1．2019年度　研究成果

A　冲中記念成人病研究所専任研究員による基礎的研究

ヒトLPL遺伝子の転写抑制機序の解明

雨宮 三千代

【要旨】

リポプロテインリパーゼ（LPL）は血清脂質のクリアランスに重要である一方、マクロファージに発現するLPLは、動脈硬化における泡沫化の一因を形成すると考えられている。マクロファージLPLの転写調節機構を知ることは、動脈硬化における泡沫化抑制の手がかりを得る可能性がある。そこで、ヒトLPLプロモーターのレポータージーンを作成し、マウスのマクロファージであるRAW細胞に遺伝子導入をし、LPL遺伝子の転写制御を担う責任シス配列と責任トランス因子の同定を試みている。

トランスフェクション及びゲルシフト解析の結果から、転写活性化部位は、転写開始点上流-86bpから-92bpのCTエレメント（CCCTCCC）であることが判明した。トランス因子（SP1およびSP3）の詳細な解析は現在進行中である。

転写抑制部位の検索は、蛍光プローブを用いたフットプリント解析から、-560bpのアデニン（A）付近に、DNA分解酵素消化抵抗部位があることが判明し、その近傍を中心に解析した。すると、転写開始点上流-584bpから-536bpにシス領域が二つ存在することを発見した。そのうちの一つはOCTコンセンサス配列-580 ATTTGCAT-573である。OCT-1（OCT-2）が結合した。もう一つは、-572 GAGACAAAAATTAGAAACT-554である。ゲルシフト法による変異体競合阻害実験から、-562TT-561がDNA結合認識に重要であることが判明したが、トランス因子の同定には至っていない。

【目的】

発見した3つのヒトLPL遺伝子調節領域に着目し、マウスのマクロファージであるRAW細胞を用いて、LPLプロモーターの転写制御機構を解析することで、動脈硬化抑制機序を解明する。

【方法】

(1) 自己血ゲノムDNAからLPL遺伝子調節領域（-2.87k→+50bp）をクローニングし、レポータージーン（LPL-Luc）を作製した。RAW細胞にレポータージーンを遺伝子導入し、転写活性を測定した。

(2) 蛍光プローブを用いたフットプリント解析およびゲルシフト法により、この領域に結合する転写因子を同定した。

【結果】

1. シス領域の同定

LPL遺伝子調節領域（-2.87k→+50bp）レポータージーン（LPL-Luc）を、マウスのマクロファージであるRAW細胞と、ヒト肝細胞HepG2に遺伝子導入し、転写活性を比較した（**図1**）。RAW細胞では、-75から-150bpで転写活性が著しく増加し、-300から-550bpで抑制された。一方、HepG2細胞では、このような顕著な変化はみられなかった。従って、-75から-150 bpのプロモーター近位部は、RAW細胞特異的な転写活性化部位、-300から-550bpのプロモーター遠位部は転写抑制部位であると考えた。

2. 近位部の解析

転写開始点上流-75から-150bpの領域について、LPLプロモーターの解析をRAW細

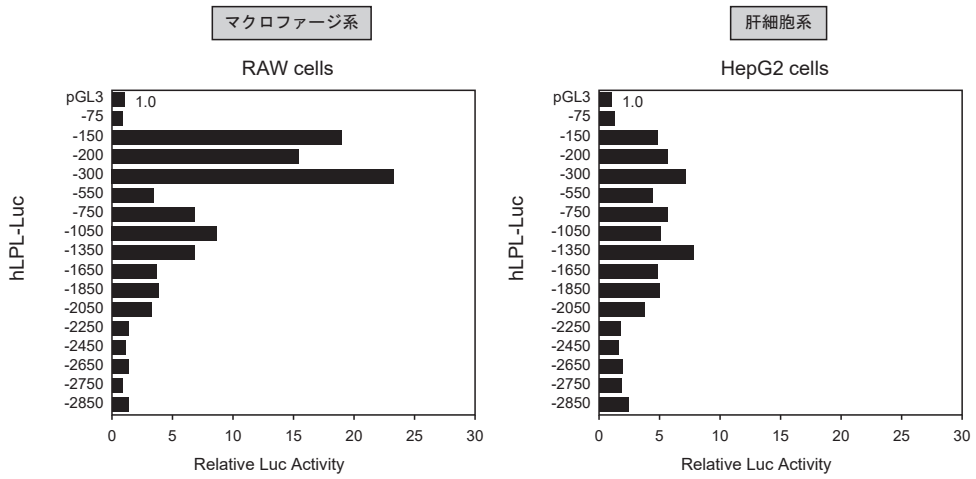


図１　ヒトLPLプロモーターの転写活性の比較

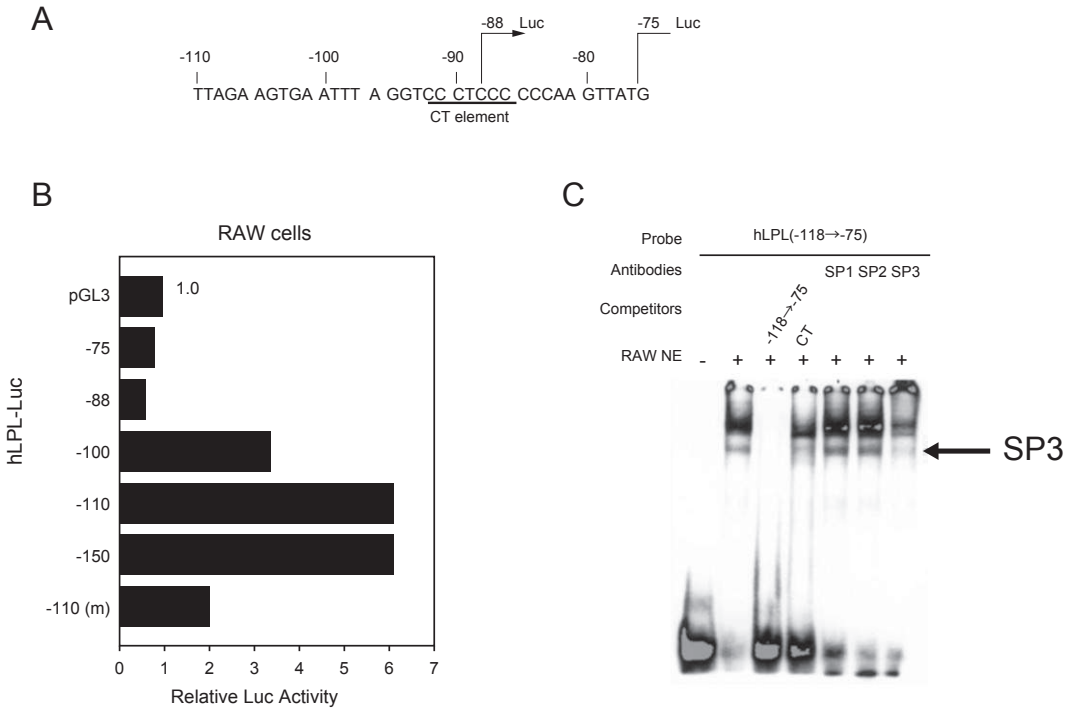


図２　ヒトLPLプロモーター近位部の解析

胞で行った。この領域には、CTエレメント（-86CCCTCCC-92）が存在する（**図2A**）。**図2B**に示すように、-100LPL-Lucで活性が増強し、CTエレメントを変異させた-110(m)-Lucで活性が低下したことから、CTエレメントが責任シス配列と考えられる。また、-118～-75bpをプローブにしてゲルシフト法で解析した結果、SP3抗体でスーパーシフトしたことから、この領域に

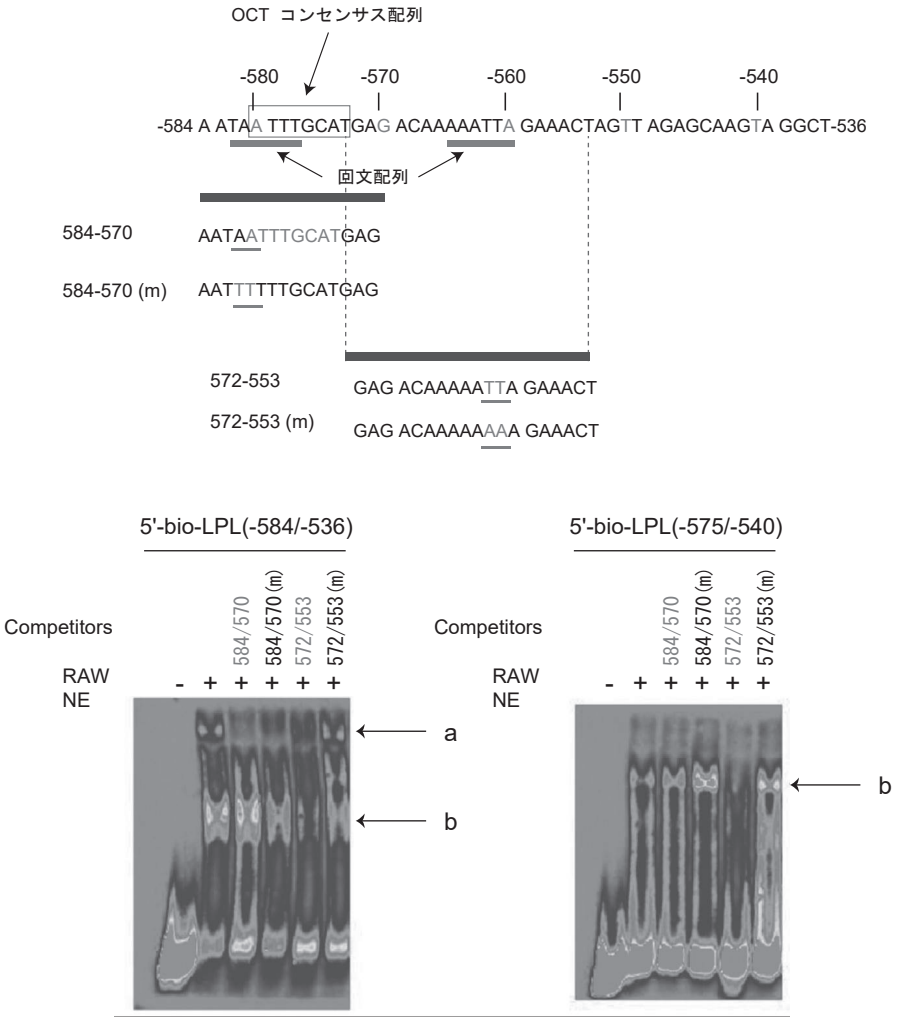


図３　ヒトLPLプロモーター遠位部の解析

は、少なくともSP3が結合することが判明した(**図2C**)。トランス因子（SP1およびSP3）の詳細な解析は現在進行中である。

3. 遠位部の解析

遠位部については、初めに、蛍光プローブ(Fam)を用いたフットプリント解析を行ったところ、-560bpのアデニン(A)付近に、DNA分解酵素消化抵抗部位があることが判明したので(DATA not shown)、更に、ゲルシフト法で、その近傍を中心に解析した。

転写開始点上流-584bpから-536bpにシス領域が二つ存在することを発見した（**図3**）。一つはOCTコンセンサス配列-580 ATTTGCAT-573である。OCT-1（OCT-2）が結合した（矢印aのバンド）。

もう一つは、-572 GAGACAAAAATTAGAAACT-553であり、ゲルシフト法による変異体競合阻害実験から、-562TT-561がDNA結合認識に重要であることが判明したが、トランス因子の同定には至っていない（矢印bのバンド）。

【考察】

ヒトLPL遺伝子には、ATTTGCATという典型的なOCTコンセンサス配列が2ケ所ある(-46～-39, -580～-573)。脂肪細胞では、-46

～ -39bpの配列はLPL遺伝子の活性化に関与することが報告されているが[1)]、マクロファージ（RAW細胞）では、近位部の転写活性は-92 CCCTCCCC-83のCT boxが担っているようである。つまり、脂肪細胞と異なり、マクロファージの近位OCT配列は、転写活性には関与していないのである。

CT boxには、古典的なSPファミリーが結合することが知られている。我々が行ったゲルシフトでも少なくともSP3が結合していた（**図2C**）。そこで、現在、SP1、SP3の発現ベクターをRAW細胞に遺伝子導入し、LPLプロモーターの転写活性を測定している。

一方、遠位部にあるOCTコンセンサス配列（ATTTGCAT）は、ゲルシフトの実験からOCT1とOCT2が結合した（DATA not shown）。しかし、OCT1やOCT2はLPLプロモーターの転写活性において、責任因子としては機能していないようである。

では、LPLの転写はどのように抑制されるか？今回、注目している-572 GAGACAAAAATTAGAAACT-553の領域が関与するのではないかと考える。この配列は、フットプリント解析で、-560bpのアデニン（A）にDNA分解酵素消化抵抗部位があることから判明してきたものである。ゲルシフトでは、結合タンパクの存在は確認できているが、その正体の同定には至っていないのだ。

そこで、間接的な方法として、現在、LPLの転写を活性化・不活性化をするリガンド（22OHコレステロール、9cisレチノイン酸）を用いて、転写と当該領域に結合する転写因子量との相関をクロマチン免疫沈降法やゲルシフト法で検討している。

LPL遠位抑制部位においては、OCT配列よりも、この-572から-553bpの領域が、転写抑制機序に関与していると考えており、現在、SP1、SP3、OCT1、OCT2、当該未知の転写因子及びLXR、RXRのクロストークを検討している。

【文献】

1. Ryan AK, et al.: POU domain family values: flexibility, partnerships, abd developmental codes. Genes & Dev 11: 1207-1225, 1997

糖尿病と認知機能-9
－糖尿病ラットの認知機能障害のメカニズムについて－

新郷　明子

【要約】

今日では、脳内産生型インスリンは、脳内に広く存在する受容体を介して、記憶学習機能に関与することが次第に明らかになっている[1)]。このインスリンを介した情報伝達経路が障害されることにより、認知機能が低下すると考えらることを基に、我々はこれまでに、グルコーストランスポーターを介してインスリン分泌を障害するストレプトゾトシン（STZ）を脳室内に投与して作製した“脳の糖尿病”モデルラット[2)]では認知機能が低下していること、これらのモデルラットの脳組織において、特に海馬歯状回堤部にアミロイドベータタンパクが著明に蓄積していること、また、これらの様相を示した海馬体内部回路の状態は、“脳の糖尿病ラット”の認知機能の低下には、大脳から海馬歯状回顆粒細胞への情報入力障害がまず先にあり、それからインスリン受容体情報伝達経路の機能低下に繋がる可能性があることなどを、明らかにしてきた。これらを背景に、脳海馬内のインスリンの存在量と認知機能低下には、相互に関与している可能性があると考え、「末梢型」2型糖尿病ラット脳海馬内のインスリン存在量を測定した。

【目的】

生後2-3日齢の新生ラットの腹腔内にSTZを投与して作製した2型糖尿病ラット（DM2T）を用い、脳海馬に存在するインスリンの量の状態を検討することを目的とした。

【方法】

Portaらの方法[3)]に従い、Wistar系雄性ラット2-3日齢の腹腔内に、STZ 80mg/10ulを直接単回投与した。投与後4週後にMorrisの水迷路（MWM）を用い、行動科学的検索を連続10日間行い、認知機能の低下を確認した。コントロールにはSTZの溶解液であるPBSを等量投与したラットを用いた。行動実験後、これらラット

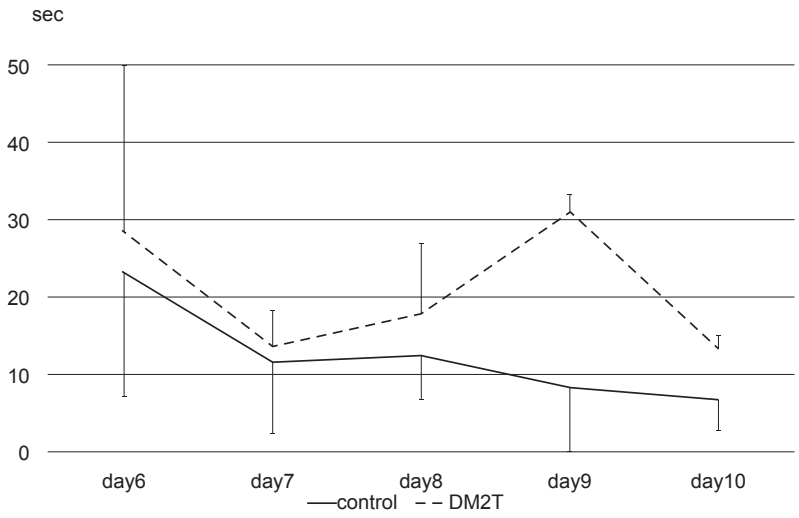


図 1a　ゴール到達時間（秒）

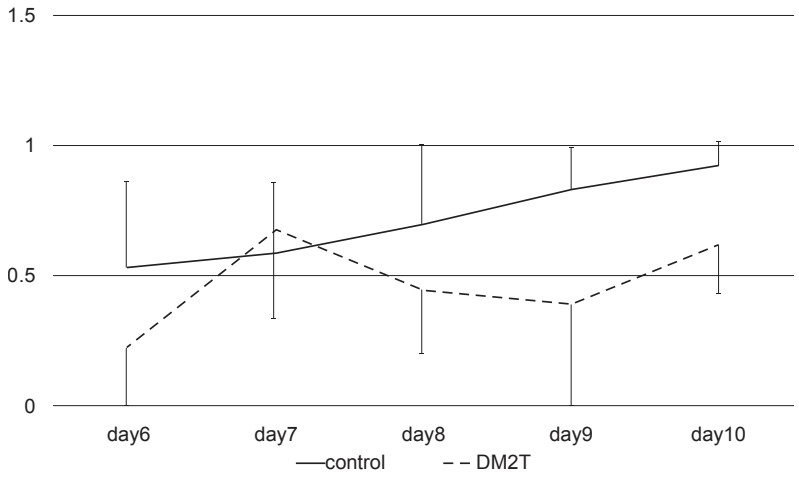


図 1b　行動効率

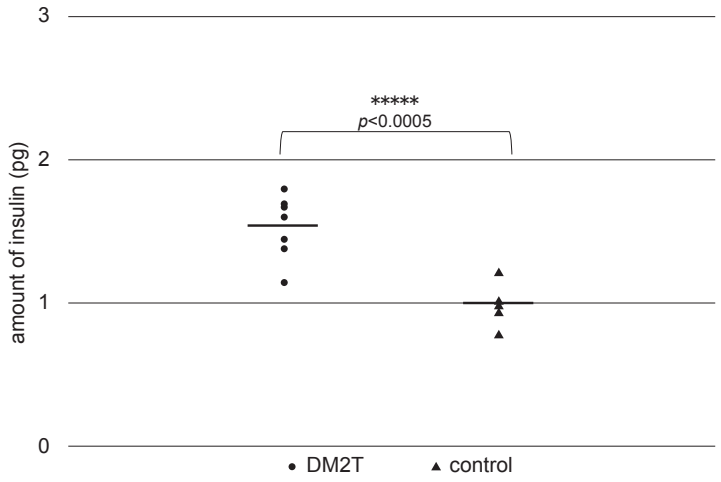


図 2a　1海馬当たりのインスリン量

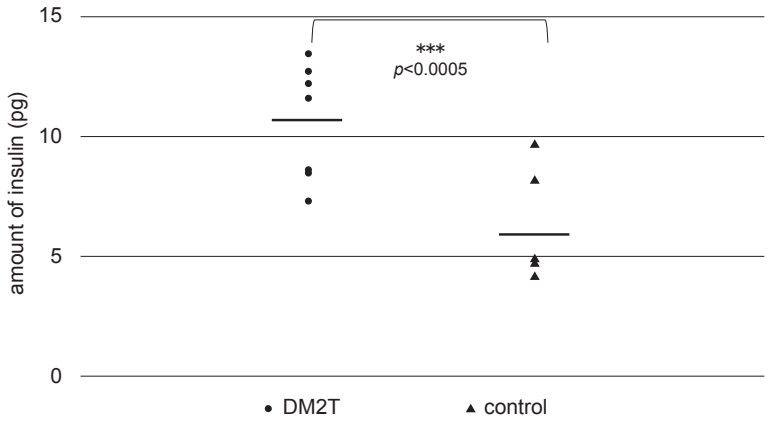


図 2b　海馬1mg当たりのインスリン量

の脳から海馬を単離し、Steinerの方法[4]によって、インスリンを抽出した。測定にはレビス®インスリン－ラット（U-Eタイプ）を使用し、全検体はtriplicateでの検出とした。尚、海馬内蔵インスリン量は超微量、且つ、一臓器＝一検体では検出感度以下となるため、5臓器（5海馬）を1検体として使用した。解析に用いた試料数は、コントロール群 N=5、n=25、2型糖尿病ラット N=5、n=25である。なお、用いた動物の血糖値は、DM2T群では250mg/dL以上を、コントロール群では低いもので145、高いもので190を示した。

【結果】

ゴール到達時間については、コントロールは日を追うごとに時間短縮がみられたが、糖尿病ラットについては有意に短縮しているとは認められなかった（**図1-a**）。また、無駄のない行動を行うほど値1に近づく行動達成効率については、コントロールでは日を追うごとに上昇する一方、糖尿病ラットでは、ゴール達成時間と同様に、有意な上昇は認められなかった（**図1-b**）。尚、コントロール、および糖尿病ラットの遊泳速度に差はほとんどなく、また、日を追っての速度変化も認められなかった。

海馬内に存在するインスリンを確認するために免疫染色を行ったが、検出感度以下であったため、ELISAによる方法で測定した。海馬ひとつあたりに内蔵されるインスリン量の増加は、コントロールに比して有意差が認められた。一臓器当たりでは約1.5倍、1mgあたりでは約2倍であった（**図2-a、b**）。尚、それぞれの海馬の重量には差は認められなかった。

【考察】

“脳の糖尿病”ラットでは、行動学的評価において認知機能が著明に低下しており[5]、インスリン受容体シグナル伝達経路の一因子であるAkt、インスリン分解酵素（IDE）がともに低下しており、アルツハイマー病発症の一因子とされるアミロイドベータタンパク（Ab）の免疫活性が著明に増加していた[4]ことを、すでに明らかにした。これらの現象は、“脳の糖尿病”ラット脳室内にインスリンを投与することによって改善を示した[6]ことから、脳室内STZ投与由来における脳の糖尿病状態には、脳内インスリンの量、またはインスリン受容体情報伝達経路が関係すると考えられた。また、大脳嗅内野と海馬体を貫通する貫通線維を介した情報伝達系に異常があるために、大脳から海馬歯状回顆粒細胞への情報入力に障害が生じ、それがインスリン受容体情報伝達経路の機能低下を引き起こし、認知機能障害として現れている可能性を示唆した[7]。

2型糖尿病における認知機能障害にも、脳内インスリンの存在、またはその量がこれらの現象を引き起こす可能性を検討するため、実験を行った。本実験結果では、2型糖尿病状態のラット脳内インスリンは、むしろ増加しており、インスリン量の低下は見られなかった。しかしながら、2型糖尿病モデルラットの認知機能は、「脳の糖尿病」ラット同様に低下していた。これらのことから、2型糖尿病の脳内では、末梢と同様に、脳内でもインスリン抵抗性が存在する可能性があり、このことが認知機能の低下に繋がっている可能性があり、と結論した。

【文献】

1. Schechter R, Abboud M: Neuronal synthesized insulin roles on neural differentiation within fetal rat neuron cell cultures. Brain Res 127: 41-49, 2001
2. De la Monte SM, Wands JR: Alzheimer's disease is type 3 diabetes-evidence reviewed. J of Diabetes Sci and Technol 2: 1101-1113, 2008
3. Portha B, Levacher C, Picon L, Rosselin G: Diabetogenic effect of streptozotocin in the rat during the perinatal period. Diabetes 23: 889-895, 1974
4. Steiner DF, Cho S, Oyer PE, Terris S, Peterson JD, Rubenstein AH: Isolation and characterization of proinsulin C-peptide from bovine pancreas. J of Biol Chem 246: 1365-1374, 1971
5. Shingo AS, Kanabayashi T, Murase T, Kito S: Cognitive decline in STZ-3V rats is largely due to dysfunctional insulin sig-

nalling through the dentate gyrus. Behav Brain Res 229: 378-383, 2012
6. Shingo AS, Kanabayashi T, Kito S, Murase T: Intracerebroventricular administration of an insulin analogue recovers STZ-induced cognitive decline in rats. Behav Brain Res 241: 105-111, 2013
7. Shingo AS, Mervis R, Kanebayashi T, Kito S, Muease T: The dendrites of granule cell layer neurons are the primary injury sites in the "Brain Diabetes" rat. Behav Brain Res 280: 78-83, 2015

B　研究助成者による研究

(1) 血液疾患

臍帯血移植後の生着前免疫反応の臨床的意義についての後方視的検討

内田　直之、山本　久史、谷口　修一

【要約】

移植後早期に発症する生着前免疫反応（PIR）は、臍帯血移植（CBT）特有の同種免疫反応であるが、その臨床的意義は不明である。そこで当院で非寛解期にCBTを実施した患者を対象に、PIRの移植成績に与える影響について検討した。AML 337例、MDS+MPD+CML 61例、ALL 33例、ML+ATLL+MM 120例の計551例が対象となった。年齢中央値57歳（16-77歳）、HCT-CI≧2点475例を含んだ。PIR発症群382例、非発症群169例の2群間で、2年累積非再発死亡率、累積再発率、全生存率はそれぞれ35.7% vs. 34.9%（$P=0.88$）、27.2% vs. 48.8%（$P<0.01$）、41.2% vs. 31.5%（$P<0.01$）であった。臓器障害を伴う重症PIR群と伴わない非重症PIR群とを比較すると、重症PIR群が再発率は低いものの非再発死亡率が高く、全生存率は非重症PIR群で有意に良好であった。以上より、非寛解期造血器疾患に対するCBTにおいて、PIRは再発抑止効果を有すること、PIRの重症度を適切に制御することが予後改善につながる可能性が示唆された。

【目的】

臍帯血中に含まれるT細胞は、未熟なnaïve T細胞がほとんどであるにもかかわらず、移植後の再発率は骨髄・末梢血移植と比べて同等、もしくは低いと報告されている[1)]。CBTに特有な同種免疫反応として、生着前免疫反応（pre-engraftment immune reactions, PIR）が報告されており[2)]、PIRの再発、生存率への影響について、非寛解例を対象に後方視的に解析した。

【方法】

非寛解期の造血器悪性疾患で、2004年1月～

表1　PIRの定義

38℃以上の発熱に以下の症状が2つ以上伴い、生着日より6日以上前に発症した場合をPIRと定義する。

- 皮疹
- 下痢（≧500ml/日か≧7回/日）
- 黄疸（T.bil ＞2mg/dl）
- 体重増加（ベースラインの＞5%）
- 末梢性浮腫

以下の臓器障害のうち1つ以上該当する場合severe typeとする。

- 肺（SpO_2＜92%か胸水・心嚢水貯留）
- 腎臓（Cr ≧ベースライン×3）
- 肝臓（T.bil ＞3mg/dl）
- 骨髄（血球貪食症候群）
- 中枢神経（痙攣）

表２　患者背景（AML, acute myeloid leukemia; MDS, myelodysplastic syndrome; MPD, myeloproliferative disorder; CML, chronic myeloid leukemia; ALL, acute lymphoblastic leukemia; ML, malignant lymphoma; ATLL, adult T-cell leukemia/lymphoma; MM, multiple myeloma; RIC, reduced-intensity conditioning; MAC, myeloablative conditioning; TAC, tacrolimus; CsA, cyclosporine A; MMF, mycophenolate mofetile; TNC, total nucleated cell count）.

Age, median（range）	57 years（16-77）
Disease, n.（%）	
AML	337（61.1%）
MDS + MPD + CML	61（11.1%）
ALL	33（6.0%）
ML + ATLL +MM	120（21.8%）
Disease status, n.（%）	
non-remission status	551（100%）
Conditioning regimen, n.（%）	
RIC / MAC	195（35.4%）/ 356（64.6%）
GVHD prophylaxis, n.（%）	
TAC / CsA	205（37.2%）
TAC + MMF	346（62.8%）
HLA disparity（at HLA A, B, DRB1）	
0-1 / 6	76（13.8%）
2-3 / 6	475（86.2%）
Number of TNC infused	
Median（range）x 10^7/kg	2.59（1.56-6.84）
Number of CD34$^+$ cells infused	
Median（range）x 10^5/kg	0.89（0.11-3.76）

表３　PIRの発症リスク因子

			Univariate		Multivariate	
Factors	Variable	n	Cumulative incidence (%)	P-value	Hazard ratio (95% CI)	P-value
Age	≤55	249	73.9	0.01	1.24 (1.03-1.49)	0.01
	>55	302	65.6			
Disease	Myeloid	398	68.6	0.29		
	Lymphoid	153	70.6			
Conditioning	MAC	356	71.9	0.14		
	RIC	195	64.6			
GVHD prophylaxis	TAC/CsA	205	69.8	0.36		
	TAC + MMF	346	69.1			
CD34+ cell	≤0.85x10^5/kg	268	72.8	0.05		
	>0.85x10^5/kg	283	66.1			
HLA Ag Mismatch	0-1	76	64.5	0.24		
	2-3	475	70.1			

2017年12月に初回同種移植としてCBTを実施された患者を後方視的に解析した。同種移植歴を有するECOG PS≧3、移植時活動性感染症を有する例、GVHD予防でMTX・ATG使用例を除外した。PIRの診断には、既報告で用いた基準を元に**表1**のように定めた[3)]。

【結果】

1. 患者背景

551例が対象となった。年齢中央値57（16-77）歳、AML 337例、MDS+MPD+CML 61例、ALL 33例、ML+ATLL+MM 120例、骨髄破壊的移植前治療が356例、GVHD予防でtacrolimus・ciclosporine単独が205例、MMF使用が346例であった（**表2**）。

2. PIR発症頻度・リスク因子

PIRの累積発症率は69.3%（382例）、severe type PIRは20.0%（110例）であった。PIR発症に影響する因子としては、単変量解析で年齢（>55歳）、CD34+細胞数（≦0.85×10^5/kg）が統計学的に有意であった。多変量解析では年齢（>55歳）のみが有意な因子であった（**表3**）。

3. PIRと再発率、非再発死亡率、生存率

(1) PIR有無による再発率・非再発死亡率: PIR有群の再発率はPIR無し群と比べて有意に低かった（**図1A**）。非再発死亡率は、両群間で有意な差は認めなかった（**図1B**）。

(2) PIRの重症度別再発率、非再発死亡率

PIR有群を重症型（110例）、非重症型（mild PIR、272例）に分け、PIR無群と共に解析した。再発率は重症型PIR群で有意に低く、次いでmild PIR群、PIR無群の順であった（**図2A**）。一方非再発死亡率は重症型PIR群で有意に高く、次いでPIR無群、mild PIR群の順であった（**図2B**）。

(3) PIRと全生存率

PIRの有無別の全生存率を**図3A**、PIR重症度別の全生存率を**図3B**に示す。PIR有群はPIR無群と比べて有意に全生存率が良好であった。一方、PIR有群を重症型と非重症型とに分けて3群間で比較すると、非重症型PIR有群が全生存率は最も良好で、次いでPIR無群、重症型PIR有群の順であった。

【考察】

今回の非寛解例のみを対象とした解析では、PIR有群で有意に再発率が低下し、PIRの抗腫瘍効果が示された。重症になる程、再発抑止効果は強いことが示されたが、非再発死亡が増加して、生存率はむしろ低下するため、非重症型PIRを適切に発症できることが、予後の改善に重要であることが示された。

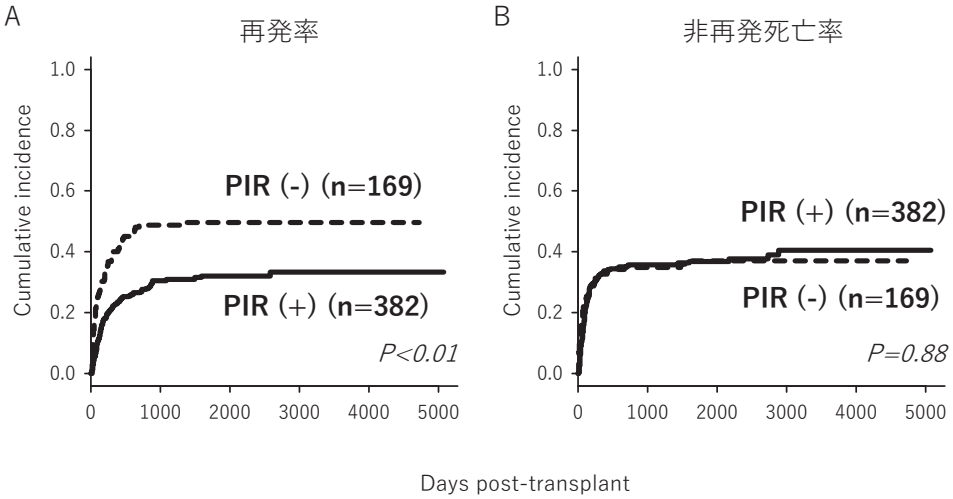


図1　PIRと再発、非再発死亡の累積発症率: A. PIR有群でPIR無群と比べて有意に再発率が低下した。B. PIRの有無で非再発死亡率は有意差を認めなかった。

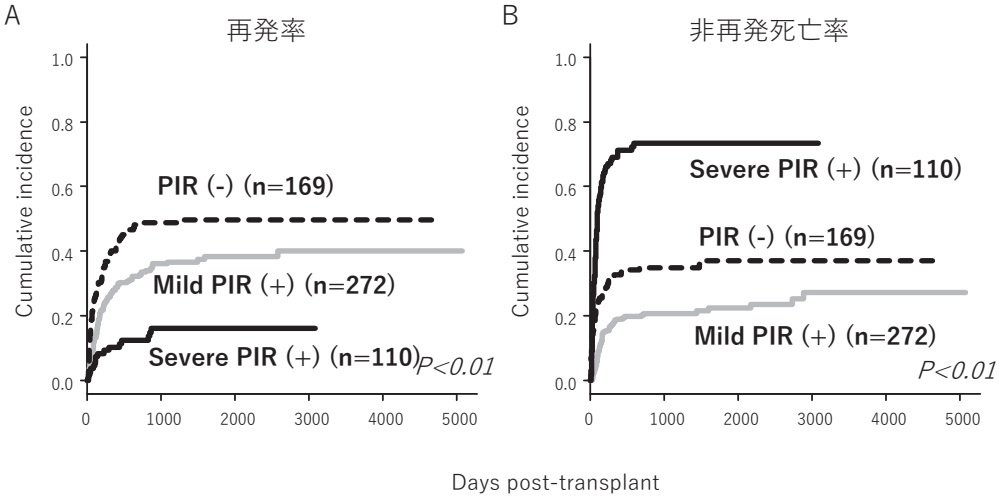


図２　PIRの重症度と再発、非再発死亡の累積発症率: A. PIRの重症度と再発率は負の相関を認めた。B. PIR重症度が高い群で非再発死亡率が有意に高かった。

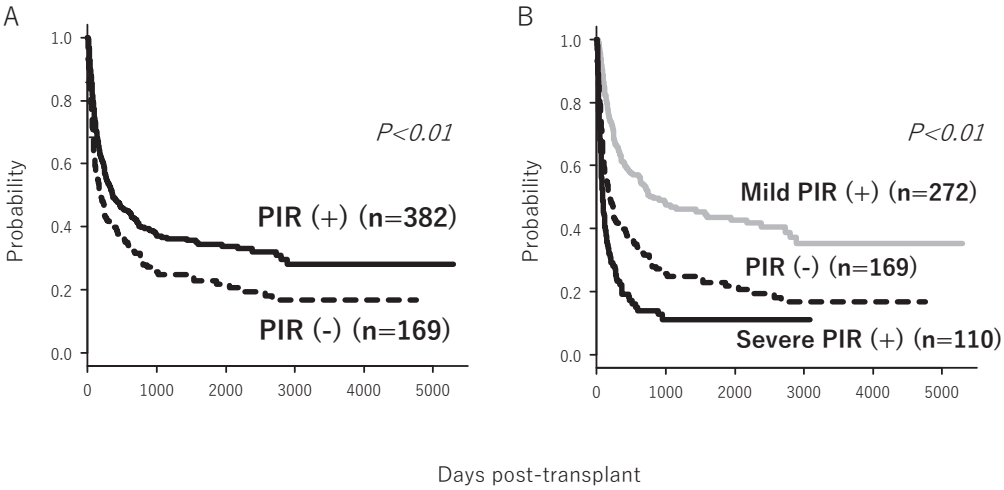


図３　PIRと全生存率: A. PIR有群で有意に全生存率が良好であった。B. 非重症PIR有群が全生存率が良好であった。一方重症PIR有群で全生存率が低下した。

PIR発症に高年齢のみが有意な因子として検出された。高年齢になる程、胸腺機能の低下に伴う免疫再構築不全や重症GVHDの発症が増えることが知られており、PIRの発症機序を考える上で興味深い結果であった。一方、移植実施に際して介入可能な因子である移植前治療強度やGVHD予防法、臍帯血の条件（CD34＋細胞数やHLA一致度）は多変量解析上有意な因子ではなかった。非寛解期の患者に限った解析であり、患者背景が寛解期と比べて多岐に及ぶ点が、有意因子が限られた理由である可能性がある。

PIRが臍帯血移植に特異的に認められる理由は明らかではないが、臍帯血に含まれるT細胞は、骨髄や末梢血に含まれるT細胞とは遺伝子発現

パターンや細胞増殖カイネティクスが異なり、発生学的にも異なった細胞集団であることが示唆されている[4)]。PIR発症と抗腫瘍効果発揮のメカニズムが明らかにできることで、その効果の最大化と毒性の最小化が目指せるだけでなく、最近進歩が著しい細胞免疫療法への応用へとつなげることができれば、造血器悪性疾患の治癒率向上へとつながることが期待される。

本研究は後方視的な解析であり、表面に現れない選択バイアスの存在から免れない。今後、寛解例等できるだけ均一な集団において、同様の解析を行ってmild PIRの予後へのpositiveな効果について検証すると共に、適切なPIRの発症と治療成績向上のための方法論の確立を目指す予定である。

【文献】

1. Milano F, Gooley T, Wood B, et al.: Cord-blood transplantation in patients with minimal residual disease. N Engl J Med 375: 944-953, 2016
2. Kishi Y, Kami M, Miyakoshi S, et al.: Early immune reaction after reduced-intensity cord blood transplantation for adult patients. Transplantation 80: 34-40, 2005
3. Uchida N, Wake A, Nakano N, et al.: Mycophenolate and tacrolimus for graft-versus-host disease prophylaxis for elderly after cord blood transplantation: a matched pair comparison with tacrolimus alone. Transplantation 92: 366-371, 2011
4. Hiwarkar P, Hubank M, Qasim W, et al.: Cord blood transplantation recapitulates fetal ontogeny with a distinct molecular signature that supports CD4+-T-cell reconstitution. Blood Adv 1: 2206-2216, 2017

臍帯血移植後における生着と移植細胞数についての検討

髙木　伸介、谷口　修一

【背景】

骨髄や末梢血幹細胞を用いた同種造血細胞移植後と比較して、臍帯血移植後はドナー細胞の生着遅延や生着不全の頻度が高いことが知られている。移植に用いる臍帯血の細胞数は生着率および生着速度を左右する重要な因子である。したがって、移植細胞数を十分に得られない症例においては移植後の生着遅延や生着不全が未だに臨床的な懸念事項となる。近年、臍帯血の有核細胞数とCD34+細胞数のうち、CD34+細胞数が臍帯血移植後の生着率および生着速度により相関するとの報告が国内外からなされている。一般的にCD34+細胞数は1.5×10^5/kg以上が至適とされるが、成人患者に対する臍帯血移植の実臨床で用いるCD34+細胞数の中央値は0.8×10^5/kg前後であり、その乖離は大きい。しかし、これまでにCD34+細胞数が低値の臍帯血を用いた場合の生着について詳細に検討した報告はほとんどない。

【方法】

2009年から2017年の間に虎の門病院で行なった臍帯血移植を解析した。対象は、ECOG performance statusが0か1の患者、かつ、ドナー特異的抗HLA抗体を有さない患者とした。

【結果】

421症例を解析した（**表1**）。移植後60日での好中球生着率は90.7%だった（**図1**）。好中球生着率に影響する因子について多変量解析を行なったところ、CD34+細胞数高値、HLA一致、リンパ系腫瘍が抽出された（**表2**）。臍帯血に含まれるCD34+細胞数によって以下のように群分けした。

表 1

Characteristics	Value
No. of transplants	421
Age at transplants, median(range), year	57（16-74）
Sex, male/female	258/163
Actual body weight, median(range), kg	56.4（32.2-94.6）
ECOG performance status, 0/1	98/323
Disease, myeloid/lymphoid	331/90
Disease status, CR/non-CR	70/351
Anti-HLA antibody（non-DSA), negative/positive	240/181
Total nucleated cell dose, median(range), x 10^7 /kg	2.61（1.57-5.85）
CD34+ cell dose, median(range), x 10^5 /kg	0.86（0.29-3.77）
HLA antigen match, ≥5*6/≤4*6	61/360
ABO match, matched/mismatched	156/265
Sex match, matched/mismatched	179/242
Conditioning regimen, MAC/RIC	335/86
GVHD prevention, Tac/Tac plus MMF	104/317

A群: > 1.5 × 10^5/kg（n = 41）
B群: 1.0 – 1.5 × 10^5/kg（n = 109）
C群: 0.5 – 1.0 × 10^5/kg（n = 255）
D群: ≤ 0.5 × 10^5/kg（n = 16）

C1群: 0.9 – 1.0 × 10^5/kg（n = 50）
C2群: 0.8 – 0.9 × 10^5/kg（n = 39）
C3群: 0.7 – 0.8 × 10^5/kg（n = 67）
C4群: 0.6 – 0.7 × 10^5/kg（n = 51）
C5群: 0.5 – 0.6 × 10^5/kg（n = 48）

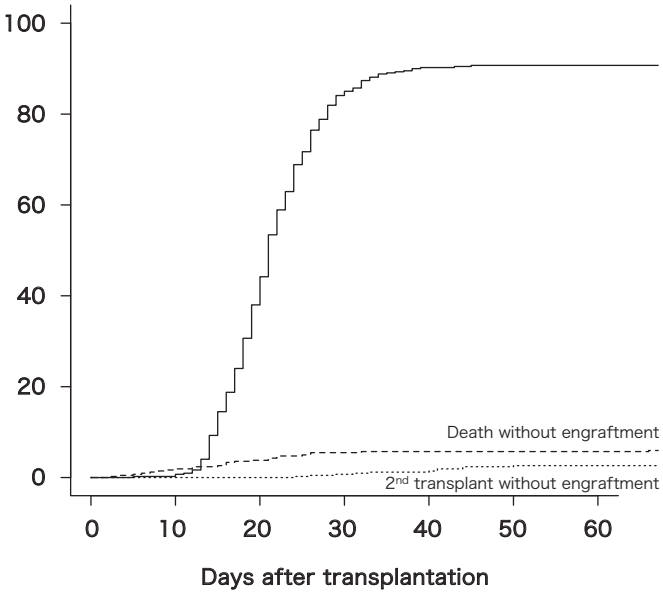


図 1

表 2

Characteristics	Cohort	Number	HR	95% CI	p value
Age at transplants, year	≤57 vs. >57	211 vs. 210	–	–	–
Actual body weight, kg	≤56.4 vs. >56.4	212 vs. 209	–	–	–
ECOG performance status	0 vs. 1	98 vs. 323	–	–	–
Disease	myeloid vs. lymphoid	331 vs. 90	1.59	1.24 – 2.05	0.00028
Disease status	CR vs. non-CR	70 vs. 351	–	–	–
Anti-HLA antibody（non-DSA）	positive vs. negative	181 vs. 240	–	–	–
Total nucleated cell dose, × 10^7/kg	≤2.61 vs. >2.61	210 vs. 211	–	–	–
CD34+ cell dose, × 10^5/kg	≤0.86 vs. >0.86	211 vs. 210	1.59	1.31 – 1.94	0.0000041
HLA antigen match	≤4*6 vs. ≥5*6	360 vs. 61	1.32	1.04 – 1.68	0.025
ABO match	matched vs. mismatched	156 vs. 265	–	–	–
Sex match	matched vs. mismatched	179 vs. 242	–	–	–
Conditioning regimen	MAC vs. RIC	335 vs. 86	–	–	–
GVHD prevention	Tac vs. TAC plus MMF	104 vs. 317	–	–	–

AからDの4群で好中球生着を比較したところ、C群（0.5 – 1.0 × 10^5/kg）の移植後60日での好中球生着率は、よりCD34＋細胞数が多いAおよびB群と同等だった（**図2**）。このC群をさらにC1からC5に分けた5群で好中球生着率を比較したところ、最もCD34+細胞数が少ないC5群（0.5

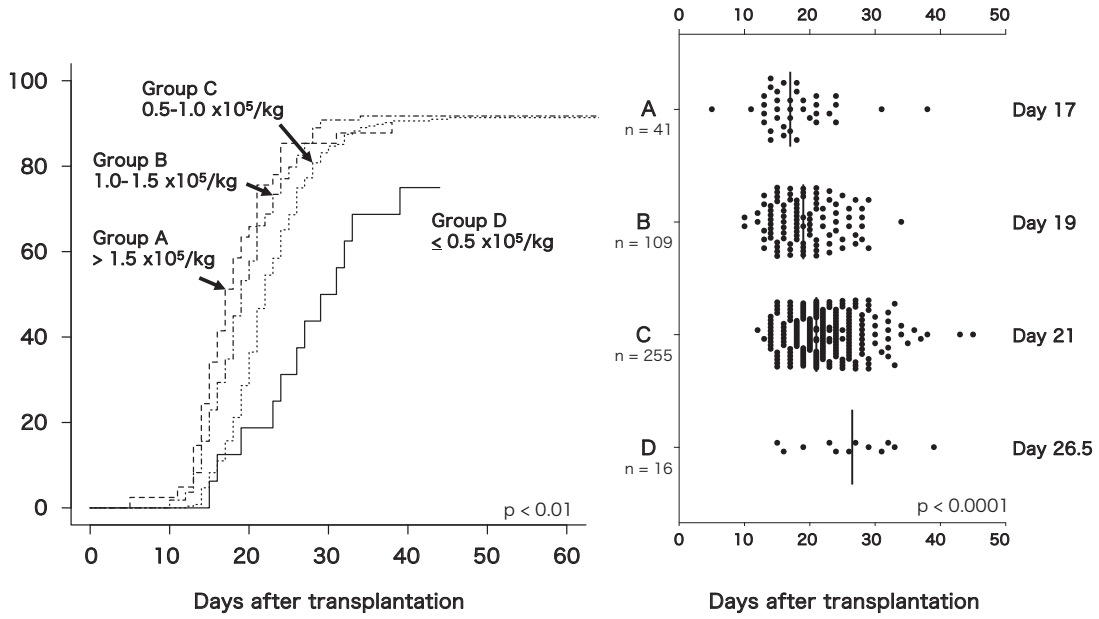


図 2

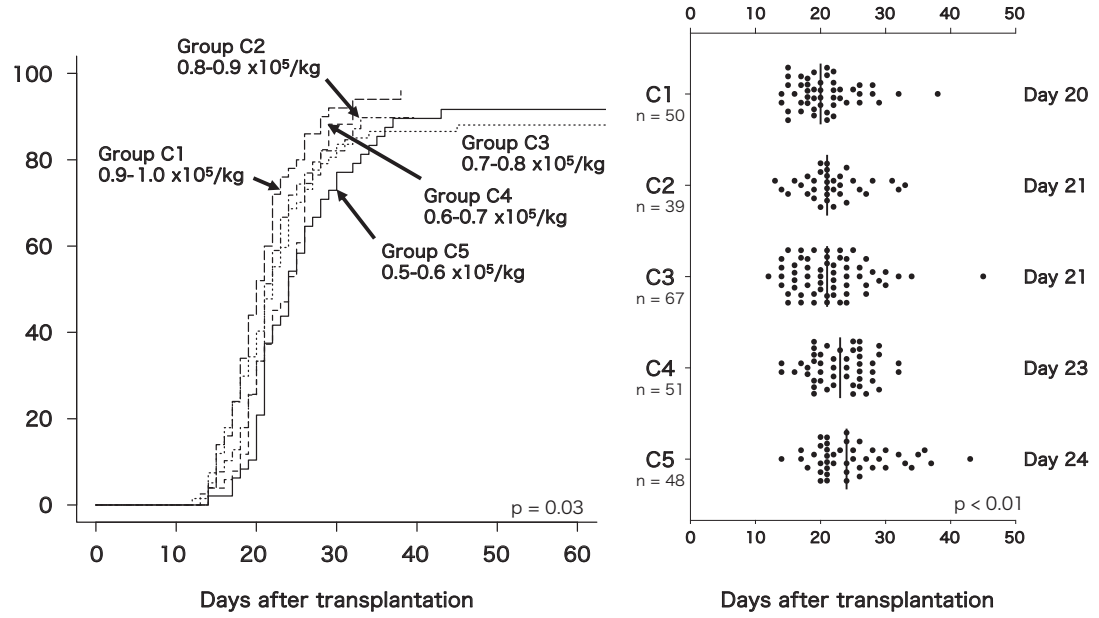


図 3

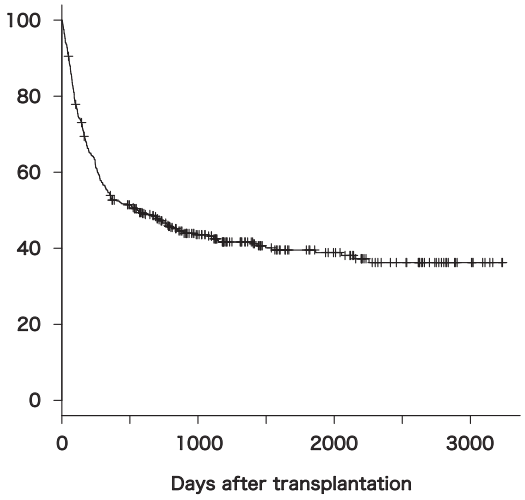


図４

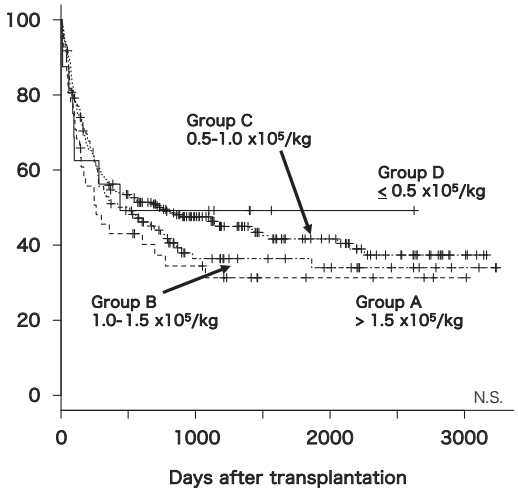


図５

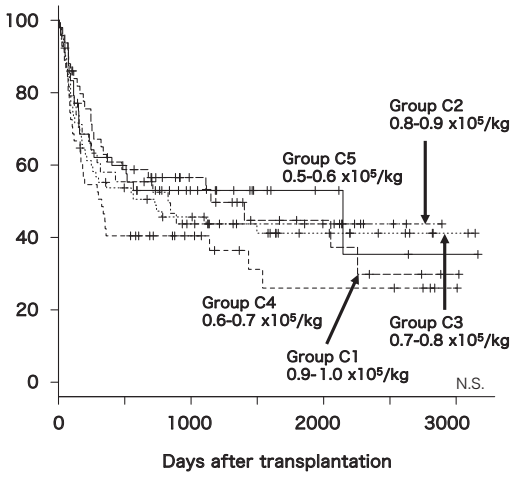


図６

－0.6×10^5/kg）の移植後60日での好中球生着率は、よりCD34＋細胞数が多いC1からC4群と同等だった（**図3**）。移植後3年の全生存率は43.2％だった（**図4**）。AからD群、C1からC5群、それぞれの全生存率を比較したが有意差はなかった（**図5、6**）。

【考察】

CD34＋細胞数が多い群でより速い好中球生着を確認した。その一方で、移植後60日での好中球生着率は同等だった。これまで至適とされてきたCD34＋細胞数よりも低い細胞数（0.5－1.0×10^5/kg）を有する臍帯血を用いた移植が可能であることが示された。

同種造血幹細胞移植後の肺炎球菌感染症に関する研究

森　有紀、梶　大介、景山　康生、湯浅　光博、高木　伸介
山本　久史、山本　豪、内田　直之、谷口　修一

【要約】

同種造血幹細胞移植後の肺炎球菌感染症は、移植後期に好発し、急激に発症して短期間で致死的経過を辿ることも多く、予防接種が推奨されている。しかし、本邦における肺炎球菌感染症及びその予防に関するデータは少ないことから、本研究では成人移植患者における肺炎球菌感染症の発症率及び予後と予防接種の有効性及び安全性に関する後方視的解析を行った。1487例中61例で発症を認め、全累積発症率は7.1%、移植から発症までの期間の中央値は621日だった。計83エピソード中、肺炎が最も多く、続いて敗血症、気管支炎の順だった。侵襲性感染症は19例で、累積発症率は2.9%であり、3例で肺炎球菌感染症が直接死因となった。310例で肺炎球菌ワクチン（PCV13又はPPV23）を接種し、移植から初回接種までの期間の中央値は738日だった。14例で接種後の発症を認め、そのうち11例はPCV13又はPPV23単独接種例であった。本患者群に対するPCV13導入後の肺炎球菌感染症の発症率は有意差ではないもののそれ以前に比べて低い傾向にあった（3.1% vs 7.4%, P=0.14）。医療介入が必要な副作用は特に認められず、以上より移植後早期からPCV13計3回+PPV23の接種をより積極的に行っていく必要性が示唆された。

