

日本財団補助金による


1999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—

2000年5月 / 日

財団法人 日中医学協会

理事長 中島章殿

研究代表者氏名 河盛隆造   
所属機関名 順天堂大学医学部内科学  
職名 教授 年齢 57 才  
所在地 〒113-8421 文京区本郷2-1-1  
電話 03(3813)3111 内線 3560

1. 研究課題

Impaired Glucose Tolerance (IGT) にみる動脈硬化症退縮研究  
—糖尿病予備軍に対するライフスタイル介入・日本中国共同試馬—  
Japan-China Joint Study on Atherosclerosis Regression in IGT- Intervention  
on Life Style.

2. 研究期間 自 1999 年 4 月 1 日 ~ 至 2000 年 3 月 15 日

3. 研究組織

日本側研究者氏名 河盛隆造 (57才)  
所属機関 順天堂大学医学部内科 職名 教授  
中国側研究者氏名 呂 麗和 (66才)  
所属機関 北京中医药大学 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、日中医学協会助成事業—日本財団補助金による旨を明記して下さい。

## Impaired Glucose tolerance (IGT) にみる動脈硬化症退縮研究

—糖尿病予備軍に対するライフスタイル介入、日本中国共同試験—

順天堂大学医学部内科学 河盛隆造

### 研究目的

本邦の糖尿病患者数は700万以上であり、中国では3400万にも及ぶ。糖尿病予備軍と捉えられている IGT（経口ブドウ糖負荷試験が Impaired Glucose tolerance (IGT) の範疇に入る例）は、疫学的に糖尿病性細小血管合併症の発症率が極めて低い

が、一方虚血性心疾患死、脳血管障害死が多いことが知られている。本研究の目的は、日本および中国において同一の手法を用いて、IGT から糖尿病への進展阻止と動脈硬化症進行阻止が可能であるか否かを検索することとした。

### 研究方法

1999年は本研究の初年であり、中国における IGT の特性が日本人 IGT と相違があるか、と IGT 症例では頸動脈硬化症が進展しているか否かを、検索せんとした。

#### 1) IGT におけるインスリン分泌動態の検索

中国人 IGT 82例（男性60例、女性22例、平均年齢54歳（39歳—70歳）に75gOGTTを行い、負荷前、負荷後30分、60分、120分、の血清インスリン値を radioimmunoassay にて計測した。

#### 2) 動脈硬化症進展度の定量化；頸動脈内膜中膜複合体肥厚度 (IMT ; intimal and medial complex thickness) の測定；

Bモードエコー法により測定した。具体的には、7.5-10.0MHzのリニア型パルスエコープローブを有する高解像度超音波断層装置を用いた。被検者は仰臥位または坐位にして左右の総頸動脈を描出し、縦断面で前斜位・側面・後斜位の3方向から、IMTで最も肥厚している部位とその前後1cmの3ポイントの平均を求めた。左右の総頸動脈の各3方向の合計6方向の平均肥厚度のうち、最大値を各々の症例におけるIMTとした。

### 研究結果

#### 1) IGT におけるインスリン分泌動態の検索

75gOGTT時、負荷後60分、あるいは120分の血清インスリン値が50 $\mu$ U/ml以上であった例は82例中、39例であった。インスリン値が高い群では、インスリン値が低い群に比し、BMIが大(25.3 $\pm$ 1.9 vs 22.1 $\pm$ 2.3)、拡張期血圧が高い(81 $\pm$ 7 vs 72 $\pm$ 7 mmHg)、血中中性脂肪が高い(228 $\pm$ 101 vs 153 $\pm$ 60 mg/dl)ことが判明した。

#### 2) IGT における頸動脈内膜中膜複合体肥厚度 (IMT)

年齢別にみたIMTの平均値はIGT群において、健常人に比し厚い傾向を示した。一方、IGT群のIMTは糖尿病群のIMTに比し、有意差なく厚かった。さらに、IGT群をインスリン値の高低で前述の2群に分け比較したところ、インスリン値が高かった群の平均IMTは1.03 $\pm$ 0.04 mmであり、インスリン値が低かった群の0.89 $\pm$ 0.05mmに比し、有意に厚かった。

以上の検索により、中国人のIGTにおいて、遅延過剰インスリン分泌を呈しているにもかかわらず、血糖応答が異常である、すなわち、インスリン抵抗性である例では、頸動脈硬化症が既に発症・進展していることが証明された。かかる例に対しては、ライフスタイルの改善により、糖尿病への進展阻止、ならびに動脈硬化症の進展阻止が

なされるべきであることが強く示唆された。

## 考察

頸動脈は大動脈、大動脈とともに動脈硬化の好発部位であり、Bモードエコー法で求めた頸動脈のIMTが動脈硬化症の進展度の定量的指標として有用であることがわかっている。頸動脈病変は虚血性脳血管障害と密接に結び付いているため病変診断の価値は高く、頸動脈エコー法は脳梗塞のうち、脳血栓症、特にアテローム血栓性脳梗塞の場合に最も診断的価値が高く、無症候性多発性脳梗塞の原因としての頸動脈病変の意義は大きい。また、内頸動脈閉塞症により前頭葉の低灌流が起こり痴呆様症状が起こるといわれており、何らかの局所症状を伴った多発性脳梗塞の場合、本検査は有用と考えられる。また頸動脈病変は虚血性脳血管疾患だけでなく虚血性心疾患や末梢動脈閉塞性疾患の発症とも相関していることがわかっており、無症候性の虚血性心疾患や末梢動脈閉塞性疾患を予想する指標ともなりうる。このように頸動脈エコーによる動脈硬化の評価は全身の動脈硬化の指標となる。

筆者等は、既に健常者120例と糖尿病患者800例のIMTを測定した(1)。健常者では加齢と共に増加するものの1.1mmを越えることはないことより、正常範囲は1.1mm以下としている。糖尿病患者約1000名では20才代から80才代まで、各年代ごとの健常者に比べ有意にIMTが増加した。ことに、20~40才代の糖尿病患者のIMTは、健常者50~70才代と同等であり、20~30年早く動脈硬化が糖尿病患者において進展していることを認めた。肥満や高脂血症を全く認めないインスリン依存型糖尿病患者でIMTが顕著に厚いこと(2)、頭部MRI検索ラクナ梗塞巣を有する例の大多数でIMTが1.3mm以上であること、冠動脈造影をおこなった糖尿病患者90例で狭窄枝数が増加する程、平均IMTが大となることなどを認めた(3)。成人発症型インスリン非依存型糖尿病(2型糖尿病)多数例における経年的観察の結果、IMTの変化率は非HDLコレステロール値とHbA1c値に大きく依存することが判明した。

一方、OGTT境界型160例においても糖尿病患者と差がない程度の動脈硬化を呈していることを認めた(4)。とくに肥満などを合併しているものは、糖尿病性細小血管合併症は発症しないが、動脈硬化症はすでに発症・進展していたことから、これらの症例を血糖応答曲線およびインスリン分泌動態の面から解析したところ、2時間値の血糖値が高いほど、インスリン値が高い(1, 2時間平均値約 $100\mu\text{U/ml}$ )ほどIMTが肥厚していることが判明した(3)。インスリン値が高い2群では、インスリン値が低い2群に比し、BMIが大(血糖値高値、血糖値低値; $25.0\pm 2.2$ ,  $25.3\pm 2.1$  vs  $22.6\pm 2.5$ ,  $22.3\pm 2.9$ )、拡張期血圧が高い( $84\pm 9$ ,  $83\pm 9$  vs  $74\pm 9$ ,  $75\pm 6$  mmHg)、血中中性脂肪が高い( $245\pm 157$ ,  $215\pm 198$  vs  $140\pm 59$ ,  $160\pm 154$  mg/dl)ことがわかった。以上のように、糖尿病予備軍のなかでインスリン抵抗性を呈しているものは、動脈硬化症がすでに発症・進展しているといえる。

また、IMTは心血管事故の予測パラメーターとして繁用され始めている。例えば、O'Learyらは心血管障害を有さない、65才以上、4476名のIMTを計測し、以降7年弱追跡した(5)。その結果、IMTが既に厚い例では観察中に高頻度に心血管事故が発症した。

この様にBモードエコーによるIMTの測定は、動脈硬化症の早期発見、進展度の経時的観察に有用であることが広く認識されてきたが、測定にあたっては慎重な対応が必須である。熟練した医師や技師が十分時間をかけて、前回計測部と同部位を描出し、ノギスで正確に測定すべきである。胆嚢ポリープのサイズを計測するのと同様に扱うと、誤った結論を導き兼ねない。

以上、現段階では動脈硬化症を根本的に治療することは困難であり、糖尿病状態に進展してからだけでなく境界型糖尿病の段階から、より早期に動脈硬化を診断し進展の予防や動脈硬化の危険因子を是正していくことが重要である。

## まとめ

初年に解明しえたことは、1)中国においても、日本と同様Impaired Glucose Toleranceを呈する人々のうち、インスリン抵抗性を示すと捉えられた例では、既に

動脈硬化症の進行が始まっていることが証明された。2) BモードエコーによるIMTの測定精度を本邦と中国で一致させることができた。3) これらを対象とした介入試験を開始することのfeasibilityが証明できた。

#### 引用文献

- (1) Kawamori R et. al; Prevalence of carotid atherosclerosis in diabetic patients. Ultrasound high-resolution B-mode imaging on carotid arteries. ; Diabetes Care 15;1290-1294, 1992
- (2) Yamasaki Y et al. ; Atherosclerosis in carotid artery of young IDDM monitoring by ultrasound (high resolution B-mode imaging. Diabetes 43;634-639, 1994
- (3) Kawamori R; Asymptomatic hyperglycemia and early atherosclerosis changes; Diab Res Clin Pract 40; S35-S42, 1998
- (4) Yamasaki Y et al. ; Asymptomatic hyperglycemic is associated with increased intimal plus medial thickness of carotid artery, Diabetologia 38;585-591, 1995
- (5) O'Leary, DH, et al; Carotid-artery intima and media thickness as a risk factor for myocardial infarction and stroke in older adults; The New England Journal of Medicine 340 : 14-22, 1999


## 日本財団補助金による

# 1999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－

2000年3月13日

財団法人 日 中 医 学 協 会  
理事長 中 島 章 殿

研究代表者氏名 柏原嘉子   
所属機関名 国立感染症研究所  
ハンセン病研究センター  
職 名 病原微生物部長 年 齢 60歳  
所 在 地 〒189-0002 東京都東村山市青葉町  
4-2-1  
電話 042-391-8211 内線 22

### 1. 研究課題

らい菌の型別に関する研究

2. 研究期間 自 1999年4月1日～ 至 2000年3月15日

### 3. 研究組織

日本側研究者氏名 柏原嘉子 (60歳)  
所属機関 国立感染症研究所 ハンセン病研究センター 職名 部長

中国側研究者氏名 呉勤学 (62歳)  
所属機関 中国医学科学院皮膚病研究所  
中国協和医科大学 職名 教授/研究員

### 4. 研究報告

別添書式を参考に、報告本文 4000 字以上で作製して下さい (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 報 告

研究テーマ： らい菌の型別に関する研究

研究代表者氏名	柏 原 嘉 子
所 属	国立感染症研究所 ハンセン病研究センター
役 職	病原微生物部長

## 要旨：

ハンセン病の病原体であるらい菌に関して、感染源の特定や感染経路の解析に必須な分離株間の識別に有効な生物学的特質についての報告はほとんどない。分離株間でらい菌の遺伝子発現調節に関与する *rpoT* 遺伝子の構造の差異を認め、多数の分離株で調べた結果、らい菌が2つの遺伝子型に分けられること、またその分布に偏りがあることを明らかにした。中国各地からの分離株について検索した結果、日本本土・韓国に分布する型は中国北東部に、沖縄・アジア等に広く分布する型は中国南西部に分布が偏る傾向が認められた。2つの遺伝子型の分布は、わが国へのらい菌の渡来に2通りの伝播経路を推測させた。

KEY WORDS: *Mycobacterium leprae*, genotype, *rpoT* gene

## 目的：

ハンセン病は *Mycobacterium leprae* による慢性感染症で、アジア・ラテンアメリカ・アフリカでは現在なお公衆衛生上重要な疾患である。世界では、WHO をはじめとし、多剤併用化学療法によるハンセン病制圧に向けての取り組みが精力的に行われている。しかし、毎年50万人を上回る新患発生は減少傾向を示さないばかりか、近年増加傾向さえ示している。ハンセン病制圧には適切な化学療法、ワクチンによる予防、化学予防に加えて感染源や感染経路の同定とその除去が不可欠である。そのためには各症例の原因菌の異同を識別する方法の確立が求められている。ハンセン病は非常に長い潜伏期を経て発症し、また原因菌であるらい菌が人工培養不可能であるため、感染源を特定することが極めて困難である。これまで制限酵素多型(RFLP)等他の感染症原因菌で汎用されている方法でらい菌分離株の異同を識別する試みが成されてきたが、現在まで目的にかなう実用的方法の報告はない。

報告者らはらい菌の遺伝子多型に基づくらい菌の型別を意図して、由来を異にする

らい菌の遺伝子を比較した結果、らい菌の *rpoT* 遺伝子内に6塩基からなる繰り返し配列の数に差を認めた。わが国及び韓国からの分離株について検討した結果、この配列を3個持つ菌と4個持つ分離株が存在すること即ちらい菌が *rpoT* 遺伝子の型により2群に分けられること、またその分布に偏りが有ることを明らかにした。

本研究の目的は、中国のらい菌分離株について *rpoT* 遺伝子型を検索、遺伝子型の分布を調べ、わが国、韓国、並びにアジア諸国を中心とするその他の地域からの分離株の遺伝子型と比較し、この型別法の有効性を検証すると共に、らい菌のグローバルな伝播経路を推定することにある。

方法：

らい菌分離株とゲノム DNA の調製：

分離株には臨床から直接得たもの、ヌードマウスで継代した株、パラフィン包埋標本中のらい菌を含む。中国各地からは46例のハンセン病患者由来組織のパラフィン包埋標本を集めた。

凍結あるいはアルコール浸漬生検材料、皮膚擦過材料は細碎し、生食中で懸濁、遠心分離でらい菌を精製後、proteinase K および Tween 20 含有緩衝液に懸濁後凍結融解により DNA を遊離、常法に従い、またパラフィン包埋標本からは切片 (5 μm 厚) 3から5枚を用い、DEPAD (タカラ酒造製)により鋳型 DNA を調製した。

PCR および塩基配列決定：

*rpoT* 遺伝子の構造の差異が認められる領域を含む300塩基対の DNA 断片を PCR 法で増幅、増幅産物の塩基配列を BigDye Terminator Cycle Sequencing FS Ready Reaction キット (Perkin-Elmer Applied Biosystem 社製) を用いて決定した。塩基配列の解析は DNASIS プログラム (Hitachi Software Engineering 製) を用いた。

電気泳動：

*rpoT* 遺伝子内差異を簡易迅速に検出するために、標的部位内の更に短い断片を増幅しうるプライマーを設計し、97あるいは91塩基対の断片を PCR 法で増幅し、4%MetaPhor アガロース (FMC Bioproducts 製) で電気泳動を行い、97塩基対の断片を生じる型 (4型、繰り返し配列を4個持つ型) と91塩基対の断片を生じる型 (3型、繰り返し配列を3個持つ型) の簡易検出法を確立した。

結果：

#### 1. 分離株間での *rpoT* 遺伝子の塩基配列

これまでに、マウスでの増殖速度の異なるらい菌分離株間で、結核菌や *M. smegmatis* において遺伝子の発現調節に関与することが報告されている *sigA* 遺伝子と高い相同性を有するらい菌の *rpoT* 遺伝子内に6塩基対からなる繰り返し構造の数に差異の有ることを認めた (Fig. 1)。 *rpoT* 遺伝子内の差異について地理的に異なる地域からの分離

株について検索した結果、らい菌が2群に分類可能で有ることが示された。即ち、1群は繰り返し構造を4個有し、他の1群は3個有した。575のアミノ酸をコードする *rpoT* 遺伝子の全長を比較したが、上流、下流領域を含む1900塩基対の中で、6塩基対の繰り返し構造のみが分離株間で差異を示すものであった。これらの分離株がらい菌であることは Plikytis らの方法により、*groEL* 遺伝子内のらい菌特異的配列の存在をPCR法で確認した。

## 2. *rpoT* 遺伝子構造の差異による2つの遺伝子型の簡易検出

2つの遺伝子型の簡易検出を目的として、*rpoT* 遺伝子の標的部位内にプライマーを設定、各型を区別可能にする91あるいは97塩基対のDNA断片を増幅し、4% MetaPhor アガロースによる電気泳動を行った。Fig. 2 に示すように2つの遺伝子型を示す各バンドは明瞭に分離された。各バンドはアガロースゲルより回収後、塩基配列を決定し、*rpoT* 遺伝子内の当該部位由来であることを確認した。

## 3. わが国のらい菌分離株の *rpoT* 遺伝子型

日本人から分離されたらい菌分離株25例について *rpoT* 遺伝子型別を調べた結果を Fig. 3 に示す。図から明らかなように繰り返し構造を3個有する3型と4個有する4型の2つの遺伝子型が検出されたが、その分布は際だった偏りを示した。即ち、沖縄からの分離株は全て3型であったのに対し、本土からの分離株は殆どが4型であった。3型を示した3例中の1例は日系ブラジル人由来のものであった。

## 4. 韓国からのらい菌分離株の遺伝子型

韓国からのらい菌分離株に関しても同様に *rpoT* 遺伝子型の分布を検索した。結果を Fig. 4 に示す。2つの遺伝子型が検出されたが、33例中25例が4型、3型は8例と、4型が多いというわが国本土と類似のパターンを示した。

## 5. 中国のらい菌分離株の *rpoT* 遺伝子型

46のパラフィン包埋標本から得られた鋳型DNA標品を用いてPCRを行った結果、28例で目的とするDNA断片が増幅され、2つの遺伝子型が検出された。中国における遺伝子型分布を Fig. 5 に示す。3型がやや多く検出されたが、南部では全て3型、北東部では4型の頻度が高い傾向が認められた。

## 6. その他の地域からのらい菌分離株における遺伝子型

アジア、ラテンアメリカからの分離株およびヒト以外に由来するらい菌分離株について、バングラデシュ(3例)、インド(1例)、インドネシア(5例)、ネパール(1例)、パキスタン(1例)、フィリピン(2例) タイ(4例)、ブラジル(3例)、ハイチ(1例) および各1例ずつのマンガベイザル(ナイジェリア)、アルマジロ(アメリカ、ルイジアナ)由来のらい菌分離株について *rpoT* 遺伝子型を検索した。その結果、これらの地域からの分離株は調べた範囲で全ての株が3型を示した。アルマジロ及びマンガベイザル由来のらい菌も3型を示した。(Fig.6)



考察：

非常に顕著な所見は日本本土に見られるらい菌の遺伝子型（4型）が韓国及び中国の北東部に偏って分布していることである。この分布の偏りの理由に関しては現段階では不明である。同様な遺伝子型の偏った分布は *Helicobacter pylori* においても認められている。*H. pylori* についての分子疫学的研究から日本と韓国から分離される *H. pylori* 分離株は殆ど全てが *cag*<sup>+</sup> であるのに対し、世界の他の地域からの分離株の30-40%は *cag*<sup>-</sup> である。またアジア諸国からの *H. pylori* 株はコーカソイドから分離される株と異なることが塩基配列を基に報告されている。*H. pylori* においては遺伝子型の特異的分布は人類の移動に関連すると想定されている。今回認められたらい菌における遺伝子型分布の偏りも人類の移動に関連している可能性が考えられる。考古学的研究から、日本人形成過程で弥生人は中国・韓国を経て日本に渡来し、先住の縄文人と置き換わっていったとされている。

少なくとも本土に広く分布する4型のらい菌は中国北東部から韓国を経て我が国に伝播してきた可能性が示唆される。

一方、沖縄、奄美での分離株は本土の分離株と遺伝子型が異なり、中国南部やアジア、ラテンアメリカからの分離株で見られる3型を示した。歴史的に沖縄は19世紀まで独立国家として、日本本土よりも中国南部や東南アジア諸国と密接な交流を保っていた。沖縄・奄美で検出されるらい菌が本土で検出されるらい菌と遺伝子型を異にしているのはこれら地域へのらい菌の渡来は中国南部やアジア諸国を経由したものと推測される。

今回28の中国各地からのらい菌分離株について *rpoT* 遺伝子型を調べることができたが、らい菌のグローバルな伝播経路を明らかにするためには、中国国内の異なる地方からのより多数のらい菌分離株で *rpoT* 遺伝子型の分布を調査する必要がある。

*rpoT* 遺伝子型で3型を示すらい菌は世界に広く分布していた。感染経路や感染源解析のための疫学調査にはより細分化を可能にする遺伝子型別法の開発が必要である。Fshih と Cole は8例の分離株（臨床分離株 5例、アルマジロ継代株 3例）を用いてらい菌の *poIA* locus に遺伝子多型性があると報告している。我々は彼らの方法に従い、*rpoT* 遺伝子型で3型あるいは4型を示す分離株について *poIA* locus の多型性を検討したが、いずれも同一のタイプを示した。

らい菌分離株間の遺伝的多型性の探索にこれまで多くの試みが成されてきたが、分離株間の相違を明快に識別し疫学調査に利用可能な遺伝的多型性に関してはこの *rpoT* 遺伝子多型性以外報告がない。今回中国、韓国及びアジア・ラテンアメリカ等世界の異なる地域からの分離株で *rpoT* 遺伝子多型性が認められ、またその分布の偏りかららい菌のグローバルな伝播経路を推察する道具になる可能性が示唆された。

*rpoT* 遺伝子の3型と4型の生理的意義とその分布の偏りに関しても今後の研究課題と考える。

文献

1. Plikaytis, B.B., Gelber, R.H., Shinnick, T.M. (1990)  
Rapid and Sensitive detection of *Mycobacterium leprae* using a nested-primer gene amplification assay. J. Clin. Microbiol. 28: 1913-1917.
2. Achtman, M., Azuma, T., Berg, D.E., Ito, Y. Morelli, G., Pan, Z.J., Suerbaum, S., Thompson, S.A., van der Ende, A., van Doorn, L.J. (1999)  
Recombination and clonal groupings within *Helicobacter pylori* from different geographical regions. Mol. Microbiol. 32: 459-470.
3. van der Ende, A., Pan, Z.aj., Bart, A., van der Hulst, R.W.M., Feler, M., Xiao, S.D., Tytgat, G.N.J., Dankert, J. (1998)  
*cag-A*-positive *Helicobacter pylori* population in China and the Netherland are distinct. Infect. Immun. 66: 1822-1826.
4. Covacci, A., Telford, J.L., Giudice, D.G., Porsonnet, J., Rappuoli, R. (1999)  
*Helicobacter pylori*: virulence and genetic geography. Science 284: 1328-1333.
5. Fsihi, H., Cole, S.T. (1995) The *Mycobacterium leprae* genome: systematic sequence analysis identifies key catabolic enzymes, ATP-dependent transport systems and a novel pol A locus associated with genomic variability. Mol. Microbiol. 16: 909-919.

謝辞：韓国からのらい菌分離株をご提供いただいた Dr. Gue-Tae Chae(Institute of Hansen's Disease, College of Medicine, The Catholic University of Korea)をはじめ、世界各地からの分離株の供与にご協力頂いた国内外の諸先生に謝意を表します。また、国立感染症研究所ハンセン病研究センターの松岡正典、前田伸司、甲斐雅規、前田百美、橋本研が共同研究者としてこの研究の推進に携わった。

## Legends for Figures

Fig. 1. Sequence alignment of DNA fragment corresponding from 541 to 585 (for 4 tandem repeats) or 541 to 579 (for 3 tandem repeats) of the *rpoT* gene from *Mycobacterium leprae* isolates.

Sequences from 7 isolates and the reference (from Database, accession no. U15181) are shown.

Fig. 2 Genotype detection by electrophoresis in agarose.

Five  $\mu$ l of PCR products were electrophoresed in 4% Meta Phor™ agarose and then stained with ethidium bromide. Samples were lane 1, Kagoshima (Japan); lane 2, Kanazawa (Japan); lane 3, Korea-1; lane 4, Thai 53; lane 5, Okinawa-1 (Japan); lane 6, PHS-3 (Mangabey monkey); lane 7, PHS-4 (Armadillo) and lane 8, the DNA size marker of 50 bp ladder.

Fig. 3 Distribution of two genotypes of *M. leprae* in Japan.

● : *M. leprae* with 3 repeats in the *rpoT* gene; ○ : *M. leprae* with 4 repeats in the *rpoT* gene.

Fig. 4 Distribution of two genotypes of *M. leprae* in Korea.

● : *M. leprae* with 3 repeats in the *rpoT* gene; ○ : *M. leprae* with 4 repeats in the *rpoT* gene.

Fig. 5 Distribution of two genotypes of *M. leprae* in China.

● : *M. leprae* with 3 repeats in the *rpoT* gene; ○ : *M. leprae* with 4 repeats in the *rpoT* gene.

Fig. 6 Distribution of two genotypes of *M. leprae* in the world.

● : *M. leprae* with 3 repeats in the *rpoT* gene; ○ : *M. leprae* with 4 repeats in the *rpoT* gene.

Fig. 1

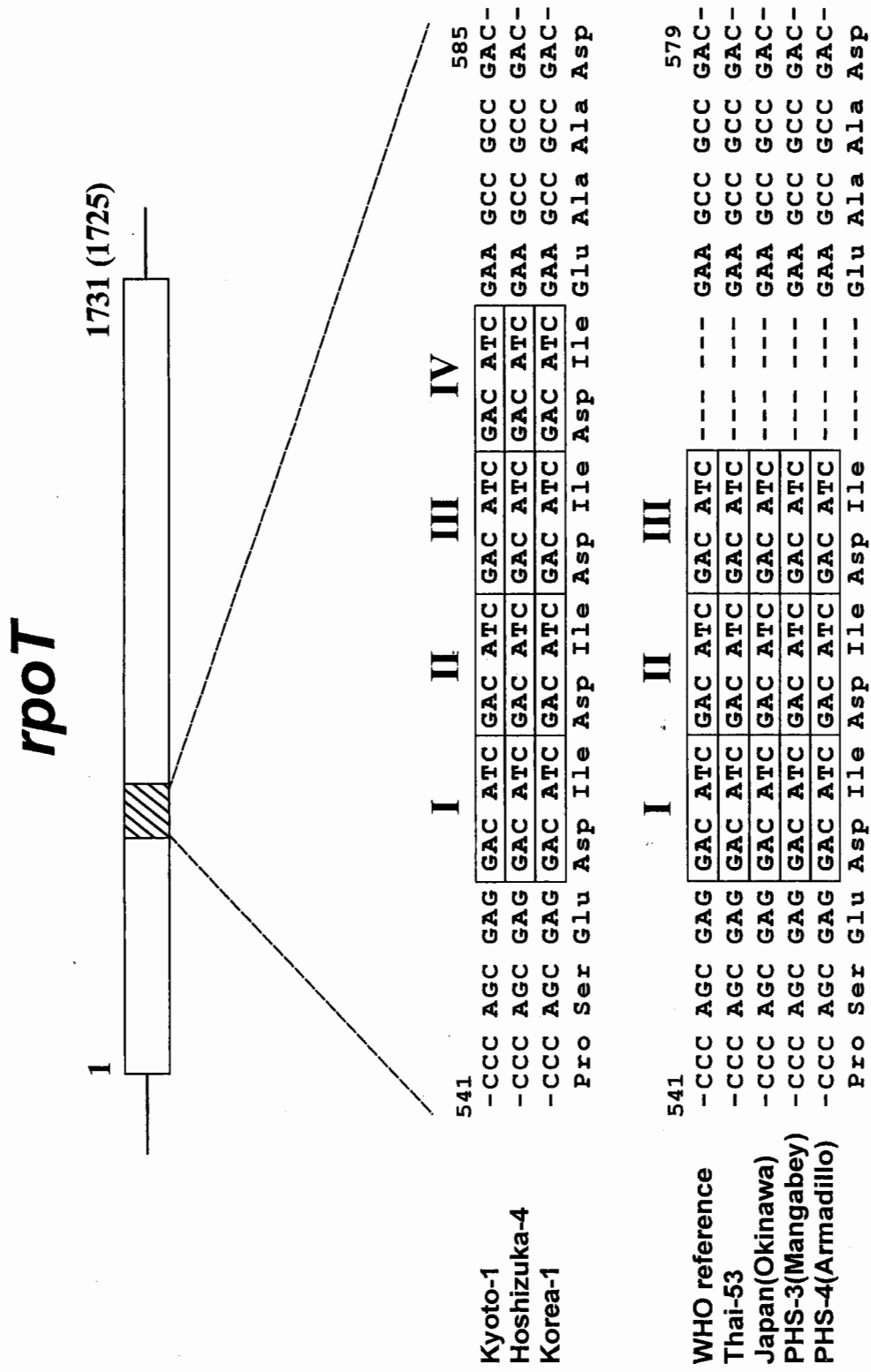




Fig. 3

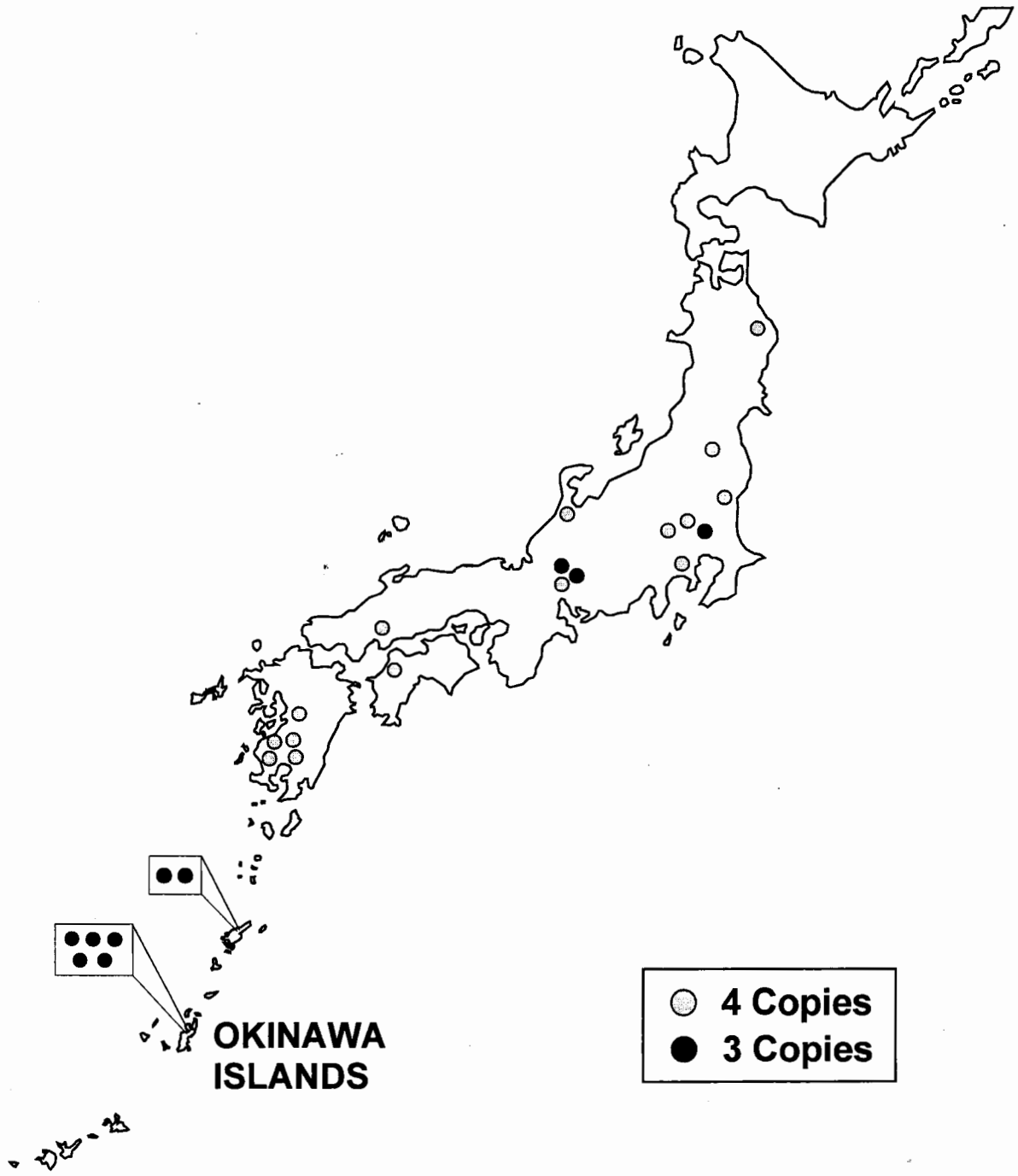


Fig. 4

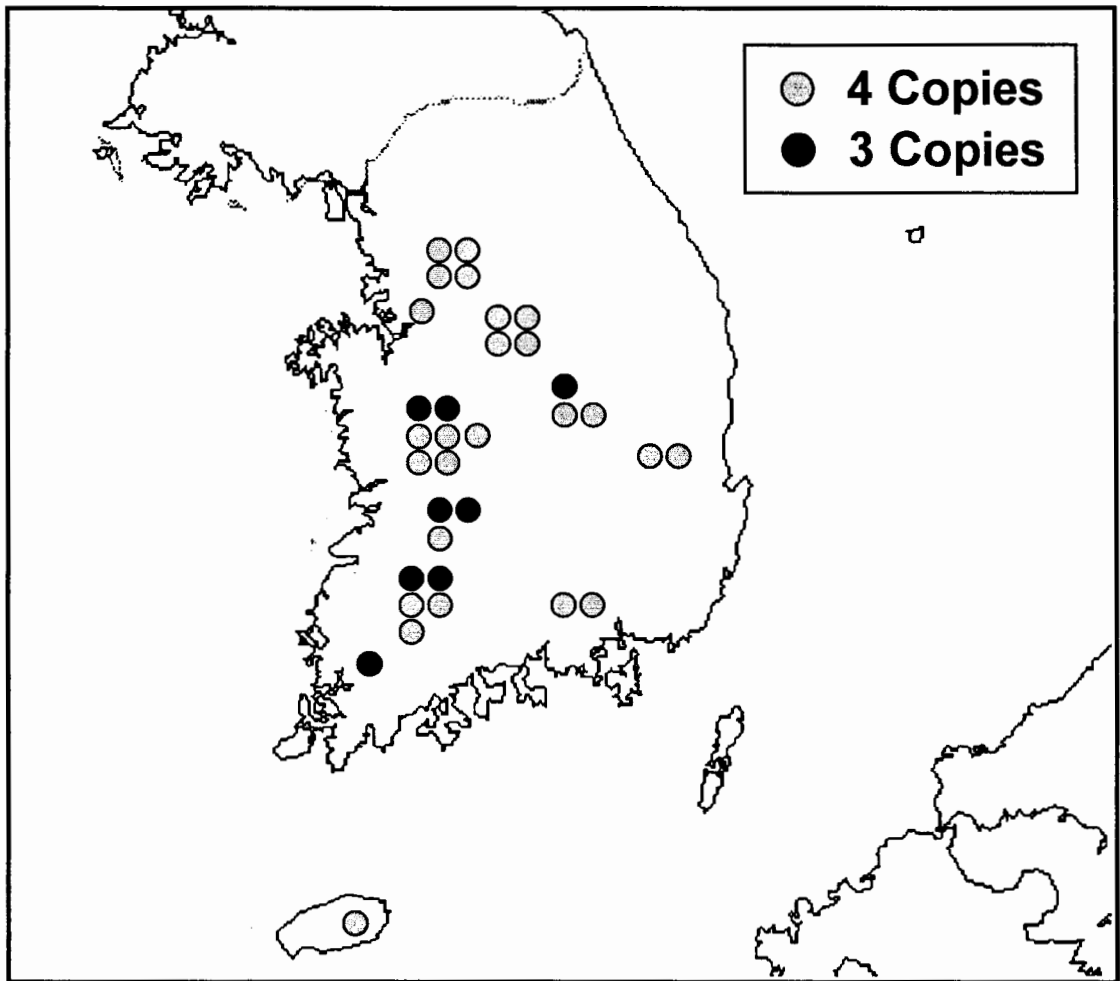


Fig. 5

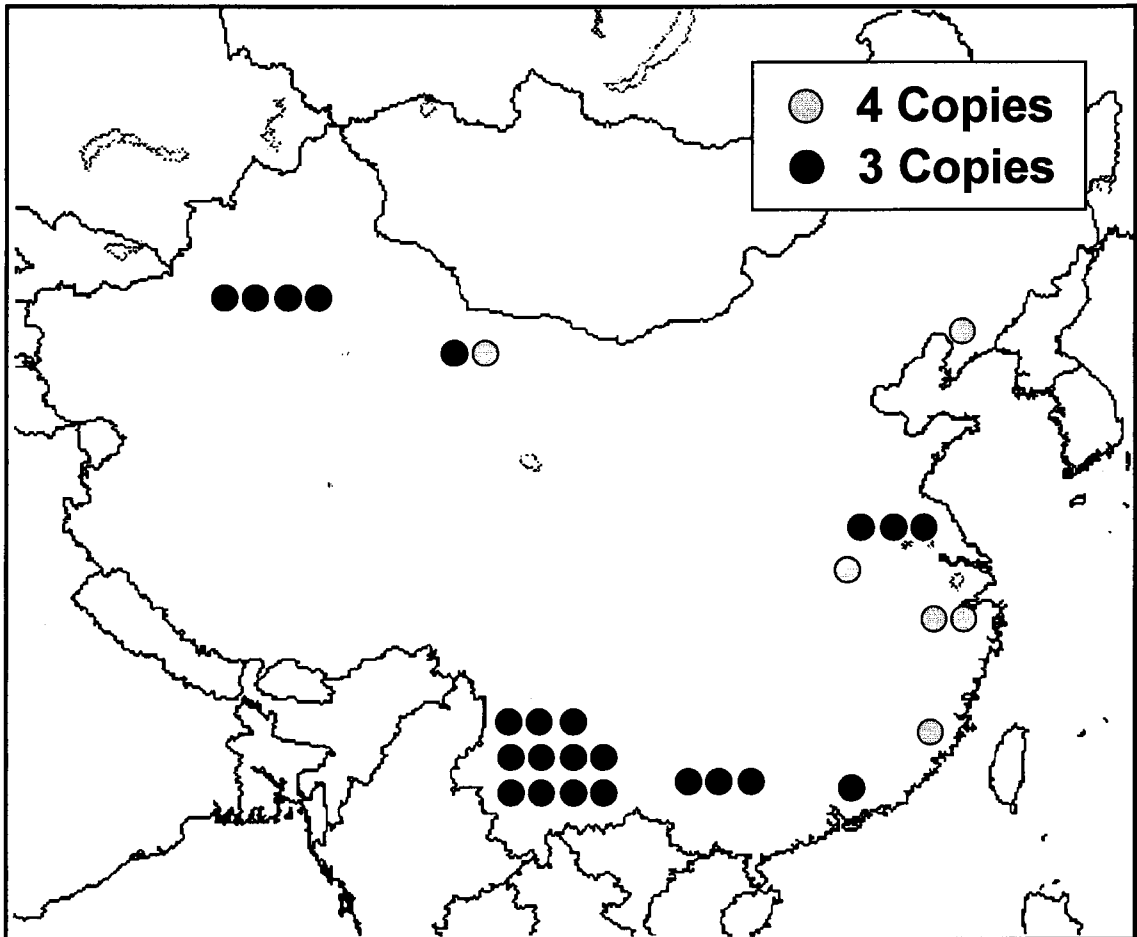
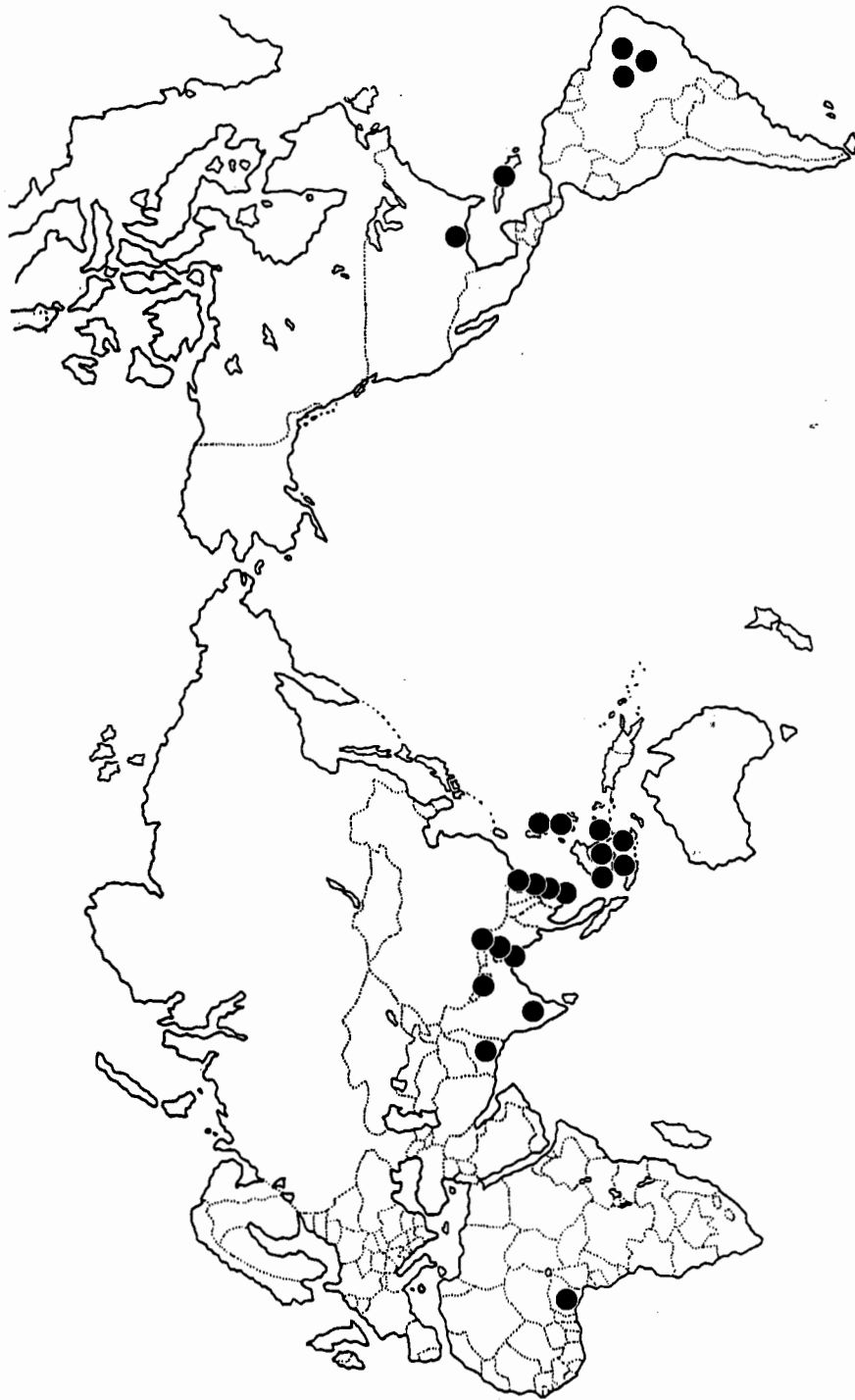




Fig. 6



日本財団補助金による

1999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—

2000年4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 山田 宣孝  
所属機関名 日本医科大学病理学教室  
職 名 助教授 年齢 53 才  
所 在 地 〒113-8602 東京都文京区千駄木 1-1-5  
電話 03-3822-2131 内線 5327



1. 研究課題

ヘリコクターピロリ菌感染と胃十二指腸病変の発生に関する中日民族間比較研究

—とくに両国の胃癌発生母地の病理組織学的検討—

2. 研究期間 自 1999 年 4 月 1 日 ~ 至 2000 年 3 月 15 日

3. 研究組織

日本側研究者氏名 山田 宣孝 (53 才)  
所属機関 日本医科大学病理学教室 職名 助教授  
中国側研究者氏名 張 亜歴 (39 才)  
所属機関 第一軍医大学消化病研究所 職名 副所長、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、日中医学協会助成事業—日本財団補助金による旨を明記して下さい。

## I. 研究課題

ヘリコバクターピロリ菌感染と胃十二指腸病変の発生に関する中日民族間比較研究

—とくに両国の胃癌発生母地の病理組織学的検討—

II. 研究代表者： 山田 宣孝

所属機関： 日本医科大学病理学教室

役職： 助教授

## III. 要旨

*Helicobacter pylori* 菌 (以下ピロリ菌と略)の胃粘膜感染は最も頻度の高い感染症の一つであります。本研究グループは病理医の他、内視鏡にたずさわる臨床医、電顕、組織培養等の研究者らから成り、ピロリ菌感染の研究班を結成し、6年間にわたり日本の胃生検標本 12,000 余例を用い、ピロリ菌感染と胃内視鏡像、胃粘膜組織像の判定基準の作成、除菌治療の評価法の検討、ピロリ菌の三次元再構築などの研究を行ってきました。その結果、ピロリ菌感染は慢性胃炎、消化性潰瘍と密接に関連するだけでなく、胃癌の発生母地とされている、粘膜萎縮、腸上皮化生との関係の研究が極めて重要であることが明らかになりました。

1996年、本研究グループは北京中日友好医院消化器内科と病理科、及び、広州第一軍医大学消化器病研究所との間で、胃癌発生のメカニズム解明の為、ピロリ菌と胃粘膜病変の関係に関する研究について共同研究協議を結びました。北京、広州でシンポジウムを開催し学術交流を行い、胃疾患に関する内視鏡診断と病理組織診断の判定基準、内視鏡の生検部位(三定点)を統一して、北京、広州の他いくつかの地域で各 200 症例以上を内視鏡検査、病理組織検査、血清学検査を行うことを決めました。

第一段階として日本の研究チームが北京中日友好医院を4回にわたり訪れ 257 症例の調査を行いました。日本で標本を作成、診断し、結果を中国側に報告しました。

第二段階として、1997年2月1日から7月1日まで、広州第一軍医大学消化器病研究所の張亜歴先生を日本に招き、日本医科大学附属第一病院病理部と内視鏡科でピロリ菌感染胃粘膜の生検組織診断法と内視鏡診断法を5ヶ月間研修していただきました。張先生は若手の有望な研究者で、帰国後中国の広州第一軍医大学消化器病研究所の教授、副所長に任命されました。また、ピロリ菌の研究で優れた成績を挙げられ、中国科学研究賞を授賞されました。

第三段階として、今回、日本の研究チームが広州第一軍医大学消化器病研究所副所長、張教授の研究グループ、福建医科大学消化器病研究所所長、林教授の研究グループと共に胃内視鏡検査、胃生検を行い、更に西安医科大学の研究グループと共同研究の予備交渉を現地にて行ないました。西安での共同調査は2000年9月に予定し当局の調査許可を申請中です。

以上、中国の3ヵ所(北京市、福建省福州市、広東省広州市)とベトナム(ホーチミン市)、タイの2ヵ所(チアンマイ市、バンコク市)日本の2ヵ所(東京、東京外)の胃粘膜の変化について、同一の基準で、内視鏡診断、組織診断を行い、その結果を、年齢群別に、比較、検討し、民族差、地域差によるピロリ菌感染と胃粘膜病変出現の関連性を検討しました。

#### IV. KEY WORDS

ヘリコバクターピロリ菌、胃内視鏡診断、胃組織診断、粘膜萎縮、腸上皮化生、民族差、地域差

#### V. 研究報告

##### 1) 目的

日本は胃癌の好発国である。欧米人ではピロリ菌感染率、胃粘膜萎縮、胃癌の発生率とも日本より低い。一方、中国、東南アジアではピロリ菌感染率が日本より高いにもかかわらず、胃癌の発生率は日本より低いことが知られている。日本人に多い胃粘膜萎縮、腸上皮化生は分化型胃癌の発生母地とされている。ピロリ菌感染は胃癌発生の重要な因子の一つとされているが、その因果関係は未だ解明されていない。中国は面積が広く、気候は寒暖著明、多民族の国として、地域によって胃癌の発病率も大きく異なることが知られている。日中共同研究により、ピロリ菌感染者の地域分布状態及びピロリ菌感染と胃粘膜病変の発生との関係を研究することは日中両国民にとって有意義と考えられる。

##### 2) 方法

外来患者（除菌例を除く）を対象として中国人 257 例（北京）、207 例（福州）、189 例（広州）に胃内視鏡診断後、三定点生検（①幽門大彎、②体上部大彎、③体下部小彎）を施行、H.E.菌、菌染色、免疫染色を行い、The Sydney system により組織学的に病変を 4 段階で評価、年齢群別に、ピロリ菌感染率は第 1,2,3 点を総合して陽性、陰性を判定、粘膜萎縮、腸上皮化生の有無、程度を第 3 点にて判定した。この結果を、同様の方法で調査した、ベトナム人 379 例（ホーチン）、タイ人 516 例（チェンマイ）、276 例（バンコク）、日本人 4194 例（東京）、3335 例（東京外）の結果と比較検討した。

##### 3) 結果

#### 内視鏡診断別集計：

正常群(Normal)、胃潰瘍(G.U.)、十二指腸潰瘍及び胃十二指腸潰瘍(D.U.&G.D.U.)、胃癌(G.C.)、その他の胃病変と萎縮性胃炎(Others)

	Normal	G.U.	D.U. & G.D.U.	G.C.	Others
China, Peking(%)	44.4	4.3	14.8	4.7	28
China, Fuzhou(%)	24.2	2.4	22.2	3.9	47.3
China, Guanzhou(%)	35.4	3.7	17.5	3.2	40.2
Vietnam, HCM(%)	46.2	4	20	2.6	27.2
Thai, Chiangmai(%)	50.4	3.3	15.5	0.8	30
Thai, Bangkok(%)	33.7	18.1	20.3	1.4	26.4
Japan, Tokyo(%)	8.8	25.3	17.2	3.4	45.4
Japan, non-Tokyo(%)	19.6	20.6	14.1	0.8	44.9

内視鏡診断別ピロリ菌感染率集計：

	Normal	G.U.	D.U. & GDU.	G.C.	Others
China, Peking(%)	58.2	81.8	78.9	75	53.7
China, Fuzhou(%)	54	60	66.7	62.5	45.9
China, Guanzhou(%)	34.3	100	87.9	100	75
Vietnam, HCM(%)	41.1	86.7	64.5	80	47.5
Thai, Chiangmai(%)	69.6	64.7	83.8	75	72.3
Thai, Bangkok(%)	54.9	47.9	65.4	75	65.2
Japan, Tokyo(%)	58.9	78.7	83.6	81	60.7
Japan, non-Tokyo(%)	55.9	80.1	88.7	53.8	58.1

北京：年齢群別、ピロリ菌感染率、萎縮率、腸上皮化生率

	<=30	31-40	41-50	51-60	>=61
HP infection(%)	65	60.7	65	58.3	57.1
Total Atrophy(%)	7.4	10.3	3.8	4.8	25
Mild Atrophy(%)	3.7	2.6	3.8	0	15
Mod. Atrophy(%)	3.7	5.1	0	4.8	5
Sev. Atrophy(%)	0	2.6	0	0	5
Total Metaplasia(%)	0	12.7	12.5	8.3	25
Mild Metaplasia(%)	0	5.5	5	0	10.7
Mod. Metaplasia(%)	0	3.6	5	4.2	3.6
Sev. Metaplasia(%)	0	3.6	2.5	4.2	10.7

福州：年齢群別、ピロリ菌感染率、萎縮率、腸上皮化生率

	<=30	31-40	41-50	51-60	>=61
HP infection(%)	54.2	66.1	53.8	57.7	55.6
Total Atrophy(%)	6.9	10.9	30	34.4	36.8
Mild Atrophy(%)	0	4.3	15	6.3	10.5
Mod. Atrophy(%)	6.9	4.3	7.5	9.4	5.3
Sev. Atrophy(%)	0	2.2	7.5	18.8	21
Total Metaplasia(%)	5.7	8.9	25	25	29.7
Mild Metaplasia(%)	2.8	5.4	9.6	11.1	0
Mod. Metaplasia(%)	0	1.8	5.8	2.8	3.7
Sev. Metaplasia(%)	2.8	1.8	9.6	11.1	25.9

広州：年齢群別、ピロリ菌感染率、萎縮率、腸上皮化生率

	<=30	31-40	41-50	51-60	>=61
HP infection(%)	69.5	72.6	54.2	75	50
Total Atrophy(%)	0	7.3	0	12.5	14.3
Mild Atrophy(%)	0	4.9	0	12.5	4.8
Mod. Atrophy(%)	0	2.4	0	0	9.5
Sev. Atrophy(%)	0	0	0	0	0
Total Metaplasia(%)	0	7.7	8.6	18.8	14.3
Mild Metaplasia(%)	0	5.8	8.6	6.3	4.8
Mod. Metaplasia(%)	0	1.9	0	6.3	9.5
Sev. Metaplasia(%)	2.8	0	0	6.3	0

ホーチン：年齢群別、ピロリ菌感染率、萎縮率、腸上皮化生率

	<=30	31-40	41-50	51-60	>=61
HP infection (%)	44.6	55.3	46.4	70	49.2
Total Atrophy (%)	5	16	8.5	24	22.9
Mild Atrophy (%)	5	9.1	6.4	24	17.1
Mod. Atrophy (%)	0	6.8	2.1	0	2.9
Sev. Atrophy (%)	0	0	0	0	2.9
Total Metaplasia (%)	1.2	4.3	0	8	16.7
Mild Metaplasia (%)	1.2	2.1	0	4	10
Mod. Metaplasia (%)	0	0	0	0	0
Sev. Metaplasia (%)	0	2.1	0	4	6.7

フアンマイ：年齢群別、ピロリ菌感染率、萎縮率、腸上皮化生率

	<=30	31-40	41-50	51-60	>=61
HP infection (%)	71.4	59.2	72.9	79.5	74
Total Atrophy (%)	0	12.2	19.6	18	17.5
Mild Atrophy (%)	0	9.8	10.7	12	8.4
Mod. Atrophy (%)	0	0	5.3	6	7.7
Sev. Atrophy (%)	0	2.4	3.6	0	1.4
Total Metaplasia (%)	0	2.6	4.2	6.8	8.9
Mild Metaplasia (%)	0	0	1.3	4.5	4.3
Mod. Metaplasia (%)	0	1.3	0	1.1	2.6
Sev. Metaplasia (%)	0	1.3	3.9	1.1	2.1

ハノク：年齢群別、ピロリ菌感染率、萎縮率、腸上皮化生率

	<=30	31-40	41-50	51-60	>=61
HP infection (%)	53	52.8	62.5	58.8	52.2
Total Atrophy (%)	0	12.2	19.6	18	17.5
Mild Atrophy (%)	0	9.8	10.7	12	8.4
Mod. Atrophy (%)	0	0	5.3	6	7.7
Sev. Atrophy (%)	0	2.4	3.6	0	1.4
Total Metaplasia (%)	3.8	7.7	8.1	7.3	20.5
Mild Metaplasia (%)	3.8	4.6	0	4.9	8.2
Mod. Metaplasia (%)	0	0	5.4	2.4	9.6
Sev. Metaplasia (%)	0	3.1	2.7	0	2.7

日本、東京：年齢群別、ピロリ菌感染率、萎縮率、腸上皮化生率

	<=30	31-40	41-50	51-60	61=<
HP infection(%)	45.6	61.3	72.4	75.2	70.1
Total atrophy(%)	7.5	20.6	29.5	45.6	53.1
Mild Atrophy(%)	4.8	11.4	13.1	16.5	16.7
Mod. Atrophy(%)	2.1	5.4	9.4	16.3	16.6
Sev. Atrophy(%)	0.5	1	7	12.9	19.8
Total Metaplasia(%)	5.2	11.5	27.9	39.2	47.3
Mild Metaplasia(%)	3.6	3.3	7.4	8.3	8.7
Mod. Metaplasia(%)	1.6	4.2	9.2	11.7	13.2
Sev. Metaplasia(%)	0	4	9.3	19.3	25.4

日本、東京外：年齢群別、ピロリ菌感染率、萎縮率、腸上皮化生率

	<=30	31-40	41-50	51-60	61=<
HP infection(%)	42.6	58.3	75.3	74.4	64.2
Total atrophy(%)#3	10.8	26	46.7	56	61.6
Mild Atrophy(%)#3	4.7	13.9	24	24.4	21.8
Mod. Atrophy(%)#3	5.6	9.3	12.1	15.7	19.6
Sev. Atrophy(%)#3	0.4	2.8	10.6	16	20.2
Total Metaplasia(%)#3	4.2	12.9	29.9	22.1	45.8
Mild Metaplasia(%)#3	0.4	5	9.4	10.2	11.3
Mod. Metaplasia(%)#3	1.9	4.2	8.4	9.8	11.4
Sev. Metaplasia(%)#3	1.9	3.6	12.1	17.1	23.1

その他日本人をピロリ菌陽性群、陰性群に分け、粘膜萎縮、腸上皮化生について集計した。

日本人、東京、ピロリ菌陽性群、萎縮率、腸上皮化生率

	<=30	31-40	41-50	51-60	61=<
Total Atrophy(%)	32.5	30.9	36.2	50.4	69.8
Mild Atrophy(%)	20.0	19.8	14.4	18.9	23.1
Mod. Atrophy(%)	10.0	9.3	11.8	18.0	23.5
Sev. Atrophy(%)	2.5	1.9	8.9	13.6	23.1
Total Metaplasia(%)	9.6	18.4	34.7	44	50.3
Mild Metaplasia(%)	6.1	4.5	9.3	9.2	10.3
Mod. Metaplasia(%)	3.5	6.9	12.6	2.6	15.7
Sev. Metaplasia(%)	0	6.5	12.8	20.9	24.3

日本人、東京、ピロリ菌陰性群、萎縮率、腸上皮化生率

	<=30	31-40	41-50	51-60	61=<
Total Atrophy(%)	0.7	2.2	9.4	28.7	30.9
Mild Atrophy(%)	0.7	1.3	5.8	7.9	8.2
Mod. Atrophy(%)	0	0.7	2.2	10.4	7.4
Sev. Atrophy(%)	0	0	1.4	10.4	15.3
Total Metaplasia(%)	0.8	0.6	9.9	24.7	40.4
Mild Metaplasia(%)	0.8	0.6	2.5	5.5	5
Mod. Metaplasia(%)	0	0	3.7	4.8	7.5
Sev. Metaplasia(%)	0	0	3.7	14.4	27.9

日本人、東京外、ピロリ菌陽性群、萎縮率、腸上皮化生率

	<=30	31-40	41-50	51-60	61=<
Total atrophy(%)	26.4	45.9	60.4	36.7	77.1
Mild Atrophy(%)	12.1	24.7	31.1	18.7	26.2
Mod. Atrophy(%)	13.2	16.4	15.2	9.5	27.1
Sev. Atrophy(%)	1.1	4.8	14.1	7.4	23.8
Total Metaplasia(%)	8	19.7	36.9	42.1	52.3
Mild Metaplasia(%)	0.9	8.2	11.6	11.9	12.4
Mod. Metaplasia(%)	3.6	6.3	10	11.2	13.6
Sev. Metaplasia(%)	3.6	5.3	15.3	19.4	25.9



日本人、東京外、ピロリ菌陰性群、萎縮率、腸上皮化生率

	<=30	31-40	41-50	51-60	61=<
Total atrophy(%)	0.2	4.4	12.9	29.9	38
Mild Atrophy(%)	0	2.2	6.5	14.6	15
Mod. Atrophy(%)	0.2	1.5	4.3	6.1	8.2
Sev. Atrophy(%)	0	0.8	2.2	9.1	14.8
Total Metaplasia(%)	1.3	3.4	8.7	23.2	33.9
Mild Metaplasia(%)	0	0.7	2.5	5.4	9.7
Mod. Metaplasia(%)	0.7	1.3	3.7	5.9	6.8
Sev. Metaplasia(%)	0.7	1.3	2.5	11.8	17.4

内視鏡診断について：

民族、地域により胃十二指腸病変は大きく異なっていた。日本人は他民族と比較して胃潰瘍は1.4-10.5倍、他の胃病変は約2倍、十二指腸潰瘍は0.6-0.9倍であった。

内視鏡診断別ピロリ菌感染率について：

民族、地域により胃十二指腸病変のピロリ菌感染率は大きく異なっていた。正常群(Normal):34.3-69.6%, 胃潰瘍(G.U.):47.9-86.7%, 十二指腸潰瘍及び胃十二指腸潰瘍(D.U.&G.D.U.):64.5-88.7%, 胃癌(G.C.):53.8-100%, その他の胃病変と萎縮性胃炎(Others):45.9-72.3%であった。

民族、地域別、年齢群別、ピロリ菌感染率、萎縮率、腸上皮化生率について：

ピロリ菌感染率は日本人では若年群で低く、中、高年群で高かったが、他民族では、どの地域でも、年齢群間に大差は認めなかった。但し、ベトナム(ホーチン市)では、ベトナム戦争による衛生状態の悪化を反映して年齢群間奇妙な差異を認めた。ピロリ菌感染率は全年齢群でタイ人(フアンマイ)が最も高く、粘膜萎縮、腸上皮化生は全年齢群で日本人が最も高かった。萎縮率、腸上皮化生率は全年齢群で日本人が最も高く、粘膜萎縮、腸上皮化生の程度でも日本人が最も強かった。中国の3地域では、同じ漢民族でありながら、ピロリ菌感染率、萎縮率、腸上皮化生率に有為差を認めた。中国福州(福建省)では日本人に似た結果を得た。タイの2地域でも、ピロリ菌感染率、萎縮率、腸上皮化生率に有為差を認めた。

ピロリ菌陽性群、陰性群別、年齢群別、粘膜萎縮率、腸上皮化生率について：

日本人菌陽性群では粘膜萎縮、腸上皮化生とも若年群より始まり加齢とともに増加、一方、日本人陰性群では、粘膜萎縮、腸上皮化生とも、若年群では稀であるが、中年群から始まり、高年群で著しく増加していた。

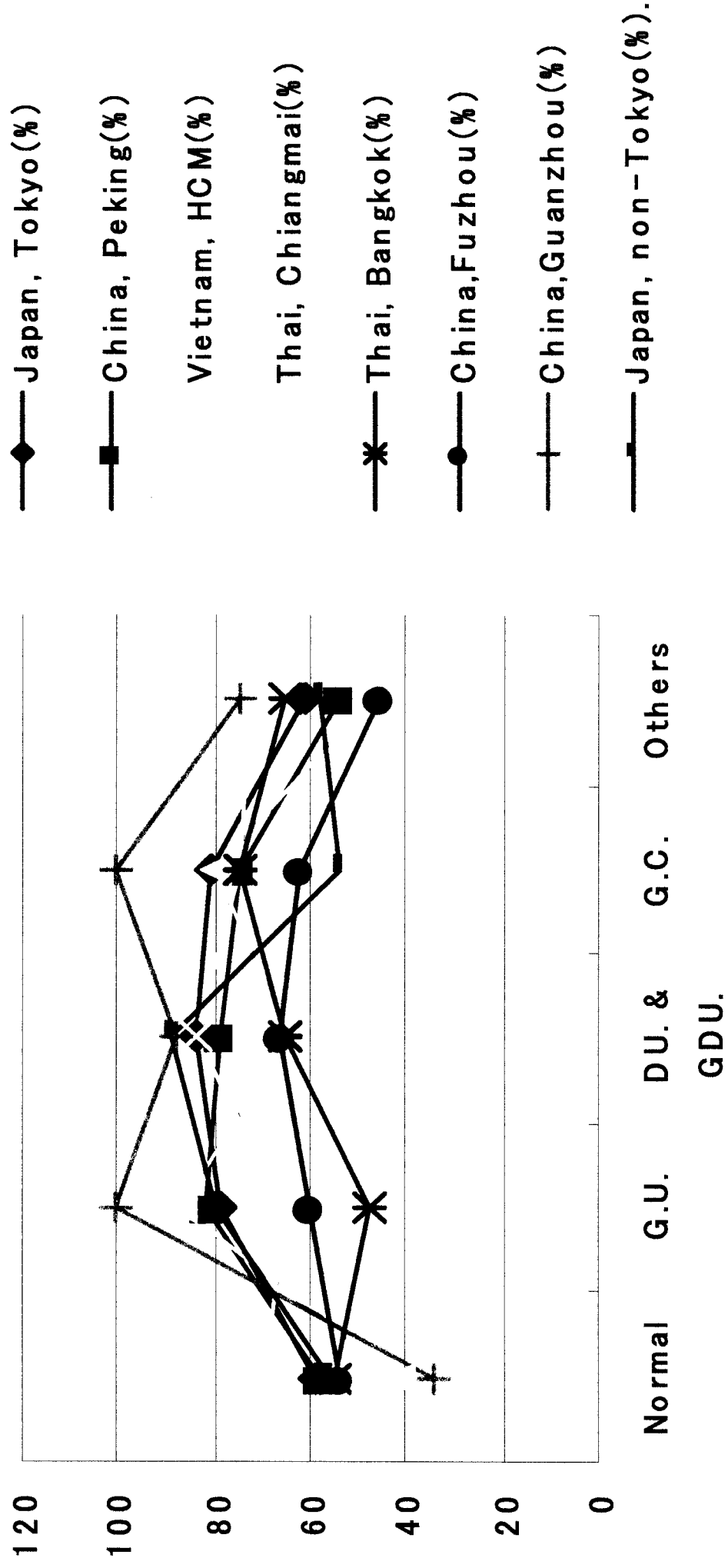
3) 考察

胃十二指腸病変、ピロリ菌感染率、粘膜萎縮率、腸上皮化生率は民族、地域によっても大きく異なっている。胃病変の進展は、ピロリ菌感染(菌因子)、食事を含む生活習慣(環境因子)、体質、民族移動を含む宿主側の因子(宿主因子)の関与により規定される可能性

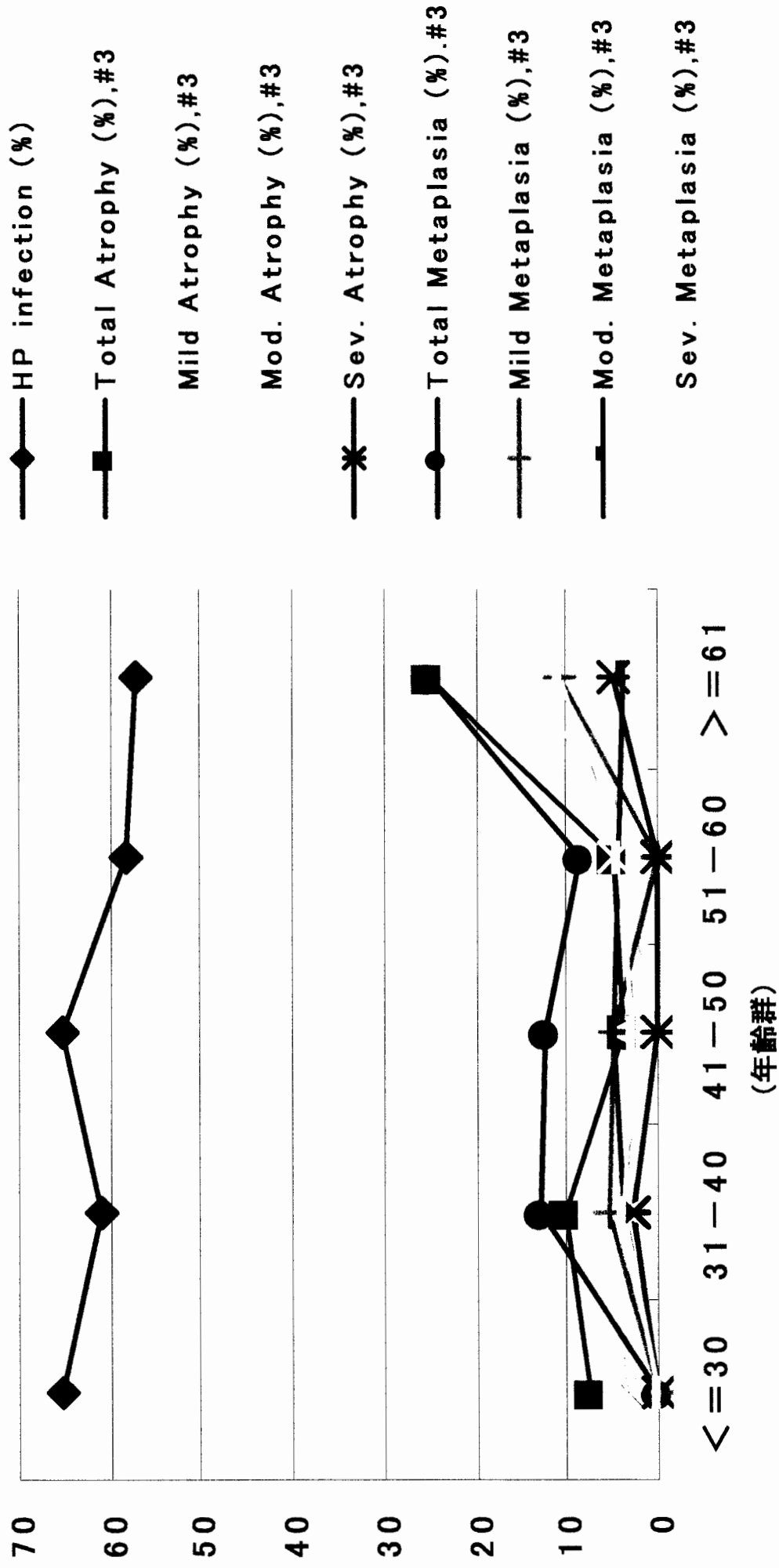
が強く示唆され、今後の学際的研究の発展が期待された。さらに日本人の場合、ピロリ菌感染によらない、粘膜萎縮、腸上皮化生の進展が明らかにされたことは、ピロリ菌除菌治療の意義を考える上で今後興味深い。



# 4民族8地域内視鏡診斷別HP感染率

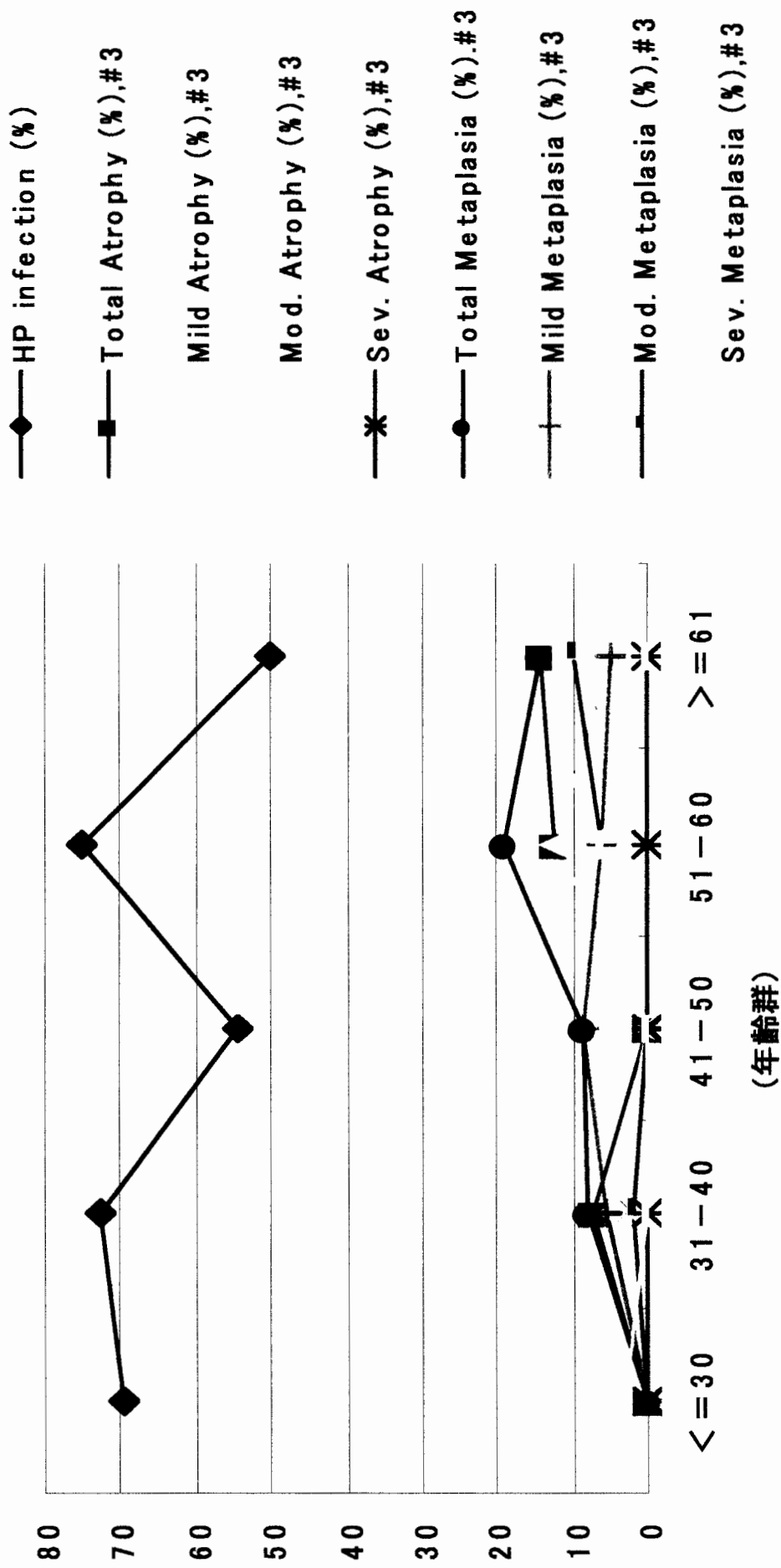


# 中国、北京のHP感染と萎縮、腸上皮化生

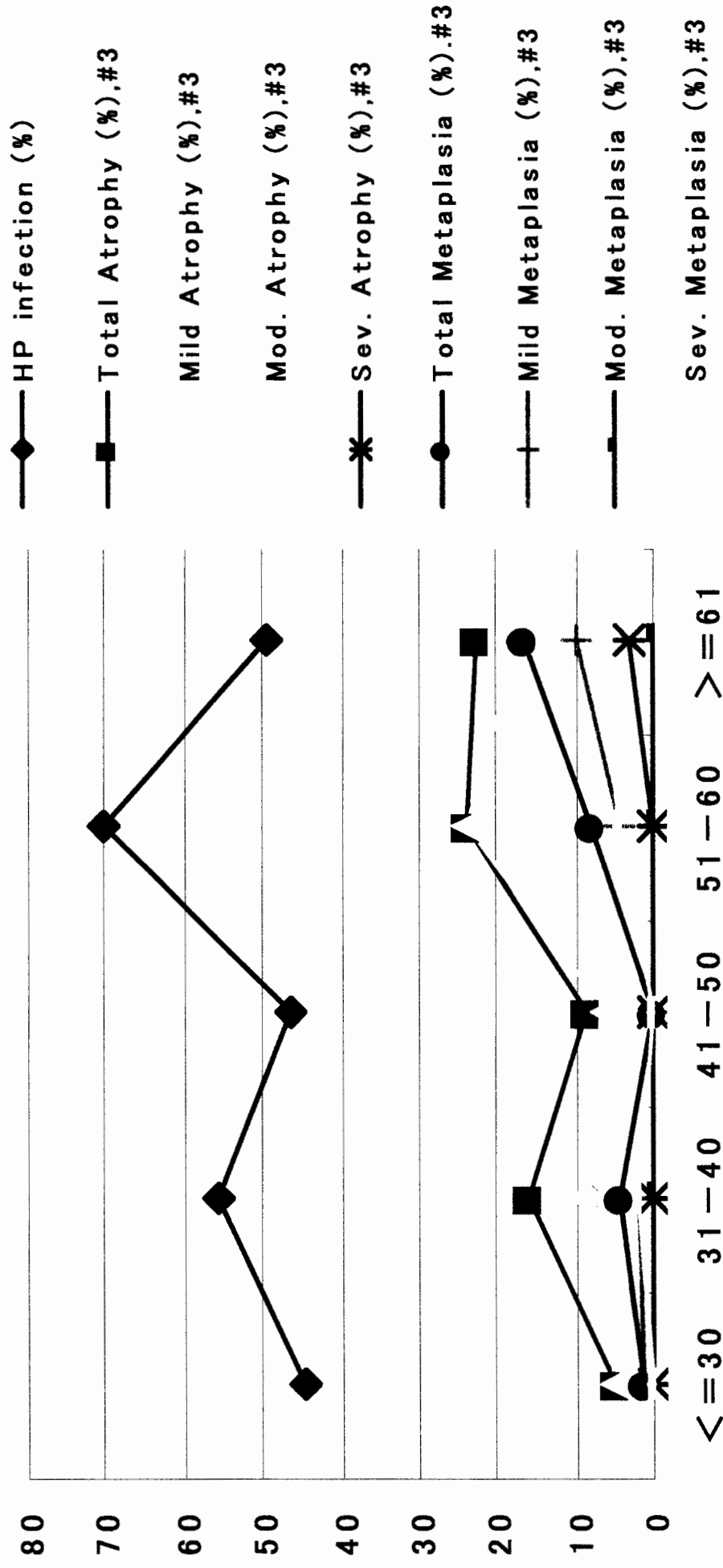




# 中国広州のHP感染と萎縮、腸上皮化生



# ベトナムのHP感染と萎縮、腸上皮化生

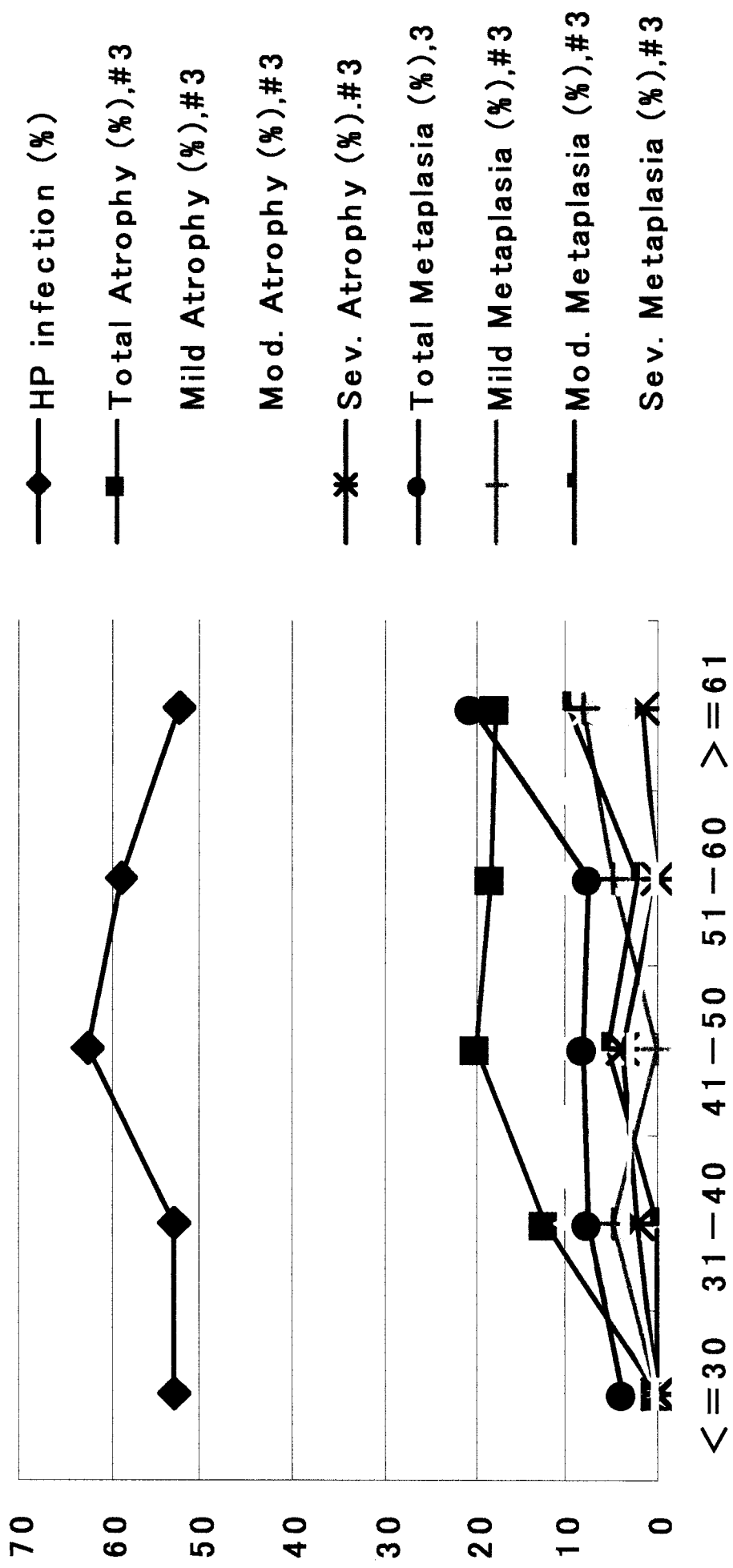


(年齢群)





# タイ、バンコクのHP感染と萎縮、腸上皮化生

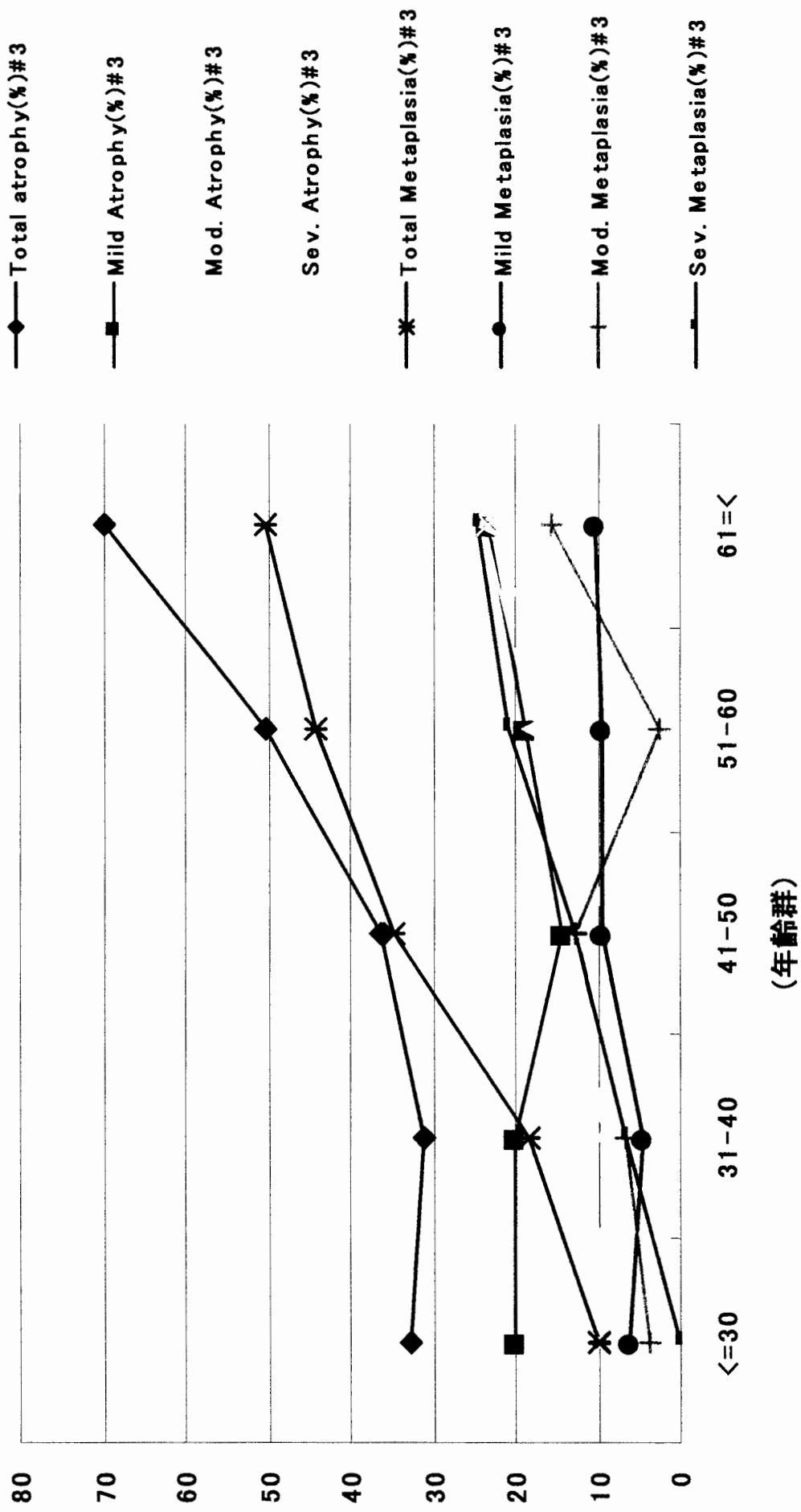


(年齢群)

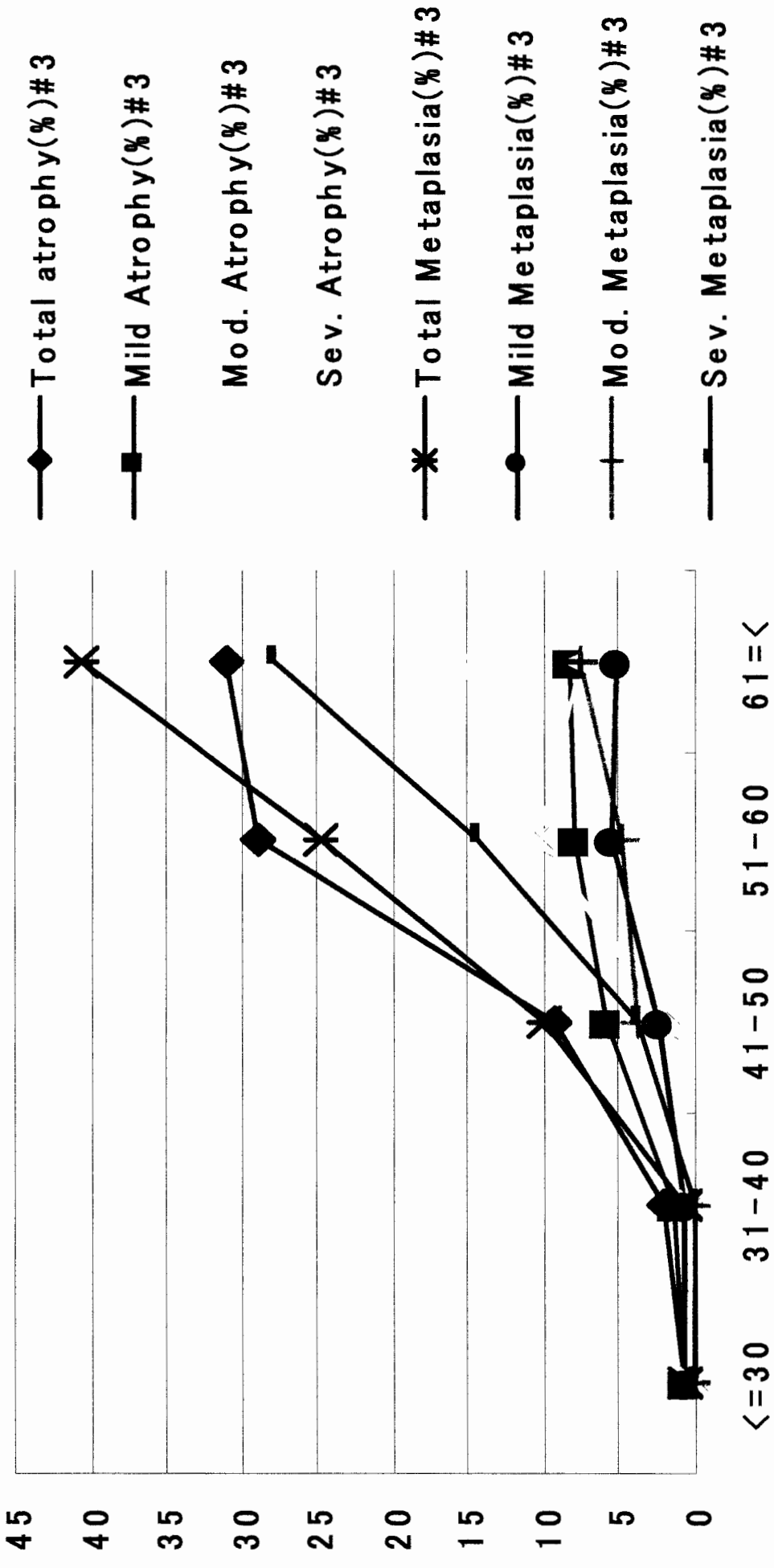




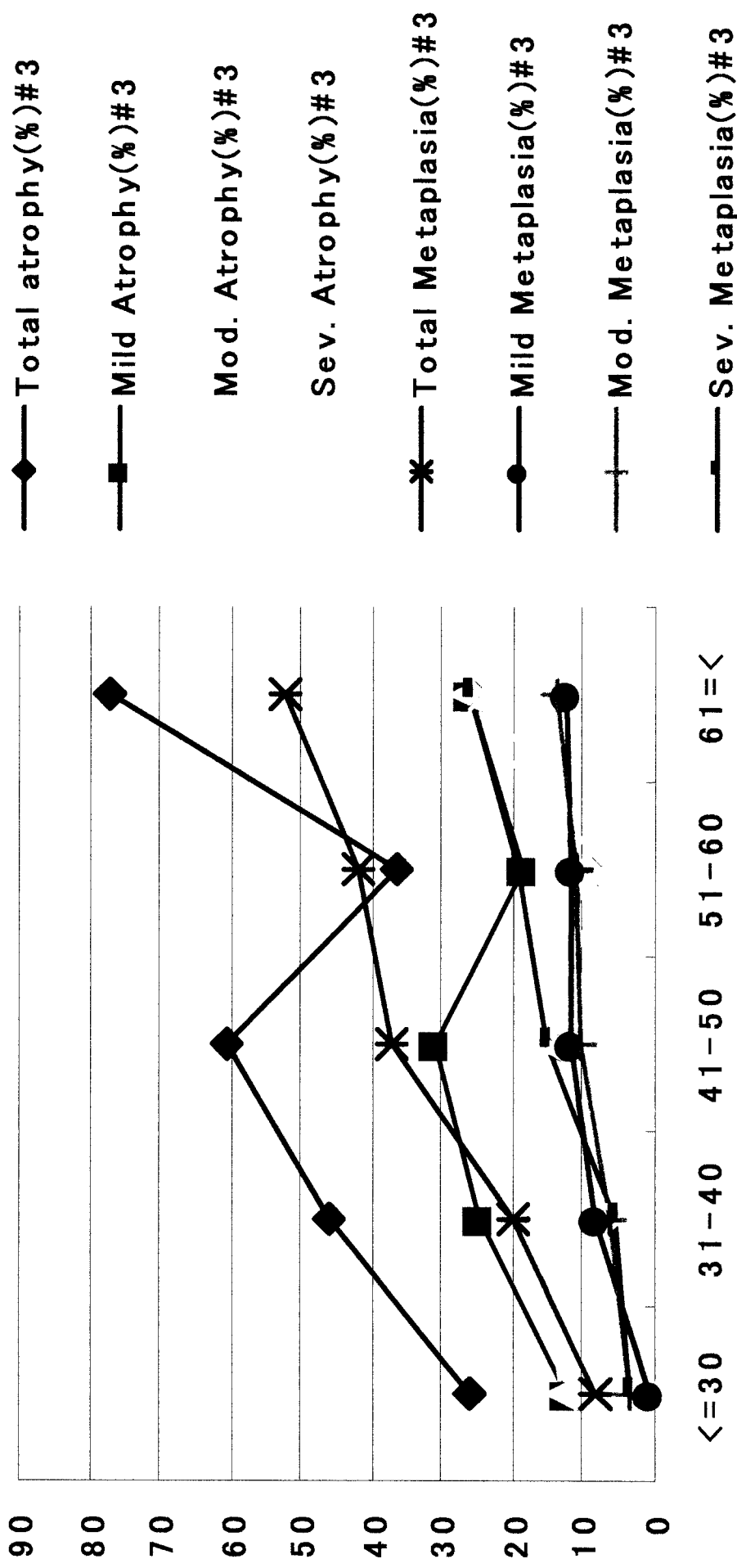
# 日本人東京HP陽性群の萎縮、腸上皮化生



# 日本人東京HP陰性群の萎縮、腸上皮化生

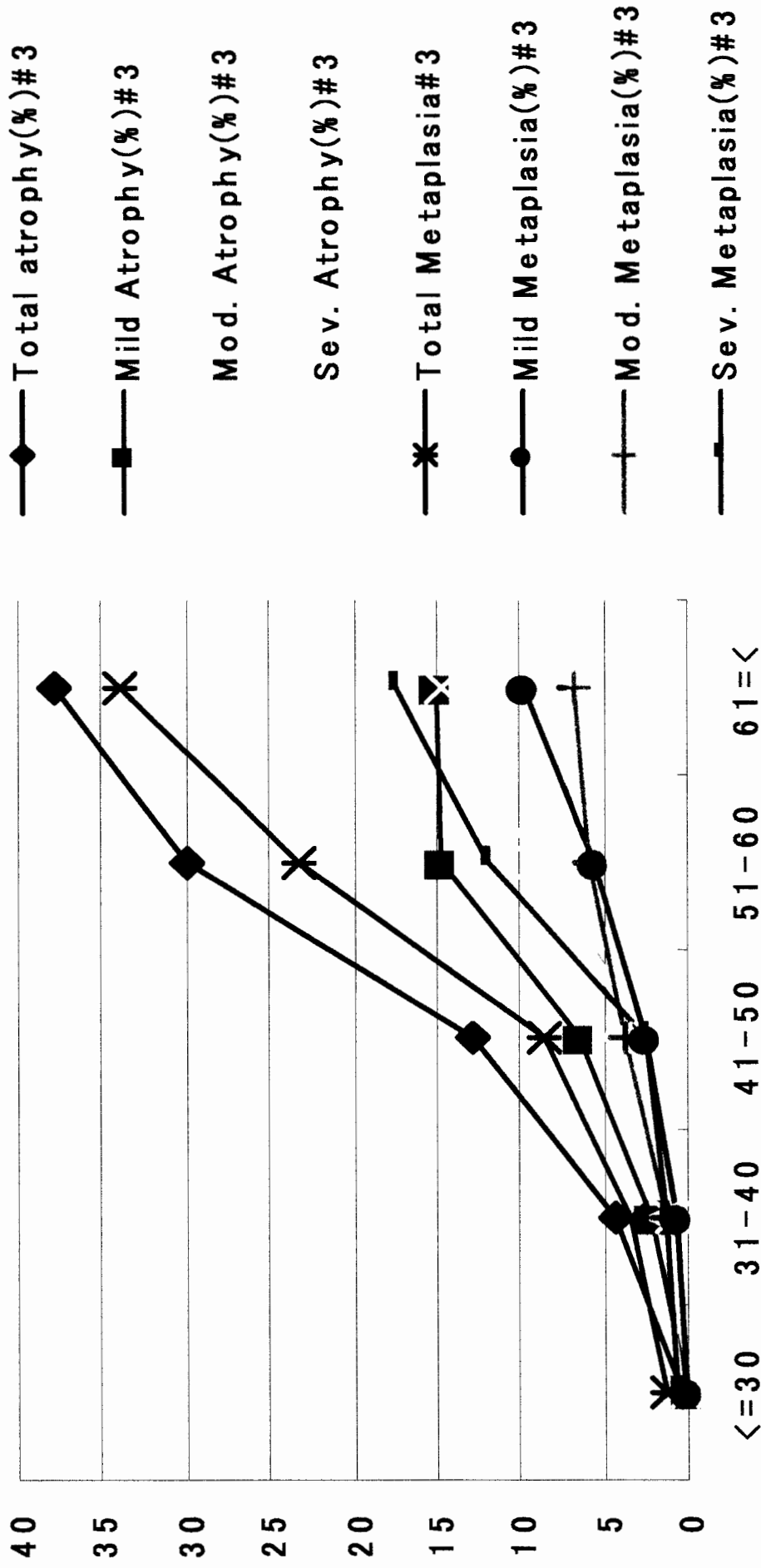


# 日本人東京外HP陽性群の萎縮、腸上皮化生



(年齢群)

# 日本人東京外HP陰性群の萎縮、腸上皮化生



(年齢群)



# 日本病理学会会誌

第89巻 第1号

Proceedings of The Japanese Society of Pathology

2000

**The Japanese Society of Pathology**

Editorial Office : New Akamon Bldg. 4F, 2-40-9 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo, Japan

---

Proc Jpn Soc Pathol ISSN 0300-9181

- 3-113 濾胞性気管支炎の一部検例  
増田 隆夫 (東邦大学 医学部 病理学第二講座) ほか
- 3-114 4カ月間の Highly Active Antiretroviral Therapy (HAART)の後に全身性クリプトコックス症で死亡した後天性免疫不全症候群の1剖検例  
渋谷 和俊 (東邦大学大橋病院病理学講座) ほか
- 3-115 MAC感染症の2剖検例  
池田 雄史 (国立療養所南京都病院) ほか
- 3-116 侵襲性肺アスペルギルス症の結節性病変の成立機序に関する病理学的研究  
安藤 常浩 (東邦大学 大橋病院 病理学教室) ほか
- 3-117 末梢血幹細胞移植、骨髄移植後に全身性トキソプラズマ症を発症した2剖検例  
清水辰一郎 (東京都立駒込病院 病理科) ほか
- 3-118 血球貪食症候群を伴った cytomegalovirus 関連胃潰瘍の4剖検例  
西原 弘治 (防衛医科大学校 検査部) ほか
- 3-119 *Helicobacter pylori* (HP)関連胃潰瘍の mucosa-associated lymphoid tissue (MALT)と所属リンパ節における inducible nitric oxide (iNOS)の発現の機序の検討  
蓮井 和久 (鹿児島大学 医学部 医学科 病理学第2講座) ほか
- 3-120 *H. pylori*感染胃粘膜におけるマスト細胞の出現と stem cell factor について  
馬場 史道 (滋賀医科大学 病理学第一講座) ほか
- 3-121 地域、民族差による *H. Pylori*感染と粘膜萎縮、腸上皮化生の関係の組織学的検討 (第3報)  
山田 宣孝 (日本医科大学第二病理学教室) ほか
- 3-122 ボウシテナガザルからの B型肝炎ウイルスゲノムの分離  
相羽 直人 (国立感染症研究所 感染病理部) ほか
- 3-123 エキノコックス症の一部検例  
長谷川 剛 (新潟大学医学部第2病理) ほか
- 3-124 TTV 単独陽性患者の肝生検40例の病理組織学的検討  
深澤雄一郎 (幌南病院 臨床検査科)
- 3-125 各種霊長類における TTV DNAの検出と simian-TTVの分離  
稲見 知子 (国立感染症研究所 感染病理部) ほか
- 3-126 マラリア感染胎盤の組織学的検討  
杉山 達朗 (秋田大学 医学部 病理学第二講座) ほか
- 3-127 “*de novo*”型子宮頸部扁平上皮癌における HPV 陽性像  
古田 玲子 (癌研究所 病理部) ほか
- 3- 中国新疆ウイグル自治区の Kaposi 肉腫(第2報告)  
派祖拉 地力努尔 (東京医科大学第二病理講座) ほか
- 3-129 *Listeria monocytogenes*感染におけるマクロファージスカベンジャー受容体(MSR-A)の役割  
石黒 卓朗 (新潟大学 医学部 第二病理学講座) ほか
- 3-130 伝染性単核球症候群のリンパ節病変12例の臨床病理学的検討  
小島 勝 (獨協医科大学 第一病理) ほか
- 3-131 EBウイルス感染による血球貪食症が結核重複感染によって重篤化したと考えられる一部検例  
叶 春霖 (藤田保健衛生大学 医学部 病理学講座) ほか
- 3-132 大脳白質に JCウイルス抗原陽性突起膠細胞が広範に見られたが、PMLに特徴的な脱髄巣を伴わなかった AIDSの一部検例  
青木 直人 (東京都立衛生研究所 病理) ほか
- 3-133 JC virus 外殻蛋白 VP1の粒子形成に関する研究  
駒込 理佳 (北海道大学 医学部 分子細胞病理、CREST JST) ほか
- 3-134 HTLV-I Tax 蛋白による JC virus (JCV) promoter の神経/グリア細胞特異的な活性化  
岡田 由紀 (北海道大学 医学部 分子細胞病理学、CREST JST) ほか
- 3-135 Sezary 症候群に合併したサイトメガロウイルス感染症の一部検例

第 89 回日本病理学会総会、会場；大阪国際会議場

演題番号；P-3-121(示説)抄録

地域、民族差による H. Pylori 感染と粘膜萎縮、腸上皮化生の関係の  
組織学的検討（第 3 報）

1) 日本医大第二病理、2) 同附属病院病理部、3) 同多摩永山病院内  
視鏡科

山田宣孝、浅野伍郎 1) 温敏、杉崎祐一 2) 松久威史 3)

【目的】胃癌の発生に関連するとされる粘膜萎縮、腸上皮化生の発生  
因子を明らかにするため調査を行った。

【材料と方法】外来患者,日本人 7529 例（東京、東京外）,中国人、257  
例（北京）、207 例（福建省）、189 例（広東省）、ベトナム人 379 例（ホ  
ーチン）、タイ人 516 例（チェンマイ） 276 例（バンコク）に胃内視鏡下,三定  
点生検を施行、H.E. 菌、免疫染色を行い The Sydney system により組  
織学的に評価、菌陽性群、陰性群に分け、年齢群別に、粘膜萎縮、腸  
上皮化生を胃角上部で比較した。

【結果】日本人は他民族と比較して胃潰瘍は 3-8 倍、他の胃病変は約 2 倍、十二指腸潰瘍は 0.6-0.9 倍であった。H. Pylori 感染率は全年齢群でタイ人が最も高く、粘膜萎縮、腸上皮化生は全年齢群で日本人が最も高かった。日本人菌陽性群では粘膜萎縮、腸上皮化生とも若年群より始まり加齢とともに増加、一方、H. Pylori 陰性群では中年群までは稀であるが、高年群で著しく増加していた。中国福建省では日本人に近い結果を得た。

【考察】粘膜萎縮、腸上皮化生の進展は、H. Pylori 感染の他、環境因子、民族移動を含む宿主側の因子の関与により規定される可能性が示唆された。

発表原稿：別紙参照

日本財団補助金による

1999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—

2000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 野村大成   
所属機関名 大阪大学医学部医学科  
職名 教授 年齢 58 才  
所在地 565-0871 大阪府吹田市山田丘2-2 (B4)  
電話 06-6879-3811 (直通) 内線           

1. 研究課題

中国河南林県における食道癌高発の原因究明と予防

2. 研究期間 自 1999年 4月 1日 ~ 至 2000年 3月 15日

3. 研究組織

日本側研究者氏名 野村大成 (58才)  
所属機関 大阪大学医学部医学科 職名 教授  
中国側研究者氏名 唐勁天 (40才)  
所属機関 中国中日友好病院 職名 放射腫瘍科・副部長

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。

研究テーマ 中国河南林県における食道癌高発の原因究明と予防

研究代表者氏名 野村大成

所属 大阪大学大学院医学系研究科

役職 教授

要旨 中国河南林県は、世界でも最高率の食道癌発生率で知られている。同県における食道癌患者手術標本腫瘍部と同周辺正常組織の遺伝子変異を調査したところ、高率に*p53*癌抑制遺伝子の突然変異が検出された。周辺正常組織においても高率に*p53*遺伝子の突然変異が検出されたが、腫瘍部位の突然変異スペクトルはG-Aのtransitionが多く、環境癌原・変異原物質（ニトロサミン等）の関与も疑われる。

KEY WORDS Esophageal cancer, Genetic change, China, Henan-Linxian, High Susceptibility Area, *p53* mutation

## 研究報告

目的 食道癌の発病率は、アメリカで5.8~20.5/10万人、日本で20.7/10万人であるが、中国河南省林県の発病率は478.87/10万人と、世界で一番高い地域である。また年死亡率をとってみても、日本、アメリカは約5/10万人であるが、中国河南林県は303.37/10万人と極めて高い。ちなみに中国でも雲南省は1.41/10万人である。

一方、日本においても奈良県など食道癌高発地域があり、その原因究明が進んでいる。特に、食道癌と関連する癌抑制遺伝子(*p53*, *Rb*, *APC*, *MTS-1*)、や癌遺伝子(*c-myc*, *erb*, *EGFR*, *hst-1*, *int-2*, *cyclin D1*, *bcl-2*)などの遺伝子変異の追求がなされている。

中国における共同研究者である唐勁天博士は、大阪大学医学部大学院学生等として5年間、食道癌等悪性腫瘍の放射線治療法を学び、中国帰国後も中日友好病院にて食道癌等の治療を行っている。一方、大阪大学においては、悪性腫瘍の遺伝子診断、原因遺伝子の追求、治療などが高度に進んでおり、中日友好病院等では不可能な研究手段を用いることができる。同博士により、河南林県に発生した食道癌の疫学調査と病理標本の収集を行い、同県における食道癌の高発原因を遺伝子レベルで解明するのを目的とした。

本共同研究を行うことにより、中国河南林県における食道癌高発の原因物質、あるいは食道癌そのものの発生原因の解明がなされることが期待され、食道癌の予防、治療に結びつくものと考えられる。また、本共同研究を行うことにより、中国、日本の学術研究レベルの向上に大いに役立つものと考えられる。

**方法** 中国河南林県における食道癌病理標本の収集を行い、病理標本から、*p53* 癌抑制遺伝子、*K-ras*, *c-kit*, *catenin* 遺伝子について、大阪大学で行っている迅速高感度検出法 (Cold-SSCP) により、突然変異を検出し、そのスペクトロムを調べ、化学物質 (ニトロサミン他) に特有の突然変異があるかどうか調査した (1-4)。

また、大阪大学医学部で維持している、拒絶反応をなくした重度複合免疫不全マウス (SCID) にヒト正常食道組織を移植し、継代維持を行い、実験動物などで食道癌を特異的に誘発するとされているニトロサミン、例えば、*N-amyl-N-methylnitrosamine* を作用させ、ヒト正常食道に誘発される *p53*, *ras* 等の遺伝子変異を同定し、中国河南林県におけるものと同一かどうか調べた。

**結果** 中国河南林県地方における食道癌患者24症例より食道癌手術標本を入手できた (表1)。年齢は39-70才で、いずれも病理組織診断は扁平上皮癌であった。そのうち食道癌組織22例、周辺正常組織17例について、*p53*, *c-kit*, *β-catenin* および *K-ras* 遺伝子の突然変異を我々の開発した Cold-SSCP-direct sequence法にて解析した。食道癌患者腫瘍組織22例中10例に *p53*, *c-kit*, *β-catenin* および *K-ras* 遺伝子の突然変異が単独あるいは、重複して検出された。その中でも9例に *p53* 癌抑制遺伝子に18個の突然変異が検出されている。食道癌周辺正常組織17例中12例においても何らかの突然変異が検出され、そのうち9例に *p53* 遺伝子に10個の突然変異が検出されている。*c-kit* 遺伝子の突然変異は食道癌組織22例中2例 (症例1, 20) に、*β-catenin* の突然変異は2例 (症例1, 14) に、*K-ras*の突然変異も2例 (症例2, 20) に検出された。*p53* 癌抑制遺伝子の突然変異に比べてかなり低かった。

*p53*遺伝子については、食道癌病例のうち、*p53* 突然変異をもった癌組織6例中4例に周辺正常組織にも突然変異が検出されているが、同一の突然変異ではなかった。発癌以前に *p53* 遺伝子の変異は発生しているものと思われる。また、興味深いことに食道癌組織の18突然変異中、G-A Transitionが8つ、deletion (6, 16 bp) が2つあるのに対し、周辺正常部では10突然変異中G-A Transitionは1つ、deletionは存在しなかった。GuanineのO<sup>6</sup>部位のalkylation等が関与しているものと考えられる。

SCIDマウスに移植したヒト正常食道組織11片に対し、AMNを毎週作用させたところ、9片で *p53* 遺伝子に同様の突然変異が検出された。*K-ras* 遺伝子の突然変異は全く検出されなかった。

**考察** 食道癌の原因としてタバコ、アルコール類、熱いもの、真菌の感染、化学物質、細菌毒素、栄養の関連、不明の微量物質、動物実験では、アカラシマウスを用いた食物充満と停留による高発癌などがあると考えられているが、河南林県における極めて高い発病率は、*p53*癌抑制遺伝子の突然変異のパターンからニトロサミン系化学物質の関与が疑われる。

## 参考文献

1. Hongyo, T., Weghorst, C. M., et al. 'Cold SSCP': a simple, rapid and non-radioactive method for optimized single-strand conformation polymorphism analyses. *Nucl. Acids Res.*, 21: 3637-3642, 1993.
2. Nomura, T., Nakajima, H., Hongyo, T., Taniguchi, E., Fukuda, K., Li Y. L., Kurooka, M., Sutoh, K., Hande, P. M., Kawaguchi, T., Ueda, M. and Takatera, H. Induction of cancer, actinic keratosis and specific *p53* mutations by ultraviolet light B in human skin maintained in SCID mice. *Cancer Res.*, 57: 2081-2084, 1997.
3. Hongyo, T., Kurooka, M., Taniguchi, E., Iuchi, K., Nakajima, Y., Aozasa, K. and Nomura, T. Frequent *p53* Mutations at Dipyrimidine Sites in Patients with Pyothorax-associated Lymphoma(PAL). *Cancer Res.*, 58: 1105-1107, 1998.
4. Hongyo, T., Li, T., Syaifudin, M., Baskar, R., Ikeda, H., Kanakura, Y., Aozasa, K. and Nomura, T. Specific *c-kit* Mutations in Sinonasal NK/T-Cell Lymphoma in China and Japan. *Cancer Res.*, 2000 (in press).



表1 河南林県地区における食道癌手術標本

症例	年齢	性別	病理診断	手術年時	病巣部位	術前治療	検査標本	
1	65	男	扁平上皮癌	1997	上部	なし	腫瘍部	—
2	48	男	扁平上皮癌	1997	上部	放射線治療	腫瘍部	周辺組織
3	39	男	扁平上皮癌	1998	下部	なし	腫瘍部	—
4	61	女	扁平上皮癌	1998	下部	なし	腫瘍部	周辺組織
5	40	男	扁平上皮癌	1998	下部	なし	腫瘍部	周辺組織
6	70	女	扁平上皮癌	1998	中部	放射線治療	—	周辺組織
7	54	男	扁平上皮癌	1998	中部	なし	—	周辺組織
8	70	女	扁平上皮癌	1999	下部	なし	腫瘍部	周辺組織
9	50	男	扁平上皮癌	1999	中部	なし	腫瘍部	周辺組織
10	66	男	扁平上皮癌	1999	上部	なし	腫瘍部	周辺組織
11	43	男	扁平上皮癌	1999	中部	なし	腫瘍部	周辺組織
12	60	男	扁平上皮癌	1999	上部	放射線治療	腫瘍部	周辺組織
13	62	男	扁平上皮癌	1999	上部	なし	腫瘍部	周辺組織
14	60	女	扁平上皮癌	1999	上部	なし	腫瘍部	周辺組織
15	51	男	扁平上皮癌	1999	上部	なし	腫瘍部	周辺組織
16	67	男	扁平上皮癌	1999	上部	なし	腫瘍部	周辺組織
17	53	女	扁平上皮癌	1999	中部	なし	腫瘍部	周辺組織
18	49	男	扁平上皮癌	1999	上部	なし	腫瘍部	—
19	57	女	扁平上皮癌	1999	下部	なし	腫瘍部	—
20	61	男	扁平上皮癌	1999	下部	化学療法	腫瘍部	周辺組織
21	63	男	扁平上皮癌	1999	下部	なし	腫瘍部	—
22	65	女	扁平上皮癌	1999	中部	放射線治療	腫瘍部	—
23	60	男	扁平上皮癌	1999	中部	なし	腫瘍部	周辺組織
24	54	男	扁平上皮癌	1999	—	—	腫瘍部	—

表2 河南林県地区における食道癌手術標本腫瘍組織における突然変異

症例	年齢	性別	突然変異	コドン	塩基変異	アミノ酸変異
1	65	M	<i>c-kit</i> (17)	825	GTT-GCT	Val-Ala
			<i>β-catenin</i>	20	GCG-GCA	Ala-Ala
2	48	M	<i>p53</i> (4)	111	CTG-CTA	Leu-Leu
				131	GGG-GAG	Gly-Glu
			K-ras (1)	22	CAG-CAA	Gln-Gln
3	39	M	none			
4	61	F	<i>p53</i> (5)	179	CCA-CTA	Pro-Leu
5	40	M	none			
8	70	F	<i>p53</i> (4)	107	TAC-TAT	Tyr-Tyr
9	50	M	none			
10	66	M	none			
11	43	M	<i>p53</i> (4)	102	ACC-ACT	Thr-Thr
				135	CAT-TAT	His-Tyr
			<i>p53</i> (5)		16bp deletion	
12	60	M	none			
13	62	M	none			
14	60	F	<i>p53</i> (4)	131	GGG-GAG	Gly-Glu
			<i>p53</i> (6)	196	CGA-TGA	Arg-stop
			<i>β-catenin</i>	57	GTG-ATG	Val-Met
15	51	M	none			
16	67	M	none			
17	53	F	none			
18	49	M	<i>p53</i> (7i)	242	CTG-CCG	Leu-Pro
19	57	F	none			
20	61	M	<i>p53</i> (4)	111	CTG-CTA	Leu-Leu
				131	GGG-GAG	Gly-Glu
			<i>p53</i> (5)	152	CCG-CCA	Pro-Pro
			<i>p53</i> (6)	208	GAC-AAC	Asp-Asn
			<i>p53</i> (7i)	250	CCC-TCC	Pro-Ser
			K-ras (1)	18	GCC-ACC	Ala-Thr
			<i>c-kit</i> (17)	825	GTT-GCT	Val-Ala
21	63	M	<i>p53</i> (6)	208	GAC-AAC	Asp-Asn
			<i>p53</i> (7i)	248	CGG-TGG	Arg-Trp
22	65	F	none			
23	60	M	none			
24			<i>p53</i> (4)		6bp deletion	

( ): エキソン

表3 河南林県地区における食道癌手術標本周辺正常組織における突然変異

症例	年齢	性別	突然変異	コドン	塩基変異	アミノ酸変異
2	48	M	<i>p53</i> (7i)	256	ACA-GCA	Thr-Ala
			<i>c-kit</i> (17)	825	GTT-GCT	Val-Ala
4	61	F	<i>p53</i> (5)	144	CAG-CGG	Gln-Arg
			<i>c-kit</i> (17)	825	GTT-GCT	Val-Ala
5	40	M	<i>c-kit</i> (17)	825	GTT-GCT	Val-Ala
6	70	F	<i>p53</i> (5)	145	CTG-CTA	Leu-Leu
7	54	M	<i>p53</i> (4)	111	CTG-CAG	Leu-Gln
8	70	F	<i>p53</i> (5)	141	TGC-TGT	Gys-Cys
			<i>p53</i> (7i)	256	ACA-GCA	Thr-Ala
			<i>β-catenin</i>	55	GAG-AAG	Glu-Lys
				14	ATG-ATA	Met-Ile
			<i>c-kit</i> (17)	825	GTT-GCT	Val-Ala
9	50	M	none			
10	66	M	none			
11	43	M	<i>p53</i> (4)	107	TAC-TAT	Tyr-Tyr
			<i>β-catenin</i>	40	ACT-ACC	Thr-Thr
			<i>c-kit</i> (17)	825	GTT-GCT	Val-Ala
12	60	M	<i>c-kit</i> (17)	825	GTT-GCT	Val-Ala
13	62	M	<i>p53</i> (4)	58	TTG-TGG	Leu-Trp
14	60	F	<i>c-kit</i> (17)	825	GTT-GCT	Val-Ala
15	51	M	none			
16	67	M	none			
17	53	F	<i>p53</i> (5)	144	CAG-CGG	Gln-Arg
20	61	M	none			
23	60	M	<i>p53</i> (7i)	268	CCT-TCT	Pro-Ser

( ): エキソン

日本財団補助金による


1999 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－

2000 年 3 月 9 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 宮沢裕夫   
所属機関名 松本歯科大学  
職 名 主任教授 年齢 51 才  
所 在 地 〒399-0781 長野県塩尻市広丘郷原1780  
電話 0263-51-2105 内線 \_\_\_\_\_

1. 研究課題

中国人小児の歯科疾患実態調査

2. 研究期間 自 1999 年 4 月 1 日 ~ 至 2000 年 3 月 15 日

3. 研究組織

日本側研究者氏名 宮沢裕夫 (51才)  
所属機関 松本歯科大学 職名 教授

中国側研究者氏名 石 四 箴 (59才)  
所属機関 上海鉄道大学 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。

## 上海市幼稚園児の歯科疾患

### —第4報 1999年度調査結果について—

○齋藤珠実、岩崎 浩、中山 聡、内山盛嗣、  
西村健司、菊田賀子、紀田晃生、園田尚弘、  
宮沢裕夫、石 四箴\*

(松歯大・小児歯、\*上海鉄道大・小児歯)

#### 【目的】

中華人民共和国(以下、中国)では近年、改革開放政策に伴う経済発展により生活環境の変化が著しく、食習慣の多様化による口腔環境への影響、それに伴う小児の齲蝕罹患の増悪が懸念されている。演者らは、中国上海市の幼稚園歯科検診を1996年から実施しており、今回1999年の調査結果について検討を行った。

#### 【資料・方法】

調査は1999年11月に中国上海市、上海師範大学付属幼稚園の3歳から5歳までの園児177名(男児:88名、女児:89名)を対象に口腔内診査を行った。口腔内診査は座位により視診・触診を行った。なお、齲蝕診査は日本の厚生省の検診基準によりC<sub>1</sub>からC<sub>4</sub>までの齲蝕進行度別に検診を行い、歯肉炎に関してはPMA Index(最高値58、最低値0)を用いて行った。

これらの診査をもとに、齲蝕罹患状況、歯肉炎、不正咬合について検討を行った。

#### 【結果】

##### 1. 齲蝕罹患状況について

1) 齲蝕罹患率:被検者177名中罹患者は110名(62.1%)であった。年齢別では3歳児66名中32名(48.5%)、4歳児63名中41名(65.1%)、5歳児48名中37名(77.1%)であった。

2) 齲蝕罹患歯率:現在歯数3511歯に対し罹患歯は455歯(13.0%)であった。年齢別では3歳児1317歯中119歯(9.0%)、4歳児1253歯中166歯(13.3%)、5歳児941歯中170歯(18.1%)であった。

3) 一人平均齲蝕歯数:被検者177名中罹患歯は455歯であり一人平均齲蝕歯数は2.6歯(3歳児1.8歯、4歳児2.6歯、5歳児3.5歯)であった。

4) 齲蝕処置歯率:現在歯数は3511歯に対し41歯(1.2%)であった。年齢別では3歳児1317歯中2歯(0.2%)、4歳児1253歯中9歯(0.7%)、5歳児941歯中30

歯(3.2%)であった。

5) 厚生省分類:齲蝕罹患患者110名中A型58名(52.7%)、B型42名(38.2%)、C2型12名(9.1%)であり、C1型は認められなかった。

##### 2. 歯肉炎について

被検者177名中罹患者は3名(1.7%)であった。年齢および男女別では4歳男児1名(2.6%)、4歳女児1名(4.0%)、5歳女児1名(3.7%)であり、3歳男女児および5歳男児には認められなかった。さらに、PMA Indexは4歳男児で20、4歳女児で5および5歳女児では1であった。

##### 3. 不正咬合について

被検者177名中不正咬合は21名(11.9%)に認められた。

1) 反対咬合:177名中11名(6.2%)で、年齢および男女別では3歳男児29名中3名(10.3%)、4歳男児38名中4名(10.5%)、5歳男児21名中1名(4.8%)であり、3歳女児37名中5名(13.5%)、4歳女児25名中4名(16.0%)、5歳女児27名中2名(7.4%)であった。

2) 開咬:177名中2名(1.1%)で、年齢および男女別では3歳男児29名中1名(3.5%)、3歳女児37名中1名(2.7%)であった。

#### 【考察】

本調査結果より齲蝕、歯肉炎および不正咬合の罹患率あるいは重症度共に先人の報告に比べ低い値であった。その要因としては調査人数が少ないことや検診を1996年から継続して行っていることで、調査幼稚園での口腔衛生に関する意識の向上等が要因として考えられた。

齲蝕は多因子性の疾患であり、さまざまな要因が関与しているが、その中でも生活環境の影響は大きな因子といえる。日本がかつて経験した「齲蝕の洪水」の時期を迎えないとも限らない。その予防対策としては、的確かつ有効な口腔衛生指導・予防のための実態を把握することが必要であり、林ら<sup>1)</sup>も報告しているように現状にあった具体的な予防の対策や口腔衛生実施指導の普及と定着が重要である。また、処置歯率が低いことから、歯科医療関係者の人材を確保し、予防の教育および指導法を修得させ広く普及させる必要がある。

#### 【文献】

1) 林 芳裕ほか:上海市小児の歯科疾患実態調査, 歯科学報, 96(6):577-584, 1996.

## 上海市幼稚園児の歯科疾患

—第4報 1999年度調査結果について—

○齋藤珠実、岩崎 浩、中山 聡、内山盛嗣、  
西村健司、菊田賀子、紀田晃生、園田尚弘、  
宮沢裕夫、石 四箴\*

(松歯大・小児歯、\*上海鉄道大・小児歯)

### 【目的】

中華人民共和国(以下、中国)では近年、改革開放政策に伴う経済発展により生活環境の変化が著しく、食習慣の多様化による口腔環境への影響、それに伴う小児の齲蝕罹患の増悪が懸念されている。演者らは、中国上海市の幼稚園歯科検診を1996年から実施しており、今回1999年の調査結果について検討を行った。

### 【資料・方法】

調査は1999年1月に中国上海市、上海師範大学付属幼稚園の3歳から5歳までの園児177名(男児:88名、女児:89名)を対象に口腔内診査を行った。口腔内診査は座位により視診・触診を行った。なお、齲蝕診査は日本の厚生省の検診基準によりC<sub>1</sub>からC<sub>4</sub>までの齲蝕進行度別に検診を行い、歯肉炎に関してはPMA Index(最高値58、最低値0)を用いて行った。

これらの診査をもとに、齲蝕罹患状況、歯肉炎、不正咬合について検討を行った。

### 【結果】

#### 1. 齲蝕罹患状況について

1) 齲蝕罹患率:被検者177名中罹患者は110名(62.1%)であった。年齢別では3歳児66名中32名(48.5%)、4歳児63名中41名(65.1%)、5歳児48名中37名(77.1%)であった。

2) 齲蝕罹患歯率:現在歯数3511歯に対し罹患歯は455歯(13.0%)であった。年齢別では3歳児1317歯中119歯(9.0%)、4歳児1253歯中166歯(13.3%)、5歳児941歯中170歯(18.1%)であった。

3) 一人平均齲蝕歯数:被検者177名中罹患歯は455歯であり一人平均齲蝕歯数は2.6歯(3歳児1.8歯、4歳児2.6歯、5歳児3.5歯)であった。

4) 齲蝕処置歯率:現在歯数は3511歯に対し41歯(1.2%)であった。年齢別では3歳児1317歯中2歯(0.2%)、4歳児1253歯中9歯(0.7%)、5歳児941歯中30

歯(3.2%)であった。

5) 厚生省分類:齲蝕罹患患者110名中A型58名(52.7%)、B型42名(38.2%)、C2型12名(9.1%)であり、C1型は認められなかった。

#### 2. 歯肉炎について

被検者177名中罹患者は3名(1.7%)であった。年齢および男女別では4歳男児1名(2.6%)、4歳女児1名(4.0%)、5歳女児1名(3.7%)であり、3歳男女児および5歳男児には認められなかった。さらに、PMA Indexは4歳男児で20、4歳女児で5および5歳女児では1であった。

#### 3. 不正咬合について

被検者177名中不正咬合は21名(11.9%)に認められた。

1) 反対咬合:177名中11名(6.2%)で、年齢および男女別では3歳男児29名中3名(10.3%)、4歳男児38名中4名(10.5%)、5歳男児21名中1名(4.8%)であり、3歳女児37名中5名(13.5%)、4歳女児25名中4名(16.0%)、5歳女児27名中2名(7.4%)であった。

2) 開咬:177名中2名(1.1%)で、年齢および男女別では3歳男児29名中1名(3.5%)、3歳女児37名中1名(2.7%)であった。

### 【考察】

本調査結果より齲蝕、歯肉炎および不正咬合の罹患率あるいは重症度共に先人の報告に比べ低い値であった。その要因としては調査人数が少ないことや検診を1996年から継続して行っていることで、調査幼稚園での口腔衛生に関する意識の向上等が要因として考えられた。

齲蝕は多因子性の疾患であり、さまざまな要因が関与しているが、その中でも生活環境の影響は大きな因子といえる。日本がかつて経験した「齲蝕の洪水」の時期を迎えないとも限らない。その予防対策としては、的確かつ有効な口腔衛生指導・予防のための実態を把握することが必要であり、林ら<sup>1)</sup>も報告しているように現状にあった具体的な予防の対策や口腔衛生実施指導の普及と定着が重要である。また、処置歯率が低いことから、歯科医療関係者の人材を確保し、予防の教育および指導法を修得させ広く普及させる必要がある。

### 【文献】

1) 林 芳裕ほか:上海市小児の歯科疾患実態調査, 歯科学報, 96(6):577-584, 1996.

研究テーマ

中国人小児の歯科疾患実態調査

研究代表者 : 宮沢 裕夫

所属 : 松本歯科大学小児歯科学講座

役職 : 主任教授

## 要 旨

中国上海市上海師範大学付属幼稚園児 177 名を対象に歯科疾患実態を把握する目的で、歯科検診を実施し、以下の結果を得た。

1. 齲蝕罹患者率は 3 歳児 48.5 % , 4 歳児 65.1 % , 5 歳児 77.1 % であり、増齡的に増加傾向を示した。また一人平均齲歯数は 3 歳児 1.8 歯、4 歳児 2.6 歯、5 歳児 3.5 歯であり、増齡的に増加傾向を示した。
2. 歯肉炎は 1.7 % に認められ、全体的に少ない傾向を示した。
3. 不正咬合は反対咬合 10.7 % , 開咬 1.1 % であった。また、正常咬合においては 16.4 % であり、ターミナルプレーンは近心段階型の発現は高率であった。
4. 歯牙異常は癒合歯 4.0 % , 先天性欠如 1.1 % , 矮小歯 0.6 % , 形成不全 0.6 % , 歯牙色素沈着 2.8 % に認められた。また地図状舌は 2.8 % の発現が認められた。
5. 歯冠形態からは中国人の特徴と考えられる所見は得られなかった。
6. 異常結節は Carabelli 結節の発現頻度は 73.1 % , Protostylid の発現頻度は 49.2 % であり、Carabelli 結節および Protostylid の発達状態は弱いものの、発現頻度は高い傾向を示した。

KEY WORDS : 上海市小児 , 歯科疾患実態 , 乳歯列咬合 , 歯冠形態 , 歯牙異常



## 研究報告

### 【目的】

近年、中華人民共和国（以下中国と略称）での経済発展は著しく、特に食生活の変化に伴う口腔環境の悪化による小児の口腔疾患の増加が懸念されている。また、一人っ子政策による健康に対する意識向上とともに保護者の口腔疾患の予防への関心は深まりつつある。

そこで、都市部を中心に増加傾向にある齲蝕をはじめとする口腔疾患に対し、その実態調査が実施されているが、小児の歯科予防や治療は現在、最重要課題として進められている<sup>1-3)</sup>。一方、小児歯科臨床においては将来的な永久歯列を予測するために重要な情報である乳歯歯冠幅径、歯列弓幅径・長径および咬合状態を把握することは、咬合育成の重要な課題であるが、中国全土での基準値の設定は未だ報告されていない。

しかしながら、中国の歯科医療の現状は、歯科医師数を例にとると、1990年初頭は人口10万人に一人と少ない状況で現在でも約4万人に一人とされ<sup>4)</sup>、都市部での偏りが強く、農村部での予防や治療はほとんど行われていないのが現状である。

本講座では1989年より1992年まで河北省衛生庁の協力により中国石家荘市の小児歯科疾患実態調査<sup>1)</sup>を実施した。また、1996年からは上海鉄道大学歯学部小児歯科学講座との共同研究の一環として上海師範大学付属幼稚園の園児を対象として小児歯科疾患実態調査<sup>5)</sup>を行っている。

我々は、可能な限り中国諸地域の調査を行い、中国人小児の歯科疾患の特徴や成長・発達に関する諸項目の基準値を明確にすることを目的に1999年に実施した上海の幼稚園児を対象とした歯科疾患実態調査について報告する。

## 【 調 査 対 象 お よ び 方 法 】

### 調 査 対 象

上 海 師 範 大 学 付 属 幼 稚 園 の 3 歳 から 5 歳 の 園 児 177 名 ( 男 児 88 名 , 女 児 89 名 ) を 対 象 に 行 っ た ( 表 1 ) .

### 資 料

口 腔 検 診 表 , 口 腔 内 写 真 お よ び 歯 列 模 型 を 用 い ,

1. 齲 蝕
2. 歯 周 疾 患
3. 歯 列 咬 合
4. 歯 牙 異 常
5. 地 図 状 舌
6. 歯 冠 形 態
7. 異 常 結 節

に つ い て 検 討 を 行 っ た .

な お , 比 較 検 討 を 行 う に あ た っ て は  $\chi^2$  検 定 を 用 い た .

### 方 法

#### 1. 齲 蝕

検 診 表 から 厚 生 省 歯 科 疾 患 実 態 調 査<sup>7)</sup> に 準 じ , 以 下 の 項 目 に つ い て 検 討 を 行 っ た .

- 1 ) 罹 患 状 況
- 2 ) 齲 蝕 罹 患 者 率
- 3 ) 齲 蝕 罹 患 歯 率
- 4 ) 一 人 平 均 齲 蝕 数
- 5 ) 処 置 歯 率
- 6 ) 厚 生 省 分 類

#### 2. 歯 肉 炎

PMA Index を 用 い , 検 診 表 から 炎 症 の 有 無 に つ い て 検 討 を 行 っ た .

#### 3. 歯 列 咬 合

#### 1) 不正咬合

検診表から反対咬合および開咬について検討を行った。

#### 2) 正常咬合

検診表（視診）にて正常咬合と考えられたものの中から、さらに歯列模型を用い、日本小児歯科学会正常咬合の分類基準<sup>9)</sup>に沿った歯列模型を対象に乳歯歯冠近遠心幅径、歯列弓幅径・長径、咬合高径、歯間空隙、第2乳臼歯および乳犬歯咬合状態について計測を行った（図1）。なお、乳歯列弓計測に際し、歯列弓の大きさについては成長による変化を考慮し、3・4歳の低年齢児群と5歳の高年齢児群の2群に分類した（表2）。

歯列弓の大きさに関する統計学的分析方法はt検定を用いた。

#### 4. 歯牙異常

検診表および歯列模型より検討を行った。

##### 1) 癒合歯

##### 2) 先天性欠如歯

##### 3) 矮小歯

##### 4) 形成不全

##### 5) 歯牙色素沈着

#### 5. 地図状舌

検診表より検討を行った。

#### 6. 歯冠形態（乳臼歯咬合面形態）

各々の項目が観察可能と考えられた、上下顎歯列模型を資料とした。なお、観察は原則として左右側の歯を対象としたが、観察が不明瞭と思われるものは除外した。したがって、対象歯は調査歯種により異なる

( 表 3 ) .

上下顎第1・2乳臼歯歯冠形態は埴原<sup>9)</sup>、<sup>10)</sup>、<sup>11)</sup>が定めた分類基準に従って観察を行った。

## 7. 異常結節

観察は原則として左右側の歯を対象としたが、観察が不明瞭と思われるものは除外した。したがって、対象歯は調査歯種により異なる(表3)。

### 1) Carabelli 結節の観察

Hanihara<sup>12)</sup>の分類基準(Plaque D7)に準じ、発達状態別に8型に区分し、発現頻度を調査した。

### 2) Protostylid の観察

出現頻度および発達段階別に調査を行った。発達段階は埴原<sup>9)</sup>の分類に準じ分類した。

## 【 結 果 】

### 1. 齲蝕

#### 1) 罹患状況

被検者177名中齲蝕罹患者は110名(62.1%)であり、男児88名中52名(59.1%)、女児89名中58名(65.2%)であった(表4)。

#### 2) 齲蝕罹患者率

被検者177名中罹患者は110名(62.1%)であった(表4)。年齢別では3歳児66名中32名(48.5%)、4歳児63名中41名(65.1%)、5歳児48名中37名(77.1%)であった。さらに、年齢および男女別では3歳男児29名中16名(55.2%)、4歳男児38名中22名(57.9%)、5歳男児21名中14名(66.7%)であり、3歳女児37名中16名(43.2%)、4歳女児25名中19名(76.0%)、5歳女児27名中23名(85.2%)で、男児に比べ女児では増齡的に急激な増加傾向が認められた。

### 3) 齲蝕罹患歯率

現在歯数 3511 歯に対し罹患歯は 455 歯 ( 13.0 % ) であつた ( 表 4 ) . 年齢別では 3 歳児 1317 歯中 119 歯 ( 9.0 % ) , 4 歳児 1253 歯中 166 歯 ( 13.3 % ) , 5 歳児 941 歯中 170 歯 ( 18.1 % ) であつた . さらに , 年齢および男女別では 3 歳男児 578 歯中 59 歯 ( 10.2 % ) , 4 歳男児 714 歯中 76 歯 ( 10.6 % ) , 5 歳男児 412 歯中 60 歯 ( 14.6 % ) であり , 3 歳女児 739 歯中 60 歯 ( 8.1 % ) , 4 歳女児 539 歯中 90 歯 ( 16.7 % ) , 5 歳女児 529 歯中 110 歯 ( 20.8 % ) で , 男児は 4 歳から 5 歳時に , 女児は 3 歳から 4 歳時に著しい増加傾向が認められた .

### 4) 一人平均齲歯数

被検者 177 名中罹患歯は 455 歯であり一人平均齲歯数は 2.6 歯 ( 3 歳児 1.8 歯 , 4 歳児 2.6 歯 , 5 歳児 3.5 歯 ) であつた ( 表 4 ) . 年齢および男女別では 3 歳男児 2.0 歯 , 4 歳男児 2.0 歯 , 5 歳男児 2.9 歯であり , 3 歳女児 1.6 歯 , 4 歳女児 3.6 歯 , 5 歳女児 4.1 歯で , 男児では増齢による増加傾向はほとんど認められないのに対し , 女児では増齢的な増加傾向が認められた .

### 5) 齲蝕処置歯率

現在歯数 3511 歯に対し 41 歯 ( 1.2 % ) であつた ( 表 4 ) . 年齢別では 3 歳児 1317 歯中 2 歯 ( 0.2 % ) , 4 歳児 1253 歯中 9 歯 ( 0.7 % ) , 5 歳児 941 歯中 30 歯 ( 3.2 % ) であつた . さらに , 年齢および男女別では 4 歳男児 714 歯中 1 歯 ( 0.1 % ) , 5 歳男児 412 歯中 16 歯 ( 3.9 % ) であり , 3 歳女児 739 歯中 2 歯 ( 0.3 % ) , 4 歳女児 539 歯中 8 歯 ( 1.5 % ) , 5 歳女児 529 歯中 14 歯 ( 2.7 % ) で , 3 歳男児は認められず , 男女児ともに 5 歳時での処置が多い傾向であつた .

### 6) 厚生省分類

齲蝕罹患者 110 名中 A 型 58 名 ( 52.7 % ) , B 型 42 名 ( 38.2 % ) , C2 型 10 名 ( 9.1 % ) であり , C1 型は認め

られなかった（表5）。年齢別では3歳児66名中A型22名（33.3%）、B型5名（7.6%）、C2型5名（7.6%）、4歳児63名中A型19名（30.2%）、B型20名（31.8%）、C2型2名（3.2%）、5歳児48名中A型17名（35.4%）、B型17名（35.4%）、C2型3名（6.3%）であった。

年齢および男女別でのA型は3歳男児16名中12名（75.0%）、4歳男児22名中11名（50.0%）、5歳男児14名中7名（50.0%）であり、3歳女児16名中10名（62.5%）、4歳女児19名中8名（42.1%）、5歳女児23名中10名（43.5%）、B型は3歳男児16名中2名（12.5%）、4歳男児22名中11名（50.0%）、5歳男児14名中6名（42.9%）であり、3歳女児16名中3名（18.8%）、4歳女児19名中9名（47.4%）、5歳女児23名中11名（47.8%）、C2型は3歳男児16名中2名（12.5%）、4歳男児22名中0名、5歳男児14名中1名（7.1%）であり、3歳女児16名中3名（18.8%）、4歳女児19名中2名（10.5%）、5歳女児23名中2名（8.7%）で、全体的に重症齲蝕は少なかったが、男女別では女児の方がやや重症傾向を示した。

## 2. 歯肉炎

177名中3名（1.7%）に認められ、4歳児63名中2名（3.2%）、5歳児48名中1名（2.1%）であり、3歳児には認められなかった（表6）。

年齢および男女別では4歳男児1名（2.6%）、4歳女児1名（4.0%）、5歳女児1名（3.7%）であり、3歳男女児および5歳男児には認められなかった。

また、PMA Indexは4歳男児で20、4歳女児で5、5歳女児で1であり、全体的に罹患者が少ない傾向を示した。

### 3. 齒列咬合

反対咬合および開咬を有する不正咬合患児は177名中21名(11.9%)に認められ、男女別頻度では男児9名(10.2%)、女児12名(13.5%)であった(表7)。

#### 1) 反対咬合

177名中19名(10.7%)で、年齢別では3歳児66名中8名(12.1%)、4歳児63名中8名(12.7%)、5歳児48名中3名(6.3%)に認められた。年齢および男女別では3歳男児29名中3名(10.3%)、4歳男児38名中4名(10.5%)、5歳男児21名中1名(4.8%)であり、3歳女児37名中5名(13.5%)、4歳女児25名中4名(16.0%)、5歳女児27名中2名(7.4%)に認められ、男女ともに5歳児が最も少なかった。

#### 2) 開咬

177名中2名(1.1%)で、年齢および男女別では3歳男児29名中1名(3.5%)、3歳女児37名中1名(2.7%)であり、4歳児および5歳児には認められなかった。

#### 3) 日本小児歯科学会分類基準<sup>9)</sup>に沿った正常咬合

男児16名(低年齢群8名、高年齢群8名)、女児13名(低年齢群7名、高年齢群6名)を抽出した。

##### (1) 齒冠近遠心幅径

性差は下顎乳中切歯のみに認められたが、その他の齒種では認められなかった(表8)。

##### (2) 齒列弓の大きさ

低年齢児群では全ての計測項目で、男児は女児よりも大きく、上顎 $C_L - C_L(b)$ および下顎 $A - E(i)$ において性差が認められた(表9)。

また高年齢児群では下顎 $A - C_c(g)$ 、Dental Height( $j$ )および $ULA - LLA(k)$ を除く全ての計測項目で、男児は女児よりも大きい傾向を示した、性差は認められなかった(表9)。

### (3) 齒間空隙状態

空隙型は靈長空隙のみ認められるものが上顎 27.6 % , 下顎 17.2 % であり , 靈長空隙と發育空隙が共存しているものは上顎 62.1 % , 下顎 51.7 % , 發育空隙のみが上顎 0.0 % , 下顎 17.2 % であった ( 表 10 ) . また , 空隙の認められなかった閉鎖型は上顎 10.3 % , 下顎 13.8 % であった .

### (4) ターミナルプレーンおよび乳犬歯咬合状態

ターミナルプレーンは , 垂直型 60.3 % , 遠心段階型 10.3 % , 近心段階型 29.3 % であり , 垂直型で性差が認められた ( 表 11 ) . また両側組み合わせ発現頻度は垂直 - 垂直型 44.9 % , 垂直 - 遠心型 17.2 % , 垂直 - 近心型 13.8 % , 近心 - 近心型 20.7 % , 近心 - 遠心型 3.4 % で遠心 - 遠心型は認められなかった ( 表 12 ) .

乳犬歯咬合状態は , I 型 31.0 % , II 型 19.0 % , III 型 50.0 % であり , 各型とも性差は認められなかった ( 表 11 ) .

ターミナルプレーンと乳犬歯咬合状態の組み合わせでは , 垂直 - I 型 19.0 % , 垂直 - II 型 15.5 % , 垂直 - III 型 25.9 % , 遠心 - I 型 3.4 % , 遠心 - II 型 3.4 % , 遠心 - III 型 3.4 % , 近心 - I 型 8.6 % , 近心 - III 型 20.7 % で近心 - II 型は認められなかった ( 表 13 ) .

## 4. 齒牙異常

### 1) 癒合齒

177 名中 7 名 ( 4.0 % ) に認められ , 年齢別では 3 歳児 66 名中 3 名 ( 4.5 % ) , 4 歳児 63 名中 2 名 ( 3.2 % ) , 5 歳児 48 名中 2 名 ( 4.2 % ) に認められた ( 表 14 ) .

年齢および男女別では 3 歳男児 29 名中 2 名 ( 6.9 % ) , 4 歳男児 38 名中 1 名 ( 2.6 % ) , 5 歳男児 21 名中 1 名 ( 4.8 % ) であり , 3 歳女児 37 名中 1 名 ( 2.7 % ) , 4 歳女児 25 名中 1 名 ( 4.0 % ) , 5 歳女児 27 名中 1 名



( 3.7 % ) に認められた。

歯数では現在歯 3511 歯中 14 歯 ( 0.4 % ) であった。  
年齢別では 3 歳児 1317 歯中 6 歯 ( 0.5 % ) , 4 歳児 1253  
歯中 4 歯 ( 0.3 % ) , 5 歳児 941 歯中 4 歯 ( 0.4 % ) に認  
められた。

年齢および男女別では 3 歳男児 578 歯中 4 歯 ( 0.7 % ) ,  
4 歳男児 714 歯中 2 歯 ( 0.3 % ) , 5 歳男児 412 歯中 2 歯  
( 0.5 % ) であり, 3 歳女児 739 歯中 2 歯 ( 0.3 % ) , 4  
歳女児 539 歯中 2 歯 ( 0.4 % ) , 5 歳女児 529 歯中 2 歯  
( 0.4 % ) に認められた。

## 2 ) 先天性欠如

177 名中 2 名 ( 1.1 % ) に認められ, 年齢別では 4 歳  
児 63 名中 1 名 ( 1.6 % ) , 5 歳児 48 名中 1 名 ( 2.1 % )  
であり, 3 歳児には認められなかった ( 表 14 ) 。

年齢および男女別では 4 歳男児 38 名中 1 名 ( 2.6 % )  
および 5 歳女児 27 名中 1 名 ( 3.7 % ) のみであった。

歯数では現在歯 3511 歯中 3 歯 ( 0.1 % ) であった。

年齢および男女別では 4 歳男児 714 歯中 1 歯 ( 0.1 % )  
および 5 歳女児 529 歯中 2 歯 ( 0.4 % ) であった。

## 3 ) 矮小歯

177 名中 1 名 ( 0.6 % ) に認められ, 4 歳児 63 名中 1  
名 ( 1.6 % ) で女児 1 名 ( 4.0% ) のみに認められた ( 表  
14 ) 。また, 歯数では 4 歳女児 539 歯中 1 歯 ( 0.2% )  
であった。

## 4 ) 形成不全

177 名中 1 名 ( 0.6 % ) に認められ, 3 歳児 66 名中 1  
名 ( 1.5 % ) で男児 1 名 ( 4.0% ) のみに認められた ( 表  
14 ) 。また, 歯数では 3 歳男児 578 歯中 1 歯 ( 0.2% )  
であった。

## 5 ) 歯牙色素沈着

177 名中 5 名 ( 2.8 % ) に認められた。

年齢別では 3 歳児 1 名 ( 1.5 % ) , 4 歳児 3 名 ( 1.6

%) および 5 歳児 1 名 ( 1.7 % ) に認められた ( 表 14 ) .  
年齢および男女別では 3 歳男児 29 名中 1 名 ( 3.4 % ) ,  
4 歳男児 38 名中 2 名 ( 5.3 % ) , 5 歳男児 21 名中 1 名  
( 4.8 % ) であり, 4 歳女児 25 名中 1 名 ( 4.0 % ) であ  
り, 3 歳女児および 5 歳女児には認められなかった.  
歯数では現在歯 3511 歯中 5 歯 ( 0.1 % ) であった. 年  
齢別では 3 歳児 1317 歯中 1 歯 ( 0.1 % ) , 4 歳児 1253 歯  
中 3 歯 ( 0.2 % ) , 5 歳児 941 歯中 1 歯 ( 0.1 % ) に認め  
られた.

年齢および男女別では 3 歳男児 578 歯中 1 歯 ( 0.2 % ) ,  
4 歳男児 714 歯中 2 歯 ( 0.3 % ) , 5 歳男児 412 歯中 1 歯  
( 0.2 % ) であり, 4 歳女児 539 歯中 1 歯 ( 0.2 % ) に認  
められた.

## 5. 地図状舌

177 名中 5 名 ( 2.8 % ) に認められた ( 表 15 ) .

年齢別では 3 歳児 2 名 ( 3.0 % ) および 4 歳児 3 名  
( 4.8 % ) であり, 5 歳児には認められなかった.

年齢および男女別では 3 歳男児 29 名中 1 名 ( 3.4 % ) ,  
3 歳女児 37 名中 1 名 ( 2.7 % ) , 4 歳女児 25 名中 3 名  
( 12.0 % ) であり, 4 歳男児には認められなかった.

## 6. 歯冠形態 ( 乳臼歯咬合面形態 )

### 1 ) 上顎第 2 乳臼歯

咬合面型は 197 歯中 4 型 179 歯 ( 90.9 % ) , 4- 型 18 歯  
( 9.1 % ) , 3+ 型, 3 型は認められなかった ( 表 16 ) .  
男女別頻度では男児の 4 型 86 歯 ( 86.0 % ) , 4- 型 14  
歯 ( 14.0 % ) で, 女児の 4 型 93 歯 ( 95.9 % ) , 4- 型 4  
歯 ( 4.1 % ) , 検定の結果, 4 型では女児の方が高い  
発現頻度を示し, 4- 型では男児の方が高い発現頻度  
を示し, とともに性差が認められた.

### 2 ) 上顎第 1 乳臼歯

咬合面型は 202 歯中 2 型 10 歯 ( 5.0 % ) , 3M 型 144 歯 ( 71.3 % ) , 3H 型 16 歯 ( 7.9 % ) , 4- 型 26 歯 ( 12.9 % ) , 4 型 6 歯 ( 3.0 % ) に認められた ( 表 16 ) .

男女別頻度では , 男児の 2 型 4 歯 ( 3.8 % ) , 3M 型 74 歯 ( 69.8 % ) , 3H 型 10 歯 ( 9.4 % ) , 4- 型 13 歯 ( 12.3 % ) , 4 型 5 歯 ( 4.7 % ) , 女児の 2 型 6 歯 ( 6.3 % ) , 3M 型 70 歯 ( 72.9 % ) , 3H 型 6 歯 ( 6.3 % ) , 4- 型 13 歯 ( 13.5 % ) , 4 型 1 歯 ( 1.0 % ) であり , 性差は認められなかった .

### 3 ) 下顎第 2 乳臼歯

咬合面裂溝型は 188 歯中 Y 型 186 歯 ( 98.9 % ) であり , + 型 2 歯 ( 1.1 % ) であった ( 表 17 ) . 男女別頻度では男児は 96 歯全てが Y 型であり , 女児の Y 型 90 歯 ( 97.8 % ) , + 型 2 歯 ( 2.2 % ) であった . 性差は Y 型および + 型ともに認められなかった .

また , 咬頭数も全て 5 咬頭であり , 4 咬頭は認められなかった .

### 4 ) 下顎第 2 乳臼歯における第 6 咬頭

出現頻度は 188 歯中 48 歯 ( 25.5 % ) であり , 男児 25 歯 ( 26.0 % ) , 女児 23 歯 ( 25.0 % ) に認められ性差は認められなかった . また , 咬合面裂溝型では , 男女ともに全て Y 型であった ( 表 18 ) .

### 5 ) 下顎第 2 乳臼歯における第 7 咬頭

出現頻度は 188 歯中 103 歯 ( 54.8 % ) であり , 男児 50 歯 ( 52.1 % ) , 女児 53 歯 ( 57.6 % ) に認められ , 性差は認められなかった ( 表 18 ) .

また , 第 7 咬頭に認められた咬合面裂溝型は , 男女ともに Y 型であった .

次に , 5 咬頭歯で第 7 咬頭を認めるものは 71 歯 ( 37.8 % ) で , 更に 6 咬頭歯で第 7 咬頭を認めるものが , 32 歯 ( 17.0 % ) であり , 5 咬頭歯の方が高く , 有意差が認められた .

## 6) 下顎第1乳臼歯

咬合面裂溝型は196歯中Y型168歯(85.7%)、+型7歯(3.6%)、×型は21歯(10.7%)に認められた(表17)。

男女別頻度では、男児のY型83歯(81.4%)、+型5歯(4.9%)、×型14歯(13.7%)であり、女児のY型85歯(90.4%)、+型2歯(2.1%)、×型7歯(7.4%)に認められ、それぞれ性差は認められなかった。

また咬頭数では、4咬頭149歯(76.0%)、5咬頭47歯(24.0%)であり、6咬頭歯は全く認められなかった。男女別頻度では、男児の4咬頭84歯(82.4%)、5咬頭18歯(17.6%)であり、女児の4咬頭65歯(69.1%)、5咬頭29歯(30.9%)に認められ、各咬頭歯間での性差が認められた。

## 7. 異常結節 (Carabelli 結節、Protostylid)

### 1) Carabelli 結節

上顎第2乳臼歯に対しての出現頻度を調査する目的に歯を抽出し、208歯中152歯(73.1%)に認められた(表19)。男女別頻度では、男児78歯(72.2%)、女児74歯(74.0%)であり、性差は認められなかった。

次に発達状態については、全く認められない0型56歯(26.9%)、1型より3型は痕跡程度のものを含むくぼみ状のもの(carabelli's pit)で、そのうち1型72歯(34.6%)、2型48歯(23.1%)、3型16歯(17.7%)であった。4型から7型までは咬頭状のもの(carabelli's cusp)で、そのうち4型は9歯(4.3%)、5型4歯(1.9%)、6型3歯(1.4%)であり、7型は全く認められなかった(表20)。また男女別頻度では、男児の1型44歯(40.7%)、2型19歯(17.6%)、3型5歯(4.6%)、4型4歯(3.7%)、5型4歯(3.7%)、

6 型 2 齒 ( 1.9 % ) であり , 女児の 1 型 28 齒 ( 28.0 % ) , 2 型 29 齒 ( 29.0 % ) , 3 型 11 齒 ( 11.0 % ) , 4 型 5 齒 ( 5.0 % ) , 5 型 0 齒 ( 0.0 % ) , 6 型 1 齒 ( 1.0 % ) であった . 5 型は男児にのみ認められ , 2 型および 5 型では性差が認められた .

## 2 ) Protostylid

下顎第 2 乳臼歯を 199 齒抽出し , 98 齒 ( 49.2 % ) に Protostylid が認められた ( 表 19 ) . 男女別頻度では , 男児 51 齒 ( 50.0 % ) , 女児 47 齒 ( 48.5 % ) であり , 性差は認められなかった .

次に Protostylid の発達状態別に 3 型に分類すると trace 72 齒 ( 36.2 % ) , distinct 26 齒 ( 13.1 % ) , strong 0 齒 ( 0.0 % ) であった ( 表 20 ) .

また男女別頻度では , 男児の trace 34 齒 ( 33.3 % ) , distinct 17 齒 ( 16.7 % ) , 女児の trace 38 齒 ( 38.1 % ) , distinct 9 齒 ( 9.3 % ) であり , 性差は認められなかった .

## 【 考 察 】

### 1. 齲蝕罹患状況について

齲蝕は多因子性の疾患であり , 様々な要因が関与しているが , その中でも生活環境の影響は大きな因子といえる .

