from AM induced by TO1

dose(μg/ml)	LDH(U/100ml)
0	511.81±6.80
50	573.04±28.05*
100	620.67±90.52*
200	824.78±40.63*

vs control group *: p<0.05 (x±s, n=3)

Tab.10 Release of LDH from AM induced by JFM fibers

tested materials	LDH(U/100ml)
AR1	1488.16±118.11*
UICC chrysotile B	1433.98±82.56*
PT1	1256.83±154.35*
TO1	824.78±40.63**
SC1	819.68±22.48**
WO1	627.47±13.03**
RW1	627.47±30.17**
RF2	627.47±48.90**
RF3	586.65±48.94**
RF1	569.64±36.00#
control group	511.81±6.80
MG1	501.60±83.52#
GW1	487.99±257.35#

*: vs control group, p<0.05

(x±s, n=3)

#: vs UICC chrysotile B, p<0.05

3) 細胞膜流動性に対する影響

200 μ g/mlのPT1, MG1, TO1, WO1とUICC Chrysotile BをそれぞれAMと1時間作用させ細胞膜流動性の指標として蛍光偏光性を測定したところ、そのうちWO1だけ顕著にAMの流動性を低下させた(表11)。

Tab.11 Effect of JFM fibers on membrane of AM($\bar{x}\pm s$, n=3)

tested materials	P
control group	0.080 \pm 0.019
PT1	0.087 \pm 0.003
UICC chrysotile B	0.108 \pm 0.018
MG1	0.113 \pm 0.020
TO1	0.102 \pm 0.015
WO1	0.114 \pm 0.014*

*: vs control group, $p<0.05$

4) アルカリ性染料の吸着

10 μ g/mlのメチレンブルーを用いて500 μ g/mlのJFM試料と混合して30分後、AR1, MG1とRF1のメチレンブルー吸着量は顕著に増加して、そのうちAR1のメチレンブルー吸着量は大体対照群UICC Chrysotile Bと等しかった(表12)。

Tab.12 Adsorption of methylene blue on JFM(μ g/ml $\bar{x}\pm s$, n=3)

tested materials	methylene blue in supernatant
UICC chrysotile B	1.99 \pm 0.23**
AR1	2.09 \pm 0.46**
MG1	6.41 \pm 0.22**##
RF1	7.97 \pm 0.23**##
RF2	8.12 \pm 0.38##
RW1	8.24 \pm 0.83##
RF3	8.29 \pm 0.75##
WO1	8.52 \pm 1.04##
control group	8.97 \pm 0.45
TO1	8.97 \pm 0.54##
PT1	9.07 \pm 0.77##
SC1	9.17 \pm 0.96##

*: vs control group, $p<0.05$ **: $p<0.01$

##: vs UICC chrysotile B, $p<0.01$

5) 細胞内 $[Ca^{2+}]_i$ 濃度に対する影響

JFM試料200 μ g/mlとAMを1時間作用させた。JFM試料の内、GW1を除いたすべてがAM細胞内の $[Ca^{2+}]_i$ 濃度を明らかに増加させた(表13)。ただし、対照群UICC Chrysotile Bと比較すると遥かに低かった。WO1は正常対照と統計上差異はないにも拘わらず、AM細胞内の $[Ca^{2+}]_i$ 濃度の増加は、尚量-反応関係が認められた(表14)。

Tab.13 Increase of $[Ca^{2+}]_i$ induced by JFM fibers($x \pm s$, n=4)

tested materials	$[Ca^{2+}]_i$ (nmol/L)
UICC chrysotile B	1563.4±264.9**
SC1	640.1±103.3**#
TO1	425.7±26.5**#
PT1	418.5±36.2**#
MG1	380.9±28.0**#
RF3	363.8±43.9**#
RF2	347.1±30.1**#
RF1	340.0±24.1**#
RW1	329.4±23.7*#
WO1	329.3±55.3#
GW1	259.1±28.8#
control group	256.3±33.1

*: vs control group, $p < 0.05$; **: $p < 0.01$

#: vs control group, $p < 0.01$

Tab.14 Increase of $[Ca^{2+}]_i$ induced by WO1 in AM($x \pm s$, n=4)

dose(μ g/ml)	$[Ca^{2+}]_i$ (nmol/L)
0	256.3±33.1
50	260.1±54.5
100	293.9±53.2
200	329.3±55.3
400	360.0±8.2*

*: vs control group, $p < 0.05$

6) AM細胞内グルタチオン(GSH)濃度に対する影響

JFM試料200 μ g/mlとAMを2時間作用させた。PT1, TO1, SC1, WO1, MG1, RF2などは、細胞内グルタチオン(GSH)濃度を明らかに減少させた。そのうち、PT1とTO1は対照群UICC Chrysotile Bと大体類似していた(表15)。

Tab.15 Depletion of GSH in AM induced by JFM fibers($x \pm s$, n=4)

tested materials	GSH(μ g/ 10^6 cells)
PT1	0.188±0.007**
UICC chrysotile B	0.198±0.017**
TO1	0.221±0.016**
SC1	0.261±0.020**#
WO1	0.280±0.017**#
MG1	0.340±0.011**#
RF2	0.430±0.012*#
RF3	0.448±0.013#
GW1	0.452±0.013#
RF1	0.455±0.021#
RW1	0.488±0.021#
control group	0.488±0.033

*: vs control group, $p < 0.05$; **: $p < 0.01$

#: vs UICC chrysotile B, $p < 0.05$

[III] 遺伝的損傷影響

1) JFM試料のA549細胞DNA鎖の断裂

JFM試料200 μ g/mlとA549細胞を1時間作用させた。試料全てにDNA鎖の断裂発生が見られた(表16)。そのうちPT1が対照群UICC Chrysotile Bと大体類似の値を示した。

Tab.16 DNA strand breaks induced by JFM fibers(x \pm s, n=30)

tested materials	tail/total length
UICC chrysotile B	0.606 \pm 0.143*
PT1	0.554 \pm 0.144*
SC1	0.500 \pm 0.133*#
MG1	0.475 \pm 0.155*#
TO1	0.461 \pm 0.117*#
WO1	0.458 \pm 0.152*#
RF3	0.441 \pm 0.121*#
RF2	0.404 \pm 0.127*#
RF1	0.330 \pm 0.091*#
GW1	0.322 \pm 0.135*#
RW1	0.255 \pm 0.110*#
control group	0.127 \pm 0.122

*: vs control group, p<0.01

#: vs UICC chrysotile B, p<0.01

2) HEL細胞染色体異常

2.5 μ g/mlのJFM試料をHuman Embryo Lung Cell (HEL細胞)に24時間作用させた後、細胞染色体異常を測定した。大多数のJFM試料は染色体異常を現した。そのうちSC1の起こした染色体異常率は明らかに対照群UICC Chrysotile Bより高かった(表17)。染色体異常のタイプは単体型の異常であった。

Tab.17 Chromosome aberration induced by JFM fibers in HEL cells(n=100)

tested fibers	aberration cells(%)	aberration type (%)						total aberration rate(%)
		ace	csb	f	ctb	cte	pp	
SC1	6	2		2	1	2	1	8
UICC B	6	2		2	2			6
RF2	5			1	2	1	1	5
WO1	4		1	1	2			4
MG1	3				1	3		4
RF3	3			2	2			4
PT1	3		1		2			3
TO1	3					2	1	3
GW1	2			1	1			2
RF1	2			1	1			2
RW1	1				1			1
control	1				1			1

Note ace: acentric fragment, csb: chromosome breaks, f: fragment, ctb: chromatid breaks, cte: chromatid exchanges, pp: polyploid

[IV] 表面改質の試み：くえん酸アルミニウムの溶血性抑制作用

500 μ g/mlのWO1, TO1と対照群UICC Bを200及び500 μ g/mlのくえん酸アルミニウム (CitAl) を1時間混合した後、細胞に作用させた。その結果、処理後のWO1と対照群UICC Bの起した溶血性は、未処理の試料の溶血性に比べて明らかに減少していた。TO1, WO1及び対照群UICC Chrysotile Bの起したK⁺の漏出も明らかに少なくなった。

5. 結 論

以上の実験結果より、ほとんどのJFM試料の毒性は対照試料のクリソタイル (UICC Chrysotile B) よりも低いといえる。しかし、JFM試料は各影響指標によってその作用程度と順番は同じでなく指標ごとに多様であった。

1) 繊維試料の表面電荷を現すゼータ電位は、クリソタイルのみプラスで他はマイナスである。溶血性はクリソタイル (UICC Chrysotile B) がプラス52.54%で他はいずれもその1/10以下の数%以下であった。表面電荷がプラスのものが高い溶血性を示すと考えられる。

2) 細胞膜傷害性の指標としての赤血球、AMからのK⁺漏出は、対照試料のクリソタイル (UICC Chrysotile B) より強いとか同等レベルのものとして、赤血球とAMのいずれに於てもTO1, WO1, AR1が挙げられる。同じくAMからのLDH (乳酸脱水素酵素) の漏出は、AR1とPT1がクリソタイルと同レベルの値を示し、TO1とSC1が比較的高かった。これらの繊維と細胞との接触に於て細胞膜の傷害が発生すると考えられる。

3) 繊維試料とAMとの作用の影響を、細胞内[Ca²⁺]_i濃度とAM細胞内グルタチオン(GSH)濃度を指標として評価した。その結果、前者は対照試料のクリソタイルに比べいずれも低かったが、後者はPT1とTO1が対照試料のクリソタイルと同等レベルにまで低下したことが確認された。

4) 遺伝的損傷影響を(1)A549細胞DNA鎖の断裂と(2)HEL細胞染色体異常を指標として見た場合、対照試料のクリソタイルより強いとか同等レベルのものとして、(1)ではPT1がほぼ同レベルでSC1, MG1, TO1, WO1などが比較的高かった。(2)については、SC1がクリソタイルより強い異常の発生値を示した。

今後、これらの成果を踏まえて期待されることは、(1) 個々の繊維状物質の線維化能や遺伝毒性などがアスベストと比較して評価される、(2) 繊維状物質表面の微細構造と細胞毒性との関連性が評価される、(3) 毒性評価のための簡便なスクリーニング法の確立のための基礎データとして用いられる、などである。

関係論文の発表予定 (含む既発表)

- 1) Kohyama, N. et al. : Preparation and characteristics of some fibrous minerals for biological experiments, Ninth International Conference for Occupational Respiratory Diseases, Kyoto, 1997.10.10/15
- 2) Wang, Q., Wu, W and Shi, J: Effects of JFM on membrane and genetic materials in cells, 日本繊維状物質研究協議会研究交流会、東京、1998.3.7
- 3) 神山宣彦、栗盛静江、篠原也寸志：2種のチタン酸カリウムウイスカの表面形態の直接観察、日本産業衛生学会、盛岡、1998.4.22 (発表予定)
- 4) Wang, Q., Wu, W, Shi, J and Kohyama, N: Biological effects of man-made mineral fibers and some whiskers on mambrane and genetic materials in cells, Ind. Health, (preparation)

日本財団補助金による


1997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—

1998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 千葉仁志 
所属機関名 北海道大学医学部 附属病院
職名 講師 年齢 44 才
所在地 〒060-8648 札幌市北区北14条西5丁目
電話 011-716-1161 内線 5705

1. 研究課題

中国におけるコレステリルエステル転送蛋白欠損症の疫学調査

2. 研究期間 自 199 年 4 月 1 日 ~ 至 1998 年 3 月 15 日

3. 研究組織

日本側研究者氏名 小林邦彦 (57才)
所属機関 北海道大学医学部 職名 教授(小児科学)

中国側研究者氏名 李美琳 (65才)
所属機関 北京医科大学 職名 教授(神経内科学)

研究報告書

中国におけるコレステリルエステル転送蛋白欠損症の疫学調査

北海道大学医学部附属病院 千葉 仁志

研究目的

コレステリルエステル転送蛋白 (cholesteryl ester transfer protein; CETP) は疎水性糖蛋白で、血漿中では大部分が高密度リポ蛋白 (HDL) に存在している。その機能は、HDL中のコレステリルエステルを超低密度リポ蛋白や低密度リポ蛋白 (LDL) へと転送し、同時に逆方向にトリグリセリドを転送することであり、血管壁から肝へのコレステロール逆輸送に貢献すると考えられる。CETP 遺伝子は第16染色体上にあり、全長25 kbpの中に16個のエクソンを含む。

CETP欠損症は日本人の家族性高HDL血症の家系で初めて見いだされた。この家系の遺伝子異常は、イントロン14第1塩基のGからAへの置換 (Int14A) によるスプライシング異常であった。Int14A変異はHDLコレステロール濃度上昇作用が強く、ホモ接合体の血清HDLコレステロール濃度は120~200 mg/dl (正常; 40~80 mg/dl) に及ぶ。我々は、Int14A変異の日本人一般人口における頻度が1.6%であると報告した。我々は、同時に、CETPの442番目のアスパラギン酸がグリシンに置換される変異型 (D442G) が日本人に高頻度 (9.2%) に出現し、HDLコレステロールを穏やかに上昇させる (50~100 mg/dl) ことを報告した。以上の研究から、CETP欠損は日本人のリポ蛋白代謝を特徴づける最大の遺伝形質であることが明らかとなった。

CETP欠損症の報告は日本人に限られていたが、我々は北京地区の小規模の調査でD442G変異例 (日本人以外で初のCETP欠損例) を見いだした (*Am J Med Genet*, 1995年)。本研究における我々の目的は、CETP欠損が中国でどのように分布するか、それが中国人のリポ蛋白代謝にどのような意義を持つか、また、CETP欠損の表現型に影響する因子は何か、などについて明らかにすることである。

方法

1. 対象

北京, 成都, ハルピンの3カ所を調査地点として, 健康診断受診者から採血した. 比較の目的で札幌でも同様の検討を行った.

2. 血清脂質分析

検診での血漿総コレステロール (TC), トリグリセリド (TG), HDLコレステロール (HDL-C) 濃度測定値を採用した. D442G変異例については, 凍結保存血漿を用いて一元免疫拡散法によるアポリポ蛋白測定を行った.

3. 遺伝子解析

DNA解析にはEDTA血球を用いた. 既報のPCR反応によりCETP遺伝子を増幅後, 制限酵素による切断パターンからD442G変異とInt14A変異の有無を判定した. D442G変異が中国人の寿命に与える影響を検討する目的で, ≥ 70 歳以上の高齢者の病院受診者からも採血して同様の検索を行った (札幌, 北京のみ). また, 遺伝子変異が共通祖先遺伝子に由来するかどうかを明らかにする目的で, CETP遺伝子のイントロン9についてhaplotypingを行った.

4. CETP活性測定

北京の正常者とD442G変異例について, 既報の方法によるCETP活性測定を行った. 比較の目的で札幌でも同様の測定をおこなった.

5. ライフスタイルに関する情報

肥満度の指標としてBody Mass Indexを算出した.

結果

各調査地点の対象者の年齢, BMI, D442GとInt14Aの頻度を表1示す. 北京とハルピンでは, 日本と同等の頻度でD442Gが検出されたが, 成都ではやや低い傾向がみられた (統計学的に有意ではない). Int14Aは中国では検出されず, 北京と札幌との頻度の差は統計学的にも有意であった. BMIは調査地点間で有意な差を認めなかった.

血清脂質の結果を表2に示す. 正常者については, 中国の各地点では, 札幌と比較してTC, HDL-C, LDL-Cのいずれも低い値を示した. D442G変異例と正常者との比較では, 札幌においては変異群でHDL-Cの有意な増加を認めたが, 中国の北京とハルピンでは, HDL-Cレベルには差がなく, TCとLDL-Cが有意に

低かった。成都でも同様の傾向を認めた。

D442G変異例の血清アポ蛋白では、札幌ではHDLの構成蛋白であるapoA-Iの高値が目立つが、中国ではLDLの構成蛋白であるapoBの低値が目立つ所見であった。これは血清脂質の成績と矛盾しない結果であった（表3）。

高齢者のD442G変異の頻度を表1の標本集団と比較すると、札幌ではやや頻度が低く、北京では逆にやや高い傾向ではあったが、これは統計学的に有意ではなかった（表4）。

D442GのCETP活性は、日本では正常者の61%に低下していた。これに対し、北京の正常者は日本の正常者の69%の活性を有しており、D442G変異例はその37%の活性しか有していなかった（表5）。すなわち、中国人（北京）は日本人より低いCETP活性を有しており、その傾向はD442G変異例でいっそう顕著であった。

考察

本研究により、D442G変異が中国に広く分布することが明らかとなった。日本人のD442G変異との関係については、我々は、両者が共通の祖先遺伝子に由来することをhaplotypingによって確認した（結果は示さない）。我々は、韓国におけるD442Gの存在と、そのhaplotypeが日本や中国と共通することも確認している。このことから、D442G変異は北アジアに広く分布する遺伝子であることが示され、D442G変異の起源は北アジアへの人類分布のかなり早期にまで遡れる可能性が示唆された。人類学的に北部中国とは一線を画する揚子江南部の成都で、統計学的には有意でないものの、やや低いD442G遺伝子頻度が確認されたが、このことは、D442G変異の北アジア起源を示唆するのかもしれない。しかし、少数例の検討で結論することはできないので、更に例数を増やすとともに、東南アジア地域の調査も行う必要がある。

本研究では、いずれの地点の中国人D442G変異群においても高HDL-C血症は観察されず、むしろ低LDL-C血症と低コレステロール血症が観察された。アポ蛋白の測定結果も脂質のパターンに合致したので、この現象は脂質測定上の過誤によるものではない。これまでの日本人の成績やハワイの日系人の成績では、HDL-Cの有意な増加が共通の所見として報告されているが、TCやLDL-Cの低下はいずれの報告にも認められない。この中国人の成績の特異性に関連して重要と思われるのは、中国人の血清TC濃度が日本人と比べて低値である点である。

上海の中国人の血清脂質レベルの報告によれば、中国人の血清TCが日本人のそれと比較して明らかに低い、一方では、シンガポールや台北に在住する中国人の血清脂質レベルは日本人のそれと似ていることが報告されており、本研究で観察された北京在住の中国人の血清脂質レベルが低いという特徴は遺伝的要因ではなく環境因子を反映していると考えられる。しかし、今回のBMIの比較では日本と中国に明らかな差を検出できず、環境要因の何が脂質レベルに差を生じさせたかは現時点では明らかではない。この点については、我々は食事内容まで含めた調査を続行中である。

高脂肪食では血清脂質の増加とともに血中CETP活性の増加が観察される。この事実から、比較的低脂血症にある中国人では血中CETP活性の低下が予想される。実際に、本研究では、中国人非変異者のCETP活性が日本人非変異者のそれより有意に低下していることが示された。CETPの低下がLDLとHDLの間のcholesterolのバランスをHDL側に傾けることは、CETPの生理的機能がHDLからLDLへcholesteryl esterを転送することである点を考慮すれば明白である。中国人では、低コレステロール血症の存在に対して、LDL-Cを低下させることを代償にHDL-Cを高く維持しようとするメカニズムが働いていると考えられる。血清TCレベルがhumanと比べてかなり低いratやguineapigでは、CETP活性が非常に低く、血漿リポ蛋白としてはHDLが主体となりLDLは著しく減少する。中国人の脂質プロファイルの特徴は、これらの小動物での特徴と一致しており、低コレステロール状態への適応現象と考えることができる。

中国人のD442G変異群でCETP活性が著しく低いことは、同群の血清レベルの特徴と関連していると考えられる。すなわち、中国人変異群では、表2に示したように正常群よりも強い低コレステロール状態にあるため、CETP合成が正常群よりも更に低下していると推測される。その結果、遺伝子変異（アミノ酸置換）だけから予想されるよりも大きな血清CETP活性の低下が生じると解釈できる。

では、中国人変異群で中国人正常群よりも低い血清TCレベルの原因は何であるか。両群でコレステロール摂取量に差があるとは考えづらい。可能な説明の一つは、中国人変異群では血漿リポ蛋白（特にLDL）の代謝回転が亢進しており、血漿から早くに消失するという考えである。CETP欠損では、当然ながら、VLDLやLDLのTG含量が大きく、逆にこれらのコレステロール含量は低い。TGはlipoprotein lipaseによって水解を受け、free fatty acidやglycerolとなってリポ蛋白から遊離し、リポ蛋白粒子そのものは小型化する。これに対してcholesteryl

esterは水解を受けないためリポ蛋白粒子に留まる性質があり、リポ蛋白の小型化という面では不利に働く。VLDLから中間比重リポ蛋白（IDL）を経てLDLに至り、ついにLDL受容体に取り込まれるためには、リポ蛋白の小型化は必須のプロセスであることを考慮すると、このような考えは検討に値すると思われる。このようなりポ蛋白代謝面の違いの他に、肝におけるコレステロール合成の差や、腸管におけるコレステロール吸収の差などに説明を求めることも可能であろう。中国人D442G変異群の低コレステロール血症と低LDL-C血症のメカニズムの解明には今後の更なる研究が必要である。

中国人のD442G変異が中国人の寿命に関してどのような影響を持つかは重要な問題である。ごく最近、ハワイ在住の日系人において、D442G変異群は非変異群に比較して1.61倍の冠動脈疾患のリスクを負うという結果が報告された。ハワイ在住日本人のD442G変異群の血清脂質プロフィールは中国人変異群のそれと大きく異なっており、彼らの結果を中国人に直ちに当てはめることはできない。欧米化の進む中国の将来におけるD442G変異の予後を予測するデータとしてはハワイの日系人の成績は貴重であるが、現時点でD442G変異が中国人の動脈硬化の予後にどのように影響しているかを明らかにするには中国での大規模な疫学調査が必要である。今回の我々の成績では、北京の高齢者のD442G変異の頻度は比較的若年のグループと比較して統計学的に有意な差は認められず、この結果からはD442G変異の中国人の長寿に及ぼす影響はないという結論が導かれる。しかし、これは小さい集団での比較であり、性急な結論は控えるべきであろう。我々は更に大集団での検討でこの問題の結論を見いだしたいと考えている。

中国では都市部を中心に急速にライフスタイルの西洋化が進行しており、今後は農村部でも同様の傾向が進むと予想される。中国人と類似の遺伝形質を有する日本人は、過去に同様の道を歩んできて、現在は高脂血症や動脈硬化性疾患の治療に多大な労力と経費を費やしている。世界的に社会資源が枯渇する中で、人類が同じ過ちを繰り返すことは避けなければならない。その意味で、中国人の遺伝形質を理解し、それに適したライフスタイルを模索する努力を今後も継続する必要があると思われる。

謝辞

本研究成果は高脂血症関連の国際雑誌に発表される予定である。本研究をご支援頂いた日中医学協会と関係者の皆様に深く感謝致します。

表 1. CETP欠損の頻度の比較

	n	年齢	BMI	D442G	Int14A
札幌	160	34±8.9	21.9±1.6	5.70%	1.30%
北京	379	36±11.3	20.1±2.3	4.20%	0% ^a
ハルビン	121	33±8.0	20.3±1.9	5.80%	0%
成都	136	35±12.6	21.3±2.2	2.20%	0%

^aP<0.05 vs. Sapporo (Fisher's exact probability test)

表 2. CETP欠損の血清脂質への影響

		n	TC	TG	HDL-C	LDL-C
札幌	正常	149	176±28	103±62	60±12	97±28
	CETP欠損	11	174±26	96±56	71±10 ^a	86±19
北京	正常	366	146±36 ^b	106±71	48±12 ^b	77±30 ^b
	CETP欠損	16	122±28 ^{a,b}	99±26	46±9 ^b	56±24 ^{a,b}
ハルビン	正常	114	153±26 ^b	76±29	52±9 ^b	85±22
	CETP欠損	7	134±18 ^{a,b}	113±35	49±9 ^b	63±19 ^{a,b}
成都	正常	133	158±33 ^b	99±41	54±9 ^b	84±20
	CETP欠損	3	148±22 ^b	123±31	54±8 ^b	70±28

^aP<0.05 vs. normal and ^bP<0.05 vs. Sapporo (Mann-Whitney U test).

表3. D442G変異者の血漿アポ蛋白レベル

		apoA-I	apoB	apoE
	n	mg/dl	mg/dl	mg/dl
札幌	11	172±35	74±15	4.6±1.2
中国	26	121±19 ^a	66±13 ^a	4.4±1.3

^aP<0.05 vs. Sapporo.

表4. 高齢者におけるD442G変異の頻度

	n	年齢	D442G
札幌	82	75±4.3	3.60%
北京	39	73±6.9	7.90%

表5. 正常者とD442G変異者のCETP活性の比較

		n	CETP活性
札幌	正常	10	13.8±1.9
	D442G	10	8.4±1.8 ^a
北京	正常	20	9.5±2.3 ^b
	D442G	15	3.5±2.5 ^{a,b}

^aP<0.05 vs. normal and ^bP<0.05 vs. Sapporo.


日本財団補助金による

1997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-

1998年3月12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 竹内 康浩 
所属機関名 名古屋大学医学部
職 名 教授 年齢 60 才
所 在 地 〒466-8550 名古屋市昭和区鶴舞町65
電話 052-744-2124 内線 _____

1. 研究課題

中国労働者における2-プロモプロパン曝露と生殖、骨髄機能障害
に関する研究

2. 研究期間 自 1997 年 4 月 1 日 ~ 至 1998 年 3 月 15 日

3. 研究組織

日本側研究者氏名 市原 学 (36才)
所属機関 名古屋大学医学部 職名 助手

中国側研究者氏名 丁 訓誠 (57才)
所属機関 National Evaluation Center for the 職名 教授
Toxicology of Fertility regulation drugs

研究目的

クロロフルオロカーボンの生産は、先進国では 1996 年より国際条約に基づいて禁止された。これに伴い、多くの種類のクロロフルオロカーボンの代替物質が労働現場に導入されつつある。1995 年 7 月、韓国の電子部品製造工場において無月経、精子数減少、貧血が 2-プロモプロパンに曝露された労働者に発見された。2-プロモプロパンは、揮発性が高く、不燃性であり、オゾン層を破壊しにくい、という理由でクロロフルオロカーボン代替物質として用いられるようになった。2-プロモプロパンの生殖、骨髄毒性はそれまで知られていなかった。というのは、この物質が主に、他の化学物質合成における中間原料として、閉鎖系で用いられ、労働者は、高濃度の 2-プロモプロパンに曝露される機会がなかったためである。最近の動物実験によって 2-プロモプロパンの特異的な精巣、卵巣、骨髄毒性が明らかとなった。この物質は精巣においては精祖細胞を標的とし、卵巣においては卵子を減少させ、骨髄においては汎血球減少症を引き起こす。この 2-プロモプロパンの明らかな毒性にも関わらず、その許容濃度は未だ提案されていない。2-プロモプロパンが、クロロフルオロカーボン代替物質として大量に使用され始めていることから、この物質の量反応関係を明らかにすることは、緊急の課題である。しかしながら、韓国の研究では工場の設備が改善された後に曝露濃度が測定されたために、労働者の実際の被曝露量は明らかでなかった。本研究の目的は、2-プロモプロパンのリスク評価のために量反応関係を明らかにすることである。我々は、2-プロモプロパン製造工場で働く労働者の個人曝露量を測定し、面接、健康診断を行い、曝露量と生殖毒性指標、血液指標との関係を明らかにした。

方法

中国江蘇省宣興における 2-プロモプロパン製造工場の調査を行った。この工場は 1991 年以来、毎年 5 トンの 2-プロモプロパンを生産していた。生産物は揮発性が高く、暑い季節には生産効率が落ちるため、8 月は操業を停止していた。調査時点で 25 人の労働者（男性 11 人、女性 14 人）が働いていた。2-プロモプロパンは、硫酸存在下で 2-プロパノールと臭化水素を加熱、反応させることによって作られた。生成した 2-プロモプロパンは蒸留後、陶器のコンテナに貯蔵された。蒸留された溶液は 20 リットルのプラスチック製容器に移され、炭酸水素ナトリウムにて脱水された。精製した 2-プロモプロパンは、1000 リットルのドラム缶に貯えられた。作業工程は、次の部分に分かれる。(1) 反応鍋に原料を投入する。(2) 反応鍋中の温度を測定、記録する。(3) 蒸留した 2-プロモプロパンをプラスチック容器に移す。(4) 炭酸水素ナトリウムを投入し、棒で攪拌する。(5) 精製した 2-プロモプロパンをドラム缶に移す。9 人の女性労働者は、作業工程 (1)、(2)、(3) に従事していた（操作係）。一人の男性と一人の女性が工程 (4)、(5) に従事していた

(攪拌係)。操作係と攪拌係は、常時工場内で働いており、2-プロモプロパンに頻回に曝露する機会があった。一人の男性は、1991年に技術者として工場内2-プロモプロパン製造設備のセットアップを行った。二人の男性は工場設備の修理と維持をする役割であった(修理係)。一人の女性は、ガスクロマトグラフによって、最終生産物の純度を測定する仕事に従事していた。技術者、修理係、攪拌係は、ときどき曝露する機会があったと考えられる。これに加えて、四人の男性ボイラー操作係、二人の男性販売係、一人の男性副工場長、三人の女性会計係が働いていた。ボイラー操作係は、工場の外で、反応鍋を加熱するためのボイラーを操作していた。販売係は、販売に出かけている時以外は、事務所にいた。副工場長と会計係はいつも事務所内にいた。これらの労働者は工場にめったに入らず、曝露される機会はほとんどなかったと考えられる。環境中2-プロモプロパン濃度を、工程(2)から(5)に従事する労働者の口元で北川式検知管にて数回測定した。さらに2-プロモプロパンおよび原料である2-プロパノールの各労働者の個人曝露量をパッシブサンプラーにて測定した。パッシブサンプラーチューブ(柴田科学)を各労働者につけた。8時間の労働の後、パッシブサンプラーチューブを直ちに回収し、シールされた袋の中に入れて4℃にて保存した。吸収された溶剤を調査より2週間後に分析した。分析にあたっては活性炭をサンプラーより取り出し、スクリーキャップ付き試験管に入れた2mLの二硫化炭素中に浸し、5分間振とうした。2時間以上経過後、上清を電子イオン化検出器付ガスクロマトグラフ GCD システム GC1800A(ヒューレットパッカード社製)に注入した。2-プロモプロパンおよび2-プロパノールの検出限界はそれぞれ、8時間の時間加重平均値として、0.2、1.0ppmであった。それぞれの溶剤の時間加重平均は、次式によって求めた。

$$TWA = \text{吸収溶剂量} (\mu\text{g}) / [\text{サンプリング率} (\mu\text{g} / \text{ppm} \cdot \text{min}) \times \text{サンプリング時間} (\text{min})]$$

工場における生産物は、電子イオン化検出器付ガスクロマトグラフ GCD システム GC1800A(ヒューレットパッカード社製)にて行った。ヘルシンキ宣言に基づいてインフォームドコンセントをとり、労働者の面接、健康診断を行った。労働者は、中国人の産業医学専門医師の間診をうけた。主訴、現症、既往歴、職業歴、結婚歴、子どもの有無を男性、女性労働者に質問した。月経の状態を女性労働者から聴取した。赤血球、ヘモグロビン、ヘマトクリット、白血球を測定した。血液生化学試験(血清鉄、葉酸、ビタミン B12、フェリチン、黄体化ホルモン、卵胞刺激ホルモン、性ステロイドホルモン)が測定された。射精精液の分析を男性労働者に対して行った。射精された精液をプラスチック容器に採取し、37℃で液化が完全になるまでインキュベーションした。精子濃度、運動精子率、形態正常精子率を WHO の基準に基づいて測定した。精子指標、血球指標、ホルモン指標の2-プロモプロパン曝露濃度(時間加重平均値)および2-プロモプロパン濃度と従事年数との積(時間加重平均値×従事年数)に対する回帰分析を行った。年齢、従事年数、2-プロモプロパン濃度、赤血球、ヘモグロビン、ヘマトクリット、白血球を職業と月経周期を基にした女性グループの間で分散分析の後、Tukey-Kramer の多重比較法によって比較した。

成果と考察

環境中の2-ブロモプロパン濃度は反応鍋を観察している場所では2.6-16.5 (median 2.6 ppm) ppm、陶器のコンテナからプラスチックボトルに移す時8.2-90.9 (median 27.6) ppm、脱水作業時17.6-57.6 (median 38.8) ppm、最終的にドラム缶に移す時19.8-110.8 (median 88.6) ppmであった。工場内の気温は10.5℃であった。生産された2-ブロモプロパンの分析によると、純度は98.08%であった。不純物は2-プロパノール(1.76%)、ジブロモプロパン(0.085%)、ベンゼン(0.055%)、トリクロロエチレン(0.010%)であった。4人の男性労働者が検出可能な2-ブロモプロパンに曝露されていた。検出可能な2-プロパノールに曝露されている労働者はいなかった。男性技術者は、精子濃度、運動精子率が低かった。彼は、製造工場をセットアップした際に高濃度の2-ブロモプロパンに曝露された可能性がある。その他4人の男性労働者については運動精子率がWHO基準に比して低かった。形態的に正常な精子の率はすべてWHOの基準である30%を超えていた。男性攪拌係と一人の修理係は基準値より低い赤血球、ヘモグロビン、ヘマトクリット値を示した。ボイラー操作係の一人は基準値より低いヘマトクリット値を示した。白血球、黄体化ホルモン、卵胞刺激ホルモンの異常値を示した男性労働者はいなかった。男性労働者では、精子指標、血球指標と2-ブロモプロパン時間荷重平均値、2-ブロモプロパン時間荷重平均値×従事年数との間に直線的な関係は見られなかった。女性労働者のうち、三人の労働者には無月経、二人の女性には頻月経がみられた。無月経の3人の女性労働者は、比較的高い黄体化ホルモン、卵胞刺激ホルモンを示した。頻月経の2人の女性労働者は、若干高い黄体化ホルモンとエストラジオール値を示していた。9人のうち5人の女性労働者は基準値より低いヘモグロビン、ヘマトクリット、赤血球値を示していた。2-ブロモプロパンの時間加重平均値、2-ブロモプロパン時間荷重平均値×従事年数とホルモンとの直線関係はなかった。年齢、従事年数、血球指標の、職種と月経状態に基づいて分類した女性労働者のグループ間の比較において、無月経、頻月経を示す女性労働者は、正常月経を示す女性労働者より有意に年齢が高かった。仕事の内容から推測されるように、女性操作系の曝露濃度は、会計係より有意に高かった。年齢や従事年数に有意な差がないにも関わらず、正常月経の操作係は正常月経の会計係より有意にヘモグロビン、ヘマトクリットが低かった。他方、無月経や頻月経を示す女性操作系の赤血球、ヘモグロビン、ヘマトクリットは、月経が正常な女性操作係よりも高く、会計係と同程度であった。月経の有無は女性の血液学的指標に大きな影響を及ぼすため、赤血球、ヘモグロビン、ヘマトクリット、白血球の2-ブロモプロパン曝露時間加重平均値に対する回帰分析を正常月経を示す女性労働者のみを対象にしておこなった。その結果、曝露濃度の赤血球、ヘモグロビン、ヘマトクリットに対する効果は有意であり、白血球に対する効果は有意でなかった。同様の回帰分析を時間加重平均値と従事年数との積に対して行った結果、直線性はよくなかったが、

有意な関係があることが明らかとなった。

男性労働者における生殖毒性の有無は、検出可能な2-ブロモプロパンに曝露された労働者が少なすぎたため、明らかでなかった。ただし、一人の男性技術者の精子数、運動精子率減少は過去の曝露の影響による可能性がある。本研究では、月経周期に異常のある女性労働者が見られたが、比較的高齢であるために曝露による影響を裏付ける明らかな根拠は得られなかった。しかしながら、10 ppm以下の2-ブロモプロパン曝露が、血液学的所見に影響をおよぼす可能性が、正常月経を示す女性労働者の中での仕事間の比較および回帰分析によって示唆された。

結論

2-ブロモプロパン 10ppm（時間荷重平均）以下の曝露では生殖毒性は明らかでなかったが、造血作用に影響がある可能性がある。

上記研究成果は *American Journal of Industrial Medicine* に現在投稿中である。

日中医学助成金による研究成果発表(学会発表)

*SIXTH INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON
NEUROBEHAVIORAL METHODS AND
EFFECTS IN OCCUPATIONAL AND
ENVIRONMENTAL HEALTH.*

15 - 18 October 1997, Shanghai, China



Keynote Articles/Abstracts
and
Scientific Program

ORGANIZING COMMITTEES

President

Huiqing Jin, MD Anhui Sanlian Accident Prevention Institute, China

Co-presidents

Youxin Liang, MD Shanghai Medical University, China

Shunichi Araki, MD University of Tokyo, Japan

International Organizing Committee

Mahmoud M. Amr, MD	Cairo University, Egypt
Shunichi Araki, MD	University of Tokyo, Japan
Renato Gilioli, MD	University of Milan, Italy
Philippe Grandjean, MD	Odense University, Denmark
Anders Iregren, PhD	National Institute for Working Life
Barry L. Johnson, PhD	ATSDR, USA (Honorary Member)
Philip J. Landrigan, MD	Mt. Sinai School of Medicine, USA

National Advisory Committee

Prof. Fengsheng He	Chinese Academy of Preventive Medicine, CAPM
Dr. Xinhua Qin	Ministry of Health
Prof. Xueqi Gu	Shanghai Medical University
Prof. Changqi Zou	Institute of Occupational Medicine, CAPM
Prof. Daoyu Tong	National Natural Sciences Foundation of China
Prof. Yongchang Huang	China Association of Preventive Medicine
Dr. Fushan Wang	People's Insurance Company of China
Prof. Daomin Wang	Shanghai Association of Preventive Medicine
Prof. Huizhang Yuan	Shanghai Association of Preventive Medicine

ORGANIZING COMMITTEES

Scientific Program Committee

Chairs:

Prof. Fengsheng He	Chinese Academy of Preventive Medicine, CAPM, China
Prof. Youxin Liang	Shanghai Medical University, China
Dr. Anders Iregren	National Institute for Working Life, Sweden

Members:

Prof. Jiongliang Zhou	Guangzhou Zhongshan Medical University, China
Prof. Xiaorong Zhou	Institute of Occupational Medicine, CAPM, China
Dr. Kent Anger	Oregon Health Sciences University, USA
Prof. Xuezhi Jiang	Shanghai Medical University, China
Prof. Zhiliang Yang	East China Normal University, China
Dr. Kazuhito Yokoyama	University of Tokyo, Japan
Prof. Fangzhen Zhang	Anhui Medical University, China
Dr. Ziqiang Chen	Shanghai Medical University, China
Dr. Bingshuang Hu	Shanghai Medical University, China
Dr. Rong Chen	Anhui Sanlian Accident Prevention Institute, China
Ms. Xiuli Jiang	Anhui Sanlian Accident Prevention Institute, China
Ms. Hongwang	Anhui Sanlian Accident Prevention Institute, China

Local Organizing Committee

Prof. Huiqing Jin (Chair)	Anhui Sanlian Accident Prevention Institute
Prof. Youxin Liang (Co-chair)	Shanghai Medical University
Dr. Miaolian Jin (Co-chair)	Anhui Sanlian Accident Prevention Institute
Dr. Bingshuang Hu	Shanghai Medical University
Dr. Rong Chen	Anhui Sanlian Accident Prevention Institute
Mr. Hongguang Yang	Shanghai Medical University
Ms. Hong Wang	Anhui Sanlian Accident Prevention Institute
Ms. Xiuli Jiang	Anhui Sanlian Accident Prevention Institute
Ms. Qianyan Hu	Anhui Sanlian Accident Prevention Institute
Mr. Zhixin Yang	Anhui Sanlian Accident Prevention Institute
Mr. Ping Dai	Anhui Sanlian Accident Prevention Institute

ORGANIZERS AND SPONSORS

Organized by

Organizing Committee of the Sixth International
Symposium on Neurobehavioral Methods and Effects
in Occupational and Environmental Health

Anhui Sanlian Accident Prevention Institute, China

WHO Collaborating Center for Occupational
Health, Shanghai Medical University, China

With the Cooperation of

Scientific Committee on Neurotoxicology and Psychophysiology of the
International Commission on Occupational Health (ICOH)

Under the Auspices of

The World Health Organization (WHO)

The International Commission on Occupational Health (ICOH)

Supported by

China Association of Preventive Medicine

Chinese Academy of Preventive Medicine

National Natural Sciences Foundation of China

Vehicle Insurance Department, People's Insurance Company of China

China International Center for Economic Technical Exchanges (CICETE)

PROGRAM SCHEDULE

Tuesday, 14 October

Registration (Shanghai Worldfield Convention Hotel)

Wednesday, 15 October

- 08:30 Opening Ceremony
- 09:00 Hanninen's Lecture (K-1)
- 09:30 Keynote Lecture 1 (K-2)
- 10:30 Group-photo
- 10:50 Keynote Lecture 2 (K-3)
- 12:00 Poster (P-1 -- P-17)
- 14:30 Keynote Lecture 3 (K-4)
- 15:30 Keynote Lecture 4 (K-5)
- 16:45 Keynote Lecture 5 (K-6)
- 17:45 Meeting of the International Organizing Committee of the 6th Symposium
- 20:00 Welcome Reception

Thursday, 16 October

- 08:30 Oral Sessions 1 (1a-1--1a-9, 1b-1--1b-9, 1c-1--1c-8)
- 10:45 Oral Sessions 2 (2a-1--2a-5, 2b-1--2b-6, 2c1--2c-6)
- 13:30 Oral Sessions 3 (3a-1--3a-9, 3b-1--3b-9, 3c-1--3c-8)
- 16:00 Oral Sessions 4 (4a-1--4a-9, 4b-1--4b-9, 4c-1--4c-8)
- 19:30 Special Evening Event

Friday, 17 October

- 09:30 Oral Sessions 5 (5c-1--5c-9)
Special Training Course (1, 2)
- 14:00 Special Training Course (3, 4, 5)
- 17:30 Meeting of the Scientific Committee on Neurotoxicology and
Psychophysiology, ICOH
- 20:00 Banquet

Saturday, 18 October

- 09:00 Keynote Lecture 6 (K-7)
- 10:00 Keynote Lecture 7 (K-8)
- 13:00 Panel Discussion
- 14:00 Synthesis Remark
- 14:30 Closing Remark

GENERAL INFORMATION

Meeting Venue

The 6th Symposium will be held at Shanghai Worldfield Convention Hotel ****, located within the Hongqiao commercial area with the most modern conference facilities.

Address: 2106 Hongqiao Road, Shanghai 200335, China

Phone: (86-21) 62703388

Fax: (86-21) 62704554

Language

The official language of the Symposium is English.

Registration

The Symposium Secretariat is in charge of registration, hotel deposit and social activities. The **Registration Desk** will be open at Shanghai Worldfield Conference hotel throughout the Symposium period (8:00am to 6:00pm) from 15-18 October.

Registration fee for participants include:

participation in the scientific programs, conference documents, certificate of attendance, invitation to the Welcome Reception on October 15, Special Evening Event on October 16, lunches during the Symposium, shuttle bus between the airport and the Worldfield Convention Hotel, and shuttle bus between meeting venue and hotels.

Registration fee for accompanying persons include:

invitation to the Welcome Reception on October 15, Special Evening Event on October 16, lunches during the Symposium, and shuttle bus between the airport and the Worldfield Convention Hotel.

All participants and accompanying persons are requested to wear their badges (participants: yellow, accompanying persons: blue, staff: white) at all scientific and social events.

Thursday, 16 October

Afternoon

- 3b-6 *Neurobehavioural Effects Due to Exposure to Physical Agents in Different Industries with Special Concern to Aluminium Industry*
M.M. Amr, Cairo University, Egypt
- 3b-7 *Neurobehavioral Function & Monoamine Metabolism of Aluminium Exposure*
Hongguang Yang, Shanghai Medical University, China
- 3b-8 *Neurobehavioral Development and Blood Lead in Children Living in Rural Areas of Slovakia*
Tomas Trnovec, Institute of Preventive and Clinical Medicine, Slovak Republic
- 3b-9 *The Effects of Lead on $[Ca^{2+}]_i$ and the PKC activity in LTP at Hippocampal Zones of Rats*
Liguang Sun, China Medical University, China

3c. Neurobehavioral Mechanism (3c-1-3c-9, Beijing Room 5)

Chairs: Michael Dietz, Germany; Xiuqin Li, China

- 3c-1 *Peripheral Neuropathy among Community Residents Exposed to Arsenic*
Fredric Gerr, Rollins School of Public Health, Emory University, USA
- 3c-2 *The Effects of Low Level Lanthanum on Neurobehavior in Mice*
Xiuqin Li, Beijing Medical University, China
- 3c-3 *Reversal of Al-Induced Neurobehavioral Deficits by L-DOPA or Eserine in Rats*
Yuxin Zheng, Shanghai Medical University, China
- 3c-4 *Effects of Prenatal Styrene Exposure on Postnatal Development and Brain Serotonin and Catecholamine Levels in Rats*
Yoko Katakura, Sapporo Medical University, Japan
- 3c-5 *Neuropathological Changes in Mouse Brain Following a Single Administration of Allylnitrile: Relationship to Behavioral Abnormalities*
Zhang X-P, Kanazawa University School of Medicine, Japan
- 3c-6 *Results of Magnetic Resonance Imaging(MRI) in Long Term Manganese Dioxide Exposed Workers*
Michael Dietz, University of Heidelberg, Germany

Thursday, 16 October
Afternoon

- 3c-7 *Effects of 50-HZ Electric Fields on Monoamine Neurochemistry and Learning Behavior in Rats*
Gengdong Yao, School of Public Health, Zhejiang Medical Univ., China
- 3c-8 *Behavioral Analysis of Fish Activity by an Image Processing System*
Masato Ohkawa, University of Kanazawa School of Medicine, Japan
- 3c-9 *Neurotoxicity of 1-Bromopropane and 2-Bromopropane in Rats*
Xiaozhong Yu, Nagoya University School of Medicine, Japan

15:30 General Discussion

15:45 Break

16:00 Oral Session 4

- 16:00-18:00 4a. Neurobehavioral Methods (4a-1-4a-9, Beijing Room 3)
4b. Neurobehavioral Effects (4b-1-4b-9, Beijing Room 4)
4c. Neurobehavioral Mechanism (4c-1-4c-8, Beijing Room 5)

4a. Neurobehavioral Methods (4a-1-4a-9, Beijing Room 3)

Chairs: Richard Stephen USA; Liming Xu, China

- 4a-1 *Who is the User: Building or Selecting a Computerized Test System for Neurobehavioral Research*
Diane Rohlman, CROET, Oregon Health Sciences University, USA
- 4a-2 *Development of Multi-media Neurobehavioral Evaluation System--- Third Chinese Version (NES-C3)*
Liming Xu, Shanghai Pudong Anti-Epidemic & Health Station, China
- 4a-3 *Social Competence Training Program for Hospitalized Psychiatric Patients*
Zeinab Loutfi, Ain- Shams University, Egypt
- 4a-4 *Methodology and Direct Quantitative Methods of the Evaluation of Health, and also its Changes Under the Environ. Influences*
Bulich Ella, Simferopol State University, Ukraine
- 4a-5 *Making a Scale of Safety Attitude for Crane Workers*
Rongchen, Anhui Sanlian Accident Prevention Institute, China
- 4a-6 *Feasibility of the Use of Eye Movement Data in the Analysis of Neuro-behavioral Test Performance*
Richard Stephen, Health and Safety Laboratory, Ergonomics and Work Psychology Section, U. K.

NEUROTOXICITY OF 1-BROMOPROPANE AND 2-BROMOPROPANE IN RATS

XIAOZHONG YU¹, GAKU ICHIHARA¹, ZHENLIN XIE¹, MICHIIRO KAMIJIMA¹, NOBUYUKI
ASAEDA², JUNZOH KITO³, YASUHIRO TAKEUCHI¹

¹Department of Hygiene, Nagoya University School of medicine, Japan ² Safety Assessment Laboratory, Sanwa Kagaku Kenkyusho Co., Ltd., Japan ³ Institute for Laboratory Animal Experiment, Nagoya University School of Medicine, Japan

Aim. With the decreasing use of chlorofluorocarbons (CFCs) due to the destroying effects on ozone layer, a number of alternatives were introduced into workplace. In 1995, patients with amenorrhea, oligospermia and anemia were found among workers in electronic factory in Korea. The epidemiological study suggested that 2-bromopropane might be the causative agent. In our previous experimental study, we demonstrated that 2-bromopropane impaired spermatogenesis and hematopoiesis at 300 ppm or above in male rats, and disrupted ovarian cyclicity and decreased the number of antral and growing follicles in 300 and 1000 ppm groups in non-pregnant female rats. These results clearly demonstrate the genital and hematopoietic toxicity of 2-bromopropane. In addition, some patients in Korea also complained of polyneuropathy. In this study we tried to clarify the neurotoxicity of 2-bromopropane in comparison with 1-bromopropane, which began to be used as cleaner in large amount.

Materials and methods. Thirty six Wistar strain male rats of 8 weeks old were housed in stainless steel cages with conditions of 22-25 °C and 57-60% relative humidity for 2 weeks. Then, the rats were divided into four groups of nine. The separate groups were exposed to 1000 ppm 1-bromopropane, 100 ppm 2-bromopropane, 1000 ppm 2-bromopropane or fresh air in an exposure chamber for 8 hrs a day. The vapor concentration in the chamber were measured by gas chromatograph and controlled within $\pm 5\%$ of target concentration by means of personal computer. After four weeks, rats in the group of 1000 ppm 1-bromopropane showed paralysis of hindlimb, and became weak. Then 4 rats were sacrificed for electronic microscope study. The remained 5 rats were exposed until the end of 7 weeks. The body weights were measured every two weeks and peripheral nerve conduction velocity was measured in the nerve of the rat's tail before exposure, once every month.

Results Body weight gain in 1000 ppm 1-bromopropane and 1000 ppm 2-bromopropane were significantly suppressed compared to the control group after 2 weeks' exposure. The body weight gain in 1000 ppm 1-bromopropane group was significantly lower than that in 1000 ppm 2-bromopropane group at the end of four weeks' exposure. The motor nerve conduction velocity (MCV) of the 1-bromopropane group was considerably lower than that of the control. The MCV of 100 ppm 2-bromopropane group became slightly high after one month's exposure. The distal latency (DL) of the 1-bromopropane group was significantly greater than that of control after four weeks' exposure. In the 1000 ppm 2-bromopropane, there was marginal increase of DL after four weeks' exposure. Rats in 1000 ppm 1-bromopropane group showed noticeable hindlimb paralysis at the end of the fifth week exposure. There was no significant changes in hematological indices. The absolute weight of liver, spleen, epididymides, prostate, seminal vesicles, brain was decreased in comparison with the control.

Conclusion. In this study we found that 1-bromopropane has a stronger neurotoxicity than 2-bromopropane while the genital and hematopoietic toxicity were not so significant as those of 2-bromopropane.

WHO IS THE USER: BUILDING OR SELECTING A COMPUTERIZED TEST SYSTEM FOR NEUROBEHAVIORAL RESEARCH

Rohlman, Diane S (1), Sizemore, OJ (1), Anger, WK (1), Reed, RR (2)
(1) Center for Research on Occupational and Environmental Toxicology, Oregon Health Sciences University, Portland, USA. (2) Ronald R. Reed Consultants, Inc., Tigard, USA

In the past 25 years the selection of computerized tests and tests systems has increased dramatically making the selection of a test increasingly difficult. Guidelines for selecting or building a computerized test system based on the needs of the people using the system is offered from The perspectives of four different users: the Program Developer, the Principal Investigator, the Examiner, and the Participant taking the tests. The Program Developer is concerned with elements such as controlling the visual display and audio components of a test, timing accuracy, and response definition. The Principal Investigator is concerned with test and parameter selection, choosing instruction formats and linking tests together. The Examiner is concerned with administering the test battery, and saving data. The Participant should be able to sit down and easily understand the instructions to complete the tests.

日本財団補助金による

1997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—

1998年3月10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 佐藤 栄一
所属機関名 鹿児島大学医学部病理学第2
職 名 教授 年齢 64 才
所 在 地 〒890-8520 鹿児島市科野5丁目 35-1
電話 099-275-5267 内線 _____

1. 研究課題

日本と中国に於けるウイルス関連悪性腫瘍の病理疫学的比較研究

日本と中国の胃のB細胞性悪性リンパ腫の腫瘍細胞の免疫グロブリン重鎖遺伝子 (IgH) について polymerase chain reaction (PCR) による分子病理学的検索を行った。材料は、中国の9例の胃B細胞性悪性リンパ腫と日本の6例の胃のリンパ腫と2例の節外性リンパ腫のホルマリン固定パラフィン包埋切片である。DNA抽出には、脱バラ後に核染し実体顕微鏡下で少数個の細胞を採取するかその組織から目的の細胞を剃刀で削ぎ取り、proteinase Kで消化しDNAを抽出する方法、TAKARA DEXPAT™で直接DNAを抽出する方法の何れが適当な長さのDNAが得るのに適法であるかを検討した。IgHのPCRは、Fr2AとLJH、Fr3AとLJHのprimersを用いて、2 times PCR法で行った。中国の胃リンパ腫と日本の胃と節外性リンパ腫から抽出したDNAには、Fr2A-LJHのPCRで検出出来るだけの長さのDNAが遺残していないことが明らかになった。Fr3A-LJHのPCRで、中国の胃リンパ腫では1例で、日本の胃と節外性リンパ腫では4例で特異なDNA増幅が見られた。日本のリンパ腫で特異な長さのDNA増幅が見られなかった例のMALT型2例では幅広いDNA増幅を、MALT型1例と節外性1例(多発性骨髄腫)では全くDNA増幅が見られなかった。従って、中国の胃B細胞リンパ腫には、免疫グロブリン軽鎖遺伝子の異常がある可能性が示唆された。増幅されたDNAの核酸塩基配列の検索をdye-terminator法で行い、日本の胃のリンパ腫の2例で、通常は抗体産生のない物質とのDNAレベルで高いホモロジーが認められ、胃のB細胞性リンパ腫の細胞起源として免疫監視機序より逃れた異常クローンが想定された。

2. 研究期間 自 _____年____月____日 ~ 至 1998年3月15日

3. 研究組織

日本側研究者氏名 蓮井 和久 (43才)
所属機関 鹿児島大学医学部病理学第2 職名 講師
中国側研究者氏名 賈 巴 蓉 (54才)
所属機関 中国医科大学病理学教室
分子病理研究室 職名 教授

1997年度日中医学協力事業助成（調査並びに研究に対する助成） 報告書

研究代表者 佐藤栄一 (鹿児島大学医学部病理学第2講座・教授)
 日本側共同研究者 蓮井和久 (鹿児島大学医学部病理学第2講座・講師)
 中国側共同研究者 賈心善 (中国医科大学病理学教室分子病理研究室・教授)

研究課題 日本と中国に於けるウイルス関連悪性腫瘍の病理疫学的比較研究

研究報告

この研究では、日本と中国に於けるウイルス関連悪性腫瘍の分子病理学的特徴の比較研究を実施に
 に必要な技術習得とその技術の応用の可能性を模索する為に、胃の悪性リンパ腫を用いて、リンパ腫細胞
 の遺伝子の解析法を検討した。この研究は、将来的には、single cell PCR (polymerase chain reaction)による
 非腫瘍性B細胞やT細胞の認識する抗原をDNAレベルで解析する研究発展するものである。

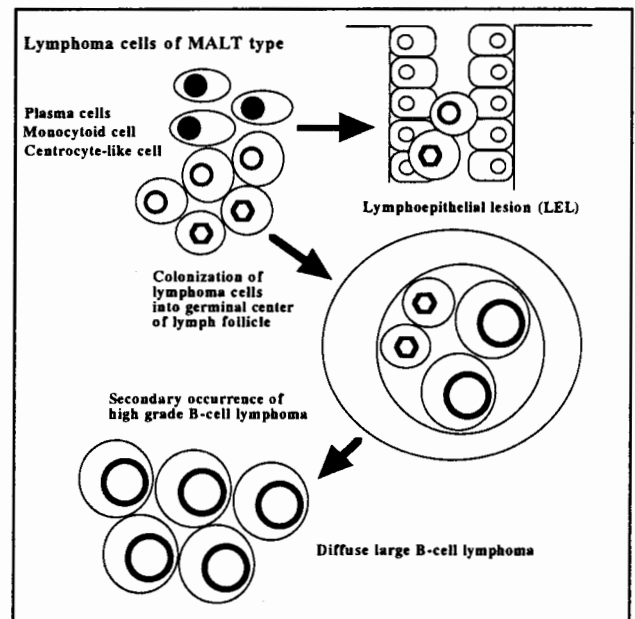
節外性B細胞性リンパ腫のリンパ腫細胞の免疫グ
 ロブリンの重鎖のCDRIII可変領域をpolymerase
 chain reaction (PCR)で増幅し、増幅DNAのシークエ
 ンスを行う方法が、既に、紹介されている(湯本典
 夫他、病理と臨床 vol. 14 臨時増刊号, 1996)。

胃悪性リンパ腫の組織像は、右図に示す様に、リン
 パ腫細胞がmonocytoid cells, centrocyte-like cellsと
 plasma cellsから成り、部位によりリンパ腫細胞の構
 成が異なる特徴がある。リンパ腫細胞は腺管へ浸潤
 し、リンパ上皮性病変 (lymphoepithelial lesion: LEL)
 を形成する。この組織像を呈する胃リンパ腫はlow-
 grade mucosa-associated lymphatic tissue (MALT)型と
 呼ばれる。更に、centrocyte-like cellsは反応性リンパ
 装置の濾胞胚中心に侵入(colonization)し大型化す
 る、そして、high-grade MALT型リンパ腫への形態
 転換が起こる。一方、ヘリコバクター・ピロリー菌
 (HP) の感染による胃粘膜免疫の賦活が、
 胃のlow-grade MALT型リンパ腫の発生に
 強く関与し、HPへの免疫の陰で、免疫的
 な癌発生の監視機構の乱れが示唆されて
 いる。

従って、この研究は、胃リンパ腫の腫
 瘍細胞の構成が異なる部位別にDNA抽出
 する方法を試み、リンパ腫細胞の免疫学
 的特徴として、免疫グロブリン重鎖遺伝
 子の可変領域の検索(Kurosaki K et al, Labo-
 ratory Investigation 74(3):609-616;1996)を
 企図した。

材料

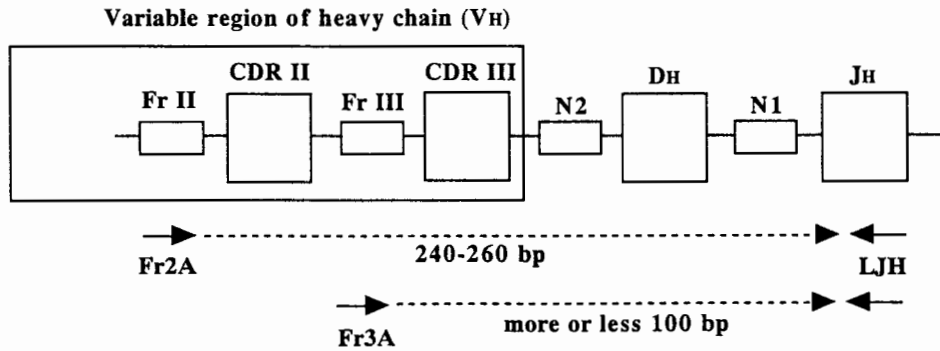
材料は、右表に示す9例の中国胃リン
 パ腫と日本の6例の胃リンパ腫と2例の



検索症例

DNA抽出	組織型	実体顕微鏡下切片採取
中国例 (胃悪性リンパ腫)		
1, No. 1 69321	Typical, low-grade MALT	1
7, No. 7 52953	Low-grade MALT	8, 9, 10
4, No. 4 104176	Immunocytoma	4
9, No.10 95470	Early phase of High grade MALT	13, 14
2, No. 2 93461 -1	Diffuse large B-cell ML (CB-like)	2
5, No. 5 108605 -1	Diffuse B-cell ML (High grade MALT)	5, 6
6, No. 6 47699-5	Diffuse large B-cell ML	7
8, No. 8 54764	Diffuse large B-cell ML	11, 12
3, No. 3 99907	Anaplastic B-cell lymphoma (HD-like)	3
日本例 (胃リンパ腫)		
4, No.5 II962778-1,-2	Quite early MALT	7, 8
2, No.2 II951468-4	MALT (intramucosal lesion)	2, 3
No.3		5
3, No.4 II896485-14	MALT	6
1, No.1 S95-1309-16	Diffuse large B-cell lymphoma	1
5, No.6 II950587-6	Diffuse large B-cell ML a)	8, 9
6, No.7 S910069-2	Diffuse large B-cell ML	10
日本例 (節外性)		
7, C-1 P85-5063	Multiple myeloma (BM)	11
8, No.8 S902376	Immunocytoma (LN)	12

Primers of PCR detecting rearranged immunoglobulin heavy chain gene



節外性リンパ腫(多発性骨髄腫を含む)である。

中国の9例の胃リンパ腫は、immunocytomaを入れて3例のlow-grade MALT型リンパ腫と6例のhigh-grade MALT型とその他のリンパ腫であった。日本の胃リンパ腫は3例のlow-grade MALT型リンパ腫と3例のhigh-grade MALT型とその他のリンパ腫であった。

免疫グロブリン重鎖遺伝子のPCR

免疫グロブリン重鎖(IgH)遺伝子の可変領域は、上図に示す様に、Fr I-CDR I-Fr II-CDR II-Fr III-CDR IIIから成る。この可変領域を含むPCRのprimersの組み合わせが公表されている(Ramasamy I et al. J Clin Pathol 1992;45:770-775)。Fr2AとLJHのprimersでは、CDR IIとIIIを含む増幅DNAは240~260bpの長さであり、非特異的な100bp前後のDNA増幅もあることが明らかにされている。このprimersの組み合わせによるPCRでは、B細胞性リンパ腫の検索において、リンパ腫細胞がリンパ濾胞胚中心細胞より未分化であるのか否かをsomatic mutationにて知ることが出来る(田丸淳一他, 日本網内系学会会誌35(3・4); 1995;181-186)。また、Fr3AとLJHの組み合わせのPCRでは、30~60bpの再構成CDR IIIの長さの検索も可能である(Kurosu K et al, Laboratory Investigation 74(3);609-616;1996)。

DNA抽出

DNAの抽出方法は、以下の3つの方法を試みた。
a) 脱バラ後、ヘマトキシリンで核染色、実体顕微鏡下で目的リンパ腫細胞を少数個(100個レベル)で、ガラスプローブ(パスツールピペットの細い部分をガスバーナーで加熱し、引き伸ばしながら細くして切断して作成)で、100 μ l用PCR用チューブの中の10 μ lの200mg/ml proteinase K TRIS緩衝液中に細胞を採取する。37 $^{\circ}$ C 3時間のincubation後に、PCR装置で、94 $^{\circ}$ C 10分間で、proteinase Kを失活させた。そ

の10 μ lを、DNA template溶液とし、PCRを行う。

b) 上記の少数の細胞を採取した残りのリンパ腫組織を剃刀でそぎ取り、100 μ lの200mg/ml proteinase K TRIS緩衝液中に採取する。37 $^{\circ}$ C overnight以上のincubation後に、100 $^{\circ}$ C 3~5分間の加熱でproteinase Kを失活させる。その上清5 μ lを、DNA template溶液とし、PCRを行う。

c) 3 μ m厚さの切片数枚を、1.5mlチューブに取り、TAKARA DEXPATTMで、PCR用DNA template溶液を採取する。その溶液の5 μ lをPCRに用いる。

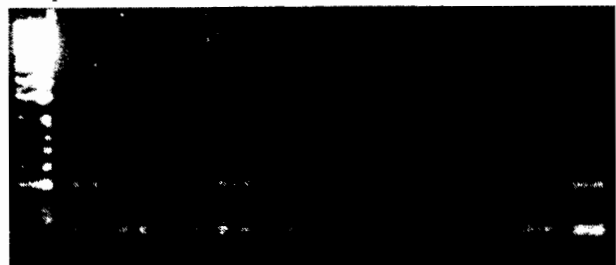
Fr2A-LJHのPCRの結果

上記のa)のDNA抽出法で、検索症例切片からDNAを採取した。そして、Fr2A-LJHのPCRを、pre-denature 94 $^{\circ}$ C 5min., 30サイクルのdenature 94 $^{\circ}$ C 30s, annealing 55 $^{\circ}$ C 30s, extension 72 $^{\circ}$ C 30sとpost-extension 72 $^{\circ}$ C 5min.の2 times PCR法で行った。2回目のPCRのDNA templateは、1回目のPCR産物の100倍

中国の胃リンパ腫のa)DNA抽出法によるFr2A-LJHの2 times PCRの産物の電気泳動、左より、Marker 9とSample 1 to 14 (検索症例表参照)



日本の胃と節外性リンパ腫のa)DNA抽出法によるFr2A-LJHの2 times PCRの産物の電気泳動、左より、Marker 9とSample 1 to 3と5 to 12 (検索症例表参照)



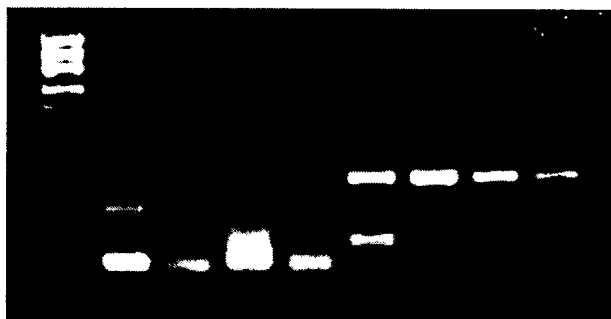
希釈溶液である。中国の胃リンパ腫でも日本の胃と節外性リンパ腫でも、240~260bpの特異な増幅DNAは得られなかった。

フォルマリン固定の影響と長期のブロックの保存による遺残DNAが非常に短くなっていることが示唆された。因みに、日本の胃と節外性リンパ腫の少数例では、100bp前後の非特異なDNAの増幅が確認された。

human β -globin遺伝子のPCR (切片中の遺残DNAの長さの検討)

human β -globin遺伝子のprimersの組み合わせによるPCRで、中国の胃リンパ腫のb)とc)法で抽出したDNAを用いて、切片中の遺残DNAの長さの検討を行った。その結果、中国の胃リンパ腫の切片には、少なくとも110bp前後の長さのDNAしか残っていないことが明らかになった(日本例でも同様)。

中国の胃リンパ腫症例6と8のb)とc)法による抽出DNAのhuman β -globin遺伝子のGH20-21 (増幅DNAは408bpと204bp)とPC03-04 (増幅DNAは110bp)のPCRによる抽出DNAの長さの検討



左より、Marker 9、GH20-21のPCR (左より、症例6のb)法とc)法、症例8のb)法とc)法)とPC03-34のPCR (左より、症例6のb)法とc)法、症例8のb)法とc)法)

Fr3A-LJHのIgHのPCR

中国の胃リンパ腫切片からc)法で抽出したDNAと日本の胃と節外性リンパ腫のa)法で抽出したDNAで、Fr3A-LJHのIgHのPCRを行った。

中国例では、1例(症例5)で100bp前後の増幅DNAを認めた。症例5は、びまん性大細胞性B細胞性リンパ腫であるが、粘膜にLELを示す小型リンパ

中国の胃リンパ腫のc)DNA抽出法によるFr3A-LJHの2 times PCRの産物の電気泳動、左より、Marker 9とcase 1 to 10 (検索症例表参照、case 10は胃癌)



腫細胞を認め、high-grade MALT型リンパ腫とされるものであった。Fr3A-LJHのPCRで特異な長さのDNA増幅が認められることは、monoclonalな増殖を示す。

IgH遺伝子のFr3A-LJHのPCRで特異な長さのDNA増幅が認められないB細胞性リンパ腫が多い中国の胃悪性リンパ腫には、狭義のlight chain diseaseと他の癌遺伝子とight chain 遺伝子の再構成による遺伝子異常が存在する可能性が示唆される。

日本の胃と節外性リンパ腫では、sample 3、5、8、9、10、12で、100bp前後で増幅DNAを認めた。

sample 7は、monocytoid cellsがリンパ濾胞周辺部に出現し早期のMALT型リンパ腫とされた部位から抽出されたDNAであり、明らかなDNA増幅が認められなかった。リンパ濾胞周辺部に出現するmonocytoid cellsは、未だIgH遺伝子の再構成が起こっていない前リンパ腫細胞ないし反応性細胞である可能性が示唆された。

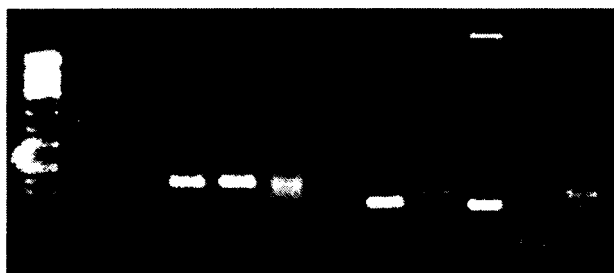
sample 2, 3, 5 は、症例2の粘膜病変の異なる部位から抽出されたDNAである。sample 3と5で100bp前後の同長のDNA増幅が認められたが、sample 2ではより短い幅広いDNA増幅が見られた。MALT型リンパ腫のリンパ腫細胞にはclonalな成分とpolyclonalな成分から成る粘膜病変があることが示唆された。

sample 8は、症例5の胃壁内のびまん性大細胞性B細胞性リンパ腫組織から抽出されたDNAである。sample 9はこのリンパ腫の所属リンパ節転移部位からのDNAである。sample 8は60bp前後の明瞭なDNA増幅を、sample 9は60bp前後のDNA増幅を示し、優勢な壁内リンパ腫細胞と異なるクローンが所属リンパ節に転移増殖していることを示唆した。

sample 11はmultiple myelomaの骨髄からのDNAであるが、特異なDNA増幅は認められず、light chain diseaseが示唆された。

sample 12は節外性のimmunocytomaの抽出DNAであるが、80bp前後と60bp前後のDNA増幅が見られ、ologoclonalなリンパ腫細胞であることが示唆された。

日本の胃と節外性リンパ腫のa)DNA抽出法によるFr3A-LJHの2 times PCRの産物の電気泳動、左より、Marker 9とSample 1 to 3と5 to 12 (検索症例表参照)



J10 Fr3AでのDNA配列解析結果とLJHの相補的DNA配列とのMaximum matching

```

1  GNGAGANANNAGAGNGAGANNTCGTGNGTGGGCGTGGGCGCACNNGGGACN      50
-54 .....
51  CNNNGGGNACACGCGNTCTCTCTACAA.....      100
    ||  ||| ||  ||| ||  ||
-4  .....GGT-CAC-CGT-CTC-CT-CA.....      45
    
```

J10 LJHでのDNA配列解析結果とFr3Aの相補的DNA配列とのMaximum matching

```

1  TACCCAACNCTGTCGCCCTTTTATCCTCGCACAAAGTAATACACAGCCCG      50
                                ||| | ||||| ||| |
-30 .....ACA-GYAATACANNGCC-G      19
51  TGTA.....      100
    |||
20  TGT.....      69
    
```

J10のDNA配列のJ10 Fr3AとJ10 LJHの解析配列を基に決定したDNA配列とのホモロジー検索結果

DNASIS
Maximum Matching [J10 Fr3A -43(CORRECTED) VS HUMDMKIN 11300-11330]

```

File1: J10 Fr3A -43(CORRECTED)
Mode: Normal          1 -      43
File2: HUMDMKIN 11300-11330
Mode: Normal          1 -      43
    
```

Matching Percentage (Total Window: 63%, Alignment Window: 64%)

```

0  .GCGAGATAAAAGAGGGAGACATCGTGTGTGGGCGTG-G-GCGCAC....      49
    ||| | ||||| ||| | ||||| ||| | | |||
1  TTTGAGC-ACCAGAGGGA--CATAGGGTGTGTTAGTGTGTGAGCAC....      50
    
```

免疫グロブリン重鎖遺伝子の
Fe3A-LJH のPCR の
増幅DNAのシーケンス

前記のFr3A-LJHのPCRで増幅されたDNAの核酸塩基配列の解析を、direct法のdye-terminater法で検討した。direct法とは、DNA組換え過程を含むDNAクローニング法を利用しない方法で、特異なprimersが準備可能なPCRの増幅DNAの解析に利用出来る方法である。dye-terminater法は、A、T、C、Gの核酸塩基に対応し蛍光色素で標識され類似物質がDNA合成に用いられると、それ以降のDNA合成が行われないことを利用し、片側のサイクルPCRを行い、DNAの核酸塩基配列を知る方法である。

中国の症例5、日本の症例2のsample 3と5、症例5のsample 8と9、症例6のsample 10、症例8のsample 12のFr3A-LJHのPCRで増幅されたDNAの全量を4% agar-geldで電気泳動し、DNAバンドをゲルごと切り出し、TAKARA SUPREC01を用いて、

DNAを回収した。そのDNAの核酸塩基配列を検索した。

DNAの配列がある程度判明したのは、日本の症例5のsample 8と症例6のsample 10であった。

日本の症例6のsample 10のFr3AとVLJHをprimerとする両方向の解析では、上図に示した様に、Fr3AとLJHがおよそ判読されていた。その判読された2本のDNA配列よりNと表記された不明部位を修正し、DYNASISによるホモロジー検索を行った。その結果、このDNA配列は、human myotonic dystrophy kinase (DM kinase) gene (HUMDMKIN) の11300前後のDNA配列と72.7%のmatching%を示した。図に示したのは、Maximum matchingの結果である。

また、症例5のsample 8のFr3AとVLJHをprimerとする両方向の解析では、Fr3Aでの解析でしかLJHと相補的DNA配列は判読されなかったため、Nと表記された判読不明の配列が多かったが、この配列のホモロジー検索を行い、H. sapiens (D13S260) DNA

segment containing (CA) repeat (HA177XF4)の310-360の配列と50.0%の、Human ornithin decarboxylase (ODC) gene, 5' flanking reion (HUMORNDECA)の530-570の配列と51.9%のMatching%を得た。

日本の胃のリンパ腫の症例5と6のリンパ腫細胞の免疫グロブリン重鎖遺伝子の可変領域(CDR3)は本来抗体産生のない生体の成分とDNAレベルで近似した配列を示し、胃のB細胞性悪性リンパ腫の細胞起源として、免疫監視機序より逃れた異常クローンが想定された。

核酸塩基配列の解析が出来なかったsampleは、ホルマリン固定パラフィン包埋と長期の保存によるDNAへの影響が考えられると共に、胃や節外性リンパ腫がクローン内でも遺伝子の再構築がon-goingの状態にある可能性も示唆した。

考察

この研究の過程で、以下の点が明らかになった。

1) フォルマリン固定パラフィン包埋切片からDNAを抽出して検索を行ったが、切片中の遺残DNAは予想以上に短いDNAである。可能な限り、新しい症例での検索が望まれる。また、凍結標本での検索が最も良い結果が出ると思われる。

2) DNA抽出方法として、実体顕微鏡下でガラスプローブを用いる方法は、一組のprimersのPCRでしか検索出来ないが、singel cell PCRと通常の切片単位のPCRの中間にある方法であり、病理組織所見と対応した解析が行えて、今後、頻繁に利用される技術と思われる。

3) 免疫グロブリン軽鎖遺伝子の異常や再構成を検索する方法の開発が必要である。

4) PCRで増幅されたDNAの核酸塩基配列の解析の利用範囲が、single cell PCRの技術の確立により、非腫瘍性B細胞が検索対象となり、種々の免疫機序の関与する病変の組織分子病理学的研究分野を開くものと思われる。

5) 同様の方法で、T細胞での抗原受容体の解析には、 β 鎖ではレパートリーのレベルが問題であり応用出来ないが、 γ 鎖では応用出来る可能性があることが、文献的に明らかになった。

要約

日本と中国の胃のB細胞性悪性リンパ腫の腫瘍細胞の免疫グロブリン重鎖遺伝子(IgH)のpolymerase chain reaction(PCR)による分子病理学的検索を行った。材料は、中国の9例の胃B細胞性悪性リンパ腫と日本の6例の胃のリンパ腫と2例の節外性リンパ腫のホルマリン固定パラフィン包埋切片であ

る。DNA抽出には、脱パラ後に核染し実体顕微鏡下で少数個の細胞を採取するかその組織を剃刀で削ぎ取る方法でproteinase Kで消化しDNAを抽出する方法、TAKARA DEXPATTMで直接DNAを抽出する方法を試みた。IgHのPCRは、Fr2AとLJH、Fr3AとLJHのprimersを用いて、2 times PCR法で行った。中国の胃リンパ腫と日本の胃と節外性リンパ腫から抽出したDNAには、Fr2A-LJHのPCRで検討出来るだけの長さのDNAが遺残していないことが明らかになった。Fr3A-LJHのPCRで、中国の胃リンパ腫では1例で、日本の胃と節外性リンパ腫では4例で特異なDNA増幅が見られた。日本のリンパ腫で特異なDNA増幅が見られない例のMALT型2例では幅広いDNA増幅を、MALT型1例と節外性1例(多発性骨髄腫)では全くDNA増幅が見られなかった。従って、中国の胃B細胞リンパ腫には、免疫グロブリン軽鎖遺伝子の異常がある可能性が示唆された。増幅されたDNAの核酸塩基配列の検索をdye-terminater法で行い、日本の胃のリンパ腫の2例で、通常は抗体産生のない物質とのDNAレベルで高いホモロジーが認められ、胃のB細胞性リンパ腫の細胞起源として免疫監視機序より逃れた異常クローンが想定された。

謝辞

この検索の実施にあたり、免疫グロブリン重鎖遺伝子のPCRについて多くの情報を提供して下さった田丸淳一先生(千葉大学一病理、三方淳男教授)に、PCR産物のDNA配列の検索法の解説をして頂いた古河龍彦先生(鹿児島大学腫瘍研、秋山伸一教授)に、DNAのdye-terminater法の検索に全面的に協力して頂いた中川正法先生(鹿児島大学三内科、納光弘教授)に、著者らは深謝致します。

DNA抽出方法は、皮膚リンパ腫研究学会の機関誌に症例報告の形で、現在、印刷中であり、また、日本樹状細胞研究会の機関誌であるDENDRITIC CELLSにも症例報告の形で印刷の予定である。この報告の内容は、平成10年3月の時点で、未発表である。



スナップ写真（左より、買教授、佐藤教授、蓮井）

日本財団補助金による

1997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

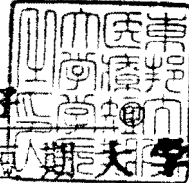
理事長 中 島 章 殿

1998. 2. 25

年 月 日

I. 招へい責任者

● 長五島 瑛智子



所属機関

東邦大学医療短期大学

職名

学長

所在地 〒143-0015

東京都大田区大森西4丁目16番20号

電話

03 (3762) 9831

招へい研究者氏名

李 香華

所属機関

東邦大学医学部

職名

研究生

II. 日本滞在日程

1996. 11. 25 ~ 1998. 11. 20



Ⅲ. 研究報告(4000字以上で記入して下さい 別紙可)

1997年度日中医学協力事業助成により、東邦大学医学部研究生(微生物学教室)として在籍中に、既に提出した研究計画表に従い細菌学と感染症学に関する基礎的な研修を行った。また、この間に研究活動に従事し、論文作成と学会発表を行ったのでそのリストを以下に記載し、別刷のコピーを添え報告をする。リスト番号はコピーの番号に一致する。

原著論文

- 1) 李 秀華: Bacillus 属の孢子菌液に対する過酢酸およびグルタルアルデヒドの殺菌効果. 東邦大学医療短期大学紀要 11:26-30, 1997
- 2) 辻 明良、山崎智子、李 秀華、山口聖賀、五島瑛智子: バイオフィルム形成 *Staphylococcus aureus* および *Pseudomonas aeruginosa* に対する消毒薬の殺菌効果と作用温度による影響. 環境感染 13:1-4, 1998

学会発表等

- 3) 辻 明良、弥富真澄、李 秀華、五島瑛智子: バイオフィルム形成緑膿菌に対する消毒薬の効果. 日本防菌防黴学会第24回年次大会、千里ライフサイエンスセンター 大阪、1997、5
- 4) Murai T. Goto S. Tsuji A. Li X.: Epidemiological Study on Bacterial Flora of Mucous Membrane, 20th International Congress of Chemotherapy, Sydney, Australia, 1997、6
- 5) 李 秀華、村井貞子、辻 明良、小林明子、五島瑛智子: 中国の医療機関で分離した *S. aureus* の抗菌薬感受性. 第42回ブドウ球菌研究会、川崎医科大学現代医学教育博物館、岡山、1997、9
- 6) 李 秀華、小林明子、村井貞子、辻 明良、五島瑛智子: 中国の医療機関で分離した緑膿菌の抗菌薬感受性: 第32回緑膿菌感染症研究会、杉乃井ホテル、大分、1998、2

尚、これらに加え、看護管理の立場から下記の総説をまとめた。

総説論文

- 7) 李 秀華、王 秀卿、韓 春燕、徐 偉: 看護の卒後継続教育における学分管理制の実施の現状. 看護管理 7:362-366, 1997

以上

Ⅳ. 助成金の使途内訳

助成金額 400,000 円

交通費 _____ 円 宿泊費 _____ 円 食費 400,000 円

雑費 _____ 円 他 _____ 円

〈原 著〉

バイオフィルム形成 *Staphylococcus aureus* および *Pseudomonas aeruginosa*
に対する消毒薬の殺菌効果と作用温度による影響

辻 明良・山崎 智子・李 秀華・山口 聖賀
五島瑳智子

*In Vitro Bactericidal Activities of Disinfectants and Effects of Temperature Against Biofilm Formed
Staphylococcus aureus or Pseudomonas aeruginosa*

別 刷

環境感染

Vol. 13 no. 1, 1998

〈原著〉

バイオフィーム形成 *Staphylococcus aureus* および *Pseudomonas aeruginosa* に対する消毒薬の殺菌効果と作用温度による影響

辻 明良・山崎 智子・李 秀華*・山口 聖賀**
五島瑳智子

In Vitro Bactericidal Activities of Disinfectants and Effects of Temperature Against Biofilm Formed *Staphylococcus aureus* or *Pseudomonas aeruginosa*

Akiyoshi TSUJI, Tomoko YAMASAKI, Xiu Hua LI*, Seika YAMAGUCHI**, Sachiko GOTO

College of Health Professions, Toho University, Tokyo;

*Department of Microbiology, Toho University School of Medicine

**Laboratory of Pharmacology, Asahi Chemical Industry

要 旨

バイオフィーム形成黄色ブドウ球菌および緑膿菌に対する消毒薬(グルコン酸クロルヘキシジン, 塩化ベンゼトニウム, グルタルアルデヒド)の殺菌効果を検討した。その結果, 2%グルタルアルデヒドは両菌種に対し優れた殺菌効果を示し, 15分間の作用で殺菌した。0.1%グルコン酸クロルヘキシジン, 0.1%塩化ベンゼトニウムでは, バイオフィーム形成黄色ブドウ球菌に対しては $\leq 15\sim 60$ 分で殺菌したが, 緑膿菌に対しては60~180分間の作用時間が必要であった。また, 消毒薬に抵抗するバイオフィーム形成緑膿菌について作用温度の影響を検討したところ, グルコン酸クロルヘキシジン, 塩化ベンゼトニウムとも作用温度を50°Cで行うと $\leq 15\sim 30$ 分間で殺菌が認められ, 作用時間の短縮がみられた。さらに, 3%過酸化水素との併用でも協力作用が認められた。

Key words : バイオフィーム, 消毒薬, 黄色ブドウ球菌, 緑膿菌

はじめに

院内感染対策としての消毒薬の使用は, 原因微生物の伝播の遮断に重要な一方法である¹⁾。そのため手指消毒, 器具消毒, 環境消毒などに使用されている。しかし, 消毒薬の適切な使用と選択については十分考慮されていないことが多い²⁻⁴⁾。細菌は生育に不利な環境下におかれた場合, 菌体表面にグリコカリックスを産生し, 互いに凝集, 被覆, 膜状を呈する状態, いわゆるバイオフィーム(biofilm)を形成する。このようなバイオフィーム形成菌は, 生体内にあっては抗菌薬や好中球などの, 食細胞に抵抗することが知られている⁵⁻⁷⁾。また, 長期間使用する各種器具や環境においても細菌はバイオフィームを形成する。消毒薬の除菌・殺菌効果の基礎評価で, いままでの検討の多くが浮遊菌に対する報告^{8,9)}でバイオフィームを形成した菌についての報告は少ない。

今回, 黄色ブドウ球菌, 緑膿菌を用いてバイオフィームを形成させ, 消毒薬の殺菌効果および作用温度による影響について検討した。

材料と方法

1. 使用消毒薬

グルコン酸クロルヘキシジン(CHD, 5%ヒビテン液[®];ゼネカ薬品), 塩化ベンゼトニウム(BZC, 10%ハイアミン[®];丸石製薬), グルタルアルデヒド(GA, 20%ステリハイド[®];丸石製薬)を用いた。

2. 使用菌種とバイオフィーム形成法

標準株および臨床分離株を含む *Staphylococcus aureus* 8菌株, *Pseudomonas aeruginosa* 10菌株を使用した。バイオフィームの形成は両菌種とも Mueller-Hinton broth (Difco)に約 10^3 cfu/mlになるよう菌を接種した後, 滅菌済塩化ポリビニル製カテーテルチューブ(径5 mm)を約10 mmに切った小片を加え, 35°C 7日間培養

東邦大学医療短期大学, *東邦大学医学部微生物

**旭化成工業株式会社 開発薬理研究所

して作製した。

3. 除菌・殺菌効果の測定

バイオフィームを形成したチューブを消毒薬(常用使用濃度)内に入れ、15, 30, 60, 120分間作用させた。殺菌効果の測定は各作用時間後の検体を SCDLP「ダイゴ」培地(日本製薬)に接種し、35°C 2日間培養後の菌の発育の有無を検討した。なお、作用させた消毒薬の濃度は CHD では0.1と0.5%, BZC では0.1と0.2%, GA では2.0%を使用した。また、バイオフィーム形成 *P. aeruginosa* については作用温度(25°, 40°, 50°C)および過酸化水素(3, 5, 10, 20%)の影響について検討した。

成 績

1. *S. aureus* と *P. aeruginosa* のバイオフィーム形成と消毒薬の殺菌効果

塩化ポリビニル製チューブに形成したバイオフィームを走査電子顕微鏡で観察したのが図1, 2である。ともに培養7日目の結果であるが、両菌株とも著明なバイオフィームの形成が観察されている。

このバイオフィーム形成菌について常用濃度の消毒薬を作用させた成績を表1に示した。*S. aureus* 8株に対する0.1および0.2% BZC, 2% GA, 0.5% CHD の殺菌効果は、15分間の作用時間ではほとんどの菌株が殺菌された。しかし、0.1% CHD では60分間の作用時間が必要であった。また、バイオフィーム形成 *P. aeruginosa* 10株に対し2% GA では15~30分間の作用で殺菌されたが、CHD, BZC では作用が弱く、0.5% CHD, 0.2% BZC では30~180分間の作用時間が必要であった。また、両薬剤とも0.1%の濃度では60~≥180分間の作用時間が必要であった。

2. 各消毒薬の50%および80%殺菌時間

S. aureus 8株, *P. aeruginosa* 10株の計18株について作用時間に対する累積殺菌率を図3に、消毒薬の50%殺菌時間および80%殺菌時間を表2に示した。2% GA は80%殺菌時間でも15分以内と優れた殺菌効果を示した。0.1% CHD, 0.1% BZC はともに同程度の殺菌時間を示し、50%殺菌時間は60分; 80%殺菌時間は180分であった。0.5% CHD では50%殺菌時間は30分, 80%殺菌時間は60分となり短時間となった。0.2% BZC では50%殺菌時間は30分と短縮されたが、80%殺菌時間は180分で変化は認められなかった。

3. 作用温度による殺菌効果の変動

バイオフィーム形成 *P. aeruginosa* 3株について作用温度による殺菌効果の影響をみた成績を表3に示した。作用時間を15, 30, 60, 120, 180分について検討した。40°Cにおいては180分間作用しても殺菌効果は認められず、50°Cでも120分以上が必要であった。また、0.5% CHD, 0.1% BZC を用い各温度で作用させた場合、



図1 *S. aureus* (培養7日目, チューブ内)

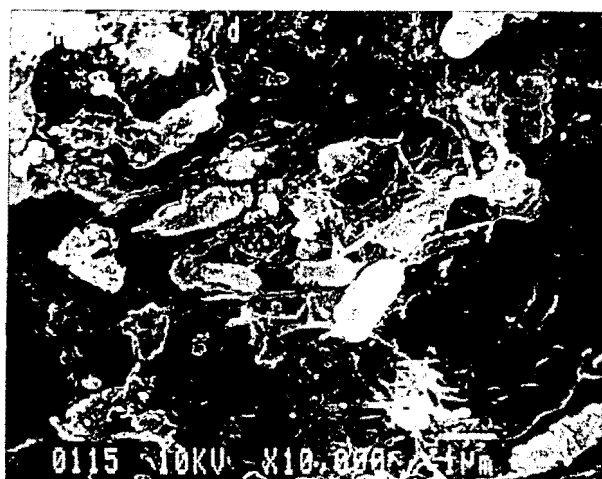


図2 *P. aeruginosa* (培養7日目, チューブ内)

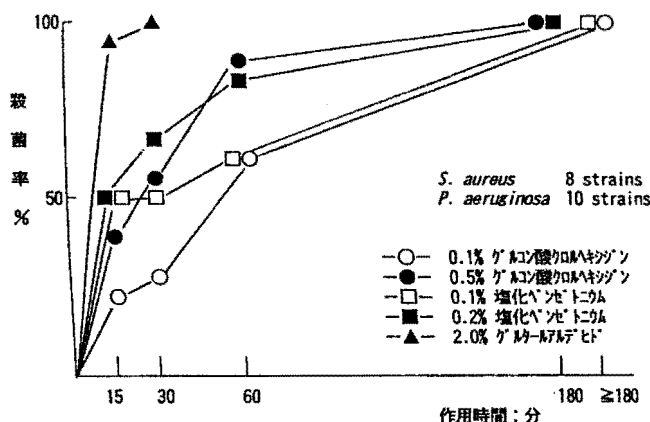


図3 バイオフィーム形成 *S. aureus*, *P. aeruginosa* 18菌株に対する消毒薬の殺菌効果

0.5% CHD では作用温度が上昇するに従い短時間で殺菌効果が認められ、50°Cにおいては≤15~30分間で殺菌され、0.1% BZC でも30分で殺菌された。

表1 バイオフィーム形成菌に対する消毒薬の殺菌効果

菌 株	グルコン酸クロルヘキシジン		塩化ベンゼトニウム		グルタルアルデヒド
	0.1%	0.5%	0.1%	0.2%	2%
<i>S. aureus</i> 209-P	≤15	≤15	≤15	≤15	≤15
<i>S. aureus</i> Smith	≤15	≤15	≤15	≤15	≤15
<i>S. aureus</i> No. 1923	30	≤15	≤15	≤15	≤15
<i>S. aureus</i> IS406	≤15	≤15	≤15	≤15	≤15
<i>S. aureus</i> IS408	60	30	≤15	≤15	≤15
<i>S. aureus</i> IS527	60	≤15	≤15	≤15	≤15
<i>S. aureus</i> IS555	≤15	≤15	≤15	≤15	≤15
<i>S. aureus</i> IS594	60	≤15	≤15	≤15	≤15
<i>P. aeruginosa</i> ATCC27853	60	30	180	180	≤15
<i>P. aeruginosa</i> Fisher III	180	180	180	60	≤15
<i>P. aeruginosa</i> TA25	180	60	60	30	≤15
<i>P. aeruginosa</i> TA312	180	60	180	180	≤15
<i>P. aeruginosa</i> TA344	180	30	180	30	≤15
<i>P. aeruginosa</i> TA339	60	60	180	30	≤15
<i>P. aeruginosa</i> TA343	180	60	180	180	≤15
<i>P. aeruginosa</i> TA347	60	60	180	60	≤15
<i>P. aeruginosa</i> No. 10	>180	60	60	60	≤15
<i>P. aeruginosa</i> TA335	>180	180	>180	180	30

(殺菌時間：分)

表2 バイオフィーム形成 *S. aureus*, *P. aeruginosa* 18菌株に対する消毒薬の50%および80%殺菌時間

消毒薬	殺菌時間(分)	
	50%	80%
0.1%グルコン酸クロルヘキシジン	60	180
0.5%グルコン酸クロルヘキシジン	30	60
0.1%塩化ベンゼトニウム	60	180
0.2%塩化ベンゼトニウム	30	180
2.0%グルタルアルデヒド	≤15	≤15

検討菌株：*S. aureus* 8 strains, *P. aeruginosa* 10 strains

4. 過酸化水素との併用殺菌効果

バイオフィーム形成 *P. aeruginosa* に対する過酸化水素(H₂O₂)および0.5% CHD, 0.1% BZC との併用における殺菌効果の成績を表4に示した。

3, 5, 10, 20%のH₂O₂について検討したが, 3% H₂O₂では殺菌には60~180分間の作用が必要であったが, 5%以上のH₂O₂では≤15~30分間で殺菌された。3% H₂O₂と0.5% CHD, 0.1% BZC との併用では, 30~60分間で殺菌され, 併用効果が認められた。

考 察

消毒薬の殺菌効果の基礎評価の多くは浮遊菌を用いて検討されている。固体表面に形成されるバイオフィームについての検討は少ない。今回, 我々はバイオフィームを形成しやすい *S. aureus* と *P. aeruginosa* を用い, ポリ

表3 バイオフィーム形成 *P. aeruginosa* に対する消毒薬の殺菌効果

薬剤, 温度	—作用温度による影響—		
	(殺菌時間：分)		
	<i>P. aeruginosa</i>		
	ATCC27853	TA312	TA335
0.5% CHD	120	30	120
0.1% BZC	180	120	180
25°C	>180	>180	>180
40°C	>180	>180	>180
50°C	120	>180	180
0.5% CHD+25°C	120	30	120
0.5% CHD+40°C	60	30	60
0.5% CHD+50°C	30	≤15	≤15
0.1% BZC+25°C	180	120	180
0.1% BZC+40°C	120	120	120
0.1% BZC+50°C	30	30	30

CHD：グルコン酸クロルヘキシジン
BZC：塩化ベンゼトニウム

塩化ビニル製カテーテルチューブにバイオフィームを形成させ, 消毒薬の殺菌効果を検討した。その結果, グルコン酸クロルヘキシジンや塩化ベンゼトニウムではバイオフィーム形成 *S. aureus* に対しては30分間の作用で殺菌が認められるが, バイオフィーム形成 *P. aeruginosa* に対しては60~180分間以上の殺菌時間が必要であった。以前報告した浮遊菌に対する殺菌効果と比べ, バイ

表4 バイオフィーム形成 *P. aeruginosa* に対する消毒薬と H₂O₂ の併用殺菌効果

(殺菌時間:分)

薬 剤	<i>P. aeruginosa</i>		
	ATCC27853	TA312	TA335
3% H ₂ O ₂	60	180	180
5% H ₂ O ₂	≤15	30	60
10% H ₂ O ₂	≤15	30	30
20% H ₂ O ₂	≤15	30	30
0.5% CHD	120	30	120
0.1% BZC	180	120	180
0.5% CHD+3% H ₂ O ₂	30	30	60
0.1% BZC+3% H ₂ O ₂	30	60	60

CHD: グルコン酸クロルヘキシジン
BZC: 塩化ベンゼトニウム

オフィーム形成菌では短時間殺菌効果は弱く、長時間の作用が必要であった。しかし、グルタルアルデヒドでは *S. aureus*, *P. aeruginosa* とも短時間の作用で殺菌効果が認められた。

細菌性バイオフィームは固形物表面に付着し、多糖体を主成分とするグリコカリックスを菌体外に分泌し強固な膜状を呈した状態をいうが、菌種間やおかれた環境によりその構成成分や形成量に違いがみられることが知られている^{10,11)}。今回のグルコン酸クロルヘキシジンや塩化ベンゼトニウムにみられた *S. aureus* と *P. aeruginosa* に対する効果の違いは、このことが原因ではないかと考えられた。また、消毒薬に抵抗性の強い *P. aeruginosa* バイオフィームに対し作用温度と過酸化水素との併用効果について検討したが、作用温度を50°Cに、また3%以

上の過酸化水素との併用で作用時間が短縮される結果を得た。各種器具消毒に有効な方法の一つではないかと考えられた。

文 献

- 1) 辻 明良: MRSA 感染対策における消毒薬の役割. 日環感 12: 154-156, 1997
- 2) 辻 明良: 院内感染対策としての消毒薬の選択と適正使用. 日病薬誌 33: 797-801, 1997
- 3) 辻 明良: 消毒薬—その特性・使用とユニバーサル・プレコーション—. 化学療法の領域 12(S-1): 235-243, 1996
- 4) 辻 明良, 久家智子, 五島磋智子: 消毒薬の抗微生物スペクトルからみた使い方. 総合臨床 42: 2082-2086, 1993
- 5) Costerton J. M., et al: Bacterial biofilms in nature and disease. Ann. Rev. Microbiol. 41: 435-464, 1987
- 6) 小林宏行: 細菌バイオフィーム. 感染症 21: 161-168, 1991
- 7) Lopez-Lopez G., Pascual A., Perea E. J.: Effect of plastic catheter material on bacterial adherence and viability. J. Med. Microbiol. 34: 349-353, 1991
- 8) 辻 明良, 他: 各種消毒薬の作用濃度, 作用時間および血清添加による殺菌効果の変動. 感染症学雑誌 53: 292-303, 1979
- 9) 五島磋智子, 辻 明良: 消毒薬の評価法. 検査と技術 8: 200-206, 1980
- 10) 藤巻一雄, 池田 靖, 高畑正裕, 保田 隆: *In vitro* における緑膿菌のバイオフィームの性状について. 日本化学療法学雑誌 40: 886-893, 1992
- 11) 池田文昭, 横田好子, 峯 靖弘: *Staphylococcus epidermidis* の slime 産生株による biofilm 形成と抗菌剤の作用について. 感染症学雑誌 65: 875-882, 1991

[連絡先: 〒143 東京都大田区大森西 4-16-20
東邦大学医療短期大学 辻 明良]

日本財団補助金による

1997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12月9日

I. 招へい責任者 百瀬 皓



所属機関 財団法人 臨床眼科研究所

職名 理事長 所長

所在地 群馬県桐生市梅田町1丁目100番地

電話 0277-32-1010

招へい研究者氏名 陳 榮 家

所属機関 上海医科大学眼耳鼻咽喉科医院眼科

職 名 副 教 授

研 究 テ ー マ 臨床眼科学

II. 日本滞在日程

- 6月： 6月1日東京/成田国際空港より入国。
6月2日より臨床眼科研究所で毎日手術見学、角膜移植に際して得られた病理組織標本の観察
6月19日横浜市深作眼科で手術見学
6月20日～22日第36回日本白内障学会第12回日本限内レンズ屈折手術学会合同学会参加
6月26日～28日オリンピア眼科クリニックに井上洋一先生を訪問緑内障に関して意見を交換する
引き続き臨床眼科研究所で手術見学並びに病理組織標本の観察
- 7月： 上旬論文“予防的レーザー虹彩切開術後の水疱性角膜症の病理組織学的観察”の執筆に着手、文献收拾を行う
7月8日防衛医科大学校眼科学教室沖坂重邦教授を訪問、論文執筆の指導を受ける
中旬手術見学、病理標本の観察、文献の收拾
7月20日恩師慈恵医科大学名誉教授舟橋知也先生を訪問
7月21日～24日神戸海星病院院長山中昭夫先生を訪問手術見学並びに医療の実際を見学
- 8月： 手術見学、角膜切除標本の所見のまとめ（550例）。文献の整理
中旬論文執筆と文献の整理
下旬論文ほぼ完成。臨床眼科研究所百瀬皓理事長所長と今後の共同研究の打合せ
- 8月31日東京/成田空港より帰国

論文は防衛医科大学校眼科学教室沖坂重邦教授にご協力頂き、さらに内容を点検して、1～2ヶ月以内に日本眼科学会雑誌に投稿の予定である

Ⅲ. 研究報告 (4000字以上で記入して下さい 別紙可)

研究報告

上海医科大学眼耳鼻咽喉科医院眼科陳榮家副教授は1997年6月1日より8月31日までの3ヶ月間、財団法人臨床眼科研究所に滞在し、以下の項目に就いて研究研修をおこなった。

1) 眼科手術の見学。滞在中毎日手術室で、小切開白内障外摘出術+眼内レンズ移植術。角膜移植術、放射状角膜切開術、角膜乱視矯正切開術、高度近視に対する後部強膜保護術と透明水晶体摘出術、糖尿病性増殖性網膜症に対する硝子体手術、緑内障手術などの眼科手術の最新の術式を見学し、また前房内麻酔の実際を多数例見学して習得した。また日程表にあるように、神戸海星病院の山中昭夫先生を訪ね、網膜硝子体手術も見学した。また臨床眼科研究所のビデオライブラリーで多数のビデオフィルムをみて、異なる術者の各種の術式についての理解を深めた。また研究所外来で術前術後の患者の臨床検査と診察を見学した。

2) 病理組織標本の観察。陳榮家副教授は今日まで眼科腫瘍病理を専攻してきたが、臨床眼科研究所が保有する約550症例の病理組織標本(大部分は角膜移植に際して切除した角膜組織)を観察し、眼科臨床病理の理解を深めた。

3) 予防的レーザー虹彩切開術後の水疱性角膜症の組織病理学的観察。偶然にも陳榮家副教授が来日する前日に、臨床眼科研究所でアルゴンレーザー虹彩切開術の後に発症した水疱性角膜症に対して、全層角膜移植を行い角膜切片を得ることが出来た。アルゴンレーザー虹彩切開術後の水疱性角膜症は前房レンズ移植に起因する水疱性角膜症に比して、虹彩切開より角膜症発生までの期間がはるかに短く、前房レンズ移植による水疱性角膜症とは発生の機序が異なるかも知れないと考えられる。しかしわが国では角膜移植のが行われる機会が少なく、したがって本症例の病理組織に関する報告は未だなく、また欧米でも数件の報告があるに過ぎない。以上の理由により、このアルゴンレーザー虹彩切開術後の水疱性角膜症の組織病理学的観察を、眼病理を専攻している陳榮家副教授の研究課題に加えた。この研究には防衛医科大学校眼科学教室沖坂重邦教授の多大なる御指導、御協力を頂いた。この研究は論文として日本眼科学会雑誌に投稿の予定である。この論文の要旨は別紙に添付する如くである。

4) 今後の共同研究

財団法人臨床眼科研究所理事長・所長百瀬皓と上海医科大学眼耳鼻咽喉科医院副教授陳榮家は、現在眼科医療の課題になっているドライアイの問題を研究するため、“涙液分泌減少症の病理学的研究”を共同研究することに合意し、合意書を取り交わした。また同副教授はこの共同研究のための、予備知識と資料をもって帰国した。

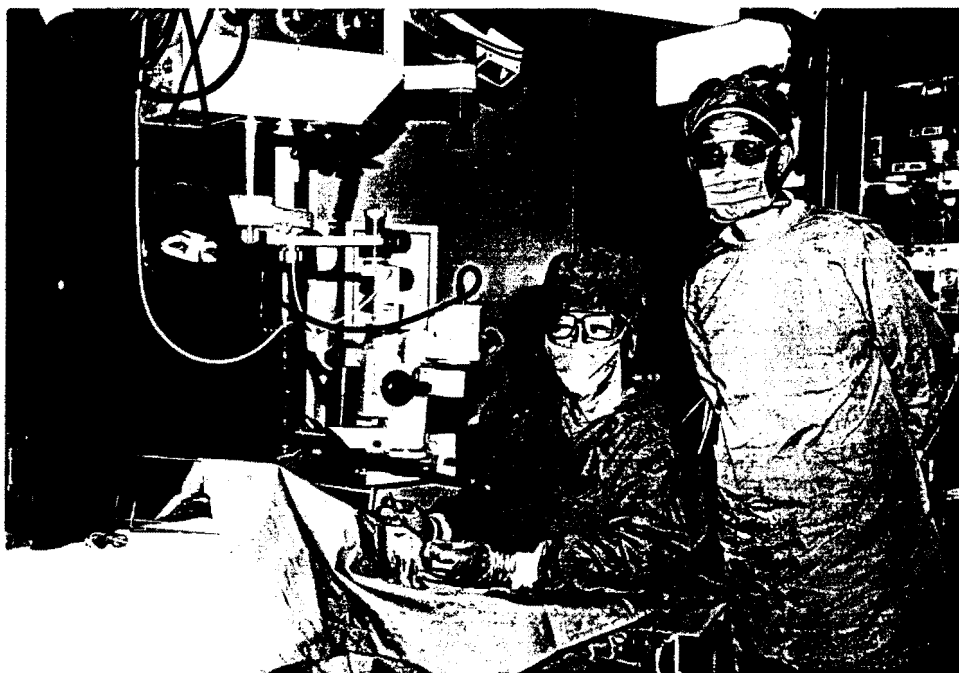
注記：陳榮家副教授は来年初頭に教授審査を受けることになっており、財団法人日中医学協会の助成で財団法人臨床眼科研究所で3ヶ月研修したことも、教授審査で考慮されるでしょう。

Ⅳ. 助成金の使途内訳

助成金額 50万 円

交通費 20万 円 宿泊費 10万 円 食費 10万 円

雑費 10万 円 他 0 円



陳榮家（右）百瀨（中央）

論文標題：レーザー虹彩切開術後の水疱性角膜症の組織病理学的観察

簡略標題：レーザー虹彩切開後の水疱性角膜症の病理組織

著者名：陳榮家¹⁾、百瀬 皓²⁾、沖坂重邦³⁾、水川淳³⁾、

所属名：¹⁾上海医科大学眼耳鼻喉科医院

²⁾財団法人臨床眼科研究所

³⁾防衛医科大学校眼科学教室

英文論文標題：Histopathological Observation on Bullous Keratopathy
after Argon-laser Iridotomy

英文著者名：Ron-Jia Chen¹⁾、Akira Momose²⁾、Shigekuni Okisaka³⁾
Atsushi Mizukawa³⁾、

英文所属名：1)Eye and Ear Nose Throat Hospital of Shanghai Medical
University

2)Institute of Clinical Ophthalmology

3)Department of Ophthalmology, National Defense Medical
College

別刷請求先：☎ 3 7 6 - 0 6 0 1

群馬県桐生市梅田町 1 - 1 0 0

(財) 臨床眼科研究所

百瀬 皓

別刷請求先の英文：Akira Momose, MD, FICS

Institute of Clinical Ophthalmology

1-100 Umeda, Kiryu, Gunma, Japan 376-0601

著者校正宛先：☎ 3 7 6 - 0 6 0 1

群馬県桐生市梅田町 1 - 1 0 0

(財) 臨床眼科研究所

百瀬 皓

☎ 0 2 7 7 - 3 2 - 1 0 1 0

FAX 0 2 7 7 - 3 2 - 2 2 1 6

有料別刷希望部数 []

要約：60歳女性。両眼の白内障を伴う狭隅角眼のため、両眼にアルゴンレーザー虹彩切開術を受け、その後約2ヶ月経過して左眼の視朦を感じ、左眼の水疱性角膜症の診断を受け、アルゴンレーザー虹彩切除術後1年2ヶ月経過して全層角膜移植術が施行された。摘出角膜は2.5%ホルマリン・1.0%グルタルアルデヒド混合液で固定し、光学顕微鏡と電子顕微鏡で観察した。虹彩切開部に隣接する角膜内皮は基底膜様物質をデスメ膜の内側に産生している。その後レーザー障害を強く受けた内皮は細胞内小器官・細胞膜を消失し脱落する。周囲の健全な内皮は基底膜様物質を産生しながらデスメ膜露出部をおおうようにレーザー障害部に向かって遊走するものと考えられる。内皮の変性につれてレーザー障害部には、実質浮腫、実質細胞減少、ボウマン膜断列・消失、上皮浮腫、上皮結合組織増生、上皮剥離が生じてくると考えられる。

キーワード：アルゴンレーザー虹彩切開術、水疱性角膜症、全層角膜移植術
組織病理学、角膜内皮細胞

Abstract : We report histopathological findings of a case of bullous keratopathy developed about two months in the left eye after bilateral argon-laser iridotomy (ALI) for narrow angle of the eyes. The patient was a 60 year-old female underwent penetrating keratoplasty after 1 year and 2 months of ALI. The corneal specimen was fixed with 2.5% Formalin and 1.0% glutaraldehyde mixture, and examined under the light and electron microscopes. Laser damaged endothelium produced large amount of basement membrane like material beneath Descemet's membrane. As the next stage, severely damaged endothelium loses organelle and cell membrane. Surrounding healthy endothelium may migrate into the damaged area and produces small amount of basement membrane like material beneath Descemet's membrane. After that, stromal swelling, decrease of keratocytes, break and disappearance of Bowman's membrane, epithelial edema, connective tissue accumulation beneath basal cells and epithelial detachment may occur at the laser damaged area.

Keywords : Argon-laser Iridotomy, Bullous Keratopathy, Penetrating Keratoplasty, Histopathology, Corneal Endothelial Cells

I : 緒言

レーザー虹彩切開術の適応は、瞳孔ブロックによる閉塞隅角緑内障と、現在眼圧は正常でも将来瞳孔ブロックにより眼圧上昇を起こす危険性がある状態である。閉塞隅角緑内障および狭隅角眼に対するアルゴンレーザー虹彩切開術 (ALI) および Q スイッチ Nd : YAG レーザー虹彩切開術は、外来で施行できる簡便さゆえ、一般に副作用も少なく比較的 안전한方法と考えられ^{1) - 9)}、観血的周辺虹彩切除術に代わって、現在広く行われるようになった。レーザー虹彩切開術の合併症として、術後早期には一過性の虹彩炎、眼圧上昇、角膜混濁などを生じ、その他角膜内皮損傷、虹彩切開孔の再閉塞、虹彩後癒着がある。しかし最近 ALI 後数年経過してから水疱性角膜症や角膜内皮代償不全を起こした報告が現れてきた^{10) - 19)}。このうち日本に於ける報告は、筆者等が調べた範囲内では 1 例を除きすべて臨床的観察の報告で、この 1 例も角膜移植が行われたとの報告のみで¹⁹⁾、摘出角膜の組織病理像の報告は認められなかった。欧米でも角膜移植を行いその摘出角膜片の組織病理学的観察^{9) 10)}の報告は限られている。今回筆者等は、ALI 後に生じた水疱性角膜症に対して全層角膜移植を行い、摘出した角膜片の組織病理像に就き詳細な報告を行う。

II : 症例

症例：60 歳、女性、職業：小児科医

初診：1996 年 5 月 14 日

主訴：左眼の視力障害

現病歴：1995 年 2 月下旬某病院の人間ドックを受診し、両眼の白内障と狭隅角を指摘され、同年 3 月 16 日同病院眼科で左眼の ALI の施行を受けた。使用した機種は Argon All (Blue/Green) (NIDEK 社, ADC-8000) で、左眼の照射条件は Abraham Lens を用いて照射径 50 μ m、出力 1.0W、照射時間 0.05 秒、95 発 (総エネルギー量 4.75 J) であった。また同年 3 月 23 日右眼に同アルゴンレーザーで、Abraham Lens を用いて、照射径 50 μ m、

出力 1.0W, 照射時間 0.05 秒, 78 発 (総エネルギー量 3.9 J) の条件で ALI の施行を受けた。この病院からの連絡によると、術前スペキュラーマイクロスコープ及び角膜の厚みの検査は行われなかった。その後同年 5 月頃より左眼視朦感が出現し 自動車の運転に支障を感じるようになった。右眼は ALI 施行前後に変化はなかった。

初診時眼所見：視力は右眼 0.4 (1.5 x + 1.25 D \curvearrowright cyl - 0.75 D Ax 140°, 左眼 0.05 (0.1 x - 2.0 D) であった。レーザー視力は右眼 1.0、左眼 0.63 であった。右角膜は透明で細隙灯顕微鏡で異常を認めなかったが、左角膜は全体に浮腫を認め水疱性角膜症の状態であった。超音波パコメーターで測った角膜中心の厚みは、右眼は 553 μ m、左眼は角膜浮腫のため正確には測定出来なかったが、約 580 μ m であった。スペキュラーマイクロスコープで撮影した角膜内皮細胞は、右眼の細胞密度は 2,150 個/ mm^2 左眼は 1,050 個/ mm^2 であったが、両眼特に左眼では著明に、細胞の拡大、大きさの不同、形状と配列の乱れを認め、左眼には六角形細胞以外の形状の細胞も出現していた (図 1、2)。虹彩には両眼ともに外上方にレーザーによる穿孔が見られた。右眼水晶体には楔状の混濁、左眼水晶体には皮質と後囊下混濁を認めた。眼底は両眼ともに異常を認めなかった。。

手術と術後経過：1997年5月31日左眼に全層角膜移植術、白内障囊外摘出術、後房レンズ移植術のTriple Procedureを行った。術後の経過は良好で移植角膜は透明で、11月19日現在眼鏡で矯正して視力0.7を得ている。

Ⅲ：組織病理学的観察方法

手術で摘出した角膜は、2.5%ホルマリン・1.0%グルタルアルデヒド混合液 (PH 7.2、0.3M 磷酸緩衝液) に入れたただちに固定した。母角膜は図 3 の如くレーザー照射時の外力が直接加わったと思われる部位を光学顕微鏡および電子顕微鏡で観察の出来るように細切した。光学顕微鏡用標本はアルコール系列で脱水、パラフィン包埋し、5 μ m 切片をヘマトキシリン・エオジン、PAS、マッソン 3 色染色した。電子顕微鏡用標本

はアルコール系列で脱水後、エボン包埋した。先ず1 μ m切片を1%アズールII染色し光学顕微鏡で観察後、更に超切片をウラン鉛二重染色し、透過型電子顕微鏡で観察した。

IV：組織病理学的所見

エボン包埋B切片とパラフィン包埋切片の断端以外のエボン包埋A、C、D、E とパラフィン包埋の組織病理像はほぼ同一であったので、エボン包埋A、B切片を代表として述べる。

切片A (図4) 上皮の基底細胞の配列は乱れているが、細胞内・外に浮腫を認めない。翼状細胞には異常を認めず、表層細胞の細胞間隙に軽度拡大を認める。ボウマン膜に異常を認めない。実質、薄葉はやや乱れているが、実質細胞の数にも変化はない。古いデスメ膜の内側に、古いデスメ膜より染色性の薄い20~30%の厚さ(内皮細胞とほぼ同じ厚さ)の新しいデスメ膜が形成されている。所々に新しいデスメ膜が滴状角膜様に前房内に突出しているところもある。内皮細胞は線維芽細胞様に引き伸ばされた形を呈している(図4A)。電子顕微鏡で新しいデスメ膜を観察すると、細胞外基質の中に膠原線維束が不規則に疎に配列している。内皮細胞の細胞質中のミトコンドリア、ゴルジ装置、小胞体、リボゾームなどの小器官に異常を認めない(図4B)。

切片B (図5)：上皮の基底細胞の配列は乱れているが、細胞内・外浮腫は認められない。翼状細胞の配列も乱れ、細胞間隙にリンパ球の浸潤しているところがある。表層細胞の細胞間隙に軽度拡大がみられ、一部剥離しかけているものもある。基底細胞とボウマン膜間に滲出液が貯留しているところがある。ボウマン膜にも一部断裂しているところがある。実質薄葉は乱れ、実質の厚さは切片Aの140~170%である。実質細胞は軽度減少している。古いデスメ膜の内側に古いデスメ膜の100~180%の厚さの染色性の薄い新しいデスメ膜が形成されている。古いデスメ膜に隣接する新しいデスメ膜の染色性は薄く、内皮側はその中間の染色性を呈する。内皮細胞は線維芽細胞様の形態を呈し、一部欠損しているところがある(図5A)。

電子顕微鏡で古いデスメ膜に隣接する新しいデスメ膜を観察すると、細胞外基質の中に膠

原線維やlong spacing banded collagenが疎に不規則に配列している（図5 B、C）。内皮細胞に隣接する新しいデスメ膜には膠原線維束が密に不規則に配列している（図5 D、E）。内皮細胞には、細胞内小器官に異常のないもの、細胞内小器官が破壊され細胞質がほぼ一様にみえるもの、細胞膜が破れて細胞質が一部残っているものから、内皮細胞がデスメ膜から脱落しているものまで種々な形態を呈している（図5 B、D、E）。また変性に陥った内皮細胞の前房側に、細胞内小器官に異常のない内皮細胞がおおい互いに接着装置で結合しているところもみられる（図5 D）。

IV：考案

一般的にレーザー虹彩切開術は、照射時に僅かに角膜内皮細胞の損失を伴うが、長期的には内皮細胞には影響を与えないと考えられてきた。また視機能に影響を及ぼすような重篤な合併症はさらに少ないと考えられてきた^{1) - 9)}。しかし最近になって、一部の症例でレーザー虹彩切開部に対応する部位の角膜のみならず、晩期的に角膜内皮全体が代償不全に陥る現象が認められるようになった^{10) - 19)}。この原因としては、レーザー側の要因として過剰なエネルギー照射が指摘されており、また過剰なエネルギー照射にレーザーの熱作用が、直接あるいは間接的に角膜内皮細胞に損傷を与え、発症に対して誘因になったと考えられている^{10) - 12)}。Hongらは総エネルギー量が20Jを越えると角膜内皮細胞の減少をきたすと報告している²⁰⁾。Wheelerによると、虹彩をレーザー光で蒸散させるためには600°C以上の温度上昇が必要で²¹⁾、ALIの適応が閉塞隅角緑内障と狭隅角眼であることを考えると、角膜周辺部で角膜と虹彩の距離の極めて近い症例では、虹彩の熱上昇の角膜に対する影響は無視できないであろう。透明な角膜のアルゴンレーザー光の透過率は非常に高く約90%である^{22) 23)}。しかし急性緑内障発作を起こし角膜浮腫が起きれば透過率は低下し、より多くの光線が角膜で吸収される。また初期のアルゴンレーザー虹彩切開のように、Abraham Lensを使わずに切開を行えばより多くのエネルギーが必要になることは自明である。

患者角膜の要因としては、緑内障の急性発作、糖尿病、滴状角膜やフックス角膜内皮ジス

トロフィなど、何らかの角膜内皮の既存の異常（脆弱性）がある場合である。眼圧上昇による角膜内皮細胞の減少については、多くの報告があり^{16) 24-33)}、急性隅角閉塞を起こした眼は、起こしていない反対眼に比して、約20%細胞数の減少があると言われている²⁴⁾。糖尿病との関係についてもいくつかの報告があり¹⁰⁾⁻¹⁴⁾特にSchultzらによると、I型（若年発症）及びII型（成人発症）の糖尿病のいずれもが、同年齢の非糖尿病患者と比較して、内皮細胞密度に有意差はないが、内皮細胞の配列、大きさと六角形細胞のパーセントには有意差があったと言い、特にI型の糖尿病ではこのような変化は年齢の若いうちに始まり、細胞密度の減少が大きく、患者が40代、50代になると細胞密度の減少がさらに著しくなるとのべている³⁴⁾。

滴状角膜はフックス角膜内皮ジストロフィーの初期段階であるといわれている。フックス角膜内皮ジストロフィは、軸性遠視、浅前房、閉塞隅角緑内障と関連があることが知られている³⁶⁻³⁷⁾。Smithら²⁾は17人のALIを行った中に、閉塞隅角緑内障を起こす前にフックス角膜内皮ジストロフィと診断されていた患者で、内皮細胞密度がALI前の1、433/mm²からALI後10週間に612/mm²に減少した症例があった。これはフックス角膜内皮ジストロフィか閉塞隅角発作自体が進行性内皮細胞減少を起こし、アルゴンレーザー虹彩切開により細胞減少が急速に加速されたのであろうと推論している。米国カナダで報告されたALI後の水疱性角膜症の症例の中には、滴状角膜またはフックス角膜内皮ジストロフィの存在が報告されているものがある^{2) 10-12)}。

本症例は右眼のスペキュラーマイクロスコープ所見および左眼の組織病理像が示す如く滴状角膜は認められない。切片にみられた滴状角膜様の所見はALI後の新しいデスメ膜の限局性増生であり、レーザー照射部よりはなれた部位でも、内皮細胞は反応性に基底膜様物質の産生を起こしていることを示している。図6にレーザー虹彩切開術後水疱性角膜症の発生病理（仮説）を示す。レーザー照射部の角膜内皮は基底膜様物質をデスメ膜の内側に産生する。レーザー傷害をより強く受けた内皮の方が基底膜様物質（新しいデスメ膜）を急速かつ多量に産生するので、ポンプ作用は低下し、実質浮腫から上皮基底細胞浮腫を

起こしてくる。これに引き続いてレーザー傷害を強く受けた内皮は、細胞内小器官が消失し、更に細胞膜が消失し、この内皮細胞は脱落する。この過程で、隣接する活性のある内皮はこの部分に遊走してきてデスメ膜が露出しないように消失過程の内皮を被覆する（図5D）。隣接する内皮に活性がない場合には、この部分のデスメ膜は露出し、実質浮腫は更に増強し、実質細胞も減少し、ボウマン膜離断・消失、基底細胞下への線維芽細胞・膠原線維増生を惹起し、最終的には上皮剥離に至る。健常部の内皮細胞も傷害部に向かって徐々に遊走し、この際基底膜様物質が産生されるものと考えられる。すなわちレーザー傷害は限局性であっても傷害部に向かう内皮の遊走により内皮傷害は角膜全体に波及して行き、レーザー傷害が強ければ遊走に動員された内皮も次第に活性が低下してきて、細胞内小器官、細胞膜を消失してくるものと考えられる。

ALI後の水疱性角膜症は偽水晶体眼性水疱性角膜症より発症が早いものがある。。著者等が調べた範囲でもレーザー照射後直ちに発症した症例もあり（表1）、また本症例もALI後2ヶ月で左眼の視蒙を感じている。同じく表1に示す如く、水疱性角膜症を起こした症例のアルゴンレーザーの総エネルギー量にもかなり症例差があり、本症例では左眼のエネルギー量は4.75Jであった。これは角膜内皮と眼内レンズの部分的接触による偽水晶体眼水疱性角膜症と異なり、レーザーの熱作用による前房水、虹彩の温度上昇の角膜内皮への影響、レーザーのショック波などにより、レーザー照射部のみならず角膜内皮が広汎に傷害される症例があるためであろうか。したがってALIは緑内障の急性発作、糖尿病、滴状角膜やフックス角膜内皮ジストロフィなど、何等かの角膜内皮の既存の異常（弱性）がある場合はもちろん、それ以外の場合でも慎重に適応を定めるべきであろうと考える。万一わずかな杞憂でもあれば、観血的周辺虹彩切除術を選択すべきであろう。有色人種の虹彩は欧米人に比較して厚さが厚く、メラニン顆粒に富み熱吸収が良いことも考慮すべきであろう。

文献

- 1) Hirst LW, Robin AL, Sherman S, Green WR, D'anna SD, Dunkelberger G : Corneal endothelial changes after argon-laser iridotomy and panretinal photocoagulation. *Am J Ophthalmol* 93:473-481, 1982.
- 2) Smith J, Whitted P : Corneal endothelial changes after argon-laser iridotomy. *Am J Ophthalmol* 98:153-156, 1984.
- 3) Thoming C, Buskirk EM, Samples JR : The corneal endothelium after laser therapy for glaucoma. *Ophthalmology* 91:518-522, 1987.
- 4) Panck WC, Lee DA, Christensen RE : Effect of argon laser iridotomy on the corneal endothelium. *Am J Ophthalmol* 105:395-397, 1988.
- 5) Lederer CM, Thomas JV : Laser surgery for glaucoma. In *Glaucoma surgery*. Ed by Thomas JV, CV Mosby, St Louis, 157-194, 1992.
- 6) 中嶋基磨、山下秀明、三木弘彦 : 予防的レーザー虹彩切開術後の角膜内皮細胞の長期経過。臨眼 48 : 1180 - 1181、1994。
- 7) 三浦嘉久、上野 真、三浦恵子、松島差都子、森山有理 : アルゴンレーザー虹彩切開術後早期の角膜内皮細胞の変化。眼紀 10 : 1062 - 1065、1995。
- 8) 河野達朗、児玉達夫、喜多有紀、谷戸正樹、勝部 透、瀬戸川朝一 : 六日市病院におけるアルゴンレーザー虹彩切開術の検討。眼臨 91 : 871 - 873、1997
- 9) Pollack IP: Current concepts in laser iridotomy. *Int Ophthalmol Clin* 24:153-180, 1984
- 10) Schwartz AL, Martin NF, Weber PA : Corneal decompensation after argon laser iridotomy. *Arch Ophthalmol* 106:1572-1574, 1988.
- 11) Zabel RW, Mc Donald IM, Mintsoulis G : Corneal endothelial decompensation after argon laser iridotomy. *Can J Ophthalmol* 26:367-373, 1991.

- 1 2) Wilhelmus KR : Corneal edema following argon laser iridotomy. *Ophthalmic Surgery* 23:533-537, 1992.
- 1 3) Jeng S, Lee JS, Huang SCM : Corneal decompensation after argon laser iridotomy - a delayed complication. *Ophthalmic Surg* 22:565-569, 1991.
- 1 4) 湯口幹典、長坂 誠 : アルゴンレーザー虹彩切開術後に生じた水疱性角膜症. *眼臨* 86 : 2098 - 2101、1992.
- 1 5) 薄田 寿、桜木章三 : 予防的アルゴンレーザー虹彩切開術後に晩発性角膜内皮代償不能を来たした1例. *眼科* 35 : 1489 - 1491、1993.
- 1 6) 鯉淵浩、早川和久、山川良治、長瀧重智 : アルゴンレーザー虹彩切開後の水疱性角膜症・眼科手術 7 : 107 - 111、1994.
- 1 7) 細谷比左志、大橋裕一、大黒伸行、桑山泰明、木下 茂 : アルゴン・レーザー虹彩切開術後に生じた水疱性角膜症. *臨眼* 48 : 420 - 422、1994.
- 1 8) 会田千穂、井尾晃子、松田 彰、田川義継 : アルゴンレーザー虹彩切開後に生じた水疱性角膜症の3症例. *眼紀* 46 : 1184 - 1187、1995.
- 1 9) 西沢仁志、喜多容子、西 起史 : アルゴンレーザー虹彩切開術後、水疱性角膜症をきたした1症例. *眼臨* 90 : 1168 - 1170、1996.
- 2 0) Hong C, Kitazawa Y, Tanishima T : Influence of argon laser treatment on corneal endothelium. *Jpn J Ophthalmol* 27:567-574, 1983.
- 2 1) Wheeler CB : Temperature distribution in the anterior segment resulting from laser iridotomy. *Adv Ophthalmol* 34:153-157, 1977.
- 2 2) vanBest JA, Bollemeijer JG, Sterk CC : Corneal transmission in whole human eyes *Exp Eye Res* 46:765-768, 1988
- 2 3) Kidwell TP, Priebe LA, Welch AJ : The measurement of ocular transmittance and irradiation distribution in argon laser irradiated rabbit eyes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 15:668-671, 1976

- 24) Setälä K : Corneal endothelial density after an attack of acute glaucoma. *Acta Ophthalmol* 57:57, 1004-1013, 1979.
- 25) Olson T : The endothelial cell damage in acute glaucoma. On the corneal thickness response to intraocular pressure. *Acta Ophthalmol* 58:257-266, 1980.
- 26) Bigar F, Witmer R : Corneal endothelial change in primary acute angle closure glaucoma. *Ophthalmology* 89:596-599, 1982.
- 27) 吉永健一、谷村幸三、渡辺義晴 : 眼圧による角膜内皮侵襲に関する研究 その 1 原発閉塞隅角緑内障を中心として. *眼紀* 33 : 997 - 1001、1982.
- 28) Malaise-stals J, Collignon-Brach J, Weekers JF : Corneal endothelial cell density in acute angle-closure glaucoma: *Ophthalmologica* 189:104-109, 1984.
- 29) Markowitz SN, Morin JD : The endothelium in primary angle closure glaucoma. *Am J Ophthalmol* 98:103-104, 1984.
- 30) 安田典子 : 緑内障眼における角膜内皮障害. *日本の眼科* 61 : 541 - 548、1990.
- 31) 目谷千聡、中村昌弘、小原喜隆 : 緑内障眼の角膜内皮障害の検討. *眼紀* - 43 : 306 - 210、1992.
- 32) Brooks AV, Gillic WE : Effect of angle closure glaucoma and surgical intervention on the corneal endothelium. *Cornea* 10:489 - 497, 1991.
- 33) 清水 透、安田典子 : 急性原発閉塞隅角緑内障における角膜内皮障害. *眼臨* 84 : 494 - 496、1990.
- 34) Schultz RO, Matsuda M, Yee RW, Edelhauser HF, Schultz KJ : Endothelial changes in the type I and type II diabetes mellitus. *Am J Ophthalmol* 98:401-409, 1984.

- 35) 秋谷忍：角膜変性症－最近の知見－. 三島濟一、塚原勇、植村恭夫（編）MOOK
15 角膜. 金原出版、東京、65-74、1981.
- 36) Pitts JF, Jay JL : The association of Fuchs' corneal endothelial dystrophy
with axial hypermetropia, shallow anterior chamber, and angle closure
glaucoma. Br J Ophthalmol 74:601-609, 1990.
- 37) Loewenstein A, Geyer O, Hourvitz C et Lazar M: The association of Fuchs'
corneal endothelial dystrophy with angle closure glaucoma. Br J
Ophthalmol 75:510, 1991.

図1：右眼角膜スペキュラーマイクロスコープ写真。

図2：左眼角膜のスペキュラーマイクロスコープ写真。

両眼特に左眼に著明に細胞の拡大、大きさの不同、形状と配列の乱れを認める。
左眼には六角形細胞以外の形状の細胞も出現している。左眼の写真は角膜浮腫のため、不鮮明である。

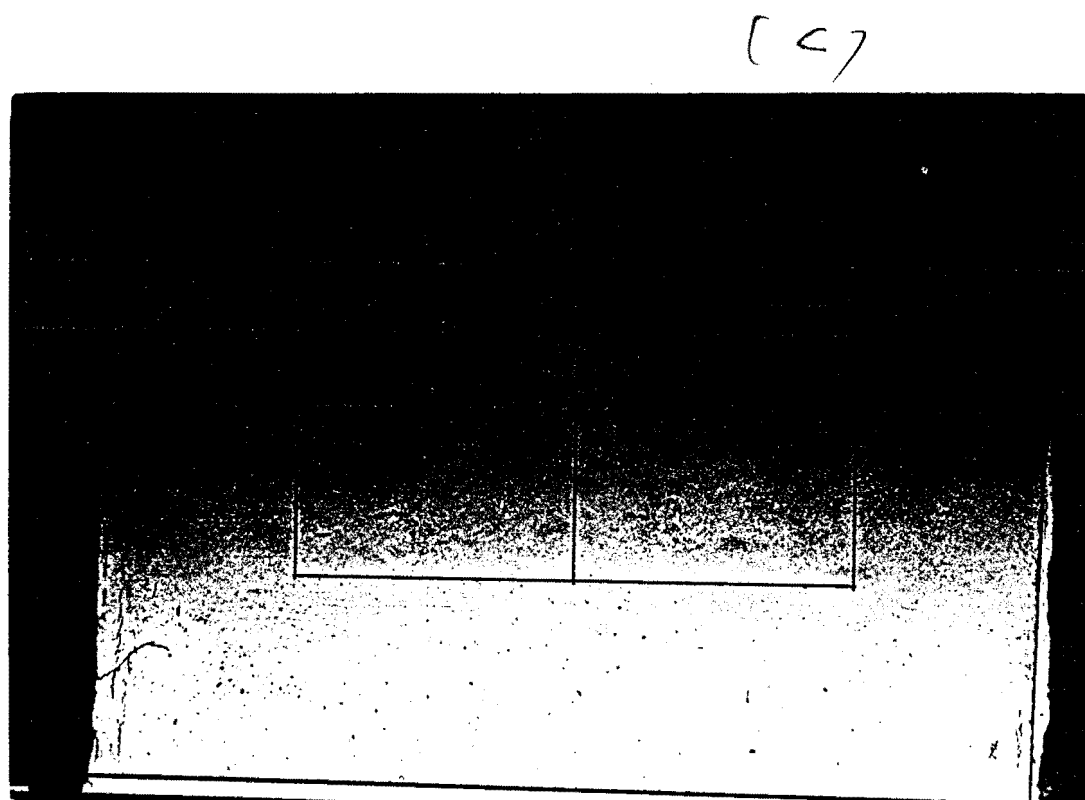
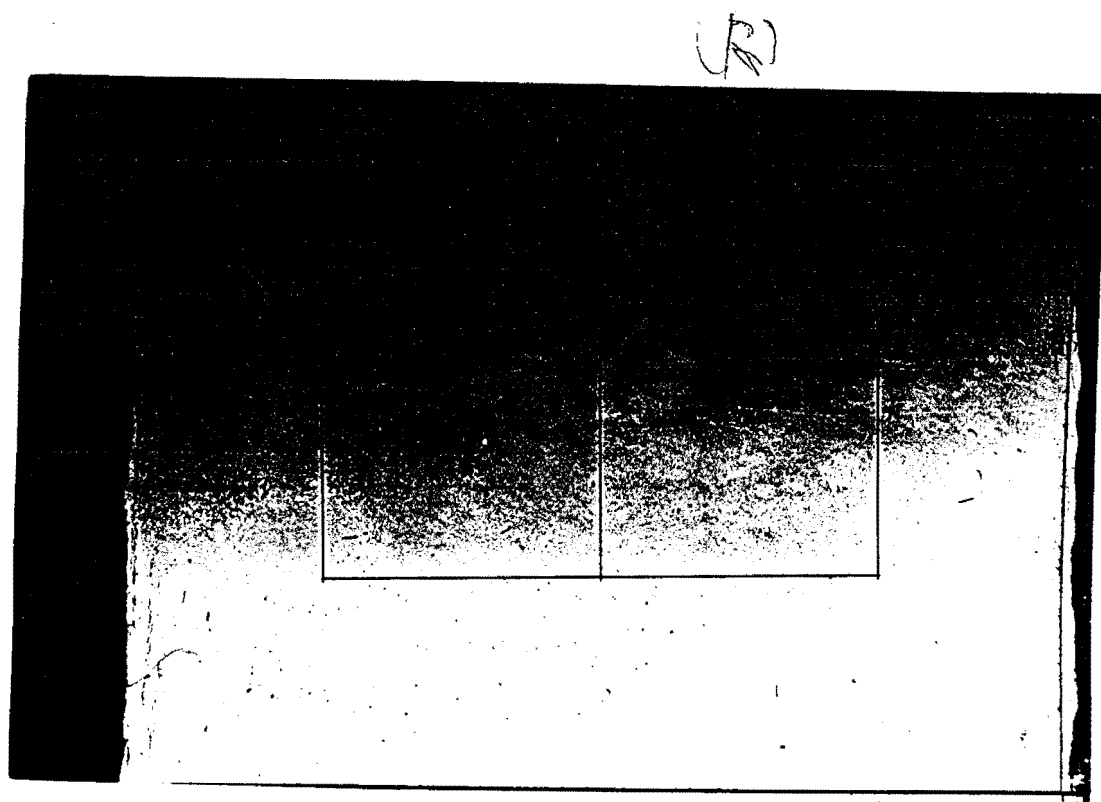


図3：母角膜細切模式図。

斜線の部分はレーザー照射時の外力が直接加わったと思われる部位を示す。

==== パラフィン包埋標本の断面、———— エポキシ包埋標本の断面を示す。

陳. 呂. 澤. 沖. 坂. 水

図3

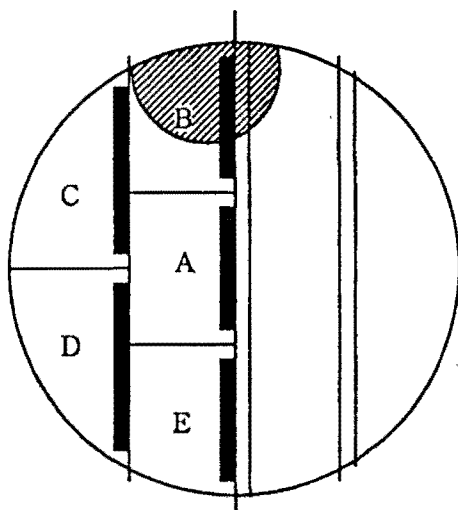


図4： 切片Aの組織病理像

- A. アズールⅡ染色光顕組織像。上皮細胞層、ボウマン膜、実質には著変を認めない。古いデスメ膜の内側に染色性の薄い新しいデスメ膜（矢印）が形成され、一部内皮側に結節状に突出している。内皮細胞は線維芽細胞様になっている（x300）。
- B. デスメ膜、内皮細胞の電顕組織像。古いデスメ膜（DM）と内皮細胞（En）との間に膠原線維束が疎に不規則に配列している新しいデスメ膜（*）がある。内皮細胞の細胞内小器官には異常を認めない（x19200）。

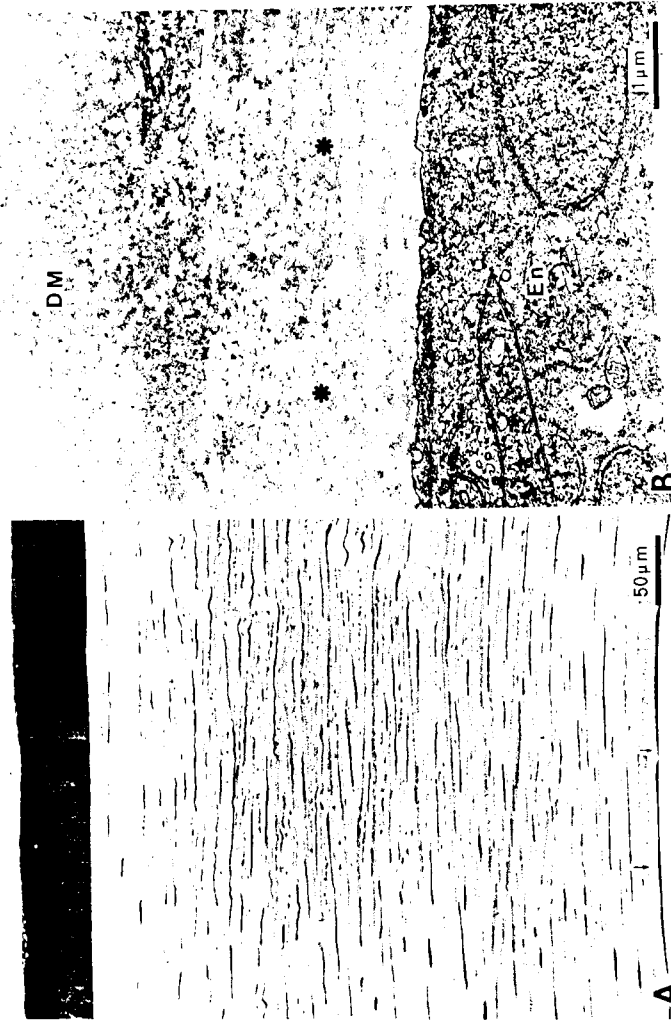


図 5 : 切片 B の組織病理像

- A. アズールⅡ染色光顕組織像。上皮細胞層は菲薄化し、一部ボウマン膜から剥離している。実質薄葉は乱れ、実質細胞は減少している。古いデスメ膜の内側に染色性の薄い新しいデスメ膜（*）が形成されている。内皮細胞は著しく菲薄化している（x 300）。
- B. デスメ膜、内皮細胞の電顕組織像。古いデスメ膜（DM）と内皮細胞（En）との間に電子密度の低い新しいデスメ膜（**）と高い新しいデスメ膜（*）が形成されている（x 4800）。
- C. 電子密度の低い新しいデスメ膜の電顕組織像。古いデスメ膜（DM）の内側にLong spacing banded collagen（太矢印）と膠原線維（細矢印）が疎に不規則に配列している（x 24,000）。
- D. 新しいデスメ膜、内皮細胞の電顕組織像。膠原線維束が不規則に配列している新しいデスメ膜（*）の内側の内皮細胞（En）の細胞内小器官が不明瞭になっている。隣接する内皮細胞の細胞内小器官は残っている（x 14,400）。
- E. 新しいデスメ膜、内皮細胞の電顕組織像。電子密度の低いデスメ膜（**）高いデスメ膜（*）の内側の内皮細胞（En）は一部残っているが、脱落しデスメ膜が露出しているところもある（x 9,600）。

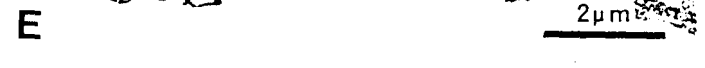
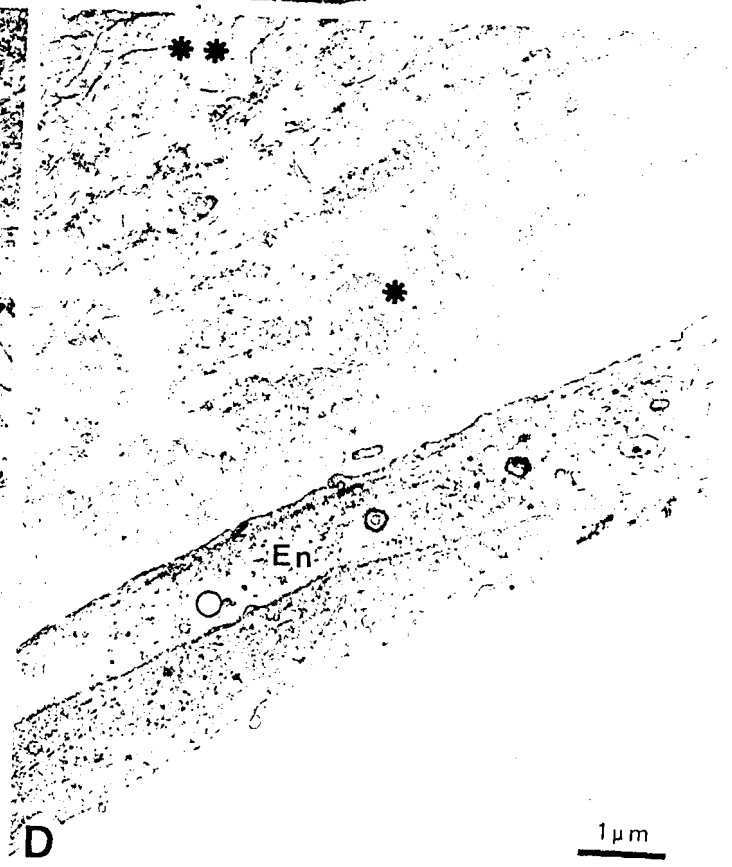
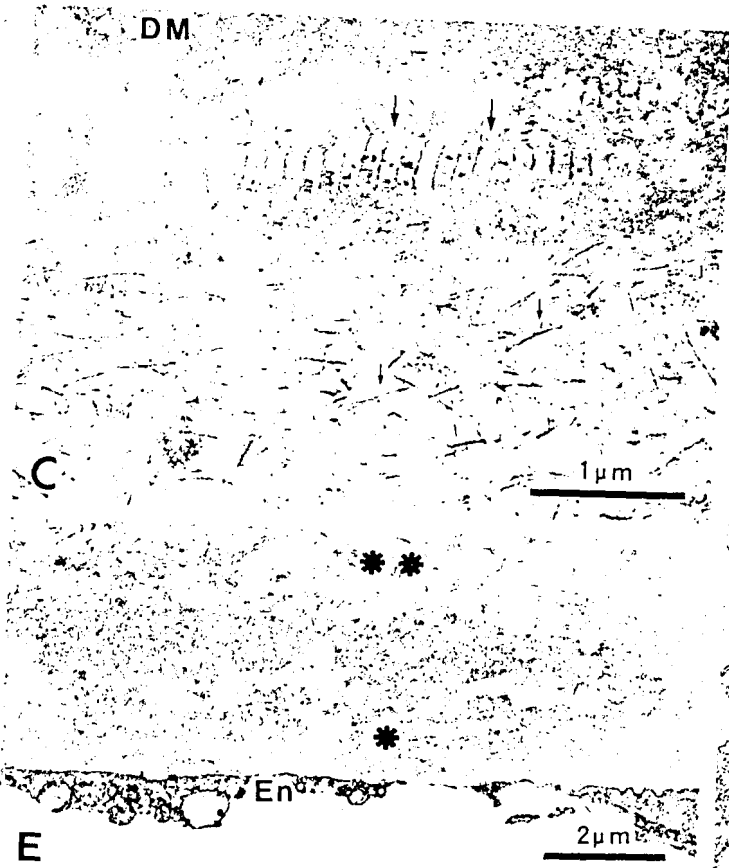
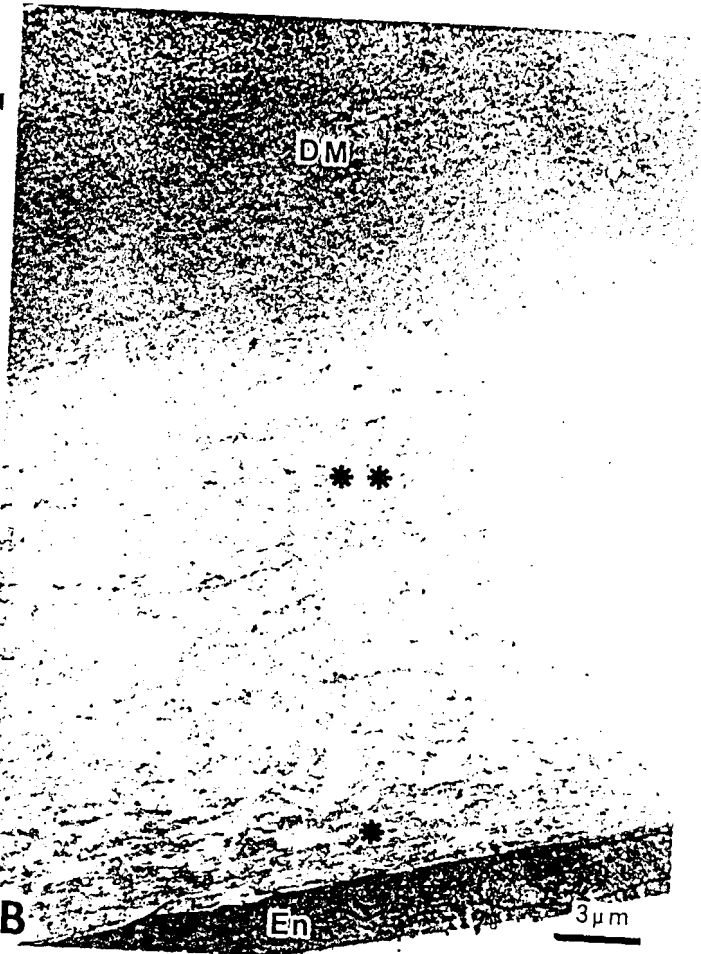


表 1 : 文献に見られたAL T後の水疱性角膜症の症例

著者	患者 ナンバー	年齢性別	眼	レーザー エネルギー	発症までの 期間	角膜脆弱性 の有無
Swartz AL, Martin NF, Weber PA ¹⁰⁾ :	1)	63 F	RE	46.0J	5年2月	糖尿病
	2)	74 F	LE	62.4J	4年	糖尿病フックス
	2)	74 F	RE	7.3J	8月	糖尿病フックス
	3)	80 F	LE	2.5J	10月	
	3)	80 F	RE	2.92J	9月	
Zabel RW, Mac Donald LM, Mintsiouslis G ¹¹⁾ :	4)	不詳	RE	101.0J	7月	緑内障発作
	5)	不詳	LE	25.8J	7年	
	6)	不詳	RE	72.3J	1年11月	滴状角膜
	6)	不詳	LE	45.2J	2年5月	滴状角膜
	7)	不詳	LE	5.6J	3年3月	
	8)	59 F	RE	63J	直後	緑内障発作
	9)	57 F	RE	48.5J	5年	糖尿病緑内障発作滴状角膜
Wilhelmus, KR ¹²⁾ :	10)	62 F	LE	3.5J	2年	緑内障発作発作
	11)	67 F	1E	24 ~ 281J	直後)	
	12)	68 F	LE	16.6~83J		糖尿病 滴状角膜
	13)	48 F	LE	18.86J	7月	糖尿病緑内障発作
	13)	48 F	RE	10.85J	6月	糖尿病
湯口、長坂 ¹⁴⁾ :						
清田、桜木 ¹⁵⁾ :	14)	64 F	LE	14.04J	7年2月	
細谷、大橋、大黒、桑山、木下 ¹⁷⁾ :	15)	72 F	RE	19.24J	1年11月	滴状角膜
	15)	72 F	LE	44.4J	1年5月	
	16)	70 F	RE	44.4J	9月	緑内障発作
	16)	70 F	LE	144J	1年9月	
	17)	69 F	LE	20J	2年 1月	緑内障発作
梶原、早川、山川、長瀬 ¹⁶⁾ :	18)	69 F	RE	8.2J	5年9月	糖尿病
合田、井尾 松田、田川 ¹⁸⁾ :	19)	75 F	RE	9.86J	2年5月	緑内障発作
	20)	77 F	LE	16.5J	1年	
	20)	77 F	RE	10.16J	2年11月	
	21)	58 F	RE	不詳	6年	滴状角膜緑内障発作
西沢、喜多、西 ¹⁹⁾ :	22)	66 F	LE	52.3J	5月	
陳、百瀬、沖坂、水川 :	23)	60 F	LE	4.75J	2月	

注: YAGレーザーも総エネルギー量に加えた。総エネルギー量としての記載のない報告は著者らが算出した。記載のない項目は不詳とした。ALIを2回以上行った症例はエネルギー量を合計した。

水疱性角膜症はレーザー照射部位の角膜に浮腫が出現したことをもって発症とした。

日本財団補助金による

1997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

平成10年 3 月 31 日

I. 招へい責任者 関 根 一 郎



所属機関 長崎大学医学部原爆後障害医療研究施設 職名 教授

所在地 〒852-8523 長崎市坂本1丁目12番4号 電話 095-849-7105

招へい研究者氏名 温 春 陽

所属機関 長崎大学医学部原爆後障害医療研究施設

職 名 長崎大学外国人客員研究員

研 究 テ ー マ 実験的放射線腸炎の病理組織学的研究

II. 日本滞在日程

1996年10月21日 来日。長崎大学原爆後障害医療研究施設にて見学生として研修。

1997年4月1日 外国人客員研究員。原爆後障害医療研究施設にて研究。

日中医学協会より中国人研究者・医療技術者招聘助成を受ける。

1998年2月20日 長崎大学大学院研究科を受験、合格。

(別紙)

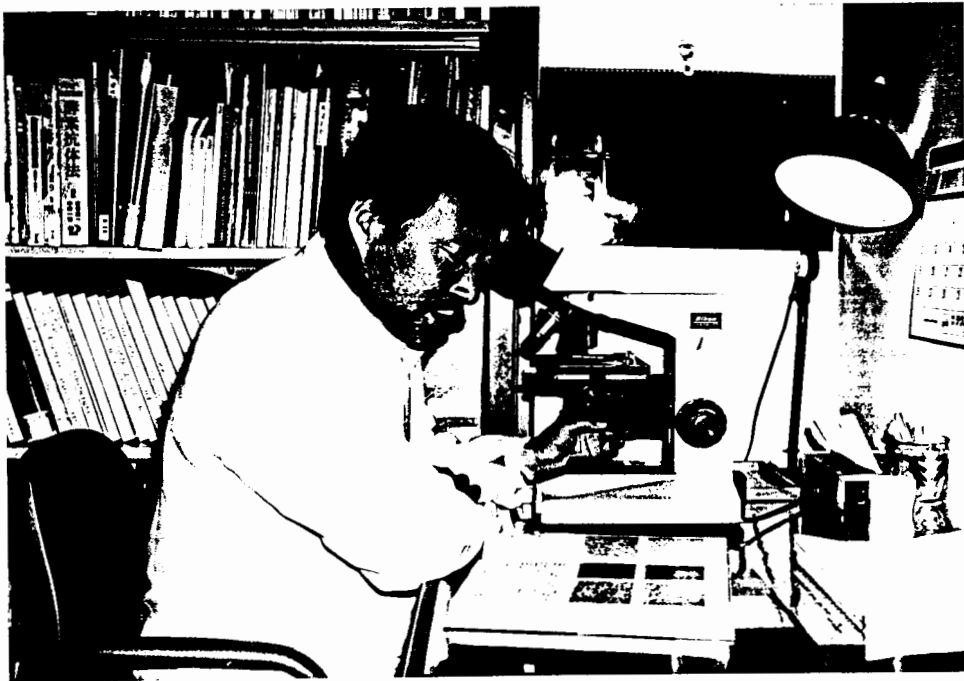
1997年4月より研究活動を開始しました。日本語が不十分な点を補うために、長崎大学内に開講されている日本語講座に時間が許す限り参加、日本語の力を付けることに努力しました。結果、日本語力はかなり上達し、病理学の学習・理解が可能となり、また種々の実習における説明の理解も充分で意見交換にも参加できるようになりました。

