

日本財団補助金による

1998年度日中医学協力事業報告書

—調査並びに研究に対する助成—

1999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 松葉剛  [Ⓜ]
所属機関名 国立国際医療センター 保健協力課
職名 医師 年齢 35 才
所在地 〒162-8655 東京都新宿区戸山1-21-1
電話 03-3202-7181 内線 2964

1. 研究課題

計数型抜き取り検査法を用いたポリワクチン接種率評価法 FAX 5272-3090
- 中国雲南省少数民族居住地域での応用 - 2742

2. 研究期間 自 1998年 4月 1日 ~ 至 1999年 3月 15日

3. 研究組織

日本側研究者氏名 小林 誠 (34才)
所属機関 東京女子医科大学 職名 助手

中国側研究者氏名 梁志松 (43才)
所属機関 雲南省人民医院 職名 科学教育処副処長

4. 研究報告

別添書式を参考に、報告本文4000字以上で作成して下さい(枚数自由・ワープロ使用)

研究成果の発表予定がある場合は発表原稿・抄録集等を添付して下さい。

論文発表に当っては、日中医学協会—日本財団補助金による旨を明記して下さい。

計数型抜き取り検査法を用いたポリオワクチン接種率評価法
—中国雲南省少数民族居住地域での応用—

研究代表者氏名：松葉 剛

所 属：国立国際医療センター国際協力局派遣協力課

役 職：医師

要旨：計数型抜き取り検査法は元来工業製品の品質管理の分野で広く用いられてきた統計手法であるが、近年開発途上国におけるワクチン接種率の調査および評価・モニタリングに用いられ、その有用性が確認されている。本研究はこの技法を用いて従来様々な要因で調査が困難であり、またポリオ根絶事業上高危険群と見なされている中国雲南省の少数民族居住地域における児童のポリオワクチン接種率調査を行い、今後の中国におけるポリオ根絶事業に資するデータを得ること、並びに該当地域の保健従事者が当手法を用い独自で予防接種プログラムの評価・モニタリングが実施できるようになることを目的として実施された。

KEY WORDS：計数型抜き取り調査、中国、雲南省、少数民族、ポリオ根絶

研究報告

目的：計数型抜き取り検査法は元来工業製品の品質管理の分野で以前より広く用いられてきた統計手法である。近年開発途上国におけるワクチン接種率の調査および評価・モニタリングに用いられ、その有用性が確認されている^{1) 2)}。

通常日本ではワクチン接種率の評価やモニタリングについては予防接種台帳に登録された児童を母集団値とし、実際の接種数を分子に計算されている。予防接種台帳は住民票や外国人登録を基に市町村で作成されるが、わが国の場合これが実際の対象児童人口と大きく違っていることはまれである。途上国の場合接種数については割合正確に把握することが可能であるが、対象母集団については信頼性の高いデータを得ることは困難である。中国の場合都市部においては流入人口の把握が困難であり、農村部では超生児と呼ばれるいわゆる一人っ子政策の上で禁止されている第二子以降の児童のように正確に住民として登録されていない子供が多く存在している。中国の予防接種事業においても日本と同様に接種台帳がありこれは接種者である郷村医師（村落ヘルスワーカー）が作成している。接種台帳の作成にあたっては、定住人口のみでなく、実際に

家庭訪問等を実施して実態調査の上流動人口や超生児についても記載するよう衛生部より指導されているが、家族計画事業は中国の国策であり、違反者への罰則もあることから実際にはきちんと接種台帳にこれらの児童が登録されることは希である。従って公式に報告されている予防接種率は分母の母集団が実際より低く見積もられているため、実際よりも高い値を示している。出生率を基に接種対象人口を推定し、実際に使用したワクチンの数を分子にし接種率を推定する方法もあるが、出生率に関しても家族計画事業との関係で必ずしも実勢を反映したものではないことが多く、この方法によっても不正確な値しか得られない。このような事情によってワクチン接種率の評価やモニタリングに際してフィールド調査が必要とされている。

中国雲南省の少数民族居住地域は一般に交通の不便な山岳地域であり保健行政予算や人的資源も乏しく、ワクチン接種率の評価やモニタリングに際して従来のサンプリングにより母集団のパラメータを推定する方法を用いることは困難である。また上記の理由や近年の経済事情による人口の流動化、国境を越えた住民の交流等によりワクチン接種率が低い集団が当地域内に存在し、ポリオ根絶事業上高危険地域と見なされている。当研究は計数型抜き取り検査法を用いることによって従来評価が困難であった地域のポリオワクチン接種に関するデータを得ることによって、今後の中国におけるポリオ根絶事業に資するデータを得ること、並びに該当地域の保健従事者が当手法を用い独自で予防接種プログラムの評価・モニタリングが実施できるようになることを目的として実施された。

方法：計数型抜き取り検査法は、従来のサンプリングにより母集団値を推定する方法に比べ少ないサンプル数で結果が得られることが一番の利点である。具体的な手順を以下に記す。帰無仮説の採択または棄却を行うことに関しては一般によく知られた統計学的検定手法とは同様である。帰無仮説は「あるロットからの不良品の出現率が p 以上である」とする。 N 個のロットより n 個を無作為抽出しその中の不良品の個数を示す確率は超幾何分布を表す。この確率分布の式を利用し、 N 、 p 、 d (限界値、 n 個のサンプルの中ある不良品の個数。通常 0、1、2 程度で設定する。)、 α (検定の第一種エラー、通常 0.01 または 0.05) を決めることによって必要なサンプル数 n が決められる。この値を得るためには煩雑な数式を解く必要があるが、あらかじめ用意された表を用いると簡単に値が得られる³⁾。

当手法をワクチン接種率評価に用いる際、ロットをコミュニティに置き換え不良品の出現率をワクチン非接種率に置き換えればよい。コミュニティの母集団人口 N はおよそ 1,000~10,000 とした。非接種率は 0.15 とした。即ち接種

率が 0.85 ということである。この基準は中国が 1996 年にポリオ接種率全国調査を実施した際に用いた値であり、基準的な値としてローカルヘルスワーカーや地区、県レベルでの衛生行政担当者にも広く受け入れられている。これが基準値設定の一つの理由である。実際には流動人口や外国籍の児童では更に接種率が低いことが今までの調査によって推測されている。ポリオ根絶のようなプロジェクトではワクチン接種率が一年で 40%から 50%に上昇したからといっても意味のある変化とはみなされない。高いワクチン接種率が保たれることによって疾病根絶が可能となるため、たとえ接種率が 30%でも 70%でもどちらも不合格とみなされることに変わりはない。よって 85%を評価基準とすることに問題はない。さらに限界値 d を 0、 α を 0.05 に設定することによって必要なサンプル数 $n=16$ を得た。即ち 1,000~10,000 人の母集団より 16 人を無作為抽出し全て接種ありであれば、その集団の接種率は 85%以上であり、一人でも接種なしの児童がサンプルに含まれれば 85%以下という調査モデルを得た。

1997 年に中国雲南省の 10 地区（文山、麗江、杵慶、徳宏、思茅、西双版纳、昆明、玉溪、昭通、曲靖）29 地点および 1998 年に 3 地区（大理白族自治州、楚雄イ族自治州、昆明市）9 地点において上記モデルを用い調査を実施した。調査には質問紙が用いられ、全国予防接種日（ナショナルキャンペーン）時および EPI（拡大予防接種計画）による定期予防接種によるポリオワクチンの接種の有無について尋ね、性別、年齢、居住形態など接種に影響すると思われる要因についても調査された。インタビューは標準中国語、漢語雲南方言、各民族語の話者によって適宜各言語を用い行われた。ポリオワクチンの性質より接種回数が 0 のものの他に接種が規定回数に達していない児童も不合格とした。

結果：雲南省にある 17 の地区のうち 12 地区（文山、麗江、杵慶、徳宏、思茅、西双版纳、昆明、玉溪、昭通、曲靖、大理白族自治州、楚雄イ族自治州）38 地点において実施した調査結果を表に示した。同じ地点でも定住人口と流動人口、外国人は別集団と考え別の地点として計上した。38 地点を居住形態別に見ると定住人口 10 地点、流動人口 10 地点、外国人 2 地点、区別しなかったもの 16 地点である。そのうち合格と判定されたものは定住では 8 地点、流動人口および外国人では共に 0、区別しなかったものでは 2 地点である。この区別しなかったものの 2 地点は農村であり、標本の中に流動人口を含んだものの殆どが定住人口であった。このことから定住人口に対するポリオワクチン接種率は非常に高いことが明らかになった。対照的に流動人口や外国人ではサンプルが集まらずに判定不能であった 2 地点を除くとすべて不合格であった。

表、計数型抜き取り調査を用いたポリオワクチン接種率調査の結果 ($\alpha=0.05$)

調査日時	調査地点	居住形態	合格基準	標本数	限界値	不合格数	結果
97. 4.26	文山州砚山县	区別せず	85%以上	29	2	3	不合格
4.27	文山州文山市 (1)	区別せず	85%以上	29	2	3	不合格
4.27	文山州文山市 (2)	区別せず	85%以上	29	2	5	不合格
4.28	文山州丘北県双龍營郷	区別せず	85%以上	29	2	0	合格
6.13	麗江地区麗江県	定住	85%以上	16	0	1	不合格
6.13	麗江地区麗江県	流動	85%以上	16	0	5	不合格
6.15	デイ慶州中デソ県	定住	85%以上	16	0	0	合格
6.15	デイ慶州中デソ県	流動	85%以上	16	0	6	不合格
7.9	徳宏州瑞麗市	定住	85%以上	16	0	0	合格
7.9	徳宏州瑞麗市	流動	85%以上	16	0	4	不合格
7.9	徳宏州瑞麗市	外国人	85%以上	16	0	4	不合格
7.9	徳宏州瑞麗市、龍川県	定住	85%以上	16	0	0	合格
7.9	徳宏州瑞麗市、龍川県	流動	85%以上	16	0	2	不合格
7.9	徳宏州瑞麗市、龍川県	外国人	85%以上	16	0	2	不合格
8.10	思茅地区江城県	区別せず	85%以上	16	0	3	不合格
8.11	西双版纳州モンテ県モーハン	定住	-	8	-	0	-
8.11	西双版纳州モンテ県モーハン	流動	85%以上	16	0	2	不合格
8.13	西双版纳州景洪市	流動	85%以上	16	0	1	不合格
9.1	昆明市宜良県	区別せず	85%以上	16	0	1	不合格
9.1	昆明市路南県堡子村	区別せず	85%以上	16	0	0	合格
9.24	玉溪地区峨山県	定住	85%以上	16	0	0	合格
10.23	昭通地区昭通市	定住	85%以上	16	0	0	合格
10.23	昭通地区昭通市	流動	85%以上	16	0	1	不合格
10.25	昭通地区塩津県	定住	85%以上	16	0	0	合格
10.25	昭通地区塩津県	流動	-	4	-	1	-
10.26	昭通地区水富県	定住	85%以上	16	0	0	合格
10.26	昭通地区水富県	流動	85%以上	16	0	2	不合格
10.27	曲靖地区曲靖市	定住	85%以上	16	0	0	合格
10.27	曲靖地区曲靖市	流動	-	4	-	1	-
98. 4.15	大理州大理市大理古城	区別せず	85%以上	16	0	4	不合格
4.16	大理州大理市下関紫雲	区別せず	85%以上	16	0	7	不合格
4.17	大理州劍川県	区別せず	85%以上	16	0	7	不合格
4.19	大理州洱源县	区別せず	85%以上	16	0	5	不合格
4.21	楚雄州楚雄市	区別せず	85%以上	16	0	7	不合格
4.22	楚雄州牟定県	区別せず	85%以上	16	0	6	不合格
4.23	楚雄州双柏県	区別せず	85%以上	16	0	7	不合格
4.25	昆明市	区別せず	85%以上	16	0	7	不合格
4.25	昆明市官渡区	区別せず	85%以上	16	0	7	不合格

考察:中国雲南省の少数民族居住地域はポリオ根絶事業上高危険群と見なされていた。今回この地域の児童のポリオワクチン接種率調査を行ったところ、定住人口については接種率が高く、流動人口では接種率が低いことがわかった。この結果は以前より保健従事者の間で推測されていたことと変わらないが、今回我々は統計的手法を用いて数理的に実態を証明することができた。また調査

に使用された計数型抜き取り検査法を用いることによって今後継続的にワクチン接種率のモニタリングが可能となった。今後地域の保健従事者が当手法を用い独自で予防接種プログラムの評価・モニタリングが実施できるようになることが望まれる。

調査実施の上で問題となったのは正確なサンプリングの実行である。定住人口であれば無作為抽出は可能であるが流動人口については困難である。実際に我々はエリアサンプリング（対象地域を地理的に分割し、無作為抽出する）と抽出されたエリアにおける単純無作為抽出からなる多段階抽出法を用いた。ただしこの方法では母集団の地理的な人口分布が正しく反映される保証はないので誤差を生じる可能性が大きい。今後エリアサンプリングを行う際に誤差を減少させるよう適切なサンプル数を設定する必要がある。

参考文献:

- 1) Lemeshow S. et al.. Quality assurance sampling for evaluating health parameters in developing countries. Survey Methodology, 15, 1, 71-81, 1989
- 2) Lanata C. F. et al. .Lot quality assurance sampling techniques in health surveys in developing countries: advantages and current constraints. Wld hlth statis. quart., 44, 133-139, 1991
- 3) Lemeshow S. et al..Lot quality assurance sampling: single and double sampling plans. Wld hlth statis. quart., 44, 115-132, 1991
- 4) Claudio F. Lanata, Robert E. Black, Lot quality assurance sampling techniques In health surveys In developong countries: advantages and current constraints. Wld hlth statis., 44, 133-139, 1991

中国少数民族居住地区におけるNID(全国予防接種日)事業およびEPI(拡大予防接種計画)の問題点について

小林 誠 (東京女子医大 第二病院 検査科)
松葉 剛 (国立国際医療センター 国際医療協力局)
梁 志松 (中国雲南省第一人民病院)

[要約]

中国の少数民族居住地区におけるポリオの予防接種特にNIDによる接種状況について、市場などでの聞き取り調査を行った。その結果以下の群がNIDから漏れやすい高危険群であることがわかった。①男、②漢族、③流動人口、④居住期間が1年未満、⑤以前のポリオの接種歴がない、⑥接種証を持っていない。当初の少数民族が高危険群であることを予想していたが、少数民族の大多数は定住人口で、しかも同じ場所に1年以上居住しており、定期接種、NIDなどの保健医療サービスを受けやすいことが考えられた。今後上記の高危険群をも巻き込む形で定期接種、NIDを行っていく必要がある。

Key word : ポリオ、拡大予防接種計画、NID(全国予防接種日)、流動人口、少数民族

I 目的

ポリオ根絶事業においてAFP(急性弛緩性麻痺)サーベイランスとポリオワクチンの接種は不可欠である。中国の南方に位置する雲南省は、全人口4000万人のうち33%が少数民族であり、最近まで野生株ポリオ症例の見られたヴェトナム、ミャンマーと接し、全地域の94%が山岳地帯という地理的要因もありポリオ根絶上高危険地域と考えられている。雲南省の少数民族居住地域におけるNID(全国予防接種日)事業およびEPI(拡大予防接種計画)の問題点およびその対策について検討した。

II 方法

98年4月に雲南省の3つの地区(大理、楚雄、昆明)の市場、商店街、駅前において、4歳未満の子供を持つ親144人を対象に97/98NID(97年12月5日、98年1月5日に中国全土で行われたNID)の接種状況について調査を行った。調査方法は、市場などの調査地点でランダムに4歳未満の子供を持つ親を抽出し、居住形態、子供のNIDの接種状況等について聞き取り調査をした(表1)。調査には標準中国語(普通話)のほかに現地の民族語が使用された。

出された結果を、NIDを完了したかどうか(「完了」とはNIDを2回とも接種されていること)について、性別、民族、居住形態、居住期間、以前のOPV接種歴、接種証の有無などに分けて χ^2 検定を行い検討した。またNIDの情報源、NIDを受けなかった理由についても検討した。

III 結果

1. 地区ごとのNID接種状況

中国ではNIDは12月5日と1ヶ月後の1月5日に行われている。どちらも接種されていない場合を「0回」、どちらの日か1回のみ接種された場合を「1回」、どちらの日も接種された場合を「2回」とした。大理、楚雄、昆明のそれぞれの地区でNIDを2回接種されているのは60%前後で、地区による大きな差はなかった(表2)。

2. 性別、民族の違いによるNID接種状況

性別では女兒の方が男児に比べ12月5日と1月5日に2回ともNIDが接種されている率が有意に高かった($p=0.00191$)。また民族別では少数民族の方が漢族に比べ2回ともNIDが接種されている率が有意に高かった($p=0.00416$) (表3)。

3. 居住形態、居住期間の違いによるNID接種状況

居住形態では、定住人口（戸籍がある場所に居住している人口）の方が流動人口（戸籍がある場所とは違う場所に住んでいる人口）に比べ2回ともNIDが接種されている率が有意に高かった（ $p=0.00109$ ）。居住期間では、1年以上現住所に住んでいる群の方が1年未満の群に比べNIDが接種されている率が有意に高かった（ $p=0.02961$ ）（表4）。

4. 過去のOPV接種歴の有無、接種証の有無とNID接種状況

過去にOPVの接種歴がある群は、接種歴がない群に比べ2回ともNIDが接種されている率が有意に高かった（ $p=0.00055$ ）。接種証を持っている群は持っていない群に比べ2回ともNIDが接種されている率は高いが有意差はなかった（ $p=0.07991$ ）（表5）。

5. NIDのことをどこで知ったか

今回のNIDを2回接種された群で、NIDのことをどこで知ったかについては、「村医者からの通知」が42（42%）と最も多かった。以下「テレビ」、「壁に書かれたスローガン」、「県防疫センター（予防保健を行う県レベルの機関）の通知」、「病院からの通知」、「知人からの情報」の順であった。また「接種の時までNIDのことは知らなかった」つまり接種の時初めてNIDのことを知った人は10人であった（表6）。

6. NIDの未接種理由

今回のNIDが未接種だった理由は、「知らなかった」が最も多く33人（58%）であった（表7）。

以上のことから以下の群がNIDから漏れやすい高危険群であることがわかった。

- ①男 ②漢族 ③流動人口 ④居住期間が1年未満 ⑤以前の接種歴が無い ⑥接種証を持っていない

IV 考察

民族別のNIDの接種状況に関しては、当初少数民族の方がNIDなどのワクチン接種から漏れやすいと考えていたが、実際には少数民族の方が接種状況は良かった。これは表8に示すように少数民族の大多数が定住人口で、しかも同じ場所に1年以上居住しており、村医者などにより定期接種に登録されやすく、定期接種やNIDを受けやすいためと考えられる。一方漢族は表8に示すように、約半分が流動人口で18%が居住期間が1年未満であった。そういった流動人口や居住期間が1年未満の人口は、短い期間に移動するため定期接種などの保健サービスから漏れやすく、今回のNIDでもやはり漏れてしまったと考えられる。

以前の接種歴は、定期接種や昨年（96/97）以前のNIDのことで、過去に何らかのかたちでOPVを接種されている子供は、今回の97/98NIDでも接種されている。逆に言えば、以前にOPVから漏れている子供は今回のNIDもまた漏れてしまう危険が高いということが言える。したがってNIDでは、より多くのしかも以前OPVを受けたことの無いような子供を見つけだし、接種することが重要である。

性別に関しては男の方がNIDから漏れやすい理由は不明で今後の検討が必要である。

人々のNIDに関する情報は、普段身近にいる村医者からのものの役割が大きい。NID未接種の理由は「知らなかった」が33/57（58%）で最も多く、村医者を通して人々への情報提供、啓蒙を行うことがNIDを一人でも多くの子供に接種するために重要である。

参考文献

- 1 Nakano T, Tsuyoshi M, et al. Transient population bypassed by polio vaccination programmes in Yunnan Province, China. *Lancet* 1997;350:1004
- 2 Tsuyosi M, et al. The Utility of Hayashi's Quantification Theory Type 2 for The Rapid Assessment of The Epidemiological Survey in The Developing Countries. *Journal of Epidemiology* 1998;8,1:24-27

表1. 調査項目

- ・子供の性別、年齢、民族
- ・居住形態(戸籍のある場所に住む場合を「定住」、そうでない場合を「流動」とした)
- ・居住期間(現在の住所に住んでいる期間)
- ・前回NID(97年12月/98年1月)の接種の有無、接種の場合はどこでNIDのことを知ったか(情報源)、未接種の場合はその理由
- ・以前のOPV接種歴の有無
- ・ワクチン接種証(ワクチンスケジュールや個人の接種歴が記録されている手帳で、防疫センターや医院で発行される)の有無

表2. 97/98NID接種状況

	対象者数	0回	1回	2回
大理	64	10(16%)	13(20%)	41(64%)
楚雄	48	8(17%)	12(25%)	28(58%)
昆明	32	8(25%)	6(19%)	18(56%)
合計	144	26(18%)	31(22%)	87(60%)

表3. 性別、民族とNID接種状況

	0回、1回	2回	合計
性別			
男	38(52%)	35(48%)	73
女	19(27%)	52(73%)	71
	(p=0.00191)		

民族			
漢族	44(45%)	53(55%)	97
少数民族	13(28%)	34(72%)	47
	(p=0.04168)		

表4. 居住形態、居住期間とNID接種状況

	0回、1回	2回	合計
居住形態			
定住	28(30%)	65(70%)	93
流動	29(57%)	22(43%)	51
	(p=0.00109)		

居住期間			
1年以上	46(37%)	78(63%)	124
1年未満	11(65%)	6(35%)	17
	(p=0.02961) ※居住期間不明3名		

表5. 以前のOPV接種歴の有無、接種証の有無とNID接種状況

	0回、1回	2回	合計
以前のOPV接種歴			
有り	41(34%)	81(66%)	122
なし	16(73%)	6(27%)	22
	(p=0.00055)		

接種証			
なし	23(50%)	23(50%)	46
有り	34(35%)	64(65%)	98
	(p=0.07991)		

表6. NIDのことをどこで知ったか

①村医者からの通知	42(42%)
②テレビ	16(16%)
③壁に書かれた標語	11(11%)
④県防疫センターの通知	10(10%)
⑤病院からの通知	6(6%)
⑥知人からの情報	6(6%)
⑦その他	8(8%)

合計 99

※複数回答あり

※「接種の時までNIDのことは知らなかった」は10人

表7. NIDの未接種理由

①NIDのことを知らなかった	33(58%)
②知っていたが忙しかった	8(14%)
③知っていたが外出、旅行中だった	5(9%)
④本人(子供)が病気、発熱していた	2(3%)
⑤その他	9(16%)
合計	57

表8. 居住形態、居住期間と民族

	定住	流動	合計	
民族				
漢族	49(51%)	48(49%)	97	
少数民族	44(94%)	3(6%)	47	
	1年未満	1年以上	不明	合計
民族				
漢族	17(18%)	79(81%)	1(1%)	97
少数民族	0(0%)	45(96%)	2(4%)	47

日本財団補助金による

1998年度日中医学協力事業報告書

—調査並びに研究に対する助成—

1999年3月14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 清水 宏 

所属機関名 慶應義塾大学医学部皮膚科学教室

職名 助教授 年齢 43 才

所在地 〒160 新宿区信濃町35

電話 03-3353-1211 内線 2413

1. 研究課題

日本と中国における先天性表皮水疱症患者の遺伝子変異部位の比較検討

2. 研究期間 自 1998 年 4 月 1 日 ~ 至 1999 年 3 月 15 日

3. 研究組織

日本側研究者氏名 西川 武二 (58才)

所属機関 慶應義塾大学医学部皮膚科 職名 教授

中国側研究者氏名 Xye-Jun Zhu (56才)

所属機関 北京大学医学部皮膚科 職名 教授

4. 研究報告

別添書式を参考に、報告本文4000字以上で作成して下さい(枚数自由・ワープロ使用)

研究成果の発表予定がある場合は発表原稿・抄録集等を添付して下さい。

論文発表に当っては、日中医学協会—日本財団補助金による旨を明記して下さい。

研究テーマ

日本と中国における先天性表皮水疱症患者の
遺伝子変異部位の比較検討

研究代表者

清水 宏
慶應義塾大学医学部皮膚科学教室
助教授

要旨

表皮水疱症は多くの病型に分類されるが、いずれの病型においても先天的に皮膚が脆弱であり、軽度の機械的刺激で容易に水疱、潰瘍を生ずる。その中でも劣性栄養障害型と Herlitz 致死接合部型は最重症型であり、表皮水疱症の中でも最も予後の悪いタイプである。両者はともに常染色体劣性に遺伝する。本症では先天的に皮膚基底膜の VII 型コラーゲン、あるいは laminin 5 の形成障害が基盤にあることが最近解明された。また一部の患者においてはそれぞれの遺伝子の変異も確認されるに至った。

本研究の目的は、表皮水疱症の最重症型である劣性栄養障害型ならびに Herlitz 型の日本人患者と中国人患者における VII 型コラーゲン、および laminin 5 の遺伝子変異部位を同定をしようとする確実な遺伝子診断法を設定し、日本人、中国人患者における遺伝子変異パターンの異同を明らかにすることであった。

本研究では、実際に劣性栄養障害型ならびに Herlitz 致死型表皮水疱症患者を集積した。患者の皮膚を基質として、VII 型コラーゲン、および laminin 5 に対するモノクローナル抗体を用いてタンパクレベルの異常を確認した。

続いて、個々の劣性栄養障害型、ならびに Herlitz 型表皮水疱症患者から DNA を抽出し、個々の症例における VII 型コラーゲン、あるいは laminin 5 における遺伝子変異部位を DNA レベルで確認した。この結果、中国人表皮水疱症患者においても日本人患者と類似の遺伝子変異パターンが存在することが示唆された。

Key Words

表皮水疱症、ラミニン 5、VII 型コラーゲン、皮膚基底膜、遺伝子診断

目的

本研究の目的は、日本と中国における先天性表皮水疱症患者の遺伝子変異部位を比較検討し、遺伝子変異部位を同定をしよう確実な遺伝子診断法を設定することである。

方法

1) 日中両国での表皮水疱症患者の集積：

表皮水疱症患者を中国全土から集積する。具体的にはこれまでに集積した日本人患者50例に加え、あらたに北京大学を窓口で中国人の表皮水疱症患者を集積する。shave biopsyにて患者皮膚を生検し、凍結生切片を蛍光抗体間接法の基質とする。また患者、および家族から採血を行いDNAを抽出し、遺伝子解析の材料とする。

2) 蛍光抗体法

表皮水疱症患者皮膚を基質として、Herlitz 致死型で特異的に欠損している laminin 5、劣性栄養障害型で特異的に欠損している VII 型コラーゲンに対するモノクローナル抗体を用いて蛍光抗体間接法を施行する。

3) 電顕

電顕的に患者皮膚における水疱形成部位を電顕的に同定する。同時に表皮基底膜構成成分であるヘミデスモゾームならびに anchoring fibril の微細形態異常の有無を観察する。

4) PCR ならびに Heteroduplex 法

個々の Herlitz 型表皮水疱症患者、ならびに劣性栄養障害型患者について、1) - 3) までの検索により推定された laminin 5 あるいは VII 型コラーゲン遺伝子における変異部位を PCR ならびに Heteroduplex 法にて推定する。

5) Direct sequencing ならびに制限酵素による遺伝子変異部位の確定

Heteroduplex 法にてダブルバンドがあらわれたエクソン部分に関しては、我々の保有する自動 sequencer にて遺伝子変異部位を検索する。発見された変異部位の確認には、適当な制限酵素、あるいは allele-specific oligonucleotide hybridization 法を用いて行う。

6) DNA 出生前診断への応用と実施

laminin 5、あるいはVII型コラーゲンのDNA変異部位が確認された家系については統計解析し、日中両国患者において共通に認められる hot spot mutation 部位を確認する。同時にその部位を同定するための、正確、簡便な遺伝子変異同定法を確立する。さらにもし罹患児出産の既往がある母親が再び妊娠し出生前診断を希望した場合、実施計画がたてられるように検討する。

結果

中国における劣性栄養障害型ならびにHerlitz致死型表皮水疱症患者を集積した。患者の皮膚を基質として、VII型コラーゲン、およびlaminin 5に対するモノクローナル抗体を用いてタンパクレベルの異常を検索した。その結果、日本人患者と類似のタンパク以上がそれぞれVII型コラーゲン、およびlaminin 5に見られることが示唆された。

続いて、個々の劣性栄養障害型、ならびにHerlitz型表皮水疱症患者からDNAを抽出し、個々の症例におけるVII型コラーゲン、あるいはlaminin 5における遺伝子変異部位をDNAレベルで確認した。この結果、すくなくとも日本人患者においては、特異的な遺伝子変異が同定された。中国人患者については現在検索中である。

考察

表皮水疱症は、皮膚基底膜抗原をコードする遺伝子の変異により生じ、国の難治性疾患にも指定されている皮膚遺伝病であり、いくつかの病型に分類される。とくにHerlitz致死型と劣性栄養障害型は最重症型であり、早期に死亡するか、合指症、扁平上皮ガンの発生などにより予後不良な経過をたどる。有効な治療法が無いため、臨床面、社会面においても、安全確実な本症のDNAレベルでの診断、出生前診断法の確立は重要な課題である。申請者らは表皮水疱症の病因、診断法に関する研究を長年続けており、一部の症例においては出生前診断することにもすでに成功している（業績；Shimzu H et al.参照）。一方、最近の免疫学、分子生物学の著しい進歩にともない、表皮水疱症の原因となる遺伝子異常も解明されつつある展開を迎えている。しかし、最近本症における遺伝子変異部位は人種間によりかなりの多様性があることも判明し、欧米の患者と日本人患者ではそのhot spot mutation 部位が異なり、正確かつ効率的なDNA診断法も人種間により差があることが明らかとなった。

本研究の目的は、人種的に比較的近縁な中国、日本両国における表皮水疱症患者を比較対象として、遺伝子変異部位、臨床所見に多様性である本症の遺伝子レベルでの診断、出生前診断を確立させることであった。本研究の遂行には、日本のみならず多数の中国人患者の解析も必要であったため、現在中国における水疱症研究の第一人者である北京大学皮膚科のZhu教授と共同研究を行った。

本研究は、日本と中国という人種的に近縁な両国での表皮水疱症の hot spot mutation を見いだすための基礎データになることが予想される。

参考文献

1. Shimizu H et al. J Am Acad Dermatol 31:429-433, 1994.
2. Shimizu H et al. J Invest Dermatol 103:104-106, 1994.
3. Shimizu H et al. Prenat Diagn 14:443-450, 1994.
4. Shimizu H et al. J Histochem Cytochem 42:687-692, 1994.
5. Shimizu H et al. J Invest Dermatol 105:153-159, 1995.
6. Shimizu H et al. J Invest Dermatol 104:370-373, 1995.
7. Shimizu H et al. Dermatology 192:203-207, 1996.
8. Shimizu H et al. J Invest Dermatol 106:119-124, 1996.
9. Shimizu H et al. Arch Dermatol 132:919-925, 1996.
10. Shimizu H et al. Acta Dermato-Venereol 77:10-13, 1997.
11. Shimizu H et al. Arch Dermatol Res 289:174-176, 1997.
12. Shimizu H et al. Lab Invest 76:753-763, 1997.
13. Zhu XJ, Niimi Y, Bystryjn JC: Identification of a 160-kD molecule as a component of the basement membrane zone and as a minor bullous pemphigoid antigen. J Invest Dermatol 94:817-821, 1990.
14. Zhu XJ et al. J Clin Dermatol 22:190, 1993.
15. Zhu XJ et al. Chinese J Dermatol 27:157, 1994.
16. Zhu XJ et al. Chinese Med J 108:269, 1995.

日本財団補助金による

1998年度日中医学協力事業報告書

—調査並びに研究に対する助成—

1999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 田口 喜雄 
所属機関名 東北大学留学生センター
職名 教授 年齢 61 才
所在地 〒980-77 仙台市青葉区片平2-1-1
電話 217-4867 内線 _____

1. 研究課題

中国におけるスギ花粉症の実態調査とその対策

2. 研究期間 自 1998年 5月 1日 ~ 至 1999年 3月 15日

3. 研究組織

日本側研究者氏名 三好 彰 (48才)
所属機関 三好耳鼻咽喉科クリニック 職名 院長
中国側研究者氏名 程 雷 (33才)
所属機関 南京医科大学 職名 講師

4. 研究報告

別添書式を参考に、報告本文4000字以上で作成して下さい（枚数自由・ワープロ使用）

研究成果の発表予定がある場合は発表原稿・抄録集等を添付して下さい。

論文発表に当たっては、日中医学協会—日本財団補助金による旨を明記して下さい。

1. 研究テーマ

中国におけるスギ花粉症の実態調査とその対策

2. 研究代表者氏名

田口 喜雄

3. 所属・役職

東北大学留学生センター医学系研究科・教授

Cedar Pollinosis in China —An epidemiological and clinical study in south China

【Abstract】 Objective: To confirm cedar pollinosis in China and investigate the prevalence of it. **Methods:** From 1995, an epidemiological survey on nasal allergy was carried out among 1660 primary and middle school students and 2167 university students in 3 provinces of south China (Jiangsu, Guangdong, Yunnan), including questionnaire investigation, nasal inspection, and scratch test. Secondly, clinical observation was made to the patients of nasal allergy in the First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University in the spring of 1998. **Results:** 1. The epidemiological survey showed that the total positive rate of cedar pollen scratch test was 3.8%, and the prevalence of cedar pollinosis was 0.26%. 2. The clinical investigation showed that 16.7% of patients were hypersensitive to cedar pollen. **Conclusions:** Cedar pollinosis does exist in China. However the prevalence was low, which was related to the low quantity of cedar pollen and other background factors.

【Key words】 cedar pollinosis, *Cryptomeria japonica*, *Cryptomeria fortunei*, China

Cedar Pollinosis, generally referred to Japanese cedar Pollinosis, was reported in Nikko of Japan by Horiguchi and Saito^[1] in 1964 and was regarded as the characteristic pollinosis of Japan^[2]. It had not been reported ever other than in Japan. However, in China, cedar pollinosis was paid little attention to because of its low prevalence at present.

It is well known that cedar came into being even about 2 million years ago and mainly existed in south China and Japan^[3], and all kinds of cedar were of the s

same family and the same genus at that time when Japanese and Chinese land were connected together. With the development of geography and history the both lands separated, which resulted in the separation of Chinese cedar (*Cryptomeria fortunei*, Cf) and Japanese cedar (*Cryptomeria japonica*, Cj).

It is self-proved that pollinosis should exist where there is pollen. As the plant of cedar^[4] and the flying of cedar pollen^[5] had been recognized in many regions of China, does cedar pollinosis exist in China? From 1995, we carried out an epidemiological survey and clinic investigation on nasal allergy, and found cedar pollinosis in China.

Material and Methods

1. About epidemiological survey

(1) Subjects

Freshmen and seniors of Nanjing Medical University in Nanjing, Sun Yat-sen University of Medical Sciences in Guangzhou and Kunming medical college in Kunming, 1st and 4th grade students in Lili Town primary school, 1st grade students in both Lili Town middle and high school in Wujiang of Jiangsu Province, amounting to 3280 students, aged from 6 to 24 years, accepted the survey. The distribution of subjects was listed in table 1.

(2) Methods

The process of survey are : 1) Questionnaire investigation: to grasp the nasal symptoms; 2) Nasal inspection: conducted by the same doctor to confirm the signs; 3) Allergen scratch test: using the allergen extracts of *Cryptomeria japonica* produced by Torii Pharmacological Co. Ltd. The contrast liquid was 50% glycerin liquid.

(3) Date and Place

We held the survey in university and school. The date were Oct 7, 1995, Oct 29, 1996, Sep 29-30, 1997, Sep 25, 1998 in Nanjing; May 6, 1996, May 5, 1997, May 4, 1998 in Lili Town; Oct 25, 1996 in Guangzhou; Sep 27, 1998 in Kunming. Questionnaire survey was completed one month early.

(4) Criteria of scratch test and nasal allergy

According to Japanese Allergy Academic Society, the positive reaction should be decided if papule is over 5mm or patch over 15mm after 20 minutes of scratch, while what is under 2 times of contrast liquid should be omitted.

Nasal allergy should be diagnosed if 3 points are fitted at the same time: 1)

At least 2 or 3 of the main symptoms of nasal allergy (sneeze, snivel, nasal obstruction), 2) Signs of nasal allergy, 3) Positive reaction to at least one kind of allergen in scratch test.

2. About clinic investigation From February to April of 1998 when cedar pollen was flying, skin allergen test, including scratch test and nasal provocation test, were conducted among 30 patients of nasal allergy (male 14, female 16, aged 15-47 years), in the department of Otolaryngology, First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University.

Results

1. About epidemiological survey

(1) Positive rate of scratch test (Table 2.)

The total positive rate of cedar was 3.8%.

(2) Prevalence of nasal allergy

According to the criteria, among 3827 objects, cedar pollinosis were 10 cases (0.26%).

2. About clinic investigation

Clinical investigation showed that 5 cases (16.7%) were hypersensitive to cedar pollen. The first case of cedar pollinosis in China was reported as follows.

Patient: 32-year old, female

Symptom: sneeze, snivel and nasal obstruction

Family history: Her mother had nasal allergy.

Present history: In April of 1989, these symptoms occurred in the suburbs of Nanjing. From then on the symptoms occurred in spring and autumn every year. Nasal allergy was diagnosed in 1990 and treated by anti-histamine drugs. From 1993, it turned into perennial and worsened in spring and autumn, combined with ophthalmic and laryngological symptoms. On March 3 of 1998, she came to the department of Otolaryngology, First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University for treatment.

Examination: Swollen and white inferior turbinate and watery rhinorrhea could be observed. In scratch test, positive reaction was shown to allergens of Cedar, Orchard, Ragweed, House Dust and Mite. Nasal mucosa test using cedar pollen allergen showed positive.

Discussion

It is well known that cedar is evergreen arbor, and as the main afforestation tree it exists almost in whole Japan. It is also considered that cedar pollen is the main sensitizing pollen in Japan and belongs to Japan only^[2]. The prevalence of cedar pollinosis is so high that it is said to be the 「national disease」 in Japan^[6].

From the Chinese Botanical annals^[7], cedar includes 2 species: *Cryptomeria fortunei* and *Cryptomeria japonica*. Cf exists only in China, distributing in southeast China; Cj yields in Japan originally and is also imported in southeast China (figure 1) and it is testified by our observation, in which many cedars were found in Nanjing, Kunming, Shanxi and Mountain Tianmu. Further, through the national survey of airborne and allergic pollen over whole China in 1980s^[5], cedar pollen had been affirmed in many regions. The results were summarized into the map (figure 2). The quantity of cedar pollen constituted 0.02%-11.27% of the total quantity of a whole year, especially in Chengdu(11.27%), Wuhan(6.16%), Nanchang(3.27%), Xi'an(1.78%) and so on. The last study in 7 districts of Wuhan showed that it was 38.5% (5523 pollens per annum)^[8].

It was affirmed that Cj and Cf were of the same family and genus through RFLP analysis of PCR-amplified specific chloroplast genes by Japanese scholars^[9]. According to the last research of our group on genetic characteristics of the cedar growing in Mountain Tianmu, China and Yakushima and Izu Ohshima islands, Japan, only the slight genetic variation seemed to occur and the morphological features between Cf and Cj were very similar to each other^[10]. It could be considered that Cf and Cj had the originally equal origin and were distinguished as one form by the allozyme, and the necessity of dividing as a species was not indicated.

It became obvious that cedar pollinosis does also exist in China. According to our investigation, the prevalence rate of cedar pollinosis was 0.26%. As for Jiangsu Province, the potential patients of cedar pollinosis would reach about 200 thousands based on the whole population of 80 million. In China, that cedar pollinosis has been paid little attention to before is attributed to the following factors: 1) The quantity of cedar pollen does not predominate in airborne pollen in most regions of China, the sensitizing rate was low and cedar pollinosis is not prevalent at present. 2) Meanwhile, there is no extracts of cedar pollen that could be applied for clinic. 3) The main kinds of allergic pollen in China are *Artemisia* and *Ambrosia*, the doctor does not pay much attention to cedar pollinosis. 4) Only a few patients with severe symptoms came to the hospital. Nowadays, u

nder the campaign of 「Planting and afforesting, greenizing the country」, cedar is wildly used in the afforestation^[11]. With the development of society and economy, spread of afforestation, variance of circumstance, it is possible that cedar pollinosis would increase in China as it did in Japan.

Reference

- 1) 堀口申作・斎藤洋三：栃木県日光地方におけるスギ花粉症 Japanese cedar pollinosis の発見. アレルギー 13:16-18, 1964.
- 2) 斎藤洋三：スギ花粉症. すずさわ書店東京, 1980.
- 3) 三好彰・佐橋紀男：中国のスギ花粉症—スギ花粉症は日本独特か—. 耳喉頭頸 70:139-145, 1996.
- 4) 橋本与良：中国のスギ, 新版スギのすべて. 594-599, 全国林業改良普及協会, 東京, 1983.
- 5) 中国気伝致敏花粉調査領導小組 (組長; 葉世泰) 編：中国気伝致敏花粉調査. 北京出版社, 北京, 1991.
- 6) 奥田稔：鼻アレルギー, 第二版. 金原出版, 東京, 1992.
- 7) 中国科学院中国植物誌編輯委員会 編：中国植物誌 (第7巻). 293-299, 科学出版社, 北京, 1978.
- 8) 劉光輝 著：武漢城区花粉症患者主要致敏花粉的研究. 臨床耳鼻咽喉科雜誌 12: 226-227, 1998.
- 9) Tsumura Y et al: Molecular phylogeny of conifers using RFLP analysis of P CR-amplified specific chloroplast genes. Theor Appl Genet 91:1222-1236, 1995.
- 10) 佐橋紀男 著：中国の天目山と日本の屋久島・伊豆大島産のスギの遺伝的特性. 耳鼻 45: (投稿中), 1999.
- 11) 殷敏：中国のスギ花粉症. 三好彰 編:鼻アレルギー. 48. 日本評論社, 東京, 1998.

Reference (引用文献はすべて英文で)

- 1) Horiguti S and Saito Y: A discovery of Japanese cedar pollinosis in Nikko, Tochigi Prefecture. Jpn J Allergol 13: 16-18, 1964. (in Japanese)
- 2) Saito Y: Japanese cedar pollinosis. Suzusawa Books, Tokyo, 1980. (in Japanese)
- 3) Miyoshi A and Sahashi N: Oversea Topics; Japanese cedar Pollinosis in China—Is it distinction in Japan?—Otolaryngol Head Neck Surg(Tokyo) 70: 139-145, 1998. (in Japanese)

- 4) Hashimoto A: *Cryptomeria fortunei*, Sugi (new edition), 594-599. National Association of Forestry Improvement and Popularization of Japan, Tokyo, 1983. (in Japanese)
- 5) The committee of the national survey of airborne and allergic pollen in China: A national survey of airborne and allergic pollen in China. Beijing Press, Beijing, 1991. (in Chinese)
- 6) Okuda M: Nasal Allergy. Kanehara Press, 1992. (in Japanese)
- 7) Academia Sinica editorial board of Chinese botanical annals: Taxodiaceae, 4. *Cryptomeria*, Chinese botanical annals (Volume 7), 293-299. Science Press, Beijing, 1978. (in Chinese)
- 8) Liu GH et al: A survey of main allergic pollen in pollinosis in district of Wuhan. J Clin Otorhinolaryngol (China) 12: 226-227, 230, 1998. (in Chinese with an English abstract)
- 9) Tsumura Y et al: Molecular phylogeny of conifers using RFLP analysis of PCR-amplified specific chloroplast genes. Theor Appl Genet 91: 1222-1236, 1995.
- 10) Sahashi N et al: Research on genetic characteristics of the cedar which grows in Mt. Tianmu, China and Yakushima and Izu Ohshima islands, Japan. Otologia Fukuoka 45: in contribution, 1999.
- 11) Yin M: Cedar pollinosis in China. In : Miyoshi A; Nasal allergy, 48. Nihon Hyoronsha, Tokyo, 1998. (in Japanese)

日本財団補助金による

1998年度日中医学協力事業報告書

—調査並びに協同研究に対する助成—

1999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 伊藤洋一 (伊藤印)
所属機関名 北里大学医学部
職名 教授 年齢 63 才
所在地 〒228-0829 相模原市北里1-15-1
電話 042-778-8836 内線 _____

1. 研究課題

有鉤囊虫症診断のための免疫反応用抗原の調製
と、それをを用いた中国東北地方における同症感
染状況の調査

2. 研究期間

自 1998年 4月 1日 ~ 至 1999年 3月 15日

3. 研究組織

日本側研究者氏名 伊藤洋一 (63才)
所属機関 北里大学医学部 職名 教授
中国側研究者氏名 張永生 (58才)
所属機関 白求恩医科大学 職名 教授

4. 研究報告

別添書式を参考に、報告本文4000字以上で作成して下さい (枚数自由・ワープロ使用)

研究成果の発表予定がある場合は発表原稿・抄録集等を添付して下さい。

論文発表に当っては、日中医学協会—日本財団補助金による旨を明記して下さい。

中国吉林省囊虫病院における脳囊虫症入院患者の状況

伊藤洋一（北里大学・医学部教授）、大場正巳（北里大学・看護学部教授）、杜軍、張永生（白求恩医科大学助教授、教授）、市川秀隆（金沢医科大学助手）

要旨

1. 吉林省囊虫病研究中心囊虫病専科医院で脳囊虫症と診断され、入院治療を受けた患者について調査を行った。
2. 同病院で脳囊虫症の診断で治療を受けた患者は、1987年～1994年の8年間で4504名に達し、年間平均で563名、人口10万人あたりの年間平均は2.2であった。
3. 男性は女性よりも2倍の患者数であった。
4. 30代、40代の成人年代層に多くの患者が認められた。
5. 農村居住者のみならず、都市居住者にも多くの患者が認められた。
6. 患者は吉林省全域に認められた。
7. 今後はその感染様式や撲滅対策につき詳細な調査を行う必要がある。

KEY WORDS:

条虫症、脳有鉤囊虫症、中国東北地方、疫学

中国東北地方には未だ各種の風土病が流行し、多くの住民がその罹患に悩まされ、経済的にも多くの損失が生じている。

一部の疾病に関しては中国衛生部を始め多くの関係機関や研究者により調査・研究がなされ、その対策も施されているが、その実態も明らかでなく、対策の施されないままに現在に至っている疾病の少なくはない。その中には有鉤囊虫症、エキノコックス症、旋毛虫症などの組織寄生虫症が含まれている。

我々は1991年より北里学園国際学術交流資金や日中友好協会研究助成金からの資金援助を受け、白求恩医科大学、哈尔滨医科大学、中国医科大学などと共に主に中国東北地方に流行する有鉤囊虫症に関する共同調査・研究を実施してきた。

今回はそのうちから、吉林省の囊虫病院の入院患者の調査結果を報告する。

調査方法

調査地区：吉林省は黒竜江省、遼寧省とともに中国東北地区に位置し、面積18.7万平方キロ、人口約2500万人、鹿茸、人参など漢方薬の原料を主産業とする地区である。中央を松花江が流れ、省都長春はかつて満州国の首都として知られている。

調査対象：吉林省には囊虫病専門病院として軍に所属する囊虫病研究中心囊虫病専科医院（病床数約150）及び農業大学付属病院（病床数約160）があり、吉林省で囊虫病と診断された患者の多くはこれらの病院で治療を受ける。今回は、囊虫病研究中心囊虫病専科医院に1987年より1994年の間に入院、治療を受けた患者のうち、脳囊虫症と

診断された患者の診療記録から性別、年齢、住所、家族状況、職業などを調べ、その実態を明らかにした。

結果

1. 患者数の年次推移

図1には年次別の患者数と人口100,000人あたりの罹患状況を示した。同病院で脳囊虫症と診断され、治療を受けた患者の数は年による若干の変動はあるものの、388人から746人、年平均563人（罹患率：1.5～3.0）であり、年次経過による増減傾向はみられなかった。

2. 性別の年次推移

図2に男女別の患者数を年次別に示した。何れの年も男性が多く、総計では男性2988名に対して女性1516名で、女性が男性の約半分（66：34）であった。この8年間で年次による男女比に大きな違いが見られなかった。

3. 年齢と感染

図3に年齢階級別の患者数を、図4には人口10万人あたりの罹患率を示した。3歳の患者から72歳に至る40歳代をピークとした一峰性の年齢階級分布が認められた。

4. 患者居住地の分布

図5は患者の居住地をプロットしたものである。南東部の山岳地帯を除き、全地区のその分布が認められた。

5. 都市と農村居住者別罹患状況

図6には長春市内に居住する住民（都市居住者）とそれ以外の地区居住者（農村居住者）別にその患者状況を示した。患者数、罹患率共に、何れの年においても両者に大きな違いは認められなかった。

考察

有鉤囊虫症は有鉤囊虫の虫卵を経口的に摂取することにより感染する幼虫移行症の一つである。ヒトに摂取された虫卵からは六鉤幼虫が孵化し、小腸壁より体内各所に侵入・寄生し、有鉤囊虫に発育する。寄生部位によっては重篤な症状を呈し、生命の危険に曝されることも少なくない。虫卵は成虫を小腸に宿しているヒトの糞便内に含まれている。

成虫のヒトへの感染はヒトと同じく有鉤条虫卵を摂取し、有鉤囊虫に感染した豚肉を不完全調理の状態ですることにより生じる。すなわち、ヒトは豚肉内の有鉤囊虫を摂取することにより小腸に成虫が寄生し（終宿主）、その成虫から産出された虫卵を摂取することにより有鉤囊虫が脳、眼球、心臓を始め、体内各所に寄生（中間宿主）することとなる。

吉林省を含め、東北三省は餃子をよく食されることで知られ、その食習慣に伴い豚肉の消費量が多く、この食物を介してこの地区に有鉤（条虫）囊虫症が流行していることは

よく知られているが、実際にはその実態は必ずしも明らかにされていない。

今回我々は吉林省の囊虫症専門病院の入院患者について、脳有鉤囊虫症患者の実態調査を試みた。記録が必ずしも完全ではなく、詳細な状況は不明の点が多いが、1987年から1994年の8年間の記録調査の結果、年間の入院患者が実数で563人(388~746)、人口10万人あたり2.2(1.5~3.0)であった。この地区に同じ規模の囊虫専門病院として農業大学付属病院があること、この地区の医療状況から見て、症状があっても受診できない住民や、感染を受けていても症状に気が付かない住民が受診者数を遙かに凌ぐことなどを勘案すると、現在でも有鉤囊虫症の流行がこの地区で継続して発生しており、年間にかかなりの住民が感染に危険に曝されていることが窺われた。実際に入院患者数が女性に比べて男性が2倍になっていることは、感染の実態を示しているということよりも、一家の働き手である男性が入院・加療を受ける機会の高いことを示唆している。

年齢層で30代~40代の成人の罹患率が高くなっていることも、長年蓄積された結果症状が発現し、加療を受けざるを得なくなったことも原因の一つであると考えられるが、さらに高年齢層で減少の傾向が認められるのは入院・加療の機会が働き盛りの成人で高いことを示しているのではなからうか。

尿尿で汚染された野菜や飲み水の摂取により感染を受ける有鉤囊虫症などの疾病は一般的に尿尿処理施設の完備されていない農村地区で高いことが多い。今回の調査では、予想に反して脳囊虫症患者の居住地が都市(49%)と農村(51%)でほぼ同じ比率であり、農村地区の住民のみならず都市に居住する住民にもかなりの患者が認められた。この都市の住民の感染の原因を长春市などの都市に居住する条虫保有者の糞便とすることは考えにくい。農村地区より都市に搬入された汚染野菜にその原因があるのではなからうか。実際にこの地区の都市住民における有鉤条虫感染者は現在きわめて少なく、有鉤囊虫のみの感染者が大多数である。

もし、このことが事実であるとする、農村で生産された有鉤条虫卵汚染野菜はその輸送能力の拡大に伴い、近郊都市から遠隔都市へ、さらには日本などの隣近諸国へも輸出される可能性が予想される。詳細な調査を早急に実施する必要がある。

今回の調査で有鉤囊虫症が吉林省でかなり流行していることが数字で示され、明らかとなった。今後はさらに黒竜江省、遼寧省における状況を調べると共に、中国東北地方の一般住民の有鉤囊虫症感染状況、有鉤条虫症感染者の実態、飼育豚の有鉤囊虫感染状況、感染源・感染経路とその対策、輸入に伴う汚染拡大の現況把握など早急に調査すべき課題が残されている。

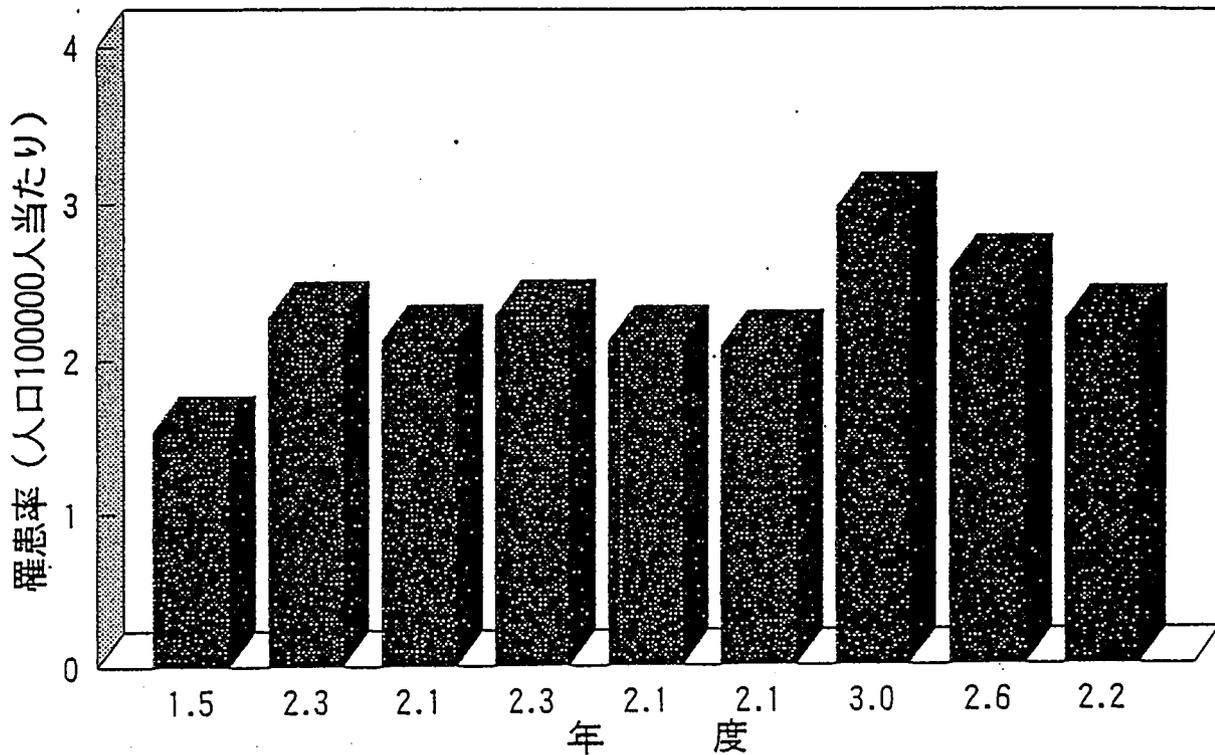
日本としては、地理的、歴史的に関係が深く、食糧の流通が頻繁に行われることの予想される中国東北地方において現在でも流行する有鉤囊虫症対策は対岸視できない風土病の一つである。しかし、その実態調査並びに予防対策の開発を中国独自で実施することは困難な状況にある。種々の寄生虫撲滅対策に輝かしい実績を持つ日本がその経験を生かして、積極的な援助の手を差し伸べるべきであろう。

参考文献:

1. 杜軍、伊藤洋一、李叔紅、連建安:猪囊尾幼可溶性蛋白的提取和分析、中国寄生虫学与寄生虫病雜誌、12(2), 155, 1994

2. 李叔紅、杜軍、易世紅、連建安、伊藤洋一、小山浩一、長田房子、張連三：猪囊尾幼病的免疫診斷研究、白求恩医科大学学報、20（5）、474-475, 1994
3. 伊藤洋一、杜軍：有鉤囊虫症を疑う患者血清中の有鉤囊虫 ELISA 抗体の測定、日中医学、10（4）、7-9, 1996
4. Ito Y., Maki J., Ichikawa H., Do J., Zhang Y.:Epidemiological Studies on Cerebral Cysticercosis in Jilin Province, China, Parasitology International, 47(Suppl.), 319, 1998.
5. Ichikawa H., Ito Y., Zhang Yongsheng, Xu Zhi-jie:A Sero-Immunological Studies on Cysticercosis in Jilin Province of China, Parasitology International, 47(Suppl.), 363, 1998.

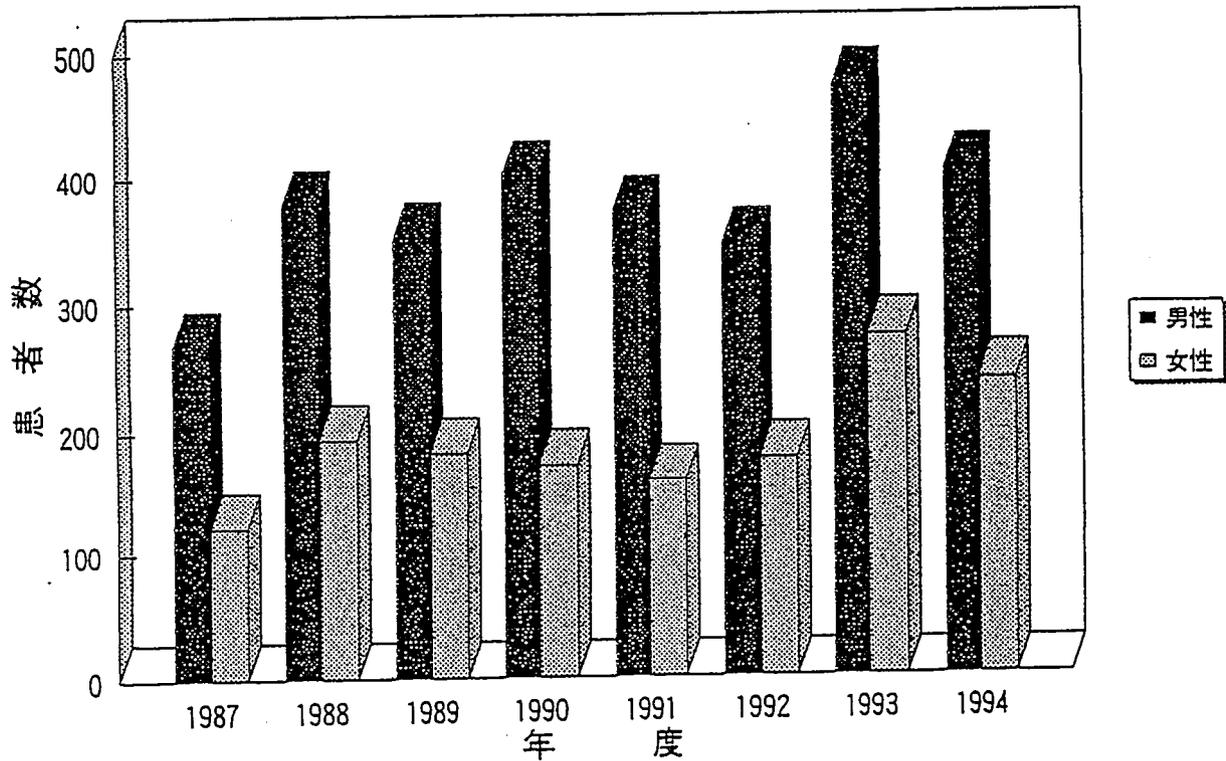
図 1 脳嚢虫症罹患率の年次推移
(1987-1994)



脳嚢虫症罹患率の年次推移
(人口10万人当たり) (1987-1994)

年 度	総人口(25156135人)	
	患者数	罹患率
1987	388	1.5
1988	571	2.3
1989	533	2.1
1990	572	2.3
1991	530	2.1
1992	521	2.1
1993	746	3.0
1994	643	2.6
平均	563	2.2

図 2 男女別脳囊虫症患者の年次推移
(1987-1994)



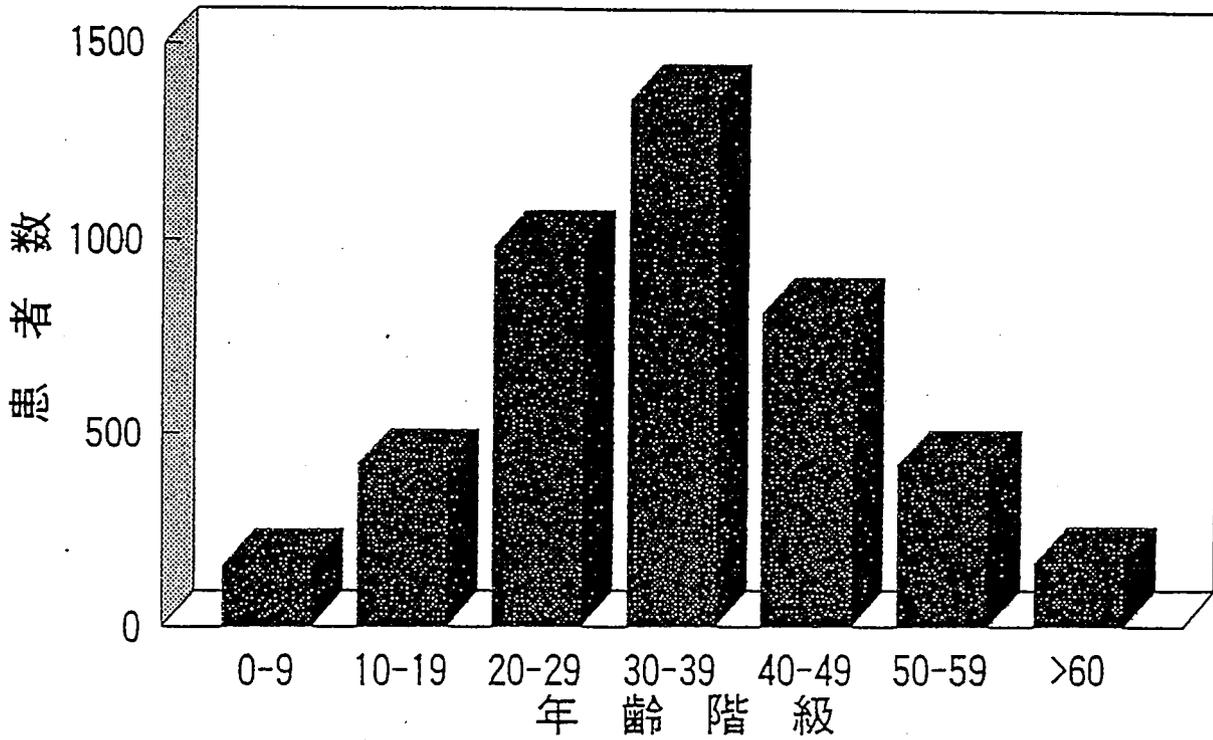
男女別脳囊虫症患者の年次推移

(1987-1994)

年 度	男性	(%)	女性	(%)	合計
1987	267	68.8	121	31.2	388
1988	378	66.2	193	33.8	571
1989	351	65.9	182	34.1	533
1990	400	69.9	172	30.1	572
1991	371	70.0	159	30.0	530
1992	344	66.0	177	34.0	521
1993	473	63.4	273	36.6	746
1994	404	62.8	239	37.2	643
合計	2988	66.3	1516	33.7	4504

図 3

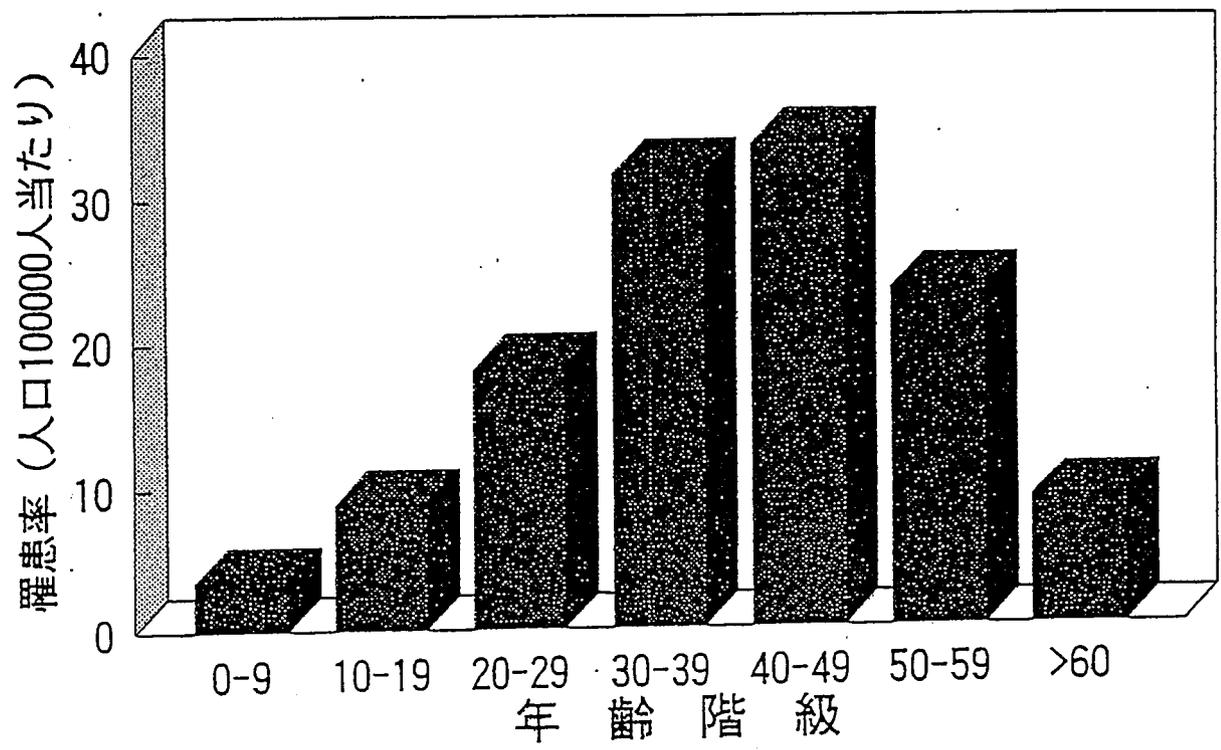
年齢階級別患者数
(1987-1994)



年齢階級別患者数
(1987-1984)

年齢階級	患者数
0-9	154
10-19	419
20-29	983
30-39	1356
40-49	813
50-59	418
>60	161
合計	4304

図 4 年齢階級別罹患率
(1987-1994)



年齢階級別罹患率(1987-1994)
(人口10万人当たり)

年齢階級	罹患率
0-9	3.59
10-19	8.91
20-29	18.09
30-39	31.70
40-49	33.79
50-59	23.51
>60	9.02

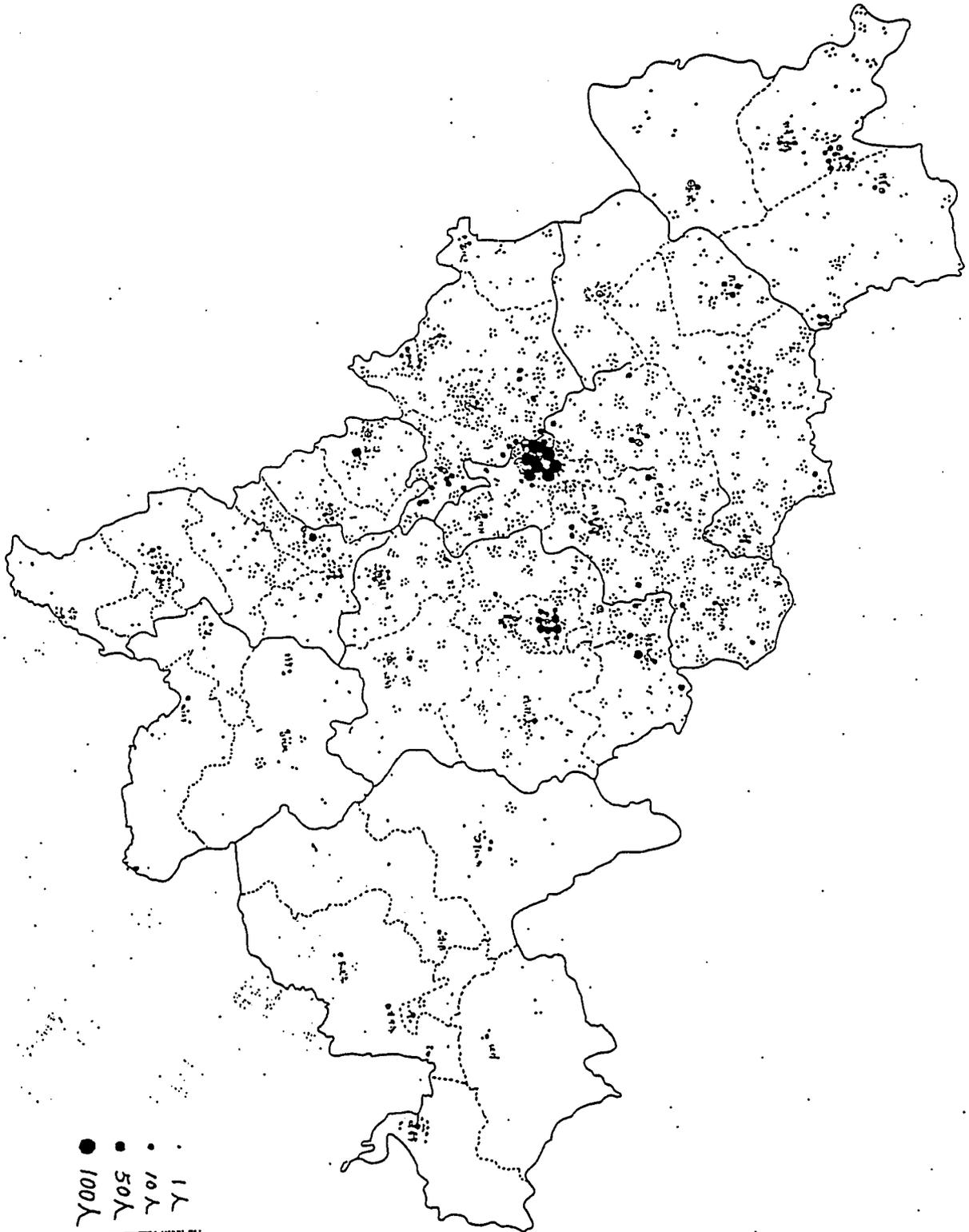
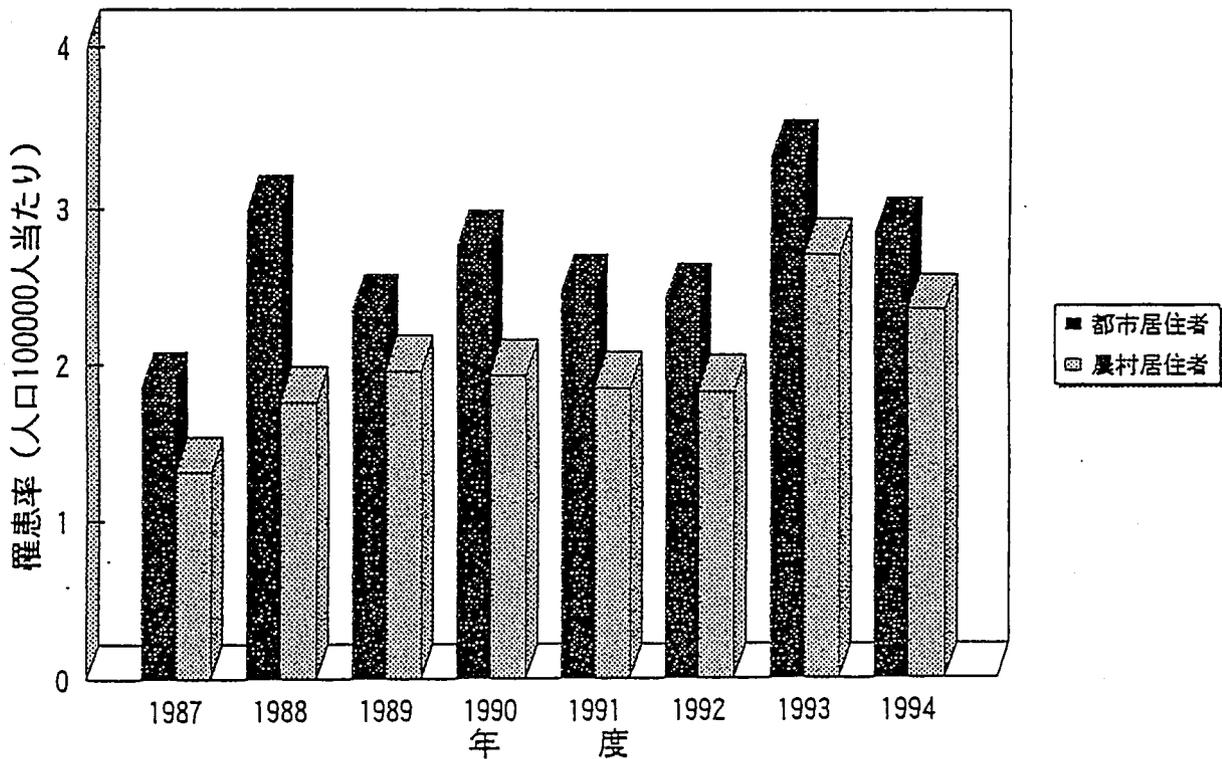


図 6

都市と農村居住者別の脳囊虫症罹患率の年次推移
(1987-1994)



都市と農村居住者別の脳囊虫症罹患率の年次推移

(人口10万人当たり) (1987-1994)

年 度	都市居住者(10504544人)		農村居住者(14651591人)		合計(25156135人)	
	患者数	罹患率	患者数	罹患率	患者数	罹患率
1987	195	1.9	193	1.3	388	1.5
1988	314	3.0	257	1.8	571	2.3
1989	247	2.4	286	2.0	533	2.1
1990	290	2.8	282	1.9	572	2.3
1991	260	2.5	270	1.8	530	2.1
1992	254	2.4	267	1.8	521	2.1
1993	350	3.3	396	2.7	746	3.0
1994	299	2.8	344	2.3	643	2.6

日本財団補助金による

1998年度日中医学協力事業報告書

—調査並びに研究に対する助成—

11年3月24日

財団法人 日中医学協会
理事長 中島章 殿

研究代表者氏名 山田信博 

所属機関名 東京大学医学部附属病院第3内科

職名 助教授 年齢 47 才

所在地 東京都文京区本郷7-3-1

電話 03-3815-5411 内線 3101

1. 研究課題

日本人と中国人β3-アドレナリン受容体遺伝子突然変異の調査研究と比較

2. 研究期間 自 1998年 4月 1日 ~ 至 1999年 3月 15日

3. 研究組織

日本側研究者氏名 山田信博 (47才)
所属機関 東京大学医学部附属病院第3内科 職名 助教授

中国側研究者氏名 孫黎明 (47才)
所属機関 大連鉄路病院 職名 主任医師(部長)

4. 研究報告

別添書式を参考に、報告本文4000字以上で作成して下さい(枚数自由・ワープロ使用)

研究成果の発表予定がある場合は発表原稿・抄録集等を添付して下さい。

論文発表に当たっては、日中医学協会—日本財団補助金による旨を明記して下さい。

日本人と中国人 β 3 - アドレナリン受
容体遺伝子突然変異の調査研究と比較

山田 信博

東京大学糖尿病代謝内科 助教授

< 要 旨 >

β 3 - アドレナリン受容体遺伝子

Trp 64 Arg 突然変異が肥満、インスリン非依存型糖尿病 (NIDDM) およびインスリン抵抗性と関連があると報告されている。本研究ではわれわれが日本人および中国人について BMI、血圧、血清脂質等多くの臨床的パラメーターを用い、 β 3 - アドレナリン受容体遺伝子 Trp 64 Arg 突然変異と肥満との関連性について検討した。 β 3 - アドレナリン受容体遺伝子突然変異 Trp 64 Arg allele 頻度は日本人では 21.7% で、中国人では 18.8% であり、ピマインデアン人より低く、欧米人より高かった。中国人女性においては BMI と β 3 - アドレナリン受容体遺伝子 Trp 64 Arg 突然変異と相関がみられ、中国人男性では BMI が高くなるにつれ β 3 - アドレナリン受容体遺伝子 Trp 64 Arg allele 頻度が高くなる傾向が認められたが、日本人においてはこのような傾向は見られな

かった。日本人男性では Arg / Arg が Trp / Trp より収縮期血圧が有意に高かったが、日本人女性および中国人男女においてはこのような傾向は認められなかった。中国人では糖尿病群では $\beta 3$ -アドレナリン受容体遺伝子突然変異 Trp 64 Arg allele 頻度が非糖尿病群より高い傾向がみられたが、日本人には糖尿病群と非糖尿病群間に有意差はなかった。生化学的検査血清総コレステロール、LDL-コレステロールが日本人および中国人男性においてのみ Arg / Arg では有意に低く、両国の女性にはこのような傾向は認められなかった。従って、われわれの研究では $\beta 3$ -アドレナリン受容体遺伝子 Trp 64 Arg 突然変異と肥満との関連性について同じアジア人でも日本人と中国人では微妙に異なることが分かった。

Key Word: $\beta 3$ -アドレナリン受容体、肥満、高血圧、糖尿病、コレステロール

< 目的 >

肥満は虚血性心疾患を引き起こす高血圧、耐糖能異常、高脂血症等多くの疾患と関連をもっている¹。遺伝的及び環境的な素因がいずれも肥満を引き起こす原因となる²。遺伝的な素因は長時間謎に包まれ不可解とされてきたが、最近の分子生物学の発展に伴い、脂肪細胞の代謝も次第に解明されつつある³。

$\beta 3$ -アドレナリン受容体は近年 $\beta 1$ -アドレナリン受容体と $\beta 2$ -アドレナリン受容体に引き続き発見された脂肪組織の代謝調節に重要なファクターの一つである^{4, 5}。 $\beta 3$ -アドレナリン受容体は新生児の褐色脂肪組織、成人では腹部脂肪細胞に存在し⁶、熱産生、脂肪利用を調節している。 $\beta 3$ -アドレナリン受容体はまた心臓⁷、消化管⁸等他の組織にも広く分布している。マウスの動物実験ではこの $\beta 3$ -アドレナリン受容体遺伝子を破壊することにより、中程度の肥満を引き起こした⁹ことから、 $\beta 3$ -アドレナリン受容体遺伝

子が肥満の進展に大きな役割を果たしていることを示唆した。

1995年ヒトではトリプトファンからアルギニンに置換するミセス突然変異

(Trp64Arg)が報告され¹⁰、フランス人では体重増加¹⁰と、フィンランド人ではインスリン抵抗性症候群¹¹と、ピマインデアン人ではインスリン非依存型糖尿病(NIDDM)の早期発症¹²と関連があると報告されている。他に日本人¹³⁻¹⁸、デンマーク人¹⁹およびオーストラリア人²⁰等各異なる人種の研究からもこれらの結果を裏付けている。いずれにせよこの β 3-アドレナリン受容体遺伝子Trp64Arg突然変異と肥満との関係はまだ完全に解明されていないのが現状である。

本研究ではアジアの中で特に日本人及び中国人においてこの β 3-アドレナリン受容体遺伝子Trp64Arg突然変異と肥満との関連性を調べるため、より細かにグループ分けをし、BMI、血圧、血漿脂質等より多くの臨床

的パラメータを用い検討を行った。

< 方法 >

対象

日本人対象者

グループ1は八丈島在住民746名、男性224名、女性522名（年令30-89歳、平均年令 61.5 ± 11.33 歳）を対象としている。

グループ2は東京大学附属病院内科外来患者371名、男性180名、女性191名（年令21-88歳、平均年令 58.6 ± 11.40 歳）を用いることにした。

中国人対象者

2年に1回の健康診断に来られた在職国家公務員および退職者747名、男性567名、女性180名（年令34-89歳、平均年令 65.15 ± 10.12 歳）を対象とし、中では糖尿病群と肥満者群に分けて検討を行った。

1) 糖尿病群138名、男性84名、女性54名、年令35-66歳、平均年令 $62.12 \pm$

11.49歳。

2) 肥満者群 (body mass index BMI \geq 25) 349名、男性262名、女性87名、年齢35-89歳、平均年齢65.00 \pm 10.49歳。

すべての日本人および中国人対象者に身長、体重、血圧、心拍数等測定した。BMIは体重 (kg) / 身長 (m)² で換算したもので、BMI > 28、BMI 25 \leq 28、BMI < 25はそれぞれ高度、中程度、軽度の肥満とした。

実験室検査

血液サンプルはすべて12時間絶食後の空腹時採血のものである。すべての対象者に血清総コレステロール (TC)、中性脂肪 (TG)、HDL-コレステロール (HDL-C) 等測定した。LDL-コレステロール (LDL-C) は Friedewald 式で算出したものである。

DNA解析

ゲノムDNAは全血より抽出されたものである。 β 3-アドレナリン受容体遺伝子

Trp 64 Arg コドンが含まれたゲノム DNA フラグメントを PCR 法で増幅し、制限酵素 Bst N I で消化後、3% アガロースで泳動分離し診断した。

統計学的解析

全データは平均値 ± 標準偏差で表している。ANOVA、Student's t、 χ^2 検定等を用い統計学的な解析を行った。

< 結果 >

遺伝型頻度

β 3 - アドレナリン受容体遺伝子突然変異 Trp 64 Arg allele 頻度は日本人グループ 1 では 23.4% で、グループ 2 では 18.3% であり、両グループを合わせた Trp 64 Arg allele 頻度は 21.7% であった。中国人の頻度は 18.8% で、日本人と中国人の β 3 - アドレナリン受容体遺伝子突然変異 Trp 64 Arg allele 頻度はほぼ同じであった。

B M I

日本人では男女ともホモ接合体 (Arg / Arg) 、ヘテロ接合体 (Trp / Arg) 、ワイルドタイプ (Trp / Trp) のいずれの genotype 間に平均 BMI の差は見られていなかった

(TABLE 1) 。両グループを合わせて検討しても有意差は認められなかった (TABLE 2) 。また、BMI グループ分けの検討では日本人男性 BMI 26 - 28 は他のグループより $\beta 3$ - アドレナリン受容体突然変異

Trp64Arg allele 頻度が高い傾向があったが、統計上有意差は見られていなかった。

中国人では女性において Arg / Arg では平均 BMI が最も高く、Trp / Arg でも Trp / Trp より平均 BMI が高い傾向が認められた。男性にはこのような傾向は認められていなかった (表 1) 。また、BMI グループ分けの検討では、中国人男女とも BMI が上昇するに伴い $\beta 3$ - アドレナリン受容体遺伝子

突然変異 Trp 64 Arg allele 頻度が高く
なり、このような傾向は中国人女性において
はさらにより顕著に見られていた（表 2）。

血 圧

日本人男性ではグループ 2 はいずれの
genotype においてグループ 1 より収縮期
血圧が有意に低かった（TABLE 1）。これ
はグループ 2 が外来患者であり、高血圧に対
し減塩の食事療法、薬物療法を受けていたか
らによると考えられる。両グループを合わせ
て検討したところ、日本人男性においては収
縮期血圧が Arg / Arg で他の genotype よ
り有意に高いことが分かった（TABLE 2）。

中国人では男女とも収縮期血圧、拡張期血
圧において Arg / Arg、Trp / Arg、
Trp / Trp 3 つの genotype 間に有意差は
認められていなかった（表 1）。

N I D D M の 発 症

日本人グループ 1 では糖尿病患者群の $\beta 3$
- アドレナリン受容体遺伝子突然変異

Trp64Arg allele 頻度が18.6%で、グループ2では18.1%であり、非糖尿病群と有意差は見られなかった。

中国人では非糖尿病群の β 3-アドレナリン受容体遺伝子突然変異Trp64Arg allele 頻度が18.0%であるのに対し、糖尿病群では22.5%であり、糖尿病患者群では β 3-アドレナリン受容体遺伝子突然変異Trp64Arg allele 頻度は高い傾向が認められた(表3)。

生化学データ

日本人および中国人の男性においてのみ血清TC, LDL-CがArg/Argでは有意に低かった(TABLE 3, 表4)。両国の女性にはこのような傾向は見られなかった。

< 考察 >

日本人及び中国人 β 3-アドレナリン受容体遺伝子突然変異Trp64Arg allele 頻度がほぼ同じであり、これはピマインデアン

人より低く、欧米人より高かった。

β3-アドレナリン受容体遺伝子

Trp64Arg 突然変異は肥満、NIDDMおよびインスリン抵抗性と関連があると報告されている¹⁰⁻²⁵。肥満に関しては、われわれの中国人についての研究では中国人女性では Trp / Trp、Trp / Arg、Arg / Arg の順で平均 BMI が上昇していた。BMI グループ分けの検討では中国人男女とも BMI が高くなるにつれ β3-アドレナリン受容体遺伝子突然変異 Trp64Arg allele 頻度が上昇していた。特に中国人の中高年女性においてはこのような傾向がより顕著に認められた。これはオーストラリアの報告²⁰と一致している。しかしわれわれの日本人についての研究をみると、日本人 β3-アドレナリン受容体遺伝子 Trp64Arg 突然変異の各 genotype 間に平均 BMI の差は見られず、BMI グループ分けを検討しても Trp64Arg allele 頻度にも有意差は認められなかった。これは同

じアジア人でも日本人と中国人の人種間の異なりを示唆している。また、平均BMIが中国人のほうが全体的に高いことが分かった。これは日本人が最近食生活、ライフスタイルに関心が高いのに対し、高度経済成長期の中国では過食や肥満に対する認識がまだ不十分であることも一つの原因と考えられる。

糖尿病に関しては、 β 3-アドレナリン受容体遺伝子突然変異 Trp 64 Arg が NIDDM の早期発症及び NIDDM において高頻度に見られると報告されている^{1,2}。われわれの研究では中国人糖尿病群は β 3-アドレナリン受容体遺伝子突然変異 Trp 64 Arg allele 頻度が非糖尿病群より高かった。これは中国の別の報告をみても一致した結果であった。しかし、われわれの日本人についての研究をみると、日本人 β 3-アドレナリン受容体遺伝子突然変異 Trp 64 Arg allele 頻度に日本人糖尿病群と非糖尿病群で有意差は見られていなかった。

われわれは日本人男性において $\beta 3$ -アドレナリン受容体遺伝子突然変異 Arg / Arg では Trp / Trp より収縮期血圧が有意に高いことが分かった。しかし中国人に関してはこのような傾向は見られていなかった。いくつかの研究では $\beta 3$ -アドレナリン受容体遺伝子 Trp 64 Arg 突然変異と高血圧との関連について報告されている^{11, 16, 20}。機能的 $\beta 3$ -アドレナリン受容体がヒトでは心臓に存在しており、 $\beta 3$ -アドレナリン受容体刺激剤は血管収縮を抑制している。従って、 $\beta 3$ -アドレナリン受容体遺伝子が障害されると結果的に高血圧を引き起こすことと考えられる。また高血圧がインスリン抵抗性の結果によるとの報告¹¹もある。

日本人および中国人男性においてのみ血清 TC, LDL-C が $\beta 3$ -アドレナリン受容体遺伝子突然変異 Arg / Arg では低い傾向が見られた。これは $\beta 3$ -アドレナリン受容体遺伝子突然変異 Trp 64 Arg の性別特異性を示

峻している。β3-アドレナリン受容体遺伝子突然変異による脂肪分解の減少が肝臓での遊離脂肪酸蓄積を限定し、VLDLの産生減少となり、結果的にLDL-コレステロール減少につながると思われる。また実際的に男性においては女性に比べより多くの内臓脂肪が存在していることも一つの原因と考えられる。

結論としては、中国人女性ではBMIとβ3-アドレナリン受容体遺伝子Trp64Arg突然変異とは相関がみられ、中国人男性ではBMIが高いほどTrp64Arg allele頻度が高くなるのに対し、日本人男女においてはこのような傾向は見られなかった。われわれの研究ではβ3-アドレナリン受容体遺伝子Trp64Arg突然変異と肥満との関連性について同じアジア人でも日本人と中国人では微妙に異なることが分かった。

<参考文献>

1. Hubert HB, Feinleib M, McNamara PM, Castelli WP. Obesity as an independent risk factor for cardiovascular disease: a 26-year follow-up of participants in the Framingham Heart Study. *Circulation*. 1983;67:968-977.
2. Bouchard C, Perusse L. Genetics and obesity. *Annu Rev Nutr*. 1993;13:337-354
3. Spiegelman BM, Flier JS. Adipogenesis and obesity. *Cell*. 1996;87:377-389.
4. Emorine L, Marullo S, Briend-Sutren G, Tate K, Delavier-Klutchko C, Strosberg D. Molecular characterization of the human β 3-adrenergic receptor. *Science*. 1989;245:1118-1121.
5. Muzzin P, Revelli J-P, Kuhne F, Gocayne JD, McCombie WR, Venter JC, Giacobino J-P, Fraser CM. An adipose tissue-specific β -adrenergic receptor: molecular cloning and downregulation in obesity. *J Biol Chem*. 1991;266:24053-24058.
6. Krief S, Lonnqvist F, Raimbault S, Baude B, Spronsen AV, Arner P, Strosberg AD, Ricquier D, Emorine LJ. Tissue distribution of β 3-adrenergic receptor in man. *J Clin Invest*. 1993;91:344-349.
7. Gauthier C, Tavernier G, Charpentier F, Langin D, Le Marec H. Functional β 3-adrenergic receptor in the human heart. *J Clin Invest* 1996;98:556-562.
8. Benseid M, Kaghad M, Rodriguez, Le Fur G, Caput D. The rat β 3-adrenergic receptor gene contains an intron. *FEBS Lett*. 1993;318:223-226.
9. Suslic VS, Frederich RC, Lawitts J, Tozzo E, Kahn BB, Harper M-E, Himms-Hagen J, Flier JS, Lowell BB. Targeted disruption of the β 3-adrenergic receptor gene. *J Biol Chem*. 1995;270:29483-29493.
10. Clement K, Vaisse C, Manning BSJ, Basdevant A, Guy-Grand B, Ruiz J, Silver KD, Shuldiner AR, Froguel P, Strosberg AD. Genetic variation in the β 3-adrenergic receptor and an increased capacity to gain weight in patients with morbid obesity. *N Engl J Med*. 1995;333:52-54.
11. Widen E, Lehto M, Kanninen T, Walston J, Shuldiner AR, Groop LC. Association of a polymorphism in the β 3-adrenergic receptor gene with feature of the insulin resistance syndrome in Finns. *N Engl J Med*. 1995;333:348-351.
12. Walston J, Silver K, Bogardus C, Knowler WC, Celi FS, Austin S, Manning B, Strosberg D, Stern MP, Raben N, Sorkin JD, Roth J, Shuldiner AR. Time of onset of non-insulin-dependent diabetes mellitus and genetic variation in the β 3-adrenergic receptor gene. *N Engl J Med*. 1995;33:343-347.
13. Kadowaki H, Yasuda K, Iwamoto K, Otabe S, Shimokawa K, Silver K, Walson J, Yoshinaga H, Kosaka K, Yamada N, Saito Y, Hagura R, Akanuma Y, Shuldiner A, Yazaki Y, Kadowaki T. A mutation in the β 3-adrenergic receptor gene is association with obesity and hyperinsulinemia in Japanese subjects. *Biochem Biophys Res Commun*. 1995; 215:555-560.
14. Yoshida T, Sakane N, Umekawa T, Sakai M, Takahashi T, Kondo M. Mutation of β 3-adrenergic receptor gene and response to treatment of obesity. *Lancet*. 1995;346:1433-1434.
15. Fujisawa F, Ikegami H, Yamato E, Nakagawa Y, Hamada Y, Oga T, Ueda H, Shintani M, Fukuda M, Ogiwara T. Association of Trp64Arg mutation of the β 3-adrenergic receptor with NIDDM and body weight gain. *Diabetologia*. 1996;39:349-352.
16. Sakane N, Yoshida T, Umekawa T, Kondo M, Sakai Y, Takahashi T. β 3-adrenergic receptor polymorphism: a genetic marker for visceral fat obesity and the insulin resistance syndrome. *Diabetologia*. 1997;40:200-204.
17. Kim-Motoyama H, Yasuda K, Yamaguchi T, Yamada N, Katakura T, Shuldiner AR, Akanuma Y, Ohashi Y, Yazaki Y, Kadowaki T. a mutation of the β 3-adrenergic receptor is association with visceral obesity but decreased serum triglyceride. *Diabetologia*. 1997;40:469-472.
18. Higashi K, Ishikawa T, Ito T, Yonemura A, Shige H, Nakamura H. Association of a genetic variation in the β 3-adrenergic receptor gene with coronary heart disease among Japanese. *Biochem Biophys Res Commun*. 1997;232:728-730.
19. Urhammer SA, Clausen JO, Hansen T, Pederson O. Insulin sensitivity and body weight changes in young white carriers of the codon 64 amino acid polymorphism of the β 3-adrenergic receptor gene. *Diabetes*. 1996;45:1115-1120.
20. Kurabayashi K, Carey DGP, Morrison NA. The β 3-adrenergic receptor gene Trp64Arg mutation is overrepresented in obese women. *Diabetes*. 1996;45:1358-1363.
21. Sun LM, Ishibashi S, Osuga J, Harada K, Ohashi K, Gotoda T, Fukuo Y, Yazaki Y, Yamada N. Clinical features associated with the homozygous Trp64Arg mutation of the β 3-adrenergic receptor -no evidence for its association with obesity in Japanese. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1998;18:941-946

TABLE 1. Clinical Characteristics of Subjects According to Trp⁶⁴Arg Mutation of β 3-AR Gene (日本人)

	Men				Women			
	Arg/Arg	Trp/Arg	Trp/Trp	P	Arg/Arg	Trp/Arg	Trp/Trp	P
Group 1, n	22	77	125		29	169	324	
Age, y	63.6±12.6	63.2±12.2	60.0±11.3	0.11	60.8±11.8	61.5±10.6	61.4±11.4	0.96
BMI, kg/(m) ²	23.4±2.7	23.8±3.2	24.4±3.4	0.28	24.1±3.4	23.7±3.5	23.6±3.4	0.75
SBP, mm Hg	149±23	142±19	141±19	0.16	137±18	139±20	139±20	0.91
DBP, mm Hg	83±12	82±11	83±11	0.99	78±9	80±11	80±11	0.49
Group 2, n	8	49	121		8	54	127	
Age, y	58.5±11.1	55.5±12.5	56.0±12.3	0.82	63.1±7.6	60.9±10.5	61.1±9.2	0.82
BMI, kg/(m) ²	23.0±2.5	23.7±3.8	23.1±2.7	0.63	23.0±3.5	23.0±3.1	22.6±3.0	0.96
SBP, mm Hg	131±22	123±17	122±14	0.31	126±16	128±19	124±16	0.24
DBP, mm Hg	83±4	76±13	76±9	0.17	77±7	79±10	75±7	0.05

Data are mean±SD, analyzed by ANOVA.

表1 中国人臨床的特徴とβ3-AR遺伝子Trp64Arg突然変異

	男性			女性		
	Arg/Arg	Trp/Arg	Trp/Trp	Arg/Arg	Trp/Arg	Trp/Trp
人数	22	160	385	4	69	107
年齢	65.3±6.0	63.2±12.6	65.7±10.4	63.7±6.2	68.8±12.0	65.6±10.1
BMI	24.4±2.6	25.1±3.9	24.6±3.4	27.0±2.4	25.5±4.3	24.8±3.6
SBP	137±23	137±23	138±22	137±22	139±24	136±21
DBP	79±12	81±12	80±12	76±13	83±12	80±13

表 2 中国人Body Mass Indexとβ3-AR遺伝子Trp64Arg allele頻度

	Arg/Arg	Trp/Arg	Trp/Trp	合計人数	Trp64Arg allele頻度
男性					
BMI<25	14	79	212	305	17.50%
BMI25-28	6	48	116	170	17.60%
BMI>28	2	33	57	92	20.10%
女性					
BMI<25	1	32	60	93	18.20%
BMI25-28	2	26	35	62	23.80%
BMI>28	1	11	12	24	27.10%
合計					
BMI<25	15	111	272	398	17.70%
BMI25-28	8	74	151	233	19.30%
BMI>28	3	44	69	116	21.60%

TABLE 2. Body Mass Index and Blood Pressure Analyses of Combined Populations (Groups 1 and 2) (日本人)

	Arg/Arg	Trp/Arg	Trp/Trp	<i>P</i>
N				
Men	30	127	247	
Women	37	222	247	
Total	67	349	702	
BMI, kg/(m)²				
Men	23.5±2.7	23.8±3.4	23.8±3.1	0.87
Women	23.9±3.4	23.6±3.4	23.3±3.5	0.45
Total	23.7±3.1	23.6±3.4	23.5±3.4	0.71
SBP, mm Hg				
Men	144.3±18.2*	134.8±20.5	131.7±19.3	0.0026
Women	134.7±18.2	136.2±20.3	134.2±20.1	0.48
Total	138.8±21.5	135.7±20.3	133.1±19.8	0.025
DBP, mm Hg				
Men	82.9±10.4	79.8±12	79.4±10.3	0.28
Women	77.4±8.1	79.4±10.6	78.8±10.3	0.50
Total	80.4±10.6	79.5±11.1	79.0±10.3	0.49

Statistical analyses were performed on the combined population consisting of groups 1 and 2. Data are mean±SD, analyzed by ANOVA.

*Statistically significant difference at $P < 0.05$ vs Trp/Trp genotype by Fisher test.

表3 中国人糖尿病群と非糖尿病群とβ3-AR遺伝子Trp64Arg allele頻度

	Arg/Arg	Trp/Arg	Trp/Trp	合計人数	Trp64Arg allele頻度
糖尿病群	8	46	84	138	22.50%
非糖尿病群	18	183	408	609	18.00%

TABLE 3. Biochemical Characteristics of Subjects According to Trp⁶⁴Arg Mutation of β 3-AR Gene (日本人)

Trp ⁶⁴ Arg	Men				Women				P
	Arg/Arg	Trp/Arg	Trp/Trp	P	Arg/Arg	Trp/Arg	Trp/Trp	P	
Group 1, n	22	77	125		29	169	324		
TC, mmol/L	4.70±1.03*	5.05±0.83	5.20±0.79	0.03	5.33±0.95	5.27±0.83	5.26±0.82	0.91	
TG, mmol/L	1.21±0.62	1.43±0.88	1.56±1.26	0.35	1.38±0.57	1.19±0.56	1.24±0.72	0.29	
HDL-C, mmol/L	1.33±0.32	1.40±0.37	1.30±0.37	0.18	1.29±0.33	1.39±0.31	1.40±0.31	0.22	
LDL-C, mmol/L	2.82±0.84*	2.99±0.78	3.19±0.70	0.04	3.40±0.93	3.34±0.76	3.29±0.72	0.67	
Group 2, n	8	49	121		8	54	127		
TC, mmol/L	5.25±1.0	5.34±1.1	5.5±1.2	0.61	5.73±0.81	6.07±0.96	5.85±0.83	0.25	
TG, mmol/L	1.60±0.94	1.80±1.18	1.99±1.79	0.67	1.48±0.66	1.60±0.82	1.37±0.89	0.25	
HDL-C, mmol/L	1.39±0.47	1.4±0.39	1.47±0.47	0.59	1.6±0.23	1.75±0.51	1.69±0.54	0.38	
LDL-C, mmol/L	3.14±1.1	3.16±1.03	3.07±1.16	0.89	3.39±0.68	3.7±0.94	3.51±0.89	0.38	

表4 中国人生化学検査とβ3-AR遺伝子Trp64Arg突然変異

	男性			女性		
	Arg/Arg	Trp/Arg	Trp/Trp	Arg/Arg	Trp/Arg	Trp/Trp
TC, mmol/L	4.71±0.77	5.02±0.88	5.19±0.87	6.14±0.83	5.58±0.84	5.73±0.98
TG, mmol/L	1.32±0.72	1.38±0.71	1.42±1.00	2.10±1.03	1.65±1.02	1.67±1.17
LDL-C, mmol/L	2.16±0.88	2.33±0.80	2.60±0.73	4.12±0.90	2.89±0.81	3.10±0.90

日本財団補助金による
1998年度日中医学協力事業報告書

—調査並びに研究に対する助成—

平成 11 年 2 月 26 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 野坂 久美子 
所属機関名 岩手医科大学歯学部小児歯科学講座
職 名 助教授 年齢 58 才
所 在 地 〒020-8505 岩手県盛岡市中央通り1-3-27
電話 019-651-5111 内線 4515

1. 研究課題

中国と日本の小児における歯肉に関する研究
—歯肉炎と血流量—

2. 研究期間 自 1998年 4 月 1 日 ~ 至 1999年 3 月 15 日

3. 研究組織

日本側研究者氏名 野坂 久美子 (58才)
所属機関 岩手医科大学歯学部小児歯科学講座 職名 助教授

中国側研究者氏名 馬 新顔 (Feng Xin-Yan) (29才)
所属機関 北京医科大学第二臨床医学院口腔科 職名 助手

4. 研究報告

別添書式を参考に、報告本文4000字以上で作成して下さい (枚数自由・ワープロ使用)

研究成果の発表予定がある場合は発表原稿・抄録集等を添付して下さい。

論文発表に当たっては、日中医学協会—日本財団補助金による旨を明記して下さい。

中国と日本の小児における歯肉に関する研究
—歯肉炎と血流量—

野坂 久美子

岩手医科大学歯学部小児歯科学講座
助教授

要旨

歯肉炎は、環境要因の影響を受けるが、その中でも、食べ物との関連は、非常に大きな比重を占め、軟食になればなるほど、歯肉炎の発生が多くなることが警告されている。そこで、本研究では、食生活の異なる中国と日本の小児の歯肉の状態について、まず、肉眼で観察し、次いで、それらの部位の歯肉の血流量を測定し、両国間の小児における歯肉の健康状態と食生活習慣との関連性について調査した。対象は盛岡市在住の日本人小児と北京市在住の中国人小児である。結果：乳歯—肉眼的観察において、上顎乳中切歯の歯肉炎は、中国の小児の方が日本の小児よりも少なかった。また、下顎第二乳臼歯では、近心において、日本人小児の方が歯肉炎のない小児が多いが、遠心では、両国間に差がなかった。血流量について、上顎乳中切歯では、日本人、中国人ともに、近心より遠心の方が血流量が多く、日中間の比較では、中国人の方が血流量が多かった。また、下顎第二乳臼歯でも、中国人小児の方が GI-0 で血流量が多かった。前歯と臼歯の比較では、日本人のみの値であるが、上下顎ともに、乳中切歯よりも第二乳臼歯の方が血流量が多かった。永久歯：上顎中切歯では、日本人小児の方が中国人小児よりも歯肉炎が多く、GI-1、2 も多く出現していた。しかし、第一大臼歯では、日本人小児の方が歯肉炎が少なかった。血流量は、中切歯において、日中ともに、GI-0 から GI-2 にかけて、血流量は増加していた。第一大臼歯でも、中国の方が血流量が多かった。食生活では、中国の小児の方が野菜類など、繊維性の食品が多く、しかも咀嚼回数をより必要とする調理法が多かった。このことは、環境的な影響を受けやすい歯肉において、食習慣の差異が歯肉炎や血流量になんらかの関連性があるもと考えられた。

Key words: 日本人小児、中国人小児、歯肉炎、歯肉の血流量、食生活習慣

中国と日本の小児における歯肉に関する研究
—歯肉炎と血流量—

野坂 久美子

岩手医科大学歯学部小児歯科学講座
助教授

要旨

歯肉炎は、環境要因の影響を受けるが、その中でも、食べ物との関連は、非常に大きな比重を占め、軟食になればなるほど、歯肉炎の発生が多くなることが警告されている。そこで、本研究では、食生活の異なる中国と日本の小児の歯肉の状態について、まず、肉眼で観察し、次いで、それらの部位の歯肉の血流量を測定し、両国間の小児における歯肉の健康状態と食生活習慣との関連性について調査した。対象は盛岡市在住の日本人小児と北京市在住の中国人小児である。結果：乳歯—肉眼的観察において、上顎乳中切歯の歯肉炎は、中国の小児の方が日本の小児よりも少なかった。また、下顎第二乳臼歯では、近心において、日本人小児の方が歯肉炎のない小児が多いが、遠心では、両国間に差がなかった。血流量について、上顎乳中切歯では、日本人、中国人ともに、近心より遠心の方が血流量が多く、日中間の比較では、中国人の方が血流量が多かった。また、下顎第二乳臼歯でも、中国人小児の方が GI-0 で血流量が多かった。前歯と臼歯の比較では、日本人のみの値であるが、上下顎ともに、乳中切歯よりも第二乳臼歯の方が血流量が多かった。永久歯：上顎中切歯では、日本人小児の方が中国人小児よりも歯肉炎が多く、GI-1、2 も多く出現していた。しかし、第一大臼歯では、日本人小児の方が歯肉炎が少なかった。血流量は、中切歯において、日中ともに、GI-0 から GI-2 にかけて、血流量は増加していた。第一大臼歯でも、中国の方が血流量が多かった。食生活では、中国の小児の方が野菜類など、繊維性の食品が多く、しかも咀嚼回数をより必要とする調理法が多かった。このことは、環境的な影響を受けやすい歯肉において、食習慣の差異が歯肉炎や血流量になんらかの関連性があるもと考えられた。

Key words: 日本人小児、中国人小児、歯肉炎、歯肉の血流量、食生活習慣

研究報告

目的：日本の小児の口腔内において、う触は減少傾向にあるものの、歯肉炎は増加傾向にあるといわれている。また、歯肉炎は、う触と同様に、環境要因の影響を受けるが、その中でも、食べ物との関連は、非常に大きな比重を占め、軟食になればなるほど、歯肉炎の発生が多くなることが警告されている。

一方、歯肉の健康状態は、臨床的に、肉眼所見や歯肉溝内の滲出液の状態、また、歯肉溝の深さや出血の有無などで検討される。組織学的には、歯肉内毛細血管の形態変化による拡張や萎縮が、歯肉炎と関連があり、この現象は、また、血流に関連性をもっていることが示唆されている。

そこで、本研究では、食生活の異なる中国と日本の小児の歯肉の状態について、まず、肉眼で観察し、次いで、それらの部位の歯肉の血流量を測定することで、両国間の小児における歯肉の健康状態を比較した。次ぎに、食生活の状態を、日本人、中国人小児のそれぞれに、同一のアンケート形式で調査し、歯肉炎と食生活との関連性について検索した。

資料ならびに研究方法：歯肉炎の観察ならびに歯肉の血流量測定で対象とした日本人小児は、岩手医科大学歯学部小児歯科外来を訪れた全身疾患を有さない小児188名と、中国人小児は、北京市在住の150名で、合計338名である。年齢は、乳歯列が3～5歳児であり、永久歯列は、1群が8～9歳、2群が10～14歳である。観察ならびに測定部位は、乳歯において、上顎右側乳中切歯と第二乳白歯ならびに下顎左側乳中切歯と第二乳白歯の唇（頬側）における近心、中央、遠心部位の歯肉である。ただし、中国人小児では、上顎右側乳中切歯と下顎左側第二乳白歯のみとした。永久歯の測定部位は、上顎右側中切歯と第一大白歯ならびに下顎左側中切歯と第一大白歯の唇（頬側）の歯肉で、近心のみである。肉眼的歯肉の観察は、Løe & Silness の Gingival Index(GI)を用い、血流量の測定には、アドバンスレーザー血流計[®]を用いた。

アンケートの調査対象は、7～11歳の小児で、中国人小児は182名、日本人小児は208名である。調査内容は、1. 朝食、昼食、夕食に摂取した食品68種（香川式食品分類法で1～4群に分類）の摂取状況とその調理方法ならびに間食16種と飲み物8種の摂取状況、2. 摂取に要する時間、場所、与える人、について、調査した。なお、摂取状況については、頻繁ならびに時々項目を設定し、週4回以上の摂取を頻繁、週1～3回を時々とした。

結果：1. 歯肉の状態とその血流量について

乳歯：肉眼的観察において、上顎乳中切歯における歯肉の状態は、近心では、GI-0が日本で72.5%であり、中央で91.3%、遠心で67.5%であるが、中国では、それぞれ、80%、94.1%、75%と、歯肉炎のない小児が多かった。また、

日本人小児では、遠心で GI-2 を呈した小児が 1 人存在したが、中国人小児では、1 人もいなかった。下顎第二乳臼歯の近心では、日本人小児の方が GI-0 が 89.9% であり、中国人小児では、79.1% であった。しかし、中央では、若干、中国人小児の方が GI-0 が多く、100% であり、遠心では、両国間に差がなかった。

血流量について、上顎乳中切歯では、日本人、中国人ともに、近心から遠心に行くに従い血流量が多く、近心は中央あるいは遠心に対して有意に少なかった。また、GI-0 より GI-1 の方で、より多い血流量であった。さらに、日中間の比較では、GI-0、GI-1 ともに、中国人の方が血流量が多く、約 1.5 倍であった。また、下顎第二乳臼歯でも、中国人小児の方が GI-0 で血流量が多く、中央で有意差を認め、日本人の 1.3 倍であった。下顎乳中切歯と上顎第二乳臼歯は、日本人のみの値であるが、GI-0 では、近心に比べると、中央あるいは遠心がやはり、より高い血流量を示していた。さらに、乳中切歯と第二乳臼歯を比較すると、上下顎ともに、第二乳臼歯の方が血流量が多く、1.3~2.0 倍の量であった。

永久歯：上顎中切歯では、歯肉炎のない小児が、中国では、1 群で 46.3%、2 群で 56.5% であったが、日本人小児では、それぞれ、33.3%、25.4% と、中国の小児の方が歯肉炎が少なかった。日本人小児では、さらに、GI-2 の出現が、1 群では、中国の小児の 2.5 倍であり、2 群では、日本の小児のみに 22% 認められた。しかし、第一大臼歯では、歯肉炎のない GI-0 が、1 群では、中国の小児の 59.2% に対し、日本人小児の方はその出現が多く、78.3% であった。2 群でも、同様の傾向を示し、中国人小児の 60.9% に対し、日本人小児では、84.7% であった。

血流量は、上顎中切歯において、1 群では、日中ともに、GI-0 から GI-2 にかけて、血流量は増加していた。また、日中間の比較では、中国の小児の方が日本の小児よりも、血流量が多く、約 1.5 倍であり、GI-1 では、有意差が見られた。2 群でも、GI-0 より GI-1 の方が若干、血流量が多く、しかも、中国の小児の方がより多い傾向にあった。しかし、その差は、1 群ほどではなかった。第一大臼歯でも、GI-0 より GI-1 の方が血流量が多い傾向にあった。また、日中間の比較では、1、2 群ともに、GI-0、GI-1 で中国の方が血流量が多く、GI-0 で有意差を認めている。また、年齢間の比較では、年齢の低い 1 群の方が血流量が多かった。

2. 食生活習慣について

第 1 群の卵は、朝、昼、夕食ともに、中国の方が有意に摂取している小児が多く、朝で 56%、昼 35%、夕食で 30% 強であったが、日本の小児は、昼、夕食で 10% 以下であった。しかし、牛乳は、日本の小児の方が摂取者が多かった。一方、乳加工品では、日中の小児間に差はなかった。また、22 種類の食品を列挙した 2 群の中で、魚介類のさけ、さば類は日本人小児の方が、貝類と川魚は

中国人小児の方が、多く摂取していた。全体的には、1群と比較し、2群は摂取している小児は少なく、20%以下であった。同じ2群の肉類の摂取では、朝、昼、夕食のいずれも中国の小児の方が多く、とくに、豚肉、牛肉では50~70%の割合であった。レバーの摂取は、日中ともに摂取が少ないものの、それでも中国の方が日本よりも有意に高い摂取の割合を占めていた。その加工品も同様の結果であった。また、豆製品では、日中間に差はなかった。32種類を列挙した3群の野菜類の中で、にんじんとかぼちゃ以外は、すべて、朝、昼、夕食ともに、中国の方が日本人小児よりも摂取者が有意に多く、30~70%を占めていた。それに比し、日本の小児では、もっとも多いにんじん類でも、約30%と、中国人小児の下限と同じような値であった。第3群の中の芋類、きのこでは、朝、昼食で、中国人小児の方が有意に摂取者が多く、海藻では、朝、夕食で、日本人小児の方が摂取が多かった。7種類の食品を列挙した第4群の中で、ご飯は昼食で、麺類や主食は朝、昼、夕食で、いずれも中国の小児の方が日本の小児よりも多く摂取していた。また、麺類やご飯は、中国人小児では、朝、昼、夕食間に差がなかった。

一方、調理法では、第1群のたまごは、中国では、生はなかった。しかし、日本では、朝、昼、夕食に生の摂取が見られた。また、朝食では、中国では、煮る、茹でるが約60%を占めるが、日本での調理法は、炒める、焼くになっていた。一方、牛乳は、中国では、ほとんど温めて飲み、日本は、そのまま冷たい状態で飲んでいて、第2群の豆類でも、日中間に大きな差があり、日本は茹でるが、中国は100%炒ったものであった。豆腐に関しても、中国は炒める、焼くが60~70%であるが、日本では、煮るが70%前後であった。肉類の調理法には日中間にあまり差はなかった。第3群の調理法について、とくに、摂取の多いほうれん草とじゃがいもについて、中国では、炒めると焼くが約70%を占めているが、日本では、70%以上が煮た調理法であった。第4群の主食では、朝昼夕食に日中間に差が見られ、中国では、蒸す、煮るが約70%を占め、日本は、煮るが約70%であった。

間食は、日本の小児よりも中国の小児の方が摂取が多く、しかも、自由に摂取していた。

食事とおやつにかかる時間について、食事では、中国人小児の方が日本人小児よりも短く、10分以下あるいは10~20分であり、おやつでは、日中間に差がなかった。

食事とおやつを与える人あるいは場所について、朝、夕食は、日中ともに、両親が最も多いが、昼食は、中国では両親、日本では学校であった。また、間食は、中国は学校、日本は、両親がほとんどであった。さらに、中国の小児では、家庭において、祖父母あるいは自分で自由に間食を摂る傾向があった。

考察：歯肉炎の有無にかかわらず、中国人小児の方が日本人小児よりも、血流量が多かった。その理由の1つに、民族的な相違が考えられた。しかし、環境的な影響を受けやすい歯肉において、摂取している食品の種類は、大きな影響を与えるものと考えられる。

香港の小児の食生活を調査した天野らの結果では、本研究の中国の小児と同様、主食は、ご飯や麺類であった。また、香港の小児では、肉類や野菜など、やはり、日本の小児と異なり、多種のものが食されていた。ところが、日本の最近の小児の食生活は、1995年の水野の論文から、嫌いな食品の第1位がピーマンであり、次いで魚類、また、野菜類である。すなわち、魚類からの動物性たんぱく質や繊維性の食品が本調査と同様に、中国の小児より減少してきている。一方、曹らが調査した日中の永久歯の咬耗状態をみても、中国人の方が咬耗が著しく、この原因は、顎骨の形態のみでなく、食生活習慣に基づくものが大きいものと考えられる。いわゆる、咀嚼をより必要とする第3群の野菜類や、第2群の肉類の摂取状況である。さらに、中国において、繊維性でしかも、咀嚼回数を必要とする調理方法は、歯肉における生理的な血流量の増加を招く1要因と考えられた。

参考文献：

1. 野坂久美子他4名：レーザー血流計を用いた幼弱永久歯の歯肉における血流量に関する研究、小児歯誌、34：1007—1016、1996.
2. 天野秀昭他9名：中国人小児の疾患と歯科的特質に関する研究
—中国人小児の食生活の実態について—、小児歯誌、31：606—640、1993.
3. 水野清子：最近の子どもの食生活と小児成人病、小児科診療、58：44—50、1995.
4. 野坂久美子他1名：日本と中国の小児における咬合力の比較について、日中医学、10：2—6、1996.

日本財団補助金による

1998年度日中医学協力事業報告書

—調査並びに研究に対する助成—

1999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 成井孝雄 
所属機関名 明治薬科大学 生物研究室
職名 助教授 年齢 44 才
所在地 〒204-8588 東京都清瀬市野塩
電話 0424-95-8591 内線 2-522-1

1. 研究課題

雲南省の地衣類の Chemotaxonomy 並びに
地衣成分の薬理スクリーニング試験

2. 研究期間 自 1998 年 4 月 1 日 ~ 至 1999 年 3 月 15 日

3. 研究組織

日本側研究者氏名 成井孝雄 (44才)
所属機関 明治薬科大学 生物研究室 職名 助教授

中国側研究者氏名 王立松 (36才)
所属機関 中国科学院昆明植物研究所 職名 専任講師

4. 研究報告

別添書式を参考に、報告本文4000字以上で作成して下さい (枚数自由・ワープロ使用)

研究成果の発表予定がある場合は発表原稿・抄録集等を添付して下さい。

論文発表に当っては、日中医学協会—日本財団補助金による旨を明記して下さい。

雲南省の地衣類の chemotaxonomy 並びに 地衣成分の薬理スクリーニング試験

成井 孝雄

明治薬科大学生物研究室

助教授

雲南省各地で地衣類の調査・採集を実施し、400種を超えるサンプルを得た。現在、これらの chemotaxonomy とスクリーニング試験を実施している。ここでは、雲南省において現在も食品やお茶などに用いられている地衣類の中で、今回の調査・研究で二次代謝産物の詳細を明らかにすることが出来た12種の地衣類の chemistry など報告する。

KEY WORDS — chemotaxonomy; gradient HPLC; lichen;
secondary product; standardized TLC analysis; Yunnan

[序論]

中国雲南省は熱帯地方から高山地帯まで極めてバラエティーに富んだ環境を有し、植物学的に未調査の地域が存在するばかりでなく、この地域にのみ産する地衣類が数多く存在する事で知られる。実際、著者らが今回採集した地衣類標本は400種を超えており、これら全てのサンプルの chemistry の解明と、薬理スクリーニング試験にはもう暫く研究時間が必要である。

ここでは、中国側の共同研究者が既に雲南省の周辺で採集し、昨年4月から日本と米国に於いて化学分析を始めてきた12種の地衣類サンプルの分析結果を報告する。一方、これらの地衣類は、現地の少数民族が食品や健康茶などに古来から用いているもので、それらの用法や効能などに関する現地調査の結果は新規の医薬品開発の一助となりうる情報を含むと考えられた。そこでこれらの調査結果も併せて報告する。なお今回の調査・研究に、米国ノースカロライナ州デューク大学植物学部の Chicita F. Culberson 教授、並びに William L. Culberson 教授の両氏を共同研究者として加えた。

[目的]

雲南省各地に居住する多数の少数民族が食用もしくは薬用や健康食品として利用してきた以下の地衣類の chemistry 並びにそれらの用法、あるいは効能に関して調査・研究する。

Everniastrum cirrhatum (Fr.) Hale ex Sipman, *Lasallia asiae-orientalis* f. *major* Wei & Jiang, *Lethariella cladonioides* (Nyl.) Krog em Wei, *Lobaria isidiophora* Yoshim., *Lobaria kurokawae* Yoshim., *Ramalina conduplicans* Vainio, *Sulcaria sulcata* (Lev) Bystr. ex Brodo & Hawksw., *Thamnolia vermicularis* (Sw.) Ach. ex Schaerer, *Thamnolia subuliformis* (Ehrh.) W. Culb., *Thamnolia vermicularis* ssp. *solida* Sato, *Umbilicaria indica* Frey, *Usnea longissima* Ach.

[方法]

TLC は Chicita らの "Three solvent systems" を用いた (1981)¹。
すなわち、展開溶媒に

A 液 : toluen — dioxane — acetic acid = 180:45:5

pre B 液 : 60 % acetic acid (5 min)

B 液 : hexane — methyl tertiary-butyl ether — formic acid
= 140:72:18

pre C 液 : acetic acid (3 min)

C 液 : toluene — acetic acid = 200:30

を使用し、コントロールレーンには norstictic acid と atranorin を用いた。TLC プレートは Merck 社の Silica gel 60 F254 5715 を使用した。

HPLC は溶媒系として

Solvent 1 methanol — water — o-phosphoric acid = 30:70:1

Solvent 2 methanol

を用いた。グラジエント条件は Narui らの報告²に従い、80 % の Solvent 1 を 40 分間で 15 % の Solvent 1 にリニアグラジエントした。次に、この条件を 20 分間維持し、計 60 分間測定した。カラムは Beckman 社製の ODS カラムを用い、検出波長に 270

nm を用い、色素の検出には 430 nm と 760 nm を採用した。

[結果-1]

雲南省周辺で採集した 12種の地衣類の chemistry

1. *Everniastrum cirrhatum* (Fr.) Hale ex Sipman

記注—CHINA. Yunnan Prov.: Luquan Co.; 3,000 m.

Wang Li-song 93-18129, 1993. (HKAS 16051)

成分—アトラノリン、クロロアトラノリン、コンサラチン酸、サラチン酸、脂肪酸、プロトリケステリン酸、リケステリン酸。

2. *Lasallia asiae-orientalis* f. *major* Wei & Jiang

記注—CHINA. Sichuan Prov.: Hueili Co., Longzhoushan; 3,500 m. On rock.

Wang Li-song, 97-17832, 1997. (HKAS 16059)

成分—ヂロフォル酸、パプロシン酸、ヒアスチン酸、ラッサリル酸、レカノール酸、トリテルペノイド。

3. *Lethariella cladonioides* (Nyl.) Krog em Wei

記注—CHINA. Yunnan Prov.: Lijiang Co.; 3,900 m.

Wang Li-song 81-18132, 1981. (HKAS 16053)

成分—アトラノリン、カナリオン、コンノルスチクチン酸、ノルスチクチン酸。

4. *Lobaria isidiophora* Yoshim.

記注—CHINA. Sichuan Prov.: Luding Co.; 2,450 m.

On *Picea* sp.

Wang Li-song 96-16930, 1996. (HKAS 15922)

成分—クリプトスチクチン酸、コンスチクチン酸、スチクチン酸、ヂロフォル酸、ノルスチクチン酸、レカノール酸。

5. *Lobaria kurokawae* Yoshim.

記注—CHINA. Yunnan Prov.: Binchuan Co.; 3,000 m.

Wang Li-song 96-18134, 1996. (HKAS 16060)

成分—ヂロフォル酸、レカノール酸。

6. *Ramalina conduplicans* Vainio

記注—CHINA. Yunnan Prov.: Lijiang Co.; 2,500 m. On a bush.
Wang Li-Song 81-18130, 1981. (HKAS 16052)

成分—ウスニン酸 (trace)、コンサラチン酸、サラチン酸、
色素成分 SV- 1。

7. *Sulcaria sulcata* (Lev.) Bystr. ex Brodo & Hawksw.

記注—CHINA. Sichuan Prov.: Hueili Co.; 3,450 m.
On *Rhododendron* sp.

Wang Li-song, 97-18133, 1997. (HKAS 16054)

成分—アトラノリン、プソローム酸、プソローム酸に関連
した構造の未同定化合物、未同定化合物 (Rf class =
A6B5-6C6; H+ 黄緑; トルエン不溶)。

8. *Thamnolia vermicularis* (Sw.) Ach. ex Schaerer

記注—CHINA. Yunnan Prov.: Lijiang Co.; 4,100 m.

Wang Li-song 81-18131, 1981. (HKAS 16050)

成分—(Wang Li-song 81-18131B, 1-18131D):

スカマート酸、タムノール酸、デカルボキシタムノ
ール酸、ベオミケス酸。地衣体は UV- を示した。

9. *Thamnolia subuliformis* (Ehrh.) W. Culb.

記注—CHINA. Yunnan Prov.: Lijiang Co.; 4,100 m.

Wang Li-song 81-18131, 1981. (HKAS 16050)

成分—バルバチン酸、3- α -ヒドロキシバルバチン酸、ベ
オミケス酸、スカマート酸。地衣体は UV+ を示した。

10. *Thamnolia vermicularis* ssp. *solida* Sato

記注—TIBET. 4,400 m. Collector in Chinese, 87, 1975.

(HKAS 1089)

成分—スカマート酸、バルバチン酸、3- α -ヒドロキシバル
バチン酸、ベオミケス酸。地衣体は UV+ を示した。

11. *Umbilicaria indica* Frey

記注—CHINA. Sichuan Prov.: Hueili Co., Longzhoushan;

3,500 m. On rock. Wang Li-song, 97-17831, 1997.

(HKAS 16058)

成分—ジロフォール酸、未同定トリテルペノイド、ヒアス
チン酸、レカノール酸。

12. *Usnea longissima* Ach.

記注—CHINA. Sichuan Prov.: Julong Co.; 3,000 m.

On *Rhododendron* sp.

Wang Li-song, 96-16561, 1996. (HKAS 15923)

成分—ウスニン酸、ニューロポゴリン酸、ネオジヒドロムロリン酸、ノルバルバチン酸、バルバチン酸、ムロリン酸。

[結果 -2]

雲南省周辺の食用地衣類の調査・研究

A. 食品としての地衣類

雲南省の少数民族は5種の地衣類を食糧としてきた。その内、*Lobaria* 属の3種は油で炒めて温かい料理として食べる。一方、*Ramalina* 属の2種は通常は冷製料理として供されてきた。

1. 冷製として

Ramalina conduplicans Vain.,

Ramalina sinensis Jatta, Nuov.

地方名：‘shu hua’ (Jinggu 郡)、
‘shi hua cai’ (雲南省中心部)。

雲南省南西部、Yi 族、Dai 族、Han 族などが暮らす Jinggu 郡では、*Ramalina* 属の上記2種の地衣類を結婚式の際の冷製として宴会料理に供する。この習慣は古代から今日まで変わることなく続いており、調味料として塩と唐辛子粉が添えられる事はあるが、温められた料理が給仕されることはない。例外的に、雲南省中央部や Chuxiong 地方ではこれら2種の地衣類が豚肉と一緒に油炒めで供される事がある。

食べる際には、まず地衣体を重曹の入った湯で10-20分沸騰させた後、流水で1-2日晒してから前記の目的で食用に用いる。

2種の地衣類は外観が良く似ており、現地の人々はこれらを区別することはない。Jingdong 郡の食品店は何処も2種を混合した状態で販売している。

R. canduplicans は樹皮に着生する樹枝状地衣で、0.5-2 mm 幅で、平坦かつ不規則に2分枝しながら生長する。*R. sinensis* も

樹皮着生で、扇状に生長し、長さ 6 cm、幅 3-5 cm になる。

2. 珍味として

Lobaria kurokawae Yoshim.,

Lobaria isidiophora Yoshim.

地方名：‘qing wa pi’ (Dali、Bin chuan 郡).

雲南省北西部の Bai 族の居住地域ではこの 2 種はごく普通の食料である。初め地衣体を 10-20 分間煮て、清水に 1-2 日浸した後、豚肉と油で炒めて食膳に供す。

この 2 種は区別が容易であるため、Bin chuan 郡の食料品店では分けて販売しているが、混合状態で売られている事もあった。

Lobaria isidiophora はブナなどの樹皮に着生し、直径 15 cm を超えて生長するのは珍しくない。共生藻は緑藻。湿っている状態では地衣体の背面は緑灰色、裂芽は円筒状で縁生、裂片の背面に裂芽を持つ。一方、*L. kurokawae* は樹皮などに着生し、直径 10-15 cm に生長する。共生藻は藍藻で、地衣体の背面は黒茶色、湿潤時は緑藍色。裂芽や粉芽は無く、背面は凸凹な小じわが有るか滑らかである。

3. 救荒食として

Lobaria orientalis (Asahina) Yoshim.

地方名：‘Lao long pi’ (Mianning 郡近辺)

Zang (チベット) 族が居住する雲南省北西部では古来から飢饉の際、*L. orientalis* を救荒食とした。地衣体を水で 30 分間沸騰させた後、清水に 1-2 日浸し、油炒めにしたり、香辛料と混ぜて冷製として供する。

L. orientalis は雲南省北西部では最も一般的に見られる地衣類で、樹皮に着生し、地衣体の直径が 20 cm を超える事が珍しくない。地衣体背面は湿った状態では灰緑色で、厚みがあり、裂芽も粉芽も無い。子器は時折その縁部に認められる。胞子は無色で 1 子嚢に 8 個、4 室に分かれる。

B. 健康茶としての地衣類

雲南省では健康維持、あるいは保健飲料として少なくとも 4 種の地衣類がお茶代わりに利用される。*Thamnotia vermicularis* と *Th. subuliformis* の 2 種が ‘雪茶’、*Lethariella cladonioides*

と *L. sinensis* の 2 種が ‘紅雪茶’ として常用される。現地では上記の地衣体をカップやグラスに入れ、沸騰水を注いで 3-5 分置いた後に直接飲み始める。一般の緑茶を飲用する習慣と同様、極めて日常的な慣習となっている。

1. 雪茶

Thamnolia vermicularis (Sw.) Ach. ex Schaer,
Thamnolia subuliformis (Ehrh.) W. Culb.

地方名：Xue cha (Zhong dian、Lijiang 地方)。この Xue Cha とは ‘高原に生育する茶’ を意味する。

Thamnolia vermicularis と *Th. subuliformis* には抗炎症の効果があるとされ、明代から漢方薬の原料として使用されてきた長い歴史があると信じられる。その他の効能としては体液の生産を高め、渴きを止め、精神を安定させ、心臓を助け、高血圧、神経衰弱、肺炎などに効果があると言われる。

今では雲南省の何処でも入手出来るが、オリジナルな商品は Naxi 族の住む Lijiang 地方で入手出来る。この 2 種は形態がよく似ているため、混じり有った状態で売られている事が多い。

2. 紅雪茶

Lethariella cladonioides (Nyl.) Krog em. Wei Krog.,
Lethariella sinensis Wei et Jiang

地方名：Lu xing cha 又は Hong xue cha (Deqin、Zgongdian、Lijiang 地方)。

これらの地衣類はチベットの伝統医学で用いられる薬物で、血圧を下げたり体脂肪を減少させる効があると言われ、一般に、炎症に有効であると伝承されている。

現地の人々は健康に不安や問題がない場合でも、まるでお茶を飲むように飲用していた。この茶は Zang (チベット) 族が居住する Zhongdian 郡などで容易に購入できる。現地の人々は高地まで出かけてこれらの地衣類を採集している。2 種の地衣類は似かよった赤錆色で形も良く似ており、現地の人々は両者を全く区別せずに採集している。

L. cladonioides は二股に分枝しながら 5-10 cm の高さに直立して生育する。一方、*L. sinensis* は 15 cm まで枝分かれしなが

ら垂れ下がるように生育する。

[考察]

雲南省産の地衣類の chemotaxonomy 並びに地衣成分の薬理スクリーニング試験を実施する第一段階として、現地少数民族の間で古来から食品あるいは健康茶に用いられてきた 12 種の地衣類の chemistry を [結果-1] に記載した様に、詳細に明らかにする事が出来た。特に今回は HPLC を併用したため、これまで当該地衣類で存在を確認出来なかった、クロロアトラノリン、コンノルスチクチン、デカルボキシタムノール酸、3- α -ヒドロキシバルバチン酸、リケステリン酸などをそれぞれ検出することが出来た。これら微量に存在する二次代謝産物の検出は今後の研究において chemotaxonomy の一助となる可能性が考えられる。なお、今回の調査・研究において、中国で食用地衣類とされる *Cladina aggregata*, *Umbilicaria esculenta* の 2 種を採集する機会に恵まれず残念であった。

次に、[結果-2] としてこれらの食用地衣類の現地での用法や効能などをまとめた。新婚の 2 人が *Ramalina canduplicans* あるいは *R. sinensis* で造られた冷製を結婚式で食べるのは一種のセレモニーと考えられる。カップルの幸せと生命の誕生そして子孫の繁栄を願い、それらを象徴するのがこの 2 種の地衣類であると伝えられる。この事実は、彼らが菌類と藻類が共生して新しい生命を創造し、繁殖していくという地衣類の本質をあたかも見抜いているように窺えて興味をそそられる。

[参考文献]

1. Culberson, C. F., Culberson W.L. and Johnson A.,
A standardized TLC analysis of β -orcinol depsidones.
Bryologist **84**, 16-29 (1981).
2. Narui, T., Culberson, C. F., Culberson, W.L., Johnson, A. and
Shibata, S.,
A contribution to the chemistry of the lichen family
Umbilicariaceae (Ascomycotina)
Bryologist **99**, 199-211 (1996).

日本財団補助金による

1998年度日中医学協力事業報告書

—調査・共同研究に対する助成—

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 池島 喬 
所属機関名 長春中医学院附属医院
職名 教授 年齢 51 才
所在地 130021 中国吉林省長春市工農大路 20 号
電話 0431-5634444 内線 _____

1. 研究課題

サイトカイン産生調節機能を有する中国独特薬の探査と
其の炎症性疾患、動脈硬化への影響

2. 研究期間 自 1998 年 10 月 1 日 ~ 至 1999 年 3 月 15 日

3. 研究組織

日本側研究者氏名 池島 喬 (51才)
所属機関 長春中医学院附属医院 職名 教授
中国側研究者氏名 王 本祥 (62才)
所属機関 長春中医学院附属医院 職名 教授

4. 研究報告

別添書式を参考に、報告本文4000字以上で作成して下さい (枚数自由・ワープロ使用)

研究成果の発表予定がある場合は発表原稿・抄録集等を添付して下さい。

論文発表に当たっては、日中医学協会—日本財団補助金による旨を明記して下さい。

サイトカイン産生調節能を有する中国独特薬の探査とその炎症性疾患、動脈硬化への影響

池島 喬

長春中医学院附属医院急症薬物研究中心
教授

要旨

中国で伝統的に使用されて来た自然薬による抗炎症効果をヒト炎症性サイトカインの産生及び活性の制御の面から検討した。蜂毒は内毒素投与によるラットの体温上昇を有為に抑制するが、それは炎症性サイトカインの産生の直接的な抑制を介していない事が *in vitro* の実験結果から示唆された。慢性腎炎治療薬である「益気血活血複方」はその構成単方である黄耆により IL-1 α と TNF α の産生を抑制する事により抗炎症薬効を発揮すると思われるがその抑制メカニズムは各サイトカインによって異なる。黄耆は炎症性サイトカインによる他種の炎症性サイトカインの誘導という、炎症における「雪崩現象」の抑制には関与せず、免疫細胞刺激物質による炎症性サイトカインの産生を直接抑制する。また特定の癌細胞に対しアポトーシス（計画死）誘導効果をも有する。淫羊かくのサポニン (icariin) の体内代謝産物であり且つ薬効主体である baohuoside は免疫細胞が已に毒素などで刺激されていた場合は炎症性サイトカインの産生の抑制を、刺激されていない場合は産生の亢進をもたらし、中国自然薬の逆二方向性の薬効を示唆する。

また中国に多い寄生虫である脳囊虫の簡易診断法の開発も同時に手掛けており、約 90%以上の診断確率を得た。

KEY WORDS

炎症性サイトカイン、IL-1 α , IL-1 β , IL-1ra, IL-6, IL-8, TNF α , 中国自然薬、漢方複方、蜂毒、黄耆、アポトーシス、脳囊虫症簡易診断法

I. 蜂毒による炎症性サイトカイン産生制御と抗炎症作用の関係に関する研究

目的

中国自然薬のサイトカイン産生への関与を探る

材料及び方法

蜂毒を DFCII 型電子蜂毒採集器(吉林省)を用いて採取精製した。Wister rat における内毒素 (LPS) による直腸体温の上昇に対する蜂毒の効果を電子体温計で測定した。また炎症性サイトカインの代表としての IL-1 β による体温上昇の誘発に対する蜂毒の影響も試みた。更に副腎摘出ラットへの LPS による体温上昇に対する蜂毒の影響を調べた。LPS によるヒト末梢血単核細胞 (PBMC)からの各種炎症性サイトカイン (IL-1 α , IL-1 β , IL-1ra, IL-6, IL-8, TNF α) の産生分泌に対する蜂毒の影響をラジオイムノアッセイ法 (RIA)で測定した。

結果

100 μ g/kg 体重量の LPS をラットに腹腔内投与すると 60 分後から 240 分後にかけて 1.5 から 2 $^{\circ}$ C の直腸体温の上昇が観察された。LPS 投与 30 分前に蜂毒を投与しておくことと蜂毒投与量依存的に体温上昇は抑制され、6 mg/kg 体重量投与量では体温上昇の完全な抑制が見られた。即ち蜂毒は抗炎症作用が有る事が分かった。体温上昇の主な原因となる内因性サイトカインの一種である (ヒト) IL-1 β のラットへの 100 μ g/ml 投与では投与後 10 分以内に体温上昇が開始されたが、蜂毒は如何なる投与量においても体温上昇を抑制しなかった。即ち蜂毒は炎症性サイトカインの活性には関与していない可能性が高い。ヒト末梢血培養に 1, 10, 100, 1,000 ng/ml の LPS をそれぞれ添加すると IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF α の産生は LPS 濃度依存的に上昇したが、蜂毒の添加は LPS によるこれらの炎症性サイトカインの産生量に影響しなかった。天然の抗炎症物質である IL-1 レセプターアンタゴニスト (IL-1ra) は LPS 濃度に関係なく一定量の産生が認められたが、蜂毒は IL-1ra の産生量にも変化をもたらさなかった。故に蜂毒は *in vitro* では炎症性サイトカインの産生に影響しない。炎症性サイトカイン産生抑制能を有する副腎皮質ホルモンの産生へ蜂毒が影響する可能性を考えて副腎摘出ラットを用いて実験を行った。副腎摘出ラットに対して 100 μ g/kg LPS を腹腔内に注射し、LPS 誘起性の体温上

昇に対する蜂毒の抑制効果の減少を得る事を試みたが副腎摘出ラットはLPSに対する発熱反応が低く、顕著な結果を得ることは出来なかった。

考察

IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF α 等の炎症性サイトカインは発熱、火傷、細菌感染症、リュウマチ性関節炎を含む炎症性疾患に対してその症状の発現に大きく関与している。蜂毒がリュウマチ性関節炎に治療効果を有する事は古来中国で伝えられている事である。しかし蜂毒はin vivo (ラット)においてこれらの炎症性発熱を抑制してもヒトin vitro 実験において炎症性サイトカインの産生を抑制しなかった。いまだ、蜂毒によるサイトカイン抑制性副腎皮質ホルモンの分泌亢進効果の可能性は有るものの、蜂毒の抗炎症作用は数編の論文で記載されているような炎症性サイトカインの産生の直接的抑制ではなく、他の免疫機構を介して行われているものと推定する。

参考文献

- 1) Hadjipetrou-Kourounakis L. and Yiangou M.
J. Rheumatol. 15(7):1126-1128,1988
- 2) Panush RS.
J. Rheumatol. 15(10):1461-1462,1988
- 3) McHugh S.M. et al.,
Clinic. Exp. Allergy 25:828-838,1995

II. 「中薬益気血活血複方」のサイトカイン産生に対する影響

目的

中医慢性腎炎治療薬の炎症性サイトカイン産生に対する影響を調べる

材料及び方法

長春中医学院第五内科 (朴志賢教授) で慢性腎炎患者に投与している複方 (当

帰、黄耆、益母草、丹参、桃仁、紅花) 及び各単方の水煎剤を遠心濾過して使用した。 ヒト末梢白血球から Ficoll-Hypaque 組織分離液を用いて単核細胞を得た。 複方もしくは各単方を加えて後、LPS を加えて培養、ラジオイムノアッセイを用いてヒト IL-1 α , IL-1 β , IL-1ra, IL-6, IL-8, TNF α 量を測定、また RT-PCR を用いて各炎症性サイトカインの mRNA の産生を観察した。

結果

患者投与用の複方の 20 倍希釈液をヒト末梢単核細胞培養に加えると、IL-1 α , IL-1 β , TNF α の産生を顕著に抑制したが、この薬剤投与量では末梢白血球細胞に対する毒性は認められなかった。また各単剤においては当帰、益母草、黄耆が TNF α の産生を顕著に抑制した。特に黄耆は IL-1 α , TNF α の蛋白質産生を抑制した。RT-PCR において複方及び黄耆は TNF α mRNA の産生を完全に抑制したが IL-1 α mRNA の産生には影響しなかった。

考察

抗慢性腎炎中薬「益気養血活血複方」は IL-1 α , TNF α 等の炎症性サイトカイン産生を抑制することによって抗炎症効果を発揮する可能性が高い。しかしそのサイトカイン産生抑制の機作は各サイトカインによって異なっており、IL-1 α の産生は IL-1 α 遺伝子の転写後 (posttranscriptional), TNF α の産生は TNF α 遺伝子の発現(transcriptional)時に制御されていると思われる。また免疫亢進剤と思われている黄耆に抗炎症効果が認められた。

参考文献

Zhao KW and Kong HY

中国中西医結合雑誌 13(5):263-265, 1993

Ⅲ. 炎症性サイトカインによる炎症性サイトカインの産生誘導に対する黄耆の影響

目的

炎症には炎症性サイトカインが炎症性サイトカインを誘導して炎症の増悪

化の原因になることが多い。黄耆の抗炎症作用はこのステップに関与しているかどうか調べてみた。

材料及び方法

A375-S2 ヒト黒色腫、L929 マウス肺上皮癌細胞、T98G ヒト神経膠細胞培養に黄耆水煎剤及び黄耆多糖を 0.001-1 mg/ml 濃度で加え、IL-1 β , TNF α (100 ng/ml)による他種の炎症性サイトカインの誘導をラジオイムノアッセイで測定した。

結果

如何なる濃度に於いても黄耆水煎剤及び黄耆多糖は IL-1 β 或は TNF α による T98G 細胞からの IL-6 及び IL-8 の産生分泌量に影響を与えなかった。また IL-1 特異的な細胞死をする A375-S2 細胞に黄耆水煎剤或は黄耆多糖を添加しても IL-1 による A375-S2 細胞の細胞死は阻害されなかった。

考察

黄耆による炎症性サイトカインの産生抑制は内毒素等の免疫亢進物質によるサイトカイン産生誘導の過程に働くのであって、以後の過程である炎症性サイトカインによる炎症性サイトカインの産生誘導を抑制するのではない。またこの実験で黄耆成分が或る特定の腫瘍細胞株 (A375-S2) に対してアポトーシス (プログラムされた細胞死) を誘導する予備的知見を得た。

参考文献

- 1) Dinarello CA et al.,
J. Immunol. 139:1902-1910, 1987
- 2) Ikejima T. et al.,
J. Infect. Dis. 1162:215-223, 1990

IV. 淫羊かくサポニンの代謝産物による炎症性サイトカインの 産生制御

目的

淫羊かくサポニンの血清内代謝産物中で免疫亢進効果を有する成分のサイトカイン産生に対する影響を調べた。

材料と方法

ヒト組織球由来マクロファージ様細胞である THP-1 を LPS, PMA を用いて刺激した。刺激 30 分前に淫羊かくサポニン icariin 及び其のラット血中またはヒト尿中から分離した、顕著な免疫亢進性を有する代謝産物である baohuoside を THP-1 細胞培養に加え、ラジオイムノアッセイを用いて炎症性サイトカイン (IL-1 α , IL-6, IL-8, TNF α) の産生を比較した。

結果

濃度 0.1 若しくは 1 $\mu\text{g/ml}$ baohuoside は LPS, PMA を用いて THP-1 細胞を刺激時、IL-6 の産生を亢進するが、IL-8 の産生は抑制する。しかし LPS, PMA 不存在時、baohuoside は逆に IL-8 の産生を顕著に誘導した。

考察

免疫亢進剤淫羊かくは其の血中代謝産物 baohuoside により IL-8 の産生を誘導するが已に他種のマクロファージ刺激が有る時は逆に其の産生を抑制し、逆二方向の薬効を有する事が判明した。多くの漢方薬には濃度依存的若しくは他の薬剤との併用投与により其の薬効が逆転するが無刺激時に baohuoside による IL-8 の産生の顕著な誘導はこれらの現象を一部説明していると思われる。

参考文献

- 1) Hattiri M. et al.,
Chem. Pharm. Bull. 33:3838, 1985
- 2) 李書桐 et al.,

其他

現在、靈芝、銀耳、人参等の多糖に於ける抗炎症に関する炎症性サイトカインの産生制御の研究を継続中である。

また現時点では日中医学協会からの助成金を使用していないが脳囊虫症患者血清中の抗体価を感染豚より分離精製した特異的抗原を用いる事によって測定する簡易診断法（旭川医科大学伊藤亮教授開発）を吉林省長春市と内蒙古通遼市を中心とする農村部患者に予備試験中である。中国では CT スキャン等を用いて確定診断出来る医療施設が少なく、特に囊虫症流行地域である遠隔農村地域の診療施設には診断設備が無きに等しい。また現在中国国内での抗原抗体法による囊虫症診断キットは測定感度が低すぎる。まず、長春近郊の豚屠殺場から感染豚血清及び囊虫胞を入手し、等電電気泳動で抗原を精製分離してから豚血清中の抗体価の存在を確認した。長春市、通遼市周辺の囊虫症（CT 及び視診で確定診断済み）の患者血清を検定した。簡易血清診断法と確定診断とは約 90%の相関性が得られた。皮膚表面などにまだ虫体が顕在する以前の初期感染症患者への診断及び早期治療に応用出来るものと期待している。

参考文献

- 1) Ma L. et al.,
Transac. Royal Soc, Tropic. Med. Hygiene 91:476-478, 1997
- 2) Simanjuntak GM. Et al.,
Immunol. Today 13:321-323, 1997

日本財団補助金による

1998年度日中医学協力事業報告書

— 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

1999年3月15日

研究室で撮影した本人のスナップ写真、及び発表論文等のコピーを添付

1. 招へい責任者 平岡 真寛 
- 所属機関 京都大学大学院医学研究科放射線医学講座 職名 教授
- 所在地 〒606-8507 京都市左京区聖護院川原町54 電話 (075) 751-3417
- 招へい研究者氏名 朱京麗
- 所属機関 北京中日友好病院放射線腫瘍科 職名 副主任医師
- 研究テーマ 難治癌に対する各種先端放射線治療法の臨床的研究

2. 日本滞在日程

1998年7月1日 ~ 1999年3月31日 まで
京都大学大学院医学研究科放射線医学講座
および、医学部附属病院放射線科において、
各種先端放射線治療法の情報交換
あるいは技術指導を行った。

3. 研究報告

別紙書式を参考に、報告本文4000字以上で報告して下さい（枚数自由・ワープロ使用）

タイトル・要旨等は日本語で、KEY WORDS以下は日本語或いは英語で記入して下さい。

研究成果の発表予定がある場合は発表原稿・抄録集等を添付して下さい。

論文発表に当っては、日中医学協会—日本財団補助金による旨を明記して下さい。

研究テーマ

難治療に対する各種先端的放射線治療法の臨床的研究

来日研究者氏名

朱 京麗

中国での所属・役職

北京中日友好病院放射線腫瘍科 副主任医師

招聘者氏名

平岡 真寛

所属・役職

京都大学大学院医学研究科放射線医学講座 教授

(要旨)

原発性、転移性骨腫瘍に対する局所温熱療法の評価

1982年から1997年までに京都大学で温熱療法を行った原発性、転移性骨腫瘍症例を検討した。治療を行ったのは、合計16人の19部位で局所温熱療法を中心として放射線療法や化学療法との併用効果を評価した。これらの患者に対して、のべ86回の治療を行い、その内55回で効果腫瘍内温度測定を行った。腫瘍内最高、平均、最低温度は、各々42.9,40.4,41.6℃であった。12腫瘍(63%)で腫瘍内最高温度は42.5℃をこえた。CT画像で評価した局所腫瘍制御は、15.8%でみられた。また局所疼痛制御は62.5%であった。1年累積生存率は60%であった。我々の初期臨床研究は、原発性および転移性骨腫瘍に対する温熱療法の有用性を証明するものである。

Preliminary clinical results of locoregional hyperthermia for primary and secondary bone tumors

(ABSTRACT)

Nineteen primary and secondary bone tumors in 16 patients were treated with hyperthermia plus radiotherapy and/or chemotherapy between 1982 and 1997 at Kyoto University Hospital. The thermometric and clinical results were analyzed retrospectively. In 55 of 86 hyperthermia sessions, the intratumor temperature was measured using a thermometer. Of the 19 tumors, 16(84%) received heat treatment 4-7 times, and 3(15.8%) received 1 or 2 treatments of hyperthermia. The mean maximum, mean minimum and average intratumor temperatures were 42.9, 40.4 and 41.6°C, respectively, and 12(63%) reached a tumor maximum temperature above 42.5°C. The durations that intratumor points exceeded 42, 41 and 40°C were 27, 33.8 and 37.9 minutes, respectively. The local tumor response to treatment was assessed using X-ray computed tomography. The local response rate was 15.8% and the local pain relief rate was 63.2%. The 1-year cumulative survival rate was 60%. Our preliminary results indicated that thermoradiotherapy and thermochemotherapy are clinically feasible and potentially beneficial in the management of locally advanced bone tumors.