近年の中国における齲蝕罹患状況は著者ら<sup>1)</sup> , 石ら<sup>2)</sup> や林ら<sup>3)</sup> により報告されており , 石ら<sup>2)</sup> や林ら<sup>3)</sup> は本調査と同様 , 都市部である上海市の幼稚園児の報告を行っている . その中で林ら<sup>3)</sup> は , 上海市における小児の口腔保健状況は年々悪化していることを指摘し , 歯科医療関係者の慢性的な不足がその一要因と考え , その改善策として , さらなる歯科医療関係者の人材を確保し , 齲蝕予防プログラムの教育および指導法を広く普及させる必要性を報告している .

本調査では 177 名の小児の半数以上 ( 62.1 % ) に齲

蝕 罹 患 が 認 め ら れ ， 3 歳 から 5 歳 へ と 増 齢 的 に 増 加 傾 向 が 認 め ら れ 先 人 の 報 告 と 同 様 で あ っ た 。

し か し ， 齲 蝕 罹 患 者 率 で は 調 査 対 象 数 の 問 題 か ら 単 純 に 先 人 と の 比 較 は で き な い が ， 石 ら<sup>2)</sup> や 林 ら<sup>3)</sup> の 結 果 と 検 討 す る と 下 回 っ て い た ( 表 21 ) 。 さ ら に わ が 国 に お け る 齒 科 疾 患 実 態 調 査 と 比 較 し て も 3 歳 児 で は 下 回 っ て い た も の の ， 4 歳 お よ び 5 歳 児 で は 本 調 査 結 果 と 同 様 の 値 を 示 し た 。 ま た ， 一 人 平 均 齲 蝕 数 に お い て も 増 齢 的 な 増 加 は 認 め ら れ る も の の ， 先 人<sup>1-3)</sup> の 報 告 に 比 べ 低 い 値 ( 平 均 2.6 齒 ) を 示 し た 。

次 に 齲 蝕 処 置 齒 率 に つ い て も 増 齢 的 な 増 加 が 認 め ら れ ， 齒 科 疾 患 実 態 調 査 に 比 較 し て ， 先 人 と 同 様 に 下 回 っ て い た も の の ， 先 人<sup>1-3)</sup> の 報 告 に 比 較 す る と 増 加 傾 向 が 認 め ら れ た 。

し た が っ て ， 本 調 査 に お い て は 齲 蝕 罹 患 状 況 は 先 人 の 報 告 に 比 較 し て 低 率 を 示 し ， 処 置 齒 率 で は 増 加 し て お り ， そ の 要 因 と し て 調 査 人 数 の 違 い あ る い は 著 者 ら<sup>5, 6)</sup> が 1996 年 か ら 齒 科 検 診 を 継 続 し て 行 っ て い る こ と で ， 調 査 幼 稚 園 で の 口 腔 衛 生 に 関 す る 意 識 の 向 上 な ど が 考 え ら れ た 。 し か し ， 近 年 の 中 国 で の 生 活 環 境 の 著 し い 変 化 は 日 本 が か つ て 経 験 し た 「 齲 蝕 の 洪 水 」 の 時 期 を 迎 え な い と も 限 ら な い 。 そ の 予 防 対 策 と し て は 的 確 か つ 有 効 な 口 腔 衛 生 指 導 が 必 要 で あ り ， 普 及 お よ び 定 着 さ せ る こ と が 重 要 で あ る 。

## 2. 齒 肉 炎 に つ い て

本 調 査 で の 齒 肉 炎 罹 患 者 は 著 者 を 含 む 先 人 の 報 告 の 中 で 著 し く 低 率 で あ り ( 表 22 ) ， こ の 結 果 が 実 態 を 反 映 し て い る か 否 か に つ い て の 判 断 は 困 難 で あ る が ， 齒 肉 炎 罹 患 者 が 低 率 で あ っ た 要 因 と し て は 齲 蝕 罹 患 状 況 の 項 で 述 べ た よ う に 調 査 人 数 の 違 い あ る い は 著 者 ら<sup>5, 6)</sup> が 1996 年 か ら 齒 科 検 診 を 継 続 し て 行 っ て い る こ と

で、調査幼稚園での口腔衛生に関する意識の向上などが考えられた。

### 3. 乳歯列咬合について

#### 1) 不正咬合

先人の報告では、中国人小児の乳歯列では過蓋咬合が特徴的に認められ、増齡的に減少傾向を示し<sup>13)</sup>、大多数の症例は正常咬合へ移行し、永久前歯交換後に過蓋咬合が継続して認められるものは少ないとされることから、本調査では反対咬合と開咬について調査を行った。その結果を石家荘市小児<sup>11)</sup>と上海市小児<sup>3)</sup>と比較すると、石家荘市小児<sup>11)</sup>に比べ反対咬合と開咬ともにやや高い発現率を示したが、上海市小児とはほぼ同様の発現率であった(表23)。

反対咬合の多くは遺伝的要因が関与しており、今後の調査の課題として問診票を作製し、家族歴の聴取および該当する小児については歯列の変化を経年的に観察していく必要性が示唆された。

また、開咬については従来より口腔習癖に起因することが多く<sup>1)</sup>、日本に比べ中国では低い発現を示すとされている<sup>1, 3)</sup>。その理由として「一人っ子政策」から保護者の愛情を独占することが可能であり心理的ストレスなどを日本に比べ受けにくいためと考えられているが、開咬についても今後の動向を観察していく必要性が示唆された。

#### 2) 正常咬合

##### (1) 歯冠近遠心幅径

乳歯歯冠形態は原始的形態を保持し、比較的変異は少ないとされているものの、歯種によっては歯冠幅径に人種差を認めるものがある<sup>14)</sup>。

一般に同人種であっても、男児は女児に比べわずかに大きい傾向を示し<sup>15)</sup>、本調査においても同様であっ

た。また、日本人小児<sup>8)</sup>に比較して全体的に上海市小児の方がやや小さい傾向を示したが、有意差は認められなかった(表24)。したがって、以前に著者らも報告<sup>15)</sup>したように日本人小児と上海市小児での歯冠近遠心幅径における差はないものと考えられた。

### (2) 歯列弓の大きさ

日本小児歯科学会<sup>8)</sup>によると、高年齢児は低年齢児に対し歯列弓幅径は増加し、歯列弓長径では減少傾向にある。しかしながら著者ら<sup>15)</sup>は上海市小児の歯列弓幅径では男女ともに増加し、女兒の歯列弓長径では減少し、先人の報告と同様であったが、男児では増加傾向にあった。また、石家荘市小児<sup>16)</sup>でも女兒の歯列弓長径で増加傾向にあったことから日本人小児の増齢による計測値の変換点と中国人小児のそれでは若干異なるのではないかと推察した。

本調査では低年齢児と高年齢児を比較した場合、女兒の歯列弓幅径では上下顎ともに増加傾向にあったものの、男児のそれは一致しなかった。また、長径では男児の上下顎および女兒の上顎では減少傾向を認めたものの、女兒の下顎では増加傾向を示した。さらに、高径では上海市小児<sup>15)</sup>や石家荘市小児<sup>16)</sup>では増加傾向を示したものの、日本人小児<sup>8)</sup>では必ずしも増加傾向が認められず、本調査も日本人小児と同様の結果を示した(表25-1, 25-2)。

このことから日本人と中国人は同人種でありながら若干の相違が認められる要因として生活環境や成長のスタートの違いが関係しているものと推察された。

### (3) 歯間空隙状態

歯間空隙は永久歯の配列や調整に重要な役割を示すもので、日本人小児や中国人小児では靈長空隙と發育空隙が共存するものが最も高率に認められた<sup>15), 16)</sup>。

著者ら<sup>15)</sup>は上海市小児の各空隙状態の頻度は日本人



小児と石家莊市小児<sup>16)</sup>の中間に位置するものであったと報告し、中国人小児では上下顎ともに靈長空隙と發育空隙が共存するものが最も高率を示すものの、日本人小児に比較して靈長空隙のみ認められるものがわずかではあるが高率を示し、これが中国人の特徴であるか否かについて検討課題とした。

本調査においては上下顎ともに靈長空隙と發育空隙が共存するものが最も高率を示したが(表26)、著者ら<sup>15-17)</sup>の報告したように靈長空隙のみの発現頻度が上下顎ともに高率を示した点から、靈長空隙のみの発現は中国人小児の特徴と考えられた。

#### (4) ターミナルプレーンおよび乳犬歯咬合状態

従来より咬合状態を検討する要因の1つとしてターミナルプレーンや乳犬歯咬合関係が報告され、ターミナルプレーンは一般的に垂直型の頻度が高いされている<sup>8, 17)</sup>。

ターミナルプレーンについて波多江<sup>18)</sup>は、中国人(香港、台湾)は垂直型が最も多く、次いで近心段階型が多いことを報告し、著者ら<sup>15, 17)</sup>の中国人(石家莊市、上海市)も同様の結果であった(表27)。しかし、中国人小児においては垂直型の発現頻度に次いで近心段階型の発現頻度が日本人小児に比較して圧倒的に高い結果を示し、両側組み合わせ(近心-近心型)においても発現頻度が日本人小児に比較して圧倒的に高く(表28)、本調査においても先人の報告<sup>15, 17, 18)</sup>と同様であったことから、近心段階型の発現は中国人小児では特徴的に認められるものと推察された。

さらに、乳犬歯咬合状態においても日本人小児ではI型が最も高い発現頻度を示す(表27)。また、著者ら<sup>15-17)</sup>は石家莊市および上海市小児ではI型が最も多いものの、日本人小児に比較して低率を示し、逆にIII型については日本人小児に比較して高率を示した。

しかし、本調査ではⅢ型が高率を示し、次いでⅠ型であり、先人の報告との相違が認められた。

次にターミナルプレーンと乳犬歯咬合状態の組み合わせについて著者ら<sup>15-17)</sup>は垂直-Ⅰ型が日本人小児と上海市小児ともに最も多いものの、日本人小児に比較して低率であった。また、石家荘市小児では近心-Ⅲ型が最も高率で、次いで垂直-Ⅰ型であった。しかし、本調査では垂直-Ⅲ型が最も高率を示し、次いで近心-Ⅲ型、垂直-Ⅰ型の順であった(表29)。

したがって、以前に著者ら<sup>15-17)</sup>は中国人小児では日本人小児に比較してターミナルプレーンは垂直型が最も多いものの、近心型の発現率も高く、乳犬歯咬合状態においてもⅠ型とⅢ型の発現率が高く、中国人小児に特徴的に現れるものと考察し、本調査においても同様の推察であった。

#### 4. 歯牙異常について

##### 1) 形態異常歯および先天性欠如歯

歯の退化現象とされる癒合歯、矮小歯や先天性歯牙欠如(以下先天性欠如)は臨床上しばしば遭遇する。これらが存在することにより、歯列あるいは咬合関係に異常を惹起する可能性が示唆されており、その成因は系統発生学的退化現象、遺伝説、全身あるいは局所的疾患や胎生期の母体の障害などが報告され、また癒合が完全に起こったものが先天性欠如であるとする説など様々であるが、未だ定説はない<sup>19)</sup>。

臨床上、癒合歯と判定されるものにはエックス線撮影により癒着歯、癒合歯、双生歯に分類され、一般的な定義、分類は組織発生学的に正常歯の2個の歯胚が軟組織である時期に合体し、後に複合体となったもので、正常歯同志の結合であるとされている。

また、近年の本邦での癒合歯発現頻度は、乳歯で

は 2 ~ 5 %<sup>20)</sup> で以前の 1 ~ 3 % より若干の増加傾向を示している。好発部位は乳歯，永久歯ともに下顎前歯部とされている<sup>19)</sup>。

次に矮小歯における本邦での発現頻度は 0.3 % であり，著者ら<sup>1)</sup>の石家荘市の報告（0.3 %）との差はなかった。また，本調査における発現頻度は 0.6 % であったことから先人との差はないものと考えられた。

一方，先天性欠如の発現は歯胚発育の開始あるいは増殖期に何らかの障害により生じたものとされ，近年の本邦での乳歯の発現頻度は 0.5 ~ 3 % といわれ，性差は認められない<sup>19), 20)</sup>。

本調査では認められなかったが，これら癒合歯や矮小歯と先天性欠如が同一口腔内に認められたものは，臨床的な障害として，歯列や咬合への影響が惹起され，さらに永久歯列への影響が危惧される。

乳歯癒合歯について中国上海の調査を行った石らは発現率において日本に比べ低率であるが，諸外国に比べ日本人や中国人といったモンゴロイドでは発現率が高いことを報告し，人種的要因が多いと述べている<sup>21)</sup>。しかし，本調査での癒合歯，矮小歯および先天性欠如の発現率は先人の報告とほとんど差は認められず，同じモンゴロイドである中国人との差は明確にはならなかった。

## 2) 形成不全

一般には乳歯の形成不全は少なく，その理由として胎児の子宮内における保護とされているが，生後 1 年以内の全身疾患により発現する可能性も示唆されている<sup>22)</sup>。

著者ら<sup>1)</sup>は中国石家荘市の報告において 0.8 % の発現を認め，本調査では 0.6 % であり，差はないものと考えられた。

### 3) 歯牙色素沈着

带状に付着する黒褐色の外來性色素沈着は齲蝕の罹患低下や進行抑制が報告されており、本邦での発現率は0.9%とされている<sup>23)</sup>。また、著者らの中国石家荘市の報告<sup>1)</sup>においては2.0%とやや高率を示した。しかし、

林ら<sup>24)</sup>は13.4%とさらに高率を示し、上海市あるいは中国人についてはかなり高率に認められるものと報告している。また、齲蝕抑制因子として直接関与していると結論づけることはできないとも述べている。

本調査の発現頻度は2.8%で石家荘市<sup>1)</sup>とほぼ同様の頻度を示し、林ら<sup>24)</sup>に比べて低いものであったが、外來性色素沈着については未だ不明確な部分が多く、沈着原因が口腔衛生上の問題なのかあるいは環境要因の違いが発現率に反映しているのかなど、今後も発現頻度や齲蝕抑制因子との直接的な関与の有無についての検討の必要性が示唆された。

### 5. 地図状舌について

本症は舌背部に境界明瞭な斑紋が発生し、やがて剥離して糸状乳頭が消失し、赤色斑が拡大、融合して地図状を呈し、数時間あるいは日によって位置や形が変化するもので、原因は不明であるが、環境要因、消耗性疾患、体質、遺伝などが要因として考えられている。発現頻度としては1~2%程度<sup>25)</sup>で、性差はない。好発年齢も小児に限るわけではなく、幅広い年齢層で見られる。また、人種差もないとされている<sup>26)</sup>。

通常は自覚症状がなく<sup>27)</sup>、確定的な治療法もないため、経過をおって自然治癒を待つのが一般的のようである。

なお、本症はアレルギー（アトピー性皮膚炎など）や尋常性乾癬などの疾患との併発を見ることが多く、

臨床で本症の発現が見られた場合は全身的にも考慮する必要がある<sup>25)</sup>。

本調査では5名(2.8%)の発現頻度であり、男児1.1%、女児4.5%であり、女児が多い傾向を示した。なお、本症の発現をみた5名に対しての詳細な問診が取れなかった(言葉の問題から)ため、全身的な問題点は不明であった。今後の検討として全身的な問題点を踏まえて詳細な問診を行う必要性が示唆された。

## 6. 歯冠形態(乳臼歯咬合面形態)について

### 1) 上顎第2乳臼歯(以下 $m^2$ ) の咬合面型

埴原<sup>10)</sup>は  $m^2$  に関して調査を行った結果、3型(3咬頭)は全く認められなかったと報告し、hypoconeの発達状態について4型、4-型、3+型、3型の4つの型(Plaque D 6)に分類した。しかし、小住<sup>26)</sup>は  $m^2$  におけるDahlberg分類の3型が1例認められたと報告していることから、本調査では5型(3+型を3+B型と3+A型に区分して)に分類したが、その結果、4型90.9%、4-型9.1%で3+B型、3+A型および3型は認められなかった。

著者ら<sup>29)</sup>は同様の分類方法で中国石家荘市の調査を行い、その頻度を先人の報告と比較検討すると、日本小児および日米混血児(白人系および黒人系)、中国石家荘市ともに4型と4-型の占める割合が100%近い出現率を示したことから、大多数が4咬頭を呈しており、hypoconeの発達状態に若干の差はあるものの、人種間に顕著な差は認められないと報告した。したがって、本調査結果も同様の頻度を示した(表30)ことから人種間に顕著な差は認められず、上顎大臼歯の基本形態を有しているものと考えられた。

### 2) 上顎第1乳臼歯(以下 $m^1$ ) 咬合面型

歯冠形態は、protoconeとparaconeはよく発達しているも

の の , metacone あるいは hypocone では発達が弱いかあるいは分化していないことが多く, このことから  $m_1$  の咬頭数に関し, 研究者により種々の見解が示されている<sup>29)</sup> .

Hanihara<sup>12)</sup> は metacone と hypocone が痕跡程度ではあるが, 3咬頭, 4咬頭に近づこうとする傾向から, 日本人小児では3咬頭を示すものが最も多く, さらに3咬頭の内, metacone が発達しているものを60.3%に認めたと述べている. また, 先人<sup>30-32)</sup> の日本人小児の報告においても同様に3咬頭で, metacone の発達しているものが50%以上に認められ, 中国人を調査した著者ら<sup>29)</sup> においても同様であった.

本調査においても3咬頭を示すものが最も多く, そのうち metacone (3M型) の発達したものが71.3%に認められ, 次いで4咬頭のもの12.9%, hypocone (3H型) の発達したものの7.9%の順に認められ埴原<sup>10)</sup> の日本人小児や著者ら<sup>29)</sup> の中国人小児と同様の結果であった(表31). したがって, 日本人や中国人では metacone の発達した3咬頭を示すものは高い出現頻度を示すものと考えられた.

### 3) 下顎第2乳臼歯(以下 $m_2$ ) の咬合面型

下顎大臼歯の歯冠は5咬頭と溝により構成され, 溝の形もY型を呈する Dryopithecus pattern (Y5) が基本形態である<sup>33)</sup> .

特に下顎第1大臼歯( $M_1$ )に酷似している  $m_2$  について調査を行った結果,  $m_2$  が Y5 の基本形態を有するものが98.9%と最も多く(表32), さらに性差においても差はなく, 著者ら<sup>34)</sup> および本調査においてもほぼ同様の頻度を認めたことから,  $m_2$  の咬合面形態は人種間に差はなく, 原始的形態を未だ保持しているものと考えられた.

### 4) 第6咬頭

埴原<sup>35)</sup> や小住<sup>36)</sup> らは  $m_2$  における第6咬頭はモンゴロイドでは高い出現頻度であると述べている。

本調査での  $m_2$  における出現率は 25.5 % であり、性差も認められなかった。著者ら<sup>34)</sup> の中国人小児では性差を認めたが、出現率全体を比較した場合、本調査との有意差は認められなかった(表 33)。また、日本人小児に対して有意差は認められなかった<sup>34)</sup> が、Hanihara<sup>37)</sup> の白人系、黒人系に対しては高い出現率を示し、著者ら<sup>34)</sup> が報告しているようにモンゴロイド(日本人や中国人)における本咬頭の出現頻度は比較的高いものと考えられた。

#### 5) 第7咬頭

埴原<sup>9)</sup> は、 $m_2$  における本咬頭の調査を行い、独立した咬頭として認められるものはなく、舌側面溝とは別にもう1本の弱い溝の存在を認め、この溝が第7咬頭の先駆的形態と考え、調査し 50 % を越える出現率であったと報告している。

本調査での出現率は 54.8 % であり、性差は認められなかった(表 34)。

この結果は著者ら<sup>34)</sup> の報告した出現率と類似するものであり、埴原<sup>9)</sup> の日本人小児および日米混血児(白人系および黒人系)に対して有意差は認められなかったことから、埴原<sup>9)</sup> の述べているように舌側溝とは別にもう1本の溝が本咬頭の先駆的なものと考えらるならば、 $m_2$  における本咬頭はモンゴロイドでは発達程度に関しては弱いものの、出現頻度は高いものと考えられた。

#### 6) 下顎第1乳臼歯(以下 $m_1$ ) の咬合面型

$m_1$  の歯冠は、protoconid, metaconid, hypoconid, entoconid の4咬頭、あるいは hypoconid が分かれて hypoconulid を生じ5咬頭となるものがある。さらに6咬頭性を示すものも先人<sup>9), 30), 31), 38)</sup> により報告されている。一方中国人小児

を調査した著者ら<sup>34)</sup>は6咬頭性を示すものは認めらず、本調査も認められなかった。

裂溝の形もY型、+型、×型に区分し、調査すると本調査では、Y型を呈するものが最も高い出現頻度(85.7%)で著者ら<sup>34)</sup>の報告と同様であった(表35)。また咬頭数では、4咬頭と5咬頭を比較すると4咬頭の方が多く、76%の出現率を認めたが、著者ら<sup>34)</sup>とは若干の相違が認められた。

埴原<sup>9)</sup>の日本人小児の報告では4咬頭および5咬頭は著者ら<sup>34)</sup>と同様ほぼ半数ずつであった。また、服部<sup>30)</sup>は裂溝の形もY型が最も高い出現頻度であり、次いで+型となり、性差も認められないとしている。したがって、m<sub>1</sub>咬合面型における人種的な差はなく、未だ原始的な基本形態を保持しているものと考えられた。

## 7. 異常結節 (Carabelli 結節、Protostylid) について

### 1) カラベリー結節

本結節は、Carabelli<sup>39)</sup>により tuberculum anomalum として、上顎大臼歯舌側面に認めれると報告されたもので、発達状態の分類については先人<sup>40-42)</sup>により報告されているが、Hanihara<sup>12)</sup>は本結節の分類基準として Plaque D 7 を報告し、本調査もこの分類に準じて調査した。

Dahlberg<sup>43)</sup>は、本結節はコーカソイドに多く、モンゴロイドやEskimoには少ないと述べ、さらにコーカソイドとモンゴロイドあるいはEskimoとの混血になると出現頻度が高くなると報告している。また、中野<sup>32)</sup>はミクロネシア小児の調査から日本人小児は白人小児に比べて低い値を示し、コーカソイド形質群とは異なると述べている。

埴原<sup>10, 11)</sup>の調査においても、日米混血児(白人系)や米国人小児(白人)に出現頻度が高く、Dahlberg<sup>43)</sup>と同様の結果を報告している。



著者ら<sup>29)</sup>の中国人小児においても埴原<sup>10)</sup>の米国人小児(白人)に比較して出現頻度は低く、本調査においても73.1%で米国人小児(白人)(94.6%)に比較して低い値を示した。

また、発達状態を比較しても cusp として認められるものは、本調査では7.6%であり、著者ら<sup>29)</sup>の石家荘市小児に比較すると高率を示したものの、埴原<sup>10)</sup>のコーカソイド形質群の小児に比較して弱い発達状態を示すことから考えると(表36)、モンゴロイドではコーカソイドに比べ出現頻度は低く、発達程度も弱く、Dahlberg<sup>43)</sup>の報告と同様、モンゴロイド形質群とコーカソイド形質群における出現頻度および発達状態に差があるものと考えられた。

## 2) Protostylid

Greve<sup>44)</sup>および De Jonge<sup>45)</sup>は下顎大臼歯の頬側面近心位に限って認められる結節に関して mesio - buccal edge - prominence と称し報告した。この結節は比較的稀なものとされていたが、Dahlberg<sup>46)</sup>は Pima Indian に関する調査から本結節が下顎第1大臼歯において30%以上の出現頻度を示し、この結節を Protostylid と命名した。

また、Dahlberg<sup>46)</sup>や埴原<sup>35)</sup>は下顎の混合歯列中の下顎第1大臼歯に Protostylid が認められる場合、同一個体内の下顎第2乳臼歯においても Protostylid が認められ、逆に下顎第2乳臼歯に認められても必ずしも下顎第1大臼歯に認められるとは限らず、下顎第2乳臼歯は下顎第1大臼歯に比べ、Protostylid の出現頻度は高いと述べている。

本調査では、49.2%の出現率であり、著者ら<sup>34)</sup>の石家荘市小児と同様であった。

また発達状態については(表37)、著者ら<sup>34)</sup>の報告しているように、日本人や中国人といったモンゴロイドでは発達状態に関して個体差があるものの、出現

頻度に関しては比較的高い頻度を示すものと考えられた。

【 参 考 文 献 】

- 1) 宮 沢 裕 夫 ， 難 波 比 呂 志 ， 林 春 二 ， 鈴 木 稔 ， 張 金 延 ， 今 西 孝 博 ： 中 国 石 家 莊 市 に お け る 小 児 齒 科 検 診 結 果 ， 松 本 齒 学 ， 17 : 327 - 336 ， 1991 ．
- 2) 石 四 箴 ， 陳 文 菊 ， 越 玉 梅 ， 汪 隼 ， 中 田 稔 ， 二 木 寿 子 ， 市 野 浩 司 ， 緒 方 哲 朗 ： 上 海 市 10864名 幼 児 乳 牙 齲 蝕 状 況 分 析 ， 中 国 現 代 口 腔 医 学 雜 誌 ， 5 : 97 - 100 ， 1991 ．
- 3) 林 芳 裕 ， 藥 師 寺 仁 ， 町 田 幸 雄 ， 石 四 箴 ， 單 偉 文 ， 蔣 祿 ， 梁 勤 ： 上 海 市 小 児 の 齒 科 疾 患 実 態 調 査 ， 齒 科 学 報 ， 96 : 577 - 584 ， 1996 ．
- 4) 姚 軍 ： 私 が 見 た 日 本 の 小 児 齒 科 ， 小 児 齒 科 臨 床 ， 4 卷 10 号 ( 10 月 号 ) : 95 - 97 ， 1999 ．
- 5) 中 山 聡 ， 岩 崎 浩 ， 近 藤 靖 子 ， 林 于 方 ， 宮 沢 裕 夫 ， 石 四 箴 ： 上 海 市 幼 稚 園 児 の 齒 科 疾 患 第 1 報 乳 齒 齲 蝕 に つ い て ， 小 児 齒 誌 ， 35 : 348 ， 1997 ．
- 6) 中 山 聡 ， 岩 崎 浩 ， 近 藤 靖 子 ， 林 于 方 ， 宮 沢 裕 夫 ， 石 四 箴 ： 上 海 市 幼 稚 園 児 の 齒 科 疾 患 第 2 報 齒 肉 の 状 況 に つ い て ， 小 児 齒 誌 ， 36 : 189 ， 1998 ．
- 7) 厚 生 省 健 康 政 策 局 齒 科 衛 生 課 編 ： 平 成 5 年 齒 科 疾 患 実 態 調 査 報 告 ， 厚 生 省 ， 1993 ， pp 42 - 69 ．
- 8) 日 本 小 児 齒 科 学 会 ： 日 本 人 の 乳 齒 齒 冠 並 び に 乳 齒 列 弓 の 大 き さ ， 乳 齒 咬 合 状 態 に 関 す る 調 査 研 究 ， 小 児 齒 誌 ， 31 : 375 - 388 ， 1993 ．
- 9) 埴 原 和 郎 ： 日 本 人 及 び 日 米 混 血 児 の 研 究 Ⅲ ， 下 顎 乳 臼 齒 に つ い て ， 人 類 誌 ， 64 : 67 - 87 ， 1956 ．
- 10) 埴 原 和 郎 ： 日 本 人 及 び 日 米 混 血 児 乳 齒 の 研 究 ， Ⅳ ． 上 顎 乳 臼 齒 に つ い て ， 人 類 誌 ， 65 : 67 - 87 ， 1956 ．
- 11) Hanihara, K. : Crown characters of the dentition of the Japanese -American hybrids. Dent. Anthropol, 5 : 105 - 124 ， 1963 ．
- 12) Hanihara, K. : Criteria for Classification of Crown Characters of the Human Deciduous Dentition. J. Anthropol. soc. Nippon, 69

: 27 - 45 , 1961 .

13) 野中和明 , 大谷裕子 , 佐々木康成 , 他 23 名 : 漢民族小児の歯科疾患と歯科的特質に関する実態調査 - 歯列咬合状態 -, 小児歯誌 , 31 : 527 - 535 , 1993 .

14) 埴原和郎 : 日本人及び日米混血児乳歯の研究 , V . 総括 , 人類誌 , 65 : 151 - 164 , 1957 .

15) 岩崎 浩 , 中山 聡 , 内山盛嗣 , 近藤靖子 , 宮沢裕夫 , 石 四箴 : 中国上海市小児 43 例の乳歯列形態 - 正常咬合児の乳歯歯冠および歯列弓の大きさ , 咬合状態における日本と上海市との比較 -, 小児歯誌 , 36 : 625 - 633 , 1998 .

16) 岩崎 浩 , 中山 聡 , 内山盛嗣 , 近藤靖子 , 落合宏子 , 宮沢裕夫 , 石 四箴 : 中国人小児の乳歯列形態の検討 - 石家荘市と上海市の小児 , 松本歯学 , 24 : 77 - 92 , 1998 .

17) 岩崎 浩 , 林 于方 , 宮沢裕夫 , 宮崎顕道 , 須澤弥生子 , 張 曉燕 , 李 憲起 , 徐 兵 , 海 懷麗 , 張 英懷 , 廉 雲敏 , 牛 夢勇 , 王 躍進 , 蘇 強 , 小林茂夫 : 石家荘市 ( 中国 ) 小児の乳歯列形態 第一報 : 乳歯歯冠ならびに歯列弓の大きさ , 咬合状態に関する調査研究 , 松本歯学 , 20 : 157 - 171 , 1994 .

18) 波多江 正憲 : 香港居住中国人幼児の乳歯列の咬合および形態に関する研究 , 九州歯会誌 , 46 : 647 - 657 , 1992 .

19) 川端宏之 , 川端明美 , 内山盛嗣 , 岩田盛満 , 岩崎 浩 : 1 口腔に永久歯の癒合と先天性欠如を認めた 2 例 , 小児歯誌 , 35 : 732 - 739 , 1997 .

20) 桑原康生 : 乳前歯における癒合歯ならびに先天性欠如と後継永久歯との関連について , 小児歯科臨床 , 2 月号 : 63 - 67 , 2000 .

21) 石 四箴 , 町田幸雄 , 米津卓郎 : 日本と中国における乳歯癒合歯の発現状況について , 歯科学報 , 93

: 631 - 638 , 1993 .

22) 野坂久美子, 佐藤輝子, 向井田珠美, 島津聡子, 長谷川淳子, 甘利英一: 歯の形成不全とその原因についての臨床的考察 - 第1報 乳歯 -, 小児歯誌, 28 : 561 - 578 , 1990 .

23) 石井真澄, 角尾明美, 山下登, 鈴木康生, 佐々竜二, 小高鉄男, 東昇平: 小児にみられる外因性色素沈着について -出現状況と沈着状態-, 第27回日本小児歯科学会抄録集: 129 , 1989 .

24) 林芳裕, 辻口敦, 薬師寺仁, 町田幸雄, 石四箴: 上海市小児に認められた乳歯の黒色性色素沈着と齲蝕罹患状況について, 小児歯誌, 35 : 208 , 1997 .

25) 山中清光, 小林仁, 大河原章, 木村鉄宣: 地図状舌, 皮膚病診療, 13 : 331 - 334 , 1991 .

26) 高橋紀子, 島田義弘: 定期歯科検診で検出された某高専校学生における舌疾患の有病状況, 東北大歯誌, 8: 19 - 27 , 1989 .

27) 黒須一夫: 現代小児歯科学 -基礎と臨床-, 医歯薬出版, 改訂第5版, 1996 , PP 456 .

28) 小住啓一: 日本人大臼歯並びに第2乳臼歯歯冠の形態学的研究, 第1編上顎大臼歯と上顎第2乳臼歯歯冠の形態について, 九州歯会誌, 14 : 435 - 454 , 1960 .

29) 岩崎浩, 宮沢裕夫, 小林茂夫: 中国石家荘市小児の乳歯列形態 第三報: 上顎乳臼歯歯冠形態の調査研究, 松本歯学, 22 : 260 - 282 , 1996 .

30) 服部禮子: 乳臼歯における咬合面溝の形態学的研究, 1. 咬合面型; 愛院大歯誌, 6 : 39 - 55 , 1968 .

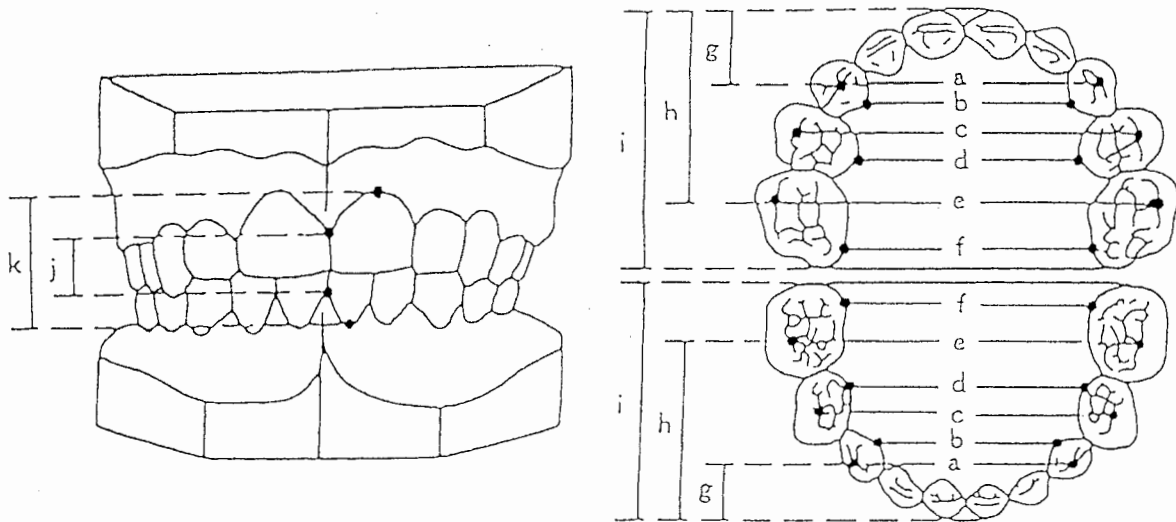
31) 都筑勝美: 乳臼歯歯冠部の形態学的研究, 愛院大歯誌, 24 : 1 - 60 , 1986 .

32) 中野愛彦: 上顎乳臼歯歯冠形態によるミクロネシア人と日本人の歯科人類学的研究,

- 齒科学報, 91 : 129 - 157, 1991 .
- 33) Gregory, W. K. : Studies on the evolution of the primates. Bull. Am. Mus. Natur. Hist, 35 : 239 -355 , 1916 .
- 34) 岩崎 浩, 宮沢裕夫, 小林茂夫 : 中国石家荘市小児の乳齒列形態 第二報 : 下顎乳臼齒齒冠形態の調査研究, 松本齒学, 22 : 245 - 259 , 1996 .
- 35) 埴原和郎 : 同一個體における第2乳臼齒及び第1大臼齒齒冠形態の類似性について, 日本人類学会・日本民族学協会連合大会第9回記事, 1954 .
- 36) 小住啓一 : 日本人大臼齒並びに第2乳臼齒齒冠の形態学的研究, 第II編下顎大臼齒と下顎第2乳臼齒齒冠の形態について, 九州齒会誌, 14 : 455 - 478 , 1960 .
- 37) Hanihara, K. : Mongoloid dental complex in the deciduous dentition. J. Anthrop. soc. Nippon, 74 : 61 - 72 , 1966 .
- 38) 森戸康純 : 下顎乳臼齒の原始的形質に関する研究, 九州齒会誌, 31 : 317 - 335 , 1977 .
- 39) Carabelli, G. : Systematisches Handbuch der Zahnheilkunde. II Anatomie des Menschen des Mundes, Braunmuller und Seidel, Wien, 1842 .
- 40) Dietz, V. H. : A common dental morphotropic factor the Carabelli Cusp. J. Am. Dent. Assn. 31 : 784 - 789 , 1944 .
- 41) 上條雅彦, 芳賀忠夫, 佐藤勝也, 森 春樹, 岩田卓延, 柏木昭二 : 日本人生体齒牙の研究, カラベリー結節について, 口腔解剖研究, 1 : 1 - 5 , 1956 .
- 42) 酒井琢朗, 花村 肇 : 上顎大臼齒カラベリー結節の形態学的分析, 愛院大齒誌, 5 : 60 - 72 , 1967 .
- 43) Dahlberg, A. A. : The Dentition of the American Indian, The Physical Anthropology of the American Indian, The Viking Fund Inc, 1949 , pp 138 - 176 .
- 44) Grave, H. C. : Ueber das vorkommen der akzessorischen Wangenhocker an oberen and unteren zweten Molaren. Deut. Mschr. Zahnhlk, 37 : 393 - 397 , 1919 .
- 45) De Jonge - Cohen, Th. E. : Opposite developmental tendencies

in human denture. Proc. Med. Akad. V. Wetensch. Amsterdam, 50 :  
1324-1328, 1947.

46) Dahlberg, A. A. : The evolutionary significance of the  
Protostylid . Am. J. Phys. Anthropol, 8 : 15 - 24 , 1950 .



歯列弓幅径

- a : 上下顎両側乳犬歯咬頭頂間距離 ( $C_c - C_c$ )
- b : 上下顎両側乳犬歯口蓋 (舌) 側歯頸部最下点間距離 ( $C_i - C_i$ )
- c : 上顎両側第一乳臼歯頬側咬頭頂間距離 ( $D - D$ )  
下顎両側第一乳臼歯頬側分界溝間距離
- d : 上顎両側第一乳臼歯口蓋側歯頸部最下点間距離 ( $D_i - D_i$ )  
下顎両側第一乳臼歯舌側近遠心咬頭頂間の舌側溝直下点間距離
- e : 上顎両側第二乳臼歯頬側分界溝間距離 ( $E - E$ )  
下顎両側第二乳臼歯近心頬側分界溝間距離
- f : 上下顎両側第二乳臼歯口蓋 (舌) 側歯頸部最下点間距離 ( $E_i - E_i$ )

歯列弓長径

- g : 両側乳中切歯の唇面を連ねた線の中央から垂線を降ろした、両側乳犬歯咬頭頂を結んだ線までの距離 ( $A - C_c$ )
- h : 両側乳中切歯の唇面を連ねた線の中央から垂線を降ろした、両側第二乳臼歯近心頬側分界溝間を結んだ線までの距離 ( $A - E$ )
- i : 両側乳中切歯の唇面を連ねた線の中央から垂線を降ろした、両側第二乳臼歯遠心端間を結んだ線までの距離 ( $A - E_n$ )

歯列弓高径 (咬合平面を基準として)

- j : 上下顎両側乳中切歯間の歯間乳頭間距離 (Dental Height)
- k : 上下顎左側乳中切歯唇面歯頸部中央間距離 (ULA - LLA)

図 1 : 乳歯列弓の計測項目 (日本小児歯科学会による)



表1 調査対象

対象	3歳	4歳	5歳	計
男児	29	38	21	88
女児	37	25	27	89
計	66	63	48	177

単位：名

表2 乳歯列における調査対象

単位：名

	男児	女児	計
幼稚園児	88	89	177
分類基準に沿った正常咬合者	15	14	29
低年齢群 (3・4歳)	8	8	16
高年齢群 (5歳)	7	6	13

表3 調査対象歯

上顎	第2乳臼歯 (m <sup>2</sup> )		第1乳臼歯 (m <sup>1</sup> )		計	単位：歯 (m <sup>1</sup> )
	男児	女児	男児	女児		
咬合面形態	100	97	106	96	202	
Carabelli 結節	108	100				
下顎	第2乳臼歯 (m <sub>2</sub> )		第1乳臼歯 (m <sub>1</sub> )		計	単位：歯 (m <sub>1</sub> )
	男児	女児	男児	女児		
咬合面形態	96	92	102	94	196	
Protostylid	102	97				

表4 齲蝕罹患状況

	男児					女児					総計
	3歳	4歳	5歳	計	3歳	4歳	5歳	計	4歳	5歳	
調査対象数 (名)	29	38	21	88	37	25	27	89	177		
齲蝕罹患児数 (名)	16	22	14	52	16	19	23	58	110		
齲蝕罹患児率 (%)	55.2	57.9	66.7	59.1	43.2	76.0	85.2	65.2	62.1		
現在歯数 (歯)	578	714	412	1704	739	539	529	1807	3511		
齲蝕罹患歯数 (歯)	59	76	60	195	60	90	110	260	455		
齲蝕罹患歯率 (%)	10.2	10.6	14.6	11.4	8.1	16.7	20.8	14.4	13.5		
一人平均齲蝕歯数 (歯)	2.0	2.0	2.9	2.2	1.6	3.6	4.1	2.9	2.6		
齲蝕処置歯数 (歯)	0	1	16	17	2	8	14	24	41		
齲蝕処置歯率 (%)	0.0	0.1	3.9	1.0	0.3	1.5	2.7	1.3	1.2		

表5 齲蝕罹患状況（厚生省分類）

	男児					女児					総計
	3歳	4歳	5歳	計	3歳	4歳	5歳	計	5歳		
調査対象数	29	38	21	88	37	25	27	89	177		
齲蝕罹患児数	16	22	14	52	16	19	23	58	110		
型別分類											
A型	12	11	7	30	10	8	10	28	58		
発現率 (%)	75.0	50.0	50.0	57.7	62.5	42.1	43.5	48.3	52.7		
B型	2	11	6	19	3	9	11	23	42		
発現率 (%)	12.5	50.0	42.9	36.5	18.8	47.7	47.8	39.7	38.2		
C1型	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
発現率 (%)	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0		
C2型	2	0	1	3	3	2	2	7	10		
発現率 (%)	12.5	0.0	7.1	5.8	18.8	10.5	8.7	12.1	9.1		

単位：名

表6 歯肉炎の発現状況

単位：名

	男児					女児					総計
	3歳	4歳	5歳	計		3歳	4歳	5歳	計		
調査対象数	29	38	21	88		37	25	27	89	177	
歯肉炎発現数	0	1	0	1		0	1	1	2	3	
発現率 (%)	0.0	2.6	0.0	1.1		0.0	4.0	3.7	2.2	1.7	

表7 不正咬合の発現状況

単位：名

	男児					女児					総計
	3歳	4歳	5歳	計	3歳	4歳	5歳	計	5歳		
調査対象数	29	38	21	88	37	25	27	89	177		
反対咬合	3	4	1	8	5	4	2	11	19		
発現率 (%)	10.3	10.5	4.8	9.1	13.5	16.0	7.4	12.4	10.7		
開咬	1	0	0	1	1	0	0	1	2		
発現率 (%)	3.4	0.0	0.0	1.1	2.7	0.0	0.0	1.1	1.1		

表8 乳齒齒冠近遠心幅徑

顎	齒種	男兒 (16名)			女兒 (13名)			性差
		平均值±標準偏差 (mm)	變動係數	平均値±標準偏差 (mm)	變動係數	變動係數		
上	A 乳中切齒	6.76±0.36	5.33	6.63±0.24	3.62			
	B 乳側切齒	5.47±0.20	3.66	5.31±0.31	5.84			
	C 乳犬齒	6.56±0.32	4.88	6.62±0.21	3.17			
	D 第1乳臼齒	7.52±0.32	4.26	7.37±0.29	3.93			
	E 第2乳臼齒	9.27±0.38	4.10	9.16±0.21	2.29			
下	A 乳中切齒	4.27±0.21	4.92	3.96±0.31	7.83	*		
	B 乳側切齒	4.68±0.24	5.13	4.52±0.26	5.75			
	C 乳犬齒	5.81±0.22	3.79	5.79±0.24	4.15			
	D 第1乳臼齒	8.15±0.38	4.66	8.07±0.27	3.35			
	E 第2乳臼齒	10.07±0.38	3.77	9.80±0.52	5.31			

\* P<0.05



表9 乳歯列弓の大きさ

低年齢児群

高年齢児群

単位：mm

計測部位	男児(8名)		女児(7名)		性差
	平均値±標準偏差	平均値±標準偏差	平均値±標準偏差	平均値±標準偏差	
歯列弓	a	31.32±1.21	29.63±1.28		
	b	23.90±1.40	22.46±1.76	*	
	c	25.54±0.85	23.85±0.86		
	d	19.33±1.15	18.38±1.45		
	e	39.96±1.48	37.25±1.94		
	f	31.06±1.76	29.40±1.41		
幅径	a	28.51±1.45	26.62±1.28		
	b	24.44±1.41	23.74±1.20		
	c	46.51±2.14	43.58±2.25		
	d	39.59±2.00	37.47±1.58		
	e	30.56±1.55	29.15±1.20		
	f	28.63±1.37	27.95±1.59		
歯列弓長径	g	8.94±0.93	8.32±0.83		
	h	6.07±0.42	5.51±0.89		
	i	21.10±3.61	20.76±2.45		
	g	18.08±3.30	18.05±2.35		
	h	29.31±1.14	28.02±1.38		
	i	26.44±1.02	24.82±0.68	*	
高径	j	4.52±1.03	4.20±1.70		
	k	7.92±1.39	7.12±1.01		
		男児(8名)	女児(6名)		
		平均値±標準偏差	平均値±標準偏差	平均値±標準偏差	性差
		31.29±1.48	30.73±1.15		
		23.56±0.47	22.92±1.03		
		25.65±0.91	25.08±1.00		
		19.42±0.57	19.07±1.31		
		39.73±1.33	38.59±1.65		
		30.69±0.64	30.43±1.05		
		28.50±0.80	27.31±1.60		
		24.82±0.65	23.65±1.30		
		45.40±2.71	44.40±1.83		
		38.98±1.12	38.07±1.86		
		31.20±0.77	29.88±1.58		
		29.14±0.60	27.40±1.69		
		8.58±0.49	7.85±0.48		
		5.31±0.43	5.28±0.51		
		22.05±3.80	21.96±1.57		
		17.83±3.54	18.92±1.16		
		29.58±1.42	28.46±0.81		
		26.18±1.04	25.42±1.07		
		2.92±0.82	3.46±0.58		
		7.36±0.81	7.51±0.41		

表10 齒間空隙状態

	n	発現頻度 (%)
上顎	空隙型	
	靈長のみ	8 27.6
	靈長+発育	18 62.1
閉鎖型	発育のみ	0 0
	空隙なし	3 10.3
下顎	空隙型	
	靈長のみ	5 17.2
	靈長+発育	15 51.7
閉鎖型	発育のみ	5 17.2
	空隙なし	4 13.8

表11 ターミナルプレーン，乳犬歯咬合状態の分類別発現頻度

単位：% (実数)

	ターミナルプレーン			乳犬歯咬合関係		
	垂直型	遠心型	近心型	I型	II型	III型
男児 (n=32)	68.8 (22)	19.6 (2)	25.0 (8)	34.4 (11)	18.8 (6)	46.9 (15)
女児 (n=26)	50.0 (13)	15.4 (4)	34.6 (9)	26.9 (7)	19.2 (5)	53.8 (14)
計 (n=58)	60.3 (35)	10.3 (6)	29.3 (17)	31.0 (18)	19.0 (11)	50.0 (29)

表12 ターミナルプレートの両側組み合わせ発現頻度

組み合わせ	男児			女児			計		
	実数	発現頻度 %	実数	発現頻度 %	実数	発現頻度 %	実数	発現頻度 %	
垂直-垂直型	9	56.3	4	30.8	13	44.8			
垂直-遠心型	2	12.5	3	23.1	5	17.2			
垂直-近心型	2	12.5	2	15.4	4	13.8			
遠心-遠心型	0	0.0	0	0.0	0	0.0			
近心-近心型	3	18.8	3	23.1	6	20.7			
近心-遠心型	0	0.0	1	7.7	1	3.4			

表13 ターミナルプレーンと乳犬歯咬合関係の組み合わせ

ターミナル プレーン	乳犬歯 咬合関係		単位：% (実数)		
	男児	女児	計		
垂直	-	I型	18.8 (6)	19.2 (5)	19.0 (11)
垂直	-	II型	18.8 (6)	11.5 (3)	15.5 (9)
垂直	-	III型	31.2 (10)	19.2 (5)	25.9 (15)
遠心	-	I型	2 (6.3)	0.0 (0)	3.4 (2)
遠心	-	II型	0.0 (0)	7.7 (2)	3.4 (2)
遠心	-	III型	0.0 (0)	7.7 (2)	3.4 (2)
近心	-	I型	9.4 (3)	7.7 (2)	8.6 (5)
近心	-	II型	0.0 (0)	0.0 (0)	0.0 (0)
近心	-	III型	15.6 (5)	26.9 (7)	20.7 (12)

表14 歯牙異常の状況

発現数・率	男児			女児			計	総計
	3歳	4歳	5歳	計	3歳	4歳		
調査対象数	29	38	21	88	37	25	89	177
癒合歯	2 (4)	1 (2)	1 (2)	4 (8)	1 (2)	1 (2)	3 (6)	7 (14)
発現率 (%)	6.9	2.6	4.8	4.5	2.7	4.0	3.4	4.0
先天性欠如	0	1 (1)	0	1 (1)	0	0	0	2 (3)
発現率 (%)	0.0	2.6	0.0	1.1	0.0	0.0	0.0	1.1
矮小歯	0	0	0	0	0	1 (1)	1 (1)	1 (1)
発現率 (%)	0.0	0.0	0.0	0	0.0	4.0	1.1	0.6
形成不全	1 (1)	0	0	1 (1)	0	0	0	1 (1)
発現率 (%)	3.4	0.0	0.0	1.1	0.0	0.0	0.0	0.6
歯牙色素沈着	1 (1)	2 (2)	1 (1)	4 (4)	0	1 (1)	1 (1)	5 (5)
発現率 (%)	3.4	5.3	4.8	4.5	0.0	4.0	1.1	2.8

単位：名 (歯)

表15 地図状舌の状況

単位：名

発現数・率	男児			女児			計	総計
	3歳	4歳	5歳	3歳	4歳	5歳		
調査対象数	29	38	21	88	37	25	89	177
地図状舌	1	0	0	1	1	3	4	5
発現率 (%)	3.4	0.0	0.0	1.1	2.7	12.0	4.5	2.8

表16 上顎乳白齒咬合面型

單位：齒

		男兒	女兒	計
m <sup>2</sup>	4			
	n	86	93	179
	(%)	(86.0)	(95.9)	(90.9)
	4-			
	n	14	4	18
	(%)	(14.0)	(4.1)	(9.1)
	3+B			
	n	0	0	0
	(%)			
	3+A			
n	0	0	0	
(%)				
3				
n	0	0	0	
(%)				
計		100	97	197
m <sup>1</sup>	2			
	n	4	6	10
	(%)	(3.8)	(6.3)	(5.0)
	3M			
	n	74	70	144
	(%)	(69.8)	(72.9)	(71.3)
	3H			
	n	10	6	16
	(%)	(9.4)	(6.3)	(7.9)
	4-			
n	13	13	26	
(%)	(12.3)	(13.5)	(12.9)	
4				
n	5	1	6	
(%)	(4.7)	(1.0)	(3.0)	
計		106	96	202



表17 下顎乳白齒咬合面裂溝型

咬合面型	男兒						女兒						計
	Y		+		X		Y		+		X		
	n	(%)	n	(%)	n	(%)	n	(%)	n	(%)	n	(%)	
	5	96	0	0	0	0	90	2	0	0	0	188	
		(100.0)					(97.8)	(2.2)					
m <sub>2</sub>	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	計	96	0	0	0	0	90	2	0	0	0	188	
	4	65	5	14	14	56	65.9	100.0	100.0	100.0	7	149	
		(78.3)	(100.0)	(100.0)	(100.0)	(65.9)	(100.0)	(100.0)	(100.0)	(100.0)	0	(76.0)	
m <sub>1</sub>	5	18	0	0	0	29	0	0	0	0	0	47	
		(21.7)				(34.1)						(24.0)	
	6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	計	83	5	14	14	85	2	2	7	7	7	196	

單位：齒

表18 下顎第2乳臼歯の第6および第7咬頭

単位：歯

咬合面型	咬頭数	男児						女児			計
		Y		+		Y		+			
		n	(%)	n	(%)	n	(%)	n	(%)		
m <sub>2</sub>	6	188	25 (26.0)	0	0	23	23 (25.0)	0	0	48	48 (25.5)
	5+		37 (38.5)	0	0	34	34 (36.9)	0	0	71	71 (37.8)
m <sub>2</sub>	6+	188	13 (13.5)	0	0	19	19 (20.7)	0	0	32	32 (17.0)
	計		50 (52.1)	0 (0.0)	0 (0.0)	53	53 (57.6)	0 (0.0)	0 (0.0)	103	103 (54.8)

5+：5咬頭歯で、さらに第7咬頭が認められたもの

6+：6咬頭歯で、さらに第7咬頭が認められたもの

表19 異常結節の発現状況

単位：歯

	男児	女児	計	
Carabelli 結節 (m <sup>2</sup> )	無			
	n	30	26	56
	(%)	(27.8)	(26.0)	(26.9)
	有			
	n	78	74	152
	(%)	(72.2)	(74.0)	(73.1)
計	108	100	208	
Protostylid (m <sub>2</sub> )	無			
	n	51	50	101
	(%)	(50.0)	(51.5)	(50.8)
	有			
	n	51	47	98
	(%)	(50.0)	(48.5)	(49.2)
計	102	97	199	

表20 異常結節の発達状況

単位：歯

	型別	男児	女児	計
Carabelli 結節 (m <sup>2</sup> )	0			
	n	30	26	56
	(%)	(27.8)	(26.0)	(26.9)
	1			
	n	44	28	72
	(%)	(40.7)	(28.0)	(34.6)
	2			
	n	19	29	48
	(%)	(17.6)	(29.0)	(23.1)
	3			
	n	5	11	16
(%)	(4.6)	(11.0)	(17.7)	
4				
n	4	5	9	
(%)	(3.7)	(5.0)	(4.3)	
5				
n	4	0	4	
(%)	(3.7)		(1.9)	
6				
n	2	1	3	
(%)	(1.9)	(1.0)	(1.4)	
7				
n	0	0	0	
(%)				
	計	108	100	208
Protostylid (m <sub>2</sub> )	無			
	n	51	50	101
	(%)	(50.0)	(52.6)	(50.7)
	trace			
	n	34	38	72
	(%)	(33.3)	(38.1)	(36.2)
	distinct			
	n	17	9	26
	(%)	(16.7)	(9.3)	(13.1)
	strong			
n	0	0	0	
(%)				
	計	102	97	199

表21 齲蝕罹患状況の比較

	齲蝕罹患率 (%)				一人平均dft			
	3歳	4歳	5歳	計	3歳	4歳	5歳	計
日本								
厚生省 (1993)	59.7	67.8	77.0	68.2	3.2	4.3	6.2	4.6
中国								
石家荘市 (著者ら 1991)	78.2	80.6	84.5	81.1	5.0	6.2	5.8	5.7
上海市 (石ら 1990)	59.5	77.3	83.4	73.4	2.7	4.3	5.3	4.1
上海市 (林ら 1996)	66.7	77.9	84.7	76.4	3.1	5.1	6.0	4.7
上海市 (本調査)	48.5	65.1	77.1	63.6	1.8	2.6	3.5	2.6

表22 歯肉炎罹患状況の比較

単位：名 (%)

	3歳	4歳	5歳	計
石家荘市 (著者ら 1991)	8 (14.5)	18 (10.0)	28 (10.3)	54 (10.7)
上海市 (著者ら 1997)	14 (46.7)	27 (77.1)	30 (57.7)	71 (63.2)
上海市 (本調査)	0	2 (3.2)	1 (2.1)	3 (1.7)

表23 不正咬合の発現状況の比較

単位：%

	反対咬合				開咬			
	3歳	4歳	5歳	計	3歳	4歳	5歳	計
中国								
石家荘市 (著者ら 1991)	3.6	6.7	7.4	5.9	0.0	0.0	0.4	0.1
上海市 (林ら 1996)	10.0	10.1	12.8	11.0	2.2	0.7	1.0	1.3
上海市 (本調査)	12.1	12.7	6.25	10.4	3.0	0.0	0.0	1.0

表24 乳歯歯冠近遠心幅径の比較

単位：mm

顎	歯種	日本		上海市		本調査	
		日本小児歯科学会) (著者ら1994)	石家莊市 (著者ら1994)	上海市 (著者ら1998)	平均値	平均値	平均値
男 児	A 乳中切歯	6.65	6.60	6.67	6.67	6.76	
	上 B 乳側切歯	5.50	5.45	5.42	5.42	5.47	
	C 乳犬歯	6.67	6.59	6.63	6.63	6.56	
	顎 D 第1乳臼歯	7.36	7.40	7.47	7.47	7.52	
	E 第2乳臼歯	9.30	9.01	9.17	9.17	9.27	
	A 乳中切歯	4.24	4.16	4.12	4.12	4.27	
	下 B 乳側切歯	4.78	4.62	4.71	4.71	4.68	
	C 乳犬歯	5.82	5.78	5.87	5.87	5.81	
	顎 D 第1乳臼歯	8.23	8.14	8.08	8.08	8.15	
	E 第2乳臼歯	10.34	9.97	10.05	10.05	10.07	
女 児	A 乳中切歯	6.50	6.51	6.62	6.62	6.63	
	上 B 乳側切歯	5.35	5.35	5.42	5.42	5.31	
	C 乳犬歯	6.54	6.42	6.50	6.50	6.62	
	顎 D 第1乳臼歯	7.19	7.12	7.30	7.30	7.37	
	E 第2乳臼歯	9.22	8.83	9.19	9.19	9.16	
	A 乳中切歯	4.11	4.02	4.04	4.04	3.96	
	下 B 乳側切歯	4.66	4.63	4.65	4.65	4.52	
	C 乳犬歯	5.72	5.62	5.78	5.78	5.79	
	顎 D 第1乳臼歯	8.08	7.86	8.07	8.07	8.07	
	E 第2乳臼歯	10.12	9.69	10.04	10.04	9.80	







表26 齒間空隙状態の比較

		単位：%			
		日本 (n=158)	石家莊市 (n=55)	上海市 (n=43)	本調査 (n=29)
上 顎	空隙型				
	靈長のみ	2.5	20.0	9.3	27.6
	靈長+発育 発育のみ	91.8 2.5	69.1 3.7	86.1 2.3	62.1 0.0
	閉鎖型	3.2	7.3	2.3	10.3
下 顎	空隙型				
	靈長のみ	7.6	9.1	9.3	17.2
	靈長+発育 発育のみ	70.9 12.0	61.8 10.9	67.4 11.6	51.7 17.2
	閉鎖型	9.5	18.2	11.6	13.8

表27 ターミナルプレーン、乳犬歯咬合状態の分類別発現頻度の比較

型別	男児				女児			
	日本	石家荘市	上海市	本調査	日本	石家荘市	上海市	本調査
	(n=83)	(n=36)	(n=21)	(n=32)	(n=75)	(n=19)	(n=22)	(n=26)
ターミナルプレーン								
垂直型	85.0	36.1	66.7	68.8	86.0	52.6	63.6	50.0
遠心段階型	8.4	5.6	4.8	19.6	8.7	7.9	9.1	15.4
近心段階型	6.6	58.3	28.6	25.0	5.3	39.5	27.3	34.6
乳犬歯咬合状態								
I型	85.6	59.7	52.4	34.4	80.7	68.4	61.4	26.9
II型	8.4	11.1	7.1	18.8	18.0	18.4	11.4	19.2
III型	6.0	29.2	40.5	46.9	1.3	13.2	27.3	53.8

単位：%

表28 ターミナルプレートの両側組合せ発現頻度の比較

単位：%

段階型組合せ	発現頻度			
	日本	石家荘市	上海市	本調査
垂直—垂直型	77.8	32.8	55.8	44.9
垂直—遠心型	9.5	3.6	9.3	17.2
垂直—近心型	5.7	14.6	9.3	13.8
遠心—遠心型	3.8	3.6	2.3	0.0
近心—近心型	3.2	43.6	23.3	3.4
近心—遠心型	0.0	1.8	0.0	20.7

表29 ターミナルブレーンと乳犬歯咬合状態との組合せ発現頻度の比較

単位：% (左右別実数)

ターミナル ブレーン	乳犬歯 咬合状態	男児				女児			
		日本	石家荘市	上海市	本調査	日本	石家荘市	上海市	本調査
		垂直	77.7 (129)	25.0 (18)	45.2 (19)	18.8 (6)	73.3 (110)	36.8 (14)	45.5 (20)
垂直	3.0 (5)	6.9 (5)	4.8 (2)	18.8 (6)	12.0 (18)	13.2 (5)	4.6 (2)	11.5 (3)	
垂直	4.2 (7)	4.2 (3)	16.7 (7)	31.2 (10)	0.7 (1)	2.0 (1)	13.6 (6)	19.2 (5)	
遠心	2.4 (4)	2.8 (2)	2.4 (1)	2 (6.3)	2.7 (4)	0.0	2.3 (1)	0.0 (0)	
遠心	5.4 (9)	2.8 (2)	2.4 (1)	0.0 (0)	6.0 (9)	5.3 (2)	6.8 (3)	7.7 (2)	
遠心	0.6 (1)	0.0	0.0	0.0 (0)	0.0	2.6 (1)	0.0	7.7 (2)	
近心	5.4 (9)	31.9 (23)	4.8 (2)	9.4 (3)	4.7 (7)	31.6 (12)	13.6 (6)	7.7 (2)	
近心	0.0	1.4 (1)	0.0	0.0 (0)	0.0	0.0	0.0	0.0 (0)	
近心	1.2 (2)	25.0 (18)	23.8 (10)	15.6 (5)	0.7 (1)	7.9 (3)	13.6 (6)	26.9 (7)	

表30 上顎第2乳臼歯 咬合面型 による出現率の比較

単位：歯 (%)

	n	4	4-	3+	3
日本小児 (埴原1956)	110	93 (84.5)	17 (15.5)	0 (0.0)	0 (0.0)
日米混血児 (白人系) (埴原1956)	70	53 (75.7)	17 (24.3)	0 (0.0)	0 (0.0)
日米混血児 (黒人系) (埴原1956)	36	30 (83.3)	6 (16.7)	0 (0.0)	0 (0.0)
中国人小児 (石家莊市) (著者ら1996)	165	130 (78.8)	34 (20.6)	1 (0.6)	0 (0.0)
中国人小児 (上海市) (本調査)	197	179 (92.1)	18 (7.6)	0 (0.0)	0 (0.0)

表31 上顎第1乳臼歯 咬合面型 による出現率の比較

	n	単位：歯 (%)			
		2	3M	3H	4-
日本小児 (埴原1963)	184	28 (15.2)	111 (60.3)	8 (4.4)	37 (20.1)
日米混血児 (白人系) (埴原1963)	70	12 (17.1)	48 (68.6)	3 (4.3)	7 (10.0)
米国小児 (白人) (埴原1963)	55	33 (60.0)	13 (23.6)	9 (16.4)	—
日米混血児 (黒人系) (埴原1963)	42	5 (11.9)	19 (45.2)	2 (4.8)	16 (38.1)
米国小児 (黒人) (埴原1963)	50	14 (28.0)	18 (36.0)	8 (16.0)	10 (20.0)
中国人小児 (石家荘市) (著者ら1996)	143	58 (40.5)	54 (37.8)	17 (11.9)	10 (7.0)
中国人小児 (上海市) (本調査)	202	10 (5.0)	144 (71.3)	16 (7.9)	26 (12.9)
					4 (2.8)
					6 (3.0)



表32 下顎第2乳臼歯の咬頭数及び咬合面型による出現率の比較

単位：歯 (%)

咬合面形態	5咬頭			4咬頭		
	Y	+	X	Y	+	X
	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)
人種						
日本小児 (埴原1956)	79 (97.5)	2 (2.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
日米混血児 (白人系) (埴原1956)	62 (95.0)	3 (5.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
日米混血児 (黒人系) (埴原1956)	33 (100.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
中国人小児 (石家荘市) (著者ら1996)	97 (95.1)	5 (4.9)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
中国人小児 (上海市) (本調査)	186 (98.9)	2 (1.1)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)

表33 下顎第2乳臼歯の第6咬頭出現率の比較

単位：歯（％）

人種	第6咬頭	
	計	n（％）
日本小児 （埴原1956）	81	12 （14.8）
日本小児 （埴原1966）	92	34 （36.9）
日米混血児（白人系） （埴原1956）	59	8 （13.2）
日米混血児（黒人系） （埴原1956）	28	5 （17.9）
中国人小児（石家荘市） （著者ら1996）	102	30 （29.4）
中国人小児（上海市） （本調査）	188	48 （25.5）

表34 下顎第2乳臼歯の第7咬頭出現率の比較

人種	単位：歯 (%)	
	第7咬頭	
	計	n (%)
日本小児 (埴原1956)	81	44 (54.3)
日本小児 (埴原1966)	156	115 (73.7)
日米混血児 (白人系) (埴原1956)	61	35 (57.4)
日米混血児 (黒人系) (埴原1956)	28	16 (57.0)
中国人小児 (石家荘市) (著者ら1996)	102	46 (45.1)
中国人小児 (上海市) (本調査)	188	103 (54.8)

表35 下顎第1乳臼歯の咬頭数及び咬合面型による出現率の比較

単位：歯 (%)

人種	咬合面型		Y4		+4		X4		Y5		+5		X5		Y6		+6		X6	
	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)
日本小児 (埴原1956)			46 (54.1)								38 (44.7)					1 (1.2)				
日米混血児 (白人系) (埴原1956)			31 (53.4)								26 (44.8)					1 (1.8)				
日米混血児 (黒人系) (埴原1956)			11 (37.9)								17 (58.6)					1 (3.5)				
中国人小児 (石家荘市) (著者ら1996)	40 (38.1)		3 (2.9)	10 (9.5)		50 (47.6)	0 (0.0)							2 (1.9)	0 (0.0)	0 (0.0)				0 (0.0)
中国人小児 (上海市) (本調査)	121 (61.7)		7 (3.6)	21 (10.7)		47 (24.0)	0 (0.0)							0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)				0 (0.0)

表36 上顎第2乳臼歯 カラベリ一結節発達状態別比較

単位：歯 (%)

	n	carabelli's pit							carabelli's cusp								
		0	1	2	3	4	5	6	7	0	1	2	3	4	5	6	7
日本小児 (埴原1956)	113	58 (51.3)		45 (39.8)											10 (8.8)		
日米混血児 (白人系) (埴原1956)	70	18 (25.7)		41 (58.6)											11 (15.7)		
米国人小児 (白人) (埴原1963)	56	3 (5.4)		33 (58.9)											20 (35.7)		
中国人小児 (石家莊市) (著者ら1996)	183	87 (47.5)		87 (47.5)											9 (5.0)		
中国人小児 (上海市) (本調査)	208	56 (27.0)		136 (65.4)											16 (7.6)		

表37 下顎第2乳臼歯 Protostylid 出現頻度および発達状態の比較

人種	頻度 (%)	単位：歯 (%)			
		trace	distinct	strong	計
日本小児 (埴原1956) n=81	27/81 (33.3)	20 (74.2)	7 (25.8)	0 (0.0)	27 (100.0)
中国人小児 (石家莊市) (著者ら1996) n=140	65/140 (46.5)	46 (70.8)	15 (23.1)	4 (6.1)	65 (100.0)
中国人小児 (上海市) (本調査) n=199	98/199 (49.2)	72 (36.2)	26 (13.0)	0 (0.0)	98 (100.0)

日本財団補助金による

1999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－

2000年3月31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 北中 進   
所属機関名 日本大学薬学部  
職 名 教授 年齢 50 才  
所 在 地 〒274-8555 船橋市習志野台7-7-1  
電話 047-465-5356 内線 \_\_\_\_\_

1. 研究課題

中国東北部植物からのI型アレルギー抑制物質の探索

2. 研究期間 自 1999 年 4 月 1 日 ~ 至 2000 年 3 月 15 日

3. 研究組織

日本側研究者氏名 北中 進 (50才)  
所属機関 日本大学薬学部 職名 教授

中国側研究者氏名 姚 新生 (64才)  
所属機関 瀋陽薬科大学 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。

## 中国東北部植物からの I 型アレルギー抑制物質の探索

研究代表者氏名 北中 進

所 属 日本大学薬学部

役 職 教授

### 要 旨

中国東北部の植物 60 種についてラット腹腔由来のマスト細胞を用いて抗原抗体反応によるヒスタミン遊離抑制試験を行い、*Bidens parviflora* Willd. に強い抑制活性が認められた。本植物のエタノール抽出エキス中のブタノール画分について活性成分を探索し、5 種の化合物を単離して、NMR、MS などのスペクトル解析及び酵素加水分解等により、5 種の新規ポリアセチレン配糖体の構造を決定した。また、C-3 位に二級水酸基を持つ 4 種のポリアセチレン配糖体の C-3 位の絶対配置決定には、それらのアグリコンに改良 Mosher 法を適用していずれの化合物も *R*-配置と決定した。これらのポリアセチレン配糖体は *in vitro* において強いヒスタミン遊離抑制作用を示し、更に 4 種のポリアセチレン配糖体はマウスマクロファージ様株化細胞、RAW264.7 細胞活性化による NO 産生を濃度依存的に抑制することが分かった。

### KEY WORD

*Bidens parviflora* Willd.; Antiallergic reagent; polyacetylene glycoside; mast cell; macrophage

### 研究報告

#### 目的

中国東北部は、高麗ニンジンの野生する長白山脈や内モンゴルの草原地帯まで様々な環境に適応した植物の分化がみられ、多くの種類と大きな群落が認められる。しかしながら、漢方医療に使用されている植物はその一部にすぎない。そこで多様な植物相を持つ中国東北部の瀋陽薬科大学の姚教授との共同研究で、今まで利用されていない植物や民間薬を収集し、I 型アレルギー抑制物質の探索を行った。

アトピー性皮膚炎、気管支喘息、アレルギー性鼻炎、花粉症などの I 型アレルギー疾患は、近年急速に増加しているが、これらの疾患に対して有効な治療法がない状態である。これらの疾患は主に I 型アレルギー反応が関与していると考えられており、この I 型アレルギー反応は反応の初期段階に、マスト細胞や抗塩基球に結合した IgE 抗体と対応するアレルゲン分子が反応してこれらの細胞を刺激し、ヒスタミンやロイコトリエン類などの化学伝達物質が遊離され、他の炎症細胞なども動員されて炎症を生じておこるものである。そこでマスト細胞からヒスタミンおよびロイコトリエン類の放出を抑制する新たな物質が望まれている。さらにアレルギー性炎症にも深く関与していると考えられるマクロファージの活性化機能について影響を及ぼす天然物質について医薬品開発の観点から興味をもたれる。



マクロファージは生体内において、食細胞、抗原提示細胞、あるいは免疫学的機序のエフェクター細胞として、生体防御反応である炎症や免疫系への橋渡しに関与している。また活性化されることにより、活性酸素や NO の他、各種のインターロイキンや腫瘍壊死因子 (TNF- $\alpha$ ) などのサイトカインを分泌する。これらの生理活性成分は、腫瘍細胞を傷害したり、微生物による感染を防ぐなど、生体を守る上で大きな役割を果たしている。しかし、過剰に産生された NO やサイトカインは逆に生体に傷害を与え炎症を起こし、種々の疾病のもととなる。従って、マクロファージの活性化機能を検討することは、アレルギーや癌など、各種の疾病予防又は治療に大きな意義があると考えられる。

これまで我々は、中国東北部地域の植物を採取した中で *Bidens parviflora* Willd. にヒスタミン遊離抑制活性とマクロファージの NO 産生抑制活性が認められた。*Bidens parviflora* Willd. は中国名小花鬼針草といい、感冒による発熱、咽頭痛、腸炎による下痢、盲腸炎、打撲症中国の東北、内モンゴル、河北、河南及び西南部に分布する。<sup>1,2)</sup> 成分に関しては、astragalín、isoquercetin、sulfurein、maritimein、<sup>3)</sup> jujubasterol 3 $\beta$ -O-[ $\beta$ -D-glucopyranosyl-1-(1-3)-[ $\alpha$ -L-deoxytalosyl-(1-2)]- $\alpha$ -L-arabinosyl]、6-hydroxycoumarin、7-hydroxy-6-methoxycoumarin、oleanolic acid、ursolic acid、narirutin、rutin、5,7,2',5'-tetrahydroxyflavone<sup>4)</sup> の報告がある。

そこでこれらの活性を指標として、マスト細胞からのヒスタミン遊離を抑制し、更にマクロファージの活性化機能を制御する化合物を探索してその構造決定と阻害活性を検討した。

## 方法

### (1) スクリーニング試料の作製

中国東北部植物 60 種 (Table 1) をそれぞれ 60% エタノールにより抽出し、エキスを作製して生物活性試験の試料とした。

### (2) スクリーニング

#### ヒスタミン遊離抑制試験

7~8 週齢の Wister 系 ラットを断頭後放血させ、腹腔内に冷タイロート液を腹腔内に注入し、公知の方法により肥満細胞を単離し、 $1\sim 2\times 10^6$  cells/mL となるように 0.1% 牛血清アルブミン (BSA) を含むタイロート液に懸濁し、細胞浮遊液を調整した。各抽出物を各濃度に調整した試料溶液に上記細胞浮遊液を加えて 37 $^{\circ}$ C、5 分間 インキュベートを行い、脱顆粒誘発剤に compound 48/80 をもちた場合はこれに加え、37 $^{\circ}$ C、10 分間 インキュベートを行う。また、抗原抗体反応によるヒスタミン遊離抑制試験には脱顆粒誘発剤に抗ジニトロフェニル (DNP)-mouse monoclonal IgE を加えて 37 $^{\circ}$ C、1 時間 インキュベートを行った後、細胞はタイロート液で洗浄する。この感作した肥満細胞は試料溶液に加え、37 $^{\circ}$ C、5 分間 インキュベートを行い、抗原として DNP-BSA とフォスファチジルセリンを加え、37 $^{\circ}$ C、10 分間 インキュベートを行う。これらの反応液は氷冷して反応を停止、遠心分離した上澄に 0.1N 塩酸を加えた後、ヒスタミン量を前法に準じて高速液体クロマトグラフィーにより測定した。

この結果から、阻害率を次式により算出した。

$$\text{阻害率 (\%)} = \left( 1 - \frac{A - B}{C - B} \right) \times 100$$

A：薬物存在下で compound 48/80 あるいは IgE 及び DNP-BSA 刺激により遊離されるヒスタミン量

B：自発的に遊離されるヒスタミン量

C：compound 48/80 あるいは IgE 及び DNP-BSA 刺激により遊離されるヒスタミン量

### マクロファージの NO 産生抑制試験

活性作用を有する植物のスクリーニングは、マクロファージの NO 産生能に対する効果を指標とした。マクロファージはマウスマクロファージ様株化細胞、RAW264.7 細胞を用い、植物抽出エキスを単独に添加した時の NO 産生効果と植物抽出エキスと既知活性化物質である IFN- $\gamma$  (10 U/ml) 及び LPS (100 ng/ml) を同時に添加したときの NO 産生抑制作用を検討した。16 時間培養した後の培養上清中の NO<sub>2</sub><sup>-</sup>量をグリース法で測定した。また、細胞毒性を MTT 法及びトリパンブルー色素排除法及び鏡検による形態観察で確認した。

### (3) 研究材料及び抽出

*Bidens parviflora* Willd. は中国遼寧省大黒山にて 1999 年 7 月に全草を採集し乾燥生薬を得た。*Bidens parviflora* の全草 (5.5 kg) は 60%エタノールで還流抽出した。抽出液は減圧下濃縮し、エキス (674.2 g) を得た。このエキスを水に懸濁後、ヘキサン、酢酸エチル、1-ブタノールで抽出し、それぞれの画分のエキスを作成した。1-ブタノールエキス (176 g) はシリカゲル、Sephadex LH-20、逆相型 HPLC を繰り返し、活性成分 1-5 を単離した。

## 結果

中国東北部に産する植物 60 種 (Table 1) についてヒスタミン遊離抑制試験及びマクロファージの NO 産生能に対する効果を検討した結果、*Bidens parviflora* にヒスタミン遊離抑制活性及びマクロファージの NO 産生能に対する抑制活性が認められた。そこで *Bidens parviflora* の 60%エタノールエキスについて、ヘキサン、酢酸エチル及び 1-ブタノールで順次抽出し、それらの画分について活性試験を行ったところ、ヒスタミン遊離抑制活性及びマクロファージの NO 産生能に対する抑制活性が共に 1-ブタノール画分に比較的強い活性が認められた。そこで 1-ブタノール画分についてバイオアッセイにより検討しながら各種クロマトグラフィを適用し、化合物 1-5 の 5 種の化合物を単離した。

化合物 1 は淡褐色粉末、 $[\alpha]_D^{25}$  -146.4° で、HR-MS より分子式は C<sub>16</sub>H<sub>22</sub>O<sub>7</sub> が、また EIMS より  $m/z$  164 [M-hexose]<sup>+</sup> にアグリコン相当するフラグメントイオンが観測された。

(Table 2) UV スペクトルは 241 ( $\epsilon$ =1597)、253 (2282)、268 (3064)、284 (2324) に 4 つの特徴的な極大吸収が認められた。IR スペクトルでは、水酸基 (3396cm<sup>-1</sup>)、アセチレン (2231, 2138 cm<sup>-1</sup>) 及びエチレン基 (1675 cm<sup>-1</sup>) の存在が認められた。1 の  $\beta$ -グルコシダーゼによる酵素加水分解では、相当するアグリコン (1a) とグルコースが

得られた。1 の UV スペクトルにおいて、241、253、268 及び 284 nm に 4 つの特徴的な吸収が認められアセチレンによる吸収であることが示唆された。また、HMQC スペクトルによる測定を含めた  $^1\text{H-NMR}$  スペクトル (Table 3) 及び  $^{13}\text{C-NMR}$  スペクトル (Table 4) の解析において、1 は 1 モルのグルコース、3 個のメチレン、2 個のメチン、1 組のトランス二重結合のプロトン及び 4 つの 4 級炭素の存在が認められた。アグリコン部の構造には、 $^1\text{H-}^1\text{H-COSY}$  スペクトルにより、 $\delta 1.80$  (dd,  $J=7.1, 1.8$  Hz, Me-10) のメチル基と連結する 2 個のトランス二重結合  $\delta 6.32$  (dd,  $J=15.9, 7.1$  Hz, H-9) と  $\delta 5.58$  (H-8, dq,  $J=15.9, 7.1$  Hz) の存在が認められた。 $\delta 3.72$  (dd,  $J=10.4, 6.4$  Hz, H-1a) と  $3.99$  (dd,  $J=10.4, 5.8$  Hz, H-1b) の非等価のメチレンプロトン、 $\delta 1.97$  (m) のメチレン及び  $\delta 4.64$  (t,  $J=6.7$  Hz) のメチンの接続性が認められた。そこで HMBC スペクトルを測定し更に構造解析を行った。(Fig. 1) その結果、アグリコン部の構造は共役した 2 個のアセチレンにメチル基が結合したトランスオレフィン及び 1,3-ジヒドロキシプロパンが結合した炭素 10 個の直鎖構造と決定した。D-グルコースの結合位置は  $\delta 4.26$  のアノメリックプロトン (d,  $J=7.7$  Hz) が  $\delta 66.9$  (C-1) のオキシメチレンと遠隔カップリングが認められたことから、C-1 に結合していることが判明した。これらのスペクトルデータより、1 の構造は Fig. 1 のように決定した。次に、2 級水酸基が結合する C-3 位の絶対配置を決定するため、1a について改良 Mosher 法を適用し検討した。その結果、1 位及び 2 位のメチレンプロトンはいずれもプラスの値をとり、また、プロペン部分のメチル基及びオレフィンプロトンはいずれもマイナスの値をとることから、C-3 位は R-配置と決定した。(Fig. 2)

以上の結果より、1 の構造は Fig. 1 のように決定した。本化合物及びアグリコン 1a は新規化合物である。

化合物 2 は淡褐色粉末、 $[\alpha]_D -157.5^\circ$  で、HR-MS より分子式は 1 と同じ  $\text{C}_{16}\text{H}_{22}\text{O}_7$  が示された。その UV、IR、 $^1\text{H-}$ 及び  $^{13}\text{C-NMR}$  スペクトルは 1 のそれらとほとんど類似しているが、 $^1\text{H-}$ 及び  $^{13}\text{C-NMR}$  スペクトル中のオレフィンに結合するメチル基の化学シフト値はわずかに 1 と異なっている。すなわち、1 と比較してメチルプロトン ( $\delta 1.89$ ) は 0.09 ppm 低磁場へ、メチル炭素 ( $\delta 16.5$ ) は 2.3 ppm 高磁場へシフトが認められた。 $\delta 5.53$  (H-8) と  $6.20$  (H-9) の 2 個のオレフィンプロトンの  $J$  値 (10.5 Hz) から *cis*-配置が推定された。また、差 NOE 実験において、 $\delta 1.89$  (Me-10) と  $\delta 5.53$  (H-8) の間に NOE が観測されたことから、二重結合の配置は *Z* と決定した。更に 2 の HMBC スペクトルから、2 の構造は 1 の幾何学異性体が推定された。C-3 の絶対配置の決定は、2 を  $\beta$ -グルコシダーゼにより加水分解して得たアグリコン (2a) に Mosher 法を適用した結果、R-配置と決定した。(Fig. 2) 以上のことから、2 の構造は 1 の幾何学的異性体である Fig. 1 に示す構造と決定した。

化合物 3 は淡褐色粉末、 $[\alpha]_D -52.2^\circ$  で、HR-MS より分子式は  $\text{C}_{16}\text{H}_{20}\text{O}_7$  が示された。その UV スペクトル、284 ( $\epsilon=284$ )、267 (162)、253 (119)、239 (40) は 1 及び 2 と類似したスペクトルを示すが、その吸収はたいへん弱い。一方、IR スペクトルにおいて、 $2221\text{ cm}^{-1}$  及び  $2138\text{ cm}^{-1}$  にアセチレンの吸収が認められ、1 より強い吸収強度が認められた。3 の  $^1\text{H-NMR}$  及び  $^{13}\text{C-NMR}$  スペクトルデータは 1 と部分的に類似するが、3

ではオレフィンが消失し、アセチレンが1つ増えた3つのアセチレンの存在が認められた。更に<sup>1</sup>H-<sup>1</sup>HCOSEY、HMBCスペクトルから、**3**の平面構造はFig. 1のように決定した。C-3の絶対配置については、**3**のアグリコン (**3a**)について Mosher 法を適用したところ *R*-配置と決定した。(Fig. 2)

化合物**4**は淡褐色粉末、 $[\alpha]_D -71.6^\circ$ で、HR-MSより分子式はC<sub>16</sub>H<sub>22</sub>O<sub>8</sub>が示された。そのUVスペクトル、284 ( $\epsilon=284$ )、267 (162)、253 (119)、239 (40)は化合物**1**及び**2**とよく類似したスペクトルを示すが、その吸収はたいへん弱い。一方、IRスペクトルにおいて、2221cm<sup>-1</sup>及び2138cm<sup>-1</sup>にアセチレンの吸収が認められ、その強度は1の吸収より強く認められた。**4**のUV、IR、<sup>1</sup>H-及び<sup>13</sup>C-NMRスペクトルは**1**とほとんどよく類似するが、**1**にあるメチル基が認められなく、そのかわりヒドロキシメチレン ( $\delta_H 4.13$ , dd,  $J=4.9, 1.9$  Hz;  $\delta_C 62.6$ , t)の存在が認められた。更に<sup>1</sup>H-<sup>1</sup>HCOSEY、HMBCスペクトルから、**3**の平面構造はFig. 1のように決定した。C-3の絶対配置は、化合物**3**のアグリコン (**3a**)について Mosher 法を適用し *R*-配置と決定した。(Fig. 2)

化合物**5**はmp 164.0°Cの無色針状晶、 $[\alpha]_D -67.4^\circ$ で、HR-MSより分子式はC<sub>16</sub>H<sub>20</sub>O<sub>8</sub>が示された。そのUV及びIRスペクトルは**4**とよく類似するが、**5**の<sup>1</sup>H-NMR及び<sup>13</sup>C-NMRスペクトルでは**4**で見られるヒドロキシメチンが消失し、かわりに1個のメチレン基が認められ、C-4からC-10の構造及び糖部は**4**と同一であることが判明した。更に**5**のHMBGスペクトルからFig.1の構造と決定した。

化合物**1-5**についてヒスタミン遊離抑制試験及びマクロファージの一酸化窒素(NO)産性能におよぼす効果について検討した。

ヒスタミン遊離抑制活性はラット腹腔由来のマスト細胞に試験薬物を添加した後、IgEを感作させた、更に抗原刺激により遊離するヒスタミン量を測定し、抑制率を算出した。化合物**1-5**のいずれの化合物においても活性が認められた。(Table 5)また、マクロファージのNO産性能におよぼす効果についてLPSのみ及びIFN- $\gamma$ とLPSで活性化した時の試験薬物の作用について検討した結果、**2**を除く**1**、**3**、**4**及び**5**に強い活性が認められた。(Table 6, 7)

## 考察

*Bidens parviflora* Willd. は中国東北部に自生するキク科の植物で、その全草は古来、解熱、抗炎症、リウマチ治療に民間薬として使用されてきた。<sup>1,2)</sup>しかし、この植物の抗炎症作用や生理学的あるいは病理学的機能については十分に明らかとなっていない。本研究において、*Bidens parviflora*にはマスト細胞におけるヒスタミン遊離抑制作用やマクロファージの産生するNOを調節する作用が明らかとなった。そこで活性成分の分離を行ったところ、強い活性を示す画分の一つから5種の化合物を単離した。これら5種の化合物の構造は各種スペクトル解析、化学反応からいずれも炭素10個の直鎖状のポリアセチレンアルコールのグルコース配糖体と決定した。また、化合物**1-4**は2級水酸基が結合するC-3位の絶対配置をそれらのアグリコンについて Mosher 法を適用することにより、いずれも *R* 配置と決定することができた。化合物**1-5**のアグリコンも新規化合物であった。今回単離したポリアセチレン配糖体は天然では非常に珍しいものであり、植物

からは *Bidens pilosa*<sup>5)</sup> に続き 2 例目と考えられる。

化合物 1-5 のポリアセチレン配糖体に強いヒスタミン遊離抑制作用が認められた。ポリアセチレン類にヒスタミン遊離抑制作用が認められた初めての例と考えられる。また、*Bidens parviflora* は抗炎症を目的に用いられていることから、これらの成分が関与している事が推察される。次に、化合物 1、3、4、5 はリポポリサッカライド (LPS) 刺激のマクロファージが産生する NO について、 $IC_{50}$  0.116~0.225  $\mu$ M で抑制を示し、LPS 及び IFN-g 刺激によるマクロファージが産生する NO では  $IC_{50}$  0.077~0.116  $\mu$ M で強い抑制がみとめられ、これらの抑制は LPS のみの刺激より、LPS と IFN-g の両者による刺激でより強い抑制が認められた。これらの NO 産生の機構については今後検討していきたい。そしてこれらのポリアセチレン配糖体はマクロファージの活性化を抑制し、TNF- $\alpha$  等のサイトカイン類の遊離をも抑制することが推察され、生体に対し過剰な炎症性サイトカインが自己組織に傷害を与える働きを防御する効果を持つことが期待される。また、LPS と IFN- $\gamma$  による免疫応答に対しても強く抑制することから、本植物がリウマチ治療に用いられていることを考え合わせ、これらの化合物が新たな治療薬と成りうる可能性が示唆され、また、医薬品開発のリード化合物として注目したい。今後、更にサイトカイン類の産生に対する作用についても検討していかなければならない。

#### 参考文献

- 1) 中薬大辞典、上海科学技術出版社 小学館編 第四卷 pp 2806.
- 2) 中国長白山薬用植物彩色図誌、人民衛生出版社、pp 423、1997.
- 3) Chinese Traditional and Herbal Drugs, **22**, 531-533 (1991).
- 4) De Tommasi, N., De Feo, V., De Simone, F., Pizza, C., Zhou, Z. L., Fitoterapia , **63**, 470 (1992).
- 5) Alvarez, L., Mrquina S., Villarreal, M. L., Alonso D., Aranda, E., Delgado, G., Planta Med., **62**, 355-357 (1996).

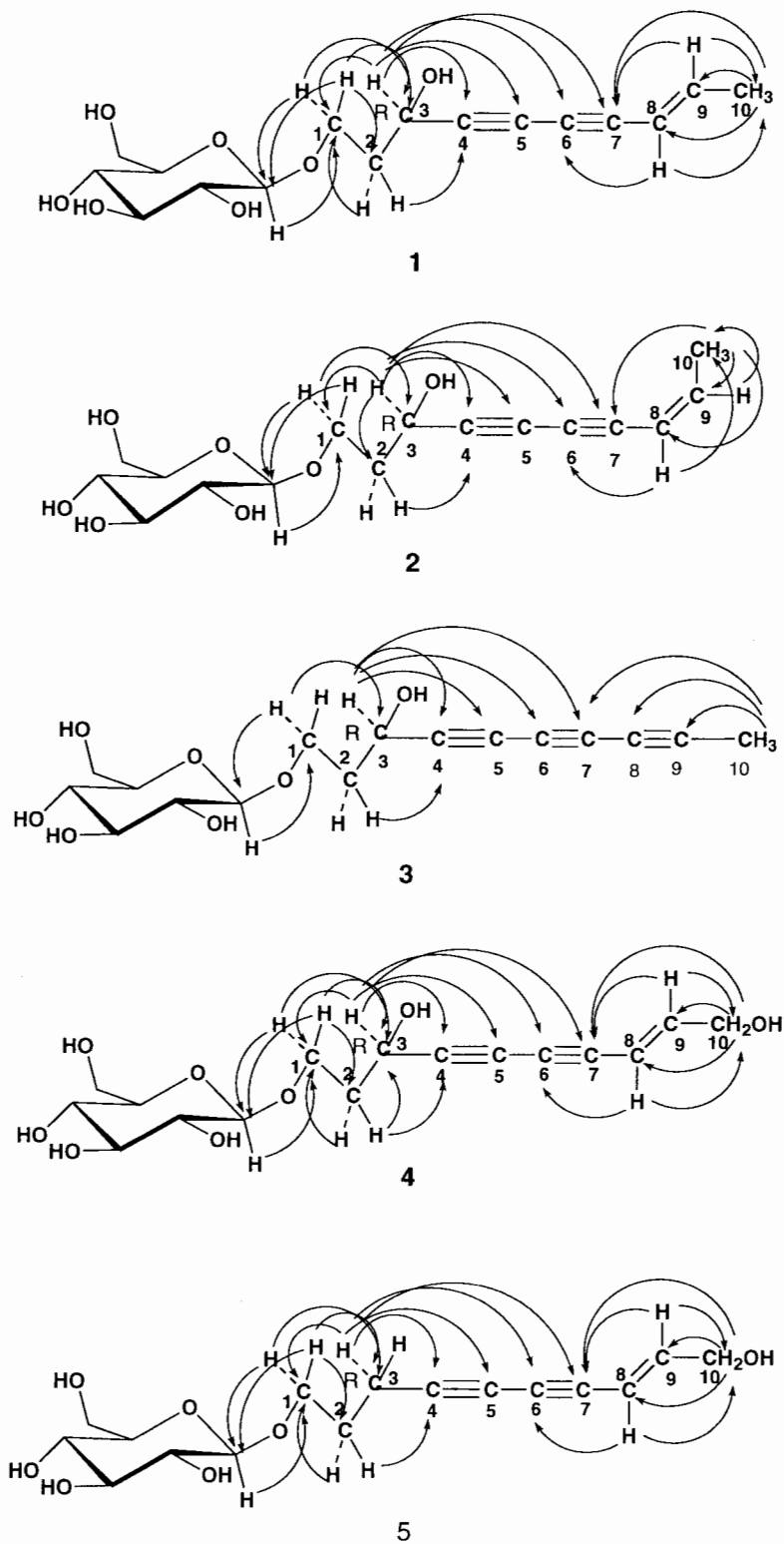


Fig. 1. HMBC correlations of compounds 1-5 (H  $\rightarrow$  C)

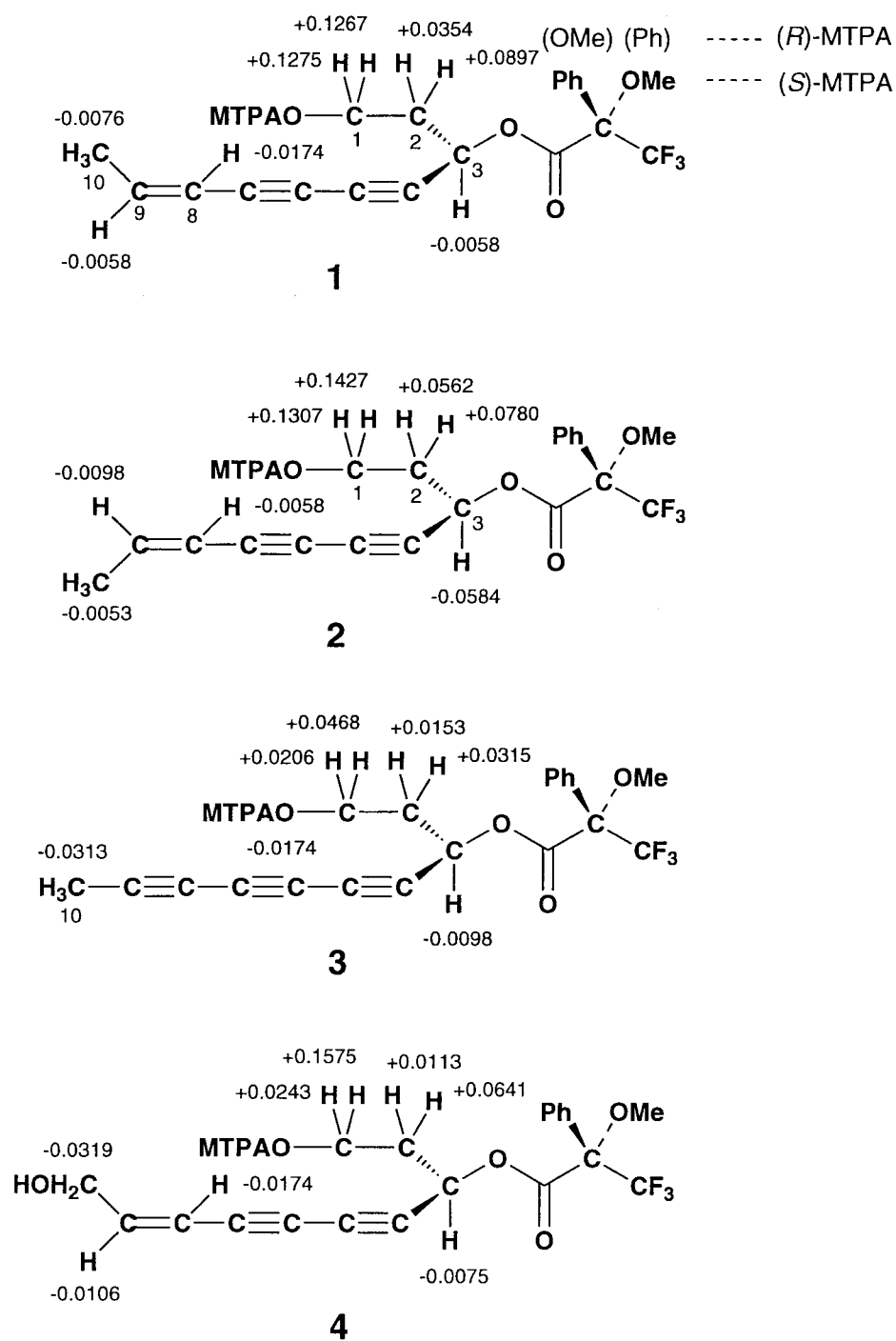


Fig. 2.  $\Delta\delta$  ( $\delta_S - \delta_R$ ) values (ppm) obtained from the MTPA esters of the aglycones of polyacetylene glucosides 1-4 in  $\text{CHCl}_3$  at 25 °C.

Table 1. Screening

No.	Plants	No.	Plants
1	<i>Melastoma dodecandrum</i> Lour.	31	<i>Chrysanthemum boreale</i> Mak.
2	<i>Aster tataricus</i> L.	32	<i>Ainsliaea acerifolia</i> Sch.-Bip.
3	<i>Achillea millefolium</i> L.	33	<i>Aralia continentalis</i> Ktag.
4	<i>Gnaphalium tranzschelii</i> Kriep.	34	<i>Ligulara</i> sp.
5	<i>Aster scaber</i> Thunb.	35	<i>Dryopteris crassrhizoma</i> Nakai
6	<i>Adenocaulon himalaicum</i> Bdgew.	36	<i>Porphyrosclia decursiva</i> f. <i>albiflora</i> N.
7	<i>Synurus deltoides</i> (Ait.) Nakai	37	<i>Aconitum koreanum</i> (Levl.) Raipaics
8	<i>Eupatorium japonicum</i> Thunb.	38	<i>Inula japonica</i> Thunb.
9	<i>Siegesbeckia pubescens</i> Makino	39	<i>Galium verum</i> L.
10	<i>Cirsium vlassoniahum</i> Fisch	40	<i>Leontopodium leontopodioides</i> (Will.) Beauv.
11	<i>Carpesium macrocephalum</i> Franch et Sar	41	<i>Dioscorea nipponica</i> Makino
12	<i>Ligularia fischri</i> (Ledeb.) Turcz.	42	<i>Cynura segetum</i> (Lour.) Merr.
13	<i>Senecio argunensis</i> Turcz.	43	<i>Lactuca sativa</i> L.
14	<i>Patrinia scabiosaefolia</i> Fisch.	44	<i>Maericaria chamomilla</i> L.
15	<i>Hypericum ascyon</i> L.	45	<i>Centaurea monanthus</i> Ge.
16	<i>Equisetum hiemale</i> L.	46	<i>Ageratum conyzoides</i> L.
17	<i>Bidens tripartita</i> L.	47	<i>Rumex crispus</i> L.
18	<i>Veronica sibirica</i> L.	48	<i>Polygonum tinctorium</i> Lour.
19	<i>Allium senescens</i> L.	49	<i>Isatis indigotica</i> Fort.
20	<i>Tribulus terrestris</i> L.	50	<i>Juglans mandshrica</i> Maxim.
21	<i>Lactuca indica</i> L.	51	<i>Aristolochia contorta</i> Bge.
22	<i>Senecio flammeus</i> Thrcz.	52	<i>Helianthus decapetalus</i> Hort.
23	<i>Echinops gmelini</i> Turcz.	53	<i>Mentha spicata</i> L.
24	<i>Delphinium grandiflorum</i> L.	54	<i>Cardiospermum halicacabum</i> L.
25	<i>Datura stramonium</i> L.	55	<i>Euphorbia pekinnensis</i> Rupr.
26	<i>Ephedra sinica</i> Stapf.	56	<i>Ruta graveoles</i> L.
27	<i>Cirsium setosum</i> (Willd.) MB.	57	<i>Isodon glaucocalyx</i> (Maxim.) Kodo
28	<i>Saussurea glomerata</i> Poiret.	58	<i>Bidens parviflora</i> Willd.
29	<i>Aster naackii</i> Regel	59	<i>Galatella dahurica</i> DC.
30	<i>Aster integrifolias</i> Franch.	60	<i>Periploca sepium</i> Bge.



Table 2. Physicochemical Properties of Polyacetylene Glucosides 1-5

	1	2	3	4	5
Appearance	brown powder	brown powder	brown powder	brown powder	needles
mp					164
$[\alpha]_D^{25}$	-146.4° (c=0.6, CH <sub>3</sub> OH)	-157.5° (c=0.4, CH <sub>3</sub> OH)	-52.2° (c=0.6, CH <sub>3</sub> OH)	-71.6° (c=0.5, CH <sub>3</sub> OH)	-67.7° (c=0.5, CH <sub>3</sub> OH)
EI-MS <i>m/z</i>	326 (M) <sup>+</sup> 164 (M-glc) <sup>+</sup>	326 (M) <sup>+</sup> 164 (M-glc) <sup>+</sup>	324 (M) <sup>+</sup> 162 (M-glc) <sup>+</sup>	342 (M) <sup>+</sup> 163 (M-Oglc) <sup>+</sup>	326 (M) <sup>+</sup> 164 (M-glc) <sup>+</sup>
HR-MS <i>m/z</i> found.	326.13690	326.13633	324.12116	342.13145	326.13658
calcd.	326.13655	326.13655	324.12090	342.13145	326.13655
Molecular formula	C <sub>16</sub> H <sub>22</sub> O <sub>7</sub>	C <sub>16</sub> H <sub>22</sub> O <sub>7</sub>	C <sub>16</sub> H <sub>20</sub> O <sub>7</sub>	C <sub>16</sub> H <sub>22</sub> O <sub>8</sub>	C <sub>16</sub> H <sub>22</sub> O <sub>7</sub>
UV $\lambda_{\max}^{\text{KBr}}$ nm ( $\epsilon$ )	283.5 (2,324) 267.5 (3,064) 253.0 (2,282) 240.5 (1,597)	283.0 (2,287) 267.0 (3,250) 253.0 (2,328) 239.5 (1,630)	283.5 (136) 267.0 (162) 253.0 (119) 238.5 (40)	283.0 (25,650) 267.0 (33,242) 253.0 (23,392) 240.5 (12,209)	328.5 (17,537) 283.0 (24,963) 266.5 (23,725) 252.0 (21,854) 239.0 (20,857)
IR $\nu_{\max}$ cm <sup>-1</sup>	3394 s (OH) 2923 s (CH) 2231 m (C=C) 1675 m (C=C) 1160 s (C-O) 1074 s (C-O)	3382 s (OH) 2921 s (CH) 2231 m (C=C) 1635 m (C=C) 1160 s (C-O) 1074 s (C-O)	3386 s (OH) 2924 s (CH) 2221 s (C=C) 1643 m 1161 s (C-O) 1074 s (C-O)	3381 s (OH) 2886 s (CH) 2231 m (C=C) 1641 m (C=C) 1160 s (C-O) 1076 s (C-O)	3230 s (OH) 2927 s (CH) 2233 m (C=C) 1627 m (C=C) 1160 s (C-O) 1074 s (C-O)

Table 3. <sup>1</sup>H-NMR data of polyacetylene glucosides 1-5 (δ (ppm) in MeOH-d<sub>4</sub>, 500 MHz)

Position	1	2	3	4	5
1	3.99 1H dt(10.4,5.8)	4.00 1H dt(10.8,5.4)	3.98 1H dt(10.1,5.6)	3.99 1H dt (9.8,5.8)	3.96 1H dt(9.8,5.8)
	3.72 1H dt(10.4,6.4)	3.74 1H dt(10.8,6.8)	3.70 1H dt(10.1,6.8)	3.73 1H dt (9.8,6.7)	3.63 1H dt(9.8,6.6)
2	1.97 2H m	1.97 2H m	1.96 2H m	1.97 2H m	1.83 2H m
3	4.64 1H t (6.7)	4.67 1H t (8.2)	4.62 1H t (7.1)	4.65 1H t (6.7)	2.47 2H t (7.3)
8	5.58 1H dq(15.9,1.8)	5.53 1H dq(10.5,2.1)		5.81 1H dt (15.9,1.9)	5.76 1H dt(15.9,1.9)
9	6.32 1H dq(15.9,7.1)	6.20 1H dq(10.5,6.8)		6.39 1H dt(15.9,4.9)	6.34 1H dt (15.9,4.6)
10	1.80 3H dd (7.1;1.8)	1.89 3Hdd(6.8;2.1)	1.96 3H s	4.13 2H dd(4.9;,1.9)	4.13 2H dd(4.6,1.9)
glc-1'	4.26 1H d (7.7)	4.26 1H d (7.8)	4.25 1H d (7.6)	4.26 1H d (8.0)	4.24 1H d (8.0)

Table 4.  $^{13}\text{C}$ -NMR data of polyacetylene glucosides **1-5** ( $\delta$  (ppm) in MeOH- $d_4$ , 125 MHz)

Position	1	2	3	4	5
1	66.9 t	66.8 t	66.7 t	66.8 t	69.2t
2	39.1 t	38.9 t	38.9 t	39.0 t	29.8 t
3	60.3 d	60.2 d	60.0 d	60.2 t	16.9 t
4	83.1 s	85.2 s	79.4 s	84.4 s	84.3 s
5	69.8 s	69.5 s	69.7 s	69.6 s	66.2 s
6	72.5 s	76.0 s	64.6 s	74.2 s	74.1 s
7	78.2 s	78.5 s	59.1 s	77.6 s	75.3 s
8	110.6 d	109.7 d	64.9 s	108.6 d	109.2d
9	145.1 d	144.0 d	78.0 s	148.1 d	147.1d
10	18.8 q	16.5 q	3.8 q	62.6 t	62.7 t
glc-1'	104.6 d	104.6 d	104.6 d	104.6 d	104.5 d
2'	75.2 d	75.1 d	75.1 d	75.1 d	75.2 d
3'	78.1 d	78.5 d	78.1 d	78.1 d	78.1 d
4'	71.7 d	71.6 d	71.6 d	71.6 d	71.7 d
5'	78.0 d	78.0 d	77.9 d	77.9 d	77.9 d
6'	62.8 t	62.7 t	62.7 t	62.7 t	62.8 t

Table 5. Inhibitory Effect of Polyacetylene Glucosides **1-5** on Histamine Release from Mast Cells Induced by Antigen-Antibody Reaction (Inhibition rate (%))

Concentration	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>
100 $\mu\text{g/ml}$	64.49	60.95	53.76	80.00	49.90
30 $\mu\text{g/ml}$	60.79	41.64	46.70	39.93	42.88
10 $\mu\text{g/ml}$	43.24	37.08	37.26	32.08	35.56
3 $\mu\text{g/ml}$	37.16	34.08	29.88	22.60	10.27

Indomethacine 625  $\mu\text{M}$  ; Inhibition rate 44.86%

Table 6. Inhibitory Effect of Polyacetylene Glucosides **1-5** toward NO Production by Macrophages pretreated with LPS (Inhibitory rate (%))

Concentration	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>
100 µg/ml	74.7	13.5	75.0	81.7	82.1
30 µg/ml	41.1		60.3	38.2	40.9
10 µg/ml	32.2		15.6	3.8	17.8
3 µg/ml			3.3	0.0	3.3

Assay : Cells were treated with compounds in the presence of 100 ng LPS at 37 °C for 18 h. The amount of NO<sub>2</sub><sup>-</sup> in the culture supernatant was determined.

Table 7. Inhibitory Effect of Polyacetylene Glucosides **1-5** toward NO Production by Macrophages pretreated with LPS and IFN-γ (Inhibitory rate (%))

Concentration	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>
100 µg/ml	57.2	4.4	74.5	71.0	71.2
30 µg/ml	14.2		19.3	16.6	21.1
10 µg/ml	5.3		9.3	13.2	4.3
3 µg/ml			8.2	6.3	2.0

Assay : Cells were treated with compounds in the presence of 100 ng LPS + 10 U/ml IFN-γ at 37 °C for 18 h. The amount of NO<sub>2</sub><sup>-</sup> in the culture supernatant was determined.

日本財団補助金による

1999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—

2000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 王 秀玲



所属機関名 東京女子医科大学医学部法医学教室

職名 助手 年齢 42 才

所在地 〒162-8666 新宿区河田町8-1

電話 03-3353-8111 内線 22242

1. 研究課題

日本人および中国人における6種類STR多型の解析

2. 研究期間 自 1999 年 4 月 1 日 ~ 至 2000 年 3 月 15 日

3. 研究組織

日本側研究者氏名 王 秀玲 (42 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 張 曉東 (46 才)

所属機関 中国人民刑事警察学院

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。

# 日本人及び中国人における6種類STR多型の解析

王 秀 玲

東京女子医科大学医学部法医学教室

助手

## 要 旨

STR (Short Tandem repeat) は、個人識別や親子鑑定などの法医実務において有効な遺伝子マーカーとし、広く応用されている。最近、多色蛍光色素標識技術の開発により、多数のSTR多型は同時に解析する方法が検討されている。今回は、血縁関係のない日本人と中国人の健康者（各300名）における ABI PRISM™ 310 Genetic Analyzer及びGeneScan™ Analysis Software Ver 2.1を用い、D8S1179, D21S11, D18S51, D5S818, D13S317, D5S818, D7S820の6種類のSTR遺伝子頻度を調べ、データベースを作成した。日本人および中国人各300名においては、6ローカスの対立遺伝子頻度の分布はHardy-Weinbergの法則に適合していた。更に、STR多型の法科学的応用の有用性を評価するため、遺伝形質の多型性の指標とされる遺伝子型の異型接合率 (Heterozygosity H), 多型情報量 (Polymorphism information content PIC) および個人識別確率 (Distinguishing Probability DP) について検討した。日本人集団においては、D8S1179, D21S11, D18S51, D5S818, D13S317, D5S818, D7S820のH値は0.8434, 0.8132, 0.8505, 0.7875, 0.8086, 0.7851, CIP値は0.8366, 0.8033, 0.8484, 0.7682, 0.8003, 0.7653, DP値0.9602, 0.9375, 0.9616, 0.9219, 0.9363, 0.9217で算出された。中国人集団においては、D8S1179, D21S11, D18S51, D5S818, D13S317, D5S818, D7S820のH値は0.8245, 0.8495, 0.8490, 0.7851, 0.7949, 0.7690, CIP値は0.8151, 0.8492, 0.8402, 0.7519, 0.7646, 0.7354, DP値は0.9486, 0.9604, 0.9602, 0.9194, 0.9281, 0.9121で算出された。日本人集団および中国人集団において6ローカスは多型性の高いSTR部位であり、法科学的証拠資料の個人識別にとって極めて有用な遺伝子型であることが認められた。

## KEY WORDS

STR (Short Tandem Repeat), H (Heterozygosity), PIC (Polymorphism information content), DP (Distinguishing Probability), Allele Frequencies, Japanese, Chinese.

# 研 究 報 告

## 目 的

STR多型は2-5塩基を基本単位とする繰り返し配列であり、ゲノム中に多数散在している。他の多型マーカーよりも染色体上の出現頻度が高く、多型性も高いことから近年注目を集めている<sup>1-3)</sup>。しかしながら日本人集団および中国人集団におけるデータが整っていない形質は多いので、法医実務に応用する際にSTR多型のデータベースが必要である。今回は、ABI PRISM™ 310 Genetic Analyzer 及び Gene Scan™ Analysis Software Ver 2.1 を用いた D8S1179, D21S11, D18S51, D5S818, D13S317, D5S818, D7S820の6種類STR多型マーカーが開発され、その検査システムが確立される一方、日本人及び中国人のデータベースが得られることを望む次第であった。

D8S1179, D21S11, D18S51, D5S818, D13S317, D5S818, D7S820のSTR多型性は、現在までに開発されているSTR多型で最も多くの対立遺伝子を有し、6種STR多型を合わせて80以上の対立遺伝子があり、これらの対立遺伝子に基づいて出現される可能な遺伝子型の数は3240通りである<sup>4-6)</sup>。これらの高度な遺伝的多型性は人類遺伝学的な研究に利用されるのみならず、個人識別、親子鑑定、犯罪捜査などの法医実務にも応用されている。犯罪の国際化に伴う、個人識別、集団識別、地域識別等は各人種のデータベースが必要となっている。本共同研究は、中国漢族及び日本民族の6種STR多型の分布を調べ、両国民族の遺伝的類縁関係を明らかにし、データベースを作成することを目的とした。

## 方 法

### 1. DNA抽出

Johnらの方法に基づき、血縁関係のない日本人と中国人（各300名）の血液から迅速なDNA抽出を行った<sup>7)</sup>。200  $\mu$ l 血液にSolution I液（10 mM Tris HCl pH 7.6, 10 mM KCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>）1 mlとNonidet P-40 10  $\mu$ lを加え、7,000 rpmで2分間遠心し、白血球の核を分離した。分離した白血球の核の中にSolution II液（10 mM Tris HCl pH 7.6, 10mM KCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.5 M NaCl, 0.5 % SDS, 2 mM EDTA）を0.5 ml加え、混和した後、Phenolを0.5 ml加え、よく混和した。12,000 rpmで1分間遠心後、溶液の上層に対し、Phenol : Chloroform : isoamyl alcohol (25 : 24 : 1)液を0.5 ml加え、よく混和。12,000 rpmで1分間遠心後、溶液の上層を採取した。更に、Ethanol沈殿によりDNAを抽出した。



## 2. STR多型の検出

STR多型の検出はABI PRISM™ 310 Genetic AnalyzerとPCR法を用いて、多色蛍光色素標識により、異なる染色体とサイズの6種のSTR多型が同時に検出した。PCR増幅は1検体につき25 μlとし、DNA試料10 μl (0.05 ng / μl), PCR Reaction Mix 10 μl, AmpliTaq Gold DNA Polymerase 0.5 μl及び蛍光色素標識したPrimer Set 4.5 μlを0.2 ml ポリプロピレンチューブに入れ、94℃ 1分間、59℃ 1分間、72℃ 1分間を30回繰り返す条件で、PCR増幅を行った。キャピラリー電気泳動はABI PRISM™ 310 Genetic Analyzer (Perkin-Elmer)とInternal Lane Size Standard (Perkin-Elmer)を用いて、15 KV, 60℃, 30分間で泳動した。

## 3. 遺伝子の解析

遺伝子の解析は、GeneScan™ Analysis Software Ver 2.1を用いて、Internal Lane Size Standardによる型判定を行った。

## 4. データベースの作成

遺伝子頻度は、複数対立遺伝子の任意交配集団における遺伝子頻度の式に従って算出し、遺伝子頻度から、遺伝子型の期待値をHardy-Weinbergの法則に従って推定した。遺伝形質の異型接合率(H), 多型情報量(PIC)および個人識別確率(DP)は以下の式に従って算出した。

$$H^{(8)} = 1 - \sum_{i=1}^n P_i^2 \quad (P_i = \text{対立遺伝子の頻度}, n = \text{対立遺伝子の数})$$

$$CIP^{(9)} = 1 - \left( \sum_{i=1}^n P_i^2 \right) - \sum_{i=1}^{n-1} \sum_{j=i+1}^n 2P_i^2 P_j^2 \quad (P_i = \text{対立遺伝子の頻度}, n = \text{対立遺伝子の数})$$

$$DP^{(10)} = 1 - \sum_{i=1}^n P_i^2 \quad (P_i = \text{各遺伝子型の頻度}, n = \text{遺伝子型の数})$$

## 結 果

日本人と中国人の健康者各300名におけるABI PRISM™ 310 Genetic Analyzer及びGeneScan™ Analysis Software Ver 2.1を用い、D8S1179, D21S11, D18S51, D5S818, D13S317, D5S818, D7S820の6種類STR遺伝子頻度の分布をTable 1に示した。算出された6ローカスの遺伝子型の分布はHardy-Weinbergの法則に適合していた。遺伝形質の異型接合率, 多型情報量および個人識別確率については計算した結果をTable 1に示し、いずれの数値も極めて高い値を確認した。

## 考 察

日本人集団におけるD8S1179, D5S818, D7S820対立遺伝子の出現頻度は中国人集団のものと大きな違いは見られず、ほぼ同様の傾向が確認された。D21S11, D18S51, D13S317には日本人集団の対立遺伝子の出現頻度と中国人集団の対立遺伝子の出現頻度を比較するとやや異なる傾向が観察され、いずれも高多型性であることが確認された。

本STR解析方法は、正確な遺伝子型判定を効率よく行うことができるうえ、微量のDNA (0.05 ng / μl) から多数のローカスを同時に解析できた。また、多型性の高い6種類のSTRローカスの組み合わせを選択し、従来の尿素変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動法より操作が簡単かつ有効であり、DNA多型分析の信頼性も高くなった。日本人集団および中国人集団における6ローカスのSTRは、個人識別や親子鑑定などの法医実務において有効な遺伝子マーカーであることが認められた。

## 参 考 文 献

- 1) Hammond, H.A., Jin, L., Zhong, Y., et al.: Evaluation of thirteen STR loci for use in personal identification application. *Am J Hum Genet*, 55: 175-189, 1994.
- 2) Anderson, J.F., Greenhalgh, M.J., Bulter, S.R., et al.: Further validation of multiplex STR system for use in routine forensic identity testing. *Forens Sci Int*, 78: 47-64, 1996.
- 3) Lins, A.M., Sprecher, C.J., Puers, C., et al.: Multiplex sets for the amplification of polymorphic short tandem repeat loci-silver stain and fluorescence detection. *Bio Techniques*, 20: 882-889, 1998
- 4) Barber, M.D., Parkin, B.H.: Sequence analysis and allelic designation of the two short tandem repeat loci D18S51 and D8S1179. *Intl J Legal Med*. 109: 62-65, 1996.
- 5) Barber, M.D., Mckeown, B.J., Parkin, B.H.: Structural variation in the alleles of a short tandem repeat system at the human alpha fibrinogen locus. *Intl J Legal Med*. 108: 180-185, 1996.
- 6) Sharma, V., Litt, M.: Tetranucleotide repeat polymorphism at the D21S11 locus. *Hum Mol Genet*, 1: 67, 1992.
- 7) John, S.W.m., Weitznerr, G., Rozen, R., Scriver, C.R.: A rapid procedure for extracting genomic DNA from Leukocytes. *Nudeic Acids Res*, 19: 408, 1991.
- 8) Nei, M., Roychoudhury, A.K.: Sampling variances of heterozygosity and genetic distance. *Genetics*, 76: 379-390, 1974.
- 9) Botstein, D., White, R.L., Skolnick, M., Davis, R. W.: Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Am J Hum Gonet*, 32: 314-331, 1980.
- 10) Grunbaum, B.W., Selvin, S., Pace, N., Black, D.M.: Frequency distribution and discrimination probability of twelve protein genetic variants in human blood as functions of race sex, and age. *J Forens Sci*, 23: 577-587, 1978.

Table 1 The distribution of six STR allele frequencies in Japanese and Chinese

Allele	Japanese						Chinese					
	D8S1179	D21S11	D18S51	D5S818	D13S317	D7S820	D8S1179	D21S11	D18S51	D5S818	D13S317	D7S820
6				0.0033								0.0017
7				0.0017	0.0050	0.0050				0.0167	0.0017	0.0033
8				0.0100	0.2583	0.1150	0.0033			0.0050	0.2917	0.1183
9	0.0083			0.0750	0.1250	0.0684	0.0100			0.0717	0.1283	0.0633
10	0.1600			0.1933	0.1150	0.2300	0.0867		0.0033	0.1867	0.1617	0.2000
11	0.1000		0.0067	0.2883	0.2200	0.3067	0.0983		0.0067	0.2966	0.2400	0.3467
12	0.0900		0.0433	0.2367	0.2100	0.2183	0.1100		0.0283	0.2366	0.1367	0.2267
13	0.2283		0.2067	0.1733	0.0567	0.0483	0.3050		0.2067	0.1750	0.0333	0.0367
13.2				0.0050								
14	0.1850		0.1983	0.0117	0.0083	0.0083	0.1717		0.2183	0.0067	0.0066	0.0050
14.2				0.0033								
15	0.1417		0.1633	0.0067	0.0017		0.1400		0.1983	0.0033		
16	0.0800		0.1717				0.0617		0.1000			
17	0.0067		0.0783				0.0133		0.0717			
18			0.0367						0.0367			
19			0.0250						0.0483			
20			0.0217						0.0300			
21			0.0267						0.0217			
22			0.0033						0.0117			
23			0.0050						0.0117			
24		0.0017	0.0033						0.0033			
25			0.0017					0.0067				
26		0.0017							0.0033			
27												
28		0.0600						0.0584				
28.2		0.0033						0.0083				
29		0.2100						0.2050				
29.2								0.0017				
30		0.3317						0.2283				
30.2		0.0133						0.0133				
31		0.0900						0.1683				
31.2		0.0717						0.0567				
32		0.0300						0.0500				
32.2		0.1100						0.1183				
33		0.0167						0.0033				
33.2		0.0483						0.0667				
34		0.0033						0.0067				
34.2		0.0083						0.0083				

Table 2 The statistical data of six STR loci  
in Japanese and Chinese

	Japanese			Chinese		
	H	PIC	DP	H	PIC	DP
D8S1179	0.8434	0.8366	0.9602	0.8245	0.8151	0.9486
D21S11	0.8132	0.8033	0.9375	0.8495	0.8492	0.9604
D18S51	0.8505	0.8484	0.9616	0.8490	0.8402	0.9602
D5S818	0.7875	0.7682	0.9219	0.7851	0.7519	0.9192
D13S317	0.8086	0.8003	0.9363	0.7949	0.7646	0.9281
D7S820	0.7851	0.7653	0.9217	0.7690	0.7354	0.9121

\* H: Heterozygosity

PIC: Polymorphism information content

DP: Distinguishing Probability

Xiuling Wang  
Toshiko Sawaguchi  
Akiko Sawaguchi

Department of Legal  
Medicine, Tokyo Women's  
medical University, School  
of Medicine, Shinjuku-ku,  
Tokyo, Japan

## Application of electrophoresis technology to DNA analysis

We used the variable number tandem repeat (VNTR) polymorphism and the ten short tandem repeat (STR) polymorphisms to study a number of disputed paternity cases in the Japanese population. For the determination of VNTR locus (D1S80) and the ten STR loci (vWA, F13B, TH01, TPOX, CSF1PO, F13A01, LPL, D3S1744, D12S1090, D18S849) we used polymerase chain reaction (PCR) amplification and the vertical polyacrylamide gel electrophoresis technique followed by SYBR green I staining. The irregular repeats were analyzed by sequencing from bands of vertical polyacrylamide gel electrophoresis using the latest gene analyzing equipment, the ABI PRISM 310 Genetic Analyzer. The probable genotypes of the deceased putative father were deduced by Komatu's method from the genotypes of the widow and the genotypes of their children. The calculation of paternity probability used the Essen-Moller formula and Bayes's theorem. Calculated in eleven loci, the distinguishing probabilities (DP) and the mean exclusion chance (MEC) were 0.9999 and 0.9989, respectively. Therefore, information obtained from eleven DNA polymorphisms is enough to determine paternity plausibility.

**Keywords:** Vertical polyacrylamide gel electrophoresis / Polymer capillary electrophoresis / DNA polymorphism / Paternity testing  
EL 3668

### 1 Introduction

In recent years, electrophoretic technology showed a truly dramatic development in the area of biological research. The polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) technique is available for the analysis of DNA polymorphism and the study of genome organization [1]. Especially the allele size and repeats can be determined precisely by high-resolution PAGE technique [2]. DNA polymorphism is widely used in areas such as criminal investigation, human identification, and paternity testing [3]. In particular, the highly distinguishable polymer capillary electrophoresis is an important complement to the analysis of DNA sequence using the ABI PRISM 310 Genetic Analyzer [4]. The allele frequency distribution of D1S80 vWA, F13B, TH01, TPOX, CSF1PO, F13A01, LPL, D3S1744, D12S1090, and D18S849 has been reported in the Japanese population [5–8]. The D1S80 locus has 26 alleles, and the ten STR loci have 108 alleles, which were observed in the Japanese population. This report deals with

two cases of special paternity testing. In the first case the widow of the putative father and their children, as well as the alleged children and their mother, were tested for the eleven DNA polymorphisms. From the results, the probabilities *a posteriori* for the possible genotypes of the deceased putative father were estimated by means of the principle given by Komatu based on Essen-Moller's theorem. Then, the probability of paternity was calculated according to the method described by Komatu. In the second case, for detection of the irregular repeats and confirmation of the genotypes, we used sequencing analysis from the bands of vertical polyacrylamide gel electrophoresis followed by sequencing analysis software Version 3.0.

### 2 Materials and methods

#### 2.1 DNA extraction

Samples were obtained from Japanese individuals in disputed paternity casework. DNA was extracted from whole blood using John's method [9].

#### 2.2 PCR amplification

Each amplified sample contained 50 ng DNA (0.25 units) of *Taq* DNA polymerase, 2.5  $\mu$ L of primer and 2.5  $\mu$ L of  $10 \times$  dNTPs in  $10 \times$  PCR buffer. PCR amplification was performed for 30 cycles in DNA Thermal Cycler 480 (Per-

**Correspondence:** Dr. Xiuling Wang, Department of Legal Medicine, Tokyo Women's Medical University, School of Medicine, 8-1 Kawada-cho, Shinjuku-ku, Tokyo, Japan  
**E-mail:** xiuling@research.twmu.ac.jp  
**Fax:** +81-3-5269-7300

**Abbreviations:** DP, distinguishing probabilities; MEC, mean exclusion chance; VNTR, variable number of tandem repeats

**Table 1.** The results of VNTR and STR analysis in the case of a deceased putative father

Locus	Widow	Son	Daughter 1	Daughter 2	Common law wife	Alleged daughter 1	Alleged daughter 2
D1S80	19, 43	19, 24	19, 25	24, 43	29, 43	25, 43	25, 29
CSF1PO	11, 12	12, 12	11, 12	11, 12	11, 12	11, 12	11, 12
F13A01	4, 6	6, 6	6, 6	4, 6	4, 6	4, 6	4, 6
F13B	8, 10	8, 8	8, 10	8, 8	9, 10	8, 9	8, 9
LPL	10, 10	10, 11	10, 11	10, 11	10, 12	11, 12	10, 11
TH01	7, 9	7, 9	7, 9	9, 9	6, 9	9, 9	9, 9
TPOX	8, 11	8, 8	11, 11	11, 11	11, 11	11, 11	11, 11
vWA	17, 18	18, 18	17, 18	17, 18	19, 20	18, 20	18, 20
D3S1744	15, 16	15, 19	15, 18	16, 19	16, 18	16, 18	18, 19
D12S1090	20, 26	12, 26	20, 26	12, 26	25, 27	12, 25	25, 26
D18S849	14, 16	15, 16	14, 17	15, 16	15, 16	15, 16	15, 17

**Table 2.** The estimative possible genotypes of the deceased putative father from the widow and children

Locus	Rate of possible genotypes of the deceased putative father		
D1S80	24, 25 (1.00)		
CSF1PO	12 (0.61),	11, 12 (0.26),	Other (0.13)
F13A01	4, 6 (0.31),	6 (0.62),	Other (0.07)
F13B	8 (0.13),	8, 10 (0.74),	Other (0.13)
LPL	10, 11 (0.55),	11 (0.31),	Other (0.14)
TH01	9 (0.50),	7, 9 (0.39),	Other (0.11)
TPOX	8, 11 (1.00)		
vWA	18 (0.35),	17, 18 (0.45),	Other (0.20)
D3S1744	18, 19 (1.00)		
D12S1090	26 (0.28),	12, 26 (0.60),	Other (0.12)
D18S849	15, 17 (1.00)		

kin Elmer, Foster City, CA, USA) according to standard protocols: denaturation at 94°C for 1 min, primer annealing at 60°C for 1 min, and primer extension at 72°C for 1 min.

### 2.3 PAGE

The amplified DNA samples were loaded on a 0.75 mm thick and 130 mm long 8% polyacrylamide gel for D1S80 or 6% denaturing polyacrylamide gel for STR loci. Electrophoresis was performed at 400 V for 2 h. The gels were stained in 100 mL of SYBR green I nucleic acid gel staining buffer for 5 min at room temperature and then photographed.

### 2.4 Sequencing analysis

The sequence was analyzed from bands of PAGE using the polymer capillary electrophoresis of ABI PRISM 310 Genetic Analyzer at 7.5 kV for 60 min at 42°C. The sequence analysis used sequencing analysis software Version 3.0.

**Table 3.** The results of VNTR and STR analysis in a disputed paternity case

Locus	Mother	Daughter	Son*	Putative father
D1S80	18, 28	28, 30	18, 30	25, 30
CSF1PO*	10, 13	10, 12	9, 10*	11, 12*
F13A01	4, 6	4, 6	4, 6	6, 6
F13B	9, 10	10, 10	9, 10	8, 10
LPL	11, 12	12, 12	11, 12	10, 12
TH01*	7, 8	7, 9	7, 9.3*	6, 9*
TPOX	8, 11	8, 11	8, 11	8, 8
vWA	14, 17	14, 17	14, 17	17, 17
D3S1744	18, 20	19, 20	18, 20	18, 19
D12S1090	20, 23	21, 23	23, 26	21, 26
D18S849	16, 17	16, 16	15, 17	15, 16

### 3 Results

The D1S80, vWA, F13B, TH01, TPOX, CSF1PO, F13A01, LPL, D3S1744, D12S1090, and D18S849 were analyzed in the case of the putative father and the disputed paternity case by using the PCR with PAGE technique followed by SYBR green I staining. The calculated distinguishing probabilities (DP) and the mean exclusion chance (MEC) were 0.9999 and 0.9989, respectively. In the case of the deceased putative father, the results of variable number of tandem repeats (VNTR) and STR polymorphic analysis are shown in Table 1. The rate of possible genotypes of the deceased putative father is shown in Table 2. The probability of paternity thus obtained was 0.9998 and 0.9999 for alleged daughter 1 and alleged daughter 2, respectively. The results of VNTR and STR polymorphic analysis for the disputed paternity are shown in Table 3. The CSF1PO locus and TH10 locus excluded the paternity by the PAGE technique. The detection of the irregular repeats and confirmation of the genotypes used sequencing analysis for the son from the

thus obtained was 0.999 for the daughter. These results demonstrated that analysis of VNTR and STR polymorphisms are an extremely effective method for paternity testing and personal identification in forensic sciences. The sequence analysis is an important complement for detection of the irregular repeats and confirmation of the genotypes.

*We would like to thank Dr. Miwa Mikami for the assistance in the research work. This work was supported by The Japan China Medical Association – The Japan Foundation Subsidy.*

Received June 15, 1999

## 5 References

- [1] Anderson, J. F., Greenhalgh, M. J., Bulter, S. R., *Foren. Sci. Int.* 1994, 55, 175–189.
- [2] Budowle, B., Chakraborty, R., Giusti, A. M., Eisenberg, A. J., Allen, R. C., *Am. J. Hum. Genet.* 1991, 48, 137–144.
- [3] Sjerpes, M., Geest, N., Pieron, C., Gajadhar, M., Kloosterman, A., *Int. J. Legal. Med.* 1995, 108, 127–134.
- [4] Brinkmann, B., Sajantila, A., Goedde, H. W., Matsumoto, H., Nishi, K., Wiegand, P., *Eur. J. Hum. Genet.* 1996, 4, 175–182.
- [5] Nagai, A., Yamada, S., Bunai, Y., Ohya, I., *DNA Polymorphism*, Toyoshoten, Tokyo 1994, pp. 82–86.
- [6] Nagai, A., Yamada, S., Watanabe, Y., *Int. J. Leg. Med.* 1996, 109, 34–36.
- [7] Yamaguchi, H., Takizawa, H., Shimasaki, C., *Jpn. J. Legal. Med.* 1996, 50, 163–167.
- [8] Wang, X., Sawaguchi, T., Yamashita, K., Sawaguchi, A., *DNA Polymorphism*, Toyoshoten, Tokyo 1998, pp. 50–55.
- [9] John, S. W. M., Weitzner, G., Rozen, R., Scriver, C. R., *Nucleic Acids Res.* 1991, 19, 408.
- [10] Komatu, Y., *Acta Crim. Jpn.* 1939, 13, 485–494.
- [11] Essen-Moller, E., *Anthropol. Ges. Wien* 1938, 68, 9–53.
- [12] Asano, M., *Jpn. J. Legal. Med.* 1991, 45, 277–287.