病理学の基本力を養うために、日本語の病理学総論の教科書を用いて、病理学総論：細胞組織障害、修復、循環障害、炎症、腫瘍、免疫などについて学習しました。さらに、病理学各論の教科書をもって各臓器組織の特有の疾病の病理学的変化、特に各臓器に発生する腫瘍病変の特徴を理解し、同時に組織標本を用いての病理組織学の実習を行い、実際に病理組織診断ができるようになりました。特に私共の教室の専門領域であります消化器、消化管の病理については、かなり深いレベルまで理解、修得しました。

日常の病理検査室の業務であります生検、あるいは手術材料の病理診断学の実習を連日行いました。また、病理学の最も基本的な手技である病理標本作製法について病理標本作製室で実習を行いました。すなわち、手術摘出された標本の肉眼所見会に参加し、肉眼による観察・診断の方法を修得し、手術材料より標本切出し、脱水系列、包埋、薄切、染色と云う過程を実際に行い、標本作成の手技とその理論を修得しました。さらに、免疫染色と云った特殊な染色の手技についても、その実際と理論を修得しました。

動物実験手技についても医学部附属動物実験施設での講習会に参加、利用者としての資格を取得しました。また動物実験の基本的なトレーニングを受け、ラットの取り扱い、麻酔法、そしてラットの解剖、さらには組織標本作成法についての実習を行いました。

トレーニングが終了した9月頃より、実験と実験助手を担当するようになりました。即ち、教室の主研究テーマのひとつである「実験的放射線腸炎についての研究」に着手いたしました。既発表の論文から実験内容を検討し、実験計画書を作製し、実験準備を行い、実験に着手しました。そのために、まず学内で開催されています「放射線従事者講習会」に参加、利用者許可証を取得しました。実験自体はX線発生装置を用いて放射線をラットに全身照射、経時的に標本を摘出し、病理標本を作製・観察するものでした。この半年間に行った実験とその結果の概要は下記の通りです。



研究中の温春陽先生

低線量放射線による腸管アポトーシス—自律神経機能異常ラットを用いて—
実験担当者：

温 春陽、関根一郎、伊東正博、七條和子、松鶴睦美、中村恭子

[研究目的]

放射線照射後、全身に見られる倦怠感、無気力、食欲不振、嘔気等は放射線宿酔 (radiation sickness) と呼ばれており、放射線被曝者に大きな苦痛を与える。原因には細胞障害説、免疫機能障害説など種々想定されているが、確立したものはない。その一つとしてこれら症状が交感神経・副交感神経に関係していることより、放射線照射による自律神経機能失調すなわち機能障害やアンバランスといったものが考えられている。一方、広島・長崎の原爆被曝者あるいは、主に悪性腫瘍の治療としての医療用放射線照射後みられる、放射線宿酔や放射線障害の発現の程度には個人差 (個体差) があるように思えるが、個体差の原因や機構は明らかでない。われわれは1968年京都大学で確立され、人の高血圧症に最も近い遺伝的高血圧モデルとして、高血圧実験領域で世界中で頻用されている高血圧自然発症ラット (Spontaneously Hypertensive Rats : SHR) が自律神経異常、特に交感神経系が亢進していることに注目し、SHRと対照の京都系ウイスターラット (WKY) を用いて自律神経とその機能に関する種々の実験を行ってきた。例えば、数時間のストレスにより、胃粘膜には出血性胃潰瘍 (ストレス潰瘍) が惹起される。ストレス潰瘍の発生には副交感神経が大きく作用するが、交感神経は副交感神経作用を抑えることで、ストレス潰瘍発生には抑制的に働き、結果、交感神経の亢進したSHRにはストレス潰瘍は発生しにくい。これまでわれわれが行ってきたSHRとWKYを用いた放射線と自律神経の関係の研究の結果としては、X線全身照射後見られる食思不振や下痢の結果生じる体重減少が、WKYに比してSHRに高度であること、WKYは全身照射7.0Gyで初めて死亡するものが出るが、SHRは6.0Gy全身照射で死亡が始まるなど、SHRの放射線感受性が高いことや、SHRは全身X線照射後数時間で見られる血圧低下やその後の回復と云った血圧の変動や、組織内 (小腸、結腸) の交感神経機能の指標としてのカテコールアミン含有量の変動が大きく放射線照射により交感神経機能がSHRで大きく作動すること、さらに小腸、大腸などに見られる放射線組織障害がSHRの方がWKYより強いことなどを明らかにしてきた。さらに放射線照射後、最も早期かつ、顕著に組織内にみられる現象としてのアポトーシスがある。アポトーシスは細胞死の一種で細胞自殺とも云われ、放射線照射では分裂・増殖しつつある細胞が被曝することにより増殖・分裂を停止し死滅していく現象と捉えられている。最近のわれわれの研究により胸腺、脾臓、小腸といった放射線に感受性の高い臓器においてアポトーシスの出現がSHRで高度であることを明らかになった。今回の実験では、これまで放射線障害の研究の対象であった高線量と異なり、低線量照射による小腸のアポトーシス出現数のSHR, WKY間での差異や、そのアポトーシス出現に対する交感神経の役割について検討を行った。

[実験方法]

6週令雄性SHR-Izm, WKY-Izmに0.75、0.50、0.25GyのX線単回全身照射を行った。放射線照射後小腸腺窩に最もアポトーシスが出現する2時間後、空腸を摘出し中性ホルマリン固定、型通りに顕微鏡標本を作成し、組織学的に腺窩内のアポトーシスの数を算出した。次いで、交感神経遮断薬であるreserpin 5mg/kgを腹腔内に投与し、1時間後、tail-cuff法にて血圧を測定し、交感神経抑制効果を血圧の低下で確かめた上で、放射線全身照射を行い、同様にアポトーシス数の検索を行った。

[実験結果]

今回照射した最も低線量である0.25Gy照射でSHR, WKY両方の腺窩に、その数は少なかったが、アポトーシスを認めた。0.5、0.75Gyと線量依存性にアポトーシス数は増加し、いずれの線量においてもSHRでは有意にWKYより多かった (図1.)。

reserpin 投与後、1 時間で SHR、WKY とともに最高血圧、平均血圧の低下を認めた。SHR、WKY とともに 0.5Gy、1.0Gy、2.0Gy でアポトーシスの数は増加したが、reserpin 投与群ではいずれの線量でもアポトーシスの数は減少し、その減少は SHR で高度であった (図 2.)。

[考案]

これまで広島・長崎の原爆被爆者の放射線障害の研究は、高線量被曝者に対するものが多かった。結果高線量被曝者に種々の発癌が多いことが明らかとなり、放射線障害の最も恐るべきものとして発癌が大きく認識されるようになった。しかるに原爆後 50 余年が過ぎ、被爆者の絶対数が減少する中で、低線量被曝者の検討が最近注目されるようになった。また、基礎的放射線障害の研究も、障害の強い高線量領域の研究が多く、低線量放射線による生体・細胞応答に関するものは少なかった。最近、低線量に対する生物応答が着目され始め、種々の観点から低線量放射線に関する研究報告がなされ初めている。

アポトーシスと云う現象は旧くから細胞死の一種として知られていたが、最近、アポトーシスが個体発生に重要な役割を果たしていることが明らかとなったこと、生体内での細胞死でアポトーシスは当初思われていたものより、はるかにしばしば生じていることが解明されてきたこと、免疫系を構成している細胞の分化・機能獲得の場でアポトーシスが重要であること、さらに放射線による細胞・組織障害の重要にして最初に起こる現象がアポトーシスであること、などにより、アポトーシス研究は現代医学・生物学研究の最も注目されているテーマとなってきた。われわれも放射線によるアポトーシスに着目し、SHR、WKY を用いて、小腸、胸腺、脾臓、骨髄といった放射線高感受性臓器におけるアポトーシスの出現を 6.0~7.5 Gy と云う、比較的高線量で検討したことがあるが、SHR は WKY に比して、これらの臓器全てで強いアポトーシスの出現を観察した。

小腸粘膜上皮の life span は僅か 2~3 日とされ、腺窩で新生された上皮細胞は分化し吸収作用を行いつつ、エスカレーター様に絨毛先端にたどり着き脱落する。このため腺窩では、常時幹細胞の分裂像が観察され、細胞を補充している。小腸幹細胞の細胞分裂・増殖能は高く、リンパ球の一部と同様に最も放射線感受性の高い細胞とされる。

今回、低線量によるアポトーシス出現について、小腸粘膜を用いての研究を行った。結果、SHR、WKY 両ラットで 0.25Gy と云う低線量で 2 時間後、アポトーシスが空腸粘膜腺窩に観察されることが明らかとなり、両 strain とともに低線量によるアポトーシス研究に有用であることが分かった。さらに SHR は低線量でも WKY よりも多くのアポトーシスを小腸腺窩で呈することより、SHR、WKY 間のアポトーシスの出現数の差異の原因は、高線量と同じであることが示唆された。さらに、交感神経抑制剤である reserpin 投与でアポトーシス出現数が減少したことより、交感神経は低線量領域でのアポトーシス出現を誘導もしくは亢進させている可能性が示唆された。今後、交感神経のみならず、副交感神経の腸管アポトーシスへの影響も検討したい。

Apoptotic index in the jejunum 2hrs. after irradiation

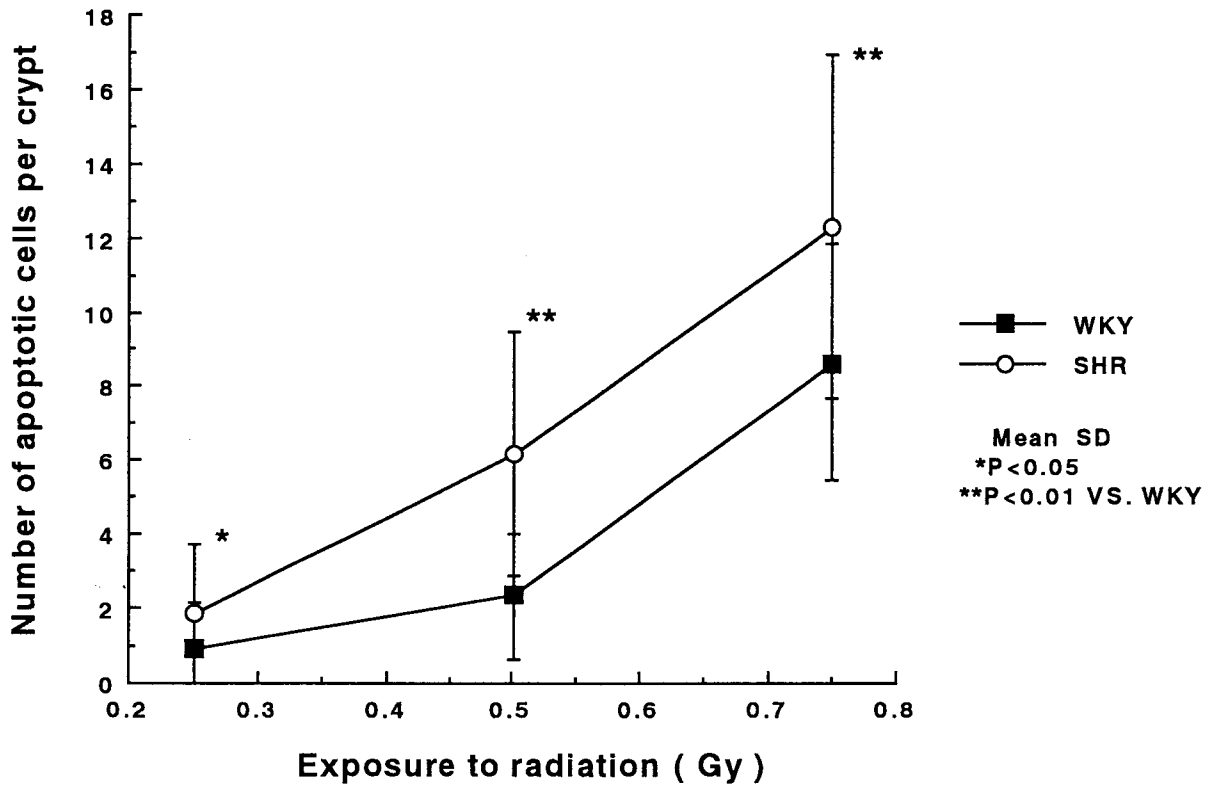
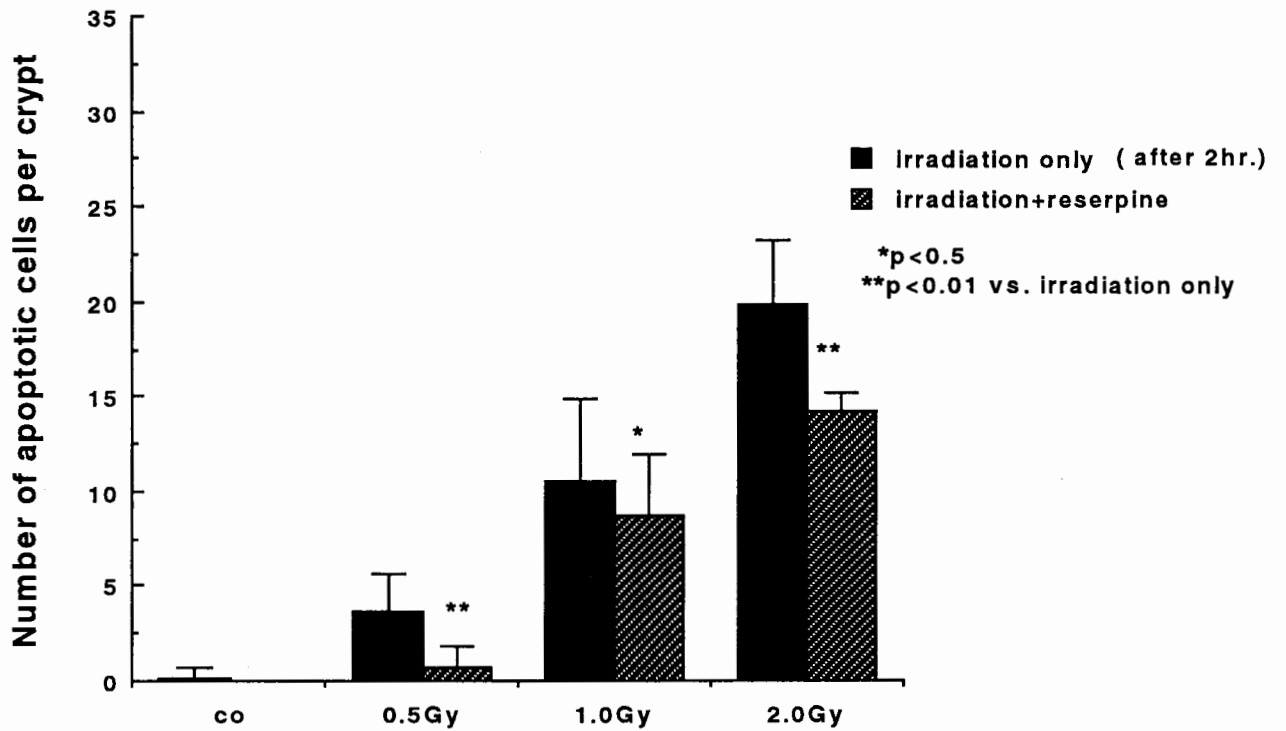
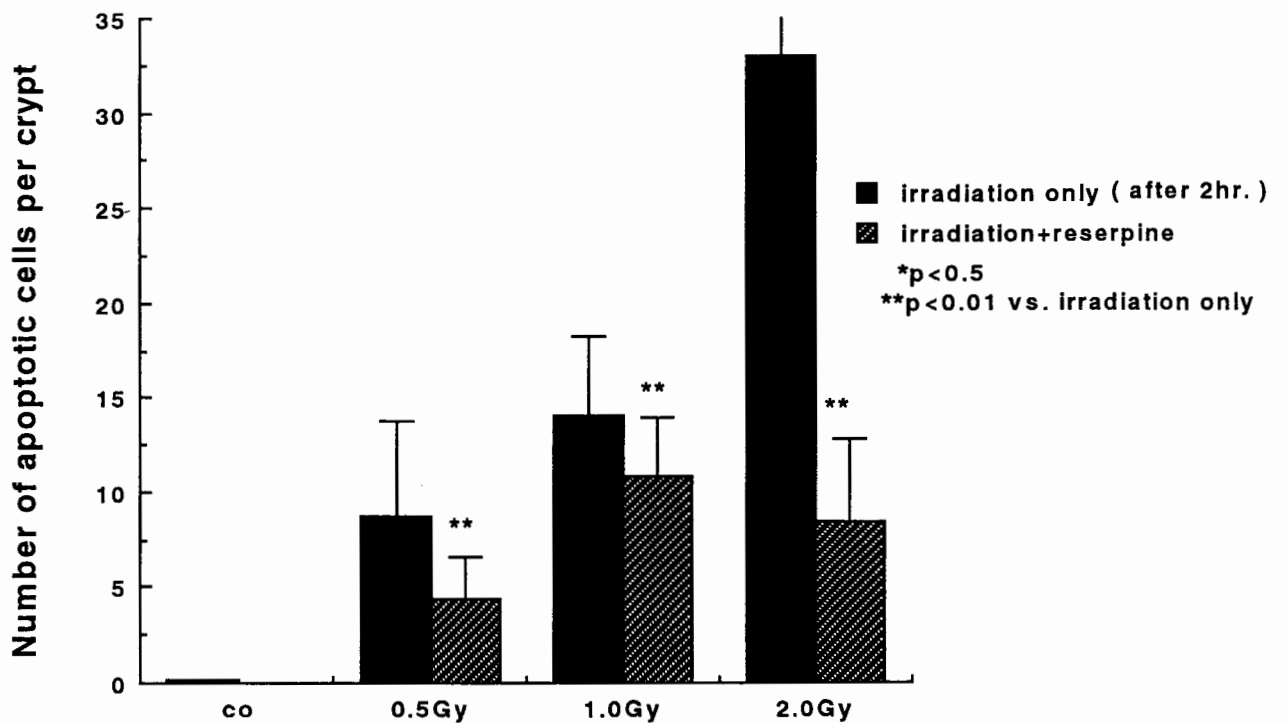


图 2

Apoptotic index in jejunum of WKY after injection of reserpine



Apoptotic index in jejunum of SHR after injection of reserpine



日本財団補助金による


1997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12月9日

I. 招へい責任者 百瀬 皓 

所属機関 財団法人 臨床眼科研究所 職名 理事長 所長

所在地 群馬県桐生市梅田町1丁目100番地 電話 0277-32-1010

招へい研究者氏名 陳 栄 家

所属機関 上海医科大学眼耳鼻喉科医院眼科

職 名 副 教 授

研 究 テ ー マ 臨床眼科学

- II. 日本滞在日程
- 6月： 6月1日東京/成田国際空港より入国
 6月2日より臨床眼科研究所で毎日手術見学、角膜移植に際して得られた病理組織標本の観察
 6月19日横浜市深作眼科で手術見学
 6月20日～22日第36回日本白内障学会第12回日本眼内レンズ屈折手術学会合同学会参加
 6月26日～28日オリンピア眼科クリニックに井上洋一先生を訪問緑内障に関して意見を交換する
 引き続き臨床眼科研究所で手術見学並びに病理組織標本の観察
 - 7月： 上旬論文“予防的レーザー虹彩切開術後の水疱性角膜症の病理組織学的観察”の執筆に着手、文献收拾を行う
 7月8日防衛医科大学校眼科学教室沖坂重邦教授を訪問、論文執筆の指導を受ける
 中旬手術見学、病理標本の観察、文献の收拾
 7月20日恩師慈恵医科大学名誉教授舟橋知也先生を訪問
 7月21日～24日神戸海星病院院長山中昭夫先生を訪問手術見学並びに医療の実際を見学
 - 8月： 手術見学、角膜切除標本の所見のまとめ(550例)。文献の整理
 中旬論文執筆と文献の整理
 下旬論文ほぼ完成。臨床眼科研究所百瀬皓理事長所長と今後の共同研究の打合せ
 - 8月31日東京/成田空港より帰国

論文は防衛医科大学校眼科学教室沖坂重邦教授にご協力頂き、さらに内容を点検して、1～2ヶ月以内に日本眼科学会雑誌に投稿の予定である

Ⅲ. 研究報告 (4000字以上で記入して下さい 別紙可)

研究報告

上海医科大学眼耳鼻咽喉科医院眼科陳栄家副教授は1997年6月1日より8月31日までの3ヶ月間、財団法人臨床眼科研究所に滞在し、以下の項目に就いて研究研修をおこなった。

1) 眼科手術の見学。滞在中毎日手術室で、小切開白内障嚢外摘出術+眼内レンズ移植術。角膜移植術、放射状角膜切開術、角膜乱視矯正切開術、高度近視に対する後部強膜保護術と透明水晶体摘出術、糖尿病性増殖性網膜症に対する硝子体手術、緑内障手術などの眼科手術の最新の術式を見学し、また前房内麻酔の実際を多数例見学して習得した。また日程表にあるように、神戸海星病院の山中昭夫先生を訪ね、網膜硝子体手術も見学した。また臨床眼科研究所のビデオライブラリーで多数のビデオフィルムをみて、異なる術者の各種の術式についての理解を深めた。また研究所外来で術前術後の患者の臨床検査と診察を見学した。

2) 病理組織標本の観察。陳栄家副教授は今日まで眼科腫瘍病理を専攻してきたが、臨床眼科研究所が保有する約550症例の病理組織標本(大部分は角膜移植に際して切除した角膜組織)を観察し、眼科臨床病理の理解を深めた。

3) 予防的レーザー虹彩切開術後の水疱性角膜症の組織病理学的観察。偶然にも陳栄家副教授が来日する前日に、臨床眼科研究所でアルゴンレーザー虹彩切開術の後に発症した水疱性角膜症に対して、全層角膜移植を行い角膜切片を得ることが出来た。アルゴンレーザー虹彩切開術後の水疱性角膜症は前房レンズ移植に起因する水疱性角膜症に比して、虹彩切開より角膜症発生までの期間がはるかに短く、前房レンズ移植による水疱性角膜症とは発生の機序が異なるかも知れないと考えられる。しかしわが国では角膜移植のが行われる機会が少なく、したがって本症例の病理組織に関する報告は未だなく、また欧米でも数件の報告があるに過ぎない。以上の理由により、このアルゴンレーザー虹彩切開術後の水疱性角膜症の組織病理学的観察を、眼病理を専攻している陳栄家副教授の研究課題に加えた。この研究には防衛医科大学校眼科学教室沖坂重邦教授の多大なる御指導、御協力を頂いた。この研究は論文として日本眼科学会雑誌に投稿の予定である。この論文の要旨は別紙に添付する如くである。

4) 今後の共同研究

財団法人臨床眼科研究所理事長・所長百瀬皓と上海医科大学眼耳鼻咽喉科医院副教授陳栄家は、現在眼科医療の課題になっているドライアイの問題を研究するため、“涙液分泌減少症の病理学的研究”を共同研究することに合意し、合意書を取り交わした。また同副教授はこの共同研究のための、予備知識と資料をもって帰国した。

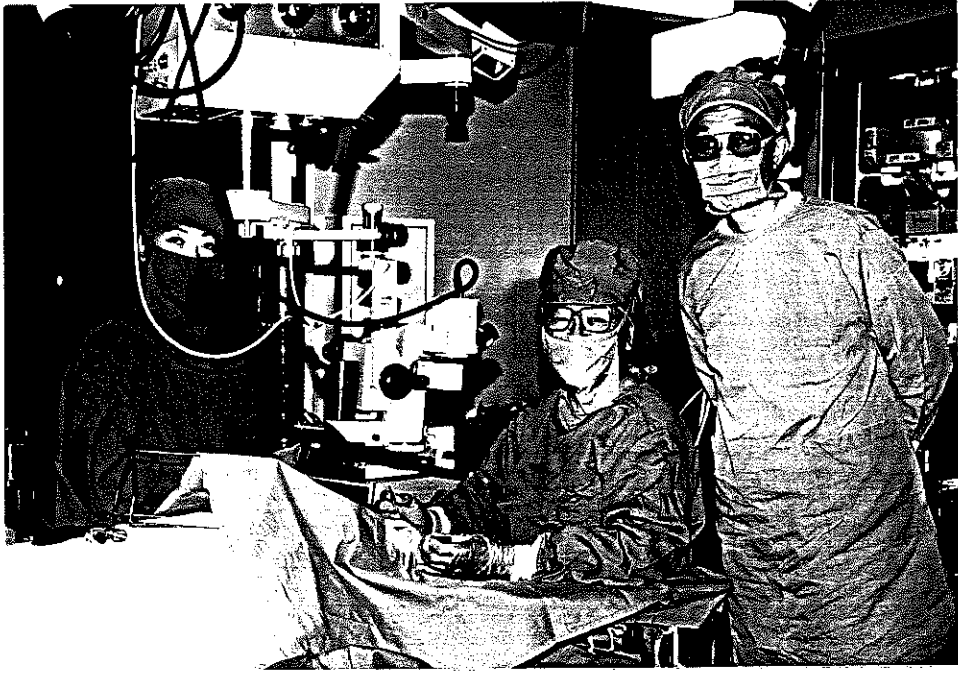
注記：陳栄家副教授は来年初頭に教授審査を受けることになっており、財団法人日中医学協会の助成で財団法人臨床眼科研究所で3ヶ月研修したことも、教授審査で考慮されるでしょう。

Ⅳ. 助成金の使途内訳

助成金額 50万 円

交通費 20万 円 宿泊費 10万 円 食費 10万 円

雑費 10万 円 他 0 円



陳榮家（右）百瀨（中央）

論文標題：レーザー虹彩切開術後の水疱性角膜症の組織病理学的観察

簡略標題：レーザー虹彩切開後の水疱性角膜症の病理組織

著者名：陳榮家¹⁾、百瀬 皓²⁾、沖坂重邦³⁾、水川淳³⁾、

所属名：¹⁾上海医科大学眼耳鼻喉科医院

²⁾財団法人臨床眼科研究所

³⁾防衛医科大学校眼科学教室

英文論文標題：Histopathological Observation on Bullous Keratopathy
after Argon-laser Iridotomy

英文著者名：Ron-Jia Chen¹⁾、Akira Momose²⁾、Shigekuni Okisaka³⁾
Atsushi Mizukawa³⁾、

英文所属名：1)Eye and Ear Nose Throat Hospital of Shanghai Medical
University

2)Institute of Clinical Ophthalmology

3)Department of Ophthalmology, National Defense Medical
College

別刷請求先：☎ 3 7 6 - 0 6 0 1

群馬県桐生市梅田町1-100

(財)臨床眼科研究所

百瀬 皓

別刷請求先の英文：Akira Momose, MD, FICS

Institute of Clinical Ophthalmology

1-100 Umeda, Kiryu, Gunma, Japan 376-0601

著者校正宛先：☎ 3 7 6 - 0 6 0 1

群馬県桐生市梅田町1-100

(財)臨床眼科研究所

百瀬 皓

☎ 0 2 7 7 - 3 2 - 1 0 1 0

FAX 0 2 7 7 - 3 2 - 2 2 1 6

有料別刷希望部数 []

要約：60歳女性。両眼の白内障を伴う狭隅角眼のため、両眼にアルゴンレーザー虹彩切開術を受け、その後約2ヶ月経過して左眼の視朦を感じ、左眼の水疱性角膜症の診断を受け、アルゴンレーザー虹彩切除術後1年2ヶ月経過して全層角膜移植術が施行された。摘出角膜は2.5%ホルマリン・1.0%グルタールアルデヒド混合液で固定し、光学顕微鏡と電子顕微鏡で観察した。虹彩切開部に隣接する角膜内皮は基底膜様物質をデスメ膜の内側に産生している。その後レーザー障害を強く受けた内皮は細胞内小器官・細胞膜を消失し脱落する。周囲の健全な内皮は基底膜様物質を産生しながらデスメ膜露出部をおおうようにレーザー障害部に向かって遊走するものと考えられる。内皮の変性につれてレーザー障害部には、実質浮腫、実質細胞減少、ボウマン膜断列・消失、上皮浮腫、上皮結合組織増生、上皮剥離が生じてくると考えられる。

キーワード：アルゴンレーザー虹彩切開術、水疱性角膜症、全層角膜移植術
組織病理学、角膜内皮細胞

Abstract : We report histopathological findings of a case of bullous keratopathy developed about two months in the left eye after bilateral argon-laser iridotomy (ALI) for narrow angle of the eyes. The patient was a 60 year-old female underwent penetrating keratoplasty after 1 year and 2 months of ALI. The corneal specimen was fixed with 2.5% Formalin and 1.0% glutaraldehyde mixture, and examined under the light and electron microscopes. Laser damaged endothelium produced large amount of basement membrane like material beneath Descemet's membrane. As the next stage, severely damaged endothelium loses organelle and cell membrane. Surrounding healthy endothelium may migrate into the damaged area and produces small amount of basement membrane like material beneath Descemet's membrane. After that, stromal swelling, decrease of keratocytes, break and disappearance of Bowman's membrane, epithelial edema, connective tissue accumulation beneath basal cells and epithelial detachment may occur at the laser damaged area.

Keywords : Argon-laser Iridotomy, Bullous Keratopathy, Penetrating Keratoplasty, Histopathology, Corneal Endothelial Cells

I : 緒言

レーザー虹彩切開術の適応は、瞳孔ブロックによる閉塞隅角緑内障と、現在眼圧は正常でも将来瞳孔ブロックにより眼圧上昇を起こす危険性がある状態である。閉塞隅角緑内障および狭隅角眼に対するアルゴンレーザー虹彩切開術 (ALI) および Q スイッチ Nd : YAG レーザー虹彩切開術は、外来で施行できる簡便さゆえ、一般に副作用も少なく比較的 안전한方法と考えられ^{1) - 9)}、観血的周辺虹彩切除術に代わって、現在広く行われるようになった。レーザー虹彩切開術の合併症として、術後早期には一過性の虹彩炎、眼圧上昇、角膜混濁などを生じ、その他角膜内皮損傷、虹彩切開孔の再閉塞、虹彩後癒着がある。しかし最近 ALI 後数年経過してから水疱性角膜症や角膜内皮代償不全を起こした報告が現れてきた^{10) - 19)}。このうち日本に於ける報告は、筆者等が調べた範囲内では 1 例を除きすべて臨床的観察の報告で、この 1 例も角膜移植が行われたとの報告のみで¹⁹⁾、摘出角膜の組織病理像の報告は認められなかった。欧米でも角膜移植を行いその摘出角膜片の組織病理学的観察^{9) 10)}の報告は限られている。今回筆者等は、ALI 後に生じた水疱性角膜症に対して全層角膜移植を行い、摘出した角膜片の組織病理像に就き詳細な報告を行う。

II : 症例

症例：60 歳、女性、職業：小児科医

初診：1996 年 5 月 14 日

主訴：左眼の視力障害

現病歴：1995 年 2 月下旬某病院の人間ドックを受診し、両眼の白内障と狭隅角を指摘され、同年 3 月 16 日同病院眼科で左眼の ALI の施行を受けた。使用した機種は Argon All (Blue/Green) (NIDEK 社, ADC-8000) で、左眼の照射条件は Abraham Lens を用いて照射径 50 μ m、出力 1.0W、照射時間 0.05 秒、95 発 (総エネルギー量 4.75 J) であった。また同年 3 月 23 日右眼に同じアルゴンレーザーで、Abraham Lens を用いて、照射径 50 μ m、

出力 1.0W, 照射時間 0.05 秒, 78 発 (総エネルギー量 3.9 J) の条件で ALI の施行を受けた。この病院からの連絡によると、術前スペキュラーマイクロスコープ及び角膜の厚みの検査は行われなかった。その後同年 5 月頃より左眼視朦感が出現し 自動車の運転に支障を感じるようになった。右眼は ALI 施行前後に変化はなかった。

初診時眼所見：視力は右眼 0.4 (1.5 x + 1.25 D cyl - 0.75 D Ax 140°, 左眼 0.05 (0.1 x - 2.0 D) であった。レーザー視力は右眼 1.0、左眼 0.63 であった。右角膜は透明で細隙灯顕微鏡で異常を認めなかったが、左角膜は全体に浮腫を認め水疱性角膜症の状態であった。超音波パコメーターで測った角膜中心の厚みは、右眼は 553 μ m、左眼は角膜浮腫のため正確には測定出来なかったが、約 580 μ m であった。スペキュラーマイクロスコープで撮影した角膜内皮細胞は、右眼の細胞密度は 2、150 個/ mm^2 左眼は 1、050 個/ mm^2 であったが、両眼特に左眼では著明に、細胞の拡大、大きさの不同、形状と配列の乱れを認め、左眼には六角形細胞以外の形状の細胞も出現していた (図 1、2)。虹彩には両眼ともに外上方にレーザーによる穿孔が見られた。右眼水晶体には楔状の混濁、左眼水晶体には皮質と後囊下混濁を認めた。眼底は両眼ともに異常を認めなかった。

手術と術後経過：1997年5月31日左眼に全層角膜移植術、白内障囊外摘出術、後房レンズ移植術の Triple Procedure を行った。術後の経過は良好で移植角膜は透明で、11月19日現在眼鏡で矯正して視力 0.7 を得ている。

Ⅲ：組織病理学的観察方法

手術で摘出した角膜は、2.5%ホルマリン・1.0%グルタルアルデヒド混合液 (PH 7.2、0.3M 磷酸緩衝液) に入れたただちに固定した。母角膜は図 3 の如くレーザー照射時の外力が直接加わったと思われる部位を光学顕微鏡および電子顕微鏡で観察の出来るように細切した。光学顕微鏡用標本はアルコール系列で脱水、パラフィン包埋し、5 μ m 切片をヘマトキシリン・エオジン、PAS、マッソン 3 色染色した。電子顕微鏡用標本

はアルコール系列で脱水後、エボン包埋した。先ず1 μ m切片を1%アズールII染色し光学顕微鏡で観察後、更に超切片をウラン鉛二重染色し、透過型電子顕微鏡で観察した。

IV：組織病理学的所見

エボン包埋B切片とパラフィン包埋切片の断端以外のエボン包埋A、C、D、Eとパラフィン包埋の組織病理像はほぼ同一であったので、エボン包埋A、B切片を代表として述べる。

切片A (図4) 上皮の基底細胞の配列は乱れているが、細胞内・外に浮腫を認めない。翼状細胞には異常を認めず、表層細胞の細胞間隙に軽度拡大を認める。ボウマン膜に異常を認めない。実質、薄葉はやや乱れているが、実質細胞の数にも変化はない。古いデスメ膜の内側に、古いデスメ膜より染色性の薄い20~30%の厚さ(内皮細胞とほぼ同じ厚さ)の新しいデスメ膜が形成されている。所々に新しいデスメ膜が滴状角膜様に前房内に突出しているところもある。内皮細胞は線維芽細胞様に引き伸ばされた形を呈している(図4A)。電子顕微鏡で新しいデスメ膜を観察すると、細胞外基質の中に膠原線維束が不規則に疎に配列している。内皮細胞の細胞質中のミトコンドリア、ゴルジ装置、小胞体、リゾソームなどの小器官に異常を認めない(図4B)。

切片B (図5)：上皮の基底細胞の配列は乱れているが、細胞内・外浮腫は認められない。翼状細胞の配列も乱れ、細胞間隙にリンパ球の浸潤しているところがある。表層細胞の細胞間隙に軽度拡大がみられ、一部剥離しかけているものもある。基底細胞とボウマン膜間に滲出液が貯留しているところがある。ボウマン膜にも一部断裂しているところがある。実質薄葉は乱れ、実質の厚さは切片Aの140~170%である。実質細胞は軽度減少している。古いデスメ膜の内側に古いデスメ膜の100~180%の厚さの染色性の薄い新しいデスメ膜が形成されている。古いデスメ膜に隣接する新しいデスメ膜の染色性は薄く、内皮側はその中間の染色性を呈する。内皮細胞は線維芽細胞様の形態を呈し、一部欠損しているところがある(図5A)。

電子顕微鏡で古いデスメ膜に隣接する新しいデスメ膜を観察すると、細胞外基質の中に膠

原線維やlong spacing banded collagenが疎に不規則に配列している（図5 B、C）。内皮細胞に隣接する新しいデスメ膜には膠原線維束が密に不規則に配列している（図5 D、E）。内皮細胞には、細胞内小器官に異常のないもの、細胞内小器官が破壊され細胞質がほぼ一様にみえるもの、細胞膜が破れて細胞質が一部残っているものから、内皮細胞がデスメ膜から脱落しているものまで種々な形態を呈している（図5 B、D、E）。また変性に陥った内皮細胞の前房側に、細胞内小器官に異常のない内皮細胞がおおい互いに接着装置で結合しているところもみられる（図5 D）。

IV：考案

一般的にレーザー虹彩切開術は、照射時に僅かに角膜内皮細胞の損失を伴うが、長期的には内皮細胞には影響を与えないと考えられてきた。また視機能に影響を及ぼすような重篤な合併症はさらに少ないと考えられてきた^{1) - 9)}。しかし最近になって、一部の症例でレーザー虹彩切開部に対応する部位の角膜のみならず、晩期的に角膜内皮全体が代償不全に陥る現象が認められるようになった^{10) - 19)}。この原因としては、レーザー側の要因として過剰なエネルギー照射が指摘されており、また過剰なエネルギー照射にレーザーの熱作用が、直接あるいは間接的に角膜内皮細胞に損傷を与え、発症に対して誘因になったと考えられている^{10) - 12)}。Hongらは総エネルギー量が20Jを越えると角膜内皮細胞の減少をきたすと報告している²⁰⁾。Wheelerによると、虹彩をレーザー光で蒸散させるためには600°C以上の温度上昇が必要で²¹⁾、ALIの適応が閉塞隅角緑内障と狭隅角眼であることを考えると、角膜周辺部で角膜と虹彩の距離の極めて近い症例では、虹彩の熱上昇の角膜に対する影響は無視できないであろう。透明な角膜のアルゴンレーザー光の透過率は非常に高く約90%である^{22) 23)}。しかし急性緑内障発作を起こし角膜浮腫が起きれば透過率は低下し、より多くの光線が角膜で吸収される。また初期のアルゴンレーザー虹彩切開のように、Abraham Lensを使わずに切開を行えばより多くのエネルギーが必要になることは自明である。

患者角膜の要因としては、緑内障の急性発作、糖尿病、滴状角膜やフックス角膜内皮ジス

トロフィなど、何らかの角膜内皮の既存の異常（脆弱性）がある場合である。眼圧上昇による角膜内皮細胞の減少については、多くの報告があり^{16) 24-33)}、急性隅角閉塞を起こした眼は、起こしていない反対眼に比して、約20%細胞数の減少があると言われている²⁴⁾。糖尿病との関係についてもいくつかの報告があり¹⁰⁾⁻¹⁴⁾特にSchultzらによると、I型（若年発症）及びII型（成人発症）の糖尿病のいずれもが、同年齢の非糖尿病患者と比較して、内皮細胞密度に有意差はないが、内皮細胞の配列、大きさと六角形細胞のパーセントには有意差があったと言い、特にI型の糖尿病ではこのような変化は年齢の若いうちに始まり、細胞密度の減少が大きく、患者が40代、50代になると細胞密度の減少がさらに著しくなるとのべている³⁴⁾。

滴状角膜はフックス角膜内皮ジストロフィーの初期段階であるといわれている。フックス角膜内皮ジストロフィーは、軸性遠視、浅前房、閉塞隅角緑内障と関連があることが知られている³⁶⁻³⁷⁾。Smithら²⁾は17人のALIを行った中に、閉塞隅角緑内障を起こす前にフックス角膜内皮ジストロフィーと診断されていた患者で、内皮細胞密度がALI前の1、433/mm²からALI後10週間に612/mm²に減少した症例があった。これはフックス角膜内皮ジストロフィーか閉塞隅角発作自体が進行性内皮細胞減少を起こし、アルゴンレーザー虹彩切開により細胞減少が急速に加速されたのであろうと推論している。米国カナダで報告されたALI後の水疱性角膜症の症例の中には、滴状角膜またはフックス角膜内皮ジストロフィーの存在が報告されているものがある^{2) 10-12)}。

本症例は右眼のスペキュラーマイクロスコープ所見および左眼の組織病理像が示す如く滴状角膜は認められない。切片にみられた滴状角膜様の所見はALI後の新しいデスメ膜の限局性増生であり、レーザー照射部よりはなれた部位でも、内皮細胞は反応性に基底膜様物質の産生を起こしていることを示している。図6にレーザー虹彩切開術後水疱性角膜症の発生病理（仮説）を示す。レーザー照射部の角膜内皮は基底膜様物質をデスメ膜の内側に産生する。レーザー傷害をより強く受けた内皮の方が基底膜様物質（新しいデスメ膜）を急速かつ多量に産生するので、ポンプ作用は低下し、実質浮腫から上皮基底細胞浮腫を

起こしてくる。これに引き続いてレーザー傷害を強く受けた内皮は、細胞内小器官が消失し、更に細胞膜が消失し、この内皮細胞は脱落する。この過程で、隣接する活性のある内皮はこの部分に遊走してきてデスメ膜が露出しないように消失過程の内皮を被覆する（図5D）。隣接する内皮に活性がない場合には、この部分のデスメ膜は露出し、実質浮腫は更に増強し、実質細胞も減少し、ボウマン膜離断・消失、基底細胞下への線維芽細胞・膠原線維増生を惹起し、最終的には上皮剥離に至る。健常部の内皮細胞も傷害部に向かって徐々に遊走し、この際基底膜様物質が産生されるものと考えられる。すなわちレーザー傷害は限局性であっても傷害部に向かう内皮の遊走により内皮傷害は角膜全体に波及して行き、レーザー傷害が強ければ遊走に動員された内皮も次第に活性が低下してきて、細胞内小器官、細胞膜を消失してくるものと考えられる。

ALI後の水疱性角膜症は偽水晶体眼性水疱性角膜症より発症が早いものがある。。著者等が調べた範囲でもレーザー照射後直ちに発症した症例もあり（表1）、また本症例もALI後2ヶ月で左眼の視蒙を感じている。同じく表1に示す如く、水疱性角膜症を起こした症例のアルゴンレーザーの総エネルギー量にもかなり症例差があり、本症例では左眼のエネルギー量は4.75Jであった。これは角膜内皮と眼内レンズの部分的接触による偽水晶体眼水疱性角膜症と異なり、レーザーの熱作用による前房水、虹彩の温度上昇の角膜内皮への影響、レーザーのショック波などにより、レーザー照射部のみならず角膜内皮が広汎に傷害される症例があるためであろうか。したがってALIは緑内障の急性発作、糖尿病、滴状角膜やフックス角膜内皮ジストロフィなど、何等かの角膜内皮の既存の異常（弱性）がある場合はもちろん、それ以外の場合でも慎重に適応を定めるべきであろうと考える。万一わずかな杞憂でもあれば、観血的周辺虹彩切除術を選択すべきであろう。有色人種の虹彩は欧米人に比較して厚さが厚く、メラニン顆粒に富み熱吸収が良いことも考慮すべきであろう。

文献

- 1) Hirst LW, Robin AL, Sherman S, Green WR, D'anna SD, Dunkelberger G : Corneal endothelial changes after argon-laser iridotomy and panretinal photocoagulation. *Am J Ophthalmol* 93:473-481, 1982.
- 2) Smith J, Whitted P : Corneal endothelial changes after argon-laser iridotomy. *Am J Ophthalmol* 98:153-156, 1984.
- 3) Thoming C, Buskirk EM, Samples JR : The corneal endothelium after laser therapy for glaucoma. *Ophthalmology* 91:518-522, 1987.
- 4) Panek WC, Lee DA, Christensen RE : Effect of argon laser iridotomy on the corneal endothelium. *Am J Ophthalmol* 105:395-397, 1988.
- 5) Lederer CM, Thomas JV : Laser surgery for glaucoma. In *Glaucoma surgery*. Ed by Thomas JV. CV Mosby, St Louis, 157-194, 1992.
- 6) 中嶋基磨、山下秀明、三木弘彦 : 予防的レーザー虹彩切開術後の角膜内皮細胞の長期経過。臨眼 48 : 1180 - 1181、1994。
- 7) 三浦嘉久、上野 真、三浦恵子、松島差都子、森山有理 : アルゴンレーザー虹彩切開術後早期の角膜内皮細胞の変化。眼紀 10 : 1062 - 1065、1995。
- 8) 河野達朗、児玉達夫、喜多有紀、谷戸正樹、勝部 透、瀬戸川朝一 : 六日市病院におけるアルゴンレーザー虹彩切開術の検討。眼臨 91 : 871 - 873、1997
- 9) Pollack IP : Current concepts in laser iridotomy. *Int Ophthalmol Clin* 24:153-180, 1984
- 10) Schwartz AL, Martin NF, Weber PA : Corneal decompensation after argon laser iridotomy. *Arch Ophthalmol* 106:1572-1574, 1988.
- 11) Zabel RW, Mc Donald IM, Mintsioulis G : Corneal endothelial decompensation after argon laser iridotomy. *Can J Ophthalmol* 26:367-373, 1991.

- 1 2) Wilhelmus KR : Corneal edema following argon laser iridotomy. *Ophthalmic Surgery* 23:533-537, 1992.
- 1 3) Jeng S, Lee JS, Huang SCM : Corneal decompensation after argon laser iridotomy - a delayed complication. *Ophthalmic Surg* 22:565-569, 1991.
- 1 4) 湯口幹典、長坂 誠 : アルゴンレーザー虹彩切開術後に生じた水疱性角膜症. *眼臨* 86 : 2098 - 2101、1992.
- 1 5) 薄田 寿、桜木章三 : 予防的アルゴンレーザー虹彩切開術後に晩発性角膜内皮代償不能を来たした1例. *眼科* 35 : 1489 - 1491、1993.
- 1 6) 鯉淵浩、早川和久、山川良治、長瀧重智 : アルゴンレーザー虹彩切開後の水疱性角膜症・眼科手術 7 : 107 - 111、1994.
- 1 7) 細谷比左志、大橋裕一、大黒伸行、桑山泰明、木下 茂 : アルゴン・レーザー虹彩切開術後に生じた水疱性角膜症. *臨眼* 48 : 420 - 422、1994.
- 1 8) 会田千穂、井尾晃子、松田 彰、田川義継 : アルゴンレーザー虹彩切開後に生じた水疱性角膜症の3症例. *眼紀* 46 : 1184 - 1187、1995.
- 1 9) 西沢仁志、喜多容子、西 起史 : アルゴンレーザー虹彩切開術後、水疱性角膜症をきたした1症例. *眼臨* 90 : 1168 - 1170、1996.
- 2 0) Hong C, Kitazawa Y, Tanishima T : Influence of argon laser treatment on corneal endothelium. *Jpn J Ophthalmol* 27:567-574, 1983.
- 2 1) Wheeler CB : Temperature distribution in the anterior segment resulting from laser iridotomy. *Adv Ophthalmol* 34:153-157, 1977.
- 2 2) vanBest JA, Bollemeijer JG, Sterk CC : Corneal transmission in whole human eyes *Exp Eye Res* 46:765-768, 1988
- 2 3) Kidwell TP, Pricbe LA, Welch AJ : The measurement of ocular transmittance and irradiation distribution in argon laser irradiated rabbit eyes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 15:668-671, 1976

- 2 4) Setälä K : Corneal endothelial density after an attack of acute glaucoma. Acta Ophthalmol 57:57,1004-1013,1979.
- 2 5) Olson T : The endothelial cell damage in acute glaucoma. On the corneal thickness response to intraocular pressure. Acta Ophthalmol 58:257-266, 1980.
- 2 6) Bigar F, Witmer R : Corneal endothelial change in primary acute angle closure glaucoma. Ophthalmology 89:596-599,1982.
- 2 7) 吉永健一、谷村幸三、渡辺義晴 : 眼圧による角膜内皮侵襲に関する研究 その 1 原発閉塞隅角緑内障を中心として. 眼紀 33 : 997 - 1001、1982.
- 2 8) Malaise-stals J, Collignon-Brach J, Weekers JF : Corneal endothelial cell density in acute angle-closure glaucoma: Ophthalmologica 189:104-109,1984.
- 2 9) Markowitz SN, Morin JD : The endothelium in primary angle closure glaucoma. Am J Ophthalmol 98:103-104,1984.
- 3 0) 安田典子 : 緑内障における角膜内皮障害. 日本の眼科 61 : 541 - 548、1990.
- 3 1) 目谷千聡、中村昌弘、小原喜隆 : 緑内障の角膜内皮障害の検討. 眼紀 - 43 : 306 - 210、1992.
- 3 2) Brooks AVM, Gillie WE : Effect of angle closure glaucoma and surgical intervention on the corneal endothelium. Cornea 10:489 - 497,1991.
- 3 3) 清水 透、安田典子 : 急性原発閉塞隅角緑内障における角膜内皮障害. 眼臨 84 : 494 - 496、1990.
- 3 4) Schultz RO, Matsuda M, Yee RW, Edelhauser HF, Schultz KJ : Endothelial changes in the type I and type II diabetes mellitus. Am J Ophthalmol 98:401-409,1984.

- 35) 秋谷忍：角膜変性症－最近の知見－．三島濟一、塚原勇、植村恭夫（編）MOOK
15 角膜．金原出版、東京、65-74、1981．
- 36) Pitts JF, Jay JL : The association of Fuchs' corneal endothelial dystrophy
with axial hypermetropia, shallow anterior chamber, and angle closure
glaucoma. Br J Ophthalmol 74:601-609, 1990.
- 37) Loewenstein A, Geyer O, Hourvitz C et Lazar M: The association of Fuchs'
corneal endothelial dystrophy with angle closure glaucoma. Br J
Ophthalmol 75:510, 1991.

図1：右眼角膜スペキュラーマイクロスコープ写真。

図2：左眼角膜のスペキュラーマイクロスコープ写真。

両眼特に左眼に著明に細胞の拡大、大きさの不同、形状と配列の乱れを認める。
左眼には六角形細胞以外の形状の細胞も出現している。左眼の写真は角膜浮腫のため、不鮮明である。

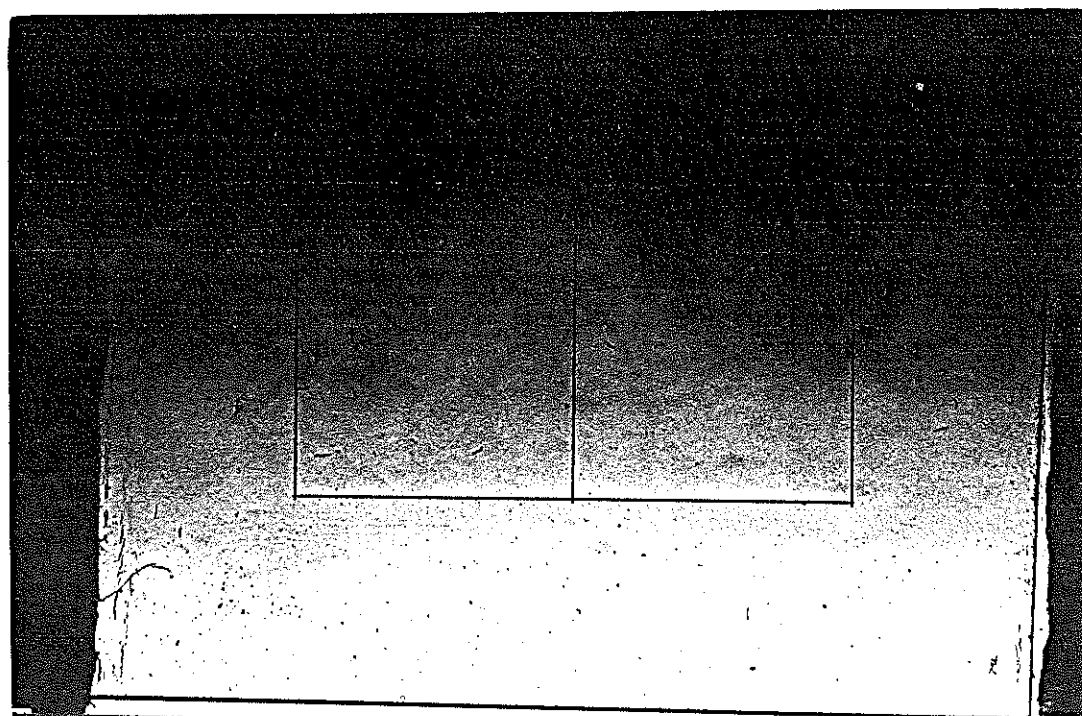
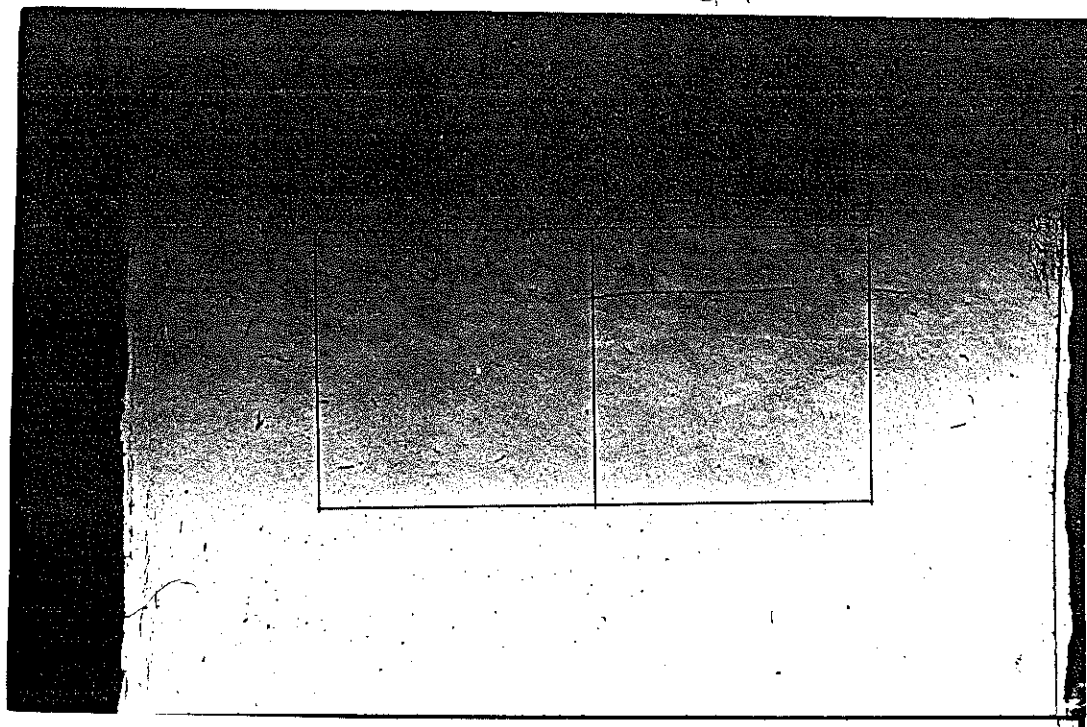


図3：母角膜細切模式図。

斜線の部分はレーザー照射時の外力が直接加わったと思われる部位を示す。

==== パラフィン包埋標本の断面、—— エポキシ包埋標本の断面を示す。

陳. 百. 輝. 沖. 敏. 木

図3

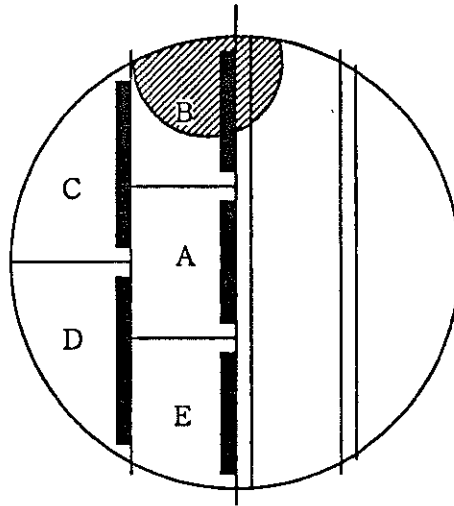


図4： 切片Aの組織病理像

- A. アズールⅡ染色光顕組織像。上皮細胞層、ボウマン膜、実質には著変を認めない。古いデスメ膜の内側に染色性の薄い新しいデスメ膜（矢印）が形成され、一部内皮側に結節状に突出している。内皮細胞は線維芽細胞様になっている（x300）。
- B. デスメ膜、内皮細胞の電顕組織像。古いデスメ膜（DM）と内皮細胞（En）との間に膠原線維束が疎に不規則に配列している新しいデスメ膜（*）がある。内皮細胞の細胞内小器官には異常を認めない（x19200）。

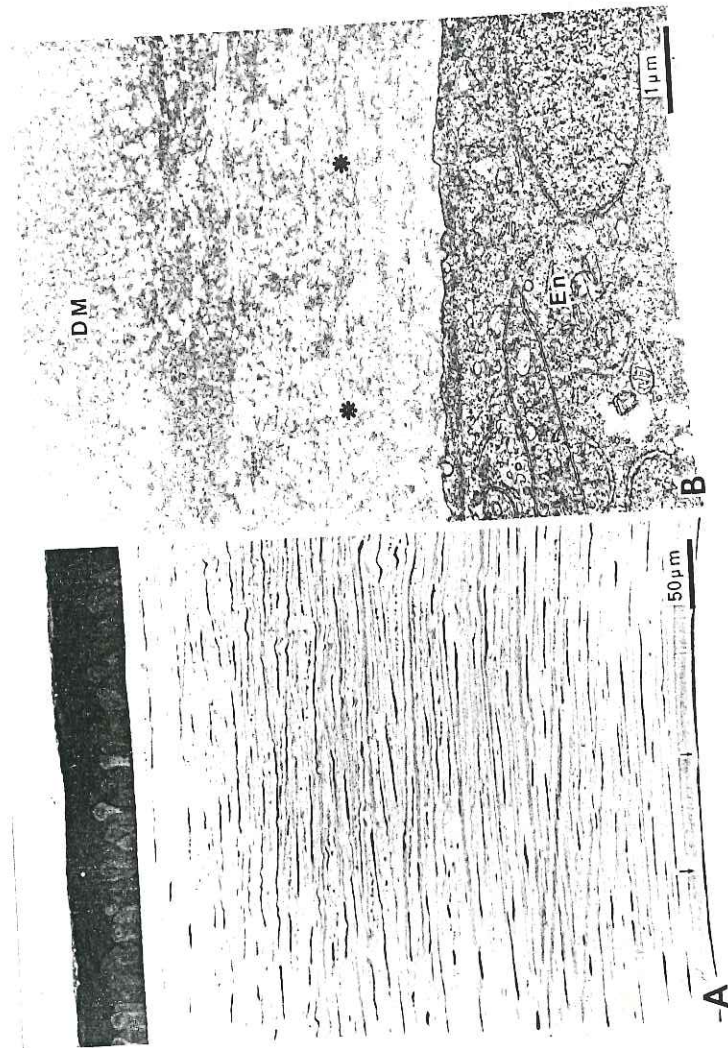


図5： 切片Bの組織病理像

- A. アズールII染色光顕組織像。上皮細胞層は菲薄化し、一部ボウマン膜から剥離している。実質薄葉は乱れ、実質細胞は減少している。古いデスメ膜の内側に染色性の薄い新しいデスメ膜(*)が形成されている。内皮細胞は著しく菲薄化している(x300)。
- B. デスメ膜、内皮細胞の電顕組織像。古いデスメ膜(DM)と内皮細胞(En)との間に電子密度の低い新しいデスメ膜(**)と高い新しいデスメ膜(*)が形成されている(x4800)。
- C. 電子密度の低い新しいデスメ膜の電顕組織像。古いデスメ膜(DM)の内側にLong spacing banded collagen(太矢印)と膠原線維(細矢印)が疎に不規則に配列している(x24,000)。
- D. 新しいデスメ膜、内皮細胞の電顕組織像。膠原線維束が不規則に配列している新しいデスメ膜(*)の内側の内皮細胞(En)の細胞内小器官が不明瞭になっている。隣接する内皮細胞の細胞内小器官は残っている(x14,400)。
- E. 新しいデスメ膜、内皮細胞の電顕組織像。電子密度の低いデスメ膜(**)高いデスメ膜(*)の内側の内皮細胞(En)は一部残っているが、脱落しデスメ膜が露出しているところもある(x9,600)。

1815

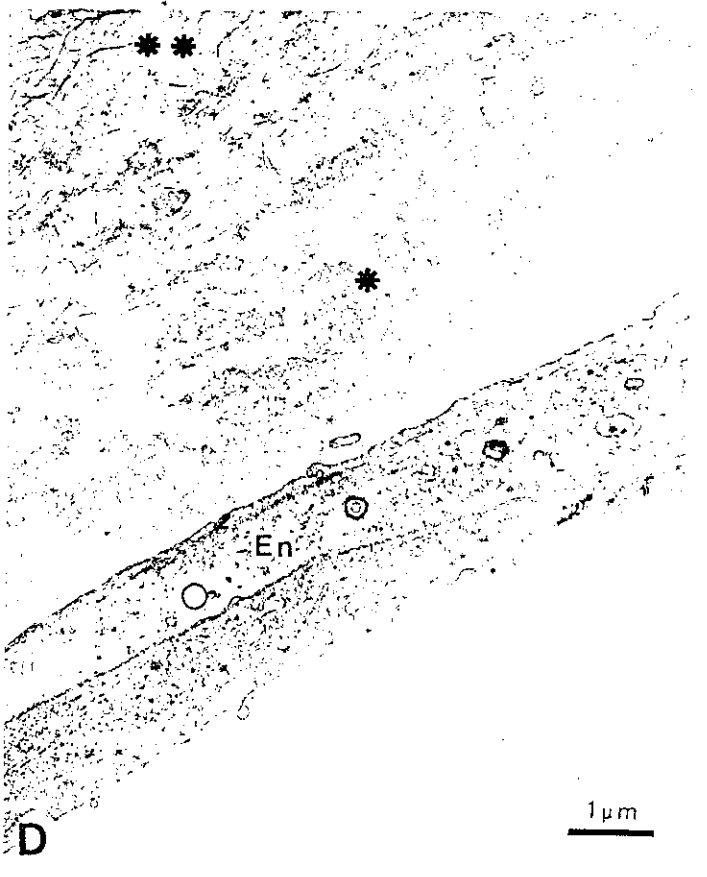
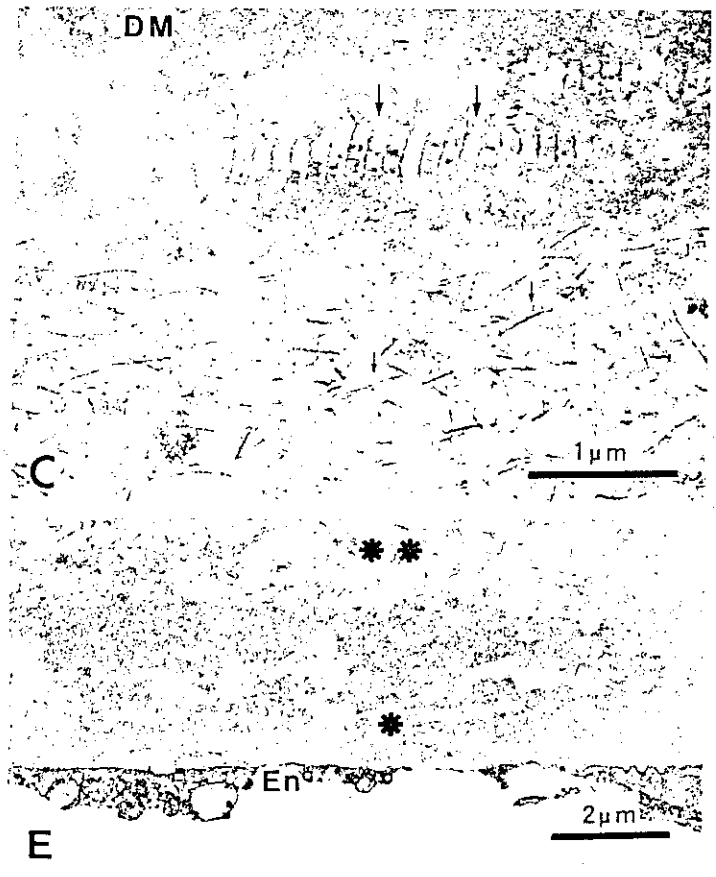
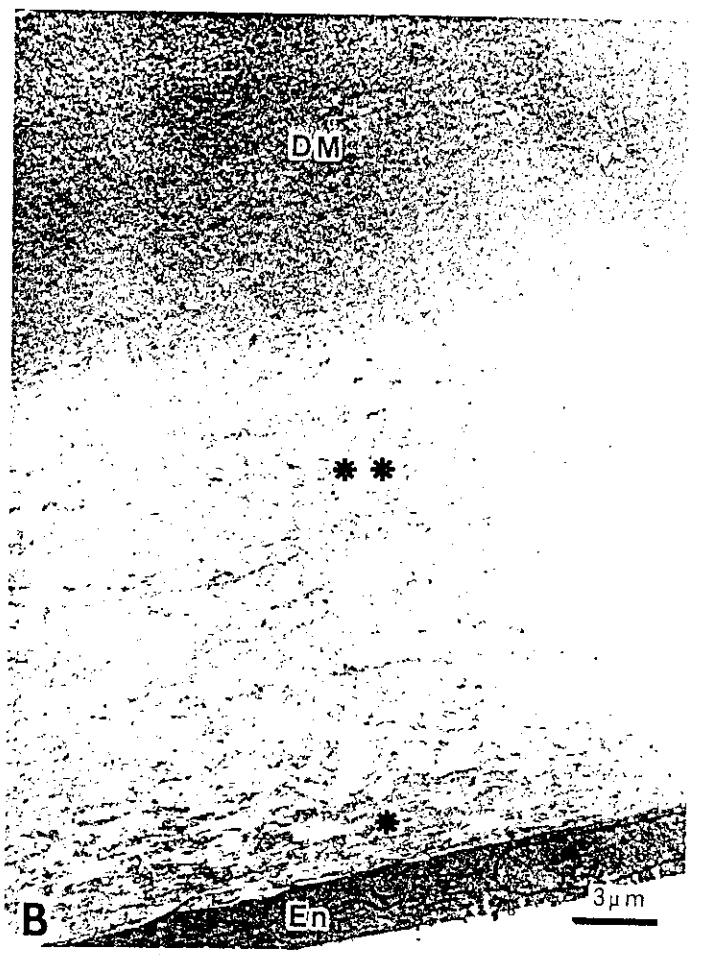
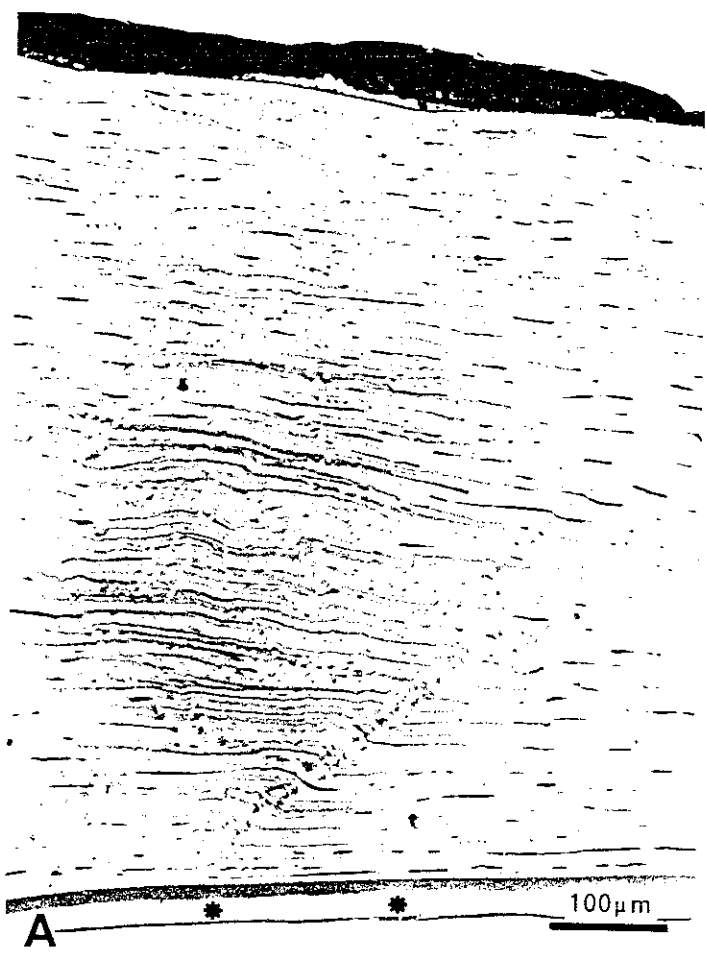


表 1 : 文献に見られたALT後の水疱性角膜症の症例

著者	患者 ナンバー	年齢性別	眼	レーザー エネルギー	発症までの 期間	角膜脆弱性 の有無	
Swartz AL, Martin NF, Weber PA ¹⁰⁾ :	1)	63 F	RE	46.0J	5年2月	糖尿病	
	2)	74 F	LE	62.4J	4年	糖尿病フックス	
	2)	74 F	RE	7.3J	8月	糖尿病フックス	
	3)	80 F	LE	2.5J	10月		
	3)	80 F	RE	2.92J	9月		
Zabel RW, Mac Donald LM, Mintsiouslis G ¹¹⁾ :	4)	不詳	RE	101.0J	7月	緑内障発作	
	5)	不詳	LE	25.8J	7年		
	6)	不詳	RE	72.3J	1年11月	濾状角膜	
	6)	不詳	LE	45.2J	2年5月	濾状角膜	
	7)	不詳	LE	5.6J	3年3月		
	8)	59 F	RE	63J	直後	緑内障発作	
	9)	57 F	RE	48.5J	5年	糖尿病緑内障発作濾状角膜	
Wilhelmus, KR ¹²⁾ :	10)	62 F	LE	3.5J	2年	緑内障発作発作	
	11)	67 F	1E	24 ~281J	直後)		
	12)	68 F	LE	16.6~83J		糖尿病 濾状角膜	
	湯口、長坂 ¹⁴⁾ :	13)	48 F	LE	18.86J	7月	糖尿病緑内障発作
		13)	48 F	RE	10.85J	6月	糖尿病
薄田、桜木 ¹⁵⁾ :	14)	64 F	LE	14.04J	7年2月		
細谷、大橋、大黒、桑山、木下 ¹⁷⁾ :	15)	72 F	RE	19.24J	1年11月	濾状角膜	
	15)	72 F	LE	44.4J	1年5月		
	16)	70 F	RE	44.4J	9月	緑内障発作	
	16)	70 F	LE	144J	1年9月		
	梶原、早川、山川、長瀬 ¹⁶⁾ :	17)	69 F	LE	20J	2年 1月	緑内障発作
18)		69 F	RE	8.2J	5年9月	糖尿病	
合田、井尾 松田、田川 ¹⁸⁾ :	19)	75 F	RE	9.86J	2年5月	緑内障発作	
	20)	77 F	LE	16.5J	1年		
	20)	77 F	RE	10.16J	2年11月		
	21)	58 F	RE	不詳	6年	濾状角膜緑内障発作	
西沢、喜多、西 ¹⁹⁾ :	22)	66 F	LE	52.3J	5月		
陳、百瀬、沖坂、水川 :	23)	60 F	LE	4.75J	2月		

注: YAGレーザーも総エネルギー量に加えた。総エネルギー量としての記載のない報告は著者らが算出した。記載のない項目は不詳とした。ALIを2回以上行った症例はエネルギー量を合計した。

水疱性角膜症はレーザー照射部位の角膜に浮腫が出現したことをもって発症とした。

日本財団補助金による


1997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

1998 年 3 月 5 日

I. 招へい責任者 中野 今治 
所属機関 自治医科大学 神経内科 職名 教授
所在地 〒329-0498 栃木県河内郡南河内町薬師寺3311 電話 0285-44-2111
(内) 3521
招へい研究者氏名 樊 東昇
所属機関 自治医科大学 神経内科
職 名 自治医科大学 研究生
研 究 テ ー マ パーキンソン病の遺伝子治療の基礎的研究

II. 日本滞在日程

平成9年5月17日 ~ 平成10年3月31日



(右) 樊東昇先生



(左) 樊東昇先生

自治医科大学研究生樊東昇報告書（1997/5/17～1998/3/31）

パーキンソン病は中脳黒質のドーパミン神経細胞の消失と線条体のドーパミン減少を特徴とする原因不明の神経変性疾患である。対症療法としてL-dopa内服による補充療法が一般に行われている。しかし、L-dopa内服治療も長期的には薬効の減弱や精神症状等の副作用がみられるなど多くの問題を抱えている。新しい治療法として遺伝子治療の開発が期待されている。

研究生、樊東昇は線条体におけるドーパミン量を効率よく回復させるための遺伝子（カテコールアミン関連酵素遺伝子など）の開発を行った。既にカテコールアミン関連酵素のチロシン水酸化酵素や芳香族アミノ酸脱炭酸酵素遺伝子を培養神経細胞やパーキンソン病モデルラット脳に導入する実験を行っており、さらに他の酵素遺伝子も使用して最も有効性の高い遺伝子治療プロトコルを策定する基礎的な実験を行った。以下箇条書きにまとめると、

1. 今回遺伝子治療にはアデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターを用いた。AAVベクターは神経細胞のような非分裂細胞にも遺伝子導入が可能でありまた病原性がないために脳内に遺伝子を導入するには適したベクターである。
2. 導入する遺伝子はドーパミン合成酵素であるチロシン水酸化酵素(TH)と芳香族アミノ酸脱炭酸酵素(AADC)とTHのcofactorであるtetrahydrobiopterin合成の律速酵素であるGTP cyclohydrolase 1 (GTPCH1)である。これまでのパーキンソン病遺伝子治療実験はTH遺伝子を使ったものがほとんどである。TH遺伝子とAADC遺伝子を組み合わせることによって治療効果が増すことは既に我々が報告済みである。今回は三つのドーパミン合成系の酵素遺伝子を導入することによりさらに治療効果が高めることが可能と考えられる。この三つの遺伝子を導入する試みは行われておらず独創的な点である。AAVベクターは重複感染が可能であり三つのベクターを使って3種類の遺伝子の導入は可能である。上記の遺伝子を組み込んだAAVベクターを培養細胞に導入し、生化学的にドーパミン合成量を測定し、最終的には組織で導入した遺伝子が働いていることを確認した。
3. さらに神経栄養因子の一種であるGDNF遺伝子を使いAAV-ベクターを作製し、黒質培養細胞にGDNF遺伝子を導入しTH陽性細胞の生存維持および神経突起伸長作用について確認した。

研究発表は日本遺伝子治療学会、日本神経学会総会、神経組織の成長再生移植研究会、Neuroscience Meeting等で発表した。

原著論文をHuman Gene Therapyに投稿中であり、Neuroscience letterでは印刷中である。

研究生樊東昇の一年間の研究は実り多いものであった。

パーキンソン病モデルラットに対する遺伝子治療

Gene therapy of a rodent model of Parkinson's disease

樊 東昇^{1,2}、小川松夫¹、池口邦彦¹、藤本健一¹、静間奈美¹、中野今治¹、小澤敬也²
1自治医科大学神経内科、2同分子生物学

D. Fan^{1,2}, M. Ogawa¹, K. Ikeguchi¹, K. Fujimoto¹, N. Shizuma¹, I. Nakano¹, K. Ozawa²
1Dept. of Neurology and 2Dept. of Molecular Biology, Jichi Medical School

[目的]

パーキンソン病の治療はL-dopaの補充療法が主に行われているが、胎児中脳の細胞を移植する治療法が開発され実際に臨床応用されてきている。近年遺伝子工学の進歩により遺伝子治療という新しい治療法が開発され、神経疾患に対する遺伝子治療の試みも動物実験レベルで始められている。パーキンソン病に対する遺伝子治療の導入遺伝子としてはdopamine生合成系の律速酵素であるtyrosine hydroxylase(TH)の遺伝子が使われてきた。しかし、THのみではL-dopaは合成されるがdopamineは生合成されない。L-dopaからdopamineを生合成するにはaromatic L-amino acid decarboxylase(AADC)が必要である。TH遺伝子とAADC遺伝子を一緒に導入することによりdopamineの生合成が増し、治療効果増大が期待できる。そこで我々はTHとAADCの二種類の遺伝子を同時に導入する実験を行った。また、神経系への遺伝子導入法は体外の細胞に遺伝子を導入しそれを脳内に移植する方法と、脳内細胞に直接遺伝子を導入する二つの方法がある。我々は脳内に直接遺伝子を導入する方法を取った。

遺伝子導入ではどのウイルスベクターを使うかが大きな問題である。現在遺伝子治療実験には主にレトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクター(AAV)の3種類が使われている。レトロウイルスベクターは非分裂細胞への遺伝子導入が不可能であり、アデノウイルスベクターには病原性があるため、我々は非分裂細胞への導入が可能で病原性もないAAVベクターを使用した。しかし、AAVベクターは大きな遺伝子を導入できない。そこで、今回の実験では二つの遺伝子から別々のベクターを作り、同時に導入する実験を行い、同一細胞に二つの遺伝子導入が可能であるのかも確認した。

[方法]

(1)TH遺伝子、AADC遺伝子のAAVベクター作製：TH遺伝子あるいはAADC遺伝子を組み込んだベクタープラスミドとヘルパープラスミドを293細胞にtransfectionし、さらにアデノウイルスのAAVに対するヘルパー領域の遺伝子をプラスミドにしてtransfectionしAAVベクターを作った(TH遺伝子のAAVベクターをAAV-TH、AADC遺伝子のAAVベクターをAAV-AADCとする)。AAV-THとAAV-AADCの単独あるいは両者を用いて293細胞へ遺伝子を導入し、ウエスタンブロットによりTHとAADCの発現を確認した。

(2)パーキンソン病モデルラットへの遺伝子導入：一側のmedial forebrain bundleに6-hydroxydopamineをステレオ装置下に注入し、一側の黒質線条体ドーパミン系を破壊してパーキンソン病モデルラットを作った。このモデルラットにはアポモルフィンの投与により回転運動を惹起することが可能である。回転運動を起こしたラットの障害側線条体にベクターを注入した。ベクター注入前後でアポモルフィンを投与して回転運動を惹起し、回転運動をしているラットをビデオにとり、単位時間当たりの回転数を数え治療効果を判定した。ラットは注入したベクターにより5群に分けた。内訳はAAV-TH単独群、AAV-AADC単独群、AAV-THとAAV-AADCの併用群、対照としてAAV-LacZ群とPBS注入群である。

(3)組織学的検討：回転運動の評価後、ラットをパラホルムアルデヒドで灌流固定後、クリオスタットにて10 μ mの切片を作った。抗TH抗体と抗AADC抗体を用いた蛍光二重染色によりTH陽性細胞とAADC陽性細胞を確認した。

[結果]

(1)AAV-THとAAV-AADCの単独あるいは両者を用いて293細胞に遺伝子導入し、ウエスタンブロットによりTHとAADCの発現を確認した。

(2)パーキンソン病モデルラットに遺伝子を導入したときの治療効果をアポモルフィンによる回転運動で比較したところ、AAV-TH単独より、AAV-THとAAV-AADCの併用の方が治療効果が大きいことが分かり、この二群間には有意差があった。AAV-AADC単独では効果無く、AAV-LacZやPBS注入群でも効果は無かった。

(3)蛍光二重染色の結果から、TH陽性細胞の多くがAADC陽性であった。また陽性細胞は形態からほとんどが神経細胞と判断した。

[考察]

1994年にMatthewらによりTH遺伝子がパーキンソン病モデルラットの線条体に導入され、この手法が本症の治療法

としての可能性が示されてから1)、パーキンソン病の遺伝子治療実験が注目を集めてきた。当初使われたベクターはヘルペスウイルスベクターであったが、ヘルペスウイルスは病原性の問題から、臨床的には使用不可能である。その後、AAVベクターを使用したパーキンソン病治療実験も行われてきたが導入する遺伝子はTHだけであった2)。

今回の実験はTHとAADCの二種類の遺伝子を同時に導入する実験を行ったが、培養細胞、パーキンソン病モデルラットへの遺伝子導入実験でTH遺伝子単独よりもTH遺伝子とAADC遺伝子を同時に導入した方がより効果的であることが確認できた。また、免疫染色から神経細胞にTH遺伝子とAADC遺伝子の両者がAAVベクターによって導入可能であることが確認された。パーキンソン病の遺伝子治療実験は始まったばかりであり、今後更に基礎的実験と治療効果を高める工夫が必要である。

[文献]

- 1) Matthew JD, et al:Science 266:1399-1403,1994
- 2) Michael GK, et al:Nature Genetics 8:148-154,1994

以上を Human Gene Therapy に投稿中である。

樊 東昇

アデノ随伴ウイルスベクターを用いた培養神経細胞へのGDNF遺伝子導入によるTH陽性細胞の生存維持および神経突起伸長作用について

Dong-sheng Fan^{1, 2)}、中野今治¹⁾、小川松夫¹⁾、池口邦彦¹⁾、藤本健一¹⁾、村松慎一¹⁾、小澤敬也²⁾、小笠原洋治²⁾、卜部匡司²⁾、久米晃啓²⁾、一ノ瀬宏³⁾、永津俊治³⁾、Gary J. Kurtzman⁴⁾

- 1)自治医科大学神経内科、
- 2)血液医学研究部門分子生物学
- 3)藤田保健衛生大学総合医科学研究所神経科学
- 4)Avigen, Inc.

はじめに

パーキンソン病に対する遺伝子治療の試みが動物実験レベルで盛んに行われている。パーキンソン病に対する遺伝子治療の導入遺伝子としてはdopamine生合成系の律速酵素であるtyrosine hydroxylase(TH)の遺伝子が使われてきた。しかし、THのみではL-dopaは合成されるがdopamineは合成されない。L-dopaからdopamineを生合成するにはaromatic L-amino acid decarboxylase(AADC)が必要である。TH遺伝子とAADC遺伝子を一緒に導入することによりdopamineの生合成が増し、治療効果増大が期待できる。昨年の本研究会で我々はTHとAADCの二種類の遺伝子を同時に導入する実験の結果を報告した。遺伝子導入ではどのウイルスベクターを使うかが大きな問題である。我々は非分裂細胞への導入が可能で病原性もないAAVベクターを使用してきた。しかし、AAVベクターは大きな遺伝子を導入できない。前回、二つの遺伝子から別々のAAVベクターを作り、同時に導入する実験を行い、同一細胞に二つの遺伝子導入が可能であることも報告した。

パーキンソン病に対する遺伝子治療はドーパミン生合成酵素遺伝子を導入する方法とドーパミン神経細胞の生存維持に関係する神経栄養因子遺伝子を導入する方法の二つが現在考えられている。神経栄養因子のなかでもドーパミン神経細胞に効果が期待されているのはneurotrophin family (BDNF, NT-3, NT-4/5), ciliary neurotrophic factor, mitogenic growth factors (FGF, EGF, IGF), TGF, PDGF, IL-6, GDNFなどがある¹⁾。GDNFはドーパミン神経細胞と運動神経細胞に対して生存維持作用が報告されている神経栄養因子である。GDNFはドーパミン神経細胞に対する効果が大きく最近、大変注目されている。我々は今回GDNF遺伝子を培養細胞に導入しドーパミン神経細胞に対する効果を確認したので報告する。

方法

(1)GDNF遺伝子のAAVベクター作製：

GDNF遺伝子を組み込んだベクタープラスミドとヘルパープラスミドを293細胞にtransfectionし、さらにアデノウイルスのAAVに対するヘルパー領域の遺伝子をプラスミドにしてtransfectionしAAVベクターを作った(AAV-GDNFとする)。AAV-GDNFを用いて293細胞へ遺伝子を導入し、ウエスタンブロットによりGDNFの発現を確認した。

(2)培養神経細胞へのGDNF遺伝子導入：

胎生14日目のウィスターラット胎児の中脳腹側を取り出し培養した。培養開始2時間後から培地を完全無血清にした。培養開始24時間後に培地にmock, AAV-GDNF, AAV-LacZおよびrecombinant human GDNF(rhGDNF)を添加した。添加24時間後に培地を無血清培地に変更し、その後は無血清培地で培養を続けた。rhGDNF添加群は引き続き固定するまでrhGDNFを添加した培地で培養を続けた。

(3)組織学的検討：

培養開始1週と2週後にパラホルムアルデヒドにて固定し、抗TH抗体を用いABC法にて免疫染色を行った。各培養皿のTH陽性細胞数を数え、単位面積あたりの陽性細胞数を計算した。また、TH陽性細胞の神経突起の長さについても検討した。

結果

単位面積あたりのTH陽性細胞数を数えると、培養1週後ではrhGDNFとAAV-GDNF添加群がmock及びAAV-LacZ添加群と比較してTH陽性細胞数は有意に多かった。培養2週後には無血清培地であるためどの群でもTH陽性細胞数が減少していた。しかし、2週目でもrhGDNFとAAV-GDNF添加群は他の群と比較して有意にTH陽性細胞が多く残存していた。

mockを添加した培養皿の抗TH抗体陽性神経細胞とAAV-GDNFを添加した培養皿の抗TH抗体陽性細胞を比較すると、AAV-GDNFを添加した方が神経細胞体が大きかった。さらに、神経突起を観察するとAAV-GDNFを添加した培養皿の神経突起の方が著明に伸長していた。

考察

パーキンソン病脳の分析から、黒質のドーパミン神経細胞の変性脱落がおり、線条体のドーパミン減少によりパーキンソン病の様々な症状が起こることが確認されている。また、L-DOPAの内服治療が確立している。そこで我々はドーパミン生合成酵素遺伝子を組み込んだベクターを線条体に注入し遺伝子を発現させ、線条体でのドーパミンを増やす実験を行ってきた。

神経栄養因子を使ったパーキンソン病の治療は変性していくドーパミン神経細胞を守ろうとするものである。前述の

ように、GDNFはドーパミン神経細胞に効果を示す。神経栄養因子のなかでもドーパミン神経細胞にとくに効果が大きく、最近注目されている神経栄養因子である。今回の我々の培養細胞を使った実験からGDNF遺伝子を導入することによりTH陽性細胞の細胞死予防と神経突起伸長作用が確認できた。さらに、ラットモデルを使ったGDNF遺伝子治療の報告がある2), 3), 4), 5)。我々の実験結果およびこれまでの報告からGDNF遺伝子治療はパーキンソン病患者のドーパミン神経細胞変性予防効果が期待できる。

今後、我々もモデル動物を使ったGDNF遺伝子治療実験を進める。さらに、GDNFは運動神経にも作用することが分かっており6)、筋萎縮側索硬化症モデル動物を使った実験を進める予定である。

文献

- 1) Lindsay RM et al, *Exp Neurol* 124: 103-118, 1993
- 2) Bilang-Bleuel A et al, *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 8818-8823, 1997
- 3) Choi-Lindberg DL et al, *Science* 275: 838-841, 1997
- 4) Mandel RJ et al, *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 14083-14088, 1997
- 5) Kojima H et al, *BBRC* 238:569-573, 1997
- 6) Henderson CE, *Pathogenesis and therapy of amyotrophic lateral sclerosis*, Lippincott-Raven Publishers, 235-240, 1995

以上は英文で *Neuro Science Letter* (in press) です。

樊 東昇

日本財団補助金による

1997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

1998年 3月 11日

- I. 招へい責任者 立身政信 (立身)[®]
- 所属機関 岩手医科大学医学部衛生学公衆衛生学講座 職名 助教授
- 所在地 〒020-8505 岩手県盛岡市内丸19-1 電話 019-651-5111
- 招へい研究者氏名 劉海波
- 所属機関 中国医科大学予防医学系社会医学教研室
- 職 名 副教授
- 研究テーマ 日本における農村保健医療福祉の歴史と現状を解明し、中国の農村社会発展の方向も探る研究

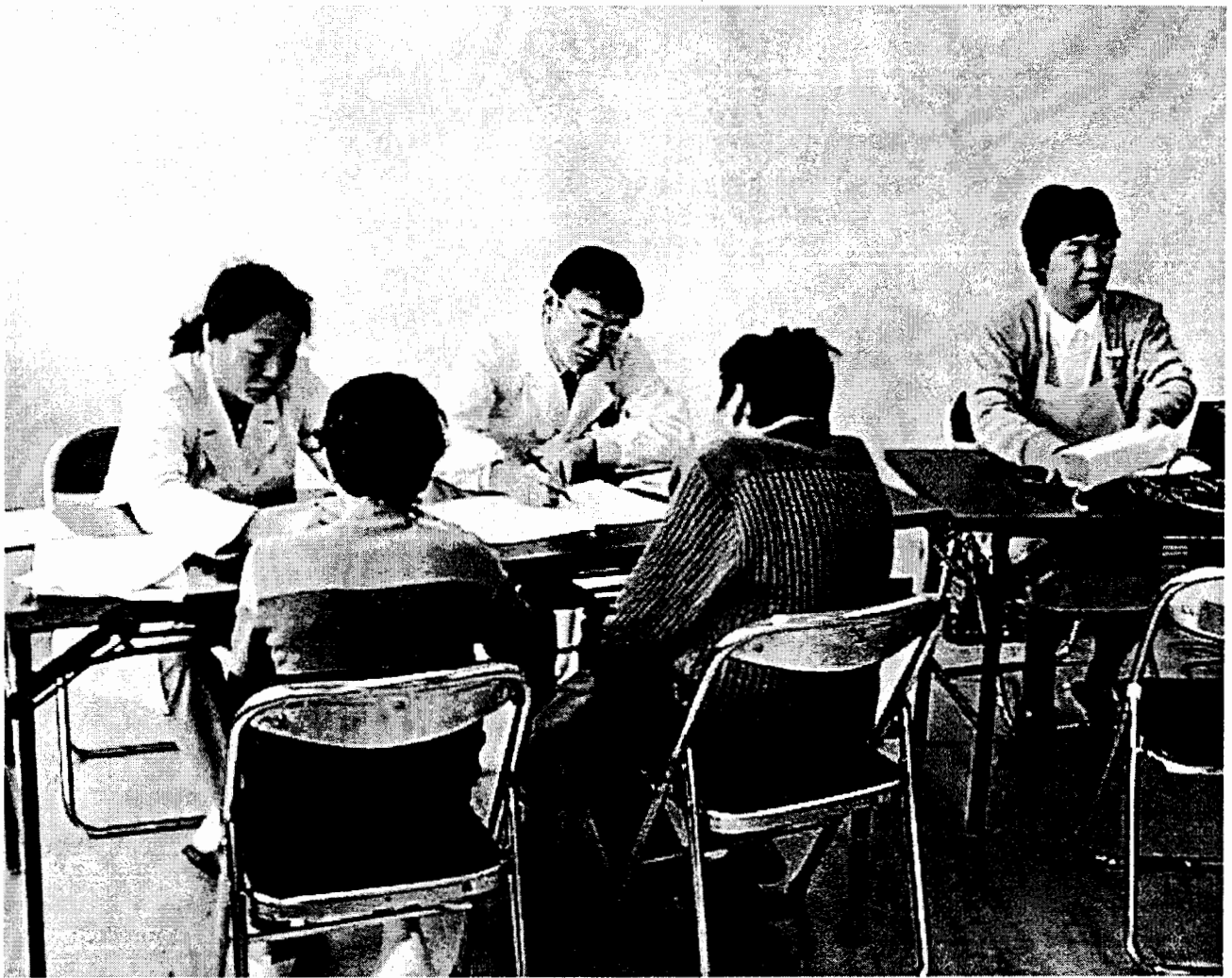
II. 日本滞在日程

1997年

- 9月23日(火) 来日
- 10月18日(土) 岩手県川井村(国保川井中央診療所、川井村保健センター)訪問
- 10月25日(土) 岩手県藤沢町(国保藤沢町民病院、老人保健施設)訪問
- 10月26日(日) 岩手県雫石町(身体障害者療護施設)訪問
- 11月5日(水) 岩手県藤沢町にて地域住民の受療状況等アンケート調査
- 11月6日(木) 同上
- 以後、資料収集とデータの集計

1998年

- 2月21日(土) 第9回岩手公衆衛生学会において研究成果を口演
以後、報告書の作成
- 3月19日(水) 帰国



1997年11月5日(水) 藤沢町 (JA.いわか東藤沢支所) にて、

左端：劉海波，中央：立身政信

日本における農村保健医療福祉の歴史と現状を解析し、中国の農村社会発展の方途を探る研究

日本側研究者代表
立身政信
岩手医科大学助教授

中国側研究者代表
劉海波
中国医科大学助教授

目的

1997年に中国の人口は12億3千6百万人となった。65歳以上人口は全体の6.5%であるが¹⁾、2000年には7%に至ると推計され、高齢化社会に突入する²⁾。この状態は日本の約30年前に相当するが、その頃の日本では既に国民皆保険・皆年金体制が達成(1961年)され、社会保障制度の充実が図られてきた。一方、中国では高齢化社会を迎えるにあたって、このような医療保障制度をはじめ、種々の社会制度が不備な現状にある。そのため市場経済への移行とともに医療制度改革の推進が重要課題となっている。取り敢えずは医療保険制度を作ることから始められているが、偶然ながら、現在日本においてはその制度施行後30年を経て、医療費の国庫負担が膨大なものとなり、保険者も破綻の危機に直面するなど、医療制度の抜本的改革が迫られている。

一般に、医療保障制度の不備は医療市場の活力を失なわせるが、現在の中国における農村医療市場はその典型的な状態にある。本研究は、中国における医療保険制度の策定と日本における医療保険制度の改革という気運を背景にして、中日両国の某鎮・町における医療環境及び住民の医療ニーズを比較分析することによって、今後の中国における医療保険制度の充実や保健医療福祉を一体化した総合的サービスを推進するための資料を得ることを目的とした。

方法と資料

1. 中日両国の官報等により、両国の医療供給状況等を比較検討した。
2. 医療環境、規模、地理的条件、国内における経済レベルなどが近似した地域として、中国遼寧省の某鎮と日本の岩手県某町を選択した。両地区の産業や人口は表4、中核病院の概要は表5に示す通りであり、両地区の病院利用状況や医療環境等については表6～9に示す通りである。
3. 両地区の主婦を対象にアンケート調査を行った。中国では鎮内の5地区に家庭訪問して調査票を配布し、無効回答を除いて100人の回答を得た。日本では健康診断受診者80人に調査票を配布し、後日対面して回収した。回収数は75人であった。調査時期は1997年9月～11月で、回答者の平均年齢は、中国は52歳、日本は60歳であった。

別に、両鎮・町の病院から、1995年の医療データを提供してもらった。

結果

1. 中日両国の医療供給状況と国民医療費

官報等によって中日両国の医療状況を比較した。医療供給状況を表1に示した³⁾⁴⁾。1995年現在人口十万人対の医師数は中国が162人、日本が176人(医療施設従事医師数)で大きな差はないが、人口十万人対看護婦数は中国がわずかに95人、日本が743人と大きな差がある。人口十万人対病床数は中国が239床であるのに対し、日本は1,543床で中国の6.5倍であり、病床利用率は中国が78.6%で日本が83.6%である。平均在院日数は中国が16.2日で日本が33.7日であり、日本の平均在院日数が中国の約2倍となっている。

表2には国民医療費と国民所得の比較を示した⁵⁾⁶⁾。国民医療費の推移を見ると、1980年～1994年の平均で中国は年間約20%、日本は年間約6%夫々増加しており、中国は日本の3倍以上の増加率を示している。ところが、中国における国民所得はこれと並行して伸びており、国民医療費の国民所得に占める割合でみると、1980年は中国2.9%、日本6.0%で1994年は中国3.8%、日本6.9%と両国とも同じ0.9%の伸びに過ぎない。現在の中国の状況は1960年代前半の日本の状況に酷似している。

表 3 には 1994 年における両国の財源別国民医療費を示したが⁹⁾、中国では税金が約 58% (公務員などの医療費を含む) で患者自己負担が約 42% であり、日本では税金が約 31%、保険料が約 57%、患者自己負担が約 12% である。中国の患者自己負担は日本の約 3.3 倍である。

2. 選択した両国対象地区の医療環境

調査対象とした中国遼寧省の某鎮と日本の岩手県某町の面積、地理的条件、国内における経済レベル及び産業、人口を表 4 に示した。面積、地理的特徴、主要産業等は大略同様であるが、人口は中国の方が約 2 倍多く、そのうち 65 歳以上の人口割合は中国が 6.5%、日本が 25.3% で日本が約 4 倍となっている。

中核病院の概要を表 5 に示した。中国の某鎮病院と日本の某町民病院は夫々 40 床と 54 床の病床を有し、医師数は夫々郷村医師 15 人を含む 25 名と非常勤 2 人を含む 7 名であるが、郷村医師は 10 ケ所の衛生所に常勤しているので、病院の医師数には大差ない。但し、対象人口は夫々 24,600 人と 11,287 人で 2 倍以上の差がある。更に、医師の内訳をみると、中国では医科大学を卒業した者は皆無であり、看護婦数が中国で 7 人、日本で 25 人と非常に大きな差が認められる。

表 6 に示すように、年間外来患者数は日本が 48,343 人、中国が 11,740 人であるが、中国では 10 ケ所の衛生所を受診する一日あたり約 100 人の患者を含んでいるので、病院への一日外来者数は中国の鎮病院ではわずか 40 人である。年間入院総数は中国が 536 人、日本が 15,639 人と大きな差があり、病床利用率も夫々 18% と 82%、平均在院日数も夫々 1.8 日と 18.9 日で大きな差が見られる。また、医療費収入中薬代の占める割合は夫々 64% と 28% であり、中国で非常に高くなっている。

表 7 に示すように、日本の町民病院では国や町の補助金があり、受診者は皆何らかの医療保険を利用できるが、中国の鎮病院では国庫補助が 15% のみで、公務員などは 3% の公費負担を受けられるものの、農民は全額自己負担である。また、表 8 に示すように、日本の町民病院では在宅医療や老人保健施設などの諸施設との連携が積極的に図られているが、中国の鎮病院ではこの様なことは全く行われていない。

表 9 に示すように中国の鎮病院においては老人保健施設のような中間施設は無く、日本の養護老人ホームに近い敬老院などに医師が訪問することはない。健康相談、健康診断、往診、在宅医療なども余り行われていない。看護婦も病院での看護を行うのみである。日本において病院、保健所、老人保健施設、老人ホーム、保健センター、役場などで保健婦が行っている家庭訪問、健康教育、健康相談、健康診断などに近い仕事は、中国においては郷村医師が行っており、疾病予防活動として、予防接種、衛生活動、計画出産、衛生知識の普及、さらに、簡単な治療、投薬、注射等の医療行為も行っている。

3. アンケート調査結果 (表 10)

- 1) 受診する医療機関の選択は、両国とも約 60% が「近い所」と答えたが、次いで、中国は 27% が「高度医療を受けられる所」、日本は 24% が「親切に診てくれる所」と答えていた。
- 2) 身近な医療機関を選択する理由は、両国とも約 80% 以上が「近いから」と答えていたが、次いで、日本では「信頼感があるから」(10%)、「親切だから」(5%) が選ばれ、中国では「本当はもっと大きな病院に行きたいが交通費が掛かるから」(6%) が選ばれていた。
- 3) 地元医療機関以外の医療機関を選ぶ場合は、日本では 84% が「医者から紹介してもらった所」と答えたが、中国ではこれが 38% にすぎず、30% が「可能な限り高度な医療をしてくれる所」、32% が「その他(知っている人がいる所等)」をあげていた。
- 4) どの様な治療を希望するかとの質問には、両国とも 95% 以上が「病状に応じた治療」を選び、選択肢としてあげた「高度な機械を使ったり薬をたくさん出す治療」を選んだ人は殆どいなかった。
- 5) 病気に掛かった時に最も気になる事は、日本では 75% が「治るか治らないか」であり、次いで 13% が「医療費の支払い」であるのに対し、中国では前者が 64% で後者が 29% となっていた。
- 6) 「病院で薬を出来るだけたくさんもらったほうがいい」という質問に賛成する人は両国とも 10% 未満であった。

考察

中日両国における最近の国民医療費と国民所得の動向を比較すると、中国においては日本に比較して国民所得の割合に、医療費が少ないことがわかる。患者の自己負担額が多いことから見ても、医療保険制度が不十分であることがその最大の要因と考えられる。医療供給の面でも 1995 年現在の人口十萬対医師数は大差ないが、人口十萬対看護婦数は日本が中国の約 7.8 倍、人口十萬対病床数は日本が中国の約 6.5 倍となっている。

本研究の対象地区では、人口対医師数は大差ないが、人口対病床数では約 3 倍、病床利用率では約 4.5

倍、平均在院日数では約 10 倍、日本が中国より多く、逆に医療費収入中薬代の占める割合では約 2.3 倍中国が日本より多い。住民アンケートによると、「病院で薬を出るだけたくさんもらったほうがいい」という質問に賛成する人は両国とも 10%未満であり、中国の鎮病院における治療内容が住民のニーズに合致していないことを示しているとも考えられる。

中国の医療保険制度は国家公務員や労働者など少数の人が公費医療或は労働医療保険を受けているのみで、農民は 95%以上が自費である。ただし、最近の中国における医療制度改革として医療保険制度の創設に関わる事項があり、農民と都市の自営業者に対する「合作医療」即ち協同医療を主とする医療保険が開始されようとしている。この制度では、被保険者はその域内に住所を有する者であり、実施主体は農村においては郷鎮政府である。この形は日本の国民健康保険と似ている。現在、モデル地区が設定されて推進されているが、本研究の中国側対象地区は未だそのような制度の無い多くの農村の一つである。すなわち、対象とした鎮病院の受診者中、公務員などは 3%の公費負担を受けられるものの、農民などは全額自己負担である。一方、日本は国民皆保険であり、本研究における日本側対象地区では、町民病院の受診者は皆何らかの医療保険を利用することができる。

地域中核病院の地域医療総合サービスとしては、中国においては前述の「合作医療」において、保健・医療・リハビリ・母子保健・老人保健・家族計画などを一体化しようとしている。しかし、本研究の対象地区では、そうしたサービスは全く行われていない。さらに、国庫補助は 15%のみであり、医科大学を卒業した医師は皆無である。一方、日本側対象地区の町民病院では医療計画によって設定された二次医療圏内での在宅医療を含めた病病・病診連携や老人保健施設等の諸施設との連携が積極的に図られている。また、国や町の補助金が中国に比較して多く、医師はすべて大学医学部を卒業した者である。

地域住民に対するアンケート結果からみると、最初に受診しようとする医療機関は、中日両国とも「近い所」が最も多いが、中国では「高度医療を受けられる所」がそれに続いて多く、約 30%に及んでいる。ただし、中国の農村医療機関の現状からみて、この「高度医療」が日本におけるそれと同じ程度のものではない事を考慮する必要がある。受診した際の医療費を心配する人は両国とも多少見られたが、中国では受診先を決定する際に交通費を考慮して近い医療機関を選ぶ人がいることや、疾病に罹患して最も気にかかることに医療費の支払いを挙げる人が 30%に及ぶことなどから、中国の方が受診行動に経済的要因が強く影響しているようである。

中国側の対象鎮病院は、医師数や病床数等が日本と比較して大差ないものの、外来・入院患者数が非常に少ない。この要因としては、これまで述べた理由から、医療機関側の設備や技術といった医療提供能力が低いことと医療の受けて側の利用能力が主に経済的理由から低いことが考えられる。

これらを解決する手段として中国で模索されている医療保険制度について考察したい。

日本の医療保険は、1922 年に貧しい労働者の対策として開始された。国民健康保険は、農民や自営業者を対象にして、1938 年にその法が公布され、1948 年に市町村公営の原則を確立し、1961 年には国民皆保険の達成をみた⁹⁾。その後、医療施設数、医師数、薬局数などが急激に増加して、患者の受診率も増加し、国民医療費が著しく増加してきた。1980 年代には医療保険制度の抜本的改革や景気拡大の中で医療費の国民所得に対する伸びは逡減したものの、1990 年代に入ると、バブル時代前後の過剰投資の影響や人件費・物件費の高騰などにより医療機関の経営内容が悪化し、これに対する診療報酬の改定や国民所得の低成長により医療費は国民所得を上回って増加してきた。医療保険制度運営のあり方が改めて問われる厳しい状況となっている¹⁰⁾。しかし、このような医療保険システムの発展が、日本における医療の普及に大きく貢献してきた事実は何人も認めざるを得ない¹¹⁾。それは、昔も今も国民の健康を守り、生活水準の向上に寄与して世界最長寿国を支える柱である。

中国側の本調査対象地区において公費医療を受けている人口は 3%にすぎない。中国における農村住民の医療サービス利用率についての調査(1987 年)によると、人口 100 人対年間入院者数は、公費・労働保険の受給者が 5.4 人、自費医療受診者が 2.7 人、同じく一人平均入院日数は、前者が 0.52 日、後者が 0.24 日、入院の必要があるにもかかわらず入院をしなかった人は前者が 3%、後者が 21%である¹⁰⁾。中国の農村地域では、本対象地区のような保険制度の不備な地域が約 90%と圧倒的に多いのが実情である。中国の農村は医療保険制度の不備により、住民は合理的で納得のいく医療を受け難くなっている。そのため、住民は身近な病院への信頼感を失っていることが対象地区住民のアンケート結果から伺われる。

医療保険制度を確立するためには各種の前提条件が必要である。医療の供給側である医療機関の適正配置、医師を含むマンパワーの確保と資質の向上、さらには診療報酬支払方法の適正化などである。中国における医療供給の現状には、都市・農村間の不均衡、過剰と不足の共存があり、数量的充実だけではなく、医療資源の資質の向上と効率的利用を促進することが大きな課題である。現有のマンパワーである郷村医師がその資質を向上させ、日本の保健婦のようなプライマリヘルスケアの役割を担うものとして、地元

土着して、軽症の患者を診ることによって不必要な高度医療の受診を抑制することができる。

また、今後医療保険制度が開始された場合、患者から求められる医師をはじめとした医療スタッフの資質として、患者の受診行動へのアドバイザーとしての能力が重要となつてこよう。いわゆる病診連携とインフォームドコンセントに基づいた医療が不可欠の条件であり、証拠に基づいた医療 (Evidence - Based Health Care) や地域における医療マネジメント面を含めた医療経済効率の向上の要求はこれまで以上に益々強くなると思われる¹¹⁾。これは、今後、限られた資源で効率のよい医療サービスの提供を行うための前提条件でもあり、日本においても検討を深める必要のあることと思われる。

結論

高齢化社会を目前にして、医療制度改革の推進が重要課題となっている中国の農村において、医療保険制度の充実や保健医療福祉を一体化した総合的サービスを推進するための資料を得ることを目的に、中日両国の医療環境及び地域住民の医療ニーズを比較分析した。

中国においては日本に比較して国民所得に占める医療費の割合が少ない。患者の自己負担額が多いことから見ても、医療保険制度が不十分であることがその最大の要因と考えられる。一方、日本の医療保険制度は医療サービスの過剰提供を誘発して医療費を高騰させたとも考えられる。高度経済成長下にある中国ではこのことを警戒する必要があるものの、医療保険制度の整備は焦眉の急である。

医療保険制度の確立には、医療機関の適正配置、マンパワーの確保と資質の向上、診療報酬支払方法の適正化などの前提条件が必要である。都市・農村間の不均衡が目立つ中国においては、数量的充実だけではなく、医療資源の資質の向上と効率的利用を促進することが大きな課題である。そのためには、医療機関の機能連携や地域医療支援事業を制度化する必要がある。

謝辞

終始助言と指導を戴いた岩手医科大学医学部衛生学公衆衛生学講座の角田文男教授をはじめスタッフの皆様、ご協力を戴いた調査対象地区の町民病院職員と鎮病院職員および両地区住民の皆様に深く感謝いたします。

本研究の一部は第9回岩手公衆衛生学会にて口演発表した。

本研究は、財団法人日中医学協会の1997年度日中医学協力事業の助成を得て行った。

参考文献

- 1)中国情報報 1998年1月7日,1998.
- 2)徐栄凱,曹栄桂 主編:中共中央、國務院における衛生改革及び発展に関する決定 学習補導材料,28,人民衛生出版社,北京,1997.
- 3)衛生部編:1994年版中国衛生年鑑,367,人民衛生出版社,北京,1996.
- 4)厚生統計協会:厚生の指標(臨時増刊 国民衛生の動向),44(9),192-209,1997.
- 5)徐栄凱,曹栄桂 主編:中共中央、國務院における衛生改革及び発展に関する決定 学習補導材料,35,人民衛生出版社,北京,1997.
- 6)厚生省編:平成7年版厚生白書,114,財団法人厚生問題研究会,東京,1995.
- 7)厚生統計協会:厚生の指標(臨時増刊 国民衛生の動向),44(9),247,1997.
- 8)厚生統計協会:厚生の指標(臨時増刊 国民衛生の動向),44(9),235-246,1997.
- 9)若月俊一:農村医学,467-468,勁草書房,東京,1971.
- 10)顧杏元,周寿祺,羅益勤:中国農村医療保健制度研究,16,上海科学技術出版社,上海,1991.
- 11)近藤正英:イギリスの医療改革その変遷と最新情報, JAMIC JOURNAL,18(2)40-43,1998.

表1 医療供給及び利用比較

	中 国	日 本
人口十万対医師数	162 人	176 人
人口十万対看護婦数	95 人	743 人
人口十万対病床数	239 床	1,543 床
病床利用率	78.6%	83.6%
平均在院日数	16.2 日	33.7 日

中国衛生部編：1994年版中国衛生年鑑,367,人民衛生出版社,北京,1996.
 厚生統計協会：厚生の指標（臨時増刊 国民衛生の動向）,44(9),192-209,1997.

表2 国民医療費と国民所得比較

年 度	中 国		日 本	
	国民医療費の国民所得に占める割合	国民医療費の増加率	国民医療費の国民所得に占める割合	国民医療費の増加率
1961~1966 (平均)			3.2%	22%
1980	2.9%		6.0%	
1994	3.8%		6.9%	
1980~1994 (平均)		20%		6%

徐栄凱,曹栄桂 主編：中共中央、國務院における衛生改革及び発展に関する決定 学習補導材料,35,人民衛生出版社,北京,1997.
 厚生省編：平成7年版厚生白書,114,財団法人厚生問題研究会,東京,1995.

表3 財源別国民医療費比較（1994年）

	中 国	日 本
国庫	20.6%	23.9%
地方	37.4%	7.4%
保険料	上段2項に含む	56.9%
患者自己負担	42.0%	11.8%

徐栄凱,曹栄桂 主編：中共中央、國務院における衛生改革及び発展に関する決定 学習補導材料,35,人民衛生出版社,北京,1997.
 厚生統計協会：厚生の指標（臨時増刊 国民衛生の動向）,44(9),247,1997.

表4 中日両国対象地区の概況

	中国 某鎮	日本 某町
面積	140 平方キロ	123 平方キロ
地理特徴	70%が山林で、比較的寒冷、降水量が少ない	60%が山林で、比較的温暖、降水量が少ない
主要産業	玉蜀黍が主体の農業、製造業	畜産が主体の農業、製造業
人口	24,600 人	11,287 人
65歳以上人口割合	6.5%	25.3%

表5 対象地区の医療供給比較

	中国 (某鎮病院)	日本 (某町民病院)
医療施設数 (病院) (診療所)	鎮立 (国営) 1 村衛生所 10 か所	町立 (国保直営) 1 なし
対象人口	24,600 人	11,287 人
病床数	40 床	54 床
スタッフ数	45 人	36 人
医師数 (医科大学卒業)	25 (郷村医者 15 人を含む) 0%	7 (非常勤 2 人を含む) 100%
看護婦数	7 人	25 人

表6 対象地区の医療機関利用比較

	中国 (某鎮病院)	日本 (某町民病院)
年間外来総数	11,740 人	48,343 人
一日あたり外来	140 人 (衛生所約 100 人を含む)	165 人
年間入院総数	536 人	15,639 人
病床使用率	18%	82%
平均在院日数	1.8 日	18.9 日
医療費中薬代割合	64%	28%

表7 対象地区における医療機関の財源および医療制度比較

	中国（某鎮病院）	日本（某町民病院）
医療保健制度	自費（公費3%）	国民皆保険
財源	国の補助金や患者自費負担の医療費	国や自治体補助金 保険料、患者個人負担
国から補助金	15%	45%
地方自治体補助金	なし	ある

表8 対象地区における医療機関の機能及び他の医療機関との連携

	中国（某鎮病院）	日本（某町民病院）
病院の機能	疾病治療、予防活動 計画出産技術の指導	疾病治療、健康相談、健康診断、 在宅医療（全例退院患者と連絡）、家庭訪問、 特別養護老人ホームや精神薄弱者と 連携
他の医療機関との連携	管内村衛生所の業務を監督 予防活動、計画出産技術などについて 県病院から指導を受ける	医科大学と医師充足、技術、教育など、 の面で協力 病病連携：県立病院 病診連携：他町の診療所

表9 対象地区における保健医療のマンパワー役割比較

	中国（某鎮病院）	日本（某町民病院）
医師	疾病治療、予防活動や計画出産 技術などの指導	病院、老人保健施設、特別養護ホーム、 患者自宅等で疾病治療 健康相談、健康診断、予防接種
郷村医師 （衛生所）	疾病の予防を主として、予防接種、 衛生活動、計画出産、衛生知識的 普及。簡単な治療、投薬、注射等 の医動行動	なし
保健婦 （保健センター）	なし	病院、保健所、老人保健施設、老人ホ ーム、保健センター、役場などで家庭 訪問、健康教育、健康相談、健康診断、
看護婦	病院での看護	病院、老人保健施設、特別養護ホーム での看護、在宅訪問看護

表 10 対象地区の住民に対する医療機関利用に関するアンケート調査結果

	中 国	日 本
貴方が病気になったとき、まず受診する医療機関はどれですか		
① 近い所	63%	57%
② 高度医療が受けられる所	27%	16%
③ 親切に診てくれる所	6%	24%
④ その他	4%	3%
貴方が病気になったとき、まず受診する医療機関は鎮（町民）病院ですか		
① はい	85%	77%
「はい」と答えた人はなぜですか	(N=74)	(N=58)
① 近いから	87%	83%
② 親切だから	0%	5%
③ 信頼感があるから	0%	10%
④ 本当はもっと大きな病院に行きたいが交通費が掛かるから	6%	0%
⑤ その他	7%	2%
もしもっと専門的な治療を受ける必要があったら、どのような医療機関を選びますか		
① 医者から紹介してもらった所	38%	84%
② 可能な限り高度な医療をしてくれる所	30%	15%
③ その他	32% (知人がいる所等)	1%
貴方はどのような治療をして欲しいですか		
① 病状に応じた治療	95%	98%
② 高度な機械を使ったり薬をたくさん出す治療	2%	1%
③ その他	3%	1%
貴方は病気になったら、一番心配することはなんですか		
① 治るか治らないか	64%	75%
② 医療費の支払い	29%	13%
③ 仕事への影響	6%	8%
④ その他	1%	4%
貴方は病院で薬をできるだけたくさんもらったほうがいいですか		
① はい	6%	9%
② いいえ	94%	90%
③ その他	0%	1%

日本財団補助金による

1997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

平成10年3月30日

I. 招へい責任者 浅野 伍朗



所属機関 日本医科大学 病理学教室

職名 主任教授

所在地 〒113-8602 東京都文京区千駄木1-1-5

電話 03-3822-2131

招へい研究者氏名 張 晶

所属機関 中国 北京市 中日友好医院 病理部

職 名 技師長

II. 日本滞在日程

平成9年8月20日 来日.

8月24日～9月20日 研究施設の見学.
研究設備の使用法の習得.

9月22日～10月31日. 剖検標本の採取. 切出し. 標本作成

11月4日～現在. 多摩永山病院へ出向

(H10.3.30)

生検標本の採取. 固定. 標本作成.
一般染色. 特殊染色. 免疫組織学的手法
を用いて「アルコール性肝線維症ならびに肝
硬変症における細胞外基質の動態」につ
いて研究を行う.

平成10年4月16日. 第87回日本病理学会総会にて
研究成果を発表する予定.

Ⅲ. 研 究 報 告 (4000字以上で記入して下さい) 別紙可)



Ⅳ. 助成金の使途内訳

助成金額 1000000 円

交通費 12万 円 宿泊費 36万 円 食費 36万 円

雑費 10万 円 他 6万 円

研究報告

課題： アルコール性肝線維症ならびに肝硬変症における
細胞外基質の動態

内容：

目的：細胞外基質(ECM)は細胞の増殖制御因子の一つとして注目され、近年、分子生物学および分子病理学の発展と共に、その機構の解明が進められています。ここに、肝臓における線維化の進展過程における細胞外基質の動態とその役割についての解明を目的に、アルコール性肝線維症と肝硬変症における各種 ECM 成分の動態につき免疫組織化学的手法を用いて検討した。

対象と方法：早期および末期のアルコール性肝線維症とアルコール性肝硬変症患者の肝生検標本あるいは剖検標本を用いて、10%ホルマリン液で固定後、通常の方法を用いて脱水後、パラフィン包埋し、4~6umの厚さの標本作製した。光学顕微鏡的にはH&E染色に加えて、Masson染色、Victoria blue and Sirius Red染色にてI,III型collagenの局在を観察すると共に、免疫組織化学的手法(LsAB法)により、肝臓におけるIV型collagen, Fibronectin(FN), Laminin(LN), Proteoglycans(PG)-C4s, FactorVIII, basic Fibroblast Growth Factor(bFGF), Transforming growth factor- β (TGF- β)および α -smooth muscle actin(α -SMA)の局在を観察した。対照として正常肝臓を使用した。免疫組織化学的にI,III,IV型collagenとFibronectinについては反応前に0.1%のproteaseで10~30分間処理し、LamininとProteoglycansについては反応前に0.4%のpepsinで30分間処理を行った。使用したI,III,IV型collagen, FN, LN, PG-C4s, FactorVIII, α -SMA抗体はいずれもDAKO社製で、bFGF, TGF- β 抗体はRDS社製の商品である。

結果：

正常肝臓内における各種ECM成分の局在の特徴をみると、I型collagenは主にグリソン鞘および大小の静脈周囲に分布していた。III型collagenとFNは肝類洞壁に局在し、IV型collagenとLNはグリソン鞘の胆管と血管の基底膜にその局在が見られた。Proteoglycansは主に血管壁と門脈域の間質

にわずかにその局在が見られた。Victoria blue and Sirurs Red 染色では肝内の弾力線維は淡明な青色を示し、不規則な配列が見られ、血管壁および血管周囲に局在し、被膜内とグリソン鞘の膠原線維と混在していた。正常な肝組織の類洞には弾力線維はなく、蛍光顕微鏡で弾力線維の蛍光は認められないが、Ⅲ型 collagen は緑色、Ⅰ型 collagen は赤黄色を呈し、粗な索状の配列を示した。そして、門脈域と中心静脈周囲の細胞外基質の成分はⅠ型 collagen が主体で、肝類洞ではⅢ型 collagen が見られた。

アルコール性肝線維症の初期では、病変は終末肝静脈と類洞の周囲から始まり、中心静脈周囲と門脈域で幅の広い線維性隔壁の形成がみられ、類洞間の肝細胞は消失していた。そして、隔壁内に多くの α -SMA 陽性細胞の増殖が見られ、活性化された伊東細胞、即ち myofibroblast が確認された。Masson 染色, Victoria blue and Sirurs Red 染色では myofibroblast の周囲に多量の弾力線維とⅠ,Ⅲ型 collagen の局在が観察された。また、Ⅰ型 collagen は赤色、Ⅲ型 collagen は緑色を呈していた。産生された大量の線維は門脈域から肝類洞に向かって伸び、弾力線維,Ⅰ・Ⅲ型 collagen, FN, LN を含む細胞外基質が含まれていた。図 6, 7 の如く線維隔壁内の毛細血管様間隙に FactorⅧ陽性の内皮細胞と内皮細胞の直下にⅣ型 collagen 陽性の基底膜の形成がみられた。また、線維隔壁には PG-C4s の沈着が見られ、肝線維化の初期には伊東細胞が活性化され盛んに増殖し線維の産生に関与していた。これらの細胞は弾力線維,Ⅰ・Ⅲ型 collagen, FN, LN を含む細胞外基質を合成し、類洞の内皮細胞の直下に基底膜を形成し、毛細血管の増生に関与していた。

また、病変の進展と共に、肝細胞が bFGF, や TGF- β などの増殖因子を産生し、autocrine や paracrine 機構を介してクッパー細胞と伊東細胞の増殖をさらに促進させ、細胞外基質も増加していた。

肝硬変症の末期では線維隔壁の線維成分の密度は高く、毛細血管様間隙の減少が認められた。また、肝類洞には多数の α -SMA 陽性細胞と多量の弾力線維、Ⅰ,Ⅲ型 collagen の局在が認められ、膠原線維の密集する部位にはⅠ型 collagen の顕著な増加を認めたが、Ⅲ型 collagen は相対的に減少していた。

考察：

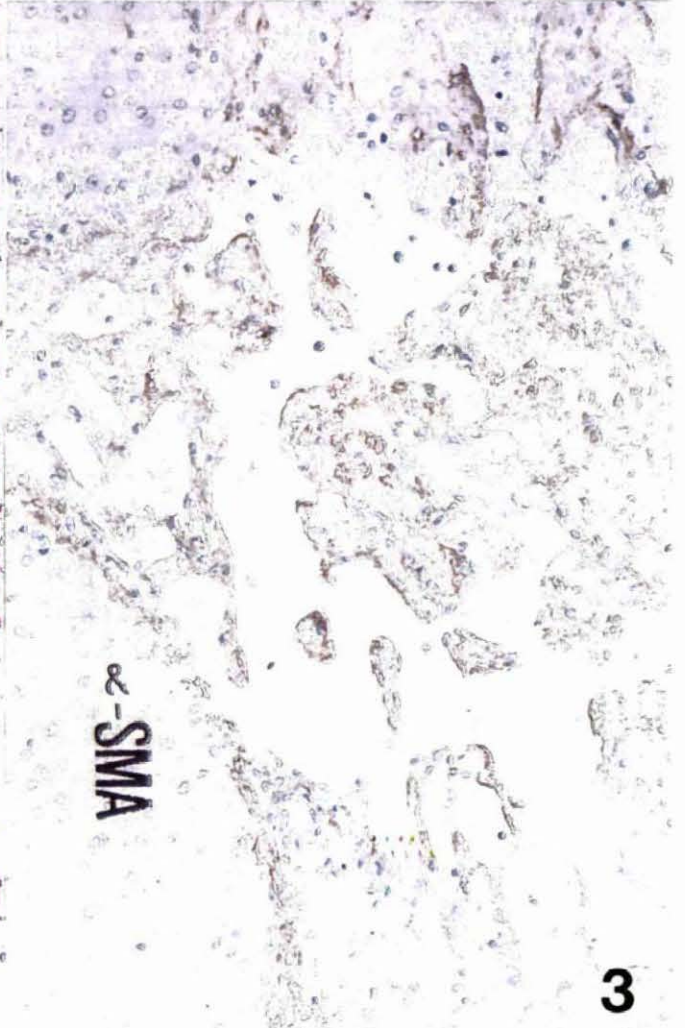
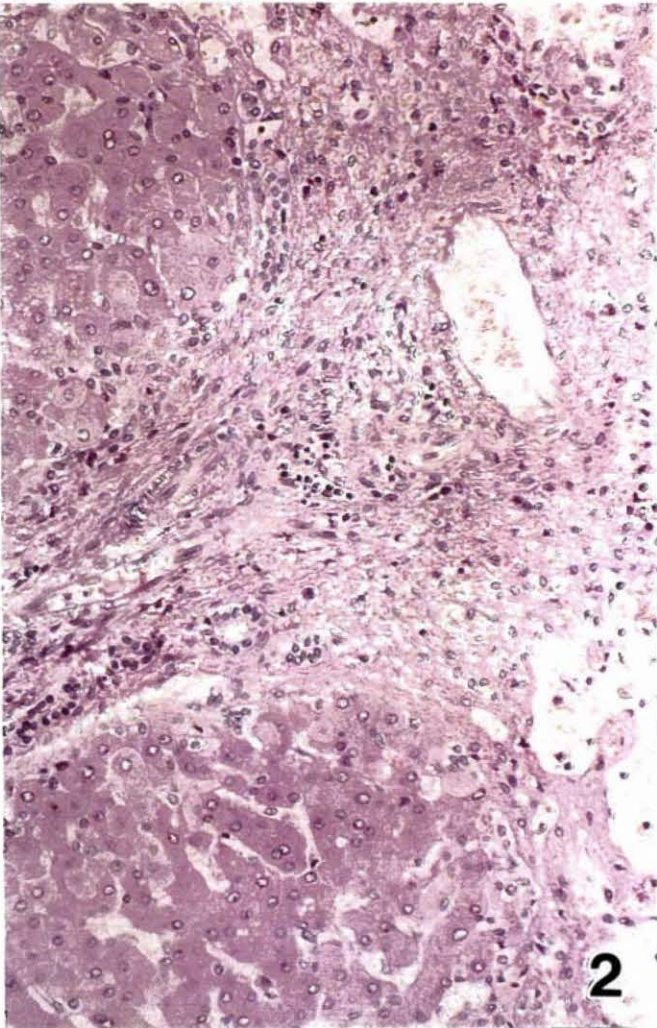
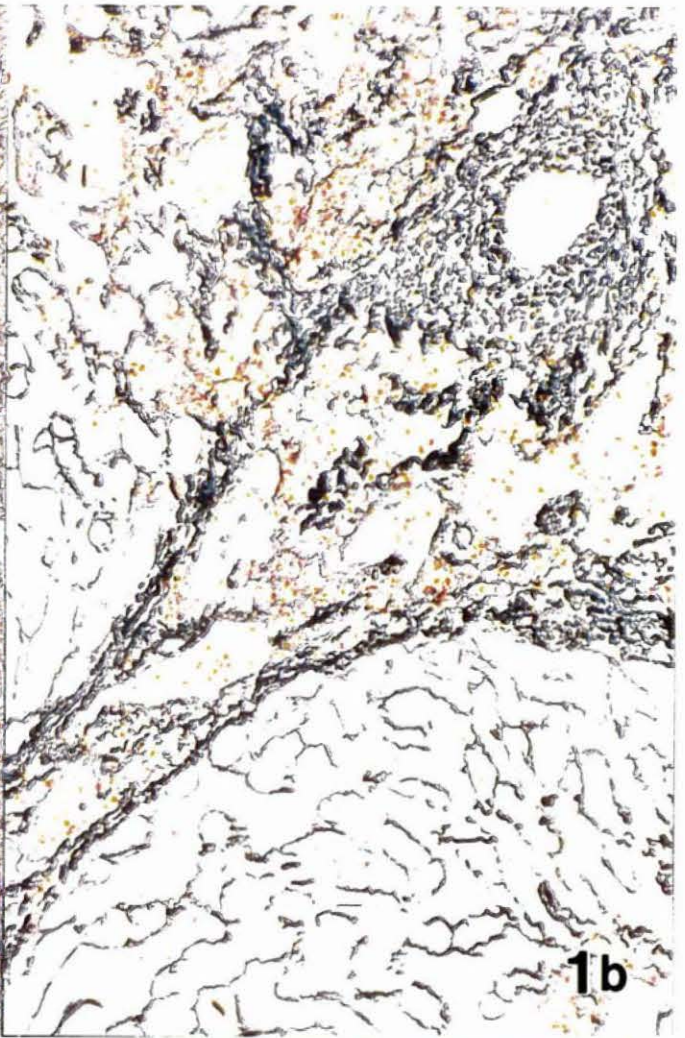
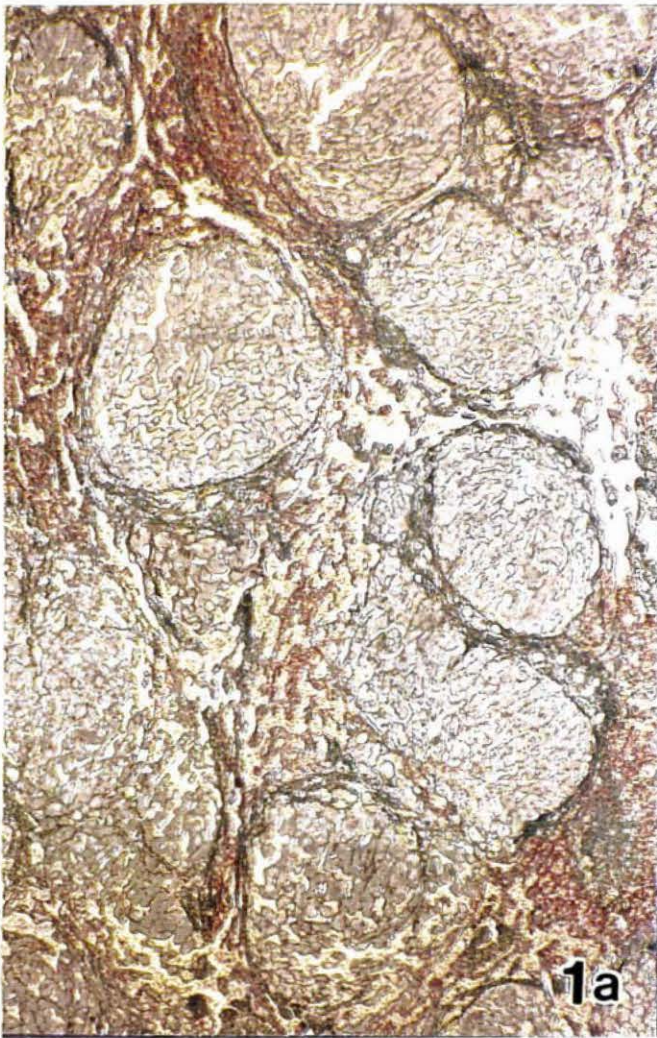
肝線維化の進展過程においては、細胞外基質の合成は亢進し、多量の細胞外基質が肝内に見られる。I型 collagen は 8~10 倍、III型 collagen は 3~4 倍、IV型 collagen は 50 倍にまで増加していた。PG-C4s、FN、LN を含む細胞外基質の合成も、2~10 倍に増加していた。正常肝組織内では細胞外基質および類洞の間隙は肝臓全体積の約 20% を占めるが、本研究によると、アルコール性肝線維症の初期には 60% にも達していた。肝線維化の進展では、細胞外基質の産生と分解の反復で進展すると思われる。

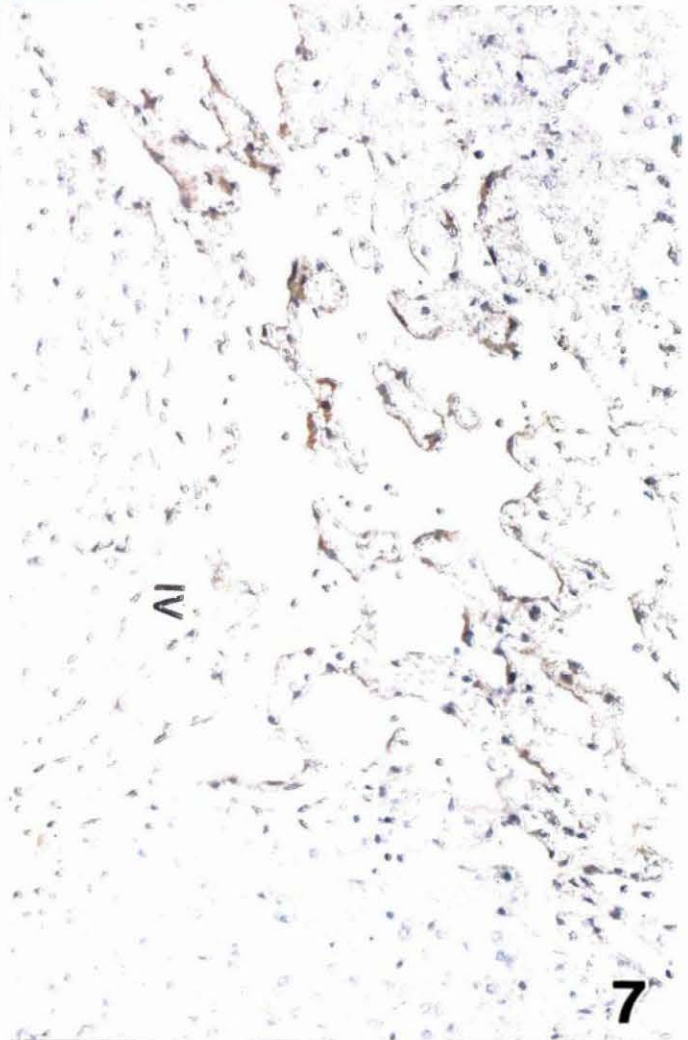
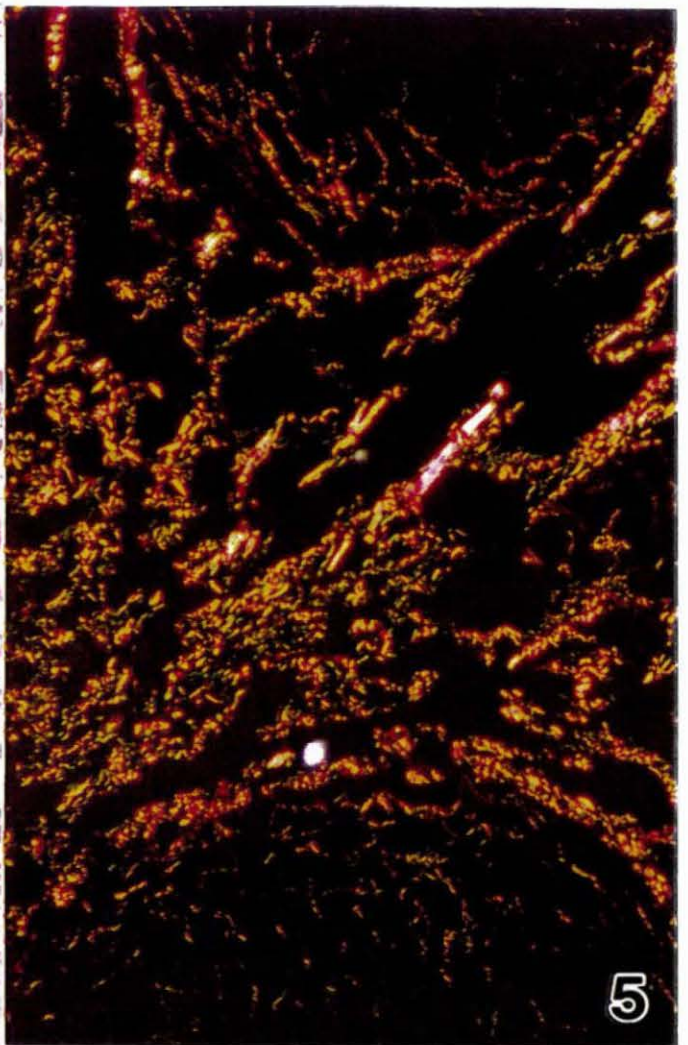
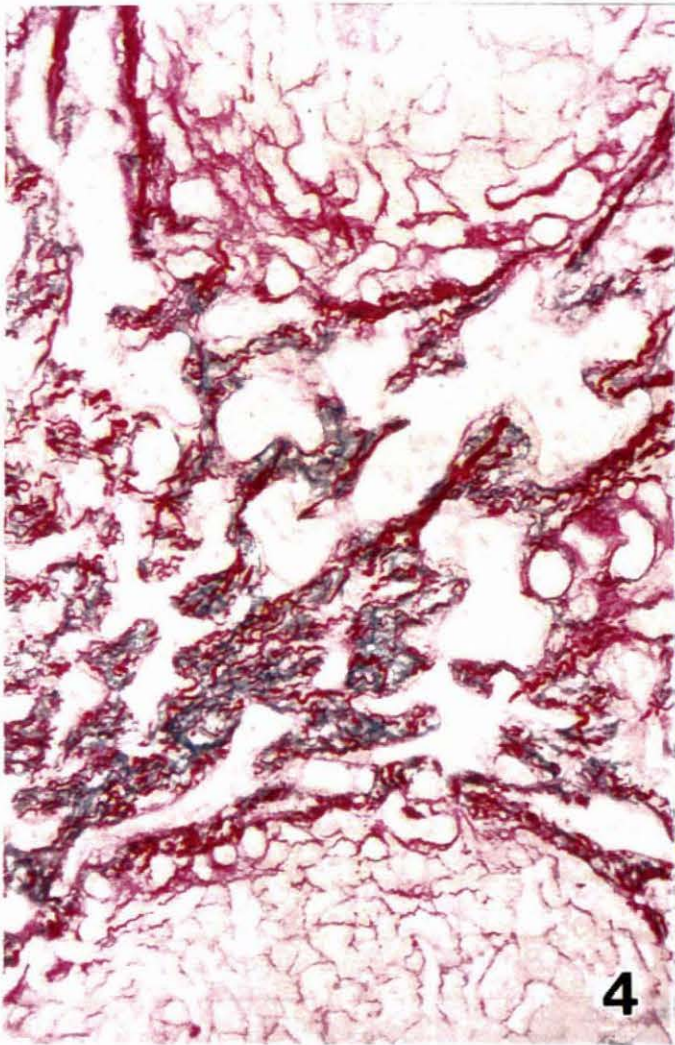
アルコール性肝線維症の初期では伊東細胞が活性化し線維細胞化し増殖する。これらの細胞より多量の細胞外基質が産生され、I、III型 collagen は基底膜を構成し、肝類洞内の毛細血管増生が肝線維症の初期変化の特徴の一つと考えられる。このように肝線維化の進展と共に、bFGF、や TGF- β などの増殖因子の産生が促進し、autocrine や paracrine 機構を介してクッパー細胞や伊東細胞の増殖を促進し、細胞外基質の産生が増加する。

肝硬変症の末期では線維隔壁内の血管様間隙が減少し、幅の広い線維隔壁が形成される。特に Masson 染色や Victoria blue and Sirius Red 染色では I、III 型 collagen の局在と共に、線維増生の時期や成分変化の比率などが観察できる。隔壁内の弾力線維と膠原線維は平行に配列し、I 型 collagen を主成分とする線維束が再生結節を囲み、典型的な肝硬変症の偽小葉が形成される。III型 collagen の局在も認められるが、相対的に減少傾向が見られる。

以上、肝線維化の進展過程においては細胞外基質の産生と分解が繰り返され、膠原線維の性状変化が見られる事が確認された。

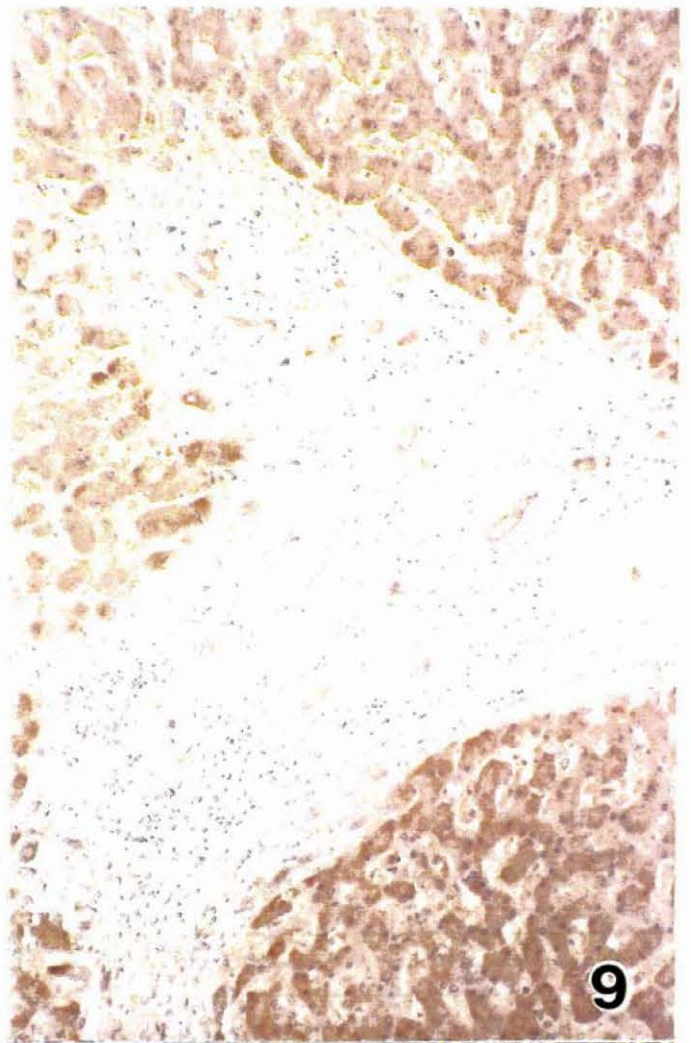
- 図 1 : アルコール性肝線維症の初期では偽小葉を囲む線維束が幅広く疎で(a)、血管様間隙が中心静脈に移行している(b)。
- 図 2 : 線維隔壁に拡張した血管様間隙が多数存在し、その周囲に多量の細胞外基質成分と細胞成分が見られる。
- 図 3 : 肝類洞内に α -SMA 陽性細胞の増殖が見られ、活性化された伊東細胞、即ち myofibroblast が確認できる。
- 図 4 : 増殖した細胞の周囲に多量の弾力線維と膠原線維が見られる。
- 図 5: 図 4 と同一切片の蛍光顕微鏡写真で、I 型 collagen は赤色、III 型 collagen は緑色で表示される。
- 図 6 : 線維隔壁内の毛細血管様間隙に Factor VIII 陽性の内皮細胞の存在がみられる。
- 図 7 : 内皮細胞の直下に IV 型 collagen 陽性の基底膜形成が見られる。
- 図 8 : 線維隔壁に PG-C4s の沈着が見られる。
- 図 9,10 : 肝硬変症の肝細胞に bFGF(9) と TGF- β (10) の発現を認めた。
正常肝組織にその発現を認めない。
- 図 11 : 末期肝硬変症では線維隔壁内の血管様間隙が減少し、幅の広い線維隔壁を作り、III 型 collagen の局在が認められる。
- 図 12 : 肝硬変症の末期では線維隔壁内の弾力線維と膠原線維が平行に配列する。
- 図 13 : I 型 collagen を主成分とする線維束が再生結節を囲み、典型的な肝硬変症の偽小葉を形成する。







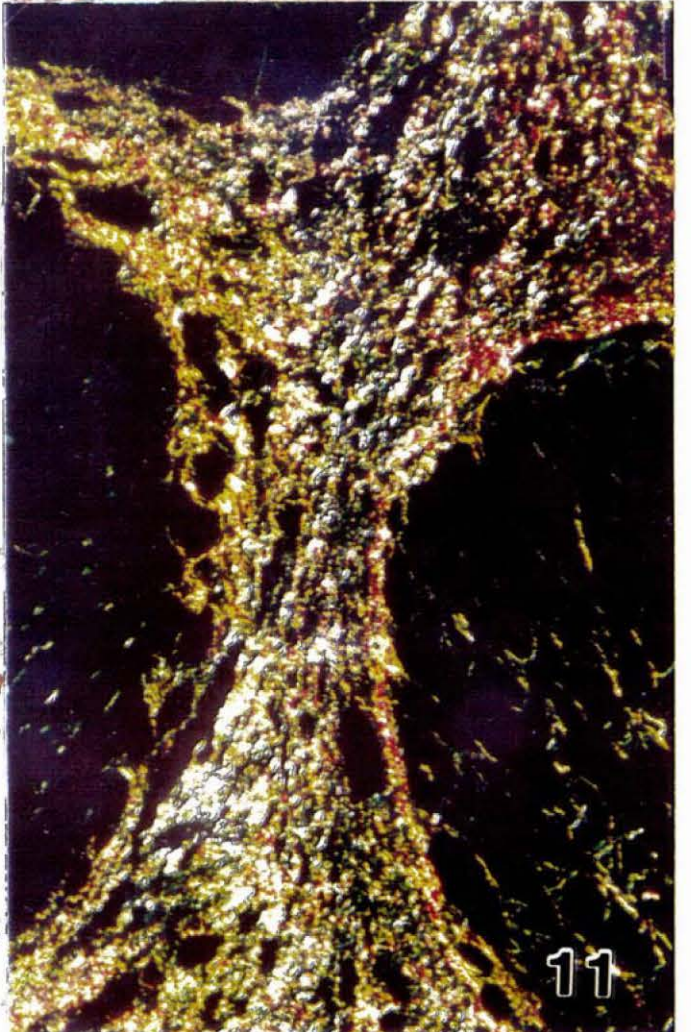
8



9



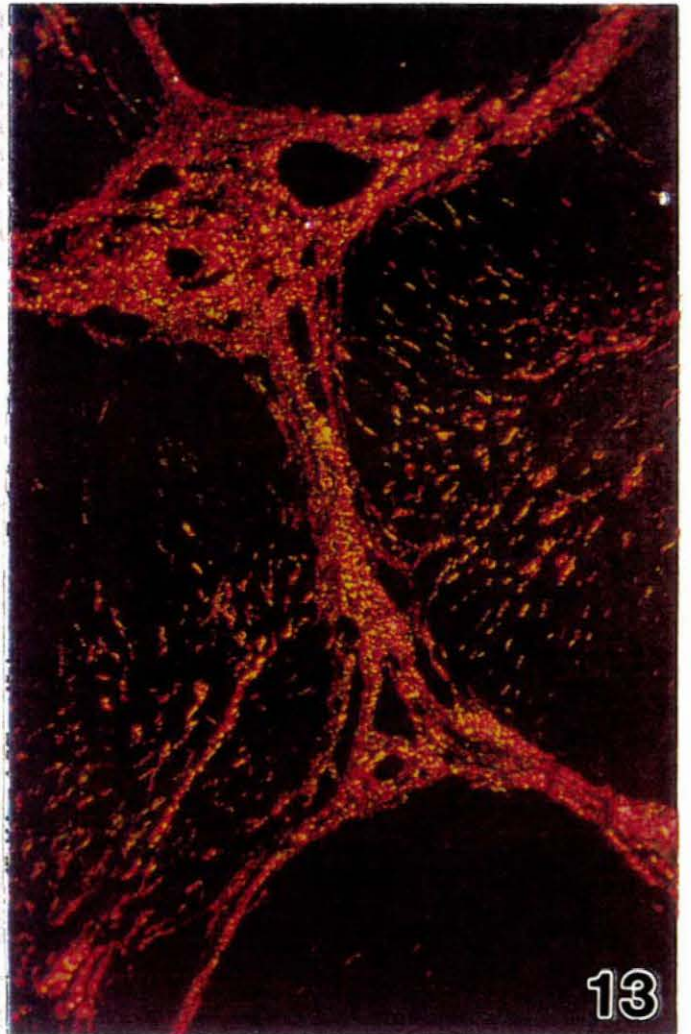
10



11



12



13

Argentation and Masson double staining

1. sections deparaffinize into the water,
2. in the 0.5% potassium permanganate solution oxidation 5 min.,
3. flowing water 5 min.,
4. 2% oxallic acid solution 2 min.,
5. washing 2 min.,
6. 2% ammonium iron alum solution 40 second,
7. DW washing 5 min.,
8. ammoniacal silver solution 5 min.,
9. DW washing 1 second,
10. 70% alcohol 1 second,
11. reducing rinses 5 min.,
12. flowing water 2min.,
13. gold chloride solution 10 min.,
14. washing 1min.,
15. oxalic acid solution 2 min.,
16. washing 2 min.,
17. sodium thiosulfate solution 5 min.,
18. washing 1 min.,
19. potassium dichromate 10 % 10 min.,
20. washing 5 min.,
21. nuclear fast red solution 2 min.,
22. washing 2 min.,
23. martius yellow and phosphotungstic acid solution 5 min.,
24. washing,
25. 0.5% glacial acetic acid solution washing,
26. Masson's solution 10 min.
27. 0.5% glacial acetic acid solution washing,
28. 2.5 % phosphotungstic acid solution 5 min.,
29. 0.5% glacial acetic acid solution washing,
30. 2 % light green staining 5 min.,
31. 0.5% glacial acetic acid solution washing,
32. alcohol dehydration,
33. xylene clearing .
34. covering.

(showing the reticular fibre and collagen)

Victoria blue and Sirius red double staining

1. sections deparaffinize into the water,
2. 0.5 % potassium permanganate solution oxidation 5 min.,
3. washing 2 min.,
4. 2 % oxalic acid solution 2 min.,
5. wash,
6. 70 % alcohol 5 -10 second ,
7. victoria blue solution stains 24h,
8. 70 % alcohol 10--20 min.,
9. sirius red stains 1 h,
10. wash
11. dehydration in the alcohol,
12. covering of the sections.

(1) Victoria blue showing the elastic.

(2) Sirius red staining show the type I and type III collagen under the polarization microscope.

日本財団補助金による

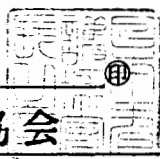
1997年度日中医学協力事業助成報告書

— 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12月12日

I. 招へい責任者 見 藤 隆 子 
所属機関 社団法人 日本看護協会 職名 会 長
所在地 〒150 東京都渋谷区神宮前5丁目8番2号 電話 03(3400)8331
招へい研究者氏名 閻 秀 英
所属機関 協和医科大学付属阜外心臓血管病院看護部
職 名 看護婦
研 究 テ ー マ 看護管理と継続教育

II. 日本滞在日程

9/16 来日

9/17-22 見学：表参道訪問看護ステーション
日本看護協会管理学会

9/24-10/17 看護管理認定コース：セカンドレベルII

10/20-11/4 見学：杏林大学医学部付属病院
日本医科大学付属多摩永山病院
東京榊原記念病院

自由研究

11/5-18 看護教育：継続教育

11/20-12/8 看護管理：ミドル・マネージメント（婦長コース）

Ⅲ. 研 究 報 告 (4000字以上で記入して下さい 別紙可)

別紙のとおり



中 央



中 央

研修報告書

研修期間

平成9年9月16日—12月9日

場所

日本看護協会

看護教育研修センター

研修生

中国 閻秀英

<1>最新ニュース - 夕 - 情報.

<2>看護継続教育の考え方と実際.

<3>教育企画の知識と技術.

<4>都. 道. 府. 県. 看護協会の教育及び運営の課題.

3. モデル マネジメント コース

<1>コミュニケーション リーダーシップとグループ マネジメント.

<2>文献の活かし方.

<3>目標管理 考え方と作り方.

<4>看護管理の実際. 演習. 看護部門の目標管理.

<5>医療保険制度改革と診療報酬体系の見直し

<6>看護の本質と看護を管理するということ

<7>看護方式変更のプロセス プライマリーナシクスの導入

4 見学

<1>杏林大学医学部付属病院.

<2>日本医科大学付属多摩永山病院.

<3>東京神原記念病院.

必要があります。看護実践の教育内容が理論的に教えられ、現在の若者を育てること看護教育を生涯教育として位置づけられています。今の社会の変化にともない、看護への期待、要求が高まると思われますし厳しくなると思われます。当然、この点は教育の内容や看護婦自身が一定の水準であることにより、看護レベルを向上して行けるとおもいます。

環境論の学習を通して、昨の看護管理の概要や高齢化の現状や介護保険や少子高齢化社会看護問題検討などを学びました。わが国は将来高齢化社会を迎え、老人の晩年の福祉事業やリハビリテーションや児童の健康保護などを看護が専門職としての職域を広め深めゆくためには、現在看護サービスの拡大と看護職員の資質の向上が重要な課題となります。社会主義市場経済の発展に寄与し、これに国民の期待医療ニーズに対応する医療事業を推進する、これは看護のニーズに色濃く表われます。わが国の職業教育に大学看護学部や大学看護学部や看護学校などが何種類もあるが、卒業後の継続教育専門センターがあります。看護婦の素質及び年齢構成は日本と同じですが、わが国は看護婦らは看護を生涯職業にしています。だから看護婦の中堅人材が大勢います。一部の看護婦が職業化は少なく、主婦も兼ねています。今、社会の環境の影響を受ける中堅人材の学習ニーズがだんぜん高まっています。看護に対して実践の経験はあるが経験のまとめや看護領域の研究などの能力が十分でない。経験の欠けた仕事に任せれば

日本財団補助金による


1997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

平成 10 年 3 月 12 日

I. 招へい責任者 下門 顕太郎 
所属機関 国立循環器病センター研究所 職名 室長
所在地 〒565-8565 大阪府吹田市藤白台5丁目7番1号 電話 06-833-5012

招へい研究者氏名 宋志清
所属機関 泰安中心医院 (中華人民共和国 山東省)
職 名 主治医師

II. 日本滞在日程

平成9年8月28日来日、平成10年2月25日 帰国のため離日した。

この間、国立循環器病センター研究所の研修生の身分で、同研究所 機能評価研究室において、血管壁の細胞情報伝達に関する研究に従事した。成果は第62回日本循環器学会学術集会にて発表予定であり、また論文を投稿中である。



Ⅲ. 研究報告 (4000字以上で記入して下さい 別紙可)

和文抄録

血管傷害による血管壁内の細胞内情報伝達の変化。
—とくに接着斑のチロシンりん酸化蛋白の変化について—

【目的】最近、細胞と細胞外マトリックスの接着部位 (focal adhesion 以下 FA) が血管傷害にともなう様々な情報伝達に参与する可能性が指摘されている。今回このような情報伝達に関わるとされる FA の構成分子のチロシンりん酸化が、バルーンカテーテルによる血管傷害によりどのように変化するか検討した。【方法】12週令雄性 Sprague-Dawley ラットの両側総頸動脈および胸部大動脈を、sodium orthovanadate で前処置後摘出した。動脈中膜を界面活性剤を含む溶液中で細切・ホモゲナイズし得られた可溶画分を、抗りん酸化チロシン抗体で免疫沈降し、同抗体および種々の FA 構成蛋白に対する抗体で Western blot 分析を行った。また左頸動脈を Fogarty embolectomy catheter で傷害後、経時的に屠殺、同様の分析を行い、非傷害右頸動脈と比較した。【結果】正常大動脈および頸動脈では FA 構成蛋白である paxillin および focal adhesion kinase のチロシンりん酸化が著明であった。また talin、phosphatidylinositol 3-kinase の弱いチロシンりん酸化が認められた。バルーンカテーテル傷害後、focal adhesion kinase のチロシンりん酸化は著しく低下したが、paxillin では変化せず、phosphatidylinositol 3-kinase では増加した。傷害早期には PDGF レセプターおよび PDGF により活性化される phospho-lipase C- γ のりん酸化は認められなかった。【総括】バルーンカテーテル傷害により血管平滑筋と細胞外マトリックスとの接着部位に局在する情報伝達分子のチロシンりん酸化状態が変化した。この変化は増殖因子を介さず、カテーテルの機械的傷害により直接引き起こされると思われた。従来指摘されている増殖因子以外に機械的刺激が直接血管細胞の反応を惹起する可能性が示された。

Ⅳ. 助成金の使途内訳

助成金額 1,000,000 円

交通費 157,291 円 宿泊費 345,200 円 食費 480,000 円

雑費 17,670 円 他 -161 (利子) 円

日本財団補助金による 1997 年度日中医学協会事業助成報告書

Major tyrosine-phosphorylated proteins in the rat carotid artery, FAK and paxillin, are decreased after balloon injury.