Keywords: Bone tumor, Hyperthermia, Radiotherapy, Chemotherapy,

Thermometry

1. Introduction

Locally advanced or recurrent primary and metastatic bone tumors are considered to be refractory to conventional treatment modalities. Patients with bulky bone tumors often complain of intractable pain. In such patients, surgical treatment is seldom an option, and the efficacy of conventional radiotherapy and chemotherapy remain unsatisfactory. Hyperthermia in combination with radiotherapy and/or chemotherapy is expected to be effective for these tumors.

During the past 2 decades, hyperthermia in combination with radiotherapy or chemotherapy has been investigated basically and clinically as a new cancer treatment modality (Abe and Hiraoka 1990). In our department, hyperthermia has been employed for the treatment of locally advanced or recurrent primary and metastatic bone tumors since 1982. We herein retrospectively analyzed the thermometric and clinical results of this treatment to determine whether or not the temperature of bone tumors could be elevated to the therapeutic range of hyperthermia, and whether hyperthermia in combination with radiotherapy and/or chemotherapy improves the local control, quality of life and survival. In addition, the toxicity of the treatment was examined.

2. Materials and Methods

2.1 Patients

Nineteen primary and metastatic bone tumors in 16 patients underwent

hyperthermia from August 1982 to June 1997. The patients consisted of 11 males and 5 females and their ages ranged from 14 to 76 years with a mean of 58 years. All patients complained of pain.

All patients had histologically confirmed malignant tumors. Of the 19 tumors, 10 were primary tumors in 8 patients which consisted of 4 osteosarcoma, 3 chordoma, 2 chondrosarcoma, and 1 Ewing's sarcoma: The remaining 9 tumors in 8 patients were metastatic bone tumors and the primary sites were the liver in 4, the thyroid in 2, the kidney in 1, the urinary bladder in 1 and the colon in 1. The tumor volume was calculated by the formula $\pi abc/6$ and it ranged from 65.4 to 1565cm³ with a mean of 539 cm³. Treatment sites were the pelvis in 16, chest wall in 2 and lower extremity in 1.

Prior treatment consisted of systemic chemotherapy in 3 tumors, transcatheter arterial embolization (TAE) and transcatheter arterial infusion (TAI) in 5, radiotherapy in 5, hyperthermia in 3 and surgery in 3. Five of the 19 tumors received a multimodality approach and 7 received a single modality approach. The remaining tumors were not pretreated in the treatment site.

2.2 Hyperthermia

Three types of heating equipment were used for locoregional hyperthermia depending on the tumor volume, anatomic location and depth from surface. The methods of heating treatment and temperature

measurement were described previously (Hiraoka et al. 1994, Mitsumori et al. 1996, Nishimura et al. 1990). In brief, an 8 MHz radiofrequency (RF) capacitive heating device (Thermotron RF8, Yamamoto Vinita Co., Osaka, Japan) was employed for treating 15 deep-seated or large subsurface tumors. In general, 2 opposing electrodes were used and the sizes of the pair of electrodes were determined according to the size and location of the tumors. When the tumor was located at the central part of the anatomical site, a pair of same-sized electrodes was used. Otherwise, a pair of different-sized electrodes was employed to shift the high temperature area to the tumor side.

Three heating treatments were employed using an ultrasound heating system (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan). This device had an improved center holed planar transducer, which minimized the hot spots at the central axis and provided homogeneous distribution of acoustic fields. The frequency and diameter of the applicator was selected, according to the size and depth of the tumor. A single heating treatment was performed using a 430 MHz microwave heating apparatus with a lens applicator (HTS-100, Tokyo keiki Co. Ltd., Tokyo, Japan), for a subsurface tumor.

A temperature-controlled water pad or water circulation unit was used in all heat treatments, to control the temperature of the skin surface and subcutaneous layer. Hyperthermia was delivered for 30-65 minutes (mean, 43.4 min.), once or twice weekly, within 30 minutes following

radiotherapy. The power was increased in a stepwise manner until the intratumor temperature reached the therapeutic range or the patient became tolerate the treatment.

Sixteen of the 19 tumors received heating treatment 4-7 times. The remaining 3 tumors received the treatment only 1 or 2 times, partly due to intolerance of sufficient power elevation, and partly due to a poor general condition.

The blood pressure, pulse rate and body temperature were measured before, during and after heating treatment.

2.3 Tumor Temperature Measurement

The intratumoral temperature was measured using a thin Teflon-coated microthermocouple probe. The probe was inserted into the tumor via a 21-gauge angiocatheter that had been introduced into the deepest part of the tumor with the aid of ultrasonic guidance or X-ray computed tomography (CT). The thermal distribution within the tumor was obtained either by withdrawing the thermocouple by 1 cm step during and immediately after hyperthermia with a single point thermocouple, or by using a stationary multipoint thermocouple probe.

We defined $T_{max.}$, $T_{min.}$, and $T_{ave.}$ as the maximum, minimum and average intratumoral temperature in a thermal distribution recorded at the termination of treatment, respectively. In addition, $T > 42^{\circ}\text{C}$, $T > 41^{\circ}\text{C}$ and $T > 40^{\circ}\text{C}$ were defined as the duration that intratumor point exceeded 42°C , 41°C

°C, and 40°C, respectively.

2.4 Combination Therapy

Hyperthermia was combined with radiotherapy and/or chemotherapy. Radiotherapy was applied using megavoltage photons of 6 and 15 MV or 60 Co for 15 of the 19 tumors. The prescribed dose and fractionation was 37.0-61.2 Gy in 1.8-2.5 Gy per fraction for 12 tumors, and 27.0-32.0 Gy in 3-4 Gy per fraction for 3 other tumors, 5 times weekly, respectively.

Hyperthermia was administered after radiotherapy, usually within 30 minutes. In 4 of the 15 tumors, both radiotherapy and TAE and/or TAI were combined with hyperthermia. The anti-cancer drugs used were cisplatin and doxorubicin. One of the 19 tumors was given concurrent systemic chemotherapy using cisplatin 50mg /m², weekly, for 4 cycles, intravenously. Three of the 19 tumors were treated by hyperthermia alone, because the tumor had been heavily pretreated. One patient underwent intraoperative radiotherapy after treatment with external radiotherapy in combination with hyperthermia. This tumor was previously considered unresectable.

2.5 Assessment of Response

The local effect to treatment was evaluated by the change in tumor volume (using CT) when the tumor showed maximum regression. CR(complete response) was defined as 100% tumor regression, PR(partial response) indicated more than 50% tumor regression, NC(no change) less than 50% tumor regression and less than 50% tumor progression,

PD(progressive disease) signified more than 50% tumor progression.

Pain control by treatment was evaluated according to the change in pain score before and after treatment. Pain was scored based on multiplied pain severity (0=none, 1=mild, 2=moderate, 3=severe) and pain frequency (0=no pain, 1=occasional, 2=intermittent, 3=constant), with values ranging from 0-9. Complete pain relief (CPR) was defined as a pain score decreasing to zero. Partial pain relief (PPR) represented a pain score below the initial score. Other patients were classified as no pain relief.

The follow-up period ranged from 2 to 95 months. Survival rates were calculated using the Kaplan-Meier method.

3. Results

3.1 Thermometry

Eighty-six hyperthermia sessions were performed for the 19 tumors, and the thermometry was performed in 55 of the 86 (64 %) heat sessions. Intratumoral thermometry was performed in all patients at least 1 time except for 1 patient who refused it.

Table 1. shows the thermometry data obtained during heating treatment. The range and average for $T > 42^{\circ}\text{C}$, $T > 41^{\circ}\text{C}$, and $T > 40^{\circ}\text{C}$ were 0-54 minutes (Ave.=27), 13-54 minutes (Ave.=33.8) and 15-57 minutes (Ave.=37.9), respectively. The heating time ranged from 36 to 58 minutes (Ave.= 47.3).

The average \pm SD (standard deviation) values for T_{max} , T_{min} , and T_{ave} were $42.9 \pm 2.16^{\circ}\text{C}$, $40.4 \pm 1.43^{\circ}\text{C}$ and $41.6 \pm 1.27^{\circ}\text{C}$, respectively, (Table 2).

Twelve of the 19 tumors reached a maximum temperature of $\geq 42.5^{\circ}\text{C}$. Five out of the 19 reached a minimum temperature of $>41^{\circ}\text{C}$, and 11 out of the 19 showed an average temperature of $>41^{\circ}\text{C}$.

3.2 Local Response and Pain Control Rate

With regards to local response, 3 achieved PR and the remaining 16 showed NC (Table 3) of the 19 tumors treated. The local response rate was 3/19 (15.8%). The local response rate was 3/12 (25%) in 12 tumors in which the intratumoral temperature was $\geq 42.5^{\circ}\text{C}$. A local response was not obtained for tumors with T_{max} below 42.5°C .

Six of the 19 tumors achieved complete pain relief (CPR) and 6 achieved partial pain relief (PPR). A total pain control rate was 12/19 (63.2%). Pain scores before and after the treatment are listed in Table 4. In 9 of 12 tumors in which $T_{\text{max}} \geq 42.5^{\circ}\text{C}$, the pain control rate was 9/12 (75 %). On the other hand, in 3 of 7 tumors in which $T_{\text{max}} < 42.5^{\circ}\text{C}$, the pain control rate was 3/7 (42.8 %).

Among the 10 primary tumors, 2 obtained PR and 7(70%) reached $T_{\text{max}} \geq 42.5^{\circ}\text{C}$. Of the 9 metastatic tumors, 1 achieved PR and 5(55%) reached $T_{\text{max}} \geq 42.5^{\circ}\text{C}$. Concerning pain control CPR+PPR, the results were similar for both primary and metastatic tumors.

Figure 1 shows a patient with chordoma who obtained PR and CPR following thermoradiotherapy.

3.3 Survival

The cumulative survival rate of 16 patients is shown in Figure 2. The 1 year and 3 year survival rates were 60% and 25%, respectively. The survival outcome for the 3 partial local responders was 44+in 1 case and 39+ months in another case. The remaining outcome was 59+ months and the patient continues to live with stable disease. The mean survival period of patients with pain relief was 26.8 months. There was no significant difference in survival between primary and secondary bone tumors.

3.4 Toxicity

Regarding blood pressure, the systolic blood pressures before and after heating treatment were 128.8 ± 23.7 mmHg (mean \pm SD) and 130.6 ± 22.9 mmHg (mean \pm SD), respectively. The diastolic blood pressures before and after heating treatment were 75.6 ± 13.4 mmHg (mean \pm SD) and 77.8 ± 15.8 mmHg (mean \pm SD), respectively. The blood pressure increased in 50 % of the patients, while it decreased in the other 50%.

The pulse rate was elevated in most patients, with a range of 6-51 beats/min. (mean \pm SD, 18.8 ± 11.7).

The sequelae of hyperthermia were not severe. The majority of the patients reported mild pain associated with heating. The pain disappeared spontaneously after hyperthermia finished. Two patients could not tolerate treatment because of pain, and the treatment was unsatisfactory. Numbness and edema in the treatment regions were observed in 4 and 1 patient,

respectively. There was no thermometry-catheter related complication. No late sequelae were observed in any patient.

4. Discussion

Hyperthermia has been used effectively as an adjuvant to radiotherapy and/or chemotherapy in the treatment of soft tissue tumors (Leopold et al. 1989, Hiraoka et al. 1995), head and neck tumors (Valdagni et al. 1994, Wust et al. 1996), breast cancer (Bornstein et al. 1992), liver tumors (Nagata et al. 1995) and pelvic tumors (Sapozink et al. 1984, Nishimura et al. 1992). To the best of our knowledge, few studies have examined the treatment of bone tumors with hyperthermia. Our results demonstrated that adding hyperthermia to radiotherapy and/or chemotherapy was advantageous without increased side effects in a group of patients with locally advanced primary or metastatic bone tumors.

The thermal parameters showed that hyperthermia for bone tumors is clinically feasible, because the intratumor temperature was heated to a therapeutic temperature. Twelve out of the 19(63%) tumors reached $T_{max} \geq 42.5^{\circ}C$. Ten out of 19(52%) tumors achieved a $T_{max} > 43^{\circ}C$. Moreover, 84%(16/19) tumors were treated 4 to 7 times and these patients tolerated the treatment. The thermometric results reported by Matsui et al. (1989) were also positive. According to their study, temperatures above $42.5^{\circ}C$ were observed in the center and surface of pig femurs. Furthermore, the majority of malignant bone tumors was raised to a maximum temperature

above 42.5°C in a pilot clinical study.

Our findings suggested the following benefits of hyperthermia in the management of locally advanced bone tumors.

The first is that the local control rate may be improved if tumors are heated above 42.5 °C. The local control rate was 25% (3/12).

Since all of these tumors were regarded as refractory to radiotherapy or chemotherapy alone because of their volume, histological type and history of prior therapy, this response was good. The second benefit to patients is pain reduction. Reduced pain was observed even in patients who showed no tumor regression. Twelve out of the 19 tumors (63.2%) achieved pain control. A higher pain control rate (75%) was noted in tumors heated above 42.5°C in the T_{max}. than in tumors heated below 42.5°C whose pain control rate was 42.8% ($p > 0.1$). All tumors which achieved either local response or pain relief were heated more than 4 times, except 1, which was heated 2 times. No significant relationship between T_{max}. over 42.5°C and local response or pain relief was found, because the patient number was small. However, the clinical results suggested that T_{max}. over 42.5°C and more than 4 times heat treatments are necessary to obtain local control or pain relief.

The addition of hyperthermia to radiotherapy and/or chemotherapy did not increase the acute complications. Hyperthermia-related toxicity such as subcutaneous fat necrosis and skin burn was not observed.

With regard to the systemic effects of hyperthermia, the pulse rates increased after hyperthermia in all patients, while the blood pressure changed individually.

More recently, a patient's quality of life has become a new criterion for assessing cancer therapy. Our multimodality approach using hyperthermia provided pain relief and tumor volume reduction, suggesting that this treatment method is clinically useful.

In conclusion, our thermometric and clinical results indicate that locoregional hyperthermia is feasible for locally advanced bone tumors. The clinical benefit of hyperthermia in combination with radiotherapy and/or chemotherapy was suggested. Since the number of patients was small, further hyperthermia clinical trials should be performed to confirm these observations.

Acknowledgement:

This study is partly supported by JAPAN-CHINA MEDICAL ASSOCIATION.

References

- ABE, M. and HIRAOKA, M., 1990, Hyperthermia in combination with radiation in the treatment of cancers. *Stress Proteins in Biology and Medicine*, edited by R. I. Morimoto, A. Tissieres, C. Georgopoulos (New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press), pp.117-129.
- BORNSTEIN, B. A., ZOURANJIAN, P. S., HANSEN, J. L., FRASER, S. M., GELWAN, L.A., TEICHER, B. A., and SVENSSON, G.K., 1992, Local hyperthermia, radiation therapy, and chemotherapy in patients with local-regional recurrence of breast carcinoma. *International Journal of Radiation Oncology Biology and Physics*, 25, 79-85.
- HIRAOKA, M., NISHIMURA, Y., NAGATA, Y., MITSUMORI, M., OKUNO, Y., LI, P. Y., ABE, M., TAKAHASHI, M., MASUNAGA, S., AKUTA, K. and KOISHI, M., 1994, Site-specific phase I, II trials of hyperthermia at Kyoto University. *International Journal of Hyperthermia*, 10, 403-410.1
- HIRAOKA, M., NISHIMURA, Y., NAGATA, Y., MITSUMORI, M., OKUNO, Y., LI, P. Y., TAKAHASHI, M., MASUNAGA, S., AKUTA, K., KOISHI, M., JO, S. and ABE, M., 1995, Clinical results of thermoradiotherapy for soft tissue tumors. *International Journal of Hyperthermia*, 11, 365-377.

LEOPOLD, K. A., HARRELSON, J., PROSNITZ, L., SAMULSKI, T. V., DEWHIRST, M. W., and OLESON, J. R., 1989, Preoperative hyperthermia and radiation for soft tissue sarcomas: advantage of two vs one hyperthermia treatments per week. *International Journal of Radiation Oncology Biology and Physics*, 16, 107-115.

MATSUI, N., OHTA, H., OTSUKA, T., HATTORI, M., SEKIYA, I. AND KUSADA, J., 1989, Hyperthermia in malignant tumors of the extremities -experimental heating by a radiofrequency applicator and its clinical significance. *Japanese Journal of Cancer Chemotherapy*, 16(4 Pt 2-3), 1788-1794.

MITSUMORI, M., HIRAOKA, M., OKUNO, Y., NISHIMURA, Y., LI, P. Y., FUJISHIRO, S., NAGATA, Y., ABE, M., KOISHI, M., SANNO, T., MARUME, T. and TAKAYAMA, N., 1996, A phase I and II clinical trial of a newly developed ultrasound hyperthermia system with an improved planar transducer. *International Journal of Radiation Oncology Biology and Physics*, 36, 1169-1175.

NAGATA, Y., HIRAOKA, M., NISHIMURA, Y., MASUNAGA, S., MITSUMORI, M., OKUNO, Y., FUJISHIRO, S., KANAMORI, S., HORII, N., AKUTA, K., SASAI, K., ABE, M. and FUKUDA, Y., 1997, Clinical results of radiofrequency hyperthermia for malignant liver tumors. *International Journal of Radiation Oncology Biology and Physics*, 38, 359-365.

NISHIMURA, Y., HIRAOKA, M., AKUTA, K., JO, S., NAGATA, Y., MASUNAGA, S., TAKAHASHI, M., and ABE, M., 1992, Hyperthermia combined with radiation therapy for primarily unresectable and recurrent colorectal cancer. *International Journal of Radiation Oncology Biology and Physics*, 23, 759-768.

NISHIMURA, Y., AKUTA, K., HIRAOKA, M., MASUNAGA, S., NAGATA, Y., TAKAHASHI, M., ABE, M. and KOIZUMI, K., 1990, Initial clinical results of a 430 MHz microwave hyperthermia system using a lens applicator. *Radiotherapy and Oncology*, 17, 219-227.

SAPOZINK, M. D., GIBBS, F. A., GATES, K. S. and STEWART, J. R., 1984, Regional hyperthermia in the treatment of clinically advanced deep seated malignancy: results of a pilot study employing an annular array applicator. *International Journal of Radiation Oncology Biology and Physics*, 10, 775-786.

VALDAGNI, R. and AMICHETTI, M., 1993, Report of long-term follow-up in a randomized trial comparing radiation therapy and radiation therapy plus hyperthermia to metastatic lymphnodes in stage IV head and neck patients. *International Journal of Radiation Oncology Biology and Physics*, 28, 163-169.

WUST, P., STAHL, H., DIECKMANN, K., SCHELLER, S., LÖFFEL, J., RIESS, H., BIER, J., JAHNKE, V. and FELIX, R., 1996, Local hyperthermia of N2/N3 cervical lymph node metastases: correlation

of technical/thermal parameters and response. International
Journal of Radiation Oncology Biology and Physics, 34, 635-646.

日本財団補助金による

1998年度日中医学協力事業報告書

—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

98 年 10 月 13 日

研究室で撮影した本人のスナップ写真、及び発表論文等のコピーを添付

1. 招 へ い 責 任 者 尾 崎 由 基 男



所属機関 山梨医科大学臨床検査医学

職名 教 授

所 在 地 〒 409-03898 山梨県中巨摩郡玉穂町下河東1110

電 話 0552-73-6770

招へい研究者氏名 馬 西

所属機関 西安医科大学 血液研究室

職名 教 授

研 究 テ ー マ ベラプロストの血小板機能抑制機序:2種類の血小板凝集計を用いて。

2. 日 本 滞 在 日 程

98年7月6日 来日

98年7月20日より23日 新潟大学医学部血液内科見学

98年8月22日より24日 三重大学医学部分子病態学科見学

98年10月1日より3日 第5回日中線溶凝固血小板シンポジウム 参加

上記の日程を除き、山梨医科大学臨床検査医学にて実験

98年10月6日 帰国

3. 研 究 報 告

別紙書式を参考に、報告本文4000字以上で報告して下さい（枚数自由・ワープロ使用）

タイトル・要旨等は日本語で、KEY WORDS以下は日本語或いは英語で記入して下さい。

研究成果の発表予定がある場合は発表原稿・抄録集等を添付して下さい。

論文発表に当っては、日中医学協会—日本財団補助金による旨を明記して下さい。

研究テーマ

ベラプロストの血小板機能抑制機序: 2種類の血小板凝集計を用いて。

研究者氏名 馬 西

所属・役職 西安医科大学血液研究室 教授

招聘者氏名 尾崎由基男 山梨医科大学臨床検査医学 教授

プロスタサイクリンの安定化誘導体であるベラプロストの血小板凝集能に対する作用を、2種類の血小板凝集計を用いて判定した。一つの凝集計は従来の吸光度法を用いたものであり、広く日本で用いられているが小凝集塊の検出ができない、また凝集の程度と吸光度法の変化との相関が悪い等の弱点がある。一方、最近開発された散乱光を用いた血小板凝集能は 数個程度の血小板凝集塊も測定できること、また凝集塊のサイズと個数が定量的に判定できることなどの利点を有している。この新しい血小板凝集計を用いると、以前より低濃度の刺激剤でおきる血小板凝集が測定でき、それ故低濃度の血小板機能阻害剤の効果が判定できるのではないかとの仮定の下、今回の実験を行った。結果として、トロンボキサンA2類似体であるU-46619およびコラーゲン刺激の場合、散乱光を用いた血小板凝集計により判定されたベラプロストのED50は従来の吸光度法より数倍から10倍程度低い値を取った。一方、エピネフリンおよびADPでは従来法との間に大きな差は認められなかった。ベラプロストは細胞内cAMPを増加させることにより血小板機能を抑制させるが、トロンボキサンA2による血小板活性化をおそらくこれに鋭敏に反応することが示唆された。ADPやエピネフリンの小凝集塊の形成はトロンボキサンA2非依存性であることが明らかにされており、おそらくこの現象がADPやエピネフリン刺激の場合のベラプロストの有効性を落としていることが示唆された。

Key words:

platelet aggregation, light scatter, optical density,
sodium beraprost, collagen, U-46619, ADP, epinephrine

Introduction

Platelets play a key role in physiological hemostasis, and also participate in the pathogenesis of thrombosis which occurs with various disorders including diabetes mellitus and ischemic heart diseases. Platelets appear to be activated *in vivo* in these disorders, and the modification of platelet hyperfunction has been one of the therapeutic aims for a long time. A number of agents have been developed to attenuate platelet hyperfunction, and several drugs have been already introduced into market with limited success. Hence, accurate measurement of platelet function is a prerequisite for the evaluation of efficacy of anti-platelet agents.

The most widely applied method of platelet function today is platelet aggregometry based on changes in light transmission of platelet suspensions, developed by Born *et al.* in 1962. Although most, if not all, of clinical evaluations of platelet aggregation have been performed with this conventional platelet aggregometry, it is now realized that there is only a little, if not none, correlation between the extent of aggregation assessed by this method and clinical responses. This discrepancy may be attributed to the poor correlation between changes in light transmission and the formation of platelet aggregates, and to the low sensitivity of the conventional method to detect small aggregates. We have recently developed a platelet aggregometer based on a particle counting method using light scattering. This new method can quantitatively assess the number and size of platelet aggregates in a suspension. It is also sensitive enough to detect aggregates consisting of several platelets, and therefore can evaluate platelet activation of a weak magnitude. This device is now commercially available, and several clinical trials as well as fundamental evaluation have been reported.

Prostaglandin I₂ (PGI₂) is synthesized and released by endothelial cells. PGI₂ by interacting with its receptors on platelets elevates the intracellular level of cAMP in platelets, and this process is considered to play an important role in preventing platelet adhesion to endothelium and subsequent aggregate formation. While administration of PGI₂ should

prove useful in the therapeutic regimen for thromboembolism, its instability precluded its wide clinical application. Recently, several stable analogues of PGI₂ have been developed, and their clinical efficacy has met considerable success. They should also prove to be potent inhibitors of platelet aggregation in *in vitro* studies, but previous reports using the conventional platelet aggregometry have found inhibitory effects of these agents only at high concentrations which cannot be achieved *in vivo*. In this study, we evaluated the effects of sodium beraprost, a stable analogue of PGI₂ synthesized by Toray Co. Ltd., on platelet aggregation, as assessed by the new aggregometry based on light scattering. Changes in light transmission, used in the conventional aggregometry, were simultaneously measured along with light scattering, to delineate the comparative efficacy of these two methods in detecting changes in platelet aggregation.

Materials and Methods

1. Agents: Sodium Beraprost was a generous gift from Toray Co. Ltd., Tokyo, Japan. It was dissolved in distilled water at a concentration of 0.1 mM just prior to use. ADP and epinephrine were obtained from Sigma (St. Louis, MO, U.S.A). U46619 was purchased from Funakoshi (Tokyo, Japan). Collagen was obtained from Form-Chemie.
2. Platelets: Venous blood was drawn from healthy volunteers who denied uptake of any drug for a minimum of two weeks prior to experiments. Blood was immediately mixed with 3.8% sodium citrate (1 volume of citrate/9 volumes of blood), and the mixture was centrifuged at 160 x g to obtain platelet-rich plasma (PRP). For the measurement of changes in light transmission, PRP was further centrifuged at 2000 x g to obtain platelet-poor plasma, which was used to calibrate 100% light transmission.
3. Measurement of platelet aggregation: We developed a platelet aggregometer that simultaneously measures platelet aggregation by two means. One is the conventional method based on changes in the

light transmission (LT) of a platelet suspension, developed by Born. The other is based on the particle counting method using light scattering (LS). Briefly, a diode laser light beam (40 μ m in width, wavelength 675 nm) was passed through PRP in a cylindrical glass cuvette maintained at 37°C. An optical device focuses on a limited area of the platelet suspension, and measures the intensity of light scattered by particles passing through the area, thus minimizing multiple light scattering. The intensity of light scattering detected by this device provides information on the number and size of aggregates in the suspension. It has been demonstrated that this device is particularly sensitive in detecting platelet aggregates of small size.

Results

1. Dose-response curves of ADP-induced platelet aggregation assessed by LT or LS.

Assessed by LT, ADP at the range of 0.5 and 1.5 μ M induced a transient increase in light transmission, which has been defined as the "primary aggregation". At higher concentrations of ADP, the primary aggregation is followed by the secondary aggregation, which represents irreversible platelet aggregation. Since the primary aggregation is of small magnitude and varies between measurements, the secondary aggregation has conventionally been used to evaluate the effects of various inhibitors on platelet aggregation.

On the other hand, LS which can evaluate the size and number of platelet aggregates demonstrates that the formation of small aggregates occurs in the phase of the primary aggregation, as defined by LT. LS also shows that platelet aggregates of small size precede the formation of larger aggregates, which coincides with the phase of the secondary aggregation as detected by LT. The ED50 value of ADP assessed by LS for inducing platelet aggregation is approximately

0.75 μ M, whereas that of LT is approximately 2.0 μ M. These findings clearly demonstrate that LS which can detect the formation of small aggregates can evaluate platelet activation more sensitively than LT. Other agonists, including epinephrine, collagen, and U46691 gave results essentially similar to that of ADP (data not shown).

In experiments thereafter, two concentrations were determined for each agonist. One was the minimal concentration of the agonist which induced the secondary aggregation assessed with LT, and the other was the maximum concentration of the agonist that induced the formation of small aggregates as assessed by LS but not that of larger aggregates or substantial changes in light transmission. The effects of sodium beraprost were determined on platelet aggregation induced by the agonists in the concentration range thus determined.

2. Effect of beraprost on platelet aggregation induced by ADP.

Beraprost in a dose-dependent manner inhibited ADP-induced platelet aggregation assessed by LT as well as LS. At concentrations higher than 10 nM, beraprost almost completely inhibited the formation of platelet aggregates induced by ADP. The ID50 values of beraprost were approximately 5 nM with LT, and 2.5 nM with LS.

3. Effect of beraprost on platelet aggregation induced by epinephrine.

Beraprost in a dose-dependent manner inhibited epinephrine-induced platelet aggregation assessed by LT as well as LS. At concentrations higher than 10 nM, beraprost almost completely inhibited the formation of platelet aggregates induced by epinephrine. The ID50 values of beraprost were approximately 7 nM with LT, and 5 nM with LS.

4. Effects of beraprost on platelet aggregation induced by U46619.

Beraprost up to the concentrations of 3 nM virtually had no effects on U46619-induced platelet aggregation, when assessed with LT. At concentrations higher than 10 nM, however, platelet aggregation was almost completely inhibited. Thus, although the ID50 value falls between 3 and 10 nM, its value could not be determined with accuracy. Assessed with LS, beraprost in a dose-dependent manner inhibited platelet aggregation with the ID50 value of 0.2 nM.

5. Effects of beraprost on platelet aggregation induced by collagen
Beraprost up to the concentrations of 3 nM had virtually no effects on collagen-induced platelet aggregation, assessed with LT. At concentrations higher than 10 nM, platelet aggregation was completely inhibited by beraprost. Thus, although the ID50 value falls between 3 and 10 nM, its value could not be determined with accuracy. When collagen-induced platelet aggregation was assessed with LS, the inhibitory effects of beraprost could be observed at concentrations lower than those required for LT. The ID50 value for beraprost was approximately 0.5 nM, when assessed with LS.

Discussion

In the process of platelet aggregation, aggregates consisting of a small number of platelets are initially formed. Platelet stimulation of a minor degree can only reach this phase, called the "primary aggregation", and eventually the aggregates dissociate into single platelets. With platelet activation of higher degree, the primary aggregation is followed by the secondary phase, in which small aggregates fuse to form aggregates of larger size. The newly developed platelet aggregometer based upon the particle counting method (LS) can sensitively detect the formation of small aggregates in the phase of the "primary aggregation".

The "primary aggregation" can also be detected by the conventional platelet aggregometry (LT) as a small deflection in light transmission. However, the changes are generally minimal, and variable in magnitude. Moreover, changes in light transmission in this phase reflect shape change as well as the formation of small aggregates, rendering the quantitative assessment of aggregate formation difficult. Thus, the conventional aggregometry mainly assesses the changes in the "secondary aggregation" which corresponds to the formation of large aggregates. Our findings clearly demonstrate that the agonist concentrations required for the "secondary aggregation" or the formation of large

aggregates, which allows the assessment with LT, are greater than those required for the formation of small aggregates that can be quantitatively measured by LS. Thus, LS can evaluate platelet aggregation of a minor degree induced by agonists at concentrations lower than those required for the assessment by LT.

Anti-platelet agents which have clearly proved useful in clinical trials are often known to lack inhibitory effects at physiologic concentrations on platelet aggregation *in vitro*. Most of these studies have used the conventional platelet aggregometry, which requires the formation of large aggregates for assessment, and the concentrations of the agonists used in these studies were much higher than could be generated *in vivo*. Platelet aggregate formation induced by potent agonists at high concentrations may be resistant to anti-platelet agents or requires higher concentrations of these inhibitors. It is possible that anti-platelet agents at concentrations closer to the physiologic range may prove effective if they are tested for platelet aggregation induced by agonists at concentrations closer to those *in vivo*. This hypothesis led us to perform the comparative study on the effects of beraprost on platelet aggregation, as assessed by LT and that of LS.

In the present study, we have demonstrated that sodium beraprost in a dose-dependent manner inhibited platelet aggregation induced by all the four agonists, ADP, collagen and U46619, irrespective of the methods for measuring platelet aggregation. However, there appear to be differences in the ID50 values of beraprost between the agonists. With ADP or epinephrine, the ID50 values determined by LS were relatively close to those of LT (2.5 nM vs. 5 with ADP stimulation, and 5 nM vs. 7 nM with epinephrine). On the other hand, the ID50 values determined by LS were much lower than those of LT with U-46619- or collagen-induced platelet aggregation (0.2 nM vs. 3-10 nM with U-46619, and 0.5 nM vs. 3-10 nM with collagen). These data raise several interesting notions. First, the formation of small aggregates induced by U-46619, a thromboxane A2 mimetic, and by collagen appears to be highly sensitive to the elevated intracellular cAMP level induced by beraprost.

Since the formation of small aggregates in collagen-induced platelet activation is known to be dependent upon thromboxane A2 formation, these findings suggest that cAMP potently inhibits the formation of small aggregates, which is the initial phase of platelet activation induced by thromboxane A2. It is also suggested that the intracellular cAMP level is relatively less potent in suppressing the transformation of small aggregates into large aggregates.

日本財団補助金による

1998年度日中医学協力事業報告書

— 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11年 3月 12日

研究室で撮影した本人のスナップ写真、及び発表論文等のコピーを添付

1. 招 へ い 責 任 者 清水信義 
所属機関 慶応義塾大学 医学部 職名 教授
所在地 〒160-8582 東京都新宿区信濃町35 電話 03-3353-1211
(内 2721)
招へい研究者氏名 趙彦艳
所属機関 中国医科大学 遺伝学教室 職名 助教授
研 究 テ ー マ 高血圧症に関するゲノム解析

2. 日本滞在日程

平成10年8月25日 成田到着
8月26日～12月15日 高血圧症原因遺伝子発見のためのBACクローンのスクリーニング、
BACクローンの一部整列
12月16日～12月19日 日本分子生物学会参加
12月20日～平成11年2月24日 整列BACクローンの一部シーケンシング、
シーケンスのコンピュータ解析による候補遺伝子の探索
2月25日 帰国

3. 研 究 報 告

別紙書式を参考に、報告本文4000字以上で報告して下さい（枚数自由・ワープロ使用）

タイトル・要旨等は日本語で、KEY WORDS以下は日本語或いは英語で記入して下さい。

研究成果の発表予定がある場合は発表原稿・抄録集等を添付して下さい。

論文発表に当っては、日中医学協会—日本財団補助金による旨を明記して下さい。

研究テーマ: 高血圧症に関するゲノム解析

来日研究者氏名: 趙彦艶

中国での所属・役職: 中国医科大学遺伝学教室・助教授

招聘者氏名・所属・役職: 清水信義・慶應義塾大学医学部・教授

要旨: インスリン非依存性糖尿病患者の家系分析によれば、高血圧に関する遺伝的素因が8番染色体のLPL遺伝子の近傍(8p22)に存在することを示唆している。本研究ではこの結果を確認し高血圧関連遺伝子をクローニングするために、LPL近傍の13個のSTSマーカーを用いて、慶應BACライブラリーをコロニーハイブリダイゼーションでスクリーニングした。得られた29個のBACクローンをサザンブロットおよびPCRを併用して整列した上で、6個の重なり合うBACクローンを選定しそれらを用いてエキソントラッピングを行った。30個のエキソンが得られたのでそれぞれシーケンスを決定しデータベースへのホモロジーサーチを行った。その結果、1個はLPL遺伝子由来のエキソンであったが、他の29個は未知のシーケンスであった。本研究によって、8p22領域に存在する新規遺伝子のクローニングが可能となり、高血圧関連遺伝子を発見する基盤ができた。

Key Words: エキソントラッピング、BACライブラリー、8番染色体、高血圧

Hypertension is a common complex disease characterized by quantitative trait under polygenic control. The identification of genes responsible for high blood pressure is of major importance, because it provides a mechanistic classification and guides therapy for the primary abnormality. Wu *et al* studied the distribution of blood pressure in 48 Taiwanese families with noninsulin-dependent diabetes mellitus and conducted quantitative sib-pair linkage analysis with candidate loci for blood pressure, insulin resistance and lipid metabolism. They obtained significant evidence for linkage of systolic blood pressure to a genetic region at or near the lipoprotein lipase (LPL) gene on chromosome 8p22¹). As a step toward identifying the pathogenic gene of hypertension, I screened BAC clones from Keio human BAC contig covering markers D8S1715-D8S1949-D8S282. Furthermore, I performed exon trapping and sequencing of the obtained exon-like fragments. This information will aid in the isolation of candidate genes involved in the pathogenesis of hypertension and other disorders mapped to the 8p22 region.

MATERIALS AND METHODS

Human BAC library. The Keio BAC library was constructed by Asakawa *et al.* and reported previously²).

Synthesis of oligonucleotide probe. The sequence information on 13 STS markers located on chromosome 8p22 was downloaded from the database of the

Whitehead Institute at MIT. They were used as probes for hybridization and PCR amplimers.

Colony hybridization using high-density replica (HDR) filters. The 3072 BAC clones were blotted onto a 12 x 8 cm Biodyne nylon membrane by a Biomek 2000 workstation (Beckman). DNAs were fixed to membranes according to a microwave/proteinase k colony lysis procedure³). The end-labeled probe reaction was followed by mixture containing 0.1 pmol each of 13 STS marker oligonucleotides (forward amplimers), 6.5 μ Ci of [γ -³²P] ATP (5000 Ci/mol, AA0018 Amersham), and 1 unit of T4 polynucleotide kinase (Takara) in the supplied buffer and was incubated at 37°C for 1 hr. The unincorporated [γ -³²P]ATP was removed with a Sephadex G-50 spun column. Prehybridization was performed with a solution of 5 x SSC, 5 x Denhardt's, 0.5% SDS, 0.5 mg/ml denatured ssDNA at 55°C for overnight. The labeled probes were added to the hybridization solution and incubated for 72 hr at 55°C. The filters were washed three times with 2 x SSC and 0.5% SDS for 15 min at room temperature, followed by two washing for 30 min at 55°C, and finally washed with 0.1 x SSC and 0.1% SDS for a few min at room temperature. The filter was exposed against Fuji imaging plate for 72 hr. The autoradiograms were obtained with a BAS 2000 Bio Imaging Analyzer (Fuji, Japan).

PCR screening. 29 BAC clones were amplified by PCR with 13 STSs respectively.

Southern blot analysis. DNA from 29 BAC clones which cover the 13 markers near LPL locus was digested with *Hind*III, separated by 0.7% agarose gel electrophoresis and transferred onto a nylon membrane (NEN). *Hind*III-digested DNA was labeled with [α -³²P]dCTP by a random priming method and hybridized to the Southern blot filter of BAC DNA.

Exon trapping. Exon trapping was performed using an exon trapping system (GIBCO, BRL) as recommended by the supplier. DNAs of six BAC clones (1220-D6, 1689-F4, 1961-C5, 1460-H10, 1381-A1 and 2048-D6) were digested with *Pst*I and subcloned into *Pst*I-digested pSPL3 vector. Transformed colonies resistant to ampicillin were pooled and plasmid DNA was purified. Recombinant plasmids were transfected into COS-7 cells using FuGENE 6 transfection reagent (BOEHRINGER, MANNHEIM). After 48 hr, total RNA was purified from COS-7 cells, reverse-transcribed and PCR-amplified using vector-specific primers. The PCR products were subcloned into pAMP10 using the uracil DNA glycosylase (UDG) cloning method as recommended by the supplier.

DNA sequencing. The trapped sequences were amplified directly from each colony by PCR using cassette-specific primers, purified by QIAquick-spin columns (QIAGEN), and then subjected to DNA sequencing. The sequencing

reaction was performed using Taq DNA polymerase and Fluorescence-labeled dideoxy-nucleotides in a BigDye terminator cycle sequencing kit (Perkin-Elmer). The DNA sequence was then determined using an automatic DNA sequencer (ABI, Model 377). The nucleotide homologies were analyzed using BLASTN search of the non-redundant databases.

RESULTS AND DISCUSSION

We attempted to construct a BAC contig map to cover the region corresponding to quantitative trait locus of human blood pressure at chromosome 8p22. From BAC library, 29 BAC clones were selected by colony hybridization with labeled 13 STSs near LPL locus. We then performed PCR with the same STSs to confirm the BAC clones containing human DNA inserts. To find neighboring clones, we used Southern hybridization with each BAC clones as the probe. After a series of experiments we were able to construct the BAC contig covering markers D8S1715-D8S1949-D8S282.

To isolate transcribed sequences from this region, we performed exon-trapping using 6 BAC clones, and isolated 30 putative exon fragments. These exons ranged from 57 bp to 261 bp in size. Homology search with nucleotide sequence database revealed that one exon is derived from gene LPL located in this region. 18 exons matched with partial EST sequences without known function. 4 exons matched with exon sequences that were independently trapped by other investigators. 7 exons had no considerable homology with the sequences deposited in database. We found 18 exons to be present in human liver, thymus, brain, placenta, retina and testis cDNA libraries. These exons reported here will be useful resources for isolation of candidate genes involved in the pathogenesis of hypertension as well as other novel genes located in the 8p22 region.

ACKNOWLEDGMENTS

I thank Prof. Shimizu for his advice and suggestion, Dr. Asakawa for his technical assistance and Ms. Harigai for her assistance in this report preparation.

REFERENCES

- 1) Du-An Wu, Xiangdong Bu, Craig H. Warden *et al.*(1996) Quantitative Trait Locus Mapping of Human Blood Pressure to a Genetic Region at or near the Lipoprotein Lipase Gene Locus on Chromosome 8p22. *J. Clin. Invest.*, 97:2111-2118
- 2) Shuichi Asakawa, Izumi Abe, Yoshiki Kudoh, *et al.* (1997) Human BAC Library:Construction and Rapid Screening. *Gene*, 191:69-79
- 3) Shuichi Asakawa and Nobuyoshi Shimizu (1998) High-fidelity Digital Hybridization Screening. *Genomics*, 49:209-217

日本財団補助金による

1998年度日中医学協力事業報告書

— 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12月15日

研究室で撮影した本人のスナップ写真、及び発表論文等のコピーを添付

1. 招へい責任者 鈴木盛一 
- 所属機関 国立小児病院小児医療研究センター 実験外科体学 職名 部長
- 所在地 〒154-8509 東京都世田谷区太子堂3-35-31 電話 03-3414-8121
- 招へい研究者氏名 何維
- 所属機関 中国医科学院基礎医学研究所、中国協和医大免疫系 職名 教授
- 研究テーマ マウス混合リンパ球反応における熱、シロップタンパク質60kDaに対するap.88T細胞の反応性についての検討

2. 日本滞在日程

1998.6.28. ~ 1998.10.26.

3. 研究報告

別紙書式を参考に、報告本文4000字以上で報告して下さい（枚数自由・ワープロ使用）

タイトル・要旨等は日本語で、KEY WORDS以下は日本語或いは英語で記入して下さい。

研究成果の発表予定がある場合は発表原稿・抄録集等を添付して下さい。

論文発表に当たっては、日中医学協会—日本財団補助金による旨を明記して下さい。

研究テーマ

マウス混合リンパ球反応における熱ショックタンパク質60に対する $\alpha\beta$ 、 $\gamma\delta$ T細胞の反応性についての検討

来日研究者氏名、所属、役職

何維 中国医科学院基礎医学研究所、中国協和医科大学免疫学教室 教授

招聘者氏名、所属、役職

鈴木盛一 国立小児病院小児医療研究センター実験外科生体工学部 部長

要旨

熱ショックタンパク質 (Hsp) 反応性リンパ球の同種異系 (アロ) 臓器移植拒絶反応時の関与が最近報告されている。しかし、熱ショックタンパク質の発現機構及び役割について、特に二種類のT細胞、すなわち $\alpha\beta$ T細胞、 $\gamma\delta$ T細胞のアロリンパ球に対する反応性についてはまだ不明である。そこで、アロ抗原による一方性、二方性マウス混合リンパ球反応におけるHspの発現機構及び役割について検討を行った。正常またはX線照射後リンパ球においては細胞成長因子、抗原、マイトジンなど存在の有無に関わらず、Hsp60またはHsp70分子が細胞表面に発現し、アロ抗原の刺激によりその発現は著しく増強した。 $\alpha\beta$ T細胞はアロ生細胞と共培養時に強く増殖し、また、その増殖性は抗Hsp60抗体によって、31-43%に抑えられた。一方 $\gamma\delta$ T細胞では抗Hsp60抗体の添加によって、完全に増殖が抑えられた。以上の結果から、マウス *in vitro* 系においてアロ反応性はHsp60分子と $\gamma\delta$ T細胞が関連し、 $\alpha\beta$ T細胞の関与は部分的であることを判明した。臓器移植拒絶反応におけるHsp60分子の関与及び役割の機序の解明は臨床において拒絶反応の制御に役に立つと考える。

KEY WORDS

heat shock protein, $\alpha\beta$, $\gamma\delta$ T lymphocyte, alloreactive response, transplantation immunology, mixed lymphocyte reaction

研究報告

INTRODUCTION

Heat shock proteins (hsps) are produced by both prokaryotic and eukaryotic cells under a variety of stresses such as sudden elevation of temperature, oxidative radicals, anoxia, alcohol, heavy metals, ischemia, cytokines, infection and inflammation(1-6). This cellular response is presumed to be responsible for protecting stressed cells through reactivating denature protein(7). Besides, many investigations have shown that hsps perform a function as "molecular chaperones" by folding, unfolding and translocation of polypeptides(7,8,) which is closely related to antigen processing and presentation. (9-13)

For example, hsp70 can interact with unfolding polypeptides so as potentially to facilitate a conformational change in the peptide-MHC complex, which is required for transit of peptide-MHC complex to cellular surface(9). Expression of MHC is promoted by the stimulation via heat stress(13). Antigen presentation can be blocked by antibodies against hsp70(12). These data suggest that hsps belong to antigen-presenting molecules. On the other hand, hsps also seem to be the target antigens recognized by immune system, which can trigger autoimmune response,(5,14) tumor immunity(15), and graft rejection(16-24).

Several investigators have noted that alloreactive lymphocytes are a rather small proportion of T cells within infiltrating lymphocytes in allograft. Therefore, they postulated that graft-infiltrating lymphocytes might possess other specificity to additional antigen(16). They found that rat allograft lymphocytes responded markedly to recombinant mycobacterial hsp65 and hsp70. Many studies have recently revealed that allograft undergoes a stress, in which hsps including the families of hsp60 and hsp70 are upregulated and hsp-reactive lymphocytes can be induced in rat, (16,18-20) mouse(17) and human system(21-24). However, there are several questions required to be clarified. Firstly, in several studies the reactivity of lymphocytes infiltrated in allograft tissues to hsps is evaluated by the response to recombinant or non recombinant mycobacterial hsps(16,18,19). This is obviously not so powerful evidence for the interpretation of involvement of hsps in allograft rejection because no hsps derived from same species could be tested for the response to lymphocytes in these investigations. Recently a group had a promising result that T cells from rejected human kidney allograft respond to human hsp72(23). The conclusion from this report seems to imply that hsp72 is a target antigen which elicits lymphocyte response. Do hsps really therefore serve as alloantigen or antigen presenting molecules in allogeneic lymphocyte reaction? Moreover, although hsp60-reactive ab and $\gamma \delta$ T cells have been identified in mice(25) and humans(26), what is the difference between the responses of TCR $\alpha \beta$ -expressing cells and TCR $\gamma \delta$ -expressing cells to allo-stimulator in hsp-reactive pathway? At last, the hsps express generally in within both the cytoplasm and nucleus, however, would hsps express on cell surface under a stressful stimulation by allo-reactivity? In present study, we definitively confirmed the expression of both hsp60 and hsp70 molecules on the cells in murine mixed lymphocyte reaction in vitro. A hsp60-dependant alloreactive response in both cases of $\alpha \beta$ T and $\gamma \delta$ T cells was found in murine system in vitro.

MATERIALS AND METHODS

Animals

Ten-week-old male inbred BALB/c (H-2d) and C57BL/6 (H-2k) mice, 2 months of age, were purchased from Shizuoka, Laboratory Animal Center (Shizuoka, Japan). All animals had access to water and foods ad libitum and were housed in accordance with institutional animal care policies.

Antibodies and reagents

The following mAbs were used: anti-hsp60 mAb derived from the LK1 hybridoma (mouse IgG1 isotype) has a unique specificity for mammalian hsp60 and avian hsp60, but does not cross react with the bacterial counterpart, or with helminths and spinach. The anti-hsp70 mAb derived from the BRM-22 hybridoma localized both the constitutive (hsp73) and inducible (hsp72) forms of hsp70 in immunoblotting. Both anti-hsp mAbs were purchased from Sigma. The following mAbs or reagents were purchased from PHARMINGEN, USA: Biotin-conjugated hamster anti-mouse anti-TCR $\gamma \delta$ and anti-TCR $\alpha \beta$; biotin-conjugated rat anti-mouse CD19; FITC-conjugated hamster anti-mouse TCR β ; R-PE-conjugated hamster anti-mouse TCR $\gamma \delta$, FITC- or R-PE-conjugated hamster IgG isotype standard. FITC-conjugated F(ab')₂ rabbit anti-mouse IgG were from SEROTEC. Streptavidin microbeads were purchased from (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany).

Preparation of TCR $\alpha \beta$ - and TCR $\gamma \delta$ -expressing cells. Splenic tissues, obtained from BALB/c or C57BL/6 mice, were gently pressed by slides and passed through a syringe, in which was filled with sterilized tampon, to obtain single-cell suspension. The mononuclear splenocytes separated from Ficoll-Hypaque centrifugation were then passed through Nylon Fiber Column (Wako Pure Chemical Industries) to obtain T cell-enriched population. Purification of $\alpha \beta$ or $\gamma \delta$ T cells from these BALB/c splenic T cells were done by magnetic activated cell sorter (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany). Cells were resuspended in labeling buffer (PBS, pH7.2, 2mM EDTA), to which biotin-conjugated mAbs anti-CD19 (1mg/10⁶ cells) and anti-TCR $\gamma \delta$ or anti-TCR $\alpha \beta$ were added at 1mg/10⁶ cells. The cells were incubated for 20 min on ice and washed twice with labeling buffer. The resuspended cells were then incubated with streptavidin microbeads (10ml/10⁷ cells) for 15 min on ice and washed. Cells were then added in a column, which was placed in magnetic activated cell sorter. We collected the entire effluate as a "nonmagnetic" fraction, in which $\alpha \beta$ or $\gamma \delta$ T cells accounted for >90%, as analyzed by fluorescence staining.

Proliferation assay: One-way reaction and two-way reaction of $\alpha\beta$ or $\gamma\delta$ T cells to allogeneic splenocytes. Two-way allo-reactivity: proliferative responses of $\alpha\beta$ or $\gamma\delta$ T cells from spleens of BALB/c mice to splenocytes from C57BL/6 mice were determined in a ^3H -TdR incorporation assay. Responder cells (1×10^4 $\alpha\beta$ or $\gamma\delta$ T cells from BALB/c mice) were cultured with 2×10^4 irradiated (20 Gy x-ray) or not irradiated (living) stimulators (splenocytes from C57BL/6 mice) in triplicate in the wells of 96-well V-bottom microtiter plates (Nunc, Wiesbaden, Germany) in a volume of 0.2 ml. The medium was RPMI-1640 supplemented with 10% heat-inactivated FCS, 10 mM HEPES, 2 mM L-glutamine, 100 U/ml penicillin, and 100 μ g/ml streptomycin. The cells were incubated at 37°C in a humidified atmosphere of 5% CO_2 in air for 6 days. Anti-hsp 60 (1:400) or -hsp70 (1:5000) mAb was added to cultures respectively. Controls included responder or stimulator alone, and cultures without anti-hsp60 or -hsp70 mAb. At the indicated time, individual microcultures were pulsed with 1 μ Ci ^3H -TdR per well and incubated for another 6 hours. Thereafter, cultures were harvested onto glass fibers and counted for beta emission using a trace-96 direct beta counter (Berthold).

The one-way mixed lymphocyte reaction in a ^3H -TdR incorporation assay was also performed. 5×10^4 T cells (responder), which were separated by nylon wool isolation from splenocytes from BALB/c, co-cultured with irradiated (20Gy) 5×10^4 spleen cells (stimulator) from C57BL/6 mice in 96-well round-bottom microplates (Nunc) for 3 days, while expressions of hsp60 and hsp70 on responder, stimulator and responder + stimulator cells were analyzed at day 2 and day 3.

Flow cytometry

For phenotypic analysis, the magnetic isolated cells were stained with FITC-anti-TCR β and R-PE- anti-TCR $\gamma\delta$. For hsp expression of analysis, cells were stained with anti-hsp60 or anti-hsp70 respectively for 15 min on ice. After two washing steps, cells were then incubated with FITC-conjugated F(ab')₂ rabbit anti-mouse IgG for 15 min on ice and washed twice. The cells were resuspended in PBS with 1% paraformaldehyde. All analyses were measured on a FACScan flow cytometer (Becton Dickinson).

Statistical analysis

Analysis of variance was used to test the differences among all tested groups in proliferation assay.

RESULTS

Expression of hsp60 and hsp70 on cultured cells in one-way mixed lymphocyte reaction in vitro is illustrated in fig 1, a conventional proliferation of murine splenic T cell (BALB/c) anti allogeneic irradiated splenocyte (C57BL/6) was obviously observed during 3 days of culture in vitro. However, the event in this process we are interested in is whether the response of T cells to allogeneic stimulation could correspond with hsp expression on cells. As shown in fig 2, both freshly isolated responder (BALB/c) splenic T cells and stimulator (C57BL/6) splenocytes could express surface hsp60 molecule in minor population (< 6%, A and B). Responder cells maintained this level of hsp60 expression at day 2 (C) and increased at day 3 (F) with 25%. The hsp60 expression in irradiated (20Gy) stimulator cells increased with prolonging time of culture (at day 2, 43% and at day 3, 62%). In the cultures of responder mixed with irradiated stimulator cells, there was increasing positive cell percentage in the whole population accounted for 49% at day 2 and 67% at day 3 respectively. At same time point, the sequence for the levels of hsp60+ cell percentages is as follows: responder with stimulator (R with S) > stimulator (S) > responder (R). We used a formula to calculate a net increasing percentage in cells from the culture of responder with stimulator. That is, %net increasing = %R with S - [%R (responder) + %S (stimulator)/2]. According the calculation with this formula, we found the net increasing percentages in cultures of responder with stimulator cells were 24.5% at day 2 and 23.5% at day 3. It indicates that an increasing hsp60 expression exists in cultures of responder with stimulator cells, when compared with responder or stimulator cells at same time. Similar manifestation also happened in the case of hsp70 expression in same test system (fig 2 I to P). Before culture, both responder T cells and stimulator splenocytes expressed hsp70 molecule on their surface in minor population (8%, I and J). After culture, responder cells almost kept this level at day 2 (K, 6%) and increased at day 3 (N) with 43%. The hsp70 expression in irradiated stimulator cells increased with prolonging time of culture (at day 2, 50% and at day 3, 24%). The hsp70+ cell percentages in the cultures of responder with irradiated stimulator cells significantly increased (38% at day 2 and 58% at day 3). Their net percentages were 10% at day 2 and 29% at day 3.

The alloreactive proliferative responses of $\gamma \delta$ T or $\alpha \beta$ T cell to allogeneic stimulator cells in one-way or two-way reaction were completely or partially blocked by anti-hsp60 antibody in vitro. To directly address the role of hsp60 and hsp70 in allo-reactivity of $\alpha \beta$ T or $\gamma \delta$ T cells (BALB/c), we performed the experiment as

illustrated in fig. 4. As noted elsewhere, $\gamma \delta$ T cells were not as good responder as $\alpha \beta$ T cells to alloantigens. In one-way reaction, there was no growth detected in cultures of $\gamma \delta$ T cells plus irradiated allogeneic spleen cells (C57BL/6), which was similar with the cases of all controls, such as $\gamma \delta$ T cells, $\alpha \beta$ T cells, irradiated or not irradiated (living) stimulator cells alone. A detectable proliferation was found in the cultures of $\gamma \delta$ T cells with living allogeneic cells (two-way reaction) during 3 to 4 days of incubation in vitro ($P < 0.05$, when compared with all controls or $\gamma \delta$ T cells plus irradiated allogeneic stimulator cells), while this response was completely blocked by adding mAb anti-hsp60 to culture ($P < 0.05$, $\gamma \delta$ T cells + living stimulator versus (vs) $\gamma \delta$ T cells + living stimulator + anti-hsp60), and was not affected at all by anti-hsp70 ($P > 0.05$, $\gamma \delta$ T cells + living stimulator vs $\gamma \delta$ T cells + living stimulator + anti-hsp70). Differentially to $\gamma \delta$ T cells, $\alpha \beta$ T cells demonstrated irradiated allo-lymphocyte-induced proliferation at the top level on day4. We interestingly noted that this allo-reactive response was not influenced by adding both mAbs anti-hsp60 and anti-hsp70 to cultures ($P > 0.05$, when compared these groups). However, when the irradiated stimulator was changed into living allogeneic cells, anti-hsp60 antibody could blocked the proliferative allo-reactivity of between $\alpha \beta$ T cells and allogeneic living spleen cells ($P < 0.05$, blocked vs not blocked), which was the strongest proliferation in this tested system ($P < 0.05$, when compared with other groups except $\alpha \beta$ T cells plus living stimulator with anti-hsp70). Anti-hsp70 antibody did not show any blocking effect on two-way allo-reaction between $\alpha \beta$ T cells and allogeneic living spleen cells. As clearly shown in fig4, the following proliferative responses during the period from day3 to day5 were at same level ($P > 0.05$, when compared with each other): $\alpha \beta$ T cells plus irradiated stimulator with or without mAbs anti-hsp60 or anti-hsp70, $\alpha \beta$ T cells plus living stimulator with mAb anti-hsp60, and $\gamma \delta$ T cells plus living stimulator with or without mAb anti-hsp70. All statistical analyses above were basely on data from the determination at time from day3 to day4.

Expression of hsp60 and hsp70 on cultured $\alpha \beta$ and $\gamma \delta$ T cells and stimulator cells in one-way or two-way mixed lymphocyte reaction in vitro. The both freshly isolated $\alpha \beta$ and $\gamma \delta$ T cells (BALB/c) express hsp60 and hsp70 at similar level to T cells isolated with nylon wool as shown in fig2 (data not shown). At the top of alloreactive proliferation in one-way or two-way mixed lymphocyte reaction at day4 (fig4), we analyzed the expressions of these two hsps on cultured cells (fig5). After 4 days of culture, $\gamma \delta$ T cells alone had 40% of hsp60+ cells (A) and 53% of hsp70+ cells (G) respectively, whereas $\alpha \beta$ T cells alone possessed 26% of hsp60+ cells (D).

and 25% of hsp70+ cells (J) respectively. Among $\gamma \delta$ or $\alpha \beta$ T cells with stimulator (C57BL/6) irradiated splenocytes (one-way reaction), there were 60% (B, $\gamma \delta$) or 38% (E, $\alpha \beta$) of hsp60+ cells, as well as 49% (H, $\gamma \delta$) and 37% (K, $\alpha \beta$) of hsp70+ cells respectively. On the other hand, there were 48% (C) of hsp60+ cells and 43% (I) of hsp70+ cells in cultures with $\gamma \delta$ T cells plus not irradiated stimulator cells, whereas there were 44% (F) of hsp60+ cells and 53% (L) of hsp70+ cells in cultures with $\alpha \beta$ T cells plus not irradiated stimulator cells. We had analyzed cultured cells with $\gamma \delta$ or $\alpha \beta$ T cells plus stimulator with or without irradiation via dual color staining by means of anti-TCR $\alpha \beta$ -PE or anti-TCR $\gamma \delta$ -PE plus anti-hsp60/-hsp70-FITC, the results showed that all non- $\alpha \beta$ T cells or non- $\gamma \delta$ T cells in the cultures were 100% positive for hsp60 or hsp70 (data not showed).

DISCUSSION

Although hsps have basically intracellular expression under a stress, the expression of both hsp60 and hsp70 molecules on cellular surface were observed in present investigation. We found that there was the expression of both hsp60 and hsp70 on the cells in one-way mixed lymphocyte reaction in vitro. In our experimental system, these hsps expressed at small proportion in responder cells (T cells), at large rate in irradiated stimulator lymphocytes, and at the highest percentage in the responder with irradiated stimulator cells. Some T cells cultured with only medium could express hsp60 and hsp70 on surface. As every immunologist knows, T cells tends to die in vitro if they would not be further stimulated by antigens, mitogens, or T cell growth factor, such as IL-2. If no stimulation for T cells in vitro could serve as a stress to T cell, it would not be any difficulty for us to understand the phenomenon of hsp expression in this condition. Furthermore, irradiated lymphocytes expressed high rates of hsp60 (significantly) and hsp70 molecules in same cultural condition. X-ray irradiation seems to be a stimulus for hsp expressions of the lymphocytes. The highest expression of both hsp60 and hsp70 happened in the case of the mixture of T responder cells with allogeneic irradiated lymphocytes in vitro. After the spontaneous expressions of both hsp60 and hsp70 were excluded, the net increasing rates of these expressions were found in this case. It strongly suggests that an allogeneic stimulus could trigger inducible hsp expression on cellular surface. Based on the analysis above, we have a reason to postulate that hsps might be alloantigens or alloantigen-related molecules to participate in the allo-reactivity of lymphocytes as someone have already presumed it several years ago(16). We then designed a further experimental system in vitro. In the design, we

had stressed the three key points as follows: (1) to check possible different alloreactive responses of $\alpha\beta$ T and $\gamma\delta$ T cells to hsp molecules; (2) both one-way and two-way mixed lymphocyte reaction might be all necessary for the evaluation of the role of hsp in all-reactivity, because the hsps could express on both alloreactive lymphocytes; (3) checking possible blocking effects of anti-hsp antibodies on alloreactive response is important to definite hsp-reactive response in this system. As expected, and noted by someone else(27), it is difficult to induce a response of $\gamma\delta$ T cells against irradiated allogeneic lymphocytes, unlike the situation with $\alpha\beta$ T cells. However, an alloreactive proliferation was found in two-way allogeneic reaction in the mixture of $\gamma\delta$ T cells with living allogeneic lymphocytes. Moreover, this proliferation was completely blocked by anti-hsp60 antibody added to the culture, whereas an increasing expression of hsp60 molecule was detected at same time on the cells of both $\gamma\delta$ T cells cultured alone and $\gamma\delta$ T cells with allogeneic spleen cells. Although hsp60 expressed in 60% of the cells cultured with irradiated allogeneic splenocytes, there was no cell growth detected in this culture yet. However, a complete hsp-reactive alloreactive response of $\gamma\delta$ T cells with allogeneic spleen cells existed in anti-*allo-lymphocyte*/ $\gamma\delta$ T cells in our experimental system. In striking contrast, $\alpha\beta$ T cells responded to irradiated allogeneic spleen cells at similar proliferative level to $\gamma\delta$ T cells with living allogeneic cells, while there was the strongest cell growth in the mixture of $\alpha\beta$ T cells with living allogeneic spleen cells. Alloantigens are obviously good stimuli for the response of $\alpha\beta$ T cells. In blocking test, we found that both anti-hsp60 could partially blocked two-way allo-reactivity with 31-43% inhibition rate at day3 to day5 of culture, but did not affect one-way allo-reactive response. Similarly to the case of $\gamma\delta$ T cells, we also found the expression of both hsp60 and hsp70 on the cells in the cultures of $\alpha\beta$ T cells without or with irradiated or not irradiated allogeneic spleen cells, which were all positive for hsps. In spite of high rate of hsp70+ cells in two-way reaction culture, there was not a blocking effect of anti-hsp70 antibody to be detected in the experimental system. It indicates that hsp70 seems not to be related to allo-reactivity or only to participate in antigen presentation in intracellular environment.

Taken together, our results indicate that alloreactive response in two-way reaction of both $\gamma\delta$ T cells to allogeneic spleen cells could be a complete hsp60-dependant, that is, hsp60 serves as an exclusive alloantigen in our experimental system. On the other hand, the allo-reactivity of $\alpha\beta$ T cells only partially due to hsp60, while MHC class I and II alloantigens might be responsible for remaining effect. If this mechanism could be confirmed in humans both in vivo and in vivo, a strategy based on blocking hsp60-dependant allo-reactivity might be beneficial to the control of allgraft rejection in clinic.

Besides, it is need to clarify the further questions: what is exact role of hsp60 in allo-reactive response? Is it target antigen itself, or an antigen present molecule? The resolution of these question will provide further evidence for the participation of hsp in alloreactive response.

REFERENCES

1. LINDQUIST S. (1986) The heat shock response. *Annu Rev Biochem* 55, 1151.
2. WELCH W.J. (1987) The mammalian heat shock or stress response: a cellular defense mechanism. *Adv Exp Med Biol* 225, 287.
3. ELLIS J. (1987) Proteins as molecular chaperonins. *Nature* 328, 378.
4. LINDQUIST S & CRAIG E.A. (1988) The heat-shock proteins. *Annu Rev Genet* 22, 631.
5. YOUNG R. & ELLIOT T. (1990) Stress Proteins, infection, and immune surveillance. *Cell* 59,5.
6. CURRIE R.W., TANGUAY R.M. & KINGMA J.G. (1993) Heat-shock response and limitation of tissue necrosis during occlusion/reperfusion in rabbit hearts. *Circulation* 87, 963.
7. GEORGOPOULOS C. & WELCH W.J. (1993) The role of the major heat shock proteins as molecular chaperones. *Annu Rev Cell Biol* 9, 601.
8. BRCKMANN R.P., MIZZEN L.E. & WELCH W.J. (1990) Interaction of Hsp 70 with newly synthesized proteins: implications for protein folding and assembly. *Science* 248, 850.
9. STERN L.J. & WILEY. (1992) The human class II MHC protein HLA-DR1 assembles as empty ab heterodimers in the absences of antigenic peptide. *Cel* 68, 465.
10. LAKEY E.K., MARGOLIASH E. & PIERCE S.K. (1987) Identification of a peptide binding protein which plays a role in antigen presentation. *Proc Natl Acad Sci USA* 84, 1659.
11. VAN BUSKIRK V.A., DENAGEL D.C., GUAGLIARDI LE, BRODSKY FM & PIERCE SK. (1991) Cellular and subcellular distribution of PBP72/74, a peptide-binding protein that plays a role in antigen processing. *J Immunol* 146,500.
12. VAN BUSKIRK V.A., CRUMP B.L., MARGOLIASH E. & PIERCE S.K. (1989) A peptide binding protein having a role in antigen presentation is a member of the HSP70 heat shock family. *J Exp. Ed* 170, 1799.

13. REES A.D.M., CHIANG H.L., OLSON R.S. & DICE J.F. (1991) Stress-induced modulation of antigen-presenting cell function. *Immunology* 74, 386.
14. KAUFMANN S. (1990) Heat shock proteins and the immune response. *Immunol Today* 11, 129.
15. UDONO H. & SIVASTRAVA P. (1991) Heat shock protein 70-associated peptides elicit specific cancer immunity. *IJ Exp Med* 178, 1391.
16. MOLITERNO R., VALDIVIAL L, PAN F. & DUQUESNOY RJ. (1995) Heat shock protein reactivity of lymphocytes isolated from heterotopic rat cardiac allograft. *Transplantation* 59, 589.
17. SANDBERG JAN-OLOV, MARGULIS B., JANSSON LEIF, KARLSTEN R & KORSGREN O. (1995) Transplantation of fetal porcine pancreas to diabetic or normoglycemic nude mice. *Transplantation* 59,1665.
18. QIAN J., MOLITERNO RA, ANN DONOVAN-PELUSO M., et al. (1995) Expression of stress proteins and lymphocyte reactivity in heterotopic cardiac allografts undergoing cellular rejection. *Transplant Immunology* 3, 114.
19. LIU K., MOLITERNO R.A., FU X-F. & DEQUESNOY R.J. (1997) Identification of two types of autoreactive T lymphocyte clones cultured from cardiac allograft-infiltrating cells incubated with recombinant mycobacterial heat shock protein 71. *Transplant Immunology* 5, 57.
20. BABA H.A., SCHMID C., WILHELM, M.J., BLASIUS, SCHELD H.H., BOECKER W & DOCKHORN-DWORNICZARK. (1997) Inducible heat shock protein 70 in rat cardiac allograft and its immunohistochemical location in cardiac myocytes. *Transplantation* 64,1035.
21. DAVIS E.A., WANG B.H., STAGG C.A., BALDWIN W.M., BAUMGARTNER W.A., SANFILIPPO & UDELSMAN R. (1996) Induction of heat shock protein in cardiac allograft rejection-a cyclosporine-suppressible response. *Transplantation* 61,279.
22. ALEVY Y.G., BRENNAN D., DURRIYA S., HOWARD T. & MOHANAKUMAR T. (1996) Increased expression of the HDJ-2 heat shock protein in biopsies of human rejected kidney. *Transplantation* 61,963.
23. TRIEB K., GRUBECK-LOEBENSTEIN B., EBERL T. & MARGREITER R. (1996) T cells from rejected human kidney allografts respond to heat shock protein 72. *Transplant Immunology* 4, 43.
24. BABA H.A., SCHMID K.W., SCHMID C., BLASIUS S., HEINECKE A., KERBER S., SCHELD H.H., BOECKER W.& DOCKHORN-DWORNICZARK. (1998) POSSIBLE RELATIONSHIP BETWEEN heat shock protein 70, cardiac

hemodynamics, and survival in the early period after heart transplantation. Transplantation 65,799.

25. BRENNER M.B., MCLEAN J., DISLYNAS D.P., et al. (1986) Identification of a putative second T-cell recepto. Nature322,145.

26. BUCY R.P., CHEN C.L. & COOPER M.D. (1989) Tissue localization and CD8 accessory molecule expression of T gd cells in humans. J Immunol 142, 3045.

27. LANNIER L.L. (1995) Unusual lymphocytes-gd T cells and NK cells. The Immunologist 3, 182.

TITLE:

DIFFERENT ALLOREACTIVE RESPONSES OF MURINE TCR $\alpha\beta$ - AND TCR $\gamma\delta$ -EXPRESSING CELLS TO HEAT SHOCK PROTEIN 60 IN ALLOGENEIC LYMPHOCYTE REACTION IN VITRO

WEI HE*¶, XIAO-KANG LI*¹, AND S. SUZUKI* *Department of Experiment Surgery & Bioengineering, National Children's Medical Research Center, Taishido, Setagaya-ku, Tokyo 154 Japan and ¶Department of Immunology, Institute of Basic Medicine, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100005, PR China

SUMMARY

Heat shock protein (hsp)-reactive lymphocytes and inducible expression of hsps have been recently found to be present in allograft undergoing rejection. It is necessary to check the role of hsp in allogeneic lymphocyte reaction, to analysis the difference between the responses of $\alpha\beta$ T cells and $\gamma\delta$ T cells to allo-stimulator in hsp-reactive pathway, and to detect hsp expression on cell surface under a stressful stimulation. In present study, we definitively confirmed increasing expression of both hsp60 and hsp70 molecules on murine cells in a one-way or two-way mixed lymphocyte reaction *in vitro*. T cell or x-ray irradiated lymphocytes could express both hsp60 and hsp70 molecules in the absence of exogenous cell growth factor, antigen or mitogen. Allogeneic stimuli would markedly promote these hsp expressions. $\alpha\beta$ T cells, not $\gamma\delta$ T cells, responded to allogeneic irradiated lymphocytes *in vitro*. The strongest proliferation would be elicited when $\alpha\beta$ T cells co-cultured with allogeneic living lymphocytes not irradiated. This proliferation was partially (31-43%) blocked by anti-hsp60 antibody. On the other hand, a detectable proliferative response occurred in the mixture of $\gamma\delta$ T cells with allogeneic lymphocytes not irradiated, which would completely (100%) inhibited by adding anti-hsp60 antibody to the culture. Our results suggest that hsp60-dependant allo-reactivity in murine system *in vitro* is completely related to $\gamma\delta$ T cells and partially to $\alpha\beta$ T cells. A strategy based on blocking hsp60-dependant allo-reactivity would be beneficial to the control of allgraft rejection in clinic if the mechanism above would be further confirmed in humans both *in vitro* and *in vivo*.

INTRODUCTION

Heat shock proteins (hsps) are produced by both prokaryotic and eukaryotic

¹ Address correspondence to Dr. Xiao-kang Li, Department of Experiment Surgery & Bioengineering, National Children's Medical Research Center, 3-35-31, Taishido, Setagaya-ku, Tokyo 154 Japan

cells under a variety of stresses such as sudden elevation of temperature, oxidative radicals, anoxia, alcohol, heavy metals, ischemia, cytokines, infection and inflammation.¹⁻⁶ This cellular response is presumed to be responsible for protecting stressed cells through reactivating denature protein.⁷ Besides, many investigations have shown that hsps perform a function as "molecular chaperones" by folding, unfolding, and translocation of polypeptides^{7,8}, which is closely related to antigen processing and presentation.⁹⁻¹³ For example, hsp70 can interact with unfolding polypeptides so as potentially to facilitate a conformational change in the peptide-MHC complex, which is required for transit of peptide-MHC complex to cellular surface.⁹ Expression of MHC is promoted by the stimulation via heat stress.¹³ Antigen presentation can be blocked by antibodies against hsp70.¹² These data suggest that hsps belong to antigen-presenting molecules. On the other hand, hsps also seem to be the target antigens recognized by immune system, which can trigger autoimmune response,^{5,14} tumor immunity¹⁵, and graft rejection.¹⁶⁻²⁴

Several investigators have noted that alloreactive lymphocytes are a rather small proportion of T cells within infiltrating lymphocytes in allograft. Therefore, they postulated that graft-infiltrating lymphocytes might possess other specificity to additional antigen.¹⁶ They found that rat allograft lymphocytes responded markedly to recombinant mycobacterial hsp65 and hsp70. Many studies have recently revealed that allograft undergoes a stress, in which hsps including the families of hsp60 and hsp70 are upregulated and hsp-reactive lymphocytes can be induced in rat,^{16,18-20} mouse¹⁷ and human system.²¹⁻²⁴ However, there are several questions required to be clarified. Firstly, in several studies the reactivity of lymphocytes infiltrated in allograft tissues to hsps is evaluated by the response to recombinant or non recombinant mycobacterial hsps.^{16,18,19} This is obviously not so powerful evidence for the interpretation of involvement of hsps in allograft rejection because no hsps derived from same species could be tested for the response to lymphocytes in these investigations. Recently a group had a promising result that T cells from rejected human kidney allograft respond to human hsp72.²³ The conclusion from this report seems to imply that hsp72 is a target antigen which elicits lymphocyte response. Do hsps really therefore serve as alloantigen or antigen presenting molecules in allogeneic lymphocyte reaction? Moreover, although hsp60-reactive $\alpha\beta$ and $\gamma\delta$ T cells have been identified in mice²⁵ and humans²⁶, what is the difference between the responses of TCR $\alpha\beta$ -expressing cells and TCR $\gamma\delta$ -expressing cells to allo-stimulator in hsp-reactive pathway? At last, the hsps expressed generally within both the cytoplasm and nucleus, however, would hsps be expressed on cell surface under a stressful stimulation by allo-reactivity? In the present study, we definitively confirmed the expression of both hsp60 and hsp70 molecules on the cells in murine mixed lymphocyte reaction *in vitro*. A hsp60-dependant alloreactive response in both cases of $\alpha\beta$ T and $\gamma\delta$ T cells was found in murine

system *in vitro*.

MATERIALS AND METHODS

Animals

Ten-week-old male inbred BALB/c (H-2^d) and C57BL/6 (H-2^b) mice, 2 months of age, were purchased from Shizuoka, Laboratory Animal Center (Shizuoka, Japan). All animals had access to water and foods *ad libitum* and were housed in accordance with institutional animal care policies.

Antibodies and reagents

The following mAbs were used: anti-hsp60 mAb derived from the LK1 hybridoma (mouse IgG1 isotype) has a unique specificity for mammalian hsp60 and avian hsp60, but does not cross react with the bacterial counterpart, or with helminths and spinach. The anti-hsp70 mAb derived from the BRM-22 hybridoma localized both the constitutive (hsp73) and inducible (hsp72) forms of hsp70 in immunoblotting. Both anti-hsp mAbs were purchased from Sigma. The following mAbs or reagents were purchased from PHARMINGEN, USA: Biotin-conjugated hamster anti-mouse anti-TCR $\gamma\delta$ and anti-TCR $\alpha\beta$; biotin-conjugated rat anti-mouse CD19; FITC-conjugated hamster anti-mouse TCR β ; R-PE-conjugated hamster anti-mouse TCR $\gamma\delta$, FITC- or R-PE-conjugated hamster IgG isotype standard. FITC-conjugated F(ab')₂ rabbit anti-mouse IgG were from SEROTEC. Streptavidin microbeads were purchased from (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany).

Preparation of TCR $\alpha\beta$ - and TCR $\gamma\delta$ -expressing cells

Splenic tissues, obtained from BALB/c or C57BL/6 mice, were gently pressed by slides and passed through a syringe, in which was filled with sterilized tampon, to obtain single-cell suspension. The mononuclear splenocytes separated from Ficoll-Hypaque centrifugation were then passed through Nylon Fiber Column (Wako Pure Chemical Industries) to obtain T cell-enriched population. Purification of $\alpha\beta$ or $\gamma\delta$ T cells from these BALB/c splenic T cells were done by magnetic activated cell sorter (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany). Cells were resuspended in labeling buffer (PBS, pH7.2, 2mM EDTA), to which biotin-conjugated mAbs anti-CD19 (1 μ g/10⁶ cells) and anti-TCR $\gamma\delta$ or anti-TCR $\alpha\beta$ were added at 1 μ g/10⁶ cells. The cells were incubated for 20 min on ice and washed twice with labeling buffer. The resuspended cells were then incubated with streptavidin microbeads (10 μ l/10⁷ cells) for 15 min on ice and washed. Cells were then added in a column, which was placed in magnetic activated cell sorter. We collected the entire effluate as a " nonmagnetic" fraction, in which $\alpha\beta$ or $\gamma\delta$ T cells accounted for >90%, as analyzed by fluorescence staining.

Proliferation assay: one-way reaction and two-way reaction of $\alpha\beta$ or $\gamma\delta$ T cells to allogeneic splenocytes

Two-way allo-reactivity: proliferative responses of $\alpha\beta$ or $\gamma\delta$ T cells from spleens of BALB/c mice to splenocytes from C57BL/6 mice were determined in a $^3\text{H-TdR}$ incorporation assay. Responder cells (1×10^4 $\alpha\beta$ or $\gamma\delta$ T cells from BALB/c mice) were cultured with 2×10^4 irradiated (20 Gy x-ray) or not irradiated (living) stimulators (splenocytes from C57BL/6 mice) in triplicate in the wells of 96-well V-bottom microtiter plates (Nunc, Wiesbaden, Germany) in a volume of 0.2 ml. The medium was RPMI-1640 supplemented with 10% heat-inactivated FCS, 10 mM HEPES, 2 mM L-glutamine, 100 U/ml penicillin, and 100 $\mu\text{g/ml}$ streptomycin. The cells were incubated at 37°C in a humidified atmosphere of 5% CO_2 in air for 6 days. Anti-hsp 60 (1:400) or -hsp70 (1:5000) mAb was added to cultures respectively. Controls included responder or stimulator alone, and cultures without anti-hsp60 or -hsp70 mAb. At the indicated time, individual microcultures were pulsed with 1 μCi $^3\text{H-TdR}$ per well and incubated for another 6 hours. Thereafter, cultures were harvested onto glass fibers and counted for beta emission using a trace-96 direct beta counter (Berthold).

The one-way mixed lymphocyte reaction in a $^3\text{H-TdR}$ incorporation assay was also performed. 5×10^4 T cells (responder), which were separated by nylon wool isolation from splenocytes from BALB/c, co-cultured with irradiated (20Gy) 5×10^4 spleen cells (stimulator) from C57BL/6 mice in 96-well round-bottom microplates (Nunc) for 3 days, while expressions of hsp60 and hsp70 on responder, stimulator and responder +stimulator cells were analyzed at day 2 and day3.

Flow cytometry

For phenotypic analysis, the magnetic isolated cells were stained with FITC-anti-TCR β and R-PE- anti- TCR $\gamma\delta$. For hsp expression of analysis, cells were stained with anti-hsp60 or anti-hsp70 respectively for 15 min on ice. After two washing steps, cells were then incubated with FITC-conjugated F(ab') $_2$ rabbit anti-mouse IgG for 15 min on ice and washed twice. The cells were resuspended in PBS with 1% paraformaldehyde. All analyses were measured on a FACScan flow cytometer (Becton Dickinson).

Statistical analysis

Analysis of variance was used to test the differences among all tested groups in proliferation assay.

RESULTS

Expression of hsp60 and hsp70 on cultured cells in one-way mixed lymphocyte reaction *in vitro*

As illustrated in fig.1, a conventional proliferation of murine splenic T cell (BALB/c) anti allogeneic irradiated splenocyte (C57BL/6) was obviously observed during 3 days of culture *in vitro*. However, the event in this process we are interested in is whether the response of T cells to allogeneic stimulation could correspond with hsp expression on cells. As shown in fig.2, both freshly isolated responder (BALB/c) splenic T cells and stimulator (C57BL/6) splenocytes could express surface hsp60 molecule in minor population (< 6%, A and B). Responder cells maintained this level of hsp60 expression at day2 (C) and increased at day3 (F) with 25%. The hsp60 expression in irradiated (20Gy) stimulator cells increased with prolonging time of culture (at day2, 43% and at day3, 62%). In the cultures of responder mixed with irradiated stimulator cells, there was increasing positive cell percentage in the whole population accounted for 49% at day2 and 67% at day3 respectively. At same time point, the sequence for the levels of hsp60⁺ cell percentages is as follows: responder with stimulator (R with S) > stimulator (S) > responder (R). We used a formula to calculate a net increasing percentage in cells from the culture of responder with stimulator. That is, %net increasing = %R with S - [%R (responder) + %S (stimulator)/2]. According the calculation with this formula, we found the net increasing percentages in cultures of responder with stimulator cells were 24.5% at day2 and 23.5% at day3. It indicates that an increasing hsp60 expression exists in cultures of responder with stimulator cells, when compared with responder or stimulator cells at same time. Similar manifestation also happened in the case of hsp70 expression in same test system (fig.2 I to P). Before culture, both responder T cells and stimulator splenocytes expressed hsp70 molecule on their surface in minor population (8%, I and J). After culture, responder cells almost kept this level at day2 (K, 6%) and increased at day3 (N) with 43%. The hsp70 expression in irradiated stimulator cells increased with prolonging time of culture (at day2, 50% and at day3, 24%). The hsp70⁺ cell percentages in the cultures of responder with irradiated stimulator cells significantly increased (38% at day2 and 58% at day3). Their net percentages were 10% at day2 and 29% at day3.

The alloreactive proliferative responses of $\gamma\delta$ T or $\alpha\beta$ T cell to allogeneic stimulator cells in one-way or two-way reaction were completely or partially blocked by anti-hsp60 antibody *in vitro*

To directly address the role of hsp60 and hsp70 in allo-reactivity of $\alpha\beta$ T or $\gamma\delta$ T cells (BALB/c), we performed the experiment as illustrated in fig. 4. As noted elsewhere, $\gamma\delta$ T cells were not as good responder as $\alpha\beta$ T cells to alloantigens.

In one-way reaction, there was no growth detected in cultures of $\gamma\delta$ T cells plus irradiated allogeneic spleen cells (C57BL/6), which was similar with the cases of all controls, such as $\gamma\delta$ T cells, $\alpha\beta$ T cells, irradiated or not irradiated (living) stimulator cells alone. A detectable proliferation was found in the cultures of $\gamma\delta$ T cells with living allogeneic cells (two-way reaction) during 3 to 4 days of incubation *in vitro* ($P < 0.05$, when compared with all controls or $\gamma\delta$ T cells plus irradiated allogeneic stimulator cells), while this response was completely blocked by adding mAb anti-hsp60 to culture ($P < 0.05$, $\gamma\delta$ T cells + living stimulator versus (vs) $\gamma\delta$ T cells + living stimulator + anti-hsp60), and was not affected at all by anti-hsp70 ($P > 0.05$, $\gamma\delta$ T cells + living stimulator vs $\gamma\delta$ T cells + living stimulator + anti-hsp70). Differentially to $\gamma\delta$ T cells, $\alpha\beta$ T cells demonstrated irradiated allo-lymphocyte-induced proliferation at the top level on day 4. We interestingly noted that this allo-reactive response was not influenced by adding both mAbs anti-hsp60 and anti-hsp70 to cultures ($P > 0.05$, when compared these groups). However, when the irradiated stimulator was changed into living allogeneic cells, anti-hsp60 antibody could blocked the proliferative allo-reactivity of between $\alpha\beta$ T cells and allogeneic living spleen cells ($P < 0.05$, blocked vs not blocked), which was the strongest proliferation in this tested system ($P < 0.05$, when compared with other groups except $\alpha\beta$ T cells plus living stimulator with anti-hsp70). Anti-hsp70 antibody did not show any blocking effect on two-way allo-reaction between $\alpha\beta$ T cells and allogeneic living spleen cells. As clearly shown in fig.4, the following proliferative responses during the period from day 3 to day 5 were at same level ($P > 0.05$, when compared with each other): $\alpha\beta$ T cells plus irradiated stimulator with or without mAbs anti-hsp60 or anti-hsp70, $\alpha\beta$ T cells plus living stimulator with mAb anti-hsp60, and $\gamma\delta$ T cells plus living stimulator with or without mAb anti-hsp70. All statistical analyses above were basely on data from the determination at time from day 3 to day 4.

Expression of hsp60 and hsp70 on cultured $\alpha\beta$ and $\gamma\delta$ T cells and stimulator cells in one-way or two-way mixed lymphocyte reaction *in vitro*

The both freshly isolated $\alpha\beta$ and $\gamma\delta$ T cells (BALB/c) express hsp60 and hsp70 at similar level to T cells isolated with nylon wool as shown in fig 2 (data not shown). At the top of alloreactive proliferation in one-way or two-way mixed lymphocyte reaction at day 4 (fig 4), we analyzed the expressions of these two hsps on cultured cells (fig.5). After 4 days of culture, $\gamma\delta$ T cells alone had 40% of hsp60⁺ cells (A) and 53% of hsp70⁺ cells (G) respectively, whereas $\alpha\beta$ T cells alone possessed 26% of hsp60⁺ cells (D) and 25% of hsp70⁺ cells (J) respectively. Among $\gamma\delta$ or $\alpha\beta$ T cells with stimulator (C57BL/6) irradiated splenocytes (one-way reaction), there were 60% (B, $\gamma\delta$) or 38% (E, $\alpha\beta$) of hsp60⁺ cells, as well as 49% (H, $\gamma\delta$) and 37% (K, $\alpha\beta$) of hsp70⁺ cells respectively. On the other hand, there were 48% (C) of hsp60⁺ cells and 43%

(I) of hsp70⁺ cells in cultures with $\gamma\delta$ T cells plus not irradiated stimulator cells, whereas there were 44% (F) of hsp60⁺ cells and 53% (L) of hsp70⁺ cells in cultures with $\alpha\beta$ T cells plus not irradiated stimulator cells. We had analyzed cultured cells with $\gamma\delta$ or $\alpha\beta$ T cells plus stimulator with or without irradiation via dual color staining by means of anti-TCR $\alpha\beta$ -PE or anti-TCR $\gamma\delta$ -PE plus anti-hsp60/-hsp70-FITC, the results showed that all non- $\alpha\beta$ T cells or non- $\gamma\delta$ T cells in the cultures were 100% positive for hsp60 or hsp70 (data not showed).

DISCUSSION

Although hsps have basically intracellular expression under a stress, the expression of both hsp60 and hsp70 molecules on cellular surface were observed in present investigation. We found that there was the expression of both hsp60 and hsp70 on the cells in one-way mixed lymphocyte reaction *in vitro*. In our experimental system, these hsps expressed at small proportion in responder cells (T cells), at large rate in irradiated stimulator lymphocytes, and at the highest percentage in the responder with irradiated stimulator cells. Some T cells cultured with only medium could express hsp60 and hsp70 on surface. As every immunologist knows, T cells tends to die *in vitro* if they would not be further stimulated by antigens, mitogens, or T cell growth factor, such as IL-2. If no stimulation for T cells *in vitro* could serve as a stress to T cell, it would not be any difficulty for us to understand the phenomenon of hsp expression in this condition. Furthermore, irradiated lymphocytes expressed high rates of hsp60 (significantly) and hsp70 molecules in same cultural condition. X-ray irradiation seems to be a stimulus for hsp expressions of the lymphocytes. The highest expression of both hsp60 and hsp70 happened in the case of the mixture of T responder cells with allogeneic irradiated lymphocytes *in vitro*. After the spontaneous expressions of both hsp60 and hsp70 were excluded, the net increasing rates of these expressions were found in this case. It strongly suggests that an allogeneic stimulus could trigger inducible hsp expression on cellular surface.

Based on the analysis above, we have a reason to postulate that hsps might be alloantigens or alloantigen-related molecules to participate in the allo-reactivity of lymphocytes as someone have already presumed it several years ago.¹⁶ We then designed a further experimental system *in vitro*. In the design, we had stressed the three key points as follows: (1) to check possible different alloreactive responses of $\alpha\beta$ T and $\gamma\delta$ T cells to hsp molecules; (2) both one-way and two-way mixed lymphocyte reaction might be all necessary for the evaluation of the role of hsp in all-reactivity, because the hsps could express on both alloreactive lymphocytes; (3) checking possible blocking effects of anti-hsp antibodies on alloreactive response is important to definite hsp-

reactive response in this system. As expected, and noted by someone else²⁷, it is difficult to induce a response of $\gamma\delta$ T cells against irradiated allogeneic lymphocytes, unlike the situation with $\alpha\beta$ T cells. However, an alloreactive proliferation was found in two-way allogeneic reaction in the mixture of $\gamma\delta$ T cells with living allogeneic lymphocytes. Moreover, this proliferation was completely blocked by anti-hsp60 antibody added to the culture, whereas an increasing expression of hsp60 molecule was detected at same time on the cells of both $\gamma\delta$ T cells cultured alone and $\gamma\delta$ T cells with allogeneic spleen cells. Although hsp60 expressed in 60% of the cells cultured with irradiated allogeneic splenocytes, there was no cell growth detected in this culture yet. However, a complete hsp-reactive alloreactive response of $\gamma\delta$ T cells with allogeneic spleen cells existed in anti-allo-lymphocyte/ $\gamma\delta$ T cells in our experimental system. In striking contrast, $\alpha\beta$ T cells responded to irradiated allogeneic spleen cells at similar proliferative level to $\gamma\delta$ T cells with living allogeneic cells, while there was the strongest cell growth in the mixture of $\alpha\beta$ T cells with living allogeneic spleen cells. Alloantigens are obviously good stimuli for the response of $\alpha\beta$ T cells. In blocking test, we found that both anti-hsp60 could partially blocked two-way allo-reactivity with 31-43% inhibition rate at day3 to day5 of culture, but did not affect one-way allo-reactive response. Similarly to the case of $\gamma\delta$ T cells, we also found the expression of both hsp60 and hsp70 on the cells in the cultures of $\alpha\beta$ T cells without or with irradiated or not irradiated allogeneic spleen cells, which were all positive for hsps. In spite of high rate of hsp70⁺ cells in two-way reaction culture, there was not a blocking effect of anti-hsp70 antibody to be detected in the experimental system. It indicates that hsp70 seems not to be related to allo-reactivity or only to participate in antigen presentation in intracellular environment.

Taken together, our results indicate that alloreactive response in two-way reaction of both $\gamma\delta$ T cells to allogeneic spleen cells could be a complete hsp60-dependant, that is, hsp60 serves as an exclusive alloantigen in our experimental system. On the other hand, the allo-reactivity of $\alpha\beta$ T cells only partially due to hsp60, while MHC class I and II alloantigens might be responsible for remaining effect. If this mechanism could be confirmed in humans both *in vivo* and *in vivo*, a strategy based on blocking hsp60-dependant allo-reactivity might be beneficial to the control of allograft rejection in clinic. Besides, it is need to clarify the further questions: what is exact role of hsp60 in allo-reactive response? Is it target antigen itself, or an antigen present molecule? The resolution of these question will provide further evidence for the participation of hsp in alloreactive response.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by a grant from Japan-China Medicine Friendship

Foundation in 1998.

REFERENCES

1. LINDQUIST S. (1986) The heat shock response. *Annu Rev Biochem* 55, 1151.
2. WELCH W.J. (1987) The mammalian heat shock or stress response: a cellular defense mechanism. *Adv Exp Med Biol* 225, 287.
3. ELLIS J. (1987) Proteins as molecular chaperonins. *Nature* 328, 378.
4. LINDQUIST S & CRAIG E.A. (1988) The heat-shock proteins. *Annu Rev Genet* 22, 631.
5. YOUNG R. & ELLIOT T. (1990) Stress Proteins, infection, and immune surveillance. *Cell* 59,5.
6. CURRIE R.W., TANGUAY R.M. & KINGMA J.G. (1993) Heat-shock response and limitation of tissue necrosis during occlusion/reperfusion in rabbit hearts. *Circulation* 87, 963.
7. GEORGOPOULOS C. & WELCH W.J. (1993) The role of the major heat shock proteins as molecular chaperones. *Annu Rev Cell Biol* 9, 601.
8. BRCKMANN R.P., MIZZEN L.E. & WELCH W.J. (1990) Interaction of Hsp 70 with newly synthesized proteins: implications for protein folding and assembly. *Science* 248, 850.
9. STERN L.J. & WILEY. (1992) The human class II MHC protein HLA-DR1 assembles as empty ab heterodimers in the absences of antigenic peptide. *Cel* 68, 465.
10. LAKEY E.K., MARGOLIASH E. & PIERCE S.K. (1987) Identification of a peptide binding protein which plays a role in antigen presentation. *Cproc Natl Acad Sci USA* 84, 1659.
11. VAN BUSKIRK V.A., DENAGEL D.C., GUAGLIARDI LE, BRODSKY FM & PIERCE SK. (1991) Cellular and subcellular distribution of PBP72/74, a peptide-binding protein that plays a role in antigen processing. *J Immunol* 146,500.
12. VAN BUSKIRK V.A., CRUMP B.L., MARGOLIASH E. & PIERCE S.K. (1989) A peptide binding protein having a role in antigen presentation is a member of the HSP70 heat shock family. *J Exp. Ed* 170, 1799.
13. REES A.D.M., CHIANG H.L., OLSON R.S. & DICE J.F. (1991) Stress-induced modulation of antigen-presenting cell function. *Immunology* 74, 386.
14. KAUFMANN S. (1990) Heat shock proteins and the immune response. *Immunol Today* 11, 129.
15. UDONO H. & SIVASTRAVA P. (1991) Heat shock protein 70-associated peptides elicit specific cancer immunity. *IJ Exp Med* 178, 1391.

16. MOLITERNO R., VALDIVIAL L, PAN F. & DUQUESNOY RJ. (1995) Heat shock protein reactivity of lymphocytes isolated from heterotopic rat cardiac allograft. *Transplantation* 59, 589.
17. SANDBERG JAN-OLOV, MARGULIS B., JANSSON LEIF, KARLSTEN R & KORSGREN O. (1995) Transplantation of fetal porcine pancreas to diabetic or normoglycemic nude mice. *Transplantation* 59,1665.
18. QIAN J., MOLITERNO RA, ANN DONOVAN-PELUSO M., *et al.* (1995) Expression of stress proteins and lymphocyte reactivity in heterotopic cardiac allografts undergoing cellular rejection. *Transplant Immunology* 3, 114.
19. LIU K., MOLITERNO R.A., FU X-F. & DEQUESNOY R.J. (1997) Identification of two types of autoreactive T lymphocyte clones cultured from cardiac allograft-infiltrating cells incubated with recombinant mycobacterial heat shock protein 71, *Transplant Immunology* 5, 57.
20. BABA H.A., SCHMID C., WILHELM, M.J., BLASIUS, SCHELD H.H., BOECKER W & DOCKHORN-DWORNICZARK. (1997) Inducible heat shock protein 70 in rat cardiac allograft and its immunohistochemical location in cardiac myocytes. *Transplantation* 64,1035.
21. DAVIS E.A., WANG B.H., STAGG C.A., BALDWIN W.M., BAUMGARTNER W.A., SANFILIPPO & UDELSMAN R. (1996) Induction of heat shock protein in cardiac allograft rejection-a cyclosporine-suppressible response. *Transplantation* 61,279.
22. ALEVY Y.G., BRENNAN D., DURRIYA S., HOWARD T. & MOHANAKUMAR T. (1996) Increased expression of the HDJ-2 heat shock protein in biopsies of human rejected kidney. *Transplantation* 61,963.
23. TRIEB K., GRUBECK-LOEBENSTEIN B., EBERL T. & MARGREITER R. (1996) T cells from rejected human kidney allografts respond to heat shock protein 72. *Transplant Immunology* 4, 43.
24. BABA H.A., SCHMID K.W., SCHMID C., BLASIUS S., HEINECKE A., KERBER S., SCHELD H.H., BOECKER W.& DOCKHORN-DWORNICZARK. (1998) POSSIBLE RELATIONSHIP BETWEEN heat shock protein 70, cardiac hemodynamics, and survival in the early period after heart transplantation. *Transplantation* 65,799.
25. BRENNER M.B., MCLEAN J., DISLYNAS D.P., *et al.* (1986) Identification of a putative second T-cell receptor. *Nature*322,145.
26. BUCY R.P., CHEN C.L. & COOPER M.D. (1989) Tissue localization and CD8 accessory molecule expression of T $\gamma\delta$ cells in humans. *J Immunol* 142, 3045.
27. LANNIER L.L. (1995) Unusual lymphocytes- $\gamma\delta$ T cells and NK cells. *The Immunologist* 3, 182.

Legends:

Figure 1. The proliferative response of BABL/c splenic T cells (R) freshly isolated by nylon wool column to allogeneic (C57BL/6) irradiated (20Gy) splenocytes (S) *in vitro*. The data represent the mean value of triplicate wells \pm SD from 7 cases of mice

Figure 2. The expressions of hsp60 and hsp70 on cells in one-way mixed lymphocyte reaction *in vitro*. The culture protocol was as same as one in fig.1. Cells were stained with mAbs anti-hsp60 (A to H) and anti-hsp70 (I to P) followed stained with FITC-conjugated F(ab')₂ rabbit anti-mouse IgG. The curves with solid areas are FITC-conjugated F(ab')₂ rabbit anti-mouse IgG staining alone as isotype control, while ones with empty areas are anti-hsp60- or -hsp70-FITC. Samples: A and I: BABL/c splenic T cells freshly isolated by nylon wool column before culture; B and J: splenocytes from fresh C57BL/6 mouse before culture; after 48 hours (C to E and K to M) or 72 hours (F to H and N to P) of culture *in vitro*, the following cells were stained: responder cells (BABL/c splenic T cells, C, F, K and N), stimulator cells (irradiated C57BL/6 splenocytes, D, G, L and O) and responder + stimulator cells (E, H, M and P).

Figure 3. Immunofluorescence analysis of murine $\alpha\beta$ T and $\gamma\delta$ T cells isolated by magnetic activated cell sorter. The sorted cells were stained with anti-TCR $\alpha\beta$ -FITC and anti-TCR $\gamma\delta$ -PE. FL1-H: TCR $\alpha\beta$ -FITC. FL2-H: TCR $\gamma\delta$ -PE.

Figure 4. The alloreactive proliferative responses of $\alpha\beta$ T or $\gamma\delta$ T cells to allogeneic stimulator cells in one-way or two-way reaction. $\alpha\beta$ T or $\gamma\delta$ T cell (BABL/c) were co-cultured with stimulator allogeneic spleen cells (C57BL/6) with (two-way) or without (one-way) x-ray irradiation (20Gy) for 6 days. The mixed lymphocyte cultured cells were added or not by mAb anti-hsp60 (1:400, ahsp60 in legend) or anti-hsp70 (1:5000, ahsp70 in legend) respectively. Living stimulator in legend means the C57BL/6 splenocytes without irradiation. Data were expressed as mean cpm of triplicate culture from three separate experiments. SD were <10% of mean values.

Figure 5. The expressions of hsp60 and hsp70 on cells in one-way or two-way mixed lymphocyte reaction *in vitro*. The culture protocol was as same as one in fig.4 and staining was performed at day4 of culture. Cells were stained with mAbs anti-hsp60 (A to F) and anti-hsp70 (G to L) followed stained with FITC-conjugated F(ab')₂ rabbit anti-mouse IgG. The curves with solid areas are FITC-conjugated F(ab')₂ rabbit anti-mouse IgG staining alone as isotype control, while ones with empty areas are anti-hsp60- or -hsp70-FITC. Samples:

A and G: $\gamma\delta$ T cells (BABL/c) alone; B and H: $\gamma\delta$ T cells (BABL/c) with C57BL/6 splenic irradiated (20Gy) cells; C and I: $\gamma\delta$ T cells (BABL/c) with C57BL/6 splenic cells; D and J: $\alpha\beta$ T cells (BABL/c) alone; E and K: $\alpha\beta$ T cells (BABL/c) with C57BL/6 splenic irradiated (20Gy) cells; F and L: $\alpha\beta$ T cells (BABL/c) with C57BL/6 splenic cells.

Abbreviation:

hsp(s), heat shock protein(s); TCR, T cell receptor; mAb, monoclonal antibody; FITC, fluorescein isothiocyanate; R-PE, R-phycoerythrin; Sav-PE, Streptavidin-phycoerythrin.

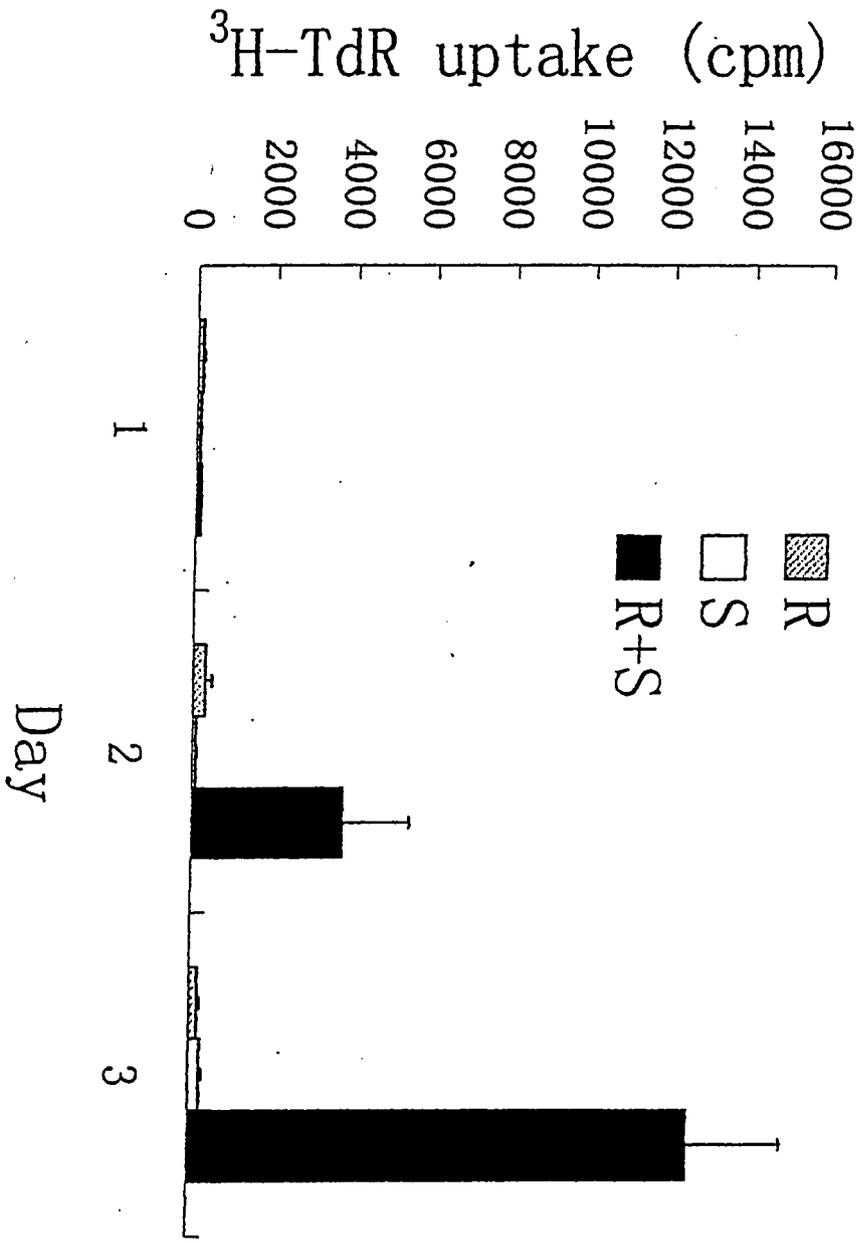


Figure 1

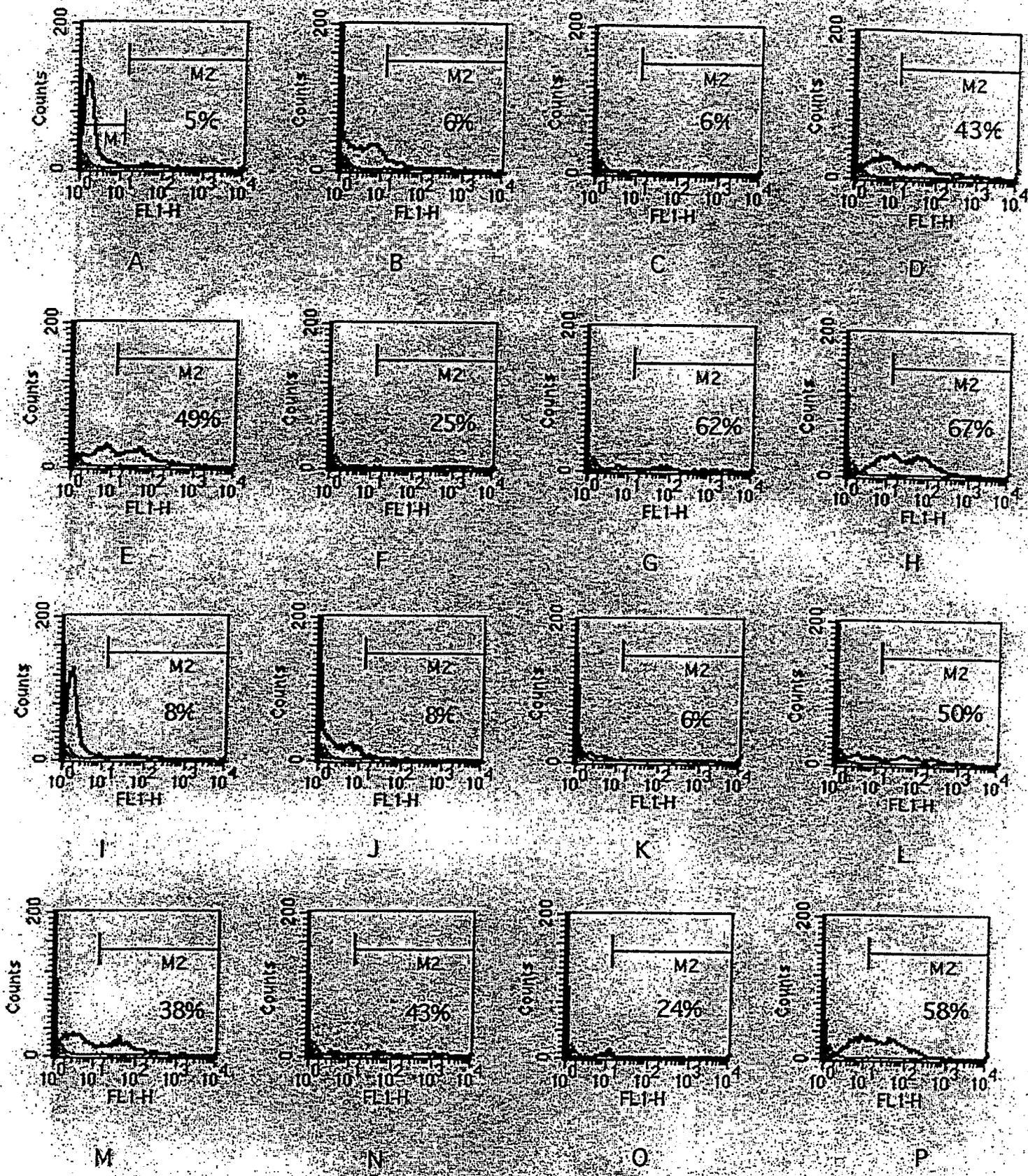
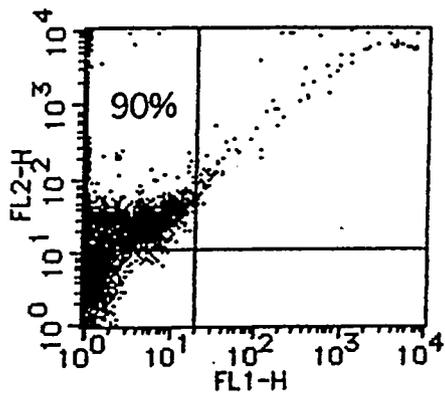
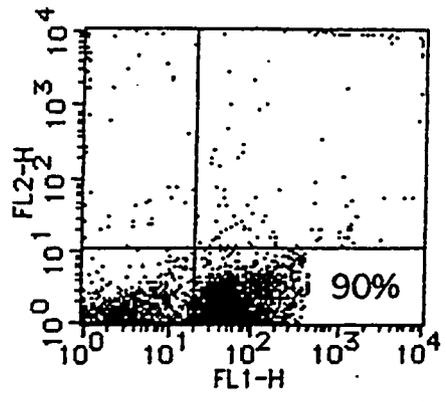


Fig 2

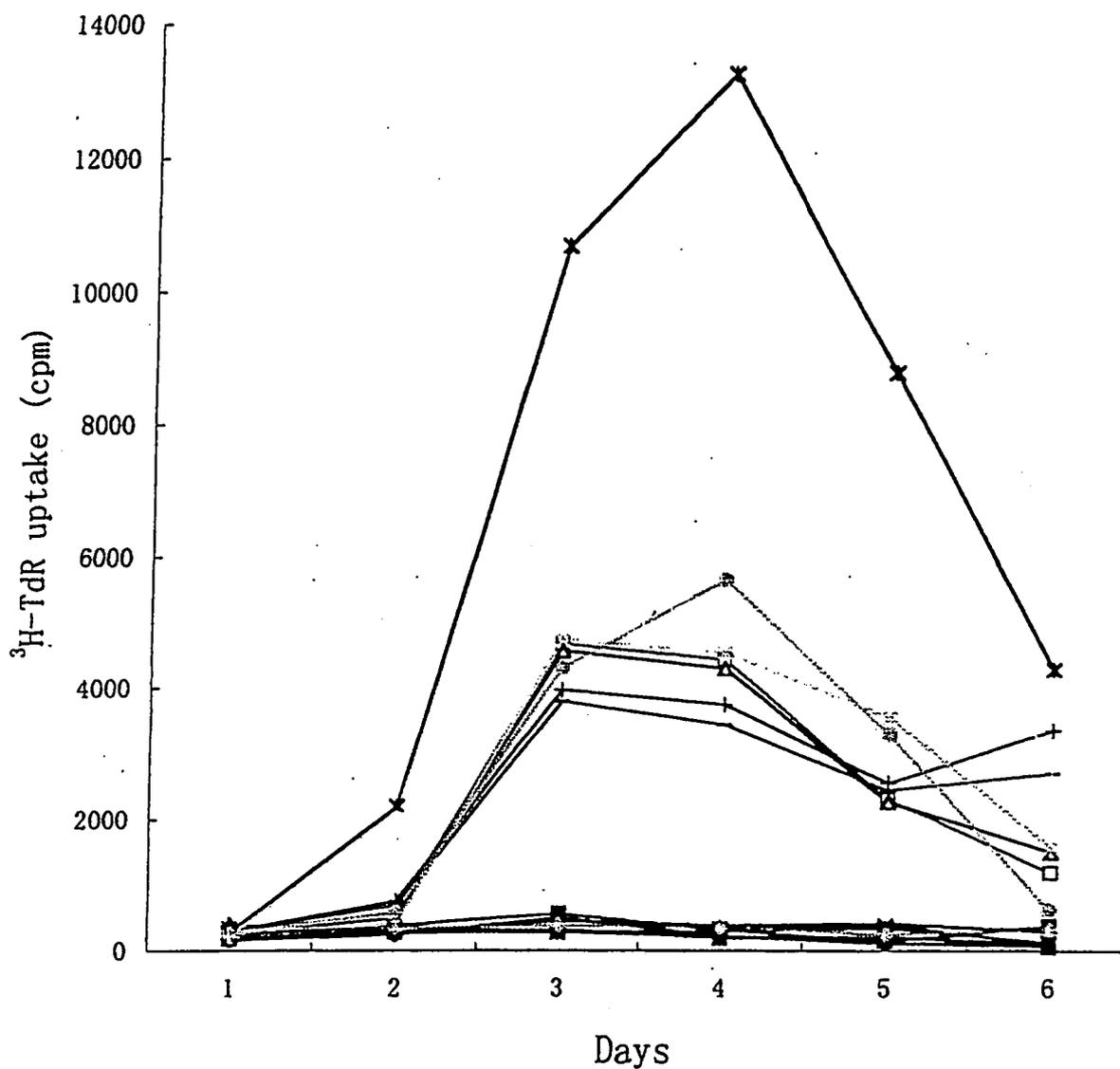


A



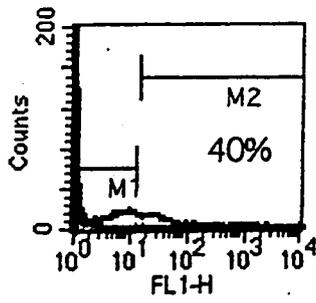
B

Figure 3

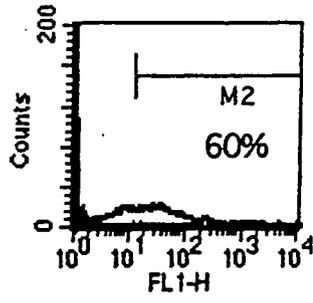


- ◆ Irradiated Stimulator (IS)
- ▲ gamma/delta T cells (gdT)
- ✱ gdT+IS+anti-hsp60
- + gdT+LS
- gdT+LS+anti-hsp70
- abT+IS
- ✱ abT+IS+anti-hsp70
- abT+LS+anti-hsp60
- Living Stimulator (LS)
- ✱ gdT+IS
- gdT+IS+anti-hsp70
- gdT+LS+anti-hsp60
- alfa T cells (abT)
- ▲ abT+IS+anti-hsp60
- ✱ abT+LS
- abT+LS+anti-hsp70

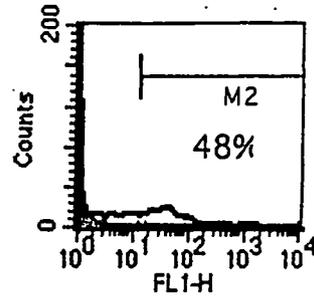
Fig 4



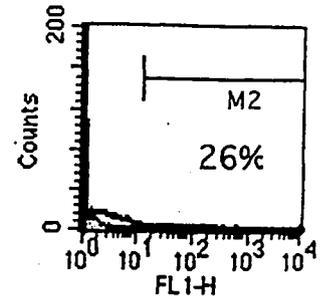
A



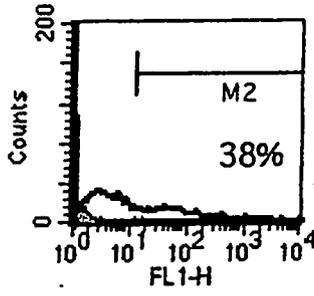
B



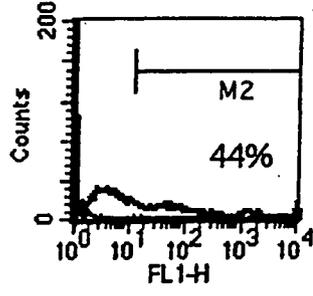
C



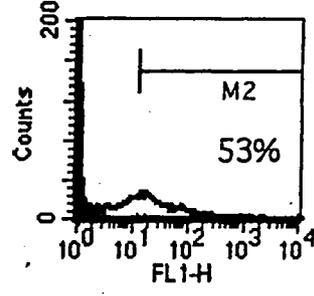
D



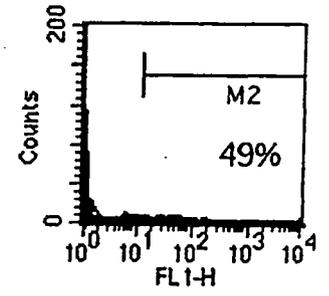
E



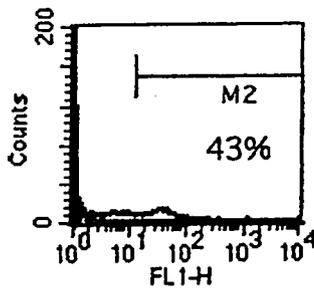
F



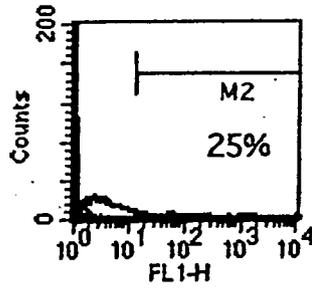
G



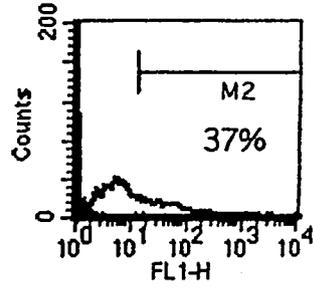
H



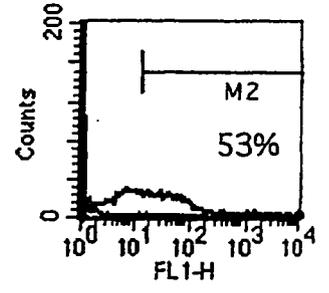
I



J



K



L

Fig 5

日本財団補助金による

1998年度日中医学協力事業報告書

— 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

1999年 3月 23日

研究室で撮影した本人のスナップ写真、及び発表論文等のコピーを添付

1. 招 へ い 責 任 者 仙道富士郎 
- 所属機関 山形大学医学部 職名 教授
- 所在地 〒990-9585 山形市飯田西 2-2-2 電話 023-628-5265
- 招へい研究者氏名 錢 元恕
- 所属機関 重慶医科大学附属第一病院伝染病寄生虫病研究所 職名 教授
- 研 究 テ ー マ 多包虫に対する単クローン抗体の樹立

2. 日 本 滞 在 日 程

1998年7月1日～9月30日

7月1日：山形大学医学部免疫学・寄生虫学教室に於いて研修開始

～7月3日：オリエンテーション

7月4日：マウスへの3回目の免疫

7月7日：細胞融合操作実施

8月20日：ハイブリドーマ樹立/細胞凍結・保存

8月23日～：産生抗体の特異性等について検討開始

9月30日：研修終了

3. 研 究 報 告

別紙書式を参考に、報告本文4000字以上で報告して下さい（枚数自由・ワープロ使用）

タイトル・要旨等は日本語で、KEY WORDS以下は日本語或いは英語で記入して下さい。

研究成果の発表予定がある場合は発表原稿・抄録集等を添付して下さい。

論文発表に当っては、日本財団補助金による旨を明記して下さい。

研究テーマ：多包虫に対する単クローン抗体の樹立

来日研究者氏名：錢 元恕

中国での所属・役職：重慶医科大学附属第一病院伝染病寄生虫病研究所・教授

招聘者氏名・所属・役職：仙道富士郎・山形大学医学部・教授

【要旨】

多包虫*Echinococcus multilocularis*の原頭節protoscolex抗原を用いて、他種寄生虫抗原と交叉反応のない単クローン抗体を作製し、確度の高い免疫学的診断法を確立することを目的として本研究を行なった。多包虫protoscolex粗抗原を作製し、BALB/cマウスに免疫後、脾細胞とミエローマ細胞を融合し、単クローン抗体産生ハイブリドーマを樹立した。多包虫に対する単クローン抗体7株を作製し、認識抗原の特異性について検討した。その結果、4株は、多包虫抗原とのみ高い反応性を呈し、単包虫抗原、その他の7種蠕虫抗原およびBALB/cマウス腎抽出抗原とは反応が認められなかった。免疫組織学的検討から、単クローン抗体は1) laminated layerとtegument of the germinal layerとのみ反応する単クローン抗体、2) laminated layer, tegument of the germinal layerおよびyoung protoscolexと反応する単クローン抗体、3) germinal layer, brood capsuleおよびprotoscolexと反応する単クローン抗体の3群に分類された。各群の単クローン抗体ともに虫体の他に虫体周囲の結合織とも反応したが、その他の虫体周囲正常組織とは反応が認められなかった。したがって、この虫体周囲結合織の反応は、虫体外に分泌された虫体抗原が結合織に沈着し、この沈着抗原と単クローン抗体が反応したものと推察された。今回得られた単クローン抗体を用いて認識抗原を精製することにより、他種寄生虫抗原と交叉反応のない診断用法を樹立する可能性が期待される。

<KEY WORDS> 多包虫、免疫学的診断法、単クローン抗体、protoscolex

研究報告

【目的】

中国を含む開発途上国においては、寄生虫症は未だ重要な疾患であり、診断が遅れ重篤な病状に陥るケースが少なくない。このような地域における早期治療には、簡便迅速で、確度の高い早期診断が重要なポイントになる。中国における重要な寄生虫症としては、住血吸虫症、マラリア、リーシュマニア症、糸状虫症、有鉤囊虫症等、数多くあげられるが、これらはいずれも診断技術に習熟すれば、必ずしも確定診断が難しい寄生虫症ではない。しかしながら、中国にも分布する包虫症は、診断法が確立し

ていないため、治療が遅れ、死にいたることが多い寄生虫症である。すなわち、最初に肝臓に寄生することが多く、ここで徐々に発育する。症状がでるまでの潜伏期間が長く数年～数十年を要するが、この間に血流を介して他臓器に転移している場合もあり、発症した時点ですでに手遅れであることが多いため治療が非常に困難な寄生虫症である。このため、感染早期に確定診断を行ない、外科的に摘出する以外に有効な対応策がないが、現時点ではそのような診断法がないのが実情である。そこで今回は、多包虫抗原に対するモノクローナル抗体を作製し、血中に存在する可溶性多包虫抗原を検出し得る新しい免疫学的診断法を確立することを最終目的において、以下の研究を行なった。なお、中国には、今回研究対象とした多包虫のほかに単包虫が分布しているが、抗原入手等、技術的問題から前者について検討した。

【方法】

- 1) 弘前大学医学部寄生虫学教室神谷春男教授から分与いただいたスナネズミ肝臓寄生多包虫のprotoscolexを凍結、融解処理後、50 mM n-heptyl- β -D-thioglycoside存在下で超音波破碎した。10,000 x gで1時間遠心処理後、上清を採取し、多包虫protoscolex粗抗原として以下の実験に用いた。
- 2) 上記protoscolex粗抗原100 μ g量をFreund's complete adjuvantと混合し、BALB/cマウスに腹腔内及び皮下に注入、免疫した。さらに同粗抗原をFreund's incomplete adjuvantと混合したものを、最初の免疫から2週間目と更にその10日後に免疫した(日程の関係上、錢教授は、最後の免疫処置から実験に直接携わった)。この免疫の期間にマウス尾静脈から採血、血清を採取し、血中のprotoscolex抗原に対する抗体価の上昇をELISA法で確認することにより、protoscolex粗抗原を用いた免疫効果について判定した。すなわち、a) 多包虫protoscolex粗抗原を3%スキムミルク含有PBSで希釈し、ELISA用96穴プレートに100 μ lずつ加えた。b) 37°Cで2時間インキュベーション後、さらに4°Cで一晩静置した。c) 0.05% Tween 20 (Tween 20-PBS)で5分、3回洗浄した。d) 5%スキムミルク含有PBS (スキムミルク-PBS)で各wellを満たし、37°Cで1時間インキュベーション(ブロッキング操作)した。e) Tween 20-PBS)で5分、3回洗浄後、3%スキムミルクで希釈したマウス血清を100 μ l加え、37°Cで1時間反応させた。f) Tween 20-PBSで5分、3回洗浄後、3%スキムミルクで希釈したperoxidase-conjugated rabbit anti-mouse immunoglobulins polyclonal antibody (二次抗体)を加え、37°Cで1時間反応させた。g) Tween 20-PBSで5分、5回洗浄した。h) OPD水溶液(メタノールで可溶化させたOPD: O-phenylene diaminと過酸化水素水を蒸留水で希釈したもの)を加え、暗所・室温にて30分間、静置した。i) 吸光度計にてO.D.値を測定し、抗体価の上昇の有無について検討することにより、protoscolex粗抗原を用いた免疫効果について判定した。なお、樹立したハイブリドーマ産生単クローン抗体の下記7種蠕虫粗抗原との交叉反応性の有無

の判定も本法により行なった。一次抗体としては、樹立した7株ハイブリドーマの培養上清を用いた。

3) protoscolex抗原に対する抗体価の上昇を確認したうえで最後の免疫処置の3日後にマウス脾臓を摘出し、ガラスホモジナイザーを用いて脾細胞懸濁液を作製をした。この脾細胞とマウスミエローマ細胞(P3X63-Ag8.653 cell)をポリエチレングリコール存在下で融合させ、ハイブリドーマ細胞を作製した。protoscolex粗抗原を用いたELISA法によりスクリーニングし、多包虫protoscolexに対する単クローン抗体産生ハイブリドーマを樹立した。

4) 樹立したハイブリドーマが産生する単クローン抗体のクラス及びサブクラスを、抗マウスIgM, IgG1, IgG2aおよびIgG2b抗体とアガロースゲルを用いたオクタロニー法により判定した。

5) 単クローン抗体の抗原認識特性を明らかにするために、多包虫感染スナネズミの肝臓を用いて病理切片を作製し、免疫組織学的検討を行なった。すなわち、a) 上記肝臓をスナネズミから取り出し、10%ホルマリン-PBSで固定した。b) 固定した肝臓を適当な大きさに切り出し、エタノール(70%~100%)で脱水後、パラフィンにて包埋し、パラフィンブロックを作製した。c) このパラフィンブロックを用いて、4 μ mの厚さの切片を作り、免疫組織学用のプレパラートを作製した。d) このプレパラートを十分乾燥後、キシレンにてパラフィンを除去し(脱パラフィン)、エタノール(100%~70%)を経て、PBSにまで移行した。e) さらに、スキムミルク-PBS中に1時間静置し、ブロッキング操作を行った。Tween 20-PBSで5分、3回洗浄した。f) 次に、このプレパラート上の組織切片に、樹立した7株ハイブリドーマの培養上清をまんべんなくかけ、室温で1時間反応させた。g) Tween 20-PBSで5分、3回洗浄後、3%スキムミルク-PBSで希釈したperoxidase-conjugated rabbit anti-mouse immunoglobulins polyclonal antibodyを同様に組織切片にかけ、室温で1時間反応させた。h) Tween 20-PBSで5分、5回洗浄後、蒸留水で軽く水洗した。i) このプレパラートをDAB水溶液(DAB: 3, 3'-ジアミノベンチジンと過酸化水素水を蒸留水で希釈したもの)中に浸漬し、ハイブリドーマ産生単クローン抗体認識抗原を黄褐色に発色させた。j) プレパラートを蒸留水で水洗、エタノールで脱水、キシレンで透徹後、カナダバルサムで封入し、顕微鏡観察を行った。

6) 単クローン抗体認識抗原の特異性について、巨大肝蛭*Fasciola gigantica*、イヌ糸状虫*Dirofilaria immitis*、旋毛虫*Trichinella spiralis*、広節裂頭条虫*Diphyllobothrium latum*、肝吸虫*Clonorchis sinensis*、単包虫*Echinococcus granulosus*および有鉤囊虫*Cysticercus cellulosae*の7種蠕虫粗抗原およびBALB/cマウス腎抽出抗原を用いたELISA法により、交叉反応の有無を判定することにより比較検討した。

【結果】

1) 96穴プレート3枚(288 wells)に融合細胞懸濁液を100 μ lずつ蒔き、そのうち184 wells (約64%) にハイブリドーマのコロニーが認められた。さらにそのうちの56 wells (約19%) が、多包虫protoscolexに対する抗体を産生しているハイブリドーマであった。

2) 抗体産生ハイブリドーマ56 wellsのうちから、抗体の力価の高低等の反応性の違いをもとに7 wellsを選び、リミッティングダイリューション操作を3回繰り返して実施し、多包虫protoscolexに対する単クローン抗体産生ハイブリドーマ7株を樹立した。

3) この樹立したハイブリドーマ7株が産生する単クローン抗体のクラス及びサブクラスは、4株がIgG1、2株がIgG2b、1株がIgMであった。

3) この7株のうち4株は、多包虫抗原と高い特異性を呈し、単包虫抗原を含むその他の7種蠕虫抗原およびBALB/cマウス腎抽出抗原とは反応(交叉反応)が認められなかった。

免疫組織学的検討から、単クローン抗体認識抗原の分布は、大別して次の3群に分類された。

4) 一群の抗体により認識される抗原は、laminated layerとtegument of germinal layerのみに認められた。

5) 二群の抗体により認識される抗原は、laminated layer、tegument of germinal layerおよびyoung protoscolexに認められた。

6) 三群の抗体により認識される抗原は、germinal layer, brood capsuleおよびprotoscolexに認められた。

7) 各群の単クローン抗体ともに虫体の他に、虫体周囲の結合織とも反応したが、その他の虫体周囲正常組織とは反応が認められなかった。

8) この虫体周囲結合織の反応は、虫体外に分泌された虫体抗原が結合織に沈着し、この沈着抗原と単クローン抗体が反応したものと推察された。

【考察】

多包虫のprotoscolex抗原をマウスに免疫し、7株の単クローン抗体産生ハイブリドーマを樹立した。その認識抗原の分布から、a) laminated layerとtegument of germinal layerのみと反応するもの、b) laminated layer、tegument of germinal layerおよびyoung protoscolexと反応するもの、c) germinal layer, brood capsuleおよびprotoscolexと反応するものの三群に分類された。これまでlaminated layerが宿主と虫体のいずれから産生されるかは明らかでなかったが、今回得られた単クローン抗体の反応性から、虫体由来である可能性が示唆された。今後、多包虫protoscolexをスナネズミに感染させ、経時的にlaminated layerについて観察することにより、その可能性について検討する予定である。さらに他種寄生虫抗原と交叉反応性のない単クローン抗体が得られた可能性が高

い。そこでこの単クローン抗体を用いて認識抗原を精製し、ELISA法のコーティング用抗原として使用することにより、他種寄生虫抗原と交叉反応のない多包虫症診断法を樹立する可能性が期待される。また免疫診断法の一つとして、血流中に存在する寄生虫抗原、いわゆる循環抗原を検出する方法がある。今回得られた結果から、虫体抗原が虫体に接する正常肝臓組織に沈着していたことから、循環抗原として血流中に移行するかは判断しづらいところではあるが、今後は、この循環抗原検出の可能性についても単クローン抗体を用いて検討していく予定である。

日本財団補助金による
1998 年度日中医学協力事業報告書

—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 9 月 29 日

研究室で撮影した本人のスナップ写真、及び発表論文等のコピーを添付

1. 招 へ い 責 任 者 高橋元秀



所属機関 国立感染症研究所 細菌・血液製剤部

職名 室 長

所在地 〒 208-0011 東京都武蔵村山市学園 4-7-1

電 話 042-561-0771

招へい研究者氏名 李 偉華

所属機関 中国衛生部 蘭州生物製品研究所

研究テーマ 生物製剤の品質管理技法の研修
—特にバイオアッセイと統計解析について—

2. 日本滞在日程

別紙1の通り

3. 研究報告

◆研究テーマ

生物製剤の品質管理技法の研修
－特にバイオアッセイと統計解析について－

◆来日研究者氏名

李 偉華 研究員

◆中国での所属・役職

中国衛生部 蘭州生物製品研究所 医学工程師

◆招聘者氏名・所属・役職

高橋元秀 国立感染症研究所 細菌・血液製剤部 細菌製剤第3室長

◆要旨

1. 日本の生物学的製剤基準の概要説明と試験の実施
・ジフテリアおよび破傷風トキソイドの安全性と有効性について実験動物を用いた無毒化試験、力価試験を実施する
2. 試験成績の統計学的解析法の概要説明
・コンピューター利用におけるバイオアッセイの理論とソフトの基礎研修とその応用について
3. 現在国際的に求められている基準とハーモナイゼーションについて
・WHO基準との整合性

◆KEY WORDS

生物学的製剤、品質管理、バイオアッセイ、統計学的解析

◆研究報告

1. 目的

生物学的製剤であるワクチンは多数の健康者の免疫に用いられるため十分安全でなくてはならない。また、当該疾病を予防する手段として免疫を付加するに十分なある一定水準以上の力価を有する必要がある。これら、生物学的製剤の品質を保証するために品質管理と呼ばれる手法が基本となる。製品の品質は

物理学的、科学的、あるいは生物学的手法により測定される。品質の測定値は偶然の結果としてある範囲で変動するもので有る。この変動の量は統計学的に平均と偏差値として把握される。これら生物学的手法を用いた測定法をバイオアッセーと呼び、安全性と有効性を評価する手段となっている。バイオアッセーに際しては、動物、培養細胞、微生物等が使用され、物理学的または化学的測定法より測定値の変動が大きくなる。変動の原因には、使用動物の種差、個体差、試験方法や動物の管理状況等があげられる。これら変動要因を考慮して、ワクチン等の本質に近い値を知るために統計学的手法が重要である。

今回、日本におけるこれらワクチン類の品質管理技術の実際を学び、中国での品質管理技術を振り返り整理する。ワクチン類の国際的市場開発が行われている今、両国間さらに国際的な視野においてこの分野の発展に資するために研修するものである。

2. 方法

生物学的製剤の品質管理の中で、国の管理機構を中心に調査、研修する。従って、ワクチンの国家検定と標準品の交付を行っている国立感染症研究所の組織とその機能について調査する。国立感染症研究所の行っている検定の中でジフテリアと破傷風トキソイドワクチンについて、安全性と有効性についての品質管理技術を細菌・血液製剤部、細菌製剤第3室において技術研修する。特に、有効性の保証試験である動物を用いた力価試験法について実習する。

また、研修して得られた力価試験成績について、元国立感染症研究所 安全性研究部 統計室長 石田説而先生の元で生物定量法の統計学的解析を研修し、さらに通常の試験成績解析をコンピューターシステムの導入とその応用について発展させる。

3. 結果および考察

(1) 日本の生物学的製剤の国の管理機構

「ワクチン開発と承認審査プロセス」について以下に示す。

候補ワクチン→



動物での前臨床試験



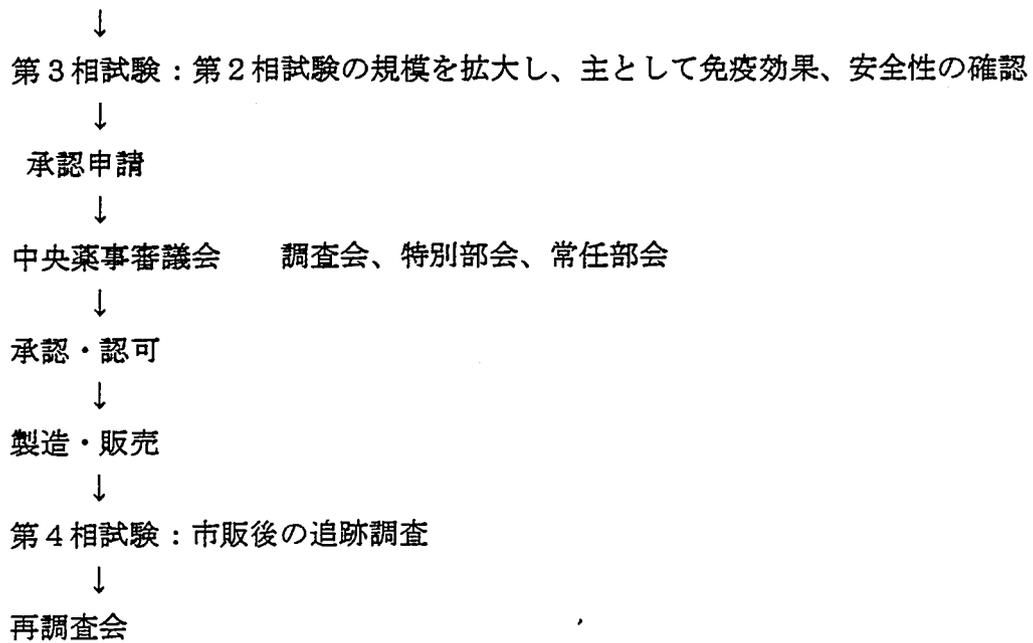
治験届



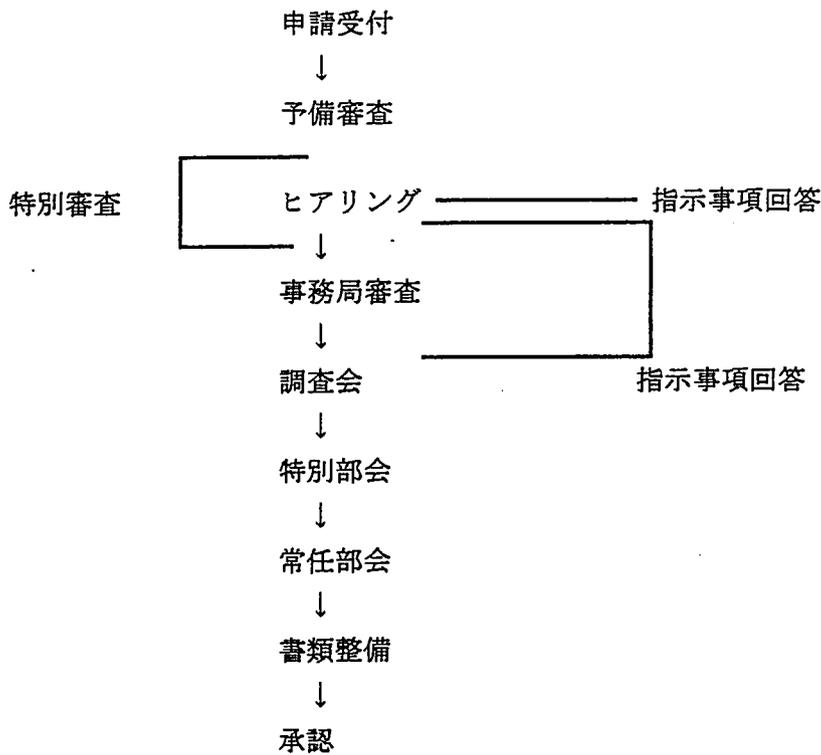
第1相試験：少数の健康人希望者で安全性（副作用）、免疫効果の確認



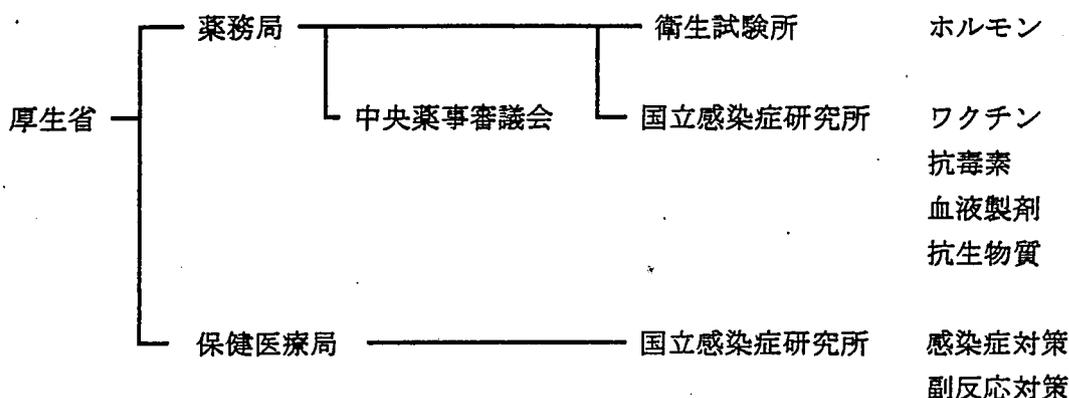
第2相試験：接種方法、接種量、副作用、免疫効果について検討



「厚生省内での手続きの流れ」を以下に示す。



「国家検定・検査システム」を以下に示す。



「国立感染症研究所の組織」を以下に示す。

戸山庁舎 所長 国家検定試験室 (NCL) の統括責任者
 細菌部 NCL: コレラワクチン、肺炎球菌ワクチン
 ウイルス部 NCL: インフルエンザワクチン
 感染病理部 NCL: 病理学的検査
 感染症情報センター: 国内感染症情報、流行予測調査
 国際協力室: 海外感染症情報、研修生の受け入れ
 村山分室 細菌・血液製剤部 NCL: 細菌製剤全般、血液製剤全般
 安全性研究部 NCL: 安全性一般試験
 ウイルス製剤部 NCL: ポリオ、麻疹、風疹ワクチン等
 動物管理室 NCL: 動物試験
 筑波医学実験用霊長類センター: サル実験施設
 バンセン病研究センター