【目的】

同種移植後の肺炎球菌感染症は、移植後期に好発し、高度の免疫抑制を背景に急速に進行し致死的経過を辿る場合も少なくない。一般人口における肺炎球菌ワクチンの定期接種化は、2013年4月より小児に対して（当初は7価結合型ワクチン（PCV7）で11月より13価結合型ワクチン（PCV13）に変更）、2014年10月より65歳以上の高齢者に対して（23価多糖体ワクチン（PPV23））実施されると共に、移植患者に対する予防接種の有用性も検討され、国内外のガイドラインでも肺炎球菌ワクチンの接種が推奨されている[1,2]。しかし、国内における同種移植後肺炎球菌感染症と予防接種の有効性・安全性に関する報告は、欧米に比較して非常に少ない。本研究では、本邦の同種造血幹細胞移植患者における肺炎球菌感染症の発症頻度と予後、肺炎球菌ワクチンの有効性・安全性に関して後方視的に解析することを目的とした。

【方法】

1993年4月～2016年12月に当院で第1回目の同種造血幹細胞移植を受けた20才以上の患者を解析対象とした。各種培養検査陽性及び/又は尿中肺炎球菌抗原陽性で肺炎球菌感染症に合致する所見を有する場合を肺炎球菌感染症と定義し、特に血液や髄液など本来無菌的な部位から細菌が分離された場合を侵襲性感染症とした。肺炎球菌感染症を繰り返す症例においては、前回感染症より3カ月以上経過した後に再燃したものを別エピソードとした。当院でPCV13の接種が可能となった2014年4月以降は、原則としてPCV13を計3回接種した後6ヶ月～1年後にPPV23の接種を行ったが、それ以前はPPV23単独或いは先行の接種が主体であった。既にPPV23の接種歴がある場合は、advisory committee on immunization practicesの推奨に従って、PPV23接種より1年以上間隔をあけてPCV13の接種を行った。肺炎球菌感染症の全累積発症率を、非発症死亡を競合因子として、Gray's法を用いて評価した。肺炎球菌感染症に対する予防接種の効果については、ステップワイズ比例ハザードモデルを用いて時間依存解析を行った。

【結果】

解析対象は1487例で、男性が946例及び女性が541例、年齢の中央値は55（20-82）才で、臍帯血

移植（CBT）が907例、非血縁者間骨髄移植（uBMT）が320例、血縁者間移植が259例だった。フォローアップ期間の中央値は242（1-8554）日だった。61例で肺炎球菌感染症を発症し、全累積発症率は7.1％で、移植から発症までの期間の中央値は621（7-5456）日だった（**図1-a**）。移植後100日以内の発症は2例だった。13例で2エピソード以上（8例で2エピソード、1例で3エピソード、2例で4エピソード、1例で5エピソード）を認め、計83エピソードだった。肺炎が55エピソード、菌血症が24エピソード、気管支炎が10エピソード、気管支肺炎が4エピソード、髄膜炎と副鼻腔炎が各2エピソードで、中耳炎、中耳炎+乳突蜂巣炎及び咽頭炎が各1エピソードだった。侵襲性感染症は19例で、全累積発症率は2.9％、移植から発症までの期間の中央値は、654（431-1089）日だった（**図1-b**）。61例中33例（54.1％）でGradeⅡ-Ⅳの急性移植片対宿主病（GVHD）を、29例（47.5％）で広汎型慢性GVHDを認めたが、83エピソードにおいて、侵襲性感染症とGVHDとの明らかな関連性は認められなかった（GradeⅡ-Ⅳ急性GVHD P=1.00、広汎型慢性GVHD P=0.81）。

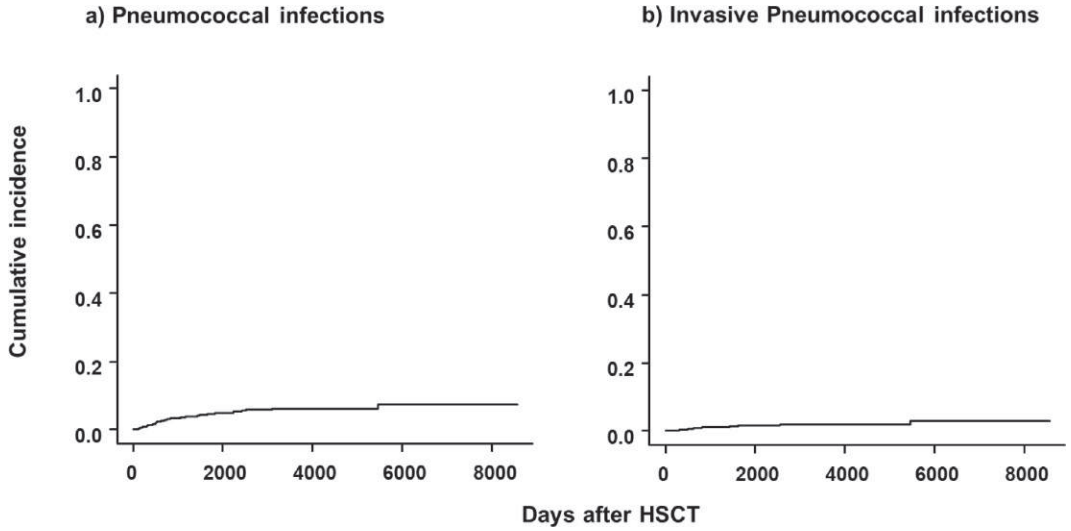


図 1　肺炎球菌感染症の累積発症率

表 1　侵襲性肺炎球菌感染症死亡例

症例	移植時年齢/性別	原疾患	移植源	GVHD予防	急性GVHD	慢性GVHD	肺炎球菌感染症						転帰
							病型	移植～発症の期間	発症前予防接種の有無	発症時免疫抑制剤の有無	感受性	治療	
1	62/女性	AML	CBT	FK/MMF	Grade II	無し	肺炎	114日	無し	有り	PISP	MFLX	軽快
							敗血症 副鼻腔炎	256日	無し	有り	PISP	PIPC/TAZ, VCM	死亡
2	53/男性	ALL	uBMT	FK/MTX	Grade II	広汎型	肺炎 敗血症	4年4か月	無し	有り	PSSP	PIPC/TAZ →ABPC	軽快
							敗血症	8年6か月	無し	有り	PSSP	MEPM	死亡
3	60/男性	AML	CBT	FK/MMF	無し	限局性	肺炎 敗血症	3年9か月	PPV23 PCV13 (1回)	無し (二次がん治療中)	PSSP	PIPC/TAZ	死亡

AML: 急性骨髄性白血病、ALL: 急性リンパ性白血病、FK: タクロリムス、MMF: ミコフェノール酸モフェチル、MTX: メトトレキサート、PISP: ペニシリン低感受性菌、PSSP: ペニシリン感受性菌、MFLX: モキシフロキサシン、PIPC/TAZ: ピペラシリン・タゾバクタム、VCM: バンコマイシン、ABPC: アンピシリン、MEPM: メロペネム

表２　肺炎球菌ワクチンの接種状況

		PPV23		合計
		接種	未接種	
PCV13	接種	150	73	223
	未接種	87	1177	1264
合計		237	1250	1487

62エピソード（74.6%）で入院加療を要し、侵襲性肺炎球菌感染症が直接の死因となったのは3例で、いずれの症例も発症から3～9日後と非常に短期間で死亡に至った（**表1**）。

310例で肺炎球菌ワクチンを接種し、移植から初回接種までの期間の中央値は 738（222-6826）日だった。PPV23を接種したのが237例、PCV13を接種したのが223例（3回接種213例、2回接種10例、1回接種10例）で、両方を接種したのが150例だった（**表2**）。予防接種後に肺炎球菌感染症を発症したのは14例（23.0%）で、5例は侵襲性感染症であり、PPV23接種後の発症が5例、PCV13接種後が6例、PPV23+PCV13接種後が3例だった。予防接種後に何らかの医療介入が必要な副作用を合併した症例はなかった。本研究における肺炎球菌感染症の発症率は、本邦の小児定期接種導入前後で有意差は認められなかった（7.5% vs 3.7%, P=0.22）。本患者群に対するPCV13導入後の発症率は導入以前に比べて有意ではないものの低い傾向がみられた（3.1% vs 7.4%, P=0.14）。PCV13の肺炎球菌感染症及び侵襲性肺炎球菌感染症に対する発症抑制効果は明らかでなかった（HR 0.61（0.26-1.46）、P=0.27 & HR 0.63（0.14-2.89）、P=0.56）。

【考察】

移植患者における侵襲性肺炎球菌感染症のリスクは高く、一般人口の11.5/10万人・年に対して590/10万人・年との報告がある[3)]。本研究における、侵襲性肺炎球菌感染症の全累積発症率は2.9%、移植から発症までの期間の中央値は約1年8カ月と、今までの報告とほぼ同等だった[4)]。移植後100日以降の後期に多く[5)]、慢性GVHDとの関連性が報告されているが[6)]、本研究では同様に移植後期発症がほとんどを占めるものの、慢性GVHDとの関連性は明らかではなかった。本研究における肺炎球菌感染症による死亡は、侵襲性感染症19例中3例（15.7%）で、既報告とほぼ同程度であった[5)]。

米国では、小児におけるPPV7の定期接種の導入後は、血液疾患患者における侵襲性肺炎球菌感染症が有意に減少したとの報告があるが[7)]、国内の小児に対する定期接種導入前後で、本研究の患者群における肺炎球菌感染症の発症率に有意差は認められなかった。本患者群におけるPCV13の肺炎球菌感染症抑制効果を確認することもできなかったが、時期別でみるとPCV13導入後の発症率はそれ以前に比べて低い傾向が見られた。その要因として、接種開始時期の影響があると考えられる。欧米では、移植後3～6ヶ月よりPCV13の予防接種を開始することを推奨しているが[2,8)]、本邦では移植患者に対する予防接種は全て自費で公費助成などもないことから、ある程度十分な接種効果及び安全性を担保すべく、本研究では移植後1年で活動性慢性GVHDがなくCD4陽性リンパ球の十分な回復が見られた場合に接種開始としてきた。またPCV13の国内認可以前に移植を行った患者では、PCV13の接種は行ったとしても移植からの時期がかなり遅い状況である。今回の研究で、日本人成人移植患者におけるPCV13の安全性が確認できたことから、今後はより接種開始時期を早めることにより、発症率を低減できるのではないかと考えられる。

【文献】

1. 造血細胞移植ガイドライン予防接種（第3版）. 日本造血細胞移植学会ガイドライン委員会, 2018
2. Cordonnier C, Einarsdottir S, Cesaro S, Di Blasi R, Mikulska M, Rieger C, et al.: Vaccination of haemopoietic stem cell transplant recipients: guidelines of the 2017 European Conference on Infections in Leukaemia（ECIL 7）. Lancet Infect Dis 19: e200-e212, 2019
3. Centers for Disease Control and Prevention. Influenza Antiviral Medications: Sum-

mary for Clinicians. Available from http: //wwwcdcgov/flu/professionals/antivirals/summary-clinicianshtm
4. Torda A, Chong Q, Lee A, Chen S, Dodds A, Greenwood M, et al.: Invasive pneumococcal disease following adult allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. Transplant infectious disease 16: 751-759, 2014
5. Engelhard D, Cordonnier C, Shaw PJ, Parkalli T, Guenther C, Martino R, et al.: Early and late invasive pneumococcal infection following stem cell transplantation: a European Bone Marrow Transplantation survey. British journal of haematology 117: 444-450, 2002
6. Kulkarni S, Powles R, Treleaven J, Riley U, Singhal S, Horton C, et al.: Chronic graft versus host disease is associated with long-term risk for pneumococcal infections in recipients of bone marrow transplants. Blood 95: 3683-3686, 2000
7. Lee YJ, Huang YT, Kim SJ, Kerpelev M, Gonzalez V, Kaltsas A, et al.: Trends in Invasive Pneumococcal Disease in Cancer Patients After the Introduction of 7-valent Pneumococcal Conjugate Vaccine: A 20-year Longitudinal Study at a Major Urban Cancer Center. Clinical infectious diseases 66: 244-253, 2018
8. Cordonnier C, Ljungman P, Juergens C, Maertens J, Selleslag D, Sundaraiyer V, et al.: Immunogenicity, safety, and tolerability of 13-valent pneumococcal conjugate vaccine followed by 23-valent pneumococcal polysaccharide vaccine in recipients of allogeneic hematopoietic stem cell transplant aged >/=2 years: an open-label study. Clinical infectious diseases 61: 313-323, 2015

末梢血幹細胞動員方法が移植に与える影響についての後方視的観察研究

山本　豪、谷口　修一

【要約】

2015年から2018年の間に当院にて自家末梢血幹細胞移植を行った101例を調査した。年齢、性別、疾患、輸注細胞数をはじめとする各種パラメータを調査・解析を行ったが、好中球生着日と有意に関連する指標は明らかではなかった。当院の自家移植においては、好中球生着は全例で得られており、長期的な血球の回復や生着症候群、再発率などの調査も必要であると考えられた。

【目的】

再発難治性のリンパ腫に対しては、おおむね70歳以下の患者では、救援化学療法後に自家造血幹細胞移植（以下自家移植）を行うことが標準療法である。また、初発の多発性骨髄腫においても、同様に導入療法後の自家移植が標準療法となっている。これらの自家移植においては、造血幹細胞として、末梢血幹細胞を用いることが多いが、化学療法後の血球回復期にG-CSFを投与し末梢血幹細胞を動員する方法と、化学療法は行わずG-CSFを投与し、末梢血幹細胞を動員する方法がある。前者の方がより多くの幹細胞数が採取できるとされている。近年ではCXCR4ケモカイン受容体拮抗薬であるプレリキサホルの投与で、より効率よく幹細胞が採取できるとされている。しかし、幹細胞動員方法の違いによる移植への影響については十分には分かっていない。本研究では、幹細胞動員方法の違いによる、採取幹細胞数、移植時の生着までの日数、生着症候群、予後などへの影響を後方視的に調査研究する。

【方法】

(1) 対象患者：虎の門病院血液内科において2015年以降に自家末梢血幹細胞採取を行った成人患者。疾患は問わない。幹細胞採取を行ったが移植に至らなかった患者も対象とする。

(2) 調査項目

①患者背景：年齢、性別、身長、体重、移植の対象となった疾患、疾患の骨髄浸潤歴の有無、移植時の病期、化学療法歴、放射線治療歴など

②幹細胞の動員方法: 化学療法の有無、G-CSFの投与日数、プレリキサホル使用の有無

③幹細胞採取日の検査値: 血算、血液像、LDH

④幹細胞採取の結果： 採取総細胞数、CD34陽性細胞比率、採取CD34陽性細胞数、採取に要した日数

⑤移植の経過： 移植前処置の内容、G-CSFの使用状況、生着日、体温の推移、抗生剤使用状況、ステロイドの使用状況、退院日

⑥予後: 移植からの無増悪生存期間、全生存期間

(3) 解析内容

①幹細胞動員方法と採取細胞数の関係

化学療法後にG-CSFを投与する動員方法とG-CSF単独投与による動員方法、またプレリキサホルの投与の有無により、採取幹細胞数の違いについて比較する。また、移植に必要な細胞数（体重1kg当たりCD34陽性細胞数が100万個）を基準としたときの採取成功率、採取必要日数を比較する。

②幹細胞動員方法と生着日数の関係

幹細胞動員方法により、生着日数に差があるかについて検討を行う。また、生着日数が影響すると考えられる、感染症の発症率、退院までの日数との関連を検討する。

③血幹細胞動員方法と生着症候群の関係

自家移植後の生着に伴って、発熱、皮疹、体液貯留、臓器障害などの生着症候群が出現することがある。幹細胞動員方法と生着症候群の関係を検討する。

(4) 本研究の実施については、院内臨床研究審査委員会での審査の上、病院長の承認を得て行わ

れた。本研究は介入を伴わない後方視的観察研究で、「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」に従い、本研究の実施を病院ホームページにて公開し、対象となる患者のオプトアウトの機会を確保した。

【結果】

2015年から2018年の間に当院にて自家末梢血幹細胞移植を行った101例を調査した。患者背景は、年齢17歳-69歳（中央値53歳）、男性71例、女性30例、疾患はリンパ腫72例、多発性骨髄腫（類縁疾患を含む）23例、急性骨髄性白血病6例であった。輸注細胞数の平均は2.79×10^6/kgであり、98例（97%）でG-CSFの投与を行った。全例好中球生着が得られたが、好中球生着は9-26日（中央値12日、平均12.0日）であった。

好中球生着日の平均は、年齢（39歳以下（n=20): 12.4日、40-59歳（n=52): 12.0日、60歳以上（n=29）11.7日）、性別（男性（n=71): 12.0日、女性（n=30): 11.9日）、疾患（リンパ腫（n=72): 11.9日、多発性骨髄腫（n=23): 11.5日、急性骨髄性白血病（n=6): 15.2日）、輸注細胞数（1.0×10^6/kg未満（n=25): 12.4日、1.0-2.0未満（n=37): 11.8日、2.0以上（n=39): 11.9日）であった。

【考察】

今回の解析では、自家移植を行った患者において、好中球生着までの日数に影響する因子を調べるため、年齢、性別、疾患、輸注細胞数をはじめとする各種パラメータを調査・解析を行ったが、好中球生着日と有意に関連する指標は明らかではなかった。自家移植においては、全例生着が得られており、生着が問題になることはまれであり、好中球生着以外に、長期的な血球の回復の調査も必要であることが考えられた。

今後、調査項目をさらに増やし、好中球生着に関連する指標の探索を行うことや、生着症候群や、再発率などの他の項目との関連についても研究を行っていく必要があると考えられた。

同種移植後に再発した急性骨髄性白血病に対する臍帯血移植術の免疫再構築に関する研究

湯淺　光博、海老原 理穂、景山　康生、梶　大介
西田　彩、高木　伸介、山本　久史、山本　豪
森　有紀、内田　直之、谷口　修一

【要約】

2011年から2018年までに当院で初回同種移植として臍帯血移植術を受けた502症例を初回移植群の対象、2005年から2014年までに当院で同種移植後に再発した急性骨髄性白血病に対して2回目の同種移植として臍帯血移植術を受けた76症例を再移植群として解析を行った。初回移植群では、好中球生着率が92.8％で好中球生着日中央値は20日であった。3年生存率が40.6％、再発率23.5％、非再発死亡率は35.3％であった。2回目の臍帯血移植群では好中球生着率が77.6％で好中球生着日中央値は21日であった。2年生存率が35.1％、再発率36.2％、非再発死亡率は49.4％であった。NRMのうち42％が感染症であった。2回目の臍帯血移植において好中球生着のCIと1回目の臍帯血移植における好中球生着のCIはほぼ同等の立ち上がりを示したが、最終達成率は2回目の臍帯血移植の方が有意に低かった。敗血症罹患後の致死率の高さが影響を及ぼしていると考えられた。一方で、好中球生着後の致死的感染症も高く、それらの要因としてリンパ球回復遅延の影響が初回移植の検討から示唆されるため、今後はそれらを解析していきたい。

【目的】

同種移植は化学療法抵抗性の急性骨髄性白血病に対して完治を望める唯一の治療法であるが、同種移植を行っても4割近くの患者が再発しており、同種移植後の再発に対する至適治療の確立は喫緊の課題である。臍帯血移植は多くの患者に適切な時期に移植医療を提供できるため、同種移植後再発した急性骨髄性白血病に対する治療手段として有望視されていた。しかしながら、臍帯血移植は血球回復の遅延が懸念されており、再移植における臍帯血移植後の免疫回復を検討する必要があるがデータに乏しい。今回の研究では初回での臍帯血移植術と再移植での臍帯血移植術の血球回復を比較し検討する事を目的とした。

【方法】

2011年から2018年までに当院で初回同種移植として臍帯血移植術を受けた579症例の内、前処置開始時点で活動性感染症を有する患者（n=40）、PS3以上の患者（n=36）、移植前CT検査未施行の患者（n=1）を除外した502症例を初回移植群の対象とした。患者背景を**表1**に示す。2005年から2014年までに当院で同種移植後に再発した急性骨髄性白血病に対して2回目の同種移植として臍帯血移植術を受けた85症例の内、前処置開始時点で活動性感染症を有する患者（n=9）を除外した76症例を再移植群として解析を行った。

【結果】

初回移植群では、好中球生着率が92.8％で好中球生着日中央値は20日であった。3年生存率が40.6％、再発率23.5％、非再発死亡率は35.3％であった。2回目の臍帯血移植群では好中球生着率が77.6％で好中球生着日中央値は21日であった。2年生存率が35.1％、再発率36.2％、非再発死亡率は49.4％であった。NRMのうち42％が感染症であった。

好中球生着率は2回目の臍帯血移植が有意に低いものの好中球生着日中央値は同等であった。好中球生着日中央値が20日前後であるのは、他の移植ソースが18日前後である既存の報告と比較すると臍帯血移植がほぼ同等の好中球回復を起こせる事が示された。2回目の移植において最終的な好中球生着率が77.6％と低い理由としては、感染症を契機に多臓器不全と至る例が多かった。

表 1　Characteristics of All Patients and Those with or without Splenomegaly, who Received 1st SCT

		ALL	Splenomegaly (+)	Splenomegaly (-)	p-value
Characteristic		Value	Value	Value	
Patients, n		502	152	350	
Median age, years (range)		57 (16-77)	55 (19-74)	58 (16-77)	0.07
Male/female, n		317/185	117/35	200/150	<0.01
PS	0/1/2	77/357/68	20/107/25	57/250/43	0.37
HCT-CI	0/1/2/≧3	91/47/135/229	25/18/39/70	66/29/96/159	0.92
Dianosis	MDS	43 (9%)	17 (11%)	26 (7%)	<0.01
	AML	307 (61%)	84 (55%)	223 (64%)	
	MPD or MDS/MPD	20 (4%)	11 (7%)	9 (3%)	
	ALL	50 (10%)	11 (7%)	39 (11%)	
	ATL	10 (4%)	2 (1%)	8 (2%)	
	Lymphoid malignancies	54 (11%)	23 (15%)	31 (9%)	
	AA	10 (2%)	0 (0%)	10 (3%)	
	Others	8 (2%)	4 (3%)	4 (1%)	
Disease status at SCT	CR	104 (21%)	19 (13%)	85 (21%)	<0.01
	non-CR	398 (79%)	133 (88%)	265 (79%)	
Duration of transplantation after diagnosis		7.5 (0.5-413.9)	5.9 (1.1-184.8)	8.5 (0.5-413.9)	0.93
Conditioning regimen	Myeloablative*	400 (80%)	120 (79%)	280 (80%)	0.81
	Reduced intensity	102 (20%)	32 (21%)	70 (20%)	
	*Myeloablative: oral Bu > 9mg/kg, ivBu 〉7.2mg/kg, TBI > 8Gy, Mel >				
GVHD prophylaxis	CNI	132 (26%)	48 (32%)	84 (24%)	0.11
	CNI + MMF	363 (72%)	101 (66%)	262 (75%)	
	CNI + MTX	7 (1%)	3 (2%)	4 (1%)	
Median no. of TNC at cryopreservation	(x107/kg)(range)	2.65 (1.57-6.84)	2.59 (1.57-5.13)	2.64 (1.57-6.84)	0.14
Median no. of CD34+ cells at cryopreservation	(x105/kg)(range)	0.86 (0.29-3.77)	0.82 (0.29-3.77)	0.89 (0.30-3.61)	0.79
Median no. of CFU-GM cells at cryopreservation	(x105/kg)(range)	0.27 (0.02-1.14)	0.28 (0.03-1.10)	0.27 (0.02-1.14)	0.73
Total no. of HLA serological mismatch(HVG	0/1/2/3/4	17/116/359/9/1	8/42/99/2/1	9/74/260/7/0	0.08
Anti-HLA antibody	Positive	186 (37%)	56 (37%)	130 (37%)	1
	Negative	308 (61%)	94 (62%)	214 (61%)	
	Not tested	8 (2%)	2 (1%)	6 (2%)	
Spleen maximal length (Lmax)		10.1 (5.7-21.6)	12.6 (9-21.6)	9.3 (5.7-15)	<0.01
Spleen maximal thickness (Thmax)		6 (2.8-14.8)	8.2 (4.7-14.8)	5.4 (2.8-10.1)	<0.01
Spleen vertical hight (Hvert)		9 (3-27)	12 (7.5-27)	8 (2-12.5)	<0.01
Spleen index Lmax x Thmax (SI LxTh)		60.2 (16.5-319.7)	100.4 (47.9-319.7)	51.4 (16.5-147.5)	<0.01
Spleen index Lmax x Hvert (SI LxHvert)		90.1 (19.2-583.2)	147.6 (115–583.2)	75.3 (19.2–113.4)	<0.01

初回移植においては、脾腫と輸注したCD34陽性細胞数の免疫再構築に与える影響を検討した。脾臓の大きさを横断面での長径、短径、冠状断での高さを計測した。横断面での長径と冠状断での高さを掛け合わせた物が造血幹細胞移植においても血球回復遅延の良い指標となる事がわかった。CD34陽性細胞数が少ない場合にその影響が顕著になる事がわかった。一方で非再発死亡に脾腫、CD34陽性細胞数は有意な影響を与えず、リンパ球回復の遅延が影響を与えた。

【考察】

2回目の臍帯血移植において好中球生着のCIと1回目の臍帯血移植における好中球生着のCIはほぼ同等の立ち上がりを示したが、最終達成率は2回目の臍帯血移植の方が有意に低かった。敗血症罹患後の致死率の高さが影響を及ぼしていると考えられた。一方で、好中球生着後の致死的感染症も高く、それらの要因としてリンパ球回復遅延の影響が初回移植の検討から示唆されるため、今後はそれらを解析していきたい。

【発表に関する事項】

1. 湯淺光博、景山康生、梶　大介、西田　彩、高木伸介、山本久史、山本　豪、森　有紀、内田直之、谷口修一: Low Lymphocyte Count at Day 30 after Single Cord Blood Transplantation Had Negative Impact on Survival, Because of Higher NRM Rate. 第61回アメリカ血液学会総会

（2）内分泌・代謝疾患

糖原病Ⅲ型の遺伝子変異と機能に関する検討－5

大久保　実、村勢　敏郎

【要約】

日本人糖原病Ⅲ型患者の遺伝子解析を行い、これまでに報告のない新しい*AGL*変異（c.3378 delA）を同定した。また、他施設で「糖原病Ⅲ型」と診断されていた患者が別病型の糖原病であることを明らかにした。両者とも*AGL*遺伝子解析が正確な診断のために有用であった。

【目的】

糖原病は、グリコーゲンの分解と合成を司るさまざまな酵素の先天性代謝異常症の総称である。欠損している酵素により、Ⅰa型からⅨ型まで異なる病型が存在する[1)]。このうち、糖原病Ⅲ型（glycogen storage disease type Ⅲ：GSDⅢ）はグリコーゲン脱分枝酵素（遺伝子シンボルは*AGL*）の欠損症であり、肝障害・筋萎縮・心筋症・低血糖など多彩な症状を示す[2)]。頻度は20-30万人に一人の稀な常染色体劣性遺伝病である。

私どもは、日本人を含む様々なエスニックグループの糖原病Ⅲ型患者の遺伝子解析を報告してきた[3-5)]。本年度は、肝腫大などの臨床症状から糖原病Ⅲ型が疑われた日本人患者2例を検討した。

【方法】

患者の末梢血からDNAを調製し、既報のように*AGL*遺伝子の35個のエクソンとエクソン－イントロン接合部の塩基配列を決定して、*AGL*変異を検索した[6)]。

【結果】

1. 患者Aでは、*AGL*遺伝子のエクソン27に1塩基欠失を同定した（c.3378 delA）。この欠失により早期に終止コドンが出現し、正常な酵素が生成されないことが推測された。c.3378 delAはこれまでに報告のない新奇な点変異で、患者は変異のヘテロ接合体であった。
2. 患者Aには、*AGL*遺伝子のイントロン32に点変異（IVS32-12 A>G）も認めた。これは私どもが既に報告した変異と同一であった[7)]。この変異はスプライシング異常を惹起して、酵素活性を失わせる。患者は変異のヘテロ接合体であった。
3. 家系分析を行うと、1塩基欠失は父親から、点変異は母親から受け継がれて、患者Aが2つの異なる*AGL*変異の複合ヘテロ接合体となって糖原病Ⅲ型を発症していた（**図1**）。
4. 患者Bは、他施設でグリコーゲン脱分枝酵素活性が低値であったため「糖原病Ⅲ型」と診断されていた。患者B の*AGL*遺伝子を検索したが、変異は見つからなかった。
5. 患者Bの酵素活性を測定したところ、グリコーゲン脱分枝酵素活性は正常範囲内であった。グリコーゲン フォスフォリラーゼ活性が低下していたため、患者Bを糖原病Ⅵ型と診断した。

【考察】

本研究では、日本人糖原病Ⅲ型患者Aから新奇な*AGL*変異（c.3378 delA）を同定した。私どもは日本人患者から多様な*AGL*遺伝子変異を報告してきたが、このうち複数の家系に見られた変

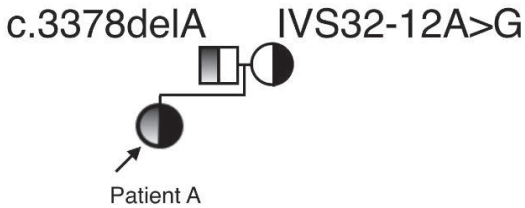


図１　患者Aの家系分析
患者は二つの異なる*AGL*遺伝子変異をそれぞれ両親から受け継いだ複合ヘテロ接合体であった。

異もあった。もっとも頻度が多いのがイントロン14のスプライシング変異（IVS14+1G>T）で、日本人以外に中国人、韓国人などアジア系でも報告されている。また、患者Aのもう一つの変異はイントロン32のスプライシング変異（IVS32-12A>G）であるが、これは西欧白人、サウジアラビア、チュニジア、トルコ、香港など多くのエスニックグループからも報告されている。

患者Bには*AGL*遺伝子変異がなく、糖原病でも別の病型であることが判明した。肝臓グリコーゲン フォスフォリラーゼ欠損症は糖原病Ⅵ型（Hers病）という別の病型である[8)]。Ⅵ型の臨床症状は肝腫大が主体で、低血糖の頻度はⅢ型より少なく、Ⅲa型で起こる筋症状は起こらない。Ⅵ型はⅢ型より予後が良好とされているので、正確な診断が重要である。

以上のように、*AGL*遺伝子解析は糖原病の正確な診断に有用である。

【文献】

1. 大久保実: グリコーゲン病（糖原病）. 今日の診断指針　第7版: 1242-1244, 2015
2. 大久保実: 糖原病Ⅲ型. 日本臨牀, 新領域別症候群シリーズ19: 47-50, 2012
3. Okubo M, et al.: Glycogen storage disease type Ⅲa: first report of a causative missense mutation（G1448R）of the glycogen debranching enzyme gene found in a homozygous patient. Hum Mutat 14: 542-543, 1999
4. Aoyama Y, et al.: Molecular features of 23 patients with glycogen storage disease type Ⅲ in Turkey: a novel mutation p.R1147G associated with isolated glucosidase deficiency, along with 9 *AGL* mutations. J Hum Genet 54: 681-686, 2009
5. Rousseau-Nepton I, et al.: A founder *AGL* mutation causing glycogen storage disease type Ⅲa in Inuit identified through whole-exome sequencing: a case series. CMAJ 187: E68-E73, 2015
6. Okubo M, et al.: Heterogeneous mutations in the glycogen-debranching enzyme gene are responsible for glycogen storage disease type Ⅲa in Japan. Hum Genet 106: 108-115, 2000
7. Okubo M, et al.: A novel point mutation in an acceptor splice site of intron 32（IVS32 A-12-->G）but no exon 3 mutations in the glycogen debranching enzyme gene in a homozygous patient with glycogen storage disease type Ⅲb. Hum Genet 102: 1-5, 1998
8. Kishnani PS, et al.: Diagnosis and management of glycogen storage diseases type Ⅵ and IX: a clinical practice resource of the American College of Medical Genetics and Genomics（ACMG）. Genet Med 21: 772-789, 2019

クッシング病におけるグルココルチコイド・ネガティブフィードバック抵抗性のメカニズム

竹下　章、右高　潤子[1]、荻久保 明香
戸来　孝、井下　尚子[2]、西岡　宏
山田　正三[3]、竹内　靖博
聖マリアンナ医科大学解剖学[1]
東京都健康長寿医療センター病理診断科[2]
森山脳神経センター病院[3]

【要約】

背景: ACTH産生下垂体腫瘍が原因であるクッシング病は、ACTHの過剰分泌が副腎からの高コルチゾール血症を来たし、肥満・糖尿病・高血圧・骨粗鬆症・易感染性・心脳血管障害等を高率に合併する予後不良な疾患である。健常人では、コルチゾールが過剰になると下垂体からのACTHの分泌が抑制されるネガティブフィードバック（NF）機構が働くが、クッシング病ではNFが破綻しており高コルチゾール血症に関わらずACTHの持続的分泌が認められる。しかしながらクッシング病におけるNF破綻のメカニズムは不明である。

方法と結果: ACTH産生下垂体腫瘍から抽出したRNAのうち、ACTHの前駆体であるPOMC遺伝子の発現が高い腫瘍3例と、低い腫瘍3例を選び、DNAマイクロアレイを用いて両群での遺伝子発現プロファイルを比較したところ、POMC遺伝子の発現が高い腫瘍でコルチゾール代謝酵素に関わるCYP3A4遺伝子発現が高かった。このため50例の腫瘍RNAを用いて定量リアルタイムPCRを行い検証したところPOMC mRNAとCYP3A4 mRNA発現量に正の相関が認められた。CYP3A4モノクローナル抗体を用いた免疫染色を69例のACTH産生下垂体腫瘍で検討したところ、60%は発現陰性であったが28%が1+、12%が2+でありCYP3A4 mRNAとCYP3A4免疫染色スコアに正の相関が認められた。肝臓や腸管ではCYP3A4の発現は核内受容体であるステロイドゼノバイオティック受容体SXRを介して調節されており、SXRの発現についてモノクローナル抗体を用いた免疫染色を67例で行ったところ36%は発現陰性であったが42%が1+、22%が2+であった。CYP3A4とSXR発現に相関は認められなかった。

考察: ACTH産生下垂体腫瘍の一部にCYP3A4およびCYP3A4発現を制御するSXRの発現が認められた。CYP3A4発現が高いほどPOMC発現も高いことから、CYP3A4による腫瘍細胞内コルチゾール代謝の促進がクッシング病におけるNF機構の破綻の成因のひとつに関与する可能性が示唆された。

【目的】

クッシング病は下垂体腺腫からのACTH過剰分泌による高コルチゾール血症が原因である。男女比が約1: 4と女性に多く、30～40歳代を中心に比較的広い年齢層に発症する。ACTH産生腺腫の約8割はミクロ腺腫とよばれる1cm以下の小さな腫瘍が多いのが特徴である。一方、周囲組織に浸潤する大きな腫瘍は、低頻度ながら手術による摘出が困難で難治性である。

健常人では、コルチゾールが過剰になると下垂体からのACTHの分泌が抑制されるネガティブフィードバック機構が働くが、クッシング病ではネガティブフィードバック機構が破綻しており高コルチゾール血症に関わらずACTHの持続的分泌が認められる。しかしながらクッシング病にお

けるネガティブフィードバック機構破綻のメカニズムは不明である。

2015年、エクソーム・シークエンスによる解析によりクッシング病下垂体腺腫の1/3～2/3の症例で、脱ユビキチン化酵素USP8（Ubiquitin-specific peptidase 8）の体細胞性変異が相次いで報告された[1, 2]。変異USP8がどのような機序で疾患を引き起こすのか、その分子機構はいまだ不明であるが、我々はUSP8変異を持つ腫瘍（MUT）は女性で2cm以下の小さな腫瘍に多くACTHの前駆体であるPOMC遺伝子の発現が高い一方、野生型の腫瘍（WT）は周囲組織への浸潤性の強い大きな腫瘍に多く、POMC遺伝子発現は一般に低いことを報告した[3]。

これまでの研究で、POMC遺伝子発現が高くUSP8変異陽性の腫瘍3例と、POMC遺伝子の発現が相対的に低くUSP8変異陰性の腫瘍3例を選び、DNAマイクロアレイを用いて両群での遺伝子発現プロファイルの異なる遺伝子を抽出後、50例の腫瘍RNAを用いて定量リアルタイムPCR（qPCR）を行って検証した。POMC発現を目的変数として、重回帰分析を行ったところ、2つの遺伝子が説明変数として選ばれた。そのうちのひとつCYP3A4に着目し、クッシング病下垂体腫瘍検体を用いたリアルタイムPCRと免疫染色によって、その発現を検討した。

【方法】

インフォームドコンセントを得、当院で2004年3月から2013年8月に手術したクッシング病患者の腫瘍組織からRNA抽出が可能であった60例を対象とした。内訳は女性47例と男性13例、また腫瘍の大きさが1cm未満のミクロ腺腫は28例、1cm以上のマクロ腺腫は32例であった[3]。上記60例のRNAを用いてSYBR-Green法による定量リアルタイムPCR（qPCR）によりPIT1遺伝子発現を検討し、PIT1遺伝子発現が無視できる程度で正常下垂体の混在がないと判断した50例（MUT16例、WT34例）を用いて検討した。

マイクロアレイ解析はクッシング病下垂体腫瘍組織のうち6例（POMC遺伝子発現が高くUSP8変異陽性MUTのミクロ腺腫3例: MUT群とPOMC遺伝子の発現が相対的に低くUSP8変異陰性で周囲組織への浸潤性の強いマクロ腺腫の3例: WT群）からtotal RNAを抽出し、Affymetrix社のGeneChip® WT PLUS Kitで処理後、Affymetrix GeneChip® Human Gene 2.0 ST Arrayを用いて2群間で遺伝子発現プロファイルを比較した。

WTとMUTで発現が有意に異なる遺伝子に関しては正常下垂体の混在を否定した50例（MUT16例、WT34例）の腫瘍RNAを用いてqPCRによりmRNA発現を評価した。qPCRはGAPDHを内部標準とし、mRNAの発現量を補正した。

免疫染色はCYP3A4抗体としてBio-Rad社のマウスモノクローナル抗体（PrecisionAb™ Monoclonal, VMA00117）を、SXR抗体としてSanta Cruz Biotechnology社のマウスモノクローナル抗体（SC-4840）、発色はベクター社のImmPRESS Reagentを用いて行った。CYP3A4の判定はエストロゲンレセプターに使われるAllred score（0～8点）を用い、3点以上を陽性とし3～5を1+、6～8を2+とした[4]。SXRの発現については0, +1, +2で判定した。

【結果】

使用したマイクロアレイは53,981個のプローブを有し、24,670個の既知遺伝子の発現解析を行った。その結果、MUTでの発現量がWTに比べ有意に平均2倍以上（$p<0.05$）を呈した既知遺伝子は1,128個（POMC遺伝子も含む）、逆に1/2以下（$p<0.05$）の発現を呈した遺伝子数は288個であった。有意に変動する遺伝子数が多いため、倍率の高い遺伝子を40種、低い遺伝子を2種選び50例の腫瘍RNAを用いて計42の遺伝子について定量リアルタイムPCRを行ったところ28遺伝子でPOMC発現と$R>0.3$の相関を認めた。POMC遺伝子発現を目的変数として前進法によるステップワイズ重回帰分析を施行したところ、28遺伝子のうち2つの遺伝子（CYP3A4とMAP3K4）の発現量が説明変数として選ばれた（$R=0.795$, $p<0.0001$）（**図1A**）。CYP3A4 mRNAとPOMC mRNA発現量に正の相関が認められた（$R=0.428$, $p=0.002$）（**図1B**）。CYP3A4は肝臓や十二指腸・小腸に多く発現し、正常下垂

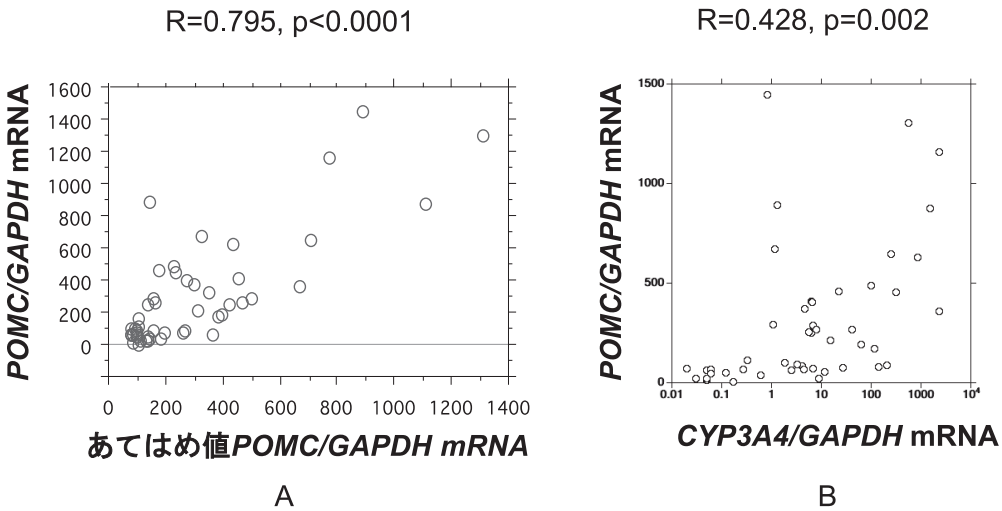


図１　CYP３A４とPOMC遺伝子発現の関連性

A. 重回帰分析によるPOMC遺伝子発現の予測値と実際値の関係

前進法によるステップワイズ重回帰分析により２つの遺伝子（CYP３A４遺伝子とMAP３K４遺伝子）の発現量がPOMC発現を予測する説明変数として選択された。mRNAはGAPDHの発現量で補正した（n=51）。

B. 腫瘍のCYP３A４ mRNAとPOMC mRNA発現量の相関

Spearmanの順位相関係数を用いて検定した。mRNAはGAPDHの発現量で補正した（n=51）。

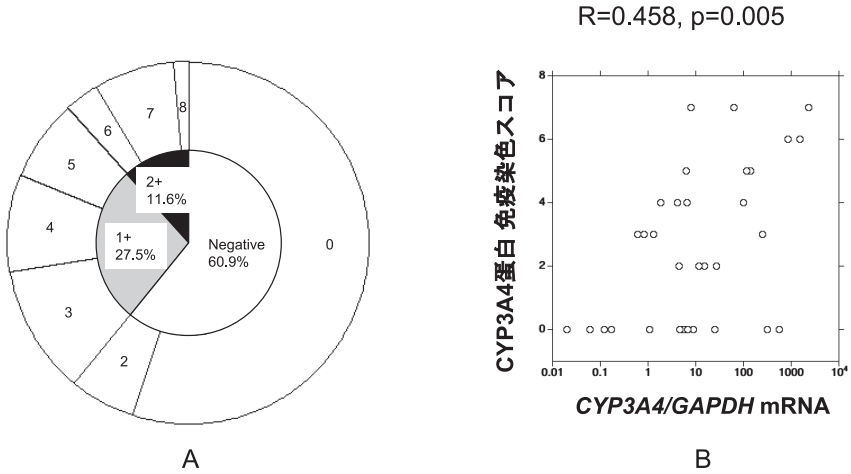


図２　CYP３A４蛋白の発現とCYP３A４遺伝子およびの関連性

A. 免疫染色によるCYP３A４蛋白発現の評価

免疫染色によるCYP３A４蛋白の発現をAllred score（０～８点）を用いて評価した。３点以上を陽性とし３～５を１+、６～８を２+とした（n=69）。

B. CYP３A４蛋白とCYP３A４ mRNA発現量の相関

Spearmanの順位相関係数を用いて検定した。mRNAはGAPDHの発現量で補正した（n=36）。

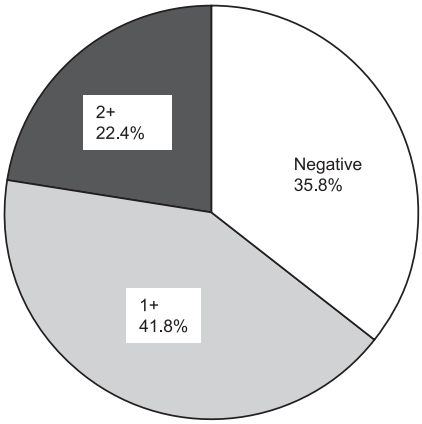


図３　免疫染色によるSXR蛋白の発現の評価
SXRの発現について陰性、+1、+2で判定した（n=67）。

体には発現は認められないことから、CYP3A4のモノクローナル抗体を用いて69例のクッシング病下垂体腺腫の免疫染色を行ったところ60.9%が陰性、27.5%が1+、11.6%が2+と約4割に発現が認められ（**図2A**）、腫瘍のCYP3A4 mRNA発現量と蛋白発現量（Allred score）には正の相関が認められた（R=0.458, p=0.005）（**図2B**）。肝臓や腸管ではCYP3A4の発現は核内受容体であるステロイドゼノバイオティック受容体SXRを介して調節されており、SXRの発現について67例の免疫染色を行ったところ36%は発現陰性であったが42%が1+、22%が2+であった（**図3**）。CYP3A4とSXR発現に相関は認められなかった。

【考察】

本研究によりクッシング病の下垂体腺腫の約40%にCYP3A4の異所性発現が認められることが明らかとなった。重回帰分析によりCYP3A4発現とPOMC発現には強い関連性があり正の相関が認められた。

CYP3A4は主に肝臓や十二指腸・小腸に発現しているが、文献によると、免疫染色による検討で正常乳腺組織や乳癌組織にも発現が認められ、正常乳腺組織よりも乳癌組織でより発現が多い傾向が認められるとの報告があるが、その意義については不明である[5)]。

CYP3A4は肝臓や十二指腸・小腸においてグルココルチコイドなどのステロイドホルモン代謝に関わる主要な酵素である。従ってクッシング病では腫瘍内のCYP3A4遺伝子の異所性発現により、腫瘍細胞内でのグルココルチコイドの代謝が亢進し、グルココルチコイド受容体を介したネガティブフィードバック機構が破綻することで、高コルチゾール血症に関わらずACTHの持続的過剰分泌が生じる可能性が考えられた。

SXRは核内受容体に属しCYP3A4と同様に肝臓や小腸に主に発現する転写調節因子である。生体内のさまざまなステロイドホルモンや薬物がSXRに結合しリガンドとして作用しCYP3A4の発現調節に関与している。SXRとCYP3A4の発現量に明らかな相関は認められなかったが、約65%の腫瘍にSXRの発現が認められたことから、生体内のなんらかの物質がSXRにリガンドとして作用しCYP3A4の発現に関与する可能性が考えられた。

【文献】

1. Reincke M, Sbiera S, Hayakawa A, et al.: Mutations in the deubiquitinase gene USP8 cause Cushing's disease. Nat Genet 47: 31-38, 2015
2. Ma ZY, Song ZJ, Chen JH, et al.: Recurrent gain-of-function USP8 mutations in Cushing's disease. Cell Res 25: 306-317, 2015
3. Hayashi K, Inoshita N, Kawaguchi K, et al.: The USP8 mutational status may predict drug susceptibility in corticotroph adenomas of Cushing's disease. Eur J Endocrinol 174: 213-226, 2016
4. Allred DC, Harvey JM, Berardo M,et al.: Prognostic and predictive factors in breast cancer by immunohistochemical analysis. Mod Pathol 11: 155-168,1998
5. Kapucuoglu N, Coban T, Raunio H, et al.: Expression of CYP3A4 in human breast tumour and non-tumour tissues. Cancer Lett 202: 17-23, 2003

アルドステロン産生腫瘍における細胞内メタボロームを介したアルドステロン合成制御機構の解明

沖　健司
広島大学病院内分泌・糖尿病内科

【要約】

全高血圧患者の5～10%に認められる原発性アルドステロン症は、最も頻度の高い二次性高血圧症である[1)]。原発性アルドステロン症は、アルドステロン産生腺腫（APA）と特発性アルドステロン症に分類され、いずれにおいてもアルドステロン過剰症をきたす。アルドステロン過剰は、高血圧を呈するのみならず、心血管疾患や慢性腎臓病を高率にもたらすため、アルドステロン合成・分泌の制御は臨床的に極めて重要である。

原発性アルドステロン症の一病型であるAPAの原因は長らく不明であったが、細胞膜のイオンチャネルやポンプに体細胞変異を認めることがわかり、これらの体細胞変異がアルドステロン合成に関わっていることが報告された[2)]。アルドステロン合成はミトコンドリアや小胞体において、複数のステロイド合成酵素により制御されている。ステロイド合成酵素はCYP代謝を介しており、CYPの反応には電子供与体を必要とし、電子供与体の合成には細胞内メタボロームの合成が関わっている。そこで、本研究では、アルドステロン合成制御の新規標的因子探索のため、アルドステロン合成に関わる細胞内メタボロームに焦点を当てたアルドステロン合成機構の解明を行うことを目的とした。

細胞内メタボロームを同定するために、APAに認める体細胞変異である*KCNJ5*変異や*ATP1A1*変異を副腎皮質癌細胞株（HAC15）に導入し、APAモデル細胞株の樹立を行った。これらの細胞における網羅的細胞内メタボローム解析を行い、アルドステロン合成に必要な細胞内メタボロームの同定を行った。

【目的】

APAにおいてアルドステロン合成に関わるKCNJ5変異やATP1A1変異をHAC15に導入し、APAモデル細胞株を樹立し、細胞内メタボローム解析により、CYP代謝に関わる細胞内シグナルを明らかにすることを目的とした。

【方法】

APAに認める変異のひとつであるKCNJ5 G151R、ATP1A1 L104Rの配列をもったcDNAをレンチウイルスベクターに挿入し、293TN細胞株にトランスフェクション法を用いて、上記遺伝子導入用のウイルス作製を行った。KCNJ5 G151R、ATP1A1 L104R、および空ベクターをもつレンチウイルスをHAC15に感染させ、APAモデル細胞株とコントロール細胞株を作製した（HAC15_KCNJ5, HAC15_ATP1A1, control）。HAC15_KCNJ5, HAC15_ATP1A1, controlは、感染72時間後に、0.1%血清を含んだ培養液で24時間培養した（serum starvation）。0.1%血清培養液で培地交換後、24時間培養した上清を回収しアルドステロン濃度測定を行った。

メタボローム解析には、上記と同様に、HAC15_KCNJ5, HAC15_ATP1A1, controlを作製した。細胞内代謝物（メタボライト）の抽出には、各細胞株を、感染72時間後に、10%血清を含む新しい培地で24時間培養した。細胞は、上清を取り除いた後5%マンニトール水溶液で洗浄し、メタノールで固定・溶解した後バッファーを加えて細胞内容抽出液を回収した。回収したサンプルを、キャピラリー電気泳動-飛行時間型質量分析計（CE-TOFMS）により、メタボライトの解析を行った。

【結果】

細胞内メタボロームを同定するために、APAに認める体細胞変異である*KCNJ5*変異や*ATP1A1*変異をHAC15に導入し、APAモデル

細胞株の樹立を行った。APAモデル細胞株の上清では、controlに比較し、アルドステロン濃度はHAC15_KCNJ5で1.6倍、HAC15_ATP1A1で2.6倍と有意に高値であった（**図1**）。

これらの細胞における網羅的細胞内メタボローム解析を行ったところ、APAモデル細胞株において、CYP代謝の補酵素であるNADPHが有意に低下していることがわかった（**図2**）。NADPHの供給源は、ペントースリン酸経路、TCA回路、TCA回路-ピルビン酸合成経路などがある。解糖系に関わるメタボロームが広範にわたり低下していることから、ペントースリン酸経路の活性化が示唆された。

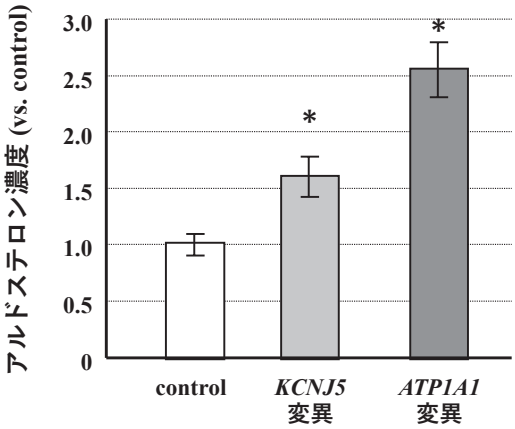
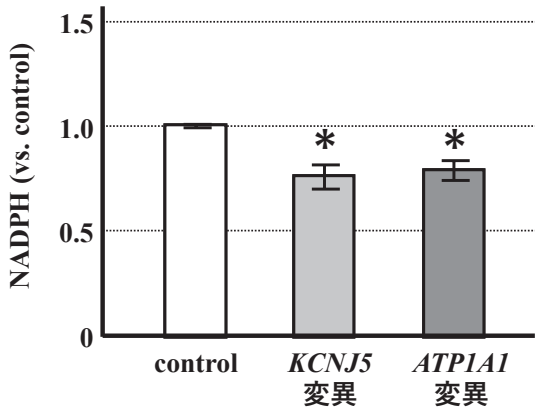


図１　APAモデル細胞株上清におけるアルドステロン濃度　$^{*}P<0.05$（vs. control）

【考察】

APAに認める遺伝子変異を導入し作製した細胞株において、アルドステロン合成に必要なステロイド合成酵素の発現上昇、また、それに伴うアルドステロン合成促進がみられ、遺伝子変異がアルドステロン合成を促進していると考えられた。つまり、これらの遺伝子変異を導入し作製した細胞株は、APAにおけるアルドステロン合成機構を検討する上で、有用なAPAモデル細胞株と考える。