血管傷害による血管壁内の細胞内情報伝達の変化。

—特に接着斑のチロシンりん酸化蛋白の変化について—

招聘責任者： 下門 顕太郎

国立循環器病センター研究所

招聘研究者： 宋 志清

泰安市中心医院 主治医師

Key words: cell adhesion molecules; muscle, smooth; remodeling; restenosis; balloon

Abstract

Background. Protein tyrosine phosphorylation plays an important role in signal transduction mediated by cytokines and vasoactive substances, and through the focal adhesion. However, the protein tyrosine phosphorylation in the normal and injured artery has not been elucidated. Therefore, we attempted to identify the major tyrosine-phosphorylated proteins in the normal artery, and their changes after balloon injury. **Methods and Results.** The normal and balloon-injured carotid arteries, the aorta, and other tissues from Sprague-Dawley rats were perfused with sodium vanadate, excised, and then homogenized in detergent-containing lysis buffer. The clarified tissue lysate was subjected to immunoprecipitation with anti-phosphotyrosine antibody, and then analyzed by Western blot with antibodies against focal adhesion kinase (FAK), paxillin, and phosphotyrosine. Western blot analysis with three different antibodies against phosphotyrosine revealed that pp68 and pp125 were the two major tyrosine-phosphorylated proteins present in the normal carotid artery and the aorta. Reprobing with various antibodies identified these proteins as paxillin and FAK. Immunodepletion with anti-phosphotyrosine removed FAK and paxillin, suggesting that most of these proteins were tyrosine-phosphorylated in the artery. The artery contained greater amount of tyrosine-phosphorylated FAK compared to the other tissues examined, including the inferior vena cava and the heart. Following the balloon injury of the carotid artery, but not after endothelial denudation *ex vivo*, the content of FAK and paxillin was decreased. **Conclusions** Our findings suggested that FAK and paxillin may play an important role in the maintenance of the normal structure and function, and in the response to balloon injury of the artery.

Tyrosine phosphorylation plays an important role in the signal transduction mediated by growth factors, cytokines, vasoactive substances, cell-cell or cell-matrix interaction, and mechanical stimuli (see reviews, 1 – 2). Based on studies with cultured vascular cells, tyrosine phosphorylation has been implicated in the maintenance of the structure and function of the normal artery[3 - 4] as well as in its responses to injury[5]. Activation of the PDGF receptor tyrosine kinase has been studied in the artery

in vivo [6]. However, the overall state of tyrosine phosphorylation in the normal and injured artery has not been elucidated.

Methods

Antibodies: Anti-phosphotyrosine (PY20), anti-focal adhesion kinase (FAK, clone 77), and anti-paxillin (clone 349) monoclonal antibodies were obtained from Transduction Laboratories (Lexington, Kentucky). Anti-phosphotyrosine (4G10) and anti-FAK (2A7) were obtained from Upstate Biotechnology, Inc. (Lake Placid, NY). Anti-phosphotyrosine rabbit IgG (RF-1) was a kind gift from Dr. Jiro Seki.

Tissue preparation: Eight-week-old male Sprague-Dawley rats were killed with a lethal dose of pentobarbital (50 mg/kg). After ice-cold sodium vanadate solution, containing 0.5 mmol/L sodium ortho-vanadate, 10 mmol/L phosphate buffer (pH 7.4), 150 mmol/L sodium chloride, and 20 mmol/L hydrogen peroxide, was perfused through the left ventricle of the heart under pressure of 110 mm Hg, the carotid artery and the aorta were excised. After the adventitia was removed, the remaining arterial tissue was minced in cold RIPA buffer [7], and homogenized in a motor-driven Daws homogenizer. Unsolubilized material was removed by centrifugation at 15,000 r.p.m. for 20 minutes at 4 ° C. The protein concentration of the resulting supernatant, used as tissue lysate, was determined by DC-protein assay kit (Bio-Rad, Hercules, CA). Each experiment was repeated at least three times with similar results.

Immunoprecipitation and Western blot analysis: Immunoprecipitation and Western blot analysis were conducted as reported previously [7], using RIPA buffer as the lysis buffer.

Immunodepletion: Since tyrosine phosphorylation of FAK and paxillin changes in response to various stimuli [8 – 14], we examined how much of FAK and paxillin is tyrosine-phosphorylated in the normal artery. Tyrosine-phosphorylated proteins in the tissue lysate were depleted by sequential immunoprecipitation with PY-20-Sepharose four times, and then FAK was immunoprecipitated with anti-FAK antibody.

Tissue distribution: For the study of the tissue distribution of FAK, tissue lysate was prepared from the heart, inferior vena cava, skeletal muscle, lung, kidney, and liver. Equal amount of protein (100 µg) from each tissue was used for immunoprecipitation with PY20.

Balloon injury: The left common carotid arteries of fifteen 10-week-old Sprague-Dawley rats were denuded of endothelium by three passages of a 2-F balloon catheter inserted through the left external carotid artery by a method reported previously[15]. After 24 h, 7 days and 17days, the content of tyrosine-phosphorylated proteins in the injured (left) and control (right) carotid artery was examined. Intraperitoneal administration of pentobarbital (30 mg /ml) and local administration of 1% xylocaine were used for anesthesia. All procedures were approved in advance by the institutional committee.

Ex vivo deendothelialization: To estimate the contribution of FAK and paxillin in the endothelium that was removed during the balloon injury, the endothelium of the aorta was removed ex vivo. The aorta was excised, transferred to cold sodium vanadate solution, and cut into two halves longitudinally. The endothelial cells of one half were removed with a surgical scalpel.

Results

Western blot analysis with three different anti-phosphotyrosine antibodies, PY20, 4G10 and RF-1, demonstrated that two major tyrosine-phosphorylated proteins, pp125 and pp68, were present in both the carotid artery and the aorta (data not shown). These bands were eliminated following addition of exogenous phosphotyrosine, but not following addition of phosphoserine or phosphothreonine, indicating that these bands represent specifically tyrosine-phosphorylated proteins. These two major tyrosine- phosphorylated proteins were identified as FAK and paxillin by probing the immunoprecipitate of tyrosine-phosphorylated proteins sequentially with PY20, anti-FAK, and anti-paxillin (Fig. 1, A). In a separate experiment where FAK and paxillin were immunoprecipitated with anti-FAK or anti-paxillin antibody, and probed with PY-20, both FAK and paxillin were also shown to be tyrosine phosphorylated (data not shown, but a similar finding also shown in Fig. 1, B, lane 8).

Following immunoprecipitation of tissue lysate depleted of tyrosine-phosphorylated proteins

with anti-FAK antibody, there was no FAK detected, while FAK was detected in the control lysate that was treated with protein G-Sepharose instead of PY20-Sepharose, indicating that most FAK was tyrosine-phosphorylated in the normal artery (Fig. 1, B). The same type of experiment conducted for paxillin demonstrated that all paxillin was tyrosine-phosphorylated in the normal artery (data not shown).

The aorta and the carotid artery contained more tyrosine-phosphorylated FAK than the inferior vena cava and the heart (Fig. 1C). The artery showed the greatest FAK content among the tissues tested, followed by the lung and the liver. As reported before [16], the kidney and the skeletal muscle had only small FAK content (Fig. 1C). Immunoprecipitation with anti-FAK antibody (data not shown) yielded the tissue distribution of FAK similar to those obtained by immunoprecipitation with PY20 (Fig. 1C).

Balloon injury of the carotid artery decreased the content of tyrosine-phosphorylated FAK and paxillin (Fig. 2A). This decrease was detected as early as 24 h after the injury (Fig. 2 B,C), through 17 days after the injury (Fig 2A, D), the last time point we examined. Immunoprecipitation with anti-FAK antibody revealed decrease of FAK protein (Fig 2 C) equivalent to the decrease of tyrosine-phosphorylated FAK detected by immunoprecipitation with anti-phosphotyrosine antibody (Fig 2 B), suggesting that the decrease was not due to the dephosphorylation of FAK or paxillin, but due to decrease of the content of these proteins themselves. The content of tyrosine-phosphorylated FAK and paxillin in the aorta deendothelialized *ex vivo* (Fig 2 E) was not different from that in the non-deendothelialized aorta, indicating that the decrease in FAK after the balloon injury was not due to loss of endothelial cells.

Discussion

In this study, we demonstrated that FAK and paxillin are two major tyrosine phosphorylated proteins in the normal rat artery, and characterized these proteins in the artery; most of these proteins are tyrosine phosphorylated in the normal artery; the artery contains larger amount of tyrosine-

phosphorylated FAK than the other components of the circulatory system; and balloon injury of the carotid artery decreases the content of these proteins. These findings suggest an important role of FAK and paxillin both in maintaining the normal structure and function of the artery, and in the development of vascular dysfunction after injury.

Most of the FAK and paxillin were tyrosine phosphorylated in the arterial wall as indicated by the failure to detect FAK or paxillin after immunodepletion of tyrosine-phosphorylated proteins. It is possible that FAK or paxillin are not tyrosine phosphorylated themselves, but are associated other tyrosine-phosphorylated proteins, and removed by immunoprecipitation with anti-phosphotyrosine. However, this is not likely because each of FAK and paxillin was tyrosine phosphorylated when it was immunoprecipitated with anti-FAK and anti-paxillin, respectively, and probed with anti-phosphotyrosine, and because the major tyrosine-phosphorylated protein was FAK or paxillin following the anti-FAK or anti-paxillin immunoprecipitation (data not shown).

It is interesting that the artery contained more FAK than the vein, while both consist a continuous circulatory system. This difference in FAK content may be partly explained by the difference in the blood pressures to which the artery and the vein are exposed, since the vein becomes arterialized when it is connected to the artery and exposed to a higher blood pressure [17]. This possibility is also supported by the observation that tyrosine phosphorylation of FAK in the heart is affected by the intraventricular pressure [14]. The difference of blood pressure may exert its effect directly through biomechanical sensors [18], indirectly through change in the matrix components [8 – 9], or through generation of molecules such as PDGF [10], insulin-like growth factor-I [11], thrombin [12], and angiotensin II [13]. Our finding that the artery is abundant in FAK accords with a previous report that the artery is a major tissue expressing FAK during the early development [16].

FAK and its tyrosine phosphorylation are implicated in the cardiac hypertrophy induced by pressure overload [14], in the sensing shear stress and subsequent increase of NO production by the endothelium [3], and in the survival of the cell [4]. Deficiency of FAK changes cell adhesiveness and cell motility, and causes lethal phenotype in FAK-knockout mice [19]. These reports suggest that the

tyrosine phosphorylation of these proteins plays an important role in signal transduction through the focal adhesion in the artery.

The vascular injury decreased the content of FAK and paxillin in the injured artery. This decrease was not solely due to the endothelial loss, since deendothelialization of excised aortas did not decrease the content of FAK. One potential mechanism of this decrease is that via growth factors generated at the injury sites. Insulin and insulin-like growth factor-I decrease tyrosine phosphorylation of FAK through insulin receptor in vitro [20]. However, there is no evidence that insulin receptor is activated in injured arteries. Most of other growth factors increase tyrosine phosphorylation of FAK [8 – 14]. More likely is that the mechanical stretch associated with the ballooning disturbed the interaction between smooth muscle integrins and the extracellular matrix, dephosphorylated FAK and paxillin, and subsequently decreased the content of these proteins. Detachment of cells from the matrix dephosphorylated FAK in vitro [21]. Based on the observation that balloon injury causes change of the matrix composition and smooth muscle integrins, it has been pointed out that signals transmitted through focal adhesion may play an important role in the development of restenosis after balloon angioplasty[22]. Our study provides new evidence that balloon injury impairs the intracellular signaling pathway of signals transmitted through the focal adhesion.

Acknowledgments

This study was supported by Special Coordination Funds for Promoting Science and Technology from the Science and Technology Agency of Japan, a Grant from the Japan-China Medical Association, and a Grant-in-Aid for Scientific Research (C) from the Ministry of Education, Science & Culture. We thank Ms. H.Sugita for technical assistance.

References

1. Srivastava, A. Protein tyrosine phosphorylation in cardiovascular system. *Molecular and Cellular Biochemistry*.1995;149-150:87-94.

2. Berk BC, Corson MA. Angiotensin II signal transduction in vascular smooth muscle, Role of tyrosine kinases. *Cir Res.*1997;80:607-616.
3. Ishida T, Peterson TE, Kovach, NL ,Berk, BC. MAP kinase activation by flow in endothelial cells, role of beta 1 integrins and tyrosine kinases. *Cir Res.*1996;79:310-316.
4. Frisch SM, Vuori K, Ruoslahiti E ,Chan-Hui P-Y. Control of adhesion-dependent cell survival by focal adhesion kinase. *J Cell Biol.*1996;134:793-799.
5. Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature.*1993;362:801-809.
6. Panek RL, Dahring TK, Olszewski BJ ,Keiser JA. PDGF receptor protein tyrosine kinase expression in the balloon-injured rat carotid artery. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.*1997;17:1283-1288.
7. Higaki M, Sakaue H, Ogawa W, Kasuga M ,Shimokado K. Phosphatidylinositol 3-kinase-independent signal transduction pathway for platelet-derived growth factor-induced chemotaxis. *J Biol Chem.*1996;271:29342-29346.
8. Schaller MD, Borgaman CA, Cobb BS, Vines RR, Reynolds AB ,Parsons JT. pp125FAK, a structurally distinctive protein-tyrosine kinase associated with focal adhesions. *Proc Natl Acad Sci USA.*1992;89:5192-5196.
9. Hanks SK, Calalb MB, Harper MC ,Patel SK. Focal adhesion protein-tyrosine kinase phosphorylated in response to cell attachment to fibronectin. *Proc Natl Acad Sci USA.*1992;89:8487-8491.
10. Abedi H, Dawes KE, Zachary I. Differential effects of platelet-derived growth factor BB on p125focal adhesion kinase and paxillin tyrosine phosphorylation and on cell migration in rabbit aortic vascular smooth muscle cells and Swiss 3T3 fibroblasts. *J Biol Chem.*1995;270:11367-11376.
11. Leventhal PS, Shelden EA, Kim B, Feldman EL. Tyrosine phosphorylation of paxillin and focal adhesion kinase during insulin-like growth factor-I-stimulated lamellipodial advance. *J Biol Chem.*1997;272:5214-5218.
12. Choudahury GG, Marra F ,Abboud HE. Thrombin stimulates association of src homology domain containing adaptor protein Nck with pp125FAK. *Am J Physiol.*1996;270:F295-F300.

13. Leduc I, Meloche S. Angiotensin II stimulates tyrosine phosphorylation of the focal adhesion-associated protein paxillin in aortic smooth muscle cells. *J Biol Chem.* 1995;270:4401-4404.
14. Kuppuswamy D, Kerr C, Nirishige T, Kasi V S, Menick DR, Cooper GI. Association of tyrosine-phosphorylated c-src with the cytoskeleton of hypertrophying myocardium. *J Bio Chem.* 1997;272:4500-4508.
15. Clowes AW, Reidy MA, Clowes MM. Mechanisms of stenosis after arterial injury. *Lab Invest.* 1983;49:208-215.
16. Polte TR, Jaftilan AJ, Hanks SK. Focal adhesion kinase is abundant in developing blood vessels and elevation of its phosphotyrosine content in vascular smooth muscle cells is a rapid response to angiotensin II. *J Cell Biochem.* 1994;55:106-119.
17. Dobrin PB. Mechanical factors associated with the development of intimal and medial thickening in vein grafts subjected to arterial pressure. *Hypertension.* 1995;26:38-43.
18. Wilson E, Sudhir K, Ives HE. Mechanical strain of rat vascular smooth muscle cells is sensed by specific extracellular matrix/integrin interaction. *J Clin Invest.* 1995;96:2364-2372.
19. Ilic D, Furuta Y, Kanazawa S, Takeda N, Sobue K, Nakatsuji N, Nomura S, Fujimoto J, Okada M, Yamamoto T, Aizawa S. Reduced cell motility and enhanced focal adhesion contact formation in cells from FAK-deficient mice. *Nature.* 1995;377:539-544.
20. Konstantopoulos N, Clark S. Insulin and insulin-like growth factor-1 stimulate dephosphorylation of paxillin in parallel with focal adhesion kinase. *Biochem J.* 1996;314:387-390.
21. Kornberg L, Earp HS, Parsons JT, Shaller M, Julian RL. Cell adhesion or integrin clustering increases phosphorylation of a focal adhesion-associated tyrosine kinase. *J Biol Chem.* 1992;267:23439-23442.
22. Schwartz SM. Smooth muscle migration in atherosclerosis and restenosis. *J Clin Invest.* 1997;99:2814-2817.

Figure legends

Figure 1. Western blot analysis of tyrosine-phosphorylated proteins in arterial tissue lysates.

A: Tissue lysate of the aorta (AO, lanes 1, 3, and 5) and the carotid artery (CA, lanes 2, 4, and 6) was immunoprecipitated with PY20, and then analyzed by Western blotting. Three antibodies, PY20 (lanes 1 and 2), anti-FAK (lanes 3 and 4), and anti-paxillin (lanes 5 and 6) were applied sequentially to the same nitrocellulose membrane. Arrows indicate positions of FAK and paxillin. Molecular sizes are indicated on the left. **B:** Tyrosine-phosphorylated proteins in tissue lysates of the aorta were depleted by repeated immunoprecipitation with PY20-Sepharose beads (lanes 1-3, and 9-11), and then FAK was immunoprecipitated with anti-FAK antibody (lanes 4 and 12). In control determinations, the tissue lysates were treated with protein-G Sepharose instead of PY20-Sepahrose (lanes 5-7, and 13-15), and then FAK was immunoprecipitated (lane 8, 16). The nitrocellulose membrane was probed sequentially with PY20 (lanes 1-8) and anti-FAK antibody (lanes 9-16). **C:** FAK was immunoprecipitated with PY20 from various tissues, and detected with anti-FAK antibody.

Figure 2. Effects of balloon injury. **A:** Seventeen days after deendothelialization of the left carotid artery with a balloon catheter, the right (cont) and left (injured) carotid arteries were excised, and tyrosine-phosphorylated proteins were analyzed as described in the legend to Fig. 1. The lysate was immunoprecipitated(IP) with PY20 and probed with the same antibody. Arrows indicate positions of FAK, paxillin and the antibody(IgG). Molecular sizes are indicated on the left. **B:** Twenty-four h after the balloon injury, FAK was immunoprecipitated with PY20, and probed with anti-FAK. **C:** Twenty-four h after the balloon injury, FAK was immunoprecipitated with anti-FAK, and probed with the same antibody. **D:** The same nitrocellulose membrane as in A was reprobed with anti-FAK and anti-paxillin antibodies. **E:** Ex vivo deendothelialization. The aorta was cut into two halves longitudinally. Endothelial cells of one half were removed ex vivo, and FAK was immunoprecipitated with PY20, and probed with anti-FAK.

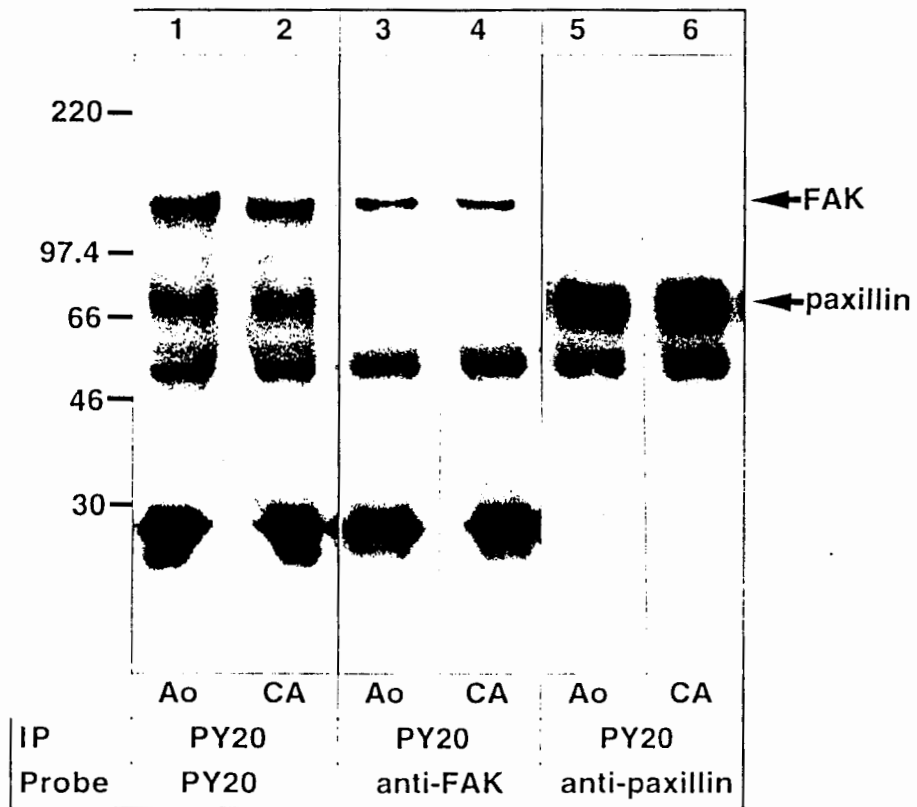


Fig 1A

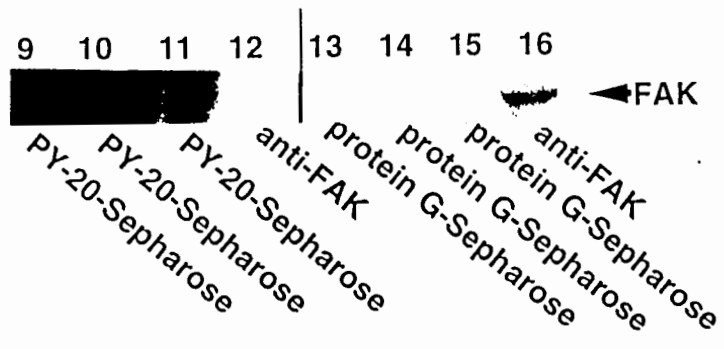
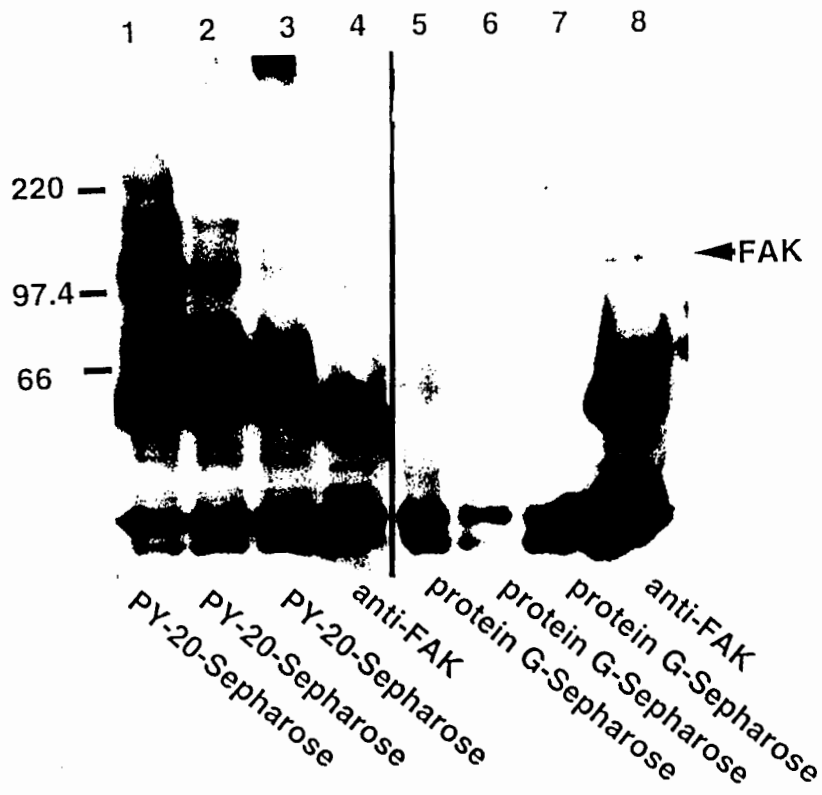
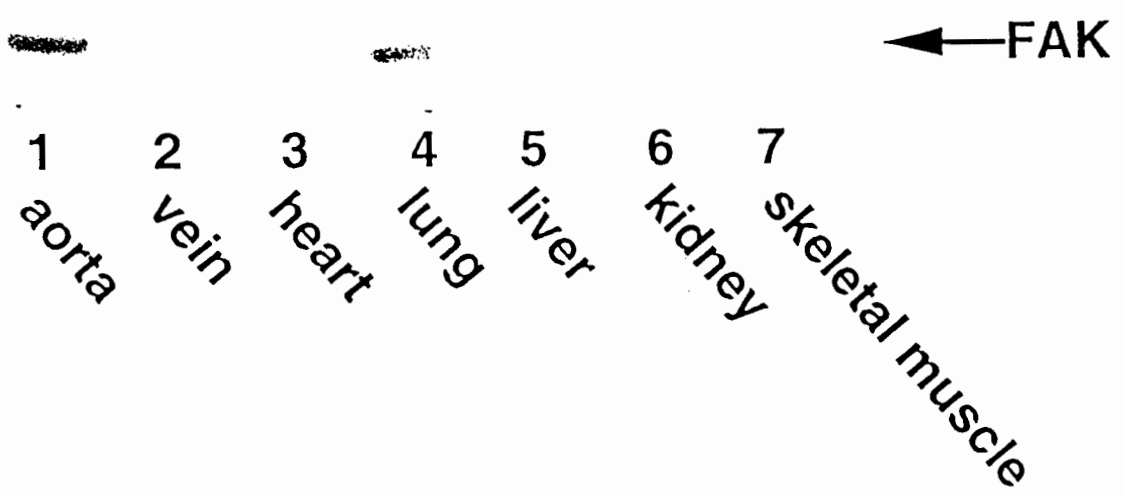
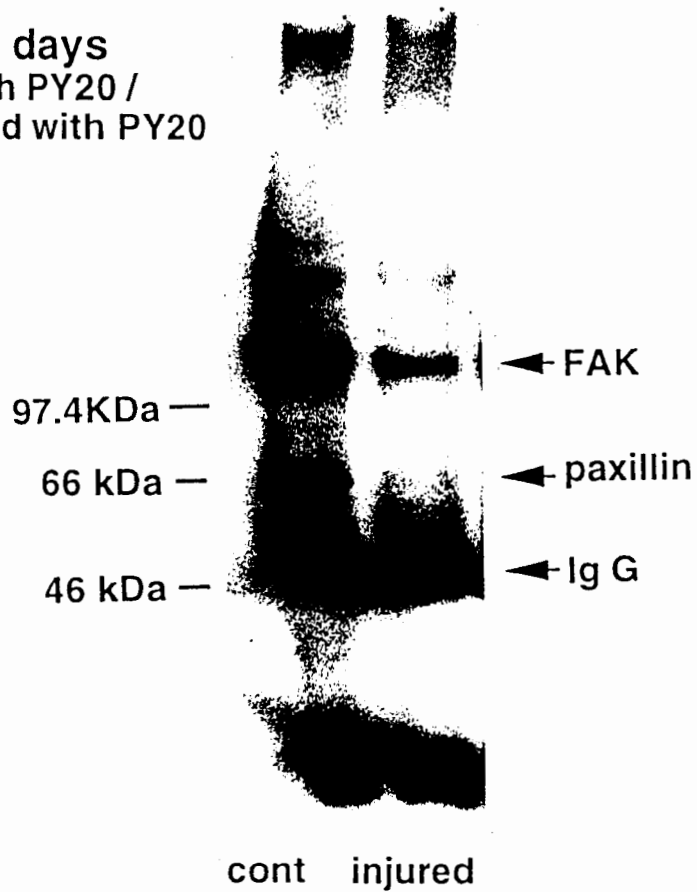


Fig 1B

Fig 1C



A. 17 days
IP with PY20 /
probed with PY20



B. 24h. IP with PY20 / probed with anti-FAK

C. 24h. IP with anti-FAK / probed with anti-FAK

D. 17 days. IP with PY20 / probed with anti-FAK

probed with anti-paxillin

E. ex vivo deendothelialization. IP with PY20 /
probed with anti-FAK

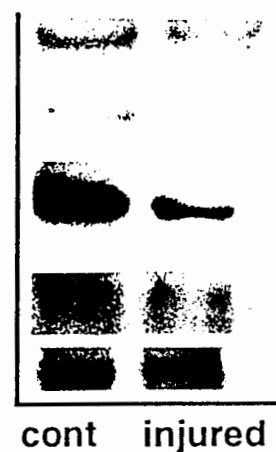


Fig 2

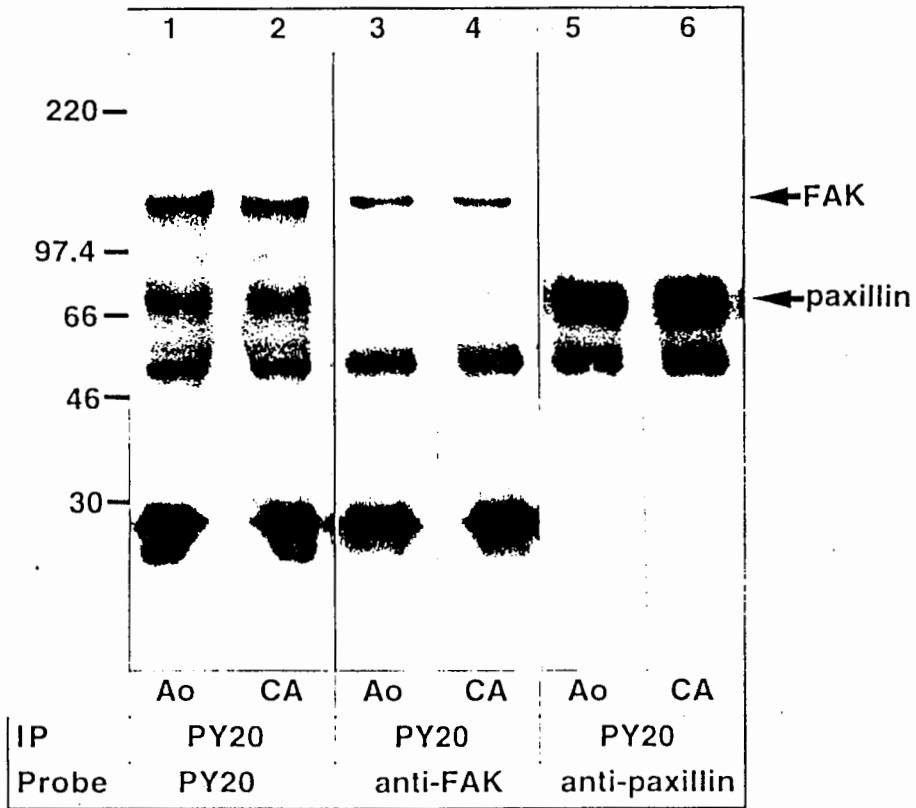


Fig 1A

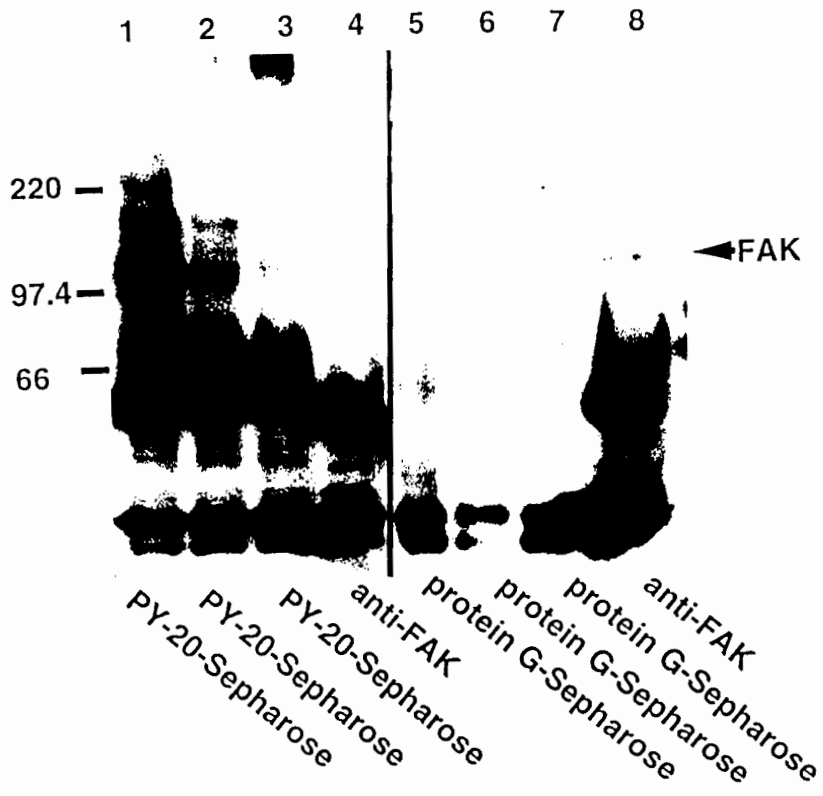


Fig 1 B

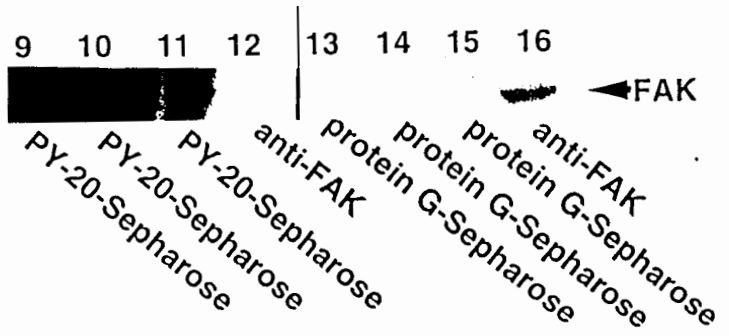
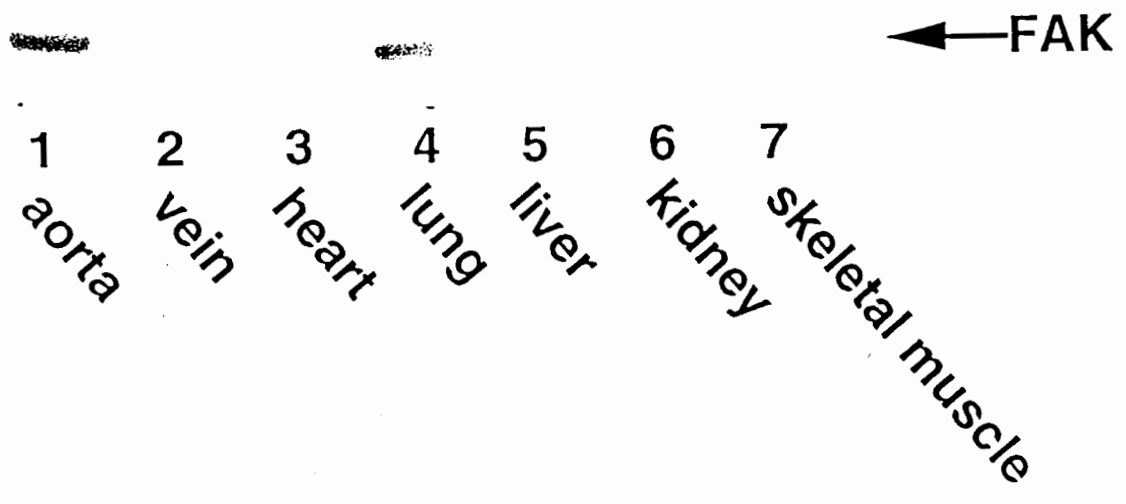


Fig 1 C



日本財団補助金による

1997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

1998年 3月 10日

I. 招へい責任者 佐藤 信 弘 (印)
所属機関 順天堂大学 消化器内科 職名 主任教授
所在地 〒113 東京都文京区本郷 2-1-1 電話 03-3813-3111
EXT. 3304
招へい研究者氏名 郭 新 彪
所属機関 順天堂大学 消化器内科
職 名 医学部 協力 研究員

II. 日本滞在日程

1997年9月4日	来日
1997年9月5日～	当研究室にて研究活動
1998年8月31日	帰国予定



アルコールによる肝障害の機構について

— 細胞間コミュニケーションの役割

はじめに

アルコール性肝障害は最終的に肝硬変、肝臓癌に進展し、肝疾患の主要な成
因の一つとなっている。従来、日本を含む東アジアにおいては、アルコール性
肝硬変は欧米に比し少なかった。しかし、最近生活習慣の変化につれ、飲酒量
が増大し、アルコール性肝疾患は増えつつある。

正常な肝臓は強力な再生能を持ち、物理的あるいは化学的な障害を受けた後、
数週間以内にはもとのサイズまで回復できる。アルコールの肝臓への影響は、
肝再生障害があげられる。大酒家、短期間または長期間にわたるアルコールを
摂取させた動物では、肝臓の再生能がかなりの障害を受け、アルコールによる
肝臓の不可逆的变化に繋がると思われる。現在のところ、アルコールによる肝
再生障害の機構についてまだよく分かっていない。アルコールが投与された動
物では、ポリアミン合成の障害や増殖因子に対する細胞感受性の低下などが指
摘されている。

ギャップ結合を介した細胞間コミュニケーションは細胞の増殖、分化におい
て重要な役割を果たしている。肝切除を受けた動物では、肝細胞間コミュニケ
ーションは最初に低下し、肝再生に伴い、徐々に回復し、最終的に肝切除前と
同じ程度にまで回復する。細胞間コミュニケーションを通じて、肝再生に重要
な情報伝達物質が交換されると考えられ、とくに肝再生後期の協調した細胞機
能の回復に重要と思われる。多くの研究から、細胞間コミュニケーションは肝
再生過程をコントロールする役割を果たしていることが示唆されている。

本研究では、アルコールによる肝再生障害機構を明らかにする研究の一環と
して、アルコールの肝細胞間コミュニケーションに及ぼす影響を *in vitro* に
おいて検討した。

方法

1 肝細胞の分離と初代培養

正常な雄性ラット（体重 200 g 前後）より *in situ* コラーゲンナーゼ灌流
法で doublet 肝細胞を作成した。Leibovitz's L-15 培地で細胞浮遊液を作り、
直径 6 センチのプラスチックディッシュに細胞を撒いて、37°C, 100% 空
気条件下で培養を行った。2 時間後に培地を交換し、アルコールの作用を検討
した。

2 肝細胞間コミュニケーションの測定

マイクロピペットを用い蛍光色素である Lucifer Yellow CH を肝細胞に注

入し、倒立蛍光顕微鏡下で doublet 肝細胞間色素の移動を観察し、それをギャップ結合を介した細胞間コミュニケーションの指標とした。

3 ギャップ結合蛋白であるコネキシン32細胞内分布の間接蛍光免疫染色

培養肝細胞を液体窒素で凍結し、 -20°C にて風乾させた後、ギャップ結合蛋白であるコネキシン32のモノクローナル抗体を用い、通常の免疫蛍光染色法に従って染色を行った。肝細胞のコネキシン32分布は共焦点レーザー蛍光顕微鏡下で観察、撮影した。

研究結果と考察

われわれはまず肝細胞間コミュニケーションの培養における経時的な変化を見た。培養早期には肝細胞間をよくカプリングされ、高いレベルの細胞間コミュニケーションが維持されているが、その後は徐々に低下し、9時間目に肝細胞間の色素移動率は10%程度までになった。肝細胞のコネキシン32の分布も細胞間コミュニケーションと一致する変化を見せている。これは今までの報告と一致しており、通常の培養条件ではコネキシン32のような膜蛋白はかなり速い速度で減少していくことが分かった。その結果、コネキシンで構築されるギャップ結合も機能しなくなり、最終的に細胞間コミュニケーションの低下に繋がると思われる。

そこで、肝細胞間コミュニケーションに対し、アルコールはどう影響しているかを *in vitro* において検討した。アルコールを添加した培養肝細胞では肝細胞間コミュニケーションの減少がほとんど見られず、培養9時間目でも80%に維持されており、しかも、この作用はアルコール濃度に依存していることが分かった。免疫蛍光染色でも、アルコールで処理した肝細胞は対照群細胞より細胞間にコネキシン32が多く分布していることが分かった。上記で述べたように、ギャップ結合を介した細胞間コミュニケーションは細胞の増殖、分化の引き金のような働きをしており、組織のホメオシースの維持に重要であると言われている。以上の所見から、アルコールがギャップ結合蛋白の turnover に何らかの影響を与えていることが示唆され、その肝再生障害機構を考える上で非常に興味深いと思われる。

アルコールによる肝障害はその代謝と深く関わっているとされている。肝臓ではアルコールが主にアルコール脱水素酵素によってアセトアルデヒドに代謝され、後者はさらにアルデヒド脱水素酵素の触媒で酢酸となる。アセトアルデヒドは生体内の種々の蛋白と結合して蛋白を変性させ、その機能に障害を与えると考えられている。酢酸も ATP の分解を助長し、肝細胞の酸化ストレスの増加に繋がると考えられる。そこで、われわれはアルコールのギャップ結合蛋白の turnover に対する作用過程にその代謝の関与を調べた。アルコール脱水素酵素およびアルデヒド脱水素酵素の抑制剤である 4-methylpyrazole と pargyline をそれぞれアルコールといっしょに培養液に添加して調べたところ、

両抑制剤はアルコールの肝細胞間コミュニケーションへの維持作用には影響を与えなかった。このことから、エタノールで処理された肝細胞で見られた細胞間コミュニケーションの維持はその直接作用によるもので、代謝の関与は少ないことが示唆された。

無処置の肝細胞に比べて、アルコールで処理されたものは培養ディッシュの上であまり伸展せず、細胞が球形に維持されたことが今回の研究で分かった。これはエタノールが細胞の骨格系への影響によるものと思われる。細胞形の保持は細胞膜上ギャップ結合蛋白の維持と何らかの関わりがあると思われ、今回の研究ではこのことについても検討した。細胞骨格の維持に微小管とアクチンが重要な役割を果たしていると言われている。そこで、肝細胞間コミュニケーションに対するアクチンの重合を阻害するサイトカラシン B と微小管の形成を阻害するコルヒチンの作用を検討した。サイトカラシン B またはコルヒチンで細胞の伸展が阻止され、一晚培養しても細胞は球形のままであった。しかし、細胞間コミュニケーションに対する作用は両者では異なっており、コルヒチンで処理した doublet 肝細胞間に色素がスムーズ移動しているのに対し、サイトカラシン B 群の細胞は無処置群細胞と同様、培養 9 時間目時点では色素の移動がほとんど見られなくなった。以上のことから、培養肝細胞における細胞間コミュニケーションの維持には微小管が関わっていることが示唆され、エタノールが細胞骨格の重要な要素である微小管の機能を修飾することで、ギャップ結合蛋白の turnover に影響を与えていると考えられる。

結語

アルコールは濃度依存的に培養肝細胞で見られた細胞間コミュニケーション減少を遅延させた。これはアルコールの直接的な作用によるもので、その代謝物質アセトアルデヒドおよび酢酸は関与していないと思われる。アルコールが細胞骨格の重要な要素である微小管の機能を修飾することでギャップ結合蛋白の turnover に何らかの影響を与え、正常な肝再生機構の障害に繋がると考えられる。

1998年 4月 7日 16:24

JPN-CHN MED ASSO 81-3-3291-9164

P. 2/3

日本財団補助金による

1997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

年 月 日

I. 招へい責任者 田村 守 (田村)

所属機関 北海道大学 電子科学研究所 職名 教授

所在地 〒060-0812 札幌市北区北12条西6丁目 電話 011-706-2410

招へい研究者氏名 張 思 迅

所属機関 中日友好病院

職 名 医師

研 究 テ ー マ 近赤外分光法の脳神経外科領域への応用

II. 日本滞在日程

平成9年9月25日 ~ 平成10年4月21日

北海道大学 電子科学研究所・研究員

III. 研究報告

< 研究目的 >

近赤外分光法は、組織の酸素化状態をリアルタイムで連続的にモニターすることができる新しい非観血的計測法で、近年多くの注目を集めている。この方法により組織血液量、ヘモグロビン(Hb)、ミオグロビン(Mb)の酸素化状態、さらにミトコンドリア内チトクロームオキシダーゼ(cyt. ox.)の酸化-還元状態を測定できる。特に cyt. ox. の酸化-還元状態の測定は、従来の方法では知り得なかった細胞内(ミトコンドリア内)の酸素化状態の情報を直接与えてくれる。本法は患者モニターのみならず、様々な生体现象解明の一手段としても応用することができる。しかし、現時点ではまだ解決すべき幾つかの問題が残されており、主たる問題点は定量化と cyt. ox. の酸化-還元状態の測定法に関するものである。定量化と cyt. ox. の測定法の問題は、本法の将来性にかかわる重大な問題である。そこで、本研究ではラットを用いて脳神経外科への応用の基礎研究を行なう。

< はじめに - 近赤外領域におけるチトクロームオキシダーゼ(cyt. ox.)の分光学的特性 >

近赤外領域とは可視部と赤外領域の間で、通常700から3000nmの波長領域をいう。この領域の光は、可視部の光に比べ散乱されにくく生体物質による吸収減衰が少ないため、生体組織に対して高い透過性を示す。主要な計測領域は700-1300nmの範囲で、この領域に特徴的な吸収帯を持つ物質は限られており、通常“分光学的酸素濃度指示物質”として測定の対象になっているのは、Hb、Mb、そして cyt. ox. である。

cyt. ox. は、ミトコンドリア内膜に存在し、電子伝達系の末端に位置し、直接酸素に電子を伝達する役割を担っている。体内にとりこまれた酸素の約95%はここで消費されている。cyt. ox. は2個のヘム(heme a, heme a₃)と2個の銅(Cu_A, Cu_B)を有し、heme a₃とCu_B は酸素との反応に直接関与し、heme aとCu_A は主に電子の伝達経路と考えられている。酸化型では830nm付近に幅の広い吸収がみられるが、これの約85%はCu_Aに由来し、残りの約15%はCu_Bとheme群に由来している。可視部の吸収は、heme a+a₃に由来しており、近赤外領域の吸収強度はこの可視部の約5%である。本法は、この銅の酸化型と還元型でのスペクトルの変化をミトコンドリア内の酸素濃度測定に利用している。同様に、Hb、Mbも酸素化型(oxy-)と脱酸素化型(deoxy-)でスペクトルは異なり、このスペクトルの変化をHb、Mbの酸素化状態の測定に利用している。

< cyt. ox. のラットでの測定 >

ある波長 λ_1 の光が、透明試料に照射された時、透過してきた光量 I は次の式で表

されされる。

$$\log I/I_0 = \varepsilon cd \quad (1)$$

ここで、 I_0 :照射光量、 ε :吸光係数、 c :濃度、 d :光路長である。この関係式はBeer-Lambert則として知られ、 $\log I/I_0$ は吸光度である。Beer-Lambert則は散乱のない均一な透明試料でのみ成立するが、生体のような散乱粒子を含む不均一系でも近似的に用いることができる。

ある波長の光 λ_1 が生体に照射されている間に状態AからBに変化した時、吸光度差 ΔA_1 は次のように表される。

$$\Delta A_1 = \varepsilon_1 \Delta [\text{oxy-Hb}] t_1 + \varepsilon_2 \Delta [\text{deoxy-Hb}] t_2 + \varepsilon_3 \Delta [\text{cyt. ox.}] t_3 \quad (2)$$

ここで ε は吸光係数、 $\Delta []$ はそれぞれの濃度変化、 t は光路長で $t_1 = t_2 = t_3$ とみなすことができる。oxy-Hb, deoxy-Hb, cyt. ox.による個々の信号は、お互いにまた背景となる組織の吸収から区別されなければならないので、多波長を用いた計測が必要である。それぞれの波長について(2)式と同様の式をたて、連立方程式をたててoxy-Hb, deoxy-Hb, cyt. ox.の濃度変化を求める。しかし、生体において真の光路長をもとめることは不可能なため、ここで得られる値は変化量の絶対値ではなく相対値である。

< cyt. ox. の測定意義 >

cyt. ox. の酸化-還元状態は、直接細胞内の酸素化状態に関する情報を与えてくれるが、その測定意義はまだよく理解されていない。そこでまず、ラットを用いた実験結果から、生体におけるcyt. ox. の測定意義を示した。

定常状態を保ちながら段階的に FiO_2 を下げていった時の脳内Hbの酸素化-脱酸素化状態、cyt. ox. の酸化-還元状態と脳波の変化を測定した。 FiO_2 を21%から16%に下げるとoxy-Hbは減少し、脳波の低振幅速波化を認めたが、cyt. ox. の酸化-還元状態に変化は見られなかった。 FiO_2 8%でHbが約60%脱酸素化された時点でcyt. ox. の還元が始まった($PmtO_2$ 約0.2mmHg)。さらにcyt. ox. が60~65%まで還元された時点($PmtO_2$ 約0.08mmHg)で脳波上徐波が出現し、 FiO_2 0%でcyt. ox. の完全還元($PmtO_2$ 約0.06mmHg)が生じ、それよりわずかに遅れて脳波の平坦化を認めた。

脳波は、脳の機能状態を示す一つの指標と考えられ、低酸素症において出現する徐波は脳機能低下を示している。この徐波の出現時期は一定しており、cyt. ox. が60~65%還元された時点であった。また、低酸素状態で脳内cyt. ox. の還元とPCr/Piの

低下はほぼ同程度に進行することが報告されている。従って、cyt.ox.の還元は、低酸素状態における脳の代謝障害、機能障害の早期指標と考えられる。

<おわりに>

今回、ラットを用いてHbの酸素化状態及びcyt.ox.の定量に関する研究を行なった。今後、臨床応用までにはまだ数年かかると思われるが、患者管理においてHbのみを測定した場合、絶対値表示の無い本法単独ではモニターとして不十分である。しかし、我々が測定したcyt.ox.の還元開始は、生体が危険な状態になりつつあることを示しており、一種の“アラーム”として使うことができ、cyt.ox.を測定することによって、本法単独でもモニターとしての役目を十分に果たせると考える。ただし、このことはcyt.ox.の測定が正確になされることが前提になっている。今回のラットの実験結果は今後の臨床応用、特に脳神経外科領域への応用の基礎を拓いた。


日本財団補助金による
1997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—

9年9月17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 荒川 泰行 
所属機関名 日本大学医学部第3内科学教室 職名 主任教授
所在地 〒173 東京都板橋区大谷口上町30-1 電話 03-3972-8111
招へい受け入れ機関名 遼寧中医学学院 附属病院 FAX 033956-8496
所在地 遼寧省 瀋陽市 北陵大街 33号
招へい責任者 袁家麟 院長
交流テーマ 肝炎ウイルス (B型, C型, G型) の分子疫学等に関する日中共同研究

II. 中国滞在日程

8月16日 成田 → 北京
↓
(北京市滞在)
8月17日 北京医科大学で講演
8月18日 人民解放軍第302医院で講演
8月19日 北京医科大学庄輝教授らとミーティング
8月20日 北京 → 長春
↓
(長春市滞在)
8月21日 第1回中国実験診断学会に参加
8月22日 白求恩医科大学訪問
8月23日 長春 → 瀋陽
↓
(瀋陽市滞在)
8月23日 中国医科大学と遼寧中医学学院を訪問して
講演
8月26日 瀋陽 → 北京 → 成田

III. 学術交流報告

1. 北京医科大学 消化器病センター（所長 林三三教授）と 人民解放軍第302 医院（院長 李建华）に於て、「G型肝炎ウイルスの遺伝子診断と臨床」について特別講演を行った。
2. 北京医科大学微生物学講座・肝炎研究センター所長の庄輝教授らのグループと G型肝炎ウイルスの分子生理学的研究の最近のトピックス、とくに感染実験等の研究成果について意見を交換した。
3. 第1回中国実験診断学会（8月20日～23日、長春市）に参加し、同行の教室の医師が2題共同発表した。
4. 白求恩医科大学を訪問し、同大学の名誉教授の称号を授与された。
5. 遼寧中医学院と中国医科大学で「C型慢性肝炎に対するIFNの治療効果と長期予後」について特別講演を行って、遼寧中医学院より名誉教授の称号を授与された。

IV. 感想及び意見、希望等

今回貴財団の御援助により、中国の北京市、長春市および瀋陽市を10日間余りで訪問し、北京医科大学、白求恩医科大学、中国医科大学、遼寧中医学院の消化器病や肝炎ウイルス等の研究者らと学術交流をはかることができ、所期の目的を達成できたものと思っております。心から深謝申し上げます。

中国人研究者、とくに若手研究者は海外に目が向いており、「日本へも是非留学したい」と希望するものが多くいることがわかりました。今後も貴財団の日中学術交流のため事業をなお一層拡大発展されることを希望しております。

日本の学会に参加する若手中国人研究者に対して、7～10日程度の短期滞在の財政支援をしていただけるような制度があると大変好都合と思います。


日程	行程	時間	参加者	活動内容	宿泊	中国留学生
8月16日 (土)	1. 成田ー北京	1. 10:40ー13:25 ANA 905 (C class)	荒川泰行	午後: 庄教授 夕食:	北京長富宮飯店 (朝食付) 荒川泰行	王、一緒の飛行機。趙、北京で出迎え
8月17日 (日)				午前:北京医科大学で講演 昼食: 庄教授 午後:観光 庄教授 夕食: 庄教授	北京長富宮飯店 (朝食付) 荒川泰行	趙
8月18日 (月)				午前:302 医院訪問 昼食: 庄教授 午後:302 医院で講演 夕食: 庄教授	北京長富宮飯店 (朝食付) 荒川泰行	趙
8月19日 (火)	1. 成田ー北京	1. 10:40ー13:25 ANA 905 (C class)	森山光彦 松村 寛	午前: 庄教授 昼食: 午後:教授と合流。 空港までお迎え 北京市内観光ガイド付夕食付	北京長富宮飯店 (朝食付) 荒川泰行 森山光彦 松村 寛	趙
8月20日 (水)	1. 北京ー長春	1. 19:55ー21:30 CJ 6146 飛行機	荒川泰行 森山光彦 松村 寛	午前:万里の長城 十三陵 ガイド付 昼食付 空港までお見送り 夕食:	長春名門飯店 (朝食付) 荒川泰行 森山光彦 松村 寛	趙、王、も飛行機移動 岳 長春で出迎え
8月21日 (木)	第1回実験診断学会 (天都Hotel)			午前:学会 昼食: 午後:発表 夕食:	長春名門飯店 (朝食付) 荒川泰行 森山光彦 松村 寛	趙、王、岳
8月22日 (金)	実験診断学会			午前:観光(岳の案内による) 昼食: 午後:観光(岳の案内による) 夕食:	長春名門飯店 (朝食付) 荒川泰行 森山光彦 松村 寛	趙、王、岳
8月23日 (土)	実験診断学会 1. 長春ーしん陽	1. 10:20ー15:00 T 602 列車	荒川泰行 森山光彦 松村 寛	午前:列車移動 昼食: 午後: 夕食:	しん陽凱菜大飯店 (朝食付) 荒川泰行 森山光彦 松村 寛	岳 長春で見送り 趙、王 も列車移動
8月24日 (日)				午前:観光(王の案内による) 昼食: 午後:観光(王の案内による) 夕食:	しん陽凱菜大飯店 (朝食付) 荒川泰行 森山光彦 松村 寛	趙、王
8月25日 (月)	遼寧中医学院			午前: 昼食: 午後:遼寧中医学院で講演 (荒川、森山) 夕食:	しん陽凱菜大飯店 (朝食付) 荒川泰行 森山光彦 松村 寛	趙、王
8月26日 (火)	1. しん陽ー北京 2. 北京ー成田	1. 8:55ー10:25 CJ 6309 飛行機 2. 15:00ー19:15 ANA 906 (C class)	荒川泰行 森山光彦 松村 寛	午前:飛行機移動 昼食: 午後:		王 しん陽見送り 趙 しん陽ー北京 北京で見送り



日本財団補助金による
1997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—

1997年5月6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 小路 武彦 
所属機関名 長崎大学医学部解剖学第三講座 職名 助教授
所在地 長崎市坂本1-12-4 電話 2958-497026
招へい受け入れ機関名 華人民共産国第4軍医大学 及び 第3軍医大学
所在地 西安市 及び 重慶市
招へい責任者 李繼碩 張遠強 教授 及び 蔡文琴 教授
交流テーマ In situ hybridization法を用いた各種の分子組織細胞学的的手法の紹介

II. 中国滞在日程

平成9年4月23日 名古屋より上海を経て西安空港着
同 4月27日 西安より重慶へ
同 4月30日 重慶より上海へ
同 5月1日 上海より福岡空港へ

Ⅲ. 学 術 交 流 報 告

4月23日に西安に到着してより4月27日まで第4軍医大学関係者との研究連絡を行った。特に、4月24日には組織学・胚胎学教研室の張遠強教授と終日懇談した。又、4月25日には第4軍医大学に於いて午前中3時間に渡り、「Recent advances in molecular histochemistry: In situ hybridization and Southwestern histochemistry」(in English)及び「アポトーシスの分子組織細胞化学」(in Japanese)の演題のもと2題の特別講演を行った。午後は夕刻まで、解剖学教研室の李継碩教授、李雲慶教授及びその教室員と特にin situ hybridizationの手技的な問題について質疑応答並びに意見を交換した。

4月27日には重慶に移動し、4月30日まで第3軍医大学関係者と研究連絡を行った。特に4月28日には第3軍医大学に於いて、午前中は組織学・胚胎学教研室の蔡文琴教授及びその教室員と最近のホットな話題に関し意見を交換し、午後には1時間30分の「Recent advances in molecular histochemistry: In situ hybridization and Southwestern histochemistry」(in English)と題する特別講演並びに質疑を行った。ここでは特に、転写調節因子の新しい検出法であるSouthwestern histochemistryに議論が集まった。

Ⅳ. 感想及び意見、希望等

実際に中国を訪問し研究の現状を視察すると共に現場の研究者と率直な意見交換を行うことが出来、今後の共同研究の推進に大きな前進を感じる。特に、共同研究に際し何が問題で何が我々に要求されているのかも良く理解できたつもりである。更に、多くの現地研究者と個人的なパイプを確立できた点も今回訪中の大きな成果と考える。これらの大きな前進を実質的な成果とできるかどうかは、今後の共同研究への資金的援助に依存しており貴財団への更なる御協力を希望する次第であります。

[会談記録]

平成9年4月24日昼食時

第四軍医大学組織発生学教室の張遠強教授、黄威権教授、方永強教授、王瑞安講師等と昼食を取りながら今後の計画の打ち合わせを行った。

平成9年4月24日20:00

ホテルに於いて、第四軍医大学解剖学教室 李継碩教授と予定の打ち合わせ。

平成9年4月25日9:00-12:00

第四軍医大学に於いて講演を行った。

平成9年4月25日13:00-17:00

第四軍医大学に於いて解剖学教室 李雲慶教授並びに大学院学生等とin situ hybridizationの結果について討論を行った。

平成9年4月28日9:00-12:00

第三軍医大学に於いて組織発生学教室 祭文琴教授並びにスタッフ・大学院学生と今後の計画並びに研究状況について会談した。

平成9年4月28日15:00-16:30

第三軍医大学に於いて講演を行った。

平成9年4月30日夕食時

第二軍医大学生理学教室副主任 Weifang Rong博士と会談し中国と日本の研究状況の差異等について意見を交換した。

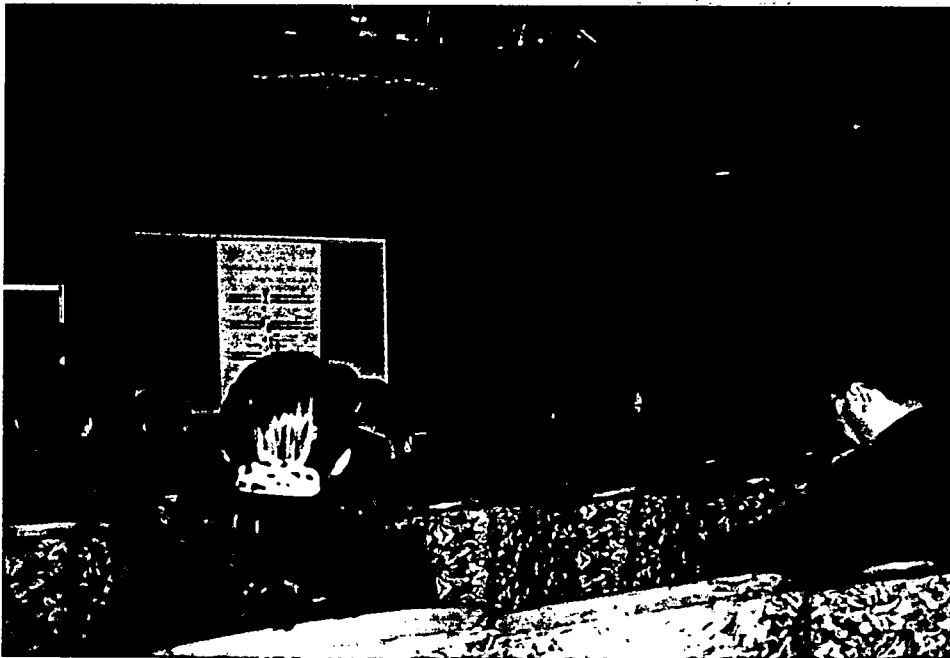
[写真の説明]

1：第四軍医大学組織発生学教室の張遠強教授と私の講演会を知らせる掲示板の横で撮影したもの。基礎棟玄関。（平成9年4月25日）

2：第四軍医大学での二番目の演題であるapoptosisに関する講演を行っている様子を撮影したもの。基礎棟にある講堂で行われた。（平成9年4月25日）

3：第四軍医大学での講演後、解剖学教室並びに組織発生学教室のスタッフと昼食を取った時のもの。私と乾杯している方が解剖学教室李継碩教授で、右が同じく李雲慶教授。（平成9年4月25日）

4：第三軍医大学組織発生学教室祭文琴教授並びにスタッフとの記念撮影。（平成9年4月28日）





3



4

日本財団補助金による

1997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10年 3月 31日

財団法人 日中医学協会

理事長 中島章 殿

I. 研究者氏名 王 璞
 研究機関 東海大学医学部内科 研究指導者 半田俊之介 職名 教授
 所在地 〒259-1100 伊勢原市望星台 電話 0463-93-1124 内線 2200

研究テーマ 循環器内科学とくに心臓核医学の臨床応用

II. 過去の研究歴

心電図の巨大陰性T波の臨床的意義について核医学的手法を用いた解析を続けた。

III. 過去の研究実績

日本内科学会講演会(第92回)1995.4, 心臓核医学研究会(第9回)1996.7などで報告した。

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)

日中核医学会(第2回)1997年5月(上海) 1. 心尖部肥大型心筋症に下がる心電図陰性T波の秩序, 2. 肥大型心筋症に下がる心筋の局所肥大と交感神経の活性分布-TL201およびI123MIBG心筋SPECTによる検討。

(2) 学会誌等に発表した論文 無・**有**(雑誌名・論文名)

核医学: 心尖部肥大型心筋症における心電図陰性T波の秩序-TL201およびI123MIBG心筋SPECTによる検討 33(9):999-1004, 1996.9

内科: 器血阻害薬の現状 79(1):64-68, 1997.1

Curr Topics in Cardiology: 器血阻害薬の現状と今後の展望(II) 17:10-23, 1997.8

V. 今後の研究計画及び希望

上海に帰国 病態の解明と臨床研究を継続する。

日本財団補助金による

1997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 -

1998年2月27日

財団法人 日中医学協会

理事長 中島章殿

I. 研究者氏名 梁一強

研究機関 帝京大学 内科 研究指導者 寺本民生 職名 教授

所在地 〒173-8605 板橋区加賀 2-11-1 電話 03-3964-1211 内線 1969

II. 過去の研究歴

1993年7月～1998年現在 帝京大学内科で「動脈硬化」について研究

III. 過去の研究実績

Clinica Chimica Acta. 247:159-166, 1996

Characterization of low-density-lipoprotein in apolipoprotein E deficiency in a patient without coronary atherosclerosis.

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)

DDW-Japan 1997 脂質肝疾患における肝MTP活性の意義 ポスター (4/8)

第29回 日本動脈硬化学会総会 肝臓におけるMTP活性の調整因子 (6/8)

XIth International symposium on Atherosclerosis PARIS

Regulatory factor of MTP activity in liver (10/6)

(2) 学会誌等に発表した論文 無・(有) (雑誌名・論文名)

J. B. Vol. 123 No.1

Defect in an intrahepatic degradation of apolipoprotein B in humans
— an animal model of hypobetalipoproteinemia —

V. 今後の研究計画及び希望

今後とも動脈硬化疾患メカニズムについて研究のつもりであり、
特に血管平滑筋細胞の増殖に関する因子を重点を絞って研究したいと
考えている。

研究報告

脂肪肝の発症とMTPの役割

帝京大学内科 梁一強

スunksはトガリネズミ科に属し、体重は約70gの小動物で、24時間の絶食により容易に脂肪肝が誘発され、再摂食により速やかに脂肪肝が改善することがわかった。この脂肪肝発症メカニズムを検討していく過程で報告してきたことをまとめると1) 血清脂質は極めて低く、血清アポ蛋白Bがほとんど検出されない。2) 絶食により遊離脂肪酸は有意に上昇した。3) 肝臓におけるコレステロールのエステル化酵素であるACATは著明な低活性を示した。

一般的に脂肪肝の原因として、1) 肝臓におけるトリグリセリド (TG) の合成過剰、2) 肝臓からのTG分泌の低下が考えられるが、スunksにおける脂肪肝について以上の結果を考慮すると肝臓からのTG分泌低下すなわち超低比重リポ蛋白 (VLDL) の形成不全により肝臓からTGを放出できないことが主な原因と考えられる。肝臓で合成されたアポ蛋白BはVLDLの形成に利用されないと一部が細胞内異化を受けていることが報告されている。従って、アポ蛋白Bの細胞内異化が亢進していると血清アポ蛋白Bは低くなり、脂肪肝が発症することが予測される。この点について検討したところスunksにおいてアポ蛋白Bの細胞内異化は亢進していないことが確認された。一方、VLDLの分泌にコレステロールエステル (CE) の合成が関与していることも報告されており、スunksでもACAT活性が低いいためCEの合成が低く、VLDLの分泌が低下している可能性も考えられる。また、VLDLの形成にはMicrosomal triglyceride transfer protein(MTP)が重要な役割を演じていることも報告されている。

そこで、本研究ではスunksを飢餓状態にした際発症する脂肪肝のメカニズムを解明するため、VLDLの統合にキー蛋白と考えられるMTP活性、そしてACAT活性との関連について検討した。

【方法】 雄性スunksと雄性Wistar系ラットを用いて、対照群、絶食群、再摂食群の3群について検討した。従来の方法で肝臓並びに小腸粘膜よりMicrosome分画を分離し、MTP活性はWetterauらの方法にてliposome間の¹⁴C-TGと³H-PCの転送率から計算した。また、肝細胞実験では体重160~180gの雄性Wistar系ラットから肝細胞を分離し、3日間培養した後、実験に供した。HMG-CoA還元酵素阻害薬 (CS514) は1ng/ml、10ng/mlの濃度で添加して1時間培養し、MTP活性に及ぼす影響について検討した。また、CEの合成阻害薬としてACAT阻害薬58-035 (Sandoz) を0.5μg/ml、5μg/mlの濃度で添加して20時間培養した。また、細胞内CEを増加させる目的でLDLの添加効果も検討した。ヒトLDLは50μg/ml、100μg/mlの濃度で添加して14時間培養した。

【結果】 図1に示したようにラットでは添加microsome蛋白を25、50、75μgとするとMTP活性は直線的に上昇したが、スunksでは75μgまでは転送活性が観察できず、MTP活性が極めて低い可能性が考えられた。そこで、図2に示したようにスunksで

microsome蛋白を200 μ gまで増やして測定したところ初めて直線的な増加を示した。その活性はmicrosome蛋白あたりで計算すると、ラットの約30%と計算された。unksでは24時間の絶食で脂肪肝が起こることから次に、絶食のMTP活性に及ぼす影響についてラットと比較して観察した。図3に示すようにラットでは対照、絶食、再摂食の3群間でMTP活性の変動が認められなかった。一方、unksでは、絶食による影響は認められなかったが再摂食によりMTPの活性が有意に上昇しラットの約80%となっていることが判明した。

unks肝におけるMTP活性の著明な低下が肝臓に特異的であるのか検討する目的で小腸粘膜についても検討してみた。表1に示したようにunks小腸のMTP活性はラットとほぼ同等であり、肝臓において特異的に低活性を示すものと考えられた。

unksにおけるMTP活性の低下がコレステロールエステルの合成酵素であるACAT活性と関係がないか検討する目的で、ラットの初代培養肝細胞を用いてMTP活性の調節因子について検討した。

MTP活性に及ぼすコレステロールの影響を観察するためにHMG - CoA還元酵素阻害薬を用いて検討した。HMG - CoA還元酵素阻害薬の添加により、ラット初代培養肝細胞のMTP活性はコントロールの約50%と有意に低下した。^(図6)次にACAT阻害薬の影響を検討した。図4に示すようにACAT阻害薬の添加により、細胞内のCEは著明に低下しており、それと同時にMTP活性はコントロールの約70%と有意な低下が認められた。この二つのデータは、肝内CEの含量がMTP活性を制御している可能性を示唆するものと考えられる。そこでCEの濃度上昇を目的としてLDL添加の影響を観察した。図5に示すようにラット初代培養肝細胞にLDLを添加するとMTP活性は濃度依存的に有意に上昇した。

【考察】

以上の結果をまとめるとunksでは絶食により著明に血清遊離脂肪酸が上昇し、脂肪酸プールの増大があり、相対的に肝臓でのTGの生成量は増加する可能性が考えられる。一方、unksではMTP活性が著明に低下していることから、VLDLの統合障害が常に存在するものと考えられる。従って、合成されたトリグリセリドを速やかに分泌する能力が十分でない可能性が考えられる。また、unksにおいて再摂食により脂肪肝が急速に改善することは、MTP活性の上昇により急速にVLDLとして分泌されるためと考えられた。つまりMTP活性が40%未満では肝内脂質輸送に障害を生ずるが、70%以上であれば十分な輸送効果があると考えられた。

また、ラットの肝細胞実験から、細胞内コレステロールエステルの合成がMTP活性に重要な役割を演じている可能性が示唆された。unksの肝臓では特異的にACAT,MTP両活性が低下していることを考慮すると、肝臓における特異的なMTP活性の低下はコレステロールエステルの低下に起因する可能性が考えられる。また、MTP活性の制御にはACAT活性の制御が重要である可能性が示唆された。

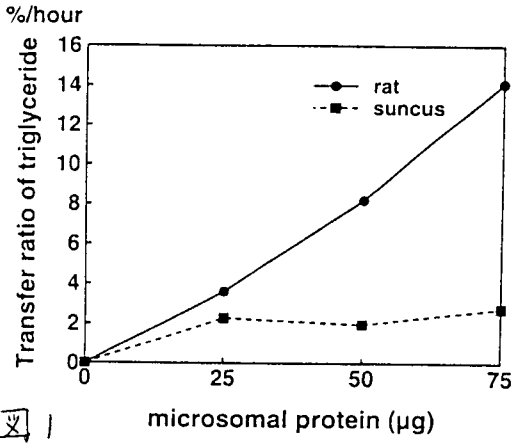


图 1

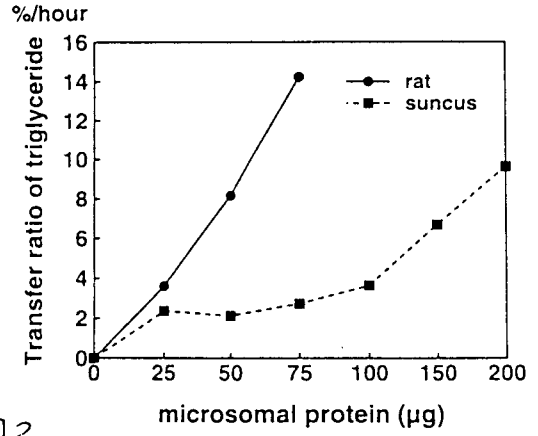


图 2

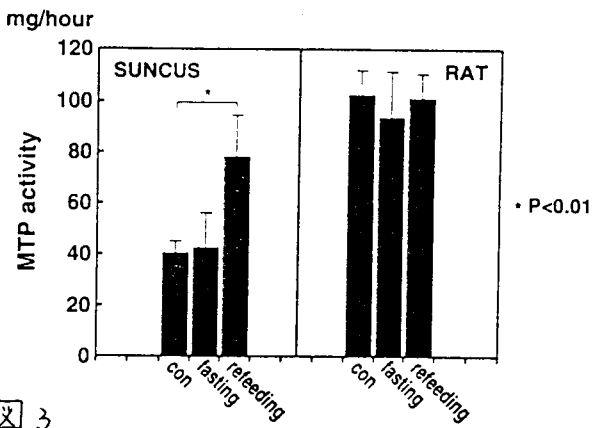


图 3

MTP activity of liver and intestine

liver	rat	0.923 ± 0.25
	suncus	0.370 ± 0.10***
intestine	rat	1.143 ± 0.36
	suncus	1.422 ± 0.79

(nmole/mg/hour)
*** P < 0.005

表 1

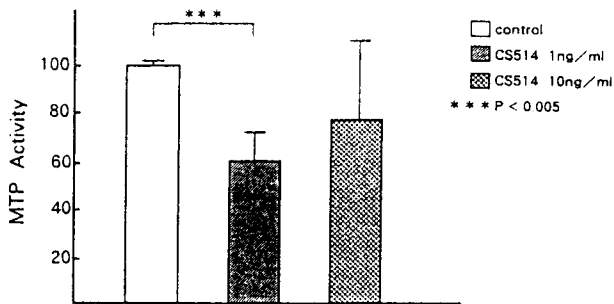


图 6

Effect of LDL on MTP activity in rat hepatocytes

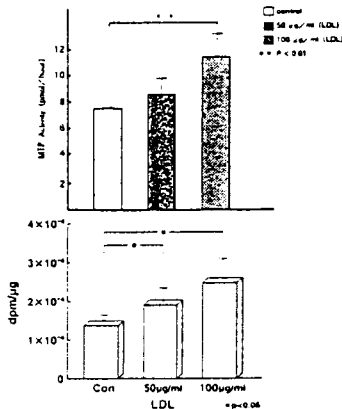


图 5

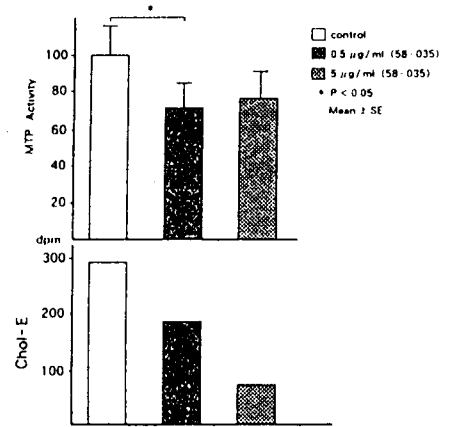


图 4

105 肝臓におけるMicrosomal Triglyceride Transfer Protein (MTP)の調節因子

帝京大学第一内科 齋一強¹ 武藤朝美、藤田美峰子、金子和子
嶋津伸子、木下誠、山中正己、寺本民生

【目的】脂肪肝易発動物であるスックスにおける肝内脂質輸送機構の検討よりVLDLの合成に関するものとしてトリグリセリド(TG)、コレステロールエステル(CE)の合成とMTP活性が重要であることを報告してきた。特に、MTP活性が脂質分泌のキーポイントと考えられたので、本研究ではラットの肝細胞を用いてMTP活性の調節因子としてTGとCEの合成に焦点をあてて検討したので報告する。

【方法】雄性Wistar系ラットの初代培養遊離肝細胞を実験に供した。脂肪酸添加実験ではmediumにoleic acidを0.5mMと1mMの濃度で添加し、2時間培養した。CEの合成阻害薬としてACAT阻害薬(S8-035)を0.5mg/mlと5mg/mlの濃度で添加して20時間培養した。HMG-CoA還元酵素阻害薬(CS514)は1ng/mlと10ng/mlの濃度で添加して1時間培養した。MTP活性はWetterauらの方法にてliposome間の¹⁴C-TGと³H-PCの転送率におよぼすmicrosomal分画の添加量から計算した。

【成績】ラット培養肝細胞のMTP活性は 8.98 ± 0.81 pmoles/hと同時に測定した肝組織の 6.99 pmoles/hより高値を示した。oleic acidの添加によりMTP活性は 6.79 ± 0.57 (0.5mM)と 6.62 ± 0.70 (1mM)と有意な低下が認められた($p < 0.01$)。このとき細胞内のTGは有意に増加していたがmedium中のTGには有意な変化は認められなかった。ACAT阻害薬やHMG-CoA還元酵素阻害薬の添加でもMTP活性はそれぞれコントロールの83%、85%と有意な低下を示したか濃度依存性はなかった。

【結論】ラット培養肝細胞のMTP活性はその組織より高値を示した。これは脂肪酸無添加mediumを用いたためと考えられる。oleic acidの添加により肝組織と同等の活性を示したはこのためと考えられる。一方、S8-035やCS514の添加によりCEの合成を抑制することはMTP活性の抑制効果をもたらすものと考えられた。

106 肝臓でのコレステロール蓄積による中性脂肪合成抑制の機序

国立健康・栄養研究所臨床栄養部、東北大遺伝子実験施設*
池本真二、角田伸代、山本徳男^{*}、江崎 治

【目的】コレステロール代謝に関係するLDLレセプター、HMG-CoA還元酵素、HMG-CoA合成酵素の遺伝子発現はsterol regulatory element 1 (SRE1)を介してコレステロールにより抑制されることが知られている。また、SRE1に結合するSRE binding proteins 1 (SREBP1)とADD1が同一であることから、細胞内コレステロール量が脂肪酸合成や脂肪細胞の分化に関与することが推定されている。本研究では、中性脂肪の合成にコレステロール代謝が関与するかどうかを検討した。【方法及び結果】C57BL/6Jマウスを高炭水化物食(対照群)、高炭水化物食+0.5%コレラト食、高脂肪食及び高脂肪+0.5%コレラト食で15週間飼育した。摂餌量及び脂肪の吸収量に著明な差が認められないにもかかわらず、高脂肪食で内臓性肥満と高血糖を生じた。しかし、高脂肪食にコレラトを加えておくと、これらの発症が完全に防止された。肝臓のTC量は、コレラト添加で、それぞれ対照群の2.6倍、高脂肪食群の3.3倍に増加した。また、肝臓のTG量は、高脂肪食によって対照群の1.7倍に増加したが、コレラト添加によって対照群の83%にまで減少した。肝臓のAcyl-CoA synthetase (ACS) mRNA量は、高脂肪食によって対照群の1.4倍に増加し、コレラト添加によって対照群の46%にまで減少した。ACS mRNAは5'-非翻訳領域の違いから3種類(Form-A、-B、-C)存在することが知られているが、その中でも、Form Aは、主として肝臓に存在してTG合成に関与すると考えられており、そのプロモーター部分にSRE1領域を持つことが知られている。【結論】肝臓での中性脂肪合成に関与する酵素もコレステロールによる発現抑制が認められ、糖尿病や肥満の発症にコレステロール代謝が関与する可能性が推定された。

107 非インスリン依存性糖尿病患者における血中cholesteryl ester transfer protein濃度と血清脂質との関連性について

獨協医科大学越谷病院 一般内科
田山一己、小林秀城、藤原幸雄、麻生好正、犬飼敏彦、竹村喜弘

【目的】血漿脂質転送蛋白質のひとつであるcholesteryl ester transfer protein (CETP)は主としてCEやTGの交換・転送反応を特異的に促進し、LCAT、HTGLなどの酵素と共に、HDLを介した動脈硬化の防御機構における重要な因子であることが知られている。今回われわれは、非インスリン依存性糖尿病(NIDDM)患者に焦点を当て、血中CETP濃度と血清脂質レベルとの関連性につき検討した。

【方法】NIDDM患者193名(男性99名、女性94名、年齢 59.0 ± 10.6 才)、健常者73名を対象とした。血中CETP濃度は抗ヒトトリコンビナントCETPモノクローナル抗体とHRP標識抗ラットCETPポリクローナル抗体を用いたサンドイッチELISA法により測定した(株)三菱化学ビーシーエル)。血清脂質はTC、TG、HDL-C、Apo A 1、Apo B、Apo E、LDL、VLDL、chylomicron等の測定を行った。

【結果】①NIDDM患者では健常者に比し、有意なCETP濃度の低下が認められた($P < 0.01$)。CETP濃度の下限のcut off値を 14.4 µg/mlと規定すると、NIDDM患者の10.4%に明らかなCETP濃度の低下が認められた。②女性は男性に比しCETP濃度は約13%高く、有意に上昇していた($P < 0.01$)。③NIDDM患者においてCETP濃度はTCと有意の正相関を認めた($P < 0.05$)。HDL-C高値群(80mg/dl)では、CETP濃度は低下傾向を示し、逆にLDL高値群(500mg/dl)はCETP濃度は有意に上昇していた($P < 0.05$)。CETP濃度は、Apo B、Apo Eとそれぞれ有意な正の相関関係を示した(いずれも $P < 0.05$)。

【結論】NIDDM患者において、血漿脂質転送蛋白質であるCETPは、その血中濃度と血清TC、HDL-C、LDL-C、Apo B、Apo E値との間にそれぞれ密接な関連性を有しており、それらの脂質代謝pathwayに影響を及ぼす重要な因子のひとつであることが示唆された。

108 家兎CETPモノクローナル抗体によるELISA法を用いた血漿CETP濃度の臨床的検討

名古屋市立大学第三内科 第一生化学*
笹井冠奈 野路久仁子* 日比野剛 佐久間長彦 藤原隆夫
横山信治*

【目的】我々は、rabbit cholesteryl ester transfer protein (CETP)に対するモノクローナル抗体(mAb)を作成し、ヒトのCETPに反応する2種類の抗体(mAb 3-11D, 14-8F)を用いて、CETP濃度測定ELISA法を確立した。このELISA法を用いて、シンバスタチン投与前後のCETP濃度を測定し、検討した。【方法】IIa型高脂血症22例にシンバスタチン5mg/日を4週間投与し、投与前後の早朝空腹時採血にて血清脂質を測定した。CETP濃度はCETPに対する2つのモノクローナル抗体(mAb 3-11D, 14-8F)を用いたELISAサンドイッチ法を作成し、測定した。mAb 3-11DはCETPのTGとCEの転送を阻害し、mAb 14-8FはTGの転送を阻害する。CETP活性はAlbersらの方法にて測定した。【結果】Albersらの方法にて測定したCETP活性と本法でのCETP濃度は有意な相関性を認めた(前: $r = 0.446$, $P < 0.05$ 後: $r = 0.625$, $P < 0.001$)。シンバスタチン投与にてTC (271 ± 56 mg/dl vs 226 ± 45 mg/dl, $P < 0.0001$)、LDL-C (188 ± 61 mg/dl vs 142 ± 48 mg/dl, $P < 0.0001$)と有意に低下した。HDL-C (51.7 ± 10.9 mg/dl vs 58.0 ± 10.9 mg/dl, $P < 0.0001$)と有意な増加を認めた。TG (158 ± 95 mg/dl vs 134 ± 77 mg/dl, NS)と低下傾向を示した。CETP活性は($11.3 \pm 3.7\%$ /10ml/3hr vs $9.4 \pm 3.9\%$ /10ml/3hr, $P < 0.05$)、CETP濃度は(1.22 ± 0.38 µg/dl vs 1.09 ± 0.35 µg/dl, $P = 0.0997$)と低下傾向を示した。【結論】シンバスタチン投与によるCETP活性の低下はCETP濃度の低下によることを示唆したが、HDL-Cの増加とCETP活性・濃度には相関性を認めなかった。



Short communication

Characterization of low-density-lipoprotein in apolipoprotein E deficiency in a patient without coronary atherosclerosis

Tamio Teramoto^{*a}, Makoto Kinoshita^a, Mitsunobu Kawamura^a,
Yi-Qiang Liang^a, Kazuko Kaneko^a, Nobuko Shimazu^a,
Satoko Suga^a, Nobuharu Akatuka^b, Masami Yamanaka^a

^aFirst Department of Internal Medicine, Teikyo University School of Medicine, Tokyo 173, Japan

^bInternational Medical Center of Japan, Division of Cardiology, Tokyo, Japan

Received 4 August 1995; revision received 10 November 1995; accepted 14 November 1995

Keywords: Apolipoprotein E deficiency; Coronary atherosclerosis; Small-dense LDL; Oxidative modified LDL; Type III hyperlipidemia

1. Introduction

Type III hyperlipoproteinemia (HLP) is an uncommon lipid disorder characterized by elevations in both plasma cholesterol and triglyceride concentrations due to increases in the levels of chylomicron remnants, VLDL and IDL. The patients generally present in adulthood, often manifesting signs of premature coronary artery disease (CAD) and peripheral vascular disease, palmar and tuberoeruptive xanthomas [1]. Inherited type III HLP is usually associated with molecular abnormalities of apolipoprotein (apo) E or with absence of apo E.

Only three patients with inherited apo E deficiency have been previously reported [2–4]. Although individuals deficient in apo E typically have severe

* Corresponding author, Tel: +81-3-39641211; Fax: +81-3-39647637.

type III HLP, there has been only one report regarding coronary atherosclerotic lesions in these individuals. This suggests that coronary atherosclerosis does not occur prematurely in these patients [5].

We performed coronary angiography and exercise treadmill testing in a patient with apo E deficiency and found no evidence of atherosclerotic narrowing. In order to elucidate the absence of CAD in this patient, we characterized his LDL, an atherogenic lipoprotein.

2. Materials and methods

2.1. Patient

We studied a 43-year-old man with a history of apo E deficiency, in whom plasma apo E had not been detected by radioimmunoassay as reported previously [4]. He had a history of cigarette smoking (approximately 20 cigarettes/day) and heavy alcohol abuse. His serum cholesterol and triglyceride concentrations were 51.8 mmol/l (2000 mg/dl) and 71.2 mmol/l (6300 mg/dl), respectively, at the time of admission. He had been diagnosed with diabetes mellitus at the age 35 years and his diabetes was controlled with insulin therapy.

Coronary angiography had been performed at 42 years and revealed no significant atherosclerotic narrowing, though abdominal CT scan showed calcifications on the wall of common iliac artery and abdominal aorta as shown in Fig. 1. He had striking xanthomas on his elbows, knees and Achilles tendon.

2.2. Preparation of serum lipoproteins

Lipoprotein analysis was performed when the patient's serum cholesterol and triglyceride concentrations had decreased by diet and insulin therapies as described previously [4] to 9.8 mmol/l (378 mg/dl) and 2.92 mmol/l (258 mg/dl), respectively. The lipoproteins were separated into four fractions by sequential ultracentrifugation after removal of chylomicrons: VLDL, 0.96–1.006; IDL, 1.006–1.019; LDL, 1.019–1.063; HDL, 1.063–1.21 g/ml.

An isopycnic density gradient ultracentrifugation of the LDL fraction was performed as follows. The LDL fraction, which was separated as the density between 1.019 and 1.050 g/ml, was adjusted to a density of 1.25 g/ml with NaBr. A total of 1.5 ml of 1.25 g/ml (density) LDL was placed at the bottom of a nitrocellulose tube. This was overlaid with 1.12 ml of 1.21 g/ml, 1.15 ml of 1.063 g/ml, 1.12 ml of 1.019 g/ml and 1 ml of 1.006 g/ml solution in a sequential fashion. Ultracentrifugation was continued at 15°C for 24 h at 38 000 rev./min in an SW 6ST rotor. The gradient was eluted and separated into 12 fractions.

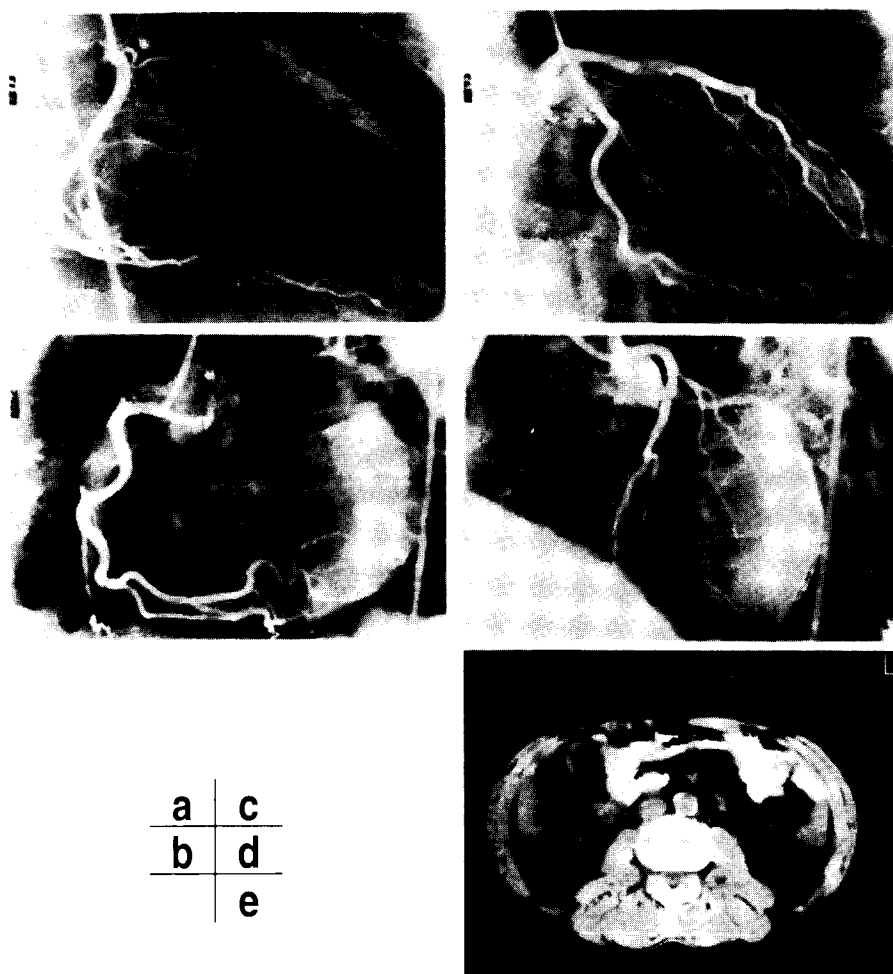


Fig. 1. Coronary angiography and abdominal CT scan of the patient with apo E deficiency. (a) Right coronary artery (RAO); (b) right coronary artery (LAO); (c) left coronary artery (RAO); (d) left coronary artery (LAO); (e) abdominal CT scan showing calcification of abdominal aorta.

Fractionated LDLs were analyzed on a 2–16% polyacrylamide gradient gel electrophoresis (GGE) without sodium dodecyl sulfate (SDS) according to the method described by Anderson et al. [6]. After staining of the gels with Coomassie brilliant blue, the peak distribution of LDL was determined by densitometer.

2.3. Susceptibility of LDL to oxidative modification

Studies of conjugated diene formation were performed to investigate the

susceptibility of LDL to oxidative modification according to previously reported techniques [7]. The conjugated dienes were assessed by monitoring increases in absorbance at 234 nm as described by Esterbauer et al. [8].

3. Results

Data regarding the plasma lipoprotein constituents of the patient and of normal Japanese control subjects ($n = 4$) are given in Table 1, demonstrating a significant increase in the patient's VLDL. Seventy-four percent of his total cholesterol concentration and 92% of his triglyceride concentration were recovered in the VLDL. The IDL concentration was not significantly increased. The ratios of cholesterol to triglyceride of VLDL and IDL were increased on compositional analysis. On the other hand, a significant decrease in LDL (d : 1.019–1.063 g/ml) constituents were noted in our patient, despite the finding that the composition of the patient's LDL did not significantly differ from that of normal controls. The composition of HDL constituents was within the normal range, although the concentration in our patient was significantly reduced.

The particle size distribution of plasma LDL obtained from the patient was analyzed by GGE after separation into 12 subfractions using isopycnic density gradient ultracentrifugation (Fig. 2). The patient's LDL was distributed over a wide buoyancy range of the gradient. The normal LDL bands which appeared are rather uniform and smaller than those of our patient. With increases in density, the size of the normal LDL decreased. However, in the case of our patient's LDL, the large-sized LDL were distributed throughout the range of densities, while smaller particles were not observed in the denser fraction.

In order to examine the susceptibility of LDL to oxidative modification, we measured the production of conjugated dienes of the oxidized LDL in a cell-free system using copper ions. The time-course curves for LDL oxidation did not differ between the control subjects and the patient with apo E deficiency.

4. Discussion

Morganroth et al. have reported that 43% of type III patients have vascular disease and about one-third have definite CAD [9]. They reported also that the average age of male subjects with ischemic heart diseases was 38.1 years old. Peripheral vascular disease involving the lower extremities is nearly as prevalent as coronary artery disease [1]. Individuals with apo E deficiency also have been reported to have severe type III HLP [2–4]. Schaefer et al. performed coronary angiography in a 60-year-old patient with apo E

Table 1
Serum lipoprotein constituents in patients and control subjects

Protein	TG	TC	TPL	TC/TG
<i>VLDL</i>				
Patient (mg/dl) (%)	49.7 233.8	216.6	143.0	0.9
	7.7 36.4	33.6	22.2	
Control (mg/dl) (%)	5.86 ± 3.90 15.4 ± 4.1	6.75 ± 4.99 15.8 ± 2.7	8.50 ± 6.70 18.9 ± 2.8	0.32 ± 0.08
<i>IDL</i>				
Patient (mg/dl) (%)	7.4 8.48	23.4	17.1	2.76
	13.1 15.0	41.5	30.3	
Control (mg/dl) (%)	3.21 ± 1.40 22.4 ± 3.6	4.4 ± 2.83 25.1 ± 3.1	3.64 ± 1.78 24.7 ± 1.2	0.97 ± 0.35
<i>LDL</i>				
Patient (mg/dl) (%)	10.1 3.16	17.6	14.8	5.57
	22.0 6.9	38.6	32.6	
Control (mg/dl) (%)	58.3 ± 12.2 28.8 ± 5.42	13.5 ± 4.7 39.1 ± 2.6	63.0 ± 16.4 26.4 ± 1.8	7.29 ± 1.7
<i>HDL</i>				
Patient (mg/dl) (%)	112.3 7.4	34.6	74.4	4.68
	49.1 3.2	15.1	32.5	
Control (mg/dl) (%)	138.0 ± 23.3 53.9 ± 3.0	10.2 ± 3.3 4.0 ± 1.26	67.0 ± 17.9 25.7 ± 2.2	4.43 ± 1.6
Patient serum (mg/dl)	258	378	253	

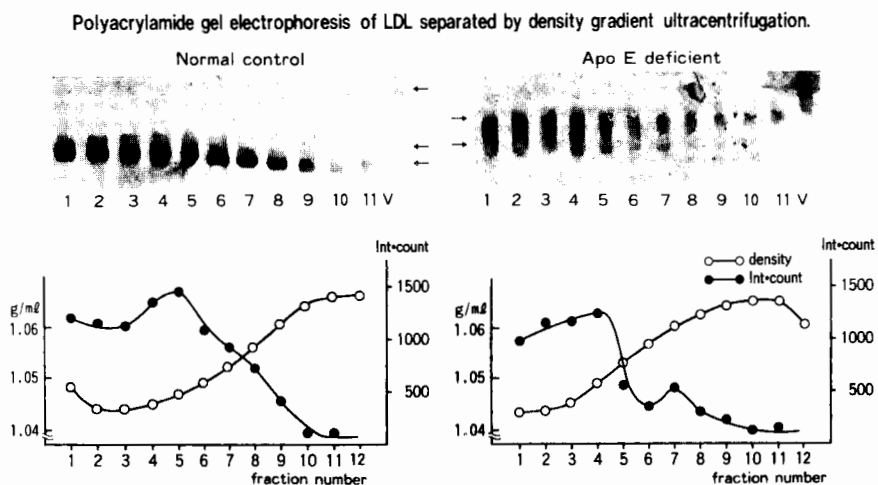


Fig. 2. LDL density gradient fraction displayed by non-denatured gradient gel electrophoresis. After fractionation of the gradient, 20 μ l of each fraction were subjected to non-denatured GGE. On each gel, the far right track represents normal VLDL, while the remaining 11 tracks are the LDL fractions. The far left track represents the top (most buoyant) end of the gradient. Lower panels represent the density of each LDL fraction. Int-count represents the counts of LDL displayed on GGE which were determined by densitometer.

deficiency and revealed an 80% narrowing of the first diagonal branch of the left anterior descending coronary artery but no other detectable narrowings [5]. Based upon this evidence, they speculated that coronary arteriosclerotic disease does not occur prematurely in patients with apo E deficiency. In our 43-year-old case, the patient demonstrated no detectable coronary narrowing, despite manifesting peripheral atherosclerosis, numerous tuberoeruptive and tendon xanthomas and possessing multiple-risk factors (smoking, diabetes, male gender and severe type III HLP). Furthermore, he demonstrated no evidence of ischemic heart disease in the exercise treadmill testing at 46 years, when his serum cholesterol and triglyceride concentrations were 11.0 mmol/l (426 mg/dl) and 3.3 mmol/l (295 mg/dl), respectively, under the treatment of HMG CoA reductase inhibitor and clinofibrate. This evidence suggests that hyperlipoproteinemia caused by apo E deficiency may be a risk factor for peripheral atherosclerosis but not for coronary atherosclerosis.

A complete lipoprotein analysis indicated that greater than 70% of the lipoprotein constituents are within the VLDL density but only 8% in the IDL density with respect to cholesterol. On the other hand, the composition of LDL was nearly normal, though the concentration was extremely low. The abnormalities of the patient's lipoprotein profile are similar to but more prominent than that of conventional type III HLP, which may be induced by

associated diabetes mellitus and/or alcohol abuse. Studies of size and density of the patient's LDL revealed a definite shift to larger, less dense components than normal LDL. Thus, the patient has a paucity of small-dense LDL particles.

Swinkels et al. have reported a connection between mass concentrations of small-dense LDL and increased coronary disease risk [10]. De Graaf et al. have reported that small-dense LDL from healthy subjects have progressively greater susceptibility to *in vitro* oxidation than the more buoyant LDL [11]. In our study we examined the susceptibility to oxidative modification of LDL, as large, less dense LDL may be resistant to oxidative modification. However, the production rate of conjugated dienes from the patient's LDL did not differ from those observed in subjects with normal LDL.

These observations suggest that lower levels of LDL and small-dense LDL are largely responsible for the absence of CAD in patients with apo E deficiency.

Zhang et al. have demonstrated that transgenic mice lacking apo E have five times normal levels of plasma cholesterol and develop foam cell-rich deposition in the proximal aorta [12]. However, no pathologic changes were noted in the coronary arterial bed or the distal aorta. Reddick et al. [13] and Nakashima et al. [14] also found that the coronary arteries were not involved with atherosclerosis, though atherosclerotic lesions were present in the aorta of the young apo E deficient mice. They, therefore, suggested that the lesions of atherosclerosis appeared somewhat different in the coronary arteries than in the other parts of the arterial system in apo E deficient mice. On the other hand, Plump et al. found narrowed lumen of small branches of the coronary arteries in apo E deficient mice of 10 months of age fed chow diet [15]. The authors reported that LDL-cholesterol levels of the aged apo E deficient mice fed a chow diet were not so low, which is clearly different from our human case, suggesting that LDL plays an important role in coronary arteriosclerosis in elder apo E deficient mice.

Acknowledgements

This study was supported in part by Grant-in-Aid No. 07671155 for Scientific Research from the Ministry of Education, Science and Culture of Japan, by a Metabolism of HDL Research Fund and by the National Milk Promotion Association of Japan.

References

- [1] Brewer HB, Gregg RE, Zech LA, Schwarz D, Schaefer EJ. Recent advances in the diagnosis, molecular defect, pathology, and treatment of type III hyperlipoproteinemia. *Ann Intern Med* 1983;98:623–640.

- [2] Ghiselli G, Schaefer EJ, Gascon P, Brewer HB. Type III hyperlipoproteinemia associated with apolipoprotein E deficiency. *Science* 1981;214:1239–1241.
- [3] Mabuchi H, Itoh H, Takeda M et al. A young type III hyperlipoproteinemic patient associated with apolipoprotein E deficiency. *Metabolism* 1989;38:115–119.
- [4] Kurosaka D, Teramoto T, Matsushima T et al. Apolipoprotein E deficiency with a depressed mRNA of normal size. *Atherosclerosis* 1991;88:15–20.
- [5] Schaefer EJ, Gregg RE, Ghiselli G et al. Familial apolipoprotein E deficiency. *J Clin Invest* 1986;78:1206–1219.
- [6] Anderson DW, Nichols AV, Forte TM et al. Particle distribution of human high density lipoprotein. *Biochim Biophys Acta* 1977;493:55–68.
- [7] Heinecke JW, Kawamura M, Suzuki L, Chait A. Oxidation of low density lipoprotein by thiols: superoxide-dependent and independent mechanism. *J Lipid Res* 1993;34:2051–2061.
- [8] Esterbauer H, Striegl G, Duhl H, Rotheneder M. Continuous monitoring of in vitro oxidation of human low density lipoprotein. *Free Radical Res Commun* 1989;6:67–75.
- [9] Morganroth J, Levy RI, Fredrickson DS. The biochemical, clinical, and genetic features of type III hyperlipoproteinemia. *Ann Intern Med* 1975;82:158–174.
- [10] Swinkels DW, Demacker P, Hendriks J, Van't Laara A. Low density lipoprotein subfractions and relationship to other risk factors for coronary artery disease in healthy individuals. *Arteriosclerosis* 1989;9:604–613.
- [11] De Graaf J, Hak-Lamners HLM, Heeters MPC et al. Enhanced susceptibility to in vitro oxidation of the dense low density lipoprotein subfraction in healthy subjects. *Arteriosclerosis* 1991;11:298–306.
- [12] Zhang SH, Reddick RL, Piedrahita JA, Maeda N. Spontaneous hypercholesterolemia and arterial lesions in mice lacking apolipoprotein E. *Science* 1992;258:468–471.
- [13] Reddick RL, Zhang SH, Maeda N. Atherosclerosis in mice lacking apo E. Evaluation of lesional development and progression. *Arterioscler Thromb* 1994;14:141–147.
- [14] Nakashima Y, Plump AS, Rames EW, Breslow JL, Ross R. Apo E-deficient mice develop lesions of all phases of atherosclerosis throughout the arterial tree. *Arterioscler Thromb* 1994;14:133–140.
- [15] Plump AS, Smith JD, Hayek T et al. Severe hypercholesterolemia and atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice created by homologous recombination in ES cells. *Cell* 1992;71:343–353.

日本財団補助金による 1997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 —

財団 法人 日中 医学 協会
理 事 長 中 島 章 殿

I. 研究者氏名 趙 莉欣

研究機関 日本大学医学部第二内科心臓研究班 研究指導者：小沢 友紀雄教授

所在地 〒173-8610 東京都板橋区大谷口上町30-1号 電話 03-3972-8111 内線 2411

研究テーマ：不整脈と突然死

II. 過去の研究歴：中国医科大学循環器内科：不整脈、高血圧、冠心病

日本医科大学第一内科：不整脈、臨床薬理学

慶応大学医学部呼吸循環器内科：心臓電生理学

III. 過去の研究実績：

*犬の脱分極冠動脈における三種言うのケマリンのカルシウム拮抗作用：Diltiazemとの比較
第65回日本薬理学総会1992年3月25日 JPN. J. of pharmacology Vol.1.58 Suppl.I.P.2281992

* Calcium antagonistic action of Qian-Hu on canine coronary artery第5回世界臨床薬理学会1992年7月28日 J. of the Vth conference on clinical pharmacology and therapeutics P.225 1992

* Nitrovasodilator noco-randil augments regional ischemia-induced monophasic action potential shortening without proarrhythmic action 第21回世界心電学会1994年7月4日等9論文

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）

a. The Fifth Annual Scientific Congress of Hong Kong Collegy of Cardiology. April 25, 1997 in HK. Title : Effects of ATP-sensitive potassium channels opener on epicardium myocardial ischemia zone in anesthtized dogs.

b. The xxIVth International Cogress on Electrocardiology. June 24-28, 1997 in Bratislava Slovak R Title : Compared study to Holter-SA-ECG with left ventricular function using multiple gated acquisition cardiac blood pool imaging in ppatients with arrhythmia.

c. 第45回日本心臓病学会 1997年9月24-28 会場：ロイトン札幌 演題：心筋梗塞合併心室性不整脈のHolter-SAE陽性と左室機能との関連性について心プールシンチグラフィによる検討

(2) 学会誌等に発表した論文、有：

a. 雑誌名：Journal of Hong Kong Collegy of Cardiology Vol.5, No.1, P.51 April 1997
論文名：Effects of ATP-sensitive potassium channels opener on epicardium myocardial ischemia zone in anesthtized dogs.

b. 雑誌名：The Jornal of the xxIVth International Cogress on Electrocardiology
論文名：Compared study to Holter-SA-ECG with left ventricular function using multiple gated acquisition cardiac blood pool imaging in patients with arrhythmia.

c. 雑誌名：第45回日本心臓病学会会誌 J. of Cardiology, Vol.30. Suppl.I.P.406
論文名：心筋梗塞合併心室性不整脈のHolter-SAE陽性と左室機能との関連性について心 プールシンチグラフィによる検討

d. 予定投稿の雑誌名：

日本循環器雑誌および英語雑誌

論文名：

I. "心筋梗塞患者のホルター加算平均心電図と左室収縮機能および拡張機能との関連性について心プールシンチグラフィによる検討"

II. "QT dispersionによる心臓突然死の予測"

V. 今後の研究計画及び希望：

私をご指導くださる教授小沢先生に従って、高分解能心電図を中心とした不整脈による突然死の予知予防に関する研究を継続して、当大学医学部にて医学博士の学位を修得するために客員研究員として研究活動を一生懸命頑張っていきたいと思っております。皆先生方にご指導ご鞭撻のほどよろしくお願いいたします。

VI. 研究報告

私は1994年10月21日より日本大学医学部第二内科にて小沢教授のご指導のもとで客員研究員として研究中です。

私の研究は主に循環器学、電気生理学および心臓核医学の分野における、最新の知識、技術を駆使した研究です。当大学医学部にて医学博士の学位を修得するために客員研究員として研究活動に従事しております。

お陰様で1997年度在留中国人研究者研究助成金をいただき、本年度の研究成果を報告いたします。

その研究の一部は：“The Effects of ATP-sensitive potassium channels opener on epicardium myocardial ischemia zone in anesthetized dogs”を1997年4月25-27日に香港にて開催された第五回香港心臓病学会にて発表いたしました。そして、“Compared study to Holter-SA-ECG with left ventricular function using multiple gated acquisition cardiac blood pool imaging in patients with arrhythmias”を1997年6月24-28日欧州で開催された第24回世界心電学にて発表いたしました。さらに、“心筋梗塞合併心室性不整脈のHolter-SAE陽性と左室機能との関連性について心プールシンチグラフィによる検討”を1997年9月25-27日札幌にて開催された第四十五回日本心臓病学会にて発表いたしました。上記発表した研究論文はそれぞれの学会雑誌に投稿して採用され出版されました。

更に、(1) “心筋梗塞患者のホルター加算平均心電図と左室収縮機能および拡張機能との関連性について心プールシンチグラフィによる検討”と(2) “QT dispersionによる心臓突然死の予測”を当大学の医学博士学位の副論文及び主論文として書きます。この二つ論文を日本循環器雑誌及び英語の雑誌に投稿する予定です。

ここで、私の研究にあたり直接ご指導をいただいた小沢友紀雄教授、日中医学会理事長中島章先生、理事安達勇先生と諸理事先生方および事務局川口様と諸関係者皆様によるいろいろとお世話になりました、更に、経済的な支えとなった1997年度在留中国人研究者研究助成金のご援助に厚くお礼を申し上げます。

以上、誠にありがとうございました。



VII. 指導教授のご意見

趙莉欣先生は、学内に於ける真摯な態度で、活動的な研究発表を行い、日常生活面でも極めて真面目であり、今後ますます研究成績が期待出来る人物であると評価いたしました。



原著

新開発ペン型携帯用電話伝送心電
計の診断精度と臨床的有用性
に関する検討

趙 莉 欣、 小 沢 友 紀 雄、 飯 田 潔
谷 川 直、 渡 辺 一 郎、 堀 内 孝 一
笠 卷 祐 二、 森 内 正 人、 小 牧 宏 一
齋 藤 穎、 上 松 瀬 勝 男

日本大学医学部第二内科学教室

茂木智宏

共同開発：カシオ計算機（株）会社

目次

1 . 背景

2 . 目的

3 . ペン型心電計

(1) 本機システムの構成

(2) データ転送 I / F . 心電波形再生ユニ

ット : データ処理ソフト

(3) 心電図サービス医療機関システム概要

(4) 心 電 図 サ ー ビ ス セ ン タ ー シ ス テ ム 概 要

4 . 使 用 方 法

(1) 記 録 方 法

(2) 送 信 方 法

5 . 1 2 誘 導 心 電 図 と の 比 較 に つ い て

(1) 1 2 誘 導 心 電 図 と の 比 較 実 例

(2) V 5 相 当 誘 導 各 波 振 幅 の 相 関

(3) V 5 相 当 誘 導 各 波 振 幅 の 平 均 値 の 比 較

(4) 各 誘 導 に お け る R 波 高 の 相 関

(5) 本 機 心 電 図 に よ る S T - T 変 化 の 評 価

(6) 各 種 不 整 脈 の 判 定 合 致 率

(7) 心 筋 虚 血 の 診 断 精 度 と 比 較

6 . 本機用いた心電図評価法の特長

7 . 臨床応用範囲と有用性

8 . 結論

9 . 考察

10 . 参考文献

合計 50頁でした

そのなかに部分だけ copy (たものびす)。

検討も可能なペン型携帯用電話伝送心電計が開発されました(図1.2と表1)。

目的：常に携帯して任意の時間、あるいは空間場所にて、症状のあるときの心臓のチェック、日常生活の種々の状態での心臓のチェック、在宅療法への応用などを可能にすることです。最近のように電話が発達してきますと、携帯電話やポケットベルを利用して指示などのシステムの日常的に任意の状態の心電図の記録できますし、更に電話伝送により心電図の結果が直ちに解析され、被験者がその結果を短時間で知ることのできるシステム作りも可能です(図3.表2.図4.5.6と図7)。本機は病院の診療における利用はもとより、各家庭、学校の保健室、職場、スポーツ、ラブ、ホテル、レジャー施設、旅行など、種々な場合の利用により、発病の早期発見、早期対応が可能になります。即ち、そ

本機を用いた心電図評価法の特長

(1) 小型、軽量

本機は携帯が容易で、検査時に計測しやすい形状になっています。

(2) 電極装着が不必要

長時間記録心電図と異なり、ただ携帯するだけでよいので予め電極を装着しておく必要がなく、日常生活上の不快感が全くありません。

(3) 服を着たままで心電図の計測も可能

襟元から電極部を差し込んで胸部の当てることが出来るので、脱衣の必要がなく、いつでも、どこでも計測できます。

(4) 発作前後の計測も可能

デイスポーザブル電極をあらかじめ装着し、本機を”イベントモード”に設定しておけば、スイッチを押す直前の心電図を計測することもできます。

(5) 電話で心電図データを伝送可能

計測した心電図を、自宅や公衆電話など、一般の電話から受信センターに送信できます。

(6) 無人データ受信が可能

受信センターでは、システムを”自動受信”に設定しておけば、登録された会員からの心電図データを24時間体制で受け付け、自動的に保存されます。

(7) 送られた心電図を転送可能

パソコン通信を利用して、受信センターから医療機関へ心電図を転送し、さらに医療機関から解析結果を受信センターへ

転送できます。これにより利用者への診断結果の返がスピーディーに行えます。

(8) 記録装置から直接データを入力することも可能

電話を介さずに直接本機から受信システムにデータ入力もできます。

(9) 1 2 誘導心電計の代用
計測部位を選択することにより、1 2 誘導心電計の代用として使用することも可能です。

臨床応用範囲：

心電図による心臓の異常のチェックを目的とし、常時携帯し、記録伝送可能であるために、その利用分野は極めて広いと言えます。

は 1 2 誘導心電図の V 1 - 2 の S T - T 変化がみられたが V 5 誘導では S T - T 変化がみとめなかつた症例でした。

以上より、ペン型携帯用電話伝送心電計による心筋虚血の判定は、V 5 誘導相当の I 誘導に限った検討でも、1 2 誘導心電図による判定とほぼ同程度の診断が可能である結果が得られた。ペン型携帯用電話伝送心電計は、不整脈の診断のみならず、心筋虚血の判定にも有用である。

結 論

新しく開発されたペン型小型携帯用電話伝送心電計は、従来の機器に比し小型化と精度の向上がみられ、携帯用電話あるいはポケットベルの利用で、結果が直ちに被検

考 察 :

心筋シンチグラフィの成績ちの比較では、
12誘導心電図で一致率68%、ペン型携帯
用電話心電計では70%とほぼ同様の一致率
を示したが、必ずしも満足のいくものではな
かった。しかし、12誘導心電図とペン型携
帯用電話伝送心電計との比較では、一致率
90%と極めて良好であった。

12誘導心電図にたいしてペン型携帯用電
話伝送心電図の陰性例では、7例中5例が
12誘導心電図のaVFで有意なST低下が
みられたがV5誘導ではjunctionalなS
T低下であり、ペン型携帯用電話伝送心電計
でもjunctionalなST低下が認められた。
また1例では12誘導心電図のaVFで有意
なST低下がみられたがV5誘導ではST
低下をみちめず、ペン型携帯用電話伝送心電
図でもST低下をみとめなかった。残り1例



XXIVth INTERNATIONAL CONGRESS ON ELECTROCARDIOLOGY

38th International Symposium on Vectorcardiography
June 24 - 28, 1997, Bratislava, Slovak Republic

ECG

1

COMPARED STUDY TO HOLTER-SA-ECG WITH LEFT VENTRICULAR FUNCTION USING MULTIPLE GATED ACQUISITION CARDIAC BLOOD POOL IMAGING IN PATIENTS WITH ARRHYTHMIA

Zhao LX, Horiuchi K., Ozawa Y., Tanigawa N, Saito S, Watanabe I., Kanmatsusei K.

The 2nd Dept. of Medicine, School of Medicine, Nihon University, Tokyo, Japan.

The purpose of this study was to evaluate left ventricular function from multiple gated acquisition (MUGA) cardiac blood pool imaging in patients with arrhythmia; And also evaluation of relationship between it and Holter -signal averaged ECG(Holter-SA-ECG).

Subjects and Methods: 30 patients were followed intravenous administration of 20 mCi of Technetium-99m labeled human serum albumin-DTPA for study MUGA cardiac blood pool imaging; And every patients performed 24h Holter monitor, the data were recorded by Del Mar Avionics Model 459 3-channel Cardio-Corder and Model 563 strata scan-Holter ECG analysis system. The criteria of Holter-SA-ECG: QRSd>114ms, RMS40<12uV, LAS40>38ms. An abnormal Holter-SA-ECG[Late Potential (LP) positive] was defined as the presence of at least 2 of 3 parameters. At our this study, we using peak filling rate(PFR) to evaluate early diastolic filling function, and using ejection fraction(EF) to evaluate systolic function of left ventricular in these 30 patients.

Results: 1). PFR in Group of normal Holter-SA-ECG was higher than that group which have abnormal Holter-SA-ECG.

2). Difference of EF was no significantly in both groups.

Conclusion: 1. EF was no significantly difference both in patients with normal and abnormal Holter-SA-ECG

2. PFR in group of abnormal Holter-SA-ECG was lower than that group which have normal Holter-SA-ECG. It was sensitively and stronger evidence for that left ventricular early diastolic dysfunction was due to myocardial injury in patients with abnormal Holter-SA-ECG. This results suggestion that PFR as earliest manifestation of cardiac diastolic dysfunction and have possibility after that frequently develop systolic dysfunction,

3. MUGA cardiac blood pool imaging as a noninvasive, reliable and reproducible means to quantify left ventricular function.

日本財団補助金による

1997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 -

1998年2月27日

財団法人 日中医学協会

理事長 中島章殿

I. 研究者氏名 梁一強
 研究機関 帝京大学 内科 研究指導者 寺本民生 職名 教授
 所在地 〒173-8605 板橋区加賀2-11-1 電話 03-3964-1211 内線 1969

II. 過去の研究歴
1993年7月～1998年現在 帝京大学内科で動脈硬化について研究

III. 過去の研究実績
Clinica Chimica Acta. 247:159-166, 1996
Characterization of low-density-lipoprotein in apolipoprotein E deficiency in a patient without coronary atherosclerosis.

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)
DDW-Japan 1997 脂肪肝症における肝MTP活性の意義 (4/8)
第29回 日本動脈硬化学会総会 肝臓におけるMTP活性の調整因子 (6/8)
XIth International symposium on Atherosclerosis PARIS
Regulatory factor of MTP activity in liver (10/6)
 (2) 学会誌等に発表した論文 無・ (雑誌名・論文名)

J. B. Vol. 123 No.1
Defect in an intrahepatic degradation of apolipoprotein B in humans
— an animal model of hypobetalipoproteinemia —

V. 今後の研究計画及び希望
今後とも動脈硬化症メカニズムについて研究のつもりであり、
特に血管平滑筋細胞の増殖に關する因子を重点を絞って研究したいと
考えている。

研究報告

脂肪肝の発症とMTPの役割

帝京大学内科 梁一強

スunksはトガリネズミ科に属し、体重は約70gの小動物で、24時間の絶食により容易に脂肪肝が誘発され、再摂食により速やかに脂肪肝が改善することがわかった。この脂肪肝発症メカニズムを検討していく過程で報告してきたことをまとめると1) 血清脂質は極めて低く、血清アポ蛋白Bがほとんど検出されない。2) 絶食により遊離脂肪酸は有意に上昇した。3) 肝臓におけるコレステロールのエステル化酵素であるACATは著明な低活性を示した。

一般的に脂肪肝の原因として、1) 肝臓におけるトリグリセリド (TG) の合成過剰、2) 肝臓からのTG分泌の低下が考えられるが、スunksにおける脂肪肝について以上の結果を考慮すると肝臓からのTG分泌低下すなわち超低比重リポ蛋白 (VLDL) の形成不全により肝臓からTGを放出できないことが主な原因と考えられる。肝臓で合成されたアポ蛋白BはVLDLの形成に利用されないと一部が細胞内異化を受けていることが報告されている。従って、アポ蛋白Bの細胞内異化が亢進していると血清アポ蛋白Bは低くなり、脂肪肝が発症することが予測される。この点について検討したところスunksにおいてアポ蛋白Bの細胞内異化は亢進していないことが確認された。一方、VLDLの分泌にコレステロールエステル (CE) の合成が関与していることも報告されており、スunksでもACAT活性が低いいためCEの合成が低く、VLDLの分泌が低下している可能性も考えられる。また、VLDLの形成にはMicrosomal triglyceride transfer protein(MTP)が重要な役割を演じていることも報告されている。

そこで、本研究ではスunksを飢餓状態にした際発症する脂肪肝のメカニズムを解明するため、VLDLの統合にキー蛋白と考えられるMTP活性、そしてACAT活性との関連について検討した。

【方法】 雄性スunksと雄性Wistar系ラットを用いて、対照群、絶食群、再摂食群の3群について検討した。従来の方法で肝臓並びに小腸粘膜よりMicrosome分画を分離し、MTP活性はWetterauらの方法にてliposome間の¹⁴C-TGと³H-PCの転送率から計算した。また、肝細胞実験では体重160~180gの雄性Wistar系ラットから肝細胞を分離し、3日間培養した後、実験に供した。HMG-CoA還元酵素阻害薬 (CS514) は1ng/ml、10ng/mlの濃度で添加して1時間培養し、MTP活性に及ぼす影響について検討した。また、CEの合成阻害薬としてACAT阻害薬58-035 (Sandoz) を0.5μg/ml、5μg/mlの濃度で添加して20時間培養した。また、細胞内CEを増加させる目的でLDLの添加効果も検討した。ヒトLDLは50μg/ml、100μg/mlの濃度で添加して14時間培養した。

【結果】 図1に示したようにラットでは添加microsome蛋白を25、50、75μgとするとMTP活性は直線的に上昇したが、スunksでは75μgまでは転送活性が観察できず、MTP活性が極めて低い可能性が考えられた。そこで、図2に示したようにスunksで

microsome蛋白を200 μ gまで増やして測定したところ初めて直線的な増加を示した。その活性はmicrosome蛋白あたりで計算すると、ラットの約30%と計算された。unksでは24時間の絶食で脂肪肝が起こることから次に、絶食のMTP活性に及ぼす影響についてラットと比較して観察した。図3に示すようにラットでは対照、絶食、再摂食の3群間でMTP活性の変動が認められなかった。一方、unksでは、絶食による影響は認められなかったが再摂食によりMTPの活性が有意に上昇しラットの約80%となっていることが判明した。

unks肝におけるMTP活性の著明な低下が肝臓に特異的であるのか検討する目的で小腸粘膜についても検討してみた。表1に示したようにunks小腸のMTP活性はラットとほぼ同等であり、肝臓において特異的に低活性を示すものと考えられた。

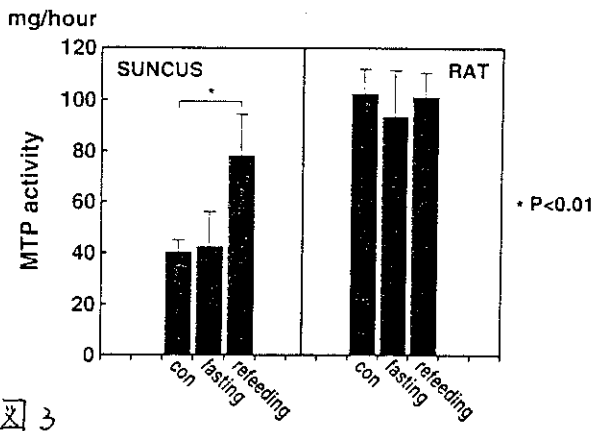
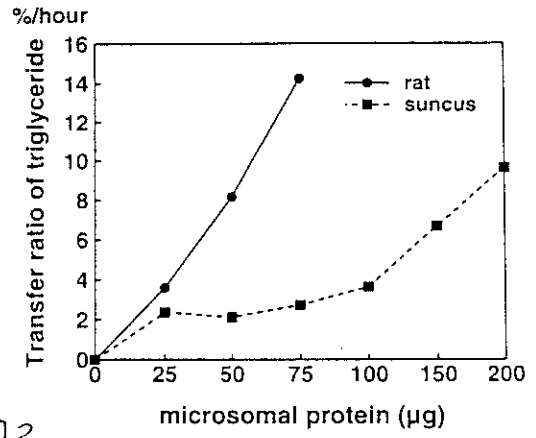
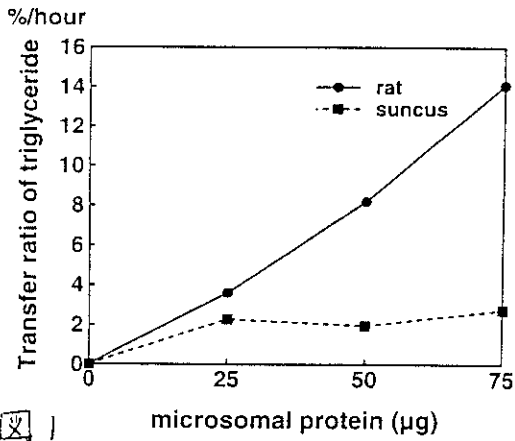
unksにおけるMTP活性の低下がコレステロールエステルの合成酵素であるACAT活性と関係がないか検討する目的で、ラットの初代培養肝細胞を用いてMTP活性の調節因子について検討した。

MTP活性に及ぼすコレステロールの影響を観察するためにHMG-CoA還元酵素阻害薬を用いて検討した。HMG-CoA還元酵素阻害薬の添加により、ラット初代培養肝細胞のMTP活性はコントロールの約50%と有意に低下した。^(図4)次にACAT阻害薬の影響を検討した。図4に示すようにACAT阻害薬の添加により、細胞内のCEは著明に低下しており、それと同時にMTP活性はコントロールの約70%と有意な低下が認められた。この二つのデータは、肝内CEの含量がMTP活性を制御している可能性を示唆するものと考えられる。そこでCEの濃度上昇を目的としてLDL添加の影響を観察した。図5に示すようにラット初代培養肝細胞にLDLを添加するとMTP活性は濃度依存的に有意に上昇した。

【考察】

以上の結果をまとめるとunksでは絶食により著明に血清遊離脂肪酸が上昇し、脂肪酸プールの増大があり、相対的に肝臓でのTGの生成量は増加する可能性が考えられる。一方、unksではMTP活性が著明に低下していることから、VLDLの統合障害が常に存在するものと考えられる。従って、合成されたトリグリセリドを速やかに分泌する能力が十分でない可能性が考えられる。また、unksにおいて再摂食により脂肪肝が急速に改善することは、MTP活性の上昇により急速にVLDLとして分泌されるためと考えられた。つまりMTP活性が40%未満では肝内脂質輸送に障害を生ずるが、70%以上であれば十分な輸送効果があると考えられた。

また、ラットの肝細胞実験から、細胞内コレステロールエステルの合成がMTP活性に重要な役割を演じている可能性が示唆された。unksの肝臓では特異的にACAT,MTP両活性が低下していることを考慮すると、肝臓における特異的なMTP活性の低下はコレステロールエステルの低下に起因する可能性が考えられる。また、MTP活性の制御にはACAT活性の制御が重要である可能性が示唆された。

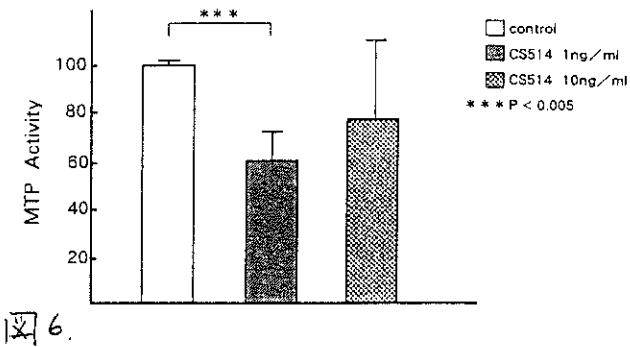


MTP activity of liver and intestine

liver	rat	0.923 ± 0.25
	suncus	$0.370 \pm 0.10^{***}$
intestine	rat	1.143 ± 0.36
	suncus	1.422 ± 0.79

(nmole/mg/hour)
*** $P < 0.005$

表 1



Effect of LDL on MTP activity in rat hepatocytes

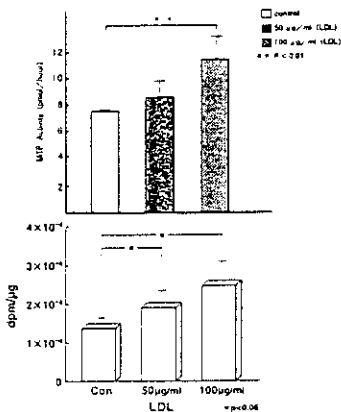


图 5

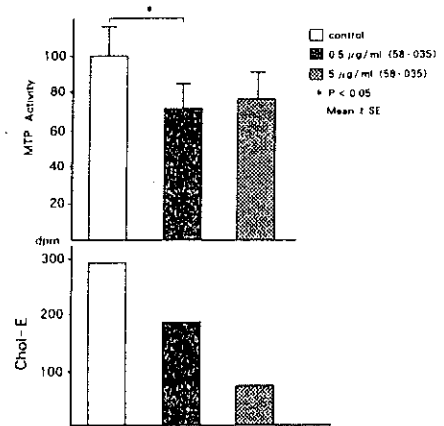


图 4

105 肝臓におけるMicrosomal Triglyceride Transfer Protein (MTP)の調節因子

帝京大学第一内科 梁一強、武藤朝美、藤田美峰子、金子和子
嶋津伸子、木下誠、山中正己、寺本民生

【目的】脂肪肝易発動物であるスックスにおける肝内脂質輸送機構の検討よりVLDLの統合に関するものとしてトリグリセリド(TG)、コレステロールエステル(CE)の合成とMTP活性が重要であることを報告してきた。特に、MTP活性が脂質分泌のキーポイントと考えられたので、本研究ではラットの肝細胞を用いてMTP活性の調節因子としてTGとCEの合成に焦点をあてて検討したので報告する。

【方法】雄性Wistar系ラットの初代培養遊離肝細胞を実験に供した。脂肪酸添加実験ではmediumにoleic acidを0.5mMと1mMの濃度で添加し、2時間培養した。CEの合成阻害薬としてACAT阻害薬(58-035)を0.5mg/mlと5mg/mlの濃度で添加して20時間培養した。HMG-CoA還元酵素阻害薬(CS514)は1ng/mlと10ng/mlの濃度で添加して1時間培養した。MTP活性はWetterauらの方法にてliposome間の¹⁴C-TGと¹⁴P-Cの転送率におよぼすmicrosomal分画の添加量から計算した。

【成績】ラット培養肝細胞のMTP活性は 8.98 ± 0.81 pmoles/hと同時に測定した肝組織の 6.99 pmoles/hより高値を示した。oleic acidの添加によりMTP活性は 6.79 ± 0.57 (0.5mM)と 6.62 ± 0.70 (1mM)と有意な低下が認められた($p < 0.01$)。このとき細胞内のTGは有意に増加していたがmedium中のTGには有意な変化は認められなかった。ACAT阻害薬やHMG-CoA還元酵素阻害薬の添加でもMTP活性はそれぞれコントロールの83%、85%と有意な低下を示したが濃度依存性はなかった。

【結論】ラット培養肝細胞のMTP活性はその組織より高値を示した。これは脂肪酸無添加mediumを用いたためと考えられる。oleic acidの添加により肝組織と同等の活性を示したのはこのためと考えられる。一方、58-035やCS514の添加によりCEの合成を抑制することはMTP活性の抑制効果をもたらすものと考えられた。

106 肝臓でのコレステロール蓄積による中性脂肪合成抑制の機序

国立健康・栄養研究所臨床栄養部、東北大遺伝子実験施設*
池本真二、角田伸代、山本徳男*、江崎 浩

【目的】コレステロール代謝に関係するLDLレセプター、HMG-CoA還元酵素、HMG-CoA合成酵素の遺伝子発現はsterol regulatory element 1 (SRE1)を介してコレステロールにより抑制されることが知られている。また、SRE1に結合するSRE binding proteins 1 (SREBP1)とADD1が同一であることから、細胞内コレステロール量が脂肪酸合成や脂肪細胞の分化に関与することが推定されている。本研究では、中性脂肪の合成にコレステロール代謝が関与するかどうかを検討した。【方法及び結果】C57BL/6Jマウスを高炭水化物食(対照群)、高炭水化物+0.5%コレレート食、高脂肪食及び高脂肪+0.5%コレレート食で15週間飼育した。摂食量及び脂肪の吸収量に著明な差が認められないにもかかわらず、高脂肪食で内臓性肥満と高血糖を生じた。しかし、高脂肪食にコレレートを加えておくと、これらの発症が完全に防止された。肝臓のTC量は、コレレート添加で、それぞれ対照群の2.6倍、高脂肪食群の3.3倍に増加した。また、肝臓のTG量は、高脂肪食によって対照群の1.7倍に増加したが、コレレート添加によって対照群の83%にまで減少した。肝臓のAcyl-CoA synthetase (ACS) mRNA量は、高脂肪食によって対照群の1.4倍に増加し、コレレート添加によって対照群の46%にまで減少した。ACS mRNAは5'非翻訳領域の違いから3種類(Form-A、B、C)存在することが知られているが、その中でも、Form Aは、主として肝臓に存在してTG合成に関与すると考えられており、そのプロモーター部分にSRE1領域を持つことが知られている。【結論】肝臓での中性脂肪合成に関与する酵素もコレステロールによる発現抑制が認められ、糖尿病や肥満の発症にコレステロール代謝が関与する可能性が推定された。

107 非インスリン依存性糖尿病患者における血中cholesteryl ester transfer protein濃度と血清脂質との関連性について

獨協医科大学越谷病院 一般内科
田山一巳、小林秀城、藤原幸雄、麻生好正、犬飼敏彦、竹村喜弘

【目的】血漿脂質転送蛋白質のひとつであるcholesteryl ester transfer protein (CETP)は主としてCEやTGの交換・転送反応を特異的に促進し、LCAT、HTGLなどの酵素と共に、HDLを介した動脈硬化の防御機構における重要な因子であることが知られている。今回われわれは、非インスリン依存性糖尿病(NIDDM)患者に焦点を当て、血中CETP濃度と血清脂質レベルとの関連性につき検討した。

【方法】NIDDM患者193名(男性99名、女性94名、年齢 59.0 ± 10.6 歳)、健康者23名を対象とした。血中CETP濃度は抗ヒトトリコンビナントCETPモノクローナル抗体とHRP標識抗ラットCETPポリクローナル抗体を用いたサンドイッチELISA法により測定した(株)三菱化学ビーシーエル)。血清脂質はTC、TG、HDL-C、Apo A I、Apo B、Apo E、LDL、VLDL、chylomicron等の測定を行った。

【結果】①NIDDM患者では健康者に比し、有意なCETP濃度の低下が認められた($P < 0.01$)。CETP濃度の下限のcut off値を $1.14 \mu\text{g/ml}$ と規定すると、NIDDM患者の10.4%に明らかなCETP濃度の低下が認められた。②女性は男性に比しCETP濃度は約13%高く、有意に上昇していた($P < 0.01$)。③NIDDM患者においてCETP濃度はTCと有意な正相関を認めた($P < 0.05$)。HDL-C高値群(80mg/dl)では、CETP濃度は低下傾向を示し、逆にLDL高値群(500mg/dl)ではCETP濃度は有意に上昇していた($P < 0.05$)。CETP濃度は、Apo B、Apo Eとそれぞれ有意な正の相関関係を示した(いずれも $P < 0.05$)。

【結論】NIDDM患者において、血漿脂質転送蛋白質であるCETPは、その血中濃度と血清TC、HDL-C、LDL-C、Apo B、Apo E値との間にそれぞれ密接な関連性を有しており、それらの脂質代謝pathwayに影響を及ぼす重要な因子のひとつであることが示唆された。

108 家兎CETPモノクローナル抗体によるELISA法を用いた血漿CETP濃度の臨床的検討

名古屋市立大学第三内科 第一生化学*
笹井冠宗、野路久仁子*、日比野剛、佐久間長彦、藤浪隆夫、横山信治*

【目的】我々は、rabbit cholesteryl ester transfer protein (CETP)に対するモノクローナル抗体(mAb)を作成し、ヒトのCETPに反応する2種類の抗体(mAb 3-11D、14-8F)を用いて、CETP濃度測定ELISA法を確立した。このELISA法を用いて、シンバスタチン投与前後のCETP濃度を測定し、検討した。【方法】IIa型高脂血症22例にシンバスタチン5mg/日を4週間投与し、投与前後の早朝空腹時採血にて血清脂質を測定した。CETP濃度はCETPに対する2つのモノクローナル抗体(mAb 3-11D、14-8F)を用いたELISAサンドイッチ法を作成し、測定した。mAb 3-11DはCETPのTGとCEの転送を阻害し、mAb 14-8FはTGの転送を阻害する。CETP活性はAlbersらの方法にて測定した。【結果】Albersらの方法にて測定したCETP活性と本法でのCETP濃度は有意な相関性を認めた(前: $r = 0.446$, $P < 0.05$ 後: $r = 0.625$, $P < 0.001$)。シンバスタチン投与にてTC ($271 \pm 56\text{mg/dl}$ vs $226 \pm 45\text{mg/dl}$; $P < 0.0001$)、LDL-C ($188 \pm 61\text{mg/dl}$ vs $142 \pm 48\text{mg/dl}$; $P < 0.0001$)と有意に低下した。HDL-C ($51.7 \pm 10.9\text{mg/dl}$ vs $58.0 \pm 10.9\text{mg/dl}$; $P < 0.0001$)と有意な増加を認めた。TG ($158 \pm 95\text{mg/dl}$ vs $134 \pm 77\text{mg/dl}$; NS)と低下傾向を示した。CETP活性は($11.3 \pm 3.7\%$ /10ul/3hr vs $9.4 \pm 3.9\%$ /10ul/3hr; $P < 0.05$)、CETP濃度は($1.22 \pm 0.38\mu\text{g/dl}$ vs $1.09 \pm 0.35\mu\text{g/dl}$; $P = 0.0997$)と低下傾向を示した。【結論】シンバスタチン投与によるCETP活性の低下はCETP濃度の低下によることを示唆したが、HDL-Cの増加とCETP活性・濃度には相関性を認めなかった。

日本財団補助金による 1997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 —

財団 法人 日中 医学 協会
理 事 長 中 島 章 殿

I. 研究者氏名 趙 莉欣

研究機関 日本大学医学部第二内科心臓研究班 研究指導者：小沢 友紀雄教授

所在地 =173-8610 東京都板橋区大谷口上町30-1号 電話 03-3972-8111 内線2411

研究テーマ：不整脈と突然死

II. 過去の研究歴：中国医科大学循環器内科：不整脈、高血圧、冠心病

日本医科大学第一内科：不整脈、臨床薬理学

慶応大学医学部呼吸循環器内科：心臓電生理学

III. 過去の研究実績：

*犬の脱分極冠動脈における三種言うのケマリンのカルシウム抗作用：Diltiazemとの比較
第65回日本薬理学総会1992年3月25日 JPN. J. of pharmacology Vol.1.58 Suppl.I.P.2281992

* Calcium antagonistic action of Qian-Hu on canine coronary artery第5回世界臨床薬理学会1992
年7月28日 J. of the Vth conference on clinical pharmacology and therapeutics P.225 1992

* Nitrovasodilator nocorrandil augments reginal ischemia-induced monophasic action potential
shortening without proarrhythmic action 第21回世界心電学会1994年7月4日等9論文

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）

a. The Fifth Annual Scientific Congress of Hong Kong Collegy of Cardiology. April 25, 1997 in
HK. Title : Effects of ATP-sensitive potassium channels opener on epicardium myocardial
ischemia zone in anesthtized dogs.

b. The xxIVth International Cogress on Electrocardiology. June 24-28, 1997 in Bratislava Slovak R
Title : Compared study to Holter-SA-ECG with left ventricular function using multiple gated
acquisition cardiac blood pool imaging in ppatients with arrhythmia.

c. 第45回日本心臓病学会 1997年9月24-28 会場：ロイトン札幌 演題：心筋梗塞合
併心室性不整脈のHolter-SAE陽性と左室機能との関連性について心プールシンチグラ
フィーによる検討

(2) 学会誌等に発表した論文、有：

a. 雑誌名：Journal of Hong Kong Collegy of Cardiology Vol.5, No.1, P.51 April 1997
論文名：Effects of ATP-sensitive potassium channels opener on epicardium myocardial
ischemia zone in anesthtized dogs.

b. 雑誌名：The Jornal of the xxIVth International Cogress on Electrocardiology
論文名：Compared study to Holter-SA-ECG with left ventricular function using multiple
gated acquisition cardiac blood pool imaging in patients with arrhythmia.

c. 雑誌名：第45回日本心臓病学会会誌 J. of Cardiology, Vol.30. Suppl. I. P. 406
論文名：心筋梗塞合併心室性不整脈のHolter-SAE陽性と左室機能との関連性につい
て心 プールシンチグラフィによる検討

d. 予定投稿の雑誌名：

日本循環器雑誌および英語雑誌

論文名：

I. "心筋梗塞患者のホルター加算平均心電図と左室収縮機能および拡張機能との
関連性について心プールシンチグラフィによる検討"

II. "QT dispersionによる心臓突然死の予測"

V. 今後の研究計画及び希望：

私をご指導くださる教授小沢先生に従って、高分解能心電図を中心とした不整脈による
突然死の予知予防に関する研究を継続して、当大学医学部にて医学博士の学位を修得する
ために客員研究員として研究活動を一生懸命頑張っていきたいと思っております。皆先生方にご
指導ご鞭撻のほどよろしくお願い申し上げます。

VI. 研究報告

私は1994年10月21日より日本大学医学部第二内科にて小沢教授のご指導のもとで客員研究員として研究中です。

私の研究は主に循環器学、電気生理学および心臓核医学の分野における、最新の知識、技術を駆使した研究です。当大学医学部にて医学博士の学位を修得するために客員研究員として研究活動に従事しております。

お陰様で1997年度在留中国人研究者研究助成金をいただいて、本年度の研究成果を報告いたします。

その研究の一部は：“The Effects of ATP-sensitive potassium channels opener on epicardium myocardial ischemia zone in anesthetized dogs”を1997年4月25-27日に香港にて開催された第五回香港心臓病学会にて発表いたしました。そして、“Compared study to Holter-SA-ECG with left ventricular function using multiple gated acquisition cardiac blood pool imaging in patients with arrhythmias”を1997年6月24-28日欧州で開催された第24回世界心電学にて発表いたしました。さらに、“心筋梗塞合併心室性不整脈のHolter-SAE陽性と左室機能との関連性について心プールシンチグラフィによる検討”を1997年9月25-27日札幌にて開催された第四十五回日本心臓病学会にて発表いたしました。上記発表した研究論文はそれぞれの学会雑誌に投稿して採用され出版されました。

更に、(1) “心筋梗塞患者のホルター加算平均心電図と左室収縮機能および拡張機能との関連性について心プールシンチグラフィによる検討”と(2) “QT dispersionによる心臓突然死の予測”を当大学の医学博士学位の副論文及び主論文として書きます。この二つ論文を日本循環器雑誌及び英語の雑誌に投稿する予定です。

ここで、私の研究にあたり直接ご指導をいただいた小沢友紀雄教授、日中医学会理事長中島章先生、理事安達勇先生と諸理事先生方および事務局川口様と諸関係者皆様いろいろなとお世話になりました、更に、経済的な支えとなった1997年度在留中国人研究者研究助成金のご援助に厚くお礼を申し上げます。

以上、誠にありがとうございました。



VII. 指導教授のご意見

趙莉欣先生は、学内に对する真摯な態度で、活動的な研究発表を行い、日常生活面でも極めて真面目であり、今後ますます研究成績が期待できる人物であると評価しております。



原著

新開発ペン型携帯用電話伝送心電
計の診断精度と臨床的有用性
に関する検討

趙 莉 欣 小沢友紀雄 飯田 潔

谷川 直 渡辺 一郎 堀内孝一

笠巻祐二 森内 正人 小牧宏一

斎藤 穎 上松瀬 勝男

日本大学医学部第二内科学教室

茂木智宏

共同開発：カシオ計算機（株）会社

目次

1 . 背 景

2 . 目 的

3 . ペ ン 型 心 電 計

(1) 本 機 シ ス テ ム の 構 成

(2) デ ー タ 転 送 I / F . 心 電 波 形 再 生 ユ ニ
ット : デ ー タ 処 理 ソ フ ト

(3) 心 電 図 サ ー ビ ス 医 療 機 関 シ ス テ ム 概 要

(4) 心電図サービスマニピュレーションシステム概要

4 . 使用 方法

(1) 記 録 方 法

(2) 送 信 方 法

5 . 1 2 誘 導 心 電 図 と の 比 較 に つ い て

(1) 1 2 誘 導 心 電 図 と の 比 較 実 例

(2) V 5 相 当 誘 導 各 波 振 幅 の 相 関

(3) V 5 相 当 誘 導 各 波 振 幅 の 平 均 値 の 比 較

(4) 各 誘 導 に お け る R 波 高 の 相 関

(5) 本 機 心 電 図 に よ る S T - T 変 化 の 評 価

(6) 各 種 不 整 脈 の 判 定 合 致 率

(7) 心 筋 虚 血 の 診 断 精 度 と 比 較

6 . 本機用いた心電図評価法の特長

7 . 臨床応用範囲と有用性

8 . 結論

9 . 考察

10 . 参考文献

合計 50頁です

そのなかに部分だけ copy (したものです)。

検討も可能なペン型携帯用電話伝送心電計が開発されました(図1.2と表1)。

目的：常に携帯して任意の時間、あるいは空間場所にて、症状のあるときの心臓のチェック、日常生活の種々の状態での心臓のチェック、在宅療法への応用などを可能にすることです。最近のように電話が発達してきますと、携帯電話やポケットベルを利用して指示などのシステムの日常的に任意の状態の心電図の記録できますし、更に電話伝送により心電図の結果が直ちに解析され、被験者がその結果を短時間で知ることのできるシステム作りも可能です(図3.表2.図4.5.6と図7)。本機は病院の診療における利用はもとより、各家庭、学校の保健室、職場、スポーツ、ラブ、ホテル、レジャー施設、旅行など、種々な場合の利用により、発病の早期発見、早期対応が可能になります。即ち、そ

本機を用いた心電図評価法の特長

(1) 小型、軽量

本機は携帯が容易で、検査時に計測しやすい形状になっています。

(2) 電極装着が不必要

長時間記録心電図と異なり、ただ携帯するだけでよいので予め電極を装着しておく必要がなく、日常生活上の不快感が全くありません。

(3) 服を着たままで心電図の計測も可能

襟元から電極部を差し込んで胸部の当てることが出来るので、脱衣の必要がなく、いつでも、どこでも計測できます。

(4) 発作前後の計測も可能

デイスポータブル電極をあらかじめ装着し、本機を”イベントモード”に設定しておけば、スイッチを押す直前の心電図を計測することもできます。

(5) 電話で心電図データを伝送可能

計測した心電図を、自宅や公衆電話など、一般の電話から受信センターに送信できます。

(6) 無人データ受信が可能

受信センターでは、システムを”自動受信”に設定しておけば、登録された会員からの心電図データを24時間体制で受け付け、自動的に保存されます。

(7) 送られた心電図を転送可能

パソコン通信を利用して、受信センターから医療機関へ心電図を転送し、さらに医療機関から解析結果を受信センターへ

転送できます。これにより利用者への診断結果の返りがスピーディーに行えます。

(8) 記録装置から直接データを入力することも可能

電話を介さずに直接本機から受信システムにデータ入力もできます。

(9) 1 2 誘導心電計の代用

計測部位を選択することにより、1 2 誘導心電計の代用として使用することも可能です。

臨床応用範囲：

心電図による心臓の異常のチェックを目的とし、常時携帯し、記録伝送可能であるために、その利用分野は極めて広いと言えます。

は 1 2 誘導心電図の V 1 - 2 の S T - T 変化がみられたが V 5 誘導では S T - T 変化がみとめなかつた症例でした。

以上より、ペン型携帯用電話伝送心電計による心筋虚血の判定は、V 5 誘導相当の I 誘導に限った検討でも、1 2 誘導心電図による判定とほぼ同程度の診断が可能である結果が得られた。ペン型携帯用電話伝送心電計は、不整脈の診断のみならず、心筋虚血の判定にも有用である。

結 論

新しく開発されたペン型小型携帯用電話伝送心電計は、従来の機器に比し小型化と精度の向上がみられ、携帯用電話あるいはポケットベルの利用で、結果が直ちに被検

考 察 :

心筋シンチグラフィの成績ちの比較では、
1 2 誘導心電図で一致率 6 8 %、ペン型携帯
用電話心電計では 7 0 % とほぼ同様の一致率
を示したが、必ずしも満足のいくものではな
かった。しかし、1 2 誘導心電図とペン型携
帯用電話伝送心電計との比較では、一致率
9 0 % と極めて良好であった。

1 2 誘導心電図にたいしてペン型携帯用電
話伝送心電図の陰性例では、7 例中 5 例が
1 2 誘導心電図の a V F で有意な S T 低下が
みられたが V 5 誘導では j u n c t i o n a l な S
T 低下であり、ペン型携帯用電話伝送心電計
でも j u n c t i o n a l な S T 低下が認められた。
また 1 例では 1 2 誘導心電図の a V F で有意
な S T 低下がみられたが V 5 誘導では S T て
いがをみちめず、ペン型携帯用電話伝送心電
図でも S T 低下をみとめなかった。残り 1 例



XXIVth INTERNATIONAL CONGRESS ON ELECTROCARDIOLOGY

38th International Symposium on Vectorcardiography
June 24 - 28, 1997, Bratislava, Slovak Republic

ECG

1

COMPARED STUDY TO HOLTER-SA-ECG WITH LEFT VENTRICULAR FUNCTION USING MULTIPLE GATED ACQUISITION CARDIAC BLOOD POOL IMAGING IN PATIENTS WITH ARRHYTHMIA

Zhao LX, Horiuchi K., Ozawa Y., Tanigawa N, Saito S, Watanabe I., Kanmatsusei K.

The 2nd Dept. of Medicine, School of Medicine, Nihon University, Tokyo, Japan.

The purpose of this study was to evaluate left ventricular function from multiple gated acquisition (MUGA) cardiac blood pool imaging in patients with arrhythmia; And also evaluation of relationship between it and Holter -signal averaged ECG(Holter-SA-ECG).

Subjects and Methods: 30 patients were followed intravenous administration of 20 mCi of Technetium-99m labeled human serum albumin-DTPA for study MUGA cardiac blood pool imaging; And every patients performed 24h Holter monitor, the data were recorded by Del Mar Avionics Model 459 3-channel Cardio-Corder and Model 563 strata scan-Holter ECG analysis system. The criteria of Holter-SA-ECG: QRSd>114ms, RMS40<12uV,LAS40>38ms. An abnormal Holter-SA-ECG[Late Potential (LP) positive] was defined as the presence of at least 2 of 3 parameters. At our this study, we using peak filling rate(PFR) to evaluate early diastolic filling function, and using ejection fraction(EF) to evaluate systolic function of left ventricular in these 30 patients.

Results: 1). PFR in Group of normal Holter-SA-ECG was higher than that group which have abnormal Holter-SA-ECG.

2). Difference of EF was no significantly in both groups.

Conclusion: 1. EF was no significantly difference both in patients with normal and abnormal Holter-SA-ECG

2. PFR in group of abnormal Holter-SA-ECG was lower than that group which have normal Holter-SA-ECG. It was sensitively and stronger evidence for that left ventricular early diastolic dysfunction was due to myocardial injury in patients with abnormal Holter-SA-ECG. This results suggestion that PFR as earliest manifestation of cardiac diastolic dysfunction and have possibility after that frequently develop systolic dysfunction,

3. MUGA cardiac blood pool imaging as a noninvasive, reliable and reproducible means to quantify left ventricular function.