(2) 力価試験の実習

現在、中国においてはジフテリアと破傷風トキトイドの力価試験はモルモットを用いて行われているが、日本ではマウスを用いた試験方法で行われている。以下に日本における両トキトイドの生物学製剤基準試験方法を別紙2にあらわし、以下その概要を示す。

国内標準品と試験品を任意に希釈し、各用量を1群10匹のマウス(4-5週齢、雌、ddy/SPF)皮下に0.5ml宛注射する。ジフテリアの力価測定に関しては、トキソイド注射4-5週後に採血し、血清中の抗毒素を培養細胞法(Vero細胞)で定量する。また、破傷風はトキソイド注射4-5週後に破傷風毒素の100LD₅₀を皮下に直接注射し、毒素による麻痺の出現(特異症状)と死亡日数を観察する。症状および死亡に至る日数はスコアに変換して、統計解析をする。標準品に対

する相対力価を平行線定量法で求めた。

上記の方法を用いて、日本の標準品と中国 蘭州研究所で製造した混合ワクチン中のジフテリアトキソイドの力価を比較試験するとともに、作製したソフトを用いてコンピューターで統計解析した。

培養細胞法で求めた個々のマウスのジフテリア抗毒素価表 3-1 に示した。表には簡単な計算機で求めた平均値を示した。さらに作製したソフトで計算した実例を表 3-2 に示した。個々の値を入力後に表される成績とその詳細解析は必要な要因を考慮に入れた成績としてあらわした。共通の回帰係数を採用して蘭州の製品を評価すると 960 単位となった。

日本の標準品を対照として蘭州研究所の製品を評価すると 677 単位または 960 単位となった。この計算の違いは、今回の実験だけで得られた成績だけ解析すると 960 単位、現在までに累積された日本国内の混合ワクチンの成績を考慮に入れると 677 単位となった。表中の図でわかるように標準品 (REF) と蘭州の製品 (RAN) は傾き (b) が異なり、平行性は否定された。これは両者の品質が異なることを意味し、統計学的には両者の解析に無理が生じる。また、結果的には RAN トキソイドは高力価のために、用いた用量が適当でなく、より希釈した用量で試験するべきであった。今回の成績によると蘭州研究所製のジフテリアトキソイドは国際的に求められている WHO 基準 (30 単位/0.5ml) を遙かに上回る力価であった。

(3) その他作製した統計解析プログラムの実例

日常の実験で得られた成績を統計解析得るためのプログラムを作製した。実際に例題を作り、解析した実例を別紙 4 に示す。

別紙 4-1 : 一元配置法

別紙 4-2 : 二元配置法 (繰り返しのない場合)

別紙 4-3 : 相関係数

別紙 4-4 : 平均値の差の検定 (対応のない場合)

別紙 4-5 : 平均値の差の検定 (対応のある場合)

別紙 4-6 : 回帰係数 (繰り返しのある場合)

別紙 4-7 : 回帰係数 (繰り返しのない場合)

別紙 4-8 : 平行線定量法 (連続量の場合)

別紙 4-9 : 平行線定量法 (プロビット法)

別紙 4-10 : 度数分布

(4) National control authorities (NCA) の位置づけと役割を WHO のテキストで学んだ。

ワクチン等の生物学的製剤を製造する製造所は、Good Manufacturing Practice (GMP)で規制され、査察制度が国際的に導入されようとしている。それに伴い、国家検定をどのように行い、ワクチンの品質保証を確立するか、国際的にハーモナイゼーションが叫ばれていることを理解した。以下にそのガイドラインの要約を示す。

NCA は国内で生産されたものや輸入されたワクチン等について規制された品質であることを保証する義務がある。適切な品質、安全性および有効性を有することを保証するために製造者のための要求基準（生物学的製剤基準）および製剤に特有な品質管理に準拠しているかを確認する。その手段として、国家検定があり一般試験法と製剤別試験法について明記し用意する必要がある。これら基準は WHO から提供された資料や、各国の基準とできる限り調和しかつその時代に適合した水準を基盤として作られる。しかしながら、これら品質、安全性および有効性は背増車に主たる責任があるため、製造者は設立状況と設備の充実性、出発材料、製造工程、コントロールテスト過程及び製剤特殊性を評価するための専門家をもうける必要がある。一般的にこの機能は national control laboratory (NCL) として単独の行政的ユニットとして設立される。NCA は独立した専門顧問と適切な専門家との顧問審議会の活用と可否決定を援護するために NCL の試験施設と同様な施設との関連を持たなければならない。

要員：NCA と NCL の要員には訓練された専門家を含み、コントロール過程の技術的及び行政的両面の側面を包括する。

行政：NCA は製造者の提出書類の受理と評価のため裏付け過程を確立し（サンプルテスト等）、詳細報告の検討を含め承認または不承認の通達をする。

GMP 査察：査察の目的は製造者の施設及び製造工程が WHO 出版物に記載されているような GMP の原則または生物学的製剤基準または状況に適合していることを保証することにある。

製造者と製剤の承認過程：生産工程確立の承認またはライセンス授与は GMP の原則に対応している場合にだけ許可される。承認を許可されるためには製造法確立に関する情報、製剤に関する情報等についての詳細情報を精査しなければならない。

国家検定試験室 (NCL)：NCL の施設の大きさとスタッフの数は、要求される品質管理の性格と範囲に依存する。主な重要な機能は、試験室のテストと評価、生物学的製剤用の国内参照品の作製があげられる。

製造承認後のモニターリング：製剤出荷、監視、市場調査、リコールと取り消し、製造変更の承認、新しい指示の承認等について連続的に行う。

輸入製剤承認の手続き：輸入を希望する国の NCA は製剤の品質あるいは基準に合致することを説明する製造者 NCA により発行された証明書を受け、テス

トの必要性を減じライセンス書類を簡略化することができる。この際に、WHO 参加メンバー、製剤の証明、追加情報の請求、欠陥と副反応の報告等について検討する。

日本国の NCAs の現状はほぼガイドラインに沿うものと理解した。すなわち、予防接種による健康被害は国が責任を持ち迅速に対応すると法律で規定されていた（予防接種法 1994 年）。その責任を果たすために、生物学的製剤の品質、安全性および有効性を有することを保証するための機構が確立し、今回研修した国立感染症研究所の国家検定および GMP 査察等が行われていた。

4. 参考文献

- 1: 石田説而、高橋元秀(1993) 生物学的製剤の統計学的品質管理法
細菌製剤協会 平成5年8月
- 2: ワクチンハンドブック(1994)
第2編 ワクチン各論 ジフテリアトキソイド 71-80. 佐藤博子、高橋元秀
第2編 ワクチン各論 破傷風トキソイド 81-90. 佐藤博子、高橋元秀
丸善株式会社
- 3: 日本臨床、増刊号 第53巻(1995)
広範囲血液・尿化学検査、免疫学的検査(下巻)
破傷風菌 P148-150 ジフテリア菌 P204-206 日本臨床社
- 4: Vaccine Handbook (1996) MARUZEN, Tokyo
Part Two: Chapter 9; Diphtheria Toxoid, Hiroko SATO and Motohide TAKAHASHI
p52-59
Part Two: Chapter 10; Tetanus Toxoid, Hiroko SATO and Motohide TAKAHASHI
p60-67
- 5: 細胞培養法によるジフテリア抗毒素価測定の際にみられる VERO 細胞内の顆粒増加について . マウス血清について
保田幸子、小宮貴子、高橋元秀、亀山昭一、松橋直
日本臨床病理学会誌 第41巻第3号 P289-292(1993.3)
- 6: 細胞培養法によるジフテリア抗毒素価測定の際にみられる VERO 細胞内の顆粒増加について . 顆粒の性状と力価試験に及ぼす影響
保田幸子、小宮貴子、高橋元秀、亀山昭一、松橋直
日本臨床病理学会誌 第41巻第5号 P609-613(1993.5)
- 7: 百日咳・ジフテリア・破傷風・日本脳炎の抗体検査法
近田俊文、高橋元秀 日本医事新報 P721-722(1996)
- 8: ジフテリア抗毒素価測定に用いる培養細胞法の改良
小宮貴子、高橋元秀、福田靖、貞弘省二 医学検査 46巻2号 P135-138(1997)
- 9: Summary and recommendations. Brown F, Cussler K, Hendriksen C(eds): Dev Biol Stand. Basel, Karger, 1996, Vol.86, p353-358

滞 在 日 程 表

申請人：李 偉華 の滞在予定

予定滞在期間 1998年7月 5日 より 1998年10月 2日 (90日間)

月・日	予 定	宿 泊 先
7月 5日	北京空港から成田空港へ	日中友好会館後楽寮 東京都文京区後楽 一丁目五番三号 (03-3814-1261) に滞在。
7月 6日	国立感染症研究所(感染研) にて入所手続き	
7月 7日	感染研、細菌製剤第3室にて品質管理学を聴講	
7月 8日	感染研、細菌製剤第3室にて品質管理学を聴講	
7月 9日	感染研、細菌製剤第3室にて品質管理学を聴講	
7月10日	感染研、細菌製剤第3室にて品質管理学を聴講	
7月11日	行楽寮で自習及び休息	
7月12日	行楽寮で自習及び休息	
7月13日	感染研、細菌製剤第3室にて品質管理学を聴講	
7月14日	感染研、細菌製剤第3室にて品質管理学を聴講	
7月15日	感染研、細菌製剤第3室にて品質管理学を聴講	
7月16日	感染研、細菌製剤第3室にて品質管理学を聴講	
7月17日	感染研、細菌製剤第3室にて品質管理学を聴講	
7月18日	行楽寮で自習及び休息	
7月19日	行楽寮で自習及び休息	

月・日	予 定	宿 泊 先
7月20日	行楽寮で自習及び休息	日中友好会館後楽寮 (03-3814-1261) に滞在。
7月21日	感染研、細菌製剤第3室にて品質管理学を聴講	
7月22日	感染研、細菌製剤第3室にて品質管理学を聴講	
7月23日	感染研、細菌製剤第3室にて品質管理学を聴講	
7月24日	感染研、細菌製剤第3室にて品質管理学を聴講	
7月25日	高橋元秀室長宅訪問	
7月26日	行楽寮で自習及び休息	
7月27日	感染研、細菌製剤第3室にて品質管理学を聴講	日中友好会館後楽寮 (03-3814-1261) に滞在。
7月28日	感染研、細菌製剤第3室にて品質管理学を聴講	
7月29日	感染研、細菌製剤第3室にて品質管理学を聴講	
7月30日	感染研、細菌製剤第3室にて品質管理学を聴講	
7月31日	感染研、生物統計室にて生物統計学を聴講	
8月 1日	行楽寮で自習及び休息	
8月 2日	行楽寮で自習及び休息	
8月 3日	感染研、生物統計室にて生物統計学を聴講	
8月 4日	感染研、生物統計室にて生物統計学を聴講	
8月 5日	前生物統計室長石田説而先生宅を訪問	
8月 6日	前生物統計室長石田説而先生宅を訪問	

月・日	予 定	宿 泊 先
8月 7日	石田説而先生宅でコンピューター基礎学を聴講	日中友好会館後楽寮 (03-3814-1261) に滞在。
8月 8日	行楽寮で自習及び休息	
8月 9日	行楽寮で自習及び休息	
8月10日	石田説而先生宅でコンピューター基礎学を聴講	
8月11日	石田説而先生宅でコンピューター基礎学を聴講	
8月12日	感染研、細菌製剤第3室にワクチン学の実習	
8月13日	感染研、細菌製剤第3室にワクチン学の実習	
8月14日	感染研、細菌製剤第3室にワクチン学の実習	
8月15日	行楽寮で自習及び休息	
8月16日	行楽寮で自習及び休息	
8月17日	感染研、細菌製剤第3室にワクチン学の実習	
8月18日	感染研、細菌製剤第3室にワクチン学の実習	
8月19日	感染研、細菌製剤第3室にワクチン学の実習	
8月20日	感染研、細菌製剤第3室にワクチン学の実習	
8月21日	感染研、細菌製剤第3室にワクチン学の実習	
8月22日	行楽寮で自習及び休息	
8月23日	行楽寮で自習及び休息	
8月24日	感染研、細菌製剤第3室にワクチン学の実習	

月・日	予 定	宿 泊 先
8月25日	感染研、細菌製剤第3室にワクチン学の実習	日中友好会館後楽寮 (03-3814-1261) に滞在。
8月26日	感染研、細菌製剤第3室にワクチン学の実習	
8月27日	感染研、細菌製剤第3室にワクチン学の実習	
8月28日	感染研、細菌製剤第3室にワクチン学の実習	
8月29日	行楽寮で自習及び休息	
8月30日	行楽寮で自習及び休息	
8月31日	石田説而先生宅でコンピューター応用学の実習	
9月1日	石田説而先生宅でコンピューター応用学の実習	
9月2日	石田説而先生宅でコンピューター応用学の実習	
9月3日	石田説而先生宅でコンピューター応用学の実習	
9月4日	石田説而先生宅でコンピューター応用学の実習	
9月5日	行楽寮で自習及び休息	
9月6日	行楽寮で自習及び休息	
9月7日	石田説而先生宅でコンピューター応用学の実習	
9月8日	石田説而先生宅でコンピューター応用学の実習	
9月9日	石田説而先生宅でコンピューター応用学の実習	
9月10日	石田説而先生宅でコンピューター応用学の実習	
9月11日	石田説而先生宅でコンピューター応用学の実習	

月・日	予 定	宿 泊 先
9月12日	行楽寮で自習及び休息	日中友好会館後楽寮 (03-3814-1261) に滞在。
9月13日	行楽寮で自習及び休息	
9月14日	感染研、細菌製剤第3室にワクチン学の実習	
9月15日	石田説而先生と箱根研修旅行	箱根泊
9月16日	石田説而先生と箱根研修旅行	日中友好会館後楽寮 (03-3814-1261) に滞在。
9月17日	感染研、細菌製剤第3室にワクチン学の実習	
9月18日	感染研、細菌製剤第3室にワクチン学の実習	
9月19日	行楽寮で自習及び休息	
9月20日	行楽寮で自習及び休息	
9月21日	感染研、細菌製剤第3室にワクチン学の実習	
9月22日	感染研、細菌製剤第3室にワクチン学の実習	
9月23日	行楽寮で自習及び休息	
9月24日	石田説而先生と京都・奈良見学	
9月25日	石田説而先生と京都・奈良見学	
9月26日	石田説而先生と京都・奈良見学	京都泊
9月27日	行楽寮で自習及び休息	日中友好会館後楽寮 (03-3814-1261) に滞在。
9月28日	最終報告書の作成	
9月29日	帰国後の共同研究に関する打ち合わせ	

月・日	予 定	宿 泊 先
9月30日	帰国に関する部屋の整理	日中友好会館後楽寮 (03-3814-1261) に滞在。
10月 1日	帰国に関する部屋の整理	
10月 2日	成田空港から北京空港へ	北京着

ジフテリアトキソイド

1 本質及び性状

本剤は、ジフテリア毒素（以下「毒素」という。）をホルマリンでその免疫原性をなるべく損なわないように無毒化（以下「トキソイド化」という。）して得られた『ジフテリアトキソイド』（以下「トキソイド」という。）を含む無色ないし淡黄褐色の澄明な液剤である。

2 製 法

2.1 原 材 料

2.1.1 製 造 用 株

ジフテリア菌 Park-Williams No. 8 株又はこれと同等以上の毒素産生能をもつ株を用いる。

2.1.2 培 地

毒素の産生に用いる培地には、馬肉、人体に由来する材料、ヒト血液型物質を含む可能性のあるもの、又はその他の人体に高度のアレルギーを起こすおそれのあるものを用いてはならない。

2.2 原 液

2.2.1 毒 素 液

ジフテリア菌の培養終了後、鏡検又は適当な培養法によって検査するとき、他の細菌の混入を認めない培養液を適当な方法で除菌し、これを毒素液とする。

毒素液は、3.2.8を準用して試験するとき、1 ml 中に毒素の 100 Lf 以上を含まなければならない。

2.2.2 トキソイド化及び精製

トキソイド化には、ホルマリンを用いる。トキソイド化の前あるいは後に精製しなければならない。

この精製トキソイドを含む液を原液とする。

原液について、3.1の試験を行う。

2.3 最終バルク

原液を緩衝性の生理食塩液等で希釈し、1 ml 中のトキソイドの含量が 70 Lf を超えないようにして作る。

この際、チメロサルを 0.01 % になるように添加することができる。また、適当な安定剤を加えることができる。

3 試 験

3.1 原液の試験

3.1.1 純 度 試 験

一般試験法のたん白窒素定量法を準用してたん白窒素含量を、また、3.2.8を準用してトキソイド含量を測定するとき、たん白窒素 1 mg につきトキソイドの 1,500 Lf 以上を含まなければならない。

3.1.2 無 菌 試 験

一般試験法の無菌試験法を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.1.3 無 毒 化 試 験

検体を 0.017 M リン酸塩緩衝塩化ナトリウム液 (pH 7.0) で薄めて、1 ml 中にトキソイドの 200 Lf を含むようにしたもの、及び最終バルクと同等の濃度となるようにして 37°C に 20 日間置いたものを試料として、次の試験を行う。

ジフテリアトキソイド

3.1.3.1 モルモット試験

3.2.6.1を準用する。ただし、1 ml中にトキソイドの200Lfを含む試料の場合には、動物1匹当たりの注射量は、2 mlとする。

3.1.3.2 ウサギ試験

3.2.6.2を準用する。

3.2 小分製品の試験

小分製品について、次の試験を行う。

3.2.1 pH 試験

一般試験法のpH測定法を準用して試験するとき、6.6~7.4でなければならない。

3.2.2 チメロサル含量試験

一般試験法のチメロサル定量法を準用して試験するとき、0.012 %以下でなければならない。

3.2.3 ホルムアルデヒド含量試験

一般試験法のホルムアルデヒド定量法を準用して試験するとき、0.01 %以下でなければならない。

3.2.4 無菌試験

一般試験法の無菌試験法を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.2.5 異常毒性否定試験

一般試験法の異常毒性否定試験法を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.2.6 無毒化試験

検体及びこれを37℃に20日間置いた試料について、次の試験を行う。

3.2.6.1 モルモット試験

検体及び試料にそれぞれ体重300~400gのモルモット4匹以上を用い、1匹当たり5mlを皮下に注射して30日間以上観察する。

この間、いずれの動物も毒素による中毒死、壊死、麻痺等の中毒症状、著しい体重減少、その他の異常を示してはならない。

3.2.6.2 ウサギ試験

検体、試料及び0.2 %ゼラチン加0.017 Mリン酸塩緩衝塩化ナトリウム液(pH 7.0)で40倍に薄めたシック試験液(動物用)のそれぞれ0.1 mlを体重約2.5 kgのウサギ2匹以上の各々の皮内に注射して、2日間観察す

る。この間に異常を示す。

この間、シック試験液(動物用)希釈の注射部位は、毒素による明らかな特異反応を示さなければならず、かつ、各試料の注射部位は、この特異反応その他の異常を示してはならない。

3.2.7 力価試験

モルモットを用いる毒素攻撃法若しくは血中抗毒素価測定法又はマウスを用いる血中抗毒素価測定法によって試験する。

3.2.7.1 毒素攻撃法

3.2.7.1.1 材料

検体、標準ジフテリアトキソイド(以下「標準品」という。)及び適当な毒素液を用いる。検体及び標準品の希釈は、0.02 %ゼラチン加0.017 Mリン酸塩緩衝塩化ナトリウム液(pH 7.0)に、また、毒素液の希釈は、

0.2 %ゼラチン加0.017.Mリン酸塩緩衝塩化ナトリウム液 (pH 7.0) による。

3.2.7.1.2 試 験

検体及び標準品をそれぞれ希釈し、対数的等間隔の階段希釈を作る。

体重 300~400 g のモルモット 10 匹以上を 1 群とし、検体及び標準品の各希釈に 1 群ずつを用い、1 匹当たり 2 ml を 1 回皮下に注射する。免疫注射の 4~6 週間後に、それぞれの動物を約 50 LD₅₀ の毒素で攻撃して、7 日間観察する。

また、非免疫対照群の体重約 400 g のモルモット 3 匹以上を 1 群とし、その 3 群以上を用いて攻撃に用いた毒素の LD₅₀ 数を測定するとき、その値は 25~100 でなければならない。

3.2.7.1.3 判 定

試験の成績を統計学的に処理して比較するとき、検体の力価は 3 国際単位以上でなければならない。

3.2.7.2 血中抗毒素価測定法

ウサギ皮内法、培養細胞法又は血球凝集反応法によって行う。

3.2.7.2.1 材 料

検体、標準品、標準ジフテリア抗毒素及び結合価既知の毒素液を用いる。ただし、血球凝集反応法により行うときは、純度 2,500 Lf/mgN 以上のジフテリア毒素又はトキソイドの感作血球を用いる。

3.2.7.2.2 試 験

動物の免疫は、3.2.7.1.2 を準用して行う。ただし、マウスを用いるときは約 5 週齢 (体重約 20 g) のマウス 10 匹以上を 1 群とし、検体及び標準品の各希釈に 1 群ずつを用い、1 匹当たり 0.5 ml を皮下に注射する。

免疫注射の 4~6 週間後にそれぞれの動物から採血し、血中抗毒素価を測定する。

3.2.7.2.3 判 定

3.2.7.1.3 を準用する。

3.2.8 表示確認試験

参照ジフテリア抗毒素 (フロキュラシオン用) を用い、抗体変量法による試験管内沈降反応によって行う。

4 貯法及び有効期間

有効期間は、2 年とする。

5 そ の 他

5.1 添付文書等記載事項

次の用法及び用量

初回免疫には、通常、1 回 0.5 ml ずつ 3 回、いずれも 3~8 週間の間隔で皮下に注射する。ただし、10 歳以上の者には、第 1 回量を 0.1 ml とし、副反応の少ないときは、第 2 回以後適宜増量する。

第 1 回の追加免疫には、通常、初回免疫後 12~18 箇月の間に 1 回 0.5 ml を皮下に注射する。ただし、初回免疫のとき副反応の強かった者には適宜減量し、以後の追加免疫のときの接種量もこれに準ずる。また、10 歳以上の者には、0.1 ml 以下を皮下に注射する。

破傷風トキソイド

1 本質及び性状

本剤は、破傷風毒素（以下「毒素」という。）をホルマリンでその免疫原性をなるべく損なわないように無毒化（以下「トキソイド化」という。）して得られた『破傷風トキソイド』（以下「トキソイド」という。）を含む無色ないし淡黄褐色の澄明な液剤である。

2 製 法

2.1 原 材 料

2.1.1 製 造 用 株

破傷風菌 Harvard 株又はこれと同等以上の毒素産生能をもつ株を用いる。

2.1.2 培 地

毒素の産生に用いる培地には、馬肉、人体に由来する材料、ヒト血液型物質を含む可能性のあるもの、又はその他の人体に高度のアレルギーを起こすおそれのあるものを用いてはならない。

2.2 原 液

2.2.1 毒 素 液

破傷風菌の培養終了後、鏡検又は適当な培養法によって検査するとき、他の細菌の混入を認めない培養液を除菌ろ過し、これを毒素液とする。

毒素液は、標準破傷風抗毒素を用いて結合価を測定するとき、1Lf量が0.05ml以下であるか、又は3.2.8を準用して試験するとき、1ml中に毒素の20Lf以上を含まなければならない。

2.2.2 トキソイド化及び精製

トキソイド化には、ホルマリンを用いる。トキソイド化の前あるいは後に精製しなければならない。この精製トキソイドを含む液を原液とする。

原液について、3.1の試験を行う。

2.3 最 終 バ ル ク

原液を緩衝性の生理食塩液等で希釈し、1ml中のトキソイドの含量がたん白質として200 μ gを超えないようにして作る。

この際、チメロサルを0.01%になるように添加することができる。また、適当な安定剤を加えることができる。

3 試 験

3.1 原 液 の 試 験

3.1.1 純 度 試 験

最終バルクと同等の濃度に薄めたものを試料とし、一般試験法のたん白窒素定量法を準用して試験するとき、1ml中のたん白質量は200 μ g以下でなければならない。

3.1.2 無 菌 試 験

一般試験法の無菌試験法を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.1.3 無 毒 化 試 験

検体を0.017Mリン酸塩緩衝塩化ナトリウム液(pH7.0)で薄めて最終バルクの3倍の濃度となるようにした

破傷風トキソイド

もの及び最終バルクと同等の濃度となるようにして37℃に20日間置いたものをそれぞれ試料とし、3.2.6を準用する。

3.2 小分製品の試験

小分製品について、次の試験を行う。

3.2.1 pH 試験

一般試験法のpH測定法を準用して試験するとき、6.6～7.4でなければならない。

3.2.2 チメロサル含量試験

一般試験法のチメロサル定量法を準用して試験するとき、0.012 %以下でなければならない。

3.2.3 ホルムアルデヒド含量試験

一般試験法のホルムアルデヒド定量法を準用して試験するとき、0.01 %以下でなければならない。

3.2.4 無菌試験

一般試験法の無菌試験法を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.2.5 異常毒性否定試験

一般試験法の異常毒性否定試験法を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.2.6 無毒化試験

検体及びこれを37℃に20日間置いた試料について、次の試験を行う。

検体及び試料にそれぞれ体重300～400gのモルモット4匹以上を用い、1匹当たり5mlを皮下に注射して、21日間以上観察する。

この間、いずれの動物も毒素による中毒死、けいれん、強直等の中毒症状、著しい体重減少、その他の異常を示してはならない。

3.2.7 力価試験

モルモット又はマウスを用い、毒素攻撃法又は血中抗毒素価測定法によって試験する。

3.2.7.1 毒素攻撃法

3.2.7.1.1 材 料

検体、標準破傷風トキソイド（以下「標準品」という。）及び適当な毒素液を用いる。検体及び標準品の希釈は、0.02 %ゼラチン加0.017 Mリン酸塩緩衝塩化ナトリウム液（pH7.0）に、また、毒素液の希釈は、0.2 %ゼラチン加0.017 Mリン酸塩緩衝塩化ナトリウム液（pH7.0）による。

3.2.7.1.2 試 験

検体及び標準品をそれぞれ希釈し、対数的等間隔の階段希釈を作る。

体重300～400gのモルモット又は約5週齢（体重約20g）のマウス10匹以上を1群とする。検体及び標準品の各希釈に1群ずつを用い、1匹当たりモルモットでは2ml、マウスでは0.5mlを1回皮下に注射する。免疫注射の4～6週間後に、それぞれのモルモットを約50 LD₅₀の毒素で、又はそれぞれのマウスを約100 LD₅₀の毒素で攻撃して、7日間観察する。

また、非免疫対照群の体重約400gのモルモット又は免疫マウスと週齢をあわせたマウス3匹以上を1群とし、その3群以上を用いて攻撃に用いた毒素のLD₅₀数を測定するとき、その値は、モルモットでは25～100、マウスでは50～200でなければならない。

3.2.7.1.3 判 定

試験の成績を統計学的に処理して比較するとき、検体の力価は 30 国際単位以上でなければならない。

3.2.7.2 血中抗毒素価測定法

3.2.7.2.1 材 料

検体、標準品及び結合価既知の毒素液を用いる。これらの希釈は、3.2.7.1.1 を準用して行う。

3.2.7.2.2 試 験

動物の免疫は、3.2.7.1.2 を準用して行う。

免疫注射の 4～6 週間後にそれぞれの動物から採血し、血中抗毒素価をマウス法によって測定する。

3.2.7.2.3 判 定

3.2.7.1.3 を準用する。

3.2.8 表示確認試験

参照破傷風抗毒素（フロキュラシオン用）を用い、抗体変量法による試験管内沈降反応によって行う。

4 貯法及び有効期間

有効期間は、2 年とする。

5 そ の 他

5.1 添付文書等記載事項

次の用法及び用量

初回免疫には、通常、1 回 0.5 ml ずつ 3 回いずれも 3～8 週間の間隔で皮下に注射する。

追加免疫には、通常、初回免疫後 6～18 箇月の間に、0.5 ml 以下を 1 回皮下に注射する。ただし、初回免疫のとき、副反応の強かった者には、適宜減量する。以後の追加免疫のときの接種量もこれに準ずる。

ジフテリアトキソイド力価試験成績 (培養細胞法) (60PC)

実習
試験毒素 Lot M59

免疫年月日 1998.8.13
測定年月日 1998.9.14

採血年月日 1998.9.10
力価判定年月日 1998.9.18

検定番号	Ref. DT. comb Lot. 2 (Ab)(64 μ ml)			蘭川 DPT			
検体番号	④	⑤	⑥	①	②	③	
注射量(ml) 希釈倍数	0.5 / 0.125 μ ml 4X	0.5 / 0.0400 μ ml 12.5X	0.5 / 0.0125 μ ml 40X	0.5 / 0.065 μ ml 8X	0.5 / 0.0195 μ ml 25.6X	0.5 / 0.0063 μ ml 80X	
x	-0.903	-1.398	-1.903	-1.204	-1.710	-2.201	
抗毒素価 個体価	CCU / ml	CCU / ml	CCU / ml	CCU / ml	CCU / ml	CCU / ml	
♀	1	0.294	0.0408	0.0010	0.137	0.137	0.0686
	2	0.0196	0.0086	0.0010	0.0971	0.0485	0.156
	3	0.294	0.0329	0.0036	0.589	0.416	0.0288
	4	0.147	0.0277	0.0010	0.832	0.832	0.137
	5	0.0485	0.0086	0.0010	0.104	0.104	0.0686
♀	6	0.0686	0.0243	0.0007	0.294	0.147	0.0138
	7	0.0485	0.137	0.0010	0.147	0.186	0.104
	8	0.0783	0.0204	0.0233	0.416	0.147	0.104
	9	0.294	0.0172	0.0184		0.263	0.0783
	10		0.0164	0.0086			0.147
Σy	-9.0338	-16.2783	-26.0319	-4.9140	-6.5972	-11.3031	
\bar{y}	-1.0038	-1.6278	-2.6032	-0.6143	-0.7330	-1.1303	
Σy^2	10.4902	27.5964	70.8677	3.9175	5.8470	13.7877	
$(\Sigma y)^2 / f$	9.0677	26.4983	67.7660	3.0184	4.8359	12.7760	
E	1.4225	1.0981	3.1017	0.8991	1.0111	1.0117	
(S^2)	0.1778	0.1220	0.3446	0.1284	0.1264	0.1124	

$\Sigma x = (0.0991) \times + (0.0236) \times (0.0025) (0.243) = (0.185) (0.0741)$

$S_{xx} = \{ ()^2 \times + ()^2 \times \} - ()^2 =$

$S_{xy} = () \times () + () \times () - \{ () + () \} \times ()$

=

b =

	REF		RAN			
	-0.903	-1.398	-1.903	-1.204	-1.710	-2.201
1	0.294	0.041	0.001	0.137	0.137	0.069
2	0.020	0.009	0.001	0.097	0.048	0.156
3	0.294	0.033	0.004	0.589	0.416	0.029
4	0.147	0.028	0.001	0.832	0.832	0.137
5	0.048	0.009	0.001	0.104	0.104	0.069
6	0.069	0.024	0.001	0.294	0.147	0.014
7	0.048	0.137	0.001	0.147	0.186	0.104
8	0.078	0.020	0.023	0.416	0.147	0.104
9	0.294	0.017	0.018		0.263	0.078
10		0.016	0.009			0.147
平均	-1.004	-1.628	-2.603	-0.614	-0.733	-1.130
分散	0.178	0.122	0.345	0.128	0.126	0.112

	SXX	SXY	直線式	共通回帰使用可否
REF	4.743	7.621	Y= 1.607X + 0.509	可
RAN	4.432	2.335	Y= 0.527X + 0.073	不可

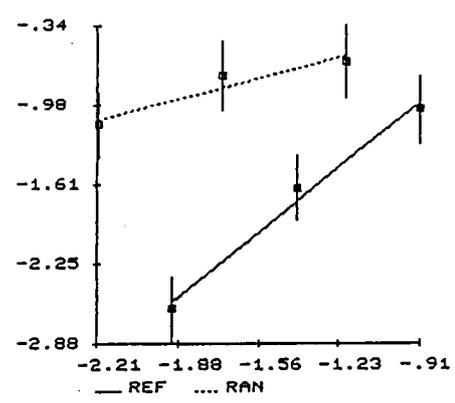
用量	SS	DF	MS	F
検体間	11.977	1	11.9767	70.09**
回帰	10.803	1	10.8034	63.22**
平行性	2.671	1	2.6713	15.63**
直線性	0.306	2	0.1532	0.90
用量間	25.758	5	5.1516	
誤差	8.544	50	0.1709	
合計	34.302	55		

共通の分散: 0.1709
 分散の一様性の検定
 $\chi^2 = 4.38$
 一様性あり

共通の回帰係数:	1.085	95% 信頼区間	V(M)
	力価		
1 RAN	960.489	534.658, 2255.150	0.02188

共通の回帰係数 (1.320) で計算した相対力価
 力価 基準値との比較

RAN	677.226	1%の危険率で差あり
-----	---------	------------

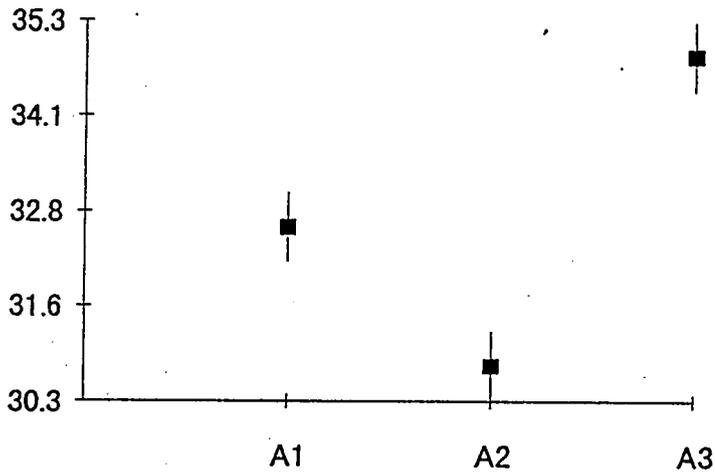


一元配置法
単要素設計法

ファイル名: EX15

	A1	A2	A3
1	31.5	31.4	34.2
2	31.6	30.4	35.5
3	33.0	30.5	35.5
4	32.3	30.9	34.3
5	33.0	30.9	35.2
6	32.0	30.5	35.4
7	33.0	32.0	35.0
8	32.8	29.8	34.1
9	33.5	30.4	33.5
10	33.5	31.2	35.9

水準間 $F=81.0313$
1%以下の危険率で有意差あり



二元配置法(繰返しのない場合)

別紙 4-2

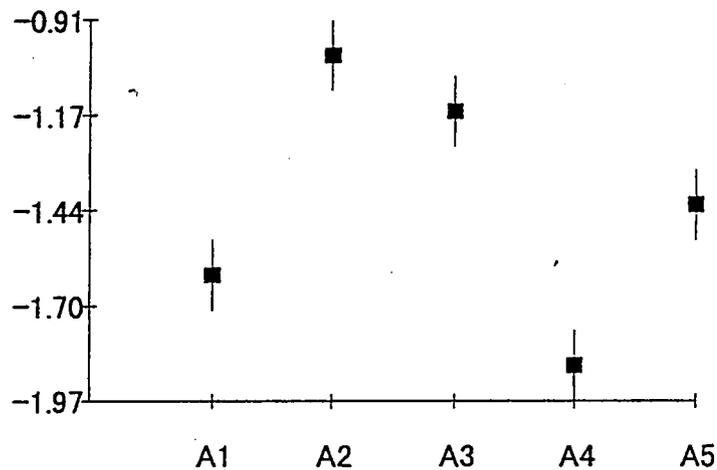
双因子設計法(不重复)

ファイル名: EX16

	A1	A2	A3	A4	A5
B1	0.033	0.119	0.062	0.014	0.039
B2	0.025	0.071	0.056	0.009	0.034
B3	0.019	0.101	0.075	0.018	0.030
B4	0.022	0.109	0.086	0.015	0.052

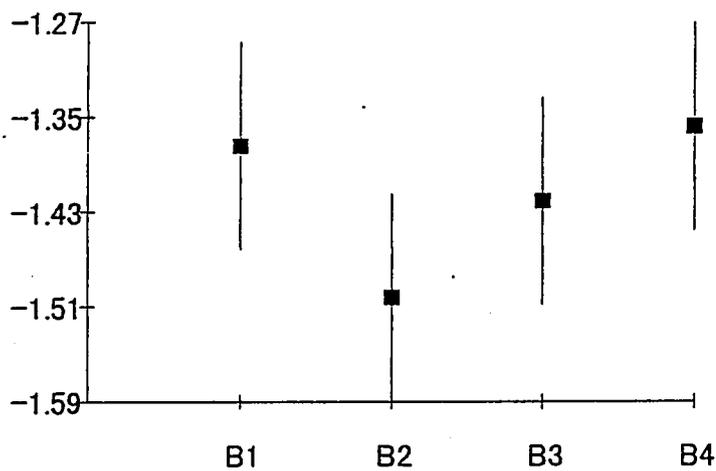
Aの水準間 F=57.83

1%以下の危険率で有意差あり



Bの水準間 F=2.56

有意差なし



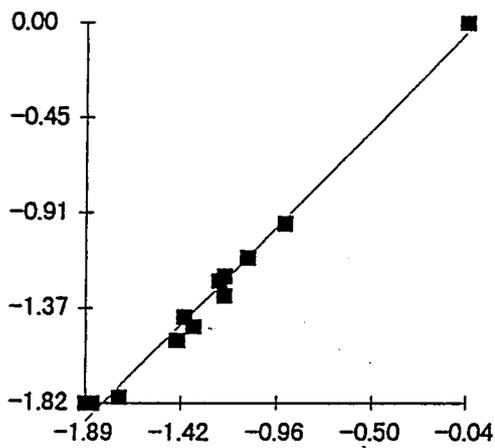
相関係数

ファイル名: EX27

	X	Y
1	0.060	0.049
2	0.043	0.035
3	0.119	0.109
4	0.036	0.030
5	0.057	0.058
6	0.013	0.015
7	0.912	1.007
8	0.060	0.061
9	0.078	0.075
10	0.014	0.015
11	0.019	0.016
12	0.039	0.039

相関係数=0.9943

1%以下の危険率で相関有意



平均値の差の検定(対応の無い場合)

別紙 4-4

平均値的差の検定(非対応設計)

ファイル名: EX07

	A1	A2
1	0.8	2.2
2	0.7	1.7
3	0.6	2.0
4	1.3	2.1
5	0.7	2.1
6	1.0	2.5
7	1.3	1.7
8	0.6	2.3
9	0.9	2.1
10	0.9	2.3

平均値=0.8800 分散=0.0662

平均値=2.1000 分散=0.0644

t=10.673

1%以下の危険率で有意差あり

平均値の差の検定(対応のある場合)
平均値的差の検定(配対設計)

別紙 4-5

ファイル名: EX06

	X	Y
1	0.022	0.019
2	0.008	0.010
3	0.049	0.040
4	0.109	0.110
5	0.076	0.051
6	0.026	0.022
7	0.064	0.055
8	0.015	0.008
9	0.052	0.048
10	0.023	0.019

平均値=-0.075

分散=0.010

t=2.427

5%以下の危険率で有意差あり

回帰分析(繰り返しのある場合)

別紙 4-6

回帰分析(裏表)

ファイル名: EX24

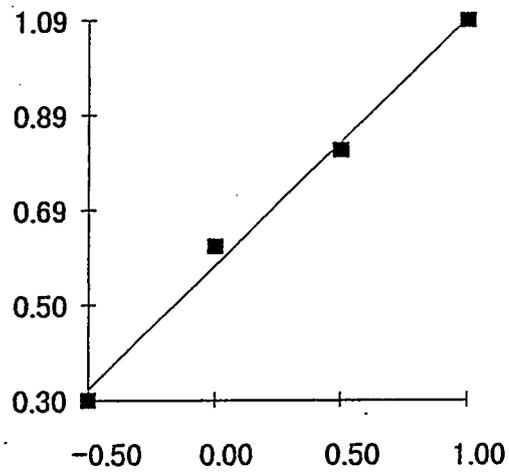
Dose	10.0	3.16	1.0	0.316
1	1.0	1.3	0.5	0.3
2	1.5	0.7	0.3	0.4
3	1.2	0.8	1.0	0.2
4	1.4	0.5	0.4	0.3
5	0.9	1.2	0.5	0.1
6	1.0	0.5	1.1	0.2
7	0.9	1.1	0.4	0.3
8	1.3	0.6	0.8	0.5
9	0.8	0.9	0.7	0.6
10	0.9	0.6	0.5	0.1

回帰 $F=54.02$ 1%以下の危険率で回帰成立

$F(1, 36, 0.01)=7.40$

直線性 $F=0.20$ 直線性成立

$F(2, 36, 0.05)=3.26$



回帰分析 (線形でない場合)
回帰分析 (不変)

別紙 4-7

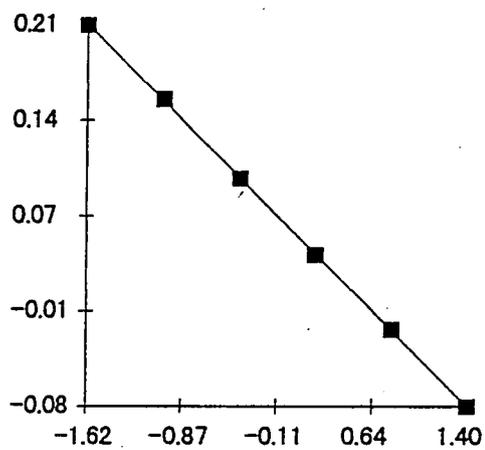
ファイル名: EX23

	X	Y
1	25.0	6.8
2	6.25	9.0
3	1.561	12.3
4	0.391	17.7
5	0.098	27.3
6	0.024	43.5

一次回帰 F=54482.2070

1%以下の危険率で一次回帰成立

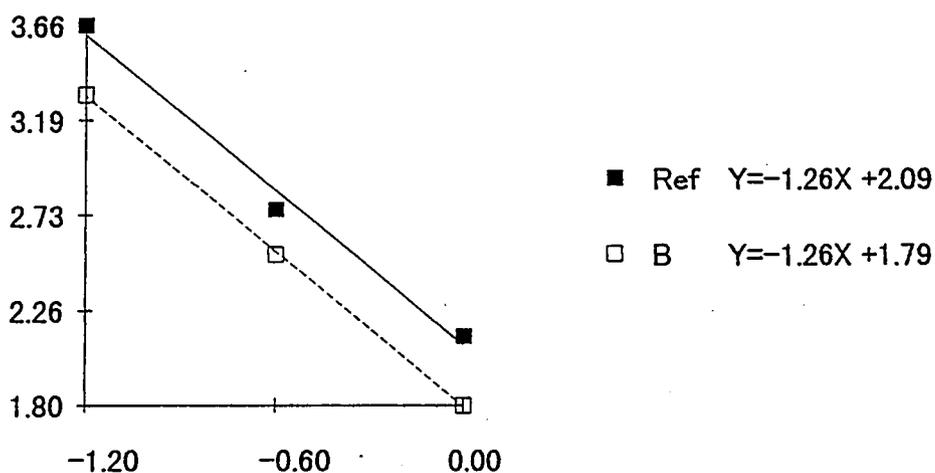
$Y = -0.098X + 0.057$



DOSE	Ref			B		
	1	0.25	0.0625	1	0.25	0.0625
1	2.3	2.6	3.6	1.6	2.4	3.1
2	1.9	2.9	4.1	2	2.6	3.2
3	2.5	3	3.7	1.4	2.9	3.3
4	2.2	2.5	3.5	2.3	2.2	3.4
5	1.8	2.8	3.4	1.7	2.6	3.6
平均	2.140	2.760	3.660	1.800	2.540	3.320
分散	0.083	0.043	0.073	0.125	0.068	0.037

標本間 F=9.44 1% Significance F(1, 24, 0.01)=7.82
 回帰 F=161.57 1% Significance F(1, 24, 0.01)=7.82
 平行性 F=0.00 No Significance F(1, 24, 0.05)=4.26
 直線性 F=0.47 No Significance F(2, 24, 0.05)=3.40

相対力価 95%信頼区間
 1.728 2.574, 1.195



プロビット法による平行線定量法
 概率単位平行線定量法

別紙4-9

ファイル名: EX302

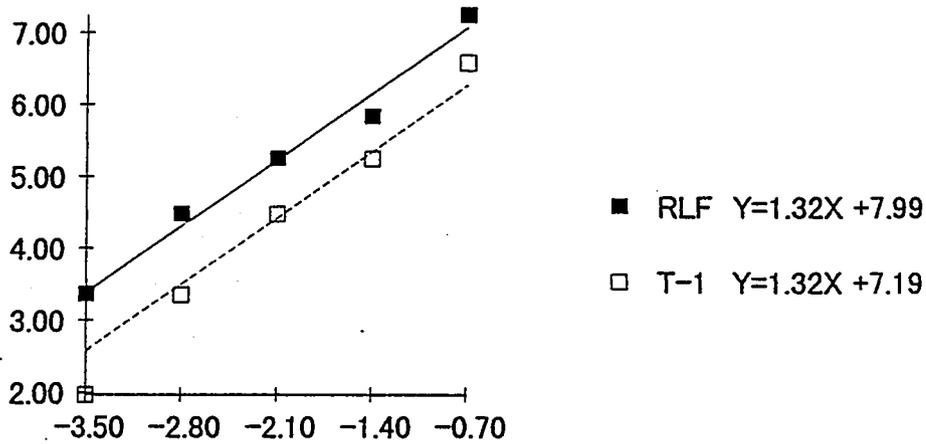
RLF		
DOSE	N	r
-0.699	20	20
-1.398	20	16
-2.097	20	12
-2.796	20	6
-3.495	20	1

T-1		
DOSE	N	r
-0.699	18	17
-1.398	20	12
-2.097	20	6
-2.796	20	1
-3.495	20	0

	LD50	95%信頼区間	直線性	Y=BX + C
RLF	0.0053	0.0097, 0.0029	成立	Y=1.233X + 7.804
T-1	0.0214	0.0380, 0.0121	成立	Y=1.477X + 7.466

共通の回帰係数	直線性	平行性
1.320	成立	成立

	相対力価	95%信頼区間
T-1	0.246	0.105, 0.549



度数分布および散布図

別紙 4-10

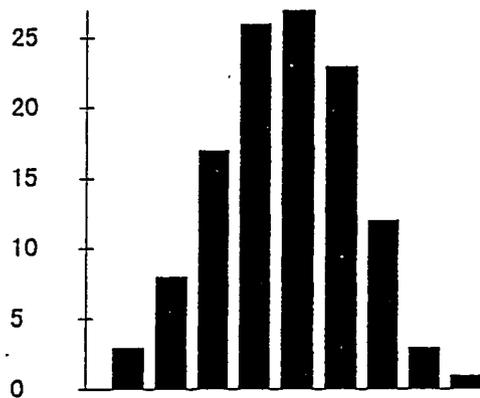
頻数分布

ファイル名: EX03

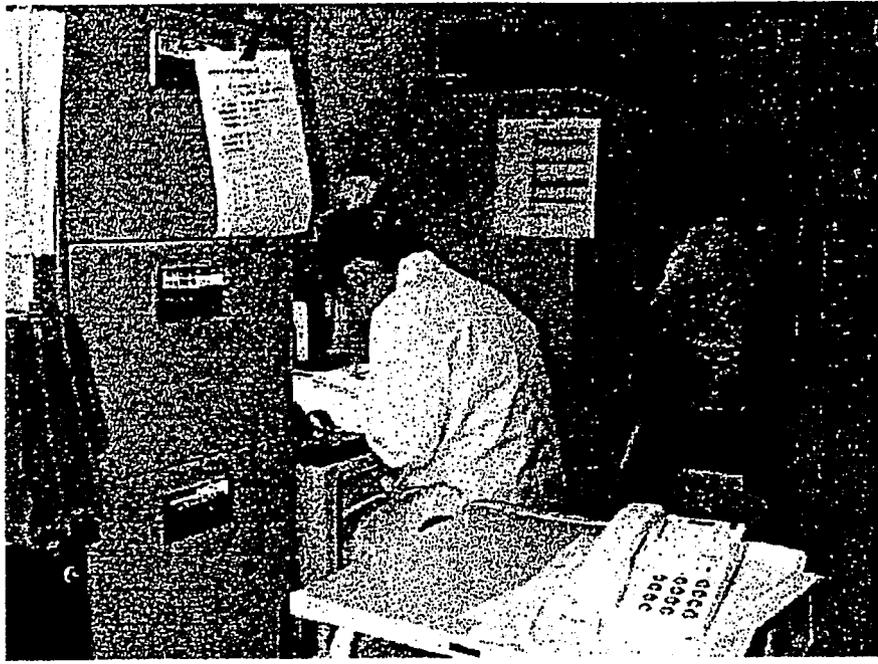
	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8
1	19	16	19	18	18	21	23	18
2	16	14	9	23	12	11	17	13
3	15	14	16	13	13	20	14	13
4	18	15	11	16	17	27	23	15
5	15	18	18	13	18	16	16	18
6	14	15	17	16	18	10	11	16
7	16	13	16	25	20	21	17	22
8	11	13	18	22	16	15	19	14
9	14	23	16	15	16	15	20	12
10	11	11	15	13	14	16	15	12
11	12	16	19	19	17	25	18	14
12	21	21	21	14	13	17	20	24
13	15	20	14	16	16	11	14	17
14	18	19	21	16	14	13	16	16
15	14	12	15	12	14	9	13	11

平均 = 1.198

分散 = 0.009



範囲	度数	
0.945	1.005	3
1.005	1.065	8
1.065	1.125	17
1.125	1.185	26
1.185	1.245	27
1.245	1.305	23
1.305	1.365	12
1.365	1.425	3
1.425	1.485	1



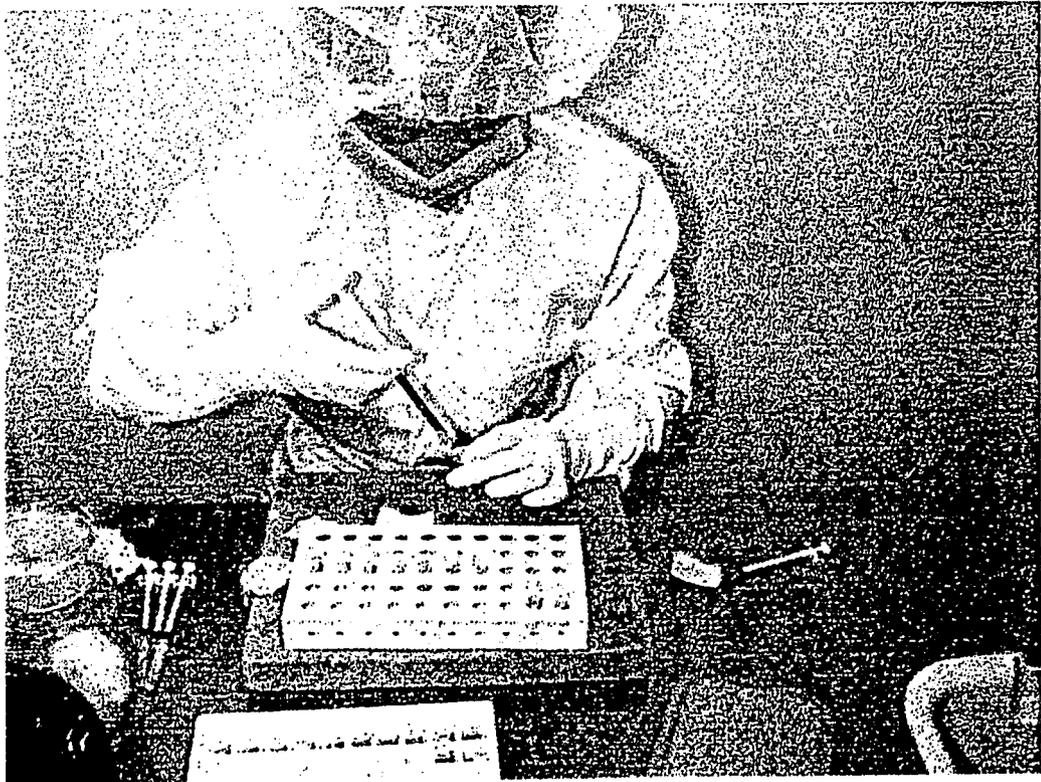
研究室で記録中の李研究員



石田先生宅で統計解析用プログラム作製



マウス免疫中の李研究員



マウス採血中の李研究員

日本財団補助金による

1998年度日中医学協力事業報告書

— 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

1999 年 2 月 10 日

研究室で撮影した本人のスナップ写真、及び発表論文等のコピーを添付

1. 招 へ い 責 任 者 加藤 照

所属機関 北海道大学歯学部歯科保存学第二講座 職名 主任 教授

所 在 地 〒 060-8586 札幌市北区北 13 条西 7 丁目 電 話 706-4266

招へい研究者氏名 王 培軍

所属機関 中国哈爾濱医科大学第一臨床医学院口腔正畸科 職名 講師

研 究 テ ー マ 歯周疾患における矯正治療 —特にMTMによる治療方法について—

2. 日 本 滞 在 日 程

- 1998年8月2日来日、札幌に入る。次日より、北海道大学歯学部歯科保存学第2講座にて研究に従事、歯周病学の臨床研修。
- 1998年10月26日より、上記の研修に加えて、北海道大学歯学部歯科矯正学講座にて臨床研修を受ける。
- 1999年2月14日、研修を終了し、帰国。

3. 研 究 報 告

別紙書式を参考に、報告本文4000字以上で報告して下さい（枚数自由・ワープロ使用）

タイトル・要旨等は日本語で、KEY WORDS以下は日本語或いは英語で記入して下さい。

研究成果の発表予定がある場合は発表原稿・抄録集等を添付して下さい。

論文発表に当っては、日中医学協会—日本財団補助金による旨を明記して下さい。

歯周疾患における矯正治療 —特にMTMによる治療方法について—

王培軍

中国哈爾濱医科大学第一臨床医学院口腔正畸科●講師

加藤 熙 北海道大学歯学部歯科保存学第二講座●主任 教授

要旨

北海道大学歯学部にて加藤熙教授の指導のもと、歯周病学、歯科矯正学の臨床、教育、研究に関する研修を受けた。特に歯周病患者をいかにして治療するか、歯周病患者に矯正治療を施すにはどのような前処置をするべきか等、実践的技術を身につけることができた。今回、研修内容の概略を記すとともに、今後中国において必要とされるであろう治療法 MTM について考察する。今回の経験を中国の歯科治療に生かし、日中の友好のために今後とも貢献したい。

KEY WORDS: Minor Tooth Movement, Periodontics, and Dentition

研究報告

During my stay in the Hokkaido University, I have been involved in clinics, education, and researches. I had learnt some articles on M.T.M written by Pro. Kato before I came to Japan. It is a good chance for me to come to the Dental School, Hokkaido University and study under the supervision of Pro. Kato. I learnt not only some basic knowledge of Periodontics, but also basic practices on periodontal patients here.

In the clinic, I attended both periodontal clinic and orthodontic clinic. I learnt basic clinical skills of periodontal treatment, i.e. periodontal pocket probing, scaling/root planning, and minor surgeries. Because I had a lot of experience in orthodontics in China, attending Japanese orthodontic clinic is a good opportunity for me. I saw a lot of new skills, i.e. Lingual Arch, Edgewise appliance, chin caps, etc. I also learnt how to do orthodontic treatment for periodontally involved patients. In many cases, elimination of inflammation is

needed prior to orthodontic treatment. Otherwise, orthodontic force will affect the tissue as a traumatic force.

I helped teaching students during my stay. The pre-clinical training impressed me deeply because the students were using the equipment as similar as the real clinical ones. It was benefit to the students in learning clinical skills on models. The attitude of seriousness towards working has been developed before they work on the patients.

I was involved in some researches within the period. One of the researches was focused on the occlusal traumatism. Normal occlusal force or even minor orthodontic force can be worked as a traumatic force when the gingival condition is not healthy. Cats were used for the experiment and 100g of orthodontic force was applied to the artificially made animal models. In the pathologic observation, Osteoclastic (bone resolving cell) activities were found around the tooth. This experiment is still underway.

I would express my thankfulness to the Medical Committee of Japan-China for supporting me during the study. When I go back to my country, I will share my experience and technique with my colleague and teach my students. I am sure it will be helpful to our school and our country. I will also contribute to the friendship between Japan and China, the Hokkaido University and Harbin Medical University in the future.

I would review the articles on Minor Tooth Movement (M.T.M) which is not so common in China yet. I think it is very important to learn this technique because it is an easier and less time taking technique.

* * * * *

Minor Tooth Movement (M.T.M) is defined as a limited tooth movement within a few teeth. It differs from the Major Tooth Movement in that it uses minor orthodontic force in a limited teeth range. M.T.M can deal with most of the dental disorder rather than skeletal dysplasia. It does not take very long period of treatment as the Major Tooth Movement.

In most cases, M.T.M works as one phase of the periodontal treatment. It has been widely used in correcting displaced teeth caused by alveolar bone loss or teeth loosening.

The indications for the use of minor tooth movement may be categorized in eight main classes: esthetic purposes, prosthetic purposes, periodontal purposes, procedural purposes, interception of malocclusion in the developing dentition, prevention of pathology of the oral tissues, correction of speech defects, and facilitation of oral surgical procedures.

The etiologic factors causing malposition of the teeth may be grouped into four main categories: hereditary, congenital, systemic, and locally acquired factors. Any one of these factors may be responsible for the malocclusion. The acquired local factors components of the occlusal forces, improper position and distribution of teeth, occlusal attrition, periodontal disease, inadequate restorations, pernicious habits, inadequate or misdirected muscular activity, and labial freni.

FACTORS OF MALOCCLUSION

One of the primary characteristics of periodontal disease is the loss of the alveolar support of the affected teeth. Forces of a magnitude insufficient to move a tooth with normal alveolar bone may cause movement of a tooth with reduced support. When a force is applied to a tooth, resistance to movement is

derived partly from the periodontal fibers attached to the bone and tooth on the side from which the force comes.

When the periodontal pocket is palatal to an anterior tooth, the tooth is moved labially, since the thin labial plate and the restraining forces of the lip may not offer sufficient resistance. When periodontal treatment removes the granulation tissue and the pocket heals, the force acting to move the tooth is eliminated. Pressure of the lip in the opposite direction frequently will move the malposed tooth back to its original position if occlusal and other forces are no longer present.

Periodontal disease is often characterized by gingival enlargement as a result of inflammation and edema. Gingival enlargement associated with several systemic diseases, with fibromatosis, and with the use of Dilantin sodium, can cause migration.

The tongue is an active force in the development and maintenance of the normal positions of the teeth. The morphology, physiology, coordination, and mode of function of the patient's tongue should be evaluated for their influence on the dentition.

CASE SELECTIONS

The choice of cases suitable for minor tooth movement is based upon knowledge of the objectives that can be obtained by the procedures and an understanding of their limitations. A thorough examination is essential for successful selection because what may appear at first to be a minor malposition may really be part of a generalized malocclusion or malrelationship. If the diagnosis is not correct, the proposed movement procedure may cause

unexpected side reactions or a final result that may be worse than the present malposition.

Minor movement techniques may be considered if most of the teeth are in correct relationships, if the malpositions are limited to relatively few teeth, and if the desired movement is not more than a few millimeters. In the case of extruded teeth the degree of extrusion is especially important, since extensive depression is difficult to achieve.

FORCES APPLIED FOR MINOR TOOTH MOVEMENT

All tooth movement is the result of the application of forces to the crowns of the teeth being moved. The response of the tooth and the direction of movement are determined by the type and direction of forces applied, modified by the resistance of the periodontium and the opposing forces.

To produce movement, forces may be derived from the effort of a metal wire to resist distortion by returning to its passive position after it has been displaced. Forces also may be obtained from the ability of rubber or elastic acrylic to return to its passive state after having been stretched or compressed. Methods used for minor tooth movement component of acrylic-and-wire appliance, fixed arch wires, labial arch appliance, lingual arch appliance, sectional arches, steel alloy wire ligatures for anchorage, soft rubber tooth positioners, elastic acrylic positioners, contracting silk ligatures, bite plates and bite planes, tongue depressors, functional appliances and depressor appliances.

M.T.M AND ADULT

Minor tooth movement and complex orthodontic procedures are frequently indispensable in the rehabilitation of the adult dentition. Tooth movement can make the apparently untreatable case manageable. The esthetics of

periodontal and prosthetic treatment can be enhanced. Repositioning of teeth can frequently correct abnormal and eccentric function of the mandible and thus provide a sound basis for subsequent restorative procedures. By correcting abnormal axial inclinations and tooth relationships and by improving anatomic and functional relationships of the teeth and jaws, the number of abutment and crowned teeth frequently can be reduced.

M.T.M AND CHILDREN

Minor tooth movement must be applied with full understanding of the growth and development of the dentofacial complex. In a basically normal occlusion early retraction of a severely protruding maxillary incisor to correct abnormal muscle function and habits of the lip and tongue may be desirable therapy. Minor movement procedures play an important role in the prevention and interception of developing malocclusions but cannot be considered as early stages of orthodontic treatment.

* * * * *

In China, lots of patients are waiting for the periodontal and orthodontic treatment. Time and money for the treatment needs to be taken in consideration. M.T.M is an appropriate technique for answering to these demands. As I could cover both periodontal and orthodontic field, I will do my best to become a pioneer of this technique through my continuous studying and practice.

I would express my thankfulness to Professor Hiroshi Kato and Lecturer Ryuji Sakagami in the Periodontal Department, to Associate Professor Tohru Imai in the Orthodontic Department as well as to the School of Dentistry, Hokkaido

University. I would also express my thankfulness to the Medical Committee of Japan-China for supporting me during the study.

参考文献

1. A.Geiger/L.Hirschfeld 著, 加藤 熙 訳: 一般臨床における MinorTooth Movement. 医歯薬出版株式会社
2. Leonard Hirschfeld, & Arnold Geiger: Minor tooth movement in general practice. Second edition. THE C. V. MOSBY COMPANY, 1966
3. Joseph M. Sim: Minor tooth movement in children. The C.V.Mosby Company, 1972

日本財団補助金による

1998年度日中医学協力事業報告書

— 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

1999年 3月 12日

研究室で撮影した本人のスナップ写真、及び発表論文等のコピーを添付

1. 招 へ い 責 任 者 山田陽城 

所 属 機 関 (社) 北里研究所 職 名 理事

所 在 地 〒 108-8642 東京都港区白金5-9-1 電 話 03-5791-6174

招 へ い 研 究 者 氏 名 馬 百平

所 属 機 関 北京放射医学研究所 職 名 助理研究員

研 究 テ ー マ 和漢生薬エキス中の低分子性腸管免疫調節物質の解明

2. 日 本 滞 在 日 程

馬 百平 氏は平成10年9月24日に来日し、翌日より研究を開始した。これまで順調に研究が進行しており、本課題での研究の完了にはさらに1年を要するため、馬 百平氏は2年間北里研究所・東洋医学総合研究所において研究を行う予定になっている。平成11年4月1日からは、北里研究所より経済的なサポートを受けて研究を続行する予定である。また、得られた研究成果については、貴協会からの助成による研究成果も含めて馬 氏の帰国前に日本国内で開催される関連学会にて発表、学術誌に投稿する予定である。

3. 研 究 報 告

別紙書式を参考に、報告本文4000字以上で報告して下さい（枚数自由・ワープロ使用）

タイトル・要旨等は日本語で、KEY WORDS以下は日本語或いは英語で記入して下さい。

研究成果の発表予定がある場合は発表原稿・抄録集等を添付して下さい。

論文発表に当っては、日中医学協会—日本財団補助金による旨を明記して下さい。

研究テーマ：和漢生薬エキス中の低分子性腸管免疫調節物質の解明

研究者氏名：馬 百平

中国での所属・役職：北京放射医学研究所・助理研究員

招聘者氏名・所属・役職：山田陽城 (社) 北里研究所・理事

要旨

漢方薬の構成生薬の熱水エキスについて腸管免疫調節活性の検討を行った結果、TI-147が活性を有していることが明らかとなった。TI-147の熱水抽出エキスのEtOHやMeOHを用いた分画、ゲルろ過および疎水性クロマトグラフィーによりTI-147中には粗多糖画分に分画される高分子性の腸管免疫調節物質と低分子性活性物質が含まれることが示唆された。また、TI-147からの直接のMeOH抽出による低分子性活性物質の分画についても検討し、活性物質がMeOH可溶性の比較的高極性物質として分画できることを明らかとした。

KEY WORDS

腸管免疫調節活性、パイエル板、漢方薬、構成生薬、活性物質

研究報告

【目的】漢方薬の煎液や市販エキス製剤は経口的に投与されることから、漢方薬中の薬効成分は消化管より吸収され、生体内機構に直接作用すると考えられる。一方、消化管にはパイエル板等の腸管免疫系が存在している。腸管免疫系は近年その詳細が明らかにされてきた生体内機構で、腸管内での細菌感染に対する防御バリアーの形成や食物アレルギーに代表される免疫寛容の調節に関与している¹⁾。また、腸管上皮やパイエル板中のT細胞は、腸管上皮から鼻粘膜等の他の粘膜組織に移行し(ホーミング)、これらの粘膜系の制御を行うことも明らかとなっている。さらに腸管上のT細胞は、Interleukin-6 (IL-6)やTumor necrosis factor (TNF)などのサイトカインを産生し、粘膜局所のみならず全身免疫系や造血系などの生体内機構を調節すると考えられている。これらのことから、漢方薬中の薬効成分が腸管免疫系を介して間接的に作用する可能性が考えられる。著者らはこれまでに重要漢方処方の一つである十全大補湯が腸管パイエル板中のT細胞を活性化し、骨髄細胞の増殖促進因子としての機能を有するIL-6や顆粒球-マクロファージコロニー産生促進因子(GM-CSF)などのサイトカイン産生を促進させる作用を有することを明らかとした²⁾。このことから、漢方薬の構成生薬中に腸管免疫系を調節する薬効発現物質が含まれている可能性が考えられ、本研究で検討を行った。

【方法】腸管免疫調節活性の測定：以下のように招聘者の研究グループで確立した方法にもとづいて測定した²⁾。

1) パイエル板細胞の調製

雌性C3H/HeJマウス(7~8週令)を脊髄脱臼後、眼科用ハサミを用いて消化管よりパイエル板を切り出した。このパイエル板を氷冷した5%牛血清アルブミン(BSA)含有ハンクス培地にとり、これをステンレスメッシュ(200 mesh)上で3~5mLのディスプレイ

ザブル注射器のゴムラバー付き内筒を用いてすりつぶすことによりパイエル板細胞を遊離させた後、3~5mLのデスポーザブル注射器を用いて50mLファルコンチューブに本液を採取した。さらに、Vortexミキサーを用いて攪拌することにより完全に分散させ、ステンレスメッシュ(200 mesh)で濾過後、遠心分離を行った(1200rpm, 4℃, 5min)。培地をデカンテーションすることによりパイエル板細胞を得た。本細胞について5% BSA含有ハンクス培地(10mL)を用いて2回同様の操作を繰り返すことにより細胞を洗浄後、5% ウシ胎児血清(FBS)含有RPMI-1640培地を用いて $2\sim 3 \times 10^6$ cell/mLのパイエル板細胞懸濁液を調製した。本懸濁液(180 μ L/well)を96穴マイクロタイタープレートに分注後、サンプル溶液(0~1000 μ g/mL, 20 μ L)を加えて5% CO₂インキュベーター(37℃)にて5日間培養した。

2) マウス骨髄細胞の調製と培養

雌性C3H/HeJマウスを脊髄脱臼後、大腿骨を摘出した。両骨頭を眼科用ハサミで除去後、3~5mLのデスポーザブル注射器を用いて5% BSA含有ハンクス培地により骨髄細胞を50mLファルコンチューブに押し出し採取した。本液をVortexミキサーを用いて攪拌することにより骨髄細胞を分散させ、ステンレスメッシュ(200 mesh)で濾過した後、遠心分離を行った(1200rpm, 4℃, 5min)。デカンテーション後、5% BSA含有ハンクス培地を用いて細胞を洗浄後、得られた骨髄細胞を5% FBS含有RPMI-1640培地(10mL)を用いて懸濁した。細胞集塊が残る時は上記の方法により濾過した。得られた細胞浮遊液を 2.5×10^5 cell/mLに調製し、骨髄細胞懸濁液とした。96穴マイクロタイタープレートに1)で得たパイエル板細胞培養上清(50 μ L/well)、5% FBS含有RPMI-1640培地もしくは25% ウマ血清(50 μ L/well)を加え、本溶液中に上記のように調製した骨髄細胞懸濁液(100 μ L/well)を加えて5% CO₂下37℃で5~6日間培養した。

3) 骨髄細胞数の計測

2)で培養した骨髄細胞を含む96穴マイクロタイタープレートにAlamar Blue溶液(20 μ L/well, Biosource社)を添加後、プレートミキサーで5分間攪拌し、37℃、5% CO₂下、数時間インキュベーションした。この溶液について蛍光プレートリーダー(大日本製薬製)を用いて励起波長544nm、測定波長590nmで蛍光強度を測定し、増殖した骨髄細胞数を計測した。またサンプルのかわりとして精製水もしくは5%メタノールを用いてパイエル板を培養したものをコントロールとし、コントロールによる骨髄細胞数に対するサンプルによる骨髄細胞数の増殖率を腸管免疫調節活性とした。

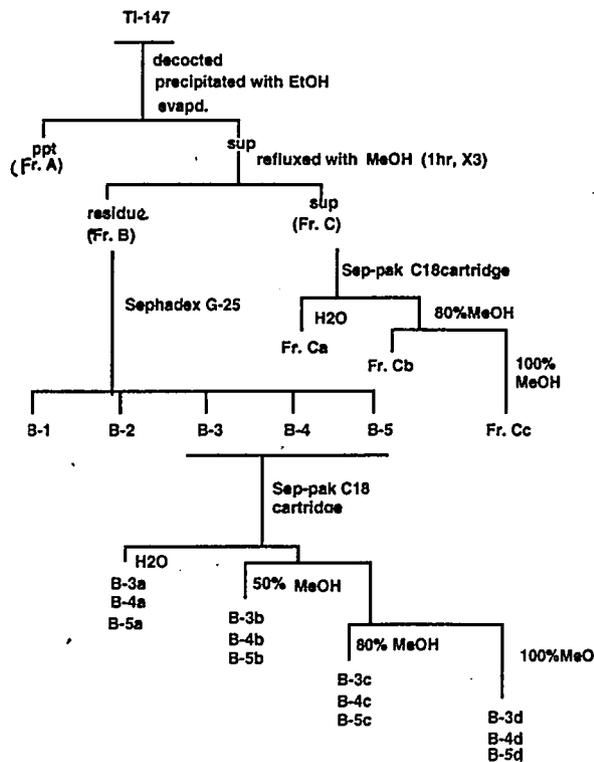
【結果】

1 和漢生薬の熱水抽出エキスからの腸管免疫調節物質の分画

漢方薬の構成生薬のうち数種の熱水抽出エキスについて腸管免疫調節活性の検討を行った結果、TI-147に高い活性が認められたことから、本生薬中に低分子性の腸管免疫調節物質が含まれている可能性について検討を行った。

TI-147の熱水抽出エキスについてEtOH沈殿、MeOHでの還流および透析を行うことにより粗多糖画分(Fr. A)、MeOH不溶性-EtOH沈殿上清画分(Fr. B)、MeOH可溶性画分(Fr. C)を得た(Scheme 1)。さらにFr. BについてはSephadex G-25を用いたゲルろ過により分画し、分子量の大きさに従いB-1~B-5までの5画分を得た(Scheme 1)。これらの画分について腸管免疫調節活性を検討した結果、Fr. AとともにB-3、B-4およびB-5に強い活性が認められたが(Fig. 1)、他の画分は不活性であった。B-3~B-4には低分子性の活性物質が

含まれていることが推定されたことから、次にB-3~B-4についてSep-pak C₁₈カートリッジを用いた疎水性クロマトグラフィーにより分画することを試みた。その結果、未吸着画分(B-3a~B-5a)、50% MeOH溶出画分(B-3b~B-5b)、80% MeOH溶出画分(B-3c~B-5c)および100% MeOH溶出画分(B-3d~B-5d)を得た(Scheme 1)。これらの画分について腸管免疫調節活性を検討した結果、100% MeOH溶出画分のみが高い活性を示し、活性強度はB-5d>B-4d>B-3dであった(Fig. 2)。B-3d~B-5dは低分子物質であることが推定されたことから、これらの画分をTLCを用いて比較検討した(Silica gel, CHCl₃-MeOH = 20 : 1)。その結果、これらの画分中には共通してRf値0.01, 0.11, 0.38付近に展開されるスポットが観察され、活性画分中には有機溶媒で展開可能な低分子性の活性物質が含まれることが示唆された。



Scheme 1 TI-147からの腸管免疫調節物質の分画

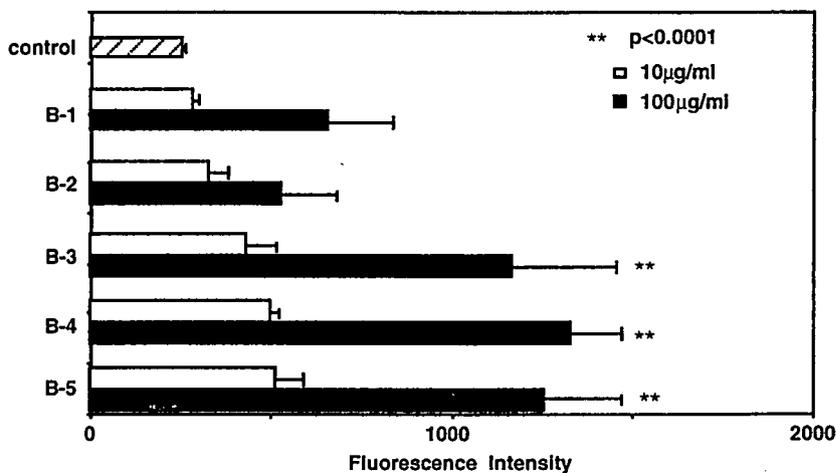


Fig. 1 TI-147の分画画分の腸管免疫調節活性

2 TI-147からの腸管免疫調節物質の分画法の改良

前述のようにTI-147には低分子性の腸管免疫調節物質が含まれていることが示唆された。前法では熱水抽出エキスからの検討を行っているため、構造解析に十分な量の活性物質を精製することが煩雑であると考えられた。そこで次にMeOH抽出法を用いた分画法について検討した。TI-147をソックスレー抽出器を用いてMeOHにより抽出後、MeOHエキスについてethyl ether、CHCl₃、AcOEt次いでn-BuOHを用いて順次分配し、各分画画分を得た(Scheme 2)。これらの画分について腸管免疫調節活性を測定したが、いずれの

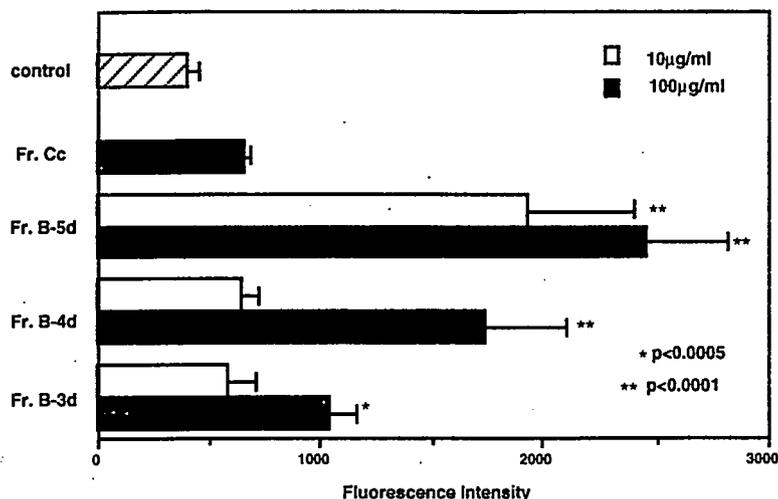
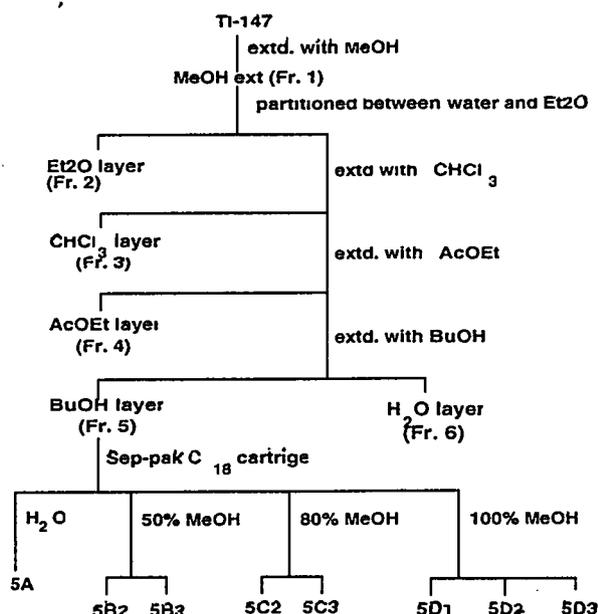


Fig. 2 TI-147より得られた低分子画分の腸管免疫調節活性

画分も活性は認められなかった。これらの画分のうち比較的収量が高く、前述の活性物質が分画されると考えられる高極性画分[n-BuOH (Fr. 5)画分]についてSep-pak C₁₈カートリッジを用いてさらに分画した。Fr. 5をSep-pak C₁₈カートリッジに添加後、未吸着画分を水を用いて溶出させ、さらに吸着画分を50%, 80%次いで100% MeOHにて溶出させた。この際、各MeOH液での溶出においてカートリッジ上で数種のバンドが観察されたことから、各バンドごとに分取し(Scheme 2)、各画分について活性を測定した。その結果、100% MeOH溶出画分のFr. 5D3に最も強い活性が観察され、5D1と5D2も活性を有していた(Fig. 3)。さらにTI-147をMeOHを用いて還流抽出した場合においても同様の結果が得られ、以上のことから、TI-147中の低分子性腸管免疫調節活性物質はMeOHにより抽出可能であることが示された。



Scheme 2 TI-147からの直接MeOH抽出法による活性成分の分画

【考察】今回、和漢生薬の一つであるTI-147中のパイエル板を介した腸管免疫調節物質の検索を行った結果、TI-147中には高分子性の腸管免疫調節物質とともに低分子性の活性物質がいずれも含まれていることが明らかとなった。これまでTI-147に腸管免疫調節活性を有する低分子化合物が含まれていることは報告されていない。またTI-147に含まれる代表的な既知化合物について活性の検討を行った結果、いずれの化合物も活性を示さず、特異な活性物質が含まれていることが推定された。現在TI-147について大量に分

画を行い、活性物質の精製を行っている。

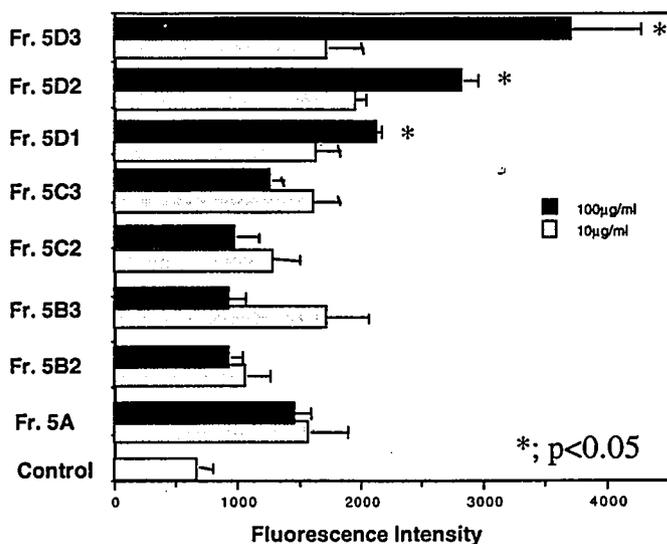


Fig. 3 TI-147から直接MeOH還流により得られた分画画分の腸管免疫調節活性

【参考文献】

- 1) P.L. Ogura, J. Mestecky, M.E. Lamm, W. Strober, J. Bienenstock and J.R. McGhee (Eds.), Mucosal Immunology, Academic Press, New York (1999).
- 2) T. Hong, T. Matsumoto, H. Kiyohara and H. Yamada: Enhanced production of hematopoietic growth factors through T cell activation in Peyer's patches by oral administration of Kampo (Japanese herbal) medicine, Juzen-Taiho-To, Phytomedicine, 5, 353-360 (1998).

日本財団補助金による

1998年度日中医学協力事業報告書

－日本人研究者派遣－

1998年12月14日

財団法人日中医学協会

理事長 中島章 殿

講演・手術指導等の写真を添付して下さい。

1. 訪中者氏名 一瀬幸人



所属機関名 国立病院九州がんセンター

職名 呼吸器部部長

所在地 福岡市南区野多目3-1-1

電話 092-541-3231

受入機関名 遼寧省腫瘍医院

所在地 遼寧省瀋陽市大東区小河沿路44号

受入責任者名・役職 柏和（院長）

2. 中国滞在日程（訪問都市・機関名等主な日程を記入して下さい）

1998年10月 9日 瀋陽市着

10日 遼寧省腫瘍医院

11日 //

12日 帰国

3. 交流報告

（別添書式を参考に、講演・指導内容、訪問地の状況・課題、今後の交流計画等を4000字以上で報告して下さい。

ワープロ使用）

交流テーマ：講演及び臨床研究の検討

訪中研究者氏名 一瀬幸人

所属 国立病院九州がんセンター

役職 呼吸器部部長

報 告

I. 講演「進行非小細胞肺癌の治療－現状と今後の展開－」

1. 従来薬による化学療法の有用性の検討

進行非小細胞肺癌(NSCLC)に対する化学療法の有用性に関しては、1995年にNSCLC共同研究グループ(Non-Small Cell Lung Cancer Collaborative Group)が、11臨床試験のメタアナリシスの結果を報告している。それによると、支持療法に加えてシクロホスファミド(CPA)などのアルキル化剤を長期に用いた群と支持療法を単独で行った群では、むしろ抗癌剤を服用させた方が予後不良という成績になっている。

また、支持療法単独群に比べて、シスプラチン(CDDP)を中心とした治療群ではハザード比が0.73で1.5カ月の生存期間延長が認められているが、標準的治療法となるほどの有用性はなく、さらに効果的な新規抗癌剤の出現が待たれていた。

2. 新規抗癌剤の登場で向上した奏効率

近年、パクリタキセル(TXL)、ドセタキセル(TXT)、ビノレルビン(VNB)、ジェムシタビン(dFdC)、イリノテカン(CPT-11)などの新規抗癌剤が相次いで登場した。これらの抗癌剤をNSCLCに対して単独使用した結果、奏効率は20%～30%、生存期間中央値(MST)は30週～40週であったと報告されている。

次に、これら抗癌剤とプラチナ製剤(主にCDDP)を併用すると奏効率は40%台となり、これまでの標準的併用療法とされていたビンデシン(VDS)+CDDPあるいはエトポシド(VP-16)+CDDPを確実に上回る。たとえばTXL+CDDPとVP-16+CDDPの両群間で第III相比較臨床試験を行った米国ECOGでの成績(n=560)では、TXL+CDDPの奏効率は26.5%、MST9.6カ月(TXLの用量は135 mg/m²/24h)、VP-16+CDDPの奏効率は12.0%、MST7.4カ月であった。前者の奏効率は後者の2倍であり、生存についても良好である。この結果ECOGでは、TXL+CDDPをNSCLCに対する化学療法のスタンダード・レジメンの一つとしている。

3. 最も有用なレジメンをめぐる種々の臨床試験

NSCLC の治療に新規抗癌剤を用いる場合、どのようなレジメンが最も有用であろうか。そのようなレジメンの検討についてもすでに種々の臨床試験が行われている。たとえば ECOG では TXL+CDDP、TXL+カルボプラチン (CBDCA)、TXT+CDDP、dFdC+CDDP 間で、SWOG では TXL+CBDCA、VNB+CDDP 間で有用性の比較検討が始まっている。

わが国では、これら新規抗癌剤のうち TXT と CPT-11 が承認済みであり、他の 3 剤は現在申請中である。TXT+CDDP と VDS+CDDP、CPT-11+CDDP と VDS+CDDP、あるいは VNB+マイトマイシン(MMC)+CDDP と VDS+MMC+CDDP などの間で臨床比較試験が行われている。

4. 既存の抗癌剤の再評価

新規抗癌剤に期待が集まる一方で、既存の抗癌剤の見直しも行われつつある。そのような薬剤の一つとして、テガフルとウラシルの合剤である UFT が現在注目されている。

まず、予備的臨床試験として、31 例の進行 NSCLC (n=31) を対象に UFT と CDDP を同時投与する併用療法を行った。その結果、奏効率は 35% と高く、さらに驚くべきことに有害事象としてグレード 3、4 の骨髄抑制がわずか 6% であった。骨髄抑制は VDS+CDDP のレジメンでは数 10% に出現し、VDS+MMC+CDDP といったレジメンでは大部分に発現している。したがって、UFT+CDDP による骨髄抑制の発現率が一桁台ということはきわめて注目に値する。そこで、新たに UFT の肺癌に対する有用性を検討するグループ (Japan UFT Lung Cancer Study Group) が組織され、多施設間での検討が行われた。対象はステージ IIIB (32%)、ステージ IV (68%) の 108 例の NSCLC で、UFT 400 mg/m² × 14 日 + CDDP 80 mg/m² (8 日間) を 3~4 週間隔で投与した (UFT の最大投与量は 600 mg/body)。その結果、103 例の評価可能例のうち CR 1 例、PR 29 例で、全奏効率は 29.1% であった。層別解析では、ステージ IIIB の方が IV に比べて高い奏効率が得られた。

MST は 40 週、1 年生存率は 39% で、前述の新規抗癌剤の成績と比べても遜色がなかった。さらにグレード 3 の毒性も白血球減少がわずか 0.9% と、非常に安全性が高いことが確かめられた。したがって UFT は今後、新規抗癌剤と並んで第 III 相臨床試験の候補に上げられるべき薬剤と考えられる。

5. 主流を占める化学療法と放射線療法の同時併用

現在の局所進行 NSCLC に対する治療は、放射線単独療法よりも化学療法との併用療法が主流となりつつある。これは米国の大規模第 III 相試験の結果を反映したものである。しかしその効果は、化学療法後に継続して放射線療法を行った群が、放射線単独治療群に比して MST を 2~4 カ月延長させる程度に

すぎない。

一方、抗癌剤には放射線の増感作用が期待できることから、最近では化学療法と放射線療法を同時に併用する方が継続して行うより優れているとする報告が増えつつある。TXL+CBDCA にさらに放射線療法を同時併用した場合の奏効率は 80%弱、1年生存率が 63%と報告されている。ただし、この場合は食道炎を高頻度に併発し、骨髄抑制も強く、こうした問題の克服が化学療法と放射線療法の同時併用における今後の課題といえよう。

われわれは UFT+CDDP の毒性がきわめて低かったことから、本療法と放射線療法の同時併用についても第II相試験を行っている。対象は切除不能 IIIA 及び IIIB の NSCLC で、PS (performance status) が 0~2 の全 17 例である。UFT は 400 mg/m^2 を 52 日の治療期間中連日、CDDP は 80 mg/m^2 を 3 週間おきに 3 回投与し、放射線療法は 1 回 1.6 Gy を週 5 回、計 60.8 Gy 照射した。結果は PR 16 例、MR 1 例で、全例に反応が認められ、1年生存率は 80.4%であった。また安全性の検討では、骨髄抑制が約 60%にみられたが、その他の毒性は軽微で、重篤な食道炎や呼吸器障害などの副作用は認められなかった。

以上の成績から、UFT+CDDP、さらに放射線療法の同時併用は NSCLC の治療に有用であり、今後全国的規模で検討するに値すると考えられる。

II. 臨床研究の検討

1. 中国医学の実状

昨年、遼寧省腫瘍医院での講演の後、院長及び肺癌診療部門の医師より、肺癌患者を対象とした臨床研究の開発について相談を受けていた。そこで帰国後、遼寧省腫瘍医院より当院に研修に来ていた二人の肺癌専門医と話し合い、以下の臨床研究を行うことを相談し柏和院長より了承を得ていた。

- ①「開胸時発見された癌性胸膜炎に対する Hypotonic cisplatin treatment (臨床第II相試験)」
- ②「臨床的 T2N0、T1,2N1 症例に対する術前化学療法 (第III相試験)」
- ③「局所進行非小細胞肺癌患者における化学放射線同時併用療法と放射線療法との比較 (第III相試験)」

これらの研究課題は症例数、医療費の面でも実行可能であるということであったが、1998年8月の時点で腫瘍医院に研究の進捗状況を尋ねたところ何も始まっていないばかりかプロトコールもないということであった。今回の訪中にて以下の事柄が明らかとなった。

- 1)臨床研究の内容、必要性について実は理解していない。
- 2)個々の staff の力が強く group で一つの研究を押し進める土壤がない。

2. 指導内容

上記の2点を踏まえ、胸部外科、内科、放射線科の総ての staff に集まって貰い、臨床研究の必要性を強調し、個々の研究課題の質疑応答を行った。

また、第III相試験は研究体制が不備なため実行不可能と考え、第II相試験へと変更した。

①、②については現地の data を基にプロトコールを作製し、③については本邦のプロトコール（来年1月より研究開始予定）を送付することにした。

III. 今後の交流計画

遼寧省腫瘍医院の客員教授として年に1度は講演を予定している。また上記の臨床研究が軌道に乗れば、研究が適正に行われているかまた論文としてまとめる方法などの指導を行う予定である。

肺癌の増殖・進展に関する細胞増殖因子ならびに細胞外基質の発現
についての研究指導

日本大学医学部病理学教室

教授 根本則道

【目的】 笹川医学奨学金第 19 期研修生、北京胸科医院主治医師 席 家寧氏ならびに黄 衛祖院長の要請にもとづき、1998 年 9 月 26 日から 10 月 2 日の日程で北京市北京胸科医院を訪問した。今回の訪中目的は席 家寧氏が第 19 期研修生として日本大学医学部病理学教室で研究に携わった「肺癌の増殖・進展に関する細胞増殖因子ならびに細胞外基質の発現についての研究」を北京胸科医院において継続するための環境を整備すること、また、学術ならびに文化交流を通じて日中両国の一層理解と信頼を深めることにあった。

【講演・指導内容ならびに学術交流】 席 家寧氏はすでに本学における研修期間中の研究成果を平成 9 年 10 月、上海で開催された第 4 回国際病理アカデミー中国支部・中国病理学会合同会議において「Expression of TGF β , bFGF and FGF-Receptor(FGFR) in pulmonary neuroendocrine tumors」として発表している。今回の訪問では研究指導の一環として医師、検査技師、看護婦を対象とした講演を行った。テーマは「気管支・肺ならびに縦隔の神経内分泌腫瘍の細胞診断学」で、席 家寧氏との共同研究の内容にも一部関連している。細胞診断学は病理診断の一要素をなすものであり、わが国では広く用いられている。とくに、穿刺吸引細胞診は組織診に比較してより低侵襲性であり、また廉価であるが、的確なサンプリングが行われれば得られる医療情報はきわめて大きい。そのためには種々の病態における細胞像を的確に把握することが必要不可欠である。呼吸器領域についても通常の剥離細胞診に加え、穿刺吸引細胞診の持つ有用性は図り知れないものがある。神経内分泌腫瘍には低悪性度のものから高悪性度までであるが、各々の細胞像には特徴があり、その特徴を理解することは呼吸器領域における神経内分泌腫瘍の診断にきわめて有用であることを強調した。近年、Gastrin releasing peptide (GRP)は肺小細胞癌の自己増殖因子の一つであることが明らかにされている。このペプチドの腫瘍内局在ならびに血清値の測定は、本腫瘍の確定診断のみならず腫瘍の進展や治療後の再発などのモニタリングにもきわめて有用である点を示した。一方、研究面では神経内分泌腫瘍に限らず、腫瘍の増殖における種々の増殖因子とその受容体 (bFGF、bFGF-Receptor(FGFR)、TGF- β s) ならびに細胞外基質タンパクの発現が重要な役割を担うことを明らかにしてきた。今回の訪問では bFGF、FGFR、TGF- β s 免疫組織化学的方法に加え、これら増殖因子を含むサイトカインならびに受

容体タンパクの mRNA の局在を In situ hybridization 法により組織レベルで明らかにし、タンパク発現と比較検討することの意義を説明した。これは機能発現にはタンパクの発現が必須であるが、mRNA の局在は必ずしもタンパクの発現を意味せず、両者の間には乖離が存在する場合があることを認識してもらうためである。今回の訪問では限られた時間内でのことであり、分子生物学的手法についてはそのその基本的概念を説明し、その手技の実際に関しては症例を用いて解説した。今日、病理学ならびに腫瘍学における研究の進歩は分子生物学的手法に負うところがきわめて大きい。従って、将来においてはこれらの手法を駆使することの有用性と、その研究面ならびに診療面への応用の必要性についても触れた。

【訪問地の状況・課題】北京胸科医院は 1949 年に創設された市級専科病院であり、北京市の郊外に位置し、約 7 万坪の広大な敷地の中にゆったりと建てられている。周囲の環境が良く“花園式”と称されている病院であり、北京結核病医院をへて 1989 年に現在の名称に改められた。病床数 600 で、結核内科、腫瘍科、総合内科、胸部外科、一般外科、麻酔科、外来・救急外来、RICU 病棟など 14 部門が設置されている。以前は肺結核症が治療対象の大半を占めていたそうであるが、近年は肺癌の取り扱いが非常に増加しているとのことであった。しかし、肺結核症の罹患率はわが国に比較するとまだ高く、北京胸科医院における取り扱い疾患として重要な位置を占めている。病理診断科には 2 名の病理医が専任しており、組織診ならびに細胞診を担当している。穿刺吸引細胞診は病理医が行っていた。日常の診断業務内容はわが国とほぼ同様であるが、術中迅速診断はほとんど行われていないようであった。病理解剖についてもきわめて限られていた。病理診断については免疫組織化学を含む特殊染色が併用されており、きわめて適切な診断がなされていた。しかし、免疫組織化学試薬や抗体などの種類はかなり限られており、基本的な免疫組織化学の遂行には問題はないが、その研究への応用には大きな制約があると考えられた。また、参考図書、マニュアル本などはかなり不足しており充実させる必要性を感じた。病理診断科の 2 名の病理医と 3 名の技師はほとんど日常業務に追われており、病理診断科内に独自の研究体制をもつことは困難と思われた。臨床医との連携はあるもののプロジェクトを組んでの研究体制は、今までほとんどなされていないとのことであった。北京胸科医院内には基礎研究施設と動物実験施設が備わっている。しかし、研究を遂行するための指導的人材は圧倒的に不足している状況にあると思われた。さらに、効率的に実験を行うためには実験助手や技師に対する教育と人員の確保が必要と思われた。一方、分子生物学的手法の遂行に必要な機器についてはほとんどが不足の状況であった。今後、新しい技術を導入するにあたっては、これら周辺機器の整備は勿論であるが、何よりも指導者

としての人材確保のための教育指導が先決であると痛感した。以上のことから、今後の課題としては1) 研究指導体制の確立、2) 段階的かつ継続的な研究指導者の育成、3) 実験助手ならびに技師などコメディカルの教育、4) 機器・備品などの充足を中心とした研究環境の整備などが挙げられる。これらは一朝一夕には成しえないものであり、時間をかけた継続性のある指導と援助が必要であると感じた。

【文化交流ならびに交歓】中国は数々の歴史的、文化的遺産を多々有しているが、今回の滞在中は万里長城（八達嶺）、明の十三陵、天壇公園、故宮博物館などを訪れる機会を得た。限られた時間内であったため十分な視察ならびに観賞は出来なかったが、いずれもスケールの大きさは想像をはるかに越えるものであり、わが国では経験できない文化的背景を目の辺りにできたことは大きな収穫であった。また、国慶節の祝賀に接し天安門広場を埋めた人波の迫力は東京の雑踏の比ではなく中国が有するマンパワーの底力を見せ付けられる思いであった。食文化に関しても今までない貴重な経験をすることができた。歓迎会に始まり送別の晩餐は勿論のこと、街の小さな食堂においても常に新たな発見のある滞在であった。バスを利用して一人で市街見学した折りには片言の中国語で買い物をし、料理を注文せざるを得ず本当に良い経験であった。ホテルなどでは英語が通じるので問題はないが、市中では英語は役に立たず中国語の必要性を痛感し、今後の中国語勉強への刺激にもなった。

【今後の交流計画】現在、我々の教室では継続して「腫瘍の増殖・進展に関する増殖因子ならびに細胞外基質の発現」を基本テーマとした病理学的ならびに分子生物学的方法による研究を行っている。席 家寧氏および研究グループからは、同テーマならびに関連領域での共同研究の継続の希望がだされており、我々も学際的な支援は今までと同様に行っていくつもりである。今回の訪問指導に際しては北京胸科医院から客員教授を委嘱されているので期間内においては学術ならびに技術指導のための訪中の必要性を感じている。今後は共同研究の幅を広げると共に、分子生物学的研究分野の技術指導の充実を念頭においた支援体制を整えていく予定である。なお、席 家寧氏自身は特別笹川奨学生としての再研修を希望しており、今後、もし状況が許せば我々としても支援してゆきたいと考えている。

【おわりに】北京滞在中は席 家寧氏、黄 院長はじめ胸科医院のスタッフの皆様から本当に心暖まる歓迎を受けた。スタッフの中にはかつて日本で教育を受け、私の家の近くに居住されたことのある先生もいて本当に驚いた。今回の訪問を機会に北京胸科医院と本学の友好がさらに発展することを期待している。

月日	訪問地・機関	交流内容
9月26日	北京市	笹川医学奨学金第19期研修生 席 家寧氏と会食
27日	北京市	万里長城（八達嶺）ならびに明の十三陵の観光視察、天壇公園
28日	北京市・北京胸科医院	北京胸科医院黄 衛祖院長表敬訪問 検査科病理部門視察ならびに 免疫組織化学研究室開設指導 胸科医院指導部と会食
29日	北京市・北京胸科医院	免疫組織化学研究室開設指導 病理医との学術交流 講演：気管支・肺ならびに縦隔の神経 内分泌腫瘍の細胞診断学
30日	北京市・北京胸科医院	免疫組織化学研究室開設指導 席 家寧氏宅訪問、会食
10月1日	北京市	天安門広場観光、故宮博物館 送別晚餐（全聚徳烤鸭店）
2日	北京市	帰国

聘書

茲聘日本大學病理部長根本則
道先生為北京胸科醫院病理科名譽
教授。聘期為五年。



日本財団補助金による
1998年度日中医学協力事業報告書

—日本人研究者派遣—

平成 11 年 3 月 29 日

財団法人 日中医学協会
理事長 中島章 殿

講演・手術指導等の写真を添付して下さい。

1. 訪中者氏名 三浦 廣行 ①
所属機関名 岩手医科大学 職名 教授
所在地 〒020-8505 登岡市内丸19-1 電話 019-651-5111
受入機関名 1. 大連市中心医院 2. 大連医科大学
1. 大連市沙河口区春柳街工街42号
所在地 2. 大連市沙河口区中山路465号
受入責任者名・役職 1. 劉業俊(院長) 2. 姜潮(学長)

2. 中国滞在日程 (訪問都市・機関名等主な日程を記入して下さい)

別紙添付

3. 交流報告

(別添書式を参考に、講演・指導内容、訪問地の状況・課題、今後の交流計画等を4000字以上で報告して下さい。

ワープロ使用)

中国滞在日程

1998年

- 8月20日（木）盛岡出発、日本出国（成田空港）
21日（金）大連市中心医院訪問
院長、副院長、書記と会見
大連市中心医院で講演
「不正咬合は放置するとどうなるか」
22日（土）大連市中心医院口腔科で臨床指導
24日（月）大連医科大学訪問 歯学部長と会見
歯学部医員にセミナー
25日（火）日本帰国（仙台空港）、盛岡帰着

1999年

- 3月5日（金）盛岡出発、日本出国（仙台空港）
6日（土）大連市中心医院で臨床指導
大連医科大学で講演
「骨格型不正咬合の治療」
7日（日）鞍山市楊萌梅口腔診療所訪問、臨床指導
8日（月）大連市中心医院で臨床指導
大連市中心医院で講演
「骨格型反対咬合の治療」
9日（火）日本帰国（仙台空港）、盛岡帰着

交流テーマ
訪中研究者氏名
所 属
役 職

歯科矯正学の臨床指導
三浦 廣行
岩手医科大学歯学部歯科矯正学講座
教 授

報 告

講 演

講演1：1998年8月21日午後、大連市中心医院において、大連市内の歯科医師約120名を対象に、演題「不正咬合を放置するとどうなるか」について2時間の講演を行った（写真1）。講演後約1時間にわたって活発な質問を受けた。講演の要旨は以下の通りである。

演題「不正咬合は放置するとどうなるか」

外観は同じように見える不正咬合でも、その成り立ち方はいろいろである。矯正臨床においては、まず治療の対象となるそれぞれの不正咬合について、どこに、どのように（質的・量的）不正な状態が存在するのかを見極めておく必要がある。

そこで不正咬合の成立ちを、骨格型、機能型、ディスクレパンシー型、デンタル型の4つの要因に分けて捉えるとよい。診断にあたっては、これら要因の現症とのかかわり合いの程度を明確にしたうえで、それぞれの要因ごとに治療目標と治療時期、治療期間とを設定し、それにみあった力系と装置の選択を行い治療計画をたてる。その際には生物学的反応、心理的反応を考慮し、さらに動的治療後の保定や予後などを含めて、かなりの長期間にわたった治療計画となる。

不正咬合の成立ちとして

- (1) 骨格型の不正要因：顎骨の形態異常（形、大きさ）および頭蓋に対する位置の異常のあるもの
- (2) 機能型の不正要因：早期接触等によって誘導される下顎の位置に異常のあるもの、その他習癖等によるもの
- (3) ディスクレパンシー型の要因：歯と顎骨との大きさに不調和のあるもの
- (4) デンタル型の要因：上の三型と結びつかない個々の歯の異常

の四つの要因があげられる。

治療に際しては、これら要因の現症とのかかわり合いの程度を明確にしたうえで、それぞれの要因ごとに的確な治療目標と治療時期、治療期間とを設定し、それにみあった力系と装置の選択を行い、治療計画をたてる必要がある。

治療時期の設定にあたっては、不正咬合の成り立ち（要因）に対して、それぞれの時期に適した治療法を講じるが、その動的治療後の保定や予後などを含めて、かなりの長期間にわたった治療計画をたてる必要がある。

治療方法の選択にあたっては、対象となる不正咬合の種類、不正咬合の要因、治療目標、治療の時期さらに、適応する矯正力の種類、力学的要素、生物学的反応、心理的反応を考

慮して行う。それぞれの要因について要点は以下の通りである。

(1) 骨格型の不正要因：顎骨の形態異常（形、大きさ）および頭蓋に対する位置の異常のあるもの

骨格型の不正要因に関しては、上下顎について、顎骨の大きさの異常、位置の異常、形態の異常の有無について判断する。さらに現症とのかかわり合いの程度についても判定する。また、骨格型の不正要因は、個体の成長発育と密接な関連をもっているため、あわせて顎発育の評価と予測を行う必要がある。

治療目標として骨格型要因に対しては成長誘導を行う。

顎骨の過大（過成長）→成長抑制

顎骨の過小（劣成長）→成長抑制因子の除去

→成長促進

顎骨の前方位 →後方移動

顎骨の後方位 →抑制因子の除去

→前方移動

顎骨の形態異常 →成長促進あるいは成長抑制

治療時期は骨格型要因は加齢とともに増悪化する傾向にあるため、できるかぎり早期から顎関係の改善を計り、かつ顎発育が終了するまで長期間にわたる管理が必要である。

治療方法として骨格型要因に対しては、顎整形力を適応し、成長抑制として chin cap 装置や EOA といった顎外固定法が、成長促進として急速拡大法や、上顎前方牽引法を適用する。

(2) 機能型の不正要因：早期接触等によって誘導される下顎の位置に異常のあるもの、その他習癖等によるもの

機能型の不正要因に関しては、歯の位置異常による早期接触などにより、咀嚼時や顎運動時に下顎が近心、遠心あるいは側方の不正な位置に強制的に誘導されていないかどうかを判断する。また、舌癖や指しゃぶりなどの習慣や、筋機能異常もこの機能型の要因に含まれるので、この点に関しても現症の誘因となっていないかどうか精査する必要がある。

治療目標として機能型要因に対しては、早期接触等の機能障害の除去あるいは習癖のコントロールを行う。

治療時期は機能型要因は放置すれば骨格型の異常へと発展して固定化してしまう可能性があるため、できるだけ早期に機能障害や習癖を除去する必要がある。

治療方法として機能型要因に対しては、機能障害の除去のために、歯槽性あるいは、下顎性の移動を行う他、習癖を除去するための種々の方法を講ずる。

(3) ディスクレパンシー型の要因：歯と顎骨との大きさに不調和のあるもの

ディスクレパンシー型の要因 tooth to denture base discrepancy に関しては、上下顎歯列それぞれについて歯の大きさと歯槽基底の大きさとの間の不調和、すなわち、ディスクレパンシーの有無と程度を判定しておく必要がある。また、この要因は、骨格型の要因と関連があり、とくに、上顎骨の劣成長を伴う反対咬合症例では、上顎歯列に叢生や萌出遅延といったかたちでディスクレパンシーの要因の影響が強く現われることになる。逆に、下顎の劣成長を伴う上顎前突症例では下顎歯列にディスクレパンシーの要因の影響が強く現われる。さらに、ディスクレパンシーの存在はときとして咬合状態や顎関係の安定

に大きな影響を与えることがあるため、この点も留意しておく。

治療目標としてはディスクレパンシー型要因に対しては、とくに萌出余地不足に対しては、拡大あるいは抜歯によりディスクレパンシーの解消を行う。

治療時期はディスクレパンシー型要因の解消における抜歯には連続抜去法が適応されるが、単にディスクレパンシーの量のみを判断基準とせず、咬合状態や顎の成長発育との兼ね合いの中で、抜歯部位や抜歯の時期を決定する。

治療方法としてディスクレパンシー型要因に対しては、ディスクレパンシー量が少ない場合には、歯列の拡大が、その量が多い場合には、抜歯によって解消する。

(4) デンタル型の要因：上の三型と結びつかない個々の歯の異常

デンタル型の要因に関しては、個々の歯の位置異常や、埋伏歯、先天欠如、過剰歯さらには歯周疾患などがあり、これらの有無についても確認しておく必要がある。

治療目標としてはデンタル型要因に対しては、その状態に応じた処置を行う。

治療時期はデンタル型要因では、他の不正要因に対する目標や治療計画の設定との係わり合いからその治療の時期を設定する。

治療方法としてデンタル型要因に対しては、歯槽性の移動を主に考えられるが、他の要因の治療との関連のもとに装置を選択する。

今回の講演では不正咬合はそのまま放置されると悪化することが多く、自然には改善しない例があることを示した。そのため不正咬合は、できるだけ早期に的確な診断を行い、そのもとでの一貫した治療と管理を行う必要があることを述べた。

講演 2：8月24日午後、大連医科大学において医員8名を対象に日本の矯正歯科臨床の現状について約1時間のセミナーを行った(写真3, 4)。セミナーの要旨は以下の通りである。

不正咬合は、できるだけ早期に的確な診断を行い、そのもとでの一貫した治療と管理を行う必要がある。しかしその一方で、臨床症状がすべて動的処置の対象となるわけではなく、その判断の誤りで患者さんに多大の迷惑をかけたかねないこともあり得る。このことは何らかの臨床症状がある症例の総てで、必ずしも動的処置が適切な選択ではなく、注意深い観察と適切な助言が最適な処置である場合もあることを物語っている。

また医療を行うにあたって、医療の質として第一にあげられるのは安全性であり、これは患者さんは勿論のこと医療従事者の安全をも確保しなければならないのはいままでもない。そして患者さんに効果的な医療を提供することも必須のものである。そのためこれからの臨床にあたっては、臨床判断学とリスクマネジメントを考慮した取り組みが必要と思われる。

講演 3：3月6日午後、大連医科大学において中国の矯正専門医約110名を対象に「骨格型不正咬合の治療」と題して、2時間の講演を行った(写真6, 7, 8)。講演後約1時間にわたって活発な質問を受けた。その際瀋陽口腔正畸研究所(中国医科大学)所長鄧燕教授から、瀋陽での講演依頼の打診があった。講演の要旨は以下の通りである。

演題「骨格型不正咬合の治療」

今回の講演では骨格型不正咬合の概要ならびに、その治療法の要点について解説した。

骨格型の不正要因とは顎骨の形態異常（形、大きさ）および頭蓋に対する位置の異常のあるものをいう。

骨格型の不正要因に関しては、上下顎について、顎骨の大きさの異常、位置の異常、形態の異常の有無について判断する。さらに現症とのかかわり合いの程度についても判定する。また、骨格型の不正要因は、個体の成長発育と密接な関連をもっているため、あわせて顎発育の評価と予測を行う必要がある。

治療目標として骨格型要因に対しては成長誘導を行う。

治療時期は骨格型要因は加齢とともに増悪化する傾向にあるため、できるかぎり早期から顎関係の改善を計り、かつ顎発育が終了するまで長期間にわたる管理が必要である。

治療方法として成長発育期においては、顎整形力を適応し、成長抑制として chin cap 装置や EOA といった顎外固定法が、成長促進として急速拡大法や、上顎前方牽引法を適用する。成長発育終了後は歯の移動で改善を行うか、顎骨形成手術を適用する。

骨格型の不正咬合の治療にあたってはフェイシャルパターンの分類が大切である。ロングフェイスとショートフェイスに分けられるが、これは特に垂直的な問題を捉えているわけだが、各フェイシャルパターンにはそれなりの顎発育の経緯があり、遺伝的な要因がある。各フェイシャルパターンがどういった特徴をもっているのか、パターン別に分けた顔面の発育状態、あるいは治療効果を検討する必要がある。その他、Sassouni の水平基準による分類がある。

分析方法としては、これまでの Downs 法や Northwestern 法とは異なり Harvold, McNamara の分析方法は、顎態異常の程度が前後的なものか、垂直的なものかを非常に簡単に判別できる方法である。Wits の分析方法はさらに単純で、咬合平面に対して A 点あるいは B 点からの垂線をおろし、その前後的関係をみる方法で、咬合平面を基準にして顎態の異常を把握するものである。Kim の分析は、2 級傾向か 3 級傾向か、オープンバイト傾向かディープオーバーバイト傾向か、抜歯症例か非抜歯症例かを分析している。

今回の講演にあたっては、骨格型不正咬合の治療に必要な基礎知識を解説した。

講演 4：3 月 8 日午後、大連市中心医院において大連市内の歯科医師と医療関係者約 100 名を対象に「骨格型反対咬合の治療」と題して 2 時間の講演を行った（写真 10, 11, 12）。講演後約 1 時間にわたって活発な質問を受けた。講演の要旨を以下の通りである。

演題「骨格型反対咬合の治療」

反対咬合は、歯槽性・機能性・骨格性反対咬合分類される。歯槽性は異常が前歯部に限局し、機能性は下顎が前方転位しており、骨格性の場合は上下顎骨の位置関係、あるいは大きさに問題がある症例となる。また、よく使われる Sanborn の分類は日本では顎変形症の保険を適応する際の分類の一つに採用されている。

日本で一般的に骨格型反対咬合の治療に用いられる装置を解説する。

チンキャップ装置について

通常行っている牽引は下顎頭の方向で、12 時間は使用する。下顎の成長抑制により被蓋が改善し、上顎の成長抑制がとれることで、キャッチアップグロースが得られる。頭の変形を指摘する先生もいるが、これは殆ど無いと考えていいが、牽引の強さによってはその可能性が無きにしも有らずだと思う。我々の外来では牽引力として通常 600g 前後であ

る。低年齢の場合は 400g か 300g ぐらいから始めることが多く、そういった力ではほとんど頭が変形することは無いと思うし、ベルトの幅が最近少し幅広くなっているから、頭の変形は考えなくてもすむと思う。開始時期は患者さんが使える状態であればいつからでも可能だと思う。3、4歳ぐらいでも聞き分けのいい子であれば十分装置に対応できる。終了時期に関しては、本来は顎発育終了時まで使うのが原則である。チンキャップの効果について、効果を認めている人の中には顎顔面の成長のコントロールが可能であるといっている人もいる。ただ、Graber は適用開始時の適用力が 900 から 1000 g とかなり強い顎整形力を用い、被蓋改善後、段階的に少しずつ力を弱めていくという方式をとっており、我々の通常の臨床的なものと異なる。多くの日本の先生方は、最初の使用で下顎オトガイ部が下方または後下方に回転し、下顎の位置が変化し、その後成長方向を変化させる、というのが一般的なチンキャップの効果に対する見解である。Proffit や McNamara は牽引方向を低くすることで下顎の成長方向を下方に変えることができると述べている。また、下顎骨の成長方向の転換は、チンキャップの使用中に限定され、使用を中断すると、装着前に有していた本来の方向に下顎の成長が戻るため、顔面骨格型のパターンを変えるには成長終了期まで使用することが必要であるとの報告もある。しかし、チンキャップを長期間使うことに関しては患者さんにかなりの負担となるし、途中で中だるみという現象も起きてくるため、患者さんの顎発育の状態をよく確認しながら適用を考えていくことが必要である。強さに関しては、日本では 300g から 600g が適当だといわれている。

上顎前方牽引装置について

チンキャップと同様に、低年齢から適用可能である。患者さんが低年齢で対応できた場合は、被蓋の改善だけでなく、中顔面部の陥凹感もとれ、上下のバランスがとれてくる。一方、思春期前期以降から始めると、被蓋は改善されても上顎の劣成長が残り、全体的なバランスの改善は難しいと考えられる。本装置についても、効果はあるのか、いつ使うのかという問題が出てくる。効果について、私も含め多くの研究者が、上顎骨の前方移動の他に上顎切歯の唇側傾斜、下顎切歯の舌側傾斜、下顎の位置の変化を被蓋改善のメカニズムとしてあげている。適用時期は、思春期性成長スパート期、またはそれ以前の適用が効果的である。

急速拡大装置と上顎前方牽引装置の併用について

上顎前方牽引装置だけでなく、急速拡大装置が適応可能な時期には両装置を使用する場合もある。まず最初に急速拡大を行って正中口蓋縫合を開き、その後前方牽引を行う。急速拡大を行うことで正中口蓋縫合のみならず、上顎骨を取り巻く縫合が緩んでき、その後で上顎を前方に牽引すれば、上顎が前方移動しやすいだろうというのが、この装置を適用する一つの理由である。教室の森岡は、急速拡大と上顎前方牽引装置を適用した骨格性反対咬合症例について、被蓋改善が認められた症例と認められなかった症例の検討を行った。その結果被蓋改善が認められた症例では、臼歯部の咬合接触状態が変化して下顎の後下方への回転が認められ、オーバーバイト、オーバージェットが減少して、下顎位が変わる。それから上顎歯列の拡大により前歯部の叢生が軽減あるいは解消される。そして急速拡大終了直後から前方牽引を行うことで、上顎の前方移動が認められたと述べている。ほとんどの症例でチンキャップと前方牽引を併用しているのだから、下顎前歯の舌側傾斜が認められ、これも被蓋改善に関与していると考えられる。ただ、前方牽引終了後はチンキャッ

ブだけで維持しところ、下顎の後下方への回転は徐々に戻ってきてわずかに前方に位置し、その間に歯のコンペンセーションが起きて、上顎前歯の唇側傾斜と下顎前歯の舌側傾斜が大きくなり、上顎前歯被蓋を保っているという状態が認められた。それに対し被蓋改善が認められなかった症例では、下顎の後下方への回転が起きていない。さらに問題なのは急速拡大の終了直後から前方牽引を行うことで上顎の前方移動は認められるが、下顎の前下方への移動ができずに前方と一緒に移動してしまうということがわかった。顔のパターンをショートフェイスとロングフェイスに分けて検討した場合、特にショートフェイスタイプは後戻りする傾向にあることがわかった。もう一つは、A'-Ptm'と Pog'-Go の比率が 37 以下の症例は被蓋改善が難しいと言える。

歯槽性の移動

成長発育期においては、チンキャップや上顎前方牽引装置の使用、または急速拡大装置と上顎前方牽引を併用することで、ある程度顎発育のコントロールが可能で、できるだけ低年齢から使った方が効果的な事がわかった。これまで述べてきた顎整形力の適用を行っても被蓋改善ができない場合、あるいは年齢が高い患者さんの場合には、成長発育のコントロールができないため、ある程度顎発育が収まった段階で歯槽性の改善を行うか、顎骨形成手術を適用するかを選択していくことになる。歯槽性の改善による対応は、患者さんの非協力により顎発育のコントロールができなかったケースや、手術の適応でありながら手術を希望しないケースなどにみられるが、手術を適応した症例に比べ歯槽性による改善は、顔のバランスやプロフィール上に問題が残る。

顎骨形成手術

顎骨形成手術は、以前は骨体離断短縮という方法が殆どであったが、その後矢状分割法が導入され、現在では上下顎を両方同時に移動する方法が可能になった。

顔のバランスは非常に大切で、今後の矯正治療は、単に被蓋がつく、咬合関係が緊密にとれるだけではなく、フェイシャルバランスを考慮した治療が重要である。

以上のことをまとめると、骨格性反対咬合の治療には、顎整形力を適応するか、外科手術を適応するかあるいは歯列だけで改善するかという3つの選択肢がある。成長発育期の段階は上顎に関しては急速拡大装置か上顎前方牽引装置、下顎に対してはチンキャップ装置が多く使われる。適応はいずれも乳歯列期から可能であるが、いつまで適応できるかという、前方牽引、急速拡大も思春期までが限界と考える。チンキャップはもう少し長く使う場合も出てくる。顎発育のコントロールがうまく行かなかった症例、あるいはアダルトケースで来た場合には、歯の移動で改善する顎骨形成手術を適用するかの選択になる。

今回の講演では、中国でも数多く見受けられる骨格型反対咬合の具体的な治療法を紹介した。

臨床指導

8月22日終日大連市中心医院口腔科において、36名の患者さんについて診断ならびに具体的な治療法について実地指導を行った(写真2)。

3月6日午前大連市中心医院口腔科において、21名の患者さんについて診断ならびに具体的な治療法について実地指導をおこなった(写真5)。

3月7日午前鞍山市楊萌梅口腔診療所において、10名の患者さんについて診断ならびに具体的な治療法について実地指導をおこなった(写真9)。

3月8日午前大連市中心医院口腔科において、16名の患者さんについて診断ならびに具体的な治療法について実地指導を行った。

訪問地の状況、今後の訪中計画

大連市はめざましい経済発展を遂げており、治安も良好である。人々も経済的に潤ってきており、矯正治療を求める患者さんも増加の一途にある。中国における矯正歯科臨床はここ10年の間に急速に発展してきているが、診断機器や治療に用いる材料が十分供給されておらず、また診断技術、治療技術も十分とはいえ、これらの点に関してさらなる指導と援助が必要である。

そのため今後もできるだけ多くの機会をとらえて学術ならびに臨床指導を行う考えている。その一環として、1999年6月26、27日に北京で開催される「日中歯科医学大会1999」で大連市中心医院の李志強先生を共同演者に研究発表(別紙)を行う。そしてこの学会参加の日程に大連市での講演と臨床指導を加える計画である。

写真1 1998年8月21日
大連市中心医院で講演



写真2 1998年8月22日
大連市中心医院口腔科で臨床指導

写真3 1998年8月24日
大連医科大学でセミナー開催





写真4 1998年8月24日
大連医科大学訪問 朱歯学部長に見送られる



写真5 1999年3月6日
大連中心医院口腔科で臨床指導



写真6 1999年3月6日
大連医科大学訪問

写真7 1999年3月6日
大連医科大学で講演





写真8 1999年3月6日
大連医科大学で講演

写真9 1999年3月7日
鞍山市楊萌梅口腔診療所で
臨床指導



写真10 1999年3月8日
大連市中心医院訪問
王副院長の出迎えを受ける

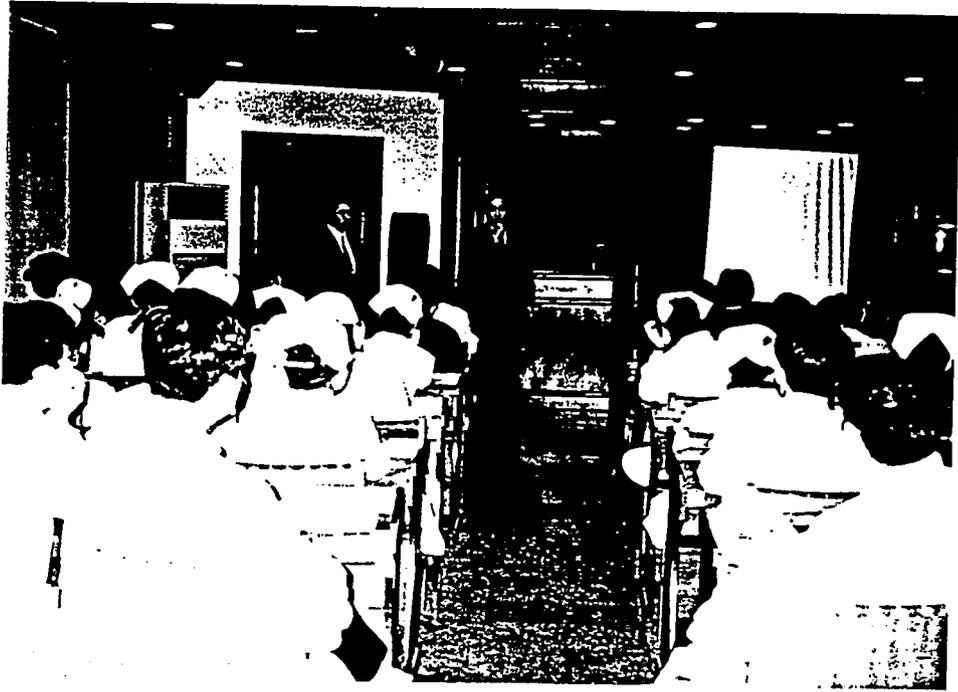


写真11 1999年3月8日
大連市中心医院で講演

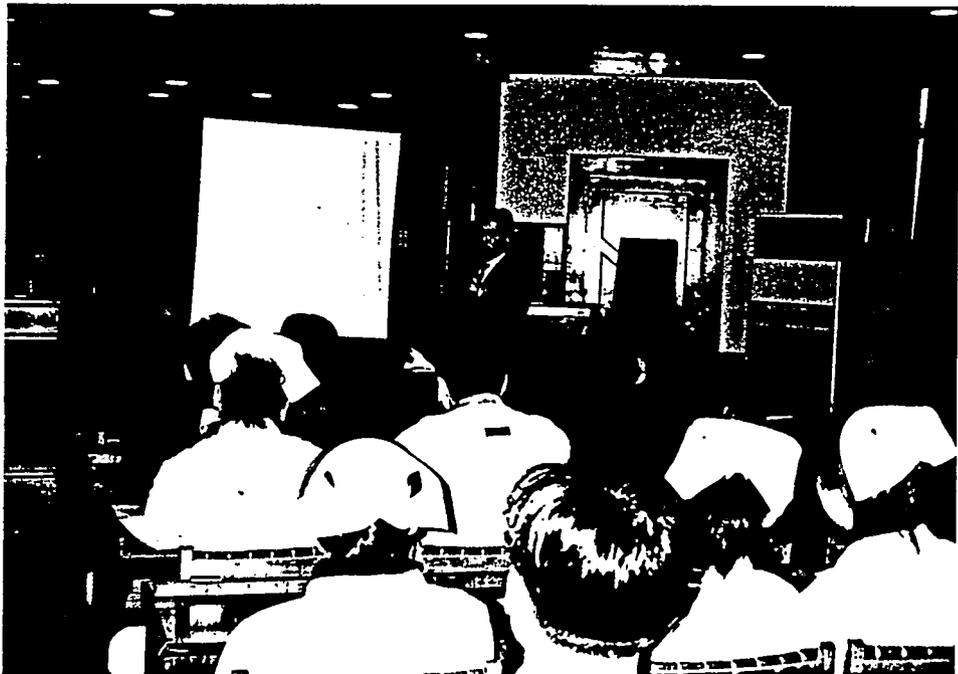


写真12 1999年3月8日
大連中心医院で講演

日本財団補助金による
1998年度日中医学協力事業報告書

—在留中国人研究者研究助成—

11年3月12日

財団法人 日中医学協会
理事長 中島章 殿

研究室で撮影した本人のスナップ写真、及び発表論文のコピーを添付

1. 研究者氏名 王銀娜
研究機関 大阪市立大学医学部第一生体 研究指導者 大谷周造 職名 教授
所在地 〒545-8585 大阪市阿倍野区旭町1-4-3 電話 6645-3726 内線 _____

研究テーマ CTLL-2細胞における、新しい増殖抑制剤SMDによる
アポトーシスの誘導

2. 本年度の研究業績

(1) 学会・研究会等における口頭発表 有 ・ (学会名・内容)

(2) 学会誌等に発表した論文 有 ・ (雑誌名・論文名)

3. 今後の研究計画

SMI2 におよぶ増殖を抑制された細胞の重要な酵素群であるプロテインキナーゼに与える影響を調べる。

4. 研究指導者の意見

王銀娜さんは大変熱心に実験を行い、漢方薬中の物質の化学誘導体の一種が細胞増殖抑制作用をもつ、細胞のアポトーシスを誘発することと証明し、現在学術誌に投稿すべく論文を執筆中である。この論文が発表されると、アポトーシス誘発物質の新しいものとして注目と集めると思われる。さらに、アポトーシスの機序を明らかにする努力をされており、来年3月には医学博士の学位を取得する予定である。医学博士取得後は、中国へ帰り、研究と続けたいとの希望をもっており、日中医学の協力に役立つ人材に育てられることと思われる。

研究指導者氏名

大谷周造



5. 研究報告

別紙形式を参考に、報告本文4000字以上で報告して下さい（枚数自由・ワープロ使用）

タイトル・要旨等は日本語で、KEY WORDS以下は日本語或いは英語で記入して下さい。

研究成果の発表予定がある場合は発表原稿・抄録集等を添付して下さい。

論文発表に当っては、日中医学協会－日本財団補助金による旨を明記して下さい。

CTLL-2(ラット Tリンパ球系)細胞における、新しい増殖抑制剤 Saliva
Miltiorrhiza Derivative (SMD) によるアポトーシスの誘導

王銀娜 中国湖南省婦幼保健院 主治医師 科主任
指導者：大谷周造 大阪市立大学医学部第二生化学教室
教授 部長

SMD は、抗癌作用のある saliva miltiorrhiza (漢方薬) の分子構造を単純化した合成誘導体であり、構造的にはポリフェノール合成誘導体に属する。サイトカイン Interleukin-2 (IL-2) により増殖が維持される CTLL-2 細胞は、SMD による増殖抑制作用と、誘導されるアポトーシスを研究するのにいいモデルとなります。SMD は培養細胞の増殖を抑制し、この抑制効果は、DNA 断片化率で測定されるアポトーシスの誘導と相関する事がわかった。このアポトーシスの過程では、セリン、スレオニンのリン酸化よりもむしろ 91, 80, 55kDa の各蛋白質のチロシンリン酸化が阻害され、同時にチロシンキナーゼ活性も抑制され、その結果としてプロテインキナーゼ C (PKC) 活性の抑制を伴うこと、即ち PKC は PTK のシグナル伝達の下流で阻害されるが、プロテインキナーゼ A (PKA) にたいしては SMD は効果がないことを示した。bcl-2 蛋白の翻訳、bcl-2mRNA の発現及び酵素 caspase-3 の活性化はダウンレギュレーションを受けることがわかった。SMD は Bcl-2 の発現と caspase-3 の活性を増加させたが、PKC の活性化剤である TPA (12-O Tetradecanoylphorbol 13-acetate) は、少なくともある部分で、SMD で誘導されるアポトーシスを弱めることができた。以上の結果により、SMD は新種の細胞増殖抑制剤であり、アポトーシス死を誘導するチロシンキナーゼの阻害剤であることを明らかにした。

Induction of Apoptosis in CTLL-2 Cells by a Novel Antiproliferative Agent, Saliva Miltiorrhiza Derivative(SMD)

Yinna Wang*, Tadayoshi Hasuma*, Yoshihisa Yano*, Yoshihiro Morishima*, Toshiko Yoshimata*, Isao Matsui-Yuasa and Shuzo Otani*†**

* Department of Biochemistry, Osaka City University Medical School, Asahimachi, Abeno-ku, Osaka, 545-8585, Japan

**Department of Food and Nutrition, Faculty of Human Life Science, Osaka City University, Sugimoto, Sumiyoshi-ku, Osaka 558-8585, Japan

†To whom correspondence should be addressed: Dr Shuzo Otani, Department of Biochemistry, Osaka City University Medical School, 1-4-3 Asahimachi, Abeno-ku, Osaka, 545-8585, Japan. Fax: 81-6645-3725. E-mail: otanis@med.osaka-cu.ac.jp

Abstract

Saliva miltiorrhiza derivative (SMD) is a simplified synthetic analogue of the principle of active saliva miltiorrhiza, and structurally it belongs to a polyphenol synthetic analogue. The cytotoxic T cell line driven by IL2 (CTLL-2 cells) was used as a model to study the antiproliferative potential and the development of apoptosis induced by SMD. We found that SMD can suppress the cell proliferation and this inhibitory effect by SMD was associated with the induction of apoptosis detected by DNA fragmentation assay. This apoptosis process is accompanied by inhibition of tyrosine phosphorylation of about 91, 80, 55-kDa proteins, rather than that of protein serine/threonine phosphorylation which dependent on IL2, and suppression of protein tyrosine kinase activity and subsequently inhibition of PKC activity that is in downstream of PTK without affecting PKA activity, as well as down-regulation of bcl-2 anti-apoptotic protein and bcl-2 mRNA, and activation of caspase-3 activity. A relation of bax protein levels to apoptosis was not appreciated. TPA, a protein kinase C activator was able to attenuate the apoptosis induced by SMD at least in part though increasing of bcl-2 protein expression and inhibiting of caspase-3 activity. Taken together, we conclude that SMD is a novel potent antiproliferative agent and a tyrosine kinase inhibitor that induced apoptotic cell death in CTLL-2 cells.

Key words: apoptosis, DNA fragmentation, protein phosphorylation, protein tyrosine kinase, protein kinase C, protein kinase A, bcl-2, bax, CPP32/Caspase-3 protease.

The abbreviations used are: IL2, interleukin-2; FCS, fetal calf serum; TCGF, T cell growth factor supplement; CTLL-2 cells, cytotoxic T lymphocyte; PTK, protein tyrosine kinase; PKC, protein kinase C; PKA, cAMP-dependent protein kinase (protein kinase A); TPA, 12-O-Tetradecanoylphorbol 13-acetate; SMD, Saliva Miltiorrhiza Derivative.

Introduction

Saliva miltiorrhiza (Danshen) is a traditional chinese medicine which has been widely use for the treatment of cardiovascular diseases and inflammation for a long time. Saliva miltiorrhiza derivative (SMD) is a simplified synthetic analogue of the principle of active saliva miltiorrhiza, structurally, it belongs to a polyphenol synthetic analogue. Some studies have indicated that SMD is capable of a antioxidant and an antitumor activity in vitro(1,2). However, the biochemical and pharmacological mechanism for the SMD inhibitory effect has not yet been elucidated.

Apoptosis is the process of cell death relying on both gene induction and protein activation. A variety of genes involved in the regulation of apoptosis have been identified(3). Cells undergoing apoptosis display several morphological and biochemical changes, including cellular collapse, nuclear chromatin condensation, the formation of vesicular apoptotic bodies and internucleosomal DNA fragmentation. The morphological alterations are accompanied by a variety of biochemical changes, although the molecular mechanisms of apoptosis are still large unknown. Many signals and external stimuli regulate the apoptosis activity by interaction with a number of proteins and gene products, such as transcription factors, Myc, Apaf-1, wild-type 53 protein and bax were able to induce apoptotic cell death. and others bcl-2, bcl-xL, Ras, Raf prevented cells from undergoing apoptosis(5-

6). Numerous disparate agents, for example toxins, glucocorticoids, protein kinase inhibitor, irradiation, growth factor withdrawal and anticancer drug induce apoptosis in variety of cell types (4). Protein phosphorylation may have multiple roles in the control of apoptosis process (10) and activation of specific protein kinase can in some circumstances protect against apoptosis (7). Recently, much attention has focused on the role of proteases related to interleukin-1 β converting enzyme (ICE, renamed caspases) (8,9) and it may be positive regulators in apoptosis. Now many experiments have been underscored that apoptosis can be activated by many types of cancer chemotherapeutic agents (11,12) and new therapeutic strategies aim to counteract dysregulation of apoptosis by pharmacological intervention.

CTLL-2 cells are the cell lines that undergo apoptosis upon growth factor deprivation (13). We used this cell line to investigate the effects of SMD on the inhibition of cell proliferation as it is a good model to study apoptosis. Our purpose in this study was to ascertain the molecular basis in CTLL-2 cells by examining a potent antiproliferative effect and the development of apoptosis by SMD in respect to IL2 induced-cell proliferation, apoptosis phenomenon, protein phosphorylation, protein kinases, as well as the alterations of expression of bcl-2/bax, CPP32/Caspase-3 activity.

Methods and Materials

Chemicals. Saliva miltiorrhiza derivative (SMD) was synthesized by professor Lianning-Li (Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences) and were kindly provided. Recombinant human IL2 were from Shionogi Chemical Industries, Ltd.. 12-O-Tetradecanoylphorbol

13-acetate (TPA) was purchased from Sigma. Mouse monoclonal anti-phosphotyrosine antibody (Clone PY20) was purchased from Transduction Laboratories (Lexington, KY). Rabbit polyclonal anti-phosphoserine antibody and rabbit polyclonal anti-phosphothreonine antibody were from ZYMED Laboratories, Inc (South Francisco, CA). Rabbit polyclonal anti-bcl-2 antibody (Ab-2) was obtained from Calbiochem (Cambridge, MA). Rabbit polyclonal anti-bax (P-19) was purchased from Santa Cruz Biotechnology, Inc. cDNA probe for bcl-2 was kindly provided by Dr Jeffrey Sklar (Stanford University School of Medicine, Stanford, California). [γ - ^{32}P] ATP (3000Ci/mmol) and [α - ^{32}P] dCTP (3000Ci/mol) were from NEN (Boston) and Amersham (England), respectively. All the other chemicals were of the purest grade commercially available.

Cell Culture. The cytotoxic T cell line CTLL-2 was cultured in a growth medium- RPMI 1640, 10% fetal calf serum (FCS) and 5% rat T cell growth factor supplement (TCGF) which is from the culture of rat spleen cells stimulated by concanavalin A (4 $\mu\text{g}/\text{ml}$) for 48h. Cells in their exponential growth phase were harvested, washed with RPMI 1640 medium, and suspended at $3.3 \times 10^5/\text{ml}$ in the growth medium without TCGF in a humidified atmosphere of 95% air and 5% CO_2 for 8-10 h for starved cells. Then, cells were added to IL-2 (100 U/ml) and SMD in the various concentrations for the following experiments. The viable cells were determined by the trypan blue dye exclusion (14). Three representative fields were examined and viability was expressed as the percentage of cells excluding trypan blue dye.

DNA fragmentation assay. The internucleosomal DNA degradation was assay as described

previously (15) with slight modification. Briefly, 1.2×10^6 cells were seeded in 35mm² culture dishes and treated with different concentrations of SMD and IL2 (100 U/ml) for different times. Cells were harvested and washed with ice-cold phosphate buffered saline (PBS). DNA was extracted by the lysis buffer (20 μ l of 10 mM EDTA, 50 mM Tris-Hcl (PH 8.0) containing 0.5% (w/v) sodium lauryl sarkosinate and 0.5 mg/ml proteinase K) for 1 h at 50°C. After then, 10 μ l of 10 mg/ml RNase A was added to the each sample, and incubated for further 1 h at 50°C. Reaction was stopped by the addition of 10 μ l 10 mM EDTA (PH 8.0). Sample were heated at 70°C for 20 min. The total DNA from each sample was loaded in 1.2% (w/v) horizontal agarose gel containing 0.1 μ g/ml ethidium bromide. The gel was run in TBE buffer (90 mM Tris, 90 mM borate and 2 mM EDTA) at 2.5 v/cm, and photographed under UV light.

Protein kinase Assay. Kinase activities of protein tyrosine kinase (PTK), protein kinase C (PKC) and cAMP-dependent protein kinase (PKA) were assessed using a SignaTECT™ PTK, PKC and PKA Assay System Kit (Promega, U.S.A) using PTK Biotinylated Peptide Substrate (for PTK), Biotinylated Peptide Neurogranin (for PKC) and Biotinylated Peptide Kemptide (for PKA) as substrates, respectively, according to the manufacturer's instructions. For detecting the three of protein kinase activities in intact cells, the cells were incubated in RPMI 1640 medium treated by with or without IL2 and SMD for various periods of time (0 min to 120 min) and harvested by washing with PBS. The cells were lysed by the extract buffer to determine the protein kinase activities. For measuring the kinase activities in cell lysate, the cells treated with or without IL2 were incubated in 10 min and lysed by the extraction buffer, and centrifugated and save the supernatant. 5 μ l of cell lysate

was added to the Reaction Mixture containing DMSO solution of SMD (1 μ l) at various concentrations in a final volume of 25 μ l for determining the protein kinase activities, respectively. The biotinylated, 32 P-labeled peptides were recovered from the Reaction Mixture with the SAM²™ Biotin Capture Membrane and phosphorylation of the peptides were determined by a scintillation counting (LS 6500, Beckman). Protein concentration was determined by a Bio-Rad protein assay kit (Bio-Rad, Richmond, VA) using bovine serum albumin as a standard.

Western Blot Analysis. 2.5×10^6 cells were harvested and washed with ice-cold PBS, and solubilized in a lysis buffer (1% Triton X-100, 50 mM Tris (PH7.4), 1 mM NaVO₄, 0.5 mM EGTA, 200 mM NaCl, 60 μ g/ml phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), 1.5 μ g/ml aprotinin) by vortexing and incubating on ice for 10 min. The lysates were centrifuged at 1,500g for 10 min, and supernatants were further clarified by centrifugation at 100,000g for 30 min. The supernatants were saved and the protein contents were determined with the Bio-Rad protein assay using bovine serum albumin as a standard. Twenty-forty micrograms of protein per lane respectively, was electrophoresed on 8.75-13.8% polyacrylamide-SDS minigels (16) in SDS sample buffer. The proteins were then transferred to polyvinylidene difluoride sheet (PVDF membrane; Pall Biosupport Division, Port Washington, NY) by electroblotting at 18V for 1 h. The membrane was blocked for 2-3 h in a blocking buffer (3% BSA and 0.25% normal horse serum in TBS). The blots were detected by anti-phosphotyrosine (1:1000), anti-phosphoserine (1:500), anti-phosphothreonine (1:500), bcl-2 (1:20) and bax (1:200) antibodies. Blotted membrane was incubated with a peroxidase-conjugated avidin (ABC kit; Vector Laboratories, Burlingame, CA) and developed in AEC solution (0.8%

amino-ethylcarbazole and 0.1M acetate, PH 5.2). The bands that recognized by each antibodies were scanned with a laser densitometer.