このAPAモデル細胞株において、アルドステロン合成に関わるメタボロームを同定するために、網羅的メタボローム解析を行った。この度の解析では、約900のメタボロームを同時解析できる[3)]。メタボロームなどの細胞内低分子化合物の同定には、質量分析などが有用であるが、本検討では、低分子化合物を網羅的に同定できるため、アルドステロン合成に重要な細胞内情報を一度の解析で得ることができた。近年の報告では、副腎細胞において、ペントースリン酸経路が活性化されていることが報告されており[4)]、APAにおけるアルドステロン合成時にも補酵素供給のために、ペントースリン酸経路が利用されていると考えられる。遺伝子変異を介したアルドステロン合成機構として、ペントースリン酸経路の活性化がCYP代謝の補酵素供給源となり、アルドステロン合成が促進されることが示唆された。



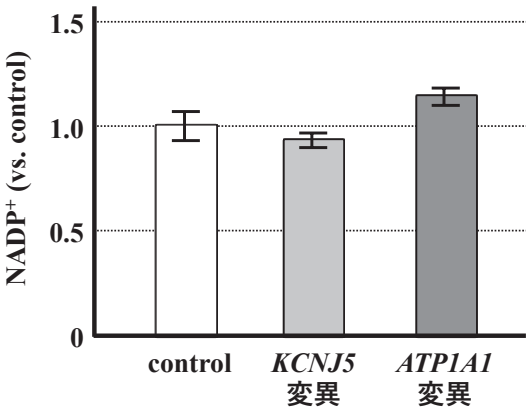


図２　APAモデル細胞株における細胞内NADPH，$NADP^{+}$濃度　$^{*}P<0.05$（vs. control）

【文献】

1. Funder JW, Carey RM, Mantero F, Murad MH, Reincke M, Shibata H, Stowasser M, Young WF Jr: The management of primary aldosteronism: case detection, diagnosis, and treatment: an Endocrine Society Clinical Practice Guideline. J Clin Endocrinol Metab 101: 1889-1916, 2016
2. Omez-Sanchez CE, Oki K: Minireview: potassium channels and aldosterone dysregulation: is primary aldosteronism a potassium channnelopathy? Endocrinology 155: 47-55, 2014
3. Munemoto M, Mukaisho KI, Miyashita T, Oyama K, Haba Y, Okamoto K, et al.: Roles of the hexosamine biosynthetic pathway and pentose phosphate pathway in bile acid induced cancer development. Cancer Sci 110: 2408-2420, 2019
4. Li B, Baba T, Miyabayashi K, Sato T, Shima Y, Ichinose T, et al.: Role of Ad4-binding protein/steroidogenic factor 1 in regulating NADPH production in adrenocortical Y-1 cells. Endocr J 64: 315-324, 2017

人工知能による臨床エビデンスの統合と体系化

山田　朋英[1]、門脇　孝[1]、山内　敏正[1]、庄嶋　伸浩[1]
野間　久史[2]、Sophia Ananiadou[3]、森　臨太郎[4]
東京大学大学院医学系研究科糖尿病・代謝内科[1]
統計数理研究所[2]、マンチェスター大学[3]
コクラン共同計画[4]

【要約】

本研究では国内外の診療ガイドラインで実際に引用されたシステマティックレビュー・メタアナリシスを用いた検証を行い、人工知能アルゴリズムの実用化に向けた改良を行った。また、メタアナリシストの国際共同研究WHO GBDとして、Lancet誌などに成果を報告した。これらの研究は、全世界の公衆衛生や政策決定に寄与するものである。今後は本研究を発展させ、糖尿病領域などに関し、応用解析を進めていきたいと考えている。

【目的】

根拠に基づく医療（evidence-based medicine: EBM）は、「臨床的専門技能」と、現在利用できる最新･最善の「科学的な臨床的根拠」を統合して、患者一人ひとりのニーズにあった治療法を決定する方法である。システマティックレビュー・メタアナリシスは、過去に行われた複数の独立な研究結果を統合するための手法や統計解析のことである。この結果は最も質の高い根拠であり、世界の診療ガイドラインの礎となっている。本研究提案は、臨床エビデンスの統合と体系化におけるシステマティックレビューでの医学文献検索を、人工知能を用いて大幅な省略化を目指すものである。

【方法】

人工知能ロボットアナリスト

ロボットアナリストは、英国マンチェスター大学コンピューターサイエンス学科、英国国立テキストマイニングセンター（NaCTeM）で開発されたニューラルネットワークを介した人工知能である。ロボットアナリストは、文章を読んだ人が重要だと判断する暗黙の基準を学習（ディープラーニング）し、多数の文書からその基準に沿ったものを抽出できる人工知能（AI）である（http://www.nactem.ac.uk/robotanalyst/）。ロボットアナリストは、教師データを学習する際に、教師データに含まれる単語ごとに教師データとの関連性と単語同士のつながりに関して伝達情報量を通して数値化し、ニューラルネットワークを介し、特徴量として利用している。教師データを学習した後、新たに評価用に投入されたデータにも同様の処理がなされ、教師データによって付与された特徴量により、それぞれの文章はスコア化され、そのスコア（＝正解である予測確率）を基に教師データとの関連性を評価した。

【結果】

本研究では国内外の診療ガイドラインで実際に引用されたシステマティックレビュー・メタアナリシスを用いた検証を行い、ロボットアナリストの人工知能アルゴリズムの実用化に向けた改良を行った。

まず、既報のメタアナリシス論文で実際にシステマティックレビューに用いた論文を、正解論文（最終的に系統的レビューの対象となった論文）、非正解論文（系統的レビューの対象とならなかった論文）に分けた。

人工知能が、教師データをもとに機械学習し、評価データにスコア付けした。結果ロボットアナリストが5報の論文の機械学習を行うことで、専門家の暗黙知を理解した。その後AIが独自に付けた高スコア順に論文を閲覧した場合、全候補論文の12％の閲覧で、100％の正解論文をもれなく

抽出することができた。88％の論文スクリーニングの省力化が可能であった。

国内外の診療ガイドラインで実際に引用されたシステマティックレビュー・メタアナリシスを用いた検証を行い、ロボットアナリストの人工知能アルゴリズムの実用化に向けた改良に関して、引き続き検討を進める。

現在、国内外の人工知能やテキストマイニングを専門とする企業と提携し、現在の医療の抱える問題点の解決に向けた多くの研究開発を進めている。

これまで、メタアナリシストの国際共同研究WHO GBDとして、Lancet誌などに成果を報告した。これらの研究は世界195か国の疾患データから、全世界的にみた疾病の社会への影響を解析したものであり、全世界の公衆衛生や政策決定に寄与するものである。今後は本研究を発展させ、糖尿病領域などに関し、応用解析を進めていきたいと考えている。

(1) 国際メタアナリシストの一員としてGBDの解析に協力しコラボレーターとして活動した[1－9]。

重要な臨床議案に関し質の高いネットワークメタアナリシスを行い、臨床ガイドライン構築に貢献する。

いくつかの臨床議案に関し系統的レビューを行いDiabetes Careなどの医学雑誌に報告した[10－12]。

(2) システマティックレビューの自動化を実現させる。

PICORON-EBM（PICO and Risk Of bias Navigator for Evidence Based Medicine）の開発を行った[13]。

システマティックレビュー・メタアナリシスにおいて、多くの医学臨床論文の質（バイアスなど）に関して適切に評価することが求められる。しかし、個々の論文の質的評価には時間がかかることや時に見落としが生じることが問題であった。我々はこの質的評価時間を短縮し、見落としを防ぐためのテキストマイニングソフトウェアPICORON（PICO and Risk of Bias Navigator）を開発した（http: //www. picoron. com/）。PICORONに英文の臨床試験の論文を読み込ませることで、質的評価に必要な単語が自動でハイライトされ、論文の質的評価時間は3分の1まで短縮することができた。

(3) 人工知能による臨床エビデンスの統合と体系化を行う。世界のビックデータを、人工知能やテキストマイニングの技術を用い解析する。これはプレシジョンメディシンの実現に寄与する。

T-Library の開発を行った[14]。

我々は病歴要約情報自動データ抽出ソフトT-Libraryを開発した（http: //www.picoron.com/tlibrary/index）。医療情報（退院サマリ）の情報を項目ごとに自動で分割抽出し、エクセルデータ上の対応項目に分割され転記することができる。T-Libraryにより退院サマリデータの転記にかかる時間は5分の1に省力化できた。このソフトにより数千数万のテキストベースの退院サマリなどのビックデータを解析することが容易となり、自動更新される疾患リスクエンジンや人工知能を用いた解析に利用することが可能となる。

(4) AIを用い、現場の医療者の作業の省力化や効率化、日本の医療システムの維持と改善を目指す。

現在、国内外の人工知能やテキストマイニングを専門とする企業と提携し、現在の医療の抱える問題点の解決に向けた多くの研究開発を進めている。

【考察】

(1) 現時点で最もエビデンスレベルが高い臨床知見を迅速かつ精密に提供することができ、全疾患領域において、我国・世界の健康・長寿への治療ガイドラインの礎となる。

(2) ビッグデータから、必要とする情報を迅速に手に入れることがAI技術で可能となることは、すべての研究者にとって時間の節約となる。

(3) 臨床疫学研究者・図書館司書・臨床試験コーディーネーター・医薬情報担当者がこれまでに担っていた仕事の大部分をAIが代替できることで、世界的に見て人件費のコスト削減ができる。また、当該研究領域の飛躍的な進

歩につながる。

(4) 非英語言語で書かれた医学文書のデータ検索、解析の効率化にも大きく貢献する。これは、糖尿病の半分以上を占めるアジア、今後人口が増大するアジア地域での医学、医療においてその情報検索という点で大きく貢献しうる。

【結語】

煩雑な作業の専門家の暗黙知を学んだ人工知能が代行することで人類はより生産的な作業に従事することが可能となる。

【文献】

1. GBD 2016 Neurology Collaborators (incl Yamada T); Global, regional, and national burden of neurological disorders, 1990-2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. Lancet Neurol 18: 459-480, 2019
2. GBD 2016 Stroke Collaborators (incl Yamada T); Global, regional, and national burden of stroke, 1990-2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. Lancet Neurol 18: 439-458,2019
3. GBD 2017 SDG Collaborators (incl Yamada T); Measuring progress from 1990 to 2017 and projecting attainment to 2030 of the health-related Sustainable Development Goals for 195 countries and territories: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. Lancet 392: 2091-2138, 2018
4. GBD 2017 Population and Fertility Collaborators (incl Yamada T); Population and fertility by age and sex for 195 countries and territories, 1950-2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. Lancet 392: 1995-2051, 2018
5. GBD 2017 Risk Factor Collaborators (incl Yamada T); Global, regional, and national comparative risk assessment of 84 behavioural, environmental and occupational, and metabolic risks or clusters of risks for 195 countries and territories, 1990-2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. Lancet 392: 1923-1994, 2018
6. GBD 2017 Disease and Injury Incidence and Prevalence Collaborators (incl Yamada T); Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 354 diseases and injuries for 195 countries and territories, 1990-2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. Lancet 392: 1789-1858, 2018
7. GBD 2017 Mortality Collaborators (incl Yamada T); Global, regional, and national age-sex-specific mortality and life expectancy, 1950-2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. Lancet 392: 1684-1735, 2018
8. GBD 2017 DALYs and HALE Collaborators (incl Yamada T); Global, regional, and national disability-adjusted life-years (DALYs) for 359 diseases and injuries and healthy life expectancy (HALE) for 195 countries and territories, 1990-2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. Lancet 392: 1859-1922, 2018
9. GBD 2016 Alcohol Collaborators (incl Yamada T); Alcohol use and burden for 195 countries and territories, 1990-2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. Lancet 392: 1015-1035, 2018
10. Yamada T, Kamata R, Ishinohachi K, Shojima N, Ananiadou S, Nom H, Yamauchi T, Kadowaki T: Biosimilar vs originator insulins: Systematic review and meta-analysis. Diabetes Obes Metab 20: 1787-1792,2018
11. Yamada T, Shojima N, Noma H, Yamauchi T, Kadowaki T: Sodium-glucose co-transporter-2 inhibitors as add-on therapy to insulin for type 1 diabetes mellitus: System-

atic review and meta-analysis of randomized controlled trials. Diabetes Obes Metab 20: 1755-1761, 2018
12. Yamada T, Shojima N, Noma H, Yamauchi T, Kadowaki T: Weekly Versus Daily Dipeptidyl Peptidase 4 Inhibitor Therapy for Type 2 Diabetes: Systematic Review and Meta-analysis. Diabetes Care 41: e52-e55, 2018
13. Yamada T, Kondo Y, Momosaki R: PICO and Risk Of bias Navigator for Evidence Based Medicine. PeerJ Preprints 7: e27684v1, 2019
14. Yamada T, Kondo Y, Momosaki R: Automated data extraction software for medical summary using text mining (T-Library). PeerJ Preprints 7: e27685v1, 2019

（3）呼吸器疾患

肺大細胞神経内分泌癌の化学療法の最適化の検討

宇留賀 公紀、髙谷　久史、藤井 丈士、岸　一馬[1]
東邦大学医療センター大森病院呼吸器内科[1]

【要約】

目的: 肺大細胞神経内分泌癌は原発性肺癌の1-3%に認められ、従来は小細胞癌に準ずる化学療法が行われてきた。近年の次世代シークエンサーを用いた解析では肺大細胞神経内分泌癌は多様な集団と報告されており、化学療法の最適化を目指して当院の症例で検討を行った。

方法: 白金製剤を含む2剤併用化学療法を行った進行・再発肺大細胞神経内分泌癌6例を対象とした。抗Rb抗体と抗p53抗体を用いて免疫染色を行い、いずれかが陰性であった症例を小細胞癌様群、いずれも陽性であった群を非小細胞癌様群と定義した。

結果: 小細胞癌様群と非小細胞癌様群はいずれも3例づつであった。酵素抗体法による免疫染色の評価は、synaptophysinは小細胞癌様群は3例全例で陽性で、非小細胞癌様群は2例で陽性あった。小細胞癌様群では1st line治療の最良効果判定は全例が安定であったが、非細胞癌様群は1例が部分奏効、残り2例が進行と多様であった。

結論: 小細胞癌様群では全例で1st line治療に対して安定しており、ある程度の効果予測は可能であった。今回の検討では免疫染色を用いたが、次世代シークエンスを用いればより正確な効果予測の向上に寄与する可能性が考えられた。

【目的】

肺大細胞神経内分泌癌は、2015年版WHO分類から肺小細胞癌、カルチノイドとともに肺神経内分泌腫瘍に分類された[1)]。病理組織学的には小細胞癌より大型で、核小体と豊かな細胞質を有し、palisadingと呼ばれる柵状構造やロゼット構造、類器官構造などを有する。臨床的には原発性肺癌の1-3%に認められ、進行が早い腫瘍である。進行期肺大細胞神経内分泌癌に対しては、肺神経内分泌腫瘍に属する小細胞癌に準ずる化学療法（白金製剤+エトポシドなど）が行われてきた。しかし最近の次世代シークエンサーを用いた解析では肺大細胞神経内分泌癌は多様な集団であり、40%の症例では小細胞癌に類似する*TP53*や*RB*などの遺伝子異常を、残りの60%の症例では*STK11*や*KRAS*、*KEP1*など非小細胞癌類似の異常を示したと報告されている[2)]。これらの遺伝子の多様性は化学療法の効果に影響することが報告されており[3)]、肺大細胞神経内分泌癌に対する化学療法の最適化を目指して、当院の症例で検討を行った。

【方法】

本研究について虎の門病院 研究倫理審査委員会で承認を得た。2012年から2019年までに肺癌取扱い規約第8版に基づいて肺大細胞神経内分泌癌と診断し、白金製剤を含む2剤併用化学療法を行った6例を対象とした。性別や年齢、喫煙歴、化学療法、無再発生存期間、全生存期間などの臨床所見について検討した。また、抗Rb抗体（DAKO #M7001, × 3000）と抗p53抗体（Leica #NCL-L-RB-358, × 100）にて免疫染色を行い、癌細胞の染色強度（0-3）に陽性細胞の割合（0-100%）を掛け合わせたH score（0-300）を用いてスコアリングし、100以上を陽性とした。抗Rb抗体または抗p53抗体が陰性であった群を小細胞癌様群、いずれも陽性であった群を非細胞癌様群と定義した。化学療法の治療効果判定は、固形がんの治療効果判定のための新ガイドライン（（RECISTガイドライン）改訂版 version 1.1. New response evaluation criteria in solid tumors: Revised RECIST guideline（version 1.1））に基づ

表１　症例背景

		小細胞癌様 （n=3）	非小細胞癌様 （n=3）
年齢中央値		74（69-75）	81（58-85）
性別　男性/女性		3/0	3/0
喫煙中央値（pack years）		60	45
EGFR mutation	陰性/不明	2/1	3/0
免疫染色	Synaptophysin陽性	3	2
	Chromogranin陽性	2	2
	CD56陽性	3	3
病理病期	IV	1	3
	術後再発	2	0
1st line	カルボプラチン+エトポシド	2	2
	シスプラチン+イリノテカン	0	1
	カルボプラチン+ イリノテカン→エトポシド	1	0
1st lineの最良効果	部分奏効	0	1
	安定	3	0
	進行	0	1
2nd line以降	アムルビシン	1	2
	ノギテカン	1	1
	ナブ パクリタキセル	2	1
	ペンブロリズマブ	0	1

いた。統計は、SPSS statistical software（version 18.0, SPSS Inc., Chicago, IL）を用いた。生存曲線をKaplan-Meier法により算出し、生存曲線の比較はLog Rank検定で行い、$p=0.05$以下を有意とした。

【結果】

症例の背景は**表1**に示した。小細胞癌様群、非小細胞癌様群のいずれも全例が男性で、喫煙歴を有した。*EGFR* mutationは、小細胞癌様群の1例で不明であったが、他は全例で陰性であった。酵素抗体法による免疫染色の評価は、synaptophysinは小細胞癌様群は3例陽性で、非小細胞癌様群は2例陽性あった。Chromograninは両群ともに2例、CD56は両群ともに全例で陽性であった。化学療法については、1st lineは白金製剤とエトポシドまたはイリノテカンが使用されていた。2nd line以降については、アムルビシン、ナブパクリタキセルが比較的多く使用されており、非小細胞癌様群の1例にペンブロリズマブが投与されていた。1st line治療の最良効果判定は、小細胞癌群では全例で安定であったが、非小細胞癌群では2例が進行で、残り1例が部分奏効であった。1st line治療の無再発生存期間は、小細胞癌様群 21.5週（95%信頼区間 16.6-26.4週）、非小細胞癌様群 17.0週（95%信頼区間 0-35.6週）で、有意差は認めなかった（$p=0.786$）（**図1**）。全生存期間は、小細胞癌様群 57.7週（95%信頼区間 24.3-91.0週）、非小細胞癌様群 91週（95%信頼区間 56.5-126.8週）で、有意差は認めなかった（$p=0.110$）。

【考察】

今回、肺大細胞神経内分泌癌6例を抗Rb抗体と抗p53抗体を用いて小細胞癌様群と非小細胞癌様群に分類して検討した。免疫染色で神経内分泌

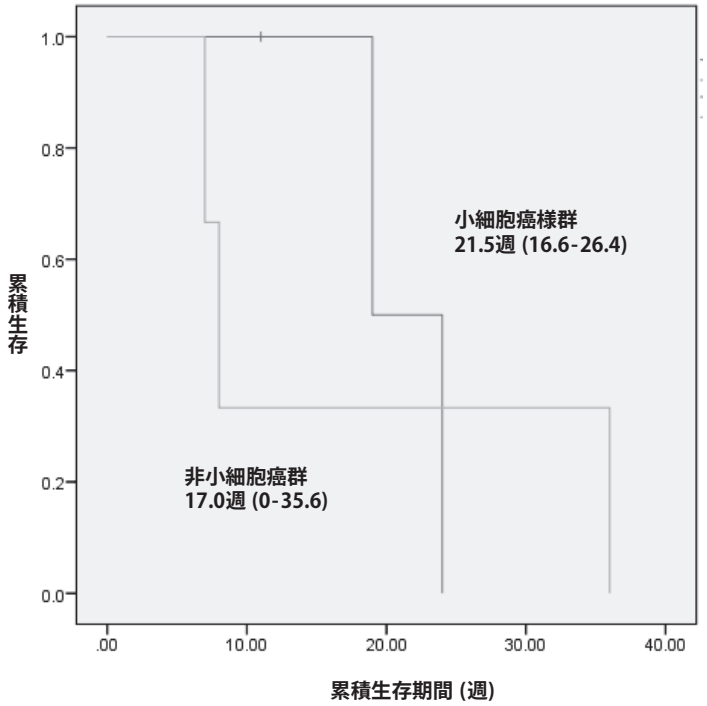


図 1　1st lineのKaplan-Meier曲線

系のマーカーであるsynaptophysinは小細胞癌様群は3例陽性で、非小細胞癌様群は2例陽性あった。治療効果判定については、小細胞癌様群では1st line治療の最良効果判定は全例が安定であったが、非細胞癌様群は1例が部分奏効、残り2例が進行と多様であった。

従来は進行・再発肺大細胞神経内分泌癌は小細胞癌としての治療が行われてきた。Nihoらは30例の進行・再発肺大細胞神経内分泌癌に対してシスプラチンとイリノテカンによる併用化学療法の多施設共同第Ⅱ相試験を行い、奏効率46.7%、全生存期間12.6カ月と報告している[4)]。

しかし、次世代シークエンサーを用いた解析によれば、40%の症例では小細胞癌に類似する遺伝子異常を、残りの60%の症例では非小細胞癌類似の異常を示している[2)]。また、Miyoshiらは日本の症例で同様の検討を行っており、小細胞癌で多く認められ*TP53*は71%、*RB1*は26%で不活化されており、小細胞癌に遺伝子背景が近い症例が多かったとしている[5)]。これらの肺大細胞神経内分泌癌の多様な遺伝子異常は抗癌剤の臨床的効果に影響されているとされ、*RB*の異常がない肺大細胞神経内分泌癌では非小細胞癌に対する抗癌剤治療（白金製剤＋ゲムシタビン/パクリタキセル）が小細胞癌に対する抗癌剤治療（白金製剤＋エトポシド）より高い効果を示したが、*RB*の異常がある症例では効果に差がなかった[3)]。

今回の検討では、小細胞癌様群では全例で1st line治療に対して安定しており、ある程度の効果予測は可能であった。一方で、両群の無再発生存期間では有意差を認めなかった。今回の検討では免疫染色を用いて2群を分けたので、次世代シークエンスを用いればより正確な効果予測の向上に寄与する可能性が考えられた。

【文献】

1. Travis W, Brambilla E, Burke A, et al.: WHO Classification of Tumours of the Lung, Pleura, Thymus and Heart. 4th ed. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 2015. World Health Orga-

nization Classification of Tumours, vol. 7
2. Rekhtman N, Pietanza MC, Hellmann MD, et al.: Next-Generation Sequencing of Pulmonary Large Cell Neuroendocrine Carcinoma Reveals Small Cell Carcinoma-like and Non-Small Cell Carcinoma-like Subsets. Clin Cancer Res 22: 3618-3629, 2016
3. Derks JL, Leblay N, Thunnissen E, et al.: Molecular Subtypes of Pulmonary Large-cell Neuroendocrine Carcinoma Predict Chemotherapy Treatment Outcome. Clin Cancer Res 24: 33-42, 2018
4. Niho S, Kenmotsu H, Sekine I, et al.: Combination chemotherapy with irinotecan and cisplatin for large-cell neuroendocrine carcinoma of the lung: a multicenter phase Ⅱ study. J Thorac Oncol 8: 980-984, 2013
5. Miyoshi T, Umemura S, Matsumura Y, et al.: Genomic Profiling of Large-Cell Neuroendocrine Carcinoma of the Lung. Clin Cancer Res 23: 757-765, 2017

【発表に関連する事項】

1. Uruga H, Fujii T, Nakamura N, et al.: Squamous cell transformation as a mechanism of acquired resistance to tyrosine kinase inhibitor in EGFR-mutated lung adenocarcinoma: a report of two cases. Respirol Case Rep. In press, 2020
2. Shih AR, Uruga H, Bozkurtlar E, et al.: Problems in the reproducibility of classification of small lung adenocarcinoma: an international interobserver study. Histopathology 75: 649-659, 2019

Acute fibrinous and organizing pneumonia（AFOP）の臨床放射線病理的検討

髙橋　由以、黒崎　敦子[1]、藤井　丈士、岸　一馬[1,2]
結核予防会複十字病院放射線診療部[1]
東邦大学医療センター大森病院呼吸器内科[2]

【要約】

Acute fibrinous and organizing pneumonia（AFOP）は特発性間質性肺炎の一亜型であり、2013年に改訂された American Thoracic Society / European Respiratory Societyのガイドラインで“rare histologic pattern”に組み込まれた。臨床経過はびまん性肺細胞傷害（diffuse alveolar damage; DAD）に類似し予後不良とされているが、報告例が少なく十分な知見が得られていない。2008年1月から2018年12月に虎の門病院呼吸器センター内科で気管支鏡検査を施行しAFOPと診断された11例を対象に後方視的に検討した。男性7例、女性4例、年齢中央値は65歳であった。2例は基礎疾患を持たず、骨髄異形成症候群が2例、非小細胞肺癌が2例、残り5例の基礎疾患はそれぞれ気管支喘息、糸球体腎炎、自己免疫性肝炎、関節リウマチ、乳癌であった。胸部CT画像では、4例に浸潤影、1例にびまん性のすりガラス影を認め、5例は浸潤影とすりガラス影が混在していた。1例は両側の小葉中心性の粒状影を呈していた。全例がステロイドによる治療を受け、4例にステロイドパルス療法が施行された。5例が低酸素血症を呈し、そのうち1例で人工呼吸器管理を要し、最終的に死亡した。その他の10例は治癒した。ステロイドで適切に治療され良好な経過をたどった症例が多かった。

【目的】

Acute fibrinous and organizing pneumonia（AFOP）は特発性間質性肺炎の一亜型であり、2013年に改訂された American Thoracic Society / European Respiratory Societyのガイドラインで“rare histologic pattern”に組み込まれた。臨床経過はびまん性肺細胞傷害（diffuse alveolar damage; DAD）に類似し、予後不良とされているが、報告例が少なく十分な知見が得られていない。当院でAFOPと診断された症例の臨床的検討を行う。

【方法】

2008年1月から2018年12月に虎の門病院呼吸器センター内科で病理学的にAFOPと診断された11例を対象に、病理組織所見、血液検査、気管支鏡検査、CT画像所見、臨床経過を後方視的に検討した。

【結果】

11例はいずれも当院に入院し気管支鏡検査を施行され、経気管支肺生検（transbronchial lung biopsy; TBLB）の組織検体で病理学的に肺胞上皮細胞の腫大、肺胞腔内へのフィブリン析出を認めAFOPの診断に至った。男性7例、女性4例、年齢中央値は65歳であった。入院時の症状は発熱10例、咳嗽7例、喀痰3例、胸痛1例であった。2例は基礎疾患を持たず、2例が骨髄異形成症候群、他の2例が非小細胞肺癌を基礎疾患とし、残り5例の基礎疾患はそれぞれ気管支喘息、糸球体腎炎、自己免疫性肝炎、関節リウマチ、乳癌であった。原因もしくはリスクとしては、免疫チェックポイント阻害剤（ペンブロリズマブ）による薬剤性肺障害と考えられた症例が1例、乳癌に対する放射線治療が原因と考えられた症例が1例で、関節リウマチ症例が1例含まれたが関節リウマチの病勢とは一致しておらず関連は明らかではなかった。その他の症例で原因ははっきりしなかった。3例でKL-6の上昇（平均388.1［137-731］U/ml）、7例でSP-Dの上昇（平均222.2［26.4－

750.6］ng/ml)、7例でSP-Aの上昇（平均871.64［17-244.7］ng/ml)、9例でsIL-2受容体の上昇（平均1400［598-3378］μ/l）を認めた。気管支肺胞洗浄（bronchoalveolar lavage; BAL）が9例に施行され、BAL液の性状は好中球優位が5例、マクロファージ優位が3例、リンパ球優位が1例であった。胸部CT画像では、4例に浸潤影、1例にびまん性のすりガラス影を認め、5例は浸潤影とすりガラス影が混在していた。残り1例は両側の小葉中心性の粒状影を呈していた。入院期間の平均は34.5［15-89］日であった。全例が診断前に抗菌薬治療を受けたものの改善に乏しくTBLBを施行されており、いずれもその後にステロイドによる治療を受け、うち4例はステロイドパルス療法が施行された。5例が低酸素血症を呈しそのうち人工呼吸器管理を要した1例が最終的に死亡した。その他の10例は治癒した。治癒した10例のうち2例はステロイド漸減の経過でAFOPが再燃したが、ステロイドの増量で改善し良好な経過をたどった。

【考察】

AFOPは2002年にBeasleyらが提唱した概念で[1]、急性肺傷害をきたすものの他のDAD・器質化肺炎（organizing pneumonia; OP）・好酸球性肺炎（eosinophilic pneumonia; EP）には該当しない組織型とされている。肺胞腔内に析出するフィブリンが特徴的で、標本全体の平均50％の肺胞腔内にみられる。病変は斑状に分布し、病変間に正常組織が介在する。肺胞構造の破壊や硝子膜形成が見られない。画像所見だけではDAD、OP、EPとの判別は困難で病理所見により確定診断される。特発性とする報告や、膠原病とその類縁疾患、過敏性肺炎、免疫抑制状態や移植後の拒絶反応、感染症、薬物に関連するという報告がある。確立された治療法はないが副腎皮質ステロイドが使用されることが多く、加えて免疫抑制剤を併用した報告もある[2]。Gomesらは13例のAFOP患者の後ろ向き検討を行っている[3]。8例が血液疾患を基礎疾患にもち、そのうち2例は治療薬（アザシチジン、ブレオマイシン）が、1例は腎移植後に使用していたシロリムスがそれぞれ原因薬剤と考えられ、残り5例は原疾患との関連が示唆された。2例は基礎疾患がなく特発性であった。全症例のうち7例が死亡しそのうち3例がAFOPによる死亡であったと報告している。診断方法はCTガイド下肺生検が8例、外科的生検が5例で、TBLBにより診断された症例は含まれなかった。Jin-Hong-Daiらは20例の報告を行っており[4]、AFOPによる死亡例はなく、基礎疾患である血液疾患の増悪によって2例が死亡していた。CTガイド下肺生検が16例、診断はTBLBが4例であった。いずれもステロイド治療が行われていたがその用量・種類・期間などの記載はなかった。本研究では当院でAFOPと診断された11例について検討を行った。既報告と類似して血液疾患や薬剤によるAFOPが原因と考えられる症例が含まれた。全例がまず細菌性肺炎を想定した抗菌薬治療を行ったものの改善に乏しく、その後生検を行い診断に至っていた。上述のとおりAFOPは画像所見での診断は困難で、症状も発熱・咳・痰といった非特異的な症状であるため診断に苦慮することが多く、これを支持する結果であった。本症例はいずれもTBLBによって診断されたが、気管支鏡で診断された症例報告は特に限られている。呼吸器内科医が常駐する施設であれば行える検査であるため、本疾患を鑑別に挙げて早期にTBLBでの診断を試みることが有用である可能性があると考えられた。また、本疾患はDADと臨床経過が類似し予後不良であるとされているが、多くはステロイド治療で良好な経過をたどり、予後不良であったのは1例のみであった。要因の1つにTBLBによって早期に診断・治療介入できたことが奏功した可能性が挙がる。しかしながら一方で、診断に至らぬまま呼吸不全の急速な進行によって死亡した症例の中に本疾患が含まれている可能性はあり、今後引き続き、より多く症例を集積し知見を深めることが重要と考えられた。

【文献】

1. Baseley MB, et al.: Acute fibrinous and organizing pneumonia: a histological pattern of lung injury and possible variant of diffuse alveolar damage. Arch Pathol Laboratory Med 126: 1064-1070, 2002
2. Kuza C, et al.: Life after acute fibrinous and

organizing pneumonia: a case report of a patient 30 months after diagnosis and review of the literature. J Crit Care 31: 255–261, 2016
3. Gomes R, et al.: Acute fibrinous and organizing pneumonia: a report of 13 cases in a tertiary university hospital. Medicine (Baltimore) 95: e4073, 2016
4. Dai JH, et al.: Clinical and radiological profile of acute fibrinous and organizing pneumonia: A retrospective study. Chin Med J 128: 2701–2706, 2015

（4）消化器疾患

咽頭表在癌における内視鏡治療（ESD）後のリンパ節転移リスクに関する検討

飯塚　敏郎

【目的】

表在咽頭癌における腫瘍の生物学的動態についての解明はこれまでなされておらず、未知な状態である。特にリンパ節転移をきたす危険因子の解析は、まだまだ不明な点が多い。そこで、同時性もしくは異時性にリンパ節転移をきたした症例における腫瘍の性状を検討し、転移に関与する因子を明らかにすることを目的とした。

【方法】

2010年1月から2018年3月までに、ESDの治療を受けた方の中で、同時性もしくは異時性にリンパ節転移が認められる症例13例を対象とした。コントロールとして、表在癌に対してESDが行われた症例のうち、すでにESD後5年が経過して観察期間中にリンパ節転移が認められなかった症例で主病変の厚みが1000 μm以上の病変9例を用いた。両群間における各種免疫染色の比較を検討した。

【結果】

年齢、性別、腫瘍局在においては、両群間で差は認められなかった。腫瘍サイズ、腫瘍の厚み、脈管侵襲の有無においても両群間に差は認められなかった。各種免疫染色においても、両群間に有意差は認められなかった。転移をきたすリスク因子として多変量解析を行うと、DDR2がP=0.074, Odd ratio 9.31で独立したリスク因子になる可能性が示唆された。

【結論】

DDR2が表在咽頭癌におけるリンパ節転移をきたす独立したリスク因子である可能性が示された。

【目的】

咽頭表在癌に対する内視鏡治療（ESD）が広く普及し、安全に施行できるようになってきている。それに伴いQOLの観点から、術前画像診断で転移のない表在性癌とともに腫瘍原発巣と同側のリンパ節転移がある表在癌の場合でも、原発巣局所の切除としてESDを施行し、リンパ節郭清を行っている。このことは治療ガイドライン上も治療選択の一つとして記載されており、ESDにおける治療選択の幅が広がってきている。一方でこうした表在癌における腫瘍の生物学的動態についての解明はこれまでなされておらず、未知な状態である。特に表在癌におけるリンパ節転移をきたす危険因子の解析は、まだまだ不明な点が多い。そこで、同時性もしくは異時性にリンパ節転移をきたした症例における腫瘍の性状を検討し、転移に関与する因子を明らかにすることを目的とした。

【方法】

2010年1月から2018年3月までに、内視鏡的に表在癌と診断され、ESDの治療を受けた方の中で、同時性もしくは異時性にリンパ節転移が認められ、かつこれが咽頭癌由来であることが強く疑われる症例13例を対象とした。コントロールとして、同時期に表在癌としてESDが行われた症例のうち、すでにESD後5年が経過して観察期間中にリンパ節転移が認められなかった、主病変の厚みが1000 μm以上の病変9例を用いた。両群間における臨床的組織学的な所見とともに、がん幹細胞に関与する各種因子（CD44, ALDH1, BCRP, CD24）とcollagen receptor tyrosine kinaseの一つであるDDR2の免疫染色を行い、その染色性の頻度を比較検討した。

統計学的には、2群間同士の比較を行い、連続変数は、Mann-Whitney *U* testもしくはStudent t testで、カテゴリー変数は、$\chi 2$ testまたはFisher's exact test で、STATA software（ver. 11, StataCorp LP, Texas, USA）を用いて行った。

【結果】

両群間の臨床的な因子を**表1**に明示する。年齢、性別、腫瘍局在においては、両群間で差は認められなかった。腫瘍サイズ、腫瘍の厚み、脈管侵襲の有無においても両群間に差は認められなかった。腫瘍部における免疫染色性の結果は、**表2**に示す。非腫瘍部の染色性と比較して、強陽性を示す染色性を陽性として評価をすると、いずれの染色においても、両群間に有意差は認められなかった。DDR2においてのみp値が0.074と傾向がみられる程度であった。

転移をきたすリスク因子として、ALDH1、脈管侵襲、DDR2陽性を因子として多変量解析を行うと、DDR2がP=0.074, Odd ratio 9.31という形で独立したリスク因子になる可能性が示唆された（**表3**）。

表１　背景因子

	Case群	Control	P
症例数	13	9	
平均年齢（歳）	68.1	67.9	0.87
性別			
男性	13	9	
女性	0	0	
病変の局在			
梨状陥凹	11	8	
下咽頭後壁	1	0	
中咽頭	1	1	

表２　組織学的検討結果

	Case	Control	P
症例数	13	9	
腫瘍最大長径	30.1	29.4	0.74
腫瘍の最大厚（μm）	2169	1818	0.46
脈管侵襲陽性	10	5	0.38
ALDH１陽性	6	1	0.17
BCRP陽性	0	0	1.00
CD24陽性	0	0	1.00
CD44陽性	10	6	1.00
DDR2陽性	11	4	0.074

【考察】

本検討において、確定的なことが言えるほどではないが、DDR2がリンパ節転移をきたす独立したリスク因子である可能性が示された。DDR2は大腸癌におけるリンパ節転移や局所腫瘍浸潤の程度とよく相関し、予後予測因子となりうることが報告[1]されている。また頭頸部癌においてもRNAの過剰発現がリンパ節転移と強く相関することの報告[2]があり、今回の検討でも有意性を示すことが期待されていた。しかし、統計学的に有意を示すほどのデータは得られなかった。この原因として、症例数が少ないこと、また免疫染色性の陽性の判断に客観性が十分でないことなどが挙げられる。Discoidin domain receptor 2(DDR2)はチロシンキナーゼの受容体で、線維性コラーゲンで活性化され、VEGFの発現、腫瘍における血管新生、浸潤、転移などに関与すると考えられている[3-5]。従ってリンパ節転移のリスク因子になりうる理論的背景もあることから、今後の症例数を蓄積しての解析が望まれる。一方ALDH1は幹細胞分化の段階でのレチノール酸の酸化や細胞の上皮間葉への移行に関与すると考えられており、転移のメカニズムのキーファクターと考えられている[6,7]。Tamataniらの報告[8]では、ALDH1の免疫染色での陽性率は25.7%と低いものの、組織学的癌の分化度やリンパ節転移と相関し、さらに多変量解析で無病生存期間における唯一の予後因子として抽出されている。本検討では、転移

表３　リンパ節転移に関与する因子の多変量解析

	Odds Ratio	Std. Err.	P	95% Conf.interval
脈管侵襲	2.55	2.87	0.406	0.28 ～ 23.2
DDR2	9.31	11.6	0.074	0.81 ～ 107.4
ALDH1	11.2	16.5	0.101	0.63 ～ 201.4

をきたした症例では46%、コントロール群では11%と有意差はつかなかったものの、症例を蓄積することで、有意性が得られる可能性を期待させる結果であった。現段階では、他の消化管の表在癌における脈管侵襲陽性という転移リスク因子が、表在咽頭癌においても転移をきたすリスク要因の一つになると考えられているが、実際のところ、今回の検討では相関の程度は強くないことが示された。

本検討でのLimitationとして、症例数が少ないこと、コントロール群に選択バイアスがあること、免疫染色性の解釈の再現性が高くないことなどが挙げられた。今後症例を追加することとコントロール群の枠を広げることでより精度の高い解析が行えるものと考えられる。

【結論】

DDR2が表在咽頭癌におけるリンパ節転移をきたす独立したリスク因子である可能性が示された。

【文献】

1. Sasaki S, Ueda M, Iguchi T, et al.: DDR2 Expression Is Associated with a High Frequency of Peritoneal Dissemination and Poor Prognosis in Colorectal Cancer. Anticancer Res 37: 2587-2591, 2017
2. Xu J, Lu W, Zhang S, et al.: Overexpression of DDR2 contributes to cell invasion and migration in head and neck squamous cell carcinoma . Cancer Biol Ther 15: 612-622, 2014
3. Badiola I, Villace P, Basaldua I, et al.: Downregulation of discoidin domain receptor 2 in A375 human melanoma cells reduces its experimental liver metastasis ability. Oncol Rep 26: 971-978, 2011
4. Zhang K, Corsa CA, Ponik SM, et al.: The collagen receptor discoidin domain receptor 2 stabilizes SNAIL1 to facilitate breast cancer metastasis. Nat Cell Biol 15: 677-687, 2013
5. Valiathan RR, Marco M, Leitinger B, et al.: Discoidin domain receptor tyrosine kinases: new players in cancer progression. Cancer Metastasis Rev 31: 295-321, 2012
6. GoossensBeumer IJ, Zeestraten EC, Benard A, et al.: Clinical prognostic value of combined analysis of Aldh1, Survivin and EpCAM expression in colorectal cancer. Br J Cancer 110: 2935-2944, 2014
7. Kahlert C, Bergmann F, Beck J, et al.: Low expression of aldehyde dehydrogenase 1A1 (ALDH1A1) is a prognostic marker for poor survival in pancreatic cancer. BMC Cancer 11: 275, 2011
8. Tamatani T, Takamaru N, Ohe G, et al.: Expression of CD44, CD44v9, ABCG2, CD24, Bmi-1 and ALDH1 in stage I and Ⅱ oral squamous cell carcinoma and their association with clinicopathological factors. Oncol Lett 16: 1133-1140, 2018

NBI拡大時代におけるMucosal breakの定義

菊池　大輔、星原　芳雄、落合　頼業
鈴木　悠悟、早坂 淳之介、野村　浩介
小田切 啓之、山下　聡、布袋屋　修

【背景】

近年、Helicobacter pyloriの感染率低下、食生活の欧米化などの影響で胃食道逆流症（gastroesophageal reflux disease: GERD）の患者数は増加しており、日常診療において非常に多く遭遇する。GERDとは、胃食道逆流（gastroesophageal reflux: GER）により引き起こされる食道粘膜傷害と煩わしい症状のいずれかまたは両者を引き起こす疾患と定義されている[1)]。つまりGERDの診断には内視鏡診断と症状による診断の両者が重要である。そしてGERDは内視鏡的に食道粘膜傷害を有する「びらん性GERD」と、内視鏡的に食道粘膜傷害を有さず症状のみを認める「非びらん性GERD」に分類される。びらん性GERDの内視鏡重症度分類には広くロサンゼルス分類（LA分類）が用いられている[2, 3)]。LA分類では、それまでのびらん・潰瘍などの内視鏡所見とは異なる粘膜傷害（mucosal break）という概念が提唱された。

近年消化器内視鏡はその画像解像度が飛躍的に進歩した[4, 5)]。また、Narrow band imagingやBlue laser imagingのような画像強調内視鏡や拡大内視鏡の技術の進歩により従来観察が困難であった詳細な観察が可能となっている。LA分類が提唱された時代と現在では得られる内視鏡画像が全く異なると考えられる。mucosal breakとは「より正常にみえる周囲粘膜と明確に区別される白苔ないし発赤を有する領域」と定義されるが、この判定が内視鏡医により異なることを時に経験する。今回我々は白色光、NBI、NBI拡大画像を用いて内視鏡医の間でのmucosal breakの判定の差異についての検討を行った。

【方法】

1. 症例

2016年4月から2018年4月の間に1名の内視鏡医がMucosal breakの存在を疑って、白色光内視鏡と同じ方法で非拡大NBI画像を撮影した患者のうち、引き続きNBI拡大観察を行った43症例を対象とした。

2. 内視鏡方法

内視鏡はGIF-H260ZもしくはGIFH290Z（オリンパス社製）が用いられた。鎮静剤は原則使用せずに観察を行い、必要に応じて適宜塩酸ペチヂンもしくはジアゼパムが使用された。鎮痙剤はブスコパンを使用した。

3. 画像ファイル

対象症例43症例の内視鏡画像ファイルを作成した。画像ファイルは1症例毎に白色光内視鏡画像、非拡大NBI画像、拡大NBI画像の3つ作成され、全部で129ファイル作成された。

4. 評価方法

8名の内視鏡医がランダムに提示された画像ファイルを読影した。4名は日本消化器内視鏡学会の専門医であり、4名は非専門医であった。

主要評価項目は各モダリティーにおけるmucosal breakの出現率とした。副次評価項目として内視鏡医間の一致率の級内相関を検討した。

【結果】

Mucosal breakの判定率は白色光で79.4%（67.4-93.0%）であった。非拡大NBIでは76.7%（53.5-90.7%）であった。白色光と非拡大NBIとのmucosal breakの出現率には有意差は認められなかった。一方でNBI拡大では48.8%（18.6-65.1%）であり、両者と比較して有意に低値であった（$p<0.05$）。

観察者間の級内相関は、白色光で0.864（95% CI 0.793-0.918）、非拡大NBIで0.863（95% CI 0.791-0.917）と同等で高値であったが、NBI拡大では0.758（95% CI 0.631-0.854）と低値であった。

【考察】

LA分類の問題点は、症状との一致率の低さと内視鏡医間での判定の一致率の低さが挙げられる。当初LA分類は胸焼け症状の重症度と高い相関があると報告されていたが、その後の検討では必ずしも症状の重症度との相関が高くないと報告されている。Nagaharaらは内視鏡的に診断されたGERDを症状別にわけて検討し、症状のないGERD（asymptomatic GERD）の頻度は11.6%と比較的高く、高齢者でとくに多いと報告している[6)]。LA分類におけるmucosal breakとは「より正常にみえる周囲粘膜と明確に区別される白苔ないし発赤を有する領域」と定義される。そしてmucosal breakの範囲によりGERDの重症度はAからDまでの4つに分類される。Grade Aは「長径が5mmを超えない粘膜傷害で、粘膜ひだに限局されるもの」、Grade Bは「少なくとも1ヶ所の粘膜傷害の長径が5mm以上であり他の粘膜傷害と連続しないもの」、Grade Cは粘膜傷害が2条以上のひだに連続して存在するが全周の75%未満のもの」、Grade Dは「全周の75%以上の粘膜傷害」と定義されている。Grade AとBを軽症型、CとDを重症型とすると、多くの日本人のGERDは軽症型に当てはまる。GERDの内視鏡診断においていかにmucosal breakを判定するかは非常に重要であるがその一定の見解がないのが現状である。特にLA分類が提唱された1990年代の内視鏡画像と、NBIやBLIなどの画像強調内視鏡や拡大内視鏡などを利用できる現在の内視鏡画像とでは解像度に大きな乖離が存在する。NBIを用いることでmucosal breakの検出率は高くなり、

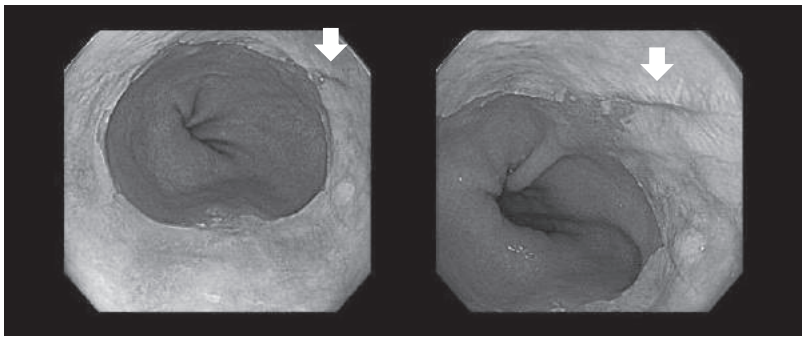


図１　実際に検討に用いた白色光内視鏡像。白色の矢印部分を８名の医師全員がmucosal break有りと判定した。

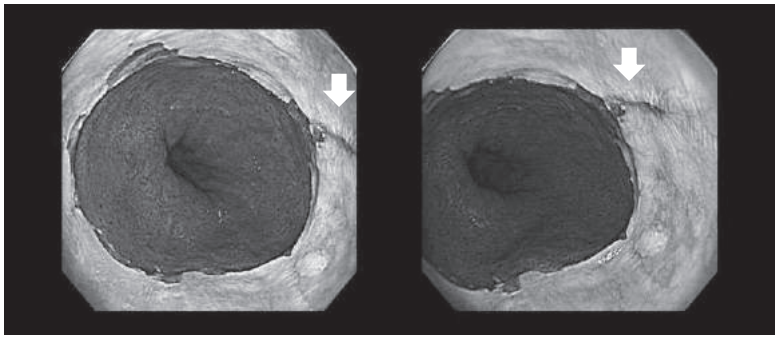


図２　NBI非拡大画像。８名の医師全員がmucosal break有りと判定した。

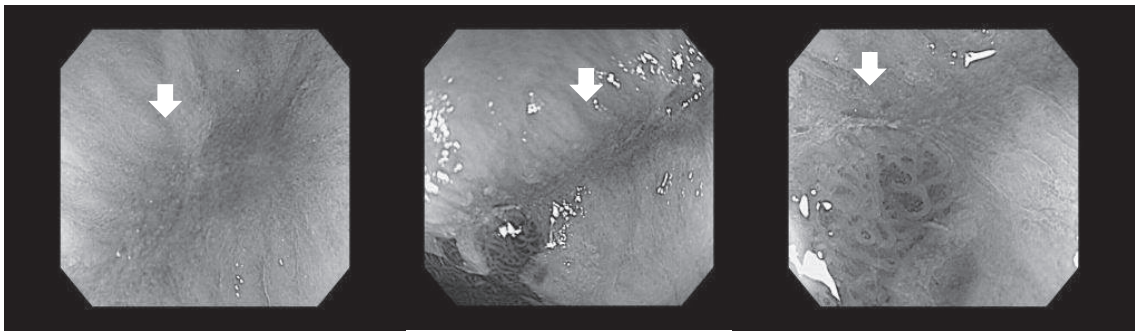


図３　NBI拡大画像。白色光で明瞭な発赤領域として認識された部分は完全に上皮化しており、８名の医師全員がmucosal break無しと判定した。

かつその検査者間での一致率も高くなるとの報告もあるが[7, 8]、各種の画像強調内視鏡をどのように用いるべきかについては一定の見解がないのが現状である。現在の内視鏡技術を用いた新たな内視鏡分類が必要と考えられる。

今回の検討において一人の内視鏡医がmucosal breakを疑った症例に対し、同様の画像を非拡大NBIで撮影し、その後連続してNBI拡大観察を行った。その画像を他の内視鏡医が判定すると白色光や非拡大NBIの判定はほぼ同等であり、8割の症例においてmucosal break有りと判定した。しかしNBI拡大を同部位に行うと、その出現率は有意に低下していた。これは非拡大観察において明瞭に発赤調もしくはbrownish areaとして認識される領域を拡大観察し完全に上皮化していると多くの内視鏡医が同部位をmucosal breakと判定しないことが原因と考えられた(**図1-3**)。一方で、白苔の付着した領域を有する病変は非拡大、拡大いずれにおいてもmucosal breakと判定される傾向が高くなっていた。つまり上皮化された発赤領域の取り扱いが内視鏡医において異なることが大きな問題点と考えられた。

本検討にはいくつかのlimitationが存在する。一つはretrospectiveの少数の検討であることである。また静止画を用いた検討であることも大きなlimitationである。食道胃接合部の内視鏡像は吸気や送気量によって変化する。動画を用いた判定、もしくは前向きの検討を行うことが今後必要と考えられる。また症状との関連性についても検討を行うべきである。GERDの内視鏡診断が決して症状との相関が高くないと報告されており、画像強調内視鏡や拡大内視鏡を用いた診断基準と症状との相関を今後検討する必要があると考えられた。

結論であるが、一人の内視鏡医がmucosal breakを疑った病変を他の内視鏡医がmucosal breakと判定する確率は白色光、非拡大NBIでは高値であり同等であった。しかし同部位に対しNBI拡大観察を行うことで、その判定は低値となりかつその判断にバラつきが生じた。NBI拡大時代においては完全に上皮化した発赤領域の取り扱いを今後統一化する必要があると考えられた。

【文献】

1. 日本消化器病学会（編）: 胃食道逆流症（GERD）診療ガイドライン2015　改訂第2版. 南江堂, 2015
2. Lundell LR, Dent J, Bennett JR, et al.: Endoscopic assessment of oesophagitis: clinical and functional correlates and further validation of the Los Angeles classification. Gut 45: 172-180, 1999
3. 星原芳雄: 逆流性食道炎の新しい内視鏡分類（ロサンゼルス分類）の必要性と問題点. 消化器内視鏡 8: 1747-1752, 1996
4. Ezoe Y, Muto M, Horimatsu T, et al.: Magnifying narrow-band imaging versus magnifying white-light imaging for the differential diagnosis of gastric small depressive

lesions: a prospective study. Gastrointest Endosc 71: 477-484, 2010
5. Kikuchi D, Iizuka T, Yamada A, et al.: Utility of magnifying endoscopy with narrow band imaging in determining the invasion depth of superficial pharyngeal cancer. Head Neck 37: 846-850, 2015
6. Nagahara A, Hojo M, Asaoka D, et al.: Clinical feature of asymptomatic reflux esophagitis in patients who underwent upper gastrointestinal endoscopy. J Gastroenterol Hepatol 27: 53-57, 2012
7. Lee YC, Lin JT, Chiu HM, et al.: Intraobserver and interobserver consistency for grading esophagitis with narrow-band imaging. Gastrointest Endosc 66: 230-236, 2007
8. Sharma P, Wani S, Bansal A, et al. A feasibility trial of narrow band imaging endoscopy in patients with gastroesophageal reflux disease. Gastroenterology 133: 454-464, 2007

表在性非乳頭部十二指腸腫瘍に対するNBI併用拡大内視鏡観察の有効性と内視鏡切除後偶発症予防に関する検討

布袋屋　修、岡本　陽祐、井下　尚子[1]
東京都健康長寿医療センター病理診断科[1]