日本財団補助金による

1997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—

1998年 2月 27日

財団法人 日中医学協会
理事長 中島章殿

陳霞芬

I. 研究者氏名

研究機関 東北大学医学部 研究指導者 濃沼 信夫 職名 教授
所在地 仙台市青葉区星陵町2-1 電話 022-717-8127 内線

II. 過去の研究歴

看護管理、母子保健医療の管理についての研究 上海市松江果中心病院にて
農村医学、病院管理などについての研究 中国卫生部医政司にて

III. 過去の研究実績

著書・訳書 ①「若月侯一和農村医学」吉林科学技术出版社; ②「母親必読」華夏出版社
原著: ①「チーム医療における構成員の貢献度とその経済言平価に関する研究」第14回経管情報学会大会
論文集(1996年)
②「変化する中国の保健医療」ALIST(1995年)
③「チーム構成員の貢献度から見たチーム医療のあり方に関する研究」看護管理(1996年)

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 ・ 有 (雑誌名・論文名)

なし

V. 今後の研究計画及び希望

チーム医療と構成する医師と看護婦以外の職種と対象として、同様の貢献度の意識
調査を展開する。また、保健福祉分野に携わる諸職種における貢献度の調査へと展開
したい。

VI. 研 究 報 告 (日本語、又は英語で書いて下さい。 4,000字以上で記載して下さい。別紙可)

別紙の通り



VII. 指導教官の意見

陳君はチーム医療への意識に関して、医師と看護婦を
対象とした実態調査を行い、詳細に解析した。その
結果、医師、看護婦ともにいずれの診療行為もチーム
構成員の協同作業によると認識しているが、各診療行
為の貢献度についての自己評価は、他者の評価よりも
約10%高いことが明らかになった。これらの研究成果は、
東北大学から学位論文として受理され、医学博士授与に
値する研究と評価された。



高齢化社会におけるチーム医療のあり方
と推進の方策に関する

研 究 報 告

東北大学大学院医学研究科
社会医学講座医療管理学分野

陳 霞芬

緒言

高齢化社会を迎えて医療と保健・福祉との接点が拡大するなど、医療環境は大きく変貌している。こうした変化に対応するには、各分野の専門職による円滑なチーム・ワークを組めるような意識改革とシステムづくりが、医療・保健・福祉の有機的連携を促進し、高齢者ケアの質の向上を図る上で極めて重要な課題となっている。本研究は、チーム構成員の貢献度という視点から、医師と看護婦の意識を把握することにより、円滑で効率的なチーム医療のあり方と推進の方策を検討する。

研究方法

調査は宮城県内の地域中核病院 16 施設の

医師 312 名と看護婦 845 名を対象に、胃癌、糖尿病、慢性肝炎の 3 つの典型的な症例モデルを設定し、それに関する 21 の診療行為について、チーム構成員の貢献度、診療時間、適切と思われる診療報酬額など、Linear Analogue Scale を中心とした調査票を用いて自記方式で実施した。

調査データは職種別(医師、看護婦、その他の職種)、専門別(内科系、外科系)、臨床経験年数別(10 年以上と 10 年以下)に集計し、各診療行為におけるチーム構成員の貢献度の分布はカイ 2 乗検定、貢献度の平均値は t 検定によって比較検討した。

調査結果

医師の有効回答者数は 43 名、回答率 13.8%、その平均年齢は 41 歳、専門は内科系 7 : 外科系 3 の割合、臨床経験年数は平均 14.5 年である。看護婦の有効回答者数は 599 名、回答率 70.1%、その平均年齢は 33 歳、

所属は内科系 6 : 外科系 4 の割合、臨床経験年数は平均 11.5 年である。

1、診療行為全体に対するチーム医療構成員の貢献度について、まず職種別に見ると、医師の回答では、胃癌症例のような急性変化を伴う慢性疾患、腹腔鏡下肝生検のような高度な医療技術を要する慢性肝炎症例では、自らの貢献度を 54%とし、糖尿病症例のような典型的な慢性疾患では 41%としている。また医師はこれら 3 つの症例に対する看護婦の貢献度を 25%から 30%未満としている。一方、看護婦は自らの貢献度を、いずれの症例も 40%前後とし、医師の貢献度を、胃癌と慢性肝炎症例では約 40%とし、ほぼ看護婦の貢献度と同じで、糖尿病症例では 32%とし、看護婦の貢献度より 10 ポイント低く見ている。しかし、両職種の貢献度を合計すると、医師と看護婦ともにチーム構成員全体の貢献度の 70 から 80%となり、他職種の貢献度を 25%程度としている。

次にこの貢献度を臨床経験年数別に見ると、経験年数 10 年以上の看護婦は、10 年未満の看護婦に対して、看護婦自らの貢献度を 3 ポイントから 6 ポイント程度高く評価し、これらの間には統計上有意の差を認めた。医師も経験年数 10 年以上のグループは、10 年未満のグループより、各症例とも医師自らの貢献度を 10 ポイント以上高く評価し、これらの間にも統計上有意の差を認めた。

また貢献度を専門別にみると、慢性肝炎症例の医師の貢献度について、内科系の回答者(医師、看護婦)は外科系の回答者より高く評価しているが、胃癌症例と糖尿病症例では、専門別に有意の差はない。

2、診療行為にかける現状時間と適正と思われる時間との関係について、医師、看護婦の回答とも、いずれの診療行為においても適正時間は現状時間より長く、特に糖尿病患者への種々の指導、慢性肝炎患者への退院指導、胃癌患者へのインフォームド・コンセント、

と言った患者とのコミュニケーションに係わる行為は、医師、看護婦とも適正と思う時間が現状時間の約2倍としている。

3、適切と思われる診療報酬額について、医師は現行の診療報酬から算定された金額に対して16万円から26万円高く、また看護婦は胃癌症例で12万円、慢性肝炎症例では10万円高く、糖尿病症例では6万円低く回答し、医師、看護婦とも適切と思われる報酬額は現行の試算額にかなり近いとしている。

考 察

近年、人口の高齢化は急速に進んでおり、総人口に対する老年人口の比率は、1980年は9.1%であったが、1995年には14.8%となり、2000年には17.0%、2020年には25.5%に達すると予測されている。このような高齢社会の下、多様な高齢者の医療ニーズに対応するには臓器の病態に着目するだけでなく、身体の全体的な変化、日常生活への影

響などにも十分な配慮がなされなければならない。高齢者医療においては治療よりもケアに比重をおくべき場合が少なくないわけである。即ち、高齢者の治療とケアの質の向上を図るには、各種の専門職による円滑なチーム医療を組むことが重要となっている。

従来の医療現場では看護婦は医師に従属した関係にあり、看護業務の殆どが医師の指示によって行われることが多かった。しかし、高齢者に対する医療では、保健・福祉との連携、訪問看護、在宅ケア、療養指導など看護婦の治療範囲が広がっており、看護婦は医師の指示に従うだけでは十分ではなくなってきた。

諸外国における看護婦の役割をみると、アメリカでは、臨床現場における看護婦の役割は増しつつあり、一部の医療過疎地域ではプライマリ・ケア医と遜色のない業務を遂行している。ドイツでは、在宅介護で必要とされる処置は、通常看護職または介護専門職が行

っている。スウェーデンでは、在宅のターミナルケアなど特別な場合に限り、担当医の書面による指示があれば、看護婦は処方を行うことができる。カナダでも、看護婦は健康増進と疾病予防で新しい役割を担いつつある。

看護職の重要な業務の1つとして、チームの管理があげられる。これはチーム・スピリットを維持、増進する役割を担うことである。即ち看護婦は医師と同じく管理者であるという立場が認識されなければならない。本研究の結果をみると、医師と看護婦を合わせた貢献度は医師及び看護婦の評価とも70～80%で大差はなかった。しかし、それぞれの貢献度は立場が異なると大きく違っている。

この医師と看護婦の立場の違いによる貢献度の評価の差は、第1に医師と看護職の関係について固定的な観念から生じているものと考えられる。医師は治療を担当し、看護職はケアを担当する考え方、また医師をプロフェッションとするのに対して、看護職をオキュ

ペーシジョンとするステレオタイプの考え方が反映されたものとみることができる。

第 2 に法律によって規定される業務上の制約があげられる。現行の保助看法では、看護婦の業務は療養の世話と診療の補助と規定されている。看護婦は医師の指示のもとに行う診療の補助が中心的な業務と解釈される。このため、総じて医師、看護婦とも医師の貢献度を看護婦の貢献度より高めに評価する傾向がある。

本研究の診療行為における貢献度の意識調査においても、医師は医師の貢献度を看護婦よりも高く評価している要因の一つとなったと考えられる。もちろん貢献度の意識は診療行為における医学的判断、技術などにみられる医師と看護婦との質的な差によっても影響される。このことは急性変化を伴う慢性疾患への貢献度について、医師が自身の貢献度を看護婦の貢献度の 2 倍以上も高く見ていたことから理解できる。

第 3 に治療と同程度にケアへの貢献度を高く評価する看護婦の意識のあり方が、治療への貢献度に比重をおいて意識する医師の貢献度と大きな違いを生じさせた結果となったと考えられる。ある看護行為に伴う判断様式に関する調査では、看護婦の行う患者指導、手術・検査前オリエンテーションについて、医師は看護婦との取り決めによって行っていると認識し、一方、看護婦は看護婦の独自の判断で行っていると認識する傾向にある。入院患者は治療とケアの両方を求めており、看護はこの両方に主体的に関わる必要がある。こうした観点に立つならば、本研究で看護婦が各診療行為における自身の貢献度を、医師の貢献度に比して同等か、それ以上に評価していることも理解できる。

貢献度を臨床経験年数別にみると、両職種ともに経験年数が増えるにつれ高くなり、とりわけ 10 年以上で貢献度が高くなる傾向がある。ある調査によれば、自己の看護評価は

経験年数 1～5 年目が低く、6 年目以上からは高くなり、さらに 9 年目以上になると、組織の一員としての意識、自己への役割なども高くなるとしている。このことは、臨床経験年数が長ければ長いほど、積み重ねた経験によって自身の役割を高くみるようになり、自分の看護を自分の判断で実践できるためと思われる。また職務の満足も臨床経験を重ねるに従って、自己の看護観を自ら高め続けること、かつ仕事に対する自己評価能力を自ら育成し続けることにあると思われる。

医師、看護婦以外の医療従事者の貢献度をみると、薬剤師、放射線技士、臨床検査技士、栄養士の貢献度が比較的高め、全体の 20～30%を占めており、医師、看護婦だけで医療が完結しないことは明らかである。多くの慢性疾患への対応においては、各職種からなるチーム医療を組むことが不可欠であることがわかる。チーム医療を推進するには、各職種がお互いの専門性を認め合い、チーム構成員

それぞれの能力を効率的に発揮させる上で重要と思われる。

また、各診療行為における業務時間については、医師、看護婦ともいずれの診療行為でも、現状時間は適正と思う時間より短く、多忙な医療現場で希望するほどの十分な時間を確保しえない状況が窺える。チーム構成員の医療への貢献度を高めるため、すなわち、より良い医療サービスを提供するには、医療者がベットサイドにいる時間を十分に確保する必要があると思われる。現行の必要以上に多い病床数、長い平均在院日数など、量的拡大が進みすぎ、歪みの目立ってきた医療を質の向上に転換することが急務であることがわかる。

さらに、各症例毎に適切と思われる診療報酬額について、医師、看護婦のコスト意識は、モデル的に試算した現行の診療報酬点数にかなり近いことが窺える。診療行為に関与する各職種の貢献度は、診療報酬点数の算定根拠

として考慮されるべきであるが、個々の職種
の貢献度ではなく、総体としてのチーム医療
が評価されるようなものでなければならない
と思われる。

従って、円滑で効率的なチーム医療を推進
する方策、とりわけチーム構成員のモラル
を高めるには、医師の役割を中心に据えた現
行の診療報酬体系を改め、チーム構成員の役
割を総合的に評価する診療報酬体系の確立が
望ましいと考えられる。

日本財団補助金による

1997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 -

10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 汪先恩

研究機関 順天堂大学消化内科 研究指導者 佐藤信紘 職名 主任教授

所在地 〒144 文京区本郷2-1-1 電話 3813-3111 内線 3608

II. 過去の研究歴

1984年7月 安徽中医学院 学士卒業

1988年7月 同济医科大学 修生卒業

1997年10月 順天堂大学 医学博士号 (No 1387)

III. 過去の研究実績

肝線維化の解析

胃粘膜損傷後のメカニズム

漢方薬の作用機序

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 ・ ㊦ (雑誌名・論文名)

別紙

V. 今後の研究計画及び希望

現在肝線維化における Ito cell の役割および胃粘膜上皮細胞損傷修復の機序についてさらに高いレベルの研究を行い、貴財団の引きつぎご支援をお願いいたします。

VI. 研 究 報 告 (日本語、又は英語で書いて下さい。4,000字以上で記載して下さい。別紙可)



別紙論文原稿

VII. 指導教官の意見

汪先恩君は貴財団の援助により、世界中に多発する肝線維症の成立機序を実験的に証明する試みの研究に成功した。その成果は添付した業績のごとく極めて優れたもので、日社の協力が結果したものと評価される。貴財団の今後の援助を願い、又、これの援助を厚く感謝申し上げます。

汪先恩平成9年度研究業績

学会

- 1 汪先恩、渡辺純夫、大井手弘純、広瀬美代子、吉澤孝史、北村庸雄 宮崎招久、佐藤信紘:Lipo-PGE1 による肝臓類洞伊東細胞収縮の制御。第22回日本微小循環学科総会。2, 28-1, 1997東京
- 2 Sumio Watanabe, Xian-En Wang, T Yoneta, and Nobuhiro Sato:
Zinc and its derivative accelerated gastric wound Healing through the production of insulin-like growth factor from fibroblasts in a culture cell model.
AGA-DDW, Washington, DC. May 11-14, 1997 Gastroenterology 112:4 A327
- 3 汪先恩、渡辺純夫、大井手弘純、広瀬美代子、宮崎招久、佐藤信紘:
伊東細胞の遊走と増殖に及ぼすSubstance Pの影響。
名古屋 DDW-Japan 4, 18, 1997
- 4 長田太郎 渡辺純夫、汪先恩、渡辺純夫、吉澤孝史、佐藤信紘:
胃粘膜培養細胞を用いて損傷修復モデルにおけるボラプレジンの損傷修復作用について。名古屋 DDW-Japan 4, 20, 1997
- 5 大井手弘純、広瀬美代子、汪先恩、渡辺純夫、宮崎招久、佐藤信紘:
カルシウムチャネル発現伊東細胞の細胞生物学的特性。
名古屋 DDW-Japan 4, 18, 1997
- 6 Xian-En Wang, S, Watanabe, Y Chino, H, Oide, M. Hirose, Miyazaki, N. Sato:
Lipo-prostaglandin E1 inhibited endothelin 1-induced contraction of cultured rat Ito cell.
AGA-DDW, Washington, DC. May 11-14, 1997 Gastroenterology 112:4, A1412
- 7 Xian-En Wang, S, Watanabe, H, Oide, M. Hirose, Miyazaki, N. Sato:
Ito cell migration and proliferation are modulated by growth factors and contribute to liver fibrosis.
AGA-DDW, Washington, DC. May 11-14, 1997 Gastroenterology 112:4, A1412
- 8 Sumio Watanabe, Miyoko Hirose, Xian-En Wang, et al.
Effects of neurotrophic pyrimidine compounds MS-430 and MS-818 on gastric epithelial cell restoration in vitro. The 7th Taisho International Symposium on Gastroenterology. Lansdowne 5, 10, 1997
- 9 汪先恩、渡辺純夫、大井手弘純、広瀬美代子、鈴木聡子、北村庸雄 宮崎招久、佐藤信紘:培養伊東細胞に対するエンドセリン-1の増殖促進作用。
第1回日本肝臓学会大会。盛岡10, 23-24, 1997肝臓38;supl2, p137
- 10 汪先恩 渡辺純夫 黄光英 高德勝 李鳴真 叶望云 佐藤信紘:胃粘膜細胞損傷修復に及ぼす参麦注射液の影響-補法作用の機序について。第15回日本東方医学, 東京、11, 29-30, 1997
- 11 Xian-En Wang, S, Watanabe, N. Sato: Shen Mai Injection accelerates the wound repair of cultured gastric mucosal cells. Alimentary disease week Hong Kong. December 12-17, 1997. Journal of Gastroenterology and

Hepatology. 12:A214

- 12 Xian-En, Wang, S, Watanabe, H, Oide, M, Hirose, Miyazaki, N. Sato: Substance P induced Ito cell migration and proliferation in vitro. Alimentary disease week Hong Kong. December 12-17, 1997

Journal of Gastroenterology and Hepatology. 12:A268

- 13 汪先恩、渡辺純夫、大井手弘純、佐藤信紘：培養星細胞の遊走に及ぼすエタノールの影響。18回アルコール医学生物学研究会。3, 6-7, 1998

論文

- 1 汪 先恩、渡辺純夫、大井手弘純、佐藤信紘：エンドセリン-1による培養伊東細胞の収縮に及ぼすLipo-PGE1の影響。
肝類洞壁細胞研究の進歩, 第10巻. 112-114, 1997
- 2 大井手弘純、立山充博、汪 先恩、佐藤信紘。伊東細胞のCa²⁺チャンネル：パッチクランプ法による同定。肝類洞壁細胞研究の進歩, 第10巻。
79-83, 1997
- 3 Sumio Watanabe, Xian-En Wang, Miyoky Hirose, et al.
MIGRATION OF CULTURED ITO CELLS IS MODULATED BY GROWTH FACTORS.
Cells of the Hepatic Sinusoid, Vol. 6, 34-36, 1997
- 4 H Oide, M Tateyama, X-E Wang, et al.
L-type calcium channel current revealed by patch clamp method in Ito (fat-storing) cell.
Cells of the Hepatic Sinusoid, Vol. 6, 330-333, 1997
- 5 Xian-En Wang, Sumio Watanabe, Miyoky Hirose, et al
SUCRAFATE PREVENTS BILE ACID-INDUCED RETARDATION OF GASTRIC EPITHELIAL REPAIR IN A RABBIT CULTURED CELL MODEL.
Current Therapeutic Research 58:533-543, 1997
- 6 Xian-En Wang, Sumio Watanabe, Hirosumi Oide, et al.
Lipo-prostaglandin E1 modulated cultured Ito cell contraction.
Microcirculation annual Vol. 13:161-162, 1997
- 7 汪 先恩 李鳴真 叶望云. 肝細胞生長因子促進培養的兔胃粘膜細胞損傷的修復. Acta Univ Med Tongji 26;3:205-207, 1997
- 8 Hirosumi Oide, Mitsuhiro Tateyama, Xian-En Wang, et al.
Voltage-dependent calcium channels in Ito cell: New evaluation using the patch clamp technique. Journal of Gastroenterology and Hepatology. (in press)
- ✓ 9 Xian-En Wang, Sumio Watanabe, Hirosumi Oide, Nobohiro Sato et al.
Hepatic stellate cell contraction is inhibited by lipo-prostaglandin E1 in vitro. Journal of Gastroenterology and Hepatology. (in press)
- ✓ 10 汪 先恩 渡辺純夫 黄光英 高德勝 李鳴真 叶望云 佐藤信紘：胃粘膜細胞損傷修復に及ぼす参麦注射液の影響—補法作用の機序について。東方医学出版中

9.10.11 v: 研究報告集と1冊.

√11汪 先恩 渡辺純夫 大井手弘純 佐藤信紘：培養星細胞の遊走と細胞骨格に及ぼすエタノールの影響。アルコールと医学生物学．1998

日本財団補助金による
1997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-

1998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 斌
研究機関 東京大学 外科 研究指導者 木村 理 職名 講師
所在地 〒113-8655 東京都文京区本郷7-3-1 電話 (03) 38155411 内線 3246

II. 過去の研究歴
1992年~1995年6月 中国医科大学 医学修士課程 膵腫瘍のK-ras変異の研究
1995年6月~1996年3月 東京大学 第1外科 客員研究員 膵胆管腫瘍の分子生物学変化の研究
1996年4月~現在 東京大学医学系大学院 博士課程 膵腫瘍の分子生物学基礎研究

III. 過去の研究実績
1. 膵癌におけるK-ras遺伝子点突然変異の研究
2. 12指腸乳頭部癌におけるp53, p21/Waf1およびK-rasの意義
3. 膵臓癌のK-ras遺伝子変異とそのheterogeneity

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97回日本外科学会総会 "膵頭部癌におけるp53蛋白^{over} expressionの意義" (poster)
2. Fourth Congress of the Asian Society of Hepato-Biliary-Pancreatic Surgery
"p53 and p21/Waf1 expression in carcinoma of the papilla of Vater" (poster)
3. 第98回日本外科学会総会 "膵頭部癌におけるp53, p21/Waf1およびK-ras変異の意義" (口頭予定)
(2) 学会誌等に発表した論文 無・ (雑誌名・論文名)
1. Japanese Journal of Clinical Oncology 1997; 27: 58~61 Renal Cell Carcinoma of the spindle type with metastasis to the pancreas: a case report
2. 臨床雑誌[外科] 1997年 第59巻 第1号 "膵臓K-ras点突然変異は膵癌診断に有用か?"
3. 胆と膵 1997; 18: 251~257 "先天性膵臓の概念と病態"

V. 今後の研究計画及び希望
膵癌は悪性度が高く、その発生が増えている一方、発現時に与えらるるのが早期からいはいは現病の早期診断と加療とその予後改善の肝要である。遺伝子研究により、膵癌の発癌順序の解明、その早期診断に貢献できることは期待される。今後膵癌によく見られるhyperplasia & dysplasia などいはいは癌前病変における遺伝子変異の検索で、膵癌がこれらの病変から発生するかどうかを解明したい。

VI. 研 究 報 告 (日本語、又は英語で書いて下さい。4,000字以上で記載して下さい。別紙可)

別紙



VII. 指導教官の意見

趙斌は東京大学医学系博士課程外科専攻の大学院生で膵臓癌・胆道癌などの研究をしています。研究業績、日本語力を始めとする周囲とのコミュニケーション能力において卓越したものを持っており、中国からの留学生達のリーダー的存在となっています。研究に取り組む姿勢は大変真摯で、時間と手間のかかる研究に対しても積極的に取り組み、着実な成果を上げ、既に英文論文1本を完成し、現在も英文原著論文を執筆中です。国際学会でも、日本語で日本の学会でも演者として発表するなど業績を上げています。日本語、英語ともに堪能で日本語検定試験1級に合格し、現在は日常生活はもちろん、研究過程におけるディスカッションも日本語ですべてこなしています。性格は温厚でとても思いやりがあり、周囲の人皆から慕われております。将来素晴らしい研究成果を携えて日中友好の架け橋になってくれるものと確信しております。

研 究 報 告

Theme: p53 and p21/Waf1 Protein Expression and *K-ras* Codon 12 Mutation in Carcinoma of the Papilla of Vater

I. Aim and Background

Carcinoma of the papilla of Vater accounts for nearly 40% of all surgically operable pancreatoduodenal tumors, and is second only pancreatic carcinoma in the periampullary region. Carcinoma of the papilla of Vater originates mainly in three anatomical regions, i.e., the common channel, the intraduodenal portion of the common bile duct, or the intraduodenal portion of the pancreatic duct. Thus, carcinoma of the papilla of Vater may have a different biological behavior depending on its origin. However, there have been few reports on the molecular changes in carcinoma of the papilla of Vater.

Human malignancies are associated with the activation of oncogenes and inactivation of tumor suppressor genes. Among these molecular changes, *K-ras* and p53 have frequently been reported to be related to the development and progression of many malignancies. p53 is also related to apoptosis and progression of the cell cycle through regulation of some downstream factors, e.g., p21. The p21/Waf1 gene encodes a cyclin-dependent kinase inhibitor (CDI) which inhibits multiple complexes of cyclin and cyclin-dependent kinase in initiating the progression of cells from G1 to S phase.

In this study, p53, p21/Waf1 immunohistochemical expression and *K-ras* codon 12 mutation in carcinoma of the papilla of Vater were investigated.

II. Materials and Methods

Thirty seven cases of carcinoma of the papilla of Vater were studied. Formalin-fixed, paraffin-embedded samples were available for all cases. The mean age of the patients was 65 years (range 41 to 80). There were 24 men and 13 women. The average size of the tumors was 25 mm in diameter. The TNM stage was classified according to the staging manual of AJCC. Macroscopically, the carcinoma was ulcerative type in 15 cases, and non-ulcerative type in 22 cases. Histologically, the tumors were divided into intestinal and pancreaticobiliary types as described previously. There were nine intestinal type, 27 pancreaticobiliary type, and one undifferentiated. Five micrometer-thick serial sections were cut and one piece was used for hematoxylin and eosin (HE) staining, two for immunohistochemical staining of p53 and p21/Waf1, and another for DNA extraction to detect *K-ras* codon 12 mutation.

The correlations among p53 overexpression, p21/Waf1 expression, *K-ras*

codon 12 mutation and the clinicopathological parameters described above were studied. The significance of these molecular changes in determining the patient's prognosis was analyzed. The relationship between p53 and p21/Waf1 expression was also studied.

Immunohistochemical staining

1. After deparaffinization, antigen retrieval with citrate buffer was performed by heating in a microwave oven and boiling for p53 and p21/Waf1, respectively.
2. Samples were incubated at 4°C overnight with monoclonal anti-p53 antibody Do7 and monoclonal anti-p21/Waf1 antibody EA10, respectively.
3. Endogenous peroxidase activity was blocked in methanol with H₂O₂.
4. Samples were then incubated with biotinylated antibody.
5. After incubation with Avidin-Biotin Complex, samples were developed with 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB).
6. Finally, samples were counterstained with hematoxylin and mounted.
7. Staining was evaluated using an Image Cytometer CAS 200R. Briefly, 20 fields were randomly selected in each stained section, and the percentage of stained cells in each field was counted. For p53 and p21/Waf1, percentages above 10% and above 5% were defined as positive, respectively.

Detection of K-ras codon 12 mutation

1. DNA extraction. Both normal duodenal mucosa and tumor tissues were scraped from paraffin-embedded slices under microscopic investigation. The scraped samples were dried overnight at 37°C. After deparaffinization, samples were incubated in digestion buffer for 24 h at 48°C. DNA was extracted by the phenol-chloroform method.
2. Two-step PCR-RFLP. K-ras codon 12 was amplified using the two-step PCR-RFLP method. PCR was carried out in a total volume of 50 μ l containing genomic DNA, 50 mM KCl, 10 mM Tris HCl (pH 8.3), 1.5 mM MgCl₂, 200 μ M of each dNTP, 1.25 U of Taq Polymerase, and 12.5 pM of each primer. The system was subjected to 40 cycles of PCR (95°C for 2 min, 55°C for 3 min, and 72°C for 1.5 min in each cycle) using an automatic thermal cycler. The following primers were used:

A(sense): 5' ACTGAATATAAACTTGTGGTAGTTGGACCT 3'

B(antisense): 5' GTCCTGCACCAAGTAATATGC 3'

C(antisense): 5' CTATTGTTGGATCATATTCG 3'

Primer A is a mutant in which the underlined base represents a mismatch to the K-ras gene sequence and provides an artificial restriction site for *Mva*I if K-ras codon 12 is wild-type. The first PCR was performed with primers A and B, and generated a 147-bp fragment. Eight μ l of the product was digested with 10 units of *Mva*I and

0.6 μ l of the digested product was subjected to a second PCR under the same conditions as the first PCR with primers A and C, and generated a 106-bp fragment. Eight μ l of the product of the second PCR was then digested with 10 units of *Mva*I followed by electrophoresis on an 8% acrylamide gel.

3. Direct sequencing. The dye-terminator cycle sequencing method was used to analyze the mutation on codon 12 if a mutant band was detected on electrophoresis. Briefly, the band was removed from the gel and incubated in elution buffer overnight at 37°C. DNA was precipitated with ethanol and sodium acetate. PCR and purification of the PCR products were performed according to the manufacturer's protocol. The reaction was performed in a volume of 20 μ l containing 8.8 μ l of the template DNA, 8.0 μ l of the terminator premix, and 3.2 μ l (1pM/ μ l) of primer C, which was used in the PCR-RFLP method. The samples were subjected to 25 cycles of PCR (96°C for 10 sec, 55°C for 5 sec, 60°C for 4 min). The PCR products were purified with a Centri-Sep spin column to discriminate the extra ddNTP. Electrophoresis was performed using an ABI PRISM™ 90 Genetic Analyzer. Data were analyzed with sequencing analysis software.

Statistical Analysis

A statistical analysis was performed using the chi-square test. Survival was analyzed using the Kaplan-Meier method.

III. Results

p53 overexpression was found in 45% (17/37) of the cases. The staining was confined to the nuclei of tumor cells. No normal epithelium was positive for p53. p53 overexpression was seen in 67% (10/15) of the ulcerative cases, which was significantly higher than the incidence in non-ulcerative cases (32%; 7/22, $p < 0.05$). There was no significant difference in p53 overexpression between the intestinal and pancreaticobiliary types. No correlation was found between p53 overexpression and tumor size, lymph node metastasis or tumor stage.

p21/Waf1 staining was found in 41% (15/37) of the cases. Again, staining was confined to the nuclei of tumor cells, but was scattered among tumor cells. Staining was seen in both primary lesions and infiltrating parts. Normal duodenal mucosa was slightly stained near the intestinal lumen. Tumors larger than 3 cm in diameter more frequently exhibited p21/Waf1 expression than those smaller than 3 cm. However, p21/Waf1 expression did not correlate with any other clinicopathological parameters.

There was no correlation between p53 and p21/Waf1 expression. In 18 of 37 (49%) cases, the staining pattern was either positive for p53 while negative for p21, or negative for p53 while positive for p21. In the other 19 (51%) cases, p53 and

p21/Waf1 were either both positive or both negative. We further investigated their relationship in 33 cases by comparing the staining in 20 pairs of samples taken from the same site in one tumor on adjacent slices stained for p53 and p21/Waf1, respectively. Among the 660 pairs of sites studied, 421 sites were negative for both p53 and p21/Waf1, and 21 sites were positive for both. One hundred fifty five sites were positive for p53 but negative for p21/Waf1, while 63 sites were positive for p21/Waf1 but negative for p53. No significant correlation was found by this analysis. Moreover, even within the same case, staining showed heterogeneity regarding the relationship between p53 and p21/Waf1.

The frequency of *K-ras* codon 12 mutation was 38% (14/37). The mutation was significantly more frequent in carcinoma of the intestinal type (67%, 6/9) than in that of the pancreaticobiliary type (30%, 8/27, $p < 0.05$). No significant difference in the frequency of *K-ras* codon 12 mutation was found between ulcerative and non-ulcerative types. The mutation did not correlate with any other clinicopathological parameters including tumor size, lymph node metastasis, or tumor stage.

On direct sequencing, the mutation exclusively involved the second base of codon 12, and the base-pair changes were GGT to GAT (9/14), GGT to GTT (4/14), and GGT to GCT (1/14). GGT to GAT was also the main type in tumors of the pancreaticobiliary type (6/8). GGT to GAT and GGT to GTT were detected equally in the intestinal type. There was no significant difference in the type of mutation between the two histological types.

In a survival analysis, neither p53 nor p21/Waf1 expression or *K-ras* codon 12 mutation was correlated with postoperative survival.

IV. Summary

1. p53 overexpression was significantly more frequent in the ulcerative type than the non-ulcerative type. This indicated that p53 overexpression may play a role in ulcer formation in carcinoma of the papilla of Vater. ulceration was more frequently seen in the histologically pancreaticobiliary type, which had a much higher incidence and malignant potential in carcinoma of the papilla of Vater. The non-ulcerative type was more associated with the histologically intestinal type, which has a relatively lower malignant potential than the pancreaticobiliary type. Thus, it was assumed that p53 overexpression was related to highly malignant tumors although a significant correlation was not found between p53 overexpression and this histological classification into intestinal and pancreaticobiliary types in carcinoma of the papilla of Vater.

2. With regard to the relationship between p53 and p21/Waf1, in the present study, in addition to areas that were positive for p53 but negative for p21/Waf1 and *vice versa*, there were also areas that were positive for both p53 and p21/Waf1 and areas that were negative for both p53 and p21/Waf1. Furthermore, even in the same

case, heterogeneity was seen with regard to the relationship between p53 and p21/Waf1 expression. These results indicate that p21/Waf1 protein induction also follows a p53-independent pathway in carcinoma of the papilla of Vater.

3. The two histological types, i.e., intestinal type and pancreaticobiliary type, varied regarding the incidence of *K-ras* codon 12 mutation, with the higher mutation rate in the intestinal type. In colorectal carcinoma, it has been clarified that there is an adenoma-adenocarcinoma sequence and *K-ras* mutation is closely associated with the progression from small to relatively larger adenomas in this sequence. Moreover, *K-ras* mutation is mainly associated with the development of carcinomas from polypoid adenomas, while carcinomas that have developed from flat adenomas rarely involve this genetic alteration. In carcinomas of the papilla of Vater, some authors have claimed that there is an adenoma-adenocarcinoma sequence similar to that in colorectal carcinoma. Although it is possible that carcinoma of the papilla of Vater and that of the colon and rectum are quite different with regard to development, carcinoma of the papilla of Vater of the intestinal type closely resembles tubular adenocarcinoma of the colon and rectum, histologically. Therefore, it can be assumed that carcinoma of the papilla of Vater of the intestinal type may develop in the same way as that of the colon and rectum, and may originate from a polypoid adenoma. On sequencing, it seems that mutation itself rather than the type of mutation is more important in carcinogenesis in this malignancy.

日本財団補助金による

1997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—

98年03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 尹淑萍

研究機関 名古屋市立大学医学部分子研 研究指導者 岡田秀親 職名 教授

所在地 〒467 名古屋市瑞穂区瑞穂町字川澄1 電話 853-8196 内線 _____

II. 過去の研究歴

1986-1987年 中国医学科学院血液学研究所薬理学研究室 研究員;

1987-1992年 同上研究助手

1994 - 現在 中国医学科学院血液学研究所薬理学講座助教授

III. 過去の研究実績

公表学会発表論文: 16 報.

研究助成: 6 件.

受賞: 3 件.

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

BFAが臨床治療に応用できるか否かを検討するためには、いろいろ in vivoに近い条件でBFAの効力を確認する AIDS発症を防止する免疫療法の研究に役立てたい。

VI. 研 究 報 告 (日本語、又は英語で書いて下さい。4,000字以上で記載して下さい。別紙可)

別紙



VII. 指導教官の意見

尹淑萍氏は大変熱心に研究に励んでおられます。
特に、抗体産生の取り扱いや融合抗体 BFA の作成及び
その応用に深い関心を寄せられており、優れた研究成果を
あげつつあります。HIV 治療法の確立のための基礎研究として
重要であり、今後更なる研究の発展を期待いたします。

岡田

by Y. Inshupin
980310

Report

Introduction

BFA(Bifunctional Antibody) is an antibody recognizing two different antigens. In this department, about two years ago, some research works about specific cytolysis of HIV-infected cells with BFA had been done, *in vitro*, the results were inspiring. On this basement, I will try to test the role of BFA on primary isolates of HIV-1. Two kinds of BFA were prepared, one is preparing with UCHT-1 and 4G6, UCHT1 is anti-CD3 mouse monoclonal antibody, a membrane molecule associated with T cell receptor, 4G6 is mouse McAb to gp41 of HIV-1 expressed on HIV-1 infected cells, another is preparing with UCHT-1 and 2F5, 2F5 is a human McAb to gp41 of HIV-1 expressed on HIV-1 infected cells. Two kinds of BFA are trier type BFA which consists of Fab' fragment of UCHT1 and F(ab')₂ fragment of 4G6 and 2F5.

1. Purification and fragmentation of McAb

A). Purification and fragmentation of anti-CD3 mouse McAb UCHT-1(IgG1) and anti-gp41 mouse McAb 4G6(IgG2a)

Method of purification of UCHT-1IgG and 4G6 IgG: Ammonium sulfate precipitation coupled with Protein A affinity column

1) The ascites fluid 10 ml added 10ml PBS, centrifuged 30min at 20,000xg (13000rpm in SS-34 rotor) at 4°C, removed lipid.

2) Added saturated ammonium sulfate(SAS) slowly with stirring to the ascites to 50%(v/v). Left overnight at 4°C to ensure precipitation of the protein.

3) Centrifuged 1 hr at 20,000xg at 4°C. Dissolved precipitate in 10 ml of PBS. Placed the dissolved precipitate in dialysis tubing. Dialyzed against 600 ml PBS for 48 hr total at 4°C, changed the dialysis buffer six times during dialysis.

4) Prepared a 5 mg Hilord-Protein A column and load dialyzed solution onto it(5ml/ time), collected bound fraction and Dialyzed against 600 ml PBS containing 0.02% NaN₃ for 48 hr total at 4°C, changed the dialysis buffer six times during dialysis.

5) Checked the purity of the product on a 8% SDS-polyacrylamide gel. Assessed the concentration of the IgG at A₂₈₀. Store at 4°C

Method of fragmentation of UCHT-1 IgG and 4G6 IgG to F(ab')₂ using Pepsin

- 1) Dialyzed 1ml of 2.5 mg/ml purified IgG against 200ml acetate buffer, PH4.0, overnight. Determined the concentration of Dialyzed IgG solution by A₂₈₀ readings using the acetate buffer PH4.0 as blank and adjusted to 2 mg/ml
- 2) Piped 100ul of the 2mg/ml IgG PH4.0 into each of 8 numbered tubers, and then added 100ul of 0.1mg/ml pepsin in acetate buffer, PH4.0 to them.
- 3) Incubated the tubes in a 37°C water bath, removing one tube of eight tubes after 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 4, 5, 6. As each tube is removed, stop the reaction by adding 2M Tris base, checked with pH paper until pH=8.0 (about 20ul 2M Tris would be added).
- 4) Analyzed the fragmentation products on a 8% nonreducing SDS-polyacrylamide gel.
- 5) Did the same tests with 1), 2), 3), 4) in different pH(4.2, 4.4) and different pepsin/IgG(1/25, 1/30).
- 6) Choused the best conditions to obtain maximum yield of F(ab')₂ by the gel results and used these conditions in the large-scale fragmentation.

Purification of UCHT-1F(ab')₂ and 4G6 F(ab')₂

- 1) Prepared a 5 mg Hilord-Protein A column and load dialyzed mixture solution onto it, collected unbound fraction and concentrated it to 2ml.
- 2) Prepared a 16x900-mm Sephacryl S-200 Superfine column and load concentrated mixture solution onto it (1mm/l/time). Collected fractions corresponding to a molecular weight of 100-110kDa.
- 3) Checked the purity of the final product on a 8%SDS-polyacrylamide gel under reducing and nonreducing condition. Assessed the concentration of the F(ab')₂ at A₂₈₀. Store at 4°C in PBS.

B) Purification of anti gp41Human McAb 2F5 F(ab')₂

- 1) Prepared a 5 mg Hilord-Protein A column and load 2F5 solution 1.7ml onto it, collected every fractions and concentrated them. checked them on a 8%SDS-polyacrylamide gel under nonreducing condition
- 2) Prepared a 16x900-mm Sephacryl S-200 Superfine column and load concentrated unbound mixture solution onto it (0.5ml/time). Collected fractions and checked them on a 8%SDS-polyacrylamide gel under reducing and nonreducing condition. Assessed the concentration of the F(ab')₂ at A₂₈₀. Store at 4°C in PBS.

Result

- 1) the result about UCHT-1IgG, UCHT-1F(ab')₂ showed in Fig.1
the result about 4G6 IgG, 4G6 F(ab')₂ showed in Fig.2
the result about 2F5 F(ab')₂ showed in Fig.3
- 2) the best conditions to obtain maximum yield of UCHT-1F(ab')₂ is Pepsin/UCHT-1=1/25, pH=4.0 and incubate in 37°C water bath 1hr.
- 3) the best conditions to obtain maximum yield of 4G6F(ab')₂ is Pepsin/4G6=1/30, pH=4.2 and incubate in 37°C water bath 2 hrs.

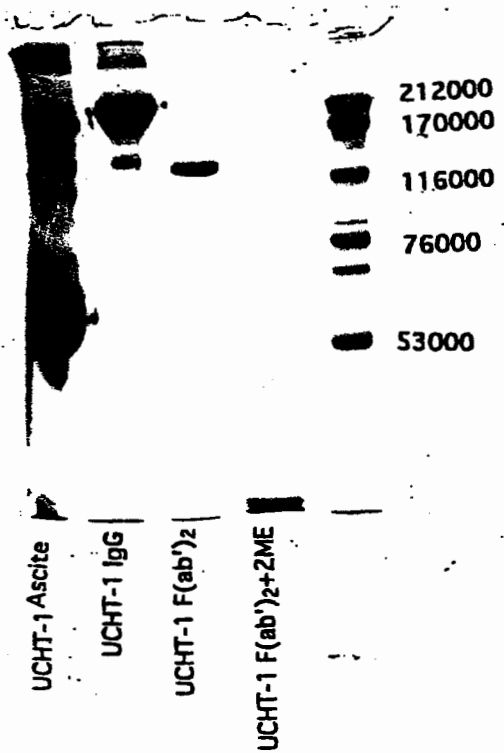


Fig.1 Purification and Fragmentation of anti-CD3 McAb UCHT-1

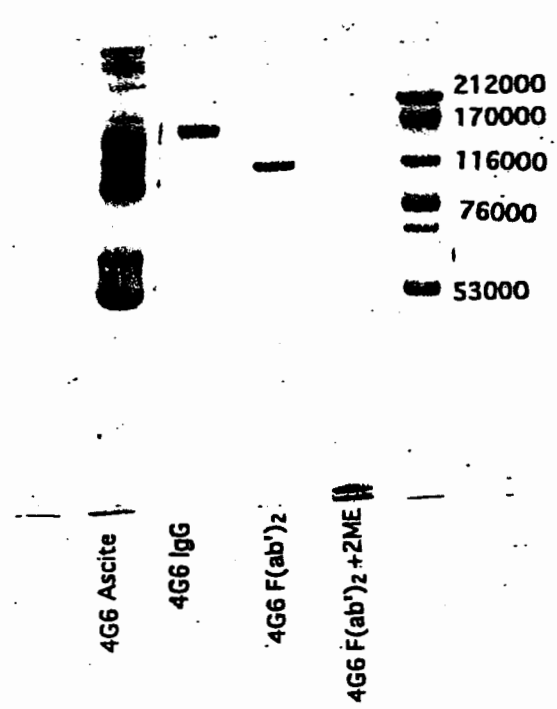


Fig.2 Purification and Fragmentation of anti-HIV1 McAb 4G6

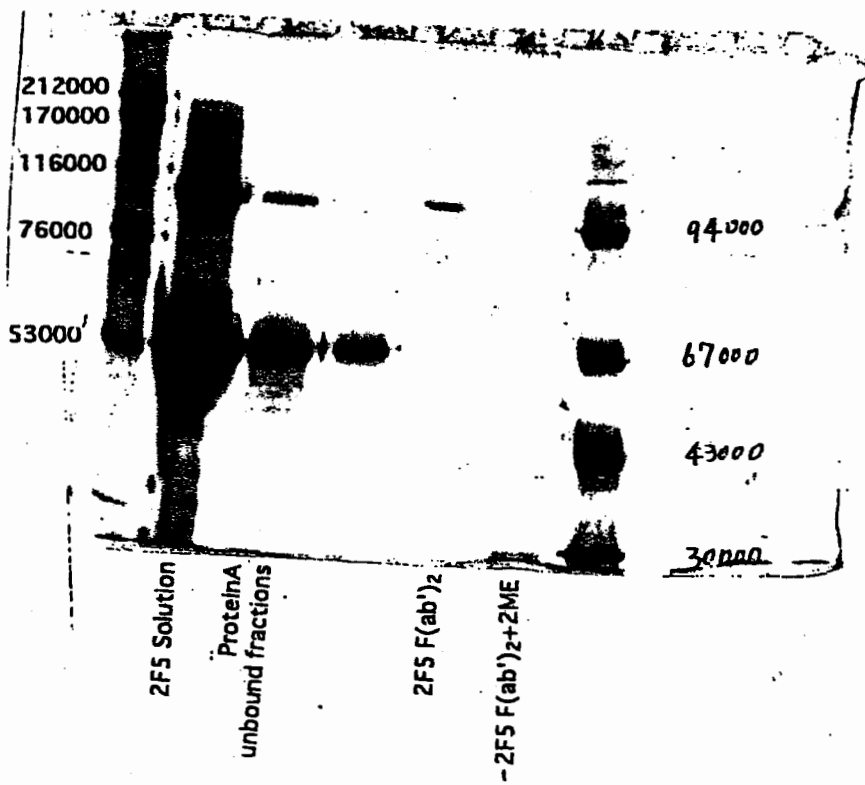


Fig.3 Purification of anti-HIV1 Human McAb 2F5 F(ab')

2. Preparation of the BFA of UCHT-1Fab'-4G6 F(ab')₂ and UCHT-1Fab'-2F5 F(ab')₂

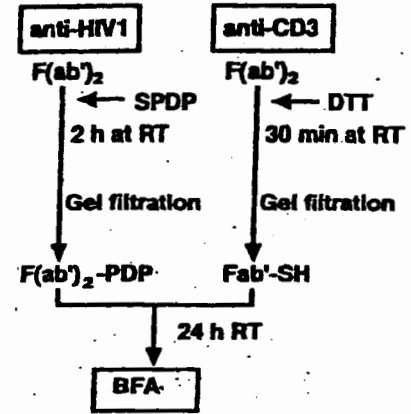
Materials:

anti-HIV1 F(ab')₂: 4G6F(ab')₂ and 2F5F(ab')₂

anti-CD3 F(ab')₂ : UCHT-1F(ab')₂

Method:

4G6 -F(ab')₂(2mg/ml) was incubated with an 10 molar excess of 3-(2-pyridylthio)propionic acid N-hydroxysuccinimide ester(SPDP) at 37°C water bath for 2h generating F(ab')₂ -PDP which was then purified by Sephadex G25 gel filtration. The F(ab')₂-PDP was mixed with an equimolar amount of UCHT-1Fab' immediately after gel filtration following reduction of UCHT-1F(ab')₂ with 1.0 mM DTT. After incubation at 37°C water bath for 2 h, remove it at RT for 20h. The fraction of BFA(UCHT-1Fab'-4G6F(ab')₂) was separated by gel filtration on a 26x900-mm Sephacryl S-200 Superfine column.



The preparation of BFA of UCHT-1Fab'-2F5F(ab')₂ was similar with BFA of UCHT-1Fab'-4G6F(ab')₂.

result

- Two Kinds of BFA (UCHT-1Fab'-4G6F(ab')₂ and UCHT-1Fab'-2F5F(ab')₂) were prepared. (Fig.4 and Fig.5)
- BFA UCHT-1Fab'-4G6F(ab')₂ was purified by gel filtration (Fig.4).

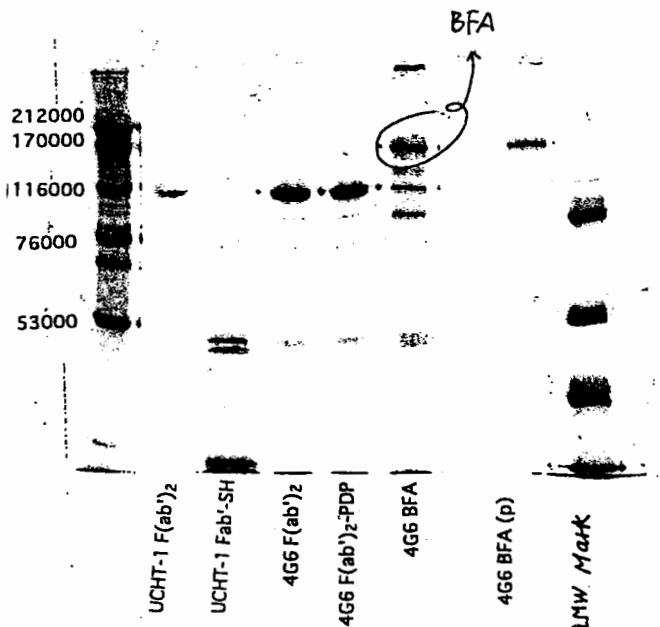


Fig.4 Preparation and purification of 4G6 BFA

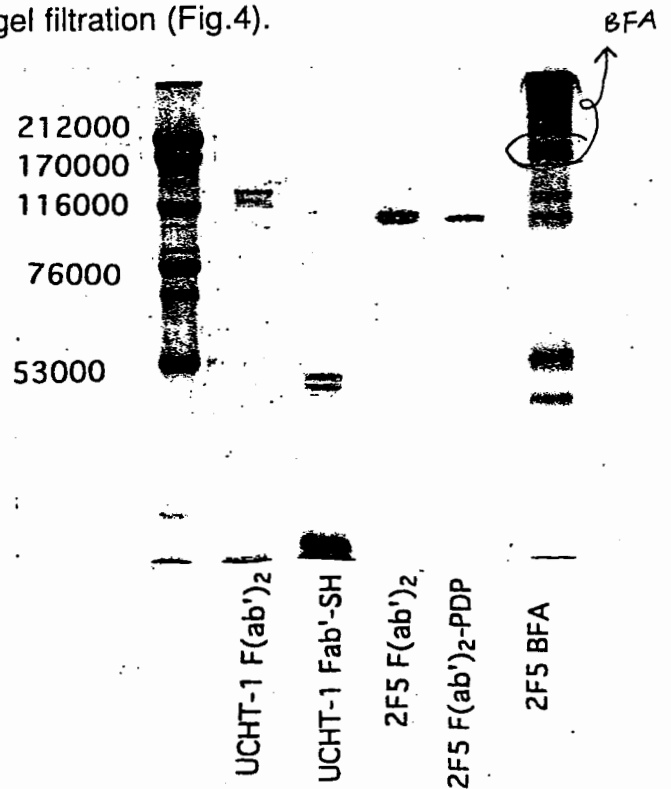


Fig.5 Preparation of 2F5 BFA

3. Determination of the reactivity of BFA against HIV-infected cells by FACS

Method:

1. Treatment of peripheral blood from the patient infected with HIV: 10ml whole blood from the patients (W and C) were collected into two sterile evacuated tubes containing sodium heparin. The blood was centrifuged at 1,800 rpm for 5 min to collect the plasma and then the pellets were resuspended in PBS of the two volumes of original blood for separation of PBMC by centrifugation on a Ficoll-Hypaque gradient (1800rpm for 25 min). After CD8+ cells depleted by MiniMACS Separation Columns (Miltenyi Biotec Inc. CA, USA), PBMC (1×10^6 cells/ml/well) were stimulated by anti-CD3 (0.5ug/ml) in a 24 well plate with RPMI 1640 medium (20% FCS). On the day 3, the cells were washed and suspended in IL2 (50U/ml) RPMI 1640 (20% FCS) medium. On the day 10, half of patient's PBMC were mixed with CD8+ cells depleted HIV seronegative PHA-PBL blasts. The mixed and residual cells were also washed and cultured in IL2 (50U/ml) RPMI 1640 (20% FCS). HIV P24 antigen concentration of PBMC supernatant on the day 10 and 20 was determined with HIV-1 P24 ELISA kit (Dupont Medical Products, MA, USA).

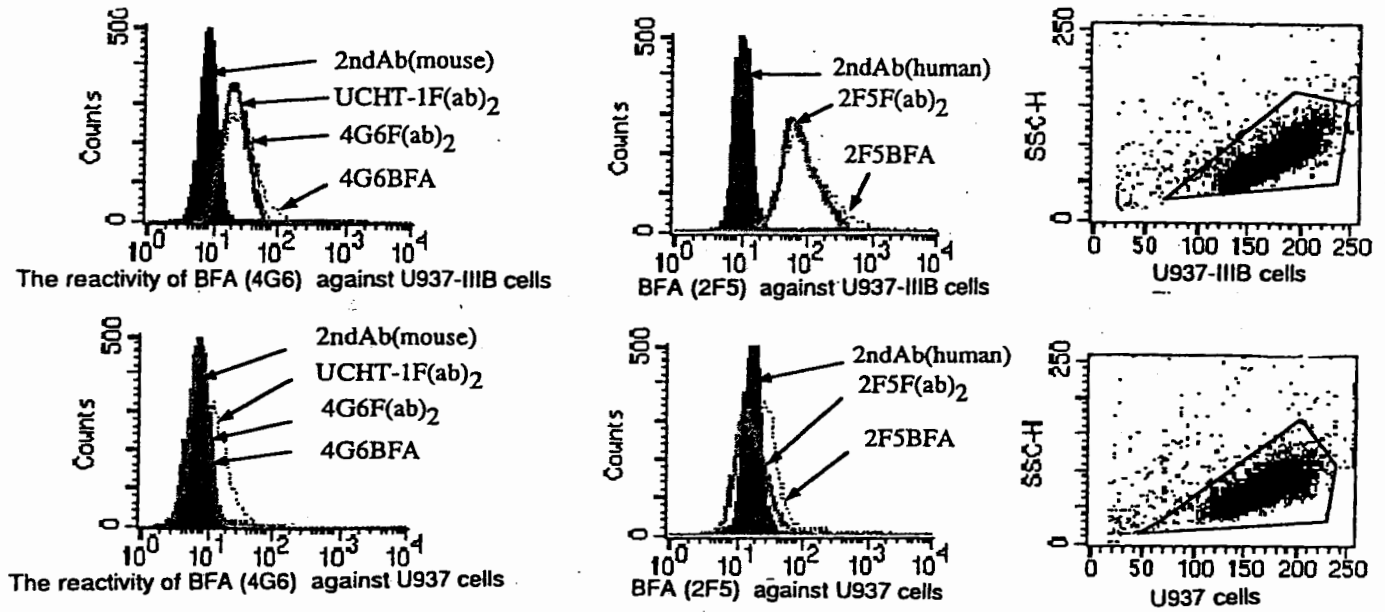
2. Indirect immunofluorescence staining followed by flowcytometric analysis using FACS.

The reactivity of BFA was verified by indirect immunofluorescence staining followed by flowcytometric analysis using FACScan (Becton Dickinson, Mountain View, CA) as follows: 10^6 PBMC (comes from patient, on the day 20) or U937-IIIB or MOLT-4-IIIB were centrifuged (1000rpm/5 min) and the pelleted cells were suspended in 10ul of 10mg/ml normal goat IgG before incubation with 10ug/100ul of two kinds of BFA and every control. After incubation at 4°C for 30 min, cells were washed twice with phosphate-buffered saline (PBS) supplemented with 0.1% bovine serum albumin (BSA). The cells were then incubated at 4°C for 30 min in 30ul of fluorescein-isothiocyanate (FITC)-labeled anti-mouse IgG (10ug/ml) or fluorescein-isothiocyanate (FITC)-labeled anti-human IgG (10ug/ml). Then cells were washed 3 times with PBS containing 0.1% BSA and suspended in 1% *para*-formaldehyde in PBS. After more than 3 hours incubation in the cold (4°C) for inactivation of HIV, FITC staining was analyzed by FACScan.

Result

- 1) Two kinds of BFA have the reactivity against U937-IIIB and Molt-4-IIIB (Fig.6 and Fig.7).
- 2) Two kinds of BFA retained the reactivity against PBL (Fig.8)

Fig.6 The reactivity of BFA against HIV-infected cell line U937-IIIB



The reactivity of BFA against HIV-infected cell line Molt-4-IIIB(Fig.7)

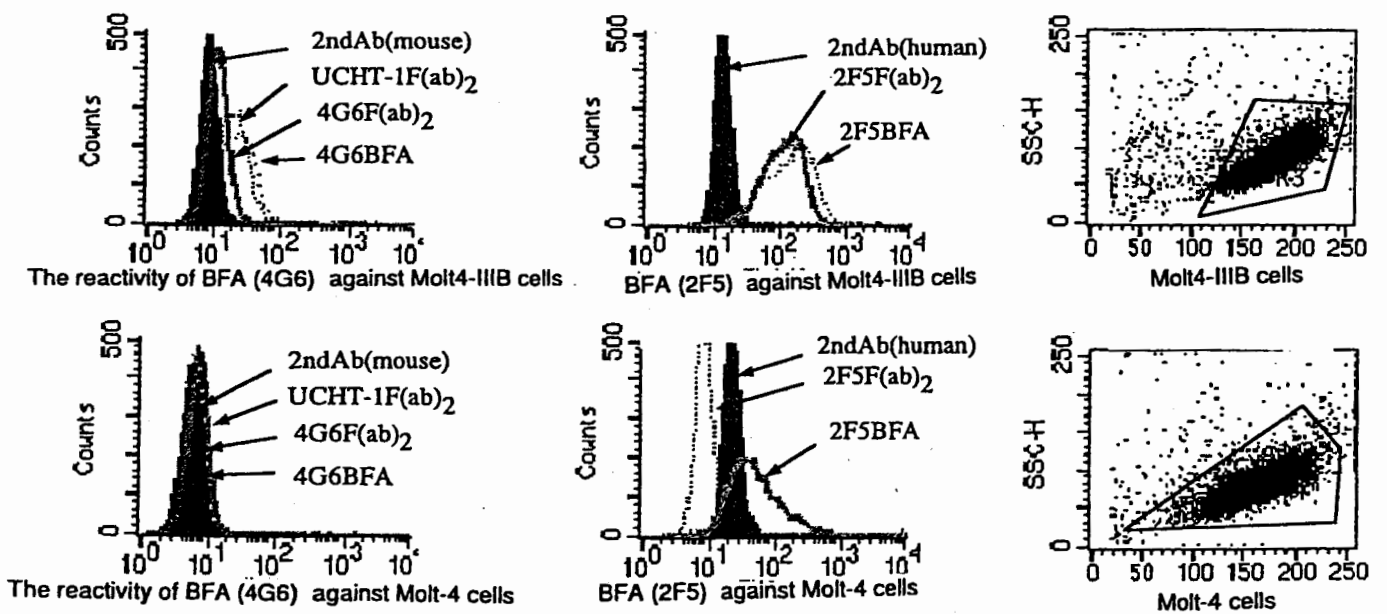
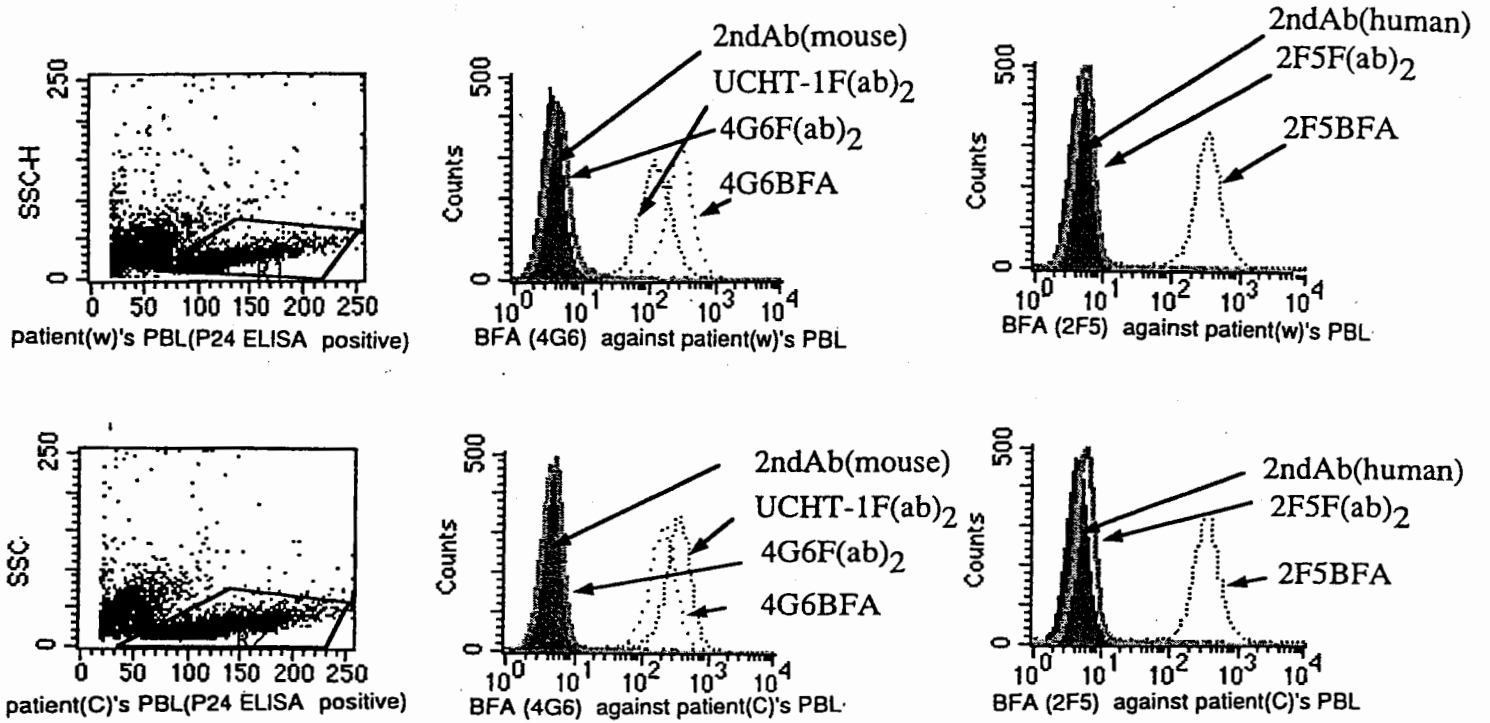


Fig.8 The reactivity of BFA against HIV-infected patient's PBL



For the further experiments:

- 1) Determination the specific cytolysis of HIV-infected cells by BFA. (⁵¹Cr-release assay)
- 2) Test the role of BFA in patient's PBL

以 此 为
尹 淑 萍
980310

日本財団補助金による

1997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-

1998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 劉冬梅

研究機関 国立小児医療センター 病態生理研究指導者 宮坂勝之 職名 部長

所在地 〒154-004 東京世田谷区千歳3-35-31 電話 3414-8721 内線 2751

II. 過去の研究歴

1995.10 - 現在 国立小児医療センター 病態生理研究室で小児重症患者の生命予後に関する病態の治療を研究しております。研究内容: (1) 高頻度振動型人工換気法(HFO)の応用および気道、肺損傷、(2) 小児重症患者治療機器の開発。

III. 過去の研究実績

1. 口頭発表 (in English): The evaluation of infusion accuracy and consistency of four: disposable infusion pumps. 9th Asian Congress of Paediatrics, 23rd - 27th March 1997 Hong Kong.
2. 論文 (in English): Evaluation of extracorporeal membrane oxygenation system using a nonporous membrane oxygenator and a new method for heparin coating. Journal of Pediatric Surgery 32: 691-697, 1997.

IV. 本年度の研究業績

(1) 学会、研究会等においての口頭発表 (学会名・内容)

1. ディスポーザブル携帯型微量持続注込器の評価。
第19回日本麻酔・薬理学会総会、東京、6月12-13日、1997。
2. 四種類携帯型微量注込器の精度と一定性の評価。
第6回日中臨床麻酔学討論会、北九州市、11月14日、1997。

(2) 学会誌等に発表した論文 無・ (雑誌名・論文名)

1. Infusion speed accuracy and consistency of disposable infusion pumps.
J Pediatr Child Health 33:595, 1997.
2. Evaluation of continuous intra-arterial blood gas monitoring under rapidly changing body temperature in pigs. Clin Pediatr Anesthesia 3:153-158, 1997

V. 今後の研究計画及び希望

- 前から研究してきた研究テーマをつづけたいと思っております。
- <1> 高頻度振動型人工換気法の応用および気道と肺損傷。
 - <2> 膜型人工肺 (ECMO) による呼吸循環補助の研究。

VI. 研 究 報 告 (日本語、又は英語で書いて下さい。4,000字以上で記載して下さい。別紙可)

別紙で




↑
劉先生

VII. 指導教官の意見

劉先生は、1995年10月に来日以来、当研究室で、「新しいヘパリン処理法を応用した新生児用ECMOシステムの開発」をはじめとして、「高頻度振動換気法と気道損傷」、「腹圧の呼吸循環に及ぼす影響」など幅広い分野にわたり、活発に研究活動を行っている。

昨年度は、貴財団の補助を得て、「輸液ポンプの性能の検討」の研究にたずさわって、その成果を学会で報告し、高い評価を得ている。

谷坂 勝之 

Report

I graduated from Sun Yat-sen University of Medical Science at Guangzhou in 1988 and started my physician's career in Guangzhou Children's hospital. During the past seven years, I have done clinical and research works in Pediatric Care medicine. In was promoted as an assistant in Pediatrics. Since the October of 1995, I have begun my study and research work in National Children's Medical Research Center, Tokyo. My research work is to develop the technology of artificial ventilation and artificial circulation. The purpose is to improve the survival rate and quality of life of critically ill children.

Here I should say thanks to the Japan-China Medical Association for their economic support for me. With these help, I have done my research work smoothly in the Department of Pathophysiology, National Children's Medical Research Center. Here I would like to introduce my research work which I have mainly done during the past one year.

1. High Frequency Oscillation Ventilation (HFO)

High frequency oscillation ventilation (HFO) now has become popular in the critical care medicine area. HFO is mainly used in the management of acute respiratory failure with air leak, hypoplastic lung, and persistent pulmonary hypertension. In Japan, for the newborn patients with ARDS (acute respiratory distress syndrome), HFO were used surround 20-30%. HFO is considered a less invasive way of ventilation fragile lungs since it dose not

involve intermittent stretching of alveolar walls. Contrarily, in the low compliant, atelectatic lung, the conventional ventilation not only has to produce a pressure within the lung in excess of alveolar "opening pressure" in order to achieve oxygen exchange, but also has to use high level of positive end expiratory pressure (PEEP) to prevent the lung collapse during the expiratory phase of the respiratory cycle. It is this constant opening and closing of terminal airway units under high pressure that results in further injury to the already damaged lung. HFO offers an entirely different ventilation strategy for dealing with this form of lung disease. Increasing airway pressure by adjusting fresh gas flow can raise mean airway pressure (MAP) above alveolar opening pressure and maintain lung volume at this level, where the small airway pressure swing around the mean will be less injurious to the lung by avoiding the continual cycle of inflation and collapse terminal lung units. In 1993, Ogawa and Miyasaka et al conducted a multicenter randomized trial in nine neonatal centers in Japan. The result demonstrated HFO was effective and safe in the treatment of respiratory failure for preterm infants. There are now several publications demonstrating that HFO decreased barotrauma in very low weight infants, decreased incidence of BPD in infant respiratory distress syndrome and a reduction in the requirement for ECMO therapy in term infants with ARF (acute respiratory failure) and an $OI > 40$. In addition, the ease of control of CO_2 make HFO an attractive option in PPHN where the induction of a

respiratory alkalosis can reverse right to left ductal shunting without the necessity to hyperventilation with high peak inspiratory pressures which lead to pulmonary barotrauma. Following the recognition for its benefits. HFO has been extended to be used in infants, children and adults.

Last year, a new ventilator of HFO has been developed for using to the children and adults in Japan. I have been evaluated this ventilator in the animal experiments and confirm that this new ventilator can be used not only for children but also for adults. But there are some problems remained , for example, the protection from infection, deducing the noise, et al.

Many studies have been done about lung injury and lung protection strategy concerning HFO. But there is less studies about tracheobroncheal injury of HFO. Last year the experiment about airway injury has been done by us. In this experiment, we compared the airway histopathologic findings in kitten given Conventional Mechanical Ventilation (CMV) with those seen after HFOV. Seventeen normal kittens were paralyzed and mechanically ventilated for 24 hours. Seven were treated with CMV, and eleven with HFOV. A semiquantitative histopathologic scoring system was used to grade tissue changes in the cartilage cricoidea, mid trachea, trachea at the tip of endotracheal tube, carina, and right mainstem bronchi. The degree of damage was mild in both of groups, even the part at tip part of endotracheal tube and carina which were thought the main influenced part by fresh gas flow and vibration. There was no significant difference in the extent of injury

between the two groups. High-frequency oscillatory ventilation appears to result in no greater degree of airway damage than conventional positive pressure ventilation.

2. Disposable infusion pumps for home care and pain management.

The disposable infusion devices have the advantages of lightweight, great mobility, noneed of electricity, easy concealment and easy to be use by the patients. Now they have been widely used for infusion therapies and patient transportation. The potential problems now is that the flow rate may not consistent through the whole infusion, and the infusion accuracy may vary from device to device. The infusion speed may also be influenced by fluid viscosity, temperature, type of venous access, catheter patency, and patient body position.

Last year, we introduced a new disposable infusion device, Coopdecch Syrinjector (Daiken Medical, Japan), which is called a syringe type and using negative pressure for infusion. The infusion accuracy and consistency have been investigated by us. At the same time the influence of the room temperature, device's position also have been studied. The result suggested that the new disposable infusion device can provide more accurate and consistent infusion flow than other type disposable infusion devices, such as the balloon type. We also suggested this device can be used for intra-

arterial monitoring system.

3. Evaluation of an Extracorporeal Membrane Oxygenation System (ECMO) Using a Nonporous Membrane Oxygenator and a New Method for Heparin Coating.

Extracorporeal membrane oxygenation (ECMO) has been successfully used to treat refractory neonatal respiratory failure. Its application in clinical uses tends to be wide, for example in premature newborn, in pediatric patients and adults who have the refractory heart and respiratory failure. At present bleeding complication is the principal cause of morbidity and mortality in infants treated with ECMO. This problem limits its usefulness in clinical application. To resolve the anticoagulation problem in ECMO system, heparin-coating or immobilization is the most explored and promising approach.

Various types of heparin-coated surfaces have been developed to overcome the risk of major bleeding resulting from systemic heparinization during extracorporeal circulation. Two products with heparin-coated surfaces are now commercially available for cardiopulmonary bypass. Heparin is immobilized covalently in one (Carmeda Bioactive Surfaces; Medtronic, Anaheim, CA) and ionic in another (Duraflo II; Baxter, Irvine, CA). Covalent binding should be suited for those circuit used for long periods because the covalently bound heparin is known to be more stable compared with ionically bound heparin. Heparin molecules, to allow their free

molecules. In Carmeda Bioactive Surfaces (CBAS), the bonds between heparin molecules and spacer molecules (polyethyleneimine; PEI) are covalent, but those between spacer molecules, and base material are ionic. We have recently developed a new method in which all the bonds involved are covalent with an aim of augmenting the stability of the immobilized heparin for long-term extracorporeal membrane oxygenation.

The major drawback of the current heparin-coated systems is inevitable plasma leakage caused by the use semipermeable membrane oxygenator. ECMO, in contrast to cardiopulmonary bypass of relatively short duration, provides cardiopulmonary support over a long period. Frequent exchange of oxygenators caused by plasma leakage is a serious problem because it is accompanied by rapid hemodynamic changes, loss of circulating platelets, and greater requirements for blood transfusion. Silicone-based membrane oxygenators are routinely used for long-term pulmonary support, but heparin coating these oxygenators has not yet been reported because of technical difficulties.

This study was performed to evaluate a new heparin-coated ECMO system that should reduce the amount of systemic heparinization while preventing plasma leakage. A miniature ECMO system including a membrane oxygenator made of a double-layer polyolefin hollow fiber, which is known to be resistant to plasma leakage, was coated by heparin with a new covalent binding method. We evaluated the stability of the immobilized

heparin in vitro and the feasibility of this system in animals. Samples of hollow fibers and tubing were rinsed at 40 C for four days in normal saline, Ringer's lactate, and 1mol/L NaCl solution. Heparin activities on hollow fibers after rinsing were $99 \pm 2.3\%$ (mean \pm SD), $96 \pm 3.9\%$, and $93 \pm 2.0\%$ of the control in each solution, while those of the tubing were $87 \pm 4.1\%$, $86 \pm 3.1\%$, and $76 \pm 8.6\%$, respectively. Veno-arterial ECMO using this heparin-coated system were performed on five beagles (8 to 12 Kg) for 10 hours. Neither major thrombus formation nor plasma leakage was detected during the procedure in spite of a low flow rate (300 ml/min) and reduced activated clotting time (mean. 128 seconds). Platelets decreased to 52% of the control ($p < .01$) at 1 hour, but no progressive decrease was seen thereafter. Antithrombin-III decreased ($p < .01$) and thrombin/antithrombin III complex increased ($p < .05$ at 4 hours and $p < .01$ at 6, 8, and 10 hours) during bypass, but the changes of fibrinogen and fibrinopeptide A were not significant. Fibrinogen/fibrin degeneration products, fibrinopeptide B β 15-42, and plasma-free hemoglobin levels did not rise significantly. O₂ transfer of the oxygenators at a flow rate of 300 ml/min were 12.3 ± 0.4 mL/min at 30 minutes, 14.3 ± 1.2 mL/min at 5 hours, and 14.7 ± 4.7 mL/min at 10 hours (no statistical difference). Histological examination of the brains and the kidneys showed no evidence of thrombotic sequela in any of the animals. These results suggest that this new system is a promising device for long-term ECMO in which the amount of systemic heparinization can be reduced

with the minimal possibility of plasma leakage.

Finally thanks the Japan-China Medical Association again. Also thanks my instructors, K Miyasaka, S Nakagawa, and all the staff of the Dep. of pathophysiology, National Children's Medical Research Center.

Thesis:

1. Infusion speed accuracy and consistency of disposable infusion pumps.

J Pediatr Chil Health 33:S95, 1997.

2. Evaluation of continuous intra-arterial blood gas monitoring under rapidly changing body temperature in pigs.

Clinical Pediatric Anesthesia 3(1):153-158, 1997

3. Evaluation of an Extracorporeal Membrane Oxygenation System Using a Nonporous Membrane Oxygenator and a New Method for Heparin Coating

Journal of Pediatric Surgery 32(5):691-697, 1997

Presentation:

1. Evaluation of four disposable infusion pumps

9th Asian Pediatric Congress. 23rd-27th March 1997, Hong Kong

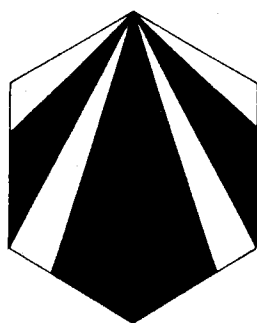
2. Using of disposable infusion pumps for home care

24th Congress of Intensive Care Medicine of Japan, 15-16th May, 1997,

Morioka, Iwate, Japan

第19回日本麻酔・薬理学会総会

講演抄録集



平成9年6月12日(木)・13日(金)

会 長 細山田 明義

昭和大学医学部麻酔学教室
〒142 東京都品川区旗の台1-5-8

TEL. 03-3784-8575

FAX. 03-3784-8357

プログラム

C-17 鼓室形成術直後に肺水腫を発生した1例

帝京大学市原病院集中医療センター 後藤 幸子、他6名

C-18 脳内結核腫で救急受診した若年者の術後管理の1例

帝京大学市原病院集中治療センター 白土 瑞枝、他6名

ふくいや
薬物の効果と持続注入ポンプ 14:30~15:30 座長 古家 仁(奈良医科大学)

C-19 ウリナスタチンが人工心肺中の interleukin-8 (IL-8)

および P-selectin に及ぼす影響

慶應義塾大学麻醉学教室 大内 貴志、他4名

C-20 ARDSに対するウリナスタチンの経気道的投与

—急性期および慢性期での治療効果の比較検討—

埼玉医科大学総合医療センター麻醉科 川崎 潤、他6名

C-21 低用量アミノフィリン投与は全身麻酔後の低酸素血症に対して有効

近畿大学麻醉科学教室 田仲 毅至、他6名

C-22 ディスポーザブル携帯型持続微量ポンプの評価

—在宅疼痛管理応用の観点から—

国立小児医療研究センター病態生理研究室 劉 冬梅、他5名

C-23 微量輸液回路を用いたプロポフォールの簡便な投与方法

社会保険横浜中央病院麻醉科 増田都志彦、他5名

C-24 速度可変式簡易持続注入ポンプを用いた完全静脈麻酔においての

術中・術後疼痛管理

日本大学麻醉科学教室 長島 真治、他4名

疼痛管理

15:30~16:30

座長 宮崎 東洋(順天堂大学)

C-25 帯状疱疹後神経痛に対する末梢循環改善薬の効果

—PGE₁テストによる効果予測の有用性—

奈良県立医科大学麻醉学教室 山上 裕章、他4名

C-26 発症後長期間を経た帯状疱疹後神経痛症例に対する

硬膜外腔へのケタミン注入の効果

近畿大学麻醉科学教室 蔵 昌宏、他7名

C-27 帯状疱疹後神経痛の難治例に対する10%リドカインクリームの有効性

順天堂大学麻醉科学教室 井関 雅子、他6名

C-28 帯状疱疹後神経痛(PHN)の鍼治療

北里研究所東洋医学総合研究所鍼灸診療部

石野 尚吾、他1名

C-29 持続皮下モルヒネ注入法による下腹部手術後鎮痛法

杏林大学麻醉学教室 巖 康秀、他5名

C-21 低用量アミノフィリン投与は全身麻酔後の低酸素血症に有効

近畿大学医学部麻酔科学教室

○田仲毅至 蔵昌宏 有光正史 河田圭司 泉貴文 奥田隆彦 古賀義久

全身麻酔後の低酸素血症の原因には、前投薬・麻酔薬・術後疼痛また呼吸機能など多くの因子が挙げられる。今回、術後の回復室において低酸素血症($PaO_2 < 80 \text{ mmHg}$, $FiO_2: 0.4$)に対して低用量アミノフィン(2 mg/kg)を投与して、その影響について検討したので報告する。

【対象と方法】全身麻酔後の回復室でフェイスマスクによる酸素投与($FiO_2: 0.4$)にもかかわらず、動脈血ガス分析で低酸素血症($PaO_2 < 80 \text{ mmHg}$)を呈した58症例を対象とした。対象群では FiO_2 を0.5以上に上昇させて、15分後の動脈血ガス分圧・血圧・脈拍数について酸素投与前と比較検討した。一方、アミノフィリン群では FiO_2 を0.4のまま維持して、アミノフィリン 2 mg/Kg を5分間で静脈内投与し、投与終了10分後に同様の項目について測定して投与前値と比較した。統計学的検討としてpaired t -testを用いて $p < 0.05$ を有意差ありとした。

【結果】対象患者の平均年齢、身長、体重および回復室入室後の動脈血ガス分圧では、両群間に有意差を認めなかった。 PaO_2 は対象群では平均 $67 \pm 6 \text{ mmHg}$ (mean \pm SD)から $95 \pm 7 \text{ mmHg}$ に、アミノフィリン群では $70 \pm 4 \text{ mmHg}$ から $128 \pm 13 \text{ mmHg}$ とそれぞれ有意な上昇が認められた。 FiO_2 を考慮したとき、 PaO_2 はアミノフィリン群の方が対照群に比して有意に上昇した。 $PaCO_2$ ・平均動脈圧・脈拍数は両群間に有意差を認めなかった。また、対象患者のうち術前術後の胸部レントゲン写真上明らかな異常所見を認めた症例はなかった。

【結語】術後の低酸素血症に対して 2 mg/kg のアミノフィリン投与は循環動態に影響を与えないで低酸素状態を改善するために有用である。

C-22 ディスポーザブル携帯型持続微量ポンプの評価 —在宅疼痛管理応用の観点から—

国立小児医療研究センター 病態生理研究室、国立小児病院 麻酔集中治療科*

○劉冬梅、鈴木康之*、宮坂勝之、張欽明、杉山正彦、中川聡

ディスポーザブル携帯型持続微量ポンプ(DP)は、電気を必要とせず、また、軽量であるという利点から、入院中のみならず在宅での疼痛管理への応用が期待される。我々は、現在使用可能な4種類のDPの輸液速度の精度と一定性に加え、環境温やDPの位置が輸液速度に及ぼす影響を検討した。【方法】対象のDPは、バルーン型であるバクスターインフューザー(バクスター、B)、DIBカテーテル(三矢メディカル、D)、シュアフューザーA(ニプロ、S)と、シリンダー内の陰圧を駆動源としたシリンジ型であるクーデックシリンジジェクター(大研医器、C)の計4種類である。DPの輸液速度を、Dでは 1.7 ml/hr 、Sでは 2.1 ml/hr 、BとCでは 2.0 ml/hr に設定し、その実際の輸液速度を小児用点滴輸液セットと光電センサーを用い測定した。実測した輸液の精度と分散を4種間で比較した。さらに、3種類の環境温設定(4 、 25 、 $37 \text{ }^\circ\text{C}$)において、またDPの位置を3段階に変化させ(仮想した心臓と同じ高さ、それよりも 50 cm ずつ高い場合と低い場合)、同様の検討を行った。【結果】環境温が $25 \text{ }^\circ\text{C}$ で、心臓と同じ高さにDPを置いたときの輸液速度(輸液開始2時間から22時間まで)を表に示す。また、輸液速度は、環境温およびDPの位置により影響を受けた。

【結論】DPの輸液速度の精度と一定性はポンプ間で異なり、なかではシリンジ型(C)が最も安定していた。また、輸液速度は環境温やDPの位置により影響を受けるため、在宅も含む臨床使用においては、それらを考慮する必要がある。

ポンプ(設定輸液速度; ml/hr)	B (2.0)	D (1.7)	S (2.1)	C (2.0)
平均輸液速度 (ml/hr)	2.10	1.69	2.06	2.11
輸液速度の分散係数 (%)	5.0	15.5	6.7	2.9

日本財団補助金による 1997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－

1998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 王 玉来

研究機関 信州大学医学部皮膚科学教室 研究指導者 斎田俊明 職名 教授

所在地 〒390-0802 長野県松本市旭3-1-1 電話 0263-(35)-4600 内線 5274

II. 過去の研究歴

1993年1月28日より3月31日まで、信州大学大学院医学研究科研究生（皮膚科学講座）として研修した。

そして、1993年4月1日より1997年3月31日まで、信州大学大学院医学研究科入学、斎田俊明教授の指導を受けた。

III. 過去の研究実績

Y.-L. Wang, H. Uhara, Y. Yamazaki, T. Saida. Immunohistochemical detection of CDK4 and p14^{INK4} proteins in cutaneous malignant melanoma. British Journal of Dermatology 134(2):269-275,1996.

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）

土肥庄二郎, 王 玉来, 木庭幸子, 斎田俊明: ワークショップ, 移植ヒト皮膚を用いる in vivo 発癌実験

第61回日本皮膚科学会東部支部総会・学術大会, 松本, 1997年10月4, 5日.

H. Uhara, Y.-L. Wang, H. Kubo, T. Saida: Invasive and in situ squamous cell carcinomas probably caused by chronic heat exposure, 19th World Congress of Dermatology, Sydney, Australia, June 15-20, 1997.

(2) 学会誌等に発表した論文 無・有（雑誌名・論文名）

福沢正男, 小岩原冬子, 王 玉来, 山崎自子, 河内繁雄, 斎田俊明: 治療への反応性が悪かった若年男性の SLE, 皮膚科の臨床, 52(1) 42~45, 1998.

小岩原冬子, 王 玉来, 福沢正男, 山崎自子, 河内繁雄, 斎田俊明: B cell lymphoma: 多発性の皮下結節としてみられ、血管壁に浸潤を示した1例, 皮膚のリンフォーマ, 印刷中, 1998年.

V. 今後の研究計画および希望

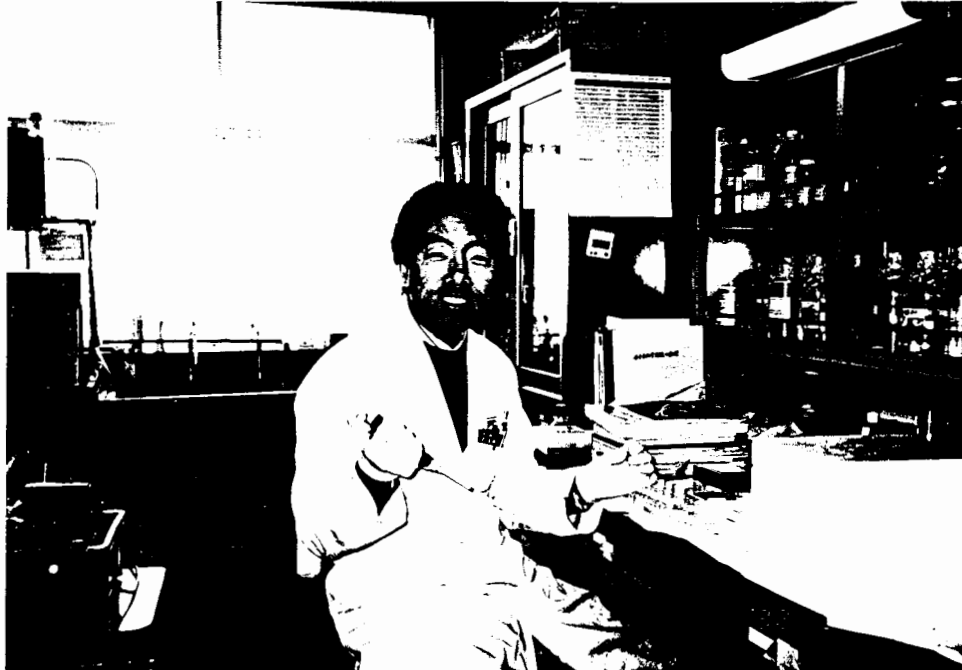
今後は前癌病変を含めて、様々な良性と悪性皮膚腫瘍について同じ方法を用い検討し、アンドロゲン受容体遺

伝子のクローナリティといった1側面から、即ち腫瘍の単一性という面から再評価することを目的として調べて

いきたい。

VI. 研 究 報 告（日本語、又は英語で書いてください。4,000字以上で記載してください。別紙可）

別 紙



VII. 指導教官の意見

王 玉来君は貴協会からの在留中国人研究者研究助成を受け、「X染色体不活性化の検出による皮膚前癌病変におけるモノクローナリティに関する研究」というテーマで研究し、その結果を研究報告（別紙）としてまとめることができました。これから、投稿する予定です。本研究におけるモノクローナリティの検出法は、開発されてからまだ3年と日も浅く、皮膚腫瘍についてはメラノーマ転移巣1例について行われている以外報告はありません。今回の研究は皮膚前癌病変について一部の結果を得ることができましたが、今後は前癌病変を含め症例数を増やして、様々な良性と悪性皮膚腫瘍について同じ方法を用い検討し、アンドロゲン受容体遺伝子のクローナリティといった1側面からの見方ではあるとしても有益な情報となりうると思われます。

最後に、日中医学協会からの研究助成に厚くお礼申し上げます。

信州大学医学部皮膚科学教室 教授 齊田俊鷹

Clonal analysis by the study of X chromosome inactivation in melanoma and preneoplastic tissues of the skin

Abstract

Recently, the gene for the androgen receptor has been shown to be a highly polymorphic locus in which methylation of DNA correlates with inactivation of one or the other X homologue. Analysis of clonality by X chromosome inactivation has proved useful in the study of neoplastic and preneoplastic tissue. We performed clonal analysis on malignant melanomas and preneoplastic lesions of females as well as keratoacanthoma, epithelioma, lymphomatoid papulosis and dysplastic nevus. PCR amplification was performed to generate fragments surrounding the highly polymorphic CAG trimetric repeat in exon I of the androgen receptor gene, using DNA extracted from frozen tissues or paraffin-embedded archival sections as templates. Of a total of 40 tumors analyzed, 34 cases showed heterozygosity (85%) and were therefore informative for clonal analysis. Monoclonal composition of the tumors was suggested in a total of 26 of 34 cases, including 13 melanomas, 7 keratoacanthomas, 2 epithelioma, 4 lymphomatoid papulosis and none dysplastic nevus. However, polyclonal composition was observed in two melanomas, in other containing mutation in p16 gene. Our studies demonstrated the utility of PCR amplification of highly polymorphic repetitive sequences for analysis of patterns of X-chromosome inactivation. This approach is practical for the analysis of clonal cell composition in a high proportion of both formalin-fixed and frozen archival tissues.

Introduction

Analysis of clonality by X chromosome inactivation has proved useful in the study of neoplastic and preneoplastic tissue (1,2) as well as in the study of female heterozygotes of X-linked diseases, especially the immunodeficiency syndromes (3). Although analyses of chromosome deletions, gene rearrangements, or patterns of oncogene activation have been widely used, the most consistently informative marker of clonal composition of tissues is the cellular pattern of X-chromosome inactivation.

During the process of embryogenesis in the female, either the maternally derived or paternally derived X-chromosome in each cell is randomly and permanently inactivated (4,5). The choice once made is stable through subsequent cell cycles (6). Thus, normal tissues in females are composed of cellular mosaics differing in which of the two X chromosomes has been inactivated. By contrast, in neoplasms of females, there is a uniformity in the pattern of X-chromosome inactivation which indicates clonality of the cellular composition. (1)

Application of polymerase chain reaction (PCR) for analysis of clonality was first targeted to portions of the PGK-1 gene (7). The increased sensitivity of the PCR-based approach made it theoretically feasible for the first time to use DNAs derived from archival tissue collections. RFLP analysis of PCR products has been used for the analysis of clonality in solid tumors including breast lesions (8). This approach, however, is also severely limited by the relatively low level of heterozygosity in the amplification target, permitting analysis of clonality in only ~30% of cases.

Recently, a polymorphic short tandem repeat (STR) has been identified in the X-linked human androgen receptor gene (HUMARA) (9). This sequence, consisting of the trinucleotide [CAG]_n, shows heterozygosity in ~90% of the general population (10). Using DNA from hamster/human hybrid cell lines, as well as the DNA from human tissues, these workers were able to show that methylation of Hha I sites within the HUMARA amplification target directly correlates with X-chromosome inactivation. Thus, based on the high level of heterozygosity and the presence of adjacent methylation sensitive restriction endonuclease sites, the HUMARA STR is an appropriate target for the determination of X-chromosome inactivation.

In the current study, we use PCR amplification of the HUMARA STR for analysis of patterns of X-chromosome inactivation in malignant melanomas and preneoplastic lesions of females as well as keratoacanthoma, epithelioma, lymphomatoid papulosis and dysplastic nevus. The method is informative in a high proportion of cases, permitting determination of clonality in both fresh and archival tissue specimens.

Materials and methods

Tissues

A total of 40 tumors, including 15 malignant melanomas, 9 keratoacanthomas, 4 epithelioma, 7

lymphomatoid papulosis and 5 dysplastic nevi, were obtained from the Department of Dermatology at the Shinshu University Hospital in Japan. No initial chemotherapy was performed before tumor excision. Surgically removed tissues were sampled for histopathological diagnosis, and the remaining tissue was frozen or paraffin embedded (10% formalin fixed) for extraction of DNA. DNA was extracted from frozen samples following the procedures previously described(10). Sections of paraffin-embedded tissues stained with hematoxylin and eosin were examined under the microscope, and normal and neoplastic regions were identified using standard morphological criteria. A single adjacent unstained section 10 μ m thick was used for DNA extraction. DNA was extracted from sections following the procedures previously described(11).

PCR

One microgram of DNA extracted from frozen tissue was digested with 10 U of Hha I (Toyobo, Japan) in 10 μ l of digestion buffer recommended by the manufacturer. After incubation at 37°C for 12 h, digestion was terminated by incubating the digestion mixture at 95°C for 10 min. From this mixture, 2 μ l of DNA were used as a template for the PCR reaction. DNAs extracted from selected areas of paraffin-embedded archival sections were also digested with 5 U of Hha I in 10 μ l of digestion buffer at 37°C for 12 h. After heat inactivation, the DNAs were reextracted with phenol, precipitated with ethanol, and resuspended with PCR reaction mixture.

Primers sequences were (5' to 3') TCCAGAATCTGTTCCAGAGC and TGGGGAGAACCATCCTCACC. Two μ l of each DNA reaction mixture were added to a 50 μ l reaction containing 100 ng of each primer, standard PCR reaction buffer (Toyobo, Japan), 200 μ M concentration of each dATP, dTTP, dGTP, and 20 μ M dCTP. The tubes were heated to 80°C, then 0.1 μ l [α -³²P]dCTP (6000 Ci/mmol) and 0.25 unit Taq polymerase were added. Forty cycles of amplification were carried out using cycling parameters of 95°C for 15 s, 64°C for 30 s, and 72°C for 30 s. Two to 5 μ l of each reaction were added to an equal volume of formamide containing 0.1% bromophenol blue and 0.1% xylene cyanol, loaded onto a 7.2 M urea-6.5% polyacrylamide gel, and electrophoresed at 60 W for 3.5 h. Gels were dried and autoradiographed for 12-48 h at room temperature using Fuji X-ray film. PCR amplification was also performed from DNA extracted from white blood cells or from histologically normal tissue from each case.

Results

PCR amplification was performed to generate fragments surrounding the highly polymorphic CAG trimeric repeat in exon 1 of the androgen receptor gene, using DNA extracted from frozen tissues or paraffin embedded archival sections as templates. PCR amplification was successful from all the samples used. There was basically no difference in terms of the success rate between frozen material and paraffin embedded material. PCR amplification from undigested DNA revealed that 34 of 40 cases (85%) were heterozygous in this locus and were, therefore, informative for analysis of clonality (Table 1). In 34 cases that showed heterozygosity, two bands were identified corresponding to the amplification products of each X-chromosome. For each case, the intensity of the signals for both alleles was almost identical to each other and there was no difference between the PCR product from histologically normal tissue or from WBCs and that from the tumor (Fig 1).

Genomic DNAs extracted from frozen samples or from paraffin-embedded archival sections were next digested with methylation-sensitive restriction enzyme Hha I, before PCR amplification. Predigestion of DNA with Hha I permitted PCR amplification only from the methylated (inactivated) allele. Hha I pretreatment of genomic DNA from normal tissue or WBCs, followed by PCR amplification of AR, yielded two product bands, and the intensity of the two bands was almost identical (Fig 1). By contrast, PCR amplification from Hha I digested tumor DNA derived from 26 of 34 heterozygous cases after digestion with Hha I generated either a single product band or showed significant reduction in the intensity of one of the two bands. There was, again, no difference in terms of the success rate of PCR amplification between frozen material and paraffin-embedded material. These observations indicated that these 26 tumors are of clonal composition. By contrast, the intensity of the two

product bands were almost identical in two melanoma, in other we previously showed a CC--TT mutation in exon 2(codons 57/58) of p16.

Discussion

The present study demonstrates the technical feasibility of clonality analysis by PCR amplification of short tandem repeats. The use of PCR based methods permitted the use of both frozen and formalin-fixed tissues, making the approach practical for application in both recent and archival tissue collections. Previous PCR-based methods have been directed to a portion of the PGK-1 gene, showing heterozygosity in only 30% of cases(12,13), precluding the widespread application of the method. However, analysis of repetitive sequence polymorphisms, as described in the current articles, showed heterozygosity in >90% of cases. Thus, PCR amplification of the AR target is a practical approach for the analysis of clonality in a high proportion of cases from women.

Of the 13 melanomas, 7 keratoacanthomas, 2 epithelioma, 4 lymphomatoid papulosis in which monoclonal expansion was suggested by the present study. But none of the dysplastic nevus was suggested. Unique characteristics of nevus cells, such as growing, intradermal dropping, might represent the retention of capability in oncogenic evolution, and should not be regarded as a manifestation of a neoplastic nature.

Polyclonal composition was observed in two melanoma, which evaluated in the present study were also analyzed for the presence of p16 mutations. The other case, exhibited a CC--TT tandem base mutation in p16 (S. Dohi et al, unpublished data). Inactivation of the p16 gene can occur by mutation at the majority of codons in the highly conserved regions of the gene. If the tumor consists of cells derived from more than one progenitor cell and if alteration of these gene is essential for the tumorigenesis, each clone should have mutations in the p16 gene and/or other genes independently.

In summary, PCR amplification of a highly polymorphic repetitive sequence of the X-linked human androgen receptor gene can be used for the investigation of clonal composition in fresh and archival formalin-fixed tissues. Common neoplastic and preneoplastic tissues of the female skin, including malignant melanoma, keratoacanthoma, epithelioma and lymphomatoid papulosis were shown to have a uniform pattern of X-chromosome inactivation, consistent with their full malignant potential.

References

1. Fialkow, P.J Clonal Origin of human tumors. *Biochim. Biophys. Acta*, 458:283-321, 1976.
2. Vogelstein, B., Fearon, E.R., Hamilton, S.R. et al: Clonal analysis using recombinant DNA probes from the X chromosome. *Cancer Res.*, 47:4806-13, 1987.
3. Feron, E.R., Winkelstein, J.A., Civin, C.I., et al: Carrier detection in X-linked agammaglobulinemia by analysis of X-chromosome-linked severe combined immunodeficiency. *Proc. natl. Acad. Sci. USA*, 85:3090-94, 1988.
4. Barr ML., Bertram EG. A morphological distinction between neurones of the male and female, and the behaviour of the nucleolar satellite during accelerated nucleoprotein synthesis. *nature* 163:676-7, 1949.
5. Gartler SM, Riggs AD. Mammalian X-chromosome inactivation. *Ann Rev Genet* 17;155-90, 1983.
6. Riggs AD. X inactivation, differentiation and DNA methylation. *Cytogenet Cell Genet* 14;135-48, 1975.
7. Gilliland DG, Blanchard KL, Levy J, Perrin S, Bunn F, Clonality in myeloproliferative disorder: analysis by means of polymerase chain reaction. *Proc Natl Acad Sci USA* 88,6848-52, 1991.

Table 1. Analysis of clonality by polymerase chain reaction amplification of short tandem repeat

Histologic diagnosis	total cases	Heterozygous	Monoclonal
malinant melanoma	15	15	13
Keratoacanthomas	9	7	7
Epithelioma	4	2	2
Lymphomatoid papullosis	7	5	4
Dysplastic nevus	5	5	0
Total	40	34	26

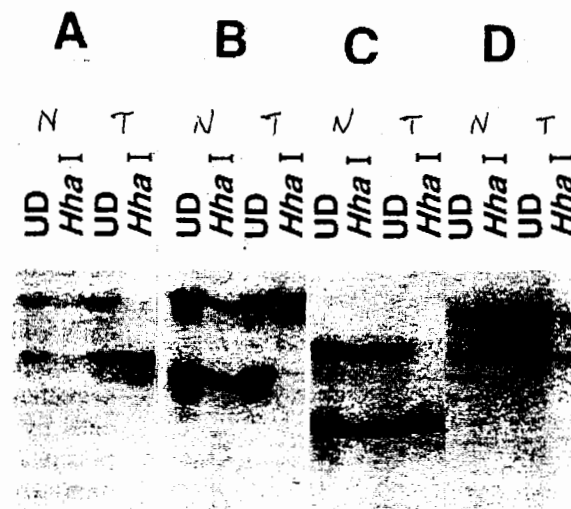


Fig 1. Demonstration of clonal composition of a tumor using apolymerase chain reaction(PCR)-based method. Genemic DNA derived from histologically normal tissue or while blood cells(N) or tumor(T) was digested with methylation-sensitive restriction enzyme Hha I, and PCR amplification was performed, targeting a highly polymorphic CAG repeat in exon 1 of the androgen receptor gene, using [32p]end-labeled primer as one of the primers. PCR amplification was also performed on undigested genemic DNA. PCR products were electrophoresed on a 7.2% denaturing polyacrylamide gel. A-C: PCR product from Hha I digested template derived from the normal tissue(N-Hha I),as well as that from undigested template derived from the normal tissue(T-Hha I),yielded two bands, and the intensity of the two bands was almost identical.By contrast,PCR amplification from Hha I digested tumor DNA(T-Hha I) generated either asingle fragment or two fragment with one signal significantly reduced.(A:a case from melanoma; B:a case from keratoacanthoma; C:a case of Lymphomatoid papullosis) By contrast,the intensity of the two bands was almost identical in the PCR product from Hha I difested tumor DNA(T-Hha I) derived from one melanoma(D).

Print Post Approved: 381667/00473

ISSN 0004-8380

Australasian Journal of Dermatology

VOLUME 38 • SUPPLEMENT 2 • JUNE 1997

ABSTRACTS OF THE



19TH WORLD CONGRESS OF DERMATOLOGY

15-20 JUNE, 1997
SYDNEY AUSTRALIA



0004-8380 (199702) 38:1;1-G

b

Blackwell
Science

A 81-year-old Japanese woman was referred to our clinic for evaluation of the nodule of the face that had developed during preceding several years. Physical examination disclosed 10 × 7 mm, elliptical, dark brown to black nodule on her left nasojugal furrow. Histological examination revealed multiple, dilated, thin-walled blood vessels throughout the dermis. These blood vessels were lined by a single layer of endothelial cells. The lumen contained blood and eosinophilic serous materials. By immunohistochemical staining these endothelial cells were positive for CD34, Factor VIII-related antigen and thrombomodulin, confirming that the nodule is vascular tumor.

This case implies that cutaneous hemangioma is one of the skin lesions to be differentiated in the clinical diagnosis of pigmented BCC of the face.

2374 Classical Kaposi's sarcoma: Low dose interferon alfa treatment

E. Tur, S. Brenner. *Dept of Dermatology, Sourasky Medical Center, Tel Aviv, Israel*

No definitive cure is known for Kaposi's sarcoma. All treatments are palliative and have only temporary efficacy. High doses of interferon alfa are needed for treating AIDS-related Kaposi's sarcoma, whereas low doses are generally ineffective. We have previously shown a beneficial effect of low-dose interferon alfa in the treatment of 4 patients with classical Kaposi's sarcoma. The present report summarizes the results of low-dose interferon alfa treatment of 10 patients with classical Kaposi's sarcoma.

Ten patients, 56–96 y old were treated: 9 men, 1 woman, 3 of whom had an associated malignancy. Subcutaneous injections of interferon alfa, 2–6 million units, were given 3–6 times a week, for 4–12 months.

In 9 out of the 10 patients, initial response was noted after 3–13 weeks of treatment. This was manifested by a reduction of lesion size and fading of color, leading to a partial resolution. Remission was achieved after 4–6 months, for a duration of 8–45 months. Recurrences were retreated, with additional remissions after only 5–8 weeks. Side effects included fever and fatigue, which were overcome by dose reduction.

There are responders and non-responders. Within 3 months of treatment a response should be noted when such a response is about to occur. The extent of the disease is not a predictive factor, as our 3 patients with widespread lesions and an associated malignancy had a favorable response. There were no indications for age, gender, duration of the disease or previous treatments giving a clue. Whereas in AIDS-related Kaposi's sarcoma patients become refractory to IFN, this was not observed in our patients with classical Kaposi's sarcoma. Moreover, unlike AIDS-related Kaposi's sarcoma, continuous treatment was not needed in classical Kaposi's sarcoma.

2375 Prevalence of actinic keratosis in Japan

K. Naruse, M. Ueda, T. Nagano, T. Suzuki, S. Harada, K. Imaizumi, S. Watanabe, M. Ichihashi. *Kobe University School of Medicine, Kobe, Japan*

Most of the epidemiological studies on skin cancer that have been conducted to date have addressed the incidence in light-skinned Caucasians. To determine the prevalence rate of skin cancer and actinic keratosis (AK) on sun-exposed body sites of Japanese in Japan, we examined the skin of 4736 people during health examinations. The study was undertaken in Kasai City, Japan, which had a population of 52837 in 1992, where participants in a regional health examination were seen by dermatologists. The final diagnosis was made histopathologically. Participants were also interviewed by means of a questionnaire. A total of 36 cases of AK and two of basal cell carcinoma were identified, to give a prevalence of 413.4 per 100,000 for AK. The prevalence among outdoor workers was significantly higher than that of indoor workers. Furthermore, when the participants were classified into three Japanese skin types, the prevalence of AK among people of skin type I, who are sensitive to UV irradiation, was significantly higher than that among people of skin type II and III, who are less sensitive.

2376 Invasive and in situ squamous cell carcinomas probably caused by chronic heat exposure

H. Uhara, Y.-L. Wang, H. Kubo, T. Saida. *Shinshu University School of Medicine, Matsumoto City, Nagano, Japan*

We report five cases of squamous cell carcinoma (SCC) and/or SCC in situ developed on the shins that had been chronically exposed to heat of "KOTATSU", a traditional type leg-warmer generally used in Japan. The patients, 4 females and one male, were elderly Japanese, ranged from 75 to 85 years in age. All the patients had multiple brownish hyperkeratotic lesions, 1 to 20 mm in size. Erosive or crusted nodules were also observed in some cases. Reticular erythematous pigmented lesions of erythema ab igne were detected in 2 of the 5 cases. Histopathologically, keratinocytes in

the lower epidermis showed various degrees of nuclear atypia, suggesting the diagnosis of thermal keratosis or SCC in situ. Frank dermal invasion by atypical keratinocytes was observed in 4 cases. Elastica-van-Gieson stain revealed thickened collagen bundles and diminished elastic fibers in the upper and middle dermis. By contrast, markedly increased elastic fibers were detected in the lower dermis. These changes were compatible to those recognized in damaged skin by chronic irradiation of infrared rays.

In conclusions, chronic exposure of the shins to heat of the traditional leg-warmer used in Japan should be added to the list of causes of cutaneous SCC.

2377 Simultaneous chemotherapy and radiotherapy for cerebral metastases from malignant melanoma

J. Ulrich¹, C. Rosin¹, G. Gademann², K.-H. Kühne¹, H. Gollnick¹.
¹Department of Dermatology & Venereology, University of Magdeburg School of Medicine, Magdeburg, Germany, ²Department of Radiotherapy, University of Magdeburg School of Medicine, Magdeburg, Germany

Rationale: Patients with cerebral metastases from malignant melanoma in the presence of additional extracerebral metastases have a particularly poor prognosis. Hitherto, in cases of primary inoperable disease palliative radiation therapy was usually chosen. Furthermore remissions of cerebral metastases from malignant melanomas under chemotherapy or combined chemo-immunotherapy have rarely been reported. Not until the introduction of the cytostatic fotemustine (being able to cross the blood-brain-barrier) have remissions been demonstrated. In the present paper, we report our clinical results of the combination therapy with fotemustine and irradiation in patients with metastatic melanoma.

Patients and Methods: Since 1993, 9 patients have been treated with the combination therapy. The treatment protocol was as follows: 100 mg/m² fotemustine were given as intravenous infusion once a week for 3 weeks. After an interval of 4 weeks without any treatment, the same infusion was given monthly until the disease eventually progressed. Simultaneously, the patients received either focal irradiation (up to 60 Gy) or a total brain irradiation (up to 39 Gy).

Results: In our 9 patients treated to date, we observed 4 CR, 2 PR, 2 NC, and 1 PD with a mean survival of 24.1 weeks (95% CI 20.9; 27.3) with respect to their brain metastases. There were few side effects, including thrombocytopenia and leukopenia, as well as alopecia, with quite acceptable overall tolerance.

Conclusions: Though limited by the small number of patients treated, the present study suggest a therapeutic synergism of the combined chemo-radiotherapy. This treatment may add a well tolerable option to the armamentarium for the palliative, conservative therapy of cerebral metastases from malignant melanoma.

2378 Adjuvant chemotherapy for malignant melanoma with DTIC

J. Ulrich¹, A.-K. Ulrich¹, C. Garbe², U. Ellwanger², K.-H. Kühne¹, H. Gollnick¹. ¹Department of Dermatology & Venereology, University of Magdeburg School of Medicine, Magdeburg, Germany, ²University of Tübingen School of Medicine, Tübingen, Germany

Rationale: The adjuvant immuno- and chemotherapy for malignant melanoma is still a matter of scientific controversy. Whilst few studies have reported positive effects of such therapy in patients with stage I and II disease, in stages with loco-regional metastases there seems to be an advantage for the patients treated.

Patients and Methods: In this retrospective study, 365 patients with melanoma stages Ia through IIb received an adjuvant therapy with 5 courses of DTIC (200 mg/m²) after surgical removal of the primary tumour plus elective, or therapeutic lymph node dissection. The patients' survival rate was analysed according to Kaplan & Meier. In addition, 323 of the patients were compared with untreated controls from the Central Malignant Melanoma Registry of the German Dermatological Society.

Results: The mean follow-up of the patients was 5 years. The median survival (95% Confidence interval) was as follows: 140.8 (131.5–150.1) months for patients with stage Ia and Ib, 148.4 (134.2–162.7) months for patients with stage IIa, 92.0 (49.6–134.4) months for patients with stage IIb disease, 137.0 (0–309.4) months for patients with stage IIIa disease, and 34.0 (0–70.9) months for patients with stage IIIb disease, respectively. Matched pair analysis failed to demonstrate a statistically significant advantage for patients treated with DTIC with respect to both relapse-free interval and overall survival.

Conclusions: The present data suggest that the adjuvant mono-chemotherapy with DTIC does not provide a prognostic advantage for patients with malignant melanoma thus confirming the findings of large randomised trials. In adjuvant situations, therefore, the therapeutic efficacy of interferons as well as cytokines should rather be elucidated.

The 61st Annual Meeting of the East-Japan Dermatological Society
October 4-5, 1997, Matsumoto

第61回日本皮膚科学会東部支部 総会・学術大会

プログラム 抄録集

会期：平成9年10月4日(土)・5日(日)

会場：長野県松本文化会館

〒390-03 長野県松本市水汲69-2

TEL 0263-34-7100

FAX 0263-34-7101

事務局：

信州大学医学部皮膚科学教室

〒390 長野県松本市旭3-1-1

TEL 0263-37-2647

FAX 0263-37-2646



3. 移植ヒト皮膚を用いる *in vivo* 発癌実験

と ひ しょうじろう
土 肥 庄二郎
(信州大、諏訪中央)

王 玉 来、木 庭 幸 子、齋 田 俊 明
(信州大)

瀧 澤 好 廣
(長野松代総合)

発癌機構を解明することは、癌の治療や予防に重要な意義を有する。近年、分子生物学的手法が急速に発展し、発癌機構の解明も日進月歩の勢いで進んでいる。しかし、これまでの発癌研究は *in vitro* を対象としたものが多く、*in vivo* の研究はマウスなどの実験動物の組織を用いる研究が主体であった。そのため、実際にヒトの臓器でどのように癌が発生し、進展していくかについて未解明のところが多い。

皮膚は直視下に実験操作を加えることができ、観察も容易であることから発癌研究において恰好の研究対象となり得る。これまでヒト皮膚を実験動物に移植した実験モデルは、ヌードマウスにおいてもヒト皮膚を長期間生着させておくことが不可能であったために、開発が遅れていた。しかし、SCID マウスの発見により、ヒト皮膚の *in vivo* 実験モデル作製の可能性が出てきた。上山らが作出した nude-scid マウスや beige-scid マウスへヒト皮膚を移植すると比較的容易に、しかも一年以上もの長期間にわたり、その3次元構築を保持したままに生着させ続けることが可能となった。

我々は、これらの SCID 系マウスを利用してヒト皮膚 *in vivo* 実験モデルを作成し、発癌に関するいくつかの研究を行ってきた。ヒト前癌病変皮膚の移植実験では、ケラチノサイト系腫瘍の前癌症 (Bowen 病や日光角化症など) と非ケラチノサイト系腫瘍の carcinoma *in situ* 病変 (乳房外 Paget 病や悪性黒色腫の色素斑部) との間で、植皮片内の腫瘍細胞の生着率に明らかな差異がみられた。また、beige-scid マウスへ移植した Bowen 病の1検体で SCC への進展が確認された。移植ヒト皮膚への化学発癌剤の塗布および中波長紫外線照射による発癌実験では、一部の前癌病変移植片などにおいて発癌の進展をうかがわせる所見が認められた。

日本財団補助金による

1997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 -

10年3月2日

財団法人 日中医学協会

理事長 中島章殿

I. 研究者氏名 邵青
研究機関 鹿児島大学医学部 研究指導者 丸山征郎 職名 教授
所在地 〒890 鹿児島市桜ヶ丘1丁目35-1 電話 099-275-5437 内線 _____

II. 過去の研究歴

1994.09.10 ~ 1996.09.11 鹿児島大学歯学部 日本学術振興会特別研究員
1996.09.12 ~ 1997.04.01 鹿児島大学医学部 臨床検査医学講座 研究員
1997.04.01 ~ 現在 鹿児島大学医学部 " " 大学院生

III. 過去の研究実績

"Effect of hepatocyte growth factor/scatter factor on lipogenesis" J. Biochem. 1996, Vol 119 pp 840~84
"Identification of human hepatocyte growth factor in human liver carcinoma: an immunohistochemical study" Chinese Journal of Physiological Science 1995, Vol 11, pp 94~96.

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15回 日本骨代謝学会 (見別紙)
Vitamin K & Bone 研究会 (見別紙)

(2) 学会誌等に発表した論文 無・ (雑誌名・論文名)

"Bcl-2 prevent human T-cell leukemia virus type I tax induced apoptosis through inhibition of IκB degradation" is submitting to Journal of Biological Chemistry

V. 今後の研究計画及び希望

ヒトT細胞^に白血病ウイルスタキ7° I Tax の誘導するアポト-シスを更にそのメカニズムを中心に研究して行きたい。特に Two-hybrid を用い Tax binding 蛋白について検討していきたい。

VI. 研 究 報 告 (日本語、又は英語で書いて下さい。4,000字以上で記載して下さい。別紙可)

(別紙)



VII. 指導教官の意見

本教室においては成人T細胞性白血病(ATL)細胞のアポトーシスの分子機構について研究し、成果をあげて現在 J. Biol. Chem 誌に投稿中である。短期間に分子生物学、新手法を次々と導入して大いに実績をあげると同時に、匠の、空をこえて力を尽くす。

研究報告

The research under this scholarship at Clinic and Molecular Medical Lab, Kagoshima University Medical School, will finish soon. Under the guidance of Professor Maruyama, my host researcher, and other teachers, researchers and graduate students in this research lab, I have been doing research successfully and obtained some results, and meanwhile had led a significant and rich life of Japanese style.

My working here is about apoptosis, which (also called programmed cell death) is characteristic of the collapse of the nucleus due to chromatin condensation, the formation of globular apoptotic bodies, increased transglutaminase activity, and genomic DNA fragmentation into oligomers of well-organized chains of from one to more than ten nucleosomes, on different cell lines.

First of all, I did the experiment on the inhibitory effect of thrombin on apoptosis induced by serum deprivation in osteoblast like, ME3T3-E1 cell. I found that serum withdrawal could induce apoptosis in E1 cells after cells confluence. Thrombin can inhibit the apoptosis in this cells. To demonstrate that murine clonal osteoblasts MC3T3-E1 cells in response to serum withdrawal undergo apoptosis by flow cytometry assay, detecting the DNA fragmentation and cell stained with Hoechst 33258. Further analysis of cell cycle show that the progressive decline in the numbers of cells in S and G2/M phases of the cell cycles, with an increase in cells in the resting state of G0. The signal pathway of apoptosis induced by serum withdrawal is involved inhibitory activities of transcription factor AP-1. Curcumin, AP-1 inhibitor, alone can induce apoptosis in this cell species. Also, I demonstrate that thrombin can stimulate the activation of AP-1 and prevent the effect of cell accumulating in G0/G1 phase. These data suggest that thrombin plays not only an important role in blood coagulation cascade through its cleavage of fibrinogen to form fibrin, but also in bone remodeling through proliferation of osteoblast. This data have been shown in Bone Metabolism Meeting and the paper is writing.

Next part of my working is about the "Bcl-2 prevents human T cell leukemia virus type I Tax induced apoptosis through inhibition of I κ B degradation". As we all know that human T-cell leukemia virus I (HTLV-I) is an oncogenic retrovirus etiologically associated with adult T-cell leukemia. The HTLV-I encoded Tax protein is central to initiation of

this virally induced T-cell proliferation. Tax has been shown to serve as a potent transcriptional activator inducing expression not only of genes driven by the HTLV-I long terminal repeat but also of various cellular genes involved in T-cell activation and growth, such as those encoding interleukin-2. Tax appears to act indirectly through cellular pathways including activation of the NF- κ B/Rel family of host transcription factors.

In my experiment, we found that inhibitory effect of Bcl-2 against activation of transcription factor- κ B (NF- κ B) in human T-cell leukemia virus type I Tax expressing rat fibroblasts (Rat-1 cell). The transcriptional factor, NF- κ B in stable tax-transfected Rat-1 lines was activated constitutively, and apoptosis occurred constitutively in stable Tax-transfected Rat-1 lines once cells had become confluent, particularly when stimulated by serum-deprivation. Bcl-2 inhibited the activation of NF- κ B and suppressed cell death in the Tax and Bcl-2 cotransfected cells (Tax/ Bcl-2 cells). Trans-activation of a NF- κ B-dependent chloramphenicol acetyltransferase (CAT) construct showed significant elevation in Tax-expressing cell lines, while CAT activity in Tax/Bcl-2 cotransfected cell lines or the Bcl-2-expressing cell line were significantly decreased. Furthermore, Bcl-2 dose-dependent decreased activation of NF- κ B. We excluded the possibilities that Bcl-2 inhibits the synthesis of I κ B α or phosphorylation of I κ B α and confirmed inhibition by Bcl-2 of I κ B α degradation by immunoprecipitation with antibody against I κ B α /MAD3. Immunohistochemistry shown that NF- κ B was detected only in cytoplasm on Bcl-2 expressing and Bcl-2/Tax-co-expression cells. These results suggest that Tax-induced apoptosis requires activation of NF- κ B and that Bcl-2 can suppress activation of NF- κ B by preventing proteolytic degradation of I κ B α .

During the one year of research, I have chances to attend the conference under the support of the scholarship and got the academic exchange with other researcher from other universities.

Japan is Chinese neighbor sharing a long history and culture. This is especially favorable for a Chinese to understand and get to used to Japan society. After the War, Japan has taken in a lot from the western countries, thus forming its own unique culture. I had opportunities to experience and enjoy this culture through miscellaneous activities during

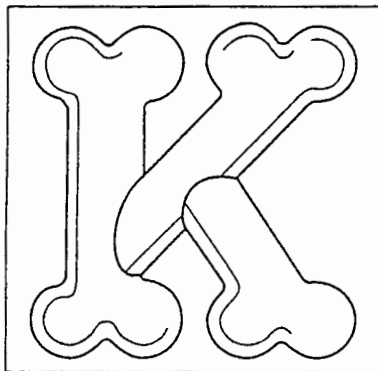
my stay in Japan, such as homestead and various festivals. Additionally the highly developed material life and civilized manners and diligent working attitude in Japan society have impressed me favorably and deeply.

It was really a good chance and significant experience for me to have undertaken scientific research in a surrounding with a reasonable academic system, advanced facilities, hard working researchers. I hope to have such a chance again. The term of scholarship was limited, but my research work which needs many and long experiments will be continued. I will do my best to contribute my bit not only for scientific research work but also for promoting academic exchange between China and Japan.

第2回

VitaminK & Bone研究会

抄録集



日 時

平成10年2月14日(土) 13:00~17:00

会 場

日本海運倶楽部 2 F 国際会議場

VitaminK & Bone研究会
主催 エーザイ株式会社

ビタミンK₂の細胞分化作用と 骨芽細胞における転写因子活性化作用の検討

鹿児島大学医学部臨床検査医学

○北島 勲先生 高崎育子先生 ~~Shao-Qing~~先生 丸山征郎先生

(○は口演者)

【目的】

ビタミンK₂の作用機序として、骨芽細胞に直接作用しオステオカルシンのGla化促進作用や分化誘導作用が知られている。本研究の目的は、ビタミンK₂が細胞増殖、分化にどのような影響を及ぼすのか、またビタミンK₂のシグナル伝達、とくに転写因子活性化作用について検討し、新たなビタミンK₂の薬理作用を明らかにすることである。

【方法】

マウス骨芽細胞様細胞MC3T3-E1、ヒト由来骨芽細胞SaM、ヒト急性前骨髄性白血病細胞HL60にビタミンK₂、1 α ,25(OH)₂ vitamin D₃、Retinoic Acidを投与し細胞分化を検討した。転写因子活性化は、刺激前後の細胞から核蛋白を抽出し、転写因子(NF- κ B, CREB, AP1, AP2, OCT1, GRE)に対するプローブを用い、Electrophoretic mobility gel shift assay(EMSA)にて検討した。NF- κ Bの活性化に関しては、その核内移行をp65に対する抗体を用い免疫組織化学的に検討した。またc-fos, IL-6 mRNA発現をRT-PCR法で検討した。

【結果】

HL60細胞は、1 α ,25(OH)₂D₃刺激で単球へ、Retinoic Acid刺激で顆粒球へ分化したがビタミンK₂刺激ではCD11b, CD14抗原発現に変化が生じなかった。しかし、NBT還元能においてはビタミンK₂単独でも促進し、1 α ,25(OH)₂D₃、Retinoic acidとsynergicに作用することが認められた。骨芽細胞ではビタミンK₂刺激によりコンフルエントに達してから2週間後にカルシウム沈着が誘導された。骨芽細胞におけるビタミンK₂の転写因子活性化はNF- κ B, AP1の結合活性上昇が認められたが、その活性化率は低く1 α ,25(OH)₂D₃、Retinoic acidの刺激と比較すると30%以下に留まった。またビタミンKは刺激15分でNF- κ Bの活性を上昇させ、NF- κ Bの核内移行を誘導した。その他の転写因子活性化には影響を及ぼさなかった。c-fos mRNA発現は刺激30分後、IL-6 mRNA発現は刺激60分後に一過性に上昇した。

【考察】

今回の検討でビタミンK₂は1 α ,25(OH)₂D₃やRetinoic Acidとは異なる生物作用と細胞内シグナル伝達系が存在する可能性が推定された。ビタミンK₂は1 α ,25(OH)₂D₃、Retinoic Acidが有するような細胞のphenotypeの変化誘導作用は示さなかった。さらにビタミンDの受容体に対する結合能にもビタミンKは影響を与えなかった。しかし既知の転写因子については弱いNF- κ BとAP1活性能を有していることが判明した。とくにNF- κ B活性化は15分で上昇することより、ビタミンK₂はI κ Bのリン酸化とその変性過程に作用する可能性も考えられる。また、骨芽細胞にビタミンK₂を刺激したところIL-6, c-fos mRNA 発現が上昇した。NF- κ BとAP1は初期遺伝子発現やサイトカイン発現に関与し、c-fos, IL-6mRNAの発現上昇、細胞増殖やアポトーシスに関連することが知られている。骨芽細胞におけるその発現調節の意義について現在検討中である。

日本財団補助金による
1997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－

1998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 孫 英傑

研究機関 信州大学大学院医学研究科 研究指導者 森泉哲次 職名 教授
所在地 〒390-0802 長野県松本市旭3-1-1 電話 0263-(35)-4600 内線 5167

II. 過去の研究歴

1991年4月1日から1992年3月31日まで1年間、笹川医学奨学金制度研修生として信州大学医学部第2解剖学講座において研修した。

III. 過去の研究実績

Sun Y-J, Komatsu S, Naito A and Watanabe SY: Fine structure of perikaryal myelin sheaths on statoacoustic ganglion cells in 3-day-old chicks. Tohoku J Exp Med 180: 307-317, 1996

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)

孫 英傑、内藤輝、渡辺真珠：培養鶏胚内耳神経節細胞の核周囲部髄鞘内にみられるミエリン層板の不連続性、不規則性について。第102回日本解剖学会総会、愛知医科大学、1997. 3. 28. (解剖学雑誌 72: 338, 1997)

(2) 学会誌等に発表した論文 無・ (雑誌名・論文名)

Sun Y-J, Naito A and Watanabe SY: perikaryal myelination on cultured chick embryo statoacoustic ganglion cells: An electron microscopic study. Acta Otolaryngol (Stockh) (in press)

V. 今後の研究計画および希望

今後は髄鞘形成に必要なミエリン蛋白質やミエリン接着因子に焦点をあて、髄鞘化の初期メカニズムを追求していきたい。また、分離培養やビデオ撮影などの方法を用いて、髄鞘化におけるシュワン細胞の動態を調べていきたい。

Ⅵ. 研 究 報 告 (日本語、又は英語で書いてください。4,000字以上で記載してください。別紙可)

別紙



Ⅶ. 指導教官の意見

孫 英傑君は日中医学協会からの研究助成を受け、「培養鶏胚内耳神経節における核周囲部髄鞘化のメカニズムについて」のテーマで研究し、その結果を研究報告(別紙)としてまとめることができました。さらに耳鼻咽喉科領域で一流の国際誌であります「Acta Otolaryngologica」に投稿し、受理されました。ひとえに本人の真面目な研究態度によるものと思われます。研究計画に記載されてあります課題のうち、髄鞘化におけるシュワン細胞の動態につきましては、さらなる今後の研究に委ねざるを得ませんでした。髄鞘形成に關与するシュワン細胞数につきましては明確な結論を得ることができました(研究報告参考)。また本研究で、髄鞘形成・髄鞘変性に影響を及ぼす様々な環境因子・薬剤の効果を検定する上でのすぐれた *in vitro* スクリーニング系を提供できたことは髄鞘化のメカニズムの解明を進める上で有効であると思われます。最後に、日中医学協会からの研究助成に厚く御礼申し上げます。

平成10年3月10日

信州大学医学部

解剖学第2講座

教授 森 泉哲次(發)

研究報告

培養鶏胚内耳神経節細胞における核周囲部髄鞘化のメカニズムについて

緒言

脊椎動物の第8脳神経節細胞は細胞体（核周囲部）にも髄鞘を持つ。この髄鞘は双極性の神経節細胞の核周囲部全体を包み、一つの髄節となるよう形作っている。また、この核周囲部髄鞘は、compact (major dense line がみられる) な層板だけで構成される軸索部髄鞘とは異なり、compact と未だシュワン細胞細胞質の残る loose な層板により構成されている。

in vitro における核周囲部髄鞘形成に関する報告は、これまで Shimizu (1965) による培養鶏胚内耳神経節細胞の観察以外なされていない。Shimizu は、孵卵 12-15 日目のまだ髄鞘形成の始まっていないニワトリ胚の第8脳神経節を長期培養したところ、培養4週以降で核周囲部髄鞘がみられるようになったこと、この核周囲部髄鞘は *in vivo* 生後3日目のものと同じ構造を示すことなどを光顕的な観察から報告している。しかし、光顕では loose な髄鞘層板の観察は難しく、後の *in vivo* における光顕と電顕を用いた観察では、光顕で無髄（1層のシュワン細胞細胞質に被われる）と判定された部位の多くは2層以上の loose な層板により包まれていることが明らかとなった。そこで本研究では、培養下の核周囲部髄鞘形成について透過電顕を用いて観察した。

材料と方法

材料は孵卵 13 日目鶏胚を使用した。鶏胚の内耳神経節を実体顕微鏡下で取り出し、コラーゲンを塗布したカバーガラスに乗せ、CO₂ 3%、湿度 100% (36°C) で培養した。培養液は Eagle's MEM 80%、鶏胚抽出液 10%、馬血清 10% の組成のものを用い、週2回交換した。培養 1、2、3、4、5、6 週後に、神経節を 2.5% glutaraldehyde と 1% OsO₄ で各々 30 分固定し、脱水、包埋後、厚さ 0.07-0.1 μm の切片を作製し、透過電顕で観察した。

結果

その結果、培養下では無髄、核周囲部の一部が髄鞘に包まれ残りは無髄の部分的

有髄、全周が髄鞘に包まれた有髄の3種類の神経節細胞が認められた。そこで、培養週数による3種類の神経節細胞（電顕像で核の断面がみられた細胞のみ）の比率の変化を調べた。また培養週数毎に核周囲部髄鞘と軸索部髄鞘の層板の数を数えた。以下は、培養週数ごとに所見を述べる。

1週

155個の神経節細胞を観察したが、全てが無髄であった。軸索も有髄のものはみられなかった。

2週

2層以上のシュワン細胞細胞質により核周囲部の一部が被われた神経節細胞がみられるようになった（本研究ではこのような細胞も部分的有髄に含めた）。神経節細胞170個を観察したところ、無髄は155個（91%）、部分的有髄は15個（9%）であった。

有髄軸索が初めて観察された。髄鞘の層板の数は6から11（ 7.9 ± 1.9 , $n=13$ ）層であった。

3週

有髄神経節細胞および核周囲部髄鞘内にcompactな層板が初めてみられるようになった。しかし、compactな層板により全周を被われた神経節細胞は認められなかった。神経節細胞204個を観察したところ、無髄は162個（80%）、部分的有髄は27個（13%）、有髄は15個（7%）であった。また、有髄神経節細胞の核周囲部髄鞘の層板の数は2から9（ 5.1 ± 1.8 , $n=14$ ）層であった。

軸索髄鞘の層板の数は9から14（ 11.9 ± 1.7 , $n=19$ ）層であった。

4週

全周をcompactな層板に包まれた有髄神経節細胞が初めてみられるようになった。このような有髄神経節細胞の核周囲部髄鞘は、軸索小丘の部位で、末梢神経軸索のparanodeでみられるような髄鞘ポケットを形成して終わっていた。神経節細胞178個を観察したところ、無髄は120個（68%）、部分的有髄は36個（20%）、有髄は22個（12%）であった。有髄神経節細胞の核周囲部髄鞘の層板の数は2から12（ 7.4 ± 3.2 , $n=22$ ）層であった。

軸索髄鞘の層板の数は11から26（ 16.6 ± 3.2 , $n=38$ ）層であった。

5 週

144 個の神経節細胞を観察したところ、88 個 (61%) が無髄、40 個 (28%) が部分的有髄、16 個 (11%) が有髄であった。有髄神経節細胞の核周囲部髄鞘の層板の数は 2 から 15 (8.2 ± 3.9 , $n=10$) 層であった。

軸索髄鞘の層板の数は 13 から 26 (18.4 ± 3.6 , $n=16$) 層であった。

6 週

130 個の神経節細胞を観察したところ、80 個 (62%) が無髄、34 個 (26%) が部分的有髄、16 個 (12%) が有髄となった。有髄神経節細胞の核周囲部髄鞘の層板の数は 2 から 15 (8.6 ± 3.7 , $n=12$) 層であった。

軸索髄鞘の層板の数は 12 から 26 (19.6 ± 4.9 , $n=12$) 層となった。

考 察

in vivo ニワトリ内耳神経節細胞では 13 日胚 (stage39) で軸索に 16-17 日胚 (stage42-43) で核周囲部に compact な層板がみられるようになり、2021 日胚で軸索は 2 から 12 層の compact、核周囲部は 2 から 6 層の compact と loose な層板 (ただし神経節細胞には未だ無髄のものが残っている)、生後 3 日目では軸索は 11 から 29 層の compact、核周囲部は 4 から 17 層の compact と loose な層板に包まれるようになる (無髄のものはなくなる)。また、部分的有髄神経節細胞の報告はないことから、髄鞘は核周囲部全周にわたりほぼ一様に形成されることが推定される。

本研究では、培養下の無髄、部分的有髄、有髄の 3 種類の神経節細胞が示された。無髄および有髄については、*in vivo* でも髄鞘形成開始前と後で認められる。しかし、部分的有髄については *in vivo* では報告されず、培養下独特のものと考えられる。一方、本研究から、培養 4 週以降で 11-12% の細胞が有髄となること、これらの細胞の核周囲部髄鞘は loose と compact な層板から構成され、これらの層板の終末は軸索小丘で髄鞘ポケットを形成していることが示された。これらの所見は、*in vivo* のものと一致しており、培養下でも 10% 以上の細胞に *in vivo* と同じ構造の核周囲部髄鞘が形成されることが明らかとなった。

本研究では、軸索の髄鞘と核周囲部髄鞘の compact な層板はそれぞれ培養 2 週以降と 3 週以降で認められるようになった。また、軸索の髄鞘は compact、核周囲部髄鞘は loose と compact な層板が増加することにより形成された。これらの所見は *in vivo* のものと一致しており、軸索と核周囲部髄鞘は培養下でも *in vivo* と同じ順序・同じ過程で形成されることが分かった。一方、髄鞘層板の数は、軸索では、培

養4週以降で12から26層、核周囲部では培養5週以降で2から15層となり、*in vivo* 生後3日目（軸索：11から29層、髓鞘形成開始から11日目、核周囲部：4から16層、髓鞘形成開始から7-8日目）に相当する数となった。このことは培養下の髓鞘形成は *in vivo* に比べ非常にゆっくりとしたものであることを示している。

ま と め

「培養鶏胚内耳神経節細胞における核周囲部髓鞘化のメカニズムについて」のテーマで研究し、以下の結論を得た。

1. 培養下で無髓、部分的有髓、有髓の3種類の神経節細胞が示された。培養4週以降で11-12%の細胞が有髓となり、これらの細胞の核周囲部髓鞘は軸索小丘で髓鞘ポケットを形成していることが示された。培養下でも10%以上の細胞に *in vivo* と同じ構造の核周囲部髓鞘が形成されることが分かった。
2. 軸索部髓鞘の方が核周囲部髓鞘に比べ髓鞘形成が早期に始まった。また、軸索部髓鞘は compact、核周囲部髓鞘は compact と loose な層板により形成されていた。一方、層板の数は各々軸索部髓鞘では培養4週で、核周囲部髓鞘は5週で *in vivo* 生後3日目に相当する数となった。
3. 培養下における内耳神経節細胞の核周囲部髓鞘形成を電顕で詳細に観察し、
(a) 1個のシュワン細胞直下に loose と compact の層板からなる明瞭な髓鞘が形成される、
(b) しかし1個のシュワン細胞だけで核周囲部の全周に髓鞘が形成されることはない、
(c) 逆に核周囲部の全周に髓鞘が形成される場合、1個の神経節細胞のまわりに必ず複数のシュワン細胞が認められるなどの実験結果が得られた。1個のシュワン細胞でも髓鞘形成はおこるが、核周囲部の全周にわたり髓鞘形成がおこるためには、複数のシュワン細胞の関与が不可欠であると結論された。

以上の研究内容は「Acta Otolaryngologica」に受理され、現在印刷中である。

日本財団補助金による
1997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 —

1998 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 孫 英傑

研究機関 信州大学大学院医学研究科 研究指導者 森泉哲次 職名 教授

所在地 〒390-0802 長野県松本市旭 3-1-1 電話 0263-(35)-4600 内線 5167

II. 過去の研究歴

1991年4月1日から1992年3月31日まで1年間、笹川医学奨学金制度研修生として信州大学医学部第2解剖学講座において研修した。

III. 過去の研究実績

Sun Y-J, Komatsu S, Naito A and Watanabe SY: Fine structure of perikaryal myelin sheaths on statoacoustic ganglion cells in 3-day-old chicks. Tohoku J Exp Med 180: 307~317, 1996

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)

孫 英傑、内藤輝、渡辺真珠：培養鶏胚内耳神経節細胞の核周囲部髄鞘内にみられるミエリン層板の不連続性、不規則性について。第102回日本解剖学会総会、愛知医科大学、1997. 3. 28. (解剖学雑誌 72: 338, 1997)

(2) 学会誌等に発表した論文 無・ (雑誌名・論文名)

Sun Y-J, Naito A and Watanabe SY: perikaryal myelination on cultured chick embryo statoacoustic ganglion cells: An electron microscopic study. Acta Otolaryngol (Stockh) (in press)

V. 今後の研究計画および希望

今後は髄鞘形成に必要なミエリン蛋白質やミエリン接着因子に焦点をあて、髄鞘化の初期メカニズムを追求していきたい。また、分離培養やビデオ撮影などの方法を用いて、髄鞘化におけるシュワン細胞の動態を調べていきたい。

Ⅵ. 研 究 報 告 (日本語、又は英語で書いてください。4,000字以上で記載してください。別紙可)

別紙



Ⅶ. 指導教官の意見

孫 英傑君は日中医学協会からの研究助成を受け、「培養鶏胚内耳神経節における核周囲部髄鞘化のメカニズムについて」のテーマで研究し、その結果を研究報告(別紙)としてまとめることができました。さらに耳鼻咽喉科領域で一流の国際誌であります「Acta Otolaryngologica」に投稿し、受理されました。ひとえに本人の真面目な研究態度によるものと思われます。研究計画に記載されてあります課題のうち、髄鞘化におけるシュワン細胞の動態につきましては、さらなる今後の研究に委ねざるを得ませんでした。髄鞘形成に關与するシュワン細胞数につきましては明確な結論を得ることができました(研究報告参考)。また本研究で、髄鞘形成・髄鞘変性に影響を及ぼす様々な環境因子・薬剤の効果を検定する上でのすぐれた *in vitro* スクリーニング系を提供できたことは髄鞘化のメカニズムの解明を進める上で有効であると思われます。最後に、日中医学協会からの研究助成に厚く御礼申し上げます。

平成10年3月10日

信州大学医学部
解剖学第2講座

教授 森 泉 哲 次 (森)

研究報告

培養鶏胚内耳神経節細胞における核周囲部髄鞘化のメカニズムについて

緒言

脊椎動物の第8脳神経節細胞は細胞体（核周囲部）にも髄鞘を持つ。この髄鞘は双極性の神経節細胞の核周囲部全体を包み、一つの髄節となるよう形作っている。また、この核周囲部髄鞘は、compact（major dense lineがみられる）な層板だけで構成される軸索部髄鞘とは異なり、compactと未だシュワン細胞細胞質の残る looseな層板により構成されている。

*in vitro*における核周囲部髄鞘形成に関する報告は、これまで Shimizu (1965) による培養鶏胚内耳神経節細胞の観察以外なされていない。Shimizu は、孵卵 12-15 日目のまだ髄鞘形成の始まっていないニワトリ胚の第8脳神経節を長期培養したところ、培養4週以降で核周囲部髄鞘がみられるようになったこと、この核周囲部髄鞘は *in vivo* 生後3日目のものと同じ構造を示すことなどを光顕的な観察から報告している。しかし、光顕では looseな髄鞘層板の観察は難しく、後の *in vivo* における光顕と電顕を用いた観察では、光顕で無髄（1層のシュワン細胞細胞質に被われる）と判定された部位の多くは2層以上の looseな層板により包まれていることが明らかとなった。そこで本研究では、培養下の核周囲部髄鞘形成について透過電顕を用いて観察した。

材料と方法

材料は孵卵 13 日目鶏胚を使用した。鶏胚の内耳神経節を実体顕微鏡下で取り出し、コラーゲンを塗布したカバーガラスに乗せ、CO₂ 3%、湿度 100% (36°C) で培養した。培養液は Eagle's MEM 80%、鶏胚抽出液 10%、馬血清 10%の組成のものを用い、週2回交換した。培養 1、2、3、4、5、6 週後に、神経節を 2.5% glutaraldehyde と 1% OsO₄ で各々 30 分固定し、脱水、包埋後、厚さ 0.07-0.1 μ m の切片を作製し、透過電顕で観察した。

結果

その結果、培養下では無髄、核周囲部の一部が髄鞘に包まれ残りは無髄の部分的

有髄、全周が髄鞘に包まれた有髄の3種類の神経節細胞が認められた。そこで、培養週数による3種類の神経節細胞（電顕像で核の断面がみられた細胞のみ）の比率の変化を調べた。また培養週数毎に核周囲部髄鞘と軸索部髄鞘の層板の数を数えた。以下は、培養週数ごとに所見を述べる。

1週

155個の神経節細胞を観察したが、全てが無髄であった。軸索も有髄のものはみられなかった。

2週

2層以上のシュワン細胞細胞質により核周囲部の一部が被われた神経節細胞がみられるようになった（本研究ではこのような細胞も部分的有髄に含めた）。神経節細胞170個を観察したところ、無髄は155個（91%）、部分的有髄は15個（9%）であった。

有髄軸索が初めて観察された。髄鞘の層板の数は6から11（ 7.9 ± 1.9 , $n=13$ ）層であった。

3週

有髄神経節細胞および核周囲部髄鞘内にcompactな層板が初めてみられるようになった。しかし、compactな層板により全周を被われた神経節細胞は認められなかった。神経節細胞204個を観察したところ、無髄は162個（80%）、部分的有髄は27個（13%）、有髄は15個（7%）であった。また、有髄神経節細胞の核周囲部髄鞘の層板の数は2から9（ 5.1 ± 1.8 , $n=14$ ）層であった。

軸索髄鞘の層板の数は9から14（ 11.9 ± 1.7 , $n=19$ ）層であった。

4週

全周をcompactな層板に包まれた有髄神経節細胞が初めてみられるようになった。このような有髄神経節細胞の核周囲部髄鞘は、軸索小丘の部位で、末梢神経軸索のparanodeでみられるような髄鞘ポケットを形成して終わっていた。神経節細胞178個を観察したところ、無髄は120個（68%）、部分的有髄は36個（20%）、有髄は22個（12%）であった。有髄神経節細胞の核周囲部髄鞘の層板の数は2から12（ 7.4 ± 3.2 , $n=22$ ）層であった。

軸索髄鞘の層板の数は11から26（ 16.6 ± 3.2 , $n=38$ ）層であった。

5週

144個の神経節細胞を観察したところ、88個(61%)が無髓、40個(28%)が部分的有髓、16個(11%)が有髓であった。有髓神経節細胞の核周囲部髓鞘の層板の数は2から15(8.2 ± 3.9 , $n=10$)層であった。

軸索髓鞘の層板の数は13から26(18.4 ± 3.6 , $n=16$)層であった。

6週

130個の神経節細胞を観察したところ、80個(62%)が無髓、34個(26%)が部分的有髓、16個(12%)が有髓となった。有髓神経節細胞の核周囲部髓鞘の層板の数は2から15(8.6 ± 3.7 , $n=12$)層であった。

軸索髓鞘の層板の数は12から26(19.6 ± 4.9 , $n=12$)層となった。

考 察

in vivo ニワトリ内耳神経節細胞では13日胚(stage39)で軸索に16-17日胚(stage42-43)で核周囲部にcompactな層板がみられるようになり、2021日胚で軸索は2から12層のcompact、核周囲部は2から6層のcompactとlooseな層板(ただし神経節細胞には未だ無髓のものが残っている)、生後3日目では軸索は11から29層のcompact、核周囲部は4から17層のcompactとlooseな層板に包まれるようになる(無髓のものはなくなる)。また、部分的有髓神経節細胞の報告はないことから、髓鞘は核周囲部全周にわたりほぼ一様に形成されることが推定される。

本研究では、培養下の無髓、部分的有髓、有髓の3種類の神経節細胞が示された。無髓および有髓については、*in vivo*でも髓鞘形成開始前と後で認められる。しかし、部分的有髓については*in vivo*では報告されず、培養下独特のものと考えられる。一方、本研究から、培養4週以降で11-12%の細胞が有髓となること、これらの細胞の核周囲部髓鞘はlooseとcompactな層板から構成され、これらの層板の終末は軸索小丘で髓鞘ポケットを形成していることが示された。これらの所見は、*in vivo*のものと同じであり、培養下でも10%以上の細胞に*in vivo*と同じ構造の核周囲部髓鞘が形成されることが明らかとなった。

本研究では、軸索の髓鞘と核周囲部髓鞘のcompactな層板はそれぞれ培養2週以降と3週以降で認められるようになった。また、軸索の髓鞘はcompact、核周囲部髓鞘はlooseとcompactな層板が増加することにより形成された。これらの所見は*in vivo*のものと同じであり、軸索と核周囲部髓鞘は培養下でも*in vivo*と同じ順序・同じ過程で形成されることが分かった。一方、髓鞘層板の数は、軸索では、培

養4週以降で12から26層、核周囲部では培養5週以降で2から15層となり、*in vivo* 生後3日目（軸索：11から29層、髓鞘形成開始から11日目、核周囲部：4から16層、髓鞘形成開始から7-8日目）に相当する数となった。このことは培養下の髓鞘形成は *in vivo* に比べ非常にゆっくりとしたものであることを示している。

ま と め

「培養鶏胚内耳神経節細胞における核周囲部髓鞘化のメカニズムについて」のテーマで研究し、以下の結論を得た。

1. 培養下で無髓、部分的有髓、有髓の3種類の神経節細胞が示された。培養4週以降で11-12%の細胞が有髓となり、これらの細胞の核周囲部髓鞘は軸索小丘で髓鞘ポケットを形成していることが示された。培養下でも10%以上の細胞に *in vivo* と同じ構造の核周囲部髓鞘が形成されることが分かった。
2. 軸索部髓鞘の方が核周囲部髓鞘に比べ髓鞘形成が早期に始まった。また、軸索部髓鞘は compact、核周囲部髓鞘は compact と loose な層板により形成されていた。一方、層板の数は各々軸索部髓鞘では培養4週で、核周囲部髓鞘は5週で *in vivo* 生後3日目に相当する数となった。
3. 培養下における内耳神経節細胞の核周囲部髓鞘形成を電顕で詳細に観察し、
(a) 1個のシュワン細胞直下に loose と compact の層板からなる明瞭な髓鞘が形成される、
(b) しかし1個のシュワン細胞だけで核周囲部の全周に髓鞘が形成されることはない、
(c) 逆に核周囲部の全周に髓鞘が形成される場合、1個の神経節細胞のまわりに必ず複数のシュワン細胞が認められるなどの実験結果が得られた。1個のシュワン細胞でも髓鞘形成はおこるが、核周囲部の全周にわたり髓鞘形成がおこるためには、複数のシュワン細胞の関与が不可欠であると結論された。

以上の研究内容は「Acta Otolaryngologica」に受理され、現在印刷中である。

日本財団補助金による

1997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—

98年3月24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 航

研究機関 京都府立医科大学薬理学教室 研究指導者 矢部 千尋 職名 教授
所在地 〒602 京都市上京区河原町通広小路上ル梶井町465 電話 075-251-5332 内線 5333

II. 過去の研究歴

1992.4—1996.3 名古屋大学医学研究科 大学院 卒業

1996.4—1997.3 国立小児病院小児医療研究センター HS研究員

III. 過去の研究実績

1). Hang Li, et al. "Intranuclear localization of a multifunctional protein, collagenase inhibitor in proliferating human fibroblasts in culture" Acta Anat Nippon. Vol.69, No.4, 508.1994.

2). Hang Li, et al. "Cell cycle-dependent localization of tissue inhibitor of metalloproteinases-1 immunoreactivity in cultured human gingival fibroblasts" Nagoya Journal of Medical Science. Vol.58, No.3, 1995.

3) Hang Li "Depletion of Gelatinolytic Activity in Dental Pulp in Response to the Administration of Lead in Mice" Aichi-Gakuin Dent Sci. No.9, 1-4.1996.

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71回日本薬理学会年会

Characterization of the genomic regions regulating expression of mouse aldose reductase gene.

第41回日本糖尿病学会年会

マウスアルドース還元酵素の遺伝子構造と遺伝子発現調節領域の解析 (予定)

(2) 学会誌等に発表した論文 無 ・ (有) (雑誌名・論文名)

THE JAPANESE JOURNAL OF PHARMACOLOGY Vol.76 supplement 46P 1998

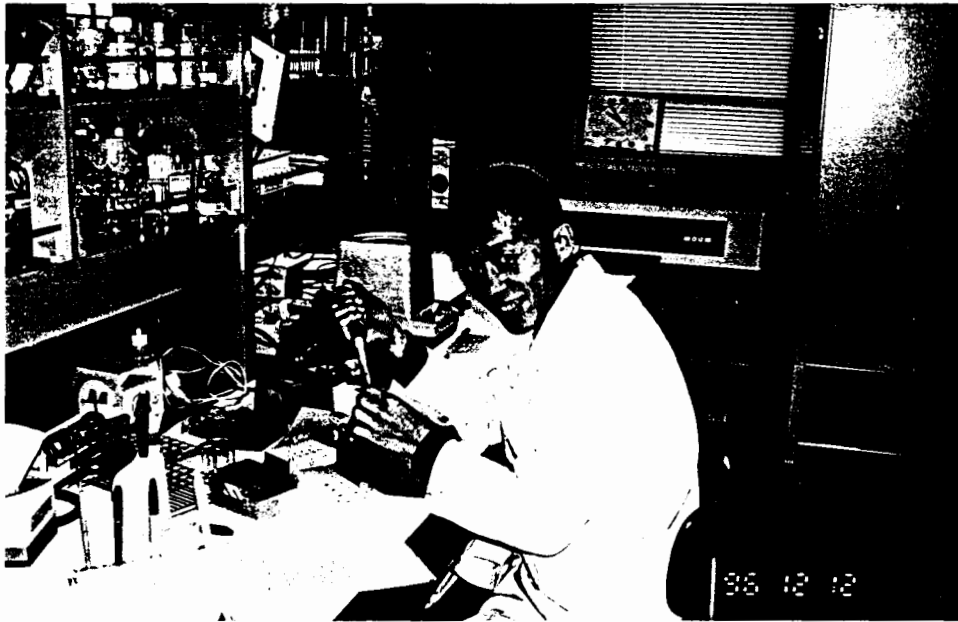
Characterization of the genomic regions regulating expression of mouse aldose reductase gene.