日本財団補助金による

1999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－

2000年3月13日

財団法人 日中医学協会

理事長 中島章殿

研究代表者氏名 藤野 乱 

所属機関名 特定医療法人 芳和会水俣協立病院

職名 総院長 年齢 57 才

所在地 〒867-0045 水俣市桜井町2-2-12

電話 0966-63-1704 内線 930

1. 研究課題

中国松花江流域住民のメチル水銀汚染の影響に関する  
臨床疫学的研究

2. 研究期間 自 1999年4月1日 ～ 至 2000年3月15日

3. 研究組織

日本側研究者氏名 藤野 乱 (57才)

所属機関 水俣協立病院 職名 総院長

中国側研究者氏名 崔 洪斌 (54才)

所属機関 哈爾濱医科大学公共衛生学院 職名 副院長

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。



# 中国松花江流域住民のメチル水銀汚染の影響に関する

## 臨床疫学的研究

---

研究代表者：藤野 紘

所属：特定医療法人芳和会・水俣協立病院

役職：総院長

---

### 調査参加者

- 日本 藤野 紘（医師、特定医療法人芳和会・水俣協立病院・総院長）  
高岡 滋（医師、特定医療法人芳和会・水俣協立病院・院長）  
富田 満夫（医師、長崎労働衛生コンサルタント事務所長）  
柏木 勇蔵（臨床検査技師、特定医療法人芳和会・水俣協立病院・検査部）  
星野 一徳（臨床検査技師）  
北岡 秀郎（事務員）  
板井 洋平（医学生）
- 中国 范春（医師、ハルピン医科大学公共衛生学院・副教授）  
唐玄乐（医師、ハルピン医科大学公共衛生学院・副教授）  
王锐（医師、ハルピン医科大学公共衛生学院・研究生）  
任锐（医師、ハルピン医科大学公共衛生学院・研究生）  
赵淑媛（技師）  
史力田（技師）  
李春英（医師、通訳）  
金红梅（通訳）  
池光范（通訳）  
崔惠松（通訳）  
李勇（技師）  
翟平阳（技師）  
潘守学（技師）
- 

### 共同研究者

- 日本 赤木洋勝（国立水俣病総合研究センター・国際総合研究部長）  
津田敏秀（岡山大学衛生学教室講師）
- 中国 王维国（医師、ハルピン医科大学公共衛生学院・院長）  
崔洪斌（医師、ハルピン医科大学公共衛生学院・教授）
-

## 【要旨】

中国松花江流域が水銀に汚染されていたことが1971年に判明し、健康被害に関する報告もなされている。1982年、工場は操業を停止したが、慢性メチル水銀汚染の健康への影響が考えられるほか、川床に存在する水銀による二次汚染の影響が懸念されている。汚染源が断ち切られて17年が経過した現在、汚染地域の住民に汚染の影響がどの程度残っているかをみるために、1999年7月、黒龍江省内の汚染地域と非汚染地域の臨床疫学的調査を実施した。

汚染地と非汚染地の背景因子が若干異なる可能性があるが、非汚染地と比較すると汚染地では毛髪総水銀濃度が有意に高値であった。自覚症状は、不定愁訴、メチル水銀中毒に比較的特異的な項目で高値を示していた。神経所見では、汚染地では表在感覚異常の頻度が高く、二点間識別覚閾値も有意差を示した。これらは慢性的なメチル水銀汚染の影響による可能性が高い。しかし、この差が過去の汚染の影響によるものか、現在の汚染も影響を与えているのか、という問題については、より若年者での今後の調査が必要である。

## 【KEY WORDS】

メチル水銀、水俣病、慢性中毒、体性感覚障害、二点間識別覚

---

## 【研究報告】

### 【目的】

もともと松花江は漁業が盛んであったが、1950年代末から漁獲量が年々減少していった<sup>17)</sup>。その原因を調べていく中で、1971年、松花江が水銀に汚染されていることが判明、吉林市のカーバイド工場からアセトアルデヒド工程から水銀を含む排水を松花江に流されていたことがわかった。吉林市は、1950年代から中国東北地区の化学工業の中心となっていた。松花江の水銀とメチル水銀汚染が更に悪化したため、1982年工場は操業を停止、1988年には工場を壊した<sup>1)2)7)8)17)</sup>。1975年～1978年の中国国内の調査では、汚染地域の黒龍江省肇源では対照地域の黒龍江省（当時）達来湖に比較して、痛覚鈍麻、視野狭窄、聴力低下を高率に認めていた<sup>1)2)17)</sup>。

藤野らは1970年より慢性水俣病の問題にとりくみ、不知火海沿岸住民の8000名以上を直接診察する中で、劇症患者を頂点とする汚染のピラミッドの実態を明らかにしてきた<sup>3)</sup>。メチル水銀汚染が慢性的に持続している可能性のある地域での住民の健康状態の経過をみた研究は少ない。日本で1971年に調査された汚染地域住民を1977～78年に再調査したところ、自覚症状、神経症状が増大していた<sup>16)</sup>。

松花江流域の住民は、過去汚染がより悪かった時期の水銀による影響と、現在川床に残っている水銀による影響のいずれをも受けている可能性がある。今回は、工場が操業を停止して17年が経過した現在、流域住民の自覚症状や神経所見などを調査し、メチル水銀の慢性的な影響について評価し、今後の対策の資料とすることを目的として研究を計画した。

### 【方法】

調査期間は、1999年7月14日から7月18日であった。調査地域は、黒龍江省肇源周辺地域のうち、魚介類多量摂取がみられる専業漁業地域である水手管子(A)の60世帯、半農半漁の地域である古恰村(B)の856世帯、および日常的に魚介類消費がほとんどないと言われる農業地域である立功村(C)の659世帯から、それぞれ40世帯、40世帯、120世帯を無作為に選択し、18歳以上の世帯の任意の代表者が健康調査をおこなった。本来ならば、住民全体から無作為に抽出して検診を行うことが望ましいが、住民の協力を得るためにこの手法をとった。また、参考として、同地域で比較的魚介類摂取が多いと言われている公務員41人(D)についても職場で同様の健康調査を施行したが、この群は他の群とは選択基準が異なるため、参考として集計し、有意差検定等はおこなわなかった。

調査項目は、問診、一般身体所見、神経所見、毛髪総水銀濃度、聴力、視野、検尿、血糖である。問診項目には水俣病にしばしばみられる症状が含まれ、こむらがえりについては、詳細に聞き取った。

診察は、日本、中国双方3人ずつの医師が一組ずつペアになって、二人で一人の患者を診察し、所見の評価は、二人の一致するものを採用した。神経所見の項目は、意識レベル、脳神経、運動系、感覚系、深部腱反射、病的反射、感覚障害を含んだ。脳神経系の検査で

は、視野は対面法を用い、聴力はストップウォッチの音が聞こえなくなる距離を記録した。感覚障害の検査としては、表在覚として痛覚、触覚、深部知覚としてC音叉による振動覚、位置覚を調査し、更に、立体覚と二点間識別能の検査もおこなった。調査用紙は後述のとおりである。

腱反射の評価については、下顎反射、左右の上腕二頭筋、上腕三頭筋、腕橈骨筋、膝蓋腱反射、アキレス腱反射について評価した。それぞれ、消失を0、低下を1、正常を2、亢進を3、クローヌス陽性の亢進を4として点数評価した。今回の評価では、上肢の腱反射と下肢の腱反射の点数を合計表示した。正常であれば、上肢の合計点は12点、下肢の合計点は8点となる。病的反射の検査では、病的反射を認めないときに1、認める時に2という評価をおこなった。

触覚と痛覚の表在感覚障害の評価については、以下のように点数化した。口周囲の異常のないものを1、低下のあるものを2とした。上肢については、感覚障害のないものを1、手指先の感覚低下を2、手関節より末梢の感覚低下のあるものを3、肘関節から末梢の感覚低下のあるものを4、肩関節から末梢の感覚低下のあるものを5とした。下肢については、感覚障害のないものを1、足趾の感覚低下を2、足関節から末梢の感覚低下のあるものを3、膝関節から末梢の感覚低下のあるものを4、股関節から末梢の感覚低下のあるものを5とした。これらに分類されない感覚障害については点数化から除外することにした。

二点間識別閾値距離は、下口唇下縁、左右1、2指の指尖部で検査した。患者に対して閉眼を命じ、指の向きに対して垂直方向で、製図用コンパスを用いて、二点を識別できる最短距離を閾値とした。この時、被験者が開眼してもコンパスの先が見えないように片手で検査する指を覆って検査を施行した。

立体覚は、丸い鉛筆、六角形の鉛筆、三角形の鉛筆を用意し、閉眼状態で触らせて、形を当てさせることで調査した。

視野検査は、対面法に加えてフェルステル視野計を用いた検査をおこなった。聴力はストップウォッチによる検査に加えて、気導のみとを聴力計にて検査した。検尿に関しては、糖、蛋白、潜血について、テープ法による定性検査であった。血糖は、耳朶穿刺により、簡易自己血糖検査器（三和化学研究所のグルテストエース）を使用しておこなった。毛髪総水銀は、国立水俣病総合研究センターの赤木洋勝氏が開発し改良を重ねてきた測定法を用いて測定をおこなった。この方法は、高感度で精度が高いと言われている<sup>18)20)21)</sup>。

統計学的検定については、平均値の比較についてはt検定、頻度の比較についてはOdds Ratioを用いた。

次のページから、実際の調査に用いた調査用紙を掲載する。

# 松花江流域住民健康調査・問診票

## A. 調査日時、担当者

調査年月日 1999年 7月 日

調査者 \_\_\_\_\_、\_\_\_\_\_、\_\_\_\_\_

担当医師 \_\_\_\_\_

## B. 患者基本情報

姓名 姓 \_\_\_\_\_ 名 \_\_\_\_\_

読み 姓 \_\_\_\_\_ 名 \_\_\_\_\_

生年月日 \_\_\_\_\_年 \_\_\_\_\_月 \_\_\_\_\_日 年齢 \_\_\_\_\_歳 性別 男・女

住所 \_\_\_\_\_

電話番号 \_\_\_\_\_

## C. 生活歴

現在の職業は、漁業・農業・林業・製造業・サービス業・その他 ( \_\_\_\_\_ )・無職

上記職業への従事年数 約 \_\_\_\_\_年

現在、人並みに仕事ができているか、十分・不十分・できない

25年前の職業は、漁業・農業・林業・製造業・サービス業・その他 ( \_\_\_\_\_ )・無職

魚は好きか、好き・嫌い・どちらでもない

魚を食べる量は、平均して毎日3食・毎日2食・毎日1食・それ以下

25年前と比較して食べる魚の量は、減った・増えた・変わらない

アルコールは、毎日飲む・時々飲む・飲まない

タバコは、一日 ( \_\_\_\_\_ ) 本吸う・やめた・吸わない

## D. 日常生活の状況

総合的に、自立・一部助けが必要・全面的に助けが必要

食事は、自立・一部助けが必要・全面的に助けが必要

排泄は、自立・一部助けが必要・全面的に助けが必要

移動は、自立・一部助けが必要・全面的に助けが必要

入浴は、自立・一部助けが必要・全面的に助けが必要

E. 家族歴

脳卒中・高血圧・心臓病・腎臓病・肝臓病・糖尿病・胃腸病・リウマチ  
癌・結核・結核以外の呼吸器疾患・膵臓病・貧血・神経疾患・脊椎疾患・関節疾患  
その他 ( \_\_\_\_\_ )

F. 既往歴

脳卒中・高血圧・心臓病・腎臓病・肝臓病・糖尿病・胃腸病・リウマチ  
癌・結核・結核以外の呼吸器疾患・膵臓病・貧血・神経疾患・脊椎疾患・関節疾患  
その他 ( \_\_\_\_\_ )

G. 現在治療中の病気

脳卒中・高血圧・心臓病・腎臓病・肝臓病・糖尿病・胃腸病・リウマチ  
癌・結核・結核以外の呼吸器疾患・膵臓病・貧血・神経疾患・脊椎疾患・関節疾患  
その他 ( \_\_\_\_\_ )

H. 飼い猫、家畜など、動植物の異常の有無

無し・有り (時期 1 9 年頃、内容 \_\_\_\_\_ )

I. 精査歴

毛髪水銀測定歴 有り・無し  
水俣病検診受診歴 有り・無し

## J. 自覚症状(1)

現在症状がある場合は番号に○を、過去あったが現在ない症状には番号に△、  
これまでに経験のない症状には番号に×を、つけて下さい。

1. しびれ・じんじん感(四肢、手のみ、足のみ、口周囲、その他)
2. その他の知覚異常
3. 関節痛 ( )
4. 関節以外の痛み(頭、頸、肩、上肢、背中、腰、下肢、 )
5. だるさ(全身、腰から下、下肢、 )
6. 物がはっきり見えない
7. 回りが見えない
8. 耳が遠い
9. 耳鳴り
10. においが分からない
11. 味が分からない
12. 転び易い
13. スリッパや草履が履きにくい
14. 草履などが脱げる
15. 手が不自由
16. 指先がきかない
17. 手から物を取り落とす
18. ボタンかけが難しい
19. 言葉がはっきりしない
20. 言葉が出にくい
21. 力が弱くなった(手、上肢、下肢)
22. 筋肉がびくびくする(上肢、下肢、躯幹)
23. 手足の発作性の大きなふるえ・けいれん
24. 持続性のふるえ(上肢、下肢、手指)
25. 不眠
26. 疲れ易い
27. 食欲がない
28. 何もしたくない
29. 根気がない
30. もの忘れする
31. 急にイライラしたり悲しくなる
32. めまい(回転性、動揺性、 )
33. 気の遠くなりそうな発作がある
34. 意識をなくしたことがある(失神発作)
35. てんかん大発作
36. たちくらみ
37. 身体がふらつく

## K. 自覚症状(2)

現在症状がある場合は番号に○を、過去あったが現在ない症状には番号に△、  
これまでに経験のない症状には番号に×を、つけて下さい。

1. 手さげやバッグは、落としてしまいそうになるので、手で持たずに肘にかけることが多い
2. 風呂の湯加減がわからないので困ることがある
3. 手がやける（熱くなる）
4. 足がやける（熱くなる）
5. 怪我や火傷をしても、痛みを感じない
6. ものをじっと見ていると、最初ははっきり見えていたものが、次第に見えにくくなることがある
7. 味の感覚が正常でなく、料理の味見に困る
8. 人と話すとき、言葉は聞こえても、何を言っているか分からないことが多い
9. なんでもない平地でもつまづいたり転げたりすることがある
10. 最近1ヶ月以内に転倒した
11. 最近1年以内に転倒して病院で治療を受けた。
12. ご飯をたべていて、箸を落としてしまうことがある
13. 頭の中が真っ白になる、あるいは何も考えられなくなることがある
14. 自分が自分でないような感じがすることがある
15. 人と話をしている最中に、自分が何を話していたか分からなくなることがある
16. 探し物をしているときに、人から話しかけられると、物を捜すことが出来なくなる

## L. こむらがえりに関する質問

1. 「こむらがえり」を経験したことがありますか？

①ある                      ②ない

(以下は、「ある」と答えた方のみお答えください。)

2. こむらがえりを初めて経験した時期は、いつ頃ですか？

①約25年以上前    ②約10年以上前    ③約1年以上前    ④約1年以内

3. こむらがえりが最もひどかった時期は、いつ頃ですか？

①約25年以上前    ②約10年以上前    ③約1年以上前    ④約1年以内

4. 最もひどい時期のこむらがえりの頻度は、およそどの程度ですか？

①毎日1回以上    ②週1回以上    ③月1回以上    ④年1回以上    ⑤年1回以下

5. 現在のこむらがえりの頻度は、およそどの程度ですか？

①毎日1回以上    ②週1回以上    ③月1回以上    ④年1回以上    ⑤年1回以下    ⑥なし

6. こむらがえりの起こったことのある部位を教えてください(複数回答可)。

①足                  ②手                  ③胸～腹              ④顔～頭



# 松花江流域住民健康調査・診察カルテ

## A. 調査日時、担当者

調査年月日 1999年 7月 日

担当医師 \_\_\_\_\_

## B. 一般身体所見

体格 良・普通・不良 身長 \_\_\_\_\_ cm 体重 \_\_\_\_\_ kg

血圧 \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_ mmHg 脈拍 \_\_\_\_\_ / 分

結膜 貧血 無・有 黄疸 無・有

胸部の異常 無・有 ( \_\_\_\_\_ ) 腹部の異常 無・有 ( \_\_\_\_\_ )

骨格・関節の変形・欠損 無・有 ( \_\_\_\_\_ ) 歩行への影響 無・有

## C. 精神症状

情意障害 無・有 ( \_\_\_\_\_ )

知能障害 無・有 ( \_\_\_\_\_ )

## D. 脳神経

構音障害 無・有 ( \_\_\_\_\_ )

聴力障害 無・有

ストップウォッチ 右 \_\_\_\_\_ cm ・ 左 \_\_\_\_\_ cm

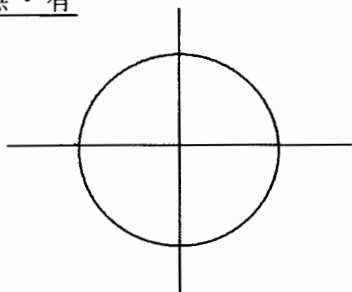
音叉(Rinne) 骨導 右 \_\_\_\_\_ 秒 ・ 左 \_\_\_\_\_ 秒

気導 右+ \_\_\_\_\_ 秒 ・ 左+ \_\_\_\_\_ 秒

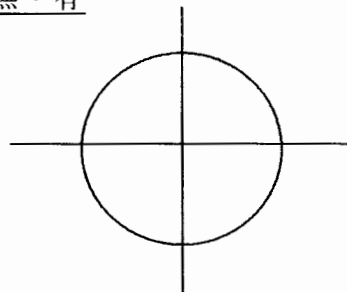
(Weber) 正中・右へ偏位・左へ偏位

視野異常 (対面法)

右 無・有



左 無・有



E. 頸部の運動

	制限	痛み
前屈	(-, +, ++)	(-, +, ++)
右側屈	(-, +, ++)	(-, +, ++)
左側屈	(-, +, ++)	(-, +, ++)
後屈	(-, +, ++)	(-, +, ++)

	右	左
Spurling	(-, +)	(-, +)
Jackson	(-, +)	(-, +)

F. 運動系

普通歩行 正常・麻痺性・失調性・その他

一直線歩行 安定（10歩以上）・不安定（9歩以内）・不能（2歩以内）

ロンベルグ -・+

開眼片足立 右 安定（5秒以上）・不安定（4秒以内）・不能（2秒以内）

左 安定（5秒以上）・不安定（4秒以内）・不能（2秒以内）

アジアドコキネーゼ -・±・+ （遅い、不器用、\_\_\_\_\_）

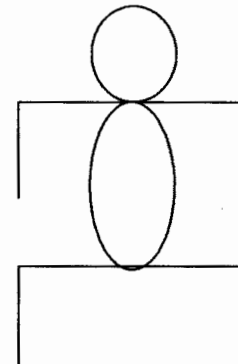
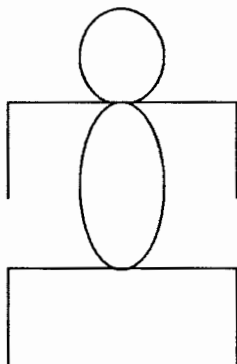
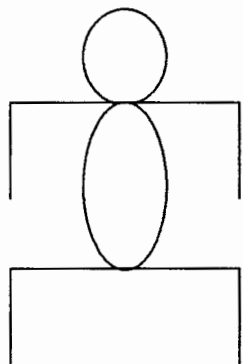
指鼻試験 右 -・±・+ 左 -・±・+ （震え、はずれ、遅い、\_\_\_\_\_）

不随意運動 無・有（\_\_\_\_\_）

筋緊張（N、H低下、S痙縮、R固縮）

筋萎縮

筋力



G. 反射

固有反射

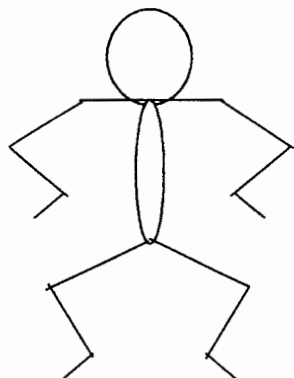
消失：0

低下：1

正常：2

亢進：3

Clonus陽性：4



	右	左
Hoffmann		
Troemner		
Wartenberg		
Babinski		
Chaddock		

H. 自律神経症状

よだれ 無・有

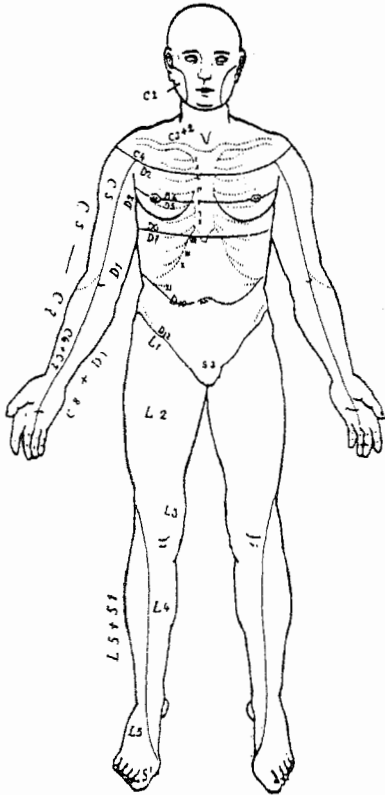
発汗過多 無・有

皮膚紅潮 無・有

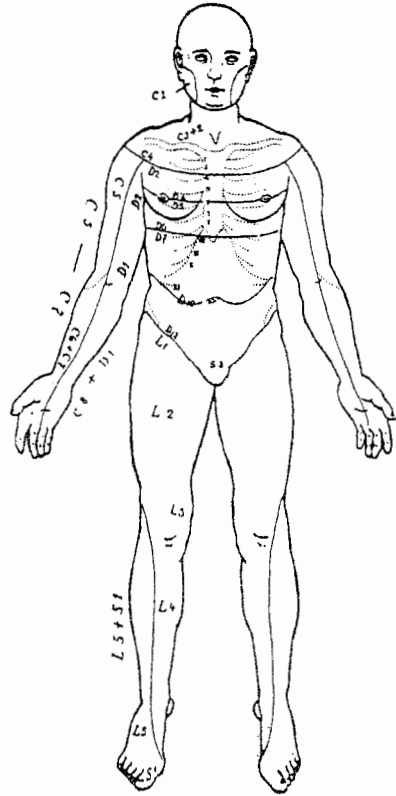
直腸膀胱障害 無・有

I. 知覚障害

触覚



痛覚



振動覚

胸部 \_\_\_\_\_ 秒

右手首 \_\_\_\_\_ 秒

左手首 \_\_\_\_\_ 秒

右足首 \_\_\_\_\_ 秒

左足首 \_\_\_\_\_ 秒

位置覚

右手指 正常・低下

左手指 正常・低下

右足趾 正常・低下

左足趾 正常・低下

二点識別覚 (識別可能な最小距離)

舌 \_\_\_\_\_ mm

下口唇 \_\_\_\_\_ mm

右親指先 \_\_\_\_\_ mm

右示指先 \_\_\_\_\_ mm

左親指先 \_\_\_\_\_ mm

左示指先 \_\_\_\_\_ mm

立体覚 三角 (判別可、不可)、六角 (判別可、不可)、丸 (判別可、不可)

Active Touch 正常、異常 ( → → → )



**【結果】**

それぞれの地域の住民総数および選択された世帯は以下の通りである。それぞれ 39 人、40 人、120 人が受診した。しかし、A 地区の 1 人と C 地区の 2 人が 18 歳未満であったため集計から除外し、A, B, C 群それぞれの受診者数は、38 人、40 人、118 人となった。統計学的検定は、A, B, C 群の間でのみおこなった。

男女比は、C 群に比して A 群で有意に高かった(P<0.05)。年齢は、A 群、C 群に比して B 群で有意に高かった(P<0.05)。

	地域	住民総数	18歳以上人口	世帯総数	受診者数	男/女比	年齢
A	水手管子	255 人	194 人	60 世帯	38 人	31/7	39.3±12.8
B	古恰村	4122 人	3372 人	856 世帯	40 人	28/12	44.2±13.0
C	立功村	2555 人	1790 人	659 世帯	118 人	63/55	38.8±11.8
D(参考)	公務員				41 人	23/18	39.4±12.8

I. 問診

**【生活歴(C)】**

生活歴のうち、アルコール嗜好については、以下の結果であり、飲酒をするか否かでは、C 群に比較して、B 群で有意に飲酒者が多かった(p<0.01)。喫煙については、現在喫煙しているものとしていないものを比較すると、いずれの群間にも有意差を認めなかった。

**アルコール**

地域	毎日	時々	飲まない
A	1	19	18
B	11	18	11
C	16	38	64
D	13	11	17

**喫煙**

地域	吸う	やめた	吸わない
A	22	0	16
B	16	7	17
C	67	0	51
D	12	4	25

**【ADL(D)】**

ADLについては、各群とも、全例が自立であった。

**【家族歴(E)】**

家族歴については、以下の通りであった。家族に病歴のないものは、A 群、B 群と比較して C 群で有意に多かった(p<0.001)。

地域	なし	脳卒中	高血圧	心臓病	腎臓病	糖尿病	肝臓病	胃腸病	リウマチ	癌
A	13	6	5	0	0	1	0	0	0	3
B	15	3	5	5	0	3	0	1	0	6
C	80	10	8	5	1	5	0	2	0	1
D	26	2	3	7	0	0	0	1	0	4

地域	結核	他の呼吸器	脾臓病	貧血	神経疾患	脊椎疾患	関節疾患	その他
A	1	7	0	0	0	0	3	0
B	1	3	0	0	0	0	0	0
C	2	4	0	0	0	0	0	0
D	0	1	0	1	0	0	1	0

【既往歴(F)】

既往歴は以下のとおりであった。既往に病歴のないものを各群で比較すると有意差を認めなかった。

地域	なし	脳卒中	高血圧	心臓病	腎臓病	糖尿病	肝臓病	胃腸病	リウマチ	癌
A	23	0	4	0	0	1	0	1	0	1
B	24	2	4	2	0	2	0	0	0	3
C	83	4	6	3	0	2	0	6	3	0
D	27	3	4	4	0	1	0	2	0	1

地域	結核	他の呼吸器	脾臓病	貧血	神経疾患	脊椎疾患	関節疾患	その他
A	1	6	0	0	0	0	1	0
B	0	2	0	0	1	0	0	1
C	0	4	0	0	3	0	5	1
D	0	1	0	0	0	0	2	2

【現病歴(G)】

現病歴は以下の通りであった。現在疾患をもっていないものを各群で比較すると、A群、C群と比較して、B群で有意にその割合が少なかった(p<0.001)。

地域	なし	脳卒中	高血圧	心臓病	腎臓病	糖尿病	肝臓病	胃腸病	リウマチ	癌
A	22	0	2	2	1	1	0	9	0	0
B	4	1	1	8	2	9	0	11	0	0
C	74	1	4	4	0	0	0	10	4	0
D	27	1	3	2	0	1	1	0	0	0

地域	結核	他の呼吸器	脾臓病	貧血	神経疾患	脊椎疾患	関節疾患	その他
A	1	0	0	0	1	0	2	0
B	1	3	0	0	14	3	2	0
C	1	3	0	0	6	2	8	3
D	0	2	0	0	3	0	3	3

【飼い猫、家畜などの異常の有無(H)】

A群で、異常が2件見られたとの回答があったが、他の群ではなかった。A群とC群とで、有意差を認めた(p<0.05)。

【精査歴(I)】

毛髪水銀検査を受けたことのあるものは、A群で21人、B群で1人のみであった。メチル水銀中毒についての検診を受けたことのあるものは、A群に15人みられたが、B群、C群ではなかった。

## 【自覚症状調査(J)】

自覚症状(J)については、以下の表の通りであった。次ページからの各集計表のなかで、Odds Ratioの95%限界値の下限が1.0を超える、又は、上限が1.0未満のものは、網掛け表示とした。

まず、既往を含めた自覚症状におけるA群とC群の比較では、筋肉がびくびくする(Odds Ratio 23.6)、持続性のふるえ(17.0)、何もしたくない(13.7)、身体がふらつく(10.0)、だるさ(7.6)、たちくらみ(7.2)、転び易い(6.8)、疲れ易い(6.1)、力が弱くなった(6.0)、急にイライラしたり悲しくなる(4.2)、食欲がない(3.8)、めまい(3.7)、根気がない(3.5)、もの忘れする(3.5)、手足の発作性の大きなふるえ・けいれん(3.0)、関節以外の痛み(2.6)、不眠(2.4)、耳鳴り(2.4)、しびれ・じんじん感(2.1)の順にA群で有意に高かった。B群とC群との比較では、持続性のふるえ(Odds Ratio 42.2)、だるさ(34.8)、身体がふらつく(16.7)、回りが見えない(16.1)、筋肉がびくびくする(14.5)、何もしたくない(12.8)、力が弱くなった(9.7)、手足の発作性の大きなふるえ・けいれん(9.6)、たちくらみ(6.8)、もの忘れする(6.6)、めまい(5.89)、疲れ易い(4.4)、関節以外の痛み(4.4)、急にイライラしたり悲しくなる(4.4)、根気がない(4.2)、食欲がない(4.0)、意識をなくしたことがある(4.0)、耳鳴り(2.8)、しびれ・じんじん感(2.2)の順にB群で有意に高かった。A群とB群との比較では、だるさ(Odds Ratio 0.22)、手足の発作性の大きなふるえ・けいれん(0.31)がB群で有意に高かった。

次に、現在の自覚症状におけるA群とC群との比較では、何もしたくない(Odds Ratio 13.7)、筋肉がびくびくする(13.1)、身体がふらつく(10.0)、たちくらみ(5.8)、力が弱くなった(5.1)、だるさ(4.3)、食欲がない(3.8)、疲れ易い(3.6)、急にイライラしたり悲しくなる(3.3)、めまい(3.1)、根気がない(3.0)、もの忘れする(2.7)の順にA群で有意に高かった。B群とC群との比較では、持続性のふるえ(42.2)、だるさ(34.8)、身体がふらつく(16.7)、回りが見えない(16.1)、筋肉がびくびくする(14.5)、何もしたくない(12.8)、力が弱くなった(9.7)、手足の発作性の大きなふるえ・けいれん(9.6)、もの忘れする(6.6)、めまい(5.9)、たちくらみ(5.5)、疲れ易い(4.4)、関節以外の痛み(4.4)、根気がない(4.2)、食欲がない(4.0)、急にイライラしたり悲しくなる(3.9)、耳鳴り(3.3)、しびれ・じんじん感(2.1)の順にB群で有意に高かった。A群とB群との比較では、だるさ(Odds Ratio 0.12)、持続性のふるえ(0.17)、手足の発作性の大きなふるえ・けいれん(0.22)がB群で有意に高かった。

既往を含めた自覚症状においても現在のみの自覚症状においても、A群、B群よりもC群の頻度が有意に高い症状、B群よりもA群の頻度が有意に高い症状はなかった。

C群と比較してA群、B群では、しびれを訴えるものの割合が有意に高かったが、その他の点では、倦怠感や食欲不振、不眠などのいわゆる不定愁訴で有意差があり、「スリッパがぬげる」、「ボタンがはめにくい」などの、水俣で特徴的な神経症候の多くは有意差がなかった。

自覚症状調査(J)…既往を含めたもの

					A対B			A対C			B対C		
	A	B	C	D	OR	下限	上限	OR	下限	上限	OR	下限	上限
1. しびれ・じんじん感	18	19	35	9	0.99	0.41	2.42	<b>2.13</b>	<b>1.01</b>	<b>4.52</b>	<b>2.15</b>	<b>1.03</b>	<b>4.48</b>
2. その他の知覚異常	5	3	5	0	1.87	0.41	8.43	3.42	0.93	12.55	1.83	0.42	8.04
3. 関節痛	16	18	41	17	0.89	0.36	2.18	1.37	0.65	2.88	1.54	0.74	3.19
4. 関節以外の痛み	21	27	38	16	0.59	0.24	1.49	<b>2.60</b>	<b>1.23</b>	<b>5.49</b>	<b>4.37</b>	<b>2.03</b>	<b>9.41</b>
5. だるさ	8	22	4	41	<b>0.22</b>	<b>0.08</b>	<b>0.59</b>	<b>7.60</b>	<b>2.14</b>	<b>26.95</b>	<b>34.83</b>	<b>10.75</b>	<b>112.87</b>
6. 物がはっきり見えない	8	9	12	4	0.92	0.31	2.70	2.36	0.88	6.29	2.56	0.99	6.65
7. 回りが見えない	2	4	0	1	0.50	0.09	2.90	9.65	0.97	95.57	<b>16.08</b>	<b>1.82</b>	<b>142.05</b>
8. 耳が遠い	4	5	13	2	0.82	0.20	3.33	0.95	0.29	3.11	1.15	0.38	3.47
9. 耳鳴り	12	14	19	7	0.86	0.33	2.20	<b>2.40</b>	<b>1.04</b>	<b>5.58</b>	<b>2.81</b>	<b>1.24</b>	<b>6.33</b>
10. においが分からない	2	2	4	1	1.06	0.14	7.90	1.58	0.28	9.01	1.50	0.26	8.52
11. 味が分からない	1	2	4	0	0.51	0.04	5.91	0.77	0.08	7.11	1.50	0.26	8.52
12. 転び易い	4	3	2	1	1.45	0.30	6.96	<b>6.82</b>	<b>1.20</b>	<b>38.87</b>	4.70	0.76	29.23
13. スリッパや草履が履きにくい	0	0	1	1	1.05	0.06	17.40	1.51	0.13	17.14	1.44	0.13	16.29
14. 草履などが脱げる	1	1	0	0	1.05	0.06	17.47	6.26	0.55	71.01	5.95	0.53	67.39
15. 手が不自由	3	3	2	0	1.06	0.20	5.59	4.97	0.80	30.95	4.70	0.76	29.23
16. 指先がきかない	1	0	1	0	2.16	0.19	24.78	3.16	0.19	51.81	1.44	0.13	16.29
17. 手から物をとり落とす	4	3	3	0	1.45	0.30	6.96	4.51	0.96	21.14	3.11	0.60	16.07
18. ボタンかけが難しい	0	1	0	0	0.51	0.04	5.89	3.05	0.19	49.94	5.95	0.53	67.39
19. 言葉がはっきりしない	0	1	0	0	0.51	0.04	5.89	3.05	0.19	49.94	5.95	0.53	67.39
20. 言葉が出にくい	0	1	0	0	0.51	0.04	5.89	3.05	0.19	49.94	5.95	0.53	67.39
21. 力が弱くなった	8	12	5	2	0.62	0.22	1.75	<b>6.03</b>	<b>1.84</b>	<b>19.76</b>	<b>9.69</b>	<b>3.15</b>	<b>29.75</b>
22. 筋肉がびくびくする	11	8	2	2	1.63	0.57	4.63	<b>23.63</b>	<b>4.95</b>	<b>112.88</b>	<b>14.50</b>	<b>2.93</b>	<b>71.69</b>
23. 手足の発作性の大きなふるえ・けいれん	16	28	23	9	<b>0.31</b>	<b>0.12</b>	<b>0.79</b>	<b>3.00</b>	<b>1.36</b>	<b>6.61</b>	<b>9.64</b>	<b>4.26</b>	<b>21.78</b>
24. 持続性のふるえ	4	10	0	0	0.35	0.10	1.24	<b>17.00</b>	<b>1.92</b>	<b>150.37</b>	<b>42.23</b>	<b>5.25</b>	<b>339.67</b>
25. 不眠	11	10	17	2	1.22	0.45	3.33	<b>2.42</b>	<b>1.01</b>	<b>5.77</b>	1.98	0.82	4.78
26. 疲れ易い	21	19	20	7	1.37	0.56	3.33	<b>6.05</b>	<b>2.72</b>	<b>13.47</b>	<b>4.43</b>	<b>2.02</b>	<b>9.72</b>
27. 食欲がない	9	10	9	1	0.93	0.33	2.62	<b>3.76</b>	<b>1.37</b>	<b>10.33</b>	<b>4.04</b>	<b>1.50</b>	<b>10.83</b>
28. 何もしたくない	10	10	3	2	1.07	0.39	2.96	<b>13.69</b>	<b>3.53</b>	<b>53.06</b>	<b>12.78</b>	<b>3.31</b>	<b>49.36</b>
29. 根気がない	10	12	11	3	0.83	0.31	2.24	<b>3.47</b>	<b>1.34</b>	<b>9.00</b>	<b>4.17</b>	<b>1.66</b>	<b>10.44</b>
30. もの忘れする	14	21	17	5	0.53	0.21	1.31	<b>3.47</b>	<b>1.50</b>	<b>7.99</b>	<b>6.57</b>	<b>2.93</b>	<b>14.70</b>
31. 急にイライラしたり悲しくなる	13	14	13	3	0.97	0.38	2.46	<b>4.20</b>	<b>1.74</b>	<b>10.17</b>	<b>4.35</b>	<b>1.82</b>	<b>10.37</b>
32. めまい	8	12	8	4	0.62	0.22	1.75	<b>3.67</b>	<b>1.27</b>	<b>10.58</b>	<b>5.89</b>	<b>2.20</b>	<b>15.80</b>
33. 気の遠くなりそうな発作がある	2	3	2	3	0.69	0.11	4.35	3.22	0.44	23.70	4.70	0.76	29.23
34. 意識をなくしたことがある	5	7	6	2	0.71	0.21	2.48	2.83	0.81	9.86	<b>3.96</b>	<b>1.24</b>	<b>12.60</b>
35. てんかん大発作	0	1	1	0	0.51	0.04	5.89	1.51	0.13	17.14	3.00	0.18	49.11
36. たくらみ	6	6	3	0	1.06	0.31	3.64	<b>7.19</b>	<b>1.70</b>	<b>30.34</b>	<b>6.76</b>	<b>1.61</b>	<b>28.49</b>
37. 身体がふらつく	3	5	1	0	0.60	0.13	2.71	<b>10.03</b>	<b>1.01</b>	<b>99.48</b>	<b>16.71</b>	<b>1.89</b>	<b>147.86</b>



自覚症状調査(J)…現在症状のあるもの

					A対B			A対C			B対C		
	A	B	C	D	OR	下限	上限	OR	下限	上限	OR	下限	上限
1. しびれ・じんじん感	13	19	35	8	0.57	0.23	1.43	1.23	0.57	2.68	<b>2.15</b>	<b>1.03</b>	<b>4.48</b>
2. その他の知覚異常	4	3	5	0	1.45	0.30	6.96	2.66	0.68	10.46	1.83	0.42	8.04
3. 関節痛	15	17	41	17	0.88	0.36	2.18	1.22	0.58	2.60	1.39	0.67	2.89
4. 関節以外の痛み	18	27	38	16	0.43	0.17	1.09	1.89	0.90	3.99	<b>4.37</b>	<b>2.03</b>	<b>9.41</b>
5. だるさ	5	22	4	9	<b>0.12</b>	<b>0.04</b>	<b>0.38</b>	<b>4.32</b>	<b>1.10</b>	<b>17.01</b>	<b>34.83</b>	<b>10.75</b>	<b>112.87</b>
6. 物がはっきり見えない	6	9	12	4	0.65	0.21	2.03	1.66	0.58	4.76	2.56	0.99	6.65
7. 回りが見えない	2	4	0	1	0.50	0.09	2.90	9.65	0.97	95.57	<b>16.08</b>	<b>1.82</b>	<b>142.05</b>
8. 耳が遠い	4	5	13	2	0.82	0.20	3.33	0.95	0.29	3.11	1.15	0.38	3.47
9. 耳鳴り	8	13	15	7	0.55	0.20	1.54	1.83	0.71	4.73	<b>3.31</b>	<b>1.41</b>	<b>7.77</b>
10. においが分からない	1	2	4	1	0.51	0.04	5.91	0.77	0.08	7.11	1.50	0.26	8.52
11. 味が分からない	0	2	4	0	0.33	0.03	3.35	0.59	0.07	5.20	1.50	0.26	8.52
12. 転び易い	2	3	2	1	0.69	0.11	4.35	3.22	<b>0.44</b>	<b>23.70</b>	4.70	0.76	29.23
13. スリッパや草履が履きにくい	0	0	1	1	1.05	0.06	17.40	1.51	0.13	17.14	1.44	0.13	16.29
14. 草履などが脱げる	1	1	0	0	1.05	0.06	17.47	6.26	0.55	71.01	5.95	0.53	67.39
15. 手が不自由	3	3	2	0	1.06	0.20	5.59	4.97	0.80	30.95	4.70	0.76	29.23
16. 指先がきかない	1	0	1	0	2.16	0.19	24.78	3.16	0.19	51.81	1.44	0.13	16.29
17. 手から物をとり落とす	3	2	3	0	1.63	0.26	10.33	3.29	0.63	17.01	2.02	0.32	12.53
18. ボタンかけが難しい	0	1	0	0	0.51	0.04	5.89	3.05	0.19	49.94	5.95	0.53	67.39
19. 言葉がはっきりしない	0	1	0	0	0.51	0.04	5.89	3.05	0.19	49.94	5.95	0.53	67.39
20. 言葉が出にくい	0	1	0	0	0.51	0.04	5.89	3.05	0.19	49.94	5.95	0.53	67.39
21. 力が弱くなった	7	12	5	2	0.53	0.18	1.53	<b>5.10</b>	<b>1.51</b>	<b>17.19</b>	<b>9.69</b>	<b>3.15</b>	<b>29.75</b>
22. 筋肉がびくびくする	7	8	2	2	0.90	0.29	2.79	<b>13.10</b>	<b>2.59</b>	<b>66.22</b>	<b>14.50</b>	<b>2.93</b>	<b>71.69</b>
23. 手足の発作性の大きなふるえ・けいれん	13	28	23	9	<b>0.22</b>	<b>0.09</b>	<b>0.58</b>	2.15	0.96	4.83	<b>9.64</b>	<b>4.26</b>	<b>21.78</b>
24. 持続性のふるえ	2	10	0	0	<b>0.17</b>	<b>0.03</b>	<b>0.82</b>	9.65	0.97	95.57	<b>42.23</b>	<b>5.25</b>	<b>339.67</b>
25. 不眠	9	10	17	2	0.93	0.33	2.62	1.84	0.74	4.57	1.98	0.82	4.78
26. 疲れ易い	16	19	20	7	0.80	0.33	1.97	<b>3.56</b>	<b>1.60</b>	<b>7.96</b>	<b>4.43</b>	<b>2.02</b>	<b>9.72</b>
27. 食欲がない	9	10	9	1	0.93	0.33	2.62	<b>3.76</b>	<b>1.37</b>	<b>10.33</b>	<b>4.04</b>	<b>1.50</b>	<b>10.83</b>
28. 何もしたくない	10	10	3	2	1.07	0.39	2.96	<b>13.69</b>	<b>3.53</b>	<b>53.06</b>	<b>12.78</b>	<b>3.31</b>	<b>49.36</b>
29. 根気がない	9	12	11	3	0.72	0.26	1.98	<b>3.02</b>	<b>1.14</b>	<b>7.98</b>	<b>4.17</b>	<b>1.66</b>	<b>10.44</b>
30. もの忘れする	12	21	17	5	0.42	0.17	1.05	<b>2.74</b>	<b>1.17</b>	<b>6.45</b>	<b>6.57</b>	<b>2.93</b>	<b>14.70</b>
31. 急にイライラしたり悲しくなる	11	13	13	3	0.85	0.32	2.22	<b>3.29</b>	<b>1.33</b>	<b>8.15</b>	<b>3.89</b>	<b>1.62</b>	<b>9.35</b>
32. めまい	7	12	8	4	0.53	0.18	1.53	<b>3.10</b>	<b>1.04</b>	<b>9.23</b>	<b>5.89</b>	<b>2.20</b>	<b>15.80</b>
33. 気の遠くなりそうな発作がある	2	1	1	2	2.17	0.19	24.93	6.50	0.57	73.79	3.00	0.18	49.11
34. 意識をなくしたことがある	5	5	6	2	1.06	0.28	4.00	2.83	0.81	9.86	2.67	0.77	9.27
35. てんかん大発作	0	1	1	0	0.51	0.04	5.89	1.51	0.13	17.14	3.00	0.18	49.11
36. たちくらみ	5	5	3	0	1.06	0.28	4.00	<b>5.81</b>	<b>1.32</b>	<b>25.59</b>	<b>5.48</b>	<b>1.25</b>	<b>24.07</b>
37. 身体がふらつく	3	5	1	0	0.60	0.13	2.71	<b>10.03</b>	<b>1.01</b>	<b>99.48</b>	<b>16.71</b>	<b>1.89</b>	<b>147.86</b>

## 【自覚症状調査(K)】

自覚症状(K)については、以下の表の通りであった。自覚症状(J)と同様に、次ページからの各集計表のなかで、Odds Ratioの95%限界値の下限が1.0を超える、又は、上限が1.0未満のものは、網掛け表示とした。

まず、既往を含めた自覚症状におけるA群とC群の比較では、「手さげやバッグは、落としてしまいそうになるので、手で持たずに肘にかけることが多い」(Odds Ratio 17.0)、「人と話すとき、言葉は聞こえても、何を言っているか分からないことが多い」(4.2)、「探し物をしているときに、人から話しかけられると、物を捜すことが出来なくなる」(3.6)、「ものをじっと見ていると、最初ははっきり見えていたものが、次第に見えにくくなることもある」(2.3)の順にA群で有意に高かった。B群とC群との比較では、「怪我や火傷をしても、痛みを感じない」(Odds ratio 12.5)、「味の感覚が正常でなく、料理の味見に困る」(10.2)、「人と話すとき、言葉は聞こえても、何を言っているか分からないことが多い」(8.5)、「人と話をしている最中に、自分が何を話していたか分からなくなることもある」(7.1)、「自分が自分でないような感じがすることがある」(6.4)、「探し物をしているときに、人から話しかけられると、物を捜すことが出来なくなる」(3.8)、「足がやける(熱くなる)」(3.7)、「手がやける(熱くなる)」(3.2)の順にB群で有意に高かった。A群とB群との比較では、「人と話をしている最中に、自分が何を話していたか分からなくなることもある」(Odds Ratio 0.23)、「足がやける(熱くなる)」(0.27)がB群で有意に高かった。

次に、現在の自覚症状におけるA群とC群との比較では、手さげやバッグは、落としてしまいそうになるので、手で持たずに肘にかけることが多い」(Odds Ratio 17.0)、「探し物をしているときに、人から話しかけられると、物を捜すことが出来なくなる」(3.3)がA群で有意に高かった。B群とC群との比較では、「怪我や火傷をしても、痛みを感じない」(Odds Ratio 12.5)、「味の感覚が正常でなく、料理の味見に困る」(10.2)、「人と話すとき、言葉は聞こえても、何を言っているか分からないことが多い」(7.6)、「人と話をしている最中に、自分が何を話していたか分からなくなることもある」(7.5)、「探し物をしているときに、人から話しかけられると、物を捜すことが出来なくなる」(4.6)、「足がやける(熱くなる)」(3.7)、「手がやける(熱くなる)」(3.2)の順にB群で有意に高かった。A群とB群との比較では、「足がやける(熱くなる)」(Odds Ratio 0.15)、「手がやける(熱くなる)」(0.23)がB群で有意に高かった。

既往を含めた自覚症状においても現在のみの自覚症状においても、A群、B群よりもC群の頻度が有為の高い症状、B群よりもA群の頻度が有為の高い症状はなかった。

	A				B				C				D				A対B			A対C			B対C		
	あり	ない	あり	ない	あり	ない	あり	ない	あり	ない	あり	ない	あり	ない	OR	下限	上限	OR	下限	上限	OR	下限	上限		
1. 手さげやバツグは、落としてしまいそうになるので、手で持たずに肘にかけることが多い	4	34	1	39	0	118	0	41	4.59	0.49	43.06	<b>17.00</b>	<b>1.92</b>	<b>150.37</b>											67.39
2. 風呂の湯加減がわからないので困ることがある	0	38	1	39	0	118	0	41	0.51	0.04	5.89	3.05	0.19	49.94	5.95	0.53	67.39								
3. 手がやける(熱くなる)	10	28	18	22	24	94	11	30	0.44	0.17	1.13	1.40	0.60	3.27	<b>3.20</b>	<b>1.49</b>	<b>6.90</b>								
4. 足がやける(熱くなる)	8	30	20	20	25	93	11	30	<b>0.27</b>	<b>0.10</b>	<b>0.72</b>	0.99	0.40	2.43	<b>3.72</b>	<b>1.74</b>	<b>7.96</b>								
5. 怪我や火傷をしても、痛みを感じない	2	36	3	37	0	118	0	41	0.69	0.11	4.35	9.65	0.97	95.57	<b>12.53</b>	<b>1.36</b>	<b>115.52</b>								
6. ものをじっと見ていると、最初ははつきり見えていたものが、次第に見えにくくなることがある	13	25	11	29	22	96	8	33	1.37	0.52	3.60	<b>2.27</b>	<b>1.00</b>	<b>5.12</b>	1.66	0.72	3.81								
7. 味の感覚が正常でなく、料理の味見に困る	3	35	6	34	2	116	0	41	0.49	0.11	2.10	4.97	0.80	30.95	<b>10.24</b>	<b>1.97</b>	<b>53.05</b>								
8. 人と話すとき、言葉は聞こえても、何を言っているかわからないことが多い	8	30	14	26	7	111	2	39	0.50	0.18	1.37	<b>4.23</b>	<b>1.42</b>	<b>12.60</b>	<b>8.54</b>	<b>3.13</b>	<b>23.27</b>								
9. なんでもない平地でもつまづいたり転げたりすることがある	2	36	2	38	1	117	0	41	1.06	0.14	7.90	6.50	0.57	73.79	6.16	0.54	69.82								
10. 最近1ヶ月以内に転倒した	1	37	2	38	1	117	0	41	0.51	0.04	5.91	3.16	0.19	51.81	6.16	0.54	69.82								
11. 最近1年以内に転倒して病院で治療を受けた。	1	37	0	40	1	117	2	39	2.16	0.19	24.78	3.16	0.19	51.81	1.44	0.13	16.29								
12. ご飯をたべていて、箸を落としてしまうことがある	2	36	2	38	4	114	0	41	1.06	0.14	7.90	1.58	0.28	9.01	1.50	0.26	8.52								
13. 頭の中が真っ白になる、あるいは何も考えられなくなることもある	4	34	6	34	13	105	1	40	0.67	0.17	2.58	0.95	0.29	3.11	1.43	0.50	4.04								
14. 自分が自分でないような感じがすることがある	3	35	4	36	2	116	1	40	0.77	0.16	3.70	4.97	0.80	30.95	<b>6.44</b>	<b>1.13</b>	<b>36.65</b>								
15. 人と話をしていて最中に、自分が何を話していたかわからなくなることもある	3	35	11	29	6	112	3	38	<b>0.23</b>	<b>0.06</b>	<b>0.89</b>	1.60	0.38	6.73	<b>7.08</b>	<b>2.42</b>	<b>20.75</b>								
16. 探し物をしていてときに、人から話しかけられると、物を探すことが出来なくなる	11	27	12	28	12	106	3	38	0.95	0.36	2.52	<b>3.60</b>	<b>1.43</b>	<b>9.04</b>	<b>3.79</b>	<b>1.54</b>	<b>9.33</b>								
総数	38		40		118		41																		

自覚症状調査(K)…現在症状のあるもの

	A		B		C		D		A対B			A対C			B対C		
	あ	ない	あ	ない	あ	ない	あ	ない	OR	下限	上限	OR	下限	上限	OR	下限	上限
1. 手さげやバッグは、落としてしまいそうになるので、手で持たずに肘にかけることが多い	4	34	1	39	0	118	0	41	4.59	0.49	43.06	<b>17.00</b>	<b>1.92</b>	<b>150.37</b>	5.95	0.53	67.39
2. 風呂の湯加減がわからないので困ることがある	0	38	1	39	0	118	0	41	0.51	0.04	5.89	3.05	0.19	49.94	5.95	0.53	67.39
3. 手がやける(熱くなる)	6	32	18	22	24	94	11	30	<b>0.23</b>	<b>0.08</b>	<b>0.67</b>	0.73	0.28	1.96	<b>3.20</b>	<b>1.49</b>	<b>6.90</b>
4. 足がやける(熱くなる)	5	33	20	20	25	93	11	30	<b>0.15</b>	<b>0.05</b>	<b>0.47</b>	0.56	0.20	1.59	<b>3.72</b>	<b>1.74</b>	<b>7.96</b>
5. 怪我や火傷をしても、痛みを感じない	2	36	3	37	0	118	0	41	0.69	0.11	4.35	9.65	0.97	95.57	<b>12.53</b>	<b>1.36</b>	<b>115.52</b>
6. ものをじっと見ていると、最初ははつきり見えていたものが、次第に見えにくくなることもある	9	29	11	29	21	97	8	33	0.82	0.29	2.27	1.43	0.59	3.47	1.75	0.76	4.06
7. 味の感覚が正常でなく、料理の味見に困る	2	36	6	34	2	116	0	41	0.31	0.06	1.67	3.22	0.44	23.70	<b>10.24</b>	<b>1.97</b>	<b>53.05</b>
8. 人と話すとき、言葉は聞こえても、何を言っているかわからないことが多い	6	32	13	27	7	111	2	39	0.39	0.13	1.16	2.97	0.93	9.48	<b>7.63</b>	<b>2.78</b>	<b>20.97</b>
9. なんでもない平地でもつまづいたり転げたりすることがある	1	37	2	38	1	117	0	41	0.51	0.04	5.91	3.16	0.19	51.81	6.16	0.54	69.82
10. 最近1ヶ月以内に転倒した	1	37	2	38	1	117	0	41	0.51	0.04	5.91	3.16	0.19	51.81	6.16	0.54	69.82
11. 最近1年以内に転倒して病院で治療を受けた。	1	37	0	40	1	117	2	39	2.16	0.19	24.78	3.16	0.19	51.81	1.44	0.13	16.29
12. ご飯をたべていて、箸を落としてしまうことがある	2	36	2	38	1	117	0	41	1.06	0.14	7.90	6.50	0.57	73.79	6.16	0.54	69.82
13. 頭の中が真っ白になる、あるいは何も考えられなくなることもある	4	34	6	34	11	107	1	40	0.67	0.17	2.58	1.14	0.34	3.83	1.72	0.59	4.99
14. 自分が自分でないような感じがすることがある	2	36	3	37	2	116	1	40	0.69	0.11	4.35	3.22	0.44	23.70	4.70	0.76	29.23
15. 人と話している最中に、自分が何を話していたかわからなくなることがある	3	35	10	30	5	113	3	38	0.26	0.06	1.02	1.94	0.44	8.52	<b>7.53</b>	<b>2.39</b>	<b>23.71</b>
16. 探し物をしているときに、人から話しかけられると、物を捜すことが出来なくなる	9	29	12	28	10	108	3	38	0.72	0.26	1.98	<b>3.30</b>	<b>1.28</b>	<b>8.51</b>	<b>4.63</b>	<b>1.81</b>	<b>11.81</b>
総数	38	40	118	41													

【こむらがえり(L)】

L-1 経験の有無：こむらがえりの経験のあるものは、C群と比較してB群で有意に多かった。

L-1	A	B	C	D
あり	17	26	38	16
なし	21	14	80	25

L-2 初発時期：こむらがえりの初発時期は、25年以上群間に差はなく、10年以上ではC群に比較してA群に多く、1年以上および1年以内を含めるとC群に比較してB群で有意に多かった。

L-2	A	B	C	D
25年以上前	1	1	0	0
10～25年前	5	3	4	3
1～10年前	9	14	24	9
1年以内	2	8	10	4
なし	21	14	80	25

L-3 最悪時期：最悪時期は、10年以上前と回答したものは、C群に比較してA群、B群で有意に多かった。他の回答では各群間に有意差を認めなかった。

L-3	A	B	C	D
25年以上前	0	1	0	0
10～25年前	2	0	3	0
1～10年前	12	13	15	7
1年以内	2	12	12	1
なし	21	14	80	25
無回答	1	0	8	8

L-4 最悪頻度：最悪時期の頻度については、週1回以上、月1回以上、年1回以上と回答したものは、C群に比較して、A群、B群で有意に多かった。年1回以下を含めたものは、C群に比較してB群に有意に多かった。毎日の回答は各群間で有意差を認めなかった。

L-4	A	B	C	D
毎日	3	5	6	5
週1回以上	4	7	8	2
月1回以上	6	9	7	2
年1回以上	4	3	4	1
年1回以下	0	2	10	5
なし	21	14	80	25
無回答	0	0	3	1

L-5 現在頻度：現在の頻度では、週1回以上、月1回以上と回答したものは、A群、C群に比較してB群に有意に多かった。年1回以上、年1回以下を含めた回答は、C群に比較してB群に有意に多かった。

L-5	A	B	C	D
毎日	1	2	4	0
週1回以上	3	10	9	1
月1回以上	5	6	6	5
年1回以上	2	1	3	2
年1回以下	4	3	7	4
なし	23	18	87	26
無回答	0	0	2	3

L-6 発生部位：足に起こったことのある人は、C群と比較してA群、B群で有意に多く、手に起こったことのある人は、C群、B群と比較してA群に有意に多かった。体幹、頭部・顔面に起こったことのある人は、有意差がなかった。

L-6	A	B	C	D
足	15	19	25	12
手	7	16	18	3
体幹	0	1	7	2
頭部・顔面	0	1	0	0

L-6	A	B	C	D
足	38.5%	47.5%	21.2%	29.3%
手	17.9%	40.0%	15.3%	7.3%
体幹	0.0%	2.5%	5.9%	4.9%
頭部・顔面	0.0%	2.5%	0.0%	0.0%

## II. 診察所見

### 【一般身体所見(B)】

身長は、B群、C群に比較して、A群で有意に高かった。体重はC群に比較してA群で有意に重かった。

身長(cm)

地域	平均	標準偏差
A	167.8	6.6
B	164.7	6.9
C	162.8	7.3
D	167.2	8.3

体重(kg)

地域	平均	標準偏差
A	61.3	7.2
B	60.8	13.7
C	58.6	10.0
D	67.8	13.1

血圧は、収縮期、拡張期ともに、C群に比較して、A群、B群で有意に高かった。

収縮期血圧(mmHg)

地域	平均	標準偏差	最低	最高
A	118.3	13.0	90	152
B	117.2	13.0	100	160
C	109.2	13.3	85	170
D	119.2	22.9	80	190

拡張期血圧(mmHg)

地域	平均	標準偏差	最低	最高
A	70.4	6.5	60	85
B	71.4	9.5	50	90
C	64.8	8.5	45	100
D	71.0	14.3	48	110

脈拍は、A群に比較して、B群、C群で有意に高かった。

脈拍数(回/分)

地域	平均	標準偏差
A	63.2	29.1
B	72.7	15.9
C	75.0	17.2
D	75.0	21.1

その他の診察所見で各群間に有意差を認めなかった。

眼球結膜貧血

地域	なし	あり	不明
A	38	0	0
B	39	1	0
C	116	1	1
D	40	1	0

眼球結膜黄染

地域	なし	不明
A	37	1
B	40	0
C	116	2
D	41	0

### 【精神症状(C)】

情緒異常、知的異常を認めたものはなかった。

情緒異常

地域	なし	不明
A	38	0
B	38	2
C	118	0
D	41	0

知的異常

地域	なし	不明
A	38	0
B	38	2
C	118	0
D	41	0

【脳神経(D)】

構音障害を認めたものはなかった。ストップウォッチによる聴力検査では20cm以内ものは、左右とも、C群に比較してB群で頻度が高かった。10cm以内のものは、左耳でC群に比較してB群で頻度が高かった。Weber検査では、C群と比較してB群で正中のものが有意に少なく、右へ偏移するものが有意に多かった。視野異常には、各群間に有意差を認めなかった。

構音障害

地域	なし	不明
A	38	0
B	38	2
C	116	2
D	40	1

右耳聴力

地域	0~10cm	11~20cm	21cm~	合計
A	6	9	23	38
B	9	15	16	40
C	13	25	80	118
D	3	7	31	41

左耳聴力

地域	0~10cm	11~20cm	21cm~	合計
A	6	8	24	38
B	12	10	18	40
C	17	21	80	118
D	2	7	32	41

Weber検査

地域	正中	右へ偏移	左へ偏移	不明
A	28	6	3	1
B	18	12	9	1
C	83	16	18	1
D	29	4	8	0

右視野異常

地域	なし	あり	不明
A	37	1	0
B	40	0	0
C	118	0	0
D	40	0	1

左視野異常

地域	なし	あり	不明
A	36	2	0
B	40	0	0
C	117	0	1
D	41	0	0

【頸部の運動(E)】

Jacksonおよび、Spurling陽性ものの頻度は各群間に有意差を認めなかった。

右 Jackson

地域	なし	あり	不明
A	35	3	0
B	39	1	0
C	112	5	1
D	39	2	0

左 Jackson

地域	なし	あり	不明
A	34	4	0
B	35	5	0
C	109	8	1
D	39	2	0

右 Spurling

地域	なし	あり	不明
A	33	5	0
B	38	2	0
C	110	7	1
D	39	2	0

左 Spurling

地域	なし	あり	不明
A	33	5	0
B	37	3	0
C	108	9	1
D	40	1	0

【運動系(F)】

運動系に関しては、異常なものの頻度は筋力、筋緊張、失調検査、不随意運動など、各群間で有意差を認めなかった。

筋緊張

地域	正常	異常
A	38	0
B	38	2
C	116	2
D	41	0

筋萎縮

地域	正常	異常
A	38	0
B	40	0
C	117	1
D	41	0

筋力

地域	正常	異常
A	38	0
B	40	0
C	118	0
D	41	0

普通歩行

地域	正常	異常	不明
A	38	0	0
B	39	1	0
C	117	1	0
D	39	1	1

一直線歩行

地域	安定	不安定	不能	不明
A	38	0	0	0
B	36	3	1	0
C	114	4	0	0
D	36	4	0	1

Romberg

地域	陰性	陽性	不明
A	37	1	0
B	40	0	0
C	118	0	0
D	40	0	1

右片足立ち

地域	安定	不安定	不能	不明
A	36	2	0	0
B	37	2	1	0
C	113	5	0	0
D	37	3	0	1

左片足立ち

地域	安定	不安定	不能	不明
A	37	1	0	0
B	38	2	0	0
C	115	3	0	0
D	37	3	0	1

ジアドコキネーゼ

地域	正常	やや拙劣	拙劣
A	26	8	4
B	28	6	6
C	95	19	4
D	39	2	0



右指鼻試験

地域	正常	やや拙劣	拙劣
A	37	1	0
B	36	4	0
C	113	5	0
D	40	0	1

左指鼻試験

地域	正常	やや拙劣	拙劣
A	37	1	0
B	36	4	0
C	114	4	0
D	40	0	1

不随意運動

地域	なし	あり	不明
A	34	0	4
B	36	0	4
C	107	9	2
D	37	0	4

【反射(G)】

上下肢の深部腱反射の点数合計を上肢は左右3個所ずつ、下肢は左右2個所ずつの合計点を求めて、上肢、上肢では11点～13点を正常とし、それより大きいものを亢進、小さいものを低下とした。下肢では、7点～9点を正常とし、それより大きいものを亢進、小さいものを低下とした。上肢内、下肢内で、亢進と低下～消失が混在していると評価が困難になるが、そのような症例は上肢で1例、下肢で4例に過ぎず、無視できると考えてこの計算をおこなった。

上肢の腱反射は、C群に比してA群、B群で有意に低下しているものが多かった。また、下肢試験反射は、B群、C群に比較してA群で有意に低下しているものが多く、B群に比してC群で有意に亢進しているものが多かった。病的反射は、有意差はなかった。

下顎反射

Area	低下～消失	正常	亢進	不明
A	7	9	0	22
B	4	19	0	17
C	5	88	0	25
D	2	26	0	13

上肢深部腱反射

地域	低下 ～10	正常 11～13	亢進 14～	不明
A	15	21	1	0
B	9	30	1	0
C	9	104	5	0
D	8	33	0	1

下肢深部腱反射

地域	低下 ～6	正常 7～9	亢進 10～	不明
A	12	17	9	3
B	3	30	7	0
C	11	65	42	0
D	4	26	11	0

上肢病的反射

地域	正常	軽度異常	異常
	6	7~8	9~
A	34	4	0
B	36	2	2
C	107	8	3
D	39	2	0

下肢病的反射

地域	正常	軽度異常	異常
	4	5	6~
A	36	1	1
B	39	0	1
C	118	0	0
D	39	2	0

【自律神経症状(H)】

以下の4項目について、問診も含めて確認をおこなったが、各群間で有意差を認めなかった。

よだれ

地域	なし	あり
A	35	3
B	39	1
C	115	3
D	39	2

発汗過多

地域	なし	あり
A	28	10
B	33	7
C	95	23
D	35	6

皮膚紅潮

地域	なし	あり
A	38	0
B	40	0
C	118	0
D	41	0

直腸膀胱障害

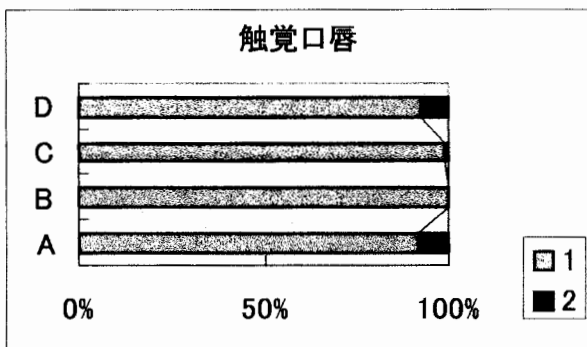
地域	なし	あり	不明
A	31	7	0
B	28	12	0
C	104	14	0
D	38	2	1

【知覚障害(I)】

触覚：口唇では、C群と比較してA群で有意に障害の頻度が高かった。四肢それぞれでは、手関節より末梢を含む四肢遠位部の感覚障害を示すもの(評価点数3~5)の割合は、C群と比較して、A群、B群で有意に高かった。

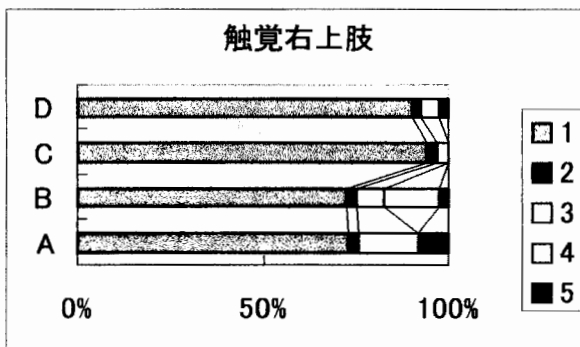
口唇

地域	1	2	不明
A	34	3	1
B	40	0	0
C	117	1	0
D	38	3	0



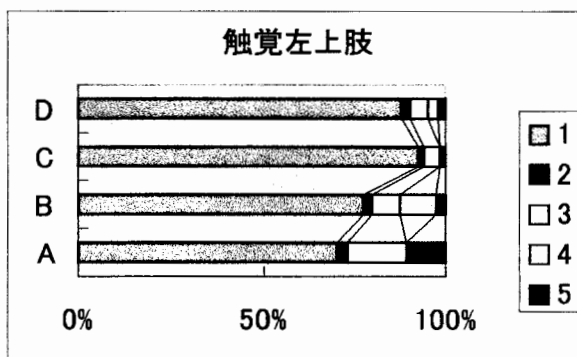
右上肢

地域	1	2	3	4	5	不明
A	27	1	6	0	3	1
B	29	1	3	6	1	0
C	111	3	4	0	0	0
D	37	1	2	0	1	0



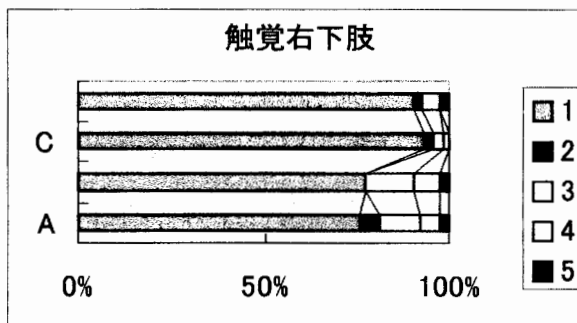
左上肢

地域	1	2	3	4	5	不明
A	26	1	6	0	4	1
B	31	1	3	4	1	0
C	109	2	5	0	2	0
D	36	1	2	1	1	0



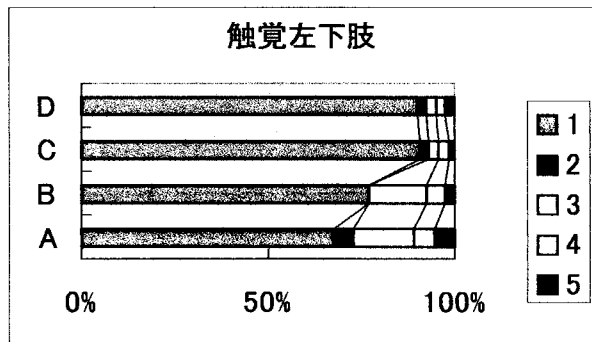
右下肢

地域	1	2	3	4	5	不明
A	28	2	4	2	1	1
B	31	0	5	3	1	0
C	109	3	3	2	0	1
D	37	1	2	0	1	0



左下肢

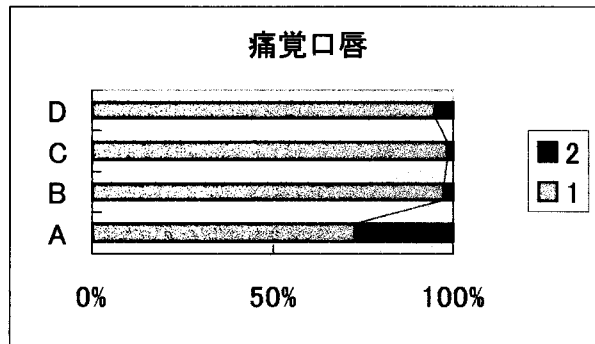
地域	1	2	3	4	5	不明
A	25	2	6	2	2	1
B	31	0	6	2	1	0
C	106	3	3	3	2	1
D	37	1	1	1	1	0



痛覚：口唇では、C群と比較してA群で有意に障害の頻度が高かった。四肢それぞれでは、手関節より末梢を含む四肢遠位部の感覚障害を示すもの(評価点数3~5)の割合は、C群と比較して、A群、B群で有意に高かった。

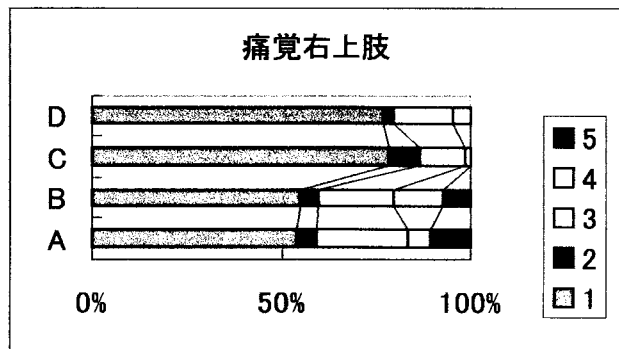
口唇

地域	1	2	不明
A	27	10	1
B	39	1	0
C	112	2	4
D	38	2	1



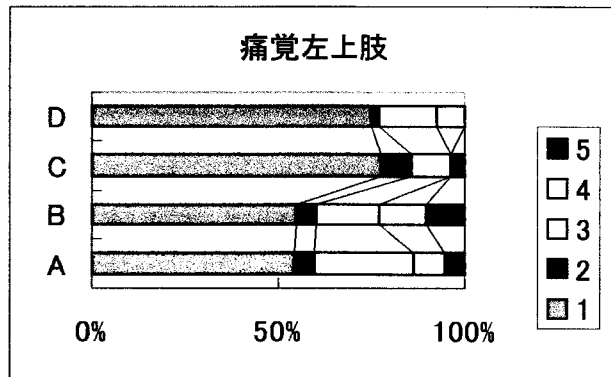
右上肢

地域	1	2	3	4	5	不明
A	20	2	9	2	4	1
B	22	2	8	5	3	0
C	90	9	13	2	0	4
D	31	1	6	2	0	1



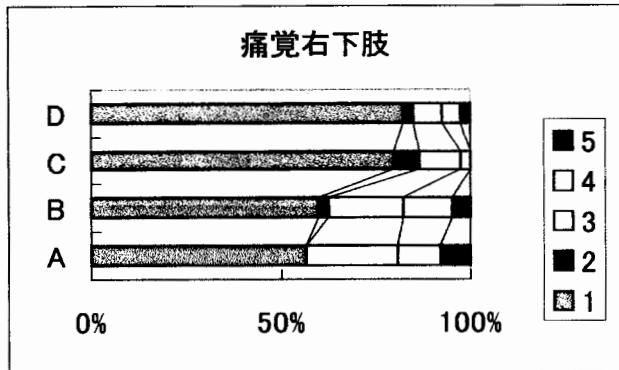
左上肢

地域	1	2	3	4	5	不明
A	20	2	10	3	2	1
B	22	2	7	5	4	0
C	89	9	12	0	4	4
D	30	1	6	3	0	1



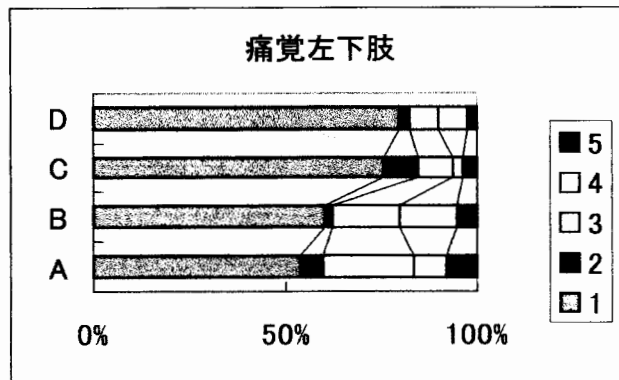
右下肢

地域	1	2	3	4	5	不明
A	21	0	9	4	3	1
B	24	1	8	5	2	0
C	90	8	12	3	0	5
D	33	1	3	2	1	1



左下肢

地域	1	2	3	4	5	不明
A	20	2	9	3	3	1
B	24	1	7	6	2	0
C	85	10	10	3	4	6
D	32	1	3	3	1	1



振動覚：振動覚では、10秒以下のものと11秒以上のものとを比較した。胸部振動覚で、A群と比較して、C群で10秒以下のものの割合が有意に高かったが、他の部位では有意差を認めなかった。

胸部

地域	0~5秒	6~10秒	11~15秒	16秒~	不明
A	1	10	25	2	0
B	0	14	20	6	0
C	1	57	57	2	1
D	0	17	22	2	0

右手首

地域	0~5秒	6~10秒	11~15秒	16秒~
A	0	10	18	10
B	1	12	17	10
C	4	45	57	12
D	0	18	20	3

左手首

地域	0~5秒	6~10秒	11~15秒	16秒~
A	1	18	17	2
B	2	16	15	7
C	8	51	49	10
D	1	19	20	1

右足首

地域	0~5秒	6~10秒	11~15秒	16秒~
A	0	9	20	9
B	1	11	17	11
C	5	45	56	12
D	0	15	24	2

左足首

地域	0~5秒	6~10秒	11~15秒	16秒~
A	1	16	19	2
B	0	19	17	4
C	5	58	46	9
D	1	21	17	2

位置覚：左右の手指、足趾で、各群に差を認めなかった。

右手指

地域	正常	異常	不明
A	36	2	0
B	39	0	1
C	118	0	0
D	41	0	0

左手指

地域	正常	異常	不明
A	37	1	0
B	39	0	1
C	118	0	0
D	41	0	0

右足趾

地域	正常	異常	不明
A	36	2	0
B	39	0	1
C	118	0	0
D	41	0	0

左足趾

地域	正常	異常	不明
A	38	0	0
B	38	1	1
C	118	0	0
D	40	1	0

二点間識別覚：下口唇、左右1、2指のいずれにても、C群と比較して、B群で二点間識別閾値距離が有意に長かった。他のC群と比較してA群では長い傾向を示したが、有意差はなかった。

下口唇

地域	平均	標準偏差
A	2.61	0.89
B	2.85	0.89
C	2.40	0.99
D	2.15	0.73

右一指

地域	平均	標準偏差
A	2.87	1.40
B	3.10	0.67
C	2.79	0.65
D	2.61	0.83

左一指

地域	平均	標準偏差
A	3.08	1.42
B	3.23	0.70
C	2.81	0.89
D	2.80	0.72

右二指

地域	平均	標準偏差
A	2.74	1.20
B	3.03	0.83
C	2.64	0.72
D	2.61	0.86

左二指

地域	平均	標準偏差
A	2.74	1.37
B	2.98	0.73
C	2.53	0.71
D	2.51	0.81

立体覚：立体覚には、各群間に有意差を認めなかった。

三角

地域	判別可	判別不可	不明
A	36	2	0
B	38	1	1
C	114	4	0
D	40	1	0

六角

地域	判別可	判別不可	不明
A	36	2	0
B	39	0	1
C	112	5	1
D	41	0	0

丸

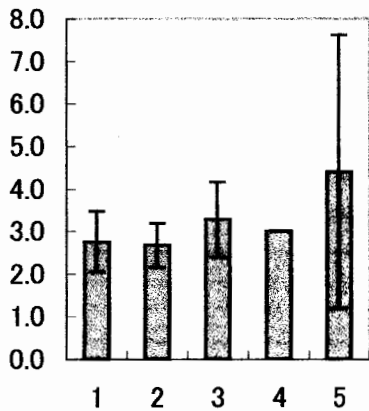
地域	判別可	判別不可	不明
A	37	1	0
B	39	0	1
C	118	0	0
D	41	0	0

上肢の触覚障害重症度別の右1、2指二点間識別覚閾値検査の結果

右左上肢触覚検査での重症度別に、右左それぞれ1、2指での二点間識別覚閾値検査の結果を比較したところ、触覚障害が重症なものほど二点間識別距離が長い傾向があったが、有意差はなかった。

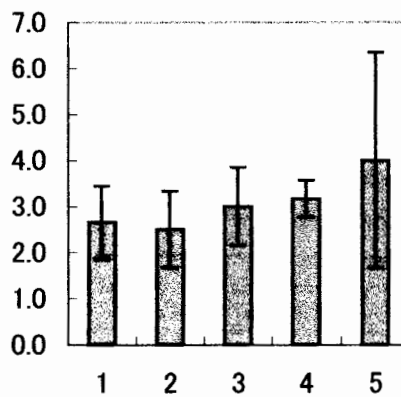
右上肢触覚 vs 右1指閾値

触覚障害	平均	標準偏差	症例数
1	2.75	0.71	204
2	2.67	0.52	6
3	3.27	0.88	15
4	3.00	0.00	6
5	4.40	3.21	5
不明	3.00		1



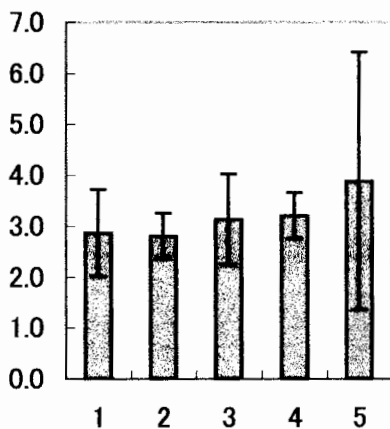
右上肢触覚 vs 右2指閾値

触覚障害	平均	標準偏差	症例数
1	2.66	0.79	204
2	2.50	0.84	6
3	3.00	0.85	15
4	3.17	0.41	6
5	4.00	2.35	5
不明	2.00		1



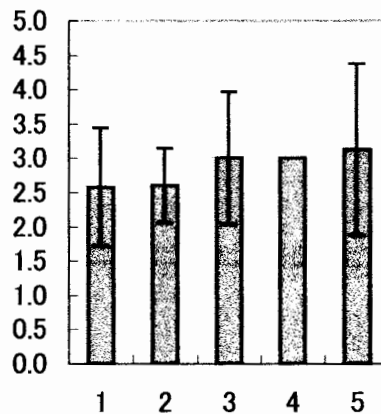
左上肢触覚 vs 左1指閾値

触覚障害	平均	標準偏差	症例数
1	2.87	0.85	202
2	2.80	0.45	5
3	3.13	0.89	16
4	3.20	0.45	5
5	3.88	2.53	8
不明	3.00		1



左上肢触覚 vs 左2指閾値

触覚障害	平均	標準偏差	症例数
1	2.58	0.87	202
2	2.60	0.55	5
3	3.00	0.97	16
4	3.00	0.00	5
5	3.13	1.25	8
不明	2.00		1



### III. 検査値

血糖値は、A群、B群に比較して、C群で有意に高かったが、尿糖+以上のものは、C群と比較して、B群で有意に多かった。毛髪総水銀濃度は、C群と比較してA群、B群で有意に高値であった。(p<0.001)。

血糖値 (単位: mg/dl)

地域	平均	標準偏差	最大値
A	86.1	16.1	121
B	83.9	12.2	123
C	91.9	13.5	139
D	90.4	17.0	170

尿糖

Area	—	±	+	++	+++
A	36	0	2	0	0
B	33	2	2	3	0
C	114	1	1	1	1
D	37	1	1	1	1

尿蛋白

Area	—	±	+	++	+++
A	38	0	0	0	0
B	40	0	0	0	0
C	117	0	1	0	0
D	40	0	1	0	0

尿潜血

Area	—	±	+	++	+++
A	33	0	1	2	2
B	37	2	0	1	0
C	96	2	8	6	6
D	33	0	4	3	1

毛髪総水銀濃度 (単位: ppm)

Area	平均±標準偏差	最低	最高
A	3.1±1.7	0.5	7.2
B	2.7±1.9	0.7	7.8
C	1.0±0.6	0.1	3.2
D	2.1±1.5	0.3	8.3



## 【考察】

### I. 疫学調査の方法

#### (1)調査地域および時期の選択

今回の調査地域は黒龍江省肇源県内であり、A 地区は漁業地域、B 地区は半農半漁、C 地区は農業地域であった。A 地区と C 地区は約 35km、B 地区と C 地区は約 26km 離れている。気候や風土はほとんど同じと考えられるが、A 地区、B 地区と異なって、C 地区ではほとんど魚介類を摂取していない。1975 年、B 地区で毛髪水銀調査をおこなったところ、平均 19.25ppm、最低 5.3ppm、最高 71.2ppm であった。今回の住民の毛髪総水銀検査では、B 群の平均は 2.7ppm、最低 0.7ppm、最高 7.8ppm である。以前毛髪水銀調査を受けた人が B 群にはないとはいえ、以前より低値になっているのは間違いない。

この地域は中国の農村部であり、道路などもまだ舗装されていないところも多く、流通体制はまだ整っていない。住民の生活水準がまだ高くないことから、特に松花江から離れたところに位置する C 地区ではほとんど魚介類を摂取することがないと言われている。以前は、現在より他地域との交流が少なかったため、今回の住民の毛髪総水銀検査で、A 群、B 群と比較して C 群で有意に低値である。

以上のことから、C 群は、過去も現在も A 群、B 群と比較して水銀汚染の影響が明らかに少ないと考えられる。

当該地域は、冬の寒さは厳しいため、調査時期は夏を選んだ。

#### (2)住民の抽出方法

今回は、現地の事情により、やむをえず、A、B、C それぞれの地区の世帯を無作為に抽出し、その世帯の任意の 18 歳以上の人を検査するという方法をとった。のちに述べるが、年齢、性で、有意差が出た原因はここにあると考えられる。今後、年齢、性を調整するなど、別の解析方法をとって行く必要があると考えられる。

### II. 背景因子の相違に関して

#### (1)年齢および性別

C 群では B 群と比較して有意に男性が多く、B 群では、A 群と C 群と比較して有意に年齢が高かった。これは前述したように、抽出方法が関係していると考えられるが、今後解析方法を検討する必要がある。

#### (2)生活習慣

喫煙に関しては、有意差を認めなかったが、飲酒する人は、C 群と比較して B 群に多かった。これが交絡要因となってくる可能性があるが、飲酒で増加してくることが多い肝疾患は、病歴を見る限りでは各群に差を認めなかった。

#### (3)病歴

B 群で、A 群と C 群と比較して現在病気を持っていない人が少なかった。これは、B 群で平均年齢が有意に高いことと関連している可能性がある。また、A 群、C 群と比較して、B 群で糖尿病に罹患していると答えた人が有意に多いが、血糖値はむしろ C 群で高い。また、糖尿病性神経障害をきたす程度の糖尿病患者では、尿蛋白が出ることも多いが、尿蛋白を認めた住民は C 群の 1 人のみであった。

以上から、糖尿病が神経所見に影響を与える要因になっている可能性は低い。

#### (4) 体格、血圧

A 群は、より身長が高く、体重が重いという結果が出たが、これも抽出方法、職業などの影響が考えられる。しかし、体格で神経症状や神経所見の差が出やすいという報告はない。C 群に比較して A 群、B 群で有意に血圧が高かった。これは、食生活、労働の相違が原因となっている可能性がある。

### Ⅲ. 自覚症状

#### (1) 全般的傾向

自覚症状(J)、自覚症状(K)では、有意差のたものは、A 群対 B 群ではすべて B 群の頻度かより高く、A 群または B 群対 C 群では、C 群の頻度がより低かった。A 群対 C 群で有意差のないものを含めた場合、既往を含んでも含まなくても、自覚症状(J)では 37 項目中 35 項目、自覚症状(K)では 16 項目中 14 項目で Odds Ratio が 1.0 以上であった。B 群対 C 群では、既往を含んでも含まなくても、自覚症状(J)、自覚症状(K)すべての項目で Odds Ratio が 1.0 以上であった。しかし、B 群の場合、前述の様に加齢の影響が加わっている可能性もあることを考慮する必要がある。

自覚症状(J)では、A 群と B 群間の「持続性のふるえ」以外は、現在症状があるもので有意差が出たものは、すべて既往のあるものを含めた場合にも有意差が出ている。自覚症状(K)でも、A 群と B 群間の「手がやける(熱くなる)」以外は、現在症状があるもので有意差が出たものは、すべて既往のあるものを含めた場合にも有意差が出ている。以上のように、既往を含めた方が、現在のみの症状よりも有意差が出やすく、以前のほうが、症状出現率の差が多かったことを示唆しており、これは、メチル水銀汚染の程度の変化を反映している可能性がある。

#### (2) メチル水銀汚染地域でみられる比較的特異的な神経症状

自覚症状(J)で既往を含めると、「筋肉がびくびくする」、「持続性のふるえ」、「力が弱くなった」、「手足の発作性の大きなふるえ・けいれん」、「耳鳴り」、「しびれ・じんじん感」で C 群に比較して A 群、B 群で頻度が高かったが、水俣地域でより高い頻度でみられる「しびれ・じんじん感」は Odds Ratio が 2.13、2.15 と比較的低値であった。しかし、現在ある症状に限定すると、「筋肉がびくびくする」、「力が弱くなった」では依然有意差を認めるものの、「しびれ・じんじん感」では、A 群対 C 群では有意差がなくなった。

また、自覚症状(K)は、水俣地域で比較的良好にみられ、メチル水銀との関連をわれわれが疑っている症候に関する質問項目を追加したものである。質問内容をかなり具体的にしているが、その要因としては、複数の神経・精神要因が絡んでいるものが多い。A 群、B 群ではほとんどの項目で C 群に比べて Odds Ratio が高く、「手さげやバッグは、落としてしまいそうになるので、手で持たずに肘にかけることが多い」や「ものをじっと見ていると、最初ははっきり見えていたものが、次第に見えにくくなることもある」、「味の感覚が正常でなく、料理の味見に困る」などの感覚系の障害が主として関与している症候で C 群に対して A 群または B 群で有意に高いという結果が出ている。しかし、水俣地域でしばしばみられる「なんでもない平地でもつまづいたり転げたりすることがある」、「最近 1 ヶ月以内に転倒した」など、主として運動系に関わる症状では、C 群に比較して A 群、B 群で高い傾向があったものの、有意差は出なかった。

総じて、水俣地域でみられる比較的メチル水銀中毒に特異的と思われる症状に関しては、その頻度が高いが、水俣地域と比較すると、臨床症状の出現頻度が低いか、出現様式が異なる可能性がある。

### (3)いわゆる不定愁訴

既往を含めたものも現在だけのものでも、自覚症状(J)のなかでの「何もしたくない」、「だるさ」、「たちくらみ」、「疲れ易い」、「食欲がない」、「根気がない」などの不定愁訴の率がC群に比較してA群、B群で有意に高かった。これも前述の如く、加齢の影響が加わっている可能性を考慮しなければならぬが、慢性メチル水銀中毒の底辺症状となっている可能性もある。

### (4)より高次の精神神経機能に関連する項目

自覚症状(J)のなかでの、「急にイライラしたり悲しくなる」、「もの忘れする」、自覚症状(K)のなかでの、「人と話すとき、言葉は聞こえても、何を言っているか分からないことが多い」、「人と話をしている最中に、自分が何を話していたか分からなくなることがある」、「探し物をしているときに、人から話しかけられると、物を捜すことが出来なくなる」などでC群に比較してA群、B群のどちらかあるいは両方で有意に頻度が高かった。これらの症状は水俣地域でも比較的高率であり、メチル水銀の脳障害との関連が疑われる。

### (5)こむらがえり

水俣地域では、こむらがえりが高率に発生している<sup>27)28)</sup>。水俣地域ではこむらがえりは汚染の濃厚な時期から発症しており、汚染の濃厚に疑われるものほど、頻度が高い<sup>27)</sup>。今回の中国の調査でも、最悪時期、現在ともにC群に比較してA群、B群のどちらかあるいは両方で有意にこむらがえりの頻度が高く、発症時期がより早かった。この結果も、A群、B群でのメチル水銀による健康障害を示唆するものと考えられる。

## IV. 神経所見

### (1)感覚障害

#### a) 体性感覚障害（表在感覚および深部感覚）

慢性メチル水銀中毒で最も頻度が高い神経所見は、口唇、四肢末梢に強い体性感覚障害である<sup>3)16)</sup>。四肢の触覚、痛覚は、C群と比較してA群、B群で有意に障害されている住民が多かった。口唇ではC群と比較してA群でのみ触覚、痛覚が障害されていた。この所見は、慢性のメチル水銀による障害を示唆するものである。水俣病でも重症になるとこれら深部感覚の異常を示す。A群と比較してC群で胸部振動覚の低下を認めたほかは、位置覚、振動覚では有意差を認めなかった。

#### b) 皮質性感覚障害でおこなわれる検査（二点間識別覚、立体覚）

二点間識別閾値の異常は皮質性感覚障害で出現すると言われているが、表在感覚障害が存在する時は、その異常がただちに皮質性感覚障害によるものと断定するのは困難である。水俣病の感覚障害の原因が中枢神経にあるのか、末梢神経にあるのかの議論がなされてきており、結論が出ていない。

今回、この検査をした意味は、患者の主観に依存するという理由で通常を表在感覚障害検査に対して不信を持つ流れがあることから<sup>26)</sup>、感覚障害検査をより患者側からのバイアスがかかりにくい方法を併用したのである。その結果、下口唇、左右1、2指のいずれにても、C群と比較して、B群で二点間識別閾値距離が有意に長かった。他のC群と比較してA群では長い傾向を示したが、有意差はな

かった。このことは、慢性メチル水銀暴露と二点間識別覚閾値の異常に関連がある可能性が高い。上肢の触覚障害の程度別に二点間識別覚閾値の平均を出してみた。有意差はないものの、触覚異常があるほど、二点間識別覚閾値は高い傾向を認めた。しかしながら、表在感覚障害と二点間識別覚閾値の異常との関係については、未解明であり、この解釈には今後の研究をまたなければならない。

### (2)失調、視野狭窄、難聴、構音障害

視野狭窄、難聴は、以前、肇源地域で異常が確認された<sup>1)2)8)9)17)</sup>。しかし、今回は、聴力以外はこれらの症状は汚染地、非汚染地ともに出現しないか、極めて低かった。これは、汚染が過去に比べて少なくなってきたことによるものと、症状を持っていた住民の所見が改善したことが考えられる。

ストップウォッチを使用した聴力検査では、C群と比較してB群で有意に聴力低下を認めた。これは、汚染によるものの可能性もあるが、同時にWeberが偏移しているものが多かったことから、中耳疾患などによるものの可能性も考えておかなければならない。

### (3)その他の神経所見

Jackson、Spurling陽性の住民の頻度は各群間で変わらず、感覚障害をしばしば引き起こす頸椎症の頻度にも差がないと考えられた。筋力にも差がなかった。A群で深部腱反射の低下、C群で亢進がみられたが、上記所見から頸椎症によるものである可能性は少なく、背景要因と検査値についての考察から糖尿病によるものの可能性もないと考えられ、原因は不明である。

## V. 慢性的なメチル水銀暴露による健康被害を示す指標

### (1)日本および中国のメチル水銀中毒の歴史

メチル水銀の環境汚染による人体被害は、1956年、日本の水俣にて発見され、これは水俣病として知られている<sup>4)</sup>。1965年、新潟県の阿賀野川流域において第二の水俣病が発生した。日本における環境庁の水俣病の判断条件では、魚介類を摂取し四肢末梢に強い感覚障害に加えて、視野狭窄や失調などの症状をもつものを水俣病としており、2000人を超える患者が認定された。

1958年操業を開始した中国吉林省のアセトアルデヒド工場から排出されたメチル水銀が第二松花江および松花江を汚染した。中国松花江の水銀汚染は1971年に発見され、1973年より吉林省、黒龍江省の研究が始まった<sup>1)2)7)8)17)</sup>。その結果、7人の中国の漁民が、視野狭窄、感覚障害、聴力障害を認められ、水俣病に罹患したとされた<sup>1)2)</sup>。また、中国貴州省でもメチル水銀汚染が存在するが、人体被害は報告されていない<sup>29)</sup>。

### (2)慢性メチル水銀暴露による症候としての中核症状としての体性感覚障害

メチル水銀中毒の症状としては、ハンター・ラッセル症候群が知られている。これは、イギリスの労働者にみられた急性中毒症状であり、視野狭窄、感覚障害、失調、難聴、構音障害などの症候を認めた<sup>21)22)</sup>。当初、水俣病の診断基準としてもハンター・ラッセル症候群の症状組み合わせを重視した診断基準が利用された<sup>23)24)</sup>。

しかし、藤野らは1970年より慢性水俣病の問題にとりくみ、不知火海沿岸住民の8000名以上を直接診察する中で、劇症患者を頂点とする汚染のピラミッドの実態を明らかにしてきた。それによると、水俣周辺地域で魚介類を摂取してきた患者のなかには、失調や視野狭窄がなく、感覚障害のみを認める患者が少なからず認められた<sup>3)</sup>。1986年、環境庁は、主症状として感覚障害のみを有すると政府が認

めた患者を対象に、水俣病とは認めないものの、医療費などの一定の救済をすることを決定した。1996年までに該当患者は1万3千人以上にのぼっている。われわれは、感覚障害はメチル水銀中毒の中核となる症状と考えている。しかし、感覚障害を基準にするのは客観性に欠けるという批判がなされてきた。近年、二点間識別覚などの大脳皮質感覚症状の検査法を用いて患者の感覚障害を調査する方法がとえられている。今回は、二点間識別覚でも汚染群に異常を認めており、この異常の解釈については、今後検討を加える必要があるであろうが、感覚障害をとらえる幅が広がったことは確かである。

### (3) 感覚障害よりも更に底辺に存在しうる症候の追求

また、われわれは感覚障害以外に水俣病の底辺となる症状や所見を追求してきた。1994年、高岡は、水俣病患者のこむらがえりについて研究をおこない、水俣病患者および総合対策医療事業対象患者にこむらがえりが高率に認められることを明らかにし、メチル水銀中毒症状の底辺に位置する可能性を示した<sup>27)</sup>。今回の調査では、こむらがえりに関して、詳細な調査をおこなった。

### (4) 残留メチル水銀の二次汚染による健康障害について

松花江底に流入した水銀は、20年間に300トンといわれており、これらが二次汚染源となっている可能性がある。堆積した水銀は微生物などの作用により自然界でメチル化することが知られており、無機およびメチル水銀が、水や水生生物に移行して、新しい環境汚染問題となり、人々の健康に悪影響与える可能性が懸念されている。そのため、多分野の総合的な研究が必要で、松花江の水銀による二次汚染としての環境変化、生態と健康に及ぼす影響に対する評価と予測が必要である。しかし、今回の患者は18歳以上であり、今回の症状、所見の差が、過去の汚染によるものか、現在も続いている二次汚染によるものかは、判断できない。これらについての検討は、さらに若い世代に対する調査を待たなければならない。

## VI. 公務員職場(D)での調査結果について

Dは職場であったため、集計はしなかった。日本と異なり、中国のこの地区では比較的裕福な住民が魚介類を摂取する傾向にあり、D職場は、魚介類を比較的多量に摂取している可能性があったため、同時に調査をおこなった。母集団が確定できていないため、他の地域と比較するわけにはいかないが、有症状者に対しては、今後ともフォローしていくことも必要と思われる。

### 【結論】

1. 黒龍江省肇源の水銀汚染地区住民の毛髪総水銀濃度は、以前より低下している可能性が高いが、非汚染地と比較すると現在もなお有意に高値である。
2. 汚染地では、慢性メチル水銀汚染地域に比較的特異的にみられる症候、不定愁訴を高率に認める。
3. 汚染地では、表在感覚障害、二点間識別覚の異常を認めた。
4. 今回の汚染地と非汚染地の差が過去の汚染のものによるものか、現在の汚染が継続していることによるものかは、より若年者の調査を将来実行することで解決されなければならない。
5. 汚染地と非汚染地での地域背景、患者構成などが若干異なっており、今後の検討を要する。

### 【参考文献】

- 1) 宋増仁ほか: 松花江流域(黒龍江省肇源県)の水銀汚染と漁民、住民に対する臨床疫学的調査報告. ハルビン医科大学衛生学系環境衛生教室: 1, 1984.
- 2) 潘云舟: 中国松花江河畔のメチル水銀中毒問題. 水俣病国際フォーラム(1988年)の記録: 109-114, 1989.
- 3) Fujino T.: Clinical and Epidemiological Studies on Chronic Minamata Disease. Part 1.: Study on Katsurajima Island. *Kumamoto Med J*, 44: 139-155, 1994.
- 4) 水俣病－有機水銀中毒に関する研究. 熊本大学医学部水俣病研究班編, 1966.
- 5) 椿忠雄, 近藤喜代太郎: 新潟市における有機水銀中毒の集団的発生, *労働衛生*. 627-631, 1965.
- 6) 水俣病に関する社会科学的研究会: 水俣病の悲劇を繰り返さないために－水俣病の経験から学ぶもの－国立水俣病総合研究センター「水俣病に関する社会科学研究」報告書, 1999年12月.
- 7) 原田正純: 水俣と三池をもって中国へ, *気質季報* (熊大体質医学研究所, 気質学運営会), 1982.
- 8) 斎藤恒: 松花江の水銀汚染. *医学評論*(通巻95号): 16-22, 1995.
- 9) 宋増仁, 高良文, ほか: 松花江汞汚染对人体健康影响的流行病学研究[*环境与健康杂志*, 1987. 4(6)], 北方环境污染与健康, 环境卫生学科论文集(1983-1997), 哈尔滨医科大学公共卫生学院环境卫生教研室, 1997.
- 10) 哈尔滨医科大学卫生系环境卫生教研室: 环境卫生学科论文集, 1984. 3.
- 11) 黑龙江省卫生厅卫生处, 黑龙江省松花江沿岸慢性甲基汞中毒调查防治办公室: 黑龙江省松花江沿岸渔(居)民慢性甲基汞中毒调查防治研究, 1994. 4.
- 12) ”地面水甲基汞环境质量标准研究”课题组: ”地面水甲基汞环境质量标准研究”与研究报告, 1994. 10.
- 13) 哈尔滨医科大学公共卫生学院环境卫生教研室: 北方环境污染与健康, 环境卫生学科论文集(1983-1997), 1997. 12.
- 14) Wang Renhua, Liu Jingshuang: Variation and Fate of Mercury Pollution on the Songhua River, China, *Proceeding of the International Symposium on “Assessment of Environmental Pollution and Health Effects from Methylmercury.”* W.H.O., Kumamoto, 1993.
- 15) SCOPE: SCOPE Workshop on Mercury Pollution in Asia, Changchun, 1997.
- 16) 藤野紘, ほか: 有機水銀汚染地区住民の臨床症状の遷移－比較的少量の汚染の影響に関する臨床的研究－. *体質医学研究所報告別刷* 34(3): 541-558, 1984.
- 17) 劉瑞璋: 中国の松花江流域における水俣病. *久留米医学会雑誌* 55: 483-486, 1992.
- 18) Akagi, H. & H. Nishimura: Speciation of mercury in the environment. In: *Advances in Mercury Toxicology* (eds. T. Suzuki, N. Imura, T. W. Clarkson) 53-76. Plenum Press, New York, 1991.
- 19) Akagi, H., et al.: Methylmercury pollution in the Amazon, Brazil. *Sci Total Environ* 175: 85-95, 1995.
- 20) Akagi, H., et al.: Human exposure to mercury due to gold mining in the Tapajos river basin, Amazon, Brazil. *Water, Air, & Soil Pollution* 80: 85-94, 1995.
- 21) Hunter, D. et al.: Poisoning by methylmercury compounds, *Quart. J Med* 9(35): 193-213, 1940.
- 22) Hunter, D. & Russell, D. S.: Focal cerebral and cerebellar atrophy in a human subject due to

日本財団補助金による

1999 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

2000 年 3 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 桐野 高明



所属機関 東京大学医学部脳神経外科

職名 教授

所 在 地 〒113-8655 東京都文京区本郷7-3-1

電話 03-5800-8848

招へい研究者氏名 王 岩

所属機関 東京大学医学部脳神経外科

職名 大学院生

研 究 テ ー マ 虚血性神経細胞死の機構解明と脳細胞保護療法の開発に関する研究

2. 日 本 滞 在 日 程

1999年4月 来日  
東京大学大学院博士課程に入学

2003年3月 東京大学大学院博士課程卒業予定

2003年5月 帰国予定

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、日中医学協会助成事業—日本財団補助金による旨を明記して下さい。

## 研究テーマ

虚血性神経細胞死の機構解明と脳細胞保護療法の開発に関する研究

来日研究者氏名：王 岩

中国での所属・役職：中国北京日中友好病院脳神経外科・医員

招聘者氏名・所属・役職：桐野高明・東京大学医学部脳神経外科・教授

## 要旨

一過性前脳虚血後に生じる海馬 CA1 領域の神経細胞死をモデルとし、その細胞死の機構として MAP kinase を介する情報伝達機構が関与しているか否か、及び mitochondrial permeability transition 抑制作用を介してアポトーシスに対する保護効果を有するとされる trifluoroperazine がこれらの神経細胞死保護効果を有するか否かを検討することを目的とした。モデルはラットの6分間の頸動脈閉塞モデルを用いた。MAP kinase は ERK、p38、JNK について Western blotting 法にて検討した結果、ERK では虚血後に海馬 CA1、その他の海馬、皮質の3領域全てでリン酸化の亢進を認めたが、その他の kinase ではこれらの変化は乏しかった。Trifluoroperazine 投与実験では、虚血前15分に15 mg/kg を腹腔内投与したが、control 群に比較して有意な保護効果がみられた。海馬 CA1 の虚血性神経細胞死の機序として、アポトーシスの経路のひとつとして知られる MAP kinase のリン酸化が関与している証拠は得られなかったが、trifluoroperazine の保護効果が見られたことは、ミトコンドリアを介する他のアポトーシスの系が関与している可能性が示唆された。

**KEY WORDS:** delayed neuronal death, ischemic injury, MAP kinase, mitochondrial permeability transition, trifluoroperazine, apoptosis

## 研究報告

脳の神経細胞は非常に脆弱で、短時間の一過性虚血後でも神経細胞死が生ずることが広く知られている (Kirino 1982)。特に、海馬 CA1 領域にて生ずる神経細胞死は、3-4日の後に細胞死に陥る特殊なものとして注目されてきたが、その分子機構については、未だ解明されていない。

一方、成長段階で不要になった細胞や、障害を受けた細胞が生体から排除される時のひとつの細胞死の機序としてアポトーシスが近年注目されて来ている。アポトーシスでは特にミトコンドリアの機能障害(膜電位の消失)が特に注目されており、その調節には bcl-2 family に属する分子が重要な役割を担っていることも示されてきている。in vivo に於ける遅発性神経細胞死もアポトーシスであると示唆する結果も報告されており、その治療法に向けて様々な取り組みが成されてきているが、未だに臨床応用可能な治療法は確立されていないの実情である。

本研究では、アポトーシスにて重要な役割を果たす機構を中心に神経細胞死の機構解明とその予防法を開発する事を目的とする。具体的には1) アポトーシス時の重要な情報伝達機構とされる mitogen activated protein kinase (MAP kinase) の蛋白リン酸化がどのように虚血性神経細胞死に関与しているか、2) ミトコンドリアの機能障害(膜電位消失)に対して保護効果を有するとされる trifluoroperazine の薬理効果(治療効果)を検討する。



## 対象及び方法

### 1) 実験モデル

本実験では、ラットの一過性前脳虚血モデルを用いた。体重約300gの雄性 Wistar ラットを用い、麻酔下に両側椎骨動脈を頸椎C1部にて凝固切断。翌日に1% halothane 下に脱血により血圧を60 mmHg に低下させ両側頸動脈を6分間クリップにて閉塞。再灌流と同時に血液を注入した。虚血の間、全例にて脳波の平坦化を確認した。

### 2) MAP kinase リン酸化動態実験

虚血再灌流後5分、30分、1時間、3時間、6時間、24時間にて脳を in situ freezing 法にて急速凍結した。具体的には、麻酔下に動物を定位固定装置に固定し、頭蓋冠に plastic tube を装着し、同部に液体窒素を注入して頭部～脳を凍結した。凍結後に断頭し、-20℃にて脳を取りだし、2 mm slice にした後に顕微鏡を用いて海馬 CA1 領域(CA1 sample)、その他の領域(dentate gyrus(DG) sample)、皮質 (cortical sample) に分離した。これらの sample を、phosphatase inhibitor を含んだ buffer にてホモジュネートとし、蛋白濃度を測定した。

以上の sample を SDS-Polyacrylamide gel (10-15%)にて分離し (各 well 蛋白 20 ug)、Immobilon-P membrane に semi-dry electroblotting 法にて transfer した。充分なる blocking の後に、以下の1次抗体を用いて免疫複合体を形成させ、HRP-conjugated の2次抗体、さらに蛍光基質にて可視化した。用いた1次抗体は、抗 ERK 抗体、抗 phospho-ERK 抗体、抗 p38 抗体、抗 phospho-p38 抗体、抗 JNK 抗体、抗 phospho-JNK 抗体の6種である (New England Biolab)。

### 3) trifluoroperazine 薬理効果判定実験

trifluoroperazine を生理食塩水にて溶解し、15 mg/kg を虚血15分前に腹腔内投与した。Control に対しては、同量の生理食塩水を虚血15分前に腹腔内投与した。再灌流後7日目に、4% paraformaldehyde/ phosphate buffer にて灌流固定し、paraffin 包埋の後に4μm の切片とし、hematoxylin and eosin 染色を行った。海馬 CA1 領域の錐体細胞を顕微鏡下にカウントし、生存細胞数/mm を左右の平均値として算出した。

薬剤による低体温の効果を判定するため、これらの動物には虚血10日前に脳温測定センサー (Minimitter system) を右線条体に挿入固定し、24時間連続的に脳温の変化を追跡した。

## 結果

### 1) MAP kinase リン酸化動態実験

ERK, p38, JNK の3種の MAP kinase についてリン酸化状態と無関係に反応する抗体 (リン酸化型、非リン酸化型両者を認識) を用いた結果では、虚血後の各部位にてこれらの蛋白量に変化を認めなかった。

一方、それぞれのリン酸化特異的抗体を用いた結果では、虚血後に変化を認めた。特に ERK にその傾向が著しく、CA1 sample, DG sample, cortical sample の全てにおいて虚血後5分をピークに著明なリン酸化の亢進をみとめた。これらのリン酸化は30分後でもわずかに残っていたが、1時間後には control 値に復した。一方、p38, JNK に付いては、CA1 sample にて30分後に若干上昇傾向を示すものもあったが、有意な変化とは考えられなかった。また、部位特異的な変化も見られなかった。

### 2) trifluoroperazine 薬理効果判定実験

海馬 CA1 錐体細胞の平均細胞密度は、naive control 群にて  $102.6 \pm 5.7$  cells/mm (n=7) であった。生理食塩水を投与した虚血 control 群では、 $25.4 \pm 13.1$  cells/mm (n=5) と正常の25%の細胞しか生存していなかった。一方、trifluoroperazine 投与群では  $53.0 \pm 9.7$  cells/mm (n=5) と正常の52%の神経細胞が生存しており、これら2群間で統計的な有意差が得られた (t-test, p<0.01)。

また、脳温の測定も持続的に行ったが、虚血 control 群、trifluoroperazine 投与群間で有意な差はなかった。

## 考察

脳虚血による神経細胞障害は、動物実験モデルが確立されてから精力的にその機序解明の努力が続けられているが、いまだ詳細な病態については不明である。近年、神経細胞の生存、分化、アポトーシスに mitogen-activated protein kinase (MAP kinase) が関与していることが示されて、注目されている(Lange, 1993)。特に、神経栄養因子はその受容体からのリン酸化伝達機構を介して MAP kinase family の内の ERK を活性化し、細胞を分化、生存の方向へ維持する。一方、同一 family に属する JNK(c-Jun N-terminal kinase)は各種ストレス、熱ショック、cytokine によって誘導され、神経細胞死との関係が特に注目されている。実際に、神経成長因子(NGF)除去による神経細胞のアポトーシスの時に、ERK の活性が低下し、JNK の活性が上昇することが示されている。これらの MAP kinase と虚血性神経細胞死との関係についての報告は未だに少なく一定の見解が得られていない。しかし、神経栄養因子の虚血に対する保護作用は種々報告されており、神経栄養因子はその受容体から MAP kinase シグナル伝達機構を介して作用発現していると考えられていることから(Segal 1996)、MAP kinase 系が虚血後の神経細胞死に深く関与していることも予想される。

本研究では、ERK のリン酸化、すなわち活性化の所見が得られたが、部位別の変化は得られなかった。本モデルでは、海馬 CA1 領域にて神経細胞死が生じるが他の部位にてはこれらの障害を殆ど認めない。これらの事より、ERK の活性化が得られても神経細胞死に対する保護効果は十分ではないことが判明した。また、p38、JNK のリン酸化(活性化)の所見に関しては細胞死の生じる海馬 CA1 にても一定の傾向が見られなかった。以上の結果から、虚血後の海馬 CA1 領域に於ける虚血性神経細胞死の機序として、MAP kinase を介する情報伝達機構が関与している可能性は高くないと予想される。近年の報告では、虚血耐性と ERK の活性化の関連が *in vitro study* にて報告されており(Gonzalez-Zulueta 2000)、今後は *in vivo* の系にて虚血耐性における役割の検証などが課題として残されている。

一方、アポトーシスの過程でミトコンドリアの膜電位の消失が重要な役割を担っていることが判明してきている。特にミトコンドリア膜上に存在する megachannel を介してサイトクロームCなどが漏出すると同時にイオン濃度勾配も消失し、膜電位が消失してゆくと考えられている(mitochondrial permeability transition) (Lemasters 1997)。リンパ球などを用いた系では、この channel の blocker として trifluoroperazine が有効であることが示され、Bcl-2, Bcl-X<sub>L</sub> などと同等の保護効果を有するとされる。また、海馬 CA1 領域における虚血性の遅発性神経細胞死がアポトーシスであると示唆する報告も散見されるようになってきている。実際、trifluoroperazine が局所性脳虚血に対して脳梗塞巣縮小効果があることも示された(Kuroda 1997)。本研究で虚血性遅発性神経細胞死が、trifluoroperazine にて統計的に有意に細胞死抑制効果を有していることが示されたことは、虚血性神経細胞死全般に、アポトーシスを介する機序が関与していることをさらに示唆するものと考えられる。

しかし trifluoroperazine は MPT 抑制作用だけでなく、calmodulin や phospholipase 2 の抑制剤としても知られている(Broekemeier, 1995)。これらの系を介する情報伝達系が虚血性神経細胞死と深く関与しているとの報告もあり、trifluoroperazine の効果が mitochondrial permeability transition (MPT)の抑制のみに基づいているか否かの検証は今後の課題と考えられる。

#### 参考文献

- Broekemeier KM, et al (1995) Inhibition of the mitochondrial permeability transition by cyclosporin A during long time frame experiments: relationship between pore opening and the activity of mitochondrial phospholipases. *Biochemistry*. 34:16440-16449.
- Gonzalez-Zulueta M, et al. (2000) Requirement of nitric oxide activation of p21 ras/extracellular regulated kinase in neuronal ischemic preconditioning. *Proc Natl Acad Sci* 97:436-441
- Kirino T (1982) Delayed neuronal death in the gerbil hippocampus following ischemia. *Brain Res* 239:57-69
- Kuroda S., et al. (1997) The calmodulin antagonist trifluoperazine in transient focal brain ischemia in rats. Anti-ischemic effect and therapeutic window. *Stroke* 28: 2539-2544
- Lange, C C ,et al. (1993) A divergence in the MAP kinase regulatory network defined by MEK kinase and Raf. *Science* 260:315-319
- Lemasters JJ, et al. (1997) The mitochondrial permeability transition in toxic, hypoxic and reperfusion injury. *Mol Cell Biochem* 174: 159-165
- Segal, R. A., et al. (1996) Intracellular signaling pathways activated by neurotrophic factors. *Ann Rev Neurosci* 19: 463-489

# 日本財団補助金による

## 1999年度日中医学協力事業報告書

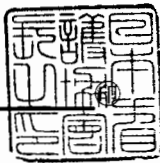
—中国人研究者・医療技術者招聘助成—

財団法人 日 中 医 学 協 会

理 事 長 中 島 章 殿

1999 年 2 月 18 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	南 裕 子		
所属機関	社団法人 日本看護協会	職名	会 長
所 在 地	〒 150-0001 渋谷区神宮前 5-8-2	電話	03-3400-8331
招へい研究者氏名	李 斌		
所属機関	首都医科大学宣武医院	職名	看護婦
研 究 テ ー マ	手術室看護とその管理		

### 2. 日 本 滞 在 日 程

2000年1月17日-2月17日。1月18日-22日/三井記念病院（オリエンテーション、手術室看護婦の機能と役割、手術に伴う施設、物品、環境の管理）。1月24日-26日/JNA看護教育・研究センター（生命倫理、倫理諸問題への看護アプローチ）。1月27日-2月12日/三井記念病院（臨床実習：麻酔法と看護、手術前・中・後の看護の実際、中央材料部における活動の実際、看護管理）。2月14日/東京女子医科大学病院での研修（手術室看護の実際、院内教育、看護管理）  
2月15日/東邦医療短期大学の見学。2月16日/まとめ。

### 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、日中医学協会助成事業—日本財団補助金による旨を明記して下さい。

研究テーマ  
手術室研修

来日研究者氏名

李 斌

中国での所属・役職

首都医科大学宣武医院手術室 主管護師

招聘者氏名・所属・役職

見藤隆子 日本看護協会 会長(申請時)

要旨 (日本語)

1月17日から2月17日まで1ヶ月の時間です。1月18日から2月12日まで三井記念病院の手術室に見学していました。周手術期看護をはじめ、術前訪問、術中看護、術後訪問を見学しました。それに手術室の人事管理の面と新人教育について、一週間で婦長さんについて相談していて、いろいろな資料をもらっていました。この間に1月24、25、26日に看護協会研修センターで生命倫理と緩和医療及び倫理看護の問題の勉強会に参加しました。2月14日に東京女子大学病院の手術室に見学しました。

KEY WORDS

研修の目的は手術室の周手術期看護と新人教育について見学する。

実践の方法は三井記念病院の手術室に1ヶ月ぐらい見学しました。婦長さんについて週隔ぐらい婦長さんの仕事をしてみました。主任さんとチームメイトについて病棟へ行って術前訪問をしまして、それから患者さんの手術の準備にいろいろな物品を準備しておきます。

手術中看護の面は循環科、胸科、婦人科、整形外科、消化器外科の手術の外回りにしました。新人教育について毎週の土曜日に1年生、2年生と一斉に勉強会に参加していて、それに毎日仕事をしてから反省していて、どんな問題があるかどうか婦長さんと主任さんとチームメイトに意見をもらいました。この方法は新人の成長

目的

方法

結果

考察

参考文献

にたいして大切の役立ちを認めます。

研修結果は：1ヶ月を経て周手術期看護と新人教育のことが大部分がよくわかりました。国へ帰ってからの取組に実施したいと思っています。おまに看護理念として患者中心の人間看護を実施する。

考察：三井記念病院の看護理念、術中手術室看護理念、周手術期看護、東京女子大学病院手術室周手術期看護、及び新人教育階段。

参考文献：手術室基礎看護、周手術期看護問題。

東京女子大学病院手術室のマニュアル

## 李斌氏研修プログラム

【テーマ】：手術室看護とその管理

期 日	内 容	研 修 先
1月17日	来日 (CA#925)	
18日   22日	オリエンテーション 手術室看護婦の機能と役割 手術に伴う施設、物品、環境の管理	三井記念病院
24日   26日	生命倫理 倫理諸問題への看護のアプローチ	JNA 看護教育・研究センター
27日     2月12日	麻酔法と看護 手術前・中・後看護の実際 中央材料部における活動の実際 看護管理	三井記念病院
14日	手術室看護の実際、院内教育、看護管理	東京女子医科大学病院
15日	病院見学	東邦大学医療短期大学
16日	研修まとめ	
17日	帰国 (CA#926)	

日本財団補助金による

1999 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

2000 年 3 月 8 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 近 藤 隆 
- 所属機関 富山医科大学医学部 職名 教授
- 所在地 〒930-0194 富山市杉谷2630 電話 076-434-7265
- 招へい研究者氏名 李 富 君
- 所属機関 中国医科大学公共衛生学院労働衛生学教授 職名 講師
- 研 究 テ ー マ 環境毒性物質によるアポトーシスの分子機構

2. 日 本 滞 在 日 程

1999年9月1日～2000年8月31日 本学医学部  
放射線基礎医学講座にて研究に従事。  
この間 2000年6月17, 18日 明治大学リバティホール  
で開催される第22回磁気共鳴医学会・第4回SFRR Japan  
合同学会に発表予定

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	環境毒性物質によるアポトーシスの分子機構
来日研究者氏名	李 富君
中国での所属・役職	中国医科大学公共衛生学院労働衛生学教室・講師
招聘者氏名・所属・役職	近藤 隆 富山医科薬科大学医学部放射線基礎医学講座・教授

### 要旨

フリーラジカルを誘発する物理・化学的因子が遺伝毒性を示すことは知られているが、アポトーシス誘発の機構についてはかならずしも十分に解明されているとはいえない。本研究では温度依存性にフリーラジカルを生成するアゾ化合物 (AAPH, 2,2'-azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride) のアポトーシスに及ぼす影響について検討した。フリーラジカル生成を電子スピン共鳴-スピン捕捉法で測定したところ、その生成量はAAPH濃度、処理時間、および温度に依存して増加した。ヒト白血病細胞株 U937 を用いて、アポトーシス動態 (形態学的変化、DNA断片化、ホスファチジルセリン発現)、アポトーシス関連蛋白質発現、ミトコンドリア膜電位、脂質過酸化、および細胞増殖速度について調べたところ、温熱処理(44℃, 10分) 6時間後のアポトーシス発現は温熱単独処理では僅かであったが、AAPH併用により顕著に増加した。また、併用により脂質過酸化量は増加し、ミトコンドリア膜電位の低下は促進し、細胞増殖の遅延が観察された。以上の結果はフリーラジカル生成による脂質過酸化およびミトコンドリア損傷がアポトーシスの原因となることを示唆した。

KEY WORDS アポトーシス、アゾ化合物、フリーラジカル毒性、脂質過酸化

### 研究報告

#### 目的

環境汚染化学物質の生物学的毒性の特徴として、極微量で作用するため、検出の困難さから、広範な人々が知らないうちに長期間の暴露を受けた後、その影響が発現することが懸念されている。特に極めて低濃度で内分泌機構を攪乱するという観点から生殖毒性の研究が進んできた。一方、生殖細胞以外での細胞毒性に関する研究は必ずしも多くなく、環境汚染化学物質の生体影響を考えると、生殖細胞以外の細胞毒性の検討も必須と思われる。

アポトーシスは遺伝子で制御された能動的細胞死で形態形成、生体制御、生体防御の3点で極めて重要な働きをしており、その破綻は多くの疾患を引き起こすことが知られている。アポトーシスの分子機構は現在急速に進みつつあり、FasやTNF等受容体を仲介するアポトーシス機構については詳細が解明されてきたものの、物理・化学的因子によるアポトーシス機構については未だその解明が進んでいるとはいえない。環境毒性物質にはフリーラジカルを生成する化学物質があり、フリーラジカル生成が多くの細胞傷害を引き起こすことが知られているものの(1)、アポトーシスへの影響は未だ十分に解明されていない。



そこで、本研究では特に温度依存性にフリーラジカルを生成するアゾ化合物2,2'-azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride (AAPH), のアポトーシスに及ぼす影響について検討し、アポトーシスを細胞毒性の指標とし環境汚染化学物質の評価に役立てることおよび併せてそのアポトーシスの分子機構を解明することを目的とする。

## 方法

### 細胞培養と薬剤処理

アポトーシスを検討するためのモデル細胞としてヒト組織球性リンパ腫細胞株U937を用いた(2)。細胞は10%牛胎児血清を添加したRPMI1640培地にて、37°C, 5%CO<sub>2</sub>条件で維持培養された。AAPHは使用前に10%牛胎児血清を添加したRPMI1640培地に溶解され、温熱処理直前に細胞に加えられた。細胞増殖の測定については経時的に細胞数を血球計算盤で測定した。

### 温熱処理

温熱処理は細胞浮遊液(3 ml)を所定の温度に設定した恒温水槽に浸漬することで行われた。試料の温度は熱電対を装着したデジタル温度計(YOKOGAWA 7563)で測定された。

### フリーラジカル生成の測定

AAPHが熱分解されて生じるフリーラジカルはスピン捕捉法で調べられた。電子スピン共鳴装置としてラジカルリサーチ社製RFR-30, Free Radical Analyzerを用いた。スピン捕捉剤として5,5-dimethyl-1-pyrroline-N-oxide (DMPO)およびN-tert-butyl-phenylnitron (PBN)を用いた(3)。

### アポトーシスの検出

アポトーシスにともなう細胞核の形態学的な変化はギムザ染色された標本の光学顕微鏡による観察により調べられた。DNAの断片化については細胞からDNAを抽出し、アガロースのゲル電気泳動によって検出した。DNAの断片化の定量はSellins およびCohenの方法(4)により、13,000 g 遠心後の上清および沈殿物のDNA量を化学的定量し、(上清の吸光度/上清の吸光度+沈殿物の吸光度) X 100により計算した。細胞膜表面へのホスファチジルセリン発現はFITC標識したAnnexin-Vで染色した細胞を、また、ミトコンドリア膜電位の変化については3,3'-dihexyloxacarbocyanine iodide (DiOC<sub>6</sub>(3))で染色した細胞をフローサイトメータで調べた。アポトーシス関連蛋白質発現についてはWestern ブロット法で調べた。

### 脂質過酸化の測定

脂質過酸化については細胞あるいは細胞培養液中のチオバルビツール酸反応物質を生化学的に定量した。

### 細胞内 Ca<sup>2+</sup> 濃度の測定

Fura 2-AMを負荷した細胞について蛍光画像解析装置 (Argus 50/CA)で検討した。方法の詳細は既報に従った(5)。

## 結果

### 1. フリーラジカル生成の測定

AAPHが熱分解されて生じるアルコキシルラジカルはスピン捕捉法で調べられた。スピン捕捉剤としてDMPOを用いて付加体を調べたところ、図1(a)に示すESRスペクトルがまたPBNを用いた場合には図1(b)に示すESRスペクトルが得られた。ラジカル付加体の生成量はAAPH濃度、処理時間、および温度に依存して増加した。酸素を除い

たAr存在下で実験を行った場合には両スペクトルとも形は変わらないが、ラジカル付加体の生成量は減少した。

## 2. アポトーシスの検出

アポトーシスにともなう細胞核の形態学的を光学顕微鏡により観察したところ、温熱処理(44°C, 10分)で核の形態変化の割合が僅かに増加するが、AAPHおよび温熱併

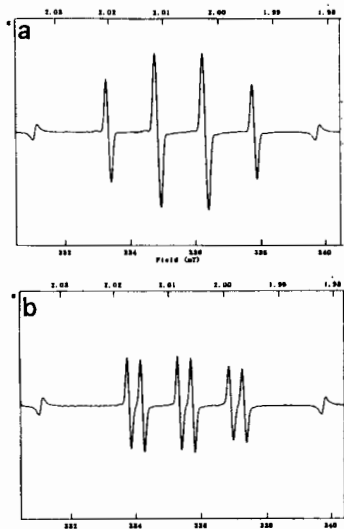


図1. DMPO (a)およびPBN (b)を用いて得られたESRスペクトル。

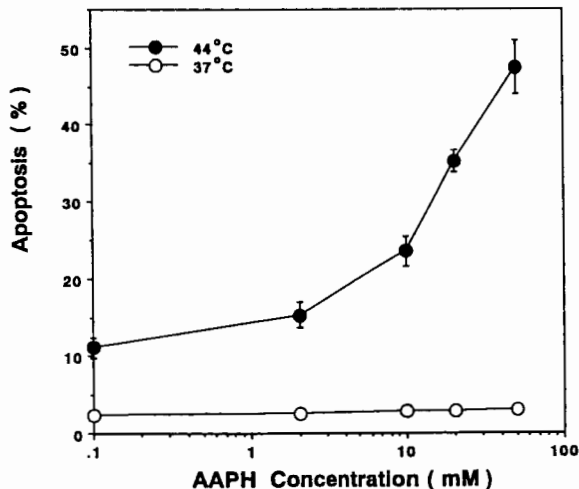


図2. AAPH濃度と核の形態学的変化を指標にして調べたアポトーシス誘発率との関係。

用群でその割合は濃度に依存して増加した(図2)。DNAのアガロースゲル電気泳動の結果においてAAPHおよび温熱併用群でより明瞭なDNAラダーが認められた。DNAの断片化を定量したところ、アポトーシスの変化と同様に温熱併用群で濃度依存性に増加した(図3)。フローサイトメータによる解析の結果ではFITC標識Annexin-Vでのみ染色される早期アポトーシス細胞の割合は10 mMのAAPHと温熱の併用群で有意に増加し、50 mMの併用群でさらに顕著となった。Western プロット法の結果はBcl-2の発現の低下およびBaxの発現上昇を示した(図4)。また、ミトコンドリア膜電位の変化を

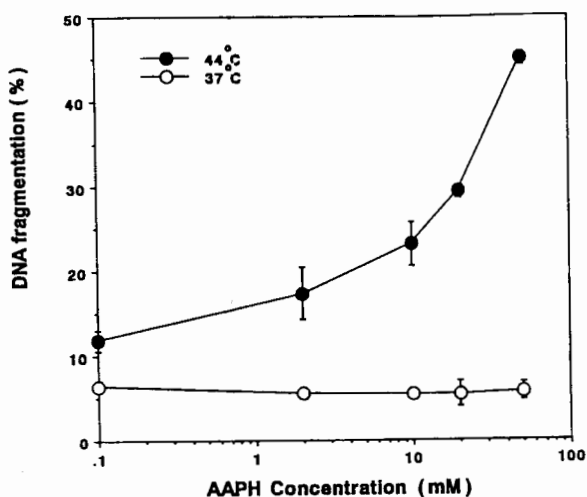


図3. AAPH濃度とDNA断片化の誘発率との関係。

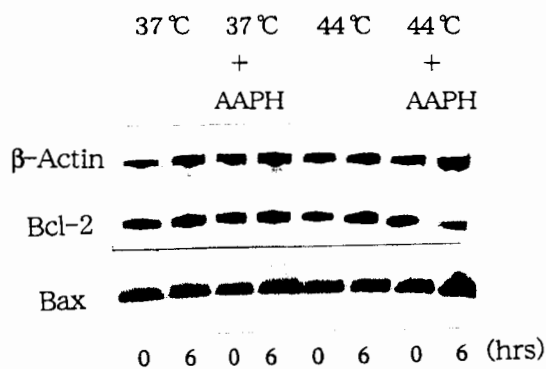


図4. Westernプロットによる蛋白質発現。

調べたところ、AAPHと温熱の併用群で顕著な低下を認めた(図5).

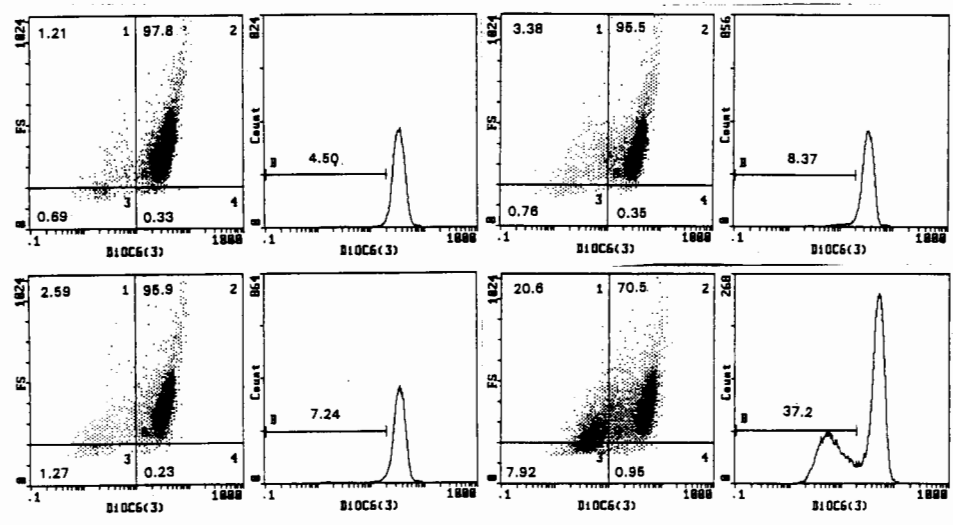


図5. ミトコンドリア膜電位の変化 (左上、37°C対照群、右上、37°C+AAPH、左下、44°C対照群、右下、44°C+AAPH)

### 3. 脂質過酸化の測定

脂質過酸化について、細胞あるいは細胞培養液中のチオバルビツール酸反応物質、マロンジアルデヒド(MDA)量を定量したところ、細胞内量の変化は僅かであった。一方、総量は加温6時間後 $1.32 \pm 0.07$  (nM, 平均値 $\pm$ SD, n=3)であり、AAPH単独処理群で $1.50 \pm 0.05$ 、温熱処理群で $1.54 \pm 0.08$ と増加し、両者併用で顕著に増加した( $1.93 \pm 0.04$ )。

### 4. 細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度の測定

細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度 (340 nm/380 nm蛍光比) を単一細胞について測定し、その分布を調べたところ、AAPHと温熱の併用群で細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度の高い細胞が増加した(図6)。

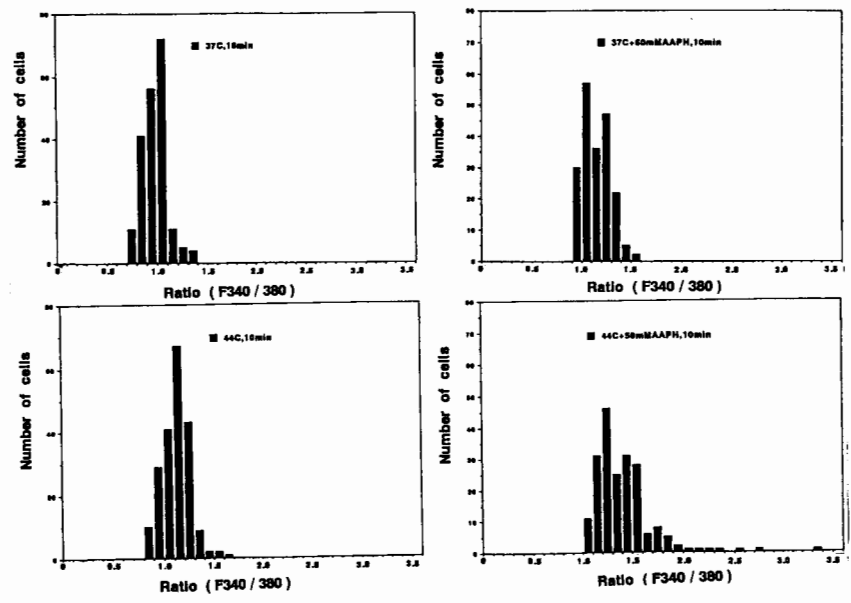


図6. 細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度の分布 (左上、37°C対照群、右上、37°C+AAPH、左下、44°C対照群、右下、44°C+AAPH).

## 5. 細胞増殖の測定

細胞数の経時的変化を調べたところ、AAPH単独処理、温熱処理(44℃, 10分) 群は対照群と同様の細胞増殖を示したが、両者併用で顕著な細胞増殖の遅延を認めた。

### 考察

アポトーシスは遺伝子制御された自発的細胞死であり、多くの疾患に関係することが知られているが、環境毒性化学物質や重金属イオンによるアポトーシスの研究例は少なく、その機構はまだ不明な点が多く残されている。本研究では第一に温度依存性にフリーラジカルを生成するアゾ化合物AAPHのアポトーシスに及ぼす影響について検討した。AAPHは温度に依存して自発的に分解し、アルコキシルラジカルを生成する化学物質であり、温熱併用により細胞毒性を増強することが報告されている(6)。温熱処理(44℃, 10分) と併用することにより、6時間後に観察される早期アポトーシス発現を顕著に増強した。併用により脂質過酸化量は増加し、ミトコンドリア膜電位の低下は促進し、細胞増殖の遅延が観察された。また抗アポトーシスタンパク質であるBcl-2発現の低下およびアポトーシス誘導タンパク質Baxの発現上昇も認めた。また、細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度の増加も認めた。結果はフリーラジカル生成による膜の脂質過酸化およびミトコンドリア損傷がアポトーシスの原因となることを示唆された。

また、同様の細胞を用いてイタイイタイ病の原因とされるカドミウム誘発アポトーシスについても検討した。その結果、DNA断片化は濃度依存性に誘発された。時間的には処理後6時間、70 μMの濃度で最もアポトーシスが誘導され、その後あるいはそれ以上の濃度では二次的ネクロシスとなった。各種阻害剤を用いた検討ではCa<sup>2+</sup>チャネルブロッカーであるベラパミール、カルパイン阻害剤I、カスパー3および8の阻害剤が抑制効果を示した。細胞外液のCa<sup>2+</sup>を除いた条件でカドミウム処理すると細胞内Fura 2の蛍光強度の高い細胞の割合が増えるが、ベラパミール処理によりその増加は抑制された。ミトコンドリアの膜電位の変化を検討したところ、アポトーシス発現に伴い膜電位の低下が認められ、また抗アポトーシスタンパク質であるBcl-2発現の低下も認めた。現在まで得られた結果より、カドミウムイオンは電位依存性Ca<sup>2+</sup>チャネルを経て細胞内に蓄積し、カスパー8活性化→ミトコンドリア損傷→カスパー3活性化経路およびCa<sup>2+</sup>増加によりカルパインが活性化される経路によりアポトーシスが誘発される可能性が示された。

以上の如く、環境汚染化学物質や重金属イオンは細胞内情報伝達機構に大きな影響を与え、アポトーシスを誘導する。アポトーシスは早期に発現する細胞死であり、その検出系も進歩してきた。今後選択的情報伝達機構を有するモデル系を用いることにより環境毒性物質の迅速評価の指標としてアポトーシスの利用が可能になると思われる。

### 謝辞

本研究実施にあたっては日中医学協会-日本財団補助金の援助受けました。また、放射線基礎医学教室 趙 慶利博士、田邊清司博士、公衆衛生学教室 加須屋 実教授、李 民氏、荒井陽子氏には実験遂行にあたり多くの協力を得ました。ここに感謝申し上げます。

## 文献

- (1) Halliwell ,B. and Gutteridge J.M.C. Free Radicals in Biology and Medicine. Oxford: Clarendon Press; 1989.
- (2) Kimura, C., Zhao, Q.-L., Kondo, T. et al. Exptl. Cell Res. 239: 411-422; 1998.
- (3) Riesz, P. and Kondo, T. Free Radical Biol. Med. 13:247-270; 1992.
- (4) Selins, K. S. and Cohen, J. J. J. Immunol. 139: 3199-3206; 1987.
- (5) Kondo, T., Kano, E., Habara, Y. et al. Cell Calcium 14: 621-629; 1993.
- (6) Krishna, M. C., Dewhirst, M. W., Friedman, H. S. et al. Int. J. Hyperthermia 10: 271-281; 1994.


日本財団補助金による  
1999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12年3月21日

放射線治療部内で撮影した本人のスナップ写真、及び学会発表のプログラムを添付

1. 招聘責任者 森田 皓三   
所属機関 愛知県がんセンター病院 職名 名誉病院長  
所在地 〒464-8581 名古屋市千種区鹿子殿 1-1 電話 052-762-6111  
招聘研究者氏名 王 継英  
所属機関 中日友好病院放射腫瘍科 職名 医長  
研究テーマ 凹みのある高線量域を作成するための原体照射技術の開発

2. 日本滞在日程

- 1999年12月3日 北京より天津経由で来日  
6日から愛知県がんセンター放射線治療部にて、原体照射法に関する臨床研究ならびに実習開始。  
2000年1月24日—29日 京都大学医学部放射線医学教室における原体照射法とくに IMCRT の実際の研修  
2000年2月 6日 名古屋市における日本医学放射線学会中部地方会にて、「中日友好病院の放射線治療経験」について発表  
2000年2月15—17日 千葉市にある放射線医学総合研究所重粒子治療センターを訪問し、重粒子線治療における原体照射法を見学すると共に、IMCRT について意見交換  
2000年3月10日 愛知県がんセンター放射線治療部における、原体照射法に関する臨床研究ならびに臨床実習を終了して、名古屋から天津経由で帰国

3. 研究報告 別紙の通り。

IMCRT がどこまで成果を挙げることができるか、日本が持っている高橋方式の CRT と比較してその利点・欠点などの分析は将来の大きな課題のひとつであるが、本研究の目的は、すでに実用化されている三つの方式による「CRT を用いた凹形の高線量域を作る方法」の利点・欠点を分析し、現在中日友好病院で実施しているのは、方法（1）の打ち抜き照射方式のみであるから、もし必要であれば、同病院における他の 2 方法の開発を図ることにある。

#### 研究方法：

1. 凹みのある高線量域を作成する方法として、すでに高橋方式で用いられている 3 方法の比較。

凹みのある高線量域を作成する方法として、日本で開発された高橋方式による原体照射法は、（1）打ち抜き照射法（高橋・森田）、（2）多軸振子照射法（森田）、（3）偏心性多分割絞りによる原体照射法（小幡）の 3 方法を有している。

（1）打ち抜き照射法(Hollow-out technique)は主として上顎がんの治療時の眼球の保護あるいは、後腹膜リンパ節領域照射時の脊髄の保護に用いる方法で、すでに中日友好病院で実施されている、日本では愛知県がんセンター及び土岐市立総合病院にて日常的に用いられている。この 2 病院に配置されている治療計画用コンピューター(FOCUS)も、この方法についてはすでに一般の CRT 治療計画の中にプログラム化されており、計算されたデータは on line で治療装置に送られ、放射線治療が実施される。

（2）多軸振子照射法(Multicentric arc technique)は、主として子宮頸がんの全骨盤照射に用いられる方法で、愛知県がんセンターで開発され、最近 FOCUS 内にプログラム化された。

(3) 偏心性多分割絞りによる原体照射法(CRT with over-centerable MLC)は、治療計画プログラムの作成上の問題から、最近までその臨床応用が遅れていたが、昨年夏に愛知県がんセンターでプログラムが完成し、現在同病院にて臨床応用が始まっている。

2. この3方法の内、方法(2)と方法(3)については、もし必要であれば、そのプログラムを中日友好病院の治療計画用コンピューターに移植が可能であるかを検討する。

### 研究結果：

ファントムを用いたフィルム法による線量分布測定と、コンピューターを用いた線量分布計算の結果に基づいて、種々の観点から検討した3方法の選択順位は次のようであった。

治療の方法 (註)	(1)	(2)	(3)
高線量域内の線量均等性	B	A	B
健常組織の防護の程度	B	C	A
高線量域から健常組織への線量勾配	B	C	A
治療計画の難易度	A	B	C
実際の患者に対する治療の難易度	A	A	C

註：(1) 打ち抜き照射法(Hollow-out technique)

(2) 多軸振子照射法(Multicentric arc technique)

(3) 偏心原体照射法(CRT with over-centerable MLC)

病巣に一致させようとする高線量域内の線量均等性は、高線量域内に凹みを持たせようとする場合には、どの方法を用いても凹みのない場合と比較して、悪くなることはすでに確かめてある。従って、実際の治療計画の立案に当たっては、高線量域内の線量均等性の劣化の程度と、病巣周囲健常組織の保護の必要性とのかねあいから、



どの方法が最善であるかが選択されることとなる。上に示した我々の結果から明らかな如く、種々の観点から分析してみると、どの方法も一長一短で、どの場合でもこの方法が最善ということではなかった。

そこでこの3つの方法を、日常の診療で出会う種々の臨床症例に適用して、どのような場合にはどのような方法が良いかを比較検討することとした。日常の臨床でしばしば経験される、「凹みのある高線量域」を作成する必要がある治療対象として、(a) 上顎がんに対する原発巣照射、(b) 食道がんに対する原発巣と所属リンパ節照射／子宮頸がんの後腹膜リンパ節領域の照射、(c) 前立腺がんの原発巣照射が選択された。(a) は放射線感受性が最も高い水晶体の保護、(b) は放射線感受性が中等度ではあるが、発生するとほとんどの場合重篤な晩期障害を惹起する脊髄の保護、(c) は放射線感受性はそれほど高くないが、照射体積が障害度に大きく影響するパラレル臓器である直腸の保護が目的である。その結果、それぞれの部位における各方法の選択順位は、次のようになった。

(a) 上顎がんに対する原発巣照射。

治療法	(1)	(2)	(3)
	B	C	A

この部位では、水晶体の発生線量が 20Gy 程度と非常に低いために、もし患側の白内障も避けようとするれば、高線量域内の線量均等性は3方法中最悪でも、高線量域から低線量域までの線量勾配を最大にする（言い換えれば線量勾配を急峻にする）ことが要求される。その観点からみれば、方法(3)が最も優れていよう。ただ、患側眼はあまりに病巣に近いので、健側眼の保護のみで良いという

ことであれば、実行し易いという観点が優先して、方法（１）を選択することも、臨床的にはしばしばみられる。

（b）食道がんに対する原発巣と所属リンパ節照射、および子宮頸がんの後腹膜リンパ節領域照射。

治療法	（１）	（２）	（３）
	B	A	C

脊髄の晩期障害発生線量は、低く見積もっても 40Gy 程度であり、病巣に 60Gy 照射するとしても、その 60%程度の被曝までは許容されている。しかも食道あるいはリンパ節領域から脊髄までの間には、脊椎体も介在しており、直接病巣に脊髄が隣接しているわけではない。この場合には、高線量域内の線量均等性が最も重視されるので、健常組織の防護の程度が多少悪くても、方法（２）が最善の方法と考えられる。実行しやすいという観点からは、方法（１）が方法（３）に勝るであろう。

（c）前立腺がんの原発巣照射

治療法	（１）	（２）	（３）
	C	A	C

この部位で最も重要なことは、直腸自身の耐容線量は高くないが、その前壁が病巣に密接していることであろう。健常組織への線量減衰は大きくなくても良いが、水晶体或いは脊髄と比較して、保護すべき健常組織の体積はかなり大きい。方法（１）は大きな体積の健常組織を軽度に保護するには適していない。方法（３）は、高線量域からの線量勾配が大きすぎて、毎日その位置を少しずつ変化させ、しかも体積の大きな直腸の防護には適さない。

これらのことから、方法（１）—（３）は適用する部位によって

適宜使い分ける必要があると判断された。

#### 考察：

1. 高橋方式の原体照射法における、三つの「凹みを持った高線量域を作成する方法」の中国における運用。

高橋方式の原体照射法における、三つの「凹みを持った高線量域を作成する方法」は、いずれも利点と欠点を有しており、実用性から考えても、どれかひとつがあれば万能という訳ではない。従って、最も早く開発された方法（1）のプログラムのみを有している中日友好病院に、他のふたつの方法のプログラムを移植できるかが今後のテーマとなろう。この方法を三つとも駆使している愛知県がんセンターでは、いずれも"FOCUS"という治療計画システムで運用されており、他の治療システムでも運用が可能かどうかは、短期間の研修のために中日友好病院との連絡が十分に図れなかった。今後、このプログラムが中国において運用可能であることを、現地で検討する予定である。

2. 高橋方式の原体照射法と IMCRT との比較。

海外における IMCRT(intensity modulated CRT)の開発目的のひとつに、凹みのある高線量域の作成がある。前立腺がんの多い欧米にあっては、外照射によって、直腸の晩期障害の増加なしに可及的多くの線量を投与したいという要望が強い。その期待を背負って登場した CRT であるが、前立腺の背後から入り込んでいる直腸前壁の線量を何とか減少させることが、この部への CRT 利用の突破口となっていた。残念ながら我々が使用している治療計画装置"FOCUS"の標準装備中には IMCRT が含まれていないので、今回は日本で開発された高橋方式の原体照射法と IMCRT との比較はできなかった。しか

し、凹みのある高線量域を作るための、国内における三つの治療計画については今回検討してあるので、今後の IMCRT の普及と共に、我々の方式との比較を、中国と日本との共同で実施する予定である。

**参考文献：**

1. 森田皓三：原体照射法とその発展。癌の臨床。40: 33-46, 1994.
2. 森田皓三：上顎癌及び篩骨洞悪性腫瘍に対する打ち抜き照射法の応用。日本医学放射線学会誌。21: 77-85, 1961.
3. 森田皓三：打ち抜き照射法における放射線九州体の材質。日本医学放射線学会誌。30: 356-367, 1970.
4. Morita,K., C.Kimura, K.Takahashi, T.Ueda: Verbesserung der Dosisverteilung bei der Konformationsbestrahlung des Kollumkarzinoms. Strahlenther. 147: 487-497, 1974.
5. Morita,K., N.Fuwa., E.Kato, Y.Ito: results of conformal radiotherapy for carcinoma of the uterine cervix. Endocurieth.Radioth. 4:137-148, 1988.

日本財団補助金による


1999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

2000年3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 浅野喜博   
所属機関 愛媛大学医学部 職名 教授  
所在地 〒791-0295 愛媛県温泉郡京浜町 電話 089-960-5272  
招へい研究者氏名 劉鳳芝  
所属機関 中国医科大学基礎医学院疫学教室 職名 講師  
研究テーマ 感染症における自然疫源と獲得疫源の関わりに関する研究

2. 日本滞在日程

1999年1月12日 来日。(愛媛大学医学部外国人客員研究員)  
1999年4月1日 愛媛大学大学院医学研究科博士課程入学。  
現在に至る。

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。

## 感染症における自然免疫系と獲得免疫系の関わりに関する研究

来日研究者氏名：劉 鳳芝

中国での所属・役職：中国医科大学基礎医学院免疫学教室・講師

招聘者氏名・所属・役職：浅野喜博・愛媛大学医学部・教授

要旨： 病原体感染におけるマクロファージ細胞を主とするinnate immunityの機能解析を行い、病原体の感染に際して早期に機能するinnate immunityの細胞群、特にマクロファージ系の細胞が、抗原提示機能を介して獲得免疫系を活性化するのみならず、その反応の方向をも規定している可能性を示した。このとき、獲得免疫系のT細胞の抗原特異性とは全く別の抗原性を持つ病原体の感染であっても、抗原特異的なT細胞の分化をコントロールしていること、すなわち、一種類の病原体の感染により免疫系全体がシフトすることが示された。したがって、マクロファージ系細胞の機能制御は、病原体感染における感染病態制御のために重要であると考えられる。

KEY WORDS：自然免疫系、獲得免疫系、病原体感染、抗原提示機能、T細胞の分化

## 研 究 報 告

研究目的：細菌・原虫感染の第一次防御線としてのマクロファージやNK細胞が、それ以後に続く第二次防御線としてのT細胞・B細胞を中心とする免疫系をコントロールしている。感染病原体の種類によりマクロファージ系細胞が異なる機序で異なる質の活性化を受ける可能性が考えられる。本研究では、生体防御における指令センターと云う視点からマクロファージ・NK細胞系のネットワークに焦点を当てて解析する。生体防御の指令センターをどの方向に向けるかを規定する刺激が何かを明らかにし、この刺激を人為的にコントロールすることにより、感染症の制御法の開発を目指す。

研究方法：1) 感染防御に作用する遺伝子の発現が障害されている遺伝子ターゲットマウスで、細菌感染と原虫感染で活性化される応答遺伝子を調べる。併せてマクロファージ・

NK細胞のネットワークでコントロールされているT細胞系の機能解析を行う。

2) 感染に伴うT細胞の機能的サブセットの分化を、病原体とは特異性の異なるT細胞レセプターを導入したトランスジェニックマウスを用いて解析する。これにより、病原体感染に伴い免疫系全体がどのような影響を受けるかを調べる。

3) 骨髄細胞をヘルパーウイルスフリー組み替え型レトロウイルスで形質転換し、マクロファージ系細胞株を樹立する。これを用いて、種々の病原体の感染実験を行い、ターゲットとなる感染初期遺伝子を分離・同定する。この遺伝子についてその発現調節機能や生体内における機能、特に、どの様にして生体の感染防御系をコントロールしているかを明らかにする。さらに、マウスにこの遺伝子を導入、あるいは欠損させ、感染病態に対する影響を調べる。

これら一連の解析により、感染防御における初期応答遺伝子の機能を明らかにすると共に、細菌・原虫感染における第一次防御線としてのマクロファージ系細胞・NK細胞ネットワークが、どの様な機序で、T細胞・B細胞を中心とする第二次防御線のコントロールセンターとして機能しているかを明らかにするとともに、その制御法を開発する。

研究結果：1) IRF-1遺伝子欠損マウスではタイプ1 T細胞反応に異常がある。病原体の感染防御にはマクロファージそのものの活性化は重要であるが、さらに、マクロファージを活性化するタイプ1 T細胞が感染抵抗性を賦与することを考えあわせると、IRF-1遺伝子欠損マウスではタイプ1 T細胞型の免疫応答が障害されている可能性も考えられる。

IRF-1は転写因子として、上述したように免疫応答に関与している重要な複数の遺伝子の転写を調節している。そこで、T細胞サブセット分化に関わる遺伝子に関して検討したところ、以下のようにタイプ1 T細胞への分化のキー分子であるIL-12遺伝子の発現をもコントロールしていることが明らかになった。

ア) IL-12遺伝子の発現障害によるタイプ1 T細胞サブセットへの分化障害。

リステリア菌、百日咳菌、リーシュマニア原虫感染におけるIRF-1遺伝子欠損マウスとその野生型マウスのT細胞サイトカイン応答を比較した。野生型マウスでは強いIFN $\gamma$ 産生が認められ、タイプ1 T細胞反応が起きている。これに対して、IRF-1遺伝子欠損マウスでは、IFN $\gamma$ 産生が低く、IL-4産生が高い。したがって、このマウスでは、本来起きるはずのタイプ1 T細胞の誘導が起きず、むしろ、T細胞反応はタイプ2 T細胞サブセットの誘導へと偏りを示していることが分かる。これらの結果は、菌の増殖カーブお

よび足蹠の腫脹から推測された様に、IRF-1遺伝子欠損マウスでは感染に伴い、本来感染に抵抗するためにマクロファージの機能を活性化するのに必要なタイプ1T細胞反応が起きず、T細胞サブセットがタイプ2T細胞サブセットに偏っていることを示している。

それではなぜIRF-1遺伝子欠損マウスでこのようなT細胞サブセットの偏りが生じるのかである。マクロファージからのIL-12産生は、LPSとIFN $\gamma$ とにより誘導される。そこで、IRF-1欠損マウスでのIL-12遺伝子発現を調べると、全く検出できなかった。TNF $\alpha$ 遺伝子の発現が野生型と同程度に認められることから、LPSによるマクロファージの活性化は正常に起こっていると考えられる。この点は、IL-12遺伝子プロモーター部分を用いたルシフェラーゼ法およびゲルシフト法により、IL-12 p40遺伝子プロモーター部分にIRF-1結合部位があることが示され、したがって、IL-12遺伝子発現の差は転写レベルでの差であり、IRF-1分子がIL-12 p40遺伝子の発現を制御していることが明らかとなった。

#### イ) マラリア原虫感染。

ネズミマラリア原虫 (*P. berghei*) 感染で調べてみると、IL-12の遺伝子の発現が障害されているはずのIRF-1遺伝子欠損マウスでも、IFN $\gamma$ 産生T細胞が誘導されることが明らかになった。*P. berghei*感染を見ると、IRF-1遺伝子欠損マウスでも野生型とほぼ等しい程度にIFN $\gamma$ 産生T細胞が誘導されている。マラリア原虫感染マクロファージを刺激したときのIL-12遺伝子の発現を調べると、非感染マウスに比べて、遺伝子発現の転写レベルでの抑制が認められる。この機序は現在解析中でまだ不明であるが、麻疹ウイルス感染時に認められる転写レベルでのIL-12遺伝子発現抑制に似た機序であろうと考えている。これらのことは、タイプ1/タイプ2T細胞サブセット分化過程にIL-12の関与しない経路が存在することを示唆している。

さらに、マラリア原虫やいくつかの病原体に対する反応では、IRF-1遺伝子欠損マウスでIL-4産生細胞の誘導が等しく認められる。このことは、このIL-12非依存性の経路は、タイプ1/タイプ2T細胞サブセットへの従来から知られている誘導経路とは独立して機能していることを示唆している。この点に関しては今後さらに解析を進める予定である。

2) T細胞サブセットの分化はマクロファージ系細胞のレベルで抗原非特異的にコントロールされている。

#### ア) マクロファージ系細胞の添加による機能の補償。



IRF-1遺伝子ノックアウトマウスと野生型マウスのT細胞サブセットを、非感染の状態（ナイーブ）で調べると、2つの系統でIFN $\gamma$ 産生およびIL-4産生の程度に違いは認められなかった。すなわち、T細胞サブセットの偏りは認められないこと、換言すれば、ナイーブな状態ではTh0タイプ（pTh）までの分化はIRF-1遺伝子欠損マウスでも正常に起こっていると考えられる。したがって、T細胞サブセットの偏りの原因はナイーブT細胞が外部からの刺激によりpThから分化する過程にあり、しかも、T細胞そのものには差が認められないことから、T細胞と抗原提示細胞間の問題である可能性が考えられる。

ここまで見てきたIRF-1遺伝子欠損マウスで認められる機能的T細胞サブセットへの分化障害がIL-12の誘導が起きないためだけによるものであれば、IL-12を外因性に投与することによりT細胞サブセットの偏りを是正することが可能になると考えられる。そこで、病原体を投与するときにリコンビナントIL-12を共投与してIFN $\gamma$ の産生誘導が野生型で起きる条件で、遺伝子欠損マウスにIL-12を共投与してみたところ、T細胞サブセットの偏りを正すことが出来なかった。しかし、野生型マウスから得たマクロファージを共投与すると、この偏りが是正された。したがって、遺伝子欠損マウスのT細胞そのものは正常に機能的分化を起こし得る状態にあるが、これを誘導するシステムが異常であると考えられる。この異常の原因は、単にIL-12遺伝子の誘導が起きないためよりは、タイプ1T細胞誘導に作用するIL-12を含めた未知のシステムがマクロファージ系の細胞に内在するためと考えられる。

Innate immunityに関わるマクロファージ系細胞以外の細胞群はどのように関与してくるかをであるが、IRF-1遺伝子欠損マウスでは、NK細胞の分化障害が認められている。もしNK細胞がキーとなる細胞であるとすれば、上記のマラリア感染でタイプ1T細胞が誘導され、しかもタイプ2T細胞の分化が認められることの説明ができない。さらに、NK1.1+T細胞のレセプターで特異的に使われる遺伝子を欠損しているためにNKT細胞が存在しないマウス（千葉大学大学院、谷口克教授より供与）を用いても、病原体感染によりタイプ1T細胞の誘導が認められる。したがって、innate immunityの中で病原体感染時のT細胞サブセット分化に重要な役割を演じるのは、マクロファージ系細胞である可能性が強く示唆される。

イ) 一種類の病原体の感染により免疫系全体が、抗原特異性は問わず、シフトする。

T細胞の活性化にはT細胞レセプターに特異的な抗原の存在が必要であり厳密に抗原特異的な反応である。一方、innate immunityの細胞群の活性化にはこのような抗原特異性

が見られない。この性質を利用して、病原体感染により誘導されるT細胞サブセットの偏りが、どのレベルで決定されるかを解析することができる。そこで先ず、OVA特異的CD4 T細胞クローンのT細胞レセプタートランスジェニックマウスにリステリア菌を感染させ、このTCRトランスジェニックマウスT細胞を、非感染のマウスから調整したマクロファージ系細胞（抗原提示細胞）と特異的抗原（OVA）ペプチドにより*in vitro*で培養し、OVA特異的T細胞サブセットのシフトを調べた。この*in vitro*の培養は、pTh→Th1/Th2の抗原特異的なステップを解析することになる。

非感染マウスのT細胞は、この*in vitro*の培養により、タイプ2T細胞が優位に誘導されたが、感染マウスのT細胞からは、タイプ1T細胞が優位に誘導された。また、この変化は、感染マウスの抗原提示細胞を用いて非感染マウスT細胞を刺激した場合にも認められることから、抗原提示細胞のレベルでコントロールされていると考えられる。抗原提示細胞がタイプ1/タイプ2T細胞の増殖反応を誘導する活性には、感染マウスと非感染マウスとの間に差が認められない。さらに、感染マウス・非感染マウスで認められるタイプ1T前駆細胞およびタイプ2T前駆細胞の頻度を調べたところ、非感染マウスではタイプ2T前駆細胞の頻度が高く、感染によりこの頻度が下がり、逆にタイプ1T前駆細胞の頻度が上昇することが明らかになった。したがって、病原体感染により誘導されるT細胞サブセットのシフトは、innate immunityの細胞おそらくはマクロファージ系細胞により、抗原非依存性にコントロールされていると考えられる。ここで重要なことは、獲得免疫系のT細胞の抗原特異性（OVA）とは全く別の抗原性を持つ病原体の感染であっても、OVA抗原特異的なT細胞の分化をコントロールしていることである。このことは、一種類の病原体の感染により免疫系全体が、抗原特異性は問わず、シフトすることを意味している。

考察：IL-12はタイプ1T細胞分化には必須の因子と考えられている。ところが、必ずしもIL-12が存在しなくてもタイプ1T細胞が誘導されることが明らかになってきた。この点は、ここに述べた我々の解析の他にも、幾つかのグループの解析結果でも示唆されている。また、ここに示した結果は、タイプ1T細胞の誘導経路に、IL-12の存在を必要としない、従来のタイプ1/タイプ2T細胞サブセット誘導経路と独立に機能する経路が存在することを示唆している。さらに、TCRトランスジェニックマウスを用いた感染実験からは、T細胞サブセットのシフトをコントロールしているのはマクロファージ系細胞である可能性が強く示唆された。病原体の感染に際して早期に機能するinnate

immunityの細胞群、特にマクロファージ系の細胞が、抗原提示機能を介して獲得免疫系を活性化するのみならず、その反応の方向をも規定している可能性を考えさせる。どのような分子がこのような機能を果たしているかを明らかにすることが次の目標である。

株化マクロファージを樹立して行う解析は、現在いくつかの株化マクロファージが得られつつある。細胞の由来の解析を行った後、研究方法の3で述べた解析を順次進める予定である。また、感染・非感染マクロファージ間で発現に差のある遺伝子の解析は、RDA法とシグナル配列トラップ法を組み合わせを行っているが、まで遺伝子の同定には至っていない。

参考文献：

1. Lamphier M and Taniguchi T : The transcription factors IRF-1 and IRF-2. *Immunologist* 2, 167-171, 1994.
2. Ogasawara K, Hida S, Azimi N, et al : Requirement for IRF-1 in the microenvironment supporting development of natural killer cells. *Nature* 391, 700-703, 1998.
3. Feng, C., et al. An alternative pathway for type 1 T cell differentiation. *Int. Immunol.* 11, 1185-1194, 1999.
4. Taki, S., et al. Multistage regulation of Th1-type immune responses by the transcription factor IRF-1. *Immunity* 6, 673-679, 1997.
5. Kamijo R, Harada H, Matsuyama T et al. : Requirement for transcription factor IRF-1 in NO synthase induction in macrophages. *Science* 263, 1612-1615, 1994.
6. Reiner SL and Locksley RM : The regulation of immunity to *Leishmania major*. *Annu Rev Immunol* 13, 151-177, 1995.
7. Lohoff M, Ferrick D, Mittrucker HW, et al : Interferon regulatory factor-1 is required for a T helper 1 immune response in vivo. *Immunity* 6, 681-689, 1997.
8. Karp, C. L., et al. Mechanism of suppression of cell-mediated immunity by measles virus. *Science* 273, 228-231, 1996.
9. Sutterwala, F. S., Noel, G. J., Clynes, R., & Mosser, D. M. Selective suppression of Interleukin-12 induction after macrophage receptor ligation. *J. Exp. Med.* 185, 1977-1985, 1997.

10. Fehr, T., et al. Crucial role of interferon consensus sequence binding protein, but neither of interferon regulatory factor 1 nor of nitric oxide synthesis for protection against murine listeriosis. *J. Exp. Med.* 185, 921–931, 1997.
11. Ohteki T, Yoshida H, Matsuyama T, et al : The transcription factor interferon regulatory factor 1 (IRF-1) is important during the maturation of natural killer 1.1<sup>+</sup>T cell receptor- $\alpha$ / $\beta$ <sup>+</sup> (NK1.1<sup>+</sup>T) cells, natural killer cells, and intestinal intraepithelial T cells. *J Exp Med* 187, 967–972, 1998.
12. Murphy, K. M., Heimberger, A. B., & Loh, D. Y. Induction by antigen of intrathymic apoptosis of CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>TCR<sup>lo</sup> thymocytes *in vivo*. *Science* 250, 1720–1723, 1990.

# 日本財団補助金による

## 1999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

12年 2月 2/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 覚道 健一 

所属機関 和歌山県立医科大学第二病理学教室 職名 教授

所在地 〒641-0012 和歌山市紀三井寺811-1 電話 073-441-0635

招へい研究者氏名 汪 筱娟

所属機関 和歌山県立医科大学第二病理学教室 職名 研究生

研 究 テ ー マ 消化管間質腫瘍107例症例におけるbc1-2, p53免疫組織化学的検討

### 2. 日 本 滞 在 日 程

- 7月 7月9日来日した。第二病理教室にて研究活動を始めた。同時に県国際交流課主催の日本語教室で週1回学習を始める。
- 8月 病理業務を研修した。
- 9月 16日に行われる大学院医学研究科受験し（語学試験と面接）、合格した。
- 10月 ウエスタンブロット，ノーザンブロットの分子医学的技術を研修した。
- 11月 PCR-SSCP法の技術研修を行った。
- 12月 人消化管間質腫瘍におけるbc1-2, p53免疫組織化学的検討をした。
- 1月 研究結果のとりまとめと，データの解析，文献考察を行い，現在まで論文化へ努力中である。同時にDNAシーケンス解析を研修した。
- 2月 2月18日和医大第二病理学訪中団の通訳として同行した。
- 4月より 和歌山県立医科大学大学院医学研究科入学予定。医学振興会より奨学金をうけることが内定した。

### 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、日中医学協会助成事業－日本財団補助金による旨を明記して下さい。

学会名称 **第89日本病理学会総会**

学会テーマ **消化管間質腫瘍107症例におけるbc1-2, p53  
免疫組織化学的検討**

日本側主催代表者氏名・所属・役職

**北村幸彦 大阪大学医学部 教授**

中国側主催代表者氏名・所属・役職

**無**

学会報告

報告者氏名・所属・役職

**汪 筱娟 和歌山県立医科大学第二病理学教室 研究生**

## 消化管間質腫瘍107症例におけるbcl-2、p53免疫組織化学的検討

汪 筱娟、森 一郎、宇都宮洋才、中村美砂、中村靖司、覚道健一  
和歌山県立医科大学第二病理学教室

消化管の非上皮腫瘍中で間質腫瘍（GIST）は頻度が高く、その悪性度判定として腫瘍細胞密度、腫瘍径、周辺浸潤、核分裂数などがある。このうち核分裂数は最も重要な指標とされている。

p53はその変異が大多数の癌において認められる癌抑制遺伝子である。一方、bcl-2は細胞周期器に関わるタンパク質である。一部の腫瘍ではbcl-2陽性およびp53陰性の間に相関があり、予後規定因子としての重要性が報告されている。

今回我々は免疫組織化学的手法を用いて消化管間質腫瘍107症例におけるbcl-2およびp53発現を検討した。Bcl-2陽性症例は84.1%であり、良性と高分化に有意に陽性例が多かった( $p<0.01$ )。p53陽性症例は49%であり、低分化に有意に多かった( $p<0.01$ )。しかし、Bcl-2とp53発現の間には負の相関がなかった。同時bcl-2とp53発現は核分裂数、腫瘍細胞密度、腫瘍径、周辺浸潤との間にも相関の傾向が認められた。

以上よりBcl-2、p53発現は消化管間質腫瘍においても悪性指標として有用であると考えられる。

キーワード： 消化管， 間質腫瘍， bcl-2， p53， 免疫組織化学

\* 日中医学協会助成事業—日本財団補助金による。

## **bcl-2 & p53 Expression and Relation to Histopathological Features in 107 Cases of the Gastrointestinal Stromal Tumor**

Xiaojuan Wang, M.D., Ichiro Mori, M.D., Ph.D., Wutsunomiya, M.D., Ph.D., Misa Nakamura, M.D., Ph.D., Yasushi Nakamura, M.D., Ph.D., Kakudo Kenichi, M.D., Ph.D., F.I.A.C.

### **Summary**

**Aim** We examined bcl-2 and p53 expression in 107 cases of human gastrointestinal stromal tumor (GIST) to study their relation to histopathological features by immunohistochemical technique (LSAB).

**Method** Labelled streptavidin-biotin (LSAB) method.

Primary antibody: Ncl-bcl-2 (Novocastra Laboratories Ltd. Batch: 111701, United Kingdom); Ncl-p53-D07 (Novocastra Laboratories Ltd. Batch: 753, United Kingdom)

**Results** bcl-2 positive rate was 84.1% (90/107) and significantly expressed in benign (85.7%, 36/42,  $p < 0.01$ ) and well differentiated GIST (94.9%, 37/39,  $p < 0.01$ ). P53 positive rate was 49% and significantly expressed in poorly differentiated GIST (88.5%, 23/26). There are tendentious relationship between p53 expression and mitosis number ( $r = 0.35$ ), cellularity ( $r = 0.36$ ), peripheral infiltration ( $r = 0.34$ ) although no significant statistically, as well as relationship between bcl-2 negative and maximal tumor size ( $r = -0.16$ ), peripheral infiltration ( $r = -0.23$ ). But no inverse correlation was identified between bcl-2 expression and p53 expression.

**Conclusion** Our results suggest that immunohistochemical p53 overexpression and bcl-2 negative expression might be an important parameter in predicting malignancy. Mitosis might be a helpful criteria in malignancy diagnosis.

**Keywords:** gastrointestinal stromal tumor, bcl-2, p53, immunohistochemical technique



## **bcl-2 & p53 Expression and Relation to Histopathological Features in 107 Cases of the Gastrointestinal Stromal Tumor**

Xiaojuan Wang, M.D., Ichiro Mori, M.D., Ph.D., Utsunomiya, M.D., Ph.D.,  
Misa Nakamura, M.D., Ph.D., Yasushi Nakamura, M.D., Ph.D, Kakudo Kenichi,  
M.D., Ph.D., F.I.A.C.

### **Introduction**

Gastrointestinal stromal tumors (GIST) are the most common non-epithelial tumors of the gastrointestinal tract. Its malignant diagnosis and grade mainly depending on mitotic number, and its malignant potential is correlated with the large tumor size, high cellularity, necrosis and peripheral infiltration. Sometimes it is very difficult to make a distinction between benign and malignancy.

It is known that overexpression of tumor-suppressor gene p53 suggesting a loss of p53 function which is implicated in the pathogenesis of many tumors and correlates with a poorly differentiation of tumor. bcl-2 is involved in cell cycle regulation and apoptosis. In some cancers bcl-2 expression correlates with negative p53 staining and its prognostic significance has already been reported in number of malignancies. Gastrointestinal stromal tumors, however, have rarely been examined.

The aim of this study was to examine bcl-2 and p53 expression in 107 cases human gastrointestinal stromal tumor (GIST) to study their relation to histopathological features by immunohistochemical technique(LSAB).

### **Material and Method**

Hundred and seven cases of GIST were selected from the Department of Pathology, the Affiliated Hospital of Shandong Medical University, Jinan, Shandong, China, in the 30-year period from 1969 to 1999. All of these surgical specimens were routinely fixed in formalin and embedded in paraffin. The cases occurred between the age of 6 days and 73-year-old, with the mean of 49.3, and the tumor ranged in size from 0.5 to 30cm. The male to female ratio was 63:44. Twenty-five cases located in the esophagus, 38 in the stomach, 33 in the small intestine and eleven in the

large intestine. The original diagnoses included leiomyoma, leiomyoblastoma, leiomyosarcoma and GIST.

Gross features including tumor size were checked in surgical and pathological records. Microscopically, these cases were divided into three groups depending on mitotic number (10 high power fields in one group; observed 5 groups at the fields of cellularity in each case, then obtained a mean.). Group I as benign, no mitosis is seen, ie.0/10HPF; Group II as well differentiated malignancy, with mitosis 1-4/10HPF and Group III as poorly differentiated malignancy, with mitosis>5/10HPF. Simultaneously, 1)microscopic arrangement pattern of tumor cells; leiomyoma type, schwannoma type, leiomyoblastoma type and mixed type; 2)cellularity; low, intermediate and high; 3)peripheral infiltration; 4) necrosis and 5)the presence of hemorrhage were also noted in every case.

Immunohistochemical studies of bcl-2 and p53 protein were detected by standard Labelled Streptavidin –Biotin (LSAB) method with microwave epitope retrieval (5 x 3min, in 10mmol/L citrate buffer, pH6.0). Sections were 3  $\mu$ m cut from paraffin blocks, placed onto silane-coated slides, and dried at 60 C for minutes. The sections were dewaxed in Xylene , rehydrated through graded alcohols and treated with 3% hydrogen peroxide for 10 minutes to inactivate endogenous peroxidase activity. They were then incubated with the primary antibody of Ncl-bcl-2 (Novocastra Laboratories Ltd. Batch: 111701, United Kingdom) and Ncl-p53-D07 (Novocastra Laboratories Ltd. Batch: 753, United Kingdom) for over night at 4C. The dilution of antibody was 1: 400 and 1: 300, respectively for bcl-2 and p53. Sections were incubated with biotinylated secondary antibody, followed by peroxidase-conjugated streptavidin by use of the Universal DAKO LSAB kit (Dako Corp.) at 10 minutes for each step. Staining was visualized by use of 3-amino-9ethyl-carbazole; the sections were washed in water and counterstained with methlgreen. A stomach carcinoma with documented p53 mutation was used as a positive control and a follicular lymphoma was used as a positive control for bcl-2. Negative controls were performed by substituting normal sheep serum for primary antibody.

The results were evaluated in the following criteria: negative (-) for bcl-2 and p53, with no tumor cell stained; positive (+) for bcl-2 (tumor cell stained) and positive (+)~(++) for p53 ( less than 50% of tumor cells

stained for+, and more than 50% of tumor cells stained for++).

Statistical methods: Chi-squared test and relative analysis.  $P < 0.05$  was considered to represent statistical significance.

## **Results**

### **Gross and microscopic features**

The gross, microscopic features and immunohistochemical studied of the 107 cases GIST were summarized in Table\*.

The age of case ranged from 6 days to 73-year-old, with the mean of 49.3, and the mean of 43.5 for benign, the mean of 52.9 for malignancy. The size of tumor was measured in maximal diameter, occurring between 0.5cm and 30cm, with the mean of 6.56cm and a mean of 3.97cm for benign and a mean of 8.41cm for malignancy. Of the 107, the male were 63 cases and the female were 44 cases. Twenty-five cases located in esophagus, 38 in stomach, 33 in small intestine and eleven in large intestine.