【要約】

目的: 表在性非乳頭部十二指腸上皮性腫瘍（SNADET）に対する内視鏡的切除の技術的難易度は他臓器と比しはるかに高く、死亡に至る重篤な偶発症も報告されている。そのため、治療適応判断のためのNBI拡大内視鏡所見による術前悪性度診断能および内視鏡切除後の遅発性穿孔予防策について検討を行った。

方法: 当院にて内視鏡精査・治療を行ったSNADET 188病変に対するNBI拡大観察診断アルゴリズムの妥当性と遅発性穿孔予防のための内視鏡下縫縮術の成績について評価した。

結果: 最終病理診断にて低異型度腺腫（LGA）、高異型度腺腫（HGA）、早期癌（Ca）に分類し、NBI拡大内視鏡にて領域をもって表面微細構造に不明瞭化、癒合の所見があり腺窩辺縁上皮が不均一な所見をHGA/Caとした場合の病理学的異型度は80.0%（120/150）であり、我々の既報より良好な成績であった。術後潰瘍底のクリップによる完全縫縮は78.9%で可能あった。全体の後出血率は4.4%で全例保存的に改善したが、縫縮不能例における後出血率が21.1%に対し縫縮例では0%であった。遅発性穿孔は縫縮不能例の5.3%に対し縫縮例では0%であった。

結論: SNADETに対する内視鏡治療適応基準は確立されていないが、NBI併用拡大所見による組織学的悪性度予測が可能であることが示唆された。また、内視鏡切除後の重篤な偶発症予防には潰瘍底の縫縮が極めて有用であった。

【目的】

表在性非乳頭部十二指腸上皮性腫瘍（SNADET）の疾患頻度は低いものの、近年の内視鏡技術および機器の進歩、さらには内視鏡検診の普及によって発見率は徐々に増加している。しかし、疾患頻度の低さから、腫瘍の病理組織学的病態も解明されておらず、診断、治療法について確立されたものは存在していない。内視鏡診断において、その質的診断学は他の食道・胃・大腸などの消化管腫瘍に大きく遅れをとっており、病変を発見しても、その後どう診断したらよいのか、生検すべきか、治療適応をどう判断すべきかなど、臨床の現場では大きな問題となっている。さらに内視鏡治療となると、その解剖学的特徴から、技術的難易度は高く、合併症率の高さから内視鏡的粘膜下層剥離術（ESD）は一般的ではない上、内視鏡的粘膜切除術（EMR）においても、重篤な合併症や、死亡に至る偶発症も報告されているため、世界でもごく限られた先進施設でのみ行われている。一方で十二指腸腫瘍の標準外科術式である膵頭十二指腸合併切除の侵襲も多大であり、転移リスクの少ない腫瘍に対する診断的治療としての内視鏡切除の意義、とりわけ患者QOLにもたらすメリットは極めて大きく、安全で確実な治療戦略の確立が急務である。今回我々はNBI併用拡大所見の分類を新たに提唱し、組織学的悪性度と対比することで、術前診断への有用性を検討した。また、SNADETに対する内視鏡切除後の重篤な偶発症が問題となっている[1,2]が、当院で行っている術後偶発症予防としての潰瘍底縫縮術の有用性についても検討した。

【方法】

検討1: 2018年12月31日までに、当院で内視鏡的切除され、術前にM-NBIが実施されたSNADETで内視鏡的粘膜切除（EMR）または内視鏡的粘膜下層剥離術（ESD）を行った180病変を解析対象とした。M-NBI像は、大小不同の粘膜微細模様をpreserved pattern、小型化を

表１　NBI併用拡大分類と病理組織の対比

Clinicopathological feature	Group A	Group B	*P* value
Histological type			*<0.001*
Low grade adenoma	15（51.7）	28（20.0）	
High grade adenoma	14（48.3）	112（80.0）	
Adenocarcinoma			

micrified pattern、構造不明瞭をabsent patternとし、単独及び複数の模様で構成されるものをそれぞれmono type及びmixed typeとした。血管分類は視認されないものをabsent pattern、network状をnetwork pattern、粘膜微細模様内に異型血管がとどまるものをISV pattern、前述3つに分類できない異型血管をirregular vascular patternとした。

検討2: 同時期にESDを完遂した90病変の治療成績（腫瘍・切除サイズ、治療時間、術中穿孔、後出血、遅発穿孔、完全一括切除率、担癌率）について報告する。当院では十二指腸ESDは外科のバックアップのもと、できるだけ全身麻酔下にて行い、状況に応じてスコープやデバイスを複数回変更することでより確実な一括切除を達成している。術中穿孔に対してはクリップ縫縮、術後は粘膜把持法などで可能なかぎり粘膜完全縫縮を行うことで偶発症対策を講じている。今回　縫縮の遅発性合併症予防に対する縫縮の有効性についても分析した。

【結果】

結果1: 平均年齢62.2（32-89）歳、男女比132: 56、腫瘍径14.8（3-60）mm、局在はbulbs/SDA/2nd/IDA/3rd: 9/25/102/34/18、肉眼型は0-I/0-Ⅱa/0-Ⅱb/0-Ⅱc/0-Ⅱa+Ⅱc: 16/89/1/61/21、病理は低異型度腺腫（LGA）/高異型度腺腫（HGA）/表在型十二指腸癌（Ca）: 50/82/56であった。アルゴリズムによる内視鏡診断はmono/mixed: 51/137で病理との対比はmono typeはLGA/HGA/Ca: 23/17/11でmixed typeはLGA/HGA/Ca: 27/17/45であった。absent patternあるいはnetwork patternを伴うmono typeをGroup Aとし、irregular vascular patternを伴うmono typeあるいはmixed typeをGroup Bとした場合、治療適応基準となるHGA/CaのM-NBI診断Group Bの感度は82.8%、特異度50.0%、PPV 80.4%、NPV 54.0%であった（**表1**）。

表２　予防縫縮による遅発性合併症率

	術後潰瘍底の縫縮術	
	あり（n=71）	なし（n=19）
後出血率	0%	21.1%（4/19）
遅発性穿孔率	0%	5.3%（1/19）

結果2: ESD完遂した90病変の平均サイズ（病変/標本）は24.6/32.4mmであった。治療時間156.8±83.1分、術中穿孔は10.0%（9/90）であった。78.9%（71/90）は完全縫縮可能であったが、球部や乳頭近傍は縫縮が不可能であった。全体の後出血率は4.4%（4/90）で全例保存的に改善したが、縫縮不能例における後出血率が21.1%（4/19）と高率であった（**表2**）。縫縮不能であった1例（1.1%）に遅発性穿孔を認め外科手術を要した。完全一括切除は94.4%（83/90）担癌率は50.0%（45/90）で、現在まで局所・遠隔再発例を認めていない。

【考察】

SNADETに対するM-NBIの有用性に関する報告はまだ一定の見解に達しておらずSNADETの内視鏡像の多様性から診断の困難性が示唆される[3-5]。十二指腸の特徴として絨毛の白色沈着物の存在などから異型血管の判別が困難となることも一つの要因として考えられる。HGAとCaの判別には課題が残されているが、表面の微細構造と微細血管に着目した診断は、切除適応判断に有用である可能性が示唆された。今後病理組織学的な検討を加え、免疫形質発現による悪性度診断が可

能かどうか検討する必要がある。治療については様々な工夫を駆使することで難易度の高い十二指腸ESDも安全かつ根治性の高い治療が可能であった。しかし術前診断が困難で切除断念例があることも念頭に置く必要がある。術後合併症予防には予防縫縮が極めて有効であるが球部と膵臓側の縫縮不能例が今後の課題である。

【文献】

1. Hoteya S, Kaise M, Iizuka T, et al.: Delayed bleeding after endoscopic submucosal dissection for non-ampullary superficial duodenal neoplasias might be prevented by prophylactic endoscopic closure: analysis of risk factors. Dig Endosc 27: 323-330, 2015
2. Hoteya S, Furuhata T, Toba T, et al.: Endoscopic submucosal Dissection and endoscopic mucosal resection for non-ampullary superficial duodenal tumor. Digestion 95: 36-42, 2017
3. Tsuji S, Doyama H, Tsuji K, et al.: Preoperative endoscopic diagnosis of superficial non-ampullary duodenal epithelial tumors, including magnifying endoscopy. World J Gastroenterol 21: 11832-11841, 2015
4. Goda K, Kikuchi D, Yamamoto Y, et al.: Endoscopic diagnosis of superficial non-ampullary duodenal epithelial tumors in Japan: Multicenter case series. Digestive Endoscopy 26: 23-29, 2014
5. Kikuchi D, Hoteya S, Iizuka T. et al.: Diagnostic algorithm of magnifying endoscopy with narrow band imaging for superficial non-ampullary duodenal epithelial tumors. Digestive Endoscopy 26: 16-22, 2014

（5）肝疾患

HCV薬剤耐性がdirect-acting antivirals併用療法に与えるインパクト

芥田　憲夫、鈴木　文孝

【要約】

C型肝炎の直接作用型抗ウイルス薬（DAAs）不成功例に対するグレカプレビル/ピブレンタスビルは良好な成績を示した。DAAs再治療における難治要因としてウイルスと宿主要因（*IL28B*遺伝子多型）が関与することが確認された。ウイルス学的難治要因の検討に置いて、Ultra-deep sequenceは薬剤耐性ウイルス動態の評価に有用であった。DAAs再治療にも関わらず、NS5A-L31/Y93の野生型の症例では、相互排他的な関係にある強力な耐性NS5A-P32 deletionの評価が必要である。

【目的】

C型肝炎における直接作用型抗ウイルス薬（DAAs）併用療法は副作用も軽く、高い治癒率が期待される反面、不成功例では薬剤耐性ウイルスが問題となる[1)]。今回は、HCV薬剤耐性ウイルスがDAAs併用療法に与えるインパクトを、微量な薬剤耐性ウイルスを検出可能な次世代シークエンス技術を用いて検討した[2)]。

【方法】

虎の門病院でDAAs併用療法不成功後にグレカプレビル/ピブレンタスビル（G/P）12週間のDAAs再治療を行ったC型肝炎123例を対象と

表１　虎の門病院でGenotype 1bのDAA不成功例に対するマヴィレット®配合錠の治療効果から見た背景の比較

5回目のDAAsで治癒した2例

Case	性別	年齢	Geno	*IL28B* rs8099917	FIB-4 index	DCV/ASV 治療効果	DAA 既往歴	NS3 D168	NS5A L31	NS5A Y93	その他 NS5A耐性
1	男	72	1b	TG	5.3	無効	4回	D168E	L31V	Y93H	無し
2	女	81	1b	TT	10.4	無効	4回	D168V	L31M	Y93H	無し

3例の非治癒例

Case	性別	年齢	Geno	*IL28B* rs8099917	FIB-4 index	DCV/ASV 治療効果	DAA 既往歴	NS3 D168	NS5A L31	NS5A Y93	その他 NS5A耐性
1	女	56	1b	TG	3.3	無効	1回	D168V	Wild	Wild	P32 deletion
2	男	56	1b	TG	1.3	ﾌﾞﾚｰｸｽﾙｰ	2回	Wild	Wild	Wild	L28M/R30E/Q54H/A92K
3	男	57	1b	TG	1.4	ﾌﾞﾚｰｸｽﾙｰ	1回	Wild	Wild	Wild	L28M/R30Q/Q54Y/A92T

Direct sequenceでNS3/NS5A耐性を評価

IL28B TG、NS5A-Y93 Wildのマヴィレット®再治療の難治例を確認した

表２　虎の門病院でNS５A阻害剤治療後にNS５A-P32 deletion（Direct sequence）が確認された６例

Case	性別	年齢	Geno	SMV 投与歴	前治療	DCV/ASV 効果	L31 耐性*	Y93 耐性*	*IL28B* rs8099917	FIB4 index	IFN効果
1	女	74	1b	無し	DCV/ASV	ﾌﾞﾚｰｸｽﾙｰ	L31F	Wild	TG	7.61	無効
2**	男	56	1b	無し	DCV/ASV	無効	L31F	Wild	TG	4.53	無効
3	男	72	1b	有り	DCV/ASV	ﾌﾞﾚｰｸｽﾙｰ	Wild	Wild	TG	3.90	無効
4	女	71	1b	無し	DCV/ASV	再燃	Wild	Wild	TG	3.26	無効
5	女	64	1b	無し	DCV/ASV	無効	Wild	Wild	TG	8.43	無効
6	女	57	1b	無し	DCV/ASV	無効	Wild	Wild	TG	3.28	無効

*Direct sequenceでNS5A耐性を測定.

Y93 Wildかつ難治な宿主（*IL28B* TGかつFIB4高値）の症例で NS5A-P32 deletionが検出されている

した。〔**検討1**〕DAAs再治療の治癒率（SVR率;治療終了後12週経過時点までHCV RNA陰性持続率）を検討した。〔**検討2**〕DAAs再治療難治要因の解析と、DAAs再治療不成功例におけるNS5A薬剤耐性ウイルスの特徴と経時的な推移を検討した。特に、高度治療抵抗性の薬剤耐性変異であることが基礎研究で確認されているNS5A-P32 deletion[3]の推移をDirect sequence（DS）、Ultra-deep sequence（UDS）、市販の測定系で評価した[4]。Ultra-deep sequencerはIon PGM™（Life Technologies Japan）を用い、HCV Plasmid DNAの変異出現率を基準に0.1％以上を有意な変異とした。本研究は、虎の門病院研究倫理審査委員会で承認された研究である。

【結果】

〔**検討1**〕DAAs再治療のSVR率は97％であった。不成功3例は何れもGenotype 1bであった。〔**検討2**〕再治療不成功3例の特徴として、G/P開始時にDSでNS5A-L31/Y93のアミノ酸が何れも野生型であり、宿主遺伝子要因の*IL28B* rs8099917遺伝子多型は何れも難治なTG型を示した（**表1**）。高度治療抵抗性のNS5A-P32 deletionを有する6例は何れもY93野生型で*IL28B* TGかつ肝線維化進行例であった（**表2**）。再治療不成功例中1例は、ダクラタスビル/アスナプレビル不成功後にG/Pを導入し、G/P開始時にDSでNS5A-P32 deletionが確認された。G/P開始後2.5年間の経過では、UDSでP32 deletion 99％以上とY93野生型99％以上を持続した。UDSでNS5A-P32 deletionとL31/Y93耐性の間には相互排他的な関係が存在することが確認された。

【考察】

DAAs併用療法難治かつ肝発癌リスクの高い症例を治癒に持ち込むことが日本の高齢化社会においては重要課題である。特に、DAAs併用療法難治例に対するDAAs再治療の成績に関する詳細な報告はこれまで存在しなかった。今回の検討でDAAs不成功例に対するG/PのSVR率は97％と良好な成績を示すことが確認された。

薬剤耐性ウイルスがDAAs治療中に如何なる推移をするかに関する詳細な検討はこれまで存在しなかった。今回の検討では、UDSが薬剤耐性ウイルス動態の評価に有用であることが確認され

た。特に、DAAs再治療にも関わらず、NS5A耐性L31/Y93の野生型の症例では、相互排他的な関係にある強力な耐性P32deletionの評価が必要である。

将来的にはC型肝炎の薬剤耐性ウイルスの問題を解決し、HCV排除に伴う肝発癌抑制にまで繋げることが最終的な課題と言える[5)]。

【文献】

1. Akuta N, Sezaki H, Suzuki F, Kawamura Y, Hosaka T, Kobayashi M, Kobayashi M, Saitoh S, Suzuki Y, Arase Y, Ikeda K, Kumada H: Favorable efficacy of daclatasvir plus asunaprevir in treatment of elderly Japanese patients infected with HCV genotype 1b aged 70 and older. J Med Virol 89: 91-98, 2017
2. Sano T, Akuta N, Suzuki F, Kasuya K, Fujiyama S, Kawamura Y, Sezaki H, Hosaka T, Saitoh S, Kobayashi M, Suzuki Y, Kobayashi M, Arase Y, Ikeda K, Kumada H: Role of NS5A-L31/Y93 double wild-type in failure of glecaprevir/pibrentasvir double therapy in two patients with a history of direct-acting antiviral agent failure: an ultra-deep sequencing analysis. Intern Med 58: 2657-2662, 2019
3. Krishnan P, Schnell G, Tripathi R, Beyer J, Reisch T, Dekhtyar T, Irvin M, Xie W, Fu B, Burroughs M, Redman R, Kumada H, Chayama K, Collins C, Pilot-Matias T: Integrated resistance analysis of CERTAIN-1 and CERTAIN-2 studies in hepatitis C virus-infected patients receiving glecaprevir and pibrentasvir in Japan. Antimicrob Agents Chemother 62: e02217-17, 2018
4. Pawlotsky JM: Hepatitis C virus resistance to direct-acting antiviral drugs in interferon-free regimens. Gastroenterology 151: 70-86, 2016
5. Akuta N, Suzuki F, Sezaki H, Kobayashi M, Fujiyama S, Kawamura Y, Hosaka T, Kobayashi M, Saitoh S, Suzuki Y, Arase Y, Ikeda K, Kumada H: Complex association of virus- and host-related factors with hepatocellular carcinoma rate following hepatitis C virus clearance. J Clin Microbiol 57: e01463-18, 2019

B型慢性肝炎に対するインターフェロン療法の長期的治療効果
－ウイルス学的因子と生体側因子（遺伝子多型（SNPs））を含めた検討－

鈴木　文孝

【要約】

当院におけるB型慢性肝炎に対するインターフェロン（IFN）の長期的な治療成績を明らかにし、現在のB型肝炎治療の最終目標であるHBs抗原の陰性化を目指してIFN治療をどのような症例で行うべきか明らかにすることを目的とした。対象はIFN投与を行った967例。治療開始時年齢37歳（15-72）、HBeAg+/- 658/311、HBsAg量3240 IU/mL（0.39-309000）である。ウイルス側因子とともに生体側因子としてIL28B（rs8099917）、HLA-DPA1（rs3077）、HLA-DPB1（rs9277535）の測定を行った。SNPsのアレル解析はTaqMan-PCRを用いた方法で行った。IFN投与によるHBsAg量の減少量は、1年後-0.5（log IU/ml）、5年後-0.72、7年後-1.02であった。HBsAgの陰性化率はKaplan-Meier法にて5年7.5%、10年15.5%、20年44.4%であった。HBsAg陰性化に寄与する因子は、治療開始時HBeAg陰性（P=0.001）、HBsAg量<3000（P=0.008）であった。この条件では、10年で37.4%のHBsAg陰性化が得られた。一方IL28B、HLA-DPA1、HLA-DPB1の遺伝子多型はHBs抗原陰性化には関係を認めなかった。さらにIFN療法後に核酸アナログ（NA）治療を行った411例からは、5年3.5%、10年7%のHBsAgの陰性化率であった。HBsAg陰性化に寄与する因子は、治療開始時ALT>200（P=0.01）、HBsAg<3000（P=0.003）であった。従って IFN療法は、治療開始時HBeAg陰性例、HBsAg量<3000で高率にHBsAg陰性化が得られやすい。また現在のPEG-IFN治療では、治療後ALT値の上昇を約30%で認めており、この時期に核酸アナログ（NA）治療を開始することがHBeAg陽性例も含め、HBsAgの陰性化に関係する。ETV単独治療でのHBsAg陰性化は限られた症例であり、PEG-IFNの併用療法（add-on等）などの工夫が必要である。また今回検討したSNPsはIFN治療でのHBs抗原陰性化には関係を認めなかったが、さらなるSNPsの解析も将来的には行いたい。

【目的】

当院におけるB型慢性肝炎に対するインターフェロン（IFN）の長期的な治療成績（抗ウイルス効果; ALT値の正常化率、HBV DNA陰性化率、HBe抗原陰性化、HBs抗原陰性化など）を明らかにする。特にHBs抗原の陰性化は、現在のB型肝炎治療の最終目標であり、HBs抗原陰性化を目指してIFN治療をどのように行うべきか明らかにする。

【対象と方法】

対象は、1982年から2015年までに当院でIFN（従来型およびペグインターフェロン）投与を行った967例。治療開始時年齢37歳（15-72）、性別 男/女 745/224、開始時AST 73 IU/L（15-1208）、ALT 134 IU/L（8-2020）、HBeAg+/- 658/311、HBV DNA量7.5 Log copies/mL（neg.-9.1<）、HBsAg量3240（0.39-309000）である。治療期間29週（1-1178）、治療後の経過観察期間8.2年（0.5-29.1）、genotype A/B/C/D/H 37/73/834/2/1、であった。抗ウイルス効果、HBs抗原の陰性化についてウイルス側因子とともに生体側因子についても検討した。生体側因子としては、IL28B（rs8099917）、HLA-DPA1（rs3077）、HLA-DPB1（rs9277535）の測定も行った。各SNPsのアレル解析はTaqMan-PCRを用いたReal-Time PCR法で行った。さらにIFN療法後核酸アナログ（NA）治療を行った411例についてHBs抗原陰性化率と陰性化に寄与する因子について検討した。411例の背景は、治療開始時年齢44歳（19-78）、性別 男/女 314/97、治療開始時AST 71 IU/L（19-2593）、ALT 111 IU/L（11-2528）、HBeAg+/- 230/180、

HBV DNA量6.9 Log copies/mL（neg.-9.1<）、HBsAg量2410（0.12-295000）である。IFN終了後からNA治療開始までの期間1.2年(0-25.3)、NA種類 ラミブジン/エンテカビル/テノホビル（TDF）/アデホビル 267/126/12/6、NA治療期間9.8年（0.5-22.1）、genotype A/B/C/H 16/25/360/1であった。

当研究は、虎の門病院研究倫理審査委員会および虎の門病院ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理委員会の承認を得ている。

【結果】

IFN投与による長期的な効果（ALT値の正常化率、HBV DNA陰性化率、HBe抗原陰性化を達成した症例）は、1年15%、3年20%、5年22%、10年26%（104/399）であった。治療開始時HBe抗原の有無別でみると、HBe抗原陽性例で1年11%、3年16%、5年19%、10年18%（47/256）、HBe抗原陰性例では、1年25%、3年29%、5年29%、10年40%（57/143）で、HBe抗原陰性例で効果が高かった。またIFN投与によるHBsAg量の減少量は、1年後-0.5（log IU/ml）、5年後-0.72、7年後-1.02であった。HBsAgの陰性化率はKaplan-Meier法にて5年7.5%、10年15.5%、20年44.4%であった。HBsAg陰性化に寄与する因子は、治療開始時HBeAg陰性（P=0.001）、HBsAg量<3000 IU/mL（P=0.008）であった。この条件では、10年で37.4%のHBsAg陰性化が得られた。さらにIFN療法後NA治療411例からは、5年3.5%、10年7%のHBsAgの陰性化率であった。HBsAg陰性化に寄与する因子は、治療開始時ALT>200 IU/L（P=0.01）、HBsAg<3000 IU/mL（P=0.003）であった。一方IL28B、HLA-DPA1、HLA-DPB1の遺伝子多型はHBs抗原陰性化には関係を認めなかった。

【考察】

IFN療法は、HBeAg陰性例、HBsAg量<3000 IU/mLで高率にHBsAg陰性化が得られやすい。また現在のPEG-IFN治療では、治療後ALT値の上昇を約30%で認めており、この時期にNA治療を開始することがHBeAg陽性例も含め、HBsAgの陰性化に関係することが明らかになった。ETV単独治療でのHBsAg陰性化は低率（5年2.9%、10年3.7%）であり[1]、PEG-IFNの併用療法（add-on等）などの工夫が必要である。

B型肝炎ウイルスの持続感染には、HLAの遺伝子多型が関係することが報告されてきた[2]。さらに最近のgenome-wide association studiesを用いた解析では、B型肝炎ウイルスの持続感染にHLA-DP領域のSNPsが関係することが日本、タイ、韓国の症例を用いた解析で報告されている[3,4]。さらにB型肝炎の持続感染例（キャリア例）からのHBs抗原陰性化にこれらのSNPsが関係することが、中国人や白人（ドイツ）の症例を用いた解析で示されている[5,6]。また、C型肝炎症例において自然経過でウイルス排除に関係すると報告されているIL28B（rs8099917）のSNPが、HBs抗原の陰性化に関係するという報告もある[5]。そこで当院におけるIFN治療でこれらのSNPsの遺伝子多型とHBs抗原陰性化について検討したが、関係を認めなかった。さらなるSNPsの解析も行っていきたい。

【文献】

1. Suzuki F, Hosaka T, Suzuki Y, et al.: Long-term outcome of entecavir treatment of nucleos(t)ide analogue-naïve chronic hepatitis B patients in Japan. J Gastroenterol 54: 182-193, 2019
2. Thursz MR, Kwiatkowski D, Allsopp CE, et al.: Association between an MHC class Ⅱ allele and clearance of hepatitis B virus in the Gambia. N Engl J Med 20: 1065-1069, 1995
3. Kamatani Y, Wattanapokayakit S, Ochi H, et al.: A genome-wide association study identifies variants in the HLA-DP locus associated with chronic hepatitis B in Asians. Nat Genet 41: 591-595, 2009
4. Nishida N, Sawai H, Matsuura K, et al.: Genome-wide association study confirming association of HLA-DP with protection against chronic hepatitis B and viral clearance in Japanese and Korean. PLoS One 7: e39175, 2012
5. Seto WK, Wong DK, Kopaniszen M, et al.:

HLA-DP and IL28B polymorphisms: influence of host genome on hepatitis B surface antigen seroclearance in chronic hepatitis B. Clin Infect Dis 56: 1695-1703, 2013
6. Koukoulioti E, Fischer J, Schott E, et al.: Association of HLA-DPA1 and HLA-DPB1 polymorphisms with spontaneous HBsAg seroclearance in Caucasians. Liver Int 39: 646-654, 2019

新規核酸アナログ製剤のHBs抗原量に与える影響の解析

鈴木　義之、小林 万利子

【要約】

これまでHBVに対する治療の目標はHBV-DNAの陰性化と肝炎の鎮静化にあったが、近年になりHCV排除と同様、その目標はさらに難しい到達点であるHBs抗原の陰性化を目指すところまできている。このため我々のグループでは、これまでに様々な治療を行ってきた過去の症例の解析とともに、drug freeを目指して行ってきたIFN sequential therapyを総括し、その長期予後と治療を中止しえた症例の特徴をまとめ、中止に関わる因子（特に免疫応答に関与する因子）を検討した。更に新規核酸アナログ治療薬であるテノホビル（TDF）とTAFの成績を解析し、今後HBs抗原陰性化を目指すうえでこの薬剤をどのように使用すべきかについても検討を加えたので報告する。

【目的】

近年HBVに対する治療は大きく変化し、これまでの目標であったHBV-DNAの陰性化ではなくHBs抗原の陰性化を目指すことが要求されている。当院ではこれまでに数多くのHBs抗原陰性化達成例を経験しており、また昨年まで報告してきたsequential療法を用いることで積極的にHBs抗原を陰性化させるという方法論も展開している。その中でHBs抗原を陰性化しえた症例を解析し、今回の目標であるHBs抗原達成による治療の終了が可能かを検討する時期に来ている。さらには第四の核酸アナログ製剤であるテノホビル（TDF、TAF）を使用した症例を数多く経験し、同薬剤がHBs抗原を低下させるかどうかの検討も可能となってきた。その上でウイルス学的因子と宿主の免疫応答のパターンによる肝病態の相違や治療に対する反応性の面からHBs抗原の陰性化をもたらす因子の解析を行い、実際の臨床に応用していくことを目標とする。

【対象と方法】

2009年より核酸アナログ製剤の中止を目的としてIFN sequential therapyを導入している。本療法導入の条件は核酸アナログ投与中、HBe抗原は陰性で、肝酵素の正常化を維持し、HBV-DNAが感度以下（2.1 log copy/ml未満）もしくはHBcrAgが感度以下（3.0 log U/ml未満）を達成している患者とした。これまでに14症例に導入し、全例IFN投与を終了し経過観察期間（drug free）に入っている。本治療法を導入してきた14症例の約10年間の成績を検討した。さらにこのうちHBs抗原の陰性化を獲得した4例の症例を中心にIFN sequential therapy治療前の背景因子（HBs抗原量、宿主因子など）が治療反応性にどのように関わっているかにつき検討した。また、当科で経過観察中の409例のTDF投与症例と77例のTAF投与症例についても検討した。それぞれの症例の背景因子を解析するとともに、その後の経過につき検討した。

【成績】

IFN sequential therapy導入症例の背景は年齢43.5歳、男性は12例（85.7%）、肝酵素はいずれも20IU/L以下、HBV-DNAは一例を除き2.1>log copy/mlであった（**表1**）。Genotypeは2例がBで残りはCでラミブジン（LMV）からの中止例が10例、エンテカビル（ETV）からの中止例が4例となっている。drug freeの達成率は71%（10/14）であり、4例（29%）にHBs抗原の陰性化が得られており有効な治療の選択肢であることが示された。14症例の経過を示したのが**図1**であり、治療終了後のdrug free期間は中央値102か月（96～108）である。経過中のALTは治療終了後に一過性に上昇する症例も認められるもののその後は沈静化するケースがほとんどであったが、その後の再燃で再治療を導入した症例が4例認められた。このうち3例は当初の

表１　IFN sequential療法　14症例の背景

	核酸アナログ開始時	IFN開始時
年齢（歳）	36.5（25－57）	43.5（34－60）
性別	男：女　12（85.7%）：2（14.3%）	
AST（IU/L）	97.5（29－1356）	19.5（15－26）
ALT（IU/L）	192（32－2412）	16.5（12－26）
HBe抗原陽性	3例（21.4%）	0例（0%）
HBV DNA（log copy/ml）	7.4（3.0－8.1）	2.1>（検出せず－2.9）
HBV genotype	B；2例（14.3%），C；12例（85.7%）	
核酸アナログの種類	Lamivudine: 10例	Entecavir: 4例

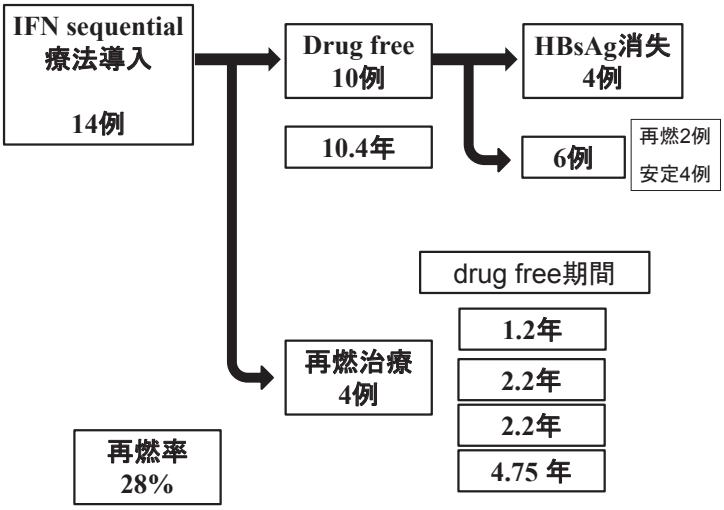


図１　IFN sequential療法　14症例の経過

目標である2年以上のdrug freeを達成している。単純中止例で当院が報告してきた再燃率68%に比べ本治療法の再燃率が28%と有意に低いことが示されている。本治療法によるTDF投与症例の内訳HBV-DNAの陰性化率とALTの正常化率（**図2**）については特筆すべきものがあり、ALTはIFN開始後12か月目をピークにやや正常化率は低下するものの再治療に至らなかった症例では約3年後以降には100%安定という数字であった。一方DNAは感度以下を維持できている症例は少ないもののガイドラインでは治療域とはならない2.1から4.0の範囲内で変動している症例が多く認められている。再治療となった4例の要因を解析するため経過中のHBcrAgの経過をみてみると、3症例はいずれもHBcrAgが高いままで再治療を導入され2例は依然として高値を持続している。一方再治療とならなかった症例はIFN終了直後は不安定であるが1例を除きすべて3以下まで低下し安定していた。これをまとめると経過中HBcrAgが3.6以下の症例からは1例の再燃があったものの再治療にはいたらず、再治療となった4例中3例はHBcrAgが5.9が1例と6.8<が2例であった。また、TNF-αの測定をみてみると、再燃をきたした症例はTNF-αが高く炎症が持続する要因が示唆されている（**図3**）。このように本療法は効率よくdrug freeを獲得する

表２　IFN sequential療法　14症例の背景

No.	性別	年齢	genotype	NA種	期間	開始時	IL28	HLADPA1	HLADPB1	最終観察時	
						HBsAg	rs8099917	rs3077	rs9277535	ALT	DNA
3	M	60	C	ETV	100+16M	227	TT	GA	GA	17	−
13	M	53	C	LMV	123M	5.45	TG	GA	GA	18	−
4	M	43	C	LMV	76M	1910	TT	GA	GG	21	−
5	M	55	C	LMV	100M	119	TG	GA	GG	19	−
6	M	41	C	LMV	79M	916	TG	GG	GG	36	2.1
8	M	36	C	LMV	66M	785	GG	GG	GG	24	4.4
10	M	35	C	LMV	122M	6080	TG	AA	AA	20	5.1
11	M	44	C	LMV	98M	109	TT	GG	GG	39	1.5>
12	M	49	C	LMV	76M	1400	TT	GA	GA	20	3.3
14	F	34	C	ETV	20M	5740	TT	GG	GA	9	2.5
1	M	60	Bj	LMV	55M	1370	TT	GG	GG	528	5.4
2	M	41	C	LMV	94M	1390	TT	GG	GA	388	6.9
7	M	37	C	ETV	31M	6110	TT	GA	GA	980	7.8
9	F	59	Ba	ETV	38M	554	TT	GG	GG	114	8.9

ことが明らかとなったが、このうちHBs抗原陰性化を獲得した4症例の背景因子を他の症例と比較したのが**表2**である。上段のNo.3, 13, 4, 5がHBs抗原を陰性化した症例であるが、既報のごとくHLADPA1がGAは4例ともまたそれに加えてHLADPB1もGAの症例が2例、HBs抗原の陰性化を獲得していた。また、これまでにsequential therapyを応用した方法でIFNと核酸アナログを繰り返し治療することによりHBs抗原の陰性化を獲得した症例を経験したが、最後に用いたテノホビル（TDF）により持続的なHBs抗原の陰性化が得られた。このような経験から当科では積極的にテノホビルに切り替えることも行っており、特に最近では最後の市販されたTAFへと切り替える症例も増加している。TDF投与症例は、初回治療（Naïve）群、不応例治療（rescue）群、治療切り替え群（経過良好でTDFに治療薬を変更: switch）に分け治療効果について検討した（**図4**）。Naïve症例は核酸アナログ製剤初回投与としてTDFを選択した症例であり、rescue症例は核酸アナログに対する不応症例でTDFに切り替えまたはadd onした症例である。Switch症例は他の核酸アナログで安定しているもののHBs抗原

	再燃率	再治療率 (核酸アナログ再投与のみ)
単純中止例 62例	68% 42例	52% 32例
Sequential併用例 14例	28% 4例	21% 3例

図２　核酸アナログ中止例の経過

量のさらなる低下を目指してTDFに切り替えた症例である。ALT正常化率、HBV-DNA陰性化率とも切り替え群が最も高く、**図5**に示すように1.5年の経過ではHBs抗原量に低下は未だ十分といえないものの、HBV-DNAの陰性化率は高く、いずれの群においても1.5年で80%以上の症例がHBV-DNAの陰性化を獲得しており、今後のHBs抗原量の低下が期待されている。これらの中には一部の症例に急激なHBs抗原の低下が認められており、HBs抗原量の低下については各郡に差は認められなかった（**図6**）。また、併用薬別で検討を行うとLMVよりもETV併用群のほうがHBs抗原の低下率が高かった。次に最近使用

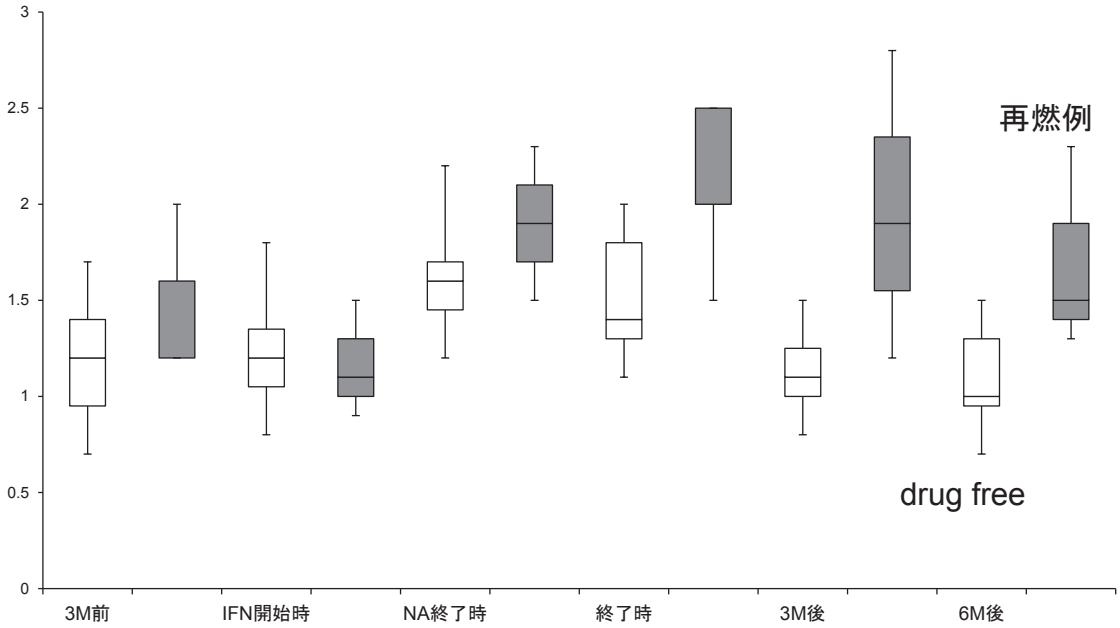


図３　IFN sequential療法中のTNF-αの変化

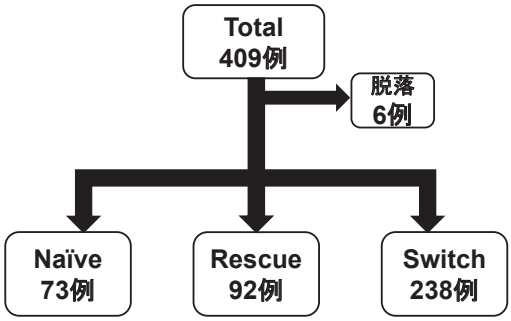


図４　TDF投与症例の内訳

可能となったTAFについての成績を示す。背景は**表3**に示す通りで安定した状態からの薬剤の変更症例が多くなっているのが特徴である。十分な観察期間とは言えないがTDFの問題点である腎機能障害を改善させる可能性があり、**図7**に示すようにHBs抗原量を低下する可能性も示唆された。これらの中には一部の症例に急激なHBs抗原の低下が認められており、このような症例の特徴をとらえ、より有効な方法でHBs抗原の陰性化を目指すことが今後に期待される治療法であると考える。

【考察】

2000年に登場したLMVは確かに画期的な治療薬であり、我々は、かつてLMV投与において経年的に肝生検を行いその組織学的改善度につき報告してきた[1, 2]。その中でも述べたように、抗ウイルス剤投与により肝炎の鎮静化を持続することができれば、肝臓の線維化についても改善が認められることを示した。しかしながら、投与後1年経過したあたりから耐性ウイルスが出現し、それに伴う肝炎の再燃、重症化で難渋したことも事実である。その後、アデホビル、エンテカビル、テノホビルと登場した核酸アナログ製剤により多くの問題が解決されたかに見えたが耐性ウイルスについてはそれを防止する手段はいまだない。これまでに行ってきたIFN sequential therapyにおいては宿主の遺伝子を検討することでHBs抗原消失の確立を向上させることができるかもしれない方法に一歩近づいたと言える。特にIFN開始時のHBcrAgが低値でありgenotype B以外の症例においては良好な結果が得られ、有用な治療法であることが示された。また、テノホビル製剤であ

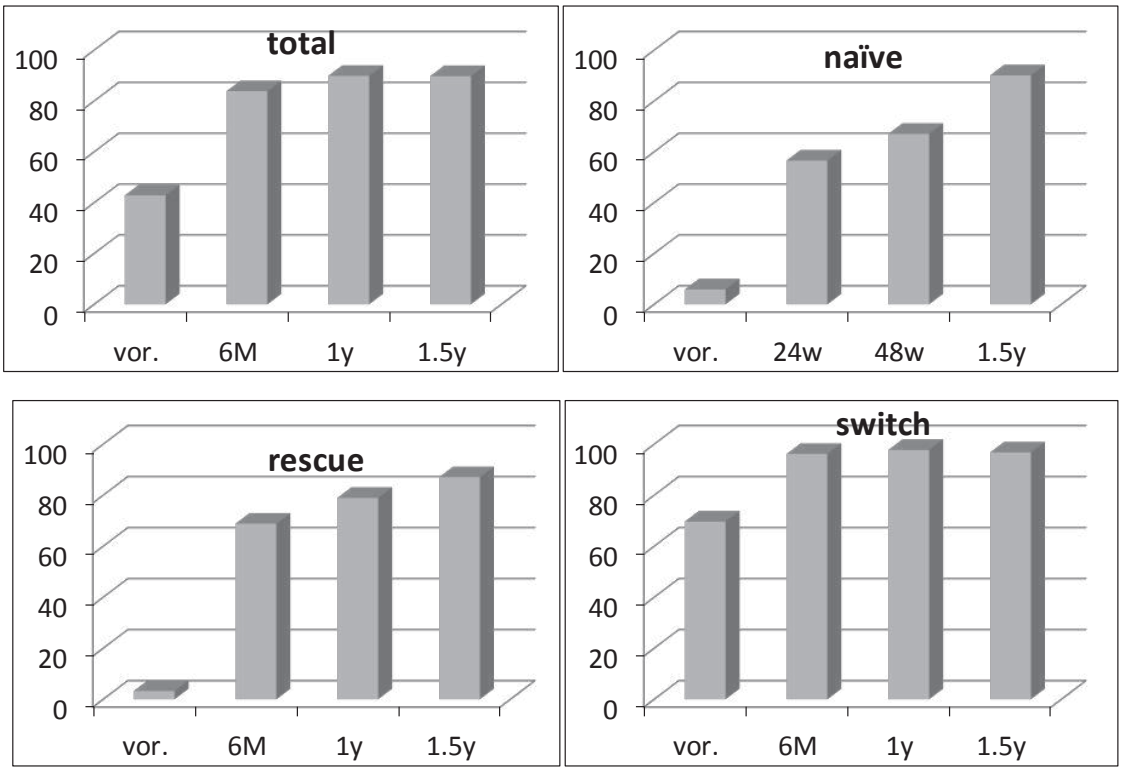


図 5　TDF 投与症例の治療法別の HBV-DNA の陰性化率

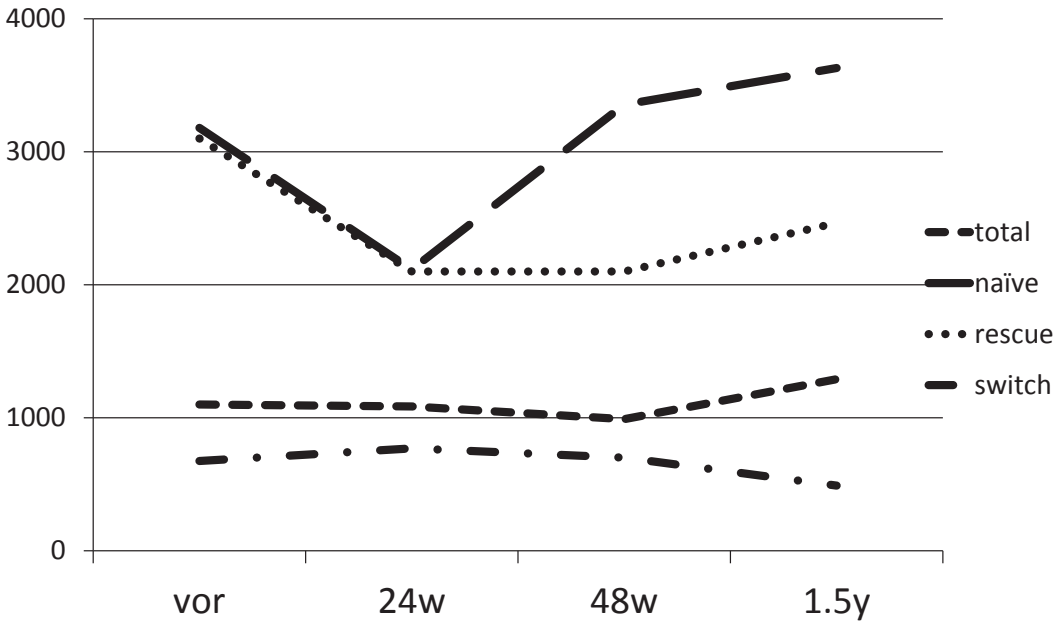


図 6　TDF 投与症例の治療法別の HBs 抗原量の推移

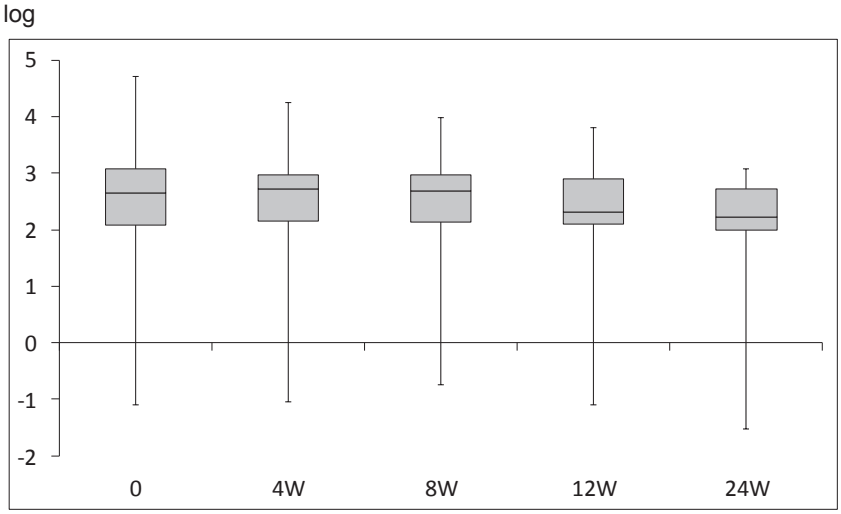


図７　TAF投与症例のHBs抗原量の推移

表３　TAF投与症例の背景

男：女	55：22
年齢	63（28－88）
AST	14（14－514）
ALT	21（9－492）
HBV-DNA	検出せず（検出せず－8.2）
HBsAg	450（0.08－52000）
HBeAg	+16：－55
Genotype A：B：C	1：10：65
CH：LC	57：20

るTDF投与症例の中には急激なHBs抗原低下をきたす症例が散見され、その次の世代として注目されているTAFはTDFの弱点を克服できる可能性がありさらに詳細に検討する必要があると考えられる。今後は積極的にHBs抗原陰性化に向けた取り組みが可能であるかどうかを中心に解析を行っていくべきと考える。宿主因子を考慮した選択と、核酸アナログ以外の新規薬剤を組み合わせることでより安全にかつより有効な治療法が確立できるよう今後さらに検討を進めていくことが重要であると考える。

【文献】

1. Suzuki Y, Kumada H, Ikeda K, et al.: Histological changes in liver biopsies after one year of lamivudine treatment in patients with chronic hepatitis B infection. Journal of Hepatology 30: 743-748, 1999
2. Suzuki Y, Arase Y, Ikeda K, et al.: Histological improvement after a three-year lamivudine therapy in patients with chronic hepatitis B in whom YMDD mutants did not or did develop. Intervirology 46: 164-170, 2003

C型慢性肝炎に対するオムビタスビルとパリタプレビル/リトナビル併用療法における治療不成功例の臨床背景ならびにHCV遺伝子変異の特徴と治療終了後の経過の検討

瀬崎 ひとみ、鈴木　文孝

【要約】

C型慢性肝炎の治療はIFN freeの経口抗HCV薬併用療法（DAAs）が主流となったが、各種DAAs治療の実臨床における治療効果および治療不成功の特徴を明らかにする必要がある。そこで、当院におけるオムビタスビルとパリタプレビル併用12週間の治療を受けた249症例のSVR12と各種薬剤耐性変異との関係を検討した。NS5A-Y93アミノ酸変異を有する症例のSVRは72.7%と低下しており、治療不成功に寄与する独立因子であった。またY93変異を有する症例の内2例（8.3%）がSVR12を達成後ウイルスの再燃を認めた。今後は、DAAs既治療例、特に複数回のDAAs治療でも難治の症例に対しても有効な治療法を確立していく必要があると考える。

【目的】

genotype 1型C型慢性肝疾患に対する経口抗HCV薬（DAAs）である、NS3/4Aプロテアーゼ阻害剤であるパリタプレビル（PTV）とNS5A阻害剤であるオムビタスビル（OBV）の併用12週間治療は、本邦における国内臨床試験において95.3%の症例が著効となり、治療開始前にNS5A耐性変異を有している症例でも83.0%の症例が著効となったと報告された[1)]。しかしながら、実臨床においては各種DAAsが使用可能となっている中、適切な治療対象を絞り込むためにも、各薬剤の治療不成功例の臨床的特徴を明らかにするとともに、C型肝炎ウイルスの遺伝子変異の観点からも治療不成功とのかかわりを明らかにするする必要がある。そこで当院でOBV/PTV/r併用療法を行った症例で、治療不成功に関わる因子を明らかにし、さらに治療不成功前後のウイルス遺伝子変異の特徴とその後の臨床経過との関係を検討することを目的とした。

【方法】

OBV/PTV/r12週併用療法を行ったgenotype 1b型の症例の血清を用い、direct sequence法により治療開始前のHCV遺伝子のNS3領域およびNS5A領域のアミノ酸変異の有無を決定し[2)]、背景因子を含めて治療不成功に関わる因子を多変量解析を用いて検討した。さらに治療不成功時のアミノ酸変異の特徴を検討した。

【結果】

HCVのアミノ酸変異を測定しえたのは249例であった。NS5A阻害剤未治療例のSVR12は94.6%であり、NS3領域、NS5A領域にいずれも変異のない症例では96.4%、NS3-D168単独変異、NS5A-L31単独変異は100%と高率であったが、NS5A-Y93単独変異は72.7%と低下した。2種以上の変異（D168+Y93変異の2例、D168+L31変異の1例）は100%であった。一方、NS5A阻害剤既治療例9例はいずれも変異のない8例とL31単独変異の1例であり、全例SVRに達した。背景因子によるSVR率を検討すると、年齢、*IL28B* genotype、背景肝組織および肝癌治療歴の有無により治療効果に差は認めなかった。治療不成功に寄与する独立因子は、治療前NS5A-Y93変異の存在、開始時アルブミン値3.8 g/dL未満、ALT60 IU/L以上であった。OBV/PTV/r治療不成功であった11例の内、治療不成功時にD168変異を7例、Y93変異を3例に新たな出現を認めたが、L31の変異が出現したのは1例のみであった。また、Y93に変異を有する症例の内2例（8.3%）がSVR12を達成後ウイルスの再燃を認めた。

【考察】

OBV/PTV/r併用療法の国内臨床試験の成績では、治療開始前にY93のアミノ酸変異がなけれ

ば99.0％に著効が得られる一方、変異があると83.0％へ軽度低下すると報告された[1,3]。しかしながら、実臨床ではより高齢の症例や肝癌既治療例、様々な合併症を有する症例、DAAs既治療例なども含まれており、これら様々な背景因子を有する症例に対する治療効果を明らかにする必要があった。本研究により、実臨床におけるOBV/PTV/r併用療法のDAAs未治療例に対する治療成績は、国内臨床試験とほぼ同等の結果が得られ、DAAs既治療例についても治療開始前にNS5A-Y93変異がなければ高率にSVRが得られる結果が得られた。さらに、Y93変異を有する症例は、SVR12は81.8％となり国内臨床試験の結果と同等であるが、SVR12を達成後ウイルスが再燃し、最終的に72.3％のSVR率まで低下するということも明らかとなり、治療開始前のY93変異の存在が治療不成功の独立要因であることが改めて証明された。また、治療不成功となった後L31に変異が出現する症例は少ない、すなわち治療不成功となってもL31とY93の2重変異になりにくいということも判明した。L31とY93の2重変異については、これまでのDAAs治療において治療不成功の要因として注目されている点であり、治療不成功となっても2重変異となりにくいということは次なるDAAs治療を選択する上で有益となる。今後は、DAAs既治療例、特に複数回のDAAs治療でも難治の症例に対しても有効な治療法を確立していく必要があると考える。

【文献】

1. Kumada H, Chayama K, Rodrigues Jr. L, et al.: Randomized phase 3 trial of ombitasvir/paritaprevir/ritonavir for hepatitis C virus genotype 1b-infected Japanese patients with or without cirrhosis. Hepatology 62: 1037-1046, 2015
2. Kato N, Hijikata M, Ootsuyama Y, et al.: Molecular cloning of the human hepatitis C virus genome from Japanese patients with non-A, non-B hepatitis. Proc Natl Acad Sci USA 87: 9524-9528, 1990
3. Krishnan P, Schnell G, Tripathi R, et al.: Analysis of Hepatitis C Virus Genotype 1b Resistance Variants in Japanese Patients Treated with Paritaprevir-Ritonavir and Ombitasvir. Antimicrob Agents Chemother 60: 1106-1113, 2016