V. 今後の研究計画及び希望

なるべく早くこの研究テーマ(マウスアルドース還元酵素の遺伝子構造と遺伝子発現調節領域の解析)を完成する。

VI. 研 究 報 告 (日本語、又は英語で書いて下さい。4,000字以上で記載して下さい。別紙可)

別紙



VII. 指導教官の意見

李博士は貴財団の助成のもとに15 Kb にわたるマウス Aldose Reductase 遺伝子の構造と遺伝子上流領域の塩基配列を決定し、さらに最新の分子生物学的・細胞生物的手法を用いて本酵素の発現調節領域の解析に着手することが出来ました。

彼は次々と新しい実験技術を習得し、きわめて勤勉に実験を進め、今年度の教室の研究の発展に大きく貢献してくれました。この1年間、貴財団からの助成を受けて李博士が研究に専念できたことを指導教官として深く感謝している次第です。

矢部 千尋

マウスアルドース還元酵素の遺伝子構造と遺伝子発現調節領域の解析

アルドース還元酵素は NADPH を補酵素とするアルド・ケト還元酵素の一員であり、グルコースをソルビトールに変換する酵素である。この酵素はソルビトールをフルクトースに変換するソルビトール脱水素酵素とともにグルコース代謝の副経路であるポリオールを形成している。

糖尿病合併症の発症に関わるアルドース還元酵素は、高浸透圧負荷により遺伝子上流領域に位置する osmotic response element を介して発現上昇をきたし、腎髄質の浸透圧調節物質の一つであるソルビトールを産生すると考えられている。しかし腎以外の組織における Aldose Reductase の生理的意義は未だ明らかではなく、長期の Aldose Reductase 阻害剤投与による副作用は予測出来ない。そこで我々は遺伝子改変マウスを用いて本酵素の生理的役割の全貌を解明するべく、今回はマウスアルドースリダクターゼの遺伝子構造とその生理的条件下での発現調節領域について解析を進めた。

まず Mouse Aldose Reductase の cDNA を probe としてラムダファージマウスゲノムライブラリーをスクリーニングし、3個のオーバーラップしたクローンを得た。制限酵素地図並びにエクソン-イントロン構造とその接合部の塩基配列を決定した。続いて Aldose Reductase の遺伝子上流領域約 3.4 kb をルシフェラーゼレポータープラスミドに挿入し、プロモーター領域の serial deletion mutant を作製すると同時に遺伝子上流領域の塩基配列を決定した。これらのキメラプラスミドを NIH3T3、CV1、CHO の各細胞株にリン酸カルシウム法にて遺伝子導入後、ルシフェラーゼ活性を測定することにより転写活性に重要な領域を同定した。

Aldose Reductase の発現量はマウスの各組織間において、また各種の培養細胞株において大きく異なることがわかった。即ち Aldose Reductase はほとんどすべての組織(座骨神経、網膜、水晶体、卵巣、睾丸輸精管、脳、腎臓、肝、骨格筋)に発現していたが、その発現量は各組織において大きく異なっていた。また異なった組織由来の培養細胞株 NIH3T3, Y1, NG108, L6, CHO, Hela, MG63, NEC8, CV1) での発現量にも大きな違いがあることがわかった。Mouse Aldose Reductase 遺伝子は全長約 15 Kb で、10コの Exon よりなり、Exon 1 と Exon 2 の間は約 4.3 Kb であったが、Exon 2 から Exon 8 までは 3.6 Kb の間に局在していた。また Mouse Aldose Reductase プロモーターは、TATA box と二つの CCAAT box を持つことが確認され、上流約 1.1Kb に Osmotic Response Element と呼ばれる領域と AP1 結合コンセンサス配列があった。

トランスフェクションアッセイの結果、NIH3T3 細胞において転写活性が大きく変わる二つの領域を認めた。一つは上流約 -1.1 kb から -0.85 Kb の領域で、この領域には、これまでに報告された TonE という Osmotic Response Element が存在し、もう一つは -0.6 Kb から -0.24 Kb の領域で、この領域をけずることにより転写活性は 2.0 倍低下することが分

かった。一方 CHO 細胞においては、-0.6 Kb から-0.24 Kb の領域を除くと NIH3T3 細胞同様に、転写活性は 3.5 倍低下したが、-1.1 kb から -0.85 Kb の領域をけずってもプロモーター活性に大きな違いは認められなかった。

本年度得られた結果をまとめると、

1. Mouse Aldose Reductase 遺伝子は全長約 15 Kb の大きさに、10コの Exon よりなる。
2. Mouse Aldose Reductase の発現量は各組織間において、また各種の培養細胞間において大きく異なる。
3. Mouse Aldose Reductase のプロモーター領域には TATA box と二つの CCAAT box が存在し、Aldose Reductase プロモーター活性は転写開始点より上流約 1.1 kb を含むフラグメントでほぼ最大活性を示す。
4. NIH3T3 細胞において転写活性が大きく変わる二つの領域がある。一つは上流約 -1.1 kb から -0.85 Kb の領域で、この領域には、Aldose Reductase 発現の浸透圧調節にかかわる Osmotic Response Element が存在する。もう一つは -0.6 Kb から -0.24 Kb の領域で、この領域をけずることにより転写活性は 2.0 倍低下する。
5. CHO 細胞においては、-0.6 Kb から -0.24 Kb の領域を除くと NIH3T3 細胞同様に、転写活性は 3.5 倍低下するが、-1.1 kb から -0.85 Kb の領域をけずってもプロモーター活性に大きな違いは認められない。-1.1 kb から -0.85 Kb の領域が、各組織あるいは培養細胞間における Aldose Reductase の発現量の違いにどのような役割を果たしているかについて、今後更に検討する予定である。

以上、貴財団の奨学金により私の研究を一年間ご援助頂きまして、心より感謝致します。

日本財団補助金による

1997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 -

10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 郭 徽
 研究機関 大阪大学医学部形態機能学 研究指導者 遠山正彌 職名 教授
 所在地 565 大阪府吹田市山田丘2-2 電話 06-879-3221 内線 _____

II. 過去の研究歴
肝線維症と関係する遺伝子の解析
C型肝炎に関する母子感染及び治療診断

III. 過去の研究実績
肝線維症で遺伝子発現の上昇するものとして転写因子と翻訳調節因子の両者からクローニングされたものを解析して Grb1R と TAF112 を解析してやる。

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 日本神経科学学会 赤松第一ラット胎期におけるミオサイト-ルトランスポーターの遺伝子発現
 ② 日本解剖学会 口演: ラット結腸におけるミオサイト-ルトランスポーター (SM2P) の高浸透圧負荷による発現変化。 ③ 口演: 浸透圧応答性の新規 RNA helicase の cDNA の単離と高浸透圧

(2) 学会誌等に発表した論文 無 (有) (雑誌名・論文名) 発荷時の発現調節機構の解析
MOLECULAR BRAIN RESEARCH
Developmental regulation of Na⁺/myo-inositol cotransporter gene expression

V. 今後の研究計画及び希望
新規 RNA helicase の機能解析を継続して研究 (cDNA) と関係する。

VI. 研 究 報 告 (日本語、又は英語で書いて下さい。 4,000字以上で記載して下さい。別紙可)

別紙



VII. 指導教官の意見

郭薇氏は短期間で留学生という言語や生活体系の違いも克服し、多くの難しい実験手法を習得し、さらに自主的な考えで研究を発展させ、それらの研究成果を、国際誌や学会を通して発表し、教室に多大な貢献をしてくれました。現在も我々の研究室の主要な研究プロジェクトの中心人物として研究を引っ張っております。申請者の研究に対する厳しい姿勢と最後までやり抜く態度には、常々感心しております。また一方では、性格は温厚で明るく、素直で、後輩の面倒見も良く、研究室の皆に慕われております。

袁山正彌 (印)

論文:

1. **Guo, W.**, Shimada, S., Tajiri, H., Yamauchi, A., Yamashita, T., Okada, S., Tohyama, M. Developmental regulation of Na⁺/myo-inositol cotransporter gene expression
Mol Brain Res 51(1997) 91-96
2. Yamashita, T., Shimada, S., Yamaguchi, A., **Guo, W.**, Kohmura, E., Hayakawa, T., and Tohyama, M. Induction of Na⁺/myo-inositol cotransporter mRNA after rat cryogenic injury.
Mol Brain Res 56(1997) 128-134
3. Yamashita, T., Shimada, S., **Guo, W.**, Kohmura, E., Hayakawa, T., Takagi, T. and Tohyama, M. Cloning and functional expression of a brain peptide/histidine transporter.
J Biol Chem 272, 10205-10211, 1997.
4. Tada, K., Tajiri, H., Kozaiwa, K., Sawada, A., **Guo, W.**, and Okada, S. Role of screen for hepatitis C virus in children with malignant disease and who undergo bone marrow transplantation
Transfusion Volume 37, June 1997.
5. Etani, Y., **Guo, W.**, Tajiri, H., Okada, S., Shimada, S., Tohyama, M. Analysis of glucose transporter gene in a case of fructose malabsorption with chronic Diarrhea
Digestion & Absorption 1995, 18, 40-4(Japanese)
6. Tada, K., Tajiri, H., Sawada, A., **Guo, W.**, Etani, Y., Kozaiwa, K., Ozaki, Y., Okada, S. HCV Infection in Children with Primary Malignant Diseases
The Journal of the Japan Pediatric Society (Japanese)
7. **Guo, W.**, Shimada, S., Mushiage, S., Tajiri, H., Yamauchi, A., Yamashita, T., Okada, S., Tohyama, M.
Differential localization and induction of Na⁺/myo-inositol cotransporter mRNA in the large intestine.
投稿中
8. **Guo, W.**, Shimada, S., Yamashita, T., Yamauchi, A., Okada, S., Tohyama, M.
Purification and Characterization of a new member of DEAD box of RNA helicase
投稿中

研究報告書

私は小児の消化器系の疾患に興味を持ち、最初に、肝線維症で同一患者の正常な肝組織と線維症の起こっている肝組織の間で differential display 法を用いることにより、プロトオンコジーンのRETと結合するGrb10と、RNA結合蛋白であるiron-responsive element-binding protein (IRE-BP)が肝線維症で遺伝子発現が上昇していることを明らかにした。肝線維症で遺伝子発現の上昇するものとして転写調節因子と翻訳調節因子の両者がクローニングされたのは興味深い。この二つの遺伝子については症例を増やし、肝線維症との関係を検討中である。このようなヒトの剖検組織を用いた疾患関連遺伝子の検索を進める一方、基礎的な研究として、消化管での浸透圧変化に対する細胞保護機構を解析している。グリセロール注腸動物や脱水モデル動物を用いて、大腸の吸収上皮細胞や杯細胞でミオイノシトールトランスポーターのmRNAが管腔内の浸透圧が上昇した際や、血清浸透圧が上昇した際に顕著に上昇することを明らかにし、大腸の上皮細胞が細胞外の浸透圧変化から細胞を保護するためにミオイノシトールの取り込みを増加させていることを示した。さらに、ミオイノシトールトランスポーターの発達段階での遺伝子発現及び蛋白発現の変化を解析し、中枢神経系で胎生期に一過性の非常に強い発現が神経系に認められることを明かとした。最近、Differential Display法により浸透圧調整に関係する新規のRNAhelicaseのcDNAを単離して、現在その機能解析を行っています。

消化管は管腔内に様々な摂取物、水分、分泌液が存在し、これらの濃度や量が吸収や分泌によって複雑に調整されている。このことは消化管上皮が絶えず浸透圧の変化に曝されていることを意味する。さらに大腸上皮では浸透圧勾配を利用し、水分の吸収を行うために、この部位の細胞には極端に高い浸透圧負荷が、常時かかっている。またこれらの浸透圧変化及び調節に異常を来すと下痢等の様々な消化器症状を来す。細胞外の浸透圧変化は細胞内の体積や電解質組成に、大きな影響を与えるため、浸透圧変化から細胞を保護する機構が存在すると考えられる。このような浸透圧変化からの細胞保護機構の研究は主に腎臓で行われてきた。浸透圧物質（オスモライト）のトラ

ンスポーターは細胞外の高浸透圧に対抗して、オスモライトを細胞内に蓄積することによって、細胞内外の浸透圧バランスを保つという有効浸透圧作用と、同時に細胞内の蛋白質や核酸の高次構造が高浸透圧により変化するのを防ぐ細胞機能保護作用を示すと考えられている。私どものグループはオスモライトトランスポーターの発現調節について、多くの解析を進めてきた。しかし、浸透圧の変化する刺激からオスモライトトランスポーターの発現誘導までの経路はほとんど明らかにされていない。そこで本研究では大腸上皮由来のCaco-2細胞を用いて、Differential Display法によって、浸透圧負荷時に必要となる新規の遺伝子を解析する。

消化器系において高浸透圧刺激からオスモライトのトランスポーターの遺伝子発現誘導がおこるまでの経路に関与している遺伝子を検討するため、CACO-2培養細胞を、高張、等張、低張の培養液下で、培養しmRNA抽出後、differential display法を用いて浸透圧負荷時に新たに発現する遺伝子を同定する。これらのin vitro系を用いてdifferential display法で得られた浸透圧応答候補遺伝子を、ノーザンプロット解析により実際にCACO-2培養細胞で浸透圧負荷時に、発現誘導がかかるかどうかスクリーニングする。浸透圧負荷時に発現が上昇する遺伝子については、蛍光プライマー法を用いて塩基配列を決定する。その中で新規遺伝子についてはそのcDNAの全長を獲得するために、高浸透圧下で培養したCACO-2細胞から、cDNAライブラリーを作製し、スクリーニングする。このスクリーニングでも全長が得られない場合は、5'や3'race法を用いてcDNAを延長する。

これらの浸透圧応答遺伝子は、その相同性から機能が推測できるものに関しては、cDNAを適切な発現ベクターに組み替えて、HEK細胞発現系やアフリカツメガエル卵母細胞発現系を用いて適切な解析を行い、浸透圧変化時におけるこの遺伝子の役割を検討する。また大腸菌の発現系を用いて、浸透圧応答遺伝子の蛋白を単離し、抗体を作製し、結合蛋白を作製しました。

これらの機能解析により浸透圧応答遺伝子の特性を明らかにするとともに、in

vivoでの浸透圧負荷モデル、虚血、浮腫等の動物モデルを用いてその発現調節を解析する。さらにCACO-2細胞を用いて、antisense法により、浸透圧負荷時にこれらの浸透圧遺伝子の発現が抑制されると°Cのような細胞傷害が起こるか検討する。

最近、私はこの実験計画をスタートし、Differential Display法の系から、浸透圧負荷により遺伝子発現が上昇するRNAhelicase遺伝子ファミリーに属する新しい遺伝子を単離しました。現在大腸菌BL21細胞を用いて、融合蛋白を合成し、2本鎖のDNAやRNAのhelicase活性があるかどうか検討中です。

郭 敬

98. 3. 11.

Reprinted from

MOLECULAR BRAIN RESEARCH

Molecular Brain Research 51 (1997) 91–96

Research report

Developmental regulation of Na⁺/*myo*-inositol cotransporter gene expression

Wei Guo ^{a,b,*}, Shoichi Shimada ^b, Hitoshi Tajiri ^a, Atsushi Yamauchi ^c,
Toshihide Yamashita ^{b,d}, Shintaro Okada ^a, Masaya Tohyama ^b

^a Department of Pediatrics, Osaka University School of Medicine, 2-2 Yamadaoka, Suita, Osaka 565, Japan

^b Department of Anatomy and Neuroscience, Osaka University School of Medicine, 2-2 Yamadaoka, Suita, Osaka 565, Japan

^c First Department of Medicine, Osaka University School of Medicine, 2-2 Yamadaoka, Suita, Osaka 565, Japan

^d Department of Neurosurgery, Osaka University School of Medicine, 2-2 Yamadaoka, Suita, Osaka 565, Japan



ELSEVIER

BRAIN RESEARCH

SCOPE AND PURPOSE

MOLECULAR BRAIN RESEARCH is a special section of **Brain Research** which provides a medium for prompt publication of studies on molecular mechanisms of neuronal, synaptic and related processes that underlie the structure and function of the brain. Emphasis is placed on the molecular biology of fundamental neural operations relevant to the integrative of the nervous system.

TYPES OF PAPERS

1. **Interactive Reports** are papers describing original, high quality, fundamental research in any area of Neuroscience. These will first appear electronically on the WWW (<http://www.elsevier.com/locate/bres> or <http://www.elsevier.nl/locate/bres>) and published soon after in the relevant section of *Brain Research*. The on-line version may include additional data sets, 3-D/confocal images, animations, etc., and be linked to relevant on-line databases. Comments from readers may be appended later in a linked *Discussion Forum* at the discretion of an appointed Moderator.
2. **Research Reports** reporting results of original fundamental research in any branch in the brain sciences. It is expected that these papers will be published about six months after acceptance.
3. **Short Communications** reporting on research which has progressed to the stage when it is considered that the results should be made known quickly to other workers in the field. The maximum length allowed will be 1500 words or equivalent space in tables and illustrations. It is expected that Short Communications will be published about three months after acceptance.
4. **Protocols:** full-length protocols in any area of Neuroscience, to be published in the journal section *Brain Research Protocols*. Updates on published protocols submitted by the authors thereof, describing new developments which are of sufficient interest to the neuroscience community, but which do not warrant a completely new submission, will be published as **Protocol Updates**. The maximum length allowed will be 1500 words or equivalent space in tables and illustrations. Comments on published Protocols describing useful hints and "tricks" related to any aspect of the Protocol, such as timing, equipment, chemicals, troubleshooting, etc., will be published in the on-line version of the journal as linked **Technical Tips** at the discretion of the Editor.

SUBMISSION OF MANUSCRIPTS

Submission of a paper to *Molecular Brain Research* is understood to imply that it deals with original material not previously published (except in abstract form), and that it is not being considered for publication elsewhere. Manuscripts submitted under multiple authorship are reviewed on the assumption that all listed authors concur with the submission and that a copy of the final manuscript has been approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities in the laboratories where the work was carried out. If accepted, the article shall not be published elsewhere in the same form, in either the same or another language, without the consent of the Editors and Publisher. The Publisher and Editor regret that they are unable to return copies of submitted articles except in the case of rejected articles, where only one set of manuscript plus figures will be returned to the author.

Manuscripts in English should be organised according to the *Brain Research Guidelines for the Submission of Manuscripts* and sent to the appropriate address shown below. Authors should state clearly the section of the journal for which the article/Interactive Report should be considered.

Research Reports & Short Communications:

Professor D.P. Purpura
Brain Research, Office of the Dean
Albert Einstein College of Medicine
Jack and Pearl Resnick Campus
1300 Morris Park Avenue
Bronx, NY 10461, USA
Tel.: (1) (718) 430-2387
Fax: (1) (718) 430-8980
E-mail: brain@acom.yu.edu

Interactive Reports:

Professor F.E. Bloom
Brain Research Interactive
Dept. of Neuropharmacology
The Scripps Research Institute
10666 N. Torrey Pines Road
La Jolla, CA 92037, USA
Fax: (1) (619) 784-8851
E-mail: smart@scripps.edu
Website: <http://smart.scripps.edu>

Protocols & Protocol Updates:

Dr. Floris G. Wouterlood
Department of Anatomy
Faculty of Medicine
Free University
van der Boechorststraat 7
1081 BT Amsterdam
The Netherlands
Fax: (31) (20) 444-8054
E-mail: fg.wouterlood.anat@med.vu.nl

Correspondence regarding accepted manuscripts relating to proofs, publication and reprints should be sent to:

Brain Research, Elsevier Science B.V., P.O. Box 2759, 1000 CT Amsterdam, The Netherlands. Tel. (31) (20) 485-3474; Fax: (31) (20) 485-3271; E-mail: a.prukar@elsevier.nl

EDITORIAL BOARD

Editor-in-Chief: **Dominick P. Purpura** (Bronx, NY, USA)

J. Battey (Bethesda, MD, USA)
I.B. Black (Piscataway, NJ, USA)
F.E. Bloom (La Jolla, CA, USA)
X.O. Breakefield (Charlestown, MA, USA)
A.C. Cuello (Montreal, Que., Canada)
A. Dragunow (Auckland, New Zealand)
P.C. Emson (Cambridge, UK)
S.J. Enna (Kansas City, KS, USA)
L. Fricker (Bronx, NY, USA)
C.S. Goodman (Berkeley, CA, USA)
J.F. Gusella (Boston, MA, USA)
B.S. McEwen (New York, NY, USA)
J.I. Morgan (Nutley, NJ, USA)
R.L. Neve (Belmont, MA, USA)
R. Quirion (Verdun, Que., Canada)

L.F. Reichardt (San Francisco, CA, USA)
H.A. Robertson (Halifax, NS, Canada)
M.G. Rosenfeld (La Jolla, CA, USA)
B. Sakmann (Heidelberg, FRG)
M. Schachner (Zurich, Switzerland)
J.H. Schwartz (New York, NY, USA)
P. Seeburg (Heidelberg, FRG)
P. Seeman (Toronto, Ont., Canada)
S.H. Snyder (Baltimore, MD, USA)
C.F. Stevens (San Diego, CA, USA)
K. Suzuki (Chapel Hill, NC, USA)
L. Terenius (Stockholm, Sweden)
M. Tohyama (Osaka, Japan)
A. Ullrich (Martinsried, FRG)
R.S. Zukin (Bronx, NY, USA)

GUIDELINES FOR THE SUBMISSION OF MANUSCRIPTS

These can be found in the "front matter" of the last issue of each volume of the journal.

The preferred medium for *final* submission is on disk with accompanying manuscript (see "Electronic manuscripts").

Research report

Developmental regulation of Na^+ /*myo*-inositol cotransporter gene expression

Wei Guo^{a,b,*}, Shoichi Shimada^b, Hitoshi Tajiri^a, Atsushi Yamauchi^c,
Toshihide Yamashita^{b,d}, Shintaro Okada^a, Masaya Tohyama^b

^a Department of Pediatrics, Osaka University School of Medicine, 2-2 Yamadaoka, Suita, Osaka 565, Japan

^b Department of Anatomy and Neuroscience, Osaka University School of Medicine, 2-2 Yamadaoka, Suita, Osaka 565, Japan

^c First Department of Medicine, Osaka University School of Medicine, 2-2 Yamadaoka, Suita, Osaka 565, Japan

^d Department of Neurosurgery, Osaka University School of Medicine, 2-2 Yamadaoka, Suita, Osaka 565, Japan

Accepted 17 June 1997

Abstract

myo-Inositol plays a role in many important aspects of cellular regulation including membrane structure, signal transduction and osmoregulation. It is taken up into the cells by the Na^+ /*myo*-inositol cotransporter (SMIT). We investigated developmental changes in the expression of SMIT mRNA and protein in the rat. In the fetal rat brain, SMIT mRNA was abundantly and diffusely expressed throughout the whole brain and the spinal cord. Positive signals were expressed in neuronal and non-neuronal cells in these regions. SMIT is gradually down-regulated nearer birth, but intense signals were still detected in the brain at postnatal day one. In the adult rat brain, very weak hybridization signals were detected throughout whole brain except for the choroid plexus where SMIT mRNA expression remained high. In contrast, the pattern of developmental regulation of SMIT gene expression in the kidney was opposite to that seen in the brain. Signals in the kidney were very weak during embryonic stages, whereas SMIT expression increased significantly after birth. These results suggest that *myo*-inositol and its transporter play an important role in the CNS developmental stage. © 1997 Elsevier Science B.V.

Keywords: Osmolyte; Blood-brain barrier; Na^+ /*myo*-inositol cotransporter

1. Introduction

myo-Inositol and its various biochemical derivatives are widely distributed in mammalian tissues and cells [10]. The levels of *myo*-inositol in most mammalian cells or tissues are much higher than those in plasma and interstitial fluids [5,13]. Plasma concentrations in adult mammals have been reported to be 10–200 μM [10], whereas tissue *myo*-inositol levels are usually greater than 1 mM. Sodium-dependent *myo*-inositol transporter (SMIT) appears to be responsible for the maintenance of these concentration gradients. Interestingly, *myo*-inositol concentrations in fetal mammalian serum may be elevated with levels which are sometimes greater than 1 mM, depending on the time of gestation [4,9]. Similarly, while the range of

myo-inositol in adult cerebrospinal fluid (CSF) is 100–500 μM [20,22], the concentration in fetal CSF may reach 3 mM [1].

The reasons for the elevated *myo*-inositol levels in fetuses are unknown. Fruen and Lester have shown more recently that sodium-dependent *myo*-inositol uptake in fetal brain cells in vitro is also increased when compared to adult cells [6]. They postulated that disruption of *myo*-inositol homeostasis in Down syndrome (trisomy 21) may affect the developing brain and thus contribute to the pathogenesis of mental retardation, the most consistent and debilitating feature of the syndrome. There is some supportive evidence for their hypothesis. When polyol species were examined in CSF, a significant increase in the level of *myo*-inositol alone was observed in Down syndrome compared with controls [21]. Furthermore, recent mapping of a human SMIT gene onto the long arm of chromosome 21 [3] suggested that the altered *myo*-inositol homeostasis

* Corresponding author. Fax: +81 (6) 879-3229.

involving the CSF may result from increased transport. Despite these studies, no information is available about expression of SMIT during fetal development.

To gain insight into the expression of SMIT during time of gestation, we determined regional distributions of SMIT mRNA in rat fetuses using *in situ* hybridization. The results obtained demonstrated that SMIT is highly expressed in the fetal brain and spinal cord, whereas there were only weak signals in the kidney. The significance of SMIT in development of the CNS will be discussed.

2. Materials and methods

2.1. *In situ* hybridization

Pregnant Wistar rats were anesthetized with pentobarbital (65 mg/kg intraperitoneally) and fetuses were removed at embryonic day (E) 14, E16, and E18. Animals were also examined at postnatal day (P) 1 ($n = 5$ for each age). Fetuses and P1 rats were sacrificed by decapitation and their whole bodies were immediately frozen at -80°C . Adult rats (postnatal week 3, $n = 5$) were treated in the same manner and their brains and kidneys were removed. Serial coronal sections (5 μm thick) were obtained from the frozen tissues and the whole bodies with a cryostat and stored in a tightly closed case at -80°C . The antisense probe for SMIT was synthesized from a 490 bp rat SMIT cDNA (bases 808–1297) insert cloned into the Novagen T-vector. The sense probe for SMIT was synthesized from a 490 bp rat SMIT cDNA insert cloned in the vector pSPORT 1. To synthesize hybridization riboprobes *in vitro* transcription, this sequence was first linearized by digestion with restriction endonucleases of *EcoRI* for both antisense and sense RNA synthesis. The linearized cDNA was then incubated at 37°C for 60 min with a mixture of reagents. This mixture consisted of 2 μl of transcription buffer ($\times 5$), 0.5 μl of 100 mM dithiothreitol, 0.5 μl of RNase inhibitor, 0.5 μl of 10 mM ATP, CTP and GTP, 5 μl of [^{35}S]UTP (NEG-039H, New England Nuclear), 0.5 μl of DNA template (1 mg/ml) with 1 μl of appropriate RNA polymerase (T7 RNA polymerase for antisense; SP6 RNA polymerase for sense probe). DNA was digested by addition of 2 μl of DNase (1 U/ μl) and incubation at 37°C for 10 min. Efficacy of labeling was estimated by counting radioactivity of the synthesized probes.

In situ hybridization techniques for SMIT mRNA (RNA probe) were based on those of Wilkinson et al. [23] with some modifications. Briefly, sections were fixed in 4% paraformaldehyde in 0.1 M phosphate buffer (PB) for 20 min. After washing with PBS, the sections were treated with 10 mg/ml of proteinase K in 50 mM Tris-HCl and 5 mM EDTA (pH 8.0) for 5 min at room temperature. They were fixed again in the same fixative, then acetylated with acetic anhydride in 0.1 M triethanolamine, rinsed with

PBS, dehydrated and air-dried. The ^{35}S -labeled RNA probes (sense and antisense) were diluted in hybridization buffer, applied to the sections and covered with siliconized coverslips. Hybridization was performed overnight in a humid chamber at 55°C . The hybridization buffer consisted of 50% deionized formamide, 0.3 M NaCl, 20 mM Tris-HCl, 5 mM EDTA, 10 mM PB, 10% dextran sulfate, $1 \times$ Denhardt's solution, 0.2% sarcosyl, 500 mg/ml yeast tRNA, and 200 mg/ml herring sperm DNA (pH 8.0). The probe concentration was 5×10^5 cpm/ $150 \mu\text{l}$ per slide. After hybridization, the slides were soaked in $5 \times$ SSC at 55°C , and the coverslips were allowed to slough off. The sections were then incubated at 65°C in 50% deionized formamide with $2 \times$ SSC for 30 min. After rinsing with RNase buffer (0.5 M NaCl, 10 mM Tris-HCl, 5 mM EDTA (pH 8.0)) four times for 10 min each time at 37°C , the sections were treated with 1 mg/ml of RNase A in RNase buffer for 30 min at 37°C . After an additional washing in RNase buffer, the slides were incubated in 50% formamide with $2 \times$ SSC for 30 min at 65°C , rinsed with $2 \times$ SSC and $0.1 \times$ SSC for 10 min each at room temperature, dehydrated through an ascending alcohol series and air-dried.

X-ray film was placed on uncoated sections for 3 days. The slides were then coated with Ilford K-5 emulsion diluted in distilled water containing 2% glycerine (1:1). The slides were exposed for 3 weeks in a tightly sealed dark box at 4°C , developed in Kodak D-19, fixed with photographic fixer, stained with thionine and coverslipped. The tissue sections were examined under a light microscope. For quantitative assessment of SMIT mRNA expression on the macroautoradiograms, an optical density of a target region was measured, and optical density ratio (ODR) was calculated in comparison with the film background density. Statistical analysis was performed using non-parametric analysis of the Mann-Whitney *U*-test with two-tailed probability.

2.2. Western blotting

Anti-SMIT antibody was raised against a synthetic peptide, CTPPTKEQ, corresponding to amino acids 533–540 of SMIT [12]. The peptide was coupled with KLH and used to immunize rabbits.

Extracts were prepared from E16, E18 and P1 and P21 rat brain. Aliquots of 20 μg of protein were electrophoresed in 10% SDS-polyacrylamide gels. Proteins were transferred from the gels onto nitrocellulose membranes in a modified Towbin transfer buffer (25 mM Tris, 192 mM glycine, pH 8.4, containing 0.05% 2-mercaptoethanol). The nitrocellulose was blocked with blot buffer (20 mM Tris (pH 7.6), 150 mM NaCl, 0.05% Tween-20, 0.05% NaN_3) containing 3% BSA for 1 day at 4°C . The filters were probed at room temperature for 2 h with anti-SMIT rabbit antiserum diluted in blot buffer, washed

with blot buffer, and then incubated for 2 h with anti-rabbit IgG HRP antibody diluted 1:500 in blot buffer containing 1% BSA. After washing with blot buffer, immunoreactivity was visualized using the ECL system (Amersham, Braunschweig, Germany).

3. Results

Throughout the present study, adjacent sections were hybridized with both sense and antisense probes to confirm the specificity of SMIT mRNA hybridization signals. Signals were observed only in sections hybridized with the antisense probes. Fig. 1 and Fig. 2 show developmental changes in the expression of SMIT mRNA; since signifi-

cant expression was observed in the fetal brain and the kidney after birth, we focused on these two organs.

3.1. SMIT mRNA expression in the brain

The most intense SMIT mRNA hybridization signals were constantly found in the choroid plexus of the lateral ventricle and fourth ventricle constantly from E14 to P21. In contrast, other regions of the brain showed intense hybridization signals until P1, while these hybridization signals were markedly decreased and reached low levels at P21.

Detailed observations revealed low to moderate levels of SMIT mRNA in the neocortical neuroepithelium, septum, rhinencephalon, pallidal subventricular zone, pal-

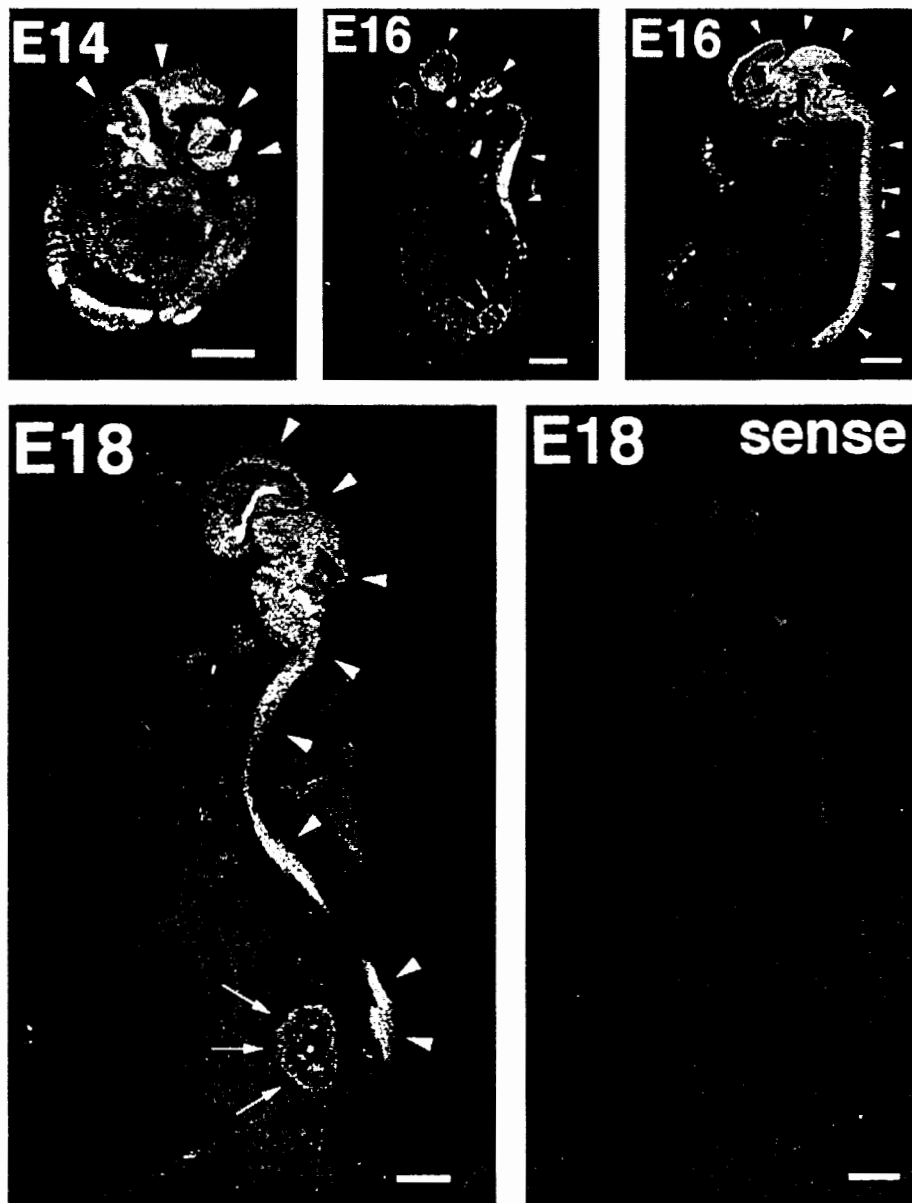


Fig. 1. SMIT mRNA hybridization signals were widely distributed throughout the fetal brain (E14, E16, E18) with the most intense signals in the choroid plexus. In contrast, SMIT mRNA levels were low in the fetal kidney. No specific hybridization signals were found using a sense SMIT probe. Scale bar = 2 mm.

lidum and thalamus at E14, while intense hybridization signals were seen in the hypothalamus, pretectum, tegmentum, anterior pons, posterior pons, medulla and spinal cord. At E16, intense hybridization signals were observed in the cortical plate and neocortical neuroepithelium, whereas weak signals were detected in the intermediate zone in the cerebral cortex. Most of the other areas in the brain showed moderate to intense hybridization signals with less intense signals in the pallidal subventricular zone. Moderate to intense hybridization signals were also seen in the neural layer of the retina at E16. At E18, almost all the regions in the brain and neural layer of the retina showed moderate to intense SMIT mRNA signals with less intense signals in the intermediate zone in the cerebral cortex, striatal subventricular zone and pallidal subventricular zone. At P1, moderate to intense hybridization signals were found throughout whole brain. Particularly high expression of SMIT mRNA was detected in the subiculum, CA1–3 fields in the hippocampus, hypothalamus and amygdaloid complex. At P21, very low signals were widely distributed throughout the whole brain with slightly higher

intensity in the olfactory bulb, hippocampus and cerebellum. No signals were found with the sense probe.

3.2. SMIT mRNA expression in the kidney

In contrast, SMIT mRNA levels were low in the kidney during fetal stages, whereas the hybridization signals were markedly increased after birth.

Detailed observation revealed weak SMIT mRNA signals in the nephrogenic zone, and low-level signals were scattered in the medulla at E16. Moderate hybridization signals were sporadically spread over cortical and medullary regions with higher levels in the nephrogenic zone at E18. At P1, intense hybridization signals were concentrated in the medulla, whereas weak signals were scattered in the cortex. At P21, SMIT mRNA was intensely expressed in the outer medulla. SMIT mRNA signals showed a gradient of concentration along the corticomedullary axis from the inner medulla to the papillary tip, with the most abundant transcript levels in the papillary tip. These signals in the papillary tip were as intense

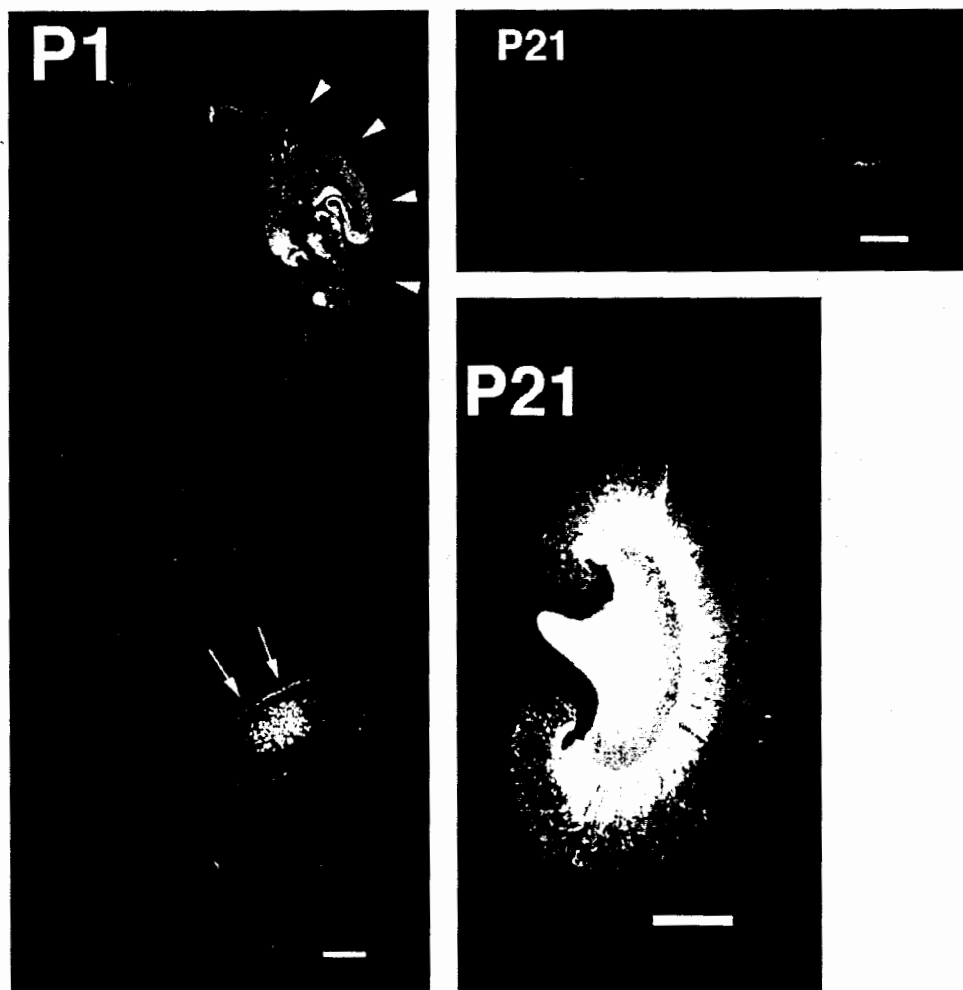


Fig. 2. Postnatal day 1 (P1) rat, and the brain and kidney of postnatal day 21 (P21) adult rat. The brain showed intense hybridization signals at P1, while these hybridization signals were markedly decreased and reached low levels at P21. In contrast, the hybridization signals in the kidney were markedly increased after birth, especially in the medulla.

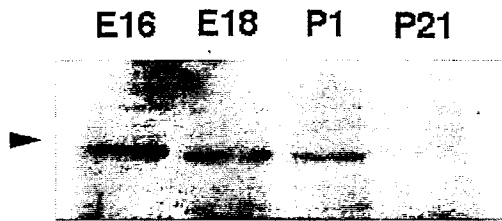


Fig. 3. On Western blotting analysis, polyclonal antiserum against SMIT recognized a single protein with M_r of 80000. The levels of SMIT protein in the brain were decreased from embryonic day 16 (E16) to postnatal day 21 (P21). Arrowhead indicates 83 kDa marker.

as those in the outer medulla. Moderate hybridization signals were scattered in the cortex.

3.3. Western blotting analysis

We also analyzed levels of SMIT protein in the rat brain at E16, E18, P1 and P21 by immunoblotting. As shown in Fig. 3, SMIT was expressed as a single component with an M_r of 80000. The protein levels of SMIT throughout developmental stages showed a pattern similar to that observed for SMIT mRNA. The brain SMIT protein levels were high during embryonic stages and decreased with development.

4. Discussion

Our results indicated that SMIT mRNA and SMIT protein are highly expressed in the fetal CNS and decrease with development. This result is consistent with *in vitro* study using cultured brain cells from fetal mice [6] in which Na^+ -dependent *myo*-inositol uptake in fetal brain cells was significantly higher than that in adult brain cells. Their results together with our observations suggest that the development of the brain from the fetal to the adult stage is associated with a significant decrease in SMIT activity as well as in its mRNA and protein levels. A similar decrease in SMIT activity accompanies differentiation of neuroblastoma cells in culture [19]. Changes in brain SMIT with development may be related to the high ambient concentration of *myo*-inositol. Considering the marked elevation of its concentration in fetal plasma [4,9] and CSF [1], one would expect that intracellular concentration would be extremely high. Since *myo*-inositol levels in most mammalian tissues are 10–100-fold higher than those in plasma [5,13], its concentration in the fetal CNS might be more than 10 mM. This raises the question why the fetal CNS need such a large amount of *myo*-inositol. The rate of synthesis of phosphatidylinositol would not be markedly affected because it is already saturated at much lower concentrations [2]. Low levels of ambient *myo*-inositol seem to be adequate to maintain normal cellular phosphatidylinositol production. Thus, it is possible that *myo*-inositol plays another role in the fetal brain that is

distinct from that of a simple substrate for phospholipid biosynthesis.

In addition to its role in membrane structure and signal transduction, *myo*-inositol functions as an osmolyte in the kidney and the brain [7,8]. It is accumulated under hypertonic conditions by increasing SMIT activity [17]. The abundance of SMIT mRNA and the transcription rate of the SMIT gene increased when the cultured kidney cells were cultured in hypertonic medium, suggesting that transcription is the primary step in regulation of *myo*-inositol transport by hypertonicity [12,25]. Similar results were obtained from brain glial cells [18] and lens epithelial cells [26]. We have recently reported the localization and regulation of SMIT mRNA in kidney [24], brain [11,14], eye [16] and ear [15]. These results strongly suggest an important role of SMIT in the CNS regarding cell volume regulation. Although we found intense expression of SMIT in the fetal CNS, it is unknown whether the transporter is also under osmoregulatory control. Berry et al. [2] suggested that *myo*-inositol may be an osmolyte in fetal endothelial cells since they have a high-affinity transport system for *myo*-inositol and accumulate more *myo*-inositol with fetal bovine serum than with adult bovine serum. It is possible that *myo*-inositol functions as an osmolyte in the fetal CNS. We speculate that the intense expression of SMIT might be related to the immature blood–brain barrier in the fetus, which is much more permeable to a variety of solutes than that in adults.

Our results thus suggest that SMIT plays an important role in the fetal CNS but not in the kidney. The hypothesis proposed by Fruen et al. [6] regarding the relationship between Down syndrome and SMIT gene is consistent with our results. In patients with Down syndrome, mental retardation and neurological abnormalities are always present but the kidney is usually normal. Further studies are necessary to clarify the significance of *myo*-inositol and its transporter in this syndrome.

References

- [1] F.C. Battaglia, G. Meschia, J.N. Blechner, D.H. Barron, The free *myo*-inositol concentration of adult and fetal tissues of several species, *Q. J. Exp. Physiol.* 46 (1961) 188–193.
- [2] G.T. Berry, R.A. Johanson, J.E. Prantner, B. States, J.R. Yandrazt, *myo*-Inositol transport and metabolism in fetal aortic endothelial cells, *Biochem. J.* 295 (1993) 863–869.
- [3] G.T. Berry, J.J. Mallee, H.M. Kwon, J.S. Rim, W.R. Mulla, M. Muenke, N.B. Spinner, The human osmoregulatory Na^+ /*myo*-inositol cotransporter gene (SLC5A3): molecular cloning and localization to chromosome 21, *Genomics* 25 (1995) 507–513.
- [4] J.D. Campling, D.A. Nixon, The inositol content of foetal blood and foetal fluids, *J. Physiol.* 126 (1954) 71–80.
- [5] R.M.C. Dawson, N. Freinkel, The distribution of free *meso*-inositol in mammalian tissues, including some observation on the lactating rat, *Biochem. J.* 78 (1961) 606–610.
- [6] B.R. Fruen, B.R. Lester, High affinity [^3H]inositol uptake by dissociated brain cells and cultured fibroblasts from fetal mice, *Neurochem. Res.* 16 (1991) 913–918.

- [7] A. Garcia-Perez, M.B. Burg, Renal medullary organic osmolytes, *Physiol. Rev.* 71 (1991) 1081–1115.
- [8] S.R. Gullans, J.G. Verbalis, Control of brain volume during hyperosmolar and hypoosmolar conditions, *Annu. Rev. Med.* 44 (1993) 289–301.
- [9] M. Hallman, S. Slivka, P. Wozniak, J. Sills, Perinatal development of *myo*-inositol uptake into lung cells: Surfactant phosphatidylglycerol and phosphatidylinositol synthesis in the rabbit, *Pediatr. Res.* 20 (1986) 179–185.
- [10] B.J. Holub, Metabolism and function of *myo*-inositol and inositol phospholipids, *Annu. Rev. Nutr.* 6 (1986) 563–597.
- [11] K. Inoue, S. Shimada, Y. Minami, H. Morimura, A. Miyai, A. Yamauchi, M. Tohyama, Cellular localization of Na^+ /*myo*-inositol cotransporter mRNA in the rat brain, *Mol. Neurosci.* 7 (1996) 1195–1198.
- [12] H.M. Kwon, A. Yamauchi, S. Uchida, A.S. Preston, A. Garcia-Perez, M.B. Burgand, J.S. Handler, Cloning of the cDNA for a Na^+ /*myo*-inositol cotransporter, a hypertonicity stress protein, *J. Biol. Chem.* 267 (1992) 6297–6301.
- [13] L.M. Lewin, Y. Yannai, S. Sulimovici, P.F. Kraicer, Studies on the metabolic role of *myo*-inositol. Distribution of radioactive *myo*-inositol in the male rat, *Biochem. J.* 156 (1976) 375–380.
- [14] Y. Minami, K. Inoue, S. Shimada, H. Morimura, A. Miyai, A. Yamauchi, T. Matsunaga, M. Tohyama, Rapid and transient up-regulation of Na^+ /*myo*-inositol cotransporter transcription in the brain of acute hypernatremic rats, *Mol. Brain Res.* 40 (1996) 64–70.
- [15] Y. Minami, S. Shimada, K. Inoue, H. Morimura, A. Miyai, A. Yamauchi, T. Matsunaga, M. Tohyama, Expression of Na^+ /*myo*-inositol cotransporter mRNA in the inner ear of the rat, *Mol. Brain Res.* 35 (1996) 319–324.
- [16] H. Morimura, S. Shimada, Y. Otori, A. Yamauchi, Y. Minami, K. Inoue, A. Miyai, I. Ishimoto, Y. Tanoand, M. Tohyama, Expression of Na^+ /*myo*-inositol cotransporter mRNA in normal and hypertonic stress rat eyes, *Mol. Brain Res.* 35 (1996) 333–338.
- [17] T. Nakanishi, R.J. Turner, M.B. Burg, Osmoregulatory changes in *myo*-inositol transport by renal cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 8 (1989) 6002–6006.
- [18] A. Paredes, M. MacManus, H.M. Kwon, K. Strange, Osmoregulation of Na^+ -inositol cotransporter activity and mRNA levels in brain glial cells, *Am. J. Physiol.* 263 (1992) C1282–C1288.
- [19] C.P. Reboulleau, Inositol metabolism during neuroblastoma B50 cell differentiation: effects of differentiating agents on inositol uptake, *J. Neurochem.* 55 (1990) 641–650.
- [20] C. Servo, J. Palo, E. Pitkanen, Polyols in the cerebrospinal fluid and plasma of neurological, diabetic and uraemic patients, *Acta Neurol. Scand.* 56 (1977) 111–116.
- [21] H.U. Shetty, M.B. Schapiro, H.W. Holloway, S.I. Rapoport, Polyol profiles in Down syndrome, *J. Clin. Invest.* 95 (1995) 542–546.
- [22] S.L. Smith, M.V. Novotny, *myo*-Inositol levels in the cerebrospinal fluid of infants, *J. Chromatogr.* 223 (1981) 173–175.
- [23] D.G. Wilkinson, G. Peters, C. Dickson, Expression of the FGF-related proto-oncogene int-2 during gastrulation and neurulation in the mouse, *EMBO J.* 7 (1988) 691–695.
- [24] A. Yamauchi, A. Miyai, S. Shimada, Y. Minami, Y. Tohyama, E. Imai, T. Kamada, N. Ueda, Localization and rapid regulation of Na^+ /*myo*-inositol cotransporter in rat kidney, *J. Clin. Invest.* 96 (1995) 1195–1201.
- [25] A. Yamauchi, S. Uchida, A.S. Preston, H.M. Kwon, J.S. Handler, Hypertonicity stimulates transcription of the gene for Na^+ /*myo*-inositol cotransporter in MDCK cells, *Am. J. Physiol.* 264 (1993) F20–F23.
- [26] C. Zhou, N. Agarwal, P.R. Cammarata, Osmoregulatory alterations in *myo*-inositol uptake by bovine lens epithelial cells, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 35 (1994) 1236–1242.

Elsevier Science B.V.

Fax: (31) (20) 485 3271
Phone: (31)(20) 485 3474

Postal Address:

Brain Research
Elsevier Science B.V.
P.O. Box 2759, 1000 CT Amsterdam
The Netherlands

Courier Service Address:

Brain Research
Elsevier Science B.V.
Molenwerf 1, 1014 AG Amsterdam
The Netherlands

* * *

If you need information about your accepted manuscript, proof, etc. then phone or FAX us at the above numbers, stating the journal name and article code number. We can also FAX this journal's Instructions to Authors to you.

NEW AND FORTHCOMING TITLES IN ELSEVIER'S NEUROSCIENCE PROGRAMME

BRAIN RESEARCH PROTOCOLS

VOLUME 1/2 IS THE MAY 1997 ISSUE!

For more information, please contact Joyce Hobbelenk, Elsevier Science, PO Box 1527, 1000 BM Amsterdam, The Netherlands, Fax: +31 20 485 3342, e-mail: j.hobbelenk@elsevier.nl

SUBSCRIPTION AND PUBLICATION DATA 1997

Brain Research (including **Molecular Brain Research**, **Developmental Brain Research**, **Cognitive Brain Research** **Brain Research Protocols** and **Brain Research Reviews**) will appear weekly and be contained in 57 volumes (120 issues): **Brain Research**, Volumes 743-778 (36 volumes in 72 issues), **Molecular Brain Research**, Volumes 41-50 (10 volumes in 20 issues), **Developmental Brain Research**, Volumes 98-104 (7 volumes in 14 issues), **Cognitive Brain Research**, Volume 5 (1 volume in 4 issues) **Brain Research Protocols**, Volume 1 (1 volume in 4 issues) and **Brain Research Reviews**, Volumes 24-25 (2 volumes in 6 issues). Please note that Volumes 41-43 of **Molecular Brain Research**, Volume 743 of **Brain Research** and Volume 5 issues no. 1 and 2) of **Cognitive Brain Research** were published ahead of schedule in 1996, in order to reduce publication time. The volumes remain part of the 1997 subscription year.

Separate subscriptions: Molecular Brain Research, Vols. 41-50, Developmental Brain Research, Vols. 98-104, Cognitive Brain Research, Vol. 5, Brain Research Protocols, Vol. 1 and Brain Research Reviews, Vols. 24 and 25, may also be ordered separately. Prices are available from the Publisher upon request. Subscriptions are accepted on a prepaid basis only, unless different terms have been previously agreed upon.

Subscription orders can be entered only by calendar year (Jan.-Dec.) and should be sent to Elsevier Science B.V., Order Fulfillment Department, P.O. Box 211, 1000 AE Amsterdam, The Netherlands, Tel.: (31) (20) 485 3642, Fax: (31) (20) 485 3598, or to your usual subscription agent.

Postage and handling charges include surface delivery except to the following countries where air delivery via SAL (Surface Air Lift) mail is ensured: Argentina, Australia, Brazil, Canada, Hong Kong, India, Israel, Japan, Malaysia, Mexico, New Zealand, Pakistan, P.R. China, Singapore, South Africa, South Korea, Taiwan, Thailand and USA. For all other countries airmail rates are available upon request.

Claims for missing issues must be made within six months of our publication (mailing) date, otherwise such claims cannot be honoured free of charge.

Orders, claims, and product enquiries: please contact the Customer Support Department at the Regional Sales Office nearest you: **New York**, Elsevier Science, P.O. Box 945, New York, NY 10159-0945, USA. Tel: (+1) 212-633-3730, [Toll free number for North American customers: 1-888-4ES-INFO (437-4636)], Fax: (+1) 212-633-3680, e-mail: usinfo-f@elsevier.com; **Amsterdam**, Elsevier Science, P.O. Box 211, 1000 AE Amsterdam, The Netherlands. Tel: (+31) 20-485-3757, Fax: (+31) 20-485-3432, e-mail: nlinfo-f@elsevier.nl; **Tokyo**, Elsevier Science, 9-15, Higashi-Azabu 1-chome, Minato-ku, Tokyo 106, Japan. Tel: (+81) 3-5561-5033, Fax: (+81) 3-5561-5047, e-mail: kyf04035@niftyserve.or.jp; **Singapore**, Elsevier Science, No. 1 Temasek Avenue, #17-01 Millenia Tower, Singapore 039192. Tel: (+65) 434-3727, Fax: (+65) 337-2230, e-mail: asiainfo@elsevier.com.sg

Advertising Information: Advertising orders and enquiries may be sent to: *International:* Elsevier Science, Advertising Department, The Boulevard, Langford Lane, Kidlington, Oxford, OX5 1GB, UK; Tel.: (+44) (0) 1865 843565; Fax: (+44) (0) 1865 843976. *U.S.A. & Canada:* Weston Media Associates, Dan Lipner, P.O. Box 1110, Greens Farms, CT 06436-1110, USA, Tel.: (203) 261 2500; Fax: (203) 261 0101. *Japan:* Elsevier Science Japan, Marketing Services, 1-9-15 Higashi-Azabu, Minato-ku, Tokyo 106, Japan; Tel.: (+81) 3 5561 5033; Fax: (+81) 3 5561 5047.

ADONIS Identifier. This Journal is in the ADONIS Service, whereby copies of individual articles can be printed out from CD-ROM on request. An explanatory leaflet can be obtained by writing to ADONIS B.V., P.O. Box 17005, 1001 JA Amsterdam, The Netherlands.

⊕ The paper used in this publication meets the requirements of ANSI/NISO Z39.48-1992 (Permanence of Paper).

日本財団補助金による

1997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3日

財団法人 日中医学協会
理事長 中島章殿

I. 研究者氏名 李柔

研究機関 名古屋市立大学医学部小児科 研究指導者 和田義郎 職名 教授
所在地 名古屋市中区瑞穂区瑞穂町守川屋 電話 052-853-8246 内線

II. 過去の研究歴

C型肝炎ウイルス(HCV)に感染した母子例を対象として、HCVのエンベロープ領域にある起可変領域の塩基及びアミノ酸配列を解析して、その多様性及び母子間の同一性を明らかにし、感染経路の解明を試みる。

III. 過去の研究実績

上記の研究についていくらかの成果をおよげた。自験例の研究によって小児のC型肝炎のほとんどがその母親から移殖後と明らかになる結果を得た。そして第一作者で日本小児科学会雑誌に論文を三つ載せた。また共同研究者として数回の論文を執筆した。

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)

"Homology of E2 gene in 8 child-mother pairs infected with hepatitis C virus." The Tohoku Journal of Experimental Medicine 1997, 183(3).

"Sequential change of hepatitis C virus E2 gene in two mother-child pairs." ~
(この論文は書いておらずで、まだ最後に完成していません)

V. 今後の研究計画及び希望

今後ともHCVについて研究を続けるか。また、G型肝炎及びまた未知のウイルス性肝炎の原因や感染経路についての研究も兼ねたいです。

研究助成金を与えていたことに、心から感謝いたします。また、ありがとうございます。

今後とも研究助成金を頂く機会を与えてほしいです。

VI. 研 究 報 告 (日本語、又は英語で書いて下さい。4,000字以上で記載して下さい。別紙可)

研究報告は別紙にて。



VII. 指導教官の意見

李桑氏が貴財団の研究助成を得て行った研究結果は、今日のわが国における小児のC型肝炎の感染経路を明らかにするもので、成人の領域では国民病といわれるC型肝炎の予防および治療対策を小児の立場から明らかにする上で重要な知見が提供されたものと考えます。李桑氏の研究に対する姿勢は真摯で、助成の効果と十分生かされたものと思う。しかし、更に研究を進展させるためには貴財団の研究助成が継続できる体制が望まれる。

目的

(1) 小児におけるC型肝炎ウイルス (HCV) の感染機序を解明するため、HCVに感染した母子を対象にHCV E2領域の塩基配列を解析し、母子感染の確認に役立つか否かを検討する。

(2) HCVの変異状況と持続感染の関係を解明するため、HCVに感染した母子を対象にHCV E2領域の塩基配列を経時的に解析する。

対象

感染経路の解明については、名古屋市立大学病院小児科外来に通う小児8例とその母親8例とした。8例の性別は男児3例、女児5例で、年齢は2ヵ月から12歳であった。4例の児はHCV感染の母親から生まれ、フォローアップ中にHCVに感染した。他の4例の児はHCV抗体スクリーニングによって、HCV感染が判明し、母子共にHCV感染と診断された。児は全例輸血歴はなく、HCV水平感染のリスク因子もなかった。家族1の母子以外全例血液サンプルを同時に採取した。血液サンプルは採取後直ちに血清に分離し、 -30°C に保存した。

母子感染例におけるHCV E2領域の経時的解析は2組の母子で行った。即ち、

家族1：母親は妊娠初期に流産に対する免疫治療として夫の白血球の皮下注射を受けた。治療前の母親のHCV抗体は陰性であった。治療後夫がHCVキャリアであることが判明した。母親は分娩前にHCV抗体陽性となっていた。

児は生後3ヵ月時HCV RNA陽性で、その後ウイルス血症が持続している。

血清サンプルは児においては、生後3、6、9、12、15、21、27、および30ヵ月の8時点で、母親においては、分娩後3、9及び12ヵ月の3時点で採取した。

家族2：母親は無症候性HCVキャリアであった。生後4ヵ月に行った児のHCV RNA検査が陽性で、その後HCV RNA陽性が続いている。血清サンプルは児においては、生後4、6、9、12、18、24及び30ヵ月の7時点で、母親においては、分娩後4、6、9、12及び30ヵ月の5時点で採取した。

方法

RNA抽出とRT-PCRについて

血清 $100\mu\text{l}$ よりAGPC(acid guanidium thiocyanate-phenol-chloroform)法でRNAを抽出し、random hexamerをprimerとして、MMLV(moloney murine leukemia virus)逆転写酵素を用いてcDNAを合成した。

HCVゲノタイプの同定は岡本らの測定方法を一部改変して行った。即ち岡本らはHCVのC領域に位置するuniversal primer (sense)と4種類のtype-specific primers (antisense)の混合液を用いてPCR反応を行い、4つのgenotypeにHCVを分類しているが、4種類のtype-specific primersを別々に用いてPCR反応を行った。

HCVのE2領域ゲノムの増幅は岡田らの方法に従って行った。1st及びnested PCRはそれぞれ1種類のsense primerと2種類のantisense primerを用いた。PCR反応はthermal cyclerを用い、1st PCRでは35サイクル、nested PCRでは30サイクル行った。denaturation温度は 94°C 、annealing温度は 55°C 、extension温度は 72°C とし、反応時間はそれぞれ1分とした。

cDNA サブクリーニング法について

増幅したcDNAはアガロース泳動した後目的のバンドを切り出し、ガラスパウダーで抽出した。制限酵素EcoRIとBclIIで処理した後cDNAのフラグメントをplasmid vectors (pUC119)のEcoRI/BamHIのサイトに組み込むことでクローン化した。1つの検体についてそれぞれ5つのcDNAクローンを解析した。

シーケンス解析について

塩基配列の解析はABI (Applied Biosystems)のTaq Dye Deoxy Terminator Cycle Sequencing Kitと373A蛍光DNA sequencerを用いて、プラス鎖とマイナス鎖について行った。

塩基及びアミノ酸の番号はgenotype IIでは、HCV-BK株、genotype IIIでは、J6株を基準とした。本研究では解析した全領域をF領域と定義し、更にそれを3つの部分、即ち超可変領域(HVR)-1、HVR-2、及びHVR-1と2の間の領域に分けて検討した。超可変領域-1と2の間の領域はI領域と定義した。

系統発生的解析について

I 領域に対して系統発生的解析を行った。この解析はソフトウェア GENETYX-MAC を用い、neighbor-joining法で行った。

結果と考察

HCVゲノタイプをtype-specific primersを用いたPCR法で検索した結果、家族1、4、6、7及び8の母子はtype IIと判定され、家族2、3と5の母子はtype IIIと判定された。一方cDNAクローンの塩基配列に最も類似した塩基配列をGenBankに登録されている塩基配列の中から検索すると、家族1、4、6、7及び8の母子のcDNA塩基配列はtype IIのHCV-BK株が選択された。同様に家族2、3、と5の母子ではtype IIIのHCV-J6株が選択された。即ち二つの異なった方法によってgenotype分類を検討したところ同じ結果であった。

Table 1は各症例それぞれ5クローン間の塩基及びアミノ酸配列の同一性を検討した結果を示す。各項の左側の値は各領域の塩基及びアミノ酸配列の最も高い変異率を示し、右側は最も高い保存率を意味する。百パーセントは解析した5クローンのcDNAの中に完全に一致したクローンが少なくとも2クローンあったことを意味する。

超可変領域-1においてクローンの種類を検討すると図1に示した通りである。

図1のaは家族1-5までの超可変領域のアミノ酸配列を示す。家族3の児では単一のアミノ酸配列が見られたが、他の症例では多種類の配列が見られた。図1のbは家族6-8までの超可変領域のアミノ酸配列を示す。家族6の母子とも単一のアミノ酸配列を示す。家族7の児と家族8の母親は以前にinterferonの治療を受けていたがHCVウイルス血症が続いていた。これらの症例では多種類のアミノ酸配列が観察された。なお、家族7の児の10クローン中7クローンには3塩基、1アミノ酸の挿入を認め、またその母親の11クローン中の9クローンには1塩基の欠失を認め、frame shiftにより生じたstop codonが多数認められた。

Table 2には児とその母親の間、児と他の児及び他の母親との間、また児とGenBankに登録されている塩基配列との間の一致率を各領域について検討した結果を示す。I領域について相同性をみると8組中6組(75%) (家族1、2、3、5、6と8)では児とその母親の間の塩基配列の相同性は、5クローン全部が児とほかの児、他の母親及びGenBankに登録されている最も類似性の高い塩基配列の間の相同性より高かった。1組(13%) (家族7)は一部のクローンのみ高い相同性を示した。即ち、児の10クローン中6クローンと母親の11クローン中の5クローンの間の相同性は児と他の児、他の母親及びGenBankからの塩基配列の間の相同性より高い値を示した。他の1組(13%) (家族4)は母子間の塩基配列の相同性が児の5クローン中の4クローンと家族7の母親の11クローン中の5クローンの間の相同性より低い値を示した。F領域について同様のことをみた結果をTable 2に示した。即ち母子間の相同性を比較する場合、F領域よりI領域の方がいくぶん高いという成績が得られた。

I領域の塩基配列を用いて系統発生的関係を検討した結果を示す。8家族で64個、GenBankから得た22個のユニークな塩基配列を用いて分析した。家族1、2、3、4、6及び8の児のDNA塩基配列は母親のそれと同じ枝に分類されたが、GenBankから得られた1つの塩基配列と家族5の塩基配列が同じ枝に分類され、また家族7では、GenBankから得られた多数の塩基配列とその家族の半数のクローンは比較的類似性の高い塩基配列として分類された。

今回の検討で我々は1症例について、5クローンを解析し、HVR-1と2の間のI領域について母子間の相同性をみると、8家族中7家族で母親とその児の間で一致率が高いことを実証できた。これはまた系統発生的分析法によっても証明された。即ちこの研究の結果によって、I領域についての塩基配列を解析することで、HCVの母子感染の確認が可能と考えられた。

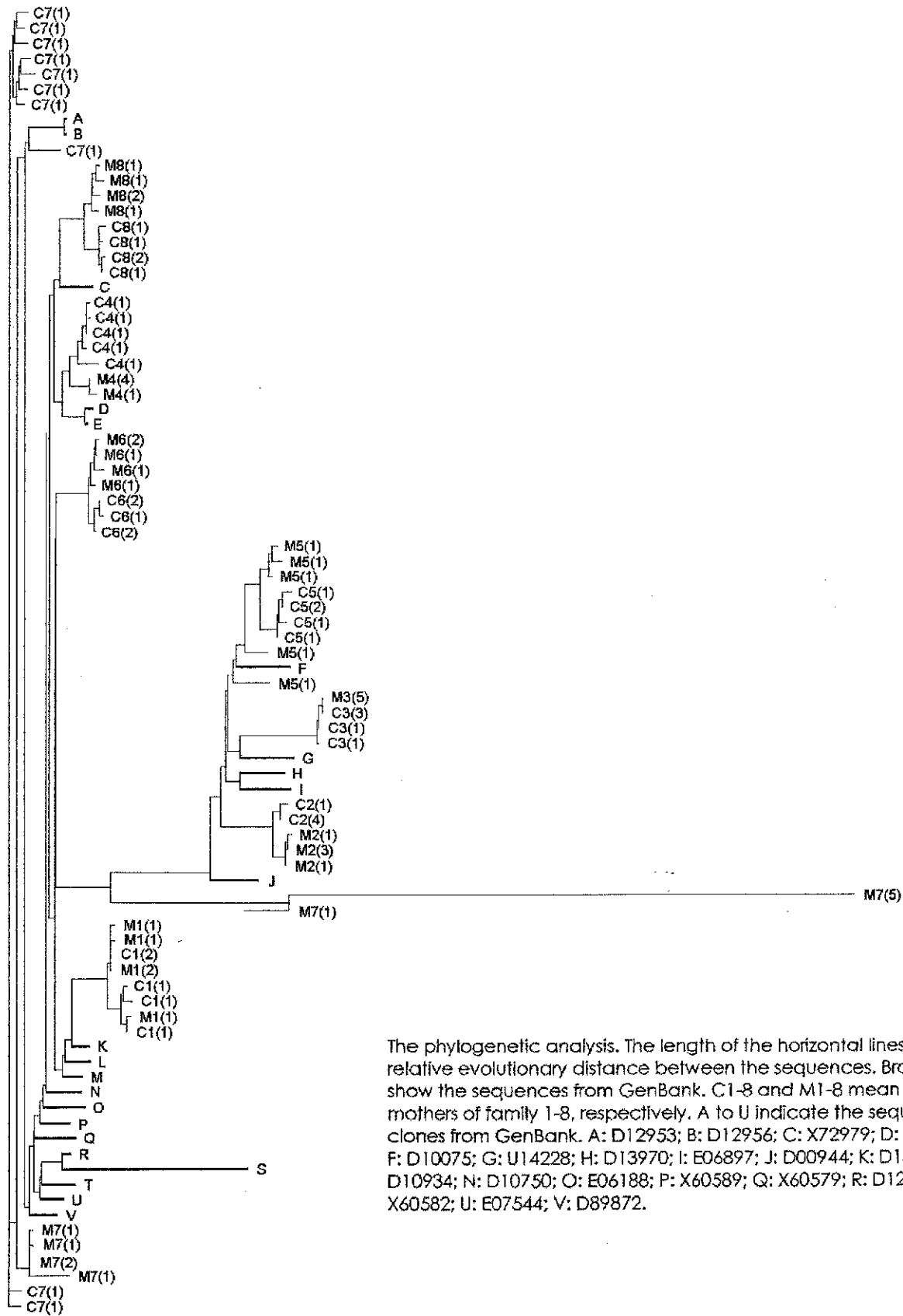
		HVR-1		HVR-2			
family 1	m1	AGVDG	ETHVTGASEGRAAHGLTRLFNFAS	QKIQI	WGPIT	Y AEPGNL	DQRPY
	m2TQ.....S..GF.TS.P.
	m3	S.....TQ.....T..GF.SP.P.	C
	m4TQ.....T.....T.
	m5A.....S.....
	c1-2
	c3-4	HIR...AQ..T.KTF.SF..P.P.
c5	S.....TQ.....T..GF.SP.P.	
family 2	m1-4	AGVDA	STHTVGGTAARTVDGLTSLFSPGAK	QNIQI	WGTLO	YEDNVTNSE	DMRPY
	m5V.
	c1-3R.....GM..P...
	4TG..P...
	5TG..P...	H.....
family 3	m1	AGVDA	KTQISGSVAGHTSRGLSSFFAPGAR	QEIQL	WGNLQ	YEENVTNPE	DMRPY
	m2-5K
	c1-5K
family 4	m1	AGVDG	HTVVSGGTQAFTRSFVSLFNGAQ	QKIQI	WGPIT	Y AERGSS	DQRPY
	m2-3	Y.....
	m4	Y.....L.....
	m5	R.....A..H..FTLT...RF.P.
	c1S...GV..F.TA.PK	.N...
	c2	R.....A..S...L...TR.P.	.S...G...
	c3A...K.....GV.GF.TA.PK	.N...
	c4A...K.....GV.GF.TA.P.	.N...	..R..	.D...
	c5	R.A.....S.....N..TS.P.	.N...D...
	c5	R.A.....S.....N..TS.P.	.N...D...
family 5	m1	AGVDA	QTHTTGGTAARNAYGLVSLFRAGAK	QNIQI	WGTLO	YEDNVTNPE	DMRPY
	m2	S...V..Q..H..RT.T...AP...	H.....S.
	m3	S...V..SM.QSTSRVAG..TP..Q
	m4-5	S...V..Q..H..RT.T...AP...
	c1-3	N...V..K..HSVSTFTG..TS.P.
	c4-5	D...V..Q...SVSTFTG..TS.P.

Fig. 1 a. Amino acid sequences for HCV HVR-1 and HVR-2. The consensus sequences for the predicated amino acid of the mother is shown by a single letters on the top line. A dotted line indicates identical residue to consensus. * indicates stop codon. m indicates mother. c indicates child. The regions enclosed in boxes indicate HVR-1 and HVR-2.

		HVR-1			HVR-2		
family 6	m1-4	AGVDG	DTRVTGAVQGYTTRSITSLFTTGPH	QKIQL	WGPIT	Y ASPDNP	DQRPY
	m5 V.....
	c1-3	..A..	..HTI...SR.A..F....P..QS..
	c4-5	..A..	..HTI...SR.A..F....P..Q
family 7	m1	AGVDG	RTHVTGESAGRTTQSFTSFFTPGPS	QKIQL	WGPIS	H VVPNTP	DQRPY
	m2	H.R.....
	m3	H.R.....
	m4-8	H.V.S.GTOAF..RG.VDL..V..Q
	m9	H.R...RARAVPPRALRPSLHQ.LH	R.SN.
	m10	N.RT..GARAVPPRALRPSLHQ.LH	R.SN.
	m11	.S...	H.R.....
	c1	N.RTA.GAVAH..ST..GL..R.AA	Y...DI.
	c2	N.RTA.GAVAH..ST..GL..R.AAT	.L.V.
	c3G	S.RTM.G.MAH...GL...Q...I.
	c4G	.G.RTM.G.VAH..RGL.T...Q...DI.
	c5G	.G.RA..G.MAH..RGL.T..NL...DI.
	c6G	VG.RTM.G.MAH..KG..T...Q...DI.
	c7R	RG.RT..G.MAH..RGL.T..NL...DV.
	c8G	.G.RTM.G.VAH..RGL.T.*D...DI.
	c9G	.G.RTM.G.VAHN.RGL.T...Q...DI.
	c10G	RG.RT..G.MAH..RGL.T..NL...DI.
family 8	m1	AGVDG	RTHVVGTTAGLTTRGLSSLFTTGPS	QKIQL	WGPIT	H GVSQMP	DQRPY
	m2	T.....A.S.....C.....
	m3A.S.....F.....
	m4	T.....A.S.....F.....
	m5A.....F.....
	c1	N.F....QT.QV.....P.A.	D..P.
	c2-3	T.VA...K.SQV.S.A...SP.A.G..P.
	c4	T.VA...K.SQV.S.PA...SP.A.	P.G..P.
	c5	N...I..RS.QV.....V.A.	D..P.

Fig. 1 b. Amino acid sequences for HCV HVR-1 and HVR-2. The consensus sequences for the predicated amino acid of the mother is shown by a single letters on the top line. A dotted line indicates identical residue to consensus. * indicates stop codon. m indicates mother. c indicates child. The regions enclosed in boxes indicate HVR-1 and HVR-2.

Fig. 2



The phylogenetic analysis. The length of the horizontal lines indicates the relative evolutionary distance between the sequences. Broad lines in trees show the sequences from GenBank. C1-8 and M1-8 mean the children and mothers of family 1-8, respectively. A to U indicate the sequences of cDNA clones from GenBank. A: D12953; B: D12956; C: X72979; D: D50481; E: D50485; F: D10075; G: U14228; H: D13970; I: E06897; J: D00944; K: D13406; L: X60581; M: D10934; N: D10750; O: E06188; P: X60589; Q: X60579; R: D12958; S: D12965; T: X60582; U: E07544; V: D89872.

Table 1 Homology search for nucleotide and amino acid sequences among the clones from 8 children and their mothers

Patient No.	Region F		HVR-1		Region I		HVR-2		
	Nucleotide (%)	Amino acid (%)	Nucleotide (%)	Amino acid (%)	Nucleotide (%)	Amino acid (%)	Nucleotide (%)	Amino acid (%)	
Family 1	Child	93.8-99.8	88.1-99.4	73.3-100	48.0-100	96.4-100	93.9-100	100	100
	mother	94.7-98.7	92.6-98.9	78.7-96.0	64.0-92.0	95.9-100	95.4-100	95.2-100	85.7-100
Family 2	Child	98.1-100	94.9-100	94.7-100	88.0-100	99.0-100	96.9-100	96.3-100	88.9-100
	mother	99.4-100	98.9-100	98.7-100	96.0-100	99.0-100	98.5-100	100	100
Family 3	Child	99.4-100	99.4-100	100	100	99.0-100	100	100	100
	mother	99.1-99.8	98.3-100	97.3-100	96.0-100	100	100	100	100
Family 4	Child	96.0-98.3	91.5-96.0	80.0-98.7	60.0-96.0	95.4-99.5	95.4-98.5	90.5-100	71.4-100
	mother	94.7-99.1	92.1-98.9	72.0-100	60.0-100	99.0-100	98.5-100	100	100
Family 5	Child	97.6-99.3	96.1-99.4	94.7-100	88.0-100	97.4-100	100	96.3-100	100
	mother	87.1-98.5	86.5-98.3	60.0-100	40.0-100	88.7-98.0	90.8-100	88.9-100	77.8-100
Family 6	Child	98.9-100	98.3-100	100	100	98.5-100	98.5-100	100	100
	mother	98.5-99.4	97.2-98.9	100	100	98.0-100	95.4-100	95.2-100	85.7-100
Family 7	Child	89.8-97.6	85.9-99.4	66.7-100	42.3-100	89.7-97.4	89.2-100	81.0-100	42.9-100
	mother	85.1-100	----- a	60.0-100	----- a	89.7-100	----- a	52.4-100	----- a
Family 8	Child	94.3-99.8	90.3-100	76.0-100	52.0-100	98.0-100	98.5-100	76.2-100	57.1-100
	mother	97.9-99.6	95.5-98.9	92.0-98.7	84.0-96.0	97.4-100	93.9-100	100	100

a Data could not be obtained.

Table 2 Homologous frequencies of nucleotide and amino acid sequences between 8 child-mother pairs

Child No.	Region F				HVR-1				Region I				HVR-2			
	Nucleotide		Amino acid		Nucleotide		Amino acid		Nucleotide		Amino acid		Nucleotide		Amino acid	
	Child-mother	Child-GenBank	Child-mother	Child-GenBank	Child-mother	Child-GenBank	Child-mother	Child-GenBank	Child-children and mothers	Child-children and mothers	Child-GenBank	Child-mother	Child-mother	Child-mother	Child-mother	
1	93.9-99.6	87.1	86.7	88.1-100	73.3-100	48.0-100	95.9-100	88.7	92.3	92.3-100	95.2-100	85.7-100	85.7-100	85.7-100	85.7-100	
2	96.8-97.8	88.0	86.1	92.7-95.5	92.0-94.7	76.0-84.0	95.9-97.4	89.2	85.1	90.8-95.4	96.3-100	88.9-100	88.9-100	88.9-100	88.9-100	
3	99.1-100	84.3	82.4	98.3-100	97.3-100	96.0-100	99.0-100	85.1	84.6	100	100	100	100	100	100	
4	92.6-95.3	97.2	92.1	86.9-91.5	70.7-84.4	48.0-76.0	92.3-95.4	96.9	94.9	87.7-92.3	95.2-100	85.7-100	85.7-100	85.7-100	85.7-100	
5	87.5-94.4	87.8	88.4	87.1-89.3	65.3-84.0	44.0-60.0	89.2-95.4	85.1	88.7	90.8-93.9	88.9-100	77.8-100	77.8-100	77.8-100	77.8-100	
6	93.8-94.5	86.6	85.2	90.3-92.1	80.0	64.0	95.9-98.5	90.8	92.8	93.9-98.5	95.2-100	85.7-100	85.7-100	85.7-100	85.7-100	
7	83.4-95.3	86.7	88.8	-----	54.4-85.3	-----	86.7-96.9	90.3	93.9	-----	42.9-90.5	-----	-----	-----	-----	
8	91.1-93.4	85.7	85.6	85.8-91.5	69.3-78.7	48.0-68.0	93.9-96.4	90.3	90.8	89.2-93.9	71.4-85.7	57.1-71.4	57.1-71.4	57.1-71.4	57.1-71.4	

a Highest homologous frequency of nucleotide sequence between one child and the other children or mothers for Region F and I.

b Highest homologous frequency of nucleotide sequence between one child and accession cases in GenBank database for Region F and I.

日本財団補助金による

1997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-

10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

郭 徽

研究機関 大阪大学医学部形態機能解剖学 研究指導者 遠山正彌 職名 教授

所在地 〒565 大阪府吹田市山田丘2-2 電話 06-879-3221 内線

II. 過去の研究歴

肝線維症と関係ある遺伝子の解析

C型肝炎に関する母子感染及び治療診断

III. 過去の研究実績

肝線維症で遺伝子発現の上昇するものとして転写因子と翻訳調節因子の両者からクローニングされたものを発現して Grb2R と TRF の解析をせよとす。

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 日本神経科学学会 木下第一 胎期におけるミオシリントランスポーターの遺伝子発現

② 日本解剖学会 口演: 胎期結腸におけるミオシリントランスポーター (SM2) の高浸透圧負荷による発現変化。③ 口演: 浸透圧応答性の新規 RNA helicase の cDNA の単離と高浸透圧

(2) 学会誌等に発表した論文 無 (有) (雑誌名・論文名) 負荷時の発現調節機構の解析

① MOLECULAR BRAIN RESEARCH

Developmental regulation of Na⁺/myo-inositol cotransporter gene expression

V. 今後の研究計画及び希望

新規 RNA helicase の機能解析を継続して研究 (有) とす。

VI. 研究報告（日本語、又は英語で書いて下さい。4,000字以上で記載して下さい。別紙可）

別紙



VII. 指導教官の意見

郭薇氏は短期間で留学生という言語や生活体系の違いも克服し、多くの難しい実験手法を習得し、さらに自主的な考えで研究を発展させ、それらの研究成果を、国際誌や学会を通して発表し、教室に多大な貢献をしてまいりました。現在も我々の研究室の主要な研究プロジェクトの中心人物として研究を引っ張っております。申請者の研究に対する厳しい姿勢と最後までやり抜く態度には、常々感心しております。また一方では、性格は温厚で明るく、素直で、後輩の面倒見も良く、研究室の皆に慕われております。

素山 正彌 (印)

論文:

1. **Guo, W.**, Shimada, S., Tajiri, H., Yamauchi, A., Yamashita, T., Okada, S., Tohyama, M. Developmental regulation of Na⁺/myo-inositol cotransporter gene expression
Mol Brain Res 51(1997) 91-96
2. Yamashita, T., Shimada, S., Yamaguchi, A., **Guo, W.**, Kohmura, E., Hayakawa, T., and Tohyama, M. Induction of Na⁺/myo-inositol cotransporter mRNA after rat cryogenic injury.
Mol Brain Res 56(1997) 128-134
3. Yamashita, T., Shimada, S., **Guo, W.**, Kohmura, E., Hayakawa, T., Takagi, T. and Tohyama, M. Cloning and functional expression of a brain peptide/histidine transporter.
J Biol Chem 272, 10205-10211, 1997.
4. Tada, K., Tajiri, H., Kozaiwa, K., Sawada, A., **Guo, W.**, and Okada, S. Role of screen for hepatitis C virus in children with malignant disease and who undergo bone marrow transplantation
Transfusion Volume 37, June 1997.
5. Etani, Y., **Guo, W.**, Tajiri, H., Okada, S., Shimada, S., Tohyama, M. Analysis of glucose transporter gene in a case of fructose malabsorption with chronic Diarrhea
Digestion & Absorption 1995, 18, 40-4 (Japanese)
6. Tada, K., Tajiri, H., Sawada, A., **Guo, W.**, Etani, Y., Kozaiwa, K., Ozaki, Y., Okada, S. HCV Infection in Children with Primary Malignant Diseases
The Journal of the Japan Pediatric Society (Japanese)
7. **Guo, W.**, Shimada, S., Mushiage, S., Tajiri, H., Yamauchi, A., Yamashita, T., Okada, S., Tohyama, M.
Differential localization and induction of Na⁺/myo-inositol cotransporter mRNA in the large intestine.
投稿中
8. **Guo, W.**, Shimada, S., Yamashita, T., Yamauchi, A., Okada, S., Tohyama, M.
Purification and Characterization of a new member of DEAD box of RNA helicase
投稿中

研究報告書

私は小児の消化器系の疾患に興味を持ち、最初に、肝線維症で同一患者の正常な肝組織と線維症の起こっている肝組織の間で differential display 法を用いることにより、プロトオンコジーンのRETと結合するGrb10と、RNA結合蛋白であるiron-responsive element-binding protein (IRE-BP)が肝線維症で遺伝子発現が上昇していることを明らかにした。肝線維症で遺伝子発現の上昇するものとして転写調節因子と翻訳調節因子の両者がクローニングされたのは興味深い。この二つの遺伝子については症例を増やし、肝線維症との関係を検討中である。このようなヒトの剖検組織を用いた疾患関連遺伝子の検索を進める一方、基礎的な研究として、消化管での浸透圧変化に対する細胞保護機構を解析している。グリセロール注腸動物や脱水モデル動物を用いて、大腸の吸収上皮細胞や杯細胞でミオイノシトールトランスポーターのmRNAが管腔内の浸透圧が上昇した際や、血清浸透圧が上昇した際に顕著に上昇することを明らかにし、大腸の上皮細胞が細胞外の浸透圧変化から細胞を保護するためにミオイノシトールの取り込みを増加させていることを示した。さらに、ミオイノシトールトランスポーターの発達段階での遺伝子発現及び蛋白発現の変化を解析し、中枢神経系で胎生期に一過性の非常に強い発現が神経系に認められることを明かとした。最近、Differential Display法により浸透圧調整に関係する新規のRNA helicaseのcDNAを単離して、現在その機能解析を行っています。

消化管は管腔内に様々な摂取物、水分、分泌液が存在し、これらの濃度や量が吸収や分泌によって複雑に調整されている。このことは消化管上皮が絶えず浸透圧の変化に曝されていることを意味する。さらに大腸上皮では浸透圧勾配を利用し、水分の吸収を行うために、この部位の細胞には極端に高い浸透圧負荷が、常時かかっている。またこれらの浸透圧変化及び調節に異常を来すと下痢等の様々な消化器症状を来す。細胞外の浸透圧変化は細胞内の体積や電解質組成に、大きな影響を与えるため、浸透圧変化から細胞を保護する機構が存在すると考えられる。このような浸透圧変化からの細胞保護機構の研究は主に腎臓で行われてきた。浸透圧物質（オスモライト）のトラ

ンスポーターは細胞外の高浸透圧に対抗して、オスモライトを細胞内に蓄積することによって、細胞内外の浸透圧バランスを保つという有効浸透圧作用と、同時に細胞内の蛋白質や核酸の高次構造が高浸透圧により変化するのを防ぐ細胞機能保護作用を示すと考えられている。私どものグループはオスモライトトランスポーターの発現調節について、多くの解析を進めてきた。しかし、浸透圧の変化する刺激からオスモライトトランスポーターの発現誘導までの経路はほとんど明らかにされていない。そこで本研究では大腸上皮由来のCaco-2細胞を用いて、Differential Display法によって、浸透圧負荷時に必要となる新規の遺伝子を解析する。

消化器系において高浸透圧刺激からオスモライトのトランスポーターの遺伝子発現誘導がおこるまでの経路に関与している遺伝子を検討するため、CACO-2培養細胞を、高張、等張、低張の培養液下で、培養しmRNA抽出後、differential display法を用いて浸透圧負荷時に新たに発現する遺伝子を同定する。これらのin vitro系を用いてdifferential display法で得られた浸透圧応答候補遺伝子を、ノーザンブロット解析により実際にCACO-2培養細胞で浸透圧負荷時に、発現誘導がかかるかどうかスクリーニングする。浸透圧負荷時に発現が上昇する遺伝子については、蛍光プライマー法を用いて塩基配列を決定する。その中で新規遺伝子についてはそのcDNAの全長を獲得するために、高浸透圧下で培養したCACO-2細胞から、cDNAライブラリーを作製し、スクリーニングする。このスクリーニングでも全長が得られない場合は、5'や3'race法を用いてcDNAを延長する。

これらの浸透圧応答遺伝子は、その相同性から機能が推測できるものに関しては、cDNAを適切な発現ベクターに組み替えて、HEK細胞発現系やアフリカツメガエル卵母細胞発現系を用いて適切な解析を行い、浸透圧変化時におけるこの遺伝子の役割を検討する。また大腸菌の発現系を用いて、浸透圧応答遺伝子の蛋白を単離し、抗体を作製し、結合蛋白を作製しました。

これらの機能解析により浸透圧応答遺伝子の特性を明らかにするとともに、in

vivoでの浸透圧負荷モデル、虚血、浮腫等の動物モデルを用いてその発現調節を解析する。さらにCACO-2細胞を用いて、antisense法により、浸透圧負荷時にこれらの浸透圧遺伝子の発現が抑制されると°Cのような細胞傷害が起こるか検討する。

最近、私はこの実験計画をスタートし、Differential Display法の系から、浸透圧負荷により遺伝子発現が上昇するRNAhelicase遺伝子ファミリーに属する新しい遺伝子を単離しました。現在大腸菌BL21細胞を用いて、融合蛋白を合成し、2本鎖のDNAやRNAのhelicase活性があるかどうか検討中です。

郭 敏

98. 3. 11.

日本財団補助金による

1997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-

1998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 賈 玉霞
研究機関 東北大学医学部老人科 研究指導者 佐々木英忠 職名 教授
所在地 〒980 仙台市青葉区星陵町1-1 電話 022-717-7180 内線 8212

II. 過去の研究歴
私は、1987年に上海医科大学を卒業後、北京医院に内科医として勤務しました。
1995年に東北大学と北京医院間の交換研究者在選出されました。これにより
東北大学医学部老人科に研究を行っております。

III. 過去の研究実績
・ Altering airway tone influences the sensitivity of cough reflex in awake guinea pigs.
Journal of Autonomic Pharmacology (manuscript in revising)
・ Effects of adrenomedullin and calcitonin gene-related peptide on airway and pulmonary vascular
Smooth muscle in guinea pigs British J. of Pharmacology 1996; 119:1477-83.

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)
American Thoracic Society 1998 International Conference in Chicago.
Role of Heme Oxygenase-1 (HO-1) In Airway Microvascular
Leakage Caused By Antigen Challenge In Sensitized Rats

(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
モルモットにドーパミン受容体阻害剤の投与下でサブスタンスPの低下と嚔下反射
の低下を観察し、ドーパミン補充療法は嚔下反射を正常化し、不顕性嚔を防ぐ手段で
あることを証明する。これからよろしくお願いいたします。

VI. 研 究 報 告 (日本語、又は英語で書いて下さい。4,000字以上で記載して下さい。別紙可)

研究報告は別紙に添付いたします。



VII. 指導教官の意見

貴医師は当科にて多くの仕事をこなしている。そのいくつかは現在英文誌に掲載されている。又、現在も教官と共同研究をしており、その論理的考へ方、実績が上かられている。これより、多くの中国人留学生が当科を訴求するが、最も優秀である。現在大学院生であり、これをも支援していると考えられている。

VI: 研究報告.

Role of HO-1 in pulmonary vascular leakage caused by antigen challenge in sensitized rats

Jia YX, Sekizawa K, Okinaga S, Lee L, and Sasaki H

*Department of Geriatric Medicine, Tohoku University School of Medicine,
Sendai 980 Japan*

Introduction

Reactive oxygen species (ROS) been increasingly implicated in the pathogenesis of a variety of diseases and important biologic processes, including inflammatory disorders[1,2]. Toxic effects of these oxidants, including the superoxide and hydroxyl radicals and hydrogen peroxide, commonly referred to as oxidative stress, can cause cellular damage[3,4]. The lung is one major target organ for injury by these ROS, generated endogenously by inflammatory cells and by exogenous oxidants[5]. One major inflammatory lung disease is asthma. Asthma is now viewed as a chronic inflammatory process[6,7]. Edema of the airway wall as a result of microvascular leakage, and luminal obstruction due to exuded plasma and airway secretions are important mechanisms of asthmatic airway obstruction[8,9]. Recently, much interest has been stimulated by observations that HO-1 plays important roles in cellular protection against oxidant injury[10-14]. Otterbein and colleagues observed that hemoglobin induced HO-1 induction plays a key role in providing protection against oxidant-mediated endotoxic shock and lung injury[14]. In view of the important functional role of HO-1 against oxidative lung injury, we employed an established allergic asthmatic model of ovalbumin-sensitized animal to investigate the role of HO-1 in pulmonary vascular leakage caused by antigen challenge.

Materials and methods

Ovalbumin sensitization

Animals were sensitized as previously described[15]. Adult male Sprague-Dawley rats weighing 200-300g were injected subcutaneously with 1.0ml of a suspension containing 1.0mg of ovalbumin (OA) and 200mg of Al(OH)₃ in physiologic saline and intraperitoneally with 0.5ml of a Bordetella pertussis antigen solution containing 1.0x10⁹ organisms/ml.

Antigen provocation and measurement of PIP

Ten to fourteen days following active sensitization to OA, rats were anesthetized intraperitoneally with pentobarbital sodium (100-120mg/kg, 50mg/ml saline). A tracheal

cannula was inserted via a tracheostomy into the lumen of the trachea and connected to a constant-volume ventilator (Model 607;). A tidal volume of 5ml/kg and a frequency of 90 breaths/min were used to ventilate the animals. Pulmonary insufflation pressure (PIP) was measured by means of a differential pressure transducer (MP45; Validyne Engineering Corp. Northridge, CA) connected to a side arm in the expiratory limb of the ventilation tubing, and was recorded on a pen recorder (RECTI-HORIZ-8K; San-ei, Tokyo, Japan). To evaluate validation of the methods of measuring PIP, known resistances (from 0.1 to 1.0cmH₂O/ml/s) were connected to the tracheal cannula. Linear increases in PIP were recorded with increases in resistance.

Measurement of airway plasma extravasation

The magnitude of vascular permeability was quantified with a modification of the method described by Saria and Lundberg[16], which correlates well with extravasation of radiolabeled albumin[17]. Evans blue (EB) dye (30mg/kg, 30mg/ml), dissolved in saline solution, was injected into a jugular vein. To determine the tissue content of EB dye after stimulation, the systemic circulation was perfused with saline to wash the dye out of the vasculature. The left ventricle was incised, a blunt-ended needle was inserted into the aorta, and the ventricles were cross-clamped. Blood was expelled from the incised right atrium at a pressure of 100mmH₂O until the perfusate was clear (about 200ml infused). The lungs were then removed. The connective tissues, vasculature, and parenchyma were gently scraped, and airways were divided into three components: lower part of the trachea, main bronchi, and segmental bronchi. The tissues were blotted dry and weighed. To quantify the amount of extravasated EB dye, each tissue sample was immersed in 2ml of 100% formamide for 24 hours at 50°C to extract the dye, and concentrations of dye in the solutions were determined spectrophotometrically by measuring the absorbance at 620nm (220A Spectrophotometer; Hitachi Ltd., Tokyo, Japan). Tissue content (nanograms of dye per milligram of wet tissue weight) was calculated from a standard curve of dye concentrations ranging from 0.5 to 10ug/ml.

Effects of Hb and SnPP on antigen-induced vascular leakage

Male Sprague-Dawley rats, weighing 200-300g, were sensitized to ovalbumin, as described above. These sensitized animals were challenged and subsequently studied after 10 to 14 days when they weighed 300-420g. The EB dye (30mg/kg) was injected into a jugular vein, followed 1 minute later by intravenously administered ovalbumin (200ug/kg, 200ug/ml in saline). Animals were divided into three groups, control (n=11), Hb group (n=10), and SnPP group (n=15). Hb group animals received rat hemoglobin (150mg/kg, 75mg/ml in saline), which was injected into the rat tail vein 16h before antigen-challenge, while in SnPP group, SnPP (50umol/kg) was administered subcutaneously 21h before

antigen-challenge.

Drugs

The following drugs were used: Evans blue dye, Ovalbumin, rat hemoglobin (Sigma chemical co.), $Al(OH)_3$, Bordetella pertussis (Wako pure chemical industries LTD.), and SnPP (Porphyrin products, Inc.).

Statistical analysis

Results are reported as means \pm SEM. For statistical analysis, we used one-way analysis of variance. Significance was accepted at $p < 0.05$.

Results

Intravenous injection of ovalbumin (200 μ g/mg) caused a significant leakage of EB dye in the trachea (138.7 \pm 20.0ng/mg), main bronchi (100.1 \pm 14.1ng/mg), and segmental bronchi (47.1 \pm 8.1ng/mg). The EB dye leakage is highest in the trachea, followed by main bronchi and segmental bronchi. 16h pretreatment with Hb (150mg/kg) significantly reduced the vascular leakage in the trachea ($p < 0.05$) by 42.2% and main bronchi ($p < 0.05$) by 42.5%, but not in segmental bronchi ($p > 0.05$). In contrast, 21h pretreatment with SnPP (50 μ mol/kg) further potentiated ovalbumin-induced vascular leakage in all tissues, increased 31.5% in the trachea, 36.7% in the main bronchi and 57.0% in the segmental bronchi (Figure 1).

PIP was without obvious change after ovalbumin challenge in all groups (data not shown).

Discussion

Our results show that pretreatment of Hb decreases the pulmonary vascular permeability that is produced by antigen-challenge, whereas SnPP increases it. Hb is a potent inducer of HO-1, and SnPP is a competitive inhibitor of HO. HO is the rate limiting enzyme in the catabolism of heme molecules. Two isoforms of HO have been characterised, the constitutive form heme oxygenase-2 and an inducible form heme oxygenase-1[18]. HO is induced not only by the substrate heme but also by a variety of non-heme inducers such as heavy metals, cytokines, hormones, endotoxins, sulfhydryl reagents, and heat shock[19-20]. Recent studies suggest that HO-1 plays important roles in cellular protection against oxidant injury[10-14]. Our results suggest that HO-1 is also involved in the pulmonary vascular leakage induced by antigen-challenge.

Several of the inflammatory cells which are believed to participate in the inflammatory

response of asthmatic airways have been shown to release reactive oxygen species after activation by a variety of stimuli. Activation of mast cells, macrophages[21,22], eosinophils[23], and neutrophils[24] generates O_2^- , which are rapidly converted to H_2O_2 by superoxide dismutase (SOD). These metabolites may have effects on the various target cells of the airway. Oxygen radicals cause increased vascular permeability, possibly via a direct damaging effect on vascular endothelial cells[25]. Antigen-challenge activates eosinophils. It is likely that HO-1 effects as a scavenger of oxygen radicals, consequently inhibits the increase in vascular leakage induced by antigen-challenge. However, in the present study, Hb pretreatment did not completely inhibit the vascular leakage if it is referred that the EB dye extravasation is lower than 30ng/mg tissue in trachea, main bronchi and segmental bronchi in OA-sensitized animals without OA challenge[26]. Hb (75mg/kg) pretreatment reduced the vascular leakage of EB dye by 42.2% in trachea, 42.5% in main bronchi. This study suggests the involvement of HO-1 in the rat model of increased vascular permeability induced by antigen challenge. Other mediators are also significant contributors to increased vascular permeability during antigen challenge[27,28].

One of our previous studies showed that the vascular permeability is low in OA-sensitized guinea pigs without antigen-challenge. The leakage of EB dye is lower than 30ng/mg tissue in the trachea, main bronchi, and nasal mucosa[28]. We found that intravenous injection of ovalbumin (200mg/kg) significantly increased the leakage of EB dye compared with saline control in the trachea (41.3 \pm 8.7ng/mg), main bronchi (56.3 \pm 8.8ng/mg), and nasal mucosa (80.1 \pm 10.0ng/mg) in sensitized guinea pigs. The present study is partly in accord with the previous one. In OA-sensitized rats, antigen-challenge (OA 200mg/kg, iv) also induced a significant leakage of EB dye in the trachea (138.7 \pm 20.0ng/mg), main bronchi (100.1 \pm 10.1ng/mg), and segmental bronchi (47.1 \pm 8.1ng/mg). But the absolute value of EB dye leakage is much higher in rats than that in guinea pigs. Furthermore, in guinea pigs, the EB dye leakage is highest in segmental bronchi, followed by main bronchi and trachea[26]. But our study shows that it is highest in trachea, followed by main bronchi and segmental bronchi. This difference may be due to different species.

Otterbein et al emphasized a crucial pretreatment period for the functional effect of HO-1 inducer[14]. They observed that experiments in which rats receiving simultaneous administration of hemoglobin and a lethal dose of LPS all died within 8 to 10 h, comparable to rats receiving a lethal dose of LPS alone. Additionally, a shorter pretreatment period (4h) of hemoglobin administration also failed to provide a protection against a lethal dose of LPS. Importantly, HO enzyme activity was not induced at 4h after

hemoglobin injection in rat lungs. They conclude that for protection against lethal endotoxemia, pretreatment with hemoglobin to induce HO-1 induction before administration of a lethal dose of LPS is essential. In the present experiment, we chose a 16h pretreatment because previous reports have observed that 16h after hemoglobin was the time point at which peak HO enzyme activity is observed in rat tissue[29]. Increased HO-1 mRNA induction was highest in the rat lung, followed by heart, liver, spleen, and kidney 16h after hemoglobin administration.

Plasma exudation is a feature of the inflamed airways of asthmatics and may contribute significantly to the pathogenesis of asthma and bronchial hyperresponsiveness. Reduction of plasma leakage may, thus, be useful in asthma therapy. The present study shows that OA antigen-induced increases in vascular permeability were inhibited in part by pretreatment of HO-inducer, hemoglobin, and potentiated by pretreatment of HO inhibitor, SnPP. Thus HO-1 may play an important role in regulating allergic reactions. HO-1 or HO-1 inducers may be of value in the treatment of bronchial asthma.

Acknowledgment

This work was supported partly by 日中医学協会.

References

- 1.Halliwell B. and Gutteridge MC. 1985. Free Radicals in Biology and Medicine. Clarendon Press, Oxford, England.
- 2.Fridovich I. 1978. The biology of oxygen radicals. Science. 201:875-880.
- 3.Kimball RE., Reddy K, and Pierce TH. 1976. Oxygen toxicity: augmentation of anti-oxidant defense mechanisms in rat lung. Am.J.Physiol.230:1425-1431.
- 4.Freeman B, and Crapo JD. 1981. Hyperoxia increases oxygen radical production in rat lungs and lung mitochondria. J.Biol.Chem. 256:10986-10092.
- 5.Clark JM, and Lambertson CJ. 1971. Pulmonary oxygen toxicity: a review. Pharmacol.Rev. 23:37-133.
- 6.Barnes PJ. 1989. New concepts in the pathogenesis of bronchial hyperresponsiveness and asthma. J. Allergy Clin. Immunol. 83:1013-1026.
- 7.Barnes PJ. 1989. A new approach to asthma therapy. N. Engl. J.Med. 321:1517-1527.
- 8.Barnes,P.J. 1990. Reactive oxygen species and airway inflammation. Free Radical bilolgy& Medicine 9:235-243.
- 9.Djukanovic R, Roche WR, Wilson JW, Beasley CRW, Twentyman OP, Howarth PH, and Holgate ST. 1990. Mucosal inflammation in asthma. Am Rev Respir Dis 142:434-457.

10. Vile GF, Basu-Modak S, Waltner C, and Tyrrell RM. 1994. Heme oxygenase I mediates an adaptive response to oxidative stress in human skin fibroblasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:2607-2610.
11. Vile GF, Tyrrell RM. 1994. Oxidative stress resulting from ultraviolet A irradiation of human skin fibroblasts leads to a heme oxygenase-dependent increase in ferritin. *J. Biol. Chem.* 268:14678-14681.
12. Abraham NG, Lavrovsky Y, Schwartzman L, Stoltz RA, Levere RD, Gerritsen ME, Shibahara S, and Kappas A. 1995. Transfection of the human heme oxygenase gene into rabbit coronary microvessel endothelial cells: protective effect against heme and hemoglobin toxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:6798-6802.
13. Nath DA, Balla G, Vercelotti GM, Balla J, Jacob HS, Levitt MD, and Rosenberg ME. 1992. Induction of heme oxygenase is a rapid, protective response in rhabdomyolysis in the rat. *J. Clin. Invest.* 90:267-270.
14. Otterbein L, Sylvester SL, and Choi AMK. 1995. Hemoglobin provides protection against lethal endotoxemia in rats: the role of heme oxygenase-1. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 13:595-601.
15. Blythe S, England D, Esser B, Junk P, and Lemanske RF. 1986. IgE antibody mediated inflammation of rat lung: histologic and bronchoalveolar lavage assessment. *Am Rev Respir Dis.* 134:1246-1251.
16. Saria A, Lundberg JM. 1983. Evans blue fluorescence: quantitative and morphological evaluation of vascular permeability in animal tissues. *J Neurosci Methods.* 8:41-49.
17. Utake K, Takeuchi Y, Movat HZ. 1970. Simple method for quantitation of enhanced vascular permeability. *Proc Soc Exp Biol Med.* 133:1384-1387.
18. Willis D. 1995. Expression and modulatory effects of heme oxygenase in acute inflammation in the rat. *Inflamm Res* 44, Suppl 2: S218-S220.
19. Abraham NG, Lin JHC, Scharzman L, Levere RD, and Shibahara S. 1988. The physiological significance of heme oxygenase. *Int. J. Biochem.* 20:543-558.
20. Lautier D, Luscher P, and Tyrrell RM. 1992. Endogenous glutathione levels modulate both constitutive and UVA radiation/hydrogen peroxide inducible expression of the human heme oxygenase gene. *Carcinogenesis.* 13:227-232.
21. Drath DB, Karnovsky ML. 1975. Superoxide production by phagocytic leukocytes. *J. Exp. Med.* 141:257-262.
22. Babior BM. 1984. The respiratory burst of phagocytes. *J. Clin. Invest.* 73:599-601.
23. De Chatelet LR, Shirley PS, McPhail LC, Huntley CC, Muss HB, and Bass DA. 1977. Oxidation metabolism of the human eosinophil. *Blood* 50:526-535.
24. Babior BM, Kipnes RS, Curnutte JT. 1973. The production by leukocytes of

superoxide, a potential bactericidal agent. *J. Clin. Invest.* 52:741-744.

25. Del Maestro RF, Bjork J, and Arfors KE. 1981. Increase in microvascular permeability induced by enzymatically generated free radicals. I. In vivo study. *Microvasc. Res.* 22:239-254.

26. Miura M, Ichinose M, Kageyama N, Tomaki M, Tsuneyuki T, Ishikawa J, Ohuchi Y, Oyake T, Endoh N, and Shirato K. 1996. Endogenous nitric oxide modifies antigen-induced microvascular leakage in sensitized guinea pig airways. *J Allergy Clin Immunol.* 98:144-151.

27. Evans TW, Rogers DF, Aursudkij B, Chung KF, Barnes PJ. 1988. Inflammatory mediators involved in antigen-induced airway microvascular leakage in guinea pigs. *Am Rev Respir Dis.* 138:395-399.

28. Sekizawa K, Nakazawa H, Morikawa M, Yamauchi K, Maeyama K, Watanabe T, and Sasaki H. 1995. Allergens, IgE, Mediators, inflammatory mechanisms: Guanabene B-methyltransferase inhibitor potentiates histamine- and antigen-induced airway microvascular leakage in guinea pigs. *J Allergy Clin Immunol.* 96:910-916.

29. Pimstone NR, Engel P, Tenhunen R, Seitz PT, Marver HS, and Schmid R. 1971. Inducible heme oxygenase in the kidney: a model for the homeostatic control of hemoglobin catabolism. *J. Clin. Invest.* 50:2042-2050.

日本財団補助金による

1997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—

10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 黄 建勇

研究機関 大阪歯科大学 内科学講座 研究指導者 堂前 尚親 職名 教授

所在地 〒573-1121 枚方市榊葉花園町8-1 電話 0720-64-3079 内線 3039

II. 過去の研究歴

昭和62年福建医学院(中華人民共和国)卒業、福建医学院附属协和医院勤務後、
平成4年6月1日より、大阪歯科大学博士課程専攻生として、内科学講座において腫瘍
免疫学の研究を開始する。

III. 過去の研究実績

1. 黄建勇他、5名。自己免疫発症における細胞機能の解析。厚生省特定疾患“免疫異常の発症機
調直研究班”平成6年度研究報告書 16-18, 1995.
2. 黄建勇他、5名。NK細胞におけるCD2, FcR架橋刺激によるPI-3キナーゼの活性化と細胞内
顆粒放出能との関係。厚生省特定疾患 平成7年度研究報告書 31-34, 1996

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25回日本臨床免疫学会。CD2架橋刺激によるNK細胞の活性化シグナルと細胞傷害能
2. 第27回日本免疫学会。CD2架橋刺激によるNK細胞活性化シグナル(1)
3. International Symposium on Recent Advances of Human Tumor Immunology and
Immunotherapy. Involvement of protein tyrosine kinase, p72^{syk} and PI-3 kinase in -

(2) 学会誌等に発表した論文 無 ・ (雑誌名・論文名)

Journal of Immunology, Vol 159: 1200-1207, 1997.
"Involvement of protein tyrosine kinase p72^{syk} and phosphatidylinositol 3-
kinase in CD2-mediated granular exocytosis in the natural killer cell
line, NK3.3"

V. 今後の研究計画及び希望

来年度より、米国カリフォルニア州サンディエゴ、La Jolla Institute for Allergy of
Immunology" の Dr. Howard M. Grey のもとで、研究留学に入る予定です。

私は、養子免疫療法の改良にあたり、NK 細胞の活性化メカニズムを CD2 分子を介したシグナル伝達の面より解析いたしました。A) CD 2 分子架橋刺激による細胞内顆粒放出能についての検討: CD2 抗体濃度依存性に細胞内顆粒放出の増強を認めた。この効果は、抗 CD16 抗体にても同様に認められたが、コントロール IgG や、抗 LFA-1, CD28 抗体では認められなかった。また、チロシンキナーゼ阻害剤である Herbimycin と PI 3 キナーゼ阻害剤である Wortmannin は、この効果を完全に抑制した。B) CD2 架橋刺激による、NK 細胞内蛋白のチロシンリン酸化: CD2, および CD16 架橋刺激により、数種のチロシンリン酸化蛋白が出現した。さらに、免疫沈降 Syk のチロシンリン酸化と in vitro kinase assay による検討により、CD2, および CD16 架橋刺激により Syk の活性化が起こっていることを確認した。C) CD2 架橋刺激による PI 3-キナーゼの活性化: PI 3-キナーゼは、p85 subunit の SH2 domain を介して細胞内チロシンリン酸化蛋白に結合し活性増強を受けることが知られている。そこで、CD2 架橋刺激後に、チロシンリン酸化蛋白を免疫沈降し、これに結合する PI 3-キナーゼを immuno blott 法により検出したところ、CD2, および CD16 架橋刺激により、チロシンリン酸化蛋白に結合した PI 3-キナーゼが増加していた。さらにこの免疫沈降物の PI 3-キナーゼ活性も増強していた。D) 細胞内アダプター蛋白 Shc のチロシンリン酸化と PI 3-キナーゼとの結合: Shc は、CD2 および CD16 架橋刺激により著明にチロシンリン酸化を受けていた。しかも、チロシンリン酸化 Shc に結合した PI 3-キナーゼ活性も有意に増強していた。以上の結果より、NK 活性化レセプターである CD2 分子は、チロシンキナーゼ Syk と PI 3-キナーゼの活性化を介して、細胞内顆粒放出を引き起こしていることが明らかとなった。以上の結果を Journal Immunology vol:159, 1200-1207, 1997 に発表いたしました。

VII. 指導教官の意見

黄 建勇 君は、約4年半のあいだ勤勉に研究に取り組み、彼の優れた資質により、立派な成果を残しました。これも一重に日中医学協会の御援助のお陰と感謝致しております。また、研究室内での人間関係も良く、スムーズな研究室の運営に貢献致しました。来年度より、米国カリフォルニア州サンディエゴの La Jolla Institute for Allergy and Immunology, Dr. Howard M Grey のもとで研究を続けることが決まっております。今後も、彼のさらなる飛躍を期待いたしております。



在592人②

Involvement of Protein Tyrosine Kinase p72^{syk} and Phosphatidylinositol 3-Kinase in CD2-Mediated Granular Exocytosis in the Natural Killer Cell Line, NK3.3¹

Hisanori Umehara,^{2*} Jian-Yong Huang,* Takeshi Kono,[†] Fazal H. Tabassam,* Toshiro Okazaki,* Eda T. Bloom,[‡] and Naohika Domae*

The granular exocytosis pathway is one mechanism by which NK cells and CTLs induce cytolysis of target cells. Triggering through adhesion molecules such as CD2 and LFA-1 as well as Fc γ RIII (CD16) can invoke this pathway. CD2 is a cell surface glycoprotein present on CTLs and NK cells that plays an important role in both cellular adhesion and signal transduction. Here we report that cross-linking of CD2 as well as CD16 by immobilized Abs enhances granular exocytosis in an NK cell line, NK3.3. Herbimycin, a protein tyrosine kinase (PTK) inhibitor, or wortmannin, a specific inhibitor of phosphatidylinositol 3-kinase (PI 3-K), inhibited completely or almost completely CD2- or CD16-mediated granular exocytosis, suggesting the involvement of protein tyrosine kinases and PI 3-K in both CD2- and CD16-mediated granular exocytosis. We also observed that cross-linking of CD2 as well as CD16 enhances p72^{syk} tyrosine kinase activity, and this enhancement correlated well with the increased tyrosine phosphorylation of several cellular proteins, including the adapter protein Shc. Furthermore, we have observed that cross-linking of CD2 as well as CD16 enhances the PI 3-K activity associated with the tyrosine-phosphorylated cellular proteins and Shc. These results provide insight into the signaling pathways by which triggering of CD2 and CD16 on NK cells leads to cytolysis of target cells. *The Journal of Immunology*, 1997, 159: 1200–1207.

NK cells express a low affinity Fc γ RIII³ (CD16) and are believed to mediate immunity against viruses and surveillance against neoplastic transformation. The granular exocytosis pathway, using lytic mediators, such as perforin, and several proteases (granzymes) residing within cytoplasmic granules, is one mechanism by which NK cells or CTLs mediate cytotoxicity (1). This mechanism induces both necrotic and apoptotic death of target cells (2, 3) and can be triggered by CD16 as well as adhesion molecules on NK cells (4, 5). We previously reported that the β_2 integrin, LFA-1 (CD11a/CD18), on NK cells was tyrosine phosphorylated during the generation of LAK cells, and that cross-linking of LFA-1 on LAK cells enhanced the production of inositol 1,4,5-triphosphate and induced a Ca²⁺-dependent increase in granular exocytosis (6). Kanner et al. re-

ported that co-cross-linking of LFA-1 with CD3 in T cells increased tyrosine phosphorylation of phospholipase C- γ (PLC- γ) and mobilization of intracellular calcium (7). Signaling through other receptors on NK cells, such as CD2 and CD16, is also reported to induce tyrosine phosphorylation of PLC- γ , resulting in Ca²⁺ influx and cytolytic activity (8–10). Although the protein tyrosine kinase (PTK) and PLC- γ pathways, leading to phosphatidylinositol (PtdIns) breakdown and the mobilization of intracellular calcium, are important in signaling through adhesion molecules, other signaling molecules, such as GTP binding proteins and phosphatidylinositol 3-kinase (PI 3-K), may be involved in granular exocytosis by NK cells (11–13).

It is well established that receptor-type tyrosine kinases, such as platelet-derived growth factor and epidermal growth factor receptors, mediate activation of PI 3-K as well as that of PLC- γ (14). Several lines of evidence demonstrate that stimulation of TCR and B cell Ag receptors (BCR), which lack tyrosine kinase domains but are functionally coupled to PTKs such as p56^{lck} (*Lck*), p59^{fyn} (*Fyn*), and p53/56^{lyn} (*Lyn*), can also mediate PI 3-K activation (15–17). PI 3-K consists of an 85-kDa regulatory subunit (p85) and a 110-kDa catalytic subunit that phosphorylates PtdIns at the 3-D position of the inositol ring (18, 19). The products of PI 3-K are not substrates for PLC- γ and, therefore, must participate in cellular signaling through a novel mechanism. CD2 is a glycoprotein adhesion molecule present on CTLs and NK cells and reported to be crucial for the activation of T cells or NK cells via *Lck* and *Fyn* (4, 20, 21), which mediate PI 3-K activation (14–17). We, therefore, hypothesized that signaling through adhesion molecules on NK cells, such as CD2, involves PI 3-K.

Here we report that cross-linking of CD2 by immobilized Ab enhances exocytosis of cytoplasmic granules, and that both herbimycin, a tyrosine kinase inhibitor, and wortmannin, a potent and selective inhibitor of PI 3-K, prevent CD2-mediated granule exocytosis in an NK cell line, NK3.3, suggesting the involvement of

*Department of Medicine, Osaka Dental University, Osaka; and [†]Department of Molecular Cell Biology, Kawanishi Pharma Institute, Nippon Boehringer Ingelheim, Kawanishi, Japan; and [‡]Division of Cellular and Gene Therapies, Center for Biologics Evaluation and Research, Food and Drug Administration, Bethesda, MD 20892

Received for publication October 15, 1996. Accepted for publication May 1, 1997.

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked *advertisement* in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

¹ This work was supported by Grant 06671899 from the Japanese Ministry of Education, Science, and Culture; the Uehara Memorial Foundation (to H.U. and J.Y.H.); the Science Research Promotion Fund of the Japan Private School Promotion Foundation; and the Osaka Dental University Research Foundation (to H.U., T.O., and N.D.).

² Address correspondence and reprint requests to Dr. Hisanori Umehara, Department of Medicine, Osaka Dental University, 1–5–31 Otemae, Chuo-ku, Osaka 540, Japan.

³ Abbreviations used in this paper: Fc γ R (Fc γ RIII), low affinity Fc receptor for immunoglobulin G; PLC, phospholipase C; PTK, protein tyrosine kinase; PtdIns, phosphatidylinositol; PI 3-K, phosphatidylinositol 3-kinase; BCR, B cell antigen receptor; *Lck*, p56^{lck}; *Fyn*, p59^{fyn}; *Lyn*, p53/56^{lyn}; p85, p85 subunit of PI 3-K; *Syk*, p72^{syk}; BLTE, N^ε-benzyloxycarbonyl-L-lysine thiobenzyl ester; MBP, myelin basic protein; PSL, photostimulated luminescence.

PTKs and PI 3-K in CD2-mediated granular exocytosis. We further observed that cross-linking of CD2 activates the PTK p72^{Syk} (Syk), enhances tyrosine phosphorylation of cellular proteins including an adapter protein Shc, and enhances PI 3-K activity associated with tyrosine-phosphorylated proteins and Shc.

Materials and Methods

Cell and cell culture

The human NK cell line, NK3.3, was provided by Dr. Jacki Kornbluth (University of Arkansas, Little Rock, AR) (22) and maintained in RPMI 1640 medium supplemented with 10% heat-inactivated FCS (Upstate Biotechnology, Inc., Lake Placid, NY), 2 mM L-glutamine, penicillin, and 2 nM rIL-2 (Shionogi Co., Ltd., Osaka, Japan). NK3.3 cells expressed CD2, LFA-1 α (CD11a), LFA-1 β (CD18), CD45, ICAM-1 (CD54), and Fc γ RIII (CD16), but not CD3 or CD28 (data not shown), characteristics similar to those of NK cell populations present in peripheral blood.

Abs and reagents

Hybridomas producing Abs against CD11a (LFA-1 α : TS1/22; IgG1), CD18 (LFA-1 β : TS1/18; IgG1), and CD2 (TS2/18; IgG1) were purchased from the American Type Culture Collection (Rockville, MD), and mAbs were purified as previously described (6). Monoclonal anti-phosphotyrosine Ab (4G10) and polyclonal Abs against the p85 subunit of PI 3-K and Shc were obtained from Upstate Biotechnology. Control IgG1 (MOPC-31c), N^ε-benzyloxycarbonyl-L-lysine thiobenzyl ester (BLTE), 5,5'-bithiobis(2-nitro-benzoic acid), and myelin basic protein (MBP) were purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO). Anti-Fc γ RIII (CD16: B-E16; IgG1) mAb was purchased from Serotec (Oxford, U.K.). Anti-human CD28 mAb (TN228; IgG1) was provided by Dr. M. Azuma (Juntendo University, Tokyo, Japan). Anti-CD45 mAb (UCHL1; IgG2a) was purchased from Dako (Glostrup, Denmark). Anti-p72^{Syk} (Syk) mAb and wortmannin were obtained from Wako Pure Chemical Industries (Osaka, Japan), and rabbit anti-human Syk Ab, useful for Western blot analysis, was provided by Dr. T. Kurosaki (Lederle Laboratory, New York, NY). Rabbit anti-mouse IgG mAb was purchased from Cappel (Durham, NC). The ECL immunodetection system and horseradish peroxidase-conjugated goat anti-mouse or anti-rabbit IgG mAb were obtained from Amersham International (Amersham, Aylesbury, U.K.). Polybeads (polystyrene microspheres, 2.5% solid latex; diameter = 6 μ m; no. 07312) were purchased from Polysciences, Inc. (Warrington, PA).

Cross-linking of surface Ags and measurement of BLTE esterase activity

Flat-bottom microtiter plate wells were coated with 20 μ g/ml rabbit anti-mouse IgG at 4°C overnight. Wells were then washed and incubated with control IgG1 (MOPC 31c) or Abs against LFA-1 α , LFA-1 β , CD2, CD28, CD45 (20 μ g/ml), and CD16 (1/100 dilution) at 37°C for 1 h, followed by several PBS washes. NK3.3 cells (2×10^5) were added in 200 μ l of phenol red-free RPMI 1640 (IBL, Fujioka, Japan) containing 2% FCS and incubated at 37°C for 4 h, and 100- μ l aliquots were harvested from each well for BLTE esterase assay. In some experiments, cells were incubated in the presence of herbimycin or wortmannin in DMSO at 37°C for 2 h and 20 min before the assay, respectively. The final concentration of DMSO did not exceed 0.1%. The BLTE esterase assay was adapted to 200 μ l for use in 96-well plates (6). Optical density was read at 414 nm on an ELISA microplate reader (Iwaki, Osaka, Japan), and the percentage of BLTE esterase activity was calculated as: (experimental BLTE esterase release - spontaneous BLTE esterase release)/(maximum BLTE esterase release - spontaneous BLTE esterase release) \times 100.

Cell stimulation, solubilization, and immunoprecipitation

Polybeads were prepared as described previously (23), by coating with 20 μ g/ml rabbit anti-mouse IgG, followed by storage with the Ab, and extensive washing before use. NK3.3 cells (5×10^6) were washed and resuspended in 100 μ l of RPMI 1640 medium and incubated with Abs (20 μ g/ml or 1/100 dilution for anti-CD16) for 30 min on ice. After washing, cells were resuspended in 100 μ l of RPMI 1640 containing 2% FCS and stimulated with rabbit anti-mouse IgG-bound polystyrene beads at a ratio of 1:2 at 37°C for 3 min in polypropylene round-bottom tubes in a final volume of 200 μ l/tube. The reaction was terminated by the addition of 800 μ l of ice-cold RPMI 1640 and centrifuged for 2 min. Cells were solubilized with lysis buffer containing 50 mM Tris-HCl (pH 7.6), 0.5% Triton X-100, 300 mM NaCl, 5 mM EDTA, 10 μ g/ml leupeptin, 10 μ g/ml aprotinin, 1 mM PMSF, and 1 mM sodium orthovanadate by gentle rocking at 4°C for

30 min. Insoluble material was removed by centrifugation, and the supernatants were subjected to SDS-PAGE for Western blotting or to immunoprecipitation with protein G beads precoated with the anti-phosphotyrosine mAb (4G10) or anti-Shc Ab.

Electrophoresis, Western blotting, and immunoblotting

Cell lysates and immunoprecipitated proteins were eluted by boiling in SDS-containing sample buffer and fractionated by SDS-PAGE (8%) (24). Proteins were electrophoretically transferred to polyvinylidene difluoride (Immobilon-P) membranes (Sigma Chemical Co.). Membranes were blocked using 10% Blockace (Dainippon Pharmaceutical Co., Ltd., Osaka, Japan) in 50 mM Tris-HCl (pH 7.5) and 150 mM NaCl overnight. Membranes were incubated for 3 h with anti-phosphotyrosine mAb, 4G10 (1 μ g/ml) or anti-p85 subunit, and anti-Shc Ab (1/1000), as indicated, in PBS containing 0.05% Tween-20 and 10% Blockace. Peroxidase-conjugated secondary Abs (Amersham) were used at a 1/1000 dilution, and immunoreactive bands were visualized using ECL (Amersham).

In vitro kinase assay

The in vitro kinase reaction was essentially as described by Minami et al. (25). Briefly, anti-Syk immunoprecipitates were washed once with kinase buffer (25 mM HEPES (pH 7.4), 0.1% Nonidet P-40, 10 mM MgCl₂, 3 mM MnCl₂, and 1 mM orthovanadate) and resuspended in 30 μ l of the kinase buffer containing 2 μ g of MBP as the substrate. Reactions were initiated by the addition of 3.75 μ M [γ -³²P]ATP (10 μ Ci of [γ -³²P]ATP/sample, 5000 Ci/mmol; Amersham), incubated for 5 min at 25°C, and terminated by the addition of an equal volume of 2 \times Laemmli buffer. Samples were subjected to SDS-PAGE (11% gels) under reducing conditions and were electrophoretically transferred to polyvinylidene difluoride membrane filters, which were treated with 1 N KOH for 2 h at 55°C, fixed, and subjected to autoradiography. Radioactivity within bands was also estimated using a Bio-Imaging analyzer (BAS 2000, Fuji Photo Film Co. Ltd., Tokyo, Japan), corrected for background, and expressed as photostimulated luminescence (PSL) arbitrary units.

Measurement of PI 3-K enzymatic activity

The PI 3-K activity of anti-phosphotyrosine or anti-Shc immunoprecipitates was measured by the method of Whitman et al. (26). Briefly, immunoprecipitates were washed twice with lysis buffer, followed by once with PBS, once with 0.5 M LiCl/0.1 M Tris-HCl, pH 7.5, once with distilled water, and once with 0.1 M NaCl/1 mM EDTA/20 mM Tris-HCl, pH 7.5, and then assayed for PI 3-K activity. All wash solutions contained 0.2 mM sodium orthovanadate. To evaluate PI 3-K activity, PtdIns (Sigma Chemical Co.) and [γ -³²P]ATP (10 μ Ci/sample, Amersham) were added to the immunoprecipitates at room temperature for 10 min. PtdIns was suspended in 10 mM HEPES/1 mM EGTA, pH 7.5, sonicated before use, and added to the immunoprecipitates at a final concentration of 0.2 mg/ml. [γ -³²P]ATP was added in a solution of 50 mM ATP, 5 mM MgCl₂, and 1 mM HEPES. The lipid-containing organic phase was resolved on oxalate-coated TLC plates (Silica Gel 60, MCB reagents, Merck, Rahway, NJ), developed in chloroform/methanol/water/ammonium hydroxide (43/38/7/5), and lipid species were visualized by autoradiography. Radioactivity within spots of PtdIns-3'-monophosphate was estimated with a Bio-Imaging analyzer and expressed as PSL arbitrary units.

Results

CD2-mediated granular exocytosis in NK3.3 cells and effects of herbimycin and wortmannin on BLTE secretion

It has been reported that various surface receptors, such as CD2 and CD16, can participate in target cell lysis via the granular exocytosis pathway (4). Therefore, we first examined whether cross-linking of CD2 induced granular exocytosis in the NK cell line, NK3.3. Cross-linking of CD2 on NK3.3 cells enhanced BLTE esterase secretion in an Ab-dose dependent manner (Fig. 1A). Although CD2 lacks an intrinsic tyrosine kinase domain, it has been reported to be functionally and physically associated with *src* family tyrosine kinases, *Fyn* and *Lck* (27, 28). Therefore, we examined the effect of a specific tyrosine kinase inhibitor, herbimycin, on CD2-mediated BLTE esterase release. Herbimycin suppressed CD2-mediated granular exocytosis in a dose-dependent manner (data not shown), and treatment of cells with 10 μ M herbimycin significantly reduced CD2- as well as CD16-mediated granular

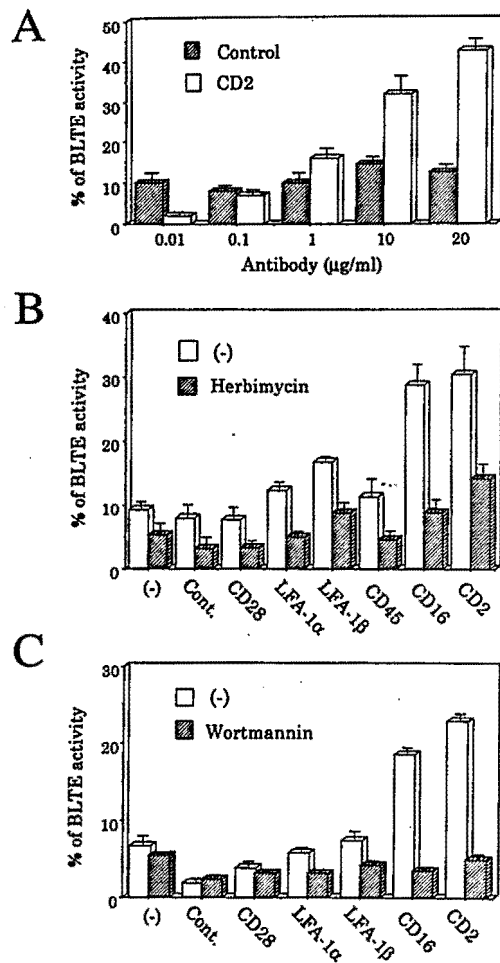


FIGURE 1. Induction of BLTE esterase release by cross-linking of CD2 and effects of herbimycin and wortmannin on BLTE secretion. Cross-linking of CD2 enhances BLTE esterase secretion that depends on the dose of Ab used. NK3.3 cells (5×10^5) were stimulated with immobilized CD2 mAb or control IgG1 at the indicated concentration at 37°C for 4 h. BLTE esterase activity was measured and expressed as described in *Materials and Methods* (A). NK3.3 cells were incubated in the absence or the presence of 10 μ M herbimycin for 2 h, then stimulated with the indicated Abs (1/100 for CD16 mAb or 20 μ g/ml for the others) for 4 h, and supernatants were assayed for BLTE esterase activity. Herbimycin inhibited CD2- as well as CD16-mediated BLTE secretion (B). NK3.3 cells were incubated in the absence or the presence of 10^{-7} M wortmannin for 20 min, then stimulated with the indicated Abs (1/100 for CD16 mAb or 20 μ g/ml for the others) for 4 h, and supernatants were assayed for BLTE esterase activity. Wortmannin inhibited CD2- as well as CD16-mediated BLTE secretion (C). These data are representative of more than three independent experiments.

exocytosis (Fig. 1B). Previously, we reported that cross-linking of LFA-1 had no effect on BLTE release in fresh NK cells, while it increased BLTE secretion in LAK cells that had been produced by IL-2 stimulation of NK cells, suggesting a functional change in LFA-1 during IL-2 activation (6). A slight or moderate increase in BLTE secretion following cross-linking of LFA-1 was also observed in NK3.3 cells (Fig. 1, B and C), a finding consistent with our previous results, since NK3.3 cells are continuously cultured with IL-2.

Since PI 3-K is reported to be involved in various biologic functions such as membrane ruffling (29), endocytosis (30), and histamine secretion (31), the PI 3-K pathway as well as the PLC- γ

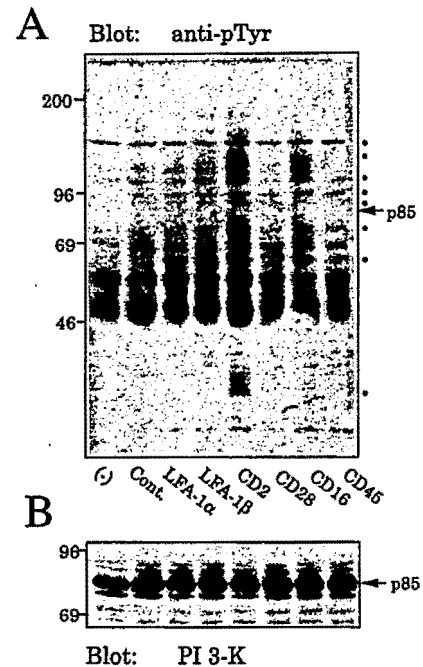


FIGURE 2. Induction of protein tyrosine phosphorylation by cross-linking of CD2 in NK3.3 cells. NK3.3 cells were treated with the indicated Abs and stimulated using polybeads coupled to rabbit anti-mouse IgG Ab at 37°C for 3 min. Detergent-soluble proteins were fractionated by SDS-PAGE (8% polyacrylamide gel) and were transferred to an Immobilon-P membrane. The membrane was immunoblotted with anti-phosphotyrosine mAb (A) and then stripped and immunoblotted with Ab against the p85 subunit of PI 3-K (B). Open circles indicate tyrosine-phosphorylated proteins, and the arrow indicates p85. The migration positions of m.w. markers are indicated. Data are representative of five independent experiments.

pathway, may be crucial for cytoskeletal rearrangement and granular exocytosis at the site of effector-target cell conjugation. Therefore, we examined the effect of a specific inhibitor of PI 3-K, wortmannin, on CD2-mediated BLTE esterase release. The data demonstrated that wortmannin inhibited CD2-mediated granular exocytosis in a concentration-dependent manner (data not shown) and that treatment of cells with 10^{-7} M wortmannin also essentially abrogated the CD2- as well as CD16-mediated granular exocytosis (Fig. 1C). These results suggest that PTKs and PI 3-K are both involved in CD2- and CD16-induced granular exocytosis.

Cross-linking of CD2 induces tyrosine phosphorylation of cellular proteins in NK3.3

To ascertain whether stimulation through CD2 activates PTKs in NK3.3 cells, CD2 was cross-linked, and tyrosine-phosphorylated proteins were analyzed by Western blotting using anti-phosphotyrosine Ab. The data (Fig. 2A) demonstrated that cross-linking of CD2 as well as CD16 triggered tyrosine phosphorylation of several cellular proteins migrating with apparent molecular mass of 160, 140, 120, 105, 90, 72, and 56 kDa, suggesting that these receptors may use similar signaling pathways. In contrast, cross-linking of LFA-1 α , LFA-1 β , or CD45 or of CD28 as a negative control or use of an isotype-matched control IgG1 induced no detectable increase in tyrosine phosphorylation of cellular proteins in NK3.3 cells. The same membrane was stripped and immunoblotted with Ab against the p85 subunit of PI 3-K. Although considerable amounts of p85 were detected in lysates (Fig. 2B), tyrosine phosphorylation of a band corresponding to p85 was not observed in any of the NK3.3 cell lysates (Fig. 2A, arrow).

Cross-linking of CD2 activates *Syk* in NK3.3

It has been reported that CD2-mediated signals depend in part on the CD3 ζ -chain, a signal-transducing subunit of the TCR/CD3 complex, and that CD16 on NK cells is functionally equivalent to the TCR on T cells for coupling CD2 to its signaling pathway (10, 32, 33). At least four PTKs have been shown to be implicated in the TCR/CD3-mediated signal pathway: two kinases of the *src* family, *Lck* and *Fyn*, and two of the *Syk* family, ZAP-70 and *Syk*. The recruitment of the *Syk* family tyrosine kinases, ZAP-70 and *Syk*, to the TCR/CD3/ ζ complex is probably a key step in the CD3-mediated signal transduction, most likely by an interaction through SH2 domains (20). Therefore, we examined whether cross-linking of CD2 activates *Syk* in NK3.3 cells. Cells were stimulated by cross-linking of surface receptors for 3 min, and detergent-soluble proteins were immunoprecipitated with anti-*Syk* mAb, resolved by SDS-PAGE, and immunoblotted with anti-phosphotyrosine mAb (Fig. 3A). The same membrane was stripped and immunoblotted with anti-*Syk* polyclonal Ab (Fig. 3B). The results indicated that tyrosine phosphorylation of a band corresponding to *Syk* was induced by cross-linking of CD2 and CD16 (Fig. 3A). We then examined *Syk* kinase activity using an in vitro kinase assay. Figure 3C revealed that cross-linking of CD2 markedly increased *Syk* kinase activity using MBP as substrate (1768 PSL U/mm²), and cross-linking of CD16 moderately increased *Syk* activity (1280 PSL U/mm²) compared with engagement of other surface receptors or treatment with control IgG1 (991, 923, 638, and 765 PSL U/mm² for LFA-1 β , CD28, CD45, and control IgG1, respectively). The less marked *Syk* activation as a result of CD16 cross-linking compared with CD2 cross-linking may be due to the differential surface expression of CD16 and CD2 on NK3.3. FACS analysis revealed that the intensity of CD16 expression on NK3.3 cells is substantially lower than that of CD2 and LFA-1 (data not shown). Therefore, CD16 cross-linking may not be sufficient to activate *Syk* in NK3.3 cells.

Cross-linking of CD2 increases the association between PI 3-K and tyrosine-phosphorylated proteins

It has been reported that tyrosine phosphorylation of p85 is induced by platelet-derived growth factor or IL-2 stimulation and correlated with increased PI 3-K activity (34, 35). Since our Western blotting experiments did not reveal increased tyrosine phosphorylation corresponding to p85 after cross-linking of CD2 (Fig. 2A), we immunoprecipitated p85 and examined its tyrosine phosphorylation to verify whether cross-linking of CD2 directly induces tyrosine phosphorylation of p85. These data also revealed no tyrosine phosphorylation of p85 after cross-linking of CD2 or CD16 (data not shown). p85 is reported to contain two SH2 domains and bind to tyrosine-phosphorylated YXXM motifs (17, 36). Therefore, we examined the possible association between PI 3-K and tyrosine-phosphorylated cellular proteins following cross-linking of CD2. NK3.3 cells were stimulated by cross-linking of surface receptors for 3 min, and detergent-soluble proteins were immunoprecipitated with anti-phosphotyrosine Ab and immunoblotted with Ab against p85. The data in Figure 4A clearly showed that cross-linking of CD2 as well as CD16 increased the association between PI 3-K and immunoprecipitable tyrosine-phosphorylated proteins. Anti-phosphotyrosine immunoprecipitates were also examined for PI 3-K activity by in vitro PI 3-K enzymatic assay, and radioactivity of spots relevant to PtdIns-P was estimated with a Bio-Imaging analyzer. The results revealed that PI 3-K activity associated with tyrosine-phosphorylated proteins was also augmented following cross-linking of CD2 or CD16 (Fig. 4B).

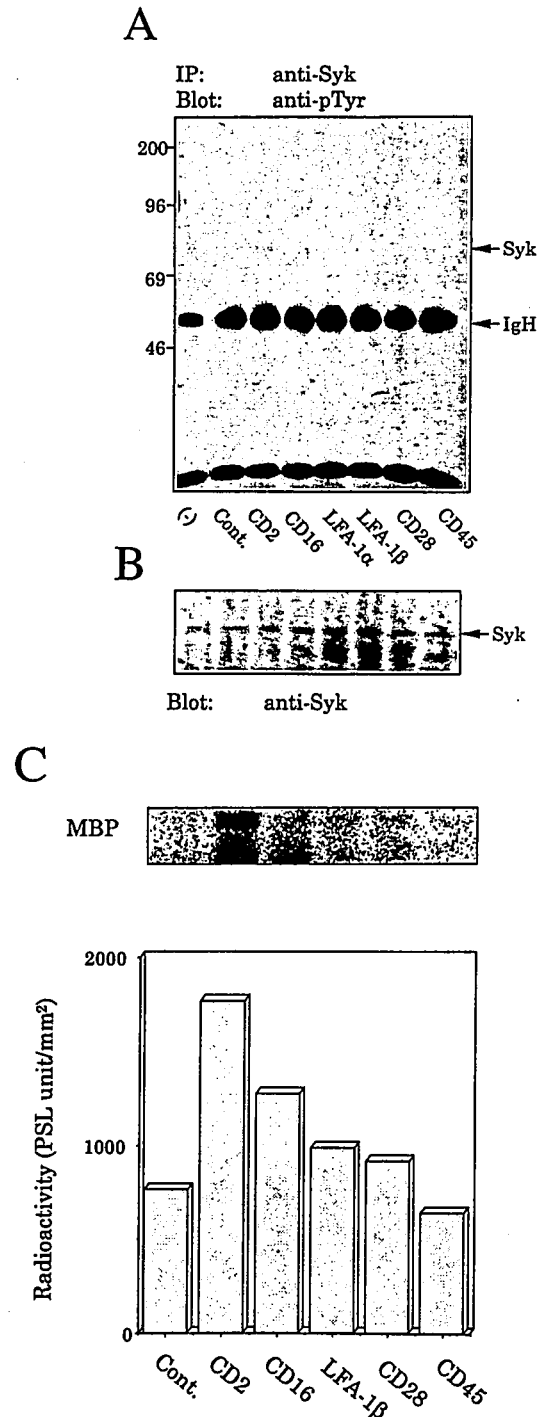


FIGURE 3. Cross-linking CD2 activates *Syk* protein kinase. NK3.3 cells (5×10^6 /sample) were stimulated with the indicated Abs using polybeads coupled to rabbit anti-mouse IgG Ab at 37°C for 3 min, and detergent-soluble proteins were immunoprecipitated with anti-*Syk* mAb, resolved by SDS-PAGE, and immunoblotted with antiphosphotyrosine mAb (A). The same membrane was stripped and immunoblotted with anti-*Syk* polyclonal Ab (B). Arrows indicate the position of *Syk* and the heavy chain of IgG (IgH). The migration positions of m.w. markers are indicated. Anti-*Syk* immunoprecipitates were subjected to in vitro kinase assay as described in *Materials and Methods*. Tyrosine phosphorylation of MBP was monitored for evaluating *Syk* kinase activity (top panel), and radioactivity within bands was also estimated by a Bio-Imaging analyzer and expressed as PSL arbitrary units as described in *Materials and Methods* (bottom; C). These data are representative of three for A and B, and two for C.

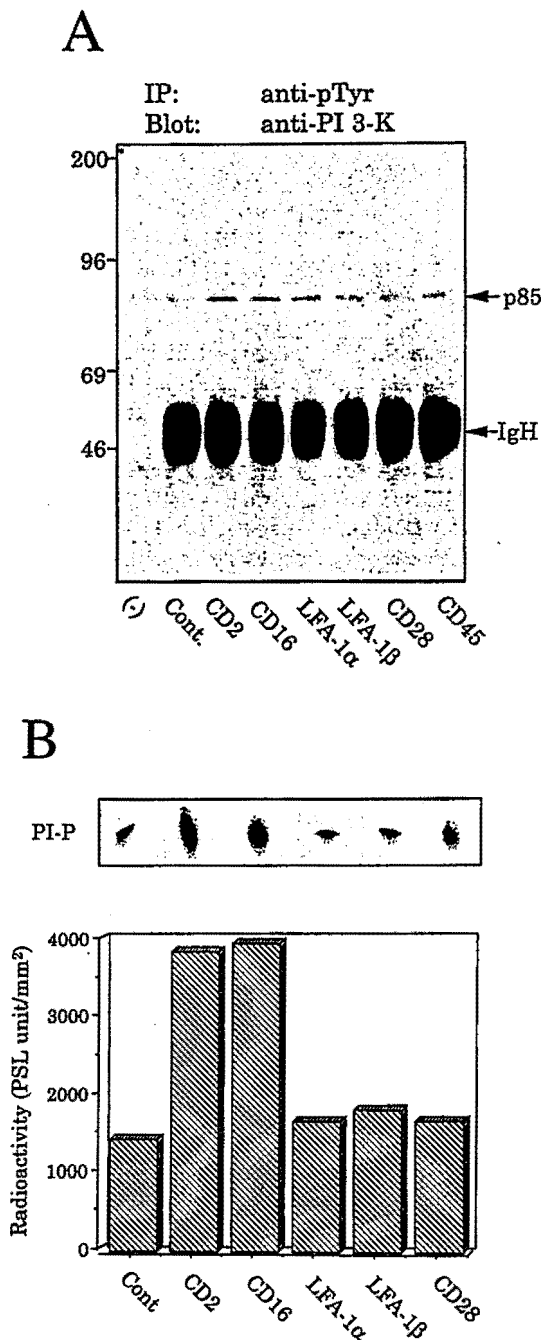


FIGURE 4. Association of PI 3-K with tyrosine-phosphorylated proteins induced by cross-linking of CD2. NK3.3 cells were treated with the indicated Abs and stimulated with polybeads coupled to the rabbit anti-mouse IgG Ab at 37°C for 3 min. Tyrosine-phosphorylated proteins were immunoprecipitated with anti-phosphotyrosine mAb (4G10) coupled to protein G beads. Precipitated proteins were fractionated by SDS-PAGE and transferred to an Immobilon-P membrane. The membrane was immunoblotted with Ab against the p85 subunit of PI 3-K. Arrows indicate the position of p85, and the huge bands at M_r 50 kDa are nonspecific binding of rabbit IgG used for cross-linking of receptors. The migration positions of weight markers are indicated (A). Immunoprecipitates, obtained as described for A, were assayed for PI 3-K activity as described in *Materials and Methods*. The reaction products were subjected to TLC and visualized by autoradiography. Radioactivity within spots of PtdIns-P (PI-P; top panel) was estimated by a Bio-Imaging analyzer and expressed as PSL arbitrary units as described in *Materials and Methods* (B). These data are representative of two independent experiments.

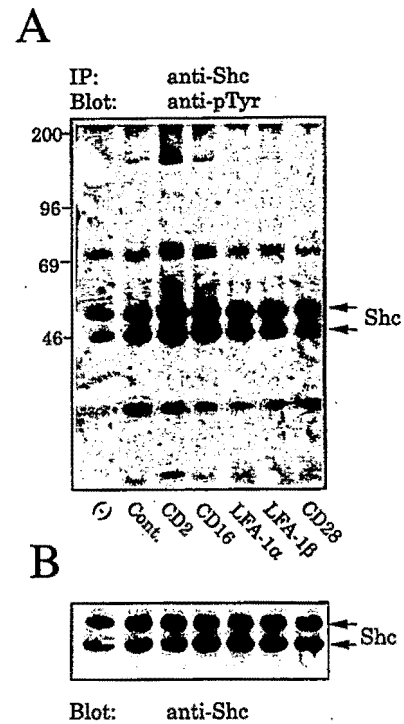


FIGURE 5. Cross-linking of CD2 enhances tyrosine phosphorylation of Shc. NK3.3 cells (5×10^6 /sample) were stimulated with the indicated Abs using polybeads coupled to rabbit anti-mouse IgG Ab at 37°C for 3 min, and detergent-soluble proteins were immunoprecipitated with anti-Shc Ab, resolved by SDS-PAGE, and immunoblotted with anti-phosphotyrosine mAb (A). The same membrane was stripped and immunoblotted with anti-Shc polyclonal Ab (B). Arrows indicate the positions of p46 and p52 Shc proteins, and the migration positions of m.w. markers are indicated.

Cross-linking of CD2 enhances the tyrosine phosphorylation of Shc and increases PI 3-K activity associated with Shc

Shc is an adapter protein that is widely expressed in all tissues and contains an SH2 domain and a collagen-like domain but no obvious catalytic domain. Shc proteins of 46 and 52 kDa encoded by a 3.4-kb mRNA are ubiquitously expressed, whereas a 66-kDa Shc is likely to be encoded by a distinct Shc transcript and is absent in some hemopoietic cells (37). Because this protein is phosphorylated on tyrosine residues in cells transformed by nonreceptor tyrosine kinases such as *v-src* and *v-fps* (37) and by cross-linking of CD3 in T cells (38) or through the stimulation of growth factors, we speculated that Shc might couple the PI 3-K and be involved in the CD2-mediated signal pathway. To evaluate the role of Shc, we determined whether Shc is tyrosine-phosphorylated by cross-linking of CD2 in NK cells. Cells were stimulated by cross-linking of surface receptors for 3 min, and Shc were immunoprecipitated, resolved by SDS-PAGE, and immunoblotted with anti-phosphotyrosine mAb (Fig. 5A). The same membrane was stripped and immunoblotted with anti-Shc Ab (Fig. 5B). The results indicated that tyrosine phosphorylation of 46- and 52-kDa Shc proteins was enhanced by cross-linking of CD2 as well as CD16 (Fig. 5A). Specifically, CD2-mediated tyrosine phosphorylation of Shc was observed in a CD2 Ab concentration-dependent manner, increased within 1 min, and peaked at 3 min (data not shown). To ascertain the association between Shc and PI 3-K, anti-Shc immunoprecipitates were also examined for PI 3-K activity by *in vitro* PI 3-K enzymatic assay, and radioactivity of spots relevant to PtdIns-P was estimated by a Bio-Imaging analyzer. The results revealed that PI 3-K activity

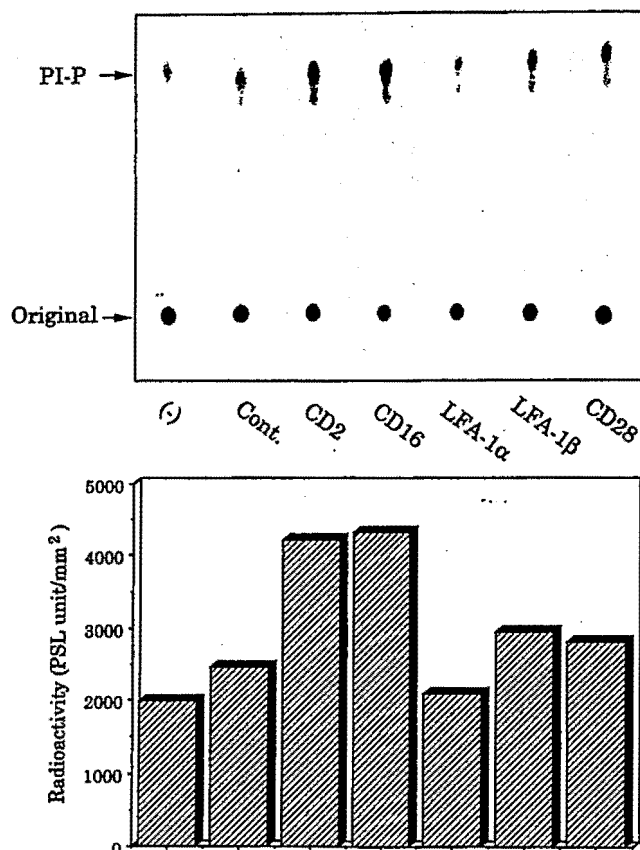


FIGURE 6. Cross-linking of CD2 increases the PI 3-K activity associated with Shc. Shc immunoprecipitates, obtained as described in Figure 5, were assayed for PI 3-K activity as described in *Materials and Methods*. The reaction products were subjected to TLC and visualized by autoradiography (*top panel*). Radioactivity within spots of PtdIns-P (PI-P) was estimated by a Bio-Imaging analyzer and expressed as PSL arbitrary units as described in *Materials and Methods* (*bottom*). These data are representative of two independent experiments.

associated with Shc precipitates was also augmented by cross-linking of CD2 as well as CD16 (Fig. 6).

Discussion

Although CD2 is believed not only to serve adhesion functions by binding its ligands CD48, CD58, and CD59, but also to generate transmembrane signals during the activation of T cells and NK cells, there have been conflicting reports about the signal transduction ability of CD2 on T cells and NK cells. The anti-CD2 mAb (IgG3) in the form of F(ab')₂ is reported to have no effect on cytoplasmic calcium influx and cytolytic activity in NK cells, and the trace amounts of contamination of cross-linking Ab in the form of whole IgG have been found to induce calcium influx (9, 10), suggesting that bridging and comodulation of CD2 and CD16 may be required for CD2-mediated signal transduction. In our assay, we used the isotype-matched Abs (IgG1) against CD2, CD16, LFA-1 α , LFA-1 β , CD28, control IgG1, and cross-linking Ab in the form of whole IgG. In contrast to the effects seen by cross-linking CD2 or CD16, we could not detect a significant increase in BLTE esterase secretion (Fig. 1), tyrosine phosphorylation of cellular proteins (Fig. 2), or Syk activation (Fig. 3) by cross-linking of LFA-1 α or LFA-1 β or by use of control anti-CD28 or control IgG1, suggesting that the nonspecific binding of the Fc portion of Abs to CD16 did not stimulate NK3.3 cells. Furthermore, co-cross-

linking experiments with anti-CD2 and anti-CD16 Ab revealed no synergistic effects on either granular exocytosis or tyrosine phosphorylation of cellular proteins (data not shown). Therefore, we concluded that multivalent cross-linking of CD2 itself was sufficient to transduce signals in NK3.3 cells and may represent another means of triggering a similar response to that through CD16.

CD2-induced signaling events depend on the cytoplasmic domain of CD2, which is relatively large (116 amino acids); is highly conserved among humans, rats, and mice; and lacks intrinsic kinase activity (39). The remarkable capacity of CD2 to activate T cells and NK cells raises the possibility that, like CD3/TCR, CD2 interacts with cytoplasmic PTKs. Previous studies revealed that CD2 and CD16 are functionally and physically associated with the *src* family tyrosine kinases, *Fyn* and *Lck* (28, 40, 41), and induce tyrosine phosphorylation of PLC- γ (8, 27). Recently, Bell et al. clearly demonstrated that the SH3 domain of *Lck* binds to proline-rich sequences in the cytoplasmic domain of CD2 (42). It has been reported that signal transduction via CD2 in NK cells is dependent in part on the CD3/ ζ -chain, a signal-transducing subunit of the TCR complex, or the γ subunit of CD16, which is homologous to the CD3/ ζ -chain (10, 33, 43). The current model of T cell activation is based on a sequential interaction of *src* and *Syk* family PTKs with the TCR/CD3/ ζ complex, which by itself lacks intrinsic kinase activity. *Lck* or *Fyn* is thought to be responsible for the tyrosine phosphorylation of the CD3/ ζ -chain on the immunoreceptor tyrosine-based activation motif (ITAM; YXXL-based sequences interspaced by six to eight amino acids) that is present as three copies in each ζ subunit and as two copies in γ subunit of CD16, which lead to recruitment of the tyrosine kinase ZAP-70, most likely by an interaction mediated by SH2 domains (20). *Syk* is structurally homologous to ZAP-70, with two tandemly arranged SH2 domains and a C-terminal kinase domain (44), and a similar mechanism of recruitment has been proposed for *Syk*. *Syk* has been reported to be activated by various receptors, such as CD3/TCR (45–47), BCR (48), Fc ϵ RI (49), and Fc γ RIIA (50). In NK cells, engagement of CD16 has been reported to induce tyrosine phosphorylation of cellular proteins (51) and to increase the catalytic activity of both ZAP-70 and *Syk* (52, 53). Therefore, we examined whether cross-linking of CD2 activates *Syk* in NK cells, and we found that cross-linking of CD2 or CD16 enhances tyrosine phosphorylation of *Syk* and activates its kinase activity against MBP substrates (Fig. 3, A and C), suggesting that CD2 and CD16 use similar signaling pathways.

Involvement of PI 3-K in CD16-mediated signal transduction and granular exocytosis in NK cells has been reported (12, 13). Our results extend these analyses by demonstrating that cross-linking of CD2 as well as CD16 stimulates *Syk* kinase activity (Fig. 3, A and C) and enhances tyrosine phosphorylation of cellular proteins and an adapter protein, Shc (Figs. 2A and 5A), resulting in the increase in PI 3-K activity associated with tyrosine-phosphorylated Shc (Fig. 6). Although we could not detect tyrosine phosphorylation of p85 in NK3.3 cells, we have observed increased PI 3-K activity in phosphotyrosine immunoprecipitates following cross-linking of CD2 or CD16, as reported for CD3 stimulation of T cells (54, 55). The p85 subunit contains two SH2 domains that bind to tyrosine-phosphorylated YXXM motifs, one SH3 domain that binds to the proline-rich region of *src* family kinases, and two proline-rich regions that are docking sites for SH3 of *src* family PTKs (17, 36). Thus, PI 3-K participates in the assembly of signal transducing complexes through multiple association sites. Although Shimizu et al. have reported constitutive association of PI 3-K and CD2 in a CD2-transfected cell line (56), we found PI 3-K associated with CD2 in CD2 immunoprecipitates as well as in control immunoprecipitates (data not shown). Therefore, our data

do not support a specific association between PI 3-K and CD2 in NK3.3 cells. A possible alternative explanation for the participation of PI 3-K in the CD2-mediated signaling and granular exocytosis may be that the SH2 domains of the p85 subunit bind to tyrosine-phosphorylated receptors and/or adapter proteins. It is reported that full activation of PI 3-K occurs only when both SH2 domains of p85 are occupied by tyrosine-phosphorylated YXXM motifs, and partial activation occurs when either SH2 domain is occupied (57, 58). We speculated that Shc, an adapter protein, may associate with and regulate PI 3-K activity, because it has been reported to be phosphorylated on tyrosine residues by *Syk* as well as other PTKs (59, 60). Shc has also been reported to associate with PI 3-K or to be involved in the assembly of signaling complexes that include PI 3-K following stimulation through CD3/TCR, BCR, or cytokine receptors (37, 61–63). Therefore, we examined whether cross-linking of CD2 increases Shc tyrosine phosphorylation and mediates the association between PI 3-K and Shc. The results clearly demonstrated that cross-linking of CD2 increases tyrosine phosphorylation of Shc (Fig. 5A) and enhances PI 3-K activity associated with Shc (Fig. 6). We examined Grb2-associated PI 3-K activity and found that no remarkable change in PI 3-K activity was induced by cross-linking of CD2 or CD16. Furthermore, we examined the Grb2-associated molecules by binding assay using glutathione-S-transferase fusion proteins of Grb2 and found that Grb2 associated with Shc, but not with PI 3-K. These results indicate that neither direct association of Grb2 and PI 3-K nor a trimolecular complex of Shc, Grb2, and PI 3-K was formed in significant amounts (data not shown). Although several reports have indicated the physical association of PI 3-K with *src* family PTKs (15–17), we propose an additional mechanism for the involvement of PI 3-K in the CD2-mediated signal pathway: 1) cross-linking of CD2 as well as CD16 activates *Syk* directly or dependent upon tyrosine phosphorylation of the γ subunit of CD16 through *Lck* activation; 2) activated *Syk* induces phosphorylation of Shc on tyrosine residues; and 3) full or partial activation of PI 3-K is mediated by association with Shc via SH2 domains of p85.

In conclusion, we have clearly demonstrated that CD2-mediated granular exocytosis in NK cells is dependent on PTKs and PI 3-K activity, since herbimycin or wortmannin strongly inhibited or completely abrogated CD2-mediated granular exocytosis. Moreover, we have observed that cross-linking of CD2 increases *Syk* kinase activity and enhances tyrosine phosphorylation of cellular proteins such as Shc, resulting in increased PI 3-K activity associated with Shc. These results suggest a potential role for *Syk* and PI 3-K in the CD2-mediated signal pathway and granular exocytosis.

Acknowledgments

We thank Dr. J. Kornbluth for providing the NK 3.3 cell line, Dr. M. Azuma for the generous gift of anti-CD28 mAb, and Dr. A. Morinobu for performing FACS analysis. We also thank Dr. Y. Minami for the critical review and the insightful discussion, and members of the Nippon Immunologic Herald (National Institutes of Health) for helpful comments.