Microscopically, 42 cases were in Group I, Group II were 39 cases and 26 cases in Group III. Cellularity were 7 intermediate and 35 low in benign, 20 cases low, 29 intermediate, 16 high in malignancy. No peripheral infiltration in Group I, but 35 cases (53%) were seen with a peripheral infiltration in Group II and group III. Necrosis was observed 45 cases(69%) in Group II and Group III, but only 4 cases(9%) in Group I, hemorrhage was noted 44 cases(67%) in Group II and III and only 5 cases(16%) in Group I.

### **Immunohistochemical expression**

bcl-2 positive rate was 84.1% (90/107) in total and significantly expressed in benign (85.7%, 36/42,  $p < 0.01$ ) and well-differentiated GIST (94.9%, 37/39,  $p < 0.01$ ), expression in poorly-differentiated is 65% (17/26), but no significant difference between benign and well differentiated. P53 positive rate was 49% in total and significantly expressed in poorly differentiated GIST (88.5%, 23/26,  $p < 0.01$ ). The expression of p53 between well-differentiated (53.8%, 21/39) and benign group (19%, 8/42) also has a significant difference ( $p < 0.01$ ), as well as the expression of p53 between well and poorly-differentiation. Positive(++) of p53 was seen only in malignancy(18/65) but no significant different expression between well

and poorly differentiated. There are tendentious relationship between p53 expression and mitosis number( $r=0.35$ ), cellularity( $r=0.36$ ), peripheral infiltration ( $r=0.34$ ) although no significant statistically, as well as the relationship between bcl-2 negative and maximal tumor size( $r=-0.16$ ), and peripheral infiltration ( $r=-0.23$ ). But no inverse correlation was identified between bcl-2 expression and p53 expression.

**Table\*** Gross, microscopical features and immunohistochemical studied

	Total (n=107)	Group I(benign) (n=42)	Group II(well-) (n=39)	Group III(poorly-) (n=26)
Mean age	49	43	54	52
Female: male	63:44	24:18	26:13	13:13
Location, E:S:SI:LI	25:38:33:11	24:9:4:5	1:20:16:2	0:9:13:4
Mean volume	6.56	3.97	7.34	9.84
Arrange, Lei:Sch:Blas:Mix	85:22:0:0	27:6:4:5	23:13:2:1	5:13:4:4
Cellularity, I, II, III	56:36:15	35:7:0	14:16:9	7:13:6
Mitosis ( 10HPF )	0~28	0	1~4	
>5~28				
Hemorrhage	49	5	29	15
Necrosis	49	4	31	14
bcl-2 (+)	90	36	37	17
p53	52	8	21 (4++)	23 (11++)

E: esophagus, S: stomach, SI: small intestine, LI: large intestine

Lei: leiomyoma type, Sch: schwannoma type, Blas: blastoleiomyoma, Mix: mixed type

HPF: high power field

## Discussion

Gastrointestinal stromal tumors are the most common mesenchymal tumors which traditionally have been designated as smooth muscle tumors. Its myogenic differentiation was unable to demonstrate in most series of research, although with increasing analytic tools. Furthermore, the biological behavior of GIST is difficult to predict.

bcl-2 is one of the many proteins that regulate programmed cell death and is overexpressed in B-cell lymphomas. It is encoded in the 18q21 region that is frequently involved in the t(14:18)(q32;q21) in follicular

lymphomas. The p53 tumor suppressor gene encodes a 53KD nuclear protein involved in the regulation of cell growth. Mutations in the p53 gene are among the most common genetic abnormalities in human cancers and more than 95 per cent occur in exons 5-8. In contrast to non-stabilized wild-type protein, which has a short half-life(5-20min.), mutated p53 protein becomes stabilized and can be detected by immunohistochemical techniques. Mutation and overexpression of p53 have been reported in leiomyosarcoma of soft tissue and uterus<sup>1-7</sup>, as well as the expression of bcl-2<sup>8-10</sup> and the correlation of p53 negative expression with bcl-2 expression<sup>11</sup>. However, rare study has been examined in the gastrointestinal stromal tumor<sup>12-14</sup>. The aim of this study was to evaluate bcl-2 and p53 as additional prognostic markers, as well as the correlation with the differentiation, maximal tumor sizes, cellularity, peripheral infiltration, hemorrhage and necrosis and the correlation of p53 negative expression with bcl-2 expression.

This study has revealed the presence of a bcl-2 expression in benign and well-differentiated GIST than in poorly differentiated GIST, the same as the other reports. The bcl-2 over-expression in benign and well differentiated suggests that it might play an important role in preventing apoptosis among benign and well-differentiated GIST. Although bcl-2 itself does not stimulate cell growth, an inhibition of apoptosis by bcl-2 may provide a survival advantage to the cells of benign and well-differentiated GIST. In the study no significant difference between benign and well differentiated. Since cellular proliferation and apoptosis form a complex mechanism, another pathway could also be implicated in the regulation of the cell and cell growth in benign and well-differentiated GIST.

Mutation of the P53 gene occurs in many human cancers and p53 overexpression has been demonstrated by immunohistochemistry in a variety of tumor types. Positive staining for p53 has been correlated with tumor differentiation and with a poor prognosis in a series of reports. The present study showed that p53 positive rate was significantly expressed in poorly differentiated GIST. The expression of p53 between well-differentiated and benign group also has a significant difference, as well as the expression of p53 between well and poorly differentiation. Moreover, positive (++) of p53 was seen only in malignancy (18/65), but no significant difference between well and poorly differentiated. As the

other reports, the result suggests that p53 gene might play an important role in formation and differentiation of gastrointestinal stromal tumors.

In the study inverse correlation between bcl-2 and p53 expression was not revealed, although an inverse correlation of expression has been reported in a number of human malignancies previously. The finding suggests that expression of bcl-2 in GIST might have not been induced by mutant p53.

Pathologically and clinically, it is important to predict the biological nature of GIST. So far the importance of the mitotic index has especially emphasized due to its objectivity. The large tumor size, high cellularity, tumor hemorrhage and tumor necrosis and have been reported as indicator in detecting malignant potential of GIST. In our materials there are tendentious relationship between p53 expression and mitosis number, cellularity, peripheral infiltration although no significant statistically, as well as the relationship between bcl-2 negative expression and maximal tumor size, peripheral infiltration.

In conclusion, the present study showed that bcl-2 is frequently expressed in benign and well-differentiated GIST and p53 is frequently expressed in malignant GIST both in well and poorly differentiated GIST, especially in the condition of strong p53 positive, a malignant potential might be considered. But no correlation between bcl-2 negative expression with p53 positive expression. On the other hand, mitosis was a helpful criteria to distinguish benign and malignant GIST, as well as to grade well-differentiated and poorly-differentiated GIST.

## REFERENCES

1. Lopes JM, Silva P, Seixas M, et al. Microsatellite instability is not associated with degree of malignancy and p53 expression of gastrointestinal stromal tumours. *Histopathology* 1998 Dec; 33 (6): 579-81.
2. Chang MS, Choe G, Kim WH, et al. Small intestinal stromal tumors: a clinicopathologic study of 31 tumors. *Pathol Int* 1998 May; 48(5): 341-7.
3. Michael DJ, Maura AF, James AR, et al. p53 immunoreactivity and mutation of the p53 gene in smooth muscle tumours of the uterine corpus. *J Pathol* 1995; 177:65-70.
4. Expression of steroid receptors, Ki-67, and p53 in uterine leiomyosarcomas. *Int J Gynecol Pathol* 1999 Jan; 18(1):20-8.
5. Meye A, Bache M, Hinze R, et al. Molecular characterization and liposomal transfection of a p53-mutated cell line established from a poorly differentiated leiomyosarcoma. *Int J Oncol* 1998 Aug; 13 (2): 241-8.
6. Hall KL, Teneriello MG, Taylor RR, et al. Analysis of Ki-ras, p53, and MDM2 genes in uterine leiomyomas and leiomyosarcomas. *Gynecol Oncol* 1997 May; 65(2): 330-5.
7. Yoo J, Lee HK, Kang CS, et al. p53 gene mutations and p53 protein expression in human soft tissue sarcomas. *Arch Pathol Lab Med* 1997 Apr; 121(4): 395-9.
8. Miettinen M, Sarloma-Rikala M, Lovatich AJ. Cell-type- and tumour-type-related patterns of bcl-2 reactivity in mesenchymal cells and soft tissue tumours. *Virchows Arch* 1998 Sep; 433(3): 255-60.
9. Suster S, Fisher C, Moran CA. Expression of bcl-2 oncoprotein in benign and malignant spindle cell tumors of soft tissue, skin, serosal surfaces, and gastrointestinal tract. *Am J Surg Pathol* 1998 Jul; 22(7): 863-72.
10. Chilosi M, Facchetti F, Dei Tos AP, et al. bcl-2 expression in pleural and extrapleural solitary fibrous tumours. *J Pathol* 1997 Apr; 181(4):

362-7.

11. Y-L Zhai, T Nikaido, T Toki, et al. Prognostic significance of bcl-2 expression in leiomyosarcoma of the uterus. *Br J Cancer* 1999; 80 (10), 1658-1664.
12. Kenichi Tazawa, Kazuhiro Tsukada, Hiroyasu Makuuchi, et al. An immunohistochemical and clinicopathological study of gastrointestinal stromal tumours. *Pathol Int* 1999; 49:786-798.
13. Hillemanns M, Pasold S, Bottcher K, et al. Prognostic factors of gastrointestinal stromal tumors of the stomach. *Verh Dtsch Ges Pathol* 1998; 82:261-6.
14. Uma N.M.Rao, Sydney DF, Merka WJ, et al. Comparative immunohistochemical and molecular analysis of uterine and extrauterine leiomyosarcomas. *Mod Pathol* 1999; 12(11): 1001-1009.



# 日本財団補助金による

## 1999 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12年3月20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 野坂 洋一郎



所属機関 岩手医科大学歯学部口腔解剖学第一講座 職名 教授

所在地 〒020-8505 盛岡市中央通1-3-27 電話 019-651-5111

招へい研究者氏名 謝 雪峻

所属機関 北京医科大学付属人民医院 職名 主治医師

研 究 テ ー マ 口腔周囲組織のリンパ管とその構造

### 2. 日 本 滞 在 日 程

平成11年6月29日日本国入国 同日研究開始

平成12年3月31日 研究終了

平成12年4月1日から引き続き研究継続

平成13年6月25日研究終了予定

### 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：口腔周囲組織のリンパ管分布とその構造

来日研究者氏名：謝 雪峻

中国での所属・役職：北京医科大学人民医院口腔科・主治医師

招聘者氏名・所属・役職：野坂 洋一郎・岩手医科大学歯学部・教授

要旨：口腔領域の末梢リンパ管構築を研索した結果、舌のリンパ管は舌背上皮の下に結合組織乳頭の中に盲端となったリンパ管が侵入し、固有層の中に網目状のリンパ管網を形成していた。このリンパ管網から舌深動脈伴行集合リンパ管、オトガイ舌筋伴行集合リンパ管、舌中隔内集合リンパ管が顎下リンパ節に流入する。舌上皮下のリンパは舌中隔を越えて交叉する流れが認められ、反対側に流入する量は時間の経過と共に増加した。

KEY WORDS: リンパ管構築、頭頸部領域、腫瘍

### 目的

近年、その吸収機能に注目が集っているリンパ管は口腔領域のみならず、全身の数カ所を除いてほとんどの臓器における末梢リンパ管構築は不明のままである。特に、血管の微小循環の研究が臓器固有の構築が機能を反映していることを理解した上での進歩であるにも関わらず、リンパ管構築は顧みられていなかった。その理由として、リンパ管は閉鎖系である血管系とは異なり、末梢から中枢への一方通行であり、途中にリンパ節が存在することから、血管系と同じ研究方法では確認できなかったこと、さらに静脈、特に細静脈との鑑別が、通常の組織切片観察では全く不可能で、組織化学、免疫染色等でも困難であったことが挙げられる。特に、口腔領域では末梢のリンパ管構築の検索はほとんどされておらず、頭頸部各部位の所属リンパ節が確認されているのみで、各臓器のリンパ管構築および各末梢組織から所属リンパ節への集合リンパ管経路ですら、詳細は不明である。本研究の目的は口腔領域の中では癌発生率の高い舌に注目して、舌の粘膜上皮下および舌筋内リンパ管構築を観察し、吸収効率、左右の交叉率を明らかにすることにある。

### 方法

## 1. マウス胎仔のリンパ管構築

雌雄マウス（2カ月齢）を一晩同居させ、翌日の朝8時に膈プラグ形成を確認後、雌雄を分ける。この時点を経胎齢1日として、18日目の午前8時に子宮より胎齢18日の胎仔を摘出、直ちに中性緩衝10%ホルマリンにて浸漬固定を施した。固定完了後、各試料はエタノール上昇系列にて脱水、通法に従って、GMA レジンに包埋した。電動ミクロトームにて3  $\mu\text{m}$  連続切片を作成し、トルイジン・ブルー染色を施し、カバーガラスにて封入した。各切片の全体像と口腔領域像を光学顕微鏡 (E800, NIKON) にて観察、冷却3—CCD カメラ (C-5860, Hamamatsu Photonics) にてパーソナルコンピュータ (Macintosh G4, Apple) に二次元画像として入力した。画像処理ソフト (Photoshop ver.5.5, Adobe) にて観察臓器および、リンパ管を抽出、二次元画像の軸合わせを行い、三次元構築ソフト (Voxblast ver.2.2) にて立体再構築を行った。さらに、同ソフトにて三次元画像アニメーションを作成し、あらゆる角度からの観察を可能とした。

## 2. 舌のリンパ流交叉

### 1) RI による検索

2カ月齢雄性マウスの舌右側の舌尖より5mmの筋肉内に $^{14}\text{C}$ ラベリング・ウシ・アルブミンを注入し1分、10分、20分後に舌、左右顎下リンパ節、左右深頸リンパ節を摘出、2N水酸化ナトリウム(70℃、1時間)にて処理後、室温に戻して、2N塩酸にて中和した試料を液体シンチレーション・カウンター(2550TR/LL, Packard, 東京)にて放射活性を計測した。

### 2) ultrasphere による検索

2カ月齢雄性マウスの舌右側の舌尖より5mmの筋肉内に直径5  $\mu\text{m}$  のultrasphere 100 $\mu\text{l}$  (1,000万個)を注入し、30分、1時間、3時間、6時間後に舌、左右顎下リンパ節を摘出し、10%中性緩衝ホルマリンにて固定、30  $\mu\text{m}$  連続凍結切片を作成した。光学顕微鏡下で顎下リンパ節のultrasphereの数を計測、舌から顎下リンパ節への移行および左右差を検索した。

## 3. VX2 癌細胞移植実験

組織型が扁平上皮癌に類似している易転移性のVX2癌細胞を体重約3Kgの日本白色雄性ウサギの舌右側に舌尖より5mmの筋肉内に移植する。VX2癌細胞を移植後後7日、10日、14日目に耳静脈内麻酔を施し、開胸、心尖よりカニューレを挿入して、先端を上行大動脈の位置に固定、カコジル酸緩衝液にて瀉血後、2%パラフォルムアルデヒドにて灌流固定を施す。舌を移植部を含め

て摘出し、直ちに $-30^{\circ}\text{C}$ にて凍結、 $30\ \mu\text{m}$ 切片を作成する。切片を軽く4%パラフォルムアルデヒドにて再固定後、緩衝液にて洗浄、5'-Nucleotidase 酵素組織化学染色をほどこして光学顕微鏡にて腫瘍周囲のリンパ管の変化を観察する。

## 結果

### 1) マウス胎仔舌のリンパ管構築

舌では舌背、舌下面、舌に対向する口腔底のリンパ管構築を観察した。

1) 舌背、粘膜には糸状乳頭が認められ、各乳頭の直下には結合組織乳頭が存在する。リンパ管網は粘膜固有層に存在し、この網目から各結合組織乳頭に盲端となったリンパ管が立ち上がり、侵入していた。一方、粘膜固有層に存在するリンパ管網からは舌筋筋束間の内筋周膜内を舌深動脈に向かって下行していた。

2) 舌下面には舌背のような舌乳頭は存在せず、粘膜の分類では保護粘膜となり、上肢は非常に薄かった。リンパ管が粘膜固有層に認められ、舌背と同じく網目を形成しているが、管径は太く、網目が粗かった。粘膜上皮に向かう盲端となったリンパ管は確認された。

3) 一方、舌に対向する口腔底のリンパ管は、口腔底を構成する筋肉の上面に同じく目の粗いリンパ管網を形成しており、このリンパ管網から粘膜上皮に向かう盲端となったリンパ管は認められなかった。

これらの各部位からの集合リンパ管はほとんどが顎下リンパ節へ、一部舌根部付近は深頸リンパ節へと走行していた。

### 4) マウス胎仔下顎切歯部唇側歯肉のリンパ管構築

観察したマウスが胎生期のものであったことから、切歯は未だ萌出しておらず、歯肉と口唇は上皮の陥入によって境界されていた。歯肉では下顎骨歯槽表面に目の粗いリンパ管網が形成されており、盲端となったリンパ管の立ち上がりは観察されなかった。一方、陥入上皮をはさんだ口唇側では筋層の上皮側に歯肉よりは目の細かなリンパ管網が形成されており、短い盲端となったリンパ管が形成されていた。これらのリンパ管網は下顎骨外側を経過して下顎角の角前切痕の位置で下顎骨内面に方向を変え、顎下リンパ節に流入していた。

### 5) マウス胎仔顎下リンパ節のリンパ管構築

口腔、顔面のほとんどの部位からリンパをうける顎下リンパ節は、胎齢18

日胎仔ではリンパ球の集合として存在しており、小節等の形成は未だ行われていない。しかしながら、リンパ洞（辺縁洞、中間洞、髓洞）の形成は終了していた。輸入リンパ管が辺縁洞に合流する部位には弁様構造が形成されていた。辺縁洞には二種類の隔壁が存在し、液成分は通過させるが、細胞成分の通過は抑制するものと、すべての内容物の流通を妨げるものが形態学的に確認できた。

#### 6) 舌のリンパ流交叉 (RI ならびに ultrasphere による検索)

マウス右側舌筋内に<sup>14</sup>C ラベリング・ウシ・アルブミンを1%エバンス、ブルーとともに注入した。注入後、1分、10分、20分後に舌、左右顎下リンパ節、左右深顎リンパ節を摘出し、2N水酸化ナトリウムにて溶解し、中和後、液体シンチレーションカウンターにて放射活性を計測した。

色素は注入直後から舌中隔を越えて反対側に経時的に拡散し、1分後には左右ほぼ同じ状態になった。また、1分後には同側顎下リンパ節に10分後には左右顎下リンパ節に、20分後には同側深顎リンパ節に色素が流入していた。

放射活性計測の結果、注入した RI の 0.5~1%が右側（同側）顎下リンパ節に流入していた。10分後にはほぼ1%、20分後には約2%が流入していた。一方、反対側顎下リンパ節には1分後では流入を確認できず、10分後、20分後ではそれぞれ同側顎下リンパ節の約1/3が流入していたに留まった。深顎リンパ節への流入は左右ともに本実験時間内には確認できなかった。ultrasphere を注入した結果では30分、1時間経過後は同側の顎下リンパ節流入するが3時間後には反対側にも流入が認められた。流入量は3時間までは経時的に増加したが6時間では減少した。

### 3. VX2 癌細胞移植実験

舌内のリンパ管は大きく3つの経過をとって舌から流れ出していた。(1) 舌深動脈伴行集合リンパ管。(2) オトガイ舌筋伴行集合リンパ管。(3) 舌中隔内集合リンパ管である。VX2 癌細胞移植後、10日例で、腫瘍周囲のリンパ管は太くなっていた。リンパ管網は常に腫瘍周囲の血管網の外側に位置しており、腫瘍の増殖に伴い外側へと移動していた。

#### 考察

##### 1) マウス胎仔舌のリンパ管構築

舌背および舌下面には、リンパ管網が粘膜固有層に存在していた。舌背ではこの網目から各結合組織乳頭に盲端となったリンパ管が立ち上がって侵入していた。一方、舌下面には舌背のような舌乳頭は存在せず、粘膜上皮に向かう盲

端形成は認められなかった。さらに舌下面ではリンパ管の管径が太く、網目の目が粗かった。舌下面に対向する口腔底のリンパ管は、口腔底を構成する筋肉の上面に同じく目の粗いリンパ管網が形成されており、そこから粘膜上皮に向かう盲端となったリンパ管が確認された。これらのことから、舌背、舌下面、対向する口腔底のリンパ管を比較すると、舌下面より対向する口腔底のリンパ管に吸収能の高い盲端となったリンパ管が存在することから、口腔底のほうが形態学的には吸収効率が高いと推測された。一方、舌背にも盲端形成が認められたが、舌背粘膜上皮の厚さ、特に角化層の厚さから考えてもこれら盲端となったリンパ管が上皮を経由した吸収能と関係があるとは考えづらい。この舌背結合組織乳頭内の盲端形成は吸収能とは異なった意味がある可能性があるが、本研究ではその詳細を明らかにできなかった。

## 2) マウス胎仔下顎切歯部唇側歯肉のリンパ管構築

胎生期のマウスでは、切歯は未だ萌出しておらず、表面的には歯肉と口唇は一連続で境界不明瞭であったが、組織切片的では歯肉と口唇は上皮の陥入によって界されていた。この陥入上皮の歯肉側では下顎骨歯槽表面に目の粗いリンパ管網が形成されており、盲端となったリンパ管は認められなかった。一方、陥入上皮の口唇側では歯肉側よりは目の細かなリンパ管網が形成されており、短い盲端となったリンパ管が認められた。すなわち、形態学的には歯肉は口唇よりリンパ管吸収能が低いことが推測された。

## 3) マウス胎仔顎下リンパ節のリンパ管構築

口腔、顔面のほとんどの部位からリンパをうける顎下リンパ節実質では、胎齢18日胎仔ではリンパ球の集合として存在しており、未完成であった。しかしながら、リンパ洞（辺縁洞、中間洞、髓洞）の形成はすでに終了していた。輸入リンパ管が辺縁洞に合流する部位には弁様構造が形成されていた。このことはリンパ節が未だ機能していない時期にすでにリンパ流は存在し、辺縁洞に流入したリンパは逆流しないことを意味している。さらに、辺縁洞には二種類の隔壁が存在し、液成分は通過させるが細胞成分の通過は妨げるものと、すべての通過を妨げるものが形態学的に確認できた。これらの結果は、墨汁を末梢組織に注入した際、その直後には所属リンパ節の表面に墨汁が網目上に確認され、時間の経過とともにその網目がすべて墨汁色で埋められることや、蛍光ラベリングしたリンパ球を末梢部に注入した後、所属リンパ節表面を蛍光観察すると、リンパ球が網目状に辺縁洞を走行することを説明できる。すなわち、液

成分（分子量の少ないもの）が辺縁洞に流入すると、最初は流れやすい経路、すなわち、隔壁を避けながら移動する。時間の経過とともにこの液成分は拡散により、辺縁洞内で均一な濃度になるが、液成分をも通過することを妨げる隔壁を越えることはできないため、ある一定範囲を越えて拡散することはない。一方、細胞成分は液成分の流入直後の流れ、すなわち、流れやすい経路をとるのみで、拡散がないため、蛍光ラベリングのリンパ球の動きはリンパ節を表面から観察すると辺縁洞に流路があるように見えることになる。

#### 4) 舌のリンパ流交叉

同時に注入した色素は注入直後から舌中隔を越えて反対側に経時的に拡散し、1分後には左右ほぼ同じ状態になった。色素のような分子量の小さい物質は拡散によって容易に舌中隔を越えることを示している。また、1分後には同側顎下リンパ節に10分後には左右顎下リンパ節に、20分後には同側深頸リンパ節に色素が流入していた。すなわち、注入後、舌内では拡散は明らかにおこっているが、量的に均一ではないため、時間的に多少の差が認められた。長時間の観察で、徐々に均等な流入量になると推測された。<sup>14</sup>C ラベリング・ウシ・アルブミンは分子量が大きく、舌中隔を拡散によっては越えることがない。すなわち、アルブミンが反対側の顎下リンパ節に流入することは舌内におけるリンパ流の交叉が存在することを示すことになる。その結果、アルブミンにおいては1分後で0.5~1%が右側（同側）顎下リンパ節に流入していた。10分後にはほぼ1%、20分後には約2%が流入していた。一方、反対側顎下リンパ節には1分後では流入を確認できず、10分後、20分後ではそれぞれ同側顎下リンパ節の約1/3が流入していたに留まった。深頸リンパ節への流入は左右ともに本実験時間内には確認できなかった。一方、5 $\mu$ m 径 (ultrasphere) の微粒子を1時間、2時間後には反対側顎下リンパ節に流入した。本実験における舌から顎下リンパ節への流入量は時間の経過が徐々に増加を示すことが分かった。また、左右の交叉は約1/3であることが判明した。

#### 5) VX2 癌細胞移植実験

VX2 癌細胞移植後、10日例で腫瘍周囲のリンパ管が拡大していることから、腫瘍による影響は血管より遅れていることが明らかである。腫瘍蜂巢形成後もリンパ管網は常に血管網より外側に存在することは、栄養を司る血管網が腫瘍の近くに存在し呼吸専門のリンパ管が外側に存在することは機能的な位置関係を制御する機構が残っていることを示していると考えられた。

## 参考文献

1. ゴールデンハムスターの舌におけるリンパ管の走行  
陳 寛宏、藤村 朗  
岩手医科大学歯学雑誌 Vol.19(2): 91-102, 1994
2. 口腔領域における毛細リンパ管構築  
藤村 朗  
リンパ学 Vol.22(1): 21-26, 1999
3. Lymphatic architecture of the mouse head and neck region by computer graphic 3-D imaging. – Submandibular lymph node –  
Akira Fujimura, Masao Onodera, Wang Yaoguang and Yohichiro Nozaka  
Dentistry in Japan Vol. 36: 3-8, 2000
4. Architecture of lymphatic vessels of the esophagus in the mouse fetus by 3D-reconstruction images.  
Akira Fujimura, Masao Onodera, Xie Xuejun and Yohichiro Nozaka  
Microcirculation annual, Vol. 16: in press, 2000



# 日本財団補助金による 1999年度日中医学協力事業報告書

－日本人研究者派遣－

平成12年3月3日

財団法人 日中医学協会  
理事長 中島章殿

1. 訪中者氏名 豊澤英子  
所属機関名 大分医科大学 職名 教授  
所在地 〒879-5593 大分県大分郡挾間町医大ヶ丘1-1 電話 097-586-5092  
受入機関名 河北医科大学  
所在地 中華人民共和国河北省石家荘市中山東路361号  
受入責任者名・役職 河北医科大学長・温進坤

## 2. 中国滞在日程（訪問都市・機関名等主な日程）

10月23日	石家荘市	大分より移動（福岡・北京経由）
24日	河北医科大学	学長表敬訪問 副学長・教授陣との意見交換及び学内見学
25日	同大学看護学科	教員との意見交換及び学内見学
26日	同大学第四医院	「日本における老年看護の現状」について講演 院長・看護部長・看護スタッフとの意見交換
27日	同大学第四医院	「日本における看護教育の現状」について講演 医師・看護婦・看護学科教員・学生との意見交換
28日	同大学第四医院 北京	臨床研究方法（老年看護）について意見交換 石家荘より移動
29日	帰国	北京より大分へ（福岡経由）

### 3. 交流報告

#### 交流テーマ：老年看護学分野における研究枠組及び教授法の開発

訪中研究者氏名 豊澤英子

所属 大分医科大学

地域・老人看護学講座

役職 教授

#### 〔1〕訪中目的

大分医科大学と河北医科大学は、学術協定校として医学分野の教育・研究交流を発展してきた。看護学科が1994年に創設され、修士課程が1998年に開設されたのを機会に、看護分野においても両大学の交流を深めることを目的に、1998年10月より国費留学生として河北医科大学第四医院看護婦1名を老年看護学教室に迎えた。この度、看護教育及び老年看護学研究に関して情報交換を行ない、臨床実践及び学士課程教育の質を高めるための活動を促進するとともに、両大学における共同研究の基礎づくりを行いたいと考えた。

#### 〔2〕河北医科大学および第四医院の状況

河北医科大学（Hebei Medical University）は河北省石家荘市に位置する。1915年に医学校が創設され、1995年には11大学及び看護学校2校から成る現在の組織となった。職員数は7,000人で、その内研究領域の教授は266人、助教授は767人である。教育領域の教授は134人、助教授は253人である。博士課程プログラムは3コース、修士課程プログラムは30コースで、学生数はフルタイム8,000人、社会人学生2,000人、日本や韓国からの留学生100人である。河北省の人口は6,000万人であり、多くの医師が必要とされているために学生数が多いとのことであった。基礎医学の研究が進んでおり、毎年1,000人の卒業生の内300人が大学院へ進学している。

河北医科大学は6つの付属病院を有しており、教育・研究関連病院は70病院である。今回の主な訪問先である第4医院（Fourth Hospital of Hebei Medical University）は河北省腫瘍医院とも呼ばれ、ベッド数620で40診療科より構成され、1,500人以上の職員が従事している。その内教授は170人、助教授は160人であり、年間の外来患者数は45万人、入院患者は13,000人で、その70%はがん患者である。特に河北省では食道癌の発生率が高く、食道癌の年間手術件数の多いのが特徴といえる。

河北医科大学には第一医院に5年制、第四医院に4年制の2つの看護学士課程が併設されて

いる。訪問した第四医院では、14年前に看護専門学校が開設され、1998年に4年制の学士課程に発展した。2002年の修士課程開設に向けて準備中であり、看護職を研修のために国内外へ派遣している。その内の一人は、大分医科大学看護学科の研究生として勉学に励んでいる。新病院及び看護学院の建設が進められており、2001年には完成予定である。

現在、学士課程の1・2回生は専門学校当時の校舎と宿舎を使用している。教室・実習室の教材等の設備は十分とはいえない状況であったが、新校舎の準備とともに、人的・物的環境を整えていくとの説明があった。看護学科と第4医院看護部との連携は密であり、学校長と看護部長は、看護教育の質の向上のために熱意をもって各々の役割を発揮していた。

### 〔3〕講演・指導内容と参加者の反応等

第四医院の院長、副院長、看護部長、医師、看護婦、看護学科教員及び学生を対象として、日本における看護教育及び老年看護の現状について講演した。それらの内容と出席者との質疑応答については次の通りであった。

#### (1) 日本における老年看護の現状について（資料Ⅰ参照）

日本の高齢化は他国に例をみないほどのスピードで進行しており、21世紀における保健・医療・福祉サービスの質を高めるための社会政策は大きく変化している。激動する時代の中で、看護専門職としてどのような役割を発揮していくのか、新しい分野である老年看護の研究をいかに促進するのか等について述べるとともに、日中両国の看護事情の共通点あるいは相違点について討議した。

#### 〈主な講演内容〉

- ① 老年看護学の歴史
- ② 日本における高齢者の実態
  - ・急速な高齢化
  - ・寝たきり老人と痴呆性老人の将来推計
  - ・1997年衛生の主要指標
  - ・全国の新聞記事にみる高齢者問題
  - ・21世紀の福祉に関する展望
  - ・介護保険
  - ・在宅医療の状況
  - ・寝たきりゼロへの十ヶ条
- ③ 看護職の役割と求められる能力

#### ④ 老年看護学研究の課題

中国の60歳以上の人口は世界でもっとも多く、1、2億人といわれる。しかも、その増加率は毎年上昇しており、急速な高齢化は深刻な問題となりつつある。従って、日本における高齢化社会の問題と社会政策に対する参加者の関心は高く、高齢者の主な疾患と治療、生活の場と家族関係、介護保険の目的と内容、生活保障、将来の人口構造などについて幅広く質問が提出された。

#### (2) 日本における看護教育の現状について（資料Ⅱ参照）

日本の看護教育は約115年の歴史を有する。当初より現在に至る迄病院附属の形態を中心として看護婦養成が行われてきたが、1990年代になり急速に大学における看護教育が促進されるようになった。1999年4月において学士課程は76校、修士課程は30校、博士課程は9校となった。看護の大学教育に対する社会の期待は大きいと考えられるので、看護カリキュラムをいかに開発するのか、社会のニーズに応えられるサービスを提供するための研究をいかに発展させるかといった課題についてを述べた。

##### 〈主な講演内容〉

- ① 日本の看護教育制度
- ② 大分医科大学医学部看護学科の概要
  - ・教育方針
  - ・教育目標
  - ・教育内容
  - ・カリキュラムの構造
  - ・年次開講科目
- ③ 看護教育方法
- ④ 21世紀における看護の方向性

河北省において看護の学士課程は2大学3コースのみであり、中国全体でもまだ少ない。中国では保健婦（士）のコースはないため、「地域看護学では何を学ぶのか、保健婦（士）はどこで働くのか。」について関心が寄せられた。また、日本の大学病院ICUで研修した医師より「日本の看護婦はほとんど介護業務が中心。中国の看護婦は輸液療法等積極的に行っている。看護の仕事についてどのように考えるか。」について質問があり、看護介入（nursing

intervention) と責務 (responsibility & accountability) について、種々の視点から意見交換を行った。「看護婦と准看護婦はどのように異なるのか」に関しては、教育制度とカリキュラム、資格試験、看護業務等の違いについて説明を加えた。

看護学生からは、開講している科目の内容と実習施設・期間等についての質問があり、学習への積極的な姿勢と熱意が感じられた。

#### 〔4〕臨床と教育現場における課題

中国では医師・看護婦の国家試験はない。各々の病院にて継続教育（院内・院外研修）を行いながら、専門的スキルと管理能力を育成している。第四病院では数年毎に上級看護婦になるための試験を実施している。学士課程の卒業生には、臨床における実践能力を養いながら、上級コースへとキャリア開発していくことが期待されていた。学士課程の目標と継続教育システムが十分に連動していけば、看護の専門性は大いに発展していくものと考えられた。教育現場の課題としては、看護教員の教授能力の開発と人材確保があげられよう。修士・博士号をもつ教員養成の準備は徐々に進められているが、今しばらく時間を要するものと考えられた。

臨床現場の課題としては、病院の特性を活かした看護の専門性の確立と高齢者の継続看護におけるシステム作りといえる。また、学士課程の卒業生の能力をさらに開発するための研修計画や組織作りを促進する必要がある。

21 世紀の高齢化社会において、病院から地域（在宅）へとケアを継続する上で中心的存在である看護婦には、益々リーダー的役割が求められよう。これ迄の臨床中心（病院内看護）の認識から脱し、地域（在宅）ケアまで展望できるように、看護学生・看護職員への意識改革と教育を推進していくことが課題である。

#### 〔おわりに〕

河北医科大学で出会った教職員、事務系職員、看護学生の皆様が笑顔で迎えて下さり、数々の心遣いと温かな接待をいただいたことに深く感謝しています。また、訪中の機会を与えて下さった日中医学協会の皆様に心よりお礼を申し上げます。

日本財団補助金による

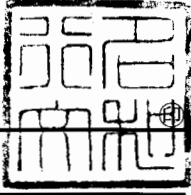
1999年度日中医学協力事業報告書

—日本人研究者派遣—

1999年 7月 2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 名和行文   
所属機関名 宮崎医科大学 職名 教授  
所在地 〒889-1692 宮崎県宮崎郡清武町大字木原5200 電話 0985-85-0990  
受入機関名 温州医学院附属第二医院  
所在地 中国浙江省温州市学院路325027  
受入責任者名・役職 王小同 神经内科主任

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)

1999年6月14日 宮崎→福岡→上海→温州 (移動日)  
6月15日 }  
16日 } 温州医学院附属第二病院・育英兒童病院  
17日 }  
18日 温州医学院 医学部  
19日 温州医学院附属第二病院  
20日 休息日 (観光)  
21日 温州医学院附属第一病院  
22日 " 第二病院  
23日 温州→上海→福岡→宮崎 (移動日)

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)

## 温州における広東住血線虫症の免疫診断

訪中研究者氏名 名和 行文

所属 宮崎医科大学寄生虫学講座

役職 教授

### 報 告

#### はじめに

中国浙江省温州市は上海から約 500 Km 南の海岸沿いに位置しており、市街区人口約 70 万人、周辺を含めた行政区人口約 600 万人の軽工業都市である。1997 年 12 月に WHO/WPRO Office に滞在中の長崎大学熱帯医学研究所スタッフから同研究所資料情報センターに対して、同年 10 月頃から温州市において多彩な神経症状を伴う好酸球性脳脊髄膜炎が小規模集団発生しており、免疫診断についての技術援助を要請している旨の情報が e-mail で伝えられた。このニュースが mailing list を利用してインターネットで日本寄生虫学会会員に配布された。当教室ではかねてより多種類の寄生虫疾患について免疫診断を実施しているので、対応可能である旨回答した。直ちに、温州医学院附属第二医院神経内科主任：王小同氏より e-mail および FAX にて小職宛に患者についての詳細な情報が提供された。臨床症状や検査データからは広東住血線虫感染による好酸球性脳脊髄膜炎が強く疑われた。しかしながら同地には肺吸虫症や囊虫症などの寄生虫感染症も流行しているということなので、免疫血清診断による鑑別診断が必須である旨を伝えた。諸般の事情により患者血清を中国から国外に持ち出すことができないという制約があるため、診断に必要な抗原を秋田大学医学部寄生虫学教室吉村堅太郎教授から御分与いただき、当方から提供し、温州医学院附属第二医院臨床検査科で抗体価の測定を行ない、結果について当方がコメントを加えて技術的な改良をすることとした。数度にわたるやりとりの結果、温州での好酸球性脳脊髄膜炎の小規模集団発生は、免疫血清学的にも広東住血線虫の感染であることが強く示唆された。この過程で、同医院における寄生虫疾患の免疫血清診断における技術的問題点、および疫学的調査上の問題点が明らかとなって、小職に対し、同医院神経内科主任：王小同氏および同医院院長：陳肖鳴氏より学術研究指導のため招聘したい旨の申し込みがあった。そこで、1999 年度日中医学協力事業日本人研究者派遣助成に応募したところ、訪中が認められ王小同氏を招聘責任者とする小職の同医院訪問が実現したものである。

## 講演・指導内容

6月14日～23日までの都合10日間の訪問日程のうち前後各1日は移動日、また土・日曜が含まれるため、実質的な活動日数は6.5日間であった。活動内容の概略は下記一覧表にまとめた。

日 時	訪 問 先	主要面接者	内 容
6月15日(火)	午前：第2医院神経内科	王小同	好酸球髄膜炎症例検討
	午後：児童医院神経内科	葉秀雲	小児2例の検討
6月16日(水)	午前：第2医院臨床検査科	張信良	免疫診断技術の検討
	午後：臨床講義室	王小同(司会)	<b>粘膜免疫 講演</b>
6月17日(木)	午前：病院長室	陳肖鳴	交流協定について検討
	午後：附属第2病院病理科	王宗敏	好酸球性肺炎について検討
6月18日(金)	午前：温州医学院	徐正	現地の寄生虫病について検討
	午後：同	徐正(司会)	<b>新興再興寄生虫病 講演</b>
6月19日(土)	午前：第2医院神経内科	王小同	疫学的解析について検討
6月21日(月)	午前：第1医院	徐力辛	病院運営について検討
	午後：第1学院開発区実験室		施設見学
6月22日(火)	午前：副病院長室	李昌崇	交流協定について検討
	午後：第2医院	王小同	今後の作業について確認

## 学術講演

学術講演は2回行なった。第1回は6月16日(水)午後、温州医学院附属第2医院セミナールームで行ない、聴衆は約50名であった。中国側からの「臨床の若手医師に対して、基礎研究の重要性を示してほしい」という要請に応じて、「粘膜免疫」というテーマで、粘膜型マスト細胞や杯細胞が粘膜防御に果たす役割と、これらの細胞の分化・増殖の調節機構について、できるだけ平易に英語による解説を行なった(図1)。温州では急速な工業化による大気汚染と関連して小児喘息患者が急増していることから、特にマスト細胞とアレルギーの関連について、熱心な質問を受けた。第2回目の講演は6月18日(金)に「日本における新興・再興人獣共通食品媒介寄生虫病」というタイトルで、温州医学院キャンパスの育英学術館会議室で行なった。この講演には基礎医学研究者のみならず、臨床で感染症の診断・治療に従事する医師や検査技師、さらには、寄生虫学を学習中の3年次学生も加わって、約100名の聴衆が参集した(図3)。学生が英語のヒアリング能力を身につけようと集中していたのが印象的だった。



## 技術指導

今回の訪中の主要な目的は1997年秋に温州市で小規模集団発生した広東住血線虫（中国語では广州管圓綫虫と表記）感染による好酸球性髄膜脳炎の全体像を明らかにすることと、この疾患を含めた寄生虫感染症の免疫診断について技術指導をすることである。

1997年秋の温州市での小規模集団発生については、王小同先生と事前に情報交換をしており、論文のコピーも頂いていたので、ある程度の予備知識は持っているつもりであった。それによると、小規模集団発生の原因は、温州市郊外にあるレストランにおいて、広東住血線虫の中間宿主として有名なリング貝（通称ジャンボタニシ、中国名は福寿螺）を「鹽漬淡水螺」という料理（ナマの貝のむき身の塩漬をスライスしたもの）として饗し、それを食した複数グループの中から患者が発生したということであった。ところが、今回訪問して、関係者に詳細を聞いて見たところ、実際に何グループの何名がそのレストランでリング貝を生食し、何名が発症したかということについては、現在でもまだ正確に把握できていないことが判明した。この点について、王小同先生が中心となって疫学データを至急取りまとめるように、滞在期間中に繰り返し厳しく指導した。

それ以上に今回の訪問で明らかになった大きな問題は、レストランの食事に関係した1997年の集団発生とは無関係に、既に1997年からこの地域において散発的な患者発生が見られているということである。王小同先生が主任を勤めている温州医学院附属第2医院神経内科において、1997年に2名が、また今回の訪問の直前の本年6月上旬には3名が広東住血線虫による好酸球性脳脊髄膜炎と診断されていた。本年発生した3名のうち2名は問題のレストランとは別のレストランでリング貝を生食して感染したと推測されている。2名の患者は現在入院中であり、回診時に患者を見せて頂くことができた（図3）。他の患者については、市場で購入した貝を自宅で調理して食たということで、この地域の貝がかなり広汎に汚染されている可能性が示唆された。

6月15日には児童病院神経内科を訪問し、葉秀雲先生らから、同科で経験した2例についての詳細を伺うことができた。そのうちの1例は1997年の集団発生患者の1人であったが、もう1例（2歳女児）はそれとは無関係に1998年に発症しており、感染源も不明であった。この症例では好酸球増多が著明ではなく、脳脊髄液にも炎症細胞が認められていない。減圧目的で反復して脳脊髄液を採取したところ、その中に広東住血線虫幼虫を合計43匹検出したことで、確定診断に至った症例である。血清や脳脊髄液の抗体は測定していないとのことだったので、それを調べることにより抗体価と幼虫出現の関係が明らかにできるかもしれないということをおアドバイスした。

6月16日には第2医院臨床検査科の張信良先生および若手スタッフと面談した。ここの検査科ではELISAによる抗体測定技術は装置・人員とも完備しており、技術面では何ら問題がなかった。また、最近になって好酸球顆粒蛋白のひとつであるECP (Eosinophil Cationic Protein)の測定系を導入したがその測定意義についてよく理解できていないということであったので、その臨床的意義や活性化好酸球との関係などについて、簡単な講義をおこなった(図4)。しかしながら、本年神経内科に入院した3名の患者についてまだ抗体測定が実施されていなかったため、小職の訪問滞在中に是非とも実施するよう要請した。その結果は6月22日に見せてもらうことができた。アッセイシステムや測定結果そのものにはまったく問題はなかった。けれども、陽性・陰性を判定するためのカットオフ値や、測定の再現性を確認するための陽性・陰性コントロールなどデータ解析に必要な知識が殆ど理解されていなかったため、これらの重要性について測定担当者に指導を行なった。

6月17日には同病院病理科王宗敏主任と面談、主として広東住血線虫感染に伴う好酸球性肺炎の問題について討論した。実際に何枚かの喀痰塗抹標本を見せて頂いたが、好酸球の判定に疑問があり、好酸球同定のために必要な特殊染色などの技術的な指導を行なった。

6月18日には陳肖鳴第2医院院長、徐正 学術研究所長、陳惠生党委書記らの随行のもとに、温州医学院を訪問、寄生虫学教室において潘長旺助教授と懇談した(図5)。潘長旺助教授のグループは広東住血線虫の疫学調査をすすめており、温州の数ヵ所で採取されたリング貝における広東住血線虫幼虫保有率が約70%、鼠での成虫寄生率が約20%と、極めて高率であるというデータおよび関連した論文を提示された。しかしながら、これらの調査は患者居住地と無関係になされていたため、今後は患者発生地を重点的に調査するようにアドバイスした。また、寄生虫学教室でも患者血清を用いたELISAが行なわれていたが、この検体は温州市衛生防疫站から提供されており、患者に関する情報が一切与えられていないために、集団発生との関係や、神経内科患者との関係などが全く不明であった。患者情報を抜きにして抗体価を測定しても貴重な研究データが生きてこないことを説明し、今後その点を改善するように指導した。

## 訪問地の状況・課題

まず第1に今回の訪問全体として感じたことは、温州医学院・附属第2医院・育英児童医院のスタッフの語学力の問題である。日中交流という視点から考えると、日本語と中国語で意志疎通ができれば良いことになる。しかしながら、今回の訪問で、日本語による会話が可能であったのは陳惠生党委書記だけであった。彼は北京外語学院を卒業しており、非常に流暢な日本語を話す。しかしながら、その他のスタッフは全く日本語を理解できないし、話すこともできない。残念なことに、陳惠生氏は医師でもなく、医学研究者でもないために、医学関係の学術用語の内容が理解できないため、個別専門領域での交流では通訳として機能できない。温州医学院では一時期陳惠生氏を助教授として、日本語コースが開設されていたということであるが、現在は実施されていない。したがって、今後も日本語による交流の可能性は期待できないであろう。日中だけでなく広く国際交流という視点からは、英語力が問題である。残念ながら、現時点での温州医学院・附属第2医院・育英児童医院のスタッフの英語力はそれほど高くない。滞在中に会ったスタッフで何とか英語で意志疎通ができたのは、王小同氏を含めて4-5名程度、おそらく全スタッフの1割前後しか英語会話能力がないのではないかと推測される。今回の訪問期間中に全く不自由なく英語で意志疎通ができたのは通訳としてついてくれた金朝偉君だけであった。彼は温州医学院の3年制医師養成コースを卒業した後、上海で英語のトレーニングを受け、現在、温州医学院附属第2医院院長秘書室および外事處（国際交流課に相当）に勤務している。彼のようなポジションは日本にもなく、今後こちらが学ぶ必要がある点だと思われる。現在、温州医学院では米国から教師を招聘して学部学生のみならず、医師の英語教育に非常に力をいれているので、これから卒業してゆく若手医師たちはある程度のレベルの英語力を身につけているものと期待される。

第2に感じたことは、診療・研究に関する先端機器類の充実と比べて、マンパワーが不足していることである。たとえば、寄生虫に対する抗体をELISAで測定する技術はあっても、それをどのように日常診療に生かすか、あるいは、疫学調査をどのように計画立案するか、先端機器を用いて得られたデータをどのように解析するか、といったマンパワーを含めたソフトウェア面の充実が早急に必要であろう。

第3の問題点は情報の閉鎖性である。今回、広東住血線虫の疫学と免疫診断の問題で訪問したのだが、患者情報が附属第2医院神経内科、育英児童医院神経内科、温州医学院寄生虫学教室、そして温州市衛生防疫站と分散しており、結局は10日間の滞在中に今回の流行の全体像をつかむことはできなかった。新興感染症のような問題に立ち向かうためには、病院・医学部・行政の

専門家がいかに迅速に連携して情報交換をおこなうか、ということが最も重要な課題である。今回の訪問ではこの連携の悪さが眼についた。これは、ここだけの問題ではなく、日本でも同じ様な問題を抱えている。今後は共通の問題として対策を考えて行く必要があるだろう。また、今回訪問してみて、同じ様な研究が医学院と附属第2医院とで全く無関係に実施されていることに気がついた。たとえば、ELISAによる患者血清の抗体価測定や、鼠を用いた感染実験などである。双方が情報交換をしてプロジェクトチームを作れば、もっと効率良く研究を推進することが可能であろう。また、せっかく貴重な症例について診断・治療の経験をしながら、その報告が中国の国内雑誌のみに発表されているというのも情報の閉鎖性という点で問題であろう。広東住血線虫は台湾、香港、タイそれに日本など東南アジアの広い範囲で患者が発生している。中国での診断・治療の経験が国際誌に発表されると、それは貴重な財産としてその領域の研究者や医療従事者が共有することができる。今後も益々国際化が進むにつれ、情報の国際化は重要になるであろう。そのためには、情報を海外から収集するだけでなく、自ら発信する姿勢が強く求められる。

最後に、第3の情報の閉鎖性と関連して、相互批判の欠如ということが挙げられる。今回滞在中に、中国の国内医学関係雑誌に掲載された広東住血線虫関連の論文を何編か眼を通す機会を得た。残念ながらこれらの論文は幾つかの興味深いデータを含んでいるにも拘わらず、国際的な学術論文のスタンダードで見た場合にはいずれも不満足あるいは不完全なものであった。また、それぞれの論文の英文抄録も内容以前に英語として問題があるように思われた。国内の雑誌を通して情報を発信することは、国内の医学・科学のレベルの向上のために必須ではあるが、その内容は十分に国際的な批判にも耐えるような高いレベルに維持される必要があるだろう。そのためには、国内の医師・研究者同士が厳しく相互批判する姿勢が必要である。

## 今後の交流計画

今回の訪問期間中、6月17日に陳肖鳴院長、また6月22日に李昌崇副院長と面談し、大学間交流協定の締結について予備会談を行なった。温州医学院は創立40年、宮崎医科大学は創立25年をそれぞれ過ぎたばかりでお互いに歴史の浅い大学であり、ともに温暖多湿で海に面していることから、自然条件も共通するところが多い。そのような環境条件のせいもあって、食品媒介寄生虫病など共通した疾病も見られる。福岡・上海を経由して1日で移動可能という距離の近さも相互交流には適している。今回、帰国に際して、陳肖鳴院長より、宮崎医科大学長宛の交流協定締結へ向けての親書を手渡された。この点についてはできるだけ早い機会に双方で全学的な検討の機会を持ち、前進させる方向で努力することで意見が一致した。

個別の問題である温州での広東住血線虫症の流行については、王小同氏が中心となって責任を持って情報収集にあたり、データが出揃った時点で、FAX・e-mailを利用してデータ解析を共同で行ない、その成果は国際的な英文誌に投稿することで意見の一致をみた。

## おわりに

一通のe-mailから始まった個人的な日中交流が、今回日中医学協会・日本財団の援助を受けたことで、大学間交流にまで発展できる可能性が見えてきた。今回の訪問は学問的には100%満足いくものではなかったにせよ、次の発展へむけて両国のささやかな懸け橋となったことは大きな収穫であったと云える。今回のテーマのように、ある意味ではローカルな小さなトピックに対して日中医学協会・日本財団が助成して下さったことは、この領域で仕事をしている多数の研究者の大きな励みになると思われる。今後も日中医学協会・日本財団がこの様な姿勢を堅持されることを切に願うものである。

日本財団補助金による

1999年度日中医学協力事業報告書

—日本人研究者派遣—

1999年10月13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 竹内義喜 ㊟  
所属機関名 香川医科大学才-解剖学 職名 教授  
所在地 〒761-0792香川県木田郡三木町池戸1250-1 電話 087-891-2086  
受入機関名 中国医科大学脳研究所  
所在地 中国沈阳市和平区北2馬路92  
受入責任者名・役職 呂永利・教授

2. 中国滞在日程 (訪問都市・機関名等主な日程を記入して下さい)

平成11年9月19日 中国沈阳市 中国医科大学脳研究所  
S  
平成11年9月26日 同上

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 アルコールおよびメタアンフェタミン依存症の脳の分子病態学的研究：  
脳血管透過性による解析

訪中研究者氏名 竹内義喜

所属 香川医科大学第一解剖学

役職 教授

## 報告

### <講演・指導内容>

1999年9月23日(13:30-15:30)、中国医科大学脳研究所セミナー室において、“扁桃体の自律機能に関する形態学的研究”と題し講演を行った(添付資料1、2)。一般的に自律機能の上位中枢としては視床下部が最も知られているが、近年、扁桃体の自立機能のうち主として心血管系・呼吸・分泌・腺などの機能に対する神経学的アプローチが大いになされてきた。一方、自律機能異常は薬物依存症でしばしば認められ、とくにアルコール中毒では末梢血管の拡張、脳血流量の増加、腎におけるADH分泌抑制、腎尿細管からの水再吸収低下、さらにアルコールの血中濃度12.0-13.2 g/lでは心停止をきたし、呼吸に関しては頸動脈洞反射と考えられる呼吸抑制(呼吸麻痺)が報告されている。メタアンフェタミン(MAP:覚醒剤)中毒においては交感神経興奮作用として、散瞳・頻脈・不整脈・血圧上昇・発汗あるいは悪寒・悪心・嘔吐・錯乱・失見当・幻覚をきたし循環器系の虚脱・全身痙攣・昏睡を引き起こし、ついには死亡に至る場合もある。以上の事からを背景にし、講演では自律神経機能のうち心血管系に影響を与える迷走神経の起始である迷走神経背側核、延髄カテコールアミンニューロングループ、結合腕傍核、呼吸に対しては孤束核、分泌腺に対しては上唾液核と下唾液核等の脳幹内自律神経関連諸核について扁桃体(中心核)との神経線維連絡および免疫組織化学的研究を中心に話をした。

前述した自律機能異常がアルコールおよびMAP中毒において脳のどの領域の組織学的ダメージにより発症するか、血管透過性の面から検討を行うため、その実験手技、電顕的観察および実験結果の考察に関して指導を行った。実験手技としては、まず、脳組織における神経細胞障害を検索するためグリア細胞の変化をみるGFAP免疫染色を施した(抗

G F A P 抗体：以下、下線部は実験に使用するため購入した薬品を示す)。この染色では主として動物実験(アルコール投与方法とM A P 腹腔内注入法)と反応時の諸注意(一次抗体、二次抗体の濃度、Normal goat serum: NGSの免疫反応制御およびA B C 反応)の説明を行った。さらに、血管透過性の実験としてHorseradish peroxidase (HRP)の投与方法およびHRPの電顕組織への応用(E P O N 樹脂包埋)に関して詳細な説明を加えた。とくにこの中ではHRP反応産物の安定性について、Diaminobenzidineと Tetramethyl benzidine法使用時におけるアルコール脱水とアセトン脱水の適用の違い、また、モリブデン酸アンモニウム溶液使用に関して実際、実験を通じて結果を比較対照し説明を行った。

G F A P 陽性所見は海馬、大脳皮質、扁桃体、レンズ核等で見られたが、これらの領域の内、とくに海馬ではHRP法による血管透過性領域とも一致したため、まずこの領域をE P O N 樹脂包埋し電顕的観察に付した(添付資料3、4、5、6)。

実験結果およびその考察として、脳組織は海馬外側部(C A 1 外側~C A 2 ~C A 3 外側)を対象としHRPを大腿静脈内に注入し、30分後に動物を灌流固定し当該領域を電顕的観察に付した。電顕所見ではHRP反応産物は高電子密度の顆粒として認められ、血管内皮細胞内には大小さまざまな反応産物が存在した(添付資料7、8)。また、このような所見を示す血管の近傍には、同様、HRP反応産物を含むグリア細胞が特徴的に存在した(添付資料9、10)。なお、血管内皮細胞間の細胞間隙にはHRP反応産物は全く認められなかった。以上の所見を総合し考察を行うと、海馬外側部においては静脈内に注入されたHRP酵素が血管内皮細胞に取り込まれ、さらにこの細胞を通過し脳実質内にあるグリア細胞まで達することが明らかになった。これはアルコールおよびM A P 中毒における海馬領域では、正常では血液脳関門(Blood-brain-barrier: BBB)が働いている場所でBBBが破壊されていることを示すものである。BBB破壊は、例えば覚醒剤中毒患者における逆耐性現象(過敏反応性)の発症を血管透過性亢進という一側面から説明する科学的根拠の提供ができるものと考えられる。今回の実験では血管透過性が亢進している場所として海馬以外に大脳皮質、扁桃体、レンズ核があげられているが、これらの領域における詳細な観察はなされておらず、今後、電子顕微鏡等を駆使し中国の脳研究所の呂永利教授をはじめスタッフの方々と脳組織の全体像を明らかにする必要がある。



## <訪問地の状況・課題>

訪問先である中国医科大学脳研究所では若いスタッフも多く、精力的に研究を行っていた。近年、我が国をはじめ欧米に留学する研究者が増え非常に喜ばしい状況になりつつあるが、反面、留学先でそのまま現地のスタッフとなり帰国しない人も多く中国本国の研究レベルをアップするための人材不足に悩んでいる側面もあった。

G F A PおよびH R P組織標本の作製については中国医科大学脳研究所においても従来から行われていることであり、非常に良好に実施された。電顕的観察については主としてH R P反応産物の同定についてであり、脳研究所のスタッフに対しては、無染色下（ウラニール染色のみ）でどのように高電子密度の反応産物が観察されるかという点をとくに強調して説明した。

課題については何と言っても研究テーマである血管透過性の亢進領域において、①どのような物質が脳組織内に入るか ②そのB B B破壊域と侵入した物質によりヒトで見られるような多彩な臨床症状発現（アルコール中毒においては中枢神経系機能抑制、運動障害、呼吸・循環器系、腎、消化器・肝に対する障害。また、M A P中毒においては気分高揚、誇大妄想、過覚醒、不眠、多弁、精神運動興奮等の精神状態や散瞳、頻脈、不整脈、血圧上昇、発汗および頭・肩・四肢のヒョレア様不随意運動、幻覚、失見当の身体症状や抑うつ、疲労感、睡眠障害等の離脱症状）と密接な関連性が確立されるかどうかである。この点の確立は臨床上非常に重要なものであり、将来アルコールおよび覚醒剤中毒症（含：離脱症状）の治療にも大いに貢献するものと期待できる。今回は血管透過性を海馬の領域で証明したにすぎず、今後、中国医科大学脳研究所のスタッフとの共同研究が益々必要とされる。

## <今後の交流計画>

本研究は最終的にはアルコールや覚醒剤依存症患者の多彩な臨床症状を血管透過性の面から分子病態学的に解明を行うことであり、そのため相当長期にわたる共同研究期間が必要とされる。概略ではあるが、将来5年間程度を目安にして以下の順で交流計画を考えている。

- 1 アルコールおよびM A P依存症モデル実験動物の脳組織における血管透過性領域の微細構造の解明 (中国医科大学脳研究所)

- 2 血管透過性亢進にともなう易浸透性物質の同定およびその物質による脳組織への障害  
(香川医科大学第一解剖学、中国医科大学脳研究所)
- 3 モデル実験動物において血管透過性抑制物質の検索 (香川医科大学第一解剖学)
- 4 血管透過性抑制物質投与時のモデル実験動物の病態学的変化  
(香川医科大学第一解剖学、中国医科大学脳研究所)

<謝辞>

この度、日中医学協会のご援助により中国医科大学脳研究所において多大な研究協力および成果をあげることができました。ここに貴協会理事長 中島 章様はじめ関係各位の皆様のご協力に対し深く感謝申し上げます。



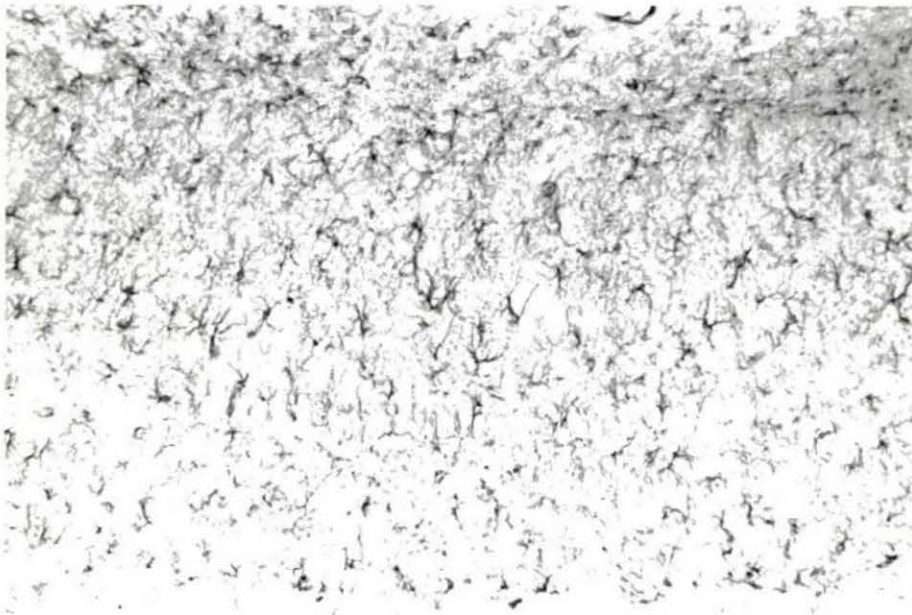
資料 3  
海馬外側における血管透過性亢進領域  
(右側海馬、黒色部)



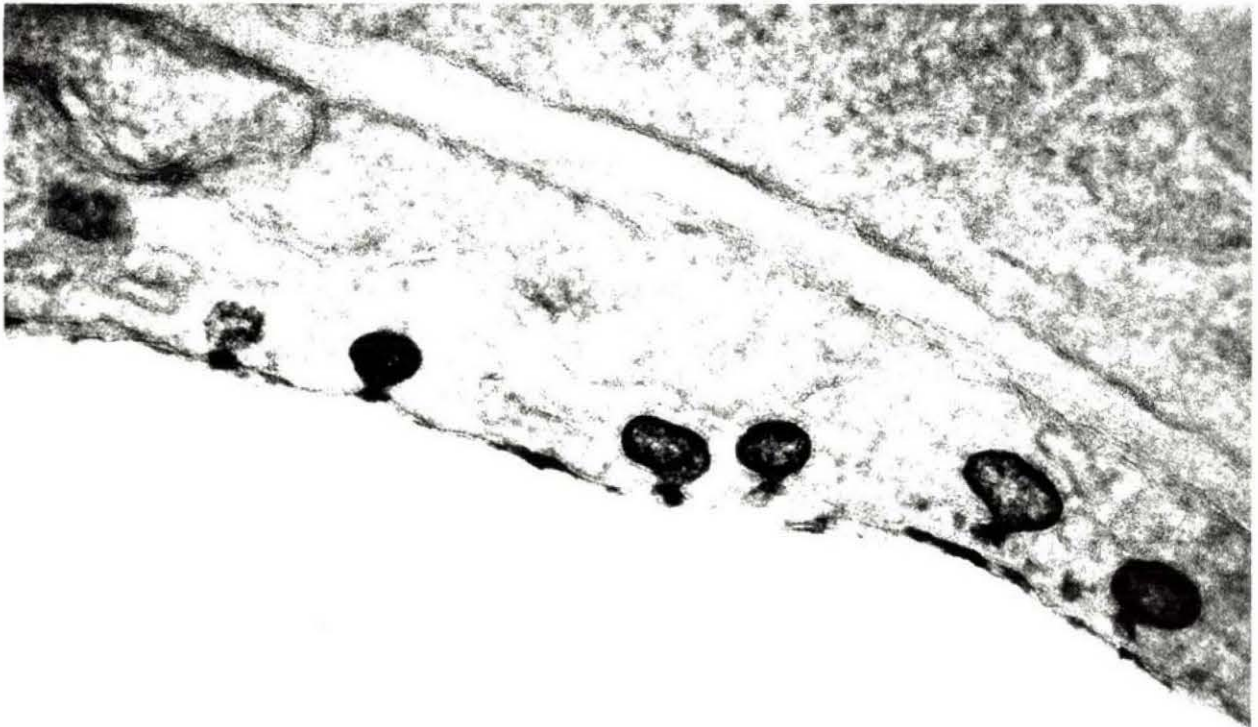
資料 4  
海馬外側における血管透過性亢進領域  
(左側海馬、黒色部)



資料 5  
海馬領域におけるGFAP免疫反応陽性所見



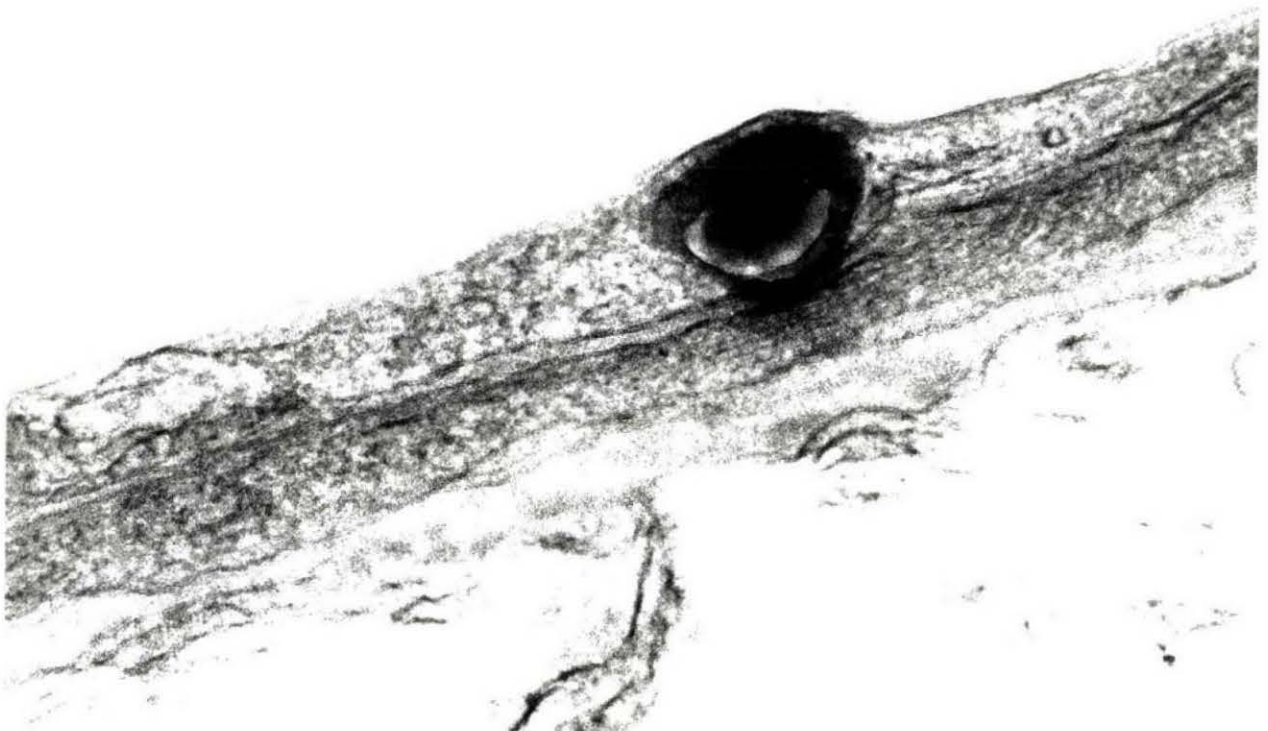
資料 6  
海馬領域におけるGFAP陽性グリア細胞増殖所見



資料 7

海馬外側の血管透過性亢進領域における電子顕微鏡所見

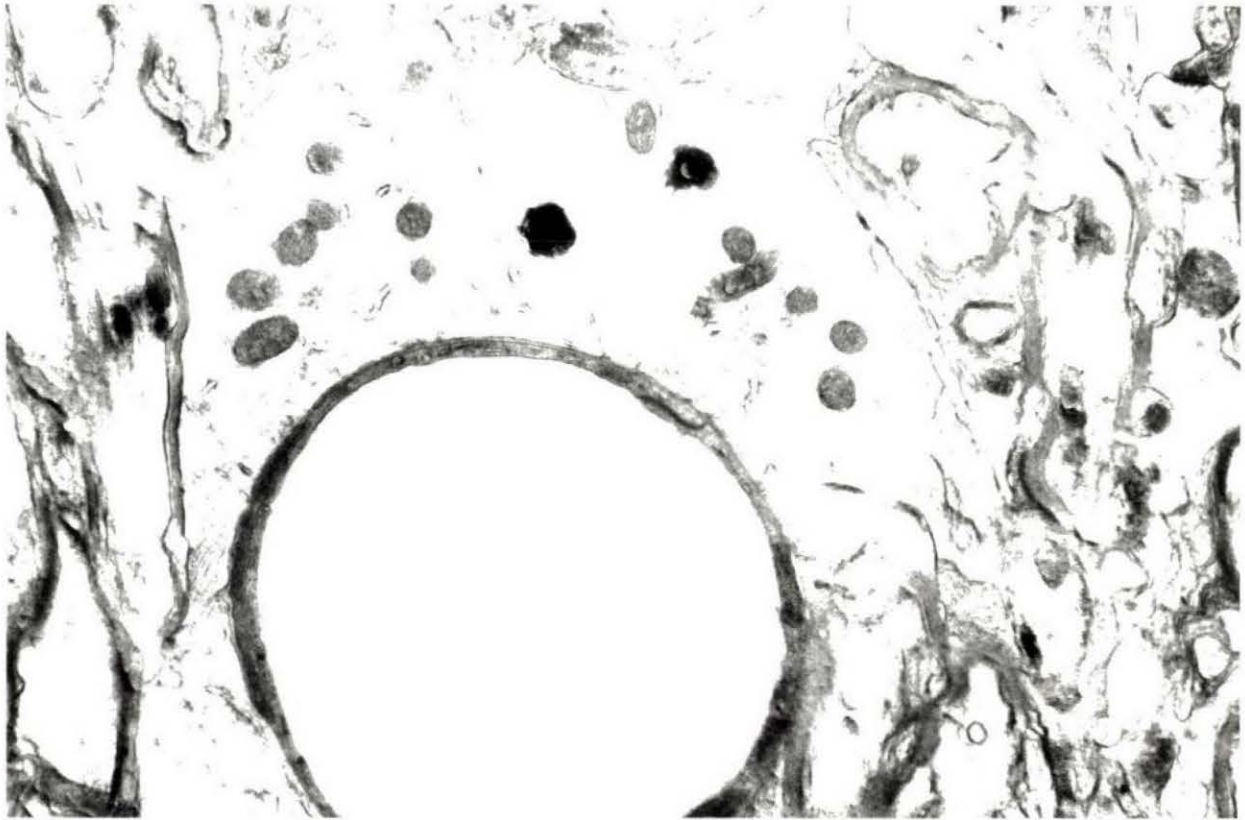
血管内皮細胞に取り込まれているHRP反応産物は高電子密度の顆粒として認められる



資料 8

海馬外側の血管透過性亢進領域における電子顕微鏡所見

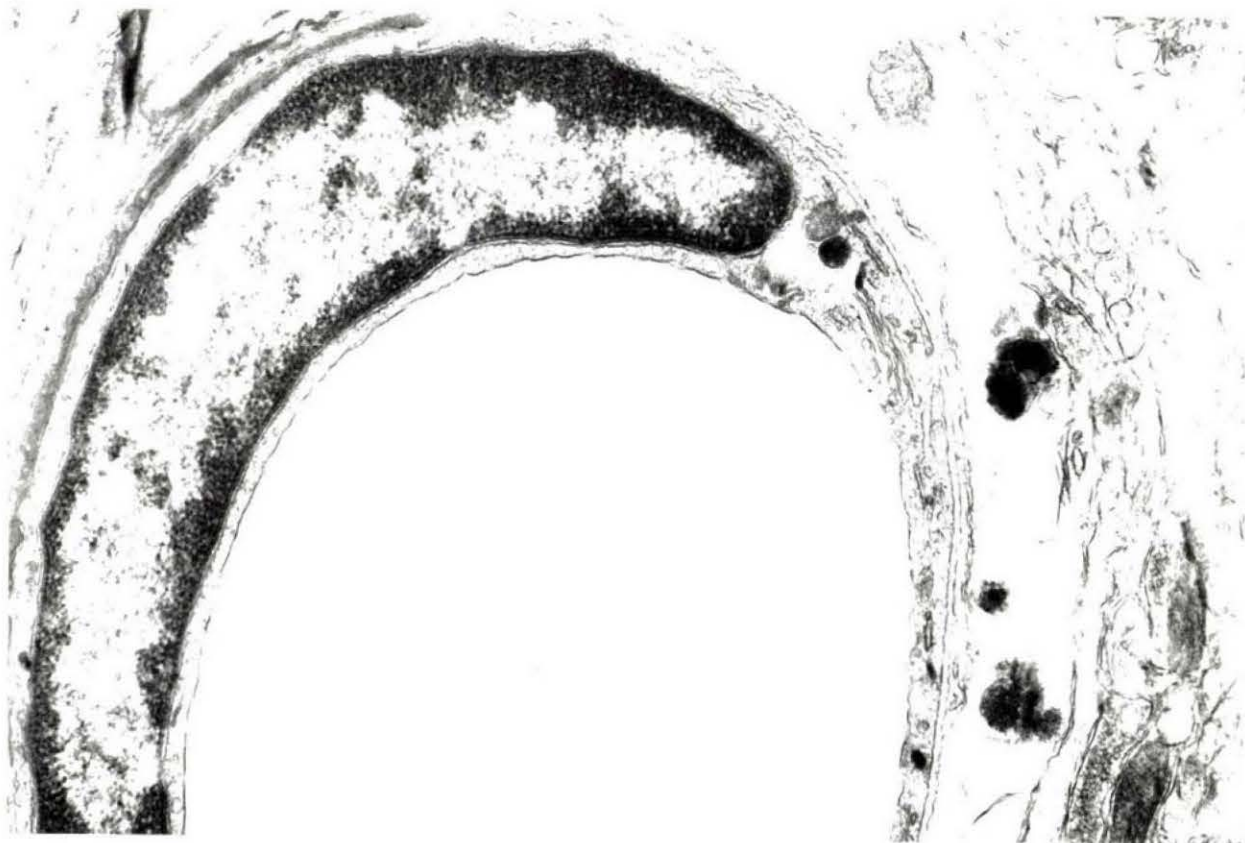
血管内皮細胞に取り込まれているHRP反応産物



資料 9

海馬外側の血管透過性亢進領域における電子顕微鏡所見

HRP反応産物は血管周囲のグリア細胞に取り込まれている



資料 10

海馬外側の血管透過性亢進領域における電子顕微鏡所見

HRP反応産物は血管内皮細胞と隣接するグリア細胞に取り込まれている

日本財団補助金による

1999年度日中医学協力事業報告書


—日本人研究者派遣—

2000年3月24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 道 健一   
所属機関名 昭和大学 職名 教授  
所在地 〒145-8515 大田区北千束2-1-1 電話 03-3787-1151  
受入機関名 中国医科大学第二臨床学院 2X.22J  
所在地 中国遼寧省沈陽市和平区三好街26号  
受入責任者名・役職 孫 建 社 病院長

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)

1999年8月5日(木) (南雲、川和、長谷川、道) 東京発、大連乗り継ぎ瀋陽へ、瀋陽泊  
8月6日(金) (南雲、川和、長谷川、道) 中国医科大学第2病院で打ち合わせおよび講演会  
8月7日(土) (南雲、川和、長谷川、道) 中国医科大学第2病院で打ち合わせ、瀋陽観光、  
8月8日(日) (南雲、川和、長谷川、道) 鞍山発、大連へ  
(南雲、川和、道) 午後：大連着、  
(長谷川) 大連発、関西空港着、  
(大塚) 羽田発、関西空港着、大連着  
8月9日(月)：(南雲、川和、道、大塚) 大連医科大学で講演会  
8月10日(火) (南雲、川和、道、大塚) 大連、旅順観光  
8月11日(水) (南雲、川和、道、大塚) 大連発、成田へ

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:日中協力歯科診療センター設立と歯科医療技術の指導

訪中研究者氏名:道 健一、南雲 正男、川和 忠治、長谷川 紘司、大塚 純正

所属:昭和大学歯学部

役職:教授(大塚のみ助教授)

## 報告

### 1、概要

今回の訪中においては日本の優れた歯科治療技術を提供することによって、中国の歯科医師を教育し、中国における歯科医療技術の向上を図ることを主な目的とし、同時にこの計画を通じて日中両国の学術交流を一層深め、促進することを目的としていた。目的地は沈陽の中国医科大学第二臨床医学院であるが、経由地の大連の大連医科大学においても交流を図ることとした。

事前に中国医科大学第二臨床医学院口腔外科主任劉維賢氏および大連医科大学口腔外科主任潘巨利氏と緊密に連絡を取り合い、日程、訪問先、学術交流の内容などを決定した。

主な内容は以下の通りである。

- ①中国医科大学第二臨床医学院と昭和大学との間での「日中技術協力歯科治療センター成立協議書」の調印
- ②中国医科大学第二医学院からの客座教授の証の授与
- ③中国医科大学第二医学院における学術講演会
- ④大連医科大学における学術講演会
- ⑤中国医科大学臨床第二医学院、同口腔外科、大連医科大学、同歯学部、同口腔外科、大連医科大学付属第一医院との交流会

訪中団は昭和大学歯科病院院長：南雲正男（口腔外科学）、副院長：川和忠治（歯科補綴学）、歯科保存学教授：長谷川紘司、歯科矯正学助教授：大塚純正、口腔外科教授：道健一で構成した。日程表にも示したように、これらのうち南雲正男、川和忠治、道健一の3名は全日程に、長谷川紘司は前半、大塚純正は後半の日程に参加した。

### 2、計画の実施状況

- 1)中国医科大学第二臨床医学院と昭和大学との間での「日中技術協力歯科治療センター成立協議書」の調印

8月6日午後4時30分から中国医科大学第二臨床医学院会議室において中国医科大学第二臨床医学院孫建純病院長代理の李副病院長と昭和大学歯科病院南雲正男病院長の間で「日中技術協力歯科治療センター成立協議書」の調印を行なった。協議書の内容は別紙の通りである。

- 2)中国医科大学第二臨床医学院からの客座教授の証授与式

8月6日午後5時から中国医科大学第二臨床医学院孫建純病院長代理の李副病院長から昭



和大学の南雲正男病院長、川和忠治副院長、長谷川紘司教授、道健一教授にそれぞれ客員教授の証が授与された。一部のコピーを別に示す。

### 3) 中国医科大学第二臨床医学院における講演会

8月6日午前8時~12時に中国医科大学第二臨床医学院講堂において昭和大学の南雲正男病院長、川和忠治副院長、長谷川紘司教授、道健一教授による講演会が行なわれた。東北地方各地の病院から約100名の参加者があり、講演の後、熱心な質疑応答が行なわれた。

講演の内容は以下の通りである。

- ①南雲正男病院長（口腔外科）：高齢者口腔癌の臨床病理学的特徴
- ②川和忠治副院長（補綴科）：歯のQOLを考えた修復
- ③長谷川紘司教授（歯周病科）：歯周治療に必要な新しい知識
- ④道 健一教授（口腔外科）：インプラント成功のための要件（難症例への対応）

### 4) 大連医科大学における講演会

8月9日午前9時~午後3時まで大連医科大学講堂において昭和大学の南雲正男病院長、川和忠治副院長、大塚純正助教授、道健一教授による講演会が行なわれた。東北地方各地の病院から約50名の参加者があり、講演の後、熱心な質疑応答が行なわれた。

講演の内容は以下の通りである。

- ①南雲正男病院長（口腔外科）：高齢者口腔癌の臨床病理学的特徴
- ②川和忠治副院長（補綴科）：歯のQOLを考えた修復
- ③大塚純正助教授（矯正歯科）：口蓋裂の矯正
- ④道 健一教授（口腔外科）：インプラント成功のための要件（難症例への対応）

### 5) 中国医科大学臨床第二医学院、同口腔外科、大連医科大学、同歯学部、同口腔外科、大連医科大学付属第一医院との交流会

①8月5日夜：中国医科大学臨床第二医学院口腔外科による歓迎会：管前主任、劉主任ほか約10名参加。

②8月6日夜：中国医科大学臨床第二医学院病院長招宴、李副院長ほか約10名参加。

③8月7日夜：中国医科大学臨床第二医学院口腔外科関係者による歓送会：管前主任、劉主任ほか約20名参加。

④8月8日夜：大連医科大学付属第一医院病院長招宴：姜副院長、趙副院長ほか約20名参加。

⑤8月9日夜：大連医科大学歯学部長招宴：朱歯学部長ほか約20名参加。

⑥8月10日夜：大連医科大学学長招宴：趙副学長ほか約20名参加。

⑦8月10日昼：大連医科大学口腔外科関係者との懇親会：潘主任ほか約10名参加。

### 3、事業の成果・今後の交流計画

1) 「日中技術協力歯科治療センター成立協議書」の調印によって今後、約5年間にわたる協力関係が樹立された。この協定に沿って年に複数回の訪中団が昭和大学歯科病院の中で組織され、技術援助が行なわれる予定である。この事業によって中国医科大学臨床第二医学院の歯科医療の向上が期待される。さらに、その機会を通じて両病院の親交はさらに密になり、参加者の両国に対する理解が深まるものと期待される。

2) 講演会は沈陽と大連において開催されたが、日本の歯科界を代表する4名の演者による4時間にわたる講演と質疑応答はこの地区の歯科医にとって大きく裨益することと期待され

る。参加者の中には日本に留学した研究者が多く、日本語の講演がそのまま理解できるものも多かったが、各専門領域の日本語に精通した者を選んで通訳してもらったことによって、さらに、成果が上がったものと思われる。

講演後の参加者の感想では東北地方において歯科の専門各領域の教授が揃って講演をしたことはなかったもので、画期的であったとのことで概ね好評であった。今後も訪中団が組織され技術援助と同時に講演会も継続する予定である。すでに、今年春には中国衛生部の予算で3名の講演者が招待されている。

3) 交流会が毎日行なわれたが、その間に実際の協力体制についての打ち合わせが行なわれ、さらには新規の協力体制、例えば、大連医科大学に対する歯科補綴、歯科技工、歯科インプラントの技術指導についての提案がなされ、今後、前向きに検討することとなった。

#### 4、訪問地の状況・課題

中国における歯科医療の現状は未だ不十分であるように感じられた。しかし、沈陽と大連とでは事情が少し異なっていた。

沈陽においては日本に留学して帰国した歯科医師が多く、特に、それが口腔外科に集中していた。従って、口腔外科については臨床の技術面、特に手術では日本と対等あるいはそれ以上のものもある。しかし、口腔外科でも研究面および臨床のリハビリ関係の知識、能力はまだ不十分でこれからも援助の必要があると感じられた。口腔外科以外の一般歯科については技術、知識、材料の面で未だ不十分で、その上、留学経験者がいないために語学のハンディキャップがあり、交流が難しい。今後、人材育成を含めて援助する必要があると感じられた。

大連においては歯学部長が中心となって計画的に専門各領域の代表者に日本留学の機会を与えている。未だ、日本留学中、あるいは、帰国直後で準備中の分野が多く未完成であるが、数年後には人材が揃い発展するものと期待される。しかし、現状でも、主要なスタッフは日本語が十分に使えるので知識、技術の援助は比較的容易に行なえるし、その成果が期待されると思われた。ただし、パラデンタルのスタッフは未だ未熟であり、今後は技工士の育成と材料、器材などの面での援助も必要であると考えられる。

大連市では開業歯科医が急増し、開業医の設備、技術は一定の水準に達していた。開業歯科医は経済的余裕もあり、設備も充実しているので、口腔外科以外の一般歯科を目指す者にとっては大学勤務よりもはるかに魅力的のようである。このままでは日本に留学しても帰国後に開業を選ぶ者が増えそうで心配であった。留学生には指導者として大学で次の世代を育成してもらえることを期待したいが、そのためには大学の環境を充実する必要がある。中国における政策も重要であるが日本からの援助の方法にも一考を加えなければならぬと感じた。

# 日中技術協力歯科治療センター設立協議書

協力機関：日本側：昭和大学歯科病院

(主として口腔外科、補綴科、矯正科、保存科)

責任者：南雲 正男 病院長

実務担当：第一口腔外科、道 健一 教授

中国側：中国医科大学第二附属病院(中国遼寧省沈陽市)

責任者：孫 建純 病院長

実務担当：口腔科、劉 維賢 主任

目的：日本の優れた歯科治療技術を提供することによって、中国の歯科医師を教育し、中国における歯科医療技術の向上を図ることを主旨とし、この計画を通じて、日中両国の学術交流を一層深め、促進することを目的とする。

主な協力内容：

臨床：(1)インプラントの臨床に関する手術、補綴および保存などの新しい治療法。

(2)口唇・口蓋裂患者に対する手術、矯正、補綴および機能訓練などの新しい治療法。

(3)顎変形症患者に対する矯正、手術および機能訓練などの治療法。

(4)う蝕による歯髄疾患に対する新しい治療法。

(5)歯周病に対する新しい治療法。

(6)陶材焼付鑄造冠などによる冠橋義歯および歯の欠損に対する床義歯等についての補綴技術。

(7)その他：口腔外科、補綴、矯正および保存など、各専門分野における新しい治療法。

研究：

双方の長所を十分に生かして、共同研究を行う。

双方は各専門領域で毎年1～2件程度の共同研究が施行できるように努力する。

研究費については双方が各自の分担する部分の費用を負担する。

研究結果については共同発表するか、あるいは双方とも自国で発表する。

具体的な方法については研究内容、研究分担に応じて、その都度協議して決める。

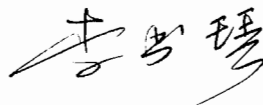
人材養成：日本側は中国における指導のほかに、可能な範囲内で中国からの短期（3～6か月）の研修生を受け入れる。  
中国側は日本側の希望に応じて臨床研修生の中国における研修を受け入れる。

実施方法：日本側は3か月おきに、各診療科の歯科医師1～2名を中国側へ派遣する。  
滞在期間は7～10日とし、中国滞在中、臨床診療に従事しながら、中国の歯科医師の臨床指導を行う。

費用分担：日本側は日本人歯科医師の国際間の旅費を負担する。  
中国側は日本人歯科医師の中国滞在中の全費用を負担する

実施期間：とりあえず、5年間とする。5年経過時に再検討し、双方の話し合いで延長の有無を決定する。


中国側：中国医科大学第二附属病院院長



孫建純

日本側：昭和大学歯科病院院長

南雲正男



日本財団補助金による  
1999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—

2000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

研究者氏名 張 馨 (Zhang Shen)  
研究機関 京都大学 研究指導者 本田弘士 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 内線 3252

研究テーマ 初代培養網膜神経細胞を用いてグルタミン酸毒性に対するイフェンprodilの保護作用

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)

ARVO (The Association for Research in Vision and Ophthalmology)

内容: Protective Effects of Vitamin B6 Against Glutamate-Induced Neurotoxicity in Cultured Retinal Neurons.

日本眼科学会総会

内容: ラット網膜初代培養神経細胞におけるグルタミン酸毒性に対するビタミンB6の保護作用

(2) 学会誌等に発表した論文  有 ・ 無 (雑誌名・論文名)  
予定

雑誌名: «Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology»

論文名: Protective Effects of Ifenprodil Against Glutamate-Induced Neurotoxicity in Cultured Retinal Neurons

### 3. 今後の研究計画

アポトーシス関連因子:bcl-2のノックアウトマウスとbcl-2を過剰発現するトランスジェニックマウスより網膜神経細胞初代培養を行い、低酸素負荷あるいはグルタミン酸曝露などの条件下での生存率を対照正常マウスと比較し、bcl-2の網膜神経細胞死における役割を明らかにする。特に、NOが網膜神経細胞を障害するのに単独では障害性はなく活性酸素を必要とすることから、bcl-2がミトコンドリア等の脂質膜の活性酸素生成系への抗酸化作用を有する事より、bcl-2類縁制御遺伝子の分子機構を明らかにする上でNOおよび活性酸素との関係の解明を行いたい。

### 4. 研究指導者の意見

現在の研究のテーマはラット初代培養網膜神経細胞を用いたグルタミン酸毒性のメカニズムの解明及びその毒性に対する保護物質の検討です。このテーマに関する研究を始めて、早くも多くの重要な発見を次々に見いだしております。その成果は世界的にも有名な英語雑誌に投稿を予定しております。また、同時に臨床面でも精力的に研究活動を行っており、京都大学同窓会学会でも共同演者として発表をしておりました。このように研究面、臨床面ともに短期間で多くの成果を上げており、今後はその発表のために数多くの学会に参加していただく予定です。申請者は日本語の勉強も熱心で、日常会話に関しては全く問題なく、近々、自身での日本語による発表も行ってもらいます。将来、母国である中国に帰国された時には、当研究室での成果あるいは日本での滞在の経験を生かし、眼科領域の研究及び臨床の発展あるいは日中友好に大きく貢献されるものと確信しております。

研究指導者氏名

和田 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。

# **Protective Effects of Ifenprodil Against Glutamate-Induced Neurotoxicity in Cultured Retinal Neurons**

Shen Zhang, Satoshi Kashii, Hiroki Yasuyoshi, Masashi Kikuchi, Yoshihito Honda,  
Katsuyuki Kaneda, Sati Sato, Akinori Akaike

S. Zhang • S. Kashii • H. Yasuyoshi • M. Kikuchi • Y. Honda  
Department of Ophthalmology and Visual Sciences, Graduate  
School of Medicine, Kyoto University, Kyoto 606-8507, Japan.

K. Kaneda • S. Sato • A. Akaike  
Department of Pharmacology, Graduate School of Pharmaceutical  
Sciences, Kyoto University, Kyoto 606-8501, Japan

Correspondence: Satoshi Kashii, M.D.,Ph.D.,  
Department of Ophthalmology and Visual Sciences, Graduate Scholl of  
Medicine, Kyoto University, Kyoto 606-8507, Japan.  
Phone: 81-75-751-3248, Fax: 81-75-494-3555

e-mail: [skashii@kuhp.kyoto-u.ac.jp](mailto:skashii@kuhp.kyoto-u.ac.jp)

## **Abstract**

•**Purpose:** To examine the effects of ifenprodil on glutamate induced neurotoxicity in the cultured retinal neurons. •**Methods:** Primary cultures obtained from the fetal rat retinas (gestation day 17-19) were used for the experiment. Neurotoxicity effects on retinal cultures were quantitatively assessed by the trypan blue exclusion method. The cells were exposed briefly (10 min) to excitatory amino acids (EAA, 1 mM) and then were incubated for 1 hour in an EAA-free medium. Ifenprodil (10 mM) was added during the 10-min exposure to EAA and subsequent 60-min incubation in an EAA-free medium. •**Results:** Ifenprodil dose-dependently prevented cell death induced by glutamate or NMDA, but did not affect that induced by kainate. The protective effects of ifenprodil against glutamate neurotoxicity were significantly reduced by spermidine, a polyamine modulatory site agonist, but not by glycine, a strychnine-insensitive glycine site agonist. •**Conclusion:** These results suggest that ifenprodil protected retinal neurons against glutamate neurotoxicity by selective antagonism of the polyamine modulatory site of the NMDA receptor complex..



## Introduction

Recent receptor cloning studies have shown that the N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor is a heteromer composed of the two subunit families NMDA receptor NR1, and NR2 subunits, A-D[12]. Studies of NMDA receptor subtypes in heterologous expression systems have established that the kinetic and pharmacological properties of NMDA receptors are determined by their subunit composition. Consequently, regional and developmental changes in NMDA subunit composition have been correlated with alterations in the properties of NMDA receptors in the brain[4]. In cortical neurons, NR2B subunits were reported to predominate during embryonic and early neonatal days, whereas expression of NR2A subunits became detectable during the early postnatal period and increased through the second postnatal week[13]. These developmental changes in the subunit compositions were suggested partly by findings on the developmental alterations in the sensitivity of the NMDA receptors to ifenprodil[14,20,22]. Ifenprodil, originally considered to act as a competitive antagonist at a polyamine binding site of the NMDA receptor, has been shown to act at a distinct site which has an allosteric effect on the polyamine site and is now regarded as the NR2B subunit-selective NMDA receptor antagonist[3,8].

Developmental differences in antagonism of NMDA toxicity by ifenprodil were first indicated in an *ex vivo* preparation of embryonic chick retina[23,24]. However, these studies did not clarify precisely how ifenprodil interacts with NMDA receptors to rescue retinal neurons. To determine the mechanism of protective action of ifenprodil against glutamate neurotoxicity, neuronal cell

culture is required where exposure and ionic conditions can be precisely controlled and multiple drug manipulations are possible at once. According to a study using cultured hippocampal cells, it is suggested that neither polyamine nor glycine sites were linked to the neuroprotective effects of ifenprodil, but instead they were ascribed to antagonism of the NMDA receptors[17]. As we have been studying glutamate neurotoxicity in cultured retinal neurons, we decided to study the effects of ifenprodil on glutamate-induced neurotoxicity using our well-characterized culture system of embryonic retinal neurons. We report that ifenprodil protects the embryonic retinal neurons by acting as an antagonist at the polyamine modulatory site of the NMDA receptor complex.

## **Materials and Methods**

### **Materials**

Primary cultures were obtained from the retinas of fetal rats(16 to 19 days gestation) and were used for the experiments. Drug-induced neurotoxicity was assessed as described previously[6,7,9]. In brief, retinal tissues were dissociated mechanically and single-cell suspensions were plated on plastic coverslips ( $1.2$  to  $1.8 \times 10^6$  cells/dish). Cultures were incubated in Eagle's minimal essential medium (EMEM, Eagle's salts, Nissui, Tokyo) supplemented with 10% heat-inactivated fetal calf serum (1 ~ 8 days after plating), or 10% heat-inactivated horse serum (1~9 days after plating) or 10% heat-inactivated horse serum (10~14 days after plating), containing 2mM glutamine, 11mM glucose (total), 24mM sodium bicarbonate, and 10mM HEPES. After a 6-day culture, nonneuronal cells were removed by the addition of  $10^{-5}$ M cytosine arabinoside. In this study we used only those cultures maintained for 10 to 12 days invitro and

only isolated cells. Clusters of cells were excluded from the results because cells located in clusters could not be used for histologic experiments. A previous immunocytochemical study showed that these isolated cells consisted mainly of amacrine cells[7]. All animals were treated in accordance with the ARVO Resolution on the Use of Animals in Research. The Principles of laboratory animal care (NIH publication no. 85-23, revised 1985), the OPRR Public Health Service Policy on the Humane Care and Use of Laboratory Animals (revised 1986) and the U.S. Animal Welfare Act, as amended, were followed, as well as specific national laws (the Japanese Law on the Protection and Care of Animals, revised 1983, and the current version of the German Law on the Protection of Animals).

### Drug Application

Ifenprodil was dissolved in the incubation medium immediately before the experiments to yield final concentrations of  $10^{-8}$  to  $10^{-5}$  M.  $Mg^{++}$ -free Eagles's solution was used to determine NMDA-induced cytotoxicity. Cultures were exposed for 10 minutes to glutamate followed by postincubation in glutamate-free medium for more than 1 hour. The cell viability was decreased. Ifenprodil was added for 10min before, during or after the 10 min exposure to glutamate (1mM). The drug induced maximal protection when added during glutamate exposure for 10 min and to glutamate-free medium for 1 hour. Therefore, in the current study, ifenprodil and MK-801 were added during glutamate exposure for 10min and to glutamate-free medium for 1 hour.

### Measurement of Neurotoxicity

The neurotoxin effects of glutamate were assessed quantitatively by the trypan blue exclusion method[7,9,10]. All experiments were performed in Eagle's solution at 37°C. After the completion of drug treatment, cell cultures were stained with 1.5% trypan blue solution at room temperature for 10 minutes and then were fixed with isotonic formaldehyde solution( PH 7.0, 2°C to 4°C), The fixed cultures were rinsed with physiological saline and examined by Hoffman modulation microscopy at x400. More than 200 cells on each of 5 coverslips were counted randomly to determine the viability of the cell culture. We counted on the order of 10% to 20% of the total cells grown on each coverslip, because the overall density of the cultures was 50 to 100 cells / mm<sup>2</sup>. Viability of culture was calculated as the ratio of the number of unstained cells (viable cells) to the total number of cells counted (viable cells plus nonviable cells). The significance of data was determined by Dunnett's two-tailed test.

The following drugs were used: ifenprodil was purchased from Merrill-Dow Japan (Osaka, Japan); kainate and monosodium L-glutamate from Nacalai Tesque (Kyoto, Japan); MK-801 from Research Biochemicals Co. (St. Louis, MO).

## Results

Figure 1 shows a typical example of ifenprodil-induced protection against glutamate neurotoxicity. The cultured retinal neurons were exposed to glutamate (1mM) for 10min and then incubated in normal solution for 60min. The viability did not change immediately after 10 min exposure to glutamate. However, further incubation in glutamate-free media for 60 min significantly increased the number of cells stained by trypan blue which reflect non-viable cells (fig.1B). Addition of ifenprodil (10µM) to both the media with and without glutamate used for the following 60 min incubation markedly reduced the number of cells stained by trypan

blue (fig.1C). Figure 2 summarizes the dose-response relationship of the protective effects of ifenprodil against glutamate-induced neurotoxicity. Ifenprodil at concentrations of 0.01 to 10  $\mu$ M restored cell viability after a brief exposure to glutamate in a dose-dependent manner.

Figure 3 demonstrates the time dependence of the protective effects of ifenprodil against glutamate neurotoxicity in cultured retinal neurons. Ifenprodil (10 $\mu$ M) were added to the incubation media for 10min before, during or after the 10min exposure to glutamate(1mM). Maximal protection was obtained when ifenprodil was added during glutamate exposure (Fig. 3.c and f). Although subsequent incubation in glutamate-free media with ifenprodil (Fig. 3.c) appeared to yield slightly greater protection than such incubation without ifenprodil (Fig. 3.f), there was no significant difference. Protective effects were also noted, when ifenprodil was applied immediately before or after glutamate exposure (Fig. 3. b and d). Ifenprodil did not affect the cell death induced by glutamate, when it was added 10min before or 10min after glutamate exposure (Fig. 3 a and e). These findings indicate that the simultaneous application of ifenprodil to glutamate exposure is critical for protective action against glutamate neurotoxicity.

To determine whether the ifenprodil-induced protection against glutamate neurotoxicity was due to its action on NMDA receptors, we further examined the effects of ifenprodil or MK-801 on the neurotoxicity induced by selective agonists, NMDA or kainate. NMDA was added to Mg<sup>++</sup>-free Eagle's medium for 10min then the cultures were subsequently incubated in normal media for 60min. Both ifenprodil and MK-801 prevented NMDA-induced neurotoxicity (Fig. 4), but neither agent affected cell death induced by kainate (Fig. 5). Thus, it seems likely that the protective action of ifenprodil against glutamate neurotoxicity involves modulation of the NMDA-receptor complex.

To determine the specificity of the antagonists of polyamine and glycine modulatory sites of NMDA receptors, we examined the effects of spermidine, a typical endogenous polyamine, and glycine on ifenprodil-induced protection. First, we examined the effects of spermidine and glycine on glutamate neurotoxicity, as it is known that NMDA receptors are positively modulated by polyamines and glycine. Simultaneous application of spermidine or glycine appeared to slightly enhance cell death induced by glutamate in comparison to that induced by glutamate alone, though there was no statistically significant difference (Fig. 6A). As in Fig. 6B, the protective action of ifenprodil was markedly inhibited by the simultaneous application of spermidine but not by that of glycine, indicating that ifenprodil prevented glutamate neurotoxicity by its selective interaction with the polyamine modulatory sites of the NMDA receptor.

## **Discussion**

Glutamate interacts with both NMDA and non-NMDA receptors. The activity of NMDA receptors is influenced by a number of endogenous substances. Such compounds include divalent cations, glycine and polyamines. Previously we demonstrated that divalent cations such as  $Mg^{++}$  and  $Zn^{++}$  reduced NMDA receptor-gated currents in cultured retinal neurons[9]. In contrast to inorganic substances, glycine and polyamines potentiate the effects of NMDA agonists. Endogenous polyamines such as spermidine selectively bind to the polyamine modulatory site linked to the NMDA receptor complex then potentiate glutamate actions on NMDA receptors. Ifenprodil is a new class of noncompetitive NMDA antagonists[19]. It has been claimed that ifenprodil blocks NMDA receptors by antagonizing the positive modulatory actions that polyamines such as spermine and spermidine have on NMDA receptor activation[2,16,18,21]. Other studies have suggested that

ifenprodil may act in vivo as an antagonist of the NMDA-coupled strychnine-insensitive glycine receptor-mediated response[15].

In our cultured retinal neurons, NMDA receptors are the predominant root of glutamate neurotoxicity, since MK-801, a selective NMDA receptor antagonist, markedly inhibited cell death induced by glutamate, as previously reported[6,7,9,10,11]. The present study demonstrates that ifenprodil significantly protected cultured retinal neurons from neurotoxicity induced not only by glutamate but by NMDA as well. Moreover, ifenprodil inhibited NMDA-induced neurotoxicity to a similar degree seen with simultaneous application of MK-801 and NMDA. However, ifenprodil failed to inhibit kainate-induced neurotoxicity. The lack of protection with ifenprodil from kainate neurotoxicity indicates the selectivity of ifenprodil for NMDA receptor subtypes among the ionotropic glutamate receptors. Therefore, it is suggested in the cultured retinal neurons that the protective effect of ifenprodil against glutamate neurotoxicity occurs by its inhibiting action against NMDA receptors.

Ifenprodil, one of the NMDA receptor antagonists, has been reported to inhibit neurotoxicity induced by glutamate and NMDA on hippocampal cultures[5]. However, there have been some controversies present as to the mechanism of its protection through NMDA receptors. Shalaby and his associates reported that protective action of ifenprodil on cultured hippocampal cells against glutamate neurotoxicity took place by inhibition of the NMDA receptor but not by interacting with the polyamine or glycine sites in contrast to those reporting the inhibitory site present with the polyamine site[17]. Previously Tamura et al[19] demonstrated in rat cultured cortical neurons that ifenprodil protects against glutamate-induced neurotoxicity by selective inhibition of the polyamine site of the NMDA receptors. Interpretation of the discrepancy between these studies is difficult, inasmuch as different brain regions were used. There may be differences between the cerebral cortex and

hippocampus in the function of NMDA receptors and the mechanisms underlying glutamate-induced cell death. As we have been studying glutamate neurotoxicity in the cultured retinal neurons[6,7,9,10,11], further study was undertaken to address this issue using our well characterized cultured retinal neurons.

Ifenprodil has been shown to inhibit NMDA receptors by inhibiting the positive modulatory polyamine sites[1], or blocking strychnine-insensitive glycine sites[15]. In order to elucidate which sites of NMDA receptors, i.e. the polyamine and/or glycine modulatory sites, were involved in the neuroprotective actions of ifenprodil on retinal neurons, we studied the effects of simultaneous applications of either spermidine, a typical polyamine, or glycine on ifenprodil-induced protection against glutamate-induced neurotoxicity. Spermidine significantly reversed the ifenprodil-induced protection against glutamate. By contrast, the simultaneous application of spermidine with glutamate appeared to enhance the cell loss induced by glutamate (1mM), although the difference was not significant. The cell viability did not change by the application of spermidine alone. Ifenprodil was initially considered a competitive antagonist at the polyamine binding site of the NMDA receptors, but recent studies on cortical neurons suggest that ifenprodil and polyamines bind to distinct sites and that there is an allosteric interaction between the ifenprodil and polyamines binding sites[8]. However, the neuroprotective effects of ifenprodil appeared not to be caused by the interaction with the strychnine-insensitive glycine binding site of the NMDA receptor, since exogenous glycine did not reverse the blockade of glutamate neurotoxicity. The simultaneous application of glycine with glutamate did not affect glutamate neurotoxicity, although there appeared to be a slight tendency for the potentiation of cell loss when spermidine was added with glutamate. These results suggest that ifenprodil protected retinal neurons against glutamate



neurotoxicity by its inhibitory action on the polyamine modulatory site of the NMDA receptor.

**Acknowledgements** The work described here was supported by the Japan China Medical Association Foundation.

## References

1. Carter C, Benavides L, Legendre P, Vincent I, Noel F, Thuret F, Lloyd K, Arbilla S, Zivkovic B, MacKenzie E, Scatton B, Langer S (1988) Ifenprodil and SL 82.0715 as cerebral anti-ischemic agents. II. Evidence for N-methyl-D-aspartate receptor antagonist properties. *J Pharmacol Exp Ther* 247:1222-1232
2. Carter C, Lloyd K, Zivkovic B, Scatton B (1990) Ifenprodil and SL 82.0715 as cerebral anti-ischemic agents. III. Evidence for antagonistic effects at the polyamine modulatory site within the N-Methyl-D-aspartate receptor complex. *J Pharmacol Exp Ther* 253:475-482
3. Gallagher MJ, Huang H, Pritchett DB, Lynch DR (1996) Interaction between ifenprodil and the NR2B subunit of the N-methyl-D-aspartate receptor. *J Biol Chem* 271:9603-9611
4. Gottmann K, Mehrle A, Gisselmann G, Hatt H (1997) Presynaptic control of subunit composition of NMDA receptors mediating synaptic plasticity. *J Neurosci* 17:2766-2774
5. Ismail A, Shalaby, Bert L, Chenard, Mary A (1991) Prochniak and Todd W. Butler. Neuroprotective Effects of the N-Methyl-D-Aspartate Receptor Antagonists Ifenprodil and SL-82,0715 on Hippocampal Cells in Culture. *J Pharmacol Exp Ther* 260:925-932

6. Kashii S, Mandai M, Kikuchi M, et al (1996) Dual action of nitric oxide in N-methyl-D-aspartate receptor-mediated neurotoxicity in the cultured retinal neurons. *Brain Res* 711:93-101
7. Kashii S, Takahashi M, Mandai M, et al (1994) Protective action of dopamine against glutamate neurotoxicity in the retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 35:685-695
8. Kew JN, Kemp JA (1998) An allosteric interaction between the NMDA receptor polyamine and ifenprodil sites in rat cultured cortical neurones. *J Physiol (Lond)* 512:17-28
9. Kikuchi M, Kashii S, Honda Y, et al (1995) Protective action of zinc against glutamate neurotoxicity in cultured retinal neurons. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 36:2048-2053
10. Kikuchi M, Kashii S, Honda Y, Tamura Y, Kaneda K, Akaike A (1997) Protective effects of methylcobalamin, a vitamin B12 analog, against glutamate-induced neurotoxicity in retinal cell culture. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 38:848-54
11. Kikuchi M, Kashii S, Mandai M, Yasuyoshi H, Honda Y, et al (1998) Protective effects of FK506 against glutamate-induced neurotoxicity in retinal cell culture. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 39:1227-1232
12. Laube B, Hirai H, Sturgess M, Betz H, Kuhse J (1997) Molecular determinants of agonist discrimination by NMDA receptor subunits: analysis of the glutamate binding site on the NR2B subunit. *Neuron* 18:493-503
13. Portera-Cailliau C, Price DL, Martin LJ (1996) N-methyl-D-aspartate receptor proteins NR2A and NR2B are differentially distributed in the developing rat central nervous system as revealed by subunit-specific antibodies. *J Neurochem* 66:692-700
14. Priestley R, Ochu E, Macaulay AJ (1996) Time-dependent changes in NMDA receptor expression in neurones cultured from rat brain. *Mol Brain Res* 40:271-274

15. Rao T, Cler J, Emmett M, Mick S, Iyengar S, Contreras P, Wood P (1989) Ifenprodil and SL-82.0715 antagonize N-methyl-D-aspartate (NMDA)-coupled glycine receptor responses in vivo. *Eur J Pharmacol* 168:129-131
16. Reynolds I, Miller R (1989) Ifenprodil is a novel type of N-methyl-D-aspartate receptor antagonist: Interaction with polyamines. *Mol Pharmacol* 36: 758-765
17. Shalaby I A, Chenard B, Prochniak M A, Butler T W (1992) Neuroprotective effects of the N-methyl-D-aspartate receptor antagonists ifenprodil and SL-82.0715 on hippocampal cells in culture. *J Pharmacol Exp Ther* 260:925-932
18. Sprosen T, Woodruff G (1990) Polyamines potentiate NMDA induced whole cell currents in cultured striatal neurons. *Eur J Pharmacol* 179: 477-478
19. Tamura Y, Sato Y, Yokota T, et al (1993) Ifenprodil prevents glutamate cytotoxicity via polyamine modulatory sites of N-Methyl-D-Aspartate receptors in cultured cortical neurons. *J. Pharmacology Exp Ther* 265: 1017-1025
20. Williams K (1993) Ifenprodil discriminates subtypes of the N-methyl D-aspartate receptor: selectivity and mechanisms at recombinant heteromeric receptors. *Mol Pharmacol* 44:851-859
21. Williams K, Romano C, Molinoff P (1989) Effects of polyamines on the binding of [<sup>3</sup>H]MK-801 to the N-methyl-D-aspartate receptor: Pharmacological evidence for the existence of a polyamine recognition site. *Mol Pharmacol* 36: 575-581
22. Williams K, Russell SL, Shen YM, Molinoff PB (1993) Developmental switch in the expression of NMDA receptors occur in vivo and in vitro. *Neuron* 10:267-278
23. Zeevalk GD, Nicklas WJ (1990) Action of the anti-ischemic agent ifenprodil on N-methyl-D-aspartate and kainate-mediated excitotoxicity. *Brain Res* 522;135-139

24. Zeevalk GD, Nicklas WJ (1992) Developmental differences in antagonism of NMDA toxicity by the polyamine site antagonist ifenprodil. *Dev Brain Res* 65:147-155

### Legends for Figures

**Figure 1:** Photomicrographs showing the effect of chronic application of ifenprodil on glutamate-induced neurotoxicity. All cultures were photographed after trypan blue staining followed by formaldehyde solution fixation using Hoffman modulation microscopy. Cells stained with trypan blue dye were regarded as nonviable. (A) Control (nontreated cells). Cells were stained without application of glutamate. (B) Cells were treated with glutamate (1mM), followed by a 1-hour incubation with glutamate-free medium. Marked cell death occurred. (C) Ifenprodil was applied during glutamate incubation for 10 minutes and glutamate-free incubation for 1 hour. Cell death was reduced markedly.

**Figure 2.** The dose response relationship of the protective action of ifenprodil against glutamate-induced neurotoxicity. Application of ifenprodil showed protective effects against glutamate(1mM) neurotoxicity in a dose-dependent manner at concentrations between  $10^{-8}$  M and  $10^{-5}$  (\*\*  $P < 0.01$  versus the black column).

**Figure 3.** Time dependence of the protective effect of ifenprodil against glutamate-induced neurotoxicity. (A) Methods of drug

application. Cells were treated with 1mM glutamate, followed by 1 hour postincubation in glutamate-free medium. Time dependence of the protective effects of ifenprodil against glutamate cytotoxicity. Closed and open columns represent the periods of exposure to glutamate (1mM) and ifenprodil( $10^{-5}$  M). In (c) and (f), ifenprodil was added during glutamate exposure with subsequent incubation in glutamate-free media with ifenprodil (f) or without ifenprodil (c). Ifenprodil was applied immediately before (b) or after glutamate exposure(d). Ifenprodil was added 10 min before (a) or 10 min after glutamate exposure(e). (B) Potentiation of ifenprodil against glutamate-induced neurotoxicity. Ifenprodil inhibited glutamate-induced cell death (\*\*  $P < 0.01$  versus the black column) and ifenprodil ( $10^{-5}$ M) showed a maximal protective effect against glutamate neurotoxicity when applied as in (f).

**Figure 4.** Effect of ifenprodil and MK-801 against NMDA-induced neurotoxicity. NMDA (1mM) was added to  $Mg^{++}$ -free Eagle's medium, then ifenprodil or MK-801 were applied with NMDA for 10-min and added to NMDA-free medium for 1 hour. In this treatment, ifenprodil ( $10^{-5}$ M) or MK-801 inhibited NMDA-induced cell death(\*\*  $P < 0.01$  versus the black column).

**Figure 5.** The effects of ifenprodil and MK-801 against kainate-induced neurotoxicity. When ifenprodil( $10^{-5}$ M) or MK-801( $10^{-5}$ M) was administered during kainate exposure(10 minutes) and subsequent incubation in kainate-free medium for 1 hour, neither agent showed significant protection against kainate-induced neurotoxicity.

**Figure 6.** Effects of spermidine and glycine on ifenprodil-induced neuroprotection. (A) Spermidine ( $10^{-4}$ M) and glycine ( $10^{-4}$ M) in the

culture with and without glutamate (1mM) neurotoxicity. Spermidine did not show any effect when added in the presence or absence of glutamate ( $p > 0.05$ ). (B) Ifenprodil was administered during glutamate (1mM) exposure (10minutes) and during glutamate-free incubation (1 hour). Protective effects of ifenprodil against glutamate neurotoxicity were inhibited by simultaneous application with spermidine but not with glycine.

日本財団補助金による

1999 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—

2000 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 馬 靈  
研究機関 東邦大学大学院医学研究科 研究指導者 山口 恵三 職名 教授  
所在地 〒1438540 東京都大田区大森西 5-21-16 電話 03-3762-4151 内線 2391

研究テーマ 基質特異性拡張型  $\beta$ -ラクタマーゼの分子生物学的解析

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)

第 114 回東邦医学会総会

老人病院で発生した院内感染の原因菌であるセフトキシム耐性大腸菌の性質

第 114 回東邦医学会総会

各種  $\beta$ -ラクタマーゼ遺伝子の迅速検出法の確立

(2) 学会誌等に発表した論文  有 ・ 無 (雑誌名・論文名)

雑誌名 感染症 論文名 ESBL 産生菌  
(総説)

雑誌名 日本化学療法学雑誌 論文名 各種  $\beta$ -ラクタマーゼ遺伝子の  
迅速検出法の確立  
(原著)

雑誌名 ル デパール 論文名 VitekII による薬剤感受性試験成績  
およびそのコメントに関する検討  
(原著)

雑誌名 日本化学療法学雑誌 論文名 塩酸セフェピムと各種  $\beta$ -ラクタム系  
抗菌薬に対する感受性および耐性菌  
出現状況に関する Etest を用いた検討  
(原著)

### 3. 今後の研究計画

現在、大学院の最終学年であり、大学院終了後もこのテーマに関する研究を続けていくことが可能かどうかは分からない。ただ、可能であれば4年間続けてきたテーマでもあり、さらに臨床に役立つような研究にかかわって行きたいと思っている。

### 4. 研究指導者の意見

馬 靈氏は、1996年4月に東邦大学大学院医学研究科に入学し、一貫して薬剤耐性菌の耐性機構の解明、特に $\beta$ -ラクタマーゼによる耐性菌に関する研究を続けてきました。その主な成果は、1998年にアメリカ細菌学会が出版している Antimicrobial Agents and Chemotherapy に発表し、さらに、英国の細菌学会が出版している Journal of Antimicrobial and Chemotherapy に投稿中の論文もあります。日本語での論文も6報、1997年から今までに発表しています。また、基質特異性拡張型 $\beta$ -ラクタマーゼに関する総説も2報共著ではありますが掲載されております。一方では、彼女の有している分子生物学的手技を生かして、感染症の遺伝子診断や院内感染の分子疫学的検討など公表はしていないものの、数多くの病院から寄せられた臨床材料を対象に検査を行ってきました。馬氏がこの4年間に日本で果たしてきた臨床微生物学に対する貢献度は極めて高いものと考えられます。したがって、大学院を修了した後も母国でこれまでの研究を継続できるような職種に就く事を希望しております。

今回の報告書を書くに当たり、数ある彼女の業績の中でも、今後の臨床細菌学の分野で汎用される可能性が極めて高い喀痰中の $\beta$ -ラクタマーゼ活性の測定方法に関する検討を報告することにいたしました。この報告は、共著ではあるものの極めて独創性の高い論文であるとの評価も得ております。

1年間、馬氏に対してご援助下さいました財団法人日中医学協会に深謝申し上げます。

研究指導者氏名 山本 隆三



### 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

喀痰中 $\beta$ -ラクタマーゼ活性の測定方法の確立に関する検討

## 研究者氏名

馬 壘

中国での所属・役職

日本での指導者氏名・所属・役職

山口 恵三・東邦大学大学院医学研究科・教授

## 要旨

喀痰から直接 $\beta$ -ラクタマーゼを検出することを目的に、*Pseudomonas aeruginosa*が分離された喀痰を対象とした $\beta$ -ラクタマーゼ活性の測定方法を確立した。喀痰からの抽出操作は30分以内に終了した。*P. aeruginosa*が $10^6$  cfu/mL存在する喀痰からの抽出液を $100\mu\text{M}$ のニトロセフィン溶液に添加して5分間 $37^\circ\text{C}$ で経時的に吸光度を測定したところ、きわめて良好な直線関係得ることができた。一方、 $10^6$  cfu/mLの*Enterococcus faecalis*が存在する検体からは $\beta$ -ラクタマーゼ活性は認められなかった。次ぎに検出された菌量が異なる複数の検体を用いて検出限界に関する検討を行った。その結果、*P. aeruginosa*が $10^5$  cfu/mL以上の菌量が存在する検体からは $\beta$ -ラクタマーゼ活性が検出された。また、ペニシリナーゼを産生する*Escherichia coli*が $10^7$  cfu/mL存在する喀痰の $K_m$ 値は $127\mu\text{M}$ と大きな値を示し、セファロsporリナーゼを産生する*P. aeruginosa*の値とは大きく異なった。以上の結果から、今回検討した方法は迅速、簡便且つ高感度で検体から $\beta$ -ラクタマーゼを検出することが可能な方法であった。

## KEY WORDS

喀痰、 $\beta$ -ラクタマーゼ、ニトロセフィン、UV法

## はじめに

臨床では感染症の原因菌が同定される以前に経験的な抗菌薬の投与がなされる場合が多いのが現実である。感染症の原因菌と考えられる微生物の耐性因子を検体から直接検出することが可能になれば、菌の分離、同定あるいは薬剤感受性検査の結果が出る以前に、よりの確な抗菌薬の投与が可能になると考えられる。これまでも喀痰からの $\beta$ -ラクタマーゼ活性の測定に関しては、高速液体クロマトグラフィーを用いる方法が報告されているが(1)、操作が煩雑なことと結果が出るまでに時間を要することなどの理由から一般的な方法とはなっていない。

今回は検体から直接、簡便且つ迅速に $\beta$ -ラクタマーゼを酵素学的方法で検出することを目的として、現在最も高感度な $\beta$ -ラクタマーゼ検出試薬として知られているニトロセフィンを基質として用いる検出方法の確立を試みた。

## 材料および方法

### 1. 対象とした喀痰

呼吸器疾患の患者由来の喀痰で*Pseudomonas aeruginosa*が分離された9検体を対象とした。さらに、典型的なペニシリナーゼを産生する*Escherichia coli*が分離された喀痰も使用した。なお、喀痰から分離された菌種はVitek(日本ビオメリュー、東京)を用いて同定した。

## 2. 喀痰からのβ-ラクタマーゼの抽出方法

検体の処理は、喀痰200μLを1.5 mLのマイクロチューブに移し、1/15Mリン酸緩衝液(pH7.0) 200μLを加えてホモジナイザーでホモジネート後、1000,000 G、4°Cにて15分間超遠心機を用いて遠心し、その上清を酵素液とした(図1)。

## 3. 分離された菌体からのβ-ラクタマーゼの抽出方法

各菌株をL-brothで一夜培養した5mLの菌液を3,500 rpm、4°C、15分間遠心して集菌した。その沈査を50mMのリン酸緩衝液(pH7.4)で洗浄し、100μLの同緩衝液に再浮遊した後凍結融解を5回繰り返した。その後、1000,000 G、4°C、30分間の超遠心を行い、得られた上清を粗酵素液とした(図2)。

## 4. β-ラクタマーゼ活性の測定方法

酵素反応はBeckman自記吸光度計DU640恒温槽付きを用いて3mLの基質となるニトロセフィン溶液に試料となる酵素液50μLを添加して、波長482nm、反応温度37°Cの条件(2)でUV法(3)により行った(表1)。

実験に先立ち100μMの濃度のニトロセフィン溶液に*P. aeruginosa*が $10^6$  cfu/mL検出された喀痰からの抽出液、*E. faecalis*が $10^6$  cfu/mL検出された喀痰からの抽出液を50μL添加して5分間のタイムスキャンを実施し、酵素との反応性を確認した。

基質となるニトロセフインは10μM、25μMおよび100μMの濃度の溶液を使用した。酵素活性の算出は、反応開始後1分間に生じるOD値の変化をもとに次式から行った。

$Activity = y / 1.59 \times 0.3 \times v$  ( $v = 3.05 / 0.05 \times 2$ ,  $y = \Delta OD / \text{min}$ ) さらに、酵素学的パラメータは、Michaelis-Menten plotを行い、その座標をから算出した(4)。なお、実験で得られた値は、Lineweaver-Burk plot、Eadie-Hofstee plot、Hanes-Woolf plotの各プロットも同時に行い、実験値の信頼性を確認した(4)。

## 5. 薬剤感受性試験

薬剤感受性試験は日本化学療法学会が定めた微量液体希釈法に準じて測定した。力価が明確なpiperacillin(富山科学工業株式会社、東京)、imipenem(萬有製薬株式会社、東京)、cefsulodine(武田薬品工業株式会社、大阪)、cefoperazone(ファイザー製薬株式会社、東京)、ceftazidime(日本グラクソ株式会社、東京)、ceftiprome(ブリストル・マイヤーズ・スクイブ株式会社、東京)およびaztreonam(エーザイ株式会社、東京)の各抗菌薬を対象薬剤とした。なお、培地はMuller-Hinton broth(Difco、USA)を使用し、接種菌量は約 $5 \times 10^5$ となるように設定した。

## 結 果

### 1. ニトロセフィンと喀痰からの抽出液との反応性

*P. aeruginosa*が $10^6$  cfu/mL検出された喀痰からの抽出液50μLを用い、ニトロセフィン溶液と5分間、30秒毎に吸光度を測定しながら反応させた場合、きわめて良好な直線関係が得られた。同様に*E. faecalis*が喀痰から抽出された溶液のβ-ラクタマーゼ活性 $10^6$  cfu/mL検出された喀痰からの抽出液を用いて5分間、経時的に吸光度を測定したが吸光度の変化は認められなかった(図3)。

### 2. 喀痰中β-ラクタマーゼの活性測定

喀痰中からの抽出操作は30分以内に終了した。今回は*P. aeruginosa*が $10^4 \sim 10^7$  cfu/mL分離された喀痰を対象に検討を加えた。*P. aeruginosa*が分離された喀痰からは $10^4$  cfu/mLの菌量

でも十分に $\beta$ -ラクタマーゼ活性の測定が可能であり、喀痰中に存在する $\beta$ -ラクタマーゼの酵素学的パラメータをMichaelis-Menten plotから算出することが可能であった(表2)。さらに、そのデータをLineweaver-Burk plot、Eadie-Hofstee plot、Hanes-Woolf plotの各plotでも検討したが、いずれのplotにもよくフィットした。

### 3. 喀痰から分離された菌株の薬剤感受性成績

表3に各喀痰から分離された*P. aeruginosa*の各抗菌薬に対する薬剤感受性試験の成績を示した。I株を除く菌株のimipenemに対するMICは $4\mu\text{g/mL}$ 以上の値を示した。B株、C株およびF株のaztreonamに対するMIC値はそれぞれ、 $4\mu\text{g/mL}$ 、 $8\mu\text{g/mL}$ 、 $2\mu\text{g/mL}$ であったが他の菌株は $16\mu\text{g/mL}$ 以上の値を示した。

### 4. 喀痰から分離された菌株の $\beta$ -ラクタマーゼ活性

喀痰から分離された菌株の $\beta$ -ラクタマーゼ活性を表4に示した。C株およびE株の $V_{\text{max}}$ 値が各々 $0.495\mu\text{M/sec}$ 、 $0.673\mu\text{M/sec}$ と高い値を示した。一方、A株およびF株から抽出した $\beta$ -ラクタマーゼ活性は各々 $0.012\mu\text{M/sec}$ 、 $0.011\mu\text{M/sec}$ と低い値を示した。

## 考 察

現在まで、喀痰中 $\beta$ -ラクタマーゼ活性の測定は、あらかじめ酵素と基質を反応させその分解産物を高速液体クロマトグラフィーで定量して求める方法が報告されている(1)。しかし、この方法は検体の処理が極めて煩雑であること、迅速に検査が行えないこと、酵素学的パラメータを算出することが困難なことなどの理由から一般的な方法とはなり得ないと考えられる。

今回検討した $\beta$ -ラクタマーゼを検出する方法は、簡便、迅速且つ高感度な方法であった。さらに、酵素学的パラメータを算出することも可能であり、 $V_{\text{max}}$ および $K_m$ 値に対する解析を加えれば $\beta$ -ラクタマーゼの型の推定も可能であるものと考えられた。しかし、現在問題となっている基質特異性拡張型 $\beta$ -ラクタマーゼ(5)や複数の型の $\beta$ -ラクタマーゼが一つの菌体内に存在する場合(6)などのデータの解析は今後の課題である。しかし、阻害剤との併用とその時の酵素学的パラメータの詳細な解析を加えれば、喀痰中に存在する $\beta$ -ラクタマーゼの型もある程度判別することが可能となるものと思われた。

喀痰中 $\beta$ -ラクタマーゼの活性と分離された菌種のMICとの間にいくつか食い違う結果が認められた。この結果が乖離した原因として、MIC測定をされる菌株は、喀痰中に存在する多くの菌株の中に存在する限られた菌株であることが挙げられる。したがって、MICを測定された菌株の値は、全ての菌株の代表値ではありえないと考えられる。

一方、今回報告した方法の問題点としては、検体を採取した時点で抗菌薬が投与されている場合が挙げられる。すなわち、 $\beta$ -ラクタマーゼと投与された $\beta$ -ラクタム系抗菌薬が結合している場合、正確な酵素学的パラメータを得ることはできないと考えられる。したがって、この方法を実施する場合に最も重要なことは、患者に対して投与されている抗菌薬に関する情報を得ることであると考えられた。

今後は喀痰以外の検体中に存在する $\beta$ -ラクタマーゼの活性測定に関する検討を加えるとともに、様々な型の $\beta$ -ラクタマーゼの酵素学的パラメータに関するデータを収集し、更なる応用の可能性について検討を加える予定である。

文 献

1. 齋藤 厚、草野展周、普久原 浩、副島林造、中浜 力、二木芳人、橋口浩二、山口恵三、館田一博、石井良和、大野 章：呼吸器感染症におけるclindamycinの臨床効果の検討—clindamycinの $\beta$ -lactamase産生抑制作用を中心に—。1993. *Chemotherapy* 41:1232-1245.
2. O'Callaghan, C. H., A. Morris, S. M. Kirby, and A. H. Shingler. 1973. Novel method for detection of  $\beta$ -lactamases by using a chromogenic cephalexin substrate. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1:283-288.
3. Waley, S. G. 1974. A spectrophotometric assay of  $\beta$ -lactamase action on penicillins. *Biochem. J.* 139:789-790.
4. Cleland, W. W. 1977. Determining the mechanism of enzyme-catalyzed reactions by kinetic studies. *Adv. Enzymol.* 45. 273- 387.
5. Bush, K., G. A. Jacoby, and A. A. Medeiros. 1995. A functional classification scheme for  $\beta$ -lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 39(6):1211-1233.
6. Ma, L., Y. Ishii, M. Ishiguro, H. Matsuzawa, and K. Yamaguchi. 1998. Cloning and sequencing of the gene encoding Toho-2, a class A  $\beta$ -lactamase preferentially inhibited by tazobactam. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 42(5):1181-1186.

塩酸セフェピムと各種β-ラクタム系抗菌薬に対する Etest を用いた薬剤感受性および耐性菌の出現状況に関する検討

石井良和、馬 リン、山口恵三  
東邦大学医学部 微生物学教室

## 要 旨

cefepime (CFPM) をはじめとするβ-ラクタム系抗菌薬間での感受性および耐性菌の出現状況を把握するために全国レベルでの疫学調査を行った。今回の検討には Etest を使用した。Etest を使用するにあたり、精度管理株を用いて再現性および施設間の誤差に関して調査を行ったが、再現性ならびに施設間の誤差とも少なく、ほぼ満足できる結果が得られた。今回はグラム陽性菌として oxacillin 感性の *Staphylococcus aureus* および oxacillin 感性の coagulase negative staphylococcus を対象としたが、ceftazidime (CAZ) を除いて耐性株の出現は認められなかった。*Escherichia coli* には piperacillin (PIPC) に対する耐性菌が 14.6% 存在したが、そのほかの抗菌薬に対する耐性菌は 0.5% であった。*Klebsiella spp.* および *Citrobacter freundii* に対しては、CFPM および imipenem (IPM) には耐性株が認められなかった。*Enterobacter spp.* には IPM が 0.5%、CFPM が 1.0% の割合で、*Serratia spp.* に対しては IPM が 4.5%、CFPM が 5.0% の割合でそれぞれ耐性株が認められたが他の抗菌薬に対する耐性菌の出現率と比較して小さい値を示していた。Indole-positive *Proteus* の場合、CFPM は CAZ と同様に耐性菌の出現率が低く 0.5% であった。*Pseudomonas aeruginosa* に対しては今回対象とした薬剤の中では CFPM の感受性が最も優れており、耐性率も 9.1% であった。一方、CAZ は 11.4%、IPM は 22.4% の値を示した。以上の結果から、CFPM に対する耐性菌の出現は、今回対象とした他のβ-ラクタム系抗菌薬と比較すると低いものと考えられた。

## 序 文

現在まで様々な抗菌薬が開発され、臨床応用されているがそれらの抗菌薬に対する耐性菌が必ず出現してきた。第三世代、第四世代セフェム系抗菌薬あるいはカルバペネム系抗菌薬もその例外ではなかった。第三世代、第四世代セフェム系抗菌薬は腸内細菌科の菌種や *Pseudomonas aeruginosa* をはじめとするグラム陰性菌が産生するβ-ラクタマーゼに安定な抗菌薬としてドラッグデザインされている。ところが、これらβ-ラクタマーゼに安定な抗菌薬を分解する菌株が 1980 年代に欧米を中心に出現してきた 1)。これらの菌株は基質特異性拡張型β-ラクタマーゼと呼ばれ、クラス A に属するβ-ラクタマーゼが点変異を起こして、第三世代、第四世代セフェム系抗菌薬まで分解することが可能となったのである 2)。カルバペネム系抗菌薬は、通常はこれら基質特異性拡張型β-ラクタマーゼにも安定であるが、BlaIMP と呼ばれているクラス B に属するβ-ラクタマーゼに効率良く分解される 3)。

このクラス B $\beta$ -ラクタマーゼは、モノバクナム系抗菌薬を除く多くの $\beta$ -ラクタム系抗菌薬を分解することができる。この BlaIMP は、本邦で多く見出されており、欧米での報告は極めて少ないのが現状である。カルバペネム系抗菌薬に対しては当初より、*P. aeruginosa* においてその透過口である D2 ポーリンの欠損による耐性が問題となっていた。この D2 ポーリンの欠損によるイミペネム耐性は第三世代、第四世代セフェム系抗菌薬耐性との交差耐性は一般的に認められない 4)。

塩酸セフェピムは、世界 50 数カ国で承認されている第 4 世代のセフェム系抗菌薬であり、 $\beta$ -ラクタマーゼに安定で、特に *P. aeruginosa* に対して抗菌力を発揮することがその特徴である。私達は、世界的規模での cefepime をはじめとする主な $\beta$ -ラクタム系抗菌薬間での感受性および耐性菌出現状況の比較検討の一環として、日本全国 22 施設における *P. aeruginosa* を含む 1996 年 10 月～1997 年 3 月の間に臨床から分離された菌株を対象として、Etest を用いて薬剤感受性試験を実施した。

#### 材料と方法

今回のトライアルには東邦大学、東京医科大学、北里大学、聖マリアンナ医科大学、大阪大学、関西医科大学、川崎医科大学、川崎医科大学附属川崎病院、久留米大学、福岡大学、長崎大学第二内科、長崎大学熱帯医学研究所、済生会宇都宮病院、信楽園病院、国立療養所西新潟中央病院、癌研究会附属病院、社会保険中央総合病院、神奈川県衛生看護専門学校附属病院、神奈川県立循環器呼吸器病センター、大手前病院、済生会吹田病院、天理よろづ相談所病院の 22 病院が参加した。各施設は 1996 年 10 月～1997 年 3 月の間に臨床から分離された、oxacillin 感性 *Staphylococcus aureus*、oxacillin 感性 coagulase-negative *Staphylococci*、*Escherichia coli*、*Klebsiella* spp.、*Citrobacter freundii*、*Enterobacter* spp.、indole-positive *Proteus*、*Serratia* spp.、*Acinetobacter* spp.、*P. aeruginosa* の 10 菌種各 10 株ずつを対象として、各病院において Etest ストリップ (AB バイオディスク社、スウェーデン) を用いて薬剤感受性試験を実施した。対象薬剤は、piperacillin (グラム陰性菌)、oxacillin (グラム陽性菌)、ceftazidime、cefpime、cefoperazone/sulbactam(2:1)、imipenem とした。なお、各施設で分離された菌株は全て薬剤感受性試験成績の結果と共に東邦大学医学部微生物学教室に送付された。

Etest ストリップ、Mueller Hinton 寒天培地(BBL、U.S.A.)、精度管理用菌株は全ての施設が同一ロットのものを使用した。対象菌株は、Mueller Hinton 寒天培地を用いて純培養した数個のコロニーを、生理食塩液に Macfaland0.5 の濃度になるように懸濁した。その菌液を Mueller Hinton 寒天培地にシャーレを 90 度ずつ回転させ、菌液を 3 回塗抹した。この菌液を塗抹した寒天培地上に常温に戻した Etest ストリップを放射状に貼付し、*Staphylococci* は 35°C で 24 時間、その他の菌種は 35°C で 16～18 時間ふ卵器で培養した後、その最小発育阻止濃度 (MIC) 値を読み取った(Fig.1)。

各施設で得られたデータは東邦大学医学部微生物学教室で一括集計し、菌株の同定、薬

剤感受性試験結果に関して疑わしいと思われるデータは同教室において同定および薬剤感受性試験を再度行い、誤りが認められた菌株のデータは削除した。

本試験の実施に当たり、事前に参加施設の実施責任者が集まり、その Etest ストリップの使用方法、判定方法など今回の試験に関する全てのプロトコールについて事前確認した。さらに、この試験では実施施設全てに同一クローンの *E. coli* ATCC25922、*S. aureus* ATCC29213、*P. aeruginosa* ATCC27853、*E. coli* ATCC35218(cefoperazone/ sulbactam の場合)および米国アイオワ大学の Ronald Jones 教授から分与された耐性株 *Enterobacter cloacae* SD-AmpC、*Citrobacter diversus* D-11、*E. coli* D-05、*S. aureus* D-05、coagulase-negative Staphylococci の各菌株を配布して精度管理に供した。

## 結 果

### (1)精度管理株の薬剤感受性試験結果

Fig.1 に精度管理株を用いた検討の結果を示す。*S. aureus* ATCC29213 に対しては oxacillin、cefepime、cefoperazone/ sulbactam が全て指定された数値の範囲を示し、その一致率は100%であり、imipenemの一致率は最も低かったものの96.8%であった。*E. coli* ATCC25922 に対しては piperacillin(95.3%)を除き全ての対象薬ストリップが指定された数値の範囲を示し、その一致率は100%であった。*E. coli* ATCC352118 に対しては cefoperazone/ sulbactam のみが対象となったが、これも指定された数値の範囲を示した。*P. aeruginosa* ATCC27853 に対しては ceftazidime および cefpirome の一致率が100%であったが、piperacillin、cefepime、imipenem の一致率は96.9%、は cefoperazone/ sulbactam は指定された数値を示した菌株は全体の95.3%であった。

### (2)施設間の測定誤差

Fig.2 に施設間の測定誤差を示す。参加施設間における正確さは100%~93.3%であった。その誤差のほとんどは Minor に属し、Very Major と判定される誤差を生じた施設は3施設であった。

### (3)臨床分離株に対する感受性試験結果

219 株の oxacillin 感性 *S. aureus* の薬剤感受性試験成績の結果を TABLE1 に示す。ceftazidime において、感性和判定された菌株が全体の3.7%、耐性と判定されたものが6.4%であった。その他の抗菌薬には耐性と判定される菌株は認められなかった。MIC90 を見てみると imipenem の値が0.064  $\mu\text{g/ml}$  と最も優れており、次いで oxacillin (0.75  $\mu\text{g/ml}$ )、cefpirome (2  $\mu\text{g/ml}$ )、cefepime および cefoperazone/ sulbactam (4  $\mu\text{g/ml}$ )、ceftazidime (24  $\mu\text{g/ml}$ )の順であった。

173 株の oxacillin 感性 coagulase-negative Staphylococci に対する薬剤感受性試験成績を TABLE2 に示す。ceftazidime(感性:45.1%、耐性:15.4%)を除く全ての薬剤に対して全ての菌株が感性を示した。MIC90 を見てみると、imipenem の値が0.125  $\mu\text{g/ml}$  と最も優れており、次いで oxacillin (1.5  $\mu\text{g/ml}$ )、cefpirome (2  $\mu\text{g/ml}$ )、cefepime (3  $\mu\text{g/ml}$ )、

cefoperazone/ sulbactam (4  $\mu$ g/ml)、ceftazidime (32  $\mu$ g/ml)の順であった。

205 株の *E. coli* に対する薬剤感受性試験成績を TABLE3 に示す。Piperacillin に対しては 14.6%の菌株が耐性を示したが、その他の抗菌薬に対して耐性を示す *E. coli* は 0.5%であった。MIC90 は cefepime (0.125  $\mu$ g/ml)が最も優れており、次いで cefpirome (0.25  $\mu$ g/ml)、imipenem (0.38  $\mu$ g/ml)、ceftazidime (0.75  $\mu$ g/ml)、cefoperazone/ sulbactam (1.5  $\mu$ g/ml)、piperacillin (>256  $\mu$ g/ml)の順であった。

220 株の *Klebsiella spp.*に対する薬剤感受性試験成績を TABLE4 に示す。MIC90 は cefepime (0.19  $\mu$ g/ml)、cefpirome (0.38  $\mu$ g/ml)の順で優れており、cefepime に対する耐性株は認められなかった。一方、その他の抗菌薬の MIC90 は imipenem (0.5  $\mu$ g/ml)、ceftazidime (0.75  $\mu$ g/ml)、cefoperazone/ sulbactam (2  $\mu$ g/ml)、piperacillin (48  $\mu$ g/ml)の順で、それぞれ 0%、1.8%、2.7%、7.2%、の割合で耐性菌が認められた。

180 株の *Citrobacter freundii* に対する薬剤感受性試験成績を TABLE5 に示す。cefepime および imipenem に対する耐性菌は認められず、MIC90 はそれぞれ 2  $\mu$ g/ml、1  $\mu$ g/ml であった。その他の抗菌薬に対しては、MIC90 の順に cefpirome (4  $\mu$ g/ml)に 1.1%、cefoperazone/ sulbactam (48  $\mu$ g/ml)に 8.3%、ceftazidime (>256  $\mu$ g/ml)に 25.0%、piperacillin (>256  $\mu$ g/ml)に 26.1%の割合で耐性菌が認められた。

205 株の *Enterobacter spp.*に対する薬剤感受性試験成績を TABLE6 に示す。MIC90 の順に imipenem (1.5  $\mu$ g/ml)には 0.5%、cefepime (3  $\mu$ g/ml)には 1.0%、cefpirome (12  $\mu$ g/ml)には 3.9%、cefoperazone/ sulbactam (128  $\mu$ g/ml)には 15.1%、piperacillin (>256  $\mu$ g/ml)には 18.5%、ceftazidime (>256  $\mu$ g/ml)には 20.5%の菌株が耐性を示した。

195 株の indole-positive *Proteus* に対する薬剤感受性試験成績を TABLE7 に示す。MIC90 は cefepime (0.19  $\mu$ g/ml)が最も優れ、次いで cefpirome (0.5  $\mu$ g/ml)であり、それぞれ 0.5%、3.1%の耐性菌がみとめられた。以下、MIC90 の順に ceftazidime (0.75  $\mu$ g/ml)には 0.5%、cefoperazone/ sulbactam (3  $\mu$ g/ml)には 1.5%、imipenem (4  $\mu$ g/ml)には 1.0%、piperacillin (64  $\mu$ g/ml)には 8.7%の割合で耐性菌が認められた。

200 株の *Serratia spp.*に対する薬剤感受性試験成績を TABLE8 に示す。MIC90 の優れている順に imipenem (2  $\mu$ g/ml)には 4.5%、cefepime (4  $\mu$ g/ml)には 5.0%、cefpirome (12  $\mu$ g/ml)には 8.5%、ceftazidime (24  $\mu$ g/ml)には 9.5%、cefoperazone/ sulbactam (>256  $\mu$ g/ml)には 23.5%、piperacillin (>256  $\mu$ g/ml)には 25.0%の割合で耐性菌が認められた。

219 株の *P. aeruginosa* に対する薬剤感受性試験成績を TABLE9 に示す。MIC90 の優れている順に Cefepime (16  $\mu$ g/ml)には 9.1%、ceftazidime (32  $\mu$ g/ml)には 11.4%、imipenem (MIC90: >32  $\mu$ g/ml)には 22.4%、cefoperazone/ sulbactam (192  $\mu$ g/ml)には 13.7%、piperacillin (>256  $\mu$ g/ml)には 20.1%、cefpirome (>256  $\mu$ g/ml)には 27.9%の割合で耐性菌が認められた。

199 株の *Acinetobacter spp.*に対する薬剤感受性試験成績を TABLE10 に示す。MIC90 の優れている順に imipenem (0.75  $\mu$ g/ml)には 2.5%、cefoperazone/ sulbactam (4  $\mu$



g/ml)には 0.5%、cefepime (6  $\mu$ g/ml)には 5.0%、ceftazidime (16  $\mu$ g/ml)には 8.0%、ceftazidime (32  $\mu$ g/ml)には 12.1%、piperacillin (>256  $\mu$ g/ml)には 31.2%の割合で耐性菌が認められた。

## 考 察

今回実施した全国レベルでのサーベイランスの目的は、cefepimeをはじめとする $\beta$ -ラクタム系抗菌薬間での感受性および耐性菌出現状況の比較検討であった。本検討を実施するにあたり、最も重要なことは全ての施設において同一プロトコールによる再現性が保証された方法である。さらに、測定方法が簡便で、その結果が数値化されることが望ましいと考えられた。以上の観点から、今回は Etest によるサーベイランスを試みた。この方法は、同一ロットの精度管理されたディスクと培地さえ供給されればどの施設でも再現性ある結果を得ることが可能となる。さらに、今回は精度管理用の菌株も同一ロットのものを予め配布し、Etest の信頼性に関するチェックも行った。その結果、いずれの施設でも、精度管理株に定められた MIC 値から大きく外れることは稀であった。しかし、3 施設において Major 誤差が発生したが、これらは Etest のディスクに書かれている数値の読み間違いによるものであろうことが報告書の数値から推察された。したがって、今回は他の薬剤感受性試験と Etest との相関性に関する検討は行わなかったが、Etest は再現性の良好な方法であるものと推察された。

今回対象としたグラム陽性菌である oxacillin 感性 *S. aureus* および coagulase negative staphylococci には今回用いた抗菌薬では ceftazidime 以外に耐性菌は認められなかった。次ぎに、*E. coli* の piperacillin に対する 14.6%の耐性菌は、ペニシリナーゼの大量産生あるいはセファロスポリナーゼの大量産生あるいはその両方によってもたらされたと考えられる 5)。しかし、それ以外の抗菌薬に対する耐性菌は基質特異性拡張型 $\beta$ -ラクタマーゼの産生 6, 7)あるいは BlaIMP の産生によるものと考えられる。*Klebsiella* spp.の耐性菌には *Klebsiella pneumoniae* の染色体上にコードされているペニシリナーゼの大量産生によるものも含まれていると考えられる 5)。しかし、*Klebsiella oxytoca* には Koxy と呼ばれている基質特異性の広い $\beta$ -ラクタマーゼが存在するため 8)、その関与も否定できない。しかし、今回の検討で imipenem と共に cefepime に対する耐性菌も存在しなかったことは注目に値するものとする。

*C. freundii* に対しても imipenem および cefepime 以外の抗菌薬には耐性菌が出現していた。その原因は *C. freundii* の中にはセファロスポリナーゼを大量に産生する菌株が存在し、これらの菌株は多くの $\beta$ -ラクタム系抗菌薬に耐性を示す事が知られている 5)。Imipenem はセファロスポリナーゼに安定なので耐性菌の出現がないことは容易に予測される。今回、セフェム系抗菌薬の一つである cefepime に対する耐性菌の出現が認められなかった理由として、Hiraoka 等が報告している抗菌薬の低濃度域における cefepime の安定性 9)がその原因と考えられる。すなわち、菌体内での抗菌薬濃度は、通常 $\beta$ -ラクタマーゼ

活性を測定するとき使用する濃度と比較するときわめて低く、このような濃度で他の抗菌薬のβ-ラクタマーゼに対する安定性と比較すると cefepime は極めて安定なのである。この特徴により、今回のサーベイランスで *C. freundii* に耐性菌が認められなかったと考えている。また、*C. freundii* と同様にセファロスポリナーゼを産生する *Enterobacter spp.* に関しても、cefepime は同様の理由から他のセフェム系抗菌薬と比較して耐性菌の出現率が低いものと考えられた。Indole-positive *Proteus* に対しても cefepime に対する感性菌は 99.5% と他の薬剤に対する感性菌より多く存在した。*Serratia spp.* の中で主要な菌種である *Serratia marcescens* もセファロスポリナーゼを産生する菌種であるので、cefepime は他のセフェム系抗菌薬と比較すると低い耐性率を示したと考えられる。*P. aeruginosa* に対してもっとも耐性率が低かったのが cefepime である。その理由として、セファロスポリナーゼの大量産生、ならびに imipenem 耐性に関与する D2 ポーリンの欠損の両方の影響を受けない cefepime の特性によるものと考えられる。

以上の結果から、グラム陽性菌からグラム陰性菌に至るまで cefepime は幅広い抗菌力を有しており、腸内細菌科における耐性菌の出現はペニシリン系抗菌薬あるいはセフェム系抗菌薬と比較して低いものと考えられる。さらに、*P. aeruginosa* に対してはペニシリン系、セフェム系ならびに imipenem と比較しても耐性菌の占める割合が低いことが確認された。しかし、今後新たな耐性菌が出現してくる可能性も十分考えられることから、さらにこのようなサーベイランスを継続して実施する必要があると考えている。

## 謝 辞

稿を終えるにあたり、今回のトライアルにご協力頂きました東邦大学、東京医科大学、北里大学、聖マリアンナ医科大学、大阪大学、関西医科大学、川崎医科大学、川崎医科大学附属川崎病院、久留米大学、福岡大学、長崎大学第二内科、長崎大学熱帯医学研究所、済生会宇都宮病院、信楽園病院、国立療養所西新潟中央病院、癌研究会附属病院、社会保険中央総合病院、神奈川県衛生看護専門付属病院、神奈川県立循環器呼吸器病センター、大手前病院、済生会吹田病院、天理よろづ相談所病院の皆様に感謝申し上げます。

## 引用文献

- 1) Knothe H, Shah P, Mitsuhashi S et al.: Transferable resistance to cefotaxime, cefoxitin, cefamandole and cefuroxime in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Serratia marcescens*. *Infection*. 11: 315~317, 1983.
- 2) Knox J R: Extended-spectrum and inhibitor-resistant TEM-type beta-lactamases: mutations, specificity, and three-dimensional structure. *Antimicrobial Agents & Chemotherapy*. 39: 2593~2601, 1995.

- 3) Ito H, Arakawa Y, Ohta M et al.: Plasmid-mediated dissemination of the metallo-beta-lactamase gene blaIMP among clinically isolated strains of *Serratia marcescens*. *Antimicrobial Agents & Chemotherapy*. 39: 824~829, 1995.
- 4) Livermore D M: Bacterial resistance to carbapenems. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 390: 25~47, 1995
- 5) Bush K, Jacoby G A, Medeiros A A: A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrobial Agents & Chemotherapy*. 39: 1211~1233, 1995.
- 6) Ishii Y, Ohno A, Matsuzawa H et al.: Cloning and sequence of the gene encoding a cefotaxime-hydrolyzing class A beta-lactamase isolated from *Escherichia coli*. *Antimicrobial Agents & Chemotherapy*. 39: 2269~2275, 1995.
- 7) Ma L, Ishii Y, Yamaguchi K et al.: Cloning and sequencing of the gene encoding Toho-2, a class A beta-lactamase preferentially inhibited by tazobactam. *Antimicrobial Agents & Chemotherapy*. 42: 1181~1186, 1998
- 8) Arakawa Y, Ohta M, Kato N et al.: Chromosomal beta-lactamase of *Klebsiella oxytoca*, a new class A enzyme that hydrolyzes broad-spectrum beta-lactam antibiotics. *Antimicrob. Agents Chemother.* 33: 63~70, 1989.
- 9) Hiraoka M, Inoue M, Mitsuhashi S: Hydrolytic rate at low drug concentration as a limiting factor in resistance to newer cephalosporins. *Reviews of Infectious Diseases*. 10: 746~751, 1988.