B型慢性肝疾患に対するテノホビルアラフェナミド療法における薬剤耐性変異と治療効果との関係

保坂　哲也、鈴木　文孝

【要約】

B型慢性肝疾患に対する核酸アナログ製剤（ラミブジン、アデホビル、エンテカビル、テノホビルジソプロキシルフマル酸塩（TDF）、テノホビルアラフェナミド（TAF））は、肝内のHBV増殖を抑制することで、肝臓の炎症を軽減し、病期の進行を抑える治療薬である。核酸アナログ製剤は概ね治療効果が高いが、TAFによる効果不良例に対する治療効果については十分解明されていない。そこで今回TAF治療を行った他剤効果不良例9例について、ウイルス学的解析と治療効果との関係を検討した。HBV DNAの遺伝子配列は、polymerase領域のreverse transcriptase領域についてPCR反応を用いてdirect sequence法にて測定した。TAF治療開始後のHBV DNA陰性化率は、3ヶ月44%、6ヶ月56%、12ヶ月78%であり、開始時のHBV DNA量が低値な症例ほど、陰性化が早い傾向にあった。9例中4例で典型的なエンテカビル耐性ウイルス（rtL180M+rtM204VにrtT184IまたはrtS202GまたはrtM250Vのいずれかの変異あり）であった。この中の1例ではアデホビル耐性であるrtA181Tの変異も同時に認めた。また5例では、ラミブジン耐性変異であるrtM204V/Iの変異を伴った。耐性ウイルス変異パターン別でのHBV DNA量低下に差は認めなかった。他剤に耐性変異を有する症例において、上市して日が浅いTAF治療の抗ウイルス効果は比較的良好であった。

【目的】

B型慢性肝疾患に対する核酸アナログ治療が普及して約19年が経過する。核酸アナログ製剤（ラミブジン、アデホビル、エンテカビル、テノホビルジソプロキシルフマル酸塩（TDF）、テノホビルアラフェナミド（TAF））は、肝内のHBV増殖を抑制することで、肝臓の炎症を軽減し、病期の進行を抑える治療薬である。核酸アナログ製剤は概ね治療効果が高いが、現在の核酸アナログ製剤でウイルス量が十分低下していない不応例（HBV DNA > 3 log copies/mL）や多剤耐性ウイルス出現例が存在することが知られており、このような症例に対してはテノホビル製剤（TDFまたはTAF）治療が推奨されている。特にTAFは約2年前に上市した新規核酸アナログ製剤で、多剤耐性ウイルスの種類と治療効果については十分解明されていない。また非常に稀なテノホビル耐性ウイルスの報告もなされている。

そこで今回、当院における核酸アナログ製剤の耐性出現例や不応例、およびウイルス再燃例における耐性ウイルスの解析と治療成績との関係を明らかにする目的で本研究を立案した。

【対象と方法】

対象: 2017年よりTAF治療を施行している症例のうち、他剤効果不良例9例を対象とした。HBV DNAの遺伝子配列は、polymerase領域のreverse transcriptase[rt]領域についてPCR反応を用いてdirect sequence法にて測定した。測定法は、既報の方法に拠った[1)]。

【成績】

(1) 対象症例の臨床的特徴とTAF治療による抗ウイルス効果: 男性6例、女性3例、HBe抗原陽性例5例、全例開始時DNA量2.0U/mL以上であった。TAF治療開始後のHBV DNA陰性化率は、3ヶ月44%、6ヶ月56%、12ヶ月78%であり、開始時のHBV DNA量が低値な症例ほど、陰性化が早い傾向にあった。

(2) rt領域のアミノ酸変異: 9例中、4例で典型的なエンテカビル耐性ウイルス(rtL180M+rtM204VにrtT184IまたはrtS202GまたはrtM250Vのいずれかの変異あり）であった。この中の1例ではアデホビル耐性であるrtA181Tの変異も

同時に認めた。また5例では、ラミブジン耐性変異であるrtM204V/Iの変異を伴うが典型的なエンテカビル耐性ウイルスのパターンではなかった。耐性ウイルス変異パターン別でのHBV DNA量低下に差は認めなかった。

【結論】

他剤に耐性変異を有する症例において、上市して日が浅いTAF治療の抗ウイルス効果は比較的良好であった。最近の韓国からの報告[2)]では、今回解析した耐性変異部位以外の箇所に4カ所変異が入るとテノホビル製剤の感受性が減弱するとしており、今後はこれらの箇所の変異の有無とTAF治療との関係を検討する必要がある。

【文献】

1. Suzuki F, Kumada H, Nakamura H: Changes in viral loads of lamivudine-resistant mutants and evolution of HBV sequences during adefovir dipivoxil therapy. J Med Virol 78: 1025-1034, 2006
2. Park ES, Lee AR, Kim DH, et al.: Identification of a quadruple mutation that confers tenofovir resistance in chronic hepatitis B patients. J Hepatol 70: 1093-1102, 2019

（6）循環器疾患

高齢者の健康状態の検討と、心血管疾患リスク因子を明らかにする研究

桑原　政成

【要約】

我が国では年々高齢者の割合が増えており、高齢化が進行している。高齢者[1]の定義についても、日本老年医学会から75歳以上が望ましいとの提言もされており[2]、今後高齢者に対する医療体制の充実が望まれている。高齢者のフレイル管理において、栄養評価は非常に重要であり、高齢者の適切な栄養指標が求められている。血清アルブミンが一つの栄養指標とされているが、加齢に伴い血清アルブミンは減少し、α1酸性糖蛋白が増加すると考えられており、年齢区分による栄養評価が必要と考えられる。さらに、血清アルブミンの減少は、非結合薬物の血清中濃度を上昇させ薬物効果を増強することもあり、加齢に伴って血液検査データがどのくらい変化するのか、年齢区分による各検査項目の正常値の評価が求められている。本研究は、健康診断の受診者を対象として、血液検査データを解析し、高齢者の加齢に伴うアルブミンを含めた栄養指標の評価を行った。

【目的】

健康診断の大規模データを用いて、高齢者の加齢に伴う栄養指標の基準値を明らかにする。

【方法】

研究①: 横断研究。2009年に虎の門病院と聖路加国際病院で健康診断を受けた55,257人の日本人のうち、65歳以上で各種検査結果を抽出可能な受診者を対象とした。身長、体重、BMI、腹囲、血圧、脈拍、血液検査として、総蛋白、血清アルブミン、中性脂肪、総コレステロール、ヘモグロビン、空腹時血糖値の値を、Group A（65歳以上75歳未満）、Group B（75歳以上85歳未満）、Group C（85歳以上）の3群に分け、各群間で違いがあるかを検討した。解析は、IBM SPSSを使用し、分散分析（analysis of variance: ANOVA）で検定を行った。

研究②: 上記研究の結果を鑑み、虎の門病院の健康診断受診者のデータを用いて、2008年と2017年の間で、血清アルブミンがどのくらい変化するかについて、10年間のコホート研究を行った。2008年と2017年の両年に受診した対象者3,412人のうち、2008年の時点で65歳以上の高齢者を対象とし、10年間での検査データの変化を検討した。さらに、本研究対象者に2008年の時点で85歳以上である者を認めなかったため、Group A（65歳以上75歳未満）、Group B（75歳以上85歳未満）の2群で、その変化に違いがあるかの比較を行った。男女の割合の検定はカイ二乗検定、10年間の数値の変化については、対応のある t 検定で解析を行った。

【結果】

研究①: 2009年に健康診断を受けた55,257人のうち、65歳以上の本研究対象者は8,409人であり、男性が4,766人（56.7%）を占めていた。各群の人数は、Group Aが6,461人（男性3,636人）、Group Bが1,776人（男性 1,018人）、Group Cが162人（男性 112人）であり、一番高齢であるGroup C群で女性の割合が有意に高かった（$p<0.001$）。3群間における、各栄養評価項目を比較したところ、総蛋白は3群間で有意な差は認めなかったが（$p=0.66$）、血清アルブミンはGroup Aで4.26 ± 0.25 g/dL、Group Bで4.18 ± 0.27 g/dL、Group Cで4.15 ± 0.29 g/dLと、高齢群ほど有意な低下を認めた（$p<0.001$）。その他の指標としては、中性脂肪、総コレステロール、ヘモグロビンは、

表１　高齢者の、年齢区分による各検査項目の違い

年齢	N		性別（男性）	身長（cm）	体重（kg）	BMI（kg/m^2）	腹囲（cm）	収縮期血圧（mmHg）	拡張期血圧（mmHg）	脈拍数（/min）
Group A	6,471	Mean	56.0%	160.9	58.8	22.6	82.2	127.8	78.4	73.7
68.8±2.8 歳		SD		8.4	10.5	2.9	8.5	18.2	10.8	11.8
Group B	1,776	Mean	57.0%	157.9	55.8	22.3	82.6	132.7	78.1	74.9
78.3±2.6 歳		SD		8.8	10.0	3.1	9.0	18.5	10.9	12.2
Group C	162	Mean	69.0%	157.0	54.4	22.0	82.4	134.4	76.4	75.4
87.4±2.8歳		SD		9.0	9.1	3.1	9.3	19.6	11.7	12.3
analysis of variance		p	0.004	<0.001	<0.001	<0.001	0.233	<0.001	0.040	<0.001

年齢	N		総蛋白（g/dL）	アルブミン（g/dL）	中性脂肪（mg/dL）	総コレステロール（mg/dL）	LDL/HDL比	ヘモグロビン（g/dL）	空腹時血糖（mg/dL）	HbA１c（%）
Group A	6,471	Mean	7.19	4.26	103	211	2.13	13.9	104.9	5.50
68.8±2.8 歳		SD	0.42	0.25	58	32	0.74	1.2	17.5	0.58
Group B	1,776	Mean	7.20	4.18	96	207	2.05	13.4	105.9	5.59
78.3±2.6 歳		SD	0.45	0.27	49	31	0.74	1.3	19.3	0.64
Group C	162	Mean	7.19	4.15	84	201	2.05	12.8	104.3	5.58
87.4±2.8 歳		SD	0.49	0.29	35	34	0.72	1.5	18.0	0.57
analysis of variance		p	0.656	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	0.13	<0.001

Group A（65歳以上75歳未満）、Group B（75歳以上85歳未満）、Group C（85歳以上）の３群間を、分散分析（analysis of variance: ANOVA）で検定

高齢群ほど低下を認めたが（p<0.001）、空腹時血糖値は、3群間で有意差は認めなかった（p=0.13）。各項目の詳細な値は、**表１**に示した。標準偏差未満を異常値と考えると、血清アルブミン3.85 g/dL未満が低栄養を示唆する指標として有用である可能性が考えられた。

研究②: 2008年と2017年の両年に受診した対象者3.412人のうち、65歳以上の本研究対象者は517人であり、男性が343人（66.3%）を占めていた。各群の人数は、Group A（65歳以上75歳未満）が447人（男性 290人）、Group B（75歳以上85歳未満）が70人（男性 53人）で、両群間で男女の割合に有意差は認めなかった（p=0.78）。血清アルブミン値は、2008年が4.10±0.23 g/dL、2017年が4.26±0.25 g/dLと10年間で有意な増加が認められていた（p<0.001）。年齢群別の血清アルブミン値の変化の検討では、Group A群は4.11±0.23 g/dLから4.25±0.25 g/dL（p<0.001）、Group Bは4.08±0.22 g/dLから4.26±0.23 g/dL（p=0.003）と、両群ともに血清アルブミン値は10年で有意な上昇を認めていた。

【考察】

横断研究では、加齢に伴い、血清アルブミン、中性脂肪、総コレステロール、ヘモグロビンが低下することが示唆されていた。特に85歳以上ではその傾向が顕著であり、高齢者ではフレイルが認められ、食事量が減ってしまう可能性があり、栄養療法の重要度が示唆された。

10年間のコホート研究では、血清アルブミン値は低下するどころか、むしろ上昇していた。本結果は、ベースラインの85歳以上の者が認められなかったことで、横断研究で顕著な低下が認められていた超高齢者の群を評価できていないことが影響した可能性が考えられた。また、10年もの間、健康診断を受け続けられていた者は、高齢者の中でも特に健康状態が良好である一方で、体調不良や重度のフレイル状態であった者は健康診

断の受診が困難となり、本研究対象者から除かれている可能性が考えられた。他の血清アルブミン値が10年の加齢に伴い上昇した理由としては、近年の食生活の欧米化などを含め、総カロリー摂取が増加している影響も考えられた[3)]。また、日本老年学会・日本老年医学会の高齢者の定義を75歳とする提言の中で述べられている、「現在の高齢者においては10～20年前と比較して加齢に伴う身体的機能変化の出現が5～10年遅延しており、『若返り』現象が認められている」内容とも合致している結果となった[2)]。本コホート研究は単施設研究であり、研究対象者の選択バイアスなどの影響も十分考えられることから、今後、欠損対象者の少ない住民コホート研究などで、85歳以上の高齢者を主な対象としたさらなる栄養評価の検討が望まれる。

栄養評価の際には、各年代の血液検査の基準値、加齢による変化に留意することが重要である。血清アルブミンについては、85歳以上であっても3.85 g/dL未満は異常値であることが示唆され、早期に栄養に対する介入を行うことで、フレイルの予防となる可能性が考えられる。また、本コホート研究の結果から、健康診断を10年間受けられている高齢者（65歳以上85歳未満）の血清アルブミン値は上昇しており、近年の高齢者の「若返り」現象を支持する結果が得られた。

【文献】

1. 内閣府: 高齢化の状況: https: //www8.cao.go.jp/kourei/whitepaper/w-2019/zenbun/pdf/1s1s_01.pdf.
2. 日本老年学会・日本老年医学会: 高齢者の定義と区分に関する、日本老年学会・日本老年医学会 高齢者に関する定義検討ワーキンググループからの提言（概要): https: //wwwjpn-geriat-socorjp/proposal/pdf/definition_01pdf.
3. Johnson RJ, Segal MS, Sautin Y, Nakagawa T, Feig DI, Kang DH, Gersch MS, Benner S, Sanchez-Lozada LG: Potential role of sugar（fructose）in the epidemic of hypertension, obesity and the metabolic syndrome, diabetes, kidney disease, and cardiovascular disease. Am J Clin Nutr 86: 899-906, 2007

（7）リウマチ・膠原病疾患

常染色体優性多発性嚢胞腎（ADPKD）患者の末期腎不全での腎容積の増大速度の研究

諏訪部 達也

【要約】

常染色体優性多発性嚢胞腎（ADPKD）の腎容積は一般的に腎機能の増悪と共に増大するが、透析導入後に腎容積がどのように変化するかについては議論の分かれるところである。我々は末期腎不全（ESRD）に至る前後に、ADPKD患者で腎容積がどのように変化するのかを明確にするために本研究を行うことにした。2004年1月から2019年12月までに当院にて人工透析を導入されたADPKD患者を対象に、透析導入前後の腎容積の推移を検討した。対象患者は90人（男27/女63）、平均年齢59.8±10.1であった。人工透析導入までは平均腎容積は増大したが、透析導入後には減少する傾向が見られた。我々の予想通り透析導入を契機に腎容積の変化率は大きく変わることが示されたが、患者による個人差も大きく、どのような因子が腎容積の変化に影響しているのか、今後さらに研究を行う必要がある。

【研究目的】

ADPKDは最多の遺伝性腎疾患であり、本邦の人工透患者のうち、約1万人がADPKD患者である。多様性のある疾患であるが、一般的な経過では60歳までに多くのADPKD患者が末期腎不全に至るとされている。腎機能の低下とともに腎腫大が進行し、しかも腎不全の進行とともに加速度的に腎容積が増大することが知られている。しかし、末期腎不全（ESRD）に至った患者において、その後、腎腫大がどのように進行するのかは未知である。我々はこの研究で、ADPKD患者でESRDに至る前後に、腎容積がどのように変化するのかを明確にすることを目的にした。また、透析導入前後の腎容積の増大速度に影響する因子を調べることにした。

【方法】

（A）対象患者: 2004年1月以降2019年12月までに当院にて人工透析を導入されたADPKD患者で、透析導入前と、導入後に少なくとも1回ずつ腹部CTまたはMRI検査を受けた患者に限る。

（B）研究方法

（1）それぞれの患者について透析導入時、導入後の腎容積を測定し、経時的な腎容積の変化を求める。

（2）透析導入前後の腎容積の変化について、腎容積の平均値の推移を分析する。

（3）患者の臨床的特徴（年齢、性別、血圧など）の情報を収集し、透析導入後の腎容積増大速度に影響する因子を分析する。

（C）ADPKDの腎容積の算出方法

ADPKDの腎容積の算出には、腹部CTやMRI画像で腎臓の1cm毎の横断面積を測定し、それを合計することで算出した。

表 1　透析導入時の患者の特徴

	人数（男/女）	平均年齢（範囲）	Hb値（mg/dl）	血清Cr値（mg/dl）	血清尿素窒素（mg/dl）	血清TP値（g/dl）	血清Alb値（g/dl）
非寛解群	90人（27/63）	59.8±10.1（38-81）	9.9±1.9	8.3±3.6	89.±39.2	6.6±0.6	3.0±0.5

【結果】

1. 透析導入時の患者特徴を示す（**表1－3、図1**）。

2. まとめ

患者の平均腎容積は、透析導入年まで腎容積は大きくなり続け、その後、縮小する傾向が見られた。現段階では患者数が少なく、多変量解析にて患者のどの要素が腎容積の変化に影響しているかは、解析が困難である。今後、患者数の蓄積が必要である。

表２　画像が存在する患者数

透析導入までの年数	12年	11年	10年	9年	8年	7年	6年	5年	4年	3年	2年	1年
画像のある患者数（人）	1	3	7	4	13	12	10	15	20	36	51	57

透析導入後の年数	透析導入年	1年	2年	3年	4年	5年	6年	7年	8年	9年	10年	11年
画像のある患者数（人）	83	55	38	20	12	12	5	2	2	1	0	1

12人以上の患者数がある年のみで腎容積を比較した。透析導入前8年より透析導入後のみで腎容積の平均値を比較検討した。

表３　腎容積の推移

	8年前	7年前	6年前	5年前	4年前	3年前	2年前	1年前	導入年	1年後	2年後	3年後	4年後	5年後
Mean（ml）	1899	2165	2238	1964	2690	2625	3092	3652	3542	3193	2838	3317	3092	2734
SD（ml）	1098	1641	768	853	1548	1554	1766	2218	2183	1962	2088	2458	2188	1675

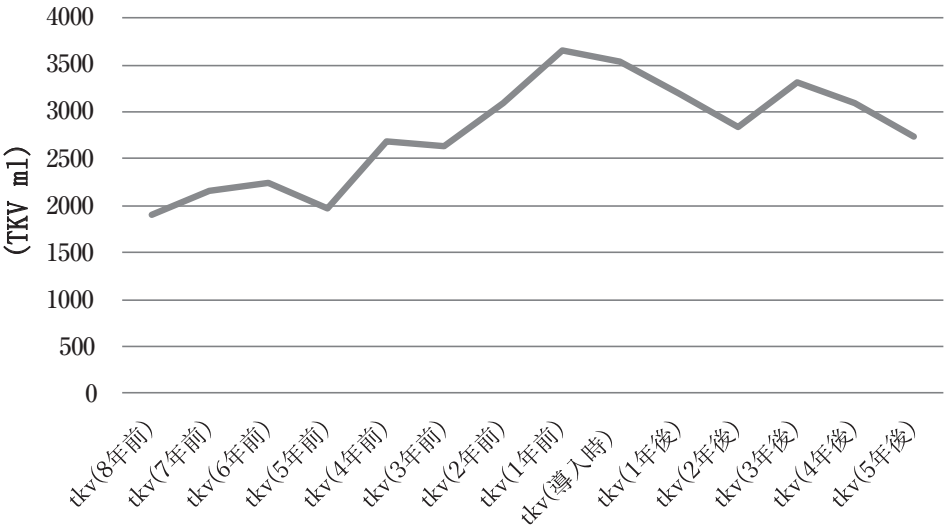


図１　総腎容積（TKV）

【考察】

我々は、透析導入後に腎容積増大速度が遅くなると予想していたが、実際には、多くの患者で縮小する傾向にあることが判明した。これは、非常に興味深い発見である。ただ、腎容積の変化は個人差が大きいため、今後、患者のどのような因子が影響しているのか、さらに患者数を重ねて検討が必要である。

透析患者に対するデノスマブ投与後の低カルシウム血症の予測因子の検討

星野　純一

【要約】

目的: 慢性腎不全患者は骨粗鬆症による脆弱性骨折のハイリスク集団であるが、薬剤蓄積性の懸念等から有効性が証明されていない薬剤が多く、治療選択肢は限定されている。近年開発された完全ヒトRANKL抗体製剤デノスマブは、昨年度の助成研究により、腎不全患者でも健常人と同等の骨密度改善が期待できることが明らかとなった。しかし透析患者で頻度が多い低カルシウム血症の頻度や予測因子は明らかでない。

方法: 2013年から2018年の間に当科にて骨粗鬆症治療を目的としてデノスマブが使用された症例を対象とし、透析の有無における投与後低カルシウム血症（Ca<8.5mg/dL）の頻度、出現時期、および予測因子を検討した。

結果: 観察期間内に透析121例（平均年齢66.7±10.6歳、透析歴中央値13年）、および非透析203例（71.2±10.9歳、eGFR中央値61ml/min/1.73m^2））にデノスマブ治療が行われた。高カルシウム血症例を除き、デノスマブ投与時に非透析例ではカルシウム/マグネシウム/天然型ビタミンD、透析例では活性型ビタミンDの開始/増量が行われた。

投与開始後の低カルシウム血症の頻度は透析群で有意に高かった（35.6% vs 5.4%, p<0.001）。透析群における発症発現までの中央値は7日（IQR 5-21日）であり、1週間以内に出現する場合が多いが、1か月間は注意深い観察が望ましいと考えられた。また、投与後の最大カルシウム低下度に関連する因子をlinear regression modelで検討すると、短い透析歴、BAP高値、PINP高値、TRACP5b高値、炭酸カルシウム不使用、ステロイド使用が関連因子として挙げられた。多変量解析にて諸因子補正した後も、TRACP5b高値、$CaCO_3$不使用、ステロイド使用は有意な因子であった。

結語: デノスマブは透析患者においても保存期CKD患者や健常人と同等な骨密度改善効果を期待できるが、その35%がCa<8.5mg/dLの低カルシウム血症を経験した。また、TRACP5b高値、$CaCO_3$不使用、ステロイドを使用している患者は投与後のカルシウム低下を起こしやすいため、注意が必要と考えられた。

【目的】

慢性腎不全は骨粗鬆症および脆弱性骨折のハイリスク集団であることが明らかになっている。

骨粗鬆症治療における第一選択薬であるビスホスホネート製剤は腎排泄性薬剤であり腎不全患者では薬剤排泄速度の低下による蓄積が懸念される。完全ヒト型抗RANKL抗体のデノスマブ（プラリア®）は破骨細胞の機能調節に重要なRANKLを特異的に阻害する生物学的製剤で、骨吸収を抑制することで高い骨密度改善効果と骨折リスク低下が期待できる。腎不全患者に対する蓄積性も問題ないと考えられており[1)]、今後の腎不全患者に対する効果が期待されている。

近年我々は腎不全患者における同剤の短期有用性を報告し[2)]、更に透析患者の1年後の骨密度上昇効果はCKD患者や健常人と同等であることを報告してきた。しかし透析患者で経験する投与後の低カルシウム血症の頻度や予測因子は明らかでない。

今回、透析患者におけるデノスマブ投与後の低カルシウム血症の頻度、出現時期、予測因子の検討を目的とした。

【方法】

2013年以降に当科で骨粗鬆症治療目的にデノスマブを使用し、投与後少なくとも4週間以上経過が追えた患者を対象とした後ろ向き観察研究。

腹膜透析施行例、腎移植例、高度な高カルシウム血症を有する症例（cCa>12 mg/dL）は除外した。

透析群および非透析群に2群し、両群における治療開始前および1年後の腰椎・大腿骨・橈骨骨密度をDEXA法によって評価し、その年間変化率（%/year）を比較した。また治療開始時の年齢、性、CKD stage、透析歴などの患者情報、および経時的な血清Ca, P, ALP, iPTH, total P1NP, TRACP-5b, 骨型ALP、オステオカルシン、25OHビタミンDなどの検査データを集め、特に両群における投与後のカルシウム濃度変化や、骨代謝マーカーの推移を評価した。

低カルシウム血症はCommon Terminology Criteria for Adverse Events, version 4.0に基づき、アルブミン補正カルシウム値（cCa）8.5 mg/dL未満とした。低カルシウムイベントは、低カルシウム血症の発症またはカルシウム製剤またはビタミンD製剤の新規開始または増量と定義した。

連続変数の比較はMann-Whitney U-test、またはstudent's t testを、カテゴリー変数の比較はカイ二乗検定を用いた。デノスマブ投与開始から低カルシウム血症イベント発症までの期間をKaplan-Meier法, Log-rank testにて比較した。また投与後に血清カルシウムが≧1.5mg/dL低下、またはビタミンD増量やカルシウム製剤増量を行ったにもかかわらず≧1.0mg/dL低下した場合を投与後カルシウム低下と定義し、その多変量調整ハザード比を算出した。解析は全てStata Special Edition Version 14（Stata Inc., USA）を使用した。

【結果】

1. 患者背景

透析例121例、非透析例203例の合計324名が研究対象となった。両群の患者背景を**表1**に示す。平均年齢は透析群66.7±10.6歳、非透析群 71.2±10.9歳、透析群の透析歴中央値13年、非透析群のeGFR中央値は61 ml/min/1.73m^{2}であった。

表 1　患者背景

	HD（n=121）	Non-HD（n=203）	p-value
Age（y）	66.7±10.6	71.2±10.9	<0.001
Female sex（%）	60.30%	85.00%	<0.001
eGFR（ml/min）		61［43-74］	
CKD G1:2:3a:3b:4:5（%）		11:39:22:17:8:2	
Dialysis vintage（years）	13［5-22］	－	
Corrected Calcium	9.9±0.8	9.6±0.4	<0.01
Serum Phosphate	4.6±1.2	3.5±0.5	<0.001
Alkaline phosphatase（IU/L）	323±218	241±92	<0.001
BAP（μg/L）	19.6±12.4	14.4±6.4	<0.001
total P1NP（μg/L）	141［73-283］	41［24-65］	<0.001
Intact PTH（pg/mL）	132［56-217］	54［39-74］	<0.001
TRACP-5b（mU/dL）	496［299-797］	354［254-481］	<0.001
Bone Mineral Density（DEXA）			
Lumbar Spine（T score）	-2.12±1.59	-2.09±1.69	0.91
（BMD（g/cm^2））	0.79±0.19	0.76±0.33	0.41
Femoral Neck（T score）	-2.45±1.00	-2.36±1.17	0.46
（BMD（g/cm^2））	0.54±0.12	0.54±0.13	0.90
Distal Radius（T score）	-2.81±2.24	-2.54±2.27	0.40
（BMD（g/cm^2））	0.53±0.13	0.52±0.16	0.73

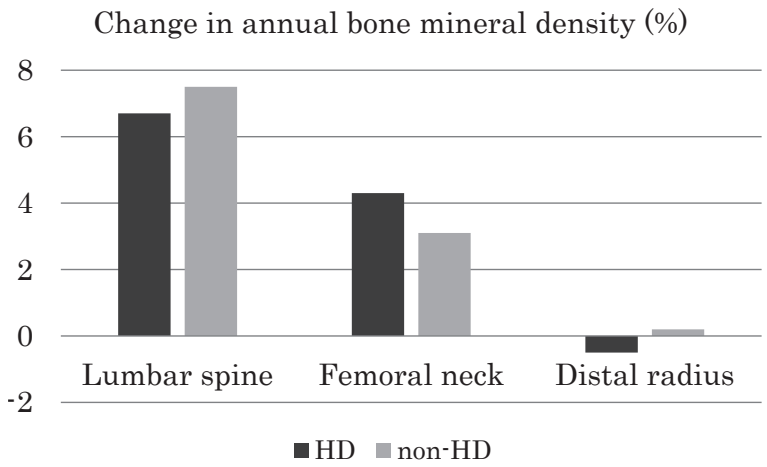
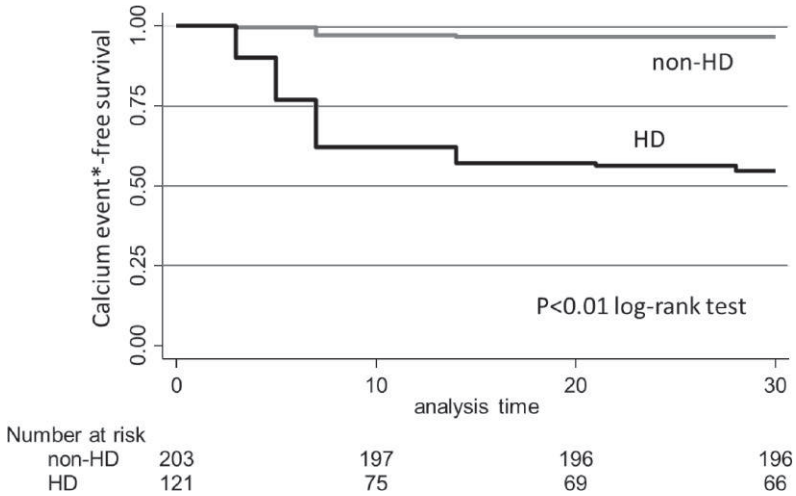


図１　透析群、非透析群における骨密度変化（%/year）の比較



低カルシウム血症イベント：血清補正カルシウム<8.5 mg/dLまたはカルシウム製剤・ビタミンD製剤の新規開始または増量

図２　透析群（HD）、非透析群（non-HD）における低カルシウム血症イベント

2．低カルシウム血症の頻度

デノスマブ投与後の低カルシウム血症（cCa<8.5mg/dl）は、透析群の43名（35%）、非透析群の11名（5%）に認め、有意に透析群で多かった（p<0.01）。またカルシウム製剤・ビタミンD製剤の新規開始または増量を含めた低Ca血症をアウトカムとすると、殆どの症例が投与開始後10日以内に低Ca血症を発症した（**図1**）。またCa低下イベント（投与前から1.5mg/dL以上の低下またはカルシウム製剤・ビタミンD増量後も1.0mg/dL以上の低下）に関するKaplan-Meier曲線を**図2**に示す。Cox比例ハザードモデルでは、多変量調整後もTRACP5b高値（HR 3.93［1.51, 10.24］）、$CaCO_3$未使用（HR 0.48［0.25, 0.94］）、ステロイド使用（HR 3.09［1.10, 8.66］）は有意な関連因子と考えられ

表２　透析患者におけるデノスマブ開始後のカルシウム低下*に関連する因子

		Univariate		Multivariate (Model 1)		Multivariate (Model 2)	
Variables		HR (95% CI)	p	HR (95% CI)	p	HR (95% CI)	p
Age (years)		1.01 (0.98, 1.04)	0.44			1.01 (0.97, 1.06)	0.53
Sex (female)		1.00 (0.58, 1.72)	0.99	0.46 (0.22, 0.95)	0.04	0.45 (0.18, 1.15)	0.1
Body mass index (kg/m2)		0.96 (0.88, 1.05)	0.38	0.94 (0.85, 1.04)	0.25	0.92 (0.81, 1.06)	0.24
Dialysis vintage (≦5years)	Q1	1.00		1.00		1.00	
(5.1-15 years)	Q2	0.96 (0.47, 1.92)	0.9	1.77 (0.74, 4.24)	0.2	2.77 (0.88, 8.74)	0.08
(15.1-22 years)	Q3	0.75 (0.38, 1.49)	0.41	0.76 (0.32, 1.83)	0.54	0.66 (0.20, 2.21)	0.5
(>22 years)	Q4	0.45 (0.19, 1.03)	0.06	0.53 (0.20, 1.44)	0.22	0.68 (0.17, 2.71)	0.58
tP1NP (μg/L) (≦62.52)	Q1	1.00				1.00	
(62.53-119.06)	Q2	1.06 (0.38, 2.93)	0.91			0.66 (0.15, 2.99)	0.59
(119.07-246.00)	Q3	1.53 (0.58, 4.04)	0.39			1.15 (0.27, 4.91)	0.86
(>246.00)	Q4	1.86 (0.73,4.73)	0.19			1.77 (0.41, 7.76)	0.45
Intact PTH (logarithmic)		1.17 (0.84, 1.63)	0.35			0.78 (0.50, 1.21)	0.27
TRACP5b (mU/dL) (M,≦305; F≦290)	Q1	1.00		1.00		1.00	
(M, 391.1-565; F, 290.1-487)	Q2	1.62 (0.60, 4.36)	0.34	2.36 (0.83, 6.73)	0.11	3.56 (1.01, 12.51)	0.048
(M, 565.1-904; F, 487.1-751)	Q3	1.46 (0.54, 3.92)	0.45	1.62 (0.59, 4.47)	0.35	2.24 (0.60, 8.42)	0.23
(M, >904; F,>751)	Q4	2.86 (1.16, 7.05)	0.02	3.93 (1.51, 10.24))	<0.01	3.86 (1.01, 14.83)	0.049
Active vitamin D		0.91 (0.36, 2.28)	0.84			0.91 (0.14, 5.79)	0.92
Calcium carbonate		0.50 (0.30, 0.86)	0.01	0.48 (0.25, 0.94)	0.03	0.49 (0.20, 1.20)	0.12
Bisphosphonate		0.68 (0.17, 2.81)	0.6			0.49 (0.20, 2.27)	0.34
Cinacalcet		0.97 (0.55, 1.68)	0.9			1.88 (0.65, 5.42)	0.25
Corticosteroid		2.07 (0.93, 4.57)	0.07	3.09 (1.10, 8.66)	0.03	5.22 (1.04, 26.30)	0.04

Abbreviations: HR, hazard ratio; CI, confidence interval; p, p-value; tP1NP, total procollagen type 1 amino-terminal propeptide; iPTH, intact parathyroid hormone; TRACP5b, titrate-resistant acid phosphatase 5b (sex specific: M, male; F, female).

*カルシウム低下：デノスマブ投与前に比べて血清カルシウム≧1.5mg/dL以上の低下、またはビタミンD・カルシウム製剤の増量を行うも≧1.0mg/dL以上の低下

Serum calcium was adjusted by serum albumin

Intact PTH was log-transformed.

Model 1, backward stepwise. Other variables were removed due to p>0.20.; model 2, full adjustment.

た（**表2**）。

【考察】

透析患者を含むCKD患者は骨折のハイリスク患者であるが、特に透析患者においては有効な確立した治療法は存在せず、その対策が急務であった。例えば通常の骨粗鬆症治療ガイドラインで推奨されているビスホスオネート製剤も透析患者での有用性は示されておらず、CKD患者を対象にしたメタ解析でも健常人のような効果は期待できないことが報告されている[3)]。抗RANKL抗体であるデノスマブは、透析患者においても健常人と同様な薬物動態を示し、その有効性が期待されている薬剤である。今回の我々の多数例の検討において、透析患者やCKD患者においても治験データと同等に優れた骨密度改善効果を有することが明らかになった。一方で、透析患者の場合、投与後に35％の症例で一過性の低カルシウム血症を認めること、最大カルシウム低下までの

期間の中央値は7日（IQR 5-21日）であること、更にデノスマブ開始時にTRACP5bが高い患者、$CaCO_3$未使用患者、ステロイド使用患者においてカルシウム低下リスクが有意に高いことが明らかとなった。

今後はこれらの患者背景に応じた低カルシウム血症を生じないための予防投薬指針の作成を検討していきたい。

今回の解析結果はScientific Reportsにacceptされた（Sci Rep 2020, in press）。

【文献】

1. Block GA, Bone HG, Fang L, Lee E, Padhi D: A single-dose study of denosumab in patients with various degrees of renal impairment. Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research 27: 1471-1479, 2012
2. Hiramatsu R, Ubara Y, Sawa N, et al.: Denosumab for Low Bone Mass in Hemodialysis Patients: A Noncontrolled Trial. Am J Kidney Dis 66: 175-177, 2015
3. Wilson LM, Rebholz CM, Jirru E, et al.: Benefits and Harms of Osteoporosis Medications in Patients With Chronic Kidney Disease: A Systematic Review and Meta-analysis. Ann Intern Med 166: 649-658, 2017

ANCA関連血管炎の病態形成に重要なNETosisと血小板のクロストークに関する分子機構の解明

松本 紘太郎
慶應義塾大学医学部リウマチ・膠原病内科

【要約】

抗好中球細胞質抗体（ANCA）関連血管炎（ANCA-associated vasculitis: AAV）は国により定められた指定難病で、本邦での患者数は約1万5千人とされる希少疾患である。本疾患は血管内皮細胞障害を伴う壊死性血管炎により、血管の閉塞や破綻、臓器障害を来たす全身性疾患で、病態形成機序の詳細が不明であることから著効を示す治療薬が存在しない。AAV患者末梢血では好中球が増加し、病理組織の検討では好中球細胞外トラップ（Neutrophil extracellular traps: NETosis）が関与する可能性が報告されている。我々は血小板がNETosis形成を誘導し、AAVの新規治療標的となると仮説した（**図1**）。患者検体を用いた*In vitro*の検討では、NETosis形成がAAV血小板由来の液性因子を介して誘導されること、血小板Toll様受容体（Toll-like receptor: TLR）シグナルを阻害することで抑制されることを明らかとし、血小板がAAVの治療標的となる可能性を示した。血管炎でのNETs誘導における血小板の役割を解明し、その中心的な役割を果たす分子を同定することができれば、今までにないアプローチの治療法が確立出来る可能性がある。今後、血管炎に特徴的な血小板分画あるいは血小板と好中球の相互作用機構を標的とした新規治療法が確立出来れば、重要な死因の1つとなっている強力な免疫抑制治療に関連した感染症を防ぐことが出来、さらなる予後の改善が期待される。

【背景】

Anti-neutrophil cytoplasmic antibody（ANCA）関連血管炎（ANCA-associated vasculitis: AAV）は、血管内皮細胞障害を伴う壊死性血管炎により、血管の閉塞や破綻、臓器障害を来たす全身性疾患で、病態形成機序の詳細が不明である。AAVでは、好中球細胞外トラップ形成（Neutrophil extracellular traps: NETosis）が病態に寄与する報告がある。細菌感染症ではToll様受容体（Toll like receptor: TLR）経路を介して刺激された血小板がNETosisを誘導できることが報告されているが[1)]、膠原病における血小板の役割は未だ解

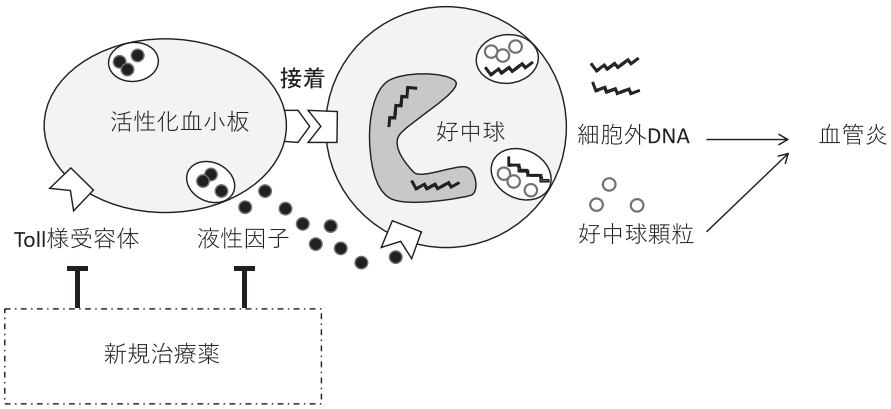


図 1　ANCA関連血管炎における血小板TLRを介したNETosis誘導

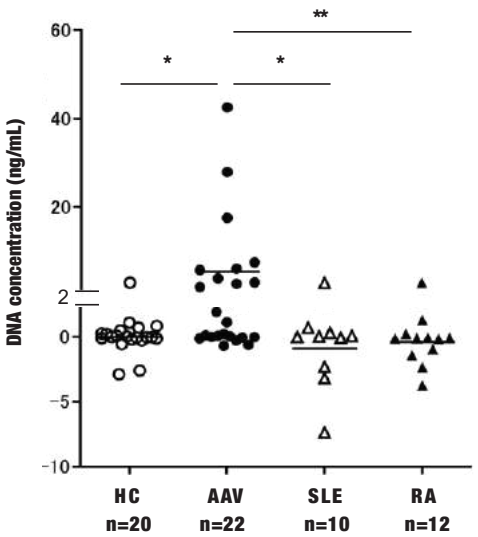


図２　血小板分画によるNETosis誘導の比較

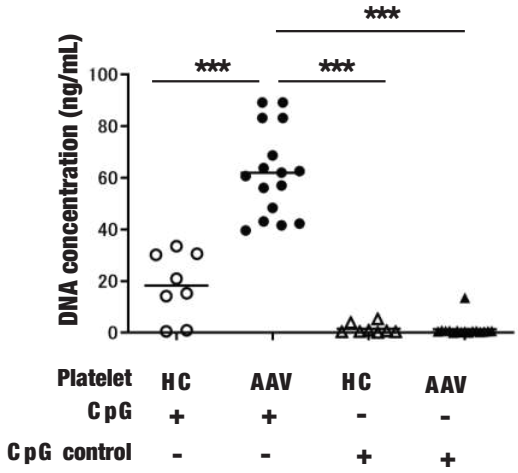


図３　血小板TLR９を介したNETosis誘導

明されていない問題が多い。血管炎についても、血管内の炎症や血栓症への血小板の関与が想定され、血小板由来のP-セレクチンやCD40リガンドが病勢と正の相関を示すという報告があり、血管炎の病態において血小板が役割をもつ可能性が示唆されてきた[2]。近年、北京大学の研究グループから、血小板が補体系を活性化したり[3]、マイクロパーティクルを放出し血栓形成を促進したりすることで[4] 血管炎の病態を増悪する可能性が報告されたが、血管炎の病態に直接関与する血小板の形質変化や、血管炎の病態の中心をなすと考えられている好中球との関連については検討されていない。本検討はNETosis誘導における血小板の役割を分子レベルで明らかとすることを目的とした。

【方法】

2017年8月～2020年1月に慶應義塾大学病院に通院しCHCC2012分類を満たすANCA関連血管炎患者（n = 22）および健常人（n = 20）を対象とする。血小板を末梢血好中球と共培養し、NETosis誘導に対する影響を検討した。NETosisは共焦点蛍光顕微鏡を用いて観察し、細胞外二本鎖DNAの蛍光強度を定量的に測定した。血小板に発現するTLRはFACS法で解析し、患者臨床情報と比較検討した。またTLRのリガンドにより血小板を刺激し、NETosis誘導への影響を共培養の系で検討した。

【結果】

AAV患者由来血小板は健常人および疾患コントロールと比較し有意にNETosisを誘導した（**図2**）。ボイデン・チャンバーを用いたトランスウェルアッセイでは、血小板の好中球への接着よりも、血小板由来の液性因子がNETsの誘導に関与した。血小板上のTLR9発現陽性率はAAVで健常人と比較して高値であったが、TLR2およびTLR4陽性率は健常人と差を認めなかった。血小板でのTLR9陽性率は肺病変を合併する患者で上昇し、血清KL-6と相関した。さらに、TLR9リガンドで刺激されたAAV由来血小板はNETosis誘導を増強した（**図3**）。

【考察】

我々は、血小板のTLR9シグナル伝達がNETosisを誘導し、AAVの発症に関与することを示した。TLR9の多型はAAVの発症に関連すること[5]、TLR9リガンドはMPO-ANCAによる血管炎モデルマウスの炎症を増強すること[6]、さらに、AAV患者の末梢Bリンパ球を介してANCA産生を促進すること[7] がこれまでに報告されている。血小板TLR9はNETosisに由来するDNAを認識することで[8]、NETosis誘導のポ

ジティブループを形成する可能性がある。我々はこれまでの検討結果に基づいて動物モデルを用いた検討を進行中である。このような取り組みは世界でも例がなく、アンメットメディカルニーズに応えることが可能となり社会的にも大きく貢献すると考えられる。

【文献】

1. Clark SR, Ma AC, Tavener SA, et al.: Platelet TLR4 activates neutrophil extracellular traps to ensnare bacteria in septic blood. Nat Med 13: 463-469, 2007
2. Tomasson G, Lavalley M, Tanriverdi K, et al.: Relationship between markers of platelet activation and inflammation with disease activity in Wegener's granulomatosis. J Rheumatol 38: 1048-1054, 2011
3. Miao D, Li DY, Chen M, Zhao MH: Platelets are activated in ANCA-associated vasculitis via thrombin-PARs pathway and can activate the alternative complement pathway. Arthritis Res Ther 19: 252, 2017
4. Miao D, Ma TT, Chen M, Zhao MH: Platelets release proinflammatory microparticles in anti-neutrophil cytoplasmic antibody-associated vasculitis. Rheumatology (Oxford) 2019; doi: 10.1093/rheumatology/kez044
5. Husmann CA, Holle JU, Moosig F, et al.: Genetics of toll like receptor 9 in ANCA associated vasculitis. Ann Rheum Dis 73: 890-896, 2014
6. Summers SA, Steinmetz OM, Gan PY, et al.: Toll-like receptor 2 induces Th17 myeloperoxidase autoimmunity while Toll-like receptor 9 drives Th1 autoimmunity in murine vasculitis. Arthritis Rheum 63: 1124-1135, 2011
7. Lepse N, Land J, Rutgers A, et al.: Toll-like receptor 9 activation enhances B cell activating factor and interleukin-21 induced anti-proteinase 3 autoantibody production *in vitro*. Rheumatology (Oxford) 55: 162-172, 2016
8. Lande R, Ganguly D, Facchinetti V, et al.: Neutrophils activate plasmacytoid dendritic cells by releasing self-DNA-peptide complexes in systemic lupus erythematosus. Sci Transl Med 3: 73ra19, 2011

【発表に関する事項】

1. 松本紘太郎、安岡秀剛、吉本桂子、鈴木勝也、竹内勤: ANCA関連血管炎における血小板Toll様受容体シグナルを介したNETosis誘導の分子機構解明. 日本骨免疫学会, 2019
2. Matsumoto K, Yasuoka H, Suzuki K, Takeuchi T: Platelet mediates neutrophil extracellular traps formation via TLR signaling in ANCA-associated vasculitis. Arthritis Rheumatol 71: suppl 10, 2019

骨代謝を制御する転写因子に着目した癌転移メカニズムの解明

松本　佳則
岡山大学大学院医歯薬学総合研究科腎・免疫・内分泌代謝内科学

【要約】
本研究では、骨代謝においてこれまでに我々が解明した蛋白相互作用に着目し、RUNX2のMMP産生を介した乳癌浸潤におけるメカニズムを分子生物学的に明らかにする。本研究結果からRUNX2はチロシンキナーゼなどに活性を制御され、乳癌浸潤に関わっている可能性が示唆された。これまで明らかにした*in vitro*での成果を基に、今後*in vivo*での意義についても明らかにしていく。

【目的】
乳癌は本邦における女性の癌罹患全体の約20%を占め、患者数は年々増加している。2016年現在、癌で死亡する女性の約9%（約14,000人）が乳癌であり、特に壮年女性層でその割合が高い。近年、実臨床には様々な乳癌に対する新規治療薬が登場しているが、その効果は十分でなく、未だ根治の難しい疾患である。根治を困難にしている最も大きな要因が脳、肺、リンパ節、肝臓、骨など様々な場所への転移であり、血行性遠隔転移の有無は患者の生命予後を決定する極めて重要な因子となる。転移は原発巣で増殖した癌細胞が脈管へと浸潤し、脈管内を移動した後に再び浸潤によって転移臓器へと移行する複雑な過程によって起こる。浸潤は癌転移において極めて重要な過程であり、癌細胞の移動を妨げている細胞外マトリックス（ECM: extracellular matrix）を癌細胞自身が産生する各種プロテアーゼやグリコシダーゼにより分解し、生じた隙間を移動することにより起こる現象で、マトリックスメタロプロテアーゼ（MMP）が中心的役割を演じている。MMPは金属イオン要求性蛋白分解酵素で、25種類以上が同定されており、転写因子により発現が調節されているが、その詳細は明らかでなく、MMP産生制御メカニズムの解明は、癌浸潤を抑制する新規治療の開発に寄与する大変重要なテーマである。

申請者はこれまで、癌増殖に関わるHippo経路の重要因子TAZの骨代謝における制御機構解明に努め、国内外で多くの成果を上げてきた。特に申請者が留学したトロント大学のProf. Robert Rottapel研究室では、アダプター蛋白3BP2に着目し、3BP2がチロシンキナーゼABLを活性化させ、ABLが下流の骨芽細胞必須転写因子RUNX2やその転写共役因子TAZのチロシンをリン酸化させることで、骨芽細胞分化を促進することを報告した[1)]。RUNX2は骨芽細胞分化だけでなく、MMPの転写を制御する転写因子として知られ、MMP産生を介して乳癌の浸潤を促進することが報告されている。そこで我々は、「RUNX2によるMMPの転写活性を骨代謝関連因子が制御しているのではないか?」と考えた。

【方法・結果】
RUNX2はMMPのプロモーターに結合して転写を促進し、MMPの発現上昇から乳癌の浸潤能を高める。そこで我々はHEK293T細胞を用いてRUNX2を強制発現させ、癌浸潤に重要なMMP2/9/13のmRNA発現を検討した結果、MMP13がRUNX2の主なターゲット遺伝子であることが明らかとなった。次に我々は293T細胞にRUNX2と共に骨代謝関連因子蛋白Aや蛋白Bを共発現させ、MMP13の発現を検討したところ、RUNX2によるMMP13の転写促進は蛋白Aや蛋白Bにより一段と増強された。更に我々は浸潤能の高いヒト乳癌細胞株MDA-MB231を用いて蛋白AやRUNX2をノックダウンし、MMP13の発現を検討したが、強制発現の結果に矛盾無く、蛋白A/RUNX2ノックダウン細胞ではMMP13の著しい発現低下が見られた。マトリゲルを用いたinvasionアッセイも行い、蛋白Aは活性依存的にRUNX2によるMMP13の転写を促進し、癌浸潤

を制御する可能性が示唆された。

【考察】

乳癌浸潤に関わるメカニズムの解明は、画期的な治療法の開発につながり、これまで臨床的に困難であった乳癌の克服に向けた大きな一歩となる。遠隔転移を伴うステージ4の進行性乳癌の5年生存率は約40％という厳しい現実があり、本研究の更なる遂行により闘病、痛みに苦しむ患者様の生活の質や生命予後の改善に貢献したいと考えている。

本研究は現在もongoingで進めており、これまで明らかにした*in vitro*での成果を基に、今後*in vivo*での意義についても詳細な解明を行いたい。

【文献】

1. Matsumoto Y, La Rose J, Kent OA, Wagner MJ, Narimatsu M, Levy AD, Omar MH, Tong J, Krieger JR, Riggs E, Storozhuk Y, Pasquale J, Ventura M, Yeganeh B, Post M, Moran MF, Grynpas MD, Wrana JL, Superti-Furga G, Koleske AJ, Pendergast AM, Rottapel R: Reciprocal stabilization of ABL and TAZ regulates osteoblastogenesis through transcription factor RUNX2. J Clin Inves 126: 4482-4496, 2016

糖尿病性網膜症の進展と末期腎症へのリスク：2型糖尿病症例の腎生検によるコホート研究

山内　真之、森　樹郎、星野　純一、木脇　圭一
藤井　丈士、大橋　健一[1]、乳原　善文
横浜市立大学附属病院病理診断科・病理部[1]

【要約】

糖尿病性腎症において、いくつかの腎病理所見が透析導入の独立した危険因子であることが報告されているが、腎生検は侵襲のある検査であり容易にはできないのが現状である。一方、糖尿病性網膜症の診断は侵襲の少ない眼底検査によって行われる。糖尿病性腎症も糖尿病性網膜症も同じ細小血管障害であり進展機序や進展速度が類似している可能性があり、糖尿病性網膜症が腎予後を予測できる可能性がある。そこで、腎不全合併2型糖尿病患者における糖尿病性網膜症の進展と末期腎症へのリスクとの関係を検討した。腎組織評価と網膜症評価が同時期に行われている2型糖尿病232症例のコホートを解析したところ、糖尿病性網膜症の重症度と腎組織の障害度に正の相関を認め、糖尿病性網膜症の重症度は腎予後とも関連を認めた。また、糖尿病性網膜症の重症度情報を追加することにより、臨床情報のみの腎予後予測能を有意に改善した。これらの結果より、糖尿病性網膜症の重症度は腎予後予測因子として有用である可能性が示唆された。

【目的】

糖尿病の細小血管合併症と知られる代表的なものに糖尿病性腎症と糖尿病性網膜症がある。糖尿病性腎症は、我が国のみならず世界でも透析（血液透析・腹膜透析）導入の原疾患の第一であり続けている[1－4]。どの患者が透析導入となるリスクが高いかを早期に予測できれば適切な医療資源を適切なタイミングで患者に提供でき腎予後（透析導入）を改善できる可能性がある。糖尿病性腎症において、いくつかの腎病理所見（分節性硬化や係蹄壁外細胞増殖など[5]）が透析導入の独立した危険因子であることが報告されているが、腎生検は侵襲のある検査であり容易にはできないのが現状である。一方、糖尿病性網膜症の診断は侵襲の少ない眼底検査によって行われる。糖尿病性腎症も糖尿病性網膜症も同じ細小血管障害であり進展機序や進展速度が類似している可能性があり、糖尿病性網膜症が腎予後を予測できる可能性がある。そこで、腎不全合併2型糖尿病患者における糖尿病性網膜症の進展と末期腎症へのリスクとの関係を検討した。

【方法】

（デザイン）後ろ向きコホート研究

（対象）1985年から2016年の観察期間に虎の門病院、虎の門病院分院で組織学的に糖尿病性腎臓病と診断され、同時期に網膜症の評価を受けていた2型糖尿病患者223名

（臨床評価項目）年齢、性別、BMI、糖尿病罹病期間、喫煙、降圧薬内服有無、血圧、HbA1c、中性脂肪、LDL、尿酸値、eGFR（推定糸球体濾過率）、UACR（尿中アルブミン量）など