Northern Blot Analysis. 5×10^6 cells were harvested after treatment of IL2 and SMD, and total RNA was extracted by the method of the acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform method (17). RNA ($20 \mu\text{g}/\text{lane}$) was electrophoresed through a 1% agarose gel containing 6% formaldehyde and blotted onto a nylon membrane (Hybond-N⁺ membrane, Amersham), The membrane was prehybridization at 42°C for 2 h in a solution containing 50% formamide, 3× standard saline citrate (SSC), 0.1% SDS, 20 mg/ml boiled salmon sperm DNA, and 1× Denharht's solution. Hybridization was performed for 16 h at 42°C in the same prehybridization solution with bcl-2 (18) and 18s-rDNA probe(19). The probes were labeled with [α -³²P] dCTP using a random DNA labelling kit (Amersham LIFE SCIENCE, England). After hybridization, the membrane was washed three times at 42°C for 20 min in 2×SSPE and 0.1% SDS washing buffer, once for 30 min in 0.1 × SSPE and 0.1% SDS washing buffer at room temperature. Then the membrane was subjected to autoradiography and the density of each band was assessed semiquantitatively using a laser densitometer. The densities of bcl-2 mRNA bands were normalized relative to the value of the 18s-rDNA.

Assay of CPP32 activity. CPP32 activity was measured using a CPP32/ Caspase-3 Colorimetric Protease Activity Assay Kit (MBL, Nagoya, Japan) according to the recommendations of manufacturer (20). Briefly, 2×10^6 SMD-treated CTLL2 cells at the indicated time were harvested

and washed in PBS, suspended in 50 μ l Cell Lysis Buffer and incubated on ice for 10 min. The lysates were centrifugated at 10,000g for 1 min. The equal amounts of protein contents in each samples were incubated with substrate DEVD-pNA (chromophore p-nitroanilide, 200 μ M) at 37°C for 1 h. The pNA light emission was monitored using a spectrophotometer (DU640, Beckman) at 400 nm. Data were expressed as absorbance of 400 nm wavelength.

Statistical analysis. The data were expressed as the means \pm SD (Standard deviation). The significance of the experiment data were validated using the Student's-t test. The differences were considered as to be significant when $p < 0.05$.

Results

1. Antiproliferative effects of SMD

Cell viability was investigated to ascertain whether or not SMD can affect the cell proliferation in CTLL-2 cells. About 50% of cells died by 16 h after deprivation of IL2 and cell viability is still above 91% by 16 h after the addition of IL2, SMD (50 μ g/ml) plus IL2 caused a markedly reduction of cell viability in a time dependent manner, and almost 50% and 70% of cells died by 12 h and 16 h, respectively, as measured by trypan blue dye exclusion (Fig 1A). The cell viability was inhibited in a dose-dependent manner (Fig 1B) when IL2 withdrawal or the addition of SMD plus IL2. The cell viability was significantly inhibited at 20 μ g/ml SMD ($p < 0.05$).

2. Effects of SMD on DNA fragmentation

The hallmark feature of programmed cell death is the formation of DNA fragments. Thus, the

analysis of DNA fragmentation by agarose gel electrophoresis was observed to understand whether or not SMD cytotoxic effect was able to induce apoptosis in CTLL-2 cells. Fig 2A shows that DNA fragmentation was visible after 12 h of IL2 deprivation, and after 16 h of IL2 deprivation, there was a marked intensification in the oligonucleosomal ladder. However, after 16 h of the cells treated by IL2, no DNA ladder was observed. When cells were treated with herbimycin A or SMD plus IL2 for 12 h, DNA degradation was induced. The data indicated that SMD induced apoptotic cell death in a time-dependent manner. Fig 2B shows that the induction of apoptosis by SMD is in a dose-dependent manner. At 20 $\mu\text{g/ml}$ -SMD plus IL2, DNA ladder was appeared and at 50 $\mu\text{g/ml}$ SMD plus IL2, the intensity of DNA ladder was visible. Otherwise, in the presence of IL2 and 0.1% DMSO (a vehicle), no DNA fragmentation was detectable. Taken together, These data suggest that SMD was able to abolish the IL-2-induced protection against cell death and induced apoptosis in CTLL2 cells.

3. Effects of SMD on protein phosphorylation induced by IL2

The phosphorylated-proteins were investigated to understand the relationship of protein phosphorylation and apoptosis induced by IL2 deprivation or SMD in CTLL-2 cells. We firstly examined the role of phospho-tyrosine containing proteins. As seen in Fig 3A and Fig 4A,B,C, the tyrosine phosphorylation of 91, 80 and 55kDa proteins were dependent on IL2, and SMD was able to inhibit tyrosine phosphorylation of that proteins. Next, we detected the presence of serine and threonine phosphorylated-proteins to understand whether or not the serine/threonine phosphorylation involved in the cell proliferation induced by IL2 and SMD can suppress these serine/threonine

phosphorylated-proteins. As shown in Fig 3B,C and Fig 4D,E, the serine phosphorylation of about 46.5kDa protein and threonine-phosphorylation of about 31.5kDa protein were increased after stimulation of IL2, and these serine/ threonine phosphorylated-proteins induced by IL2 were not inhibited by SMD. These data suggested that SMD inhibited the tyrosine phosphorylation of proteins, however does not affect serine and threonine phosphorylation of proteins which were dependent on IL2.

4. Effects of SMD on protein kinase activities

Fig 5A is the time-course of protein tyrosine kinase activity (PTK) in the intact cells, and shows that an initial increase of PTK activity was observed at 5 min and maintaining higher levels by 120 min in the cells treated with or without IL2. However, in the cells with SMD (50 μ g/ml) plus IL2, PTK activity was underwent lower activity compared with in the cells of minus or plus IL2. Fig 5B is the dose-response of PTK activity in the cell lysate by direct incubation of SMD at various concentrations and shows that SMD inhibited PTK activity in a dose-dependent manner both in the cell lysate with or without IL2. SMD substantially inhibited PTK activity at the concentration of 10 mg/ml ($p < 0.01$). Fig 6A shows that protein kinase C activity (PKC) by phospholipid activation was reduced in the intact cells treated with SMD (50 μ g/ml) plus IL2 compared to in the cells treated with IL2 ($p < 0.05$). There were no significant difference on PKC activity both in the intact cells treated with or without IL2. On the contrary, PKC activity did not decrease by direct incubation with SMD in the cell lysate ($p > 0.05$, shown in Fig 6B). Fig 7A and B shows that cAMP-dependent protein kinase activity (PKA) in the presence of cAMP was not affected both in the intact cells and

cell lysate treated by SMD. These results indicated that SMD was able to inhibit PTK activity both of dependent or independent-IL2. PKC activity was not inhibited directly, but inhibited indirectly by SMD. No inhibition of PKA activity was observed by SMD in CTLL-2 cells, and suggested that SMD is a protein tyrosine kinase inhibitor.

5. Effects of SMD on the expression of Bcl-2 homologous proteins and Bcl-2 mRNA

To explore the possible role of bcl-2 and bax in the SMD induced-apoptosis, we examined the effects of SMD on bcl-2 and bax protein expression analyzed by western blot analysis. Fig 8A,B shows that there was a significantly increase in bcl-2 protein at 4 h in the cells treated with IL2, and it continued to reach a highest level up to 12 h, and then bcl-2 protein subsequently underwent decrease. Bcl-2 protein was suppressed when SMD was added in the cultures. Fig 9A,B shows the detectable levels of bcl-2 protein began to be decreased by SMD (10-20 $\mu\text{g/ml}$) treatment, and the inhibitory effect of SMD on bcl-2 protein was in a dose -dependent manner. As indicated in Fig 10, the incubation of CTLL-2 cells without IL2 which was similar to SMD-induced apoptosis or with IL2 failed to induced a change in bax expression, indicating that there is no alteration in bax protein expression on the apoptosis process in CTLL-2 cells. We further examined the level of bcl-2 mRNA by northern blot analysis in order to determine whether the suppression of bcl-2 protein is due to a decrease in bcl-2 molecules. As shown in Figure 11, there was a significantly decrease in bcl-2 mRNA expression in the cell incubation either without IL2 (lane1) or with SMD plus IL2 (lane3) in comparison to IL2 alone (lane2).

6. Effect of TPA on apoptosis induced by SMD

TPA (phorbol ester, 12-O-Tetradecanoylphorbol 13-acetate) is a protein kinase C (PKC) activator, as well as considered as a promoter carcinogen. Some studies demonstrate that PKC activator inhibit apoptosis (21-23). So that we investigated whether or not TPA is able to block DNA fragmentation induced by SMD. As shown in Fig 12, the cells treated with 20 $\mu\text{g/ml}$ SMD showed some DNA fragmentation appeared (lane3), and TPA inhibited this DNA fragmentation (lane4). In contrast, TPA did not block DNA fragmentation induced by 50 $\mu\text{g/ml}$ SMD (lane6). The data indicated that TPA have an inhibitory effect on the apoptosis induced by SMD at dose of 20 $\mu\text{g/ml}$. Next, we examined the expression of anti-apoptotic bcl-2 protein and caspase-3 activity to further characterize some mechanism in TPA blocked-apoptosis. As shown in Fig 13A,B, western blot analysis revealed that TPA could restore the inhibition of bcl-2 protein expression caused by 20 $\mu\text{g/ml}$ SMD (lane 4). Fig 14 shows that the caspase-3 activity was increased after the withdrawal of IL2 and treatment of SMD either 20 $\mu\text{g/ml}$ or 50 $\mu\text{g/ml}$ ($p<0.01$) in comparison with IL2 treatment alone. TPA restored the increase in caspase-3 activity caused by 20 $\mu\text{g/ml}$ SMD ($p<0.05$), however, did not reverse the elevation of caspase-3 activity treated by 50 $\mu\text{g/ml}$ SMD ($p>0.05$). These results indicated that caspase-3 activity is involved in apoptosis process and TPA was able to attenuate apoptotic cell death at least in part through increasing of expression of bcl-2 protein and inhibiting of caspase-3 activity in CTLL-2 cells.

Discussion

Apoptosis can be induced by diverse signaling pathway in a variety of cell lineages. In this report, we investigated the mechanism of antiproliferative effect of SMD (a new polyphenol synthetic analogue) and found that SMD can suppress tyrosine kinase activity and the cell proliferation. This inhibitory effects by SMD were associated with the induction of apoptosis. DNA fragmentation is widely used to assess apoptosis. The present study shows that DNA fragmentation was observed in time and dose-dependent manner, and required at least 12 h and 20 $\mu\text{g/ml}$ of exposure to SMD after the addition of IL2 (Fig 2). This is consistent with the time and dose-fashion of inhibition of cell viability as assessed by trypan blue dye exclusion (Fig 1).

The protein phosphorylation is by far the most common mechanism for posttranslational regulation of protein function, therefore, the role of protein phosphorylation during apoptosis have been described in many reports. Ohoka and coworkers have demonstrated, using okadaic acid, that protein dephosphorylation is an essential step for glucocorticoid-induced apoptosis in murine T-cell hybridomas (24). A correlation has been observed between the dephosphorylations of protein by downregulation of cPKC and the induction of apoptosis in prolong culture of promonocyte leukaemia cells (U937 cells) (25). During Fas-mediated apoptosis, tyrosine phosphorylation at about 56-60, 70 and 100-110 kDa was increased in a human T-cell line (26). Barkett et al. have documented that cleavage of I κ B-alpha by CPP32 was blocked by serine phosphorylation of I κ B-alpha (27). Exposure of U936 cell, a human myeloid leukemia cell line to etoposide stimulated the tyrosine-phosphorylation of 30 and 60 kDa proteins in etoposide-induced apoptosis (28). It is well known that IL2 receptor (IL-2R) have intracellular domain to which associates an intrinsic protein-tyrosine

kinase (PTK) (29). Turner et al. reported that the activity of serine/threonine specific Raf-1 kinase can be regulated by tyrosine phosphorylation in CTLL-2 cells (30). Thus, tyrosine phosphorylation is considered often occur early in signalling cascades in the many survival factor receptors, and then, their effect can be strongly amplified via, e.g., serine/threonine kinases (10). In our study, we have demonstrated that of these phosphorylated-proteins, the about 91, 80 and 55kDa tyrosine phosphorylated-proteins, 46.5kDa serine phosphorylated-protein and 31.5kDa threonine phosphorylated-protein were dependent on IL2 in CTLL-2 cells, and implied that the cell proliferation in IL2-driven CTLL-2 cells is involved in both tyrosine phosphorylation and serine/threonine phosphorylation pathways. All of tyrosine phosphorylation of about 91, 80 and 55kDa proteins which were dependent on IL2 were suppressed in SMD-induced apoptosis process, although the nature of these proteins are as yet unidentified. Our findings suggested that SMD induced apoptosis through the inhibition of tyrosine phosphorylation rather than that of serine/threonine phosphorylation, and tyrosine phosphorylation play an important role on the apoptotic process in SMD-induced apoptosis.

We next examined the effects of SMD on protein phosphorylating enzymes- protein kinase activities in order to explore the possible role of protein kinases, because SMD could affect the tyrosine phosphorylation proteins on apoptosis process induced by SMD in CTLL-2 cells. Many studies have been shown that tyrosine kinase activity can trigger the cell proliferation and apoptosis process in multiple cells. The PTK inhibitors, herbimycin and genistein prevented the radiation-induced phosphorylation and inhibited apoptosis, and suggesting that protein tyrosine kinases play a

pivotal role in the apoptosis induced by radiation (31). Bae et al, recently reported that the protein tyrosine kinase activation is required for upregulation of Fas ligand (FasL) expression and subsequent mediation of Fas death signaling account for aburatubolactam C (a novel inhibitor of superoxide anionic generation) induced apoptosis in Jurkat cells (32). In the present study, three of protein kinase activities were investigated, protein tyrosine kinase activity (PTK) which are responsible for less than 1% of protein phosphorylation within cells; and two serine/threonine kinases, protein kinase C (PKC) and cAMP-dependent protein kinase(PKA) activities. We found that SMD significant inhibited PTK activity by the concentration of 10 μ g/ml. On the other hand, SMD did not affected PKA activity and PKC activity in the cell lysate, although when exposing intact cells to SMD, PKC activity was inhibited. Thus, suggesting that SMD may act through inhibition of protein tyrosine kinase activity, and subsequently suppressed PKC activity that is in downstream of PTK to induce cell apoptotic death. Our finding also indicated that SMD is a novel protein tyrosine kinase inhibitor.

The bcl-2 family including its homologues, and caspase family of cysteine proteases play important roles in regulating apoptotic cell death induced by a variety of stimuli in mammalia cells (33-36). Bcl-2 gene family, acting at a central checkpoint in the apoptotic pathway, can suppress apoptosis. while, caspase family of cysteine protease facilitate apoptosis that functional site is in the downstream of bcl-2 influence (37). In this study, we examined the effect of SMD-induced apoptosis on the expression of bcl-2 and bax. We found that a obvious amounts of bcl-2 protein (Fig 8,9) and mRNA (Fig 11) were seen after 12 h of treatment with IL2. However, both bcl-2 protein and mRNA were inhibited

by SMD treatment. In contrast, bax protein was not changed when the cells exposure to IL2 deprivation or treatment of IL2 or SMD, suggesting that SMD induced apoptosis through the alteration of bcl-2 protein level and mRNA expression, but not through that of bax protein level. The data presented herein argues the ratio of the expression of bax to bcl-2 play a predominant role in the apoptosis process, up-regulation of bax or down-regulation of bcl-2 facilitates apoptosis (38). Recently, in some system, bax binding bcl-2 was not sufficient to prevent apoptosis and the overexpression of bcl-2 or bcl-XL can repress apoptosis in the absence of bax (39,40). These observation are concomitant with our findings. The mechanism of bcl-2 on anti-apoptotic properties has also been elusive. Bcl-2 is considered as a phosphoprotein. It may be regulated by phosphorylation (41,42). Bcl-2 prevent apoptosis also through blocking cytochrome C release from mitochondria (43). We next measured caspase-3/ CPP32 activity to understand whether or not caspase family of cysteine proteins contribute to the apoptosis process induced by SMD in CTLL-2 cells, because overexpression of these proteases frequently results in apoptosis (44) and bcl-2 and caspase inhibitor can abrogate the activation of caspase leading to cell survival(37). Recently, Hughes et al. reported that disruption of the natural K^+ electrochemical gradient suppressed the activity of both caspase and apoptosis induced by glucocorticoid dexamethasone, thapsigargin and staurosporin (36). In present study, we shows that an increase in caspase-3 activity in response to both IL2 deprivation and SMD-treatment was observed (Fig 14). These results suggested the caspase-3 protease is involved in the apoptosis process in CTLL-2 cells, although the involvement of ICE family proteases other than caspase-3 on the apoptosis process is not yet clear.

Protein kinase C (PKC) is intimately involved in the regulation of cell proliferation and cell survival (45). TPA, a protein kinase C activator, have been reported to protect several cell lines from apoptosis induced by a variety of agents (46,47). Our studies shows that PKC activity was inhibited through suppressing PTK activity in apoptotic cell death by SMD and TPA can attenuate apoptotic cell death induced by SMD. This was interpreted to be due to PKC activation. Now it is unclear that why activation of PKC blocked apoptosis induced by different agents. A correlation has been observed between the dephosphorylation and downregulation of cPKC and the induction of apoptosis, and suggesting PKC provides a survival signal that can be supplied by PKC α alone (25). Knox et al (48) reported that the PKC isozyme distribution are associated with the regulation of apoptosis in stratified squamous epithelium and coincident with the presence of bcl-2 protein. We also shown that TPA reduced the extent of cell death at least in part by increasing the expression of the bcl-2 anti-apoptotic protein and inhibiting of caspase-3 activity. Our observations are concomitant with above reports.

In summary, in this study, we conclude that SMD possesses potential antiproliferative activity that rapidly induces apoptotic cell death in CTLL-2 cells. This apoptosis process is correlated with the inhibition of protein tyrosine phosphorylation, protein tyrosine kinase and subsequently suppression of protein kinases C that is in downstream of PTK without affecting PKA activity, as well as the decrease in bcl-2 protein and increase in caspase-3 activity, and suggesting that SMD is a protein tyrosine kinase inhibitor and expected to be a promising candidate for novel antiproliferative therapeutics. Our results also imply that multiple parallel and possible independent apoptotic pathway

exist in CTLL-2 cells rather than a single linear pathway.

Acknowledgements

This work supported in part by the Medical Association of Japanese and Chinese which provided a fellowship is gratefully acknowledged. The author thanks the numerous colleagues for their help in various ways and many stimulating discussions.

References

1. Chen, X.G., Lui, H.Y., Lei, X.G., Yan, L., and Han, J. (1998). S-3-1 inhibits lipid peroxidation and scavenges free radicals in vitro. *Chinese Medical Sciences Journal* 13, 3.
2. Chen, X.G., Fu, Z.D, and Han, J. (1995). L-519, A phenolic compound, inhibits metabolism of benzo(a)pyrene and mutagenesis induced by benzo(a)pyrene. *Chinese Journal of Cancer Research* 7(1): 5-9.
3. Steller, H. (1995). Mechanisms and genes of cellular suicide. *Science* 267, 1445-9.
4. Saini, K. S. and Walker, N. I. (1998). Biochemical and molecular mechanisms regulating apoptosis. *Mol Cell Biochem* 178, 9-25.
5. Lincz, L. F. (1998). Deciphering the apoptotic pathway: all roads lead to death. *Immunol Cell Biol* 76,1-19.
6. Hale, A. J., Smith, C. A., Sutherland, L. C., Stoneman, V. E., Longthorne, V.L., Culhane, A. C. and Williams, G. T. (1996). Apoptosis: molecular regulation of cell death [published erratum

- appears in Eur J Biochem 1996 May 1;237 (3):884]. Eur J Biochem 236, 1-26.
7. Lavin, M. F., Watters, D. and Song, Q. (1996). Role of protein kinase activity in apoptosis. *Experientia* 52, 979-94.
 8. Cohen, G. M. (1997). Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem J* 326, 1-16.
 9. Yuan, J., Shaham, S., Ledoux, S., Ellis, H. M. and Horvitz, H. R. (1993). The *C. elegans* cell death gene *ced-3* encodes a protein similar to mammalian interleukin -1 beta-converting enzyme. *Cell* 75, 641-52.
 10. Gjertsen, B. T. and Doskeland, S. O. (1995). Protein phosphorylation in apoptosis. *Biochim Biophys Acta* 1269, 187-99.
 11. Parker, B. W., Kaur, G., Nieves-Neira, W., Taimi, M., Kohlhagen, G., Shimizu, T., Losiewicz, M. D., Pommier, Y., Sausville, E. A. and Senderowicz, A. M. (1998). Early induction of apoptosis in hematopoietic cell lines after exposure to flavopiridol. *Blood* 91, 458-65.
 12. Sinha, B. K., Yamazaki, H., Eliot, H. M., Schneider, E., Borner, M. M. and O'Connor, P. M. (1995). Relationships between proto-oncogene expression and apoptosis induced by anticancer drugs in human prostate tumor cells. *Biochim Biophys Acta* 1270, 12-8.
 13. Gillis, S., Baker, P. E., Ruscetti, F. W. and Smith, K. A. (1978). Long-term culture of human antigen-specific cytotoxic T-cell lines. *J Exp Med* 148, 1093-8.
 14. Tennant, J.R. (1964). Evaluation of the trypan blue technique for determination of cell viability. *Transplantation*. Vol.2, No.6, 685-694

15. Smith, C. A., Williams, G. T., Kingston, R., Jenkinson, E. J. and Owen, J. J. (1989).
Antibodies to CD3/T-cell receptor complex induce death by apoptosis in immature T cells in
thymic cultures. *Nature* 337, 181-4.
16. Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of
bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-5.
17. Chomczynski, P. and Sacchi, N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid
guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162, 156-9.
18. Cleary, M. L., Smith, S. D. and Sklar, J. (1986). Cloning and structural analysis of cDNAs for
bcl-2 and a hybrid bcl-2/immunoglobulin transcript resulting from the t(14;18) translocation. *Cell*
47, 19-28.
19. Otani K, Yano Y, Hasuma T, Arakawa T, Kobayashi K, Matsui-Yuasa I, and Otani S.(1998).
Polyamine metabolism of rat gastric mucosa after oral administration of hypertonic sodium
chloride solution. *Am J Physiol* 274:G299-305.
20. Casciola-Rosen, L., Nicholson, D. W., Chong, T., Rowan, K. R., Thornberry, N. A., Miller,
D. K. and Rosen, A. (1996). Apopain/CPP32 cleaves proteins that are essential for cellular
repair: a fundamental principle of apoptotic death [see comments]. *J Exp Med* 183, 1957-64.
21. Forbes IJ, Zalewski PD, Giannakis C, and Cowled PA. (1992). Induction of apoptosis in
chronic lymphocytic leukemia cells and its prevention by phorbol ester. *Exp Cell Res* 198:367-
72.

22. McConkey DJ, Hartzell P, Jondal M, and Orrenius S. (1989). Inhibition of DNA fragmentation in thymocytes and isolated thymocyte nuclei by agents that stimulate protein kinase C. *J Biol Chem* 264:13399-402.
23. Tomei LD, Kanter P, and Wenner CE. (1988). Inhibition of radiation-induced apoptosis in vitro by tumor promoters. *Biochem Biophys Res Commun* 155:324-31.
24. Ohoka, Y., Nakai, Y., Mukai, M. and Iwata, M. (1993). Okadaic acid inhibits glucocorticoid-induced apoptosis in T cell hybridomas at its late stage. *Biochem Biophys Res Commun* 197, 916-21.
25. Whelan, R. D. and Parker, P. J. (1998). Loss of protein kinase C function induces an apoptotic response. *Oncogene* 16, 1939-44.
26. Schlottmann, K. E., Gulbins, E., Lau, S. M. and Coggeshall, K. M. (1996). Activation of Src-family tyrosine kinases during Fas-induced apoptosis. *J Leukoc Biol* 60, 546-54.
27. Barkett, M., Xue, D., Horvitz, H. R. and Gilmore, T. D. (1997). Phosphorylation of IkappaB-alpha inhibits its cleavage by caspase CPP32 in vitro. *J Biol Chem* 272, 29419-22.
28. Usami, I., Kubota, M., Bessho, R., Kataoka, A., Koishi, S., Watanabe, K., Sawada, M., Lin, Y. W., Akiyama, Y. and Furusho, K. (1998). Role of protein tyrosine phosphorylation in etoposide-induced apoptosis and NF-kappa B activation. *Biochem Pharmacol* 55, 185-91.
29. Miyazaki, T., Liu, Z. J., Kawahara, A., Minami, Y., Yamada, K., Tsujimoto, Y., Barsoumian, E. L., Permuter, R. M. and Taniguchi, T. (1995). Three distinct IL-2 signaling pathways

mediated by bcl-2, c-myc, and lck cooperate in hematopoietic cell proliferation. *Cell* 81, 223-31.

30. Turner, B. C., Tonks, N. K., Rapp, U. R. and Reed, J. C. (1993). Interleukin 2 regulates Raf-1 kinase activity through a tyrosine phosphorylation-dependent mechanism in a T-cell line. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 5544-8.
31. Uckun, F. M., Tuel-Ahlgren, L., Song, C. W., Waddick, K., Myers, D. E., Kirihara, J., Ledbetter, J. A., Schieven, G. L. (1992). Ionizing radiation stimulates unidentified tyrosine-specific protein kinases in human B-lymphocyte precursors, triggering apoptosis and clonogenic cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 9005-9.
32. Bae, M. A., Kang, H.S., Rue, S. W., Seu, J. H., Kim, Y. H. (1998). Enhanced expression of Fas ligand is associated with aburatumolactam C-induced apoptosis in human Jurkat T cells. *Biochem Biophys Res Commun* 246, 276-81.
33. Chen, Z., Naito, M., Mashima, T. and Tsuruo, T. (1996). Activation of actin-cleavable interleukin 1beta-converting enzyme (ICE) family protease CPP-32 during chemotherapeutic agent-induced apoptosis in ovarian carcinoma cells. *Cancer Res* 56, 5224-9.
34. He, J., Whitacre, C. M., Xue, L. Y., Berger, N. A. and Oleinick, N. L. (1998). Protease activation and cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase: an integral part of apoptosis in response to photodynamic treatment. *Cancer Res* 58, 940-6.
35. Zhu, W., Friedman, H. and Klein, T. W. (1998). Delta9-tetrahydrocannabinol induces apoptosis in macrophages and lymphocytes: involvement of Bcl-2 and caspase-1. *J Pharmacol Exp Ther*

286, 1103-9.

36. Hughes, F. M., Jr., Bortner, C. D., Purdy, G. D. and Cidlowski, J. A. (1997). Intracellular K⁺ suppresses the activation of apoptosis in lymphocytes. *J Biol Chem* 272, 30567-76.
37. Shimizu, S., Eguchi, Y., Kamiike, W., Matsuda, H. and Tsujimoto, Y. (1996). Bcl-2 expression prevents activation of the ICE protease cascade. *Oncogene* 12, 2251-7.
38. Oltvai, Z. N., Milliman, C. L. and Korsmeyer, S. J. (1993). Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell* 74, 609-19.
39. Cheng, E. H., Levine, B., Boise, L. H., Thompson, C. B. and Hardwick, J. M. (1996). Bax-independent inhibition of apoptosis by Bcl-XL. *Nature* 379, 554-6.
40. Knudson, C. M. and Korsmeyer, S. J. (1997). Bcl-2 and Bax function independently to regulate cell death. *Nat Genet* 16, 358-63.
41. Haldar, S., Jena, N. and Croce, C. M. (1995). Inactivation of Bcl-2 by phosphorylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 4507-11.
42. Haldar, S., Jena, N. and Croce, C. M. (1994). Antiapoptosis potential of bcl-2 oncogene by dephosphorylation. *Biochem Cell Biol* 72, 455-62.
43. Yang, J., Liu, X., Bhalla, K., Kim, C. N., Ibrado, A. M., Cai, J., Peng, T. I., Jones, D. P. and Wang, X. (1997). Prevention of apoptosis by Bcl-2: release of cytochrome c from mitochondria blocked [see comments]. *Science* 275, 1129-32.

44. Nicholson, D. W., Ali, A., Thornberry, N. A., Vaillancourt, J. P., Ding, C. K., Gallant, M., Gareau, Y., Griffin, P. R., Labelle, M., Lazebnik, Y. A. and et al. (1995). Identification and inhibition of the ICE/CED-3 protease necessary for mammalian apoptosis [see comments]. *Nature* 376, 37-43.
45. Nishizuka, Y. (1992). Intracellular signaling by hydrolysis of phospholipids and activation of protein kinase C. *Science* 258, 607-14.
46. Rodriguez-Tarduchy, G. and Lopez-Rivas, A. (1989). Phorbol esters inhibit apoptosis in IL-2-dependent T lymphocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 164, 1069-75.
47. Haimovitz-Friedman, A., Balaban, N., McLoughlin, M., Ehleiter, D., Michaeli, J., Vlodaysky, I. and Fuks, Z. (1994). Protein kinase C mediates basic fibroblast growth factor protection of endothelial cells against radiation-induced apoptosis. *Cancer Res* 54, 2591-7.
48. Knox, K. A., Johnson, G. D. and Gordon, J. (1993). A study of protein kinase C isozyme distribution in relation to Bcl-2 expression during apoptosis of epithelial cells in vivo. *Exp Cell Res* 207, 68-73.

Fig 1. Effect of SMD on the cell viability in CTLL-2 cells. The cells in the exponential growth were harvested and starved in the fresh RPMI 1640 with 10% FCS without TCGF for 8-10 h. SMD were added to the culture for 30 min before the addition of IL2. Viable cells were measured by trypan blue exclusion. Data are mean \pm SD of three determinations. (A) Kinetics. † $p < 0.05$ and †† $p < 0.01$ compared to time 0 h. * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ compared to IL2 alone at each time point. (B) Dose-response. * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ compared to IL2 alone.

Fig 2. Effect of SMD on DNA fragmentation in CTLL-2 cells. The cells were incubated and harvested after the addition of SMD and IL2 for agarose gel electrophoresis analysis as described in Materials and Methods. (A) kinetics. SMD is 50 $\mu\text{g/ml}$, and Herbimycin A (Hb A) is 0.25 $\mu\text{M/ml}$. (B) Dose-response. The cells were cultured up to 16 h. Lane 1: without IL2, Lane 2: with IL2, Lane 3: Herbimycin A (0.25 $\mu\text{M/ml}$) plus IL2, Lane 4: 0.1% DMSO plus IL2, Lane 5: SMD 0.5 $\mu\text{g/ml}$ plus IL2, Lane 6: SMD 5 $\mu\text{g/ml}$ plus IL2, Lane 7: SMD 10 $\mu\text{g/ml}$ plus IL2, Lane 8: SMD 20 $\mu\text{g/ml}$ plus IL2, Lane 9: SMD 50 $\mu\text{g/ml}$ plus IL2, Lane 10: SMD 100 $\mu\text{g/ml}$ plus IL2.

Fig 3. Effects of IL2 and SMD on tyrosine, serine and threonine phosphorylated-proteins in CTLL-2 cells. The cells were incubated stimulated with IL2 and SMD and harvested at 10 min. Cellular proteins were extracted and separated by SDS-PAGE electrophoresis. The tyrosine, serine and threonine phosphorylated-proteins were detected by western blot analysis with anti-phosphotyrosine, anti-serine and anti-threonine antibodies as described in Materials and Methods. M: Molecular size of protein was measured using Protein Molecular Weight Marker as the standard. The results are from three independent experiments. (A) Protein tyrosine phosphorylation. (B) Protein serine phosphorylation. (C) Protein threonine phosphorylation.

Fig 4. The extent of tyrosine, serine and threonine phosphorylated-protein was measured by a laser densitometer. (A) Phospho-tyrosine 91 kDa protein. (B) Phospho-tyrosine 80 kDa protein. (C) Phospho-tyrosine 55 kDa protein. (D) Phospho-serine 46.5 kDa protein. (E) Phospho-threonine 31.5kDa protein.

Fig 5. Effect of SMD on protein tyrosine kinase activity (PTK) in CTLL-2 cells. (A) Effect of SMD on PTK activity in intact cells. SMD (50 $\mu\text{g/ml}$) and IL2 were added to the cell culture at 37°C in the indicated time to measure PTK activity as described in Materials and Methods. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and $^{\circ}p > 0.05$ compared to IL2 values at each time point. ‡ $p < 0.05$ and † $p > 0.05$ compared to time 0 hr. (B) Effect of SMD on PTK activity in the cell lysate. NS not significant difference and ** $p < 0.01$ compared to with or without IL2 values, respectively.

Fig 6. Effect of SMD on protein kinase C activity (PKC) in CTLL-2 cells. (A) Effect of SMD on PKC activity in intact cells. SMD (50 $\mu\text{g/ml}$) and IL2 were added to the cell culture for 10 min at 37°C and harvested to detect PKC activity as described in Materials and Methods. ** $p < 0.05$ and NS $p > 0.05$ compared to IL2 values. (B) Effect of SMD on PKC activity in the cell lysate. † not significantly different compared to without IL2 values.

Fig 7. Effect of SMD on cAMP-Dependent Protein Kinase Activity (PKA) in CTLL-2 cells. (A) Effect of SMD on PKA activity in intact cells. SMD (50 $\mu\text{g/ml}$) and IL2 were added to the cell culture for 10 min at 37°C and harvested to detect PKA activity as described in Materials and Methods. There was no significant difference in each groups ($p > 0.05$). (B) Effect of SMD on PKA activity in the cell lysate. † not significantly different compared to without IL2 values.

Fig 8. Time-course of SMD effect on the expression of bcl-2 protein in CTLL-2 cells. SMD (50 $\mu\text{g/ml}$) and IL2 were added to the cultures, and the cells were incubated and harvested at indicated times to detect the level of bcl-2 protein. (A) Western blot analysis. (B) Densitometric analysis of bcl-2 expression using a laser densitometer.

Fig 9. Dose-response of SMD effect on the expression of bcl-2 protein in CTLL-2 cells. SMD at indicated concentrations and IL2 were added to the cultures. The cells were incubated and harvested at 12 h for the detection of bcl-2 protein. (A) Western blot analysis. (B) Densitometric analysis of bcl-2 expression using a laser densitometer.

Fig 10. Effect of SMD on the expression of bax protein in CTLL-2 cells. SMD and IL2 were added to the cultures, and the cells were incubated and harvested at 12 h for the detection of bax protein. (A) Western blot analysis. (B) Densitometric analysis of bax expression using a laser densitometer.

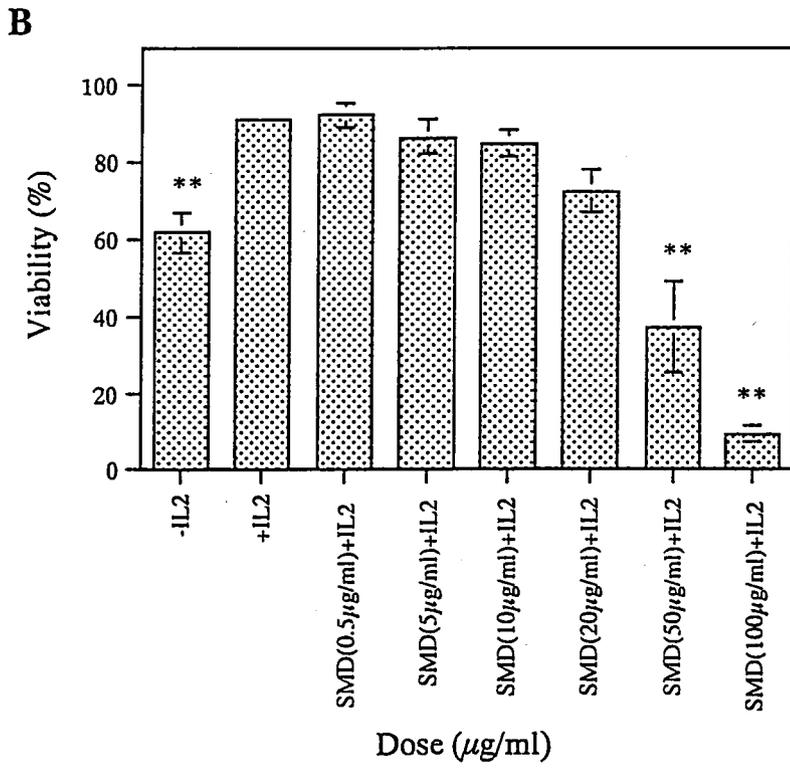
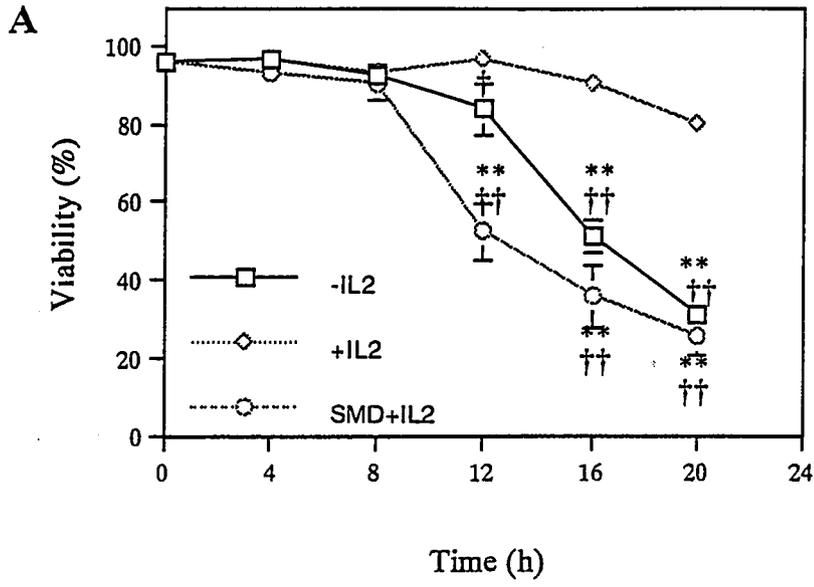
Fig 11. Effect of SMD on the expression of bcl-2 mRNA in CTLL-2 cells. The total RNA was isolated from the cells treated by SMD and IL2 at 12 h. mRNA was analyzed by Northern blot analysis. (A) Northern blot hybridization of bcl-2 mRNA. Lane 1: without IL2, Lane 2: with IL2, Lane 3: SMD 50 $\mu\text{g/ml}$ plus IL2. (B) The relative amounts of bcl-2 mRNA expression, as determined by a laser densitometer, and standardized to the amount of 18s-cDNA mRNA and expressed in arbitrary units.

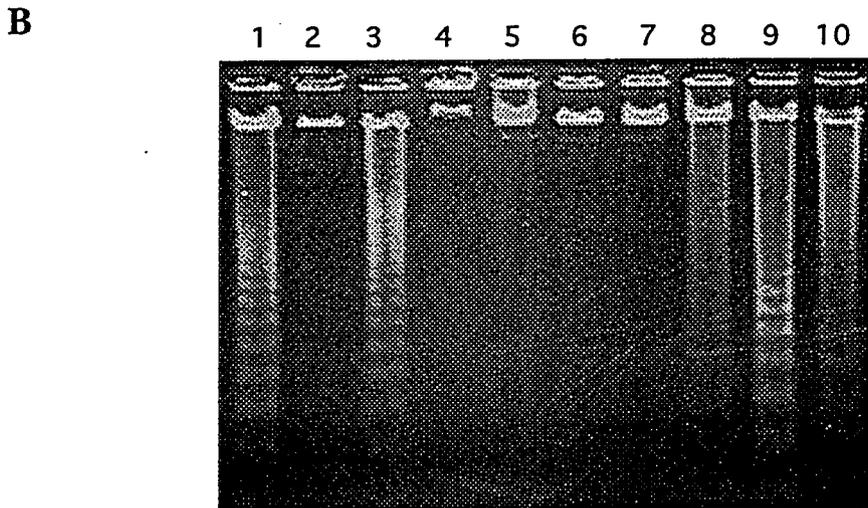
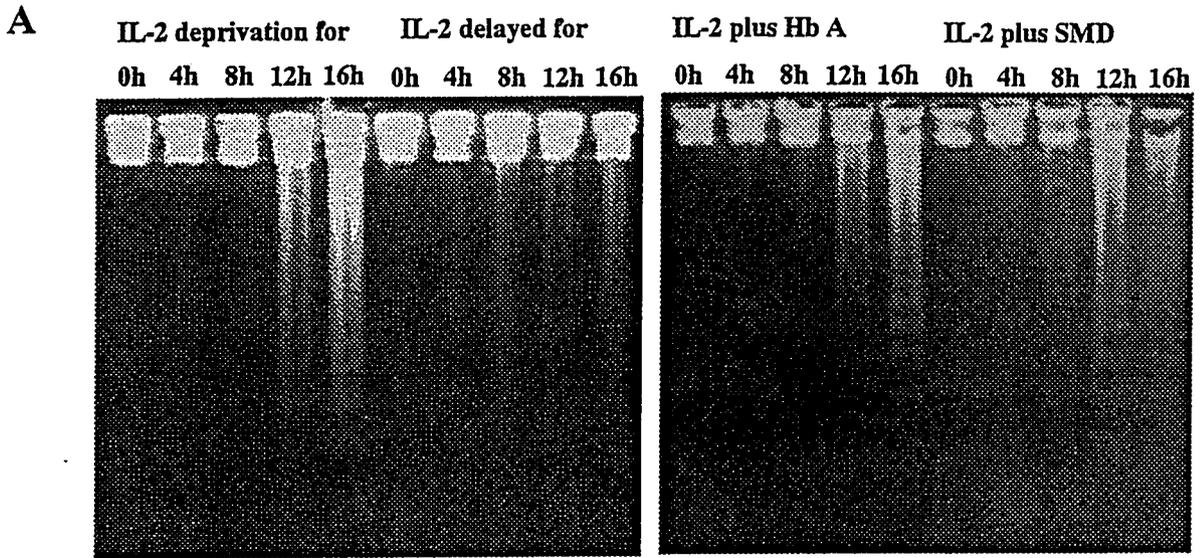
Fig 12. Effect of TPA on DNA fragmentation in the apoptosis induced by SMD. SMD was added to the cultures for 30 min before the addition of IL2 and TPA. The cells were incubated and harvested at 16 h. DNA fragmentation was analyzed as described in Materials and

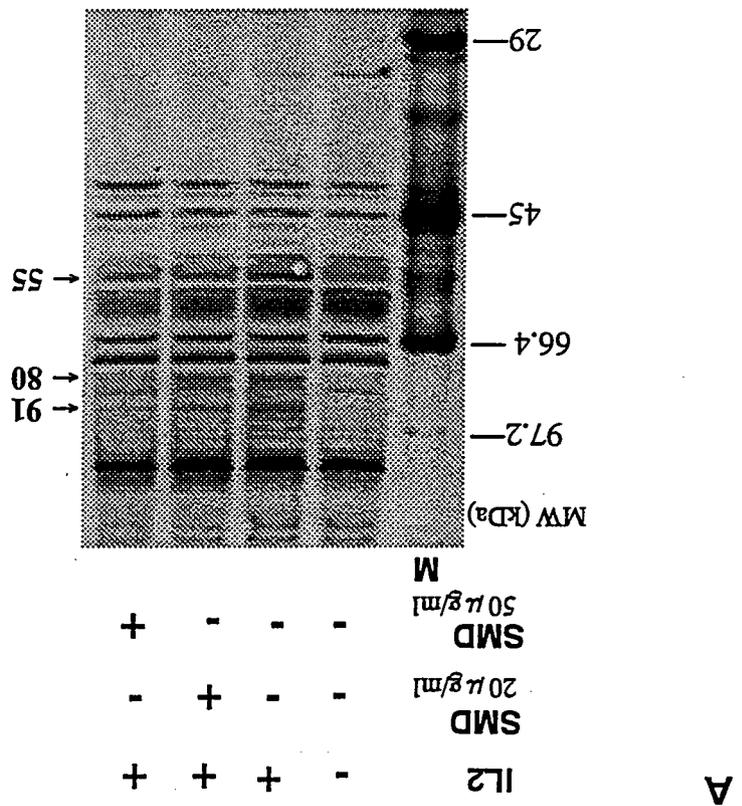
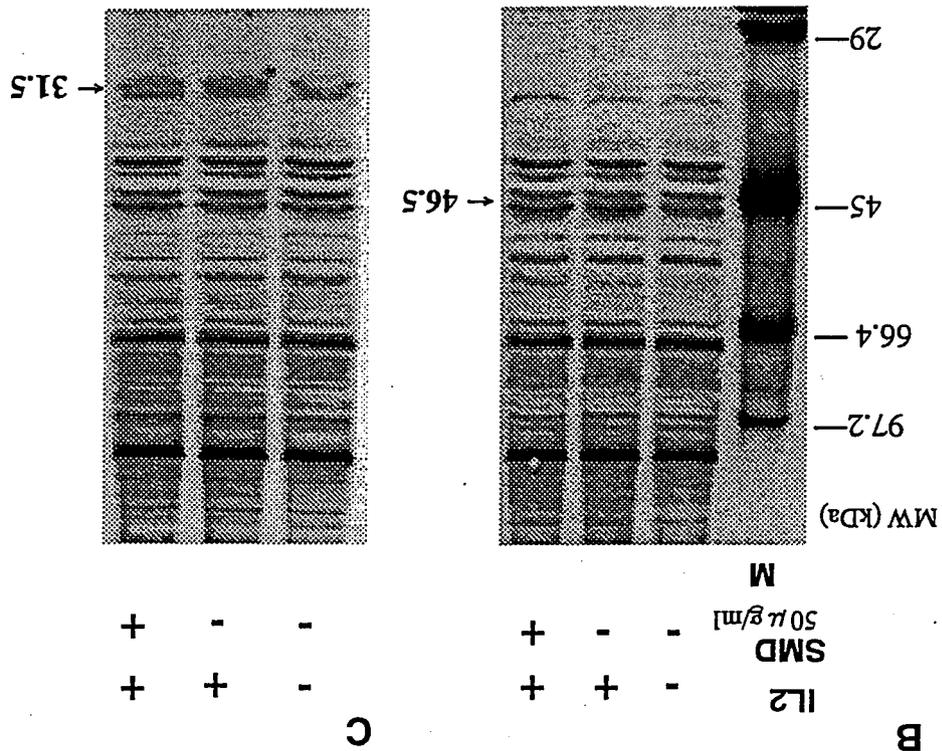
Methods. Lane 1: without IL2, Lane 2: with IL2, Lane 3: SMD (20 $\mu\text{g/ml}$) plus IL2, Lane 4: SMD (20 $\mu\text{g/ml}$) plus IL2 and TPA (0.05 $\mu\text{M/ml}$), Lane 5: SMD (50 $\mu\text{g/ml}$) plus IL2. Lane 6: SMD (50 $\mu\text{g/ml}$) plus IL2 and TPA (0.05 $\mu\text{M/ml}$).

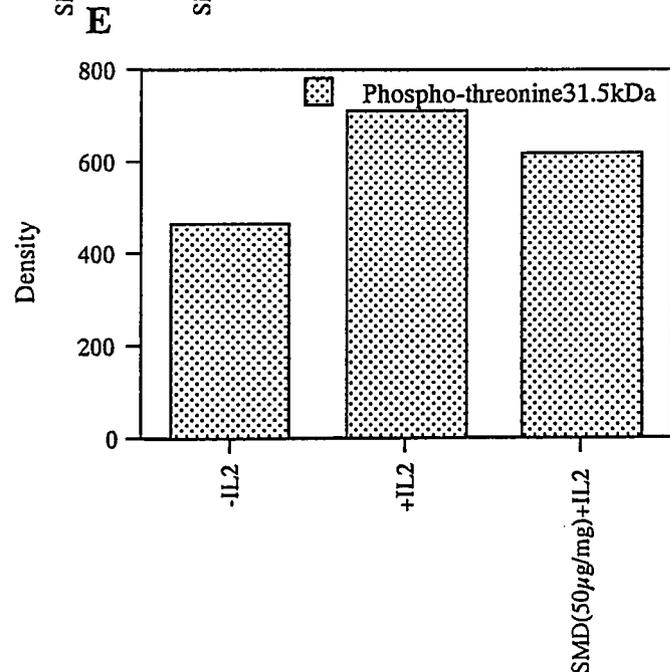
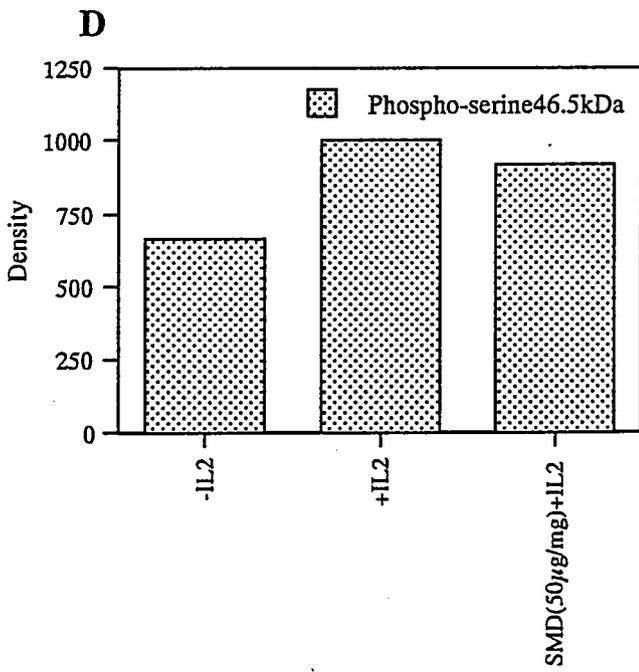
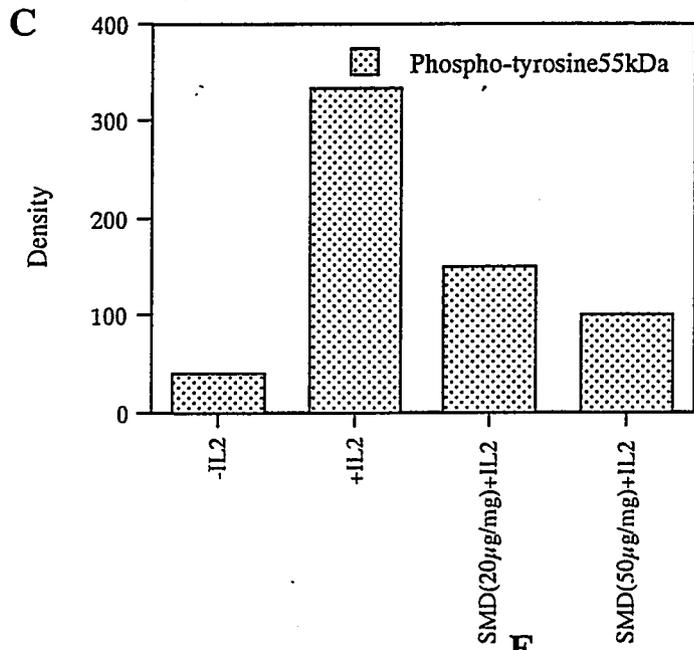
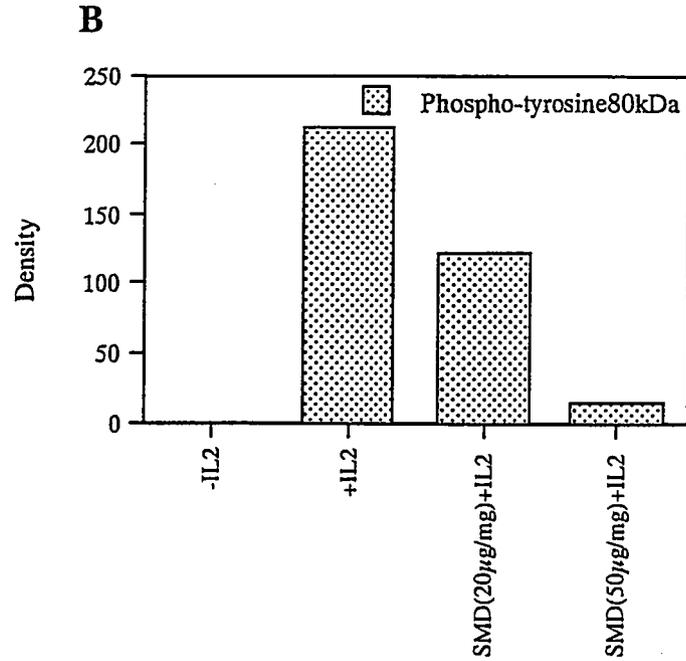
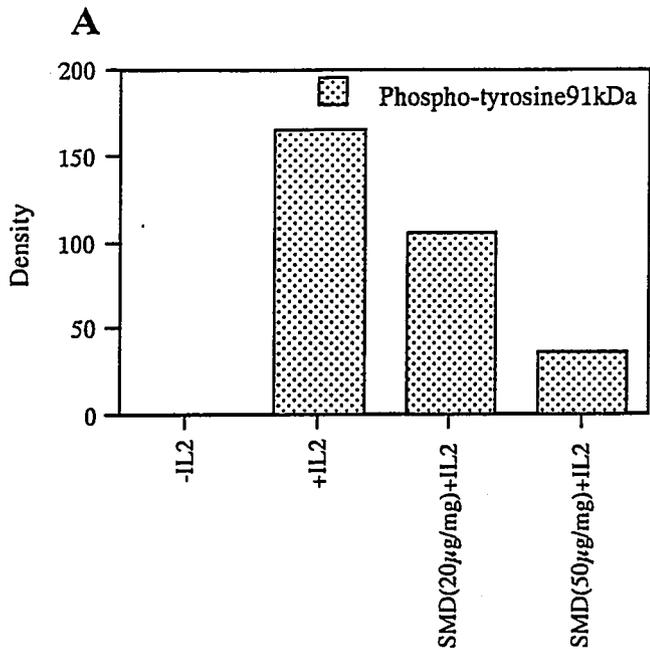
Fig 13. Effect of TPA on the expression of bcl-2 protein in the apoptosis induced by SMD. SMD (20 $\mu\text{g/ml}$), IL2 and TPA were added to the cultures. The cells were incubated and harvested at 12 h for the detection of bcl-2 protein. (A) Western blot analysis. (B) Densitometric analysis of bcl-2 expression using a laser densitometer.

Fig 14. Effect of SMD and TPA on caspase-3 activity in CTLL-2 cells. SMD, IL2 and TPA were added to the cultures. The cells were incubated and harvested at 16 h to measure caspase-3 activity as described in Materials and Methods. * $p < 0.01$ compared to IL2 alone. † $p < 0.05$ compared to SMD 20 $\mu\text{g/ml}$ plus IL2. †† $p > 0.05$ compared to SMD 50 $\mu\text{g/ml}$ plus IL2.

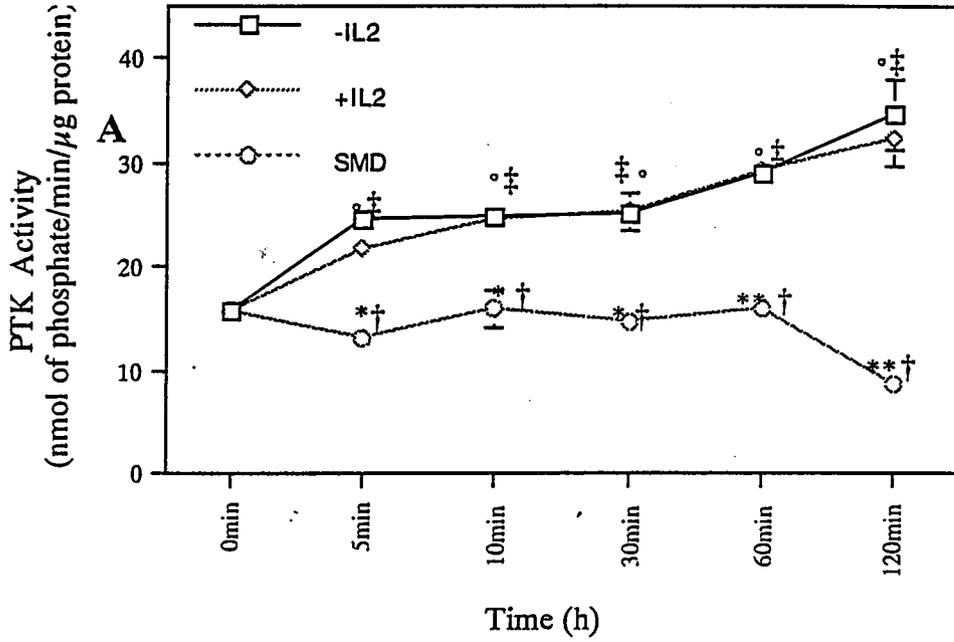




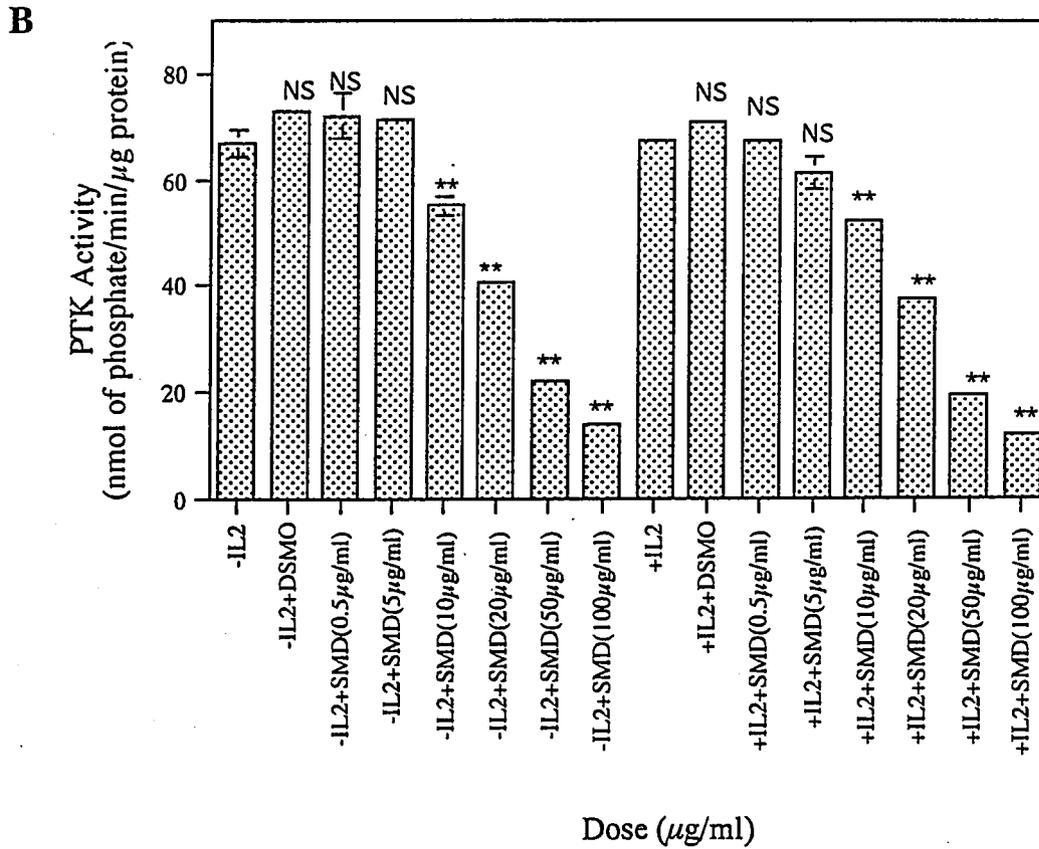




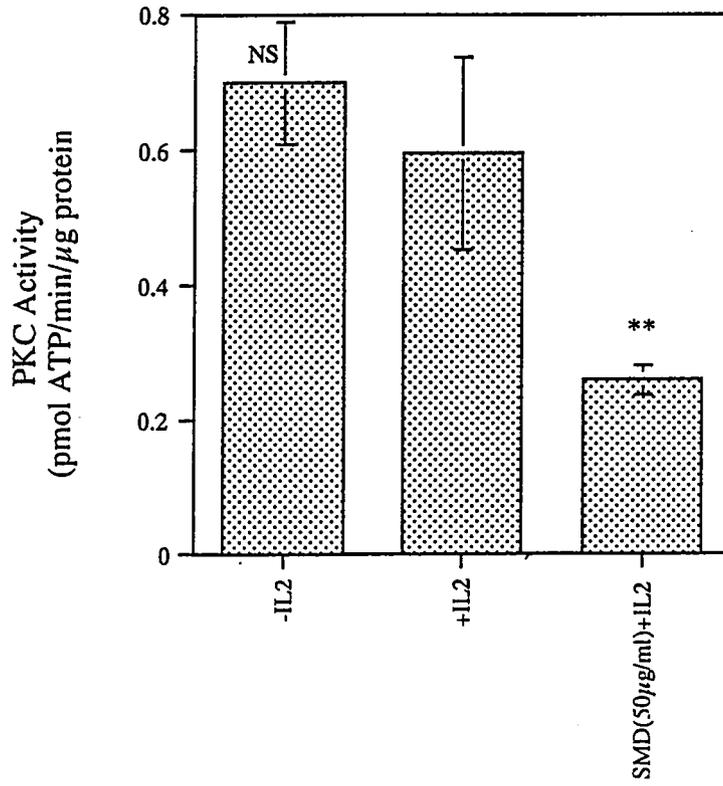
Intact Cell



Cell Lysate

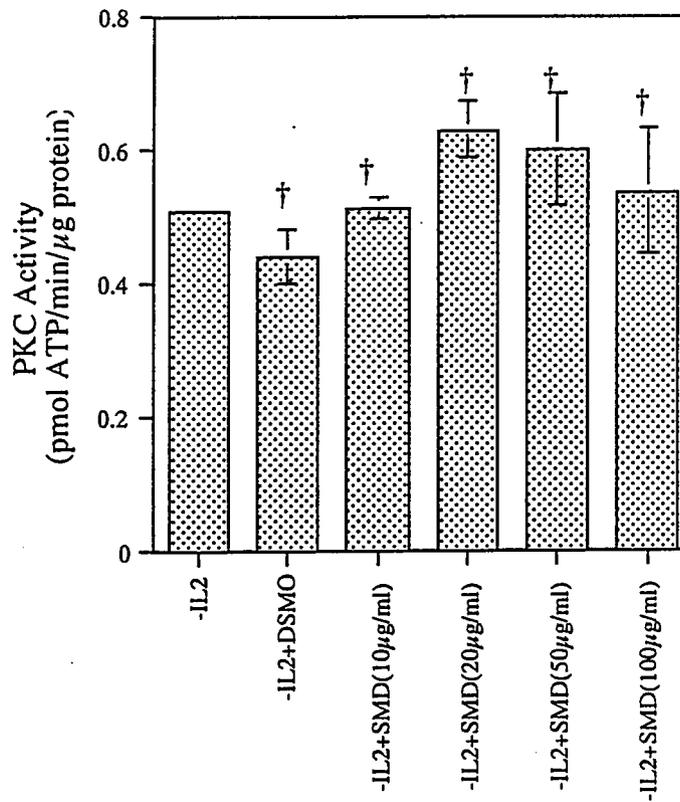


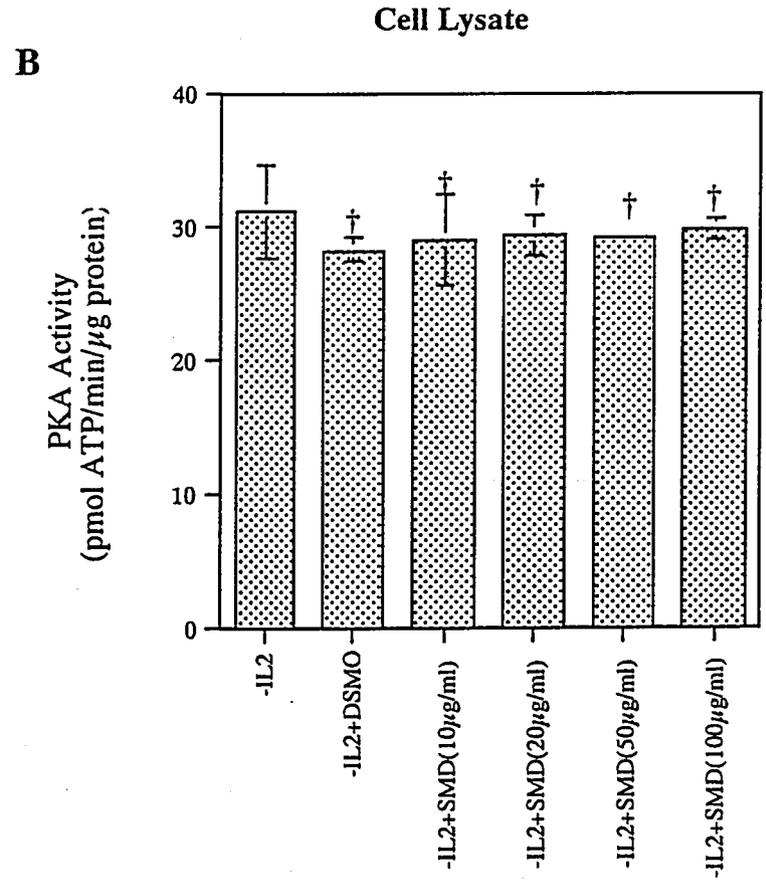
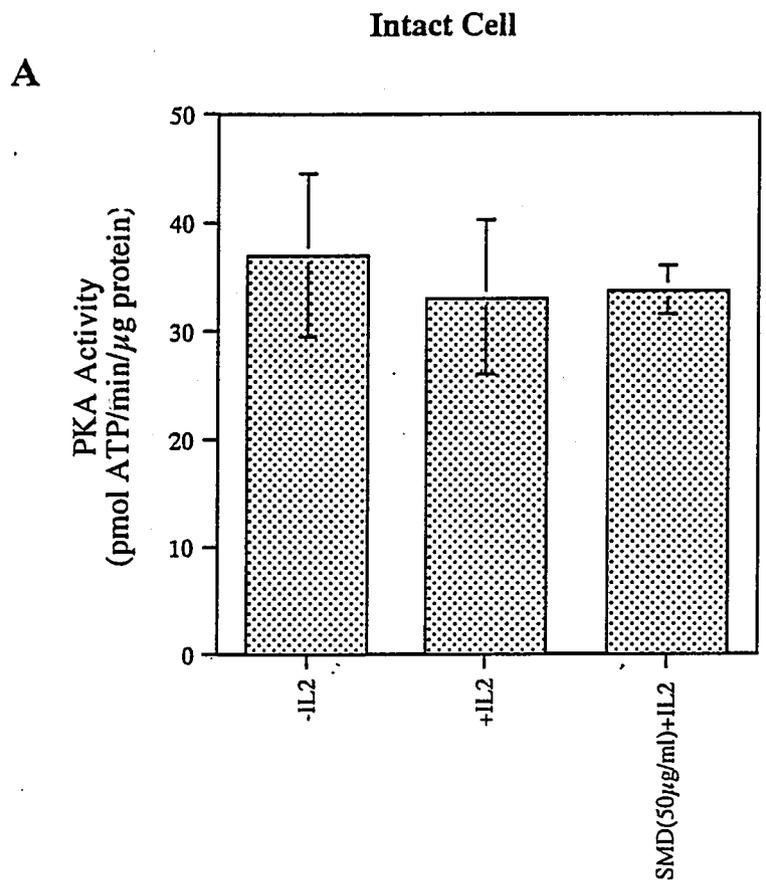
A



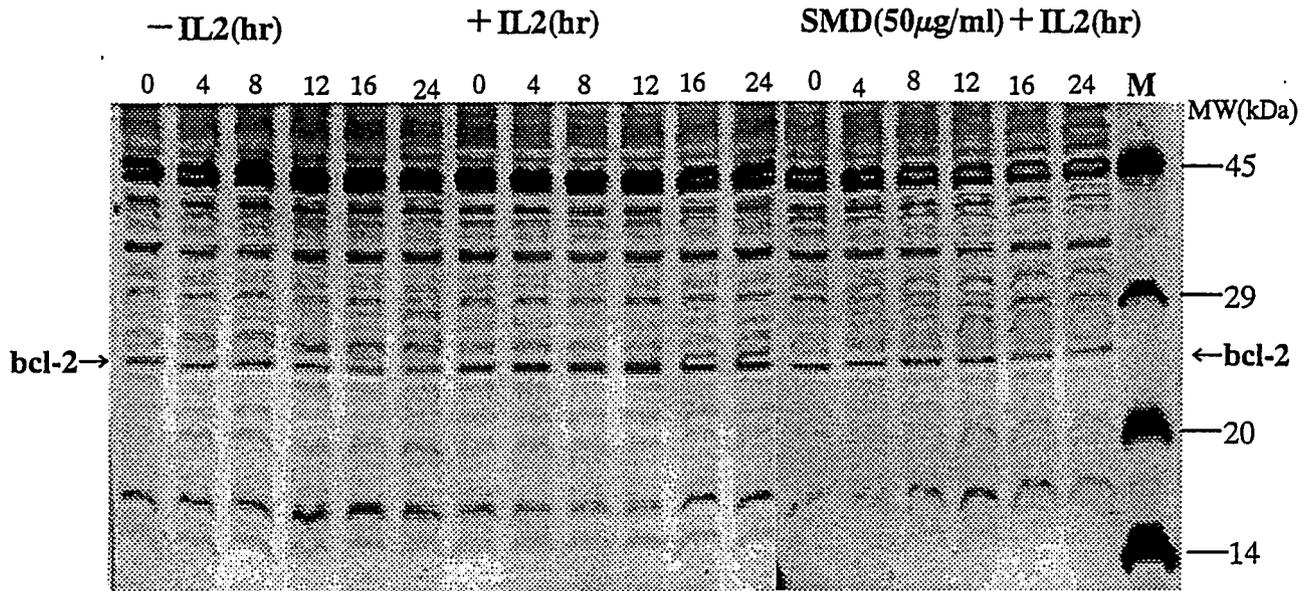
Cell Lysate

B

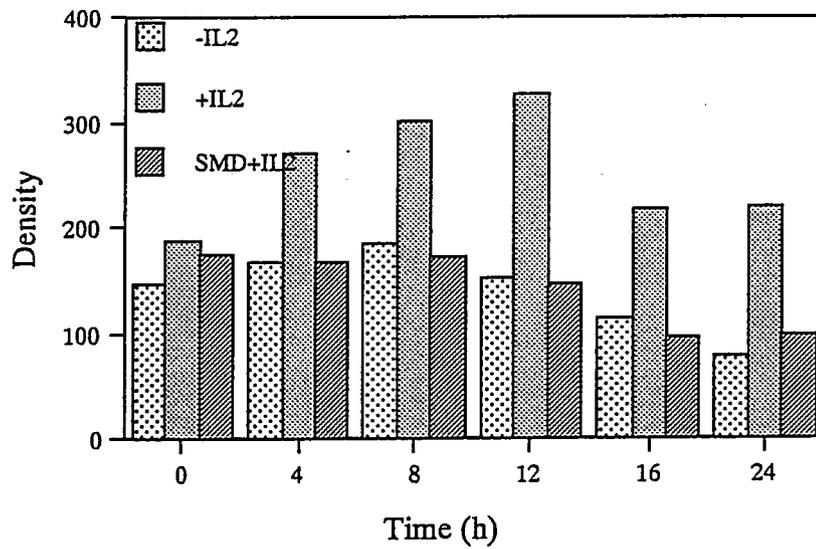




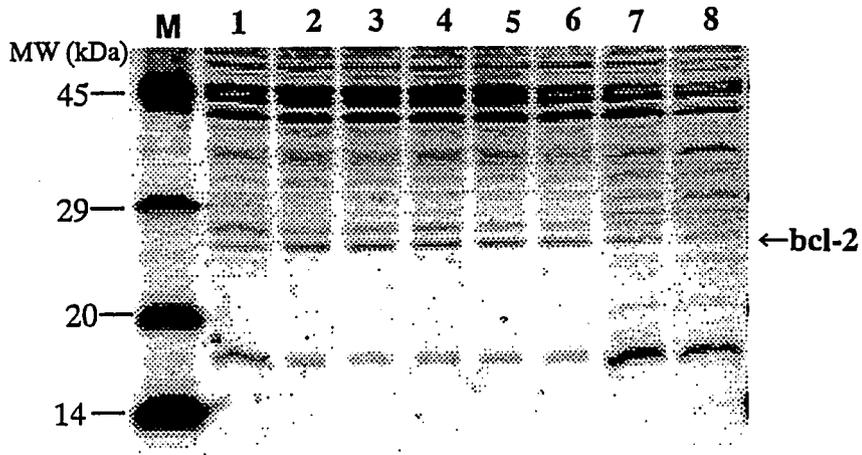
A



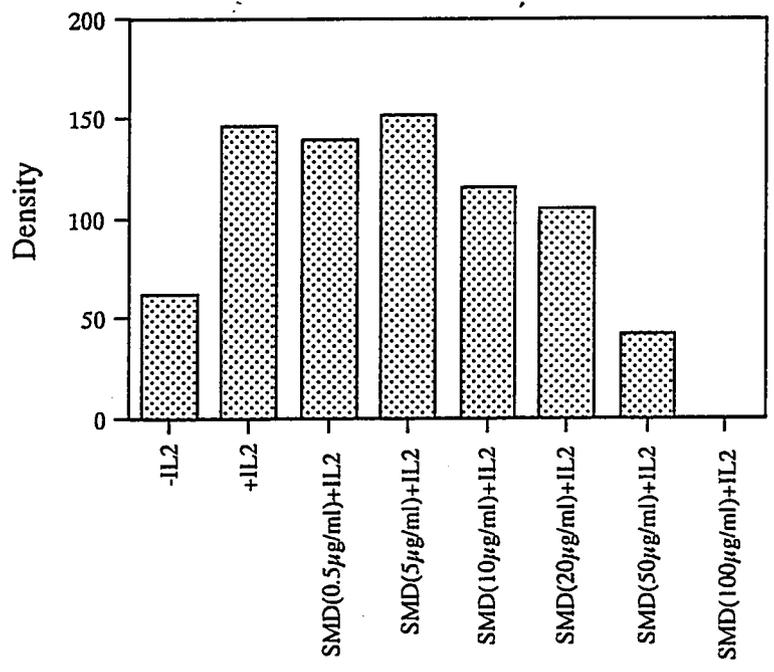
B

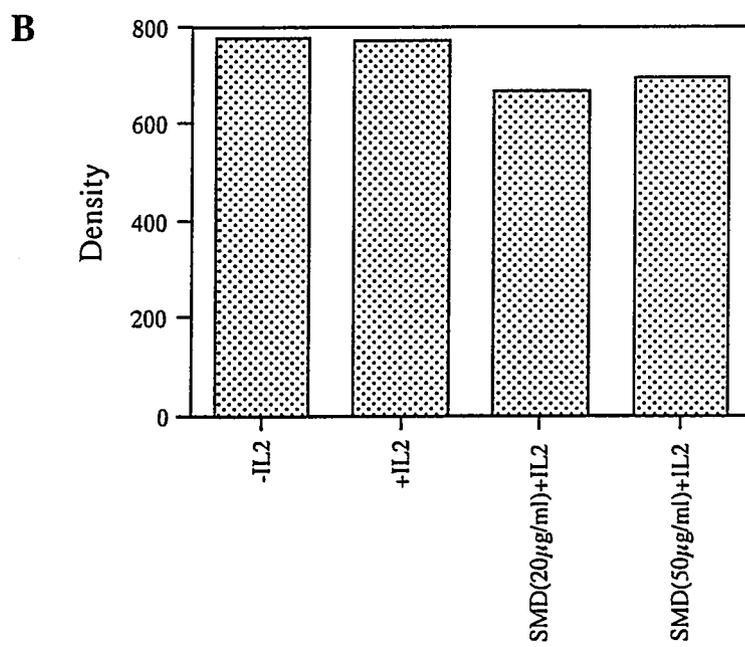
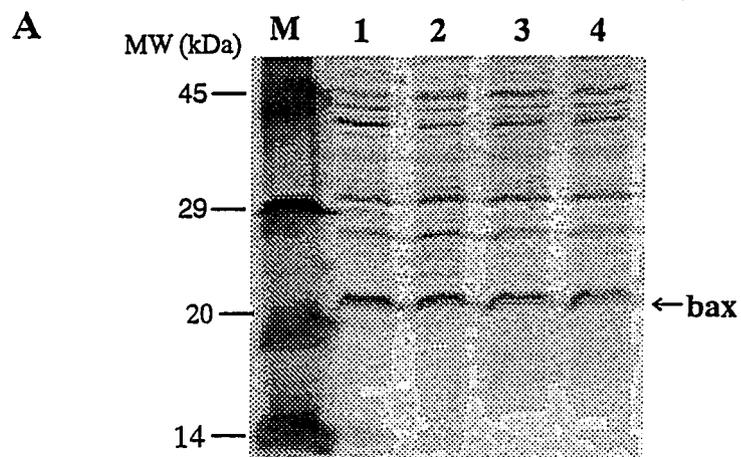


A

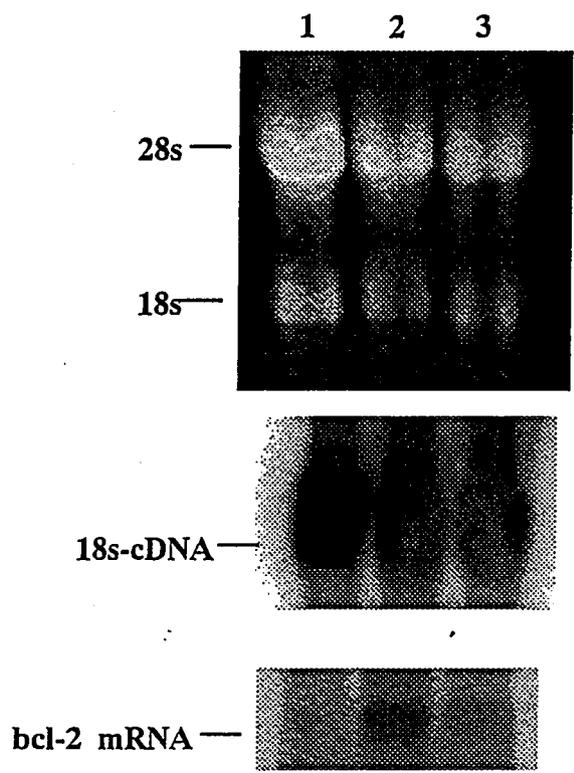


B

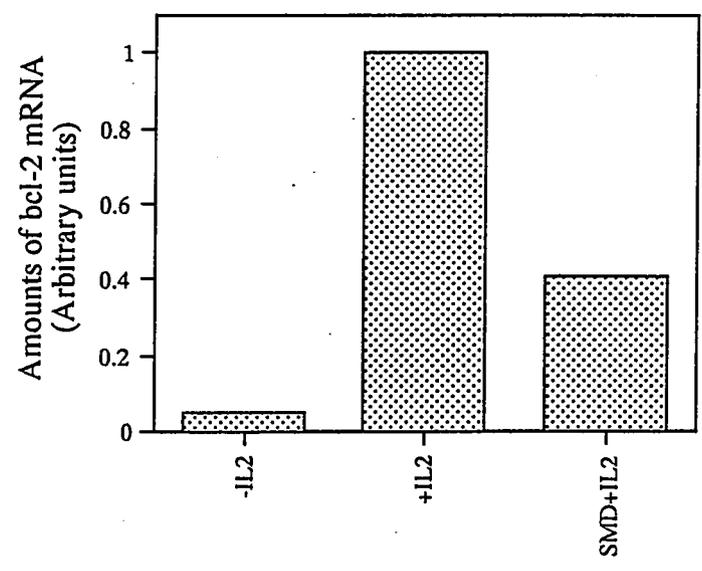


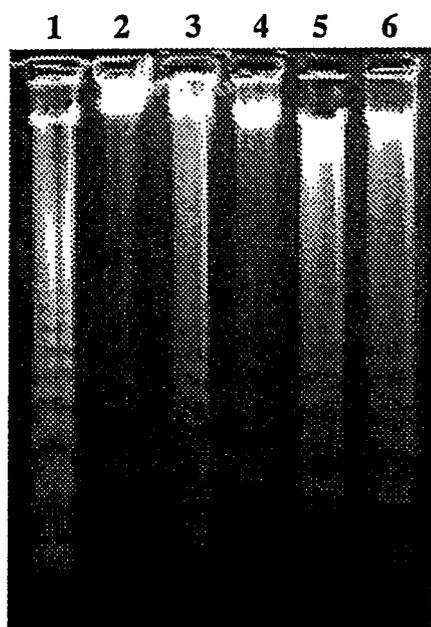


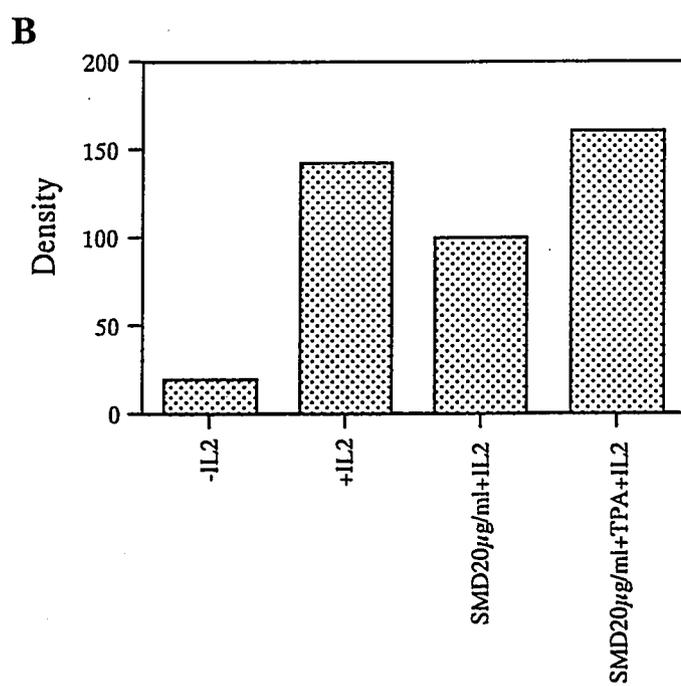
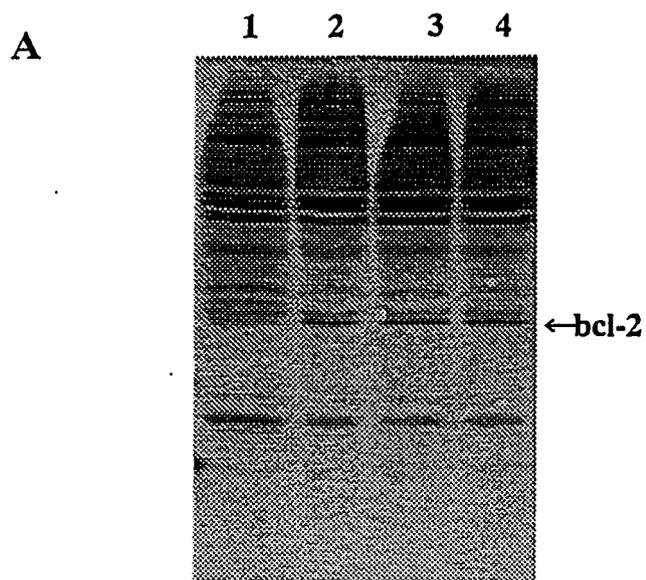
A

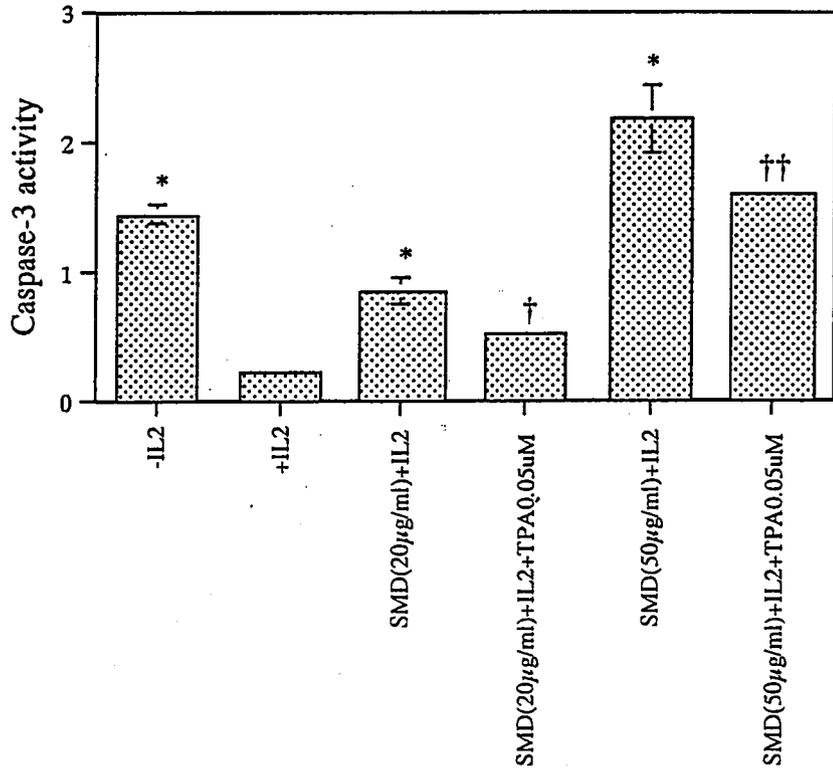


B









日本財団補助金による

1998年度日中医学協力事業報告書

-在留中国人研究者研究助成-

1999年3月9日

財団法人 日中医学協会

理事長 中島章 殿

研究室で撮影した本人のスナップ写真、及び発表論文のコピーを添付

1. 研究者氏名 柴崎 浩
研究機関 京都大学医学研究科脳病態生理学 研究指導者 柴崎 浩 職名 教授
所在地 〒606-8705京都市左京区聖護院川原町54 電話 075-751-3603 内線 _____

研究テーマ 非侵襲的測定法による高次脳機能及び脳血管障害の病態生理解明に関する研究

2. 本年度の研究業績

- (1) 学会・研究会等における口頭発表 有 (学会名・内容)
51th Annual Meeting of American Academy of Neurology.
発表予定日: April, 22, 1999 in Toronto.
Abstract 添付

- (2) 学会誌等に発表した論文 有 (雑誌名・論文名)

1. Arch Neurol, 1998, May; 55 (5): 609-614.

Atrophy of the corpus callosum, cortical hypometabolism, and cognitive impairment in corticobasal degeneration.

2. Brain (in submission)

Essential role of the human right parietal cortex in Japanese mirror reading: an fMRI study.

3. 今後の研究計画

1) fMRI および PET による Binswanger 病における脳循環代謝に関する研究。新しく開発された fMRI 装置を利用して perfusion イメージと diffusion イメージを得ることで Binswanger 病の白質及び大脳皮質の灌流状態を評価する。同一症例で PET による ^{15}O 標識ガス持続吸入法を用いて局所脳血流、脳酸素代謝率の測定を行い、fMRI で得られたデータとの関連を検討し、その白質病変がすべて虚血によるものか否かを明らかにする。

2) 血小板凝集能・赤血球変形能・血液粘稠度を測定することにより血液レオロジーの面から Binswanger 病の病態生理、発症機序を解明する。今後では Binswanger 病の形成に血液粘稠度・赤血球変形能などの血液成分が関しうるか否かについて検討する。Binswanger 病を対象として、赤血球変形能・血小板凝集能・血液粘稠度を測定し、これらの血液レオロジー学的指標と Binswanger 病の白質病変の程度及び痴呆の程度との関連性について検討する。

4. 研究指導者の意見

董氏は脳血管障害や痴呆疾患に興味を持ち、特に脳血管障害発症に関連して、血小板凝集能や赤血球変形能に関しては中国ですでに十分な実績を有しています。京都大学の研究室においては最近二年間の研究で、慢性脳梗塞における大脳皮質の中枢ベンゾジアゼピン受容体をシングルフォトン断層法によって画像化し、極めて重要な成果を得ました。この研究成果は国際雑誌に採択され、虚血性脳血管障害の病態解明に貢献し、昨年的一年間で fMRI を用いて、日本語鏡像文字の判読の脳内メガニズムに関する研究を行い、その研究成果は国際学会に発表する予定であり、さらに、論文として国際雑誌に投稿中である。董氏は十分な実験手技および研究能力を備えていると判断されます。

董氏は学業が極めて優秀で、真面目な研究態度を持ち、長期にわたる実験計画を着実に達成しつつあります。また、董氏は論理的思考に富み、実験データの処理・解釈にも有能で、協調性にも富み、他の教室員との共同研究にも積極的に参加しており、研究者としての将来は極めて有望であると考えます。

研究指導者氏名 柴崎 浩



5. 研究報告

別紙形式を参考に、報告本文4000字以上で報告して下さい（枚数自由・ワープロ使用）

タイトル・要旨等は日本語で、KEY WORDS以下は日本語或いは英語で記入して下さい。

研究成果の発表予定がある場合は発表原稿・抄録集等を添付して下さい。

論文発表に当っては、日中医学協会－日本財団補助金による旨を明記して下さい。

日本語鏡像文字の判読の脳内メカニズム

董 蘊

中国天津医科大学付属病院神経内科 • 医師

柴崎 浩 京都大学大学院医学研究科脳病態生理学講座臨床脳生理学 教授

日本語鏡像文字の判読のメカニズム

本研究では磁気共鳴機能画像 (fMRI) を用いて、平仮名の鏡像文字を判読する課題を行い、その脳内神経機構を明らかにした。両側上下後頭回、左下後頭回、左下側頭葉、両側紡錘回、右上頭頂小葉、左前頭下回、右小脳半球に賦活がみられた。これらの結果から、平仮名の鏡像文字の判読には二つの神経経路、一つは視覚空間情報の処理に関わる背側伝導経路; もう一つは物体認知に関わる腹側伝導経路) が関与することが示された。さらに、右半球の上頭頂葉皮質における fMRI の信号変化と課題の error 指数との間に有意な相関が見られた。従って、右の上頭頂葉皮質は日本語鏡像文字の判読に最も重要な役割を果たしていることが推測される。

KEY WORDS

mirror reading; fMRI; right parietal cortex; reaction time; activation

Research Report

Neural mechanism of Japanese Mirror Reading

Background and Purpose

Mirror phenomena in language which include mirror writing and reading are characterized as writing or reading which runs in the opposite direction to normal writing or reading, with reversals of words as well as letters. Critchley described the condition of mirror writing in normal subjects when they are asked to write on their forehead or on the underside of a table (1). The purpose of our study is to investigate the neuronal substrate which is associated with Japanese mirror reading.

Materials and Methods

Subjects: Ten normal volunteers participated in the fMRI study. All participants are native speaker of Japanese.

Materials: Japanese words written in *kana* were chosen from the vocabulary of Japanese high school textbook. Words used here are composed of 3 or 4 Japanese *kana* phonograms. For each word, a nonword was created by changing one or two phonograms in the word.

Experimental design:

The study consisted of two fMRI scanning sessions. In each session, subjects performed a lexical decision (word/nonword judgment) task on items visually presented in either mirror reversed or normal orientation during alternating blocks lasting 30 s each. Participants were told to press one response key if the item appearing on the screen was a word, and to press the other one if the item appearing on the screen was a nonword.

fMRI procedure: Subjects lay supine in the MR scanner. fMRI imaging was performed by 1.5 T whole-body scanner. In each session, 33 functional images were acquired. A T1-weighted 3D anatomical image of each participant was obtained after the functional measurements.

Data analysis: Functional image processing was performed on ULTRA-2 workstation. After image reconstruction, data were analyzed with SPM96 (2). Images were realigned, co-registered with the participant's structural MRI and spatially normalized to allow group analysis. Afterwards, data were spatially smoothed. For detecting the common activation among participants between mirror reversed and normal orientation condition, we used the random effect model kit of SPM96 (3). The threshold for statistics was set at $Z > 3.09$ with p value less than 0.05 correction for multiple comparisons using the theory of Gaussian fields.

Results

Behavioral data:

The reaction times (RTs) of the lexical decision task were significant increased for mirror reversed items than for normal orientated items. The mirror nonwords decision required the longest RTs for correct responses (1455 ms), followed by the mirror reversed words (1216 ms), the normal orientated nonwords (986 ms), and the normal orientated words (820 ms).

fMRI finding:

Bilateral occipital regions, bilateral temporal regions, and right superior parietal region were found to be strongly activated. In the occipital lobe, activations were identified bilaterally in the superior and middle occipital gyri which correspond to Brodmann's area (BA) 18, 19. Temporal lobe activation was detected in the left inferior temporal gyrus (BA 37) and bilateral FG (BA 19). In the parietal lobe, a strong consistent activation located in the right superior parietal cortex (SPC, BA 7) was found only in the right hemisphere.

Discussion

In the present study, we have used Japanese *kana* mirror reading task to demonstrate the neural substrate for this special kind of reading skill.

Evidence from patients with parietal lesions along with evidence from studies of normal people using functional neuroimaging method suggest that parietal cortex play an important role in the processing of mirror reversed verbal or nonverbal stimuli. Alivisatos and Petrides, who measured regional cerebral blood flow with PET, reported a significant increase of cerebral blood flow in the left parietal region when subjects mentally rotated alphanumeric stimuli (4). However, Kosslyn found task-dependent right inferior parietal lobe activity (5). Because the mirror reading task requires substantial visuospatial transformation which relies upon the right dorsal visual pathway, it is likely that the activation detected in the right SPC in the present study was associated with spatial transformation of mirror reversed *kana* items.

PET studies of reading indicate that left fusiform gyrus and extrastriate cortex are involved in letter recognition processing. We believe that the left fusiform gyrus and left inferior temporal region might be associated with these processes. This hypothesis is consistent with the previous observations of activation in the left temporal object recognition area for reading mirror reversed letter strings (6). As a conclusion, mirror reading was associated with activation in widespread cortical regions which include bilateral occipital, bilateral temporal, right superior parietal, and left inferior frontal cortices.

References

1. Wade JB, Hart RP. *Neuropsychologia* 1991; 13: 299-308.
2. Friston KJ, Holmes AP, Worsley KJ, et al. *Humam Brain Mapp.* 1995; 2: 189-210.
3. Holmes AP, Friston KJ. The 4th International conference on Functional Mapping of the Human Brain. 1998; 7:4 of 3 parts; s754.
4. Alivisatos B, Petrides M. *Neuropsychologia.* 1997; 35: 111-8.
5. Kosslyn SM, Alpert NM, Thompson WL, et al. *Brain* 1994; 117: 1055-71.
6. Poldrack RA, Desmond JE, Glover GH, et al. *Cereb Cortex* 1998; 8: 1-10.

日本財団補助金による

1998年度日中医学協力事業報告書

—在留中国人研究者研究助成—

99年 3月 11日

財団法人 日中医学協会
理事長 中島章 殿

研究室で撮影した本人のスナップ写真、及び発表論文のコピーを添付

1. 研究者氏名 徐知行
研究機関 名古屋大学医学部附属病院 研究指導者 山内一信 職名 教授
所在地 〒466-8560名古屋市昭和区鶴舞町65番 電話 (052)744-2022 内線 2022

研究テーマ Evaluation of a PC-Based Video-Teleconference System on Chest Radiographs

2. 本年度の研究業績

(1) 学会・研究会等における口頭発表 ・ 無 (学会名・内容)

1. 第37回日本エム・イ学会 市販テレビ会議システムについての画像評価-肺癌症例を用いての検討-
2. MedInfo98 Telemedicine Videoconferencing with Still and Moving Images using ISDN64
3. 日本エム・イ学会東海支部学術大会 胸部X線画像に関する市販遠隔テレビ会議システムの評価
4. 第18回日本医療情報学連合大会 市販テレビ会議システムについての画像評価

(2) 学会誌等に発表した論文 ・ 無 (雑誌名・論文名)

Journal of the Telemedicine and Telecare(掲載予定)

Evaluation of a PC-Based Video-Teleconference System on Chest Radiographs

3. 今後の研究計画

遠隔医療効率向上のために、医用静止画像及び動画の伝送、画質の改善を目的として、下記のa, b, cの研究を予定している。

a. 静止画像

比較的快適な環境でかなり高い信頼性をもって診断支援を可能とするための画像のデジタル化条件、デジタル画像の表示条件等を探究したい。また静止画像のサイズは伝送時間と直線関係がある。パソコンテレビ会議システムを用い場合、経済性と使い勝手を考慮して、パソコンテレビ会議システムにどのくらい解像度の静止画像が診断支援としての確かかつ、経済性が満足であるかを研究したい。

b. 動画

ISDN64電話回線3本で用いて、UCG、CAGのビデオ画像伝送を行いたい。また画像再生スピードを変えて、その画像を評価したい。

c. さらにケーブルテレビネットワークを用いて、医用動画及び静止画像の伝送を行いたい。

d. 中国における都市部及び農村部における遠隔医療の必要性の調査を行う。

4. 研究指導者の意見

徐君は名古屋大学医学部医療情報部大学院生として、病院管理学、心電図自動解析、医療情報システム、特に遠隔医療システムの研究をし、当部はその指導的役割を果たしてきた。徐君は中国上海第二医科大学卒業した医師であり、中国における医療状況を熟知し、遠隔医療必要性を感じている大学院生である。従って、当部での遠隔医療研究を熱心に行い、肺がん診断についてのテレビ会議システムの研究に高い成果を上げ、さらにシステム発展に努力している。この技術と知識を中国における、医療システムの改善に応用したいとの希望が大である。

研究指導者氏名 山内一信



5. 研究報告

別紙形式を参考に、報告本文4000字以上で報告して下さい（枚数自由・ワープロ使用）

タイトル・要旨等は日本語で、KEY WORDS以下は日本語或いは英語で記入して下さい。

研究成果の発表予定がある場合は発表原稿・抄録集等を添付して下さい。

論文発表に当っては、日中医学協会－日本財団補助金による旨を明記して下さい。

Evaluation of a PC-Based Video-Teleconference System on Chest Radiographs

X Zhixing¹, K Yamauchi¹, M Ikeda¹, Y Shu¹, Y Hasegawa²

¹Department of Medical Information and Medical Records, Nagoya University Hospital

²First Department of Internal Medicine, Nagoya University, School of Medicine

(Corresponding author)

Xu Zhixing

Department of Medical Information and Medical Records, Nagoya University Hospital

Nagoya University Hospital, 65, Tsurumai-cho, Showa-ku, Nagoya 466-8560, Japan.

TEL: +81-52-744-2667; FAX: +81-52-744-1356

E-mail: xuzhixin@med.nagoya-u.ac.jp

Summary

Chest radiographs of 50 patients, including 25 with lung cancer were digitized at 100 dpi resolution and saved in the JPEG format at a low compression rate. Four respiratory specialists observed these images on a video-teleconference system display with 800×600 pixels resolution. After one month, they observed original chest radiographs. ROC analysis was performed of the answers based on a 5-point confidence scale. The observer-specific Az index values for the video-teleconference system ranged from 0.803 to 0.944, and the corresponding Az values for the conventional radiographs from 0.926 to 0.957. No differences were found between the video-teleconference system image and original images, showing that a video-teleconference system will be useful as a supplement to a diagnosis of chest X-ray films.

Introduction

Most of the many clinics in Japan are staffed by general practitioners. These clinics often need the real-time input of medical specialists such as radiologists, pathologists and so on for the improvement of diagnosis and treatment. Until quite recently, it was difficult to obtain this kind of specialized help. The real-time transmission of medical images to medical specialists and discussions with them have long been sought by medical practitioners. Now the rapid development of digital radiograph systems, digital data networks and video-teleconference softwares has put such help within their reach. Medical specialists can also offer real-time radiological support and other assistance to medical practitioners using this new equipment. Such collaboration may lead to improved patient care and avoidance of unnecessary patient transfers.

The world's first medical-image transmission system was developed some thirty years ago, using TV cameras and TV signal transmission¹. In early trials, the image quality was not good enough, and the diagnostic accuracy of the transferred images was lower than expected. Now the transmission of medical images is possible via any of 6 modes: (1) Internet, (2) Integrated Service Digital Network (ISDN) narrow and broad band, (3) public telephone lines, (4) cable TV networks, (5) communication satellites and (6) mobile phones². The rapid development of modern communication technology

provides medical diagnosis and treatment with new opportunities³. Now, on video-teleconference systems are available at low cost to small and outlying hospitals.

Considering its cost-effectiveness and ease of operation, we decided on a low-cost video-teleconference system which is able to transfer both still images and moving medical images through ISDN 64, and to allow collaboration with those using personal computers. This system is extremely versatile and very easy to operate.

Although a large number of studies have been done on the diagnostic performance of digitized soft-copy images on a CRT display, most of them dealt with very expensive, specially equipped high-performance workstations. Therefore, we intend to apply the PC-based low-cost video-teleconference system to the teleradiology system, especially in this study, and we have evaluated this video-teleconference system for the detection and diagnosis of lung cancer on chest radiographs, using of receiver operating characteristic (ROC) analysis.

Methods

Video-Teleconference System

The video-teleconference system used in this study was composed of personal computers (OKI, if station 5133), a scanner (EPSON GT-8500 scanner), and

speakerphone. The PC-based video-teleconference software, PictureTelPCSlive50, was installed, and it was connected to the ISDN network at 128 kbit/s. The personal computer systems used an IBM compatible one with 32 MB RAM, 1 GB hard disk, and a 17-inch color monitor, with a resolution of 800×600 pixels, and was able to display 16,700 different of colors.

Case Selection

Fifty chest radiographs were selected for the study by an experienced physician who did not participate in the observer performance studies; 25 of these radiographs featured lung cancers of varying subtlety, including metastatic lung cancers, while the other 25 were either normal or had some lesions other than lung cancer. These radiographs were obtained from patients hospitalized from 1995 to 1996 in the First Department of the Internal Medicine or Thoracic Surgery of the Nagoya University Hospital.

Digitization and Display of Chest Radiographs

The chest radiographs were separated into the left and right sides, and were digitized and stored separately on the hard disk. This was because the maximum size up to which the scanner can scan the image for digitization was 210×297 mm. We used a resolution

of 100 dpi to digitize the complete chest radiograph in order to adapt the image for display on a 17-inch cathode-ray tube (CRT) monitor (Fig 1). When the radiographs were digitized, a specialist with no involvement in the present study controlled image contrast, brightness etc. to keep the image quality at its maximum. Then, the digitized images were compressed in the JPEG format at a low compression rate, and saved on the hard disk. The average size of the stored image was 55 Kbytes, and its range was 6-86 Kbytes.

The digitized chest radiographs were transferred by the application share mode (a function of video-teleconference software) to the monitor for image reading and analysis (Fig 2). Between the initially digitized and transferred images, there were no significant differences in image quality⁴. In according to this, separate two location observe the same quality image are thought.

Observer Performance Studies

Four respiratory specialists, each with more than 10 years of clinical experience, participated in the observer performance studies. For each observer, we previewed the image reading test composed of two reading sessions; in one session, the hard-copy screen-film images were interpreted using a conventional view box, and in the other

session, the soft-copy images on the 17-inch CRT monitor in video-teleconference system were interpreted. In the latter session, the observers were permitted to use the various functions with which the system is. There was a one-month interval between the two image reading sessions.

Although the observers were informed that the chest images might contain lung cancer, they were not informed of the purpose of this study, and were blind to individual clinical information. They were asked to indicate the presence or absence of lung cancer on the following discrete five-point scale: 1 = definitely not present, 2 = probably not present, 3 = cannot be decided, 4 = probably present, 5 = definitely present. Reading time was not limited.

To evaluate the observers' performance, the binormal ROC curves were estimated for each observer by means of the maximum likelihood method. The area under the ROC curve (A_z) was used as an index of performance. A_z together with the slope and the intercept parameters of the binormal ROC curve when plotted on normal deviate axes were calculated for each estimated curve. The statistical significance of the difference between each pair of reading conditions was analyzed by applying a Student t test for paired data to A_z values. Here, a value of $P < 0.05$ was taken to be significant. For each reading session, the overall performance of the observers as a group was

summarized with a pooled ROC curve obtained by averaging the slope and intercept parameters of individual observer's ROC curves.

Results

The reading time of the chest radiography on the CRT display and light box was less than 30 seconds for each case. Fig 3 shows the four observer-averaged ROC curves obtained in the two reading sessions. The observer-specific A_z index values for the video-teleconference system ranged from 0.803 to 0.944, and the corresponding A_z values for the conventional radiographs were from 0.926 to 0.957 (Table 1). The performance for the video-teleconference system from 3 observers was lower than that for the conventional radiographs, but the opposite for the remaining observer. However there were no clearly significant differences between the video-teleconference system and the conventional radiographs ($P = 0.07$). Every observer was satisfied with the use of the PC-based video-conference system.

Discussion

In any teleradiology system, the quality of the soft-copy image on the CRT monitor is important. This image quality is determined by: the spatial and contrast resolution of the

display device; background luminance level and luminance range of the display system; brightness uniformity; extraneous light in the reading room; displayed field size; viewing distance; image motion and monitor flickering; signal-to-noise ratio of the displayed image; magnification functions; and the user interface⁵.

The higher the resolution of the image on the CRT display is, the better the radiologists diagnostic performance will be. Slasky et al. reported that the difference between a high-resolution workstation CRT display image and a conventional film images was often small⁶. However, it is known that the radiologists diagnostic performance is not improved by improvements in the resolution power when the resolution is higher than 0.1mm pixel size (254 dpi)⁷. It is important in displaying radiography film that the minimum requirements be set at a 0.2 mm sampling pitch (127 dpi), 10 bit density sampling resolution for digitizing, and 1000×1000 resolution degree, and 8 bit resolution in the density direction. However, the above-mentioned factors⁵ make it difficult to define the exact requirements for image quality. Physicians who practice telemedicine should be aware of these differences in image quality and adapt their practice accordingly. A physician is as liable for a diagnosis based on transmitted X-rays as he or she is for one by normal X-rays. Moreover, the complete chest image digitized at 127 dpi cannot be shown on a 800×600 pixels CRT display of the kind

usually used. Therefore, it is necessary to select the spatial resolution appropriate for the PC-based video-teleconference system.

In a system built around a personal computer, the resolution of most CRT monitors is 800×600 or 1024×768 pixels. We scanned conventional radiographs with a resolution of 100 dpi, and displayed them on the 800×600 CRT display in a PC-based system, and found that the quality of these soft-copy images was slight inferior to that of conventional radiographs. In fact, the performance of three observers of the video-teleconference system was lower than that when judging conventional radiographs, although there was no statistically significant difference between the CRT images and the conventional film reading session.

System based on the personal computer in this study is not expensive, so it will be readily affordable by clinic offices of general physicians or in the outlying hospitals. Further more, it is reported that interactive, low-resolution telemedicine is valuable for consultations between generalists and subspecialists⁸. In the present study, every observer was able to indicate the site of the lung cancers, and to describe their sizes and shapes. All observers read each image within 30 seconds.

In telemedicine, the time for image-file transmission should also be considered. The transmission of high-resolution digital images required a longer time compared

with low-resolution images. As the time of a transmission image is important for collaboration, the shorter the time needed for image-file transmission the better. In our previous study, we found a close relationship between transmission time and the size of digital images⁹, and that the time for a transmission image of 800×600 pixels was 110 seconds by using ISDN 64. If the chest radiographs are digitized at 100 dpi and then compressed in JPEG format, the range of file size was from 6 to 86 Kbytes, with an average size of 55 Kbytes. Even the maximum file (86 Kbytes) was transferred within 43 seconds, a tolerable time for a PC-based video-conference system. Thus, in terms of diagnostic performance and transmission time, the PC-based video-teleconference system will be acceptable for the consultation between generalists and subspecialists.

Conclusions

We evaluated the diagnostic performance of a PC-based video-teleconference system in the detection diagnosis of lung cancer on chest radiography. There was no significant difference between the results of a PC-based video-teleconference system and the conventional radiographs, suggesting that the diagnostic performance and transmission time in a PC-based video-teleconference system would be acceptable for consultation between generalists and subspecialists.

Acknowledgements

This study was supported in part by the Japan-China Medical Association Subsidies and Grant-in-Aid for Scientific Research (B) 08458087 from the Ministry of Education, Science and Culture in Japan.

References

1. Batnitzky S, Rosenthal SJ, Siegel EL, et al. Teleradiology: an assessment. *Radiology* 1990; 177: 11-7
2. Reponen J, et al. Digital wireless radiology consultations with a portable computer. *Journal of Telemedicine and Telecare* 1998; 4:201 - 205
3. Netzer T, Mairinger T, Gschwendtner A, Mikuz G, Markl C. The legal status of telemedicine in Austria. *Wiener Klinische Wochenschrift* 1996; 108: 555-9
4. Eraso FE, Scarfe WC, Hayakawa Y, Goldsmith J, Farman AG. Teledentistry: protocols for the transmission of digitized radiographs of the temporomandibular joint. *Journal of Telemedicine and Telecare* 1996; 2: 217-23
5. Wang J, Langer S. A brief review of human perception factors in digital displays for picture archiving and communications systems. *Journal of Digital Imaging* 1997; 10: 158-68
6. Slasky BS, Gur D, Good WF, et al. Receiver operating characteristic analysis of chest image interpretation with conventional, laser-printed, and high-resolution workstation images. *Radiology* 1990; 174: 775-80
7. MacMahon H, Vyborny CJ, Metz CE, Doi K, Sabeti V, Solomon SL. Digital radiography of subtle pulmonary abnormalities: an ROC study of the effect of pixel

size on observer. *Radiology* 1986; **158**: 21-6

8. Franken EA Jr, Berbaum KS. Subspecialty radiology consultation by interactive telemedicine. *Journal of Telemedicine and Telecare* 1996; **2**: 35-41

9. Xu ZX, Yamauchi K. Telemedicine videoconferencing with still and motion images. *The 3rd International Conference on the Medical Aspects of Telemedicine, 1997*

Captions for Illustrations

Fig 1

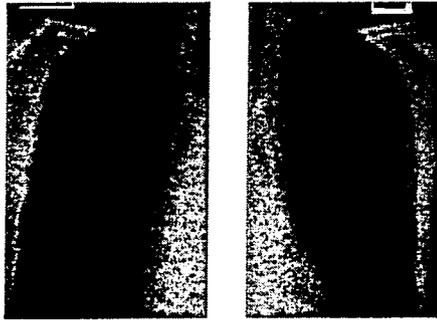
The present video-conference system, and presentation of chest radiographs on the CRT display.

Fig 2

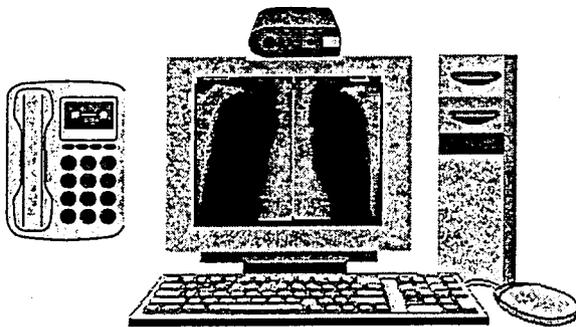
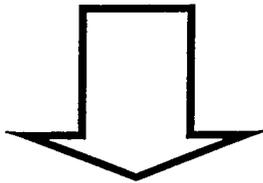
The observer was reading the soft-copy images on the 17-inch CRT monitor in video-teleconference system.

Fig 3

The combined ROC curves of the CRT display image and the conventional film.



The chest radiographs were separately scanned into the computer in the left and right side by side at 100 dpi



The digitized left and right chest images were displayed side by side on the 17-inch CRT display

The present video-teleconference system:

1. OKI If station 5133 PC
2. EPSON GT – 8500 scanner
3. The speakerphone
4. The CCD camera

Fig 1 The present video-conference system, and presentation of chest radiographs on the CRT display.

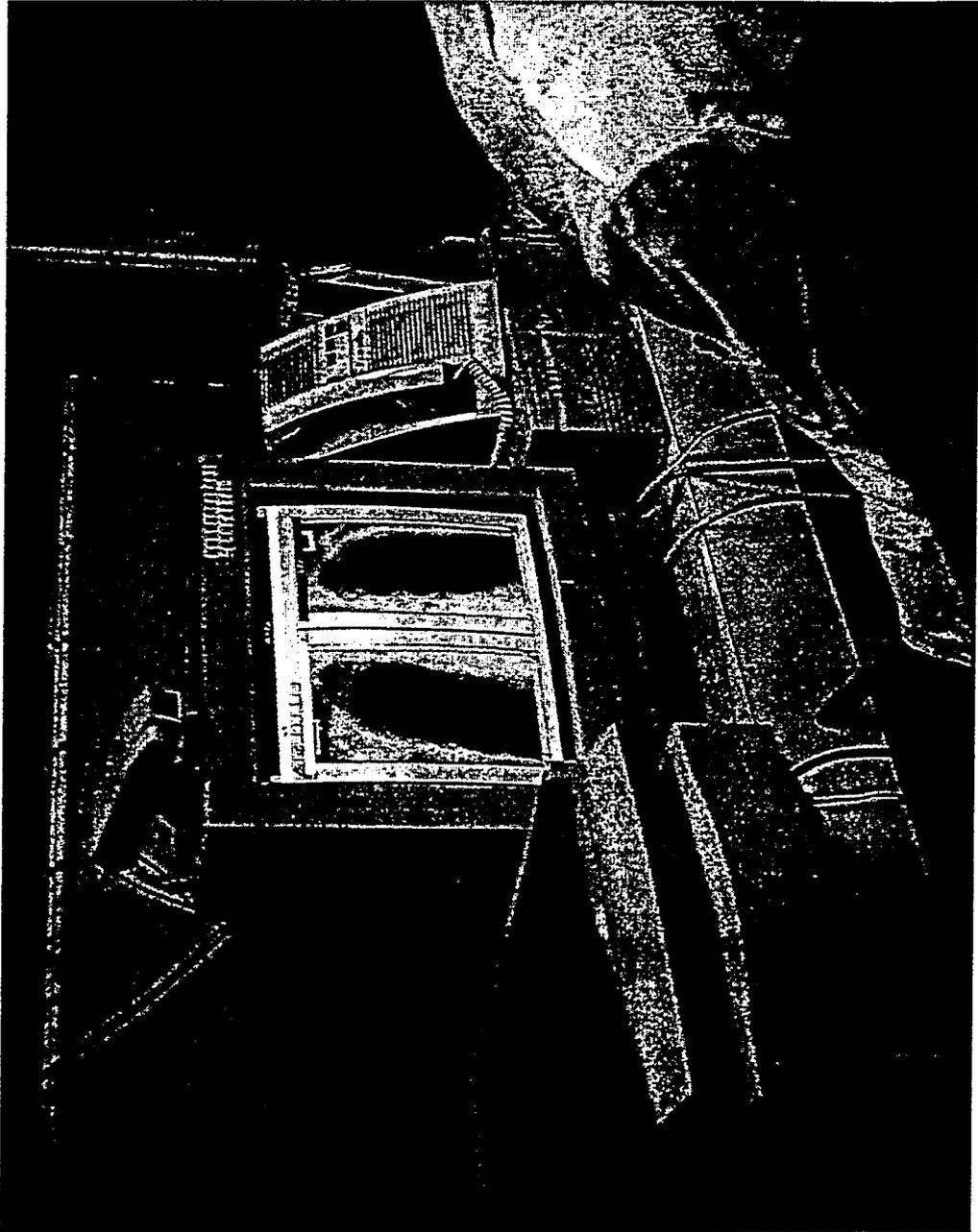


Fig 2 The observer was reading the soft-copy images on the 17-inch CRT monitor in video-teleconference system.

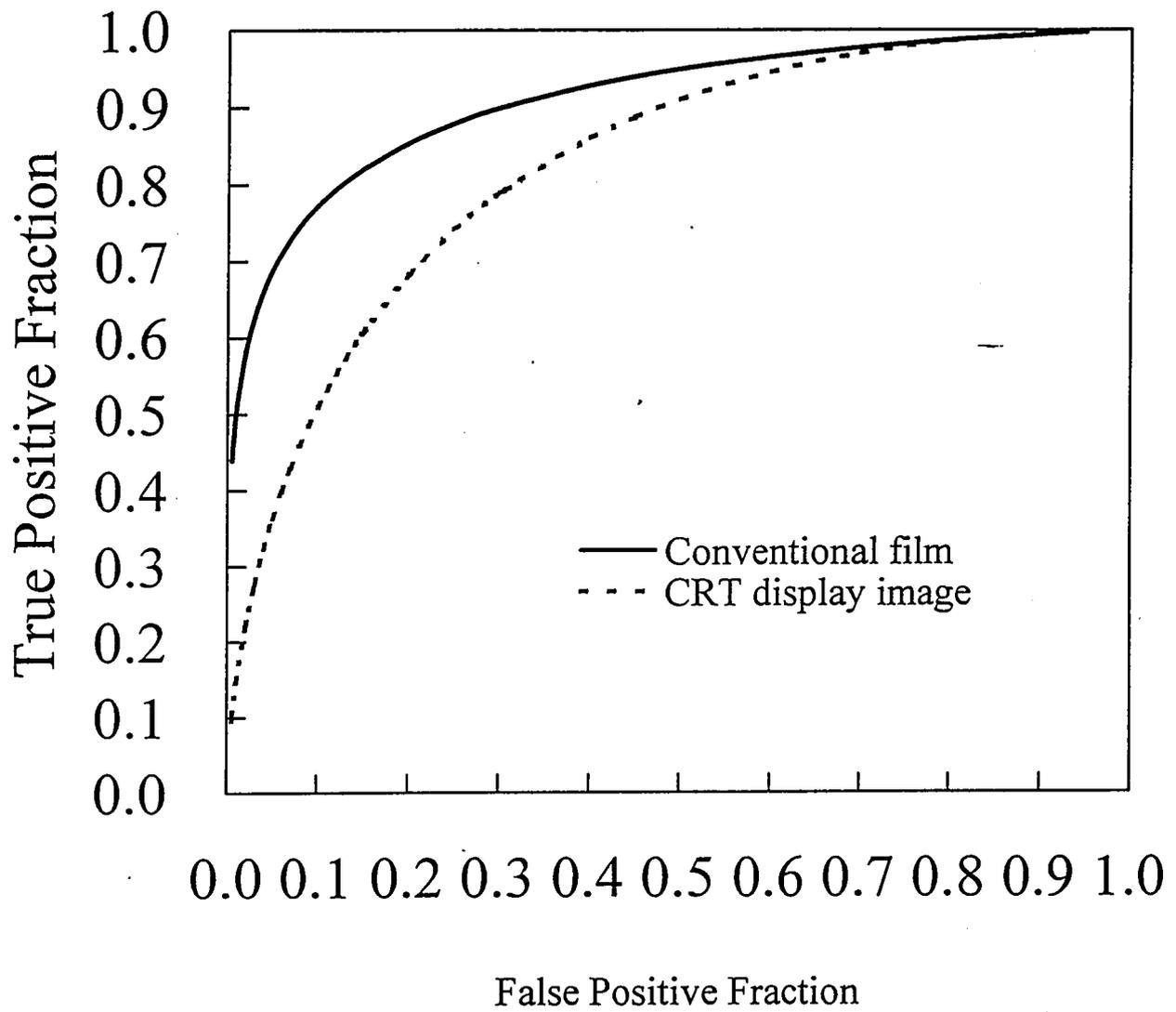


Fig 3 The combined ROC curves of the CRT display image and the conventional film

Table 1 Area under the ROC curve derived from the analysis of lung cancer by 4 specialist

	Conventional film	Images on CRT display
Observer 1	0.9255 ± 0.0427	0.8030 ± 0.0641
Observer 2	0.9414 ± 0.0357	0.9444 ± 0.0449
Observer 3	0.9343 ± 0.0415	0.8446 ± 0.0618
Observer 4	0.9570 ± 0.0289	0.8010 ± 0.0648

日本財団補助金による

1998年度日中医学協力事業報告書

—在留中国人研究者研究助成—

1999年3月5日

財団法人 日中医学協会
理事長 中島章殿

研究室で撮影した本人のスナップ写真、及び発表論文のコピーを添付

1. 研究者氏名 龐 天翔
研究機関 国立循環器病センター分子生理 研究指導者 重川 宗一 職名 部長
所在地 〒565 大阪府吹田市藤白台5丁目 電話 06-6833-5012 内線 2566

研究テーマ 心血管細胞におけるイオン代謝の分子機序の研究

2. 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回日本生化学会大会

Na^+/H^+ exchanger (NHE1)におけるカルニニューリン類似タンパク

質の結合部位とその役割

(2) 学会誌等に発表した論文 有 (雑誌名・論文名)

3. 今後の研究計画

心筋細胞膜 Na^+/H^+ 交換(NHE1)輸送体の分子内機能ドメインを明らかにするための分子生物学の研究に継続進めし、この輸送体にする心筋細胞膜内 pH 及増殖因子や高浸透圧制御の機序及び病態との関連を明らかにする。 Na^+/H^+ 交換(NHE1)輸送体蛋白質の細胞質ドメインの活性調節に、詳しい解析を行っている。

4. 研究指導者の意見

バン・テンシアンさんは、現在循環器病センターで Na^+/H^+ 交換輸送体(NHE)の構造と機能、特にカルシニューリン類似タンパク質(CHP)とNHE1との相互作用に関する研究を行っています。DNA、タンパク質、細胞等の基本的な扱いをトレーニングした後、現在では十分一人で実験を進めていけるまで成長しました。彼は熱心に注意深く実験を行う点で大変優れており、彼が堅実な成果を収めてきたのもその彼の誠実な性格がいい方に作用したものと考えています。初めのうちはコミュニケーションがうまくいかなかったこともありましたが、最近彼の日本語と英語の能力もかなり上達し、日常会話ではあまり苦勞しないようになりました。この調子でさらに飛躍するよう願っている次第です。

研究指導者氏名

重川宗一 (重川印)

5. 研究報告

別紙形式を参考に、報告本文4000字以上で報告して下さい（枚数自由・ワープロ使用）
タイトル・要旨等は日本語で、KEY WORDS以下は日本語或いは英語で記入して下さい。
研究成果の発表予定がある場合は発表原稿・抄録集等を添付して下さい。
論文発表に当っては、日中医学協会－日本財団補助金による旨を明記して下さい。

研究テーマ：Na⁺/H⁺交換(NHE1)におけるカルシニューリン類似蛋白質の結合部位とその役割

研究者：バン 天翔

中国での所属：中国武装警察部隊遼寧病院 主治医師 講師

日本での指導者：重川 宗一、日本国立循環器病センター分子生理部 部長、大阪大学連携大学院医学部医学研究科 教授

要旨：

細胞形質膜に普遍的に発現する Na⁺/H⁺交換(NHE1)は、増殖因子や高浸透圧等、様々な刺激によって活性化されることが知られる。活性化の全貌はまだ明らかでないが、NHE1の細胞質ドメインとカルモデリンやその他の制御因子との相互作用が重要と考えられている。NHE1 に結合する蛋白質としてカルシニューリン類似蛋白質(CHP)が最近クローニングされたが(Lin X, 1996;93:12631-12636)、その NHE1 における正確な結合部位と活性調節における役割には疑問が残された。私たちは、CHP 抗体と NHE1 抗体、NHE1 の様々な MBP 融合蛋白質、CHP の様々な GST 融合蛋白質作成し、in vitro オーバーレイアッセイ、共免疫沈降法によって、NHE1 と CHP との相互作用を検討した。CHP の様々な GFP 融合蛋白質作成し、細胞に NHE1 と GFP-CHP との相互作用を検討した。その結果、NHE1 細胞質ドメイン中の膜貫通ドメインに近いアミノ酸 510-540 が CHP 結合部位同定された。この領域は、以前報告されたもの(aa566-635)とは完全に異なる。私たちは最終的に、細胞に発現した変異蛋白質 NHE1 delat 515-530(aa515-530 を欠失)と NHE1 I522C/D528C/H529C と、CHP との結合が検出できない程弱いことを確認した。また免疫染色の結果、この変異蛋白質 NHE1 I522C/D528C/H529C の大部分は細胞内膜系(Golgi ?)にとどまっており、NHE1 の膜へのターゲティングにおける CHP の関係が想定される。細胞に NHE1 と GFP-CHP との相互結合が高浸透圧の調節を確認した。しかし一方で、この領域は私たちが以前報告した pHi 感受性維持、ATP 感受性、増殖因子活性化等に関与するサブドメイン I (aa503-595)の中にあり、CHP が NHE1 の活性調節に関与する可能性もあり、現在より詳しい解析を行っている。

Interaction of the Na⁺/H⁺ exchanger (NHE1) with Calcineurin-homologue Protein (CHP): CHP Binding Domain and its Physiological Role

KEY WORDS

Na⁺-H⁺ exchanger, calcineurin B homologue protein, protein-protein interaction, intracellular pH

The abbreviation used are

NHE1, Na⁺/H⁺ exchanger isoform 1; CHP, calcineurin B homologous protein; EIPA, 5-(N-ethyl-N isopropyl)amiloride; GFP, green fluorescent protein; GST, glutathione S-transferase; MBP, maltose binding protein; pHi, intracellular pH; pH_o, extracellular pH; SDS-PAGE, sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis; aa, amino acid.

Purpose (目的)

The Na⁺/H⁺ exchanger (NHE) is an important regulator for intracellular pH (pH_i), cell volume, and transepithelial Na⁺ transport (1-3). It exists in virtually all cells with cell type-dependent pattern of isoform expression. Among six known isoforms of NHE, a ubiquitous isoform NHE1 is known to be rapidly activated in response to a variety of extracellular stimuli ranging from growth factors to mechanical stimuli such as hyperosmotic stress and cell spreading (4-6). Some accessory regulatory factors has been suggested to be involved in the regulation of NHE1. Calmodulin is the first identified regulatory factor that is involved in Ca²⁺-induced activation of NHE1 (7-9). Recently, the calcineurin B homologous protein (CHP) has been cloned as a candidate for such regulatory factors of NHE1 (10). However, the CHP-binding domain within NHE1 has not yet been precisely identified in that report (10). In addition, evidence presented in that study (10) was not enough to understand completely a regulatory role of CHP. In this study, we tried to identify precisely the CHP-binding site within NHE1 and to clarify the role of CHP by analyzing the mutant NHEs that can not bind CHP. The data suggest that CHP may be involved in protein processing rather than the acute regulation of NHE1.

EXPERIMENTAL PROCEDURES (方法)

Antibodies. The NHE1-specific polyclonal antibody was purified from rabbits immunized with maltose-binding protein (MBP) fusion protein containing the cytoplasmic domain (aa 503-815) of NHE1 (7). The CHP-specific polyclonal antibody (IgG fraction) was purified from rabbits immunized with GST/CHP 1-195 fusion protein.

Plasmid construction and purification of fusion proteins. All the plasmids used in this study were constructed based on production of DNA fragments by polymerase chain reaction (PCR), ligation into various cloning vectors and automated sequencing of the inserted fragment. Plasmids were transformed into *E.coli* (HB 101) for expression of the fusion proteins or plasmid preparation. MBP or GST fusion proteins were purified according to manufacturer's protocol.

Cells and plasmid transfection. The Na^+/H^+ antiporter-deficient PS 120 cells and transfectants were maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) containing 25 mM NaHCO_3 and supplemented with 7.5% (v/v) fetal calf serum, penicillin 50 units/ml and streptomycin 50 mg/L in the presence of 5% CO_2 . Cells (5×10^5 cells/10 cm dish) were transfected with wild type and various mutant NHE1 plasmids or GFP-CHP plasmids (20 μg) by calcium-phosphate co-precipitation technique. Cell populations that stably express NHE1 variants were selected by the " H^+ -killing"(11), and cells stably expressing GFP variants were selected with G418.

Immunoblot and immunoprecipitation. For immunoprecipitation, cells were harvested in a lysis buffer [containing: 150 mM NaCl, 20 mM HEPES/Tris (pH7.4), 1% Triton-100, 1 mM PMSF, 1 mM benzamide] and incubated for 1-2 hours with polyclonal antibodies against NHE1 or CHP in the presence of 30 μl of protein A-Sepharose. The immune complex was washed 5 times with lysis buffer and proteins were eluted with the sample buffer containing 1% SDS. Proteins were subjected to SDS-PAGE and transferred to Immobilon membranes. After incubation of membranes with antibodies, the blots were visualized by enhanced chemiluminescence (ECL) and Konica immunostaining HRP 1000. In some experiments to study the interaction between NHE1 and CHP, membranes were incubated with 100 μg of GST-CHP or MBP-NHE1 before incubation with the first antibodies.

Measurements of the Na^+/H^+ exchange activity and pH_i . The Na^+/H^+ exchange activity was evaluated by measuring EIPA-sensitive $^{22}\text{Na}^+$ uptake activity using stable transfectants grown to

confluence in 24-well dishes (12). For measurement of intracellular pH (pH_i)-dependence of $^{22}\text{Na}^+$ uptake, pH_i was clamped to various values by K^+ /nigericin (12). Change in pH_i in response to various extracellular stimuli was monitored by equilibration of [^{14}C]benzoic acid using transfectants grown to confluence in 24-well dishes.

RESULTS (結果)

Identification of CHP-binding domain within NHE1. In order to identify the CHP-binding site within NHE1, we produced 24 MBP-NHE1 fusion proteins containing various regions of the cytoplasmic domain (aa 503-815) of human NHE1. We also produced GST-CHP fusion protein as a probe to detect the interaction between NHE1 and CHP *in vitro*. MBP-NHE1 Fusion proteins were subjected to SDS-PAGE and GST-CHP overlay assay. As a long purification step caused protein degradation, we initially checked whether CHP binds to MBP-NHE1 fusion proteins by analyzing directly total bacteria proteins without purification. We found that GST-CHP strongly bound to several MBP-NHE1 fusion proteins containing aa 503-815 (complete cytoplasmic domain), aa503-540, aa503-575 or aa 515-575 of NHE1, whereas it did not bind to other fusion proteins containing aa530-656, aa540-656 or aa560-815. These data indicated that the CHP-binding domain exists in the N-terminus of the cytoplasmic domain of NHE1. To confirm finally the CHP-binding domain, we produced three MBP-NHE1 fusion proteins containing aa 503-815 but lacking aa 515-520, 515-530 or 510-530. We found that GST-CHP did not bind to these deletion mutant proteins, although we detected a weak CHP-binding to the fusion protein lacking 515-520. Thus, we concluded that the CHP-binding domain is located in aa 515-530 of NHE1.

CHP-binding to NHE1 *in vivo*. In order to study the role of CHP-binding in the function of NHE1, we introduced several mutations into CHP-binding domain of NHE1. At the first, we produced three NHE1 mutants (Δ 510-515, Δ 515-530 or Δ 510-530) deleted of aa 510-515, 515-530 or 510-530 and expressed them in the exchanger-deficient cell PS120. We immunoprecipitated the wild-type or these deletion mutant NHEs with rabbit anti-NHE1 antibody, or the endogenous CHP protein with rabbit anti-CHP antibody. We found that the wild-type NHE1 was easily detected in the immunoprecipitates with anti-CHP antibody, or vice versa, that CHP was also detected in the immunoprecipitates with anti-NHE1 antibody. As expected, NHE1 deletion mutants were not

detected in immunoprecipitates with anti-CHP antibody although a little amount of Δ 510-515 was detected, indicating that aa 515-530 of NHE1 is indeed the CHP-binding domain. Unfortunately, the Na^+/H^+ exchange activity of cells expressing these deletion mutants was considerably low as compared to that of the wild-type NHE1, probably because of a severe mutation-induced change in conformation of NHE1. Therefore, we tried to introduce a more mild mutation into the CHP-binding domain of NHE1. Among more than 10 mutants we tried, a mutant protein I522C/D528C/H529C (three amino acids were substituted with cysteine) did not bind to CHP when CHP-binding ability was checked by *in vitro* GST-CHP overlay or by immunoprecipitation with anti CHP antibody. In order to determine the localization of CHP protein in the cells, we produced a plasmid for CHP conjugated with green fluorescent protein GFP, transfected it into cells and analyzed the localization of GFP fluorescence by confocal microscopy. In the exchanger-deficient cell PS120, most of GFP fluorescence was detected in the cytosol. In contrast, in PS120 cells expressing the wild-type NHE1, GFP fluorescence became to accumulate in the plasma membrane but not in the cytosol. This result suggest that NHE1 is a major target for CHP in cells. As expected, GFP fluorescence was not detected in the plasma membrane of cells expressing the mutant I522C/D528C/H529C. In addition, even in cells expressing the wild-type NHE1, GFP-fluorescence was not detected in the plasma membrane of cells co-transfected with GFP-CHP Δ 160–180 that lost the binding ability to NHE1.

Characterization of NHE1 mutants lacking CHP binding

In order to study the role of CHP-binding in regulation of NHE1, we used the mutant NHE1 I522C/D528C/H529C that lost the binding to NHE1, but retained a relatively high activity of the Na^+/H^+ exchange. The pH_i -dependence of EIPA-sensitive $^{22}\text{Na}^+$ uptake of cells expressing I522C/D528C/H529C was almost the same as that of cells expressing the wild-type NHE1. Depletion of cell ATP strongly inhibited $^{22}\text{Na}^+$ uptake activity by inducing an acidic shift of pH_i dependence of this mutant, like the wild-type NHE1. In cells expressing NHE1, various extracellular stimuli are known to induce a long-lasting cytoplasmic alkalinization through activation of NHE1. We found that the cytoplasmic alkalinization was also observed in cells expressing I522C/D528C/H529C in response to all the stimuli tested (thrombin, PDGF, PMA, hyperosmolarity and LPA), suggesting that CHP-binding is not involved in the regulation of NHE1. Next we tested the localization of this mutant by confocal microscopy. Most of the wild-type NHE1 protein was localized in the plasma

membrane. In contrast, a relatively high amount of I522C/D528C/H529C protein was detected in the endomembranous structure around the nucleus as well as the plasma membrane. Our preliminary study revealed that this endomembranous structure is the Golgi membranes. Consistent with this finding, we found that more than 50% of the I522C/D528C/H529C protein expressed in cells existed as an immature form with the molecular weight of 90 kD. The data suggest that CHP-binding may be involved in protein processing of NHE1.

DISCUSSION (考察)

In this study, we identified the CHP-binding domain within NHE1. The identified CHP-binding domain (aa 515-530) is located in the N-terminus of the cytoplasmic domain of NHE1. The cytoplasmic domain of NHE1 has previously been shown to be separated into at least four functional domains (aa 515-595, aa 595-635, aa 635-656, aa 656-815). Subdomain I (aa 515-595) has been shown to play an important role in pH_i -maintenance, ATP-depletion-induced inhibition of NHE1 and growth factor-induced activation of NHE1. It is likely that distinct smaller regions within subdomain I are involved in these multiple physiological roles. The present data indicates that a part of subdomain I is also involved in the interaction with CHP.

In this study, we expressed a mutant exchanger I522C/D528C/H529C that has no CHP-binding ability but has a relatively high Na^+/H^+ exchange activity. However, this mutant was similar to the wild-type NHE1 in following points; 1) pH_i dependence of exchange, 2) ATP depletion-induced inhibition of exchange and 3) cytoplasmic alkalinization in response to various stimuli. These findings suggest that CHP-binding is not required for such functions of NHE1. Our data are largely different from the previous report (10). According to the previous report (10), CHP is an inhibitory protein and released from NHE1 through dephosphorylation of CHP upon stimulation of cells. However, we did not observe an alkaline shift in pH_i dependence of exchange in cells expressing I522C/D528C/H529C, that is expected from CHP-induced inhibition of exchange. We also observed a strong acidic shift of pH_i dependence induced by ATP depletion and cytoplasmic alkalinization in response to thrombin, PDGF, hyperosmolarity (200 mM sucrose) or PMA. These results are consistent with our previous reports that the former phenomenon is attributable to a limited fragment

of aa 540-560 (Ikeda et al. unpublished observation), whereas the latter one is attributable to aa 566-635 (13).

At present, the precise role of CHP is not known. However, the finding that a part of the I522C/D528C/H529C protein is concentrated in Golgi-like structure in cells, suggest that CHP may be involved in protein processing. It is possible that the CHP-binding accelerates the translocation of NHE1 from Golgi cisternae to the plasma membrane, although further study would be required. This concept was also suggested from a recent report that p22 (the same protein as CHP) is involved in vesicle traffic (14). Another possible explanation for the role of CHP came from confocal microscopy experiment with GFP-CHP. We observed that GFP-CHP accumulated in the plasma membrane only if we expressed NHE1 in PS120 cells, indicating that NHE1 is a major target for CHP. This finding leads to a novel concept that NHE1 is required as a scaffolding protein for recruitment of CHP to the plasma membrane. Future experiments would determine the precise role of CHP-binding to NHE1.

PEFERENCES (参考文献)

1. Pouyssegur, J. The growth factor-activatable Na^+/H^+ exchange system: a genetic approach. *Trends in Biochem Sci.* 1985;10:453-455.
2. Grinstein S, Rotin D, and Mason M J. Na^+/H^+ exchange and growth factor-induced cytosolic pH changes. Role in cellular proliferation. *Biochem Biophys Acta.* 1989;988:73-79.
3. Wakabayashi S, Shigekawa M, and Pouyssegur J. Molecular physiology of vertebrate Na^+/H^+ exchangers. *Physiol. Rev.* 1997;77:51-74.
4. Paris S, and Pouyssegur J. Growth factors activate the Na^+/H^+ antiporter in quiescent fibroblasts by increasing its affinity for intracellular H^+ . *J Biol Chem.* 1984;259:10989-10994.
5. Moolenaar W H, Tsien R Y, van der saag P T, and de Laar S W. Na^+/H^+ exchange and cytoplasmic pH in the action of growth factors in human fibroblasts. *Nature.* 1983;304:645-648.
6. Grinstein S, Rothstein A, and Cohen S J. Mechanism of osmotic activation of Na^+/H^+ exchange in rat thymic lymphocytes. *J Gen physiol.* 1985;85:765-787.

7. Bertrand B, wakabayahi S, Ikeda T, Pouysségur J, Shigekawa M. The Na⁺/H⁺ exchanger isoform 1 (NHE1) is a novel member of the calmodulin-binding protein: identification and characterization of calmodulin-binding sites. *J Biol Chem.* 1994;269:13703-13709.
8. Wakabayahi S, Bertrand B, Ikeda T, Pouysségur J, Shigekawa M. Mutation of calmodulin-binding site renders the Na⁺/H⁺ exchanger (NHE1) highly H⁺-sensitive and Ca²⁺ regulation-defective. *J Biol Chem.* 1994;269:13710-13715.
9. Wakabayahi S, Ikeda T, Iwamoto T, Pouysségur J, and Shigekawa M. Calmodulin-binding autoinhibitory domain controls "pH-sensing" in the Na⁺/H⁺ exchanger NHE1 through sequence-specific interaction. *Biochemistry.* 1997;36:12854-12861.
10. Lin X, Barber DL. A calcineurin homologous protein inhibits GTPase-stimulated Na-H exchanger. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1996;93:12631-12636.
11. Wakabayahi S, Fafournoux P, Sardet C, and Pouysségur J. The Na⁺/H⁺ antiporter cytoplasmic domain mediates growth factor signals and controls "H⁺-sensing". *Proc Natl Acad Sci USA.* 1992;89:2424-2428.
12. Ikeda, T., Schmitt, B., Pouysségur J., Wakabayashi, S., and Shigekawa, M. *J. Biochem.* 1997, 121: 295-303.
13. Wakabayahi S, Bertrand, B., Shigekawa, M., Fafournoux, P., Pouysségur J. *J. Biol. Chem.* 1994, 269: 5583-5588.
14. Barroso, M. R., Bernd, K. K., DeWitt, N. D., Chang, A. Mills, K., and Sztul, E. S. *J. Biol. Chem.* 1996, 271: 10183-10187.