References

- Podack, E. R. 1995. Functional significance of two cytolytic pathways of cytotoxic T lymphocytes. *J. Leukocyte Biol.* 57:548.
- Smyth, M. J., and J. A. Trapani. 1995. Granzymes: exogenous proteinases that induce target cell apoptosis. *Immunol. Today* 16:202.
- Henkart, P. A., M. S. Williams, and H. Nakajima. 1995. Degranulating cytotoxic lymphocytes inflict multiple damage pathway on target cells. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 198:75.
- Storkus, W. J., and J. R. Dawson. 1991. Target structures involved in natural killing (NK): characteristics, distribution, and candidate molecules. *Crit. Rev. Immunol.* 10:393.
- Dustin, M. L., and T. A. Springer. 1991. Role of lymphocyte adhesion receptors in transient interactions and cell locomotion. *Annu. Rev. Immunol.* 9:27.
- Umehara, H., A. Takashima, Y. Minami, and E. T. Bloom. 1993. Signal transduction via phosphorylated adhesion molecule, LFA-1 β (CD18), is increased by culture of natural killer(NK) cells with interleukin(IL)-2, and distinguishes NK from lymphokine-activated killer cells. *Int. Immunol.* 5:19.
- Kanner, S. B., L. S. Grosmaire, J. A. Ledbetter, and N. K. Damle. 1993. β 2-Integrin LFA-1 signaling through phospholipase C- γ 1 activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:7099.
- Liao, F., H. S. Shin, and S. G. Rhee. 1993. Cross-linking of Fc γ RIIIA on natural killer cells results in tyrosine phosphorylation of PLC- γ 1 and PLC- γ 2. *J. Immunol.* 150:2668.
- Anasetti, C., P. J. Martin, C. H. June, K. E. Hellstrom, J. A. Ledbetter, P. S. Rabinovitch, Y. Morishita, I. Hellstrom, and J. A. Hansen. 1987. Induction of calcium flux and enhancement of cytolytic activity in natural killer cells by cross-linking of the sheep erythrocyte binding protein (CD2) and the Fc-receptor (CD16). *J. Immunol.* 139:1772.
- Spruyt, L. L., M. J. Glennie, A. D. Beyers, and A. F. Williams. 1991. Signal transduction by the CD2 antigen in T cells and natural killer cells: requirement for expression of a functional T cell receptor or binding of antibody Fc to the Fc receptor, Fc γ RIIIA (CD16). *J. Exp. Med.* 174:1407.
- Schrezenmeier, H., G. Ahnert-Hilger, and B. Fleischer. 1988. A T cell receptor-associated GTP-binding protein triggers T cell receptor-mediated granule exocytosis in cytotoxic T lymphocytes. *J. Immunol.* 141:3785.
- Kanakaraj, P., B. Duckworth, L. Azzoni, M. Kamoun, L. C. Cantley, and B. Perussia. 1994. Phosphatidylinositol-3 kinase activation induced upon Fc γ RIIIA-ligand interaction. *J. Exp. Med.* 179:551.
- Bonnema, J. D., L. M. Karnits, R. A. Schoon, R. T. Abraham, and P. J. Leibson. 1994. Fc receptor stimulation of phosphatidylinositol 3-kinase in natural killer cells is associated with protein kinase C-independent granule release and cell-mediated cytotoxicity. *J. Exp. Med.* 180:1427.
- Kaplan, D. R., D. K. Morrison, G. Wong, F. McCormick, and L. T. Williams. 1990. PDGF β -receptor stimulates tyrosine phosphorylation of GAP and association of GAP with a signaling complex. *Cell* 61:125.
- Carrera, A. C., L. Rodriguez-Borlondo, C. Martinez-Alonso, and I. Merida. 1994. T cell receptor-associated a-phosphatidylinositol 3-kinase becomes activated by T cell receptor cross-linking and requires pp56^{lck}. *J. Biol. Chem.* 269:19435.
- Prasad, K. V. S., O. Janssen, R. Kapeller, M. Raab, L. C. Cantley, and C. E. Rudd. 1993. *src*-homology 3 domain of protein kinase p59^{src} mediates binding to phosphatidylinositol 3-kinase in T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:7366.
- Pleiman, C. M., W. M. Herz, and J. C. Cambier. 1994. Activation of phosphatidylinositol-3' kinase by *src*-family kinase SH3 binding to the p85 subunit. *Science* 263:1609.
- Otsu, M., I. Hiles, I. Gout, M. J. Fry, F. Ruiz-Larrea, G. Panayotou, A. Thompson, R. Dhand, J. Hsuan, N. Totty, A. D. Smith, S. J. Morgan, and M. D. Waterfield. 1991. Characterization of two 85 kd proteins that associate with receptor tyrosine kinases, middle-T/pp60^{c-src} complexes, and PI3-kinase. *Cell* 65:91.
- Hiles, I. D., M. Otsu, S. Volinia, M. J. Fry, I. Gout, R. Dhand, G. Panayotou, F. Ruiz-Larrea, A. Thompson, N. F. Totty, J. J. Hsuan, S. A. Courtneige, P. J. Parker, and M. D. Waterfield. 1992. Phosphatidylinositol 3-kinase: structure and expression of the 110 kd catalytic subunit. *Cell* 70:419.
- Chan, A. C., D. M. Desai, and A. Weiss. 1994. The role of protein tyrosine kinases and protein tyrosine phosphatases in T cell antigen receptor signal transduction. *Annu. Rev. Immunol.* 12:555.
- Altman, A., K. M. Coggeshall, and T. Mustelin. 1990. Molecular events mediating T cell activation. *Adv. Immunol.* 48:227.
- Kornbluth, J., N. Flomenberg, and B. Dupont. 1982. Cell surface phenotype of a cloned line of human natural killer cells. *J. Immunol.* 129:2831.
- Van Seventer, G. A., E. Bonvini, H. Yamada, A. Conti, S. Stringfellow, C. H. June, and S. Shaw. 1992. Costimulation of T cell receptor/CD3-mediated activation of resting human CD4⁺ T cells by leukocyte function-associated antigen-1 ligand intercellular cell adhesion molecule-1 involves prolonged inositol phospholipid hydrolysis and sustained increase of intracellular Ca²⁺ levels. *J. Immunol.* 149:3872.
- Umehara, H., Y. Minami, N. Domae, and E. T. Bloom. 1994. Increased processing of lymphocyte function-associated antigen-1 in human natural killer cells stimulated with IL-2. *Int. Immunol.* 6:1071.
- Minami, Y., Y. Nakagawa, A. Kawahara, T. Miyazaki, K. Sada, H. Yamamura, and T. Taniguchi. 1995. Protein tyrosine kinase *Syk* is associated with and activated by the IL-2 receptor: possible link with the *c-myc* induction pathway. *Immunity* 2:89.
- Whitman, M., D. R. Kaplan, B. Schaffhausen, and L. Cantley. 1985. Association of phosphatidylinositol kinase activity with polyoma middle-T competent for transformation. *Nature* 315:239.
- Kanner, S. B., N. K. Damle, J. Blake, A. Aruffo, and J. A. Ledbetter. 1992. CD2/CD3 ligation induces phospholipase C γ 1 tyrosine phosphorylation and regulates CD3 signaling. *J. Immunol.* 148:2023.
- Gassmann, M., K. E. Amrein, N. Flint, B. Schraven, and P. Burn. 1994. Identification of a signaling complex involving CD2, ζ chain and p59^{src} in T lymphocytes. *Eur. J. Immunol.* 24:139.
- Kotani, K., K. Yonezawa, K. Hara, H. Ueda, Y. Kitamura, H. Sakaue, A. Ando, A. Chavanieu, B. Calas, F. Grigorescu, M. Nishiyama, M. D. Waterfield, and M. Kasuga. 1994. Involvement of phosphoinositide 3-kinase in insulin- or IGF-1-induced membrane ruffling. *EMBO J.* 13:2313.
- Li, G., C. D'Souza-Schorey, M. A. Barbieri, R. L. Roberts, A. Klippel, L. T. Williams, and P. D. Stahl. 1995. Evidence for phosphatidylinositol 3-kinase as a

- regulator of endocytosis via activation of Rab5. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:10207.
31. Yano, H., S. Nakanishi, K. Kimura, N. Hanai, Y. Saitoh, Y. Fukui, Y. Nonomura, and Y. Matsuda. 1993. Inhibition of histamine secretion by wortmannin through the blockade of phosphatidylinositol 3-kinase in RBL-2H3 cells. *J. Biol. Chem.* 268:25846.
 32. Vivier, E., P. M. Morin, C. O'Brein, S. F. Schlossman, and P. Anderson. 1991. CD2 is functionally linked to the ζ -natural killer receptor complex. *Eur. J. Immunol.* 21:1077.
 33. Moingeon, P., J. L. Lucich, D. J. McConkey, F. Letourneur, B. Malissen, J. Kochan, H. C. Chand, H. R. Rodewald, and E. L. Reinherz. 1992. CD3 ζ dependence of the CD2 pathway of activation in T lymphocytes and natural killer cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:1492.
 34. Kaplan, D. R., M. Whitman, B. Schaffhausen, D. C. Pallas, M. White, L. Cantley, and T. M. Roberts. 1987. Common elements in growth factor stimulation and oncogenic transformation: 85 kD phosphoprotein and phosphatidylinositol kinase activity. *Cell* 50:1021.
 35. Karnitz, L. M., S. T. Sutor, and R. T. Abraham. 1994. The *src*-family kinase, Fyn, regulates the activation of phosphatidylinositol 3-kinase in an interleukin-2-responsive T cell line. *J. Exp. Med.* 179:1799.
 36. Rudd, C. E., O. Janssen, Y. C. Cao, A. J. da Silva, M. Raab, and K. V. S. Prasad. 1994. Two-step TCR β /CD3-CD4 and CD28 signaling in T cells: SH2/SH3 domains, protein-tyrosine and lipid kinases. *Immunol. Today* 15:225.
 37. Pellicci, G., L. Lanfrancone, F. Grignani, J. McGlade, F. Cavallo, G. Forni, I. Nicoletti, F. Grignani, T. Pawson, and P. G. Pellicci. 1992. A novel transforming protein (SHC) with an SH2 domain is implicated in mitogenic signal transduction. *Cell* 70:93.
 38. Ravichandran, K. S., K. K. Lee, Z. Songyang, L. C. Cantley, P. Burn, and S. J. Burakoff. 1993. Interaction of Shc with the ζ chain of the T cell receptor upon T cell activation. *Science* 262:902.
 39. Moingeon, P., H. C. Chang, P. H. Sayre, L. K. Clayton, A. Alcover, P. Gardner, and E. L. Reinherz. 1989. The structural biology of CD2. *Immunol. Rev.* 111:111.
 40. Pignata, C., K. V. S. Prasad, M. J. Robertson, H. Levine, C. E. Rudd, and J. Ritz. 1993. Fc γ RIIIA-mediated signaling involves *src*-family *lck* in human natural killer cells. *J. Immunol.* 151:6794.
 41. Salcedo, T. W., T. Kurosaki, P. Kanakaraj, J. V. Ravetch, and B. Perussia. 1993. Physical and functional association of p56^{lck} with Fc γ RIIIA (CD16) in natural killer cells. *J. Exp. Med.* 177:1475.
 42. Bell, G. M., J. Fargnoli, J. B. Boleyn, L. Kish, and J. B. Imboden. 1996. The SH3 domain of p56^{lck} binds to proline-rich sequences in the cytoplasmic domain of CD2. *J. Exp. Med.* 183:169.
 43. Vivier, E., N. Rochet, M. Ackerly Petrini, John, H. Levine, J. Daly, and P. Anderson. 1992. Signaling function of reconstituted CD16: ζ : γ receptor complex isoforms. *Int. Immunol.* 4:1313.
 44. Taniguchi, T., T. Kobayashi, J. Kondo, K. Takahashi, H. Nakamura, J. Suzuki, K. Nagai, T. Yamada, S. Nakamura, and H. Yamamura. 1991. Molecular cloning of a porcine gene *syk* that encodes a 72-kDa protein-tyrosine kinase showing high susceptibility to proteolysis. *J. Biol. Chem.* 266:15790.
 45. Thome, M., P. Duplay, M. Guttinger, and O. Acuto. 1995. Syk and ZAP-70 mediate recruitment of p56^{lck}/CD4 to the activated T cell receptor/CD3/ ζ complex. *J. Exp. Med.* 181:1997.
 46. Chan, A. C., N. S. C. van Oers, A. Tran, L. Turka, C. L. Law, J. C. Ryan, E. A. Clark, and A. Weiss. 1994. Differential expression of ZAP-70 and Syk protein tyrosine kinases, and the role of this family of protein kinases in TCR signaling. *J. Immunol.* 152:4758.
 47. Couture, C., B. Gottfried, A. Altman, and T. Mustelin. 1994. p56^{lck}-independent activation and tyrosine phosphorylation of p72^{syk} by T-cell antigen receptor/CD3 stimulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:5301.
 48. Kurosaki, T., S. A. Johnson, L. Pao, K. Sada, H. Yamamura, and J. C. Cambier. 1995. Role of the *syk* autophosphorylation site and SH2 domains in B cell antigen receptor signaling. *J. Exp. Med.* 182:1815.
 49. Oliver, J. M., D. L. Burg, B. S. Wilson, J. L. McLaughlin, and R. L. Geahlen. 1994. Inhibition of mast cell Fc ϵ R1-mediated signaling and effector function by the Syk-selective inhibitor, Peceatannol. *J. Biol. Chem.* 269:29697.
 50. Shen, Z., C. T. Lin, and J. C. Unkeless. 1994. Correlation among tyrosine phosphorylation of Shc, p72^{syk}, PLC- γ 1, and [Ca²⁺]_i flux in Fc γ RIIA signaling. *J. Immunol.* 152:3017.
 51. Stahls, A., M. Heiskala, T. Mustelin, and L. C. Andersson. 1992. Activation of natural killer cells via the Fc γ RIII (CD16) requires initial tyrosine phosphorylation. *Eur. J. Immunol.* 22:611.
 52. Vivier, E., A. J. da Silva, M. Ackerly, H. Levine, C. E. Rudd, and P. Anderson. 1993. Association of a 70-kDa tyrosine phosphoprotein with the CD16: ζ : γ complex expressed in human natural killer cells. *Eur. J. Immunol.* 23:1972.
 53. Stahls, A., G. E. Liwszyc, C. Couture, T. Mustelin, and L. C. Andersson. 1994. Triggering of human natural killer cells through CD16 induces tyrosine phosphorylation of the p72^{syk} kinase. *Eur. J. Immunol.* 24:2491.
 54. Reif, K., I. Gout, M. D. Waterfield, and D. A. Cantrell. 1993. Divergent regulation of phosphatidylinositol 3-kinase p85 α and p85 β isoforms upon T cell activation. *J. Biol. Chem.* 268:10780.
 55. Shimizu, Y., J. L. Mobley, L. D. Finkelstein, and A. S. H. Chan. 1995. A role for phosphatidylinositol 3-kinase in the regulation of β 1 integrin activity by the CD2 antigen. *J. Cell Biol.* 131:1867.
 56. Ward, S. G., K. Reif, S. Ley, M. J. Fry, M. D. Waterfield, and D. A. Cantrell. 1992. Regulation of phosphoinositide kinase in T cells: evidence that phosphatidylinositol 3-kinase is not a substrate for T cell antigen receptor-regulated tyrosine kinases. *J. Biol. Chem.* 267:23862.
 57. Carpenter, C. L., K. R. Auger, M. Chanudhuri, M. Yoakim, B. Schaffhausen, S. Shoelson, and L. C. Cantley. 1993. Phosphoinositide 3-kinase is activated by phosphopeptides that bind to the SH2 domains of the 85-kDa subunit. *J. Biol. Chem.* 268:9478.
 58. Rordorf-Nikolic, T., D. J. Van Horn, D. Chen, M. F. White, and J. M. Backer. 1995. Regulation of phosphatidylinositol 3'-kinase by tyrosyl phosphoproteins. *J. Biol. Chem.* 270:3662.
 59. Nagai, K., M. Takata, H. Yamamura, and T. Kurosaki. 1995. Tyrosine phosphorylation of Shc is mediated through Lyn and Syk in B cell receptor signaling. *J. Biol. Chem.* 270:6824.
 60. Crowley, M. T., S. L. Harmer, and A. L. DeFranco. 1996. Activation-induced association of a 145-kDa tyrosine-phosphorylated protein with Shc and Syk in B lymphocytes and macrophages. *J. Biol. Chem.* 271:1145.
 61. Panchamoorthy, G., T. Fukazawa, S. Miyake, S. Soltoff, K. Reedquist, B. Druker, S. Shoelson, L. Cantley, and H. Band. 1996. p120^{cbt} is a major substrate of tyrosine phosphorylation upon B cell antigen receptor stimulation and interacts in vivo with Fyn and Syk tyrosine kinases, Grb2 and Shc adaptors, and the p85 subunit of phosphatidylinositol 3-kinase. *J. Biol. Chem.* 271:3187.
 62. Harrison-Findik, D., M. Susa, and L. Varticovski. 1995. Association of phosphatidylinositol 3-kinase with Shc in chronic myelogenous leukemia cells. *Oncogene* 10:1385.
 63. Evans, G. A., M. A. Goldsmith, J. A. Johnston, W. Xu, S. R. Weiler, R. Erwin, Z. O. M. Howard, R. T. Abraham, J. J. O'Shea, W. C. Green, and W. L. Farrar. 1995. Analysis of interleukin-2-dependent signal transduction through the Shc/Grb2 adapter pathway. *J. Biol. Chem.* 270:28858.

日本財団補助金による

1997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3日

財団法人 日中医学協会

理事長 中島章殿

I. 研究者氏名 李柔

研究機関 名古屋市立大学医学部小児科 研究指導者 和田義郎 職名 教授
所在地 名古屋市中区瑞穂区瑞穂町字川澄 電話 052-853-824 内線

II. 過去の研究歴

C型肝炎ウイルス(HCV)に感染した母子例を対象として、HCVのエンベロープ領域にある起可変領域の塩基配列を解析して、その多様性及び母子間の同一性を明らかにし、感染経路の解明を試みる。

III. 過去の研究実績

上記の研究についていくらかの成果をおよぼす。自験例の研究によって小児のC型肝炎のほとんどがその母親から移されたと明らかになる結果を得ました。それ第一作者で日本小児科学会雑誌に論文を三つ載せた。また共同研究者として数回の論文を発表した。

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・ (雑誌名・論文名)

"Homology of E2 gene in 8 child-mother pairs infected with hepatitis C virus." The Tohoku Journal of Experimental Medicine 1997, 183(3).

"Sequential change of hepatitis C virus E2 gene in two mother-child pairs." ~ (この論文は書いておいて、まだ最後に完成していません)

V. 今後の研究計画及び希望

今後ともHCVについて研究を続けるが、また、G型肝炎及びまた未知のウイルス性肝炎の原因や感染経路についての研究も進めたいです。

研究助成金を与えていただき、ありがとうございます。またお礼申し上げます。

今後とも研究助成金を頂く機会を与えてほしいです。

VI. 研 究 報 告 (日本語、又は英語で書いて下さい。4,000字以上で記載して下さい。別紙可)

研究報告は別紙にて。



VII. 指導教官の意見

李柔氏が貴財団の研究助成を得て行った研究結果は、今日のわが国における小児のC型肝炎の感染経路を明らかにするもので、成人の領域では国民病といわれるC型肝炎の予防および治療対策を小児の立場から明らかにする上で重要な知見が提供されたものと考えます。李柔氏の研究に対する姿勢は真摯で、助成の効果と十分生かされたものと思う。しかし、更に研究を進展させるためには貴財団の研究助成が継続できる体制が望まれる。

目的

(1) 小児におけるC型肝炎ウイルス (HCV) の感染機序を解明するため、HCVに感染した母子を対象にHCV E2領域の塩基配列を解析し、母子感染の確認に役立つか否かを検討する。

(2) HCVの変異状況と持続感染の関係を解明するため、HCVに感染した母子を対象にHCV E2領域の塩基配列を経時的に解析する。

対象

感染経路の解明については、名古屋市立大学病院小児科外来に通う小児8例とその母親8例とした。8例の性別は男児3例、女児5例で、年齢は2ヵ月から12歳であった。4例の児はHCV感染の母親から生まれ、フォローアップ中にHCVに感染した。他の4例の児はHCV抗体スクリーニングによって、HCV感染が判明し、母子共にHCV感染と診断された。児は全例輸血歴はなく、HCV水平感染のリスク因子もなかった。家族1の母子以外全例血液サンプルを同時に採取した。血液サンプルは採取後直ちに血清に分離し、 -30°C に保存した。

母子感染例におけるHCV E2領域の経時的解析は2組の母子で行った。即ち、

家族1：母親は妊娠初期に流産に対する免疫治療として夫の白血球の皮下注射を受けた。治療前の母親のHCV抗体は陰性であった。治療後夫がHCVキャリアであることが判明した。母親は分娩前にHCV抗体陽性となっていた。

児は生後3ヵ月時HCV RNA陽性で、その後ウイルス血症が持続している。

血清サンプルは児においては、生後3、6、9、12、15、21、27、および30ヵ月の8時点で、母親においては、分娩後3、9及び12ヵ月の3時点で採取した。

家族2：母親は無症候性HCVキャリアであった。生後4ヵ月に行った児のHCV RNA検査が陽性で、その後HCV RNA陽性が続いている。血清サンプルは児においては、生後4、6、9、12、18、24及び30ヵ月の7時点で、母親においては、分娩後4、6、9、12及び30ヵ月の5時点で採取した。

方法

RNA抽出とRT-PCRについて

血清 $100\ \mu\text{l}$ よりAGPC(acid guanidium thiocyanate-phenol-chloroform)法でRNAを抽出し、random hexamerをprimerとして、MMLV(maloney murine leukemia virus)逆転写酵素を用いてcDNAを合成した。

HCVゲノタイプの同定は岡本らの測定方法を一部改変して行った。即ち岡本らはHCVのC領域に位置するuniversal primer (sense)と4種類のtype-specific primers (antisense)の混合液を用いてPCR反応を行い、4つのgenotypeにHCVを分類しているが、4種類のtype-specific primersを別々に用いてPCR反応を行った。

HCVのE2領域ゲノムの増幅は岡田らの方法に従って行った。1st及びnested PCRはそれぞれ1種類のsense primerと2種類のantisense primerを用いた。PCR反応はthermal cyclerを用い、1st PCRでは35サイクル、nested PCRでは30サイクル行った。denaturation温度は 94°C 、annealing温度は 55°C 、extension温度は 72°C とし、反応時間はそれぞれ1分とした。

cDNAサブクローニング法について

増幅したcDNAはアガロース泳動した後目的のバンドを切り出し、ガラスパウダーで抽出した。制限酵素EcoRIとBclIIで処理した後cDNAのフラグメントをplasmid vectors (pUC119)のEcoRI/BamHIのサイトに組み込むことでクローン化した。1つの検体についてそれぞれ5つのcDNAクローンを解析した。

シーケンス解析について

塩基配列の解析はABI (Applied Biosystems)の Taq Dye Deoxy Terminator Cycle Sequencing Kit と 373A 蛍光DNA sequencerを用いて、プラス鎖とマイナス鎖について行った。

塩基及びアミノ酸の番号はgenotype IIでは、HCV-BK株、genotype IIIでは、J6株を基準とした。本研究では解析した全領域をF領域と定義し、更にそれを3つの部分、即ち超可変領域(HVR)-1、HVR-2、及びHVR-1と2の間の領域に分けて検討した。超可変領域-1と2の間の領域はI領域と定義した。

系統発生的解析について

I 領域に対して系統発生的解析を行った。この解析はソフトウェア GENETYX-MAC を用い、neighbor-joining法で行った。

結果と考察

HCVゲノタイプをtype-specific primersを用いたPCR法で検索した結果、家族1、4、6、7及び8の母子はtype IIと判定され、家族2、3と5の母子はtype IIIと判定された。一方cDNAクローンの塩基配列に最も類似した塩基配列をGenBankに登録されている塩基配列の中から検索すると、家族1、4、6、7及び8の母子のcDNA塩基配列はtype IIのHCV-BK株が選択された。同様に家族2、3、と5の母子ではtype IIIのHCV-J6株が選択された。即ち二つの異なった方法によってgenotype分類を検討したところ同じ結果であった。

Table 1は各症例それぞれ5クローン間の塩基及びアミノ酸配列の同一性を検討した結果を示す。各項の左側の値は各領域の塩基及びアミノ酸配列の最も高い変異率を示し、右側は最も高い保存率を意味する。百パーセントは解析した5クローンのcDNAの中に完全に一致したクローンが少なくとも2クローンあったことを意味する。

超可変領域-1においてクローンの種類を検討すると図1に示した通りである。

図1のaは家族1-5までの超可変領域のアミノ酸配列を示す。家族3の児では単一のアミノ酸配列が見られたが、他の症例では多種類の配列が見られた。図1のbは家族6-8までの超可変領域のアミノ酸配列を示す。家族6の母子とも単一のアミノ酸配列を示す。家族7の児と家族8の母親は以前にinterferonの治療を受けていたがHCVウイルス血症が続いていた。これらの症例では多種類のアミノ酸配列が観察された。なお、家族7の児の10クローン中7クローンには3塩基、1アミノ酸の挿入を認め、またその母親の11クローン中の9クローンには1塩基の欠失を認め、frame shiftにより生じたstop codonが多数認められた。

Table 2には児とその母親の間、児と他の児及び他の母親との間、また児とGenBankに登録されている塩基配列との間の一致率を各領域について検討した結果を示す。I領域について相同性をみると8組中6組(75%) (家族1、2、3、5、6と8)では児とその母親の間の塩基配列の相同性は、5クローン全部が児とほかの児、他の母親及びGenBankに登録されている最も類似性の高い塩基配列の間の相同性より高かった。1組(13%) (家族7)は一部のクローンのみ高い相同性を示した。即ち、児の10クローン中6クローンと母親の11クローン中の5クローンの間の相同性は児と他の児、他の母親及びGenBankからの塩基配列の間の相同性より高い値を示した。他の1組(13%) (家族4)は母子間の塩基配列の相同性が児の5クローン中の4クローンと家族7の母親の11クローン中の5クローンの間の相同性より低い値を示した。F領域について同様のことをみた結果をTable 2に示した。即ち母子間の相同性を比較する場合、F領域よりI領域の方がいくぶん高いという成績が得られた。

I領域の塩基配列を用いて系統発生的関係を検討した結果を示す。8家族で64個、GenBankから得た22個のユニークな塩基配列を用いて分析した。家族1、2、3、4、6及び8の児のDNA塩基配列は母親のそれと同じ枝に分類されたが、GenBankから得られた1つの塩基配列と家族5の塩基配列が同じ枝に分類され、また家族7では、GenBankから得られた多数の塩基配列とその家族の半数のクローンは比較的類似性の高い塩基配列として分類された。

今回の検討で我々は1症例について、5クローンを解析し、HVR-1と2の間のI領域について母子間の相同性をみると、8家族中7家族で母親とその児の間で一致率が高いことを実証できた。これはまた系統発生的分析法によっても証明された。即ちこの研究の結果によって、I領域についての塩基配列を解析することで、HCVの母子感染の確認が可能と考えられた。

		HVR-1			HVR-2		
family 1	m1	AGVDG	ETHVTGASEGRAAHGLTRLFNFNGAS	QKIQL	WGPIT	Y AEPGNL	DQRPY
	m2TQ.....S..GF.TS.P.
	m3	S.....TQ.....T..GF.SP.P.	C.....
	m4TQ.....T.....T.
	m5A.....S.....
	c1-2
	c3-4	HIR....AQ..T.KTF.SF..P.P.
c5	S.....TQ.....T..GF.SP.P.	
family 2	m1-4	AGVDA	STHTVGGTAARTVDGLTSLFSPGAK	QNIQI	WGTLO	YEDNVTNSE	DMRPY
	m5V.
	c1-3R.....GM..P..
	4TG...P..
	5TG...P..	H.....
family 3	m1	AGVDA	KTQISGSVAGHTSRGLSSFFAPGAR	QEIQI	WGNLQ	YEENVTNPE	DMRPY
	m2-5K
	c1-5K
family 4	m1	AGVDG	HTVVSGGTQAFTRSFVSLFNGPAQ	QKIQL	WGPIT	Y AERGSS	DQRPY
	m2-3	Y.....
	m4	Y.....L.....
	m5	R.....A..H..FTLT...RF.P.
	c1S...GV..F.TA.PK	.N...
	c2	R.....A..S...L...TR.P.	.S...G..
	c3A...K.....GV.GF.TA.PK	.N...
	c4A...K.....GV.GF.TA.P.	.N...	..R..	...D..
	c5	R.A.....S.....N..TS.P.	.N...D..
family 5	m1	AGVDA	QHTTGGTAARNAYGLVSLFRAGAK	QNIQL	WGTLO	YEDNVTNPE	DMRPY
	m2	S...V..Q..H..RT.T...AP...	H.....S.
	m3	S...V..SM.QSTSRVAG..TP..Q
	m4-5	S...V..Q..H..RT.T...AP...
	c1-3	N...V..K..HSVSTFTG..TS.P.
	c4-5	D...V..Q...SVSTFTG..TS.P.

Fig. 1 a. Amino acid sequences for HCV HVR-1 and HVR-2. The consensus sequences for the predicated amino acid of the mother is shown by a single letters on the top line. A dotted line indicates identical residue to consensus. * indicates stop codon. m indicates mother. c indicates child. The regions enclosed in boxes indicate HVR-1 and HVR-2.

		HVR-1		HVR-2		
family 6	m1-4	AGVDG	DTRVTGAVQGYTTRSITSLETTGPH	QKIQL	WGPIT Y ASPDNP	DQRPY
	m5 V.....
	c1-3	..A..	..HTI...SR.A..F...P..QS..
	c4-5	..A..	..HTI...SR.A..F...P..Q
family 7	m1	AGVDG	RTHVTGESAGRTTQSFTSFFTPGPS	QKIQL	WGPIS H VVPNTP	DQRPY
	m2	H.R.....
	m3	H.R.....
	m4-8	H.V.S.GTOAF..RG.VDL..V..Q
	m9	H.R...RARAVPPRALRPSLHQ.LH	R.SN.
	m10	N.RT..GARAVPPRALRPSLHQ.LH	R.SN.
	m11	.S...	H.R.....
	c1	N.RTA.GAVAH..ST..GL..R.AA Y ...DI.
	c2	N.RTA.GAVAH..ST..GL..R.AA T . .L..V.
	c3G	S.RTM.G.MAH...GL....Q...I.
	c4G	.G.RTM.G.VAH..RGL.T..Q...DI.
	c5G	.G.RA..G.MAH..RGL.T..NL...DI.
	c6G	VG.RTM.G.MAH..KG..T...Q...DI.
	c7	...R	RG.RT..G.MAH..RGL.T..NL...DV.
	c8G	.G.RTM.G.VAH..RGL.T.*D...DI.
	c9G	.G.RTM.G.VAHN.RGL.T...Q...DI.
	c10G	RG.RT..G.MAH..RGL.T..NL...DI.
family 8	m1	AGVDG	RTHVVGGTAGLTTRGLSSLFTTGPS	QKIQL	WGPIT H GVSQMP	DQRPY
	m2	T.....A.S.....C.....
	m3A.S.....F.....
	m4	T.....A.S.....F.....
	m5A.....F.....
	c1	N.F...QT.QV.....P.A. D...P.
	c2-3	T.VA...K.SQV.S.A...SP.A. G..P.
	c4	T.VA...K.SQV.S.PA...SP.A. P .G..P.
	c5	N...I..RS.QV.....V.A. D...P.

Fig. 1 b. Amino acid sequences for HCV HVR-1 and HVR-2. The consensus sequences for the predicated amino acid of the mother is shown by a single letters on the top line. A dotted line indicates identical residue to consensus. * indicates stop codon. m indicates mother. c indicates child. The regions enclosed in boxes indicate HVR-1 and HVR-2.

Fig. 2

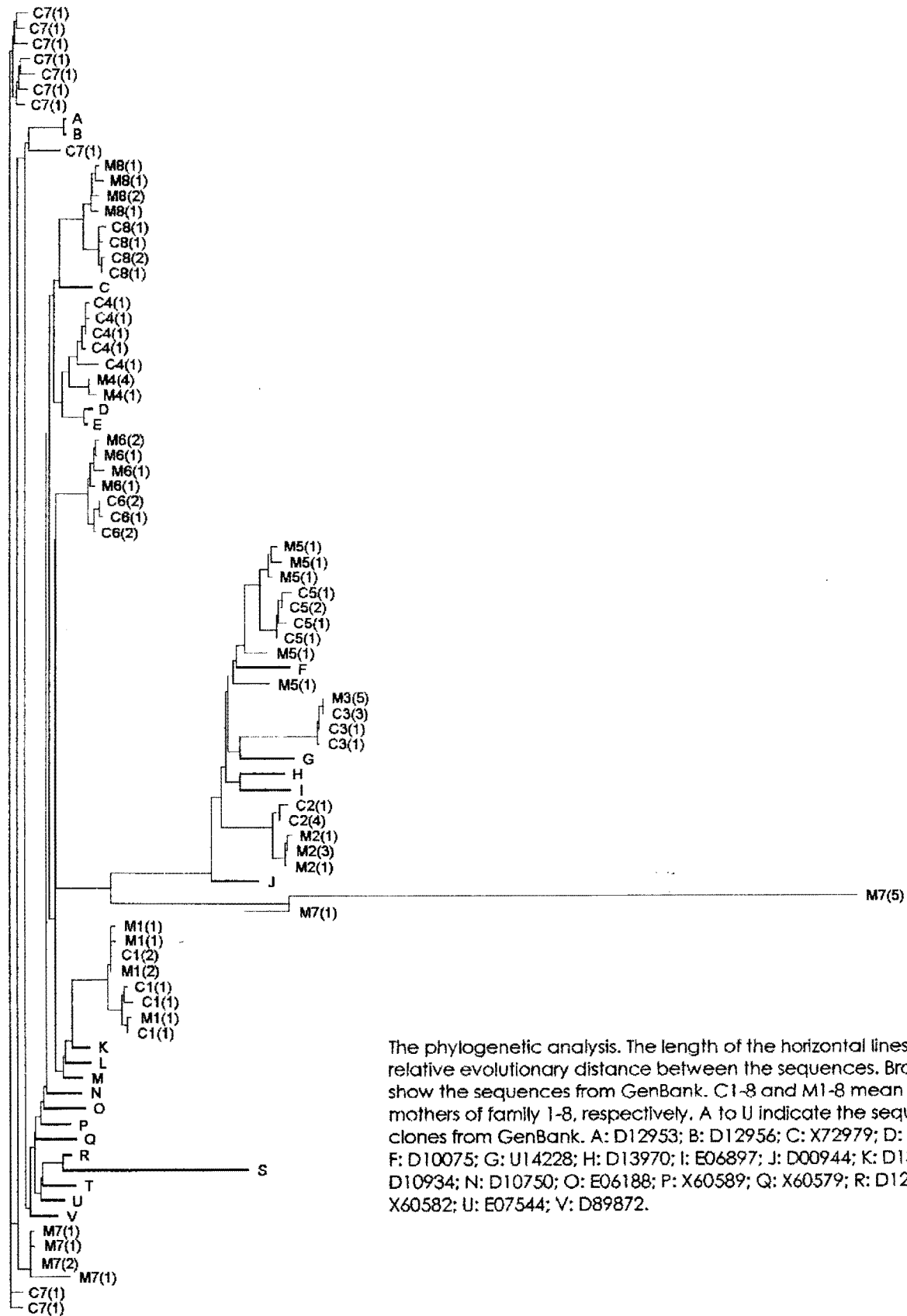


Table 1 Homology search for nucleotide and amino acid sequences among the clones from 8 children and their mothers

Patient No.	Region F		HVR-1		Region I		HVR-2		
	Nucleotide (%)	Amino acid (%)	Nucleotide (%)	Amino acid (%)	Nucleotide (%)	Amino acid (%)	Nucleotide (%)	Amino acid (%)	
Family 1	Child	93.8-99.8	88.1-99.4	73.3-100	48.0-100	96.4-100	93.9-100	100	100
	mother	94.7-98.7	92.6-98.9	78.7-96.0	64.0-92.0	95.9-100	95.4-100	95.2-100	85.7-100
Family 2	Child	98.1-100	94.9-100	94.7-100	88.0-100	99.0-100	96.9-100	96.3-100	88.9-100
	mother	99.4-100	98.9-100	98.7-100	96.0-100	99.0-100	98.5-100	100	100
Family 3	Child	99.4-100	99.4-100	100	100	99.0-100	100	100	100
	mother	99.1-99.8	98.3-100	97.3-100	96.0-100	100	100	100	100
Family 4	Child	96.0-98.3	91.5-96.0	80.0-98.7	60.0-96.0	95.4-99.5	95.4-98.5	90.5-100	71.4-100
	mother	94.7-99.1	92.1-98.9	72.0-100	60.0-100	99.0-100	98.5-100	100	100
Family 5	Child	97.6-99.3	96.1-99.4	94.7-100	88.0-100	97.4-100	100	96.3-100	100
	mother	87.1-98.5	86.5-98.3	60.0-100	40.0-100	88.7-98.0	90.8-100	88.9-100	77.8-100
Family 6	Child	98.9-100	98.3-100	100	100	98.5-100	98.5-100	100	100
	mother	98.5-99.4	97.2-98.9	100	100	98.0-100	95.4-100	95.2-100	85.7-100
Family 7	Child	89.8-97.6	85.9-99.4	66.7-100	42.3-100	89.7-97.4	89.2-100	81.0-100	42.9-100
	mother	85.1-100	----- a	60.0-100	----- a	89.7-100	----- a	52.4-100	----- a
Family 8	Child	94.3-99.8	90.3-100	76.0-100	52.0-100	98.0-100	98.5-100	76.2-100	57.1-100
	mother	97.9-99.6	95.5-98.9	92.0-98.7	84.0-96.0	97.4-100	93.9-100	100	100

a Data could not be obtained.

Table 2 Homologous frequencies of nucleotide and amino acid sequences between 8 child-mother pairs

Child No.	Region F				HVR-1				Region I				HVR-2			
	Child- mother	Nucleotide Child- children and mothers ^a	Child- GenBank	Amino acid Child- mother	Nucleotide Child- mother	Nucleotide Child- mother	Amino acid Child- mother	Child- mother	Nucleotide Child- children and mothers ^a	Child- GenBank	Child- mother	Amino acid Child- mother	Child- mother	Nucleotide Child- mother	Amino acid Child- mother	
1	93.9-99.6	87.1	86.7	88.1-100	73.3-100	48.0-100	95.9-100	88.7	92.3	92.3-100	95.2-100	85.7-100	95.2-100	85.7-100		
2	96.8-97.8	88.0	86.1	92.7-95.5	92.0-94.7	76.0-84.0	95.9-97.4	89.2	85.1	90.8-95.4	96.3-100	88.9-100	96.3-100	88.9-100		
3	99.1-100	84.3	82.4	98.3-100	97.3-100	96.0-100	99.0-100	85.1	84.6	100	100	100	100	100		
4	92.6-95.3	97.2	92.1	86.9-91.5	70.7-84.4	48.0-76.0	92.3-95.4	96.9	94.9	87.7-92.3	95.2-100	85.7-100	95.2-100	85.7-100		
5	87.5-94.4	87.8	88.4	87.1-89.3	65.3-84.0	44.0-60.0	89.2-95.4	85.1	88.7	90.8-93.9	88.9-100	77.8-100	88.9-100	77.8-100		
6	93.8-94.5	86.6	85.2	90.3-92.1	80.0	64.0	95.9-98.5	90.8	92.8	93.9-98.5	95.2-100	85.7-100	95.2-100	85.7-100		
7	83.4-95.3	86.7	88.8	-----	54.4- 85.3	-----	86.7-96.9	90.3	93.9	-----	42.9-90.5	-----	42.9-90.5	-----		
8	91.1-93.4	85.7	85.6	85.8-91.5	69.3-78.7	48.0-68.0	93.9-96.4	90.3	90.8	89.2-93.9	71.4-85.7	57.1-71.4	71.4-85.7	57.1-71.4		

a Highest homologous frequency of nucleotide sequence between one child and the other children or mothers for Region F and I.

b Highest homologous frequency of nucleotide sequence between one child and accession cases in GenBank database for Region F and I.

日本財団補助金による

1997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—

1998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 林 子清
研究機関 金沢大学医学部法医学教室 研究指導者 大島 徹 職名 主任教授
所在地 〒920-0934 金沢市宝町13-1 電話 076-233-0261 内線

II. 過去の研究歴

1984年から1997年までに、中国医科大学修士課程学生、助手、金沢大学大学院研究生、大学院博士課程学生及び金沢大学助手を経て、皮膚紋理の遺伝、骨格の性差、法医実務試料の性別及びABO式血液型判定、ミイラの性別とABO式血液型の検査、並びに人獣鑑別について幅広く研究を行いました。

III. 過去の研究実績

1984年から1997年までに、国際誌、中国及び日本の雑誌にて26篇の論文を発表し、国際及び中国と日本の国内の学会で7回の口頭発表を行いました。

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)

日本生化学会第15回北陸地方会 (金沢、1997年5月31日) にて、DNA分析の方法を用いたヒトとヒト以外の霊長類動物の鑑別について口頭発表を行いました。

(2) 学会誌等に発表した論文 無・有 (雑誌名・論文名)

1. Int. J. Legal Med., 110: 254-259, 1997. Species identification based on the point mutations of histo-blood group ABO genes by PCR-RFLP and direct sequencing.

2. Jpn. J. Legal Med., 51: 231-234. An autopsy case of suicidal strangulation with four looped rubber bands.

V. 今後の研究計画及び希望

今後も引き続き、増幅できるSTR Locusを探し、ミトコンドリアDNAについても検査して、これらミイラの人種及び血縁関係を解明するよう検討します。

VI. 研 究 報 告 (日本語、又は英語で書いて下さい。4,000字以上で記載して下さい。別紙可)

別紙参照.



VII. 指導教官の意見

これまで林子清博士は私と共に中国・新疆で発見された9体のミイラの性別とABO式血液型の遺伝子型判定を中心に、様々な種類の法医学的試料について、DNAレベルでの研究を行ってきました。本研究では、近年注目されているSTR多型についてミイラ試料を対象に検討し、DNAの抽出法及びポリメラーゼ連鎖反応(PCR)阻止因子の除去法について、独自の方法で工夫したところ、1300年以上経過したミイラ試料のSTR HUMTH01 locusの増幅に成功しました。この成果は、極めて古い考古学試料についてもSTR多型の検査が可能であることを示すもので、今後、STR多型が個人識別や親子鑑定等の法医学実務のみならず、考古学や人類遺伝学などの関連分野においても有用であることを実証しています。

研 究 報 告

—PCR法を用いた約1300年前のミイラに対するSTR増幅の試み—

林 子清

金沢大学医学部法医学教室 協力研究員

中国医科大学法医学系 法医人類学教室 講師

テキスト9枚, 写真説明1枚, 写真2枚, 表1枚, 計13枚

連絡先: 林 子清

中国医科大学法医学系 法医人類学教室

〒110001 中国遼寧省瀋陽市和平区北二馬路92号

Tel: 86-24-3863731, 内線: 法医人類学教室

又は, 金沢大学医学部法医学教室

〒920-8640 金沢市宝町13-1

Tel: 076-265-2223 Fax: 076-234-4234

目 的

1985年, Jeffreysらは, ヒトDNAにおいて33塩基対を基本単位とする繰り返し配列, いわゆるミニサテライトを発見し, その後も, 彼らは, ミニサテライトより基本単位の塩基数が少ないマイクロサテライトを発見した. これら遺伝マーカーは極めて高度の多型を示し, しかもメンデルの法則に従って安定に遺伝するので, 現在, DNAフィンガープリントやシングルローカスプローブとして, 人類学, 遺伝学及び法医学などの幅広い分野で利用されている. しかしながら, これらの検出には少なくとも数 μ gの高分子DNAが必要とされるため, 回収されるDNAの絶対量が少なかったり, あるいは断片化している可能性が高い古代の試料では, ミニサテライトの検出も困難である場合が多い.

近年, ミニサテライトよりも短い, 2-5塩基を基本単位とした反復配列であるSTR (short tandem repeat) が急速に注目されている. すなわち, STRはミニサテライトやマイクロサテライトと同様に, 繰り返し配列の回数が個人によって異なる上, この個人差がメンデル法則に従って安定に遺伝し, しかもalleleの長さは通常百から数百塩基対 (bp) と比較的短く, 微量かつ低分子化したDNA試料からでも型検出が可能である. また型判定の方法も比較的簡単であるため, 法医実務においても広く応用されて来ている.

我々は今までに, 日本の大谷光瑞探険隊が中国・新疆で発見した9体のヒトのミイラ (現在, 中国遼寧省旅順博物館に所蔵されてい

る) についてDNA検査を行い, 性別とABO式血液型を判定し, 報告してきた. しかし, これら9体のミイラの血縁関係については, 発掘当時の状況や同時に発見された副葬品等からは判定できずにいるため, 今回, これらミイラの人種や血縁関係の判定を試みて, 9体のミイラのうち8体のSTR多型について検討した.

研究材料および方法

1. ミイラ

ミイラは中国・新疆ウイグル自治区の砂漠地帯であるトルファンで発見されたもので, 発掘された古墳は中国唐代(紀元7世紀)の高昌国のものであると考古学的に鑑定されている. したがってミイラは今から約1300年前の高昌国のヒトであると考えられる.

今回対象とした8体のミイラは外表所見に基づき成人と判定される(Fig.1). 8体中, 6体の性別は外表上の形態的特徴により推定可能であり, 残り2体の性別は外表所見からは推定できなかったが, 2体とも男性であること(性染色体がXY)が我々のこれまでの研究から明らかである. また, 既にDNA検査及び血清学的方法を用いて, 各ミイラのABO式血液型の遺伝子型も判定している. 今回, 各成人ミイラからは毛髪, 骨格筋及び皮膚を採取し, 研究試料とした.

2. DNA抽出および精製

各ミイラから採取した毛髪約10本, 骨格筋約100mg, 或いは皮

膚約0.5cm²を，1.5mlのエッペンドルフチューブに入れ，1.0mlの滅菌生理的食塩水（0.85%のNaClを含む滅菌蒸留水）を加え，室温で24時間（途中で滅菌生理的食塩水を2回交換），緩徐に振盪した後，生理的食塩水を除去し，1.0mlの1%SDSを含むTNE緩衝液（10mM Tris-HCl, pH8.0, 50mM NaCl, 10mM EDTA）で30分間振盪しながら，十分に洗浄した．同様な洗浄を3回繰り返した後，2.0% SDS, 0.04M DTTと200 μ gのプロテナーゼ Kを含むTNE緩衝液1.0mlを加えて，50 $^{\circ}$ Cで20時間反応させた．チューブ中の試料が完全に分解されたことを肉眼的に確認した後，水飽和の中性フェノールを2回，フェノール/クロロホルム（24:1）を2回，クロロホルムを1回加えて除蛋白した．除蛋白後の水溶液をn-ブタノールで200 μ lに濃縮し，続いて6M NaI, 0.5% N-ラウロイルサルコシナトリウムと10mM Tris-HCl (pH8.0)を含む水溶液200 μ lをチューブに加え，45 $^{\circ}$ Cで15分間反応後，12,000rpm/minで5分間遠心し，沈殿物を15 μ lのTE緩衝液（10mM Tris-HCl, pH8.0, 1mM EDTA）に溶解した．TE緩衝液に溶解したDNA溶液が褐色或いは黒色を呈する場合は，さらにスピンカラム（吉井ら，日法医誌，47，323-329，1993）を用い，十分にDNA溶液中に含まれるPCR阻止因子を除去した．

3. PCR反応

HUMTH01 及びHUMVWAの増幅に用いたプライマーは，Edwardsら（Edwards et al, Genomics, 12, 241-253,

1992)とMöllerら(Möller et al, Int J Legal Med, 106, 183-189, 1994)の報告に従った(表1). 反応液は全量を50 μ lとし, 各プライマーを1.0 μ M, Taq DNAポリメラーゼ(宝酒造)を5.0単位, dNTPを200 μ M, 付属の10倍濃度の緩衝液(500mM KCl, 15mM MgCl₂, 100mM Tris-HCl pH8.0)を5 μ l, ウシ血清アルブミン(BSA)を20 μ g, 並びに, 抽出したDNA溶液5 μ lを加えた. PCR反応は表1に示した条件で行った.

4. 結果判定

PCR反応後の溶液をエタノールで沈殿させ, 5 μ lのホルムアミド一色素混合液(0.1%キシレンシアノール, 0.1%ブロモフェノールブルー, 20mMEDTA, ホルムアミド100ml)に溶解した後, 7Mの尿素を含む6%ポリアクリルアミドゲル(135 \times 135 \times 0.3mm)を用いて, 150Vの定電圧で3時間, 電気泳動を行い, Budowleらの方法(Am J Hum Genet, 48, 137-144, 1991)に従って銀染色を施し, 各増幅産物のバンドパターンを観察した.

成 績

1. 抽出DNAの性状とPCR法による増幅

抽出されたDNA溶液が褐色または黒色に着色していた場合は, そのままの状態でもPCR反応液に加えて増幅反応を試みても, HUMTH01とHUMVWAのいずれも増幅されなかった. しかし, スピンカラムでこのDNA抽出液中の不純物を除去すると, DNA溶

液は無色ないし薄茶色になり，このDNA溶液を用いてPCR反応を行うとHUMTH01は増幅された．しかし，HUMVWAについては，依然，増幅されなかった．

また，スピンカラムによる精製後，なおHUMTH01とHUMVWAの両方が増幅されなかったDNA溶液については，PCR阻止因子の作用を抑える目的でPCR反応液中に，段階的に濃度を変えたウシ血清アルブミン（BSA）を加えたところ，総量50 μ lの反応液中にBSAを20 μ g加えることでHUMTH01が特異的に増幅された．しかしながらHUMVWAはBSAの濃度とは関係なく，いずれも増幅されなかった．

2. HUMTH01の検査

HUMTH01については，Fig.2に示したように，8体の成人ミイラのうち6体（No.1, 3, 4, 6, 7と8）は2本のバンドを示したが，No.2とNo.5は1本のみバンドを示した．また，このNo.2とNo.5のバンドは，他の6体のミイラが示した2本のバンドのうちの短いバンドと同一位置に検出された．

3. HUMVWAの検査

8体のHUMVWAを検査したところ，いずれの試料を用いても目的としたDNAバンドが増幅されなかった．

考 察

1984年カリフォルニア大学のHiguchiらは，南アフリカの絶滅

動物「クアツガ」の剥製標本から抽出したDNAの塩基配列を決定し、クアツガの系統的位置付けを行った。その後、スウェーデン・ウプサラ大学のPääboらによって、約7000年前のアメリカ原住民の脳をもとに、ミトコンドリアDNA断片のクローニングと、その塩基配列が決定されるなど、PCR法の開発により、考古学や人類学研究は目覚ましく進歩している。現在では、約4万年前のマンモスや約1億3千万年前の琥珀中の昆虫化石からのDNAの増幅及び塩基配列決定の成功をはじめ、ヒトを含めた数多くの生物について、化石などの古代生物が残した様々な試料を用いて、遺伝子レベルでの研究が進んでいる。たとえば、これらの研究成果によって絶滅生物を含む生物の起源や進化が解明されつつある。

しかし考古学試料については、発掘ないしは発見されるまでの期間放置された環境の影響により、DNAが低分子化したり、また、生物体内の糖や蛋白質などが変性したことによって、PCR反応に対する阻害物質が多量に形成される場合には、古代試料のDNA検査は一般的に困難である。特にSTRのような単一コピーのlocusでは、DNA低分子化の過程でそのlocusが断裂することにより、PCRによる増幅が不可能となるため、STR多型の検査がミトコンドリアDNAやDYZ3のようなコピー数の多いlocusに比べて、さらに困難になると考えられる。

本研究では、まず極めて乾燥した試料を生理食塩水の中に入れて、組織や細胞にできる限り水分を浸透させ、プロテナーゼKが反応し

やすい状態にまで回復し，出来る限り多量の蛋白質が分解されるように工夫した．また，除蛋白も通常のフェノール／クロロホルム法以外にNaI法も加え，最大限にDNAが抽出できるように工夫し，しかもPCR阻止因子を可能な限り除去した．その上，BSAとスピソカラムを用いて，PCR阻止因子の作用を最小限に抑えた結果，1300年以上も経過した古いミイラ試料についてもHUMTH01 locusを増幅することに成功した．

1996年Zierdtらは，1957年に発掘した紀元5-8世紀位の古墳にあったヒトの骨と歯牙を試料とし，二重PCR法を行ったところ，90サイクルの増幅によりHUMVWA locusの型判定ができたと報告したが，本研究ではHUMVWA locusは増幅されなかった．その原因については，①増幅回数がまだ少ない，②Zierdtらが骨と歯牙のような硬組織を試料としたが，我々は一般的に硬組織より保存性の低い皮膚や筋肉などの軟組織を用いた，③発掘されるまで或いは発掘された後の保存状態が十分でなく，本研究に用いた試料のDNAの低分子化がさらに進んでいる，などが考えられる．今後，ミイラの骨や歯牙などの硬組織を採取し，PCR増幅回数をさらに増やして，HUMVWA locusや他のlocusを検討する必要がある．

また本研究では，同一DNA抽出液を用いてHUMTH01 と HUMVWAを同時に増幅して，HUMTH01は増幅されるが HUMVWAが増幅されない場合があった．その原因としては，プライマーがテンプレートDNAとアニーリングしたり，目的とする

領域のテンプレートDNAの立体構造の違いにより増幅しえなかった可能性が考えられる。

本研究結果において、これらミイラのSTR HUMTH01 locus のalleleの確定はできないが、同時に泳動したDNAのサイズマーカとの位置関係から考察すると、短い方のバンドは、現代人のallele 7 (191 bp)に相当し、より長い方のバンドは現代人のallele 9 (199 bp)或いはallele 8 (195 bp)に相当するものと考えられる。現代の中国漢民族におけるallele 7の頻度は約0.26、allele 9は約0.57で、allele 8は約0.04であるので(Meyer et al, Int J Legal Med, 107, 314-322, 1995)、この結果は、対象としたミイラが中国・唐の時代の漢民族である可能性を示唆していると考えられるが、さらに今後の検討が必要である。

8体のミイラの血縁関係については、6体のミイラは2本のバンドを有し、しかもいずれも同様なバンドパターンであった。また、No.2とNo.5の2体は他の6体と異なり、1本のバンドのみを示したが、2体のバンドが同じ長さで、しかもそのバンドは、他の6体が有する2本のバンドのうち、短い方のバンドと同一位置に検出された。このように、8体のミイラは1本の共通のバンドを有しているので、各ミイラ間の血縁関係については、現段階では否定されなかった。

結 論

1. PCR法を用いることにより，1300年以上を経過した古いミイラ試料についてSTR(HUMTH01)の増幅に成功した．

2. 8体のミイラの血縁関係については，増幅されたHUMTH01の電気泳動のバンドパターンより，現段階では血縁関係の存在の可能性を否定できなかった．

謝 辞

本稿を終えるにあたり，日中医学協会から「在留中国人研究者助成」を頂いたことに対し，深く感謝致します．また，研究の御指導と報告書の御校閲を賜りました恩師，金沢大学医学部法医学教室大島徹教授に深甚なる謝意を表します．なお，多大なご協力を賜りました金沢大学医学部法医学教室近藤稔和講師及び教室員の皆様に深謝致します．

研究発表

Ampification of Human Short Tandem Repeats on
Mummies Discovered at Taklamakan Desert. 6th.
Indo-Pacific Congress on Legal Medicine and
Forensic Sciences, July, 1998, Kobe(発表予定).

Legends of Figures

Fig. 1 One of the mummies (No.3) discovered at Taklamakan desert in Turfan in Hsinchiang Uyghur, China, in 1912.

Fig. 2 This photograph shows the band patterns after silver staining of the HUMTH01 locus amplified by PCR. In the photograph, lanes 1-8 correspond to No. 1-8 of the mummies, lane 9 shows negative control, lane 10 reveals the product amplified with a modern human DNA as a positive control, four lanes M are DNA size markers.



Fig. 1

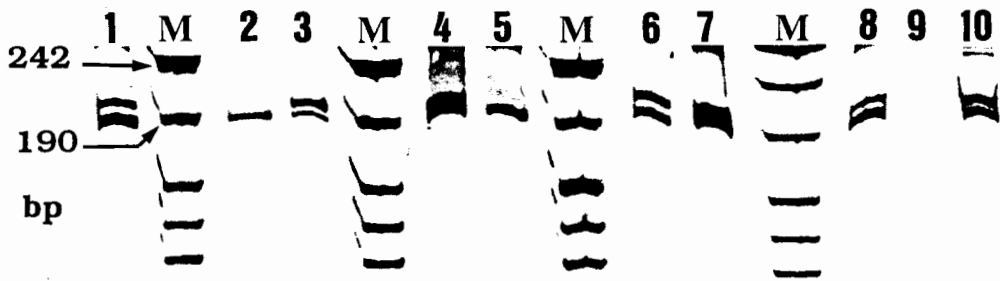


Fig. 2

Table 1. Primers and their indication in the PCR

Locus	Repeat	PCR primer sequence (5'-3')	Denaturation	Annealing	Extension	Cycles
HUMTH01	AATG	GTGGGCTGAAAAGTCCCGATTAT	94°C, 1min	64°C, 1min	70°C, 2min	10
		ATTCAAAGGGTATCTGGGCTCTGG	90°C, 1min	64°C, 1min	70°C, 2min	30
HUMVWA	TCTA	CCCTAGTGGATGATAAAGAAATAATC	94°C, 1min	50°C, 1min	72°C, 1.5min	40
		GGACAGATGATAAATACATAGGATGGATGG				

6th INPALMS
Abstract Submission Form
Deadline: December 31, 1997

Amplification of Human Short Tandem Repeats on Mummies discovered at Taklamakan Desert

Lin, Z.Q.¹, Ohshima, T.², Kondo, T.², Takayasu, T.², Minamino, T.², Sun, E.Y.³ and Liu, G.T.⁴

Dept. of Forensic Anthropology, China Medical Univ. Faculty of Med., Shenyang, China¹, Dept. of Legal Med., Kanazawa Univ. Faculty of Med., Kanazawa, Japan², Dept. of Anatomy, Dailen Medical Univ., Dailen, China³, and Lüshun Museum, Dailen, China⁴

Introduction: The authors have already reported successful sex determination and ABO genotyping on human mummies using polymerase chain reaction (PCR). In the present study, the amplification of the human short tandem repeats (STR) was also attempted.

Materials and methods: Eight adult mummies and one child one were discovered at Taklamakan desert in 1912. Archaeologically, these mummies were estimated to be the humans that have lived in Gao Chang in the terminal Tang age (7th century A.D.) . The amplification of TH01 locus was carried out on the 8 adult mummies. Hair, skin and/or muscle samples were then collected from each mummy. DNA was extracted as shown in the previous report (Jpn J Legal Med, 50, 336, 1996) and purified using a spin column devised by Yoshii (Jpn J Legal Med, 47, 323, 1993). A pair of primers (5'-GTGGGCTGAAAAGCTCCCGATTAT-3' and 5'-ATTCAAAGGGTATC-TGGGCTCTGG-3' and PCR reaction mixture were prepared according to the report by Edward (Genomics, 12, 241, 1992). At first, PCR was performed for 10 cycles (denaturation: 94 °C, 1 min.; annealing: 64 °C, 1 min; extension: 70 °C, 2 min), and, continuously, second PCR was conducted for 25 cycles (denaturation: 90 °C, 1 min; annealing: 64 °C, 1 min; extension: 70 °C, 2 min). The PCR products were then electrophorezed and visualized by silver staining.

Results: In all of the 8 mummies, TH01 locus was successfully amplified. In two mummies of them, only a single band, meaning "homotype", was found. The other six mummies showed the common band pattern; that is, two different bands, meaning "heterotype", were observed. The band length of the "homotype" was electrophoretically consistent with that of the shorter band of the "heterotype".

Conclusion: These results represented a possibility of STR typing for the specimens of ancient human remains as well as those of medico-legal case work.

Please fill out or check the appropriate items below.
 Deadline for Abstract Submission: December 31, 1997

Preferred Type of Presentation:

Oral Poster Either

Please note that the type of presentation will be ultimately decided at the discretion of the Scientific Program Committee.

Category:

Indicate the one abstract category that most closely describes the subject material. Choose from the categories listed under Instructions for Preparing Abstracts.

Category _____

Author:

Title (used for mailing address): Prof. Dr. Mr. Ms. Mrs.

Name: Ziqing _____ Lin
Given Middle Family

Institution:

Mailing Address (including the name of institution, if applicable):

Nanjing street 5-3, Heping district, Shenyang, china.
China Medical University _____ 110001 china
Postal (Zip) Code Country

Phone: 86-24-3863731 Fax: _____

Date: Jan. 7, 1998 Author's Signature Ziqing Lin

Office Use Only

Date	
Reg. No.	
Abstract No.	

6th INPALMS Abstract Submission Form Deadline: December 31, 1997

Amplification of Human Short Tandem Repeats on Mummies discovered at Taklamakan Desert

Lin, Z.Q.¹, Ohshima, T.², Kondo, T.², Takayasu, T.², Minamino, T.², Sun, E.Y.³ and Liu, G.T.³

Dept. of Forensic Anthropology, China Medical Univ. Faculty of Med., Shenyang, China¹, Dept. of Legal Med., Kanazawa Univ. Faculty of Med., Kanazawa, Japan², Dept. of Anatomy, Dailen Medical Univ., Dailen, China³, and Lüshun Museum, Dailen, China⁴

Introduction: The authors have already reported successful sex determination and ABO genotyping on human mummies using polymerase chain reaction (PCR). In the present study, the amplification of the human short tandem repeats (STR) was also attempted.

Materials and methods: Eight adult mummies and one child one were discovered at Taklamakan desert in 1912. Archaeologically, these mummies were estimated to be the humans that have lived in Gao Chang in the terminal Tang age (7th century A.D.). The amplification of TH01 locus was carried out on the 8 adult mummies. Hair, skin and/or muscle samples were then collected from each mummy. DNA was extracted as shown in the previous report (Jpn J Legal Med, 50, 336, 1996) and purified using a spin column devised by Yoshii (Jpn J Legal Med, 47, 323, 1993). A pair of primers (5'-GTGGGCTGAAAAGCTCCCGATTAT-3' and 5'-ATTCAAAGGGTATC-TGGGCTCTGG-3' and PCR reaction mixture were prepared according to the report by Edward (Genomics, 12, 241, 1992). At first, PCR was performed for 10 cycles (denaturation: 94 °C, 1 min.; annealing: 64 °C, 1 min.; extension: 70 °C, 2 min), and, continuously, second PCR was conducted for 25 cycles (denaturation: 90 °C, 1 min; annealing: 64 °C, 1 min; extension: 70 °C, 2 min). The PCR products were then electrophoresed and visualized by silver staining.

Results: In all of the 8 mummies, TH01 locus was successfully amplified. In two mummies of them, only a single band, meaning "homotype", was found. The other six mummies showed the common band pattern; that is, two different bands, meaning "heterotype", were observed. The band length of the "homotype" was electrophoretically consistent with that of the shorter band of the "heterotype".

Conclusion: These results represented a possibility of STR typing for the specimens of ancient human remains as well as those of medico-legal case work.

Please fill out or check the appropriate items below.
Deadline for Abstract Submission: December 31, 1997

Preferred Type of Presentation:

Oral Poster Either

Please note that the type of presentation will be ultimately decided at the discretion of the Scientific Program Committee.

Category:

Indicate the one abstract category that most closely describes the subject material. Choose from the categories listed under Instructions for Preparing Abstracts.

Category _____

Author:

Title (used for mailing address): Prof. Dr. Mr. Ms. Mrs.

Name: Ziqing Lin
Given Middle Family

Institution:

Mailing Address (including the name of institution, if applicable):

Nanjing Street 5-3, Heping district, Shenyang, china.
China Medical University 110001 China
Postal (Zip) Code Country

Phone: 86-24-3863731 **Fax:** _____

Date: Jan. 7, 1998 **Author's Signature** Ziqing Lin

Office Use Only

Date	
Reg. No.	
Abstract No.	

6th INPALMS
Abstract Submission Form
Deadline: December 31, 1997

Amplification of Human Short Tandem Repeats on Mummies discovered at Taklamakan Desert

Lin, Z.Q.¹, Ohshima, T.², Kondo, T.², Takayasu, T.², Minamino, T.², Sun, E.Y.³ and Liu, G.T.⁴

Dept. of Forensic Anthropology, China Medical Univ. Faculty of Med., Shenyang, China¹, Dept. of Legal Med., Kanazawa Univ. Faculty of Med., Kanazawa, Japan², Dept. of Anatomy, Dailen Medical Univ., Dailen, China³, and Lüshun Museum, Dailen, China⁴

Introduction: The authors have already reported successful sex determination and ABO genotyping on human mummies using polymerase chain reaction (PCR). In the present study, the amplification of the human short tandem repeats (STR) was also attempted.

Materials and methods: Eight adult mummies and one child one were discovered at Taklamakan desert in 1912. Archaeologically, these mummies were estimated to be the humans that have lived in Gao Chang in the terminal Tang age (7th century A.D.) . The amplification of TH01 locus was carried out on the 8 adult mummies. Hair, skin and/or muscle samples were then collected from each mummy. DNA was extracted as shown in the previous report (Jpn J Legal Med, 50, 336, 1996) and purified using a spin column devised by Yoshii (Jpn J Legal Med, 47, 323, 1993). A pair of primers (5'-GTGGGCTGAAAAGCTCCCGATTAT-3' and 5'-ATTCAAAGGGTATC-TGGGCTCTGG-3' and PCR reaction mixture were prepared according to the report by Edward (Genomics, 12, 241, 1992). At first, PCR was performed for 10 cycles (denaturation: 94 °C, 1 min.; annealing: 64 °C, 1 min; extension: 70 °C, 2 min), and, continuously, second PCR was conducted for 25 cycles (denaturation: 90 °C, 1 min; annealing: 64 °C, 1 min; extension: 70 °C, 2 min). The PCR products were then electrophoresed and visualized by silver staining.

Results: In all of the 8 mummies, TH01 locus was successfully amplified. In two mummies of them, only a single band, meaning "homotype", was found. The other six mummies showed the common band pattern; that is, two different bands, meaning "heterotype", were observed. The band length of the "homotype" was electrophoretically consistent with that of the shorter band of the "heterotype".

Conclusion: These results represented a possibility of STR typing for the specimens of ancient human remains as well as those of medico-legal case work.

Please fill out or check the appropriate items below.

Deadline for Abstract Submission: December 31, 1997

Preferred Type of Presentation:

Oral Poster Either

Please note that the type of presentation will be ultimately decided at the discretion of the Scientific Program Committee.

Category:

Indicate the one abstract category that most closely describes the subject material. Choose from the categories listed under Instructions for Preparing Abstracts.

Category _____

Author:

Title (used for mailing address): Prof. Dr. Mr. Ms. Mrs.

Name: Ziqing Lin
Given Middle Family

Institution:

Mailing Address (including the name of institution, if applicable):

Nanjing street 5-3, Heping district, shenyang, china.
China Medical University 110001 china
Postal (Zip) Code Country

Phone: 86-24-3863731 **Fax:** _____

Date: Jan. 7, 1998 **Author's Signature** Ziqing Lin

Office Use Only

Date	
Reg. No.	
Abstract No.	

日本財団補助金による

1997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 -

1998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 楊 火華

研究機関 明治薬科大学生薬研究室 研究指導者 高橋邦夫 職名 教授

所在地 〒188 東京都田無市谷戸町1-22-1 電話 0424-21-0398 内線 _____

II. 過去の研究歴

平成6年6月～9年3月 サボテン科植物のトリテルペンの研究

平成9年4月～現在 新しい鎮吐活性スクリーニングの開発と天然由来抗嘔吐物質の検索

III. 過去の研究実績

サボテン科植物から14種のトリテルペンを単離した。そのうち、4種は新規化合物、2種ははじめにサボテン科植物から単離されたトリテルペン、8種は既知トリテルペンである。

(論文) ① New Triterpenes from *Machaerocereus eruca*, a Cactaceous plant. *J. Nat. Prod.* (印刷中)

② Machaeroaric acid, A Novel Germanicane, from *Machaerocereus eruca*. *Phytochemistry*. (印刷中)

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) International Symposium on Natural Medicines (KYOTO)

(内容) Anti-emetic principles of *Alpinia katsumadai* (2P-035) P177

(学会) 日本薬学会第118年会(京都)

(内容) ヨウズクスの鎮吐活性成分の研究 (01[XH]14-5, プログラム P55)

(2) 学会誌等に発表した論文 無 ・ (有) (雑誌名・論文名)

(雑誌名) *Phytomedicine*

(論文名) Anti-emetic principles of *Pogostemon cabin* (Blanco) Benth (投稿中)

(雑誌名) *Natural Product Sciences*

(論文名) New Assay Method for Anti-Emetic Compounds from Natural Sources. (印刷予定)

V. 今後の研究計画及び希望

1) 鎮吐作用を示した化合物の構造-活性相関について検討する。その結果に基づいて、多くの誘導体を合成し、医薬品の開発への基礎研究とする。

2) 抗癌剤シスプラチンによる嘔吐モデルの確立に、今後には単離された生薬由来の鎮吐物質の有効性について検討する。

VI. 研 究 報 告 (日本語、又は英語で書いて下さい。4,000字以上で記載して下さい。別紙可)

別紙添付



VII. 指導教官の意見

楊焯氏は平成6年4月より明治薬科大学生薬学研究室の研究生となり、サボテン科植物のトリテパンの研究でスタートしました。そして、天然物化学の手法を身につけ、本人の強い希望により、薬学博士の学位を取得するため、平成9年度より研究テーマを鎮吐作用天然物質の研究を始めました。本人は、大変真面目で、研究態度も良く、別紙研究報告に見られるように、次々と成果をあげてきました。この研究は、1つは化合物の単離・精製、もう1つはヒヨコを用いた動物試験があり、とても大変なところがありますが、1つ1つ確実に結果を出してあります。来年度も引き続き本学の研究生となり、目標に向かって進んで行くこととなります。以上のことから貴財団補助金を受けるのに十分な資格があったことを認めます。

研究報告

1) 生薬「藿香」(カッコウ) (*Pogostemon cabin Benth*) の抗嘔吐活性成分の研究

「藿香」はシソ科植物：広藿香の全草である。鎮吐、飲食を促進する作用があるとされ、鎮吐の目的とした処方もいくつか知られている。和剤局方の「カッコウ正気散」はその一つである。薬理学の研究として抗真菌作用と抗スピロヘータ作用の報告がある。また、藿香は胃腸神経に対して鎮静作用があり、胃液の分泌を促進し、消化力を増強する。

「藿香」をヘキサン、クロロホルム、メタノールで順次抽出し、濃縮した各エキスのヒヨコ硫酸銅誘発嘔吐抑制活性を検討したところ、ヘキサンエキスは有意なレッチング回数減少を認められた。さらに、このヘキサンエキスの活性成分を詳細に検討し、5種の活性化合物を単離した。それぞれ patchouli alcohol, pogostol, sigmast-4-en-3-one, retusin, pachypodol である。その内、sigmast-4-en-3-one が「藿香」から単離されたのは初めてである。この5種の化合物の構造と鎮吐活性結果はそれぞれ図1と表1に示された。

2) 生薬「ソウズク」(*Alpinia katsumadai*) の鎮吐活性成分の研究

「ソウズク」はショウガ科植物であり、消化器の疾患に常用される薬物である。辛、温、芳香の薬性を持つことによって、胃腸の蠕動を強め、胃液の分泌を促進して、止痛、消化通気、止嘔の効果をあげる。薬理学の研究として、ソウズクの水煎剤(0.25-0.75%)はモルモットの摘出腸管にたいして興奮作用があり、剂量をふやす(1-1.25%)と抑制作用を示す。

「ソウズク」をヘキサン、クロロホルム、メタノール、水で順次抽出し、得られた各エキスについて鎮吐活性試験を行ったところ、ソウズクのヘキサン、クロロホルム、メタノールエキスがヒヨコの硫酸銅誘発嘔吐に有意なレッチング回数の減少を認められた。さらに、そのクロロホルムエキスの活性成分を詳細に検討し、8種の活性化合物を単離した。その内、4種の構造が明らかにした(図2)。それぞれ cadamomin, *trans, trans*-1, 7-diphenyl-4, 6-heptadie-3-one, *trans, trans*-fanesol, (5R)-*trans*-1, 7-diphenyl-6-hydroxy-6-hepten-3-one である。この8種化合物の鎮吐活性結果は表2に示された。

3) 生薬「ビワヨウ」(*Eriobotrya japonica*) と「ピャクズク」(*Amomum kravanh*) の鎮吐活性について研究した。今まで2種の活性化合物を単離した。それぞれ squalene と 5-hydroxy-3,7,4'-trimethoxyflavonol である(図3)。

4) フラボノイドの鎮吐活性と構造相関について検討してきた。漢方薬に鎮吐作用を目的の一つとしてよく配合される生薬「枳実」と「陳皮」の成分であるフラバノンの鎮吐活性と構造相関を検討した。その結果、naringin prunin(図4)は有意な鎮吐活性を示し、活性発見には糖部の構造が関係していることを明らかにした。

5) 鎮吐活性スクリーニングの開発

抗ガン剤シスプラチンによる嘔吐は体内でラジカル生成するのが原因と見なされている。このことを指標にヒヨコによる新しいスクリーニング法を検討してきた。種類のラジカル発生剤(過酸化水素-塩化第二鉄、ピロガロール、水溶性ラジカ

ル誘発剤アAAPHと脂溶性ラジカル誘発剤AMVN) を試験した。この試験法はさらに検討中である。

Table 1. Anti-emetic effect of compound1-5 on copper sulfate induced emesis in young chicks

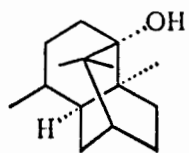
Drugs	Dose (mg/kg b.w.)	No. of young chicks	No. of retches (means±S.E)	Inhibition (%)
control		6	60.0±4.73	
patchouli alcohol (1)	10	6	54.5±7.58	9.3
	20	6	50.3±6.90	16.2
	50	6	36.0±3.69**	40.0
	70	6	25.4±2.80***	57.7
control		5	67.2±2.81	
pogostol (2)	10	5	40.8±4.79**	21.8
	20	5	38.8±8.73 *	42.2
	50	5	38.2±6.13**	43.2
control		6	55.7±4.6	
stigmast-4-en- 3-one (3)	10	6	54.9±8.80	1.4
	20	6	39.6±7.48	28.9
	50	6	24.7±1.21***	55.7
control		6	67.5±6.63	
retusin (4)	10	6	49.0±6.97	27.4
	20	6	48.0±4.97*	28.9
	50	6	18.5±2.25***	72.6
control		5	56.6±3.93	
pachypodol (5)	10	5	53.4±3.93	5.6
	20	5	44.6±7.27	21.2
	50	5	28.0±3.09***	50.6

Significantly different from the control value, *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001

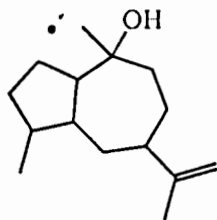
Table 2 Anti-emetic effect of compound 1-8 isolated from *Alpinin katsumadai* on copper sulfate induced-emesis in young chicks

Drugs	Dose (mg/kg)	No.of young chicks	No. of retches (means \pm S.E)	Inhibition (%)
control		6	84.8 \pm 1.31	
compound 1	10	6	67.0 \pm 3.29**	31.0
	20	6	53.8 \pm 4.01**	36.6
	50	6	39.4 \pm 2.84***	53.6
control		6	81.7 \pm 1.52	
compound 2	10	6	74.2 \pm 4.96	9.2
	20	6	40.0 \pm 6.85**	51.0
	50	6	48.3 \pm 6.75**	40.8
control		6	75.8 \pm 2.33	
compound 3	10	6	60.3 \pm 3.00**	20.4
	20	6	54.7 \pm 4.74*	27.9
	50	6	33.5 \pm 3.71***	55.8
control		6	72.8 \pm 3.27	
compound 4	50	6	42.7 \pm 3.60**	41.4
control		6	75.2 \pm 4.80	
compound 5	10	6	68.6 \pm 4.0	8.8
	20	6	64.3 \pm 5.91	14.5
	50	6	37.4 \pm 3.35**	50.2
control		6	87.5 \pm 1.15	
compound 6	10	6	57.5 \pm 10.5*	34.3
	20	6	34.7 \pm 4.69***	60.4
	50	6	40.7 \pm 6.68***	53.5
control		6	82.2 \pm 2.27	
compound 7	10	6	52.5 \pm 4.25**	36.1
	20	6	49.2 \pm 3.14**	40.2
	50	6	36.5 \pm 2.20***	55.6
control		6	74.2 \pm 4.76	
compound 8	10	6	50.1 \pm 3.64*	32.4
	20	6	32.8 \pm 4.15**	55.7
	50	6	21.7 \pm 1.19***	70.8

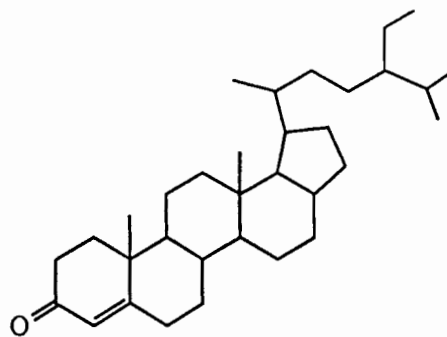
Significantly different from the control value, *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001



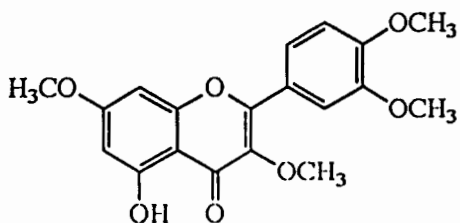
patchouli alcohol (1)



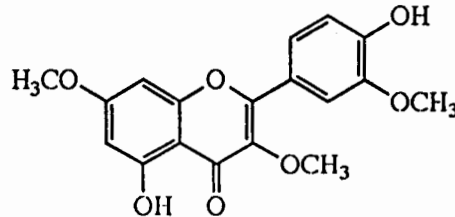
pogostol (2)



sigmast-4-en-3-one (3)

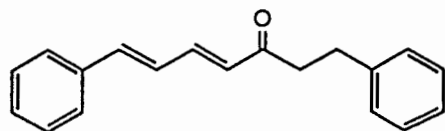


retusin (4)

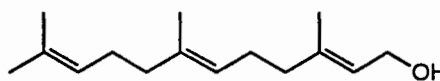


pachypodol (5)

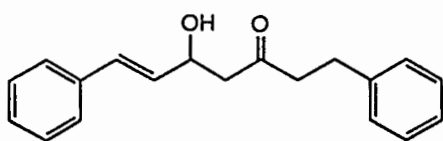
☒ 1



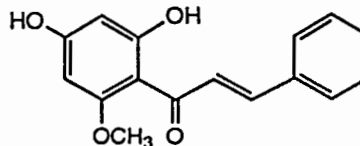
(trans, trans -1,7-Diphenyl-4,6-heptadien-3-one)



(trans,trans - Farnesol)

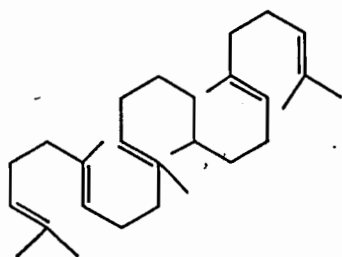


[(5R)- trans -1,7-Diphenyl-5-hydroxy-6-hepten-3-one]

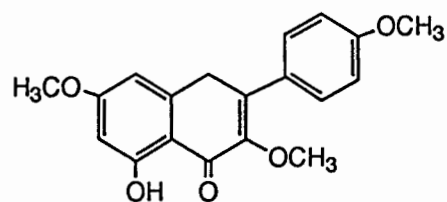


(Cardamomin)

☒ 2

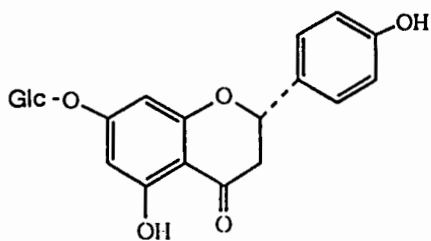


squalene

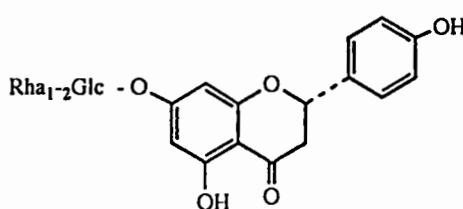


5-hydroxy-3,7,4'-trimethoxyflavonol

☒ 3



Prunin



naringin

☒ 4

Anti-emetic principles of *Pogostemon cabin* (Blanco) Benth

Y. Yang¹, K. Kinoshita¹, K. Koyama¹, K. Takahashi^{1,4}, T. Tai², Y. Nunoura², and
K. Watanabe³

¹Department of Pharmacognosy and Phytochemistry, Meiji College of Pharmacy, 1-22-1
Yato-cho, Tanashi-shi, Tokyo 188, Japan

²Kotaro Pharmaceutical Co. Ltd., Nakatsu 2-5-23, Kitaku, Osaka 531, Japan

³Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chiba University, Yayoi-Cho 1-33, Inage-ku, Chiba

⁴Author for correspondence

Tel 81-424-21-0394, Fax 81-424-1489

Summary

Bioassay-guided fractionation of anti-emetic constituents of 8 traditional Chinese herbal drugs was performed, and the 20 extracts showed anti-emetic activity on copper sulfate induced-emesis in young chicks. From n-hexane extract of Pogostemon cabin, pachouli alcohol (1), pogostol (2), stigmast-4-en-3-one (3), retusin (4), and pachypodol (5) were isolated, and they exhibited anti-emetic effects.

Key words: anti-emetic, Pogostemon cabin, pachouli alcohol, pogostol, stigmast-4-en-3-one, retusin, pachypodol

Introduction

Nausea and vomiting are noted as concomitant side effects of many cancer chemotherapeutic agents. They cause an unavoidable problem in cancer chemotherapy. To prevent these side effects traditional Chinese herbal drugs which may exhibit anti-emetic effects are examined. However, anti-emetic active principles of these crude drugs are not so much known supported by the modern pharmacological evidence. One of the difficulties for testing anti-emetic activity of natural products is that only a few mammals vomit in response to emetic drugs and require a large dose even if they are responsive.

In the previous papers, we reported anti-emetic principles from *Magnolia obovata* bark, *Zingiber officinale* rhizome (Kinoshita et al., 1996) and *Poria cocos* (Tai et al., 1995) using frogs in screening their anti-emetic activities. However, a long emetic latency of frogs induced by the emetic agent is not suitable for testing many samples within a short period of time. Therefore, we studied a new screening method using chicks for the anti-emetic activity (Akita et al., 1998) to overcome the above-mentioned difficulties.

The present paper describes the screening of 31 extracts from 8 traditional Chinese herbal drugs for anti-emetic activities using young chicks, and the identification of active principles contained in *Pogostemon cabin* (Blano) Benth.

Materials and Methods

Materials

The crude drug materials were commercial products purchased from Kinokuniya Kanyakkyoku (Tokyo, Japan) and Kotaro Pharmaceutical Co., Ltd. (Osaka, Japan).

reagents

Copper sulfate anhydride (Yokuhata Pure Chemicals Co., Ltd., Tokyo, Japan) was used as the emetic agent. Dimethyl sulfoxide (DMSO), saline and Tween 80 (Tokyo Kasei Kogyo Co., Ltd., Tokyo, Japan) are commercial products.

Spectrometry and chromatography

^1H - and ^{13}C -NMR spectra were recorded using a JEOL GSX-400 spectrometer in CDCl_3 or $\text{DMSO-}d_6$ with tetramethylsilane as an internal standard. Kieselgel 60 F_{254} (MERCK)

precoated plates were employed for thin-layer chromatography (TLC). Column chromatography was carried out on 70-230 mesh silica gel (MERCK). HPLC was performed using an SSC-3100-J pump with an Oyo-Bunko Uvilog 7 UV detector. HR-MS and EI-MS were obtained using a JEOL JMX-DX 302.

Animals

Male young chicks (4 days of age) weighing 25-35 g were purchased from Goto Furanjo Co., Ltd.(Saitama, Japan).

Bioassay of anti-emetic activity

The young chicks were divided into 1-3 groups consisting of six each, and each young chick were set aside for 10 min to stabilize in large beakers at 38°C. The sample was dissolved in saline contented 5% DMSO and 1% Tween 80 and administered abdominally at volume of 0.1 ml/10g b.w.. After 10 min, copper sulfate anhydride was administered orally at 50mg/kg b.w., then the number of retches (an emetic action without vomiting gastric materials) was recorded during the next 10 min. The results were judged by the decrease in number of retches in contrast with those of control. The inhibition (%) was calculated as follows:

$$\text{Inhibition (\%)} = [(A-B)/A] \times 100$$

A: control frequency of retching

B: frequency retching after sample treatment

Statistical analysis

All numerical data were expressed as the mean \pm S.E.. The statistical significance of the difference was determined by an unpaired student's *t*-test .

Isolation and purification of the anti-emetic principles from the Pogostemon cabin

The crude drug (1.0 kg) was extracted successively with *n*-hexane, CHCl₃, MeOH and each extract was examined for anti-emetic activity using young chicks. As shown in Table 1, three extracts significantly inhibited the emetic-action, respectively. The *n*-hexane extract which showed the highest anti-emetic activity (58.6%) was chromatographed on a silica gel column (*n*-hexane: EtOAc), and 8 fractions (fr. 1-8) were obtained.

Each fraction was tested for anti-emetic activity, and fr.2, fr.3 and fr.7 showed positive activity (Table 2). Fr.2 was chromatographed on HPLC using a silica gel column

[Silica-4251-N 10 ϕ \times 250mm, *n*-Hexane-EtOAc (11:1)], and compound **1** (1.72g) was obtained and identified as patchouli alcohol by comparison with published spectral data (Barton et al., 1987).

An active fraction, fr.3, was chromatographed on a silica gel column (*n*-hexane : acetone) and HPLC using a silica gel column [Silica-4251-N 10 ϕ \times 250mm, *n*-Hexane-EtOAc (5:1)]. Compounds **2** (79.7 mg) and **3** (41.3 mg) were obtained as active principles and identified as pogostol and stigmast-4-en-3-one by comparison with published spectral data (Hikino et al., 1986; Greca et al., 1990). Compound **3** was first isolated from *Pogostemon cabin*.

Fr.7 was chromatographed on HPLC using a silica gel column [(Silica-4251-N 10 ϕ \times 250mm, *n*-Hexane-acetone (75 : 25)], and compounds **4** (62.6 mg) and **5** (48.0 mg) were obtained and examined by MS, ^1H - and ^{13}C -NMR, DEPT experiment, ^1H - ^{13}C cosy, ^1H - ^{13}C long range cosy (COLOC) and the difference of Overhauser enhancement (nOe) spectra. These observations suggested that compound **4** and **5** are retusin and pachypodol, respectively.

Results and Discussion

As shown in Table 1, 20 extracts significantly inhibited emetic action induced by CuSO_4 in young chicks. The *n*-hexane, CHCl_3 , MeOH extracts of *Pogostemon cabin* showed significant inhibition at a dose of 300mg/kg b.w.. Patchouli alcohol (**1**), pogostol (**2**), stigmast-4-en-3-one (**3**), retusin (**4**) and pachypodol (**5**) were isolated from *n*-hexane extract of *Pogostemon cabin* as anti-emetic principles.

Patchouli alcohol (**1**) showed anti-emetic activities at two doses of 50mg/kg b.w. and 70mg/kg b.w.. Pogostol (**2**) significantly inhibited emetic action at three doses of 10mg/kg-50mg/kg b.w.. Stigmast-4-en-3-one (**3**) and pachypodol (**5**) showed anti-emetic activity at a dose of 50mg/kg b.w.. Retusin (**4**) inhibited emetic action at two doses of 20mg/kg and 50mg/kg b.w..

Pogostemon cabin is one of the traditional Chinese medicines used mainly for the treatment of dyspepsia, vomiting, diarrhea and poor appetite. On the other hand, it was known that excessive contraction of digestive organ muscles may cause of vomiting and diarrhea, and patchouli alcohol showed Ca^{2+} antagonist activity (Ichikawa et al., 1989). Therefore, the anti-emetic activity of patchouli alcohol is caused by depressing excessive excitation of smooth

muscles as a result of inhibition of inward Ca^{2+} influx through the cell membranes. Patchouli alcohol contained abundantly in *Pogostemon cabin* (>0.1%) may play a main role in anti-emetic effect clinically in view of its traditional use in Chinese medicine.

Acknowledgements

The authors would like to thank Professor emeritus Shoji Shibata, University of Tokyo, for his encouragement. This study was partly supported by Sasakawa Scientific Research Grant from Japan Science Society (1996-7).

References

- Akita, Y., Yang, Y., Kawai, T., Kinoshita, K., Koyama, K., Takahashi, K., Watanabe, K.:
New assay method for surveying anti-emetic compounds from natural sources. *Natural
product Sciences*, to be submitted.
- Barton, D., Belocil, J., Billion, A., Boivin, J., Lallemand, J., Mergui, S.: functionalisation of
saturated hydrocarbons. *Helv. Chim. Acta 70*: 273-280,1987.
- Greca, M., Monaco, P., Previtera, L.: Stigmasterols from *Typha latifolia*. *J. Nat. Prod.*53:
1430-1435,1990.
- Hikino, H., Ito, K., Takemoto, T.: Structure of Pogostol. *Chem. Pharm. Bull. 16*: 1608-1610,
1968.
- Ichikawa, K., Kinoshita, T., Sankawa, U.:The Screening of Chinese crude drugs for Ca²⁺
antagonist activity: identification of active principles from the aerial part of *Pogostemon cabin*
and fruits of *Prunus nume*. *Chem. Pharm. Bull. 37*: 345-348,1989.
- Kawai, T., Kinoshita, K., Koyama, K., Takahashi, K.: Anti-emetic principles of *Magnolia*
obovata bark and *Zingiber officinale* rhizome. *planta Med. 60*: 17-21,1994.
- Kinoshita, K., Kawai, T., Imaizumi, T., Akita, Y., Koyama, K., Takahashi, K.: Anti-emetic
principles of *Inula linariaefolia* flowers and *Forsythia suspensa* fruits. *Phytomedicine 3*:
51-58,1996.
- Tai, T., Akita, Y., Kinoshita, K., Koyama, K., Takahashi, K., Watanabe, K.: Anti-emetic
principles of *Poria cocos*. *Planta Med. 61*: 493-590,1995.

Table 1. Screening test of medicinal plants for anti-emetic activities on copper sulfate induced emesis in young chicks

Crude drugs	Extract	No. of young chicks	No. of ratches (mean \pm S.E.)	Inhibition (%)
control		6	69.3 \pm 3.19	
<i>Pogostemou cabin</i>	<i>n</i> -hexane	6	28.9 \pm 4.31***	58.6
	CHCl ₃	6	45.8 \pm 6.75*	34.4
	MeOH	6	47.8 \pm 6.39*	31.5
control		6	70.6 \pm 1.25	
<i>Alpinia katsumadai</i>	<i>n</i> -hexane	6	52.4 \pm 3.39**	25.8
	CHCl ₃	6	28.0 \pm 5.09***	60.1
	MeOH	6	18.4 \pm 0.93***	73.9
	H ₂ O	6	46.2 \pm 8.12	34.6
control		6	48.8 \pm 4.34	
<i>Amonum tsaoko</i>	<i>n</i> -hexane	6	46.6 \pm 3.29	4.5
	CHCl ₃	6	36.6 \pm 5.39	25.6
	MeOH	6	22.2 \pm 3.28***	54.5
	H ₂ O	6	39.3 \pm 7.23	19.4
control		6	75.8 \pm 1.38	
<i>Amomum cardamonum</i>	<i>n</i> -hexane	6	78.6 \pm 3.14	-3.6
	CHCl ₃	6	36.0 \pm 5.96**	52.6
	MeOH	6	70.0 \pm 11.0	7.7
	H ₂ O	6	52.0 \pm 2.98*	31.4
control		6	64.5 \pm 4.46	
<i>Amonum xanthioides</i>	<i>n</i> -hexane	6	41.8 \pm 9.05*	35.2
	CHCl ₃	6	29.8 \pm 3.94***	53.8
	MeOH	6	34.8 \pm 8.47*	46.0
	H ₂ O	6	43.5 \pm 7.70*	32.5
control		6	68.2 \pm 2.31	
<i>Eupatorium fortunei</i>	<i>n</i> -hexane	6	61.3 \pm 6.68	10.1
	CHCl ₃	6	46.3 \pm 7.32	32.1
	MeOH	6	50.8 \pm 2.42***	25.5
	H ₂ O	6	54.2 \pm 3.16*	20.5
control		6	86.8 \pm 3.69	
<i>Nelumbo nueifera</i>	<i>n</i> -hexane	6	75.3 \pm 9.81	13.2
	CHCl ₃	6	63.2 \pm 3.06**	27.2
	MeOH	6	77.6 \pm 2.98	10.6
	H ₂ O	6	71.6 \pm 5.83	17.6
control		6	44.5 \pm 2.33	
<i>Alpinia officinarum</i>	<i>n</i> -hexan	6	37.5 \pm 4.19	15.7
	CHCl ₃	6	24.2 \pm 3.23***	45.6
	MeOH	6	32.7 \pm 3.74*	26.5
	H ₂ O	6	31.2 \pm 4.26*	29.9

Significantly different from the control value, * p <0.05, ** p <0.01, *** p <0.001

Table 2. Anti-emetic effect of the fractions from the *n*-hexane extract on copper sulfate induced emesis in young chicks

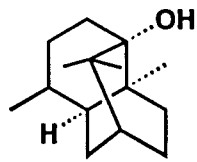
Drugs	Dose (mg/kg b.w.)	No. of young chicks	No. of retches (means \pm S.E)	Inhibition (%)
control		6	47.8 \pm 6.14	
Fr. 1	150	6	37.8 \pm 5.17	21.8
Fr. 2	150	6	11.6 \pm 7.08**	75.7
Fr. 3	150	6	7.6 \pm 1.25***	84.1
control		6	45.0 \pm 8.45	
Fr. 4	150	6	31.2 \pm 3.36	30.7
Fr. 5	150	6	27.7 \pm 6.92	42.9
Fr. 6	150	6	28.4 \pm 6.95	36.9
control		6	47.8 \pm 6.14	
Fr. 7	150	6	21.6 \pm 4.25**	54.8
Fr. 8	150	6	38.2 \pm 7.87	20.0

Significantly different from the control value, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

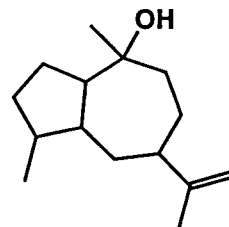
Table 3. Anti-emetic effect of compound 1-5 on copper sulfate induced emesis in young chicks

Drugs	Dose (mg/kg b.w.)	No. of young chicks	No. of retches (means \pm S.E)	Inhibition (%)
control		6	60.0 \pm 4.73	
patchouli alcohol (1)	10	6	54.5 \pm 7.58	9.3
	20	6	50.3 \pm 6.90	16.2
	50	6	36.0 \pm 3.69**	40.0
	70	6	25.4 \pm 2.80***	57.7
control		5	67.2 \pm 2.81	
pogostol (2)	10	5	40.8 \pm 4.79**	21.8
	20	5	38.8 \pm 8.73 *	42.2
	50	5	38.2 \pm 6.13**	43.2
control		6	55.7 \pm 4.6	
stigmast-4-en- 3-one (3)	10	6	54.9 \pm 8.80	1.4
	20	6	39.6 \pm 7.48	28.9
	50	6	24.7 \pm 1.21***	55.7
control		6	67.5 \pm 6.63	
retusin (4)	10	6	49.0 \pm 6.97	27.4
	20	6	48.0 \pm 4.97*	28.9
	50	6	18.5 \pm 2.25***	72.6
control		5	56.6 \pm 3.93	
pachypodol (5)	10	5	53.4 \pm 3.93	5.6
	20	5	44.6 \pm 7.27	21.2
	50	5	28.0 \pm 3.09***	50.6

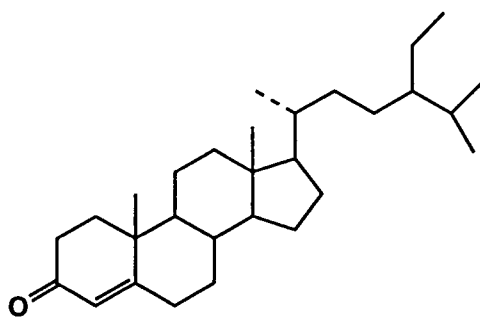
Significantly different from the control value, *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001



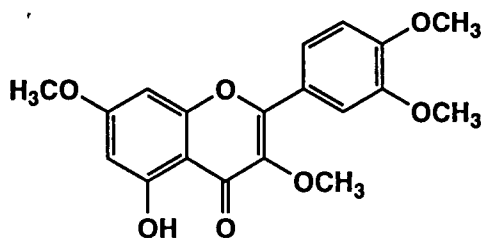
patchouli alcohol (1)



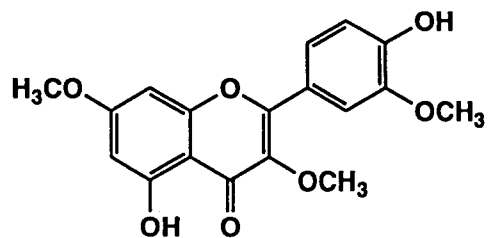
pogostol (2)



sigmast-4-en-3-one (3)



retusin (4)



pachypodol (5)

Fig. 1. The structures of active compounds isolated from *Pogostemon cabin* Benth

日本財団補助金による

1997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 -

1998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 黄 樹明
 研究機関 名屋大学医学部 研究指導者 久場 健司 職名 教授
 所在地 〒466-8550 名古屋市昭和区鶴舞町65 電話 (052)744-2047 内線 _____

II. 過去の研究歴
1982年12月～1984年9月 黒龍江中医学院(現黒龍江中医薬大学)生理学講座 助手
1984年9月～1987年7月 同上大学大学院(生理学専攻)
1987年9月～1992年4月 同上大学生理学講座 講師

III. 過去の研究実績
Inhibitory effects of cyanide on mechanical and electrical activities in the circular muscle of guinea-pig gastric antrum. Jpn. J. Physiol. 34, 229-238
Effects of phosphodiesterase inhibitors on spontaneous electrical activity: slow wave, in the guinea-pig gastric antrum. J. Physiol. 485, 493-502.

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)
運動神経終末でのアドレナリンとACTHによる伝達物質放出の可塑的促進.
第75回日本生理学会大会, 1998年3月27日 金沢

(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
神経筋接合部の交感神経伝達物質でのアドレナリンによる長期興奮増強という有意義な現象を発見したため、今後、神経終末内のCa²⁺濃度、特に微小範囲のCa²⁺濃度(D_{Ca})を測定し、この長期増強のメカニズムを追求していく予定である。

別紙



VII. 指導教官の意見

黄樹明君はこの報告書の結果に示すように、 $1\mu\sim 2\mu$ の小さな運動神経終末から細胞内 Ca^{2+} 濃度変化を測定するという非常に困難な実験を確実に成功させている。又、骨格筋でのシナプス伝達と自律神経ホルモンによる可塑性があることは、重要な発見である。

これらのことから、黄樹明君は本奨学金の主旨を十分生かして、着実にその成果を上げていると云える。

研究報告

カエル運動神経終末のインパルスによるカルシウム上昇に対するアドレナリンとアデノシンの作用

名古屋大学医学部第一生理 黄樹明、久場 健司

骨格筋の神経筋伝達は、交感神経の活動やアドレナリンにより促進され、これはオルペリーの効果として知られ、シナプス前性に起こることが分かっている。また、神経伝達物質であるアセチルコリンが放出される際に、ATPが同時に放出され、その分解産物であるアデノシンが、開口放出を抑制することが知られている。

本研究では、このアドレナリンの促進作用とアデノシンの抑制作用がインパルスによる細胞内カルシウム上昇過程に作用するのか、あるいは、伝達物質の動員や開口放出機構そのものに作用するのかを調べるために、 Ca^{2+} 蛍光色相である fura-2 及び oregon green を蛙胸皮筋の運動神経終末に神経断端に負荷し、細胞内 Ca^{2+} 測定を行い、アドレナリンとアデノシンの作用を検討した。

実験方法

50g前後のカエルを断頭屠殺し、両方の胸皮筋を神経の付いたままに注意深く摘出し、神経周りの結合組織をきれいにのぞいた後、0.5mlのチェンバーに載せ、両端をピンで固定して、室温下(23-26°C)で、リンゲル液を、2mlのスピードで灌流する条件下で、標準ガラス微小電極で、神経筋接続部のシナプス後電位(Epp)を記録した。

上記の方法で取り出したカエル胸皮筋の神経筋標本を、特別に作ったシャーレに置き、神経の断端を、色素(Oregon green 及び Fura-2)を0.2 μ L含んだ液中に置き、100%湿度の条件下で密閉する。色素は軸索輸送により、神経終末まで移動させる。神経断端の Ca^{2+} 色素による負荷時間は12時間である。共焦点レーザー顕微鏡及び光電子倍增管で細胞内Caを測定した。また、神経の電気刺激が二本の電極で行った。

実験結果及び考察

1. 蛙骨格筋の神経筋接続部のEPPに対するアドレナリンの増強作用。

図1の示したように、上のAは、Low Ca^{2+} High Mg^{2+} リンゲル液で、Bは、正常リンゲル液にD-tubocurarine $2\mu M$ 存在下で行った実験である。過去の報告 (Jankinson et al. 1968, Kuba 1973) にあるように、両方のどちらの場合も、 $20\mu M$ のアドレナリンがEPP振幅を増幅したことが見られた。今度の実験で新に発見されたことは、アドレナリンの促進効果が、アドレナリン投与後でも、長く続くことである。この現象は、中枢神経で見られている記憶と学習の基礎過程と考えられる長期増強とはいえないが、中期増強と言える。このような数時間の可塑的効果の発見は、早いシナプス伝達で機能を発揮する運動神経終末においては、予想外のことであるが、後の考察に示すように非常に生理学的な意義があると考えられる。そこで、この促進現象が、インパルスにより起こる細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇の増強によるかどうかを、細胞内 Ca^{2+} 濃度の測定によって調べた。

共焦点レーザー顕微鏡を応用し、繰り返し刺激 (テタヌス) による細胞内 Ca^{2+} 濃度 [Ca^{2+}_i] 上昇を測定し、アドレナリンの作用を見た。テタヌスにより誘発した [Ca^{2+}_i] 上昇は、アドレナリンの存在下、及びアドレナリンを洗って30分後で変化しなかった。

の上昇の時間経過の変化を見るため、光電子倍增管による Ca^{2+} 測定法でFura-2の蛍光比により Ca^{2+} 濃度変化を測定した。図2のように、左はコントロールで、100Hzで10パルス、20パルス、50パルスのテタヌス刺激による細胞内 Ca^{2+} 上昇の時間経過を示したもので、右は、アドレナリン存在下での測定結果である。10パルスの場合のように Ca^{2+} の上昇が小さい場合は降下相 (減少相) の時間経過が遅いが、上昇の大きい場合は、減少相の時間経過早い相と遅い相に分かれる。これは、細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇がある値に達すると早い Ca^{2+} 処理機構が働き始めることによると考えられる。図に示すように、アドレナリン投与する前と投与した後では、パルス刺激による細胞内 Ca^{2+} の上昇には、余り変化が見られなかった。従って、アドレナリンの神経期伝達促進効果は運動神経終末でのインパルスによる細胞外からの Ca^{2+} の流入以後の開口放出機構の促進によるものと考えられる。又、アドレナリンによるシナプス前終末からの伝達物質放出の促進作用が、アドレナリンを除いた後も数時間にわたって促進することは速いシナプス伝達でその機能

を発揮する骨格筋のシナプスでは驚くべきことだが、その生理学的意義は大きい。すなわち、運動機能はその機能が最大効率で働くためには、全運動神経系が有る程度の準備期間ウォーミングアップを必要とする。今回発見された機構はこの過程に交感神経系が関与することを示すものである。

2. アデノシンの骨格筋神経筋接続部伝達に対する抑制作用

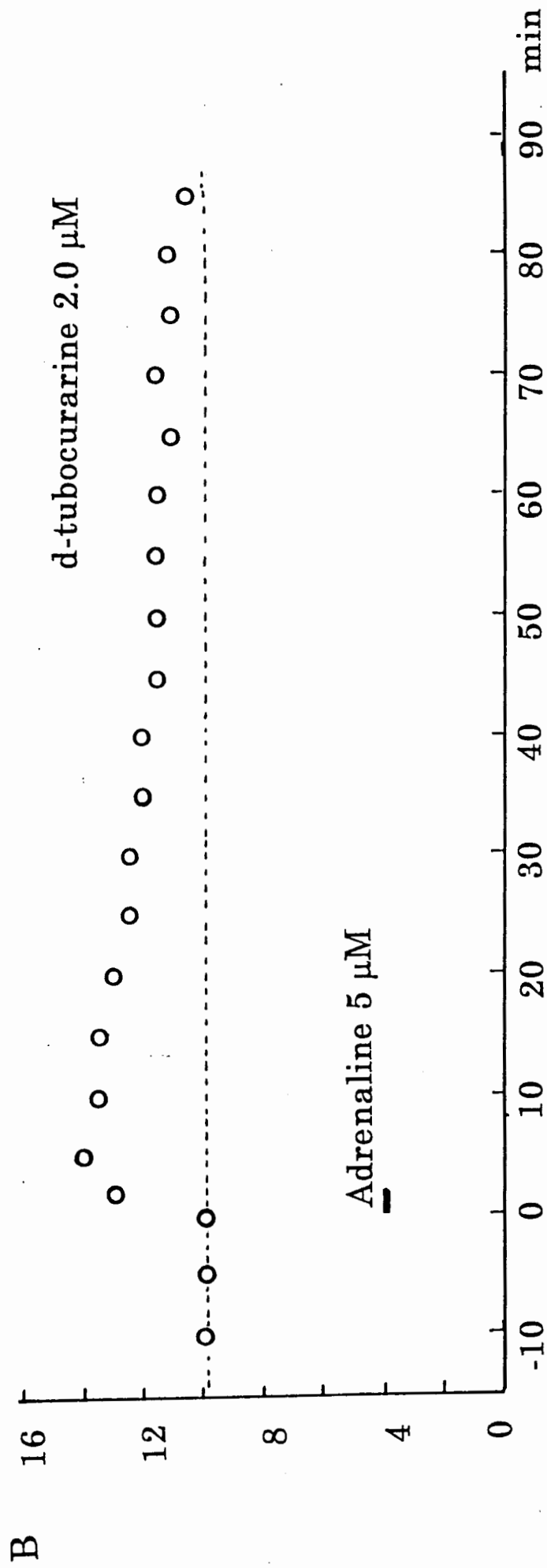
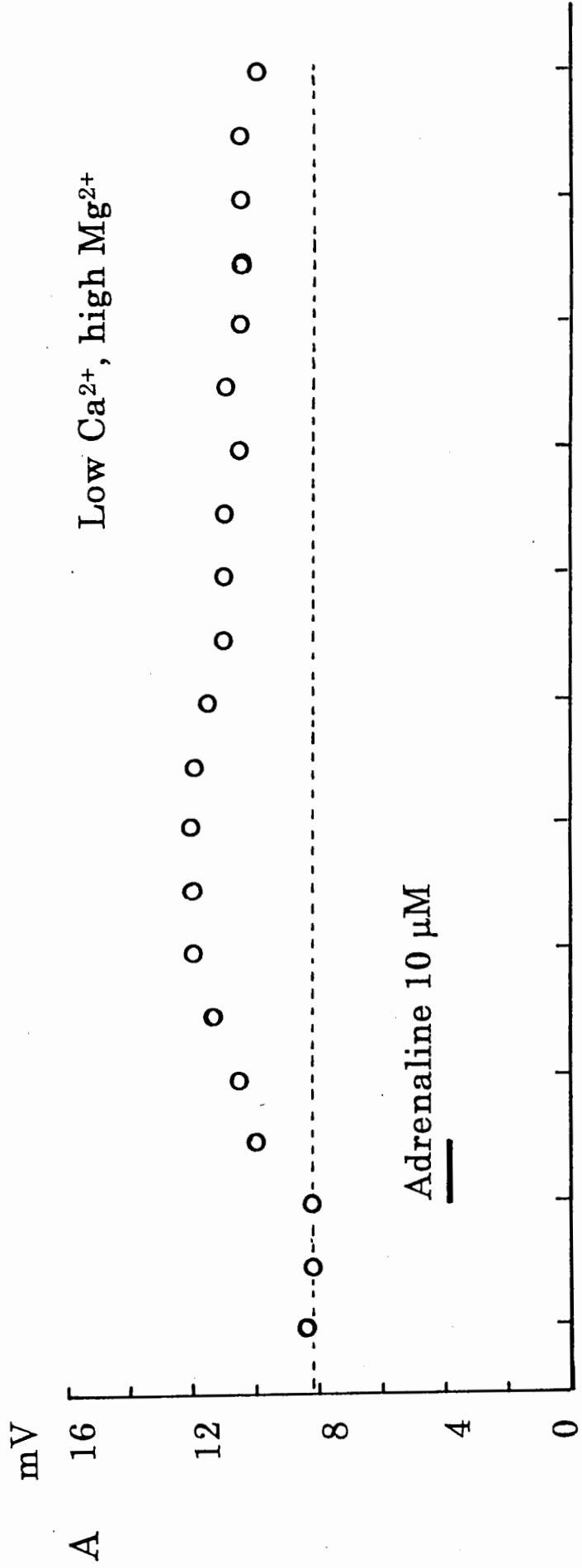
運動神経の終末では、神経のインパルスによりアセチルコリンが放出される同時、ATPも放出され、このATPは、アデノシンに分解され、それが、シナプス伝達に対し、抑制作用を示すことが、考えられている。図3の示したように、低 Ca^{2+} 高 Mg^{2+} 溶液とD-tubocurarine添加のリングル液で $100\mu M$ のアデノシンがほぼ同じように可逆的にEppの振幅を抑制しました。一般には、アデノシンが Ca^{2+} チャンネルに抑制作用を持つと言われているが、それによるかどうかを細胞内 Ca^{2+} 測定によって調べた。

もし、アデノシンのEPPの振幅の抑制は、神経ターミナル膜の Ca^{2+} チャンネルを押さえて、 Ca^{2+} の流入を減少させるによるものならば、アデノシンの存在下では、テタヌス刺激による $[Ca^{2+}]_i$ の上昇は小さくなるはずだが、期待に反して、変化が見られなかった(図4)。この結果から、アデノシンの抑制作用も、 Ca^{2+} 流入以後の開口放出機構にあると推測される。この抑制作用は神経筋伝達にネガティブフィードバックをかけることを意味し、前記のアドレナリンの促進作用と拮抗することになり、筋運動の調節が末梢レベルでも微妙に調節されることを示唆する。

結 論

1. Adrenalineは、運動神経終末に作用し、インパルスによる Ca^{2+} 流入を変えることなく、開口放出の活性化機序を促進し、この促進作用はAdrenaline除去後の数時間続く。

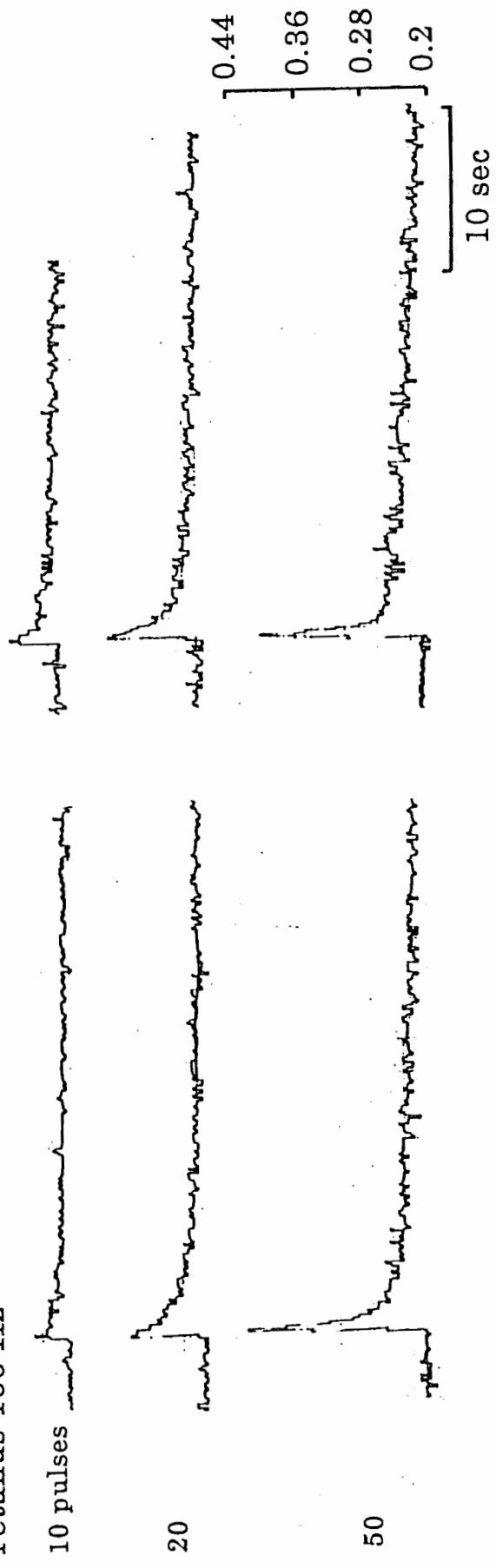
2. Adenosineは、定説とは異なり、インパルスによる Ca^{2+} 流入を抑制することなく、インパルスによる開口放出機構を可逆的に抑制する。

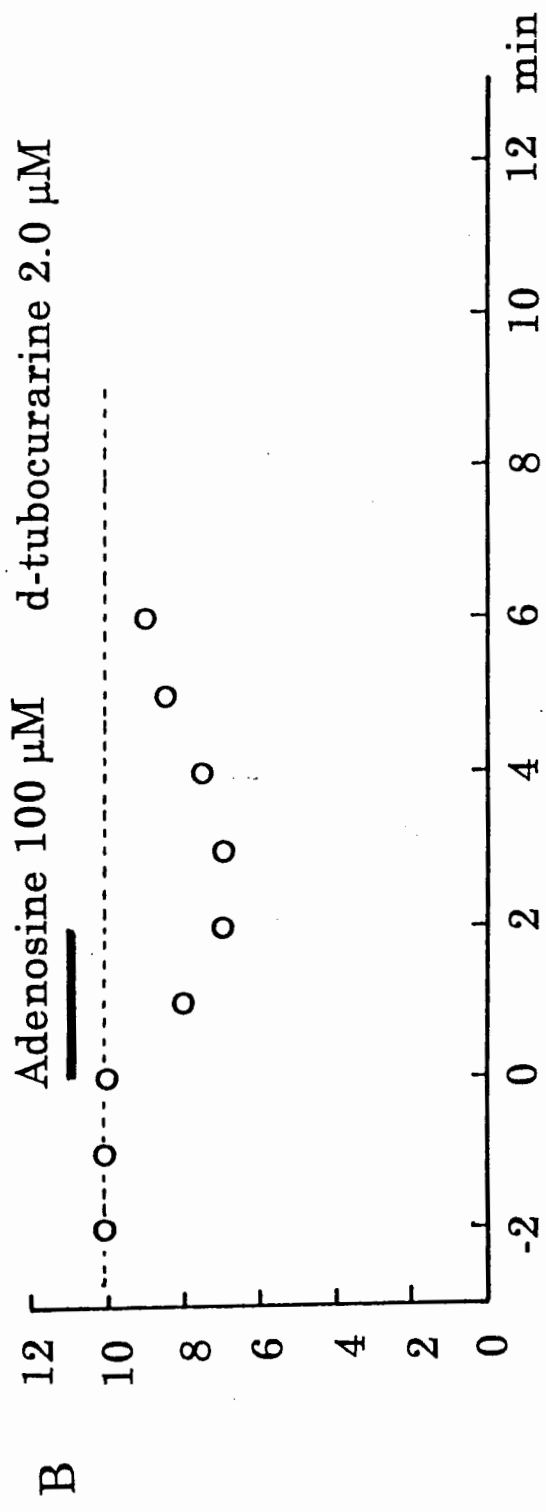
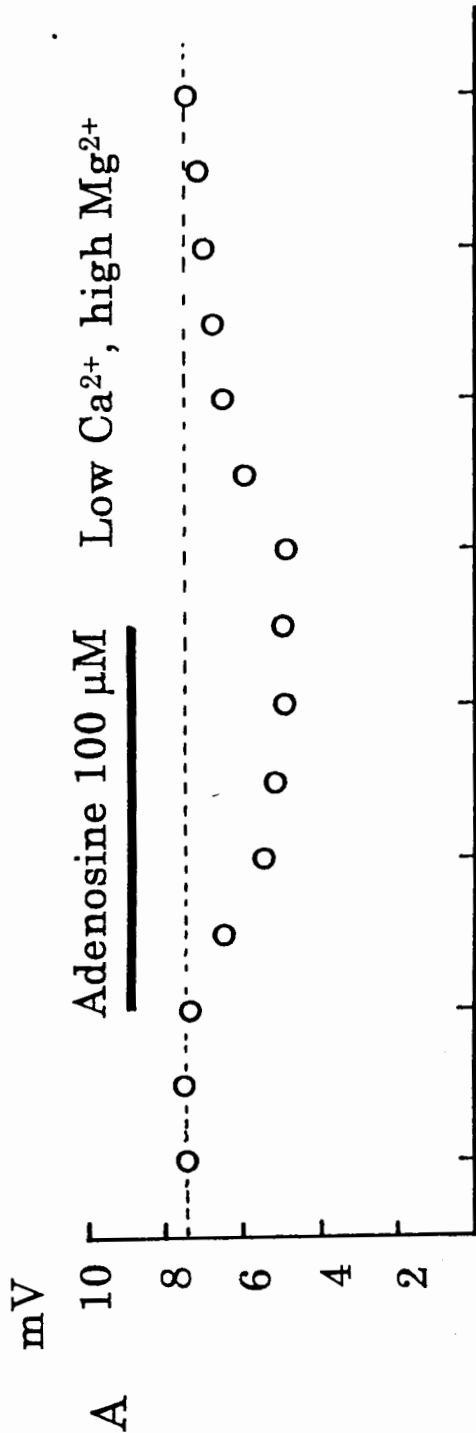


Adrenaline 5 μ M, 15 min

Control

Tetanus 100 Hz





Adenosine 100 μ M, 15 min.

Control

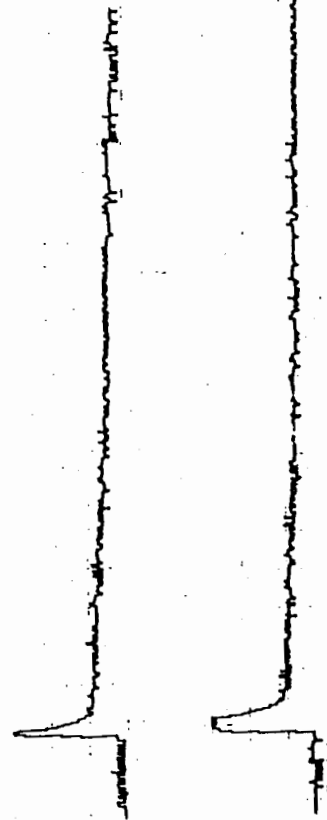
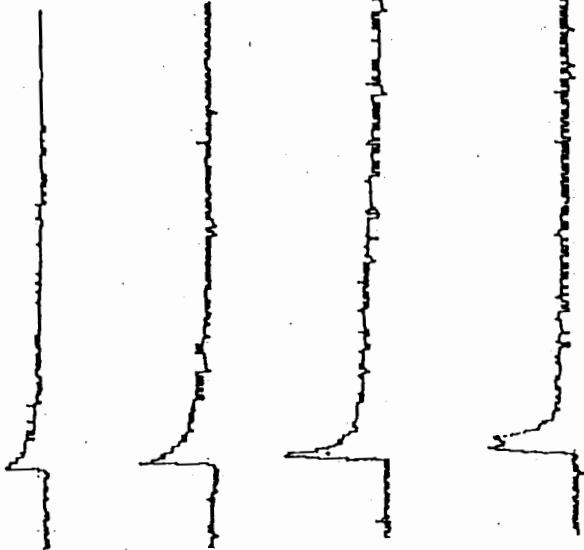
Tetanus 100 Hz

10
pulses

20

50

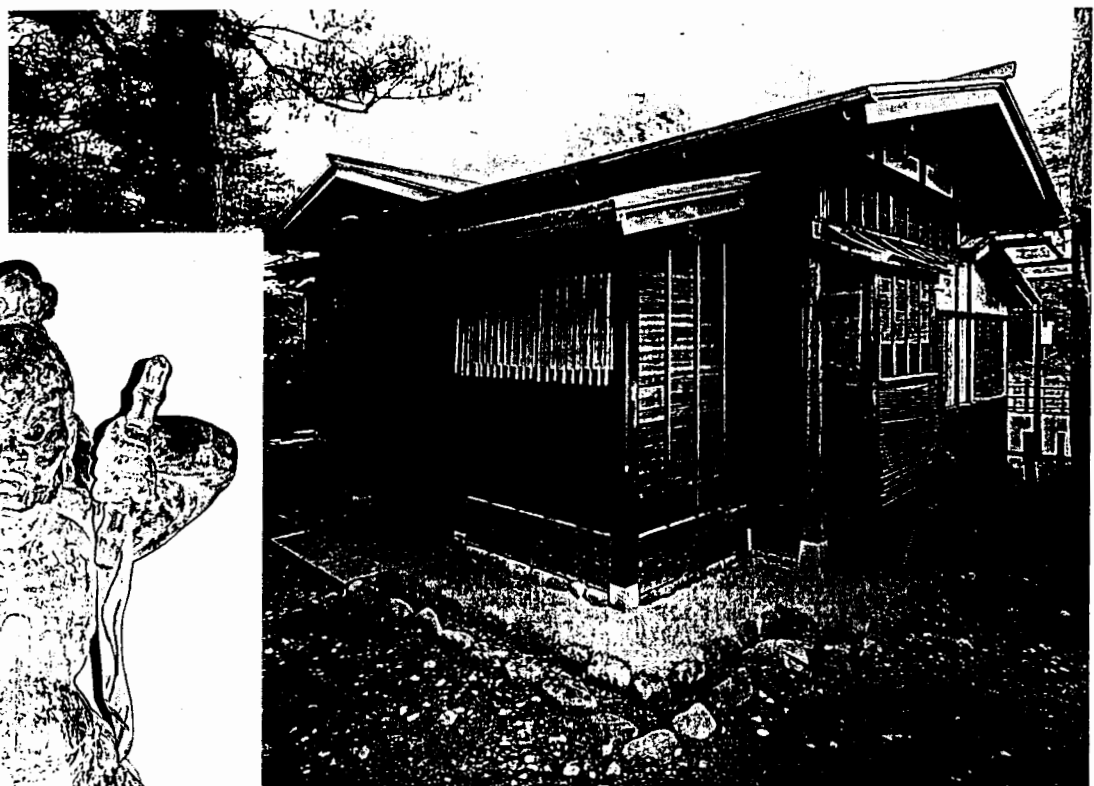
100



0.36
0.28
0.2

10 sec

第75回
日本生理学会大会
予稿集



平成10年3月27～29日

金沢大学医学部

1E1520

運動神経終末でのアドレナリンと ACTH による伝達物質放出の可塑的促進

名古屋大学・医学部・第1生理

黄樹明、秋田天平、北村淳子、中山晋介、久場健司

アドレナリンと ACTH は、d-ツボクラリン添加リンガー液や低 Ca^{2+} 高 Mg^{2+} 液中で、終板電位の振幅を約 1.5 倍に増大し、この促進作用は薬物除去後も数時間持続した。アドレナリンは、運動神経終末の細胞内 Ca^{2+} 濃度の静止時の値とテタヌス刺激による上昇に影響しなかった。アドレナリンと ACTH の開口放出に対する作用機構について考察する。

1E1535

GABA_B 受容体によるシナプス前抑制機構

梶川是直、辻本哲宏、高橋智幸

東京大学・医学部・神経生理

ラット台形体内側核の巨大前シナプスとシナプス後細胞から同時にホールセル記録を行い、GABA_B 受容体によるシナプス伝達抑制機構を検討した。GABA_B 受容体アゴニスト baclofen は、GTP 結合蛋白質の活性化を介してシナプス前終末端の Ca^{2+} 電流を抑制したが、内向き整流性 K 電流、遅延整流性 K 電流には影響を与えなかった。

1E1550

伝達物質開口放出の C-キナーゼによる増強メカニズム

東北大学大学院医学系研究科・生体情報

八尾寛

フォルボルエステルは、C-キナーゼを介して、ニワトリ胚毛様体神経節の巨大シナプス前終末からの伝達物質放出を長期にわたり増強した。これは、活動電位にともなう Ca^{2+} 流入の増加をともなわなかった。また、 Ca^{2+} -放出関係において、最大値よりは開口放出の Ca^{2+} 感受性の増加が認められた。リン酸化による Ca^{2+} 感受性の修飾が示唆される。

1E1605

AMPA 型グルタミン酸受容体 GluR2Q の flip/flop 依存性脱感作及び脱活性化特性

群馬大・医・第二生理

小池真紀、塚田昌大、都筑馨介、小澤静司

AMPA 受容体サブユニット GluR1-GluR4 には flip 型と flop 型の二種類の splice variant が存在する。今回、私達は GluR2 の Q/R site に点変異を導入した未編集型 GluR2Q をツメガエル卵母細胞に発現させ、outside-out patch 膜にアゴニストを急速投与し、flip 型と flop 型におけるチャンネル開閉の kinetics の差異を調べた。

1E1620

神経細胞傷害にともなうアミノ酸受容体応答の変化

九州大・医・第二生理

鍋倉淳一、古川義彦、赤池紀扶

生体内における神経細胞傷害—修復過程におこるアミノ酸受容体応答の変化をパッチクランプ法を用いて検討した。軸索傷害24時間後には傷害運動細胞における NMDA 受容体 Mg^{2+} ブロックは減弱し14日目に回復した。メカニズムとして関連するキナーゼ活性や NMDA 受容体サブユニットの変化の可能性を検討した。

日本財団補助金による

1997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-

1998年 3月 14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 春 玲

研究機関 名古屋市立大学 研究指導者 萩原 幸夫 職名 教授

所在地 〒467 名古屋市瑞穂区田辺通3-1 電話 052-836-3415 内線

II. 過去の研究歴

1992.4~1993.3 富山医科大学薬科大学和漢薬研究所難波矩雄教授の教室に一年間の研究を終え、名古屋市立大学薬学部萩原幸夫教授の研究室に移り、漢方方劑の薬效解析についての研究を始めた。

III. 過去の研究実績

1. 生薬学雑誌 A comparative study of Alkaloidal constituents in *Corydalis decumbens* Tubers by HPLC 47(4) 440-445 1993

2. 第27回日動脈硬化学会総会 1995.3.30-31 漢方処方の解析(第7号) 黄耆桂枝湯加味考の抗高脂血症作用

3. 第26回日本東洋医学学会東海支部例会 1996.11.17 黄耆桂枝湯加味考の抗高脂血症作用およびその作用機序の検討

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)

International symposium on Natural Medicines in Kyoto 10.28-30 1997
EVALUATION OF KAMPO-SHOHO (No. 100)
ANTICHOLESTERMIC ACTION OF KAMPO MEDICINE OGI-KEISHI-GOMOTSU-TO-KA-KOJIN (OKKK)

(2) 学会誌等に発表した論文 無・(有) (雑誌名・論文名)

- ① Phytomedicine 4(4) 295-300 1997
- ② Antihyperlipidemic Action of a traditional Chinese Medicine (Kampo medicine) Ogi-Keishi-Gomotsu-To-Ka-Kojin
- ③ Biol. Pharm. Bull submitted Antihypercholesteremic action of a Kampo Medicine OKKK.

V. 今後の研究計画及び希望

黄耆桂枝湯加味考の有効成分を分析分離により、探索する。有効成分の作用メカニズムを方劑のそれと比較しながら検討する。より有効な動脈硬化治療薬の開発も可能である。よって、漢方研究の有用性、重要性を示す。

VI. 研 究 報 告 (日本語、又は英語で書いて下さい。4,000字以上で記載して下さい。別紙可)

別紙



VII. 指導教官の意見

本人は笹川医学奨学金制度研修生として来日、帰国後勉学の念止みかたく、本生薬学教室の大学院生として進学した。以後4年着々と成果を挙げ、明年3月には博士の学位を取得可能となった。非常に熱心の実験に取り組んでおり、漢方薬の科学的評価という地味な分野ではあるが、注目に値する研究者として成長している。本助成によりこの一年は経済的にもゆとりが出て実験が進んでいる。指導者としても財団に感謝を表す次第である。

研究報告書

呉 春珍

近年、喫煙、高血圧、高脂血症および糖尿病など心血管系疾患の主たる危険因子の発見によって、その予防、治療に大きな進歩が遂げられてきた。これによって心血管系疾患発症率を有意に低下させた国も少なくない。しかし、このように大きな成果が得られているにもかかわらず、心血管系疾患はいまだに米国など多くの先進工業国において死因のトップになっている。日本人の食生活の欧米化によって、肥満、高脂血症など代謝異常が大幅に増加した。高脂血症、特に高コレステロール(CHO)血症と動脈硬化疾患の一つである虚血性心疾患との関連性については、広く研究され、高CHO血症がその発症や病態進行の危険因子であることが報告されている。高脂血症は血管壁に沈着するコレステロールを供給することにより、また、血管壁の性状、血球の性質に影響をおよぼすことにより、動脈硬化発症に関与している。また、1%の血漿コレステロール値の低下は冠動脈硬化症を2%抑制することが報告されており、高コレステロール血症の治療は粥状動脈硬化症治療にとっては不可欠な治療と考えられる。

一方、血清トリグリセライド (TG) 値の上昇と心血管系疾患のリスク増大との間に相関関係があることが多くの研究から明らかにされており、高TG血症は閉経後の女性の動脈硬化症の危険因子とされている。高TG血症では、高比重リポ蛋白(HDL)コレステロールの低下を伴うことが多く、高レムナント血症を生じて血管壁のコレステロール蓄積を促進し、また、血栓形成を助長することにより血管壁の病的反応を引き起こして冠動脈硬化症を進展させると考えられる。血清CHOのみならず血清TGを低下させることは心血管系疾患の予防および治療において重要な課題と考えられる。

古来より、主として東洋で使われてきた漢方方剤は、合成薬品に比べて比較的副作用が少なく、予防を目的とする長期投与が可能であるという特長がある。本研究室では、いくつかの漢方方剤が抗高脂血症作用、あるいは、抗動脈硬化作用を示すことを明らかにしてきた。循環器系疾患のように多くの因子が複雑に絡み合っている慢性疾患には、長期間使用可能な漢方方剤の様な薬剤が有用であると考えられる。また、漢方方剤の抗高脂血症作用、抗動脈硬化作用を検討することは、漢方方剤の作用機序を明らかにし、臨床上的有用性を裏付けるというだけでなく、新たな抗高脂血症作用、抗動脈硬化作用の機序が見いだされる可能性があり、新規薬剤の開発にもつながる可能性を秘めている。

黄耆桂枝五物湯加紅参は金匱要略の血痺虚劳症脈症并治に見られる処方であり、これまでに末梢神経系、循環器系の異常によると考えられるスモン患者の手足のしびれ、冷え、さらに運動機能障害の改善に有効であることが臨床的に示されてきた。しかし、これまでに、黄耆桂枝五物湯加紅参の作用機序に関する基礎的な研究は殆どない。そこで、本研究では、本方剤の循環器系疾患の改善効果を有する可能性を検討するために、抗高脂血症作用に焦点を絞り、ラットを用いた高コレステロール血症モデル、高TG血症モデルを作成して、本方剤の血清と肝臓のTG、CHO、およびリン脂質(PL)低下作用、および、その作用機序について検討した。

脂質代謝異常が直接因子として動脈硬化症の成立に重要な役割を演じることは異論のないところである。脂質代謝異常の中でも高CHO血症は動脈硬化症の発症因子として重要視されており、また、高TG血症は高CHO血症に比べ虚血性心疾患の発症率と相関が高いことが報告されている。現在、ヒトの脂質代謝異常を反映する動物モデルはないと考えられているが、実験的高脂血症動物は脂質代謝のしくみを知り、ヒトの高脂血症の病態を解明する手段として重要である。本研究では、脂質代謝異常を高CHO血症、高TG血症に絞り、血清CHOを増加させるコレステロール食を用い、長期間負荷することにより作成した高脂血症ラットモデルに対する本方剤の効果を調べた。

一方、Yudkinらが疫学的調査からシヨ糖摂取量と虚血性心疾患の発症率との間に正の相関のあることを報告して以来、シヨ糖およびその構成成分であるフルクトースによる脂質代謝異常が注目されるようになった。そこで、今回、12週間グリセロール/フルクトース負荷による高TG血症ラットモデルを作成し、高TG血症ラットに対する本方剤の効果を調べた。本研究の結果は次のように要約される。

1、抗高CHO血症作用とその作用機序についての検討

6週齢雄性SDラットを1%コレステロール含有飼料で、12週間飼育することにより、高コレステロール血症ラットを作成した。黄耆桂枝五物湯加紅参はヒト常用量の2倍あるいは10倍に相当する量をラットの餌一日摂取量中に含有するよう調製して与えた。すでに、黄耆桂枝五物湯加紅参はラットの高脂血症モデルにおいて、抗高コレステロール血症と同時に、強力な抗高トリグリセリド血症作用を見出ししており、血清T-CHO低下作用機序についてラット初代培養肝細胞を使用して検討したところ、CHO合成の抑制が観察されたが、HMG-CoAレダクターゼには活性低下は見られず、原因酵素の同定はできなかった。一方、腸管からのコレステロール吸収抑制作用が観察され、高コレステロール食負荷時には肝臓での内因性コレステロール合成は通常より低下することを考えると、本方剤の血清T-CHO低下作用は腸管からのCHO吸収抑制が主因になると考えられる。さらに、今回コレステロールから胆汁酸を合成する段階の律速酵素であるコレステロール7メーヒドロキシラーゼの活性に対する本方剤の影響を検討した、コレステロール7メーヒドロキシラーゼの活性の増加作用が観察された。この結果から、血清T-CHO低下作用は、コレステロールの胆汁酸としての排泄促進が関与することが示唆された。

2、抗高TG血症作用とその作用機序についての検討

6週齢雄性SDラットに15%グリセロール/15%フルクトース(GF)含有水を12週間自由摂取させることにより、高TG血症ラットを作成した。方剤投与群では、GF含有水を与えながら黄耆桂枝五物湯加紅参をヒト常用量の5倍あるいは10倍量を経口投与した。黄耆桂枝五物湯加紅参ヒト常用量の5倍量群と10倍量群のいずれでも血清TG及びPLの増加が3ヶ月間の同時投与によって、有意に抑制されることが認められた。血清TGおよびPL低下作用機序についてラットを用いて検討したところ、本方剤は14C酢酸と3Hオレイン酸の肝臓TG画分中への放射活性の取り込みを抑制し、また、肝臓ミクロソーム中のTG合成酵素のDGAT活性に対する抑制を示した。さらに、リポ蛋白のTG異化代謝に重要な役割を果たしているHTGL, LPLの活性を増加させた。本実験に用いたフルクトース負荷による高TG血症の成因は、肝におけるTG合成の亢進と肝からのTG分泌亢進およびリポ蛋白リパーゼの活性低下に起因する血中TGの分解抑制によると考えられている。また、グリセロール負荷による高TG血症の発症機構は異論はあるが、肝におけるTG合成亢進あるいは、内因性TGの除去障害によると考えられている。すなわち、黄耆桂枝五物湯加紅参は、肝臓でのTG合成を抑制することが血清TG低下の一因になると考えられる。また、リポ蛋白リパーゼ活性と肝性リパーゼ活性を増加させることにより、内因性TGの加水分解を促進することが、血清TG低下のもう一つ重要な原因になると考えられる。

黄耆桂枝五物湯加紅参は黄耆桂枝五物湯と紅参から構成された処方であり、今回さらに、この二つの構成成分との抗高TG血症作用を比較した。高TG血症モデルに対して、黄耆桂枝五物湯加紅参、黄耆桂枝五物湯と紅参はともに血清TG低下作用が観察された、強さは黄耆桂枝五物湯加紅参、紅参、黄耆桂枝五物湯の順でした。また、HTGL, LPLの活性を増加させた、黄耆桂枝五物湯加紅参は黄耆桂枝五物湯、紅参単独より強かった。

一方、コレステロール7メーヒドロキシラーゼの発現組織はおもに肝臓であり、LPLの発現組織は脂肪組織、心臓、骨格筋などに分布している。そこで、肝臓、脂肪組織、心臓、ヒラメ筋からtotal RNAを抽出し、コレステロール7メーヒドロキシラーゼおよびLPLのmRNAを測定した、黄耆桂枝五物湯加紅参の投与によるmRNAレベルの変化は見られなかった。酵素活性の増加作用は転写後の調節によると考えた。酵素活性の調節機序についてはさらに検討する必要があると考える。

1P-038

EVALUATION OF KAMPO-SHOHO (No. 100)
ANTICHOLESTEREMIC ACTION OF KAMPO MEDICINE
OGI-KEISHI-GOMOTSU-TO-KA-KOJIN(OKGK)

Chun Zhen Wu, Makoto Inoue, Yukio Ogihara
Department of Pharmacognosy, Faculty of Pharmaceutical Sciences,
Nagoya City University
3-1 Tanabe-dori, Mizuho-Ku, Nagoya 467, Japan

<AIM>

Ogi-keishi-gomotsu-to-ka-kojin(OKGK)¹⁾ is a Kampo medicine that is composed of six medicinal plants and has been used for improvement of the sensory disorder of limbs derived from the malfunction of nervous system. In this study we undertook to examine the effect of OKGK on cholesterol metabolism in rats.

<METHODS>

Male SD rats were fed a cholesterol-enriched diet or supplemented with OKGK for 12 weeks. Their serum and liver total cholesterol (TC) were measured every 2 weeks. In order to clarify the mechanism of antihypercholesteremic action, cholesterol absorption was studied using Dual isotope radio method²⁾ and cholesterol excretion was determined by measuring of excretion of intravenously injected ¹⁴C-cholesterol into feces. Furthermore, liver microsomal cholesterol 7 α -hydroxylase activity was measured.

<RESULTS AND CONCLUSIONS>

Effects of OKGK on cholesterol metabolism were examined in experimentally induced rat hypercholesteremic model. The serum and liver total cholesterol (TC) were elevated significantly by feeding of a cholesterol-enrich diet. The supplement of OKGK at 1.25% in diet significantly inhibited the increase of serum TC and liver TC at 1.25%,0.25% in diets. These results suggest that OKGK is effective in the treatment of hypercholesteremia which is induced by exogenous cholesterol and fat enrich-diet. When the mechanism of the anticholesteremic action of OKGK was investigated in detail, OKGK decreased cholesterol absorption in the alimentary tract and also increased the excretion of intravenously injected ¹⁴C- cholesterol into feces. Furthermore, OKGK enhanced the activity of cholesterol 7 α -hydroxylase in normal and hypercholesteremic rats, but had no effect on HMG-CoA reductase activity. These results suggest that the anticholesteremic action of OKGK are in part due to the inhibition of cholesterol absorption and increase of cholesterol excretion by stimulation of cholesterol 7 α -hydroxylase activity .

References

- 1) C. Z. Wu, M.Inoue and Y.Ogihara., *Phytomed.*, in press (1997)
- 2) Zilversmit, D.B.and Hughes, L.B., *J.Lipid Res*,15., 465-473 (1974)

Antihyperlipidemic action of a Traditional Chinese Medicine (Kampo Medicine), Ogi-Keishi-Gomotsu-To-Ka-Kojin

C. Z. WU, M. INOUE and Y. OGIHARA

Département of Pharmacognosy, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Nagoya City University, Japan

Summary

The antihyperlipidemic action of Ogi-Keishi-Gomotsu-To-Ka-Kojin (OKGK) was examined in rats with experimentally-induced hyperlipidemia. Oral administration of OKGK at 0.69 or 1.38 g/kg/day significantly reduced the increase of serum triglycerides (TG) and phospholipids (PL). OKGK given as a nutritional supplement (1.25%) in the diet significantly suppressed the increase of serum TG and PL in rats with hypercholesterolemia induced by a cholesterol and fat-enriched diet. These results suggest the effectiveness of OKGK in the treatment of hypertriglyceridemia induced by both endogenous and exogenous TG. The mechanism by which OKGK shows antihypertriglyceridemic action was investigated in detail. OKGK decreased [¹⁴C] acetic acid incorporation into TG and PL but not fatty acids in primary cultured rat hepatocytes from rats treated with oral OKGK for 1 week. OKGK also reduced [³H] oleic acid into TG and PL, suggesting OKGK suppresses TG and PL syntheses in the liver. Furthermore, OKGK enhanced the activities of lipoprotein lipase (LPL) and hepatic TG lipase (HTGL) in postheparin plasma. These results suggest OKGK inhibits triglyceride synthesis in the liver and stimulates the hydrolysis of TG in lipoprotein.

Key words: Kampo medicine; hypertriglyceridemia; lipoprotein lipase; hepatic triglyceride lipase.

Introduction

Hypercholesterolemia is directly linked to the initiation and progression of atherosclerosis. Considerable evidence indicates that oxidatively modified low density lipoprotein (LDL) induces macrophage-derived foam cells, resulting in fatty streak formation, which is an early characteristic of atherosclerosis. Furthermore, β -very low density lipoprotein (β -VLDL), VLDL and chylomicron remnants are con-

sidered atherogenic. On the other hand, there is increasing evidence of the relationship between triglyceride-rich lipoprotein and the progression of coronary heart disease. The Paris prospective study (Fontbonne, 1989) and the Stockholm Heart study (Carlson and Rosenhamer, 1988) also indicated that hypertriglyceridemia is both a risk factor for coronary heart disease in post-menopausal women. Furthermore, hypertriglyceridemia is linked to impaired fibrinolytic function (Hamsten et al., 1985; Nilsson et al., 1985), suggesting that it stimulates clot formation inducing thrombus and arteriosclerosis. Hypertriglyceridemia is usually accompanied by high VLDL and chylomicrons, due to high dietary fat, a high TG synthesis in the liver and impaired hepatic triglyceride lipase (HTGL) and lipoprotein lipase (LPL) activities. HTGL and LPL are critical enzymes in the

Abbreviations OKGK – Ogi-Keishi-Gomotsu-To-Ka-Kojin; LPL – lipoprotein lipase; HTGL – hepatic triglyceride lipase; TG – triglyceride; PL – phospholipid; TC – total cholesterol; FA – fatty acid; LDL – low density lipoprotein; VLDL – very low density lipoprotein; IDL – intermediate density lipoprotein; HDL – high density lipoprotein; SD – Sprague-Dawley; PBS – phosphate-buffered saline; BSA – bovine serum albumin; GF water – 15% glycerol and 15% fructose-containing water

regulation of lipoprotein and lipid metabolism. Recent studies using transgenic mice indicated that overexpression of LPL stimulates hydrolysis of TG in lipoprotein, resulting in the reduction of serum TG (Liu et al., 1994).

On the other hand, overexpression of HTGL in transgenic mice reduced cholesterol accumulation in the aorta during a hyperlipidemic diet (Busch et al., 1994) and that in transgenic rabbits decreased plasma cholesterol concentration and intermediate density lipoprotein (IDL) (Fan et al., 1994). These observations suggest that LPL and HTGL activities are implicated in the protection against atherosclerosis. In this respect, improvement of hypertriglyceridemia in addition to hypercholesterolemia is required to prevent atherosclerosis and arteriosclerosis. Several traditional Chinese medicines (Kampo medicines) exhibit antihyperlipidemic action (Shen et al., 1996). Ogi-Keishi-Gomotsu-To-Ka-Kojin (OKGK) is a Kampo medicine that is composed of six medicinal plants: *Astragali radix*, *Cinnamomi cortex*, *Paeoniae radix*, *Zingiberis rhizoma*, *Zizyphi fructus*, *Ginseng radix rubra* and has been used for improvement of the sensory disorder of the limbs. However, its pharmacological and biochemical effects have not yet been investigated. We therefore focused on the effects on the circulatory system and investigated the effect of OKGK on hyperlipidemia.

Materials and Methods

Animals

Male Sprague-Dawley (SD) rats weighing 170–190 g from Shizuoka Laboratory Animal Center (Hamamatsu, Japan) were maintained under controlled laboratory conditions.

Preparation of OKGK

Crude drug composition of OKGK is described in Table 1. Plant materials used in this study, of which grades were conformed to Japanese pharmacopoeial standards, was authenticated and provided by Tsumura Co. Ltd., Tokyo, Japan. Six crude drugs were added to 700 ml of distilled water, boiled for 1 h using an electric heater and concentrated to 300 ml. This decoction was filtered and lyophilized to give 7.5 g of powdered extract. The main constituents are astraisoflavan, cinnamic aldehyde, paeoniflorin, gingerol and oleanolic acid.

Hyperlipidemia rat model

Rats were randomized into four groups. Group 1 was used as a normal group and group 2 received drinking water containing 15% glycerol and 15% fructose (GF water). Groups 3 and 4 received a single oral administration of OKGK suspended in distilled water at doses of 0.69 and

1.38 g/kg body weight/day for 12 weeks with the aid of a 20 gauge feeding needle, respectively, while receiving simultaneously GF water. Diet, water and GF water were given *ad libitum*. To evaluate antihypercholesterolemic effects, rats were randomized into four groups. Group 1 was fed a normal chow diet (CE-2, Nippon Crea Co., Ltd., Shizuoka, Japan). Group 2 was fed a cholesterol and fat-enriched diet, which was CE-2 fortified with 1% cholesterol, 0.2% cholic acid and 2.5% olive oil. Groups 3 and 4 received a cholesterol and fat-enriched diet supplemented with 0.25% and 1.25% OKGK for 12 weeks, respectively. These diets and water were given *ad libitum*.

Determination of serum lipids

Rats were fasted for 16 h and blood samples obtained by cardiac puncture every 2 weeks. Serum was prepared from samples centrifugated at 3000 rpm for 15 min. TG, total cholesterol (TC) and phospholipids (PL) in serum were determined by the cholesterol oxidase method.

Hepatocyte isolation and lipid synthesis

Hepatic parenchymal cells were isolated from male SD rats (300 g) by two-step collagenase perfusion method (Seglen, 1972). Cell viability was determined with 0.25% trypan blue and more than 91.3 ± 1.0 (n = 9) % were used in this study. Hepatocytes were seeded in collagen-coated 12-multi-well culture dish at a density of 10^5 cells/cm² with 0.8 ml of William's E medium (pH 7.4) supplemented with 10% fetal calf serum, 100 units/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin, 10^{-7} M insulin and 10^{-7} M dexamethasone. After incubation for 4 h at 37 °C in an atmosphere of 95% air and 5% CO₂, hormone-containing medium was removed from the wells. The cells were washed twice with phosphate-buffered saline (PBS) and then incubated with

Table 1. Crude drug composition of OKGK

Plant name	Part used	Composition (g)
<i>Astragalus membranaceus</i> Bunge (Lamiaceae)	Root	8
<i>Cinnamomum cassia</i> Blume (Lauraceae)	Bark	4
<i>Paeonia lactiflora</i> Pallas (Paeoniaceae)	Root	4
<i>Zingiber officinale</i> Roscoe (Zingiberaceae)	Rhizome	4
<i>Zizyphus jujuba</i> Miller. var. <i>inermis</i> Rehder (Rhamnaceae)	Fruit	4
<i>Panax ginseng</i> C. A. Meyer (Araliaceae)	Root	3

hormone free medium containing [^{14}C] acetic acid (0.5 $\mu\text{Ci/well}$) and [^3H] oleic acid (0.5 $\mu\text{Ci/well}$) for 4 h. After the incubation, cells were thoroughly washed twice with PBS and the cellular lipids were extracted 2 times with 2 ml of hexane/isopropanol (3:2, v/v). Fatty acid (FA), TG, and PL were separated by thin layer chromatography using hexane/diethyl ether/acetic acid (50:20:1 v/v) as a solvent system. Radioactivity in regions corresponding to lipid standards was measured by liquid scintillation spectrometry. Protein was determined according to the method of Lowry (Lowry, et al, 1951) using bovine serum albumin (BSA) as a standard and data were normalized to the amount of cellular protein.

Assay of postheparin plasma hepatic lipase (HTGL) and lipoprotein lipase (LPL)

SD rats were treated with OKGK at a dose of 1.38 g/kg for 2 weeks and blood samples were obtained at 9 a.m. Rats were injected i.v. with 20 units of heparin/100 g of body weight and 5 ml of blood was drawn from vein cava inferior 10 min later. Plasma samples were stored immediately at -80°C . Hepatic lipase (EC 3.1.1.3) activity was assayed as follows. The assay mixture consisted of 1.33 mM [^3H] trioleylglycerol (10^6 dpm/ μmol), 0.1 mM lysophos-

phatidylcholine, 0.2 M Tris-HCl buffer (pH 9.0), 0.4% BSA, 0.5 M NaCl and postheparin plasma in a total volume of 200 μl . The reaction was started by the addition of plasma. After incubation at 30°C for 10 min with shaking, the reaction was terminated with 3.25 ml of methanol/chloroform/heptane (1.41:1.25:1 v/v), followed by 1.05 ml of 0.1 M borate buffer (pH 10.5) (Nilsson-Ehle and Ekman, 1977). The assay mixture was shaken vigorously with a vortex mixer and the released fatty acid recovered in the upper phase. One ml of the upper phase was taken out to count the radioactivity by scintillation spectrometry.

Lipoprotein lipase (EC 3.1.1.34) in postheparin plasma was assayed as described in the measurement of HTGL activity, except that NaCl was not added in assay mixture and that all assays were carried out at 37°C . Activity was expressed as a unit which represents nmol of free fatty acids released per hour per ml of plasma.

Chemicals

[^{14}C] Acetic acid, sodium salt (3.1 mCi/mmol), [^3H] oleic acid (9.2 Ci/mmol), [^3H] triolein (28.0 Ci/mmol) were purchased from Dupont NEN Research products, Boston, MA. 1,2-dioleoyl-sn-glycerol was obtained from Sigma chemical Co, St Louis MO.

Table 2. Effect of OKGK on incorporation of [^{14}C] acetic acid into lipids of rat primary cultured hepatocytes.

		Normal	OKGK	Inhibition	
		(dpm/mg protein)	(dpm/mg protein)	%	Means of three experiments
TG	exp. 1	50 406 \pm 426	30 559 \pm 602**	39.4	37.8 \pm 3.3
	exp. 2	62 554 \pm 2727	43 460 \pm 1168**	31.5	
	exp. 3	79 647 \pm 489	45 791 \pm 1677**	42.5	
PL	exp. 1	76 673 \pm 2844	65 255 \pm 112*	14.9	29.8 \pm 7.7
	exp. 2	111 369 \pm 1139	73 532 \pm 2302**	34.0	
	exp. 3	159 760 \pm 507	94 973 \pm 8816*	40.6	
FA	exp. 1	426 \pm 36	414 \pm 35	2.8	2.5 \pm 0.9
	exp. 2	490 \pm 41	471 \pm 44	3.9	
	exp. 3	6 486 \pm 194	6 434 \pm 356	0.9	

Values represent mean \pm S.E. of 4 wells. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs. normal group.

Table 3. Effect of OKGK on incorporation of [^3H] oleic acid into lipids of rat primary cultured hepatocytes.

		Normal	OKGK	Inhibition	
		(dpm/mg protein)	(dpm/mg protein)	%	Means of three experiments
TG	exp. 1	526 682 \pm 3 168	353 173 \pm 4576**	32.9	31.7 \pm 4.2
	exp. 2	655 964 \pm 10 308	508 470 \pm 3106**	22.5	
	exp. 3	1 240 423 \pm 35 587	785 724 \pm 1315**	36.7	
PL	exp. 1	344 244 \pm 10 645	245 465 \pm 4912**	28.7	25.4 \pm 1.9
	exp. 2	373 956 \pm 9 385	282 421 \pm 3650**	25.5	
	exp. 3	466 980 \pm 7 590	364 175 \pm 2186**	22.1	

Values represent mean \pm S.E. of 4 wells. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs. normal group.