（網膜および腎病理評価項目）

糖尿病性網膜症：糖尿病網膜症国際重症度分類

糖尿病性腎臓病：

RPS（Renal Pathology of Society）分類

間質・血管病変は日本糖尿病性腎症分類

（アウトカム）末期腎不全（血液透析、腹膜透析、腎移植、腎不全関連死）

（除外基準）他の腎症の合併、移植腎生検、観察期間<3ヶ月

（統計解析）

(1) Spearman相関係数を用いて、網膜症重症度と腎症重症度との関係を評価した。

(2) Kaplan-Meier法、単変量および多変量Cox回帰モデルを用いて、網膜症重症度と腎予後との関係を評価した。

(3) Global Chi-square、Akaike Information Criterion（AIC）、Bayesian Information Criterion（BIC）を用いて、臨床所見に対する網膜症重症度の腎予後予測能の付加価値を評価した。

【結果】

患者背景は 平均年齢59歳、男性8割、平均糖尿病罹病期間14年、平均HbA1c 7.3%、平均eGFR 40 ml/min、平均尿蛋白1.4 g/gCreであった。中央値3.2年の追跡期間において232名中、114名のアウトカムを認めた。網膜症重症度と腎症重症度とに正の相関を認めた（p<0.001）。単変量解析では累積5年、10年腎生存率は糖尿病

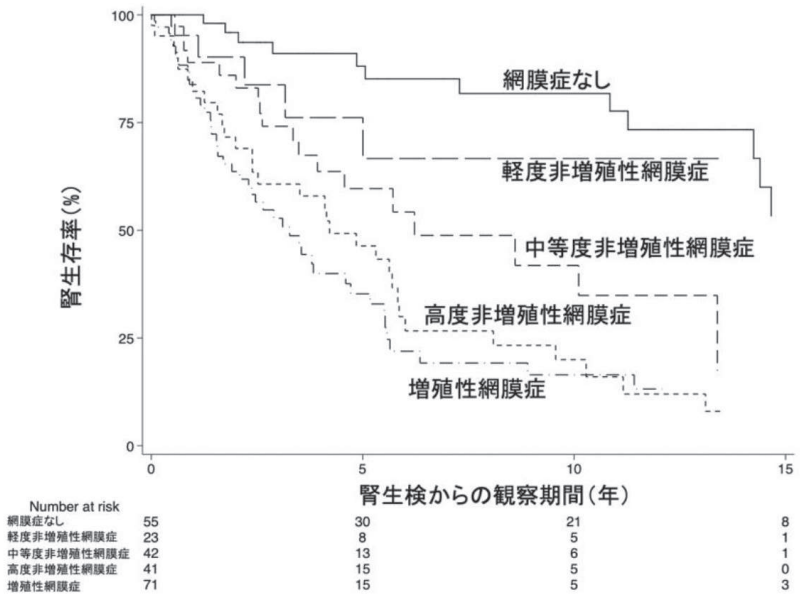


図 1

表 1

モデル	軽度非増殖性網膜症	中等度非増殖性網膜症	高度非増殖性網膜症	増殖性網膜症
1	1.35 (0.49-3.76) *P* =0.57	2.89 (1.42-5.86) *P* =0.003	5.00 (2.63-9.52) *P* <0.001	5.32 (2.89-9.78) *P* <0.001
2	1.53 (0.53-4.37) *P*=0.43	3.12 (1.49-6.58) *P* =0.003	6.15 (3.11-12.18) *P* <0.00 1	5.97 (3.20-11.14) *P* <0.00 1
3	1.96 (0.62-6.17) *P*=0.25	3.10 (1.45-6.65) *P* =0.004	3.03 (1.44-6.37) *P*=0.003	3.43 (1.68-7.03) *P* =0.001

モデル 1: 単解析
モデル 2: 多変量解析（年齢、性別、BMI、糖尿病罹病期間、収縮期血圧で調整）
モデル 3: 多変量解析（モデル 2 + HbA1c、中性脂肪、LDL、尿酸値、eGFR、UACRで調整）

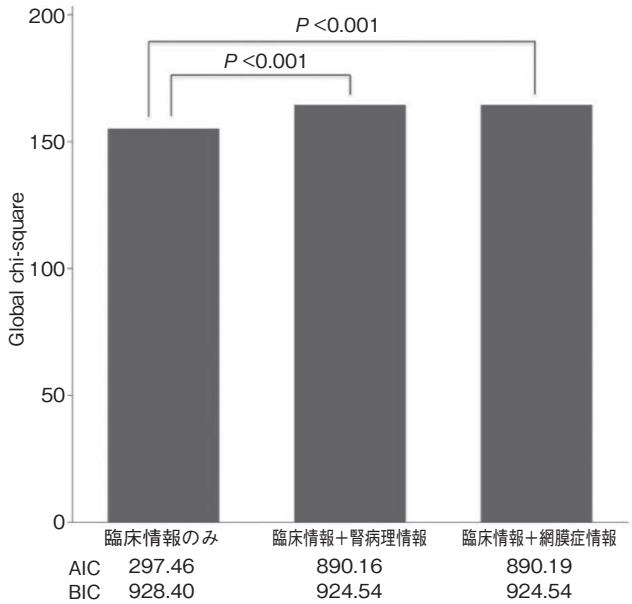


図 2

性網膜症の重症度が上がるにつれ低下していた（p <0.001）（**図1**）。糖尿病性網膜症重症度分類において重症度が高い群が腎予後を規定する独立因子であった（網膜症なし群を対照として、軽度非増殖性網膜症: HR 1.96（95%CI: 0.62-6.17）、中等度非増殖性網膜症: HR 3.10（95%CI 1.45-6.65）、高度非増殖性網膜症 3.03（95%CI 1.44-6.37）、増殖性網膜症 3.43（95%CI 1.68-7.03））（**表1**）。臨床情報への網膜症重症度の腎予後予測能の付加価値は有意な上昇を認め、臨床情報への腎組織情報の腎予後予測能の付加価値と同等であった（**図2**）。

【考察】

糖尿病の細小血管障害と知られる糖尿病性網膜症と腎症であるが、糖尿病性網膜症の進展は末期腎症の予測因子として有用である可能性が示唆された。

【文献】

1. Jha V, Garcia-Garcia G, Iseki K, Li Z, Naicker S, Plattner B, Saran R, Wang AY, Yang CW: Chronic kidney disease: global dimension and perspectives. Lancet 20: 260-272, 2013
2. United States Renal Data System. 2016 USRDS annual data report: Epidemiology of kidney disease in the United States. National Institutes of Health, National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases, Bethesda, MD, 2016
3. ERA-EDTA Registry: ERA-EDTA Registry Annual Report 2015. Academic Medical Center, Department of Medical Informatics, Amsterdam, the Netherlands, 2017
4. Japanese Society for Dialysis Therapy Renal Data Registry. Annual Report 2014, JSDT Renal Data Registry（JRDR）. Renal Replacement Therapy 3: 18. doi: 10.1186/s41100-017-0097-8
5. Mottl AK, Gasim A, Schober FP, Hu Y, Dunnon AK, Hogan SL, Jennette JC: Segmental sclerosis and extracapillary hypercellularity predict diabetic ESRD. J Am Soc Nephrol 29: 694-703, 2018

（8）精神疾患

メランコリア（内因性うつ病）の症状学的特徴に関する多施設共同研究
－尺度開発と信頼性・妥当性の検討－

玉田　有[1]、井上　猛[1]、関根　篤[2]、戸田　裕之[3]
武島　稔[1,4]、佐々木 雅明、大前　晋
東京医科大学精神医学分野[1]
慧眞会ケイメンタルクリニック[2]
防衛医科大学校精神科学講座[3]、柴田病院[4]

【要約】
メランコリアの評価尺度を開発するために、大うつ病性障害（DSM-5）の患者群から症状学的特徴に関するデータを広汎に収集し、因子分析、信頼性分析をおこなった。24項目6因子が抽出され、一定の基準関連妥当性、内的整合性が示された。

【目的】
DSM-5[1)]が規定する「大うつ病性障害」が不均質な病態の集合であるという見解が広まるにしたがって、メランコリア（内因性うつ病）概念が再評価されている[2)]。しかし、メランコリアは診断基準が確立されておらず、どのように診断すればよいのか不明な点が多い。本研究の目的は、メランコリアの症状学的特徴を実証的に検証し、尺度を開発することである。

【方法】
伝統的精神病理学の知見を含む広汎な文献調査などからメランコリアと非メランコリアの特徴をそれぞれ収集し、38項目からなる調査項目を作成した。対象は、2018年1月～同年11月の期間に虎の門病院、虎の門病院分院、防衛医科大学病院、柴田病院、ケイメンタルクリニックの5施設を受診した大うつ病性障害の患者88例（男45: 女43、平均年齢50.4±12.7歳）である。精神科医が調査項目を用いて評価した結果を、因子分析、信頼性分析で解析した。またDSM-5のメランコリア基準、CORE尺度[3,4)]を外的基準として妥当性の検証をおこなった。本研究は虎の門病院研究倫理審査委員会の承認を得て実施した。

【結果】
探索的因子分析の結果、24項目6因子が抽出された。各因子は、1)「誘因なし・当惑・日内変動」、2)「気分の非反応性・真面目な人」、3)「貧困･心気妄想」、4)「身体的異常感覚」、5)「制止」、6)「過呼吸・動悸」であった。第6因子は非メランコリアの特徴と考えられた。これら6つの下位尺度の信頼性をクロンバックのα係数で評価したところ、それぞれ0.657, 0.620, 0.791, 0.626, 0.529, 0.619であった。また、24項目の合計得点と、DSM-5およびCORE尺度との間で正の相関関係がみられた。

【考察】
メランコリアの特徴は、5つの潜在的な構成概念をもつことが示唆された。24項目のメランコリア尺度（MJ尺度）の基準関連妥当性は示されたといえる。一定の内的整合性についても示されたが、信頼性が高くない下位尺度については、項目数が少ない影響などが考えられ、今後の課題である。今後はさらに症例数を増やすとともに、共分散構造分析をおこない、因子モデルの適合度を検証する予定である。

【文献】
1. American Psychiatric Association: Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders: Diagnostic and Statistical Manual of

Mental Disorders, Fifth Edition. Arlington, VA: American Psychiatric Association, 2013
2. Bolwig TG, Shorter E: Melancholia: Beyond DSM, Beyond Neurotransmitters. Proceedings of a conference, May 2006, Copenhagen, Denmark. Acta Psychiatr Scand Suppl 433: 4-183, 2007
3. Parker G, Hadzi-Pavlovic D: Melancholia: A Disorder of Movement and Mood: A Phenomenological and Neurobiological Review. Cambridge University Press, Cambridge, 1996
4. 玉田有、井上猛、大前晋: 精神運動障害によるメランコリア（内因性うつ病）の鑑別－日本語版CORE尺度の紹介. 精神医学 61: 971-981, 2019

【発表に関する事項】

1. 玉田有、井上猛、関根篤ほか: メランコリア（内因性うつ病）の症状学的特徴に関する多施設共同研究－尺度開発と信頼性・妥当性の検討－. 第115回日本精神神経学会学術総会（新潟）, 2019年6月
2. 玉田有、井上猛、関根篤ほか: 日本語版CORE尺度の作成と信頼性および妥当性の検討. 第16回日本うつ病学会総会（徳島）, 2019年7月
3. 玉田有、井上猛、大前晋: 精神運動障害によるメランコリア（内因性うつ病）の鑑別－日本語版CORE尺度の紹介. 精神医学 61: 971-981, 2019
4. Tamada Y, Inoue T, Sekine A, et al.: Characteristics of affective temperaments and neuroticism in melancholic depression: a case-control study. 10th Conference of the International Society for Affective Disorders（London）, Nov. 2019

依存症克服に向けた新しい治療戦略

中山　高宏
杏林大学医学部病態生理学教室

【要約】

我が国において多くの罹患者を抱える依存症は、中脳報酬系のドーパミン神経亢進によって引き起こされ、その機能阻害により症状が緩和されることが知られている。我々はこれまでに、神経モノアミン伝達に関わるsyntaxin 1A（*stx1A*）遺伝子の発現量低下が、中脳ドーパミン分泌抑制を引き起こすと共に、その発現はヒストンアセチル化酵素KAT3により神経特異的に促進性の発現制御がなされていることを発見してきた。そこで本研究では、脳における*stx1A*の高発現を決定しているKAT3の阻害剤に着目し、脳内*stx1A*発現抑制によるドーパミン分泌低下と依存症状の改善効果の関連を検証することを目的とした研究を行った。その結果、KAT3阻害剤クルクミンをアルコール依存マウスに投与したところ、脳内*stx1A*発現量及びドーパミン合成・分泌量が減少し、アルコール嗜好性が有意に低下する現象を発見した。更に*stx1A*ノックアウトによりアルコール・ニコチン依存の症状を示し難くなる現象を見い出してきた。これらの結果は、KAT3阻害剤による脳内*stx1A*発現量の低下が、中脳ドーパミン分泌量の低下と共に依存症状の回復をもたらしていることを示しており、依存症に対する新たな治療法確立への道が拓かれる可能性を示唆している。

【背景・目的】

我が国において多くの罹患者を抱える、アルコール・ニコチン・ギャンブル・薬物等による依存症は、中脳辺縁ドーパミン神経の報酬系亢進によって引き起こされ、ドーパミン機能の阻害により症状が緩和されることが知られている[1)]。これら依存症の薬物療法として現在までに認可されている治療薬は病原部位である報酬系を標的としておらず、必ずしも十分な治療効果が得られていないことからも、報酬系への直接的な作用機序を有する代替療法の開発が望まれている現状にある。我々はこれまでに、神経モノアミン伝達に関わるsyntaxin1A（*stx1A*）遺伝子の発現量低下が、中脳辺縁系におけるドーパミン分泌抑制を引き起こす[2)]と共に、その発現は神経細胞におけるKAT3ヒストンアセチル化酵素による促進によって神経細胞・組織特異的に発現制御されていることを発見してきた[3, 4)]。興味深いことに、ドーパミン合成の律速酵素であるチロシン水酸化酵素（TH）も*stx1A*と同じくKAT3による促進性の制御を受けていることが知られている[5)]。従って本計画では、中脳辺縁神経細胞において*stx1A*、TH遺伝子の発現誘導を決定しているKAT3の阻害剤であり香辛料の有効成分として知られるクルクミンに着目し、マウス生体内投与により脳内*stx1A*、TH発現量を抑制可能であることを明らかにし、ドーパミン合成・分泌阻害によるアルコール・ニコチン依存症状に対する抑制効果を検証することを目的とした研究を行った。

【方法】

(1) KAT3阻害剤による脳内*stx1A*機能の抑制効果の検証

KAT3阻害剤であるクルクミンの生物学的利用能とBBB透過性を向上させた配糖体を合成し、野生型マウスへの投与により、神経細胞内の*stx1A*発現量と脳内ドーパミン合成・分泌機能が低下するか否かの検証を行った。投与法はマウスに対して1週間の慢性腹腔内投与を行い、脳における*stx1A*発現量の低下とECD液体クロマトグラフィ解析による脳内ドーパミン濃度と分泌後代謝物HVAとの比率を求めることによるドーパミン合成・分泌機能の低下を指標に投与計画を決定した[6)]。

(2) 依存症に対するKAT3阻害剤の効果の検証

先ず8-12週齢の野生型マウスをアルコール自由飲水条件下にて依存状態に陥らせたモデルマウスを作製した。これらをコントロール群と薬剤投与群の2群に分け、1週間のKAT阻害剤の腹腔内投与を行った時のアルコール消費量変化から嗜好性の低下を算出した[1)]。またニコチン依存に対する効果を検証する為、1mg/kgニコチンによる場所嗜好性（CPP）試験を行い、ニコチン嗜好性に及ぼす効果を算出した[7)]。ノックアウトマウスを用いた解析では、8週齢の野生型マウスとの比較のもと、アルコール・ニコチン依存に対する嗜好性の比較を行い、*stx1A*の依存症に対する効果を検証した。

【結果】

その結果、KAT3阻害剤であるクルクミン配糖体を野生型マウスに対して1週間の慢性腹腔内投与を行ったところ、脳内における*stx1A*タンパク質発現量が低下することを見出した。次に、効果が認められた1週間のクルクミン配糖体の投与により*stx1A*の神経機能である中脳ドーパミン分泌機能の変化を調べるためにECD-HPLC解析を行ったところ、ドーパミン分泌量と共にドーパミン合成量が顕著に低下していることが明らかになった。この結果はクルクミン配糖体投与による*stx1A*発現量の低下により、その神経機能である伝達物質の開口放出機能が抑制されたことを意味しており、ドーパミン合成量の低下はカテコルアミン合成の律速酵素であるチロシン水酸化酵素（TH）の発現抑制によりもたらされた効果であることが示唆された[5)]。そこで、アルコール自由飲水条件下にてアルコール依存に陥らせた依存症モデルマウスを作製し、クルクミン配糖体を投与したところ、アルコール嗜好性と消費量共に有意に低下する現象を見い出してきた。この結果を受けて、クルクミン配糖体と同様にKAT3の阻害剤であるアナカルジン酸配糖体についても同様の解析を行ったところ、*stx1A*の抑制効果を通じたアルコール依存症状に対する抑制効果が存在することが示された。その一方で、KAT3と同様にヒストンアセチル化酵素として知られているKAT2に対する阻害剤であるギンコール酸を依存症モデルマウスに投与したところ、アルコール嗜好性と消費量共に有意な変化を示さなかった。これらの結果から、クルクミンによるアルコール依存に対する抑制効果はヒストンアセチル化酵素KAT3を介した効果である可能性が示唆された。更に我々は、*stx1A*ノックアウトマウスを用いて、アルコール依存症ならびにニコチン依存症に対する効果を検討した。その結果、*stx1A*ノックアウトによりいずれの依存症においても症状を示し難くなる現象を見い出してきた。

【考察】

我々によるこれらの結果は、中脳ドーパミン小胞分泌機能において中心的な働きを担っている*stx1A*遺伝子が、アルコールやニコチンによる依存症の発症において重要な役割を果たしていることを示唆しており、KAT3阻害剤による中脳*Stx1A*, TH発現抑制を介したドーパミン合成・分泌量の低下が、アルコール依存ならびにニコチン依存症状の緩和に効果的であることを示している。今後の展開として、発症機序を同じくする薬物・ギャンブル依存症における効果も検証してゆく予定であり、目下これら実験の為の準備を行っているところである。

【文献】

1. El-Ghundi M, George SR, Drago J, Fletcher PJ, Fan T, Nguyen T, Liu C, Sibley DR, Westphal H, O'Dowd BF: Disruption of dopamine D1 receptor gene expression attenuates alcohol-seeking behavior. Eur J Pharmacol 353: 149-158, 1998
2. Mishima T, Fujiwara T, Kofuji T, Akagawa K: Impairment of catecholamine systems during induction of long-term potentiation at hippocampal CA1 synapses in HPC-1/syntaxin 1A knock-out mice. J Neurosci 32: 381-389, 2012
3. Nakayama T, Mikoshiba K, Akagawa K: The cell- and tissue-specific transcription mechanism of the TATA-less syntaxin 1A gene. FASEB J 30: 525-543, 2016
4. Nakayama T, Akagawa K: Transcription regulation mechanism of the syntaxin 1A

gene via protein kinase A. Biochem J 474: 2465-2473, 2017
5. Lim J, Yang C, Hong SJ, Kim KS: Regulation of tyrosine hydroxylase gene transcription by the cAMP-signaling pathway: involvement of multiple transcription factors. Mol Cell Biochem 212: 51-60, 2000
6. Fujiwara T, Kofuji T, Akagawa K: Dysfunction of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in STX1A knockout mice. J Neuroendocrinol 23: 1222-1230, 2011
7. Harenza JL, Muldoon PP, De Biasi M, Damaj MI, Miles MF: Genetic variation within the Chrna7 gene modulates nicotine reward-like phenotypes in mice. Genes Brain Behav 13: 213-225, 2014

痤瘡の内容物および脂腺細胞を用いた、痤瘡に対する精神的ストレスの影響の解析

水野　晃治[1]、坂上　弘明[1]、林　伸和、佐藤　隆[1]
東京薬科大学薬学部生化学教室[1]

【要約】

心理的ストレスにより生じる自律神経の乱れは交感神経の亢進を促し、尋常性痤瘡（痤瘡）などの皮膚疾患に関与すると考えられる。しかし、皮膚局所における神経伝達物質の発現と心理的ストレスとの関連性については十分に理解されていない。本研究は、精神的ストレスによる皮膚局所におけるカテコールアミン量の変動と痤瘡病態との相関性を明らかにすることを目的とした。痤瘡患者の唾液および面皰内容物を採取し、生化学的ストレス指標として唾液中のαアミラーゼ活性を測定した。また、患者のストレスの程度を評価するために、状態－特性不安尺度（State-Trait Anxiety Inventory: STAI）を実施した。さらに、面皰内容物中のカテコールアミンを液体クロマトグラフィー質量分析法にて解析した。また、ヒト脂腺細胞代替モデルであるハムスター脂腺細胞を用いて、脂腺細胞に対する皮脂産生に対するカテコールアミンの影響を検討した。低不安状態の患者と比較し高不安状態において、面皰から採取した内容物のノルアドレナリンの代謝物であるノルメタネフリンの濃度は有意に高値を示した。また、ヒト皮脂腺代替モデルであるハムスター脂腺細胞において、ノルアドレナリンは、脂腺細胞における脂肪滴形成の促進およびTG産生量の増加作用を示した。本研究成果より、ストレスにより毛包内に分泌されたノルアドレナリンは、脂腺細胞における脂質産生の増加を引き起こし、痤瘡発症を促進する可能性が考えられる。

【目的】

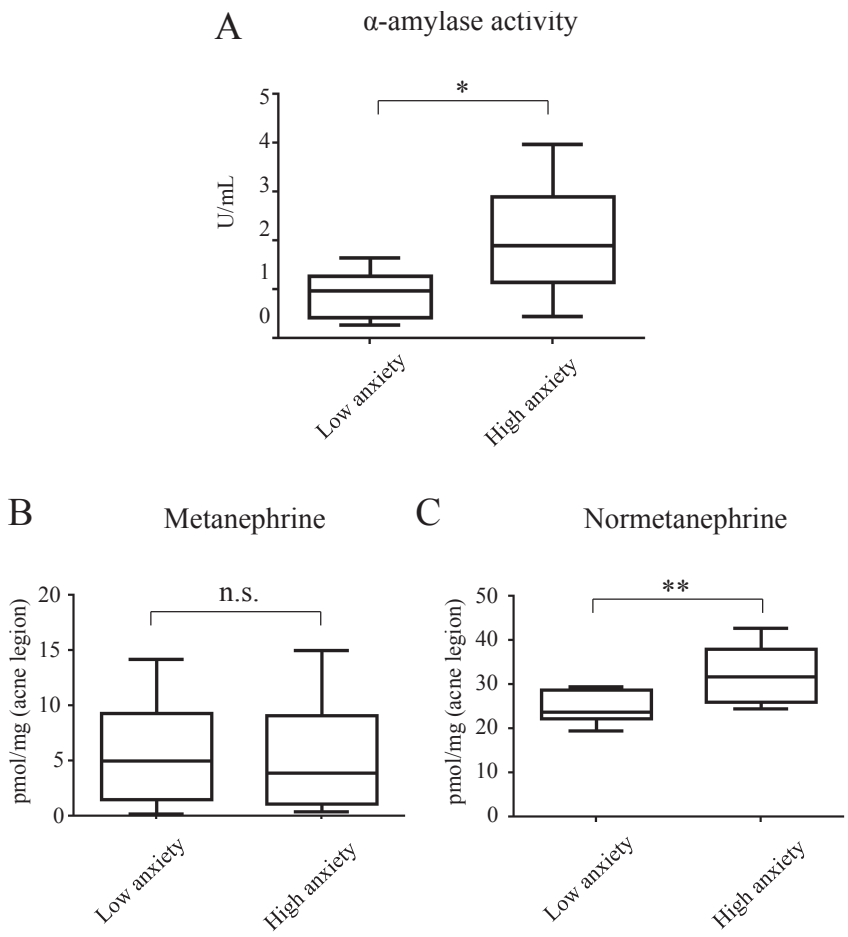
皮脂は、皮脂腺より分泌され、皮表に被膜を形成し、体外への水分蒸散の抑制、皮表での細菌増殖の抑制などの生体バリア機能を担っている。また、過剰な皮脂の産生は*Cutibacterium acnes*（*C. acnes*: 旧称*Propionibacterium acnes*）の増殖を促し、痤瘡の発症に関わると考えられている。したがって、皮脂産生調節機構を明らかにすることは、皮膚バリア機能の保持及び痤瘡の予防・治療薬の開発に寄与するものと考えられる。

一方で、現代のストレス社会において精神疾患の罹患率が増加し、自律神経の失調を見ることも少なくない。ストレスによって生じる自律神経の乱れは、交感神経の高進を促し、痤瘡発症の一因になると考えられているが、神経伝達物質と痤瘡との関連性については十分に理解されていない。近年、皮脂産生細胞である脂腺細胞において、神経伝達物質であるアセチルコリンが皮脂産生を誘導することが報告されている[1)]。したがって、神経伝達物質が皮脂腺の機能調節に関わっており、様々なストレスによる自律神経の乱れが痤瘡発症を引き起こす可能性が考えられる。

本研究では、精神的ストレスによる皮膚局所におけるカテコールアミン量の変動と痤瘡病態との相関性を明らかにすることを目的とした。

【方法】

痤瘡により虎の門病院に来院した15歳から30歳の患者に対し、状態－特性不安尺度（State-Trait Anxiety Inventory: STAI）を用いて、ストレス度を評価した。また、唾液を採取し、唾液中のαアミラーゼおよびコルチゾールをストレスの生化学マーカーとして測定した。また、痤瘡部位より圧出した痤瘡内容物を採取し、痤瘡内容物に含まれるカテコールアミン量を質量分析法（LC/MS）により定量した。ストレススコアの低い群と高い群間における毛包内容物に含まれるカテコールアミン濃度、唾液中のαアミラーゼ活性及びコルチゾール濃度をそれぞれMann-Whitney検定により順位相関分析を行った。また、



* and **, significantly different from Low anxiety ($p<0.05$ and 0.01, respectively).

図１　低不安状態および抗不安状態における唾液αアミラーゼ活性と面皰内カテコールアミン濃度の相関性

ヒト脂腺細胞代替モデルであるハムスター脂腺細胞を用いて、脂腺細胞に対する皮脂産生に対するカテコールアミンの影響を検討した。皮脂産生量は、皮脂の主成分であるトリアシルグリセロール（TG）量を指標とした。また、皮脂産生量の細胞数による影響を補正するため、DNA量に対するTG量を皮脂産生量として評価し、Fisher's PLSD検定により解析した。なお、本研究は虎の門病院研究倫理審査委員会の承認をうけ、自由意思に基づく文書同意を得て、ヘルシンキ宣言に基づき実施した。脂腺細胞を得るための動物実験は、東京薬科大学動物倫理委員会の承認を得て行った。

【結果】

痤瘡患者18人を、低不安状態の患者（STAIにおいて状態不安のスコア44以下）6人と、高不安状態の患者（同スコア45以上）12人の2群に分けると、唾液中αアミラーゼ活性は高不安状態の患者において有意に高かった（**図1A**）。また、面皰内容物からはアドレナリンとノルアドレナリンの代謝物であるメタネフリンおよびノルメタネフリンが検出された。さらに、面皰内メタネフリンの濃度は両群で同程度であったが（**図1B**）、ノルメタネフリンの濃度は、低不安状態と比較し、高不安状態において有意に高値を示した（**図1C**）。

一方、ヒト皮脂腺代替モデルであるハムスタ

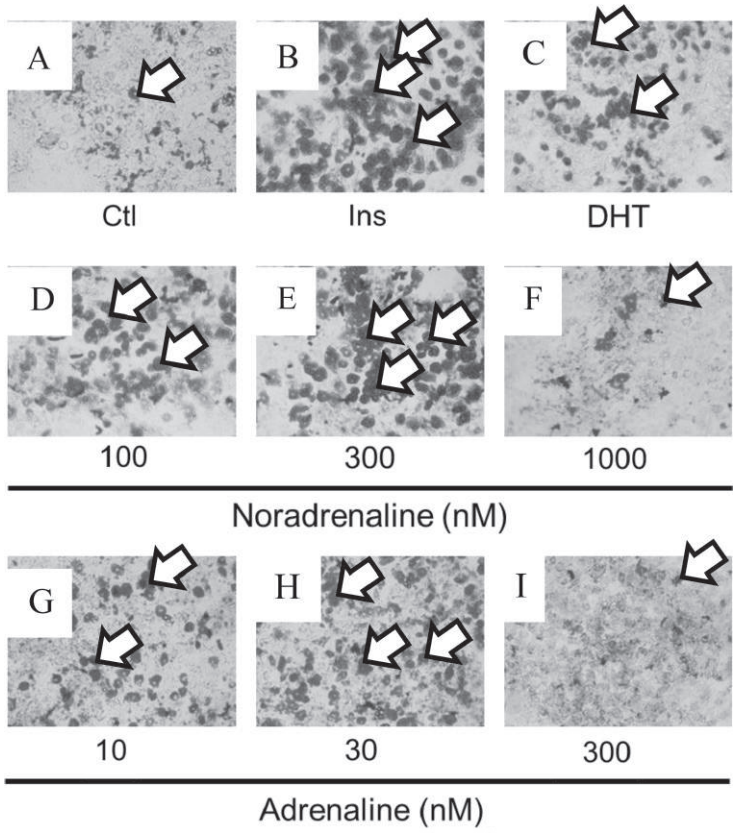
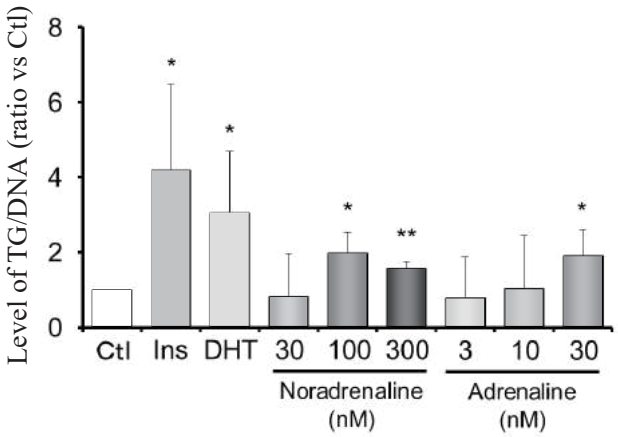


図２　ハムスター脂腺細胞におけるカテコールアミンの脂肪滴形成に対する影響

ー脂腺細胞において、アドレナリン10nMおよび30nMの処理は、脂肪滴の形成を促進した（**図2G、H**）。また、アドレナリン30nMの処理は、TG産生量も増加した（**図3**）。また、ハムスター脂腺細胞においてノルアドレナリン100nMおよび300nMの処理は、**図2**の矢印で示したように脂肪滴の形成を促進し（**図2D、E**）、有意にTG産生量も増加した（**図3**）。

【考察】

本研究は、ストレスとストレスホルモンであるカテコールアミンとの痤瘡の発症および重症度に対する相関性を明らかにするために行った。ストレス度は、STAIを用いて評価し、ストレス時に血中において高値となるカテコールアミンの面皰内濃度を解析した。痤瘡患者のストレス状態（STAIスコア）に依存して唾液中αアミラーゼ活性は増加していた。αアミラーゼは、ストレス時に分泌されたノルアドレナリンにより唾液腺が刺激されることにより分泌されることが報告されており[2,3]、ストレスの指標として用いられている。従って、本研究のSTAIスコアはストレス状態を反映しているものと考えられる。また、STAI添付文書に従い、スコア44点以下を低不安状態、スコア45点以上を高不安状態と定義し、低不安状態および高不安状態における面皰内カテコールアミン濃度の比較検討を行った。面皰内容物においてアドレナリンおよびノルアドレナリンは検出することが出来なかった。しかしながら、面皰内容物においてその代謝物であるメタネフリンおよびノルメタネフリンが検出された。また、低不安状態および高不安状態における面皰内容物に含まれるメタネフリン濃度は同程度であったが、高不安状態における面皰内ノルメタネフリンの濃度は、低不安状態に比して有意に増加してい



* and **, significantly different from the untreated cells (Ctl)
($p<0.05$ and 0.01, respectively).

図３　ハムスター脂腺細胞におけるカテコールアミンのトリアシルグリセロール産生量に対する影響

た。生体内においてアドレナリンおよびノルアドレナリンは、カテコール-O-メチルトランスフェラーゼ（COMT）により直ちにメタネフリンおよびノルメタネフリンに代謝される[4]ことから、面皰内に検出されたメタネフリンおよびノルメタネフリンは、毛包内に存在したアドレナリンおよびノルアドレナリンから代謝されたものであると推測される。ストレス負荷時に、交感神経興奮により分泌されたノルアドレナリンが唾液腺よりアミラーゼの分泌を促進する[2,3]ように、毛包内においても神経終末よりカテコールアミンが分泌され、痤瘡の発症および重症度に関与する可能性が考えられる。そこで、*C. acnes* の栄養となる脂質に着目し、脂腺細胞に対するアドレナリンおよびノルアドレナリンのTG産生に対する影響を検討した。アドレナリンおよびノルアドレナリンが、脂腺細胞における脂肪滴形成の促進およびTG産生量の増加作用を示したことから、面皰内すなわち毛包内に分泌されたカテコールアミンは痤瘡発症に関与する可能性が示唆された。一方、アドレナリンおよびノルアドレナリンの代謝物であるメタネフリンおよびノルメタネフリンの脂腺細胞への影響は、未だ明らかとされていない。これら代謝物の脂腺細胞に対する影響は今後の検討課題である。

本研究成果より、ストレスにより毛包内に分泌されたノルアドレナリンは、脂腺細胞における脂肪滴形成ならびにTG産生量の増加を引き起こし、痤瘡発症を促進する可能性が考えられる。

【文献】

1. Li ZJ, et al.: Regulation of lipid production by acetylcholine signalling in human sebaceous glands. J Dermatol Sci 72: 116-122. 2013
2. Stegeren AH, et al.: Salivary alpha amylase and cortisol responses to different stress tasks: impact of sex. Int J Psychophysiol 69: 33-40, 2008
3. Chatterton RT Jr., et al.: Extraneuronal metabolism of endogenous and exogenous norepinephrine and epinephrine in rats. Clin. Physiol. J Pharmacol Exp Ther 266: 288-293, 1993
4. Lenders JW, et al.: Salivary alpha-amylase as a measure of endogenous adrenergic activity. Clin Physiol 16: 433-448, 1996

（9）消化器外科疾患

食道癌に対する化学療法（ドセタキセル＋シスプラチン＋5-フルオロウラシル）後の発熱性好中球減少症に対するペグフィルグラスチムの一次予防効果の検討

大倉　遊、上野　正紀、宇田川 晴司

【要約】

目的: 進行食道癌に対する化学療法として、ドセタキセル、シスプラチン、5-フルオロウラシルを併用した強力なDCF療法は、有効性が高いとされている。しかし、高率に発熱性好中球減少症（FN）や血液毒性を生じることが問題視されている。血液疾患等他の分野においてFNを予防する目的でのペグフィルグラスチムの有効性が示されているものの、食道癌DCF療法に対するペグフィルグラスチムの有効性はいまだ確立されていない。そこで今回、当院でのペグフィルグラスチムの使用例を解析し、DCF療法における有効性を検討した。

方法: 2011年1月から2018年12月まで当院での食道癌患者937例中、食道癌初期治療としてDCF療法を施行した92例を対象とした。FNを引き起こすリスク因子および一次予防投与としてのペグフィルグラスチムの有効性について検討した。

結果: まずDCF療法ではCTCAE grade3以上の副作用が45人（48.9%）に生じ、そのうち、FNは20人（21.7%）に生じた。FNの発生リスク因子として、一次予防投与としてのペグフィルグラスチムを使用しないこと（オッズ比＝16.393; 95%信頼区間: 2.049-125.0）が独立した因子であった。ペグフィルグラスチムを使用した群は、使用しなかった群と比較し、好中球減少症の発生リスクも有意に低かった（9.1% vs 61.0%; p＜0.001）。FNの発生率も使用群3.0%と非使用群の32.2%と比較し有意に低かった（p＝0.001）。 さらにCTCAE grade3以上の全合併症においても使用群で有意に低かった（12.1% vs 69.5%; p＜0.001）。次コースのDCF療法の減量/中止した症例は、使用群6.1%と非使用群30.5%と比較し有意に低かった（p＝0.006）。

結語: 本研究ではペグフィルグラスチムを使用しないことがFNのリスク因子であった。食道癌に対するDCF療法を行なう患者に対して、ペグフィルグラスチムを一次予防投与することで、重篤な好中球減少やFNを予防することにつながることが確認された。

【目的】

食道癌は消化器癌の中で最も悪性度の高い癌の一つである。化学放射線療法や化学療法の有効性が示されてから、食道がんの治療法として広く用いられている。また、術前化学療法の有効性についても報告されており、とくに本邦における標準治療のひとつとなっている。現在、臨床病期Ⅱ/Ⅲ食道癌に対する標準治療は術前補助化学療法（シスプラチン＋5-FU: CF療法）＋根治手術である[1)]。術前CF療法のcT1-2での5年生存割合は79%と良好であったのに対し、cT3では47%と不良で、より進行した症例に対する効果は不十分な結果であったため、より強力な術前治療が望まれている[1)]。そこで近年では進行食道癌に対し、より強力な化学療法のレジメンのDCF療法（ドセタキセル+CF療法）を施行した報告が増えてきており、その高い奏効割合が注目されている。こうした背景から、標準治療である術前CF療法に対する、術前DCF療法と術前CF化学放射線療法の優越性を検証するための第3相比較試験

（JCOG1109試験）が現在進行中である[2]。従来のCF療法より強力なDCF療法は、高率に発熱性好中球減少症（FN）をきたすことが問題視されている。血液疾患等他の分野においてFNを予防する目的での ペグフィルグラスチムの有効性が示されているものの、食道がんDCF療法に対するペグフィルグラスチムの有効性はいまだ確立されていない。そこで今回、当院でのペグフィルグラスチムの使用例を解析し、DCF療法における有効性を検討した。

【方法】

研究デザイン: 2011年1月から2018年12月まで当院での937例の食道癌のうち、初回治療としてDCF療法を施行した92例を対象とした。92例中、20例で発熱性好中球減少症を生じた。同20例をFN群、残りの72例を非FN群（N群）とした（研究1）。また92例中33例で一次予防としてペグフィルグラスチムを投与し（投与群）、残りの59例は投与しなかった（非投与群）とした（研究2）。研究1では、初回治療としてDCF療法を選択した食道癌患者のFNのリスク因子について解析を行なった。続いて、研究2では、食道癌DCF療法における一次予防投与としてのペグフィルグラスチムの有効性について検討を行なった。

【結果】

研究1（FN群-N群）

背景因子として、年齢はFNグループで有意に若く（p=0.032）、またペグフィルグラスチムを用した症例は、FN群で有意に低かった（p=0.001）。その他、背景因子や術前採血データ、術前病期や腫瘍の局在などで両群で差は見られなかった。多変量解析では、ペグフィルグラスチム非使用症例がFNの独立したリスク因子であることが分かった（オッズ比16.393: 95%信頼区間2.049-125.0）。

研究2（投与群-非投与群）

初回治療としてDCF療法を施行した食道癌患者、全92症例中、CTCAE grade3以上の副作用が45人（48.9%）に生じた。投与群ではCTCAE grade3以上の合併症が12.1%に発生したのに対し、非投与群では69.5%と、投与群で有意に合併症が軽減された（p<0.001）。好中球減少症に関しても投与群9.1%に対し、非投与群では61.0%と、投与群で有意に合併症が軽減された（p<0.001）。さらにFN発生率では、投与群3.0%に対し、非投与群では32.2%と、投与群で有意に少なかった（p=0.001）。次コースのDCF療法の減量・中止率に関しても投与群で6.1%と、非投与群の30.5%と比較し有意に低下が見られた（p=0.006）。

【考察】

切除可能食道がん患者を術前FP療法群と手術単独群に割り付けたMRC-OE2試験の長期追跡結果では、全生存期間のハザード比が0.84（p=0.03）と有意に術前FP療法群で良好な結果であった[3,4]。わが国おいては、JCOG（日本臨床腫瘍研究グループ）9907試験の結果[1]から、現在、臨床病期Ⅱ/Ⅲ食道癌に対する標準治療は術前補助化学療法（シスプラチン+5-FU: CF療法）+根治手術である。さらに、術前化学療法と手術単独もしくは術前化学放射線療法の比較試験を集めたメタアナリシスにおいて、術前化学療法群全体の手術単独群に対する全生存期間のハザード比は0.87（p=0.005）と報告されており、術前化学療法の有効性が示唆されている[5]。しかしながら、JCOG9907試験のサブグループ解析の結果において、術前CF療法のcT1-2での5年生存割合は79%と良好であったのに対し、cT3では47%と不良で、より進行した症例に対する効果は不十分な結果であったため、より強力な術前治療が望まれている[1]。一方、欧米では手術単独での治療成績がわが国に比べ劣る背景から、術前化学放射線療法が広く行われている。わが国においても、術後の郭清範囲内の再発が少なくないことから同療法を支持する施設もある。さらに、近年では進行食道癌に対し、より強力な化学療法のレジメンのDCF療法（ドセタキセル+CF療法）を施行した報告が増えてきており、その高い奏効割合が注目されている。食道癌に対する術前補助療法に関するこうした背景から、標準治療である術前CF療法に対する、術前DCF療法と術前CF化学放射線療法の優越性を検証するための第3相比較試験（JCOG1109試験）が現在進行中である。

術前化学放射線療法では術後の再発に対して十分な放射線治療ができないこと、また、DCF療法は高率に発熱性好中球減少症をきたすことなどの問題点もあるが、この臨床試験の結果により、切除可能な進行食道癌に対する最適な治療法についての1つのエビデンスが確立することになる。従来のCF療法より強力なDCF療法は、高率に発熱性好中球減少症（FN）をきたすことが問題視されている。血液疾患等他の分野においてFNを予防する目的でのペグフィルグラスチムの有効性が示されているものの、食道がんDCF療法に対するペグフィルグラスチムの有効性については報告も少なく、いまだ確立されていない[6, 7]。今後JCOG1109の結果によっては、DCF療法が標準治療のひとつとなる可能性があるため、標準治療となる前に、FNに対する予防法の確立が急務である。そこで今回、当院でのペグフィルグラスチムの使用例を解析し、DCF療法における有効性を検討した。

G-CSFは、好中球の分化増殖を促進する分子量約2万の蛋白質である。従来のG-CSF製剤は、がん化学療法後の好中球減少症を中心とする各種の好中球減少症の治療および造血幹細胞の末梢血中への動員に対して広く臨床使用されている。しかし国内で承認されているこれまでのG-CSF製剤は、がんの種類によって適応が異なり、多くのがんではFNに対する予防投与が認められていない。さらに血中半減期が短いことから、好中球数が回復するまで連日投与が必要となり、患者負担が大きいことが臨床現場で問題となっていた。今回発売され、2014年9月に本邦でも承認されたペグフィルグラスチムは、既存のフィルグラスチム（分子量約1万9000）のN末端に水溶性高分子のポリエチレングリコール（PEG）1分子（分子量約2万）を共有結合した修飾蛋白質である。PEG化によって、プロテアーゼによる分解を抑制するとともに、腎臓でのクリアランスを低下させ体外への排泄を減少させることで、血中半減期を延長させている。

本検討から、ペグフィルグラスチム非使用症例がFNの独立したリスク因子であることが分かった。また、ペグフィルグラスチムを使用した症例では、好中球減少症やFNの発生率が有意に減少した。さらにCTCAE grade3以上の合併症に関しても有意に減少した。ペグフィルグラスチムの使用は、食道癌患者に対するDCF療法を計画的に完遂するための有効な手段となる可能性が示唆された。

【結語】

初回治療としてDCF療法を施行する患者に対し、一次予防投与としてのペグフィルグラスチムが、重度の好中球減少やFNの発生リスク低減に極めて有効であることが示唆された。ペグフィルグラスチムの一次予防投与を行なうことで、DCF療法の減量・中止をすることなく、スケジュール通りの食道癌治療を可能にする選択肢となりうると考えられた。

【文献】

1. Ando N, et al.: A randomized trial comparing postoperative adjuvant chemotherapy with cisplatin and 5-fluorouracil versus preoperative chemotherapy for localized advanced squamous cell carcinoma of the thoracic esophagus（JCOG9907）. Ann Surg Oncol 19: 68-74, 2012
2. Nakamura K, Kato K, Igaki H, et al.: Tree-arm phase Ⅲ trial comparing cisplatin plus 5-FU（CF）versus docetaxel, cisplatin plus 5-FU（DCF）versus radiotherapy with CF（CF-RT）as preoperative therapy for locally advanced esophageal cancer（JCOG1109, NExT study）. Jpn J Clin Oncol 43: 752-755, 2013
3. Medical Research Council Oesophageal Cancer Working Group: Surgical resection with or without preoperative chemotherapy in oesophageal cancer: a randomised controlled trial. Lancet 359: 1727-1733, 2002
4. Allum WH, et al.: Long-term results of a randomized trial of surgery with or without preoperative chemotherapy in esophageal cancer. J Clin Oncol 27: 5062-5067, 2009
5. Sjoquist KM, et al.: Survival after neoadjuvant chemotherapy or chemoradiotherapy

for resectable oesophageal carcinoma: an updated meta-analysis. Lancet Oncol 12: 681-692, 2011
6. 岡本浩一: 食道癌に対するDCF療法におけるペグフィルグラスチムの有用性. 第71回日本消化器外科学会
7. 安田知代: 進行食道癌DCF療法におけるペグフィルグラスチム予防投与についての検討. 第54回日本癌治療学会　ミニシンポジウム21

大腸癌化学療法に伴う肝萎縮の実態解明とリスク因子に関する検討

進藤　潤一、橋本　雅司

【要約】

化学療法の発達は転移巣を有する消化器癌患者の予後改善に貢献しているが、重篤な副作用の一つに肝障害がある。近年、大腸癌に対する全身化学療法が一定の割合で肝萎縮・肝予備能低下をもたらす可能性が報告されたがその危険因子は明らかでなく、適切な術前治療期間に関するコンセンサスも存在していない。本研究では大腸癌に対する化学療法が引き起こす肝萎縮の実態を明らかにし、その危険因子を抽出するとともに、術前化学療法の効果と安全性を最大限に引き出すための方策に関して基礎的検討を行った。虎の門病院において大腸癌肝転移に対して化学療法後に切除を行った103例をtraining set、原発巣切除後の補助療法もしくは切除不能肝転移に対して化学療法を行った171例をvalidation setとして検討した。Training setにおいて化学療法後に肝の萎縮あり、変化なし、腫大ありの割合はそれぞれ15例（14.6%）、73例（70.9%）、15例（14.6%）で、肝萎縮の程度は肝予備能と相関を示し、萎縮が見られたケースでは萎縮のないケースと比較して術後合併症率、難治性胸腹水ともに高率であった。組織学的には類洞障害と肝萎縮の強い相関が確認された。肝萎縮の累積発生率は化学療法のサイクル数が上がるとともに上昇したが、bevacizumabを投与された症例ではtraining set、validation setともに肝萎縮の発生率が抑えられることが多変量解析にて明らかとなった。化学療法後の肝萎縮は肝予備能の低下と相関し、化学療法が長引くほど高率にみられる。組織学的には肝萎縮を来したケースでは類洞障害が高頻度に認められ、bevacizumab投与によりその発生が抑制されうる可能性が示された。

【目的】

化学療法の発達は転移巣を有する消化器癌患者の予後改善に貢献しているが、重篤な副作用の一つに肝障害がある。近年、大腸癌に対する全身化学療法が一定の割合で肝萎縮・肝予備能低下をもたらす可能性が報告された[1)]。大腸癌における化学療法は特に切除困難な肝転移症例において腫瘍の縮小を狙い、根治切除を達成することを目的に施行されることが多いが、化学療法が引き起こす肝萎縮・肝予備能の低下は肝切除自体の安全性を損なうリスクがある。しかし化学療法がもたらす肝萎縮の危険因子は明らかでなく、適切な術前治療期間に関するコンセンサスは未だ存在していない。本研究では大腸癌に対して行われる化学療法が引き起こす肝萎縮の実態を明らかにし、その危険因子を抽出するとともに、術前化学療法の効果と安全性を最大限に引き出すための方策に関して基礎的検討を行った。

【方法】

虎の門病院において2008年～2018年に大腸癌肝転移に対して化学療法後に肝切除を行った103例をtraining set。Stage ⅢB/ⅢCの原発巣切除後に術後補助化学療法を受けた100例、切除不能遠隔転移に対して1st lineの化学療法を受けた71例をvalidation setとして解析を行った。化学療法前後の肝容積は2名の検査者が3次元画像解析ソフト（SYNAPSE VINCENT®、Fujifilm）を用いて独立して行い、平均値を結果として採用した。解析においてはベースラインから10%以上の変化（腫大or 萎縮）を有意な肝容積の変化として扱った。尚、結果の客観性・信頼性の担保のため、3名の独立モニタリング委員によるデータの監査・結果の確認を施行した。

【結果】

まずD volumetryの結果はr＝0.992と2名の独立検査者の結果に強い相関が認められ、適切に施行されていることがモニタリング委員に

より確認された。**表1**に背景因子の比較を示す。Validation setでは化学療法のサイクル数が長く、イリノテカンや分子標的治療薬の使用頻度がtraining setよりも低率であった。化学療法前後において、全肝容積は3%の減少、CT値の変化はなし、脾容積は10%増大、血小板数は約30%の低下がそれぞれのグループにおいて認められた。これらの変化率にtraining set、validation set間での差は認められなかった。

Training setにおいて化学療法後の肝容積の

表 1　背景因子の比較

	Training set (n=103)	Validation set (n=171)	*P*
Age[a]	61 (31-84)	64 (32-86)	0.32
Sex			
Male	62 (60.2)	41 (39.8)	0.348
Female	93 (54.4)	78 (45.6)	
Body surface area (m^2)[a]	1.62 (1.25-2.08)	1.59 (1.17-2.13)	0.461
Primary sideness (Left/Right)	81/22	121/50	0.151
RAS mutation[b]	32/52	39/59	0.815
Presence of liver metastases	103 (100)	28 (16.4)	<0.001
Chemotherapy			
Total cycles[a]	4 (1-24)	8 (1-46)	<0.001
Oxaliplatin	87 (84.5)	129 (75.4)	0.076
Irinotecan	20 (19.4)	17 (9.9)	0.026
Bavacizumab	73 (70.9)	55 (32.2)	<0.001
anti-EGFR antibodies	18 (17.5)	4 (2.3)	<0.001
Total liver volume (ml)			
Pre-chemotherapy[a]	1159 (751-1956)	1164 (723-2555)	0.625
Post-chemotherapy[a]	1170 (698-1840)	1128 (688-2434)	0.412
Ratio (Post vs. Pre)[a]	0.97 (0.69-1.30)	0.97 (0.70-1.65)	0.589
CT number (HU)			
Pre-chemotherapy[a]	59.9 (42.0-73.8)	58.6 (14.6-77.6)	0.456
Post-chemotherapy[a]	59.0 (22.2-74.8)	60.3 (-5.5-78.0)	0.812
Ratio (Post vs. Pre)[a]	1.00 (0.41-1.38)	1.00 (-0.13-1.57)	0.826
Spleen volume (ml)			
Pre-chemotherapy[a]	97 (4-313)	90 (16-240)	0.258
Post-chemotherapy[a]	107 (6-394)	104 (31-546)	0.48
Ratio (Post vs. Pre)[a]	1.08 (0.52-2.56)	1.13 (0.46-3.18)	0.567
Platelet count ($10^4/mm^3$)			
Pre-chemotherapy[a]	23.9 (10.8-63.9)	25.9 (9.6-51.3)	0.142
Post-chemotherapy[a]	17.4 (4.9-41.4)	18.5 (5.9-38.4)	0.238
Ratio (Post vs. Pre)[a]	0.68 (0.14-2.02)	0.76 (0.18-1.82)	0.736

Values in table are number or patients (percentage) unless otherwise indicated. [a]median (range), [b]Excluding unknown cases.