日本財団補助金による

1999 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—

2000 年 3 月 14 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 李 昕

研究機関 東京大学医学系研究科 研究指導者 幕内 雅敏 職名 外科教授  
所在地 〒113-8655 東京都文京区本郷 7-3-1 電話 03-3815-5411 内線 33322

研究テーマ 肝癌、胆道癌における細胞周期 G1 期制御因子及び癌抑制遺伝子の異常の解明

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)

第 58 回日本癌学会 肝外胆管癌における p21(WAF1/CIP1) 蛋白の発現  
低下と p53 の異常

厚生省研究班班会議 肝外胆管癌における p21 と p53 の発現異常

(2) 学会誌等に発表した論文  有 ・ 無 (雑誌名・論文名)

1. 著者: Ai-Min Hui, Xin Li, Masatoshi Makuuchi, Tadatoshi Takayama and Keiichi Kubota  
題名: Over-expression and lack of retinoblastoma protein are associated with tumor progression and metastasis in hepatocellular carcinoma

雑誌: Int. J. Cancer: 84, 604-608 (1999)

2. 著者: Xin Li, Ai-Min Hui, Tadatoshi Takayama, Xing Cui and Masatoshi Makuuchi

題名: Altered p21<sup>WAF1/CIP1</sup> expression is associated with poor prognosis in extrahepatic bile duct carcinoma

雑誌: Cancer letter: in press

3. 著者: Xin Li, Ai-Min Hui, Ya-Zhou Shi, Tadatoshi Takayama and Masatoshi Makuuchi

題名: Reduced p21<sup>WAF1/CIP1</sup> expression participates in the early development stage of gallbladder carcinoma and associates with p53 overexpression

雑誌: 投稿中

### 3. 今後の研究計画

サイクリン依存性キナーゼインヒビター(CKI) は二つのファミリーに大別される。一つは p16 を代表とする p16、p15、p18 と p20 のファミリーで、もう一つは p21 を代表とする p21、p27 と p51 のファミリーである。p16 ファミリー CKI の遺伝子は皆 CpG islands という結合を持っている。CpG islands がメチル化されることによって、これらの因子の蛋白発現が低下し、細胞周期進行を負に調節機能が抑制されることになる。これから、我々は Methylation-specific PCR 法を用いて、肝発癌における細胞周期制御因子 p14、p15、p16、p19 のメチル化異常の役割に関する研究をする予定であります。

### 4. 研究指導者の意見

李キン君は平成10年4月より本学大学院医学博士課程に入学し、私の元で肝癌及び胆道癌の発癌メカニズムに関する研究を行っております。肝外胆管癌における p21 と p53 の異常に関する論文 “Altered p21 expression is associated with poor prognosis in extrahepatic bile duct carcinoma” が Cancer Letter 誌に採用され、本研究成果を第58回日本癌学会総会で発表しました。また、胆嚢癌に関する論文 “Reduced p21 expression participates in the early developmental stage of gallbladder carcinoma and associates with p53 overexpression” を英文誌に投稿中であります。さらに、第二著者としての論文が International Journal of Cancer 誌 (1999, 84:604-608) に発表されました。

李君は非常に真面目で勤勉で生活態度も大変真面目で人柄は温厚で明るく協調性があり、教室員からも信頼されており、人間的にも優れた資質を有しております。李君は必ずや将来優れた研究者として、日本と中国の架け橋となることでしょう。

研究指導者氏名 幕内 雅敏



### 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。

## 肝外胆管癌における p21<sup>WAF1/CIP1</sup> と p53 の発現異常

李キン

北京市首都医科大学付属朝陽病院外科・医師

指導教官：幕内雅敏、東京大学医学部肝胆膵外科・教授

### 要 旨

[目的] 肝外胆管癌における CDK インヒビター p21<sup>WAF1/CIP1</sup> の発現異常の臨床的意義及び p53 との関連について検討した。 [材料と方法] 外科的に切除された肝外胆管癌 34 例のホルマリン固定パラフィン包埋標本を対象とし、抗 p21<sup>WAF1/CIP1</sup> 抗体及び抗 p53 抗体を用い、免疫組織染色を行った。 p21<sup>WAF1/CIP1</sup> 染色では染色された癌細胞が 10%未満を低発現(p21<sup>WAF1/CIP1</sup>-)とし、10%から 30%未満を中等度発現(p21<sup>WAF1/CIP1</sup>+)とし、30%以上を高発現(p21<sup>WAF1/CIP1</sup>++) とした。 p53 染色では染色された癌細胞が 20%以上を異常発現とした。 [結果] 肝外胆管癌 34 例中 23 例(67.6%)において p21<sup>WAF1/CIP1</sup> の低発現、6 例(17.6%)において中等度発現、5 例(14.8%)において高発現が認められた。 TNM stage との関係を見ると、p21<sup>WAF1/CIP1</sup> 中等度発現群と比べて、低発現群では stage III, IV の症例が有意に高率でした( $p=0.007$ )。 また、p21<sup>WAF1/CIP1</sup> 低発現群及び高発現群は中等度発現群より有意に予後不良であった(p21<sup>WAF1/CIP1</sup>- versus p21<sup>WAF1/CIP1</sup>+,  $p=0.02$ ; p21<sup>WAF1/CIP1</sup>++ versus p21<sup>WAF1/CIP1</sup>+,  $p=0.01$ )。 p53 の発現は肝外胆管癌 34 例中 17 例(50%)で異常であり、静脈浸潤との相関が見られた( $p=0.001$ )。 p21<sup>WAF1/CIP1</sup> の発現と p53 との関連性が認められなかった。 [結語] 1. 肝外胆管癌において p21<sup>WAF1/CIP1</sup> 発現低下及び発現過剰は予後不良に関与する。 2. p21<sup>WAF1/CIP1</sup> の発現が p53 非依存的である。

KEY WORDS : p21<sup>WAF1/CIP1</sup>、 p53、 肝外胆管癌、 予後。

## RESEARCH REPORT

### PURPOSE

Recently, a body of evidence has revealed a direct link between cell cycle control and tumorigenesis. The molecular machinery of the cell cycle consists of a series of positive regulators such as cyclins and cyclin-dependent kinases (CDKs), and a group of negative regulators known as CDK inhibitors (CKIs), which include p21<sup>WAF1/CIP1</sup>, p27<sup>Kip1</sup> and p16<sup>INK4</sup>. p21<sup>WAF1/CIP1</sup> binds to a broad range of cyclin-CDK complexes and blocks their catalytic activity. Moreover, there are several pieces of evidence to show that p21<sup>WAF1/CIP1</sup> protein suppresses tumor growth, suggesting that p21<sup>WAF1/CIP1</sup> may act as a tumor suppressor protein. Although it has been clarified that the p21<sup>WAF1/CIP1</sup> gene mutation is extremely rare in a variety of human malignancies, alteration in the expression of the p21<sup>WAF1/CIP1</sup> protein has been reported in a variety of human cancers. However, no studies have been published on the expression of p21<sup>WAF1/CIP1</sup> in EBDC so far. p21<sup>WAF1/CIP1</sup> expression was initially considered to be transcriptionally regulated by functional p53. The aim of this study was to determine the possible clinical role of p21<sup>WAF1/CIP1</sup> protein expression and whether p21<sup>WAF1/CIP1</sup> expression correlates with p53 status in EBDC.

### METHODS

**Patients and specimens** Tumor specimens were obtained from 34 patients with EBDC who underwent surgical resection at our university from October 1990 to March 1998. The median age was 65 years (range 43–88 y). There were 2 stage I, 6 stage II, 4 stage III, and 22 stage IVA tumors (TNM stage).

**Immunohistochemistry** Immunostaining for p21<sup>WAF1/CIP1</sup> and p53 was done on archival, formalin-fixed, paraffin-embedded tissue sections using the avidin-biotin-peroxidase method. Antigens were retrieved with 10mM citrate buffer (pH 6.0) by an autoclave method. Either

anti-p21<sup>WAF1/CIP1</sup> monoclonal antibody EA10 (Oncogene Science, Cambridge, MA) or anti-p53 monoclonal antibody DO-7 (Dako, A/S, Denmark), diluted 1:100, was applied to the sections. Then the sections were incubated with biotinylated secondary antibody and then with avidin-biotinylated horseradish peroxidase complex. Peroxidase staining was done using 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride, and the sections were counterstained with hematoxylin. Only when unequivocal nuclear staining was observed, cells were considered positive staining. Three categories were used to describe the extent of p21<sup>WAF1/CIP1</sup> immunoreactivity: -, negative expression (low-level expression, <10% positive carcinoma cells); +, positive expression (moderate expression, 10%–30% positive carcinoma cells); ++, strongly positive expression (high-level expression, ≥30% positive carcinoma cells). For p53, tumors with ≥20% p53 immunoreactive cells were defined as p53-positive (p53 aberrant pattern); tumors with <20% p53 immunoreactive cells were defined as p53-negative (p53 wild-type pattern).

**Statistical analysis** The  $\chi^2$  test was used to analyze the possible correlation between p21<sup>WAF1/CIP1</sup> and p53 expression and the associations of p21<sup>WAF1/CIP1</sup> and p53 expression with clinicopathologic parameters. Survival curves were calculated using the Kaplan–Meier method, and the statistical significance of the differences between the curves was evaluated by the log rank test. A *p* value < 0.05 was considered statistically significant.

## RESULTS

**p21<sup>WAF1/CIP1</sup> expression** Of the 34 EBDCs, 23 (68%) showed low-level p21<sup>WAF1/CIP1</sup> expression (p21<sup>WAF1/CIP1</sup>-), 6 (18%) showed moderate p21<sup>WAF1/CIP1</sup> expression (p21<sup>WAF1/CIP1</sup>+), and the remaining 5 (15%) showed high p21<sup>WAF1/CIP1</sup> expression (p21<sup>WAF1/CIP1</sup>++). According to the Kaplan–Meier survival analysis, patients with p21<sup>WAF1/CIP1</sup>- and p21<sup>WAF1/CIP1</sup>++ tumors had significantly shorter disease-free survival than patients with p21<sup>WAF1/CIP1</sup>+ tumors (p21<sup>WAF1/CIP1</sup>- versus p21<sup>WAF1/CIP1</sup>+, *p* = 0.02; p21<sup>WAF1/CIP1</sup>++ versus p21<sup>WAF1/CIP1</sup>+, *p* = 0.01; log rank test). No significant difference between p21<sup>WAF1/CIP1</sup>- and p21<sup>WAF1/CIP1</sup>++ tumors was detected in disease prognosis.



p21<sup>WAF1/CIP1</sup><sub>-</sub> was significantly associated with advanced disease stage (occurring in 25% of stage I/II tumors, 75% of stage III, and 82% of stage IVA), while p21<sup>WAF1/CIP1</sup><sub>+</sub> was more common in lower-stage tumors (occurring in 50% of stage I/II tumors, 0% of stage III, and 9% of stage IVA; p21<sup>WAF1/CIP1</sup><sub>-</sub> versus p21<sup>WAF1/CIP1</sup><sub>+</sub>,  $p = 0.007$ ). No significant relationship was detected between p21<sup>WAF1/CIP1</sup> expression level and the other clinicopathologic parameters assessed, including histologic type, venous invasion, and tumor site.

**p53 expression** Half of the 34 EBDCs showed p53-positive expression. p53-positive expression was significantly related to venous invasion ( $p = 0.001$ ). No significant difference in survival was found between patients with p53-positive tumors and those with p53-negative tumors ( $p = 0.17$ , log rank test).

**Relationship between p21<sup>WAF1/CIP1</sup> and p53 expression** Seventy-one percent of p53-positive and 65% of p53-negative tumors showed p21<sup>WAF1/CIP1</sup>-negative expression, while 35% of p53-negative and 29% of p53-positive tumors showed p21<sup>WAF1/CIP1</sup>-positive expression. These data indicate no significant correlation between p21<sup>WAF1/CIP1</sup> and p53 expression ( $p = 0.71$ ).

## DISCUSSION

We have shown that not only reduced expression but also overexpression of p21<sup>WAF1/CIP1</sup> protein exerted adverse influence on the clinical outcome of EBDC. By contrast, tumors showing moderate p21<sup>WAF1/CIP1</sup> expression were significantly related to increased patient survival. It was reported that reduced p21<sup>WAF1/CIP1</sup> expression correlated with poor prognosis in gastric and other cancers. On the other hand, in esophageal cancer and so on, p21<sup>WAF1/CIP1</sup> overexpression was considered to relate to unfavorable outcome. Consistent with our results, a similar finding was reported recently for bladder cancer.

p21<sup>WAF1/CIP1</sup> acts as a tumor growth suppressor. So the great proportion of EBDCs (23/34 tumors) showed low p21<sup>WAF1/CIP1</sup> expression was significantly associated with advanced stage as well as with increased recurring disease, confirming abnormal downregulation of p21<sup>WAF1/CIP1</sup> expression play a role in disease progression.

Unexpectedly, the finding that patients with tumors with elevated p21<sup>WAF1/CIP1</sup> expression had the worst prognosis indicated that overexpressed p21<sup>WAF1/CIP1</sup> protein does lose its tumor-suppressing functions. These findings suggest that there are multiple mechanisms involved in p21<sup>WAF1/CIP1</sup>-related tumorigenesis in EBDC.

The mechanisms that allow tumor progression in the presence of high p21<sup>WAF1/CIP1</sup> expression remain to be determined. The first possibility is inactivation of the inhibitory function of p21<sup>WAF1/CIP1</sup>. It has been reported that a viral oncoprotein, HPV-16 F7, can block the ability of cell growth arrest of p21<sup>WAF1/CIP1</sup>, inducing abnormal cell growth despite high level of p21<sup>WAF1/CIP1</sup>. In the second possibility, it is important to point out that cell cycle control is a complex balance between the level of positive and negative cell cycle regulators. High p21<sup>WAF1/CIP1</sup> expression may be accompanied by an even higher level of positive cell cycle regulators, which may be the real cause of the tumor progression. In this case, although p21<sup>WAF1/CIP1</sup> expression is upregulated to a high degree, CKIs are still not sufficient to overcome the activities of positive regulators.

In liver and other cancers, p21<sup>WAF1/CIP1</sup> expression was considered to be regulated through a p53-dependent pathway. However, we failed to find a significant association between p21<sup>WAF1/CIP1</sup> and p53 expression in EBDC. This suggests that, even if p53 participates in the regulation of p21<sup>WAF1/CIP1</sup> expression for a proportion of EBDCs, there should be p53-independent mechanisms involved in the process of p21<sup>WAF1/CIP1</sup> regulation. Many recent studies have clarified that p21<sup>WAF1/CIP1</sup> expression is also regulated by a p53-independent pathway.

EBDC is known to have poor prognosis and to be difficult to cure. To date, little is understood about the molecular basis of tumorigenesis for this cancer type. This study indicates that reduced expression or overexpression of p21<sup>WAF1/CIP1</sup> plays an adverse role in tumor progression and clinical outcome for this disease. Evaluation of p21<sup>WAF1/CIP1</sup> level may be important in determining the biological behaviors of EBDC, and may provide useful information in managing patients with this devastating illness.

## REFERENCES

- El-deiry, W. S., Tokino, T., Velculescu, V. E., Levy, D. B., Parsons, R., Trent, J.M., Lin, D., Mercer, W. E., Kinzler, K. W. and Vogelstein, B. WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell*, 75, 817-825 (1993).
- Miller, F. R. Tumor suppression by p21<sup>WAF1</sup>. *Cancer Res.*, 55, 4536-4539 (1995).
- Shiohara, M., El-deiry, W. S., Wada, M., Nakamaki, T., Takeuchi, S., Yang, R., Chen, D. L., Vogelstein, B. and Koeffler, H. P. Absence of WAF1 mutations in a variety of human malignancies. *Blood*, 84, 3781-3784 (1994).
- Gomyo, Y., Ikeda, M., Osaki, M., Tatebe, S., Tsujitani, S., Ikeguchi, M., Kaibara, N. and Ito, H. Expression of p21 (waf1/cip1/sdi1), but not p53 protein, is a factor in the survival of patients with advanced gastric carcinoma. *Cancer*, 79, 2067-2072 (1997).
- Stein, J. P., Ginsberg, D. A., Grossfeld, G. D., Chatterjee, S. J., Esrig, D., Dickinson, M. G., Groshen, S., Taylor, C. R., Jones, P. A., Skinner, D. G. and Cote, R. J. Effect of p21<sup>WAF1/CIP1</sup> expression on tumor progression in bladder cancer. *J. Natl. Cancer Inst.*, 90, 1072-1079 (1998).
- Diamantis, I., Karamitopoulou, E., Perentes, E. and Zimmermann, A. p53 protein immunoreactivity in extrahepatic bile duct and gallbladder cancer: correlation with tumor grade and survival. *Hepatology*, 22, 774-779 (1995).
- Suto, T., Sugai, T., Nakamura, S., Funato, O., Nitta, H., Sasaki, R., Kanno, S. and Saito, K. Assessment of the expression of p53, MIB-1 (Ki-67 antigen), and argyrophilic nucleolar organizer regions in carcinoma of the extrahepatic bile duct. *Cancer*, 82, 86-95 (1998).
- Japanese Society of Biliary Surgery "General rules for surgical and pathological studies on cancer of biliary tract," 3th ed. (1993). Kanehara & Co., Ltd., Tokyo.
- Sobin L. H. and Wittekind C. "TNM classification of malignant tumors," 5th ed. (1997). Wiley-Liss, Inc., New York.
- Sarbia, M., Stahl, M., Hausen, A. Z., Zimmermann, K., Wang, L., Fink, U., Heep, H., Dutkowski, P., Willers, R., Muller, W., Seeber, S. and Gabbert, H. E. Expression of p21<sup>WAF1</sup> predicts outcome of esophageal cancer patients treated by surgery alone or by combined therapy

modalities. Clin. Cancer Res., 4, 2615-2623 (1998).

Funk, J. O., Waga, S., Harry, J. B., Espling, E., Stillman, B. and Galloway, D. A. Inhibition of CDK activity and PCNA-dependent DNA replication by p21 is blocked by interaction with the HPV-16 E7 oncoprotein. Genes Dev., 11, 2090-2100 (1997).

Hui, A.-M., Kanai, Y., Sakamoto, M., Tsuda, H. and Hirohashi, S. Reduced p21<sup>WAF1/CIP1</sup> expression and p53 mutation in hepatocellular carcinomas. Hepatology, 25, 575-579 (1997).

Datto, M. B., Li, Y., Panus, J. F., Howe, D. J., Xiong, Y. and Wang, X. F. Transforming growth factor  $\beta$  induces the cyclin-dependent kinase inhibitor p21 through a p53-independent mechanism. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 92, 5545-5549 (1995).

日本財団補助金による  
1999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—

2000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 娜依拉馬合木提  
研究機関 岡山大学医学部第=内科 研究指導者 原田実根 職名 教授  
所在地 〒700-8558 電話 (086)223-7151 内線 7227

研究テーマ 造血幹細胞移植後末梢血中に循環している造血前駆細胞の解析

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)

平成9年 第40回日本臨床血液学会総会にて発表

平成10年 第60回日本血液学会総会にて発表

平成10年 The American Society of hematology (40th Annual meeting)にて発表

— 以上の発表内容は本研究の内容です。

(2) 学会誌等に発表した論文  有 ・ 無 (雑誌名・論文名)

(1) Analysis of circulating hematopoietic progenitor cells after peripheral blood stem cell transplantation. Int J Hematol 1999;69:36-42

(2) Hematopoietic progenitor cells from allogeneic bone marrow transplant donors circulate in the very early post-transplant period.

Bone Marrow Transplantation, 1999, 23, 659-665

(3) Very late Antigen-5 Leucocyte Function-Associated Antigen-1 are Critical For Early stage Hematopoietic Progenitor Cell Homing. Exp Hematol, (in press)

### 3. 今後の研究計画

今後は“血中遊離 DNA による癌の高感度遺伝子診断システムに関する基盤研究”とのテーマを目標にして、血液疾患を中心に末梢血遊離 DNA を高感度に検出でき、さらにその遺伝子異常を総合的に検出できる技術を開発し、癌の早期診断を実現するための研究を行う。

### 4. 研究指導者の意見

“血中遊離 DNA による癌の高感度遺伝子診断システムに関する基盤研究”は血液疾患に限らず他の悪性腫瘍の早期診断に役立つ有力な検査指標となっていく可能性があります。現在、マホモティ博士はがこの研究を熱心に進めているところで、今後の研究成果が期待されます。

研究指導者氏名

原田実穂



### 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。

## **Analysis of circulating hematopoietic progenitor cells after peripheral blood stem cell transplantation**

末梢血幹細胞移植後末梢血中に循環している造血前駆細胞についての検討

**Naira Mahmut**, Yoshio Katayama, Katsuto Takanori, Takanori Teshima, Yuji Ohno, Kenji Imajyo, Masamichi Hara, Katsuji Shinagawa, Fumihiko Ishimaru, Kazuma Ikeda, Kenji Niiya, Mine Harada

Xinjiang Medical University Urumqi, Xinjiang, 830000, China

原田実根教授 指導

Secend Deparetment of Internal Medicine, Okayama University Medical School, Okayama, Japan;

### 要 旨

造血幹細胞移植において、末梢血に輸注された造血前駆細胞の動態は明らかにされていない。今回我々は、末梢血幹細胞移植において、移植後骨髄に生着せず、末梢血を循環している造血前駆細胞の動態とその特徴について検討下。[方法] インフォームドコンセントの得られた auto-PBSC7 例、allo-PBSCT5 例につき、コンデイショニング前、移植直前 (day0), 移植後 day 1,2,3,5,7,10,14,17,21,28 まで、allo-PBSCT では同様に day35 までに末梢血 10ml を採血し、これから得られた単核球を用いて、BFU-E, CFU-GM をメチルセルロース法にてアッセイした。また、移植細胞と day1 末梢血について HPP-CFC アッセイを行った。次に、フローサイトメトリーで移植細胞と day1 末梢血の CD34 陽性細胞上の CD38, HLA-DR, VLA-4, VLA-5 の発現について測定した。

### KEY WORDS

※自己末梢血幹細胞移植: autologous peripheral blood stem cell transplantation (auto-PBSCT)

※同種末梢血幹細胞移植: allogeneic - PBSCT (allo- PBSCT)

※移植後末梢血循環造血前駆細胞: posttransplant circulating progenitor cells (PTCPC)

### 【目的】

造血幹細胞移植において、経静脈的に輸注された造血前駆細胞の動態は明らかにされていない。われわれは、移植された造血幹細胞の骨髓へのホーミング機構解明を目的として、allo- PBSCT および auto- PBSCT 後早期に、骨髓に生着せず末梢血を循環している造血前駆細胞の動態とその特徴について検討した。

## 【材料と方法】

### 1. 細胞の準備と前駆細胞アッセイ

インフォームドコンセントの得られた auto-PBSCT 7 例、allo-PBSCT 5 例を検討の対象とした。auto-PBSCT ではコンディショニング前、移植直前 (day0)、移植後 day 1, 2, 3, 5, 7, 10, 14, 17, 21, 28 まで、allo-PBSCT では同様に day35 まで末梢血 10ml をヘパリン加採血した。PBS で 5 倍に薄め、Ficoll/Hypaque による比重遠沈法を用いて末梢血の単核球を分離し、PBS で 2 回洗浄を行った。回収した単核球は day0 から day14 までは細胞数が少ないため、細胞数を調整せず、全ての細胞を用いてアッセイを行った。day17 以降は細胞の最終濃度を  $3 \sim 5 \times 10^5 / \text{ml}$  に調整した。培養は 35mm ペトリディッシュを用い、triplicate で 5%CO<sub>2</sub>、37°C の湿潤な条件のもとで 14 日間培養した。培養終了後、40 個以上の細胞によって形成される BFU-E と CFU-GM のコロニー数を倒立顕微鏡を用いてカウントし、triplicate の平均値で示した。造血前駆細胞の培養には、IMDM にメチルセルロース 0.88%, ウシ胎児血清 30%, Stem cell factor (SCF) 50ng/ml, interleukin-3 (IL-3) 10ng/ml, granulocyte-macrophage colony stimulating factor (GM-CSF) 10ng/ml, granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF) 10ng/ml, erythropoietin (Epo) 3U/ml, 1% bovine serum albumin,  $1 \times 10^{-4} \text{M}$  2-メルカプエタノール, 2mM L-glutamine を含んだものを使用した。

HPP-CFC (high proliferative potential-colony forming cells) アッセイでは最終細胞濃度を  $0.5 - 1 \times 10^5 / \text{ml}$  に調整して培養した。同じ条件下で 28 日培養後、直径 1mm 以上のコロニーを HPP-CFC としてカウントした。

### 2. フローサイトメトリー

Allo-PBSCT 5 例において、移植細胞と day 1 末梢血から得られた CD34 陽性細胞の表面マーカーと接着因子の発現を調べた。細胞表面マーカーとしては CD38, HLA-DR の各抗原、接着分子としては VLA-4, VLA-5 分子をそれぞれのモノクローナル抗体を用いてフローサイトメトリーで測定した。ドナ-から採取された末梢血幹細胞と day 1 末梢血を溶血剤を用いてそれぞれ室温で 10 分間のインキュベーションによる混入赤血球の溶血操作を行った後、PBS で細胞濃度を  $1 \times 10^6 / \text{ml}$  に調整した。次に、1.0% マウス血清 PBS を添加し、4°C にて 10 分間インキュベートして非特異反応のブロッキングを行った後、モノクローナル抗体を添加し、4°C、遮光にて 30 分間インキュベーションを行った。インキュベーション終了後、PBS にて 2 回洗浄をし、1% paraformaldehyde を用いて固定操作を行い、フローサイトメトリー (FACScan) で細胞表面マーカーの発現を測定した。



## 【結果】

### 1. PTCPC の動態

移植前(day0)の BFU-E と CFU-GM は0であったが、移植後 day1 には上昇が見られた。auto-PBSCT において day 末梢血 10ml あたりの BFU-E は 23-162、CFU-GM は 7-119 であったが、day2~5 には減少し、day7 から白血球の回復とともに再び上昇が見られた。allo-PBSCT においては day1 末梢血 10ml あたりの BFU-E は 18-47、CFU-GM は 15-61 であったが、day2~7 には減少し、day10~14 に白血球の回復とともに再び上昇が見られた。

### 2. HPP-CFC

allo-PBSCT 5例で移植した末梢血幹細胞と day 1 末梢血単核細胞を用いて HPP-CFC アッセイを行った。その結果、移植細胞中の骨髓球系コロニーのうち、HPP-CFC が占める割合は  $17.4 \pm 13.0\%$  (n=5) であったが、day 1 末梢血の場合は  $65.6 \pm 12.7\%$  (n=5) と移植細胞より有意(p=0.0013)に高かった。

### 3. フローサイトメトリー

allo-PBSCT 5例において、移植細胞と day 1 末梢血単核球における CD34 陽性細胞上の表面マーカーの 2 カラー・フローサイトメトリー解析を行った。その結果、CD34<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup>細胞が移植した造血前駆細胞の大半を占めたが、移植細胞と比べ day 1 末梢血の方がその占める割合は少なかった一方、CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>細胞の割合は、day 1 末梢血の方が移植細胞より有意に高かった( $57.5 \pm 17.6\%$  vs  $11.7 \pm 4.9\%$ , n=5, p=0.005)。しかし、day 1 末梢血と移植細胞における CD34<sup>+</sup>HLA-DR<sup>-</sup>, CD34<sup>+</sup>VLA-4<sup>-</sup>, CD34<sup>+</sup>VLA-5<sup>-</sup> 細胞の割合においては、有意差は認められなかった。

## 【考察】

造血細胞移植後の造血回復は、骨髓に生着した造血幹/前駆細胞の分化・増殖により担われていると考えられている。しかし、移植後に骨髓に生着せず、そのまま末梢血中を循環しながら分化・増殖し、造血回復の一端を担っている造血前駆細胞の有無は明らかにされていない。われわれはその PTCPC の動態を明らかにした。そして、移植前 day0 の日に0であった末梢血循環造血前駆細胞が day1 には増加していることを見出した。さらに、移植細胞と比較し day1 末梢血の方が CD34<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup>細胞よりも CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>細胞を多く含んでいること、また、骨髓球系コロニーのうち HPP-CFC の占める割合も day1 末梢血の方が多いたことが分かった。PTCPC の再上昇は、auto-PBSCT では day7 に、allo-PBSCT では day10~14 に見られた。

既発表論文によると、allo-PBSCT において CD34<sup>+</sup>細胞の大半は移植後 6 時間以内に速やかに末梢血から消え、わずかの数の CD34<sup>+</sup>細胞が増加し始める day 8 まで末梢血に循環し、白血球の回復は CD34<sup>+</sup>細胞の増加より遅れたと報

告されている。本実験においても同じ結果が得られた。

HPP-CFC が未熟な前駆細胞であることはすでに知られているが、CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>細胞もしばしば未熟な前駆細胞を含んでいる。allo-PBSCT において、day1 末梢血中の骨髓球系コロニーのうち HPP-CFC の占める割合は、移植細胞と比較し有意に高かった。さらに、CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>細胞は allo-PBSCT 後 12-15 時間たっても測定できた。CD34<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup>細胞は分化した前駆細胞を含んでいる細胞分画であるが、day 1 末梢血にはわずかしか測定出来なかった。しかし、CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>細胞は測定可能だった。これらのことから、未分化な細胞の方が移植後末梢血を循環しやすい傾向にあるのではないかと考えられた。しかし、その移植後早期に末梢血を循環している未分化な造血前駆細胞は最終的に骨髓に生着するのか、それとも、生着せずに肺などの臓器にトラップされるのかは不明であった。Osogoe らや他の研究者らは、ラットとマウスの移植において、移植した細胞は主に肺、脾、肝臓等の臓器に定着すると報告している。我々の実験における、CD34<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup>細胞が day 1 末梢血にわずかしかいなかったことは、ほかの臓器に定着してしまった可能性があることを示唆している。

接着分子 VLA-4, VLA-5 は造血組織の微小環境と造血前駆細胞の接着において非常に重要な役割を果たしていることは既に報告されている。今回の検討では、day 1 末梢血中の CD34 陽性細胞上の VLA-4, VLA-5 の発現率は移植細胞と比較し有意差が認められなかった。したがって、末梢血幹細胞移植において、VLA-4, VLA-5 の幹細胞や前駆細胞のホーミング機構における役割については明かではないと考えられた。

### 【結論】

末梢血幹細胞移植後早期に、未分化なものも含んだ造血前駆細胞が、末梢血を循環していることが明かとなった。

### 【参考論文】

1. Harada M, Akashi K, Hayashi S et al. G-CSF-combined marrow-ablative chemotherapy and autologous blood stem cell transplantation for the treatment of patients with acute myelogenous leukemia in first remission. *Int J Hematol* 1997; 66: 297-301.
2. Legros M, Dauplat J, Fleury J et al. High-dose chemotherapy with hematopoietic rescue in patients with stage to ovarian cancer: long-term results. *J Clin Oncol* 1997; 15: 1302-1308.
3. Pattengell R & Testa NG. Biology of blood progenitor cells used in transplantation.

Int J Hematol. 1995; 61: 1-15.

4 . Korbling M, Przepiora D, Huh YO et al. Allogeneic blood stem cell transplantation for refractory leukemia and lymphoma: potential advantage of blood over marrow allografts. *Blood* 1995; 85: 1659-1665.

5 . Bensinger WI, Weaver CH, Appelbaum FR et al. Transplantation of allogeneic peripheral blood stem cells mobilized by recombinant human granulocyte colony stimulating factor. *Blood* 1995; 85: 1655-1658.

6 . Schmitz N, Dreger P, Suttorp M et al. Primary transplantation of allogeneic peripheral blood progenitor cells mobilized by filgrastim (granulocyte colony stimulating factor). *Blood* 1995; 85: 1666-1672.

7. Dreger P. Allogeneic transplantation on mobilized peripheral blood progenitor cells: Towards tailored cell therapy. *Int J Hematol* 1997; 66: 1-11.

8. Yano T, Katayama Y, Sunami K et al. G-CSF-induced mobilization of peripheral blood stem cells for allografting: comparative study of daily single versus divided dose of G-CSF. *Int J Hematol* 1997; 66: 169-178.

9 . Casado LF, Steegmann JL, Pico M et al. Study of chimerism in long-term survivors after bone marrow transplantation for severe acquired aplastic anemia. *Bone Marrow Transplant* 1996; 18: 405-409.

10 . Katayama Y, Yano T, Bessho A et al. The effects of a simplified method for cryopreservation and thawing procedures on peripheral blood stem cells. *Bone Marrow Transplant* 1997; 19: 283-287.

11 . McNiece IK, Stewart FM, Deacon DM et al. Detection of a human CFC with a high proliferative potential. *Blood* 1989; 74: 609-612.

12 . McNiece IK, Bertoncello I, Kriegler AB, Quesenberry PJ. Colony-forming cells with high proliferative potential (HPP-CFC). *Int J Cell Cloning* 1996; 8: 146.

13 . J.S. Haug. Circulation of donor progenitor cells following allogeneic peripheral

blood stem cell transplantation. *Blood* 1997; 90: 99a [436]

14 . Terstappen LWMM, Huang S, Safford M, Lansdorp PM, Loken MR. Sequential generations of hematopoietic colonies derived from single nonlineage committed CD34+CD38- progenitor cells. *Blood* 1991; 77: 1218-1227.

15 . To LB, Haylock DN, Dows T et al. A comparative study of the phenotype and proliferative capacity of peripheral blood (PB) CD34+ cells mobilized by four different protocols and those of steady phase PB and bone marrow CD34+ cells. *Blood* 1994; 84: 2930-2939 .

16 . Osogoe B, Omura K. Transplantation of hematopoietic tissues into the circulating blood. *Anat Rec* 1950; 108: 663-685.

17 . Kretchmer AL, Conover WR. Colony-forming cells in the spleen: Determination of the fraction transplanted. *Transplantation* 1969; 8: 576-581.

18 . Lahiri SK, van Putten LM. Distribution and multiplication of colony-forming units from bone marrow and spleen after injection in irradiated mice. *Cell Tissue Kinet* 1969; 2: 21-28.

19 . Testa NG, Lord BI, Shore NA. The in vivo seeding of hemopoietic colony forming cell in irradiated mice. *Blood* 1972; 40: 654-661.

20 . Williams DA, Rios M, Stephens C, Patel VP. Fibronectin and VLA-4 in hematopoietic stem cell-microenvironment interactions. *Nature* 1991; 352: 438-441.

21 . Kerst M, Sanders JB, Slaper-Cortenbach ICM et al.  $\alpha 4\beta 1$  and  $\alpha 5\beta 1$  are differentially expressed during myelopoiesis and mediate the adherence of human CD34+ cells to fibronectin in an activation-dependent way. *Blood* 1993; 81: 344-351.

22 . Leavesley DI, Oliver JM, Swart BW, Berndt MC, Haylock DN, Simmons PJ. Signals from platelet/endothelial cell adhesion molecule enhance the adhesive activity of the very late antigen-4 integrin of human CD34+ hemopoietic progenitor cells. *J Immunol* 1994; 153: 4673-4683.

23. Papayannopoulou T, Nakamoto B. Peripheralization of hemopoietic progenitors in primates treated with anti-VLA4 integrin. Proc Natl Acad Sci USA 1993; 90: 9374-9378.
24. Papayannopoulou T, Craddock C, Nakamoto B, Priestley GV, Wolf NS. The VLA4/VCAM-1 adhesion pathway defines contrasting mechanisms of lodgement of transplanted murine hemopoietic progenitors between bone marrow and spleen. Proc Natl Acad Sci USA 1995; 92: 9647-9651.
25. Craddock CF, Nakamoto B, Andrews RG, Priestley GV, Papayannopoulou T. Antibodies to VLA-4 integrin mobilize long-term repopulating cells and augment cytokine-induced mobilization in primates and mice. Blood 1997; 90: 4779-4788.

日本財団補助金による

1999 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—

2000 年 3 月 17 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 李 艶  
研究機関 東北大学 医学部 研究指導者 田林 暁一 職名 教授  
所在地 〒980-8574 仙台市青葉区早稲町1-1 電話 717-7222 内線 7222

研究テーマ Nicorandil の心臓保護に関する研究

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 ・ (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)

雑誌名: The Japanese Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery

論文名: ① Nicorandil pretreatment and improved myocardial protection during cold blood cardioplegia

② Cardioprotection Effect of Orally Administered Angiotensin-Converting Enzyme Inhibitor Against Ischemic Reperfusion Injury in the Isolated Rat Heart

### 3. 今後の研究計画

心筋保護の研究は、心臓手術、心臓移植、心筋梗塞の内科介入治療に対して大変重要な存在であり、これから心筋保護に関する研究を続けたいと思います。また、最近注目されている経食道心エコー(TEE)も臨床で研究したいと思います。

### 4. 研究指導者の意見

李さんは東北大学医学部の大学院生として心筋保護に関する研究に対して熱心を持って一生懸命にがんばって、インジルの心筋保護効果に関する臨床研究は「日本胸部心臓血管外科雑誌」に発表しました。また、実験研究は「The Journal of Surgical Research」に投稿しています。そのほかに経食道心エコーを手術中に役立ちました。今後李さんは中国で研究や臨床活動の輝きを楽しんでいます。

研究指導者氏名



### 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。

# ワーキングモードを用いたラット摘出心の虚血における $K^+$ カルデイオプレジアに対するニコランジル前処置の優れた心筋保護作用

李 艶

中国北京衛生検疫局 医師

田林暁一

東北大学医学部心臓血管外科 教授

## 要旨

本研究の目的は、1) ニコランジル前処置 (ニコランジルの虚血直前投与) の心筋保護効果に関し、投与量と投与時期を検討すること、2) ニコランジル前処置の心筋保護効果をクリスタロイド心停止液と比較することである。

54匹のラット (Wistar rat, 250~350g) を使用し、摘出心をランゲンドルフ灌流装置に装着した。37℃で28分間灌流後 (ランゲンドルフモード10分間, ワーキングモード10分間とランゲンドルフモード8分間), 28℃で60分間の虚血とした。再灌流は37℃で45分間施行した (ランゲンドルフモード15分間, ワーキングモード30分間)。54匹のラットを無作為に以下の9グループ (各グループ,  $n = 6$ ) に分類した: コントロール群, ニコランジル前処置群 [投与量により4群に分類した:  $10 \mu\text{mol/l}$  投与群— Pre-NC(10),  $30 \mu\text{mol/l}$  投与群— Pre-NC(30),  $100 \mu\text{mol/l}$  投与群— Pre-NC(100),  $300 \mu\text{mol/l}$  投与群— Pre-NC(300)], クリスタロイド心停止液群 (CP), ニコランジルプレコンディショニング群 (ニコランジルの虚血5分前投与群— NC-P), Pre-NC(30) + CP 群, NC-P + CP 群。虚血前後に心拍出量(CO), 冠血流量(CF)をもとめ各群間で比較検討した。また, 虚血後心停止までの時間をもとめ各群間で比較検討した。全ての値は, 平均値±標準誤差で表し, 比較は分散分析, Post hoc テストを用いて施行した。P値が0.05以下で有意差ありとした。



Pre-NC(30) および Pre-NC(100) 群の CO と CF のパーセント回復率はコントロール群に比して有意に良好であった(%CO:62.9 ±1.8, 48.9±3.1 vs 34.3±2.9, P<0.05, %CF: 73.0±3.5, 59.7 ±2.9 vs 44.3±3.6, P<0.05)。Pre-NC(300) 群の CO と CF のパーセント回復率はコントロール群に比して不良であった(%CO: 16.1±6.0 vs 34.3±2.9, %CF: 28.5±9.6 vs 44.3±3.6, P<0.05)。Pre-NC(30) および Pre-NC(100) 群の虚血後心停止までの時間はコントロール群に比して有意に短かった(8.8±0.2分, 11.1±2.9分 vs 20.3±1.6分, P<0.05)。Pre-NC(10) および Pre-NC(300) 群の虚血後心停止までの時間はコントロール群と差がなかった。Pre-NC(30) 群の CO と CF のパーセント回復率は CP 群および NC-P 群に比して有意に良好であった(%CO: 62.9±1.8 vs 46.5±4.6, 46.1±1.6, P<0.05, %CF: 73.0±3.5 vs 55.0±7.2, 59.0 ±2.9, P<0.05)。Pre-NC(30) + CP 群の CO パーセント回復率は CP 群および NC-P 群に比して有意に良好であった(%CO:68.4 ±1.7 vs 46.5±4.6, 46.1±1.6, P<0.05)。しかし, Pre-NC(30) + CP 群の CF のパーセント回復率は CP 群および NC-P 群と差がみられなかった(%CF: 63.9±3.3 vs 55.0±7.2, 59.0±2.9)。NC-P + CP 群の CO と CF のパーセント回復率は NC-P 群と差がなかった。

結論: 1) 30 μmol/l 群のニコランジル前処置が最も良好な心筋保護効果を呈した。2) ニコランジル前処置 [Pre-NC(30) 群] はクリスタロイド心停止液より良好な心筋保護効果を呈した。3) ニコランジル前処置 [Pre-NC(30) 群] はニコランジルプレコンデューション群より良好な心筋保護効果を呈した。

以上より低濃度のニコランジルの虚血直前投与は良好な心筋保護効果を有することが判明し, 今後の臨床の可能性も持ちと考える。

# **Superior Cardioprotective Effect of Nicorandil Pretreatment to Potassium Cardioplegia during Global Ischemia in Isolated Working Rat Hearts**

Yan Li, M.D., Masaki Hata, M.D., Hitoshi Yokoyama, M.D., Ph.D., Atushi Iguchi,  
M.D., Koichi Tabayashi, M.D.

Department of Cardiovascular Surgery,  
Tohoku University School of Medicine,  
Sendai, Japan

Corresponding author:

Yan Li, M.D.

Department of Thoracic and Cardiovascular Surgery

Tohoku University School of Medicine

1-1Seiryomachi, Aoba-ku, Sendai, 980-8574,

Japan

Tel: 81-22-7177222,

Fax: 81-22-7177227

Email: [liyan@mail.cc.tohoku.ac.jp](mailto:liyan@mail.cc.tohoku.ac.jp)

## Abstract

**Objective:** This study was designed to 1) elucidate the dose-response relationship between nicorandil pretreatment (nicorandil administration just before ischemia) and cardioprotection, 2) compare the effect of nicorandil pretreatment with nicorandil preconditioning (nicorandil administration followed by 5 minutes of drug-free perfusion before ischemia) and potassium cardioplegia against ischemia/reperfusion injury. **Methods:** Fifty-four isolated working Wistar rat hearts underwent 28 minutes of 37°C equilibrium (Langendorff-mode and working-mode), 60 minutes of 28°C global ischemia, followed by 45 minutes of 37°C reperfusion (Langendorff-mode and working-mode). Cardiac function was assessed at the end of working-mode. **Results:** Nicorandil pretreatment (30 and 100  $\mu$ mol/l) significantly improved the post-ischemic percent recovery of cardiac output and coronary flow (%CO:  $62.9 \pm 1.8$  and  $48.9 \pm 3.1$  versus  $34.3 \pm 2.9$  in the control, %CF:  $73.0 \pm 3.5$ ,  $59.0 \pm 2.9$  versus  $44.3 \pm 3.6$  in the control,  $P < 0.05$  respectively). Furthermore, nicorandil pretreatment showed superior cardioprotection to potassium cardioplegia (%CO:  $46.5 \pm 4.6$ , %CF:  $55.0 \pm 7.2$ ) and nicorandil preconditioning (%CO:  $46.1 \pm 1.6$ , %CF:  $59.0 \pm 2.9$ ). Nicorandil pretreatment with potassium cardioplegia showed superior %CO ( $68.4 \pm 1.7$ ) to potassium cardioplegia and nicorandil preconditioning, however it did not show better %CF ( $63.9 \pm 3.3$ ) than potassium cardioplegia or nicorandil preconditioning. **Conclusions:** These data demonstrate (1) nicorandil pretreatment (30  $\mu$ mol/l) shows the maximal cardioprotective effect, (2) nicorandil pretreatment provides superior cardioprotection to potassium cardioplegia, (3) nicorandil pretreatment is more efficient than nicorandil preconditioning.

*Key words:* cardioprotection; nicorandil; potassium cardioplegia; ischemia/reperfusion injury.

## 1. Introduction

Cardioprotection is a major concern in ischemic/reperfusion injury such as thrombolytic therapy for acute myocardial infarction, open heart surgery and

cardiac transplantation. Potassium cardioplegia (CP) has been widely used as a conventional method of cardioprotection [1]. Potassium at high concentration depolarizes the myocardial cell membrane associated with rapid electromechanical arrest, and markedly reduces cellular energy expenditure during the ischemic period. However, depolarization of the membrane is also associated with that the exchange of intracellular sodium for calcium via the sodium-calcium exchange, influx of calcium through the calcium “window current” and derangement in transmembrane ion pumps [2]. These factors contribute to calcium overload and depletion of energy store, which is related to irreversible myocardial ischemic damage and reperfusion injury [3,4].

The natural resting state of the myocardial cell is at hyperpolarized membrane potentials [5], in which transmembrane ion gradients are balanced and energy requirements are minimal. ATP-sensitive potassium channels opener hyperpolarizes the membrane of myocyte and has been defined as “hyperpolarizing cardioplegia” [2,6] – a novel form of myocardial protection.

Nicorandil (2-nicotinamidoethyl-nitrate, NC) has drawn attention as a hybrid between an ATP-sensitive potassium channel opener and a nitrate [7]. It is suggested that the myocardial protection of NC is induced by its direct effect through the activation of ATP-sensitive potassium channels [8,9]. Opening ATP-sensitive potassium channel are responsible for an outward potassium current that shortens action potential and decreases the potential-operated calcium channel opening [10]. The reduction of calcium overload and decline in contractile activity restrict the consumption of intracellular ATP in the ischemic myocyte, which is beneficial against ischemia/reperfusion injury [11,12]. Recently subsequent evidence also suggested that the ATP-sensitive potassium channel in the

mitochondrial membrane (mito  $K_{ATP}$ ) is the mediator of cardioprotection [13-15]. The effect may occur as the result of  $K^+$  entry and intramitochondrial depolarization, which would reduce mitochondrial calcium overload leading to enhance ATP synthesis [16,17]. On the other hand, when ATP-sensitive potassium channel is opened, the membrane of coronary vessel endothelial cell is hyperpolarized and the concentration of the intracellular calcium is decreased, which contributes to vasodilation of the smaller coronary vessel [18]. The nitrate-like property of NC activates the vessel smooth muscle and reduces NO, which leads to the vasodilation of the larger coronary vessel [19]. Thus the increase of coronary flow provides an additional beneficial effect on the recovery of post-ischemic cardiac function [20].

NC has been used clinically for patients with ischemic heart disease and had been demonstrated to improve cardioprotective effect as an additive to potassium cardioplegia [21,22] or be efficient as same as CP [23]. However, there have been few investigations of NC as a novel cardioplegic agent to alternate the traditional cardioplegic method and whether the cardioprotection of NC pretreatment is better than CP. In this study, with isolated working rat hearts during 60 minutes  $28^{\circ}\text{C}$  global ischemia, we designed to compare the effect of NC pretreatment as a cardioplegia agent against ischemia/reperfusion injury with CP, to elucidate dose-related toxicity, to examine the administration time and test the effect of NC combined with CP.

## **2. Materials and methods**

### *2.1. Preparation of isolated working hearts.*

This study was approved by Committee of Animal Experimentation of Tohoku University School of Medicine ( in reference to “The Classification of Biomedical Experiments Based on Ethical Concerns for Non-human species”, Laboratory Animal Science, Special Issue P.14-16, 1987). The investigation conforms with the *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* published by the US National Institutes of Health ( NIH Publication No. 85-23, revised 1996). Fifty-four adult male Wistar rats (250-350 g) were anesthetized with sodium pentobarbital (60 mg/kg) and heparinized (300 IU) with an intraperitoneal injection. The heart was excised and immediately immersed in ice-cold Krebs-Henseleit bicarbonate (KHB) buffer, consisting of: NaCl (118.5 mmol/l), KCl (4.7 mmol/l), CaCl<sub>2</sub> (2.5 mmol/l), MgSO<sub>4</sub> (1.2 mmol/l), KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (1.2 mmol/l), NaHCO<sub>3</sub> (25.0 mmol/l) and glucose (11.0 mmol/l). Then, the heart was mounted on a Langendorff apparatus (IPH-W, S/N 300497, Labo Support Corporation, Osaka, Japan) via the aorta, and perfused with KHB solution at a constant pressure of 70 mmHg. KHB solution was equilibrated with 95% oxygen and 5% carbon dioxide (PO<sub>2</sub> > 500 mmHg, PH = 7.42 ± 0.05), and maintained at 37°C with a water jacket. During 10-minutes of non-working Langendorff mode (L-mode), the left atrium was cannulated. Then the heart was switched to working mode (W-mode) with a left atrium pressure of 13 mmHg and an aortic pressure of 70 mmHg [24]. All hearts were paced at a constant rate of 300 beats/min during the baseline and reperfusion period.

## 2.2. Experimental groups.

Fifty-four rat hearts were randomly distributed to nine groups (n=6 in each

group, Table.1). Control hearts received a perfusion with 8 minutes of KHB buffer before global ischemia without NC or CP. In the NC pretreatment group (Pre-NC), NC was administrated for 3 minutes just before ischemia; different dose (10, 30, 100 and 300  $\mu\text{mol/L}$ ) of NC was pretreated in 4 Pre-NC groups: Pre-NC(10), Pre-NC(30) Pre-NC(100) and Pre-NC(1/300). In the NC preconditioning group (NC-P), NC was administrated for 3 minutes followed by 5 minutes of drug-free KHB perfusion before ischemia. In the CP group, CP was given during the first minute of global ischemia. In the Pre-NC+CP group, NC pretreatment combined with CP administrated. And in the NC-P+CP group, NC preconditioning combined with CP was administrated.

NC was dissolved in KHB immediately and filtered through a 0.45  $\mu\text{m}$  porosity membrane before use, then was delivered into the aortic retrograde perfusion circuit for 3 minutes to achieve a different dose (10, 30, 100 and 300  $\mu\text{mol/L}$ ). The range of concentration chosen to test the cardioprotection of NC was based on previous studies [ 22, 25 ] . NC was provided by Chugai Pharmaceuticals (Tokyo, Japan).

The CP solution was prepared by potassium chloride (KCl) added to the KHB buffer (potassium concentration: 20 mmol/l) and infused through a side arm of the aortic cannula at a pressure of 45 mmHg and at 28°C during the first minute of global ischemia. The CP solution was filtered before use through a 0.45  $\mu\text{m}$  porosity membrane and gassed with 95% oxygen and 5% carbon dioxide. During the ischemic period, the myocardial temperature was kept at 28°C in a water jacket bath.

### *2.3. Experimental protocol.*

All the hearts underwent 28 minutes of 37°C equilibrium (10 minutes of L-mode, 10 minutes of W-mode and 8 minutes of L-mode, NC administration when applied), then 60 minutes of 28°C global ischemia (CP administration when applied), followed by 45 minutes of 37°C reperfusion (15 minutes of L-mode and 30 minutes of W-mode) (Fig.1).

The post-ischemic recovery of cardiac function and the time to contractile arrest after ischemia of Pre-NC at different concentrations (10, 30, 100 or 300  $\mu$  mol/l) was designed to elucidate. And the post-ischemic recovery of cardiac function among the CP and Pre-NC, NC-P administrated alone or combined with CP was designed to compare. On the base of the dose-response study, 30  $\mu$  mol/l dose of NC was selected

#### *2.4. Function measurement.*

Aortic flow (AF), coronary flow (CF) were measured at the end of W-mode before global ischemia and at the end of reperfusion. The AF (ml/min) was measured by an electromagnetic flow meter (Nihon Kohden, Tokyo, Japan) positioned in the aortic outflow line, and CF (ml/min) was measured by timed collection of the coronary venous effluent. Cardiac output (CO, ml/min) was calculated as the sum of AF and CF. Post-ischemic recovery of cardiac function was expressed as percent to pre-ischemic values in each heart (%CO, %CF). The time to contractile arrest (minute) during ischemia was measured after global ischemia.



### *2.5. Statistical analysis.*

All cumulative results were expressed as a mean  $\pm$  standard error of the mean. Analysis of variance and Post hoc test followed by Fisher's Protected Least Significant Difference were used to compare mutually exclusive data among the groups when appropriate. A difference was considered statistically significant when  $P < 0.05$ .

### 3. Results

#### *3.1. Recovery of cardiac function in the dose-response study of Pre- NC*

The post-ischemic percent recovery of cardiac function (%CO and %CF) in the dose-response study of Pre-NC was demonstrated in Fig.2. Significantly better %CO and %CF were observed in the hearts that received Pre-NC at concentration of 30 and 100  $\mu$ mol/l than control hearts (%CO:  $62.9 \pm 1.8$  and  $48.9 \pm 3.1$  versus  $34.3 \pm 2.9$  in the control;  $p < 0.05$ , %CF:  $73.0 \pm 3.5$ ,  $59.7 \pm 2.9$  versus  $44.3 \pm 3.6$  in the control;  $p < 0.05$ ). The %CO and %CF in the hearts receiving a 300  $\mu$ mol/l dose of NC (%CO:  $16.1 \pm 6.0$ , %CF:  $28.5 \pm 9.6$ ) were lower than that in the control hearts ( $p < 0.05$ ). There was no statistically significant difference of the recovery of cardiac function in the hearts receiving 10  $\mu$ mol/l dose of NC with the control hearts.

#### *3.2. Time to cardiac arrest in the dose-response study of Pre- NC*

The time to cardiac mechanical arrest after ischemia in the dose-response study of Pre-NC was shown in Fig.3. Pre-NC at doses of 30 and 100  $\mu$ mol/l significantly accelerated the time (minute) to cardiac mechanical arrest ( $8.8 \pm 0.2$  and  $11.1 \pm 2.9$  versus  $20.3 \pm 1.6$  in the control;  $p < 0.05$ ). Pre-NC at doses of 10 and 300  $\mu$ mol/l had no significant difference when compared with the control group.

#### *3.3. Comparison of the recovery of cardiac output in the six groups*

The post-ischemic percent recovery of cardiac output (%CO) among the control, CP and Pre-NC, NC-P administrated alone or combined with CP groups was summarized in Fig.4. A significantly better %CO was observed in the hearts that received CP and Pre-NC, NC-P administrated alone or combined with CP ( $46.5 \pm 4.6$  and  $62.9 \pm 1.8$ ,  $68.4 \pm 1.7$ ,  $46.1 \pm 1.6$ ,  $44.6 \pm 1.6$  versus  $34.3 \pm 2.9$  in the control;  $p < 0.05$ ). Furthermore, Pre-NC administrated alone or combined with CP showed superior %CO to CP and NC-P administrated alone or combined with CP ( $p < 0.05$ ). And there was no statistically significant difference of the %CO among the hearts that underwent CP and NC-P administrated alone or combined with CP.

### *3.3. Comparison of the recovery of coronary flow in the six groups*

The post-ischemic percent recovery of coronary flow among the control, CP and Pre-NC, NC-P administrated alone or combined with CP groups was summarized in Fig.5. A significantly better %CF was observed in the hearts that received Pre-NC administrated alone or combined with CP and NC-P groups ( $73.0 \pm 3.5$ ,  $63.9 \pm 3.3$  and  $59.0 \pm 2.9$  versus  $44.3 \pm 3.6$  in the control;  $p < 0.05$ ). There was no statistically significant difference of the %CF among the hearts that underwent CP ( $55.0 \pm 7.2$ ), NC-P administrated combined with CP ( $53.2 \pm 2.9$ ) and the control hearts. Furthermore, Pre-NC also showed superior %CF to CP and NC-P administrated alone or combined with CP ( $p < 0.05$ ). However, there was no statistically significant difference of the %CF among the hearts that underwent Pre-NC administrated combined with CP, CP and NC-P administrated alone or combined with CP.

#### 4. Discussion

This study has demonstrated that NC pretreatment as a cardioplegic agent against ischemia/reperfusion injury provided a superior post-ischemic recovery of cardiac function to CP. Furthermore, NC pretreatment significantly increased the post-ischemic percent recovery of coronary flow, which results support the mechanism link with vasodilatation of coronary arteries by its ATP-sensitive and nitrate-like properties, leading to an additional beneficial effect on cardioprotection. This data is consistent with a previous observation that EDHF (endothelium-derived hyperpolarization factor) mediated coronary endothelial function is maximally preserved by hyperpolarizing cardioplegia but impaired by depolarizing cardioplegia [26].

There has been no previous investigation of NC as a cardioplegic agent to show superior cardioprotective effect to traditional CP. Only one recent study had shown improvement of functional recovery of NC ( $100 \mu\text{mol/l}$  and  $1 \mu\text{mol/l}$ ) as effective as CP using a blood perfusion isolated rabbit heart during normothermic global ischemia [23]. However, blood cardioplegic solutions have been repeatedly shown to be more protective of post-ischemic function than crystalloid cardioplegia solutions. One can thus hypothesize that blood cardioplegia might be more protective of the hyperpolarized myocardium than the depolarized myocardium. In this way, administering the hyperpolarized cardioplegia-NC in a sanguineous cardioplegic solution might result in improved recovery of cardiac function against ischemia/reperfusion injury when compared with the depolarized cardioplegia-Potassium cardioplegia. Further investigation is necessary to define the possibility.

A puzzling observation in this study is that NC pretreatment significantly improved the recovery of cardiac function in comparison with NC preconditioning. Regardless of the exact mechanism by which NC preconditioning mimics ischemic preconditioning to produce the cardioprotective effect [27-29], the mechanism by which the heart keeps the “memory” of its brief exposure to NC is yet unknown, but has been speculated that NC sustains opening of partial potassium channels and decreases the threshold for channel activation during the ensuing period of protracted ischemia [9], which would result in a limitation with the cardioprotection of NC preconditioning.

In the present data, NC pretreatment combined with CP significantly improved the recovery of post-ischemic cardiac output which was almost the same as NC pretreatment alone, however, it did not show a better recovery of post-ischemic coronary flow than CP. The mechanistic link might be that vasodilation of coronary artery of hyperpolarizing cardioplegia-NC is abolished followed by administration of CP which depolarizes the membrane of coronary vessel endothelial cell leading to the increase of concentration of the intracellular calcium and causing systolic of coronary vessel [26]. Therefore it contributes to reduce recovery of post-ischemic coronary flow.

One previous study using the isolated rat hearts reported that NC pretreatment at doses of 300  $\mu\text{mol/l}$  improved the recovery of the contractile function after 25 minutes of normothermic global ischemia [19]. Another experiment showed 30  $\mu\text{mol/l}$  to 3  $\text{mmol/l}$  of NC increased the recovery of cardiac function after 80 minutes of 20°C global ischemia [30]. However, in this study, we used 28°C global ischemia which is a relatively lower temperature and considered to be a commonly used cardioprotective method during open-heart operation. We found

that NC pretreatment  $100 \mu\text{mol/l}$  had a significant improvement of post-ischemic recovery of cardiac function, and a more detail dose-dependent study showed a lower dose of NC  $30 \mu\text{mol/l}$  provided a maximal cardioprotective effect. In addition, a negative inotropic effect with ventricular arrhythmias happened when using NC equal to or higher than  $300 \mu\text{mol/l}$ , which is consistent with several studies that showed high doses of NC exert a negative inotropic effect with arrhythmias [31,32]. The reason may be related to the chemical structure of NC and a higher dose of NC being a factor to influence the activation of ATP-sensitive potassium channel.

At the same time, NC pretreatment induced a significantly shortened time to mechanical arrest that tended to be similar to that of CP. That the time to mechanical arrest by NC pretreatment was shortened seems to be a direct result of ATP-sensitive potassium channel opening; the addition of glibenclamide to NC completely abolished the ability of NC [23].

Our previous clinical study showed that  $0.3 \text{ mg/kg}$  ( $100 \mu\text{mol/l}$ ) NC which administrated 30 minutes before aortic clamp combined with CP tended to increase the recovery of cardiac output and significantly decreased release of cardiac enzymes after cardiac arrest when compared with CP during the open-heart operation [33]. This animal experiment provides an additional reference about the dose and timing of the addition of NC to clinical study. Whether NC pretreatment with  $30 \mu\text{mol/l}$  just before aortic clamp providing a superior cardioprotection to CP is among the possibility that warrant further investigation.

In summary, the present study has demonstrated that NC is a superior cardioprotective agent against ischemia/reperfusion injury to CP with isolated working rat hearts during 60 minutes  $28^\circ\text{C}$  global ischemia. Among the

relatively wide therapeutic range of NC, there is a maximal concentration ( $30 \mu$  mol/l), and NC pretreatment just before ischemia as its administration time provides more effective cardioprotection. This result suggests that nicorandil pretreatment may be an alternative to traditional cardioprotection in open-heart surgery.

## Reference

- [1] Hearse DJ, Baimbridge MV, Jynge P. Basic concepts. In: Hearse DJ, Baimbridge MV, Jynge P eds. Protection of the ischemic myocardium: cardioplegia, 1<sup>st</sup> ed. New York:: Raven Press, 1981:151-166.
- [2] Cohen NM, Wise RM, Wechsler AS, Damiano RJ. Elective cardiac arrest with hyperpolarizing adenosine triphosphate-sensitive potassium channel opener: A novel form of myocardial protection? *J Thorac Cardiovasc Surg* 1993;106:317-328.
- [3] Kleber AG, Oetliker H. Cellular aspects of early contractile failure in ischemia. In: Fozzard HA, Haber E, Jennings RB, Katz AM, Morgan HE, eds. *The Heart and Cardiovascular System*, 1<sup>st</sup> ed. New York: Raven Press, 1992:1975-2020.
- [4] Reimer KA, Jannings R.B P. (1992) Myocardial ischemia, hypoxia, and infarction. In: Fozzard HA, Haber E, Jennings RB, Katz AM, Morgan HE, eds. *The Heart and Cardiovascular System*, 1<sup>st</sup> ed. New York: Raven Press, 1992:1973-1975.
- [5] Cohen NM, Lederer WJ. Changes in the calcium current of rat heart ventricular myocytes during development. *J Physiol (Lond)* 1988;406:115-146.
- [6] Sargent CA, Grover GJ, Antonaccio MJ, McCullough JR. The cardioprotective, vasorelaxant and electrophysiological profile of the large conductance calcium-activated potassium channel opener NS-004. *J Pharmacol Exp Ther* 1993;266:1422-1429.
- [7] Taira N. Nicorandil as a hybrid between nitrates and potassium channel



- activators. *Am J Cardiol* 1989;63:18J-24J.
- [8] Auchampach JA, Cavero I, Gross GJ. Nicorandil attenuates myocardial dysfunction associated with transient ischemia by opening ATP-dependent potassium channels. *J Cardiovasc Pharmacol* 1992;20:765-771.
- [9] Philippe M, Egidijus K, Christian M, Christian G, Armand P, Gerard B. Preconditioning with potassium channel openers: A new concept for enhancing cardioplegic protection? *J Thorac Cardiovasc Surg* 1995;110:1606-1614.
- [10] Noma A. ATP-regulated K<sup>+</sup> channels in cardiac muscle. *Nature* 1983;305:147-148.
- [11] Cole W, McPherson C, Sontag D. ATP-regulated K<sup>+</sup> channels protect the myocardium against ischemia/reperfusion damage. *Circ Res* 1991;69:571-581.
- [12] Yao Z, Gross G. Activation of ATP-sensitive potassium channels lowers the threshold for ischemic preconditioning in dogs. *Am J Physiol* 1994;267:H1888-H1894.
- [13] Garlid K, Paucek P, Yarov-Yarovoy V, Murray H, Darbenzio R., D'Alonzo A, Lodge N, Smith M, Grover G. Cardioprotective effect of diazoxide and its interaction with mitochondrial ATP-sensitive K<sup>+</sup> Channels: possible mechanism of cardioprotection. *Circ Res* 1997;81:1072-1082.
- [14] Liu Y, Sato T, O'Rourke B, Marban E. Mitochondrial ATP-dependent potassium channels: novel effectors of cardioprotection? *Circulation* 1997;97:463-2469.
- [15] Sato T, O'Rourke B, Marban E. Modulation of mitochondrial ATP-dependent K<sup>+</sup> channels by protein kinase C. *Circ Res* 1998;83:110-114.

- [16] Holmuhamedov E, Jovanovic S, Dzeja P., Jovanovic A, Terzic A. Mitochondrial ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels modulate cardiac mitochondrial function. *Am J Physiol* 1998;275:H1567-H1576.
- [17] Vanden Hoek TL, Becker LB, Shao Z, Li C, Schumacker PT. Reactive oxygen species released from mitochondrial during brief hypoxia induced preconditioning in cardiomyocytes. *J Biol Chem* 1998;273:18092-18098.
- [18] Yanagisawa T. Hyperpolarization-relaxation coupling in vascular smooth muscle. *Folia Pharmacol. Jpn.* 1995;106:157~169. (in Japanese)
- [19] Grover GJ, Sleph PG, Parham CS. Nicorandil improves postischemic contractile function independently of direct myocardial effects. *J Cardiovasc Pharmacol* 1990;5:698-705.
- [20] Iwamoto T, Miura T, Urabe K, Itoya M, Shimamoto K, Iimura O. Effect of nicorandil on post-ischemic contractile dysfunction in the heart: roles of its ATP-sensitive k<sup>+</sup> channel opening property and nitrate property. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 1993;20:595-602.
- [21] Sugimoto S, Puddu E, Monti F, Schiariti M, Campa PP, Maino B. Pretreatment with the adenosine triphosphate-sensitive potassium channel opener nicorandil and improved myocardial protection during high-potassium cardioplegic hypoxia. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1994;108:455-466.
- [22] Qiu Y, Galinanes M, Hearse DJ. Protective effect of nicorandil as an additive to the solution for continuous warm cardioplegia. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1995;110:1063-1072.
- [23] Jayawant AM, Lawton JS, Hsia PW, Damiano RJ Jr. Hyperpolarized cardioplegic arrest with nicorandil: advantages over other potassium channel

- openers. *Circulation* 1997;96 (suppl II):II-240-II-246.
- [24] Engelman DT, Chen CZ, Watanabe M, Kulshrestha P, Das DK, Rousou JA, Flack JE 3rd, Deaton DW, Engelman RM. Hypoxic preconditioning enhances functional recovery after prolonged cardioplegic arrest. *Ann Thorac Surg* 1995;59:428-432.
- [25] Sugimoto S, Iwashiro K, Monti F, Dawodu A, Schiariti M, Puddu P. The risk of myocardial stunning is decreased concentration-dependently by K<sub>ATP</sub> channel activation with nicorandil before high K<sup>+</sup> cardioplegia. *Int J Cardiol* 1995;48:11-25.
- [26] He GW, Yang CQ. Superiority of hyperpolarizing to depolarizing cardioplegia in protection of coronary endothelial function. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1997;114:643-650.
- [27] Gross GJ, Auchampach JA. Blockade of ATP-sensitive potassium channels prevents myocardial preconditioning in dogs. *Circ Res* 1992;70:223-233.
- [28] Guo AC, Diacono J, Feuvray D. Comparison of effects of aprikalim and of hypoxic and ischaemic preconditioning on extracellular potassium accumulation, metabolism, and functional recovery of the globally ischaemic rat heart. *Cardiovasc Res* 1994;28:864-871.
- [29] Parratt JR, Kane kA. K<sub>ATP</sub> channel in ischemic preconditioning. *Cardiovasc Res* 1994;28:783-787.
- [30] Kagizaki K, Yamamodo F, Yishikawa T, Kumada Y, Kawashima Y. ATP sensitive potassium channel modulation and cardioprotection induced by nicorandil. *Ther Res* 1994;15:126-134. (in Japanese)
- [31] Noda M, Muramatsu I. Effects of nicorandil on electromechanical activity

of frog atrial muscle. *J Cardiovasc Pharmacol* 1987;9:237-241.

- [32] Kojima S, Ishikawa S, Ohsawa K, Mori H. Determination of effective and safe dose for intracoronary administration of nicorandil in dogs. *Cardiovasc Res* 1990;24:727-732.
- [33] Li Y, Iguchi A, Turu Y, Nakame T, Sato K, Tabayashi K. Evaluation of nicorandil for myocardial protection in patients undergoing cardiac protection. *Ther Res* 1998;19:83-89.

## Figure Legend

Fig.1. Experimental protocol. L-M, Langendorff-mode; W-M, Working-mode; Pre-NC (NC pretreatment just before ischemia); CP, potassium cardioplegia; NC-P (NC-preconditioning, NC administration followed by 5 minutes drug-free reperfusion); Pre-NC+CP, NC pretreatment in combination with CP; NC-P+CP, NC preconditioning in combination with CP.

Fig.2. Post-ischemic percent recovery of cardiac function (%CO and %CF) in the dose-response study of NC pretreatment (10, 30, 100 and 300  $\mu$ mol/l). Values represent the mean  $\pm$ SEM. \*  $P < 0.05$  vs. control group.

Fig.3. Time to cardiac mechanical arrest (minute) after global ischemia in the dose-response study of NC pretreatment. Values represent the mean  $\pm$ SEM. \*  $P < 0.05$  vs. control group.

Fig.4. Post-ischemic percent recovery of cardiac output (%CO) among control, CP, Pre-NC, Pre-NC+CP, NC-P and NC-P+CP groups. Values represent the mean  $\pm$ SEM. \*  $P < 0.05$  vs. control group; +  $P < 0.05$  vs. CP group;  $\neq$   $P < 0.05$  vs. NC-P group; #  $P < 0.05$  vs. NC-P+CP group.

Fig.5. Post-ischemic percent recovery of coronary flow (%CF) among control, CP, Pre-NC, Pre-NC+CP, NC-P and NC-P+CP groups. Values represent the mean  $\pm$  SEM. \*  $P < 0.05$  vs. control group; +  $P < 0.05$  vs. CP group;  $\neq$   $P < 0.05$  vs. NC-P group; #  $P < 0.05$  vs. NC-P+CP group.

日本財団補助金による

1999 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-

12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 彭輝

研究機関 安徽大学医学部附設第2講座 研究指導者 阪中雅弘 職名 教授

所在地 〒1791-0295 東京都足立区北千住 電話 081-960-5236 内線 直通  
志津川

研究テーマ インナーロイキン3の脳虚血保護作用

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)

(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

今回の我々の検討ではインターロイキン3 (IL-3)は一過性前脳虚血モデルでは明らかに神経保護作用を示したが、脳中大脳動脈永久閉塞モデルでは明らかな保護作用を示さなかった。従ってIL-3の神経保護作用は主として虚血・再灌流障害を軽減するためと考えられた。今後我々は中大脳動脈一過性閉塞モデルでの検討を予定している。虚血再灌流時に発生するフリーラジカルや一酸化窒素は神経細胞に障害を与えアポトーシスによる神経細胞死を誘発する事が知られている。IL-3がアポトーシス抑制遺伝子である**bcl-x<sub>L</sub>**の発現増強作用がある事より、中大脳動脈一過性閉塞モデルでは虚血・再灌流障害を軽減し、神経保護作用を示す事が予想される。

### 4. 研究指導者の意見

彭輝女史は当教室で熱心に研究を続けられ、既に幾つかの論文を発表されている。今回彼女の努力にも関わらず、negative dataであったため残念ながら学会発表等は出来なかった。しかしながら、そのnegative dataをそのまま終わらせず詳細に検討し、次の実験計画を構築する彼女の能力は一流の研究者としての素質が十分であると考えられる。少なくとも今回の検討でIL-3の神経保護効果は虚血・再灌流障害の軽減である事が示唆されたので、今後の彼女の研究成果に期待したい。

研究指導者氏名 阪中 稚広



### 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：インターロイキン3の脳虚血保護作用

研究者氏名：彭輝

中国での所属・役職：  
泰山医学院附属病院病理科・医師

日本での指導者氏名・所属・役職：  
阪中雅広・愛媛大学医学部解剖学第二講座・教授

### 要旨

インターロイキン3 (IL-3) の脳虚血保護作用を調べる為に、5分間の砂ネズミ前脳虚血モデルと、ラット中大脳動脈永久閉塞モデルで検討した。砂ネズミ前脳虚血モデルでは虚血2時間前に側脳室より一日量 0 ng, 64 ng, 又は 320 ng (各群N = 8) のIL-3を持続注入した。虚血後7日目に受動的回避学習試験を行いその後海馬CA1錐体細胞での神経密度を測定した。その結果受動的回避学習試験では用量依存性に反応潜時の増大が有意に見られ、記憶保持能力の改善がみられた。またCA1錐体細胞密度も用量依存性に改善された。一方ラット中大脳動脈永久閉塞モデルでは中大脳動脈閉塞後一日量 0 ng 又は320 ng (各群N = 6) のIL-3を持続注入した。中大脳動脈閉塞後2週間・4週間目にモリス水迷路試験を施行し、空間認知の獲得障害の程度を検討した。その後梗塞面積を測定し、視床後腹側核の大きさを計測した。その結果IL-3投与群はvehicle投与群に比して空間認知障害の有意な改善効果を認めなかった。また梗塞面積比や視床後腹側核面積比も両者にも有意な差は見られなかった。以上の結果よりIL-3は一過性脳虚血モデルでは神経保護効果を示すが、永久閉塞モデルでは神経保護効果が見られない事が明らかとなった。この事は、IL-3の神経保護作用の機構を考える上で極めて重要と考えられる。

key words

IL-3, cerebral ischemia, gerbil, SHR-SP



## 研究報告

### 目的：

IL-3は活性化T細胞が産性するサイトカインの1つであり、赤血球・顆粒球・単球・血小板などの全ての非リンパ系細胞の前駆細胞に作用してその増殖分化を促すサイトカインとして知られている。近年このIL-3が中枢神経系でも重要な作用をしている事が報告されてきた。例えばFrei等はIL-3がマイクログリアの増殖と分化を促進する事を報告しており

(1, 2)、Moroni等はIL-3がsensory neuronの突起伸張を促しその生存率を高める事を(3)、またKamegi等はaxonotomyを行ったcholinergic neuronで突起伸張をIL-3が促進し、神経保護効果がある事を報告している(4)。しかしながらこれらの系は全てIn vitro(培養系)のモデルでの報告であり、in vivo(動物モデル)での報告はなかった。最近我々は砂ネズミ前脳虚血モデルで3分間という短期間虚血でIL-3が遅発性神経細胞死を有意に抑制する事、さらに受動的回避学習試験で学習障害の改善が見られる事、更にアポトーシスによる細胞死を抑制する作用のあるbcl-x<sub>L</sub>の遺伝子発現の亢進が見られる事を報告した

(5)。そこで今回我々は、更に強い虚血負荷である5分間の砂ネズミ前脳虚血モデルと、よりヒトの病態に近い疾患モデルであるラット中大脳動脈永久閉塞モデルで、IL-3に神経細胞保護効果があるかどうかを検討した。

### 方法：

対象として雄性砂ネズミ(体重70-80g)24匹および脳卒中易発症性高血圧自然発症ラット(SHR-SP、体重250-300g)12匹を用いた。全ての動物実験は愛媛大学医学部実験動物取り扱い規定に従って行い、虚血中は直腸温を $37.0^{\circ}\text{C} \pm 0.2$ に保った。

#### 1. 砂ネズミ一過性前脳虚血モデルでの検討

砂ネズミに浸透圧ミニポンプを左側脳室にIL-3を持続注入できる様に固定して背部皮下に植え込んだ。IL-3はRecombinant murine IL-3を0.05 M PBS + 0.1%BSAに溶かし一日量64 ng,又は320 ng(各群N = 8)を持続注入できる様に調整した。またvehicle投与群として0.05 M PBS + 0.1%BSAのみを持続注入した(N = 8)。2時間後、1.5%ハロセン(70%笑気・30%酸素)麻酔下で両側総頸動脈を露出し、動脈瘤クリップを用い5分間血流遮断した。血流再開後7日目にstep-down型受動的回避学習箱を用いて、300秒間の一回の獲得試行を行なった。24時間後に再生試行を行いその反応潜時を検討した。受動的回避学習

試験終了後、ペントバルビタール過剰量投与し、4%パラフォルムアルデヒドにて経心臓的に灌流固定後脳を摘出し、パラフィン包埋後5 $\mu$ mの厚さで薄切切片を作成した。得られた切片にcresyl-violetで染色し海馬神経細胞密度を計測した。

## 2. ラット中大脳閉塞モデルでの検討

脳卒中易発症性高血圧自然発症ラット側頭筋を切断し、左側頭骨にドリルで小孔を開け、中大脳動脈を露出して焼灼凝固した。中大脳動脈閉塞直後から浸透圧ミニポンプを左側脳室にIL-3を持続注入できる様に固定して、背部皮下に植え込んだ。IL-3はRecombinant murine IL-3を0.05 M PBS + 0.1%BSAに溶かし一日量320 ng (N = 6) を持続注入できるように調整した。またvehicle投与群として0.05 M PBS + 0.1%BSAのみを持続注入した (N = 6)。中大脳動脈閉塞後2週間・4週間目にモリス水迷路試験を施行し、空間認知の獲得障害の程度を検討した。モリス水迷路試験終了後、ペントバルビタール過剰量投与し、4%パラフォルムアルデヒドにて経心臓的に灌流固定後脳を摘出し、パラフィン包埋後5 $\mu$ mの厚さで薄切切片を作成した。得られた切片にcresyl-violetで染色し梗塞サイズの定量した。更に視床後腹側核の大きさを計測し視床の脳虚血による2次変性の程度を定量した。

結果：

### 1. 砂ネズミー過性前脳虚血モデル

受動的回避学習試験では用量依存性に反応潜時の増大が有意に見られ、記憶保持能力の改善がみられた (図1A)。更に遅発性神経細胞死の程度を検討するために、海馬CA1錐体細胞における神経細胞密度を検討した。その結果CA1錐体細胞密度も用量依存性に改善された (図1B, 図2)。

### 2. ラット中大脳閉塞モデル

モリス水迷路試験を2週目と4週目に施行した。その結果IL-3投与群ではvehicle投与群に比して空間認知障害の有意な改善効果を認めなかった (図3)。また梗塞側とその反対側での正常大脳皮質面積比を計測した所、IL-3投与群とvehicle投与群では有意な差は見られなかった (図4A)。更に脳梗塞に伴う2次変性の程度を検討するために梗塞側とその反対側の視床後腹側核面積を計測したが、両者にも有意な差は見られなかった (図4B)。

#### 考察：

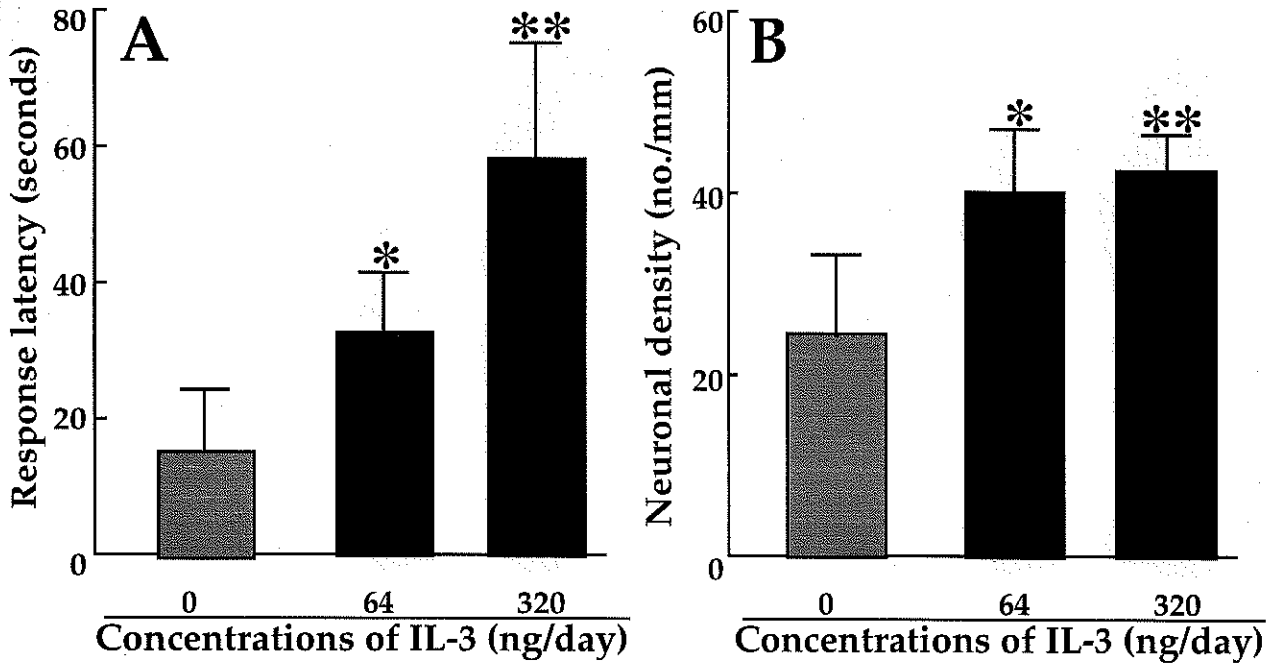
今回我々は、IL-3が5分間の一過性前脳虚血モデルでは神経細胞保護効果が見られたが、ラット中大脳動脈永久閉塞モデルでは明らかな改善効果が見られない事を示した。前回及び今回の我々の検討で、IL-3は一過性脳虚血モデルでは神経保護効果を示すが、永久閉塞モデルでは神経保護効果が見られない事が明らかとなった。即ちIL-3の神経保護作用は主として虚血再灌流障害の抑制による可能性が示唆された。前回我々はIL-3がBcl-x<sub>L</sub>の発現増強を介して神経保護作用を示す事を明らかとした。Bcl-x<sub>L</sub>はミトコンドリアの外膜に豊富に存在し、ミトコンドリアからのチトクロームcの放出を抑制する事が知られている。ミトコンドリアからのチトクロームcの放出がアポトーシスによる細胞死の最初の段階である事は良く知られた事実であるが、最近ミトコンドリア外膜にあるチトクロームcチャンネル(VDAC: voltage-dependent anion channel)をBcl-x<sub>L</sub>が直接制御している事が報告されている(6)。即ちチトクロームcチャンネルとBcl-x<sub>L</sub>又はBcl-2が結合するとミトコンドリアからのチトクロームcの放出が抑制され、チトクロームcチャンネルとBaxとが結合するとチトクロームcがミトコンドリアから放出される事が明らかとなった。実際一過性脳虚血に際してチトクロームcの放出が見られる事は既に幾つかの報告がなされている(7-9)。従ってIL-3の神経保護効果は、IL-3によるBcl-x<sub>L</sub>の発現増強によりミトコンドリアからのチトクロームc放出が抑制され、虚血性神経細胞死が抑制されると考えられる。この仮説を確かめるには中大脳動脈一過性閉塞モデルでの検討を含め、更なる検討が必要と考えられた。

#### 参考文献：

- 1 Frei, K., Bodmer S., Schwerdel C. and Fontana A., Astrocytes of the brain synthesize interleukin 3-like factors, *J Immunol*, 135 (1985) 4044-7.
- 2 Frei, K., Bodmer S., Schwerdel C. and Fontana A., Astrocyte-derived interleukin 3 as a growth factor for microglia cells and peritoneal macrophages, *J Immunol*, 137 (1986) 3521-7.
- 3 Moroni, S. C. and Rossi A., Enhanced survival and differentiation in vitro of different neuronal populations by some interleukins, *Int J Dev Neurosci*, 13 (1995) 41-9.
- 4 Kamegai, M., Nijima K., Kunishita T., Nishizawa M., Ogawa M., Araki M., Ueki A., Konishi Y. and Tabira T., Interleukin 3 as a trophic factor for central cholinergic neurons in vitro and in vivo, *Neuron*, 4 (1990) 429-36.
- 5 Wen, T. C., Tanaka J., Peng H., Desaki J., Matsuda S., Maeda N., Fujita H., Sato K. and Sakanaka M., Interleukin 3 prevents delayed neuronal death in the hippocampal CA1 field, *J Exp Med*, 188 (1998) 635-49.

- 6 Shimizu, S., Narita M. and Tsujimoto Y., Bcl-2 family proteins regulate the release of apoptogenic cytochrome c by the mitochondrial channel VDAC, *Nature*, 399 (1999) 483-7.
- 7 Antonawich, F. J., Translocation of cytochrome c following transient global ischemia in the gerbil, *Neurosci Lett*, 274 (1999) 123-6.
- 8 Sugawara t, T., Fujimura M., Morita-Fujimura Y., Kawase M. and Chan P. H., T mitochondrial release of cytochrome c corresponds to the selective vulnerability of hippocampal CA1 neurons in rats after transient global cerebral ischemia [In Process Citation], *J Neurosci*, 19 (1999) RC39.
- 9 Nakatsuka, H., Ohta S., Tanaka J., Toku K., Kumon Y., Maeda N., Sakanaka M. and Sakaki S., Release of cytochrome c from mitochondria to cytosol in gerbil hippocampal CA1 neurons after transient forebrain ischemia, *Brain Res*, 849 (1999) 216-9.

# 图 1



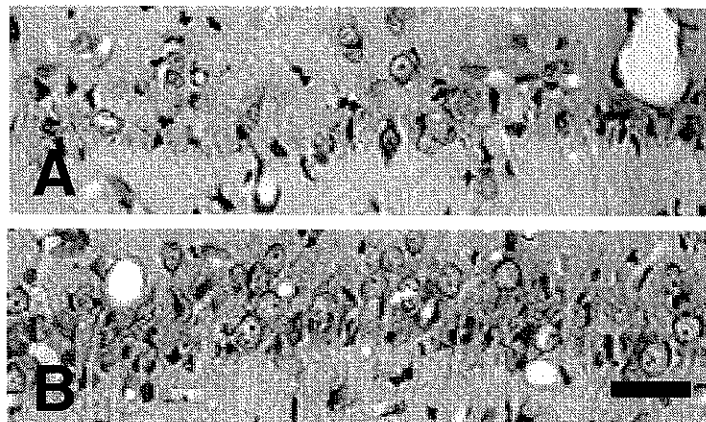
(A) Effects of intracerebroventricular IL-3 infusion on response latency in the passive avoidance task.

The infusion of IL-3 significantly prolonged the response latency in a dose-dependent manner in ischemic gerbils compared with vehicle infusion.

(B) Effects of intracerebroventricular IL-3 infusion on CA1 neuronal density in ischemic gerbils. Significant dose-dependent increase in CA1 neuronal density were noted in IL-3 infused ischemic gerbils compared with vehicle-infused ischemic animals.

\*\* $p < 0.01$  and \* $p < 0.05$ , significantly different from the value of the vehicle-infused animals

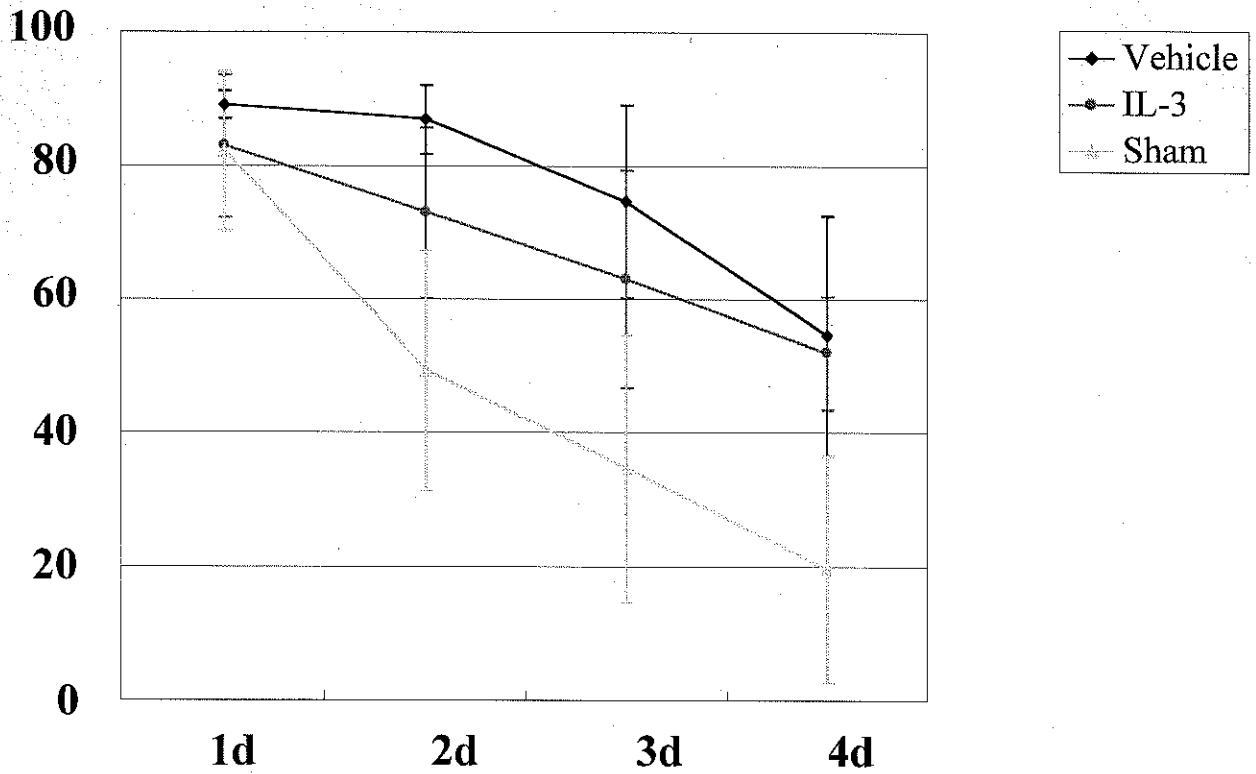
# 图 2



Photographs of the hippocampal CA1 field: sham-operated animal infused with vehicle (A); ischemic animal infused with IL-3 (B). Note that the infusion of IL-3 rescued a significant number of hippocampal CA1 pyramidal neurons. Sections were stained with 0.1% cresyl violet. Bar = 100  $\mu\text{m}$ .

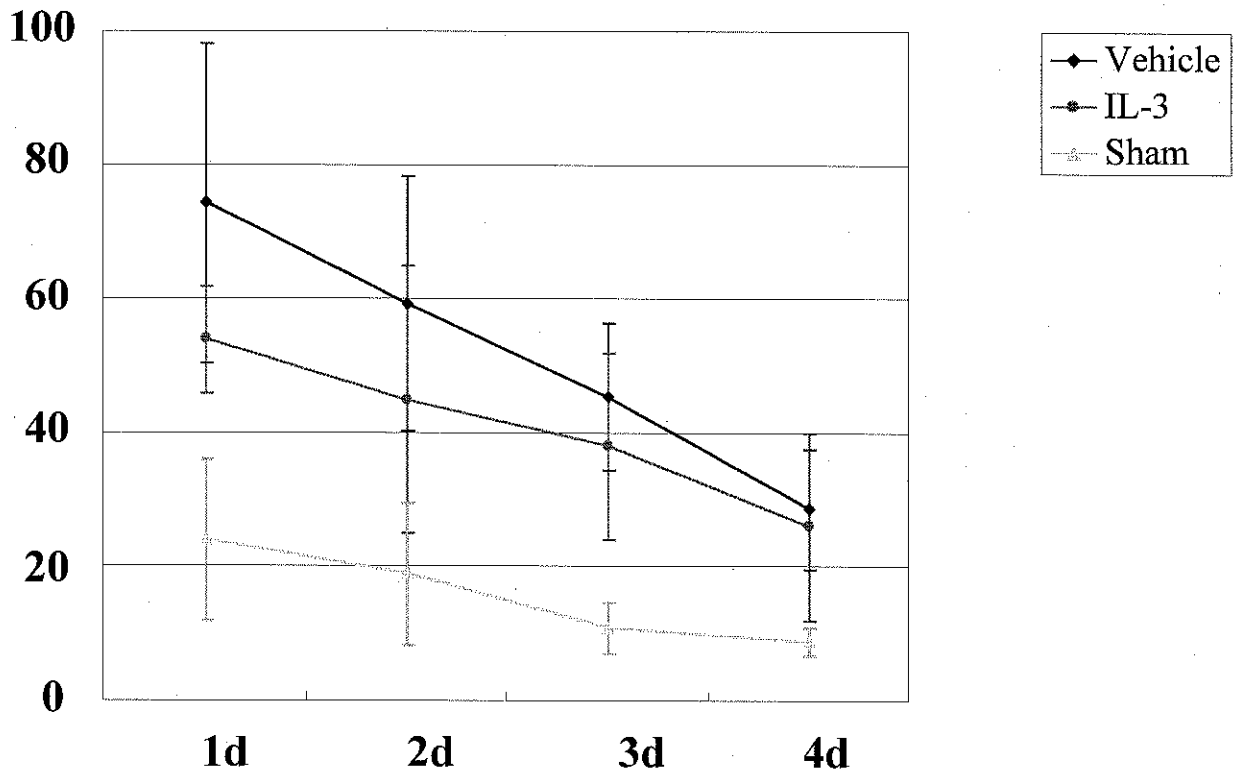
### 图 3A

#### Water Maze test



### B

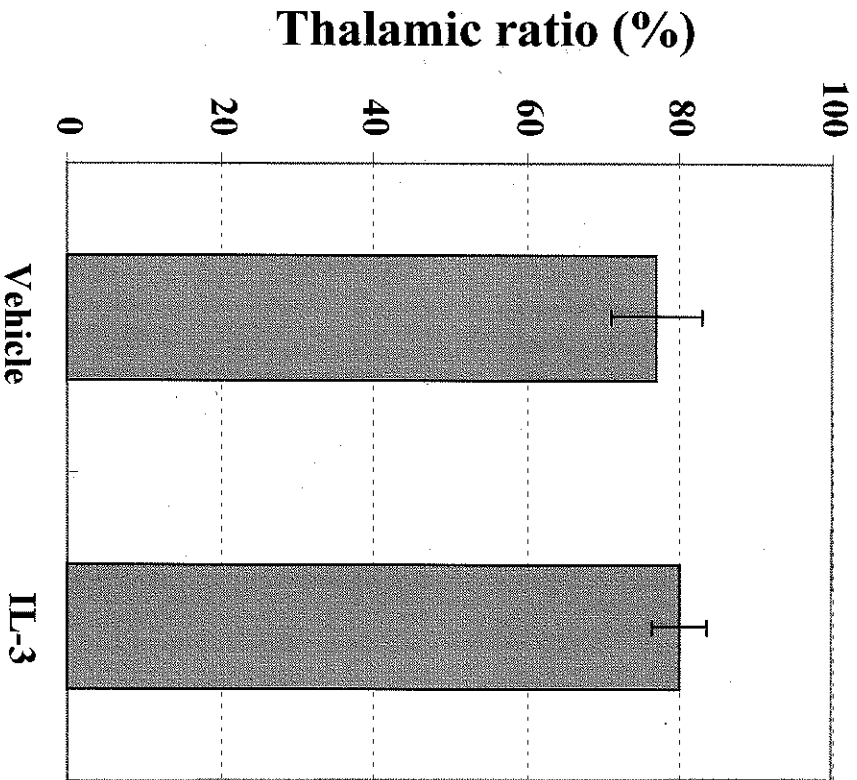
#### Water Maze test (4w)



(A) Escape latency in Morris water-maze task at the 2nd week after MCA occlusion. (B) Escape latency in Morris water-maze task at the 4th week after MCA occlusion. Note that there were not significant differences between the vehicle group and the IL-3 treated group.

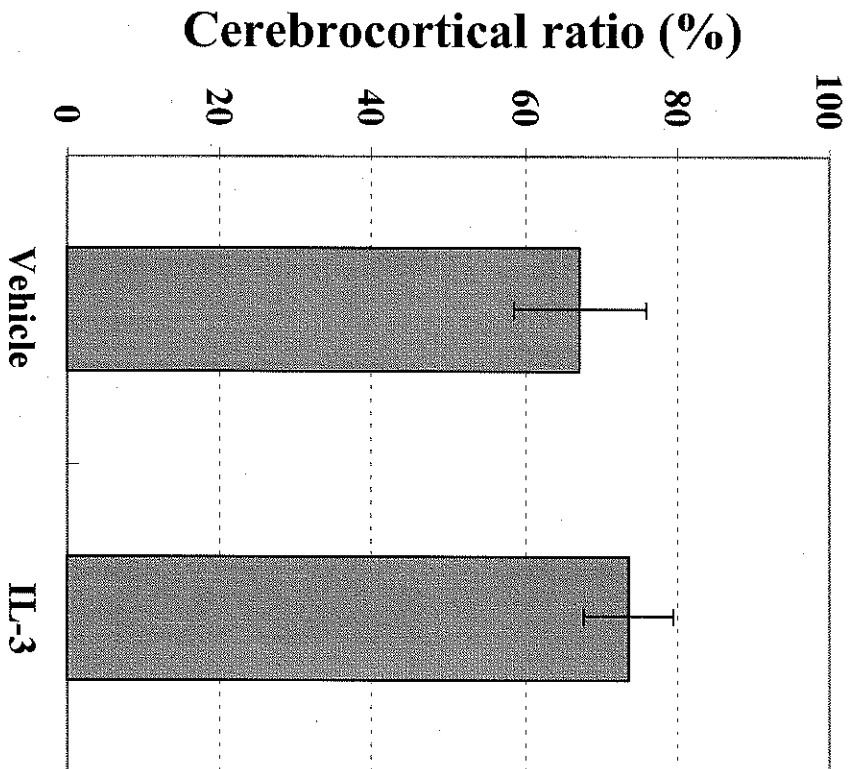
**A**

**Thalamic ratio**



**B**

**Cerebrocortical ratio**



(A) The left-to-right ratio of cerebrocortical area in left MCA occluded rats with or without IL-3 treatment. (B) The left-to-right ratio of thalamic area in left MCA occluded rats with or without IL-3 treatment. Note that there were not significant differences between the vehicle group and the IL-3 treated group.

日本財団補助金による  
1999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20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 吳 利波

研究機関 滋賀医科大学病理学第一講座 研究指導者 服部隆則 職名 教授

所在地 〒520-2192 滋賀県大津市瀬田月輪町 電話 077-548-2168 内線

研究テーマ 胃癌細胞株におけるAPC-catenin 複合体, E-cadherin-catenin複合体の発現について

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)

- a. Immunoblot analysis of the adenomatous polyposis coli-catenin and the E-cadherin-catenin complexes in gastric cancer cell lines. Digestive Disease Week and the 100th Annual Meeting of the American Gastroenterological Association. May, 1999, Orlando, FL, USA
- b. 胃癌細胞株におけるAPC-catenin 複合体, E-cadherin-catenin複合体の発現について  
第71回日本胃癌学会総会 1999.6 東京
- c. Relationship between phenotypic expression and alterations of microsatellites linked to the APC gene in intramucosal carcinomas of the stomach. 5th China-Japan Joint Histochemistry Symposium. May, 2000, Shanghai, China

(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

今年度は 胃癌細胞株を用いて、胃癌細胞株における APC-catenin 複合体、E-cadherin-catenin 複合体の発現について検討した。TFF3 (intestinal trefoil factor) は消化管上皮細胞に広く発現を認める trefoil peptide family のひとつであり、腸上皮細胞の遊走を促進し、粘膜傷害の上皮再生を増強するのが考えられている。本研究では、引き続き各種胃癌細胞における APC-catenin 複合体と E-cadherin-catenin 複合体に対する TFF3 の影響を検討する予定である。

### 4. 研究指導者の意見

多くの研究者と協力的かつ精力的に研究を進めており、来年度もその発展が期待出来ます。

研究指導者氏名 服部 隆則



### 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。

## 研究報告書

研究テーマ

胃癌細胞株におけるAPC-catenin複合体, E-cadherin-catenin複合体の発現について

研究者氏名

呉 利波

中国での所属・役職

中国医科大学附属病院 講師

日本での指導者氏名・所属・役職

服部 隆則

滋賀医科大学病理学第一講座 教授

### 要旨

目的：E-cadherin-catenin複合体は、Ca<sup>2+</sup>イオン依存性の細胞間接着の担い手であり、その機能や発現が細胞の運動性や浸潤性と深く関連していることが示されてきた。また最近、 $\beta$ -cateninはE-cadherinだけでなく、epidermal growth factor receptor (EGFR) や adenomatous polyposis coli (APC)蛋白とも複合体を形成していることが明らかとなった。この研究では各種胃癌培養細胞株を用いてAPC-catenin複合体, E-cadherin-catenin複合体の発現を定量的に検討した。

方法：人胃癌培養細胞株AGS, MKN45（未分化型由来）、HSC39, HSC40A, KATO-III（印鑑細胞癌由来）、MKN28 and MKN74（分化型癌由来）を用いた。細胞抽出液をSDS-polyacrylamide gelで分画化し、nitrocellulose membraneに転写した後、関心蛋白をモノクローナル抗体とHRPラベルした二次抗体で反応させ、ECL化学蛍光法で検出した。

結果：AGS, KATO-III, MKN45細胞では、正常のE-cadherinは検出されなかった。 $\beta$ -cateninに関してはその変異が知られているHSC39とHSC40Aにおいて約20kDaの欠失が認められた。またp120の発現はMKN28とMKN74以外で減少していた。これらの細胞株にはAPC蛋白の変異はなかったが、HSC39とHSC40Aではその発現が減少していた。

結論：高分化型管状腺癌由来の細胞株では、catenin複合体の構成要素はすべて完全に保たれているのに対して、他の細胞株ではこれらの構成要素に何らかの変異や発現の減少を認めた。Catenin複合体の発現の異常は、胃癌細胞株の分化様式と緊密に関係していることが示された。

KEY WORDS: 胃癌, 細胞接着, APC-catenin複合体, E-cadherin-catenin複合体

## Expression of the APC-catenin and the E-cadherin-catenin complexes in gastric carcinoma cell lines

Purpose: E-cadherin is a calcium-dependent cell-cell adhesion molecule, which forms the key functional component of adherence junctions of all epithelial cells. It interacts with E-cadherin molecules on adjacent epithelial cells forming an adhesive structure, which has been likened to an intercellular zipper (Shapiro, 1995). It plays a key role in the establishment and maintenance of intercellular adhesion, cell polarity and tissue architecture (Takeichi, 1991). Translocation of intercellular contact signals into cellular organization is thought to be mediated by the catenins, which are key regulator molecules in this mechanism.  $\alpha$ -catenin (102kDa),  $\beta$ -catenin (94kDa) and  $\gamma$ -catenin (82kDa), are membrane undercoat proteins which, through a series of interactions, link the cytoplasmic carboxy-terminal tail of E-cadherin to the actin cytoskeleton (Nagafuchi, 1989).

Phosphorylation of  $\beta$ -catenin, possibly through interaction with epidermal growth factor receptor (EGFR) and proto-oncogene c-erbB2, is thought to induce a disassembly of the E-cadherin-catenin complex from the actin filament network thus disruption of cell adhesion (Shibamoto, 1994). The Adenomatous Polyposis Coli (APC) gene has been shown to be important in regulating cytoplasmic  $\beta$ -catenin levels. p120 is the most recently discovered member of the catenin family. It is phosphorylated by pp60, a tyrosine kinase known to be associated with the adherens junction (Volberg, 1992), and which induces disruption of adherens junctions and epithelial cell transformation when overexpressed.

To elucidate the role of the E-cadherin-catenin complex in gastric carcinoma, we examined expression and function of complex components in a panel of gastric carcinoma cell lines.

### Materials and Methods

#### Cell lines

Human gastric cancer cell lines, AGS, MKN45, HSC39, HSC40A, Kato-III, MKN28, and

MKN74 were used in this study. Kato-III is a cell line derived from a metastatic pleural effusion secondary to signet ring cell carcinoma of the stomach. AGS and MKN45 are derived from a moderate to poorly differentiated intestinal type gastric carcinoma, while MKN28 and MKN74 are derived from a well-differentiated, intestinal-type gastric carcinoma. HSC39 was derived from malignant ascites arising secondary to a signet ring cell carcinoma, while HSC40A was established from the same original tumor after xenotransplantation of ascitic cells into an athymic BALB/c nude mouse.

#### Growth and maintenance of cells

Cell lines were maintained in DEME supplement with 10% fetal bovine serum. The cells were cultured at 37°C in a humidified atmosphere containing 10% carbon dioxide. Cells were tested for mycoplasma at 3-monthly intervals.

#### Antibodies

Mouse monoclonal IgG antibodies to  $\alpha$ -,  $\beta$ - and  $\gamma$ -catenin and p120, were purchased from Transduction Laboratories, Lexington, KY. E-cadherin (HECD-1) was kindly provided by M. Takeichi (Kyoto University). The APC antibody IgG (ALI-12-28) was purchased from AbCam Cambridge UK.

#### SDS-PAGE and Western blotting

Cell extracts were prepared using Laemmli sample buffer (715mM 2- $\beta$ -mercaptoethanol, 10% glycerol, 2% SDS, 40mM Tris pH 6.8, 1mM EDTA; Laemmli, 1970), with a protease inhibitor cocktail (aprotinin 0.1-2  $\mu$ g ml<sup>-1</sup>, leupeptin 0.5-2  $\mu$ g ml<sup>-1</sup>, PMSF 20-100  $\mu$ g ml<sup>-1</sup>, trypsin-chymotrypsin inhibitor 10  $\mu$ g ml<sup>-1</sup>, TPCK 100  $\mu$ g ml<sup>-1</sup>(all from Sigma-Aldrich Company Ltd, Poole, UK). Sample protein concentration was determined by Biorad protein assay (Biorad, Hemel Hempstead, UK), using spectrophotometry. SDS-PAGE was performed under reducing conditions using an 8% acrylamide resolving gel, pH 8.8, overlaid with a 4.5% stacking gel pH

6.8. The separated proteins were transferred to nitrocellulose (Millipore, UK), using BioRad apparatus. Visualization of protein bands was achieved by incubation in primary antibody overnight followed by extensive washing, and then in horseradish peroxidase-labelled, secondary specise-specific antibody (Dako Ltd, High Wycombe, UK). The membrane was developed in ECL chemiluminescent reagent (Amersham Life Science, Slough, UK) and exposed to X-ray film.

#### Expression of E-cadherin and the catenins in gastric carcinoma cell lines

Aberrant expression of E-cadherin and/or catenins was demonstrated in a number of the cell lines examined. Western blot analysis revealed very low levels of E-cadherin in AGS, which were often barely discernible in repeat experiments. Aberrant E-cadherin expression was detected in Kato-III and MKN45. Two protein bands reactive for E-cadherin were detected in Kato 3, one at 120KDa, and a second at a 130 kDa. MKN45 demonstrated one band at the expected molecular weight of 120 KDa and the second at 80 kDa, which is likely to represent the extracellular tryptic product of E-cadherin as previously described (Frixen et al, 1991). E-cadherin was detected at the expected molecular weight of 120 kDa in HSC39, HSC40A, MKN28 and MKN74, although levels of E-cadherin expression were lower in MKN28 and MKN74 compared to control (HT29) and other gastric carcinoma cell lines.

$\alpha$ -catenin expression was absent in AGS, but expressed at the expected molecular weight of 102 kDa in the remaining five cell lines, although levels were reduced in three of these cell lines, Kato-III, HSC39 and HSC40A, compared to control. Beta- catenin was truncated at 80 kDa in HSC39 and HSC40A, as previously described by the originators (Kawanishi et al, 1995). Finally, all seven cell lines expressed  $\gamma$ -catenin and p120<sup>cm</sup> in comparable amounts and at the expected molecular weight. A band at 300 kDa immunoreactive for APC was detected in all but one cell line, Kato-III, which was negative for APC, suggesting the probable presence of a mutation of the APC gene. A truncated APC protein migrating at 200 kDa was detected in HT29, confirming a previously described mutation.

## DISCUSSION

Loss of cadherin-mediated intercellular adhesion is an important contributory mechanism in tumor pathogenesis. It is postulated to remove contact inhibition of proliferation, thus allowing escape from growth control signals (St Croix, 1998). Loss of cadherin-mediated adhesion may also act by potentiating tumor cell detachment from the primary site, and resulting in dissemination of malignant cells to form metastasis at distant sites, and (Birchmeier, 1993). E-cadherin is thus postulated to act as a growth suppressor and invasion suppressor. An intact cadherin-catenin complex is required, however, for maintenance of normal intercellular adhesion, with mutations of either E-cadherin or  $\alpha/\beta$  - catenins being sufficient to disrupt adherens junction function.

In this study, examination of cell morphology, protein expression and molecular organization of the cadherin-catenin complex in seven gastric carcinoma cell lines have demonstrated evidence of widespread dysfunction of calcium-dependent intercellular adhesion mechanisms. E-cadherin is the principal mediator of intercellular adhesion, and adherens junction integrity in epithelial cells.

In conclusion, we have demonstrated frequent abnormalities of expression of the cadherin-catenin complex, correlated with evidence of impaired protein-protein interactions within the cadherin-catenin complex. In the cell lines derived from well differentiated tubular adenocarcinoma, all components of the catenin complexes were completely preserved, whereas some mutation or down regulation of these components were found in the other cell lines. Abnormal expression of the catenin complexes was closely related to the loss of epithelial differentiation in gastric cancer cell lines.

## REFERENCES

1. Birchmeier W, Michael Weidner K and Behrens J (1993) Molecular Mechanisms leading to loss of differentiation and gain of invasiveness in epithelial cells. *J Cell Sci.* 17:159-164
2. Frixen UH, Behrens J, Sachs M, Eberle G, Voss B, Warda A, Locner D and Birchmeier W (1991) E-cadherin-mediated cell-cell adhesion prevents invasiveness of human carcinoma

- cells. *J Cell Biol.* 113:173-185
3. Kawanishi J, Kato J, Sasaki K, Watanabe N and Niitsu Y (1995) Loss of E-cadherin-dependent cell-cell adhesion due to mutation of the beta-catenin gene in a human cancer cell line, HSC 39. *Mol Cell Biol* 15: 1175-1181
  4. Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685
  5. Nagafuchi A and M Takeichi (1989) Cell-binding function of E-cadherin is regulated by the cytoplasmic domain. *EMBO J* 7: 3679-3684
  6. Shapiro L, Fannon AM, Kwong PD, Thompson A, Lehmann ML Grubel G, Legrand JF, Als-Nielsen J, Coleman KR and Hendrickson WA (1995) Structural basis of cell-cell adhesion by cadherins. *Nature* 374: 327-386
  7. Shibamoto S, Haykawa K, Takeuchi K, Hori T, Oku N, Miyazawa K, Kitamura N, Takeichi M, and Ito F (1994) Tyrosine phosphorylation of beta-catenin and plakoglobin enhanced by hepatocyte growth factor in human carcinoma cells. *Cell Adhes Commun* 1: 295-305
  8. St Croix B, Sheehan C, Rak JW, Florenes VA, Slingerland JM and Kerbel RS (1998) E-cadherin dependent growth suppression is mediated by the cyclin-dependent kinase inhibitor p27<sup>kip1</sup>. *J Cell Biol* 142: 557-571
  9. Takeichi M (1991) Cadherin cell adhesion receptors as morphogenetic regulators. *Science* 251: 1451-1455
  10. Volberg T, Zick Y, Dror R, Sabanay I, Gilon C, Levtzki A and Geiger B (1992) The effect of tyrosine-specific protein phosphorylation in the assembly of adherens-type junctions. *EMBO J* 11: 1733-1742

日本財団補助金による  
1999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－

2000年3月30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 旭  
研究機関 九州大学大学院医学系研究科 研究指導者 猪俣 孟 職名 教授  
所在地 〒812-8582 福岡市東区馬出3-1-1 電話 092-642 内線 5648

研究テーマ 落屑症候群の緑内障発病機序に関する研究

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 ・ 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)

Japanese Journal of Ophthalmology 2000;44:9-14

Electron microscopic study on the development of precapsular layer in eyes with exfoliation syndrome



### 3. 今後の研究計画

落屑症候群の緑内障発病機序に関する研究を続けている。

### 4. 研究指導者の意見


張 旭氏は1995年12月に中国江西医学院から訪問研究員として九州大学医学部眼科学教室に留学し、1997年4月九州大学大学院医学系研究科外科系に入学し、現在博士課程の4年生です。

同氏は、緑内障発症機序の解明を目的に熱心に研究を続けています。中高齢者に高頻度に見られ、しかも緑内障を発症しやすい落屑症候群の発生が水晶体前囊の変化と密接に関係することを明らかにしました。その論文は *Japanese Journal of Ophthalmology* 44 (1): 9-14, 2000 に掲載されています。これは、落屑症候群の発症機序の解明とその予防および治療の開発に有力な手がかりを与える貴重な研究で、今後の発展が期待されます。

さらに、同氏は各種緑内障患者の線維柱帯における Matrix metalloproteinase (MMP) の局在を免疫組織化学的に検討し、緑内障と房水流出抵抗の増大との関係について研究を進めています。

張 旭氏は、非常に真摯な研究態度で、朝早くから夜遅くまで、研究し、日曜休日にも研究室を訪ねています。同氏は中国江西医学院眼科学教室の講師で、きわめて優秀であり、帰国後は中国の眼科学会で指導的立場に立つ人材であります。性格も温厚であり、今後の日中親善と学術の交流に貢献しうると確信いたします。

研究指導者氏名

張 旭 孟 

### 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。

研究テーマ：

落屑症候群に伴う前房水のmatrix metalloproteinase ならびにinhibitor of metalloproteinaseの発見の変化

研究 氏名： 張 旭

所属・役職： 中国江西医科大学・講師

指導者氏名： 猪俣 孟

所属・役職： 九州大学医学部眼科教室・教授

要旨：

Matrix metalloproteinase (MMP) 群は細胞外マトリックス(extracellular matrix, ECM)の構成タンパク質を分解する酵素で、組織の発生、炎症、創傷治癒、悪性腫瘍の浸潤や転移などに重要な働きをすることが報告されている。MMPは生体の様々な組織で生成され、分泌されている。正常あるいは病的な状態における細胞外マトリックスの改変、修復の過程においてMMPは重要な役割を担っている。

落屑症候群は高齢者の水晶体前面あるいは虹彩の瞳孔縁にフケ様の落屑物質が付着し、高頻度に緑内障を合併する疾患である。また、水晶体偏位、散瞳不良が多く見えられ、白内障手術および眼内レンズ移植術の際に、チン小帯断裂、硝子体脱出、移植眼内レンズ偏位などの合併症を伴う危険が高い。本症の緑内障発病機序については不明である。今回我々は落屑症候群眼の前房水をZymography and western blot の手法を用いて、MMPの活性の変化を検討したので報告する。

研究報告

目的：落屑症候群患者の前房水における細胞外MMPsであるgelatinaseと抗分解酵素であるTIMPsの発見の変化について検討する。

方法：落屑症候群患者の前房水。Zymography, Reverse zymography, Western blot の方法。

結果：患者の前房水にgelatinase-9 の活性が亢進していた。

考察：落屑症候群の発病機序に酵素系の発見の異常が関与している可能性が示唆された。

参考文献：

1.Sherleen,H.H et al.Matrix metalloproteinases and their inhibitors in aqueous humor.Exp.Eye Res 62:481-90,1996

2.Woessner J F. Matrixmetalloproteinases and their inhibitors in connective tissue remodeling. FASEB j5:2145-54,1995

3.Schumacher S, et al. Quantification of aqueous flare after phacoemulsification with intraocular lens implantation in eyes with pseudoexfoliation syndrome. Arch Ophthalmol 117:733-5,1999

日本財団補助金による

1999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—

平成12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 李 慶華  
研究機関 関西医科大学微生物学講座 研究指導者 藤澤順一 職名 教授  
所在地 〒570-8506 大阪府守口市文園町10-15 電話 06-6992-1001 内線 2490

研究テーマ 遺伝子欠失DT40細胞株を用いたRNA結合蛋白Sam68の機能解析

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)

1. 芳賀 泉、李 慶華、房木ノエミ、藤澤順一：  
RNA結合蛋白Sam68の細胞周期特異的な機能発現の解析  
第20回日本分子生物学会年会 1997, 12月 京都
2. 李 慶華、芳賀 泉、藤澤順一： トリSam68遺伝子の解析  
第21回日本分子生物学会年会 1998, 12月 横浜
3. 李 慶華、芳賀 泉、伊藤道恭、藤澤順一：  
遺伝子欠失DT40細胞株を用いたRNA結合蛋白Sam68の機能解析  
第22回日本分子生物学会年会 1999, 12月 福岡

(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

これまでの研究でSam68が細胞周期のS期の進展に参与していることが示唆されたことから、同時期に発現調節を受けているmRNAの性質とその調節機構に興味を持たれる。そこで、Sam68によってその安定性、局在性或いは翻訳レベルでの調節を受けている標的mRNAの同定と、そのコードする蛋白の細胞増殖制御における役割を明らかにすることを今後の目標にする。そのために、今回単離したSam68遺伝子欠失細胞特異的に発現が減少あるいは増大しているmRNAをRNA differential display法で単離・同定する。発現量に差の見られるmRNAに関しては、Sam68蛋白との結合性を確認し、さらに細胞周期および細胞増殖刺激に対応した動態を解析する。また、Sam68の有無によって発現が変動する蛋白に関しても2次元の蛋白電気泳動法を用いて同定を試み、有意な差が確認される蛋白に関しては単離・精製し、アミノ酸配列決定、遺伝子クローニングまで進める。

### 4. 研究指導者の意見

李慶華氏は、関西医科大学大学院入学以来、2年間という短い期間の間に、分子生物学および細胞生物学における基本的な手技を殆どマスターし、また、教室のセミナーにも積極的に参加されるなど、その能力と勤勉さが高く評価されます。これまでの研究に対する取り組み方から判断して、あと2年間の在学期間中に本研究をさらに展開し、優秀な学位論文を作成していただけるものと確信しております。研究生活を経済的に支えて下さいました日中友好協会のご厚意に心から感謝いたしますとともに、学位取得後は、その知識と技術を中国の医学と医療の発展に役立てていただくことを念願しております。

研究指導者氏名

藤澤 順一 

### 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。

# 遺伝子欠失 DT40 細胞株を用いた RNA 結合蛋白 Sam68 の機能解析

李 慶華

中国・瀋陽市鉄路局病院・主治医師

(指導) 藤澤順一 関西医科大学微生物講座 教授

## 要旨

Sam68 はチロシンキナーゼ Src により細胞周期のM期特異的にリン酸化される主要な分子として同定された分子量 68 kda の RNA 結合蛋白質であり、これまでに Src, Fyn 等多くのシグナル伝達分子を会合することが示されている。また、RNA 結合ドメインを欠失した分子種の強制発現が細胞増殖を抑制することから、細胞増殖制御における RNA 動態調節との関連が注目されている。

細胞増殖制御における Sam68 の機能を明らかにする目的で、トリ B 細胞株 DT40 を用いて細胞レベルでの遺伝子ターゲティングを行い Sam68 蛋白の発現を欠失した DT40 細胞株を得た。

Sam68 欠失 DT40 細胞の細胞増殖速度は、野生株と比較してわずかながら減少する傾向にあり、細胞周期の解析と合わせ、これは主に S 期の伸長に原因すると考えられた。また、血清濃度減少にともない、S 期の伸長と細胞のアポトーシスの増加が顕著に観察されることから、Sam68 蛋白は S 期或いはその準備期 (G1 期) における RNA 機能の調節に関与する可能性が示唆された。

細胞内シグナル伝達との関連を明らかにする目的で、B 細胞受容体刺激にともなう蛋白質のチロシンリン酸化を解析したところ、B 細胞シグナル伝達において主要な役割を果たす 80 kda の蛋白 BLANK のリン酸化が、Sam68 欠失 DT40 細胞において有意に減少していた。この結果は、Sam68 が部分的ながら B 細胞シグナル伝達に関与することを示している。

今後、Sam68 欠失細胞において動態の変化が観察される mRNA 分子種の有無と RNA 動態調節における細胞内シグナル伝達系の関与に興味を持たれる。

## KEY WORDS

Sam68 チロシンキナーゼ RNA 結合蛋白 遺伝子ターゲティング 細胞周期 シグナル伝達

## 研究報告

### < Purpose >

The RNA binding protein, Sam68 is the only known Src mitotic target and tyrosine phosphorylated specifically during mitosis. Since the Sam68 variant molecule lacking its RNA-binding motif (KH motif) by alternative splicing produced in the stage of contact inhibition has been shown to regulate the cell growth negatively, the functional role(s) of RNA binding in cell growth control was implicated. Sam68 was identified to associate with various signaling molecules (through its SH3 and SH2 binding domains) such as Fyn, Lck, Grb2, PI3K and so on, suggesting its involvement in signal transduction pathway. However, the physiological function or impact of Sam68 in cell growth control and signal transduction events remains to be elucidated. To address the functional role of Sam68 in cell growth control and/or signaling transduction pathways, we established DT40 B cell deficient in Sam68 by gene targeting method and analyzed its functional role in cell growth control and signaling transduction pathways.

## < Method >

### **Cells and Antibodies**

Wild type DT40 cell and its derivative mutant cells were cultured in RPMI 1640 supplemented with 10% fetal calf serum (FCS), 1 % chicken serum, 50 $\mu$ M 2-mercaptoethanol, and antibiotics. Anti-Sam68 (P62GAP) antibody and anti-chicken IgM antibody were purchased from Santa Cruz Biotechnology Inc. (Santa Cruz, CA) and Southern Biotechnology Associates, Inc., respectively. Antibody to phosphotyrosine (Tyr-P, 4G10 ) was a generous gift from Dr. Nariuchi (University of Tokyo).

### **Isolation of Sam68 deficient DT40 cells**

A 0.7 Kb chicken Sam68 cDNA fragment was cloned from DT40 total RNA by RT-PCR using synthetic DNA oligonucleotides corresponding to the KH region of human Sam68 cDNA (5':GGATTTATTTTCTCACAAGAATATG, 3':TGGATTTCATGTCTTCATTGAAGTG). This fragment was then used as a probe for screening  $\lambda$  ZAP DT40 cDNA library and a 2.4 kbp cDNA of chicken Sam68 was obtained. A 8Kb genomic clones were obtained by LA-PCR using primers to SGS homology and 3' non-coding regions. Targeting vectors, CSG-bsr and CSG-hisD, were constructed by replacing the genomic fragment containing exons that correspond to chicken Sam68 amino acids residues 157-257, 348-671 with a bsr or his-D cassettes (gifts from Dr. Kurosaki, Kansai Medical University). 50 $\mu$ g of CSG-bsr was linearized by Sall restriction cleavage and transfected into DT40 cells by electroporation (550V, 25 $\mu$ F). After selection of clones in the presence of blasticidin S (50 $\mu$ g/ml), genomic DNAs were prepared and screened by Southern blot analysis. 50 $\mu$ g of linearized CSG-his DNA was further transfected into the clone with deletion of Sam68 gene on a haploid genome and selected with both bsr (50 $\mu$ g /ml) and L-histidinol (1mg/ml).

### **Southern and RNA blot analysis**

DNA was prepared from wild-type and Sam68 deficient DT40 cells using DNA<sub>ZOL</sub><sup>TM</sup> reagent, 10 $\mu$ g of DNA was digested by EcoRI, separated in 0.8% TAE agarose gel, transferred to Hybond<sup>TM</sup>-N+ Nucleic acid transfer membranes (Amersham) and probed with P<sup>32</sup> labeled DNA probe. RNA was also prepared from wild-type and Sam68 deficient DT40 cells using TRI<sub>ZOL</sub><sup>R</sup> reagent. Total RNA (20 $\mu$ g) was separated in 1.2% formaldehyde gel, transferred to Hybond<sup>TM</sup>-N+ membrane (Amersham) and probed with P<sup>32</sup>-labeled chicken Sam68 cDNA probe.

### **Protein blot analysis**

Cells were lysed in solubilization buffer (1% Nonidet P40, 150mM Tris-HCl, pH 7.4, 50 units/ml Trasylol (Bayer, Leverkusen, Germany), and 1mMNa<sub>3</sub>vo<sub>4</sub>) at 4°C. The lysates were cleared by centrifugation, size fractionated by SDS-PAGE, and transferred onto an Immobilon<sup>TM</sup> Transfer membrane (Millipore) and probed with antiserum against human Sam68.

### **Phosphorylation analysis**

DT40 cells and Sam68 deficient cells were stimulated for 5 and 10 min at 2.5x10<sup>5</sup> cells/ml in RPMI1640 with M4 (4 $\mu$ g /ml) at 37°C. Cells were lysed in 80 $\mu$ l SDS-sample buffer and the

proteins with phosphorylated tyrosine were detected by protein blotting with anti-phosphotyrosine antibody (4G10).

### Flow-cytometric analysis

For DNA content analysis, cells were pelleted and resuspended in the Cycle TEST PLUS DNA reagent A, B, C in succession according to the manufacturer's protocol. For expression of cell surface receptor, cells were washed, subsequently incubated with FITC-conjugated anti-chicken IgM (Bethyl Laboratories, Inc., Montgomery, TX), and analyzed by FACSCan with FACSsort program.

## < Results >

### Isolation and structural analysis of chicken Sam68 gene

In order to disrupt Sam68 gene in a chicken B cell line, DT40 by homologous recombination, we first isolated the chicken Sam68 cDNA. Since the antiserum against the KH domain of human Sam68 could recognize chicken Sam68 in DT40 cell (data not shown), it was expected that the KH domain is highly conserved between chicken and human. Thus RT-PCR of DT40 RNA was performed by using synthetic DNA oligonucleotides corresponding to the KH region of human Sam68 cDNA as PCR primers. As a result a 0.7 kbp fragment was obtained and the nucleotides sequence of this fragment was indicated to encode the KH region of chicken Sam68.

Then using the 0.7 kbp RT-PCR fragment as a probe a full-length chicken Sam68 cDNA was isolated by screening the DT40 cDNA library. Sequence analysis of the full-length cDNA revealed that the structure of Sam68 is conserved by 75% and 78% in the levels of amino-acid and nucleotide sequences, respectively, between human and chicken. A stretch of 138 amino acids including the KH domain was found to be identical between the two species (Fig.1).

From the information of cDNA sequence several PCR primers corresponding chicken Sam68 gene were synthesized and used for isolating the genomic DNA fragment by PCR using DT40 genomic DNA as a template. An 8 kbp genomic fragment was amplified by using primers to a region 5' to KH domain and a 3' non-coding sequence. Structural analysis of the genomic fragment showed that functional motifs such as tyrosine-rich motif, proline-rich motif and nuclear localization signal were located as separate exons in the genome structure.

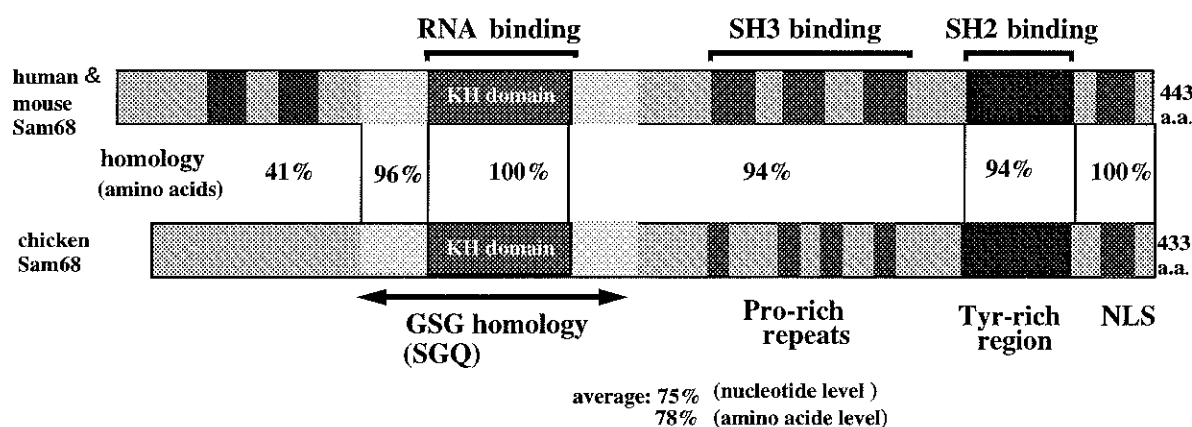


Fig.1 Structure of human and chicken Sam68 protein

## Targeted disruption of Sam68 gene

We constructed the targeting vectors with the isolated genomic DNA fragment (Fig. 2b) and transfected the vectors into DT40 cells (Fig. 2 a). The deletions of two Sam68 alleles in DT40 cell were introduced by sequential transfection of two different targeting vectors containing drug resistant genes against puromycin and histidinol, respectively. Cell clones with homologous recombination were screened by Southern blot analysis of genomic DNA and eleven independent clones were identified (Fig. 2 c).

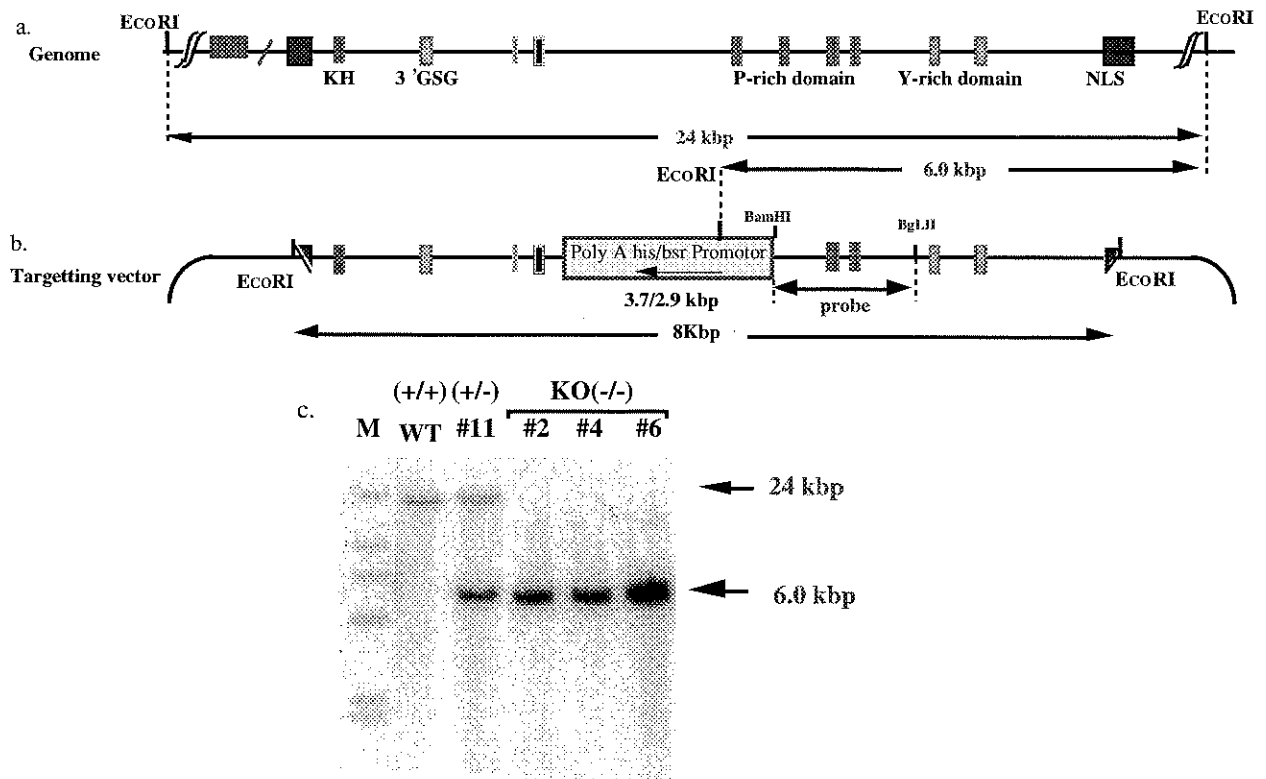


Fig.2 Structure of genomic chicken Sam68 (a) and targeting vector (b)  
Southern analysis of genomic DNA (c).

To verify null mutations, RNA and protein blot analysis using specific probes were carried out. RNA blot analysis identified a 2.3 Kb RNA species in Sam68 knocked-out DT40 cells instead of 3.0 kb wild type Sam68 mRNA (Fig. 3 left pattern). As a 40 kDa protein observed in protein blotting analysis of knocked-out DT40 cells was suggested to be encoded by the 2.3 kb mRNA, cDNA fragment from this short RNA was cloned by RT-PCR using primers in KH domain and NLS. Sequence analysis of the cDNA clearly showed that the 2.3 kb mRNA was generated by alternative splicing, which skipped the RNA sequence corresponding to drug resistant genes in targeting vector (Fig.4). Since the amount of 40 kDa product expressed in knocked-out cells, however, was ranged between 1% (in clone#6) to 10% (in clone#2) of wild type Sam68 (Fig.3 right pattern), we further analyzed the characteristics of these knocked-out cells.



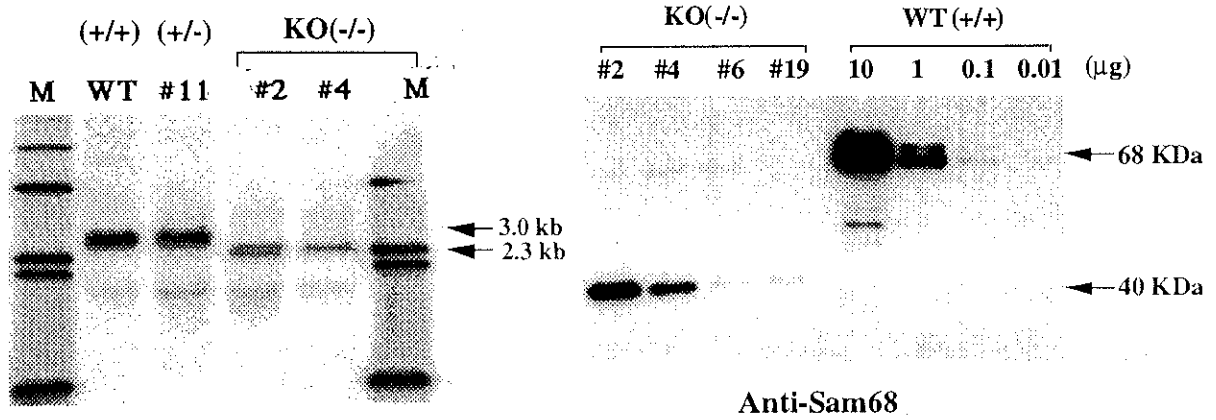


Fig.3 RNA (left) and protein (right) analysis of Sam68 knocked-out DT40 cell

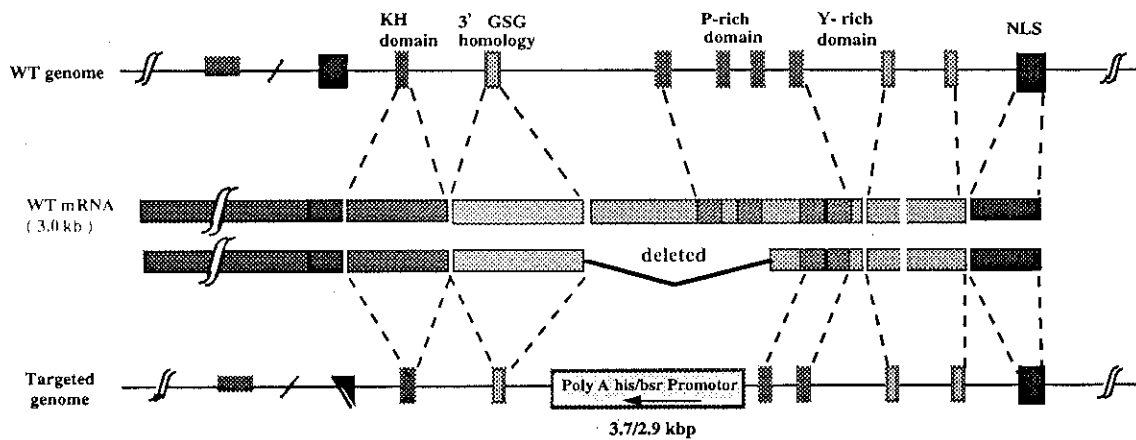


Fig.4 Structure of truncated chicken Sam68 mRNA

### Growth retardation and elongation of S phase in cell cycle of Sam68 deficient cells

To search the functional role of Sam68 in cell growth control, we first analyze the growth rate in wild type and Sam68 deficient DT40 cells. When numbers of cell in normal growth condition were monitored every 12 hours, the growth rate of Sam68 deficient cells was found to be slower than that of wild type (Fig. 5 left pattern).

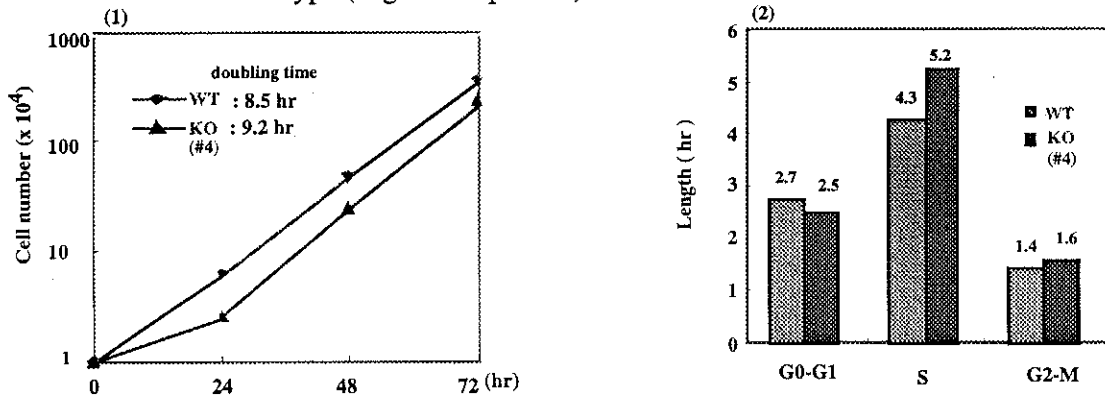


Fig. 5 Analysis of cell growth rate (left) and cell cycle (right)

To further clarify the points in cell cycle that were affected by the deletion of Sam68 gene the flow-cytometric analysis was carried out. Cell cycle pattern of each cell clones demonstrated that the retardation of cell growth of Sam68 deficient cells was mainly due to the elongation of S phase in cell cycle(Fig. 5 right pattern). Effect of Sam68 depletion on the S phase was further supported by the serum depletion experiment in which the expansion of S phase in Sam68 deficient cells was observed (Fig. 6), whereas little effect on S phase was seen in the wild type DT40 cells). Together with evidences that RNA binding activity is essential for functions of other KH-domain containing proteins as well as Sam68 those results implicated that Sam68 involves in cell growth control probably by modulating the function of mRNAs in S phase or early.

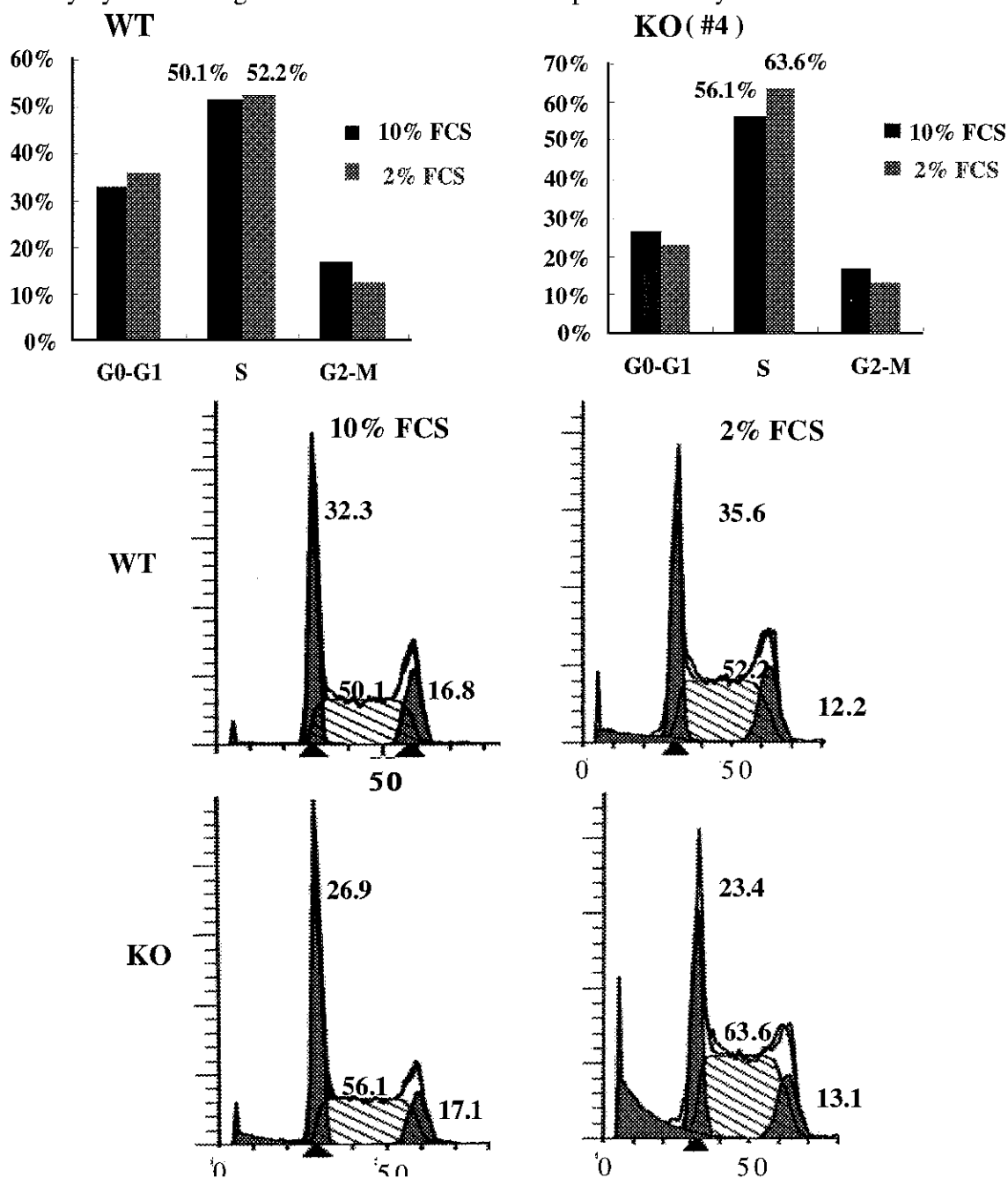


Fig.6 Analysis of cell cycle after serum depletion

## Reduced tyrosine-phosphorylation of BLNK in Sam68 deficient cells

Interaction of Sam68 with various signaling molecule indicates the involvement of Sam68 in signal transduction cascade. To assess the role of Sam68 in signal transduction, tyrosine phosphorylation of cellular proteins was analyzed. After cross-linking of B cell receptor on DT40 cells by anti-chicken IgM monoclonal antibody, M4, tyrosine phosphorylation of cellular proteins was analyzed by protein blotting with anti-phosphotyrosine antibody. The result demonstrated that the overall-pattern of phosphorylated protein in Sam68 deficient cells was similar to that in wild type DT40 cells. However, the maximal level of tyrosine phosphorylation on BLNK, a prominent signaling molecule in B cell, has been observed significantly lower in Sam68 deficient cells (Fig. 7). Since the expression levels of sIgM on the Sam68 deficient clones were essentially same as that of parental DT40 cells (data not shown) it was suggested that deletion of Sam68 resulted in the reduced B cell signaling although it is partial.

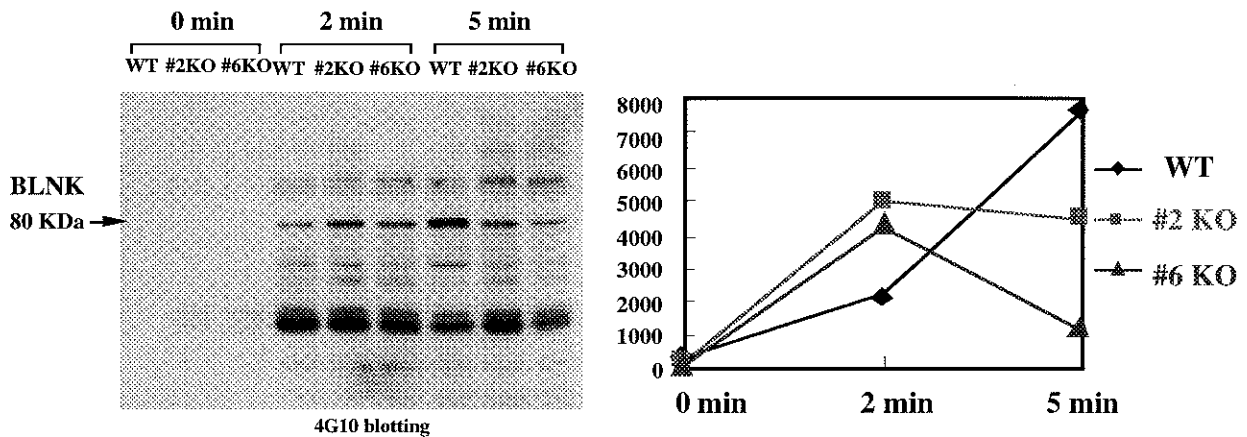


Fig.7 Tyrosine phosphorylation of cellular proteins after cross-linking of BCR

### < Discussion >

Sam68 is able to bind RNA and contains a KH domain and a region similar to a RGG box (Gibson et al., 1993), (Dryfuss et al., 1993), characteristic for a distinct family of RNA binding proteins (Ebersole et al., 1996). Sam68 is therefore a putative regulator of RNA metabolism and it could give means for a rapid pathway to regulate protein expression by modifying the mRNA stability and/or mRNA translation (Brawerman et al., 1989, Morley et al., 1991).

In addition to the RNA binding activity, tyrosine-phosphorylation by Src during mitosis and interaction with signal-transducing proteins indicated that Sam68 plays some important role(s) in cell cycle regulation. More direct evidence for a role of Sam68 in cell cycle control is that expression of a splice variant of Sam68 in which part of the KH domain is deleted inhibits serum-stimulated progression into S phase of the cell cycle (Barlat et al., 1997).

To elucidate the functional role of Sam68 in cell cycle control, we attempted to isolate the chicken DT40 cell-clone lacking intact Sam68 gene. Sam68 deficient DT40 cells were obtained by serial homologous recombination of Sam68 genome with targeting vectors and characteristics in cell growth of these cells were analyzed. The slower growth rate and elongated S phase in Sam68

deficient cells were observed and these results raised the possibility that Sam68 plays a specific role in mRNA metabolism and/or translational control in S phase or earlier. Additional observations in which serum depletion on Sam68 deficient cells resulted in the expansion of S phase and the increase of apoptotic cell also supported this hypothesis.

The RNA binding activity of Sam68 is inhibited by either Src-mediated tyrosine phosphorylation (Wang et al., 1995) or by the binding of an individual Src SH3 domain (Taylor et al., 1995). It is assumed, therefore, that tyrosine phosphorylation and the following protein association is closely associated with the control of RNA metabolism. In addition Sam68 binds a wide variety of different signal-transducing proteins including Grb2, PLY1 (Richard et al., 1995), Grap (Trub et al., 1997), the p85 subunit of PI3-kinase, Crk (Taylor et al., 1995), Nck (Iwe et al., 1997) and rasGAP (Wong et al., 1992), as well as the protein tyrosine kinases Src and Itk (Andrderotti et al., 1997). These interactions which are mediated throughout phosphorylated tyrosines and proline-rich (SH3-binding) sequences in Sam68 suggested that Sam68 may act also as an adaptor molecule in signal transduction pathway.

BLNK is a B cell specific protein that is phosphorylated by Syk after BCR ligation and interacts with variety of downstream effector proteins including PLC $\gamma$ 2, Vav, Grb2 and Nck (Fu and Chan, 1997, Fu et al., 1998, Wienands et al., 1998). Our present data showed that upon B cell receptor stimulation the maximal level of tyrosine phosphorylation on BLNK has been observed significantly lower in Sam68 deficient cells. We therefore hypothesized that Sam68 functions as an adaptor molecule to link the interaction of BCR with Syk to downstream effectors and this adaptor function may involve in the control of cell cycle progression through modulating RNA metabolism and /or translationability.

#### < References >

- Arning, S., Gruter, P., Bilbe, G. and Kramer, A. (1996) *RNA* **2**, 794-810.
- Bagrodia, S., Lanudano, A. P., and Shalloway, D. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 10247-10251.
- Barlat, I., Maurier, F., Duchesne, M., Guitard, E., Tocq, B. and Schwerighoffer, F. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 3129-3132.
- Brawerman, G. (1989) *Cell* **57**, 9-11.
- Bunnell, S C., Henry, P. A., Kolluri, R., Kirchhausen, T., Rickles, R. J. and Berg, L. J. (1996) *J. Biol. Chem.* **271**, 25646-25656.
- Chen, T., Damaj, B., Herrerra, C., and Richard, S. (1997) *Mol. Cell. Biol.* **17**, 5707-5718.
- Dreyfuss, G., Matunis, M.J., Pinol-Roma, S. and Burd, C. G. (1993) *J. Biochem.* **62**, 289-321.
- Ebersole, T. A., Chen, Q. and Shalloway, D. (1997) *Oncogene* **15**, 1247-1253.
- Fumagalli, S., Totty, N. F., Hsuan, J. J. and Courtneidge, S. A. (1994) *Nature* **368**, 871-874.
- Fusaki, N., Iwamatsu, A., Iwahima, M. and Fujisawa, J. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 6214-6219.
- Fu, C., and Chan, A.C. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 27362-27368.
- Fu, C., Turck, C.W. Kurosaki, T., and Chan, A.C. (1998) *Immunity* **9**, 93-103.
- Gibson, Y. J., Thompson, J.D. and Heringa, J. (1993) *FEBS Lett.* **324**, 361-366.
- Loel P, Fumaballi S, Polakis P, McCormik F, courtneidge SA. (1996) *Cell* **84**, 23-24.

Ishiai, M., Kurosaki, M., and Kurosaki, T. (1999) *Immunity* **10** 117-125.

Morley, S.J. and Thomas. G.(1999) *J. Pharmacol. Ther.* **50**, 291-319.

Richard S, Yu D, Blumer KJ, Hausladen D, Olszowy MW, Connelly PA and Shaw AS. (1995) *Mol. Cell. Biol.*, **7**, 777-785.

Taylor, S. J., and Shalloway, D. (1994) *Nature* **368**, 867-871.

Taylor, S. J., Anfi, M., Pawson, T., and Shalloway, D. (1995) *J. Biol. Chem.* **270**, 10120-10124.

Wang LL, Richard S and Shaw AS. (1995) *J. Biol. Chem.*, **270**, 2010-2013.

Wienands. J., Schweikert, J., Wollscheid, B., and Reth M. (1998) *J. Exp. Med.* **188**, 791-795.

Wong G, Muller O, Clark R, Conroy L, Moran ME, Polakis P and McCormick F. (1992) *Cell*, **69**, 551-558.

## **Cyclin D3-Cdk6 complex is immune to CDK inhibitors and uniquely controls cell's growth competence**

Jie Lin, Shigeki Jinno & Hiroto Okayama

Department of Biochemistry and Molecular Biology, Graduate School of Medicine, The University of Tokyo, 7-3-1 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-0033, Japan

---

Mammalian cells require a D cyclin-dependent kinase for the cell cycle start<sup>1-3</sup>, yet many mesenchymal cells express three seemingly redundant D cyclins<sup>3-4</sup> and similarly, seemingly redundant Cdk4 and Cdk6 (ref 5,6) as their kinase partner. Here we show that cyclin D3-Cdk6 complex is unique among the D cyclin and kinase combinations in the ability to promote the cell cycle start. In an anchorage-minus G<sub>1</sub>-arrested rat fibroblast, only D3-Cdk6 complex retains kinase activity due mainly to its ability to evade inhibition by p27<sup>KIP1</sup>(ref 7,8) and p21<sup>CIP1</sup>(ref 9-11) CKIs, strikingly resembling viral cyclin-bound Cdk6 (ref 12). Rodent fibroblasts engineered to overexpress both Cdk6 and cyclin D3 highly resist serum starvation- or cell-cell contact-imposed G<sub>1</sub>-arrest. In BALB/c 3T3 cells, D3 is constitutively expressed, but Cdk6 is markedly induced with concomitant activation by a growth competence factor. We propose a role for D3-Cdk6 complex in regulating cell's growth competence in response to external factors.

During studies on the mechanisms starting the cell cycle in response to oncogenic stimulation, we found that unlike Cdk4, Cdk6 kinase retained activity at G<sub>1</sub>-

arrest imposed by anchorage deprivation, at which p21<sup>CIP1</sup> and p27<sup>KIP1</sup> CKIs were abundantly expressed. The cells used were clones of the NRK-F49 cell line 3-5 fold overexpressing Cdk4 or Cdk6, obtained by transfection with an expression vector harboring the corresponding cDNA. Several independent overexpressors for each construct were initially examined with similar results and, therefore, one representing clone for each construct [Cdk6 overexpressor K6-2 and Cdk4 overexpressor K4-m5 (ref 13)] was chosen for in-depth analysis. Just like the original NRK cells, these overexpressors could not start the cell cycle without anchorage unless stimulated with oncogenic growth factors, typically with EGF plus TGF- $\beta$ . When embedded in anchorage-free methylcellulose semisolid medium, they came to arrest in G<sub>1</sub>. But when stimulated with EGF plus TGF- $\beta$ , the arrested cells could start the cell cycle and form colonies in methylcellulose medium (data not shown, described later). The anchorage-minus G<sub>1</sub>-arrested K6-2 and K4-m5 cells were stimulated with EGF plus TGF- $\beta$  for various times and lysed. From the corresponding overproducer cell lysates, Cdk4 and Cdk6 were immunoprecipitated with specific antibodies and their kinase activities were assayed. In parallel, the amounts of the kinases and D cyclins in the lysates and the immunoprecipitates were determined by western blot. As shown in Fig. 1a, Cdk4 was almost inactive at 0 and 3 h post-stimulation despite being associated with D cyclins and free from inhibitory tyrosinephosphorylation<sup>2</sup>, and became activated at 6 and 9 h. By contrast, Cdk6 was already active at 0 h and there was only a mild increase in activity thereafter. All the three D cyclins D1, D2, and D3 are expressed in NRK cells and these overproducers though they differ from one another in amount and expression

pattern (Fig. 1*a*). The cyclin partner in the active Cdk6 was D3. When cyclins D1, D2 and D3 were immunoprecipitated from the K6-2 lysates and assayed for bound Rb kinase activity, the D3, but not D1 or D2, immunoprecipitate at 0 and 3 h showed activity. When similar assays were performed for the lysate of K4-m5 cells, again only D3 immunoprecipitate had activity albeit it was much reduced. Because Cdk4 kinase activity was virtually none in this lysate (Fig. 1*a*), this residual D3-associated kinase activity was attributable to the Cdk6 that was present in this immunoprecipitate.

These results were fully confirmed by the analysis of anchorage-minus G<sub>1</sub>-arrested K6-2 cells that were additionally overexpressing cyclin D3 or D1. K6-2/D1-3 and K6-2/D3-5 are representative K6-2 clones overexpressing cyclin D1 two-fold and D3 five-fold, respectively (Fig. 1*b*). Perhaps due to a higher susceptibility of D1 to proteolytic degradation, we could not obtain any clones overexpressing D1 more than 2-fold. The cells were arrested in G<sub>1</sub> by incubation in methylcellulose medium and similarly stimulated to start the cell cycle with every 3 h harvests. Cyclin D3 or D1 was immunoprecipitated from the lysates, and their associated Rb kinase activities and the amount of associated Cdk6 were assayed. The D3-associated kinases from K6-2/D3-5 cells were already fully activated at 0 and 3 h, and had virtually no increase during subsequent stimulation (Fig. 1*b*). By contrast, the D3-associated kinase activity from K6-2/D1-3 at these time points was nearly undetectable due to a marked reduction in D3-Cdk6 complex by competition with overexpressed D1, as shown by western blot of the immunoprecipitates. Furthermore, confirming the Fig. 1*a* data, the D1-associated kinases from K6-2/D1-3 were inactive at these time points and significantly activated



during stimulation. We thus concluded that only D3-Cdk6 complex among other combinations retained Rb kinase activity at anchorage-minus G<sub>1</sub>-arrest point.