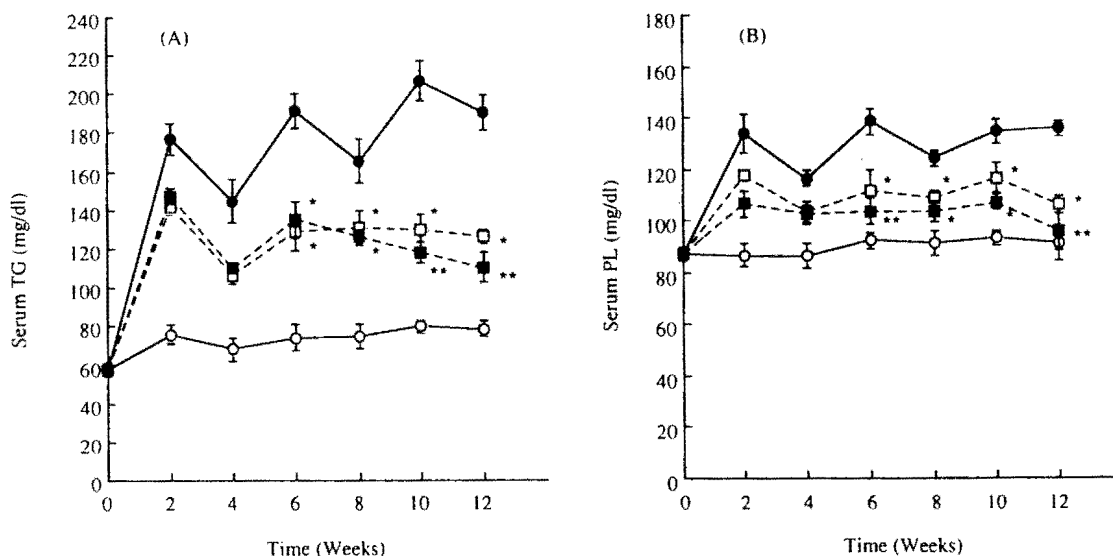


Fig. 1. Effect of OKGK on serum (A) TG and (B) PL in hypertriglyceridemic rats. Sprague Dawley rats were fed a normal chow while giving GF water for 12 weeks. Serum TG and PL were determined every two weeks. O: normal, ●: control (GF water), □: GF water and 0.69 g/kg of OKGK, ■: GF water and 1.38 g/kg of OKGK. Values represent mean \pm S.E. of 5 rats. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs. control group.

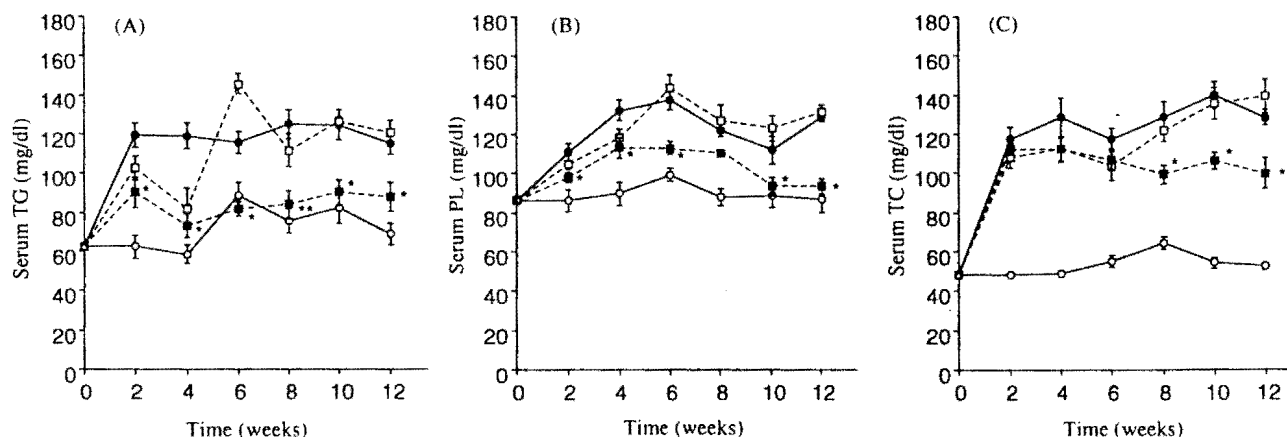


Fig. 2. Effect of OKGK on serum (A) TG, (B) PL and (C) TC in hypercholesterolemic rats. Sprague Dawley rats were fed a cholesterol and fat-enriched diet for 12 weeks. Serum triglyceride, phospholipid and total cholesterol were determined every two weeks. O: normal, ●: control (rats fed a cholesterol-fat enriched diet), □: rats fed a control diet supplemented with 0.25% of OKGK, ■: rats fed a control diet supplemented with 1.25% of OKGK. Values represent mean \pm S.E. of 7 rats. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs. control group.

Statistical analysis

Results were represented as mean \pm S.E. with the numbers of animals or experiments in parentheses. Statistical significance was determined by the Student's *t*-test. *P* values < 0.05 were considered significant.

Results and Discussion

Antihypertriglyceridemic action of OKGK in hypertriglyceridemia rat model. As shown in Fig. 1, intake of GF water markedly raised the serum TG levels 2–3 fold over nor-

mal level during the period of experiment. Serum PL also increased by 30–40 mg/dl concomitantly. OKGK at the doses of 0.69 and 1.38 g/kg, which corresponded to 5 and 10 times of human daily dose, significantly lowered TG and PL levels relative to those in control group. Both doses of OKGK did not change body weight compared with normal or control group. TG accumulation in liver was not observed in this model. Glycerol and fructose are known to augment the production of endogenous TG and OKGK reduced serum TG level in this model, thus suggesting that OKGK would inhibit TG synthesis or stimulate its degradation.

Antihypertriglyceridemic action of OKGK in hypercholesterolemia rat model. We next studied the antihypertriglyceridemic action of OKGK on hypercholesterolemic rats. In this rat model, serum TC increased about 3 fold, serum TG did 1.5–2 fold and serum PL did about 1.5 fold over normal level. OKGK showed a powerful lowering effect on serum TG and PL at a higher dose, whereas such a potent effect was not seen at a lower dose (Fig. 2). No difference in body weight among each group was observed for the entire period. On the other hand, although this model was usually used as a hypercholesterolemia model, the effect of OKGK was not potent and serum cholesterol was slightly reduced at a high dose of OKGK after 8 weeks of starting the administration. Since the increased serum TG in this model was mainly derived from dietary fat, OKGK would presumably suppress the absorption of TG at alimentary tract by inhibiting the degradation of TG by lipase or the resynthesis of TG in epithelial cells besides the suppression of TG synthesis in liver and the stimulation of TG degradation.

Effect of OKGK on lipid synthesis by hepatocytes.

OKGK (1.38 g/kg/day) reduced the incorporation of [2-¹⁴C] acetic acid into TG and PL by 37.8 and 29.8%, respectively, while no inhibitory effect was observed in FA synthesis (Table 2). Furthermore, the incorporation of [³H] oleic acid into TG and PL in OKGK-treated group was significantly suppressed by 31.7 and 25.4%, respectively (Table 3). In this experiment, [2-¹⁴C] acetic acid was incorporated into TG and PL via glycerol-3-phosphate or fatty acid and [³H] oleic acid was directly incorporated into them following the conversion to [³H] oleoyl-CoA. Actually, the incorporation of [2-¹⁴C] acetic acid or [³H] oleic acid into TG and PL in isolated rat primary cultured hepatocytes prepared from OKGK-treated rats was suppressed at the same degree. Furthermore, fatty acid and cholesteryl ester syntheses were not affected by OKGK treatment (data not shown). These results indicated that OKGK treatment seemed likely to modify the common pathway for TG and PL syntheses without the effect on glycerol-3-phosphate and fatty acid syntheses, although the precise mechanism of their suppression was not obvious at present.

Effect of OKGK on HTGL and LPL activities.

OKGK suppressed the increasing of serum TG level in both hypertriglyceridemic and hypercholesterolemic rats, suggesting a possibility that it stimulates TG degradation by LPL or HTGL. In fact, HTGL activity in OKGK-treated rats was found to be significantly higher than that in normal rats and LPL activity was also higher in OKGK-treated rats than in normal rats (Fig. 3). LPL and HTGL are known to contribute the regulation of lipoprotein metabolism. LPL is an enzyme responsible for hydrolysis of the triglyceride-

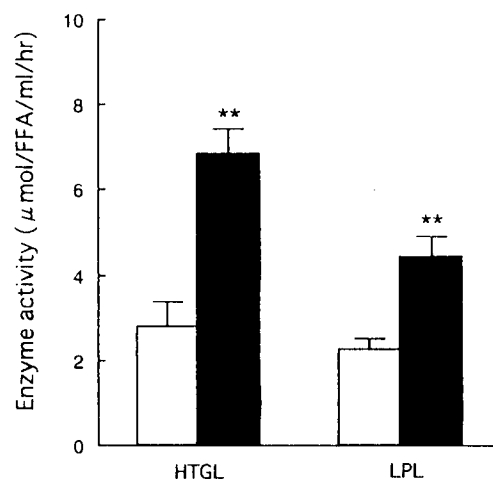


Fig. 3. Effect of OKGK on Hepatic triglyceride lipase and Lipoprotein lipase activities. Postheparin plasma was prepared from normal rats and rats treated with 1.38 g/kg of OKGK for 2 weeks as described in Materials and methods. To normal rats, water were given instead of OKGK. Open column: normal, closed column: OKGK. Values represent mean \pm S.E. of 5 rats. ** $p < 0.01$ vs. control group.

rich core of circulating chylomicrons and VLDL (Nilsson-Ehle et al., 1980) and HTGL mediates the conversion of IDL to LDL (Demant et al., 1988) and of HDL₂ to HDL₃ (Mowri et al., 1992). Disruption of LPL gene in mice elevates serum TG (Coleman et al., 1995). In contrast, transgenic mice that overexpressed HTGL gene did not appear to influence lipoprotein metabolism when fed with a normal chow and further HTGL deficient mice do not develop marked hypertriglyceridemia or accumulation of β -VLDL, although they increase plasma cholesterol and phospholipids attributable to increased HDL levels (Homanics et al., 1995). These observations reveal that LPL is intimately implicated in the metabolism of TG-rich lipoprotein such as VLDL and chylomicrons and has suggested that the antihypertriglyceridemic action shown by OKGK is likely to depend on the enhanced LPL activity. LPL is secreted by parenchymal cells of various extrahepatic tissues, mainly from muscles, macrophages and adipose tissue and HTGL is exclusively synthesized in the liver (Jansen et al., 1979; Jansen et al., 1978). In short, there are possibilities that OKGK exerts its effect on various tissues to stimulate LPL and HTGL synthesis and that it modulates both enzyme activities although their posttranslational regulation could not be clarified. So far some plant ingredients such as saikosaponin, glycyrrhizin, ginsenoside were reported to show antihyperlipidemic action and among them are flavonoids, plant phenol, ginsenoside and β -sitosterol which were contained in *Astragali radix*, *Cinnamomi cortex*, *Paeoniae radix* and *Ginseng radix rubra* of OKGK. However, it remains to be clarified whether these well known ingredients are able to explain the action of OKGK. Finally, we conclude that OKGK is effective for the treatment of hypertriglyceride-

mia which is induced by endogenous and exogenous TG and that its antihypertriglyceridemic action is in part due to the inhibition of TG synthesis in liver and the enhanced HTGL and LPL activities.

References

- Busch, S. J., Barnhart, R. L., Martin, G. A., Fitzgerald, M. C., Yates, M. T., Mao, S. J. T., Thomas, C. E. and Jackson, R. L.: Human hepatic triglyceride lipase expression reduces high density lipoprotein and aortic cholesterol in cholesterol-fed transgenic mice. *J. Biol. Chem.* 269: 16376–16382, 1994.
- Carlson, L. A. and Rosenhamer, G.: Reduction of mortality in the Stockholm ischaemic heart disease secondary prevention study by combined treatment with clofibrate and nicotinic acid. *Acta Med. Scand.* 223: 405–418, 1988.
- Coleman, T., Seip, R. L., Gimble, J. M., Lee, D., Maeda, M. and Semenkovich, C. F.: COOH-terminal disruption of lipoprotein lipase in mice is lethal in homozygotes, but heterozygotes have elevated triglycerides and impaired enzyme activity. *J. Biol. Chem.* 270: 12518–12525, 1995.
- Demant, T., Carlson, L. A., Holmquist, L., Karpe, F., Nilsson-Ehle, P., Packard, C. J. and Shepherd, J.: Lipoprotein metabolism in hepatic lipase deficiency: Studies on the turnover of apolipoprotein B and on the effect of hepatic lipase on high density lipoprotein. *J. Lipid Res.* 29: 1603–1611, 1988.
- Fan, J., Wang, J., Bensadoun, A., Lauser, S. L., Dang, Q., Mahley, R. W. and Tayler, J. M.: Overexpression of hepatic lipase in transgenic rabbits leads to a marked reduction of plasma high density lipoprotein and intermediate density lipoproteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 91: 8724–8728, 1994.
- Fontbonne, A., Eschwege, E., Cambien, F., Richard, J. L., Ducimetiere, P., Thibault, N., Warnet, J. M., Claude, J. R. and Rosselin, G. E.: Hypertriglyceridemia as a risk factor of coronary heart disease mortality in subjects with impaired glucose tolerance or diabetes. Results from the 11-year follow-up of the marked reduction of plasma high density lipoprotein and intermediate density lipoproteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 91: 8724–8728, 1994.
- Fontbonne, A., Eschwege, E., Cambien, F., Richard, J. L., Ducimetiere, P., Thibault, N., Warnet, J. M., Claude, J. R. and Rosselin, G. E.: Hypertriglyceridemia as a risk factor of coronary heart disease mortality in subjects with impaired glucose tolerance or diabetes. Results from the 11-year follow-up of the Paris Prospective Study. *Diabetologia* 32: 300–304, 1989.
- Hamsten, A., Wiman, B., de Faire, V. and Blomback, M.: Increased plasma levels of a rapid inhibitor of tissue plasminogen activator in young survivors of myocardial infarction. *N. Engl. J. Med.* 313: 1557–1563, 1985.
- Homanics, G. E., De Silva, H. V., Osada, J., Zhang, S. H., Wong, H., Bornesztajn, J. and Maeda, N.: Mild dyslipidemia in mice following targeted inactivation of the hepatic lipase gene. *J. Biol. Chem.* 270: 2974–2980, 1995.
- Jansen, H., Kalkman, C., Zonneveld, A. J. and Hülsmann, W. C.: Secretion of triacylglycerol hydrolase activity by isolated parenchymal rat liver cells. *FEBS Lett.* 98: 299–302, 1979.
- Jansen, H., Van Berkel, T. J. C. and Hülsmann, W.: Binding of liver lipase to parenchymal and non-parenchymal rat liver cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 85: 148–152, 1979.
- Liu, M. S., Jirik, F. R., Le Boeuf, R. C., Henderson, H., Castellani, L. W., Lusic, A. J., Ma, Y., Forsythe, I. J., Zhang, H., Kirk, F., Brunzell, J. D. and Hayden, M. R.: Alteration of lipid profiles in plasma of transgenic mice expressing human lipoprotein lipase. *J. Biol. Chem.* 269: 11417–11424, 1994.
- Lowry, O. H., Roserough, N. J., Farr, A. L. and Ranclall, R. J.: Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265–275, 1951.
- Mowri, H. O., Patsch, W., Smith, L. C., Gotto, A. M. and Patsch, J. R.: Different reactivities of high density lipoprotein 2 subfractions with hepatic lipase. *J. Lipid Res.* 33: 1269–1279, 1992.
- Nilsson-Ehle, P. and Ekman, R.: Rapid, simple and specific assays for lipoprotein lipase and hepatic lipase. *Artery* 3: 194–209, 1977.
- Nilsson-Ehle, P., Garfinkel, A. S. and Scholtz, M. C.: Lipolytic enzymes and plasma lipoprotein metabolism. *Annu. Rev. Biochem.* 49: 667–693, 1980.
- Nilsson, I. M., Ljungner, H. and Tengborn, L.: Two different mechanisms in patients with venous thrombosis and defective fibrinolysis: low concentration of plasminogen activator or increased concentration of plasminogen activator inhibitor. *Br. Med. J. Clin. Res.* 290: 1453–1456, 1985.
- Seglen, P. O.: Preparation of rat liver cells. I. Effect of Ca^{2+} on enzymatic dispersion of isolated perfusion liver. *Exp. Cell Res.* 74: 450–454, 1972.
- Shen, Y. R., Inoue, M., Nagatsu, Y., Ogihara, Y. and Aburada, M.: Anti-hyperlipidemic and anti-atherosclerotic actions of Shosai-koto (Kampo Medicine). *Biol. Pharm. Bull.* 19: 1160–1165, 1996.

Address

Y. Ogihara, Department of Pharmacognosy, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Nagoya City University, 3-1 Tanabe-dori, Mizuho-ku, Nagoya 467, Japan

日本財団補助金による

1997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 -

1997年11月14日

財団法人 日中医学協会
理事長 中島章殿

報告者氏名 本庄省五
所属機関名 岩手医科大学 形成外科
職名 講師
所在地 〒020 盛岡市大町1-1
電話 019-651-5111内線 2364

◎添付書類：講演集・シンポジウム写真等学会に関する資料

FAX 019-651-8402

学会・学術交流の名称 第8回 日中形成外科交流学術集会
テーマ 形成・再建外科
主催団体 岩手医科大学 形成外科
代表者 奈良卓
期間・開催地 平成9年10月25-26日 岩手県医師会館(盛岡市)
招へい・派遣目的 日中形成外科の学術交流と友好発展

I. 招へい・派遣研究者 人数 50人 以下別紙記入
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 H9年10月24日 至 H9年10月28日 (5日間)

III. 助成金の使途内訳

助成金額 50,000円
交通費 50,000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を添付して下さい。

IV. 主な滞在日程

H9年10月24日 来日

10月25日) 交流学術集会
26日)

27日 盛岡市および近郊を視察

28日 帰国

V. 学術交流報告

学会はH9年10月25、26日の両日、岩手県医師会館で行なわれ、日中合わせて110名以上の演題者が口演されました。日本側の口演セッションは中国語または英語で、中国側の口演セッションは日本語または英語を用い、質疑応答は通訳を介して活発なdiscussionが行なわれました。

招聘中国医师名簿

- 1, 两侧唇腭裂的系列手术治疗
中国医科大学第二临床医院 教授
管 宇 (Guan Yu) 1938.7.10生 男
- 2, 手软组织缺损及畸形的修复与功能重建
北京安华医院整形外科 教授
冯光珍 (Feng Guang Zhen) 1946.3.15生 男
- 3, 额部扩张器皮瓣在鼻再造及修复面部缺损中的应用
沈阳北方医院整形外科 主治医师
汪 勇 (Wang Wei) 1961.9.12生 男
- 4, 阴茎阴囊电击伤创面的修复
湖北省黄石市医院烧伤整形科 副主任医师
于 治 (Yu Ye) 1954.10.25生 男
- 5, 利用额部扩张皮瓣同时修复鼻及脸部皮肤缺损
北京黄寺美容外科医院 主治医师
王积恩 (Wang Ji Geng) 1943.12.26生 男
- 6, 注射器法脂肪抽吸术 (4000例) 操作体会
中国医学科学院整形外科医院 教授
戚可名 (Qi Ke Ming) 1994.5.7 生 男
- 7, 小组织块断离再植术几个技术问题探讨
中国人民解放军89医院全军创伤骨科中心 主任医师
王成琪 (Wang Cheng Qi) 1931.10.24生 男
- 8, 小儿手烧伤后疤痕挛缩畸形治疗体会
山西医科大学第一医院整形烧伤科 主任医师
李慧秋 (Li Hui Qiu) 1939.7.20生 女
- 9, 股前皮神经转位再造阴茎的感觉功能
湖北医科大学附一医院整形外科 教授
龙道畴 (Long Dao Chou) 1935.7.17生 男
- 10, 颜面部凹陷与萎缩畸形的修复治疗
济南市中心医院整形外科 主治医师
周兴亮 (Zhou Xing Liang) 1941.3.7生 男

- 11, 5 0 2 例皮瓣修复功能部位深度烧伤及瘢痕挛缩畸形疗效观察
山东胜利油田中心医院整形烧伤科 副主任醫師
李广路 (Li Guang Lu) 1952.10.1生 男
- 12, 耳颌畸形的治疗
中国医学科学院中国协和医科大学整形外科医院 教授
庄洪兴 (Zhuang Hong Xing) 1946.5.7生 男
- 13, 软骨组织超低温保存及其生物学特性的实验研究
第二军医大学附属长征医院外科 副教授
刘 麒 (Liu Oi) 1941.1.17生 男
- 14, 放射性皮肤损伤 6 8 例治疗报告
三 0 四医院烧伤整形科 副主任醫師
谷 斌 (Gu Bin) 1956.7.15生 男
- 15, 体表巨大血管瘤的手术切除与整复治疗
福建医科大学附属医院整形外科 教授
庄福连 (Zhuang Fu Lian) 1939.9.10生 男
- 16, 吻合血管的胫神经内侧束组移植及其解剖学研究
第二军医大学长海医院整形外科 教授
季正伦 (Li Zheng Lun) 1937.11.21生 男
- 17, 应用额肌筋膜瓣转移治疗上睑下垂
中国广东武警医院整形科 主任醫師
吴文安 (Wu Wen An) 1945.2.8生 男
- 18, 再论隆鼻术中鼻背筋膜的应用
北京医科大学第三临床医学院形成外科 副教授
李建宁 (Li Jian Ning) 1946.9.17生 男
- 19, 骨盆截骨延长术治疗下肢短缩畸形 (4 1 例临床应用体会)
沈阳市东陵区整形医院 副主任醫師
刘作今 (Liu Zuo Jin) 1927.10.1生 男
- 20, 皮肤撕脱伤真皮下血管网皮瓣回植修复
广州第一军医大学珠江医院整形外科 主治醫師
陈伯华 (Chen Bo Hua) 1966.12.2生 男
- 21, 利用桡侧伸腕长腱、伸拇短腱旋转移位重建对掌功能的体会
吉林省 8 1 1 2 3 医院 主任醫師
哈光临 (Hs Guang Lin) 1943.4.24生 男

- 22, 复合皮肤移植的临床应用及长期随访结果
济南军区总医院整形外科 主任医师
苑正太 (Yuan Zheng Tai) 1939.11.25生 男
- 23, 纤维脂肪瘤伴面骨肥大畸形治疗 1 例
沈阳军区总医院整形外科 教授
柳大烈 (Liu Da Lie) 1955.5.12生 男
- 24, 预制皮瓣行外耳再造
沈阳军区总医院整形外科 教授
柳大烈 (Liu Da Lie) 1955.5.12生 男
- 25, 面神经瘫痪外科治疗 3 0 1 例回顾
上海第二医科大学第九人民医院 教授
王 炜 (Wang Wei) 1937.7.18生 男
- 26, 瘢痕疙瘩不同部位的成纤维细胞对白介素 1 β 、白介素 6、干扰素 $\alpha - 2 b$ 和氢化可的松的反应
北京医科大学第三医院形成外科 教授
鲍卫汉 (Bao Wei Han) 1935.2.10生 男
- 27, 颧骨颧弓肥大整复术的临床应用
上海第二医科大学附属第九人民医院整形外科 主治医师
祁佐良 (Qi Zou Liang) 1958.6.1生 男
- 28, 重睑术后“睑下垂”的力学分析
沈阳军区总医院整形外科 主治医师
陶 昕 (Tao Xin) 1958.4.25生 男
- 29, 男性外生殖器湿疹样癌
大连医科大学附属二院整形外科 教授
张嘉一 (Zhang Jia Yu) 1944.6.30生 男
- 30, 女性乳房形态的预测
大连医科大学美容医学系 教授
侯在恩 (Hou Zai En) 1941.7.9生 男
- 31, 二针埋线法重睑术报告
广西桂林 1 8 1 医院美容整形中心 副教授
李新华 (Li) 1958.2.5生 男
- 32, 瘢痕成纤维细胞内收缩系统的研究

- 海第二医科大学附属第九人民医院整形外科 教授
钱云良 (Qian Yun Liang) 1951.12.4生 男
- 33, 面部除皱术 18 例报告
无锡市惠泉医院美容整形外科 主治医师
陆文鹏 (Lu Wen Peng) 1952.1.23生 男
- 34, 用ESR对大白鼠岛状皮瓣氧自由基的直接检测
哈尔滨医科大学附属第一医院整形外科 主治医师
李志海 (Li Zhi Hai) 1956.6.12生 男
- 35, 手术烧伤后再次手术的原因分析与治疗
第四军医大学西京医院整形外科中心 教授
鲁开化 (Lu Kai Hua) 1935.11.29生 男
- 36, 丹参对增生性瘢痕成纤维细胞形态影响及增殖抑制的实验研究
重庆第三军医大学西南医院美容整形外科 主治医师
张玄 (Zhang Xian) 1968.7.16生 女
- 37, 皮瓣起搏器的设计、实验研究和临床应用
第四军医大学西京医院烧伤科 副教授
徐明达 (Xu Ming Da) 1947.9.8生 男
- 38, 中药祛斑治疗的观察
第一军医大学南方医院整形外科 主治医师
孙木兰 (Sun Mu Lan) 1941.8.20生 女
- 39, 上睑下垂手术并发症分析
杭州整形医院美容整形外科 副主任医师
谭晓燕 (Tan Xiao Yan) 1958.4.17生 女
- 40, 股前外侧游离皮瓣 206 例总结评价
第一军医大学南方医院整形外科 副教授
张立宪 (Zhang Li Xian) 1954.11.1生 男
- 41, 腹部带蒂皮瓣转移治疗手部疤痕畸形的临床评价
山东兖州 91 医院烧伤科 副主任医师
陈存富 (Chen Chun Fu) 1952.6.10生 男
- 42, 皮肤色素性疾患的激光治疗
广州军区广州总医院整形美容科 副教授
刘春利 1956.2.24生 男

- 43, 软骨组织工程的实验研究预试验报告—软骨组织工程—
辽宁省人民医院整形外科 教授
○高景恒 (Gao Jing Heng) 1935.5.23生 男
- 44, 失神经皮肤感觉神经植入后感觉功能恢复的系列研究
第四军医大学西京医院整形外科中心 教授
李荟元 (Li Hui Yuan) 1935.12.28生 男
- 45, 三七片及瘢痕霜对烧伤后瘢痕增生的影响
新疆伊宁市第 1 1 医院烧伤整形科 主治医师
郭保军 (Guo Bao Jun) 1963.2.15生 男
- 46, 面神经的安全区与危险区的测定
辽宁省人民医院整形外科 教授
王志军 (Wang Zhi Juan) 1958.1.17生 男
- 47, 增生性瘢痕的系列研究
中国重庆西南医院整形外科 副教授
李世荣 (Li) 1948.7.23生 男
- 48, 神经端侧吻合的实验研究及临床应用
武汉市同济医科大学附属同济医院 教授
罗永湘 (Luo Yong Xiang) 1935.5.1生 男
- 49, 综合提紧眼袋切除成形术
北京黄寺美容外科医院 主治医师
王冀耕 (Wang Ji Geng) 1963.2.25生 男
- 50, 阴部外血管蒂阴股沟皮瓣的临床应用
上海第二军医大学附属长征医院整形外科 副教授
袁相斌 (Yuang Xiang Bin) 19512.23生 男




日本財団補助金による

1997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 —

1997年6月12日

財団法人 日中医学協会
理事長 中島章殿

報告者氏名 小野 博志 
所属機関名 東京医科歯科大学
職 名 名誉教授
所 在 地 〒113 東京都文京区湯島1-5-45
電 話 03-5803-5540 内線

◎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 第35回日本小児歯科学会学術大会および総会
テ ー マ 小児歯科学
主 催 団 体 日本小児歯科学会
代 表 者 祖父江 鎮雄
期 間・開 催 地 1997年5月23日・24日 東京(東京有明・東京ビッグサイト国際会議場)
招へい・派遣目的 1994~1996年度文部省国際学術研究大学間協力研究から得た中国人双生児資料を用いた共同研究成果の一部の発表と仲間の小児歯科学の交流、さらに収集した双生児資料を基にした今後の研究課題と双生児調査に関する検討

I. 招へい・派遣研究者 人数 1 人

1) 氏 名 (漢字) 鄧 輝 英文名 DENG HUI 男 女
所属機関、職名 北京医科大学口腔医学院 教授 生年月日 1937年4月28日
所在地 中国北京市海淀区魏公村
電 話 8610-2179977 内線 306
研究課題 日中双生児の歯列・顎顔面頭蓋の成長発育に関する比較研究

II. 滞 在 期 間 自 1997年5月21日 至 1997年5月26日 (6 日間)

III. 助成金の使途内訳

助成金額 250,000 円
交通費 125,400 円 宿泊費 106,920 円 食 費 85,980 円
雑 費 2,550 円 他 14,000 円

・招聘・派遣研究者記入欄が不足の場合は別紙を添付して下さい。

IV. 主な滞在日程

第1日	5月21日(水)	北京発 CA925 成田着 13:50 18:00~20:00 小児歯科学教室歓迎懇親会
第2日	5月22日(木)	東京医科歯科大学歯学部小児歯科学講座において、 (午前) 学術講演「中国の小児歯科の現状と将来」 (午後) 双生児研究成果の検討、研究打ち合せ
第3日	5月23日(金)	第35回日本小児歯科学会学術大会(東京有明、東京ビッグサイト)へ出席。 日本小児歯科学会会長 祖父江鎮雄教授と懇談 18:00~20:00 大会懇親会において挨拶 第35回日本小児歯科学会学術大会会長 赤坂守人教授と面談
第4日	5月24日(土)	第35回日本小児歯科学会学術大会出席 共同研究発表 A-2-11
第5日	5月25日(日)	東京医科歯科大学歯学部小児歯科学講座において 双生児研究班会議出席
第6日	5月26日(月)	成田発 CA926 14:55発 北京着

宿泊(自5月21日夜~至5月26日朝) 山の上ホテル(東京都千代田区神田豊河1-1)

V. 学術交流報告

我々の学術交流は、貴協会の学術交流助成を得て下記の通り期待していた成果を挙げる事ができた。まずもって御礼を申し上げたい。

今回の学術交流の主目的の第1は、1994年より3年間にわたって続けられた、文部省国際学術研究、大学間協力研究によって収集できた種々な中国人双生児調査資料を用いて、共同研究として、あるいは各校研究として今後行なう課題と、今後の調査について意見を交換することにあつた。

このことは主に、5月25日の双生児研究班会議において討議された。まずは、今後の研究遂行にあたって、当初計画されていた調査資料とその保管担当の見直しが必要となり、論議の末、改めて合意がえられた。これに基づいて、共同研究としては、すでに口蓋形態、顔面頭蓋形態について行なってきたので、当面歯の形態を課題とすることが決まった。各校の課題については、意見の交換の中から、またこれまでの研究実績を踏まえて各自決めることとした。今後の調査については調査費申請準備など前向きに検討することとした。

第2の目的は、第35回日本小児歯科学会学術大会に出席し、これまでの調査研究成果の一部を共同発表すると共に、日本と中国との小児歯科学の交流を深める機会を得ることにあつた。

このことは、2日間にわたる学術大会に出席し、とくに語学の壁が少なくすむ80題におよぶ展示発表、27題のテーブルクリニックにおいて交流がなされた。この間、各歯科大学、歯学部の小児歯科学講座教授と面談し、ことに、日本小児歯科学会会長の祖父江鎮雄教授と懇談する機会を得たことは有意義であった。

また、学術大会の懇親会の席上、特に挨拶する機会を与えられ、英語ではあつたが、日中の学術交流について期待と抱負を述べる事ができたのは有意義であった。

東京医科歯科大学小児歯科学講座と北京医科大学口腔医学院小児歯科学講座との間の学術交流は、新任の高木裕三教授と鄧輝教授との間で、従来同様深い友好関係を継続していくことが話し合われた。


日本財団補助金による

1997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 出月 康夫 
所属機関名 埼玉医科大学総合医療センター
職 名 _____
所 在 地 〒350 川越市鴨田辻町1981
電話 0492-25-7811 内線 3240

◎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 第4回 日中肝胆膵シンポジウム
テ ー マ 肝・胆・膵領域疾患の治療
主 催 団 体 北京军区总医院, 第三军医大学, 埼玉医大総合医療センター
代 表 者 贾克明, 劉美良, 出月康夫
期 間・開 催 地 1997年 5月 19日 から, 21日 まで。中国・重慶にて開催。
招へい・派遣目的 上記 シンポジウムにて、日本に不在各種疾患の治療・治療の現況
について講演と対話と共に、中国側からの発表を聴く。この際、お互いに質疑を
行い、相互の医学交流を行うことである。

I. 招へい・派遣研究者 人数 5 人
1) 氏 名 (漢字) 与 芝 夏 英文名 Makoto Yoshida 男・女
所属機関、職名 昭和大学藤が丘病院, 助教 生年月日 _____
所在地 横浜市青葉区藤が丘 1-30
電話 045-971-1151 内線 _____
研究課題 肝不全治療の現況
(別紙参照)

II. 滞 在 期 間 自 1997 年 5 月 19 日 至 1997 年 5 月 22 日 (4 日間)

III. 助成金の使途内訳
助成金額 500,000 円
交通費 500,000 円 宿泊費 — 円 食 費 — 円
雑 費 — 円 他 — 円

(領収書の別紙にあり)
・ 招聘・派遣研究者記入欄が不足の場合は別紙を添付して下さい。

氏名：下村一之 Kazuyuki Shimomura 男
所属機関、職名：埼玉医科大学総合医療センター外科、講師
1958年9月2日
川越市鴨田辻道町1981
TEL: 0492-25-7811 内線：3430
研究課題：総胆管結石に対する非手術的治療に関する研究

氏名：石田秀行 Hideyuki Ishida 男
所属機関、職名：埼玉医科大学総合医療センター外科、講師
1958年11月19日
川越市鴨田辻道町1981
TEL: 0492-25-7811 内線：3430
研究課題：転移性肝癌の治療

氏名：三浦健 Tuyoshi Miura 男
所属機関、職名：埼玉医科大学総合医療センター、講師
1930年8月2日
川越市鴨田辻道町1981
TEL: 0492-25-7811 内線：3430
研究課題：肝癌の治療

氏名：村田宣夫 Nobuo Murata 男
所属機関、職名：埼玉医科大学総合医療センター、助教授
1949年8月25日
川越市鴨田辻道町1981
TEL: 0492-25-7811 内線：3430
研究課題：肝癌の診断と治療

IV. 主な滞在日程

1997年 5月19日 重慶市第3軍医大学見学, 5月20日 会場の設営,
夜, 歓迎式典.

5月20日 シンポジウム開会式. 31までつき 特別講演, 一般
講演を行う.

5月21日. 特別講演, 一般講演を行う. 5月21日は
日本, 中国の医師が互に発表し, 質疑応答
を行う形式のものとなる.

講演終了後 閉会式. 31までつき 懇話会となる.

V. 学術交流報告

重慶の第3軍医大学では 肝臓下流-肝不全の研究が
盛んであるとのことであり, 特別講演は 日本から 昭和大学
の 宇芝 真 助教に来ていただき, 日本での 慢性肝臓
治療の現状について講演していただいた. 中国側からも
肝不全治療の現状の報告があり, 多数の聴衆から
さすまざる質問, コメントが寄せられ, 学術交流を充分
なした. もう一つの特別講演は, 肝臓の手術治
療に関するもので 肝移植に関するもので 日中両国
の 外科医師に深い感銘を与えた. 一般演題では
肝・胆膵領域の疾患について, 日中両国が口演発表
を行う. 会場をこやかに質疑応答があるなど, 日中友好
に大いに貢献したと思う.



日本財団補助金による
1997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 藤木 典生 ④
所属機関名 福井医科大学
職 名 名誉教授
所 在 地 910-11 福井県吉田郡松岡町下合月23
電話 0776-61-3111 内線 2300

◎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 ユネスコ・アジア生命倫理会議
テ ー マ アジアにおける生命倫理の動向
主 催 団 体 ユネスコ・アジア生命倫理会議組織委員会 (科学の責務協会日本支部)
代 表 者 岡本道雄 組織委員長
期 間 ・ 開 催 地 1997年11月4日～7日 神戸国際会議場、11月8日 福井県国際交流会館
招 へ い ・ 派 遣 目 的 1987年の国際生命倫理福井セミナー以来5回にわたる生命倫理セミナーで医学、生物学のみならず倫理、法学、社会学などの社会科学系の専門家や一般の人々も含め生命倫理の問題点について討議してきた。今回も中国から東アジア生命倫理学会の代表らを招へいして生命倫理の動向について討議し、アジアにおける生命倫理の高揚に努める。

I. 招へい・派遣研究者 人 数 4 人

1) 氏 名 (漢字) 邱 仁 宗 英文名 Renzong Qiu (男)・女
所属機関、職名 中国社会科学アカデミー 生年月日 _____
所在地 6 Jianguomennei Avenue, Beijing 100732
電話 FAX 86-10-5122025 内線 _____
研究課題 中国における生命倫理学

II. 滞 在 期 間 自 1997 年 11 月 3 日 至 1997 年 11 月 9 日 (7 日間)

III. 助成金の使途内訳

助成金額 500,000 円
交通費 340,000 円 宿泊費 160,000 円 食 費 0 円
雑 費 0 円 他 0 円

・ 招聘・派遣研究者記入欄が不足の場合は別紙を添付して下さい。

IV. 主な滞在日程

- 1 11月3日（月） 関西国際空港着
- 2 11月4日（火） ユネスコ・アジア生命倫理会議出席（神戸国際会議場）
- 3 11月5日（水） ユネスコ・アジア生命倫理会議出席（神戸国際会議場）
- 4 11月6日（木） ユネスコ・アジア生命倫理会議出席（神戸国際会議場）
- 5 11月7日（金） ユネスコ・アジア生命倫理会議出席（神戸国際会議場）
午後 福井にバスにて移動
- 6 11月8日（土） WHO支援サテライトシンポジウム出席（福井県国際交流会館）
夕刻 神戸にバスにて移動
- 7 11月9日（日） 関西国際空港より帰国

V. 学術交流報告

来日した中国側参加者は東アジア生命倫理学会の代表として全期間にわたって各セッションにて、ことに中国の実態について討論に参加した。東アジア生命倫理学R.Qui 副会長は、その総会を坂本百大会長と共に補佐して7日の閉会式のまとめでは来年の世界生命倫理会議（東京）に向かって意欲を表明した。尚、Qiu教授は保健とアジアの生命倫理のセッションでも座長として中国における独自性を報告した。

Li Luの共同研究者である名古屋大学留学中のZhu Shan-Kuanは、「終命に近づくことに関する医学上の誤解からの離脱」というテーマで発表し、Ruiping Fanは同セッションで「患者に真実を告げること：文化的多様性と東アジア的見地」を発表した。また、Jin Yihongは環境倫理のセッションで「生殖規制：フェミニストの視点」を報告した。中国における生命倫理の問題を世界の各分野の専門家と共に討議することができ、これらは日中の交流にも多大な効果をもたらした。

別 紙

I. 招へい・派遣研究者 (他3名)

氏 名 JIn Yihong
所属機関 江蘇社会科学院社会学研究所
所在地 Nanjing FAX:86-571-705-3611
研究課題 受胎調節

氏 名 Zhu Shan Kuan
所属機関 名古屋大学公衆衛生学教室研究員 (留学中)
所在地 名古屋市昭和区鶴舞町 TEL:052-741-2111
研究課題 死の倫理

氏 名 Ruiping Fan
所属機関 米国ライス大学倫理研究所
所在地 Housotn, TX 77030, USA FAX:1-713-798-5678
研究課題 医の倫理と文化の多様性



01. 開会の辞

岡本 道雄

19世紀と20世紀の前半は物理学の時代であった。そして、その成果の峯は原子の分裂であり、それは結局、原子爆弾を生み、只今、世界の最も熱い問題の一つとなっている。20世紀後半と21世紀は生物学の時代となると言われている。生物学研究のハイライトは脳と心の問題でありましょう。脳から心の生まれる機構がわかり、脳の制御によって心が支配できるようになったときはもっと深刻な問題が起こることが予想される。このような17世紀以降の科学技術時代の進歩を見ると、私共は、その成果のプラス面のみを眺めて喜んでいる訳にはいかず、常にそのマイナス面にも目を注いでいなくてはならないことがわかる。それが本当に人類の将来と幸福の方向に進んでいるかどうか、常にこのことを年頭においていることが大切である。端的に言って、科学技術時代における倫理の問題である。この際私共は、本学会の性格からして主として2つの目標をもって論議を進めていきたいと思う。その一つは科学技術時代において倫理道德の淵源を何処に求めるべきであるのかである。本来、倫理や道德を考えるとときには、多くは宗教的基盤ぬきには考え難いとされてきた。しかし、この科学技術時代の世界的傾向として、宗教的関心は次第にうすくなりつつある。ここで私共は宗教にのみ頼るのではなくて、科学技術時代そのものの中で、改めて倫理道德の淵源を考えてみなくてはならない。それは本来、科学の問題でないと訳には行かぬ。この時代に生きる人間として、重要不可欠な課題であって、これこそこの時代に倫理学会を持つ理由である。今一つは、本来科学は客観的普遍性を持つものとして、どの時代、どの国においても変わらぬものであるとの主張の一方、それが時代と国の文化的背景の影響を受けるものであることも又認められている。われわれは、西欧に生まれた近代科学技術のように世界を制覇しなかったが、違った時代、違った国において、すぐれた科学のあることを知っている。それは、インドの科学、中国の科学などである。同じく科学と呼ばれているものも文化的基盤の違いによって、その人間への影響は異なってくるということが考えられる。現代科学技術は17世紀の西欧における文化的背景のもとに生まれ、そして世界を制覇するに至っているが、それが現在、地球環境の問題、資源、人口その他、深刻な問題が直面している今日、その解決に当たって、異なった文化的背景の上に成立した科学に目を向けることも有益でないか。特に、種々の点で対極的であるとみられている東洋の文化的背景から科学技術を、そしてその際倫理、道德といったものを考えることは、西欧科学技術が問題点に直面している今日、又更に今後の科学技術の進歩、特に生物学の時代を迎えるとき、重要でないか。

この様な観点から、今回本学会が持たれる訳ではありますが、その意義の重要なところから本学会が成功に終わることを希うと共に、今日の実現に努力して頂いた藤木教授、坂本教授等のご努力に感謝し、又本学会の意義を認め、積極的に参加していただいた国内外の皆様、特に遠く外国からの参加者にお礼を申し述べて開会の辞と致します。

0.5. Science, Technology and Bioethics

Wataru Mori

Cabinet Council on Science and Technology, JAPAN

Recently we have developed a policy to make Japan a Science and Technology based Creative Nation and enacted the Science and Technology Basic Law, then instituted a Science and Technology Basic Plan. As part of this, while calling for favoured budget status for science and technology, we have instigated the necessity for vigorous assessment and evaluation, as well as raising the total budget for Science and Technology. Along these lines, "Evaluation guidelines for commonly use for Research and Development" have been decided. In the course of this process, I thought we must consider ethical aspects when setting up the standards of evaluation, but this turned out to be very difficult.

Most people around me seem to think it is enough for the few selected individuals to perform the evaluation, and that its main purpose is to justify the usage of a tax. Nevertheless I recognize that the true purpose of evaluation is not the above but rather to explain in plain language to the general public the present state of Research and Development promoted with governmental funds as exactly as possible, so that people can make a sound overall judgement for themselves, inclusive of the ethical aspects. Needless to say, we must assess results not only in the field of Research and Development in Science and technology but also in other fields. I believe such "accountability" of itself will lead naturally to the appropriate usage of tax.

科学技術と生命倫理

科学技術会議 森 亘

100 東京都千代田区霞ヶ関2-2-1

わが国では最近、科学技術創造立国という旗印を揚げ、科学技術基本法を制定、次いで基本計画を制定した。その中には一方で科学技術に対する予算措置の優遇を訴えると共に、他方、なすべき評価はきちんと行うべきであるとしている。その路線に沿って、科学技術の研究開発に関する評価の人網的指針が作られた。その課程で、評価基準の一部には何等かの倫理面も加える必要があると考えたが、実際にはなかなか難しいことであった。

今日、私の周囲にいる人々の多くは、研究評価はそのために選ばれた少数の人々が判断すればそれで十分であり、かつその主たる目的はそこに投じられる税金の効果的な使い方を担保するためと考えられているようである。しかし私自身は、研究評価の真の目的はそれとはやや異なったところにあり、むしろ国費をもって行われている研究開発の実態、状況をできるだけ正確に、できるだけ分かりやすく国民に示し、その上で国民自身がその倫理面も含めて、総合的に判断するべきではないかと考えている。評価を行わなくてはならないものは何も科学技術の研究開発に限ったわけではなく、また、こうした「国民に対する説明」は自ずから、税金の適切な使用にも繋がることであろう。

0.6. UNESCO's International Bioethics Committee and the Declaration on the Human Genome

David Shapiro, Executive Secretary, Nuffield Council on Bioethics, and Consultant, Wellcome Trust, UK

1 What makes UNESCO the appropriate organisation to develop such an international instrument?

First, UNESCO is the only UN agency with specific responsibility for scientific research, including the promotion of cooperation. Second, UNESCO's involvement in bioethics follows logically, given that it is impossible to imagine a concept of science that does not include an ethical dimension that requires society to take into account individual and collective responsibilities.

2 UNESCO's draft Declaration on the Human Genome can make three claims:

1. The text prepared by IBC falls within the tradition of the landmark founding texts of the universal rights of mankind such as the US Declaration of Independence of July 1776, the French Declaration of the Rights of Man and Citizens of 26 August 1789, and the UN Universal Declaration of Human Rights of 10 December 1948.

2. Public debate on the ethical, social, and human implications of life sciences has been deliberately incorporated in the process of drafting the declaration.

3. The content of the declaration has a twofold purpose. It protects the rights and liberties of individuals and also enshrines the role of science and knowledge in helping civilization to progress. The declaration is also designed to remind the international community of its duty of solidarity towards poorer countries, which risk being excluded from the benefits of biomedical progress.

ユネスコの国際生命倫理委員会（IBC）及びヒトゲノム宣言

デビッド・シャピロ

1 ユネスコは、なぜ、IBCのような国際機関を設置するのに相応しい組織なのでしょう？

第一に、ユネスコは協力の促進も含めて、とくに科学研究に責任を持つ国連唯一の機関です。

第二に、個人と集団の責任を社会に意識させる倫理的側面抜きに、科学という概念は考えられません。そのことから必然的にユネスコは生命倫理に関与しています。

2 ユネスコのヒトゲノム宣言の草案の主張は次の3点です：

1 IBCが作成した宣言は、1776年7月のアメリカ合衆国独立宣言、1789年8月26日のフランス国民議会人権宣言、そして1948年12月10日の国連世界人権宣言といった、人類の普遍的な権利の歴史的礎石となる宣言を踏襲しています。

2 生命科学の倫理的、社会的、そして人間にとっての意味に関する一般市民の議論が、宣言の草案づくりの過程で意識的に組み込まれました。

3 宣言の内容の目的は2点です。個人の権利と自由を保護し、なおかつ文明の進歩を助ける科学と知識の役割を正式に記録します。宣言にはまた、生物医学の進歩の恩恵から除外される危険性のある貧しい国のためにに結束するという、国際社会の義務を再認識させる目的もあります。

1.1. Human Rights and Health: Some Global Perspectives

Sev S. Fluss,

Programme Manager for Human Rights, Office of Health Policy in Development, WHO, SWITZERLAND

(Note: Any views expressed are not necessarily those of the World Health Organization)

This presentation, which will be illustrated by a series of overhead transparencies, will outline the remarkable growth of international and regional human rights treaties that include substantive provisions addressing health and health-related issues, commencing with the Universal Declaration of Human Rights, adopted in December 1948, and focusing particularly on instruments adopted under the auspices of the United Nations. The contributions of the United Nations system, including the Commission on Human Rights and its subsidiary entities as well as of the United Nations treaty bodies and of WHO, will be described as will that of such regional organizations as the Council of Europe, the Organization of African Unity, and the Organization of American States.

Particular reference will be made to the provisions on human rights as they relate to health contained in the final texts adopted by the World Conference on Human Rights (Vienna, June 1993), the International Conference on Population and Development (Cairo, September 1994), the World Summit for Social Development (Copenhagen, March 1995), and the Fourth World Conference on Women (Beijing, September 1995). Information will likewise be provided on the contributions of certain academic centres and nongovernmental organizations to the global discourse on health and human rights. Special mention will be made of the growing attention focussed on violence against women, as a human rights and as a public health issue, the linkages between human rights and bioethics, and ongoing efforts to ensure that human rights are safeguarded in HIV/AIDS prevention and control programmes (including the development of prospective anti-HIV vaccines) as well as in advances in the biomedical sciences and health technologies.

保健と人権：国際的展望

WHO途上国保健政策事務局 人権プログラム・マネージャー ジュネーブ セヴ・S・フラス

注：ここで述べられる見解は必ずしもWHOのそれではありません。

CHPを何枚か用いて行う今回の発表では、1948年12月の国際人権宣言を皮切りに、とくに国連の支援の下に採用された措置に焦点を当て、保健とそれに関連する問題を取り上げた重要な条項を含む、国際的・地域的人権条約の激増のあらましを述べていきます。人権委員会とその下部組織を含む国連制度、国連の各条約機関やWHOの貢献、そして欧州会議、アフリカ統一機構、米州機構といった組織を説明します。

とくに人権条項に言及するのは、世界人権会議（1993年6月、ウィーン）、世界人口・開発会議（1994年9月、カイロ）、世界社会開発サミット（1995年3月、コペンハーゲン）、第4回世界女性会議（1995年9月、北京）で採択された最終声明文にある保健に関係しているからです。同様に、世界的な保健／人権論に対する、いくつかの学術センターと非政府組織の貢献についてもお知らせします。女性への暴力に対して高まっている意識を人権と公衆衛生の問題として触れると共に、人権と生命倫理の結合、HIV/AIDSの予防とコントロールのプログラム（有望な抗HIVワクチンの開発を含む）や生物医科学と保健技術の進歩における人権保証の継続的努力に、とくに言及します。

1.2. Legislative Challenges of the Human Genome

Michael Yesley

Los Alamos National Laboratory, New Mexico, USA

Email: msy@lanl.gov

Advances in genetics will produce substantial medical benefits but may also result in genetic discrimination and loss of privacy. Concern about these downside risks of genetics has led to many legislative proposals and laws in the United States to prohibit genetic discrimination and control disclosure of genetic information. Unfortunately, much of this genetics legislation is narrow, impracticable, and counterproductive. This presentation will discuss the challenges of legislating to control nonmedical uses of genetics.

1.2 ヒトゲノムの法的問題

国立ロスアラモス研究所、ニューメキシコ マイケル・イエズリー

遺伝学の進歩は医学に多大なメリットをもたらしますが、遺伝的差別とプライバシーの消滅も生みかねません。遺伝学のこうした否定的なリスクへの懸念から、米国では遺伝的差別を禁じ、遺伝情報の開示を管理する、多くの法案と法律が生まれました。残念ながら、こうした遺伝学に関連した法律の多くは、範囲が狭い上、実用的ではなく、逆効果です。今回の発表では、遺伝学の非医学的利用を管理するうえでの、法律上の問題を取り上げます。

1.3. A Map to a New Treasure Island: The Human Genome and the Concept of Common Heritage

Judge Christian Byk, International Association of Law, Ethics and Science, FRANCE

Whereas the 70s were the environmental years during which international awareness of global environmental issues led United Nations Organizations to adopt declarations and prepare programmes in this field, the 90s would seem to be the genome years. While the challenge to map and sequence the human genome has greatly mobilized the scientific community, the potential of the information that would derive from this project and its possible uses have also raised fears and anxieties about risks of misusing such information. Such an attitude is however not specific to genetics. New scientific developments and extension of human knowledge have always had social and political impact. The discovery of the laws of heredity drew attention to the transmission of some traits - such as alcoholism - from parents to their offspring. But the role of heredity was also exaggerated when, for example, it was asserted that criminality was a consequence of some inherited factors. The social and political consequences of scientific development and its application were, obviously, even greater with nuclear energy. More recently, the biomedical sciences have emerged as a leading area of new mastery by man and the human species. Where advances in the areas of procreation, heredity and the brain are concerned, and in all these consequent applications, genetic technologies play an important role.

Therefore what is new is not the social aspect of the science and technology development but rather the will shown to consider it properly through public discussion and the elaboration of legislative policy, especially at the international level. It appears then quite legitimate and natural that the international governmental organization in charge of science and education within the United Nations system should decide to tackle the difficult task of reconciling the scientific community with public opinion. But in doing so UNESCO had to find a proper approach which would emphasize the scientific importance of genetics and would also contribute positively to the reinforcement of human rights.

This is the purpose of the future universal Declaration on the human genome and human rights presently being drawn up by the Organization. The 1996 version of the preliminary draft is of great interest for those who would like to examine the impact of the genetic issue on international regulations both methodologically and substantially. In fact, in this text all the principles that should govern research on the human genome (II) proceed from a fundamental declaration that the human genome is the common heritage of humanity (I).

新たな「宝島」の地図 ヒトゲノムと共通遺産という概念

法・倫理・科学国際協会事務局長* 国際医学団体協議会副議長 クリスチャン・ビイク

1970年代は環境の時代であり、地球環境問題に対する国際意識に押されて、国連各機関は宣言を採択し、プログラムを立案しました。1990年代はゲノムの時代と言えるでしょう。ヒトゲノムの地図を作成し配列化する挑戦が、科学界を大きく動かす一方で、そこから生まれる有益な情報と可能な利用はまた、情報の誤用のリスクに対する恐怖と不安を生みました。しかしこのような姿勢は遺伝学に限りません。新しい科学の発展と人間に対する知識の深まりは、常に社会的政治的インパクトがありました。遺伝法則の発見によって、ある種の形質—アルコール依存など—の親から子への伝達に注意が向けられるようになりました。しかし、犯罪性は何らかの遺伝要因の結果だという主張があったように、遺伝の役割は誇張もされました。科学の発展とその応用の社会的政治的重要性は、当然原子力エネルギーではもっと大きかったのです。最近では、生物医学が人間と人類の新しい支配を主導する分野として浮上してきました。生殖、遺伝、脳に関する限り、そしてそれがもたらす応用すべてにおいて、遺伝子技術は重要な役割を担っています。

したがって新しいのは科学技術の発展の社会的側面ではなく、特に国際レベルでの市民討論と法政策の立案を通じて、これを正しく考えようという意図なのです。国連制度内で科学と教育を担当する国際政府組織が、科学界と世論の融和という、難しい任務に取り組む決意をすべきだというのは、非常に道理にかなった自然なことでしょう。しかしそのためにはユネスコは、遺伝学の科学的重要性を強調し、なおかつ人権の強化に積極的に貢献する、正しいアプローチを見つける必要がありました。

これがユネスコが現在作成している、ヒトゲノムと人権に関する来るべき普遍的宣言の目的です。1996年版予備草案は、国際規制の遺伝問題のインパクトを方法論と実質の両方で調べたい人の関心を集めています。実際、草案では、ヒトゲノム (II) 研究を律すべきすべての原則が、ヒトゲノムは人類の共通遺産 (I) という基本的宣言から生まれています。

*The Association is a member of CIOMS and an international and multidisciplinary forum for discussing policy approaches of ethical and legal issues posed by the development of science. The *International Journal of Bioethics* is the bilingual (French/English) quarterly review of the Association, Edt. A. Lacassagne, 162 avenue Lacassagne, 69424 LYON CEDEX 03.

*本協会は国際医学団体協議会の一部であり、科学の発展が提起する倫理的法的問題の政策アプローチについて話し合う、国際的学際的フォーラムです。国際生命倫理ジャーナルは、本協会のバイリンガル評論誌（仏／英）で、年4回の発行です。

編集責任者：A. Lacasagne, 162 avenue Lacassagne, 69424 LYON CEDEX 03, FRANCE.

1.4. The human genome: metaphysical object and political icon

Alex Mauron

Centre Medical Universitaire, CH-1211 Geneve 4, Switzerland

Email:

In recent years, the Human Genome Project has generated many questions on the ethical value of the human genome as such. Is there a right to a "non manipulated" genome? Should the genome be protected? From what and in what sense? Is genetic diversity in humans a value to be treasured? if so, what is its ethical relevance? What connection does it have (if any) with the value of genetic diversity in animals and plants? To dispel some of the bewilderment raised by these questions, one must address a set of more basic conceptual problems: how do we understand the relationship between the genome of a cell, the genome of a person and "the Human Genome"? What stakes can one legitimately have in one's genome? What stakes can humankind have in "the Human Genome"?

In Switzerland, a specific and rather unique context is given to these debates because there is a special "genetics and reproductive technology" article in the Constitution, which specifies that gene technology must respect "the dignity of creatures". Not surprisingly, this article can be interpreted in contradictory ways, but it provides an interesting focal point for the dilemmas of "genomic metaphysics".

ヒトゲノム：形而上的対象、そして政治的偶像

医科大学センター、生命倫理学助教授、ジュネーブ アレックス・モーロン

最近ヒトゲノム計画は、ヒトゲノムそれ自体の倫理的価値に関してさまざまな問いを生んでいます。「操作されない」ゲノムを持つ権利はあるのか？ ゲノムは保護すべきか？ そうだとしたら何から、そしてどのような点で？ ヒトの遺伝的多様性は評価すべき価値か？ もしそうなら、その倫理的関連性は？ 動植物の遺伝的多様性の価値（あるとするなら）と、どのようなつながりがあるのか？ こうした問いが提起する困惑を払拭するためには、一連のより根本的な概念的問題に取り組まなければなりません。細胞のゲノム、人のゲノム、そして「ヒトゲノム」の関係をどう理解したらいいのでしょうか？ 自分のゲノムにどのような権利を持つことが許されるのでしょうか？ 人類は「ヒトゲノム」にどのような権利があるのでしょうか？

スイスの場合、こうした議論には特殊でややユニークな背景があります。憲法にとくに、遺伝子技術は「被造物の尊厳」を尊重しなければならないと定めた、「遺伝学及び生殖技術」条項があるからです。当然この条項は矛盾して解釈されることがありますが、「ゲノム形而上学」のジレンマの興味深い焦点ともなっています。

1.5. Legal limitations on research and its results? The cloning paradigm

Carlos M. Romeo Casabona,

Director, Inter-University Chair in Law and the Human Genome, BBV Foundation -Provincial Government of Biscay, Universities of Deusto and the Basque Country (Bilbao, Spain)

Speculation concerning possible applications of cloning is by no means new. Back in 1993 Jerry Hall and Robert Stillman (George Washington University, Baltimore, US) announced at a scientific conference in Montreal that they had obtained human embryos from other embryos (blastomers) using cloning. The technique had already been in use for some decades experimentally, having been applied successfully in plants and superior animals. Thus, from the scientific standpoint, the news did not represent anything new in the way of biotechnology, save that human embryos had been obtained. However, the authors stressed that the embryos in their experiment were non-viable.

Early in 1997 Ian Wilmut from the Roslin Institute in Edimburg (UK) published the results of a scientific experiment in which, for the first time ever, a sheep (known as Dolly) was cloned from the nucleus of a 6-year old adult -and hence differentiated (epithelial mammalian) - cell. Of great concern at present is precisely this possibility that humans might be cloned, given the developments achieved with the use of the technique in animals. These techniques may be perfected and subsequently easily extended to humans. The real debate on cloning has just begun, although when everything was purely speculative years ago such a possibility was rejected virtually to a man .

研究とその結果に対する法の限界？ クローニングのパラダイム

カルロス・M・ロメオ・カサボナ

クローニングの応用の可能性に関する仮説は、決して新しいものではありません。遡って1993年、ジェリー・ホールとロバート・スティルマン（ジョージ・ワシントン大学、バルチモア）は、モントリオールの科学会議で、クローニングによって別の胚（割球）からヒトの胚を入手したと発表しました¹。この技術は既に何十年も実験的に行われており、植物や高等動物に応用されて成功を収めてきました。したがって科学的見地からは、ヒトの胚の入手を除けば、このニュースはバイオテクノロジーのあり方について新しいものを何も示していませんでした。しかし発表者は、実験で生まれた胚は自力では生きられないと強調しました。

エディンバラのロスリン研究所のイアン・ウィルムットは1997年、科学実験の結果を印刷物に発表した。現在最も懸念されているのは、クローン技術を使って動物で達成された成果を考えれば、まさにクローン人間誕生の可能性なのです。技術が完成し、簡単に人間に応用されるかもしれません。何年か前にはすべてが推測の域を出ず、そのような可能性は事実上否定されていました。クローニングの本当の議論は始まったばかりです⁴。

1.6. Bioethics and New European Abortion Legislation

Nenad Hlaca

Law School University of Rijeka, Hahlic 6, HR - 51 000 Rijeka, Croatia

From comparative research on the situation in Europe in the field of abortion we can conclude that liberal abortion laws have not caused an increase in the incidence of abortions, especially not in those countries with successful family planning activities. Countries with rather restrictive abortion laws do not have lower abortion rates. Restrictive legislation usually causes undesirable results such as traveling abroad for abortion, the insecurity of doctors and women, illegal abortions and lack of reporting of abortions. Perhaps changes in the philosophical approaches to the value and importance of human lives in this biologically destructive civilization will lead to a consensus on the secular ethical standards at a European level which will be determinate with similar demographic trends. On the global level the situation is far away from a consensus. Until consensus is reached on the values to be used as a cornerstone for the effective enforcement of human rights on the international level, debates and medical tourism will flourish. The situation concerning abortion is a clear example that family behavior and ideas about marriage and procreation have undergone constant fluctuations while never exactly corresponding to the set of official norms.

生命倫理と欧州の新中絶法

リエカ大学法学部助教授

リエカ、クロアチア ネナド・ヘレカ

欧州の中絶の現状に関する比較研究から、リベラルな中絶法は、とくに家族計画活動が成功を収めている国では、中絶件数の増加の原因ではないと結論づけられます。制限的な中絶法のある国の中絶率は低くないのです。制限的な法律は通常、中絶のための海外渡航、医師と女性の不安定な状態、非合法中絶、中絶に関する記録の欠如といった、好ましくない影響をもたらします。おそらくこの生物学的に破壊的な文明において、人間の生命の価値と重要性に対する哲学的アプローチが変わることによって、似たような人口統計的傾向で限定された、欧州内の非宗教的倫理基準についてのコンセンサスにつながることでしょう。国際的コンセンサスはまだまだ遠い先です。国際レベルでの人権の効果的な実施の基礎となる価値観についてコンセンサスに達する日まで、議論と中絶のための旅行では盛んに行われるでしょう。中絶を巡る状況は、婚姻と生殖に対する家族の行動と考えが、変動を繰り返しつつも決して体制側の基準とは一致しない、明白な表れなのです。

1.7. The Law of "Life Units" as a New Legal Order

Zentaro Kitagawa,
Meijo University, JAPAN

Controversial issues closely connected with the fundamental values and premises of our modern society are shaking the very foundation of the modern legal system.

Technological innovations require us to re-examine fundamental legal concepts of man and nature which have formed the premises of the modern law up until now. For example, the impact of our knowledge of DNA (deoxyribonucleic acid) and the development of biotechnology have both affected our contemporary legal system.

New methods are required for evaluating these impacts upon the law. The pure legal approach under existing law is ineffective in evaluating these issues. The impacts of innovative biotechnologies upon law cannot appropriately be understood without resorting to comprehensive studies which include an examination of these biotechnologies and related specialized fields. One possibility is to encourage studies which could result in the construction of a new legal model based upon the concept of the "life unit".

Modern law categorizes the world into the two categories of "persons" and "things." The modern law recognizes the "person" as having the capacity to hold rights. "Things" are the object of such rights. In order to deal with new legal issues such as those concerning fertilized eggs, genetics, organ transplants, etc., I have proposed the interdisciplinary study of a new concept called the "life unit" which is a fundamental element of a third legal order and an addition to the existing legal dichotomy of "person" and "thing."

1.8. Human Genome as Common Heritage of Mankind

—with a proposal—

Ryuichi IDA, UNESCO IBC*

Kyoto University Law School, Yoshida, Sakyo-ku, Kyoto 606

Email: ida@law.kyoto-u.ac.jp

The Draft Universal Declaration on Human Genome and Human Rights recognises in its article 1 that, in a symbolic sense, the human genome is the heritage of humanity. This provision originated in fact from article 1 of the Preliminary Draft Declaration elaborated by UNESCO's IBC, with a slightly different wording; it provided: "the human genome is common heritage of humanity." The present article 1 is the result of a compromise between the countries who are anxious about the collective and financial impression this concept of "common heritage of humanity" might give and those who emphasise its symbolic meaning of unity and solidarity of the humanity. The author of this paper has been sharing the latter view and tried to maintain the original version in the Government Experts Meeting in last July but without success. However, the present formula does not lose its basic conception. We will examine here what will be the implication of this new concept of international law.

人類の共同遺産としてのヒトゲノム — 一つの提案 —

ユネスコIBC委員

京都大学教授（国際法）

位田隆一

「ヒトゲノムと人権に関する世界宣言案」第1条は、ヒトゲノムが象徴的な意味において、人類の遺産であると認めた。この条項は、実はユネスコIBCの手になる同宣言原案第1条に起源を有するものであるが、同草案はやや異なる文言であって、「ヒトゲノムは人類の共同遺産である」としていた。現宣言案第1条は、この「人類の共同遺産」という概念が与える集团的及び財産的印象に懸念を抱く諸国と、人類の一体性と連帯という象徴的意味を強調する諸国との妥協の産物である。筆者は、後者の立場に与するものであり、昨7月の政府専門家会合でも、原案通りの文言を維持しようと努めたが、成功しなかった。もっとも現在の宣言案の文言が、この概念の基本的内容を失ってしまったわけではない。ここでは、この国際法上の新しい概念が、どのような影響を与えるのかについて検討してみたい。

*The opinion presented in this paper is his own and does not necessarily reflect the position of Japanese Government.

本稿の意見にわたる部分は筆者個人のものであることを付記する。

2.1. The Relevance of Bioethics in Malaysian Society

Chee Heng Leng, Ph.D.

Fakulti Ekologi Manusia, Universiti Pertanian Malaysia

43400 UPM Serdang, Selangor Darul Ehsan, MALAYSIA

Email: hengleng@eco2.upm.edu.my

In the last several years, Malaysia has, in common with other countries in Asia, experienced phenomenal economic growth and a concomitant rise in per capita income, which has led to increasing private expenditure in the health care sector. As a result, the private health care sector has expanded rapidly, fuelled in part by the government's privatisation policy. In the latest development plan, the government has announced that it will retreat from the provision of health care, and that a national health security fund will be set up. The rapid growth of the private medical care sector, increasing incomes and health expenditures, and a disease pattern with a predominance of chronic illnesses, will make feasible the increasing utilisation of expensive medical technology, including genetic technology. Furthermore, the proposed National Health Security Fund will lead to an expansion of the health insurance industry. These developments will hasten the need for Malaysian society to confront bioethical questions raised by the utilisation of genetic technologies, and by the availability of genetic information. This calls for a national effort, but for it to be broad-based and representative of various sectors of society, it should necessarily incorporate an educational component.

マレーシア社会における生命倫理の今日性

Fakulti Ekologi Manusia, Universiti Pertanian Malaysia、マレーシア チー・ヘン・レン

マレーシアはここ数年、他のアジア諸国と共に、驚異的な経済成長とそれに伴う個人所得の上昇を経験してきました。それによりヘルスケア部門の個人消費が増加しています。その結果、マレーシア政府の民営化政策も手伝って、民間ヘルスケア部門は急速に拡大してきました。最新の発展計画の中で政府は、ヘルスケアの供給から撤退し、国民健康保険基金を設立することを発表しています。民間医療部門の急成長、所得と健康関連コストの上昇、慢性病が大勢を占める疾病パターンが相まって、遺伝子技術のような高価な医療技術が、今後ますます利用されることでしょう。また国民健康保険基金案は健康保険産業の拡大ももたらします。こうした進展は、マレーシア社会が、遺伝子技術の利用と遺伝情報の入手によって提起される、生命倫理の問いに対峙する必要性を高めるはずで、それには国民的努力が求められますが、幅広い基盤を持ち、社会のさまざまな分野を代表するためには、当然のことながら教育的要素を組み込むべきでしょう。

2.2. Asian/Indian Man : An agonising appraisal

R. N. Sharma, Deputy Director, National Chemical Laboratory, Pune 411 008, India

The multiregional evolution of man has not only influenced external characteristic such as anatomy, physiognomy etc. but also probably psychological, emotional and intellectual traits of the more distinct ethnic groups. These have undergone modification in response to social and environmental pressures, resulting in sometimes inexplicable, contradictory, insane and even suicidal behaviour. Certain selected distinctive traits and the overall ethos of modern man in Asia, particularly in India, have been discussed. It has been deduced that despite socio-economic and environmental conditions, intrinsic biological singularities specific to given regional populations seem to be more predominant in shaping the ultimate psycho-social and attitudinal moulds. In-depth analysis reveals disquieting contradictions in several dimensions of the Asian/Indian personality. Thus, the much vaunted proclivity for and preoccupation with the spiritual in Asia compares very poorly in humanistic terms with Western civilisations' manifest practice of social responsibility. A similar situation seems to be emerging with respect to ethics, despite the label of unabashed materialism Western societies are saddled with. Impersonal humanism, and cynical pursuit of the material afflict the latter. Correction of disturbing and disruptive human traits, then, is a concern which envelopes the entire human species. Amelioration of these requires concerted social and ethical education. Absence of such conscious and urgent persuasion can lead to the suicidal pitfalls of socio-economic and geopolitical tyranny on the one hand, and a possible future genetic management on the other, both of which must obviously be prevented at all costs.

アジア／インド人：苦悩に満ちた評価

国立化学研究所副所長、Pune 411 008、インド R.N.シャーマ

さまざまな地域で発生した人類の進化は、解剖学的構造、外観などといった外面的特徴ばかりでなく、もっと異なった民族グループの心理的、感情的、知的特徴にも影響を与えていると思われます。これらは社会と環境からのプレッシャーに対応して修正され、その結果、不可解で矛盾した、突飛な、自殺的とさえ見える行動が生まれることがあります。ここでは現代アジア人、とりわけインド人のある種の選ばれた独特な特徴と、全体的な気質を取り上げます。社会経済的環境的条件がどうであれ、その地域住民に固有な生物学的特異性のほうが、最終的な心理社会的で意識上の性質の形成に支配的だと思われます。徹底した分析によって、アジア／インド人の性格のいくつかの側面に、気がかりな矛盾があることが明らかになっています。したがってアジアの精神的なもので、高く尊ばれていた気質や大切なものは、人間性という点では、西欧文明の社会的責任という顕在的な慣習と比べると見劣りがします。同様の状況は、欧米社会に貼られた臆面もない物質主義というレッテルにも拘わらず、倫理学でも生まれているようです。人間味のない人道主義とシニカルな物質の追求が、欧米社会を苦しめています。ですから不安で破壊的な人間の性質の修正は、全人類を覆う関心事なのです。性質の改善には、社会教育と倫理教育の連携が必要です。そのような意図的で切迫した説得がなければ、片や社会経済的地域政策的専横、片や将来的な遺伝子管理の可能性という、致命的な落とし穴にはまりかねません。そのいずれも当然、絶対に防がなければなりません。

2.3 The Implications and Obligations of Self-Financing Medical Education in a Southern Country

V. Manickavel, College of Medical Sciences Bharatpur, NEPAL

One of the problems in the developing southern countries is inadequate health care. Here we will analyze one aspect of this and its ethical implications. Education is one of the effective ways of transferring the modern medical technology which determines the longevity of a population and death and live birth rates. However, this education depends upon the resources available for the health care of that nation. But the allocation of the total pie for this social development is normally small in southern countries, resulting in expensive and slow transformation. Further the limited available medical education is accessible only to economically - and socially - selected students. This selection has the potential of eliminating deserving students. To avoid this, Nepal has adopted a different type of aid program, where both the donor and receiver benefit mutually. Self-financing Medical Colleges without any government grants are allowed to be established. In these colleges qualified local students will receive free education alongside other students who will be paying for their studies. In this new aid program the southern governments help a northern entrepreneur to establish an enterprise in their country on the terms and conditions laid down by that country and while returning some of the benefits to that host country. The differences between the traditional aid programs and this aid to entrepreneurs program is discussed. The ethical strain on the principle of justice is also analyzed.

「南」側の国での自己資金で運営される医学教育に関する示唆と義務

ネパール医科学カレッジ（カトマンズ大学付属／ネパール医療審議会承認） V.マニッカベル、P.ラジャラム

南の発展途上国の問題の一つに、ヘルスケアの不備があります。ここでは、その問題のある側面と、その倫理的意味を分析していきます。教育は、国民の寿命や死亡／出生率を左右する近代医療技術を移入するうえで、有効な手段の一つです。しかしそれは国がヘルスケアに割ける資源にかかっています。全体のパイのうち社会的発展のために分配されるスライスは、発展途上国では小さいのが普通で、そのため変化はゆっくりで高くなります。おまけに医学教育は限りがあり、経済的にも社会的にも選ばれた学生しか手が届きません。選抜は、教育を受けるに値する学生を排除する可能性を秘めています。これを避けるためネパールでは、援助者と被援助者の双方が恩恵を得る、他とは違った援助プログラムを採用しました。政府からの助成を一切受けない、自己資金による医科大学の設立を認めたのです。こうした大学では、条件を満たした地元学生が、無料で他の一般学生と一緒に学びます。彼らの学費は一般学生が負担します。新しい援助プログラムの場合、発展途上国政府は、先進国の起業家が、その国の定める条件に沿って利益のいくらかを返済することを条件に、そこで事業を興すことを援助します。ここでは、従来の援助プログラムと新しい起業家援助プログラムの違いを検討します。また公正の原則の倫理的側面についても調べてきます。

2.4. Problems of “Principlism” in WASP Bioethics

Carl B. Becker,
Integrated Human Sciences, Kyoto University, Kyoto, Japan

While there is minor disagreement in their precise wording and derivation, there is wide agreement that some “principles” should inform proper decision-making in bioethics in the same way that they are thought to inform proper decision-making in civil rights or environmental policy. These principles have been taught and studied by countless university ethics centers, institutionalized in hospital rules and procedures, enshrined in court decisions, and popularized in TV dramas and computer software. Principlism, or the attempt to deduce and apply ethical conclusions to specific medical quandaries, is thus rooted in the Judaeo-Christian commandment tradition, reinforced by the theoretical training of a generation of ethicists, and espoused by a majority of Anglo-Saxon authorities and institutions. After all, it might be argued, who could reject the importance of “respect” or “autonomy”?

However, principlism has come increasingly under question by a number of contrasting positions and approaches. Its emphases on individualism and autonomy obscure the importance of a nexus of human relationships indispensable to traditional decision-making in much of the world. Its claims to objectivity also embody a legal positivism which risks ignoring the motives for and even depreciates the importance of spiritual caring. Perspectives from cultures like Japan, which do not subscribe to absolute value structures, cast a number of questions on the universality and applicability of principlism to modern medical ethics.

欧米の生命倫理に於ける「普遍原則主義」の問題点

京都大学総合人間学部助教授 カール・ベッカー

欧米に於いては、「普遍的な原理・原則」があらゆる判断の根拠になければならないと確信されてきた。「人権」「尊厳」「自由」等、超越的原理や普遍的原則に基づいて倫理的な判断を下そうとする伝統は、一神教の宗教から出発し、大学教育から病院の倫理委員会まで広範囲に亘っている。しかし最近では、当然とされてきたこの原則主義を疑問視する動きが見られる様になった。例えば「客観性」を重んじる余り、各患者の精神を軽視する恐れがある。「個々人の自由」を強調する余り、人間関係の大切さを無視してしまう危険性もある。非絶対的・非西洋的な価値観を持つ日本のような立場から考えてみても、普遍原則主義は益々疑うべき対象に見えてくるのである。

2.5. The Bhagavad Gita on Genetics and Behaviour

Dr K.K. Dua, Dayalbagn Educational Institute, INDIA

Our ancestors are present in the chromosomes of our body cells. They have reached down generation by generation through the transference of the chromosomes. The genes in the latter determine the behaviour of the organism. The Lord Sri Krishna in Bhagavad Gita (BG) has discussed in detail about the continuity of species, the role of genes in behaviour and their relationship with the environment and the factors leading to the formation of varied forms in nature (BG II-28, IV-3). A living being is present in the environment as manifested form and on death disintegrates to become formless matter. The manifested form is attained from the latter. The environment provides the material for the benefit of the living beings. The living beings having attained life, develops ego and the desire to survive and thrive. This brings about an urge to evolve with respect to morphological and physiological adaptations so as to use the environmental factors in an optimal manner, leading to evolution. Life begets life resulting in the continuity of the species (BG VII-6). Creation, preservation and destruction are the three phases of life. Further, in it the role of senses and its interaction with the environment has also been identified (BG III-3).

遺伝学と行動のバガバッド・ギータ（祝福されたる者の歌）

ダヤルバグ教育研究所動物学部、インド ドゥア・カマル・クマール

私たちの祖先は、私たちの身体の細胞の染色体の中に存在します。祖先は、染色体の転写を通じて何世代にもわたって伝えられます。染色体の中の遺伝子は生物体の行動を決定します。バガバッド・ギータ (BG) に出てくるクリシュナ神は、種の連続性、行動における遺伝子の役割、環境との関係、自然のさまざまな形態の形成を導く要素について、細かく説いています (BG II-28, IV-3)。生き物は、目に見えるかたちで環境に存在し、死によって分解されて無形の物となります。目に見えるかたちはそこから発展したものです。環境は生き物のために素材を提供します。生命を得た生き物は、自我と、生き延び成功したいという欲望を持つようになります。これが環境要因を最大限に活用できるよう、形態学的生理学的適応の展開を促し、進化を引き起こします。生命が生命を生み、種の連続性をもたらされます (BG VII-6)。生命の3つの段階は創造、維持、破壊です。また生命の中に、感覚の役割と、環境との交流も認めることができます (BG III-3)。

2.6. China and Eugenics - Preliminary remarks concerning the structure and impact of a problem of International Bioethics

Dr. Ole Doring, Institute AsienKunde, Hamburg, GERMANY

It has been argued that the human fetus in China is traditionally not considered as a 'full human life', but valued equal to parts of the pregnant mother's body, just like her ribs and eyes. This corresponds with a frequent notion of Chinese moral thinkers who hold that it is chiefly the social skills, next to rational capacities, which provides the conceptual ground for the social value of a person, including related assertions such as human rights and a right to living, but not personal autonomy.

This line of argument has provoked various objections on all levels, reaching from harsh criticism of moral rudeness over ignorance to cultural relativistic inspired ethical fatalism resulting in a premature end of mutual consultation. One thing regularly omitted in the efforts to accuse China for alleged bad moral habits is an organized international attempt to open the lines of demarcation to get into a constructive-critical dialogue with Chinese representatives. Although the prospects for such a dialogue do not suggest great optimism from a political view it is both a requirement of prudence and of fairness to check all options seriously first, if we discuss ethics.

In this paper I wish to submit some suggestions concerning the structure of a modern Chinese Medical Ethics as part of the modern world, paying tribute to the extraordinary heritage of ethical thought in China. I do not intend to support devotees of ethical cultural-relativism, but in contrary, I wish to encourage an original Chinese access to the developing international debate of medical ethics. However, the ages of national isolation, of imperialism and cultural vitalism have become obsolete and, on balance, unproductive, because we are now facing challenges for the whole mankind. The weight of these challenges requires that all persons and peoples invest their very best and share it, in order to rescue peace and survival on terms of human dignity.

中国と優生学 -- 国際的な生命倫理の問題の構造と影響についての序言

オーレ・デューリンク

従来、中国では伝統的に人間の胎児が「完全な人命」とは見なされず、肋骨や目と同様に妊婦の体の一部として評価されると主張されてきた。このことは、推理力の次に社会的な技術が、人権や生きる権利等を含むが個人の自律性は排除する個人の社会的価値の概念的根拠となる、と信じる中国の倫理学者の考えと一致します。

こういった議論は数々のレベルにおいて論議を醸し、無知への倫理的無作法に対する厳しい批判から始まって、相互協議を時期尚早に終わらせることになる文化的な相対主義の倫理的運命論まで、出されています。間違っているとされている倫理的習慣について中国を責める側にいつも欠けているのは、中国側の代表者と建設的な批判に基づいた対話を行なうための境界線を開くための組織化された国際的な試みです。そのような対話の可能性について政治的には楽観出来ないのですが、倫理を論議するならば、まず全ての可能性を真剣に試してみることが、慎重さという面や公平さという面からも必要となります。

この論文で、私は現代社会の一員としての中国の医学倫理の構造について、中国のすぐれた倫理思想の伝統に敬意を表しつつ、幾つかの提言をしたいと思います。倫理上の文化相対主義の狂信者を支持する気はありませんが、医学倫理について推進されている国際的な討議への中国独自の接近を奨励したいと考えています。しかしながら、長年に渡る国家的孤立、帝国主義や文化的生気論が時代遅れとなり、やがて非生産的になったのは、私達が全人類にとっての問題に直面しているからなのです。これらの問題の重要性は、全ての個人や国民が人間の尊厳を保証しつつ平和と生存を取り戻すために全力を尽くすことを要求します。

2.7. Biotechnology and Society

Dr. Amit Krishna De, Indian Science Congress Association, INDIA

With the advancement of science, genes are becoming the centre of attraction for scientists. New methods have evolved that introduce recombinant DNA technology or biotechnology for uplifting of society. Applications are in progress in agriculture where more nutritious and higher yielding crops are now being produced that are resistant to environmental stress such as insects, pests, diseases, cold and drought. The use of biofertilisers to maintain the biological flora and combat pollution through microbes are the latest applications of Biotechnology. Moreover, recombinant DNA products in medicine that are widely acceptable include the like of anticoagulants, erythropoietin, growth factors, human insulin, vaccines, etc. Recently, DNA fingerprinting has become a new identification technique for identification of suspects in crime, sexual assault and murder. This technique is more powerful than any other used and has found wide application in the area of Forensic Science. Human gene therapy is now a reality. The human genome project has been able to identify most of the chromosomes that are linked with genetic diseases.

However, the scientists should look before they leap for more sophisticated applications of this new technique. It is also time for society to alert itself and take measures to stop misuse of this potential genetic timebomb.

バイオテクノロジーと社会

インド科学会議協会、インド アミット・クリシュナ・デ

科学の進歩に伴い、遺伝子は科学者の注目の的になりつつあります。新しい手法が開発され、組み換えDNA技術やバイオテクノロジーが社会の向上のために導入されています。農業への応用も進んでおり、昆虫、害虫、病気、寒さ、干ばつといった環境的負荷に強く、栄養価と収穫量を高めた作物が、現在生産されています。バイオテクノロジーの最新の応用としては、生物肥料の使用による生物学的植物相の維持と、微生物による環境汚染との戦いが挙げられます。さらに抗凝血薬、エритроポエチン、成長因子、ヒト・インシュリン、ワクチンなど、組み換えDNAを使った医薬品が広く受け入れられています。最近では、DNA指紋が犯罪、性的暴力、殺人の捜査での新しい鑑定法として登場しました。この技術は他のどの鑑定法よりも威力があり、法医学の分野で広く採用されるようになりました。今やヒトの遺伝子治療は現実になっています。ヒトゲノム計画は、遺伝病に関する染色体のほとんどの同定に成功しています。

しかし科学者は新技術のさらに高度な応用に飛びつく前に、注意深く考慮すべきでしょう。そして社会も正しい情報を得、この遺伝学の時限爆弾の誤用をくい止めるために何らかの手段を取ることに、気づくべき時が来ています。

2.8. Advancing Biotechnology and the Crisis of Purpose

Dr R.R. Kishore, Ministry of Health, INDIA

The world has always been under transition, but never as fast as it is today. Fast advancing biotechnology has turned fiction into reality and humanity is on the verge of losing its identity. The increasing quest for well-being -- and for better-beings --, higher resource consciousness, and broader institutionalisation of health services have created a milieu in which human personhood has been taken over by considerations of utility and quality. Medical care is no longer the sole discretion of the physician, but a collective exercise involving the patient, family members, attorneys, administrators, and even the court of law, each with its own philosophy and paternalistic tendencies. Erosion of the individual's autonomy and the possibilities of biological exploitation of the human species have created new ethical dilemmas when contemplating answers to fundamental questions like, Who is an individual? What is personhood? Who is healthy? Why should I continue? Why should I have children? Why cure the sick? Why prolong life? What is utility? Who is useful? Why not finish off "the Useless"? Why not sell my body? Why not recycle the dead? Why not create "better-beings"? What constitutes quality of life? What is rationality? And many more.

The entire edifice of ethical formulations governing medicine is founded in our capability to address the above questions candidly. The answer to these questions lies in purpose: The purpose of Universe and the purpose of life. Science is devoid of purpose and hence it can not provide answers to these questions. The purpose lies in human virtues. What are these virtues? They are the intrinsic human traits and have been defined in Indian cultural thought as Dharma. These virtues are; love, trust, compassion, tolerance, fairness, forgiveness, truthfulness, beneficence, sacrifice, and protection of the weak and they constitute the "Common Heritage of Humanity".

The moral values -- Justive, Equality, Autonomy, Benignancy, Altruism, Human solidarity, Respect for the dead, Respect for other forms of life, and rationality -- emerge out of above virtues. These values guide the individual and their societal conduct and the material concepts like, "utility", "quality", and "economics" reflect an attempt to uphold these values. The goals of medicine therefore are essentially the same. Only the approaches and strategies may differ according to social, economic, cultural and religious perspectives.

The contemporary trends and the future possibilities in the realm of medical care carry enormous potential for transgressing human life in many ways and as such it is most imperative that a fundamental ethical paradigm is developed in order to ensure a perfect reconciliation between the individual interests and the common good.

バイオテクノロジーの進歩と意志の危機

インド保健省、ニューデリー、インド、R.R. キショア

世界は常に変わっていますが、今日ほど目まぐるしいときはありませんでした。急速に進歩するバイオテクノロジーは虚構を現実にし、人類はそのアイデンティティを失いかけています。幸福—そしてより良い人間—の熱心な追求、資源意識の高まり、ヘルスサービスの広範な制度化は、人間の個性より有用性と質の良し悪しへの配慮が優先される環境を作り出しました。医療はもはや医師の独壇場ではなく、患者とその家族、弁護士、行政、そして裁判所さえも巻き込んだ集団的行為であり、それぞれが哲学を持ち、父権主義的傾向を有しています。個人の自主性が侵され、人類が生物学的に搾取されかねないことは、次のような根本的な問いへの答に苦慮する、新たな倫理的ジレンマを生み出しました：

個人とは誰か？ 個性とは何か？ 誰が健康なのか？ なぜ私は生き続けるのか？ なぜ子供を作るのか？ なぜ病人を治療するのか？ なぜ延命させるのか？ 有用性とは何か？ 役に立つのは誰か？ なぜ「役に立たない人間」を死なせてはいけないのか？ なぜ自分の身体を売れないのか？ なぜ死体を再利用できないのか？ なぜ「より良い人間」を作ってはいけないのか？ 生命の質の中身は何か？ 合理性とは？ 問いはまだまだ続きます。

医学を支配する倫理公式という建物全体が、こうした問いに率直に取り組む私たちの能力によって築かれています。問いの答は意志にあります。宇宙の意志と生命の意志です。科学には意志がないため問いに答えられないのです。意志は、人間の美德にあります。美德とは何でしょう？ それは人間の気質に生まれつき備わり、インドの文化思想で「法」と定義されるものです。美德とは、愛、信頼、同情、寛容、公正、寛大さ、誠実、善行、犠牲、弱者の保護であり、「人類共通の財産」なのです。

道徳的価値—正義、平等、自主、仁慈、利他主義、連帯、死者への敬意、他の生き物の尊重—は美德から生まれます。道徳的価値は個人と社会の行為を導き、「有用性」、「質の良し悪し」、「経済性」といった物質的概念は、こうした価値を支えようという試みの表れなのです。ですから医学の目標は基本的に同じです。社会、経済、文化、宗教といった観点によって、アプローチと方法が違うだけなのです。

医療分野において現在の流れと今後の展望は、人間の生活をさまざまな面で広げるとてつもない可能性を秘めています。そのため、根本的な倫理規範が個人の利益と公益の完全な調和を確立しようと進化するのは、どうにも避けられなくなっています。

2.9. Bioethics in Thailand

Pitak Chaichareon and Pinit Ratanakul Mahidol University, THAILAND

Bioethical activities are concentrated at Mahidol University, established in 1886, with 3 medical faculties and 2 nursing schools. Its impetus is the replacement of traditional medicine by Western (modern) medicine, which leads to.. separation of medicine from morality; predominance of hospital-oriented medicine, research and specialized training over primary health care and communal health services; The rise of the cult of individualism and free market ideology which values wealth over persons and human needs; Emergence of new moral problems e.g. euthanasia, reproductive intervention, human experimentation.

Bioethical activities consist of: teaching bioethics to medical and nursing students to encourage ethical reflection on moral issues in modern medicine; Publicizing bioethical issues to raise public and professional awareness of these issues; Encouraging the application of moral insights and principles in Thai culture underlain by Buddhism to the solutions of bioethical problems. Buddhist Ethical Principles include:

Veracity: Truth-telling is one's social and moral duty. No exception for lying in any circumstance.

Non-Injury To Life: All human lives are precious regardless of their stages of development and/or condition. IVF techniques, abortion, suicide and active euthanasia are unacceptable. Passive euthanasia is an ethical challenge.

Interdependence (Conditionality): Individual autonomy is limited by duties and obligations arisen from interdependent relationships.

Compassion: Doing all in one's power to enhance the well-being of others, to benefit them, to increase the values of their lives. Not doing further harm (increase suffering) to them. Self-sacrifice

Conjoined with justice: Recognizing others as moral equals, in giving and claiming for each other what is due as a fellow human being. Fairness or proportionate treatment.

Conjoined with knowledge: Allowing the hopelessly ill patient to meet the end naturally. Giving care, comfort and companion to the dying.

Important Bioethical Issues include: Lack of creative coordination of traditional medicine, Buddhist compassion and modern medicine and thus the inability to provide the most relevant and most effective health care. Need to foster greater conscientiousness and integrity in the practice of medicine. Fair distribution of scarce medical resources, the imbalance of resource allocation between the urban and the rural sectors. The abuse of the poor and violation of their human rights in human experimentation. Boundaries of intervention in reproduction. Prevention of possible harm to the individual, the family and society. Humane and holistic care in AIDS, and confidentiality of testing and test results. Issues in gray areas include abortion for rape, incest, severely defective and/or HIV positive fetuses; and euthanasia for a patient in a persistent vegetative state, organ transplantation, and seriously defective infants.

2.9. タイの生命倫理

マヒドール大学, タイ ピタック・チャイチャレオン/ピニット・ラタナクール

タイの生命倫理活動の中心であるマヒドール大学は、1886年に設立され、医学施設3棟と看護学校2校を擁しています。伝統医学を近代西洋医学に置き換えることがきっかけとなって、医学と道徳の分離、病院中心の医学の優位、一次医療と地域ヘルスサービスに関する研究と専門教育が生まれています。人間やそのニーズよりも富を尊ぶ、個人主義と自由市場イデオロギーの流行、安楽死、人工生殖、人体実験といった新しい道徳問題も発生しています。

大学の生命倫理活動には次のようなものがあります。医学生と看護学生に生命倫理を教え、近代医学の道徳問題について倫理的に深く考えるよう奨励する。生命倫理問題を広報し、一般市民と専門家の認識を高める。仏教を基盤とするタイ文化の道徳的洞察と原則を、生命倫理問題の解決に応用することを奨励する。以下に仏教の倫理原則を挙げます。

誠実: 真実を語ることは社会的道徳的義務である。いかなる状況でも嘘は認められない。殺生の禁止: すべての人の命は、その発展段階や状態に拘わらず大切である。体外受精技術、中絶、自殺、積極的安楽死は認められない。消極的安楽死は倫理的難問である。

相互依存 (条件): 個人の自主性は、相互依存関係から発生する義務と責任によって制限される。憐れみ: 他者をより幸福にし、利益をなし、その生命の価値を高めるために全力を尽くす。より一層の害をなし (ますます苦しみ) てはならない。自己犠牲。

正義との連帯: 同じ人間として互いに与え受け取ることについて、他者を道徳的に同等と認める。

知識との連帯: 末期患者が自然に死を迎えられるようにする。死に行く者に介護と安らぎを与え、付き添う。伝統医学、仏教における憐れみ、近代医学の創造的な調整ができていないために、的を得た、効果的なヘルスケアが提供されないことは、生命倫理上、重要な問題です。また医療行為において、さらに良心と統一性を育てることが求められます。その他、問題として、乏しい医療資源の公平な分配; 都市部と地方の資源配分の不均衡; 貧困層の虐待と人体実験における彼らの人権の侵害; 生殖への介入の限界; 個人、家族、社会に対する危害の防止; AIDS患者の人道的で全体論的ケアと、テストとその結果の守秘などがあります。グレーゾーンの問題としては、レイプと近親相姦の場合や、重度の障害があったりHIV陽性の胎児の中絶、回復の見込みのない植物状態、臓器移植、重度障害児などが挙げられます。

3.1. Doing Bioethics in the Philippines: Challenges and Intersections of Culture(s) and Medicine(s)

Peter Sy

Department of Philosophy , University of the Philippines, Diliman, Quezon City 1104, Philippines

Email: psy@kssp.upd.edu.ph

The Philippines' unique history and culture offer a complex of opportunities and challenges to the theory and practice of bioethics. Centuries of colonialism have brought about assimilation in the country of among others, Western ethical values. Many Filipinos hold Eurocentric views and ethical principles like autonomy of persons and human rights. In practice, however, some patterns suggest conflicts between these Western values and peculiar Filipino views: for instance, organ donation as a way of saving lives versus the populist view that the human body is sacred and therefore no humanitarian/utilitarian considerations can possibly override it; and traditional medical practice versus Western 'technological' medicine. On the other hand, other practices suggest open "intersections" for Filipino culture and Western medicine: it is, for instance, not uncommon for people to consult both the doctor and the albulario (medicine man), or even for some doctors both to prescribe drugs and to allow the manghihilot (traditional "physical therapist"?) to take care of the patient; for faith healers to advise their "patients" to see the doctor.

These complexities can provide bioethicists with opportunities to test their theories and sharpen their cultural sensitivity. Certain controversies in bioethics like abortion can have new twists in the light of certain Filipino linguistic categories and cultural views. Perhaps even the ways these controversies are addressed in the Philippines can be mirrors on doing bioethics in Asia.

フィリピンの生命倫理：文化と医学の接点と課題

ピーター・サイ

フィリピン独特の歴史と文化は、生命倫理の理論と実践の双方に数々の機会や課題を提供します。何世紀にも渡る植民地風気質が西洋の倫理的価値観への同化等をもたらしました。多くのフィリピン人が自立性や人権といったヨーロッパ中心主義的な考えや倫理的な原則を信じています。しかしながら、実際はこのような西洋的価値観とフィリピン特有の考え方との間に軋轢が生じていると思われます。命を救うための臓器提供という見方と、人間の体は神聖なものでありどのような人道主義的・功利主義的な理由によっても侵されるべきではないという考えや、伝統的な治療法と西洋の「技術的」医学の対立等が、例としてあげられます。一方、フィリピン文化と西洋の医学との開かれた「接点」を思わせる事例もあります。医師とまじない師の両方の診断を受けることは珍しくありませんし、薬を処方する一方で呪術師に患者を任せる医師や、「患者」に医師の診察を受けるように勧める信仰療法者もいます。

こういった複雑な状況下において、生命倫理学者は自らの理論を試し、文化的感受性を高めることが出来ます。中絶等の生命倫理の特定の問題はフィリピンの文化に照らし合わせることでより新しい解釈が可能になります。フィリピンのこのような問題の取り組み方でさえも、アジアでの生命倫理の実態をありのままに反映しているものと考えられます。

3.2. Truth Telling to the Patient: Cultural Diversity and the East Asian Perspective

Ruiping Fan, Rice University, USA/CHINA

Email: ruiping@owlnet.rice.edu

In the *JAMA* Editorial entitled "Is truth telling to the patient a cultural artifact?" (*JAMA* 268 (1992), 1734-5), Edmund Pellegrino argues that truth telling to the patient is not a cultural artifact. This paper intends to illustrate that Pellegrino's argument ignores a significant fact: there are fundamental differences in the conceptions of truthfulness held by patients living in different cultures. The paper further argues that the crucial issue involved in the practice of truth telling in culturally diverse society is how the physician respects a patient's conception of truthfulness while maintaining his/her own moral integrity with regard to truth telling. Pellegrino argues that truth telling is morally required in general because "human capability for autonomous choices cannot function if truth is withheld, falsified, or otherwise manipulated." Furthermore, he believes that the fact that "the patient may draw [his/her] values from the circumambient culture does not make autonomy or medical ethics a cultural artifact." Instead, he contends that "autonomy is ... a valid and universal principle because it is based on what it is to be human." This argument overlooks a crucial factor. It disregards the fact that people living in different cultures hold different, incommensurable conceptions of truthfulness which in turn shape their respective ways of exercising truth telling. It is these specific conceptions of truthfulness, rather than an apparently universally applicable notion of autonomy, that are at the core of the bioethical issue of truth telling. Indeed, each culture possesses its own particular, canonical, and content-full understandings regarding how to provide appropriate information to the right person in the right place at the right time in the right way. For instance, as Alasdair MacIntyre points out, "Lutheran priests brought up their children to believe that one ought to tell the truth to everybody at all times, whatever the circumstances or consequences, and Kant was one of their children. Traditional Bantu parents brought up their children not to tell the truth to unknown strangers, since they believe that this could render the family vulnerable to witchcraft. In our culture many of us have been brought up not to tell the truth to elderly great-aunts who invite us to admire their new hats. But each of these codes embodies an acknowledgment of the virtue of truthfulness" (*After Virtue*, pp. 192-3). Such distinct conceptions of truthfulness reflect themselves saliently in clinical practice in the contemporary morally and culturally diverse world. Accordingly, the crucial issue of truth telling to the patient in cultural diversity is how the physician, when belonging to a different culture from the patient's, respects the patient's conception of truthfulness while, at the same time, being able to preserve his/her own moral integrity with regard to truth telling. For instance, in the East Asian culture, truthfulness first and foremost requires the physician to tell a terminal diagnosis or prognosis to a representative of the patient's family, rather than to the patient directly. How should Western physicians deal with patients with such an East Asian cultural background? In short, the final part of this paper will address the crucial issue of truth telling by contextualizing it into particular clinical encounters of the physician and the patient with different understandings of truthfulness.

患者に真実を告げること：文化的多様性と東アジア的見地

ファン・ルイピン

*JAMA*の論説「患者への告知は文化の産物か？」の中で、エドモンド・ペレグリーノは患者への告知は文化の産物ではないと主張しました。本論はペレグリーノの議論は重要な事実を無視していることを例証します。すなわち、患者の抱く真実性の概念は文化によって根本的に異なるということです。本論は更に、多文化社会での告知の実施において重要な問題とは、医師が患者の持つ真実性という概念を尊重しつつ、告知に関して医師自身の倫理的な誠実さを維持するかということであるとも主張します。ペレグリーノは一般的に告知が必要とされるのは「真実が隠匿・曲解その他の操作をされていたら、人間は自主的な選択を行えなくなる」からだと論じています。また、ペレグリーノは「患者が自分を取り巻く文化から価値観を引き出す」という事実があるからといって「自律性や医学的倫理が文化の産物であることにはならない」と考えています。むしろ「自律性は、人間であることの意義に基づいているので、正当で普遍的な原則である」と主張しています。このような議論は、異なる文化の中で生きる人々は比較できない程異なる『真実性』を信じており、それに基づいて告知を行なうということを軽視しています。普遍的に使われる『自律性』ではなく、このような個別的な『真実性』というものが、告知に関しての生物倫理の核心なのです。なるほど、それぞれの文化には、如何に正しい相手に正しい場所で正しい時期に適切な情報を提供すべきか、という問題について独自の規範的で意味のある見解が存在します。例えば、アラスデア・マッキンタイアが指摘したように、「ルーター派の牧師は自らの子供をどのような状況においても常に誰に対しても真実を告げるように育てました。カントもそのように育てられた1人でした。伝統的なバンツー族は見知らぬ他人に真実を告げないように子供を育てました。そうしないと魔術で一族が危険な目に会う可能性がある」と信じたからです。我々の文化では、新しい帽子を褒めて欲しがっている年老いた大叔母には本当のことを言うな、と言われて育った者が多くいます。しかし、このような慣例のそれぞれが真実性の価値を認めているのです。」そのように異なる『真実性』の概念は、現代の倫理的・文化的に多様な世界で臨床医療に反映しています。したがって、文化的多様性における患者への告知で重要なのは、医師が患者と文化を共有しない場合、どのように患者の『真実性』を尊重しつつ、自らの倫理的高潔さを維持し続けるか、です。一例を挙げれば、東アジアの文化では、『真実性』とは医師が患者自身ではなく患者の家族に余命を告げることです。そのような文化的背景を持つ患者に接する場合、西洋人の医師はどうすべきでしょうか？本稿の結論部分は、『真実性』についての見解が異なる医師と患者の個別的状況に基づいて、告知を論じます。

3.3. Are Physicians Reluctant to Withdraw Life Sustaining Treatment?

Arelene A Ricalde, Lorene Siaw & S.Y. Tan

St. Francis Medical Center, University of Hawaii John A. Burns School Medicine, Honolulu, Hawaii, USA

Clinical practice suggests that many physicians are reluctant to withdraw but not to withhold treatment, despite legal and ethical consensus that there is no difference between these two acts. In order to determine the prevalence of these attitudes in Hawaii, we analyzed the responses of 1,028 physicians and medical trainees who were asked (using questionnaires) about life-sustaining treatment in a terminally-ill patient. First, we asked if they would intubate a competent terminally-ill patient with lung cancer who has decided to forego mechanical ventilation. Secondly, we asked if they would take such a patient off a ventilator if already intubated. We found that 192 physicians and medical trainees (18.7%) would withhold intubation but would not extubate. The most common reasons were: 1) if they were to discontinue the ventilator, they would be killing the patient; 2) such actions would constitute physician-assisted suicide; and 3) their actions would not be supported by society or the courts. We also found that these attitudes were significantly ($p < 0.05$) more common among medical students, medical specialists, Hawaiian/Polynesian and Asian physicians. CONCLUSIONS: A significant number of physicians and physicians-in-training would withhold but would not withdraw life-sustaining support because they misconstrue the latter action to represent euthanasia. An intensive educational effort at all physician levels is necessary to remedy this ethical misconception.

医者は生命維持装置の停止を嫌がるのか？

ハワイ州ホノルル ハワイ大学ジョン・A・バーンス医学校 セント・フランシス医学センター
アーリーン・A・リカルド ロリーン・ショウ S・Y・タン

法的・倫理的には違いがないという世論に反して、臨床の実態は多くの医者が治療の停止は嫌がるが治療をしないことに対してはそうではないと示唆しています。ハワイでのそのような態度の普及率を確認するため、私達は末期患者に対する生命維持治療について(質問表を用いて)1028人の医者や研修医に質問をし、その回答を分析しました。まず、血液の浄化を装置で行なうと決断した判断力のある肺癌の末期患者の咽頭に管を差し込むかどうか尋ねました。第2に、既に管の差し込んである患者から装置をはずすかどうか聞きました。192人の医者や研修医(18.7%)は管を差し込むことは差し控えるが、差し込んである管を外すことはしないと答えました。最も多かった理由は、(1)浄化装置を止めれば患者を殺すことになるから；(2)そのような行為は医師の幫助による自殺になるから；(3)そういった行為は社会や法定に支持されないから、といったものでした。そういった態度は医学生、医療専門家、ハワイ系/ポリネシア系またはアジア系の医者の中で有意に($p < 0.05$)多く見られるということも分かりました。結論：かなり多くの医者や研修医が

生命維持装置の使用は差し控えるが停止はしないのは、停止は安楽死であると誤解しているからです。このような倫理的誤解を解消するためには、全ての医者を対象とした集中的な教育の努力が必要とされます。

3.4. Ethical Issues in the Generation and Utilisation of Knowledge in Biotechnology

S. Visalakshi

National Institute of Science Technology and Development Studies

K.S. Krishnan Marg, New Delhi -110012, INDIA

It is an accepted fact that the next century is going to be of Biotechnology and Information technology. The commercial prospects of and ubiquitous use of Biotechnology has made it a item in the priority list of both developed and developing countries. There is a lot of investment from both public and private parties in the generation and lot of interest in the utilisation of their results. While this has brought the traditionally isolated academia and industry closer at times too closer it has spawned some issues of ethical concern. The concerns relate to selection of projects and sharing of benefits and utilisation of information created by their efforts. This paper looks into the various concerns from both the developed nations with certain amount of awareness of these issues by various strata of society to developing countries which have a lack and indifference as of now. The implications of this status for the future is also analysed.

バイオテクノロジーの知識の開発と利用における倫理問題

国立科学技術発展調査研究所, ニューデリー S・ヴィサラクシ K・S・クリシュナン・マーグ

21世紀はバイオテクノロジーと情報技術の世紀になるという事実は既に受け入れられています。バイオテクノロジーの広範な利用と商業的見通しは、先進国と途上国の両方で優先事項になっています。官民両サイドが知識の開発に多額の投資をしており、その成果の利用に大きな関心が寄せられています。こうした動きは伝統的にバラバラだった学問の世界と産業界を近づけていますが、ときに近づきすぎて倫理的懸念の問題をいくつか生み出しています。懸念はプロジェクトの選別と、そこからの情報の利益と利用の共有に関するものです。この論文では、社会のさまざまな層がこれらの問題をかなり認識している先進国から、今のところ無関心な途上国まで、それぞれの持つ色々な懸念を検討します。現状の将来的な意味についても分析します。

3.5. Ethical problems and clinical trials. The problem of AZT trials for vertical transmission in developing countries.

Ms. Deborah Zion, University of Tokyo, JAPAN

"When we gaze at the sky at night" writes the novelist Margaret Atwood "we are looking at fragments of the past." So too when we see the results of clinical trials we look unwittingly at a drama in which the desperation and hopes of the research subjects are only present in the codification of the results. Consequently, it is easy to overlook the suffering of those involved, and to feel little sympathy for them. However, the advent HIV/AIDS has meant that many aspects of medical practice, including the way in which clinical trials are conducted, are being scrutinised with renewed vigour.

It is, unfortunately, easy to see the history of clinical trials in an unfavourable light. The Tuskegee experiment in which poor Black sharecroppers were deliberately left untreated for syphilis has recently become the object of public memory, and its victims have belatedly received an apology. But it is too easy to apply the unethical problems of one trial to others. It is undeniable that the Tuskegee syphilis study was marked by the worst excesses of paternalism and egotism. Subjects were kept in ignorance about their condition, and about the treatment that they were being offered. No consent was sought, and none was given. Trials that are taking place now, especially in the area of HIV medicine, are beset with ethical problems, that need detailed analysis, as informed consent has been given by the trial subjects, although the manner in which this consent was obtained is ethically questionable.

3.6. HIV/AIDS and Prostitution: Feminist Perspective

Wang Jin-ling

Zhejiang Academy of Social Sciences, Hangzhou 310025, CHINA

The spread of HIV/AIDS has become a worldwide trend in recent years. There is a common view that the commercial sex trade, and especially the women's commercial sex trade and that is one of the main ways that HIV/AIDS is spread and a high risk behaviour, women sex workers are a high risk group for infection with of HIV/AIDS., Therefore the women sex workers are seen easily to be condemned. There are mistakes in the view.

It is my conclusion that the commercial sex trade has a shortage of precautions but all of commercial sex trade is high risk behaviour for spread of HIV/AIDS, and all persons in the commercial sex trade, including the women who exchange sex service for money and the men who exchange money for sex service belong to a high risk group. So we should control more strictly the commercial sex trade that has a shortage of precautions, and place the group of sex service customer and sex server under surveillance to protect them from HIV/AIDS effectively.

Furthermore, there is a social background behind the spread of HIV/AIDS. I think that these are essential to improve the social existence of women's life and reduce the factors which force women to be engaged in high risk commercial sex trade. The equality between genders and women's betterment will be extremely helpful to prevent and control the HIV/AIDS spread.

HIV/AIDSと売春：フェミニストの見地から

ワン ジンリン

HIV/エイズ感染の拡大が、ここ数年の世界的傾向となっています。セックス産業、特に女性を使った風俗産業がHIV/エイズの主な感染原因であり、女性のセックス産業従事者が特に感染率の高い集団であるという見方が一般的になっています。その結果、風俗で働く女性が非難すべき対象と見られがちです。こういった考え方には間違った点を含んでいます。

結論としては、風俗産業での予防措置は不十分ですが、風俗産業は全て感染率の高い危険な行動であり、働いている女性とその客の両方を含めて関係者全員が感染率の高い危険な集団に属しているのだということがあげられます。ですから、予防措置が不十分である風俗産業をもっと厳しく取り締まり、売春婦と客の両方を監視下におくことで能率良くHIV/エイズの感染を防ぐべきなのです。

更に、HIV/エイズの広がりには社会的背景があります。女性の社会的立場を改善し、女性が危険性の高い風俗産業で働かなければなくなる要因を減らすことが重要です。両性間の平等と女性の地位の向上が、HIV/エイズ感染の広まりを予防・統制するために、非常に役立つことでしょう。

3.7. AIDS Vaccine Test and Ethics

Dr Ann Boyd, Hood College, USA & Dr Pinit Ratanakul, Mahidol University, THAILAND

The World Health Organization estimates that 22.8 million persons are infected with Human Immunodeficiency Virus (HIV) which causes progressive failure of the immune system and the disease known as Acquired Immunodeficiency Syndrome (AIDS). Thailand is a nation with 60 million people and over 700,000 of them are HIV positive. The prevalence of heterosexual transmission with clade E HIV escalated from less than 1% to almost 40% among commercial sex workers in Bangkok and Chiang Mai within two years. The American and Thai army have collaborated since 1961 in order to monitor infectious diseases in Southeast Asia. Serum samples are taken from all military conscripts each year. The analysis of these sera provide documentation of the HIV epidemic. Mobility of people for economic and career motives removes them from standard familial influences and exposes them to new cultural and social norms which affect social behavior and may affect their risk of exposure to HIV. Long term protection of future generations can best be achieved with a protective HIV vaccine. A clinical trial is in developmental stages in Thailand using a recombinant DNA vaccine which was rejected by the Federal Drug Administration of the United States. This paper offers an ethical analysis based on the scientific merit of the proposed HIV vaccine trial in Thailand as well as the way in which ethical principles and standards are interpreted in an international context.

The paradigm vaccine strategy, exemplified by the polio vaccine, is to produce a safe, harmless, derivative of the pathogenic virus and entice the immune system into producing resistance so that the host is protected against future exposure to the virus. In the case of HIV, research data show that antibody alone does not entirely prevent virus infection or transmission to others. The vaccine scheduled for clinical trial in Bangkok is a recombinant DNA generated glycoprotein, gp120, the outer most surface protein on the intact virus and the most prominent viral antigen. The plan is to immunize persons with gp120, so that antibody to gp120 would protect the host from future exposure to infectious HIV. However, persons who are infected with HIV have antibody to gp120 and remain infected and infectious. There is scientific reason to question the efficacy of this vaccine and ethical concerns about the proposed clinical trial.

A Bioethics class at Mahidol University in Bangkok evaluated this case using the Utilitarian and Respect for Persons ethical standards. The students decided that the government ought to proceed with the vaccine trial because AIDS is such a serious problem that any effort to help is better than none. This case provides an opportunity to evaluate how ethical standards derived by Western Philosophy apply in a world context and how students of primarily Buddhist philosophy use Western-based standards. The case also encompasses the primary issues of ethical reasoning including autonomy in obtaining informed consent, justice in the allocation of scarce resources, and beneficence or nonmaleficence used to obtain a risk - benefit analysis of the vaccine.

Thailand is only one nation among many that must deal with the current HIV epidemic. AIDS is only one of many health concerns but it is one with significant media visibility and public interest. Therefore, the AIDS crisis is an opportunity to encourage ethical debate in the creation of public policies.

3.7. エイズ・ワクチン裁判と倫理

アン・ルイス・ボイド&ピニト・ラタナクル

世界保健機構は、2千2百8十万人が進行性免疫不全と後天的免疫不全症候群（AIDS）として知られている疾病を引き起こすHIVに感染していると見ています。タイは6000万人の人口を持つ国ですが、うち70万人以上がHIV陽性です。クレードE HIVによる異性間感染の流行は、2年間でバンコクやチェンマイの性風俗産業従事者の1%以下から40%近くに増加しています。アメリカ軍とタイ軍は1961年以来東南アジアの伝染病を監視するために協力してきました。毎年徴集兵全員から漿液標本を採集しています。これらの漿液の分析がHIV伝染の証拠書類となるのです。経済的・経歴上の動機のために人々は移動し、そのために普通の家族性の影響から分離して新しい文化的・社会的規範に接触することとなり、社会行動やHIV感染の危険性が影響されるかもしれないのです。HIV予防ワクチンによる将来の世代の長期的予防が最善策です。タイでは、アメリカの連邦薬剤局に却下された再結合DNAワクチンを用いた臨床試験が発展段階に達しています。この論文はタイで提唱されているHIVワクチンの科学的利点に基づいた倫理的な分析と倫理的原則や水準の国際的な文脈での解釈について述べます。

ポリオワクチンに代表される模範的ワクチン策は安全で害がなく、病原菌から作られ免疫系に抵抗を作らせることにより、被接種者が将来ウイルスから護られます。HIVの場合、研究データから抗体だけがウイルス感染や他者への伝染を防ぐわけではないことが分かっています。バンコクで臨床試験が予定されているワクチンは再結合DNAが生成した糖蛋白質gp120で、完全なままのウイルスの最も外側の表面にある蛋白質であり最もはっきりとしたウイルス抗原なのです。計画としては、gp120で免疫をつけ、gp120の抗体が被接種者が感染性のHIVから護られるようにします。しかしながら、HIV感染者はgp120の抗体を持っていて、感染したままで伝染力を持つことになってしまいます。このワクチンの科学的有効性を疑問視する理由と提唱されている臨床試験に対する懸念があります。

バンコクのマヒドル大学の生命倫理のクラスで「功利主義と人間の尊厳」倫理基準を使ってこのケースを評価してみました。学生は、エイズは重大な問題なのでどのような解決策でもないよりはましだから、政府はワクチン試験を進めるべきだと結論づけました。このケースは、西洋哲学から派生した倫理基準がどのように世界的に適用され、また基本的に仏教思想を持つ学生がどのように西洋起源の基準を使用するのかを評価する機会を提供しています。また、インフォームド・コンセントを得る場合の自律性や、限られた資源の分配に関する公正さや、ワクチンの利害分析をするためにつかわれる善行や非悪行といった倫理的思考の基本概念も関わっています。

タイは現在のHIV流行に対処しなければならない多くの国々の中の1つに過ぎません。エイズも数多くの健康問題の1つに過ぎませんが、メディアで頻繁に取り上げられ、一般大衆が関心を抱いている病気でもあります。従って、エイズ危機は公共政策作成のための倫理的議論を奨励する好機なのです。

3.8. Breakaway From The Medical Misunderstanding of Approaching Life-End

Li Lu

Zhejiang Medical University, China

Brain death has always been one of the most focused on, yet the toughest issues in medicine is approaching life's-end. Because most of the issues relate with the essence of life, which involves conventional conception, scientific knowledge, moral perspectives and individual and social value. That is the main reason why there are so many different opinions about the phenomena and problems in this area between the clinical medicine and theoretical medicine. Furthermore, it is also the core, yet difficult part, to solve the problem. Therefore, we need re-discuss many of the existing medical issues of approaching life's-end with a scientific attitude, in order to break away from all the misunderstandings.

終命に近づくことに関する医学上の誤解からの離脱

中華人民共和国 Zhejiang医科大学 リ・ルー

脳死は常に中心でありながらも、命が終わりに近づくことという医学の最も困難な問題の1つです。それは、問題の大半が因習的な発想、科学知識、倫理的観点、それに個人や社会の価値観といったものに関わっているからです。それがこの分野において臨床医学と医学理論の間に大きな違いが数多くある主な理由なのです。更にまた問題解決のための核となるけれど難しい部分でもあります。従って誤解から離脱するためには、終命に近づくことについて現存する問題を科学的態度で再討議する必要があります。

3.9. Development of Bioethics in China

Cao Kai Bin, Shanghai Medical University, China

In China, development of Bioethics began in 1980's. It has been sixteen years since academic exchanges and study about Bioethics were launched in 1981. During these years of development, there has been eight nation-wide academic conferences (not including symposiums on certain issues). In July 1987, Research Association of Chinese Higher Medical Institution for Medical Ethics was founded in Shandong, sponsored by Shanghai Medical University and other institutions. In Oct. 1988, Chinese Association for Medical Ethics was established during the 5th academic conference held in Xian and Professor Du Zhi Zhen was voted as Chief Council Member. This association is divided into Secretary Department, Committee for Academic Exchange, Committee for Education, Committee for Counseling, Committee for Ethics Law and Committee for Young and Middle-aged Member.

Bioethics takes on a fast development in China as a new edge science. Firstly, Bioethics course is offered to undergraduates and students for secondary education in medical institutions for higher education, hygiene and nurse schools for secondary education and a series of teaching materials have been published. Thanks to teaching of Bioethics, the study of Bioethics in China is deepened. Secondly, various kinds of academic exchanges are widely launched and give impetus to study and development of Bioethics in China. A series of symposiums have been held during the short period. In July 1988, The 1st Chinese Symposium discussing influence of Euthanasia in society, ethics and law was held in Shanghai Medical University. In March 1990, Chinese Morality Symposium was held in Shanghai NO.2 Army Medical University and had a wide discussion on such issues as concept of morality, content of morality e.t.c. In Oct. 1994, The Second Chinese Symposium about Euthanasia and Bed-time Care was held in Shanghai, sponsored by Shanghai Medical University, Shanghai Association for Medical Ethics and other institutions.

Since 1987, a number of books about Bioethics and medical ethics have been published in China. The important works includes: 《Bioethics》 (by Qiu Ren Zhong), 《History of Medical Morality in China》 (by HeZhaoXiong, CaoKaiBin e.t.c.), 《Good Morality》 (by HouLianYuan, LiEnChang e.t.c.), 《Ethical Controversy in Medicine》 (by ShiDaPu).

After Chinese Association for Medical Ethics is founded, it strengthens ties with related academic groups at home and abroad and carries out academic exchanges with other countries. It enhances relationship with related associations in Japan, U.S.A. and signed an agreement about enhancing cooperation and exchange with Japanese association. Furthermore, the association makes much achievements in establishing relationship with other international groups. Now Chinese Association for Medical Ethics has been accepted officially into International Bioethics United Association.

At present, Bioethics in China faces four subjects of study: (1) Medical morality in hygiene reform; (2) Ethical morality in clinical treatment; (3) Some issues in contemporary Bioethics; (4) Issues on goal of Medicine.

3.10. Confucian Perspectives on Suicide and Euthanasia

Lo Ping-Cheung

(Not coming)

Centre for Applied Ethics, Hong Kong Baptist University, HONG KONG

Email: pclo@hkbu.edu.hk

Chinese ethical culture is by no means monolithic. Even within Confucian ethics there have been different schools. Hence when East Asians draw on the resources of their cultures for contemporary bioethical reflection they need to note the variety and multiplicity of traditional ethical perspectives.

In this paper I shall explain that, in traditional Chinese Confucian ethics, there have been four dominant perspectives or theses on suicide. Two of them are in favor of some kind of suicide, whereas the other two are reaction to them. (1) Confucian Thesis I: one should give up one's life, if necessary, either passively or actively, for the sake of upholding the cardinal moral values of ren and yi. (2) Confucian Thesis II: One should actively terminate one's life for the sake of avoiding humiliation or upholding one's dignity. (3) Confucian Antithesis I: One should broaden the scope of one's commitment; instead of dying for a rather limited cause, one should live and die for an object of a higher order. (4) Confucian Antithesis II: When there is no threat to one's life, and when the calling in life is clear, one should live on to fulfill one's vocation in spite of personal tragedy and undignified treatments.

The implications of these four theses on the contemporary bioethical issue of euthanasia will then be spelled out. Their agreements with and disagreements from the western discussions will also be noted.

自殺と安楽死についての儒教的見解

ピン・チョン・ロー

中国の倫理は決して単一というわけではありません。儒教的倫理の中でさえ異なる学派が存在します。従って、東アジア人が生命倫理について考える時に自らの文化に頼るとしたら、伝統的な倫理の見解の多様性を考慮する必要があります。

本論は、伝統的な儒教の倫理では、自殺について主に4つの見解があることを説明します。うち2つはある種の自殺を認めますが、残りは自殺に対する反動です。

(1) 儒教的テーゼ1: 仁と義という主要な倫理的価値のために、必要なら、どのような形であれ自らの命を投げ出すべきである。

(2) 儒教的テーゼ2: 恥を避け、自らの尊厳を維持するためには自殺すべきである。

(3) 儒教的アンチテーゼ1: 自らの責任範囲を広く持て; 限られた大義のために死ぬのではなく、もっと高度な目的のために生きて死ぬべきである。

(4) 儒教的アンチテーゼ2: 生命に危険がなく使命が明らかな場合は、個人的な悲劇や惨めな境遇に負けず、天職を全うするために生き続けるべきである。

これら4つの見解が現代の生命倫理の問題である安楽死にどのような示唆をあたえるか述べることにします。西洋的な論議との一致点や相違点についても述べます。

4.1. Culture and Community in Bioethics: The Case for an International Education Programme

Dr. Francis P. Crawley, UNAIDS Ethical Review Committee, University of Brussels, BELGIUM

In its response to the wonders and challenges of biomedicine and biotechnology, bioethics joins the values of culture and community with the promise of science. While the underlying science of medicine is nearly universal today, distinct and important differences in medical practice continue to be based on tradition and culture. Similarly, while ethics is concerned with the dignity of all human beings, without exception and without discrimination, bioethics must also recognise and give a place to the values of specific cultures and local communities. At the heart of bioethics is education: a cross-disciplinary and cross-sectorial education that takes into account the requirements of the universal and the demands of the local and particular. While science requires specific expertise in order to address the complexity of the challenges to improving the human situation, bioethics needs to incorporate the understandings of many perspectives, giving prominence to the general, lay understanding. Only through a bold international education programme will bioethics be able to address responsibly the specific needs of cultures and communities in the growing complexity of biomedicine and biotechnology. The intellectual, humanistic, and ethical concerns of science need to be situated within the values of specific cultures and communities. An international education programme in bioethics is needed to ensure that the knowledge achieved through science and the values engendered through culture and community are joined without prejudice or discrimination.

生命倫理における文化とコミュニティ 国際教育プログラムの必要性

UNAIDS倫理審査委員会、EFGCP、ブリュッセル大学 フランシス・F・クロウリー

生物医学とバイオテクノロジーの驚異と挑戦に応じて、生命倫理は文化とコミュニティの価値と、科学の約束を結びつけます。今日、医学の基礎をなす科学はほとんど普遍的ですが、医療行為の明確で重要な違いは、今も伝統と文化に基づいています。同様に、倫理学がすべての人間の尊厳を扱う一方で、おしなべて生命倫理も、特定の文化と地元コミュニティの価値を認め、優先させなければなりません。生命倫理の核は教育です。全体の要求と、地元と特定の要求を考慮に入れた、学際的で分野を越えた教育です。科学には、人間の置かれた状況を改善するという複雑な挑戦に取り組むために、特別なノウハウが求められますが、一方、生命倫理は一般的な考えを重視し、さまざまな観点の考えを一つにする必要があります。生命医学とバイオテクノロジーの複雑さが増す中、生命倫理は、大胆な国際教育プログラムを通じてのみ、文化とコミュニティの特殊なニーズに責任を持って取り組むことができるでしょう。科学の知的、人道的、倫理的問題は、特定の文化とコミュニティの価値の中で捉えなければなりません。生命倫理の国際教育プログラムは、科学によって得られる知識と、文化とコミュニティから生まれる価値が、偏見や差別を抜きにして確実に結びつくために必要なのです。

4.2. Teaching Bioethics in Medical Genetics

Mikio Hirayama, Shigeaki Nakazaki*, Kazuo Mano** & Norio Fujiki

Second Dept. Internal Medicine, Fukui Medical School, Fukui, JAPAN

*Kunitaka Clinic

**Neurology Dept. First Nagoya Red Cross Hospital

As was presented at the Japanese Association of Bioethics meeting in Tsukuba, we have carried out opinion surveys of the recent level of knowledge of the Japanese Public concerning medical genetics and also handicaps and extended these to Asian countries, with the kind assistance of WHO, UNESCO and JHGP.

In order to develop cross-cultural ethics, we have examined the ethical views that people hold. Most of the respondents in each country have misunderstandings and prejudices, even in modern societies. Education of the general public through the mass media and especially televisions seems to be effective and have impact. Differences in bioethical decisions were investigated along with the differences in religion, economics and cultures, and while the ethical and emotional conclusions, reached are common to all the countries, the degree of dependence on society varied.

We should discuss very carefully our moral norms and reach our decision on based a common understanding of both newly-developed and traditional value judgments. A curriculum on medical genetics and bioethics for medical students and related professionals is becoming more and more necessary, in order for them to be able to educate the general public.

遺伝医学における生命倫理教育

平山幹生¹⁾、中崎繁明²⁾、真野和夫³⁾、藤木典生¹⁾

1) 福井医大2内、2) 国高診療所、3) 名古屋第一日赤神経内科

筑波での日本生命倫理学会で発表したように、日本人の一般の人々の意識調査を、WHO, UNESCO, JSGPの援助のもとに、さらにアジア諸国の枠を拡げて、遺伝医学や心身障害に対する最近の知識について意識調査を行った。

文化を越えた倫理を確立するため、人々が持つ倫理感を検討した。各々の国の大部分の回答者は現代社会でさえ誤解と偏見を有していた。とくにテレビプログラムなどのマスメディアによる一般の人々の教育は効果的でインパクトがあると思われる。生命倫理的な決定の違いを宗教、経済、文化の違いとともに検討した。社会への依存度は異なっていた一方、倫理的、感情的結論は全ての国に共通していた。

我々は非常に注意深く道徳的規範を討議し、新しく確立した価値判断や伝統的な価値判断の両者について、共通の理解の上にとって決定をしなければならない。そして一般の人々を教育するために、医学生や専門家への遺伝医学や生命倫理学のカリキュラムがより必要であると考えた。

4.3. Medical Education and Japanese Bioethics

Michio Miyasaka,* Haruo Yamanouchi, Koji Dewa (Department of Legal Medicine, Niigata University School of Medicine), Koji Sakurai (College of Biomedical Technology, Niigata University), Niigata City 951, Japan

Many Japanese medical schools are not teaching bioethics or medical ethics as an independent subject, and seldom offer it as practical training during clinical education. We suppose this is due to 1) general problems that relate to Japanese medical education; too much stress on acquisition of knowledge, a lack of theoretical and organizational basis of interdisciplinary fields extending over medicine, humanities, and the social sciences, and to 2) the specific problem for Japanese bioethics as epistemological knowledge rather than practical knowledge.

In regard to the first point, three strategies tried by medical schools in other countries can be applied to integrate medical ethics education into medical curriculum; 1) the formation of a core organization of study and information exchange, 2) the formation of an academic network extending over medical fields, humanities, social sciences, and natural sciences, 3) the promotion of understanding and support for bioethics education of the dean and the college.

The solution for the second problem seems to be hard to address because the tradition of Japanese philosophy is attached to epistemology, and has kept its distance from applied ethics and social sciences. We need to develop educational sources mediating between medical practice, the understanding of natural sciences and moral philosophy. The "four principles" popular in American bioethics can be a cue to methodological reformation, but we believe that refinement of the theoretical system is essential by means of communication between classroom and bedside.

4.4. The Clinical Ethics Education in Saga Medical School, Japan

Masashi Shirahama

Director, Mitsuse National Health Insurance Clinic; Lecturer, Saga Medical School, Mituse 842-03

I spoke about "Medical ethics Education in Saga Medical School in Japan" in the 1st ABC in Beijing. This time I would like to speak about the elective course "Clinical Ethics". In Saga Medical School, of the mandatory 40 lectures of introductory course to clinical medicine for the 4th year medical students, 2 lectures are allotted to "clinical ethics". In this course, first one lecture (90 minutes), students are taught about the history of clinical ethics and one way of ethical thinking of the case using 4-Box (Medical Indication, Patient Preference, QOL, Contextual Features) analysis by AR Jonsen (Univ. of Washington) et.al.

In the second lecture(also 90 minutes), students are to discuss about the clinical case such as "The 40 years old man who had back pain owing to bone metastasis from tumor of unknown origin" What should we do first for this patient as a doctor? "To examine for the tumor origin?","Informed consent?","Pain Control?" There is no one absolute answer. It depends on the case.

For the future education of clinical ethics: 1) We hope to widen this discussion not only to western but also to Asian people. The people who have interest in this discussion, please send us E-mail (HQC00330@niftyserve.or.jp). We will send new ethical case we want to discuss. Perhaps our Japanese culture and feeling is similar to other Asian people. 2) Now we use the ethical analysis (4 box theory) by western people. I think it is also useful to analyze Japanese case. But I think there are some differences between Japanese and western culture. So we hope to revise this way of thinking to fit Japanese cases more easily.

佐賀医大における臨床倫理教育

佐賀県神埼郡三瀬村国民健康保険診療所所長 白浜雅司

私は北京における第1回東アジア生命倫理学会において、「佐賀医科大学における医療倫理教育」と演題で発表しました。今回はその中の選択コース「臨床倫理」の教育について述べたいと思います。佐賀医大では4年生の必須科目40コマの「臨床入門」において、2コマが「臨床倫理」に当てられている。この授業では最初の1時間目(90分)で学生は臨床倫理の歴史とワシントン州立大学のJonsenらによる4分割法(症例を医学的適応、患者の意向、QOL、周りの状況に分けて考えるより方)による倫理的問題の考え方を学びます。

次の2時間目(90分)では「原発不明の骨転移による腰痛で入院した40歳男性患者にどう対応するか」というような倫理的症例を4分割法を用いて討議するのである。われわれは医師としてどうすればいいのだろうか?原発巣を見つけるのか?インフォームドコンセントをとるのか?痛みのコントロールをするのか?絶対的な正解はない。ケースごとに違うのである。

1) 私たちはこの討論を西洋だけでなく、アジアの人とも広げたいと願っています。関心おある方はぜひメールを送って下さい。新しく討論する症例を送ります。E-mail:HQC00330@niftyserve.or.jp たぶん私たち日本人の文化や感じ方はアジアの国々と似ていると思います。2) 現在私たちは西洋の方が作った4分割法で倫理的課題の分析をやっています。私は日本の症例の分析にも有用であると思っています。しかし、日本と西洋の文化には違いがあると思います。それでこの考え方を日本の症例を簡単に考えられるように改善して行きたいと考えています。

4.5. High School Bioethics Education Network in Japan

Yukiko Asada, Email: asada@bombyx.biol.tsukuba.ac.jp

Darryl Macer, Email: macer@biol.tsukuba.ac.jp

Institute of Biological Sciences, University of Tsukuba, Tsukuba Science City 305

Bioethics education is essential to satisfy one of the goals in bioethics, how to develop a broader picture for inclusion of science and technology in democratic discussions. The International Bioethics Education Survey conducted in 1993 supported this notion: over 80% of the biology and social studies teachers from Japanese high schools who responded thought bioethics education is needed. In response to call from teachers to begin or deepen bioethics education, in 1994 we developed teaching materials and distributed these to about 500 teachers, who had requested summary of the survey. Based on the follow-up survey for the material use and several interviews with teachers, we revised the teaching materials in 1996. Announcing the revised teaching materials for all high schools in Japan (over 5000) by fax and post, we have dispersed them to over 800 teachers (<http://www.biol.tsukuba.ac.jp/~macer/TM.html>). The materials are also available in English, and were distributed in Australasia.

With the hope that teachers will be encouraged by exchanging ideas and information with each other, we formed a High School Bioethics Education Network in 1996. About 30 teachers from 14 different prefectures have joined in the network. The network has bimonthly meetings since the end of 1996, and 15-20 teachers participate each time. Applying some skills in environmental education and development education, the teachers now actively exchange opinions, exploring the roles of education in bioethics, and the roles of bioethics in education. The results of these meetings, and the potential for this activity to promote bioethics education in this and other settings, for example among groups of different ages, and within society will be discussed.

日本における高校での生命倫理教育ネットワーク

筑波大学生物科学系 浅田由紀子, メイサー, ダリル

科学技術の利用について民主主義的な議論のもとに意志決定がなされるということは、生命倫理の目指すところであるが、これを実現するためには、生命倫理教育が必要不可欠である。1993年に行った国際生命倫理教育調査では、回答をよせた、日本の高校の生物科、社会科の80%以上の教師が、生命倫理教育は必要だと答え、この調査からも、生命倫理教育の必要性は支持されている。

生命倫理教育をどのように始め、深めていくかを模索している教師に応えるべく、1994年に私たちは、生命倫理教育に関する補助教材を作成し、500部を、先の調査の要約を希望した教師に配布した。教材の使用に関する追跡調査と、数名の教師らとのインタビューをもとに、1996年に、改訂版補助教材を作成した。日本全国の高校(5000校以上)に改訂版教材の無料配布の情報を郵便かファックスで提供し、これまでに、要望のあった800校以上の高校に改訂版教材を配布した (<http://www.biol.tsukuba.ac.jp/~macer/TMJ.html>)。お互いに意見や情報を交換する場を設けることによって、孤立感を味わいつつ生命倫理教育を進めている教師を支援するために、1996年、学校における生命倫理教育ネットワークを発足した。現在、14都道府県から、生物科、社会科の40名強の教師が、このネットワークに参加している。ネットワークでは、1996年12月から、2カ月に1度のペースで勉強会を開いており、毎回、12~20名ほどの教師が参加している。環境教育、開発教育などでよく用いられる討論形式を導入することにより、教師らは徐々に、活発に意見を交換するようになりつつあり、生命倫理における教育の役割と教育における生命倫理の役割を探っている。

今発表では、学校における生命倫理教育ネットワークの勉強会の成果について述べ、さらに、他の年齢層や、社会の中で、あるいは別の国で、この、生命倫理教育のひとつのやり方がどのように応用できるのか、その可能性についても言及したい。

4.6. Internationalization in Japanese Bioethics

Masahiro Morioka

Email: PBI01055@niftyserve.or.jp

In this presentation I am going to give a brief outline of the development of Japan's bioethics since the 1970s, and show how they have thought about the "internationalization" of Japanese bioethics. After that three similar concepts, namely, "internationalization," "modernization," and "westernization" are distinguished from one another.

森岡正博

この発表において、私は70年代以降の日本の生命倫理の展開の簡単なアウトラインを述べて、彼らが日本の生命倫理の「国際化」をどのように考えてきたのかを示す。そしてそのあとで、「国際化」「近代化」「西洋化」という三つの概念が区別される。

4.7. Survey of Portuguese Physicians, Medical Students and Other Health Professionals on the Impact of Science and Biotechnology in Society

M.C.Rosamond Pinto*, M. Pires Bicho*, D. Macer**

* Chair of Genetics, Faculty of Medicine of Lisbon, Portugal

** Institute of Biological Sciences, University of Tsukuba, Japan

A national survey to probe the attitudes of physicians, medical students and health staff viewing "Advances in Biotechnology and Modern Sciences" was conducted in Portugal. This survey was based on the principle that ethics is considered to extend a duty on the part of medical practitioners and health workers to re-contact when and if new developments modify the perspective on problems connected to bioethics.

The survey was conducted through the medical scientific publication "ANAMNESIS" from July 1996 to March 1997. ANAMNESIS is a member of the International Federation of Audit Bureaux of Circulation (I.F.A.B.C.) with an average circulation of 12900 issues per edition distributed freely and nation-wide in Portugal, mainly to general practitioners through mail sent to Health Centres and to the physicians home addresses. The survey was published at a monthly rate and in separate issues always preceded by an editorial according to the subject focused. These subjects in order of publication were: Impact of Sciences and Technology, Screening and Attitudes Towards Diseases, Genetics Engineering, Prenatal Diagnosis, Patents in Biotechnology, The Human Genome, Gene Therapy and Ethics in Genetics. The first issue also displayed an Editorial about the purposes of the Questionnaire, emphasising advantages and disadvantages of these types of surveys, and the generally positive feedback obtained in other countries where the survey was conducted (Macer, 1994).

Surveys No. I to III generated a response of 1070. The majority of answers were from physicians ranging from 30-66 years old being general practitioners with a moderate knowledge of genetic pathology, meaning non-geneticists. About 300 of the answers were from medical students who were provided with photocopies of the surveys. As the Genetics Course is taught in the third year of the medical curriculum covering a total of 6 years, these medical students have a fair knowledge of medical genetics although lacking clinical experience.

Surveys No. IV to VII had a lower feedback response (around 600 answers) as the responses did not include medical students (Genetics is considered as a first trimester course). However, survey No. VIII dedicated to ethical dilemmas in Genetics generated 1000 responses meeting concerns expressed by medical associations, communication media and political parties. Overall most of the responses favoured reproductive genetics and genetic engineering applied to agriculture, industry and medicine. There was a high degree of agreement regarding concerns on ethical and moral issues arising from biotechnology approaches to medicine.

The Survey on "Medical Attitudes Towards Advances in Biotechnology and Sciences" displayed consistency of opinions in topics as genetic engineering, prenatal diagnosis, attitudes towards diseases. Disagreements or non approvals concerning gene therapy, progress in the Human Genome Project and eugenics are discussed given the professional, social, age, religious and other factors of the participants.

4.7. ポルトガルの医師、医学生その他のヘルスケア専門家を対象とした、科学とバイオテクノロジーの社会的影響に関する調査

リスボン大学医学部遺伝学講座 M・C・ロザモンド・ピント、M・ピレス・ピコ
筑波大学 D・メイサー

私たちはポルトガルで、医師、医学生、ヘルスケア専門家の「バイオテクノロジーと近代科学の進歩」観を調べる全国調査を行いました。この調査は、生命倫理関連の問題の展望を修正する新しい展開があったとき、倫理は医療関係者とヘルスワーカーに再接触する義務を課すると考えられるとの原則に基づいて行われました。

調査は医科学系雑誌「Anamnesis」の1996年7月号から1997年3月号で行われました。この雑誌は国際発行部数監査事務局連合の会員で、発行部数は毎号平均1万2,900部です。ポルトガル全土の主に開業医を対象に、医療センターや医師の自宅宛に無料で郵送されています。調査は月1回の割合で別々の号に発表され、常に焦点となるテーマに沿った論説を先に掲載しました。以下にテーマを発行順に挙げます：科学技術の影響、スクリーニングと疾患についての意識、遺伝子工学、出生前診断、バイオテクノロジーの特許、ヒトゲノム、遺伝子治療と遺伝学の倫理。第1回ではアンケートの目的についての論説を掲載し、この種の調査のメリットとデメリット、諸外国の調査での全般的に好意的な反応を明記しました（メイサー、1994年）。

第1～3回の調査には1,070件の回答がありました。回答の大半は、遺伝病理学の知識を多少持つ30～66歳の開業医、つまり非遺伝学者からでした。回答のうち約300件はアンケートのコピーを見た医学生からでした。6年にわたる医学部のカリキュラムで、遺伝学を勉強するのは3年生のため、回答を寄せた医学生は臨床経験はないものの、遺伝医学についてかなりの知識を有していました。

第4～7回の調査の回答は、医学生のものが含まれなかったため（遺伝学は前期の科目とされる）少なくなりました（約600件）。しかし遺伝学の倫理的ジレンマが主題の第8回調査には1,000件の回答が寄せられ、医学団体、マスコミ、政治団体が表明した懸念とも一致していました。全体としてほとんどの回答が生殖遺伝学と、遺伝子工学の農業、産業、医療への応用を支持していました。医療にバイオテクノロジーの手法で取り組むことで発生する倫理的、道徳的問題に対して、一様に懸念が表明されました。

「バイオテクノロジーと科学の進歩に対する医学関係者の意識」についての調査は、遺伝子工学、出生前診断、疾患に対する意識といった話題で、意見が一致していることを明らかにしました。回答者の職業、年齢、社会的地位、宗教その他の社会的要因に照らして遺伝子治療、ヒトゲノム計画の発展、優生学に関する意見の相違、不容認について検討します。

5.1. Women and Reproductive Health in Bangladesh

Hasna Begum

Dept of Philosophy, Dhaka University, , 6 Dhanmondi R/A, Rd. 9, Dhaka-1205, BANGLADESH

Email:

Implementation of the negative aspect of reproductive technologies to prevent the population explosion in Bangladesh neglects the more important issue of reproductive health of the female population in general. The controversy regarding such implementation is highlighted in this paper citing views of women from different professions and sections of society. The discussion aims at finding a happy synthesis between the implementation of reproductive technologies and taking care of the reproductive health care of female clients.

Bangladeshにおける女性とリプロダクティブ・ヘルス

ダッカ大学哲学科、 Bangladesh ハスナ・ベガム

Bangladeshの人口爆発を防ぐために生殖技術のマイナス面を導入することは、もっと重要な問題、とくに女性のリプロダクティブ・ヘルスをないがしろにしています。本論文は、こうした技術の使用を巡る論争を中心に、さまざまな職業と分野の女性の視点に触れていきます。そこでの目的は、生殖技術の導入と女性患者のリプロダクティブ・ヘルスへの配慮の、満足のいく結合を見出すことにあります。

5.2. Fertility Regulation: A Feminist Perspective

Jin Yihong

Institute of Sociology, Jiangsu Academy of Social Sciences, Nanjing, CHINA

Examination of the issue of fertility regulation from a feminist perspective is a totally new approach which is very useful and important in China. First, feminism helps us to penetrate into the facade of "benefit all", and expose the gender difference of interests in sexuality and reproduction. The view of "benefit all" without gender perspective is very popular in China: if a policy is good, it will benefit all. But actually in any putatively good policy and its implementation, the distribution of benefits and costs are not equal among different social groups. Feminism sharply reveals the inequality between men and women in sexuality and reproduction. Sexuality and reproduction are never a natural process, but a socio-natural one. Women's sexuality and reproduction are under the control of two forces: one patriarchal and that from the state. The costs and risks of a population policy are disproportionately placed on women.

Secondly, fertility regulation is not only a population issue, but an issue of gender equality. The solution of population issues should occur in parallel with the promotion of gender equality. Fertility regulation is not a separate, neutral and purely technical process. Provided that there is no change in the cultural context of sexism the stronger the fertility regulation by the state is, the less beneficial it is to the disadvantaged groups. The results of men dominating sexuality and reproduction include that women will take the risks in reproduction, that women will be discriminated for infertility or not giving birth a boy, and that women carry the heavy burden of caring for multiple children.

The consequences of this examination of fertility regulation from a feminist perspective are as follows: any fertility regulation, family planning and population policy should be women-centered, should provide quality of care and promote women's health, and should enhance women's autonomy.

生殖規制：フェミニストの視点

江蘇社会科学院社会学研究所、中国 ジン・イオン

フェミニストの視点から生殖規制を調べることは、中国にとって全く新しい試みで、非常に有益で重要なことです。第一に、フェミニズムは「万人の利益」という外見を突き抜け、性衝動と生殖における利益の男女差をさらけ出す手助けをします。性別の視点のない「万人の利益」観は、中国では非常に一般的です。優れた政策はすべての人の利益になるというのです。しかし現実には、どれほど優れた政策があり実行されたとしても、さまざまな社会グループの便益と費用の分配は平等ではありません。フェミニズムは男女間の性衝動と生殖の不平等を白日の下にさらします。性衝動と生殖は決して自然なものではなく、社会—自然的なプロセスなのです。女性の性衝動と生殖は2つの力に支配されます。家長と政府です。人口政策の費用とリスクは女性の上に不当に重くのしかかります。

第二に、生殖規制は人口問題に止まらず、性の平等の問題でもあります。人口問題は性の平等の促進と平行して解決されるべきです。生殖規制は性の平等と切り放された、中立的で純粋に技術的なプロセスではありません。性差別の文化的状況が変わらないとするなら、国家による生殖規制が強化されればされるほど、恵まれないグループにとって不利になります。男性が性衝動と生殖を支配する結果、女性は生殖でリスクを負ったり、不妊や男児を生まないことで差別されたり、複数の子供の世話で重い負担を背負うことになります。

フェミニストの視点から生殖規制を調べることで、次のような結論が生まれます：どのような生殖規制、家族計画、人口政策も女性中心でなければならず、ケアの質を高め、女性の健康を増進し、女性の自主性を強めるものでなければなりません。

5.3. Assisted Human Reproduction In New Zealand: The Contribution of Ethics

Ken R. Daniels

Department of Social Work, University of Canterbury, Christchurch, NEW ZEALAND

New Zealand, along with most other countries, has witnessed a rapid growth in the provision of assisted human reproduction (AHR) services. The public response to such developments can best be described as a mixture of excitement and anxiety. The New Zealand Government has not taken an active role in monitoring this area, preferring to watch developments in other countries and learn from their experiences. Only minimal legislation has been introduced, this covering the rights and responsibilities of the various parties involved, when their party gametes have been used. Because of the focus on legislation, the Justice Department of Government has taken the lead role in policy matters, setting up two exercises designed to obtain public opinion on the various issues. The Ministry of Health, in 1994, set up an Interim National Ethics Committee on Assisted Human Reproduction - later the National Ethics Committee on Assisted Human Reproduction - and most of the paper will be devoted to exploring its terms of reference, membership and deliberations. It will be suggested that the division of policy (Justice Department) and ethics (Ministry of Health) has implications for government, providers and consumers.

ニュージーランドにおけるヒトの人工生殖：倫理学の貢献

カンタベリー大学社会事業部準教授、ニュージーランド

ケン・R・ダニエルズ

ヒトの人工生殖（AHR）サービスの提供は、ほとんどの国同様ニュージーランドでも急成長しています。この進展に対する国民の反応は、興奮と不安が混ざったもの、というのが最も当たっているでしょう。ニュージーランド政府はこの分野の監視に積極的な役割を果たしておらず、諸外国の発展の様子を見てその経験から学ぶやり方を探っています。さまざまな団体の所有する配偶子が利用される場合、その権利と責任をカバーした、最低限の法律が制定されているだけです。法律に注意が集まっていることから、司法省が政策問題で主導権を採り、さまざまな問題で世論を知るために2つの行動を起こしました。保健省は1994年、ヒトの人工生殖の国家暫定倫理委員会 - 後日、ヒトの人工生殖の国家倫理委員会に改称 - を設立しました。本論文の大半は、同委員会の権限、会員資格、討議の検討に割かれています。政策（司法省）と倫理学（保健省）の分割は、政府、サービス供給者、消費者にとって関係があると提言します。

5.4. The Problem of Sex Ratio in Korea

Song Sang-yong

Hallym University, KOREA

Email: de1811@sun.hallym.ac.kr

Korea was one of few developing countries that were successful in birth control. Since the beginning of the 1960s, Korea has shown rapid decline in fertility. The total fertility rate which was around 6.0 per woman in 1960 dropped to 1.6 by the late 1980s. The use of effective contraception has increased tremendously due to the changing socio-economic factors affecting child-bearing and the continuous promotion of the official family planning programme. It has long been evident that induced abortion has also played a significant role in reducing fertility. Although the absolute number of abortions has been declining recently, it is still at a very high level compared with most Western countries, and when taken as a proportion of total pregnancies, the rate continues to increase. In Korea, increasing abortion brings forth a serious problem in connection with sex ratio.

韓国における男女比の問題

Hallym大学、韓国 Song Sang-yong

韓国は発展途上国の中でも数少ない、産児制限に成功した国の一つです。1960年代初頭以降、韓国の出生率は急速に低下しています。1960年には女性1人当たり約6.0だった総出生率が、1980年代末には1.6に落ちました。効果的な避妊法の活用は、出産に影響を及ぼす社会経済的要因の変化と、政府による家族計画プログラムの継続的な推進により、大幅に増加しています。また人工流産も出生率の低下に大きな役割を果たしていることが、以前から明らかでした。最近では中絶の絶対数は減少していますが、欧米諸国の大半と比べると依然非常に多く、総妊娠数との比で見ると、その割合は上昇し続けています。韓国では、中絶の増加が男女比に関連して深刻な問題をもたらしています。

5.5. Environmental Ethical Cost of T-shirts, Tiruppur, Tamil Nadu, India.

C.Thomson Jacob, and Dr. Jayapaul Azariah, Department of Zoology, University of Madras, INDIA

The Coimbatore-Tiruppur-Erode belt is one of the fastest growing industrial regions in Tamil Nadu, India. Coimbatore and Tiruppur are major industrial towns in Tamil Nadu. The major constraint on the development of this area is the non-availability of fresh water, both for drinking and for industrial use. Improper disposal of sewage and industrial effluent damage the whole ecology of Tiruppur. The untreated effluent from bleaching and dyeing units is released into the Noyyal river, thus creating major environmental problems, particularly with regards to ground water depletion and deterioration of water-quality. The export of T-shirts fetches a revenue in foreign exchange to the tune of 30 billion Rupees a year, but who will pay for the ecological degradation of this town? Demands placed by the textile industry and individual households have led to the conversion of agricultural wells to commercial use for selling water. There is a flourishing private water-market involving transport of water by tankers and bullock carts to users in the Tiruppur area. All users, including the poor, have to pay if they wish to use this source of water. In Tiruppur 30-60 million liters of water are transported to and sold in the private markets daily. The private supply accounts for 50-70% of water used.

The fast depleting water table in the Coimbatore district has forced some farmers to quit agriculture and become either farm or non-farm laborers. They have been pushed to this extreme step because their efforts to deepen wells or change the crop pattern have failed. There was a steep rise in the number of abandoned wells from 4000 in 1960 to 20,000 in 1996. A conservative estimate has put the cost of digging wells at Rs.50,000 a well and hence, the capital loss amount to Rs. 1 billion. In Coimbatore a large number of open wells have become dry and recently the drilling of borewells upto a depth of 750 feet has become a common feature. The heavy withdrawal of ground water for irrigation purposes has resulted in a marked lowering of the water table.

It has been reported that in many parts of the Coimbatore district the water table had fallen to nearly 200 ft during the last 20 years. In the last 10 years the mean water table has declined significantly. The figures(in meters) for the depth of decline are as follows. Avanashi(9), Coimbatore (6), Palladam (5), Pollachi (4) and Vdamalpet (3). The number of wells has doubled from 900,000 in 1996. The area under well-irrigation had increased from 600,000 ha. to 1.4 million ha. during the same period. Owing to competition for water among irrigators by the year 2025, it is predicted that 34 countries will face water scarcity and reduction in per-capita water availability between 1990 and 2025, and that for a country like India, this will reach about 39%. This paper discusses certain remedial measures for the preservation of this ecosystem.

Tシャツの環境倫理コスト—タミール・ナドゥ州ティルプールの場合

マドラス大学動物学部、インド

C・トムソン・ジェイコブ/ジャヤポール・アザリア

コインバトール、ティルプールの、エロードを結ぶ一帯は、タミール・ナドゥ州でも有数のスピードで工業化が進んでいます。コインバトールとティルプールの、同州の主要工業都市です。この地域の発展を妨げる大きな要因として、飲料/工業用の新鮮な水がないことが挙げられます。汚物と工場廃水の勝手な投棄は、ティルプールの生態系全体を悪化させています。さらしや染色の工場からの未処理廃水はノヤル川にそのまま流され、大きな環境問題、とくに地下水の枯渇と水質悪化を引き起こします。Tシャツ輸出は年間300億ルピーもの外国為替取引収入をもたらしますが、生態系悪化のコストは誰が負担するのでしょうか？ 繊維産業や家庭からの需要のせいで、農業用井戸は水を売る商業利用に転換されました。民間水市場は活気づき、タンカーや牛の荷車がティルプール地区の利用者に水を輸送しています。貧困層も含めてすべての利用者は、水が欲しければお金を払わなければなりません。ティルプールの場合、1日に3,000万から6,000万リットルの水が民間市場に輸送され、売られています。民間供給は、ティルプールで消費される水の50から70%を占めます。コインバトール地区の急速な地下水面の枯渇により、農業経営者は農業を捨て、農業または農業以外の労働者にならざるをえなくなっています。井戸を深く掘ったり耕作物を変える努力が実らなかったため、ここまで追いつめられたのです。放棄された井戸は1960年には4,000基だったのが、1996年には2万基と急増しています。井戸を1本掘るには控えめに見ても5万ルピーかかるので、資本損失は10億ルピーにも上ります。コインバトールでは数多くの蓋なし井戸が干上がり、深いもので200メートルも掘り下げるのが当たり前になっています。灌漑用に地下水を大量に汲み上げるため、地下水面が著しく下がっています。

コインバトール地区のあちこちで、地下水面がこの20年間で60メートル近くも下がっていることが報告されています。過去10年間で、地下水面の平均は大幅に低下しています。以下に数字を挙げます(単位メートル)。アヴァナシ(9)、コインバトール(6)、パラダム(5)、ポラチ(4)、ヴダマルペット(3)。井戸の数は1996年の90万基から倍増しています。井戸を利用した灌漑用地は、同時期に60万ヘクタールから140万ヘクタールに拡大しました。灌漑耕作農は競って水を使うため、2025年まで34ヶ国が水不足に直面し、国民1人当たりが使える水は、1990年から2025年の間に減少し、インドの場合、39%減ることが予想されます。本論文では、生態系保護のための改善措置をいくつか取り上げます。

5.6. Need for Ground Water Laws and Water Abstraction Ethics For Industrial Use

Jayapaul Azariah and C. Thomson Jacob, Department of Zoology, University of Madras, INDIA

The rapid growth of industrialization and excessive mining of ground water threaten the very availability and quality of ground water. The depletion of ground water resources and ground water pollution has brought about a scarcity in ground water resources in Tiruppur. Tiruppur is a special grade municipality in the Coimbatore district, Tamil Nadu, India with 400,000 inhabitants. It extends to a total area of 27.19 sq.km. The main industries of the town are hosiery and knitting garments. There are about 187 bleaching and 526 dyeing units making a total of 713 water intensive industrial units which consume a total amount of 91.7 mld of water. Phenomenal industrial growth has generated a huge annual foreign exchange of more than 30 billion Rs per year.