変化は、萎縮が15例（14.6%）、変化なし73例（70.9%）、腫大が15例（14.6%）であり、萎縮が見られたケースでは容積に変化のなかったケースや腫大が見られたケースと比較してICG15分値が有意に高かった（19.1% vs. 11.0% vs. 12.0%、P=0.025）。肝容積の変化率と脾容積の変化率の間には有意な相関は見られなかった（r=0.13、P=0.174）。**表2**に肝萎縮の有無による背景肝の病理組織像、術後成績の比較を示す。肝萎縮が認められたケースでは術後合併症、特に術後肝不全や難治性胸腹水の率が高率であった。組織学的には中等度-高度類洞障害の頻度が肝萎縮のあるケースで高率であった（66.7% vs. 14.8%、p<0.001）。

Validation setにおける化学療法後の肝容積の変化は萎縮が49例（28.7%）、変化なし98例（57.3%）、腫大24例（14.0%）であった。肝容積の変化率と脾容積の変化率の間にはtraining setと同様、相関を認めなかった（r=0.12、P=0.13）。肝萎縮を来した症例では正常上限の2

表２　術後短期成績と病理学的変化

	>10% atrophy (n=15)	No shrinkage (n=88)	*P*
Major hepatectomy	7 (46.7)	31 (35.2)	0.402
Operation time (min)[a]	218 (115-361)	219 (88-541)	0.950
Blood loss (ml)[a]	420 (145-1483)	535 (0-2875)	0.634
Postoperative peak bilirubin level (mg/mL)[a]	1.3 (0.8-23.8)	1.5 (0.6-5.5)	0.500
Any complication	9 (60.0)	28 (31.8)	0.045
Major complication	4 (26.7)	15 (17.1)	0.470
Refractory ascites/pleural effusion	7 (46.7)	7 (8.0)	<0.001
Hepatic insufficiency	1 (6.7)	0 (0)	0.146
Length of hospital stay (d)	14 (7-36)	14 (5-67)	0.857
Steatosis[a]			0.989
None	6 (40.0)	39 (44.3)	
Mild	4 (26.7)	23 (26.1)	
Moderate	2 (13.3)	14 (15.9)	
Severe/NASH	3 (20.0)	12 (13.6)	
Sinusoidal injury[b]			<0.001
None	2 (13.3)	66 (75.0)	
Grade 1	3 (20.0)	9 (10.2)	
Grade 2	5 (33.3)	10 (11.4)	
Grade 3	5 (33.3)	3 (3.4)	
Fibrosis[c]			0.876
F0	9 (60.0)	47 (53.4)	
F1	6 (40.0)	28 (31.8)	
F2	0 (0)	9 (10.2)	
F3	0 (0)	4 (4.5)	

Values in table are number or patients (percentage) unless otherwise indicated.
[a]median (range) NASH, non-alcoholic steatohepatitis.
[a]Scoring system by Kleiner et al.
[b]Grading system by Rubbia-Brandt et al. [c]Based on the classification by Desmet et al.

倍を超える肝機能障害が多く認められ（30.4% vs. 6.1%、P <0.001）、それによる化学療法の延期・中止の頻度も肝萎縮がないケースと比較して高率であった（12.5% vs. 3.5%、P=0.004）。

図1に化学療法のサイクルを横軸に取った場合の肝萎縮の累積発生率を、類洞障害の抑制効果が報告されているbevacizumab使用の有無に分けて示した。いずれの群においても化学療法のサイクル数が増加するほど肝萎縮の発生頻度が上昇するものの、bevacizumab投与例では頻度が有意に低率であることが分かる。肝萎縮を予測する因子の多変量解析において、training setではオキサリプラチンの累積投与量（+100mg/m^2）が有意な予測因子であり（オッズ比［OR］1.27、P=0.034）、bevacizumab投与は逆に肝萎縮に対して保護的に働くことが示された（OR 0.13、P=0.001）。またValidation setではbevacizumabのみが肝萎縮の低減因子として抽出された（OR 0.31、P=0.007）。

【考察】

本研究では大腸癌に対する化学療法が肝臓にもたらす形態学的変化の実態を調査した。肝障害の表現型の1つである肝萎縮は化学療法のサイクルが上昇するほど頻度が増し、切除例における肝予備能の低下や非切除例における肝障害の発生と相関することが示された。また組織学的には類洞障害との強い相関が確認され、bevacizumab投与が肝萎縮の発生を抑えることが示唆された。

大腸癌化学療法にともなう肝容積の変化は臨床的には認識されていたものの、その実態はほとんど知られてこなかった[1)]。本研究で示された通り、肝容積の変化はそこまで劇的ではないものの、本検討ではいくつかの興味深い知見が得られた。

精度の高い肝容積計算による検討において、10%前後の肝容積の変化は比較的高頻度に認められ、萎縮が肝予備能の低下と強い相関を示すことが示された。特に病理学的変化としての類洞障害と肝萎縮の間に強い相関がみられることは新しい知見であり、これは肝予備能が低下している症例で類洞障害が多く見られるという我々の臨床経験とも一致する。大腸癌の化学療法としてよく用いられるオキサリプラチンの投与は、類洞障害発生の強いリスクファクターであり[2,3)]、多変量解析の結果においてもオキサリプラチンの累積投与量が萎縮の頻度を増やすことが確認された。一方、bevacizumabの投与はオキサリプラチンによる類洞障害を抑制することが知られている[4,5)]。本研究においても類洞障害の発生頻度、並びに肝萎縮の累積発生率はbevacizumab投与例でともに低かった。これらの結果から、肝萎縮は病理組織学的な類洞障害の表現型の1つであり、肝予備能低下の形態学的な指標となり得ることが示唆される。

以上、本検討では大腸癌化学療法に伴う肝の形

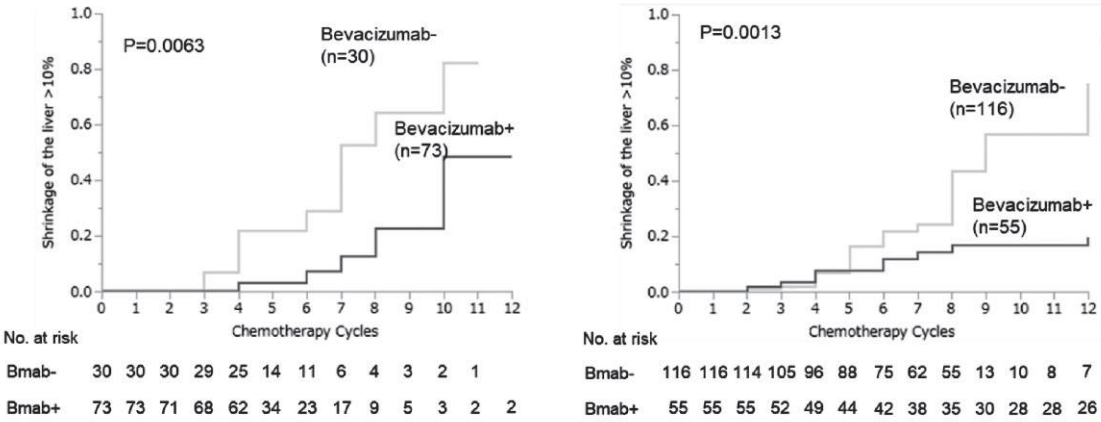


図1　10%以上の肝萎縮の累積発生率（左: training set、右: validation set）

態学的変化の実際を検討した。現在、本邦における肝予備能の検査はICG負荷試験が一般的であり、侵襲を伴い、簡便であるとは言い難い。本検討結果からCT画像上での容積変化は、化学療法中の肝障害のモニタリングや切除のタイミングを逃さないための術前精査の一環として利用できる可能性が考えられる。また、bevacizumab投与は類洞障害を抑え、肝萎縮の程度を抑えるという意味で肝庇護的に働くことが示唆され、特にconversionを企図した化学療法を受ける患者においてはその使用が一考に値すると考える。

【文献】

1. Tani K, Shindoh J, Takamoto T, et al.: Kinetic changes in liver parenchyma after preoperative chemotherapy for patients with colorectal liver metastases. J Gastrointest Surg 21: 813-821, 2017
2. Vauthey JM, Pawlik TM, Ribero D, et al.: Chemotherapy regimen predicts steatohepatitis and an increase in 90-day mortality after surgery for hepatic colorectal metastases. J Clin Oncol 24: 2065-2072, 2006
3. Rubbia-Brandt L, Audard V, Sartoretti P, et al.: Severe hepatic sinusoidal obstruction associated with oxaliplatin-based chemotherapy in patinets with metastatic colorectal cancer. Ann Oncol 15: 460-466, 2004
4. Overman MJ, Ferrarotto R, Raghav K, et al.: The Addition of Bevacizumab to Oxaliplatin-Based Chemotherapy: Impact Upon Hepatic Sinusoidal Injury and Thrombocytopenia. J Natl Cancer Inst 110: 888-894, 2018
5. Klinger M, Eipeldauer S, Hacker S, et al.: Bevacizumab protects against sinusoidal obstruction syndrome and does not increase response rate in neoadjuvant XELOX/FOLFOX therapy of colorectal cancer liver metastases. Eur J Surg Oncol 35: 515-520, 2009

（10）脳神経外科疾患

血流改変ステントを用いた脳血管内治療における被ばく線量の解析

川内　覚、濱田　祐介、鶴田 和太郎、盛武　敬[1]
産業医科大学産業生態科学研究所放射線健康医学[1]

【要約】

最大径が10mmを超える大型・巨大脳動脈瘤に対する脳血管内治療において、新たなデバイスの1つとして、血流改変ステント（Pipeline embolization device: PED）の使用が日本でも認可された。PEDの使用に伴って治療成績は大きく向上し数多く報告がなされているが、手技に伴う放射線被ばくに関しては、これまで報告が少なく十分に検証されていないのが実情であった。

今回我々は、蛍光ガラス線量計と専用の測定具を用いて、血流改変ステント留置術を行った症例において、最大皮膚線量（peak skin dose: PSD）と左右水晶体線量の測定を行い、PSDの予測増大因子を求めた。PSDと左右の水晶体線量はそれぞれ1880.0 ± 723.0mGy、124.8 ± 49.2mGy、180.7 ± 124.8mGyであった。PSDと患者因子、手技因子の関係を解析した結果、単変量解析ではPSDが2Gyを超えた症例において、BMI（$p < 0.05$）、動脈瘤の最大径（$p < 0.01$）、PEDの長さ（$p < 0.01$）、PED留置時間（$p < 0.01$）、PED留置とコイル塞栓術の併用（$p < 0.05$）において有意差を生じた。多変量解析では、BMI（$p < 0.01$; odds ratio（OR）= 1.806; 95% confidence interval（CI）= 1.007-3.238）とPED留置時間（$p < 0.05$; OR = 1.107; 95% CI = 1.001-1.224）が独立予測因子であることが明らかとなった。

PED留置症例の患者被ばく線量は、従来の脳動脈瘤塞栓術と比較して少ないと報告されているが、患者因子、手技因子に大きく影響を受けるため手技中の照射野のコリメーションや撮影条件、透視条件の最適化が必要であると考える。

【目的】

最大径10mmを超える大型・巨大の脳動脈瘤に対する治療法として、開頭手術やステントアシストコイル塞栓術等が従来行われてきたが、侵襲性が高く、術後の合併症の発生率や再発率が高いことが問題として挙げられていた。このような課題を解決するために、脳血管内治療に用いるデバイスとしてPEDの使用が認可された。このPEDにより治療成績は大きく向上し、安全性や合併症の種類や頻度についても多く報告されるようになったが、手技に伴う放射線被ばくに関しては報告が少ない。特に頭部には皮膚や水晶体など放射線に対するリスク臓器が存在し、皮膚においては初期紅斑のしきい線量が2Gy、一時的脱毛のしきい線量が3Gyであると言われているため、被ばく線量を精度高く測定することが重要であると考える。本研究では専用の線量計を用いてPED留置症例のPSDならびに水晶体線量を測定し、PSDの増大因子について解析することを目的とした。

【方法】

対象は、後交通動脈より近位に位置する最大径10mm以上の未破裂内頚動脈瘤37症例である。研究の実施に関しては倫理委員会の承認を得ており、患者本人には研究参加について説明を行い書面にて同意を得て行った。患者被ばく線量は、**図1**に示すような64個の蛍光ガラス線量計が頭部全体に配置するように設計された専用の装具（RADIREC®）を用いて測定を行い、皮膚線量ならびに水晶体線量の測定を行った。

PSDと患者因子・手技因子の関係を明らかにするために、各症例の脳動脈瘤に関する情報（位置と最大径）、留置したPEDに関する情報（口

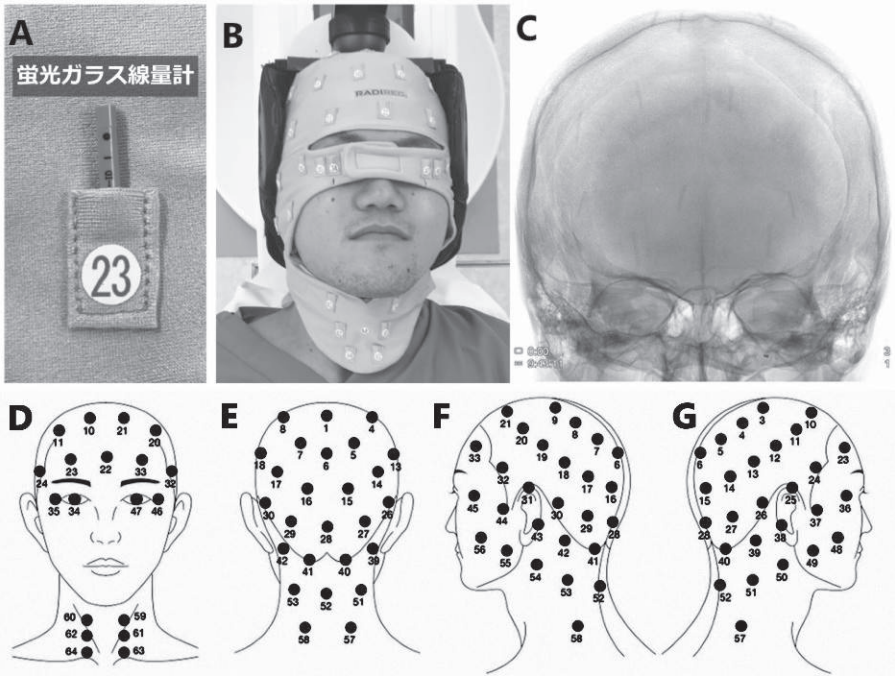


図 1　患者被ばく線量測定システム（RADIREC®）
A: 蛍光ガラス線量計　B: RADIREC® 装着時概観　C: RADIREC® 装着時透視画像
D–F: RADIREC® 装着時の線量測定ポイント

表 1　PED留置症例における手技因子ならびに放射線被ばく線量

症例数	37	
PEDの口径 [mm]	4.5 ± 0.48	（範囲：3.5–5.0）
PEDの長さ [mm]	22.2 ± 6.8	（範囲：16.0–35.0）
PED留置時間 [min]	22.6 ± 20.6	（範囲：5.0–110.7）
透視時間 [min]	41.9 ± 23.3	（範囲：15.2–102.5）
積算線量 [mGy]	3818.1 ± 1604.6	（範囲：1928.0–8026.8）
最大皮膚線量 [mGy]	1880.0 ± 723.0	（範囲：926.4–3424.7）
右水晶体線量 [mGy]	124.8 ± 49.2	（範囲：56.8–236.0）
左水晶体線量 [mGy]	180.7 ± 124.8	（範囲：80.7–664.1）

径、長さ、留置に要した時間）、手技に関する情報（PED留置に追加したコイル塞栓の有無）、血管撮影装置に表示された患者被ばくに関する情報（透視時間、積算線量）を後方視的に収集した。

PED留置症例におけるPSD増大因子を決定するため、PSDが2Gyを超えない群（PSD < 2Gy）と超える群（PSD > 2Gy）に分類し、患者因子と手技因子を用いて単変量解析ならびに多変量解析を行った。

【結果】

表1にPED留置症例におけるPEDと放射線被ばくに関するパラメーターの解析結果を示す。積算線量、PSD、右水晶体線量、左水晶体線量はそれぞれ、3818.1 ± 1604.6 mGy、1880.0 ± 723.0 mGy、

表２　PSD ＞ 2Gyに関わる単変量解析ならびに多変量解析の結果

	PSD<2Gy	PSD>2Gy	Univariate *p* value	Multivariate *p* value	OR（95% CI）
症例数 [n(%)]	23（62.2）	14（37.8）			
年齢 [y]	585±13.4	63.4±13.9	$p = 0.2039$		
女性 [n（%)]	20（87.0）	14（100）	$p = 0.2748$		
BMI	22.6± 3.3	25.4± 3.2	$p<0.05$	$p<0.01$	1.806（1.007-3238）
動脈瘤最大径 [mm]	12.5± 3.5	18.3± 5.5	$p<0.01$	$p = 0.0943$	1.317（0.9234-1.878）
PEDの口径 [mm]	4.4±0.44	4.6±0.52	$p = 0.1530$		
PEDの長さ [mm]	19.7± 5.6	26.4± 6.7	$p<0.01$	$p<0.5187$	1.112（0.8092-1.528）
PED留置時間 [min]	19.7±15.4	37.1±29.5	$p<0.01$	$p<0.05$	1.107（1.001-1 224）
手技 [n(%)]			$p<0.05$	$p = 0.0719$	16.96（0.46-618.3）
PED留置のみ	11（29.7）	19（82.6）	7（50.0）		
コイル塞栓術併用	26（70.3）	4（17.4）	7（50.0）		

BMI = body mass index; PED = pipeline embolization device; PSD = peak skin dose; OR = odds ratio; CI = confidence interval

124.8 ± 49.2mGy、180.7 ± 124.8mGyであった。**表2**にPSD ＜ 2Gy群とPSD ＞ 2Gy群の単変量解析ならびに多変量解析の結果を示す。単変量解析では、BMI（$p < 0.05$）、動脈瘤の最大径（$p < 0.01$）、PEDの長さ（$p < 0.01$）、PED留置時間（$p < 0.01$）、PED留置にコイル塞栓術の併用（$p < 0.05$）が、PSD ＞ 2Gyに関連する因子であった。多変量解析では、BMI（$p < 0.01$; OR = 1.806; 95% CI = 1.007-3.238）とPED留置時間（$p < 0.05$; OR = 1.107; 95% CI = 1.001-1.224）がPSD ＞ 2Gyの独立予測因子であった。

【考察】

本研究では、PED留置症例における透視時間と積算線量は、それぞれ41.9 ± 23.3 min、3818.1 ± 1604.6mGyであった。この値は、過去の報告と手技の難易度に伴う僅かな差はあるものの同様の傾向であった。ChalouhiらやColbyらは、大型・巨大脳動脈瘤に対するPEDを用いないコイル塞栓術とPED留置術の被ばく線量を比較しており[1,2]、PED留置術において透視時間や積算線量が低いことを報告している。本研究では、PED留置とコイル塞栓併用症例において被ばく線量が増大しており、従来の脳動脈瘤塞栓術と同等もしくはそれ以上になると考えられるが、PEDを用いた脳血管内治療は動脈瘤の高い閉塞率を得ることができ、従来は多く存在していた再発に伴う再治療の割合が少なくなると考えることができる。再治療の減少に伴い、放射線被ばくも減少することからPED留置症例全般において患者被ばく線量は従来の治療と比べ減少していると言うことができる。しかし、PSDが初期紅斑や脱毛といった放射線障害のしきい線量を超えた症例も存在したことから、手技中の照射野のコリメーションや撮影条件、透視条件を適切に設定することにより、常に患者被ばく線量の低減に務めることが重要である。

【文献】

1. Chalouhi N, McMahon JF, Moukarzel LA, et al.: Flow diversion versus traditional aneurysm embolization strategies: analysis of fluoroscopy and procedure times. J Neurointerv Surg 6: 291-295, 2014

2. Colby GP, Lin LM, Nundkumar NL, et al.: Radiation dose analysis of large and giant internal carotid artery aneurysm treatment with the pipeline embolization device versus traditional coiling techniques. J Neurointerv Surg 7: 380-384, 2015

【発表に関する事項】

1. Kawauchi S, Chida K, Moritake T, Hamada Y, Matsumaru Y, Tsuruta W, Sato M, Hosoo H, Sun L: Treatment of internal carotid aneurysms using pipeline embolization devices: Measuring the radiation dose of the patient and determining the factors affecting it. Radiat Prot Dosimetry. doi: 10.1093/rpd/ncz298 (in press)

（11）間脳下垂体疾患

巨大非機能性下垂体腺腫の外科治療における摘出阻害・リスク因子の検討

西岡　宏、井下　尚子[1]
東京都健康長寿医療センター病理診断科[1]

【要約】

従来から治療が困難とされてきた腫瘍最大径が40mmを超える巨大非機能性下垂体腺腫を対象に、安全確実な腫瘍摘出の阻害因子を自験例で検証し治療戦略を検討した。

【目的】

現在大多数のトルコ鞍近傍腫瘍、特に下垂体腫瘍に対しては経鼻手術（Transsphenoidal surgery; TSS）が選択され、手術手技の改善、内視鏡などの手術器具や支援機器の進歩などに伴いその成績は飛躍的に向上している。しかし一部の腫瘍は依然としてTSSによる摘出が困難であり[1,2]、約5%には開頭術が必要とする報告もある[3]。それらの多くは頭蓋内に大きく進展した巨大浸潤性腫瘍であり摘出が困難なだけでなく重篤な合併症のリスクもある。安全確実な腫瘍摘出の阻害因子を自験例で検証し治療戦略を検討した。

【方法】

対象は2008年から2015年に当院で外科治療を行った、腫瘍最大径が40mmを超える巨大非機能性下垂体腺腫（GNF）連続128例。男性71例、女性57例、年齢27から81（平均48.1）歳であり、91例が初回手術例で37例が再手術例であった。腫瘍の最大径は40.1-83.0（48.1）mmであった。127例に対してTSS、拡大TSS（経鞍結節部アプローチ）、開頭-TSS同時手術（Comb）を各92、17、19例に行った。腫瘍の大きさ、形状（整形・不整形）、頭蓋内進展度、海綿静脈洞（CS）内浸潤の有無、頭蓋内での血管の巻き込みの有無、初回・再手術、腺腫組織型やアプローチ法などと腫瘍の摘出度、合併症の相関を検討した。術後の観察期間は44-138（87.2）ヶ月。

【結果】

腫瘍の全摘出が得られた38例（29.7%）とCS内にのみ腫瘍が残存した亜全摘55例を摘出良好群（93例: 72.7%）、CS以外にも腫瘍が残存した亜全摘33例と部分摘出に止まった2例を摘出不良群（35例: 27.3%）とし多変量解析すると、最大腫瘍径 ≥ 50mm（P=0.002）、不整形（分葉状）腫瘍（P=0.005）、頭蓋内進展度 ≥70%（P=0.033）が摘出不良因子であり、アプローチ法等とは相関しなかった（**表1**）。悪性過高熱による死亡1例を除き永続性合併症は28例に認め、内分泌機能障害のみの18例を除いた10例（7.9%）の内訳は脳梗塞による片麻痺（3例）・見当識障害（1例）や視機能悪化（4例）などであり、不整形腫瘍（p=0.0494）とComb例（p=0.0007）に有意に多く認められた。視機能は術後改善（87例）に対

表1　腫瘍摘出阻害因子

因子（Category）	Univariate analysis	Multivariate analysis	
	P value	Hazard ratio（95%CI）	*P* value
不整形腫瘍（*yes vs no*）	0.0016	4.505（1.582-12.820）	0.005
腫瘍最大径（≥50 mm vs <50mm）	0.0107	4.484（1.670-10.870）	0.002
頭蓋内進展度（≥70 % vs <70%）	0.0352	4.484（1.115-12.346）	0.033

し、不変（19例）、悪化（4例）は頭蓋内進展度≥70％（p=0.0164）、血管の巻き込み（p=0.0003）、再手術例（p=0.0061）、Comb（p<0.0001）に多く認めた。術後放射線治療を43例に行い、平均87.2ヶ月の観察で新たな追加治療を要した症例は認めていない。腺腫の組織型はゴナドトロピン系92例、サイレントACTH系27例、サイレントPit-1系9例であり組織型と手術成績に有意な相関は認めなかったが、サイレントPit-1系腺腫は若年者（P=0.0452）やMIB-1高値が多く（P=0.025）、術後放射線治療を行った症例が多い傾向を認めた。

【考察】

GNFの大多数は通常の非機能性腺腫と同様な増殖能を示す良性腫瘍だが、治療に難渋する例が多く、また多彩な手術合併症（残存腫瘍の卒中、血管損傷が重篤）が報告されている。外科治療に関しては、一部は開頭術が必要とされているが、第一選択肢はTSSであり、特に内視鏡手術は顕微鏡手術より良好な手術成績を示すことが多いとされている。今回の検討では、GNFの70％以上の症例では良好な摘出が得られたが、一方で7.9％に内分泌機能障害以外の遷延性合併症を呈していた。これら摘出阻害・高リスク因子は不整形の形状、著明な頭蓋内進展、頭蓋内血管巻き込みなどを呈する腫瘍であった[1, 2]。これらハイリスクなGNFに対してはTSS単独ではなくComb法や定位放射線治療などを交えた個別のマルチモダリティな治療が必要である。

【結語】

著明な頭蓋内進展を呈し頭蓋内血管巻き込む不整形の腫瘍など一部のGNFは、手術アプローチ法と関係なく摘出が困難でリスクが高い。これらハイリスク症例の外科治療のゴールは腫瘍の全摘出ではなく、needsに応じた個別化治療: マルチモダリティな治療が必要である。

【文献】

1. Cappabianca P, Cavallo LM, Solari D, de Divitiis O, Chiaramonte C, Esposito F: Size does not matter. The intrigue of giant adenomas: a true surgical challenge. Acta Neurochir 156: 2217-2220, 2014
2. Nishioka H, Hara T, Nagata Y, Fukuhara N, Yamaguchi-Okada M, Yamada S: Inherent tumor characteristics that limit effective and safe resection of giant nonfunctioning pituitary adenomas. World Neurosurg 106: 645-652, 2017
3. Yousef AS, Agazzi S, van Loveren HR: Transcranial surgery for pituitary adenomas. Neurosurgery 57: 168-175, 2005

（12）整形外科疾患

骨巨細胞腫に対するPrecision medicineの開発－β-cateninの核内移行に注目して

松本　嘉寛
九州大学医学研究院整形外科

【要約】

骨巨細胞腫（Giant cell tumor of bone: GCTB）は紡錘形の腫瘍細胞（GCTB-cell）と多数の破骨細胞様の多核巨細胞によって局所再発率が高い治療困難な骨腫瘍である。近年、GCTBの画期的な分子標的治療薬としてdenosumab（deno）が開発されたが、その効果を投与前に予測するバイオマーカーは明らかにされていなかった。本研究では、GCTB-cellの骨分化にβ-cateninの核内移行が必須であること、臨床検体でβ-cateninの核内移行を認める症例は、認めない症例に比べdeno投与後に有意に高度な腫瘍内骨形成を生じている事を確認した。即ち、β-cateninの核内移行をdeno投与前に評価することで、投与後の骨硬化を予測することが可能であり、GCTBに対するdenoによる治療のPrecision medicineとして有用であると思われた。

【背景と目的】

骨巨細胞腫（Giant cell tumor of bone: GCTB）は紡錘形の腫瘍細胞（GCTB cell）と多数の破骨細胞様の多核巨細胞（巨細胞）によって構成される。GCTBは著明な骨破壊を生じ、手術後の局所再発率が高い治療困難な骨腫瘍である[1)]。近年、GCTBの研究領域において2つの大きな進歩があった。1つは、GCTB cellの特異的マーカーとしてヒストン変異（H-G34W）が同定された点である[2, 3)]。またもう1つは、破骨細胞の分化に必須なRANKL（receptor activator of NF-κB ligand）に対する中和抗体であるdenosumab（deno）により腫瘍内骨形成、巨細胞の消失が生じ、切除困難/不能なGCTBに対する治療のブレークスルーとなった事である[4)]。一方、denoの使用経験が蓄積されるにつれ、denoに対する反応性が症例により異なることが明らかとなってきたが、これまでGCTBに対するdenoによる骨形成メカニズムや、denoの反応性を投与前に予測するバイオマーカーは明らかにされていない。

【方法】

1. GCTB-cellの初代培養系の確立

手術検体を細切、コラゲナーゼ処理し細胞を単離する。その後48-72時間単層培養を行い、紡錘型の細胞を採取した。その後細胞をH-G34Wに対する抗体で免疫染色を行い、細胞の純度を確認した。（primary GCTB-cell: pGCTB-cell）

2. 骨分化アッセイ

pGCTB-cellに骨分化誘導メディウムを添加した後にアルカリフォスファターゼ（Alp）染色を行い、骨への分化を確認した。

3. Western blotting（WB）

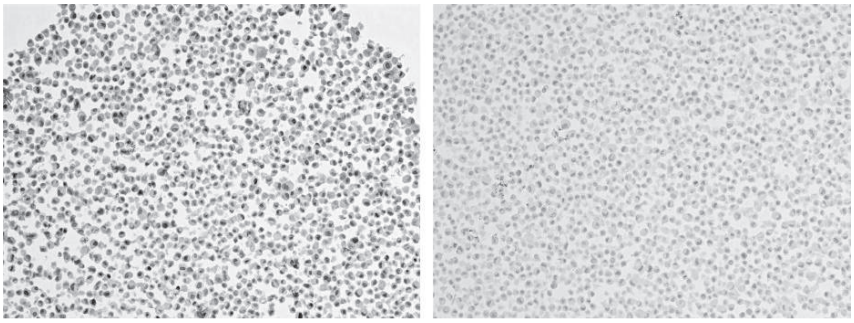
pGCTB-cellを破砕した後に、細胞質分画、核分画をわけて抽出、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行い展開した後に、各種抗体にてWBを行った。

4. 免疫染色

各種抗体を用いて、細胞標本については蛍光免疫染色を、生検標本についてはDAB（ジアミノベンジジン）を用いた組織免疫化学染色を行った。

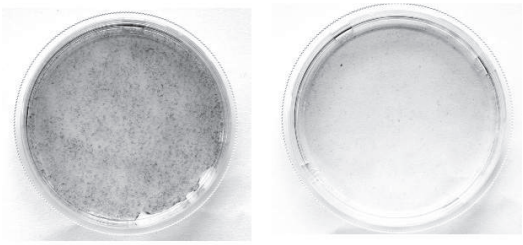
5. Deno投与症例における骨化の判定

2012年8月以降、当院にてdenosumab投与を施行したGCTBの13症例について、deno投与前の検体におけるβ-cateninの核内移行の割合と、CTを用いて定量化したdeno投与後の骨形成との相関を検討した。CTによる定量化には、先行文献[5)]よりdeno投与前後の歪度をimage Jを用い



抗H-G34W抗体　　対照

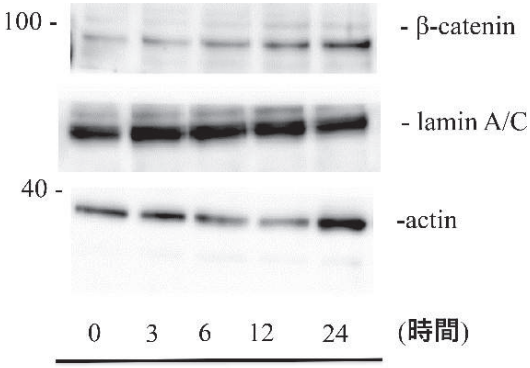
図１　p-GCTB-cellの抗H-G34W抗体による免疫染色



骨分化誘導あり　　対照

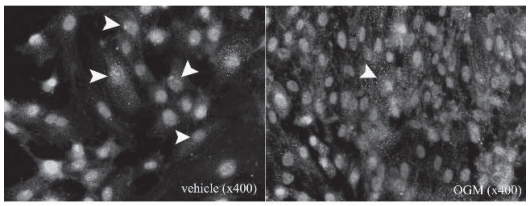
アルカリフォスファターゼ染色

図２　p-GCTB-cellの骨分化誘導



骨分化誘導メディウム添加後

(a)



骨分化誘導前　　骨分化誘導後

β-catenin抗体による蛍光免疫染色

(b)

図３　pGCTB-cellの骨分化に伴う、β-cateninの核内移行

(a) p-GCTB-cellの細胞抽出物の核分画をβ-cateninおよびlamin A/C（核内蛋白質の陽性対照）でWBを行なった。

(b) p-GCTB-cellを骨分化誘導メディウム（OGM）添加後に抗β-catenin抗体で蛍光免疫染色を行なった（×400倍）

て測定した。

【結果】

1. GCTB-cellの初代培養系の確立と骨分化能の確認

GCTBの組織標本より、H-G34W陽性のp-GCTB cellが確立可能であった。90％以上の細胞がH-G34W陽性であり、純度の高い細胞群であることを確認した（**図1**）。骨分化誘導メディウムを添加することで、p-GCTB-cellは*in vitro*で、アルカリフォスファターゼ陽性の骨芽細胞へ分化することを確認した（**図2**）。

2. pGCTB-cellの骨分化におけるβ-cateninの核内移行

pGCTB-cellの骨分化に伴い、β-cateninが核内へ移行することを、蛍光免疫染色、WBを用いて確認した（**図3a, 3b**）。さらにβ-cateninの核内移行阻害剤によりp-GCTB-cell の骨分化が、

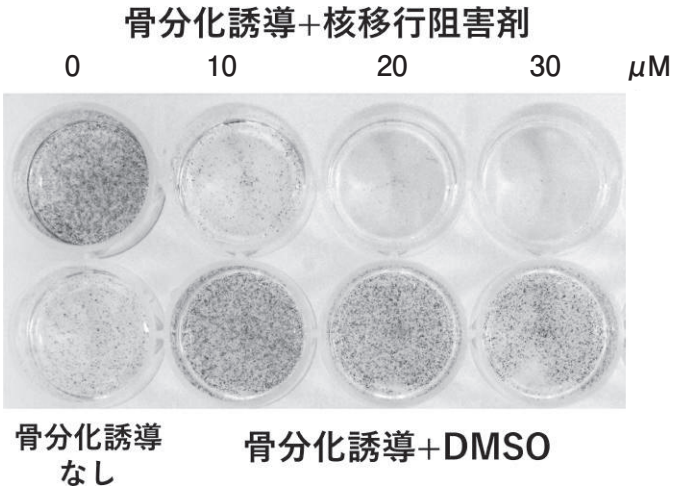


図 4　β -catenin核内移行阻害剤のp-GCTB-cellの骨分化の与える影響
アルカリフォスファターゼ染色、DMSO: ジメチルスルホキシド（溶媒）

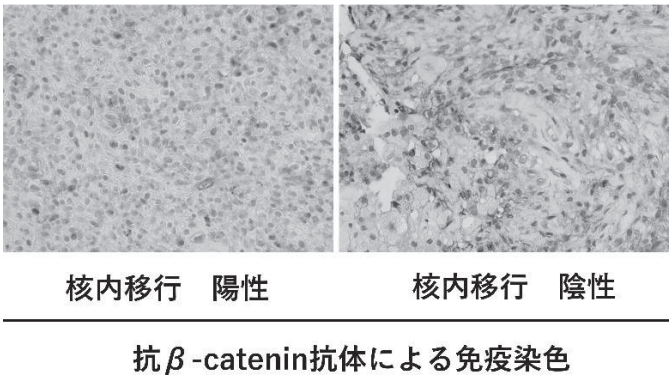


図 5　生検標本のβ -catenin免疫染色（×200倍）

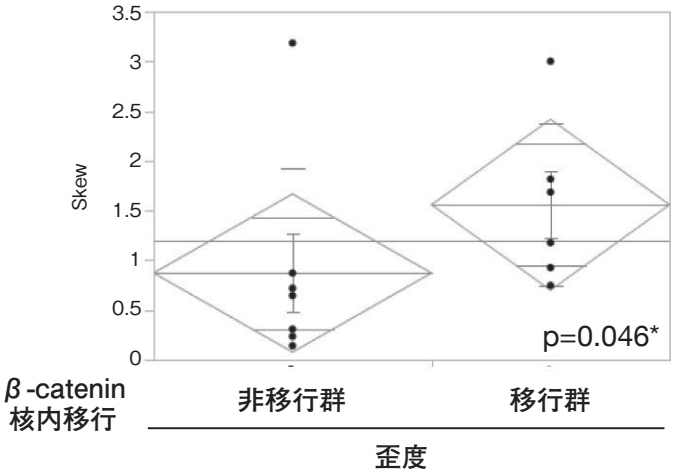


図 6　deno投与後骨形成のCTによる定量化

濃度依存的に阻害されることを見出した（**図4**）。

3. 生検標本のβ-catenin染色による、Denosmub奏功性の予測

生検標本のβ-catenin免疫染色での検討では、7例にβ-cateninの核内移行を認めたが（移行群）、6例では移行を認めなかった（非移行群）（**図5**）。deno投与後の病変のCT画像においては、移行群は非移行群に比べdeno投与後に有意に高い歪度を示した（**図6**）（p= 0.046, wilcoxon順位和検定）。このことはdeno投与に伴い、移行群において高度な腫瘍内骨形成を生じていることを示している。

【考察】

denoの登場により、GCTB治療にはパラダイムシフトとも呼べる変化が生じた。特に切除不能な症例に対する治療法として有用である。また、手術前にadjuvantとして使用し、関節温存率を向上させる取り組みも始まっている[6)]。しかし、症例によってはdeno投与による骨形成を来さず、病勢の低下が得られず、手術を含めた他の治療法選択までの時間が遷延する場合もある。

本研究により、以下の3点が初めて明らかとなった。deno投与後の骨形成は病巣内の正常骨髄細胞の反応性の変化と考えられていた。しかし、今回の検討でGCTB-cellそのものが骨分化能を持つ事が、H-G34WというGCTB-cell特異的マーカーを用いて確認された。次にGCTB-cellの骨分化メカニズムとして、β-cateninの核内移行が必須であることが生化学的解析、阻害剤投与の結果により明確に示された。

さらに臨床的に、β-cateninの核内移行を投与前に評価することで、deno投与後の骨硬化を予測することが可能であった。すなわち、生検標本に対するβ-catenin の免疫染色は、deno投与の適応判断を含む、GCTBに対するPrecision medicineの補助として有用である事が示唆され、本研究は臨床的にも大きな意義を持つと考えられた。

【文献】

1. Matsumoto Y, et al.: Role of the VEGF-Flt-1-FAK pathway in the pathogenesis of osteoclastic bone destruction of giant cell tumors of bone. J Orthop Surg Res 5: 85, 2010
2. Yamamoto H, et al.: Diagnostic utility of histone H3.3 G34W, G34R, and G34V mutant-specific antibodies for giant cell tumors of bone. Hum Pathol 73: 41-50, 2018
3. Behjati S, et al.: Distinct H3F3A and H3F3B driver mutations define chondroblastoma and giant cell tumor of bone. Nat Genet 45: 1479-1482, 2013
4. Ueda T, et al.: Objective tumor response to denosumab in patients with giant cell tumor of bone: a multicenter phase Ⅱ trial. Ann Oncol 26: 2149-2154, 2015
5. Yi J, et al.: Response evaluation of giant-cell tumor of bone treated by denosumab: Histogram and texture analysis of CT images. J Orthop Sci 23: 570-577, 2018
6. Urakawa H, et al.: Clinical outcome of primary giant cell tumor of bone after curettage with or without perioperative denosumab in Japan: from a questionnaire for JCOG 1610 study. World J Surg Oncol 16: 160, 2018

（13）泌尿器疾患

ランニング後の運動性無症候性肉眼的血尿の検討

浦上　慎司、小川　貢平、矢野　晶大
阪口　和滋、永本　将一、萩原　喜一
岡　優、林田　迪剛、岡根谷 利一

【要約】

目的: ランニング後の運動性無症候性肉眼的血尿の原因として溶血や糸球体透過性亢進など多くの原因が推測されているが、真偽は不明である。その主たる原因を同定する。

対象と方法: 2014年から2017年までに、上記主訴で当科を受診した14症例を対象として、後方視的に解析する。

結果: 14例全例が男性で、膀胱鏡にて11例（79%）に後壁中央の粘膜損傷を認め、年齢の中央値は46歳（40-66歳）であった。損傷を認めない3例には各々膀胱癌、尿管癌、尿管結石を認めた。損傷を認めた全例が、非糸球体型均一赤血球、尿細胞診陰性、尿路感染陰性、腎機能正常であったが、2例にBPH、5例に腎結石を合併していた。

結論: ランニング後運動性肉眼的血尿は若年男性に多く、膀胱後壁中央の外傷性膀胱粘膜損傷が主原因であった。その発生機序は膀胱が空虚な状態で、長時間の激しい上下運動により、自由度の高い膀胱後壁中央粘膜が前立腺により固定された膀胱ベースに繰り返し衝突するためと推定した。

【目的】

ジョギング・ランニング人口増加に伴い、泌尿器科外来ではランニング後の無症候性肉眼的血尿を主訴とする症例にしばしば遭遇する[1)]。以前は、このランニング後の肉眼的血尿の原因は、糸球体透過性亢進による腎原発説が有力視されてきた。この糸球体透過性亢進は、特に運動負荷による筋・骨への血液分布による急激な腎血流量の低下（低酸素）、乳酸濃度上昇によるアシドーシス、ミオグロビンなどの筋逸脱物質などによる糸球体障害により発生すると推察されてきた[2)]。一方で、近年では足底部の毛細血管圧迫からの溶血によるヘモグロビン尿（行軍性血尿）、前立腺肥大症、ナットクラッカー症候群、輸出細動脈でのvasoconstrictionからの毛細管の静水圧の上昇による赤血球の漏出など、様々な原因が推測されている[2)]。しかしランニング後の肉眼的血尿は無症候性であり、無治療で自然改善することが多いことから、これまで泌尿器科医はこれらの原因を深く精査検証することが無かったため、これら推測されている原因の真偽は不明である。今回われわれは、その主たる原因を検討する。

【方法】

2014年4月から2018年3月までに、ランニング後の運動性肉眼的血尿を主訴に当科外来を受診した14症例を対象とした。カルテより個々の症例の診療情報データ（年齢、性別、検尿・尿沈渣、尿培養、腎機能検査、尿細胞診、膀胱鏡所見、腹部CTなど）を後ろ向きに詳細に調査し、肉眼的血尿の原因を同定、解析することで、その主たる発生機序を推定する。

【結果】

14例全例が男性で、無症候性肉眼的血尿であった。膀胱鏡にて11例（79%）に粘膜損傷を認め、損傷を認めない3例には各々膀胱癌、尿管癌、尿管結石を認めた。損傷11例の年齢の中央値は46歳（40-66歳）であった。初診当日の膀胱鏡にて全例（100%）が膀胱の後壁中央に米粒大の粘膜剥離・発赤を認め、6例には同部位からの出血も

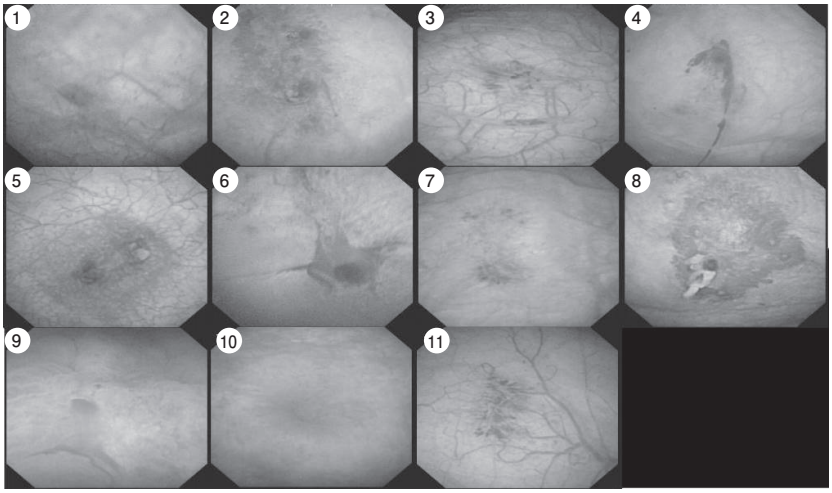


図 1

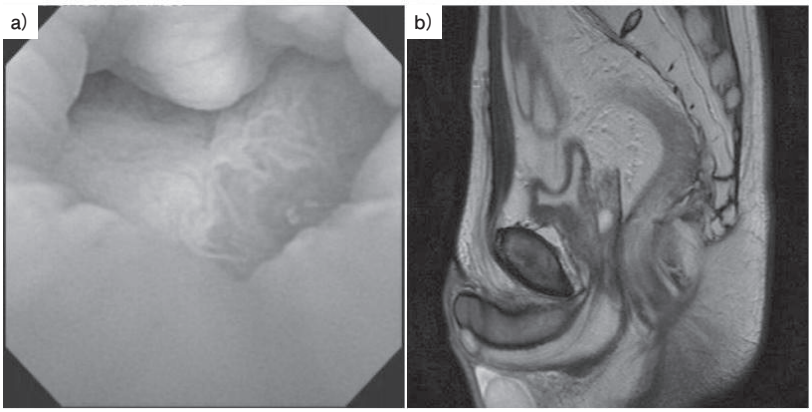


図 2

確認した（**図1**, Case 1-11）。Case 8では膀胱鏡とMRIにて、膀胱が虚脱した状態で、膀胱後壁と膀胱頸部が接触している所見が見られた（**図2 a, b**）。さらにCase 9は、膀胱内腔に突出する前立腺肥大（BPH）結節を認める症例で、MRIにてBPH結節とそれに対峙する膀胱後壁粘膜の浮腫が認められる所見が得られた（**図3**）。尿たんぱく定性では8例は（－）～（±）で、3例のみ（1+）であったが、全例腎機能は正常であった。尿中赤血球形態も全例が非糸球体型赤血球（均一赤血球）であり、尿細胞診も全例で陰性だった。CTで2例（18%）に推定前立腺重量30ml以上の前立腺肥大症を認め、面白いことに5例（45%）に腎結

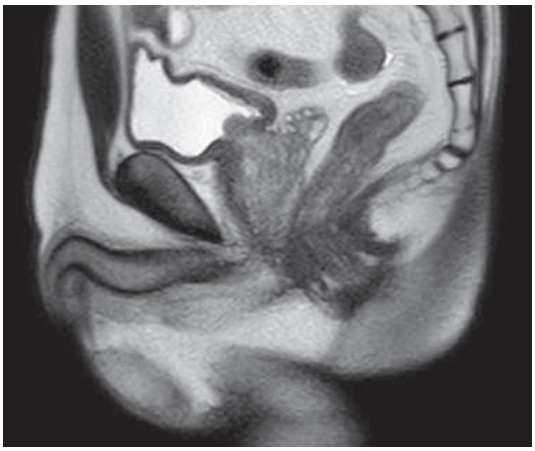


図 3

石あるいは腎石灰化を認めた。全例（100％）がランニング中止にて無治療で肉眼的血尿は3日以内に消失、9例（82％）は翌日には消失しており、顕微鏡的血尿は全例（100％）、次回受診の1ヶ月以内に消失していた。膀胱鏡検査でも調べられていた5例全例（100％）が3か月後に病変は消失していた。また6例（55％）はランニング再開後に再度肉眼的血尿を認め、当科を再診していた。

【考察】

ランニング後の運動性肉眼的血尿の約8割は、外傷性膀胱粘膜損傷が原因と考えられ、全例が膀胱後壁中央の損傷であった。その発生機序は、MRI所見や全例が膀胱後壁粘膜の剥離や発赤を認めることから、膀胱が空虚な状態で、長時間の激しい上下運動により、自由度の高い膀胱後壁中央が前立腺により固定された膀胱ベースに繰り返し衝突する機械的外傷のためと推定できる。事実、文献でも、スポーツ関連血尿の原因の一つは、繰り返される膀胱後壁と膀胱ベースの衝突による膀胱外傷の可能性があることが報告されている[3, 4]。事実、同じ非接触性の激しい運動でも、血尿はスイマーよりランナーに多いと報告されているのも、その根拠になるだろう[5]。

また、全例男性であった理由は、男性は前立腺があるため、膀胱頚部や三角部が固定され、自由度が低く、膀胱後壁衝突の衝撃を逃がすことが出来ないためと我々は推察する。実際に、そのように推察する論文も存在する[6]。すなわち言い換えれば女性は、前立腺がないため、膀胱頚部や三角部の自由度が高く、膀胱後壁衝突の衝撃を逃がすことが出来るためランニング後の運動性肉眼的血尿が少ないのかもしれない。

さらに腎結石あるいは腎石灰化症例も多く、これらは水分摂取が少ないことも推察され、ランニング後の運動性肉眼的血尿の原因が、膀胱が虚脱した状態でのランニングの上下運動による膀胱粘膜の機械的外傷だとすれば、予防には走行中の水分補給が大切と考えられた。

一方、少数ではあるが、ランニング後の運動性肉眼的血尿でもやはり腫瘍や結石の除外も必要であった。

本研究は、膀胱鏡所見によりランニング後の運動性肉眼的血尿の原因の多くが、膀胱が空虚な状態で、長時間の激しい上下運動により、自由度の高い膀胱後壁中央粘膜が前立腺により固定された膀胱ベースに繰り返し衝突するために生じる膀胱粘膜損傷である可能性を示した最初の報告である。

【文献】

1. Ubels FL, van Essen GG, de Jong PE, Stegeman CA: Exercise induced macroscopic haematuria: run for a diagnosis? Nephrol Dial Transplant 14: 2030-2031, 1999
2. Jones GR, Newhouse I: Sport-related hematuria: a review. Clin J Sport Med 7: 119-125, 1997
3. Lüthje P, Nurmi I: Recurrent macroscopic haematuria due to bladder blood vessels after exercise induced haematuria. Br J Sports Med 38: e4, 2004
4. Albersen M1, Mortelmans LJ, Baert JA: Mountainbiker's hematuria: a case report. Eur J Emerg Med 13: 236-237, 2006
5. Shephard RJ: Exercise proteinuria and hematuria: current knowledge and future directions. J Sports Med Phys Fitness 56: 1060-1076, 2016
6. Reid RI, Hosking DH, Ramsey EW: Haematuria following a marathon run: source and significance. Br J Urol 59: 133-136, 1987

（14）腫瘍性疾患

高齢がん患者を取り巻くがん診療・緩和治療の支援に向けた研究

田辺　裕子、高野　利実

【要約】

高齢がん患者に対する抗がん剤などの積極的な治療は、副作用のために早期中止となる場合も少なくない。高齢がん患者では、緩和ケア（原病に対する手術、化学療法、放射線療法などの積極的治療を終了、もしくは行わず、以後は症状緩和を中心とした治療を行うこと）は重要な選択肢となるが、その実施には障害が多い[1, 2]。そこで、高齢がん患者の緩和ケア実施における問題点を抽出することを目的に本研究を実施した。結果、高齢がん患者の緩和ケア実施において、家族の介護力、認知機能、病状の安定性、それまでの患者－家族の関係性などが障害となることがわかった。適切な情報提供下に社会的資源の活用や満足のいく意思決定支援がなされるよう、より早期から療養環境における問題点を抽出し、可能であれば患者家族とともに時間をかけて準備を進めることが重要と考える。

【目的】

高齢がん患者の緩和ケア実施における問題点を探る。

【方法】

2017年4月～2018年3月までに虎の門病院で固形がんに対して緩和ケアを行った2群（A群：20歳以上50歳未満の患者、B群：50歳以上の患者）を比較し、高齢がん患者の緩和ケアの内容、死亡場所（自宅、ホスピス、一般病院など）、最後の療養場所で過ごした期間、社会的支援の現状の把握と問題点を検討した。

【結果】

A群51名、B群7名であり、年齢中央値は、A群72（50－87）、B群42（33－49）であった。高齢がん患者の死亡場所は、若年者と比較してホスピスまたは一般病院が多く、最後の療養場所で過ごす期間が長い傾向にあった。高齢がん患者では、キーパーソンも高齢であるケースが多く、社会的支援を取り入れても自宅療養には限界があり、病院に入院の上、緩和ケアを継続するケースが多かった。特に、急速悪化例、経口摂取困難例、認知機能低下例、独居患者では、その傾向が強かった。その他、最期の療養場所の相談時期、ソーシャルワーカーの介入の有無、家族との関係性、家族毎の在宅診療の受け入れの違い、地域による支援サービスの違いなどが緩和ケアの内容に影響することが考えられた。

【考察】

高齢がん患者の緩和ケアの実施において、家族の介護力、認知機能、病状の安定性、それまでの患者－家族の関係性が障害となる場合が多かった。個々に最適ながん医療を行うためには、適切な情報提供下に社会的資源の活用や満足のいく意思決定支援がなされるよう、より早期から療養環境における問題点を抽出し、可能であれば患者家族とともに時間をかけて準備を進めることが重要である。今後は、調査数を増やし、都市部と地方での違いも含め、具体的な方策案の検討を予定している。

【文献】

1. Evers MM, Meier DE, Morrison RS: Assessing differences in care needs and service utilization in geriatric palliative care patients. J Pain Symptom Manage 23: 424-432, 2002
2. Voumard R, Rubli Truchard E, Benaroyo L, Borasio GD, Büla C, Jox RJ: Geriatric palliative care: a view of its concept, challenges and strategies. BMC Geriatr 18: 220. doi: 10.1186/s12877-018-0914-0, 2018

乳癌における晩期再発と腫瘍免疫に関する後方視的研究

尾崎 由記範、川端　英孝、高野　利実

【要約】

乳癌に対しては、それぞれの病期に応じて、手術、術前術後化学療法、放射線療法などが行われる。治療の進歩により早期乳癌は多くの症例で根治が得られるが、術後5年以上経過してからの晩期再発が臨床的には大きな問題となっている。晩期再発のメカニズムについてはまだ明らかにはなっていない。切除可能早期乳癌の晩期再発に関連したバイオマーカーを探索することを目的とした研究を行っている。乳癌の臨床症例のデータでは124症例が本研究対象に該当し、そのうち再発症例は31例であった。免疫染色にてCD8染色を行ったところ、60歳以上でCD8陽性率が低く、HER2陽性腫瘍ではCD8陽性率が高かった。CD8陽性レベルと再発有無には有意な相関はみられなかった。

【目的】

切除可能早期乳癌の晩期再発に関連したバイオマーカーを、当院の手術検体を用いて探索する。

晩期再発は腫瘍微小環境における免疫状況や細胞休眠と深く関わっていると考えられ、腫瘍組織を用いた免疫バイオマーカーの解析を行い、臨床データと共に予後への影響について解析する。