昭和29年3月25日 国鉄特別扱承認雑誌 第2762号 昭和30年7月18日 第3種郵便物認可

第70巻 第8号 平成10年8月25日発行 (毎月1回25日発行)
SEIKAQ70(8) 587-1144(1998) ISSN 0037-1017

生化学

Vol.70 No.8
1998

第71回日本生化学会大会発表抄録集

プレナリーレクチャー 587

マスターズレクチャー 590

奨励賞受賞講演 594

CGGH シンポジウム'98 595

3rd Krebs インターナショナルシンポジウム 598

シンポジウム 600

テクニカルセミナー 711

ワークショップ 716

ポスター 809

第49回タンパク質構造討論会 1123

本会記事 1127

発表者氏名索引 巻末

サブジェクトインデックス 巻末

JS
The Japanese
Biochemical
Society-1925

社団法人 日本生化学会
THE JAPANESE BIOCHEMICAL SOCIETY

TEL 03 3815 1913 FAX 03 3815 1934

1998年 8月]

2D- Na⁺/H⁺ exchanger(NHE1)におけるカルシニューリン類似タンバ
W03-06 ク質の結合部位とその役割 Tianxiang Pang、○若林繁夫、
重川宗一(国立循環器病センター研)

細胞形質膜に普遍的に発現する Na⁺/H⁺ exchanger (NHE1)は、増殖因子や高浸透圧等、様々な刺激によって活性化されることが知られる。活性化の全貌はまだ明らかでないが、NHE1 の細胞質ドメインとカルモデュリンやその他の制御因子との相互作用が重要と考えられている。NHE1 に結合するタンパク質としてカルシニューリン類似タンパク質(CHP)が最近クローニングされたが(PNAS、93:12631,1996)、その NHE1 における正確な結合部位と活性調節における役割には疑問が残された。我々は、CHP 抗体、GST-CHP 融合タンパク質、NHE1 の様々な MBP 融合タンパク質を作成し、in vitro オーバーレイアッセイ、共免疫沈降法によって、NHE1 と CHP との相互作用を検討した。その結果、NHE1 細胞質ドメイン中の膜貫通ドメインに近いアミノ酸 515-530 が CHP 結合部位として同定された。この領域は、以前報告されたもの(aa566-635)とは異なる。我々は最終的に、細胞に発現した変異タンパク質Δ515-530(aa515-530 を欠失)と CHP との結合が検出できない程弱いことを確認した。また免疫染色の結果、この変異タンパク質Δ515-530 の大部分は細胞内膜系(恐らく Golgi)にとどまっており、NHE1 の膜へのターゲティングにおける CHP の関与が想定される。しかし一方で、この領域は我々が以前報告した pH_i感受性維持、ATP 感受性、増殖因子活性化等に関与するサブドメイン I(aa503-595)の中にあり、CHP が NHE1 の活性調節に関与する可能性もあり、現在より詳しい解析を行っている。

日本財団補助金による

1998年度日中医学協力事業報告書

-在留中国人研究者研究助成-

1999年3月15日

財団法人 日中医学協会
理事長 中島章殿

研究室で撮影した本人のスナップ写真、及び発表論文のコピーを添付

1. 研究者氏名 劉愛春
研究機関 新潟大学医学部 第1内科 研究指導者 相沢義房 職名 教授
所在地 新潟市旭町通 1-757 電話 (025)227-2185内線

研究テーマ 造血器腫瘍細胞に対する免疫遺伝子治療の研究

2. 本年度の研究業績

(1) 学会・研究会等における口頭発表 有 ・ 無 (学会名・内容)

Masuihiro Takahashi, Aichun Liu, Ken Toba, Tadashi Koike, Zhiyin Zheng, Yasser Osman, Hidenobu Takahashi, Tatuo Furukawa, Miwako Narita, Sadao Aoki, Yoshifusa Aizawa
Applicability of class II transactivator (CIITA) gene for immunotherapy of HLA-DR negative hematological malignancies The 4th Annual Meeting of the Japan Society of Gene Therapy July 4th-5th 1998 (Tokyo)

高橋益広、劉愛春、真田雅好、高井和江、高橋英伸、青木定夫、小池正、相沢義房 樹状細胞前駆細胞の特徴を有する急性骨髄性白血病 (FAB分類 M5b) : myelodendritic leukemia 第9回樹状細胞研究会 平成10年11月7日 (東京)

劉愛春、高橋益広、オスマン・ヤーセル、鄭智茵、高橋英伸、鈴木訓充、新国公司、鳥羽健、青木定夫、小池正、橋本誠雄、古川達雄、相沢義房 K562 に対する CIITA 遺伝子導入による HLA-DR と MHC class I 両者の発現 第40回日本臨床血液学会総会 平成10年11月11-13日 (金沢)

(2) 学会誌等に発表した論文 有 ・ 無 (雑誌名・論文名)

1. Z. Zheng, M. Takahashi, S. Aoki, K. Toba, A. Liu, Y. Osman, R. Aizawa, N. Takahashi, S. Hashimoto, S. Maruyama, T. Furukawa, M. Narita, K. Kishi, T. Koike, Y. Aizawa : Expression of costimulatory molecules on cells derived from human hematopoietic malignancies. J Exp Clin Cancer Res 17 (3) 251-258 1998

2. Yasser OSMAN, Masuihiro TAKAHASHI, Tadashi KOIKE, Ken TOBA, Zhiyin ZHENG, Aichun LIU, Tatuo FURUKAWA, Sadao AOKI, Yoshifusa AIZAWA: Generation of bcr-abl specific cytotoxic T-lymphocytes by using dendritic cells pulsed with bcr-abl (b3a2) peptide: Its applicability for donor leukocyte transfusions in marrow grafted CML patients. Leukemia 13:166-174,1999

3. 今後の研究計画

G-CSF動員末梢血、骨髄、および臍帯血のCD34陽性細胞から樹状細胞へ誘導と応用

- 1 樹状細胞培養：G-CSF動員末梢血、骨髄および臍帯血の単核球から、MACS magnetic beadsを用いて、CD34陽性細胞を純化する。種々サイトカインを組み合わせて添加培養することにより、CD34陽性細胞増殖と、CD34細胞から樹状細胞への分化について検討する。
- 2 CD34陽性細胞のレトロウイルスベクターの遺伝子導入：EGFP(enhanced green fluorescence protein) cDNAを組み込んだレトロウイルスベクターをウイルス産生細胞に導入し、ウイルス価の高い上清を作成する。ウイルス培養上清をサイトカインで刺激したCD34陽性細胞に加え、遺伝子導入したのちサイトカインを加え、樹状細胞へ誘導培養する。樹状細胞に特徴的なmAb(CD83,CD1aなど)を用いたFACS analysisを行う
- 3 白血病に特異的な抗原のcDNAを組み込んだレトロウイルスベクターの作成：遺伝子導入したCD34陽性細胞からDCへの誘導できれば、同一レトロウイルスベクターに、白血病に特異的な抗原のcDNA(bcr-abl)を導入する。bcr-abl cDNAを組み込んだレトロウイルスベクター上清を作成し、CD34陽性細胞に遺伝子導入し、DCを培養する。このDCをstimulatorとして、同一人のリパ球をresponderとするMLRを行い、抗原提示能について検討する。白血病に対する、DCを用いた免疫治療の応用性を検討する。

4. 研究指導者の意見

劉 愛春さんは、現在医学部大学院の1年次に在学しております。学業成績は優秀で、特に専攻している血液内科学の分野においては劉さん自身による研究成果を出しており、その研究成果は、内外の学会に発表しております。第一演者としての学会発表は、1) 劉 愛春、高橋益広、鳥羽健、ほか：血液細胞株における MHC class II と CIITA 発現の関連 第 60 回日本血液学会総会 平成 10 年 3 月 25 日 - 27 日 (大阪)、2) 劉 愛春、高橋益広、オスマン・ヤーセル、ほか：K562 に対する CIITA 遺伝子導入による HLA-DR と MHC class I 両者の発現 第 40 回日本臨床血液学会総会 平成 10 年 11 月 11-13 日 (金沢) の 2 つですが、3) 劉 愛春、高橋益広、鄭 智茵、ほか：骨髄、末梢血および臍帯血 CD34 陽性細胞からの樹状細胞の培養 第 61 回日本血液学会総会 平成 11 年 4 月 19 日 - 21 日 (東京) も、発表の予定です。その他共同演者として、日本造血細胞移植学会、The International Society of Hematotherapy and graft engineering、The Annual Meeting of the Japan Society of Gene Therapy、樹状細胞研究会、The Annual Meeting of American Society of Hematology、癌特異的免疫療法研究会など 15 の学会発表を行っております。研究に対する態度は真剣で、最後まで粘り強く行い、関連する文献も主体的に検索し、研究に応用しております。研究手技の修得にも非常に熱心で、各種の細胞培養、腫瘍細胞蛋白や遺伝子 (DNA, RNA) の抽出、遺伝子増幅 (PCR 法)、細胞表面および細胞質内蛋白の解析 (FACS 法) それにヒト細胞への遺伝子導入など技術を駆使して研究を進めています。このように、劉さんは HLA-DR や樹状細胞を応用した腫瘍免疫学の研究に精力的に取り組んでおります。

研究指導者氏名

相沢義彦



5. 研究報告

別紙形式を参考に、報告本文4000字以上で報告して下さい (枚数自由・ワープロ使用)

タイトル・要旨等は日本語で、KEY WORDS以下は日本語或いは英語で記入して下さい。

研究成果の発表予定がある場合は発表原稿・抄録集等を添付して下さい。

論文発表に当っては、日中医学協会-日本財団補助金による旨を明記して下さい。

造血器腫瘍細胞に対する免疫遺伝子治療の研究

研究者 劉 愛春

指導者 相沢義房 新潟大学医学部第一内科 教授

要旨

樹状細胞は、強力な抗原提示細胞であり、ナイーブ T 細胞に抗原提示が可能な唯一の細胞とされている。最近、GM-CSF、IL-4、TNF- α 、SCF などのサイトカインを用いることにより、骨髓や末梢血の細胞から成熟樹状細胞を培養する方法が確立された。我々は、ヒト末梢血や臍帯血の付着細胞から単球由来の樹状細胞を培養し、その性状について検討した。培養した樹状細胞は特徴的な「星」のような形態を示し、表面抗原では CD83、CD1a、CMRF-44 が特徴的で、FITC 結合 dextran の取り込みが認められた。樹状細胞は、混合リンパ球培養において、少数でも強いアロ抗原刺激活性を示すだけでなく、KHL を加えた混合リンパ球培養においては、自己リンパ球に対しても刺激能が認められた。慢性骨髄性白血病の病因遺伝子と考えられている bcr-abl に由来する b3a2 ペプチドをパルスした正常ヒト末梢血付着細胞由来樹状細胞を加えて自己リンパ球を培養することにより、bcr-abl ペプチドをパルスした自己マクロファージや HLA 一致患者からの bcr-abl を発現する白血病細胞に対する細胞障害性 T リンパ球 (CTL) が誘導された。同様の腫瘍抗原ペプチドに特異的に作用する CTL の誘導は、急性前骨髄球性白血病に特徴的にみられる PML-RARA (A) ペプチドをパルスした樹状細胞を用いた検討でも認められた。ペプチドでパルスした樹状細胞を用いた CTL の誘導においては、ペプチドと樹状細胞の間で MHC 拘束性が存在するものの、腫瘍細胞に対する特異性が高く、腫瘍の免疫療法に応用できるものと考えられた。特に骨髓移植後の白血病再発に対する DLT においては、GVH はそのまま GVL のみを増強することが期待され、良い適応になるものと思われた。緩解期の白血病症例や HLA 一致骨髓移植ドナーの末梢血から培養した樹状細胞に白血病細胞抽出液をパルスし、自己リンパ球と培養することにより、白血病細胞に対する CTL が誘導された。腫瘍細胞抽出液でパルスした樹状細胞を用いる腫瘍の免疫療法は、MHC 拘束性が無いことから、腫瘍症例に広く応用できるものと考えられた。本論文では、樹状細胞を用いた腫瘍に対する免疫 (遺伝子) 治療の現状と将来の展望についても述べた。

Key Words : 樹状細胞、bcr-abl ペプチド、腫瘍細胞抽出液、細胞障害性 T リンパ球 (CTL) 、免疫 (遺伝子) 治療

1. 樹状細胞の培養とその性状

樹状細胞は、骨髓細胞、末梢血細胞、臍帯血細胞などから培養が可能である。骨髓細胞や臍帯血細胞からは、主に CD34 陽性細胞を分離し、GM-CSF、TNF- α 、SCF などのサイトカインを加えて培養すると、2~3 週間で樹状細胞の増殖がみられる。また、末梢血や臍帯血からの付着細胞を GM-CSF、IL-4、TNF- α などのサイトカインを加えて培養すると、10 日~2 週間で単球由来の樹状細胞が誘導される。末梢血から immunobeads 法などで分離した CD3 $^{-}$ 、CD11b $^{-}$ 、CD16 $^{-}$ 、CD4 $^{+}$ の細胞は、樹状細胞前駆細胞と考えられており、我々は、この細胞を GM-CSF (100 ng/ml)、IL-4 (10 ng/ml)、TNF- α (10 ng/ml) を加えて培養した。培養翌日から胞体に突起を有する樹状細胞が誘導された。細胞の由来や培養方法に関わらず、成熟した樹状細胞はその名の示すように樹状の細胞突起が多数認められ、浮遊状態の細胞でも星が光を四方に放っているように stellate 見える。

細胞表面抗原としては、CD1a、CD83、CMRF-44 などが樹状細胞に特徴的とされており、CD80

、CD86、CD40などの共刺激分子や、MHC class I、class IIは強陽性となる。単球やマクロファージと異なり、CD14は陰性であるが、顆粒球系抗原であるCD13やCD33、およびCD54(ICAM-1)やCD58(LFA-3)などの接着分子は陽性である。

我々は、正常ヒト末梢血付着細胞から培養した樹状細胞について、その成熟度と細胞表面抗原の発現の関連について検討した。その結果、GM-CSFとIL-4を加えて培養した樹状細胞に比し、GM-CSF、IL-4にTNF- α を加えて培養した樹状細胞ではCD83やCMRF-44などの成熟樹状細胞に特徴的な表面抗原が強い陽性となった。また、TNF- α を加えることにより、MHC class II(HLA-DQなど)のほか共刺激分子であるCD80やCD86も強陽性となった(図4)。このように、GM-CSFとIL-4により誘導された未熟樹状細胞は、TNF- α の作用により成熟樹状細胞となることが明らかとなった。

2. 樹状細胞の貪食能

樹状細胞がTリンパ球に抗原提示を行うには、樹状細胞が抗原となる蛋白質を取り込んで、細胞表面に存在するMHCの溝にはまりこむ適当な長さのアミノ酸配列のペプチドに断片化(trimming)する必要がある。我々は、IL-2(300 U/ml)を加えて培養した臍帯血リンパ球(NK細胞およびT/NK細胞)と臍帯血付着細胞にGM-CSF(100 ng/ml)、IL-4(10 ng/ml)およびTNF- α (10 ng/ml)を加えて培養した樹状細胞について、FITCの結合したdextranを加えて反応させた後、FACSで細胞質内のFITCを検出することにより、樹状細胞によるdextran分子の取り込みについて検討した。dextranを加えて0℃(水中)で反応させた細胞をコントロールとして、37℃で反応させた細胞の取り込みを検討したところ、リンパ球ではdextranの取り込みは全く認められなかったが、樹状細胞においては明らかな取り込みが観察された。

3. 同種および自己混合リンパ球培養における樹状細胞の抗原提示能

樹状細胞の抗原提示能の指標として、同種および自己のリンパ球に対する混合リンパ球培養(MLC)における樹状細胞のstimulatorとしての活性を検討した。正常ヒト付着細胞にGM-CSF、IL-4、TNF- α を加えて培養した成熟樹状細胞は、GM-CSFとIL-4のみで培養した未熟樹状細胞や、末梢血単核細胞に比し、少ない細胞数においても、同種末梢血非付着細胞をresponderとするMLCで、強い刺激活性が認められた。また、自己末梢血非付着細胞をresponderとするMLCにおいても、抗原蛋白としてKLH(keyhole limpet hemocyanin)を加える(100 μ g/ml)ことにより、付着細胞にGM-CSF、IL-4、TNF- α を加えて培養した成熟樹状細胞は、KHLの抗原提示による自己リンパ球に対する刺激作用が認められた。

4. 腫瘍ペプチドをパルスした樹状細胞による腫瘍特異的CTLの誘導

樹状細胞は、抗原となる蛋白質を取り込み、細胞質内でprocessingし、抗原ペプチドを細胞表面のMHCの溝に提示することにより、強力な抗原提示能を有することから、樹状細胞はいろいろな疾患の治療に応用できることが想定される。一方、腫瘍細胞は、腫瘍化の過程で正常細胞には存在しない腫瘍特異抗原を発現する。腫瘍細胞がこのような腫瘍特異抗原を有効にリンパ球に抗原提示することができれば、腫瘍細胞に対する細胞障害性免疫反応が起こるはずである。しかし多くの腫瘍細胞においては、抗原ペプチドをMHC上に提示しても、CD80やCD86などの共刺激分子の発現がないかまたは弱く、有効な腫瘍特異抗原の提示ができない。このような腫瘍に対して、抗腫瘍免疫反応を惹起させることによる効果的な免疫療法を確立する有力な方法の一つとして樹状細胞の応用が考えられる。我々は、造血器腫瘍の腫瘍抗原を提示させた樹状細胞を用いて、腫瘍細胞に対して反応する自己または組織適合抗原の一致した同種からの細胞障害性T細胞(CTL)を誘導し、抗腫瘍免疫療法に応用可能かどうかについて検討した。実際には、慢性骨髄性白血病(CML)におけるインターフェロンと併用した免疫療法の確立や血液幹細胞移植後の再発に対するdonor leukocyte transfusion(DLT)への応用を目的とし、bcr-ablペプチドでバ

ルスした樹状細胞で刺激することにより、bcr-ablペプチドに対し特異的に作用するCTLを誘導することができるかについて検討した。加えて、急性前骨髄球性白血病（APL）に対する免疫療法の可能性を明らかにする目的で、本症に特徴的な遺伝子異常であるPML-RARAに由来するペプチドについても樹状細胞を用いた同様な検討を行った。

【材料と方法】

細胞：3名の正常人と1例のCML症例のHLA一致骨髄移植ドナーの末梢血細胞（対象とした細胞のMHC class I, class IIは表1に示す）を用いた。

未熟樹状細胞の培養：末梢血付着細胞、またはdendritic cell kit (MACS: Miltenyi Biotec, Germany)を用いたimmunobeads法により末梢血単核細胞から分離した樹状細胞前駆細胞（CD3⁻, CD11b⁻, CD16⁻, CD4⁺）をGM-CSF（100 ng/ml）とIL-4（10 ng/ml）を加えて3日間培養した。培養は正常人においては自己血漿、骨髄移植ドナーにおいてはヒトAB血清をそれぞれ5%加えて行った。

bcr-ablまたはPML-RARAペプチドによる樹状細胞のパルス：12merのbcr-abl (b3a2) ペプチド（GFKQSSKALQRP）またはPML-RARA (A) ペプチド（SGAGEAAIETQS）を培養した未熟樹状細胞（ $1 \times 10^6/m l$ ）に培養3日目（50 ng/ml）と5日目（15 ng/ml）にパルスした。

成熟樹状細胞の培養：パルスした樹状細胞をGM-CSF、IL-4、TNF- α （10 ng/ml）を加えてさらに5日間培養した。

腫瘍抗原特異的CTLの誘導：自己末梢血非付着単核細胞（リンパ球）をパルスした樹状細胞（30Gyの放射線照射後）に加え（混合比10-200:1）、6日間培養した。

細胞障害性試験：正常人における検討では、自己末梢血付着細胞にM-CSF（50 ng/ml）を加えて誘導したマクロファージに、培養3日目にbcr-ablペプチドまたはPML-RARAペプチドをパルス（50 μ g/ml）した細胞をtargetとして用いた。また、CML症例のHLA一致骨髄移植ドナーからの樹状細胞を用いた検討では、CML症例の骨髄有核細胞をtargetとして用いた。いずれにおいても、樹状細胞で刺激したリンパ球をeffectorとして、target cellの⁵¹Cr放出による細胞障害試験を行い、CTLの誘導を評価した。

【結果】

正常人Aにおける検討では、bcr-abl (b3a2)ペプチドをパルスした樹状細胞は、単球由来及び樹状細胞前駆細胞由来にかかわらず、bcr-ablペプチドをパルスした自己マクロファージに対し強い障害作用のあるbcr-abl特異的CTLを誘導することができた。ただ、bcr-ablペプチドをパルスした自己マクロファージに対しては、パルスしていない樹状細胞と培養したリンパ球もある程度障害作用を示したが、これは、targetであるパルスしたマクロファージがbcr-ablペプチドを抗原提示することにより、effectorである自己リンパ球からCTLを誘導した可能性が考えられた。CML症例のHLA一致骨髄移植ドナーから培養し、bcr-ablペプチドをパルスした樹状細胞も、自己リンパ球にbcr-ablペプチドを抗原提示することにより、レシピエントであるCML症例の白血病細胞を障害するCTLを誘導することができた。しかし、正常人BおよびCにおける同様な検討では、bcr-ablペプチドをパルスした樹状細胞はbcr-ablをパルスしたマクロファージを障害するCTLを誘導することはできなかった。

PML-RARA(A)ペプチドをパルスした樹状細胞の自己CTL誘導に関するbcr-ablペプチドと同様な検討では、正常人AにおいてはPML-RARA(A)に対しても特異的に反応するCTLが誘導されたが、正常人Bにおいては、PML-RARA(A)に対するCTLの誘導は認められなかった。

【結論】

正常人およびHLA一致骨髄移植ドナーにおいて、12merのbcr-abl (b3a2) ペプチドでパルスした樹状細胞で刺激することにより、bcr-ablペプチドを提示する自己マクロファージまたはHLA一致患者白血病細胞に対し特異的に作用するCTLを誘導することができた。一方、このペプチドをパルスした樹状細胞による腫瘍抗原の提示についてはMHC拘束性が認められた。以上の結果より、予め症例のMHC拘束性についての検討や多種類のペプチドを用いることなどによ

り、CML における免疫療法や血液幹細胞移植後の再発に対する DLT への bcr-abl ペプチドと樹状細胞を応用した免疫療法の有用性が示唆された。特に、DLT への応用については、正常人の実験系で、ペプチドでパルスしないマクロファージを target とした場合は、ペプチドでパルスした樹状細胞により活性化された CTL (effector) は障害作用を示さないことから、ペプチドと樹状細胞を用いた本法は、DLT の際に問題となる GVH の増強を起こさずに、有効な GVL を誘導することができるものと考えられた。

また、12mer の PML-RARA(A) ペプチドにおいても、MHC 拘束性があるものの、樹状細胞を用いることにより、PML-RARA ペプチドに対する特異的 CTL が誘導されることから、APL に対しても、PML-RARA ペプチドと樹状細胞を用いた免疫療法の有用性が示唆された。

5. 白血病細胞抽出液をパルスした樹状細胞による CTL の誘導

腫瘍抗原ペプチドと樹状細胞を用いた CTL の誘導による腫瘍に対する免疫療法は、腫瘍に対する特異性が高く、有用な方法と考えられる。しかし、その応用に際しての問題点は、大部分の腫瘍細胞はその腫瘍特異的ペプチドが同定されていないことに加えて、ペプチドの MHC 拘束性が存在することにより、適用できる症例の数が少ないことである。我々は、腫瘍抗原ペプチドが同定されていない腫瘍に対しても樹状細胞を用いた免疫療法を応用するために、ペプチドの代わりに腫瘍細胞抽出液でパルスした樹状細胞に腫瘍細胞に対する CTL を誘導する作用があるかどうかについて検討した。

【材料と方法】

対象症例：3 例の AML 症例（初診時の芽球と寛解時の末梢血細胞および初診時の芽球と HLA 一致骨髄移植ドナーの末梢血細胞の各組み合わせ）と 1 例の ALL 症例（再発時の芽球と HLA 一致骨髄移植ドナーの末梢血細胞の各組み合わせ）で行った。

未熟樹状細胞の培養：2 例の AML 症例では寛解時の、また各 1 例の AML 症例と ALL 症例では骨髄移植ドナーの末梢血付着細胞を GM-CSF と IL-4 を加えて 3 日間培養した。培養はヒト AB 血清を 5% 加えて行った。

白血病細胞抽出液の調整：初診時もしくは再発時の骨髄単核細胞を ultrasonication した細胞抽出液に、使用直前に DOTAP (cationic liposome) を混ぜた。

白血病細胞抽出液による樹状細胞のパルス：白血病細胞抽出液を培養 3 日目の未熟樹状細胞に加え、2 時間反応させた後、洗浄した。

成熟樹状細胞の培養：パルスした樹状細胞を GM-CSF、IL-4、TNF- α を加えてさらに 5 日間培養した。

CTL の誘導：樹状細胞を培養した人と同一人の末梢血非付着単核細胞（リンパ球）を、パルスした樹状細胞（30Gy の放射線照射後）に加え（混合比 10-70 : 1）、6 日間培養した。

細胞障害性試験：白血病細胞抽出液を調整したと同じ骨髄単核細胞を target とし、樹状細胞で刺激したリンパ球を effector として、⁵¹Cr 放出による細胞障害試験を行った。

【結果】

自己の系における 2 例の AML 症例における検討では、白血病細胞抽出液でパルスした寛解期末梢血由来の樹状細胞は、自己の白血病細胞を障害する CTL を誘導することができた。各 1 例の AML 症例と ALL 症例における HLA 一致骨髄移植ドナーとレシピエントとの組み合わせによる検討では、症例の白血病芽球でパルスした HLA 一致骨髄移植ドナーの末梢血由来樹状細胞は、レシピエントの白血病細胞を障害する CTL を誘導することができた。

【結論】

自己または HLA 一致レシピエントの白血病細胞抽出液でパルスした正常人の末梢血付着細胞に由来する樹状細胞により、白血病細胞に障害性を有する CTL を誘導することができた。腫瘍細胞抽出液を用いる方法においては、樹状細胞に取り込まれた腫瘍抗原蛋白は、細胞質内でその細胞の HLA に適した腫瘍抗原ペプチドに trimming されるので、HLA 拘束性が問題にならないと考えられ、また腫瘍特異的ペプチドが同定されていない腫瘍に対しても適用することができ、免

疫療法としての応用範囲は広いと考えられる。しかし、DLTに応用した場合は、GVL効果の他、minor MHCを介するGVHの増強も考えられることから、今後の検討が必要である。

6. 樹状細胞を用いた抗腫瘍免疫療法の現状と考察

悪性腫瘍の治療成績を飛躍的に向上するためには、従来の化学療法、手術療法、放射線療法に加えて効果的な免疫療法の確立が重要である。そのためには、細胞に対し特異的に作用するCTLの誘導が不可欠である。従来行われてきたLAKやTILなどの免疫細胞を用いた方法は、腫瘍細胞に対する特異性が十分とはいえず、必ずしも癌治療成績の向上に寄与していない。腫瘍細胞に対する特異性を高める方法の1つとして、最も強力な抗原提示細胞である樹状細胞の応用が考えられる。近年、樹状細胞に対する研究が進歩し、末梢血や骨髄、それに臍帯血からサイトカインを用いることにより効率的に樹状細胞を培養できるようになったことから、樹状細胞を応用した腫瘍に対する免疫療法についての研究は広範囲な広がりを見せている。最近になって、B細胞リンパ腫に対してはハイブリドーマにより得られた腫瘍特異的イデオタイプ蛋白をパルスした樹状細胞を静注することによる⁷⁾、多発性骨髄腫に対しては骨髄腫細胞が産生しているモノクローナル抗体でパルスした樹状細胞を静注することによる、悪性黒色腫に対してはメラノーマ関連抗原ペプチドや腫瘍細胞抽出液でパルスした樹状細胞を鼠径部リンパ節に注入することによる、また前立腺癌に対しては癌特異的膜抗原ペプチドをパルスした樹状細胞を静注することによる¹⁰⁾臨床試験が開始されており、腫瘍特異的CTLの誘導とその有効性についての予備的な報告が認められる。

白血病に対する免疫療法として樹状細胞を応用した臨床試験は未だ報告されていないが、白血病においては、染色体転座に伴う遺伝子再構成により正常細胞には存在しない腫瘍特異的蛋白質の発現がみられるものが存在し、これらの型の白血病は腫瘍抗原ペプチドと樹状細胞を用いた免疫療法の最適な対象疾患になる可能性がある。このような染色体転座による腫瘍特異的蛋白質を発現する代表的な白血病はbcr-abl融合蛋白質を発現するCMLとPML-RARA融合蛋白質を発現するAPLである。今回の我々の検討では、bcr-ablペプチドとPML-RARAペプチドのいずれにおいても、MHC拘束性はあるものの、これらのペプチドをパルスした樹状細胞は、これらのペプチドを細胞表面に提示することができ(予備的な検討であるが、FITCを結合した12mer bcr-abl (b3a2)ペプチドを用いたFACSによる検討でもこのペプチドの樹状細胞表面での提示を確認している)、bcr-ablペプチドに特異的に反応するCTLを誘導することができた。特異的なCTLの誘導が可能なることから、CMLにおいてはインターフェロン治療と組み合わせることにより、またAPLではtretinoin (all-trans retinoic acid: ATRA)や地固め療法としての抗白血病剤治療と組み合わせることにより、残存する白血病細胞を根絶できる可能性が想定された。

一方、近年になって白血病やMDSに対する造血幹細胞移植後の再発に対するDLTの有用性が明らかにされている。また、最近では従来型の移植が困難な症例に対して、non-ablative conditioning regimen transplantationとDLTを組み合わせた治療法が検討されており、その有用性も最近になって報告され始めている。このように、DLTは今後の造血幹細胞移植にとってキーワードとなる方法論であるが、現状でのDLTの効果は、対象疾患によっても異なり、必ずしも十分とは言えない。白血病に対するDLTの効果としては、GVLに基づく本来の目的とする抗白血病効果と、minor MHCの相違に基づくと考えられる治療上好ましくないGVHの増強効果が存在する。GVLを増強し、GVHを抑えるような理想的なDLTの方法は現在のところ存在しないので、GVLを増強するがGVHを増強しない方法論が、とりあえずは現実的な取り組みと考えられる。この目的に添ったものとしては、腫瘍抗原ペプチドと樹状細胞によるDLTの改良が考えられ、パルスした樹状細胞を放射線照射してそのまま輸注するか、パルスした樹状細胞を用いてin vitroで誘導した腫瘍抗原特異的CTLを輸注するかの検討は必要であるが、いずれにしても現実的に無理なく施行できる方法論として期待される。ペプチドを用いて行う場合に障害となるMHC拘束性の克服については、アミノ酸の数が異なる多種類のペプチド断片を用いて樹状細胞をパルスすることにより、適応症例の拡大が可能と考えられる。

腫瘍細胞抽出液をパルスした樹状細胞を用いた腫瘍細胞特異的 CTL の誘導による腫瘍の免疫療法は、自己の系では殆ど全ての腫瘍に適用できると考えられるが、このような手技による自己免疫疾患の発症などの問題点を考慮する必要があるものと考えられる。また DLT への応用に関しては、GVL の増強効果が期待できる反面、minor MHC による GVH も顕著になる可能性が想定され、DLT に組み合わせる場合は、CTL への TK 遺伝子の導入とガンシクロピルの投与などの活性化 CTL を調節する方法の開発などを含めた十分な配慮が必要と考えられる。

日本財団補助金による

1998 年度日中医学協力事業報告書

—在留中国人研究者研究助成—

1999 年 3 月 25 日

財団法人 日中医学協会
理事長 中島章 殿

研究室で撮影した本人のスナップ写真、及び発表論文のコピーを添付

1. 研究者氏名 金朝暉
研究機関 福井医科大学皮膚科 研究指導者 熊切正信 職名 教授
所在地 〒910-1193 福井県若狭郡松岡町下合町3-3 電話 0776-61-3111 内線 2328

研究テーマ 実験皮膚腫瘍に対する光力学療法と超音波力学的療法の併用効果の研究

2. 本年度の研究業績

(1) 学会・研究会等における口頭発表 ・ 無 (学会名・内容)

1. 色素性母斑の一種か? 第14回日本皮膚病理組織学会, 1998.7, 東京.
2. 新しい腫瘍親和性物質を利用した診断法. 第19回日本レーザー医学会大会, 1998.9, 東京.
3. 光学的癌治療での活性酸素生成とアポトーシス誘導の相関について. 第57回日本癌学会総会, 1998.9, 横浜.

(2) 学会誌等に発表した論文 ・ 無 (雑誌名・論文名)

Porphyryns, 7(2-3), 145-149, 1998: Intracellular distribution of 5-aminolevulinic acid (5-ALA), produced protoporphyrin-IX (Pp-IX) in a cultivated cell and the 5-ALA-based photodynamic therapy (PDT) of squamous cell carcinoma (SCC).

3. 今後の研究計画

新しい光増感剤の外用剤を開発し、より腫瘍親和性に富み、
外来でも治療可能な簡易で有効な光学的治療法を確立する。

これと共に光学的診断法を各皮膚疾患に対して試行し確立する。

4. 研究指導者の意見

金朝暉氏の行っている光力学療法は
皮膚癌の治療法と手術療法に匹敵する
有効な手段に仕上がっていることが期待されている。
その安全性であり確実な方法と得る
ための研究が続けられている。今後の
成果がおりることを期待している。

研究指導者氏名

熊切正厚 

5. 研究報告

別紙形式を参考に、報告本文4000字以上で報告して下さい（枚数自由・ワープロ使用）

タイトル・要旨等は日本語で、KEY WORDS以下は日本語或いは英語で記入して下さい。

研究成果の発表予定がある場合は発表原稿・抄録集等を添付して下さい。

論文発表に当っては、日中医学協会－日本財団補助金による旨を明記して下さい。

研究テーマ

実験皮膚腫瘍に対する光力学療法と超音波力学的療法の併用効果の研究

研究者氏名

金朝暉

中国での所属・役職

中国上海医科大学附属中山病院皮膚科・助手

日本での指導者氏名・所属・役職

熊切正信・福井医科大学皮膚科・教授

要旨

光増感剤とレーザー光照射による光力学療法(photodynamic therapy, PDT)は、表在性皮膚腫瘍に対して有効な治療法となりうることが報告されている。しかし、浸潤性皮膚腫瘍には PDT の治療効果は少ない。近年超音波増感剤と超音波照射による癌治療の試みが提唱され、超音波力学的療法(sonodynamic therapy, SDT)とよばれている。そこで今回、扁平上皮癌組織を C3H マウスの背部に移植した実験動物腫瘍を用いて、PDT と SDT のそれぞれ単独および併用療法とを施行し、比較検討した。その結果、単独療法群と比べ併用療法群では腫瘍の退縮が顕著であり、延命効果が認められた。組織学的に深部の腫瘍組織の壊死が確認された。PDT と SDT の併用療法は有効な皮膚癌治療法の一つとなりうると思われる。

KEY WORDS

photodynamic therapy; sonodynamic therapy; cancer therapy

研究報告

INTRODUCTION AND PURPOSE

Photodynamic therapy (PDT) is a non-thermal and non-invasive tumor treatment modality, which involves administration of a tumor-localizing photosensitizer and subsequent irradiation of the tumor with visible light (usually laser light). This process results in excitation of the sensitizer molecules to generate active oxygen species, especially singlet oxygen, which are responsible for tumor necrosis. The major advantage of PDT is the selective effect on tumor

tissues while with minimum destruction of normal tissues because of the preferential accumulation of the photosensitizer into tumors and local irradiation of a low output power of light. In addition, it usually has a cosmetic outcome (Svanberg et al, 1994; Harth et al, 1998) since the healing after PDT is mainly a process of regeneration rather than scarring (Barr et al, 1987). So far, PDT has been increasingly used for skin cancers including Bowen's disease, basal cell carcinoma and squamous cell carcinoma (SCC) (Dougherty et al, 1978; Dahlman et al, 1983; Kennedy et al, 1990; Cairnduff et al, 1994; Svanberg et al, 1994; Baas et al, 1996; Stables et al, 1997). However, successful application of it has been limited to superficial lesions (Cairnduff et al, 1994; Svanberg et al, 1994; Regula et al, 1995; Peng et al, 1995; Gossner et al, 1998). Light penetration may be an important factor influencing the depth of PDT-induced tumor necrosis. Unfortunately, when laser beam passes into the deeper tissue, the light attenuation is unavoidable. To overcome this problem interstitial fibers can be used, but with a technical difficulty of placing the fiber to achieve an equal irradiation throughout the tumor. Another approach to killing the tumor cells in the deeper level is to use higher light fluence rate because of a fluence rate dependency of the laser penetration into tissues. However, when it was practically applied, a decreased PDT effect was observed, possibly due to the oxygen depletion (Foster et al, 1991). Besides modifying PDT itself, the combined use of PDT with other forms of treatments such as hyperthermia, radiotherapy and chemotherapy has been explored (Creekmore and Zaharko, 1983; Waldow and Dougherty, 1984; Nahabedian et al, 1988; Matsumoto et al, 1990; Prinsze et al, 1992). Though synergistic effects were reported, such combinations could also potentiate the damage of normal tissues. Furthermore, the results are still preliminary.

Unlike laser light, ultrasound has a good tissue penetrating ability, reaching the deeper areas while maintaining its energy. It has been used in the treatment of cancer, with the results varying greatly (Kremkau, 1979). Using a combination of ultrasound and a chemical for tumor control is a relatively new modality which is referred to as "sonodynamic therapy" (SDT) (Umemura et al, 1989, 1992). Such a combination could induce a synergistic cytotoxic effect both in cell culture and experimental tumor studies (Tachibana et al, 1993; Umemura et al, 1993; Yumita et al, 1990, 1996; Miyoshi et al, 1997; Uchida et al, 1997). The typical chemicals used in SDT are photosensitizers, and also called sonodynamic sensitizer (sonosensitizer). Yumita and colleagues (1990, 1996) reported that the growth of implanted tumors in mice could be significantly inhibited by SDT with a photosensitizer (hematoporphyrin (Hp) or a gallium porphyrin analogue (ATX-70)), while Hp or ATX-70 alone had no inhibitory effect and ultrasound alone showed a small inhibitory effect. From the above, it was thought that an efficient destruction of tumor tissues in the deeper areas might be achieved by combining SDT with PDT because of the better tissue penetrating ability of ultrasound. Using murine leukemia L1210 cells incubated with mesoporphyrin, an agent having both photodynamic and sonodynamic activity (Kessel 1977; Kessel et al, 1994), Kessel and coworkers (1995) examined the interactions between PDT and SDT. They found an enhanced cytotoxic effect by a combined use of the two modalities. However, there have not yet been any reports concerning such a combination in vivo.

Using transplanted SCC in C3H/He mice, this study was designed to investigate the combined effect of PDT and SDT on tumor growth, survival of mice, and depth of induced tumor necrosis, aiming at exploration of a new modality for nodular tumors, which show poor responses to the conventional PDT. In order to determine whether the combined effect depends on the type of sensitizer used, two different chemicals, PH-1126 (a pheoforbide derivative) and ATX-70 (a gallium porphyrin analogue) were used, respectively. The former drug has been developed in Japan as a new potent photosensitizer (Saito et al, 1996), and the latter one, initially being described as a photodynamic sensitizer (Nakajima et al, 1989), is so far most often used as a strong sonosensitizer (Umemura et al, 1992; Kessel et al, 1994). Moreover, our preliminary studies (unpublished data) showed that both of the two agents were active not only for PDT and also for SDT, using the same tumor model as in the present study.

MATERIALS AND METHODS

Sensitizers

Pheoforbide Derivative

PH-1126 (molecular weight = 666) was obtained as a powder from Hamari Chemical Ltd. (Osaka, Japan). It was mixed with same weight of DL-tartaric acid powder ($[\text{CH}(\text{OH})\text{COOH}]_2 = 150.09$, Nacalai Tesque, Inc., Kyoto, Japan), and dissolved in 5% dextrose aqueous solution (for iv-injection, Otsuka Seiyaku Ltd., Naruto, Japan) by grinding the powder of these two agents to form a tartaric acid salt of PH-1126 at a concentration of 1 mg/ml as a stock solution.

Gallium-Porphyrin Analogue

ATX-70 (7,12-bis (1-decyloxyethyl)-3,8,13,17-tetramethyl-porphyrin-2,18-bispropionylaspartic acid gallium (III) salt; purity > 95%) was a generous gift from Dr. Isao Sakata, Toyo Hakka Kogyo Ltd., Okayama, Japan. It was dissolved in physiological saline at a concentration of 1 mg/ml as a stock solution.

PH-1126 and ATX-70 were stored in the dark at - 4 °C and each stock solution was made just before administration.

Animals and Tumors

Male and female C3H/He mice (Charles River, Osaka, Japan) were used in this study. They were housed at room temperature with a 12 hr light/dark cycle and allowed free access to water and food. The tumor throughout was a squamous cell carcinoma (SCC), which developed spontaneously in a C3H/He mouse (Urano et al, 1976), and was maintained by serial subcutaneous passage in isologous C3H/He mice. Nonnecrotic tumor material for implantation was obtained by sterile dissection of tumors from donor mice and was cut into small fragments (about 1 mm³). Single tumor fragment was transplanted subcutaneously into the right flank of recipient C3H/He mice (6-8 week old, weighing 20-25 g). Mice were allocated for treatment when their tumors reached 7-10 mm in a diameter. At this size, tumor was well vascularized and spontaneous necrosis was minimal. Before irradiation the skin overlying the tumor and surrounding area was closely shaved with electric clippers and depilatory, and tumors with overlying skin being pigmented were excluded from the study. Irradiations were performed under intraperitoneal (i.p.) anesthesia (pentobarbital 65 mg/kg body weight).

Laser Light Delivery Systems

Two types of laser systems were utilized, a pulsed (50 Hz) YAG-Optical-Parametric-Oscillator (OPO) laser system and a Krypton ion laser system. The OPO laser system (Ishikawajima-Harima Heavy Industries Co., Ltd. [IHI], Tokyo, Japan) is newly developed with an easily tuning wavelength range of 620-670 nm. It was tuned to emit light irradiation at 650 nm for the SCCs at the optimum accumulation time (36 hr) (Ishihara et al, 1991) after administration of PH-1126. The Krypton ion laser system (Model LI-2530A, Toshiba Ltd., Yokohama, Japan) was used as the light source at 575 nm for irradiation of the SCCs at the optimum accumulation time (24 hr) (Yumita et al, 1996) after ATX-70 injection. The wavelengths of 650 nm and 575 nm correspond to the maximum light absorption peak of PH-1126 and ATX-70, respectively. Light from these two types of laser was delivered via a single optical fiber and the output end of the fiber was positioned to focus the laser irradiation into a uniform light spot with 1.0-cm diameter. The total light dose is expressed as joules/square centimeter (J/cm²).

Ultrasound Irradiation System

The ultrasound irradiation system consists of four parts, including generator, amplifier, oscilloscope and transducer. Sine waves were generated by the generator (Model MG442A, Anritsu Electric, Tokyo) at a frequency of 1.0 MHz, $37 \pm 1 \text{ W}/50 \Omega$, and $44 \pm 1 \text{ Volts}$, and amplified by the power amplifier (Model 240L, ENI, INC, Rochester, NY, USA). Driven by the sine waves, the transducer (supplied from Hitachi Central Research Laboratory, Tokyo, Japan), 12 mm in diameter, delivered ultrasound at an output acoustic power of $0.51 \text{ W}/\text{cm}^2$. The oscilloscope (V-252, 20 MHz, Hitachi, Japan) could monitor the driving waves during ultrasound irradiation. Figure 1 is an illustration of tumor-bearing mice being exposed to ultrasound irradiation by placing the transducer in contact with the skin overlying the tumor while with the base of tumor being fixed on a steel platform. During practical treatments, ultrasound gel was used to serve as contact medium between the transducer and the tumors, and the aluminum matching layer of the transducer was cooled by circulating water to keep the transducer and the tumors temperature below the hyperthermal level ($< 42^\circ\text{C}$).

Treatment Protocol

The combination effect of PDT and SDT was investigated using PH-1126 or ATX-70 as a sensitizer. In the case of PH-1126, the tumor-bearing mice were divided into four groups, which were classified by treatment modality as: control ($n = 5$), PDT alone ($n = 7$), SDT alone ($n = 6$), and PDT+SDT ($n = 8$). The control mice received neither PH-1126 injection nor irradiation of laser light or ultrasound. The other three groups of mice were i.p. injected with PH-1126 (5 mg/kg) and, 36 hr later, were exposed to laser light of 650 nm (PDT), ultrasound (SDT), or laser light immediately followed by ultrasound (PDT+SDT), respectively. The total light dose of 44 J/ was used for both PDT alone and the combination therapy.

For ATX-70, similar treatment protocols were applied with group size of 5-6 mice. At 24 hr before irradiation, ATX-70 was given i.p. to mice at a dose of 5 mg/kg. The laser light was delivered at a total dose of $88 \text{ J}/\text{cm}^2$ of 575 nm.

After treatments, the mice were housed in a room with subdued lighting, and the macroscopic changes of tumors were observed and photographed.

Evaluation of Tumor Growth and Survival of Mice

Following PDT and/or SDT, each tumor was measured daily by means of a caliper in the first week and afterwards every other day until day 20 post irradiation. By assuming a hemielipsoidal structure for the tumor nodule, individual tumor volumes (V) were calculated using the following formula: $V (\text{cm}^3) = (\pi/6) L \times W \times H$ (L = length, W = width, H = height) (Mukhtar et al, 1991; Peng and Moan, 1995). The survivals of each group of mice were recorded until day 120 post irradiation, and the survival time was defined as the time from the irradiation day to death.

Histological Studies

For microscopic observation of the depth of necrosis, we sampled tumors 72 hr after irradiation, which was considered to be the time of maximum necrosis, based on the macroscopic findings (described in the results) and tumor growth curves (Figs. 3A and 4A). Using PH-1126 or ATX-70, the combination therapy and the more efficient one of single treatments (PDT with PH-1126 or SDT with ATX-70) were repeated again on additional tumor-bearing mice. Untreated tumors were also sampled as control. The removed tumors were fixed in 10% formalin solution, processed for routine paraffin embedding, cut in sections ($5 \mu\text{m}$ thick), and stained with hematoxylin-eosin.

Statistical Analysis

Statistics were performed using the StatView 4.11 software (Abacus Concepts Inc., Berkely, CA). Tumor volumes and survivals of mice in the different experiment groups were compared, respectively. Tumor volumes were presented as the mean \pm SD (SD = standard deviation), and the survivals of mice were shown as the mean survival day (MSD) \pm SD. Data were analyzed by a nonparametric ANOVA, and followed by a Fisher's multiple comparisons test for tumor growth study, or by a generalized Wilcoxon test for survival study. Statistical significance was achieved at $P \leq 0.05$.

RESULTS

Macroscopic Findings

Before treatment tumors looked healthy as shown in Fig. 2A, and immediately after illumination the treated area did not show noticeable changes or exhibited little edema (Fig. 2B). Afterwards, different degrees of edema and necrosis were the two main changes generally found in all treated tumors. The edema was present in tumor and surrounding skin within the illumination field, being most pronounced 12 hr after treatment and resolved over the subsequent 36 hr. The necrosis was restricted to tumor area, being observed 24 hr after irradiation and reaching its maximum degree at 72 hr post-irradiation. The most severe tumor necrosis was found in the combination of PDT and SDT, especially with PH-1126, with four of total eight tumors being replaced by a necrotic slough or an ulcer (Fig. 2C). In any single treatment groups, no tumor was completely replaced eradicated, and the general findings consisted of a dense necrosis crust or an ulcer on the surface of tumors.

The normal skin distant from the irradiation area did not show any obvious changes (Figs. 2C), and symptoms of systemic toxicity were not observed in all treated mice.

Effects of Combination of PDT and SDT with ATX-70 on Tumor Growth and Survival of Mice

Figure 1A shows the growth curves of the tumors after PDT and/or SDT with ATX-70. There were no statistical differences between tumor volumes of any of the experimental groups (Control, PDT, SDT and PDT+SDT) before treatments. Statistical analysis was performed on the data obtained from day 3, at which time the tumor necrosis was maximum. At all time points from day 3 to 20 post-irradiation, significant differences ($P < 0.05-0.0001$) in tumor volume were obtained between any two of the four groups. Twenty days after treatment, the mean tumor volume of the PDT+SDT group, PDT group, SDT group and control group were 0.141 (SD 0.021), 1.339 (SD 0.111), 0.427 (SD 0.071), and 1.835 (SD 0.199) cm^3 , respectively. Based on the above, the tumor growth inhibition ratios were 92.3, 76.7 and 27% for the PDT+SDT, SDT and PDT groups, respectively, demonstrating the antitumor efficiency in the following order: PDT+SDT > SDT > PDT. However, the combined effect of PDT and SDT is not shown to be greater than the arithmetic sum of the effects of PDT alone and SDT alone (Fig. 3A). Figure 1B shows the survival curves of the treated mice. Mean survival was significantly prolonged in the group treated with PDT+SDT (MSD \pm SD = 105.8 \pm 21.1 days), as compared with that of the control group ($P = 0.044$, MSD \pm SD = 77.8 \pm 12.5 days). Compared to control, SDT alone led to a minor survival prolongation ($P > 0.05$, MSD \pm SD = 99.0 \pm 24.5 days), while PDT alone did not lead to a survival prolongation ($P > 0.05$, MSD \pm SD = 80.3 \pm 13.7 days). Significant difference in mean survival time was also not obtained between PDT+SDT and either single therapy. As shown in Fig. 3B, none of control and single PDT groups of mice could survive to day 120, and 40% of single SDT group of mice ($n = 5$) remained alive at this time. However, the

combination therapy increased the 120-day survival to 60% of five mice.

Effects of Combination of PDT and SDT with PH-1126 on Tumor Growth and Survival of Mice

Figure 2A shows the growth curves of the tumors after PDT and/or SDT with PH-1126. There were no statistical differences between tumor volumes of any of the experimental groups (Control, PDT, SDT and PDT+SDT) before treatments. For the same reason as in the case of ATX-70, statistical analysis was performed on the data obtained from day 3. At all time points from day 3 to 20 post-irradiation, significant differences ($P < 0.001-0.0001$) in tumor volume were obtained between any two of the four groups. On day 20 after treatment, the mean tumor volume of the PDT+SDT group, PDT group, SDT group and control group were 0.041 (SD 0.042), 0.454 (SD 0.112), 1.068 (SD 0.141), and 1.859 (SD 0.082) cm^3 , respectively. Based on the above, the tumor growth inhibition ratios were 97.8, 75.6 and 42.5% for the PDT+SDT, PDT and SDT groups, respectively, demonstrating the antitumor efficiency in the following order: PDT+SDT > PDT > SDT. However, it is also shown that the combined effect of PDT and SDT was not greater than the arithmetic sum of the effects of PDT alone and SDT alone (Fig. 4A). Figure 2B shows the survival curves of the treated mice. The mean survival time of PDT+SDT group (117.6 ± 6.8 days) was significantly greater than either that of control (81 ± 15.7 days, $P = 0.002$), that of PDT alone group (93.6 ± 21.9 days, $P = 0.019$), or that of SDT alone group (81 ± 18.1 days, $P = 0.003$). Compared to control, either single therapy could not enhance the survival of mice ($P > 0.05$). As shown in Fig. 4B, none of control and single SDT groups of mice could survive to day 120, and only 28% of single PDT group of mice ($n = 7$) were still alive at this time. However, the combination therapy increased the 120-day survival to 88% of eight mice.

Effects of PH-1126 Dose on Tumor Growth and Survival of Mice

We previously investigated the effects of single PDT using 10 mg/kg PH-1126 on tumor growth and survival of mice using the same animal tumor model (unpublished data). As an aid to comparison of PH-1126 dose effects, the data using 10 mg/kg PH-1126 were plotted in Figure 4A and B, respectively. Except for the drug dose, the light irradiation conditions were same as in the present experiment. Before irradiation, there were no statistical differences between tumor volumes of the experiment groups. Twenty days after treatment, mean tumor volume of the PDT (10 mg/kg PH-1126) group was 74.4% lower (0.116 ± 0.012 cm^3) than in PDT (5 mg/kg PH-1126) group (0.454 ± 0.112 cm^3 , $P < 0.05$), but 64.6% higher than PDT+SDT (5 mg/kg PH-1126) group (0.041 ± 0.042 cm^3 , $P > 0.05$). The data in Figure 4B indicate that within 72 hr after light irradiation, 5 of 8 mice (62.5%) treated with 10 mg/kg PH-1126 died, while no death was found in mice after single PDT or the combined use of it with SDT using 5 mg/kg PH-1126.

Histological Alterations

All tumors were sampled 72 hr post irradiation. Control slides showed the usual tumor architecture without obvious necrosis, with the tumor blood vessels being intact (Figs. 5A and a). In the tumors after single PDT with PH-1126, the superficial parts became completely necrosis with obvious hemorrhage and thrombi (Fig. 5B), while the base did not show obvious necrosis, though hemorrhage and dilated vessels were obvious (Fig. 5b). The tumors after single SDT with ATX-70 showed similar changes, but with lesser vascular changes compared with PH-1126 (not shown). In the tumors after the combination therapy with PH-1126, the major portion of tumors showed necrosis extending from the surface to its base with hemorrhage (Fig. 5C), but in the base less amounts of viable tumor cells still existed with neighboring vessels showing hemorrhage and organization (Fig. 5c). Being same as PH-1126, the combination therapy with ATX-70 also showed similar phenomenon but with no obvious microsculpture alterations (not shown).

By comparing macroscopic and microscopic changes 72 hr after irradiation, it was found that though some tumors were determined to disappear with the naked eye or became

nonpalpable, actually undamaged tumor tissues still remained.

DISCUSSION

When a combination cancer therapy is designed, besides the aim of obtaining additive or synergistic antitumor effect, the selectivity of the effect must be considered. In respect of this point, the combination of PDT and SDT is therefore very attractive since both of them have relatively high tumor selectivity by using a tumor-localizing sensitizer and a limited area of laser light or ultrasound irradiation. In addition, using one agent as a common sensitizer for PDT and SDT is also a characteristic of this combination. As we know, PDT is a process of activation of a sensitizer by laser light, while SDT is initiated by the interaction of a sensitizer and ultrasound (Yumita et al, 1990; Umemura et al, 1992). Before laser light irradiation, a tumor-localizing sensitizer is in the ground state. On absorption of light, it can be brought to an excited triplet state. But this triplet species have an extremely short lifetime (millisecond range), and decay quickly back to the ground state (Van Hillegersberg et al, 1994). Hence, after exposure to laser light, the sensitizer maybe just experience the photochemical modifications which do not influence its other properties such as sonodynamic activity.

In the results, the combination of PDT and SDT, using either ATX-70 or PH-1126 as a sensitizer, was found to yield a greater antitumor effect than PDT alone and SDT alone. However, it was also found that the combined effect of PDT and SDT is not greater than the arithmetic sum of the two individual effects, using either of the two agents (Figs. 3A and 4A). Based on the above, it is suggested that additive effects could be obtained by the combined use of PDT and SDT, not depending on the type of the sensitizer, strong PDT or SDT agent. Considering treatment mechanisms, the present result has an inclination of a similar mechanism of action for PDT and SDT, which seems to contrast with the *in vitro* study by Kessel' group. By comparing the modes of photodynamic versus sonodynamic cytotoxicity with murine leukemia L1210 cells in culture, they suggested clearly different mechanisms involved in the two modalities (Kessel et al, 1995, 1996). However, *in vitro* study can not involve tumor microvasculature, which has been reported to be an important target of *in vivo* PDT (Nelson et al, 1988). Our histological studies also suggest that PH-1126 and ATX-70 maybe have different actions on tumor vessels, possibly due to their distributions in tumor. Taking into account the tumor-killing agents, it is generally believed that photodynamic cell damage occurs primarily as a result of singlet oxygen formation via photosensitized oxidation (Valenzeno, 1987; Foote, 1991; Henderson and Dougherty, 1992), while cytotoxic agent involved in SDT remains to be established. Miyoshi and coworkers (1995) reported hydroxide radicals rather than singlet oxygen could be detected during sonodynamic action by using ATX-70 in aqueous solutions exposed to ultrasound with electron paramagnetic resonance (EPR) method. It seems that different cytotoxic agents are involved in PDT and SDT, however, this different radical from singlet oxygen can also be explained to be just intermediates during sonochemical reaction.

Although a better understanding of action mechanisms is very helpful for optimization of PDT parameters, the key to getting a cancer cure using this modality lies in matching the depth of necrosis to the depth of tumor (Fan et al, 1997). However, with the increasing depth of tumor, the red light used for PDT unavoidably gradually attenuates, so when reaching the deeper layer, it is not sufficient to induce a photochemical reaction with a sensitizer beyond the threshold for PDT necrosis. The microscopic results showed that the PDT-induced necrosis was largely superficial, though the base of tumors sensitized with PH-1126 demonstrated obvious vascular damage (Figs. 6A and B). A unique advantage of SDT is its potentiality for deep-seated lesions since the ultrasound used has a good tissue penetrating ability. When combined with SDT, as shown in the present study (Fig. 7B), the treatment-induced necrosis involved even the base of the tumors. This phenomenon may be explained by that the subsequent SDT could compensate

for the decreased PDT effect on the deeper tissues. By microscopic observation, it was also hoped that a relatively homogeneous effect of SDT on tumor tissues could be shown because ultrasound can maintain its energy into deep area. Unexpectedly, the most observable result of SDT is a superficial necrosis, which is beyond our explanation. Different from this result, other researchers reported a significant necrosis in the major part of the tumor tissue after the ATX-70-based SDT using a Colon 26 tumor implanted in the mouse kidney (Yumita et al, 1997). In their experiment, 500 kHz and 1MHz ultrasound were combined, and delivered in a progressive wave mode.

Analyzing the tumor growth curves combined with the microscopic alterations, it is implied that the tumor necrosis and shrinkage reflect the acute effects of PDT and/or SDT, thereafter, tumor cell proliferation may be affected by a delayed effect. This after action can be clearly demonstrated by the growth curve of the tumors treated with the combination of PDT and SDT using ATX-70 (Fig. 3B). Within 5 days after irradiation, the mean tumor size gradually decreased, and then followed by the tumors remaining at this size for about 4 days, indicating a period of stasis in tumor cell proliferation.

As a confirmatory evidence for the local treatment effect, the survival study was designed. The tumor models used in the present experiment are SCCs transplanted in mice. After tumor transplantation, the tumor-bearing mice without treatment usually survive for 3 months before dying. The death was considered to be as a result of an extensive local tumor because autopsy did not show any obvious metastasis. This study shows that the combination therapy using either ATX-70 or PH-1126 could significantly prolong the survival of mice, demonstrating that strong inhibition of tumor growth can also result in a survival advantage. The improved survival of mice also corroborates the enhanced therapeutic effect by the combination of PDT and SDT. In addition, it is shown that the combined use of PDT and SDT did not increase the systemic toxicity.

By means of the combination of PDT and SDT, we also hoped to use a relatively low sensitizer dose while without reducing the antitumor efficiency. In our previous experiments using the same mouse tumor model (unpublished data), PDT with 10 mg/kg PH-1126 and 88 J/cm² laser light resulted in 100% mortality of mice. Reducing the light dose to 44 J/cm² could result in good tumor control, but still caused mortality with a percentage of 62.5% (Figs. 4A and B). The dose of PH-1126 (10 mg/kg) was thought to be high enough to produce systemic toxicity in the form of acute lethality. So, in the present study we selected a dose of 5 mg/kg of PH-1126. Comparing the effect of PH-1126 dose (10 versus 5 mg/kg), it was found that using lower dose could avoid mortality but resulted in a significantly reduced PDT efficiency. It suggests that the efficiency of PH-1126-based PDT is strongly dependent upon PH-1126 dose. The lower the dose used, the lower the PDT efficacy achieved. Figure 4A also shows that when combined with SDT, PDT with 5 mg/kg PH-1126 has a slightly but not significantly stronger inhibition effect on tumor growth than PDT alone using 10 mg/kg PH-1126. From the above, an important implication is that when SDT is combined with PDT, lesser amounts of sensitizer could be used while without decreasing the treatment effect. This finding has considerable clinical value because at present the major side effect of PDT in clinical practice is a drug dose-related skin photosensitivity which usually lasts for at least 4-6 weeks, and restricts patients from outdoor activity (Dougherty et al, 1990; Ris et al, 1992).

In the present study, the doses of sensitizer (PH-1126 and ATX-70), laser light and ultrasound were chosen based on our preliminary experiment results as well as other previous studies (Saito et al, 1996; Yumita et al, 1996), not producing any apparent signs of toxicity while achieving a comparable antitumor efficiency. In addition, the doses of laser light for PH-1126 (44 J/cm²) and ATX-70 (88 J/cm²) were used low enough that thermal effect could be precluded (Suzuki et al, 1987), though it has been reported that hyperthermia may potentiate PDT (Kinsey et al, 1983; Glassberg, 1991). The reason for undesired thermal effect is that until the actions of PDT and SDT are more fully understood, it is better to restricts studies to situations in which only these two modalities are investigated at a time.

In conclusion, with a mouse SCC model, PDT and SDT exhibited an additive mode of interaction, using either PH-1126 or ATX-70 as a sensitizer. In spite of not achieving a synergistic effect, for nodular tumors the two modalities should be combined because such a combination could increase the depth of tumor necrosis as well as without increasing destruction of normal tissue. When combined with SDT, PDT could allow a low dose of sensitizer, thus decreasing the risk of generalized skin photosensitivity. However, based on the tumor growth curves and microscopic studies, a complete tumor cure could not be achieved in this experiment. This failure suggests that the treatment parameters used here are not optimum, or that the mouse SCC may be a resistant tumor model. For residual tumor cells, PDT and/or SDT can be repeated because such treatment does not cause cumulative toxicity.

Finally, although an argon-pumped dye laser is the system most often used in PDT, but it is clinically not easy to handle, and its optical parts need continued replacement and maintenance. Thus, there is a need for new laser system to be more suitable for clinical practice. In the current study, we used a newly developed OPO laser system, which is tunable between 620-670 nm, as a light source for PH-1126, and found it is simple and easy to manipulate. The present PDT results indicate the potentiality of the OPO laser system as a candidate for the argon-dye laser system. In addition, our group originally used the ultrasound transducer, and the present SDT results demonstrate its value for further study.

REFERENCES

- Baas P, van Geel IPJ, Oppelaar H, Meyer M, Beynen JH, van Zandwijk N, Stewart FA: Enhancement of photodynamic therapy by mitomycin C: a preclinical and clinical study. *Br J Cancer* 73: 945-951, 1996
- Barr H, Tralau CJ, Boulos PB, MacRobert AJ, Tilly R, Bown SG: The contrasting mechanism of colonic collagen damage between photodynamic therapy and thermal injury. *Photochem Photobiol* 46: 795-800, 1987
- Creekmore SP, Zaharko DS: Modification of chemotherapeutic effects on L1210 cells using hematoporphyrin and light. *Cancer Res* 43: 5252-5257, 1983
- Cairnduff F, Stringer MR, Hudson EJ, Ash DV, Brown SB: Superficial photodynamic therapy with topical 5-aminolaevulinic acid for superficial primary and secondary skin cancer. *Br J Cancer* 69: 605-608, 1994
- Dahlman A, Wile AG, Burns RG, Mason GR, Johnson FM, Berns MW: Laser photoradiation therapy of cancer. *Cancer Res* 43: 430-434, 1983
- Dougherty TJ, Kaufman JE, Goldfarb A, Weishaupt KR, Boyle D, Mittleman A: Photoradiation therapy for the treatment of malignant tumors. *Cancer Res* 38: 2628-2635, 1978
- Dougherty TJ, Cooper MT, Mang TS: Cutaneous phototoxicity occurrences in patients receiving Photofrin. *Lasers Med Surg* 10: 485-488, 1990
- Fan KF, Hopper C, Speight PM, Buonaccorsi GA, Bown SG: Photodynamic therapy using mTHPC for malignant disease on the oral cavity. *Int J Cancer* 73: 25-32, 1997
- Foote CS: Definition of type I and type II photosensitized oxidation. *Photochem Photobiol* 54: 659, 1991

Foster TH, Murant RS, Bryant RG, Knox RS, Gibson SL, Hilf R: Oxygen consumption and diffusion effects in photodynamic therapy. *Radiat Res* 126: 296-303, 1991

Glassberg E, Lewandowski L, Halcin C, Lask G, Uitto G: Hyperthermia potentiates the effects of aluminum phthalocyanine tetrasulfonate-mediated photodynamic toxicity in human malignant and normal cell lines. *Lasers Surg Med* 11: 432-439, 1991

Gossner L, Stolte M, Sroka R, Rick K, May A, Hahn EG, Ell C: Photodynamic ablation of high-grade dysplasia and early cancer in Barrett's esophagus by means of 5-aminolevulinic acid. *Gastroenterology* 114: 448-455, 1998

Harth Y, Hirshowitz B, Kaplan B: Modified topical photodynamic therapy of superficial skin tumors, utilizing aminolevulinic acid, penetration enhancers, red light, and hyperthermia. *Dermatol Surg* 24: 723-726, 1998

Henderson BW, Dougherty TJ: How does photodynamic therapy works? *Photochem Photobiol* 55: 145-157, 1992

Ishihara M, Sawada M, Miyoshi N, Uchibayashi T, Hisazumi H, Fukuda M: A study of the newly sensitizer, PH-1126 tartarate, for PDT into cancerous tissue. *Photomed Photobiol* 13: 147-150, 1991

Kennedy JC, Pottier RH, Pross DC: Photodynamic therapy with endogenous protoporphyrin IX: basic principles and present clinical experience. *J Photochem Photobiol B Biol* 6: 143-148, 1990

Kessel D: Effect of photoactivated porphyrins at the cell surface of leukemia L1210 cells. *Biochem* 16: 3443-3449, 1977

Kessel D, Jeffers R, Fowlkes JB, Cain C: Porphyrin-induced enhancement of ultrasound cytotoxicity. *Int J Radiat Biol* 66: 221-228, 1994

Kessel D, Lo J, Jeffers R, Fowlkes JB, Cain C: Modes of photodynamic vs. sonodynamic cytotoxicity. *J Photochem Photobiol B* 28: 219-221, 1995

Kessel D, Jeffers R, Fowlkes JB, Cain C: Effects of sonodynamic and photodynamic treatment on cellular thiol levels. *J Photochem Photobiol B* 32: 103-106, 1996

Kinsey JH, Cortese DA, Neel HB: Thermal considerations in murine tumor killing using hematoporphyrin derivative phototherapy. *Cancer Res* 43: 1562-1567, 1983

Kremkau FW: Cancer therapy with ultrasound: a historical review. *J Clin Ultrasound* 7: 287-300, 1979

Matsumoto N, Saito H, Miyoshi N, Nakanishi K, Fukuda M: Combination effect of hyperthermia and photodynamic therapy on carcinoma. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 116: 824-829, 1990

Miyoshi N, Misik V, Fukuda M, Riesz P: Effect of gallium-porphyrin analogue ATX-70 on nitroxide formation from a cyclic secondary amine by ultrasound: on the mechanism of sonodynamic activation. *Radiat Res* 143: 194-202, 1995

Mukhtar H, Agarwal R, Athar M, Lewen RL, Elmetts CA, Bickers DR: Photodynamic therapy of

murine skin tumors using Photofrin-II. *Photodermatol Photoimmunol Photomed* 8: 169-175, 1991

Nahabedian MY, Cohen RA, Contino MF, Terem TM, Wright WH, Berns MW, Wile AG: Combination cytotoxic chemotherapy with cisplatin or doxorubicin and photodynamic therapy in murine tumors. *J Natl Cancer Inst* 80: 739-743, 1988

Nakajima S, Maeda T, Omote Y, et al: Tumor localizing Ga-porphyrin complex (ATX-70) as a new photosensitizer excited with YAG-laser. *J Jpn Soc Laser Med* 10: 225-228, 1989 (in Japanese)

Nelson JS, Liaw LH, Orenstein A, Roberts WG, Berns MW: Mechanism of tumor destruction following photodynamic therapy with hematoporphyrin derivative, chlorin, and phthalocyanine. *J Natl Cancer Inst* 80: 1599-1605, 1988

Peng Q, Moan J: Correlation of distribution of sulphonated aluminum phthalocyanines with their photodynamic effect in tumour and skin of mice bearing CaD2 mammary carcinoma. *Br J Cancer* 72: 565-574, 1995

Prinsze C, Penning LC, Dubbelman TMAR, VanSteveninck J: Interaction of photodynamic treatment and either hyperthermia or ionizing radiation and of ionizing radiation and hyperthermia with respect to cell killing of L929 fibroblasts, chinese hamster ovary cells, and T24 human bladder carcinoma cells. *Cancer Res* 52: 117-120, 1992

Regula J, MacRobert AJ, Gorchein A, et al: Photosensitisation and photodynamic therapy of oesophageal, duodenal, and colorectal tumours using 5 aminolaevulinic acid induced protoporphyrin IX- a pilot study. *Gut* 36: 67-75, 1995

Ris HB, Altermatt HJ, Nachbur B, et al: Clinical evaluation of photodynamic therapy with mTHPC for chest malignancies, pp 421-425. In: Spinelli P, Dal Fante M, Marchesini R (eds). *Photodynamic Therapy and Biomedical Lasers*. Amsterdam: Elsevier Science Publishers, 1992

Saito T, Hayashi J, Sato H, Kawabe H, Aizawa K: Scanning electron microscopic analysis of acute photodynamic therapy for atherosclerotic plaques of rabbit aorta by using a pheophorbide derivative. *J Clin Laser Med & Surg* 14: 1-6, 1996

Stables GI, Stringer MR, Robinson DJ, Ash DV: Large patches of Bowen's disease treated by topical aminolaevulinic acid photodynamic therapy. *Br J Dermatol* 136: 957-960, 1997

Suzuki S, Nakamura S, Sakaguchi S: Experimental study of intra-abdominal photodynamic therapy. *Lasers in Medical Science* 2: 195-203, 1987

Svanberg K, Andersson T, Killander D, et al: Photodynamic therapy of non-melanoma malignant tumours of the skin using topical δ -amino levulinic acid sensitization and laser irradiation. *Br J Dermatol* 130: 743-751, 1994

Umemura S, Yumita N, Nishigaki R, Umemura K: Sonochemical activation of hematoporphyrin: a potential modality for cancer treatment. *Proc IEEE Ultrasonics Symp* 955-960, 1989

Umemura S, Kawabata K, Yumita N, Nishigaki R, Umemura K: Sonodynamic approach to tumor treatment. *Proc IEEE Ultrasonics symp* 1231-1240, 1992

Umemura S, Yumita N, Nishigaki R: Enhancement of ultrasonically induced cell damage by a gallium-porphyrin complex, ATX-70. *Jpn J Cancer Res* 84: 582-588, 1993

Urano M, Nesumi N, Ando K, Koike S, Ohnuma N: Repair of potentially lethal radiation damage in acute and chronically hypoxic tumor cells in vivo. *Radiology* 118: 447-451, 1976

Valenzeno DP: Photomodification of biological membranes with emphasis on singlet oxygen mechanisms. *Photochem Photobiol* 46: 147-160, 1987

Van Hillegersberg R, Kort WJ, Wilson JHP: Current status of photodynamic therapy in oncology. *Drugs* 48: 510-527, 1994

Waldow SM, Dougherty TJ: Interaction of hyperthermia and photoradiation therapy. *Radiat Res* 97: 380-385, 1984

Yumita N, Nishigaki R, Umemura K, Umemura S: Synergistic effect of ultrasound and hematoporphyrin on sarcoma 180. *Jpn J Cancer Res* 81: 304-308, 1990

Yumita N, Sasaki K, Umemura S, Nishigaki R: Sonodynamically induced antitumor effect of a gallium-porphyrin complex, ATX-70. *Jpn J Cancer Res* 87: 310-316, 1996

Yumita N, Sasaki K, Umemura S, Yukawa A, Nishigaki R: Sonodynamically induced antitumor effect of gallium-porphyrin complex by focused ultrasound on experimental kidney tumor. *Cancer-Lett* 112: 79-86, 1997

日本財団補助金による
1998年度日中医学協力事業報告書

—在留中国人研究者研究助成—

H 11 年 2 月 8 日

財団法人 日中医学協会
理事長 中島章 殿

研究室で撮影した本人のスナップ写真、及び発表論文のコピーを添付

1. 研究者氏名 劉 驍
研究機関 京都大学大学院医学研究科 研究指導者 本田孔士 教授 職名 大学院生
所在地 〒606京都市左京区吉田近衛町 電話 0757534337 内線 4337

研究テーマ マウス網膜発生におけるβ-カテニンの局在変化について

2. 本年度の研究業績

(1) 学会・研究会等におけるの口頭発表 (有) ・ 無 (学会名・内容)

南カリフォルニア大学 Doheny 眼科研究所学術集会 (平成10年10月9日)
マウス網膜発生におけるβ-カテニンの局在変化について

(2) 学会誌等に発表した論文 (有) ・ 無 (雑誌名・論文名)

Developmental changes in the subcellular localization of R-cadherin
in chick retinal pigment epithelium

(鶏胚網膜色素上皮発生におけるR-カドヘリンの局在変化)

Xiao Liu, Akira Mizoguchi, Masatoshi Takeichi, Yoshihito Honda,
Chizuka Ide

(劉 驍、溝口 明、竹市 雅俊、本田 孔士、井出 千束)

平成10年4月11日発行 Histochemistry and Cell Biology 雑誌 第10
8巻 第1号 35頁～43頁掲載

3. 今後の研究計画

軸索と成熟グリア細胞との接着は限られているが、発生における幼若グリア細胞は軸索と高い親和性をもって接着するので、軸索伸長に働く接着分子が関与していると考えられる。我々が視神経及び網膜における再生軸索の接着分子としては R-カドヘリン、および β -カテニンなど有効に機能するを明らかにした。今度は接着分子の具体的な応用として、有効と分かった接着分子の遺伝子をウイルスベクターに組み込んで強制的に接着分子を発現させた細胞を作成し、培養系および発生を用いて神経成長円錐とグリア細胞に発現される接着分子を明らかにし、そのアミノ酸配列、DNA 配列を明らかにする。また再生軸索が本来の中樞神経組織内を伸びる可能性を追求し、再生軸索がグリア細胞をはじめとする組織成分といかなる関係を保ちながら伸びるかについて形態学的な基礎を確立し、軸索の伸長を阻害するとされる髄鞘を除去することによって、網膜を含む中枢神経系の neuron の再生促進がどの程度図れるかを調べる。

4. 研究指導者の意見

劉君は、院入学後、優秀な成績で大学院の単位順調に取得し、電子顕微鏡、免疫組織化学、細胞培養、遺伝子操作などの研究技術をよく習得し、神経網膜再生および接着分子についての論文が一つ、既に出版されており、更に新しい論文が投稿中である。研究内容は、失明予防を目的とするもので、アジアの人々に貢献するところが大きいものである。難治眼疾患の基礎的な病因を地道に追求して、重要な発見をしかかっている。彼の研究生活は極めて真面目であり、学問に対する態度も極めて精勤で、模範的な留学生活である。彼は健康に恵まれ、人格的にも円満で、よく他の研究者達とも和し、教室員からも尊敬を受けている。チームワークの保持がとてもよい。今まで研究成果は網膜の形態形成における R-カドヘリンの局在と機能の解明に貢献し、細胞生物学、発生形態学及び眼科学の発展に寄与するところが多い。彼の明晰な頭脳と真摯な生活態度から見て、帰国後は中国眼科を背負う優秀な人材になるものと確信される。

研究指導者氏名 本田 孔 士 

5. 研究報告

別紙形式を参考に、報告本文4000字以上で報告して下さい（枚数自由・ワープロ使用）

タイトル・要旨等は日本語で、KEY WORDS以下は日本語或いは英語で記入して下さい。

研究成果の発表予定がある場合は発表原稿・抄録集等を添付して下さい。

論文発表に当っては、日中医学協会－日本財団補助金による旨を明記して下さい。

マウス網膜発生における β -カテニンの局在変化について

劉 曉

京都大学大学院医学研究科 大学院生

指導教官：本田 孔士 京都大学大学院医学研究科 教授

論文要旨

【目的】近年、神経系で発現している細胞接着分子が次々と同定されている。その中でカテニンは、カドヘリンの接着機能を細胞質領域に結合して、制御されていると考えられ、これらを介して細胞骨格系と連結している。本研究は、網膜の形態形成における β -カテニンの役割を明らかにするために、マウス網膜発生における β -カテニンの局在を免疫組織化学的及び分子生物学的に調べた。

【方法】マウス (C57/BL6) の 12、16 日の胎仔と出産後胎仔 1、2、5、10、16、日及び 1 が月後のアダルトから網膜を摘出して、3.5%パラホルムアルデヒドで固定し、20 μ m のクリオスタット切片を作成して、 β -カテニンの免疫染色を行った。一次抗体として抗 β -カテニンモノクローナル抗体、また二次抗体として TRITC (tetramethylrhodamine isothiocyanate) 標識抗 IgG を用いて免疫蛍光法で染色し、蛍光顕微鏡及び共焦点レーザー顕微鏡で観察を行った。次に同じ時期のものを Trizol で total RNA を取って、遺伝子レベルでの発見を見るために Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) 法によって網膜全体での β -カテニンの発見を調べた。

【結果】 β -カテニンは胎生 6 日目から網膜神経節細胞に局在していた。出産後 1-5 日目ピークに達し、10 日目から減少し、16 日目には主に神経節細胞及び神経繊維層、外、内網状層に集積がみられた。アダルトには消失した。定量的 RT-PCR 法によって、mRNA レベル上以上の局在を確認した。また、Western blot で蛋白質レベル上以上の局在を確認した。

【結論】以上により、 β -カテニンは、マウス網膜の形態形成に伴って網膜に限局して発現されることが分かった。 β -カテニンが発生初期には網膜神経節細胞から発現され、発生後期主に神経節細胞及び神経繊維層、外、内網状層に限局して発現することは興味深い事実である。 β -カテニンは、組織が分化していく際の形態変化と相関しており、発生段階に神経突起の伸長及びシナプス結合の形成と維持に重要な役割を果たしていると考えられる。

Key Words 網膜 β -カテニン 発生 マウス RT-PCR 免疫蛍光法

Developmental Expression of Beta-catenin in Mouse Retina

Xiao Liu^{1,2,3}, Vijay P. Sarthy², Yoshihito Honda³, Chizuka Ide¹

From ¹Department of Anatomy and Neurobiology, Graduate School of Medicine, Kyoto University, Kyoto, Japan; ²Department of Ophthalmology, Northwestern University Medical School, Chicago, Illinois 60611-3008; ³Department of Ophthalmology and Visual Science, Graduate School of Medicine, Kyoto University, Kyoto, Japan

Short title: β -catenin in mouse retina

Corresponding author: Xiao Liu M.D., Ph.D.

Department of Anatomy and Neurobiology, Graduate School of Medicine, Kyoto University, Yoshida-konoe-cho, Sakyo-ku, Kyoto 606-8501, Japan

Tel: 81-75-753-4337; Fax: 81-75-751-7286.

email: sliu@med.kyoto-u.ac.jp

Section code: BI, RC

Proprietary Interest: None

Key Words: Retina; β -catenin; Development; Mouse; RT-PCR; Immunocytochemistry.

Abbreviations: RGC: retinal ganglion cell; OPL: outer plexiform layer; IPL: inner plexiform layer

Abstract

PURPOSE. To examine the expression of β -catenin in the developing mouse retina.

METHODS. Cryostat sections of retinas from E12, E16, E20, P1, P5, P10, P16 and adult mice were prepared for immunocytochemistry and viewing by light microscopy. Localization of β -catenin was determined by immunocytochemistry. The reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) method was used to detect β -catenin mRNA expression of embryonic eyeball and of postnatal retina stages. Total RNA was isolated and purified.

RESULTS. β -catenin mRNA was detected clearly in embryonic day (E) 12, E16, postnatal day (P) 1 and P5. Thereafter, the expression was markedly decreased, and showed weak expression in adult mouse. Immunoreactivity for β -catenin was demonstrated in ganglion cells of retina at E12, and was strongest from E16 through P5. stages. During these stages, β -catenin was expressed uniformly around the site of the plasma membranes of the retinal cells in contact with each other. Thereafter, the immunoreactivity was still positively distributed throughout the retina cells, and gradually become weaker with development and localized in inner plexiform layer and ganglion cell layer including neurofiber layer in P10. By P16, only weak but clear immunoreactivity was obtained on the outer plexiform layer, inner plexiform layer and ganglion cell. No immunoreactivity was detected in adult mouse retina except in blood vessels. And no expression was found in RPE cells in postnatal stages.

CONCLUSIONS. These findings indicate that β -catenin may play an important role in the morphogenesis of the mouse retina, especially in development of retinal ganglion cells and synapses.

Introduction

In the recent years, there is accumulating evidence that the cell adhesion molecules play a critical role in regulating differentiation and growth of the vertebrate retina. During development of the mouse retina, growth of ganglion cell axon is dependent on the presence of many factors including adhesion molecules such as NCAM, L1, N- and R-cadherin. These molecules are localized temporally and spatially along the developing optic pathway (Matsunaga, et al. 1988; Doherty et al. 1991), and in both inner and outer plexiform layers (Hankin, et al. 1994), and on many retinal cells (Grunwald GB, 1993, Cunningham BA, 1995) including retinal pigment epithelium cells (Liu, et al. 1997).

Catenins were first characterized as linking the cytoplasmic domains of cadherins to the cortical actin cytoskeleton. They are intracellular polypeptides that part of a complex sub-membraneous network which modulates the adhesive ability of cells associated with classical cadherins. (Kemler, 1993). Recent studies proved that the function of cadherin family of cell adhesion molecules is mediated by catenins (Ranscht B, 1994). In addition to their essential role in modulating cadherin adhesivity, catenins have more recently been implicated in cell and developmental signaling pathways controlling morphogenesis (Huber, et al. 1996). β -catenin was first identified as a cytoplasmic ligand required for cadherin-mediated extracellular adhesion molecule (Nagafuchi and Takeichi, 1988; Ozawa, et al. 1990). Its function was dependent on its association with cytoskeleton. Catenins can bind to actin filaments at adherens junction (Haftik, et al. 1996). Their complex pattern of temporal and spatial expression suggest the potential involvement in morphogenetic processes (Miller et al. 1997). Subsequently, β -catenin was also found to be involved in the neurocan-GalNAcPTase connection for extracellular signals controlling cadherin function. (Lilien et al. 1997). Further studies have shown that β -catenin's ability to

regulate body axis determination was associated with its signal transduction function. Recently, β -catenin has also been found to form a complex with APC, a tumor suppressor gene product which suggests a role in regulating cell proliferation (Su et al. 1993) and neuronal apoptosis (Ahmed Y et al 1998). The APC-catenin complex in the Wnt signal transduction pathway may affect the transmission of contact inhibition signals and/or the regulation of cell adhesion (Barth, et al. 1997). β -catenin also participates in modulating cytoskeletal dynamics in association with the microfilament-bundling protein fascin and tublin (Tao, et al. 1996).

Although cadherins and some catenins have been localized in the mammalian developing retina, no studies of β -catenin localization have been reported. In the present study, we have examined the β -catenin expression during development. β -catenin localization was examined by immunocytochemistry and β -catenin mRNA expression level was analyzed by RT-PCR.

Materials and Methods

The all experiments, the procedures used conformed to the ARVO Statement for the Use of Animals in Ophthalmic and Vision Research . Time-pregnant C57/BL6 (pigmented) or CD-1 (albino) mice were used. Pups from a single litter were killed at different ages, ranging from birth to the 30th postnatal, and eyes were fixed by immersion in 4% paraformaldehyde in 0.1 M phosphate buffer (pH 7.2-7.4) overnight at 4°C. Next, eyes were immersed increasing concentrations of sucrose (10, 15, 20 and 25%) in 0.1 M phosphate buffer saline (PBS) at pH7.4, embedded in Tissue Tek OCT compound (Miles, Elkhart, In , USA), and quick-frozen in liquid nitrogen. Eight-micrometer sections transverse were cut on a cryostat, and mounted on gelatinized glass slides. Sections were air-dried, stored at -20°C and processed for histochemistry. The retina of P10, P16, and adult were dissected from the posterior part of the eyes. For RT-PCR, the whole eyeball of E12, E16 and the retinas of P1, P5, P10, P16, adult were dissected rapidly and flash frozen in liquid nitrogen until use. Mice were anesthetized with metofane before fixation. Five litters were studied by immunocytochemistry.

Immunohistochemistry. A monoclonal antibody against β -catenin was used as the primary antibody for β -catenin (Transduction Laboratories, Lexington, KY., USA). Its specificity has been tested by Western blot analysis and also well documented (Su L, 1993). Tetramethyl-rhodamine-isothiocyanate-conjugated (TRITC) goat anti-rat IgG antibody (Chemicon, Ca., USA) was used as a secondary antibody to detect and visualize antigen-binding.

Sections were washed in PBS for 30 minutes and then incubated for 30 minutes with PBS containing 5% bovine serum albumin (BSA) and 0.1% Triton X-100 to block non-

specific antibody bindings. Sections were incubated with monoclonal antibody against β -catenin at 1:200 for 2 h at room temperature. After washing three times with PBS, sections were incubated for 1 h at 37°C with TRITC-conjugated anti-mouse IgG. After rinsing with PBS, sections were mounted in DABCO mounting medium. Sections were examined with a epifluorescence microscope (Akioskope, Zeiss, Germany) and photographed using a digital CCD camera (Sony, Japan). Control sections were processed the same way except that the primary antibody was substituted with non-immune serum. Sections incubated without primary antibody were used as an additional controls.

Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction

Total RNA was isolated using Trizol reagent (Life Technologies, Gaithersburg, MD), according to the manufacturer's instructions. With embryos, RNA was isolated from the entire eyeball while at postnatal stages, RNA was isolated from isolated retina.

Reverse transcription-polymerase chain reactions (RT-PCR) were carried out in a programmable thermal cycler (model PTC-100, MJ Research, Watertown, MA). cDNA synthesis was performed with 2 μ g total RNA in 80 μ l reaction buffer comprised of 5 mM $MgCl_2$ solution, 1 mM deoxyribonucleoside triphosphates (dNTP), 2.5 μ M Oligo d(T)16, 20 U RNase inhibitor, and 50U MuLV reverse transcriptase (Perkin-Elmer, Foster City, CA). Sample was reverse transcribed for 35 minutes at 42°C, and denatured for 5 minutes at 99°C followed by cooling to 4°C. cDNA samples were subjected to PCR using specific primers for β -catenin and for glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) which served as an internal control. Primers were designed using a software RightPrimer program(BioDisk, San Francisco, CA) and their specificity was confirmed by a GenBank database. Oligonucleotide primers for mouse β -catenin and GAPDH

were synthesized by Integrated DNA Technologies, Inc. (Coralville, IA). Polymerase chain reaction primers used for β -catenin were sense 5'-GAG GCT CTT GTA CGC ACC GTC-3'. anti-sense 5'-GGT TGT GAA CGT CCC GAG CA-3'. These primers correspond to sequences in whole mouse cDNA bank and given an amplified fragment of 427bp from mature β -catenin RNA. As an internal control, cDNA samples also were amplified with primers corresponding to a GAPDH. Sense 5'-GTG AAG GTC GGT GTG TGA ACG G-3'. Anti-sense 5'-ACG TCA GAT CCA CGA CGG ACA C-3'. The predicted sizes of the amplified β -catenin and GAPDH DNA products were 427 and 730 base pairs, respectively.

The PCR (final volume, 30 ul) contained 1 ul of the RT reaction, 3 ul of 10X PCR buffer, 0.5 ul $MgCl_2$ (0.8mM), 1 ul each of the sense primer and antisense primer(50 uM) of GAPDH and β -catenin, and 0.5 ul Taq DNA polymerase (Promega, Madison, WI, 2.5 U/ml)

The PCR program consisted of an initial step at 95°C for 5 minutes, followed by 35 cycles of denaturation at 95°C for 1 minutes, annealing at 62°C for 1 minutes, extension at 72°C for 1 minutes, and a final step at 72°C for 10 minutes. Routine RT-PCR controls were done without reverse transcriptase (water control) . The total RNA from mouse testis were used as a positive control (Lin, et al. 1996) PCR products (15 ul) were analyzed by electrophoresis on 1.2% agarose gels containing 5 ug of ethidium bromide per 100 ml. The DNA bands were visualized and photographed under ultraviolet transillumination light.

Semi-Quantitative Analysis

For quantification of RT-PCR data, RT-PCR were performed in triplicate using GAPDH as an endogenous internal standard, photographs of the ethidium bromide-stained gels

were scanned in Bio-Rad Model GS-700 Imaging Densitometer using Molecular Analyst software (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA). The intensity of the pixels were summed in a constant window for each band and the area under each peak was determined by cutting out and weighing the peaks from densitometer tracings. The average of the ratios β -catenin to GAPDH were calculated to compare expression of β -catenin with the internal standard.

Western blot analysis

Western blot analysis was performed using a Cell II transblotting apparatus (Novex, CA) according to the instructions supplied. 25 μ l of protein samples were subjected to 10% NuPage gel followed by electrotransfer onto PVDF membranes. Membranes were treated with monoclonal antibody against β -catenin at a dilution of 1:1000. Using a ABC-Kit, antigen band was visualized. Finally, the membrane was scanned into a PhotoShop, and the image was processed.

Results

Immunohistochemical study

Cadherins have been found to be expressed early in developing retina. To compare time course of appearance with that of cadherins, localization of β -catenin was studied by immunofluorescence cytochemistry at the light microscopic level in mice aged ranging from E12 to adult. Two series of animals from each stage were examined. The intensity and distribution of β -catenin staining in both cases were similar. β -catenin immunoreactivity was first detected in ganglion cell layer at E12 (Fig. 1A). Staining gradually increased in intensity, and was distributed between cells in all layers of retina. This pattern was most prominent in E16 eyes (Fig. 1B). After birth, the pattern and intensity of β -catenin labeling remained unchanged to P5 (Fig. 2A-B). At this stage, there was strong labeling in ganglion cell layer including neurofiber layer and inner plexiform layers (Fig. 2C, Fig. 3C). Thereafter, β -catenin immunoactivity was decreased and at P16, only strong staining was localized in the ganglion cell layer, and weak but quite clear staining in inner plexiform and outer plexiform layers (Fig. 2D, Fig. 3D). Finally, this labeling pattern disappeared in the 3 month-adult-retina. In the adult retina, only blood vessels and cells in choroid remained weak β -catenin-positive (Fig. 2E). No expression was examined in RPE cells at postnatal stages.

Developmental mRNA expression of β -catenin

β -catenin mRNA levels were determined by RT-PCR in total RNA samples extracted from E12 to adult mice. PCR amplification were a 427-bp band corresponding to β -

catenin mRNA and a 730 bp band for GAPDH as an internal control (Fig. 4A). At all stages tested, there was a decrease in the intensity of catenin band after P16. There were no obvious differences in the intensity of the band in E12 to P1 stages, when ratio of β -catenin to GAPDH was examined and has a decrease in RNA control from P1 to P16 and into adult retina. Furthermore, positive controls from mouse testis tissue were yielded the predicted PCR products. Additionally, samples run without reverse transcriptase generated no PCR products (Fig.4B).

β -catenin localization in Muller cell line

In order to figure characterize β -catenin mAb, we performed two kinds of experiments. In one study, we examined cellular localization of antibody binding sites and in another study we used immunoblotting to characteriz the antigen. As shown in Fig. 5, β -catenin immunoreactivity was predominantly localized to the cell surface. Indeed, the most intense staining was seen at sites that juxtaposition neighboring cells (Fig 5A). Western blot and Coomassie protein stain showed a apperant band on 92 kDa which was corresponding to β -catenin (Fig 6).

Discussion

The present study has demonstrated that, β -catenin expression was at first localized in retinal ganglion cells beginning around E12, and that the staining was increased steadily to its maximal intensity at the birth. Thereafter, the immunoreactivity was confined to the outer plexiform layer, inner plexiform layer and ganglion cell layer including nervefiber layer at P16. Finally the reactivity disappeared from retina in adulthood. The changable complex pattern of temporal and spatial expression of β -catenin suggest the potential role of controlling retinal morphogenesis in the development.

The major partners for the cadherins at cell-cell junctions are catenins (Nagafuchi and Takeichi, 1988). In cells without any cadherins, catenins are never concentrated in cell-cell contact sites (Kemler, 1993). Thus, it is most likely that the observed catenin distribution represents that of cadherin/catenin complexes. Molecular mechanisms at the synapses are little known. Previous studies showed the localization of N-cadherin was abundant within both inner and outer plexiform layer (Kljavin, et al. 1994). The similar pattern is also observed in rat retina (Doherty, et al. 1991) and chick development (Matsunaga, et al. 1988). Recent studies showed that two classes of cadherin-associated proteins, alpha N- and β -catenin colocalized with synaptophysin were associated with the N-cadherin for its localization in synaptic junctions in mouse and chick brains (Uchida, et al. 1996). Synapses are thought to be dynamic adhesion structures, as implied by their functional plasticity. Our recent observation showed that the peak level of β -catenin expression in the developing retina coincides with the synapse formation in the outer and inner plexiform layer. And β -catenin localized in these synaptic junctions are likely associated with certain cadherin molecules including N-cadherin, indicating cadherin/catenin complex may contribute a critical role in the formation and maintenance

of synaptic junctions throughout development, at least in certain retinal neurons.

Moreover, it has been known that the prevalence of β -catenin colocalization with N-cadherin in the outer limiting membrane, i. e., zonula adherens junctions (Romon y Cajal S, 1973) between photoreceptors and Muller cells, suggest the cadherin/catenin complex is also more important for keeping the normal histotypic morphology of the photoreceptor cell layer.

Cadherins/catenins are localized not only in synaptic junctions but also along axonal fibers, especially at embryonic stages suggesting the cadherins/catenins play multiple roles in neuronal connections (Redies et al., 1993). Changes in the distribution of β -catenin are considered to reflect, for the most part, the developmental processes of neurite outgrowth. It has been known that during retinal development, the first ganglion axons emerge at E13, and by P1 the majority of axons have left the eye (Kuwabara, 1975). Recent studies showed N-cadherin and other adhesion molecules such as L1, N-CAM promoting retinal neurite outgrowth in vitro (Neugebauer KM et al. 1988; Hankin MH et al. 1994; Kijavini IJ et al. 1994). To date, stimulation of neurite outgrowth by N-cadherin or N-CAM-mediated binding triggers changes in intracellular Ca^{2+} by activating Ca^{2+} channels and requires the activity of a tyrosine kinase (Bixby JL et al., 1987; 1990), and recent evidence suggests that the fibroblast growth factor (FGF) receptor family members FGF-2 may be in this pathway mediate intraretinal axon guidance (Williams EJ et al 1995, Brittis PA et al 1996). Since the neurocan/GalNAc6S-6Tase pair is one of several ligand/receptor interactions that can trigger neurite outgrowth process. And β -catenin has the potential to play an important role in this process as its tyrosine phosphorylation/dephosphorylation can rapidly switch cadherin between functional and nonfunctional states. The very similar pattern as chick may suggest β -catenin is

associated with axonal processes, and may consistent with the neurocan/GalNAc6S transferase interactive pair regulation of neurite outgrowth in mouse (Balsamo J et al. 1995; Lilien J et al, 1997). On the other hand, retinal neuron outgrowth was inhibited by dephosphorylation of β -catenin which means cadherins function was mediated by catenins (Balsamo J et al. 1996). And in vivo studies showed N- and R-cadherin plays guidance function of optic nerve fibers in early development (Matsunaga M et al. 1988; Redies C and Takeichi M, 1993). The latest data suggested cadherin/catenin complex regulating the retinal neurite outgrowth in vivo (Wohrn JC et al. 1998). Although the mechanism of β -catenin related to these molecules is unknown, the current study indicates a temporal course similar to these molecules that may reflect a significant role for this adhesion molecule in retinal development and synapogenesis. Our results indicate that β -catenin initially has an important role in axon outgrowth of retinal ganglion cells through the development.

In the present study, the progressive expression of β -catenin also was seen at the RNA level suggesting that β -catenin is regulated primarily at the transcriptional level. Because of the retina isolation technique is difficult, the band seen after PCR amplification only represent the whole eyeball. But in postnatal stages, all the samples were from isolated retina. The decrease in β -catenin in the adult may reflect the function role is temporary and unique.

Acknowledgments

The author thanks Drs. M. Takeichi, A. Mizoguchi, N. Uchida, C. Podlasek for helpful discussion, T. Bervig, J. Dudley, X. He for excellent technical assistance, Y. Wang for providing the eye tissue. This research was supported by the Grants-in Aid from the Japanese Ministry of Education, Science and Culture (C.I.&Y.H), by NIH grant EY-1819 (V.S), and by grants from the Japan China Medical Association-Nippon Foundation and Murota International Foundation (X.L.).

References

Ahmed Y, Hayashi S, Levine A, Wieschaus E. Regulation of armadillo by a Drosophila APC inhibits neuronal apoptosis during retinal development. *Cell* 1998;93:1171-1182.

Balsamo J, Ernst H, Zanin MK, Hoffman S, Lilien J. The interaction of the retina cell surface N-acetylgalactosaminylphosphotransferase with an endogenous proteoglycan ligand results in inhibition of cadherin-mediated adhesion. *J. Cell Biol.* 1995;129:1391-1401.

Balsamo J, Leung T, Ernst H, Zanin MK, Hoffman S, Lilien J. Regulated binding of PTP1B-like phosphatase to N-cadherin: control of cadherin-mediated adhesion by dephosphorylation of beta-catenin. *J. Cell Biol.* 1996;134:801-813.

Barth AI, Nathke IS, Nelson WJ. Cadherins, catenins and APC protein : interplay between cytoskeletal complex and signaling pathway. *Curr. Opin. Cell Biol.* 1997;9:683-690.

Bixby JL, Pratt RS, Lilien J, Reichardt. Neurite outgrowth on muscle cell surface involves extracellular receptors as well as Ca²⁺-dependent and independent cell adhesion molecules. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1987;84:2555-2559.

Bixby JL, Zhang R. Purified N-cadherin is a potent substrate for the rapid induction of neurite outgrowth. *J. Cell Biol.* 1990;110:1253-1260.

Brittis PA, Silver J, Walsh FS, Doherty P. Fibroblast growth factor receptor function is required for the orderly projection of ganglion cell axons in the developing mammalian retina. *Mol. Cell Neurosci.* 1996;8:120-128.

Butz S, Larue L. Expression of catenins during mouse embryonic development and in adult tissues. *Cell Adhesion Communication* 1995;3:337-352.

Cunningham BA. Cell adhesion molecules as morphoregulators. *Curr. Opin. Cell Biol.* 1995;7:628-633.

Doherty P, Rowett LH, Moore SH, Mann DA, Walsh FS. Neurite outgrowth in response

to transfected N-CAM and N-cadherin reveals fundamental differences in neuronal responsiveness to CAMs. *Neuron* 1991;6:247-258.

Grunwald GB. The structural and functional analysis of cadherin calcium-dependent cell adhesion molecules. *Curr. Opin. Cell Biol.* 1993;5:797-805.

Gumbiner BM. Signal transduction by beta-catenin. *Curr. Opin. Cell Biol.* 1995;7:634-640.

Haegel H, Larue L, Ohsugi M, Fedorov L, Herrenknecht K, Kemler R. Lack of beta-catenin affects mouse development at gastrulation. *Development* 1995;121:3529-3537.

Haftik M, Hansen MU, Kaiser HW, Kreysel HW, Schmitt D. Interkeratinocyte adherens junctions: immunocytochemical visualization of cell-cell junctional structures, distinct from desmosomes, in human epidermis. *J. Invest. Dermatol.* 1996;106:498-504.

Hankin MH, Lagenaur CF. Cell adhesion molecules in the early developing mouse retina: retinal neurons show preferential outgrowth in vitro on L1 but not N-CAM. *J. Neurobiol.* 1994;25:472-487.

Huber O, Bierkamp C, Kemler R. Cadherins and catenins in development. *Curr. Opin. Cell Biol.* 1996;8:685-691.

Hoschuetzky H, Aberle H, Kemler R. Beta-catenin mediates the interaction of the cadherin-catenin complex with epidermal growth factor receptor. *J. Cell Biol.* 1994;127:1375-1380.

Kemler R. From cadherins to catenins: Cytoplasmic protein interactions and regulation of cell adhesion. *Trends Genet.* 1993;9:317-321.

Kijavitt J, Lagenaur C, Bixby JL, Reh TA. Cell adhesion molecule regulating neurite growth from amacrine and rod photoreceptor cells. *J. Neurosci.* 1994;14:5035-5049.

Kuwabata T. Development of the optic nerve of the rat. *Invest. Ophthalmol.* 1975;14:732-745.

Lilien J., Hoffman S, Eisenberg C, Balsamo J. Beta-catenin is a target for extracellular signals controlling cadherin function: the neurocan-GalNAcPTase connection. In: Pedersen RA, Schatten G, eds. *Current Topics in Developmental Biology*. San Diego: Academic Press; 1997;35:161-189.

Lin LH, DePhilip RM. Differential expression of placental(P)-cadherin in sertoli cells and peritubular myoid cells during postnatal development of the mouse testis. 1996;224:155-164.

Liu X, Mizoguchi A, Takeichi M, Honda Y, Ide C. Developmental changes in the subcellular localization of R-cadherin in chick retinal pigment epithelium. *Histochem. Cell Biol.* 1997;108:35-43.

Matsunaga M, Hatta K, Nagafuchi A, Takeichi M. Guidance of optic nerve fibres by N-cadherin adhesion molecules. *Nature* 1988;334:62-64.

Miller JR, McClay DR. Changes in the pattern of adherens junction-associated beta-catenin accompany morphogenesis in the sea urchin embryo. *Development Biol.* 1997;192:310-22.

Nagafuchi A, Takeichi M. Cell binding function of E-cadherin is regulated by the cytoplasmic domain. *EMBO. J.* 1988;7:3679-3684.

Neugebauer KM, Tomaselli KJ, Lilien J, Reichardt LF. N-cadherin, NCAM, and integrins promote retinal neurite outgrowth on astrocytes in vitro. *J. Cell Biol.* 1988;107:1177-1187.

Oda H, Uemura T, Shiomi K, Nagafuchi A, Tsukita S, Takeichi M. Identification of a Drosophila homologue of alpha-catenin and its association with the armadillo protein. *J. Cell Biol.* 1993;121:1133-1140.

Ozawa M, Ringwald M, Kemler R. Uvomorulin-catenin complex formation is regulated by a specific domain in the cytoplasmic region of the cell adhesion molecule. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1990;87: 4246-4250.

Ramon y Cajal S. The vertebrate retina. Rodieck RW, ed; Maguire D, Rodieck RW, trans.

San Francisco: Freeman; 1973:781-904.

Ranscht B. Cadherins and catenins: interactions and functions in embryonic development. *Curr. Opin. Cell Biol.* 1994;6:740-746.

Redies C, Inuzuka H, Takeichi M. Restricted expression of N- and R-cadherin on neurites of the developing chicken CNS. *J. Neurosci.* 1992;12:3525-3534.

Redies C, Takeichi M. N- and R-cadherin expression in the optic nerve of the chicken embryo. *Glia* 1993;8:161-171.

Riehl R, Johnson K, Bradley R, Grunwald GB, Cornel E, Lilienbaum A, Holt CE. Cadherin function is required for axon outgrowth in retinal ganglion cells in vivo. *Neuron* 1996;17:837-848.

Su L, Vogelstein B, Kinzler. Association of the APC tumor suppressor protein with catenins. *Science* 1993;262:1734-1737.

Tao YS, Edwards RA, Tubb B, Wang S, Bryan J, McCrea PD. Beta-catenin associates with the actin-bundling protein fascin in a noncadherin complex. *J. Cell Biol.* 1996;134:1271-1281.

Tomaselli KJ, Neugebauer KM, Bixby JL, Lilien J, Reichardt LF. N-cadherin and Integrins: two receptor systems that mediate neuronal process outgrowth on astrocyte surfaces. *Neuron* 1988;1:33-43.

Uchida N, Honjo Y, Johnson KR, Wheelock MJ, Takeichi M. The catenin/cadherin adhesion system is localized in synaptic junctions bordering transmitter release zones. *J. Cell Biol.* 1996;135:767-779.

Williams EJ, Furness I, Walsh FS, Doherty P. Activation of the FGF receptor underlies neurite outgrowth stimulated by L1, N-CAM, and N-cadherin. *Neuron* 1995;13:583-594.

Wohrn JC, Puelles L, Nakagawa S, Takeichi M, Redies C. Cadherin expression in the retina and retinofugal pathways of the chicken embryo. *J. Comp. Neurol.* 1998;396:20-38.

Figure Legends

FIGURE 1. Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) products obtained from developing mouse retina. using primers derived from Amplification of beta-catenin cDNA . RNA was extracted from retina of different stage show and converted into cDNA. Samples were amplified using specific beta-catenin primers and GAPDH primers as an internal control. Lane M : 1 kb ladder Maker, Lane 1-2 : total RNA from mouse eyeball in embryonic stages, Lane 3-6 : total RNA from mouse neuro-retina in postnatal stages. Lane 7 : A positive control reaction of amplification of adult mouse testis using the same primers, Lane 8 : a negative control reaction of P1 retina cDNA without RT. The predicted size of beta-catenin (427 bp) and GAPDH (730 bp) was obtained in lane 1-7, Note

FIGURE 2. Quantitative analysis of RT-PCR products showed in Figure 1. The ratio of the beta-catenin to GAPDH product was plotted according to the intensity of the amplified bands. The results show a progressive decrease in expression between P1 and adulthood, and may reflect a unique time course of role of beta-catenin in retinal cell morphogenesis.

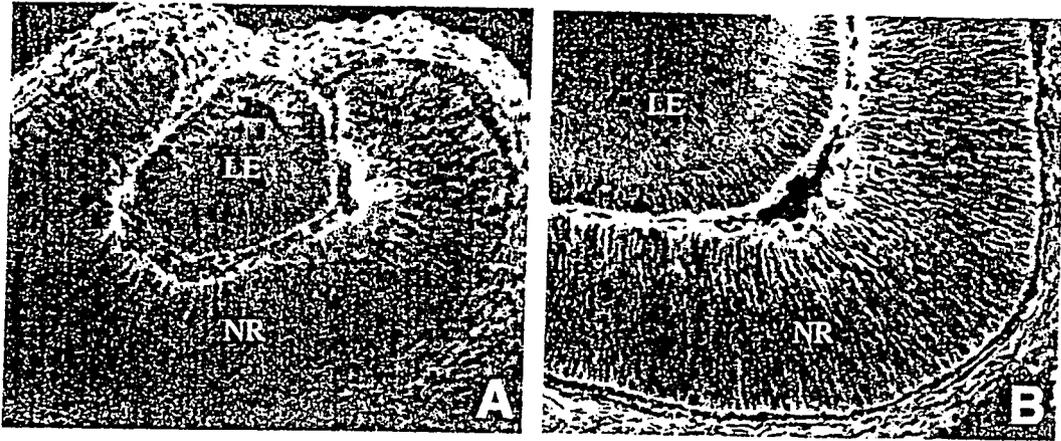
FIGURE 3. Immunocytochemical localization of beta-catenin in the embryonic mouse eye. (A) E12 eye; (B) E16 eye. (NR) neuro-retina (GC) ganglion cell layer (LE) lens. Note the beta-catenin immunoactivity localized in ganglion cells (A) in E12 and widespread the lateral circumference of all retina cells (B) in E16.

FIGURE 4. Changes in immunocytochemical localization of beta-catenin in the postnatal mouse retina. (A) P1 retina; (B) P5 retina; (C) P10 retina; (D) P16 retina; (E) adult retina; (GCL) ganglion cell layer (IPL) inner plexiform layer; (OPL) outer plexiform layer; (RPE) retinal pigment epithelium.

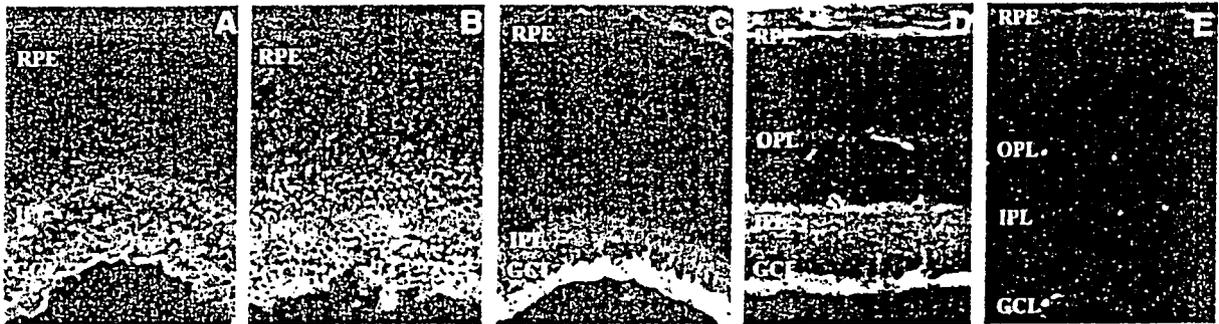
FIGURE 5. Magnification microscopy of beta-catenin immunostaining in mouse retina. (A) P1 retina; (B) P5 retina; (C) P10 retina; (D) P16 retina; (GCL) ganglion cell layer (IPL) inner plexiform layer; (OPL) outer plexiform layer; Note the prominent staining can be seen of the ganglion cell layer and ganglion cell processes in two embryonic stages and localized in inner plexiform layer and outer plexiform layer in postnatal stages.

FIGURE 6. Immunofluorescence microscopy of Muller cells labeled with antibodies to beta-catenin(A) Note the strong label between the cell-cell contact site. (B) Control. Bar

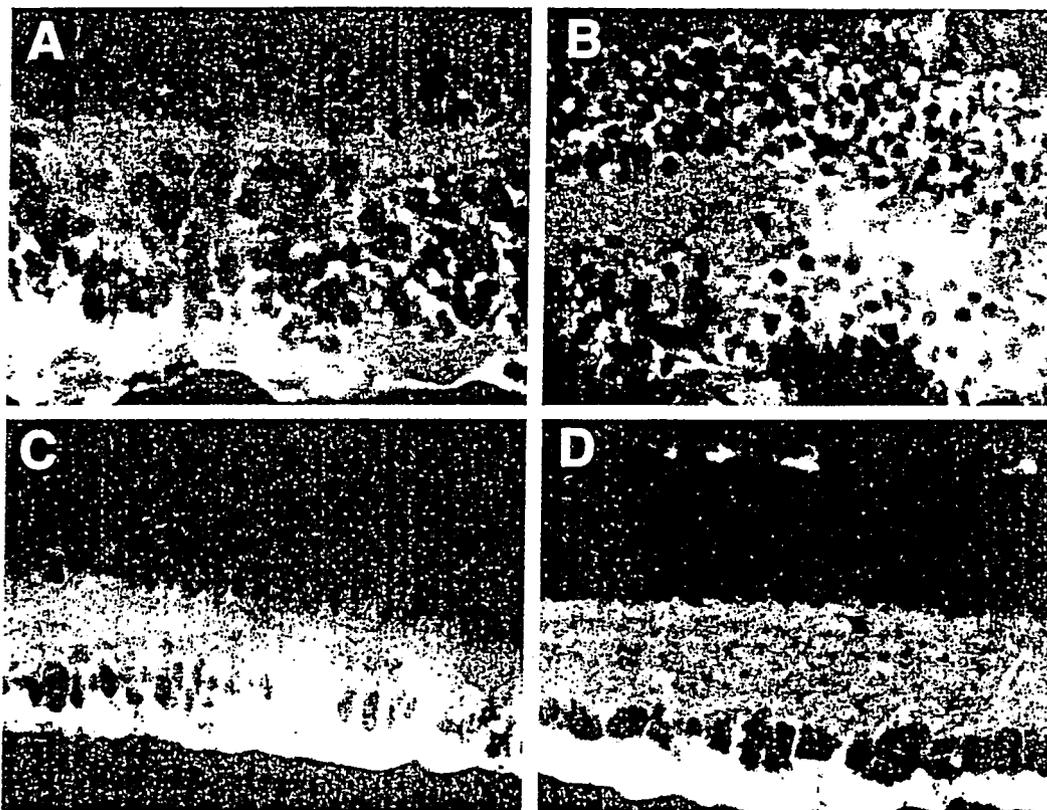
FIGURE 7. Western blot analysis of beta-catenin in Muller cell line . Arrow show the recognized band at 92 kDa corresponding to beta-catenin. Lane A: Marker, Lane B: Muller cell line.



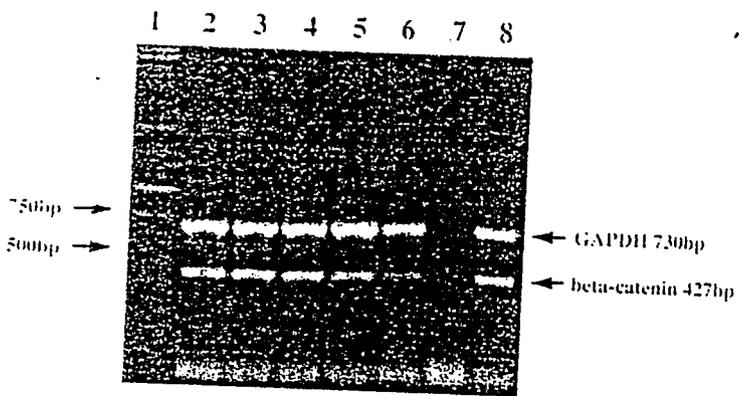
Liu et al.
Fig. 1



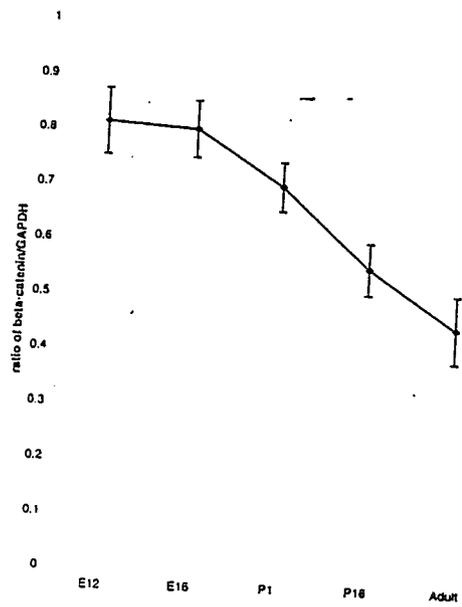
Liu et al.
Fig.2



Liu et al.
Fig.3

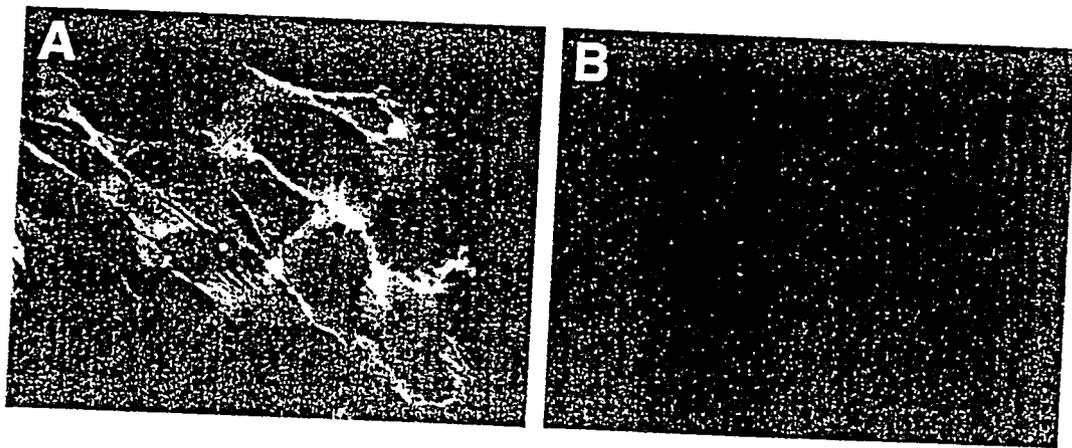


A

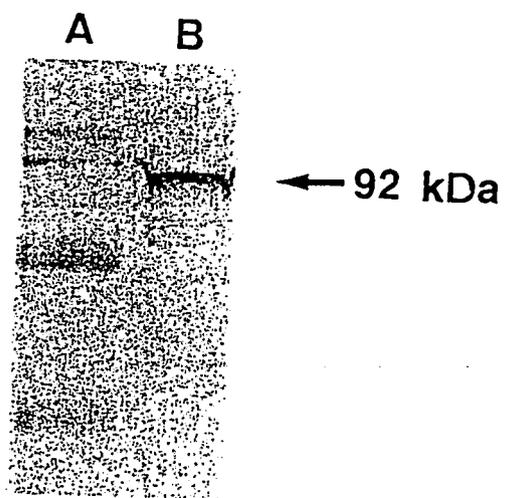


B

Liu et al.
Fig.4



Liu et al.
Fig. 5



Liu et al.
Fig.6

日本財団補助金による
1998年度日中医学協力事業報告書

—在留中国人研究者研究助成—

99年 3月 15日

財団法人 日中医学協会
理事長 中島章 殿

研究室で撮影した本人のスナップ写真、及び発表論文のコピーを添付

1. 研究者氏名 梁 亦 鄧
研究機関 名古屋大学医学部 研究指導者 祖父江 元 職名 教授
所在地 名古屋市昭和区鶴舞町65 電話 (052)741-2111 内線 2386

研究テーマ 神経変性疾患における神経栄養因子についての研究

2. 本年度の研究業績

(1) 学会・研究会等における口頭発表 有 ・ 無 (学会名・内容)

第40回日本神経学会
多発筋炎 (polymyositis PM), 皮膚筋炎(dermatomyositis
DM)におけるcostimulatory 分子の発現

(2) 学会誌等に発表した論文 有 ・ 無 (雑誌名・論文名)

3. 今後の研究計画

多発筋炎(PM)が発病している時にLymphotoxinは重要な役割を果たしているので、今は免疫組織化学方法で筋組織と浸潤細胞にその発現を確定していて、RT-PCR 及び In situ hybridizationを使って、筋組織にLymphotoxin mRNAの発現および発現量を調べている途中です。

4. 研究指導者の意見

梁亦鄧先生は現在名古屋大学大学院医学研究科に在学中で、神経内科学を勉強している。勉強、研究に対する意欲は充分にあり、成果が期待できる。また、将来に対する構想もしっかりしており、日中の学术交流にも貢献するものと期待される。

研究指導者氏名

相文元 

5. 研究報告

別紙形式を参考に、報告本文4000字以上で報告して下さい（枚数自由・ワープロ使用）

タイトル・要旨等は日本語で、KEY WORDS以下は日本語或いは英語で記入して下さい。

研究成果の発表予定がある場合は発表原稿・抄録集等を添付して下さい。

論文発表に当っては、日中医学協会－日本財団補助金による旨を明記して下さい。

多発筋炎(PM)、皮膚筋炎(DM)におけるcostimulatory分子の発現

梁 亦 鄧 中国医科大学附属第一臨床病院神経内科 医師
祖父江 元 名古屋大学医学部神経内科 教授

【目的】 PM,DMの筋組織におけるcostimulatory 分子の発現率を定量的に検討する。

【対象と方法】 PM20例とDM10例の生検筋。厚さ6 μ mの連続切片を作製し、H&E、免疫組織化学染色(in situ immunohistochemistry)を行ない、浸潤細胞におけるcostimulatory(CD80 and CD86)分子の発現率を定量的に検討した。

【結果】 PM, DMとも浸潤細胞でCD80,CD86の発現があり、浸潤細胞にCD86の発現率 (PMで35%+/-0.11, DMで32.12%+/-0.14) はCD80 (PMで0.09.94%+/-0.05, DMで10.97%+/-0.06) より高い, 明らかな差は見られなかった ($P > 0.05$) .

【結論】 PM,DMにおけるcostimulatory 分子の発見は病気の発生機序に基づくと思われる。

KEY WORDS:Polymyositis, Dermatomyositis, CD80, CD86 in situ immunohistochemistry

Expression of costimulatory molecules, CD80 and CD86, on monocytes in muscle tissues from patients with polymyositis and dermatomyositis

INTRODUCTION

Autoimmune diseases are presumably mediated by activated, auto-antigen-reactive T cell (1, 2). Two distinct signals are required to induce differentiation from naive to activated T cell: one is antigen-specific signal mediated through the interaction between major histocompatibility complex (MHC)-peptide complexes and T cell receptor, and the other is non-antigen specific that is called "costimulatory" signal (3, 4). B7 molecules on antigen-presenting cells (APC) reacting with the CD28 receptor on T cells provide the most potent costimulatory signals to T cells (5,6). B7 is known as a family that have at least three distinct isoform molecules, namely B7-1 (CD80), B7-2 (CD86) and B7-3 (7). CD80 and CD86 bind to same coreceptor that is known CD28 and CTLA-4 and provide costimulatory signals. Blocking of the B7-CD28 pathway in vitro results in T cell anergy (8, 9, 10), whereas in vivo blocking the B7-CD28 pathway results in immunosuppression (11, 12,). CTLA-4 expressed on T cells after activation may regulate T cell function (13,). Blocking of the B7-CTLA-4 pathway results in augmentation of immunoresponse.

Polymyositis (PM) and dermatomyositis (DM) is an autoimmune inflammatory disease characterized by lymphocyte infiltration within muscle fascicles or around blood vessels. The segmental myonecrosis of all fiber types associated with myophagocytosis and muscle fiber regeneration were seen in biopsied muscle specimens (14, 15, 16).

To determine whether the costimulatory molecules, CD80 and CD86, affects the necrosis progression of polymyositis and dermatomyositis. we conducted quantification of the subsets of the B7-1 and B7-2 in muscle specimens of polymyositis and dermatomyositis with immunohistochemical methods.

MATERIALS AND METHODS

Patients

Twenty patients with polymyositis and 10 patients with dermatomyositis were included in this study. The diagnosis of PM and DM met the clinical diagnosis criteria previously reported (14, 15, 16, 17). Each case showed progressive muscle weakness, elevated creatine kinase (CK) levels without steroid therapy, and typical histopathological and immunohistochemical findings. Table 1 listed the ages, sexes and creatine kinase (CK) levels et al. of the patients.

Muscle Samples

The muscle tissue specimens were obtained from biceps brachii or quadriceps femoris muscles by open biopsy. Biopsied muscles were rapidly frozen in isopentane chilled in dry ice, and reserved at -80 °C until use.

Histological, Histochemical studies

For histologic and histochemical analyses, consecutive 8- μ m-thick cryostat sections were stained with hematoxylin-eosin (H & E), modified -Gomori, rutin adenosine triphosphatase (ATPase, PH10.0), NADH-TR as described elsewhere (18).

Immunohistochemistry.

The muscle specimens were cut at 6 μ M-thick in a cryostat at -25 °C onto silan-coating slides, fixed in cold acetone for 10 min, air dried and were blocked with normal horse serum at room temperature for 60 min. And they were incubated with mouse monoclonal immunoglobulin G (IgG) antibody directed against CD4, CD8, CD19, CD 68 , and CD80, CD86 antigen diluted with phosphate-buffered saline (PBS PH 7.4) at 4 °C overnight, then we used the avidine-biotin-peroxidase complex (ABC) method (Vectastain elite ABC kit, Burlingame, USA), and the antibody binding was visualized with 3'3-diaminobenzidine (DAB). Finally, sections were counterstained with methylgreen and mounted in canada baresam.

Quantification of mononuclear cell subsets

In order to quantify mononuclear cell subsets, four scopes of each specimen were randomly chosen and analyzed. We observed at least 1,000 mononuclear cells in each specimen, and calculated the frequency of cells positive for CD80 and CD86. For each accumulation the total number of cells was counted in the H & E stained section. The B7-1, B7-2 positive reaction for a surface antigen consisted of a rim of reaction product around the cell were counted in the respective section in the series.

The student T test was used for statistical comparisons. Differences were considered significant at $P < 0.05$.

RESULT

Immunohistochemical detection of CD80 and CD86 in patients of PM and DM

There were no muscle fibers positive for CD80 and CD86 in the specimens of both PM and DM. In contrast, these molecules were expressed on the infiltrating cells between muscle fibers. CD80 were expressed on many monocytes, but CD86 were on only a few monocytes.

Quantitation of mononuclear cell subsets:

The quantitative analysis of CD80 and CD86 positive cells in PM and DM was demonstrated at table 2. Mononuclear cells positive for CD80 or CD86 were present in both diseased muscles. The frequency of CD80 positive cells was higher in DM than in PM, whereas that of CD86 positive cells was lower in DM. But, statistical analysis showed no significant difference of the frequency of CD80 and CD86 positive cells between both diseases.

DISCUSSION

Human T cells contain two distinct subsets, T-helper (Th) 1 and Th2 cells, that mediate cell-mediated and humoral immune response, respectively. Th1 cells produce mainly IL-2 and IFN- γ , and Th2 cells produce IL-4,5, and 10. Immunological disorders can cause a shift in the Th1/Th2 ratio, which could affect manifestations of different diseases. Naive T cell secreting both patterns of these cytokines have been called Th0 cells and this phenotype is thought to be in transient stage along a differentiation pathway to Th1 or Th2 cells(20).

CD80 (B7-1) is expressed on resting monocytes, dendritic cells, macrophage and activated, but not resting, T, NK and B lymphocytes (19). In the other hand, CD86 (B7-2) is expressed on macrophage, monocytes, and activated T and B cells (25). These two molecules expressed on antigen presenting cells were reported to promote T cell differentiation to Th1 and Th2 respectively (23).

It has been reported that cell-mediated immunity operates in polymyositis and humoral immunity in dermatomyositis. Consistent with this theory, Arahada et al reported the prominence of Th1-type cytokine in PM and Th2-type cytokine in DM (26).

In this study, we detected no difference of the frequencies of mononuclear cells bearing CD80 and CD86 molecules on their surfaces between these diseases. Therefore, these two molecules could not exert a pivotal role in the bifurcation of immunoresponses when clinical signs were evolved in these two diseases. We inferred that CD80 and CD86 could promote the

differentiation from Th0 to Th1 or Th2 in early stage of disease evolution and have the same functions of simply augmentation of inflammation in that time. Alternatively, differentiation of naive T cells is not decided by only CD80 and CD86 molecules. The interaction of another adhesion molecules, that is CD40 and CD40-ligand, have been shown to be critical in the regulation of B7 expression during T-B-cell collaboration (24). In addition, the cooperation among cytokines of IL-12, IFN- γ , IL-4 et al. may play an important role in T cell differentiation. The relative roles of such interaction should be further investigation.

REFERENCES

1. Powell, M.B., D. Mitchell, J. Lederman, S. Buckmeier, S. Zamvil, M. Graham, N.H. Ruddle, and L. Steinman. Lymphotoxin and tumor necrosis factor-alpha production by myelin basic protein-specific T cell clones correlates with encephalitogenicity. *Int. Immunol.* 1990, 2: 539-544
2. Kuchroo, V.J., C.A. Martin, J.M. Greer, S. Ju, R.A. Sobel, and M.E. Dorf. Cytokines and adhesion molecules contribute to the ability of myelin proteolipid protein-specific T cell clones to mediate experimental allergic encephalomyelitis. *J. Immunol.* 1993, 151: 4371-4382
3. Schwartz, R.H. A cell culture model for T lymphocyte clonal anergy. *Science (Wash. DC)*. 1990. 248: 1349-1356
4. Jenkins, M.K., C. Chen, G. Jung, D.L. Mueller, and R.H. Schwartz. Inhibition of antigen-specific proliferation of type 1 murine T cell clones after stimulation with immunobilized anti-CD3 monoclonal antibody. *J. Immunol.* 1990, 144: 16-22
5. Linsley PS, Ledbetter JA, The role of the CD28 receptor during T cell responses to antigen. *Annu Rev Immunol* 1993; 11: 191-211
6. Linsley PS, Brady W, Grosmaire L, Damle NK, Ledbetter JA. Binding of the B cell activation antigen B7 to CD28 costimulates T cell proliferation and interleukin 2 mRNA accumulation. *J Exp Med* 1991; 173: 721-33.
7. Hathcock KS, Laszlo G, Dick HB, Bradshaw J, Linsley P, Hodes RJ. Identification of an alternative CTLA-4 ligand costimulatory for T cell activation. *Science* 1993; 262: 905-7
8. Freeman, G., F. Borriello, R.J. Hoder, H. Reiser, K.S. Hathcock, G. Laszlo, A.J. et al. Uncovering the functional alternative CTLA-4 counter-receptor in B7-deficient mice. *Science (Wash. DC)*, 1993 262: 709-909
9. Gimmi, C.D., G.J. Gribben, G. Grey, and L.M. Nadler. Human T-cell clonal anergy is induced by antigen presentation in the absence of B7 costimulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1993. 90: 6586-6590
10. Turka, L.A., P.S. Linsley, H. Lin, W. Brady, J. M. Leiden, R.Q. Wei, M.L. Gibson, X.G. Zheng, S. Myrdal, and D. Gordon. T-cell activation by the CD28 ligand B7 is required for cardiac allograft rejection in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1992, 89: 11102-11105

11. Linsley, P.S., P.M. Wallace, J. Johnson, M.G. Gibson, J.L. Greene, J.A. Ledbetter, C. Sigh, and M.A. Tepper. Immunosuppression in vivo by a soluble form of the CTLA-4 T cell activation molecule. *Science* (Wash.DC) 1992, 257:792-795
12. Brunet, J.F. Denizot, M.F. Luciani, M. Roux-Dosseto, M. Suzan, M.G. Mattei, and P. Golstein. A new member of the immunoglobulin superfamily-CTLA-4. *Nature* 328: 267-270
13. Jenkins, M.K. The ups and downs of T-cell costimulatory molecules. *Immunity*. 1994, 1:443-446
14. Andrew G. Engel Clara Franzini-Armstrong . *Myology*. Second Edition . McGRAW-HILL, INC. HEALTH PROFESSIONS DIVISION
15. Anthony Bohan MD. and James B. Peter MD. PHD. Polymyositis and Dermatomyositis. *The New England Journal of Medicine* 1975, 292 (No 7):345-347 and 1975, 292 (No 8):403-407
16. inflammatory myopathy: A review of etiologic and pathogenetic factors. *Muscle & Nerve* 1982, 5:573-592
17. Thomas A. Medsger, Jr. Chester V. Oddis. Classification and Diagnostic Criteria from Polymyositis and Dermatomyositis. *The Journal of Rheumatology* 1995; 22:4
18. Dubowitz V: *Muscle Biopsy: A Practical Approach*, 2nd ed eastbourne, Bailliere Tindall, 1985
19. Linsley, P.S. T-cell antigen CD28 mediates adhesion with B cells by interacting with activation antigen B7/BB-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1990; 87:5031-5035
20. Abehsira et al, 1992; 148:3820-3829 *J. Immunol*, Monsmann
21. Jun, C.H. Bluestone, T.A. Nadler, L.M. and Thompson, C.B. 1994 *Immunology Today* 15, 321-331)
22. Paul M. Kaye Costimulatory and the regulation of antimicrobial immunity *Immunology Today* 1995, 16(9) 423-427.
23. Paul M. Kaye Costimulatory and the regulation of antimicrobial immunity *Immunology Today* 1995, 16(9) 423-427.
24. Durie, F.H., For, T.M., Masters, S.R., Laman, J.D. and Noelle, R.J. *Immunology Today* 1994, 15, 406-411)
25. Nandi, D., Gross, J.a. and Allison, J.P.J. *Immunol.* 1994, 152, 3361-3369
26. Kiichi Arahata and Andrew G Engel, Monoclonal /antibody /analysis of Mononuclear Cells in Myopathies *Annal Neurology* 1984; 13:193-208)

Table 1.

Diag.	No of cases	Sex		Age (years)		duration of illness (months)		Serum CK(u/l)	
		Male	Female	Range	Mean \pm SD	Range	Mean \pm SD	Range	Mean \pm SD
PM	20	9	11	21-74	58.65 \pm 14.29	1-42	10.4 \pm 11.70	474-13470	4049.55 \pm 3197.68
DM	10	3	7	16-78	55.1 \pm 17.73	1-36	10 \pm 11.85	195-7653	3381.9 \pm 2696.9

PM: polymyositis DM: dermatomyositis

Table 2 Quantitative analysis of B7 cell in PM and DM

Cell type or marker	PM	DM
B7-1 (CD80) (%)	0.1336 ± 0.020	0.1395 ± 0.028 *
B7-2 (CD86) (%)	0.3609 ± 0.025	0.2701 ± 0.027 *

*: p<0.05

日本財団補助金による

1998年度日中医学協力事業報告書

—在留中国人研究者研究助成—

1999年3月11日

財団法人 日中医学協会

理事長 中島章殿

研究室で撮影した本人のスナップ写真、及び発表論文のコピーを添付

1. 研究者氏名 姜奇
研究機関 三重大学医学部小児科 研究指導者 櫻井 實 職名 教授
所在地 〒514 三重県津市江戸橋 2-174 電話 059-232-1111 内線 5445

研究テーマ サイトカインによる臍帯血単球のHGFレセプター/c-met発現の調節

2. 本年度の研究業績

(1) 学会・研究会等における口頭発表 有 無 (学会名・内容)

学会: 第40回 日本小児血液学会 (広島)

内容: 臍帯血単球のc-met発現について

(2) 学会誌等に発表した論文 有 有 無 (雑誌名・論文名)

英文誌に投稿準備中

3. 今後の研究計画

臍帯血移植では、骨髄移植と比較してGVHDの発症率、重症度が低いと知られています。樹状細胞(Dendritic cell, DC)はその強力な抗原提示(APC)機能により、GVHDの発症に強く関与していると考えられます。In vitroで臍帯血単球から誘導されるDCのAPC機能及び細胞表面抗原とサイトカインの関連について検討したいと思っております。

4. 研究指導者の意見

研究相手の善奇君は現在三重大学大学院医学研究科3年2学期卒業予定と1年ごり研究のサポートに専念拍車がかかっています。日中医学協会助成金により援助を受けて研究を続けたので、研究テーマは臍帯血移植の基礎的研究です。臍帯血中の単球は臍帯血移植の重要な役割を果しているため、単球上の肝細胞増殖因子レセプターが発見されており、これら多数のサイトカインによる調節されていることが世界で初めて明らかになり、次年度の一流雑誌に投稿の準備中です。

研究指導者氏名

榎井 寛



5. 研究報告

別紙形式を参考に、報告本文4000字以上で報告して下さい(枚数自由・ワープロ使用)

タイトル・要旨等は日本語で、KEY WORDS以下は日本語或いは英語で記入して下さい。

研究成果の発表予定がある場合は発表原稿・抄録集等を添付して下さい。

論文発表に当っては、日中医学協会-日本財団補助金による旨を明記して下さい。

研究テーマ：サイトカインによる臍帯血単球のHGF レセプター/c-met 発現の調節

研究者氏名：姜 奇

中国での所属・役割：中国江蘇省鎮江医学院附属病院 小児科 医者

日本での指導者氏名・所属・役割：

東 英一（助教授） 櫻井 實（教授） 三重大学医学部小児科・臨床免疫

要 旨

c-met がHepatocyte Growth Factor (HGF) receptor として上皮細胞や骨髄CD34陽性細胞などに発現していることが報告されているが、臍帯血単球表面に発現しているかどうかについては不明である。今回、我々はcytokine 刺激による臍帯血 (CB)単球表面のc-met 発現、細胞増殖及び抗原提示能の変化について検討した。FACSscan を用いて、細胞表面のc-met の発現を測定した。成人血及び臍帯血の新鮮単球は両者とも c-met を発現しているが、両者間の有意差が認めなかった。培養液単独培養と比較して、IFN-g, IL-10あるいはGM-CSF 存在下で臍帯血及び成人血単球のc-met の発現は増加した。IL-4 の刺激によって、臍帯血単球の c-met の発現は増加され、成人血には減少された。HGF の刺激によって、臍帯血単球の c-met の発現は減少され、成人血には増加された。サザンハイブリダイゼーション法でc-met mRNA の発現を検討した。臍帯血単球では、培養液単独、IL-10, HGF 存在下で48時間培養すると、c-met mRNA が発現され、成人血単球では、培養液単独、IFN-g, GM-CSFあるいはHGF 存在下でc-met mRNA が発現された。サイトカインで72時間刺激して、単球の増殖能を検討した。IL-10 の刺激によって臍帯血単球の増殖は抑制され、GM-CSF の刺激によって増加された。IFN-g, IL-4 あるいはHGF で刺激した場合には、臍帯血単球の増殖能は高くなる傾向があり、有意差は認めなかった。更に、サイトカインで48時間培養した単球を刺激細胞にし、健康成人末梢血単核球を反応細胞にしてリンパ球混合培養を行い、5日後に抗原提示能を測定した。臍帯血単球の抗原提示能が成人血より弱いことは認められた。HGF で刺激された臍帯血単球の抗原提示能は培養液単独で培養した単球と比較して変化が認めなかった、成人血ではHGF 刺激によって抗原提示能は増加した。今回のin vitro の結果は臍帯血移植においてin vivo でHGF あるいは他のサイトカインがc-met を介して臍帯血単球の機能を調節しうることが示唆された。

KEY WORDS: c-met, cord blood, monocyte.

fig 1

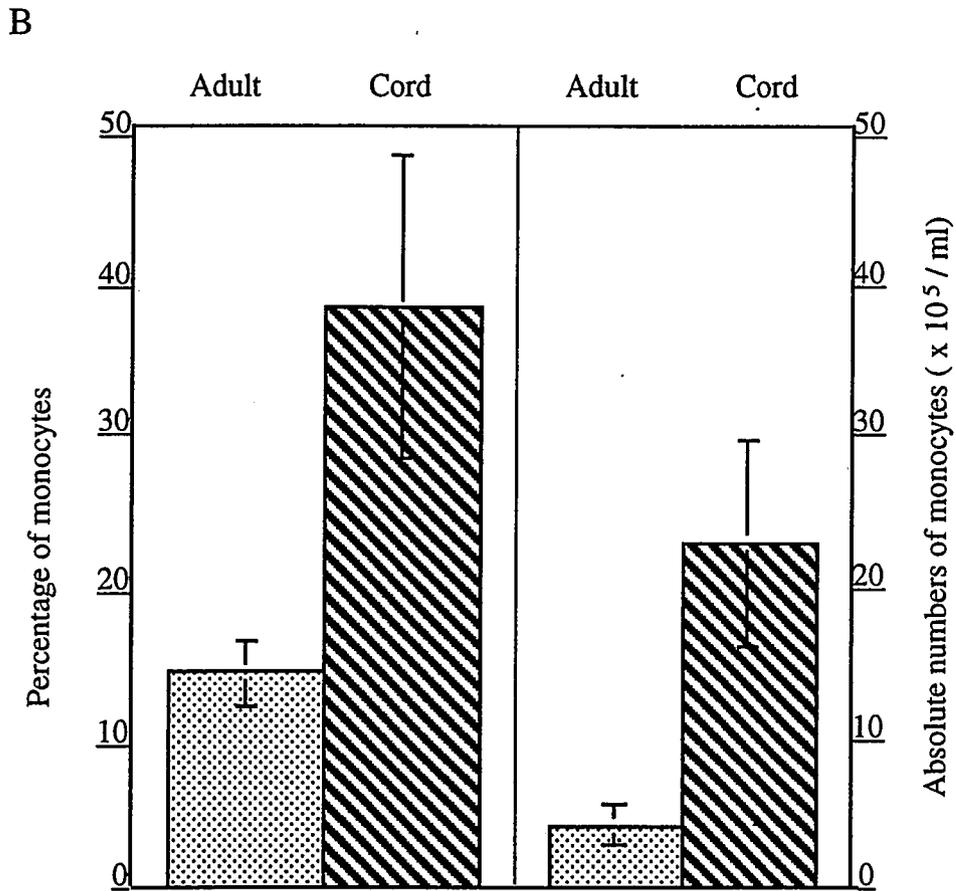
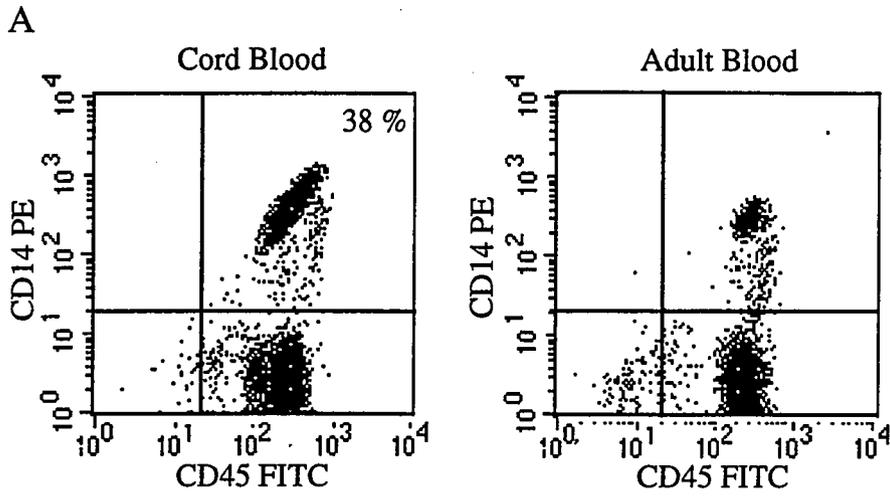


fig 2

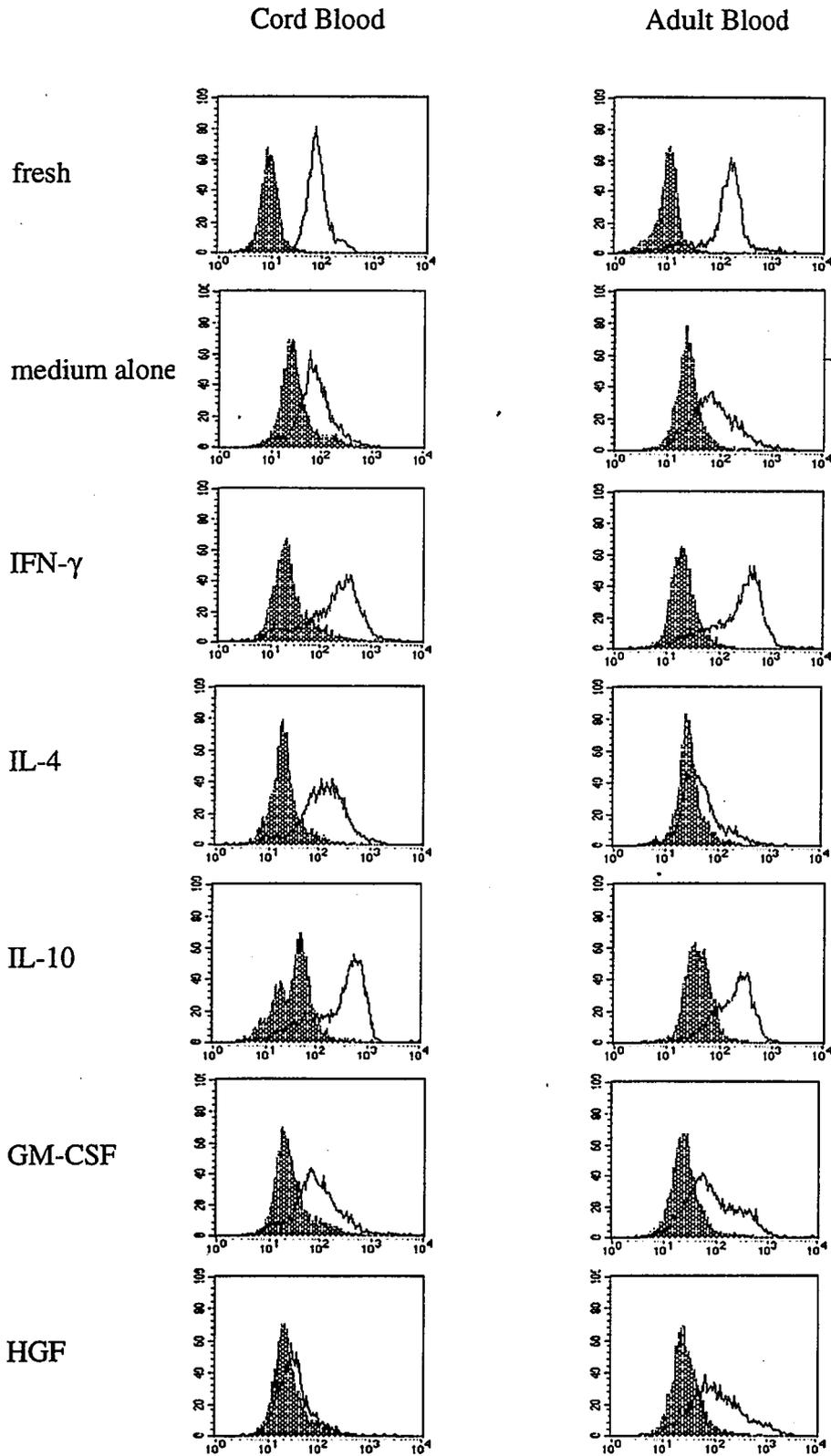


fig 3.