During anchorage-minus G<sub>1</sub>-arrest, p27<sup>KIP1</sup> is highly induced<sup>14</sup>. Similarly, in K4-m5 and K6-2 cells, it was highly expressed at the G<sub>1</sub>-arrest point and gradually decreased during stimulation (Fig. 2). p21<sup>CIP1</sup> and p18<sup>INK4</sup> (ref 11) were expressed constantly. Interestingly, the level of p21<sup>CIP1</sup> was significantly higher in K4-m5 than in K6-2 cells for unknown reasons. We therefore investigated a possible role for p27<sup>KIP1</sup> and p21<sup>CIP1</sup> in the selective inhibition of D cyclin-dependent kinases. To this end, D1 and D3 were immunoprecipitated from the same amounts of the K6-2 and K4-m5 cell lysates obtained after stimulation for various times, and the amounts of the associated kinases and the inhibitors were quantified by western blot. As shown in Fig. 2, D1 coprecipitated with both Cdk4 and Cdk6 from K6-2 cell lysates whereas D3 coprecipitated only with Cdk6 from the same cell lysates, indicating that D3 has a higher binding affinity to Cdk6 than D1 does. The D3 immunoprecipitates from both overexpressors contained much lower amounts of p27<sup>KIP1</sup> relative to Cdk4 or/and Cdk6 irrespective of the kind of the bound kinases. On the other hand, p21<sup>CIP1</sup> was nearly undetectable in the D3 immunoprecipitates from K6-2 cells, in which Cdk6 was the major associated kinase. Thus, D3-Cdk6 complex poorly bound these CKIs. To confirm this finding, we performed an indirect kinase inhibition assay. Lysates of rapidly growing K6-2/D3-5 and K4-m5 cells, which contained Cdk6-D3 and Cdk4-D1 as the major complex, respectively, were mixed with various amounts of p27<sup>KIP1</sup>, and Cdk6 and Cdk4 were then immunoprecipitated and assayed for activity. By addition of p27<sup>KIP1</sup>, Cdk4 was

strongly inhibited, but Cdk6 was not (Fig. 3b). We concluded that D3-Cdk6 is immune to the CKIs, strikingly resembling viral cyclin-bound Cdk6 (ref 12), and that this perhaps largely if not exclusively accounts for the complex being active at the anchorage-minus  $G_1$ -arrest point despite the presence of large amounts of CKIs.

The ability of D3-Cdk6 complex to evade inhibition by CKIs led us to examine the growth properties of the Cdk6 single, Cdk6/D3 double, and Cdk6/D1 double overexpressors in comparison to parental NRK cells. Their doubling times during exponential growth were similar, but their cell cycle arrest ability varied greatly. In growth medium, parental NRK ceased growth at a density of  $5 \times 10^4$  cells per 1.5 cm dish due to cell contact. K6-2/D3-5 was highly insensitive to contact inhibition and overgrew to a 3-4 fold higher density with still a large population continuing cell cycling but coming to death due to detachment from the dish. K6-2 overgrew to a 50% higher density (Fig. 3a). By contrast, additional overexpression of D1 strongly counteracted the effect of Cdk6 overexpression, and K6-2/D1-32 cells grew to a slightly less density than NRK cells. Overexpression of Cdk4 significantly facilitated density-imposed  $G_1$ -arrest and K4-m5 cells ceased growth at half the density of NRK cells, perhaps due to a reduction in D3-Cdk6 complex by competition for D3 with overproduced Cdk4 (Fig. 1a). These overexpressors behaved similarly to serum starvation. K6-2/D3-5 almost completely evaded serum starvation-imposed  $G_1$ -arrest. During a 6 h labeling in 0.05% FCS, 40% of K6-2/D3-5 entered S phase, a value 5 times higher than of NRK and nearly comparable to 55% of log phase NRK (Fig. 3b). In higher FCS concentrations, such phenotype of K6-2/D3-5 became less clear, but % S phase cells of the

overexpressors proportionally correlated with their attainable maximum cell densities on a culture dish and their D-dependent kinase activities at the anchorage-minus G<sub>1</sub>-arrest point, as shown already. Interestingly, despite the striking growth ability, K6-2/D3-5 cells were unable to grow without anchorage unless given oncogenic stimulation (Fig. 3c). When stimulated with EGF plus TGF- $\beta$ , they proliferated very rapidly and formed gigantic colonies in methylcellulose medium. BALB/c 3T3 and NIH3T3 fibroblasts engineered to overexpress both Cdk6 and D3 showed similar properties (data not shown). Thus, an elevated amount of D3-Cdk6 complex made cells highly competent to growth.

The ability of D3-Cdk6 to evade inhibition by CDK inhibitors and make cells growth-competent may put this kinase complex in a unique position in growth control, and raises the possibility that Cdk6 or/and D3 might mediate an external signal to regulate cell's growth competence. Quiescent BALB/c 3T3 and C3H10T1/2 mouse fibroblasts require two types of growth factor to resume DNA synthesis<sup>15, 16</sup>. One is called a "competence factor" and may be platelet-derived growth factor (PDGF) and 12-O-tetradecanoyl phorbol-13 acetate (TPA) a tumor promoter. The other is called a "progression factor" and may be epidermal growth factor. Accordingly, we examined a possible role for Cdk6/D3 in factor-induced growth competence. BALB/c 3T3 cells were grown to confluence and stimulated with PDGF for varying times up to 24 h. The amounts of Cdk6, Cdk4, D1, D3, p27<sup>Kip1</sup> and p21<sup>CIP1</sup> expressed at each time point were quantified by western blot. In parallel, Cdk4 and D3-associated kinase activities were assayed. Cdk4 and D3 were constitutively expressed. By contrast, Cdk6 was highly

induced with concomitant activation, as indicated by the appearance of D3-associated Rb kinase activity (Fig. 4a). D1 was also induced with concomitant Cdk4 activation, but to a much lesser extent perhaps due to inhibition by p27<sup>KIP1</sup> and p21<sup>CIP1</sup>, which were repressed and reciprocally induced, respectively, during the treatment. PDGF induced Cdk6 also in the C3H10T1/2 mouse fibroblast (Fig. 4b). Moreover, TPA also induced Cdk6 albeit weakly in both C3H10T1/2 and BALB/c 3T3 cells (Fig. 4b, data not shown). We thus conclude that Cdk6-D3 can regulate growth competence in the presence of CKIs and that Cdk6 itself mediates external stimuli that influence growth competence in some fibroblasts.

Mammals contain many redundant factors. But the most of them are functionally similar and differ only in cell type or developmental stage for expression. By contrast, D cyclins and their kinase partners are unlike such situations. D3-Cdk6 complex is unique in function and controls growth competence in fibroblasts despite that unlike Cdk4, Cdk6 is non-essential for the onset of S phase at least in NRK<sup>2</sup>. This unique function of D3-Cdk6 complex largely owes to its ability to evade inhibition by CKIs in a striking resemblance to viral cyclin-associated Cdk6 (ref 12). In fibroblasts, Cdk6 itself is an end effector of external stimuli that influence growth competence. Such role of Cdk6 (and D3) would be particularly important under the circumstances where CKIs are present sufficiently enough to inhibit induced D1-Cdk4 complex. The act of Cdk6 as an effector of external stimuli does not seem to be specific to fibroblasts. In lymphocytes Cdk6 is induced upon stimulation with antigen or interleukin<sup>17, 18</sup>.

## Methods

### Cell culture and transfection

The normal rat kidney cell line NRK-49F cells (American type Culture Collection) were maintained in DMEM with 5% FCS. Synchronization to G<sub>1</sub> by anchorage deprivation was carried out as described<sup>19</sup>. NRK cell clones overexpressing Cdk6 alone, both Cdk6 and cyclin D3 or both Cdk6 and D1 were constructed by transfection with the pEF1-neo expression vector<sup>20</sup> harboring a human Cdk6 cDNA followed by G418 (400 µg ml<sup>-1</sup>) selection and identification of overexpressors, and by subsequent transfection of one Cdk6 overexpressor (K6-2) with pEF1-hygro harboring a rat D1 or mouse D3 (gift of J. Kato) cDNA followed by hygromycin (100 µg ml<sup>-1</sup>) selection.

### *Immunoprecipitation, kinase assay and western blot*

For each time point, 4x10<sup>6</sup> cells were embedded in 50 ml of methylcellulose-DMEM medium with 5% FCS and incubated for 36 h to arrest in G<sub>1</sub> followed by stimulation with EGF + TGF-β<sup>19</sup>. The cells were harvested every 3 h and lysed with 0.5 ml of ice-cold IP buffer composed of 50 mM HEPES (pH 7.5), 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 2.5 mM EGTA, 1 mM DTT, 0.1% Tween 20, 10% glycerol, 1mM PMSF, 4 µg ml<sup>-1</sup> each of leupeptin, pepstatin and aprotinin, 1 mM NaF, 0.1 mM NaVO<sub>4</sub> and 10 mM β-glycerophosphate as described<sup>2</sup>. Cdk6, Cdk4, and Cyclins D1, D2 and D3 were immunoprecipitated from the lysates with specific antibodies as described<sup>2, 21</sup>. A 15 µl suspension of anti-rabbit or anti-mouse IgG-bound agarose beads (Sigma) was then added, and incubation continued for another 1 h. The beads were then collected by a

brief centrifugation and washed twice with ice-cold glycerol-free IP buffer. Kinase assay was carried out with a truncated Rb protein (QED) as a substrate followed by detection of Ser780-phosphorylated Rb with the antibody (MBL)<sup>21</sup>. Western blot analysis was performed as described (Jinno 1999).

#### *BrdU incorporation assay*

Cells were incubated in DMEM containing 0.5%, 0.25% or 0.05% FCS for 42 h. BrdU was then added to the culture at a concentration of 1 ng ml<sup>-1</sup> and incubated for another 6 h. Cells were then fixed with 70% ethanol for 30 min, washed with phosphate-buffered saline (PBS) twice, treated with 6N HCl for 20 min and neutralized with 0.1M Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub>. The fixed cells were washed with 0.25% Triton X-100, then with PBS containing 5% FCS for 30 min and incubated with anti-BrdU (1:1000 diluted) in a room temperature for 1 h followed by incubation with Texas red linked 2<sup>nd</sup> anti-mouse (1:100 diluted) for another 1 h to visualize cells in S phase.

#### *Indirect kinase inhibition assay*

NRK cells were arrested in G<sub>1</sub> by incubating in methylcellulose DMEM for 36 h and lysed with IP buffer. The lysate was heat-inactivated and briefly centrifuged as described<sup>22</sup>. The supernatant was used as the p27<sup>KIP1</sup> preparation. The susceptibility of Cdk4-D1 and Cdk6-D3 complexes to p27<sup>KIP1</sup> was assayed by incubation of the lysates from rapidly growing K4-m5 and K6-2/D3-5 cells with various amounts of the p27<sup>KIP1</sup>-enriched solution followed by immunoprecipitation of Cdk4 or Cdk6 and assay of Rb

kinase<sup>22</sup>.

---

1. Baldin, V., Lucis, J., Marcote, M. J., Pagano, M. & Draetta, G. Cyclin D1 is a nuclear protein required for cell cycle progression in G1. *Genes Dev.* **7**, 812-821 (1993).
2. Jinno, S., Hung, S.-C. & Okayama, H. Cell cycle start from quiescence controlled by tyrosine phosphorylation of Cdk4. *Oncogene* **18**, 565-571 (1999).
3. Xiong, Y., Zhang, H. & Beach, D. D type cyclins associate with multiple protein kinases and the DNA replication and repair factor PCNA. *Cell* **71**, 505-514 (1992)
4. Sherr, C. J. D-type cyclins. *Trends Biochem. Sci.* **20**, 187-190 (1995).
5. Meyerson, M. & Harlow, E. Identification of G1 kinase activity for cdk6, a novel cyclin D partner. *Mol. Cell. Biol.* **14**, 2077-2086 (1994).
6. Hunter, T. & Pines J. Cyclins and cancer II: cyclin D and CDK inhibitors come of age. *Cell* **79**, 573-582 (1994).
7. Polyak, K., Lee, M. H., Erdjument-Bromage, H., Koff, A., Roberts, J. M., Tempest, P. & Massague, J. Cloning of p27Kip1, a cyclin-dependent kinase inhibitor and a potential mediator of extracellular antimitogenic signals. *Cell*. **78**, 59-66 (1994).
8. Toyoshima, H. & Hunter, T. p27, a novel inhibitor of G1 cyclin-CDK protein kinase activity, is related to p21. *Cell* **78**, 67-74 (1994).
9. Harper, J. W., Adami, G. R., Wei, N., Keyomarsi, K. & Elledge, S. J. The p21 CDK-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases.

- Cell* **75**, 805-816 (1993).
10. Xiong, Y., Hannon, G. J., Zhang, H., Casso, D., Kobayashi, R. & Beach, D. p21 is a universal inhibitor of cyclin kinases. *Nature* **366**, 701-704.
  11. Sherr, C. J. & Roberts, J. M. Inhibitors of mammalian G1 cyclin-dependent kinases. *Genes Dev.* **9**, 1149-1163 (1995).
  12. Swanton, C., Mann, D. J., Fleckenstein, B., Neipel, F., Peters, G. & Jones, N. Herpes viral cyclin/cdk6 complexes evade inhibition by CDK inhibitor proteins. *Nature* **390**, 184-187 (1997).
  13. Terada, Y., Tatsuka, M., Jinno, S. & Okayama, H. Requirement for tyrosine phosphorylation of Cdk4 in G1 arrest induced by ultraviolet irradiation. *Nature* **376**, 358-362 (1995).
  14. Orend, G., Hunter, T. & Ruoslahti, E. Cytoplasmic displacement of cyclin E-cdk2 inhibitors p21Cip1 and p27Kip1 in anchorage-independent cells. *Oncogene* **16**, 2575-2583 (1998).
  15. Tatsuka, M., Mitsui, H., Wada, M., Nagata, A., Nojima, H. & Okayama, H. Elongation factor-1 $\alpha$  gene determines susceptibility to transformation. *Nature* **359**, 333-336 (1992).
  16. Tatsuka, M., Orita, S. & kakunaga, T. Analysis of cell variants showing differential susceptibilities to radiation-or chemical-induced neoplastic transformation: differences in their responses to growth factors. *J. cell Physiol.* **139**, 18-23 (1989).
  17. Wagner, E. F., Hleb, M., Hanna, N. & Sharma, S. A pivotal role of cyclinD3 and cyclin-dependent kinase inhibitor p27 in the regulation of IL-2-, IL-4-, or IL-10-



- mediated human B cell proliferation. *J. Immunol.* **161**, 1123-1131 (1998).
18. Chilosi, M., Doglioni, C., Yan, Z., Lestani, M., Menestrina, E., Sorio, C., Beneditti, A., Vinante, E., Pizzolo, G. & Inghirami, G. Differential expression of cyclin-dependent kinase 6 in cortical thymocytes and T-cell lymphoblastic lymphoma/leukemia. *Amer. J. Pathol.* **152**, 209-217 (1998).
  19. Kume, K., Jinno, S., Miwatani, H., Kizaka-Kondoh, S., Terada, Y., Nojima, H. & Okayama, H. Oncogenic signal-induced ability to enter S phase in the absence of anchorage is the mechanism for the growth of transformed NRK cells in soft agar. *New Biol.* **4**, 504-511 (1992).
  20. Mizushima, S., Nagata, S. pEF-BOS, a powerful mammalian expression vector. *Nuc. Acids Res.* **18**, 5322(1990).
  21. Kitakawa, M., Higashi, H., Jung, H-K., Suzuki-Takahashi, I., Ikeda, M., Tamai, K., Kata, J., Segawa, K., Yoshida, E., Nishimura, S. & Taya, Y. The consensus motif for phosphorylation by cyclinD-cdk4 is different from that for phosphorylation by cyclinAE-cdk2. *EMBO J.* **15**, 7060-7069 (1996).
  22. Slingerland, J. M., Hengst, L., Pan, C.-H., Alexander, D., Stampfer, M. R. & Reed, S. I. A new inhibitor of cyclin-CDK activity detected in transforming growth factor  $\beta$ -arrested epithelial cells. *Mol. Cell Biol.* **14**, 3683-3694 (1994).

**Acknowledgements.** We thank J. Kato for the mouse cyclin D3 cDNA. This work was supported by grants from the Ministry of Education and Culture, Japan.

Correspondence and requests for materials should be addressed to H. O. (e-mail:

okayama@m.u-tokyo.ac.jp

### Figure Legends

**Figure 1** Cdk6-cyclin D3 complex retains activity at G<sub>1</sub>-arrest induced by anchorage deprivation. **a.** Rb kinase activities in Cdk4, Cdk6 or D cyclin immunoprecipitates from the Cdk4 or Cdk6 overproducers. K6-2 and K4-m5 (ref 13) cells were arrested in G<sub>1</sub> in methylcellulose DMEM and stimulated with EGF + TGF-β. The cells were harvested every 3 h and lysed. Cdk4, Cdk6 and/or D cyclins were immunoprecipitated with αCdk4 (c-22), αCdk6 (c-21), αcyclin D1 (H295, 92-13G), αcyclin D2 (M-20) and αcyclin D3 (C-16) antibodies (Santa Cruz), and the associated Rb kinase activities and cyclin or kinase partners were assayed. **b.** Comparison of Rb kinase activities in Cdk6 or cyclin D3 or D1 immunoprecipitates from Cdk6 single, Cdk6/D3 or Cdk6/D1 double overproducers. K6-2/D1-3, K6-2 and K6-2/D3-5 cells were arrested in G<sub>1</sub>, stimulated, harvested and lysed as in **a.** Similarly, associated Rb kinase activities and cyclin and kinase partners were assayed.

**Figure 2** Cyclin D3-Cdk6 complex is immune to p27<sup>Kip1</sup> and p21<sup>CIP1</sup>. **a.** D3-Cdk6 complex poorly binds p27<sup>Kip1</sup> and p21<sup>CIP1</sup>. K4-m5 and K6-2 cells were arrested in G<sub>1</sub> by anchorage deprivation, stimulated, harvested and lysed as in Fig. 1. P27<sup>KIP1</sup>, p21<sup>CIP1</sup>, and p18<sup>INK4</sup> in the lysates were quantified by western blot. Cyclins D1 and D3 were immunoprecipitated from the lysates, and associated Cdk6, Cdk4, p21<sup>CIP1</sup> and p27<sup>KIP1</sup> were quantified by western blot. **b.** p27<sup>KIP1</sup> inhibits Cdk4, but not Cdk6-D3. The susceptibility of Cdk4 and Cdk6-D3 to inhibition by p27<sup>KIP1</sup> was assayed as in Methods.

1x of p27<sup>KIP1</sup> defines the amount of p27<sup>KIP1</sup> contained in 800 µg protein of the G<sub>1</sub>-arrested NRK cell lysate. Lysates (800 µg protein) prepared from rapidly growing K4-m5 and K6-2/D3-5 cells were incubated with 0.2x, 1x or 2x of the p27<sup>KIP1</sup> preparation. Cdk4 and Cdk6 were then immunoprecipitated and assayed for Rb kinase activity.

**Figure 3** Overexpression of Cdk6 and cyclinD3 blocks contact inhibition- or serum starvation-induced G<sub>1</sub>-arrest of NRK cells. *a.* Cells overexpressing both Cdk6 and D3 resists density-imposed growth arrest. NRK, K4-m5, K6-2, K6-2/D3-5 and K6-2/D1-3 cells were plated into 12 well culture dishes at a density of 5x10<sup>4</sup> cells per well, cultured in DMEM with 5% FCS and counted everyday. The data shown are values averaged from 3 independent experiments. Thin lines are standard errors. *b.* Cells overexpressing both Cdk6 and D3 resist serum starvation-imposed G<sub>1</sub>-arrest. Semi-confluent NRK, K6-2, K6-2/D3-5, and K6-2/D1-3 cells were cultured in DMEM with 0.05%, 0.25% or 0.5% FCS for 42 h, then labeled with BrdU for 6 h. The cells in S phase were determined by nuclear staining with anti-BrdU antibody. As a reference, rapidly growing NRK cells were similarly determined for % S phase cells. The data shown are values averaged from 3 experiments. Thin lines are standard errors. *c.* Overexpression of Cdk6 and D3 does not induce anchorage-independent growth, but markedly promotes the anchorage-independent growth induced by EGF + TGF-β. NRK and K6-2/D3-5 cells were incubated in 5% FCS methylcellulose DMEM in the presence or absence of EGF + TGF-β for 2 weeks.

**Figure 4** A growth competence factor induces Cdk6 in mouse fibroblasts. *a.* PDGF induces Cdk6 with concomitant activation in BALB/c 3T3 cells. BALB/c 3T3 cells were grown to confluence and then stimulated with PDGF (40 ng ml<sup>-1</sup>) for various times. Cells were lysed, and Cdk6, Cdk4, D1, D3, p27 and p21 were quantified by western blot. In parallel, D3 and Cdk4 were immunoprecipitated and the associated Rb kinase activity was assayed. *b.* PDGF and TPA induce Cdk6 in C3H10T1/2 cells. C3H10T1/2 cells were arrested in G<sub>1</sub> by contact inhibition and serum starvation<sup>15</sup>, and then stimulated with PDGF (40 ng ml<sup>-1</sup>) or TPA (100 ng ml<sup>-1</sup>) for 24 h. Cell lysates were prepared, and Cdk6, Cdk4, D1, D3, p27 and p21 were quantified by western blot.

日本財団補助金による  
1999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—

2000年 2月 26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 呂玉泉

研究機関 大阪大学医学部環境医学教室 研究指導者 森本兼曩 職名 教授

所在地 〒565-0871 大阪府吹田市山田丘2-2 電話 06-6879-3923 内線 3923

研究テーマ 環境化学物質における遺伝毒性の解析

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)

なし

(2) 学会誌等に発表した論文 有・無 (雑誌名・論文名)

雑誌名: Environmental Health Perspective

論文名: Genotoxic effects of  $\alpha$ -endosulfan and  $\beta$ -endosulfan

on human Hep G2 cells

### 3. 今後の研究計画

- 1) エンドスルファンの $\alpha$ 異性体と $\beta$ 異性体の遺伝毒性のメカニズムを解明する。
- 2) エンドスルファンは内分泌攪乱物質であるが、その $\alpha$ 異性体と $\beta$ 異性体の内分泌攪乱作用を比較する。
- 3) catechin は抗酸化また抗変異原物質であるが、その予防的な作用を解明する。

### 4. 研究指導者の意見

エンドスルファンは有機塩素類農薬である。エンドスルファンの $\alpha$ 異性体と $\beta$ 異性体の遺伝毒性に関する報告は見られなかった。この研究は姉妹染色分体交換、小核及び SCG の三つのスタンダードな方法で初めてエンドスルファンの $\alpha$ 異性体と $\beta$ 異性体の遺伝毒性及び相違点を *in vitro* で解明して、非常に有意義な知見をもたらした。今後、この二つの異性体の遺伝毒性、内分泌攪乱作用等のメカニズムの解明、さらに、予防医学への応用などの研究の発展が期待される。

研究指導者氏名 **森本兼毅**  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。

$\alpha$ -エンドスルファンと  $\beta$ -エンドスルファンの Hep G2 細胞における遺伝毒性

研 究 者： 呂 玉 泉

中国での所属・役職：河南省衛生防疫センター・主管医師

日本での指導者氏名・所属・役職：森本兼曩・大阪大学医学部・教授

### 論文要旨

「目的及び方法」エンドスルファン (endosulfan) は世界範囲でよく使われ、大きな毒性を持つ有機塩素類農薬である。エンドスルファンの遺伝毒性に関する報告は少ない一方、ほとんど異性体混合物の研究である。エンドスルファンの二つの異性体— $\alpha$ -エンドスルファン ( $\alpha$ -endosulfan) と  $\beta$ -エンドスルファン ( $\beta$ -endosulfan) のそれぞれの遺伝毒性について、今まで報告はなかった。この二つの異性体の遺伝毒性を解明するため、ヒト肝癌細胞である Hep G2 細胞を使って、姉妹染色体交換 (sister chromatid exchanges, SCE)、小核 (micronuclei, MN) 及び単細胞電気泳動 (single cell gel electrophoresis, SCG; 或いは Comet assay) 三つの方法で  $1 \times 10^{-12}$  M ~  $1 \times 10^{-3}$  M までの濃度範囲で  $\alpha$ -endosulfan と  $\beta$ -endosulfan の遺伝毒性を検討した。「結果」 $\beta$ -endosulfan は 48 時間 Hep G2 細胞を暴露した後、SCE ( $1 \times 10^{-7}$  M ~  $1 \times 10^{-5}$  M) 及び小核 ( $5 \times 10^{-5}$  M ~  $1 \times 10^{-3}$  M) の頻度は有意に増加した。しかし、同じの実験条件で、 $\alpha$ -endosulfan は SCE 頻度に影響は見られなかった。小核の頻度に影響はあったが、有意差はなかった。二つの異性体を Hep G2 細胞をそれぞれに 1 時間で暴露した後、SCG 法で DNA の損傷を測定した結果、 $\beta$ -endosulfan は  $1 \times 10^{-3}$  M の濃度で DNA を有意に損傷したが、 $\alpha$ -endosulfan は  $2 \times 10^{-4}$  M の濃度で DNA に有意に損傷した。「総括」以上の結果から見ると、 $\alpha$ -endosulfan 及び  $\beta$ -endosulfan は Hep G2 細胞に対する遺伝毒性を持っているが、遺伝毒性の特徴と作用濃度は大きく違う一方、 $\alpha$ -endosulfan より、 $\beta$ -endosulfan のほうがエンドスルファンの遺伝毒性に大きな影響を占めることを示唆された。

### Keywords:

$\alpha$ -endosulfan;  $\beta$ -endosulfan; Hep G2; Sister chromatid exchanges (SCE);  
Micronuclei (MN); Single-cell gel electrophoresis (SCG); Genotoxicity

### 1. 目的:

Endosulfan is a synthetic chlorinated cyclodiene, which has been proved to be an environmental endocrine disrupter { ADDIN ENRfu }. It was introduced into the earth's environment in 1956 as a general use insecticide, being primarily used to protect food crops such as tea, fruits, vegetables, and grains as well as wood from a wide

two isomers— $\alpha$ -endosulfan and  $\beta$ -endosulfan.

Endosulfan is toxic not only to insects, but also to fishes, animals and humans (2, 3). Autopsy examinations have revealed its damage to liver, lung and brain (3). However, the data regarding its genotoxicity (4), especially that of its two isomers, is very limited. Perhaps because its carcinogenicity and genotoxicity have not been confirmed, endosulfan is still widely used and continues to pollute the human environment not only in the developing countries but in the developed countries as well (5).

In this study, we observed the influence of  $\alpha$ -endosulfan and  $\beta$ -endosulfan on the frequency of SCE, MN and the DNA damage assessed by SCG in Hep G2, a target cell line that expresses estrogen receptors (6) and is able to metabolize xenobiotics like S9 *in vitro* or *in vivo* (7).

## 2. 方法

### 2.1. Materials

$\alpha$ -endosulfan ([ $\alpha$ -1,4,5,6,7,7-Hexachlorbicyclo-[2.2.1]-5-hepten-2,3-bis (methylen) sulfit]  $C_9H_6Cl_6O_3S$ ) was from Wako Pure Chemical Industries, Japan.  $\beta$ -endosulfan ([ $\beta$ -1,4,5,6,7,7-Hexachlorbicyclo-[2.2.1]-5-hepten-2,3-bis (methylen) sulfit]  $C_9H_6Cl_6O_3S$ ) was from Riedel-deHaen, Germany. For use, they were dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO, E. Merck, Darmstadt, Germany) to prepare a 0.5 M stock solution.

### 2.2. Cell culture

Hep G2 is from the cell bank of the Institute of Physical and Chemical Research of Japan and was cultured in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (Sigma) containing 10% fetal bovine serum (Biosciences PTY Ltd., Australia) and 1% penicillin-streptomycin (Life Technologies™). Before use, Hep G2 cells were taken from fluid nitrogen and washed two times with fresh culture medium. After culturing for 2 passages in 37°C and 5% CO<sub>2</sub>, Hep G2 cells were prepared for use in the experiments.

### 2.3. Sister Chromatid Exchanges (SCE) and Micronuclei (MN)

$2 \times 10^5$  Hep G2 cells were divided into 5 ml of culture medium and cultured for 48 h. After discarding 2.5 ml of supernatant, 2.5 ml of new culture medium containing different concentrations of either  $\alpha$ -endosulfan or  $\beta$ -endosulfan were added for both the SCE and MN assays. 5-Bromo-2'-deoxy uridine (Sigma) was added in the SCE test (final concentration 40  $\mu$  M). The cells were cultured for another 48 h. Six hours before collection, colcemid (Sigma) was added to the SCE assay (final concentration  $2 \times 10^{-7}$  M). Vehicle controls were 0.2% DMSO. Mitomycin C (Sigma) was used as a positive control.



After 48 h of treatment in both SCE and MN assays, the Hep G2 cells were collected with 0.25% trypsin-EDTA (Life Technologies<sup>TM</sup>). The cells were then treated with 0.075 M KCl for 10 min and fixed with Carnoy's solution (methanol:acetic acid = 3:1, v/v) for 30 min. The cells were washed twice with the Carnoy's solution and stored in methanol containing 1% (v/v) acetic acid.

For the measurement of SCE, the slides were stained using the fluorescence-plus-Giemsa (FPG) differential staining method. SCE in 30 cells was blindly evaluated per concentration for each experiment. The final result was the combination of two independent experiments (n=60 metaphases). For the measurement of MN, slides were stained with acridine orange (40 micrograms/ml, Sigma) solution, and the frequency of the micronucleated cells per 1000 Hep G2 cells was taken as the endpoint.

The judgement of MN: we judged the micronuclei according to the following criteria: 1) size:  $\phi$  1/10-1/2 of the main nucleus size. 2) number:  $\leq 3$  MN/cell. 3) only one main nucleus in the cells counted. 4) the micronuclei must be round and have a clear boundary. 5) the micronuclei must have the same color and staining degree as the main nucleus. 6) the micronuclei must be clearly separated from the main nucleus. 7) the micronuclei must be in the same cell plasma with the main nucleus.

To assess the effects of  $\alpha$ -endosulfan and  $\beta$ -endosulfan on the cell cycle kinetics of the cells, we scored the proliferation index (PI) on the same slides used for counting SCE. Cell cycle kinetics were evaluated by the proportion of the first ( $X_1$ ), second ( $X_2$ ), and third ( $X_3$ ) division cells in 100 consecutive metaphases for each independent experiment. The proliferation index (PI) was calculated according to the following formula:  $PI = (1 \times X_1 + 2 \times X_2 + 3 \times X_3)$ .

#### 2.4. Single-Cell Gel Electrophoresis (SCG) (8)

$2 \times 10^5$  Hep G2 cells were divided into 5 ml of culture medium and cultured for 48 h. After 2.5 ml supernatant was discarded, 2.5 ml of a new culture medium containing different concentrations of either  $\alpha$ -endosulfan or  $\beta$ -endosulfan was added. The vehicle control was 2% DMSO. After 1 h of treatment, the cells were collected with 0.25% trypsin-EDTA and adjusted to  $1 \times 10^6$  cells/ml cell suspension after thorough mixing. 25  $\mu$ l of the cell suspension was taken and mixed with 75  $\mu$ l of 0.75% low-melting agarose (Nusieve GTG, FMC BioProducts) and then placed on pre-cleaned frosted micro slides (Matsunami Glass Ind., LTD, Japan) which were first covered with 80  $\mu$ l of 0.5% normal-melting agarose (Sigma) (to make this layer adhere better to the slide, we used 20  $\mu$ l of 0.5% normal melting agarose to cover the slide and dried it beforehand). The mixed-cell suspension were immediately covered with a coverglass,

and the slides were then kept at 4°C for 10 min to allow solidification of the agarose. After gently removing the coverglass, the slides were covered with a third layer of low-melting agarose using a coverglass, and then kept at 4°C for another 10 min to allow solidification of the agarose. After gently removing the coverglass, the slides were immersed in a lysing solution for 1 h and then moved to the electrophoretic buffer to allow 20 min for the unwinding of DNA strands as described by Singh et al. (8). The electrophoresis time was 20 min under 25 V and 300 mA using an electrophoresis compact power supply (ATTO Corporation, Japan). After staining with 20  $\mu$ g/ml ethidium bromide (Sigma), DNA strand breaks were measured under a fluorescent microscope using a DNA SCG test system (Keio Electronic Ind., Co., Ltd, Japan). All the slides were examined 5 h after staining, and only the cells in the central part of the slides were detected. In the present study, the cell tail length was used to represent the degree of DNA damage to the Hep G2 cells.

2.5. Statistics: Dunnett's test in SPSS statistical software was used for the SCE and SCG assays. Chi-square test in SPSS statistical software was used for the MN assay. For all three assays, the results of two independent experiments were combined for the analysis.

### 3. 結果

#### 3.1. Influence of $\alpha$ -endosulfan and $\beta$ -endosulfan on frequency of sister chromatid exchanges (SCE) in Hep G2 cells

In this study, we treated Hep G2 cells with concentrations of  $\alpha$ -endosulfan and  $\beta$ -endosulfan ranging from  $1 \times 10^{-12}$  M through  $1 \times 10^{-5}$  M for 48 h. Because Hep G2 is an aneuploid cell line (modal number = 55 chromosomes; range = 50-60 chromosomes), we calculated SCE per chromosome. As shown in Table 1,  $\beta$ -endosulfan caused a significant increase in SCE from  $1 \times 10^{-7}$  M through  $1 \times 10^{-5}$  M. In contrast,  $\alpha$ -endosulfan failed to show any significant effect. SCE frequency was about 0.19/chromosome in 0.2% DMSO (vehicle control) against 0.27/chromosome in the highest concentration ( $1 \times 10^{-5}$  M) of  $\beta$ -endosulfan. Positive controls treated with  $1 \times 10^{-7}$  M of mitomycin C resulted in 0.484/chromosome ( $P < 0.01$ ).

In these experiments, the addition of  $\alpha$ -endosulfan and  $\beta$ -endosulfan did not cause any significant change in the proliferation index compared to the cultures with the control of 0.25% DMSO.

#### 3.2. Influence of $\alpha$ -endosulfan and $\beta$ -endosulfan on frequency of MN in Hep G2 cells

In the present study, we used the frequency of micronucleated Hep G2 cells to represent the effects of  $\alpha$ -endosulfan and  $\beta$ -endosulfan on MN induction in the Hep

G2 cells. As shown in Table 2, after treating Hep G2 cells for 48 h with  $\beta$ -endosulfan from  $5 \times 10^{-5}$  M through  $1 \times 10^{-3}$  M, the frequency of micronucleated cells was significantly increased; the frequency at  $1 \times 10^{-3}$  M was about 6 times that of the control. Although we failed to find any significant increase of MN in Hep G2 cells treated with  $\alpha$ -endosulfan, slight increases in micronucleated cells were observed at higher concentrations ( $5 \times 10^{-5} \sim 1 \times 10^{-3}$  M). In the present study, mitomycin C ( $1 \times 10^{-6}$  M) showed a much stronger potency to induce MN (116 micronucleated cells in 2000 cells) than  $\beta$ -endosulfan ( $P < 0.01$ ).

3.3. Influence of  $\alpha$ -endosulfan and  $\beta$ -endosulfan on induction of DNA strand breaks as evaluated by SCG assay in Hep G2 cells

In the present study, we measured the tail length of Hep G2 cells treated with different concentrations of  $\alpha$ -endosulfan and  $\beta$ -endosulfan. As shown in Table 3, after 1 h of treatment,  $\alpha$ -endosulfan induced significant increases in DNA strand breaks from  $2 \times 10^{-4}$  M through  $1 \times 10^{-3}$  M, as did  $\beta$ -endosulfan at  $1 \times 10^{-3}$  M.

#### 4. 考察

Endosulfan is an insecticide with estrogenic activity which is toxic to many fishes and mammals. Some reports suggested that it could accumulate in aquatic animals (9) and cause human fatalities (3). The genotoxicity of its two isomers, however, has not been confirmed.

To study the genotoxicity of endosulfan, we used Hep G2 cells in the present study; firstly because endosulfan is hepatotoxic (3), and secondly because the metabolic property of human Hep G2 cells will offer a chance to examine the effects of its metabolites on those cells. The result will thus be more comparable to findings in an in vivo study. Finally, because the Hep G2 cell line is well reported in the genotoxic studies using SCE, MN and SCG assays (10, 11), we believe using such cells to examine the genotoxicity of endosulfan is reasonable.

Our repeated in vitro experiments showed that both  $\alpha$ -endosulfan and  $\beta$ -endosulfan induced DNA strand breaks as detected by SCG assay. Nevertheless, Hep G2 cells seem more sensitive to  $\alpha$ -endosulfan than to  $\beta$ -endosulfan as shown by the cell tail length. As we used a dry-layer gel technique on the slides, the three layers of gel were easily prepared. Using trypsin-EDTA to collect the Hep G2 cells kept the individual cells well separated and evenly distributed in the second layer of gel.

For the SCE and MN assays, only  $\beta$ -endosulfan showed significant effects on the cell line, and our present results correspond to the increased frequency of SCE in blood lymphocytes from workers using pesticides including endosulfan (12) and to the increased SCE induced by endosulfan ( $1 \times 10^{-6}$  M, mixture of  $\alpha$ -endosulfan and  $\beta$

-endosulfan) in human lymphoid cells (13). The result of MN induced by  $\beta$ -endosulfan is also in agreement with an in vivo study of endosulfan (14).

In our present study, all three endpoints were from two independent experiments, and the results were satisfactorily repeated. Although both  $\alpha$ -endosulfan and  $\beta$ -endosulfan showed genotoxicity to Hep G2 cells at different concentrations by different endpoints, neither of them showed any apparent effects on cell cycle kinetics in the cell line.

Of the three biomarkers used in this study, SCE and MN was found to be more sensitive in detecting the genotoxicity of  $\beta$ -endosulfan, but SCG was less sensitive. For  $\alpha$ -endosulfan, only SCG showed genotoxicities. The concentration of  $\alpha$ -endosulfan needed to induce DNA strand breaks was apparently lower than that of  $\beta$ -endosulfan. Thus, our result suggests that  $\beta$ -endosulfan more readily induced SCE and MN, while  $\alpha$ -endosulfan more easily induced DNA strand breaks as detected by SCG in the Hep G2 cells.

We have little data regarding the mechanisms of the genotoxicity of  $\alpha$ -endosulfan and  $\beta$ -endosulfan. Clastogenic activity of the two compounds and /or their metabolites may exist, although only sparse data are available so far (15, 16). In addition, as spindle poisoning is reported to relate to MN formations such as bisphenol and diethylstilbestrol (17), whether  $\beta$ -endosulfan actually induced MN through spindle poisoning should also be examined in future studies.

Another possible target of research might be the estrogenic effects of  $\alpha$ -endosulfan and  $\beta$ -endosulfan (18), given the existence of estrogen receptors in Hep G2 cells (19). Many environmental estrogenic disrupters, such as diethylstilbestrol (DES), are reported to induce SCE either in vitro or in vivo, and it seems that their effects tend to be restricted to cells with abundant estrogen receptors (20, 21). Endosulfan (a mixture of  $\alpha$ -endosulfan and  $\beta$ -endosulfan) is able to combine with estrogen receptors and exert biological effects (22), and although we have no direct evidence, it is difficult to exclude the possibility that  $\alpha$ -endosulfan and  $\beta$ -endosulfan bind with the estrogen receptors in Hep G2 cells (19, 23) to induce genotoxicity in these cells.

As  $\alpha$ -endosulfan and  $\beta$ -endosulfan can be metabolized by Hep G2 cells, the genotoxicity we found in the cell line may include their metabolites. Further research is needed to determine whether  $\alpha$ -endosulfan and  $\beta$ -endosulfan or their metabolites are responsible for the observed genotoxicity.

Our findings are based on a study using a human hepatoma Hep G2 cell line so as to extrapolate the results to humans. However, further studies with normal human cells

and human subjects exposed to the same agents are needed.

In conclusion, our present study has shown for the first time that both  $\alpha$ -endosulfan and  $\beta$ -endosulfan are genotoxic to Hep G2 cells, and that the genotoxicity of  $\beta$ -endosulfan is more potent than that of  $\alpha$ -endosulfan. Although the underlying mechanism is still beyond our knowledge, the clastogenicity and estrogenicity of the two isomers suggest the need for further studies.

#### 参考文献

1. Soto AM, Sonnenschein C, Chung KL, Fernandez MF, Olea N, Serrano FO. The E-SCREEN assay as a tool to identify estrogens: an update on estrogenic environmental pollutants. *Environ Health Perspect* 103 Suppl 7: 113-22 (1995).
2. Kiran R, Varma MN. Biochemical studies on endosulfan toxicity in different age groups of rats. *Toxicol Lett* 44: 247-52 (1988).
3. Boereboom FT, van Dijk A, van Zoonen P, Meulenbelt J. Nonaccidental endosulfan intoxication: a case report with toxicokinetic calculations and tissue concentrations. *J Toxicol Clin Toxicol* 36: 345-52 (1998).
4. Chaudhuri K, Selvaraj S, Pal AK. Studies on the genotoxicity of endosulfan in bacterial systems. *Mutat Res* 439: 63-7 (1999).
5. Simonich SL, Hites RA. Global distribution of persistent organochlorine compounds. *Science* 269: 1851-4 (1995).
6. Lee IR, Dawson SA, Wetherall JD, Hahnel R. Sex hormone-binding globulin secretion by human hepatocarcinoma cells is increased by both estrogens and androgens. *J Clin Endocrinol Metab* 64: 825-31 (1987).
7. Knasmüller S, Parzefall W, Sanyal R, Ecker S, Schwab C, Uhl M, Mersch-Sundermann V, Williamson G, Hietsch G, Langer T, Darroudi F, Natarajan AT. Use of metabolically competent human hepatoma cells for the detection of mutagens and antimutagens. *Mutat Res* 402: 185-202 (1998).
8. Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res* 175: 184-91 (1988).
9. Naqvi SM, Newton DJ. Bioaccumulation of endosulfan (Thiodan insecticide) in the tissues of Louisiana crayfish, *Procambarus clarkii*. *J Environ Sci Health [B]* 25: 511-26 (1990).
10. Darroudi F, Natarajan AT. Metabolic activation of chemicals to mutagenic carcinogens by human hepatoma microsomal extracts in Chinese hamster ovary cells (in vitro). *Mutagenesis* 8: 11-5 (1993).
11. Rueff J, Chiapella C, Chipman JK, Darroudi F, Silva ID, Duverger-van Bogaert M,

- Fonti E, Glatt HR, Isern P, Laires A, Leonard A, Llagostera M, Mossesso P, Natarajan AT, Palitti F, Rodrigues AS, Schinoppi A, Turchi G, Werle-Schneider G. Development and validation of alternative metabolic systems for mutagenicity testing in short-term assays. *Mutat Res* 353: 151-76 (1996).
12. Rupa DS, Reddy PP, Sreemannarayana K, Reddi OS. Frequency of sister chromatid exchange in peripheral lymphocytes of male pesticide applicators. *Environ Mol Mutagen* 18: 136-8 (1991).
  13. Sobti RC, Krishan A, Davies J. Cytokinetic and cytogenetic effect of agricultural chemicals on human lymphoid cells in vitro. II. Organochlorine pesticides. *Arch Toxicol* 52: 221-31 (1983).
  14. Khan PK, Sinha SP. Impact of higher doses of vitamin C in modulating pesticide genotoxicity. *Teratog Carcinog Mutagen* 14: 175-81 (1994).
  15. Khan PK, Sinha SP. Antimutagenic efficacy of higher doses of vitamin C. *Mutat Res* 298: 157-61 (1993).
  16. Dzwonkowska A, Hubner H. Induction of chromosomal aberrations in the Syrian hamster by insecticides tested in vivo. *Arch Toxicol* 58: 152-6 (1986).
  17. Pfeiffer E, Rosenberg B, Deuschel S, Metzler M. Interference with microtubules and induction of micronuclei in vitro by various bisphenols. *Mutat Res* 390: 21-31 (1997).
  18. Soto AM, Chung KL, Sonnenschein C. The pesticides endosulfan, toxaphene, and dieldrin have estrogenic effects on human estrogen-sensitive cells. *Environ Health Perspect* 102: 380-3 (1994).
  19. Edmunds SE, Stubbs AP, Santos AA, Wilkinson ML. Estrogen and androgen regulation of sex hormone binding globulin secretion by a human liver cell line. *J Steroid Biochem Mol Biol* 37: 733-9 (1990).
  20. Forsberg JG. Estrogen effects on chromosome number and sister chromatid exchanges in uterine epithelial cells and kidney cells from neonatal mice. *Teratog Carcinog Mutagen* 11: 135-46 (1991).
  21. Lundgren K, Randerath K, Everson RB. Role of metabolism and DNA adduct formation in the induction of sister chromatid exchanges in human lymphocytes by diethylstilbestrol. *Cancer Res* 48: 335-8 (1988).
  22. Vonier PM, Crain DA, McLachlan JA, Guillette LJ, Jr., Arnold SF. Interaction of environmental chemicals with the estrogen and progesterone receptors from the oviduct of the American alligator. *Environ Health Perspect* 104: 1318-22 (1996).
  23. Tam SP, Archer TK, Deeley RG. Biphasic effects of estrogen on apolipoprotein synthesis in human hepatoma cells: mechanism of antagonism by testosterone. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83: 3111-5 (1986).

附表

Table 1. The effects of  $\alpha$ -endosulfan and  $\beta$ -endosulfan on the frequency of sister chromatid exchanges (SCE) in Hep G2 cells

Concentrations (M)	n	$\alpha$ -endosulfan		$\beta$ -endosulfan	
		SCE <sup>a</sup>	PI	SCE <sup>a</sup>	PI
Control	60	0.206 ± 0.062	1.99	0.191 ± 0.085	2.02
1 × 10 <sup>-12</sup>	60	0.203 ± 0.078	2.00	0.200 ± 0.047	2.08
1 × 10 <sup>-11</sup>	60	0.216 ± 0.068	2.00	0.204 ± 0.058	2.01
1 × 10 <sup>-10</sup>	60	0.204 ± 0.071	2.04	0.199 ± 0.113	1.93
1 × 10 <sup>-9</sup>	60	0.204 ± 0.076	2.00	0.196 ± 0.075	1.99
1 × 10 <sup>-8</sup>	60	0.206 ± 0.060	2.02	0.220 ± 0.070	2.01
1 × 10 <sup>-7</sup>	60	0.197 ± 0.065	2.02	0.248 ± 0.080*	2.02
1 × 10 <sup>-6</sup>	60	0.205 ± 0.053	1.91	0.252 ± 0.072**	1.97
1 × 10 <sup>-5</sup>	60	0.217 ± 0.059	2.00	0.272 ± 0.065**	1.93

Abbreviations: PI, proliferation index; SCE, sister chromatid exchanges

<sup>a</sup>Data are presented as means ± standard deviations.

\*Statistically significant difference when compared to control (Dunnett's test, P < 0.05).

\*\*Statistically significant difference when compared to control (Dunnett's test, P < 0.01).

Table 2. Effects of  $\alpha$ -endosulfan and  $\beta$ -endosulfan on the induction of micronuclei (MN) in Hep G2 cells

Concentration (M)	n	Micronuclei <sup>a</sup>	
		$\alpha$ -endosulfan	$\beta$ -endosulfan
Control	2000	20	13
1 × 10 <sup>-7</sup>	2000	18	14
1 × 10 <sup>-6</sup>	2000	17	13
5 × 10 <sup>-6</sup>	2000	14	17
1 × 10 <sup>-5</sup>	2000	16	22
5 × 10 <sup>-5</sup>	2000	26	39**
1 × 10 <sup>-4</sup>	2000	26	51**
5 × 10 <sup>-4</sup>	2000	26	74**
1 × 10 <sup>-3</sup>	2000	30	82**

<sup>a</sup>Data represent the number of Hep G2 cells with at least one micronucleus.

\*\* Statistically significant difference when compared to control (chi-square test, P < 0.01).

Table 3. The effect of  $\alpha$ -endosulfan and  $\beta$ -endosulfan on DNA strand breaks as detected by single-cell gel electrophoresis (SCG) assay in Hep G2 cells

Concentration (M)	$\alpha$ - endosulfan		$\beta$ - endosulfan	
	n	Tail length ( $\mu$ m) <sup>a</sup>	n	Tail length ( $\mu$ m) <sup>a</sup>
Control	116	49.28 ± 16.57	123	40.26 ± 8.26
$2 \times 10^{-5}$	119	54.73 ± 18.08	99	42.36 ± 7.31
$1 \times 10^{-4}$	110	53.37 ± 16.73	99	39.64 ± 7.34
$2 \times 10^{-4}$	128	58.32 ± 16.08**	108	43.68 ± 9.58
$5 \times 10^{-4}$	118	60.13 ± 15.86**	90	44.33 ± 11.33
$1 \times 10^{-3}$	108	63.56 ± 32.73**	126	50.27 ± 13.38**

<sup>a</sup>Data are presented as means ± standard deviations.

\*\* Statistically significant difference when compared to control (Dunnett's test, P < 0.01).



日本財団助成金による

1999年度日中医学学术交流促進事業報告書

－在留中国人研究者研究助成－

2000年3月31日

財団法人 日中医学協会  
理事長 中島章殿

研究中の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 郝 双林

研究機関 旭川医科大学麻醉学教室 研究指導者 岩崎寛 職名 教授

所在地 旭川市西神楽4線5号3番地 電話 0166-68-2583(直通) 内線

研究テーマ 炎症性疼痛刺激による脊髄遺伝子由来のFOS蛋白発現に対するくも膜下Endomorphin投与の影響

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)

有り(別紙)

(2) 学会誌等に発表した論文 有 ・ 無 (雑誌名・論文名)

有り(別紙)



## Isobolographic analysis of interaction between spinal endomorphin-1, a newly isolated endogenous opioid peptide, and lidocaine in the rat formalin test

Shuanglin Hao<sup>\*</sup>, Osamu Takahata, Hiroshi Iwasaki

Department of Anesthesiology and Critical Care Medicine, Asahikawa Medical College, Nishikagura 4-5-3-11, Asahikawa 078-8510, Japan

Received 26 August 1999; received in revised form 11 October 1999; accepted 11 October 1999

### Abstract

Endomorphin-1, a newly isolated endogenous opioid ligand, has a potential affinity with mu-opioid receptor. We investigated antinociception of intrathecal endomorphin-1 and lidocaine in the rat formalin test and examined the interaction between the two agents using isobolographic analysis. Intrathecal endomorphin-1 caused dose-dependent suppression of the formalin-induced biphasic behavioral response. Intrathecal lidocaine produced dose-dependent inhibition of phase-2 behavioral response. Isobolographic analysis confirmed that combination of intrathecal endomorphin-1 and lidocaine, given at a fixed dose ratio, produced synergistic suppression of phase-2 behavioral response. These data demonstrate that spinal endomorphin-1 synergistically interacts with local anesthetic lidocaine in producing antinociception in the formalin test. © 1999 Elsevier Science Ireland Ltd. All rights reserved.

**Keywords:** Endomorphin-1; Lidocaine; Formalin test; Isobolographic analysis

Subcutaneous injection of dilute formalin into the rat hind-paw produces a biphasic nociceptive response; phase 1 reflects an acute pain response and phase 2 is responsible to the injury-induced sensitization and hyperalgesia [3]. Several classes of agents act spinally to alter nociceptive processing. Lidocaine and mu-opioid receptor agonists produce a powerful antinociception by an inhibition of nociceptive C-fiber activity [6]. Spinal morphine and lidocaine have been shown to produce a depression of the behavioral response in the formalin test [9,20]. The aim of the combination of two drugs is to produce synergistic antinociceptive effects and to reduce the amount of each drug and thereby minimize the incidence and severity of side effects. Basic study showed antinociceptive interactions between intrathecal opioid agents and local anesthetics in rats using hot plate model [11]. To our knowledge, no study of interaction between intrathecal opioid agents and lidocaine in the formalin test has been conducted. Endomorphin-1, a newly isolated endogenous opioid ligand, has a potential affinity with mu-opioid receptor. In this study, we sought to: (1) define the effects of intrathecal endomorphin-1 and lidocaine on behavioral response of formalin test and (2)

characterize the spinal interaction between the two agents using isobolographic analysis.

The following studies were carried out under a protocol approved by the Animal Experiment Committee of our College. Chronic intrathecal catheters were implanted in male Sprague–Dawley rats (250–350 g) under the isoflurane anesthesia. Briefly, through an incision in the atlanto-occipital membrane, a polyethylene (PE-10) catheter, filled with 0.9% saline, was advanced 8.5 cm caudally to position its tip at the level of the lumbar enlargement. The rostral tip of the catheter was passed subcutaneously, externalized on top of the skull, and sealed with a stainless steel plug. Animals showing neurological deficits after implantation were excluded.

For formalin injection, 50  $\mu$ l of 5% formalin was injected subcutaneously into the dorsal surface of the right hind paw using 27-G needle. Animals were then placed in a clear plexiglas cylinder (20  $\times$  30 cm) for observation. A mirror was placed below the floor (plexiglas) at a 45° angle for unencumbered observation during the test. Pain-related behavior was quantified by counting the number of flinches for 1-min periods at 1–2 and 5–6 min (phase 1), and then at 5-min intervals during the period from 10 to 60 min (phase 2) after the formalin injection. Criteria for exclusion from

<sup>\*</sup> Corresponding author. Fax: +81-166-682-589.

E-mail address: hao@asahikawa-med.ac.jp (S. Hao)

the study included incomplete formalin injection, or excessive bleeding from injection site.

Drugs used in the study included endomorphin-1 (Tocris, UK) and lidocaine hydrochloride (RBI). As determined in preliminary studies, endomorphin-1 and lidocaine were administered intrathecally 20 and 5 min prior to formalin test, respectively, so that the peak effect of each drug coincided. The agents were delivered with a microsyringe in a total volume of 10  $\mu$ l followed immediately by a 10  $\mu$ l saline to flush the catheter. All agents were dissolved in saline.

In the formalin test, time-response data are presented as the mean  $\pm$  SEM per minute. For the dose response analysis, data from phase 1 and phase 2 were considered separately. The effective dose producing a 50% reduction of flinching response of control was defined as the inhibitory dose 50 ( $ID_{50}$ ). The log dose response lines were fitted using least square linear regression, the  $ID_{50}$  and 95% confidence interval ( $CI_{95}$ ) for each drug being calculated.

Isobolographic analysis for drug-drug interaction was conducted according to the procedure of Tallarida et al. [18]. To perform the isobolographic analysis, endomorphin-1 and lidocaine were administered in combination as fixed ratios of the  $ID_{50}$  dose for each drug (1 nmol: 20  $\mu$ g of endomorphin-1: lidocaine). The experimental  $ID_{50}$  value and  $CI_{95}$  for drug combination were calculated. The isoboloes were drawn by plotting the experimental determined  $ID_{50}$  value of lidocaine on the x-axis and that of endomorphin-1 on the y-axis, delivered alone and in combination. The theoretical additive  $ID_{50}$  dose was calculated according to Tallarida [17]. For statistical comparison of the difference between the experimentally derived  $ID_{50}$  value and the theoretical additive value, Student's *t*-test was used. To describe the magnitude of the interaction, a total dose fraction value was calculated according to Malmberg and Yaksh [10].

Intrathecal endomorphin-1 at the doses used in the study did not affect motor function during the observation period (60 min). Intrathecal lidocaine dose-dependently resulted in a motor dysfunction. The motor dysfunction was reliably localized and forelimb function was unaffected. Fifteen minutes after injection of lidocaine, motor function recovered to normal. Thus, considering that formalin was injected at 5 min after administration of intrathecal lidocaine and that phase 2 begins at 10 min after injection of formalin, we think that the motor dysfunction is not sufficient to affect observation of phase 2 response of formalin test.

Fig. 1 showed that the time course of endomorphin-1 and lidocaine on the formalin test. Fig. 2 showed that endomorphin-1 and lidocaine alone produced a dose-dependent suppression of the behavioral response induced by formalin.  $ID_{50}$  ( $CI_{95}$ ) values of endomorphin-1 in phase 1 and 2 were 12.5 (7.5–19.8) nmol and 18.6 (10.2–30) nmol, respectively.  $ID_{50}$  value of lidocaine in phase 1 was not calculated because rats showed motor dysfunction during the phase 1.  $ID_{50}$  ( $CI_{95}$ ) values of lidocaine in phase 2 was 365 (245–540)  $\mu$ g. The isobologram of combination of endomorphin-1 and

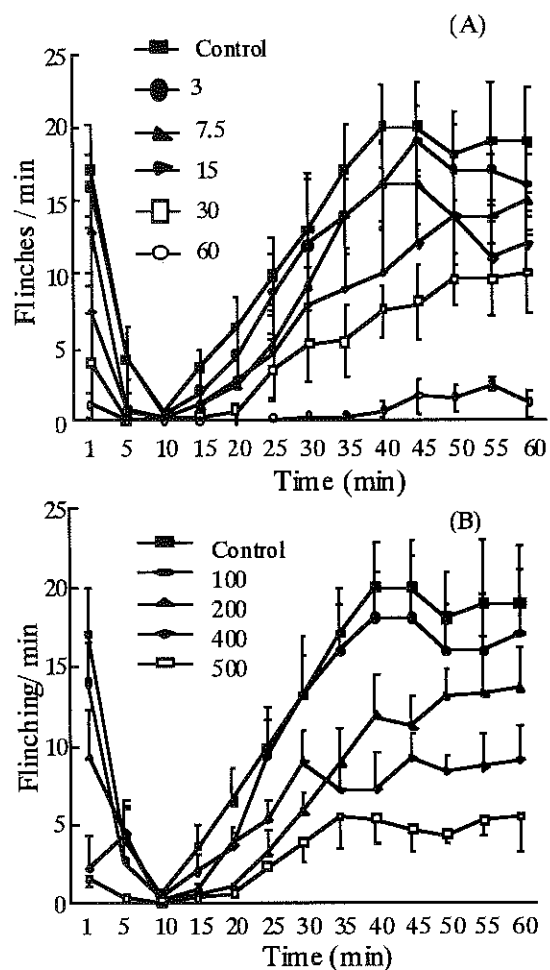


Fig. 1. Time-effect curve of intrathecal endomorphin-1 (nmol) and lidocaine ( $\mu$ g) administered before formalin. (A) Endomorphin-1 and (B) lidocaine. The number of flinches per minute is plotted vs. the time after the formalin injection into the hindpaw. Each line on the graph represents the mean  $\pm$  SEM from eight to 12 rats.

lidocaine showed that the experimentally derived  $ID_{50}$  value decreased below the theoretical dose-additive line, and  $CI$ s of the theoretical additive point and those of the experimental point did not overlap (Fig. 3). This result indicated a significant difference between the experimental  $ID_{50}$  point and the theoretical additive  $ID_{50}$  point ( $P < 0.05$ ) and a synergistic interaction between endomorphin-1 and lidocaine in the rat formalin test. The total dose fraction value in phase 2 was 0.28, which was less than 1, indicating a synergistic interaction. Even when the endomorphin-1 was given such that the time of peak pharmacological effect overlapped with the time of peak lidocaine effect, there was no enhancement in motor dysfunction.

This study clearly has shown the following: (1) intrathecal endomorphin-1 and lidocaine cause dose-dependent suppression of the behavioral response in the rat formalin test; and (2) at doses that do not affect motor function, the combination of endomorphin-1 and lidocaine produces synergistic antinociceptive interaction.

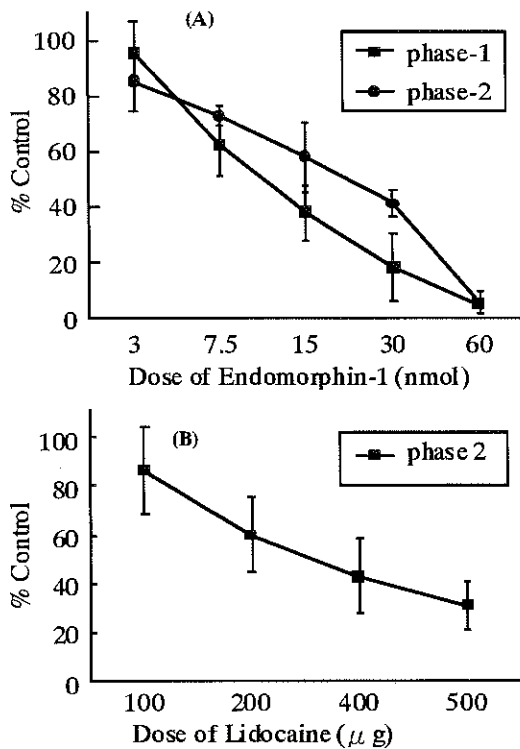


Fig. 2. Dose-response curves for intrathecal endomorphin-1 (A) and lidocaine (B). Mean values for biphasic activities expressed as a percent of control for endomorphin-1 and lidocaine.

The first phase of formalin test is representative of an acute effect mediated by the activation of nociceptive afferent C-fiber; the second phase is a composite of the ongoing barrage plus the generation of a facilitated state thought to result from the sensitization of the spinal cord (wind-up) [4]. Wind-up phenomenon is mediated partly by glutamate receptor of *N*-methyl-D-aspartate (NMDA) type [2].

Electrophysiologically, Dickenson and Sullivan [5] observed that injection of formalin resulted in a profound augmentation in the discharge of WDR neurons in rats and that the spinal administration of selective mu opioid receptor agonist before formalin injection blocked the augmentation. But this inhibition is obtained only when the agonist is given at doses that block the early C-evoked component [5]. A recent study showed that intrathecal endomorphin-1 inhibited the C-fiber activity in a dose-dependent manner [1]. There is direct evidence indicating that lidocaine selectively reduces the neuron activity evoked by C-fiber in rat spinal cord through decreasing NMDA receptor-mediated post-synaptic depolarization [13]. Importantly, electrophysiologic evidence showed that in combination with a low dose of opioid, lidocaine produced a highly marked potentiation of the inhibitions of the C-fiber evoked responses compared to either agent alone [6].

Behaviorally, a study showed that spinal endomorphin-1 produced a suppression of biphasic responses in the rat formalin test, but the effect was not dose-dependent [15]. However, the current study shows that the effect of intrathe-

cal endomorphin-1 is readily dose-dependent, which is consistent with electrophysiological study [1]. Intrathecal lidocaine produced suppression of behavioral response in the formalin test [3,9]. Although the interaction of morphine and lidocaine showed supra-additive effect in the hot plate test, the current study demonstrates that the interaction between endomorphin-1 and lidocaine is synergistic in nature by isobolographic analysis in the rat formalin test.

Synergistic interaction can occur when drugs affect different critical points along a common pathway. Although the principle effect of lidocaine remains on voltage-sensitive sodium channels, it may interact with voltage-sensitive  $K^+$  and  $Ca^{2+}$  channels [8,14]. Binding studies have emphasized that opioid receptors are located presynaptically on the these small afferent terminals and these receptors mediate the inhibition of release of C-fiber peptide neurotransmitters (such as substance P and calcitonin gene related peptide) by the blockade of the activation of voltage sensitive  $Ca^{2+}$  channels [16]. A recent study demonstrated that endomorphin-1 induced  $Ca^{2+}$  channel inhibition by selectively activating the mu-opioid receptor [12]. Endomorphin-1 produced membrane hyperpolarization and suppression of excitatory postsynaptic potential on dorsal horn neuron [19] and also activated an inward potassium current [7]. Although the mechanisms of synergism between lidocaine

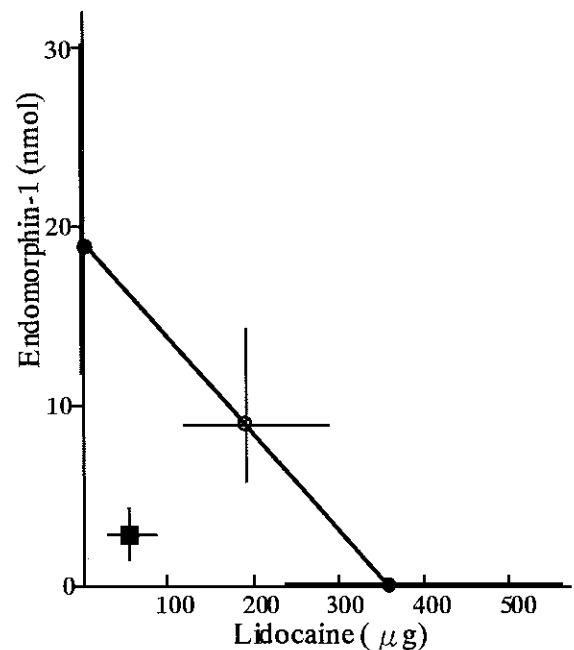


Fig. 3. Isobologram showing the interaction between intrathecal endomorphin-1 and lidocaine on phase 2 of formalin test. The ID<sub>50</sub> values of lidocaine and endomorphin-1 are plotted on the x- and y-axis, respectively. The line connecting the ID<sub>50</sub> points is the theoretical additive line, and the theoretical additive point (○) for the drug combination is shown on the additive line. The experimental ID<sub>50</sub> value (■) of combination of the two agents was significantly lower than the theoretical additive value ( $P < 0.05$ ), and CI<sub>95</sub> did not overlap, indicating a synergistic interaction.

and endomorphin-1 remain unknown, it is likely that effects on sodium, calcium, potassium channels and neurons membrane hyperpolarization, play contributory roles.

In conclusion, the current study characterizes that intrathecal endomorphin-1 and lidocaine produce antinociceptive effects in a dose-dependent fashion in the formalin test and that the antinociceptive, synergistic interaction is observed between endomorphin-1 and lidocaine by isobolographic analysis. The clinical implications of this study are important in defending the use of intrathecal drug combination for improved pain management.

We thank Dr. K. Omote and T. Kawamata (Department of Anesthesiology, Sapporo Medical University, Japan) for their statistical assistance.

- [1] Chapman, V., Diaz, A. and Dickenson, A.H., Distinct inhibitory effects of spinal endomorphin-1 and endomorphin-2 on evoked dorsal horn neuronal responses in the rat. *Br. J. Pharmacol.*, 122 (1997) 1537–1539.
- [2] Coderre, T.J. and Melzack, R., The contribution of excitatory amino acids to central sensitization and persistent nociception after formalin-induced tissue injury. *J. Neurosci.*, 12 (1992) 3665–3670.
- [3] Coderre, T.J., Vaccarino, A.L. and Melzack, R., Central nervous system plasticity in the tonic pain response to subcutaneous formalin injection. *Brain Res.*, 535 (1990) 155–158.
- [4] Dickenson, A.H. and Sullivan, A.F., Peripheral origins and central modulation of subcutaneous formalin-induced activity of rat dorsal horn neurones. *Neurosci. Lett.*, 83 (1987) 207–211.
- [5] Dickenson, A.H. and Sullivan, A.F., Subcutaneous formalin-induced activity of dorsal horn neurones in the rat: differential response to an intrathecal opiate administered pre or post formalin. *Pain*, 30 (1987) 349–360.
- [6] Fraser, H.M., Chapman, V. and Dickenson, A.H., Spinal local anaesthetic actions on afferent evoked responses and wind-up of nociceptive neurones in the rat spinal cord: combination with morphine produces marked potentiation of antinociception. *Pain*, 49 (1992) 33–41.
- [7] Gong, J., Strong, J.A., Zhang, S., Yue, X., DeHaven, R.N., Daubert, J.D., Cassel, J.A., Yu, G., Mansson, E. and Yu, L., Endomorphins fully activate a cloned human mu opioid receptor. *FEBS Lett.*, 439 (1998) 152–156.
- [8] Guo, X., Castle, N.A. and Chernoff, D.M., and Strichartz, G.R., Comparative inhibition of voltage gated cation channels by local anesthetics. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 625 (1991) 181–199.
- [9] Hao, S. and Ogawa, H., Sevoflurane suppresses behavioral response in the rat formalin test: combination with intrathecal lidocaine produced profound suppression of the response. *Neurosci. Lett.*, 248 (1998) 124–126.
- [10] Malmberg, A.B. and Yaksh, T.L., Pharmacology of the spinal action of ketorolac, morphine, ST-91, U50488H, and L-PIA on the formalin test and an isobolographic analysis of the NSAID interaction. *Anesthesiology*, 79 (1993) 270–281.
- [11] Maves, T.J. and Gebhart, G.F., Antinociceptive synergy between intrathecal morphine and lidocaine during visceral and somatic nociception in the rat. *Anesthesiology*, 76 (1992) 91–99.
- [12] Mima, H., Morikawa, H., Fukuda, K., Kato, S., Shoda, T. and Mori, K., Ca<sup>2+</sup> channel inhibition by endomorphins via the cloned mu-opioid receptor expressed in NG108–15 cells. *Eur. J. Pharmacol.*, 340 (1997) R1–R2.
- [13] Nagy, I. and Woolf, C.J., Lignocaine selectively reduces C fibre-evoked neuronal activity in rat spinal cord in vitro by decreasing *N*-methyl-D-aspartate and neurokinin receptor-mediated post-synaptic depolarizations; implications for the development of novel centrally acting analgesics. *Pain*, 64 (1996) 59–70.
- [14] Palade, P.T. and Almers, W., Slow calcium and potassium currents in frog skeletal muscle; their relationship and pharmacological properties. *Pflugers Arch.*, 409 (1985) 91–101.
- [15] Przewlocka, B., Mika, J., Labuz, D., Toth, G. and Przewlocki, R., Spinal analgesic action of endomorphins in acute, inflammatory and neuropathic pain in rats. *Eur. J. Pharmacol.*, 367 (1999) 189–196.
- [16] Sabbe, M.B. and Yaksh, T.L., Pharmacology of spinal opioids. *J. Pain Sympt. Manage.*, 5 (1990) 191–203.
- [17] Tallarida, R.J., Statistical analysis of drug combinations for synergism. *Pain*, 49 (1992) 93–97.
- [18] Tallarida, R.J., Porreca, F. and Cowan, A., Statistical analysis of drug-drug and site-site interactions with isobolograms. *Life Sci.*, 45 (1989) 947–961.
- [19] Wu, S.Y., Dun, S.L., Wright, M.T., Chang, J.K. and Dun, N.J., Endomorphin-like immunoreactivity in the rat dorsal horn and inhibition of substantia gelatinosa neurons in vitro. *Neuroscience*, 89 (1999) 317–321.
- [20] Yamamoto, T. and Yaksh, T.L., Comparison of the antinociceptive effects of pre- and posttreatment with intrathecal morphine and MK801, an NMDA antagonist, on the formalin test in the rat. *Anesthesiology*, 77 (1992) 757–763.

日本財団補助金による  
1999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—

2000年3月3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 羅 善順  
研究機関 日本医科大学付属病院 研究指導者 檀 和夫 職名 教授  
所在地 〒113-8603 東京文京区千駄木 1-1-5 電話 03-3822-2131 内線 6724

研究テーマ 骨髓異形成症候群の病態と治療に関する基礎的研究

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：第62回日本血液学会総会

一般演題示説 (ポスター) テーマ：トロンボポエチン (TPO) の骨髓異形成症候群 (MDS) 芽球増殖に対する効果。

(2) 学会誌等に発表した論文  有 ・ 無 (雑誌名・論文名)

雑誌名：Stem Cells


論文名：Effect of thrombopoietin on proliferation of blasts from patients with myelodysplastic syndromes. (印刷中)

### 3. 今後の研究計画

骨髄異形成症候群の病態と治療に関する研究を続けて行きたいと思います。

### 4. 研究指導者の意見

羅 善順君は日本医科大学第三内科(血液内科)にて血液学の研究を非常に勤勉に行い、その成果を別記のごとく日本医学会分科会である日本血液学会総会で発表し、さらにその内容を米国のピアレビュー誌である”Stem Cells”に投稿して受理され、現在印刷中であります。このように貴財団補助金を極めて有意義に使用し、着実な業績をあげております。

研究指導者氏名 檀 和夫 

### 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。

## トロンボポエチン(TPO)の骨髓異形成症候群(MDS)芽球増殖に対する効果

羅 善順

哈尔滨医科大学附属第一医院・講師

檀 和夫・日本医科大学附属病院・教授

### 要旨

MDS 芽球に対する TPO の刺激効果を検討した。患者細胞を TPO 存在下で培養すると芽球数は High-risk MDS (RAEB 以上) および白血病化 MDS で増加したが、Low-risk MDS では増加しなかった。芽球数増加は芽球細胞周期の刺激を伴っていた。芽球の TPO 受容体 mRNA 発現と TPO 反応性とは関連がなかった。芽球が TPO に反応する例は血清 LDH 値が高値であった ( $P=0.0036$ )。このデータから High-risk MDS および白血病化 MDS の臨床適応には病勢の進行がおきる可能性があり注意が必要と考えられるが High-risk MDS については特に LDH 高値例にその Risk が高いように思われる。一方 Low-risk MDS については今回の *in vitro* の検討では増殖刺激効果を認めなかったが実際の臨床適用においては慎重さが必要と思われる。



**Effect of Thrombopoietin on Proliferation of Blasts from Patients  
with Myelodysplastic Syndromes**

SHAN-SHUN LUO,<sup>a</sup> KIYOYUKI OGATA,<sup>a</sup> NORIO YOKOSE,<sup>a</sup> TAKASHI KATO,<sup>b</sup>  
KAZUO DAN<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Third Department of Internal Medicine, Nippon Medical School, Tokyo, Japan;

<sup>b</sup>Pharmaceutical Research Laboratory, Kirin Brewery Co., Takasaki, Japan

Correspondence: Kiyoyuki Ogata, MD, PhD

Third Department of Internal Medicine

Nippon Medical School, Sendagi 1-1-5

Bunkyo-ku, Tokyo 113-8603, Japan

Telephone: 81-3-3822-2131 (Ext. 6775)

FAX: 81-3-5685-1793

E-mail: ogata@nms.ac.jp

**Running head:** TPO and MDS blasts

**Key Words.** *Thrombopoietin · Myelodysplastic syndromes · Blast proliferation*

## ABSTRACT

Thrombopoietin (TPO), a major cytokine involved in megakaryocytopoiesis/ thrombopoiesis, may be effective for treatment of the thrombocytopenia associated with myelodysplastic syndromes (MDS). However, it has been unclear whether TPO stimulates proliferation of MDS blasts, as observed in *de novo* acute myeloid leukemia. This study examined this concern. When marrow cells from 37 MDS cases were cultured with or without recombinant human PEGylated TPO, TPO increased the blast number (stimulation index  $\geq 1.5$ ) in nine of 16 high-risk MDS cases (refractory anemia with excess blasts (RAEB) and RAEB in transformation) and four of 10 cases with MDS transformed to acute leukemia (MDS-AL) but none of 11 cases with low-risk MDS (refractory anemia (RA) and RA with ringed sideroblasts). When the cell cycle of cultured cells was determined by three-color flow cytometry, TPO activated the cell cycle of MDS cells (causing a decrease in G<sub>0</sub>-phase cells) in most of the cases whose blast number increased in response to TPO. Reverse transcription-polymerase chain reaction analysis detected TPO receptor mRNA in purified blasts from all six cases examined, irrespective of the response of their blasts to TPO in culture. Analysis of the patients' characteristics identified a high serum lactate dehydrogenase (LDH) value as being associated with blast proliferation in high-risk MDS cases ( $p = 0.0036$ ). We conclude that TPO stimulates *in vitro* proliferation of blasts from a fraction of MDS patients. High-risk MDS patients, especially those who have a high serum LDH value, and MDS-AL patients should be monitored with particular care in clinical trials of TPO for MDS.

## INTRODUCTION

Myelodysplastic syndromes (MDS), which are malignant disorders of hematopoietic progenitors, show various degrees of anemia, neutropenia and thrombocytopenia. Manifestations caused by the cytopenia, such as infections and bleeding, and transformation to acute leukemia are the major causes of death in MDS. No effective therapy for MDS has been established yet, except for allogeneic stem cell transplantations, which are available for a limited number of patients [1]. Hematopoietic growth factors (HGFs), such as granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF), may be effective in preventing infections in neutropenic patients [2]. Thrombopoietin (TPO, mpl-ligand), a major HGF involved in the growth and development of megakaryocytes and platelet production [3-5], is a candidate for treatment of thrombocytopenia in MDS, and a clinical trial of TPO for MDS is now being conducted in Japan.

TPO receptor (TPO-R, c-mpl) is expressed mainly on platelets, megakaryocytic cells and hematopoietic progenitors [6, 7] in normal humans. Data from patients with acute myeloid leukemia (AML) indicate that blasts from a high proportion of AML patients have TPO-R mRNA [8, 9] and blasts from a fraction of these patients proliferate in response to TPO *in vitro* [10, 11]. Therefore, the clinical effect of TPO in AML patients should be carefully monitored. Regarding MDS, such analysis has been rare. By using Northern blotting, Bouscay *et al.* [12] detected TPO-R mRNA in mononuclear cells (MNCs) from the bone marrow or peripheral blood of 19 of 58 MDS patients. The same group also reported that TPO increased <sup>3</sup>H-thymidine uptake by marrow MNCs,

which consisted of various cell types responding to TPO, and enhanced cluster formation (probably derived from the MDS clone) induced by combined stimulus with interleukin 3 (IL-3), IL-6, erythropoietin, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and stem cell factor (SCF), in some MDS cases [13]. We have previously detected TPO-R protein, which was able to bind with and degrade TPO, on blasts from a patient with MDS transformed to acute leukemia (MDS-AL) [14].

In this study, we performed *in vitro* studies to examine whether TPO increases the blast number and activates the cell cycle of blasts from MDS patients. We also sought a correlation between the proliferative response of blasts to TPO and various background characteristics of MDS patients and examined TPO mRNA expression by purified blasts from some patients.

## **MATERIALS AND METHODS**

### **Subjects**

Twenty-six MDS patients, who were diagnosed by the standard criteria [15], and 11 MDS-AL patients were the subjects in this study (Table 1). For this study, we classified refractory anemia (RA) and RA with ringed sideroblasts (RARS) as a low-risk MDS and RA with excess blasts (RAEB) and RAEB in transformation (RAEB-t) as a high-risk MDS.

### **Cell Preparation**

Heparinized bone marrow cells were obtained from the patients after they

gave informed consent. MNCs were separated by gradient centrifugation, using Histopaque-1077 (Sigma Chemical Co.; St. Louis, MO). To examine TPO-R mRNA expression, blasts were purified from six cases using immunomagnetic beads conjugated with anti-CD34 antibody (Dynal A.S.; Oslo, Norway) as described previously [16]. The purity of the blasts was 97% or more when determined for Wright-Giemsa-stained cytopsin preparations.

### **Blast Proliferation Assay**

The marrow MNCs were suspended in RPMI-1640 medium containing 10% fetal calf serum (FCS) ( $5 \times 10^5$  cells/ml) and cultured at 37°C in air containing 5% CO<sub>2</sub> in the presence of recombinant human PEGylated TPO (Kirin Brewery Co.; Tokyo) or a mixture of recombinant human hematopoietic growth factors (HGFs), i.e., 100 ng/ml of G-CSF, IL-3 and SCF (Kirin Brewery Co.). This HGF mixture (HGFs/Mix) is a powerful stimulator of MDS cells, as described previously [17]. The cells were also cultured without any HGFs as a negative control in each case. After the culture, the nucleated cell counts (NCC) were determined with a hemocytometer, and the percentage of blasts was determined for Wright-Giemsa-stained cytopsin preparations. Then the blast number was calculated from these data. The stimulation index (SI) was calculated by dividing the number of blasts in TPO- or HGFs/Mix-stimulated cultures by the number in the negative control culture.

In preliminary experiments, the marrow MNCs were cultured with different concentrations of TPO for various lengths of time. In cases whose blast number

increased in response to TPO, the maximum increase was observed at 100 ng/ml of TPO, and the SI values were comparable between 48-h culture and 96-h culture. Although the viability of cells was maintained for up to 48-h of culture ( $\geq 97\%$  by the trypan blue exclusion test), the viability decreased when the cells were cultured for 96-h in some cases. Thus, 100 ng/ml of TPO and 48-h culture were used as the experimental conditions in this study. To examine the reproducibility of this assay, cell cultures not supplemented with any HGF were set in duplicate for 10 cases, and each duplicate culture was arbitrarily labeled A or B at the initiation of culture. When the blast number after the culture was determined, the coefficient of variation, calculated from the mean  $\pm$  SD of  $I \times II^{-1}$ , was 14.1% (I = the blast number in culture A of each case, and II = the blast number in culture B of each case).

### **Cell Cycle Analysis**

For this analysis, we selected high-risk MDS cases, whose blasts were positive for CD13. The CD13-positivity of the blasts was identified with anti human CD13 monoclonal antibody (Becton Dickinson; San Jose, CA) using an immunomagnetic beads method, as described in our previous report [17]. Briefly, the marrow MNCs were reacted with anti-human CD13 monoclonal antibody, followed by incubation with immunomagnetic beads coated with anti-mouse IgG antibody. The incubated cells were subjected to cytopsin preparation and Wright-Giemsa staining. Cases were selected if more than 50% of the blasts were bound to the beads. The reasons for using CD13 to identify the cells to be

analyzed are described in detail in the Discussion. MDS-AL cases whose marrow MNCs contained more than 90% blasts were also subjected to the cell cycle analysis.

The cell cycles of the marrow MNCs cultured for 48 h were determined by three-color flow cytometry, as described previously in detail [17, 18]. Briefly, cells were labeled with anti-human CD13 monoclonal antibody conjugated with fluorescein (this step was omitted for the MDS-AL cases whose marrow MNCs contained more than 90% blasts). After washing, the cells were incubated in a buffer containing 0.004% saponin (Wako Chemical; Osaka, Japan). Then, the DNA and RNA in the cells were stained with 7-aminoactinomycin D (Sigma Chemical Co.) and pyronin Y (Polysciences; Warrington, PA), respectively. The cell cycle (G<sub>0</sub>-, G<sub>1</sub>-, S-, and G<sub>2</sub>/M-phases) of the fluorescein-stained cells (or non-stained cells in the MDS-AL cases) was analyzed with a FACScan flow cytometer using CellFIT and Lysis II softwares (Becton Dickinson). In these analyses, lymphocytes in freshly isolated peripheral blood MNCs from normal volunteers were used as an internal standard for G<sub>0</sub> cells, because a majority of unstimulated lymphocytes are -by definition- G<sub>0</sub> cells [19, 20]. The coefficient of variation of this cell cycle analysis method was determined by us and reported previously [17].

The indexes of change in the G<sub>0</sub> cell percentage (GoIC) and the S cell percentage (SIC) were calculated with the following formulas: GoIC = Go cell percentage in experimental culture x Go cell percentage in control culture<sup>-1</sup> x 10<sup>2</sup>, SIC = S cell percentage in experimental culture x S cell percentage in control

culture<sup>-1</sup> x 10<sup>2</sup>.

### **Detection of TPO-R mRNA by Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) Analysis**

RNA was extracted from the purified blasts or three cell lines by the acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform method [21]. The cell lines used were Dami cells (American Tissue Culture Collection; Rockville, MD) which express TPO-R mRNA, and K562 and Jurkat cells (RIKEN Cell Bank; Ibaraki, Japan) which do not express TPO-R mRNA [22].

RT-PCR for TPO-R mRNA was performed using an RNA PCR Kit (Ver. 2.1; Takara Shuzo; Otsu, Japan) as described previously [23]. In brief, one  $\mu\text{g}$  of total RNA was reverse-transcribed to cDNA in a final volume of 20  $\mu\text{l}$  using 1 mM each of four deoxyribonucleotide 5' triphosphates, 20 U RNase inhibitor, 2.5  $\mu\text{M}$  of the random 9 mers, and 5 U AMV reverse transcriptase XL. The reaction was performed for 10 min at 30°C, 30 min at 42°C, 5 min at 99°C and 5 min at 5°C, and the product was subjected to PCR. PCR was performed in a final volume of 100  $\mu\text{l}$  containing 0.2  $\mu\text{M}$  of the sense primer (nucleotide 843, 5'-TGGAGATGCAGTGGCACTTG-3'), 0.2  $\mu\text{M}$  of the anti-sense primer (nucleotide 1029, 5'-TGATGTCTGGGGTGTCAAGA-3'), and 2.5 U of Taq polymerase. Amplification was performed for 35 cycles (denaturation at 94°C for 1 min, annealing at 55°C for 1 min, and extension at 72°C for 1 min). Eight- $\mu\text{l}$  aliquots of the products were analyzed by 2% agarose gel electrophoresis. The presence of intact mRNA was verified by concomitant amplification of  $\beta$ -actin mRNA.



### **Measurement of Plasma TPO Concentration**

Heparinized peripheral blood was drawn from the patients after obtaining informed consent, and the plasma was immediately separated and stored at -20°C until use. Plasma TPO concentrations were determined with a sensitive sandwich enzyme-linked immunosorbent assay, as described in our previous report [14].

### **Statistical Analysis**

Differences between two groups of data for continuous variables were evaluated using the Mann Whitney-U test. Three or more groups of data for continuous variables were compared by ANOVA, and when the results were significant these groups of data were further compared with each other by Scheffe's test. Differences in categorical variables were evaluated using the chi-square test. Definitions of cytogenetic subgroups and prognostic subgroups by the international prognostic scoring system (IPSS) were the same as the reported criteria [24]. Overall survival was calculated from the day of diagnosis until death. The progression-free survival of high-risk MDS was calculated from the day of diagnosis until disease progression (transformation to RAEB-t or MDS-AL in RAEB cases and to MDS-AL in RAEB-t cases). Kaplan-Meier product limit estimates were performed to determine these survivals. A *p*-value of less than 0.05 was considered to be statistically significant.

## RESULTS

### *Effects of TPO on proliferation of MDS blasts in culture*

First, we examined whether TPO increases the number of MDS blasts in the cultures. The change in the blast number in response to TPO or the HGFs/Mix, which is expressed as the SI of the blast number, are presented in Table 1. When the data for low-risk MDS, high-risk MDS and MDS-AL were compared, the increase in the blast number induced by TPO differed significantly among the three groups ( $p = 0.0355$  by ANOVA,  $p = 0.0119$  for low-risk MDS vs high-risk MDS,  $p = 0.0646$  for low-risk MDS vs MDS-AML). The increase in the blast number induced by the HGFs/Mix did not differ significantly among the three patient groups ( $p = 0.7262$  by ANOVA).

When a significant increase in the number of MDS blasts was arbitrarily defined as  $SI \geq 1.5$ , the TPO and HGFs/Mix induced a significant increase in 13 cases (35.1%) and 33 cases (89.2%), respectively, among the total of 37 cases. Regarding the MDS subtype, a positive response to TPO ( $SI \geq 1.5$ ) was observed only in the high-risk MDS and MDS-AL cases (seven of the 11 RAEB cases, two of the five RAEB-t cases and four of the 10 MDS-AL cases), but not in any of the 11 low-risk MDS cases.

To explore whether the increase in the number of MDS blasts is accompanied by cycle activation of quiescent blasts (G<sub>0</sub>-phase blasts), we performed cell cycle analysis of the cultured cells. To obtain reliable results, only cases whose bone marrow samples contained a substantial proportion of blasts (high-risk MDS and MDS-AL) were included in this cell cycle analysis. The cell

cycle data of the examined cases are summarized in Table 2, while the indices of the cell cycle (GoIC and SIC) of each case are presented in Table 1.

Figure 1 illustrates the indices of the cell cycle in patients whose blast number increased in response to TPO ( $SI \geq 1.5$ ) and in patients whose blast number did not increase ( $SI < 1.5$ ). TPO decreased the GoIC and increased the SIC in most cases belonging to the former patient group. Further, cell cycle activation was more marked in the former patient group compared with the latter patient group ( $SIC \geq 200$  was observed in seven of the 12 cases with  $SI \geq 1.5$  but not in any of the six cases with  $SI < 1.5$ ,  $p = 0.0167$ ;  $GoIC \leq 50$  was observed in five of the 12 cases with  $SI \geq 1.5$  but not in any of the six cases with  $SI < 1.5$ ,  $p = 0.0628$ ).

### ***Correlation between increase in blast number in response to TPO and clinical and biological variables***

Because TPO induced blast proliferation in a fraction of the high-risk MDS and MDS-AL cases, we examined whether there were any patient background characteristics which correlated with the TPO-induced blast proliferation (Table 3). Regarding the high-risk MDS cases, only the LDH value differed significantly between the cases whose SI was 1.5 or more and the cases whose SI was less than 1.5 ( $p = 0.0036$ , Fig. 2). Regarding the MDS-AL cases, there was no characteristic which differed between the two groups divided according to the SI value.

The overall survival and progression-free survival did not differ between

these two groups in the high-risk MDS cases or the MDS-AL cases ( $p > 0.2$  for all analyses).

### **Expression of TPO-R transcripts in MDS blasts**

We were able to purify blasts from six cases (Cases 16, 18, 21, 26, 27 and 36) and subject them to RT-PCR analysis for TPO-R mRNA. Although the *in vitro* proliferation response of the blasts to TPO differed among these cases (SI of blast number:  $\geq 1.5$  in three cases and  $< 1.5$  in other three cases), TPO-R mRNA was detected in blasts from all six cases (Fig. 3).

### **DISCUSSION**

Although a clinical trial of TPO for thrombocytopenia in MDS is being conducted, there are no data which clarify whether TPO induces blast proliferation *in vitro* and/or disease progression *in vivo* in MDS patients. A prior report showed that TPO increased  $^3\text{H}$ -thymidine uptake by bone marrow MNCs in some high-risk MDS cases [13]. However, because the marrow MNCs consist of various types of cells and TPO may stimulate myeloid and erythroid cells as well as megakaryocytic cells [25-27], it is unknown whether TPO induced  $^3\text{H}$ -thymidine uptake by MDS blasts in that prior report. In this study, we showed that TPO increased the blast number (SI  $\geq 1.5$ ) in *in vitro* liquid culture in nearly half of cases with high-risk MDS and MDS-AL but not in any of 11 cases with low-risk MDS. In contrast, a combination of HGFs (HGFs/Mix) increased the blast number in most cases, including the low-risk MDS cases. In these

experiments, we used a short-term culture (48 h), because viable MDS blasts were not able to be maintained well in longer culture. Therefore, it remains unknown whether long-term stimulus by TPO induces blast proliferation in low-risk MDS cases. Nevertheless, our data suggest that the risk of blast proliferation by TPO is higher in high-risk MDS and MDS-AL than in low-risk MDS.

The increase in blast number by TPO indicates that TPO induces proliferation of blasts in the active cell cycle and/or TPO induces G<sub>0</sub>-phase blasts to enter the cell cycle and proliferate. Thus, we also examined whether TPO modulates the cell cycle of MDS cells by using the recently developed flow cytometric analysis method [28]. In applying this method, we employed an anti-CD13 antibody, which reacts not only with MDS blasts but also with more mature myeloid cells and monocytic cells, to identify the cells to be analyzed instead of other relatively blast cell-specific antibodies, i.e., anti-CD34 and anti-c-kit antibodies. Our main reason for using anti-CD13 antibody was that the expressions of CD34 and c-kit are restricted to a low percentage of blasts in a limited number of MDS patients [29]. On the contrary, a majority of blasts in most MDS patients express CD13 [29]. Moreover, we previously showed that the cell cycle did not differ significantly between CD13-positive cells and purified blasts in an MDS case [17]. Our present results also showed that the cell cycle of examined cells from both MDS-AL (whose MNCs consisted of more than 90% blasts in this study) and high-risk MDS cases was stimulated by TPO in most cases whose blast number increased in response to TPO. Taken together, the

present data indicate that TPO induces G<sub>0</sub>-phase blasts to enter the cell cycle and proliferate, at least in some high-risk MDS and MDS-AL cases. In Cases 14 and 36, although their blast number increased in response to TPO, this was not accompanied by a decrease in G<sub>0</sub>-phase cells. It is probable that in such cases only cycling blasts were stimulated by TPO. In the meantime, it is known that AML blasts produce HGFs which stimulate blast proliferation in some cases [30]. Therefore, another point of interest is whether MDS blasts also produce HGFs which cooperate with TPO in stimulating blast proliferation in our cases. However, we currently have no data elucidating this point.

Identification of patient characteristics which correlate with blast proliferation in response to TPO is essential for safe clinical application of TPO. Our analysis identified the serum LDH value as a predictive factor for the blast response to TPO in high-risk MDS. Other serum enzymes, such as GOT, GPT and ALP, were not associated with the blast response to TPO in the present subjects (data not shown). Although the mechanism responsible for this association remains unknown, we conclude that patients with high-risk MDS who have a high serum LDH value should be monitored with particular care in clinical trials of TPO for MDS.

Data regarding the expression of TPO-R by MDS blasts are sparse. By using Northern blot analysis for marrow MNCs, Bouscay *et al.* [12] detected an elevated TPO-R mRNA level in 11 of 26 patients with RAEB or RAEB-t but a normal TPO-R mRNA level (faint band by blotting, as observed in the normal marrow samples) in all 14 low-risk MDS. In the present study, we obtained

purified MDS blasts to minimize contamination by mRNA from other cells.

Because the number of purified blasts was small, we used RT-PCR instead of a ligand binding assay or Northern blotting to examine TPO-R expression. TPO-R mRNA was detected in blasts from all six patients but not in control cells which had been reported to have no TPO-R mRNA. It is noted that the presence of TPO-R mRNA was not related with an *in vitro* blast response to TPO in our subjects. This finding is consistent with the data for *de novo* AML, in which an *in vitro* response of blasts to TPO is not significantly associated with the TPO-R mRNA expression by the blasts [10, 11].

The data generated in this study will be useful for planning clinical trials of TPO for MDS and monitoring patients in such trials. We hope that, in the near future, appropriate use of TPO will contribute to the treatment of this intractable disease.

## REFERENCES

1. Hofmann WK, Ottmann OG, Ganser A *et al.* Myelodysplastic syndromes: clinical features. *Semin Hematol* 1996;33:177-185.
2. Negrin RS, Haeuber DH, Nagler A *et al.* Maintenance treatment of patients with myelodysplastic syndromes using recombinant human granulocyte colony-stimulating factor. *Blood* 1990;76:36-43.
3. Kaushansky K. Thrombopoietin: the primary regulator of platelet production. *Blood* 1995;86:419-431.
4. Kuter DJ, Beeler DL, Rosenberg RD. The purification of megapoeitin: a physiological regulator of megakaryocyte growth and platelet production. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994;91:11104-11108.
5. Debili N, Wendling F, Cosman D *et al.* The Mpl receptor is expressed in the megakaryocytic lineage from late progenitors to platelets. *Blood* 1995;85:391-401.
6. Debili N, Wendling F, Katz A *et al.* The Mpl-ligand or thrombopoietin or megakaryocyte growth and differentiative factor has both direct proliferative and differentiative activities on human megakaryocyte progenitors. *Blood* 1995;86:2516-2525.
7. Takeshita A, Shinjo K, Naito K *et al.* Amount of mpl on bone marrow haemopoietic preëursor cells from healthy volunteers and patients with refractory anaemia. *Br J Haematol* 1997;99:746-755.
8. Albitar M, Manshoury T, Kantarjian H *et al.* Correlation between lower c-mpl protein expression and favorable cytogenetic groups in acute myeloid



- leukemia. *Leuk Res* 1999;23:63-69.
9. Takeshita A, Shinjo K, Izumi M *et al*. Quantitative expression of thrombopoietin receptor on leukaemia cells from patients with acute myeloid leukaemia and acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Haematol* 1998;100:283-290.
  10. Wetzler M, Baer MR, Bernstein SH *et al*. Expression of c-mpl mRNA, the receptor for thrombopoietin, in acute myeloid leukemia blasts identifies a group of patients with poor response to intensive chemotherapy. *J Clin Oncol* 1997;15:2262-2268.
  11. Tokunaga Y, Miyamoto T, Okamura T *et al*. Effect of thrombopoietin on proliferation of blasts from CD7-positive acute myelogenous leukaemia. *Br J Haematol* 1998;102:1232-1240.
  12. Bouscary D, Preudhomme C, Ribrag V *et al*. Prognostic value of c-mpl expression in myelodysplastic syndromes. *Leukemia* 1995;9:783-788.
  13. Fontenay RM, Dupont JM, Picard F *et al*. Analysis of megakaryocyte growth and development factor (thrombopoietin) effects on blast cell and megakaryocyte growth in myelodysplasia. *Leuk Res* 1998;22:527-535.
  14. Tamura H, Ogata K, Luo S *et al*. Plasma thrombopoietin (TPO) levels and expression of TPO receptor on platelets in patients with myelodysplastic syndromes. *Br J Haematol* 1998;103:778-784.
  15. Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT *et al*. Proposals for the classification of the myelodysplastic syndromes. *Br J Haematol* 1982;51:189-199.
  16. Ogata K, Fujii H, Yokose N *et al*. Defective natural killer (NK) cell mediated

- cytotoxicity does not imply clonal involvement of NK cells in myelodysplastic syndromes. *Br J Haematol* 1994;87:396-398.
17. Ogata K, An E, Kamikubo K *et al*. Cell cycle modulation by hematopoietic growth factors in myelodysplastic syndromes: analysis by three-color flow cytometry. *Exp Hematol* 1997;25:8-18.
  18. An E, Ogata K, Kamikubo K *et al*. Cell cycle analysis of blasts in patients with myelodysplastic syndromes who received granulocyte colony-stimulating factor. In: Nomura T, Yoshida Y, eds. *Myelodysplastic syndromes: Advances in Research and Treatment*. Amsterdam: Elsevier Science, 1998:361-368.
  19. Tafuri A, Andreeff M. Kinetic rationale for cytokine-induced recruitment of myeloblastic leukemia followed by cycle-specific chemotherapy *in vitro*. *Leukemia* 1990;4:826-834.
  20. Raza A, Maheshwari Y, Mandava N *et al*. Cell cycle and drug sensitivity studies of leukemic cells that appear relevant in determining response to chemotherapy in acute nonlymphocytic leukemia. *Semin Oncol* 1987;14 (suppl 1):217-225.
  21. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 1987;162:156-159.
  22. Matsumura I, Ikeda H, Kanakura Y. The effects of thrombopoietin on the growth of acute myeloblastic leukemia cells. *Leuk Lymphoma* 1996;23:533-538.

23. Komura E, Matsumura T, Kato T *et al.* Thrombopoietin in patients with hepatoblastoma. *Stem Cells* 1998;16:329-333.
24. Greenberg P, Cox C, LeBeau MM *et al.* International scoring system for evaluating prognosis in myelodysplastic syndromes. *Blood* 1997;89:2079-2088.
25. Papayannopoulou T, Brice M, Farrer D *et al.* Insights into the cellular mechanisms of erythropoietin-thrombopoietin synergy. *Exp Hematol* 1996;24:660-669.
26. Era T, Takahashi T, Sakai K *et al.* Thrombopoietin enhances proliferation and differentiation of murine yolk sac erythroid progenitors. *Blood* 1997;89:1207-1213.
27. Carver MK, Broxmeyer HE, Luoh SM *et al.* Low levels of erythroid and myeloid progenitors in thrombopoietin- and c-mpl-deficient mice. *Blood* 1996;88:803-808.
28. Toba K, Winton EF, Koike T *et al.* Simultaneous three-color analysis of the surface phenotype and DNA-RNA quantitation using 7-amino actinomycin D and pyronin Y. *J Immunol Methods* 1995;182:193-207.
29. Oertel J, Kleiner S, Huhn D. Immunotyping of blasts in refractory anaemia with excess of blasts. *Br J Haematol* 1993;84:305-309.
30. Oster W, Cicco NA, Klein H *et al.* Participation of the cytokines interleukin 6, tumor necrosis factor- $\alpha$ , and interleukin 1- $\beta$  secreted by acute myelogenous leukemia blasts in autocrine and paracrine leukemia growth control. *J Clin Invest* 1989; 84:451-457.

**Table 1.** Effects of TPO and HGFs/Mix on blast number and cell cycle indices of MDS cells from each case

Case No.	Disease	Age/ Sex	Increase in		Indices of cell cycle			
			blast number (SI)		HGFs/Mix		TPO	
			HGFs/Mix	TPO	GoIC	SIC	GoIC	SIC
1	RA	75/M	5.00	1.00				
2	RA	70/M	1.95	0.90				
3	RA	77/F	4.50	1.30				
4	RA	82/F	0.50	1.00				
5	RA	60/F	1.47	0.33				
6	RA	70/M	5.64	1.07				
7	RA	58/M	4.90	1.33				
8	RA	27/F	4.00	1.00				
9	RA	65/M	6.17	1.25				
10	RA	74/F	9.44	0.62				
11	RARS	75/M	5.18	1.45				
	Subtotal		4.4 ± 2.5	1.0 ± 0.3				
12	RAEB	78/M	2.83	1.50	23.0	220.2	17.9	280.2
13	RAEB	65/M	8.14	4.86				
14	RAEB	68/M	2.34	1.50	169.5	454.3	116.4	271.7
15	RAEB	53/M	1.33	1.00	NC*	160.7	NC*	63.2
16	RAEB	72/F	3.80	1.07				
17	RAEB	87/F	5.50	4.38	14.6	6233.3	83.7	633.3
18	RAEB	61/M	3.92	1.35	34.6	164.2	116.1	103.4
19	RAEB	80/M	5.79	2.86	41.0	204.7	82.6	158.4
20	RAEB	64/M	3.43	2.57	50.8	288.1	31.4	202.4
21	RAEB	70/M	2.67	1.49				
22	RAEB	60/M	4.33	2.87	9.2	256.4	30.3	344.8
23	RAEB-t	74/M	2.20	1.45				
24	RAEB-t	48/M	1.74	1.11	40.0	116.0	153.3	100.4
25	RAEB-t	76/M	1.66	1.47				
26	RAEB-t	77/M	10.50	6.00	19.1	185.2	35.5	198.5
27	RAEB-t	59/M	5.50	4.50	48.5	166.4	67.0	99.1
	Subtotal		4.1 ± 2.5	2.5 ± 1.6				
28	MDS-AL	77/M	1.52	1.48	26.4	134.4	64.6	115.9
29	MDS-AL	66/M	1.42	0.75				
30	MDS-AL	65/F	3.12	1.32	52.4	295.2	75.7	64.5
31	MDS-AL	70/M	1.74	0.76				
32	MDS-AL	69/M	1.90	2.62	69.2	229.4	115.4	92.6
33	MDS-AL	48/M	7.94	6.14	51.1	395.8	68.5	201.4
34	MDS-AL	70/M	3.38	1.46	81.2	140.0	82.8	109.2
35	MDS-AL	69/M	7.30	2.06	3.9	219.2	36.4	212.1
36	MDS-AL	51/M	5.00	2.38	86.9	155.8	92.9	160.3
37	MDS-AL	72/M	2.40	1.40				
	Subtotal		3.6 ± 2.4	2.0 ± 1.6				

Subtotals of low-risk MDS, high-risk MDS and MDS-AL are the mean ± SD. Blanks mean no analysis was done. SI, GoIC and SIC were calculated using the formulas described in **Materials and Methods**.

\*The indices could not be calculated because the percentage of Go-phase cells in the control culture was 0.

**Table 2.** Summary of effects of TPO and HGFs/Mix on cell cycle of MDS cells

Disease	Stimulator	Cell cycle (%)				
		G0	G1	S	G2 + M	
High-risk MDS	None	10.0 ± 9.0	73.8 ± 11.1	10.2 ± 7.1	4.6 ± 4.8	
	TPO	7.8 ± 10.6	72.4 ± 13.4	14.8 ± 6.6	4.5 ± 4.0	
	HGFs/Mix	4.0 ± 4.0	66.6 ± 7.4	20.5 ± 6.2	9.0 ± 5.5	
MDS-AL	None	24.8 ± 28.7	78.9 ± 12.7	11.8 ± 10.2	4.1 ± 3.5	
	TPO	18.2 ± 22.4	69.9 ± 21.2	15.6 ± 14.1	6.4 ± 6.3	
	HGFs/Mix	14.7 ± 21.4	60.1 ± 22.7	21.6 ± 14.1	10.4 ± 15.2	

Data are mean ± SD.

Table 3. Correlation between blast proliferation response to TPO and clinical and biological variables

	High-risk MDS		MDS-AL	
	SI $\geq$ 1.5	SI < 1.5	SI $\geq$ 1.5	SI < 1.5
Age	70.9 $\pm$ 9.9	64.8 $\pm$ 4.2	59.3 $\pm$ 11.3	70.0 $\pm$ 4.3
Leukocytes (x 10 <sup>9</sup> /l) <sup>a,b</sup>	5.8 $\pm$ 4.2	10.8 $\pm$ 17.0	22.8 $\pm$ 29.4	28.3 $\pm$ 33.4
Neutrophils (x 10 <sup>9</sup> /l)	2.6 $\pm$ 2.3	5.9 $\pm$ 9.1	10.8 $\pm$ 17.4	11.5 $\pm$ 21.1
Circulating blasts (x 10 <sup>9</sup> /l)	0.19 $\pm$ 0.31	0.83 $\pm$ 2.01	2.62 $\pm$ 2.24	12.69 $\pm$ 13.57
Hemoglobin (g/dl)	7.8 $\pm$ 1.7	7.7 $\pm$ 1.6	6.8 $\pm$ 0.9	6.3 $\pm$ 0.8
Platelets (x 10 <sup>9</sup> /l)	89.4 $\pm$ 176.5	45.0 $\pm$ 43.2	33.0 $\pm$ 29.2	64.3 $\pm$ 40.0
Bone marrow blast (%)	14.2 $\pm$ 6.8	16.5 $\pm$ 7.5	54.6 $\pm$ 24.4	62.1 $\pm$ 32.4
Serum LDH (IU/l) <sup>a</sup>	816 $\pm$ 312	363 $\pm$ 152	960 $\pm$ 723	718 $\pm$ 352
Serum TPO (fmol/ml)	2.4 $\pm$ 2.0	1.5 $\pm$ 1.4	2.2 $\pm$ 3.1	1.0 $\pm$ 0.4
Cytogenetic subgroup <sup>b</sup>	3/0/5/1	4/1/2/0	1/1/2/0	1/0/2/3
IPSS <sup>c</sup>	0/1/3/4/1	0/1/0/5/1		

High-risk MDS cases and MDS-AL cases were divided into two groups, respectively, according to the proliferation response of blasts to TPO, i.e., the SI value of the blast number.

Data at the date of experiment are shown as the mean  $\pm$  SD or case number.

<sup>a</sup>Significantly different between the two groups in the high-risk MDS ( $p = 0.0036$ ).

<sup>b</sup>Good/intermediate/poor/no data.

<sup>c</sup>Low/Int-1/Int-2/High/no data.

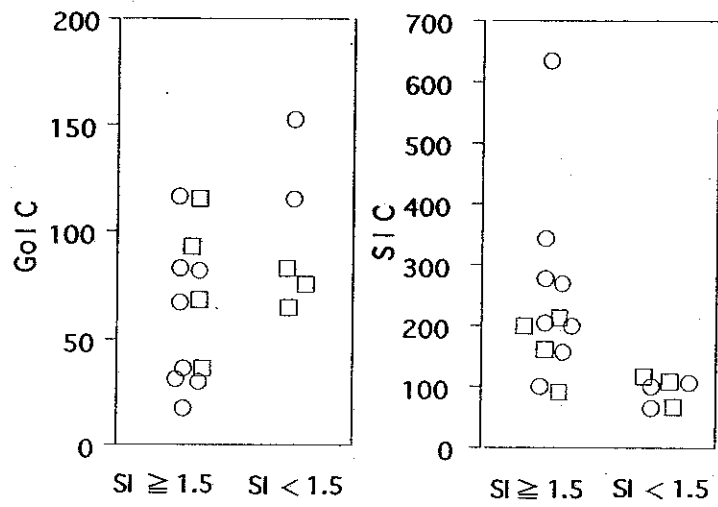
Cytogenetic subgroup and IPSS were defined according to the previous report (24).

## FIGURE LEGENDS

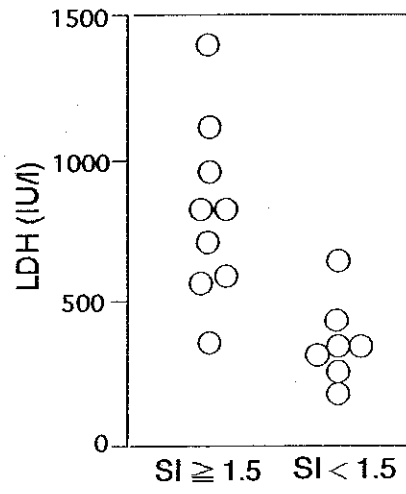
**Figure 1.** TPO-induced cell cycle change (GoIC and SIC) in the cases whose SI of the blast number was  $\geq 1.5$  and in the cases whose SI was  $< 1.5$ . Circles indicate high-risk MDS and squares indicate MDS-AL.

**Figure 2.** Serum LDH values of the high-risk MDS cases whose SI of the blast number was  $\geq 1.5$  and the cases whose SI was  $< 1.5$ . Serum LDH values were significantly different between the two groups ( $p = 0.0036$ ).

**Figure 3.** RT-PCR analysis of TPO-R mRNA (t) and  $\beta$ -actin mRNA (a) for MDS blasts and cell lines. M, D, K and J indicate markers, Dami cells, K562 cells and Jurkat cells, respectively. The numbers indicate the case numbers. The SI of the blasts was  $\geq 1.5$  in Cases 21, 18, and 16 and  $< 1.5$  in the other three cases.







日本財団補助金による  
1999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－

2000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 俞 小忠  
研究機関 名古屋大学大学院医学研究科 研究指導者 竹内 康浩 職名 教授  
所在地 〒466-8550 名古屋市昭和区鶴舞町 65 電話 052-7442124 内線 \_\_\_\_\_

研究テーマ フロン代替品 1-bromopropane と 2-bromopropane による神経、生殖毒性の発生機序

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)

Yu X, Kamijima M, Ichihara G, Li W, Kitoh J, Xie Z, Shibata E, Hisanaga N, Takeuchi Y.


2-Bromopropane causes ovarian dysfunction by damaging primordial follicles and their oocytes in female rats.

Toxicol Appl Pharmacol. 1999 Sep 15; 159(3): 185-93.

### 3. 今後の研究計画

今回の研究では2-Bromopropane (2-BP) 暴露による卵巣毒性は始原卵胞のアポトーシスの増加によることを示唆しました。今後は始原卵胞のアポトーシスに関連する遺伝子の発見を検討するつもりです。また精巣毒性の発生機序も検討する。さらに今 溶剤として多く使われる1-Bromopropaneの生殖神経毒性の発生の分子レベル機序の検討を行います。

### 4. 研究指導者の意見

オゾン層を破壊する溶剤である特定フロンや1,1,1-トリクロロエタンに代って導入された2-ブロモプロパンが、よゝゝ生殖毒性を有することが明らかになった。その生殖毒性の機序を明らかにすることは2-ブロモプロパンの中毒予防に役立つばかりでなく、他の化学物質の生殖毒性を評価する上で重要である。命君は精力的な研究で2-ブロモプロパンの此毒への毒性機序が始原卵胞のアポトーシスであることを明らかにする成果をあげた。 研究指導者氏名 竹内康浩 

### 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。

# 2-ブロモプロパンによる卵巣障害機序の検討

俞 小忠

上海医科大学公衆衛生学院 講師

竹内 康浩 名古屋大学医学部 教授

## 要 旨

2-Bromopropane (2-BP) 暴露による卵巣毒性の標的細胞を明らかにするために ラットに 2-BP を吸入暴露して濃度別 9 週間暴露及び 1 回高濃度暴露後の経時的な観察を行った。濃度別実験では始原卵胞、成長卵胞数は量依存的に対象群に比べて著明に減少した。濾胞卵胞数も量依存的に減少した。3000 ppm 1 回暴露した 5 日後に始原卵胞の卵子核の不規則、17 日後に始原卵胞の卵子核の縮小、濃縮など著明な組織学変化を認めた。ApopTag を用いて染色で暴露群では暴露後 5 及び 17 日後にアポトーシスと考えられる茶色に染められた始原卵胞の卵子核が観察された。暴露後 17 日に始原卵胞数は対象群に比べて有意に減少した。2-BP による卵巣卵胞の障害は始原卵胞のアポトーシスの増加によることを示唆した。

**Key Words:** 2-Bromopropane; ovarian toxicity; histopathology; apoptosis; follicle count; primordial follicle; inhalation exposure.

## INTRODUCTION

Reproductive toxicity of alternatives for ozone-depleting solvents has become an important issue since the outbreak of reproductive and hematopoietic disorders in workers exposed to 2-bromopropane in South Korea (2-BP, CAS No. 75-26-3) (Kim et al., 1996; Park et al., 1997; Takeuchi et al., 1997). In the incident, thirty-three workers (25 women, 8 men) were exposed to solvents containing 2-BP as the major ingredient, resulting in amenorrhea in 16 females and azoospermia or oligospermia in 6 males (Kim et al., 1996; Park et al., 1997). No exposure data were available but the geometric mean concentration of 2-BP was estimated to be 12.4 ppm (range 9.2-19.6 ppm) with short-term level of 4,360 ppm, based on a simulation study after the incident. Since the toxicity of 2-BP was unknown then, several efforts have been made to investigate whether such toxicities occur in experimental animals.

A nine-week inhalation study using male rats revealed that exposure to 2-BP at  $\geq 300$  ppm resulted in a decrease in testicular and epididymal weights, epididymal sperm count, motile sperm percentage and the number of erythrocytes and platelets. All type of germ cells decreased in the 300 ppm group, and germ cells were absent but Sertoli cells were still present in the 1,000 ppm exposure group (Ichihara et al., 1997). Subsequent study revealed that exposure to 1,000 or 3,000 ppm of 2-BP induced a hypoplastic profile with replacement of the bone marrow with fatty spaces and marked reduction in megakaryocytes (Nakajima et al. 1997). In another study using subcutaneous injections of 2-BP, it was demonstrated that spermatogonia, the stem cells of spermatocytes, were the target cells of 2-BP in rat testes (Omura et al., 1997; 1999). As for female reproductive toxicity, a 9-week inhalation study showed that the female rats exposed to 300 or 1000 ppm of 2-BP developed irregular estrous cyclicity. The cycles in the 1,000-ppm group started to lengthen around the second week of exposure, and that those in the 300-ppm group shown a gradual lengthening around the 7th week. Furthermore, luteinizing hormone tended to decrease and follicle-stimulating hormone increased dose-dependently in the 300 and 1,000-ppm groups albeit statistically insignificant. Marked atresia of ovarian follicles accompanied by reduced number of antral and growing follicles were histopathologically observed in the 300 and 1,000 ppm groups (Kamijima et al., 1997). Another study showed that 2-BP induced a significant delay in the estrous cycle, reduced fertility, and tended to decrease the number of pups born in rats treated with daily intraperitoneal injections of 2-BP (900 mg/kg for 14 days) (Lim, et al., 1997). The third study showed that intraperitoneal injection of 2-BP in mice (8 times at intervals of 2 or 3 days at 500, 1,000 and 2,000 mg/kg for 17 days) caused a marked decrease in the number of ovulated ova induced by superovulation treatment in the 1,000 and 2,000 mg/kg groups (Sekiguchi and Honma, 1998). These series of studies indicate that 2-BP exhibits reproductive toxicity in both males and females. However, the primary target site (target cell) of 2-BP in the ovary or the mechanism of target cell toxicity is still unclear. The aims of the present study were to define the primary target site of 2-BP in the ovary and determine the involvement of apoptosis as a mechanism of 2-BP-induced ovotoxicity. We determined the effects of 2-BP on subtle and early changes in ovarian structure by differential follicle counts. As demonstrated previously in male rats, the present results showed that the immature germ cell, the primordial follicle and its oocyte, is primarily vulnerable to 2-BP. We were also able to detect follicle

destruction at 100 ppm, at which significant alteration in estrous cyclicity and gross ovarian histopathology was not observed in the studies of Kamijima et al. (1997). Our results also indicated that differential follicle counts are more sensitive measure of 2-BP-induced ovarian toxicity than estrous cyclicity, as evident in dose-response and time-course experiments.

## MATERIALS AND METHODS

**Chemicals.** 2-BP was obtained from Tosoh. Co. (Japan). Purity was > 99.5% as determined by capillary gas chromatography. In situ terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) commercial kit (ApopTag, No. S7100) was purchased from Oncor (Gaithersburg, MD).

**Animals and inhalation exposure.** Female Wistar rats (8 weeks old) were purchased from Shizuoka Laboratory Animal Center, Japan. Animals were housed three per stainless steel cages, provided with food and water *ad libitum*. They were maintained in a 12-12 hr light-dark cycle (lights on at 9:00 and off at 21:00) room, with a constant temperature (23.9-25.3°C) and relative humidity (57-60%). Japanese laws concerning the protection and control of animals, standards related to care and management of experimental animals, and the Guidelines on Animal Experimental set out by Nagoya University School of Medicine, were strictly followed throughout the experiments. After 2 weeks of acclimatization, estrous cyclicity was determined by cytology from daily vaginal smear. Cycle days were classified as proestrus, estrus, diestrus I and diestrus II (Cooper et al., 1993). After monitoring the estrous cycle for three weeks (Cooper et al 1993), rats with four consecutive 4- to 5-day cycles were weighed and grouped in a cage according to their estrous stage. Thus, cage mates were at the same stage of cycle and were treated in an identical manner. Vaginal smear was taken daily. We used the inhalation exposure system described previously by Takeuchi et al. (1989) and modified by Ichihara et al. (1997). The vapor concentration in the chamber was measured by gas chromatography and digitally controlled within  $\pm 5\%$  of the target concentration using a personal computer.

**Experimental design.** The general principal of the design of this study was based on the work of Davis (1993) and Davis et al. (1997). In order to determine the dose-response and 2-BP-related pathogenetic changes on cycling female rats, we conducted dose-dependent and time-course experiments. In the dose-dependent experiments, 36 female rats, weighing 230-270 g at 12 weeks of age, were divided into four equal groups

according to their estrous stage. Each group was exposed to 0, 100, 300, or 1,000 ppm 2-BP for 8 hr/day for 9 weeks. The exposure concentrations were modified from a previous study on male rats (Ichihara et al. 1997), where rats were exposed to 0, 300, 1,000, and 3,000 ppm. Rats in the 3,000 ppm group became seriously ill after exposure for 9-10 days and spermatogenesis was impaired at  $\geq 300$  ppm. During the exposure period, body weight was measured once a week and vaginal smears were obtained every day to monitor ovarian cycle. After the 9-week exposure period, we sacrifice the rats on the day of diestrus I.

In the time-course experiments, 35 female rats were divided into five equal groups according to their estrous stages. Four groups were exposed continuously to 2-BP at 3,000 ppm for 8 hr, and one group to fresh room air only. Exposure commenced at 21:00 on day 0 and was terminated at 5:00 in the morning. The rats were sacrificed 1, 3, 5 or 17 days after exposure. In order to sacrifice animals on the estrous day, exposure in groups of 1, 5 and 17 days commenced on the day of proestrus while for group 3-days, exposure commenced on the day of diestrus I. Most rats were estrous on the day of sacrifice. Two rats in the 3-day group and one in 5-day group were sacrificed on the next day. Two in the 5-day group and one in the 17-day group were sacrificed 2 or 3 days after.

**Histopathological examination.** The reproductive organs were carefully dissected, removed, weighed immediately and fixed in 10% neutral buffered formalin for light microscopic evaluation. Following standard processing procedures to prepare tissue on slides, tissue blocks were dehydrated with serial concentrations of ethanol and embedded in paraffin. Eight  $\mu\text{m}$  serial sections were prepared from the right ovaries, mounted on glass slides, and stained with hematoxylin and eosin. A modified method of Pedersen and Peters (1968) for differential follicle counts was used according to Plowchalk et al.(1993), where types 1-3b, types 4-5b, and type 6-8 were grouped as primordial, growing, and antral follicles, respectively. The primordial follicle group consisted of a range of follicles that contained an oocyte but no surrounding granulosa cells as well as follicles that had one complete ring of granulosa cells surrounding the oocyte. The growing follicle group consisted of follicles that contained an oocyte with multiple layers of surrounding cells. There was no evidence of antrum formation in these follicles. The antral follicle group consisted of follicles that contain a large oocyte, multiple

cell layers surrounding the oocyte, and a fluid-filled antrum. Only follicles that had chromatin-visible oocytes in cross-sections were counted, and no attempt was made to differentiate atretic from normal follicles.

Starting with the first serial section that contained the ovarian tissue, each specific follicle type was counted. Thereafter, every 5th serial section was scored for differential follicle numbers. Once all sections were scored, the number of each type of follicles in all sections were summed to give the total primordial, growing, and antral follicle counts for that ovary. The total number of primordial, growing and antral follicles counted in the control were ranged from 167 to 256 (mean 202.6), 58 to 106 (mean 74.4), and 22 to 44 (mean 37.8), respectively. Light microscopy was used for morphological characterization and detection of cellular damage. The latter included nuclear pyknosis and chromatin redistribution, cytoplasmic condensation, and the shape and arrangement of the oocyte and granulosa cells. Follicle counting and morphological characterization were blindly performed by two authors.

***In situ* terminal deoxynucleotidyl transferase assay.** In the time-course experiment, 5  $\mu$ m tissue sections of the left ovary were deparaffinized with xylene and washed in serial concentrations of ethanol solutions. Section were then subjected to labeling DNA strand breaks by using a deoxynucleotidyl transferase (TdT) commercial kit according to the instructions provided by the manufacturer. Digoxigenin-conjugated deoxyuridine 5'-triphosphate (d-dUTP) was incorporated into DNA strand breaks by exogenous TdT. The incorporated d-dUTP was then detected with peroxidase-labeled digoxigenin antibodies, followed by the addition of diaminobenzidine. The specimen was then washed with distilled water and counterstained with hematoxylin, dehydrated, mounted, and examined by using a light microscope. Apoptotic cells were identified by their brownish staining. Positive and negative control sections were included in each sample.

**Statistical methods.** The relative counts of primordial, growing, and antral follicles in 2-BP exposed groups were expressed as percentages of the control. Differences between groups were examined for statistical significance using one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey-Kramer multiple comparison test. A *P* value less than 0.05 denoted the presence of a statistically significant difference.



## RESULTS

**Dose-dependent follicle damage.** Ovaries of the control rats contained follicles of all developing stage, corpora lutea, and interstitial tissue (Fig. 1). Ovaries of the 1,000-ppm group were hypoplastic and characterized by few primordial, growing and antral follicles, few or no corpora lutea (Fig. 2). Follicle counts in this group showed that all types of ovarian follicles were significantly lower than control (Fig 3). Ovaries from rats exposed to 2-BP at 300 ppm for 9 weeks were also hypoplastic and some contained no newly formed corpora lutea (Fig. 4). The numbers of primordial follicles, growing follicles, and antral follicles in this group were significantly lower than control (Fig. 3). Microscopic examination of ovaries of the 100-ppm group showed no significant morphologic changes relative the control (data not shown). Follicle counts in this group, however, significantly reduced numbers of primordial and growing follicles, but the reduction of antral follicle was not statistically significant (Fig. 3). Table 1 compares the detection limit between vaginal smear tests and follicle counts. Estrous cycles were significantly disrupted in 300 and 1,000-ppm exposed groups during the 7 and 9 week of exposure. However, there was no significant change in the estrous cycle of rats exposed to 100 ppm (Table 1). These results showed that follicle count was a more sensitive method for detecting ovarian dysfunction caused by 2-BP than vaginal smears.

**Time-course follicle damage.** There was no significant change in estrous cyclicity in all groups after a single exposure to 3,000 ppm for 8 hr. However, the single exposure to 2-BP caused apparent histological changes in the primordial follicle complex at days 5 and 17 after exposure (Figs. 5). Under normal conditions, oocytes and their nuclei are round in shape, with the chromatin being dispersed throughout the nucleus in a reticular or granular pattern (Fig. 5a). The symmetry of the oocyte and its nucleus became distorted and irregular at day 5 after exposure (Fig. 5b). Eccentric pyknotic nuclei were present at day 17 after exposure (Fig. 5c), together with shrinkage of nuclei and the appearance of brown granules (Fig. 5c). Granulosa cells appeared unaffected on 5 and 7 days after exposure (Figs. 5b, c). On the other hand, no obvious histopathological changes were detected in growing follicle complex and antral follicle complex after exposure (data not show).

The results of *in situ* end labeling staining for DNA strand breaks are shown in Figure 6. In control rats, apoptotic cells were confined to the granulosa cells of atretic follicles (Fig. 6a), and positive staining was not

detected in primordial and growing follicles. In contrast, in 2-BP-exposed groups, positively-stained cells were detected in several nuclei of oocytes in primordial follicles at days 5 and 17 after exposure, indicating wide-scale apoptosis in these follicles (Fig. 6b and c).

Fig. 7 summarizes the time-course effects of exposure to 2-BP on follicle counts. The percentage of primordial follicles did not change at days 1 and 3 after exposure but their number tended to decrease at day 5 after exposure. There was a significant reduction in the percentage of these follicles at day 17 after exposure (Fig. 7). The percentages of growing and antral follicles were also reduced after exposure, albeit insignificantly. Small effects on these follicles could not be excluded since the errors were so large that an effect must be larger than 25% to be detected. There were no clear-cut changes in the number of atretic growing and antral follicles at any interval after exposure.

## DISCUSSION

Morphological evaluation and differential follicle counts in time-course experiment demonstrated that the primordial follicle and its oocyte were the most sensitive components to a single exposure to 2-BP at 3,000 ppm for 8 hr. The effects on growing and antral follicles were minimal. Disruption of the estrous cycle and loss of growing and antral follicles in rats exposed for 9 weeks to 300, 1,000 ppm were caused by a reduction of the primordial follicle pool. Several compounds are known to damage ovarian follicles (Plowchalk and Mattison, 1992; Shiromizu et al., 1984; Smith et al., 1990) and the stage of development at which the follicle is destroyed is important in determining the impact of exposure to the chemical on reproduction function. In this regard, chemicals that selectively damage large growing or antral follicles are known to cause a transient reproductive system dysfunction which is reversible once exposure to these chemicals is terminated (Mattison and Schulman 1980; Generoso et al., 1971). Conversely, chemicals that destroy oocytes in primordial follicles might show a delayed effect on the estrous cycle or prolonged reproductive dysfunction that continues until recruitment of growing and antral follicles can no longer be supported (Mattison and Schulman, 1980; Hooser et al., 1994). Cyclophosphamide (CPA) is known to damage the primordial, growing, and antral follicles in a time-, dose-, strain-, and species-dependent fashions (Shiromizu et al., 1984; Plowchalk and Mattison, 1992). Shiromizu et al. (1984) found that primordial oocytes were the most sensitive to destruction after intraperitoneal treatment with

CPA in Sprague-Dawley rats, C57BL/6N and DBA/2N mice. A delayed decrease in the number of medium sized follicles was noted between 1 and 2 weeks after treatment. In mice treated with CPA at 75, 200 or 500 mg/kg, the primordial follicles showed the highest sensitivity and were affected by all doses, while antral and growing follicles were also impaired (Plowchalk and Mattison, 1992). Busulfan (1,4-butanediol dimethanesulfate), another cytotoxic drug, has also been shown to cause selective degeneration of the primordial follicle (Hishfield, 1994; Reddoch et al., 1986). The present study showed that one-day dose of 3,000 ppm of 2-BP produced no significant change in estrous cycle during a 17-day observation. We have previously demonstrated that the time required for 2-BP to produce obvious estrous cycle disruptions at 300 ppm or 1,000 ppm was 7 or 3 weeks, respectively (Kamijima et al., 1997). As for 100 ppm, we could not observe any estrous cycle disruption.

Several studies have investigated the mechanisms involved in the destruction of ovarian follicles and oocytes by ovotoxicants (Springer et al., 1996a,b; Hoyer and Sipes, 1996). Morphological evaluation of ovaries of 2-BP-exposed rats showed nuclear pyknosis and shrinkage but no evidence of necrosis (e.g., rupture of membrane, cellular swelling, or infiltration by macrophages) (Kerr et al., 1994). Furthermore, *in situ* analysis of DNA fragmentation of the ovaries suggested that oocytes degeneration in adult rats exposed to 2-BP is due to apoptotic cell death. In control rats, apoptotic cells were confined to the granulosa cells of atretic follicles, which was consistent with the results of previous studies demonstrating that atresia of follicles in growing or antral follicles was due to apoptosis (Hsueh et al., 1996; Kaipia et al., 1997). The primordial follicles represent a uniform group with regard to growth pattern; an all or none growth, and very few degenerate (Pedersen, 1970). However, the nuclei of several oocytes in the primordial follicles in the present study were positively stained at days 5 and 17 after exposure to 2-BP. Apoptosis, or programmed cell death, is an important cellular process involved in response to toxicants. Previous studies have shown that destruction of small preantral follicles by 4-vinylcyclohexane diepoxide was due to apoptosis, as confirmed by morphological appearance of margination of chromatin along the nuclear membrane in oocytes and disruption of focal contacts between granulosa cells and oocytes (Springer et al., 1996a). Furthermore, overexpression of bax genes in small preantral follicles was thought to represent selective susceptibility of these cells (Springer et al., 1996b).

The ovarian toxicity of 2-BP was first observed in a Korean electronic factory (Kim et al., 1996; Park et al., 1997). Of the 25 female workers exposed to 2-BP, sixteen developed amenorrhea. The latent period between exposure to onset of amenorrhea was 4 to 16 months. The present results suggest that severe ovarian failure in these workers might be irreversible due to failure of ovulation caused by damage of oocyte in the primordial follicles. In a recent report of a 2-year follow-up study, of the 16 intoxicated female workers, most of them except 2 patients failed to show recovery of normal ovarian function. Six patients underwent laparoscopic examination and ovarian biopsy and four showed focal or diffuse fibrosis in the ovarian cortex. Follicles did not show the various stages of development, and the number of primary follicles was markedly decreased. Oocytes and granulosa cells were not seen in the primary follicles (Koh et al., 1998). The histopathological findings in these patients were consistent with severe impairment of ovaries, similar to those shown in the present study.

Vaginal smear test is simple and useful for determining the extent of ovarian dysfunction induced by exposure to toxicants and the test has long been used for screening female reproductive toxicity (Cooper, et al., 1993). We have recently reported that exposure to 1,000 or 300 ppm of 2-BP results in a significant disruption of the estrous cycle, 3 or 7 weeks after exposure, respectively (Kamijima et al., 1997). Clear histopathological changes were observed in 300, and 1,000-ppm 2-BP exposure groups. On the other hand, follicle counts showed that even exposure to 100 ppm of 2-BP reduced the percentages of primordial and growing follicles. These results indicate that differential follicle count is a more sensitive measure of 2BP-induced ovarian toxicity than gross ovarian weight, smear interruption or fertility. Such method provides a quantitative evaluation of ovarian toxicity compared with the conventional descriptive studies of histopathological examination. Several investigators have also shown that follicle count represents a more sensitive measure of toxicity and could be used to assess the normal function state as well as ovarian responses to toxic agents (Takizawa et al., 1984; Plowchalk et al., 1992; Smith et al., 1990; Bolon et al., 1997). Using these parameters, subtle and early changes in ovarian structure and function could be identified before the development of any reduction in the estrous cycle, fertility or fecundity. However, there is still a controversy with regard to the usefulness of the differential follicle count. Bolon et al. (1997) compared differential ovarian counts and reproductive performance for 15 chemicals in mice ovaries from National Toxicology Program Reproductive Assessment by Continuous

Breeding (RACB) bioassays. The RACB protocols demonstrated that six agents altered female reproductive outcome, but only three of six female toxicants [2,2-bis(bromoethyl)-1,3-propanediol, BPD; ethylene glycol monomethyl ether, EGME; methoxyacetic acid, MAA] significantly decreased counts of small and/or growing follicles by 33 to 92% in CD-1 mice and female toxicants di-N-hexyl phthalate, propantheline bromide, and tricresyl phosphate reduced reproductive performance but not follicle numbers. Altered follicle counts without apparent reproductive impairment occurred in CD-1 mice at lower doses of BPD but were not observed for nontoxic chemicals. Combined with the results of the present study, we conclude that the correlation between vaginal smear test and follicle count is dependent upon the target site (cells) or the type of follicle damaged. For example, a number of female toxicants could produce disruption of estrous cycle due to the impairment in neuroendocrine system, oviduct, uterus, cervix, or accessory sex glands by without reducing the follicle number (Lamb, 1989; McLachlan and Newbold, 1989). The type(s) of follicles damaged also have a critical effect on this correlation. For example, if only primordial follicles are destroyed, cyclicity can continue for a long time until no growing or antral follicles remain (Hooser et al. 1994). On the other hand, if the direct site of damage is antral follicle, this loss should be measured at the same time that vaginal cytology is disrupted. Therefore, the follicle differential counting method will be more effective in detecting early damage to primordial and growing follicles, but not necessarily antral follicle damage. The data in Table1 show a nice correlation that low dose exposure disrupts primordial and growing follicle numbers, but not antral follicles. This is well correlated with no disruption of vaginal cytology unless a dose that produces antral follicle damage is used.

In conclusion, the present study demonstrated that ovarian dysfunction induced by 2-BP was caused by the destruction of primordial follicle and its oocyte and that such cell damage was due to apoptotic process. Furthermore, we also demonstrated the usefulness of the follicle differential count as a sensitive test for monitoring female reproductive system dysfunction induced by 2-BP.

#### REFERENCES

Bolon, B., Bucci, T.J., Warbritton, A.R., Chen, J.J., Mattison, D.R., and Heindel, J.J. (1997). Differential follicle counts as a screen for chemically induced ovarian toxicity in mice: results from continuous breeding bioassays. *Fund. Appl. Toxicol.* 39, 1-10.

- Cooper, R.L., Goldman, J.M., and Vandenberg, J.G. (1993). Monitoring of the estrous cycle in the laboratory rodent by vaginal lavage. In *Female Reproductive Toxicology*. (R. Chapin and J. Heindel, Eds.), vol 3B, pp. 45-56. Academic Press, San Diego.
- Davis, B. (1993). Ovarian target cell toxicity. In *Female Reproductive Toxicology*. (R. Chapin and J. Heindel, Eds.), Vol 3B, pp. 69-78. Academic Press, San Diego.
- Davis, B., Almekkider, J.L., Flagler, N., Travlos, G., Wilson, R., Maronpot, R.R. (1997) Ovarian Luteal cell toxicity of ethylene glycol monomethyl ether and methoxy acetic acid in vivo and in vitro. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 142, 328-337.
- Generoso, W.M., Stout, S.K., and Huff, S.W. (1971). Effects of alkylating chemicals on reproductive capacity of adult female mice. *Mutat. Res.* 13, 172-8.
- Hirshfield, A.N.(1994). Relationship between the supply of primordial follicles and the onset of follicle growth in rats. *Bio. Reprod.* 50, 421-428.
- Hooser, S.B., Douds, D.P., DeMerell, D.G., Hoyer, P.B., and Sipes, I.G. (1994). Long-term ovarian and gonadotropin changes in mice exposed to 4-vinylcyclohexene. *Reprod. Toxicol.* 8, 315-323.
- Hoyer, P.B., and Sipes, I.G. (1996). Assessment of follicle destruction in chemical-induced ovarian toxicity. *Annu. Rev. Pharmacol.Toxicol.* 36, 307-331.
- Hsueh, A.J., Eisenhauer, K., Chun, S.Y., Hsu, S.Y., and Billig, H. (1996). Gonadal cell apoptosis. *Recent Prog. Horm. Res.* 51, 433-455.
- Ichihara, G., Asaeda, N., Kumazawa, T., Takawa, Y., Kamijima, M., Yu, X., Kondo, H., Nakajima, T., Kitoh, J., Yu, J., Moon, Y., Hisanaga, N., and Takeuchi, Y. (1997). Testicular and hematopoietic toxicity of 2-bromo-propane, a substitute for ozone layer-depleting chlorofluorocarbons. *J. Occup. Health* 39, 57-63.
- Kaipia, A., Hsueh, A.J. (1997). Regulation of ovarian follicle atresia. *Annu. Rev. Physiol.* 59, 349-63.
- Kamijima, M., Ichihara, G., Kitoh, J., Tsukamura, H., Maeda, K., Yu, X., Xie, Z., Nakajima, T., Asaeda, N., Hisanaga, N., and Takeuchi, Y. (1997). Ovarian toxicity of 2-bromopropane in the non-pregnant female rat. *J. Occup. Health* 39, 144-149.
- Kerr, J.F.R., Winterfold, C.M., and Harman, B.V. (1994). Morphological criteria identifying apoptosis. In *Cell Biology: A laboratory handbook* (J.E. Celis, Ed.), pp. 319-329. Academic Press, San Diego, CA.
- Kim, Y., Jung, K., Hwang, T., Jung, G., Kim, H., Park, J., Kim, J., Park, J., Park, D., Park, S., Choi, K., and Moon, Y. (1996). Hematopoietic and reproductive hazards of Korean electronic workers exposed to solvents containing 2-bromopropane. *Scand. J. Work Environ. Health* 22, 387-391.
- Koh, J., Kim, C., Hong, S., Lee, K., Kim, Y., Kim O., and Kim, G. (1998). Primary ovarian failure caused by a solvent containing 2-bromopropane. *Eur. J. Endocrinol.* 36, 297-299.

- Lamb, J.C. (1989). Design and use of multigeneration breeding studies for identification of reproductive toxicants. In *Toxicology of the male and female reproductive system* (P. K. Working, Ed.), pp. 131-155. Hemisphere, New York.
- Lim, C.H., Maeng, S.H., Lee, J.Y., Chung, Y.H., Kim, T.G., Park, J.H., Moon, Y.H., and Yu, I.J. (1997). Effects of 2-Bromopropane on the female reproductive function in Sprague-Dawley rats. *Indus. Health* 35, 278-284.
- Mattison, D.R., and Schulman, J.D. (1980). How xenobiotic compounds can destroy oocytes. *Contemp. Obstet. Gynecol.* 15, 157-169.
- McLachlan, J.A., and Newbold, R.R. (1989). End points for assessing reproductive toxicology in the female. In *Toxicology of the Male and Female Reproductive System* (P. K. Working, Ed.), pp. 173-178. Hemisphere, New York.
- Nakajima, T., Shimodaira, S., Ichihara, G., Asaeda, N., Kumazawa, T., Iwai, H., Ichikawa, I., Kamijima, M., Yu, X., Xie, Z., Kondon, H., Takeuchi, Y. (1997) 2-Bromopropane-induced hypoplasia of bone marrow in male rats. *J Occup. Health* 39, 228-233
- Omura, M., Romero, Y., Zhao, M., and Inoue, N. (1999). Histopathological evidence that spermatogonia are the target cells of 2-bromopropane. *Toxicol. Lett.* 104, 19-26.
- Omura, M., Romero, Y., Zhao, M., and Inoue, N. (1997) Histopathological changes of the testis in rats caused by subcutaneous injection of 2-bromopropane. *J. Occup. Health* 39, 234-239
- Park, J., Kim, Y., Park, D., Choi, K., Park, S., and Moon, Y. (1997). An outbreak of hematopoietic and reproductive disorders due to solvents containing 2-bromopropane in an electronic factory, South Korea: Epidemiological survey. *J. Occup. Health* 39, 138-43.
- Pedersen, T., and Peters, H. (1968). Proposal for a classification of oocytes and follicles in the mouse ovary. *J. Reprod. Fertil.* 17, 208-212.
- Perdersen, T. (1970). Follicle kinetics in the ovary of the cyclic mouse. *Acta Endocrinol.* 64, 304-323
- Plowchalk, D.R., Smith, B.J., and Mattison, D.R. (1993). Assessment of toxicity to the ovary using follicle quantitation and morphometrics. In *Female Reproductive Toxicology*. (R. Chapin and J. Heindel, Eds.), vol 3B, pp.57-68. Academic Press, San Diego.
- Plowchalk, D.R., and Mattison, D.R. (1992). Reproductive toxicity of cyclophosphamide in the C57BL/6N mouse: 1. Effects on ovarian structure and function. *Repro. Toxicol.* 6, 411-421.
- Reddoch, R.B., Pelletier, R.M., Barbe, G.J., and Armstrong, D.T. (1986). Lack of ovarian responsiveness to gonadotropic hormones in infantile rats sterilized with busulfan. *Endocrinol.* 119, 879-886.
- Sekiguchi, S., and Honma, T. (1998). Influence of 2-bromopropane on reproductive system-- 2-bromopropane inhibits forced ovulation in mice. *Indus. Health* 36, 297-299.
- Shiromizu, K., Thorgersson, S.S., and Mattison, D.R. (1984). Effect of cyclophosphamide on oocyte and follicle number in Sprague-Dawley rats, C57BL/6N and DBA/2N mice. *Pediatr. Pharmacol.* 4, 213-21.

- Smith, B.J., Mattison, D.R., and Sipes, I.G. (1990). The role of epoxidation in 4-vinylcyclohexene-induced ovarian toxicity. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 105, 372-381.
- Springer, L. N., Tilly, J. L., Sipes, I. G., and Hoyer, P. B. (1996b). Enhanced expression of bax in small preantral follicles during 4-vinylcyclohexane diepoxide induced ovotoxicity in the rat. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 139, 402-410.
- Springer, L.N., McAsey, M., Flaws, J. A., Tilly, J. L., Sipes, I.G., and Hoyer, P. B. (1996a). Involvement of apoptosis in 4-vinylcyclohexane diepoxide induced ovotoxicity in rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 139, 394-401.
- Takeuchi, Y., Huang, J., Shibata, E., Hisanaga, N., and Ono, Y. (1989). A trial to automate an organic solvent exposure system for small animals [in Japanese]. *Jpn. J. Ind. Health* 31, 722.
- Takeuchi, Y., Ichihara, G., and Kamijima, M. (1997). A review of toxicity of 2-bromopropane: mainly on its reproductive toxicity. *J. Occup. Health* 39, 179-191.
- Takizawa, K., Yagi, H., Jerina, D.M., and Mattison, D.R. (1984). Murine strain differences in ovotoxicity following intraovarian injection with benzo(a)pyrene, (+)-(7R,8S)-oxide, (-)-(7R,8R)-dihydrodiol, or (+)-(7R,8S)-diol-(9S,10R)-epoxide-2. *Cancer Res.* 44, 2571-2577.



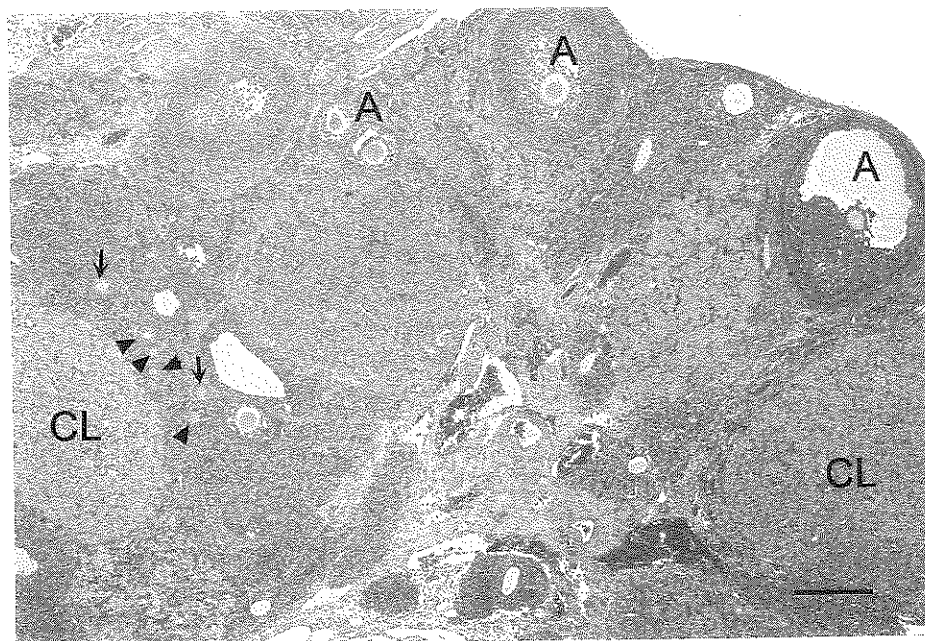


FIG. 1. Photomicrograph of an ovary from a representative control rat. CL, corpora lutea; A, antral follicles. Note the presence of growing follicles (arrows) and primordial follicles (arrowheads). Bar, 250  $\mu$ m.

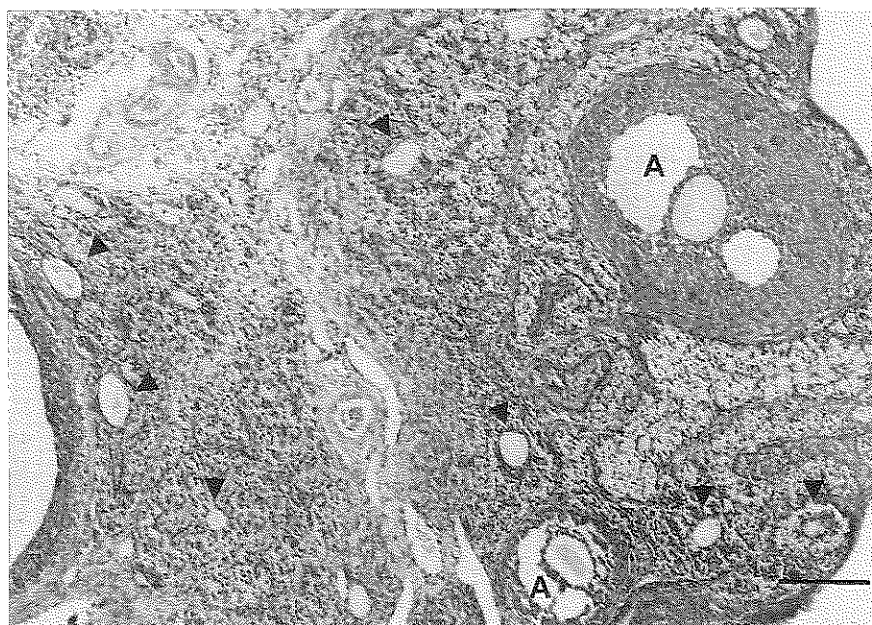


FIG. 2. Photomicrograph of an ovary from a representative rat exposed to 2-BP at 1000 ppm for 8 h/day, 7 days/week for 9 weeks. The ovary contains few primordial, growing, and antral follicles and no or few corpora lutea. A, antral follicles. Note the presence of degenerated follicles (arrowheads). Bar, 100  $\mu$ m.

TABLE 1  
Dose-Dependent Effects of 2-BP on Vaginal Estrous and Ovarian Follicles

		Dose of 2-BP (ppm)			
		Control	100	300	1000
Vaginal smear	Irregular and none	2/7	—(1/7)	↓↓(7/8)	↓↓(9/9)
Follicle differential counts	Primordial follicle	—	↓↓	↓↓	↓↓
	Growing follicle	—	↓↓	↓↓	↓↓
	Antral follicle	—	—	↓↓	↓↓

Note. Rats were exposed to 2-BP at 100, 300, and 1000 ppm or room air for 8 h/day, 7 days/week for 9 weeks. —, No significant difference from control; ↓↓, significantly lower than control at  $p < 0.01$ . Irregular and none, rats showed 0.5–3 cycles/3 weeks or 0 cycles/3 weeks from Weeks 7 to 9 after commencing exposure.

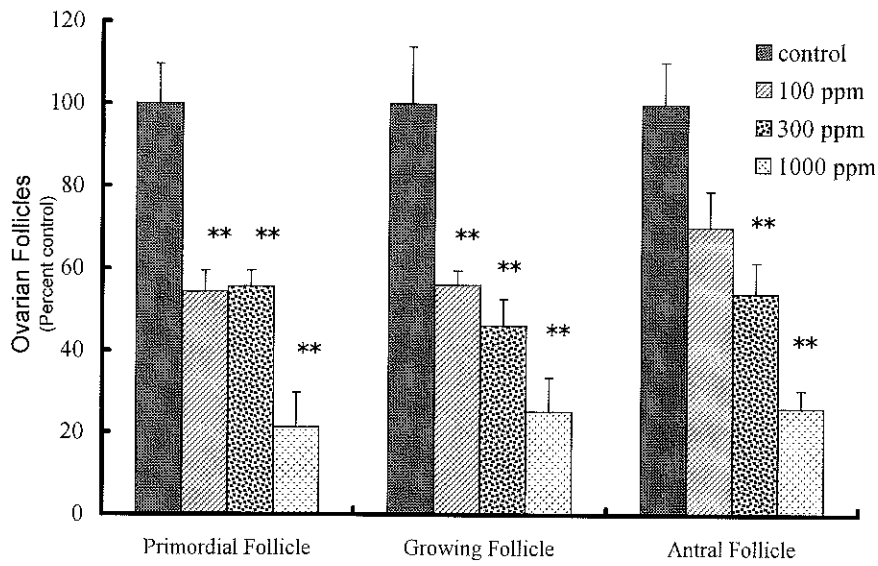


FIG. 3. Dose-effect of 2-BP on ovarian follicles. Rats were exposed to 2-BP at 100, 300, and 1000 ppm or room air for 8 h/day, 7 days/week for 9 weeks. Differential follicle counts were calculated using the modified method of Pedersen and Peters (1968), in which type 1-3b, type 4-5b, and type 6-8 were grouped as primordial, growing, and antral follicles, respectively. The relative counts of primordial, growing, and antral follicles were expressed as percentages of the control. Each bar represents the means  $\pm$  SEM of six to seven rats. \*\* Statistically significant at  $p < 0.01$ .

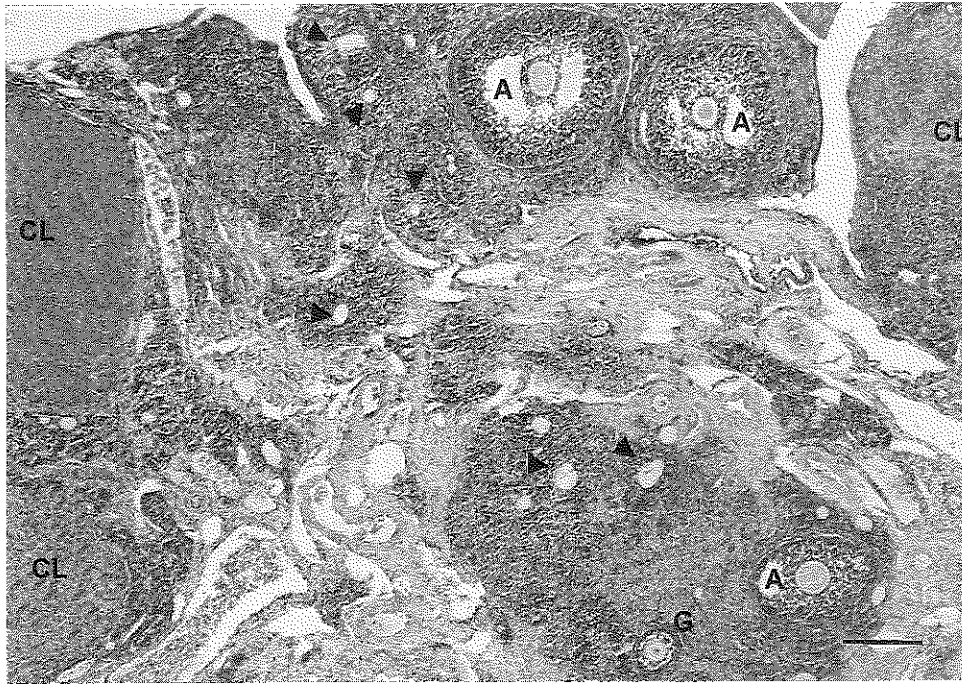


FIG. 4. Photomicrograph of an ovary from a representative rat exposed to 2-BP at 300 ppm for 8 h/day, 7 days/week for 9 weeks. CL, corpora lutea; A, antral follicles. Note the presence of degenerated follicles (arrowheads). The ovary contains few primordial, growing, and antral follicles and only a few newly formed corpora lutea. Bar, 250  $\mu$ m.