As members of the current generation we may wish to brighten our own welfare, improving during our own lifetime, and treating the needs of the future as less important. As the extent of the general damage increases the question of water rights becomes more urgent. Should future people be treated as if they were already dead? Should this generation care about its actions that will result in a degraded environment in the distant future? If we do care then what should be done? A great deal of thinking and research need to be done to come up with appropriate legal measures with regard to mining and the use of available ground water.

Ground water was not mentioned in any of the lists in the seventh schedule of the constitution of India. This could be because the farmers in their infinite wisdom did not envisage such a water crisis as we are facing today. The fact remains that we are faced with this water crisis. Furthermore all the attempts at action made by the various legislators have only tried to address extraction. None of the bills or acts have sought to deal with the inequity and inequality inherent in the very conceptualisation of ground water. Water should not have been handed out to the regulatory states at the time of the framing of our constitution. The reason why these bills and acts have failed is because the focus of regulation was merely extraction, and the authority vested with this power was based on a political or linguistic divisions of the state.

For an efficient regulatory regime, perhaps we require ecological, and more specifically aquifer-based divisions. The question of rights, those of the landed and those of the landless, need to be addressed within this framework. All attempts that ignore this question remain inadequate, and perhaps we need to look at water and water management more holistically: understanding surface water, ground water and rain water as a common pool of resource or a common world heritage. Segregating/dissecting does not make water management efficient. There is a need to develop a universal bioethics regarding the abstraction of ground water.

地下水法と工業用水汲み上げにおける倫理の必要性

マドラス大学動物学部、インド ジャヤポール・アザリア/C・トムソン・ジェイコブ

インドの急激な工業化と大量の地下水汲み上げは、地下水の供給と質そのものを危機に追いやっています。水源の枯渇と水質汚染により、ティルプールの地下水が減少しています。ティルプールは、タミール・ナドゥ州コイナトール市の人口40万人、総面積27.19平方キロメートルの特別自治区です。主要産業は靴下やメリヤス/ニット製品の製造販売です。同地区にはさらし工場187棟、染色工場526棟の計713の、水を大量に使用する工場があり、合わせて91.7mldを消費しています。脅威的な産業の成長は、年間300億ルピー以上の莫大な外国為替取引を生んでいます。

現代の人間として、私たちは生きていく間により明るい繁栄を望み、未来のニーズを軽視しています。ダメージの範囲が広がれば広がるほど、一般に水の使用権の問題の切迫感は増します。未来の人を既に死んだかのように扱っていいのでしょうか？ 私たちの世代は、遠い未来の環境を破壊する行動を意識すべきでしょうか？ 意識するとしたら、何をしたらいいのでしょうか？ 今ある地下水の汲み上げと利用に関する適切な法的措置を打ち出すには、多くの思考と調査が必要です。

地下水は、インド国憲法の第7付帯条項のどこにも触れられていませんでした。農民たちの英知をもってしても、私たちが現在直面している水問題を予見できなかったからかもしれません。私たちが水の危機に直面している事実は動かさません。どの自治体も汲み上げに取り組んだだけでした。法案も条令も、地下水の概念化そのものが内包する不公平と不平等を扱おうとはしません。水は、憲法立案時に各州の政府に委ねられるべきではありませんでした。これらの法案と条令が失敗に終わったのは、規制の焦点が汲み上げだけにあり、管轄当局が政治や言語で分裂していたからです。

効率的な管理体制のためには、環境にやさしく、とくに帯水層を扱う部署が必要かもしれません。土地を持つ者と持たざる者の権利の問題は、この枠組みで捉えるべきでしょう。権利問題を無視した試みはすべて不適切です。私たちが水と水の管理について、もっと全体的に見るべきかもしれません。地表水、地下水、雨水を共有資源または世界の共有財産として理解するのです。分裂と分断があっては、水管理は効率的に進みません。地下水汲み上げに関する世界的な生命倫理を作り上げるべきなのです。

5.7. Genes, Sex and Ethics

(Not coming)

Prof. Yaman Ors, Dept. Medical Deontology, Ankara University, TURKEY

The distinction between the non-reproducing individual body or soma and immortal reproductive tissue or germ-plasm was first made by A. Weissmann at the end of the last century. Reminding us of this point, Julian Huxley, one of the leading evolutionary biologists of our time, adds that even though this distinction is not always so clear-cut as the former supposed, it is an important one. It begins in metazoa, and the separation grows sharper during the latter's evolution.

In evolutionary terms, human sexual love and sex in biological systems in general can be seen as a means for the continuation of the species. Further, in a similar "objective approach" and at such an "objective level", the reality of sex can be scientifically studied from different points of view. This is indeed realized, on the one hand, and from a biological and/or medical standpoint, at structural, functional, biochemical, molecular levels; and, on the other hand, from psychological, social, anthropological viewpoints, with their possible medical implications.

The concept of the selfish gene might also be considered, possibly, in such a context, above all perhaps as regards reproduction. In addition, the approach of evolutionary psychology provides us with important clues as to such psychobiosocial phenomena as jealousy and sexual aggressiveness. Also our behaviour and the subjective, phenomenological attitude underlying it in connection with human sexuality and its reflections in social life such as family as an institution have definite ethical implications involving different aspects of human interactions. These are certainly worth studying in moral philosophy as well as in social or human sciences.

遺伝子、性、そして倫理学

ヤーマン・エルス

A・ワイスマンは19世紀末、生殖以外の個々の身体、または「体」と、絶えることのない生殖組織、または「生殖質」の違いを初めて明らかにしました。現代の主要な進化生物学者の一人であるジュリアン・ハクスリは、この差異が、必ずしも自身が考えるほど明快ではないものの、重要であるとして私たちの注意を喚起しました。差異は後生動物（メタゾア）で起き、その進化の過程で分化はさらに活発になります。

進化という点では、人間の性愛と生物学的システム全般における性は、種の存続の手段と見ることができます。さらに同様な「客観的アプローチ」と「客観的レベル」で、さまざまな視点から性の現実を科学的に調べることができます。これは実際、片や生物学的そして／または医学的立場から、構造的、機能的、生化学的、分子レベルで、片や心理学的、社会的、人類学的視点から、またその考えられる医学的意味を伴って実現しています。

利己的な遺伝子という概念も、とりわけ生殖に関して、そのような文脈で考えられるかもしれません。さらに進化心理学のアプローチは、嫉妬や性的攻撃性といった精神生物社会的現象に対する重要なヒントを、私たちに与えてくれます。人間の性欲と、それが社会生活に反映された制度としての家族に関して、私たちの行動とその根底にある主観的現象学的意識は、人間の交流のさまざまな側面を巻き込んだ、明確な倫理的意味を持ちます。これらは確かに、道徳学と社会／人文科学において研究する価値があると言えます。

6.1. Human Genome Diversity Studies in South America

Genoveva Keyeux,
Pontificia Universidad Javeriana, COLUMBIA

Human genetic studies are not new in South America. Even molecular genetics has already made a long way in several independent research groups. Two main issues have motivated local scientists to enter a characteristically European or North American scientific domain: the understanding of health and disease is a matter of genes *and environment*, and that of history of humankind is a matter of both social sciences *and genes*.

The historical context, especially of South and Central America, is the shaping and reshaping of populations through at least 30,000 years. In this process, genes that came from the depth of Asia, later from Europe and Africa, mixed together. The resulting present-day populations evolved in environments quite different from those of their ancestors, thus giving origin to unique forms of biological and cultural diversity.

During several decades, and in some cases centuries, anthropologists, archaeologists, linguists, geneticists and other scientists have been working on and with isolated communities in South America, in an effort to unravel and interpret those forms of diversity. In more than one occasion, treasures of jeopardized traditional wisdom, as well as scientific knowledge, were discovered and recovered through the efforts of researchers, whose publications acknowledged such achievements as part of humankind's accomplishments.

In 1994, the Human Genome Diversity Project created a South American Committee, which was joined by several of the most important research groups from the region. Some others, like the Javeriana University's Human Genetics Institute, are still independent research teams. In a context of growing international nationalism and chauvinism, reactions in several parts of the world are due to the way in which HGDP has given the impression that genetic research can be a commodity. Concentration of research within a single group acting as the organization in charge of scientific and economic ruling of investigation, is also perceived as negative.

This opposition has touched not only researchers in the field of genetics, but also of anthropology, ethnobotany, medicine, etc, in many Latin American countries. Other events might also have contributed to this climate of distrust towards research, like political and mass media manipulation.

6.1. 南米におけるヒトゲノムの多様性の研究

Javeriana大学ヒト遺伝学研究所

ジェノヴィーヴァ・ケヨウ

南米ではヒト遺伝学の研究は新しいものではありません。分子遺伝学すら、以前から独立研究グループがいくつか存在します。南米の科学者が、典型的な欧米の科学領域に参入する気になったのには、2つの大きな理由があります。健康と病気の理解は遺伝子と「環境」の問題だということ、そして人類の歴史の理解は、社会科学と「遺伝子」の両方の問題だということです。

とくに中南米の歴史は、少なくとも3万年にわたる住民の形成の繰り返しです。その過程で、アジアの奥地、後には欧州とアフリカからやってきた遺伝子が混ざり合いました。その結果生まれた現在の住民は、先祖とは全く異なる環境の中で進化し、独特な生物学的、文化的多様性の形態を起源に持つようになりました。

数十年、そして場合によっては何世紀もの間、人類学者、考古学者、言語学者、遺伝学者その他の科学者は、多様性を解明しようと、南米の隔絶した地域社会について、そしてその中で活動してきました。一度ならず、滅びかけていた貴重な故知と科学的知識が、研究者の努力によって発見され蘇りました。彼らの論文は、こうした成果を人類の業績の一部と認めています。

ヒトゲノムの多様性プロジェクトは1994年、南米委員会を設立し、同地域のいくつかの中心的研究グループも加わりました。Javeriana大学のヒト遺伝学研究所などは、独立研究チームとして残っています。ナショナリズムと排外主義の国際的な高まりについて言えば、同プロジェクトが、遺伝子研究は商品となり得るとの印象を与えているために、世界各地でこのような反応が生まれているのです。調査を科学的、経済的に統括する一つのグループに研究が集中することも、否定的に見られています。

反対は多くの中南米諸国で、遺伝学分野だけでなく人類学、民族植物学、医学などの研究者にも影響を及ぼしています。その他に政治やマスメディアの操作などの情勢も、研究に対する不信感を煽っている可能性があります。

6.2. Genetic Research and Cultural Integrity

Leonardo D. De Castro

Department of Philosophy, University of the Philippines, Diliman, Quezon City 1104 Philippines

Email: ldecastr@cssp.upd.edu.ph

Some problems pertaining to the acquisition and custody of samples for the Human Genome Diversity Project have partly been attributed to the failure of researchers properly to "educate" research subjects coming from indigenous populations. While this assessment may be correct, it should be noted that education, especially on matters that are culturally debatable, cannot be done instantly. Education does not merely involve the passing on of information from the "learned" to the ignorant. The process involves the appraisal of data within a unique framework containing values and priorities which may differ from, and even radically conflict with those of the research proponents.

The use and transfer of technology involved in genetic research and engineering cannot be evaluated solely from the perspective of the society from which it originates. The educational process that it inevitably involves must proceed at a pace that does justice to the recipients' cultural integrity and mechanisms for cultural adaptation.

Health needs that have the highest priority for urgent genetic remedies in one society may not be thought to deserve similar attention in others. Respect for persons requires that indigenous peoples be given the prerogative of appreciating the value of new technologies within the framework of their own traditions and priorities.

遺伝研究と文化的統一性

フィリピン大学哲学科教授/学科長、ケソンシティ、フィリピン

レオナルド・D・デ・カストロ

ヒトゲノムの多様性プロジェクトのためのサンプルの入手と管理に伴ういくつかの問題は、研究者が土着民の研究対象者を正しく「教育」できなかったことも原因の一つに挙げられます。この評価が正しいとしても、教育、とりわけ文化的に異論のある問題についての教育は、簡単にはできないことに注意しなければなりません。教育は、情報を「学問のある」者から無知な人間に伝えるだけではありません。それは研究者の価値や優先順位と違ったり、激しく対立することさえある価値や優先順位を含む、独自の枠内でデータを評価することも含めたプロセスなのです。

遺伝研究と遺伝子工学に関係する技術の利用と移転は、それらが生まれた社会の視点からだけでは計れません。当然伴う教育的プロセスは、受け手の文化的統一性と適応のメカニズムを正当に評価するペースで進められなければならないのです。

ある社会で緊急の遺伝子治療を真っ先に必要とする健康上のニーズも、別の社会にとってはそれほど注意を必要としないと思われるかもしれません。人を尊重するということは、土着民に、その伝統と優先順位の枠内で新しい技術の価値を評価させることなのです。

6.3. Human Genome Project: Ethical Issues An Islamic Perspective

Anwar Nasim

Advisor Science, COMSTECH Secretariat, 3 Constitution Ave., G-5/2, Islamabad-Pakistan

The sequencing of the three billion base pairs which constitute the total Human Genome has raised a series of ethical questions. These issues have been discussed at great length and also extensively documented. Such discussions also include consideration of the use of such techniques as Gene Therapy, the diagnosis of diseases at an early age and of susceptibility of individuals to a given disease as a result of their hereditary Genetic make-up. Information resulting from the HGP raises serious questions about the limits to privacy, Genetic discrimination used by employers to recruit individuals showing susceptibility to occupational hazards in the workplace.

The answers to such questions will also be greatly influenced by the prevailing religious beliefs and moral values of different societies. Nearly one billion inhabitants of the globe are Muslims and their societies have also taken an interest in the ethical, legal and social implications of the Human Genome project. The present paper will discuss in detail these issues from an Islamic perspective.

6.5. UNESCO IBC Report and an Ethical Oversight Committee on Population Genetics

Darryl Macer, (with support of G. Keyeux, N. Fujiki, J. Fleming, HL. Chee),
Institute of Biological Sciences, University of Tsukuba, Tsukuba Science City, Japan.

We have just heard several perspectives on population genetics, and in particular, the Human Genome Diversity Project (HGDP). In this paper I will summarise the conclusions of a report by a UNESCO IBC subcommittee on population genetics, that I had the privilege to be working on, with the support of several friends attending at the ABC, Genoveva Keyeux, Norio Fujiki, and Heng Leng Chee.

Given the transnational nature of population genetics studies, the issues raised were the subject of a study by the UNESCO International Bioethics Committee. The report has been available on my Internet site since completion in November 1995 <<http://www.biol.tsukuba.ac.jp/~macer/index.html>>. Key points of the UNESCO report were: 1. no endorsement of a particular population genetic project; 2. call for establishment of a separate ethical committee that is available to all population genetics researchers; 3. discussion of variety of ethical, ethnic and social issues.

Current population genetics research is under the oversight of different layers of control which vary widely around the world. This oversight ranges from the discretion of individual researchers, consent from the persons who provide the tissue samples, consent from the groups being studied, to several layers of ethical committee. International regulations on research involving human subjects are clear that informed consent is needed. Some funding agencies demand ethical review, such as NIH-funded research in the USA. Some universities in the world also demand ethical review, and the trend is to have more review.

Some of the ethical issues of population genetics research need to be further addressed include: Consent from individuals; Consent from population groups; How to obtain free and informed consent; Selection and participation; Use of the knowledge gained; Return of benefits to participants; Clash of world-views; Does the right not to know apply to communities?; Who speaks for a community?; Ownership of genes and derived knowledge; Public understanding and racism or eugenics; Stigmatization and genetic reductionism; International oversight of anthropologists & geneticists.

UNESCO IBC報告書と集団遺伝学倫理監視委員会

筑波大学 ダリル・メイサー

これまで集団遺伝学、特にヒト・ゲノム多様性プロジェクト (HGDP) についての様々な意見を拝聴しました。ここでは、UNESCO IBC 集団遺伝学分科会の報告書の結論について簡単に述べることに致します。私はこの分科会に参加させて頂く名誉を拝し、ここABCにご列席のジェノヴェーヴァ・ケーヨワ先生、藤木典生先生、ヘン・レン・チャー先生にご助力頂きました。

集団遺伝学の研究が多国間に渡るため、UNESCO生命倫理委員会の調査の対象となったのがここで取り上げられている問題です。委員会の報告書は1995年11月に完成してからずっと、私のインターネットのサイトで閲覧できるようになっています。この報告書の重要な点は以下の通りです。

- 1 特定の集団遺伝学プロジェクトを推奨することはない。
- 2 全ての集団遺伝学研究者が参加できる独立した倫理委員会の設立を求める。
- 3 様々な倫理的・民族的・社会的問題を討論する。

現在の集団遺伝学研究は、世界中で異なる様々な管理段階での監視下にあります。この監視は、個々の研究者の裁量、組織標本提供者の同意、研究対象グループの同意といったものから、諸々の段階の倫理委員会まで、多岐に渡っています。人間を実験材料にする研究に関する国際規定は、インフォームド・コンセントが必要だという点についてははっきりしています。資金を提供する機関の中には、例えばアメリカ合衆国のNIH助成研究等、倫理審査を要求する所もあります。世界の大学の中にも倫理審査を求める所がありますし、全体としてはもっと審査を行なう傾向があります。

集団遺伝学の倫理的問題の中でもっと検討を要するものには、以下のようなものがあります。

個人の同意・住民グループの同意・どのように自由なインフォームド・コンセントを得るか・選択と参加・得た知識の使用・参加者への利益の還元・世界観の衝突・知らない権利は集団にも当てはまるのか?・誰がコミュニティを代表して発言するのか?・遺伝子とそれに関連した知識の所有権・一般の理解と人種差別もしくは優生学・汚名をきせられることと遺伝的還元主義・人類学者と遺伝学者の国際的監視。

6.6. The Visual Transcription of "Family Disease": A Comparison of the Use of Medical Pedigrees in Canadian and Japanese Genetic Counselling Practices

Yoshio Nukaga

Department of Social Studies of Medicine, McGill University

The focus of this paper has been on medical pedigrees as mediating devices between external and internal, collective and individual aspects of the body, as well as between different professionals. I have examined briefly the sequential transformation of family trees into medical pedigrees, *i.e.* into tools for the production of medical evidence, or, more precisely, for the performance of family diseases and further on, as icons of 'genetic disease.' Medical pedigrees should not be reified: their power as clinical tools lies less inside them than in the fact that they can be mobilized as part of an expanding network of molecular evidence. Yet, one should also be careful not to 'oversocialize' pedigrees: objects and tools play a mediating role in social relations, to which they cannot be reduced.

An implication of my analysis is that the power of genetic knowledge resides not only in technological developments in laboratory work, but also in clinical work where fact mobilization is practiced in the taking of medical pedigrees. While I do agree with several aspects of the argument according to which the application of molecular biology techniques to medicine constitute a radical change of perspective, I hope to have shown that 'new genetics' and its clinical performance resort to apparently 'mundane' tools such as pedigrees, that have a longer, more complex history. This also means that the 'new genetics' is not exclusively grounded in laboratory tools materials, but also resorts to clinical data and records: laboratory samples will not work properly without the accompanying pedigree. For sure, the new genetic network into which pedigrees are by now integrated is a different network from the ones of which they had previously been a part. Yet, these differences should not blind us to the presence of continuities inscribed in the very tool that are transmitted from one period to the other.

Finally, and in relation to my previous point, I hope to have shown that a central issue in relation to which these continuities can be explored is the notion of the family. Quite often, social scientists have approached the topic of human and medical genetics in terms of the twin issues of race and eugenics. The association between pedigrees and family, while certainly at first less dramatic, appears to me as at least as decisive for any detailed exploration of the contemporary mechanisms of 'bio-power' and 'bio-sociality'.

6.7. Ethical Issues in Providing Genetic Services to the Asian Population in New York City

Victor. P. Penschaszadeh, Beth Israel Medical Center, N.Y., USA

The Division of Medical Genetics of Beth Israel Medical Center has been providing comprehensive genetic services to the growing Asian population of New York City for the past several years. A bilingual-bicultural Chinese American social worker from the Chinatown community was trained as a genetic assistant, to identify patients at increased risk of developing an inherited condition or having offspring with birth defects. Patients attending several primary health care centers in Chinatown were screened for increased genetic risks and offered genetic counseling and testing, including prenatal diagnosis. The work of the genetic assistant was at all times supervised by the genetic counseling team of the Division. Brochures in the Chinese language were developed for patient education in issues such as the risks of advanced maternal age, the meaning of screening for maternal serum biochemical markers and the importance of carrier screening for abnormal hemoglobins. The main ethical issues confronted by the medical genetics team in addressing the needs of the Chinese American community have been: 1) Socioeconomic barriers for patients without proper health insurance; 2) The Clash between the non-directive genetic counseling approach followed by the providers and the expectations of patients of being guided in their reproductive decision-making; 3) The role of sex prediction in outcomes of prenatal diagnosis; 4) The submissive attitudes of wives towards their husbands in reproductive decision-making; 5) The role of the extended family in decision-making and in the support network. As expected, recent immigrants showed a greater cultural disparity with western medicine practices than families that have been acculturated for more than one generation.

ニューヨーク市のアジア系住民に対する遺伝的サービスの提供を巡る倫理問題

WHO地域遺伝学及び教育協力センター、アルバート・アインシュタイン医科大学、ベス・イスラエル医療センター、ニューヨーク、米国 V.B.Penschaszadeh

ベス・イスラエル医療センター遺伝医学部門は過去数年間、増え続けるニューヨーク市のアジア系住民に、総合的な遺伝的サービスを提供してきました。チャイナタウンのバイリンガル/バイカルチャーな中国系米国人のソーシャルワーカーが、遺伝アシスタントの訓練を受け、先天性疾患を発現したり、先天的欠損症を持つ子供を生むリスクの高い親を見つけました。チャイナタウンにあるいくつかの一次ヘルスケア・センターに通う患者で、遺伝的リスクの高い者はスクリーニングにかけられ、出生前診断を含む遺伝カウンセリングと遺伝子テストを受けました。遺伝医学部門の遺伝カウンセリング・チームが常時、遺伝アシスタントの作業を監督しました。高齢出産、母体血清の生化学マーカー・スクリーニングの意味、ヘモグロビン異常のキャリア・スクリーニングの重要性といった問題で患者を教育する目的で、中国語のパンフレットが作られました。中国系米国人のニーズに対応するうえで、遺伝医学チームが直面した主な倫理問題には次のようなものがあります：1) きちんとした健康保険に加入していない患者の社会経済的障害、2) カウンセラーの採る非指示的カウンセリング手法と、生殖における意思決定を指示してほしい患者の期待の対立、3) 出生前診断の結果に対して性別嗜好が果たす役割、4) 生殖における意思決定に関して、妻が夫に対して取る従属的態度、5) 意思決定と支援ネットワークで大家族が果たす役割。予想される通り、最近の移民は1世代以上にわたって適応してきた家族に比べて、西洋医療に強い文化的違和感を持っていました。

7.1. Ethical Guidelines for Clinical Genetics in Japan

Mariko Tamai, Shinshu University School of Allied Medical Sciences, JAPAN
Email: mtamai@gipac.shinshu-u.ac.jp

Clinical genetics has mostly treated single gene disorders, which, in a narrow scope, are genetic diseases, and congenital anomalies. However, recent research has shifted its target to include common diseases such as cancer, diabetes and high blood pressure. In western countries rules to match the needs of such target changes are being established.

Also in Japan several associations have begun developing guidelines such as one developed by the Japanese Association of Family Tumor. One such attempt by this association is a set of guidelines for genetic testing. These guidelines had a unique development process and the following characteristics, which have never before been seen in Japan:

- 1) The ethics committee which developed the guidelines consists of not only association members but non-members from outside of the medical community. As a result, academic interdisciplinary discussions were facilitated.
- 2) The guidelines insist upon counseling which takes into account the fact that a strong negative bias against individuals with genetic diseases exists in our society.
- 3) The guidelines distinguish between research and clinical applications, whose distinctions were ambiguous in the past. The guidelines also refer to the fact that many techniques are still in the process of being tested.
- 4) The concerned parties were interviewed in the process of developing the guidelines.

This set of guidelines, including its unique developing process, might become an example for other guidelines in Japan. It is possible that similar ethical guidelines will be developed at a professional level.

7.1. 新しい遺伝医療と日本におけるガイドライン整備

信州大学医療技術短期大学部心理学研究室

従来の遺伝医療 (genetic services) は、単一遺伝子病 (single gene disorders) と言われる疾患、すなわち狭義の遺伝性疾患をその対象とすることが多かった。しかし、そもそも疾患とは、広い意味では「遺伝」と「環境」の相互作用の結果であると言うことができ、その意味において遺伝医療とは、本来狭義の遺伝性疾患のみを対象とするものではない。また近年、主に分子生物学分野における技術革新を背景とし、様々な疾患の病因・病態が遺伝子レベルで解明されるということが急速に進展している。このようなふたつの点から、現代遺伝医療とは、とりわけ90年代において、すでに「common diseaseをも射程内に入れた遺伝医療」として成立している、と言うことができる。

西欧先進諸国では、こうした一般的慢性疾患が遺伝医療 (とくに遺伝子診断) の実質的对象となってきたことを見据え、遺伝情報の特殊性を考慮したガイドライン作りが進んでいる。国際的なガイドラインとしても、世界保健機構 (WHO) が草案を検討中の「臨床遺伝学および遺伝サービスの提供における倫理的問題に関するガイドライン: Guidelines on ethical issues in medical genetics and the provision of genetics services」がある。このガイドラインは、家族計画 (family planning) の文脈、とりわけ遺伝病の予防 (prevention of hereditary disease) と同じ枠組みのなかで登場してきたものである。また、草案起草の段階で優生学に関連する記述が大幅に削除されるなど、「個人の選択」としての選択的人工妊娠中絶と「社会の選択」としての優生政策は違うものであることが強調されている。

「公衆衛生 (public health)」や「一次医療 (primary care)」、さらには「家族計画 (family planning)」などの文脈で語られるようになってきた遺伝医療における国際的潮流を見定めつつ、国内においても実効性のあるガイドライン等の整備が急務の課題として広く認識されるよう、学際的議論の場が必要であろう。

その際に、個人の選択も同じような選択を多くの人ですれば社会全体としてそれを選択したのと結果的には同じであるという、WHOガイドラインでは結果的に削除されてしまった重要な記述の意味していたところなど、遺伝医療の一般化に伴って起きる「個人の選択」と「社会の選択」とのバランスの問題などについて、あらためて問い直す必要がある。なぜなら、ガイドラインには、「個人の選択」を尊重しつつ「社会の選択」としての妥当性を模索する指針としての側面があると考えられるからである。

7.3. Ethical Issues in Genetics in the Next 100 Years

Glenn McGee

Center for Bioethics, University of Pennsylvania, USA

The past 100 years have seen unprecedented changes in how genetics is perceived by children and adults, families and other social institutions. Genetic information has become important for medicine, and scientific genetics has changed more than any other section of modern research. However, in the next century the changes will be more profound and rapid. Some areas of genetic medicine, such as simple genetic explanation of diseases and traits, will fall away. However, genetic diagnosis and gene therapy will become more and more effective as partners to environmentally and nutritionally-based medicine. One very important role of bioethics is to use imagination to plan the allocation of resources, the writing of laws, and the course of training for our children and young professionals in this new world. I will argue that there are three primary areas that must be studied in order that we are prepared. Current bioethics has all but ignored these areas. First, gene therapy and preimplantation diagnosis for 6-8 cell embryos will be thoroughly assimilated into obstetrics technologies. How much should parents be able to use such technologies to design their offspring? What are the moral objections to design of offspring that are most useful in initiating public conversation? Second, public health uses of genetic testing are likely to involve some public pressures on adults and institutions to regulate both the kind of therapy that is available and the times and manner of reproduction. What is a "health" public? How should we think about society for the purpose of regulating genetic testing? Third, it is clear that the maldistribution of public resources in health care cannot continue in the USA and other countries. How will the redistribution of health resources affect genetic research and therapy, and how shall we articulate an international scheme for just distribution among public health, hospitals, home care, genetic medicine, education, and other competing social goods?

今後100年間の遺伝学の倫理問題

ペンシルバニア大学 グレン・マクギー

過去100年間、遺伝学の子供や大人、家族や他の社会制度での受け止められ方は、これまでになく変化してきました。遺伝情報は医学にとって重要になり、科学的遺伝学は近代研究のどの分野よりも変わりました。しかし21世紀には変化はさらに徹底的で急速になるでしょう。疾患と形質の単純な遺伝学的説明など、遺伝医学のいくつかの分野は支持を失います。しかし遺伝診断と遺伝子治療は、環境と栄養に基づく医学のパートナーとして、ますます有効になるでしょう。生命倫理の非常に重要な役割の一つは、想像力を働かせて資源の配分や法の制定、この新しい世界に住む私たちの子供と若い専門家の教育を計画することです。その準備のために調査すべき分野は主に3つあると考えます。現在の生命倫理はこれらの分野を全て無視しています。1つは、6~8個の細胞胚の遺伝子治療と着床前診断を産科学技術に完全に組み込ませることです。親は自分の子供の設計に、どこまでこうした技術を使うことができるのでしょうか？ 子供の設計に対する道徳的反対論で、世論を喚起するのに最も有効なのはどのような意見でしょうか？ 二つ目に、公衆衛生による遺伝子テストの利用は、入手可能な治療の種類と、生殖の時期と方法の両方を規制という、成人と組織に対する社会の圧力に関係する恐れがあります。「健康な」国民とは？ 遺伝子テスト規制を目的とする社会をどう考えたらいいのでしょうか？ 3番目に、ヘルスケアにおける公的資源の不均衡配分は、米国でも他の国々でも続けられません。保健資源の再配分は遺伝学研究と遺伝子治療にどう影響するのでしょうか？ 公衆衛生、病院、在宅介護、遺伝医学、教育、そして他の競合する社会的利益の間の公正な配分のための国際的計画を、どのように組織化すべきでしょうか？

7.4. Moral Controversies on Preimplantation Genetic Testing

Dr. Sahin Aksoy, Centre for Social Ethics and Policy, UK

Preimplantation genetic testing (PIGT) is a recent medical advance, by which embryologists can predict many characteristics of a child-to-be-born as early as the four-cell stage. However, such applications have been subjected to criticism by many writers for a variety of reasons. In this paper I will examine PIGT, and elaborate on the moral dimensions of its use.

The main idea of PIGT is defined as the resolution of the question of the embryos genetic status in high-risk couples before its implication in the endometrium. It is also proposed that it be used in the in vitro fertilization (IVF) process to select embryos on the basis of their genetic make-up using particular quality criteria. PIGT is evaluated as more abstract and less invasive than other prenatal testing (PNT) techniques, and it is argued that abortion, with its ethical, religious, psychological, and medical problems, can be avoided, and the uncertainty of the first weeks up to PNT can be minimized.

But counterposed to these advantages it is maintained that, PIGT has the potential of leading to unjustified termination of pre-embryonic lives, eugenics, increased anti-handicap attitudes and gender selection for "social" reasons. Although there are some other relevant ethical issues, the moral status of the pre-nate is at the heart of these discussions. One writer argued that, to destroy an embryo merely because of its genetic characteristics could signify the reduction of a human life to the sum of its genes. In the hope of providing answers to those questions the moral status of the pre-nate will also be discussed in this paper.

着床前遺伝子テストの道德論

マンチェスター大学社会倫理・政策センター、マンチェスター、英国 サヒン・アクソイ

着床前遺伝子テスト (PIGT) は最近の医学的進歩であり、胎生学者はそれによって産まれてくる子供のさまざまな特徴を、早ければ4個の娘細胞の段階で予測することができます。しかしこうした応用は、多くのジャーナリストからさまざまな理由で批判されてきました。本論文では、PIGTについて検討し、その利用の道德的側面について詳しく述べていきます。

PIGTの主たる概念は、ハイリスクのカップルの胚の遺伝的状況の問題を、胚を子宮内膜に着床させる前に解決するためと定義されています。また「体外受精」(IVF)の過程で、一定の品質基準を用いた、遺伝構造に基づく胚の選別に使うことも提案されています。PIGTは他の出生前テスト(PNT)の技法に比べて、抽象的で侵入性が少ないとされ、倫理、宗教、心理、医療などの面で問題を抱える中絶を避け、PNTまでの最初の何週間かの不安を最小限に止められると評価されています。

しかしこうしたメリットに対して、PIGTは前期胚子の生命を不当な殺害、優生学、障害者に否定的な意識の増長、そして「社会的」理由による性選別につながる可能性を秘めている、という反論はなくなりません。関連する倫理問題は他にもありますが、議論の中心は胎児の倫理的身分です。あるジャーナリストは、胚を遺伝的特徴だけを理由に破壊するのは、人間の生命を遺伝子の集合に貶める、前触れになりかねないと主張します。こうした問いに答を出すことを期待して、胎児の道德的身分についても本論文で検討します。

7.5. Bioethical Issues in Human Genetics in India

Kailash C. Malhotra,

Indian Statistical Institute, 203 B.T. Road, Calcutta 700 035, INDIA

Indian society is an agglomeration of over 40,000 endogamous human groups displaying a rich socio-cultural, linguistic and biological diversity. India is also a mega-biodiversity area of the world with over 1,22,000 wild species of plants and animals. This rich human and other biodiversity, as well as the structure of human populations (variable levels of inbreeding, large families, large number of rare genetic mutations, rare genetic disorders, etc.) continue to attract the interests of researchers from all over the world. However, recent advances in molecular genetic technology using DNA, human genome diversity initiatives (global and Indian), the rush for patenting human genome and other biodiversity by western countries have raised serious ethical issues. This paper discusses the nature of emerging ethical issues and their likely impact on the future of genetic research in India and international collaboration in genetic and biodiversity related research. It discusses the various measures initiated by the Government and the debate generated by scientists, academic bodies and the NGOs. It concludes that while in the immediate run national and international legislation is essential, as well as value-based self-imposed ethics by all involved, in particular the scientific community, in the long run the global community must strive for complete ban on patenting of all life-forms, and create conditions for exchange of genetic materials, processes and technologies without royalty and fear, for the benefit of "every man and woman and humanity as a whole, without infringing the rights of any" (George B. Kutukdjian); these have been the values pursued by human societies the world over, until recently during the course of their short but eventful evolutionary march and must be respected.

インドにおけるヒト遺伝学の生命倫理上の問題

インド統計研究所、カルカッタ、インド

カイルシュ・クリシュナ・マルホトラ

インド社会は同族結婚からなる4万以上の階級グループの集まりで、社会文化、言語、そして生物学の面で豊かな多様性を見せています。インドはまた、12万2,000種以上もの野生動植物が生息する、世界有数の生物多様性を誇る地域でもあります。ヒトその他の豊かな生物多様性、そして人口集団の構造（さまざまな近親交配、大家族、珍しい遺伝子突然変異の多さ、珍しい遺伝病など）は、今も世界中の研究者の関心を引きつけています。しかしDNAを使った分子遺伝学技術の最近の進歩、ヒトゲノムの多様性プロジェクト（世界、そしてインドの）、欧米諸国が先を争って取得しているヒトゲノムその他の生物多様性の特許などは、深刻な倫理問題を提起しています。本論文は、明らかになりつつある倫理問題の性質や、それがインドの遺伝学研究と、遺伝学と生物多様性に関する研究での国際協力の、将来に与えると見られるインパクトについて検討します。インド政府主導によるさまざまな措置や、科学者、学術団体、NGOが提起する議論を取り上げます。国内/国際法や、全関係者、とくに科学界による価値を基本とする自主倫理は今すぐ必要です。しかし長期的には国際社会は、すべての生命体の特許取得を完全に禁止するよう努力し、遺伝物質や遺伝子操作、遺伝子技術を、印税を払ったり不安を感じることなく、「誰の権利も侵すことなく、すべての男性、女性、そして人類全体」（ジョージ・B・クックジャン）の利益のために、取引できる条件を定めなければなりません。これは世界中の人間社会が、その短くも波瀾万丈な進歩の行進の中で、最近まで追い求めてきた価値観であり、尊重されなければならないのです。

7.6. Recent Trends in Bioethics in Medical Genetics & Cloning

Norio Fujiki,

Fukui Medical University; Medical Advisor, TOYOBO Tsuruga Gene Analysis Laboratory;
Secretary General, UNESCO Asian Bioethics Conference

The application of new biotechnology has developed with tremendous speed, and DNA technology has created ethical problems requiring the development of guidelines on medical genetic practices, such as early diagnosis, mass screening prenatal diagnosis, carrier detection of genetic disease, as well as prediction of genetic susceptibility to common diseases, and this development is becoming more and more important to the society we live in. Use of genetic counselling, together with such preventive measures as prohibition of inbreeding and promotion of family planning in eugenic law, have been mostly effective.

Recently medically-assisted procreation, for example in vitro fertilization, embryo transfer, reimplantation diagnosis, has been developed rapidly, and most recently, cloning embryo experiments have been reported. These applications are still in their early stages, and ethical debate on this new reproductive technology.

We should not open Pandora's Box, which might cause the destruction of the whole world, through the misuse, misunderstanding and temptation of biotechnology. We should make every effort to educate the general public, as emphasized by our MURS Campaign and in the UNESCO Declaration.

遺伝医学とクローン技術の倫理的問題点

福井医大名誉教授、東洋紡ジーンアナリシス、ABC'97事務局長 藤木典生

最近とみに急速な発展を遂げてきたヒトゲノム計画の応用にあたって、さまざまな倫理的問題点が提起されてきた。遺伝病の早期診断、新生児マススクリーニング、出生前診断や保因者の検索と成人病の素因の予知など、遺伝医学の臨床的応用に当たってガイドラインの設定が私どもの住む社会にとって益々必要となってきた。また、上述したさまざまな技術と遺伝相談の他に、近親婚の抑止、家族計画の促進といった予防的措置が効果的に運用されてきた。

体外受精、胚移植、着床前診断のような生殖医学の進歩はめざましいものがあり、ことに最近になってクローニング技術の成功が報じられてきたが、まだまだ未熟なものであり、これらの生殖技術について倫理的な討論が望まれている。

科学技術の誤用、誤解と誘惑によって全世界の壊滅を導くようなパンドラ・ボックスを決して開けてはならない。私共の科学の責務協会やユネスコ・ヒトゲノム及び人権保全宣言で強調したように、専門家のみならず一般の人々の啓蒙教育に全力を挙げて努めなければならない。

8.1. ミトコンドリア疾患の遺伝子治療

自治医大生化学 香川靖雄

遺伝子治療の対象となる遺伝子病の頻度には大きな人種差があります。白人で最も頻度が高く遺伝子治療が行われている嚔胞性線維症、黒人に高頻度の鎌状赤血球症、地中海人種のタラセミアなど海外の教科書の遺伝子病は日本には存在しません。日本人に最も高頻度の遺伝子病はミトコンドリア疾患です。600万人の糖尿病患者の1-3%がmt変異によるので我国の単一遺伝子病としては最大頻度で、後述のMELAS変異を伴う糖尿病は日本で10万人を越えます(1)。高血糖による病態や糖尿病性腎症などの合併症も起こります。ミトコンドリア(mt)は酸化リン酸化を行うのでその異常ではmt依存性が高い神経、筋肉の症状を伴う事が多いのです(2)。これがミトコンドリア脳筋症で解糖系の代償的亢進で高乳酸血症を伴います。筋線維にはragged red fiberと呼ばれる異常mtの増加がありmtの電顕像には結晶様封入体が現れます。mtDNAの変異には、核DNAと同様に点変異(Leber病等)や欠失(KSS:Kearns-Sayre症候群等)がありますが、特にタンパク質合成のためのmttRNAの変異や欠失に伴うmttRNAの消失による疾患が多いのです。ミトコンドリア脳筋症にはKSS、MELAS、MERRFの3つの主要臨床病型があります。MELAS (mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis and stroke like episodes)はtRNA(Leu,UUR)の3,243番A→Gの点変異による症例が多く脳卒中、片麻痺、半盲、難聴等の発作を伴います。MERRF(myoclonus epilepsy with ragged red fibers)はtRNA(Lys)の8,344番A→Gの点変異でミオクローヌスてんかんを特徴とします。KSSはmtDNAの部分欠失により15才以前の発症、外眼筋麻痺、非定型的網膜色素変性、心伝達障害の3主徴を持ちます。これらの変異が細胞内の数千のmt全てで起こる場合がホモプラスミーですが、臨床例では同一細胞内に正常mtが混入している(ヘテロプラスミー)。

mtの遺伝は母系遺伝であり、ヘテロプラスミーの程度で重症度が異なります。mt構成蛋白質の大部分は核DNAにコードされているため核DNAによる遺伝子病も多いのです。mtの遺伝の解析にはmtDNAを除去した ρ^0 細胞に脱核によって得た細胞質体を融合させて、核とmtの遺伝子を区別して解析します(3)。病因遺伝子の解明は出生前診断、遺伝子治療を促進しました。この細胞質体を介する新しい遺伝子治療も試みられます(4)。mtDNAは全身の細胞で共通に発現されますので、筋肉mt等の特異性は核DNAは選択的スプライシング(5)やアイソザイム遺伝子の発現によっています。細胞内シグナル伝達系を介する転写やスプライシングの核内の分化機構の制御は将来のmt遺伝子病の解明に重要です。

mtDNAは核DNAの約10倍も変異の速度が速く、変異の蓄積は淘汰の少ない現代社会では特にmtDNAの遺伝子病の増加となって現れます。日本では産婦人科学会は出生前診断を理由とする中絶を禁止しています。しかし生まれた障害児の生涯について両親は最後まで責任を持ってません。放置すれば障害児は淘汰のない現代社会で増加するので、いずれ中絶禁止の考えは破綻するでしょう。日本では遺伝子診断の費用は支出されず、その結果かえって社会の負担を増し、医療資源が不足するなどの現実に直面しています。世論の望んでいる出生前診断は、日本の生命倫理学者は「社会的合意」「胎児の生存権」などの建前論によって、本音は公に語られることはありません。そのため医療や指導が受けられず患者の健康、生命が犠牲になる場合があります。

最後にクローン人間の問題は再生や老化の最終的な解決法として有望ですが倫理、法制、社会問題(ELSI: ethical, legal, social issues)の検討が必要です。現在の方法は個人の完全なコピーではなく、体細胞の核を導入した卵子のmtDNAが使われる点を指摘しておきましょう。

- 1) 香川: 日本内科学会誌 84:135(1995)
- 2) Wallace DC: Ann Rev Biochem 61:1175(1992)
- 3) 林、太田、香川 他: J Biol Chem 269:19060(1994)
- 4) 香川、林: Gene Therapy 4:6-10 (1997)
- 5) 遠藤、松田、香川: J Biol Chem 269:12488(1994)

8.1. Gene Therapy of Mitochondrial Diseases

Yasuo Kagawa, Jichi Medical School, JAPAN

Email: ykagawa@jichi.ac.jp

There are large ethnic differences in the frequency of genetic diseases. Cystic fibrosis, the most common target of genetic treatment in Caucasians, sickle cell anemia, very common in Negroids, and thalassemia, common in the Mediterranean population, are described in many foreign textbooks. However, these are not found among Japanese. The most frequent genetic disease caused by a single gene in Japanese is mitochondrial. The disease of about 1-3% of the 6 million diabetics is caused by mitochondrial mutation, and over 100,000 involve the MELAS mutation discussed below (1). This can result in diabetic nephropathy and many other conditions. Mitochondria (mt) are the sites of oxidative phosphorylation, and thus, the highly energy-dependent brain and muscle are often affected by mt mutation (2). This is mt encephalomyopathy, which is often accompanied by lactic acidosis as a result of a compensatory increase in glycolysis. In the muscle pathological mt known as "Ragged red fiber" is found to increase, and crystalline inclusions are found in electron micrographs of mt.

There are point mutations (Leber's disease etc.), and deletions (KSS: Kearns-Sayre syndrome etc.) in mtDNA, as in nuclear DNA, but diseases of protein synthesis caused by defective mt-tRNA arising from point or deletion mutations are most frequent. The three major clinical types of mt-enkephalomyopathies are KSS, MELAS and MERRF. MELAS (mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis and stroke like episodes) is a mutation of tRNA(Leu,UUR) and a #3243 (A to G) mutation is the most frequent. The symptoms are poplexia, hemiplegia, partial blindness, neural deafness etc. MERRF (myoclonus epilepsy with ragged red fibers) is caused by a mutation of tRNA(Lys) at #8,344 (A to G), and is characterized by myoclonus epilepsy. KSS is caused by a partial deletion of mtDNA, and the onset of trias (external ophthalmoplegia, atypical retinosis pigmentosa, and disturbance in cardiac conductance) before 15 years old. When all the mtDNA in a cell is affected, this is known as homoplasmy. However, in most clinical cases, both normal and mutated mtDNA are mixed in a cell (heteroplasmy). Mt genes are maternally inherited, and the severity of symptoms depends on the degree of heteroplasmy. Since most mt proteins are encoded by nuclear DNA, there are also many mt diseases caused by nuclear genes.

In order to analyze mt diseases, cells devoid of mtDNA, called ρ^0 (rho zero), and cells with no nucleus called cytoplasts are fused together, and in this way, diseases caused by mtDNA and nuclear DNA can be differentiated. The analysis of mutant DNA promoted fetal diagnosis and gene therapy. A new type of gene therapy using cytoplasts is also being developed (4). Since mtDNA is expressed equally in all tissues, tissue-specificity of muscle mt etc. is determined by alternate splicing (5). A control system for the transcription and splicing due to the signal transduction is needed for the future elucidation of mt disease.

Since the mutation rate of mtDNA is about 10 times that of nuclear DNA, genetic diseases caused by mtDNA mutation are on the increase, and are rapidly accumulating in modern society where practically no natural selection exists. However, in Japan, abortion because of genetic diseases discovered by fetal diagnosis is officially forbidden by the Gynecological Society. However the parents cannot take care of the child to be born to the end of the later's life. If this irresponsible attitude of the Gynecological Society continues, genetic diseases will accumulate in a society with no natural selection, and at some point in the future the consensus against abortion will breakdown. In Japan, the cost of fetal diagnosis is not paid for by public insurance. This has the paradoxical result of increasing the burden on society and leading to the present state where we face a shortage of resources. Unfortunately, many Japanese scholars of bioethics insist on a "social consensus" consistent with their own views and "fetal rights". Thus, the prevention of genetic disease by prenatal diagnosis called for by public opinion is not discussed openly. As a result, patients and their families cannot receive proper consultation, and their health and life may be threatened.

Finally, while human cloning is promising as a solution to regeneration and aging, its ELSI (ethical, legal, social issue) need to be discussed. The present cloning technology depends on an oocyte, and a human clone would not be the exact copy of their somatic cell, rather oocyte mt is involved.

1) Kagawa Y: *Japan. J Internal Med* 84: 135 (1995)

2) Wallace DC: *Ann Rev Biochem* 61: 1175 (1992)

3) Hayashi J-I, Ohta S, Kagawa Y et al.: *J Biol Chem* 269: 19060 (1994)

4) Kagawa, Y. and Hayashi, J-I.: *Gene Therapy* 4: 6 (1997)

5) Endo, H., Matsuda, C. and Kagawa, Y.: *J Biol Chem* 269: 12488 (1994)

8.2. Bioethical Aspects of Medical Applications of Human Genome and Gene Therapy Projects in Russia

Victor Ivanov, Russian Academy of Medical Sciences, RUSSIA

The introduction of genomic technologies and artificial molecular devices into routine genetic care, diagnosis and treatment calls for reconsideration of the general ethical code of professional-patient-family-society interactions when dealing with genetic and common diseases. In addition to the universal principles of observance of human rights and dignity, the free and informed consent of a subject and/or his/her legal representatives when undergoing any of other features unfavourably arise related to the nature of genetic disorders, the specific mode of communication of genes in families and populations, the biological safety of the genomic constructs, as well as certain ethnical, cultural, educational and other intrapopulation differences, which are to be taken into account to avoid conflicts and to ensure the just conduct of respective cases. The outlined heterogeneity of population is peculiar to Russia with its about 150 million inhabitants belonging to some dozens of ethnic groups and a dozen, at least, different religious confessions. Research and health care activities within the frameworks of several national projects exemplify the above statements.

ロシアにおけるヒトゲノム／遺伝子療法プロジェクトの医学的応用の生命倫理的側面

遺伝医学研究センター、モスクワ ウラジミール・I・イワノフ

遺伝病のケア、診断、治療にゲノム技術と人工分子装置を導入するには、遺伝病と一般的な病気への対応において、専門家－患者－家族－社会の相互作用の倫理規範全般の再考を必要とします。人間の権利と尊厳の尊重、すべての措置における本人及び／またはその代理人の自由で情報に基づく同意、関連情報の当然のプライバシーといった普遍的原則に加え、遺伝病の性質、家族と国民間の特殊な形式の遺伝子継承、ゲノム構成体の生物学的安全性、そして衝突を避け、各ケースに相応しい行動を取るために考慮すべき、国民間の倫理、文化、教育その他における違いに関連した、数多くの重要点が生まれることは避けられません。ここにまとめた住民の異質性は、1億5,000万人の住民が何十もの民族と、最低でも十いくつかの宗派に分かれている、ロシア特有のものです。いくつかの国家プロジェクトの枠内での研究／ヘルスケア活動が、上記を如実に示しています。

8.3. Gene Therapy: Professionals go further away from Public Opinion

Yasuko Shirai, National Institute of Mental Health, NCNP, JAPAN
Email: shirai@ncnp-k.go.jp

Dramatic advances in the Human Genome Project may open the door to gene therapy not only for hereditary diseases but also certain kinds of malignant tumors and AIDS. Japan's first steps towards gene therapy took place in 1993, when the Health Science Council in Japan issued "Guidelines for Gene Therapy Clinical Research", and in the next year the Guidelines were authorized by the Ministry of Health and Welfare. In 1995, the first Japanese clinical research on gene therapy was started on a five year old boy with ADA by a group of doctors at Hokkaido University Hospital. This work came to a tentative conclusion in 1996. Many other Japanese medical professionals are pursuing similar plans for gene therapy of malignant tumors and AIDS.

To ascertain differences in attitudes to gene therapy between professionals and lay persons, I have conducted two opinion surveys. The first survey, that of experts, was carried out in July, 1994, with the cooperation of the Japanese Society of Human Genetics and the Japanese Society of Inherited Metabolic Diseases. 700 questionnaires were distributed by mail to members chosen from the namelists, and a total of 358 responses were received (a response rate of 51%). The second survey, that of lay persons, was carried out in October, 1996, with the cooperation of three parent associations with handicapped children and a medical consumers' self-help group in Kyoto. 810 questionnaires were distributed to members and a total of 352 responses were received (a response rate of 43.5%). Differences in attitude among the two groups will be examined for six cases of gene therapy.

遺伝子治療：専門家の立場と市民の意見のズレの大きさ

国立精神・神経センター精神保健研究所 白井泰子

ヒト・ゲノム計画の驚異的な進展は、遺伝性疾患に対する遺伝子治療の途を拓いただけでなく、エイズやある種のガンの治療にも応用範囲を拡げようとしています。遺伝子治療へ向けての日本の取り組みは、1993年に厚生科学会議が"遺伝子治療のガイドライン"を作成したことでその第一歩を踏み出しました。このガイドラインを踏まえて、厚生省は1994年に"遺伝子治療臨床研究に関する指針"を出しました。日本初の遺伝子治療は、1995年に北海道大学医学部の医師グループの手によってADA欠損症の5才の男児に対して行われ、1996年に一応の終了をみえています。その他の医師グループも、エイズやガンに対する遺伝子治療を計画しています。

遺伝子治療に対して、専門家と一般の人々とはその考え方にどのような相違があるのでしょうか。このことを明らかにするために、2つの意識調査を行いました。専門家に対する調査は、日本人類遺伝学会と日本先天代謝異常学会の協力を得て1994年7月に行われました。学会名簿からランダムに選んだ700名に対して調査用紙を送付し、358名から回答を得ました(回答率51.1%)。一般の人々に対する調査は、障害児をもつ3つの親の会と京都で医療消費者活動を行っているグループの協力を得て1996年10月に行われました。4グループの会員の中から選んだ810名に調査用紙を送付し、352名から回答を得ました(回答率43.5%)。遺伝子治療に対する両者の見解の相違は、6つの治療事例に分けて検討する予定です。

8.4. Human Genetics and the Integrity of Self: Germline Gene Therapy and Cloning

Maurizio Salvi,

Department of Philosophy, Maastricht University, Postbus 616, 6200 MD, Maastricht, Netherlands

Email m.Salvi@philosophy.unimaas.nl

The purpose of this script is to analyse the ethical meaning of Germ Line Gene Therapy (GLGT) and Cloning (CL). We will found an ethical theory by linking self identity problems to the genetic manipulations. I shall present a new explanatory model in biotech. My evaluation will be based on a kind of approach which is new to the problems considered: analytical philosophy, more specifically the analysis of personal identity as an interpretative key. In particular I will analyse how the genetic identity of human pre-embryos is considered in their different development stages, following Robert Nozick's concepts (Nozick, 1981). The relationship between genotype and phenotype will be analysed with special regard to the degree of organic unity (Moore, G.E., 1964; Nozick, R., 1981). I intend to address the problem of how violation of the genetic identity of the individual could involve the destruction of his/her natural identity and the replacement of the latter with an artificial one

Abbreviations: Germ Line Gene Therapy = GLGT; Cloning = CL; Self Identity = SI

Keywords: Nozick, Embryo, Pre-Embryo, Cloning, Intrinsic Value, Organic Unity.

人間遺伝学と自我の完全性：生殖細胞遺伝子治療とクローニング

マウリツィオ・サルビ

本論の目的は生殖細胞遺伝子治療 (GLGT) とクローニング (CL) の倫理的意義を分析することにあります。自己同一性の問題を遺伝子操作と結び付けることにより、倫理学上の理論を組み立てられると考え、新たなバイオテクノロジーの説明モデルを提唱します。拙論は、分析的哲学、特に解釈上の鍵となる自己同一性の分析といった、この種の問題では従来取られることのなかった方法論に基づくものです。特に、人間の前胎児??の遺伝的同一性をどのように捉えるべきか、ロバート・ノージックの概念 (Nozick, 1981) に従い、発育段階それぞれについて考慮していきます。また、遺伝子型と表現型の関係は有機的統一体の程度に基づき分析します。どのようにして個人の遺伝的同一性の侵害が、個人本来の同一性の破壊と人工的な同一性への変換をもたらすかを検討します。

8.5. Will Nature Protect Itself Against Irresponsible Genetic Manipulation?

- Frank J. Leavitt, The Jakobovits Centre for Jewish Medical Ethics
- Ron Alexenberg, Dept. of Microbiology and Immunology
Faculty of Health Sciences, Ben-Gurion University of the Negev, Beer Sheva, Israel

Much bioethics literature has recorded fears that genetic manipulation may produce weird monsters, or genetically modified plants which might "break loose" and dominate entire ecosystems. We propose to explore the hypothesis that nature may have built-in integrity-preserving methods of defence which set limits to radical tampering with an organism's genome, dooming to failure modifications which go beyond a certain limit. There may also be natural processes by which ecosystems repair themselves, even after profound damage. As known, major disasters cause accelerated evolution. For example, the extinction of dinosaurs opened the niche to allow for the quick evolution of mammals.

Mechanisms which preserve the integrity of the genomes of organisms may include DNA repair enzymes such as the mismatch repair enzymes and loop repair enzymes. Upon fusing the nuclei of human and murine cells, expecting to create a new monstrosity, researchers were dumbfounded to see the new recombinant cell throw out whole human chromosomes one by one. Conversely many gene transfer techniques are useful, such as YAC (yeast artificial chromosomes) transfers into cells. Transgenic mammals are reproductive. Ecosystems may also be protected by the as-yet not understood processes which allowed for re-establishment of flora and fauna in the Chernobyl area.

If the hypothesis under consideration is correct then questions about the ethics of tampering with God's nature may be irrelevant questions because nature is capable of defending itself. A cautious optimism would then replace fears over the future effects of genetic manipulation. Legislation to restrict genetic manipulation might then be unnecessary. But there is truth on both sides of the story. Is humankind able to overcome nature's protection mechanisms? And even if nature will correct itself, the suffering of individuals can be too great. If nature is capable of overcoming our tampering with it, the ethical considerations take on a totally different perspective.

自然は無責任な遺伝子操作から自らを守れるか？

ジャコボヴィッツ・ユダヤ医学倫理センター フランク・J・レヴィット
ベン・グリオン大学健康科学学部微生物・免疫学科 ロン・アレクセンバーグ

イスラエルの伝統を生命倫理に適用するにあたって、私達は古来からの資料にある2つの見解を考慮しました。一方はマイモニデスで、自然の治癒能力に関して楽観的です。しかし、他方はコヘレト（伝道の書）についてのラビの注釈から、私達は自然に対して行なうことに気をつけなければならない、何故なら一度悪化させてしまったら、誰も直せないからだと述べています。

DNA修正酵素、???下垂症、突然変異した細胞の有糸分裂を防ぐ仕組みといった機能を考慮する場合には、楽観的な見解が正しいと仮定しました。自然が私達の過ちの埋め合わせをしてくれるので、無責任な遺伝子工学の心配をする必要はありません。しかし、さらなる研究により私達が間違っていたことが分かりました。自然が自由に使っている自己防衛機能を1つずつ、科学者が征服しようとしているのです。

従って、私達は多大な責任が必要なだけでなく、人類が常に多大な責任を果たすとは限らないので、この奇妙な新しい世界での生き方を教えてくれる新しい精神的な態度 - 恐らく古来の出典になるでしょうが - も必要になるであろうと結論します。そのためには、イスラエルのカバラや東アジアの神秘主義に共通する瞑想の技術が重要になるかも知れません。

C1. Ethics in the Age of Science and Technology

Michio Okamoto

President, Asian Bioethics Conference

One of the most serious problems in our society today is the ethical scandals of those engaged in education and politics in the medical field.

As you know, medical science started in ancient times and developed closely connected with magic and religion. However, in recent times it has come to be based on science and technology. Therefore, now we have to discuss the problem of ethics in science and technology when we talk about medical ethics. I have three points to discuss in this connection.

1. Now we think of highly advanced science and technology when we think of advanced medicine. However, we have to have some ethical boundary between medicine, and science and technology as applied to medicine.
2. Modern science and technology has its origins in the scientific revolution and the body mind dualism of Bacon and Descartes. How were ideas of God, religion and ethics dealt with in their theories?
3. Having contributed so much to human welfare, Western science and technology has at the same time resulted in much harm and many problems, for example the destruction of nature. When approaching these problems we must remember that Western science is not unique and that at various times through history other sciences differing in their cultural backgrounds such as those of China, India and the Islamic countries have existed. These differ in their views of the relationship between Man and Nature, and particularly now when modern Western science is being put to the question over this concern, looking at Eastern and especially East Asian ethics in medicine is of great significance.

C1. 科学技術時代の倫理

アジア生命倫理会議、会長 岡本道雄

最近我が国で大きく問題になっているのは医学そのものと医師の倫理である。一般に知られているように、医学はかつては呪術、宗教などと結びついて発達してきたが、近代の医学はもっぱら科学技術の上に乗っている。従って医学医療の倫理を論ずる場合には科学技術を除外しては考えられない。倫理に関連して、医学と科学技術の問題を考えるとときに、私は次の3つの問題を考えたい。

その1つは科学技術の先端をもって医学の先端と考えられているが、医学に対して科学技術を応用するに際しては医学上から何らかの倫理的限界が要るのではないか。

もう1つは一般に近代の科学技術はベーコン、デカルトの科学革命による心身二元論に由来すると言われているが、科学技術における倫理という問題はどう扱われていたのか。科学革命の祖といわれるデカルトについて神、宗教、道徳という問題を考えてみたい。

第3は近代の西洋科学技術は人類に多くの便宜を与えたが、同時に自然破壊などの多くの問題を惹起している。この際に当たって、西洋の科学というものが唯一のものではなく人類の歴史においてはそれ以外にイスラム、インド、中国、それぞれ文化的背景の違いによって異なる科学があったはずである。これは自然と人間との関係に関する見解の相違によるものであって、現在西洋科学技術が人間と自然との関係において問われているときに、この度東洋、特に東アジアの医学について倫理を考えることの意義は極めて大きい。

今回第2回ユネスコアジア生命倫理会議が成功に終わったことを心から喜んで前途の発展を祈るものである。

P1. Bioethics Surveys and Universal Approaches To Biotechnology

Darryl R.J. Macer

Institute of Biological Sciences, University of Tsukuba, Tsukuba Science City, 305, Japan.

Email: macer@biol.tsukuba.ac.jp

International research raises the issue of how universal bioethics are, and whether different standards can be applied to different peoples. Results of an International Bioethics Survey conducted in more than a dozen countries since 1993 suggest the same diversity of opinions on many issues raised by biology is found inside each society. Some examples of the results will be discussed to illustrate this point, and the methodology discussed. There are three ways to think of the term “bioethics”, one is as descriptive bioethics - the way people view life and their moral interactions and responsibilities with living organisms in life. Another is prescriptive bioethics - to tell others what is good or bad, what principles are most important; or to say something/someone has rights and therefore others have duties to them. Both these concepts have much older roots, which we can trace in religions and cultural patterns that may share some universal ideals. A third type is interactive bioethics, where different people or groups discuss the above two types of bioethics.

生命倫理調査とバイオテクノロジーへの普遍的アプローチ

筑波大学生物科学系 ダリル・R・J・メイサー

国際調査は、普遍的生命倫理をどのように、そして異なる基準をはたして、違った人々に適用できるのかという問題を提起します。1993年以來、10カ国以上で行われた国際生命倫理調査の結果は、どの社会にも、生物学が生んださまざまな問題に対して多様な意見があることを示しています。いくつかの調査結果を使ってこれを例証すると共に、方法論にも触れていきます。「生命倫理」という言葉には、3つの考え方があります。一つは生命、道徳的交流、生命体への責任の捉え方としての、記述的生命倫理です。もう一つは、他人にことの善悪や、どの原理が最も重要かを指示したり、ある物／人に権利があるから他は従う義務があるとする、規範的生命倫理です。いずれの概念も歴史は古く、普遍的理想をいくつか共有すると見られる、宗教的文化的パターンを辿ることができます。第3の考え方は双方向生命倫理で、さまざまな人々やグループが、先の2つの生命倫理について話し合うというものです。

P2. Human Relationships with Animals in Asia Pacific Countries and Bioethics

Kyoko Yokoyama, Darryl Macer,

Institute of Biological Sciences, University of Tsukuba, Tsukuba Science City, Ibaraki 305, JAPAN

Email: macer@biol.tsukuba.ac.jp

An analysis of comments made by respondents to the International Bioethics Survey conducted in 1993 in 10 countries of the Asia-Pacific region that mentioned animals was made. There were more comments including animals in response to the open question on images of nature than images of life. The proportion of the total comments that included animals ranged from 12-56% for nature, and from 5-28% for life. Russian respondents were the least likely to mention animals, and Australians most likely.

Among the images of nature which included animals, the most common types of relationships were: aesthetic (36%), naturalistic (27%), discussing pollution (17%), ecologicistic (13%), biocentric (9%), harmony including humans (9%), humanistic (6%), utilitarian (4%), scientific (1%), with moralistic, negativistic and doministic comments less than 1%. Among the images of life which included animals, the most common types of relationships were: biocentric (32%), ecologicistic (17%), aesthetic (16%), discussing pollution (11%), naturalistic (10%), humanistic (8%), harmony including humans (7%), moralistic (6%), scientific (6%), utilitarian (2%), negativistic (1%), and doministic (0.3%). There were few differences between countries, for example, there were more naturalistic comments in India, Hong Kong, the Philippines and Singapore; more ecologicistic in Australia; more biocentric comments in Australia and Japan; and more comments with the idea of harmony including humans in Thailand. In general, respondents who mentioned animals were more supportive of the statement that "animals have rights that humans should not violate"; and less positive and more negative in perceptions of science; and less willing to approve of genetic engineering of a sports fish. However, there were very few differences in environmental attitudes. Rural respondents had a tendency to express more comments about animals in their image of life, and expressed the idea of harmony including humans more.

アジアと環太平洋諸国における人間と動物の関係と生命倫理

筑波大学生物科学系 横山恭子、メイサー、ダリル

1993年、アジアと環太平洋地域の10か国でおこなった国際生命倫理調査の結果を用い、コメントを分析した。本調査には、自然と生命にたいするイメージについて自由表現形式の質問を設定していた。そこに動物に関するコメントが含まれていた。自然のイメージと生命のイメージについて得た回答の国別全数のなかで動物に関してのコメントが含まれていた割合は、以下のものであった。自然についての回答については

12%~56%、生命についての回答については、5%~28%であった。ロシアの回答がもっとも少なく、オーストラリアの回答が最も多かった。動物に対するイメージを含でいた、自然に対するコメントをタイプ別に表わすと以下のものであった。美観的コメント(36%)、自然主義的コメント(27%)、反虐待的コメント(17%)、生態的コメント(13%)、生物中心的コメント(9%)、人間を含む調和を表現したコメント(9%)、人道主義的コメント(6%)、功利主義的コメント(4%)、科学的コメント(1%)、道徳的コメント(1%未満)、否定的コメント(1%未満)、支配的コメント(1%未満)。

動物に対するイメージを含でいた、生命に対するコメントをタイプ別に表わすと以下のものであった。生物中心的コメント(32%)、生態的コメント(17%)、美観的コメント(16%)、反虐待的コメント(11%)、自然主義的コメント(10%)、人道主義的コメント(8%)、人間を含む調和を表現したコメント(7%)、道徳的コメント(6%)、科学的コメント(6%)、科学的コメント(6%)、功利主義的コメント(2%)、否定的コメント(1%)、支配的コメント(0.3%)。

この結果は、各国間でほとんど違いは見られなかった。各国の傾向として、インド、ホンコン、フィリピン及びシンガポールは、自然主義的傾向、オーストラリアは、生態的傾向、生物中心主義的傾向はオーストラリアと日本に見られた。また、人間を含む調和を表現するコメントは、タイにおおかった。

動物に関して回答した回答者は概して比較的「動物が権利を持ち、人間はそれを犯すべきでない」といった擁護的意見をもつものがおおかった。また、科学的知識を受け入れることに積極的でなく否定的であり、遺伝子工学やつりを歓迎しないものがおおかった。地方の回答は、生命にたいするイメージを問う質問に、動物についてコメントする割合が多かった。そしてその内容は、人間を含めた調和を表現するものであった。しかしながら、環境に対する態度に関しては、ほとんど違いが認められなかった。

P3. Attitudes toward Molecular Genetics Predictive Testing: Case Study of Familial Amyloidotic Polyneuropathy in Kyushu Island

Kaori Muto (The Health Care Science Institute)*

Setsu Akutsu (Japan Juvenile Education College)

Jiro Nudeshima, Ph.D (Mitsubishi Kasei Institute of Life Science)

Shohei Yonemoto (Mitsubishi Kasei Institute of Life Science)

*The Health Care Science Institute, Akasaka Noa 5F, 3-2-12 Akasaka, Minato-ku, Tokyo 107

Email: VZF11033@niftyserve.or.jp

FAP is an autosomal dominant genetic disease with prominent peripheral and autonomic nerve involvement. We conducted a semi-structured interview study to understand the attitudes of people with FAP and medical professions toward predictive genetic testing in Kyushu Island. As results, we have found some differences between the patients association, who wanted to promote the test to root out the disease, and medical professions, who have shown the reluctance to provide the service. We would like to discuss how the difference arise from the social and cultural context.

家族性アミロイドーシス (FAP)は、末梢神経と自律神経において顕著な障害を伴う常染色体優性遺伝の難病である。FAP患者・家族と医療専門職との間に、発症前遺伝子診断に対する考え方の違いがあるかどうかを明らかにするために、九州の集積地をフィールドとして聞き取り調査を行った。その結果として、病気を撲滅させたいとして診断の実施を促進したがった患者会と、診断サービスの提供には積極的でなかった医療専門職との間に違いがあることがわかった。そうした違いがどのように生じるのかについて、患者や家族の社会的文化的文脈に沿って検討したい。

P4. Key Issues in Bioethics in Japan

Jiro Nudeshima

Mitsubishi Kasei Institute of Life Sciences, 11, Minami-Ooya , Machida-shi, Tokyo 194

Email: jiron@libra.ls.m-kagaku.co.jp

The state of advanced medical procedures in Japan is riddled with some unsettling contradictions. Some are performed without serious debate nor regulation, while others are not permitted or timidly performed under strict scrutiny. I would like to show two fundamental problems which I think account for this situation. One is lack of medical profession's self-governing organization, the other is lack of regulation system covering all experimentations involving human subjects. I would also like to point out a lack of national center in Japan for coping with international standard-setting and propose what must be done.

日本の生命倫理の何が問題か

日本では先端医療の実施にある矛盾したばらつきがある。あるものは議論も規制もなしに広がる一方で、別のものは許されないか、非常に厳しい規制のもとで細々と行われている。この状況の原因として、二つの根本的な問題を指摘したい。医学界の自己規制組織のあり方と、臨床試験の管理のあり方の二つである。さらに国際的なルール作りに対処できる国の中心がないことも指摘し、何がなされるべきかについて私見を述べてみたい。

P5. Biodiversity Conservation and Ethics: Sacred Groves and Pools

K.C.Malhotra (1), Shashi Stanley (2), N.S. Hemam (1) and Ketaki Das (1)

1. Indian Statistical Institute 203 B.T. Road, Calcutta 700 035, INDIA

2. Integrated Rural Development of Weaker-sections in India Semiliguda 764036, Orissa, INDIA

Throughout human history people have evolved cultural ethos and institutions to promote long term persistence of biological communities. These traditional systems of conservation have taken the form of sacred sites (sacred groves, ponds, sacred species). The objectives of the present study are: to report sacred groves and a sacred pool from West Bengal and Orissa, India; to describe the ethical values associated with these sacred sites; and to examine the bearing of such ethical practices in biodiversity conservation efforts.

The materials presented in the paper comprises of field surveys carried out in sacred groves (SG) of seven villages of West Bengal and 200 villages of Orissa. Besides, a sacred pool in Orissa has also been described. The main findings of the present study are: (i) in all SGs there are strict cultural taboos in harvesting of plant biomass and hunting of animals; (ii) none of the forest products in the SG can be exploited for commercial purposes; (iii) all SGs were found undisturbed; (iv) in the sacred pool harvesting of fishes and other aquatic fauna and flora are strictly forbidden; (v) the protection of sacred sites is maintained by belief in powers of resident spirits and deities, and no policing or monitoring is carried out by humans, and (vi) persons violating the established norms and values are generally not punished, instead are punished by local spirits/deities.

In all studied villages, the communities, irrespective of ethnicity, religion, language, age or gender observe traditional values and ethics in maintaining the biological and cultural integrity of the sacred sites. Such values and ethics related to sacred sites have a strong bearing on the conservation of dwindling biodiversity. There is plenty to learn from such prudent cultural practices related to care and use of natural resources.

生物多様性の保存と倫理：聖なる森と池

カルカッタ インド統計研究所 カイラシュ・C・マルホトラ/N・S・ヘمام/ケタキ・ダス

オリッサ インド農村後進部門総合開発 シャシ・スタンレー

人類の歴史を通じ、私たちは生物界の長期的持続性を高める文化的特性と慣習を発展させてきました。こうした伝統的な保存制度は聖地（聖なる森や池、神聖な種）という形を取っています。今回の調査の目的は次の通りです：西ベンガル、オリッサの両州の聖なる森と池についての報告；聖地の持つ倫理的価値の説明；生物多様性保存活動におけるこうした倫理習慣の意味の調査。

本論文で発表するデータは、西ベンガル州の7村とオリッサ州の200村にある聖なる森で行われた実地調査のものであります。またオリッサの聖なる池1カ所についても説明します。今回の調査では主に次のような発見がありました：

(i) 全ての森で採取できる植物量と動物の狩猟に厳しい文化的タブーが存在する；(ii) 森の生産物を営利目的に利用できない；(iii) 森はどこも荒らされていなかった；(iv) 聖なる池では魚その他の水生動植物の採取は厳しく禁じられている；(v) 聖地はそこに宿る霊や神の力の信仰によって守られ、人間による警備や監視は行われていない；(vi) 確立された行動規範や価値を破る者は普通罰せられず、代わりに土着の霊と神に罰せられる。

調査が行われたどの村落でも、民族、宗教、言語、年齢、性別を問わず、聖地の生物学的、文化的全体性を維持する伝統的価値と倫理が見られました。聖地についてのそのような価値と倫理は、消滅しつつある生物多様性の保存に大きな意味を持っています。天然資源の保護と利用についての節度ある文化慣習には、学ぶべき点が数多くあります。

P6. Women and Environment

Dua Kamal Kumar

Dept. of Zoology, Dayalbagh Educational Institute, Dayalbagh, Agra, 282005, India

Women are society's most important resource managers. In some countries, they perform 80% of the work in running the household, in supplying such essentials as water and firewood, and in farming. Unfortunately, women have not received proper recognition due to lack of status in the society, education, land property rights etc.. Traditionally, they have been by-passed when training, technology and access to technical assistance were being passed around. Further, environmental degradation has made their task even heavier. Deforestation has made them to walk even further, access to safe water has sickened their children and desertification has taken their cropland. The latter has led to the migration of the bread winner to other areas for employment, thus putting added burden on the women. Environmental problems are social problems. The time a woman spends dealing with the ramifications of environment declines which include searching for food, collecting drinking water helping her children to grow and earning money.

Thus there is a need to improve the social environment of women. This is only possible by providing education to women, low cost technology for maintaining their house related work and decision making power within community. The problems of women require attention and solution has to be passed on to them. The reason is simple as the woman holds the key to a sustainable environment and development.

女性と環境

インド アグラ ダヤルバ教育研究所動物学部 デュア・カマル・クマール

女性は社会で最も重要な資源の管理者です。国によっては、家事、水や薪といった必需品の補充、農作業などの仕事の80%を担っています。残念ながら女性は社会的身分、教育、土地所有権などがいないため、十分に認められていません。訓練、技術、専門的支援へのアクセスが広まるときも、伝統的に女性を素通りしてきました。さらに環境破壊が彼女たちの負担をますます重くしています。森林伐採によって歩く距離は長くなり、安全な水の確保は子供たちを疲れさせ、砂漠化によって耕作地が奪われています。砂漠化によって稼ぎ手が別の雇用分野に移るため、女性の負担が増えています。環境問題は社会問題なのです。環境破壊のついで、女性は食料を探し、飲み水を汲み、子供を育て、お金を稼ぐことに時間を費やしています。

したがって女性の社会環境を改善させなければなりません。これは女性に教育を受けさせ、家事作業のための安い技術と、コミュニティ内での意思決定権を与えることでしか実現しません。女性問題に注意し、彼女たちに解決策を示さなければなりません。その理由は単純です。女性が持続可能な環境と開発の鍵を握るからです。

P7. Multiple Authorship in Japan and the West

Michael D. Fetters, M.D., M.P.H., Lecturer, Department of Family Medicine, University of Michigan Medical Center.

Todd S. Elwyn, J.D., Fourth-year student, University of Michigan Medical School. Fulbright Graduate Research Fellow, Department of Law, University of Tokyo.

Objective: To assess and compare the mean number of authors per article in a Japanese and a Western biomedical publication.

Design: The numbers of articles and authors appearing on original contributions, case studies, or communications in Japanese Circulation Journal (JCJ) and Circulation Research (CR) for the years 1983, 1993, and 1996, were tallied and means calculated.

Main outcome measures: Mean number of authors per each article type.

Results: There were 1,590 original research contributions to JCJ by 246 Japanese authors for a mean number of 6.5, and range of 1-13 authors per article. There were 2,022 original research contributions by 461 non-Japanese authors to CR for a mean number of 4.4, and range of 1-16 authors per article. There were 296 authors on 45 case reports in JCJ for a mean of 6.6 authors per case report with a range of 2-12 authors, and 225 authors on 59 communications in CR for a mean of 3.8 authors per communication with a range of 1-11 authors per article.

Discussion: In the years 1983, 1993, and 1996 there were roughly 2-3 more Japanese authors per article in the Japanese Circulation Journal than there were non-Japanese authors per contribution in Circulation Research. Groupism and the hierarchical structuring of Japanese research groups arguably account for legitimately larger number of Japanese authors per contribution than non-Japanese authors per contribution. These data and analysis illustrate that publication of the results of scientific inquiry is in fact the interface between the scientific method and the culture of the contributing investigators.

日本及び欧米の複数の論文執筆者

ミシガン大学医療センター地域医療部 マイケル・D・フェッターズ

ミシガン大学医学部4年

東京大学法学部フルブライト卒業研究員

トッド・S・エルウィン

調査目的：日本と欧米の生物医学出版物の論文1本当たりの平均執筆者数を比較、検討します。

調査手法：日本国内で発行された雑誌と発行部数調査において1983年、1993年、1996年の3年間に初出の論文、ケーススタディ、文書の本数と執筆者数を数え、平均数を計算しました。

主な算出数：論文タイプ別平均執筆者数

調査結果：国内雑誌に寄せられた日本人執筆者246人による1,590本の初出研究論文1本当たりの平均は6.5人で、1～13人にわたりました。部数調査に寄せられた日本人以外の執筆者461人による2,022本の初出研究論文1本当たりの平均は4.4人で、1～16人にわたりました。国内雑誌に寄せられた日本人執筆者296人による45件のケーススタディ1件当たりの平均は6.6人で、2～12人にわたりました。部数調査に寄せられた外国人執筆者225人による59件の文書1件当たりの平均は3.8人で、1～11人にわたりました。

論考：1983年、1993年、1996年の3年間に国内雑誌に発表された論文1本当たりの日本人執筆者数は、部数調査における論文の外国人執筆者数より、1本当たりにして約2～3人多くなくなっていました。論文1本当たりの日本人執筆者数が外国人執筆者数をはっきり上回った理由は、日本の研究集団の集団主義と階級構造にあると考えられるでしょう。これらのデータと分析は、科学研究の成果の発表が、実際は科学的手法と研究者の文化の結合の産物であることを物語っています。

P8. Interface Between Faunal Biodiversity and Cultural Heritage in Southwest Bengal, India

Kailash C. Malhotra and Ketaki Das

Indian Statistical Institute, 203, B.T. Road, Calcutta 700 035, INDIA

This paper examines the interface between faunal biodiversity and cultural heritage among forest dwelling communities of southwest Bengal, India. Data on species diversity, abundance, temporal changes and the relationship between wild fauna and the local communities were gathered from 20 villages, 10 each in once degraded but presently regenerating forests and in well preserved forests. In depth interviews were carried out among 369 households. The main findings of the study are: (i) the number of species in preserved forest villages was substantially higher ($n = 170$) compared to the regenerating forests ($n = 124$); (ii) the local communities hunted a variety of animals - mammals, birds, reptiles, amphibians, fishes etc; (iii) animals species hunted were significantly higher (53%) in preserved forest compared to regenerating forests (24%); (iv) significant inter-ethnic variation were observed in terms of number of species hunted and their quantities; (v) besides animals being consumed as food, the relationship between animals and local people is intimately connected with their social, cultural, economic and religious aspects; (vi) the communities practice an elaborate set of taboos, rules regulations in terms of harvesting of animals, and (vi) the persistence of faunal biodiversity, especially the ones that are harvested, is clearly because of prudent cultural ethos practiced by the indigenous cultures, rather than the State sponsored legislations and Acts.

動物相の生物多様性とインド南西ベンガル地方の文化遺産の接点

カルカッタ インド統計研究所 カイラシュ・C・マルホトラ/ケタキ・ダス

この論文では動物相の生物多様性と、インド南西ベンガル地方の森林村落の文化遺産の接点を探っていきます。種の多様性、豊かさ、一時的変化、そして野生動物と地元村落との関係についてのデータを、20の村から収集しました。一度破壊されたものの現在回復中の森林と、保存状態の良い森林からそれぞれ10村ずつ選びました。369世帯を対象に詳しい聞き取り調査を行いました。それにより主に次のような事実が判明しています：(i) 保存されていた森林の村の種の数(170)は、回復中の森林の種の数(124)よりかなり多かった；(ii) 地元村落はほ乳類、鳥、は虫類、両生類、魚などさまざまな動物を捕っていた；(iii) 狩猟対象の動物種は、回復中の森林(24%)よりも保存されていた森林(53%)のほうがかなり高かった；(iv) 狩猟対象種の種類と量は民族間で大きく違っていた；(v) 食料として消費される他に、動物と地元民との関係は、社会、文化、経済、宗教の各側面と緊密に結びついていた；(vi) 村落は動物の狩猟に関し、手の込んだタブーや規則、規制を遵守していた；(vii) 動物相、とくに狩猟される動物相の生物多様性は、州が後ろ盾の法律よりも、明らかに地元文化が遵守する節度ある特性に維持されていた。

F1. Welcome address

Masakatu Sudo, President, Fukui Medical University

It is our great pleasure to welcome many distinguished participants from various countries to the Satellite Symposium on Medical Genetic Services and Bioethics in Fukui as the 6th International Bioethics Seminar in Fukui.

Advances in science and technology have brought about remarkable benefits to mankind. This year is the 20th anniversary of neonatal mass screening in Japan, one type of genetic test. The purpose of neonatal screening is to secure early identification of problems and provide prompt treatment, and consequently, beneficial results have been obtained.

Recent progress in medicine, especially gene medicine, has opened the door to gene diagnosis, gene therapy, and biodrugs for example. However, as everything has two sides, benefit and disadvantage, it is causing various new problems, legal, ethical and social, which were never experienced in the history of human evolution. Therefore, it is important to make every effort to prevent or minimize the adverse effects.

At the UNESCO Asian Bioethics Conference in Kobe, these issues were discussed from various points of view such as law and ethics, Asian bioethics, education, human genome project and gene therapy. In this symposium also, the present state and perspectives of medical genetic services and bioethics in various countries will be presented and discussed.

I hope this symposium will stimulate a multidisciplinary discussion on the compatibility of medical genetic services and bioethics which is essential for medical genetic services that will lead to improved life for every individual.

福井医科大学長 須藤正克

サテライトシンポジウム遺伝医学サービスと生命倫理を第6回福井倫理セミナーとして開催し、様々な国から優れた参加者をお迎えすることは、われわれの大きな喜びであります。

科学や技術の進歩は人類に著しい利益をもたらしました。今年は日本における遺伝検査の1つである新生児マススクリーニングが実施されて20年目にあたります。新生児マススクリーニングの目的は問題のある新生児を早期に発見し、直ちに治療を開始することであり、それによって好ましい成績が得られています。

医学、特に遺伝子医学の最近の進歩は、遺伝子診断、遺伝子治療、生物薬剤などに道を開きました。しかし物事には総て両面、即ち利益と不利益がある様に、法的、倫理的、社会的な新しい問題を惹き起し、これらの問題は人類進化の歴史において、かつて全く経験されなかったものであります。従って、好ましくない影響をなくするか、最少にする努力が重要であります。

神戸のユネスコアジア倫理カンファレンスにおいて、これらの問題が法律、倫理、アジア生命倫理、教育、ヒドゲノムプロジェクトや遺伝子治療などの様々な見地から議論されました。今回のシンポジウムにおいても、様々な国における遺伝医学サービスと生命倫理の現状と展望が述べられ、議論されることになっております。

遺伝医学サービスが人間一人一人の生活の改善につながるためには欠くことのできない遺伝医学サービスと生命倫理の両立について、多くの学問にわたる議論を促進することを期待しております。

F3. Welcome and Explanatory Speech

Masaru Kuriyama,

Program Committee Chairman, Dept. Internal of Medicine, Fukui Medical University, Fukui

Welcome, all participants, to our Fukui Symposium. Before starting this one day symposium in Fukui, I as a chairman of advisory committee in Fukui Medical University, would like to explain to you briefly the history of our International Bioethics Seminar in Fukui and the UNESCO Asian Bioethics Conference (ABC) in Kobe, and just how we planned this symposium. UNESCO ABC '97 follows up the International Bioethics Seminar in Fukui held in 1987. At this first meeting we welcomed Prof. Jean Bernard, former President of the French National Academy of Science who gave a plenary lecture on Activities of National Bioethics Committee. At the time the symposium was little known in Japan, but it was followed by conferences in 1990, 1992, 1993, and in 1995 a joint conference with UNESCO IBC and MURS Japan.

We have discussed ethical, legal and social problems raised by the rapid progress of human genome research, in order to make what we might call a hybridoma between science, technology and humanity. We have also decided to continue cross cultural discussion on bioethics, and to strengthen friendship between biologists, physicians and bioethicologists, philosophers, lawyers, educators, economists and administrators as well as the general public world wide, with special focus in this Asian Conference.

Almost 400 Japanese and 50 foreign panelists have joined in our ABC'97 in Kobe from Nov 4-7, leading to its great success. Taking this excellent opportunity, we have planned to continue discussion on the control of hereditary diseases, which has hitherto been discussed by the WHO Scientific Group in Geneva since 1993 and was published in TRS 865 in 1996. This will take place at this WHO-assisted Satellite Symposium on Medical Genetics Science and Bioethics, under the kind support of WHO, UNESCO and the Japanese Society of Human Genetics, in International Convention Hall which opens here in Fukui, today Nov.8, 1997.

After heated discussion at ABC'97 during the last 4 days in Kobe, I hope many of you enjoyed the bus tour to Fukui and appreciated the traditional beauty and spirit of Japanese Handmade Paper and the Eiheiji Zen Experiences.

Now, we will start our whole day of discussion. First of all after this opening session, Dr. Bulyzhenkov, Head of the Hereditary Disease Program of WHO, will give a plenary lecture on the HD Projects of WHO, to be followed by Dr. Wertz, Head of Social Science, Shriver Center, who will talk on the WHO Guidelines. After a short coffee break, we will proceed to the first panel discussion on Recent Trends in Each Country by 7 panelists and the 2nd panel discussion on International Consensus Survey by 4 panelists, chaired by Dr. Bulyzenkov and Dr. Fujiki, respectively. After lunch, discussion continues by Japanese and Foreign Commentators will continue for three hours, after reading out of TRS 865 (1993) and the Guidelines on Ethical Issues in Medical Genetics and the Provision of Genetics Science 1995, translated into Japanese in 1997, which will act as reference sources for this Symposium. Probably, you have already received and read them carefully. After receiving any suggestions, we are planning to publish the proceedings for further education of the general public by the end of March 1998.

I hope you will enjoy this meeting and the farewell party afterwards until 18:00 and will go back to your countries bearing with you the tremendously fruitful results of this meeting. Thank you for your attention.

F3. 開会にあたって

実行委員会委員長 福井医科大学第二内科教授 栗山 勝

福井シンポジウムに御参加の皆様、開会にあたりまして福井医科大学実行委員会を代表致しまして御挨拶致します。

まず、福井における国際生命倫理セミナー、神戸におけるユネスコ・アジア生命倫理会議（ABC）の歴史、および、このシンポジウムがいかに計画されたかを申しのべます。ユネスコ・ABCは1987年福井で開催されました国際生命倫理セミナーに引き続くものであります。この時、前フランス科学アカデミーのJean Bernard教授をお迎えし、生命倫理委員会の活動に関してすばらしい講演をいただきました。その頃は日本ではあまりよく知られていませんでしたが、その後1990年、1992年、1993年、1995年とユネスコ、IBC、MURS（日本）とのジョイントセミナーとして開催してきました。

我々はヒト遺伝子研究の急速な進歩により生じた倫理的、法的、社会的問題を、いわば科学技術と人間性とのハイブリドームを作るため議論してきました。また、生命倫理に関する異分化間での議論を継続し、全世界の公的機関のみならず生物学者、医師、生命倫理学者、哲学者、弁護士、教育者、経済学者、行政官などの間での協調感を強化することを、特にアジアの会議に焦点をしばり行ってきました。

今回11月4日～7日の間にABC' 97神戸では、約400名の日本人、および40名の諸外国からのパネリストが集まり多大な成果をあげることができました。このすばらしい機会に遺伝病のコントロールに関する議論を続けることを計画しました。これは、これまでも1993年以来ジュネーブのWHO 科学グループにより議論され、1996年にはTRS865に出版されたことであります。

今回、本日11月8日ここ福井国際コンベンションホールにおきまして、WHO、ユネスコおよび日本遺伝学会の協力のもと、遺伝学と生命倫理に関するサテライトシンポジウムの開催をWHOが援助して実現したものであります。

神戸における4日間のABC' 97の熱心な議論の後、多くの方が越前和紙と永平寺の禅の伝統ある美と精神を楽しんでもらった事と思います。

早速本日の会議を始めたいと思います。まず最初にこのオープニングセッションの後、WHOの遺伝病プログラム主任のBulzhenkov先生に、WHOのHDプロジェクトに関する講演をいただき、その後Shriver Centerの社会科学主任のWertz先生からWHOガイドラインに関する講演を予定しております。

短い休憩の後、第1番目のパネルディスカッションとして7人のパネリストによる各諸外国における最近の話題、第2番目のパネルディスカッションとして4人のパネリストによる国際統一調査を各々、Bulyzenkov先生とFujiki先生の座長のもと予定しております。

昼食後、このシンポジウムの参考資料としてTRS865と遺伝医学の倫理的諸問題および遺伝サービスの提供に関するガイドライン、これは1997年に日本語訳されておりますが、これを読みあげた後、日本と諸外国のコメンテーターによる3時間の議論を予定しております。おそらく、すでにお手元に送付され十分に読まれていることと思います。実質的な提案を受けた後、1998年3月末までに公的機関の教育の為に、会議録を出版する計画であります。

皆様方には、この会議とその後6時までのさよならパーティを楽しまれ、たくさんの豊富な収穫を得られることを願っております。

F5. Proposed WHO Guidelines on Ethical Issues in Medical Genetics and the Provision of Genetics Services

Dorothy C. Wertz, Head, Social Sciences, Shriver Center, Watham, USA

In 1995, WHO released a 117-page draft of ethical guidelines, covering education, genetic counseling, screening, testing, prenatal diagnosis, and DNA banking. The major recommendations were as follows:

1. Services available to all, regardless of ability to pay
2. Non-directive genetic counseling
3. Voluntary rather than mandatory services, except when early diagnosis would benefit a newborn
4. Disclosure to patients of all clinically relevant information
5. Confidentiality maintained, except when there is high risk of serious harm to relatives at genetic risk.
6. Protection of individual privacy from employers, insurers, schools, and government agencies.
7. Prenatal diagnosis performed only to detect genetic conditions or fetal malformations.
8. Availability of and respect for voluntary, individual choices about counseling, screening, testing, assisted protection, and abortion following prenatal diagnosis.
9. Equal treatment for adopted children under the guidelines.
10. Established procedures for review of and informed consent to research. Preimplantation diagnosis permitted.
11. National reviews of protocols for human gene therapy.

This draft will be revised and finalized at a December 15-16 meeting of international advisors at WHO in Geneva.

遺伝医学における倫理的問題及び遺伝的サービスの規定に関するWHOの指針案

ドロシー・C・ウェルツ、(社会科学、専攻) シュライヴァー精神遅滞センター、マサチューセッツ

WHOは1995年、教育、遺伝カウンセリング、遺伝子スクリーニング、遺伝子テスト、出生前診断、DNA銀行などをカバーした、117ページにわたる倫理指針の草案を発表しました。主な勧告は以下の通り：

1. 支払い能力の如何を問わず、すべての人が利用できるサービス
2. 非指示的な遺伝カウンセリング
3. 早期診断が新生児の利益となる場合を除き、強制的ではなく自発的なサービス
4. 患者に臨床的に関係のあるすべての情報の開示
5. 遺伝的リスクを負う親族に深刻な危害が及ぶ恐れが強い場合を除き、秘密を保持する。
6. 雇用者、保険会社、学校、政府省庁からの個人のプライバシーの保護
7. 出生前診断は遺伝的状態または胎児の奇形の発見のみに用いる。
8. 出生前診断後のカウンセリング、スクリーニング、テスト、人工授精、中絶に関する自発的個人的な選択の行使とその尊重
9. WHO指針に基づく、養子に対する平等な扱い
10. 研究に対する審査及びインフォームド・コンセントについての確立された手続き。着床前診断を認める。
11. ヒトの遺伝子治療のためのプロトコルの国レベルの審査

この草案は、12月15、16日にジュネーブのWHOで開かれる、国際顧問の会合で修正され完成となります。

F6. Some Current Questions in Medical Genetics in the UK

Derek F. Roberts

University of Newcastle upon Tyne, U.K.

The 1990's have seen a shift in the ethical issues encountered in the U.K. Partly this has been associated with increased awareness of the potential applications of new knowledge deriving from molecular investigation, and the problems which may ensue, and partly with changes in the laws regarding the status of the child and the fetus. The emphasis has altered from questions of the ethics of medical procedures (e.g. prenatal diagnosis, pregnancy termination) to those of confidentiality, consent, rights and responsibilities not only of the individual concerned but also of others both within and outside his immediate family circle. A selection of issues of current relevance in Britain and the procedures that have evolved to deal with them are presented. These include commercial questions e.g. the use of genetic data in insurance applications, molecular testing by private companies, patenting genetic data, and the genetic testing of children.

連合王国における遺伝医学の最近の問題

ニューキャッスル・アポン・タイン大学

D・F・ロバーツ

連合王国で生じた倫理的問題は1990年代に転換期を迎えました。これは、分子研究のもたらした新しい知識の応用の可能性とその結果生ずる問題に対する認識が高まったことと、子供と胎児の地位に関する法律の変更に伴うものです。医療手段（例えば、出生前診断や妊娠の終結）の倫理についての問題から、当該の個人だけでなく肉親以外の人も含めての機密性、同意、権利や責任へと、重点が変わってきました。英国で現在問題となっている問題とその解決策として生まれてきた方法について幾つか発表します。遺伝データの保険への適用、私企業による分子テスト、遺伝データの特許化、子供の遺伝テストといった商業的問題も含みます。

F7. Medical Genetics Services in Russia

Vladimir I. Ivanov, Director, Research Center for Medical Genetics, Moscow, RUSSIA

Medical genetic activities in Russia include both research and clinical practice. Research covers a wide spectrum of problems from genomics to population and ecological studies of genetic and genetics related common diseases. Clinical genetics is aimed at diagnosis, prevention and treatment of these diseases, including prenatal and preclinical DNA, biochemical and chromosomal studies. A number of research institutes, universities, federal, regional and local medical genetic units are involved in the activities. The introduction of genomic technologies and artificial molecular devices into routine genetic care, diagnosis and treatment calls for reconsideration of general ethical code of professional-patient-family-society interactions in dealing with genetic and common diseases. In addition to universal principles of observance of human rights and dignity, free and informed consent of a subject and/or his/her legal representation in undergoing any of the procedures, due privacy of relevant information, etc., there unavoidably arises quite a number of features related to the nature of genetic disorders, the specific mode of communication of genes in families and populations, the biological safety of the genomic constructs, as well as certain ethical, cultural, educational and other intrapopulational differences, which are to be taken into account to avoid conflict and to ensure just conduct of individual cases. The outlined heterogeneity of the population is peculiar to Russia with its approximately 150 million inhabitants belonging to some dozens of ethnic groups and a dozen, at least different religious traditions.

ロシアの医療遺伝学サービス

遺伝医学研究センター ウラジミール・I・イワノフ

ロシアの医療遺伝学の活動には、研究と臨床の両方があります。研究はゲノム学から遺伝病と遺伝による一般的な病気の人口・生態学的調査まで、幅広い問題を網羅しています。臨床遺伝学は病気の診断、予防、治療を目的とし、出生前/前臨床DNA、生化学、染色体などの研究が含まれます。いくつもの研究所や大学、連邦、地域、そして地方の医療遺伝学ユニットが、こうした活動に関与しています。遺伝病のケア、診断、治療にゲノム技術と人工分子などを導入するには、遺伝病と一般的な病気への対応において、専門家-患者-家族-社会の相互作用の倫理規範全般の再考を必要とします。人間の権利と尊厳の尊重、すべての措置における本人及び/またはその代理人の自由で情報に基づく同意、関連情報の当然のプライバシーといった普遍的原則に加え、遺伝病の性質、家族と国民間の特殊な形式の遺伝子継承、ゲノム構成体の生物学的安全性、そして衝突を避け、各ケースに相応しい行動を取るために考慮すべき、国民間の倫理、文化、教育その他における違いに関連した、数多くの重要点が生まれることは避けられません。ここにまとめた住民の異質性は、1億5,000万人の住民が何十もの民族と、最低でも十いくつかの宗教に分かれている、ロシア特有のものであります。

F8. Genetic Services in Latin America: Issues and Challenges

Victor P. Penchaszadeh, Beth Israel Medical Center, N.Y., USA

Email: VPenchaszadeh@BETHISRAELNY.ORG

The development of medical genetics in Latin America and other third world countries has been slow and uneven compared to the industrialized nations. The main reasons for this lag have been: 1) The large load of morbidity and mortality due to environmental factors; 2) a lack of political will to address health problems in a comprehensive and equitable manner, with consequent meager public health budgets; 3) the poor understanding of genetics by health authorities, with subsequent lack of health care policies that include prevention of genetic disease and of financial resources earmarked for genetic programs within the public health sector; 4) a deficiency of trained clinical geneticists and laboratory genetics personnel; 5) deficient teaching of clinical genetics in medical schools; 6) poor coordination between teaching hospitals and general medical services; 7) the clash between "high-tech" and "primary care" services modalities; 8) a poor grasp of the intercultural nuances of genetic counseling; 9) the criminalization of abortion. The genetic services most commonly available are clinical genetics, cytogenetics and prenatal diagnosis of chromosome abnormalities and fetal malformations. On the other hand, diagnosis and management of inborn errors of metabolism is poorly developed and very few countries have sound newborn screening policies. DNA based diagnosis is even less developed. Most existing services are concentrated in large urban centers and accessible only to the small proportion of wealthy patients that can pay for them. Addressing the above mentioned issues is a major challenge for clinical geneticists and health professionals in general. Steps in the right direction include: epidemiological research to determine the distribution and impact of genetic disease and longitudinal teaching of clinical genetics; health authorities becoming conversant in medical genetics; clinical geneticists becoming more interested in community applications, development of cost-effective criteria for genetic services, utilizing existing resources and coordinating with programs like prenatal care, family planning and child growth and development follow-up clinics. Genetic services must be prioritized and regionalized, with strong links with primary care services at the community level. These steps will require coordination at national and local levels in each country and interaction between clinical geneticists, medical schools and public health officials. Education of the public at large and development of voluntary patient-oriented organizations will play an important role in ensuring that genetic services serve the needs of the population.

中南米の遺伝的サービス：問題点と挑戦

WHO地域遺伝学及び教育協力センター， アルバート・アインシュタイン医科大学， ベス・イスラエル医療センター， 医療遺伝学部 V.B.Penchaszadeh

中南米及び他の開発途上国の医療遺伝学の発展は、先進国に比べて遅く、ばらつきが見られます。遅れの主たる原因として、1) 環境要因による高い罹患率と死亡率という大きな負担、2) 保健問題に包括的かつ公正に取り組もうという政治的決意の欠如と、それが原因の乏しい公衆衛生予算3) 遺伝学に対する保健当局の理解不足と、それに伴う、遺伝病予防や公衆衛生部門の遺伝プログラムへの財源の配分といったヘルスケア政策の欠如、4) 熟練した臨床遺伝学者と遺伝学の研究スタッフの不足、5) 医大での臨床遺伝学教育の不足、6) 大学付属病院と一般の医療サービスとの調整の悪さ、7) 「ハイテク」サービスと「プライマリーケア」サービスの手法の衝突、8) 遺伝カウンセリングでの異文化間の微妙な違いに対する認識不足、9) 中絶の犯罪化。

最も一般的に利用できる遺伝的サービスは臨床遺伝学、細胞遺伝学、染色体異常と胎児奇形の出生前診断です。一方、先天性代謝異常の診断と管理は進まず、ほとんどの国にはしっかりした新生児スクリーニング政策がありません。DNAベースの診断はさらに遅れています。既存のサービスのほとんどは大都市中心部に集中し、費用を出せる一握りの富裕層しか手が届きません。上記の問題への取り組みは、臨床遺伝学者と医療従事者全般にとって大きな試練です。正しい方向へのステップとしては次のものがあります。*人口中の遺伝病の分布とインパクトを明らかにする疫学研究、*臨床遺伝学の包括的長期的教育を含めた医大カリキュラムの近代化、*保健当局が医療遺伝学に通じる、*臨床遺伝学者が地域利用にもっと関心を持つ、*遺伝的サービスのための費用効率の高い基準の開発、*既存の資源の活用や、出生前ケア、家族計画、子供の成長と発達のフォローアップ・クリニックといったプログラムとの連携。

遺伝的サービスは、地域レベルのプライマリーケア・サービスと強い絆を持ちつつ優先化、地域化されなければなりません。こうしたステップは各国の国と地域レベルの連携や、臨床遺伝学者、医大、公衆衛生職員の交流を必要とします。一般市民の教育と患者本位の任意団体が、国民のニーズに応える遺伝的サービスの確保に重要な役割を担うことでしょう。

F9. Primary Prevention is Better than Secondary Prevention

Istvan Dudas & Andrew E Czeizel, WHO Collaborating Center for Community Control of Hereditary Diseases, National Institute for Public Health, HUNGARY

There are two possibilities for the prevention of a certain group of major congenital abnormalities. After the detection of developmental defects by ultrasound scanning, the majority of parents informed choose elective abortion. However, this secondary prevention is not the optimal solution, and we have done our best to introduce primary preventive methods.

Periconceptional supplementation with folic acid and vitamin B12 containing multivitamins can reduce the occurrence of neural tube defects and some other major congenital abnormalities, mainly cardiovascular and urinary tract defects. At present, 3 approaches to supplementation with folic and vitamin B12 exist: (i) consumption of a diet that is rich in folate and other vitamins; (ii) periconceptional supplementation; and (iii) fortification of food to ensure appropriate folic acid and vitamin B12 consumption for all women of childbearing age who are capable of becoming pregnant.

一次予防は二次予防に優る

WHO地域による遺伝病コントロール協力センター、NIPH、ヒト遺伝学・奇形学部

アンドリュー・E・チェイツェル

主な先天性異常の中でもある種のもの予防には、2つの可能性があります。超音波スキャンによって発達障害が見つかり、異常を知らされた親の大半は選択的中絶を選びます。しかしこの二次予防は最適の解決策とは言えず、私たちは一次予防手段の導入に全力を尽くしてきました。

葉酸とビタミンB12を含むマルチビタミンを妊娠前後に補充することは、神経管異常その他の主要先天性異常（主に心臓血管と尿路の異常）の発生を減らします。現在、葉酸とビタミンB12の補充法には次の3つがあります。1) 葉酸その他のビタミンが豊富な食事を取る、2) 妊娠前後の補充、3) 出産適齢にあり妊娠可能なすべての女性が、適量の葉酸とビタミンB12を摂取できるよう、食品を強化する。

F10. Background of the proposed guidelines for genetic counselling and testing in Japan

Ichiro Matsuda

Kumamoto University, School of Medicine, Kumamoto, JAPAN

Email: ichiro@kaiju.medic.kumamoto-u.ac.jp

In 1948, three years after the end of the Second World War, the Eugenic Protection Law was promulgated in Japan. Under this law, legal abortion is permitted only if a family member has one of approximately 30 listed disorders, in which genetic diseases are not included. Fetal inborn error in itself was not legal grounds for an abortion: Most abortions done after prenatal diagnosis has been performed for socio-economical reasons. In 1996, the law was revised to become the Maternal Protection Law, and all eugenics was excluded. However, scientific progress, such as genetic test, gene analysis, prenatal diagnosis, in vitro fertilization and so on were given no attention, and genetic reasons for abortion are not touched on at all. Abortion is still done only for socio-economical reasons. In 1997, the Ministry of Health and Welfare established a committee for Advances in Medical Technology Assessment in the section of Health Science Council where biomedical ethics, including that of reproductive medicine, is to be discussed. Guidelines for genetic counselling and prenatal diagnosis (1994) and guidelines for genetic testing, using DNA analysis (1995) were set up by the Japan Society of Human Genetics. The context of the guideline is similar to that proposed by WHO(1996), as introduced by Dr. D.Wertz et al. There are three main approaches; (1) prenatal diagnosis will be made on a voluntary basis only, (2) disclosure of genetic information, when necessary to avoid serious injury to other family members, must follow the judgment of the ethics committee of each institute, not that of the individual attending physician, (3) abortion in the 3rd trimester, for genetic disorders is illegal in Japan. The response to genetic testing at present among the general Japanese population is most important and the issues in question should be discussed openly and in detail.

F11. The Ethical Guidelines of the “Position Paper” of the Society of Human Genetics in Germany

Prof. Hiedemarie Neizel, Inst. Human Genetics, Humboldt University, Berlin, GERMANY

In Germany, the Human Genome Project has greatly increased the public's fear about eugenics and about altering human nature. The bioethical debate in Germany has to be seen in the context of the trauma inflicted by National Socialism. On the basis of “race hygiene”, involuntary sterilization was the first step, to be followed by involuntary euthanasia of handicapped persons. The “know how” acquired during these activities was used in the “Final Solution” resulting in the systematic killing of more than 6million people. Remembering the holocaust, many German oppose the new technical developments in genetics.

Major lessons form the Nazi era are the fundamental ethical basis of medicine, and the importance of an informed, concerned, and engaged public and profession. In order to allay the public's fear about genetics and to provide guidelines for professional conduct, the first so-called define the current ethical standpoint regarding genetic testing, human autonomy, confidentiality, non-directive counseling, freedom of choice, and the right to know or not know.

ドイツ・ヒト遺伝学協会「ポジションペーパー」の倫理指針

フンボルト大学 Virchow-Klinikum, ヒト遺伝学研究所, ベルリン ヘルデマリー・ナイツェル

ドイツでは、ヒトゲノム計画は、優生学と人間性の改造に対する国民の不安を大きく掻き立てました。ドイツにおける生命倫理の討論は国家社会主義によって負わされた精神的傷害という文脈で見なければなりません。「人種衛生学」の基盤の上に、最初のステップとして強制的断種、続いて障害者の強制的安楽死が行われました。これらの活動中に得られた「ノウハウ」は「最終解決」で用いられ、その結果600万人以上が組織的に殺害されました。ホロコーストを記憶している多くのドイツ人は、遺伝学の新たな技術開発に反対しています。

ナチス・ドイツ時代の大きな教訓は、医学の根元的な倫理基盤であり、教養と社会意識が高く積極的な一般市民と知的職業人の重要性です。国民の遺伝学に対する不安を鎮め、職業行為の指針を提供するため、ドイツ・ヒト遺伝学協会初のいわゆる「ポジションペーパー」は、遺伝子テスト、人間の自主性、守秘義務、非指示的カウンセリング、選択の自由、そして知る権利と知らされない権利に関する現在の倫理的立場の定義を試みています。

F13. Bioethics of Sex Preference

Prof. Jai Rap. Singh, Director, Center for Genetic Disease, Guru Nanak Dev. University, INDIA

Prenatal sex determination, on a commercial basis, followed by selective female feticide was initiated in India in 1978 at Amritsar and quickly spread to most parts of India. In 1987, we undertook a survey of 200 individuals to ascertain their views on different aspects of prenatal sex determination. 73% were in favour of legal permission of prenatal sex determination and 50% agreed that they would abort the pregnancy were the fetus of the unwanted sex.

The alarming proportion of selective female feticide led to the passing of the Prenatal Diagnostic techniques Bill by the parliament of India on 26 July, 1994. In order to evaluate the impact of this law, we carried out another survey in 1997 on 378 individuals. Significant differences in the responses between the two surveys were seen. In 1997, only 12% were in favour of abortion of the unwanted sex fetus and only 33% favoured that abortions after prenatal sex determination be legally permitted. The responses with respect to various genetic counseling situations were also ascertained. However the data obtained from the birth registries of Amritsar district and that of Chandigarh presented an entirely different picture. In 1991, in Amritsar, 858 female births per 1000 male births were recorded; while in 1996 this figure stands at 770. In Chandigarh, in 1991, there were 793 female births per 1000 male births; while in 1996 there were only 771 female births per 1000 male ones. A similar situation clearly exists in most of the states of India.

The results of these surveys and the continued marked reduction in the female birth rates in India are viewed from the historical and cultural aspects starting from 3500 BC in order to trace the real causes which have ensured the cultural continuity of female degradation and her reduction to an unwanted sex on one hand, while the worship of the female goddesses has continued on the other. The presently prevailing ethical values which ensure a lower social status for females in the India subcontinent, can be traced to the migration of the Aryans into the Indus valley, the ensuing cultural conflicts spread over several centuries, as well as to the introduction and persistence of the caste system. The mere enactment of laws may not solve the deep-rooted social and cultural preferences impregnated during the past 3500 years.

性的嗜好の生命倫理

グル・ナナク・デヴ大学ヒト遺伝学部部長／遺伝病センター・コーディネーター ジャイ・ルップ・シン

商業ベースの出生前性別確認と、それに続く女子胎児の選別的墮胎が1978年、パンジャブ州アムリツァーで行われ、インド全土に急速に広がりました。私たちは1987年、200人を対象に出生前性別確認のさまざまな側面に対する意見の確認調査を行いました。対象者の73%は出生前性別確認の合法化を支持し、50%は望まない性別の胎児は中絶するだろうと認めました。

女子胎児の選択的墮胎の憂慮すべき割合が引き金になり、インド議会は1994年7月26日、「出生前診断技術法」を可決しています。私たちはこの法のインパクトを見るため、1997年に再び、378人を対象に調査を行いました。2調査の回答の間には大きな変化が見られました。1997年には、望まない性別の胎児の中絶を支持したのはわずか12%で、出生前性別確認後の中絶の合法化を支持したのは33%に止まりました。さまざまな遺伝カウンセリング状況に関する回答も確認されました。しかしアムリツァー地区とチャンディガルの出生登録簿から得られたデータが示す実状は、全く違っていました。アムリツァーでは1991年、出生男児1,000人当たり女児858人が記録されました。ところが1996年の数字は770人になっています。チャンディガルでは1991年、男児1,000人当たり女児793人が生まれました。しかし1996年には男児1,000人当たり女児はわずか771人でした。似たような状況はインドのほとんどの州で明かです。

片や女性の蔑視と望まれない性別への格下げ、片や変わらぬ女神崇拜を、文化的に存続させる本当の原因を追跡するため、これらの調査結果と、インドにおける女児出生率の著しい減少の継続が、紀元前3500年に始まる歴史的文化的側面から捉えられています。インド大陸における女性の社会的地位の低さを確実にしている、現在一般的な倫理的価値観は、先史アリア人のインダス川流域への移住、ついで起こった数世紀にわたる文化的対立、そしてカースト制度の導入と存続にまで遡ります。単なる法制定では、過去3,500年に植えつけられ、深く根を張った社会的文化的嗜好を解決することはできないかもしれません。

F14. Korean Consciousness on the Handicapped Person and Hereditary Defects

Yung Sun Kang, Suwon University, KOREA

Chung Choo Lee, Seoul National University, KOREA

We have investigated the awareness of Koreans towards the handicapped and hereditary defects. This survey was carried out to study and attempt to understand the consciousness of the Korean people of handicapped people. It will also provide data for the future progress of bioethics.

The subjects consisted of relatively high educational background, and mixed sex, age and religion. There were 355 males and 257 females. 50% held the opinion that people should make harmonious personal relationships with the handicapped, however the negative response reached about 30%. This supports the necessity of changing consciousness concerning the handicapped. The young emphasized more the right to life of the embryo than did the elderly. 60% of the respondents were interested in hereditary defects. They obtained most of their information on genetic problems from school education, TV and magazines. Attitudes to prenatal diagnosis were positive. The authors feel confident that the diagnosis itself was not a bioethical problem. Most respondents would not want to deliver a child with a hereditary handicap. The genetic counseling system in Korea is not yet completely established. However, there was extremely high support for the use of prenatal diagnosis mentioned above.

There is support for the development of genetic engineering technology that is useful for humankind. That is to say new drug production, increase in agricultural and marine product yields, and the diagnosis and therapy of human hereditary diseases.

障害者と遺伝的異常に対する韓国人の意識

国立科学アカデミー会員／水原大学遺伝工学科教授、韓国 姜永善
ソウル大学校生物学教授、韓国 李延珠

障害者と遺伝的異常に対する韓国人の意識を調査しました。障害者に対する韓国人の意識を探り、これを理解するのが目的です。今後の生命倫理の進歩に役立つデータも提供しています。

対象者の教育水準は比較的高く、性別、年齢、宗教ともさまざまです。男性が355人、女性が257人でした。障害者と個人的に協調的関係を持つべきだという意見は50%でしたが、否定的な回答も約30%に上りました。これは障害者に対する意識の転換の必要性を支持するものです。若者のグループのほうが年齢の高いグループよりも、胎児の生きる権利を主張しています。回答者の60%が遺伝的異常に関心を持っていました。遺伝的問題についての情報は、主に学校教育、テレビ、雑誌から得ていました。出生前診断には肯定的な態度を見せました。調査者は、診断そのものは生命倫理の範疇にないと確信しています。ほとんどの回答者は遺伝的障害を持つ子供を生またくないとしています。韓国の遺伝カウンセリング制度はまだ完全に確立されていません。しかし先述したように、出生前診断の利用の支持は非常に高かったのです。

調査では、人間にとって有益な遺伝子工学技術の発展、すなわち新薬の製造、農漁業産出量の増加、ヒトの遺伝病の診断と治療が支持されています。

F15. Buddhism, Prenatal Diagnosis and Human Cloning

Pinit Ratanakul Mahidol University, THAILAND

The Thai cultural attitude towards defective newborns is underlain by Buddhist morality emphasizing the preciousness of human life, the importance of merit-making and the practice of compassion. Accordingly it is a compassionate attitude that we see in the decision of the majority of ordinary Thai women not to abort a defective fetus but to care for it after birth. Whether this attitude will be altered in the foreseeable future when a tension may arise between compassion and the growing concern with family costs, burdens on the family, e.g. the scarcity of resources and the disruption of the life-patterns of members of the family, needs to be closely studied.

There is consensus among Thai doctors to perform prenatal diagnosis for at-risk pregnant women. There is also consensus about disclosure of the information concerning the defective condition of the fetus. But there is no consensus on the morality of selective abortion. Some want to advise the pregnant woman to abort a seriously defective fetus while others prefer to work with prospective parents to make an adjustment to the genetically defective child. All these measures are made out of compassion towards those who suffer.

仏教、出生前診断、そしてヒトのクローニング

マヒドール大学, タイ ピニット・ラタナクール

障害を持つ新生児に対するタイの文化的意識は、人間の生命の大切さや徳を積むことの重要性、慈悲の実践を強調する仏教道徳に強く支えられています。従ってタイの一般女性の大半が、障害を持つ胎児を中絶せずに産んで介護すると決断するのは、慈悲の意識の表れなのです。近い将来、慈悲と家族の負担に対する心配の高まりの間に摩擦が生じたときに、果たしてこの意識が変わるのか、きっちり調べる必要があります。家計費の心配事には、資源の枯渇や家族の生活パターンの崩壊などがあります。

リスクを持つ妊娠女性に対する出生前診断の実施について、タイの医師の間にはコンセンサスができています。胎児の障害の状態に関する情報の開示についても同様です。しかし選択的中絶の道徳性についてはコンセンサスがありません。妊娠女性に重い障害を持つ胎児の中絶を勧める医師もいれば、未来の親が遺伝的欠陥のある子供を受け入れられるよう、手を貸したいと考える医師もいます。全ての措置は、苦しんでいる人に対する慈悲から生まれています。

F16. Human Genetics and Bioethics in China

Hiraku Takebe
Kyoto University, Kyoto, Japan; Co-chair, HUGO Ethics Committee

In 1995, Law of the People's Republic of China on Maternal and Infant Health Care became effective. The law had been criticised as enforcing the eugenic aspects by the scientists in Western countries. In 1998, China will host the 18th International Congress of Genetics, but the International Federation of Genetics suggested to relocate the venue because of the law. China agreed to have sessions to discuss the law and the related issues at the Congress, and the Congress will be held in China. Because of this issue, however, many geneticists who were invited to participate in the Congress have declined the invitation, according to the organizers.

In November, 1996, HUGO Ethics Committee asked Dr. Ren-Zong Qiu from Beijing to explain China's policy on Population and Bioethics. Dr. Qiu was one of advisors for drafting the law. Dr. Qiu said that the law was needed to supplement the one-child policy, and had no intention of enforcing eugenic aspects. In Chinese language, "yousheng" which had been said to correspond "eugenics" means "healthy birth". Dr. Qiu admitted that biethics in China has just started to be discussed and has not been considered seriously when drafting the law. The HUGO Ethics Committee, after very active discussion, agreed that further dialogue between China and other countries should be needed to have mutual understanding.

According to Dr. Nyanhu Sun, People's Union Medical College Hospital, Beijing, Down's syndrome children in China live 1 year or average, more than half dying within 4 weeks after birth. This is mainly due to lack of good medical care in rural areas, as Down's syndrome children are generally very weak and are vulnerable to infection. These unfortunate situation are not known to those who have been criticizing China of the law. What advanced countries should do, I believe, is to help China to improve the medical and hygienic situation and encourage doctors and ordinary people to raise handicapped children with social and financial help by the central government. To do so, promote understanding of ethics related to human genetics should also be emphasized. It may take time and a lot of effort. But such advice and encouragement must be far better than blaming them or boycotting the Genetic Congress.

As one of Asian countries where we share culture, history and religion, Japan's role in this issue should be very important. I hope this meeting would be one of the steps toward promoting mutual understanding.

F16. 中国における遺伝倫理

京都大学医学研究科 武部啓

1995年、中国は母子保健法（中国語では母嬰保健法）を制定した。この法律には先天異常児（遺伝性疾患を含む）を生むおそれがある場合に結婚、出産などに医師の助言を求めなければならない、などの条文がある。欧米諸国の遺伝学者はこれに激しい反対を表明し、国際遺伝学連合は1998年に北京で開かれる予定の第18回国際遺伝学会議の会場を別の国へ移そうとした。中国との交渉の結果、この問題についての自由な討論のセッションを設けることを条件に、北京での開催は認められたが、多くの招待講演者が辞退するという実質的なボイコットのため、プログラム編成が危ぶまれている。

その過程で中国側からの反論に、この法律は日本の優生保護法とほぼ同じである、との指摘があったことに留意する必要がある。優生保護法は1996年に母体保護法に改正されたが、たしかに内容は大差ない。一方中国では一部の大都市を除いて医療、衛生状態はきわめて低く、ダウン症児の平均寿命は約1歳であり、90%が6歳までに死んだとの調査が公表されている。先進国は、このような状況を知るとともにその改善にまず手をさしのべる必要がある。非難するだけでは望ましい解決の方向は見えてこない。またこの法律には一人っ子政策の副産物、すなわち人口増抑制のために1人しか生むことを認めないため、ある程度選択を許すという面がある。中国の人口増抑制政策そのものは世界にとってきわめて重要な方向を示すものであることは高く評価すべきであろう。

一方で中国の生命倫理学がまだまだ初歩的な段階にあることから、この法律も含めて倫理的配慮が不足していることは、中国の研究者も認めている。ヒトゲノム解析機構（HUGO）倫理委員会は、本年度から中国から委員を1人加えることになったが、そのような国際交流によって生命倫理、遺伝倫理への理解が深まることを期待したい。

F18. Opinion Survey in Asian Countries

Norio Fujiki (Vice President of UNESCO, IBC, Emeritus Professor of Fukui Medical University),
Mikio Hirayama (Dept. of Medicine, Fukui Medical University),
Shigeaki Nakazaki (Kunitaka Clinic)
Kazuo Mano (Neurology Dept. 1st Nagoya Red Cross Hospital)
I.C. Verma (All India Institute Medical School)
P. Ratanakul (Mahidol University)
W.Y. Lo (Chinese Institute Medical Genetics)
Y.S. Kang (Suwon University)
V. Bulyzhenkov (WHO)

After the follow up study of our genetic counselling services, we have strongly emphasized the necessity of opinion surveys on the recent developments of genetic knowledges in general public and the Japanese concept of heredity and handicapped, compared with medical geneticist's concepts. Therefore, we have made the opinion survey in Japanese lay peoples and then extend this survey in world side, with the kind cooperation of WHO, UNESCO and JHGP. Following the fifth International Bioethics Seminar in Fukui, we would have UNESCO Asian Bioethics Conference in Kobe in Nov.1997 and prepared this report, especially on teaching bioethics in medical genetics.

遺伝医学の生命倫理教育—アジア諸国の意識調査—

藤木典生（福井医科大学名誉教授）、平山幹生（福井医科大学助教授）、中崎繁明（国高診療所）、真野和夫（名古屋第一赤十字病院）、I. C. Verma（全インド医科学研究所）、P. Ratanakul（マヒドール大学）、W.H.Y. Lo（中国科学院）、Y. S. Kang（水原大学）、
V. Bulyzhenkov（WHO）

遺伝相談の追跡調査を行って、一般の人々の遺伝の知識の進歩に伴う遺伝やハンディキャップに対する日本人の意識の変遷を、遺伝医学者のそれと比較し、さらに、WHO、UNESCO、ヒトゲノム計画の支援によって、アジア諸国に拡げて調査し、遺伝医学の生命倫理教育について言及した。

F19. The Japan Society of Human Genetics, present and future

Yasuo Nakagome

Department of Public Health, Juntendo Univ. School of Medicine, Kawasaki 211, Japan

Email: nakagyso@po.ijnet.or.jp (President of the Japan Society of Human Genetics)

The Japan Society of Human Genetics (JSHG) was founded in 1956 and celebrated its 40th birthday last fall. At the moment, over 1900 members are actively involved in every aspect of human/medical genetics (h/m genetics).

In its early days, emphasis was on the pedigree analysis, although, there were some biochemical studies which resulted in, for example, elucidation of the cause of acatalasemia. In the 60th and 70th, cytogenetic studies prevailed. From early 80th, studies using DNA technologies emerged. In recent years, as many as 260 papers are presented in each annual meeting, over two third of them are related to either molecular genetic or molecular cytogenetic aspects of genetic diseases. Successful cloning of causative genes of amelogenesis imperfecta, DRPLA, xeroderma pigmentosum A, Fukuyama-type muscular dystrophy and insensitivity to pain with anhidrosis, are examples of contributions by the members of JSHG.

Clinical genetic approaches have also been one of the important features of JSHG. With the advent of DNA diagnosis, genetic counseling has become increasingly important, as it is an important and integral part of DNA diagnosis and also of gene therapy. To cope with this situation, we petitioned to the Ministry of Health and Welfare that genetic counseling be covered by government's health insurance, last fall. In 1995, JSHG proposed two guidelines, one for DNA diagnosis and the other for prenatal diagnosis and genetic counseling. These guidelines have been endorsed by 6 medical societies, so far, and being accepted as a standard in these fields. We have also been trying to promote h/m genetic education in medical schools. Recently, number of universities in the field of both nursing and health sciences, has increased rapidly. In most of them, classes in h/m genetics are totally lacking. Promotion of h/m genetic education in them is quite urgent.

In the foreseeable future, JSHG will continue to make itself available and be ready to play a key role in every aspect of human/medical genetics.

日本人類遺伝学会の現状と展望

中込弥男

F20. The Mass media and Bioethics in Medical Genetics

Kiyotaro Kondo

The University of the Air, Chiba, JAPAN

When issues related to bioethical aspects of medical genetics are exposed to the public through the writer or audiovisual media, it is necessary to take account of ethical considerations in place in the media.

The University of the Air has introduced rules consisting of 8 articles in addition to the broadcasting Act (Hoso-Ho). These rules aim to assure appropriateness in its own broadcasted education programs. They protect first of all human rights and dignity, assure fairness in dealing with religion, law, politics, economy, arguments in the courts, etc., exclude advertisements and mandate the broadcasting of corrections if errors are found.

Individual human rights are of special concern in the ELSI of medical genetics. After exposure in the media human rights can be badly, and sometimes, irreparably violated. Mass media sometimes promote public prejudices against genetic stigma. Today genetic problems are often treated in commentaries, reports, debates, etc. This trend is welcome, but besides factual errors, the lack of a specific code sometimes magnifies tragedies, and makes treatment of issues excessively sentimental.

The media can nevertheless be a powerful means to eliminate such prejudice through public education. In this regard, the mass media itself must be informed and aware of progress in science and the changing attitudes of the public.

マスメディアと遺伝医学における倫理

放送大学 近藤喜代太郎

遺伝医学の倫理的側面はその問題が雑誌・視聴的メディアを通じて公けにされる場合、マスメディアにかわる倫理的配慮をも要する。

放送大学は「放送法」などの、既成の法令に加えて自己の規則8条を設けて、放送教育プログラムの適正化をはかっている。それらの規則はまず、人権と人の尊厳を守り、宗教・法令・政治・経済・裁判上の論点などに関して公正性を確保し、広告を排除し、もし放送内容に過誤があったときその訂正放送を義務づけている。

個々の人権は遺伝医学ELSIの特別の関心事である。人権はメディアで広報された場合、高度に傷つけられ、ときには回復不能である。マスメディアはときに遺伝的スティグマに対する偏見を助長する。今日、遺伝学の問題はしばしばマスコミの論説、ルポ、討論などのテーマとなる。この傾向は歓迎すべきであるが、事実のミスがあることはもとより、遺伝の問題に関して特別に設けられた規範がないことから遺伝病の悲劇を拡大し、過度に情緒的な取扱いを許すこととなる。

一方、メディアは公衆への教育を通じて偏見を除くこともできる。この意味でマスメディアは科学の進歩についての情報を持ち、絶えず変化する公衆の考え方を知る必要がある。

F21. Shinshu University Hospital Established the Division of Clinical Genetics as One of its Central Service Departments

Yoshimitsu Fukushima

Department of Hygiene and Medical Genetics, Shinshu University School of Medicine, JAPAN

Email: yfukush@gipac.shinshu-u.ac.jp

Recent advances in molecular genetics enable us to perform carrier detection, presymptomatic diagnosis or prenatal diagnosis of many genetic disorders. These techniques are useful for reducing the anxiety of patients or families, and for early diagnosis and treatment. However some people have misgivings about endangering confidentiality, genetic discrimination and enforced genetic testing. To use these techniques effectively, a division of clinical genetics, at which genetic diagnosis and counseling are provided, is necessary. However, the field of clinical genetics has lagged in Japan, and hardly any university hospitals have a division specialising in this field. Shinshu University Hospital has taken a lead in this field and established a division of clinical genetics as one of its central service departments. Several MDs from the departments of internal medicine, geriatrics, pediatrics, surgery, laboratory medicine and hygiene staff this project. All of the staff are certified as members of the Japanese Board of Medical Genetics, Clinical Geneticist or as its trainees, and serve concurrently. Those seeking genetic counseling or genetic testing, generally visit the clinic twice. On the first visit, staff collect complete and detailed information including family history, confirm the results of diagnosis and examination, and make the counselee's requirements based on this clear. We have a staff meeting once a week to discuss each case and how to provide adequate counseling on the next visit. Based on this the staff gives genetic counseling to the counselee at the second visit. As there are many kinds of specialists in our group, we can counsel on any kind of genetic disorder. Over 100 counselees with problems such as congenital defects, familial cancer, genetic nerve disorders, etc., have visited our clinic during the one and a half years since its establishment and received counseling and, when appropriate, genetic diagnosis.

This is the first clinical genetics department in a National University Hospital in Japan. It is hoped that this system of having a clinical genetics division will become widely available in other university hospitals in Japan, where there are a number of clinical geneticists and cooperative physicians and technicians.

中央診療部の一つとして開設した信州大学病院遺伝子診療部

信州大学病院遺伝子診療部 福嶋義光

近年の分子遺伝学の進歩により、多くの遺伝疾患において保因者診断、発症前診断、出生前診断が可能になってきました。これらの技術は患者・家族の不安の軽減や、早期発見、早期治療に有用です。しかし、個人のプライバシーの侵害、遺伝的差別、遺伝的検査の強要などを心配する人たちもいます。遺伝子解析技術を医療の場で応用していくためには遺伝的診断および遺伝カウンセリングを行う臨床遺伝部門が必要です。しかし、我国において臨床遺伝の分野は立ち遅れており、臨床遺伝を専門とする診療部は大学病院にはほとんどありません。信州大学病院では全国に先駆けて、中央診療部の一つとして遺伝子診療部を開設しました。遺伝子診療部のスタッフは原則として日本人類遺伝学会臨床遺伝学認定医の資格を有する医師で、内科、老年科、小児科、外科、検査医学、衛生学などから集まりました。遺伝カウンセリングや遺伝子検査を希望する人には原則として2回来院していただくことにしました。1回目の来院時には的確な遺伝カウンセリングを行うために詳しい家族歴の聴取、診断や検査結果の確認などを行います。遺伝子診療部では毎週1回スタッフミーティングを行っていますので、その場でそれぞれの症例について次回どのように遺伝カウンセリングを行ったらよいかについて検討します。その結果をもとに2回目の来院時に遺伝カウンセリングを行います。遺伝子診療部のスタッフにはさまざまな診療分野の専門家がいますので、どのような遺伝疾患にも対応できます。開設以来1年数カ月に先天異常、家族性癌、遺伝性神経疾患など100名以上が受診し、遺伝カウンセリングおよび適応のある例には遺伝子診断を行いました。

この信州大学病院の遺伝子診療部は全国に先駆けたものですが、他の大学においても臨床遺伝の専門家が数名とそれに協力する医師、技術者がいれば同様のシステムの構築は可能であり、広く試みられることを期待したいと思います。

F22. Current Status and Ethical Concerns of Assisted Reproductive Technology in Japan

Kazuo Sato

Obstetrics and Gynecology, Nihon University School of Medicine

In 1978, the new era of assisted reproductive technology (ART) began with the announcement of the successful outcome of the first in vitro fertilization-embryo transfer in the United Kingdom. In Japan the first IVF-ET child was born in 1983 but ever since then increasing concerns have been expressed amongst physicians and patients. There has relations been no carefully documented standard defining client-physician GCP relations, leaving all risk management in practicing ART to the individual physician and their client. It may be said that a fait accompli has been achieved through the mode of expansion of ART in Japan with minimum efforts to establish ethical consensus in society. The Japanese society of obstetricians and gynecologists, on the other hand, does recognize that many couples with major fertility difficulties are leaving Japan in the quest for inexpensive or no-questions-asked treatment with ART abroad.

The Japanese, as other nations, have a unique religious and cultural background to their concepts of life and death, parent-children relationships, and the marriage relationship making extrapolation of existing bioethical laws of other countries difficult. Concepts embodied in the current civil laws do not adequately compensate for the lack of bioethical legislation such as described in the laws of U.K., France or Germany. It is of the utmost importance to establish our own effective guidelines for ART covering both physician-liability and client-benefit, as well as to prevent commercially-promoted unethical practice of the technology. The board of the Japanese society of obstetricians and gynecologists has been engaged in this task but further support and cooperation is necessary.

日本におけるBiomedical ethicsとくにAssisted reproductive technology(ART)の現状と問題

日本大学産婦人科

佐藤和雄

1978年最初の体外受精児が誕生し、本格的なARTの時代が到来した。その結果日本においても不妊症の治療は大きく変わったが、新たに解決されるべき問題が生まれている。すなわちART実施における医療提供者と患者双方の義務と権利を定める基準、出生してくる子の権利とその保護、そしてARTにおける倫理的綱領の設定などである。ARTの原則として、需要あるところ供給があるべきとする国や、早期から法制に基づいた規制を設ける国もあるが、日本においては、既成事実の積み重ねによる緩徐な広がりを、関連する学会が自主的に決める見解で追認しつつ、指導していくことが繰り返されてきた。しかし多胎妊娠における減胎手術、非配偶者間人工授精における子の出自を知る権利などは世論の関心も高く、従来の轍を踏むのは避けなければならない。我が国の死生観・親子関係・夫婦関係・宗教的文化背景・民法・刑法そして医療の状況は必ずしも欧米のそれとは一致せず、フランスの生命倫理法やドイツの厳しい規制などをそのまま外挿するわけにもいかない。一方で育児を希望する人々が、自由な技術提供を求めて商業的な仲介機関を介して海外に出ていき、国内でもARTが日々多用される現状では、適切な法的ガイドラインの確立により全てが野放し状態に陥らないよう、対処することが急務である。現在日本産科婦人科学会がその任を果たすべく努力しているが、法制化には更に一層の多くの協力が必要である。

F23. The Present State of and Issues Concerning Preimplantation Diagnosis

Kaoru Suzumori, Nagoya Municipal University Medical School, JAPAN

About a quarter of a century has passed since prenatal diagnosis started in Japan with amniocentesis. During this period many improvements have been made in the ultrasound and other equipment used in diagnosis, leading to improvements in image quality. This in turn has led to dramatic advances in the safety and reliability of amniocentesis, and its coming into general and widespread use, so that now amniotic diagnosis not only plays an important part in genetic counselling, but is also established as a screening method for chromosomal abnormalities in pregnancies of the over-35 age group. Looking at how techniques of prenatal diagnosis have changed one can see that there has been a shift to earlier diagnosis with the aim of lightening the physical and mental burden on the woman in abortions of pregnancies based on findings of abnormality, and that a number of institutions have experimented with amniocentesis and chorionic villus sampling early in pregnancy. This has had the result of widening the choice of diagnostic procedures for the testee. Looking at the diagnostic methods for genetic disease, as well as the molecular genetic procedures such as chromosomal analysis and genetic biology techniques such as enzyme analysis used hitherto, recently the method of gene DNA analysis has also come into use. The application of this particular technique has not just widened the range of target diseases, but also means the sample is not selected (?), and that diagnosis can be made from a very small amount of test material. It has also led to improvement in diagnostic accuracy. The prenatal diagnostic procedures that are involved in genetic counselling have increased from amniocentesis and chorionic villus sampling as fetal blood sampling and fetal biopsy have become possible, and so not only have the types of genetic disease that are the objects of testing increased even further in variety, but also the situation has been reached where it is possible to select the most appropriate procedure in line with the diagnostic method for the disease, the organ or tissue expressing the abnormality etc.. However these procedures all have as their subject the fetus, and, depending on the outcome of diagnosis can lead to the abandonment of the fetal life itself, or putting it bluntly, abortion of the pregnancy, and so have become an ethical and social issue.

The 1980's were a period of striking advances in reproductive technology during which treatment of infertility by IVF or embryo transplant became established in Japan, where it is now carried out at many institutions. Preimplantation diagnosis was born out of a combination of these reproduction-assisting technologies and molecular biology (gene DNA analysis), its most distinguishing characteristic being that diagnosis is possible before pregnancy is achieved, so the child can be brought into the world without the fear that it will be aborted. At present it is in actual use at about 36 institutions in the U.S.. In a representative procedure at the 4-8 cell stage of the embryo 1 or 2 blastomeres are biopsied under the microscope, genetic analysis is performed, and a judgement on normalcy made. Only normal embryos are chosen and used to induce pregnancy.

F23. 受精卵診断の現状と問題点

名古屋市立大学医学部産科婦人科学 鈴 森

日本で胎児遺伝性疾患の出生前診断が羊水穿刺によって始められてから約4半世紀経っています。この間、超音波診断装置などの関連機器にも多くの改良が加えられ、画質の向上に繋がったことから、羊水穿刺の安全性や確実性も飛躍的に向上し、一般にも広く普及し、今では羊水診断は遺伝カウンセリングの重要な一翼を担っているばかりか、35歳以上の妊婦に対しては染色体異常のスクリーニングとして位置づけられるようになってきました。出生前診断手技の移り変わりをみると、異常の結果に基づく胎児の中絶に伴う女性の精神的・肉体的な負担を軽減する目的で、診断時期の早期化が計られ、妊娠早期の羊水穿刺や胎盤絨毛採取などもいくつかの施設で試みられるようになってまいりました。このことは、受診者の診断手技の選択の幅が広がるという効果をもたらしています。遺伝性疾患の診断法についてみれば、従来の染色体分析などの細胞遺伝学的あるいは酵素分析などの遺伝生化学的手法に、最近では遺伝子DNA解析法が応用されるようになりましたが、この手法が応用できるようになったことは、対象疾患の拡ったばかりか、試料検体を選ばないこと、微量の試料からも診断できること、また診断精度の向上にも繋がっています。

遺伝カウンセリングにおける出生前診断手技は、先に述べた羊水穿刺、胎盤絨毛採取の他に、胎児血採取、胎児皮膚生検も出来るようになり、ますます対象となる遺伝性疾患の種類も多彩となったばかりでなく疾患の診断法や異常が発現している臓器や組織に応じて最適の手技を選択できる状況になっています。しかし、これらは全て胎児を対象としたもので、診断結果によっては胎児生命そのものを諦めてしまう、端的に言えばこの妊娠を中絶してしまうという結末もあり得ることから倫理的・社会的な問題点となっている。

ところで、1980年代は生殖技術において著しい進歩がみられた時期で、体外受精・胚移植による不妊症治療はわが国でも定着し多施設で実施されています。この補助生殖技術と分子生物学（遺伝子DNA診断）を結合することによって生まれたのが着床前診断で、この方法の最大の特徴は妊娠が成立する以前に診断可能で、中絶を心配することなく子どもが授かるという点です。現在、欧米の約36の医療機関で実際に行われています。代表的な手技は4～8細胞期胚から顕微鏡下で1～2個の割球を生検して遺伝子解析を行い正常かどうかを判定し、正常胚のみを選択し妊娠させるというものです。

F25. Ethical, Legal and Social Issues in Pre-symptomatic Testing for Cancer

Yukiko Tsunematsu

Division of Hematology/Oncology, National Children's Hospital, Setagaya-ku, Tokyo 154, JAPAN

Email: ytsunematsu@nch.go.jp

Recent advances in molecular biology have led to the identification of several inherited cancer susceptibility genes including common adulthood cancer. Much has been learned from the experience of careful study of Huntington Diseases and other non-malignant conditions. There are some differences in the case of predisposition testing for cancer. There is often the perception that cancer is preventable, and sometimes curable, in the contrast to other hereditary conditions; thus this pre-symptomatic testing is expected to reduce cancer morbidity and mortality by preventive intervention, early detection and adequate management. But this new predictive tests raise ELSI issues, in association with the right to control private information and confidentiality. The implications of test results are enormous, not only for the individuals but also for relatives who share this genetic legacy and society as a whole. Any physician who offers genetic testing should be aware of, and able to communicate, the benefits and limits of current testing procedures and the range of prevention and treatment options to patients and their families.

Historically, Japanese doctors have not fully communicated the true diagnosis to patients with cancer. It has been thought to be very difficult for Japanese Patients to be told a serious condition concerning both hereditary and neoplastic disease. The Ethics committee in Japanese Society of Familial Tumors is now elaborating the guidelines for research on genetic testing for familial tumors in order to support the individuals or families who are the subjects of the research on the clinical applications and to protect all their rights. The perception of the families' follow-up raises the large issues like the need for a health care system which includes general family counseling. Genetic testing for cancer susceptibility should generally be performed only within the context of long-term outcome of the studies which are designed to measure the medical and psychological effectiveness. While individual autonomy must not be sacrificed, in many instances multigenerational counseling will be appropriate. It is the ethical duty for the individuals who are informed to be at genetic risk of familial cancer to disclose to their relatives that they may also be at genetic risk prior to the testing. (WHO Guideline)

家族性腫瘍におけるがん易罹患性の発症前遺伝子診断についての倫理的、法律的、社会的問題 国立小児病院血液腫瘍科 恒松由記子

分子生物学における最近の進歩により、一般成人のがんを含む数種類のがんで易罹患性を遺伝させる遺伝子が同定されてきています。この予知的な検査がもつ問題についてまず、ハンチントン病やその他の非悪性疾患において注意深く研究がなされてきましたが、がんの遺伝子診断の研究でもこれらの疾患の経験から多くを学びました。一般の遺伝的疾患では診断が治療と結びつかないことが多いのですが、がんの場合は予防や治療が可能であることが多いのです。がんの易罹患性の発症前診断では予防的介入や早期発見、適切な管理等によって、がんの罹患率や死亡率を減少させることが期待されています。

しかし、この予知的な検査は個人情報コントロール権と守秘義務に関連して、倫理的、法律的、社会的問題を引き起こす可能性があります。この検査結果の影響は大きく、個人ばかりでなく、その遺伝的体質を共有する家系内の親族やそして社会全体にも多大な影響を及ぼします。遺伝子検査を勧めるにあたって、すべての医師は、検査の利点や現在の検査の方法の限界、予防と治療の選択肢があるということをよく知るべきで、それを患者とその家族に提示するようにならなければなりません。

歴史的に見て、日本の医師はがん患者に真実を十分に伝えてきたとはいえません。遺伝的な病気と腫瘍との両方に関する深刻な病状について日本人患者に伝えることは、大変難しいと思われてきました。日本家族性腫瘍倫理委員会は、遺伝子医療応用研究の対象となっている個人や家族を援助し、そのあらゆる権利を守るため、家族性腫瘍遺伝子検査の研究のガイドラインを現在、作成中です。

家族の支援という考え方から、一般の家族カウンセリングを含んだ健康管理システムの必要性という大きな問題も起こってきます。がん素因を診断する遺伝子検査は一般的に、長期観察の結果を射程にのこした研究の枠組みのなかで行われるべきで、そのなかで検査の医療的、心理的有効性が確かめられなければなりません。その際、個人の自律性がまず尊重されるべきでこれが犠牲にならないようにすべきですが、多くの症例では世代間カウンセリングが必要になると思います。また、家族性腫瘍の検査を行う個人は他の家族へはがんになりやすいリスクを伝える義務があると思います。(WHOガイドライン)

F27. Public Perception for Medical Genetic Services

Eiko Fukumoto

Freelance Journalist, JAPAN

The revolutionary nature of life manipulating techniques not only gives new methods for diagnosis, treatment, and prevention of disease but also ties in the great changes it brings to our views of life and humanity, and social norms. And people who are affected directly by this wave of violent change are the general population. But very little information on either the state-of-art of these techniques or the WHO guidelines gets through to the population as a whole, and I feel very apprehensive that guidelines will be drawn up and the fruits of genetic analysis will be exploited with discussion and judgements only being made by professionals and experts. I propose here:

1. We need enough time to find out about and discuss the issues.
2. Both the general population and professional groups need to thrash out in more detail whether merely the simple freedom of choice (self-determination) of the people who receive medical treatment and services can keep shut in the eugenics that gene technology connotes.
3. The people at present most worried and on their guard about eugenics are those who are handicapped. I hope that the professionals will listen to their ideas and draw on their opinions.

遺伝医学サービスに対する一般の人々のとらえ方

フリーランス・ジャーナリスト 橋本英子

生命技術の革命性は、病気の診断、治療、予防に新しい手段を与えるだけでなく、生命観、人間観や社会規範に大きな変革をもたらす点にあり、変革の波に直接さらされるのは一般の人々である。しかし技術の現状についてもWHOガイドラインについても、情報はあまりにも一般には伝わっておらず、このまま専門家だけの議論と判断でガイドラインが作られ、ヒトゲノム解析の所産が利用されていくことに、私は強い危機を憶えている。

1. 一般の人々が知り、議論を詰めるための十分な時間をとってほしい。
2. 医療とサービスを受ける人の選択の自由（自己決定）だけで、遺伝子技術が内包する優生主義を封じ込めることができるのかどうか、もっと検討する必要がある。
3. 優生主義を当面最も心配し警戒しているのは「障害」をもつ人々である。この人たちの考えを充分に聞き、その意見をくみとってほしい。

F29. Informed Consent in Pediatric Genetic Screening

Frank J. Leavitt, The Jakobovits Centre for Jewish Medical Ethics
Dina Pilpel, Department of Epidemiology and Evaluation of Health Services.
Faculty of Health Sciences, Ben Gurion University of the Negev, Beer Sheva, Israel.

Difficulties in applying the concept of informed consent to small children make the concept of autonomy questionable in all pediatric medicine. This is especially so because we do not accept that the idea of surrogacy is an adequate solution to the problem. A decision made by a parent for a child may be justified but is not an autonomous decision. Perhaps an expanded framework like special institutional review boards for genetic screening can help protect interests of the child.

Screening children might be especially desirable because it might help discover a problem early enough to allow altering the natural history of a disease. But pediatric genetic screening is especially problematic ethically. As in all screening the dangers associated with false positives and false negatives make it especially important that participants be fully informed of an often small but always real statistical likelihood of being hurt. And even true positives can suffer when the predicted condition has no cure, or when health services which are available to the individual child cannot offer a cure.

These problems coupled with the difficulties inherent in pediatric informed consent, raise hard ethical questions which will be discussed in this paper. We shall discuss some of these problems partially on the basis of Talmudic ethical thinking.

小児科遺伝スクリーニングに関するインフォームド・コンセント

ジャコボヴィッツ・ユダヤ医学倫理センター フランク・J・レヴィット
ベン・グリオン大学健康科学学部疫学・ヘルスサービス評価学科 ダイーナ・ピルペル

インフォームド・コンセントの概念を幼い子供に適用することの難しさが、小児科医療全体で自律性の概念を疑わしいものとしします。それが特に問題となるのは、「代理」という考えがこの問題に対する適切な解決法だとは思えないからです。子供のために親がする決断は正当化され得るなものかも知れませんが、自律的な決断ではありません。たぶん遺伝スクリーニングのための特別な施設の検査委員会のような広い範囲での枠組みが、子供の利益を保護する助けになるでしょう。

子供に対してスクリーニングを行なうことが特に望ましいのは、疾病の本来の進行状態を変えることが可能な早い時期の問題の発見を助けることが出来るからです。しかし、小児科遺伝スクリーニングには特に倫理的に問題となります。他のスクリーニングと同様、誤った陽性や陰性の判定による危険のため、普通は可能性が低いけれども常に存在する統計上の危険性を参加者にきちんと伝えておく必要があります。そして、真の陽性の患者でさえも、予想される症状に対する治療法がなかったり、個々の子供が受けるヘルスサービスで治療が提供できなかったりした時には苦しむことになるのです。

こういった問題と小児科インフォームド・コンセント特有の難しさによって生じた困難な倫理的問題をこの論文で討議します。また、特にタルムードにおける倫理的考え方の基礎について討議します。

F30. The New Genetics and its Regulation in the UK

David Shapiro, Executive Secretary, Nuffield Council on Bioethics, and Consultant, Wellcome Trust, UK

The UK is presented as a case study in the development of national policy strategies for the application and regulation of the New genetics. The UK may well be a special case for two reasons:

- 1 The UK has a National Health Service. The public therefore expects that, in health matters, the Government will take a lead.
- 2 Professional self-regulation has long been a feature of medical law and ethics in the UK.

The development of policy strategies in the UK began with a series of reports from the Royal College of Physicians in the early 1990s. Ethical, social and legal issues were set out in 1993 in the report of the Nuffield Council on Bioethics Genetic Screening: Ethical Issues. This report was taken up by the House of Commons Select Committee on Science and Technology in its report Human Genetics: the science and its consequences (4 vols, 1995).

The UK Government has responded by establishing in January 1996 the Department of Health's Advisory Committee on Genetic Testing and in December 1996 an overview body, the Human Genetics Advisory Commission.

英国における新遺伝学とその規制

デビッド・シャピロ

新遺伝学の応用と規制の国家政策の発展におけるケーススタディとして、英国の事例を発表します。英国が特殊なケースなのは、2つの理由から見て当然と言えます。

- 1 国民健康保険がある。したがって国民は保健問題については政府主導を期待する。
- 2 英国の医療法と倫理の特色は、長い間、専門家の自主規制だった。

英国の政策は1990年代初め、王立外科医師会の一連の報告書によって立案されだしました。1993年にはナフィールド評議会の生命倫理報告書「遺伝子スクリーニング：倫理的問題」が、倫理的社会的法的問題に触れています。この報告書は下院の科学技術特別委員会の報告書「ヒト遺伝学：科学とその意義」（全4巻、1995年）で取り上げられました。

これに応じて英国政府は、1996年1月には保健省遺伝子テスト諮問委員会を、1996年12月には調査団体、ヒト遺伝学諮問委員会を設立しました。

F32. Genetics and Biomedical Technology: The Emerging Milieu and the Indian Context

R.R. Kishore, Chief Medical Officer, Ministry of Health and Welfare, INDIA

Fast advancing biotechnology, increasing quest for well-being, longer life-span, changing life styles, demographic transition, wider human interaction, growing commodification of human body, entry of corporate sector in the health delivery system, greater institutionalisation of services with higher dependence on managerial and bureaucratic setups, evolving moral concepts, lay adjudicators, judicial unpredictability, and a host of other factors have imparted unique plurality to the concept of human health and in today's milieu it carries far greater meaning and expectation than the earlier times when it was confined merely to somatic intervention. In this scenario medicine is not just a clinical science. It includes subtle appreciation of social, economic, cultural and religious aspects of individual and societal life. There have been many attempts at the national and international level to evolve an ideal legislative strategy in order to address the problems emerging out of advancing biotechnology but the conflicting perspectives and the multidimensionality of the issues involved continue to defy the solution. The biggest challenge emerges out of the respect granted to the living matter which being an end and the purpose per se is far beyond the discovery-invention, sale-purchase, and profit-loss notions. In spite of its biology and the chemistry being clear the living material is never seen as a physical object. Life is the Absolute embodied. This is a universal perception, regardless of cultural or religious affiliations, and is the biggest challenge in the process of legislating the advancing biotechnology.

F33. An Indian Perspective on some bioethical issues in Human Genetics

Indera P. Singh, Delhi, INDIA

Bioethics focusses upon the moral principles of autonomy, beneficence, nonmaleficence, and justice. These principles may be subject to the cultural beliefs and practices of different countries. The ethical principles may be universally applicable, but they must be understood in the light of cultural differences which would alter their application in difference cultures. Their moral and cultural control and acceptability requires moral assessment at the level of individual, family, religion, society, nation and internationally. National and international guidelines must protect individual human and civil rights, i.e. they must protect different religious and cultural attitudes towards manipulation of life, concepts of disease and disorders, risk in human experimentation and the identification of the appropriate agencies to make moral ethics based on available therapeutic technologies.

Some of these important issues are discussed in the paper in the context of Indian culture and values.

人間遺伝学の生命倫理的問題：インド的見地

インデラ・P・シン

生命倫理は自律性、善行、害さないことや公正といった倫理的原則に重点をおきますが、これらの原則は異なる国々の文化に基づく考えや実践に左右されることもあります。倫理的な原則は普遍的に当てはまるかも知れませんが、文化によって応用の仕方が変わってくるということを念頭においておかねばなりません。原則の倫理的・文化的な管理や受容性は、個人・社会・宗教・社会・国家・国家間といったレベルでの判断を必要とします。国内的・国際的ガイドラインは個人の人権や市民権を護るべきです。すなわち、生命の操作、疾病や障害の概念、人体実験の危険性や現存の治療技術に基づく倫理を決定する機関の設定といった事柄に関して、異なる宗教や文化に基づく判断を尊重すべきです。本論はこういった問題をインドの文化と価値観の文脈の中で論じます。

F38. Closing Remarks

Keiichi Ueda,
Director, University Hospital, Fukui Medical University

Now at the end of 6th International Bioethics Seminar, WHO Assisted Satellite Symposium on Medical Genetics Services and Bioethics in Fukui, I would like to give the closing address. It is my pleasure to give this closing address.

During this Fukui seminar, various problems in medical genetics and bioethics have been reported on by foreign investigators. Furthermore, Japanese and overseas commentators have expressed their opinions. We have heard many important opinions and comments, and the most important thing now will be to put these useful opinions into practice in the field of medicine.

I am deeply grateful to Emeritus Professor Dr. Norio Fujiki and Professor Kuriyama and his department members of Fukui Medical University for their effort during this seminar.

Finally I am looking forward to the further advance of studies on medical genetic services and bioethics.

閉会の辞

福井医科大学医学部附属病院長 上田恵一

福井における第6回国際生命倫理セミナー、WHO支援サテライト・シンポジウム「遺伝医学サービスと倫理」の閉会の辞を述べさせていただきます。

本福井におけるセミナーにおいては、諸外国からの研究者によって遺伝医学と生命倫理に関する諸問題が報告されました。さらに本邦ならびに諸外国のコメンテーターから意見が述べられました。これらのご意見やコメントは大層重要なものであると存じます。そして医学領域において、これらの有益なご意見を実現することが最も大切なことでもあります。

このセミナーにおきましては、福井医科大学藤木典生名誉教授を始め、栗山勝教授、教室員の皆様のご尽力に対して厚く御礼申し上げます。

最後に遺伝医学サービスと倫理についての研究が今後も益々発展することを期待しております。