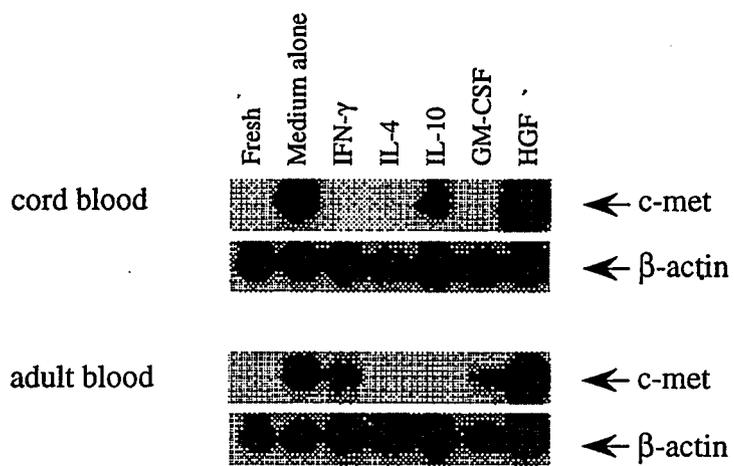


fig 4

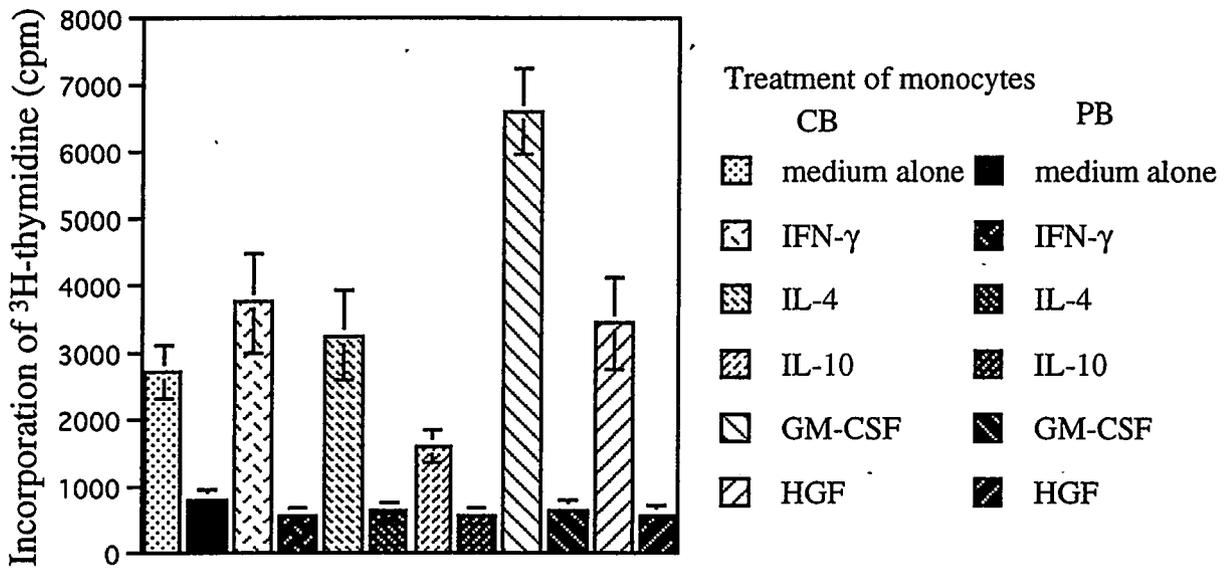
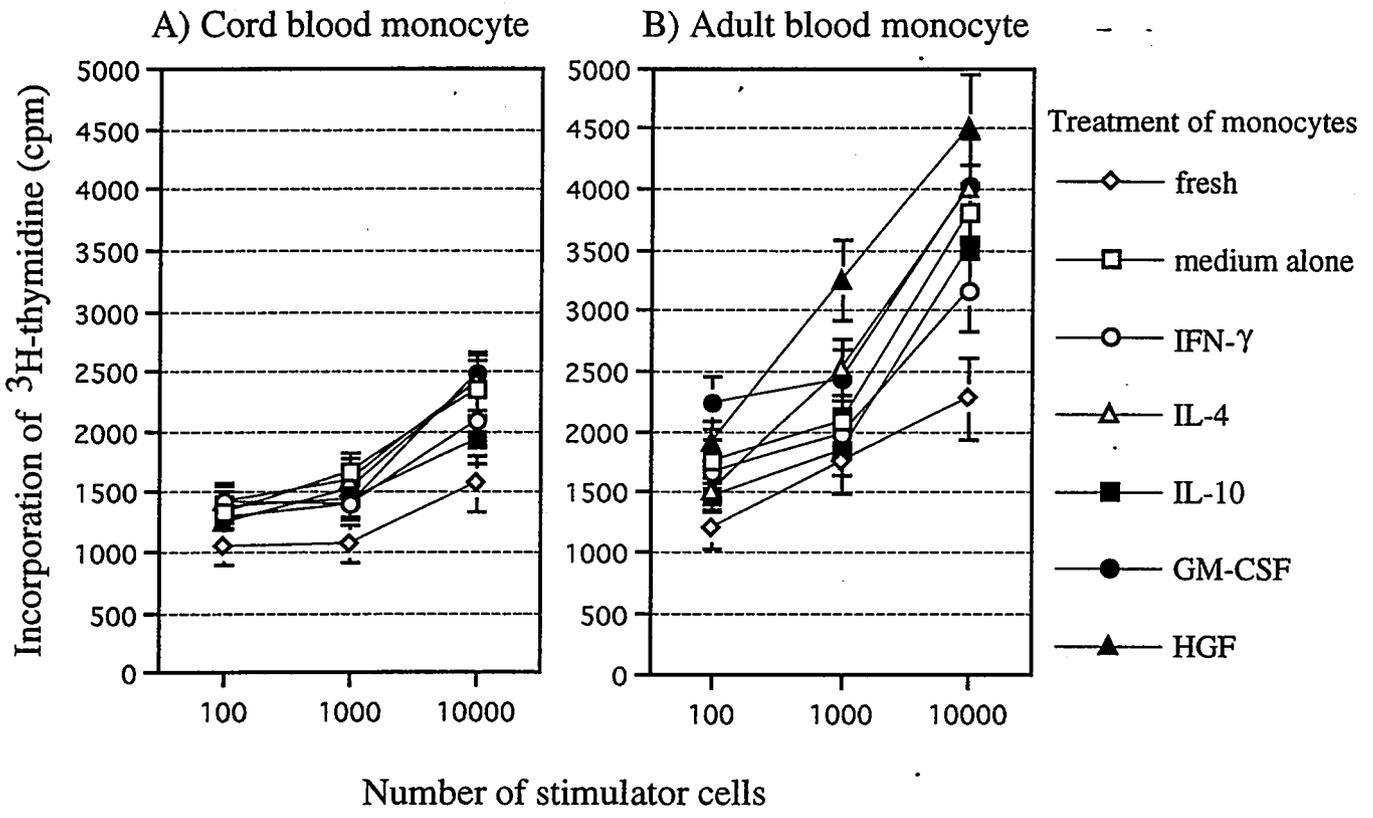


fig 5



日本財団補助金による
1998年度日中医学協力事業報告書

—在留中国人研究者研究助成—

1999年3月6日

財団法人 日中医学協会
理事長 中島章殿

研究室で撮影した本人のスナップ写真、及び発表論文のコピーを添付

1. 研究者氏名 殷 大力
研究機関 神戸大学 医学部 脳神経外科 研究指導者 玉木 純彦 先生 職名 教授
所在地 〒650-0017 神戸市中央区南四丁目7-5-1 電話 078-382-5111 内線 5969

研究テーマ 下垂体腺腫細胞に対するbromocriptineによるapoptosisの誘導機構

2. 本年度の研究業績

(1) 学会・研究会等における口頭発表 有 ・ 無 (学会名・内容)

第57回 日本脳神経外科学会総会

下垂体腺腫細胞に対するbromocriptineによるapoptosisの誘導機構

(2) 学会誌等に発表した論文 有 ・ 無 (雑誌名・論文名)

神経免疫研究

下垂体腺腫細胞に対するbromocriptineによるapoptosisの誘導機構

3. 今後の研究計画

1) 遺伝子の導入による apoptosis に対する影響の解析

p53, 2C2 と cpps2 の遺伝子発現プラスミドを培養細胞に導入し、これらの遺伝子の apoptosis に対する影響を調べた。

2) In vivo 脳腫瘍モデル動物への apoptosis の誘導と DNA 導入と増殖阻害
apoptosis への影響

マウス腫瘍モデルを用いて、遺伝子発現プラスミドベクターを腫瘍局所に注入し、in vivo での遺伝子導入を行う。その後経時的に腫瘍増殖を顕微鏡的に観察し、遺伝子治療の抗腫瘍効果を検討する。

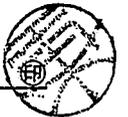
4. 研究指導者の意見

この度、財団法人日中医学協会から在留中国人研究者研究助成金をいただき、素晴らしい研究の成果をあげることができました。大変感謝を致します。殷大力先生は将来の医学、特に脳神経外科学の発展にとって必要な人材と思われます。今後、本邦及び中国において多くの研究成果を挙げ脳腫瘍の診断治療に貢献することを期待いたします。



研究指導者氏名

玉木 紀彦



5. 研究報告

別紙形式を参考に、報告本文4000字以上で報告して下さい（枚数自由・ワープロ使用）

タイトル・要旨等は日本語で、KEY WORDS以下は日本語或いは英語で記入して下さい。

研究成果の発表予定がある場合は発表原稿・抄録集等を添付して下さい。

論文発表に当っては、日中医学協会-日本財団補助金による旨を明記して下さい。

研究テーマ
下垂体腺腫細胞に対するbromocriptineによるapoptosisの誘導機構

研究者氏名

殷 大力

中国での所属・役職

中国 河南省人民病院 脳神経外科 主治医師

日本での指導者氏名・所属・役職

指導者： 玉木 紀彦 神戸大学 脳神経外科教授

要旨（日本語）

抄録：Bromocriptine (Bro)は脳下垂体腺腫に対する薬物療法として有用である。その作用機構は不明な点が多い。とくにBroによる下垂体腺腫のapoptosis誘導についてはわかっていない。今回、我々はWestern blottingとPolymerase chain reaction (PCR)にてp53, bcl-2, p21, IGF-I, IGF-IR発現変化とBro誘導性apoptosisの関係を検討した。Bro処理により、培養下垂体腺腫細胞にapoptosisの誘導が認められた。このapoptosis誘導には、p53とp21の発現亢進とbcl-2の発現低下が関与していたが、IGF-IとIGF-IRは関与していないと考えられた。

KEY WORDS

bromocriptine, pituitary, apoptosis.

研究報告

目的

↓

方法

↓

結果

↓

考察

↓

参考文献

1、目的

Programmed cell deathとしてのapoptosisは細胞死の形の一つであり、近年化学療法的作用機序との関連で注目されるようになってきた。種々の抗癌剤は癌細胞にapoptosisを起こすことが知られているが、bromocriptine (Bro)の作用機序は不明な点が多い。とくに下垂体腺腫細胞のapoptosis誘導については明らかでない。今回、我々はWestern blottingにてwild-type p53、bcl-2、p21、IGF-IとIGF-IR蛋白発現とBro誘導性のapoptosisの関係を検討し、さらにpolymerase chain reaction (PCR)にて上記遺伝子の発現変化を検討した。

2、方法

1) 細胞

下垂体腺腫細胞株 (GH3とAtT-20細胞) を用いた。培養はRPMIとD-MEM培地に10%FCS, glutamine, antibioticsを添加し、37°C, 5%CO₂の条件下で行った。

2) Broの刺激

細胞1X10⁷個に対しBroを0.01-40 μg/ml作用させ、48時間、72時間培養した後に評価を行った。

3) DNA fragmentationとHoechst 33258 staining

10 μg/ml Bro作用後、apoptosisの有無を2%アガロースゲル電気泳動法とHoechst 33258 stainingにて調べた。

4) Western blottingとPCR

Bro作用後1時間、6時間、24時間、48時間、72時間目に、下垂体腺腫細胞から蛋白およびDNAを抽出した。Western blottingとPCRを行い、wild-type p53、bcl-2、p21、IGF-IとIGF-IRの発現変化を調べた。

3、結果

1) Broによるapoptosisの誘導

Broはdose-dependentにGH3とAtT-20細胞の増殖を抑制した。10 μg/mlのBro作用後、48時間と72時間の状態で培養下垂体腺腫細胞にDNA ladder patternが認められた。Bro作用後1時間から24時間まではDNA fragmentationが認められなかった。GH3とAtT-20細胞はBro作用後48時間目に、それぞれに60%と58%のtypical apoptotic morphologyが認められた。

2) p53, bcl-2, p21, IGF-I, IGF-IRの発現変化

Bro作用後、1時間より72時間までp53の発現亢進と1時間より24時間までp21の発現亢進、さらに24時間より72時間までbcl-2の発現低下が認められた。IGF-IとIGF-IRの蛋白はBro作用前後、発現変化が認められなかった。

4、考察

Broはドーパミン作用をもつ麦角製剤で、プロラクチン産生腺腫およびGH産生腺腫¹⁾の治療によく使われているが、ACTH産生腺腫²⁾の治療にも使われている。Broは血中プロラクチン値と成長ホルモン値を低下させるだけでなく、腫瘍の縮小効果も有している。電子顕微鏡を用いた研究によってBroの投与により、細胞のnuclear pyknosis、aggregated chromatin、rough endoplasmic reticulumとGolgi apparatusの

volume densitiesの減少、細胞質の減少とmitochondriaの萎縮と腫脹ということが証明されている³⁻⁵⁾。以上の所見及び他の生物化学の研究によってBroがホルモンとDNAの生物合成を抑制することが明らかにされた⁶⁾。腫瘍細胞のapoptosisに対する感受性は化学療法効果の重要な要因とされている。種々の抗癌剤は癌細胞にapoptosisを起こすことが知られているが、Broの詳細な作用機序は不明な点が多い。我々の実験結果から培養下垂体腺腫細胞株においてもBroにより細胞死が誘導され、その死の形態はDNA fragmentationとHoechst 33258 stainingの所見より、apoptosisであることが分かった。

近年、apoptosis関連遺伝子に関する多くの研究成果によりapoptosis分子機構が次第に明らかにされてきた。なかでもp53, bcl-2, p21, IGF-I, IGF-IRとapoptosisとの関連は注目されるようになってきた。p53はapoptosisの誘導に必要とされている^{7,8)}。p53は nuclear phosphoprotein であり、細胞の増殖と分化を調節する機能も持っている⁹⁾。癌抑制遺伝子p53の機能喪失は広い範囲の癌の原因として重要な役割を果たしている⁹⁾。多くの腫瘍細胞は正常p53機能の回復により細胞周期停止またはapoptosisに陥る¹⁰⁾。一方、DNA-damaging agentsの治療により細胞のp53の発現亢進が認められている^{11,12)}。bcl-2遺伝子は濾胞性B細胞リンパ腫のt(14,18)転座の解析を通して発現された癌遺伝子で、主に26 kDの膜蛋白に翻訳され、ミトコンドリアに局在すると報告されている^{13,14)}。特徴的なことは、bcl-2を過剰発現させた細胞は延命効果が現われることである^{13,14)}。その後、bcl-2は種々の系でgrowth factor withdrawalによって誘導された細胞死(apoptosis)、或はp53-dependent apoptosisを抑制することが明らかにされて¹³⁻¹⁶⁾。bcl-2は、p53とoppositeの機能を有していると考えられている^{15,16)}。p21(WAF1/CIP1)はp53蛋白の下流で、機能としてはG1 cyclin-dependent kinaseを抑制し、さらにPCNAの活性も抑制するとされている¹⁷⁾。p21は、p53依存性またはp53非依存性に細胞分化に重要な役割をしていることが知られている¹⁸⁾。IGF-1とIGF-1Rは正常細胞のdevelopment, growthとsurvivalに重要な役割をしている。IGF-1とIGF-1RがetoposideとUV-lightによって誘導したapoptosisを抑制できると言われている^{19,20)}。これらのことより、我々もBro誘導性apoptosisとp53, bcl-2, p21, IGF-I, IGF-IRの発現の関係を検討した。今回、Western blottingとPCRを用いて、Bro作用後、p53, p21の発現亢進とbcl-2の発現低下を証明した。IGF-IとIGF-IRの蛋白はBro作用前後、発現変化が認められなかった。以上のことはBroが培養下垂体腺腫細胞にp53依存性のapoptosisを誘導することを示している。

5、結語

これらの点は下垂体腺腫細胞に対するBroの抗腫瘍効果にapoptosisが関与していることを示している。このapoptosis誘導機構には、wild-type

p53とp21のupregulation, bcl-2のdownregulationが関与しているが、IGF-1とIGF-1Rは関与していないと考えられた。Bro誘導性apoptosisはp53依存性のapoptosisであることが示された。

6、文献

- 1) Bonneville, JF., Ponlignot, D., Cattin, F., et al.: Radiology, 143:451-455, 1982
- 2) Lamberts, SWJ.: J Clin Endocrinol Metab, 51:307-311, 1980
- 3) Kabuto, M., Kubota, T., Hayashi, M., et al: Neural Med Chir, 25:886-893, 1985
- 4) Eljarmak, D., Lis, M., Cantin, M., et al: Hormone Res, 21:160-167, 1985
- 5) Hallenga, B., Seager, W. and Ludecke, DK. : Exp Clin Endocrinol, 92:59-68, 1988
- 6) Prysor-Jones, RA. and Jenkins, JS.: J Endocr, 88: 463-469, 1981
- 7) Lowe, SW., Ruley, HE., Jacks, T., et al: Cell, 74:957-967, 1993
- 8) Lowe, SW., Schmitt, EM., Smith, SW., et al: Nature, 362:847-849, 1993
- 9) Levine, AJ., Momand, J. and Finlay, CA.: Nature, 351:453-456, 1991
- 10) Yonish-Rouach, E., Grunwald, D., Wilder, S., et al: Mol Cell Biol, 13:1415-1423, 1993
- 11) Kastan, MB., Onyekwere, O., Sidransky, D., et al: Cancer Res, 51:6304-6311, 1991
- 12) Fritsche, M., Haessler, C. and Brandner, G.: Oncogene, 8:307-318, 1993
13. Hockenbery, D., Nunez, G., Milliman, C., et al: Nature, 348:334-336, 1990
14. Tsujimoto, Y.: Oncogene, 2:3-7, 1987
15. Nunez, G., London, L., Hockenbery, D., et al: J Immunol, 144:3602-3610, 1990
16. Vaux, D.L., Cory, S. and Adama, J.M.: Nature, 335:440-442, 1988
17. Chen, J., Jackson, P.K., Korsmeyer, M.W., et al.: Nature, 374:386-388, 1995
18. Steinman, R.A., Hoffman, B., Iro, A., et al.: Oncogene, 9:3389-3396, 1994

日本財団補助金による

1998 年度日中医学協力事業報告書

—在留中国人研究者研究助成—

11 年 3 月 1 日

財団法人 日中医学協会

理事長 中島章殿

研究室で撮影した本人のスナップ写真、及び発表論文のコピーを添付

1. 研究者氏名 吴小怡
研究機関 日本医科大学 研究指導者 加藤 貴雄 職名 一般内科部長
所在地 〒113 文京区千駄木1-1-5 電話 3822-2131 内線 6743

研究テーマ CHANGES OF SIGNAL AVERAGED ECG BY CLASS I ANTIARRHYTHMIC AGENTS IN PATIENTS WITH VENTRICULAR ARRHYTHMIAS

2. 本年度の研究業績

(1) 学会・研究会等における口頭発表 有 ・ 無 (学会名・内容)

第15回心電学会

「高分解能心電図を用いたピルジカイトの薬效薬理の検討」

第9回日本医科大学歯学者発表会

「高分解能心電図を用いた Class I 抗不整脈薬の薬效薬理の検討」

(2) 学会誌等に発表した論文 有 ・ 無 (雑誌名・論文名)

xxvth International Congress on Electrocardiology

《時空間心電情報の新しい視点》

— 不整脈の治療における加算平均心電図の役割

3. 今後の研究計画

高分解能心電図を使用して、各群抗不整脈薬の薬理作用、薬物動態等の研究を引き続けています。

今回、心臓分泌のホルモンで ANP, BNP は、不整脈発生との関係、ペースメーカー植込患者の心機能との関係等を研究始めました。年末に結果を発表予定です。

4. 研究指導者の意見

呉医師は来日以来、循環器病学特に不整脈学の研修研究に従事し、高分解能心電図を駆使した新しい研究領域において目覚ましい成果をあげている。特に抗不整脈薬の薬理作用、薬物動態と心電図変化との関連性に関する研究は、数多くの学会発表を通じて注目を集め、この分野の研究の発展に大いに貢献しているところである。今後、生化学的手法を取り入れた新たな研究も予定されており、研究の更なる発展が期待される。

研究指導者氏名 加藤 貴雄 

5. 研究報告

別紙形式を参考に、報告本文4000字以上で報告して下さい（枚数自由・ワープロ使用）

タイトル・要旨等は日本語で、KEY WORDS以下は日本語或いは英語で記入して下さい。

研究成果の発表予定がある場合は発表原稿・抄録集等を添付して下さい。

論文発表に当っては、日中医学協会-日本財団補助金による旨を明記して下さい。

CHANGES OF SIGNAL AVERAGED ECG BY CLASS I ANTIARRHYTHMIC AGENTS IN PATIENTS WITH VENTRICULAR ARRHYTHMIAS

吳 小怡

中国首都医科大学附属友誼病院内科 医師

指導者：

早川 弘一 教授 日本医科大学学長 第一内科主任教授

加藤 貴雄助教授 日本医科大学附属病院第一内科部長

抗不整脈薬は心電図各成分に対し影響を及ぼすが、通常の 12 誘導心電図ではそれを詳細に検討することは困難である。我々は、高分解能を使用し I 群抗不整脈薬の効果と心電図高周波成分の変化の関連を検討します。対象は心室性期外収縮が認められる患者 37 名、内訳は disopyramide(DP)5 例、mexiletine(MX)11 例、flecainide(FL)7 例、propafenone(PF)6 例、pilsicainide(PS)8 例を経口投与、VPC が 75%以上減少したものを有効と判定した。I 群抗不整脈薬投与前後に NEC-SanEi 社製 Signal Processor 7T18 を用い SAE を記録した後、f-QRS、RMS40 を測定して、さらに薬剤投与前後の変化率 Δ f-QRS、 Δ RMS40 を求めました。結果：1)DP、FL、PF、PS は投与後 f-QRS が延長していましたが、ME ではほとんど変わりませんでした。2)DP、FL、PF、PL は投与後 RMS40 が減少しましたが ME ではほとんど変わりませんでした。3)DP、FL は投与前の f-QRS が 120msec 以上あるいは f-QRS が 20% 以上延長した例が無効例が多く見られました。なお、PF、PS を経口投与した時には投与前の f-QRS が 100msec 以上の症例で無効例が多く見られました。結論：心電図高周波成分を詳細に検討することにより I 群抗不整脈薬の薬効を臨床的に評価することが可能であった。今回我々の行った検討は、薬剤有効例と無効例の比較、催不整脈作用の現れた例の検討等、抗不整脈薬を適切に使用するための指標として有用な方法となりうると思われた。

Key Words: Signal averaged ECG(SAECG), Class I antiarrhythmic drugs, Ventricular premature contractions(VPC)

INTRODUCTION

To date, the main clinical role of the signal averaged ECG (SAECG, SAE) was the

identification of patients at risk of sustained ventricular tachycardia and sudden death. Prediction of the efficacy of antiarrhythmic drugs represents another potential clinical application of this method^{1,2}.

It is important to search for new approaches to predict which drug will be most effective for a given patient with a particular arrhythmia. The same agent may be effective for one patient while it can fail for another. Empirically based antiarrhythmic treatment can be hazardous because of triggering dangerous proarrhythmias. But until now, only a few reports have examined the relation between drug induced SAE changes and antiarrhythmic efficacy.

Therefore, in our research at Nippon Medical School, we focused on SAE changes caused by antiarrhythmic drugs and their possible use for prediction of antiarrhythmic efficacy.

To evaluate the different effects of Class I antiarrhythmic drugs on SAE, recording was made before and after the administration of Class I agents - disopyramide (Ia), mexiletine (Ib), flecainide (Ic), propafenone (Ic) and pilsicainide (Ic).

PATIENTS:

We studied 37 patients with ventricular premature contractions (VPC) for a whole day. Twenty-seven were male, ten were female, and the mean age was 60 years. The type of underlying heart disease was old myocardial infarction in two patients, dilated cardiomyopathy in six patients, and hypertrophic cardiomyopathy in one patient. In the remaining patients, any organic heart diseases were not clearly determined, and the cause of VPC was thought idiopathic.

The following Class I antiarrhythmic agents (AA) were administered per os; Disopyramide (DP) in 5 cases, mexiletine (MX) in 11 cases, flecainide (FL) in 7 cases, propafenone (PF) in 6 cases and pilsicainide (PS) in 8 cases.

METHODS:

After completing the basic evaluation of arrhythmias, each patient underwent control SAE recording. Then each patient was tested with the selected anti-arrhythmic agent. All recordings were performed at Nippon Medical School with the subject lying on the bed in a quiet environment.

SAE was recorded from X,Y and Z orthogonal leads using model 1000 DX recorder (San-Ei, NEC). The recordings prior to and on medication were obtained from the same

electrode position . A mean of 256 ± 4 (range 179-356) cardiac cycles were averaged.

The skin of the patients was prepared with a mildly abrasive tape.

Then eight disposable electrodes were placed in the following positions:

1. the horizontal (X) electrodes at the right and left mid-axillary line at the fourth intercostal space,
2. the vertical (Y) electrodes at the manubrium and at the mid-axillary line on the eighth-ninth rib and
3. the sagittal (Z) electrodes in V2 position and in the corresponding position posteriorly /on the back to the left of the vertebral column.

Two ground electrodes were also attached.

Before starting the recording, two minutes were allowed for stabilization, then the signals from X, Y, Z bipolar leads were recorded for 7 minutes. Signals were analysed with a band pass filter set at 50-250 Hz and recorded on a DAT tape. After amplification, averaging and filtering, the signals were combined into a vector magnitude $\sqrt{x^2+y^2+z^2}$ and three conventional parameters were calculated:

1. the duration of the total QRS complex (f-QRS)
2. the duration of the low amplitude (<40 uV) signals at the terminal portion of the QRS complex (LAS40)
3. root mean square voltage of the last 40 msec of the QRS complex (RMS40).

The result of the time domain SAE was considered abnormal when at least two of three parameters were beyond the normal range: the total QRS duration >120 msec, the duration of the low amplitude signals >40 msec, and the root mean square voltage of the last 40 msec of the QRS complex <25 uV.

SAE recordings were obtained after short-term maintenance therapy (DP 300 mg/d, MX 300 mg/d, FL 100 mg/d, PE 150 mg/d, PS 150 mg/d), when the AA was administered for at least two week.

Drug was consider effective if caused 75% reduction of VPC.

Blood samples were collected from patients in order to check serum concentration at the time of recording around 1.5-2 hours after administration of the drug.

RESULTS:

Changes of f-QRS and RMS40:

	DS	MX	FL	PE	PL
f-QRS (%)	9.1 ± 9.6	1.8 ± 5.9	7.5 ± 5	16.9 ± 14.7	11.5 ± 4.4
RMS40(%)	-10.5 ± 67.7	-4.2 ± 0.8	-29.3 ± 28.6	-31.6 ± 38.5	-30.8 ± 17.4

1. We observed the significant prolongation of f-QRS after oral administration of disopyramide, flecainide, propafenone and pilsicainide. Mexiletine did not prolong f-QRS significantly.

2. The measurement of the RMS40 changes demonstrated that all class I AA except mexiletine markedly decreased RMS40 in most of the patients. Mexiletine decreased RMS40 slightly.

3. When we studied the cases in which the anti-arrhythmic treatment was not effective, we found that many of these patients were diagnosed with dilated cardiomyopathy (4 out of 6 DCM patients).

4. In case of propafenone and pilsicainide administration, patients who had f-QRS 100 ms before drug administration and/or excess prolongation of f-QRS ($\geq 20\%$) after administration the antiarrhythmic efficacy tended to be low.

This effect was also observed in the case of the administration of disopyramide and flecainide, but in patients with initial f-QRS 120 ms and f-QRS prolongation ($\geq 20\%$) after administration.

Mexiletine had no significant effect on f-QRS, and we could not find any relationship between f-QRS and the drug efficacy.

DISCUSSION:

In case of disopyramide, this agent caused significant prolongation of f-QRS in almost all cases. The RMS40 was also markedly decreased in most of the patients. These results correlate with the previous results of other authors. The magnitude of the drug-induced change in the SAECG is a reflection of the magnitude of the sodium channel blockade.

Already in 1992, Kulakowski studied the predictability of antiarrhythmic efficacy of procainamide, which is also a Class Ia agent. He stated that the change in the total QRS duration was similar in patients in whom arrhythmia became non-inducible and in patients in whom ventricular tachycardia was still inducible¹⁵.

This is in contrary to our results, which suggests that the drug efficacy can be predicted by analyzing the changes of SAE findings.

Mexiletine, which dissociates rapidly from cardiac sodium channels seemed not to

change any of its time-domain parameters in our study. But the studies of other authors suggest that probably it depends on the heart rate. For example, J.K.Lee studied patients with implanted pacemakers⁴. At a heart rate less than 120, lidocaine (class Ib as mexiletine) had no significant effect on the QRS duration, however at higher pacing rates, prolongation of the QRS duration by lidocaine had occurred^{6,9}.

The administration of flecainide in our study prolonged the f-QRS and decreased the RMS40 more than disopyramide. Is important, as this agent shows a similar relationship to f-QRS as Ia class disopyramide - if f-QRS was longer than 120 ms prior to administration and/or excessively prolonged after the administration, the drug's efficacy would be lower. Therefore, in the cases of disopyramide and flecainide, the evaluation of drug-induced changes of SAE may be useful not only for categorizing the antiarrhythmic agent, but for predicting antiarrhythmic efficacy on VPC as well^{8,10}.

Also administration of propafenone caused marked changes in the parameters of signal-averaged electrocardiogram confirming that slowing of the intramyocardial conduction velocity is one of the effective mechanisms of this drug¹¹.

Pilsicainide is a lidocaine derivative that was developed in Japan. It suppresses the maximal rate of increase (V max) of the action potential in atrial and ventricular tissue. It has very slow kinetics (similar to flecainide) and increases both rest and exercise duration of QRS (Sadanaga). During exercise, this prolongation of QRS is rate dependent.

It is important to recall that particularly Ic antiarrhythmic drugs have been shown to induce proarrhythmias in an unpredictable number of patients. It has been reported by Cardiac Arrhythmia Suppression Trial (CAST), that pilsicainide and other Ic agents increased the rate of sudden death in patients with acute myocardial ischaemia (post-myocardial infarction patients)^{13,7,10}. However, the majority of authors concluded that improved quality of life of patients treated by Ic drugs may outweigh the probable risk of reoccurrence of lethal ventricular tachyarrhythmias.

CONCLUSION:

Initially, the main role of the signal-averaged ECG has been the identification of patients with post-myocardial infarction who are at high risk of sudden death. In 1993, Greenspoon and Kidwell concluded that there is no SAECG parameter (either total QRS, late potential, or frequency content) that appears to be useful in predicting drug efficacy¹². However, as stated above, lately it was discovered that there is predictive

value of this method. The evaluation of drug-induced changes of SAE may be useful not only for the categorizing of anti-arrhythmic agents, but also for predicting anti-arrhythmic efficacy of Class Ia and Ic agents on VPC.

Even now, the antiarrhythmic drugs are sometimes administered in "trial and error" fashion. Therefore, further research of the SAECG - antiarrhythmic agents relationships could be useful.

References:

- [1] Piotr Kulakowski, Yaver Bashir. Prediction of Antiarrhythmic Efficacy of Class I and III Agents in Patients with Ventricular Tachycardia by Signal-Averaged ECG Analysis. PACE 1992; 15: 2116-2121.
- [2] Katoh T, Kuroki S. Arrhythmia-Related Transient Changes of High Frequency Filtered QRS Complex. Advances in Body Surface Mapping and High Resolution ECG, 1st ed. Nagoya: Life Medicom Co.Ltd. 1995; 303-312.
- [3] Foster MT, Peters RW. Electrophysiologic Effects and Predictors of Success of Combination Therapy With Class Ia and Ib Antiarrhythmic Drugs for Sustained Ventricular Arrhythmias . Am J Cardiol 1996; 78: 47-50.
- [4] J.K. Lee, C. Takanaka. Complex frequency-dependent interaction of class-I antiarrhythmic drugs as they affect intraventricular conduction. Eur Heart J 1995;16:832-841.
- [5] Arnold J. Greenspon, Gregory A. Kidwell. The effects of antiarrhythmic drugs on the signal-averaged electrocardiogram in patients with malignant ventricular arrhythmias. Progress in Cardiovascular Diseases, 1993; 35:399-406.
- [6] Remigijus zaliunas, Petras zabiela. The effects of intravenous Mexiletine on spectra of the signal-averaged ECG. PACE 1994;17:2187-2193.
- [7] J. Greenspon, Gregory A. Kidwell. The effects of type I antiarrhythmic drugs on the signal-averaged electrocardiogram in patients with malignant ventricular arrhythmias. PACE 1992; 15:1445-1453.
- [8] Freedman RA, Steinberg JS. Selective prolongation of QRS late potentials by sodium channel blocking antiarrhythmic drugs: Relation to slowing of ventricular tachycardia. J Am Coll Cardiol 1991; 17:1017-1025.
- [9] Remigijus Zaliunas, Petras Zabiela. Signal-averaged ECG in prediction of the short-term suppression of ventricular premature beats by Mexiletine. Int.J.Cardiol.1994;46:243-254.

[10] P.Kulakowski, S. Gibson. Flecainide-related alterations in the signal-averaged electrocardiogram: similarity between patients with or without ventricular tachycardia. Eur Heart J 1992;13:808-813.

[11] F.Lombardi, M.L.Finocchiaro.Effects of mexiletine, propafenone and flecainide on signal-averaged electrocardiogram. Eur Heart J.1992;13:517-525.

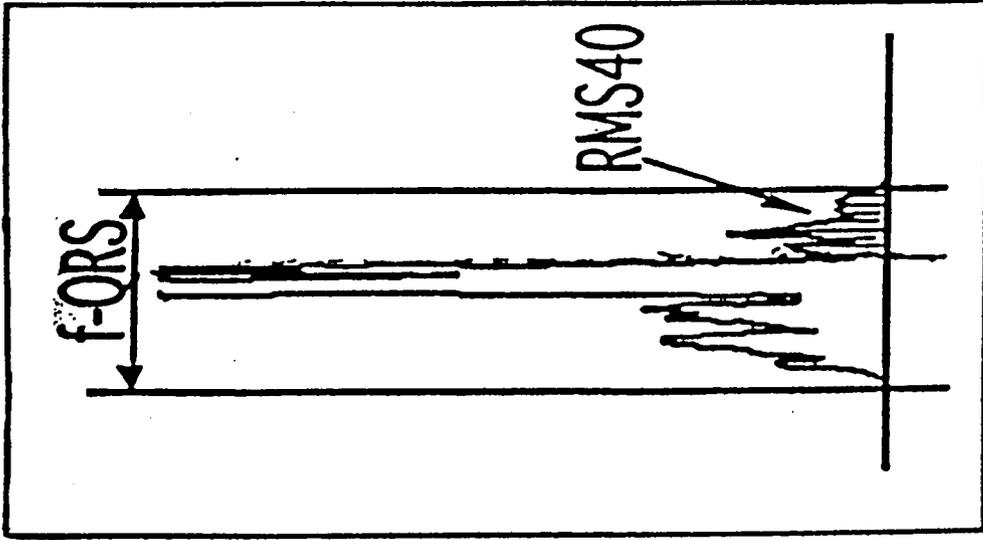
[12] Brembilla-Perrot B, Terrier de la Chaise. The Signal-Averaged Electrocardiogram Is of Limited Value in Patients With Bundle Branch Block and Dilated Cardiomyopathy in Predicting Inducible Ventricular Tachycardia or Death . Am J Cardiol 1997; 79: 154-159.

Figure 1. The SAE record obtained from a patient who was administered the DP. After DP administration, f-QRS prolonged from 99 to 114ms, RMS40 decreased from 325 to 254 uV.

Figure 2. The change of f-QRS before and after administration of Class I AA agents. (●) means that the drug was effective, (X) indices indicates ineffectiveness. After oral administration of DP, FL, PF and PS, the f-QRS was significantly prolonged. Such prolongation cannot be observed in case of MX.

Figure 3. The changes of RMS40 before and after administration of Class I AA agents. (●)means that the drug was effective, (X) indices ineffectiveness. After administration of DP, FL, PF and PS the RMS40 markedly decreased. In the case of MX, the decrease was only slight.

Figure 4. Here is displayed the f-QRS in combination with drug effectiveness. The X-axis represents the duration of f-QRS, Y-axis represents the change of f-QRS. (●) means that the drug was effective, (X) indices equals ineffectiveness. If f-QRS was more than 120ms before drug administration and/ or there was excess f-QRS prolongation 20% after administration, the therapeutic effectiveness tended to be low.

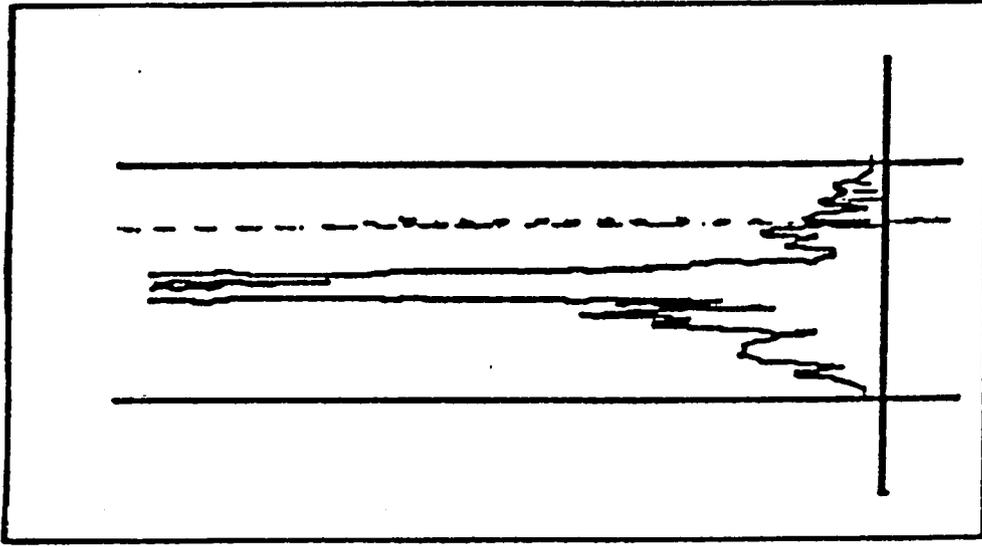


before DP

300mg p.o.

f-QRS 99msec

RMS40 325 μ V



after DP

300mg p.o.

f-QRS 114msec

RMS40 254 μ V

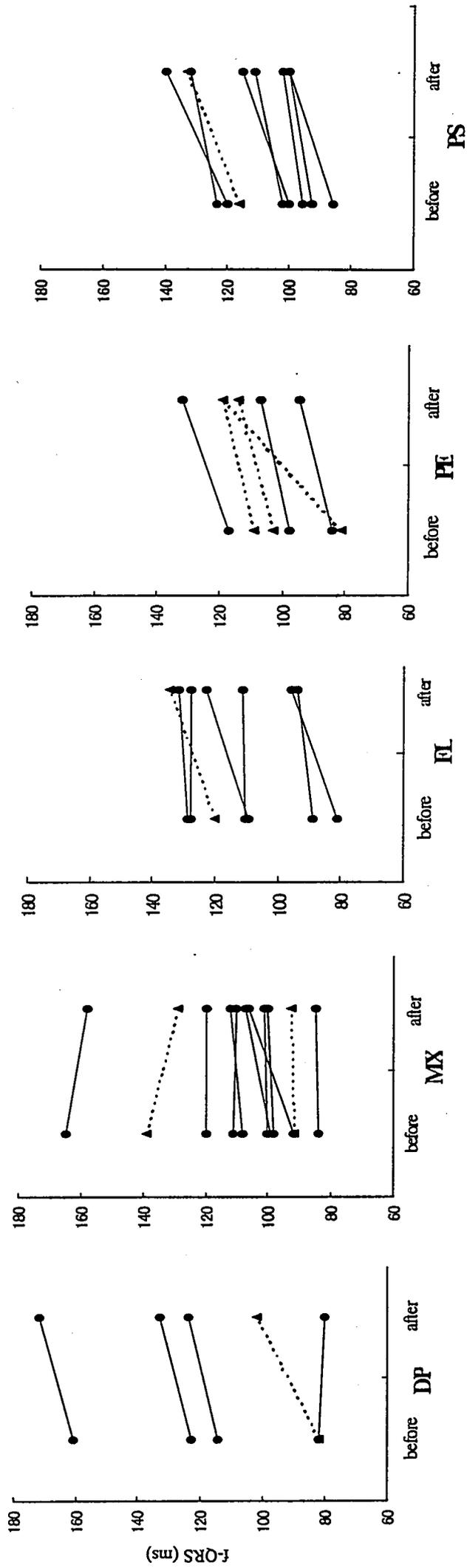


FIGURE 2.

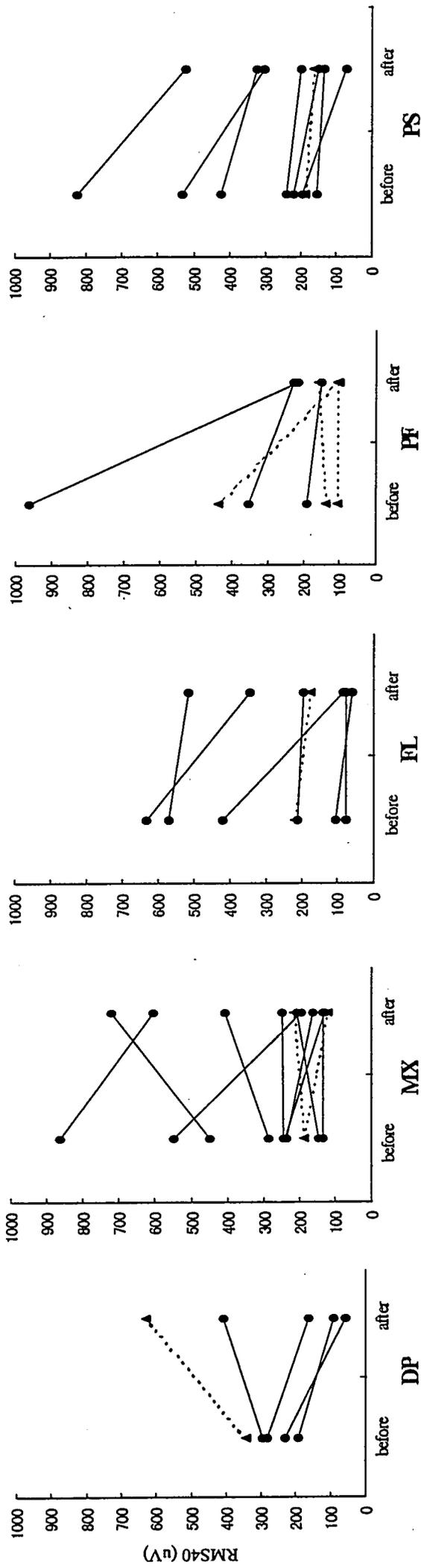


FIGURE 3.

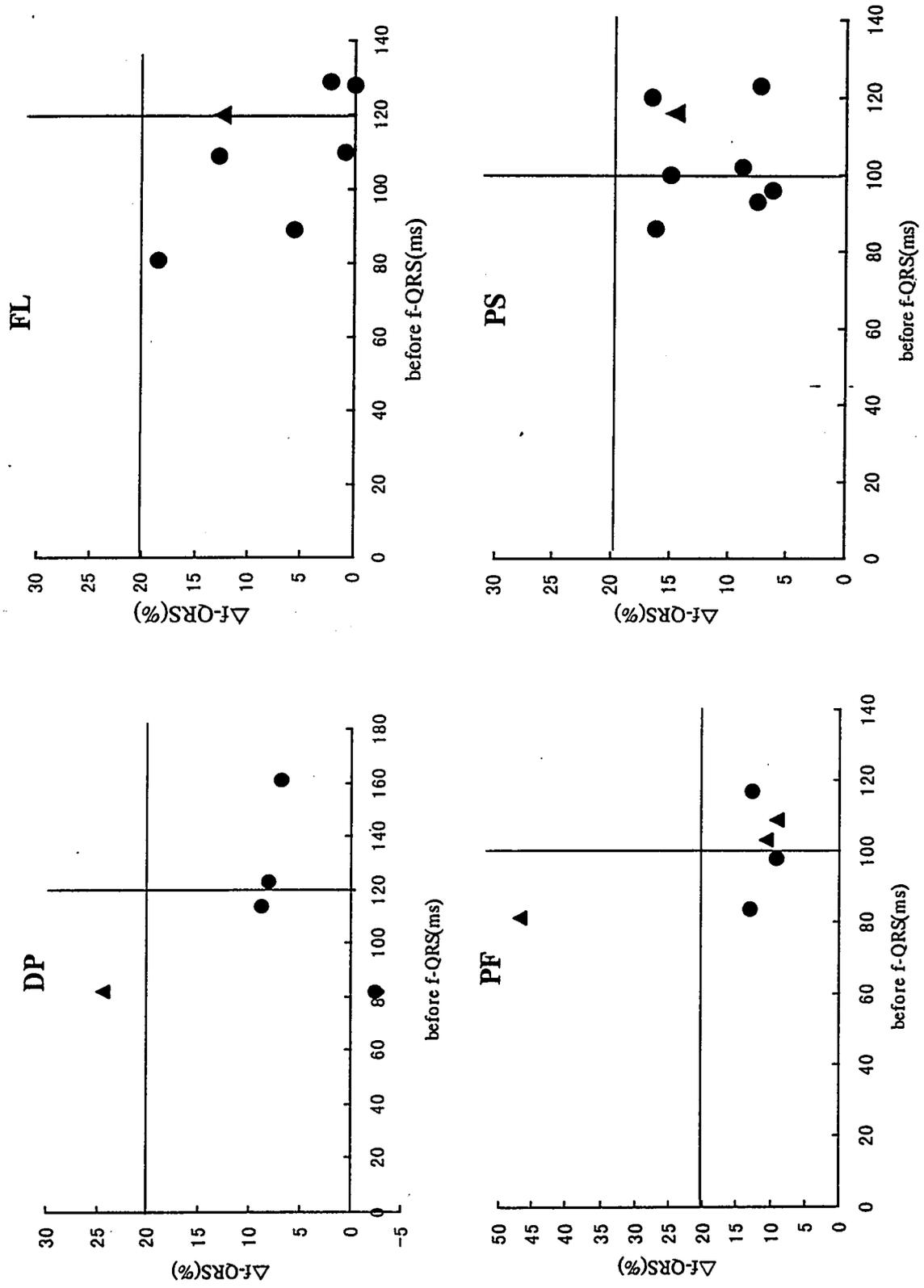


FIGURE 4.

日本財団補助金による

1998 年度日中医学協力事業報告書

—在留中国人研究者研究助成—

1999年 3月 10日

財団法人 日中医学協会

理事長 中島章殿

研究室で撮影した本人のスナップ写真、及び発表論文のコピーを添付

1. 研究者氏名 荆萍

研究機関 愛知医科大学 第四内科 研究指導者 蒲隈照典 職名 教授

所在地 〒460-1103 愛知県愛知郡長久手町大字岩作字雁又 電話 0566-62-3311 内線 2409

研究テーマ 生理活性物質とその受容体発現調節の遺伝子解析

2. 本年度の研究業績

(1) 学会・研究会等における口頭発表 有 ・ 無 (学会名・内容)

(2) 学会誌等に発表した論文 有 ・ 無 (雑誌名・論文名)

研究テーマ

生理活性物質とその受容体発現調節の 遺伝子解析

--副題--

TRH投与によるラット下垂体、視床下部、大脳
におけるTRHおよびTRH-Receptor
messenger RNA発現量の変動

研究者氏名 荊 萍

中国での所属・役職

中国衛生部北京生物製品研究所・助理研究員

日本での指導者氏名・所属・役職

満間 照典・愛知医科大学 第四内科・教授

要 旨

TRH (Thyrotropin releasing hormone) の視床下部-下垂体-甲状腺系以外における役割、機能を明らかにする目的で、ラットにTRHを負荷し、下垂体、視床下部、大脳におけるTRHおよびTRH-Receptor (TRH-R) messenger RNA (mRNA) 発現量の経時的変化をRT-PCR法およびCompetitive RT-PCR法により検討した。

TRH mRNAの基礎値は視床下部、大脳、下垂体の順に高く、TRH負荷では、下垂体において1日後に3.8倍に著増した。視床下部では一過性の軽度の増加、大脳では漸減傾向を示した。TRH-R mRNAの基礎値は視床下部、下垂体に高く、大脳は低かった。TRH負荷では、下垂体、大脳では著変はなく、視床下部において1日後より減少を示した。下垂体、視床下部、大脳の各組織にTRHおよびTRH-R mRNA が発現し、TRHにより異なった変動を示したことから、組織における発現制御の多様性が示され、新たな機能の存在の可能性が示唆された。

Key words

TRH	thyrotropin-releasing-hormone,
TRH-R	thyrotropin-releasing-hormone receptor
RT-PCR	reverse transcription polymerase chain reaction
Competitive RT-PCR	Competitive reverse transcription polymerase chain reaction

目 的

TRH (Thyrotropin releasing hormone) は視床下部-下垂体-甲状腺系において、甲状腺機能の恒常性に重要な役割を果たしているホルモンである。視床下部殊にPVN(Periventricular Nucleus) におけるTRH遺伝子の発現、つまりprepro TRH messenger RNA (mRNA) の転写は甲状腺ホルモンにより負に制御されている (1, 2)。TRHはprepro TRH 前駆体より、酵素的あるいは非酵素的に順次分解修飾され生成される (3)。

TRHとprepro TRH mRNA の発現はPVNに限らず、その他の視床下部、大脳、下垂体、胃腸など消化管、睾丸など多くの臓器に分布している。またTRHの受容体であるTRH-R (TRH-Receptor) も下垂体だけでなく広く検出されている (4)。

しかしながらTRHの作用については甲状腺系に関与しているPVNでの機能以外はほとんど知られていない。そしてTRHの発現調節機構についても、Dexamethasone、 β estradiol などの関与が検討されているのみである (5, 6, 7)。そこで、TRHの機能を知る目的で、ラットにTRHを投与し、脳の種々の部位におけるTRHおよびTRH-R の遺伝子発現を RT-PCR法およびCompetitive RT-PCR法を用いて検討した。

対象と方法

1. 動物の処置とtotal RNAの抽出

Wistar 系雄ラット (体重約 200 gm) を各群 5 匹の 6 群に分け、コントロール群以外の 5 群に 50 mg/kgのTRHを連日の午前中に腹腔内投与し、各々 1、2、3、5、12 日後に断頭し、下垂体、視床下部、大脳の各組織を摘出し、直ちに液体窒素に入れて凍結させ、RNAの抽出まで -80 °Cで保存した。

total RNAの抽出は acid guanidine phenol chloroform 法により行った。

2. オリゴDNAの設計とCompetitorの作成

TRH、TRH-R、 β actinを増幅するために、TRH-F (forward)、TRH-R (reverse)、TRH-R-F、TRH-R-R、 β actin-F、 β actin-Rの各々20merから成る6本のオリゴDNAを設計した(表1)。

Competitorの作成はTakaraのCompetitive DNA Construction Kitにより作成した。

3. RT-PCR法およびCompetitive RT-PCR法

逆転写反応は、各群の5匹からの各0.5 μ gの合計2.5 μ gのtotal RNA 2.5 μ gを鋳型にしてオリゴ dT (18mer) 50 pMとSuperScript™ II RT 100単位 (GIBCO BRL) を加え、20 μ Lの容量で、42 °Cで60分行った。

RT-PCR法は、RT産物 2 μ L (0.25 μ g total RNA相当) を鋳型として、1組のオリゴDNA各10 pM、0.5 単位の Taq DNAポリメラーゼを添加し、GeneAmp PCR System 2400 (Applied Biosystems) を用いて、94 °C 60秒 58 °C 60秒 72 °C 90秒の変性、アニール、伸長反応をTRHでは35回、TRH-Rでは45回、 β actinでは25回繰り返し目的とするDNAを増幅した。PCR産物は2~3 % の Agarose に添加し、電気泳動の後、Ethidium bromideで染色した。DNA量の定量は蛍光 Image analyser (FM BIO-100、HITACHI) により行った。

Competitive RT-PCR法は、段階希釈したCompetitorを用いる以外は基本的には上記のRT-PCR法と同じ条件を用いた。増幅DNAのコピー数の定量は、目的の遺伝子由来のDNA量をCompetitor 由来のDNA量で除し、この値のlog値を片対数グラフにプロットすることにより算定した(8)。

結 果

1. RT-PCR法によるTRH mRNA の定量

コントロール群において、視床下部、大脳、下垂体のいずれのRNAからの RT-PCR産物のアガロース電気泳動像は、期待通りの687 bp に対応する位置に1本の増幅バンドが得られた。RTを各群 triplicate で行い、各 RT 産物から monoplicate で PCRを行った。バンドの強度は視床下部が強く、下垂体では最も弱かった。β actinで補正したTRH mRNA量は視床下部ではTRH負荷1日後に低下した後、軽度の上昇を示し、その後再び減少した(表2)。大脳では漸次減る傾向を示した。下垂体ではTRH負荷翌日に382.7+89.3% (triplicateの平均+標準偏差)と著明な増加を示し、2日目には224.8+8.4と漸減を示し、12日後まで減少し続けた。

2. RT-PCR法によるTRH-R mRNA の定量

全ての試料から45回の増幅回数にて明瞭な464 bpの単一バンドが検出された。コントロール群においては、視床下部、下垂体に比較して大脳からの増幅量が少なかった。β actinで補正したTRH-R mRNA量は、TRH負荷後の視床下部において翌日から著明な減少を示した(表2)。大脳では軽度の低下を示したが、下垂体ではほとんど変動を示さなかった。

3. Competitive RT-PCR法によるTRH mRNA の定量

定量性を高める目的で、Competitive RT-PCR法により、TRH mRNA、TRH-R mRNAおよびβ actin mRNAの定量を試みた。TRH-Rは、転写産物が微量であるためか、competitorの存在下において標的遺伝子の明瞭な増幅が得られず定量不可能であった。TRHのCompetitive PCRでは、段階希釈したcompetitorを 10^3 から 10^7 コピー/tubeをRT産物2μLに加え、β actinのCompetitive PCRでは、段階希釈したcompetitorを 10^7 から 10^9 コピー/tubeをRT産物2μLに加えることにより良好な結果が得られた。Competitive PCRで定量したβ actin量は表3に示した如く 5.6×10^8 から 1.1×10^9 /μg total RNAとほぼ一定の値を示した。基

礎値、すなわちコントロール群において、 β actin量で補正した視床下部、大脳、下垂体の TRH mRNA量は、各々 6.0×10^6 、 1.7×10^5 、 3.1×10^4 コピー/ μg total RNA であった (表 3) : TRH負荷 2 日後の下垂体では 7.0×10^4 コピーと負荷前の 2.2 倍となり、RT-PCR法で得られた値にほぼ一致した。

考 察

mRNAの定量は従来からのノーザンブロット法が正確と考えられる。しかしながら、微量な転写産物あるいは試料が充分得られない時は検出が困難である。近年、PCR法が遺伝子工学に導入され多くの領域で多大の成果が出ると共に定量性に関してもCompetitive法により改善されつつある。ラットから得られるRNAは極微量であるので、今回我々は、TRH mRNA、TRH-R mRNAの定量にRT-PCR法と一部 Competitive RT-PCR法を用いた。試料間の純度の違いを補正するために、内部コントロールとして β actinを用いた。また転写産物からの特異的増幅のため、3 遺伝子を増幅するオリゴ DNAは全てイントロンを挟むように設計した。ラットgenomic DNAからの増幅は3 遺伝子とも全く無く、RT産物からのPCR産物が設計通りのDNA長の単一バンドと成ったことは、mRNAからの特異的増幅と考えられた。Competitorを用いないRT-PCR法では、増幅回数が少ない場合、ある程度定量性が維持されるが、増幅回数の増加に伴いプラトー現象など定量性が失われる可能性が指摘されている。しかしながら、下垂体におけるTRH mRNAのTRH負荷 2 日後のコントロールに対する増加度が、RT-PCR法とCompetitive RT-PCR法で一致したことは、今回のRT-PCR法がある程度定量性を持つこと示していると思われた。

TRH、TRH-Rが全身の臓器に広く分布していることが、TRHのRIA (Radioimmuno Assay) あるいは各々のmRNAの検出により証明されている。今回の検討でも両mRNAが下垂体、視床下部、大脳の各組織で認められた。下垂体におけるTRHの意義は大脳におけるものと同じく不明であるが、TRH負荷により著明に増加した。その発現レベルは増加後においても大脳での基礎値と同程度で視床下部の1/10と量的には少量である。下垂体におけるTRHの存在あるいは種々の条件下における変動については、Jacksonらの研究がある (9, 10)。彼らは、生体においては下垂体におけるTRHの発現は何らかの機構により抑制されていて、脱制御によりTRHの発現が亢進することを報告している。今回の結果を考え併せ

ると、TRHが何らかの機構を介して抑制の解除に作用していることが推測されるが、詳細は不明である。

RT-PCR法および Competitive RT-PCR法は微量のmRNAを定量するうえで有用な実験手段と考えられた。また、本実験系はTRHを初めとした種々の生理活性物質の発現制御および生理作用を検討するのに有用なものと思われる。今後更に実験を進め、TRHの役割を明らかにしたい。

結 語

本研究により、ラットの下垂体、視床下部、大脳にTRH および TRH-R mRNAの存在していることが示された。またTRHによりTRH および TRH-R mRNAの発現制御の異なることが判明したことにより、TRHの機能の多様性が示唆された。

参考文献

- 1) Yamada M, et al. Influences of hypothyroidism on TRH concentrations and prepro TRH mRNA levels in rat hypothalamus: a simple and reliable method to detect prepro TRH mRNA level. *Neuroendocrinology*. 1992 Mar; 55(3): 317-20.
- 2) Hollenberg AN, et al: The human thyrotropin-releasing hormone gene is regulated by thyroid hormone through two distinct classes of negative thyroid hormone response elements. *Mol Endocrinol*. 1995 May; 9(5): 540-50.
- 3) Lechhan RM, Wu P, Jacson IMD, et al: Thyrotropin-releasing hormone precursor: characterization in rat brain. *Science*. 1986 Jan 10; 231(4734): 159-61.
- 4) Fukusumi S, et al: Distribution of thyrotropin-releasing hormone receptor mRNA in rat peripheral tissues. *Regul Pept*. 1995 May 30; 57(2): 115-21.
- 5) Thomas O, et al: Thyropin-releasing hormone gene expression in the anterior pituitary. II stimulation by glucocorticoids. *Endocrinology* .1994; 134(2): 821-5
- 6) Ildiko K, et al: Changes in adrenal status affect hypothalamic thyropin-releasing hormone gene expression in parallel with corticotropin-releasing hormone. *Endocrinology*. 1995 Jul; 136(2): 2795-802.
- 7) Croissandeau G, et al: Evidence of thyrotropin-releasing hormone (TRH) gene expression in rat anterior pituitaries and modulation by estrogens of TRH-like immunoreactivity and TRH- elongated peptide contents. *J Endocrinol*. 1996 Oct; 151(1): 87-96.
- 8) 川上文清、高橋慎博、井上浩明、河村良久 (1996) 増幅産物の定量 2. 定量的PCR. *蛋白質 核酸 酵素* 41(5)、503-509
- 9) Rondeel JM, et al. Onset of pro-thyrotropin-releasing hormone gene expression in cultured rat anterior pituitary cells is expedited by dexamethasone. *Mol Cell Neurosci*. 1994 Dec; 5(6): 678-83.
- 10) Jackson IM, et al. Antidepressants inhibit the glucocorticoid stimulation of thyrotropin releasing hormone expression in cultured hypothalamic neurons. *J Invest Med*. 1998 Dec; 46(9): 470-4.

表1. オリゴ DNAの配列と増幅DNAの断片長

オリゴ DNA	配列 (5' -----3')	増幅DNA断片長
TRH-F	cttggttgctgctggctctg	687 bp
TRH-R	tgctgtcgtttgtggagtct	
TRHR-F	ccaccaacagatgtttcaac	464 bp
TRHR-R	atatccatatgtacaagaac	
β actin-F	cattgccgatagtgatgacc	632 bp
β actin-R	tacacagaagcaatgctgtc	

表2. 下垂体、視床下部、大脳におけるTRH-R TRH mRNA量の変動

	負荷前	負荷後 1 日	負荷後 2 日	負荷後 3 日	負荷後 5 日	負荷後 1 2 日
下垂体 TRH-R	100.0±0.74	103.1±9.6	100.5±6.7	120.4±17.1	113.6±19.7	106.0±25.9
下垂体 TRH	100.0±17.4	382.7±89.3	224.8±8.4	163.0±53.7	77.4±14.7	67.7±5.3
視床下部 TRH-R	100.0±29.3	28.5±5.7	27.5±11.5	49.6±2.3	26.1±5.3	25.5±9.5
視床下部 TRH	100.0±10.2	60.3±7.7	179.5±16.0	195.7±14.4	35.3±3.8	70.2±31.2
大脳 TRH-R	100.0±13.1	80.5±3.1	81.6±12.2	140.3±54.0	73.7±20.4	82.5±20.2
大脳 TRH	100.0±33.4	85.3±13.7	91.3±2.5	79.0±5.2	50.3±8.7	52.9±17.5

(負荷前の値を基準に%で、平均±SDで表した。RTをtriplicate、PCRをmonoplicateで行い、 β actin量で補正した。)

表3. Competitive RT-PCR法により定量したTRH mRNA

	TRH mRNA コピー数 (/ μg total RNA)	β actin mRNA コピー数 (/ μg total RNA)	補正後TRH mRNA コピー数 (/ μg total RNA)
視床下部	6.0×10^6	1.1×10^9	6.0×10^6
大脳	8.4×10^4	5.6×10^8	1.7×10^5
下垂体 (負荷前)	2.6×10^4	9.2×10^8	3.1×10^4
下垂体 (負荷後 2 日)	6.4×10^4	1.0×10^9	7.0×10^4

(β actin補正は視床下部のTRH mRNA コピー数を基準に、それ以外のものに対しおこなった)

日本財団補助金による
1998年度日中医学協力事業報告書

—在留中国人研究者研究助成—

1999年3月1日

財団法人日中医学協会
理事長 中島章 殿

研究室で撮影した本人のスナップ写真、及び発表論文のコピーを添付

1. 研究者氏名 龔 倩
研究機関 東京大学 研究指導者 大橋靖雄 職名 主任教授
所在地 〒113-0033 文京区本郷3-7-1 電話 03-3812-2111 内線 3520

研究テーマ 中国における糖尿病ハイリスク者に対する運動療法

2. 本年度の研究業績

(1) 学会・研究会等における口頭発表 有 ・ 無 (学会名・内容)

(2) 学会誌等に発表した論文 有 ・ 無 (雑誌名・論文名)

3. 今後の研究計画

1. 今年5月以降、本研究の中間結果を収集して分析する。
2. 上記の結果を評価し、12月から効果のよくない対象者に対し、北京医科大学第三附属医院の運動医学部と提携して、更に強化運動指導を行う予定。
3. 12月以降、味の素(株)の新プロジェクト(薬物臨床試験)を同病院と協力して中国に展開する予定。

4. 研究指導者の意見

龔さんは非常に独立して北京におき、味の素(株)の研究(糖尿病の予防運動療法)を立案し、施設の交渉、協力者の教育と実施を積極的に進められています。

私も1998年5月と11月に北京と訪ね、33の号誌に研究の進捗について確認いたしました。研究の規模が小さく、龔さんが取りかかっている問題を超える研究と見なされることが、本人の能力に期待して見られています。

研究の進捗状況は論文発表の形で明らかになり、1999年5月7日の研究計画の印刷版文化、1999年内の論文の公表が予定されています。

研究指導者氏名

大橋洋明

Ⓜ

5. 研究報告

別紙形式を参考に、報告本文4000字以上で報告して下さい(枚数自由・ワープロ使用)

タイトル・要旨等は日本語で、KEY WORDS以下は日本語或いは英語で記入して下さい。

研究成果の発表予定がある場合は発表原稿・抄録集等を添付して下さい。

論文発表に当たっては、日中医学協会-日本財団補助金による旨を明記して下さい。

糖尿病の生活方式介入研究要旨

研究の内容と背景：

本研究は、インスリン非依存型糖尿病(NIDDM)患者の生活方式介入により、NIDDMの予防と治療の重要な治療法である運動療法について定量的に分析・評価する。適度の運動が血糖コントロールには重要と有効であることが報告されているが、実験条件管理下で検討された成績は多く見られる。今まで運動を定量化して評価しえた報告は認められない。患者に運動療法を実践してもらう場合、患者が自分なりの方法で行っている運動について、その種類と運動に費やす時間から運動量を考慮し、助言を与えている場合が多いが、客観的に運動量を評価することは難しい。また、実際に運動指導を行うに当たって必要な運動処方作成、すなわち個人に合わせた運動強度の決定法に一定の基準がなく、経験的な指導がなされている。

研究の特徴：

本研究は上記の問題を考慮し、運動を継続させるために、運動の効果が自己測定により観察させることと、運動量の記録が残ることを試みた。6ヶ月の追跡期間の中に、日常生活で簡単に運動量を知るための方法のひとつに歩数計を用いて定量性を実現することにした。歩数計による数字に基づいて、運動量をチェック、記録し、運動量増加の可能性、増加幅による効果への影響について検討した。同時に、NIDDMのハイリスク人の性格傾向と(食事、運動などの)自己管理能力、HbA1c値、体重及び運動量の増減などとの定量的な関係を研究した。

また、生活方式介入時に、対象者の心理要因及び社会的要因が運動と食事指導に影響する重要な要因として認識し、対象者が指導の通りよくやっている人とやっていない人が性格面でどのような特徴がもち、これによりどのように対応すべきかについて研究した。

以上

AIM

- To evaluate the efficacy of exercise therapy
- To evaluate the contribution of pedometer
- To evaluate the relationship of characteristics and compliance

METHODS

Selection of Participants

Participants were recruited through clinical centers of one dwells district, one institution and six universities. Eligible requirements for participation in the study were as follows:

Table 1 : The study inclusion and exclusion criteria.

Inclusion Criteria

1. Aged 35 to 65 years old.
2. FPG concentration was between 5.0 and 7.0 mmol/dl, and had at least one parameter of the high-risk of diabetes:
 - Resting blood pressure exceeding 140/90 mm/Hg
 - BMI \geq 23 kg/m²
 - Triglyceride concentration \geq 150 mg/dl
 - HDL-c concentration \leq 35 mg/dl
 - Diabetic family history
3. FPG concentration was between 7.0 and 7.6 mmol/dl.
4. FPG concentration was between 7.6 and 8.9 mmol/dl and no drug treatment.
5. HbA1c concentration more than 4.6mmol/dl.
6. Willing to participate in the trial for 1 year.
7. Informed consent.

Excluded Criteria

1. Severe diseases: uncontrolled congestive heart failure, uncontrolled hypertension, unstable dysrhythmia, unstable angina, coronary heart disease.
 2. Clinical evidence of diabetes.
 3. Treated with oral hypoglycemic agents
 4. Medication use likely to interfere with lipid metabolism.
 5. Exercise-limiting concurrent condition.
 6. To refuse sign informed-consent documents to participate in the protocol, which was approved by the Ethics Committee of the study.
-

Screening

In early screening period the age-eligible high-risk population of diabetes were recruited and approximately 3570 people screened from June to September in 1998. Only 112 eligible participants were eventually entered into the trial. Because screening for high-risk group of diabetes was more difficult than expected, we decided to select IGT patients(1285 on total) by scanning 5805 patients' case reports in the clinical centers. As a result, 1228 patients received the screening test. The recruitment period was extended for 3 months.

Baseline Investigations

401 eligible participants according to the screening test took part in the baseline investigation in November 1998. At the baseline, informed consent was obtained, eligibility was determined, and data were collected on a series of the interview survey of questionnaire included questions on demographic characteristics, smoking habits, alcohol consumption, medical history, family history, treatment of medicine, diet habits and exercise behavior and other risk factors for diabetes, health status and functional capacity, and socio-demographic. FPG, HbA1c, FPI, TC, TG, HDL-c were measured. 256 participants were eligible for the study.

Patient Evaluation

Patient's situation were evaluated on baseline, and at 3 months, 6 months and one year after the study beginning. Table 2 summarizes the participants evaluation schedule.

Table 2 Patient Evaluation Schedule

	evaluation			
	(1)	(2)	(3)	(4)
	Initial	3 months	6 months	12 months
Demographic	○		○	○
Medical history	○		○	○
Physical activity questionnaire	○		○	○
Diet questionnaire	○		○	○
Physical exam				
Weight	○	○	○	○
Height	○		○	○
Blood pressure	○		○	○
Serum blood measures				
Fasting plasma glucose	○	○	○	○
Hemoglobin A1c	○	○	○	○
Fasting plasma insulin	○		○	○
Total cholesterol	○		○	○
Triglycerides	○		○	○
HDL-cholesterol	○		○	○
Tokyo University Egogram	○			
Treatment compliance			○	○
Pedometer measures	everyday			

Demographic data

At the initial evaluation, the participant's eligibility was assessed. As part of the eligibility determination, detailed information was collected regarding the participant's fasting blood glucose, family history of diabetes and other risk factors of diabetes. Demographic data collected at the initial evaluation included sex, age, highest educational levels achieved, occupations.

Medical history

At the initial investigation, information was obtained on participants regarding their medical history of the heaviest body weight, history of babies over 4kg, history of

pregnancy diabetes, medical history of diabetes, coronary heart disease, hypertension, hyperlipidemia, stroke, severe disease of liver and kidney and other, condition of smoking alcohol consumption, medication use data were interviewed.

Leisure time physical activity questionnaire have been shown to possess good reliability and validity in MONICA study was developed and used. The kinds and time of the activities were interviewed. The daily quantity of leisure time physical activity was evaluated.

The food frequency record advocated by diabetes clinic of the third hospital of Beijing Medical University was used. Nutrition ingredients were analyzed by nutritionist of the Beijing Medical University.

Personality characters were evaluated by TEG, that was a 60 items self-administered questionnaires, developed by research group of Tokyo University. TEG aimed to assess ego state, through five ego states: CP(Critical Parent), NP(Nurturing Parent), A(Adult), AC(Adapted Child) and FC(Free Child). TEG scores were calculated an questionnaire were displayed by a line graph of the profile of the five subscales: CP, NP, A, FC, AC. According the classification of the graph the personality characters could be assessed by authors.

Blood pressure was recorded with a sphygmomanometer after a 15 min rest while sitting on a chair. Two successive recordings were taken, and the mean was used in the analysis with adjustment for inter-observer variation.

Body mass index calculated as $\text{weight(kg)}/\{\text{height (m)}^2\}$ was used as an index of relative weight.

Daily physical activity were evaluated with the pedometer made by Suzuken Company. in Japan. The reliability and validity were tested by the pilot survey.

Blood sample collection and measurement

Blood sampling was performed at 8 AM after an overnight fast (10 to 12 hours). For total cholesterol, HDL-cholesterol, triglycerides, fasting plasma glucose concentration were determined by the methods of the enzymatic method, insulin by the radio-immuno-diffusion method. The instrument remained "standardized" according to the criteria of the Ministry determining center. For HbA1c determination, blood was drawn under EDTA, then measured by chromatographic method (turbidimetric inhibition immunoassay method) standard according to the criteria of the Boehringer Mannheim Systems with the BM/Hitachi7170. The reference range is 2.9-4.6%. (in Japan it was determined by conventional HPLC method, the reference range is 4.3-5.8%). An alter formula between the two measurement methods

is $\%HbA1c = 0.81 * HbA1c(g/dl) * 100 / Hb(g/dl) + 2.39$.

Design and randomization

At the end of the baseline investigation, eligible participants were classified into three groups: one group treated with diet alone (control group=C1), other group treated with diet and wore pedometer (pedometer control group=E1), another group treated with diet, wore pedometer and intervened by increasing 30% exercise (intervention group=E2). (E1 and E2 groups were named pedometer groups).

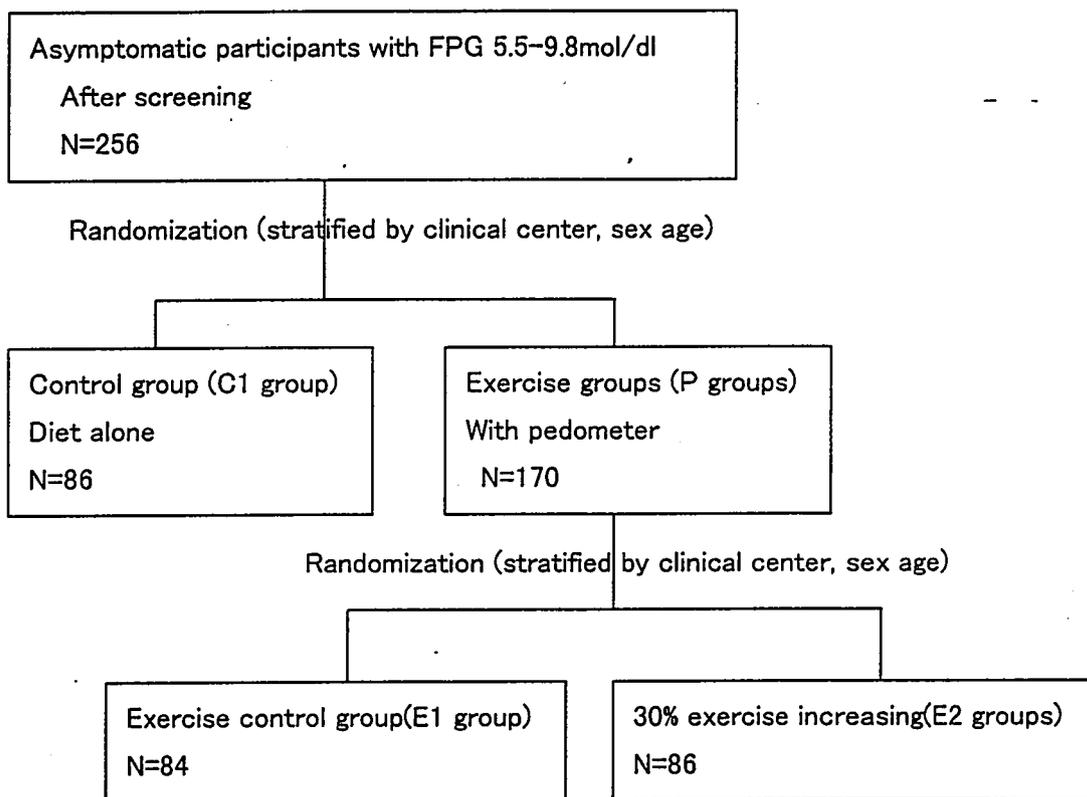


Figure 1. A flow diagram of randomization. The main analysis compares participants assigned to C1 group with participants assigned to E2 group with using pedometer and increasing exercise.

At the first randomization each participants had a 33.3% chance of being allocated into C1 group and 66.7% into P groups. The randomization was stratified by their clinical center, sex, age, FPG.

170 participants were allocated into P groups and were asked to wearing pedometer and recording the number of the steps everyday for a month.

The secondary randomization was done in the P groups, Randomization was stratified

by the average of the steps, clinical center, sex, age. 170 Participants were assigned with equal probability to the E1 group and E2 group.

Intervention

Dietary intervention

All of three groups were placed on diets provided with food scales for use during the study. The dietitian provided individual instruction on the keeping of food records at the beginning of the study. The food recording procedure was also documented in an information folder given to each subject. decreasing total energy intake from fat, with the remainder distributed between carbohydrates and protein. Diets were individually designed for each subject using the estimated energy intake food records performed during baseline. Compliance with the low-fat diet was assessed by 3 monthly interviews with the dietitian and completion of a food checklist.

Exercise Intervention

Participants in exercise groups were asked to wear the pedometer from getting-up till sleeping and record the steps numbers everyday.

The participants of intervention group were asked and encouraged to increase the amount of their leisure physical exercise by 30% steps/day. To this groups, counseling sessions were conducted monthly. The rate of increase depended on the baseline steps, and types of exercise recommended were jogging, walking.

Follow-up Visits

During the intervention phase of the phase of the trial, follow-up visits to the clinical center are scheduled every 3 month to assess and encourage compliance with study exercise treatment, and obtain outcome information.

Expected Outcome

Primary Expected Effect is 0.5% difference in change of HbA1c.

Secondary expected Effect is Decreasing in TC,TG,HDL-c FPI,BMI BP.

Discontinuation

The study treatment is discontinued but follow-up continued for the persons who develop any of the following conditions: severe syndrome diabetes or other any severe illness that may have study discontinued.

28% of 256 subjects.

The participants' data on age, sex, duration of education, income (Ken), occupation in table 3 and the risk factors in table 4 at the start of the study did not differ between groups. These base line data and enables us to examine how effectively the randomization process produced three generally equivalent groups that were unaffected by participant preferences, investigator bias and other confounding factor.

Dietary intake measures were not significantly different for the three groups(table 7).

The average steps was 9821 steps (SD:3197) everyday. The median average daily steps was 9447 steps. Average daily steps recorded with pedometer correlated well with the questionnaire measurement.

DISCUSSION

The chance of finding participants through the method of screening the high risk population was lower, the likelihood became higher through the method of checking the medical case reports.

Although the FPG is the new ADA criteria for diagnosing type 2 diabetes, but it was known to be poorly reproducible. HbA1c level may be more convenient and a more better measure test.

Pedometer should be recommended for type 2 diabetic patients to monitor the physical activity.

Table3. Demographic characteristics of sample (n=254)

Characteristics	control group	pedometer control group	intervention group	p
Age(year)				
35-45	20	18	15	ns
46-55	26	23	28	ns
56-65	40	43	43	ns
Educator(year)				
<5	5	10	6	ns
6-11	20	17	9	ns
11-15	20	15	18	ns
>=16	41	41	53	ns
Income(ken)				
<300	3	1	3	ns
300-999	37	38	43	ns
1000-2999	43	42	37	ns
>=30000	3	3	6	ns
Occupation				
officer	18	20	21	ns
worker	20	16	15	ns
teacher	26	23	27	ns
business	1	0	0	ns
retired	20	22	23	ns
others	1	3	0	ns
Smokers	21	19	13	ns

Table 4 Prevalence of diabetic risk factor

Risk Factor	control group (number)	pedometer control group (number)	intervention group (number)	p
history of pregnancy diabetes	0	1	0	ns
history of babies over 4kg	5	8	5	ns
History of hypertension	23	17	22	ns
History of CHD	9	11	10	ns
History of DM	2	3	2	ns
History of hyperlipidemia	13	24	14	ns
History of stroke	1	3	0	ns
History of	0	1	2	ns
History of liver and kidney	1	1	1	ns
Family history				
paesent	17	17	14	ns
chidren	1	0	0	ns
sister and brother	8	15	10	ns
grandmother and father	3	2	4	ns
Systoelic blood pressure(mmHg)				
<140	58	61	61	ns
140-160	18	18	15	ns
>160	10	5	10	ns
Diastolic blood pressure(mmHg)				
<90	53	59	48	ns
90-100	18	19	26	ns
>100	15	6	12	ns
Total cholesterol(mg/dl)				
<200	37	34	32	ns
200-240	21	24	16	ns
>240	28	25	38	ns
Triglycerides(mg/dl)				
<150	45	46	42	ns
>=150	41	37	44	ns
HDL cholesterol(mg/dl)				
=<35	9	12	7	ns
35-50	12	13	11	ns
>50	65	58	68	ns
fasting plasma glucose(mol/l)				
95-110	35	46	35	ns
110-126	28	19	27	ns
126-140	16	7	14	ns
140-160	7	12	10	ns
fasting plasma insulin(mol/l)				
<9	9	12	12	ns
9-20	67	55	62	ns
>20	10	16	12	ns
hemoglobin a1c				
<2.9	30	30	32	ns
2.9-4.6	47	42	41	ns
>4.6	9	12	13	ns
Body mass index				
<23(normal)	8	6	12	ns
23-25(moderately obese)	25	30	26	ns
25-28(obese)	32	30	28	ns
>28(severely obese)	21	18	20	ns
Alcohol consumption(drinks per day)				
0(no alcohol in past 7 days)	59	58	67	ns
1-2	13	12	4	ns
3-4	5	2	3	ns
>=5	9	12	12	ns

Table5 sex-specific characteristics of 256 Participants in the study

Characteristic	men		women		p
	Number	percent(%)	Number	percent(%)	
Age(year)					
35-45	28	21.88	25	19.53	ns
46-55	27	21.09	50	39.06	ns
56-65	73	57.03	53	41.41	ns
Educaton(year)					
<5	5	1.95	16	6.25	ns
6-11	19	7.42	27	10.55	ns
11-15	25	9.77	28	10.94	ns
>=15	79	30.86	57	22.27	ns
Income(ken)					
<300	1	0.39	3	1.17	ns
300-1000	59	23.05	59	23.05	ns
>1000	61	23.83	61	23.83	ns
>3000	7	2.73	5	1.95	ns
Occupation					
officer	25	9.77	34	13.28	ns
worker	27	10.55	24	9.38	ns
teacher	52	20.31	24	9.38	ns
bussiness	0	0.00	1	0.39	ns
retired	24	9.38	41	16.02	ns
others	0	0.00	4	1.56	ns

Table 6 sex-specific prevalence of 256 Participants in the study

Risk Factor	men		women		p
	Number	percent(%)	Number	percent(%)	
smokers	46	18.04	7	2.75	*
history of pregnancy diabetes	0	0.00	1	0.88	ns
history of babies over 4kg	0	0.00	18	14.52	ns
History of hypertension	28	10.94	34	13.28	ns
History of CHD	14	5.49	16	6.27	ns
History of DM	6	2.35	1	0.39	ns
History of hyperlipidemia	24	9.38	27	10.55	ns
History of stroke	2	0.78	2	0.78	ns
History of liver and kidney	21	8.20	21	8.20	ns
Family history					
paesent	21	8.20	27	10.55	ns
chidren	0	0.00	1	0.39	ns
sister and brother	17	6.64	16	6.25	ns
grandmother and father	5	1.95	4	1.56	ns
Systoelic blood pressure(mmHg)					
<140	89	34.77	91	35.55	ns
140-160	30	11.72	21	8.20	ns
>160	9	3.52	16	6.25	ns
Diastolic blood pressure(mmHg)					
<90	70	27.34	90	35.16	ns
>= 90	35	13.67	28	10.94	ns
Total cholesterol(mg/dl)					
<200	60	23.53	43	16.86	ns
200-240	30	11.76	31	12.16	ns
>240	37	14.51	54	21.18	ns
Triglycerides(mg/dl)					
<150	64	25.10	69	27.06	ns
>=150	63	24.71	59	23.14	ns
HDL cholesterol(mg/dl)					
=<35	23	9.02	5	1.96	*
35-50	25	9.80	11	4.31	ns
>50	79	30.98	112	43.92	ns
fasting plasma glucose(mol/l)					
95-110	57	22.27	59	23.05	ns
110-126	34	13.28	40	15.63	ns
126-140	20	7.81	17	6.64	ns
140-160	17	6.64	12	4.69	ns
fasting plasma insulin(mol/l)					
<9	22	8.63	11	4.31	ns
9-20	85	33.33	99	38.82	ns
>20	20	7.84	18	7.06	ns
HbA1c					
<2.9	42	16.41	50	19.53	ns
2.9-4.6	66	25.78	64	25.00	ns
>4.6	20	7.81	14	5.47	ns
Body mass index					
<23(normal)	12	4.69	14	5.47	ns
23-25(moderately obese)	45	17.58	36	14.06	ns
25-28(obese)	46	17.97	44	17.19	ns
>28(severely obese)	25	9.77	34	13.28	ns

Table 7 Characteristics of the diet at baseline(mean \pm std)

Characteristics	control group	pedometer control group	intervention group	p
Energy intake(kcal)	2038 \pm 644	1945 \pm 596	1970 \pm 638	ns
Carbohydrates(g)	577 \pm 191	540 \pm 186	552 \pm 189	ns
Protein(g)	90 \pm 31	85 \pm 24	89 \pm 31	ns
Fat(g)	74 \pm 31	76 \pm 32	77 \pm 36	ns
Alcohol(g)	52 \pm 146	29 \pm 93	44 \pm 148	ns

日本財団補助金による
1998年度日中医学協力事業報告書

—在留中国人研究者研究助成—

1999年 3 月 25 日

財団法人 日中医学協会
理事長 中島章殿

研究室で撮影した本人のスナップ写真、及び発表論文のコピーを添付

1. 研究者氏名 衛 鋼
研究機関 北大・医・癌研・遺伝子制御 研究指導者 葛巻暹 職名 教授
所在地 〒060 札幌市北区北5西9 電話 011-716-2111 内線 6053

研究テーマ 転写制御遺伝子GCFに特異的に結合する新しい蛋白質因子の構造と機能

2. 本年度の研究業績

FAX 011-706-7867

(1) 学会・研究会等における口頭発表 有 ・ 無 (学会名・内容)

(2) 学会誌等に発表した論文 有 ・ 無 (雑誌名・論文名)

1.. "Revision of cDNA and protein structures of transcription factor GCF"
Nucleic Acids Symposium Series No. 39 199-200

2. "Molecular Cloning of A Novel Human Protein that Binds Specifically
to Nuclear Factor GCF" Nucleic Acids Symposium Series No. 39 201-202

3. 今後の研究計画

We have cloned a novel human factor, D40, by two-hybrid system, but the function of D40 is still unknown. In order to understand the function of D40:

1. Spermatogenesis: Northern blotting shown that D40 is specifically transcribed in testis.

2. Tumor-specific antigen: The expression of D40 can be found in all tumor cell lines and several primary tumors.

4. 研究指導者の意見

申請者衛 鋼は、大学院医学研究科博士課程に在学中で、すでに新しい転写調節因子を見つけるという大きな業績をあげています。日中医学学术交流制度のお陰で、この研究を深め、学業に専念することをできています。

申請者は熱心に勉強しているとともに、日中両国の交流など課外活動にも積極的に参加しています。本人は将来、日本での研究成果を母国の発展に活かし、国の発展と医学の進歩に貢献したいとの決意を強く固めています。

研究指導者氏名

葛 卷 暹 

5. 研究報告

別紙形式を参考に、報告本文4000字以上で報告して下さい（枚数自由・ワープロ使用）
タイトル・要旨等は日本語で、KEY WORDS以下は日本語或いは英語で記入して下さい。
研究成果の発表予定がある場合は発表原稿・抄録集等を添付して下さい。
論文発表に当っては、日中医学協会－日本財団補助金による旨を明記して下さい。

転写制御因子GCFに特異的に結合するヒト細胞蛋白質D40の染色体マッピング

Gang Wei^{1, 2} and Noboru Kuzumaki¹ (Professor)

¹ Division of Gene Regulation, Cancer Institute, School of Medicine, Hokkaido University, Sapporo 060, Japan

² Thoracic Department of Surgery, Cancer Institute, Tianjin Medical University, People's Republic of China

「目的」我々は、D40が転写制御因子GCFに特異的に結合する新しいヒト蛋白質であることを報告してきた。今回、D40が癌を含む何らかの疾患に関与するか否かを検討するために、FISH法を用いてD40の染色体上の位置を決定することを試みた。

「方法と結果」染色体標本は正常人の抹消血リンパ球から作成した。プローブDNAとして、D40のcDNA全長にわたる複数のcDNAクローンを混合したものをを用いた。これをビオチン標識したプローブとハイブリダイズした後、抗ビオチン抗体およびFITC抗ヤギ抗体を用いてシグナルを増幅した。これを蛍光顕微鏡にて観察した。その結果、ヒト第15染色体14q13-15にマッピングされることがあきらかになった。

「結論」転写制御因子GCF結合蛋白質D40は、白血病などで異常が多く報告されているヒト第15染色体長腕に坐位する。

Key Words: Transcriptor, Chromosome

Gang Wei ^{1, 2} and Noboru Kuzumaki ¹ (Professor)

¹ Division of Gene Regulation, Cancer Institute, School of Medicine, Hokkaido University, Sapporo 060, Japan

² Thoracic Department of Surgery, Cancer Institute, Tianjin Medical University, People's Republic of China

The GC-factor (GCF) was firstly reported to be a transcriptional regulator that represses the transcription of the epidermal growth factor receptor (EGF-R) (1). It also regulates negatively expression of several other growth factor and receptor genes, including TGF- α and IGF-1R (2,3). It was reported that GCF could inhibit the growth of human gastric carcinoma cells in nude mice due to decrease in TGF- α expression (2). GCF is a phosphoprotein and predominantly localized in the nucleus (4). For several transcription factors, phosphorylation increases nuclear transport (5). GCF phosphorylation may be involved in its nuclear translocation. Phosphorylation may serve to induce binding to other regulatory proteins, regulate DNA binding, or activate a constitutively bound transcription factor (6). Since a Leucine-zipper like sequence that could mediate protein-protein interactions was found in the middle of the coding region of GCF gene, we have successfully used yeast two-hybrid system to isolate the gene encoding GCF related proteins. After screening of cDNA library derived from immortalized human B lymphocytes, a novel human cellular gene, GCF-BP(D40), that encoding protein specifically binds to GCF was cloned. Northern blot analysis indicated the testis-specific expression of GCF-BP(D40) and high expression in spermatocytes *in situ* hybridization (manuscript in preparation). To gain further insight into the function and possible relation to human diseases, we here determined the chromosomal assignment of the GCF-BP (D40) gene by fluorescence *in situ* hybridization (FISH).

Lymphocytes isolated from bloods of normal adult male human were cultured in a-minimal essential medium (MEM) supplemented with 10% fetal calf serum and 3ug/ml Concanavalin-A in 5% CO₂ at 37°C for 40h. The cultured lymphocytes were treated with Bromodeoxyuridine (30ug/ml) for 7.5h at 37°C. Colcemid was added during the incubation of

the final 30min (7). Cells were harvested and slides were prepared using standard procedures, including fixation and air drying.

For GCF-BP (D40) mapping, the five overlapped clones derived from colony hybridization that encodes to the full length cDNA of GCF-BP (D40) were used as probe. Fluorescence *in situ* hybridization (FISH) on R-banded chromosomes was performed as previously described (8). In general, metaphase spreads were prepared from concanavalin-A stimulated lymphocytes of normal male human after bromodeoxyuridine incorporation. Two hundred nanograms of mixed DNA probe was nick-translated with biotin-16-dUTP (Boehringer Mannheim) and hybridized *in situ* to metaphase chromosomes in the denatured chromosome on slides. After hybridization at 37°C for 48h, slides were washed in 50% formamide/0.5X SSC and 2X SSC sequentially. FISH signals were detected by sequential incubation with 3µg/ml anti-biotin goat IgG (Vector) and 40µg/ml FITC-conjugated anti-goat IgG (American Qualex). FITC signals were further amplified by the incubation with 40µg/ml anti-FITC goat IgG (Biomed) and FITC-conjugated anti-goat IgG. After a screening under microscope to check the hybridization efficiency, FISH signals and DAPI-banded chromosomes were photographed separately, and the assignment of FISH mapping data with chromosomal bands was obtained by superimposing FISH signals with DAPI-banded chromosomes.

Detailed analysis more than 10 individual chromosomes, the gene encoding GCF-BP (D40) maps to the chromosome 15q14-15. As shown in figure 1, fluorescence signals were detected mostly at the centromere region of chromosome 15. No any significant fluorescence signal was detected on other chromosomes. Chromosome 15 localization was further substantiated by simultaneous labeling with specific to the pericentromeric region of chromosome 15. Interestingly, cytogenetic observations and molecular studies have identified 15q11-13 as the critical regions for the Pader-Willi syndrome (PWS) and Angelman syndrome (AS) (9-10). The aberrations of chromosome 15q15 were observed in acute myeloid leukaemia (11). Recently, the tumor suppressor activity of human chromosome 15 was reported (12). Thus, this report may provide new clues to the understanding of human chromosome 15 associated genetic disorders.

Acknowledgements

We would like to thank Prof. Hiroyuki Kato for his great support to this work.

1. Kageyama, R., and Pastan, I. (1989). Molecular cloning and characterization of a human DNA binding factor that repress transcription. *Cell*, 59(5), 815-825.
2. Kitadai, Y., Yamazaki, H., Yasui, W., Kyo, E., Yokozaki, H., Kajiyama, G., Johnson, A. C., Pastan, I., and Tahara, E., (1993). GC factor represses transcription of several growth factor/receptor genes and causes growth inhibition of human gastric carcinoma cell lines. *Cell Growth Diff.* 4, 291-296.
3. Morrione, A., DeAngelis, T., and Baserga, R. (1995) The GC factor regulates the expression of the insulin-like growth factor-I receptor. *Cell Prolif.* 28: 659-671
4. Beguinot, L., Yamazaki, H., Pastan, I., and Johnson, A.C., (1995). Biochemical characterization of human GCF transcription factor in tumor cells. *Cell Growth Diff.* 6. 699-706.
5. Nigg, E. A., Baeuerle, P. A., and Luhrmann, R. (1991). Nuclear import-export: in search of signals and mechanisms. *Cell.* 66: 15-22.
6. Hunter, T., and Karin, M. (1992). The regulation of transcription by phosphorylation. *Cell.* 70: 375-387.
7. Takahashi, E., Hori, T., O'Connell, P., Leppret, M., and White, M. (1990). R-banding and nonisotopic in situ hybridization: Precise localization of the human type II collagen gene (COL2A1). *Hum. Genet.* 86: 14-16.
8. Yoshida, I., Kimura, H., and Takagi, N. (1996). The mouse Mcmd gene for DNA replication protein P1MCM3 maps to bands A3-A5 on chromosome 1 by fluorescence in situ hybridization. *Genomics*, 32, 483-484.
9. Magenis, R. E., Brown, M. G., Lacy, D. A., Budden, S., and LaFranchi, S. (1987). Is Angelman syndrome an alternate result of del (15) (q11q13) ? *Am. J. Med. Genet.* 28: 829-838.
10. Pernbrey, M., Fennell, S. J., van den Berghe, J., Fitchett, M., Summers, D., Butler, L., Clarke C., Griffiths, M. (1989). The association of Angelman's syndrome with deletions within 15q11-13. *J. Med. Genet.* 26: 73-77.
11. Mitelman, F., Mertens, F., and Johansson, B. (1997). A breakpoint map of recurrent chromosomal rearrangements in human neoplasia. *Nature Genet.* 15, 417-474.

12. Boukamp, P., Bleuel, K., Peeper, S., Vormwald-Dogan, V., and Fusenig, N. E. (1997). Functional evidence for tumor-suppressor activity on chromosome 15 in human skin carcinoma cells and thrombospondin-1 as the potential suppressor. *J. Cell Physiol.* 173: 256-260.

日本財団補助金による
1998年度日中医学協力事業報告書

－在留中国人研究者研究助成－

1999年3月10日

財団法人 日中医学協会
理事長 中島章 殿

研究室で撮影した本人のスナップ写真、及び発表論文のコピーを添付

1. 研究者氏名 寸 暉
研究機関 名古屋市立大学 研究指導者 太田伸生 職名 教授
所在地 〒467-8601 名古屋市瑞穂区瑞穂町字川原 電話 052-853-8186 内線 _____
研究テーマ 熱帯熱マラリア MSP1 の免疫生物学とそのワクチン応用に関する研究

2. 本年度の研究業績

(1) 学会・研究会等における口頭発表 ・ 無 (学会名・内容)

第 67 回 日本寄生虫学会大会

固相化ペプチドを用いた熱帯熱マラリア MSP1 のヒトヘルペ
T エピトープのスクリーニング

第 9 回 国際寄生虫学会 (Ninth International Congress Of Parasitology)

Analysis of T-cell epitopes on MSP1 of *plasmodium falciparum*
with SPOT method of simultaneous peptide synthesis on
cellulose membrane

(2) 学会誌等に発表した論文 ・ 無 (雑誌名・論文名)

PARASITOLOGY INTERNATIONAL VOL.47 Supplement, August 1998

Analysis of T-cell epitopes on MSP1 of *plasmodium falciparum*
with SPOT method of simultaneous peptide synthesis on
cellulose membrane

3. 今後の研究計画

MSP1 に対する宿主免疫応答がマラリアの感染防御および発病調節に関与する免疫生物学的意義を検討する。今後特に問題となる以下の点であるので、その問題解決を目指したい。

- (1) ワクチン応用が考えられている MSP1 のブロック 17 に対する免疫応答のうち、感染防御と直接関係する宿主応答を明らかにする。特にエピトープの比較検討、抗体のアイソタイプとの相関などをマラリア流行地住民を対象に進める。
- (2) MSP1 の分子多型が宿主の免疫応答に及ぼす影響を解析する。これまでの検討で、MSP1 の T 細胞エピトープ、B 細胞エピトープの解析を進めて来ているが、免疫標的蛋白質の分子多型は宿主免疫を不応答状態に誘導する可能性もあるので、その点を実験的に検討したい。
- (3) MSP1 のブロック 17 について、免疫応答標的となるエピトープペプチドのモチーフ解析を行い、アナログペプチドによって生ずる免疫応答パターンの修飾を解析する。

以上の解析を通じて、MSP1 をワクチンとして実用化するために課題として残っている問題を解析していく計画である。

4. 研究指導者の意見

付 軍にはヒト寄生虫感染の免疫応答の解析のモデルとして、マラリアをテーマとして与えた。従来からマラリア流行地住民のマラリア発症に免疫応答が関与すること、MSP1 に対する抗体産生がその指標となりうることなどの情報があったが、今年度の付の研究によって MSP1 の中でも特定の領域に対する抗体産生低下することが発症と関連があること、マラリアの症状を示した人とそうでない人とでは MSP1 に対する抗体でも標的エピトープに質的な違いがあることなど、この方面の研究に新しい情報を与える結果となったことは値すると考えている。

付 軍は来日以来、経済的に苦しい環境にも関わらず真面目に研究に励み、アルバイトに忙殺されることなく努力してきた。大学の研究室での人間関係、居住地住民との人間付き合いなど、日本留学の機会を自らの国際理解のために大いに活用しており、また私達日本人にとっても良い影響を与えてくれている。このまま日本で十分に研究を進展させることができるように、引き続き本人の経済的支援が得られるように指導教員としても強く希望している。

研究指導者氏名 太田 伸生



5. 研究報告

別紙形式を参考に、報告本文4000字以上で報告して下さい（枚数自由・ワープロ使用）

タイトル・要旨等は日本語で、KEY WORDS以下は日本語或いは英語で記入して下さい。

研究成果の発表予定がある場合は発表原稿・抄録集等を添付して下さい。

論文発表に当っては、日中医学協会－日本財団補助金による旨を明記して下さい。

熱帯熱マラリア感染者の症状発現とメロゾイト表面抗原 MSP1 に対する IgG 抗体産生

研究者：付軍

中国での所属：天津中医学院第一付属病院 役職：内科医師

日本での指導者：太田伸生

所属：名古屋市立大学 役職：教授

要旨

ソロモン諸島ガダルカナル島は holo-endemic ともいわれるマラリアの濃厚流行地 0 である。マラリア流行地の住民は一定の抵抗性を獲得しており、感染による症状は非流行地住民と比較して一般に軽微であるが、実際の症状発現には住民集団内でも多様性が見られる。我々はマラリアの症状発現に宿主免疫応答の多様性が関与している可能性を調べるために、熱帯熱マラリア (Pf) のスライド陽性住民の MSP1 に対する IgG 抗体産生の差異を測定して、症状の程度と比較した。

ガダルカナル島の Pf 陽性者のうち発熱、頭痛、悪寒、嘔吐を呈したものを有症状群、それ以外を無症状群とした。無症状群の多くは日常の仕事やスポーツを支障なく行っている。この 2 群について、MSP1 の N 末端 6 ブロックに対する IgG を ELISA で測定した。両群間の年齢、性の構成比率には差がなかった。マラリア即往のない日本人血清の結果を基に陽性判定を行った場合、有症状群では MSP1 に対する抗体陰性者の頻度が有意に高かった。対照としたポリオウイルスに対する抗体産生では、2 群間でまったく差がなかった。マラリアに対する抗体価は変動するパラメータである可能性があるが、1 年間隔で採取できたガダルカナルの住民血清サンプルの比較では大きな変動は見られず、ソロモンのようなマラリア流行の季節変動が小さい流行地では抗体をある程度安定した免疫学的パラメータと考えてよいと思われた。

以上の結果から、Pf 感染時の MSP1 に対する低い IgG 応答性は症状発現と何らかの関係を持つ可能性が示唆された。この低応答性が症状発現の原因であるのか、逆にその結果であるのかは今後継続して検討する必要がある。この現象の医学生物学的意味づけについては MSP1 の感染防御における機能との関連から考察する予定である。

キーワード：熱帯熱マラリア；IgG；MSP1；ポリオウイルス。

1. Introduction

The presence of protective immunity to malaria parasites is highly probable in humans, however, details are still controversial. A number of factors contributing to protective immunity are speculated, and age, sex, and/or race including genetic background have been analyzed [1-3]. It is commonly noticed that many people infected with malaria parasites have no clinical symptoms in malaria-endemic areas, and 60-70% of parasite-positive inhabitants in endemic areas are thought to be healthy carriers [4]. Guadalcanal, the Solomon Islands, is the most severely endemic place of malaria in the world, and the annual incidence of malaria is reported to be more than 300 per 1,000 population [5]. It is also common that many malaria-positive people in Guadalcanal are free from clinical symptoms. Such observation clearly shows that protective immunity to malaria contains two different concepts; inhibiting infection and protection from disease onset.

Immune responses to malaria antigens seem to be important in both two concepts of protective immunity [6,7]. Previous studies suggest that antibody responses to malaria antigens including MSP1, CSP, and RESA are impaired in symptomatic patients with falciparum malaria compared with asymptomatic individuals [4]. MSP1, major merozoite surface glycoprotein, is one of the most immunodominant malaria antigens during their asexual erythrocytic stage. To analyze in detail the malaria-specific antibody as an immunological parameter in the pathogenesis, we compared IgG antibody responses to recombinant MSP1 molecules between symptomatic and asymptomatic groups in Guadalcanal, both are infected with *Plasmodium falciparum*. We observed that impairment in antibody response in symptomatic group is malaria-specific, however, antigen molecules or epitopes to which immune responses are impaired might be selected. Biological significance of such phenomena will be discussed.

2. Materials and Methods

2.1. Studied subjects

Subjects tested in the present study were people of Guadalcanal, the Solomon Islands, where transmission of malaria is in hyper-endemic state [8]. There is little or no seasonal difference in the endemicity, therefore, people in the island seem to be at high risk for infection with *P. falciparum* whole year through. We collected blood samples by using EDTA as anti-coagulant from 67 Solomon's donors under the informed consent, all of whom were slide-positive for *P. falciparum* in microscopic observation. Of 67 tested subjects, 44 were random subjects of symptom-free carrier individuals, and 23 were patients with clinical symptoms who visited clinics because of high fever ($>38^{\circ}\text{C}$), chill, head ache, and/or vomiting. There was no significant difference in the sex ratio and age between the two groups; male-female ratio was 12:11 in symptomatic and 26:18 in asymptomatic group, and mean age was 15.7 (median 14) yr in symptomatic and 22.0 (median 18) yr in asymptomatic group. Mean parasite density (PD) in the symptomatic group was $212 \pm 610/200$ white blood cells (WBC). It was higher than that in asymptomatic group, $24.1/200$ WBC, although not all the asymptomatic subjects were examined for PD. We collected sera from 20 healthy Japanese donors, who were never exposed to malaria, as negative controls.

2.2. Antigens used in ELISA

We measured IgG antibody levels to MSP1 in ELISA. MSP1 used in this study was of MAD 20 allele [9], and are recombinant proteins of the amino-terminal region containing blocks 1 through 6 (M1/6), a monomorphic block 3 (M3) and a dimorphic block 6 (M6) [10]. We adjusted the concentration of each preparation of MSP1 to be 5.

$\mu\text{g/ml}$, and tested each plasma at 100-times dilution. We used horse-radish peroxidase-conjugated goat anti-human IgG as the second antibody (Cappel, Durham, USA), and after we added o-phenylenediamine (Sigma, St. Louis, USA) as a substrate, OD value at 492 nm was measured. We tentatively determined positive responses when OD value is higher than the mean OD value plus 3 SD of the Japanese negative control sera.

2.3. *Neutralizing antibody to polio virus*

As a positive control, neutralizing antibodies to type III polio virus were measured by indirect hemagglutination test. People in Guadalcanal were immunized with polio vaccine, and almost all are expected to be antibody-positive. We determined positive responses when titers are $\times 4$ or more.

2.4. *Statistical analysis*

Statistical analysis was done by Student's t-test or by χ^2 test.

3. Results and Discussion

We observed impaired IgG antibody production to MSP1 in symptomatic donors compared with that in asymptomatic group. Difference in the mean OD value was statistically significant ($p < 0.001$) (Fig.1). Frequency of antibody-negative donors was also significantly higher in the symptomatic group (34.8% vs 2.27%) ($p < 0.01$). Such impaired antibody response in the symptomatic group was malaria-specific because we observed almost same mean antibody titers to polio virus in the two groups (Fig.2). We further measured IgG antibody levels to two blocks of the amino-terminal region of

MSP1. Dimorphic M6 was thought to be highly immunogenic for cellular and humoral responses in humans compared with monomorphic M3 [11,12]. Our present observation was consistent with previous study by Frue et al. [12] that M6 was more immunogenic for IgG response than M3, however, the symptomatic group showed deeply suppressed IgG responses only for M6 ($p < 0.01$) (Table 1). Furthermore, responsiveness to M3 and M6 was discordant each other in the symptomatic group ($p < 0.05$) (Table 1).

The exact explanation for the present observation remains uncertain. It is not clear whether such low antibody response caused higher parasitemia as in symptomatic individuals. Alternatively, a possibility of immune suppression mediated by malaria parasites can not be ruled out [13]. The carboxyl-terminal block of MSP1 is suggested to be directly involved in MSP1-mediated protective immunity [14], while biological roles of the amino-terminal region remain unclear. It is interesting to note that there was no significant suppression in IgG level to M3 (Table 1), because antibodies to M3 were reported to inhibit protective immunity induced by the carboxyl-terminal region of MSP1 [15]. It is needed to analyze more detailed biological roles of the amino-terminal region of MSP1 to discuss the biological roles of those impaired immune responses in symptomatic patients.

Another interesting point to see is whether such impaired antibody response is a temporal or fixed phenomenon. Antibody titers have tight relationship with age of human hosts [1]. In this study, we compared two groups of which age distribution was not significantly different, however, asymptomatic group was older than symptomatic group. We have to consider this factor before getting final conclusion. Fluctuation of antibody level in a malaria endemic area should be also considered [12]. Endemicity in Guadalcanal shows only a faint seasonal difference. In this study, serum samples were collected twice with an interval of nearly one year from some of asymptomatic donors. Mean OD values of those sera were almost stable (Table 2), suggesting that MSP1-

specific IgG seems to be a relatively stable immunological parameter in Guadalcanal. It is possible to suppose that high PD caused consumption of specific antibodies in sera of the patient group [16]. It is, however, not likely the case because we observed cases showing weak IgG levels to M6 but high M3-specific IgG, or vice versa. It is rather probable that complicated regulatory mechanisms induced the impaired immune responses to some particular epitopes. Immunogenetic factors could be involved in such regulation [17]. We are planning to test MSP1-specific antibody levels in the symptomatic groups after their recovery from clinical symptoms. It is also interesting to do a follow-up study whether asymptomatic individuals with low IgG levels develop clinical symptoms in near future.

In conclusion, impaired antibody response to MSP1 of *P. falciparum* could be a risk factor for developing clinical symptoms in the holo-endemic Guadalcanal. Regulatory system involved in the present phenomenon is malaria-specific, however, there might be regulatory system specific for selective epitopes in case of antibody response to MSP1. Target epitopes of MSP1 for this immunoregulation could be involved in immunopathogenesis as well as protective immunity during falciparum malaria.

References

1. Barid, J.K. (1995) Host age as a determinant of naturally acquired immunity to *Plasmodium falciparum*. *Parasitol. Today*. 11, 105-111.
2. Taylor-Robinson, A.W. and Phillips, R.S. (1993) Anti-malarial antibodies in twins. *Parasitol. Today*. 9. 1-2.
3. Boudin, C., Chumpitazi, M., Peyron, F., Picot, B., Hogh, B. and Ambroise-Thomas, P. (1993) Possible role of specific immunoglobulin M antibodies to *Plasmodium falciparum* antigens in immunoprotection of humans living in a hyperendemic area, Burkina Faso. *J. Clin. Microbiol.* 31, 636-641.
4. Hogh, B. (1996) Clinical and parasitological studies on immunity to *Plasmodium falciparum* malaria in children. *Scand. J. Infect. Dis.* 102(Suppl), 1-53.
5. World malaria situation in 1992 - Part III. *In: Weekly Epidemiological Record* 1994 (WHO). 69, 325-330.
6. Ferrante, A. and Rzepczyk, C.M. (1997) Atypical IgG subclass antibody responses to *Plasmodium falciparum* asexual stage antigens. *Parasitol. Today*. 13, 145-148.
7. Willmann, K., Matile, H., Weiss, N.A., Imhof, B.A. (1995) In vivo sequestration of *Plasmodium falciparum* -infected human erythrocytes: a severe combined immunodeficiency mouse model for cerebral malaria. *J. Exp. Med.* 182, 643-653.
8. Nukuro, E.T. (1989) Country Report (part 1), Solomon Islands. Regional workshop on malaria control. WHO WPR/MAL (1) 89.10.28 July 1989, p.14.
9. Tanabe, K., Mackay, M., Goman, M. and Scaife, J.G. (1987) Allelic dimorphism in a surface antigen gene of the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *J. Mol. Biol.* 195, 273-287.
10. Ohta, N., Iwaki, K., Itoh, M., Fu, J., Nakashima, S., Hato, M., Tolle, R., Bujard, H., Saitoh, A. and Tanabe, K. (1997) Epitope analysis of human T-cell response to MSP-1 of *Plasmodium falciparum* in malaria-nonexposed individuals.

- Int. Arch. Allergy Immunol. 36, in press.
11. Fu, J., Kunimatsu, M., Leafasia, J.L., Kere, N., Tanabe, K., Hirayama, K., Ishii, A., Saito-Ito, A., Sasazki, M. and Ohta, N. (1997) MSP1-reactive T cells in individuals in malaria endemic Solomon area and in non-immune Japanese. *Parasitol Int.* 46, 7-16.
 12. Frue, K., Doumbo, O., Muller H-M., Koita O., McBride, J., Crisanti, A., Toure, Y. and Bujard, H. (1991) Human antibody response to the major merozoite surface antigen of *Plasmodium falciparum* is strain specific and short lived. *Infect. Immunity.* 59, 1319-1324.
 13. Blackman, M.J., Heidrich, H.G., Donachie, S., McBride, J.S. and Holder, A.A. (1990) A single fragment of a malaria merozoite surface protein remained on the parasite during red cell invasion and is the target invasion blocking antibodies. *J. Exp. Med.* 172, 379-382.
 14. Chang, S.P., Gibson, H.L., Lee-ng, C.T., Barr, P.J. and Hui, G.S.N. (1992) A carboxyl-terminal fragment of *Plasmodium falciparum* gp195 expressed by a recombinant baculovirus induces antibodies that completely inhibit parasite growth. *J. Immunol.* 149, 548-555.
 15. Holder, A.A. (1996) The potential of merozoite surface protein 1 as a malaria vaccine candidate. In: Abstracts of XIV the Int. Cong. Trop. Med. Malaria. Nov. 1996, Nagasaki, pp.24.
 16. Petersen, E., Hogh, B., Perlmann, H., Kabilan, L., Troye-Blomberg, M., Marbiah, N.T., Hanson, A.P., Bjorkman, A. and Perlmann, P. (1989) An epidemiological study of humoral and cell-mediated immune response to the *Plasmodium falciparum* antigen PF155/RESA in adult Liberians. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 41, 386-394.
 17. Hill, A.V.S., Allsopp, C.E.M., Kwiatkowski, D., Anstey, N.M., Twumasi, P., Rowe, P.A., Benett, S., Brewster, D., McMichael, A.J. and Greenwood, B.M. (1991) Common west African HLA antigens are associated with protection from

Table 1.

Heterogeneous IgG responses to M3 and M6 blocks of MSP1 in symptomatic patients with falciparum malaria in Guadalcanal.

Subjects	Positive response to			Responses to M3/M6			
	M1/6	M3	M6	+/+	+/-	-/+	-/-
Symptomatic (N=23)	15 (65.2%)	13 (56.5%)	11 (47.8%)	9	4	2	8
Asymptomatic (N=18)	18 (100%)	15 (83.3%)	17 (94.4%)				

p value	<0.01	ns*	<0.01	<0.05			

* not significant

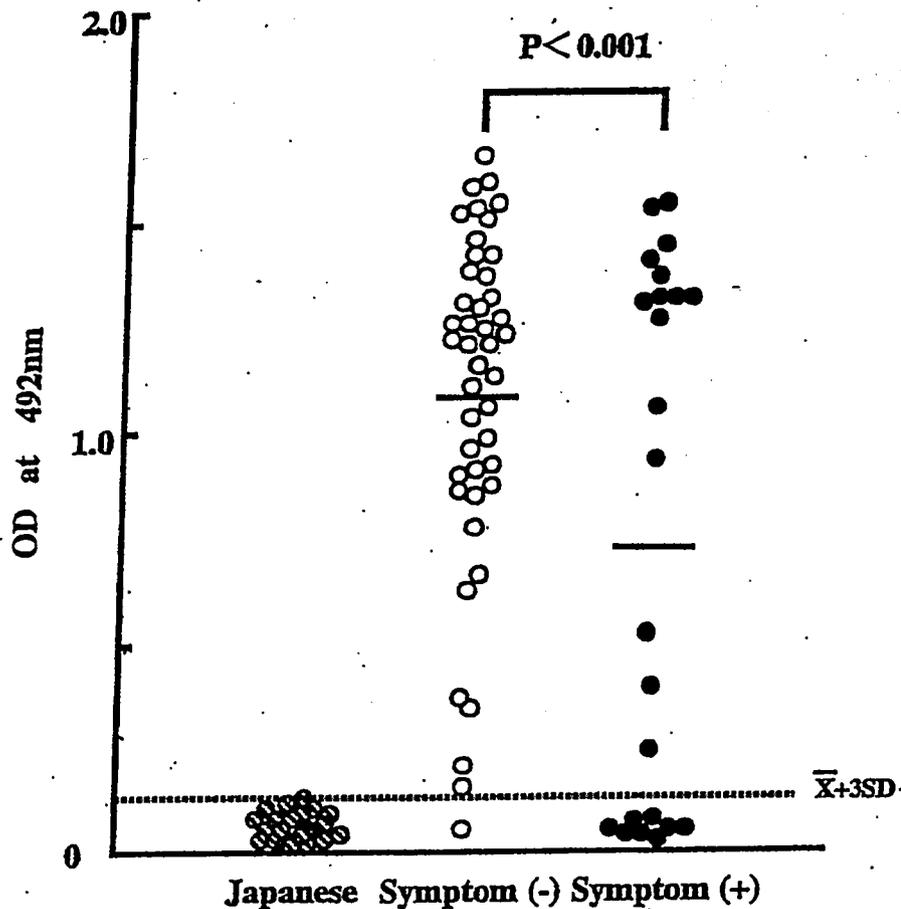
Table 2.

Comparison of MSP1-specific IgG antibodies in asymptomatic donors in plasma samples collected in two different years in Guadalcanal.

Subject ID	Age	Sex	OD values in ELISA	
			in 1994	in 1995
205	23	female	0.611	0.643
206	60	male	1.24	1.12
235	44	female	0.852	1.16
248	50	female	1.19	1.18
402	7	male	0.112	0.161
403	18	male	1.03	1.23
417	11	female	0.47	0.111
418	11	male	1.18	1.27
424	35	male	1.18	0.991

Figure 1.

MSP1-specific IgG antibodies in symptomatic and asymptomatic individuals infected with *P. falciparum*. MSP1-specific IgG level in symptomatic group was significantly low compared with asymptomatic donors ($p < 0.001$). Cutoff line for positive IgG level was tentatively determined as the mean OD value + 3 SD of the Japanese negative controls. More than 1/3 of symptomatic cases were negative for MSP1, and the frequency of negative cases significantly elevated in the symptomatic group ($p < 0.01$).



日本財団補助金による
1998年度日中医学協力事業報告書

-在留中国人研究者研究助成-

1999年3月19日

財団法人 日中医学協会
理事長 中島章殿

研究室で撮影した本人のスナップ写真、及び発表論文のコピーを添付

1. 研究者氏名 朱 偉東
研究機関 東京大学医学部循環器内科 研究指導者 小室一成 職名 講師
所在地 東京都文京区本郷7-3-1 電話 03-3815-5411 内線 5013
① 抗血小板薬による心臓障害の分子機構
研究テーマ ② 液性因子による心肥大発生の分子機構

2. 本年度の研究業績

(1) 学会・研究会等における口頭発表 有 ・ 無 (学会名・内容)

学会名: 第63回日本循環器学会総会・学術集会
内容: 別紙

(2) 学会誌等に発表した論文 有 ・ 無 (雑誌名・論文名)

別紙 (アメリカの Circulation 誌、投稿中)

3. 今後の研究計画

別紙

4. 研究指導者の意見

朱 偉東さんは

- 1、研究レポートの提出期限を守ります。
- 2、自分の意見を進んで発表します。
- 3、他人の意見をよく聞き、必要なら積極的に取り入れます。
- 4、共同研究では皆の意見をまとめます。

彼は現在の研究を今後発展させ、将来博士号を取得できると考えています。また、彼は社会性があり、将来中国医学の担い手となることができると思います。

研究指導者氏名

小室一成 

5. 研究報告

別紙形式を参考に、報告本文4000字以上で報告して下さい（枚数自由・ワープロ使用）

タイトル・要旨等は日本語で、KEY WORDS以下は日本語或いは英語で記入して下さい。

研究成果の発表予定がある場合は発表原稿・抄録集等を添付して下さい。

論文発表に当たっては、日中医学協会－日本財団補助金による旨を明記して下さい。

抗癌剤ダウノマイシン(DM)による心筋細胞アポトーシスの発症
機序—MAPキナーゼ(MAPK)スーパーファミリーの関与—

朱 偉東

中国大連四〇六病院循環器内科 医師

小室一成

日本東京大学循環器内科 講師

要旨

抗癌剤ダウノマイシン (DM) による非可逆性心筋障害は致死的であり、その病態解明と予防・治療法の開発が急務となっている。最近、心不全やある種の心筋症において心筋細胞にアポトーシスが起きていることが報告され、その病態形成における役割が注目されている¹⁾。また、mitogen-activated protein kinase (MAPK) の新しいファミリーである C-Jun NH₂-terminal kinase (JNK) と p38MAPK が同定され、その働きのひとつとしてアポトーシスとの関連が報告されている²⁾。一方、われわれは、DM による心筋障害の一因として知られている活性酸素が p38MAPK を介して培養心筋にアポトーシスによる細胞死を誘導することが報告した³⁾。そこで今回、DM による心筋細胞アポトーシスと MAP キナーゼファミリーの関係をさらに詳細に解析した。

KEY WORDS

ダウノマイシン, 心筋細胞, アポトーシス, MAP キナーゼファミリー, 活性酸素.

目的

DM は心筋細胞に傷害を与え、心不全が引き起こされます。この心不全はDM治療における致命的な副作用の一つとして挙げられます。この発症機序の解明を目指し、我々は、DM による心筋細胞アポトーシスと MAP キナーゼファミリーの関係を解析する。

方法

1) MAP キナーゼ活性測定

ERK と p38MAPK は myelin basic protein (MBP) を、JNK は c-Jun 蛋白を基質にしてその活性を測定した。さらに、p38MAPK についてはリン酸化 p38MAPK を特異的に認識する抗体によってそのリン酸化について検討した。

2) 心筋細胞のアポトーシスの検出

DM 最終濃度 10^{-6} M で 24 時間の刺激を行い、4% パラフォルムアルデヒドにて固定し、心筋細胞の細胞質をミオシンに対する抗体を用いて、また核を TUNEL 法にて二重染色を行った。さらに DNA の電気泳動を行い、ladder 形成の有無を調べた。

結果

1) 心筋細胞のアポトーシス

10^{-6} M DM 刺激により、心筋細胞に多数の TUNEL 陽性像 (24%) が確認された。コントロールの培養心筋の染色像では TUNEL 陽性像 (3%) はほとんど確認されなかった。アガロースゲル電気泳動法では、アポトーシスに特徴的な ladder formation が 10^{-6} M DM 刺激で見られた。

2) MAP キナーゼの活性化

次に DM に誘導されたアポトーシスの形成機序を解析するために、細胞の増殖・分化・アポトーシスに重要な役割を果たしている MAP キナーゼファミリーの活性について検討した。MAP キナーゼのうち、ERK、JNK、p38MAPK はいずれも活性化されたが、ERK は 15 分にその活性のピークを認め、JNK と p38MAPK は 30 分に認めた。また 10^{-6} - 10^{-3} M の範囲において濃度依存性に活性化された。

次に ERK と p38MAPK の上流について解析を行った。種々の細胞において Ras、

Raf-1 は成長因子などの刺激により ERK の上流で活性化されることが知られて

いるが⁴⁾、Ras、Raf-1 の dominant-negative mutant (D.N.) の過剰発現によって、DM 刺激による ERK の活性化は抑制された。一方、DM 刺激による p38MAPK の活性化は Ras、Raf-1 の D.N. では抑制されず、Rho ファミリー (RhoA, Rac1, Cdc42) の D.N. や、Rho を不活性化の状態のままにしてその機能を抑制する Rho GDP dissociation inhibition (RhoGDI) の過剰発現により部分的に抑制された。また逆に Rho ファミリーの抑制は ERK の活性化に影響を与えなかった。このことから ERK の上流に Ras、Raf-1 蛋白が存在し、p38MAPK の上流に Rho 蛋白が存在することが示唆された。

さらに DM による ERK と p38MAPK の活性化のメカニズムを明らかにするために、フリーラジカル消去剤 (OH の消去剤 DMSO ; H_2O_2 を還元する Catalase ; OH, H_2O_2 と O_2^- をともに消去する N-(2-mercaptopropionyl)-glycine) 及び細胞内及び細胞外 Ca^{2+} キレート剤 BAPTA-AM と EGTA にて前処置すると、ERK と p38MAPK の活性化が抑制された。一方、PKC、PKA、チロシンキナーゼの阻害薬の前処置では、ERK と p38MAPK の活性化は抑制されなかった。

3) MAP キナーゼの役割

DM 刺激により心筋細胞は一部、細胞質の縮小、核の濃染、縮小といった形態学的にアポトーシスを示し、DNA の ladder 形成も認められた。ERK の特異的な阻害剤である PD98059 の前処置によりアポトーシスを示す細胞数は増加し、DNA の ladder の形成は増加した。逆に、p38MAPK の特異的な阻害剤である SB203580 の前処置によりアポトーシスを示す細胞数は減少し、DNA の ladder の形成も減少した。

考察

近年、細胞内の最も基本的なシグナル伝達経路を構成すると考えられてきた MAP キナーゼのファミリー (ERK, JNK, p38MAPK) がアポトーシスと関連しているとの報告がいくつかなされている²⁾。in vitro の研究により、ERK の活性化が心肥大や心肥大時の遺伝子発現に重要であると報告され⁵⁾、JNK/p38MAPK の活性化がアポトーシスの誘導に重要であると報告された²⁾。今回の結果により、ラットの培養心筋細胞における抗癌剤 DM 刺激によりアポトーシスが起きていることが生化学的及び形態学的に証明された。DM により産生されたフリーラジカル (H_2O_2 と OH) が心筋細胞障害を引き起こすことがフリーラジカル消去剤により明らかとなったがその過程において ERK は細胞保護に、p38MAPK は障害に働いていることが示唆された。ERK の上流には

Ras-Raf-1 が、p38MAPK の上流には Rho が存在することも判明した。

Rho 蛋白は最近、細胞の骨格や接着を制御する機能を有することで注目されてきた低分子量 G 蛋白であり、種々の細胞で JNK 及び p38MAPK のカスケードの上流にあることが報告されている⁵⁾。DM による p38MAPK の活性化を Rho 蛋白の dominant-negative mutant が抑制することより、心筋細胞における DM 刺激のシグナル伝達においても重要な役割を果たしていることが示唆された。どのように Rho 蛋白が活性化されるか、また p38MAPK を活性化するかは今後の課題である。

Ca²⁺ は細胞内の情報伝達系の中で普遍的なシグナル物質として働いている。細胞内或いは細胞外 Ca²⁺ キレート剤にて前処置すると、ERK と p38MAPK の活性化が同時に抑制されたことから、Ca²⁺ は ERK と p38MAPK の共通の上流に存在することが示唆された。Ca²⁺ が DM による MAPK ファミリーの活性化にどのように関与するのかを今後検討する予定である。また、どのような機序で ERK が細胞保護に、p38MAPK がアポトーシス誘導に働いているかについても、今後の検討課題である。

参考文献

- 1) Wilson SC: Apoptosis in the heart. *N. Engl. J. Med.* 335: 1224-1226, 1996.
- 2) Xia Z, Dickens M, Raingeaud J, et al.: Opposing effects of ERK and JNK-p38 MAP kinases on apoptosis. *Science* 270: 1326-1331, 1995.
- 3) Aikawa R, Komuro I, Yazaki Y, et al.: Oxidative stress activates extracellular signal-regulated kinases through Src and Ras in cultured cardiac myocytes of neonatal rats. *J. Clin. Invest* 100: 1813-1821, 1997.
- 4) Rozakis-Adcock M, McGlade J, Mbamalu G, et al.: Association of the Shc and Grb2/Sem5 SH2-containing proteins is implicated in activation of the Ras pathway by tyrosine kinases. *Nature* 360: 689-692, 1992.
- 5) Hall A: Small GTP-binding proteins and the regulation of the actin cytoskeleton. *Annu. Rev. Cell Biol.* 10: 31-54, 1994.
- 6) Glennon PE, Kaddoura S, Sale EM, et al.: Depletion of mitogen-activated protein kinase using an antisense oligodeoxynucleotide approach downregulates the phenylephrine-induced hypertrophic response in rat cardiac myocytes. *Circ. Res.* 78: 954-961, 1996.

研究計画書

(一) 研究の背景及び目的

1 抗癌剤ダウノマイシン (DM) による非可逆性心筋障害は致死的であり、その病態解明と予防・治療法の開発が急務となっている。最近、心不全やある種の心筋症において心筋細胞にアポトーシスが起きていることが報告され、その病態形成における役割が注目されている。また、mitogen-activated protein kinase (MAPK) の新しいファミリーである C-Jun NH₂-terminal kinase (JNK) と p38MAPK が同定され、その働きのひとつとしてアポトーシスとの関連が報告されている。そこで本研究は、DM による心筋細胞アポトーシスと MAP キナーゼファミリーの関係を詳細に解析する。

2 高血圧の持続によって標的臓器に障害が起こり、その結果脳卒中、心筋梗塞、高血圧性心不全、突然死、腎不全などが正常血圧者より高率に発症する。そのため本研究は、持続的な高血圧負荷に対する、心筋細胞の適応及び破綻現象について、分子機構の面から病態生理の解明を試みる。

(二) 進行状況と今後のスケジュール

1 1997年4月から抗癌剤ダウノマイシンによる心筋障害のメカニズムおよびその分子機序をテーマに研究を行い、この一年間で解明された結果は以下のとおりである。

(1) 抗癌剤ダウノマイシンは Apoptosis による心筋障害を引き起こした。

(2) MAP キナーゼスーパーファミリー (ERK, p38MAPK) は抗癌剤ダウノマイシンによる Apoptosis において、ERK が細胞保護に、p38MAPK が障害に働く。

(3) ERK の上流には Ras-Raf-1 が、p38MAPK の上流には Rho が存在する。

以上の結果をアメリカの Circulation 誌に投稿した。

2 1998年2月から液性因子 endothelin 1 (ET-1) による心肥大の分子機序を解析し、現在までに以下の結果を得た。

(1) ET-1 は心筋細胞の特異的な胎児遺伝子 β MHC を活性化した。

(2) ET-1 による β MHC の活性化に Ca²⁺/calmodulin-dependent kinase II および Ca²⁺/calmodulin-dependent phosphatase calcineurin が関与した。

以上の結果を論文にまとめているところである。また、この研究結果を 1998年11月にアメリカ心臓病学会 (AHA) で報告 (poster) であった。

3 持続的な高血圧負荷に対して、心筋細胞の適応及び破綻現象の病態生理を解明する

ために、細胞肥大を引き起こす心筋細胞特異的な分泌蛋白の cloning と解析を行う。具体的に説明すると、

- (1) 培養心筋細胞を ET-1 で刺激して、differential display 法にて新しい遺伝子を探究する。
- (2) その新しい遺伝子の配列をもとに、オリゴヌクレオチドを作成し、マウス心筋細胞の遺伝子ライブラリーを用いて分泌蛋白遺伝子を単離、PCR 法で増幅後、塩基配列を決定する。
- (3) 心筋特異的な分泌蛋白の遺伝子配列をもとに、この蛋白のアミノ酸一次構造を決定する。次に、特異抗体を作成し、その心筋細胞における局在、受容体の分布、生理作用、圧負荷あるいは AngII、ET-1、カテコラミン負荷による発現の増強を解析する。さらに、プロモーター領域の解析に着手する。
- (4) 前述の心筋細胞特異的な分泌蛋白のノックアウトマウスの作成に着手する。さらに、そのノックアウトマウスにおける心肥大反応にどのように関係しているか、ノックアウトマウスにおける蛋白の局在、圧負荷による変動を解析する。

(三) 博士号取得後の計画

以上の研究をさらに発展させ、心肥大・心不全の病態生理の解明を行うとともに新しい機序に基づく治療法の開発を目指す。

MAPK Superfamily Plays an Important Role in Daunomycin-induced Apoptosis of Cardiac Myocytes

Weidong Zhu, MD (1); Issei Komuro*, MD, PhD (1); Yunzeng Zou, MD, PhD (1); Ryuichi Aikawa, MD, PhD (1); Koichiro Harada, MD, PhD (1); Sumiyo Kudoh, MD, PhD (1); Hiroki Uozumi, MD (1); Doubun Hayashi, MD (1); Yaping Gu, MD (1); Tsutomu Yamazaki, MD, PhD (1) (2); Takashi Kadowaki, MD, PhD (1); and Yoshio Yazaki, MD, PhD (1)

From the (1) Department of Cardiovascular Medicine, University of Tokyo Graduate School of Medicine, (2) Health Service Center, University of Tokyo, Tokyo 113-8655, Japan.

*To whom correspondence should be addressed:

Issei Komuro, MD, PhD.
Department of Cardiovascular Medicine,
University of Tokyo Graduate School of Medicine,
7-3-1 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8655, Japan.
Tel: 81-3-3818-6672
Fax: 81-3-3818-6673
E-mail: komuro-tky@umin.ac.jp

Running Title: Daunomycin-induced apoptosis of cardiomyocytes

Abstract

Background Although anthracyclines such as daunomycin (DM) and adriamycin, are potent chemotherapeutic agents, they have serious adverse effects including cardiac toxicity. In the present study, we investigated the molecular mechanisms of DM-induced cardiomyocyte impairment.

Methods and Results When cultured cardiac myocytes of neonatal rats were exposed to 1 μ M DM for 24 h, many cells became positive for TUNEL staining with morphological changes characteristic of apoptosis. Fragmentation of DNA into oligonucleosome-sized fragments was recognized by agarose gel electrophoresis in DM-treated myocytes. DM activated three members of mitogen-activated protein kinase (MAPK) dose-dependently, such as extracellular signal-regulated protein kinases (ERKs), c-Jun NH₂-terminal kinases, and p38MAPK in cardiac myocytes. Oxyradical scavengers or Ca²⁺ chelators inhibited DM-induced activation of ERKs and p38MAPK. DM-induced activation of ERKs was also inhibited by overexpression of dominant negative mutants of Ras (D.N.Ras), while the p38MAPK activation was attenuated by D.N.Rho. The number of DM-induced apoptotic cells was markedly increased when the ERK signaling pathway was selectively blocked by a specific MEK inhibitor PD98059, while pretreatment with a specific inhibitor of p38MAPK SB203580 significantly reduced the number of apoptosis.

Conclusions These results suggest that DM activates MAPKs through reactive oxygen species and Ca²⁺ and that the MAPK family plays important roles in DM-induced apoptosis in cardiac myocytes. ERKs protect cardiomyocytes from apoptosis, whereas p38MAPK is involved in the induction of cardiomyocyte apoptosis.

Key words: daunomycin • ERKs • p38MAPK • apoptosis • cardiomyocyte

Introduction

Anthracyclines such as daunomycin (DM) and adriamycin (AM) are very powerful antineoplastic agents which are widely used in the treatment of cancer. The clinical usefulness of these agents is, however, limited due to serious adverse effects including cardiotoxicity (1, 2). These cardiotoxic effects result in cardiac dysfunction, cardiomegaly, and finally congestive heart failure (3). Although exposure to DM or other anthracycline derivatives has been reported to block cell cycle at G₂ stage (4) and induce apoptosis in tumor cells (5), the mechanism of myocardial impairment by anthracyclines remains uncertain. It has been reported that AM enhances peroxidation of lipids in myocardial membrane (6) and that Sulfhydryl reagents inhibit AM-induced cardiotoxicity (7, 8). These observations suggest that anthracyclines impair myocardium through the production of reactive oxygen species (ROS) (2, 9).

The MAPK family is an important mediator of signal transduction and activated by a variety of stimuli such as many growth factors and cellular stresses (10). Among the MAPK family, especially three members, such as extracellular signal-regulated kinases (ERKs) (11, 12), c-Jun NH₂-terminal kinases (JNKs, also called SAPKs) (13, 14), and p38MAPK (15), have been well characterized. These MAPKs are activated by dual phosphorylation on threonine and tyrosine residues within the motif Thr-X-Tyr in subdomain VIII (10). MAPK kinase kinases phosphorylate and activate MAPK kinases, which in turn phosphorylate and activate MAPKs. Each MAPK is activated through the specific kinase cascade. Many studies on the action of growth factors have elucidated physiological functions of ERKs. ERKs are activated by a variety of signaling molecules such as tyrosine kinases (TKs), Ras, protein kinase C (PKC), protein kinase A (PKA), or Ca²⁺ (16-18), through Raf-1 and MAPK/ERK kinase (MEK), and play essential roles in the control of cell growth and differentiation (19). ERKs are also activated by oxidative stress and play critical roles in survival of NIH 3T3 cells (20), PC12 cells (21), and cardiac myocytes (22). In contrast, JNKs are weakly activated by growth factors and phorbol esters, but markedly activated in response to tumor necrosis factor- α (TNF- α), ultraviolet irradiation, and cellular stresses (13, 14, 23). Recently, cumulative evidence suggests that activation of JNKs has been associated with induction of apoptosis (24, 25). Likewise, p38MAPK, also called RK (26) and CSBP (27), a mammalian homolog of the yeast high-osmolarity glycerol

response-1 kinase (HOG1) (15), is also strongly activated by TNF- α and environmental stresses including osmotic shock and UV irradiation (28). An important physiological substrate of p38MAPK is MAPK-activated protein kinase-2, which phosphorylates heat shock protein (hsp27) as part of the cellular response to stress (26). Recently, it has been reported that small GTP proteins of the Rho family, Rac1 and Cdc42, regulate the JNK/p38MAPK pathway (29-31). More recently, Strutt et al. have also shown that RhoA is also involved in regulation of JNK/SAPK-like kinases, which are required for the generation of tissue polarity (32).

Although many studies have been performed to elucidate the molecular mechanism of anthracycline-induced myocardial impairments (1-3, 6, 8, 9), little is known about the precise intracellular signals which lead to the injury. In the present study, we showed that DM induces cardiomyocyte death including apoptosis and that the MAPK family plays a pivotal role in the process.

Materials and Methods

Materials. [γ - 32 P]ATP was purchased from Du Point-New England Nuclear Co. (Boston, MA). Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), fetal bovine serum (FBS), Tyrphostin (A25) and Genistein was from GIBCO BRL Co. (Gaithersburg, MD). Calphostin C was from Funakoshi Co. (Tokyo, Japan). Anti-hemagglutinin (HA) monoclonal antibody and anti-phospho-specific p38MAPK antibody were from Mitsubishi Biochemical Laboratories (Tokyo, Japan) and New England Biolabs, Inc (Bevelly, MA), respectively. M2 Flag monoclonal antibody was from Kodak Co. (New Haven, CT). Horseradish peroxidase-conjugated anti rabbit IgG antibody (HRP-anti-rabbit IgG) and enhanced chemiluminescence reaction system (ECL) were from Amersham Co. (England). Daunomycin and apoptosis ladder detection kit were purchased from Wako Pure Chemical Industries, Ltd. (Tokyo, Japan). 12-*O*-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) and myelin basic protein (MBP) and other reagents were purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO).

cDNA plasmids. Both HA-tagged ERK2 (HA-ERK2) and Flag-tagged p38MAPK (Flag-p38MAPK) were kind gifts from M. Karin (30). Expression vectors encoding Rho-GDI, various mutants of RhoA, Rac1, and Cdc42 were provided by J.S. Gutkind et al (31), and D.N.Ras was provided by Y. Takai (33). All plasmid DNA was prepared by using QIAGEN plasmid DNA preparation kits (Hilden, Germany).

Cell culture. Primary cultures of cardiac myocytes were prepared from ventricles of one-day old Wistar rats as described previously (34) according to the method of Simpson and Savion (35). In brief, cardiomyocytes were plated at a field density of 1×10^5 cells/cm² on 35 mm culture dishes with 2 ml of culture medium (DMEM with 10% FBS). The population of nonmyocytes was <10% of the total cell population. Twenty four hours after seeding, the culture medium was changed to DMEM with 0.1% FBS and cells were cultured for 48 h to 72 h before stimulation.

Transfection. Twenty four hours after plating the cells on culture dishes, DNA was transfected by the calcium phosphate method as described previously (36). For each dish, 2.5 μ g of Flag-

p38MAPK or HA-ERK2 plasmid was co-transfected with 7.5 μ g of control vector plasmid, Rho-GDI, or various D.N. mutants. After 15 h of transfection, the culture medium was removed, and cells were washed with PBS and maintained in DMEM with 0.1% FBS for 48 h to 72 h before treatment with DM or other reagents.

Assay of ERK activity. The activity of ERKs was measured by "in gel assay" using MBP-containing gel as described previously (37). In brief, cells were lysed with 100 μ l of Buffer A (25 mM Tris-HCl pH 7.4, 25 mM NaCl, 1 mM sodium orthovanadate, 10 mM sodium pyrophosphate, 10 nM okadaic acid, 0.5 mM EGTA, and 1mM phenylmethylsulfonyl fluoride) and 25 μ l of cell lysates were applied to an SDS-polyacrylamide gel containing 0.5 mg/ml MBP. ERKs in the gel were denatured in 6 M guanidine HCl and renatured in 50 mM Tris-HCl (pH 8.0) containing 0.04% Triton X-100 and 5 mM 2-mercaptoethanol. The phosphorylative activity of ERKs was assayed by incubating the gel with [γ - 32 P]ATP. After incubation, the gel was washed, dried, and subjected to autoradiography.

Assay of transfected HA-tagged ERK2. The activity of transfected ERK2 was determined by MBP kinase assay as described previously (37). In brief, cardiomyocytes were lysed with Buffer A and the lysates were incubated with an anti-HA polyclonal antibody for 1 h at 4°C. After incubation, the immunocomplex was precipitated using protein A sepharose, washed, resuspended in 25 μ l of the kinase buffer B (25 mM Tris-HCl pH 7.4, 10 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 40 μ M ATP, 2 μ Ci [γ - 32 P]ATP, 2 μ M Protein kinase inhibitor, and 0.5 mM EGTA), and incubated with 25 μ g MBP as a substrate at 25°C for 10 min. After incubation, the reaction was terminated by addition of Laemmli sample buffer (0.002% bromophenol blue, 10 mM sodium phosphate buffer pH 7.0, 10% glycerol, 0.4% SDS, 1% 2-mercaptoethanol) to the samples, and the samples were boiled for 5 min. The supernatants were subjected to SDS-PAGE, and the gel was dried and subjected to autoradiography.

Assay of JNK activity. Cardiac myocytes were stimulated by 100 μ M DM for 20 min at 37°C and lysed on ice with Buffer A. The cell lysates were obtained by centrifugation at 12,000 rpm for 20 min at 4°C and 100 μ l of the lysates were incubated at 4°C for 30 min with 1 μ g of glutathione S-

transferase (GST) -c-Jun (amino acid number 1-79 of human c-Jun) fusion protein bound to glutathione sepharose beads in the kinase reaction buffer C containing 25 mM Tris-HCl (pH 7.4), 10 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 0.5 mM EGTA, 40 μM ATP, and 1 μCi [γ -³²P]ATP, as described previously (13, 38). The reaction was terminated by boiling after addition of Laemmli sample buffer. After centrifugation, supernatant was subjected to SDS-PAGE. The gel was dried and subjected to autoradiography.

In addition, kinase activity of JNK was determined by the immune complex kinase assay using an anti-JNK polyclonal antibody (Santa Cruz Biotechnology, Inc) as described previously (39). In brief, cell lysates were incubated with 2 μg of the anti-JNK antibody at 4°C for 12 h and then incubated with 50 μl of protein A-Sepharose at 4°C for 40 min. After washed twice with ice-cold lysis buffer, each sample was mixed with 1 μg of the GST-c-Jun (1-79) protein in 8 μl of buffer C and incubated at 30°C for 30 minutes. The reaction was terminated by boiling after addition of Laemmli sample buffer. After centrifugation, supernatant was subjected to SDS-PAGE. The gel was dried and subjected to autoradiography.

Western blot analysis. Protein extracts were subjected to Western blot analysis as described previously (22) using p38MAPK-specific antibody. Anti-phosphorylated p38MAPK antibody recognizes only activated p38MAPK that is phosphorylated on Thr-180 and Tyr-182. The anti-rabbit IgG conjugated with HRP was used as the secondary antibody for p38MAPK and immune complexes were visualized using the ECL detection kit according to the manufacturer's directions. p38MAPK phosphorylation examined by Western blot analysis using phospho-specific p38MAPK antibody is well correlated with the p38MAPK activity as reported before (22).

For the Western blot analysis of Flag-p38MAPK, the Flag-p38MAPK-transfected cells were harvested in Buffer A. Flag-p38MAPK was immunoprecipitated with an anti-Flag M2 monoclonal antibody. The anti-mouse IgG conjugated with HRP was used as the secondary antibody and immune complexes were visualized as mentioned above.

Assay of p38MAPK activity. After transfection of Flag-p38MAPK, the myocytes were incubated with 100 μM DM for 30 min. Cardiomyocytes were lysed with Buffer A and the

transfected p38MAPK was then immunoprecipitated with an anti-Flag M2 monoclonal antibody. The immune complex was resuspended in the kinase buffer B and incubated with MBP as a substrate at 25°C for 10 min. The sample was subjected to SDS-PAGE, and the gel was dried and subjected to autoradiography.

Immunofluorescent cytochemistry. After transfection of HA-ERK2, Flag-p38MAPK or myc-tagged D.N.Rho, the myocytes plated on a cover glass were fixed with 4% paraformaldehyde solution for 30 min at room temperature and treated with 0.3% Triton X-100 for 15 min to improve permeability to the reagents. After wash with PBS, the samples were incubated for 1 h at 37°C with the phalloidin-TRITC antibody (red) that identifies filamentous actin. Next, the samples were incubated with anti-HA, anti-Flag M2, or anti-myc monoclonal antibody for 1 h at 37°C and then incubated with an anti-mouse IgG conjugated to FITC (green) for 1 h at room temperature. These samples were analyzed by fluorescence microscopy.

Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labeling (TUNEL) analysis. Cardiomyocytes plated on a cover glass were fixed with 4% paraformaldehyde solution for 30 min at room temperature. After wash with PBS, the samples were incubated with a monoclonal antibody against myosin heavy chain (MF-20) (40) for 1 h at 37°C, and then incubated with an anti-mouse IgG conjugated with rhodamine for 1 h at room temperature. Next, 50 µl terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT)-mediated dUTP nick end labeling (TUNEL) reaction mixture containing both terminal deoxynucleotidyl transferase and fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated dUTP was added on the each sample for 1 h at 37°C. These samples were analyzed by fluorescence microscopy.