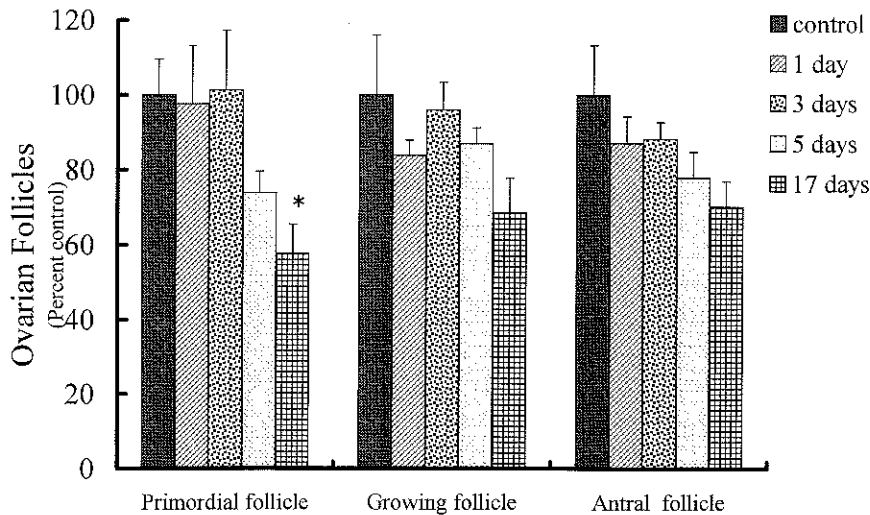


FIG. 7. Effects of a single exposure to 2-BP on ovarian follicles. Rats were exposed to 2-BP at 3000 ppm or room air for 8 h. Rats were euthanized at Days 1, 3, 5, or 17 after exposure. The method used to calculate differential follicle counts was described in Fig. 3. The relative number of primordial, growing, and antral follicles was expressed as percent of the control. Each bar represents the means  $\pm$  SEM of six to seven rats. \*Statistically significant at  $p < 0.05$ ; \*\*statistically significant at  $p < 0.01$ .

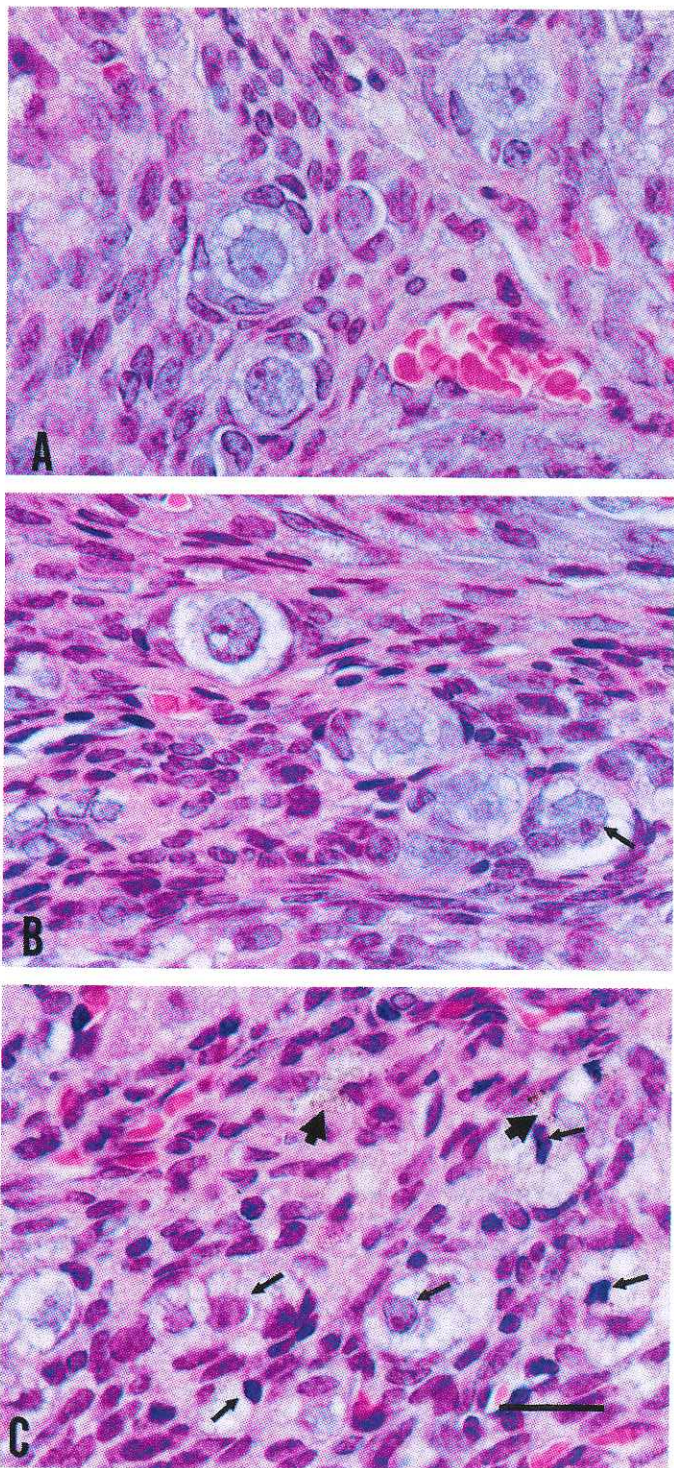


FIG. 5. Photomicrographs of ovarian tissue sections from representative rats exposed to 2-BP. Rats were exposed to 2-BP at 3000 ppm or room air for 8 h. Sections (5- $\mu$ m thick) were stained with hematoxylin and eosin. (A) A representative example of a primordial follicle from a control rat. Oocytes show a diffuse pattern of nuclear chromatin, a round shape, and each is surrounded by a layer of granulosa cells. (B) A representative example of a primordial follicle from a rat at 5 days after exposure to 2-BP. Note the granular appearance of the nuclear material in oocytes and irregular cell shape (small arrow). (C) A representative example of a primordial follicle from

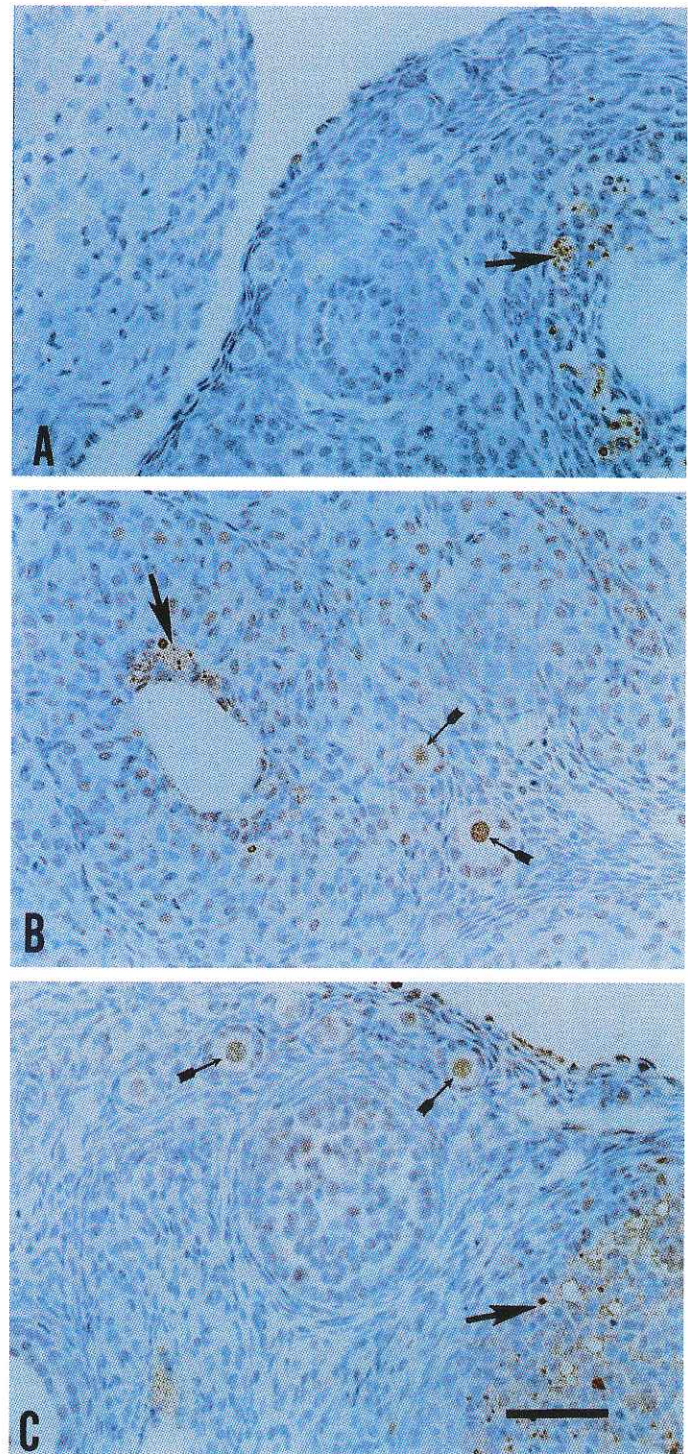


FIG. 6. *In situ* staining of apoptotic cells in ovarian tissues. Rats were exposed to 2-BP at 3000 ppm or room air for 8 h. (A) Positive staining of granulosa cells of the atretic follicle in control rats (large arrow). (B) Five days after exposure. Two oocytes stained brown in type 2 and type 3 primordial follicles (small arrows). Granulosa cells of the atretic follicle are also positively stained (large arrow). (C). Seventeen days after exposure. Apoptotic nuclei with positive brown staining in oocytes of the primordial follicles (small arrows) or granulosa cells of the atretic follicle (large arrow). Bar, 50  $\mu$ m.

日本財団補助金による  
1999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—

2000年3月14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 鄭智茵  
研究機関 新潟大学医学部第一内科 研究指導者 相澤義房 職名 教授  
所在地 〒951-8510新潟市旭町通 1-757 電話 025-227-2185 内線 2185

研究テーマ GM-CSF, IL-4, TNF- $\alpha$  添加培養による臍帯血付着細胞からの樹状細胞の誘導

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 ・ 無 (学会名・内容)

鄭智茵、高橋益広、鳥羽 健、劉 愛春、オスマン・ヤーセル、高橋英伸、橋本誠雄、古川達雄、青木定夫、小池 正、相澤義房 末梢血および臍帯血由来樹状細胞の抗原取り込み能と提示能 第61回日本血液学会総会 平成11年4月19日-21日(東京)

鄭智茵、高橋益広、劉 愛春、鳥羽 健、橋本誠雄、新国公司、古川達雄、青木定夫、小池 正、相澤義房 樹状細胞の抗原提示能に対する抑制因子の検討 第41回日本臨床血液学会総会 平成11年10月13-15日(秋田)

鄭智茵、高橋益広、劉 愛春、新国公司、成田美和子、鳥羽 健、古川達雄、小池 正、相澤義房 IL-10 および UV-B で処理した樹状細胞を用いて T cell anergy の誘導 第62回日本血液学会総会 平成12年3月16日-18日(福岡)

(2) 学会誌等に発表した論文  有 ・ 無 (雑誌名・論文名)

ZHIYIN ZHENG, MASURIRO TAKAHASHI, KEN TOBA, AICHUN LIU, TATSUO FURUKAWA, TADASHI KOIKE, YOSHIFUSA AIZAWA: Generation of Dendritic Cells from Adherent cells of Cord Blood by culture with GM-CSF, IL-4 and TNF- $\alpha$ . J Hematotherapy (in press)

### 3. 今後の研究計画

研究テーマ 白血病由来樹状細胞が分泌する白血病抗原/MHC 複合体の抗白血病免疫療法への応用

研究の背景 樹状細胞は、抗原を提示するだけではなく、主要組織適合抗原 (MHC) および抗原提示不可欠な co-stimulatory molecule と結合した抗原ペプチド複合体 (エクソゾーム) を分泌しており、このエクソゾーム自体も抗原提示能を有することが明らかにされている。白血病由来樹状細胞から分泌される白血病抗原/MHC 複合体エクソゾームを抗白血病免疫療法における白血病抗原の提示に応用することができれば、従来のリンパ球や樹状細胞自体の輸注による免疫療法に比し、より実用的で広く普及できる一般的な治療法として白血病に対する免疫療法の確立が期待できる。

研究の目的と方法 1) 白血病由来樹状細胞による細胞障害性 T リンパ球 (CTL) の誘導と樹状細胞が分泌するエクソゾームの精製。2) 白血病由来樹状細胞が分泌するエクソゾームの抗原提示能と CTL の誘導。

### 4. 研究指導者の意見

鄭 智茵さんは、中国浙江省中医学院附属浙江省中医院から新潟大学医学部内科学第一教室に留学し、医学部大学院博士課程を2000年3月31日に修了し、博士論文のテーマは”Generation of Dendritic Cells from Adherent cells of Cord Blood by culture with GM-CSF, IL-4 and TNF- $\alpha$ . (GM-CSF, IL-4, TNF- $\alpha$ を加えた培養による臍帯血からの樹状細胞の誘導)”で、主に樹状細胞を応用した悪性腫瘍の免疫療法についての研究を精力的に行いました。その成果は、発表論文、学会発表等で国内外で明らかにされています。日本における最先端の研究を行い、この分野における進歩に十分な貢献をしまして、中国に帰国後は中国における腫瘍免疫学の研究をリードするものと思います。鄭さんがこのような成果を得ることができましたのも、貴協会の補助金を頂いたことが、大きな要因になっていると思います。ここに謹んでお礼を述べさせていただきますと思います。

研究指導者氏名

相澤義房 

### 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。

研究テーマ

GM-CSF, IL-4, TNF- $\alpha$  添加培養による臍帯血付着細胞からの樹状細胞の誘導

研究者氏名 鄭 智茵

中国での所属 浙江省中医学学院附属病院浙江省中医院 役職 講師

日本での指導者氏名 相澤義房

所属 新潟大学医学部第一内科教室 役職 教授

## 要旨（日本語）

[目的] 臍帯血 CD34 陽性細胞からの樹状細胞の培養については報告されているが、臍帯血の単球からの樹状細胞の培養についての報告はない。簡便な方法で多数の樹状細胞を臍帯血から誘導することを目的として、臍帯血の付着細胞から樹状細胞の誘導を試みた。また、樹状細胞に腫瘍抗原等のパルスを行う際の好ましい培養条件である無血清培養での樹状細胞の誘導についても試みた。さらに、臍帯血付着細胞由来樹状細胞と末梢血付着細胞由来樹状細胞の抗原取り込み能と抗原提示能についても比較検討した。

[方法] 臍帯血と末梢血から付着細胞を分離し、10%FBS を添加した RPMI-1640 あるいは無血清メジウム(X VIVO-15)に GM-CSF, IL-4, TNF- $\alpha$  を添加して7日間培養により、樹状細胞の誘導を行った。また、TNF- $\alpha$  添加 (TNF- $\alpha$  を 5 日目に添加する) 及び無添加培養で、血清の樹状細胞の誘導に及ぼす効果を検討した。誘導された細胞について細胞形態の観察、細胞表面形質の解析、FITC-dextran と Lucifer Yellow (LY) の抗原取り込み能及び MLC (mixed leukocyte culture) における抗原提示能の検討を行った。

[結果] 臍帯血付着細胞を GM-CSF, IL-4 を加えて 7 日間培養することにより、単球から樹状細胞への移行が見られた。それらの細胞は樹状細胞の形態を持ち、CD14 は陽性から陰性になった。また CD1a, CD80, CD86, HLA-DR 等の発現が増強した。GM-CSF, IL-4 で培養した臍帯血付着細胞に TNF- $\alpha$  を添加することにより、成熟樹状細胞のマーカである CD83 と CMRF-44 の発現が明らかになると共に CD1a, CD80, CD86, HLA-DR の発現の増強も認められた。さらに、TNF- $\alpha$  を添加培養した細胞は TNF- $\alpha$  無添加培養の細胞に比し、MLC における強い抗原提示能が認められた。臍帯血付着細胞に GM-CSF, IL-4, TNF- $\alpha$  を加えて培養することにより、 $1.2 \times 10^7$  個の臍帯血単核細胞から血清添加培養では  $4.5 \pm 1.1 \times 10^5$ 、無血清培養では  $3.0 \pm 0.5 \times 10^5$  個の樹状細胞が誘導できた。以上の結果より、無血清培養系でも臍帯血付着細胞から樹状細胞の培養は可能であった。

臍帯血と末梢血付着細胞から培養した樹状細胞の細胞表面形質、抗原取り込み能及び抗原提示能について比較検討では、臍帯血付着細胞由来樹状細胞は CD1a, CD80, CD83 などの発現が末梢血付着細胞由来樹状細胞に比し低下していたが、抗原取り込み能及び抗原提示能では、臍帯血付着細胞由来樹状細胞は末梢血付着細胞由来樹状細胞と同程度であった。

[結論] 臍帯血は末梢血と同様、GM-CSF, IL-4, TNF- $\alpha$  を加えた培養で単球から樹状細胞への移行が認められた。血清添加、無血清培養にかかわらず、臍帯血から十分量の樹状細胞の誘導が可能で、かつ誘導された樹状細胞は強い抗原取り込み能と抗原提示能が認められたことから、臍帯血由来樹状細胞の免疫療法への応用の可能性が想定された。

## KEY WORDS

Dendritic cells, cord blood adherent cells, serum free culture, phagocytosis, antigen presentation, immunotherapy.

**Generation of Dendritic Cells from Adherent Cells of Cord Blood by Culture with GM-CSF, IL-4 and TNF- $\alpha$**

ZHIYIN ZHENG<sup>1</sup>, MASUHIRO TAKAHASHI<sup>2</sup>, KEN TOBA<sup>1</sup>, AICHUN LIU<sup>1</sup>, TATSUO FURUKAWA<sup>3</sup>, TADASHI KOIKE<sup>4</sup>, YOSHIFUSAAIZAWA<sup>1</sup>

<sup>1</sup>First Department of Internal Medicine, School of Medicine, <sup>2</sup>School of Health Sciences, <sup>3</sup>Division of Bone Marrow Transplantation, <sup>4</sup>Division of Blood Transfusion, Faculty of Medicine, Niigata University, Niigata, Japan

Address reprint requests to: Masuhiro Takahashi, M.D.

School of Health Sciences, Faculty of Medicine, Niigata University, 2-746,

Asahimachi, Niigata, 951-8518, Japan

(Tel) 81-25227-2387

(Fax) 81-25227-2387

(E-mail) matak@clg.niigata-u.ac.jp

**Running title:** Dendritic cells from cord blood adherent cells

**Key words:** dendritic cells, cord blood adherent cells, serum free culture, phagocytosis, antigen presentation, immunotherapy.



## ABSTRACT

Although dendritic cells (DC) can be cultured from cord blood (CB) CD34<sup>+</sup> progenitor cells, the generation of DC from CB monocytes has not been reported. In this paper, we explored to generate DC from CB monocytes for establishing the simple way to obtain substantial number of DC from CB. We isolated monocytes from CB mononuclear cells (CB-MNC) by plastic adherence method. These adherent cells (monocyte rich cells) were cultured in RPMI 1640 medium supplemented with 10 % fetal bovine serum (FBSM) or in serum free X-VIVO 15 medium (SFM) for 7 days, both of which contained 100 ng/ml GM-CSF and 10 ng/ml IL-4 with or without 10 ng/ml TNF- $\alpha$  (added at day 5). In the presence of GM-CSF and IL-4, CB adherent cells became nonadherent, acquired DC morphology, and showed the increased expression of CD1a, CD80, CD86 and HLA-DR; they lost membrane CD14 and some cells with the expression of CD83 and CMRF-44 were generated. With the addition of TNF- $\alpha$  to these cultures and culturing for further two days, the proportion of CD83 positive cells were elevated in both FBSM and SFM culture system, compared with the culture without TNF- $\alpha$ . In the culture with TNF- $\alpha$ , CD1a, CD80, CD86, HLA-DR and HLA-DQ expressing cells were markedly increased. TNF- $\alpha$  treated-cells were demonstrated to be stronger stimulators for proliferation of both allogeneic CB lymphocytes and PB lymphocytes than TNF- $\alpha$  nontreated-cells. The yield of CD83<sup>+</sup> DC at day 7 of cultures was  $4.9 \pm 1.1 \times 10^5$  or  $3.0 \pm 0.5 \times 10^5$  per  $1.2 \times 10^7$  CB-MNC plated initially when cultured in FBSM or SFM, respectively. These results have shown that a substantial number of mature DC could be generated from CB adherent cells even by serum free culture.

We then compared these CB adherent cell-derived DC (CB-DC) with peripheral blood (PB) adherent cell-derived DC (PB-DC) in cell surface phenotype and function. We found day 7 CB-DC have lower expression of CD80, CD1a, CD83 and CMRF-44 than day 7 PB-DC, but CB-DC have similar capacity to stimulate the proliferation of both allo-CB lymphocytes and PB lymphocytes, compared with PB-DC. CB-DC cultured with GM-CSF and IL-4 have almost identical capacity of phagocytosis to take up FITC-dextran and Lucifer yellow (LY), compared with PB-DC.

In summary, Our findings suggested cord blood adherent cells, when cultured with GM-CSF, IL-4 and TNF- $\alpha$ , are a potent source of functional DC. Thus, CB-DC as well as PB-DC may represent valuable tools for immunotherapy.

## INTRODUCTION

Dendritic cells (DC) are the most potent antigen-presenting cells (APC) of the human immune system, for they are capable of initiating antigen-specific responses in naive T lymphocytes (1,2). This outstanding T cell-stimulatory capacity of DC makes them be used as nature adjuvant in therapeutic strategies against tumor and infectious agents (3,4,5).

The use of DC for clinical research and application has been hampered by their very low frequency in any organ or tissue. Recently, two approaches to effectively generate a substantial number of DC have been found. One of them is generating DC from CD34<sup>+</sup> hematopoietic precursors by using GM-CSF and TNF- $\alpha$  as key cytokines (6,7). Another approach is to start with CD14<sup>+</sup> precursors (monocytes) in peripheral blood and culture

them in a combination of GM-CSF and IL-4 (8,9). The latter method has been widely used and appears to be more suitable for clinical application due to a number of reasons. First, the CD14<sup>+</sup> precursors are abundant in peripheral blood, compared with the frequency of CD34<sup>+</sup> cells. Secondly, the preparation and culture of monocytes are easier to perform and are inexpensive (10). Thirdly, the DC generated by this approach appears homogeneous and fully differentiated (11). In addition, the APC function of them is similar to DC generated from CD34<sup>+</sup> precursors (10). Recent studies have demonstrated that these monocyte-derived DC as well as CD34<sup>+</sup> cell-derived DC pulsed with tumor antigens could induce specific cytotoxic T cells that possess antitumor effects in vitro and in vivo (12,13,14).

Although DC can be generated from CD34<sup>+</sup> progenitor cells from human CB, obtaining enough numbers of CD34<sup>+</sup> cells that can generate a number of DC for meeting the demands of clinical immunotherapy may be difficult. Because the volume of obtainable CB is limited to small volume in which the number of CD34<sup>+</sup> cells is low. Thus, looking for other DC source in CB may be necessary.

It has been known more percentage of monocytes exist in CD34<sup>-</sup> cell population of CB, compared with PB. Caux et al. have proved the generation of DC from CB CD34<sup>+</sup> cells via CD14<sup>+</sup> cells (15), but the generation of DC from CB monocytes has not yet been reported. In this paper, we have explored to generate DC from monocytes in vitro not only for searching another DC source in CB, but also for providing simple and inexpensive approach to obtain a substantial number of DC from CB. We have investigated whether DC could be generated from adherent cells (monocyte rich fraction) in the presence of GM-CSF, IL-4 and TNF- $\alpha$ . The induction of DC from adherent cells under serum free culture

condition has been also investigated. Moreover, under the same cytokine condition, we have compared CB-DC with PB-DC in cell phenotypes, phagocytic activity and antigen presenting ability by using allo-MLR assay.

## MATERIALS AND METHODS

### *Cell preparation and culture condition*

Human CB was obtained from the placentas of normal full-term deliveries, following ethical committee approval. Healthy male and female laboratory personnel donated adult peripheral blood.

Mononuclear cells were obtained from all samples by centrifugation over Ficoll-Hypaque gradients (density=1.077 g/ml, Lymphoprep; Nycomed, Oslo, Norway). The cells were plated ( $1.2 \times 10^6$  cells/mL) in  $100 \times 20$  mm tissue culture plates (Falcon, Becton Dickinson, NJ) in RPMI 1640 supplemented with 2 mM L-glutamine, 100 U/mL penicillin, 100  $\mu$ g/ml streptomycin (Biowhittaker, Walkersville, MD). After 2 h at 37 °C, the nonadherent cells were gently removed. Adherent cells were cultured at 37 °C, in humidified 5 % CO<sub>2</sub> in air, and in RPMI 1640 supplemented with 10 % heat-inactivated fetal bovine serum (FBS, HyClone Laboratories, Logan, UT) [=further on called as FBSM], containing 100 ng/mL GM-CSF (Kirin Brewery, Maebashi, Japan) and 10 ng/mL IL-4 (Schering-Plough Research Institute, Kenilworth, NJ). 10 ng/mL TNF- $\alpha$  (Hayashibara Biochemical Labs, Okayama, Japan) was added to some of these cultures at day 5. After incubation for 7 days, cultured cells were harvested. In some experiments, cells were cultured for 7 days in serum free X-VIVO 15 medium (BioWhittaker,

Walkersville, MD) [=further on called as SFM] with the same concentrations of GM-CSF, IL-4 and TNF- $\alpha$ .

#### *Morphological observation of cells*

Cells before culture and cultured for 3 days and 7 days were centrifugated onto microscope slides using a Cytospin-2 centrifuge (Shandon Southern Products, Astmoor, U.K.), stained with May-Grunwald-Giemsa solution and observed on a microscope (Olympus, Tokyo, Japan).

#### *Analysis of surface markers by flow cytometry*

The expression of cell surface markers was analyzed by single-color immunofluorescence. Cells were harvested after culture for 1, 3, 5 and 7 days and washed with RPMI 1640 medium.  $2 \times 10^5$  cells were pelleted and incubated with 0.5 % human immunoglobulin for 10 min at 4 °C to prevent non-specific binding of monoclonal antibody (mAb). For direct labeling, cells were incubated for 30 min at 4 °C in 2 % FBS containing PBS with the FITC- or PE-conjugated mAb (listed in Table 1), or with control irrelevant isotype-matched mAb. After washing, cells were resuspended in buffer, and analyzed with a FACScan (Becton Dickinson, Muntain View, CA). For CD83 (16) and CMRF-44 (17) labeling, cells were incubated with mAb HB15a or CMRF-44 for 30 min at 4 °C, washed twice, blocked with 0.5 % human immunoglobulin for 10 min and then incubated with goat FITC-labeled anti-mouse IgG2b or IgM. MAbs of the respective isotype, but with irrelevant specificity, were included as control. After final wash, cells were suspended in

buffer and analyzed with a FACScan. For all labelling experiments, analysis was performed on the FACScan using LYSIS II software (Becton Dickinson). For each sample, not less than 5,000 events were acquired.

#### *Flow cytometric measurement of endocytosis*

The endocytic activity of the cells was measured as described (18). Briefly, cells were incubated in FBSM containing 0.5 mg/mL FITC-Dextran (Sigma, St.Louis, MO) and 0.5 mg/mL lucifer yellow CH, potassium salt (LY) (Molecular probes, Leiden, The Netherlands) for 30 min at 37 °C. As a negative control, cells were incubated with FITC-Dextran or LY at 4 °C. The cells were washed 4 times with cold PBS containing 2 % FBS and 2 mM sodium aside, and analyzed on a FACScan using LYSIS II software (Becton Dickinson).

#### *Determination of the allostimulatory potential of DC rich cells*

DC generated by the culture in FBSM or SFM in the presence or absence of TNF- $\alpha$  were used as stimulators in an allogeneic mixed leukocyte reaction (MLR). The nonadherent cells obtained from normal CBMNC and PBMNC by depleting adherent cells after culture for 2 hours were used as responder. Irradiated (30 Gy) DC rich cells of graded numbers ( $10^3$ – $3 \times 10^4$ ) were added to a constant number of nonadherent cells ( $1 \times 10^5$ /well) in 96-well flat-bottom tissue culture plates containing RPMI 1640 medium containing 10 % FBS. After culture for 5 days, the cultured cells were pulsed with  $1 \mu$  Ci/well [methyl -  $^3$ H] thymidine (Amersham, Buckinghamshire, England) for 16 hours and T cell proliferation was measured as  $^3$ H-thymidine incorporation by using  $\gamma$ -scintillation

counter (Beckman, UK).

#### Statistical analysis

Student's t-test was used to compare CB-DC with PB-DC in percent positive cells and mean fluorescence intensity (MFI) of surface antigens. A two-way analysis of variance (ANOVA) was used to compare the antigen presentation between CB-DC and PB-DC, which were generated in either FBSM or SFM. The differences were considered as significant for  $P < 0.05$ .

## RESULTS

### *Morphological changes and growth characteristics during culture*

By the culture with GM-CSF and IL-4, most CB adherent cells developed into larger cells with widespread cytoplasmic projections and the cell nucleus became nonlobulated and round within 3 days. After culture for 7 days, the cells showed typical morphology of DC (Fig. 1). There was no difference in morphological characteristics between cultured cells in FBSM and SFM culture.

During culture, most cells cultured in either FBSM or SFM containing GM-CSF and IL-4 became apart from plastic dishes. Small cell aggregates consisting of dendritic like cells were observed after culture for 3 days. By addition of TNF- $\alpha$ , the cell aggregates enlarged in size (data not shown).

### *Phenotypes of cells cultured from CB adherent cells*

Analysis by the flow cytometry showed that the frequency of large cells (gated cells in Fig. 2A) was about 20 % of the total viable population of CB adherent cells by forward and

side scatter analysis by the present procedure for obtaining adherent cells. The 75–90 % of cells was CD14<sup>+</sup>, 4 %–11 % of cells was CD3<sup>+</sup> and 4 %–6 % was CD19<sup>+</sup> in large cell population. In contrasted with large cell population, the expression of CD14<sup>+</sup> cells was less than 5 % in small cell population (cells outside of gated area in Fig. 2A).

Compared with the starting cell population, cells which were cultured with GM-CSF and IL-4 for 3 days, showed a striking change in the forward and side scatter distribution. The cells in monocyte distribution (gated area in Fig. 2A) gradually increased their size and granularity (Fig. 2A–E). When analysis by FACScan demonstrated, on average, the large cells constituted about 30 % of the total cells at day 7 (Fig. 2E). Sequential analysis of cell surface phenotypes has been done in cells before and cultured for 3, 5 and 7 days. By culture with GM-CSF and IL-4, cord blood adherent cells formed aggregates, displayed dendritic morphology with cytoplasmic projections and became CD14<sup>-</sup> with increasing population of CD1a<sup>+</sup> cells. At early time of culture (day 3), the expression of CD14 was disappeared. The expression of CD83 of cultured cells remained to be low even on day 7 of culture (Fig. 3). In the presence of TNF- $\alpha$  (when added on day 5), the expression of CD80, CD86, HLA-DR and HLA-DQ of cultured cells was increased at day 7, compared with cells cultured without TNF- $\alpha$ . Especially, the expression of CD83 (specific mature DC marker) was up-regulated at day 7 of culture (Fig. 4). As shown in table 2, CD83 positive cells were  $39.32 \pm 5.12$  % or  $28.75 \pm 7.01$  % of total large cell population, in FBSM or SFM respectively, when cultured with GM-CSF, IL-4 and TNF- $\alpha$  for 7 days. When cultured in FBSM or SFM for 7 days, the yield of mature DC (CD83<sup>+</sup> cells) were  $4.9 \pm 1.1 \times 10^5$  or  $3.0 \pm 0.5 \times 10^5$  per  $1.2 \times 10^7$  CB-MNC plated initially.



### *Mix leukocyte Reaction (MLR) studies*

The response of CB nonadherent cells (data not shown) or PB nonadherent cells to allogeneic TNF- $\alpha$  treated CB adherent cells, which were generated in either FBSM or SFM condition, was significantly greater than that to fresh isolated allogeneic PBMNC or CBMNC at any stimulator: responder cell ratio. Moreover, CB-DC generated by culture in FBSM (data not shown) or SFM with TNF- $\alpha$  (added at day 5) for 7 days possessed enhanced capacity to stimulate an allogeneic MLR, compared with the cells cultured without TNF- $\alpha$  (Fig. 5). CB-DC cultured in SFM with TNF- $\alpha$  (added at day 5) for 7 days were demonstrated to have the equivalent activity of antigen presentation to CB-DC cultured in FBSM with TNF- $\alpha$  in allogeneic MLR (Fig. 5).

### *Comparative studies of phenotypes and functions in CB-DC and PB-DC*

Based on these results obtained above, we then compared CB-DC derived from CB adherent cells with PB-DC derive from PB adherent cells in surface phenotypes, phagocytic activity and antigen presenting activity in MLR assay for detecting the differences of the levels of DC function. CB-DC and PB-DC were investigated at day 7 of culture containing GM-CSF and IL-4 with or without TNF- $\alpha$ . As shown in Table 3, CD86 and HLA-DR were almost equally expressed on CB-DC and PB-DC, when cultured in FBSM or in SFM. But the expression of CD80 in CB-DC was significantly lower than that of PB-DC in both the frequency and intensity under FBS culture condition. Moreover, the expression of CD1a and CD83 in CB-DC were significantly lower than those in PB-DC in the culture

with FBS. Although there was no significant difference between CB-DC and PB-DC in the expression CD80, CD1a and CD83 when cultured in SFM, but CB-DC also showed a tendency of lower expression of these surface markers than PB-DC. However, the expression of CMRF-44 in CB-DC prepared from SFM was significantly lower than that expression in PB-DC cultured in the same condition. These findings suggested CB-DC, prepared in FBSM and SFM seemed to have less mature phenotypes, compared with PB-DC. The expression of surface phenotypes such as CD1a, CD80 and CD83 were greater in both CB- and PB-DC cultured in FBSM condition compared with DC cultured in SFM condition.

There are two distinct mechanisms for DC to capture antigens. The first is a high level of fluid phase uptake via macropinocytosis. The second mechanism of capture is mediated via mannose receptor (18). To determine whether CB-DC has phagocytic activity as well as PB-DC, we used two fluorescent molecules: LY, a nonspecific fluid phase marker, and FITC-dextran, which is mainly taken up via the mannose receptor. We have found that 60–95% or 40–95% of cells cultured from CB with GM-CSF and IL-4 for 7 days took up FITC-DX or LY, respectively. When cultured with GM-CSF and IL-4, 80–95% of total gated cells cultured from PB adherent cells took up both FITC-DX and LY. On the contrary, PB lymphocytes did not take up these two molecules, which demonstrated that FL-1 or FL-2 positivity of dendritic cells at 37 °C is not due to the attachment of these molecules to the surface of the cells but due to taking up of the molecules (Fig. 6).

The allogeneic T lymphocyte-stimulating capacity of CB-DC and PB-DC was evaluated comparatively. As illustrated in Fig. 7, both PB-DC and CB-DC induced a significant <sup>3</sup>H

thymidine uptake. In contrast, CB-MNC and PB-MNC showed much less stimulating activity in MLR on a per cell number basis, compared with PB-DC and CB-DC. No significant difference in the antigen presentation was found between PB-DC and CB-DC, which were generated in either FBSM or SFM condition.

## DISCUSSION

In this paper, we have shown CB monocytes can differentiate to CD83<sup>+</sup> mature DC in the presence of GM-CSF, IL-4 and TNF- $\alpha$ . This differentiation of CB monocytes to DC has been proved by continuous phenotype analysis with FACScan described in this paper. The disappearance of CD14 and the increase of the expression of CD80, HLA-DR and CD1a in cultured cells were also demonstrated in our study. TNF- $\alpha$  could induce immature DC to mature DC. When TNF- $\alpha$  was added to the culture supplemented with GM-CSF and IL-4, the expression of CD80, CD86, HLA-DR, HLA-DQ and CD1a in cultured cells were further up regulated as well as mature DC markers, such as CD83 and CMRF-44. Together with forward and side scatter analyses, these changes of surface phenotypes of cultured cells suggested that the whole population of CB monocytes gradually differentiated to mature DC. PB monocytes were demonstrated to differentiate to DC using the precise analysis of surface phenotypes of cultured cells by Woodhead et al (19). Our findings revealed that the process of CB monocyte differentiation to DC is similar to that of DC differentiation from PB monocytes.

Although methods for growing DC have usually included FBS in the culture medium, it is desirable to avoid FBS, because FBS has antigenicity (20), when cultured DC would be

applied to immunotherapy. SFM supplemented with GM-CSF, IL-4 and TNF- $\alpha$  was used as DC culture medium in the present study.  $3.0 \pm 0.5 \times 10^5$  CD83<sup>+</sup> DC per  $1.2 \times 10^7$  MNC were generated in culture of CB adherent cells for 7 days. The antigen presentation of CB-DC, which were prepared in FBSM and SFM, were tested in MLR, which demonstrated no significant difference. These results suggested that a substantial number of functional CB-DC could be obtained even by serum free culture condition.

The potency of DC as antigen-presenting cells (APC) is correlated with their constitutive expression of high levels of cell surface MHC class I and II antigens and costimulatory molecules such as CD80 (21) and CD86 (1). These molecules serve to initiate and stabilize DC interaction with T cell through the corresponding ligands in T cells. Prior results (22) have shown that DC isolated from CB expressed significantly lower levels of HLA-DR, compared with adult blood DC. In our study, CB-DC that were prepared by either FBSM or SFM has exhibited the almost equal frequency and intensity in the expression of HLA-DR and CD86 to PB-DC prepared by the same culture condition, but CB-DC showed lower expression of CD80, CD1a, CD83 and CMRF-44 than PB-DC. Although CD1a, CD83 and CMRF-44 are believed to be associated with antigen presentation of DC, the precise function is not fully understood. However, no significant difference could be observed between CB-DC and PB-DC in triggering allogeneic lymphocyte proliferation, despite reduced expression of CD80, CD1a, CD83 and CMRF-44 in CB-DC. These findings suggested that CD86 might compensate the costimulatory function of CD80 in CB-DC as reported by Lanier et al. (23) who have demonstrated that CD80 and CD86 provide similar costimulatory signals for T cell proliferation.

DC which were cultured from adherent cells with GM-CSF and IL-4 are thought to be immature DC (24). Immature DC have stronger ability for antigen uptake and processing than mature DC. We found that CB-DC generated from adherent cells in the presence of GM-CSF and IL-4, could efficiently capture both FITC-dextran and LY, and this activity of endocytosis by CB-DC was almost equal to that of PB-DC.

In conclusion, we have demonstrated that a substantial number of mature CB-DC can be generated from CB adherent cells in the presence of GM-CSF, IL-4 and TNF- $\alpha$ . Moreover, a large numbers of CB-DC have been generated from adherent cells even by serum free culture. Although the expression of CD80, CD1a, CD83 and CMRF-44 was lower in CB-DC than in PB-DC, CB-DC have similar capacity to stimulate the proliferation of allogeneic lymphocytes and have almost identical activity of endocytosis to take up FITC-dextran and LY, compared with PB-DC. These results indicated CB adherent cells were thought to be a source of functional DC for immunotherapy. Further studies need to be undergone for detecting the possibility of applying DC derived from CB monocytes for immunotherapy.

## REFERENCE

- 1). Steinman RM. (1991). The dendritic cell system and its role in immunogenicity. *Annu. Rev. Immunol.* 9:271-296.
- 2). Caux C, Liu YJ, Banchereau J. (1995). Recent advances in the study of dendritic cells and follicular dendritic cells. *Immunology Today* 16:2-4.
- 3). Hsu FJ, Benike C, Fagnoni F, Liles TM, Czerwinski D, Taidi B, Engleman EG, Levy R.

(1996). Vaccination of patients with B-cell lymphoma using autologous antigen-pulsed dendritic cells. *Nature Med.* 2:52-58.

4). Inaba K, Metlay JP, Crowley MT, Witmer-Pack M, Steinman RM. (1990). Dendritic cells as antigen presenting cells in vivo. *Int. Rev. Immunol.* 6:197-206.

5). Inaba K, Inaba M, Naito M, Steinman RM. (1993). Dendritic cell progenitors phagocytose particulates, including bacillus Calmette-Guerin organisms, and sensitize mice to mycobacterial antigens in vivo. *J. Exp. Med.* 178:479-488.

6). Caux C, Dezutter-Dambuyant C, Schmitt D, Banchereau J. (1992). GM-CSF and TNF-alpha cooperate in the generation of dendritic Langerhans cells. *Nature* 360:258-261.

7). Sallusto F, Lanzavecchia A. (1994). Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha. *J. Exp. Med.* 179:1109-1118.

8). Kiertcher SM, Roth MD. (1996). Human CD14+ leukocytes acquire the phenotype and function of antigen-presenting dendritic cells when cultured in GM-CSF and IL-4. *J. Leuk. Biol.* 59:208-218.

9). Zhou LJ, Tedder TF. (1996). CD14+ blood monocytes can differentiate into functionally mature CD83+ dendritic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 93:2588-2592.

10). Herbst B, Kohler G, Mackensen A, Veelken H, Mertelsmann R, Lindemann A. (1997). CD34+ peripheral blood progenitor cell and monocyte derived dendritic cells: a comparative analysis. *Br. J. Haematol.* 99:490-499.

11). Thurner B, Roder C, Dieckmann D, Heuer M, Kruse M, Glaser A, Keikavoussi P,

- Kampgen E, Bender A, Schuler G. (1999). Generation of large numbers of fully mature and stable dendritic cells from leukapheresis products for clinical application. *J. Immunol. Methods* 223:1-15.
- 12). Kawashima I, Tsai V, Southwood S, Takesako K, Sette A, Celis E. (1999). Identification of HLA-A3-restricted cytotoxic T lymphocyte epitopes from carcinoembryonic antigen and HER-2/neu by primary in vitro immunization with peptide-pulsed dendritic cells. *Cancer Res.* 59:431-435.
- 13). Nair SK, Boczkowski D, Morse M, Cumming RI, Lyerly HK, Gilboa E. (1998). Induction of primary carcinoembryonic antigen (CEA)-specific cytotoxic T lymphocytes in vitro using human dendritic cells transfected with RNA. *Nature Biotech.* 16:364-369.
- 14). Tjoa BA, Simmons SJ, Bowes VA, Ragde H, Rogers M, Elgamal A, Kenny GM, Cobb OE, Ireton RC, Troychak MJ, Salgaller ML, Boynton AL, Murphy GP. (1998). Evaluation of phase I/II clinical trials in prostate cancer with dendritic cells and PSMA peptides. *Prostate.* 36:39-44.
- 15). Caux C, Massacrier C, Vanbervliet B, Dubois B, Durand I, Cella M, Lanzavecchia A, Banchereau J. (1997). CD34<sup>+</sup> hematopoietic progenitors from human cord blood differentiate along two independent dendritic cell pathways in response to granulocyte-macrophage colony-stimulating factor plus tumor necrosis factor alpha: II. Functional analysis. *Blood* 90:1458-1470.
- 16). Zhou LJ, Tedder TF. (1995). Human blood dendritic cells selectively express CD83, a member of the immunoglobulin superfamily. *J. Immunol.* 154:3821-3835.
- 17). Fearnley DB, McLellan AD, Mannering SI, Hock BD, Hart DN. (1997). Isolation of

human blood dendritic cells using the CMRF-44 monoclonal antibody: implications for studies on antigen-presenting cell function and immunotherapy. *Blood* 89:3708-3716.

18). Sallusto F, Cella M, Danieli C, Lanzavecchia A. (1995). Dendritic cells use macropinocytosis and the mannose receptor to concentrate macromolecules in the major histocompatibility complex class II compartment: downregulation by cytokines and bacterial products. *J. Exp. Med.* 182:389-400.

19). Woodhead VE, Binks MH, Chain BM, Katz DR. (1998). From sentinel to messenger: an extended phenotypic analysis of the monocyte to dendritic cell transition. *Immunology* 94:552-559.

20). Porgador A, Gilboa E. (1995). Bone marrow-generated dendritic cells pulsed with a class I-restricted peptide are potent inducers of cytotoxic T lymphocytes. *J. Exp. Med.* 182:255-260.

21). Young JW, Koulova L, Soergel SA, Clark EA, Steinman RM, Dupont B. (1992). The B7/BB1 antigen provides one of several costimulatory signals for the activation of CD4+ T lymphocytes by human blood dendritic cells in vitro. *J. Clin. Invest.* 90:229-237.

22). Hunt DW, Huppertz HI, Jiang HJ, Petty RE. (1994). Studies of human cord blood dendritic cells: evidence for functional immaturity. *Blood* 84:4333-4343.

23). Lanier LL, O'Fallon S, Somoza C, Phillips JH, Linsley PS, Okumura K, Ito D, Azuma M. (1995). CD80 (B7) and CD86 (B70) provide similar costimulatory signals for T cell proliferation, cytokine production, and generation of CTL. *J. Immunol.* 154:97-105.

24). Romani N, Reider D, Heuer M, Ebner S, Kampgen E, Eibl B, Niederwieser D, Schuler G. (1996). Generation of mature dendritic cells from human blood. An improved method with special regard to



clinical applicability. *J. Immunol. Methods* 196:137-151.

## Figures and Tables

Fig. 1. DC generated from CB adherent cells by culture in FBSM containing GM-CSF and IL-4 for 7 days. DC like cells showing veils at their edges were observed.

Fig. 2. The transition process of CB adherent cells to CB-DC has been examined. The results are expressed as forward scatter versus side scatter dot-plots of adherent cells before culture (A) and cultured in FBSM supplemented with GM-CSF and IL-4 for 1 day (B), 3 days (C), 5 days (D) and for 7 days (E). The distribution of gated cells at each duration of culture demonstrated the shift of monocytes before culture to DC after culture for 3 days and thereafter. The results shown are from one experiment and are representative of five independent experiments.

Fig. 3. The changes of surface phenotypes in CB adherent cells cultured in FBSM supplemented with GM-CSF and IL-4. The expressions of CD1a, CD14, CD80, CD83, CD86, HLA-DR and HLA-DQ in cells before culture (day 0) and cultured for 3, 5 and 7 days were analysed using the FACScan. The large cells gated as in Fig. 2E were analysed for surface phenotypes in the present study. Open histograms: labeling with control irrelevant mAb; solid histograms: staining with FITC-or PE-labeled relevant mAb as indicated. The results shown are from one experiment and are representative of five independent experiments.

Fig. 4. The surface phenotype of CB adherent cells cultured in FBSM containing GM-CSF

and IL-4 with or without TNF- $\alpha$  (added at day 5) for 7 days. The large cells gated as in Fig. 2E were analysed. Open and solid histograms are defined as in Fig. 3. The results shown are from one experiment and are representative of five independent experiments.

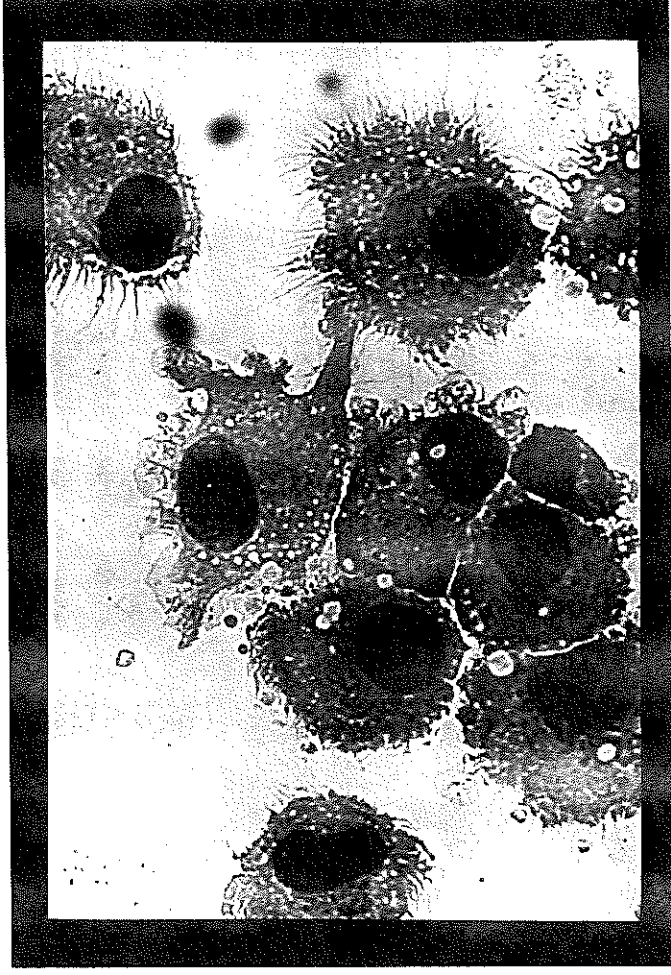
Fig. 5. The antigen presenting capacity of CB-DC cultured with or without TNF- $\alpha$  in FBSM or SFM. CB adherent cells were cultured for 7 days in SFM or FBSM in the presence of GM-CSF and IL-4 with or without TNF- $\alpha$  (see the Materials and Methods). DC obtained from these cultures were used to stimulate  $1 \times 10^5$  allogeneic PB nonadherent cells (see the Materials and Methods) and were compared with adult PBMNC. The results are shown as mean cpm of triplicate  $^3\text{H}$ -thymidine incorporation. Data are from one experiment representative of five independent experiments.

Fig. 6 Phagocytosis of FITC-dextran (A) and LY (B) by PB lymphocytes, CB-DC and PB-DC. Cells were incubated for 30 min at 4 °C or 37 °C with 0.5 mg/ml FITC-dextran or 0.5 mg/ml LY. Cells were washed 4 times with cold PBS and were then analyzed by FACScan, as described in the materials and methods. The x-axis is a logarithmic scale of fluorescence intensity and the y-axis represents cell counts. The figure depicts representative data from seven independent experiments.

Fig. 7. The antigen presenting capacity of TNF- $\alpha$  treated CB-DC, TNF- $\alpha$  treated PB-DC, PBMNC or CBMNC, which were tested in MLR.  $1 \times 10^5$  allogeneic CB or PB nonadherent cells were used as responder. DC prepared in FBSM (A) or SFM (B) were used as stimulators. The mitotic responses were measured by the uptake of

$^3\text{H}$ -thymidine on day 5 of culture. The results are representative for more than four independent experiments (the number of experiments is shown in the Figure) and are expressed as mean cpm  $\pm$  SEM of  $^3\text{H}$ -thymidine incorporation.

Figure 1.



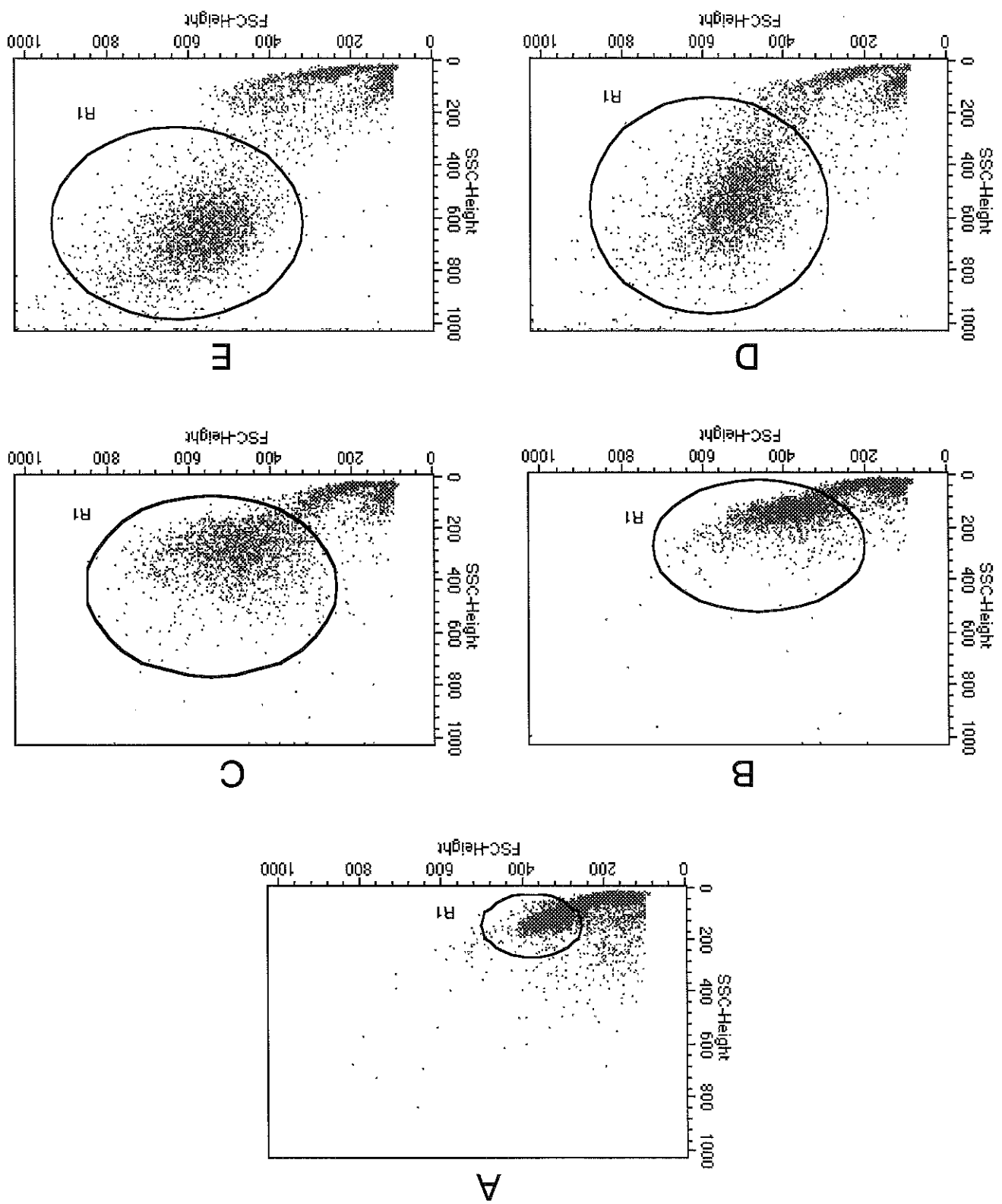


Figure 3

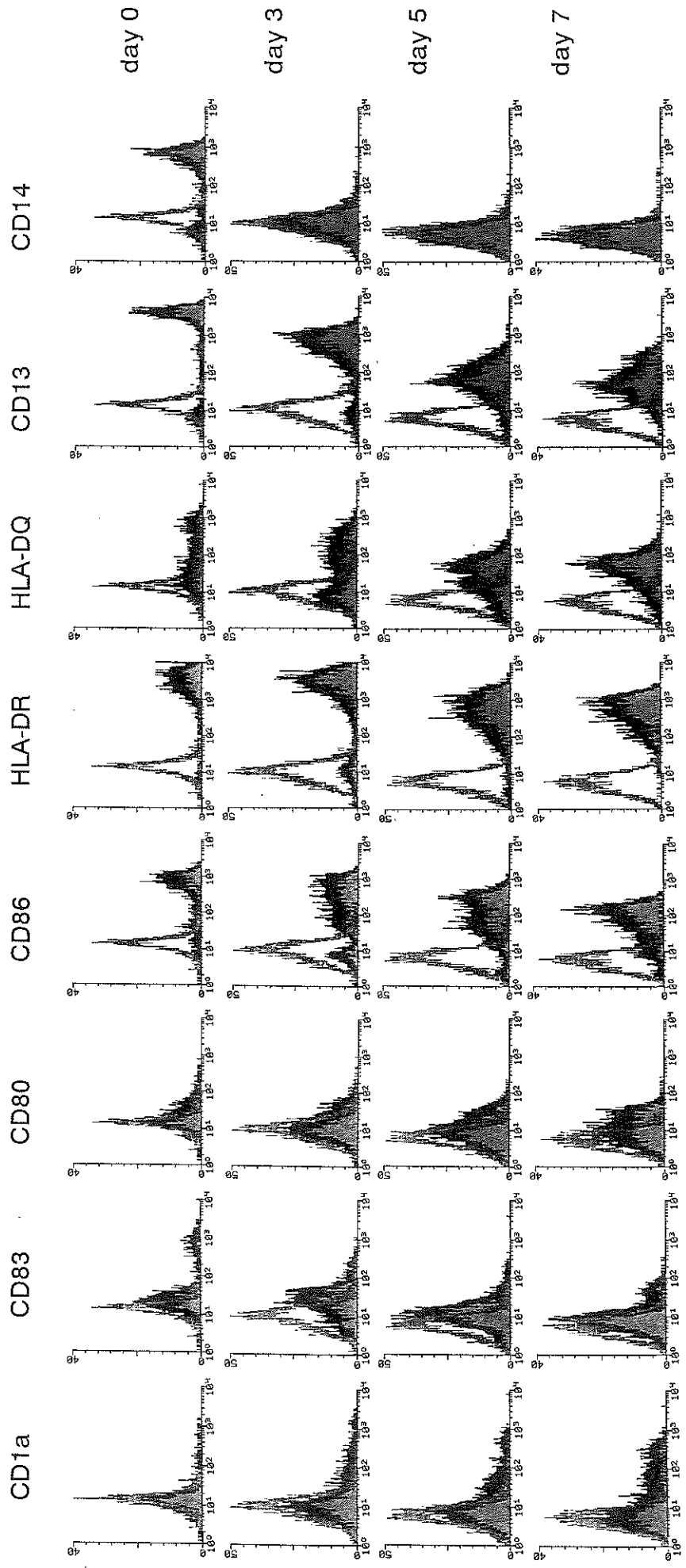


Figure 4

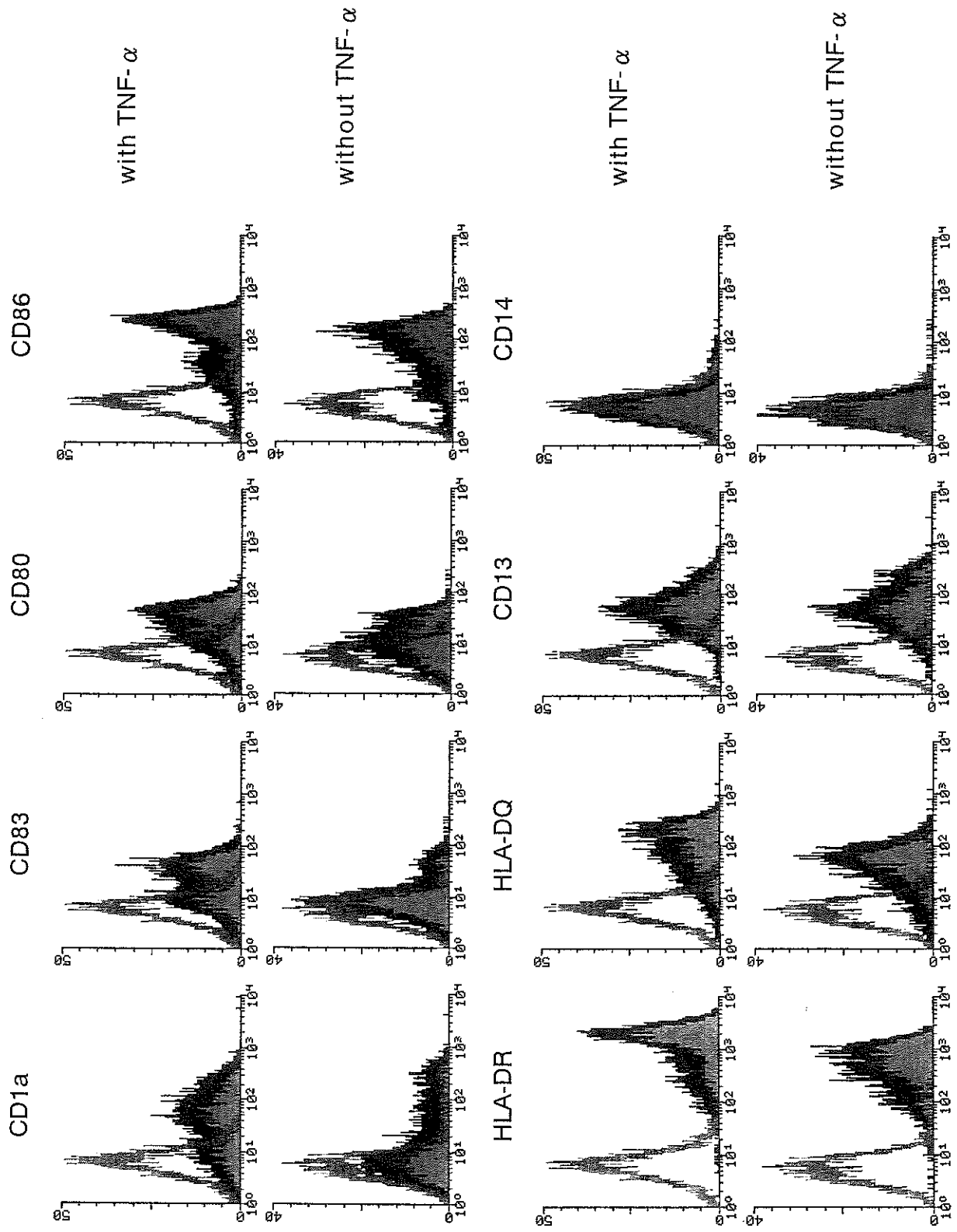


Figure 5

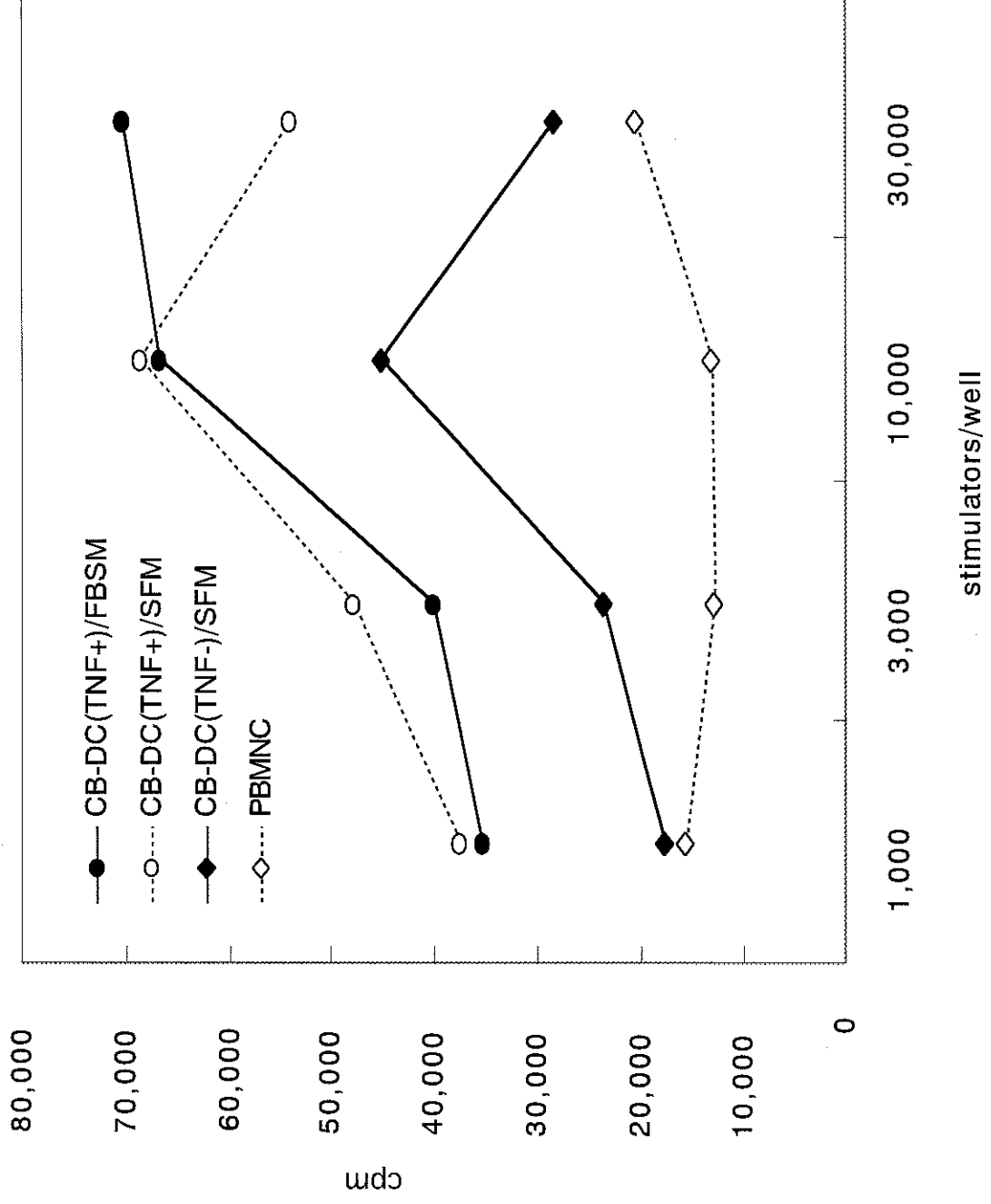




Figure 6.

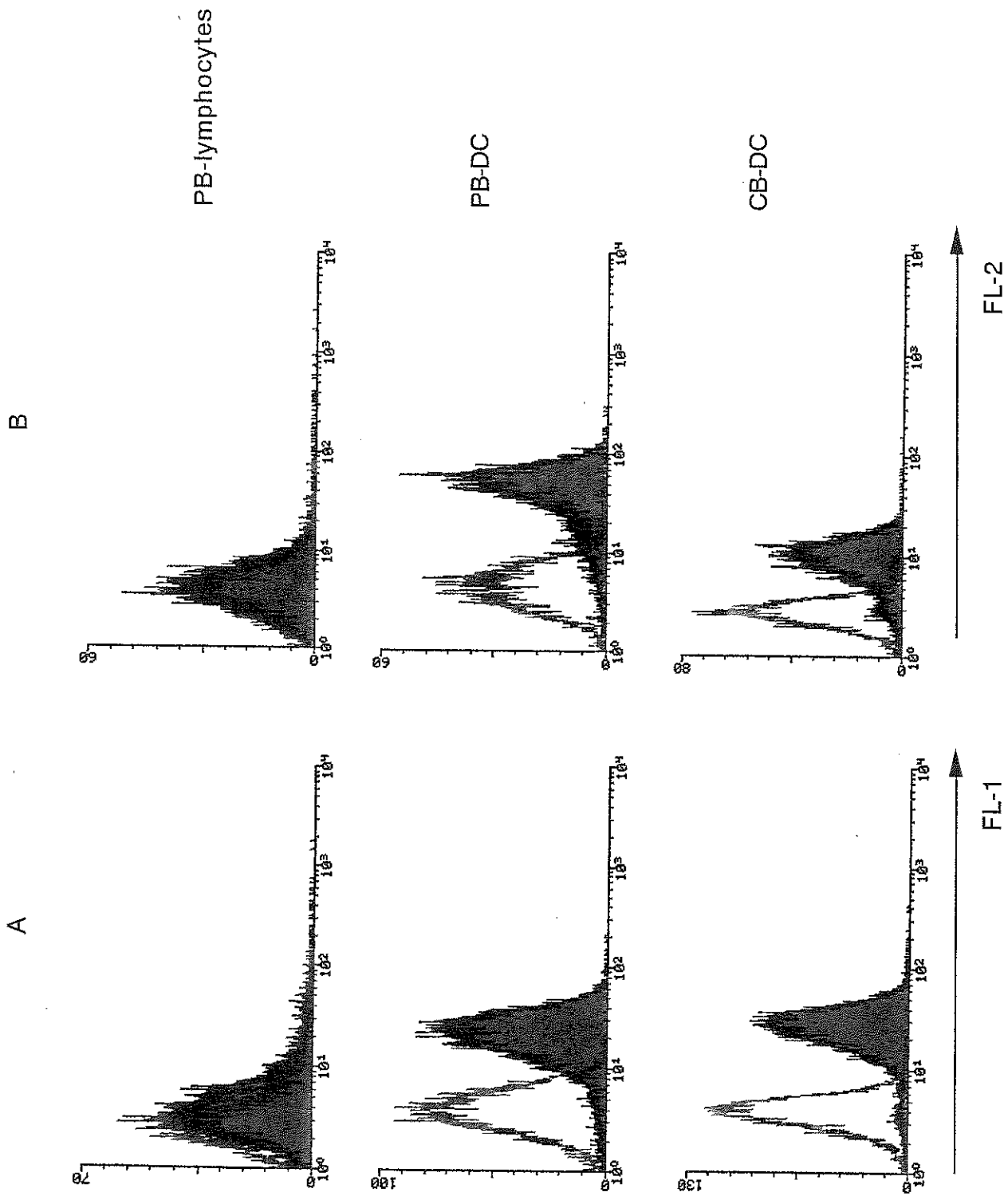


Figure 7.

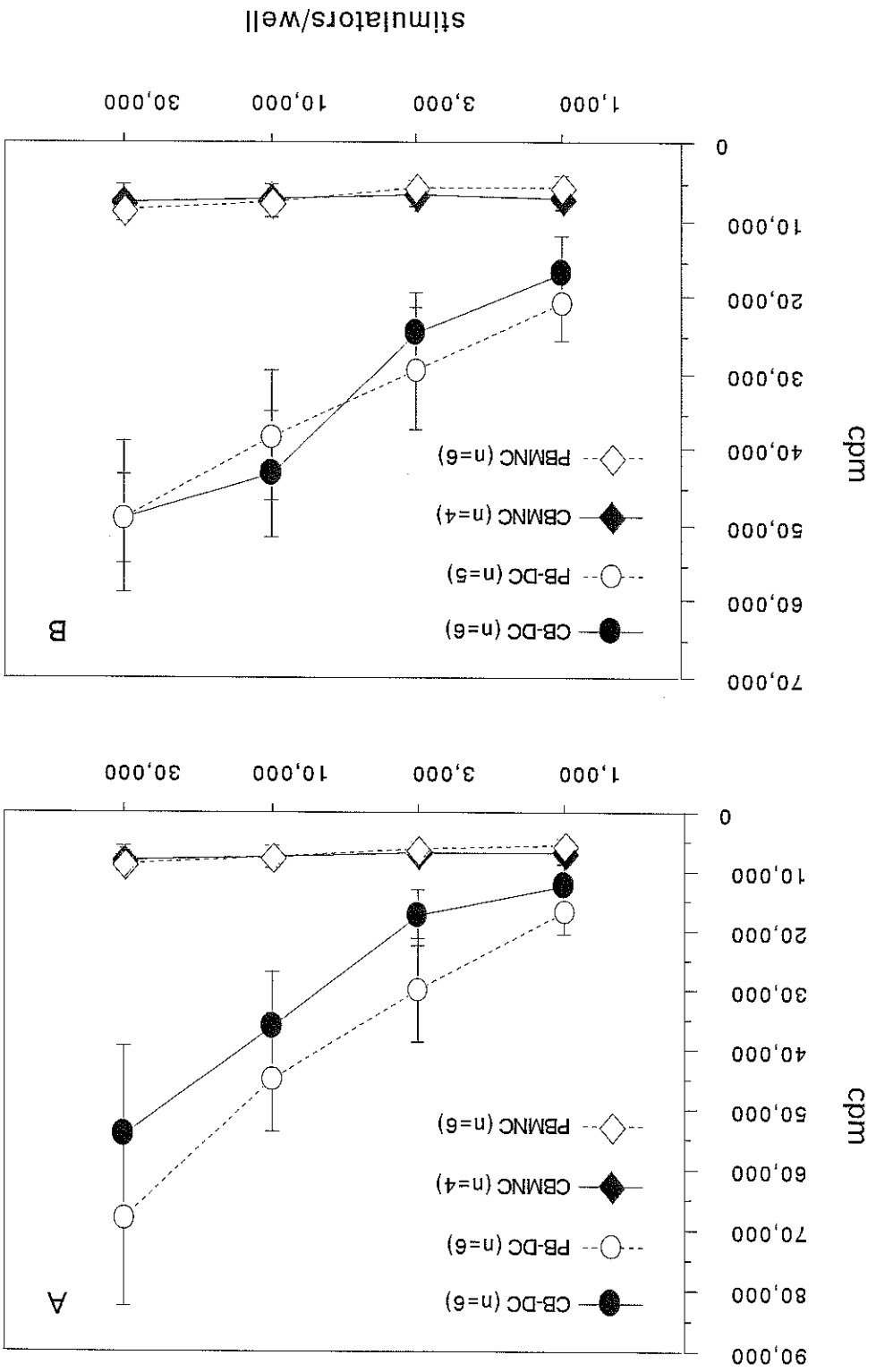


TABLE 1. MONOCLONAL ANTIBODIES USED IN THE PRESENT STUDY

Surface antigens	Monoclonal antibodies	Suppliers
Antigens for myeloid cells		
CD13	Leu-M7	Becton Dickinson
CD33	Leu-M9	Becton Dickinson
Antigens for monocytes cells		
CD14	Leu-M3	Becton Dickinson
dendritic cell marker		
CD1a	T6	Coulter
CD83	HB15A	Immunotech
CMRF-44	CMRF-44	Dr. Derek Hart (Christchurch, NZ)
Co-stimulatory molecules		
CD80	L307.4/MAB104	Becton Dickinson
CD86	IT2.2	PharMingen
MHC class II		
HLA-DR	HLA-DR	Becton Dickinson
HLA-DQ	Leu-10	Becton Dickinson
Antigens for T and B cells		
CD3	Leu-4	Becton Dickinson
CD19	Leu-12	Becton Dickinson
CD20	Leu-6	Becton Dickinson

TABLE 2. GENERATION OF CD83 POSITIVE CELLS IN THE CULTURE OF CORD BLOOD ADHERENT CELLS, WHICH WERE SEPARATED FROM  $12 \times 10^6$  MONONUCLEAR CELLS, USING SERUM FREE X VIVO-15 MEDIUM OR RPMI-1640 WITH 10% FBS CONTAINING GM-CSF, IL-4 AND TNF- $\alpha$  (ADDED AT DAY 5) FOR 7 DAYS

Exp. No.	Culture method	Total cell No. ( $\times 10^6$ )	% gated big cells <sup>a</sup>	% CD83 <sup>+</sup> cells	Total No. of CD83 <sup>+</sup> cells ( $\times 10^6$ )
1	10%FBS <sup>b</sup>	5.3	22.2	33	0.39
2	10%FBS	3	16.4	57	0.28
3	10%FBS	4.6	41.4	38	0.73
4	10%FBS	2.9	56.9	22.9	0.38
5	10%FBS	2.7	29.1	40	0.31
6	10%FBS	8.2	23.8	45	0.87
Mean $\pm$ SEM		4.45 $\pm$ 0.95	31.63 $\pm$ 6.70	39.32 $\pm$ 5.12	0.49 $\pm$ 0.11
7	X VIVO-15 <sup>c</sup>	5	36.2	18	0.33
8	X VIVO-15	2.5	25.7	33	0.21
9	X VIVO-15	4.1	22.4	44	0.4
10	X VIVO-15	3.4	38	20	0.25
Mean $\pm$ SEM		3.75 $\pm$ 0.61	30.6 $\pm$ 4.44	28.8 $\pm$ 7.01	0.30 $\pm$ 0.05

<sup>a</sup>%gated large cells, larged cells, which were gated in dot plot display figured for forward scatter and side scatter of FACS analysis and used for expression of monoclonal antibodies such as anti-CD83 Ab.

<sup>b</sup>X VIVO-15, serum free X VIVO-15 medium

<sup>c</sup>10 % FBS, RPMI-1640 with 10 % FBS

TABLE 3. COMPARISON OF PERCENT POSITIVE CELLS AND MFI OF EACH SURFACE ANTIGEN BETWEEN CB-DC AND PB-DC CULTURED IN FBSM OR SFM WITH GM-CSF, IL-4 AND TNF- $\alpha$  (ADDED AT DAY 5) FOR 7 DAYS<sup>a</sup>

Surface antigens	Culture method	% Positive cell (n <sup>b</sup> )		P	MFI (n)			P
		CB-DC <sup>c</sup>	PB-DC <sup>d</sup>		CB-DC	PB-DC	P	
CD1a	10 % FBS <sup>e</sup>	47.0 $\pm$ 7.6 (6)	87.5 $\pm$ 5.0 (6)	<0.005	92.2 $\pm$ 40.4 (6)	291.0 $\pm$ 54.8 (6)	<0.05	
CD80	10 % FBS <sup>f</sup>	46.8 $\pm$ 3.3 (4)	94.8 $\pm$ 1.7 (6)	<0.0001	41.5 $\pm$ 6.0 (4)	72.5 $\pm$ 9.2 (6)	<0.05	
CD83	10 % FBS	49.3 $\pm$ 5.2 (8)	79.5 $\pm$ 5.0 (8)	<0.001	60.0 $\pm$ 17.6 (8)	55.1 $\pm$ 7.3 (8)	NS	
CD86	10 % FBS	79.8 $\pm$ 11.7 (4)	88.0 $\pm$ 4.7 (4)	NS <sup>g</sup>	138.5 $\pm$ 15.9 (4)	129.8 $\pm$ 19.6 (4)	NS	
CMRF-44	10 % FBS	45.2 $\pm$ 10.3 (5)	73.3 $\pm$ 5.4 (4)	NS	41.4 $\pm$ 15.6 (5)	56.8 $\pm$ 10.5 (4)	NS	
HLA-DR	10 % FBS	95.8 $\pm$ 3.9 (4)	99.2 $\pm$ 0.5 (6)	NS	794.5 $\pm$ 242.6(4)	835.0 $\pm$ 172.5(6)	NS	
CD1a	XVIVO-15	17.2 $\pm$ 5.3 (5)	28.8 $\pm$ 8.4 (5)	NS	43.2 $\pm$ 15.6 (5)	43.8 $\pm$ 16.3 (5)	NS	
CD80	XVIVO-15	28.3 $\pm$ 18.1 (4)	34.0 $\pm$ 7.8 (4)	NS	30.8 $\pm$ 5.8 (4)	43.5 $\pm$ 12.9 (4)	NS	
CD83	XVIVO-15	22.8 $\pm$ 7.1 (4)	36.3 $\pm$ 11.4 (4)	NS	26.5 $\pm$ 11.6 (4)	61.0 $\pm$ 23.5 (4)	NS	
CD86	XVIVO-15	85.7 $\pm$ 6.3 (3)	67.0 $\pm$ 9.5 (3)	NS	88.0 $\pm$ 30.6 (3)	76.0 $\pm$ 28.5 (3)	NS	
CMRF-44	XVIVO-15	23.3 $\pm$ 7.5 (4)	77.7 $\pm$ 8.4 (3)	<0.005	31.8 $\pm$ 12.2 (4)	53.7 $\pm$ 11.2 (3)	NS	
HLA-DR	XVIVO-15	98.7 $\pm$ 0.3 (3)	99.0 $\pm$ 0.6 (3)	NS	482.3 $\pm$ 50.7 (3)	418.0 $\pm$ 97.8 (3)	NS	

<sup>a</sup>All values are given as the mean  $\pm$  SEM.

<sup>b</sup>n, number of experiments

<sup>c</sup>CB-DC, dendritic cells derived from cord blood adherent cells

<sup>d</sup>PB-DC, dendritic cells derived from peripheral blood adherent cells

<sup>e</sup>10 % FBS, RPMI-1640 with 10 % FBS

<sup>f</sup>X VIVO-15, serum free X VIVO-15 medium

<sup>g</sup>NS, no significant difference

日本財団補助金による  
1999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－

平成12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 佟杰  
研究機関 愛知医科大学第1病理学講座 研究指導者 伊藤元 職名 教授  
所在地 〒480-1195愛知郡長久手町大字岩作字雁又21 電話 0561623311 内線 2306  
研究テーマ TUNEL染色陽性を示すラット急性虚血心筋細胞の細胞膜透過性について  
－ TUNEL染色法とLanthanumイオンを用いた研究 －

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)

(2) 学会誌等に発表した論文 有 ・ 無 (雑誌名・論文名)

Basic and Applied Myology. 9(1):29-34,1999 (Italy)

Rat Cardiomyocytes with TUNEL-Positive Nuclei Induced by Permanent Ischemia Show Increased Plasma-Membrane Permeability Monitored by a Combined Use of TUNEL Method and Lanthanum Ions

### 3. 今後の研究計画


ラット急性虚血心筋細胞の細胞死のメカニズム(apoptosis関連蛋白の調節)について

- ①ラット左冠状動脈の前下行枝を結紮し、2h, 4h, 6h, 8h, 12h, 1day後に心臓を摘出し、虚血巣を二分割し、ホルマリン固定と4%PFA固定(凍結切片用とEpon包埋・LR white包埋用)をする。
- ②パラフィン切片のHE染色とTUNEL染色。
- ③通常電顕でのミトコンドリアの形態学観察。
- ④凍結切片のcytochrome c, caspase 3, caspase 9, bcl-2, bax等apoptosis関連蛋白の免疫組織化学染色。
- ⑤金コロ免疫染色法にてcytochrome c, caspase 3, caspase 9の細胞内分布を透過型電子顕微鏡下で観察する。

### 4. 研究指導者の意見

心筋が虚血に陥ると細胞が死ぬ。その際アポトーシスと壊死の両方の機序が働くが、アポトーシスが先行し、壊死に移行するのか、それとも、両者が別々の細胞で独立して発症し、細胞が死滅するのか、はっきりしていなかった。今回の Dr. Tong, Jie (佟杰) の研究により、虚血早期の心筋ではアポトーシス(DNA断片化)と壊死(細胞膜透過性亢進)の機序が同一細胞でほぼ同時に進行していることがはっきりした。この研究遂行に当たり、DNA断片化(アポトーシスの指標)細胞の細胞膜透過性亢進(壊死の指標)を証明する為の方法が独創的、特異的である。即ち、虚血心筋をLaを含む固定液で処理し、凍結切片を作成し、TUNEL染色によりDNA断片化細胞を確認し、更に電顕用に再固定、樹脂包埋、薄切、電顕観察し、Laの透過性を検索し、始めて納得のいく結果が得られた。これは彼女の優れた能力によるもので、今まではっきりしなかった虚血初期の心筋細胞の病態をあきらかにすることができた。彼女の研究者としての能力を高く評価したい。

研究指導者氏名

伊藤元 

### 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。

# TUNEL 染色陽性を示すラット急性虚血心筋細胞の細胞膜透過性について

## - TUNEL 染色法と Lanthanum イオンを用いた研究 -

佟 杰

中日友好医院・住院医师

伊藤元・愛知医科大学第1病理・教授

### [要旨]

虚血による心筋細胞死にはアポトーシスとネクローシスという二つの機序が存在する。DNA 断片化した急性虚血早期心筋細胞の細胞膜透過性が亢進しているか否かをはっきりさせる目的で本研究を行った。ラット左冠状動脈前下行枝を結紮し、心筋梗塞モデルを作製した。アポトーシスの検索には TUNEL 染色を、ネクローシスの検索には lanthanum イオン (La) に対して細胞膜透過性亢進を電子顕微鏡下で観察し判定基準に用いた。更に同一細胞での DNA 断片化と細胞膜透過性亢進を電子顕微鏡下で観察した。

虚血 30 分後で、既に、26.7%の心筋細胞に、細胞膜透過性亢進が認められた。更に、虚血開始 2 時間後から DNA 断片化 (TUNEL 陽性) と La に対する細胞膜透過性亢進が同一細胞で同時に出現する事が確認された。結論としては急性虚血による心筋細胞死の機序にはアポトーシスとネクローシスが同時に関与している。

KEY WORDS: Rat Myocardial Ischemia, TUNEL Method, Apoptosis, DNA Fragmentation, Lanthanum Ions.

### [緒言・目的]

細胞死の機序にはアポトーシスとネクローシスの二通りがある。ネクローシスでは細胞全体もミトコンドリアも徐々に膨化し、細胞質の変化が先行する。最終的に細胞膜が破壊し、いわゆる細胞融解を起こす。これに対しアポトーシスでは、変化はまず核で始まり、核膜へのクロマチン凝集、核断片化が起き、細胞も核もまず縮小する。最終的にアポトーシス小体を形成し、マクロファージなどに貪食される。

虚血に陥った心筋が死に至る過程で、アポトーシスとネクローシスの機序がそれぞれ関与している事を示唆する所見が報告されるようになってきた。最近 Kajstura 等は、ラット心筋虚血実験において、虚血初期、即ち、虚血開始から 6 時間後までは虚血病巣形成にアポトーシスが主役を演じ、その後はネクローシスが主役になると報告し、アポトーシスがネクローシスに先行すると述べている。彼らの研究では、TUNEL 染色をアポトーシスの指標に使い、抗ミオシンモノクローナル抗体 (以下 Ammab と略す) が、心筋細胞内に取り込まれること (膜破壊) をネクローシスの判定基準にしている。しかし、Ammab は分子量が大きく、膜の透過性亢進の指標には不相当だと思われる。一方、Koba 等は最近、Ammab よりはるかに分子量の小さい Lanthanum ( $\text{La}(\text{NO}_3)_3$ ) (直径 40Å、以下 La と略す) を細胞膜透過性亢進の指標に使い、虚血心筋細胞について研究し、虚血開始 0.5 時間後において、既に、その 19%の心筋細胞に、La の取り込みが見られる事を報告している。

私どもは、ラット心筋梗塞モデルを用い、虚血早期 (虚血開始 6 時間後まで) の虚血巣の心筋



細胞について、アポトーシスと細胞膜透過性の亢進（ネクローシス）が、同一の細胞で起き、アポトーシスが先行し、ネクローシスに移行するか、或いは、両者が別々の細胞で別々に進行するかをはっきりさせる目的で本研究を行った。アポトーシスの検索には、TUNEL 染色を、ネクローシスの検索には、La に対する細胞膜透過性亢進を電子顕微鏡下で観察し判定基準に用いた。

### [材料及び方法]

心筋梗塞ラットの作成：Wistar 系ラット（6 週齢、雄）を用い、ネンブタール麻酔下、気管内挿管下にて第 3 肋間開胸後、冠状動脈前下行枝を結紮し、0.5, 1, 2, 3, 4, 6 時間後に 3 匹ずつ屠殺。心虚血部位を切り出し、以下の処置を施し、検索した。対照群には、開胸術のみ施したラットを用いた。

1) 虚血部位の組織片の一部を 20%緩衝ホルマリンで固定、パラフィン連続切片を作成し、H-E 染色による一般的病理組織検索、TUNEL 染色による DNA 断片化細胞の有無を検索した。また光顕下 10 倍で梗塞巣の写真を撮って、200-300 個の細胞を数え、経時的に TUNEL 染色陽性細胞を定量化した。

2) 残りの一部を電顕観察用に、小ブロックに細切し、1.3% La を含む 2.6%グルタルアルデヒド固定液にて 2 時間固定し、La を含む洗浄液で洗った後、四酸化オスミウム ( $O_5O_4$ ) で再固定、型通り樹脂包埋し超薄切片を作成した。電子染色を施した後、透過型電顕にて、各グループ 150 個ずつ La 陽性細胞検索し、陽性率を経時的に算出した。

3) 上記 2) の過程で、 $O_5O_4$  で再固定する前に一部の細切ブロックから、 $8\mu m$  の厚さの凍結切片を作成し、TUNEL 染色を施し、光顕上で、TUNEL 陽性細胞を確認した後、そのままの状態、即ち、スライドガラスに貼り付けたままの状態、 $O_5O_4$  で再固定し、樹脂包埋 (pre-embedding 法) 後、超薄切片を作成し、透過型電顕にて観察した。電顕上で TUNEL 陽性核を持つ心筋細胞を確認し、その細胞の細胞質に La が取り込まれているか否かを観察した。また、TUNEL 陰性細胞についても、La の細胞内取り込みを検索した。

### [結果]

#### 虚血巣の TUNEL 染色陽性出現率

虚血開始 30 分—4 時間後の虚血巣では H&E 染色上組織学的変化は乏しいが、TUNEL 染色では虚血開始後 2 時間目から心内膜下に陽性細胞が認められ、虚血巣の TUNEL 陽性率は  $17.9\% \pm 1.9$  である。3、4 時間と時間の経過とともに陽性率が増加し、6 時間後では  $54.9\% \pm 2.0$  となった。

#### 通常電顕による La 陽性細胞発現率

虚血開始 30 分後で既に、26.7%の心筋細胞が La を細胞質内に、限局性（特にミトコンドリアの外膜）に、取り込んでいた。3 時間後ではおよそ 81.5%の心筋細胞に、4、6 時間後では 90%以上の細胞内に La が沈着していた。一方対照群では、La は心筋細胞外にのみ認められ細胞内には認められなかった。

#### TUNEL 陽性細胞の La 透過性について

La 処理と TUNEL 染色の二重処理を施した虚血巣心筋細胞を検索した結果、虚血 2 時間後の群では、TUNEL 陽性細胞 10 個のうち 7 個が La 陽性、3 個が La 陰性であった。3 時間後の群では、TUNEL 陽性細胞 13 個のうち 10 個が La 陽性、3 個が La 陰性であった。また、TUNEL 陰性のうち、La 陽

性及び La 陰性細胞がそれぞれ少数ながら認められた。4-6 時間後の群では TUNEL 陽性細胞、陰性細胞いずれにおいても、殆どの細胞に La が細胞内に沈着していた。一方対照群では、細胞内の La 沈着は認められなかった。

以上の結果をまとめますと：

- ① 虚血後 30 分で細胞膜透過性亢進が認められました。
- ② 2 時間後に DNA 断片化が検出され、DNA 断片化と細胞膜透過性亢進が同時に起きている細胞が存在しました。DNA 断片化のみ、または細胞膜透過性亢進のみが認められる細胞も少数ではあるが存在していました。
- ③ 4 時間後以降、TUNEL 陰性、陽性を問わず、殆どの細胞内に La が認められました。

#### [ 考察 ]

本研究では、虚血 30 分後で、既に 26.7%の心筋細胞に、細胞膜透過性亢進が認められた。更に、虚血 2 時間後から DNA 断片化と La に対する細胞膜透過性亢進が同一細胞で、同時に出現する事が確認された。これら TUNEL 陽性で同時に La 陽性を示す細胞は、Wyllie 等の言う典型的なアポトーシス細胞ではないことがはっきりした。しかし、これらの細胞群が虚血心筋の主要な細胞群である事もはっきりした。La 陰性で、TUNEL 陽性細胞が少数存在する。これらの細胞は典型的な意味でのアポトーシスに陥る細胞かもしれない。しかし、La 陰性であることを電顕下で確定することは困難で、これらの点については今後の研究に待つ必要がある。虚血心筋では、La 陽性細胞の一部に、TUNEL 陰性の細胞が存在する。これらの細胞はいわゆる壊死細胞である可能性が高い。本研究の結果から判断すれば、Kajstura 等の報告は、見かけ上アポトーシスがネクローシスに先行するという事を述べているのに過ぎないと言える。急性虚血による心筋細胞死の機序にはアポトーシスとネクローシスが同時に関与している。

#### [ References ]

- (1) Darzynkiewicz Z, Bruno S, Del Bino G, Gorczyca W, Hotz MA, Lassota P and Traganos F: Features of apoptotic cells measured by flow cytometry Cytometry 1992;13: 795-808
- (2) Gavrieli Y, Sherman Y and Ben-Sasson SA: Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. J Cell Biol 1992; 119:493-501.
- (3) Gottlieb RA, Burieson KO, Kloner RA, Babior BM, Engier RL: Reperfusion injury induces apoptosis in rabbit cardiomyocytes. J Clin Invest 1994; 94: 1621-1628.
- (4) Hoffstein S, Gennaro DE, Fox AC, Hirsch J, Streuli F, Weissmann G: Colloidal lanthanum as a marker for impaired plasma membrane permeability in ischemic dog myocardium. Am J Pathol 1975; 79: 207-219.
- (5) Itoh G, Tamura J, Suzuki M, Suzuki Y, Ikeda H, Koike M, Ito K: DNA fragmentation of human infarcted myocardial cells demonstrated by nick end labeling method and DNA agarose gel electrophoresis. Am J Pathol 1995; 146: 1325-1331.
- (6) Kajstura J, Cheng W, Reiss K, Clark WA, Sonnenblick EH, Krajewski S,

- Reed JC, Olivetti G, Anversa P: Apoptotic and necrotic myocyte cell deaths are independent, contributing variables of infarct size in rats. *Lab Invest.* 1995; 74: 86-107.
- (7) Kajstura J, Mansukhani M, Cheng W, Reiss K, Krajewski S, Reed JC, Quaini F, Sonnenblick EH, Anversa P: Programmed cell death and the expression of the protooncogene Bcl-2 in myocyte during postnatal maturation of the heart. *Exp Cell Res* 1995; 219: 110-121.
- (8) Kajstura J, Liu Y, Baldini A, Li B, Olivetti G, Leri A and Anversa P: Coronary artery constriction in rats: necrotic and apoptotic myocyte death. *Am J Cardiol* 1998;82:30k-41k.
- (9) Kerr JFR, Wyllie AH and Currie AR: Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 1972; 26:239-257.
- (10) Koba S, Konno S, Suzuki H and Katagiri T: Distribution of sarcolemmal integrity during ischemia and reperfusion of canine hearts as monitored by use of lanthanum ions and a specific probe. *Basic Res Cardiol* 1995; 90:203-210.
- (11) Schmiedl A, Bach F, Fehrenbach H, Schnabel Ph.A and Richter J: Cellular distribution patterns of lanthanum and morphology of rat hearts exposed to different degrees of ischemic stress. *Anat Rec* 1995; 243:496-508.
- (12) Selye H, Bajusz E, Grasso S and Mendel P: Simple techniques for the surgical occlusion of coronary vessels in the rat. *Angiology* 1960; 11:398-407. (13) Tamura J: DNA fragmentation of rat infarcted myocardial cells demonstrated by TUNEL method and DNA agarose gel electrophoresis. *J Aichi Med Univ Assoc* 1996; 24: 493-502.
- (14) Tanaka M, Ito H, Adachi S, Akimoto H, Nishikawa T, Marumo P, Hiroe M: Hypoxia induces apoptosis with enhanced expression of Fas antigen messenger RNA in cultured neonatal rat cardiomyocytes. *Circ Res* 1994; 75: 426-433.
- (15) Wyllie AH, Kerr JPR, Currie AR: Cell death: the significance of apoptosis. *Int Rev Cytol* 1980; 68: 251-306.
- (16) Wyllie AH, Morris RG, Smith AL and Dunlop D: Chromatin cleavage in apoptosis: association with condensed chromatin morphology and dependence on macromolecular synthesis. *J Pathol* 1984; 142:67-77.

## Rat Cardiomyocytes with TUNEL-Positive Nuclei Induced by Permanent Ischemia Show Increased Plasma-Membrane Permeability Monitored by a Combined Use of TUNEL Method and Lanthanum Ions

Jie Tong, Hiroshi Ikeda and Gen Itoh

---

*First Department of Pathology, Aichi Medical University*

### Abstracts

The aim of this study was to clarify whether myocardial cells with DNA fragmentation induced by ischemia show increased plasma-membrane permeability (PMP), focusing on the early lesions of acute myocardial ischemia (AMI). Rat AMI was induced by a permanent occlusion of the left coronary artery. The TUNEL method was used for the demonstration of DNA fragmentation, and lanthanum ions (La) were employed for the increased PMP of cardiomyocytes. The increased PMP of cardiomyocytes having TUNEL-positive nuclei was determined by a combined use of the TUNEL method in frozen sections and electron microscopic identification of intracellular depositions of La.

Seven of 10 cardiomyocytes having TUNEL-positive nuclei revealed the deposition of La 2 hours after ischemia, and 10 of 13 showed La deposition 3 hours after ischemia. Almost all cardiomyocytes labeled with TUNEL stain showed intracellular deposition of La 4 and 6 hours after ischemia, respectively.

The evidence obtained from this experiment demonstrates that almost all cardiomyocytes labeled with TUNEL stain simultaneously show an increase of PMP in the AMI foci. In conclusion, the mechanism of myocardial cell death caused by permanent ischemia is due to a mixed form of apoptosis and necrosis.

**Key words:** rat myocardial ischemia, TUNEL method, apoptosis, DNA fragmentation, lanthanum ions.

*Basic Appl. Myol. 9 (1): 29-34, 1999*

Apoptosis has been reported to occur after ischemia in cultured neonatal rat cardiomyocytes [14] and after ischemia/reperfusion in rabbit acute myocardial infarction, but never after ischemic injury alone [3]. However, we have reported that the nuclei of human infarcted myocardial cells with the morphological features of necrosis showed DNA fragmentation [5], and also that permanent ligation of the left coronary artery without reperfusion produced DNA fragmentation of rat myocardial cells at the ischemic foci [13]. Kajstura et al. [6] have reported that, in rat acute myocardial infarction, programmed cell death (apoptotic cell death) was the major independent form of cardiomyocyte cell death up to 4.5 - 6 hours after ischemia, and that necrotic cardiomyocyte cell death followed apoptosis. They also demonstrated recently [8] that coronary artery narrowing caused both necrotic and apoptotic cardiomyocyte cell death and that cardiomyocyte necrosis markedly exceeded apoptosis. In

their experiment, as a tracer of the ruptured myocardial cell-membrane they used monoclonal anti-myosin antibody, which was relatively large in molecular size, and they reported that cardiomyocytes showing both DNA strand breaks (apoptosis) and myosin labeling (necrosis) were a prominent aspect of myocardial damage only 6 hours after ischemia [6].

With regard to the PMP of myocardial cells injured by ischemia, a few studies have reported using lanthanum ions (La (NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub>) (La) as a tracer of PMP [4, 11], since they had smaller molecules and have been successfully used as a tracer for the detection of increased permeability of the plasma membrane of cardiomyocytes [4, 11, 10]. Koba et al. [10] have reported that, when using La, increased PMP of myocardial cells occurred at the ischemic foci in the very early stage of ischemia. They detected increased PMP in 19%, and 30% of myocardial cells at 30 min, and at 1 hour after ischemia, respectively. Though Kajstura et al. [6] have

## Increased PMP of apoptotic cardiomyocytes in ischemia

detected cardiomyocytes showing both DNA strand breaks (apoptosis) and myosin labeling (necrosis), the tracer of necrosis they used was a monoclonal anti-myosin antibody which, as they pointed out, had a large molecular size, which was a limitation of the method. In this study, therefore, by using La as a tracer of PMP (necrosis) and the TUNEL method to monitor DNA strand breaks (apoptosis), we determined whether the PMP of rat myocardial cells at the ischemic foci is increased, focusing on the early stage of acute myocardial damage from 30 minutes to 6 hours after the induction of ischemia. We also tried to determine whether the membrane permeability of myocardial cells with DNA strand breaks (TUNEL-positive nuclei) increases by a combination of the TUNEL method and an electron microscopic identification of intracellular depositions of La.

### Materials and Methods

#### *Animals*

Animals were cared for and maintained in accordance with the guidelines of the National Institute of Health (Bethesda Md. USA).

Male rats (Wistar strain, 6-weeks-old) purchased from Japan SLC, Inc. (Shizuoka, Japan) were used.

#### *Experimental protocol*

Acute myocardial infarction (AMI) was induced by the method described previously [13, 12]. In brief, after being anesthetized with an intraabdominal injection of sodium pentobarbital (35 mg/kg), male rats (120-130 g) were fitted with an endotracheal tube and placed on controlled respiration with positive pressure on inspiration. The chest was then opened through the third intercostal space. The heart was exteriorized quickly, and a 5-0 nylon ligature was placed under the visualized proximal segment of the left coronary artery (LCA). The ligature was then permanently ligated. Rats were then placed on controlled respiration until constant spontaneous respiration resumed. Those subjected to the same procedure but without coronary artery ligation were used as control animals.

#### *Myocardial tissue preparation*

Under ether anesthesia, each group of 3 rats was exsanguinated, and the hearts were removed at intervals of 30 minutes, 1, 2, 3, 4 and 6 hours after ischemia. After the hearts were sliced horizontally, the ischemic portion was selected and cut into two slices, one of which was fixed with 10% neutral buffered formalin at room temperature (RM) for 24 hours, dehydrated in graded alcohol, cleared in xylene, and embedded in paraffin.

#### *Identification of increased permeability of myocardial cell-membrane*

The second slice was cut into small pieces for electron microscopic examination. After being fixed with 4% glutaraldehyde in 0.1 M cacodylate buffered solution containing 1.3% La (NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub>(La) [4], pH 7.4, for 2 hours, small pieces of the specimens were washed thoroughly with 0.1 M cacodylate buffered solution containing 1.3% La. After the pieces thus treated were postfixed for 2 hours with 1% osmium tetroxide in 0.1 M cacodylate buffered solution without added La, they were rinsed in PBS, dehydrated in alcohol, embedded in Epon 812, cut into ultrathin sections, and examined electron microscopically. The frozen sections (8 μm thick) of the remaining small pieces were stained with TUNEL method. The frozen sections stained with TUNEL were embedded in Epon 812 on the slide glasses for electron microscopic identification of La.

#### *TUNEL method*

DNA nick end labeling was performed to demonstrate DNA fragmentation. The staining method originally reported by Gavrieli et al. [2] was applied. In brief, after being deparaffinized and washed in double distilled water (DDW), the sections were incubated with 20 μm/ml proteinase K (PK) for 15 min at room temperature (RT), and then washed four times in DDW for 2 min. After the endogenous peroxidase was inactivated by covering sections with 2% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for 5 min at RT, the sections were rinsed in DDW, and immersed in TDT buffer (30 mM Tris-HCl buffer, pH 7.2, 140 mM sodium cacodylate, 1 mM cobalt chloride). TdT (0.3 e.u./ml) and biotinylated dUTP in TDT buffer were added to cover the sections, which were then incubated in a humid atmosphere at 37°C for 60 min. The reaction was terminated by transferring the slides to TB buffer (300 mM sodium chloride, 30 mM sodium citrate) for 15 min at RT. The sections were rinsed in DDW, covered with a 2% aqueous solution of BSA for 10 min at RT, rinsed again in DDW, and immersed in PBS for 5 min. Sections were then covered with streptavidin peroxidase, incubated for 10 min at 37°C, washed in DDW, immersed for 5 min in PBS, and stained with DAB (3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride) for about 30 min at RT.

#### *Quantitative analysis of TUNEL-positive cells and La-deposited cells*

In brief, TUNEL-positive cells in three fields of infarcted areas were calculated in three experimental rats. The percentages of TUNEL-positive nuclei among the total number of nuclei at the ischemic foci were calculated at 0.5, 2, 3, 4 and 6 hours after the initiation of ischemia. At least 150 of both La-deposited and non-deposited cells were also counted under the electron microscope in each group. The percentage of La-deposited cells among total cells at the ischemic foci were also

## Increased PMP of apoptotic cardiomyocytes in ischemia

calculated at 0.5, 2, 3, 4, and 6 hours after the induction of ischemia. Paired *t* tests were performed to detect significant differences.

### *Combination of TUNEL method and electron microscopic identification of intracellular deposition of La*

In order to clarify whether or not the permeability of the plasma membrane of myocardial cells with TUNEL-positive nuclei increases, a combination study using the TUNEL method and electron microscopic identification of intra-myocardial cell depositions of La was done. In brief, small pieces of cardiac tissue fixed with 4% glutaraldehyde in 0.1 M cacodylate buffered solution containing 1.3% La, pH 7.4, for 2 hours were cut into 8 micron-thick frozen sections and stained with the TUNEL method. After the TUNEL-positive cells was identified on frozen sections with a light microscope (Fig. 1), the frozen sections on slide glasses were then postfixed with 1% osmium tetroxide in 0.1 M cacodylate buffered solution without La, rinsed in PBS, dehydrated in alcohol, and embedded in Epon 812. Ultrathin sections were

made and examined with a Hitachi 7000 electron microscope at 75 KV.

### **Results**

#### *Microscopic findings of hematoxylin and eosin (H&E) stain and TUNEL method*

Thirty minutes to 4 hours after the induction of ischemia, no remarkable changes were observed in the ischemic area by H&E staining. However, by TUNEL staining, positive nuclei were identified in a limited number of myocardial cells in the ischemic subendocardial area 2 hours after the induction of ischemia. Six hours after ischemia, myocardial cells showed deep eosinophilia of the cytoplasm in H & E sections, while in TUNEL-stained sections most of the myocardial cell nuclei corresponding to those showing deep eosinophilic cytoplasm in H&E sections were positively stained.

#### *A quantitative analysis of TUNEL-positive cells at ischemic foci*

At the ischemic foci,  $17.9\% \pm 1.9$  of cells showed positive with TUNEL stain at 2 hours after ischemia. With

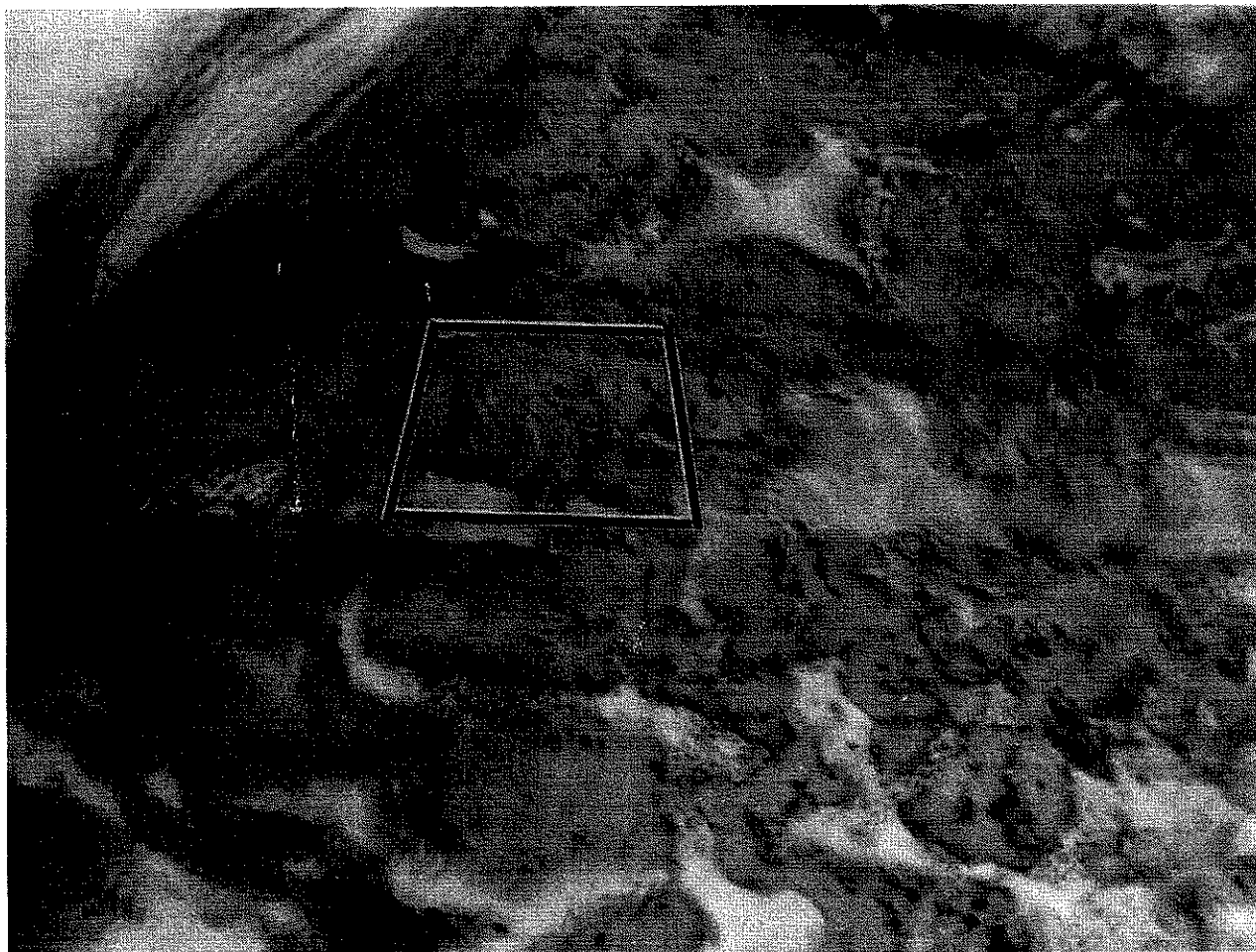


Figure 1. This shows a frozen section of the rat ischemic myocardial tissue which, after being fixed with 4% glutaraldehyde containing 1.3% La, was stained with the TUNEL method and embedded in Epon 812. Quadrangular area was examined by electron microscope. Arrow indicates TUNEL-positive nuclei. (x 25)

## Increased PMP of apoptotic cardiomyocytes in ischemia

time TUNEL-positive nuclei increased thereafter, reaching  $54.9\% \pm 2.0$  at 6 hours after ischemia (Table 1).

### *Identification of La by electron microscope and quantitative analysis*

Portions of myocardial tissues corresponding to those examined with the light microscope for both H & E and TUNEL stain were fixed with 4% glutaraldehyde in 0.1 M cacodylate buffered solution containing 1.3% La, pH 7.4, for 2 hours, and then studied electron microscopically. Even 30 min after the onset of ischemia, 26.7% of myocardial cells in the ischemic area showed depositions of La. Percentages of La-deposited cells increased with time, reaching the more than 90% at 4 and 6 hours (Fig. 2a) after ischemia (Table 1). Percentages of La-deposited cardiomyocytes are significantly larger than those of TUNEL-positive nuclei in ischemic foci. In the control group, La was only visible in the intercellular space between two adjacent normal myocardial cells (Fig. 2b).

### *A quantitative analysis of PMP of myocardial cells with TUNEL-positive nuclei*

The increased permeability of the plasma membrane of myocardial cells having TUNEL-positive nuclei at the ischemic foci was examined by electron microscope at 2,

3, 4 and 6 hours after the initiation of ischemia. Two hours after ischemia, 7 of 10 myocardial cells having TUNEL-positive nuclei revealed intracellular depositions of La (Fig. 3a), whereas the remainder did not. Three hours after ischemia, 10 of 13 myocardial cells having TUNEL-positive nuclei showed La depositions in myocardial cells (Fig. 3b), and the remainder did not. Almost all myocardial cells stained positive with the TUNEL method showed intracellular depositions of La at 4 and 6 hours after ischemia (Fig. 3c), respectively.

In control, intracellular depositions of La were not observed (Fig. 3d).

## Discussion

It has been widely accepted that apoptosis and necrosis are two forms of cell death with clearly distinguishing morphological and biochemical features [9, 15, 16]. Recent accumulating evidence indicates that the programmed cell death of cardiomyocytes plays an important role during the postnatal development of the heart [7] as well as during the occurrence of ischemia/reperfusion injury to the myocardium [3]. Furthermore, we previously reported that the nuclei of human infarcted myocardial cells having the morphological features of necro-

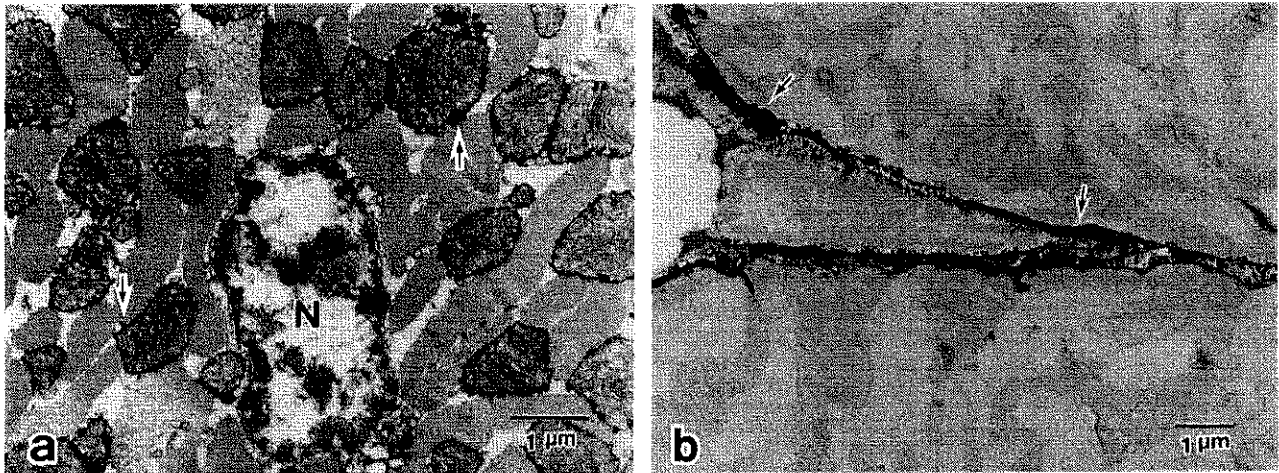


Figure 2. (a) Ultrastructure of the rat ischemic myocardial tissues which were fixed with 4% glutaraldehyde containing 1.3% La and postfixated with 1% osmic acid. Depositions of La (arrows) were found around the mitochondria. (Six hours after the onset of ischemia. This section was stained with uranyl acetate and lead citrate. N: nucleus). (b) Ultrastructure of the normal control rat myocardial tissues which were treated with the same procedures as the ischemic rat myocardial tissues. La were observed only in the intercellular space (arrows) at two adjacent normal myocardial cells. This section was stained with uranyl acetate and lead citrate.

Table 1. Frequency of lanthanum and TUNEL-positive cells at various time periods of ischemia.

	30 min (n = 1)	1 hr (n = 1)	2 hr (n = 3)	3 hr (n = 3)	4 hr (n = 3)	6 hr (n = 3)
TUNEL (%)			$17.9 \pm 1.9$	$26.2 \pm 3.7$	$38.1 \pm 2.1$	$54.9 \pm 2.0$
Lanthanum (%)	26.7	44.3	$66.8 \pm 5.0$	$81.5 \pm 3.9$	$97.3 \pm 2.8$	$99.5 \pm 0.8$

TUNEL: Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP-biotin nick end labelling. Lanthanum: Indicator of permeability of myocyte plasma membrane.

### Increased PMP of apoptotic cardiomyocytes in ischemia

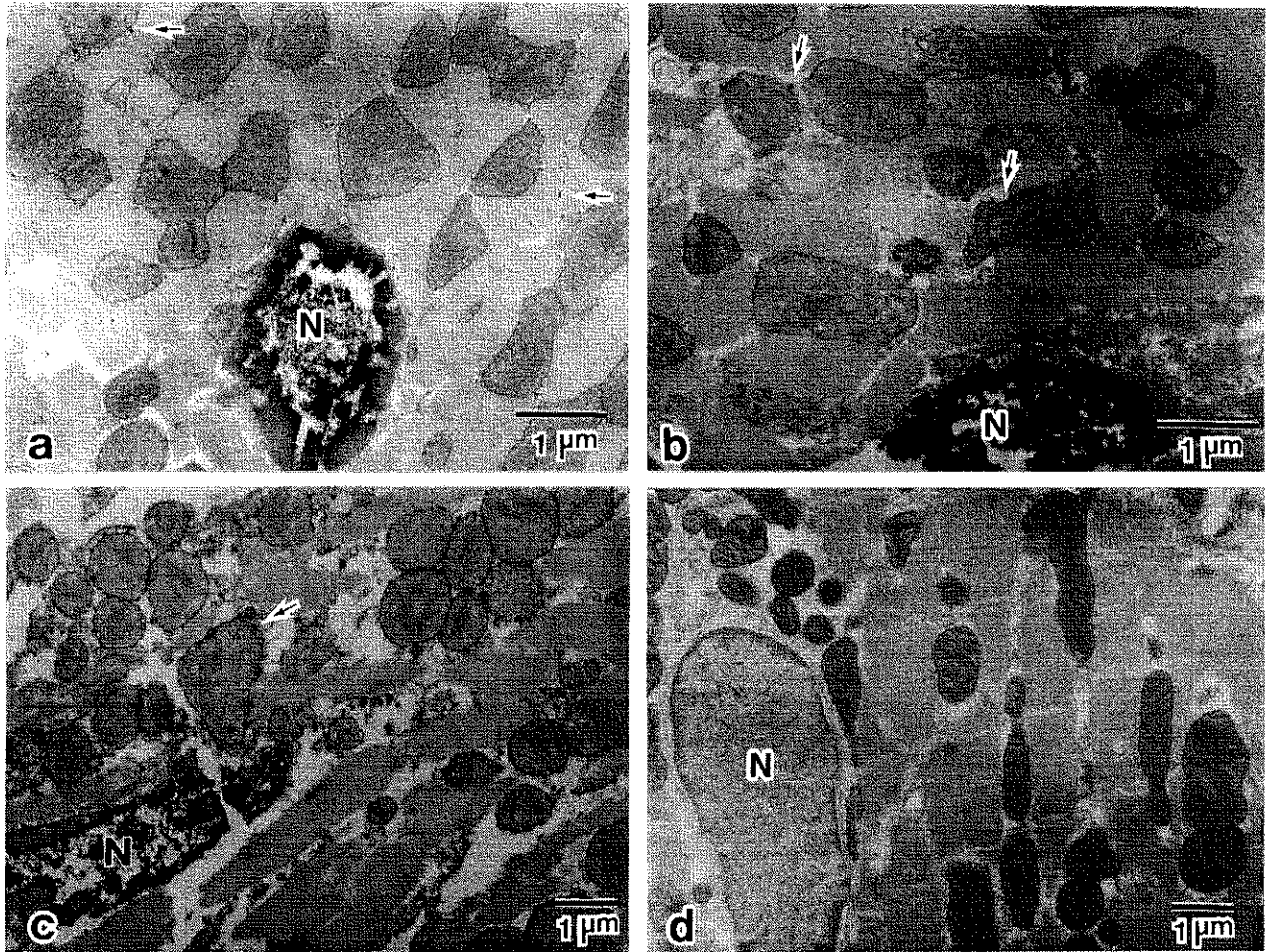


Figure 3. Electron microscopic detection of plasma-membrane permeability (PMP) of myocardial cells with TUNEL-positive nuclei. (a): 2, (b): 3 and (c): 6 hours after the onset of ischemia. Arrows indicate depositions of La which mainly located around mitochondria. (d): The normal control rat myocardial tissues which were treated with the same procedure as the ischemic rat myocardial tissues. No depositions of La were observed in the cytoplasm of myocardial cells. All sections were stained with lead citrate. N: nucleus.

sis (including both typical coagulation necrosis and contraction band necrosis) showed DNA fragmentation [5]. We also reported that permanent ligation of the left coronary artery without reperfusion produces DNA fragmentation of rat myocardial cells at the ischemic foci [13].

Kajstura et al. [6] reported that, by using both the TUNEL method for apoptosis and the anti-myosin antibody labeling method for necrosis, programmed myocardial cell death (apoptosis) appeared 2 hours after the induction of ischemia, that apoptosis was the major independent form of cardiomyocyte cell death up to 4.5-6 hours after coronary artery ligation, and that necrotic cardiomyocyte cell death follows apoptosis. Recently they [8] also reported that coronary artery narrowing caused both necrotic and apoptotic cardiomyocyte death. Necrosis is characterized by the loss of the plasma membrane integrity which remains intact in apoptotic cells [1]. Accordingly, if myocardial cell-injury caused by ischemia is due solely to the mechanism of apoptosis, the PMP of myocardial cells remains intact at an early phase of is-

chemia (2-6 hours after induction). In our study, the permeability of the plasma membrane was assessed by colloidal lanthanum, which has an average particle size of 40 Å, smaller than that of monoclonal anti-myosin antibody, and which penetrates spaces as small as 20 Å and has been successfully used as a marker for plasma membrane injury [4, 11, 10]. By using La as a tracer of PMP, we demonstrated that myocardial cells in the ischemic area showed increased permeability at a very early stage. The data obtained from our experiment were compatible with those by Koba et al. [10] who have reported that in ischemic rat hearts the deposition of lanthanum was found in 19% of ischemic cardiomyocytes after 30 min, and in 30% after 60 min of the initiation of ischemia. According to Kajstura et al. [6], cardiomyocytes showing both DNA strand breaks (apoptosis) and myosin labeling (necrosis) was a prominent mode of cell death only 6 hours after ischemia. However, in this experiment, we demonstrated that the PMP of almost all myocardial cells having TUNEL-positive nuclei showed increased plasma-



## Increased PMP of apoptotic cardiomyocytes in ischemia

membrane permeability from 2 to 6 hours after ischemia, meaning that DNA strand breaks and increased PMP occurred simultaneously at identical myocardial cells in the ischemic foci. This finding was made possible by the use of La tracer used in this experiment, the molecular size of which is smaller than that of monoclonal anti-myosin antibody, and which penetrates spaces as small as 20 Å. In only a small number of the myocardial cells with TUNEL-positive nuclei was La deposition not detected. These cells, theoretically, might be pure apoptotic cells. However, some limitations exist in the use of the electron microscope for identifying the intracellular deposition of La, since some La-deposited cells might be regarded as La-non-deposited cells by electron microscopic examination, i.e., myocardial cells without deposition of La might not necessarily be true apoptotic cells.

The data obtained from our experiment indicate that almost all myocardial cells having TUNEL-positive nuclei simultaneously show an increase in PMP in the acute ischemic foci.

This strongly suggests that the mechanism of myocardial cell death induced by ischemia is due to two separate processes affecting identical myocardial cells in the ischemic foci, and that the mechanism of cell death is not due solely to either apoptosis or necrosis, but to a combination of both.

### Acknowledgement

We thank Mr. M Takeuchi and Mr. N Igari and Mrs. Y Matsubara for their skilful technical assistance. This study was supported in part both by Sasakawa Health Science Foundation and by Japan-China Medicine Association - Nippon Foundation.

### Address correspondence to:

Gen Itoh M.D., Ph.D., First Department of Pathology, Aichi Medical University, 21 Karimata Nagakute-cho, Aichi-gun, Aichi-ken 480-1195, Japan.

### References

- [1] Darzynkiewicz Z, Bruno S, Del Bino G, Gorczyca W, Hotz MA, Lassota P, Traganos F: Features of apoptotic cells measured by flow cytometry. *Cytometry* 1992; 13: 795-808.
- [2] Gavrieli Y, Sherman Y, Ben-Sasson SA: Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol* 1992; 119: 493-501.
- [3] Gottlieb RA, Burieson KO, Kloner RA, Babior BM, Engier RL: Reperfusion injury induces apoptosis in rabbit cardiomyocytes. *J Clin Invest* 1994; 94: 1621-1628.
- [4] Hoffstein S, Gennaro DE, Fox AC, Hirsch J, Streuli F, Weissmann G: Colloidal lanthanum as a marker for impaired plasma membrane permeability in ischemic dog myocardium. *Am J Pathol* 1975; 79: 207-219.
- [5] Itoh G, Tamura J, Suzuki M, Suzuki Y, Ikeda H, Koike M, Ito K: DNA fragmentation of human infarcted myocardial cells demonstrated by nick end labeling method and DNA agarose gel electrophoresis. *Am J Pathol* 1995; 146: 1325-1331.
- [6] Kajstura J, Cheng W, Reiss K, Clark WA, Sonnenblick EH, Krajewski S, Reed JC, Olivetti G, Anversa P: Apoptotic and necrotic myocyte cell deaths are independent, contributing variables of infarct size in rats. *Lab Invest* 1995; 74: 86-107.
- [7] Kajstura J, Mansukhani M, Cheng W, Reiss K, Krajewski S, Reed JC, Quaini F, Sonnenblick EH, Anversa P: Programmed cell death and the expression of the protooncogene Bcl-2 in myocyte during postnatal maturation of the heart. *Exp Cell Res* 1995; 219: 110-121.
- [8] Kajstura J, Liu Y, Baldini A, Li B, Olivetti G, Leri A, Anversa P: Coronary artery constriction in rats: necrotic and apoptotic myocyte death. *Am J Cardiol* 1998; 82: 30k-41k.
- [9] Kerr JFR, Wyllie AH, Currie AR: Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 1972; 26: 239-257.
- [10] Koba S, Konno S, Suzuki H, Katagiri T: Distribution of sarcolemmal integrity during ischemia and reperfusion of canine hearts as monitored by use of lanthanum ions and a specific probe. *Basic Res Cardiol* 1995; 90: 203-210.
- [11] Schmiedl A, Bach F, Fehrenbach H, Schnabel Ph.A, Richter J: Cellular distribution patterns of lanthanum and morphology of rat hearts exposed to different degrees of ischemic stress. *Anat Rec* 1995; 243: 496-508.
- [12] Selye H, Bajusz E, Grasso S, Mendel P: Simple techniques for the surgical occlusion of coronary vessels in the rat. *Angiology* 1960; 11: 398-407.
- [13] Tamura J: DNA fragmentation of rat infarcted myocardial cells demonstrated by TUNEL method and DNA agarose gel electrophoresis. *J Aichi Med Univ Assoc* 1996; 24: 493-502.
- [14] Tanaka M, Ito H, Adachi S, Akimoto H, Nishikawa T, Marumo P, Hiroe M: Hypoxia induces apoptosis with enhanced expression of Fas antigen messenger RNA in cultured neonatal rat cardiomyocytes. *Circ Res* 1994; 75: 426-433.
- [15] Wyllie AH, Kerr JPR, Currie AR: Cell death: the significance of apoptosis. *Int Rev Cytol* 1980; 68: 251-306.
- [16] Wyllie AH, Morris RG, Smith AL, Dunlop D: Chromatin cleavage in apoptosis: association with condensed chromatin morphology and dependence on macromolecular synthesis. *J Pathol* 1984; 142: 67-77.

日本財団補助金による

1999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—

H12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 李 玲  
研究機関 大阪大学歯学部歯科保存学講座 研究指導者 恵比須 繁之 職名 教授  
所在地 〒565-0871 大阪府吹田市山田丘1-8 電話 06-6879-2927 内線 2927

研究テーマ ヒトの歯周ポケットにおける*P. gingivalis* 線毛の免疫組織学的検索

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)

以下の研究業績を第43回春季日本歯周病学会学術大会(平成12年5月13-14日)にて発表する予定である

《演題名》: ヒトの歯周ポケットにおける*P. gingivalis* 線毛の免疫組織化学的検索

《内容》: 本研究では、ヒトの歯周ポケットを可及的に再現した試料を作製し、厚さ3 $\mu$ mの連続薄切切片を作製した。切片の一部は、Brown-Brenn染色を施し、他の一部は、調製した抗*P. gingivalis* 381線毛抗体(抗線毛抗体)(1000倍希釈)及び抗*P. gingivalis* 381抗体(抗381抗体)(1000倍希釈)を用いて、酵素抗体法による免疫染色を行った後、光学顕微鏡にてヒトの歯周ポケットにおける*P. gingivalis* 線毛抗原の局在性を検索した。その結果、ヒトの歯周ポケットにおいて、抗線毛抗体陽性の*P. gingivalis* を検出した。抗線毛抗体に対する陽性反応は、概して歯周ポケット全域から検出されたが、抗381抗体に比べその検出頻度は低く、染色性は弱かった。さらに、歯周ポケット底部に近づくに従い、歯面に接した部位あるいは近接した部位で*P. gingivalis* の検出頻度が増加する傾向を示した。同部位では、*P. gingivalis* 線毛が歯面への初期付着の役割も担っていると推察された。

(2) 学会誌等に発表した論文  有 ・ 無 (雑誌名・論文名)

日本歯周病学会会誌, 42 (春季特別号), 2000, in press.

李 玲ら. ヒトの歯周ポケットにおける*Porphyromonas gingivalis* 線毛抗原の免疫組織学的検索

### 3. 今後の研究計画

#### 1. 免疫電顕法による*P. gingivalis*と宿主の超微細構造学的解析

光顕による観察結果に基づき、樹脂ブロックより、被検部位を切り抜き、エポンビーム先端に張り付け、ウルトラミクロトームにて連続超薄切片を作製する。得られた連続超薄切片に調製した抗線毛抗体を反応させた後、粒径5nmのコロイド金プローベを反応させ、透過電子顕微鏡にて検索し、*P. gingivalis*線毛抗原と宿主細胞の付着関係の実態を超微細構造的解析する。

#### 2. 免疫2重（線毛-Glycocalyx）染色を用いた透過免疫電顕法による*P. gingivalis*の宿主細胞への付着・定着メカニズムの超微細形態学的解析

得られる連続超薄切片をアルシアンブルーあるいはルテニウムレッドで処理し、Glycocalyx（菌体外多糖）染色を行う。洗浄後、金コロイド標識法による*P. gingivalis*線毛抗原に対する免疫染色を行い、宿主、*P. gingivalis*線毛とGlycocalyxを超微細形態的に検索し、*P. gingivalis*のヒトの歯周ポケットにおける定着・増殖メカニズムを検索する。

### 4. 研究指導者の意見

李玲君は1999年4月より、大阪大学大学院歯学研究科の2年生（歯科保存学専攻）として、《ヒトの歯周ポケットにおける*P. gingivalis*線毛の免疫組織学的検索》の研究テーマに取り組み、免疫組織学的及び免疫電顕的手法を用いて、ヒトの歯周ポケットにおける*P. gingivalis*線毛抗原の局在性を解析しました。主婦であり、一児の母親であることを感じさせない程の頑張り振りで、真摯に研究に打ち込んで、優れた研究業績をあげました。2000年5月の第43回春季日本歯周病学会にて、《ヒトの歯周ポケットにおける*P. gingivalis*線毛の免疫組織学的検索》と題する発表を予定しています。今後、免疫電顕法を用いて、*P. gingivalis*線毛と宿主細胞との相互作用を超微細構造的に解析する予定で、歯周病の有力原因菌の感染実態に関する新しい知見が得られるものと期待しています。

研究指導者氏名 恵比須 繁之



### 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。

# ヒトの歯周ポケットにおける *Porphyromonas gingivalis* 線毛抗原の免疫組織化学的検索

李 玲

中国ハルビン医科大学歯学部附属第二病院口腔内科 講師

恵比須 繁之

大阪大学歯学部歯科保存科講座 教授

《要旨》：本研究の目的は、*Porphyromonas gingivalis* がヒトの歯周ポケットにおいて線毛を形成しているか否か、あるいは線毛を介した付着・定着機構の実態を解明することである。*P. gingivalis* 381より分離・精製した線毛標品および全菌体に対する特異抗血清はウサギを用いて通法に従い調製した。ヒトの歯周ポケットを可及的に再現できる試料を調製し、連続薄切切片を作製した。切片の一部はBrown-Brenn染色を施し、他の一部は、調製した抗*P. gingivalis* 381線毛抗体（抗線毛抗体）および抗*P. gingivalis* 381抗体（抗381抗体）を用いて、酵素抗体法による免疫染色を施した後、光学顕微鏡検索に供した。次いで、顕微鏡検索結果に基づき、歯周ポケット底部に位置するいわゆるプラークフリーゾーンに相当する部位の連続超薄切片を作製した。得られた超薄切片に抗線毛抗体と、金コロイドを用いた免疫染色を行い、透過型電子顕微鏡検索に供した。顕微鏡検索の結果、ヒトの歯周ポケットにおいて、抗線毛抗体陽性の*P. gingivalis* を検出した。歯周ポケット浅部では、抗線毛抗体に対する陽性反応は、歯根付着性プラークから上皮関連プラークまでの広い領域で検出された。浅部での抗線毛抗体に対する陽性反応は、中央部や深部に比べ弱かった。歯周ポケット中央部の抗線毛抗体に対する陽性反応は、歯根付着性プラーク及び弱付着性プラーク領域で散在性に検出された。歯周ポケット深部の抗線毛抗体に対する陽性反応は、主に歯根付着性プラーク及び弱付着性プラーク領域でみとめられ、上皮関連プラークではあまりみられなかった。さらに、歯周ポケット底部に近づくに従い、歯面に接した部位あるいは近接した部位で検出される頻度が増加する傾向を示した。抗線毛抗体に対する陽性反応は、歯周ポケットのいずれの深さにおいても、上皮内では検出されなかった。透過電顕による超微細形態的な検索の結果、プラークフリーゾーンのセメント質表面に1-2層堆積したグラム陽性あるいは陰性の桿菌およびスピロヘータの小集団が散在性に観察された他、長桿菌もわずかながら観察された。グラム陰性桿菌が歯面表層のcuticleに接したあるいは近接した部位に局在する傾向がみられた。透過免疫電顕法による検索では、プラークフリーゾーンにおいて金コロイドで標識された*P. gingivalis* 線毛が観察された。*P. gingivalis* は*in vivo* 系においても線毛を形成していると推察されていたが、ヒトの歯周ポケットで*P. gingivalis* が線毛を形成し棲息していることが明らかになり、同菌と歯周組織破壊との関連が改めて示唆された。抗線毛抗体に対する陽性反応は、歯周ポケット底部の歯面に接した部位あるいは近接した部位で検出され、同部位では、*P. gingivalis* 線毛が歯面への初期付着の役割もを担っていると推察された。

Key Words : *Porphyromonas gingivalis* 線毛, 免疫組織化学, ヒトの歯周ポケット, 免疫電顕法.

## 研究報告

### 《目的》

*Porphyromonas gingivalis*は、その病原性と進行性歯周炎の歯周ポケットからの検出率の高さゆえ、成

*P. gingivalis* 線毛が歯面への初期付着の役割もを担っていると推察された。

Key Words : *Porphyromonas gingivalis* 線毛, 免疫組織化学, ヒトの歯周ポケット, 免疫電顕法.

## 研究報告

### 《目的》

*Porphyromonas gingivalis*は、その病原性と進行性歯周炎の歯周ポケットからの検出率の高さゆえ、成人性歯周炎との関連が注目されている<sup>1-3)</sup>。*P. gingivalis* の病原因子の一つである細胞付着能には、同菌の線毛が深く関与しており、*in vitro*系では、ハイトロキシアパタイトや上皮細胞に対する付着能を有している<sup>4-6)</sup>。しかしながら、*in vivo*系で*P. gingivalis*の線毛発現の実態を検索した報告は皆無であり、ヒトの歯周ポケットにおいて同菌が線毛を発現しているか否か、あるいは線毛を形成した*P. gingivalis*がいずれの部位に局在しているかといったことは、全く解明されていない。我々はヒトの歯周ポケット試料の上で歯周病関連細菌の局在性を検索し、*P. gingivalis*は歯周ポケット全域に散在性に存在すること及び走査免疫電顕法により、ヒトの歯周ポケット底部に、いわゆるプラークフリーゾーンに*P. gingivalis*が生息していることを報告した<sup>7-9)</sup>。本研究の目的は、(1) *P. gingivalis*線毛に対する特異抗体を調製し、免疫組織化学手法により、ヒトの歯周ポケットにおける*P. gingivalis*線毛抗原の発現の有無および局在性を検索する、(2) 光顕結果に基づき免疫電顕法によりヒトの歯周ポケット底部(プラークフリーゾーン)における*P. gingivalis*線毛を超微細形態学的に検索することである。

### 《方法》

#### 1. *P. gingivalis* 381線毛抗体と全菌抗体の調製

*P. gingivalis* 381より分離・精製した線毛標品及び*P. gingivalis* 381全菌に対する特異抗血清をウサギを用いて通法に従って精製した<sup>7, 10)</sup>。すなわち、*P. gingivalis* 381より分離・精製した線毛標品(1.0mg)及び*P. gingivalis* 381の凍結乾燥菌体(10mg)を生理食塩水1mlに浮遊させ、等量の Freund の完全アジュバンドと十分に混合し、得られたエマルシヨンの計2mlの体重3kgの雄性ニュージーランドラビットの後背部皮下に0.4mlずつ5か所に分けて注射した。2週間後同様に皮下に追加免疫を行い、さらに、2週間後精製した線毛(0.5mg)あるいはホルマリン処理した*P. gingivalis*菌体を1mg/mlの濃度に滅菌生理食塩水に浮遊させた線毛希釈液あるいは菌液3mlを静脈内にブースター注射した。初回免疫から5週間後採血し、血清を分離した後、濾過滅菌を行った。

#### 2. 抗血清の吸収

得られた抗線毛血清および抗線毛血清を用いて、酵素抗体法 (labeled streptavidin biotin 法) および金コロイド標識法により、種々のプラーク細菌の塗沫標本に免疫染色を施した。交差反応がみられた場合は、供試した菌株により抗血清を吸収した。吸収操作はZambonら<sup>11)</sup>の記載をもとに行った。すなわち、凍結乾燥菌体 (20mg) をウサギ抗血清 1 ml に加え、37℃で1時間浸漬し、さらに4℃にて12時間静置した。そして、7,000×g の遠心により得られた上清を、抗*P. gingivalis* 線毛および抗*P. gingivalis* 381 菌体に対する抗血清として、以下の実験に用いた。

### 3. ヒトの歯周ポケット試料の調製

過去6か月以内に歯周治療の既往がない、重度歯周炎患者のうち、術前診査により保存不可能と診断され、深さ6-10mmの歯周ポケットを有する部位を被験部位とした。歯周ポケットが可及的に再現できるよう歯とその周囲歯周組織を慎重に採取し、得られた試料は直ちにhalf-kavnovsky 溶液で浸漬固定した。洗浄後、上昇エタノール系列にて、脱水し、水溶性メタクリル樹脂に置換後、同樹脂に包埋し、ブロックを作製した。得られたブロックを硬組織切断機 (Buehler limited, Lake Bluff, USA) にて頬舌側方向に縦断し、各ブロック片を10%EDTA脱灰液にて3-4週間脱灰した後、水溶性メタクリル樹脂に再包埋した。

### 4. *P. gingivalis* 線毛抗原の免疫組織化学的検索

調製した樹脂ブロックより硬・軟組織用マイクロトーム (LEICA RM 2155, Leica Instruments GmbH, Germany) にて連続薄切切片 (3 μm) を調製した。得られた連続薄切切片の一部はBrown-Brenn染色を施し、他の一部切片は調製した抗線毛及び抗381特異抗体を反応させ、酵素抗体法 (LSAB法) による免疫染色を施した。酵素抗体法による免疫染色は、LSABキット (DAKO Corporation, Carpinteria, USA) を用いて行った。すなわち、得られた薄切切片を20% (v/v) 正常ヤギ血清で30分間処理し、1000倍希釈した抗線毛抗体および抗381抗体を1次抗体として室温で1時間反応させた。反応終了後、0.05M トリス塩酸緩衝生理食塩水 (PH7.6, 以下TBSと略す) にて5分間3回洗浄し、2次抗体としてビオチン標識抗ウサギ免疫グロブリン・ヤギ抗体を室温で30分間反応させた。次いで、0.5% (v/v) パーオキシダーゼ標識ストレプトアビジンを20分間反応させた。洗浄後、発色基質 (Vector Laboratories, Inc. Burlingame, USA) を室温で10分間反応させ、抗原-抗体複合物の発色を確認した後、グリセロールゲルで封入して、光学顕微鏡にてヒトの歯周ポケットにおける*P. gingivalis* 線毛抗原の局在部位を観察した。なお、陰性コントロールとして、1次抗体に、正常ウサギ血清を用いて免疫染色を行った。

### 5. 免疫透過電顕試料の調製

光学顕微鏡による観察結果に基づき、歯周ポケット底部に位置する、いわゆるプラークフリーゾーン

に相当する部位を保存していた樹脂ブロックから切り出し、エボンビーム先端に張り付けた。実体顕微鏡の下でトリミング後、ウルトラマイクロトームにダイヤモンドナイフを装着し、厚さ70nmの連続超薄切片を作製した。

## 6. 免疫電顕法による*P. gingivalis* 線毛抗原の検索

超薄切片の免疫染色は金コロイド標識法を用いて行った。すなわち、得られた連続超薄切片を20%正常ヤギ血清に30分反応させ、ブロッキングを施した後、100倍希釈した抗線毛抗体を1次抗体として4℃で2時間反応させた。0.1%BSA-トリス塩酸緩衝生理食塩水 (PH7.6)にて15分間3回洗浄した後、50倍希釈した粒径5 nm金コロイド標識抗ウサギ免疫グロブリン・ヤギ抗体を2次抗体として4℃で1時間反応させた。洗浄後、切片を2%酢酸ウラン染色液にて10分間処理し、蒸留水で洗浄、乾燥後、透過電子顕微鏡 (H-7500, Hitachi) にてヒトの歯周ポケットにおける*P. gingivalis* 線毛抗原のを超微細構造的に検索した。

### 《結果》

#### 1. ヒトの歯周ポケットにおけるプラーク細菌の形態学的観察

歯周ポケットにおけるプラーク細菌の分布状態をBrown-Brenn染色を施し観察したところ、歯面及び上皮に近接した部位ではプラーク細菌が密に集合しており、その間で弱付着性プラークと称される領域では菌体の密度は比較的に低かった。プロービング深さ3-4 mm付近の歯根付着性プラーク領域にはグラム陽性の球菌、桿菌およびグラム陰性の糸状菌などを観察され、ポケット底部（プロービング深さ7-8 mm）では、菌体が集合している所と疎かな所が比較的に明瞭であった。歯根に近接した菌体が密に集合した部位では、主にグラム陽性の球状菌及び桿菌がみとめられ、その表層部にグラム陰性の糸状菌が観察された。上皮に近接したところでは、グラム陽性及び陰性の球状菌、桿菌及び糸状菌等が混在して大きな集団を形成していた。

#### 2. 光学顕微鏡にてヒトの歯周ポケットにおける*P. gingivalis* 線毛抗原の免疫組織化学的検索

1) ヒトの歯周ポケットにおいて抗線毛抗体陽性の*P. gingivalis* を検出した。

2) 歯周ポケット浅部では、抗線毛抗体及び抗381抗体に対する陽性反応は、歯根付着性プラークから上皮関連プラーク領域に及ぶ広い領域で検出された。浅部での抗線毛抗体に対する染色性は、中央部や深部に比べ弱かった。歯周ポケット中央部の抗線毛抗体に対する陽性反応は、歯根付着性プラーク及び弱付着性プラーク領域で散在性に検出されたが、抗381抗体に比べその検出頻度は低く、染色性は弱かった。抗381抗体に対する陽性反応は、歯根付着性プラークから上皮関連プラークまでの広い領域でみとめられた。歯周ポケット深部の抗線毛抗体に対する陽性反応は、主に歯根付着性プラーク領域でみとめら

れ、上皮関連プラークではあまりみられなかった。さらに、歯周ポケット底部に近づくに従い、歯面に接した部位あるいは近接した部位で検出される頻度は増加する傾向を示した。一方、抗381抗体に対する陽性反応は歯根付着性プラークから上皮関連プラークまでの広い領域で検出された。

3) 抗線毛抗体及び抗381抗体に対する陽性反応は、歯周ポケットのいずれの深さにおいても、上皮内では検出されなかった。

## 2. 免疫電顕法によるプラークフリーゾーンにおける*P. gingivalis* 線毛抗原の検索

### 1) プラークフリーゾーンにおける細菌を超微細形態学的観察

セメント質に接した部位に、1-2層のグラム陽性あるいは陰性の短桿菌およびスペロヘータが散在しているのが観察された他、長桿菌もわずかながらみとめられた。グラム陰性桿菌は歯面表層のcuticleに近接して観察される傾向がみられた。さらに、歯面のcuticle表面に細胞を溶解したghost状態の細菌が観察された。

### 2) プラークフリーゾーンにおける*P. gingivalis* 線毛抗原の検索

プラークフリーゾーンにおいて金コロイドで標識された*P. gingivalis* 線毛が主にセメント質に近接した部位で観察された。

#### 《考察》

1. *P. gingivalis* は*in vivo*系においても線毛を形成していると推察されていたが、ヒトの歯周ポケットで*P. gingivalis* は線毛を形成し、棲息していることが明らかとなり、同菌と歯周組織破壊との関連が改め示唆した。

2. 光顕検索より抗線毛抗体に対する陽性反応は、概して歯周ポケット全域から検出されたが、抗381抗体に比べその検出頻度は低く、染色性は弱かった。ヒトの歯周ポケットには、今回使用した抗線毛抗体に未反応な、線毛形成量の少ない*P. gingivalis* も混在している可能性が示唆された。

3. 光顕および電顕検索より抗線毛抗体に対する陽性反応は、歯周ポケット深部の歯面に接した部位あるいは近接した部位で検出され、同部位では*P. gingivalis* 線毛が歯面への初期付着の役割もを担っていると推察された。

#### 《参考文献》

1. Slots J. et al, *J Periodont Res*, 1985; 20: 613-620.
2. White D. et al, *J Periodont Res*, 1981; 16: 259-265
3. Tanner A. et al, *J Clin Periodontol*, 1979; 6: 278-307



4. Amano A. *et al*, *Infect Immun*, 1994; 62: 3372-3380.
5. Duncan M.J. *et al*, *Infect Immun*, 1993; 61: 2260-2265.
6. Lamont R.T. *et al*, *Infect Immun*, 1995; 63: 3878-3885.
7. Noiri Y. *et al*, *J Periodont Res*, 1997; 32: 598-607.
8. 野杓 由一郎ら, 日誌周誌, 38 (1) : 60-68, 1996.
9. Noiri Y. and Ebisu S. *J Periodontol*, 2000; 71: in press.
10. Yoshimura F. *et al*, *J Bacteriol*, 1984; 160: 949-957.
11. Zambon J. J. *et al*, *Infect Immun*, 1983; 41: 19-27

# ヒトの歯周ポケットにおける *Porphyromonas gingivalis* 線毛の免疫組織化学的検索

大阪大学歯学部歯科保存学講座, \*愛知学院大学歯学部微生物学講座

○李 玲, 野村 由一郎, 吉村 文信\*, 恵比須 繁之

An Immunohistochemical Study on *Porphyromonas gingivalis* Fimbriae Antigen in Human Periodontal Pockets

Department of conservative Dentistry, Osaka University, Faculty of Dentistry

\*Department of microbiology, AICHI-GAKUIN University School of Dentistry

○Li Ling, Yuichiro Noiri, Fuminobu Yoshimura\*, Shigeyuki Ebisu

キーワード: *Porphyromonas gingivalis* 線毛, 免疫組織化学, 歯周ポケット

## 《目的》

*Porphyromonas gingivalis* の病原因子の一つである細胞付着能には、同菌の線毛が深く関与しており、*in vitro* 系では、ハイトロキシアパタイトや上皮細胞に対する付着能を有している。しかしながら、*in vivo* 系で *P. gingivalis* の線毛形成の実態を検索した報告は皆無であり、ヒトの歯周ポケットにおいて同菌が線毛を産生しているか否か、あるいは線毛を形成した *P. gingivalis* がいずれの部位に局在しているかといったことは、全く解明されていない。我々は、ヒトの歯周ポケット試料上で歯周病関連細菌の局在性を検索し、*P. gingivalis* が歯周ポケット全域に散在性に存在するを報告したり・本研究では、ヒトの歯周ポケットにおいて、*P. gingivalis* 線毛を介した付着・定着機構の実態を解明するため、同菌の線毛を免疫組織化学的手法により検索した。

## 《材料と方法》

1. *P. gingivalis* 381線毛抗体及び全菌抗体の調製: *P. gingivalis* 381より分離・精製した線毛標品及び *P. gingivalis* 381全菌体に対する特異抗血清をウサギを用いて通法に従って精製した<sup>1,2)</sup>。
2. ヒトの歯周ポケット試料の調製: 重度成人性歯周炎患者のうち、保存不可能と診断され、深さ6-10mmの歯周ポケットを有する部位を被験部位とした。歯周ポケットが可及的に再現できるよう歯とその周囲歯周組織を採取し、得られた試料は直ちにhalf-karmorsky 溶液中で浸漬固定した。洗浄後、水溶性メタクリル樹脂にて脱水、置換した後、同樹脂に包埋し、厚さ3μmの連続薄切片を作製した。切片の一部は、Brown-Brenn染色を施し、他の一部は、免疫組織化学的検索に供した。
3. *P. gingivalis* 線毛の免疫組織化学的検索: 得られた連続切片に調製した抗 *P. gingivalis* 381線毛抗体 (抗線毛抗体, 1000倍希釈) 及び抗 *P. gingivalis* 381抗体 (抗381抗体, 1000倍希釈) を反応させ、酵素抗体法による免疫染色を行った後、光学顕微鏡にてヒトの歯周ポケットにおける *P. gingivalis* 線毛を検索した。

## 《結果》

1. ヒトの歯周ポケットにおいて、抗線毛抗体陽性の *P. gingivalis* を検出した。
2. 歯周ポケット浅部では、抗線毛抗体及び抗381抗体に対する陽性反応は、歯根付着性プラークから上皮関連プラーク領域に及ぶ広い領域で検出された。浅部での抗線毛抗体に対する染色性は、中央部や深部に比べ弱かった。歯周ポケット中央部の抗線毛抗体に対する陽性反応は、歯根付着性プラーク及び弱付着性プラーク領域で散在性に検出されたが、抗381抗体に比べその検出頻度は低く、染色性は弱かった。抗381抗体に対する陽性反応は、歯根付着性プラークから上皮関連プラークまでの広い領域でみとめられた。歯周ポケット深部の抗線毛抗体に対する陽性反応は、主に歯根付着性プラーク及び弱付着性プラーク領域でみとめられ、上皮関連プラークではあまりみられなかった。さらに、歯周ポケット底部に近づくに従い、歯面に接した部位あるいは近接した部位で検出される頻度が増加する傾向を示した。一方、抗381抗体に対する陽性反応は歯根付着性プラークから上皮関連プラークまでの広い領域で検出された。
3. 抗線毛抗体及び抗381抗体に対する陽性反応は、歯周ポケットのいずれの深さにおいても、上皮内では検出されなかった。

## 《考察》

1. *P. gingivalis* は *in vivo* 系においても線毛を形成していると推察されていたが、ヒトの歯周ポケットで *P. gingivalis* は線毛を形成し、棲息していることが明らかとなり、同菌と歯周組織破壊との関連が改め示唆された。
2. 抗線毛抗体に対する陽性反応は、概して歯周ポケット全域から検出されたが、抗381抗体に比べその検出頻度は低く、染色性は弱かった。ヒトの歯周ポケットには、今回使用した抗線毛抗体に未反応な、線毛形成量の少ない *P. gingivalis* も混在している可能性が示唆された。
3. 抗線毛抗体に対する陽性反応は、歯周ポケット深部に近づくに従い、歯面に接したあるいは近接した部位で検出され、同部位では *P. gingivalis* 線毛が歯面への初期付着の役割も担っていると推察された。

## 《参考文献》

- 1) Noiri Y. et al, *J Periodont Res*, 1997; 32: 598-607. 2) Yoshimura F. et al, *J Bacteriol*, 1984; 160: 949-957.

日本財団補助金による

1999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—

2000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 劉 学  
研究機関 愛知学院大学歯学部病理 研究指導者 亀山洋一郎 職名 教授  
所在地 〒愛知県名古屋市千種区楠元町1-100 電話 (052)751-2561 内線 323  
発癌性ヘテロサイクリックアミン (Trp-P-2) 及び発癌物 (ENU, DMBA)  
研究テーマ によるヌードマウスの実験的口腔腫瘍に関する研究

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 ・  無 (学会名・内容)

(1). Effects of Various Growth Factors on Cultured Mouse Tooth-Germ.  
(JADR. 47<sup>th</sup> Annual Meeting, Nov. 27-28, 1999. Kobe) (ポスター発表、共同発表者)

(2). A Trial of Tumorigenesis in Athymic Nude Mouse Tongue by DMBA Application. (18<sup>th</sup> Annual Meeting of Japan Society for Oral Tumors, Jan. 22-23, 2000. Nagoya). (ポスター発表、主発表者)

(3). ラットの口腔粘膜と皮膚に及ぼす Iodine Tincture 及び Trp-P-2 の影響  
(第18回日本口腔腫瘍学会総会. 2000年1月22～23日名古屋) (ポスター発表、共同発表者)

(2) 学会誌等に発表した論文  有 ・ 無 (雑誌名・論文名)

(1). 器官培養におけるラットの下顎頭成長におよぼす basic fibroblast growth factor (bFGF) の影響 (共著) 日顎誌、11(3) 173-181. 1999.

### 3. 今後の研究計画

発癌物質 (Trp-P-2、ENU、DMBA) がヌードマウスの口腔粘膜におよぼす影響に関する実験病理学的研究の試料である口腔組織の病理組織学切片において、Ki-67、PCNA などの免疫染色及び AgNO などの鍍銀染色を行い、口腔粘膜の実験部位での細胞増殖活性について検索を行う予定です。

### 4. 研究指導者の意見

劉学氏は客員研究員として愛知学院大学歯学部病理学講座へ来てから研究面で真面目で勤勉であり、協調性にも優れています。今回、本研究室では研究助成金の援助の下で発ガン性ヘテロサイクリックアミン (Trp-P-2) 及び発ガン物 (ENU、DMBA) がヌードマウスの口腔粘膜におよぼす影響についての実験病理学的研究を行なっております。指導教授として日中医学会の援助に対して厚くお礼を申し上げます。

研究指導者氏名

亀山洋一郎



### 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。

# 発癌性ヘテロサイクリックアミン (Trp-P-2) 及び発癌物 (ENU、DMBA) によるヌードマウスの実験的口腔腫瘍に関する研究

研究者 劉 学 講 師  
白求恩医科大学口腔医学院口腔外科  
指導者 亀山洋一郎 教 授  
愛知学院大学歯学部病理学講座

## 要旨:

本実験で胸線が欠如し、T 細胞機能欠如のある雄性ヌードマウス 4 週齢、40 匹を用い、発癌性物質 (Trp-P-2、ENU、DMBA) を舌側縁中 1 / 3 に機械的擦過を加えて、週 3 回塗布して、塗布期間が 10 週間とした。病理組織学検索: Trp-P-2 群および ENU 群では舌の上皮には前癌病変である上皮性異形成が見られた。DMBA 群では強い前癌病変である上皮性異形成が認められた。

## Key words:

Nude mouse; Carcinogenesis; Carcinogen; Tongue; Trp-P-2; ENU; DMBA.

## **Oral Tumorigenesis in Athymic Nude Mouse Tongue by Applications of DMBA, Trp-P-2 and ENU**

### **1. Purpose:**

The immune system is involved not only in defense against infections but against "spontaneously derived" aberrant cells by immune surveillance. Thus, athymic nude mice offered a new possibility as a model for testing the effects of the absence of T-cell-mediated immunity on tumor development. The present study was undertaken to examine oral tumorigenesis in athymic nude mice (Balb/c-nv/nv s/c) by applications of

Trp-P-2, ENU and DMBA.

## **2. Materials and Methods:**

Forty male athymic nude mice (Balb/c-nv/nv s/c), aged 4 weeks, were divided into five groups (groups A-E). In Group A ( 5 mice ), the acetone solution was applied three times weekly to the right lateral border of the middle third of the tongue after scratching the area with a No.2 pulp canal cleaner. The treatment was continued for 10 days. Group B ( 5 mice ) was treated in the same manner as Group A but received application of DMSO ( dimethyl sulfoxide ) instead of acetone. Groups C to E were treated as follows: Group C (10 mice ), scratching plus 0.5% Trp-P-2 ( 3-amino-1-methyl-5H-pyrido(3,4-b) indole ) in DMSO; Group D, scratching plus 0.5% ENU ( N-ethyl-N-nitrosourea ) in distilled water; Group E (10 mice ), scratching plus painting with 0.5% DMBA ( 9,10-dimethyl-1,2-benzanthracene ) in acetone. All animals were killed at the end of 10 weeks. The tongues were fixed in 10% neutral formalin, embedded in paraffin, sectioned at 5 um, and stained with hematoxin and eosin (H&E).

## **3. Results**

### **3.1. Groups A and B**

The mucosa of the tongue in the treated region gradually became rough, but no neoplastic lesions developed. The epithelium showed a slight hyperplasia with hyperkeratosis and the basement membranes were seen clearly.

### **3.2. Groups D and E**

The similar lesions were found in groups D and E. The ulceration was formed in any of the nude mice. Moderate dysplasia developed in the experimental sites. Most of the basement membranes were distinct.

### **3.3. Group E**

A localized ulcer was produced in the treated region and this ulceration

persisted until the end of the experiment. Histological examination revealed that the epithelium exhibited a severe dysplasia in which disorientation of cells, cellular pleomorphism, nuclear hyperchromatism, proliferation of basal cells, abnormal keratinization and elongation of epithelia projection were observed. The basement membranes were not distinct.

#### 4. Discussion

There has been some reports showed that applications of DMBA combined with mechanical trauma could induce carcinomas in the middle third of the lateral border of the tongues in hamsters(1-3).

In our department, Maeda & Kameyama (4) reported that carcinomas of the tongue in hamster could be produced in less than 10 weeks by excisional wounding and DMBA, and Fujita & Kameyama (5) indicated, using the same method as Maeda's, epithelial dysplasia could be induced by application of Trp-P-2 instead of DMBA.

ENU has been shown to produce tumors of many organs when administered as a single dose to adult rats (5,6), but there have no reports concerned with lingual tumor induction by application of ENU.

Engel, A.-M.(7) reported that tumor induction with a shorter time and a higher incidence in the subcutaneous tissue was seen in nude mice ( Balb/c/A/Fib/Bom ) compared with immunocompetent mice after treatment with low doses of a carcinogen-Methylcholanthrene (MCA). However, his result differed from the observation by Stutman, O.(8), who found that MCA tumors developed with the same induction time and incidence in nude mice ( CBA/H strain ) as in normal mice.

From above-mentioned studies, it was possibly predicted that the production of a high incidence lingual carcinomas in a short time could be achieved in T-cell-mediated immunodeficiency animals by applications of DMBA combined with mechanical trauma. Our results did not completely support the prediction. In the present study, Group E, received DMBA treatment, developed severe dysplasia or premalignant lesion, although the previous study showed that carcinomas of the tongue in

hamster could be produced in less than 10 weeks by excisional wounding and DMBA(4). The evidence for an immune response to developing tumors is quite definitive ( 9, 10 ), but there is not any evidence to indicate that athymic nude Balb/c-nv/nv s/c mice apparently have a lower resistance to the employed carcinogens in the present study. One of the reasons may be that different strains of nude mice could lead to different results of tumor development even if the same experimental sites and carcinogen are used ( 7,8). Both Groups C (Trp-p-2 ) and Group E ( ENU ) gave rise to moderate epithelial dysplasia. This is probably due to weaker carcinogenicity of Trp-P-2 and ENU, and the other reason may be that the induction time using Trp-P-2 and ENU as carcinogens is too short to produce carcinoma. In the groups A and B, the epithelia in the experimental site appeared slight hyperplasia with hyperkeratosis. This may be a normal response of tissue reconstruction to the mechanical trauma .

## 5. References

- (1). Fujita, K., Kaku, T., et al.: Experimental production of lingual carcinomas in hamster by local application of 9,10-dimethyl-1,2-benzanthracene. *J. Dent. Res* 52:327-332, 1973.
- (2). Marefat, T., Shkular, G.: Experimental production of lingual leukoplakia and carcinoma. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 44:578-86,1977.
- (3). Otsubo, Y., Kameyama, Y.: Ultrastructural changes of epithelium-connective tissue junction in experimental lingual tumors. *J Oral pathol* 11:159-73. 1982.
- (4). Maeda, H., Kameyama, Y.: Effect of excisional wounding on DMBA-induced hamster tongue carcinogenesis. *J Oral pathol Med* 15: 21-27, 1986.
- (5). Druckrey, H., Ivankovic, S., et al.: Teratogenic and carcinogenic effects in the offspring after single injection of ethylnitrosurea to pregnant rats. *Nature*, 210: 2378-1379, 1966.
- (6). Swenberg, J. A., et al.: Quantitative aspects of transplacental tumor



induction with ethylnitrosurea in rats. *Cancer Res.* 32: 2656-2660. 1972.

- (7). Engel, A-M., Svane, I. M. et al: Methylcholanthrene-induced sarcomas in nude mice have short induction times and relatively low levels of surface MHC class I expression. *APMIS* 104: 629-639, 1996.
- (8). Stutman, O.: Tumor development after 3-methylcholanthrene in immunologically deficient athymic-nude mice. *Science* 183: 534-536, 1974.
- (9). Klein, G. et al.: *Cancer Res.* 20: 1561, 1960.
- (10). Mikulska, Z. B. et al.: *J. Natl. Cancer Res.* 36: 29, 1966.

日本財団補助金による

1999 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—

2000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 姚 軍  
研究機関 朝日大学歯学部小児歯科講座 研究指導者 田村康夫 職名 教授  
所在地 〒501-0296 岐阜県本巣郡穂積町穂積 1851 電話 058-329-1492 内線 1492

研究テーマ エナメル芽細胞の Ca イオン動態とその調節機構

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37回日本小児歯科学会大会

内容：エナメル質形成は、分泌期と成熟期エナメル芽細胞カルシウムイオンの動態と輸送経路については、本研究は、ラット臼歯胚エナメル芽細胞を用いて、共焦点レーザー顕微鏡と蛍光指示薬 Fluo-3 でカルシウムイオン動態を半定量的に検討した。その結果、1) Ca 蛍光指示薬 Fluo-3 (エステル型) を浸透させる際に、高浸透圧溶液との混合溶液を使用することにより、共焦点レーザー顕微鏡によるエナメル芽細胞内の Ca 濃度分布のイメージングが可能となった。2) エナメル芽細胞内の Ca イオン濃度測定はできなかったが、Ca 蛍光指示薬の蛍光強度から、エナメル芽細胞内の Ca イオンは未分化期ではやや濃度は低く、分泌前期、分泌期では中程度、成熟期では濃度が高い傾向が見られた。3) 成熟期エナメル芽細胞、近心端付近と遠心端付近に高濃度の Ca イオンが交互に繰り返して見られた。

(2) 学会誌等に発表した論文 有 ・  無 (雑誌名・論文名)

### 3. 今後の研究計画

本研究は、共焦点レーザー顕微鏡によりエナメル芽細胞におけるCaの輸送と調節機構の研究の一部として、ラット第一臼歯歯胚の各発育段階におけるエナメル芽細胞のCaイオンの濃度分布の観察することができた。これらの研究結果を基にして、さらに、Caの輸送あるいはシグナル伝達に関わるカルシウム結合タンパクであるCalmodulin, Calbindin28KD, Ca-ATPaseさらにイノシトール三リン酸レセプターの局在性を免疫組織化学的により検討する予定である。

### 4. 研究指導者の意見

共焦点レーザー顕微鏡により、蛍光指示薬FLUO-3を用いて、培養化でのエナメル芽細胞内のCaイオンイメージングは国内外で初めての研究である。この結果は、エナメル芽細胞におけるカルシウムの輸送と調節機構の研究に対して、極めて良いスタートであり、この研究の今後の大きな発展を多いに期待します。

研究指導者氏名

田村康夫



### 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。

## エナメル芽細胞 Ca イオン動態とその調節機構

姚 軍

中国・陝西省西安市第二職工医院（辞職）・医師

田村康夫・朝日大学歯学部小児歯科学講座・教授

### 要旨：

Ca イオンの可視化の技術の進歩とともに、細胞内 Ca イオンの機能調節の機構が明らかになってきている。本研究は、エナメル芽細胞におけるカルシウムの輸送と調節機構の研究の一部として、共焦点レーザー顕微鏡を用いて、Ca 蛍光指示薬 FLUO-3 により、ラット第一臼歯エナメル芽細胞における Ca 濃度分布のイメージングを検索した。その結果、1) Ca 蛍光指示薬 Fluo-3（エステル型）を浸透させる際に、高浸透圧溶液との混合溶液を使用することにより、共焦点レーザー顕微鏡によるエナメル芽細胞内の Ca 濃度分布のイメージングが可能となった。2) 今回、エナメル芽細胞内の Ca イオン濃度測定はできなかったが、Ca 蛍光指示薬の蛍光強度から、エナメル芽細胞内の Ca イオンは未分化期ではやや濃度は低く、分泌前期、分泌期では中程度、成熟期では濃度が高い傾向が見られた。3) 成熟期エナメル芽細胞では隣接する乳頭層ともに高濃度の Ca イオンが観察され、石灰化中のエナメル基質にも高濃度の Ca イオンが見られた。また、これらの細胞・組織中の Ca イオン分布は一様ではなく、乳頭層とエナメル芽細胞において高濃度の Ca イオンがみられるとき、エナメル基質では Ca 濃度は低く、またその逆の濃度分布のパターンの繰り返しが観察された。未分化・分泌前期・分泌期に局在する Ca イオンは細胞の増殖・分化に関わるシグナルのセカンドメッセンジャーのほか、基質タンパク分泌という機能調節に関わることが考えられた。成熟期エナメル芽細胞では smooth-ended ameloblasts と刷子縁を持つ ruffle-ended ameloblasts との細胞集団が交互に繰り返し配列していることに基づいた結果であることが示唆された。

keywords：エナメル芽細胞， Ca イオン， 共焦点レーザー顕微鏡， Ca 蛍光指示薬

## 研究報告

### 目的：

エナメル質形成は、内エナメル上皮から分化した分泌期エナメル芽細胞がエナメル基質タンパクを分泌し、成熟期エナメル芽細胞では有機性基質の脱却と同時に大量の Ca イオンなどのミネラルが添加され、急速に石灰化が進む。エナメル質形成における Ca イオンの動態について、従来  $Ca^{45}$  を用いたエナメル芽細胞へのオートラジオグラフィーのほか、エナメル基質に対して GBHA、Alizarin-red など Ca イオン染色法により、石灰化に必要な Ca イオンの輸送に注目されてきた。最近、エナメル芽細胞内の Ca イオンは、石灰化に関わる輸送のほか、細胞内情報伝達のセカンドメッセンジャーとして、細胞の増殖・分化、機能調節に関わっていることが示唆されてきている。

近年、共焦点レーザー顕微鏡により、筋細胞、神経細胞などにおいて Ca 蛍光指示薬を用いて、細胞生存下での細胞内 Ca イオン濃度分布および濃度測定が可能になってきている。またこの手法により、細胞内 Ca イオン動態とその調節機構がより詳細にされてきている。

本研究は、エナメル芽細胞における Ca イオンの細胞内輸送と細胞機能調節機構の研究の第一段階として、生後 5, 7, 10 日齢ラットの上顎第一臼歯歯胚を用いて、共焦点レーザー顕微鏡によりエナメル芽細胞における Ca イオン濃度分布を検索すると目的にした。

### 方法：

#### A. 実験材料

##### 1) ラット臼歯歯胚

生後 5, 7, 10 日齢のラット上顎第一臼歯歯胚をそれぞれ摘出し、矢状方向で左右均等に 2 分割した。

##### 2) 器具・機械

- ・共焦点レーザー顕微鏡 (MRC-1024 ; BIO-RAD 社)
- ・自作チャンバー

##### 3) Ca 指示薬の調整

1) ジメチロスルホキシド (Nacalai tesque 社) で FLUO-3 を溶解し、 $40\mu\text{M}$  FLUO-3 (エステル型, 蛍光指示薬 ; Molecular probes 社) と  $2\mu\text{M}$  Pluronic F-127 (高浸透圧剤 ; Molecular probes 社) を混合し、Ca 指示薬 5ml を作成。

2) PEG (Molecular probes 社) を熱湯で溶解し、HBSS (Hanks Buffer Saline Solution;

GibcoBRL社) 5ml を加える。

3) Ca 指示薬がエナメル芽細胞内への浸透性を高めるため、1) と 2) 液を混合して、高浸透圧性蛍光指示薬を作成。振動後、37℃で保温する。

## B. 実験方法

1) 2 分割した歯胚を、40 $\mu$ M FLUO-3 溶液に浸漬し、37℃で 15 min 静置。

2) 低浸透圧溶液 (HBSS : 蒸留水 = 6 : 4) に、37℃で 10min 静置。

3) 細胞内浸透圧回復のため、HBSS へ 10min 浸漬。

4) 断面を上にして、HBSS で満たした自作チャンバー内に装着。

5) 488nm の蛍光で観察し位置を確認後、Power: 3%, Iris: 2.3, Gain: 1124 で走査する。

6) 画像観察終了後、Z 軸方向 (上下) に 5 $\mu$ m 毎に、共焦点面を変化させて、画像を採取 (後処理として重ね合わせ画像。ラット断頭から観察終了まで一時間半に限定した)。

7) OS/2 Lasershape で画像を分析する。

## 結果：

1. ラット臼歯に Ca 蛍光指示薬 Fluo-3 (エステル型) を浸透させる際に、高浸透圧溶液との混合溶液を使用することにより、共焦点レーザー顕微鏡によるエナメル芽細胞内の Ca 濃度分布のイメージングが可能となった。

2. 今回、エナメル芽細胞内の Ca イオン濃度測定はできなかったが、Ca 蛍光指示薬の蛍光強度から、エナメル芽細胞内の Ca イオンは未分化期ではやや濃度は低く、分泌前期、分泌期では中程度、成熟期では濃度が高い傾向が見られた。

3. 成熟期エナメル芽細胞では隣接する乳頭層ともに高濃度の Ca イオンが観察され、石灰化中のエナメル基質にも高濃度の Ca イオンが見られた。また、これらの細胞・組織中の Ca イオン分布は一様ではなく、乳頭層とエナメル芽細胞において高濃度の Ca イオンがみられるとき、エナメル基質では Ca 濃度は低く、またその逆の濃度分布のパターンの繰り返しが観察された。

## 考察：

エナメル質形成における Ca イオンの動態については、従来より Ca<sup>45</sup> を用いてのオートラジオグラフィ法により検討されてきた。Bawden らはエナメル芽細胞内の Ca シグナル伝達に関わる G プロテイン共役型レセプター、PI レスポンス、

PKC $\alpha$  の局在性を報告し、エナメル芽細胞内の Ca イオンのシグナル伝達を示唆してきている。最近、神経細胞、リンパ球、心筋、肝細胞などにおける Ca イメージングにより細胞の機能調節が詳細にされている。本研究では、医学各分野の Ca イメージング研究を参考にして、Ca 蛍光指示薬 FLUO-3（エステル型）を用いて、ラット臼歯エナメル芽細胞における Ca イメージングを実現した。

本研究では、エナメル芽細胞内の Ca イオン濃度測定はできなかったが、Ca 蛍光指示薬の蛍光強度から、エナメル芽細胞内の Ca イオンは未分化期ではやや濃度は低く、分泌前期、分泌期では中程度、成熟期では濃度が高い傾向が見られた。エナメル質石灰化において大量の Ca イオンを必要とする成熟期では高濃度の Ca イオンがみられたことは、輸送としての Ca イオンが反映された結果と考えられる。一方、未分化・分泌前期における Ca イオンは細胞の増殖・分化に関わるシグナルのセカンドメッセンジャーとしての Ca イオンの局在が示唆される。分泌期エナメル芽細胞における Ca イオンは、基質タンパク分泌という重要な機能調節に関わるセカンドメッセンジャーであることが示唆された。また、この時期わずかな石灰化を伴うことから、Ca イオン輸送にも関わるということが考えられる。

成熟期のエナメル基質内に見られた Ca イオンは、石灰化中の遊離の Ca イオンが可視化された結果と理解される。成熟期エナメル芽細胞には細胞の遠心端が平坦な smooth-ended ameloblasts と刷子縁を持つ ruffle-ended ameloblasts との細胞集団が交互に繰り返し配列している。従来より、ruffle-ended ameloblasts では大量の Ca イオンがその刷子縁部から押し出されることが示唆されている。成熟期エナメル芽細胞と隣接する乳頭層との細胞集団と、石灰化中のエナメル基質の高濃度 Ca イオンの集団が一様ではなく、乳頭層とエナメル芽細胞において高濃度の Ca イオンがみられるとき、エナメル基質では Ca 濃度は低く、またその逆の濃度分布のパターンの繰り返しを観察された。これらの所見は smooth-ended ameloblasts と刷子縁を持つ ruffle-ended ameloblasts との細胞集団が交互に繰り返し配列していることに基づいた結果であることが考えられた。

本研究において、エナメル芽細胞における Ca イオンの輸送と調節機構の研究の一部として、Ca イオンイメージングを実現した。今後、その調節機構に関わるイノシトール 3 リン酸レセプターおよび Ca シグナル伝達に関わる Ca 結合タンパク（Calmodulin, Calbindin, Ca-ATPase）の局在について、追加検討予定である。

参考文献：

- 1：須田立雄、小澤英浩、高橋栄明。骨の科学。
- 2：小島 至。カルシウムのシグナル伝達機構。
- 3：Bawden,J.M.:Anat Rec,224:226.1998.
- 4：Nagai,N.,and Frank ,R.M.:Transfert du  $^{45}\text{Ca}$  par autoradiographie en microscopie electronique au cours de Pame logenese, Calcif Tiss Res 19:211-221,1975.
- 5：Bawden and Alf Wennberg.:In Vitro Study of Cellular Influence on  $^{45}\text{Ca}$  Uptake in Developing Rat Enamel,J Dent Res March Vol.56 No.3 313-319,1977.
- 6：川原茂敬、井上 剛、桐野 豊。神経細胞におけるカルシウムイメージング。細胞 30 (1),7-10 1998.
- 7：古野忠秀、中西 守。リンパ球におけるカルシウムイメージング。細胞 30 (1),11-14 1998.
- 8：横山慶一、松下 努、小山田正人、高松哲朗。心筋におけるカルシウム。細胞 30 (1),15-18 1998.
- 9：北村庸雄、渡辺純夫、佐藤信紘。肝細胞におけるカルシウムイメージング。細胞 30 (1),19-22 1998.
- 10：古家喜四夫、細胞間情報伝達を担う Ca、蛋白質核酸酵素 Vol43,No121547-54.
- 11：武藤 彩、御子柴克彦、細胞分裂に伴う Ca 動態、蛋白質核酸酵素 。 Vol43.No121829-33.



日本財団補助金による

1999 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—

2000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 黄新恩  
研究機関 名古屋市立大学公衆衛生学教室 研究指導者 徳留信寛 職名 教授  
所在地 〒467-8601 名古屋市瑞穂区瑞穂町11-1 電話 052-853-8176 内線

研究テーマ 胃が予防に於ける生活習慣要因

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)

International Journal of Cancer

Comparison of lifestyle and risk factors among Japanese with or without a gastric cancer family history

### 3. 今後の研究計画

今後の研究テーマ：大腸腫瘍摘除後の再発予防に対する食生活介入試験

計画：これまでに某大学で大腸腫瘍摘除を受けた患者を対象にして、臨床試験への参加のインフォームドコンセントを入手し、無作為に実験群・対照群に割付を行い、大腸腫瘍再発予防のための食習慣変容と健康食品摂取介入を実施している。すなわち、対照群には総脂肪摂取を抑制し、実験群には総脂肪摂取の抑制に加えて、1) n-6 多価不飽和脂肪酸 (PUFA) 摂取抑制、2) n-3 PUFA 摂取勧奨の勧奨を行い、n-6 PUFA/n-3 PUFA 比を4~5から2~2.5へ下げることがを目標とする。2~3年後の腫瘍再発をエンドポイントとして、実験群と対照群の間の発生率を比較する。定期的に食生活調査・健康食品摂取調査および血中脂肪酸や抗酸化物質の分析を行って、コンプライアンスをチェックする。本年度中に症例群 100 人、対照群 100 人のエントリーを目指す。


### 4. 研究指導者の意見

昨年、貴財団からご支援をいただき、黄君は研究に専念することができました。すでに「家族歴以外の胃がん危険因子における比較分析」という論文を国際学術雑誌に報告した、さらに「胃がん予後に関する生活習慣要因」という論文も投稿中であります。

私費留学生の黄君にとって、貴財団からの経済的援助は非常に有り難くかったものと信じます。

今回の貴財団のご支援を心から感謝致します。

研究指導者氏名

付留信 

### 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。

研究テーマ  
生活習慣と胃がんの予防

研究者氏名  
黄新恩  
中国での所属・役職  
江蘇省腫瘤醫院、腫瘤防治研究所・主治医師  
日本での指導者氏名・所属・役職  
徳留信寛・名古屋市立大学医学研究科・教授

要旨 (日本語)

胃がん家族歴のあるなしにかかわらず胃がんの特定の危険因子を発見するために、同時に2つの分析疫学研究が行われた。まず、胃がん外来患者と非癌外来患者に対して胃がん家族歴のあるなし、それぞれの行動・生活習慣を比較した。胃がん家族歴のある人はない人より初診に消化器科を受診、又は胃がん検診を受ける割合が統計学的有意に高く、一方、飲酒・喫煙及び大部分な食生活習慣は統計学的差が示されなかった。さらに、全外来患者を胃がん家族歴のあるなしの二群に分けて、それぞれの症例・対照研究を行った。2つの症例・対照研究で同時に、消化器科を初診療科として選択した場合と飲酒・喫煙場合はオッズが統計学的有意に増加し、自分の意志で受診した場合と頻繁に生野菜と人参を摂取する場合はオッズが減少する。2つの症例・対照研究から得た危険因子は顕著的な差がなく、したがって、胃がんの予防対策は胃がん家族歴のあるなしにかかわらず同様の方法で推進することが示唆された。

KEY WORDS

生活習慣、胃がん

研究報告

目的  
↓  
方法  
↓  
結果  
↓  
考察  
↓  
参考文献

## 研究報告

目的：

Although it is gradually clarified that dietary, drinking and smoking habits attribute to the onset of gastric cancer, little is known whether the prognosis of gastric cancer is also associated with these factors. In order to examine this hypothesis, a prognostic analysis was conducted by using data from Aichi Cancer Center Research Institute and Hospital.

方法：

From January 1988 to December 1994, information of 877 gastric cancer patients (578 male, 299 female) regarding habitual smoking and drinking, food consumption, histological grade and clinical stage of tumor, as well as follow-up results was collected. Survival statuses of all patients were followed up till December 1998. The survival function was estimated by the Kaplan-Meier method. Proportional hazard analysis was used to test the effect of each lifestyle item on gastric cancer death.

結果：

After controlling age, gender, histological grade and stage of disease, hazard ratios were calculated. The ratios of consuming raw vegetables (0.74, 95% CI: 0.56-0.98), tofu (0.65, 95% CI: 0.42-0.99) and chicken meat (0.61, 95% CI: 0.39-0.95) for more than 3 times/week were significantly decreased. However, the risk ratio were 2.53 (95% CI=1.22-5.29) for habitual smokers, an inverse dose-response relationship was also found between ever smoking and gastric cancer patients' survival. Therefore, It was suggested from this study that frequent intake of raw vegetables and tofu were favorable, while habitual smoking was a risk prognostic factor for gastric cancer.

考察：

Because dietary, drinking and smoking habits were well known as cancer risks, it was reasonable to postulate that these factors also could affect the progression of cancer. Over the

past two decades, studies on cancer prognosis and these lifestyle factors had been conducted, but mainly focused on cancer of breast (10-26), laryngeal (27), lung (28), oral (26,29), as well as malignant epithelial tumors in the upper digestive tract (30). These results convinced that frequent intake of vegetable and fruit were favorable, while habitual smoking and high-fat diet was a harmful prognostic factor, which was consistent with most etiological investigations. But few analyses concerned the lifestyle determinant on the prognosis of gastric cancer. Perhaps there were unexpected difficulties or a technical limitation in performing this kind of studies on gastric cancer.

First might be the inability to characterize antineoplastic treatment with any greater detail than surgery, radiation therapy, chemotherapy, or combined therapy. But it seemed very unlikely that a lack of these variables biased the main results, because practical choice of treatment was overwhelmingly based on clinical stage of tumor. To avoid statistical over adjustment, it was a proper choice to put only tumor stage, rather than two strongly related variables simultaneously into Cox regression model. Moreover, radical gastrectomy remained the only chance of cure for early staged gastric cancer, different adjuvant chemotherapy had not been presenting prognostic benefits by controlled clinical trials (31). Due to the same reason, few of our cases received adjuvant chemotherapy after radical gastrectomy. For later stage, high-dose 5-fluorouracil (5-FU) was still a key regimen that serving as the basis of third generation chemotherapy, but the effect still confines to palliation; the long-term survival result remained unsatisfactory (32). In terms of radiotherapy, which was not a routine choice for gastric adenocarcinoma in ACCH, no cases received this treatment, so it would not bias our calculations.

Second might be a lack of later information on lifestyle. All lifestyle information was collected before cancer diagnoses in order to keep recall bias lower, so it was not known if or

how the dietary habits would have been changed afterwards. Although most of our cases were more than 50, their dietary habits did not tend to be changed, it was reasonable to postulate that part of cases would stop smoking or limit their tobacco consumption after the diagnosis of gastric cancer. Thus, it was possible that the amount of tobacco smoked had been estimated imprecisely. This might cause an underestimated risk. Under this consideration, we must put an indispensable premise in our study: dietary habits prior to the diagnosis of gastric cancer, to avoid conceptual misleading.

Cases in our study mostly came from Chubu district of Japan. Their overall survival was comparable to those in other area of Japan (33), however obviously better than reports from European or American studies (34). Some researches suggested that relatively younger aged patients, the unique early diagnostic system and wide conduction of N2, N3 tumor resection caused this survival difference (35). The high resection rate would lead to longer life span of the case series. This might cause a bias, considering that no habitual smoking or frequent intake of raw vegetables might contribute to decreased death rate from other chronic diseases. So, to avoid affecting the main results, events from non-cancer deaths was excluded from this study.

After taking into account the relevant role of clinical and pathological factors, one of the major findings of this study was that, habitual smoking had prognostic significance on gastric cancer patient's survival. An attempt to explain this observed difference might involve the effect of cigarette smoking on immune system. Cigarette smoking was believed to correlate with unhealthy nutritional intake (36), causing immunosuppression and impairment of patient's ability to destroy cancer cells. Long-term tobacco exposure studies also indicated that immunosuppressive would develop (37): decreased lymphocyte proliferation in response to the mitogens (PHA or LPS) (38), and T cell anergy (39) suggested compromise of cell function; antibody production could also be suppressed caused

a fall of IgA, IgG, IgM and lysozyme concentrations (40).

A cohort study from Japan indicated that a dose-response relationship existed between cigarette smoking and mortality rate of pancreatic cancer (41). But the association with gastric cancer was not revealed in a prognostic study conducted in the United States (26).

In this study, frequent intake of raw vegetables was suggested with improved survival of gastric cancer, by both survival function test and proportional hazard analysis. It could not be denied that frequent intake of vegetables or fruit is correlated with high socioeconomic status, which was a favorable prognostic factor for gastric cancer (7). However, there is no tremendous rich-poor gap in Japan, the majority of Japanese are well-known middle-class. We believed this would not confuse our main results.

It has been proved that micronutrients with bioactivity are abundant in raw vegetables including carotenoids, vitamin C, dietary fiber, vitamin E and selenium. Experimental systems containing these micronutrients appeared to be able to reduce DNA damage and mutagenesis (42). Besides of the direct anti-cancer effects, these micronutrients also reinforced the immunological function, e.g. carotenoids had been shown to influence immune responsiveness through enhancement of T and B lymphocyte proliferation and improvement of cellular communication (43). Increased immunocompetence would decrease the likelihood of complications and death due to infectious agents.

Most interesting finding in this study was the effect of frequent intake of tofu on decreased HR for gastric cancer death. Etiological researches suggested that frequent consumption of soy products might contribute to the relatively low rates of breast, colon, and prostate cancers in China and Japan (44). Besides this, Japanese (2) and Korean (45) study also showed decreased risk of tofu for gastric cancer. One biologically plausible explanation was that soybean products provided a unique dietary source of isoflavone including genistein.

Isoflavone exhibited a number of anti-metastasis activities, including a specific inhibition of DNA topoisomerases (46-47) and protein tyrosine kinases (48-49), regulation of cell cycle progression (50), inhibition of cell proliferation (51-52), antiangiogenic activity (53) and inducement of apoptosis (54-55). Recent *vivo* mice test revealed that dietary supplementation of soybean protein isolate reduced pulmonary metastasis of B16BL6 cells and inhibited the growth of tumors that developed in lung (56).

From our results, difficult to interpret was the protective effect by meat, especially chicken meat. This might be tentatively considered as a surrogate of a good nutritional status. With the same reason, a protective effect of meat had also been found in esophageal cancer (57) and laryngeal cancer (27).

In conclusion, the present study suggested that dietary, drinking and smoking habits prior to the diagnosis played an important role in the prognosis of gastric cancer; frequent consumption of raw vegetable or tofu before diagnosis was a favorable, while habitual smoking was a harmful prognostic factor for gastric cancer. A potential way of improving gastric cancer survival might be achieved by a proper modification of lifestyle.

#### 参考文献：

1. Tajima K, Tominaga S. Dietary habits and gastro-intestinal cancers: a comparative case-control study of stomach and large intestinal cancers in Nagoya, Japan. *Jpn.J. Cancer Res* **76**,706-716,1985.
2. Inoue M, Tajima K, Hirose K, Kuroishi T, Gao CM. Life-style and subsite of gastric cancer - joint effect of smoking and drinking habits. *Int. J. Cancer* **56**,494-499, 1994.
3. Huang XE, Tajima K, Hamajima N, Inoue M, Takezaki T, et al. Effect of lifestyle in the risk of subsite-specific gastric cancer in



- those with and without family history. *J Epidemiol* **9**,40-45, 1999.
4. Kodera Y, Yamamura Y, Torii A, Uesaka K, Hirai T, et al.  
A  
comparison between the UICC stage classification and the 12<sup>th</sup> edition of the Japanese general rules for gastric cancer study. *Scand J Gastroenterol* **31**,476-480, 1996.
5. Papatestas AE, Mulvihill M, Josi C, Ioannovich J, Lesnik J, et al. Parity and prognosis in breast cancer. *Cancer* **45**, 191-194. 1980.
6. Koch M, McPherson TA, Egedahl RD. Effect of sex and reproductive history on the survival of patients with colorectal cancer. *J Chron Dis* **35**, 69-72, 1982.
7. Fontana V, Decensi A, Orengo MA, Parodi S, Torrissi R, et al. Socioeconomic status and survival of gastric cancer patients. *Eur J Cancer* **34**,537-542, 1998.
8. Japanese Research Society for Gastric Cancer (ed):  
" Japanese Classification of Gastric Carcinoma." Tokyo: Kanehara Shuppan, 1995.
9. SAS Institute Inc. SAS/STAT Users Guide, Version 5, Volume 2, Cary, NC: SAS Institute Inc., 1071-1126. 1990
10. Saxe GA, Rock CL, Wicha MS, Schottenfeld D. Diet and risk for breast cancer recurrence and survival. *Breast Cancer Res Treat* **53**,241-253, 1999.
11. Hebert JR, Hurley TG, Ma Y. The effect of dietary exposures on recurrence and mortality in early stage breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* **51**,17-28, 1998.
12. Nakachi K, Suemasu K, Suga K, Takeo T, Imai K, et al. influence of drinking green tea on breast cancer malignancy among Japanese patients. *Jpn J Cancer Res* **89**,254-261, 1998
13. Meng L, Maskarinec G, Wilkens L. Ethnic differences and factors related to breast cancer survival in Hawaii. *Int J Epidemiol* **26**, 1151-1158,1997.
14. Jain M, Miller AB. Tumor characteristics and survival of breast cancer patients in relation to premorbid diet

- and body size. *Breast Cancer Res Treat* **42**,43-55,1997.
15. Stoll BA. Diet and exercise regimens to improve breast carcinoma prognosis. *Cancer* **78**,2465-2470,1996.
  16. Jain M, Miller AB, To T. Premorbid diet and the prognosis of women with breast cancer. *J Natl Cancer Inst* **86**,1390-1397,1994.
  17. Ingram D. Diet and subsequent survival in women with breast cancer. *Br J Cancer* **69**,592-595,1994.
  18. Holm LE, Nordevang E, Hjalmar ML, Lidbrink E, Callmer E, et al. Treatment failure and dietary habits in women with breast cancer. *J Natl Cancer Inst* **85**,32-6,1993.
  19. Kyogoku S, Hirohata T, Nomura Y, Shigematsu T, Takeshita S, et al. Diet and prognosis of breast cancer. *Nutr Cancer* **17**,271-277,1992.
  20. Sopotsinskaia EB, Balitskii KP, Tarutinov VI, Zhukova VM, Semenchuk DD, et al. Experience with the use of a low-calorie diet in breast cancer patients to prevent metastasis. *Vopr Onkol* **38**,592-599,1992.
  21. Holm LE, Callmer E, Hjalmar ML, Lidbrink E, Nilsson B, et al. Dietary habits and prognostic factors in breast cancer. *J Natl Cancer Inst* **81**,1218-1223,1989.
  22. Verreault R, Brisson J, Deschenes L, Naud F, Meyer F, et al. Dietary fat in relation to prognostic indicators in breast cancer. *J Natl Cancer Inst* **80**,819-825,1988.
  23. Newman SC, Miller AB, Howe GR. A study of the effect of weight and dietary fat on breast cancer survival time. *Am J Epidemiol* **123**,767-774,1986.
  24. Daniell HW, Tam E, Filice A. Large axillary metastases in obese women and smokers with breast cancer-An influence by host factors on early tumor behavior. *Breast Cancer Res Treat* **25**,193-201,1993.
  25. Daniell HW. Increased lymph node metastases at mastectomy for breast cancer associated with host obesity, cigarettes smoking, age and large tumor size. *Cancer* **62**,429-435,1988.
  26. Yu GP, Ostroff JS, Zhang ZF, Tang J, Schantz SP.

- Smoking history and cancer patient survival: a hospital cancer registry study. *Cancer Detect Prev* **21**, 497-509, 1997.
27. Crosignani P, Russo A, Tagliabue G, Berrino F. Tobacco and diet as determinants of survival in male laryngeal cancer patients. *Int J Cancer* **65**, 308-313, 1996.
  28. Goodman MT, Kolonel LN, Wilkens LR, Yoshizawa CN, Le Marchand L, Hankin JH. Dietary factors in lung cancer prognosis. *Eur J Cancer* **28**, 495-501, 1992.
  29. Boyle P, Macfarlane GJ, Blot WJ, Chiesa F, Lefebvre JL, Azul AM, et al. European School of Oncology Advisory report to the European Commission for the Europe Against Cancer Programme: Oral carcinogenesis in Europe. *Eur J Cancer* **31B**, 75-85, 1995.
  30. Freng A, Daae LN, Engeland A, Norum KR, Sander J, et al. Malignant epithelial tumours in the upper digestive tract: a dietary and socio-medical case-control and survival study. *Eur J Clin Nutr* **52**, 271-278, 1998.
  31. Fuches CS, Mayer RJ. Gastric carcinoma. *N Engl J Med* **333**, 32-41, 1995.
  32. Wils J. Treatment of gastric cancer. *Curr Opin Oncol* **10**, 357-61, 1998.
  33. Fujii K, Isozaki H, Okajima K, Nomura E, Niki M, et al. Clinical evaluation of lymph node metastasis in Gastric Cancer defined by the fifth edition of the TNM classification in comparison with the Japanese system. *Br J Surg* **86**, 685-689, 1999.
  34. Songun I, van de Velde CJ. Can surgical treatment results in gastric cancer be improved? *oncologist* **1(1&2)**, 36-40, 1996.
  35. Sano T. Differences between Japan and the west in treatment strategy for gastrointestinal cancer- Gastric cancer-. *Jpn J Cancer Chemother* **25**, 1118-1122, 1998.
  36. Dallongeville J, Marecaux N, Fruchart JC, Amouyel P. Cigarette smoking is associated with unhealthy patterns of nutrient intake: a meta-analysis. *J Nutr*; **128**, 1450-1457, 1998.

37. Sopori ML, Kozak W. Immunomodulatory effects of cigarette smoke. *J Neuroimmunol* **83**,148-156,1998.
38. Johnson JD, Houchens DP, Kluwe WM, Craig DK, Fisher GL. Effects of mainstream and environmental tobacco smoke on the immune system in animals and humans: a review. *Crit Rev Toxicol* **20**,369-395,1990.
39. Geng Y, Savage SM, Razanai-Boroujerdi S, Sopori ML. Effects of nicotine on the immune response. II. Chronic nicotine treatment induces T cell anergy. *J Immunol* **156**,2384-2390,1996.
40. Moszczynski P, Moszczynski P Jr, Slowinski S. Indicators of humoral immunity and acute phase reaction in cigarette smokers. *Pol Arch Med Wewn* **83**, 194-199,1990.
41. Akiba S, Hirayama T. Cigarette smoking and cancer mortality risk in Japanese men and women results from reanalysis of the six-prefecture cohort study data. *Environ Health Perspect* **87**,19-26,1990.
42. Schorah CJ., Micronutrients. vitamins, and cancer risk. *Vitam Horm* **57**,1-23,1999.
43. Bendich A. Carotenoids and the immune response. *J Nutr* **119**,112-115,1989.
44. Messina MJ, Persky V, Setchell KD, Barnes S. Soy intake and cancer risk: a review of the in vitro and in vivo data. *Nutr Cancer* **21**,113-131,1994.
45. Ahn YO. Diet and stomach cancer in Korea. *Int J Cancer Suppl* **10**,7-9,1997.
46. Peterson G. Evaluation of the biochemical targets of genistein in tumor cells. *J Nutr* **125**,784s-789s,1995.
47. Feller SM, Wong TW. Identification and characterization of a cytosolic protein tyrosine kinase of HeLa cells. *Biochemistry* **31**,3044-3051,1992.
48. Okura A, Arakawa H, Oka H, Yoshinai T, Monden,Y. Effects of genistein on topoisomerase activity and on the growth of [Val 12] ha-ras-transformed NIH 3T3 cells. *Biochem Biophys Res Commun* **157**,183-189,1988.
49. Markovits J, Linassier C, Fosse P, Couprie J, Pierre J, et

- al. Inhibitory effects of the tyrosine kinase inhibitor genistein on mammalian DNA topoisomerase II. *Cancer Res* **49**, 5111-5117, 1989.
50. Kroemer G, Petit P, Zamzami N, Vayssiere JL, Mignotte B. The biochemistry of programmed cell death. *FASEB J* **9**, 1277-1287, 1995.
51. Barnes S, Peterson TG. Biochemical targets of the isoflavone genistein in tumor cell lines. *Proc Soc Exp Biol Med* **208**, 103-108, 1995.
52. Peterson G, Barnes S. Isoflavones inhibit the growth of human prostate cancer cell lines without inhibiting epidermal growth factor receptor autophosphorylation. *Prostate* **22**, 335-345, 1993.
53. Fotsis T, Pepper M, Adlercreutz H, Fleischmann G, Hase T, Montesano R, et al. Genistein, a dietary-derived inhibitor of *in vitro* angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* **90**, 2690-2694, 1993.
54. Matsukawa Y, Marui N, Sakai T, Satomi Y, Yoshida M, et al. Genistein arrests cell cycle progression at G<sub>2</sub>-M. *Cancer Res* **53**, 1328-31, 1997.
55. Hoffman B, Liebermann DA. Molecular controls of apoptosis: differentiation/growth arrest primary response genes, proto-oncogenes, and tumor suppressor genes as positive and negative modulators. *Oncogene* **9**, 1807-1812, 1994.
56. Yan L, Yee JA, McGuire MH, Graef GL. Effect of dietary supplementation of soybeans on experimental metastasis of melanoma cells in mice. *Nutr Cancer* **29**, 1-6, 1997.
57. Tuyns AJ, Riboli E, Doornbos G, Pequignot G. Diet and esophageal cancer in Calvados (France). *Nutr Cancer* **9**, 81-92, 1987.

日本財団補助金による

1999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—

2000年3月4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 陳翠萍  
研究機関 高山医科薬科大学 研究指導者 横澤隆子 職名 助教  
所在地 〒930-0194 富山市砂谷2630 電話 076-4342281 内線 7631

研究テーマ フリーラジカル由来腎障害モデルを用いた地楡の検討

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16回和漢医薬学会大会

フリーラジカル由来腎障害モデルを用いた地楡の検討

地楡は、バラ科植物ワレモコウ *Sanguisorba officinalis* L. の根である。中国では止血、収斂薬として用いられている。本研究では、フリーラジカルが関与する腎障害モデルを用い、地楡の影響を検討した。その結果、地楡エキスは  $O_2$ 、 $NO$  とのフリーラジカル消去作用を介して、腎機能障害の改善に寄与していることが示唆された。

(2) 学会誌等に発表した論文  無 (雑誌名・論文名)

1) Protective effect of *Sanguisorbae Radix* against apoptosis and function of renal tissues subjected to ischemia-reperfusion.  
*Journal of Traditional Medicines* 16, 97-101, (1999).


2) Beneficial Effects of *Sanguisorbae Radix* in Renal Dysfunction Caused by Endotoxin in Vivo.  
*Biol. Pharm. Bull.* 22 (12), 1327-1330 (1999).

### 3. 今後の研究計画

いままで、in vitro と in vivo の実験系において、フリーラジカル惹起する腎障害モデルを用い、地榆エキスの効果を検討していた。今後、臨床的腎病態に対して、地榆の腎機能の改善作用を調べ、臨床に置いて、腎疾患の予防、ならびに治療薬の開発を目ざして実験を続けるつもりだ。

### 4. 研究指導者の意見

陳翠萍さんは1993年に来日以來、フリーラジカルの腎疾患に及ぼす影響と抗酸化作用について精力的に研究を行ない、すでに10編以上の原著論文を發表している。また貴財団より供与された研究費によって、日本ではほとんど知られていないが、中国では止血等によく用いられている地榆の新しい作用を実験的に証明した。彼女の真摯な態度こそ将来、日中両国のかけ橋となる研究者になるものと確信している。

研究指導者氏名 横澤 隆子  横澤 隆子

### 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。

## 腎虚血-再灌流、リポポリサッカライド (LPS) による 腎機能の障害における地榆の役割

陳 翠萍 中国遼寧中医学院 講師

指導教官 服部 征雄 富山医科薬科大学和漢薬研究所 教授

横澤 隆子 富山医科薬科大学和漢薬研究所 助教授

### 要 旨

地榆は、*Sanguisorba officinalis* L. ウレモエウ及びその変種の根である。中国では止血、収斂薬として用いられている。私たちの研究グラフは *in vitro* の実験系で、DPPH、 $O_2^-$ 、NO などのフリーラジカルに対し、地榆エキスが強い消去活性を示すことを明らかにしてきた。一方、フリーラジカルお主に活性酸素、NO は腎疾患の発症、進展に密接に関与していることが報告され、特に最近、NO と  $O_2^-$  が反応して産生した peroxynitrite は強い細胞毒性としてを有することが注目されている。

本研究では、 $O_2^-$ 、NO が関与する腎障害モデルを調製作成し、地榆の影響を検討した。まず、腎虚血 60 分間、再灌流 24 時間施したラットでは、血清中の尿素窒素、Cr レベルが著しく上昇していたが、地榆エキスを前もって 30 日間経口投与した群ではこれら値が著しく低下していた。また、虚血-再灌流を施した腎臓では、明瞭な DNA 断片化をラダーを認め、DNA 断片率は正常群より有意に高値を示していたが、地榆エキス処理群では、DNA 断片化を軽減していた。次に、LPS (5 mg/kg 体重) を注射したラット血清中の尿素窒素、Cr レベルも増加し、NOx も著しく上昇していた。これに対し、地榆エキス投与群では有意に低下していた。また、腎組織中の inducible NO synthase 活性も地榆エキス投与群では抑制していた。

これら結果より、地榆エキスは、 $O_2^-$ 、NO 消去作用を介して、腎機能の障害の改善に寄与していることが示された。

Keyword: *Sanguisorbae Radix*,  $O_2^-$ , NO, renal function.

### [Purpose]

Reactive free radicals are important mediators in initiating and aggravating renal damage in acute renal failure<sup>[1]</sup>. The most related free radical species are superoxide, hydrogen peroxide, hydroxyl radical and nitric oxide. Recently, a



more cytotoxic radical peroxynitrite which is formed by the reaction between nitric oxide and superoxide has been suggested as a major factor in mediating the tissue injury of oxidative stress<sup>[2]</sup>.

Antioxidants and scavengers of free radicals have been considered as therapeutical interventions on prevention and alleviation of organ damage. Synthetic antioxidants demonstrated the efficiency, but they have a limitation in clinical application because of their toxicity, side effect or less selectivity<sup>[3,4]</sup>. Seeking the natural antioxidant and free radical-scavengers has drawn increasing interest in recent years.

During the process of systematic screening of crude drugs with free radical-scavenging effect, we found that *Sanguisorbae Radix* extract, which contains a large amount of tannins as its major constituents, has a strong inhibitory effect against  $O_2^-$  and NO generation *in vitro*<sup>[5]</sup>. We asked whether or not it has the same effect *in vivo* and thus exerts protection to organs against free radical injury. We hence conducted systematic studies in several animal models.

#### [Material and Method]

Preparation of extract from *Sanguisorbae Radix*. The roots of *Sanguisorbae Radix* (*Sanguisorba officinalis* L.), grown in China and supplied by Uchida Wakan-yaku Co., Ltd., Tokyo, Japan, were finely powdered and extracted with distilled water at 100°C for 1 h (roots : water=1 : 10, w/v). After removal of the insolubles by filtration, the filtrate was concentrated under reduced pressure and then lyophilized to yield a brown residue. The yield of the extract was 17.4% by weight of the original material.

#### Ischemia-reperfused experiment

(1) Animal and Treatment. Male LWH:Wistar rats with a body weight of 125-130 g were purchased from Shizuoka Agricultural Cooperative Association for Laboratory Animals (Hamamatsu, Japan). They were kept in wire-bottomed cages under a conventional lighting regimen with a dark night. The room temperature (about 25°C) and humidity (about 60%) were controlled automatically. Laboratory pellet chow (CLEA Japan Inc., Tokyo, Japan;

comprising 24.0% protein, 3.5% lipid and 60.5% carbohydrate) and water were given *ad libitum*. Following several days of adaptation, the animals were divided into 4 groups - a normal, a control, and two treatment groups - avoiding any intergroup difference in body weight. The normal and control groups were given water, while the others were given *Sanguisorbae Radix* extract orally at a dose of 100 or 200 mg/kg body weight/day for 30 consecutive days. After induction of anesthesia by intraperitoneal administration of sodium pentobarbital 50 mg/kg body weight, bilateral flank incisions were made and the renal arteries were exposed. Bilateral renal artery occlusion was then carried out for 60 min using a nontraumatic vascular clamp. Following release of the occlusion, the abdomen was sutured, and the animal was returned to the cage. At 24 h after reperfusion, blood samples were obtained by cardiac puncture under anesthesia, and the serum was separated immediately by centrifugation. The kidneys were subsequently extirpated from each rat following renal perfusion through the renal artery with ice-cold physiological saline. The tissues were quickly frozen and kept at -80°C until analysis. Five rats were used for each experimental group.

(2) Analysis of DNA fragmentation. According to the method of Katoh,<sup>[6]</sup> the kidney was homogenized and lysed in a cold lysis buffer (10 mM Tris-HCl, 5 mM disodium EDTA, and 0.5% Triton X-100, pH 8.0) for 10 min at 4°C. The DNA was sequentially extracted two times with half volumes of phenol/chloroform and incubated at 55°C for 10 min. After centrifugation at 3,000 rpm for 20 min, the upper layer was incubated with 2 µl proteinase K (20 mg/ml) at 37°C for 60 min followed by incubation with 2 µl ribonuclease (20 mg/ml) at 37°C for 60 min. The DNA was precipitated by adding 0.1 volume of 10 M ammonium acetate and 2.5 volumes of 100% ethanol and maintained at -20°C overnight. DNA was collected by centrifugation at 15,000 x g for 20 min, air-dried, and resuspended in TE buffer (10 mM Tris-HCl, 5 mM EDTA, pH 7.4). The resulting DNA preparations were electrophoresed through a 2% agarose gel containing ethidium bromide. Equal quantities of DNA (according to determination of the optical density at 260 nm) were loaded in each lane, and 1-kb and 50-bp multimers were employed as molecular weight standards. DNA fragmentation was visualized and photographed under ultraviolet

illumination. Semiquantitative densitometric analysis of DNA fragmentation was conducted using a BIO-RAD Model GS-670 Imaging Densitometer with Molecular Analyst/PC Software.

(3) Determination of blood constituents. Urea nitrogen and creatinine (Cr) were determined using the commercial reagents BUN Kainos and CRE-EN Kainos (Kainos Laboratories, Tokyo, Japan).

#### LPS-challenged experiment

(1) Animals and Treatments. Male LWH:Wistar rats with a body weight of 125-130 g were purchased from Shizuoka Agricultural Cooperative Association for Laboratory Animals (Hamamatsu, Japan). They were kept in wire-bottomed cages and exposed to a conventional dark/light cycle. The room temperature (approximately 25°C) and humidity (approximately 60%) were controlled automatically. Laboratory pellet chow (Clea Japan Inc., Tokyo, Japan; comprising 24.0% protein, 3.5% lipid and 60.5% carbohydrate) and water were given *ad libitum*. Following several days of adaptation, the animals were divided into four groups - a normal, a control, and two treatment groups - avoiding any intergroup difference in body weight. The normal and control groups were given water, while the others were given Sanguisorbae Radix extract orally, at a dose of 50 or 100 mg/kg body weight/d, for 30 consecutive days. For the LPS shock experiments, rats were given intravenous LPS, 5 mg/kg body weight. At 6 h after the LPS challenge, the rats were anesthetized by intraperitoneal administration of sodium pentobarbital (30 mg/kg body weight). In separate experiments, 2 groups of rats received a bolus injection plus a continuous infusion of vehicle (saline, 0.6 ml/kg/h) or aminoguanidine (5 mg/kg intravenous bolus loading dose, followed by a continuous infusion of 5 mg/kg/h in 0.6 ml/kg/h saline for 4 h) at 2 h after injection of LPS, according to the method described by Wu *et al.*<sup>[7]</sup> Blood samples were obtained by cardiac puncture, and the serum was separated immediately by centrifugation. The kidneys were subsequently removed from each rat following renal perfusion through the renal artery with ice-cold physiological saline. The tissues were quickly frozen and kept at -80°C until analysis. Six rats were used for each experimental group.

(2) Determination of Urea Nitrogen and Creatinine (Cr) in Serum. Serum

urea nitrogen and Cr were determined using the commercial reagents BUN Kainos and CRE-EN Kainos (Kainos Laboratories, Tokyo, Japan).

(3) Determination of Nitrite and Nitrate in Serum. Nitrite and nitrate levels were measured primarily following the method of Misko *et al.*<sup>[8]</sup> Briefly, serum was filtered through an Ultrafree-MC microcentrifuge filter unit (Millipore, Bedford, MA) for 1 h at 14000 rpm to remove hemoglobin released by cell lysis. As nitrite in serum is mostly oxidized to nitrate by reaction with the iron-heme center of hemoglobin, the resulting nitrate was first reduced to nitrite by incubation with nitrate reductase and measured by a microplate assay method based on the Griess reaction.<sup>[9]</sup>

(4) Measurement of iNOS Activity. Using the methodology of both Vaziri *et al.*<sup>[10]</sup> and Suh *et al.*,<sup>[11]</sup> kidney homogenates (20% w/v) were prepared in 40 mM cold Tris-buffer (pH 8.0), containing 5 µg/ml pepstatin A, 1 µg/ml chymostatin, 5 µg/ml aprotinin and 100 µM phenylmethylsulfonyl fluoride. The homogenates were centrifuged at 12000 x g for 5 min at 4°C to remove tissue debris. The supernatant was used for the determination of enzyme activity and protein content. iNOS activity was measured using a slight modification of the method of Suh *et al.*<sup>[11]</sup> The reaction mixture consisted of 10 µl supernatant in 20 mM Tris-HCl (pH 7.9), containing 4 µM FAD, 4 µM tetrahydrobiopterin, 3 mM DTT, 2 mM L-arginine and 2 mM NADPH. The mixture was incubated at 37°C for 180 min in 96-well plates. Residual NADPH was oxidized enzymatically with 10 units/ml LDH and 5 mM sodium pyruvate in a final volume of 130 µl, with incubation for a further 5 min at 37°C, and the Griess assay was performed as above.<sup>[9]</sup> Protein was determined by the micro-biuret method,<sup>[12]</sup> with bovine serum albumin as a standard.

Statistics Results are presented as means ± S.E. The data were analyzed for statistical significance using Dunnett's method. Differences at  $p < 0.05$  were considered statistically significant.

## [Results]

### Ischemia-reperfused experiment

(1) DNA fragmentation. As shown in Fig. 1, kidney DNA was fragmented

into lower-molecular-weight molecules after ischemia-reperfusion. Analysis of the agarose gel electrophoresis pattern revealed a ladder, which was absent in kidney not subjected to ischemia-reperfusion, indicating that oxidative stress induced apoptosis. However, it was confirmed in terms of the electrophoresis pattern and semiquantitative densitometry that oral administration of 100 mg of *Sanguisorbae Radix* extract decreased the DNA fragmentation significantly compared with that in ischemia-reperfused control kidney. A further increase in the dose to 200 mg produced a further decrease in the DNA fragmentation rate (Table I).

(2) Blood urea nitrogen and Cr. Table II shows the effect of *Sanguisorbae Radix* extract on parameters of blood constituents after administration of an oral dose. The blood urea nitrogen and Cr levels in ischemia-reperfused control rats were increased significantly in comparison with normal rats. In contrast, the blood urea nitrogen level in rats given *Sanguisorbae Radix* extract decreased from 138.4 to 82.1 mg/dl at the 100-mg level (a 41% change,  $p < 0.001$ ) and from 138.4 to 54.9 mg/dl at the 200-mg level (a 60% change,  $p < 0.001$ ). Similarly, the Cr level in rats given *Sanguisorbae Radix* extract showed a significant decrease at both the 100- and 200-mg dosage levels as compared with that in the control rats, as shown in Table II.

#### LPS-treated experiment

(1) Urea Nitrogen and Cr in Serum. As shown in Table 3, the serum urea nitrogen and Cr levels in LPS-treated control rats were increased significantly in comparison with those in normal rats, reflecting uremia. In contrast, the urea nitrogen level in rats given *Sanguisorbae Radix* extract for 30 d decreased from 38.1 to 33.8 mg/dl at the 50-mg level (an 11% change,  $p < 0.05$ ) and from 38.1 to 31.6 mg/dl at the 100-mg level (a 17% change,  $p < 0.001$ ). Similarly, the Cr level in rats given *Sanguisorbae Radix* extract orally for 30 d was significantly decreased at both the 50- and 100-mg dose levels compared with that in the control rats. Moreover, the increased urea nitrogen and Cr levels in LPS-treated control rats were decreased by infusion of aminoguanidine.

(2) Nitrite and Nitrate in Serum. The serum nitrite and nitrate in the LPS-treated rats increased to 6.50  $\mu\text{M}$ , as shown in Table 4. Administration of

Sanguisorbae Radix extract at a dose of 50 mg/kg of body weight/d for 30 d resulted in a significant reduction in the serum nitrite/nitrate levels from 6.50 to 4.39  $\mu\text{M}$ . A further increase in the dose of Sanguisorbae Radix to 100 mg produced a further reduction in the nitrite/nitrate levels. Infusion of aminoguanidine, not saline, significantly reduced the increased nitrite and nitrate level caused by LPS. The level in rats given aminoguanidine was 49% of the control value.

(3) iNOS Activity in Kidney. As shown in Table 4, LPS-treated rats showed a significant increase in iNOS activity in their kidneys (from 1.94 to 3.67 pmol/mg protein/min). However, in the kidneys pretreated with 50 mg/kg body weight/d Sanguisorbae Radix extract, iNOS activity was suppressed significantly to 2.69 pmol/mg protein/min. This suppression became more marked as the dose of Sanguisorbae Radix extract increased, the iNOS activity (2.58 pmol/mg protein/min) in rats given 100 mg being comparable with that in the untreated control group (3.67 pmol/mg protein/min). A significant reduction in iNOS activity was also observed in LPS-treated rats given aminoguanidine.

#### [Discussion]

Cells die by either apoptosis or necrosis. Cell death by necrosis occurs when cells are exposed to severe injurious conditions. In contrast, apoptosis occurs in a number of physiological processes such as embryogenesis, metamorphosis,<sup>[13]</sup> cytotoxic T cell-mediated killing of target cells,<sup>[14]</sup> and death of autoreactive thymocytes,<sup>[15]</sup> which play an important role in maintaining a normal balance in cell growth, development and elimination. However, recent studies have shown that multiple cytotoxic stimuli causing necrosis can also initiate apoptosis when cells are exposed to the same noxious agents at lower concentration. Apoptosis has been shown to contribute to extensive cell loss in many pathological states including ischemic renal failure.<sup>[16]</sup> Indeed, the involvement of apoptosis in ischemia-reperfusion injury was also clearly demonstrated in the present study. When rats were subjected to a 60-min period of complete ischemia, followed by 24 h of reperfusion, a ladder pattern

of low-molecular-weight DNA was detected by agarose gel electrophoresis. These fragments displayed a typical DNA ladder pattern indicative of apoptosis at intervals of about 180 bp, a feature that was absent in tissues not subjected to ischemia-reperfusion, indicating that oxidation stress induces apoptosis. In contrast, rats given *Sanguisorbae Radix* extract orally at a dose of 100 or 200 mg/kg body weight/day for 30 consecutive days prior to ischemia and reperfusion demonstrated sufficient inhibition of apoptosis. Although precise quantitative analysis of the extent of DNA fragmentation was not conducted, semiquantitative detection showed a significant difference between the controls and the groups treated with *Sanguisorbae Radix* extract. The percentage of DNA fragmentation was lower in the treated rats than in the controls. This result indicated that *Sanguisorbae Radix* was able to inhibit apoptotic cell death.

Gobe *et al.*<sup>[17]</sup> obtained pathologic evidence for both necrosis and apoptosis of renal epithelial cells during the first 2 to 8 days after occlusion of the renal artery, whereas from 10 to 28 days when the renal mass was markedly reduced, cell death continued, but only apoptosis was observed. Other experiments have also yielded similar results. These results demonstrate that apoptosis plays an important role in ischemic cell injury and is responsible for renal dysfunction in ischemic acute renal failure. On the other hand, Hellberg and Kallskog<sup>[18]</sup> have reported that ischemia-reperfusion causes aggregation of polymorphonuclear cells in the glomeruli and stimulates them to release chemical mediators including free radicals, which then undergo ultrafiltration and subsequently injure the tubule cells from the luminal side. They explained that the initial change therefore occurs at the brush border, followed by decudation of tubule cells into the lumen, forming casts in the distal part, resulting in tubule occlusion and hence decreased renal function. In this regard, we observed reversal of the decrease in renal function (in terms of increased levels of blood urea nitrogen and Cr) after administration of *Sanguisorbae Radix* extract.

The mechanism by which *Sanguisorbae Radix* inhibits apoptosis and protects against renal failure is not clear. However, reactive free radicals and oxidative stress have been extensively implicated in ischemia-reperfusion injury. As *Sanguisorbae Radix* contains a large amount of tannin as its major constituent, a species shown to have marked antioxidant and radical-scavenging activity,<sup>[19,20]</sup>

and furthermore in a preliminary study we have verified that *Sanguisorbae Radix* extract significantly scavenges superoxide and hydroxyl radical (data not shown), we speculate that these properties of *Sanguisorbae Radix* might contribute to its protective effect on renal function and inhibition of apoptosis.

NO plays an important role in the kidney, both under normal and pathological conditions. NO is produced from L-arginine by the action of NO synthase. In the kidney, three isoforms of NOS, located in different regions of the kidney and expressing different functions, have been found. The neuronal isoform (nNOS) is found in macula densa cells and the epithelium of Bowman's capsule; epithelial NOS (eNOS) is present in the endothelium of the glomerular capillaries, the afferent and efferent arteriole, the intrarenal arteries and the medullary vasa recta, and iNOS is found in the proximal tubule and the glomerulus<sup>[21]</sup>. NO generated by these NOS isoforms has been shown to exert different effects on renal physiology and pathology. Both nNOS and eNOS release a low and constant amount of NO, which plays a major role in the modulation of renal vascular tone and sodium excretion. Under normal conditions, iNOS also generates a physiological level of NO, which may participate in the modulation of vascular tone by an indirect mechanism in mesangial cell relaxation. However, as iNOS is induced by certain cytokines and hypoxia, it generates NO in a large quantities and for a prolonged period.<sup>[22]</sup> Excessive NO has been shown to be strongly cytotoxic, injuring cells and tissues. In freshly isolated rat proximal tubules, it has been demonstrated that NO and its metabolic product, peroxynitrite (ONOO<sup>-</sup>) mediate tubular hypoxia-reperfusion injury<sup>[23]</sup>. Cattell *et al.*<sup>[24]</sup> also provided experimental evidence for the effects of NO in accelerated nephrotoxic nephritis using isolated rat glomeruli. In our study, LPS-treated rats showed a rapid decline in renal function, which was indicated by large increases in two renal function parameters, blood urea nitrogen and Cr. The serum nitrite/nitrate level, an indicator of NO formation, was also seen to be markedly increased in LPS-treated rats compared with that seen in normal rats. As a more direct indicator, we monitored the activity of iNOS in renal homogenate using the method of Suh *et al.*<sup>[11]</sup> LPS-treatment resulted in an approximately 1.9-fold



increase in the activity of iNOS, suggesting the possible association of additional induction of iNOS with renal dysfunction in situ.

Various inhibitors of NO or NOS have been used in attempts to improve or attenuate the pathology involved in excessive generation of NO. However, conflicting results have been obtained. Using isolated renal proximal tubules, Yu et al.<sup>[15]</sup> reported that the NOS inhibitor, N-nitro-L-arginine methyl ester, protected the renal tubular epithelium against hypoxic injury. Weinberg et al<sup>[25]</sup> demonstrated that oral administration of N<sup>G</sup>-monomethyl-L-arginine prevented the development of glomerulonephritis and reduced the intensity of inflammatory arthritis in MRL-lpr/lpr mice. In contrast to these observed beneficial effects, NOS inhibitors have been shown to aggravate renal dysfunction in several in vivo models of acute renal failure<sup>[26,27]</sup>. It is speculated that these contradictory results were attributable to a lack of selective NOS inhibitors.

As excessive generation of NO in renal disease is mainly associated with the induction of iNOS, the therapeutic strategy has concentrated on developing effective iNOS inhibitors. During systematic studies of the traditional drugs used in the treatment of renal diseases related to free radical injury, we found that in vitro Sanguisorbae Radix, a traditional crude drug which contains a large amount of tannin as its major constituent, has a strong scavenging effect on NO induced by sodium nitroprusside, an NO donor<sup>[5]</sup>. We also recently observed that Sanguisorbae Radix extract effectively inhibited the activity of iNOS in activated macrophages induced by LPS (data not shown). These findings prompted us to see if Sanguisorbae Radix extract could improve impaired renal function related to excessive generation of NO in vivo. We, therefore, conducted the present experiment and found that Sanguisorbae Radix extract significantly improved the impairment of renal function caused by LPS. The raised levels of serum urea nitrogen and Cr were markedly reduced in the two groups treated with different doses of Sanguisorbae Radix. Reduced serum nitrite/nitrate levels and renal iNOS activity demonstrated a protective action against the renal dysfunction caused by LPS, although these effects were weaker than those produced by aminoguanidine, a selective iNOS inhibitor.

In summary, reactive free radicals, particularly reactive oxygen species and

NO play an important effect in initiating and aggravating the impairment of renal function, and mediating cell death and DNA fragmentation. This toxic effect may be attenuated by administrating *Sanguisorbae Radix* extract. The results suggested a potential of *Sanguisorbae Radix* extract in protecting renal cells and renal function against free radicals injury.

[REFERENCES]

- 1) Klahr S., *Mineral & Electrolyte Metabolism.*, **23**(3-6):140-3 (1997).
- 2) Wolin MS. Xie YW. Hintze TH., *Current Opinion in Nephrology & Hypertension.* **8**(1):97-103 (1999).
- 3) Watson BD. *Cellular & Molecular Neurobiology.* **18**(6):581-98 (1998).
- 4) Takagi A. Takada K. Sai K. Momma J. Aida Y. Suzuki S. Naitoh K. Tobe M. Hasegawa R. Kurokawa Y., *Journal of Applied Toxicology.* **16**(1), 15-23 (1996).
- 5) Yokozawa T., Chen C.P., Tanaka T., *Phytomedicine.* **6**(6), 453-463 (1999).
- 6) Katoh K., Ikata T., Katoh S., Hamada Y., Nakauchi K., Sano T., Niwa M., *Neurosci. Lett.*, **216**, 9 (1996).
- 7) Wu C.C., Ruetten H., Thiemermann C., *Eur. J. Pharmacol.*, **300**, 99-104 (1996).
- 8) Misko T.P., Schilling R.J., Salvemini D., Moore W.M., Currie M.G., *Anal. Biochem.*, **214**, 11-16 (1993).
- 9) Green L.C., Wagner D.A., Glogowski J., Skipper P.L., Wishnok J.S., Tannenbaum S.R., *Anal. Biochem.*, **126**, 131-138 (1982).
- 10) Vaziri N.D., Ni Z., Wang X.Q., Oveisi F., Zhou X.J., *Am. J. Physiol.*, **274**, F642-F649 (1998).
- 11) Suh N., Honda T., Finlay H.J., Barchowsky A., Williams C., Benoit N.E., Xie Q., Nathan C., Gribble G.W., Sporn M.B., *Cancer Res.*, **58**, 717-723 (1998).
- 12) Itzhaki R.F., Gill D.M., *Anal. Biochem.*, **9**, 401-410 (1964).
- 13) Kerr J.F.R., Wyllie A.H., Currie A.R., *Br. J. Cancer*, **26**, 239 (1972).
- 14) Duke R.C., Chervenak R., Cohen J.J., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **80**, 6361 (1983).
- 15) MacDonald H.R., Lees R.K., *Nature*, **343**, 642 (1990).
- 16) Lieberthal W., Levine J.S., *Am. J. Physiol.*, **271**, F477 (1996).
- 17) Gobe G.C., Axelsen R.A., Searle J.W., *Lab. Invest.*, **63**, 770 (1990).
- 18) Hellberg P.O.A., Kallskog T.O.K., *Kidney Int.*, **36**, 555 (1989).

- 19) Hong C.Y., Wang C.P., Huang S.S., Hsu F.L., J. Pharm. Pharmacol., **47**, 138 (1995).
- 20) Yokozawa T., Chen C.P., Dong E., Tanaka T., Nonaka G., Nishioka I.,  
Biochem. Pharmacol., **56**, 213 (1998).
- 21) Kone B.C., Baylis C., Am. J. Physiol., **272**, F561-F578 (1997).
- 22) Bachmann S., Mundel P., Am. J. Kidney Diseases, **24**, 112-129 (1994).
- 23) Yu L., Gengaro P.E., Niederberger M., Burke T.J., Schrier R.W., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., **91**, 1691-1695 (1994).
- 24) Lieberthal W., Levine J.S., Am. J. Physiol., **271**, F477 (1996).
- 25) Weinberg J.B., Granger D.L., Pisetsky D.S., Seldin M.F., Misukonis M.A.,  
Mason S.N., Pippen A.M., Ruiz P., Wood E.R., Gilkeson G.S., J. Exp. Med., **179**,  
651-660 (1994).
- 26) Mashiach E., Sela S., Winaver J., Shasha S.M., Kristal B., Nephron, **80**, 458-467  
(1998).
- 27) Schwartz D., Blum M., Peer G., Wollman Y., Maree A., Serban I.,  
Grosskopf I., Cabili S., Levo Y., Iaina A., Am. J. Physiol., **267**, F374-F379 (1994).

Table 2 Effect of Sanguisorbae Radix extract on blood urea nitrogen and creatinine.

Group	Dose (mg/kg B.W./day)	urea nitrogen (mg/dl)	Cr (mg/dl)
Normal -		20.9 ± 1.0	0.36 ± 0.03
Ischemic and reperfused			
Control	-	138.4 ± 13.1 <sup>a</sup>	2.81 ± 0.47 <sup>a</sup>
Sanguisorbae Radix extract	100	82.1 ± 9.9 <sup>a,b</sup>	1.65 ± 0.20 <sup>a,b</sup>
Sanguisorbae Radix extract	200	54.9 ± 5.5 <sup>a,b</sup>	1.05 ± 0.16 <sup>a,b</sup>

Statistical significance: <sup>a</sup>*p*<0.001 *v.s.* normal values, <sup>b</sup>*p*<0.001 *v.s.* control values with ischemia-reperfusion.

Table 1 Effect of Sanguisorbae Radix extract on DNA fragmentation.

Group	Dose (mg/kg B.W./day)	Fragmentation (%)
Normal	-	-
Ischemic and reperfused		
Control	-	14.6 ± 2.7
Sanguisorbae Radix extract	100	7.1 ± 1.4 <sup>a</sup>
Sanguisorbae Radix extract	200	6.5 ± 1.3 <sup>a</sup>

Statistical significance: <sup>a</sup>*p*<0.001 *v.s.* control values with ischemia-reperfusion.

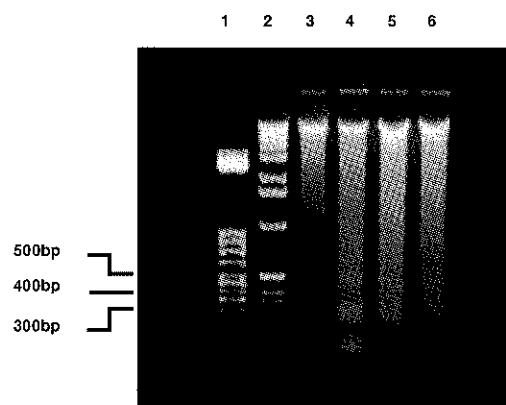


Fig. 1 Agarose gel electrophoresis of DNA. Lane 1: 50-bp marker DNA; lane 2: 1-kp marker DNA; lane 3: normal; lane 4: ischemic and reperfused control; lane 5: ischemic and reperfused Sanguisorbae Radix extract-treated (100 mg/kg B.W./day); lane 6: ischemic and reperfused Sanguisorbae Radix extract-treated (200 mg/kg B.W./day).

Table 3 Effect of Sanguisorbae Radix extract on urea nitrogen and Cr.

Group	Urea nitrogen (mg/kg B.W./day)	Cr (%)
Normal	21.3 ± 2.0	0.36 ± 0.01
LPS-treated		
Control	38.1 ± 2.9 <sup>a</sup>	1.20 ± 0.08 <sup>a</sup>
Sanguisorbae Radix extract (50 mg/kg B.W./day)	33.8 ± 3.1 <sup>a</sup>	0.78 ± 0.10 <sup>ad</sup>
Sanguisorbae Radix extract (100 mg/kg B.W./day)	31.6 ± 2.3 <sup>a</sup>	0.68 ± 0.08 <sup>ad</sup>
LPS-treated		
Control	37.8 ± 1.6 <sup>a</sup>	1.18 ± 0.06 <sup>a</sup>
Aminoguanidine (5 mg/kg plus 5 mg/kg/h)	32.4 ± 2.8 <sup>ac</sup>	0.66 ± 0.14 <sup>ad</sup>

Statistical significance: <sup>a</sup>*p*<0.001 *vs.* normal value, <sup>b</sup>*p*<0.05, <sup>c</sup>*p*<0.01, <sup>d</sup>*p*<0.001 *vs.* LPS-treated control values.

Table 4 Effect of Sanguisorbae Radix extract on Nitrite/Nitrate level and iNOS Activity.

Group	Nitrite/Nitrate in serum (µM)	iNOS in kidney (pmol/mg protein/min)
Normal	1.78 ± 1.02	1.94 ± 0.01
LPS-treated		
Control	6.50 ± 1.35 <sup>b</sup>	3.67 ± 0.27 <sup>b</sup>
Sanguisorbae Radix extract (50 mg/kg B.W./day)	4.39 ± 1.82 <sup>bc</sup>	2.69 ± 0.10 <sup>ac</sup>
Sanguisorbae Radix extract (100 mg/kg B.W./day)	3.72 ± 0.89 <sup>ac</sup>	2.58 ± 0.06 <sup>ac</sup>
LPS-treated		
Control	6.39 ± 1.24 <sup>b</sup>	3.64 ± 0.29 <sup>b</sup>
Aminoguanidine (5 mg/kg plus 5 mg/kg/h)	3.13 ± 1.28 <sup>c</sup>	2.02 ± 0.18 <sup>c</sup>

Statistical significance: <sup>a</sup>*p*<0.01, <sup>b</sup>*p*<0.001, *vs.* normal value, <sup>c</sup>*p*<0.001 *vs.* LPS-treated control values.

日本財団補助金による

1999年度日中医学協力事業報告書

—学会開催に対する助成—

11年 12月 24日

財団法人 日中医学協会  
理事長 中島章 殿

報告者氏名 高橋 孝  
所属・役職 癌研究会病院 消化器外科部長  
所在地 〒120-0245 豊島区上池袋1-37-1  
電話 03-3918-0111 内線 \_\_\_\_\_

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 第五回 北京癌研腫瘍外科検討会  
テーマ 消化器腫瘍の外科療法 最近の進歩  
主催団体 北京癌研腫瘍外科検討会  
代表者 高橋孝(癌研究会病院消化器外科) 徐懷(北京医科大学)  
期間・開催地 平成11年9月15日～平成11年9月19日  
参加者数 日本側 3名 中国側 90名(北京医科大学)  
招へい・派遣目的 60名(日中友好病院)

1. 招へい・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
高橋 孝	癌研究会病院 消化器外科部長	消化器腫瘍外科
陳 頌 松	同上 内科医員	内視鏡治療、化学療法
坂井 雄二	同上 内科医員	内視鏡 臨床病理

滞在期間 自 11年 9月 15日 至 11年 9月 19日

## 第五回 北京癌研腫瘍外科検討会 日程表

Sept. 15 ( Wed )

10 : 45 東京 NH905

13 : 25 北京 Check in at Jin Tai Hotel

18 : 00 歓迎夕食 と 日程打ち合わせ

Sept. 16 ( Thu )

08 : 30-11 : 30 日中腫瘍外科手術書 編集会議

北京医科大学第一病院

14 : 00-17 : 00 北京医科大学との検討会

北京医科大学第一病院講堂

司会 : 万运廉、北京医科大学外科教授

1 胃癌外科 直腸癌外科の最近の進歩 高橋孝

2 胃癌の化学療法 食道癌の化学療法 陳頌松

3 大腸癌の臨床病理 遺伝子変化 坂井雄二

4 北京医科大学第一病院における胃癌 大腸癌治療 万运廉

Sept. 17 ( Fri )

09 : 00-11 : 30 中日友好病院 研究所 訪問

金恩源 ( 中西医結合研究室 教授 )、酒谷薫 ( JICA 専門家 )

伊勇鉄 ( 外事赴赴長 ) と面談

13 : 30-17 : 00 中日友好病院との検討会

中日友好病院 研修室

司会 : 賈振庚 中日友好病院普通外科主任

1 胃癌外科 直腸癌外科の最近の進歩 高橋孝

2 胃癌 食道癌の化学療法 陳頌松

3 大腸癌粘液癌 未分化癌の臨床病理 坂井雄二

4 中日友好病院普通外科における胃癌 大腸癌治療 王正康

Sept. 18 ( Sat )

09 : 00-12 : 00 中日友好病院での手術供覧

13 : 30- 中日友好病院普通外科医員との懇談

Sept. 19 ( Sun )

午前 検討会のまとめ 書類整理

15 : 00 北京 NH906

19 : 20 東京

## 第五回 北京癌研腫瘍外科検討会のまとめ

- I 北京医科大学との検討会 1999年9月16日  
北京医科大学第一病院講堂 出席者90名  
司会：万运廉、北京医科大学外科教授
- II 中日友好病院との検討会 1999年9月17日  
中日友好病院 研修室 出席者60名  
司会：賈振庚 中日友好病院普通外科主任

- 1 胃癌 直腸癌外科療法最近の進歩 癌研究会病院消化器外科部長 高橋孝  
胃癌 直腸癌外科療法の進歩をビデオ供覧にて解説した  
胃癌では 迷走神経温存の縮小手術 大動脈周囲リンパ節郭清の拡大手術  
の適応 手術手技を検討した  
直腸癌では 側方転移郭清と自律神経温存の術式 結腸囊肛門吻合術を解  
説 それぞれの適応を検討した
- [討論] 迷走神経温存の適応は その効果は？ 原則として早期癌に適応してい  
るが 将来は進行癌にも適応されるであろう 術中の進行度判定 とくに  
リンパ節転移の有無の判断を正確に行う訓練が要求される 迷走神経肝  
臓枝 腹腔枝を温存することによって 術後胆石の発生率は有意に減少す  
る また術後愁訴も軽減し QOLは向上する  
結腸囊肛門吻合術の合併症 術後機能は？ 一時的人工肛門を7割の症例  
に造設している 縫合不全は5%以下である 術後1年目の排便機能は1  
日平均排便回数2.4回であり 満足ゆくものである  
直腸癌自律神経温存術の術後の性機能は満足ゆくものか？ 約7割の  
症例では神経温存の効果はあるが 術式改良の努力は続けて必要である
- 2 胃癌の化学療法 食道癌の化学療法 癌研究会病院内科医員 陳頌松  
胃癌 食道癌に 対する化学療法の意義を それぞれにたいする Best  
Supportive Therapy と比較して論じた  
胃癌にたいする最新の化学療法である CPT-11+CDDP の Phase II Study  
の有効性を報告した  
胃癌大動脈周囲リンパ節転移例にたいする Neoadjuvant Chemotherapy  
としての CPT-11+CDDP と手術所見 これまでの成績を報告した  
食道癌過進展例（食道肺嚢形成例）にたいする化学療法の有功例を提示  
し 食道癌化学療法の適応拡大の可能性を検討した
- [討論] 胃癌の腹膜播種転移に対する化学療法の現状は？ 有効な化学療法はい  
まだ確立されていない MTX+5FU 腹腔内リザバーよりの CDDP が試



みられている

胃癌治癒切除後の補助化学療法は？ 現在有効なものはない 日本全国規模で弗化ピリミジン系経口剤の臨床試験が行われている

Neoadjuvant Chemotherapy の Down Stage 効果はどの程度に期待できるか？ リンパ節転移に対しては7割の奏効率が期待でき CR 例もあるが原発巣に対しては奏効率5割を下回る

### 3 大腸癌粘液癌 未分化癌の臨床病理 癌研究会病院内科医員 坂井雄二

大腸低分化癌は病理組織学的特徴によって2群に分けられ それぞれの臨床的特徴を論じた

それぞれの群の遺伝子変異 K-ras、MSI、TGF $\beta$  R II、BAXを調べ 臨床像と比較すると 癌間質量が少なく かつ高分化 中分化腺癌成分を含まない群は 右側結腸に多く見られ 遺伝子変化の所見からもHNPCに類似し 他の大腸癌とは異なる発癌機構であることが示唆されると結論した

[討論] 遺伝子変異としてのAPC, DPC4, MSH2, MLH1 遺伝子の異常は？ HNPCに類似した群ではMSH2, MLH1 遺伝子の異常の存在する可能性が高いと予想する

今回の検討がどのようなかたちで臨床に役立つか？ 術前の生検組織の遺伝子解析により 癌の進展の特徴を術前に知り 術式検討の材料にすることができる また術後の予後を現在より正確に予知できれば 術後化学療法の選択決定因子ともなり得る


日本財団補助金による

1999 年度日中医学協力事業報告書

- 学会開催に対する助成 -

2000 年 / 月 28 日

財団法人 日中医学協会  
理事長 中島章 殿

報告者氏名 森本武彦   
所属・役職 愛媛大学医学部小児科・助教授  
所在地 〒791-0295 愛媛県温泉郡志津川  
電話 089-960-5320 内線 \_\_\_\_\_

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6回日中友好糖尿病シンポジウム  
テ マ 日中両国の糖尿病学・糖尿病医療の進歩をめざして  
主催団体 第6回日中友好糖尿病シンポジウム組織委員会  
代表者 貴田嘉一  
期間・開催地 平成11年11月18～21日・松山市  
参加者数 日本側 100 名 中国側 67 名  
招へい・派遣目的 日中両国の糖尿病学の専門家が集い意見を交換することによって  
両国の糖尿病学、糖尿病臨床を発展させること

1. 招へい・派遣研究者 人数 67 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
別紙	別紙	別紙

滞在期間 自 1999 年 11 月 17 日 至 1999 年 11 月 23 日

氏名	所属・役職	研究分野
錢榮立	北京医科大学第一医院 教授 中華医学会糖尿病分会 会長	糖尿病学
趙書貴	中華医学会 副秘書長	
項坤三	上海市第六人民医院 教授 中華医学会糖尿病分会 副会長	〃
陳家偉	南京医科大学第一附属医院 教授 中華医学会糖尿病分会 副会長	〃
向紅丁	北京協和医院 教授 中華医学会糖尿病分会 常務理事	〃
楊文英	北京中日友好医院 教授 中華医学会糖尿病分会 常務理事	〃
王家馳	天津医科大学代謝病医院 教授 中華医学会糖尿病分会 常務理事	〃
劉国良	中国医科大学第一臨床学院 教授 中華医学会糖尿病分会 常務理事	〃
李秀鈞	成都華西医科大学附属第一医院 教授 中華医学会糖尿病分会 常務理事	〃
顏純	首都医科大学附属北京兒童医院 教授	〃
包仕堯	蘇州医学院附属第二医院 教授	〃
柴偉棟	南京医科大学第一附属医院 主治醫師	〃
昌玉蘭	江西医学院第一附属医院 教授	〃
陳偉	北京協和医院 住院醫師	〃
陳莉明	天津医科大学代謝病医院 主治醫師	〃
程樺	廣州中山医科大学孫逸仙紀念医院 教授	〃

氏名	所属・役職	研究分野
遲家敏	北京医院 教授	糖尿病学
東野光	山東省泰山医学院附属医院 教授	〃
薰鳳芹	浙江医科大学付属第一医院 住院醫師	〃
薰偃琴	中華医学会學術会務部 副主任	〃
薰硯虎	潍坊医学院附屬市人民医院 教授	〃
竇京涛	北京301医院 主治醫師	〃
範麗鳳	北京301医院 副主任護師	〃
傅静奕	成都華西医科大学付属第一医院 住院醫師	〃
高妍	北京医科大学附屬第一医院 教授	〃
高紅軍	中華医学会北京分会學術会務部 主治醫師	〃
谷衛	浙江医科大学付属第二医院 副教授	〃
郭曉惠	北京医科大学第一医院 副教授	〃
紀立農	北京医科大学人民医院 副教授	〃
賈偉平	上海市第六人民医院 副教授	〃
金之欣	同濟医科大学付属同濟医院 教授	〃
李剛	中華医学会事務局 主任	〃
李焱	廣州中山医科大学孫逸仙紀念医院 主治醫師	〃
李王京芳	北京医科大学第三医院 教授	〃
李新華	中国預防医学科学院 副研究員	〃
李玉秀	北京協和医院 主治醫師	〃
廖二元	湖南医科大学第二付属医院 教授	〃
林麗香	副建省立医院 教授	〃
劉彦君	北京306医院 副教授	〃
劉彦群	徐州医学院附屬医院 教授	〃
劉尊永	中国預防医学科学院勞働衛生研究所 副研究員	〃
盧紋凱	北京医科大学人民医院 教授	〃

氏名	所属・役職	研究分野
陸俊茜	上海市第六人民医院 技師	糖尿病学
羅邦堯	上海第二医科大学附属瑞金医院 教授	〃
馬素雲	中華医学会对外連絡部 主任	〃
倪桂臣	首都医科大学附属北京兒童医院 教授	〃
錢海鑫	蘇州医学院附属第一医院 教授	〃
荣蓉	上海第二医科大学附属瑞金医院 住院醫師	〃
桑艷梅	首都医科大学附属北京兒童医院 主治醫師	〃
沈稚舟	上海医科大学華山医院 教授	〃
孫王奇	北京協和医院 副教授	〃
童光煥	西安第四軍医大学附属唐都医院 教授	〃
童鐘杭	浙江医科大学附属第一医院 教授	〃
王德全	山東医科大学附属医院 教授	〃
吳海玉	湖南医科大学第二附属医院 技師	〃
伍漢文	湖南医科大学第二附属医院 教授	〃
邢小燕	北京中日友好医院 副教授	〃
楊剛毅	重慶医科大学附属第一医院 主治醫師	〃
楊華章	廣東省人民医院 教授	〃
伊致文	昆明市第一人民医院 教授	〃
宇德民	天津医科大学代謝病医院 教授	〃
張國珍	福建医科大学附属協和医院 教授	〃
張立華	中華医学会对外連絡部 通訊	〃
張士明	天津医科大学第二医院 教授	〃
朱良湘	北京同仁医院 教授	〃
鄒敏漫	北京301医院 主治醫師	〃
左靜南	上海第二医科大学新華医院 教授	〃

## 第6回日中友好糖尿病シンポジウム

日中両国の糖尿病学・糖尿病医療の進歩をめざして

日本側主催代表者

貴田嘉一（愛媛大学医学部小児科 教授）

中国側代表者

銭榮立（北京医科大学第一医院 教授）

### 学会報告

森本武彦（愛媛大学医学部小児科 助教授）

本学会に、中国側からは中華医学会糖尿病分会会長、中華医学会副秘書長をはじめ中国各地域の大学、病院から論文審査で選出された糖尿病専門家が約70名、日本側から約100名の糖尿病専門家が参加した。

学会では、最初にKaichi Kidaによる会頭講演で『小児期の2型糖尿病』と題し初めに、日本人においては小児思春期の2型糖尿病の発症頻度が民族的に高いことを報告しこれが、日本人小児をとりまく環境の変化と日本人が有する遺伝的特徴の両者に起因するものであることを述べた。そして、小児期における2型糖尿病が先進国で増加していること、またそのスクリーニングシステムの確立と予防プログラム開発が重要であることが述べられた。特別講演として4つの講演がなされ、中国側からはHan-Wen Wu教授により『中国におけるLADA (Latent Autoimmune Diabetes in Adults)に関する研究状況』という題で、LADAモデルマウスを使った免疫療法に関する研究また人での免疫抑制剤の治療効果についてその知見が紹介された。またRong-Li Qian教授によって『中国における2型糖尿病』という題で中国における2型糖尿病の疫学的研究、合併症、分子遺伝学的研究について報告がなされた。日本側からはTakashi Shimazu教授によって『レプチンとグルコースホメオスターシスの中枢制御との関係』について講義がなされ、レプチンが視床下部に作用しVMH-sympathetic nervous systemを介して褐色細胞、筋などの末梢におけるグルコースの取り込みを促進していることが示された。Kazuya Yamagata先生から『MODY(maturity-onset diabetes of the young)に関する最新の知見』という題で、MODYに関する最新の知見が紹介された。またTopic lectureとしてKyohei Nonaka教授により『Soft Drink Ketosis』についてその臨床像について講演がなされた。Plenary lectureでは『WHOによる糖尿病の新しい分類』についてMaximilian De Courten教授によって講演がなされた。Business Lectureでは、最近発表されたADA（米国糖尿病学会）、WHO、日本糖尿病学会による新しい糖尿病分類と診断基準について意見交換、討議がなされた。今回の学会では『小児の糖尿病』をテーマの1つとして特に取り上げた。『小児の糖尿病』についてシンポジウムでは5人の演者によって発表がなされた。シンポジウ

ムの中で中国における1型糖尿病の疫学的研究が報告され民族間で発症率に有意差の認められること、高緯度ほど発症立が高いことが報告された。また中国の小児IDDMの患児の抗GAD抗体についての報告がなされ中国での抗GAD抗体陽性率は他のアジア地域と同程度でヨーロッパアメリカより低いことがしめされた。日本からはHLA genotypeと1型糖尿病の関係についても報告され、糖尿病発症の民族的差異を説明するものとしてその知見が提示された。

また中国側から 発症早期の1型糖尿病に対するNicotinamideの治療効果が発表され発症1年以内のIDDMの糖代謝改善に有効との結果が示された。日本での小児IDDMの生命予後に関しては1975以後著しく改善しており腎透析を含めた医療の進歩と糖尿病のコントロールそのものの進歩が生命予後改善の要因であることが示された。一般演題では、中国側から23題、日本側から34題の発表がなされた。セッション1では糖尿病の病態について研究が発表され討議された。セッション2では日中両国における糖尿病の疫学的研究が中心に討議された。セッション3では糖代謝についての発表がなされた。セッション4ではインスリン抵抗性について討議された。セッション5では動物モデルについての発表がなされ、セッション6では治療について討議がなされた。セッション7と8では糖尿病合併症に関する研究が報告された。基礎的研究から臨床的研究にいたる幅広い領域の研究が発表され各セッションで活発な討議がなされた。

今回の学会では著名な臨床家や研究者の講演を企画したほか、若手研究者の参加を予め中国側に依頼したため将来性の期待される研究者が多く参加でき、参加者の間で活発な討論が展開されたことは両国の糖尿病研究の将来にとって有益であったと考えられる。懇親会などの集まりでも、親しい交流が出来、学術面だけでなく社会文化面での相互理解が深まったことは、今後の日中友好のためにも大きく寄与出来たものと考えられる。

現在中国の経済状況は急速に変化してきており、それによりライフスタイルも変化し2型糖尿病も増加している。これらの問題はすでに日本も経験したことであり、相互の情報を交換しさらに共同研究を推進し糖尿病の病態の研究、治療の開発さらには糖尿病予防をめざすことが必要である。今後日中糖尿病シンポジウムがこのような共同研究を推進するために貢献できることを期待したい。

日本財団補助金による  
1999年度日中医学協力事業報告書

—学会開催に対する助成—

H11年 5月 27日

財団法人 日中医学協会  
理事長 中島章 殿

報告者氏名 福地 稔 (日本核医学会担当理事)  
 所属・役職 兵庫医科大学 核医学科 教授  
 所在地 〒663-8501 西宮市武庫川町1-1  
 電話 0798-45-6265 内線 \_\_\_\_\_  
 (直)

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10回 日中核医学会議  
 テーマ 放射性同位元素医学利用  
 主催団体 日本核医学会・中華医学会核医学分会  
 代表者 佐々木 康人・Wan-Ying Qu  
 期間・開催地 1999年5月11日～13日・西安長安城堡大酒店  
 参加者数 日本側 81 名 中国側 120 名  
 招へい・派遣目的 上記学会出席参加

1. 招へい・派遣研究者 人数 81 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
	(別紙に添付) 資料 1.	

滞在期間 自 1999 年 5 月 10 日 至 1999 年 5 月 14 日



第三回中日核医学会議 (3rd Sino-Japan Nuclear Medicine Conference)

— 放射性同位元素の医学利用 —

佐々木康人 (日本核医学会理事長・会長)、遠藤啓吾 (庶務担当理事・会長代行)、  
福地 稔 (日本核医学会理事・事務局長)

Wan-Ying Qu (中国核医学会会長)、Sheng-Zu Chen (事務局長)

報告者：福地 稔 (日本核医学会担当理事・兵庫医科大学核医学科教授)

1. 日本核医学界からの主たる参加者・および役職名

遠藤啓吾 (群馬大学医学部核医学科・教授) 日本核医学会庶務担当理事  
福地 稔 (兵庫医科大学核医学科・教授) 日本核医学会担当理事  
油野民雄 (旭川医科大学放射線科・教授) 日本核医学会理事  
小西淳二 (京都大学医学部核医学科・教授) 日本核医学会理事  
安東 醇 (金沢大学医学部健康学科・教授) 日本核医学会理事  
国安芳夫 (昭和大学藤が丘病院・放射線科教授) 日本核医学会理事  
油井信春 (千葉ガンセンター・核医学診療部部長) 日本核医学会理事  
利波紀久 (金沢大学医学部核医学科・教授) 日本核医学会理事

2. 日本核医学会からの参加者氏名および所属 (添付資料参照)

3. 通訳の派遣

通訳として現在日本に留学中の核医学研究者で、所属教室の教授から推薦のあった留学生の中から、第三回日中核医学会議に演題を提出して、採用が決まっている者から3名を選出した。派遣に際しては、正式の羽田—西安往復のエコノミークラス航空運賃を支給し、滞在費は自己負担とした。ただし1名は第三回日中核医学会議終了後、日本留学を終えて上海に帰国する研究者であるため、行きは羽田—西安、帰りは西安—上海までの航空運賃とした。通訳をお願いした研究者の氏名・所属は以下の如く、群馬大学医学部核医学教室 袁 志斌 (Zhibin Yuan)、群馬大学医学部核医学教室 張 宏 (Zhang Hong)、筑波大学臨床医学系 呉 頤 (Jin Wu) の3名である。3名が提出した演題のコピー、補助金の領収書のコピーは添付資料の如である。

4. 成果・今後の課題

第3回日中核医学会議 (3rd Sino-Japan Nuclear Medicine Conference) は、日本核医学会と中華医学会核医学分会との申し合わせにより、2年に1回中国で開催する事が決められている。今年は3回目を数えるが、両学会の間の申し合わせにより西安市で開催する事が決められ、会場としてANA Grand Castle Hotel Xi'an (長安城堡大酒店) を日本側の希望で決められ、中国側に会場の準備を全てお願いした。中国側との連絡は、準備期間中は常に、課題となり、我々を不安にさせたが、無事終って見ると結果的にE-mailの活用により、十分な意志疎通が取れたと自負している。会場はANA系のホテルで日本人としては、安心感が持てたが、中国側は恐らく経済的理由からと思われるが、人民ホテルと言う別のホテルを利用し、会場まで貸し切りバスを利用した様である。日本からの参加者は80名 (添付資料1)、中国側の参加者は120名であった。日本側の参加者の募集は、学会誌上に会告として出したが、演題の提出、中国への渡航、等が決まるにはかなり時間を要し、中国側との間で、認識の差が生じた。日本側は核医学会の役員を中心に、日中に対する役員を決め、(添付資料2)これを参考として中国側の役員をきめて頂き (添付資料3) 日本側に通知して頂いた。問題の演題。募集は日本側から28題で、特別講演1を入れても、中国側の希望であった60題には遥かに添えない数であった。その理由は、恐らく今回は発表を初めて公用語として「英語」を採用した事も原因であるかも知れない。公用語を「英語」としたものの、討論が白熱して来ると、自国語が必要になり、通訳のお世話になった。2国間の会議には言葉の問題は必ず付いてくるが、この問題を解決する必要があると思われた。

5. 今後の課題 国際間の核医学に関する会議は、韓国—中国、日本—中国があり、別にアジア・オセアニア核医学会が4年に1回開催されており、世界核医学会も4年に1回開催される。国際的な学術交流は歓迎されるべきであるが、あまり回数が多くなると対応に苦慮するのが必然である。今回も次回の打ち合わせで、中国側は日本での開催を主張し、次に日本・中国・韓国の3国での開催や、3年に1回の開催等が議論されたが、結論は得られず今後の検討課題となった。日本で開催する場合でも、航空運賃は中国側負担、但し滞在費は日本側で負担して欲しいとの希望がある様である。

	氏名	フリガナ	備考
1	油野 民雄	Aburano Tamio	旭川医科大学 教授
2	秀毛 範至	Shuke Noriyuki	旭川医科大学 講師
3	瀬戸 光	Seto Hikaru	富山医科薬科大学 教授
4	久田 欣一	Hisada Kinichi	金沢大学医学部 名誉教授
5	横山 邦彦	Yokoyama Kunihiko	金沢大学医学部 講師
6	小西 淳二	Konishi Junji	京都大学医学部 教授
7	榎林 勇	Narabayashi Isao	大阪医科大学 教授
8	末吉 公三	Sueyosi Kouzou	大阪医科大学 講師
9	辰 吉光	Tatsu Yoshimitsu	大阪医科大学 医師
10	土井 健司	Doi Kenji	大阪医科大学 医師
11	角田 はるか	Kadota Haruka	大阪医科大学
12	福地 稔	Fukuchi Minoru	兵庫医科大学 教授
13	福地 淳子	Fukuchi Junko	兵庫医科大学
14	佐藤 功	Satoh Katashi	香川医科大学 助教授
15	佐藤 裕子	Satoh Hiroko	香川医科大学
16	小西 英子	Konishi Eiko	香川医科大学
17	高橋 一枝	Takahashi Kazue	香川医科大学 医師
18	中條 政敬	Nakajo Masayuki	鹿児島大学医学部 教授
19	土持 進作	Tsuchimochi Shinsaku	鹿児島大学医学部 医師
20	谷 淳至	Tani Atsushi	鹿児島大学医学部 医師
21	伊藤 和夫	Itoh Kazuo	札幌鉄道病院 部長
22	安東 醇	Ando Atsushi	金沢大学医学部 教授
23	安東 逸子	Ando Itsuko	金沢大学医学部健康学科
24	柏木 徹	Kashiwagi Toru	兵庫医科大学 助教授

25	東 正祥	Azuma Masayoshi	大阪厚生年金病院 医師
26	長沢 昌史	Nagasawa Masashi	大阪厚生年金病院 医師
27	八谷 孝	Hachiya Takashi	みどりが丘病院 院長
28	八谷 喜久子	Hachiya Kikuko	みどりが丘病院
29	今井 照彦	Imai Teruhiko	奈良県立医科大学 講師
30	今井 幸子	Imai Yukiko	奈良県立医科大学 医師
31	大柳 光正	Ohyanagi Mitsumasa	兵庫医科大学 内科助教授
32	酒木 隆壽	Sakaki Takatoshi	兵庫医科大学 内科医師
33	高橋 敬子	Takahashi Keiko	兵庫医科大学 内科医師
34	國安 芳夫	Kuniyasu Yoshio	昭和大学藤が丘病院 教授
35	國安 好子	Kuniyasu Yoshiko	昭和大学藤が丘病院
36	石井 勝巳	Ishii Katsumi	北里大学医学部 名誉教授
37	石井 典子	Ishii Noriko	北里大学医学部
38	油井 信春	Yui Nobuharu	千葉がんセンター 部長
39	木下 富士見	Kinoshita Fujimi	千葉がんセンター
40	木下 園子	Kinoshita Sonoko	千葉がんセンター
41	内山 勝弘	Uchiyama Katsuhiko	帝京大学医学部 教授
42	内山 寛子	Uchiyama Hiroko	帝京大学医学部
43	鳥塚 莞爾	Torizuka Kanji	福井医科大学 前学長
44	鳥塚 睦子	Torizuka Mutsuko	福井医科大学
45	中島 健二	Nakajima Kenji	京都府立医科大学
46	中島 言子	Nakajima Kotoko	京都府立医科大学
47	濱本 研	Hamamoto Ken	愛媛大学医学部 名誉教授
48	濱本 映子	Hamamoto Eiko	愛媛大学医学部
49	瀬田 晴生	Seta Haruo	日本メジフィジクス


50	真貝 隆之	Shinkai Takayuki	奈良医大腫瘍放射線科
51	遠藤 啓吾	Endo Keigo	群馬大学医学部 教授
52	浅岡 伸之	Asaoka Nobuyuki	GE横河メディカル
53	川野 輝喜	Kawano Teruki	GE横河メディカル
54	奥田 順三	Okuda Junzo	D R L
55	原田 和朗	Harada Kazurou	D R L
56	相田 伸昭	Aida Nobuaki	D R L
57	坂本 澄久	Sakamoto Sumihisa	D R L
58	波多野 純一	Hatano Junichi	D R L
59	小島 靖雅	Kojima Yasumasa	D R L
60	荒川 康彦	Arakawa Yasuhiko	D R L
61	中村 日出彦	Nakamura Hidehiko	日本メジフィジクス
62	本村 廣	Motomura Hiroshi	日本メジフィジクス
63	堤 昭二	Tsutsumi Shouji	日本メジフィジクス
64	竹内 信裕	Takeuchi Nobuyuki	日本メジフィジクス
65	中島 義直	Nakajima Yoshinao	日本メジフィジクス
66	片岡 義隆	Kataoka Yoshitaka	日本メジフィジクス
67	利波 紀久	Tonami Norihisa	金沢大学医学部 教授
68	利波 よしえ	Tonami Yoshie	金沢大学医学部
69	張 宏	Zhang Hong	群馬大学医学部 大学院生
70	斉藤 京子	Saitoh Kyoko	虎ノ門病院 医師
71	日下部きよ子	Kusakabe Kiyoko	東京女子医科大学 教授
72	野口 靖史	Noguchi Yasusi	東京女子医科大学 講師
73	鈴木 肇	Suzuki Hajime	三広メディカル
74	池谷憲生	Ikegaya Kazuo	東芝メディカル

75	李 紅	Li Hon	東芝メデイカル
76	山下貴司	Yamashita Takashi	浜松ホトニクス
77	武田 徹	Takeda Tohru	筑波大学
78	松浦修三	Matsuura Shuzo	旅行社随員
79	木村典子	Kimura Noriko	旅行社随員
80	呉 頌	Jin Wu	筑波大学 留学生

日本財団補助金による  
1999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7月19日

財団法人 日中医学協会  
 理事長 中島章殿

報告者氏名 南 嶋 洋 一   
 所属・役職 宮崎医科大学・副学長  
 所在地 〒889-1692 宮崎郡清武町大字木原5200  
 電話 0985-85-1510 (代) 内線 2004

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回日中ウイルス学会・長春シンポジウム  
 テーマ 日中共通のウイルス感染症  
 主催団体 日本ウイルス学会 / 中国微生物学会  
 代表者 山西 弘一 (日本側) / 聞 玉梅 (中国側)  
 期間・開催地 1999年6月28日(月)~1999年6月30日(水)・中国吉林省長春市  
 参加者数 日本側 30名 中国側 55名  
 招へい・派遣目的 日中両国に共通なウイルスとそれによる感染症に関する研究成果を  
 発表し、最新の情報を交換し、併せて両国のウイルス研究者の交流・親睦を促進する。

1. 招へい 派遣研究者 人数 30 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
別 紙		

滞 在 期 間 自 1999年6月27日 至 1999年7月4日

学会名称  
第3回日中ウイルス学会

---

学会テーマ  
日中両国に共通のウイルス及びウイルス感染症

---

日本側主催代表者氏名  
日本ウイルス学会・理事長／大阪大学・教授・山西弘一

中国側代表者氏名  
中国微生物学会・会長／上海医科大学・教授・聞玉梅

---

学会報告

報告者氏名  
日本ウイルス学会・常務理事／宮崎医科大学・副学長・南嶋洋一

今回の第3回日中ウイルス学会は「日中両国に共通のウイルス及びウイルス感染症」を主題に、中国吉林省長春市で開催された。会場に当てられた天都大飯店は、長春市郊外の新興工業団地の一角に位置し、中国側の支援団体の一つである長春医薬集団の建物に近接し、その経営傘下にあるものであった。本学会を現地で組織した、その長春医薬集団の副総裁は、かつて大阪大学微生物病研究所に留学し、上田重晴教授の指導の下で大学院を修了して医学博士を授与された盛君博士であったことから、今回の会場の設営と学会の運営は、以前の2回の日中ウイルス学会に較べて、非常に円滑に行われた。日本ウイルス学会としては、山西理事長の下、上田重晴常務理事（大阪大学・教授）と南嶋が企画と実務を担当し、30名が参加し、25題の演題を発表した。

6月27日、飛行機の延着により予定の変更を余儀なくされたが、夜9時過ぎから両国の組織委員会のメンバーが学会の運営・進行等に関して打ち合わせを行った。すなわち、プログラムに関してワークショップ1-6の座長の確認と演題の順序の調整を行い、山西理事長立ち会いのもとで日本側の分担金を朱関福中国病毒学会会長へ手渡した。

6月28日は朝8時より開会式を行った。まず、中国微生物学会会長の聞玉梅教授が日中ウイルス学会開催の意義を強調し、歓迎の辞を述べた。続き

て、日本ウイルス学会理事長山西弘一教授が日本側を代表して挨拶し、日中ウイルス学会の第1回から第3回にいたる経緯と長春での本学会の主旨を述べた。

開会式直後の最初のワークショップは、インフルエンザをテーマにしたものであった。かつてのA型香港亜型（H3N2）や一昨年のトリ由来の新型のA型（H5N1）など、新しいA型インフルエンザウイルスの出現と、インフルエンザの世界的流行史上中国が演じた役割は極めて大きいものがある。その観点から両国の分離ウイルスの分子生物学的解析と分子進化の発表は正しく今回のテーマに合致するものであった。また、日本側から発表された果実「黒カリン」のエキスに抗インフルエンザウイルス活性があるとの報告は、漢方医学の伝統がある中国側の注目するところとなり、活発な討論が行われた。なお、新型A型インフルエンザウイルスの出現の背景には、中国のヒトとブタとニワトリと一緒に暮らしている生活環境が重要であるので、そのような場所を是非みたい、講義や講演用にその写真を撮りたいと、我々有志が中国側に要望したが、この申し入れは体裁よく断られた。

同じく、かつて中国大陸の流行性出血熱、その後韓国型出血熱として知られ、わが国でも古くは大阪梅田で、近年は大学の動物実験の担当者に患者が発生した腎症候性出血熱とその病原体であるハンタウイルスに関する解析結果も両国研究者の関心を集めた。

中国側のウイルス性肝炎の研究発表に進歩の後がみられた。6年前の北京での第1回の日中ウイルス学会に際しては、酵素抗体法で行った数万人の規模でのB型肝炎ウイルスの抗体測定の結果と、抗体陽性率が献血者群が供血者群より圧倒的に高いという仰天するような発表があった。その後、さすがに採血器具を介する医原的な感染は過去のものになったようである。ただ、肝炎ウイルスは聞玉梅会長の専門領域でありながら、今回は日本側から肝炎ウイルスの専門家の参加が得られず、日中間で有意義な討議が行われなかったことが残念であった。

なお、日本人演者の中国における風疹ウイルスの分布を示した地図が台湾を色抜きしていたことに対して、すかさず若い中国人研究者が「台湾は中国の一部である」と異議を唱える一幕があった。

獣医学領域でのウイルス感染症としては、長春近郊におけるネコおよびトラのカリシウイルス感染症の発表、特にその激しい病像を示すカラーライドが、日本側のウイルス学者にとっては非常に新鮮であった。

最後のセッションで予定を変更して行われた、中国病毒学会副会長の郭一鳴教授の疫学からワクチンに及ぶヒト免疫不全ウイルス（HIV）感染の実



態とA I D Sに関する中国の研究状況を総括する講演が圧巻であった。彼はドイツに留学した経験を持つ新進気鋭のウイルス学者で、A I D Sに関する国家プロジェクトの責任者であり、国際的にも活躍しており、近い将来中国のウイルス学会を代表する研究者になるものと思われる。

閉会式においては、日本側を代表して南嶋が総括を行い、本来ウイルスに国境は無く、日中両国は今後もウイルスとウイルス感染症を共有して行くであろうことは自明であり、21世紀においては両国のウイルス学会の間の協調と交流そして情報交換が益々必要になることを力説し、併せて今後の両国のウイルス学の進むべき道として、ウイルスの分子生物学的解析をウイルス感染症の予防に結びつけることである、と強調した。

学会終了後、日本側の参加者が醸金して中国側の組織委員会のメンバーを夕食に招待し、その席で次回の日中ウイルス学会の開催に関する打ち合わせを行った。その結果、中国側の提案に基づき、次回の第4回日中ウイルス学会は日本で開催されることになった。

なお、今回の日中ウイルス学会の特徴の一つとして、日本人参加者が、日本ウイルス学会の年次学術集会では、専門分野が細分化され、したがって会場を異にするために聞くことが出来ない日本人研究者の研究成果を熱心に聴いていたことである。学会及びその後の甘肅省視察旅行を通じての日本人参加者同志の親睦・交流も本学会の副次的効果として見逃せない。

今回の第3回日中ウイルス学会を通じての一般的な印象を列記すると以下の通りである。

1) ウイルス学の研究対象がウイルス粒子から遺伝子へ推移した。特に中国側の分子生物学的研究の進歩は目を見張るものがある。今後はそのようなミクロな分析結果を個体レベルでマクロな視点から生かしていくウイルス感染学の確立が課題であろう。

2) 学会の口演に関しては、双方に英語が通じるようになり、かなりの突っ込んだ議論が出来るようになった。

3) 発表型式に関しても、今回はコンピューターから直接スクリーンに投影するような演者も現れ、手書きのスライドを用いていた第1回の学会と隔世の感がある。

4) 定年をはるかに過ぎた73歳の朱関福博士が未だに中国病毒学会の会長の地位にあるように、長老支配が続く中国にあっても、学会中に聞玉梅教授が若手の研究者を鼓舞・激励する光景がしばしばみられた。彼女は中国微生物

物学会会長の立場から、若手研究者を養成する基金を募り、それに基づいて英語を駆使し得る優秀な若い研究者を選別して、2002年の日本での第4回日中ウイルス学会に送り込むという、構想を明かしてくれた。

5) 中国側の若手研究者の知的好奇心の高さと勤勉さに感心させられた。ノートを片手に真剣に、熱心に質問する態度は、昨今の日本の若い研究者や学生にみられないものであった。また、日本人参加者に日本留学の可能性を個別に打診する研究者も少なからず見受けられた。

確かに選ばれた中国人であるという一面を考慮しても、多くの無学・無気力・無関心・無礼な日本人学生と対比するとき、21世紀は中国のものであるろう、というのが実感である。

## 写真説明

- 【1】開会式で歓迎の挨拶をする聞玉梅中国微生物学会会長
- 【2】開会式で歓迎の挨拶をする山西弘一日本ウイルス学会理事長
- 【3】開会式の司会をする朱関福中国病毒学会会長と山西弘一理事長
- 【4】発表に聴き入る日中両国の参加者
- 【5】中国側の質問に答える栄鶴義人教授
- 【6】閉会式で総括する南嶋と郭一鳴中国病毒学会副会長

## 会议代表名录

- 闻玉梅 女 上海医科大学分子病毒室  
上海市医学院路138号 邮政编码:260032 电话:021-64041900-2116
- 陈娟 女 军事医学科学院五所  
北京市海淀区太平路27号五所 邮政编码:100850 电话:010-66931536
- 周育森 男 军事医学科学院五所  
北京丰台东大街20号 邮政编码:100071 电话:010-66948563
- 刘力 男 中国医学科学院基础医学研究所  
北京东单三条5号 邮政编码:100005 电话:010-65296454
- 黎皓 男 中国医学科学院基础医学研究所  
北京东单三条5号 邮政编码:100005 电话:010-65296454
- 邵一鸣 男 卫生部艾滋病预防与控制中心  
北京宣武区南纬路27号 邮政编码:100050 电话:010-63154638
- 蒋岩 女 卫生部艾滋病预防与控制中心  
北京宣武区南纬路27号 邮政编码:100050 电话:010-63186655\*2062
- 邢辉 女 卫生部艾滋病预防与控制中心  
北京宣武区南纬路27号 邮政编码:100050 电话:010-63186655\*2614
- 万素君 女 北京中国中医研究院广安门医院  
北京宣武区北线阁5号 邮政编码:100053 电话:010-88001149
- 张秀春 女 北京市卫生防疫站流行病科  
北京市东城区和平里中街16号 邮政编码:100013 电话:010-64212461-580
- 何忠平 男 北京地坛医院  
北京地坛公园13号 邮政编码:100011 电话:010-64211031-2357
- 张霆 男 北京首都儿科研究所  
北京市雅宝路2号 邮政编码:100020 电话:010-65127766-5585
- 赵锦铭 男 北京首都儿科研究所  
北京市雅宝路2号 邮政编码:100020 电话:010-65127766-5576
- 肖玮 女 北京首都儿科研究所  
北京市雅宝路2号 邮政编码:100020 电话:010-65127766-5585
- 万里涛 男 北京首都儿科研究所  
北京市雅宝路2号 邮政编码:100020 电话:010-65127766-5576
- 朱汝南 女 北京首都儿科研究所  
北京市雅宝路2号 邮政编码:100020 电话:010-65127766-5585
- 王琴 女 中国兽药监察所  
北京海淀区白石桥路30号 邮政编码:100081 电话:010-62178844-3265
- 袁韧 女 黑龙江省卫生防疫站  
哈尔滨市香坊区香安街187号 邮政编码:150036 电话:0451-5654178
- 刘彦成 男 黑龙江省卫生防疫站  
哈尔滨市香坊区香安街187号 邮政编码:150036 电话:0451-5654178
- 齐义鹏 男 武汉大学病毒所  
湖北武昌珞珈山武汉大学 邮政编码:430072 电话:027-87682938

**李凌云** 女 武汉大学病毒所  
 湖北武昌珞珈山武汉大学 邮政编码:430072 电话:027-87682978  
**陈化兰** 女 哈尔滨兽医研究所  
 哈尔滨市南岗区马端街427号 邮政编码:150001 电话:0451-2725786-304  
**林道红** 女 哈尔滨医科大学微生物学教研室  
 哈尔滨市保健路157号 邮政编码:150086 电话:0451-6663654  
**黄秀荣** 女 哈尔滨医科大学微生物学教研室  
 哈尔滨市保健路157号 邮政编码:150086 电话:0451-6663654  
**曲章义** 男 哈尔滨医科大学微生物学教研室  
 哈尔滨市保健路157号 邮政编码:150086 电话:0451-6663654  
**谷鸿喜** 女 哈尔滨医科大学微生物学教研室  
 哈尔滨市南岗学府路194号 邮政编码:150086 电话:0451-6685122  
**赵国强** 男 河南医科大学微生物学教研室  
 郑州市大学路40号 邮政编码:450052 电话:0371-6973624  
**孟宗达** 男 河北省卫生防疫站  
 河北保定市红旗路36号 邮政编码:071000 电话:0312-5061472  
**周义新** 男 沈阳军区军事医学研究所  
 沈阳市皇姑区孔雀河西街2号 邮政编码:110031 电话:024-23052415  
**彭世勇** 男 北京262医院  
 北京市新外大街16号 邮政编码:100088 电话:010-62022332  
**李越希** 男 南京军区军事医学研究所  
 南京市中山东路293号 邮政编码:210002 电话:025-4541320  
**吴立平** 女 山西省卫生防疫站  
 太原小南关28号 邮政编码:030012 电话:0351-7243303-3060  
**何洪彬** 男 解放军农牧大学军事兽医研究所  
 长春西安大路175号 邮政编码:130062 电话:0431-7983154  
**范泉水** 男 解放军农牧大学军事兽医研究所  
 长春西安大路175号 邮政编码:130062 电话:0431-7983154  
**王宏伟** 男 解放军农牧大学军事兽医研究所  
 长春西安大路175号 邮政编码:130062 电话:0431-7973911-66683  
**金宁一** 男 解放军农牧大学军事兽医研究所  
 长春西安大路175号 邮政编码:130062 电话:0431-7973911-66697  
**郭志儒** 男 解放军农牧大学军事兽医研究所  
 长春西安大路175号 邮政编码:130062 电话:0431-7973911-66697  
**颜冰** 女 军事医学科学院五所  
 北京市海淀区太平路27号 邮政编码:100850 电话:010-66931501  
**杨帆** 中国预防医学科学院病毒学研究所  
 北京市宣武区迎新街100号 邮政编码:100052  
**宋干** 男 中国预防医学科学院病毒学研究所  
 北京市宣武区迎新街100号 邮政编码:100052  
**陈亮** 男 福建省卫生防疫站  
 福州市南营中军后5号 邮政编码:350001  
**黄呈辉** 南 深圳宝安区宝安血站  
 广东省深圳宝安区 电话:0755-7781066-8344

**刘成福** 男 长春医药集团  
 吉林省长春市同志街64号 邮政编码:130021 电话:0431-5666377  
**盛君** 男 长春医药集团  
 吉林省长春市同志街64号 邮政编码:130021 电话:0431-5671492  
**于维国** 男 长春医药集团  
 吉林省长春市同志街64号 邮政编码:130021 电话:0431-5671387  
**黄玮** 男 长春医药集团  
 吉林省长春市同志街64号 邮政编码:130021 电话:0431-5671387  
**殷震** 男 解放军农牧大学军事兽医研究所  
 吉林长春西安大路175号 邮政编码:130062  
**朱关福** 男 军事医学科学院五所  
 北京市海淀区太平路27号 邮政编码:100850 电话:010-66931541  
**李钟铎** 男 军事医学科学院五所  
 北京市海淀区太平路27号 邮政编码:100850 电话:010-66931506  
**祝庆余** 男 军事医学科学院五所  
 北京市丰台区东大街20号 邮政编码:100071 电话:010-66948503  
**王达林** 男 军事医学科学院五所  
 北京市丰台区东大街20号 邮政编码:100071 电话:010-66948511  
**蒋越** 男 军事医学科学院五所  
 北京市海淀区太平路27号 邮政编码:100850 电话:010-66931501  
**吴庆丽** 女 军事医学科学院五所  
 北京市海淀区太平路27号 邮政编码:100850 电话:010-66931501  
**肖长松** 男 中国微生物学会  
 北京市海淀区中关村北一条13号 邮政编码:100080 电话:010-62554677  
**薛春华** 女 中国微生物学会  
 北京市海淀区中关村北一条13号 邮政编码:100080 电话:010-62554677

**Dr. Koichi Yamanishi 山西 弘一**

Department of Microbiology, Osaka University Medical School

2-2 Yamada-oka, Suita, Osaka 565-0871, Japan

Tel: 81-6-6879-3321 Fax: 81-6-6879-3329 e-mail: yamanisi@micro-med.osaka-u.ac.jp

**Dr. Yasuo Suzuki 鈴木 康夫**

Department of Biochemistry, University of Shizuoka School of Pharmaceutical Sciences

52-1 Yada, Shizuoka-shi 422-8526, Japan

Tel: 81-54-264-5725 Fax: 81-54-264-5721 e-mail: suzukiy@ys7.u-shizuoka-ken.ac.jp

**Dr. Masanobu Azuma 東 匡伸**

Department of Microbiology, Asahikawa Medical College

4-5, Nishikagura, Asahikawa 078-8510, Japan

Tel: 81-166-68-2390 Fax: 81-166-68-2399 e-mail: azumamas@asahikawa-med.ac.jp

**Dr. Jiro Arikawa 有川 二郎**

Institute for Animal Experimentation, Hokkaido University School of Medicine

Kita-15, Nishi-7, Sapporo 060-8638, Japan

TEL: 81-11-706-6905 FAX: 81-11-706-7879 e-mail: j\_rika@med.hokudai.ac.jp

**Dr. Shiro Shigeta 茂田 士郎**

Department of Microbiology, Fukushima Medical University

1, Hikarigaoka, Fukushima 960-1295, Japan

TEL: 81-24-548-2111(ext. 2161) FAX: 81-24-548-5072 e-mail: sshigeta@fmu.ac.jp

**Dr. Hiroo Hoshino 星野 洪郎**

Department of Hygiene and Virology, Gunma University School of Medicine

3-29-22, Showa-machi, Maebashi, Gunma 371-8511, Japan

TEL: 81-27-220-8001 FAX: 81-27-220-8006 e-mail: hoshino@akagi.sb.gunma-u.ac.jp

**Dr. Deyu Fang 房 德玉**

Department of Hygiene and Virology, Gunma University School of Medicine

3-29-22, Showa-machi, Maebashi, Gunma 371-8511, Japan

TEL: 81-27-220-8001 FAX: 81-27-220-8006

**Dr. Kanji Hirai 平井 莞二**

Department of Tumor Virology, Division of Virology and Immunology, Medical Research Institute, Tokyo Medical and Dental University

Yushima 1-5-45, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8510, Japan

TEL: 81-3-5803-5814 FAX: 81-3-5803-0241 e-mail: hirai.creg@mri.tmd.ac.jp

**Dr. Yoshito Eizuru 榮鶴 義人**

Division of Persistent and Oncogenic Viruses, Center for Chronic Viral Disease, Faculty of Medicine, Kagoshima University

8-35-1 Sakuragaoka, Kagoshima 890-8520, Japan

TEL: 81-99-275-5935 FAX: 81-99-275-5937 e-mail: ccvdgan@med3.kufm.kagoshima-u.ac.jp

**Dr. Setsuko Nakajima 中島 節子**

National Institute of Public Health

4-6-1 Shirokanedai, Minato-ku, Tokyo 108-8638, Japan

TEL: 81-3-3441-7111(ext.261) FAX:81-3-3446-4314 email: nakajima@iph.go.jp

**Dr. Katsuhisa Nakajima 中島 捷久**

Department of Virology, Medical School, Nagoya City University

1 Kawasumi, Mizuho-cyo, Mizuho-ku, Nagoya 467-0001, Japan

TEL: 81-52-853-3638 FAX: 81-52-853-3638 e-mail: nakajima@med.nagoya-cu.ac.jp

**Dr. Kazuyoshi Ikuta 生田 和良**

Department of Virology, Research Institute for Microbial Diseases, Osaka University

3-1 Yamada-oka, Suita, Osaka 565-0871, Japan

TEL: 81-6-6879-8307 FAX: 81-6-6879-8310 e-mail: ikuta@biken.osaka-u.ac.jp

**Dr. Takeshi Mikami 見上 彪**

**Mrs. Shizuko Mikami 見上 倭子**

The Research Center for Protozoan Molecular Immunology, Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine

Inada-cho, Obihiro, Hokkaido 080-8555, Japan

TEL: 81-155-49-5640 FAX: 81-155-49-5643 e-mail: mikamit@obihiro.ac.jp

**Dr. Shigetaka Katow 加藤 茂孝**

Department of Viral Disease and Vaccine Control, National Institute of Infectious Diseases

4-7-1 Gakuen, Musashi-Murayama, Tokyo 208-0011, Japan

TEL: 81-42-561-0771 FAX: 81-42-561-1960 e-mail: katow@nih.go.jp

**Dr. Kin-ichiro Miura 三浦 謹一郎**

Institute of Biomolecular Science, Gakushuin University

1-5-1 Mejiro, Toshima-ku, Tokyo 171-8588, Japan

TEL: 81-3-5992-1033 FAX: 81-3-5992-1034 e-mail: bio-dir@gakushuin.ac.jp

**Dr. Xuenan Xuan 玄 学南**

The Research Center for Protozoan Molecular Immunology, Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine

Inada-cho, Obihiro, Hokkaido 080-8555, Japan

TEL: 81-155-49-5648 FAX: 81-155-49-5643 e-mail: gen@obihiro.ac.jp

**Dr. Yoshihiro Tsutsui 筒井 祥博**

Second Department of Pathology, Hamamatus University School of Medicine  
3600 Handa-cho, Hamamatsu 431-3192, Japan  
TEL: 81-53-435-2221 FAX: 81-53-435-2224

**Dr. Yoshinobu Okuno 奥野 良信**

Division of Virology, Department of Public Health, Osaka Prefectural Institute of Public Health  
3-69, 1-chome, Nakamichi, Higashinari-ku, Osaka 537-0025, Japan  
TEL: 81-6-6972-1321 FAX: 81-6-6972-2393 e-mail: okuno@iph.pref.osaka.jp

**Dr. Kotaro Yasui 保井 孝太郎**

Tokyo Metropolitan Institute for Neuroscience  
2-6 Musashidai, Fuchu, Tokyo 183-8526, Japan  
TEL: 81-42-325-3881 FAX: 81-42-321-8678 e-mail: yasui@tmin.ac.jp

**Dr. Nobuko Ikegami 池上 信子**

Osaka National Hospital Clinical Research Institute  
5-22, Minami-kusunosato, Daito, Osaka 574-0004, Japan  
TEL: 81-720-77-0375 FAX: 81-720-77-0375

**Dr. Yoshizo Asano 浅野 喜造**

Department of Pediatrics, Fujita Health University School of Medicine  
Toyoake, Aichi 470-1192, Japan  
TEL: 81-562-9251 FAX: 81-562-95-2216 e-mail: yasano@fujita-hu.ac.jp

**Dr. Michiko Watanabe 渡边 倫子**

Department of Neurovirology, Research Institute for Microbial Diseases, Osaka University  
3-1 Yamada-oka, Suita, Osaka 565-0871, Japan  
TEL: 81-6-6879-8300 FAX: 81-6-6875-1170 e-mail: lynco@biken.osaka-u.ac.jp

**Dr. Kazumori Yazaki 矢崎 和盛**

Department of Ultrastructural Research, The Tokyo Metropolitan Institute of Medical Science  
3-18-22 Honkomagome, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8613, Japan  
TEL: 81-3-3823-2101(ext.5422) FAX: 81-3-3823-2965 e-mail: yazaki@rinshoken.or.jp

**Dr. Takeshi Sanekata 寶方 剛**

Veterinary Microbiology, Faculty of Agriculture, Tottori University  
4-101, Koyama, Tottori 680-8553, Japan  
TEL: 81-857-31-5430 FAX: 81-857-31-5679 e-mail: sanekata@muses.tottori-u.ac.jp

**Dr. Toshiki Inada 稻田 敏樹**

Infectious Disease Surveillance Center, National Institute of Infectious Diseases  
1-23-1 Toyama, Shinjyuku-ku Tokyo 162-8640, Japan  
TEL: 81-3-5285-1111 FAX: 81-3-5285-1129 e-mail: tinada@nih.go.jp



**Dr. Shizuko Yamadera 山寺 静子**

Infectious Disease Surveillance Center, National Institute of Infectious Diseases  
1-23-1 Toyama, Shinjyuku-ku Tokyo 162-8640, Japan  
TEL: 81-3-5285-1111 FAX: 81-3-5285-1129

**Dr. Shiro Kato 加藤 四郎**

4-23-7 Fujishiro-dai, Suita, Osaka 565-0873, Japan  
TEL: 81-6-6872-7389

**Dr. Shigeharu Ueda 上田 重晴**

Department of Neurovirology, Research Institute for Microbial Diseases, Osaka University  
3-1 Yamada-oka, Suita, Osaka 565-0871, Japan  
TEL: 81-6-6879-8299 FAX: 81-6-6875-1170 e-mail: [sueda@biken.osaka-u.ac.jp](mailto:sueda@biken.osaka-u.ac.jp)

**Dr. Yoichi Minamishima 南嶋 洋一**


Department of Microbiology, Miyazaki Medical College  
5200 Kihara, Kiyotake, Miyazaki 889-1692, Japan  
TEL: 81-985-85-0871 FAX: 81-985-85-6475 e-mail: [yallmina@post1.miyazaki-med.ac.jp](mailto:yallmina@post1.miyazaki-med.ac.jp)

日本財団補助金による  
1999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8月18日

財団法人 日中医学協会  
理事長 中島章殿

報告者氏名 北川正信   
所属・役職 富山医科薬科大学・名誉教授  
所在地 〒930-0194 富山市杉谷 2630  
電話 076-434-2281 内線 2343

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1回中日共同石綿シンポジウム  
テーマ 日中西国における石綿の健康障害  
主催団体 中国予防医学科学院労働衛生職業病研究所 / 日本石綿研究会  
代表者 李徳鴻 北川正信  
期間・開催地 1999年7月16・17日 中国北京市  
参加者数 日本側 18名 中国側 32名  
~~招へり~~ 派遣目的 石綿の健康障害に関する研究発表, 座長を含む  
専門家の交流

1. ~~招へり~~ 派遣研究者 人数 15 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
1. 平岡 武典	国立療養所宮崎病院、副院長	呼吸器内科学
2. 井内 康輝	広島大学医学部、教授	人体病理学
3. 井上 康	兵庫医科大学、医員	呼吸器内科学
4. 石原 陽子	東京女子医科大学、講師	公衆衛生学
5. 君塚 五郎	千葉大学看護学部、教授	実験病理学
6. 岸本 卓巳	岡山労災病院、部長	呼吸器内科学
7. 北川 正信	富山医科薬科大学、名誉教授	人体病理学
8. 神山 宣彦	労働省産業医学総合研究所、部長	環境計測学
9. 三浦 博太郎	横須賀共済病院、部長	呼吸器内科学
10. 三宅 光富	兵庫医科大学、医員	呼吸器内科学
11. 森永 謙二	大阪府立成以病センター、主幹	環境疫学
12. 村井 嘉寛	富山医科薬科大学医学部、助手	環境病理学
13. 大山 正幸	大阪府立公衆衛生研究所、主任研究員	公衆衛生学
14. 坂谷 光則	国立療養所近畿中央病院、副院長	呼吸器内科学
15. 横山 邦彦	国立療養所近畿中央病院、元副院長	呼吸器内科学

滞在期間 自 1999年7月15日 至 1999年7月20日

## 学術会議報告書

学会名称 第1回中日共同石綿シンポジウム

学会テーマ 日中両国における石綿の健康障害

主催者日本側代表

富山医科薬科大学・名誉教授 北川正信

主催者中国側代表

中国予防医学科学院労働衛生職業病研究所・副所長 李 徳鴻

内容報告

北川正信 (富山医科薬科大学・名誉教授、  
日本石綿研究会代表幹事)

第6回日本石綿研究会年次研究発表会を中国と共同で行おう、という発案から開催されることとなった第1回中日共同石綿シンポジウムは1999年7月16・17日北京市の天橋賓館「福寿の間」で行われた。

会は冒頭両国代表による挨拶、中国予防医学科学院許副院長による歓迎の言葉があつて記念撮影を行い、2日間にわたる学術交流に入った。今回のテーマは「両国における石綿の健康障害」であつたが、一般演題は中国から15題、米国在住の中国人が中国の資料に基づいて行った研究2題、韓国1題、そして日本から14題の計32題であり、主題別では疫学が中国(+米国)7、日本3、労働環境が中国2、臨床が日本5、病理が日本1、生物学的基礎研究が中国7、韓国1、日本4、方法論に関する基礎研究が中国1、日本1であつた。石綿関連疾患別にみると、全般的な扱いが6、石綿肺3、胸膜肥厚斑1、中皮腫6であり、個別疾患としては中皮腫が多かつた。これらに加えて特別講演が2題(スエーデンのHillerdal教授による「発展途上国ならびに産業先進国における石綿関連疾患の診断とその罹患頻度の将来展望」およびスロバキアのHurbankova部長による「繊維状産業粉塵の形状——その病原性における重要性」)、さらに特別報告1題(イタリアのBianchi部長による「イタリア北東部における石綿関連中皮腫と肺癌」)があつた。一般演題のうち中国からの3題が演者欠席のため取り下げられたが、上記のように各分野からの発表があり、熱心に討議が行われ、所期の目的を達成することができた。基本的には英語で行われたが、必要に応じて元日本へ留学していた中国人による通訳が行われ、大きな困難は生じなかつた。

総合討論で注目されたのは次の二点であった。一つは「クリソタイルのみによる肺癌等発生の危険性」についてであり、他は「なぜ日本や中国でかくも中皮腫が少ないのか」であった。前者については、中国側からのクリソタイル使用労働環境からの肺癌等発生の追跡調査が2題発表されたこともあり、中国産のクリソタイルにはトレモライトなどの混入がないのかどうか、日本はなぜクリソタイルの使用を続けているのか、が問題とされた。日本はILOの示唆に準じて「注意深く使用すれば安全」の立場をとっていることが日本側出席者から述べられた。また、中国産のクリソタイルについては産地別にその性状を日本の研究所へ送り調べるのが会議後ほぼ合意された。後者については桁違いに少ない日本（や中国）の悪性中皮腫の頻度が問題にされ、診断の確度によっているのではなく、（人口100万人に1人というのは）事実であり、近い将来増加が著しくなるであろうことが述べられた。

中国側からクリソタイルのみ使用している職場環境からの報告があったことに関連して、日本も企業側が率直にその使用石綿の種類や期間を示して信頼に耐える研究成績を挙げるのに協力してもらいたいという感想を持ったし、中国ではもっと生検・剖検という病理学的検索が日常化する必要があると思われた。また、中国における石綿取扱い上の注意点として挙げられていた innovation、water、seal、ventilation、protection、management、education、inspection の8項目が「なるほど」と思わせた。

本シンポジウムは当初計画された規模を上まわり、欧米からの演者の参加が得られたこと、会場をホテルに設営できたことは、中国保健省の全面的な支持が得られたこと、日中医学協会からの学術会議開催助成がえられたことによっており、関係当局に深く感謝したい。また、欧米からの視点でこのシンポジウムに参加し、かつ積極的に発言頂いた招へい講師の先生方には今後の研究の方向をも示して頂いたということでお礼を申し上げたい。第2回については確約はなされなかったが、3年後位に杭州市でいかがか、ということが石綿研究会出席者幹事会で話し合われた。

なお、研究会の前日中国予防医学科学院労働衛生職業病研究所を訪問し、紹介ビデオによる6研究部門の活動や後継者育成の状況の説明を受けた。建物とともにわが国の国立公衆衛生院に類似しているとの印象を受けた。

日本財団補助金による

1999 年度日中医学協力事業報告書

- 学会開催に対する助成 -

平成 11 年 11 月 18 日

財団法人 日中医学協会  
理事長 中島章 殿

報告者氏名 磯貝典孝 ④  
所属・役職 近畿大学医学部形成外科・助教  
所在地 509-8511 大阪府山田町東377-2  
FAX 電話 0223-67-7517 内線 \_\_\_\_\_  
TEL 0223-66-0221 ..... 3227

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10回 日中形成外科学会  
テーマ 組織工学おと形成外科の最新線  
主催団体 近畿大学医学部形成外科  
代表者 上石 弘 (カミシロ ヒロシ)  
期間・開催地 H11. 10. 21 ~ H11. 10. 23 大阪 (全日野ツツ717 ホテル)  
参加者数 日本側 57名 中国側 44名  
招へい・派遣目的 日中形成外科医師間の学術交流

1. 招へい・派遣研究者 人数 63 人 記入欄不足の場合は別紙を添付。(→別紙1,2)

氏名	所属・役職	研究分野

滞在期間 自 11 年 10 月 21 日 至 11 年 10 月 25 日

引紙1

中国側登録、宿泊予約						
姓名	発音	性別	大学 / 病院	滞在予定期間		
				10月21日	22日	23日
<del>宋业光</del>	<del>Song Ye-Guang</del>	<del>男</del>	<del>北京八大处整形外科医院</del>	<del>★</del>	<del>★</del>	<del>★</del>
陈宗基	Chen Zong-Ji	男	北京八大处整形外科医院	★	★	★
戚可名	Qi Ke-Ming	男	北京八大处整形外科医院	★	★	★
<del>惠博生</del>	<del>Hui Bo-Sheng</del>	<del>男</del>	<del>北京医科大学三院成形外科</del>	<del>★</del>	<del>★</del>	<del>★</del>
李东	Li Dong	男	北京医科大学三院成形外科	★	★	★
刘传君	Liu Chun-Jun	男	北京医科大学三院成形外科	★	★	★
王炜	Wang Wei	男	上海第九人民医院整形外科	★	★	★
范志宏	Fan Zhi-Hong	男	上海第九人民医院整形外科	★	★	★
干季良	Gan Ji-Liang	男	上海第九人民医院整形外科	★	★	★
高景恒	Gao Jing-Heng	男	沈阳市辽宁省人民医院整形外科	★	★	★
文小泉	Wen Xiao-Quan	男	沈阳市辽宁省人民医院整形外科	★	★	★
林子豪	Lin Zi-Hao	男	上海第二军医大学长征医院	★	★	★
赵耀忠	Zhao Yao-Zhong	男	上海第二军医大学长征医院	★	★	★
柳大烈	Liu Da-Lie	男	沈阳市沈阳军区总医院整形外科	★	★	★
刘晓燕	Liu Xiao-Yan	女	沈阳市沈阳军区总医院整形外科	★	★	★
孙明杰	Sun Ming-Jie	男	沈阳市沈阳军区总医院整形外科	★	★	★
杨宗城	YANG Zong-Cheng	男	重庆三军大西南医院烧伤研究所	★	★	★
高建华	Gao Jian-Hua	女	广州市一军大南方医院整形外科	★	★	★
颜玲	Yan Ling	女	广州市一军大南方医院整形外科	★	★	★
邓平	Deng Ping	男	中华医学会佛山分会专科门诊部	★	★	★
罗永湘	Lou Yong-Xiang	男	武汉同济医科大学同济医院	★	★	★
裴斌	Pei Bin	男	湖北襄樊市立一医院手外科	★	★	★
张家均	Zhang Jia-Jun	男	武汉同济医科大学同济医院	★	★	★
王成琪	Wang Cheng-Qi	男	山东潍坊89医院创伤骨科中心	★	★	★
王剑利	Wang Jian-Li	男	山东潍坊89医院创伤骨科中心	★	★	★
宁金龙	Ning Jing-Long	男	合肥安徽医科大学一院整形外科	★	★	★
陈存富	Chen Cun-Fu	男	山东省兖州91医院整形烧伤科	★	★	★
梁雨合	Liang Yu-He	男	山东省兖州91医院整形烧伤科	★	★	★
刘春利	Liu Chun-Li	男	广州军区总医院整形外科	★	★	★
苑凯华	Yuan Kai-Hua	女	广州军区总医院整形外科	★	★	★
宋建良	Song Jian-Liang	男	杭州整形医院	★	★	★
徐坚方	Xu Jian-Fang	男	杭州整形医院	★	★	★
<del>姚建民</del>	<del>Yao Jian-Min</del>	<del>男</del>	<del>杭州整形医院</del>	<del>★</del>	<del>★</del>	<del>★</del>
汤海萍	Tang Hai-Ping	女	青岛401医院显微外科中心	★	★	★
丛林	Cong Lin	女	大连市210医院烧伤整形科	★	★	★
贺永奎	He Yong-Kui	男	海南东湖整形美容医院	★	★	★
孙超英	Sun Chao-Ying	女	沈阳第七人民医院医学美容中心	★	★	★
史灵芝	Shi Ling-Zhi	女	沈阳杏林整形美容外科诊所	★	★	★
周波	Zhou Bo	男	大连市第二人民医院整形美容科	★	★	★
田海鹰	Tian Hai-Ying	女	淄博市疗养院美容门诊部	★	★	★
程新德	Cheng Xin-De	男	安徽蚌埠医学院附属医院整形科	★	★	★

# 別紙 Z

程 野	Cheng Ye	男	鞍山钢铁公司铁东医院整形外科	★	★	★
<del>葛俊卿</del>	<del>Ge Jun-Qing</del>	<del>男</del>	<del>大连葛俊卿医疗美容整形科诊所</del>	<del>★</del>	<del>★</del>	<del>★</del>
范启申	Fan Qi-Shen	男	山东潍坊89医院创伤骨科中心	★	★	★
<del>贾铁利</del>	<del>Jia Tie-Li</del>	<del>男</del>	<del>北京空军总医院整形外科</del>	<del>★</del>	<del>★</del>	<del>★</del>
黄 勇	Huang Yong	男	烟台硫磺顶医院整形外科	★	★	★
宋修军	Song Xiu-Jun	男	青岛市立医院骨科	★	★	★
任永安	Ren Yong-An	男	西安市中心医院烧伤整形外科	★	★	★
杨志祥	Yang Zhi-Xiang	男	北京307医院烧伤整形科	★	★	★
王玉新	Wang Yu-Xin	女	中国医大第一临床学院颌整外科	★	★	★
<del>张秀梅</del>	<del>Zhang Xiu-Mei</del>	<del>女</del>	<del>哈尔滨第五医院</del>	<del>★</del>	<del>★</del>	<del>★</del>
龙道畴	Long Dao-Chou	男	武汉湖北医科大学一院整形外科	★	★	★
艾民文	Ai Min-Wen	女	北京黄寺美容外科医院	★	★	★
庞建华	Pang Jian-Hua	女	哈尔滨第五医院整形外科	★	★	★
郭永明	Guo Yong-Ming	男	西安兵工五二一医院骨科	★	★	★
<del>李春满</del>	<del>Li Chun-Man</del>	<del>男</del>	<del>锦州医学院附属第一医院整形科</del>	<del>★</del>	<del>★</del>	<del>★</del>
付素静	Fu Su-Jing	女	沈阳医学院中心医院口腔科	★	★	★
<del>马 强</del>	<del>Ma Jiang</del>	<del>男</del>	<del>重庆渝中区整形专科诊所</del>	<del>★</del>	<del>★</del>	<del>★</del>
<del>张 红</del>	<del>Zhang Hong</del>	<del>女</del>	<del>重庆渝中区整形专科诊所</del>	<del>★</del>	<del>★</del>	<del>★</del>
鲁开化	Lu Kai-Hua	男	四军大学西京医院整形外科中心	★	★	★
艾玉峰	Ai Yu-Feng	男	四军大学西京医院整形外科中心	★	★	★
郭树忠	Guo Shu-Zhong	男	四军大学西京医院整形外科中心	★	★	★
程 健	Cheng Jian	男	浙江医科大学附二院	★	★	★
陈 洁	Chen Jie	女	海南东湖整形美容医院	★	★	★
王锡波	Wang Xi-Bo	男	哈尔滨市五院	★	★	★
曹孟君	Chao Meng-Jun	男	深圳富华美容门诊部	★	★	★
<del>管 宇</del>	<del>Guan Yu</del>	<del>男</del>	<del>中国医大二院口腔科</del>	<del>★</del>	<del>★</del>	<del>★</del>
<del>张建军</del>	<del>Zhang Jian-Jun</del>	<del>男</del>	<del>广州市刀和博士整形中心</del>	<del>★</del>	<del>★</del>	<del>★</del>
<del>古沐明</del>	<del>Gu Mu-Ming</del>	<del>男</del>	<del>广州军区总医院整形外科</del>	<del>★</del>	<del>★</del>	<del>★</del>
张健明	Zhang Jian-Ming	男	广东省顺德市顺德医院整形外科	★	★	★
<del>龙 云</del>	<del>Long Yun</del>	<del>男</del>	<del>湖北医科大学附一医院</del>	<del>★</del>	<del>★</del>	<del>★</del>
王晓明	Wang xiao-Ming	女	辽宁省本溪市本钢美容中心	★	★	★
黄 平	Huang Ping	男	湖北省荆门市立第二医院骨科	★	★	★
曾 星	Zeng Xing	男	人民军医出版社	★	★	★
曹培皙	Cao Pei-Xi	女	吉林医用材料研究所	★	★	★
青 莉	Qing Li	女	广州黄埔区红十字会医院手外科	★	★	★
尹卫民	Yin Wei-Min	男	深圳市红会医院第一门诊部	★	★	★

**The 10th Japan-China Joint Meeting on Plastic Surgery 1999**

事務局 大阪狭山市大野東3 7 7 ー 2 近畿大学医学部形成外科 TEL: 0723-66-0221 FAX: 0723-67-7517

学会名称：第10回日中形成外科学会

学会テーマ：組織工学および形成外科の最前線

日本側代表者：上石 弘（近畿大学医学部教授）

中国側代表者：Lu Kai-hua（第4軍医大学教授、西安市）

学会報告（近畿大学医学部形成外科 助教授 磯貝典孝）

平成11年10月21日より23日までの3日間に114題（特別講演5題、パネル31題、一般講演55題、ポスター22題）からなる学術集会を滞り無く終了することができました。

学会会場は、大阪の南、関西国際空港に隣接するりんくう国際会議場・全日空ゲートタワーホテルといたしました。学会会費は、日本人参加者は、参加費3万円をお支払い頂き、中国人参加者は、6千円といたしました。機械展示は10月22日（9時から17時）および10月23日（9時から12時）の間執り行いました。また、10月22日（金）18：40より総合懇親会を行い、参加者の交流をはかりました。

今回の学術集会では、本格的な同時通訳（サイマル）を取り入れ、広く学会参加者の皆様に討論して頂くことを目指しました。特別講演では、マイクロサージェリーの最先端を波利井教授にご紹介頂き、また、小児形成外科の新しい治療法や考え方をDr. Uptonに分かり易く話して頂き、参加者に感銘を与えていただきました。今回の企画が、今後の本学会の発展と日中両国の友好につながるものと確信いたします。特に、波利井教授のご講演のレベルは、極めて高く、おおくの参加者にとって勉強になりました。また、Dr. Uptonの講義では、比較的治療方法の分かり易い病気の説明始まり、次第に、困難な症例の治療法の紹介がなされ、世界レベルの治療結果には、会場のおおくの形成外科医が深い感銘を受けました。

このたびの第10回日中形成外科学会では、組織委員を日本・中国全国の主要な大学の形成外科教授にお引き受け頂き、幅広く発表を募集致しました。その結果、本年度の日中形成外科学会には、中国側より過去最多の参加申し込みがあり、また、日本側も全国より多数の演題が発表されました。



**The 10th Japan-China Joint Meeting on Plastic Surgery 1999**

事務局 大阪狭山市大野東377-2 近畿大学医学部形成外科 TEL: 0723-66-0221 FAX: 0723-67-7517

さて、今年度の学会期間中には、日中形成外科学会における言語や経済的不平等などの諸問題につきまして、中国側と話し合いの場を設け、今後の対応などについてご意見を頂きました。（組織委員会、10月22日（金）12:10～13:00、ゲートタワーホテル（53階 翼の間）。

**1.言語の問題について**

これまでの過去10年間、共通の言語に基づく討論がされていない状況が続いて参りました。本年度は、サイマルと事務局間において、数度にわたる会議を開きました。あらかじめ発表抄録を基に、発表内容を通訳し易くするとともに、学会前日に発表者の1人1人と通訳者の間で、内容の確認および質疑応答についての確認がなされました。このため、本会議では、極めて内容のある通訳がなされ、この結果、意味のある討論が数多くなされました。この同時通訳の試みは、特に中国側に好評であり、日本-中国間の治療の差がよく理解できたようです。本年度に見習い、来年度も同時通訳が導入されることとなりました。

**2.経済的援助について**

これまで日本において本学会が開催される場合、20名分の往復旅費および40名分の宿泊代と食費が中国側に準備されておりました（経費は、約300～350万円）。しかし、近年、日本経済の衰退とともに、募金活動が困難となってきております。この点を、中国側にご了解頂き、今後は、日本側と中国側の代表者間で話し合いの場を持ち、日本側援助金の金額を決定することが了解されました。

**3.査証の取得について**

今年度は、当初、63名の中国側参加者を予定しておりました。しかし、査証手続きにおいて問題が生じ、中国側から44名のみが来日しました。これまでの日本側担当大学にお尋ねすると、毎回、同じ問題が生じてきたことがわかりました。準備をする日本側にとって、査証が取得できる人数が最後までわからないことは、学会運営上、極めて不利であり、また、直前の変更による経費もかなり多額となりました。そこで、中国側に対して、今後査証の取得方法を予め検討して頂き、学会運営が円滑にできるよう、早期の査証獲得に努力して欲しい旨要請がなされました。

**成果**

本学術集会を開催してみて初めて、2国間の考え方の違いや、治療方針の違いが理解できました。トラブルが発生しても、お互いの立場を尊重しあいながら、

**The 10th Japan-China Joint Meeting on Plastic Surgery 1999**

事務局 大阪狭山市大野東377-2 近畿大学医学部形成外科 TEL: 0723-66-0221 FAX: 0723-67-7517

合理的判断に基づく解決がなされました。学会の討論では、世界レベルでの討論が展開され、極めて有意義な学会となりました。また、参加者間の交流も一層深まり、本学会を通して、日本、中国の形成外科医が多くを学び合うことができた意味深い学会となりました。また、学会開催後、多くの大学より本学会の運営方法と学術交流について高い評価を頂いております。

本学会の準備から開催まで、寄せられました暖かいお言葉と惜しみないご協力により、盛大ですばらしい学会となりました。心よりお礼申し上げます。収支決算書を添えてご報告申し上げます。

**The 10th Japan-China Joint Meeting on Plastic Surgery 1999**

事務局 大阪狭山市大野東377-2 近畿大学医学部形成外科 TEL: 0723-66-0221 FAX: 0723-67-7517

**第10回日中形成外科学会 日程および注意事項**

中国から参加する皆様へ

1999年10月21日

日 程 :

## 10月21日(木)

- 14時05分 関西国際空港着 (CA921 便)
- 15時 オリエンテーション (4 F、真珠の間)。その後、ホテル check-in。
- 15時~17時 ポスター発表者は、掲示を済ませる (6 F)
- 18時~ りんくう国際会議場 (6 F) に集合。学会受付にて抄録、名札を受け取る。
- 18時~19時 夕食 (53 F、翼の間)。
- 20時~21時 学会講演会 (6 F)

## 10月22日(金)

- 07時~08時 朝食 (4 F、鳳の間)
- 08時30分 学会参加 (終日、6 F)。受付にて同時通訳用レシーバーを受け取る。
- 12時10分 Luncheon セミナー (6 F)。組織委員の方は、組織委員会 (53 F、翼の間) に参加する。
- 17時40分 ワインとテナーの夕べ (4 F、鳳の間)
- 18時40分 総合懇親会 (4 F、鳳の間)
- 20時~21時 学会講演会 (6 F)
- 21時~22時 日中代表者会議 (4 F、高砂の間)

## 10月23日(土)

- 07時~08時 朝食 (4 F、真珠の間)
- 午前中 学会参加
- 12時 学会終了
- 午後より自由行動