Agarose gel electrophoresis for DNA fragmentation. To examine the DNA laddering formation, we used the apoptosis ladder detection kit (Wako Pure Chemical Industries, Ltd. Tokyo, Japan). Briefly, cells (1×10^5) were lysed in 180 µl of enzyme reaction solution and 20 µl of enzyme activator solution followed by incubation with 40 µg RNase and 100 µg proteinase K for 30 min at 50°C, and DNA was extracted by 50% isopropanol. The DNA was then ethanol precipitated and

finally resuspended in TE buffer. The DNA was electrophoretically fractionated on 1.5% agarose gel and stained with fluorescent SYBR[®] Green I as described by the protocol.

Statistics. Statistical comparison of the control group with treated groups was carried out using one-way ANOVA and Dunnett's *t* test. The accepted level of significance was $P < 0.05$.

Results

DM induces apoptosis in cardiac myocytes.

DM has been reported to induce apoptosis in a variety of cells such as Hela S3, Jurkat, ST4, and PF382 cells (5, 41). Thus, we first examined whether DM also induces apoptosis of cardiac myocytes. When cultured cardiac myocytes of neonatal rats were exposed to 1 μ M DM for 24 h, a considerable number of myocytes (~24%) showed positive TUNEL staining compared with the vehicle-treated cells (~3%) (Fig. 1A, B). Many TUNEL-positive cells had condensed nuclei, which are characteristic of apoptosis (Fig. 1A). When TdT was not added in the reaction solution, no myocytes were stained positively (data not shown), indicating that the specific labeling targets were the multitude of new 3'-OH DNA ends generated by DNA fragmentation induced by DM. We next examined whether DM induces DNA fragmentation using agarose gel electrophoresis. The characteristic degradation of genomic DNA into oligonucleosomal-length fragments was observed when cardiac myocytes were exposed to 1 μ M DM for 24 h (Fig. 1C).

DM activates MAPKs in cardiac myocytes.

Many lines of evidence have suggested that MAPKs are key molecules in intracellular signal transduction pathways and play important roles in cell survival or death (19, 20, 42). To elucidate the molecular mechanism of DM-induced apoptosis of cardiac myocytes, we examined whether DM activates MAPKs including ERKs, JNKs, and p38MAPK in cardiac myocytes. When cardiac myocytes were exposed to various concentrations of DM (0.1 μ M—1 mM) for 20 min, ERKs were activated in a dose-dependent manner (Fig. 2A). A significant increase in the activity of ERKs was detected from 1 μ M DM, and maximum activation was obtained by 100 μ M DM (Fig. 2A). When being incubated with 1 mM DM for 20 min, many cardiac myocytes were dead and therefore the activity of ERKs per plate was very low (Fig. 2A). The increase in the ERK activity was first detected at 5 min after the addition of 100 μ M DM, peaked at 15 min, and gradually decreased thereafter (Fig. 2B). One h after the addition of 100 μ M DM, the activity of ERKs returned to basal levels. JNKs (Fig. 3A) and p38MAPK (Fig. 4A) were also activated by DM at the dose similar to the case of ERKs. Unlike the ERK activity, the activity of JNKs and p38MAPK was high even after

treatment with 1 mM DM (Fig. 3A and 4A). Since many cardiac myocytes were dead after incubation with 1 mM DM, this result suggests that the activity of JNKs and p38MAPK of each remaining cardiomyocyte might be very high. Activation of JNKs (Fig. 3B) and p38MAPK (Fig. 4B) by 100 μ M DM was detected from 5 min and peaked at 30 min. The phosphorylation of JNKs and p38MAPK was observed even at 60 min after addition of 100 μ M DM.

ROS is involved in activation of ERKs and p38MAPK.

We next examined how DM activates MAPKs in cardiac myocytes. Since ROS have been reported to be generated from cells which are exposed to DM (2, 9), and to activate MAPKs in many cell types (20, 22), we examined whether ROS are involved in DM-induced activation of MAPKs. Cardiac myocytes were exposed to DM after pretreatment with dimethyl sulfoxide (DMSO) (a diffusible scavenger of \cdot OH), catalase (a oxidoreductase of H_2O_2), or N-(2-mercaptopropionyl)-glycine (MPG) (a rapidly diffusible scavenger of H_2O_2 , $O_2^{\cdot-}$, and \cdot OH). DMSO and catalase strongly suppressed DM-induced activation of ERKs (Fig. 5A) and p38MAPK (Fig. 5B). In contrast, heat-inactivated catalase did not show any inhibitory effects on the DM-induced activation of these kinases (data not shown). The pretreatment with MPG completely blocked activation of ERKs (Fig. 5A) and p38MAPK (Fig. 5B). However, superoxide dismutase (SOD), a scavenger of $O_2^{\cdot-}$, did not show inhibitory effects on ERKs and p38MAPK (Fig. 5A, B). These results suggest that among ROS, H_2O_2 and \cdot OH, but not $O_2^{\cdot-}$, may be involved in DM-induced activation of MAPKs in cardiac myocytes.

DM-induced ERK activation is dependent on Ras and Raf-1 in cardiac myocytes.

We further examined the DM-induced intracellular signaling pathways leading to activation of ERKs. DM increased the activity of transfected HA-ERK2 in cardiac myocytes (Fig. 6A). Overexpression of D.N.Ras or D.N.Raf-1 strongly suppressed DM-induced ERK2 activation (Fig. 6A). In contrast, overexpression of D.N.Ras or D.N.Raf-1 did not affect activation of p38MAPK induced by DM (Fig. 6B). These data suggest that Ras and Raf-1 play critical roles in DM-induced activation of ERKs and that p38MAPK is activated by DM through pathways different from those of ERKs.

DM-induced p38MAPK activation is dependent on Rho in cardiac myocytes.

It has recently been reported that among Rho family GTP-binding proteins, Rac1 and Cdc42 regulate the activity of JNKs and p38MAPK in a variety of cell types (29-31). More recently, Strutt et al. has also shown that JNK/SAPK-like kinases are regulated by RhoA signaling cascade (32). We thus examined whether small G proteins of Rho family are involved in DM-induced p38MAPK activation in cardiac myocytes. DM activated the transfected p38MAPK in cardiac myocytes (Fig. 7A, top). Inhibition of Rho family functions by overexpression of D.N.RhoA, D.N.Rac1, D.N.Cdc42, or Rho GDP dissociation inhibitor (RhoGDI) suppressed DM-induced p38MAPK activation (Fig. 7A, top). Among these dominant negative mutants, RhoGDI most strongly suppressed the activation of p38MAPK by DM. In contrast, DM-induced ERK activation was not affected by overexpression of dominant negative mutants of these Rho family small G proteins (Fig. 7B). To determine whether dominant negative mutants of RhoA, Rac1, and Cdc42 are expressed in cardiac myocytes, we transfected the myc-tagged dominant negative mutants into cardiac myocytes and stained the cultured cells using an anti-myc monoclonal antibody and the phalloidin-TRITC. Expression of the dominant negative mutants of RhoA, Rac1, and Cdc42 was observed in 1-2% of cardiac myocytes (data not shown). To determine whether expression levels of transfected Flag-p38MAPK are equal among various conditions, we performed Western blot analysis using an anti-Flag M2 monoclonal antibody. The transfected each mutant was equally expressed in cultured cardiac myocytes (Fig.7A, bottom). In addition, when constitutively active mutants of RhoA, Rac1, and Cdc42 were cotransfected into cardiomyocytes with p38MAPK, the activity of the transfected p38MAPK was markedly activated (data not shown). These results suggest that Rho family small G proteins play important roles in activation of p38MAPK by DM in cardiac myocytes.

DM-induced activation of ERKs and p38MAPK is dependent on Ca²⁺ but independent of PKC, PKA, and TKs in cardiac myocytes.

We have recently reported that Ca²⁺ plays an important role in activation of ERKs and JNKs in cardiomyocytes (39, 43). To elucidate whether Ca²⁺ is involved in DM-induced activation of MAPKs, we examined the activity of ERKs and p38MAPK after chelation of Ca²⁺ with 5 mM EGTA or 40 μ M BAPTA. Chelation of intracellular or extracellular Ca²⁺ by pretreatment with 5 mM EGTA

for 2 min or 40 μ M BAPTA for 30 min, respectively, suppressed activation of ERKs and p38MAPK (Fig. 8A, B). Complete depletion of intracellular free Ca^{2+} by BAPTA may cause certain stress to cardiac myocytes and activate ERKs and p38MAPK (Fig. 8A, B). These results suggest that Ca^{2+} is involved in DM-induced activation of ERKs and p38MAPK in cardiac myocytes. On the other hand, downregulation of PKC by pretreatment with 0.1 μ M TPA for 24 h (44) or by pretreatment with 1 μ M Calphostin C, a specific inhibitor of PKC, for 60 min (45) did not have any effects on DM-induced ERK or p38MAPK activation (Fig. 8C, D). Likewise, inhibition of PKA by pretreatment with 100 μ M RpcAMP (18) for 10 min did not affect DM-induced ERK or p38MAPK activation (Fig. 8C, D). After pretreatment for 30 min with 50 μ M Tyrphostin (A25) or 20 μ M Genistein, two chemically and mechanistically dissimilar tyrosine kinase inhibitors (46, 47), cardiac myocytes were stimulated with 100 μ M DM for 20 min. The activation of ERKs or p38MAPK by DM was not affected by the pretreatment with these tyrosine kinase inhibitors (Fig. 8C, D). TPA did not activate ERKs in cardiac myocytes after pretreatment with TPA for 24 h and Calphostin C for 60 min (Fig. 8C). ERKs were not activated by isoproterenol and insulin after pretreatment with RpcAMP for 10 min, or Tyrphostin (A25) and Genistein for 30 min (Fig. 8C), respectively. These results suggest that PKC, PKA, and TKs were fully inhibited by each pretreatment. Taken together, these results suggest that DM induces activation of ERKs and p38MAPK through the pathway independent of PKC, PKA, or TKs in cardiac myocytes.

ERKs and p38MAPK play opposite roles in DM-induced myocardial apoptosis.

Finally, to elucidate the roles of MAPKs in the development of cardiomyocyte apoptosis, we examined apoptotic death of cardiac myocytes following the DM treatment in the presence or absence of the MAPK inhibitors, PD98059 for ERKs or SB203580 for p38MAPK. PD98059 has been reported to specifically inhibit MEK1 and MEK2, which are specific activators for ERKs but not for p38MAPK or JNKs (48). When cardiac myocytes were pretreated with 50 μ M PD98059 for 60 min, DM-induced ERK activation was completely suppressed, while p38MAPK was not (data not shown). When nuclei of cardiac myocytes were stained by TUNEL method, few cardiac myocytes (less than 3%) were positive in untreated cultures (Fig. 9A). After incubation with 1 μ M DM for 24 h, the number of TUNEL-positive cardiac myocytes was increased (~24%)(Fig. 9A). When the ERK

signaling pathway was blocked by the pretreatment with 50 μ M PD98059 for 1 h, the number of TUNEL-positive myocytes was further increased by over two folds (~53%) (Fig. 9A). Treatment with PD98059 significantly increased the number of TUNEL-positive cells even in the absence of DM (~10%) (Fig. 9A). We further examined DNA fragmentation by agarose gel electrophoresis (49). When cardiac myocytes were exposed to 1 μ M DM for 24 h, extracted genomic DNA showed a prominent DNA ladder, characteristic of apoptosis (Fig. 9B). When cardiac myocytes were pretreated with PD98059, DM-induced DNA fragmentation became more prominent (Fig. 9B). Next, we examined apoptotic death of cardiac myocytes following DM exposure in the presence or absence of a p38MAPK inhibitor SB203580, which specifically inhibits p38MAPK, but not ERKs or JNKs even at 100 μ M (50). Treatment with less than 5 μ M of SB203580 showed no significant inhibition in DM-induced apoptosis. However, DM-induced apoptosis was significantly suppressed by the pretreatment with 10 μ M SB203580 for 2 h (~18%)(Fig. 9A). DM-induced DNA fragmentation was also reduced by the pretreatment with 10 μ M SB203580 (Fig. 9B). The concentration of 10 μ M SB203580 has been widely used to inhibit p38MAPK in many cell types (51, 52). To further elucidate the roles of ERKs and p38MAPK, we transfected HA-ERK2 and Flag-p38MAPK into cultured cardiac myocytes and examined apoptosis. Strong signals of both HA-ERK2 and Flag-p38MAPK were observed in the cytoplasm of cardiomyocytes before addition of DM and they were translocated into the nucleus after DM treatment (Fig. 9C), suggesting that DM activates both ERKs and p38MAPK in cardiac myocytes. When we double-immunostained the cells using TUNEL and either anti-HA or anti-Flag monoclonal antibody, many p38MAPK-transfected cells, but not ERK2-transfected cells showed TUNEL positive after starvation of 48 h (Fig. 9D). Furthermore, when the transfected cells were incubated with 1 μ M DM for 4 h, almost all p38MAPK-transfected cells were TUNEL positive (data not shown). In contrast, none of ERK2-transfected cells were TUNEL positive (data not shown). These results also suggest that p38MAPK induces apoptosis of cardiomyocytes while ERKs protect cardiomyocytes from apoptosis. Collectively, ERKs and p38MAPK play opposite roles in DM-induced myocardial apoptosis. ERKs protect cardiac myocytes from DM-induced apoptosis, whereas p38MAPK induces apoptosis.

Discussion

A growing body of evidence suggests that apoptosis is an active process induced by a variety of stresses (21, 25, 42). Even the cells that lose their proliferative ability, like cardiac myocytes, undergo apoptosis by a variety of stimuli (22, 53, 54). The present study demonstrates that DM induces apoptosis of cardiac myocytes possibly through the production of ROS. Three members of the MAPK family were activated in cardiac myocytes by DM, and among them ERKs and p38MAPK play opposite roles in the induction of apoptotic death. ERKs, which are activated by DM through Ras and Raf-1, protect cardiomyocytes from apoptosis, whereas p38MAPK, which is activated through the Rho family, is involved in DM-induced apoptosis of cardiomyocytes. Furthermore, activation of ERKs and p38MAPK by DM is dependent on Ca^{2+} , but independent of PKC, PKA, or TKs in cardiac myocytes.

Recently, apoptosis has been suggested to play a critical role in a variety of cardiovascular diseases, including myocardial infarction, heart failure, and atherosclerosis (55). We examined TUNEL staining and DNA ladder formation to determine whether DM induces apoptosis of cardiac myocytes. Although we used 100 μ M DM to examine the DM-evoked signaling pathway in the present study, we obtained basically same results even with 1 μ M DM. 1 μ M DM significantly activated ERKs, JNKs, and p38MAPK in cardiac myocytes through the same signaling pathway as we showed using 100 μ M DM. Since activation was not prominent with 1 μ M DM, we showed the data obtained with 100 μ M DM. To examine the cardiotoxicity of DM, we used 1 μ M DM. It has been reported that the plasma kinetics of anthracyclines following standard bolus administration in patients exhibit peak plasma concentration of higher than 5 μ M (56) and previous studies on cardiomyocytes demonstrated that treatment for 24-48 h at 1 μ M AM produces morphological and ultrastructural changes characteristic of AM cardiotoxicity (57). 1 μ M DM has also been used to induce apoptosis in P388 murine leukemia cells in 4-24 h (58). Although it is difficult to precisely estimate the amount of necrotic death and apoptotic death of cardiac myocytes, the present results suggest that at least a part of cultured cardiomyocytes show apoptotic cell death after exposure to DM. Since we can easily detect the ladder formation, at least more than 10% of cells may be dead by apoptosis. Ferrans and colleagues have reported that cells of the kidney and the intestine, but not of

the heart, are dead by apoptosis at 7 days after the administration of AM (59, 60). However, it is possible that apoptosis occurs more rapidly in the heart after administration of AM, leaving no residue at 7 days. In fact, Unverferth et al. have reported that AM markedly alters the morphology of the human myocardial nucleus and nucleolus at 4 hours after treatment, and that these changes diminish with 24 hours (61). Since apoptosis usually occurs in isolated single cell, the remnants of which are engulfed by peripheral phagocytic cells of the macrophage/monocyte lineage, and apoptosis does not induce persisting changes in tissue such as the inflammation and scarring that characterize necrosis, it should be difficult to detect apoptotic cells in tissue. During preparation of our manuscript, Wang et al. have reported that DM induced apoptosis in the cultured cardiomyocytes of neonatal rats (62).

Anthracycline-induced cardiotoxicity has been reported to be related to the generation of ROS (2, 9). AM stimulates NADPH oxidase-like activity in the cardiac sarcoplasmic reticulum and thereby induces oxidative stress in the myocardium (9). Cardiac glutathione peroxidase is also reported to be inhibited by AM (63). We showed here that MPG (a rapidly diffusible scavenger of H_2O_2 , $O_2^{\cdot-}$, and $\cdot OH$), DMSO (a $\cdot OH$ specific scavenger), and catalase (H_2O_2 oxidoreductase), but not SOD (a scavenger of $O_2^{\cdot-}$), markedly repressed DM-mediated activation of ERKs and p38MAPK. It has been reported that the pretreatment with catalase and mannitol (a quencher for $\cdot OH$) but not with SOD mitigates the reduction in contractile function of the papillary muscles, decreases lipid peroxidase and reduces ultrastructure damage due to AM (2). These results and observations suggest that $\cdot OH$ and H_2O_2 , but not $O_2^{\cdot-}$, are mainly involved in the DM-induced activation of MAPKs and acute cardiac injury, although it is also possible that dismutation of $O_2^{\cdot-}$ could result in further H_2O_2 and $\cdot OH$ generation or that SOD, a large molecular weight scavenger of $O_2^{\cdot-}$, remained in the extracellular space.

ERKs are activated by serial activation of Raf-1 and MEK in mammalian cells (19). However, the signal transduction pathways leading to activation of Raf-1 are different according to cell types and stimuli (16-18). It has been reported that angiotensin II (Ang II) activates Src family tyrosine kinases and Ras in smooth muscle cells through G protein-coupled Ang II type I receptor, resulting in activation of ERKs (64, 65). In contrast, we have recently reported that protein kinase C (PKC), but not Src family or Ras, is critical for Ang II-induced ERK activation in cardiac myocytes (45). Although PKC is partially involved in ERK activation by H_2O_2 in Jurkat T cells (66), Ras, but not

PKC, is necessary for ERK activation by H₂O₂ in cardiac myocytes (22). In this study, we demonstrated that DM activates ERKs through Ras and Raf-1, but not through PKC, PKA, or TKs in cardiac myocytes. Although stimulation of TKs often activates ERKs through Ras (16, 17), the DM-induced ERK activation was not inhibited by the pretreatment with Tyrphostin (A25) or Genistein. These results suggest that although we cannot exclude a possibility that Tyrphostin (A25)- and Genistein-insensitive TKs may mediate DM-induced activation of ERKs, TKs may not be involved in activation of DM-induced ERK signaling pathway.

The signaling pathway leading to activation of p38MAPK was different from that of ERKs. DM-induced p38MAPK activation was not inhibited by D.N.Ras or D.N.Raf-1. PKC, PKA, and TKs are also not involved in DM-induced p38MAPK activation. It has been reported that small GTP-binding proteins of the Rho family, including Rac1 and Cdc42, regulate the activity of JNKs and p38MAPK (29-31). Recently, Strutt et al. have also shown that RhoA regulates JNK/SAPK-like kinases, which are required for the generation of *Drosophila* tissue polarity (32). During the preparation of our manuscript, Roberts et al. have demonstrated that, in A549 lung carcinoma cells, H₂O₂ induces JNK activation via RhoA-dependent pathway (67). In the present study, we examined whether Rho family small GTP-binding proteins are responsible for DM-induced activation of p38MAPK in cardiac myocytes. Overexpression of Rho-GDI, D.N.RhoA, D.N.Rac1, and D.N.Cdc42 significantly suppressed DM-induced p38MAPK activation, but not DM-induced ERK activation. These results suggest that all three members of Rho family are involved in DM-induced p38MAPK activation in cardiac myocytes. It has been reported that the Rho family proteins regulate p38MAPK through the p21-activated kinase (PAK) (29). It needs further study to elucidate whether PAK is involved in DM-induced activation of p38MAPK.

In the present study, EGTA and BAPTA potently inhibited the DM-induced activation of ERKs and p38MAPK. It is generally regarded that rapidly raised intracellular Ca²⁺, in response to multiple hormones, neurotransmitters, and immune effectors, regulates myriad cellular processes, including gene expression and cell growth (68, 69). It has been reported that Ca²⁺ activates ERKs by modulating PKC activity (38) or by activating Ca²⁺-dependent tyrosine kinases (70), and that Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinases may regulate the JNK cascade (71, 72). It should be determined how Ca²⁺ is involved in DM-induced activation of ERKs and p38MAPK.

Many lines of evidence have suggested that the members of MAPKs, including ERKs, JNKs, and p38MAPK, play important roles in cell survival and death (25, 42). Activation of the ERK signaling pathway may function to protect cells from a variety of cellular stresses (20-22, 42). On the contrary, the JNK and p38MAPK signaling pathways have been suggested as the apoptosis-inducing pathways (24, 42, 73). JNKs and p38MAPK are activated by a variety of stresses such as mechanical stretch (38), ischemia/reperfusion (74), and AngII (39) in cardiomyocytes, but the role of JNK/p38MAPK activation in cardiomyocytes was unknown. DM activated all three members of MAPKs in a different manner. Although the activation of ERKs and JNKs/p38MAPK occurred at almost the same time, the inactivation of JNKs/p38MAPK was preceded by the one of ERKs. Furthermore, unlike the very low ERK activity, the activity of JNKs and p38MAPK remained quite high even after being dead during incubation with DM. From the differences, though uncausal to apoptosis, it at least suggested that ERKs and JNKs/p38MAPK may play distinct role in DM-induced cardiac apoptosis. Pretreatment of PD98059, a specific inhibitor of MEK-1, made the DNA fragmentation prominent and increased the number of apoptotic cells. Moreover, PD98059 treatment itself also induced apoptosis in our system. On the contrary, pretreatment of SB203580, a specific inhibitor of p38MAPK, reduced the number of apoptotic cells. In addition, most of p38MAPK-transfected cells, but not ERK2-transfected cells, became TUNEL positive, suggesting that activation of p38MAPK induces apoptosis in cardiac myocytes. Moreover, when the transfected cells were incubated with 1 μ M DM for 4 h, almost all p38MAPK-transfected cells were TUNEL positive. In contrast, none of ERK2-transfected cells were TUNEL positive. These results suggest that ERKs are important to prevent cardiac myocytes from DM-induced apoptosis, whereas p38MAPK is crucial for promoting apoptosis in cardiac myocytes. Like ERKs/p38MAPK, DM-induced activation of JNKs was inhibited by various inhibitors such as catalase, EGTA, BAPTA, and DMSO (data not shown). However, pharmacological specific inhibitors of JNKs are not available at present, we did not evaluate the role of JNKs in DM-induced cardiac apoptosis in this study.

A major question concerns the mechanism of how MAPKs are involved in DM-induced apoptosis in cardiomyocytes. Many studies have suggested that ERKs play pivotal roles in cell growth and survival (19, 20). ERKs phosphorylate and activate many molecules and some of them may be involved in preventing cells from apoptotic death as well as in promoting cell growth. It

remains to be determined what molecules are targets of ERKs and are involved in inhibition of apoptosis. Some anti-apoptotic factors such as Bcl-2 and Bcl-x_l may be such candidates (75). Caspases, such as ICE and CPP32, are critically involved in apoptosis of many cell types (76). JNKs have been reported to activate the caspase-like proteases in U937 cells (77). Caspases are regulated not only by post-translational processing but also by transcriptional control (78). AP-1, a transcription factor downstream of JNKs, may be involved in this transcriptional regulation (79). Another possibility is that DM induces secretion of some factors such as Fas ligand and TNF- α by activating p38MAPK and these factors trigger apoptosis. It has been reported that p38MAPK regulates expression of TNF- α (27), a well known apoptosis-inducing cytokine, and that hemodynamic overload induces TNF- α production in adult feline myocardium (80). These observations suggest that DM may activate p38MAPK which induces cardiomyocyte apoptosis via production of TNF- α .

In summary, the present study demonstrates that DM induces apoptosis of cardiomyocytes through the production of H₂O₂ and ·OH. DM activates ERKs through Ras- and Raf-1-dependent pathways in cardiac myocytes, and activation of ERKs is important for protecting cardiomyocytes from apoptosis. On the other hand, DM activates p38MAPK through the Rho family-dependent pathways in cardiac myocytes, and activation of p38MAPK is critical for induction of cardiomyocyte apoptosis. Although it remains to be determined how each member of MAPK family is involved in cardiomyocyte apoptosis, the present study may pave the way to prevent cardiomyocyte injury from anthracyclines.

Acknowledgments

We wish to thank Drs. M. Karin, Y. Takai, and H. Sabe for plasmids, Dr. K. Tobe for valuable advice and Ms. C. Yamamoto and M. Takano for their excellent technical assistance.

This work was supported by a Grant-in-Aid for Scientific Research, Developmental Scientific Research and Scientific Research on Priority Areas from the Ministry of Education, Science, Sports

and Culture of Japan and by Program for Promotion of Fundamental Studies in Health Sciences of the Organization for Drug ADR Relief, R&D Promotion and Product Review of Japan (to I. Komuro).

References

1. Mettler F P, Young D M, Ward J M. Adriamycin-induced cardiotoxicity (cardiomyopathy and congestive heart failure) in rats. *Cancer Res.* 1977;37:2705-13.
2. Lee V, Randhawa A K, Singal P K. Adriamycin-induced myocardial dysfunction in vitro is mediated by free radicals. *Am. J. Physiol.* 1991;261:H989-95.
3. Ferrans V J. Overview of cardiac pathology in relation to anthracycline cardiotoxicity. *Cancer Treat. Rep.* 1978;62:955-61.
4. Konopa J. G₂ block induced by DNA crosslinking agents and its possible consequences. *Biochem. Pharmacol.* 1988;37:2303-9.
5. Novelli F, Allione A, Bernabei P, Rigamonti L, Fórní G. Antiblastic chemotherapy drugs up-modulate interferon-gamma receptor expression on human malignant T cells. *Cancer Detect. Prev.* 1997;21:191-5.
6. Myers C E, McGuire W P, Liss R H, Ifrim I, Grotzinger K, Young R C. Adriamycin: the role of lipid peroxidation in cardiac toxicity and tumor response. *Science.* 1977;197:165-7.
7. Freeman R W, MacDonald J S, Olson R D, Boerth R C, Oates J A, Harbison R D. Effect of sulfhydryl-containing compounds on the antitumor effects of adriamycin. *Toxic. Appl. Pharm.* 1980;54:168-75.
8. Doroshow J H, Locker G Y, Ifrim I, Myers C E. Prevention of doxorubicin cardiac toxicity in the mouse by N-acetylcysteine. *J. Clin. Invest.* 1981;68:1053-64.
9. Thornalley P J, Dodd N J. Free radical production from normal and adriamycin-treated rat cardiac sarcosomes. *Biochem. Pharmacol.* 1985;34:669-74.
10. Davis R J. MAPKs: new JNK expands the group. *Trends Biochem. Sci.* 1994;19:470-3.
11. Boulton T G, Yancopoulos G D, Gregory J S, Slaughter C, Moomaw C, Hsu J, Cobb M H. An insulin-stimulated protein kinase similar to yeast kinases involved in cell cycle control. *Science.* 1990;249:64-67.
12. Boulton T G, Nye S H, Robbins D J, Ip N Y, Radziejewska E, Morgenbesser S D, DePinho R A, Panayotatos N, Cobb M H, Yancopoulos G D. ERKs: a family of protein-serine/threonine

- kinases that are activated and tyrosine phosphorylated in response to insulin and NGF. *Cell*. 1991;65:663-675.
13. Derijard B, Hibi M, Wu I H, Barrett T, Su B, Deng T, Karin M, Davis R J. JNK1: a protein kinase stimulated by UV light and Ha-Ras that binds and phosphorylates the c-Jun activation domain. *Cell*. 1994;76:1025-37.
 14. Kyriakis J M, Banerjee P, Nikolakaki E, Dai T, Rubie E A, Ahmad M F, Avruch J, Woodgett J R. The stress-activated protein kinase subfamily of c-Jun kinases. *Nature*. 1994;369:156-60.
 15. Han J, Lee J-D, Ribbs L, Ulevitch R J. A MAP kinase targeted by endotoxin and hyperosmolarity in mammalian cells. *Science*. 1994;265:808-811.
 16. Satoh T, Nakafuku M, Kaziro Y. Function of Ras as a molecular switch in signal transduction. *J. Biol. Chem*. 1992;267:24149-24152.
 17. Rozakis A M, McGlade J, Mbamalu G, Pelicci G, Daly R, Li W, Batzer A, Thomas S, Brugge J, Pelicci P G. Association of the Shc and Grb2/Sem5 SH2-containing proteins is implicated in activation of the Ras pathway by tyrosine kinases. *Nature*. 1992;360:689-92.
 18. Yamazaki T, Komuro I, Zou Y, Kudoh S, Shiojima I, Hiroi Y, Mizuno T, Aikawa R, Takano H, Yazaki Y. Norepinephrine induces the raf-1 kinase/mitogen-activated protein kinase cascade through both alpha 1- and beta-adrenoceptors. *Circulation*. 1997;95:1260-8.
 19. Davis R J. The mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway. *J. Biol. Chem*. 1993;268:14553-14556.
 20. Guyton K Z, Liu Y, Gorospe M, Xu Q, Holbrook N J. Activation of mitogen-activated protein kinase by H₂O₂. Role in cell survival following oxidant injury. *J. Biol. Chem*. 1996;271:4138-42.
 21. Parrizas M, Saltiel A R, LeRoith D. Insulin-like growth factor 1 inhibits apoptosis using the phosphatidylinositol 3'-kinase and mitogen-activated protein kinase pathways. *J. Biol. Chem*. 1997;272:154-61.
 22. Aikawa R, Komuro I, Yamazaki T, Zou Y, Kudoh S, Yazaki Y. Oxidative stress activates extracellular signal-regulated kinases through Src and Ras in cultured cardiac myocytes of neonatal rats. *J. Clin. Invest*. 1997;100:1813-1821.
 23. Galcheva-Gargova Z, Derijard B, Wu I-H, Davis R J. An osmosensing signal transduction pathway in mammalian cells. *Science*. 1994;265:806-808.

24. Verheij M, Bose R, Lin X H, Yao B, Jarvis W D, Grant S, Birrer M J, Szabo E, Zon L I, Kyriakis J M, Haimovitz F A, Fuks Z, Kolesnick R N. Requirement for ceramide-initiated SAPK/JNK signaling in stress-induced apoptosis. *Nature*. 1996;380:75-9.
25. Graves J D, Draves K E, Craxton A, Saklatvala J, Krebs E G, Clark E A. Involvement of stress-activated protein kinase and p38 mitogen-activated protein kinase in mIgM-induced apoptosis of human B lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1996;93:13814-8.
26. Rouse J, Cohen P, Trigon S, Morange M, Alonso L A, Zamanillo D, Hunt T, Nebreda A R. A novel kinase cascade triggered by stress and heat shock that stimulates MAPKAP kinase-2 and phosphorylation of the small heat shock proteins. *Cell*. 1994;78:1027-37.
27. Lee J C, Laydon J T, McDonnell P C, Gallagher T F, Kumar S, Green D, McNulty D, Blumenthal M J, Heys J R, Laridvatter S W. A protein kinase involved in the regulation of inflammatory cytokine biosynthesis. *Nature*. 1994;372:739-46.
28. Raingeaud J, Gupta S, Rogers J S, Dickens M, Han J, Ulevitch R J, Davis R J. Pro-inflammatory cytokines and environmental stress cause p38 mitogen-activated protein kinase activation by dual phosphorylation on tyrosine and threonine. *J. Biol. Chem*. 1995;270:7420-6.
29. Zhang S, Han J, Sells M A, Chernoff J, Knaus U G, Ulevitch R J, Bokoch G M. Rho family GTPases regulate p38 mitogen-activated protein kinase through the downstream mediator Pak1. *J. Biol. Chem*. 1995;270:23934-6.
30. Minden A, Lin A, Claret F X, Abo A, Karin M. Selective activation of the JNK signaling cascade and c-Jun transcriptional activity by the small GTPases Rac and Cdc42Hs. *Cell*. 1995;81:1147-57.
31. Coso O A, Chiariello M, Yu J C, Teramoto H, Crespo P, Xu N, Miki T, Gutkind J S. The small GTP-binding proteins Rac1 and Cdc42 regulate the activity of the JNK/SAPK signaling pathway. *Cell*. 1995;81:1137-46.
32. Strutt D I, Weber U, Mlodzik M. The role of RhoA in tissue polarity and Frizzled signalling. *Nature*. 1997;387:292-5.
33. Kikuchi A, Kaibuchi K, Hori Y, Nonaka H, Sakoda T, Kawamura M, Mizuno T, Takai Y. Molecular cloning of the human cDNA for a stimulatory GDP/GTP exchange protein for c-Ki-ras p21 and smg p21. *Oncogene*. 1992;7:289-93.

34. Komuro I, Kaida T, Shibasaki Y, Kurabayashi M, Takaku F, Yazaki Y. Stretching cardiac myocytes stimulates proto-oncogene expression. *J. Biol. Chem.* 1990;265:3595-3598.
35. Simpson P, Savion S. Differentiation of rat myocytes in single cell cultures with and without proliferating nonmyocardial cells. *Circ. Res.* 1982;50:101-116.
36. Komuro I, Katoh Y, Hoh E, Takaku F, Yazaki Y. Mechanisms of cardiac hypertrophy and injury: possible role of protein kinase C activation. *Jpn. Circ. J.* 1991;55:1149-1157.
37. Yamazaki T, Tobe K, Hoh E, Maemura K, Kaida T, Komuro I, Tamemoto H, Kadowaki T, Nagai R, Yazaki Y. Mechanical loading activates mitogen-activated protein kinase and S6 peptide kinase in cultured rat cardiac myocytes. *J. Biol. Chem.* 1993;268:12069-12076.
38. Komuro I, Kudo S, Yamazaki T, Zou Y, Shiojima I, Yazaki Y. Mechanical stretch activates the stress-activated protein kinases in cardiac myocytes. *FASEB J.* 1996;10:631-6.
39. Kudoh S, Komuro I, Mizuno T, Yamazaki T, Zou Y, Shiojima I, Takekoshi N, Yazaki Y. Angiotensin II stimulates c-Jun NH₂-terminal kinase in cultured cardiac myocytes of neonatal rats. *Circ. Res.* 1997;80:139-46.
40. Bader D, Masaki T, Fischman D A. Immunochemical analysis of myosin heavy chain during avian myogenesis in vivo and in vitro. *J. Cell Biol.* 1982;95:763-70.
41. Skladanowski A, Konopa J. Adriamycin and daunomycin induce programmed cell death (apoptosis) in tumour cells. *Biochem. Pharmacol.* 1993;46:375-82.
42. Xia Z, Dickens M, Raingeaud J, Davis R J, Greenberg M E. Opposing effects of ERK and JNK-p38 MAP kinases on apoptosis. *Science.* 1995;270:1326-31.
43. Yamazaki T, Komuro I, Kudoh S, Zou Y, Shiojima I, Hiroi Y, Mizuno T, Maemura K, Kurihara H, Aikawa R, Takano H, Yazaki Y. Endothelin-1 is involved in mechanical stress-induced cardiomyocyte hypertrophy. *J. Biol. Chem.* 1996;271:3221-3228.
44. Yamazaki T, Komuro I, Kudoh S, Zou Y, Shiojima I, Mizuno T, Takano H, Hiroi Y, Ueki K, Tobe K, Kadowaki T, Nagai R, Yazaki Y. Mechanical stress activates protein kinase cascade of phosphorylation in neonatal rat cardiac myocytes. *J. Clin. Invest.* 1995;96:438-446.
45. Zou Y, Komuro I, Yamazaki T, Aikawa R, Kudoh S, Shiojima I, Hiroi Y, Mizuno T, Yazaki Y. Protein kinase C, but not tyrosine kinases or Ras, plays a critical role in angiotensin II-induced

- activation of Raf-1 kinase and extracellular signal-regulated protein kinases in cardiac myocytes. *J. Biol. Chem.* 1996;271:33592-33597.
46. Akiyama T, Ishida J, Nakagawa S, Ogawara H, Watanabe S, Itoh N, Shibuya M, Fukami Y. Genistein, a specific inhibitor of tyrosine-specific protein kinases. *J. Biol. Chem.* 1987;262:5592-5.
47. Gazit A, Yaish P, Gilon C, Levitzki A. Tyrphostins I: synthesis and biological activity of protein tyrosine kinase inhibitors. *J. Med. Chem.* 1989;32:2344-52.
48. Alessi D R, Cuenda A, Cohen P, Dudley D T, Saltiel A R. PD098059 is a specific inhibitor of the activation of mitogen-activated protein kinase kinase in vitro and in vivo. *J. Biol. Chem.* 1995;270:27489-94.
49. Sellins K S, Cohen J J. Gene induction by gamma-irradiation leads to DNA fragmentation in lymphocytes. *J. Immunol.* 1987;139:3199-206.
50. Cuenda A, Rouse J, Doza Y N, Meier R, Cohen P, Gallagher T F, Young P R, Lee J C. SB203580 is a specific inhibitor of a MAP kinase homologue which is stimulated by cellular stresses and interleukin-1. *FEBS Lett.* 1995;364:229-33.
51. Wang X Z, Ron D. Stress-induced phosphorylation and activation of the transcription factor CHOP (GADD153) by p38 MAP Kinase. *Science.* 1996;272:1347-9.
52. Beyaert R, Cuenda A, Vanden Berghe W, Plaisance S, Lee J C, Haegeman G, Cohen P, Fiers W. The p38/RK mitogen-activated protein kinase pathway regulates interleukin-6 synthesis response to tumor necrosis factor. *EMBO J.* 1996;15:1914-23.
53. Tanaka M, Ito H, Adachi S, Akimoto H, Nishikawa T, Kasajima T, Marumo F, Hiroe M. Hypoxia induces apoptosis with enhanced expression of Fas antigen messenger RNA in cultured neonatal rat cardiomyocytes. *Circ. Res.* 1994;75:426-33.
54. Cheng W, Li B, Kajstura J, Li P, Wolin M S, Sonnenblick E H, Hintze T H, Olivetti G, Anversa P. Stretch-induced programmed myocyte cell death. *J. Clin. Invest.* 1995;96:2247-59.
55. Haunstetter A, Izumo S. Apoptosis: basic mechanisms and implications for cardiovascular disease. *Circ. Res.* 1998;82:1111-29.
56. Greene R F, Collins J M, Jenkins J F, Speyer J L, Myers C E. Plasma pharmacokinetics of adriamycin and adriamycinol: implications for the design of in vitro experiments and treatment protocols. *Cancer Res.* 1983;43:3417-21.

57. Ito H, Miller S C, Billingham M E, Akimoto H, Torti S V, Wade R, Gahlmann R, Lyons G, Kedes L, Torti F M. Doxorubicin selectively inhibits muscle gene expression in cardiac muscle cells in vivo and in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1990;87:4275-9.
58. Bose R, Verheij M, Haimovitz-Friedman A, Scotto K, Fuks Z, Kolesnick R. Ceramide synthase mediates daunorubicin-induced apoptosis: an alternative mechanism for generating death signals. *Cell*. 1995;82:405-14.
59. Zhang J, Clark J J, Herman E H, Ferrans V J. Doxorubicin-induced apoptosis in spontaneously hypertensive rats: differential effects in heart, kidney and intestine, and inhibition by ICRF-187. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 1996;28:1931-43.
60. Herman E H, Zhang J, Hasinoff B B, Clark J J, Ferrans V J. Comparison of the structural changes induced by doxorubicin and mitoxantrone in the heart, kidney and intestine and characterization of the Fe(III)-mitoxantrone complex. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 1997;29:2415-30.
61. Unverferth D V, Mehegan J P, Magorien R D, Unverferth B J, Leier C V. Regression of myocardial cellular hypertrophy with vasodilator therapy in chronic congestive heart failure associated with idiopathic dilated cardiomyopathy. *Am. J. Cardiol.* 1983;51:1392-8.
62. Wang L, Ma W, Markovich R, Chen J W, Wang P H. Regulation of cardiomyocyte apoptotic signaling by insulin-like growth factor I. *Circ. Res.* 1998;83:516-22.
63. Doroshov J H, Locker G Y, Myers C E. Enzymatic defenses of the mouse heart against reactive oxygen metabolites: alterations produced by doxorubicin. *J. Clin. Invest.* 1980;65:128-35.
64. Sadoshima J, Izumo S. The heterotrimeric Gq protein-coupled angiotensin II receptor activates p21ras via the tyrosine kinase-Shc-Grb2-Sos pathway in cardiac myocytes. *EMBO J.* 1996;15:775-787.
65. Schieffer B, Paxton W G, Chai Q, Marrero M B, Bernstein K E. Angiotensin II controls p21ras activity via pp60c-src. *J. Biol. Chem.* 1996;271:10329-10333.
66. Whisler R L, Goyette M A, Grants I S, Newhouse Y G. Sublethal levels of oxidant stress stimulate multiple serine/threonine kinases and suppress protein phosphatases in Jurkat T cells. *Arch. Biochem. Biophys.* 1995;319:23-35.

67. Roberts M , Cowser L. Interleukin-1 beta and reactive oxygen species mediate activation of c-Jun NH₂-terminal kinases, in human epithelial cells, by two independent pathways. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1998;251:166-172.
68. Berridge M J. Inositol trisphosphate and calcium signaling. *Nature.* 1993;361:315-25.
69. Ghosh A , Greenberg M E. Calcium signaling in neurons: molecular mechanisms and cellular consequences. *Science.* 1995;268:239-47.
70. Eguchi S, Matsumoto T, Motley E D, Utsunomiya H , Inagami T. Identification of an essential signaling cascade for mitogen-activated protein kinase activation by angiotensin II in cultured rat vascular smooth muscle cells. Possible requirement of Gq-mediated p21ras activation coupled to a Ca²⁺/calmodulin-sensitive tyrosine kinase. *J. Biol. Chem.* 1996;271:14169-14175.
71. Braun A P , Schulman H. A non-selective cation current activated via the multifunctional Ca²⁺-calmodulin-dependent protein kinase in human epithelial cells. *J. Physiol. (Lond.).* 1995;488:37-55.
72. Yu H, Li X, Marchetto G S, Dy R, Hunter D, Calvo B, Dawson T L, Wilm M, Anderegg R J, Graves L M , Earp H S. Activation of a novel calcium-dependent protein-tyrosine kinase. Correlation with c-Jun N-terminal kinase but not mitogen-activated protein kinase activation. *J. Biol. Chem.* 1996;271:29993-8.
73. Johnson N L, Gardner A M, Diener K M, Lange C C, Gleavy J, Jarpe M B, Minden A, Karin M, Zon L I , Johnson G L. Signal transduction pathways regulated by mitogen-activated/extracellular response kinase kinase kinase induce cell death. *J. Biol. Chem.* 1996;271:3229-37.
74. Bogoyevitch M A, Gillespie B J, Ketterman A J, Fuller S J, Ben L R, Ashworth A, Marshall C J , Sugden P H. Stimulation of the stress-activated mitogen-activated protein kinase subfamilies in perfused heart. p38/RK mitogen-activated protein kinases and c-Jun N-terminal kinases are activated by ischemia/reperfusion. *Circ. Res.* 1996;79:162-73.
75. Ito T, Deng X, Carr B , May W S. Bcl-2 phosphorylation required for anti-apoptosis function. *J. Biol. Chem.* 1997;272:11671-3.
76. Martin S J , Green D R. Protease activation during apoptosis: death by a thousand cuts?. *Cell.* 1995;82:349-52.

77. Seimiya H, Mashima T, Toho M, Tsuruo T. c-Jun NH₂-terminal kinase-mediated activation of interleukin-1 beta converting enzyme/CED-3-like protease during anticancer drug-induced apoptosis. *J. Biol. Chem.* 1997;272:4631-6.
78. Tamura T, Ishihara M, Lamphier M S, Tanaka N, Oishi I, Aizawa S, Matsuyama T, Mak T W, Taki S, Taniguchi T. An IRF-1-dependent pathway of DNA damage-induced apoptosis in mitogen-activated T lymphocytes. *Nature.* 1995;376:596-9.
79. Sawai H, Okazaki T, Yamamoto H, Okano H, Takeda Y, Tashima M, Sawada H, Okuma M, Ishikura H, Umehara H. Requirement of AP-1 for ceramide-induced apoptosis in human leukemia HL-60 cells. *J. Biol. Chem.* 1995;270:27326-31.
80. Kapadia S R, Oral H, Lee J, Nakano M, Taffet G E, Mann D L. Hemodynamic regulation of tumor necrosis factor-alpha gene and protein expression in adult feline myocardium. *Circ. Res.* 1997;81:187-95.

Figure legends

Figure 1. DM induces cardiomyocyte apoptosis.

A. After treatment with 1 μ M DM for 24 h, cardiomyocytes were marked by staining with a monoclonal anti-sarcomeric myosin heavy chain antibody (MF-20) followed by incubation with an anti-mouse IgG conjugated with TRITC (a,c). TUNEL staining using FITC-conjugated antibody was performed as described in Materials and Method (b, d). a, b, untreated cardiomyocytes; c, d, cardiomyocytes incubated with 1 μ M DM for 24 h. B. The number of TUNEL-positive cardiomyocytes was presented as a percentage of MF-20-positive cardiac myocytes (n=100) from three independent experiments (mean \pm S.E.). * P <0.05 versus control. C. Genomic DNA was extracted from cultured cardiac myocytes (1×10^5 cells). DNA was fractionated by electrophoresis in 1.5% agarose gel and stained by fluorescent SYBR[®] Green I. lane 1, molecular weight markers; lane 2, vehicle; lane 3, 1 μ M DM for 24 h. Molecular weight is shown at the left.

Figure 2. DM activates ERKs in cardiac myocytes.

Cardiac myocytes were incubated for 20 min with indicated concentrations of DM (A) or with 100 μ M DM for indicated periods of time (B) and lysed with ice-cold lysis buffer A. Kinase assays in MBP-containing gels were performed as described in Materials and Methods. The cell lysates were applied to SDS-polyacrylamide gel containing MBP. Phosphorylation of MBP was assayed by incubating the gel with [γ -³²P]ATP. After incubation, the gel was washed, dried, and then subjected to autoradiography. The intensity of each band on the autoradiogram was quantified by densitometric scanning, and the activity of ERKs is shown as percent increase in the average from four independent experiments compared with unstimulated controls (100%). * P <0.05 versus control.

Figure 3. DM activates JNKs in cardiac myocytes.

Cardiac myocytes were incubated for 20 min with indicated concentrations of DM (A) or with 100 μ M DM for indicated periods of time (B) and lysed with ice-cold lysis buffer A. A. The cell lysates were incubated at 4°C for 30 min with 1 μ g of GST-c-Jun (1-79) fusion protein in the kinase reaction buffer C containing [γ -³²P]ATP. B. Cell lysates were immunoprecipitated with an anti-JNK

antibody and protein A-Sepharose and incubated with [γ - 32 P]ATP and GST-c-Jun (1-79) protein as a substrate. The samples were applied to 12% SDS-polyacrylamide gels. The gel was washed, dried, and then subjected to autoradiography. The intensity of each band on the autoradiogram was quantified by densitometric scanning, and the activity of JNKs is shown as percent increase in the average from four independent experiments compared with unstimulated controls (100%). * P <0.05 versus control.

Figure 4 . DM activates p38MAPK in cardiac myocytes.

Cardiac myocytes were treated for 20 min with indicated concentrations of DM (A) or with 100 μ M DM for indicated periods of time (B) and lysed with ice-cold lysis buffer A. Cell lysates were subjected to SDS-PAGE, and Western blot analysis was performed using an anti-phosphorylated p38MAPK specific antibody. The blot was developed by ECL as described in Materials and Methods. The intensity of each band on the autoradiogram was quantified by densitometric scanning. The activity of p38MAPK is shown as percent increase in the average from four independent experiments compared with unstimulated controls (100%). * P <0.05 versus control.

Figure 5. DM activates ERKs and p38MAPK through \cdot OH and H_2O_2 .

Cardiac myocytes were preincubated with SOD (50 mM) for 90 min and DMSO (0.5%), catalase (500 U/mg), or MPG (20mM) for 30 min. After incubation for 20 min with 100 μ M DM, the activity of ERKs (A) and p38MAPK (B) was assayed as described under the Fig. 2 and 4 legend, respectively. Representative autoradiograms from three independent experiments are shown.

Figure 6. Ras and Raf-1 are critical for DM-induced ERK activation.

HA-ERK2 or Flag-p38MAPK was transfected into Cardiac myocytes, and the myocytes were treated with 100 μ M DM for 15 min for ERKs or 30 min for p38MAPK. The transfected ERK2 and p38MAPK were immunoprecipitated with an anti-HA polyclonal antibody and an anti-Flag monoclonal antibody, respectively. The immunocomplex was incubated with [γ - 32 P]ATP and MBP as a substrate. Aliquots of the reaction mixture were subjected to SDS-PAGE, and the gel was

washed, dried, and subjected to autoradiography. A representative autoradiogram of ERK2 (A) and p38MAPK (B) from three independent experiments is shown.

Figure 7. DM-induced p38MAPK activation is dependent on Rho.

After transfection of expression plasmids encoding Flag-p38MAPK or HA-ERK2 with D.N.RhoA, D.N.Rac1, D.N.Cdc42, or RhoGDI, cardiac myocytes were maintained in DMEM with 0.1% FBS for 48 h and then treated with 100 μ M DM for 30 min for p38MAPK or 15 min for ERK2. The activity of the transfected p38MAPK or ERK2 was assayed as described under Fig. 6 legend. Representative autoradiograms of p38MAPK (A, top) and ERK2 (B) and from three independent experiments are shown. Western blot analysis using anti-Flag M2 monoclonal antibody was performed to show equal expression of Flag-p38MAPK in each case (A, bottom).

Figure 8. DM-induced activation of ERKs and p38MAPK is dependent of Ca²⁺ but independent of PKC, PKA, and TKs in cardiac myocytes.

A, B. Extracellular and intracellular Ca²⁺ was chelated by incubation for 2 min with 5 mM EGTA and for 30 min with 40 μ M BAPTA, respectively. Cardiac myocytes were treated with 100 μ M DM for 20 min, and activities of ERKs (A) and p38MAPK (B) were assayed as described in the Fig. 2 and 4 legend, respectively. Representative autoradiograms from three independent experiments are shown. C, D. PKC was downregulated by incubation of cardiac myocytes with 0.1 μ M TPA for 24 h or inhibited by pretreatment with 1 μ M Calphostin C for 60 min. PKA was inhibited by pretreatment with 100 μ M RpcAMP for 10 min. Receptor or cytoplasmic TKs were inhibited by pretreatment with 50 μ M Tyrphostin (A25) or 20 μ M Genistein for 30 min. Cardiac myocytes were treated by 100 μ M DM for 20 min or by TPA (0.1 μ M), isoproterenol (1 μ M), or insulin (1 μ M) for 8 min and activities of ERKs (C) and p38MAPK (D) were measured as described under Fig. 2 and 4 legend, respectively. Representative autoradiograms from three independent experiments are shown.

Figure 9. ERKs and p38MAPK play opposite roles in DM-induced cardiac apoptosis.

After preincubation with 50 μ M PD98059 for 60 min or 10 μ M SB203580 for 2 h, cardiomyocytes were incubated with 1 μ M DM for 24 h. A. TUNEL staining was performed as described under Fig. 1 legend. One hundred of MF-20-positive cardiac myocytes were counted, and the number of TUNEL-positive cells was presented as a percentage from three independent experiments (mean \pm S.E.). * P <0.05 versus control; ** P <0.05 versus DM treatment. B. Genomic DNA was extracted and fractionated in a 1.5% agarose gel as described in Fig. 1 legend. lane 1, DNA size markers; lane 2, vehicle; lane 3, 1 μ M DM for 24 h; lane 4, pretreatment with 50 μ M PD98059 for 60 min+1 μ M DM for 24 h; and lane 5, pretreatment with 10 μ M SB203580 for 2 h+1 μ M DM for 24 h. C. After transfected with HA-ERK2 or Flag-p38MAPK, cardiomyocytes were stimulated by 100 μ M DM for 20 min and stained using phalloilin-TRITC (g-l) and either anti-HA or anti-Flag M2 antibodies, followed by incubation with an anti-mouse IgG conjugated with FITC (a-f). a and g, untreated cardiomyocytes; b and h, cardiomyocytes with DM treatment; c and i, Flag-p38MAPK-transfected cardiomyocytes without DM treatment; d and j, Flag-p38MAPK-transfected cardiomyocytes with DM treatment; e and k, HA-ERK2-transfected cardiomyocytes without DM treatment; f and l, HA-ERK2-transfected cardiomyocytes with DM treatment. D. After transfected with HA-ERK2 or Flag-p38MAPK, cardiomyocytes were stained with TUNEL method (d-f) and either anti-HA (c) or anti-Flag M2 (a) antibodies and anti-HA plus anti-Flag M2 antibodies (b), followed by incubation with an anti-mouse IgG conjugated with TRITC. b and e, untreated cardiomyocytes; c and f, HA-ERK2-transfected cardiomyocytes; a and d, Flag-p38MAPK-transfected cardiomyocytes.

日本財団補助金による

1998年度日中医学協力事業報告書

—在留中国人研究者研究助成—

年 月 日

財団法人 日中医学協会
理事長 中島章 殿

研究室で撮影した本人のスナップ写真、及び発表論文のコピーを添付

1. 研究者氏名 許 明 江
研究機関 東京大学医学研究所 研究指導者 中畑 龍俊 職名 教授
所在地 〒108-8639 港区白金台 4-6-1 電話 3449-5694 内線 _____

研究テーマ 造血幹細胞の自己複製機構の解析とヒト造血幹細胞の増幅への応用

2. 本年度の研究業績

(1) 学会・研究会等における口頭発表 有 ・ 無 (学会名・内容)

Ming-jiang Xu, K. Tsuji, S. Matsuoka, F.C. Yang, Y. Ebihara, M. Eguchi, and T. Nakahata. Evidence for the presence of murine primitive megakaryopoiesis in the early yolk sac. (Abstract 2331) The 40th Annual meeting of the American Society of Hematology. Miami Beach, FL, December 4-8, 1998.

(2) 学会誌等に発表した論文 有 ・ 無 (雑誌名・論文名)

Ming-jiang Xu, Kohichiro Tsuji, Takahiro Ueda, Yoh-suke Mukouyama, Takahiro Hara, Feng-Chun Yang, Yasuhiro Ebihara, Sahoko Matsuoka, Atsushi Manabe, Akira Kikuchi, Mamoru Ito, Atsushi Miyajima, and Tatsutoshi Nakahata: Stimulation of mouse and human primitive hemaropoiesis by murine embryonic aorta-gonad-mesonephros-derived stromal cell lines. *Blood* 92, 2032-2040, 1998.

Ming-jiang Xu, Kohichiro Tsuji, Sahoko Matsuoka, Feng-Chun Yang, Yasuhiro Ebihara, Mitsuki Eguchi, and Tatsutoshi Nakahata. Evidence for the presence of murine primitive megakaryopoiesis in the early yolk sac. (*Blood*, in submission)
Feng-Chun Yang, Sumiko Watanabe, Kohichiro Tsuji, Ming-jiang Xu, Azusa Kaneko, Yasuhiro Ebihara, and Tatsutoshi Nakahata: Human G-CSF stimulates the development of primitive multipotential progenitors of human G-CSF receptor-transgenic mice, but does not affect their commitment in vitro and in vivo. *Blood* 92, 4632-4640, 1998.

3. 今後の研究計画

純化されたマウス造血幹細胞と胎生期の Megakaryocyte の cDNA ライブラリーより、造血幹細胞自己複製因子受容体の cDNA をバインディング法等を用いて単離することより、造血幹細胞の自己複製機構を明らかにする。また、マウス胎生期における造血に、Megakaryocyte が Platelet に分化し易いことより、Megakaryocyte が Platelet に分化機構に関する遺伝子を単離する。

4. 研究指導者の意見

許先生は極めて熱心な血球の発生学 (Cytology) 研究で、短期間で多くの成果をあげつつあります。

先生が樹立された aorta-gonad-mesonephros (AGM) 領域からのストロー細胞株は、造血幹細胞の増殖を支持する点から、世界中の注目を集めております。

また胎児型の巨核球の存在も世界で初めて明らかとなり、今後の研究の発展が期待されます。

現在、短期間米国での分子生物学手法の習得は行われており、帰国後の一層の研究の発展が期待されます。このように許先生は極めて特筆すべき研究者であり、
研究指導者氏名 中川能俊 

5. 研究報告

別紙形式を参考に、報告本文4000字以上で報告して下さい (枚数自由・ワープロ使用)

タイトル・要旨等は日本語で、KEY WORDS以下は日本語或いは英語で記入して下さい。

研究成果の発表予定がある場合は発表原稿・抄録集等を添付して下さい。

論文発表に当っては、日中医学協会-日本財団補助金による旨を明記して下さい。

研究テーマ：マウス胎生期造血幹細胞の自己複製機
構の解析と一次造血における造血の解析

許明江 中国山東医科大学付属病院 医者

中畑龍俊 東京大学医科学研究所癌病態学研究部 教授

要旨：マウスの definitive hematopoiesis の起源となる造血幹細胞は、胎生10.5日マウスの aorta-gonad-mesonephros (AGM) 領域で著明に増幅された後胎児肝へ移動することより、この時期のAGM領域にはマウス造血幹細胞の自己複製を支持する分子を発現する細胞が存在すると考えられる。胎生10.5日マウスのAGM領域より細胞を分離、長期培養することにより、細胞株AGM-S1,2 と3を樹立した。純化された造血幹細胞を樹立された細胞株と共培養し、造血幹細胞の増殖を支持する機能を有する細胞株を選別し、最終的には培養造血幹細胞の造血再構築能を *in vivo* 移植実験にお

いて検討することにより、細胞株 AGM-S3 の造血幹細胞の自己複製支持能を確認した。

また、マウス胎生期造血においては、卵黄嚢に発生する一次造血と胎児肝を中心とする二次造血は、それぞれ性状の異なる Erythrocyte, Macrophage, Lymphocyte を有することが知られているが、Megakaryocyte, Platelet については明らかにされていない。それで我々は、マウス胎生期における造血について、特殊な Megakaryocyte, Platelet を発見し、その特性を character した。

Key words: 造血幹細胞, 自己複製, 胎生期造血, 巨核球

目的: 造血幹細胞の自己複製は、基本的な生命現象のひとつである造血の根幹をなす現象であるばかりでなく、細胞の増殖、分化、死の本態とも関わる重要かつ本質的な問題であります。また、現在行なわれている骨髄移植療法において解決しなければならない課題のひとつは、ドナーが体格の小さな女性あるいはこどもである場合のように、必要とされるヒト造血幹細胞の

採取が困難な場合の移植造血幹細胞の確保の問題です。この問題の解決のためには、ヒト造血幹細胞の増幅法の確立が重要と考えられます。ヒト造血幹細胞の生体外での増幅法が確立されれば、幹細胞移植に必要な幹細胞数の少なくすることができ、造血幹細胞の採取を簡単にし、骨髄提供者の安全性の確保のためにも有益です。また、ヒト造血幹細胞を標的細胞とする遺伝子治療においても、遺伝子の導入効率を高めるための有効な手段となります。

また、多くの出血病の原因は、MegakaryocyteがPlateletに分化障害である。マウス胎生期造血においては、卵黄嚢に発生する一次造血と胎児肝を中心とする二次造血は、それぞれ性状の異なるErythrocyte, Macrophage, Lymphocyteを有することが知られているが、Megakaryocyte, Plateletについては明らかにされていない。それで我々は、マウス胎生期における造血に、MegakaryocyteがPlateletに分化し易いことを発見した。

方法と結果：造血幹細胞は胎生10.5日AGM領域に発生し著

明に増幅することより、この領域には造血幹細胞増幅因子が発現されている可能性が示唆される。我々は造血発生や造血幹細胞の増幅機構を明らかにするために、胎生10.5日胎仔マウスのAGM領域よりストローマ細胞株、AGM-

S3を樹立した。flow cytometryによる解析では、AGM-S3細胞はVCAM-1、CD13、Sca-1を発現していた。AGM-S3細胞はマウス骨髄細胞中のLin-c-Kit+Sca-1+細胞からのコロニー形成細胞およびCFU-Sの産生を支持した。またヒトCD34+細胞との共培養では、混合コロニー形成細胞を含むコロニー形成細胞の著明な増幅が認められ、特にCD34+CD38-細胞との共培養では、培養6週間後でも多数の混合コロニー形成細胞が認められた。更にNOD/SCIDへの移植実験により、ヒトの長期造血再構築能を有する細胞はAGM-S3細胞上で4週間維持されることが示された。RT-PCRによる各種サイトカインの発現の検討では、AGM-S3細胞はSCF、IL-6、OSMを発現していた。

また、マウス胎児の卵黄嚢、胎児肝及び成体マウスの骨髄細胞を種種のサイトカイン存在下で培養し、形成されるコロニーを検討した。Megakaryocyte, Erythroidを含む混合コロニー

中の Erythroid グロビンを RT-PCR をもちいて検討した。

胎体 7.5 日の卵黄嚢からは、多数の Megakaryocyte コロニー及び Megakaryocyte コロニーを含む混合コロニーが形成されたが、胚からのコロニー形成が認められなかった。コロニーに含まれる Megakaryocyte は、成体マウス骨髄細胞から形成されるコロニーと比較して、大型で、成熟傾向が強かった。また、Megakaryocyte、Erythroid を含む混合コロニー中の Erythroid は、RT-PCR により胚型 Erythroid であることが証明された。この一次造血由来 Megakaryocyte コロニーは、種類のサイトカインにたいして高い感受性をしめした。胎生 13.5 胎児肝及び成体マウスの骨髄細胞から形成されるコロニーには、一次造血由来 Megakaryocyte コロニーはほとんど含まれていなかった。

考查：樹立された造血幹細胞の自己複製支持能を有する細胞株 AGM-S3 より cDNA ライブラリーを作製し、線維芽細胞を用いた発現クローニング法により造血幹細胞自己複製因子の cDNA を単離しました。また、前述の FACS セルソーターによ

り純化されたマウス造血幹細胞のcDNAライブラリーより、造血幹細胞自己複製因子受容体のcDNAをバインディング法等を用いて単離することより、造血幹細胞の自己複製機構を明らかにするとそれをヒト造血幹細胞の増幅に応用するに、大きな影響があると考えられる。また、マウス胎生期における造血に、MegakaryocyteがPlateletに分化し易いことより、多くの出血病の根治には、有用と考えられる。MegakaryocyteがPlateletに分化機構を明らかにするにも有用と考えられる。

References

1. Dzierzak, E.A. & Medvinsky, A.L. Mouse embryonic hematopoiesis. *Trends Genet* 11, 356-366 (1995).
2. Faust, N., Huber, M.C., Sippel, A.E. & Bonifer, C. Different macrophage populations develop from embryonic/fetal and adult hematopoietic tissues. *Exp Hematol* 25, 432-444 (1997).
3. Okuda, T., Deursen, J.V., Hiebert, S., Grosveld, G. & Downing, J.R. AML, the target of multiple chromosomal translocations in human leukemia, is essential for normal fetal liver hematopoiesis. *Cell* 84, 321-330 (1996).
4. Tanaka, Y., et al. Stem cell factor enhances proliferation, but not maturation, of murine megakaryocytic progenitors in serum-free culture. *Blood* 80, 1743-1749 (1992).

5. Bielinska, M., Narita, N., Heikinheimo, M., Porter, S. & Wilson, B. Erythropoiesis and vasculogenesis in embryoid bodies lacking visceral yolk sac endoderm. *Blood* 88, 3720-3730 (1996).
6. Kennedy, M., et al. A common precursor for primitive erythropoiesis and definitive haematopoiesis. *Nature* 386, (1997).
7. Nakano, T., Kodama, H. & Honjo, T. Generation of lymphohematopoietic cells from embryonic stem cells in culture. *Science* 265, 1098-1101 (1994).
8. Wong, P.M.C., Chung, S.W., Reicheld, S.M. & Chui, D.H.K. Hemoglobin switching during murine embryonic development: evidence for two populations of embryonic erythropoietic progenitor cells. *Blood* 67, 716-721 (1986).
9. Nakahata, T., and M. Ogawa. Identification in culture of a class of hemopoietic colony-forming units with extensive capability to self-renew and generate multipotential hemopoietic colonies. *Proc Natl Acad Sci USA* 79, 3843-3847 (1982).
10. Nakahata, T., et al. Extensive proliferation of mature connective-tissue type mast cells in vitro. *Nature* 324, 65-67 (1986).
11. Koike, K., et al. Interleukin-6 enhances murine megakaryocytopoiesis in serum-free culture. *Blood* 75, 2286-2291 (1990).
12. Sui, X., et al. gp130 and c-Kit signalings synergize for ex vivo expansion of human primitive hemopoietic progenitor cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 92, 2859-2863 (1995).
13. Imai, T., et al. Interleukin-6 supports human megakaryocytic proliferation and differentiation in vitro. *Blood* 78, 1969 (1991).
14. Eguchi, M., Nakahata, T., Tsuji, K. & Furukawa T. Morphological

and cytochemical changes in human mast cells during culture. *Med Electron Microsc* 30, 25-30 (1997).

15.. Weiss, M.J., Keller, G. & Orkin, S.H. Novel insights into erythroid development revealed through in vitro differentiation of GATA-1- embryonic stem cells. *Genes & Dev.* 8, 1184-1197 (1994).

日本財団補助金による

1998 年度日中医学協力事業報告書

—在留中国人研究者研究助成—

1998 年 10 月 21 日

財団法人 日中医学協会

理事長 中島章 殿

研究室で撮影した本人のスナップ写真、及び発表論文のコピーを添付

1. 研究者氏名 張 雁
研究機関 石島大学歯学部口腔外科 I 研究指導者 岡本 雄治 職名 教授
所在地 〒734-8553 石島市南正親 1-2-3 電話 082-257-5667 内線 _____

研究テーマ 野生型 KGF 受容体遺伝子導入によるヒト唾腺由来腺癌細胞の分化誘

2. 本年度の研究業績

(1) 学会・研究会等における口頭発表 有 ・ 無 (学会名・内容)

1. 悪性唾腺腫瘍に対する遺伝子治療の基礎的研究
第52回 口腔科学会総会, 松山, 平成10年4月16日-17日
2. wild type KGF 遺伝子導入によるヒト唾腺由来腺癌細胞の増殖制御
第57回 日本癌学会, 横浜, 平成10年9月30-10月2日
3. 野生型 KGF 受容体導入によるアポトーシス誘導
第43回 口腔外科学会, 松本, 平成10年10月7日-8日

(2) 学会誌等に発表した論文 有 ・ 無 (雑誌名・論文名)

今後の研究：

野生型KGF受容体及びドミナントネガティブFGFR1(IIIc)遺伝子を唾液腺腺癌細胞にco-transfection 後、neomycin及びzeocin耐性細胞を選択する。続いて、in vitro 及びin vivo における分化能を検討し、唾液腺腫瘍におけるFGFR1およびKGFの機能を明らかにするとともに、ヌードマウス移植腫瘍に野生型KGF受容体遺伝子をex vivo の系で遺伝子導入しその増殖、分化に及ぼす影響を検討し、最終的には唾液腺腺癌の遺伝子分化誘導療法への応用の可能性を探究する。

指導者の意見：



正常唾液腺上皮細胞の増殖・分化は間葉系組織が産生するKGFにより制御されているが、悪性化に伴いその間葉依存性は消失し、自己の産生するFGF-2と自己の発現するFGF-2受容体であるFGFR1受容体によりオートクリン機構により増殖が可能となる。したがって、野生型KGF受容体遺伝子を腫瘍細胞に導入することにより、悪性化にともない消失した腫瘍細胞の間葉依存性を回復し、間葉系が発現・産生するKGFによる分化誘導を期待するものである。現在までのところ、野生型KGF受容体遺伝子導入唾液腺由来腺癌細胞は、in vitroにおいてはその増殖能を失いKGFによりapoptosisが誘導されること、さらに、ヌードマウス背部皮下移植により、in vivoにおいても造腫瘍性は低下し組織学的に分化像を認め、一部の導入細胞は造腫瘍性を失うことを明らかにしている。

本研究は悪性腫瘍の成立を、上皮-間葉相互作用の消失ととらえ、それを回復することにより悪性腫瘍の分化誘導遺伝子療法を目指したものであり独創性は非常に高い。

張 雁

中国での所属、役職：中国広州南方医院口腔外科学 助手

日本での指導者：岡本哲治 広島大学歯学部口腔外科学第1講座 教授

要旨：唾液腺はその正常の機能と構造を維持するため、密接に連絡しあった上皮系と間葉系の高度に分化した細胞構造を示す。唾液腺腫瘍は2つのステージに分類され、初期においては多形性腺腫に代表される多分化能を持った比較的増殖の遅い腫瘍であり、後期においては腺様嚢胞癌に代表される未分化で増殖能や転移能の高い悪性度の非常に高い腫瘍である。

我々は、唾液腺腫瘍の悪性転換過程に、腫瘍細胞におけるFGF-2の発現異常および過剰発現が伴うこと、さらに、悪性化に伴い、唾液腺のstroma組織が発現するFGF-7/KGFの受容体遺伝子FGFR2(IIIb)の発現が消失し、正常唾液腺上皮細胞では発現していないFGF-2をリガンドとするFGFR1(IIIc)遺伝子が発現してくることを明らかにした。したがって、正常唾液腺においては、上皮細胞と間葉系細胞はKGF-KGFR/FGFR2(IIIb)系を介して互いに依存しあってその増殖、分化と機能を維持しているが、腺癌細胞は間葉系組織とはまったく独立して自己増殖することが可能となりその悪性化が強く裏付けられた。これらの結果は、FGF-2-FGFR1系シグナルがヒト唾液腺腫瘍の悪性化深く関与している可能性を示唆していると共に、KGF-KGFR/FGFR2(IIIb)系シグナルが唾液腺上皮の正常分化の維持に重要な働きをしていることを示唆している。

本研究においては、チロシンキナーゼ領域を欠失したドミナントネガティブ型FGFR1遺伝子(dnFGFR1)を唾液腺腺癌細胞に発現させることによりFGF-2-FGFR1系によるオートクリンループを遮断すると共に、KGF-KGFR/FGFR2(IIIb)系シグナルが唾液腺上皮の正常な分化能の維持に重要な働きをしているという仮説に基づき、野生型(wt)KGFR/FGFR2(IIIb)遺伝子をFGFR1(IIIc)発現唾液腺由来腺癌細胞に導入することにより、in vitro およびin vivoにおいて唾液腺由来腺癌細胞の分化を誘導する、唾液腺腺癌の遺伝子分化誘導療法を目指すことを目的とする。

本研究の特色は、唾液腺腫瘍の悪性転換過程を、上皮系細胞の間葉系細胞へのKGF-KGF受容体系を介したによる依存性から、FGF-2-FGFR1系へのスイッチによる間葉系細胞からの独立ととらえた点である。そして、逸脱した癌細胞の自己増殖性をdnFGFR1の導入により抑制し、さらに、KGFR/FGFR2(IIIb)遺伝子導入により間葉依存性細胞へ回復することにより、癌細胞の分化を誘導する遺伝子療法を目指すものである。本治療法が有効になれば唾液腺腫瘍だけでなく他の腫瘍の治療への応用が可能となる。

Key Words: fibroblast growth factor(FGF); FGF receptor(FGFR) ; human normal salivary gland ; adenocarcinoma; differentiation; apoptosis; signal transduction

研究報告

目的：我々は、正常ヒト唾液腺上皮細胞のin vitroにおける増殖およびコラーゲン内培養系における管腔形成にFGF-1あるいはFGF-7/KGFが必須であることを明らかにした(1, 2)。さらに、唾液腺腫瘍の悪性転換過程において、腫瘍細胞におけるFGF-2の発現異常および過剰発現が伴うこと(3, 4)、さらに、唾液腺の間葉系細胞が発現するFGF-7/KGFの受容体遺伝子FGFR2(IIIb)/KGFRの腫瘍細胞における発現が消失し、正常唾液腺上皮細胞では発現していないFGF-2の受容体遺伝子であるFGFR1(IIIc)遺伝子が発現してくることを報告した(5, 6)。したがって、正常唾液腺においては、上皮細胞と間葉系細胞はKGF-KGFR/FGFR2(IIIb)系を介してたがいに依存しあってその増殖、分化と機能を維

持っているが、腺癌細胞は間葉系組織とはまったく独立して自己増殖することが可能となりその悪性化が強く裏付けられた。これらの結果は、FGF-2-FGFR1系シグナルがヒト唾液腺腫瘍の悪性化に深く関与している可能性を示唆していると共に、KGF-KGFR/FGFR2(IIIb)系シグナルが唾液腺上皮の正常分化の維持に重要な働きをしていることを示唆している。

本研究においては、チロシンキナーゼ活性を欠失したドミナントネガティブ型FGFR1(IIIc)遺伝子(dnFGFR1(IIIc))を唾液腺腺癌細胞に発現させることによりFGF-2-FGFR1系によるオートクリンループを遮断すると共に、KGF-KGFR/FGFR2(IIIb)系シグナルが唾液腺上皮の正常な分化能の維持に重要な働きをしているという仮説に基づき、wild-type(wt)KGFR/FGFR2(IIIb)遺伝子を唾液腺腺癌細胞に導入して、*in vitro* および*in vivo*において唾液腺由来腺癌細胞の分化を誘導する唾液腺腺癌の遺伝子分化誘導療法を目指した。

方法：dnFGFR1(IIIc)遺伝子はpcDNA1/neo vectorを用いて、wild-type(wt)KGFR/FGFR2(IIIb)遺伝子はpcDNA 3.1/Zeo mammalian expression vectorを用いて、リポフェクション法にて唾液腺由来腺癌細胞HSYに導入した。Neomycin およびZeocin耐性細胞をそれぞれ選択後、125I-FGF-2および125I-KGFを用いて高発現細胞をクローニングすることにより、dnFGFR1(IIIc)過剰発現HSY細胞dnHSYR1(IIIc) およびwtKGFR過剰発現HSY細胞HSYR2(IIIb)を得た。対照として、pcDNA1/neoおよびpcDNA 3.1/Zeo vectorのみを導入したNeomycin およびZeocin耐性HSY細胞をいた。つぎに、これら細胞の*in vitro*における増殖能、FGF-1,-2およびKGFに対する反応性をRD培地にinsulin, transferrin, 2-ethanolamine, 2-mercaptoethanol, sodium seleniteを加えた無血清培地(RD5F)で検討すると共に、*in vivo*における増殖能、造腫瘍性についてBALB/cヌードマウス背部皮下移植系を用いて検討した。そして、dnFGFR1(IIIc)および(wt)KGFR/FGFR2(IIIb)遺伝子導入により、分化マーカーであるアミラーゼを検討すると共に、FGF-2-FGFR1系とKGF-FGFR2系のシグナル伝達経路およびアポトーシスシグナル下流のカスパーゼ活性を検討した。

結果：

HSY細胞にdnFGFR1(IIIc)遺伝子およびwtKGFR/FGFR2(IIIb)を発現させ、dnHSYR1(IIIc)及びwtHSYR2(IIIb)のクローンを得た。dnHSYR1(IIIc)とwtHSYR2(IIIb)細胞は無血清培地では増殖できず、dnHSYR1(IIIc)細胞はFGF-1及びFGF-2により増殖促進されなかった。wtHSYR2(IIIb)細胞はFGF-1により増殖促進されたが、FGF-2及びKGFにより増殖促進されなかった。dnHSYR1(IIIc)及びwtHSYR2(IIIb)細胞のヌードマウス背部皮下における増殖能はコントロールと比較して低下し、さらに、一部のクローンは造腫瘍性は消失した、組織学的には分化像を認めた。親HSY細胞及びwtHSYR2(IIIb)細胞における、アミラーゼのmRNA量を測定した。その結果、wtHSYR2(IIIb)細胞においてアミラーゼmRNAおよび蛋白質が高発現されていることが明らかになった。

また、KGF処理したwtHSYR2(IIIb)細胞では、位相差顕微鏡下、HE染色およびTUNELにおいて、アポトーシスを示唆する所見が認められた。さらに、DNAを抽出し、電気泳動を行ったところ、DNAの断片化を示すladder formationが認められた。カスパーゼの1つであるCPP32をCaspase activity assayおよび免疫蛍光染色法で検討した。その結果、CPP32の高い活性が認められた。

シグナル伝達経路について、KGF-FGFR系とFGF-2-FGFR1(IIIc)系シグナルの伝達経路は異なった。FGFR1は、FGFsの結合を受けて二量体化し、チロシンキナーゼ活性が上昇し、FRS2(FGF receptor substrate)/SNT/SLP-Grb2-SHCのシグナリングコンプレックス形成、リン酸化続いて、ERK型のMAPKが活性化されるという報告がなされている。ところが、本研究では、親HSY細胞における、FRS2及びSHCのリン酸化認められたが、wtHSYR2(IIIb)細胞における、FRS2及びSHC(P66 Isoform)のリン酸化は認められなかった。

考察：FGF受容体のシグナルは、FGFが細胞外部位に結合して二量体化し、FGF受容体のホモダイマーあるいはヘテロダイマー形成により、TK1領域では複数のチロシン残基が自己リン酸化するとともに、多種類の蛋白質がリン酸化され、伝達されると考えられている。

唾液腺腫瘍の悪性化に伴い、FGFR2(IIIb)遺伝子の発現の消失とFGFR1 (IIIc) 及びFGFR4遺伝子の発現が生じていることが明らかとなった。本研究では、TK1に25bpのインサートをHSY細胞に導入し、frameshift mutationを起こすことにより、FGFとの受容体結合能は持つがキナーゼ活性を持たないドミナントネガティブ受容体を用いた。その結果、キナーゼの活性化は引き起こされなかった。wt KGFR/FGFR2(IIIb)遺伝子をHSY細胞に導入すると、FRS2及びSHCのリン酸化活性は抑制され、Ras経路やMAPキナーゼなどのシグナル伝達が遮断された。さらに、SHC-Grb2コンプレックスの形成、リン酸化は悪性転換に必須で(8)、HSY2(IIIb)細胞におけるSHCリン酸化過程が阻害されることにより、唾液腺腫瘍の悪性形質転換をある程度に遮断出来る可能性が考えられる。したがって、ドミナントネガティブFGFR1 (IIIc) およびwt KGFR/FGFR2(IIIb)遺伝子を用いて唾液腺癌の増殖を制御出来ることが明らかとなり、同遺伝子を用いた唾液腺癌の遺伝子治療への応用の可能性が考えられた。

また、アポトーシスは、さまざまな生物にとって必要不可欠な生命現象である。アポトーシスに特異的なシグナル伝達分子もいくつか同定されるに至った。実行段階ではいずれも共通なシグナル伝達経路を介する、この経路ではカスパーゼと呼ばれるタンパク質分解酵素群が順次活性化され、最終的に多数の基質タンパク質を切断することが共通にみられる(7)。wt KGFR/FGFR2(IIIb)遺伝子導入により、ERK1, 2型のMAPKとは異なるJNK/MKK4型のMAPKおよびP38 MAPKが活性化され、CPP32の活性化を誘導し、アポトーシスを引き起こすの可能性が考えられる(9)。

以上、正常唾液腺においては、上皮系細胞と間葉系細胞が細胞内分泌学的に互いに依存しあって、その増殖、分化が制御されていると考えられる。今回の研究結果から、唾液腺腫瘍の悪性転換過程を、上皮系細胞の間葉系細胞へのKGF-KGF受容体系を介した依存性から、FGF-2-FGFR1系へのスイッチによる間葉系細胞からの独立ととらえた点である。そして、逸脱した癌細胞の自己増殖性をdnFGFR1の導入により抑制し、さらに、KGFR/FGFR2(IIIb)遺伝子導入により間葉依存性細胞へ回復させることにより癌細胞の分化を誘導する遺伝子治療法の可能性が示唆された。本治療法は唾液腺腫瘍だけでなく他の悪性腫瘍の治療への応用が可能となる。

参考文献：

1. Myoken, Y., et al. Effect of fibroblast growth factor-1 on the three-dimensional growth and morphogenesis of human salivary gland epithelial cells embedded in collagen gels. *In Vitro Cell. Devel. Biol.*, 31:84-86, 1995.
2. Okamoto, T., et al. Androgen-dependent expression of fibroblast growth factor-1 in submandibular gland of mouse. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 221:795-802, 1996.
3. Myoken, Y., et al. Expression of fibroblast growth factor-1 (FGF-1), FGF-2 and FGF receptor in a human salivary gland adenocarcinoma cell line, evidence of autocrine growth. *Int. J. Cancer*, 65:652-657, 1996.
4. Myoken, Y., et al. Immunohistochemical study of overexpression of fibroblast growth factor-1 (FGF-1), FGF-2 and FGF receptor-1 in human malignant salivary gland tumors. *J. Pathology*, 178: 429-436, 1996.
5. Myoken, Y., et al. Immunohistochemical location of fibroblast growth factor-1 (FGF-1), FGF-2 and FGF receptor-1 (FGFR-1) in pleomorphic adenoma of the salivary glands. *Oral Pathol. Med.*, 26:17-22, 1997.
6. Okamoto, T., et al. Expression of fibroblast growth factor binding protein HBp17 in normal and tumor cells. *In Vitro Cell. Devel. Biol.*, 32:69-71, 1996.
7. Allen, R.T., et al. Mechanisms controlling cellular suicide: role of bcl-2 and caspases. *Cell. Mol. Life. Sci.*, 54: 427-445, 1998.
8. Salcini, A. E., et al. Formation of Shc-Grb2 complexes is necessary to induce neoplastic transformation by overexpression of Shc proteins. *Oncogen*, 9:2827-2836, 1994.
9. Shine, G.S., et al. Activation of c-Jun NH2-terminal kinase and subsequent CPP32/

Yama during topoisomerase inhibitor β -lapachone-induced apoptosis through an oxidation-dependent pathway. *Can. Res.*, 59:391-398,1999.

日本財団補助金による
1998 年度日中医学協力事業報告書
-在留中国人研究者研究助成-

1999 年 3 月 15 日

財団法人 日中医学協会
理事長 中島章殿

研究室で撮影した本人のスナップ写真、及び発表論文のコピーを添付

1. 研究者氏名 陳潔
研究機関 東京大学医学部 附属病院 研究指導者 豊岡照彦 職名 教授
所在地 〒113 東京都文京区本郷 7-3-1 電話 3815-5411 内線 3074

研究テーマ 血管平滑筋細胞内イノシトール三リン酸誘発性Ca²⁺放出と細胞増殖における1と3型イノシトール三リン酸受容体の異なる役割の解明

2. 本年度の研究業績

(1) 学会・研究会等における口頭発表 有 ・ 無 (学会名・内容)

1. 作者: Yuepeng Wang, Jie Chen, Wang Yue, Wee Soo Shin, Aiji Sakamoto, Teruhiko Toyo-oka.
学会: XIII International Congress of Pharmacology, Munchen, Germany, July, 1998
題目: Intact 1,4,5-trisphosphate-induced Ca²⁺ release and capacitative Ca²⁺ entry partially defrays the effect of autocrined nitric oxide on intracellular Ca²⁺ concentration in endothelial cells.
雑誌: *Archives of Pharmacology* 1998; 358 (suppl I): R300 (abstr)
2. 作者: Jie Chen, Yuepeng Wang, Wang Yue, Wee Soo Shin, Aiji Sakamoto, Toshiaki Nakajima, Kuniaki Iwasawa, Teruhiko Toyo-oka.
学会: The 71th Scientific Session of American Heart Association, Dallas, USA, Nov., 1998.
題目: Nitric oxide buffers intracellular Ca²⁺ dynamics by its opposite autocrine actions on inositol 1,4,5-trisphosphate-induced Ca²⁺ release and capacitative Ca²⁺ entry in endothelial cells.
雑誌: *Circulation* 1998; 96(suppl I): I-667 (abstr)
3. 作者: 王岳鵬、陳潔、王岳、申偉秀、岩沢邦明、中島敏明、豊岡照彦
学会: 第63回日本循環器学会総会 東京 1999年3月
題目: 内因性Nitric Oxideは血管平滑筋細胞(VSMC)内I型IP₃受容体(IP₃R₁)とIP₃-Induced Ca²⁺ Release (ICR)をDown-Regulateする事でVSMC増殖を抑制する
雑誌: *Japanese Circulation Journal* 1999; 63(Suppl I): in press

(2) 学会誌等に発表した論文 有 ・ 無 (雑誌名・論文名)

1. 王岳鵬、陳潔、王岳、豊岡照彦 第2章 "NOと細胞間クロストーク", in 特集: NOと治療薬、治療学 (Biomedicine & Therapeutics)、平成11年6月出版、ライフサイエンス社。
2. 近く投稿する英文論文三つ。

3. 今後の研究計画

- 1) 速やかに今の研究成果を英文雑誌に投稿します。
- 2) 血管平滑筋細胞の増殖における IP_3R_3 の長期間の役割をDNA合成時の 3H -thymidine取り込み量で評価する。共存培養の血管平滑筋細胞では、in situ hybridizationで IP_3R_1 の発現変化を確認する。内皮細胞では、ecNOS又は IP_3R_1 の全長のcDNAを細胞に導入する。内皮細胞内のecNOSと IP_3R_1 蛋白質をover-expressionさせた後、IICR、CCEとNOの変化をpatch-clampで解析し、NOのCCEを促進する機構を検討する。血管平滑筋細胞では、*trpltrpl*、電位依存性 Ca^{2+} channel、細胞膜 Ca^{2+} pump、及びcalsequestrin等を別々にantisenseでblockし、その抑制作用を細胞内 Ca^{2+} 動態測定又は電気生理的解析で確認した上、IICR/CCE/NOの機能変化と細胞増殖能の変化を解明する。内皮細胞内NOはどのような Ca^{2+} channelを介してCCEを促進するか解明する。血管平滑筋細胞と比較し、NOは血管平滑筋細胞に強い作用を示す原因はNOのCCEに作用機構の違いによるものか否かを確認する。更に、PDGF等の刺激後のc-fos/rasの発現変化を求める。
- 3) 上記の培養細胞での成果をin vivoに応用する為、動脈硬化の動物modelを作る。 Ca^{2+} 動態の修飾操作の視点から血管平滑筋細胞の増殖とrestenosisを抑制する。AAVを用いて、 β -galをreporter geneとしてratの動脈硬化modelの頸動脈に遺伝子を導入する。 IP_3R_1 、 IP_3R_3 、*trpltrpl*、電位依存性 Ca^{2+} channel、細胞膜 Ca^{2+} pump、calsequestrin等の発現をantisense DNAでblockし、細胞増殖の抑制能力を評価し、効率の良い方法を見つける。

4. 研究指導者の意見

この一年間、貴協会から研究助成を頂きまして、本当に有難うございました。陳潔さんは94年8月から客員研究員として本内科に私費留学していました。その時、経済的困難を克服し、日本語を勉強しながら研究技能を学びました。97年4月大学院に入学し、血管内皮細胞と血管平滑筋細胞の相互作用の分子機序の研究に従事しています。この数年間、彼女が毎週の月曜から日曜まで、研究室で自分の研究課題に没頭に取り込んでいます。

現在、彼女は：1) 細胞内 IP_3 受容体抗体やantisenseを細胞内にマイクロインジェクション法で直接注入、細胞機能に傷害を与えずに蛋白機能や発現をする実験を行い、既に一部は成功して去年の米国心臓学会で発表しました。2) 又、そのマイクロインジェクションの欠点を見つけ、直接にantisense DNAのconstruct vectorを自分で設計と作成し、細胞内にtransfectionし、大量のantisense DNAを発現させ、細胞自身からの目的蛋白質のmRNAの翻訳を遮断する。本法は従来遮断薬剤が無ければ解析が不可能だった既法の欠点を本質的に解決する画期的な薬理学的手法となります。3) 更に、研究室の同僚と協力して、内皮細胞内 IP_3 -induced Ca^{2+} release、capacitative Ca^{2+} entryと一酸化窒素三者間の短期間の相互調節に関する研究を完成し、現在投稿中である。4) その他、彼女は同僚と協力して、内因性一酸化窒素は血管平滑筋細胞内1型 IP_3 受容体と IP_3 -induced Ca^{2+} releaseをdown-regulateして血管平滑筋細胞増殖を抑制するとの新しい信号伝達系を証明しました。血管平滑筋細胞増殖における3型 IP_3 受容体の役割も解明しました。従って、彼女がこの一年間に従事している研究も大詰めの段階に来て、その結果を二つか三つの論文にまとめ、来月中旬に投稿予定であります。留学生として良く頑張りましたと思います。

研究指導者氏名

豊岡照彦

印

5. 研究報告

別紙形式を参考に、報告本文4000字以上で報告して下さい（枚数自由・ワープロ使用）

タイトル・要旨等は日本語で、KEY WORDS以下は日本語或いは英語で記入して下さい。

研究成果の発表予定がある場合は発表原稿・抄録集等を添付して下さい。

論文発表に当っては、日中医学協会－日本財団補助金による旨を明記して下さい。

研究テーマ：血管平滑筋細胞内イノシトール三リン酸誘発性Ca²⁺放出と細胞増殖における1と3型イノシトール三リン酸受容体の異なる役割の解明

研究者氏名：陳 潔

中国での所属、役職：上海中医薬大学附属龍華病院内科 医師

日本での指導者氏名、所属、役職：豊岡照彦、東京大学医学部第二内科 教授

要旨：ホルモンと成長因子等はG-蛋白質又はtyrosine-kinaseと繋ぐ受容体を刺激する事によって細胞内Ca²⁺動態信号を介して細胞増殖を制御する。イノシトール三リン酸受容体チャンネルを介するイノシトール三リン酸(IP₃)誘発性Ca²⁺放出(IICR)は細胞内重要なCa²⁺動態信号です。免疫染色法で血管平滑筋細胞には、1型(IP₃R₁)と3型(IP₃R₃)イノシトール三リン酸受容体が存在する事を示した。しかし、そのIP₃R₁とIP₃R₃はCa²⁺動態と細胞増殖における役割が不明である。血管平滑筋細胞の異常増殖は高血圧、動脈硬化、及びPTCA治療後冠動脈再狭窄の成因となっているので、IP₃R₁とIP₃R₃は細胞増殖における役割の解明は基礎医学に限らず、臨床治療法の開発にも急務である。培養の血管平滑筋細胞内にIP₃R₁とIP₃R₃に対する特異的機能抗体を微注射すると、IP₃R₁に対する抗体だけがvasopressinに対するIICR反応を抑制できた。IP₃R₁とIP₃R₃のantisense-遺伝子をvectorに差し入れ、血管平滑筋細胞に導入し、細胞自身からのIP₃R₁とIP₃R₃のmRNAの翻訳を遮断し、30-40%のreporter vector(GFP)の陽性細胞ではIP₃R₁とIP₃R₃の発現を阻止した。IP₃R₁の場合、機能的に細胞のvasopressinに対するIICR反応と細胞増殖を部分又は完全に抑制した。IP₃R₃の場合、細胞のvasopressinに対するIICR反応と細胞増殖を抑制しなかった。しかし、IP₃R₃のantisense 遺伝子を安定的に細胞内へ導入したcoloniesはthapsigarginに対する容量性Ca²⁺流入反応は低下し、細胞増殖も減速した。血管平滑筋細胞では、IP₃R₁はIICR反応と細胞増殖に重要な役割を果し、IP₃R₃は直接IICR反応に影響せず、長期的に細胞増殖に一定の作用を有する。

KEY WORDS: Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor, Ca²⁺ dynamics, Proliferation, Vascular smooth muscle cells, Antisense DNA, Transfection

Different Role of Type-1 and Type-3 Inositol 1,4,5-Trisphosphate Receptors In Inositol 1,4,5-Trisphosphate-Induced Ca²⁺ Release and Proliferation of Vascular Smooth Muscle Cells

Jie Chen§, Yuepeng Wang§, Yue Wang, Wee Soo Shin, Yoko Matsuo-Okai, Toshiaki Nakajima, Kuniaki Iwasawa, Teruhiko Toyooka¶. *From the Second Department of Internal Medicine, Health Service Center, University of Tokyo, Tokyo 113-0033, Japan*

* This study was financially supported by grants-in-aid from the Ministry of Education, Science and Culture, the Ministry of Health and Welfare of Japan, the Research Foundation of the Japan Society for the Promotion of Science, the Uehara Memorial Foundation, the Sankyo Foundation of Life Science, and the Japanese-Chinese Medical Research Collaboration Foundation. § Both authors contributed equally to this study. ¶ To whom correspondence should be addressed: Second Dept. of Internal Medicine, University of Tokyo, Hongo 7-3-1, Bunkyo-ku, Tokyo 113, Japan. Tel.: 81-3-3815-5411, ext. 3074; Fax: 81-3-3813-2009; E-mail: toyooka-2im@h.u-tokyo.ac.jp.

SUMMARY

Stimulation of G-protein or tyrosine-kinase coupled receptor by hormones or growth factors regulates cell growth through the way of intracellular Ca²⁺ (Ca²⁺_i) signaling. Inositol 1,4,5-trisphosphate (IP₃)-induced Ca²⁺ release (IICR) through IP₃ receptor channel is an important trigger for the Ca²⁺_i handling. In VSMCs, type-1 (IP₃R₁) and type-3 (IP₃R₃) IP₃ receptor are detected by immunoblotting. However, their contribution for Ca²⁺ handling and cell proliferation is unclear. In this study, only the functional antibody to IP₃R₁ (IP₃R₁Ab), but not the antibody to IP₃R₃ (IP₃R₃Ab) microinjected into A7R5 was capable to block the vasopressin-induced IICR. Transfection of the antisense-DNA coincided with IP₃R₁ and IP₃R₃ gene into A7r5 successfully blocked the expression of the receptors in 30-40% transfected cells. Functionally, expression of IP₃R₁ antisense DNA inhibited completely or partially IICR and cell proliferation. Blockade of the expression of IP₃R₃ antisense DNA neither significantly changed an agonist induced IICR, nor effected cell growth. But, the stable colonies transfected with IP₃R₃ antisense DNA demonstrated a decrease in capacitative Ca²⁺ entry response to thapsigargin and slow in cell proliferation. It is concluded that in VSMCs IP₃R₁ plays a more important role than IP₃R₃ in the agonist-induced IICR and cell proliferation.

KEY WORDS: Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor, Ca²⁺ dynamics, Proliferation, Vascular smooth muscle cells, Antisense DNA, Transfection

INTRODUCTION

In many cells, hormones, neurotransmitters, and growth factor stimulate a receptor coupling with G-protein or tyrosine-kinase and activate the phospholipase C. Phospholipase C catalyses the production of inositol 1,4,5-trisphosphate (IP₃) from membrane lipid phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (1). IP₃ is a second messenger to cause IP₃-induced Ca²⁺ release (IICR) from the internal Ca²⁺ store. IICR forms an initial intracellular Ca²⁺ (Ca²⁺_i) rise and is also an important trigger for the subsequent capacitative Ca²⁺ entry (2-3). The Ca²⁺_i rise caused by IICR is the most versatile and universal signalling and is crucial for controlling fertilization (4-5), development (6), differentiation (7), and cell proliferation (8, 9). In mammals, there are at least three different IP₃ receptor gene, each of which, in turn, is spliced into three isoform respectively at least (10). In most organ, several types of IP₃ receptors are coexpressed at different ratios (11). Of three types, type-1 (IP₃R₁) is most generally distributed (10). In central nervous system, IP₃R₁ is a predominant type and is proven to be essential for the development of growth cones (10, 12). While type-3 (IP₃R₃) would play a role in store-operated or capacitative Ca²⁺ entry, insulin secretion in pancreatic islets, and initiation of Ca²⁺ signalling (13-17). However, in nonexcitable cells, their contributions to proliferation are unclear.

In vascular system, we detected only IP₃R₁ in endothelial cells and both IP₃R₁ and IP₃R₃ in smooth muscle cells (VSMCs, our unpublished data, 18). Although it is reported that both IICR and Ca²⁺-induced Ca²⁺ release (CICR) mechanism are operated for Ca²⁺ dynamics in VSMCs, we found that only IICR is a dominant way for internal Ca²⁺ in A7r5. A few fundamental studies showed IP₃R₁ and IP₃R₃ have different affinity to their receptor and are differently regulated by Ca²⁺ (11, 19-21). In this study, we aimed to clarify the functional differences between IP₃R₁ and IP₃R₃ in Ca²⁺ handling and in cell proliferation. Since the proliferation of VSMCs is a key step in the process of arteriosclerosis, especially during coronary restenosis after angioplasty, elucidation of these differences are very meaningful (22-25).

We succeeded in blocking the vasopressin (VP)-induced Ca²⁺_i response by microinjection of specific IP₃R₁Ab and IP₃R₃Ab in A7r5. However, it was a failure to follow the growth in the microinjected cells due to the difficulties in determining the position of an injected cell and the possible cell damage. Furthermore, we transfected two types of antisense DNA coincided with the genes of IP₃R₁ and IP₃R₃, respectively, into VSMCs to block the expression of the receptors. Under the guidance of cotransfected green fluorescent protein (GFP) which has been proven to be a stable reporter, we found the antisense DNA to IP₃R₁ gene partly or completely block IP₃R₁ expression and inhibit IICR in 40% successfully-transfected cells. In those IICR-inhibited cells, we observed the stop in cell proliferation by serial photomicrographs follow. While 35% transfected cells with the antisense DNA to IP₃R₃ gene

showed a partly or completely blocked expression of the receptor. However, the blockade had no effect on VP-induced IICR and also did not significantly change the cell proliferation. In stable transfection colonies with IP₃R₃ antisense-DNA, the cell showed a slow cell proliferation.

MATERIAL AND METHODS

Cell Culture

VSMCs (A7r5) were grown and passaged in Dulbecco's modified eagle medium (DMEM) containing 10% fetal bovine serum (FBS) and 1% antibiotic-antimycotic (Gibco-BRL), as described previously (26-29). They were seeded in a dish made of fluorescence-free glass chamber for microinjection and the assay of Ca²⁺. In the case of transfection and photomicrographs monitoring, the cells was seeded and cultured on a CELLocate coverslip (*Eppendorf*, 175 μm in diameter) which was placed in the chamber. In the case of stable transfection, they were cultured in a dish of 10 cm in diameter. The cells of 4~12 passages were used in the study.

Antibody Preparation and Immunoblotting

Three peptides were synthesized according to the amino acid sequence of the cytosolic C-terminal domain deduced from the cloned cDNA of human type-I (IP₃R₁), -II, and -III IP₃ receptor. The sequence GHPPHMNVNPQQ for type-I is preserved in most species including human, rat, mouse, and *Xenopus* oocyte, and is working for Ca²⁺ release (5, 6, 30). The employed amino acid sequences for type-II and -III were LGSNTPHYNHHMPPH and RQRLGFVDVQNCISR, respectively. The sequences of the corresponding domain in rats are identical except for substitutions of the underlined residues. All polypeptides were synthesized with an additional cysteine at their *N*- or *C*-terminal to facilitate the coupling reaction. The conjugated with epitope peptide polyclonal antibodies from New Zealand white rabbits (n = 6) to three types of IP₃ receptor were purified by affinity chromatography and were concentrated up to 10 mg/ml. The specificity of these antibodies was determined by immunoblotting, as we have described previously (31, 32). After solubilizing whole homogenate of rat brain, A7r5 and Chinese hamster ovary cells, sodium dodecylsulfate (SDS)-polyacrylamide gel electrophoresis was performed in 6% gels.

Cell Microinjection

Dulbecco's phosphate-buffered saline (PBS) which contained 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 8.1 mM Na₂HPO₄, 1.5 mM KH₂PO₄, 1 mM CaCl₂, and 0.5 mM MgCl₂ (pH 7.4) was utilized as the extracellular medium. Ca²⁺ free medium consisted of PBS in which CaCl₂ was replaced by EGTA (1 mM). After loading fura-2AM (4 μM, Molecular Probes) for 40 min, A7r5 were rinsed and incubated in Ca²⁺/Ca²⁺-free PBS. To assess an adverse effect of the

microinjection (*Eppendorf* 5171 micromanipulator and 5246 transjector, Hamburg) procedure, 400 μ M unesterified fura-2 (Molecular Probes) was added to the following substances and injected into perinuclear cytoplasm of VSMCs: 1) the vehicle for microinjection, containing 48 mM K₂HPO₄, 14 mM Na₂HPO₄, and 4.5 mM KH₂PO₄ (pH 6.9); 2) normal rabbit IgG; 3) IP₃R₁Ab; and 4) IP₃R₃Ab. The antibodies were dissolved in the vehicle. The injection time was fixed to 0.1 sec. A successful injection was verified by a stirring wave in cytoplasm and a further increase in cell fluorescence due to the injected fura-2. The injection volume into a cell could be controlled by changing the agent concentration and injection pressure (5–80 mmH₂O). The injected substances were estimated to be diluted to approximately 50 to 200 fold, according to the intensity increase of the fluorescence. Since multiple injections result in cell damage, no more than one injection was given to a cell. In some cells, a significant leakage of fura-2 was detected immediately after the injection by a reduction of emission fluorescence. These cells were considered to be damaged and excluded from the study. When no significant drop of fluorescence was observed in a cell within 5 min after the injection, the medium was changed to PBS containing 1 mM Ca²⁺ and incubated for additional 30 min to stabilize the injected cells.

Construction of Vector

The 100 bases (from nucleotide position -90 to +9) of the gene for rat IP₃R₁ or IP₃R₃ cDNA (according to the sequence of Genbank g204673 and L06096, respectively) were synthesized (Takara, Japan). This region spans the translation initiation site and shares no homology between these two receptors. Two-strands DNA was generated and amplified by the polymerase chain reaction (PCR). The used upper and lower primers are 5'-caaggagctgactaca-3' and 5'-gtcagacatgtccttg-3' for IP₃R₁ and 5'-ttccgcccagcgcgcgc-3' and 5'-ttcattcatggctttg-3' for IP₃R₃. The PCR product was subcloned into the vector pOPRSVI/MCS (Stratagene) in an antisense or sense orientation. The orientation and sequence of inserts were confirmed by using an Applied Biosystems automated DNA sequencer.

To follow the VSMCs proliferation, we inserted the same fragment of IP₃R₁ or IP₃R₃ DNA into pTracerTM-SV40 in an antisense or sense orientation. This vector owns no probability that above pOPRSVI/MCS insert and reporter pGreen Lantern^{TM1} were transfected into different cells and therefore is simple for identification. However, it is unsuitable for Ca²⁺ measurement as an interfering excitation wavelength to fura-2.

Transient and Stable Transfection of VSMCs

The VSMCs were transfected at 40–60% confluence in serum-free medium by using the mixture of 0.67 μ g of cloning vector with an insert of antisense cDNA, 0.67 μ g pGreen Lantern^{TM1} plasmid, and 0.33 μ l of lipofectin reagent (Gibco-BRL) per 1.2 mm-diameter dish. For all experiments, the following transfection controls were also performed: (1) sense IP₃R₁

or IP₃R₃ DNA with pGreen Lantern^{TM1} and (2) pGreen Lantern^{TM1} only as a mock transfection. Twelve~24 hours after transfection, the cells were gently rinsed with PBS for 2 times in order to remove the residual extracellular DNA. Then, the medium was changed to the DMEM containing 10% FBS and 1% antibiotic-antimycotic. The cells were used in experiment at 24-48 hours after the medium change.

In the case of stable transfection, VSMCs were transfected at 30%-40% of confluence in serum- and antibiotics-free DMEM by using 6 µg of cloning vector with an insert of antisense or sense cDNA and 15 µl of lipofectin reagent per 10 cm-diameter dish. One day after transfection, the cells were washed with and cultured in DMEM containing 10% FBS and 1% antibiotic-antimycotic. Two days after medium change, the cells were subcultured into dishes of 60-mm -diameter at the ratios 1:5-8 in selection medium which consist of DMEM with 10% FBS and 400 µg/ml G418 (Gibco-BRL). The concentration of G418 used has been previously determined as the lowest concentration which caused death of all non-transfected VSMCs within 2 weeks. The G418-resistant colonies were allowed to develop for 1~2 weeks in the G418-containing medium. Single colonies were isolated to separate dishes and passaged in the medium containing 50-200 µg/ml G418. The transfected VSMCs kept stable deficiency in IP₃R₁ or IP₃R₃ expression in several weeks, as long as the presence of G418. The cells in 2~6 generations were used for experiment.

Measurement of Ca²⁺_i Concentration

After microinjection, the Ca²⁺_i responses of injected and uninjected ECs in the same observation field were individually analyzed by the 2D Ca²⁺_i imaging system, as reported previously (26-29). The cells were stimulated with VP (3 µM, Sigma) or thrombin (10 U/ml, Sigma). We designated a VSMCs whose peak F₃₄₀/F₃₈₀ increased more than 15% of the rest F₃₄₀/F₃₈₀ as a responder, because some technical factors in measuring fluorescence intensity induced ±5% of fluctuation. In a part of the study, ionomycin (IM, Sigma) and thapsigargin (TG, Sigma) were employed at the end to confirm the preservation of normal Ca²⁺_i handling.

From twenty-four hours after transfection, the cells of successful transfection was recognized by their exciting blue light under FITC filter. After loading fura-2AM (4 µM) for 40 min, the VSMCs were stimulated under UV filter by VP (3 µM) or thrombin (10 U/ml) in the absence of extracellular Ca²⁺. These two agonists evokes the rise in Ca²⁺_i in VSMCs in an IP₃-dependent way and therefore can be used to test the functional IICR changes in the transfected cells. The Ca²⁺_i responses of transfected and untransfected VSMCs in the same observation field were individually analyzed by the 2D Ca²⁺_i imaging system, as reported previously (11, 12).

The absolute concentration of Ca²⁺_i was calculated by comparing the fluorescence ratios at both wavelengths obtained at the maximum Ca²⁺_i (achieved by lysing the cells and saturating

fura-2 with Ca²⁺_i) and minimum Ca²⁺_i (achieved by chelating all free Ca²⁺ with EGTA) using the equation: $Ca^{2+}_i = K_d \times (R - R_{min}) / (R_{max} - R) \times Sf_2 / Sb_2$. K_d is the dissociation constant (224 nM for fura-2) and R_{min} and R_{max} are the F₃₄₀/F₃₈₀ ratios of the Ca²⁺-free and Ca²⁺-bound forms. Sf_2/Sb_2 is the ratio of the fluorescence values at 380 nm excitation determined at R_{min} and R_{max} , respectively (33).

Immunocyto staining

VSMCs, grown on CELLocate coverslips, were rinsed with PBS and then fixed in the same buffer plus 3.6% paraformaldehyde. All subsequent steps were performed in Ca²⁺/Mg²⁺-free PBS; cells were washed once for 2 min, permeabilized with 0.5% Triton X-100 (Sigma) for 10 min, and washed 3 times (5 min/wash). Endogenous peroxidase activity was reduced in MetOH with 0.3% H₂O₂ for 10 min. Nonspecific staining was reduced by 2% milk powder for 15 min before the cells were incubated with IP₃R₁Ab (x 200) or IP₃R₃Ab (x 1,000) in the presence of 10% goat serum for 1 hour at room temperature. Then, the cells were incubated with biotinylated goat anti-rabbit or anti-mouse IgG (Vector Labs, CA) for the IP₃R₁ or IP₃R₃ staining, respectively. Subsequently, peroxidase labeling was carried out with an avidin-biotin complex (Vector Labs, CA) and visualized by 0.05% 3, 3'-diaminobenzidine (Dojin, Japan) in PBS with 0.01% H₂O₂. The coverslips were finally counter-stained with hematoxylin, dehydrated, and mounted. To define nonspecific staining, all control studies were carried out by normal rabbit or mouse IgG in the same protein concentration.

Monitoring of VSMCs Growth by Photomicrographs:

To observe the changes in cell proliferation, the photomicrographs of GFP positive-cells and phase-control were taken every 12-24 hours, from 24 hours after transfection till 5-7 days.

RESULTS

Expression of IP₃R₁ and IP₃R₃ in VSMCs

An immunoblotting showed that IP₃R₁Ab reacted with a single 260 kD band in rat cerebellum membrane fraction and whole homogenate of cultured A7r5 (Fig. 1). Also, IP₃R₃Ab reacted with a single about 260 kD band in whole homogenate of A7r5. In contrast, type-II IP₃ receptors was not detected in A7r5, although they were positive in CHO cells. On the other hand, pharmacological study using Ca²⁺_i dynamics of cultured VSMCs revealed that A7r5 weakly responded (7%) to caffeine (3~60 mM), with or without the pretreatment of ryanodine (10~60 μM, data not shown). These results suggest that CICR is not mainly working for the Ca²⁺_i handling, and IICR mediated by IP₃R₁ and IP₃R₃ could be a major source of the Ca²⁺_i release.

Ca²⁺_i Dynamics in VSMCs Microinjected with IP₃R₁Ab or IP₃R₃Ab

Microinjection of IP₃R₁Ab (10 mg/ml), but not IP₃R₃Ab (10 mg/ml) could inhibit the VP-induced Ca²⁺_i responses, including both IICR and CCE (Fig. 2).

Immunocytostaining of IP₃R₁ and IP₃R₃ in Transfected VSMCs.

About 17% cells showed a successful transfection as observed as bright blue light. Of all GFP-brilliant cells, a part of the antisense-DNA transfected cells showed a partial reduction (17%) or complete disappearance of IP₃R₁ (17%, 23%) or IP₃R₃ (13%, 22%, Fig. 3). While the surrounding cells of the antisense-DNA transfected, the whole cells of sense-DNA transfected, and the only GFP-transfected cells demonstrated a normal staining, indicating the reduced expression of IP₃ receptors were specific to IP₃R₁ or IP₃R₃ antisense. This reduced expression was most evidenced during 24-48 hours, still significant until 5-7 days (data not shown).

Ca²⁺_i Dynamics in VSMCs Transfected with Antisense-DNA of IP₃R₁ or IP₃R₃

Of all the brilliant cells transfected with antisense-DNA of IP₃R₁, about 16% and 23% cells showed an attenuated or completely-blocked Ca²⁺_i response to VP (3 μM) or thrombin (10 U/ml), correctly consistently with the immunocytostaining results described above. These attenuation or blockade of Ca²⁺_i responses of transfected VSMCs to the agonists continued until 5-7 days follow after transfection (Fig. 4a).

While all the cells transfected with antisense-DNA of IP₃R₃ showed a normal Ca²⁺_i response to VP (3 μM) or thrombin (10 U/ml). These unchanged Ca²⁺_i responses of transfected VSMCs continued until 5-7 days follow (Fig. 4b).

Serial Photomicrographs Follow of Cell Growth in Transfected VSMCs

In the experiment of IP₃R₁, the cells cultured on a CELLocate coverslips were placed in the ZOG-2 chamber. Ca²⁺ measurement was carried out to choose the cells that was used to follow must be of efficient inhibition of IICR. The cells showing complete (<10% of response in control cell) or partial (11~95% of response in control cell) inhibition of IICR was followed. During follow, the cells with complete inhibition of IICR demonstrated a complete stop of cell proliferation, as compared with adjacent cells. The cells with a partial inhibition of IICR exhibited a retarded growth (Fig. 5). The GFP-transfected cell kept the normal ability in proliferation, as showed by the increasing number of the cells exciting a bright blue light during follow of only GFP-transfected cells. In the cell transfected with antisense DNA of IP₃R₃, no such changes in cell growth was observed.

Further Identification of Important Role of IP₃R₁ in Proliferation by Cell Selection

Compared with IP₃R₁ sense-DNA transfected cells, of the IP₃R₁ antisense-DNA transfected cells, no G418-resistant colony occurred during first week after transfection. Up to 2-3 weeks, there was a few very small colony. These colonies showed much reduced immunocytochemical staining of IP₃R₁ and a weak Ca²⁺ response to the agonists (Fig. 6).

While in IP₃R₃ antisense-DNA transfected cells, many colonies occurred during first week. These subcultured cells showed much reduced IP₃R₃ staining in immunocytochemical staining, a little weak capacitative Ca²⁺ entry response to thapsigargin, and a significant down in cell proliferation (Fig. 7).

DISCUSSION

In *Drosophila*, that only IP₃R₁ is existed make it can be used for functional analysis after knock-out of the receptor gene. In result, knock-out of the receptor gene caused a great retard in growth and differentiation (7). In some mammal cells, for example, in neuron, IP₃R₁ is absolutely dominant. It has been proven that lacking IP₃R₁ caused an ataxia and epileptic seizures in mice (12, 34). Recently, in the level of single culture neuron, Mikoshiba group has further proven that IP₃R₁ is essential for the development of growth cones (12). In pancreatic islet (13), it is reported that IP₃R₃ is main type and is contributed for insulin excretion.

However, it is difficult to analyze the difference in function in the cells which coexpressed several types of the receptor. By using antisense technique, it has been proven that the IP₃R₁ is crucial also for T-cell antigen receptor signaling and IP₃R₃ is increased in B and T lymphocyte apoptosis by causing capacitative Ca²⁺ entry (17, 35). VSMCs coexpresses IP₃R₁ and IP₃R₃ (25). The former is a dominant type and its expression is increased in elderly (23). We also showed that IP₃R₁ expression is increased in the neointima of VSMCs of rat arteriosclerosis model (unpublished data).

Both IP₃R₁Ab and IP₃R₃Ab we used are capable of functional blocking of C-terminal Ca²⁺ channel domain. But, only microinjected IP₃R₁Ab blocked agonist-evoked Ca²⁺ response in VSMCs. Furthermore, microinjection of IP₃R₁Ab or IP₃R₃Ab has failed to discover any change in cell growth, probably due to the potential cell damage. Most monoclonal antibodies do not functionally inactivate the antigen they recognize. Recently, this limitation can be overcome by localized chromophore-assisted laser inactivation (12, 36) of specific antibody-linked proteins. However, CALI also need the delivery of antibody into cytoplasm by microinjection and thus owns the same limitation to microinjection in which a potential cell damage will confuse the real effects of CALI. Microinjection or combined with CALI may be more suitable for a short-time analysis of a protein function than for a long-time follow up of the influence on cell growth. The injected antibody into cytoplasm will be metabolized within hours and new protein is continued to be synthesized from gene expression. But, multiple microinjection and laser irradiation can not be given to a cell repetitively.

On the other hand, functional analysis in a knock-out mice might be influenced by some compensatory mechanism (34). Although no significant increases in the expression level of IP₃R₂ and IP₃R₃ in mice lacking IP₃R₁, that a gross anatomy appeared normal in many organs indicates the compensatory mechanism may be operated by unknown type of IP₃ receptor, for example, putative type-4 or type-5 (34).

Therefore, for a long-time follow up, expressed antisense technique without cell damage may be more suitable. Our study did overcome a major limitation of this technique that it is not effective in all transfected cells, by selecting the successful cells only. We selected the cell with successful transfection by confirmation of a loss of the receptor in immunocytochemistry and an abolishment of functional IICR on 2D imaging of Ca²⁺_i response. Of course, a complete inhibition of IICR resulted from disappearance of IP₃R₁ may lead a complete stop in cell proliferation. A part of transfected cells showed a different extent in the inhibition of both receptor expression and functional IICR. The cells those with partial inhibition also show the decreased proliferation.

GFP has a compact structure which make it is very stable under a variety of conditions, including treatment with protease (37-38). In this study, we found that GFP expressed stably during 1-2 weeks in A7r5 in a control experiment. Therefore, we followed the changes in cell proliferation by the number of cell with brilliant blue light after confirming the changes in Ca²⁺_i handlings.

In VSMCs, Ca²⁺_i response to G protein-coupled agonist stimulation consists also of an IICR and the subsequent capacitative Ca²⁺ entry, as identified by microinjection. Although in VSMCs, the real action on proliferation is IICR or CICR is unclear (1, 9, 39). It is possible that CCE is more important than IICR for proliferation. As IICR is a crucial trigger for CCE, it is proper to conclude that IICR directly control the VSMCs proliferation.

Also, a few data has showed that in elderly or the neointima of atherosclerotic plaques, the IP₃R₁ expression is potentiated (23). From our results, we further get hint for control of VSMCs contraction by decreasing intracellular IP₃R₁ expression and thus decreasing Ca²⁺_i concentration. Also, decreasing IP₃R₁ expression may be an effective way to inhibit VSMCs proliferation in the coronary artery restenosis after PTCA (40). Especially, the cell showing a partial inhibition of IICR also resulted in the inhibition of proliferation. Physiologically, some inhibitor of IICR, such as endothelium-derived nitric oxide, also inhibit IICR partially (29). So far, L-type Ca²⁺ channel antagonists capable of block Ca²⁺ influx have been proven useful for inhibiting VSMCs growth or some refractory cancer (8). It may open a new era for controlling the proliferation of VSMCs by partially inhibiting IICR in VSMCs.

REFERENCES

1. Berridge, M. J. (1993) Inositol trisphosphate and calcium signalling. *Nature*, **361**, 315-325.
2. Berridge, M. J. (1995) Capacitative calcium entry. *Biochem. J.*, **312**, 1-11.
3. Randrlamampita, C., and Tsien, R. Y. (1993) Emptying of intracellular Ca²⁺ stores releases a novel small messenger that stimulates Ca²⁺ influx. *Nature*, **364**, 809-814.
4. Miyazaki, S., Yuzaki, M., Nakada, K., Shirakawa, H., Nakanishi, S., Nakade, S. and Mikoshiba, K. (1992) Block of Ca²⁺ wave and Ca²⁺ oscillation by antibody to the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor in fertilized hamster eggs. *Science*, **257**, 251-255.
5. Kume, S., Muto, A., Aruga, J., Nakagawa, T., Michikawa, T., Furichi, T., Nakade, S., Okano, H., and Mikoshiba, K. (1993) The Xenopus IP₃ receptor: structure, function, and localization in oocytes and eggs. *Cell*, **73**, 555-570.
6. Kume, S., Muto, A., Inoue, T., Suga, K., Okano, H., and Mikoshiba, K. (1997) Role of 1,4,5-trisphosphate receptor in ventral signaling in Xenopus embryos. *Science*, **278**, 1940-1943.
7. Jairaj, K., Jalink, K., Hardy, R. W., Hartenstein, V., and Zuker, C. S. (1997) InsP₃ receptor is essential for growth and differentiation but not for vision in drosophia. *Neuron*, **18**, 881-7
8. Kohn, E. C., Reed, E., Sarosy, G., Christian, M., Link, C. J., Cole, K., Figg, W. D., Davis, P. A., Jacob, J., Goldspiel, B., and Liotta, L. A. (1996) Clinical investigation of a cytostatic calcium influx inhibitor in patients with refractory cancer. *Cancer Res.*, **56**, 569-573.
9. Berridge, M. J., Bootman, M. D., and Lipp, P. (1998) Calcium - a life and death signal. *Science*, **395**, 645-648.
10. Mikoshiba, K., Furuichi, T., and Miyawaki, A. (1994) Structure and function of IP₃ receptors. *Semin.Cell Biol.*, **5**, 273-281.
11. Wojcikiewicz, R. J. H. (1995) Type I, II and III inositol 1,4,5-trisphosphate receptors are unequally susceptible to down-regulation and are expressed in markedly different proportions in different cell types. *J. Biol. Chem.*, **270**, 11678-11683
12. Takei, K., Shin, Y. M., Inoue, T., Kato, K., and Mikoshiba, K. (1998) Regulation of nerve growth mediated by inositol 1,4,5-trisphosphate receptors in growth cones. *Science*, **282**, 1705-1708.
13. Blondel, O., Takeda, J., Janssen, H., Seino, S., and Bell, G. I. (1993) Sequence and functional characterization of a third inositol trisphosphate receptor subtype, IP₃R-3, expressed in pancreatic islets, kidney, gastrointestinal tract, and other tissues. *J. Biol. Chem.*, **268**, 11356-11363.
14. Putney, J. W. Jr. (1997) Type 3 inositol 1,4,5-trisphosphate receptor and capacitative calcium entry. *Cell Calcium*, **21**, 257-261.
15. Hagar, R. E., Burgstahler, A. D., Nathanson, M. H., and Ehrlich, B. E. (1998) Type III InsP₃ receptor channel stays open in the presence of increased calcium. *Nature*, **396**, 81-84.
16. Missiaen, L., Parys, J. B., Sienaert, I., Maes, K., Kunzelmann, K., Takahashi, M.,

- Tanzawa, K., and Smedt, H. D. (1998) Functional properties of the type-3 InsP₃ receptor in 16HBE14o- bronchial mucosal cells. *J. Biol. Chem.*, **273**, 8983-8986.
17. Khan, A. A., Soloski, M. J., Sharp, A. H., Schilling, G., Sabatini, D. M., Li, S. H., Ross, C. A., and Synder, S. H. (1996) Lymphocyte apoptosis: mediated by increased type 3 inositol 1,4,5-trisphosphate receptor. *Science*, **273**, 503-507.
 18. Morgan, J. M., Smedt, H. D., and Gillespie, J. I. (1996) Identification of three isoform of the InsP₃ receptor in human myometria smooth muscle. *Pflugers Arch*, **431**, 697-705.
 19. Cardy, T. J. A., Traynor, D., and Taylor, C. W. (1997) Differential regulation of type-1 and -3 inositol trisphosphate receptors by cytosolic Ca²⁺. *Biochem. J.*, **328**, 785-793.
 20. Smedt, H. D., Missiaen, L., Parys, J. B., Henning, R. H., Sienaert, I., Vanlingen, S., Gijssens, A., Himpens, B., and Casteels, R. (1997) Isoform diversity of the inositol trisphosphate receptor in cell types of mouse origin. *Biochem. J.*, **322**, 575-583.
 21. Yoneshima, H., Miyawaki, A., Michikawa, T., Furuichi, T. and Mikoshiba, K. (1997) Ca²⁺ differentially regulates the ligand-affinity states of type 1 and type 3 inositol 1,4,5-trisphosphate receptors. *Biochem. J.*, **322**, 591-596.
 22. Ross, R. (1993) The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature*, **362**, 801-809.
 23. Marks, A. R. (1992) Calcium channels expressed in vascular smooth muscle. *Circulation*, **86**, suppl-III, 61-67.
 24. Somlyo, A. P. and Somlyo, A. V. (1994) Signal transduction and regulation in smooth muscle. *Nature*, **372**, 231-236.
 25. Sipma, H., Deelman, L., Smedt, H. D., Missiaen, L., Parys, J. B., Vanlingen, S., Henning, R. H., and Casteels, R. (1998) Agonist-induced down-regulation of type 1 and type 3 inositol 1,4,5-trisphosphate receptors in A7r5 and DDT1 MF-2 smooth muscle cells. *Cell Calcium*, **23**, 11-21.
 26. Shin, W. S., Toyo-oka, T., Masuo, M., Okai, Y., Fujita, H., and Sugimoto, T. (1991) Subpopulations of rat vascular smooth muscle cells as discriminated by calcium release mechanism from internal stores. *Circ. Res.*, **69**, 551-556.
 27. Masuo, M., Toyo-oka, T., Shin, W. S., and Sugimoto, T. (1991) Growth-dependent alterations of intracellular Ca²⁺-handling mechanisms of vascular smooth muscle cells. *Circ. Res.*, **69**, 1327-1339.
 28. Shin, W. S., Sasaki, T., Kato, M., Hara, K., Seko, A., Yang, W. D., Shimamoto, N., Sugimoto, T., and Toyo-oka, T. (1992) Autocrine and paracrine effects of endothelium-derived relaxing factor on intracellular Ca²⁺ of endothelial cells and vascular smooth muscle cells. *J. Biol. Chem.*, **267**, 20377-20382.
 29. Wang, Y. P., Shin, W. S., Kawaguchi, H., Inukai, M., Kato, M., Sakamoto, A., Uehara, Y., Miyamoto, M., Shimamoto, N., Korenaga, R., Ando, J., and Toyo-oka, T. (1996) Contribution of sustained Ca²⁺ elevation for nitric oxide production in endothelial cells and subsequent modulation of Ca²⁺ transient in vascular smooth

- muscle cells in coculture. *J. Biol. Chem.*, **271**, 5647-5655.
30. Nakade, S., Maeda, N., and Mikoshiba, K. (1991) Involvement of the C-terminal of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor in Ca²⁺ release analysed using region-specific monoclonal antibodies. *Biochem. J.*, **277**, 125-131.
 31. Okai, M. Y., Takano, O. H., Toyooka, T., and Sugimoto T. (1991) A novel myosin heavy chain isoform in vascular smooth muscle. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **176**, 1365-1370.
 32. Sakamoto, A., Ono, K., Abe, M., Jasmin, G., Eki, T., Murakami, Y., Masaki, T. Toyooka, T. and Hanaoka, F. (1997) Both hypertrophic and dilated cardiomyopathy are caused by mutation of the same gene, α -sarcoglycan, in hamster: A model of dystrophin-associated glycoprotein complex. *Proc. Natl. Sci. Acad. USA.* **94**, 13873-13878.
 33. Grynkiewicz G., Poenie M., Tsien R. Y. (1985) A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescent properties. *J. Biol. Chem.*, **260**, 3440-3450.
 34. Matsumoto, M., Nakagawa, T., Inoue, T., Nagata, E., Tanaka, K., Takano, H., Minowa, O., Kuno, J., Sakakibara, S., Yamada, M., Yoneshima, H., Miyawaki, A., Fukuuchi, Y., Furuichi, T., Okano, H., Mikoshiba, K., and Noda, T. (1996) Ataxia and epileptic seizures in mice lacking type 1 inositol 1,4,5-trisphosphate receptor. *Nature*, **379**, 168-171.
 35. Jayaraman, T., Ondriasova, E., Ondrias, K., Harnick, D. J., Marks, A. R. (1995) The inositol 1,4,5-trisphosphate receptor is essential for T-cell receptor signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **92**, 6007-6011.
 36. Jay, D. G. and Keshishian, H. (1990) Laser inactivation of fasciclin I disrupts axon adhesion of grasshopper pioneer neurons. *Nature*, **348**, 548-550.
 37. Chalfie, M., Tu, Y., Ward, W. W., Prasher, D. C., (1994) Green fluorescent protein as a marker for gene express. *Science*, **263**, 802-805.
 38. Heim, R., Cubitt, A. B., Roger Y. Tsien, R. Y. (1995) Improved green fluorescence. *Nature*, **373**, 663-664.
 39. Putney, J. W. Jr. (1991) A model for receptor-regulated calcium entry. *Cell Calcium*, **11**, 611-624.
 40. Popma JJ, Califf RM, Topol EJ. (1991) Clinical trials of restenosis after coronary angioplasty. *Circulation*, **84**, 1426-1436.

日本財団補助金による

1998 年度日中医学協力事業報告書

—在留中国人研究者研究助成—

1999年 3 月 12 日

財団法人 日中医学協会

理事長 中 島 章 殿

研究室で撮影した本人のスナップ写真、及び発表論文のコピーを添付

1. 研究者氏名 王 永 紅
研究機関 星葉大医薬品化学研究所 研究指導者 大宮 茂 職名 教授
所在地 〒142-0085 品川区荏原 2-4-4 1 電話 03-5498-5768 内線 226
研究テーマ 中国産 *Maackia* 属植物のルピンアルカロイドに関する化学研究

2. 本年度の研究業績

- (1) 学会・研究会等における口頭発表 有 ・ 無 (学会名・内容)

学会名：日本薬学会 119 年会 (徳島)

演 題：(-)-Cytisine からの合成による (+)-hupeol の絶対配置の決定

- (2) 学会誌等に発表した論文 有 ・ 無 (雑誌名・論文名)

雑誌名：Journal of Chemical Research

テーマ：(+)-Hupeol, a possible non-basic metabolite of the lupine alkaloid (-)-cytisine in Chinese *Macckia hupehensis*

3. 今後の研究計画

1. *M. amurasis* の枝から既に3種の新塩基を見出しました。それらの構造を決定し、合成検討中です。
2. 入手した *M. tenuifolia* について検討する予定です。
3. (+)-Hupeol の合成により、新しい合成法として環状イミンから環状ヘミアセタールの変換反応の応用性について検討しました。その結果の一部を徳島学会で発表し、その後まとめて論文で投稿する予定です。

4. 研究指導者の意見

マメ科の *Maackia* 属植物はアジアに多く分布し、日本に4種、中国には8種自生する。日本産植物が含有する塩基性成分に関する我々の研究では piperidine や quinolizidine 環を基本骨格とする通常の lupin alkaloids を主要塩基として含有するが、pyrrolidine, indolizidine 環を基本骨格とする特異な alkaloids をも含有する。このように *Maackia* 属植物は lupin alkaloids の生合成あるいは植物の化学的分類上大変興味ある植物の群であることから、未だ研究がなされていない中国産植物について成分研究を着手した。植物の採取は困難でしたが、*M. hupehensis*, *M. amurensis* および *M. tenuifolia* の3種を手にすることができた。このうち *M. hupehensis* からは(+)-hupeol のように alkaloids が塩基性窒素を含まない中性物質に代謝される最初の物質と考えられる代謝産物、典型的な lupin alkaloids の(-)-cytisine と acetamide あるいは 2-pyrrolidone の窒素がメチレン基により結合した化合物など、日本産植物には見られない興味ある物質の存在を確認している。現在、*M. amurensis* の成分を検討しており、既に3種の新塩基を見出し、これから検討する *M. tenuifolia* を含めた3種の植物の塩基性成分を明らかにすることにより、lupin alkaloids の生合成、日本産との植物分類学上の関連性など、興味ある知見が得られるものと確信している。さらに、これらの新塩基は合成によって絶対配置を含め構造を確認しているが、特に、(+)-hupeol の合成は環状イミンから環状ヘミアセタールへの一般的な変換反応として有用性が期待され、合成化学の立場からも興味ある結果を得ている。このように、王永紅君は博士の学位に十分な内容の研究を行っている。

研究指導者氏名

天宮 茂



5. 研究報告

別紙形式を参考に、報告本文4000字以上で報告して下さい（枚数自由・ワープロ使用）

タイトル・要旨等は日本語で、KEY WORDS以下は日本語或いは英語で記入して下さい。

研究成果の発表予定がある場合は発表原稿・抄録集等を添付して下さい。

論文発表に当っては、日中医学協会－日本財団補助金による旨を明記して下さい。

中国産 *MAACKIA* 属植物の ルピナルカロイドに関する化学的研究

王 永 紅

北京中医薬大学中薬製造教室 専任講師

大 宮 茂

星薬科大学医薬品化学研究所 教授

要 旨

本研究室では、マメ科植物が含有するルピナルカロイドに関する研究の一環として日本産 *Maackia* 属植物の塩基性成分を精査し、*Maackia* 属は、通常のルピナルカロイドに加えて、それらの基本骨格である quinolizidine あるいは piperidine 環が indolizidine あるいは pyrrolidine 環におきかわったアルカロイドを産出する特異な植物群であることが分かりました。私は、中国産 *Maackia* 属植物の塩基性成分に興味をもち、日本産との比較として、中国産 *Maackia* 属植物の一種である *M. hupehensis* について検討し、三つの新塩基性成分の構造を決定したうえで人工合成も成功したことについて報告します。

Key word index — *Maackia hupehensis*, leguminosae, lupin alkaloids, (-)-*N*-(2-oxopyrrolidinomethyl)cytisine, (-)-*N*-(*N*-acetylaminomethyl)cytisine, (+)-hupeol, (-)-cytisine, (-)-*N*-methylcytisine, (-)-lusitanine, (-)-epibaptifoline.

Abstract - Three new lupine alkaloids, (-)-*N*-(2-oxopyrrolidinomethyl)cytisine (1), (-)-*N*-(*N*-acetylaminomethyl)cytisine (2) and (+)-hupeol (3), were isolated together with 9 known alkaloids from Chinese *Maackia hupehensis*, which is grown in the southern China. The alkaloidal constituents of *M. hupehensis* was shown to be comparable to those of the southern species of Japanese *Maackia* plants. The Chinese *Maackia* plant also showed the relationship between geographical distribution of the plant and structural type of alkaloids contained in the plant, similarly to the relationship observed in Japanese species.

INTRODUCTION

The structural types of lupine alkaloids which occur in Japanese *maackia* plants (four species, *M. amurensis*, *M. tashiroi*, *M. floribunda* and *M. floribunda f. pubescens*) are related to geographical distribution of the plants[1]. The plant of *M. amurensis* is distributed in the north of Japan. It accumulates sparteine-type lupine alkaloids such as (+)-sparteine and (-)-lupanine and does not lupinine-type alkaloids such as (+)-epilupinine, (+)-tashiromine and (-)-lusitanine[1, 2]. The plants of *M. tashiroi*, *M. floribunda* and *M. floribunda f. pubescens* are growing in the south area of Japan, and the main constituents of those plants are lupinine-type alkaloids and no sparteine-type is found[1,3]. Furthermore the Japanese *Maackia* plants occur unusual type of lupine alkaloids, such as (-)-camoensidine[4], (+)-tashiromine[3] and (+)-maackiamine[2], which contain a pyrrolizidine or an indolizidine ring, together with common lupine alkaloids which consist of a piperidine or a quinolizidine ring. The cytisine- and anagyrene-type alkaloids are constituents common to plants of the two groups. These phenomena are interesting from the viewpoints of chemotaxonomy of leguminous plants and biosynthesis of lupine alkaloids. This report describes the isolation and structural determination of eleven alkaloids, in which (-)-*N*-(2-oxopyrrolidinomethyl)cytisine (1), (-)-*N*-(*N*-acetylaminomethyl)cytisine (2) and (+)-hupeol (3)[5], were new alkaloids and also describes a comparison of alkaloidal constituents of *M. hupehensis* with those of Japanese *Maackia* plants.

RESULTS AND DISCUSSION

The alkaloid mixture (5.4g) obtained from 75% methanol extracts of the air dried stem (1.2kg) of *M. hupehensis*, collected in Jiang xi province, China, in May, was repeatedly chromatographed on silica gel columns to give eleven lupine alkaloids, (-)-*N*-(2-oxopyrrolidinomethyl)cytisine (1), (-)-*N*-(*N*-acetylaminomethyl)cytisine (2), (+)-hupeol (3), (-)-cytisine (4, 25%), (-)-methylcytisine (5, 5%), (-)-*N*-formalycytisine (3%), (-)-epibaptifoline (21%), (-)-lusitanine (12%), (+)-epilupinine (3%), (-)-*N*-(3-oxobutyl)cytisine (trace), and (-)-rhombifoline (trace). in which 1, 2 and 3 were new alkaloids. The known alkaloids were identified by comparing directly with authentic samples in all measurable respects (mass spectrometry, ¹H-NMR, IR, [α]_D, co-TLC and HPLC) as described in our previous paper [6].

The total base (1.3g) obtained from the air dried leaves (750g) was similarly treated to give seven known alkaloids, (-)-cytisine (4, 16%), (-)-methylcytisine (5, 5%), (-)-*N*-formalycytisine (2%), (-)-epibaptifoline (15%), (-)-lusitanine (11%), (+)-epilupinine (4%) and (-)-lupinine (1%). This is the first example of the coexistence of (+)-epilupinine and (-)-lupinine in plant of genus *Maackia*. Alkaloid 1 gave colorless crystals from CHCl₃, mp 169 ~ 170⁰ C, and alkaloid 2 was isolated as an oily compound. The molecular formula of 1 and 2 were established by a high resolution mass spectra to give C₁₆H₂₁N₃O₂ (*m/z* 287.1627, calc. 287.1625) and C₁₄H₁₉N₃O₂ (*m/z* 261.1473,

calc.261.1478), respectively. The mass spectra of **1** and **2** both revealed the prominent fragment ions at m/z 203, 189, 160 and 146 which are characteristic of the type of *N*-alkylcytisine like (-)-*N*-(3-oxobutyl)cytisine [6, 7]. The ^1H and ^{13}C -NMR (CDCl_3) of **1** and **2**, which were assigned by analysis of ^1H - ^1H COSY and ^1H - ^{13}C COSY spectra, also resembled that of (-)-methylcytisine(**5**), as shown in Table 1 and 2. These results suggested that new alkaloids **1** and **2** might be *N*-substituted cytisine.

The presence of the isolated methylene group in the molecule of **1** was presumed from the two doublets, which were coupled only with each other, at δ 3.91 (1H, d, $J=12.2\text{Hz}$) and δ 3.77 (1H, d, $J=12.2\text{Hz}$) in the ^1H -NMR of **1**. The signals at δ 175.9 (s), δ 31.2 (t), δ 18.0 (t) and δ 46.7 (t) in the ^{13}C -NMR spectrum of **1** were assigned to an lactum carbonyl and three methylene carbons of 2-pyrrolidone moiety. Therefore the structure of **1** was presumed to be *N*-(2-oxopyrrolidinomethyl)cytisine, and determined by comparison with the synthetic sample which was obtained in a 93% yield, by refluxing a mixture of **4**, formalaldehyde and 2-pyrrolidone.

The presence of $\text{CONH-CH}_2\text{-N}$ moiety in the molecule of **2** was proposed from the ^1H -NMR signals at δ 5.73 (1H, broad) due to the amide NH, and at δ 4.03 (1H, dd, $J=12.2, 5.7\text{Hz}$) and δ 3.84 (1H, dd, $J=12.2, 5.7\text{Hz}$) due to the isolated methylene. The singlet at δ 1.98 (3H) was assigned to a methyl group adjacent to a carbonyl group, which was also confirmed by the signal at δ 23.4 (q) in the ^{13}C -NMR spectrum. The structure of **2** was presumed to be *N*-(*N*-acetylamino methyl)cytisine, and identified by comparison with the synthetic sample, which was synthesized by refluxing a mixture of **4**, formalaldehyde and *N*-acetamide in EtOH.

The new alkaloids **1** and **2**, which have methylene interposed between two nitrogens ($\text{>N-CH}_2\text{-N}$) in the structures, are regraded as characteristic components in *Maackia hupehensis*, though *M. amurensis* [unpublished results] and *M. floribunda* f. *pubescens* [8] contain (-)-12,12'-methylenedi cytisine which have a methylene group adjacent to the two amino nitrogen.

Alkaloid **3**, colourless needles, mp 217~219 °C, the molecular formula is $\text{C}_{11}\text{H}_{13}\text{NO}_3$ (m/z 207.0882, calc. 207.0894). **3** showed one spot on TLC analysis. However, the ^1H -NMR spectrum showed a 3:1 mixture of two components which considered to be isomeric with each other. The structures of **3** were presumed to be hemiacetals, in which 12-N of **4** is displaced by an oxygen. The major component was presumed to have the ax-OH and the minor one was having eq-OH.

Maackia hupehensis is a plant native to the south of China, and contain a lupinine-type and no sparteine-type. The components of *M. hupehensis* are the same as the south species of Japanese *Maackia*. Further, **1** which contains displaced pyrrolidine ring was also isolated though the corresponded one containing piperidine ring has not been isolated. Biosynthetic pathway of **1** from L-ornithine has been assumed. The relationships of geographical distribution and biosynthesis are very interesting and have being inquired in our laboratories.

EXPERIMENTAL

General procedures. Mps were not corrected. TLC were carried out on silica gel plates in the following solvent systems: 1. CH_2Cl_2 -MeOH-25% $\text{NH}_3\text{H}_2\text{O}$ (90 : 9 : 1 or 43 : 6 : 1), 2. CH_2Cl_2 -MeOH (4 : 1 or 10 : 1), 3. CH_2Cl_2 -AcOEt-MeOH (4 : 4 : 1). The high and low resolution MS were measured at 70 eV using direct inlet system. The ^1H NMR (270 or 500 MHz) and ^{13}C -NMR (125MHz) spectra were recorded using TMS as an internal standard.

Plant material. *Maackia hupehensis* is was collected in May, 1995 and identified by Prof. Jia-shi Li, Department of pharmacognogy, Beijing University of Traditional Chinese Medicine and Director Ce-ming Tian, Jiang Xi Jiou Jiang Forest and Plant Research. A voucher specimen (No. 74568) is deposited in the Herbarium Institute of Botang Chinese Academy of Sciences Xiangshan. Isolation of alkaloids. The stems of *Maackia hupehensis* were collected in May in Jiang Xi province in the south of China. The air-dried stems (1190g) cut into silces were extracted with 75% MeOH at room temp. The combined extracts were concertrated and acidified with 10% HCl to PH 2. The acid phase was removed by CH_2Cl_2 (x 3) and was basified with 25% $\text{NH}_3\text{H}_2\text{O}$ to PH 11 and extracted with CH_2Cl_2 . The basified phase was saturated with K_2CO_3 and extracted with CH_2Cl_2 repeatedly until it became negtive to Dragendorff's reagent. The CH_2Cl_2 extracts were combined and dried on anhydrous Na_2SO_4 and evaporated to dryness in vacuo. The crude alkaloids (5.4g) were obtained as a pale brown oil in a 0.45% yield of the dry stems. The dry leaves (750g) also were treated with the same procedure as described for the stems to give the crude alkaloids (1.3g) in a 0.17% yield.

The crude alkaloid (5.4g) from the stems was subjected to silica gel column (Merck, type 60, 230-400 mesh, 410g) with CH_2Cl_2 -MeOH-25% $\text{NH}_3\text{H}_2\text{O}$ (43 : 6 : 1), 250-ml fractions collected, monotoring with TLC, to give 17 frcations. The frcation 1-2 on silica gel column with solvent Et_2O : MeOH : 25% $\text{NH}_3\text{H}_2\text{O}$ (50 : 15 : 1) yielded (-)-*N*-(3-oxobutyl) cytisine (46mg) and (-)-rhombifoline (25mg). From the fraction 6-7 yielded (-)-methylcytisine (0.27g), (-)-*N*-formalcytisine (0.16g). The fractions 8-12 were subjected to silica gel column with solvent CH_2Cl_2 -MeOH (4 : 1) yielded cytisine (1.35g) and epibatifoline (1.13g). From the fractions 14-15 on silica gel column with solvent CH_2Cl_2 -MeOH-25% $\text{NH}_3\text{H}_2\text{O}$ (50 : 2.5 : 0.5) yielded (-)-lusitanine (0.6g). (+)-epilupinine (0.2g) was separated from the fractions 16-17 with solvent CH_2Cl_2 -MeOH (10 : 1).

The basic fraction from leaves was also investigated in the same manner.

Isolation of 1. The fraction 3 was repeatedly separated by column with solvent system 3 to yield (-)-*N*-(2-oxopyrrolidinomethyl) cytisine (1, 9mg), colorless crystals from CHCl_3 , mp 169-170°C, IR (KBr)/ cm^{-1} 1650 (C=O). EI-MS m/z 287.1627 (M^+ , calc. for $\text{C}_{16}\text{H}_{21}\text{N}_3\text{O}_2$: 287.1625, 13%), 203 (6), 189 (27), 160 (10), 146 (13), 98 (100), 70 (58), 58 (10).

Isolation of 2. The fraction 5 was separated by column with solvent system CH_2Cl_2 - $\text{CH}_3\text{COOC}_2\text{H}_5$ -MeOH-25% $\text{NH}_3\text{H}_2\text{O}$ (8 : 8 : 1 : 0.1) to give (-)-*N*-(*N*-acetylaminoethyl) cytisine (2, 5mg, oil), IR (KBr)/ cm^{-1} 3450 (NH), 1650 (C=O). EI-MS m/z 261.1473 (M^+ , calc.

for $C_{14}H_{19}N_3O_2$: 261.1478, 17%), 218 (M^+-CH_3CO , 2), 203 (M^+-CH_3CONH , 24), 190 (85), 189 (60), 160 (23), 147 (100), 146 (76), 58 (93).

Isolation of **3**. The fraction 4 was separated with CH_2Cl_2 - AcOEt-MeOH (5 : 5 : 1) to yield (+) hupeol (**3**, 8mg).

Synthesis of compound **1** from **4**. (-)-cytisine (**4**, 38mg, 0.2mmol), 35% formalin 0.017ml (0.2mmol) and 2-pyrrolidone 17mg (0.2mmol) were mixed and refluxed in EtOH (2ml) for one hour. The product was chromatography on silica gel column with CH_2Cl_2 - AcOEt-MeOH (6 : 6 : 1) to obtain **1** in a yield of 93% (53mg).

Synthesis of compound **2**. It is the same way with synthesis of **1**, refluxing (-)-cytisine (**4**), 35% formalin and *N*-acetamide 0.1mmol, respectively. **2** was separated on silica gel column with solvent system 3 and obtained in a yield of 86% (22mg).

Synthesis of compound **3** from **4**. 12-chlorocytisine, which was derived from (-)-cytisine with NCS, was treated with KOH-EtOH and give 11,12-dehydrocytisine. 11,12-dehydrocytisine and $NaNO_2$ were reacted in 5% HCl at 0~5°C 12 hours to give **3** smoothly in 77% yield..

Acknowledgements We are grateful to the supports from Association of Japanese-Chinese Medicine.

REFERENCES

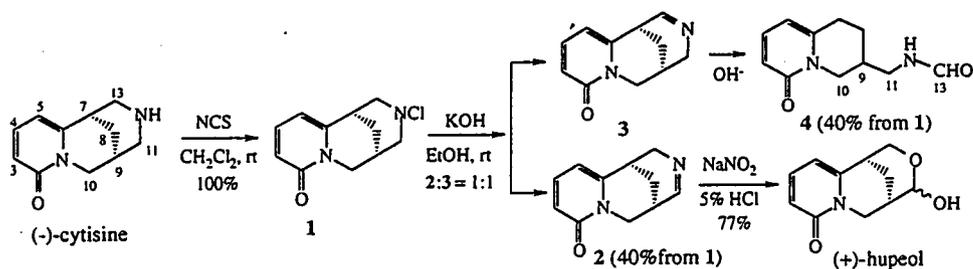
1. Ohmiya, S., Kubo, H., Otomatu, H., Saito, K. and Murakoshi, I. (1990) *Heterocycles*, **30**, 537
2. Kubo, H., Ohmiya, S., Saito, K. and Murakoshi, I. (1993) *Thai J. Pharm. Sci.* **17**, 171
3. Kubo, H., Ohmiya, S. and Murakoshi, I. (1994) *Can. J. Chem.* **72**, 214
4. Saito, K., Yoshino, T., Sekine, T., Ohmiya, S., Kubo, H., Otomatu, H. and Murakoshi, I. (1989) *Phytochemistry* **28**, 2533
5. Wang, Y.H., Kubo, H., Higashiyama, K., Komiya, H., Li, J. S., and Ohmiya, S. (1998) *J. Chem. Research (S)*, 196
6. Ohmiya, S., Saito, K. and Murakoshi, I. in *The Alkaloids*, ed.G. A. Cordell, Academic Press, New York, 1995, vol. 47, p 44.
7. Murakoshi, I., Fukuchi, K., Haginiwa, J., Ohmiya, S. and Otomatu, H. (1977) *Phytochemistry* **16**, 1460

(-)-Cytisine からの合成による(+)-hupeol の絶対配置の決定

星薬大・医薬品研 王 永紅、久保 元、東山公男、○大宮 茂
北京中医薬大・中薬 李 家実

【目的】(+)-Hupeol は、中国産 *Maackia hupehensis* から見いだされ、(-)-cytisine の様なルピンアルカロイドの基本構造をもつが、12 位窒素が酸素に置換された非アルカロイドであり、極めて珍しい化合物である。(+)Hupeol が、ルピンアルカロイドの最終代謝産物と考えられている (-)-cytisine から非アルカロイドへの代謝産物であるならば、両化合物の絶対配置は同じはずである。そこで、(+)-hupeol の絶対配置を決定するために、絶対配置既知の (-)-cytisine より合成することを試みた。

【方法・結果】(-)-Cytisine から NCS によるハロゲン化、脱塩酸反応を経て、2 を得、2 と亜硝酸を -5℃ で 24 時間反応させ、(-)-cytisine から 30% の収率で (+)-hupeol {mp 216℃, $[\alpha]_D^{23} = +33$ (EtOH, c=0.4)} を得た。この結果から、(+)-Hupeol の絶対配置は、(-)-cytisine と同じ (7*R*, 9*R*) と決定され、従って(+)-hupeol は (-)-cytisine の代謝によって生成したものと考えられる。この環状イミンと亜硝酸との反応によるヘミアセタールの生成反応の一般的な応用性については現在検討中です。



日本財団補助金による

1998 年度日中医学協力事業報告書

-在留中国人研究者研究助成-

1999年 3月 8日

財団法人 日中医学協会
理事長 中島章 殿

研究室で撮影した本人のスナップ写真、及び発表論文のコピーを添付

1. 研究者氏名 董 而 博 Erbo Dong
研究機関 富山医科薬科大学 研究指導者 渡辺裕司 職名 教授
所在地 〒930-0194 富山市杉室 2630 番地 電話 0764-34-2281 内線 2810

研究テーマ 隔離飼育ストレス誘発のペンタバルビタール睡眠短縮における
Diazepam Binding Inhibitor (DBI) の役割

2. 本年度の研究業績

(1) 学会・研究会等における口頭発表 有 ・ 無 (学会名・内容)

第49回日本薬理学会北部会

In volvement of mitochondrial benzodiazepine receptor in social isolation-induced decrease in pentobarbital sleep in mice (口演)

(2) 学会誌等に発表した論文 有 ・ 無 (雑誌名・論文名)

1. *Life Sciences* (in press) vol. 64 p1779-1784, 1999

Possible involvement of diazepam binding inhibitor and its fragment octadecaneuropeptide in social isolation stress-induced decrease in pentobarbital sleep in mice

著者: 董 而 博、松本欣三、渡邊裕司

2. *Life Sciences* (in press)

Involvement of peripheral type of benzodiazepine receptor in social isolation stress-induced decrease in pentobarbital sleep in mice

著者: 董 而 博、松本欣三、渡邊裕司

3. *Neuroscience Research* (in press)

Diazepam binding inhibitor (DBI) gene expression in the brains of socially isolated and group-housed mice

著者: 董 而 博、松本欣三、東田道久、金子喜彦、渡邊裕司

3. 今後の研究計画

これまでに脳内 GABA-A 受容体機能を制御する脳内物質の動態がストレス病態発見と密接に関連する可能性を検討していた。今後、脳内 GABA-A 受容体機能を制御する内因性物質候補の動態と薬物誘発睡眠時間の短縮や攻撃性などのストレス病態発見との関連性を定量的に解析する。この研究より、内因性物質の生理的病理学的な役割を突き止められることが期待され、またヒトにおける慢性的心理的ストレスに起因する疾患の予防、治療法の確立が可能となる。更に内因性物質の活性を調節する和漢薬、伝統薬物、合成医薬品を探索することによって新しい機序の抗ストレス薬の開発の突破口となるものと期待される。

4. 研究指導者の意見

本研究は、1) 長期隔離飼育ストレスにより内因性リガンドである DBI が中枢性および末梢性の BDZ 受容体に結合し、直接および間接的に GABA_A 受容体機能を低下させ、マウスの PB 睡眠を縮短する、2) 隔離ストレスは視床下部 DBI 遺伝子レベルの減少をもたらす、ことを明らかにした。

このような隔離飼育ストレスで惹起せれる中枢機能変化の研究が、ストレスに起因した精神神経疾患の病因解明や治療薬の開発に有用であることを示した点が評価された。

研究指導者氏名 渡辺 裕司 

5. 研究報告

別紙形式を参考に、報告本文4000字以上で報告して下さい（枚数自由・ワープロ使用）

タイトル・要旨等は日本語で、KEY WORDS以下は日本語或いは英語で記入して下さい。

研究成果の発表予定がある場合は発表原稿・抄録集等を添付して下さい。

論文発表に当っては、日中医学協会－日本財団補助金による旨を明記して下さい。

隔離飼育ストレス誘発のペントバルビタール睡眠短縮における Diazepam Binding Inhibitor (DBI)の役割

董 而博

中国遼寧中医学院薬学部 講師

指導教授 渡邊裕司

日本富山医科薬科大学和漢薬研究所 所長

本研究はストレスに起因する不眠症、うつ病、不安神経症などの発症原因の解明やそれらの疾患の治療薬の開発に資することを目的として、長期隔離飼育マウスの情動ストレスモデルとしての有用性を検討したものである。

1) 長期隔離飼育マウスではペントバルビタール(PB)誘発睡眠は短縮されるので、このPB誘発睡眠を指標として、diazepam binding inhibitor (DBI) や中枢型のベンゾジアゼピン (BZD) 受容体拮抗薬 flumazenil の作用を検討したが、影響は認められなかった。しかし、flumazenil を脳室内投与すると隔離群のPB誘発睡眠のみが延長され、DBI前処置により抑制された。他方、DBIは用量依存的に群居群マウスのPB誘発睡眠を短縮し、flumazenilの前処置によりその結果は遮断された。

これらの結果は、長期の隔離飼育によりマウス脳内におけるDBIの量または活性の変化が生じ、GABA_A受容体複合体上の中枢性BZD受容体(CBR)を介するGABA_A受容体機能低下し、マウスのPB催眠活性の減少に寄与している可能性を示唆している。

2) グリア細胞のミトコンドリア膜上に存在する末梢性BZD受容体(PBR)は、ニューロステロイド産生を調節し、GABA_A受容体機能に対して間接的に働く事が知られている。GABA_A受容体の非競合的拮抗薬であるPregnenolone sulfateを脳室内投与すると隔離群のPB睡眠は影響されず、群居群で用量依存的な短縮が起こった。一方、末梢性BZD受容体作動薬FGIN-1-27や同拮抗薬PK11195やpregnenolone(神経ステロイドのprecursor)は逆に隔離群のPB誘発睡眠のみを用量依存的に延長した。更に隔離群におけるFGIN-1-27やPK11195やPregnenoloneの効果は単独では作用しないPregnenolone sulfateにより拮抗された。

従って、隔離群の脳内では(1)GABA_A受容体作動性神経ステロイドの活性低下、(2)GABA_A受容体作動性神経ステロイドの活性上昇、あるいは(3)

(1)と(2)の両方の変化が生じてGABA_A受容体機能低下し、PB誘発睡眠が短縮される可能性が推察された。

(3) 脳内のDBI mRNA分布をin situ hybridization法で測定した結果、DBI遺伝子は視床下部や小脳に分布することが明らかとなった。脳内のDBI mRNA量をRT-PCR法で測定した結果、視床下部のDBI遺伝子量が隔離飼育期間の長さに依存して減少することが明らかとなった。この結果はDBI遺伝子が隔離マウスにおいて過剰発現するという仮説に反するが、DBIペプチドによるネガティ

ブフィードバック、DBIよりも強い活性を持つ他の内因性基質、ストレス関与ホルモン等による影響のためであると考えられた。視床下部-下垂体-副腎皮質系は種々のストレス刺激に応じて即座に活性化され、糖質コルチコイドの分泌量を増加させるので、糖質コルチコイドが脳内におけるDBI遺伝子発現に影響を及ぼす因子の一つである可能性がある。

Key words: 隔離飼育ストレス(Social isolation stress), ベンゾジアゼピン受容体 (Benzodiazepine (BZD) receptor), GABA_A受容体(GABA_A receptor), Diazepam binding inhibitor (DBI), mRNA, *In situ* hybridization, ペントバルビタール誘発睡眠 Pentobarbitol-induced sleep.

研究報告

Studies on the Involvement of Diazepam Binding Inhibitor (DBI) in Social Isolation Stress-induced Decrease in Pentobarbital Sleep in Mice

Social isolation stress causes a decrease in the hypnotic action of pentobarbital (PB) in mice. Investigations have revealed that the alteration in PB sleep by the stress is due to dysfunction of GABAergic systems in the brain, and that endogenous substance(s) with an inverse benzodiazepine (BZD) receptor agonist property play(s) a role in this alteration. Diazepam binding inhibitor (DBI), a polypeptide isolated from mammalian brains, is a putative endogenous BZD receptor ligand since it has a high affinity to BZD receptors, negatively modulates GABA_A receptor (GABA_A-R) function and produces anxiety, aggression, etc. The purpose of this study is to evaluate the possible involvement of DBI and octadecaneuropeptide (ODN), a peptide spliced from DBI, in social isolation-induced decrease in the hypnotic action of PB.

Section I. Possible Involvement of DBI and Its Fragment ODN in Social Isolation Stress-induced Decrease in PB Sleep in Mice ¹⁾

To test the possible participation of DBI and ODN in isolation stress-induced reduction of PB hypnotic activity in mice, male ddY mice (18-20 g, 4 weeks old) were either housed in groups or isolated individually for 6 weeks before experiments. PB-induced sleep was measured as the duration between the loss of the righting reflex and its return following intraperitoneal (i.p.) injection of PB-Na (50 mg/kg). The test drugs were given intracerebroventricularly (i.c.v.) 30 min before PB. DBI and ODN (3 and 10 nmol) dose-dependently decreased PB-induced sleep in group-housed but not isolated mice. In contrast, flumazenil (16.5-33 nmol), a BZD receptor antagonist, reversed the PB sleep in isolated mice to the normal level without affecting that in group-housed animals. The effects of DBI and ODN in group-housed mice were significantly blocked by flumazenil (33 nmol). In contrast, these peptides (10 nmol) significantly attenuated the reversing effect of flumazenil in isolated mice. These results suggest that the change in the activity or content of DBI and ODN in the brain occurs following social isolation and contributes partly to the decrease in the hypnotic action of PB in mice partly by down-regulating

GABA_A-R function via the central type BZD receptor (CBR) on the GABA_A-R complex (see Fig.1 and 2).

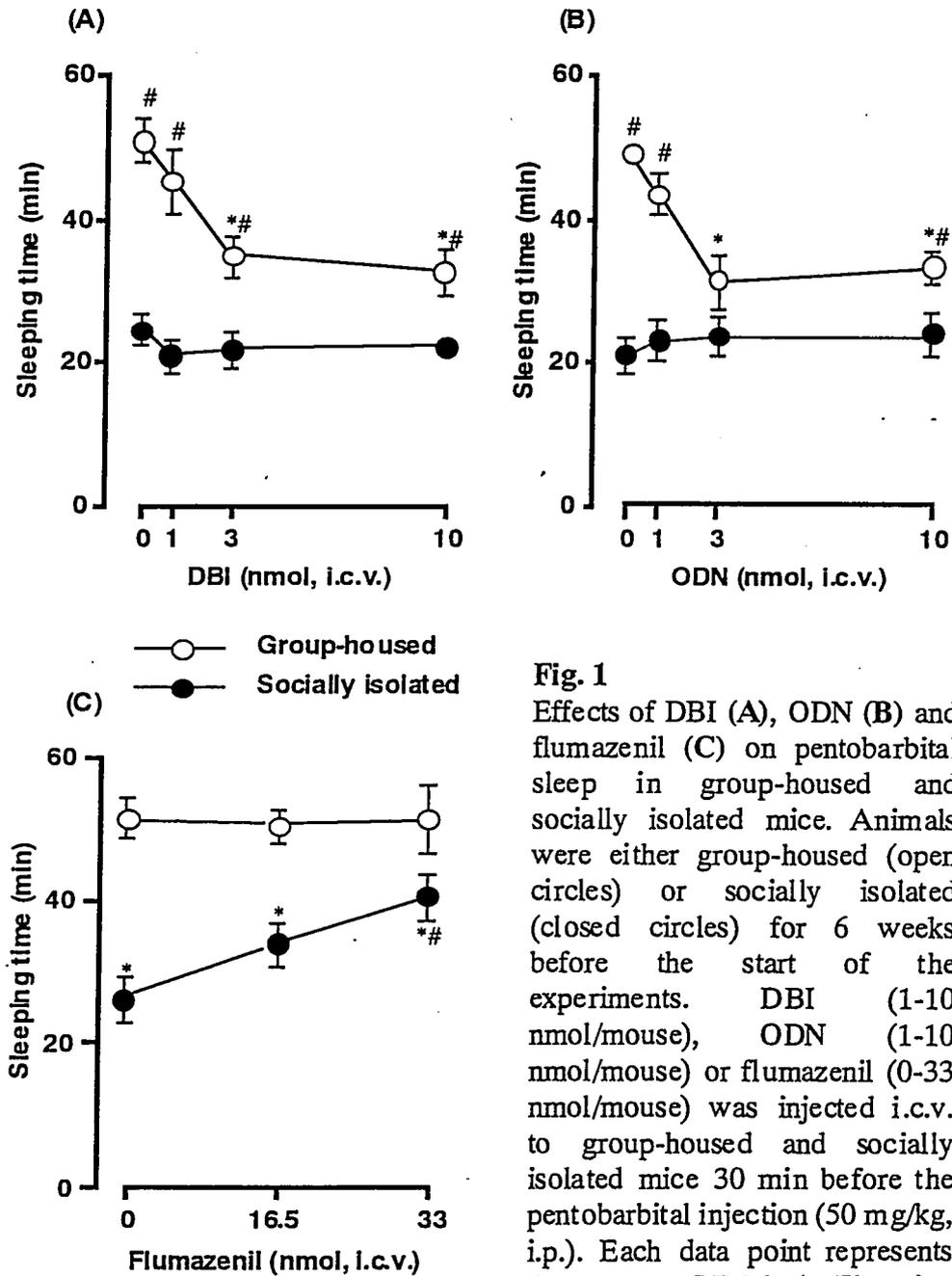


Fig. 1
 Effects of DBI (A), ODN (B) and flumazenil (C) on pentobarbital sleep in group-housed and socially isolated mice. Animals were either group-housed (open circles) or socially isolated (closed circles) for 6 weeks before the start of the experiments. DBI (1-10 nmol/mouse), ODN (1-10 nmol/mouse) or flumazenil (0-33 nmol/mouse) was injected i.c.v. to group-housed and socially isolated mice 30 min before the pentobarbital injection (50 mg/kg, i.p.). Each data point represents the mean \pm S.E.M. A: Fhousing conditions x DBI (3,69)=4.11,

P<0.01. B: Fhousing conditions x ODN (3,71)=5.20, p<0.01. C: Fhousing condition x flumazenil (2,58)=38.24, P<0.001. *p<0.05 vs. respective group-housed animals. #p<0.05 vs. vehicle-treated control. Each datum represents the mean \pm S.E.M. (n=9-10).

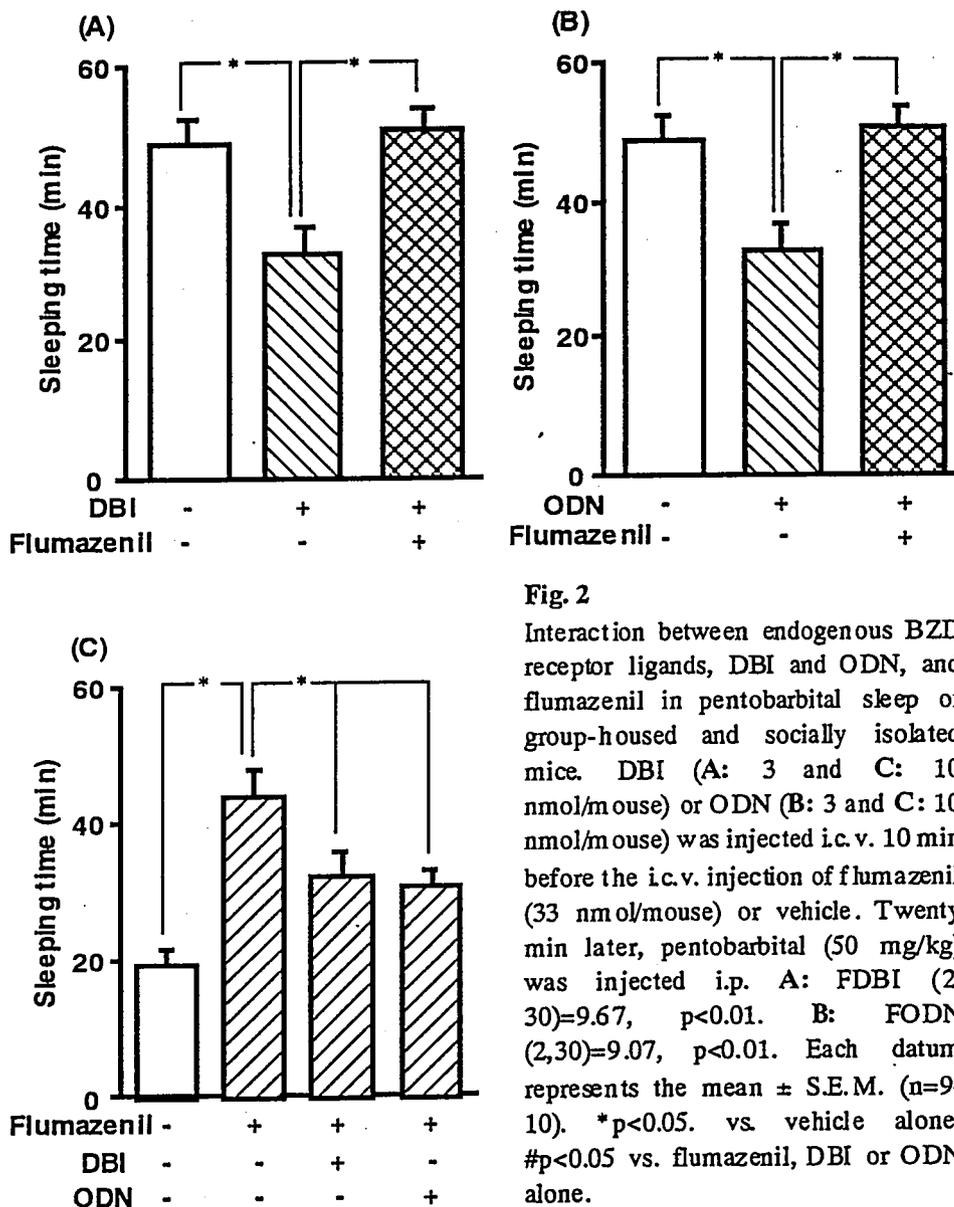


Fig. 2
 Interaction between endogenous BZD receptor ligands, DBI and ODN, and flumazenil in pentobarbital sleep of group-housed and socially isolated mice. DBI (A: 3 and C: 10 nmol/mouse) or ODN (B: 3 and C: 10 nmol/mouse) was injected i.c.v. 10 min before the i.c.v. injection of flumazenil (33 nmol/mouse) or vehicle. Twenty min later, pentobarbital (50 mg/kg) was injected i.p. A: FDBI (2, 30)=9.67, $p < 0.01$. B: FODN (2,30)=9.07, $p < 0.01$. Each datum represents the mean \pm S.E.M. (n=9-10). * $p < 0.05$. vs. vehicle alone. # $p < 0.05$ vs. flumazenil, DBI or ODN alone.

Section II. Involvement of Peripheral Type of Benzodiazepine Receptor in Social Isolation Stress-induced Decrease in PB Sleep in Mice ²⁾

In contrast to CBR, peripheral-type BZD receptors (PBR) located on the mitochondrial membrane of glial cells exerts an indirect action on GABA_A-R function through regulating neurosteroidogenesis. To clarify the role of PBR in the decrease in PB sleep caused by social isolation, FGIN-1-27 (FGIN) and PK 11195 (PK), PBR agonist

and antagonist, and pregnenolone (PREG), a neurosteroid precursor, and pregnenolone sulfate (PS), a neurosteroidal negative allosteric modulator of GABA_A-R were given i.c.v. 30 min before PB, respectively. FGIN, (25-100 nmol), PK (14-28 nmol), and PREG (15-30 nmol) dose-dependently normalized PB sleep in isolated mice without affecting that in group-housed animals. In contrast, PS (24 nmol) reduced the PB sleep in group-housed but not isolated mice. PS, at the same dose, significantly attenuated the effects of FGIN (100 nmol), PK (28 nmol) and PREG (30 nmol) in isolated mice, while FGIN (100 nmol), PK (28 nmol) and PREG (30 nmol) significantly blocked the effect of PS (24 nmol) in group-housed mice. These results suggest that decrease in the genesis of neurosteroid(s) with a GABA_A-R agonistic profile regulated by PBR is also partly implicated in the down regulation of GABA_A-R following social isolation and contributes to the decrease of PB-induced sleep in isolated mice. Besides, FGIN and PK, at the doses tested, tended to attenuate the DBI or ODN-induced decrease in PB sleep in group-housed mice, suggesting that these peptides preferentially interact with CBR in the brain as shown in Fig.3-7.

Section III. Benzodiazepine Binding Inhibitor (DBI) Gene Expression in The Brains of Socially Isolated and Group-housed Mice ³⁾

To find biochemical evidence that supports behavioral findings described above, DBI gene expression in the brain of group-housed and isolated mice was examined. Consistent with the previous reports, the *in situ* hybridization result showed strong signals of DBI mRNA around the regions of the third ventricle, especially the lining cells, the arcuate nucleus of the hypothalamus and the cerebellum in both socially isolated and group-housed animals. Unexpectedly, however, semi-quantitative analysis with RT-PCR technique revealed that isolated mice had significantly less expression of DBI mRNA in the hypothalamus than group-housed animals and there was no difference in the expression in the other brain areas between two groups. In addition, the significant decrease in the gene expression was found in the mice individually isolated for 2 weeks and this decrease paralleled with the decrease in PB sleep in the mice isolated for the same period. Although this finding hardly agrees with our hypothesis that DBI gene might be overexpressed in isolated mice, it provides evidence that isolation stress affects DBI gene expression. The most possible mechanism underlying this decrease of DBI mRNA is the

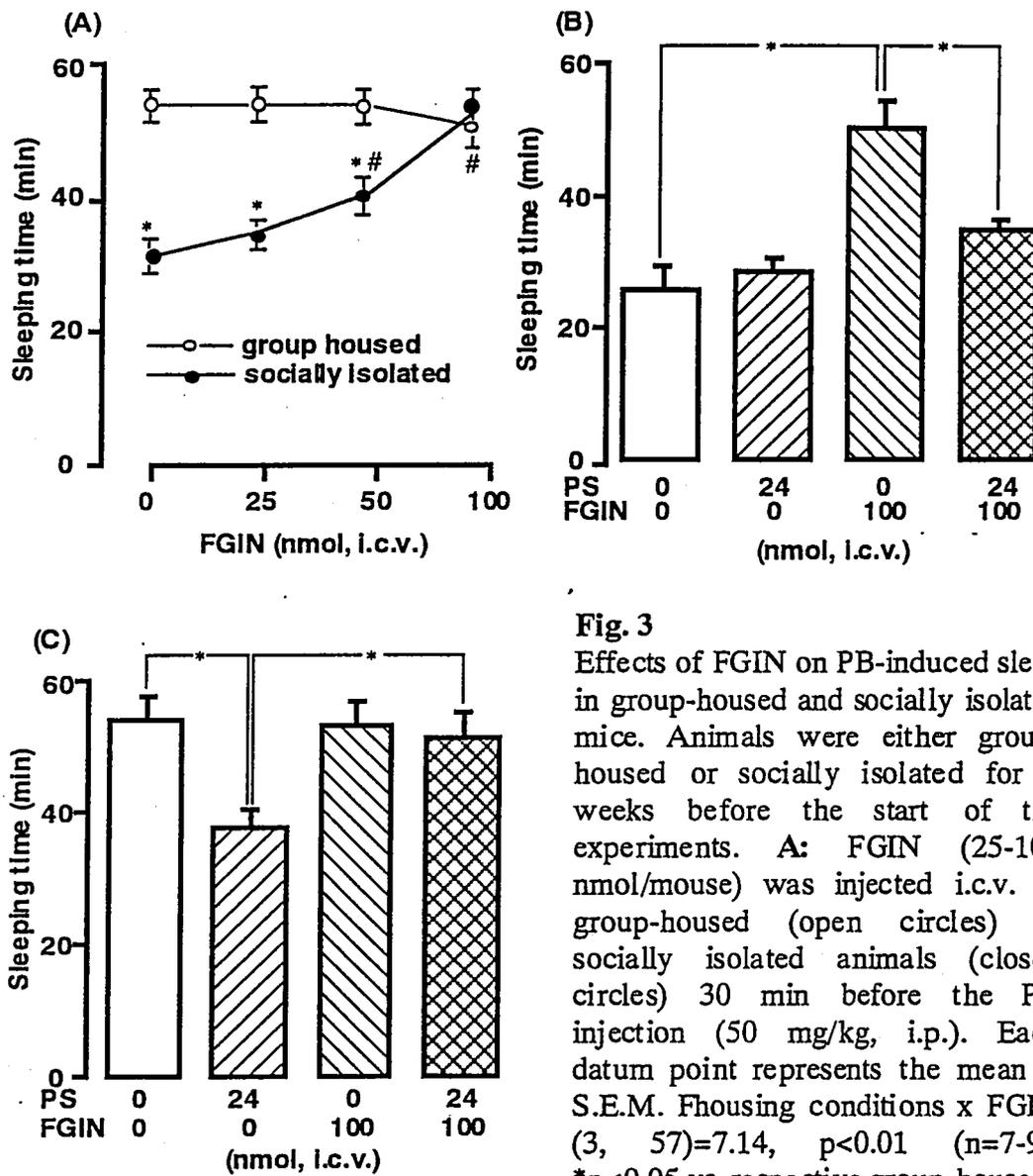


Fig. 3

Effects of FGIN on PB-induced sleep in group-housed and socially isolated mice. Animals were either group-housed or socially isolated for 6 weeks before the start of the experiments. **A:** FGIN (25-100 nmol/mouse) was injected i.c.v. to group-housed (open circles) or socially isolated animals (closed circles) 30 min before the PB injection (50 mg/kg, i.p.). Each datum point represents the mean \pm S.E.M. Housing conditions \times FGIN (3, 57)=7.14, $p < 0.01$ ($n=7-9$).

* $p < 0.05$ vs. respective group-housed

animals. # $p < 0.05$ vs. vehicle-treated control. **B and C:** PS (24 nmol/mouse) and FGIN (100 nmol) were either given alone or coadministered i.c.v. to socially isolated mice (**B**) or group-housed mice (**C**) 30 min before PB (50 mg/kg, i.p.). Each datum represents the mean \pm S.E.M. of 9-10 mice (**B**) or 8-9 mice (**C**), * $p < 0.05$.

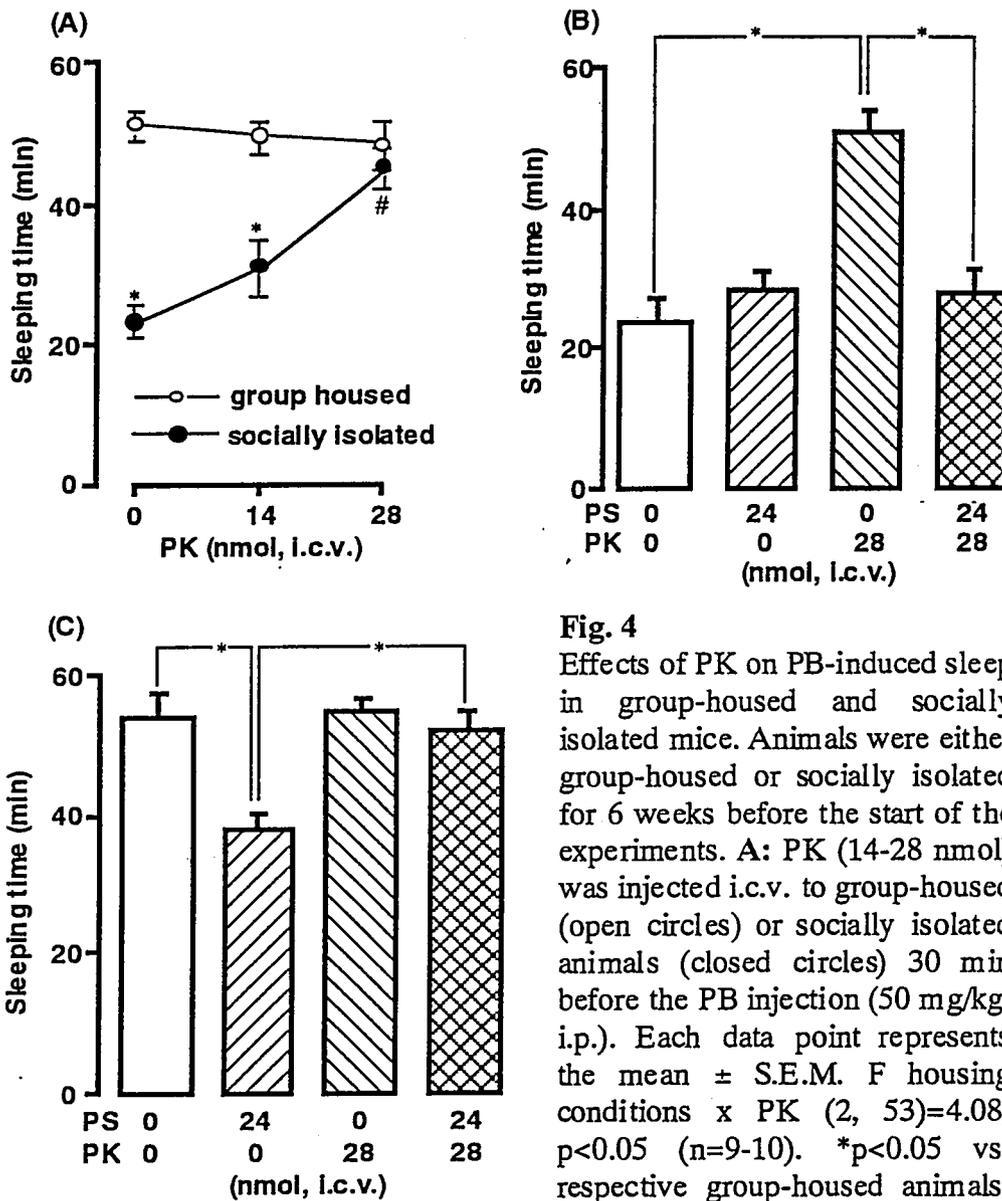


Fig. 4

Effects of PK on PB-induced sleep in group-housed and socially isolated mice. Animals were either group-housed or socially isolated for 6 weeks before the start of the experiments. **A:** PK (14-28 nmol) was injected i.c.v. to group-housed (open circles) or socially isolated animals (closed circles) 30 min before the PB injection (50 mg/kg, i.p.). Each data point represents the mean \pm S.E.M. F housing conditions \times PK (2, 53)=4.08, $p < 0.05$ ($n=9-10$). * $p < 0.05$ vs. respective group-housed animals. # $p < 0.05$ vs. vehicle-treated control. **B and C:** PS and PK (24 and 28 nmol) were coadministered i.c.v. to socially isolated mice (**B**) or group-housed mice (**C**) 30 min before PB (50 mg/kg). Each datum point represents the mean \pm S.E.M of 9 mice (**B**) or 8-9 (**C**), * $p < 0.05$.

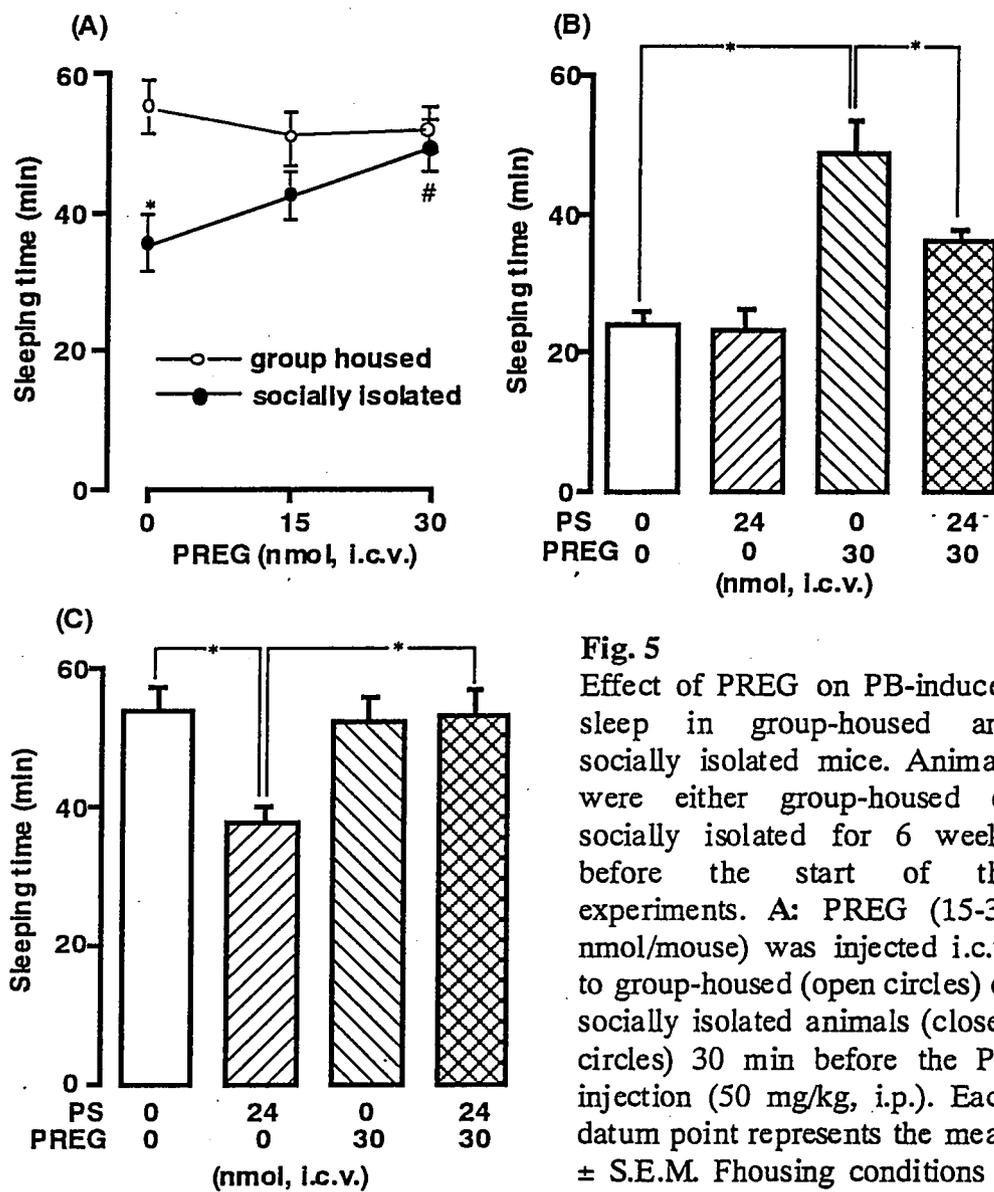


Fig. 5

Effect of PREG on PB-induced sleep in group-housed and socially isolated mice. Animals were either group-housed or socially isolated for 6 weeks before the start of the experiments. **A:** PREG (15-30 nmol/mouse) was injected i.c.v. to group-housed (open circles) or socially isolated animals (closed circles) 30 min before the PB injection (50 mg/kg, i.p.). Each datum point represents the mean \pm S.E.M. Housing conditions \times PREG (2, 48)=4.05, $p < 0.05$

($n=9$). * $p < 0.05$ vs. respective group-housed animals. # $p < 0.05$ vs. vehicle-treated isolated animals. **B** and **C:** PREG and PS (30 and 24 nmol) were coadministered to socially isolated mice (**B**) or group-housed mice (**C**) 30 min before PB (50 mg/kg). Each datum point represents the mean \pm S.E.M of 9 mice (**B**) or 8-9 mice (**C**), * $p < 0.05$.

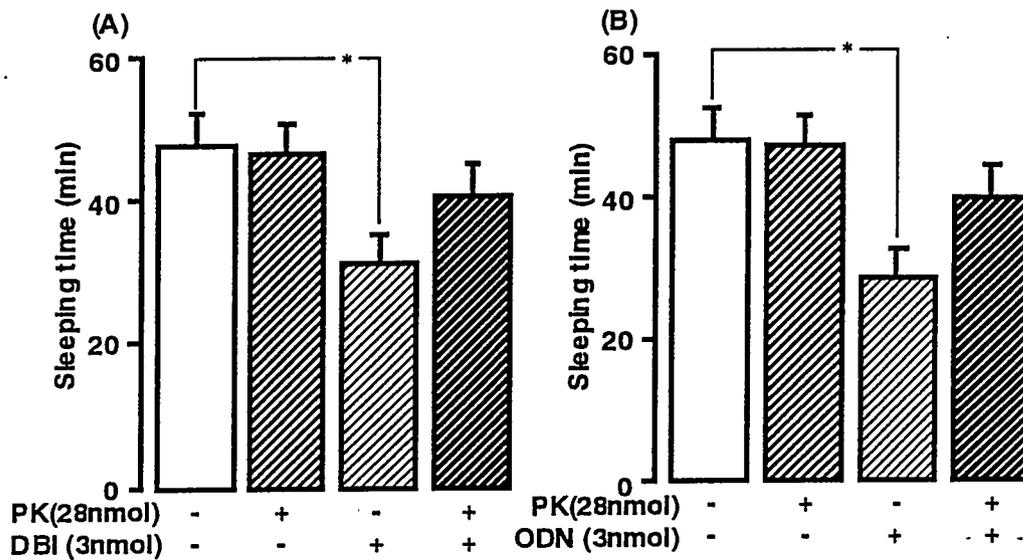


Fig.6 (A) and (B) Effects PK11195 (PK) on pentobarbital sleep in group-housed mice pretreated with DBI or ODN. Animals were either group-housed for 6 weeks before the start of the experiments. DBI or ODN (3nmol) was injected i.c.v. respectively 10 min before PK (28 nmol/mouse) given and then 20 min later the pentobarbital injection (50 mg/kg, i.p.) was administered. Each datum point represents the mean \pm S.E.M (n=9-10). *p<0.05 vs. vehicle treated group.

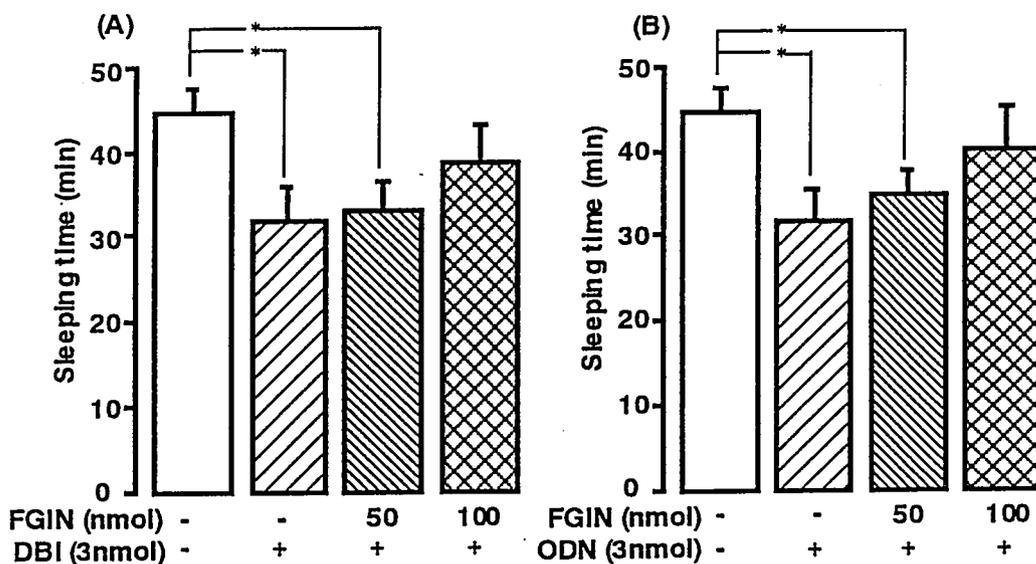


Fig.7 (A) and (B) Effects of FGIN-1-27 (FGIN) on pentobarbital sleep in group-housed mice pretreated with DBI or ODN. Animals were group-housed for 6 weeks before the start of the experiments. DBI or ODN (3nmol) was injected i.c.v. respectively 10 min before FGIN (50 and 100 nmol/mouse) given and then 20 min later the pentobarbital injection (50 mg/kg, i.p.) was administered. Each datum point represents the mean \pm S.E.M (n=9-10). *p<0.05 vs. vehicle treated group.

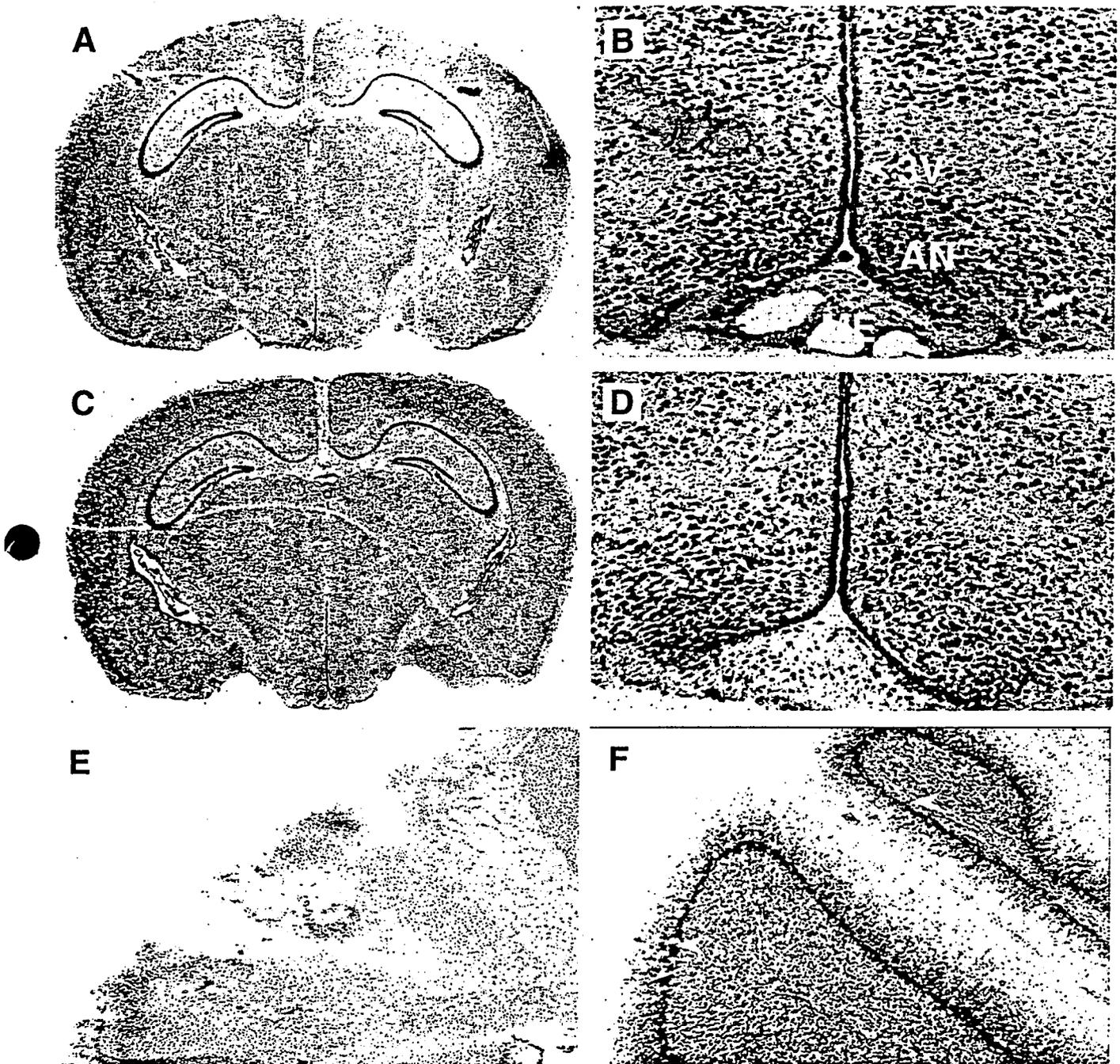


Fig. 8

DBI mRNA distribution in the brain tissue of mice group-housed for 10 weeks. DBI mRNA was found around regions of the hypothalamus and cerebellum. A: Brain slice hybridized by DBI sense probe; B: Hypothalamus region hybridized by the sense probe, in which 3V, AN and ME represent the third ventricle (ependymal cells), arcuate nucleus and median eminence (10 x), respectively. Whole brain slice (C) and hypothalamus section (D) were prepared from group-housed mice and hybridized by DBI antisense probe. E and F: Cerebellum regions hybridized by sense probe (E), or antisense probe (F), respectively. DBI mRNA was found abundantly in the Purkinje layers (arrows, 10 x).

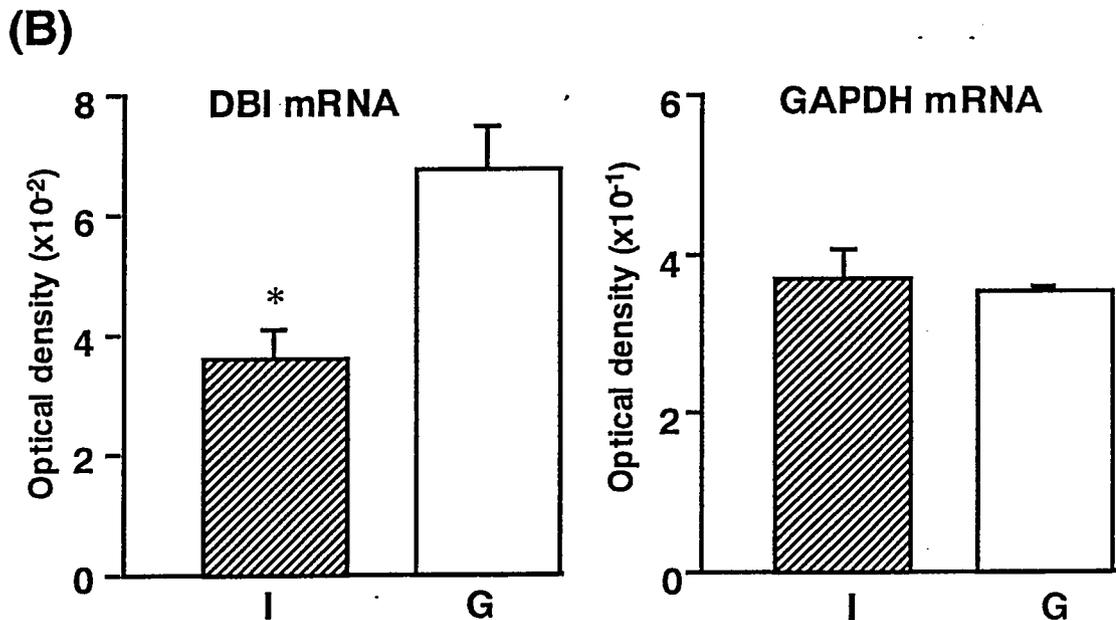
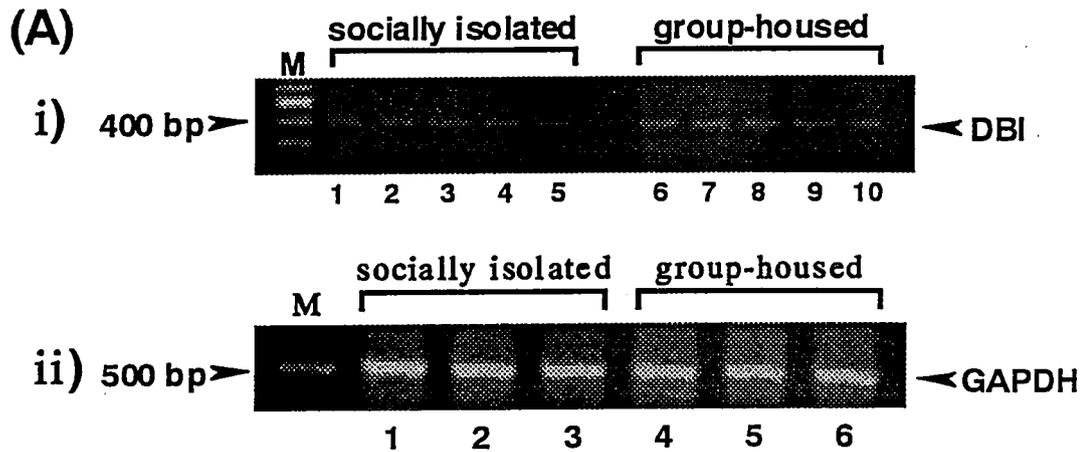


Fig. 9 Social isolation stress-induced changes in the DBI gene level in the brain. Mice were either group-housed or individually isolated for 6 weeks before the start of the experiments. DBI mRNA was extracted from the brains of each animal groups. **A:** digitized image of DBI mRNA (i, lanes 1-5: socially isolated mice; lanes 6-10: group-housed mice) and GAPDH mRNA (ii, lanes 1-3: socially isolated mice; lanes 4-6: group-housed mice) extracted from the hypothalamus region of socially isolated and group-housed mice. **B:** quantification of DBI and GAPDH mRNA signals in the hypothalamus region of group-housed and socially isolated mice. Each data column represents the mean \pm S.E.M. ($n=3-5$). * $P < 0.001$ (Student's t -test).

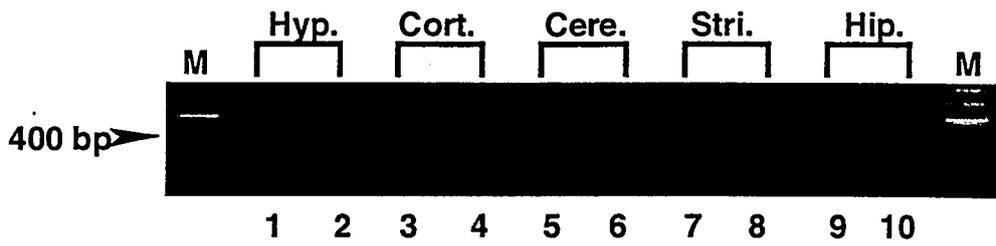


Fig. 10 Social isolation stress-induced changes in the DBI gene level in the brain. Mice were either group-housed or individually isolated for 6 weeks before the start of the experiments. DBImRNA was extracted from the brains of each animal groups. PCR image of DBI mRNA expressed in the hypothalamus (Hyp.), cortex (Cort.), cerebellum (Cere.), striatum (Stri.), and hippocampus (Hip.) of group-housed and socially isolated mice. DBI mRNA extracted from each brain region of socially isolated (lanes 1, 3, 5, 7, and 9) and group-housed mice (lanes 2, 4, 6, 8, and 10) was amplified as described in the text.

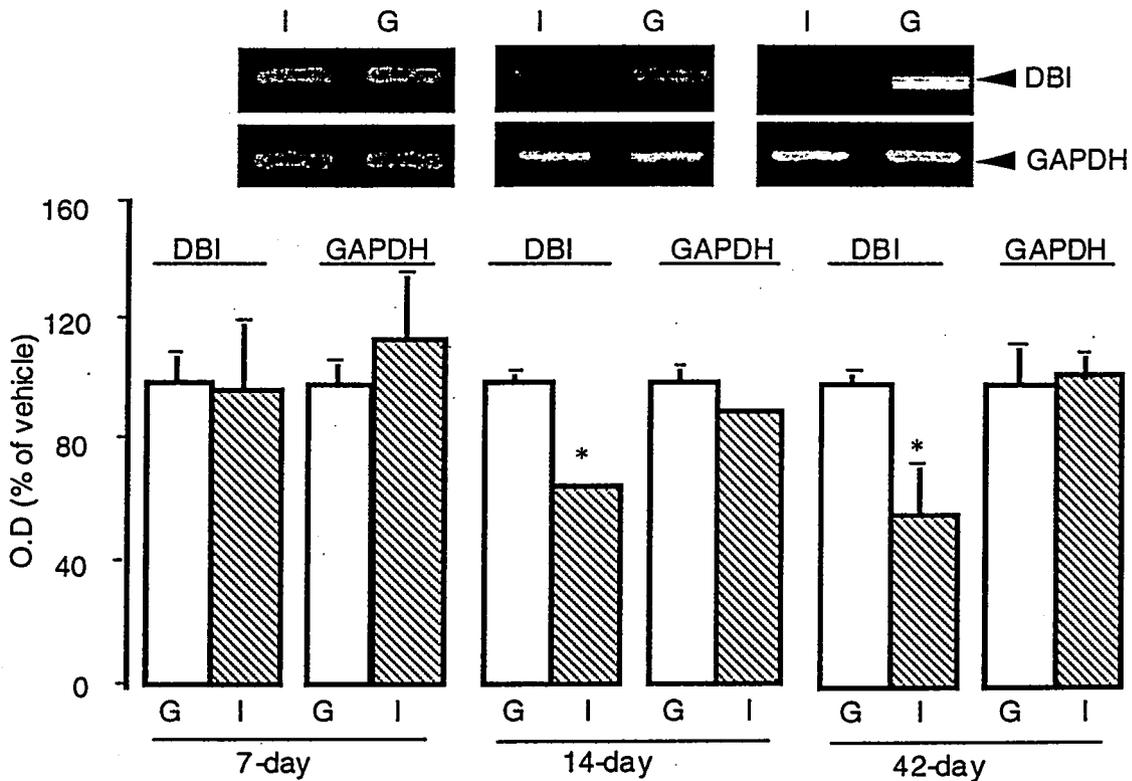


Fig. 11 Isolation stress time-dependently induces DBI gene level decrease in mice hypothalamic region

negative feedback regulation by DBI peptide, other endogenous substance(s) with more potent activity than DBI, or stress-related hormones (see Fig.8-11).

Section IV. Corticosterone Modulation in Hypothalamic DBI Gene Expression in Mice ⁴⁾

Since the hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis is promptly activated in response to variety of stressful stimuli and is duly responsible for the secretion of substantial quantities of glucocorticoids, it raises the possibility that glucocorticoids may be one of the factors that can affect DBI gene expression in the brain. To elucidate this hypothesis, male ddY mice (4 weeks old) received stress-dose of corticosterone (CORT, 1 or 5 mg, s.c.) daily for 1, 3 and 7 days and DBI mRNA level in the hypothalamus and the duration of PB sleep in these animals were measured. One day after the single injection of CORT (1 and 5 mg), 5 but not 1 mg CORT significantly decreased DBI gene level in the hypothalamus. When the treatment was repeated for 3 or 7 days, the remarkable reduction in DBI gene level appeared in the animals injected with 1 mg CORT. In parallel with the change in the gene level, PB-induced sleep also decreased significantly in CORT-treated mice. These results suggest that the decrease in DBI mRNA level in isolated mice may be partly due to a negative regulation by CORT in the brain (as shown in Fig.12-14).

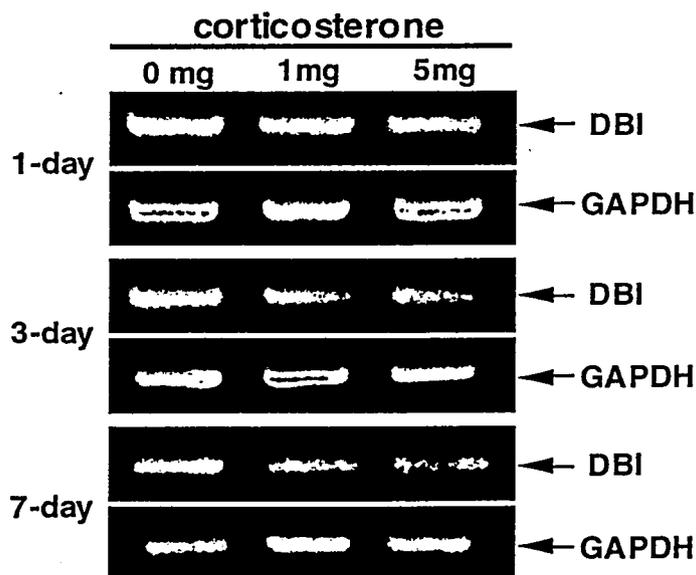


Fig. 12 Corticosterone-induced alteration in hypothalamic DBI gene level in mice. Mice were given s.c. corticosterone for 1, 3 and 7 days before the start of the experiments. RT-PCR images show the changes of DBI gene following certain interval administration of the drug. To avoid any deviation caused by sampling, GAPDH mRNA was used as an internal control.

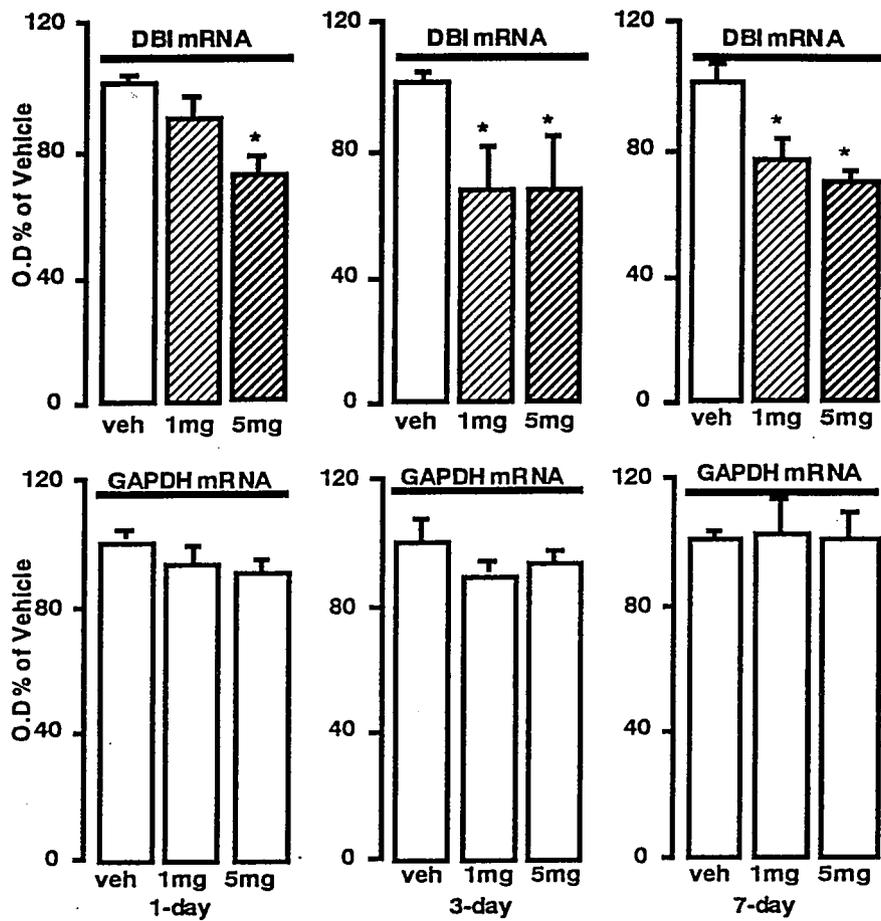


Fig. 13 Semiquantification of RT-PCR images of DBI and GAPDH mRNA signals in hypothalamic region. Each data column represents the mean \pm S.E.M.(n=3). *p<0.05.

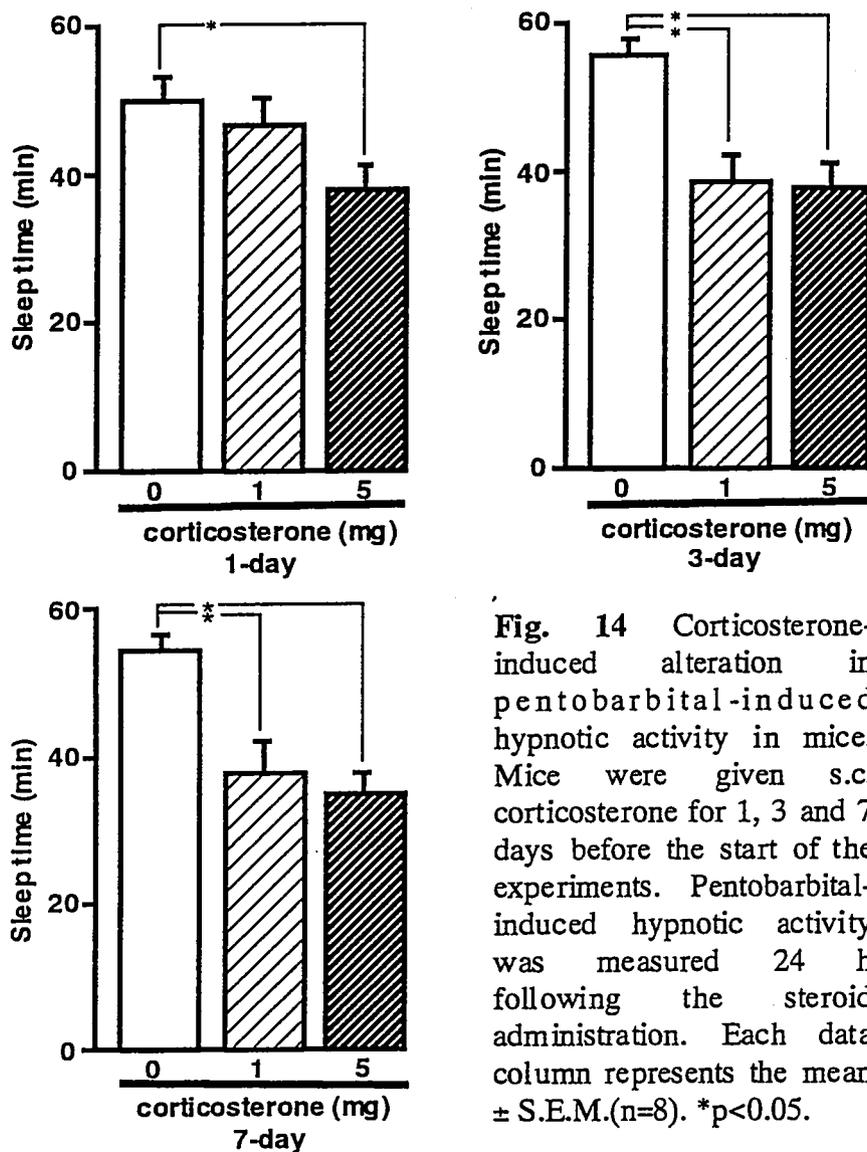


Fig. 14 Corticosterone-induced alteration in pentobarbital-induced hypnotic activity in mice. Mice were given s.c. corticosterone for 1, 3 and 7 days before the start of the experiments. Pentobarbital-induced hypnotic activity was measured 24 h following the steroid administration. Each data column represents the mean \pm S.E.M.(n=8). *p<0.05.

General Conclusion

The present findings have clarified that, 1) DBI, an endogenous BZD ligand, is responsible for the decrease in PB sleep in social isolation mice through directly and indirectly down-regulating GABA_A-R function by binding to CBR and PBR, 2) isolation stress induces a decrease in hypothalamic DBI gene level, possibly through a negative-feedback mechanism by which CORT may act as an important modulator.

References

1. Erbo Dong, Kinzo Matsumoto, and Hiroshi Watanabe. Possible involvement of diazepam binding inhibitor and its fragment octadecaneuropeptide in social isolation

- stress-induced decrease in pentobarbital sleep in Mice. Life Science. (in press)
2. Erbo Dong, Kinzo Matsumoto and Hiroshi Watanabe. Involvement of peripheral type of benzodiazepine receptor in social isolation stress-induced decrease in pentobarbital sleep in mice. Life Science (in press)
 3. Erbo Dong, Kinzo Matsumoto, Michihisa Tohda, Yoshihiko Kaneko and Hiroshi Watanabe. Diazepam binding inhibitor (DBI) gene expression in the brains of socially isolated and group-housed mice. Neuroscience Research. (in press)
 4. Erbo Dong, Kinzo Matsumoto, Michihisa Tohda, and Hiroshi Watanabe. Corticosterone modulation of hypothalamic diazepam binding inhibitor (DBI) gene expression in mice (submitted).



Diazepam binding inhibitor (DBI) gene expression in the brains of socially isolated and group-housed mice

Erbo Dong, Kinzo Matsumoto *, Michihisa Tohda, Yoshihiko Kaneko, Hiroshi Watanabe

Department of Pharmacology, Research Institute for Wakan-Yaku (Oriental Medicines), Toyama Medical and Pharmaceutical University, 2630 Sugitani, Toyama 930-0194, Japan

Received 31 July 1998; accepted 18 December 1998

Abstract

Diazepam binding inhibitor (DBI), a putative endogenous polypeptide ligand for benzodiazepine (BZD) receptors, has been shown to act as an inverse BZD receptor agonist in the brain. We previously suggested that the social isolation stress-induced decrease in pentobarbital sleeping time in mice was partly due to an increase in the activity of endogenous substances with an inverse BZD receptor agonist-like property such as DBI. In this study, we examined whether the DBI gene expression is affected by socially isolated stress. Consistent with the previous findings, the *in situ* hybridization result showed very strong signals of DBI mRNA around the regions of the third ventricle, especially the lining cells, the arcuate nucleus of the hypothalamus and the cerebellum, in both socially isolated and group-housed animals. Unexpectedly, however, semi-quantitative experiments with reverse transcription-polymerase chain reaction technique revealed that socially isolated mice had significantly less expression of DBI mRNA in the hypothalamus than group-housed animals, and no difference in the expression in the other brain areas was observed between two animal groups. We discuss the relationship between the decrease of DBI mRNA expression in the hypothalamus and the decrease of GABA_A receptor function following long-term social isolation in mice. © 1999 Elsevier Science Ireland Ltd. All rights reserved.

Keywords: DBI mRNA; Diazepam binding inhibitor (DBI); *In situ* hybridization; RT-PCR; Social isolation stress

1. Introduction

Our previous studies have showed that the pentobarbital-induced sleeping time in socially isolated mice is significantly shorter than that in group-housed animals and the intracerebroventricular (i.c.v.) injection of the benzodiazepine (BZD) receptor antagonist flumazenil can normalize the pentobarbital-induced sleeping time in isolated mice without affecting the sleep in group-housed animals (Ojima et al., 1995; Matsumoto et al., 1996; Ojima et al., 1997). In addition, the effect of an inverse BZD receptor agonist FG7142 on pentobarbital sleep in group-housed and socially isolated mice was opposite to that of flumazenil; FG7142 caused a de-

crease in the sleeping time in group-housed mice without changing the sleep in socially isolated mice. Based on these findings we hypothesized that endogenous substance(s) with an inverse BZD receptor agonist property may be involved in this alteration (Ojima et al., 1997).

Diazepam binding inhibitor (DBI) and its spliced fragment octadecaneuropeptide (ODN) and triakontatetrapeptide (TTN) are putative endogenous BZD receptor ligands (Guidotti et al., 1983; Guidotti, 1991). Evidence indicates that these peptides negatively modulate the GABA_A receptor function by binding to BZD recognition sites (Guidotti et al., 1983) like an inverse BZD receptor agonist, and that their effects on GABA_A receptors are reversed by flumazenil (Costa, 1991; Costa and Guidotti, 1991). Recently we found that DBI shortened the pentobarbital sleeping time in

* Corresponding author. Tel.: +81-764-34-2281; fax, +81-764-34-5056; e-mail: mkinzo@ms.toyama-npu.ac.jp.

group-housed but not in socially isolated mice when given i.c.v. and that flumazenil reversal of pentobarbital sleep in socially isolated mice was attenuated by the i.c.v. injection of DBI (Dong et al., 1998). These findings raise the possibility that DBI plays an important role in the reduction of barbiturate-induced sleep by long-term social isolation. Thus, in the present study, we examined the changes in DBI mRNA expression in the brains of mice following long-term social isolation by an in situ hybridization technique and a reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) method.

2. Materials and methods

2.1. Animals

Male ddY mice, weighing 18–20 g (Japan SLC, Shizuoka, Japan) were obtained at the age of 28 days. Animals were either housed in groups of five per cage (24 × 17 × 12 cm) or individually isolated in the same size cage. In the in situ hybridization experiments, the animals housed in groups or individually isolated for 2, 4, 6, 8 and 10 weeks were used. For the RT-PCR of DBI mRNA, the animals housed in groups or individually isolated for 6 weeks were used. The housing was thermostatically maintained at 24 ± 1°C with constant humidity (65%) and a 12:12 h light/dark cycle (lights on: 07:00–19:00). The mice were given free access to food and water. The present studies were conducted in accordance with the standards established by the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals of Toyama Medical and Pharmaceutical University.

2.2. In situ hybridization

The DBI cDNA was isolated from the mouse brain mRNA by using the RT/PCR method. The sequences of the sense and the antisense primers are ATTCG-GCATCCGTATCAC and AGCAGAGGT-TAACGCTGGCCCTAAT which correspond to the sequences from 13 to 29 and from 393 to 417, respectively (Owens et al., 1989). The resultant purified 405-bp fragment was inserted to the pBluescript II KS (-) vector which was treated with *EcoRV* at 37°C for 2 h followed by *Taq* polymerase with dTTP at 70°C for 2 h. The vector pDBI was cut by *Bam*HI at nucleotide 692 of DBI cDNA for a T3 RNA polymerase reaction to make antisense RNA, and by *Sal*I at nucleotide 657 of the vector for a T7 RNA polymerase reaction to make sense RNA. The reactions to make these probes were performed essentially as described previously (Tohda and Watanabe, 1996). After incubation at 37°C for 60 min, the reaction mixtures were further treated with 0.1 mg/ml DNaseI for 15 min, and the reaction mixture

was then precipitated with ethanol in the presence of 0.4 M LiCl and 25 mM EDTA. Both the digoxigenin-labeled antisense (T3) and sense (T7) cRNA probes had an apparent length of about 500 bp. The resultant cRNA was placed into hydration buffer (80 mM NaHCO₃, 60 mM Na₂CO₃, 6 mM dithiothreitol) and incubated at 60°C to generate fragments of about 200–300 bp. The reaction was terminated by adding 0.3 M sodium acetate and 250 µg tRNA, and then precipitated with ethanol. The pellet was re-dissolved in sterile water and stored at -80°C. In in situ hybridization experiments, the mice were killed by decapitation and the brain was removed, immediately frozen with powdered dry ice, and stored for 1 day at -80°C. Frozen brain sections (16 µm thick) with the coordinates of A 2.3 mm from the frontal zero plane according to the atlas of Montemurro and Dukelow (1972) were cut using a cryostat, mounted onto gelatin-coated slides, and air dried. Before hybridization, sections were fixed with 4% (w/v) paraformaldehyde in phosphate-buffered saline (PBS) for 15 min, followed by proteinase K treatment (0.5 µg/ml) and acetylation. The sections were dehydrated through a graded ethanol series, placed in chloroform to remove fat, treated with 100% ethanol and dried. After prehybridization, the sections were hybridized overnight with a digoxigenin-labeled probe in a hybridization buffer consisting of 5 × standard saline citrate (SSC: 150 mM NaCl, 17 mM sodium citrate, pH 7.0), 50% formamide, 2.7 × Denhardt's solution, 10 mM EDTA, 20 mM dithiothreitol, 0.25 mg/ml tRNA and 10% dextran sulfate at 55°C. The hybridized sections were washed with 2 × SSC at 55°C, treated with 50 µg/ml RNaseA for 30 min, washed with 50% formamide/2 × SSC at 55°C, dehydrated in ethanol and dried. DBI mRNA hybridized with the digoxigenin-labeled probe was detected immunohistochemically using an alkaline phosphatase (AP)-conjugated antidigoxigenin antibody with 450 µg/ml nitroblue tetrazolium and 175 µg/ml 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate as substrates.

2.3. RT-PCR

Total RNA in ^{the} hypothalamus, ^{ices} cortex, ^d cerebellum, striata and hippocampi of socially isolated and group-housed mice was extracted with guanidium isothiocyanate according to the method of Sambrook et al. (1989). Briefly, first-strand cDNA was synthesized using 5 µg of total RNA from group-housed or socially isolated animals as a template and antisense probe of DBI as a primer; superscript reverse transcriptase was used for the PCR fingerprinting. In addition to the template, each PCR reaction contained 0.25 mM deoxynucleoside triphosphate mix, 5 µM primers, *Taq* polymerase, PCR buffer and 2.2 mM MgCl₂. The PCR ^{subseq} primers used were the antisense and sense sequences of

Delete the underline

DBI described above. Thermal cycling was performed using a thermal cycler (PCR Thermal Cycler MP, Takara, Tokyo, Japan) and the PCR mixture was amplified as follows: one cycle of 94°C for 5 min and then 12-16 cycles of 94°C for 1 min, 62°C for 2 min, and 72°C for 2 min. These conditions were evaluated by electrophoresis, and the curve of optical density of the band versus the number of cycles was run. The PCR products were electrophoresed on a 3% agarose gel and run in a buffer containing 1 mM EDTA, 40 mM Tris and 20 mM acetic acid (pH 8.0). The gels were then visualized by ethidium bromide staining. The optical densities of the bands appeared at 400 bp were determined using a densitometer (Bio-Rad, Richmond, CA). Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) mRNA was also detected as internal control. The sequences of primer pairs of GAPDH were 5'-CCAAG-GTCATCCATGACAAC-3' (sense) and 5'-TTACTCCTGGAGGCCCATGT-3' (antisense). The PCR program for GAPDH mRNA was performed with 20 thermal cycles similarly to that of DBI. The GAPDH mRNA band appeared at about 500 bp.

2.4. Statistics

RT-PCR data from both animal groups were analyzed by Student's *t*-test. Differences with $P < 0.05$ were considered significant.

3. Results

In the *in situ* hybridization study, the sites of expression of DBI mRNA were visualized by the concentration of purple/blue AP reaction product on brain slices. In the brain coronal sections hybridized with the antisense probe, the highest signal (i.e. the areas of dense staining) was observed in the third ventricle lining cells (ependymal cells) of the hypothalamic region and Purkinje layers of the cerebellum in socially isolated and group-housed mice. In addition, the arcuate nucleus and median eminence showed considerably high levels of DBI mRNA compared with the respective sections hybridized with the control sense probe of DBI mRNA, while the cerebral cortex, the mesencephalic and telencephalic regions, the hippocampus and some thalamic nuclei exhibited a weak staining (Fig. 1). In some brain slices, a slight difference in DBI mRNA signal between the two animal groups was observed, but it was hard to evaluate the difference quantitatively (data not shown).

To compare in more detail the DBI mRNA expression in the brain between group-housed and socially isolated mice, a semiquantitative RT-PCR method was used. As shown in Fig. 2, the optical density of the DBI mRNA band was increased almost linearly by at least 16 cycles. Consistent with the data obtained by the

present *in situ* hybridization experiments, the hypothalamus and cerebellum exhibited more marked signals of DBI mRNA compared to other brain regions in the group-housed and socially isolated mice. However, the comparison of the DBI mRNA expression in the hypothalamus revealed that the socially isolated mice exhibited significantly less DBI mRNA expression than the animals housed in groups for the same period, whereas both groups exhibited almost the same level of GAPDH mRNA (Fig. 3). In contrast, social isolation did not affect the expression of DBI mRNA in the cerebellum and the cerebral cortex (Fig. 3). The striatum and hippocampus exhibited bands of DBI mRNA that were so dim that the comparisons could not be made between both group animals.

4. Discussion

Our previous study suggested that social isolation stress-induced decrease in the hypnotic action of pentobarbital in mice is partly attributed to the suppression of GABA_A receptor function, and that this suppression is mediated by an increase in the activity of endogenous BZD receptor ligand(s) with an inverse agonistic property at the GABA_A receptor complex and/or the changes in neurosteroids capable of modulating the GABA_A receptor function (Matsumoto et al., 1996; Ojima et al., 1997; Dong et al., 1998). Thus, we hypothesized that social isolation stress may change the DBI gene expression in the brain, since: (i) *in vivo* and *in vitro* studies have shown that DBI produces inverse BZD receptor agonistic actions via the BZD receptor on the GABA_A receptor complex (Costa and Guidotti, 1991) and (ii) recent findings in our laboratory suggested that DBI played an important role in the decrease of pentobarbital sleep caused by social isolation stress (Dong et al., 1998).

To test this hypothesis, we first elucidated the localization of DBI gene in the brains of both group animals using *in situ* hybridization. The distribution pattern of DBI mRNA in the mouse brain agreed with the previous reports (Alho et al., 1985, 1988; Malagon et al., 1993), indicating that both sense and antisense primers synthesized in this study were the same as the ones reported (Owens et al., 1989). However, *in situ* hybridization results failed to clearly show the differences in DBI mRNA expression between the two groups of animals. In an attempt to quantitatively evaluate the DBI mRNA level, a RT-PCR technique was employed. Unexpectedly, the animals individually isolated for 6 weeks exhibited significantly less DBI mRNA expression in the hypothalamus than the animals housed in groups for the same period. These findings suggest a close relationship between the change in the DBI mRNA expression and the decrease in GABAergic function in socially isolated animals.

The present result showed that the effect of social isolation stress on DBI mRNA expression was not ubiquitous in the brain and the expression in the hypothalamus was found to be most susceptible to long-term social isolation stress compared to that in other brain areas. Although we cannot rule out the contribution of the DBI gene in the ependymal cells to the social isolation stress-induced change in the hypothalamic DBI mRNA content because the hypothalamic tissue used for DBI mRNA extraction was not separated from the ependymal cell layer, these findings are very interesting since the hypothalamus plays an important role in a variety of stress-related responses and DBI in this area has been suggested to have a physiological

role in regulating the onset of behavioral patterns like anxiety, convulsions, aggression, etc. (Alho et al., 1985).

The unexpected results on DBI mRNA expression in the hypothalamus of socially isolated mice apparently conflict with our previous behavioral findings that endogenous BZD receptor ligands, such as DBI and/or ODN, capable of suppressing the GABA_A receptor function may be overexpressed during a period of social isolation stress exposure to mice (Ojima et al., 1997; Dong et al., 1998). The exact reason for this discrepancy between present biochemical findings and previous behavioral results remains unclear, but the social isolation-induced decrease in the hypothalamic DBI

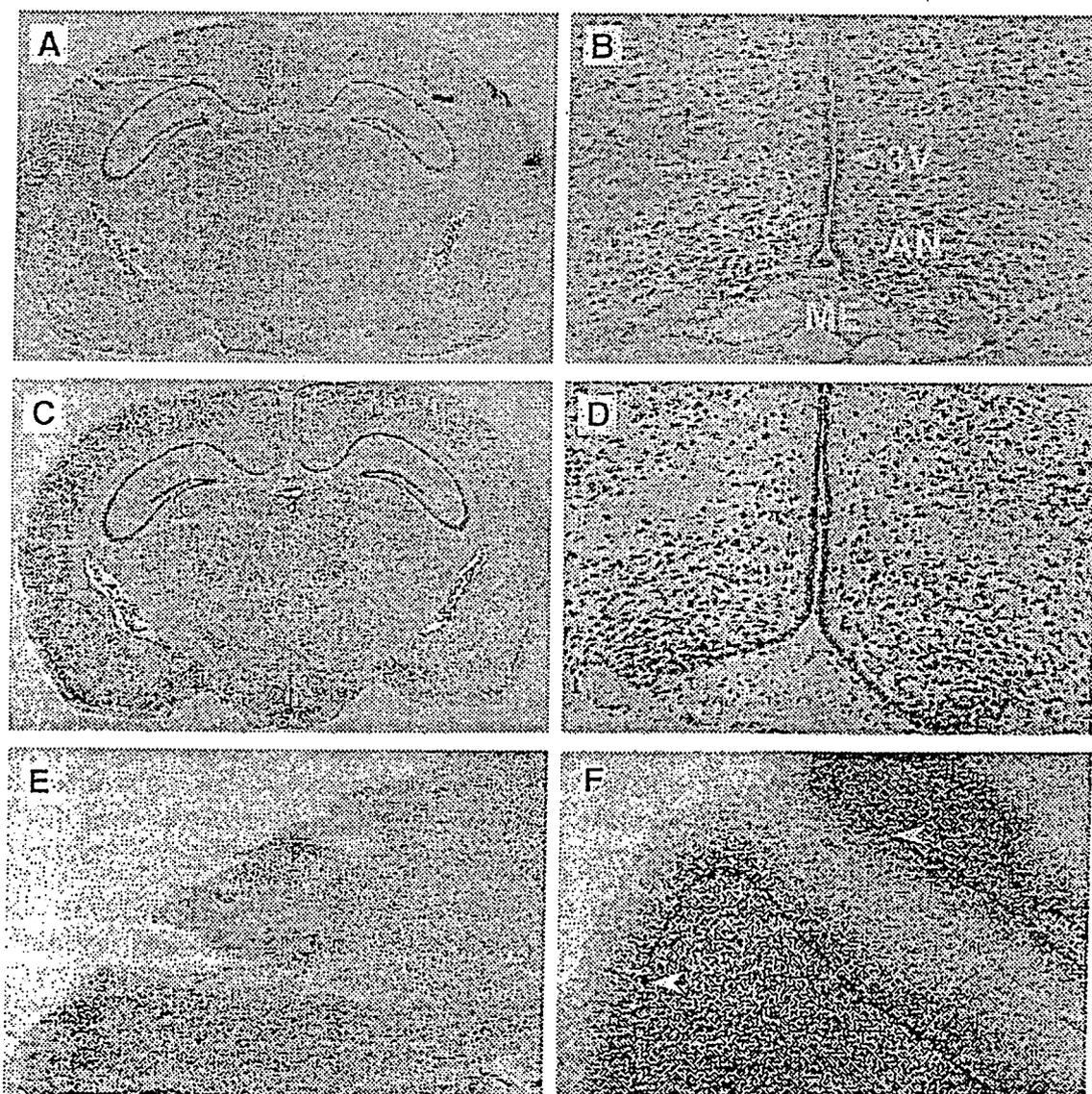


Fig. 1. DBI mRNA distribution in the brain tissue of mice group-housed for 10 weeks. DBI mRNA was found around regions of the hypothalamus and cerebellum. (A) Brain slice hybridized by DBI sense probe; (B) hypothalamus region hybridized by the sense probe, in which 3V, AN and ME represent the third ventricle (ependymal cells), arcuate nucleus and median eminence (10 ×), respectively. Whole brain slice (C) and hypothalamus section (D) were prepared from group-housed mice and hybridized by DBI antisense probe. (E, F) Cerebellum regions hybridized by sense probe (E), or antisense probe (F), respectively. DBI mRNA was found abundantly in the Purkinje layers (arrows, 10 ×).

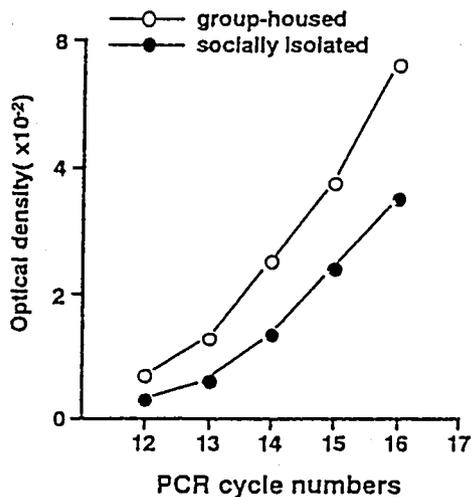


Fig. 2. Amplification kinetics of RT-PCR product (DBI gene) from the hypothalami of both group-housed and socially isolated mice. The thermal cycling was performed by the following program: 1 cycle of 94°C for 5 min, then 12–16 cycles at 94°C for 1 min, at 62°C for 2 min, and at 72°C for 2 min. Each data point represents the mean value of two independent experiments.

gene expression seems to be explained by several factors. First, there is a possibility that other endogenous substances with a more potent suppressive action on the GABA_A receptor than DBI may be induced by social isolation stress and play an inhibitory role in DBI synthesis via a negative feedback mechanism. Several DBI fragments such as ODN and TTN can be generated by proteolytic cleavage of DBI and exert more potent activity at BZD receptors than DBI (Guidotti et al., 1983, 1986; Slobodyansky et al., 1989; Ferrarese et al., 1991). In addition, our previous study demonstrated that ODN produced the same action as DBI in terms of pentobarbital sleep in group-housed and socially isolated mice and attenuated the normalizing effect of flumazenil on pentobarbital sleep in socially isolated animals at the same dose range as DBI (Dong et al., 1998). Thus, it will be very interesting to test whether endogenous substance(s) with more potent inhibitor activity against GABA_A receptors than DBI can be induced by the isolation stress.

Secondly, stress-related hormones such as corticotropin-releasing factor (CRF) and adrenocorticotrophic hormone may be involved in the social isolation-induced decrease in DBI mRNA expression in the hypothalamus. We previously demonstrated that decrease of pentobarbital sleep caused by social isolation stress was partly due to hyperactivity of corticotropin-releasing factor systems in the brain (Ojima et al., 1995) and that this decrease was not attenuated by adrenalectomy (Matsumoto et al., 1996). Moreover, DBI has been suggested to have a facilitating

role in CRF release through the GABA_A receptor in the human brain (Roy et al., 1989). Considering the findings that elevated glucocorticoid hormones response to stress exert a negative feedback to prevent the nervous system from over-reacting to stressful stimuli (Munck et al., 1984), it could be speculated that DBI mRNA expression in the hypothalamus is negatively regulated by CRF and/or other hormones responsive to the stressful stimuli and that such a regulatory mechanism contributes to social isolation-induced decrease in DBI mRNA expression in the same brain region. To clarify such a feedback mechanism of DBI mRNA expression requires measurement of the hypothalamic DBI mRNA expression at the early stages of social isolation stress exposure.

It is also possible that the decrease in DBI mRNA expression following long-term social isolation produces a reduction of DBI peptide in the hypothalamus and that this decrease may be implicated in pentobarbital sleep disorder in isolated mice. Biochemical evidence has demonstrated that, besides the negative allosteric modulation of the GABA_A receptor via central type BZD receptors, DBI also indirectly affect GABA_A receptor function by acting on glial cell mitochondrial peripheral-type BZD receptors, thereby stimulating the production of neurosteroids that positively or negatively modulate GABA_A receptor function (Costa, 1991; Costa and Guidotti, 1991). Recently Matsumoto et al. (1998) found that long-term social isolation decreased the brain content of allopregnanolone, a positive allosteric modulator of the GABA_A receptor and suggested that down regulation of the GABA_A receptor caused by decrease of allopregnanolone is implicated in the decrease of pentobarbital sleep caused by social isolation stress. Thus, a reduction in the DBI content may contribute to a decrease of neurosteroids with positive allosteric action on the GABA_A receptor, resulting in a decrease of GABA_A receptor function in the socially isolated animals. This idea, however, conflicts with the data obtained from previous behavioral experiments that administration of exogenous DBI or ODN to group-housed animals produced a similar effect to that of social isolation stress; both DBI and ODN decreased the duration of pentobarbital sleep and flumazenil reversed the action of these peptides (Dong et al., 1998). So far, no information is available on whether DBI predominantly enhances neurosteroid(s) with positive, or negative allosteric action on the GABA_A receptor. Thus, to clarify the exact relationship between the changes in DBI mRNA expression and the content of DBI peptide in the hypothalamus following long-term social isolation requires further investigations. Such investigations are in progress in this laboratory.

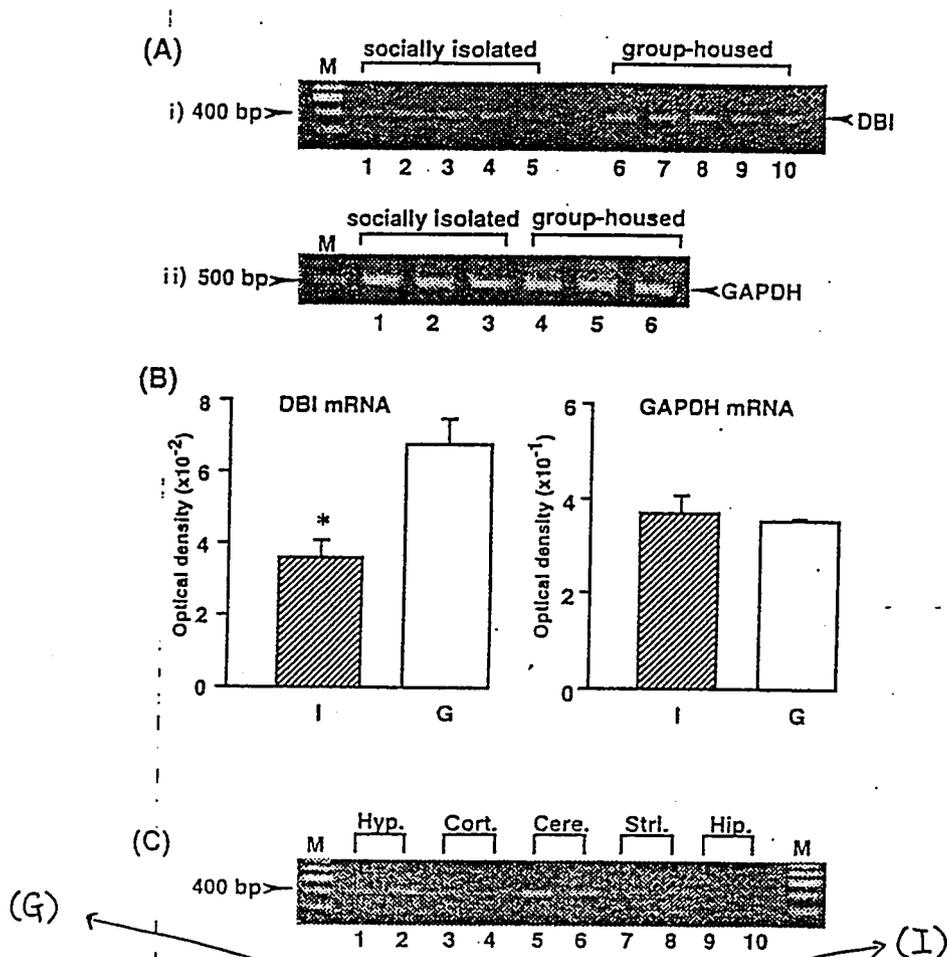


Fig. 3. Social isolation stress-induced changes in the DBI gene level in the brain. Mice were either group-housed or individually isolated for 6 weeks before the start of the experiments. DBI mRNA was extracted from the brains of each animal groups. (A) Digitized image of DBI mRNA (i, lanes 1-5: socially isolated mice; lanes 6-10: group-housed mice) and GAPDH mRNA (ii, lanes 1-3: socially isolated mice; lanes 4-6: group-housed mice) extracted from the hypothalamus region of socially isolated and group-housed mice. (B) Quantification of DBI and GAPDH mRNA signals in the hypothalamus region of group-housed and socially isolated mice. Each data column represents the mean \pm S.E.M. ($n = 3-5$). * $P < 0.001$ (Student's t -test). (C) DBI mRNA expressed in the hypothalamus (Hyp.), cortex (Cort.), cerebellum (Cere.), striatum (Stri.), and hippocampus (Hip.) of group-housed (G) and socially isolated mice (I). DBI mRNA extracted from each brain region of socially isolated (lanes 1, 3, 5, 7 and 9) and group-housed mice (lanes 2, 4, 6, 8 and 10) was amplified as described in the text.

In conclusion, we demonstrated for the first time that DBI gene expression in mouse brain, especially in the hypothalamus region, can be suppressed by long-term social isolation stress. This finding provides an evidence that DBI is actually involved in shortened pentobarbital sleep caused by isolation stress in mice. However, according to the general biochemical evidence suggesting that level of gene should parallel that of its transcribed protein, the present results seemed hardly to agree with the findings of our previous behavioral findings. To explain it, we discussed the possible mechanisms underlying this decrease of DBI mRNA expression such as a negative feedback regulation of DBI mRNA expression by DBI peptide, other endogenous substance(s) with more potent activity than DBI, or stress-related hormones. Nevertheless, further investigations are required to test these possibilities.

Acknowledgements

This work was supported in part by a Grant-in-Aid (C) to K.M. (# 10672148) from the Ministry of Education, Science, Sports and Culture, Japan, and the Toyama First Bank Foundation, and by a Chinese Research Award to E.D. from the Japan-China Medical Foundation.

References

- Alho, H., Costa, E., Ferrero, P., Fujimoto, M., Cosenza-Murphy, D., Guidotti, A., 1985. Diazepam-binding inhibitor: A neuropeptide located in selected neuronal populations of rat brain. *Science* 229, 179-182.
- Alho, H., Freneau, J.R.T., Tiedge, H., Wilcox, J., Bordin, P., Brosius, J., Roberts, J.L., Costa, E., 1988. Diazepam binding

- inhibitor gene expression: Location in brain and peripheral tissues of rat. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 7018-7022.
- Costa, E., 1991. 'Prolegomena' to the biology of the diazepam binding inhibitor (DBI). *Neuropharmacology* 30, 1357-1364.
- Costa, E., Guidotti, A., 1991. Diazepam binding inhibitor (DBI): A peptide with multiple biological actions. *Life Sci.* 49, 325-344.
- Dong, E., Matsumoto, K., Tohda, M., Watanabe, H., 1998. Possible involvement of diazepam binding inhibitor (DBI) and its fragment, octadecaneuropeptide, in social isolation-induced decrease in pentobarbital sleep in mice. *Jpn. J. Pharmacol. (Suppl.)* 76, 226.
- Ferrarese, C., Mennini, T., Pecora, N., Gobbi, M., Appollonio, I., Bernasconi, P., Frigo, M., Regondi, C., Pierpaoli, C., Frattola, L., Grattini, S., 1991. Acute noise stress in rats increases the levels of diazepam binding inhibitor (DBI) in hippocampus and adrenal gland. *Psychopharmacology* 103, 339-342.
- Guidotti, A., 1991. Role of DBI in brain and its posttranslational processing products in normal and abnormal behavior. *Neuropharmacology* 30, 1425-1433.
- Guidotti, A., Forchetti, C.M., Carda, M.G., Konkel, D., Bennett, C.D., Costa, E., 1983. Isolation, characterization and purification of homogeneity of an endogenous polypeptide with agonistic action on benzodiazepine receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80, 3531-3535.
- Guidotti, A., Ferrero, P., Fujimoto, M., Santi, R.M., Costa, E., 1986. Studies of endogenous ligands (endocoids) for the benzodiazepine/ β -carboline binding sites, vol. 41. Raven, New York, pp. 137-148.
- Malagon, M., Vaudryu, H., Van Strien, F., Pelletier, G., Gracia-Navarro, F., Tonon, M.C., 1993. Ontogeny of diazepam-binding inhibitor-related peptides (Endozepines) in the rat brain. *Neuroscience* 57, 777-786.
- Matsumoto, K., Ojima, K., Watanabe, H., 1996. Neurosteroidal modulation of social isolation-induced decrease in pentobarbital sleep in mice. *Brain Res.* 70, 81-86.
- Matsumoto, K., Uzunova, V., Pinna, G., Taki, K., Uzunov, D., Watanabe, H., Guidotti, A., Costa, E., 1998. Fluoxetine normalizes the social isolation-induced decrease of pentobarbital sleeping time by increasing brain allopregnanolone content. *Soc. Neurosci. Abstr.* 24, 346.
- Montemurro, D.G., Dukelow, R.H., 1972. A stereotaxic atlas of the diencephalon and related structures of the mouse. Futura, Mount Kisko, NY.
- Munck, A., Guyre, P., Holbrook, N., 1984. Physiological functions of glucocorticoids in stress and their relation to pharmacological actions. *Endocrinol. Res.* 5, 25-44.
- Ojima, K., Matsumoto, K., Tohda, M., Watanabe, H., 1995. Hyperactivity of central noradrenergic and CRF systems is involved in social isolation-induced decrease in pentobarbital sleep. *Brain Res.* 684, 87-94.
- Ojima, K., Matsumoto, K., Watanabe, H., 1997. Flumazenil reverses the decrease in the hypnotic activity of pentobarbital by social isolation stress: are endogenous benzodiazepine receptor ligands involved? *Brain Res.* 745, 127-133.
- Owens, G.P., Sinha, A.K., Sikela, J.M., Hahn, W.E., 1989. Sequence and expression of the murine diazepam binding inhibitor. *Mol. Brain Res.* 6, 101-108.
- Roy, A., Pickar, D., Gold, P., Barbaccia, M., Guidotti, A., Costa, E., Linnoila, M., 1989. Diazepam-binding inhibitor and corticotropin-releasing hormone in cerebrospinal fluid. *Acta Psychiatr. Scand.* 80, 287-291.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T., 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, pp. 7.19-17.22.
- Slobodyansky, S., Guidotti, A., Wambebe, C., Berkovich, A., Costa, E., 1989. Isolation and characterization of a rat brain triakontatetraneuropeptide, a posttranslational product of diazepam binding inhibitor: specific action at the Ro5-4864 recognition site. *J. Neurochem.* 53, 1276-1284.
- Tohda, M., Watanabe, H., 1996. Imipramine-induced increase in 5-HT_{2C} receptor mRNA level in the rat brain. *Neurosci. Res.* 24, 189-193.

→ Adv. Biochem. Psychopharmacol.

日本財団補助金による

1998年度日中医学協力事業報告書

-学会開催に対する助成-

1999年3月15日

財団法人 日中医学協会

理事長 中島章殿

報告者氏名 北 潔 

所属・役職 東京大学大学院医学系研究科・教授

所在地 〒113-0033 東京都文京区本郷 7-3-1

電話 03-3812-2111 内線 3526

講演集・シンポジウム写真等学会に関する資料を添付

学会・学術交流の名称 第9回国際寄生虫学会

テーマ 21世紀への寄生虫学

主催団体 日本寄生虫学会

代表者 辻 守康

期間・開催地 平成10年(1998) 8月24日～28日・幕張メッセ

参加者数 日本側 670名 中国側 25名

招へい・派遣目的 上記国際学会へ出席し、研究成果を発表する。

1. 招へい・派遣研究者 人数 3 人 記入欄不足の場合は別紙を添付。

氏名	所属・役職	研究分野
Prof. Ming-yi Xia	Professor Institute of Parasitic Diseases Chinese Academy of Preventive Medicine	寄生虫学
Prof. Hong-chang Yuan	Professor School of Public Health Shanghai Medical University	疫学・公衆衛生学
Ass. Prof. Zhan Bin	Associate Professor Institute of Parasitic Diseases Chinese Academy of Preventive Medicine	寄生虫学

滞在期間 自 1998 年 8 月 23 日 至 1998 年 8 月 30 日

第9回国際寄生虫学会

学会テーマ：21世紀への寄生虫学

日本側主催代表者：会長 辻 守康（杏林大学・教授）

中国側代表者：Ming-yi Xia（Institute of Parasitic Diseases, Chinese Academy of Preventive Medicine, 教授）

学会報告

北 潔（東京大学大学院・医学系研究科・教授）

第9回国際寄生虫学会は平成10年8月24日（月）から28日（金）までの5日間、千葉市の幕張メッセにおいて開催されました。開会式には天皇、皇后両陛下のご隣席をいただき、アジアで初めての国際寄生虫学会として参加者総数1270名の極めて内容の充実した国際学会となりました。本大会の開催にあたってはアジア諸国の経済的危機と重なりこれらの国々からの参加者の減少が危ぶまれたにもかかわらず、多数の学会員が参加できたのはひとえに貴協会をはじめとする団体や個人のご援助によるものと心から感謝致しております。本大会は日本学術会議と日本寄生虫学会の共同主催により日本医学会、日本医師会、千葉県、千葉市、日本学術振興会、国際協力事業団、東京都医師会、千葉県医師会、日本衛生動物学会、日本熱帯医学会、日本免疫学会、日本生体防御学会、日本獣医寄生虫学会、および日本臨床寄生虫学会の後援によって開催されました。開会式に始まった大会は基調講演、特別講演、シンポジウム、特別フォーラム、ワークショップ、一般講演（495題）、ポスター発表（414題）から構成され、閉会式をもって終了致しました。今回のテーマである「21世紀に向けての寄生虫学」は今日もなおマラリアや住血吸虫症をはじめとする寄生虫症が途上国で蔓延し、重大な健康問題となっているばかりでなく、これが途上国のバランスのとれた開発と経済発展にとって大きな妨げとなっている現状に対してかけられたものであります。そしてその具体的な対策について討論するとともにワクチンや新しい抗寄生虫薬の開発、また医、薬、農、獣医、理学の各分野にわたる学際領域としての寄生虫学の国際的共同研究の推進について真剣な討議が行われました。

国際寄生虫学会は世界寄生虫学者連盟（World Federation of Parasitologist; WFP）が主催国を指名して4年ごとに開催される国際学会であります。現在57カ国、83団体が加盟している寄生虫学に関する世界で唯一の国際学術団体であります。本学会は1960年にワルシャワで設立され、現在わが国から鈴木 守群馬大学医学部教授が理事長に就任しています。本学会が日本で開催された事は様々な面で大きな意義を持っていますが特にその成果として以下の点があげられると考えられます。

1) 本大会がアジアではじめて開催された事は特に強調すべき点であります。アジアは自然生態系、そしてその中の重要な構成員であるヒトの社会が最も多様性に富む地域であり、世界中で最大の人口を擁していま

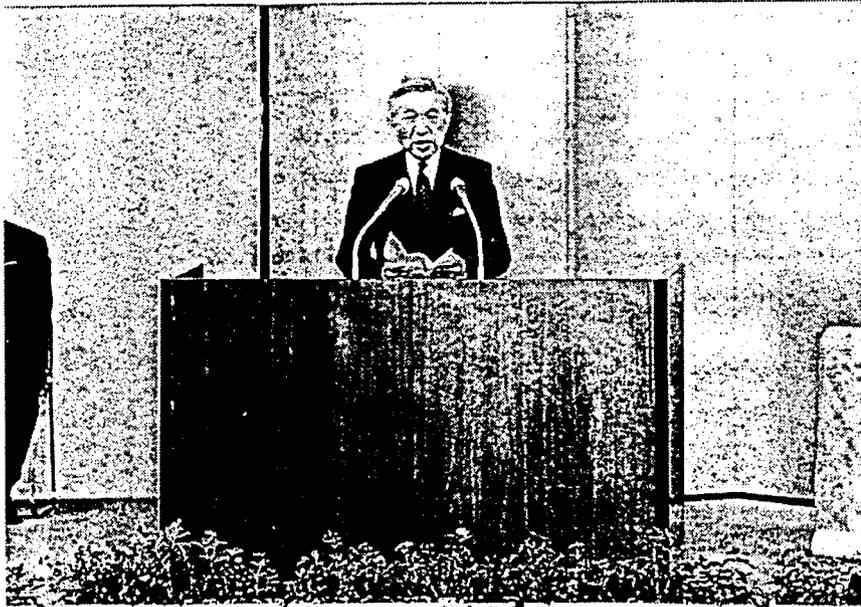
す。この様な背景と気候、風土によって多彩な寄生虫疾患がヒトと動物の間に広く蔓延しており、これらの解決がアフリカ地域とともに最も重要な課題となっております。しかしこれまでにアジア地域での開催は一度も行われておらず、日本での本大会の開催は大きな意義があったと思われま

2) 21世紀に向けての寄生虫症対策を考える上でますます多様化してきた寄生虫症に関して、現状を把握しその動向と将来について極めて活発な討議が行われました。医学の研究が進み、駆虫剤、殺虫剤、消毒剤、抗生物質などにより感染症に対する対策が進み、また衛生教育によって人々の間に知識が普及し公衆衛生の施策も進み先進国では感染症の問題はともすれば比重の軽いものと考えられています。しかし開発途上国においては特に寄生虫症に関しては年間300万人の死者を数えるマラリアをはじめとして多くの人々を苦しめています。カイチュウ、鉤虫、鞭虫などの土壌媒介腸管寄生虫の感染者も世界的に何億人の単位で発生しています。さらに先進国においても先天的あるいは免疫抑制剤の投与なども含めた後天的な免疫不全に基づく寄生虫による日和見感染が重大な問題となってきております。この様な寄生虫症にはまだ有効な化学療法剤のないものも多く、さらにマラリアで顕著な様に薬剤耐性原虫や薬剤耐性ベクターの出現が対策をますます困難にしております。この様な状況を克服するためにはフィールド、実験室を問わずこれまでの経験を活かし、さらに新しい知識と手法を取り入れた対策と研究が必須であります。この様な観点から基調講演のテーマとして「21世紀に向けての寄生虫学のとるべき姿」「21世紀における感染症と寄生虫症の防圧に向けてのWHOの目標」がとりあげられた点は非常に意義深い事でありました。

3) もうひとつの成果として、国内においてほとんどの寄生虫症の制圧あるいは根絶に成功したわが国の寄生虫症対策そして寄生虫学の進展に対する積極的な姿勢を海外の諸国に伝える事ができた点があげられます。トルコでの前回の会議において本大会をわが国で開催する様にとの指名が行われた事は諸外国のわが国に対する要請と期待の現れと考えられますが、実際にこれに応えるべき努力も今後必要であります。予想以上に多くの大学院生や学部学生が参加した点はわが国の寄生虫学の発展に大いに心強い事実であります。わが国が世界の寄生虫症対策に貢献すべきとのいわゆる「橋本イニシャチブ」が実際に動き始めた事にも少なからず影響があったと思います。この様に科学先進国としての役割を自覚する大変に良い機会であったと考えられます。

以上の様に大きな成果をあげた国際会議でしたがこれを踏まえ、さらに地球規模での寄生虫対策と現代の要請に応えられる先端的な寄生虫学研究を進めて行く必要があります。この中でわれわれ日本の寄生虫学者の果たすべき役割はますます大きいものとなると考えられます。特に若手研究者の育成は最も重要な課題であり真剣に取り組むべき問題であります。この点でボランティアも含め大会会場に多くの学部学生など若い力の新たな息吹が感じられた事は特筆に値する事でありました。

最後にこの大会の開催に当って中国から3名の第一線の研究者の参加を助成下さいました日中医学協会の皆様にあつくお礼申し上げます。







日本財団補助金による

1998年度日中医学協力事業報告書

— 学術交流に対する助成 —

1998年9月2日

財団法人 日中医学協会
理事長 中島章殿

報告者氏名 森 昌考  [Ⓜ]
所属・役職 朝日大学歯学部口腔外科 名誉教授
所在地 〒501-02 山形県本郷郡穂積町
電話 058-329 1472 内線 1473

講演集・シンポジウム写真等学会に関する資料を添付

学会・学術交流の名称 第3回日中合同口腔生物学会
テーマ 組織再生 Tissue Regeneration
主催団体 第3回日中合同口腔生物学会 準備委員会
代表者 森 昌考
期間・開催地 1998. 8. 10日. 11日 (2日間) 中国浙江省桂林市
参加者数 日本側 28名 中国側 32名
~~招~~・派遣目的 中国における歯学部口腔生物学会の充実と其の基礎
教育と臨床教育の充実

1. ~~招~~・派遣研究者 人数 31 人 記入欄不足の場合は別紙を添付。

氏名	所属・役職	研究分野
阿部 公生	福岡歯科大学 教授	口腔生化学
上田 実亮	名古屋大学歯学部	口腔外科学
大野 康亮	昭和大学歯学部	口腔外科学
奥田 一博	新潟大学歯学部	歯周病学
尾崎 登喜雄	高知医科大学	口腔外科学
蓮石 明彦	朝日大学歯学部	" "
久保不芽徳	北海道大学歯学部	口腔生化学
後藤 昌昭	佐賀医科大学	口腔外科学
白砂 兼光	九州大学歯学部	"
住友 伸一郎	朝日大学歯学部	"
辻 龍雄	山口大学歯学部	"

原道	耕二	新潟下子齒学部	教授	齒周病子
森高	課一	昭和下子齒学部	"	口腔外科子
代田	昌彦	朝日下子齒学部	名誉教授	"
陣内	翔	福岡齒科下子	留子生	口腔生化学
立本	達天	昭和下子齒学部	助手	口腔外科子
魯	重雄	佐賀医大	"	"
請川	行宏	高知栄立病院	部長	"
鷗野	大膳	高知医大	留子生	"
菊地	哲也	北海道下子齒学部	下子院	
阿部	康裕	"	"	
尾崎	正浩	"	"	
住友	公子			
住友	光彦			
社	淳子			
島谷	陽三	高知医大	留子生	
西野	桂栄			
森	潤			
李	登代子			
	敦子			
	翠吳	九州下子齒学部	留子生	病理子
		日本側日本人	28名	
		日本側中国留子生	3名	
		日本側出席者計	31名	

滞在期間

自 1998年8月8日(土). 9日(日)より

至 1998年8月13日(木)~20日(木)の周

第3回日中合同口腔生物学会
The 3rd Japan-China Joint Conference on Oral Biology

組織再生
Tissue Regeneration

森 昌彦 朝日大学名誉教授 朝日大学歯学部口腔外科

宿玉成 佳木斯大学医学部口腔医院医院長

学会報告

朝日大学名誉教授

森 昌彦

第3回日中合同口腔生物学会：開催の背景

日中合同口腔生物学会は中国の基礎医学を発展させる一環として中国の医科学大学口腔系(口腔医学院)を中心に日本の大学との合同会議として開催してきた。第一回の合同会議は1994年西安の第四軍医大学口腔医学院において8月下旬に、第二回は1996年成都の華西医科大学口腔医学院において8月に開催された。第一回会議の主題は"骨再生"。第二回は"唾液腺"であった。この2回の合同会議はいずれも中国の重点大学で開催され成功を修めた。第三回は地方大学黒竜江省佳木斯大学医学部口腔系で開くことになり日中医学協会の学術交流に対する助成を申請した。

学会準備：

1993年(平成5年)8月、佳木斯医学院を訪れ、合同会議開催に関する第1回の打ち合わせ会議を開催。黒竜江省佳木斯医大外事弁公室等の連絡方法を確立。医学院は1998年までに口腔医学系の施設の充実を計る計画を立てた。日本側は1996年から具体的に計画を実施。

1997年佳木斯大学口腔系から代表の来日計画が郵送され、1998年(平成10年)3月末から4月に福岡に到着、大阪、岐阜(朝日大学)で合同会議の最終打合せを行った。

第3回日中合同口腔生物学会(1998年8月10、11日)

日本からの参加者は中国人留学生(3名)を含み合計31名。

日本側特別講演：

森 昌彦(8月10日 10:20-11:00)

Immunohistochemical expression of cadherin and catenins in epithelial lesions of oral mucosa and skin

後藤昌昭(8月10日 13:00-13:30)

Mandibular reconstruction by combination and nonvasculeorized outogeneous graft and osseointegrated implants

奥田一博(8月10日 14:00-14:30)

Effects of transforming growth factor β on tissue regeneration through in vivo studies

道 健一(8月11日 8:00-8:30)

Electropalatographic investigation of abnormal lingual palatal contact patterns in cleft palate patients and glossectomized patient

上田 実(8月11日 9:00-9:30)

Bioartificial skin using cultured living cells, the present and future

亀谷明秀(8月11日 13:00-13:30)

Reconstruction of defective bone by BMP

久保木芳徳(8月11日 14:00-14:30)

Bioartificial principles of engineering in periodontal reconstruction

その他の日本側演題(在日中国人を含む) 7 演題

会議はすべて英語が使用され、日中両国の発表者、座長、討論等充実した二日間の会議が持たれた。

8月10日,11日 2日間の詳細プログラムは抄録集の通り。

学会費：参加費等の日本人の支払額:

- | | | |
|------------------------|-----|---------|
| 1. 合同会議の学会登録費 | 日本円 | ¥20.000 |
| 2. 佳木斯ホテル代(3泊2日) | // | ¥16.000 |
| 3. 学会後の懇親旅行(8月12日-16日) | // | ¥70.000 |

今後の課題:

日中合同口腔生物学会は今回を持って終了とし、1999年6月から日中合同口腔科学会(歯科医学会)に発展的解消となる。中国の重点大学は予算もあり、設備も比較的充実しているが、地方大学はこれに及ばない。日本との合同会議を地方の省立大学で実施するのはそれなりの大きなメリットがある。即ち合同会議までに大学(病院)の施設が改善されており、政府は日中合同会議のためにその大学に予算をつぎ込んでいることが判る。合同会議はこのようなことも考慮し、中国重点大学だけで開催することなく日本からは不便であっても地方大学で開催することも必要と考える。

SCHEDULE
OF THE THIRD CHINA--JAPAN
JOINT CONFERENCE ON ORAL
BIOLOGY

AUG. 1998

JIAMUSI, CHINA GIFU, JAPAN

THE SCHEDULE OF THE THIRD CHINA—JAPAN JOINT
CONFERENCE ON ORAL BIOLOGY

Aug. 9, 1998

REGISTER

Place The hall of the north building of JIAMUSI HOTEL

Aug. 10, 1998

7:30–8:00 **BREAKFAST**

8:30–9:50 **OPENING CEREMONY**

Chairman Prof. Ma Xuchen Beijing Medical University, China
Prof. Kamegai Asahi University, Japan

1. Speech by Jiamusi Mayor
2. Speech by Prof. Lu Xueshen, the President of the Jiamusi University
3. Speech by Prof. Mori, the Japanese Chairman of the Third China-Japan Joint Conference on Oral Biology
4. Speech by Prof. Su Yucheng, the Chinese Chairman of the Third China-Japan Joint Conference on Oral Biology
5. Speech by Prof. Wang Jianping, the Director of the Hospital

9:50–10:20 **GROUP PHOTO**

10:20–11:40 **ACADEMIC REPORT**

Chairman Prof. Shirasuna Kyusu University, Japan
Prof. Wu Qiuliang Zhejiang Medical University, China

Special Speaker

1. M. Mori Asahi University, Japan
Immunohistochemical expression of cadherin and catenines in epithelial lesions of oral mucosa and skin
2. Ma Xuchen Beijing Medical University, China
Imaging diagnosis and treatment of temporomandibular disorders

12:00–13:00 **LUNCH**

13:00-18:00 ACADEMIC REPORT

Special Speaker

Chairman Prof. Zhang Jincai West China Medical University, China
Prof. Ueda Nagoya University, Japan

1. M. Goto Saga Medical School, Japan
Mandibular reconstruction by combination of a non-vascularized autogenous graft and osseointegrated implants.
2. Zhang Jinchai West China Medical University, China
Poly(ADP-ribosy) lation and collagen synthesis of periodontal ligament cells
3. K. Okuda Niigata University School of Dentistry, Japan
Effect of transforming growth factor B on tissue regeneration through in vivo studies
4. Wu Qiuliang Zhejiang Medical University, China
A study on revascularization and it's relationship with bone remodeling of allogeneic mandible transplantation

General Speaker

Chirman Prof. Michi Showa University, Japan
Prof. Sun Hongchen Norman Bethun Medical University,
China

1. Chao Gao Fukuoka Dental School, Japan
Structure-activity relationships of sialogogic heptapeptides analogous to tachykinis
2. Li Peng West China Medical University, China
The apoptosis of human osteoblast on naturally occurring in vitro
3. S. Sumitonmo Asahi University, Japan
Expression of c-erbB-2 in rat submandibular gland carcinogenesis
4. Li Dechao Jiamusi University, China
A clinical and experimental studies on iliac bone or calvarial bone combining with osseointegrated implants to repair defect of mandible
5. Jiuli Pan Showa University, Japan
Bone remodeling around implants in ovariectomized rats after implatation
6. Shang Dezhi Jinzhou Medical University, China

- The effect of IGF-II on osteoblast gene expression
7. Fang Fengqin Shenyang Tumor Hospital, China
Parotid gland malignant tumor: a report of 120 cases
8. Li Cuiying Kyushu University, Japan
Motility responses of oral cancer cell to basement membrane proteins
9. Wang Lijing Lanzhou Medical College, China
Significance of expression of epidermal growth factor receptor,
transforming growth B factor, cerB-2 oncogene in myoepithelioma of
salivary gland
10. Lu Dapeng Kochi Medical School, Japan
Cytokeratins in Epithelial linings of maxillary cysts mainly expression of
cytokeratin 18 in metaplastic squamous cells
11. Rong Li Jiamusi University, China
A study of surface treatment on microleakage of composite resion
12. Tang Lei Shenyang Airport Hospital, China
The curative effect of light curing coposite resion in repairing defect of
front crown

18:30-20:00 ***DINNER***

Aug. 11, 1998

7:00-7:30 ***BREAKFAST***

8:00-11:00 ***ACADEMIC REPORT***

Special Sparker

Chirman Prof. Mori Asahi University, Japan

Prof. Wu Qiuliang Zhejiang Medical University, China

1. K. Michi Shwa University, Japan
Electropalatographic investigation of abnormal lingual-palatal contact
patterns in cleft palate patients and glossectomized patient
2. Sun Hongchen Norman Bethun University of Medical Sciences, China
Study of C-erbB-2 oncongene mRNA expression in the salivary gland
neoplasms
3. M. Ueda NagoyaUniversity, Japan

Bioartificial skin using Cultured living cells, the present and future

General Speaker

Chairman Prof. Kamekai Asahi University, Japan

Prof. Sun Hongchen Norman Bethun University, China

1. T. Shirota Showa University, Japan

Bone biopsy in the reconstructed mandible being considered for dental implant placement

2. Li Shenglin Beijing Medical University, China

Prevention and treatment of bone loss in the mandible by a Chinese herb medicine: an experimental study

3. K. Ohno Showa University, Japan

Morphologic study of implantation to grafted areas of the mandible

4. Peng Bin Hubei Medical University, China

Effect of PGs and LTs on mineralization of extrinsic human's pulp Cells

11:00-12:00 *VISITING ORAL HOSPITAL*

12:00-13:00 *LUNCH*

13:00-17:10 *ACADEMIC REPORT*

Chairman Prof. Kuboki Hokkaido University, Japan

Prof. Zhang Jinchai West China Medical University, China

Special Speaker

1. A. Kamegai Asahi University, Japan

Reconstruction of defective bone by BMP

2. Su Yucheng Jiamusi University, China

Clinical Study on Orthognathic Surgery

3. Y. Kuboki Hokkaido University, Japan

Bioartificial principles of engineering in periodontal reconstruction

4. Ma Xuchen Beijing Medical University, China

General Speaker

1. Huang Siguang Jinan University, China

- A clinical evaluation of tetracycline on periodontitis
2. Liu Yanjie Jiamusi University, China
A study on biologic feature of oral lichen planus
 3. Wang JianPing Jiamusi University, China
Monitoring experimental leukoplakia by ultramicropressure and temperature synchronous thermometric instrument
 4. Zhao Laiyou Jiamusi University, China
Study of blood supply of the submandibular gland and the distribution of the canals in the gland body
 5. Qiao Yongmei Jiamusi University, China
The measurement of the content of superoxide dismutase in normal and inflammatory endodontium

17:10-18:00 **CLOSING CEREMONY**

Chairman Prof. Ma Xuchen Beijing Medical University, China
Prof. Kamegai Asahi University, Japan

1. Speech by Prof. Mori
2. Speech by Prof. Su Yucheng
3. Speech by Prof. Ma Xuchen

18:00-20:00 **DINNER**

**日本財団補助金による
1998年度日中医学協力事業報告書**

- 学術交流に対する助成 -

1998年11月30日

財団法人 日中医学協会
理事長 中島章殿

報告者氏名 高久 晃 
所属・役職 富山医科薬科大学長
所在地 〒930-0194 富山市杉谷2630
電話 (0764) 34-2281 内線 2000

講演集・シンポジウム写真等学会に関する資料を添付

学会・学術交流の名称 中国交流協定機関若手研究者シンポジウム

テーマ 学術交流：その成果と将来の課題

主催団体 富山医科薬科大学

代表者 高久 晃

期間・開催地 1998年10月27日～10月29日・富山市

参加者数 日本側 8名 中国側 6名

招へい・派遣目的 本学と国際交流協定を締結している機関である瀋陽薬科大学、中日友好医院、中国中医研究院及び北京医科大学から派遣され本学の博士課程を修了し、協定締結機関又は大学等に帰国して活躍している研究者のより一層の活躍を期待するため、招へいしそのフォローアップを行い医学・薬学研究の進展及び日中兩國友好の促進を図ることを目的とする。

1. 招へい・派遣研究者 人数 6 人 記入欄不足の場合は別紙を添付。

氏名	所属・役職	研究分野
劉紅星	日中友好病院 薬剤部長	薬剤学
車慶明	北京医科大学 薬学院 教授	天然物化学
劉玉萍	中国中医研究院 中薬研究所 助教授	生薬学
楊秀偉	北京医科大学 薬学院 教授	天然物化学
崔承彬	北京生物医薬研究所 主任研究員	天然物化学
趙懷清	瀋陽薬科大学 助教授	分析学

滞在期間 自 1998年10月26日 至 1998年10月30日

2. 主な滞在日程

10月27日 午前 学長との懇談会，和漢薬研究所長との懇談会
午後 学内施設見学

- 10月28日 シンポジウム
- 1 難波恒雄 国際交流を考える－多数の留学生・客員研究員との交流研究を中心に－
 - 2 劉紅星 日本留学の経験と中日友好病院における国際的活動
 - 3 車慶明 和漢薬成分の薬物代謝及びその薬効
 - 4 劉玉萍 中国における遺伝子解析による生薬の鑑定
 - 5 楊秀偉 中草药の抗腫瘍活性について
 - 6 崔承彬 細胞周期の新規低分子制御剤の探索
－国際交流による共同研究の展開－
 - 7 趙懷清 富山医科薬科大学での研究生活
 - 8 寺澤捷年 脳血管性痴呆に対する釣藤散の効果

10月29日 午前 県内企業見学
午後 在学留学生との交流会

3. 学術会議報告

(別紙書式を参考に、成果・今後の課題等2000字以上で報告してください。ワープロ使用)

4. 収支報告

交付を受けた金額 500,000 円

支出内訳(旅費・宿泊費・印刷費その他の項目別に記載 別紙可・領収書コピーを添付すること)

区 分	金 額	使 用 目 的
旅費	302,019 円	崔承彬(171,909円), 趙懷清(130,110円) 分 内訳は別紙のとおり
宿泊費	198,550 円	劉紅星, 車慶明, 楊秀偉, 崔承彬分(4泊)及び趙懷清分 (3泊)
合 計	500,569 円	

中国交流協定機関若手研究者シンポジウム

テーマ「学術交流：その成果と将来の課題」

日本側主催代表者・高久 晃・富山医科薬科大学長
中国側代表者・劉 紅 星・中日友好病院 主任薬剤師

学会報告

高久 晃・富山医科薬科大学長

富山医科薬科大学では、瀋陽薬科大学、中日友好病院、中国中医研究院及び北京医科大学と大学間交流協定を結んでいる。これらの協定機関との継続的な学術交流及び友好関係の推進を図るため、1997年8月に、北京において第1回大学間定期国際学術交流として学生間交流を行い、医学科、薬科学科、看護学科及び大学院学生が訪中した。

1998年10月に開催の本シンポジウムは、第2回大学間定期国際学術交流として若手研究者の交流のため、交流協定機関から本学に留学し、博士課程を修了して学位取得後中国に帰国した若手研究者を招へいし開催したものである。

若手研究者の招へいにあたっては、協定機関から派遣され協定機関に帰国している者、協定機関以外から派遣され協定機関に帰国している者、協定機関から派遣され協定機関以外の研究機関に帰国している者の順位で選考し、6人を招へいすることにした。

テーマには、学問分野に関わりなく発表及び参加できるように「学術交流」そのものを選び、実際に留学生として日本での研究生活を送った経験の上に積み重なった、現在の研究を中心とした「留学の成果」についてを、また、そこから発展する「将来の課題」についての発表により、本学の今後の学術交流を躍進させる機会となるよう期待した。

10月28日のシンポジウムは、高久 晃学長のあいさつに始まり、引続き難波恒雄氏（富山医科薬科大学名誉教授）による「国際交流を考える－多数の留学生・客員研究員との交流研究を中心に－」と題した基調講演が行われた。在任中約100人の留学生を受入れ教育研究指導した実績から、今後の国際交流への提言をいただいた。

中国交流協定機関から招へいした若手研究者による演題は次のとおりである。

- 1 劉 紅 星（中日友好病院 薬剤部長）
「日本留学の経験と中日友好病院における国際的活動」
- 2 車 慶 明（北京医科大学 薬学院 教授）
「和漢薬成分の薬物代謝及びその薬効」

- 3 劉玉萍（中国中医研究院 中薬研究所 助教授）
「中国における遺伝子解析による生薬の鑑定」
- 4 楊秀偉（北京医科大学 薬学院 教授）
「中草薬の抗腫瘍活性について」
- 5 崔承彬（北京生物医薬研究所 主任研究員）
「細胞周期の新規低分子制御剤の探索－国際交流による共同研究の展開－」
- 6 趙懷清（瀋陽薬科大学 助教授）
「富山医科薬科大学での研究生活」

劉紅星氏は、本学附属病院薬剤部での研究による学位取得後、中日友好病院に勤務し、現在は薬剤部長として活躍している。シンポジウムでは、中日友好病院における新システムの確立や薬物研究・新薬開発に関する内容を中心に、劉氏が携わっている中日交流の現況について発表があった。車慶明氏、楊秀偉氏は北京医科大学薬学院で教授の、劉玉萍氏は中国中医研究院中薬研究所で助教授の職につき、日本で修得した知識を基礎に多角的な側面から展開した和漢薬の研究成果について発表があった。崔承彬氏は、新設された北京生物医薬研究所の所長として機関の整備に精力的に取り組んでおり、研究分野における国際交流の必要性を力説した。趙懷清氏は、瀋陽薬科大学の助教授であり、和漢薬研究所客員研究員として共同研究した経験から、交流協定機関からの視点での発表があった。座長はそれぞれの講演者の指導教官にお願いしたが、すでに停年退官された方もあり、大学院終了後、社会的にも研究分野でも著しく成長した姿と対面するよい機会となった。

最後に、本学医学部和漢診療学の寺澤捷年教授による「脳血管性痴呆に対する釣藤散の効果」と題した講演があり、盛会裡に本シンポジウムを終了した。

また、29日には、関連行事として本学留学生会主催による交流会が催された。現在の留学生は、過去に留学生であった若手研究者達との懇談により、修学、研究、日本での生活等について種々の助言を得ることができ、さらに、留学生及び研究者双方が今後の国際学术交流のあり方について積極的に検討する場となった。

今回のシンポジウムは、大学間協定機関との実質的な交流を一層推進することを目的に、昨年の本学学生の中国派遣に引続き、若手研究者を招へいするために企画された事業である。学生交流と同様、招へいした若手研究者が今後の日中交流の担い手となって充実した交流が続くことを願い、また、人材派遣による協定機関との定期的な交流が、相互理解の増進と信頼に基づく友好関係を導くものとなることを確信している。

最後に、本事業の遂行にあたり、日中医学協会からご支援いただいたことに関係者を代表して心から謝意を表したい。

平成10年度国際学術交流

中国交流協定機関若手研究者シンポジウム

プログラム

テーマ「学術交流：その成果と将来の課題」

主催 富山医科薬科大学

日時 平成10年10月28日(水)

会場 富山医科薬科大学 医学・薬学研究棟
ゼミナール室1・2

中国交流協定機関若手研究者シンポジウム

9 : 1 0 - 9 : 2 0

開会の辞 服部征雄 (国際交流委員会 委員長)
挨拶 高久 晃 (富山医科薬科大学長)

9 : 2 0 - 1 0 : 1 0

基調講演

難波恒雄 名誉教授

「国際交流を考えるー多数の留学生・客員研究員
との交流研究を中心にー」

座長：服部征雄 (和漢薬研究所 教授)

1 0 : 1 0 - 1 0 : 5 0

座長：堀越 勇 (富山医科薬科大学名誉教授)

演者：劉 紅 星 (日中友好病院 薬剤部長)

演題：日本留学の経験と日中友好病院における国際的活動

1 0 : 5 0 - 1 1 : 3 0

座長：難波恒雄 (富山医科薬科大学名誉教授)

演者：車 慶 明 (北京医科大学 薬学院 教授)

演題：和漢薬成分の薬物代謝及びその薬効

1 1 : 3 0 - 1 2 : 1 0

座長：小松かつ子 (和漢薬研究所 助教授)

演者：劉 玉 萍 (中国中医研究院 中薬研究所 助教授)

演題：中国における遺伝子解析による生薬の鑑定

1 2 : 1 0 - 1 3 : 1 0 昼食

13:10-13:50

座長：難波恒雄（富山医科薬科大学名誉教授）

演者：楊秀偉（北京医科大学薬学院教授）

演題：中草薬の抗腫瘍活性について

13:50-14:30

座長：菊池 徹（富山医科薬科大学名誉教授）

演者：崔承彬（北京生物医薬研究所 主任研究員）

演題：細胞周期の新規低分子制御剤の探索

—国際交流による共同研究の展開—

14:30-14:45 休憩

14:45-15:25

座長：服部征雄（和漢薬研究所 教授）

演者：趙懷清（瀋陽薬科大学 助教授）

演題：富山医科薬科大学での研究生活

15:25-16:00

基調講演

寺澤捷年

「脳血管性痴呆に対する釣藤散の効果」

座長：倉石 泰（薬学部 教授）

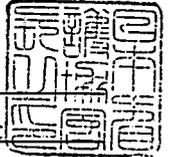
16:00 閉会の辞

日本財団補助金による
 1998年度日中医学協力事情報告書
 - 学術交流に対する助成 -

1998年10月7日

財団法人日中医学協会
 理事長 中島章殿

報告者氏名 見藤 隆子
 所属・役職 日本看護協会会長
 所在地 〒150-0001 渋谷区神宮前 5-8-2
 電話 03-3800-8344 (直通)



講演集・シンポジウム写真等学会に関する資料を添付

学会・学術交流の名称 第5回日中看護学会
 テーマ 看護研究と最新の動向
 主催団体 中華護理学会
 代表者 理事長 曾熙媛
 期間・開催地 1998年9月11日-12日、中国、杭州
 招聘・派遣目的 標記学会の共催

1. 招聘・派遣研究者 人数 人 記入欄不足の場合は別紙を添付。

氏名	所属・役職	研究分野

滞在期間 自 年 月 日 至 年 月 日

第5回日中看護学会

テーマ：看護研究と最新の動向

日本側代表者 日本看護協会会長 見藤隆子
中国側主催代表者 中華護理学会理事長 曾 熙 媛

学会報告

日本看護協会国際部係長 小山なを美

【学会概要】

期 日：1998年9月11日-12日

会 場：中国、杭州「西子賓館」

主 催：中華護理学会・理事長 曾 熙 媛

共 催：日本看護協会・会長 見藤 隆子

参加者：日本/82名、中国/96名

演題数：日本/30題、中国/26題

特別講演：日本/井部俊子第二副会長「日本の臨床看護実践を方向づけた方法論」

中国/張亜卓（北方医院）「競争者の健康リスクの分析と対策」

全体会：日本/岡谷恵子常任理事「日本における専門看護婦の機能とその評価についての研究」

中国/姜東蘭(北京中医医院)「八綱診断法と自然療法の中国伝統医学の看護における応用」

プログラム：別添のとおり

会場は西湖の辺、毛沢東の別荘として使われていたもので、格調高く、趣があり、参加者には好評であった。1分科会場については、構造上の問題があり、スライドが見えにくかったのが唯一の難点である。

日本の特別講演は、これまでに日本が影響を受けた看護理論、方法論を簡潔に紹介した上で、それらの導入についてはクリティカルな視点をもつことが重要であると述べ、海外との交流が増え、様々な理論、技術が導入されつつある中国への示唆となった。

これに対し、中国の特別講演は西洋医学的手法、全体会は中国独自の医学に基づく発表であり、中国の看護観の変化と、独自の看護手法の展開が伺えた。

中国からの一般発表では、今夏の大洪水により、7名が参加できず、被害の全土的な規模が実感された。このため、参加者からの発案で寄付を集め、本会からの見舞金とあわせ、約12万円をお贈りした。

今回の学会には、青年海外協力隊員として中国に滞在する日本の看護職5名も参加し、また、現地で中国語を勉強した看護学生が、急遽通訳の一人として参加するなど、草の根レベルでの交流の広がりも実感できた。

会を重ねるごとに内容が充実し、交流の深まりを実感している。中国の看護観に患者にどのように寄り添うか、の視点が出てきたのも今回の大きな収穫である。

来年は中華護理学会が創立90周年を迎え、祝賀会を予定している。これに併せ、来秋、北京で第6回日中看護学会の開催が決定された。本会の会員には、より臨床に結びついた発表を奨励したいと考えている。

第5回日中看護学会プログラム

9月11日(金)

8:30 開会式(司会:王春生、岡谷恵子)

挨拶:曾 熙 媛(理事長)

見藤隆子(会長)

来賓講演:林 菊 英(名誉理事長)

9:00 特別講演(座長:王春生、見藤隆子)

「競争者の健康リスクの分析と対策」 張 亜 卓(北方医院)

「日本の臨床看護実践を方向づけた方法論」 井部俊子(第二副会長)

10:30-10:40 休憩

10:40 全体会

「八綱診断法と自然療法の中国伝統医学の看護における応用」 姜 東 蘭(北京中医医院)

「日本における専門看護婦の機能とその評価についての研究」 岡谷恵子(常任理事)

12:00-13:30 昼食

	分科会Ⅰ(座長:劉淑媛、井部俊子)	分科会Ⅱ(劉書琴、岡谷恵子)
13:30	<p>胡 秀 華「看護管理における病棟運営会議についての検討」</p> <p>大島敏子「職場診断フェッカリストの開発とこれを用いた総合診断の方法」</p> <p>鄭 小 霞「患者への健康教育の評価について」</p> <p>大宮孝子「過去8年間におけるMRSA感染症の現状と今後の課題」</p> <p>王 金 婷「口腔科患者が自己申告する全身疾患罹患状況の信頼性についての研究」</p>	<p>鈴木美恵子「在宅高齢者と家族看護の状況—北海道帯広市と北京宣武区の比較」</p> <p>彭 碧 芳「地域衛生サービスの効率的運用の探究検討」</p> <p>六角遼子「高齢者観の日中比較—老人看護の基礎的課題に関連して」</p> <p>程 其 梅「地域での脳卒中早期回復看護」</p> <p>岸 英子「看護学生の職業意識の日中比較」</p>
15:00-15:20 休憩		
15:20	<p>兒玉尚子「血液透析を受けている人の日常生活についての調査」</p> <p>向 晶「持続性血液透析患者の家族に対する心理健康状況調査分析」</p> <p>米田純子「上部消化管内視鏡検査における感情情報提示の効果」</p> <p>姚 良 英「内視鏡による胆嚢切除術後の併発症の観察及び看護」</p> <p>上滝博子「婦人科領域で看護に求められるインフォームド・コンセント—手術を受けた患者の調査から」</p>	<p>馮 瑾「普通外科患者における術後の疼痛反応と焦慮気分との関連性の研究」</p> <p>森山比路美「プリゼプターシップによる新人ナースの育成」</p> <p>李 保 蘭「患者中心の看護についての検討—勤勉及び情感の重要性」</p> <p>澤村まさ子「これからの院内教育—私達の国立病院での取り組み」</p> <p>郭 風 仙「当院在職看護婦の継続看護学科教育と実施管理」</p>
16:35		
18:00	懇親会(司会:王春生)	

9月12日(土)

	分科会Ⅰ (座長：劉淑媛、富田幾枝)	分科会Ⅱ (座長：劉書琴、鈴木美恵子)
8:30	<p>銭 惠 珠「CAPD 患者地域看護の効果の分析及び体験会得したこと」</p> <p>播本雅津子「日本の訪問看護の現状」</p> <p>皮 紅 英「急性心筋梗塞の静脈血栓溶解治療の入院前処置及び看護」</p> <p>石井八重子「日本の訪問看護ステーションの実態と課題」</p> <p>青 華「臨床看護においていかに患者と意思疎通の機会を掴むか」</p> <p>山城久典「保健所が 119 の機能と役割に関する一考察」</p>	<p>高 梅 娟「119 例の高濃度ヘリン塩水の静脈内保留置入による双腔管抗凝固作用の臨床実験」</p> <p>石原紀美子「ファター位分娩の導入」</p> <p>洪 雅 蓉「尺澤、内関つぼへの注射による肺結核大咯血の治療」</p> <p>後藤幸子「授乳室環境の設計計画についての人間工学的基礎研究—授乳時における褥婦の空間配置と心理的關係性」</p> <p>李 洪「146 例のⅡ型糖尿病の臨床分析及び看護研究」</p> <p>太田にわ「乳幼児の母親の育児ストレスに関する研究」</p>
10:00—10:20 休憩		
10:20	<p>喻 海 燕「思春期の機能失調による子宮出血に対するホルモン代替の人工周期治療の心理調査と分析」</p> <p>松尾和枝「生活習慣病予防のための地域看護の課題—小学生の健康状態と日常生活習慣の関連性」</p> <p>黒 連 芝「漢方医学における看護技術の発展および臨床応用」</p> <p>関島英子「地域診療所の育児相談に見る母子の健康上のニーズ」</p> <p>張 慧 敏「イントラシナングリン眼底血管造影に伴う看護から得したこと」</p>	<p>皮 海 珍「漢方うがい薬を用いた急性白血病口腔感染治療効果の観察」</p> <p>大井伸子「両親学級への取り組みと参加者の実態」</p> <p>魏 志 華「意識覚醒患者に対する呼吸器による治療時の心理看護」</p> <p>臼井雅美「父性性に関する研究—日本男性の性役割観の特徴と父子関係及び父親像との関連」</p> <p>馬 捷「双顎奇形を正顎外科で矯正治療した患者の臨床総体看護の実施について」</p>
12:00—13:00 昼食		
	分科会Ⅰ (座長：劉淑媛、松村幸子)	分科会Ⅱ (劉書琴、宮地緑)
13:00	<p>肖 柳 紅「高齢者の生活習慣が健康に及ぼす影響—地域訪問サービスに関する対策の検討」</p> <p>結城美智子「世帯構成および年齢区分による高齢者の知的能力と生活活動状況—農村地域における老人クラブ参加者を対象として」</p> <p>邢 俊 華「老年心血管内科における心電遠隔測定への応用」</p> <p>小山幸代「Jグループホームに入居した痴呆性高齢者に見られた変化—入居直後から6ヶ月まで」</p> <p>趙 禾 欣「機械的換気治療後の COPD 患の呼吸機能と体力機能回復訓練についての研究」</p> <p>羽原美奈子「障害を持つ人の健康感と社会的支援の関連」</p> <p>李 愛 玲「患者を中心とする腰椎間板溶解術に関する看護」</p> <p>山口曜子「生活習慣病予防の為の産業看護の実際—IGT 患者の生活指導をとおして」</p> <p>霍 春 暖「脳卒中方麻痺患者の早期リハビリテーション看護について」</p>	<p>下坂真知子「看護過程を導入した臨床実習の検討—中国における日中看護教師共同による試み」</p> <p>王 仙 園「上級看護学生卒業論文の口答審査の試み」</p> <p>山本よしる「老人福祉施設及び訪問看護ステーションにおける実習の効果—学生の課題学習からの学びを分析して」</p> <p>馬 志 華「看護個別分析案における PBL 教学法の応用と実践」</p> <p>鈴木けい子「看護学生が抱くイメージと学習による変化」</p> <p>戴 風 君「高位脊髄損傷患者の尿流動態検査時に起こる血圧変化の観察と看護」</p> <p>内野幸子「看護学生の健康意識と健康習慣」</p> <p>于 志 紅「第3度褥創の治療に対する『活血破瘀膜』の効果の検討」</p>
15:15—15:45 休憩		
15:45—16:30 閉会式 (司会：曾熙媛、見藤隆子)		