【方法】

臨床検体を用いた解析を行う。2006年4月～2017年3月までに虎の門病院にて乳癌と診断され、手術または生検が行われた症例を対象とする。評価方法は、原発部位、臨床経過、治療内容、検査値、画像評価、無病生存期間、全生存期間、有害事象に関するデータをレトロスペクティブに収集する。また手術検体の病理学的特徴に関しては、HE染色や免疫組織染色を用いて評価を行う。調査項目は、年齢、性別、原発部位、臨床経過、検査値、化学療法投与歴、放射線治療歴、病理学的特徴、画像検査、無病生存期間、副作用、合併症、全生存期間、CT、PET-CT、MRI、消化管内視鏡、超音波検査、マンモグラフィなどである。病理学的評価については、日常診療で使用された標本の評価に加えて、組織型、壁深達度、間質量、脈管侵襲、簇出、神経侵襲、CD4、CD8、FOXP3などの免疫関連分子の発現性ならびにその発現レベル（免疫染色）を評価する。統計解析については、主要評価項目は、腫瘍組織内の免疫環境、免疫染色結果と無病生存期間や組織侵襲度などの臨床データとの関連を、Kaplan-Meier法・log-rank検定などを用いて統計学的に比較解析する。

【結果】

乳癌の臨床症例のデータを解析したところ、124症例が該当した。そのうちER陽性HER2陰性が97例、ER陽性HER2陽性が14例、ER陰性HER2陽性が5例、ER陰性HER2陰性が8例であった。全体124例のうち再発症例は31例であった。腫瘍組織におけるCD8陽性レベルを0, 1, 2, 3で評価した。免疫染色による評価が可能であった

表 1

Recurrence	No. of patients（%）							
	Level 0		Level 1		Level 2		Level 3	
CD8 expression	n = 45		n = 45		n = 24		n = 1	
Recurrence								
Negative, n = 88	33	38％	35	40％	20	23％	0	0％
Positive, n = 27	12	44％	10	37％	4	15％	1	4％

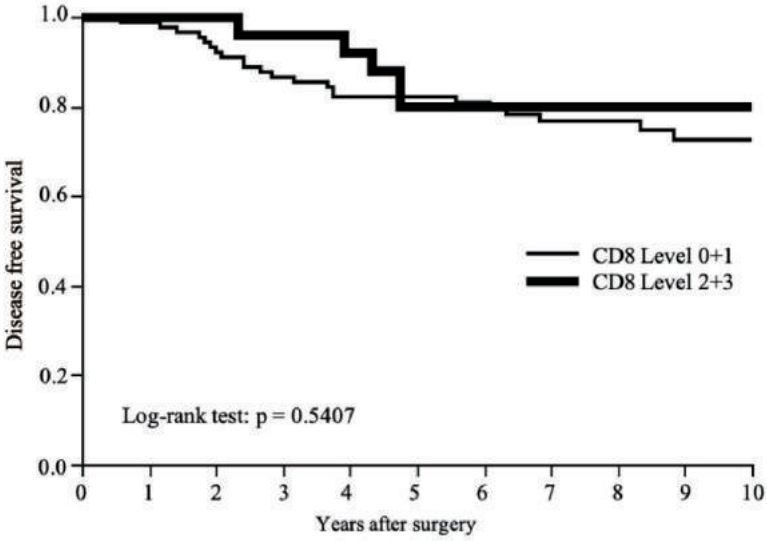


図 1

115例について、CD8 Level 0, 1, 2, 3はそれぞれ45例、45例、24例、1例であった（**表1**）。60歳以上だとCD8陽性レベルは低く、HER2陽性腫瘍はCD8陽性レベルが高かった。CD8陽性レベルLevel 0+1 vs 2+3の再発有無には有意な相関はなかった（**図1**）。

【考察】

腫瘍を用いた解析を行い、CD8陽性レベルと予後の関連を評価した。再発有無とCD8陽性レベルには有意な相関はみられなかったが、今後は他のバイオマーカーとの関連についても評価していく必要がある。ER陽性症例では晩期再発をきたすことが知られており、これらを対象とした解析を行うことで晩期再発に関連したバイオマーカーの探索を行っていく。

泌尿器腫瘍におけるChromatin Modulating分子の発現と免疫微小環境の関連

三浦　裕司

【要約】

PBRM1はChromatin Modulating遺伝子のひとつであり、淡明細胞型腎細胞がんの40％で機能欠損を引き起こす遺伝子異常が認められる。また、近年、淡明細胞型腎細胞がんの予後を飛躍的に延長させた免疫チェックポイント阻害剤の効果予測因子としても注目されている。本研究では、虎の門病院で淡明細胞型腎細胞がんと診断され、原発巣と転移巣の両方の切除検体が得られ、免疫組織染色が実施可能な33症例について、PBRM1タンパク発現と腫瘍免疫微小環境の関連について検討した。原発巣において、PBRM1の発現は、CD8, CD163, CD204の発現免疫細胞の腫瘍浸潤と関連しなかった。一方、転移巣では、PBRM1発現が陰性の腫瘍において、CD8陽性T細胞の浸潤を少なく、CD163陽性のM2マクロファージの浸潤を多く認めた。今後、症例数を増やし、他の免疫細胞に関する検討、予後との関連などの検討が望まれる。

【目的】

免疫チェックポイント阻害剤は、様々ながん種において予後の改善に寄与している。しかしながら、がん腫によって異なるが、効果がえられるのは20-40％の症例と限られており、効果予測因子の同定が急務である。Miaoらは、免疫チェックポイント阻害剤の投与を受けた腎細胞癌症例の全ゲノム解析を実施し、PBRM1変異を有する症例における腫瘍縮小効果、全生存期間が良好であることを示した[1)]。また、別のグループは、メラノーマ細胞株を使用したCRISPR/Cas9システムによるゲノムスクリーニングを行い、PBRM1とARID2遺伝子のノックアウトがT細胞による腫瘍細胞死に関連することを示した[2)]。このように、PBRM1を始めとしたChromatin Modulating分子は免疫チェックポイント阻害剤の効果予測因子の候補として注目されつつある。我々のグループは、これまでに腎細胞癌の手術、生検既存検体を使用し、腫瘍におけるChromatin Modulating分子であるBAP1、PBRM1の発現と予後の関係について発表した[3, 4)]。また、免疫微小環境と腫瘍の予後についても大腸癌[5)]、腎細胞癌[6)]にて発表した。特に腎癌における原発巣と転移巣における腫瘍関連マクロファージ（TAM）分化の違いに関する研究は世界初の報告であり、この分野をリードしている[6)]。本研究では、腎細胞がんのPBRM1発現とTAMの関係について探索することを目的とする。

【方法】

1988年から2013年に虎の門病院にて、淡明細胞型腎細胞がんと診断され、原発巣と転移巣の両方の切除FFPE検体を有する症例41例を抽出した。その中から、免疫組織染色（Immunohistochemistry: IHC）を実施し可能な33症例を対象とした。

IHCは以下の抗体を使用して実施した。

- α-CD163（mouse monoclonal, clone 10D6, Leica Biosystems, Nussloch, Germany）
- α-CD204（mouse monoclonal, clone SRA-E5, Cosmo Bio, Tokyo, Japan）
- α-PBRM1（Bethyl Laboratories Inc., TX, USA）

2人の病理医が、臨床情報などが分からない状態で陽性細胞のカウントを実施した。

統計解析はJMPを使用して実施し、P value < 0.05を統計学的有意と定義した。

【結果】

PBRM1のIHC結果について代表的な画像を**図1**に示す。

対象症例の患者背景を**表1**に示す。

原発巣と転移巣のそれぞれにおける、CD8,

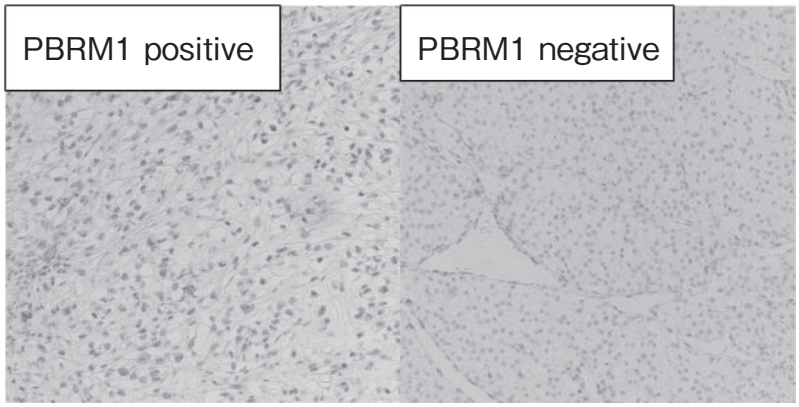


図 1

CD163, CD204の発現とPBRM1の発現について**図2**に示す。原発巣において、PBRM1タンパクの発現はCD8, CD163, CD204の浸潤には影響しなかった。しかしながら、転移巣において、CD8の浸潤はPBRM1陽性の腫瘍に有意に多く、CD163の浸潤は、PBRM1陰性の腫瘍に多く認めた。

【考察】

PBRM1遺伝子変異を有する腫瘍では、機能欠損が起きるため、IHCを実施した際に、タンパク発現が陰性となる[7)]。PBRM1タンパク欠失を起こした症例では、Interferon-γ経路の活性化が起こり、抗腫瘍的な免疫環境が起きることが予想された。しかしながら、本研究の結果、原発巣では有意差が見られなかったものの、転移巣において、PBRM1陰性の腫瘍の方が逆にCD8陽性T細胞の浸潤が少なく、CD163陽性M2-TAMの浸潤が多くみられ、腫瘍に対して免疫抑制的な腫瘍微小環境を呈していた。本研究は小規模な研究であり、かつCD4陽性T細胞や、制御性T細胞などの免疫細胞について検討していない事が

表 1

	Number（%）
Median age [range] at initial diagnosis	62 [40-80]
Male/female（%）	25/8（75.8/24.2）
T stage of primary site（%）	
pT1	15（45.5）
pT2	10（30.3）
pT3	8（24.2）
pT4	0（0）
Metastatic site	
Lung	26（78.8）
Lymph node	3（9.1）
Others	4（12.1）
(bone, opposite kidney and liver)	
Sample sourse	
Metastasectomy	32（97.0）
Complete	30（90.9）
Incomplete	2（6.1）
Biopsy	1（3.0）
MSKCC risk subgroup	
Good	27（81.8）
Intermediate	4（12.1）
Poor	0
Unknown	2（6.1）
Vital status	
Alive	22（66.7）
Death	11（33.3）

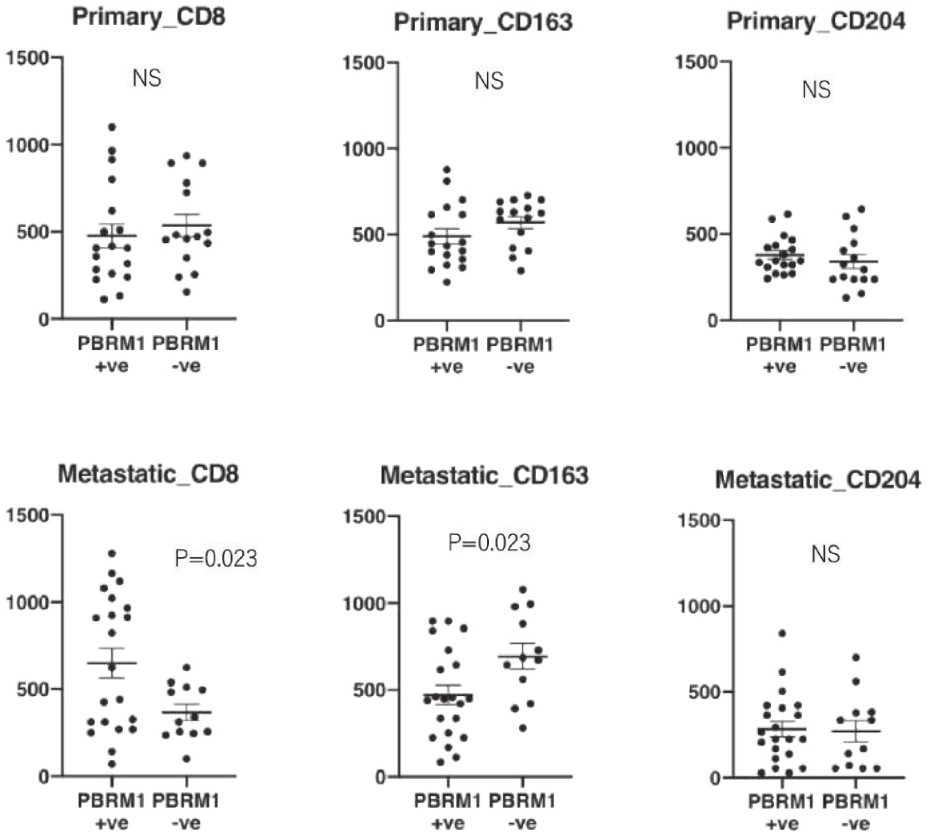


図２

Limitationとして考えられる。しかしながら、淡明細胞型腎細胞がんを対象とした、腫瘍微小環境についてのいくつかの研究では、CD8陽性T細胞の浸潤が多い方が予後不良であるという、他がん種とは逆の結果が示されている[8)]。この現象の理由については未だ明確な根拠は示されていないのが現状ではあるが、腫瘍浸潤T細胞のさらに詳細なphenotypeの解析や、抑制系の免疫細胞との関連などさらなる研究が望まれる。

【文献】

1. Miao D, Margolis CA, Gao W, Voss MH, Li W, Martini DJ, et al.: Genomic correlates of response to immune checkpoint therapies in clear cell renal cell carcinoma. Science 359: 801-806, 2018
2. Pan D, Kobayashi A, Jiang P, Ferrari de Andrade L, Tay RE, Luoma AM, et al.: A major chromatin regulator determines resistance of tumor cells to T cell-mediated killing. Science 359: 770-775, 2018
3. Miura Y, Inoshita N, Ikeda M, Miyama Y, Oki R, Oka S, et al.: Loss of BAP1 protein expression in the first metastatic site predicts prognosis in patients with clear cell renal cell carcinoma. Urol Oncol 35: 386-391, 2017
4. Oka S, Inoshita N, Miura Y, Oki R, Miyama Y, Nagamoto S, et al.: The loss of BAP1 protein expression predicts poor prognosis in patients with nonmetastatic clear cell renal cell carcinoma with inferior vena cava tumor thrombosis. Urol Oncol 36: 365 e9-e14, 2018
5. Koganemaru S, Inoshita N, Miura Y, Mi-

yama Y, Fukui Y, Ozaki Y, et al.: Prognostic value of programmed death-ligand 1 expression in patients with stage Ⅲ colorectal cancer. Cancer science 108: 853-858, 2017
6. Motoshima T, Miura Y, Wakigami N, Kusada N, Takano T, Inoshita N, et al.: Phenotypical change of tumor-associated macrophages in metastatic lesions of clear cell renal cell carcinoma. Med Mol Morphol 51: 57-63, 2018
7. Pena-Llopis S, Vega-Rubin-de-Celis S, Liao A, Leng N, Pavia-Jimenez A, Wang S, et al.: BAP1 loss defines a new class of renal cell carcinoma. Nat Genet 44: 751-759, 2012
8. Fridman WH, Zitvogel L, Sautes-Fridman C, Kroemer G: The immune contexture in cancer prognosis and treatment. Nat Rev Clin Oncol 14: 717-734, 2017

膵癌間質が惹起するヒト膵癌オルガノイドの薬剤抵抗性機能の解明

奥田　諒
横浜市立大学大学院臓器再生医学教室

【要約】

膵癌は早期発見が困難であることや、再発・転移が高率に生じることなどから、極めて予後不良な難治がんである[1,2]。膵癌による死亡者数は、我が国の癌による死亡者数の第5位に位置しており、新たな診断法・治療法の確立に向けた研究推進が急務となっている。膵癌の治療成績向上のためには、新規膵癌治療薬の開発が必要不可欠であるが、ヒト膵癌の高い治療抵抗性を再現する評価系の欠如などにより、膵癌に治療効果を示す抗癌剤の開発に至っていない。したがって、ヒト膵癌の治療抵抗性を再現することが出来る評価系を構築し、様々な薬剤のスクリーニングを実施することが極めて重要である。そこで、本研究ではヒト膵癌の治療抵抗性を再現する革新的な三次元組織の創出法の確立を目的とした。

これまでの様々な研究において、癌細胞の特性は腫瘍微小環境の影響を強く受けることが明らかとなっている。実際に膵癌組織は、癌幹細胞および癌幹細胞が分化した癌細胞に加えて、豊富な間質や腫瘍血管などの間質を含み、複雑な細胞社会により構成されている。膵癌組織内ではこれらの細胞により腫瘍微小環境が構成されており、膵癌細胞の治療抵抗性に深く関わることが数多く報告されている[3-5]。したがって、膵癌の治療法開発においては、腫瘍微小環境を再現しながら、膵癌細胞に対する薬剤の作用を解析することが重要となっている。

一方、これまでに、我々はiPS由来肝細胞と血管内皮細胞と間葉系細胞の3種類を共培養することにより肝臓の芽となる機能的「肝芽」の創出に成功している[6,7]。そこで、我々は、この臓器再構成技術を癌領域へ応用することにより、膵癌幹細胞とそれを取り巻く微小環境（血管、間質組織等）を含む膵癌組織の再構築が出来るのでは無いかと考え、本研究を推進した。

【目的】

本研究では膵癌間質が惹起するヒト膵癌オルガノイドの薬剤抵抗性機能の解明を目的とした。

【方法】

本研究では、従来法で作成することができなかった生体外におけるヒト膵癌組織を創出し、その有用性を明らかにする。そのため膵癌細胞、間質成分とを独自の革新的三次元培養技術を用いて共培養することにより薬剤評価系を構築する。

【結果】

最初に、複数の膵癌細胞株を二次元培養下で培養し、培養24時間後に抗がん剤に対する薬剤感受性を評価した。10^{-12} ～ 10^{-3}Mの濃度の抗がん剤を含む培地中で膵癌細胞株を培養し、薬剤添加後72時間目の生存細胞数からIC50を算出した結果、膵癌細胞株A、B、CのIC50はそれぞれ0.03 μM、0.7 μM、0.2 μMであった。膵癌細胞株Aは薬剤感受性が高いが、膵癌細胞株Bは低いこと、また、膵癌細胞株CはA、Bの間の中間的な*in vitro*薬剤感受性を示すことが明らかとなった。

次に、膵癌細胞株を免疫不全マウスの皮下に移植後、形成されたヒト膵癌ゼノグラフトについて、*in vivo*薬剤感受性を評価した。その結果、膵癌細胞株AおよびBに由来するヒト膵癌ゼノグラフトは抗がん剤投与後、腫瘍退縮が確認されたが、膵癌細胞株Cに由来するヒト膵癌ゼノグラフトは腫瘍退縮が認められず、増大した。膵癌細胞株AとBはいずれも*in vivo*で抗がん剤投与に感受性を示すものの、*in vitro*での薬剤感受性に大きな乖離があることが明らかとなった。膵癌細胞株Cについては、*in vivo*では抗がん剤に強い抵抗性を示すものの、*in vitro*での薬剤感受性は細胞株

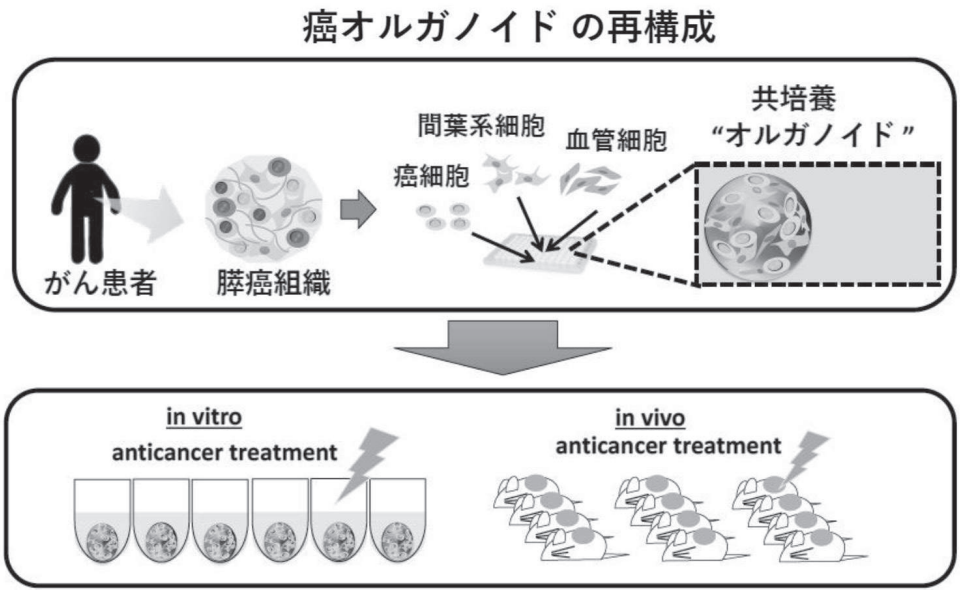


図１　膵癌オルガノイドの再構成
癌オルガノイドの再構成法を示す。ヒト膵癌細胞株、ヒト間葉系幹細胞、ヒト血管内皮細胞を三次元培養下で共培養し、癌オルガノイドを再構成した。その後、癌オルガノイドの薬剤感受性を*in vitro*および*in vivo*で評価した。本研究において、複数の細胞から成るヒト膵癌組織の再構成のための基本技術の検討をすすめた。

A, Bの中間を示した。以上の結果から、*in vitro*と*in vivo*で抗がん剤感受性に乖離があることを認め、創薬評価系の課題を明らかにした。

*in vitro*薬剤感受性と*in vivo*薬剤感受性の乖離の要因は双方の微小環境の違いにあると考えられる。*in vitro*における微小環境をヒト膵癌組織内での微小環境に近づけるため、*in vitro*において間質を含む癌組織を人為的に再構成する手法の開発を試みた。はじめに、膵癌細胞とストロマ細胞の培養条件を検討した。

ある一定の細胞比率で膵癌細胞株、血管内皮細胞、ストロマ細胞を共培養したところ、細胞の自立的な凝集が観察され、三種類の細胞から構成される癌オルガノイドが再構成された。蛍光レポーター遺伝子を導入した癌細胞を用いて癌オルガノイドの再構成過程を検討し、追尾定点観察を行った。その結果、癌オルガノイドの再構成過程では三種類の細胞が混ざり合いながら一つの組織体を形成することが確認された。次いで、様々な膵癌細胞を用いて癌オルガノイドが再構成されるか否かを検討したところ、3種類の異なる細胞株より癌オルガノイドが再構成されることを確認した。これらのことより､癌オルガノイドの再構成法は、様々な膵癌細胞において高い再現性を持つことが明らかとなった（**図1**）。

再構成した膵癌オルガノイドの特性を検討した。癌オルガノイドを免疫不全マウスに移植し、腫瘍形成能力を評価したところ、癌オルガノイドが腫瘍形成能力を有することを確認した。以上より、我々が開発した膵癌オルガノイドの再構成法は、微小環境を有したヒト膵癌の人為的創出に向けて、極めて有益な培養手法となることが明らかとなった。

【考察】

抗がん剤開発においては、薬剤評価の再現性を確保することが重要とされ、一般的に癌細胞株を用いた評価が行われている。癌細胞株を用いた評価としては、*in vitro*アッセイと*in vivo*アッセイの双方が存在するが、いずれもヒト膵癌の高い治療抵抗性を再現する点で課題がある。まず、*in*

vivo アッセイは、免疫不全マウスの皮下でゼノグラフトを作製し薬剤評価が行われるが、ゼノグラフトが膵癌原発巣の高い治療抵抗性を再現することが困難であることが問題となっている。この様な状況のもと、本研究において癌オルガノイドが膵癌の腫瘍微小環境を再現する上で有用であることが明らかとなった意義は大きい。癌オルガノイド再構成法は、再現性が必要とされるヒト癌組織の評価において有益な基盤技術となるものと考えられ、膵癌の新たな治療法開発を推進する上で広く役立つものと考えられる。

本研究では、癌オルガノイドの特性の一端を明らかにしたが、ヒト膵癌組織との同等性を評価するためには、今後、様々な角度からの解析が必要である。

ヒト膵癌組織に類似した膵癌組織を再構成する上で有益な膵癌細胞の検討も必要である 株化膵癌細胞は樹立から長い年月が経過し、長期間にわたる培養の間に遺伝子異常の蓄積やエピジェネティックな変化が生じている可能性が考えられる。したがって、膵癌患者より分離直後の膵癌細胞を用いた再構成法の確立も重要と考えられる。

本研究により確立したがんオルガノイド再構成技術は、膵癌のみならず、脳腫瘍やスキルス胃がんなどの間質を有するがんの再構成においても有益と考えられる。

【文献】

1. Jörg R, Matthias L: The MUC gene family: Their role in diagnosis and early detection of pancreatic cancer. Molecular Cancer 2: 9, 2003
2. Harry S, et al.: Survival advantage of combined chemoradiotherapy compared with resection as the initial treatment of patients with regional pancreatic carcinoma. Cancer 89: 314-327, 2000
3. Jean-Claude Cutz, et al.: Establishment in severe combined immunodeficiency mice of subrenal capsule Xenografts and transplantable tumor lines from a variety of primary human lung cancer: potential models for studying tumor progression-related changes. Clinical Cancer Research 12: 4043-4054, 2006
4. Olive KP, et al.: Inhibition of hedgehog signaling enhances delivery of chemotherapy in a mouse model of pancreatic cancer. Science 324: 1457-1461, 2009
5. Provenzano PP, et al.: Enzymatic targeting of the stroma ablates physical barriers to treatment of pancreatic ductal adenocarcinoma. Cancer Cell 21: 418-429, 2012
6. Takebe T, et al.: Vascularized and functional human liver from an iPSC-derived organ bud transplant. Nature 499: 481-484, 2013
7. Takebe T, et al.: Vascularized and complex organ buds from diverse tissues via mesenchymal cell-driven condensation. Cell Stem Cell 16: 556-565, 2015

（15）病理診断

培養細胞の分化や悪性度評価に対する形態学的Grading systemの作成

－培養細胞評価に対する形態学的アプローチ－

井下　尚子[1]、福原　紀章、西岡　宏
須賀　英隆[2]、筆宝　義隆[3]
東京都健康長寿医療センター病理診断科[1]
名古屋大学内分泌代謝内科[2]
千葉がんセンター発がん制御研究部[3]

【要約】

3次元培養組織の評価を形態学的に行うには、細胞ごとの極性、組織集塊としての極性に注目し、通常の組織切片や細胞診断技術と異なる、3次元培養組織に対する形態学的評価方法の確立が必要である。本年の研究では、胆汁やERCP検体から採取した胆管癌あるいは膵癌の癌オルガノイド、およびヒトiPS細胞由来3次元培養下垂体組織の評価を行った。その評価ポイントを示した。

【目的】

オルガノイド培養技術は臓器を模倣した構造を有する3次元の細胞塊を形成可能としたため、細胞接着性、細胞の極性、分化方向などを評価する必要が出てきた。

がん医療では、少数の癌細胞からオルガノイド培養を行うことが可能となり、病理診断や治療効果予測試験などへの応用が期待できる。再生医療におけるES細胞やiPS細胞を用いて分化誘導させた細胞集塊は1種類の細胞のみからなるわけではなく、複数種に分化した細胞がそれぞれ役割をもっているため、3次元構築を形成するためにどのような細胞がどのように配列しているか検討することが必要であるが、未知の領域である。

そこで、共同研究者らの作製した3次元培養組織を病理学的に評価して得た知見を提示する。

【方法】

ホルマリン固定パラフィン包埋切片やグルタールアルデヒド固定樹脂包埋電顕標本を用いた免疫染色などを用いて、細胞を構成する小器官の分化/成熟評価を行った。①がんオルガノイドでは、胆汁やERCP検体から得られた腺癌細胞を用いた。腺癌の分化はオルガノイドを用いてどのように評価するか、に注目した。②再生医療分野では、iPS細胞から複数方向へ分化した細胞を含む3次元培養下垂体組織の3次元構築に注目し、成熟過程を段階的に観察した。

【結果】

（1）がんオルガノイドは、マトリゲルを用いて

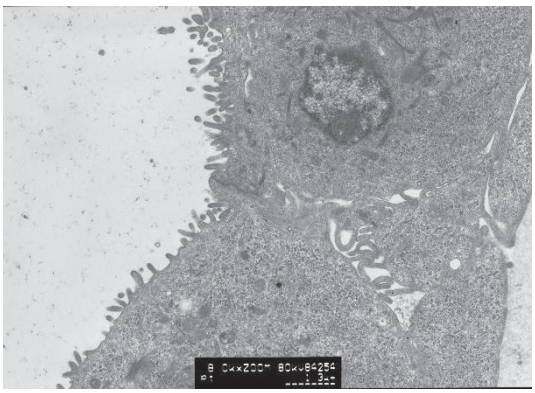


図１　膵癌オルガノイド、電顕。左側が腺腔、線毛を持つ。右下がマトリゲル側。オルガノイドは1種の細胞からなるが、細胞/配列のいずれにも極性がある。

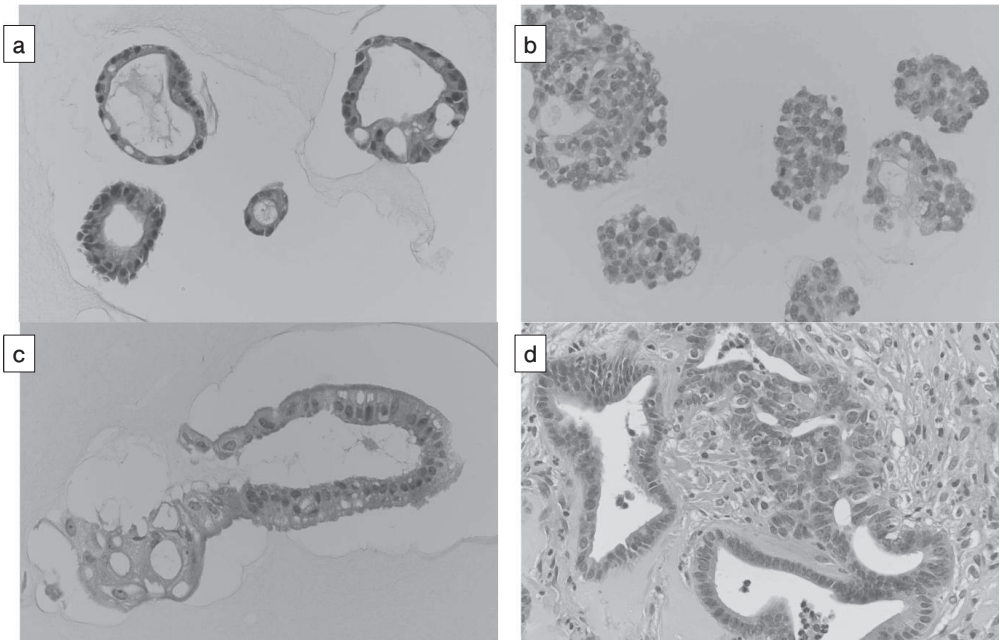


図２　膵癌オルガノイド、パラフィン切片HE標本。ａ）高分化腺癌、淡いピンク色の基質はマトリゲル。ｂ）低分化腺癌、ｃ）オルガノイドの極性が反転するところ。一部マトリゲルを付着したままであるが、右側では間隙ができている。ｄ）ヌードマウス皮下移植組織。左に見えるピンク色の基質がマトリゲルを含む部分。これを欠く領域では、がんの異型が強い。

培養された。マトリゲルにはラミニンやCollagen IVという基底膜物質が多く含まれている。高分化腺癌の管状構造は、3次元組織の外側が基底膜側、内腔が腺腔側（apical）となっていた（**図1**）。この基底膜様物質に囲まれたという利点から、非腫瘍性上皮細胞や異型の弱い腺腫相当の上皮細胞もごく小さな腺腔を形成し培養可能であった。また、低分化腺癌など、異型が強くなるに従い、inside-outというような、立体培養された組織の、外側と内側が入れ替わる現象が観察され、外側では、マトリゲルと細胞集塊の間に隙間ができるようになった（**図2a-c**）。

3次元培養組織をヌードマウス皮下に移植したPDX移植モデルでは、異型の弱い上皮はともに注入されたマトリゲル周囲のみで生存可能、異型の強いがんは、マトリゲル内では極性を保った高分化腺癌（上皮内癌）の性質、マトリゲル外（マウス間質に直接接する部分）ではより低分化で異型の強い成分の所見を呈していた（**図2d**）。

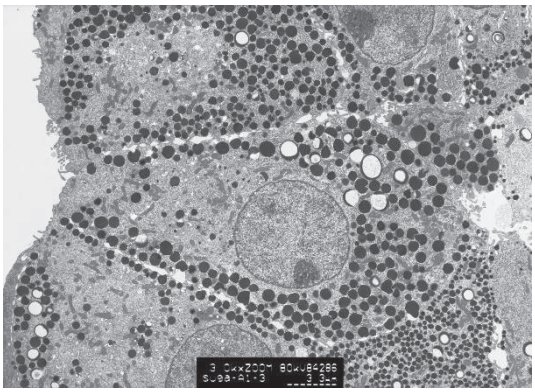


図３　ヒトiPS細胞由来下垂体組織。左が組織集塊表面、薄く上衣分化した細胞が覆っているのがわかる、線毛あり。細胞内に黒いドットに見えているのが内分泌顆粒。これは、免疫電顕により、ACTHであった。細胞内小器官の発達も目立つ。

（2）3次元培養下垂体組織では、基底膜物質を欠く調整培養液を使用した。内分泌細胞分化に伴

い、免疫染色でホルモン産生を確認できたとともに、電顕では分泌顆粒を多数認めるようになった[1)]。また、成熟に従い、集塊表面には線毛を持つ上衣細胞に分化した細胞が薄く覆うようになった（**図3**）。

【考察】

近年の細胞培養技術の進歩は、癌研究および再生医療に大きく寄与している。今まで一般的に行われてきた平板培地を用いた培養細胞では、細胞は個細胞性、シート状に増殖するため、立体構造を形成することはなく、細胞の分化を評価することは困難であった。

今回の観察で、培養液に基底膜物質が豊富であれば、上皮細胞は培養液が基底膜、細胞集塊内の空隙が腺腔側に分化していた。腺癌では、異型が強くなれば、生体内と同じように、基底膜物質がなくとも増殖することが可能である。また基底膜様物質がなければ、3次元組織の外側が外界、すなわち、腺腔側への分化（線毛など）を示す。

このように培養細胞の極性に注目することで、がんオルガノイドの分化度の評価は可能である。また再生医療を目的とした3次元組織では、どのような場所に移植するかを見据えた培養環境の調整が必要であろう、と考える。

【文献】

1. Kasai T, Suga H, Sakakibara M, Ozone C, Matsumoto R, Kano M, Mitsumoto K, Ogawa K, Kodani Y, Nagasaki H, Inoshita N, Sugiyama M, Onoue T, Tsunekawa T, Ito Y, Takagi H, Hagiwara D, Iwama S, Goto M, Banno R, Takahashi J, Arima H: Hypothalamic contribution to pituitary functions recapitulated *in vitro* using 3D-culture of human iPS cells. Cell Reports 30:18-24, 2020

（16）感染症疾患

Helicobacter cinaedi（ヘリコバクター・シネディ）感染症に関する研究

荒岡　秀樹、馬場　勝、米山　彰子

【要約】

*Helicobacter cinaedi*は腸管在位*Helicobacter*属のひとつであり、ヒトに感染を起こす腸管在位*Helicobacter*属のなかで最も報告が多い菌種である。私たちの一連の研究では、*H. cinaedi*の同定法は、既報を参考にしたgyrB-targeted PCRを用いてきた。また、16S rRNAなどの遺伝子学的検査も有用とされるが、これらの同定法は日常の検査室で簡便に施行できるものではなかった。近年、Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry（MALDI-TOF MS）が細菌の同定に用いられる機会が増加している。本研究ではヒトから分離された*H. cinaedi*菌株のMALDI-TOF MSによる同定の有用性を検証した。2015年6月から2017年7月までに血液培養から分離した*H. cinaedi* 54株を対象とした。同定のgold standardはgyrB-targeted PCRとし、参考として一部16S rRNAを併せて実施した。全54株において、MALDI-TOF MSのbest matchは*H. cinaedi*であった。Score valueは >2.0が2株、1.7-1.999が50株、<1.7が2株であった。特に同定の信頼性が低いとされるscore value <1.7の2株について16S rRNAで確認したところ、*Helicobacter* speciesとの同定に留まった。以上より、MALDI-TOF MSは*H. cinaedi*の同定に有用であることが示唆された。

【目的】

*Helicobacter cinaedi*は腸管在位*Helicobacter*属のひとつであり、ヒトに感染を起こす腸管在位*Helicobacter*属のなかで最も報告が多い菌種である。*H. cinaedi*は、1984年に米国においてホモセクシャルな男性の直腸から初めて分離された。*H. cinaedi*による感染症の臨床症状は、蜂窩織炎、腸炎、髄膜炎、感染性動脈瘤、化膿性脊椎炎など多彩な報告があるが、その多くは血液培養から本菌が検出される（菌血症）ことで認知される[1)]。

私たちの一連の研究では、*H. cinaedi* の同定法は、既報を参考にしたgyrB-targeted PCRを用いてきた[1-3)]。また、16S rRNAなどの遺伝子学的検査も有用とされるが、これらの同定法は日常の検査室で簡便に施行できるものではなかった。

近年、Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry（MALDI-TOF MS）が細菌の同定に用いられる機会が増加している。*H. cinaedi*の同定におけるMALDI-TOF MSの有用性を検証した報告は未だなく、有用であることを証明できれば、同定・診断がより容易となる。

以上より、本研究ではヒトから分離された*H. cinaedi*菌株のMALDI-TOF MSによる同定の有用性を検証した。

【方法】

2015年6月から2017年7月までに、虎の門病院本院、虎の門病院分院で血液培養から分離した*H. cinaedi* 54株を対象とした。血液培養システムはBACTEC 9240 と BACTEC FX system（Becton Dickinson Microbiology Systems, Sparks, MD, USA）を用いた。血液培養観察期間は7日間とした。同定のgold standardはgyrB-targeted PCR[4)]（195 bp; forward primer: 5′-AGGGATTCCACAAAGTGAGC-3′; reverse primer: 5′-TCTTGTCCTGTGCGTTCATC-3′）とし、参考として一部16S rRNAを併せて実施した。16S rRNA を実施した菌株の基準は、MALDI-TOF MSのscore valueが >2.0の全株、1.7-1.999のうちランダムに選択した2株、<1.7

表 1　*H. cinaedi* 菌血症 54 菌株の PCR、MALDI-TOF MS、16s RNA での同定結果

No. of strain	PCR	MALDI-TOF MS				16s RNA
		Organism (best match)	Score value	Organism (second best match)	Score value	
1	*H. cinae di*	*H. cinaedi*	1.804	*H. cinaedi*	1.72	
2	*H. cinaedi*	*H. cinaedi*	1.873	*H. cinaedi*	1.803	*H. cinaedi*
3	*H. cinaedi*	*H. cinaedi*	1.861	*H. cinaedi*	1.857	
4	*H. cinaedi*	*H. cinaedi*	1.887	*H. cinaedi*	1.817	
5	*H. cinaedi*	*H. cinaedi*	1.881	*H. cinaedi*	1.646	
6	*H. cinaedi*	*H. cinaedi*	1.778	*H. cinaedi*	1.604	
7	*H. cinaedi*	*H. cinaedi*	1.805	*H. cinaedi*	1.744	
8	*H. cinaedi*	*H. cinaedi*	1.931	*H. cinaedi*	1.796	
9	*H. cinaedi*	*H. cinaedi*	1.986	*H. cinaedi*	1.961	
10	*H. cinaedi*	*H. cinaedi*	1.629	*H. cinaedi*	1.339	*Helicobacter spedies*
11	*H. cinaedi*	*H. cinaedi*	1.56	*H. cinaedi*	1.362	*Helicobacter spedies*
12	*H. cinaedi*	*H. cinaedi*	1.928	*H. cinaedi*	1.852	*H. cinaedi*
13	*H. cinaedi*	*H. cinaedi*	1.924	*H. cinaedi*	1.881	
14	*H. cinaedi*	*H. cinaedi*	1.867	*H. cinaedi*	1.745	
15	*H. cinaedi*	*H. cinaedi*	1.797	*H. cinaedi*	1.791	
16	*H. cinaedi*	*H. cinaedi*	1.815	*H. cinaedi*	1.668	
17	*H. cinaedi*	*H. cinaedi*	1.793	*H. cinaedi*	1.764	
18	*H. cinaedi*	*H. cinaedi*	1.91	*H. cinaedi*	1.79	
19	*H. cinaedi*	*H. cinaedi*	1.864	*H. cinaedi*	1.855	
20	*H. cinaedi*	*H. cinaedi*	1.815	*H. cinaedi*	1.639	
21	*H. cinaedi*	*H. cinaedi*	1.896	*H. cinaedi*	1.803	
22	*H. cinaedi*	*H. cinaedi*	1.755	*H. cinaedi*	1.701	
23	*H. cinaedi*	*H. cinaedi*	1.804	*H. cinaedi*	1.695	
24	*H. cinaedi*	*H. cinaedi*	1.862	*H. cinaedi*	1.812	
25	*H. cinaedi*	*H. cinaedi*	1.905	*H. cinaedi*	1.837	
26	*H. cinaedi*	*H. cinaedi*	1.906	*H. cinaedi*	1.875	
27	*H. cinaedi*	*H. cinaedi*	1.769	*H. cinaedi*	1.674	
28	*H. cinaedi*	*H. cinaedi*	1.738	*H. cinaedi*	1.689	
29	*H. cinaedi*	*H. cinaedi*	1.717	*H. cinaedi*	1.705	
30	*H. cinaedi*	*H. cinaedi*	1.791	*H. cinaedi*	1.71	
31	*H. cinaedi*	*H. cinaedi*	1.817	*H. cinaedi*	1.777	
32	*H. cinaedi*	*H. cinaedi*	1.857	*H. cinaedi*	1.855	
33	*H. cinaedi*	*H. cinaedi*	1.963	*H. cinaedi*	1.926	
34	*H. cinaedi*	*H. cinaedi*	1.825	*H. cinaedi*	1.812	
35	*H. cinaedi*	*H. cinaedi*	1.808	*H. cinaedi*	1.805	
36	*H. cinaedi*	*H. cinaedi*	1.876	*H. cinaedi*	1.768	
37	*H. cinaedi*	*H. cinaedi*	1.778	*H. cinaedi*	1.742	
38	*H. cinaedi*	*H. cinaedi*	1.901	*H. cinaedi*	1.794	
39	*H. cinaedi*	*H. cinaedi*	2.004	*H. cinaedi*	1.832	*H. cinaedi*
40	*H. cinaedi*	*H. cinaedi*	1.815	*H. cinaedi*	1.769	
41	*H. cinaedi*	*H. cinaedi*	1.96	*H. cinaedi*	1.896	
42	*H. cinaedi*	*H. cinaedi*	1.884	*H. cinaedi*	1.858	
43	*H. cinaedi*	*H. cinaedi*	1.95	*H. cinaedi*	1.924	
44	*H. cinaedi*	*H. cinaedi*	1.988	*H. cinaedi*	1.885	
45	*H. cinaedi*	*H. cinaedi*	1.936	*H. cinaedi*	1.888	
46	*H. cinaedi*	*H. cinaedi*	1.767	*H. cinaedi*	1.763	
47	*H. cinaedi*	*H. cinaedi*	1.765	*H. cinaedi*	1.755	
48	*H. cinaedi*	*H. cinaedi*	1.988	*H. cinaedi*	1.736	
49	*H. cinaedi*	*H. cinaedi*	1.711	*H. cinaedi*	1.673	
50	*H. cinaedi*	*H. cinaedi*	1.735	*H. cinaedi*	1.378	
51	*H. cinaedi*	*H. cinaedi*	1.827	*H. cinaedi*	1.375	
52	*H. cinaedi*	*H. cinaedi*	1.806	*H. cinaedi*	1.52	
53	*H. cinaedi*	*H. cinaedi*	1.905	*H. cinaedi*	1.833	
54	*H. cinaedi*	*H. cinaedi*	2.008	*H. cinaedi*	1.883	*H. cinaedi*

の全株とした。MALDI-TOF MSはMALDI Biotyper（Microflex LT, flex control 3.4.135.0, MALDI Biotyper 1.0; Bruker Daltonics, Bremen, Germany）、direct smear法を用いた。

【結果】

*H. cinaedi*菌血症54菌株のPCR、MALDI-TOF MS、16s RNAでの同定結果を**表1**に示す。全54株において、MALDI-TOF MSのbest matchは*H. cinaedi*であった。Score valueは >2.0が2株、1.7-1.999が50株、<1.7が2株であった。特に同定の信頼性が低いとされる score value <1.7の2株について16S rRNAで確認したところ、*Helicobacter* speciesとの同定に留まった。Score valueが >2.0の2株、1.7-1.999の2株については*H. cinaedi*であったことが確認できた。

【考察】

本研究は、多数のヒト由来の*H. cinaedi*菌株を用いてMALDI TOF-MSの有用性を検証した初めてのものである。これまでTaniguchiらがヒト、犬、猫、ハムスターから検出した*Helicobacter* species 68株をMALDI TOF-MSで同定した報告があった。今回の研究と合わせて、MALDI TOF-MSの有用性をサポートするエビデンスとなると考えられる[5]。

本研究のlimitationとして、54菌株中2株のscore valueが <1.7であったことの理由が明らかでないことがあげられる。この理由は以下の2つの可能性を考えている。(1)MALDI TOF-MSのlibraryに入っていなかった。MALDI Biotyper 1.0を今回の研究では使用しており、最新のlibraryに更新すると別の結果が出ていた可能性が残る。(2)*H. cinaedi*の近縁の菌株であった可能性がある。腸管在位*Helicobacter*属の菌種同定は困難で、近年新菌種の報告が相次いでいる[6]。

今後、さらに菌株を増やし、MALDI TOF-MSのlibraryもアップデートして検証を進める予定である。

【結語】

MALDI-TOF MSは*H. cinaedi*の同定に有用であることが示唆された。

以上をまとめて、Diagn Microbiol Infect Dis. 2020; 96(3): 114964. PMID: 31884027、に報告した[7]。

【文献】

1. Araoka H, Baba M, Kimura M, Abe M, Inagawa H, Yoneyama A: Clinical characteristics of bacteremia caused by *Helicobacter cinaedi* and time required for blood cultures to become positive. J Clin Microbiol 52: 1519-1522, 2014
2. Araoka H, Baba M, Okada C, Kimura M, Sato T, Yatomi Y, Moriya K, Yoneyama A: First evidence of bacterial translocation from the intestinal tract as a route of *Helicobacter cinaedi* bacteremia. Helicobacter 23. e12458, 2018
3. Araoka H, Baba M, Okada C, Kimura M, Sato T, Yatomi Y, Moriya K, Yoneyama A: Risk Factors for Recurrent *Helicobacter cinaedi* Bacteremia and the Efficacy of Selective Digestive Decontamination With Kanamycin to Prevent Recurrence. Clin Infect Dis 67: 573-578, 2018
4. Minauchi K, Takahashi S, Sakai T, Kondo M, Shibayama K, Arakawa Y, Mukai M: The nosocomial transmission of *Helicobacter cinaedi* infections in immunocompromised patients. Intern Med 49: 1733-1739, 2010
5. Taniguchi T, Sekiya A, Higa M, Saeki Y, Umeki K, Okayama A, Hayashi T, Misawa N: Rapid identification and subtyping of *Helicobacter cinaedi* strains by intact-cell mass spectrometry profiling with the use of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. J Clin Microbiol 52: 95-102, 2014
6. Kawamura Y, Tomida J, Miyoshi-Akiyama T, Okamoto T, Narita M, Hashimoto K, Cnockaert M, Vandamme P, Morita Y, Sawa T, Akaike T: Proposal of *Helicobacter* canicola sp. nov., previously identified as *Helicobacter* cinaedi, isolated from canines. Syst Appl Microbiol 39: 307-312, 2016

7. Endo Y, Araoka H, Baba M, Okada C, Kimura M, Higurashi Y, Sato T, Yatomi Y, Moriya K, Yoneyama A: Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry can be used to identify *Helicobacter cinaedi*. Diagn Microbiol Infect Dis 96: 114964, 2020 (Endo Y and Araoka H contributed equally to this work)

高病原性鳥インフルエンザウイルスのヒト適応性変異の高感度・高速診断デバイスの開発とパンデミック阻止

鈴木　康夫
中部大学生命健康科学部

【要約】

高病原性鳥インフルエンザウイルス（H5N1亜型）のヒト適応性変異を高感度・高速・簡便に診断するイムノクロマトを原理とするデバイスを開発した。さらにこのデバイスは、実際にエジプトやインドネシアで発生した高病原性鳥インフルエンザウイルス（H5N1）のヒト型レセプターへの結合性変異を迅速に診断できることを明らかにした。

すなわち、化学合成したウイルス受容体シアル酸（Sia）含有糖鎖（シアロ糖鎖、2-3Siaまたは2-6Sia）を各々赤色、青色ラテックスビーズ等の担体に結合させ、これにウイルス検体を結合させ、そのウイルスをH5N1抗体とヒト型、鳥型糖鎖を特異的に識別・結合できるレクチンを塗布したストリップ上に展開し、ヒト型、鳥型受容体認識H5N1ウイルスを特異的に目視識別検出させる簡易キットの試作品を開発した。

これを用いてインドネシアおよびエジプトで分離されたH5N1ウイルスを用いてヒト型レセプター（2-6Sia）への結合性を調べたところ、エジプトで分離されたH5ウイルスにヒト型レセプター（2-6Sia）に結合する株を見出した。

よって、この検査キットは、自然界でヒトへの感染が容易になった鳥インフルエンザウイルスの変異株を検出できることが明らかとなった。本法は、Siaへ結合できるその他のウイルス（例えば、コロナウイルス、パラインフルエンザウイルス、アデノウイルス、エンテロウイルス、レオウイルス、パルボウイルス、ムンプスウイルスなど）の検出にも応用できることが期待される。

【目的】

感染症に国境はない。2019年12月に中国から始まった新型コロナウイルス（SARS-CoV-2）の感染症（Covid-19）は世界中に拡大し続けており、迅速診断法の開発が切望されている。一方、高病原性鳥インフルエンザ（H5亜型、以下H5と略）ウイルスは、1997年、香港での発生以来、日本を含む少なくとも世界63ヶ国に広がり、17ヶ国でヒトへ伝播し、この感染も拡大し続けている。ヒトに対する致死率は約53％（455人死亡/861人感染、2020年5月8日現在、WHO）であり、極めて高い。これがヒト間伝播可能変異を遂げた場合、世界大流行（パンデミック）となり、数千万人規模の死者が出る可能性が指摘されている（WHO）。よってこの変異を事前に監視し、感染防疫体制を確立することが強く望まれてる。これまで発生したインフルエンザ世界流行（パンデミック）は、全て鳥インフルエンザウイルス（以下、鳥ウイルス）がヒト喉、上気道にあるウイルス受容体（鳥が持つ鳥型受容体とは異なるヒト型受容体）への結合性獲得変異（ヒト適応変異）を起こした結果（ブタなどの中間宿主を介する場合もある）、ヒト世界で蔓延したものである。そこで、鳥ウイルスのヒトへの適応性変異の監視は、パンデミック発生の予知、防疫に極めて重要である。そこで、高病原性鳥インフルエンザウイルス（H5N1）のヒト適応性変異の高感度・高速診断デバイスの開発を試みた。

【方法】

申請者らは、「鳥、ヒトインフルエンザウイルスが特異的に結合できる2種の異なるシアロ糖鎖ポリマー：Sia α 2-3（または2-6）Gal β 1-4GlcNAc β 1-spacer-グルタミン酸ポリマー」の化学合成に成功し、これを96穴プレートに固相化し、鳥型およびヒト型ウイルスを分別して測定出来る基本技術（ELISA）・材料を創成した[1, 2]。今回、この技術をもとに、新しいイムノクロマト

を原理とする高病原性鳥インフルエンザウイルス（H5N1）のヒト適応性変異の高速、軽量、簡便診断デバイスの開発を試みた。

【結果】

(1) イムノクロマトを原理とした高病原性鳥インフルエンザウイルス（H5N1）のヒト型レセプター結合適応性変異獲得の高感度・高速・簡便診断デバイスの開発

化学合成したウイルス受容体シアロ糖鎖（α2-3シアロ糖鎖またはα2-6シアロ糖鎖）を各々赤色、青色ラテックスビーズ等の担体に結合させ糖鎖修飾ラテックスビーズを作成した（**図1**）。これにウイルス検体を結合させ、そのウイルスをH5N1抗体（C179）とヒト型、鳥型糖鎖を特異的に識別・結合できるレクチンを塗布したストリップ上に展開し、ヒト型、鳥型受容体認識H5N1ウイルスを特異的に目視識別検出させる簡易キットの試作品を開発した（**図2**）。ウイルス検出に用いたモノクローナル抗体（C179）は、インフルエンザウイルスヘマグルチニングループ1（H1, H2, H5, H6, H9）に反応することを確認した（**図1**）。

このシステムは、全行程を30分以内に終了でき、判定を目視で行うため、高額の機器を必要と

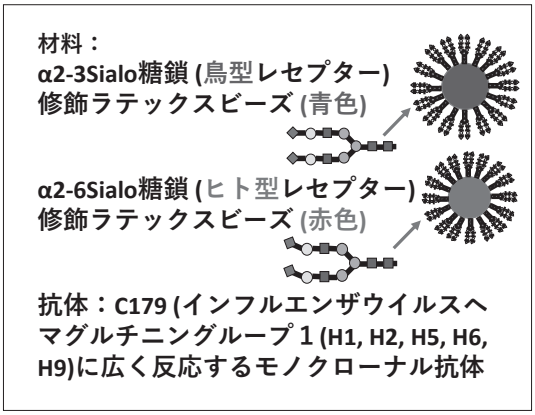


図１　鳥型レセプター（α2-3シアロ糖鎖）およびヒト型レセプター（α2-6シアロ糖鎖）で修飾したラテックスビーズおよび用いたモノクローナル抗体の性質

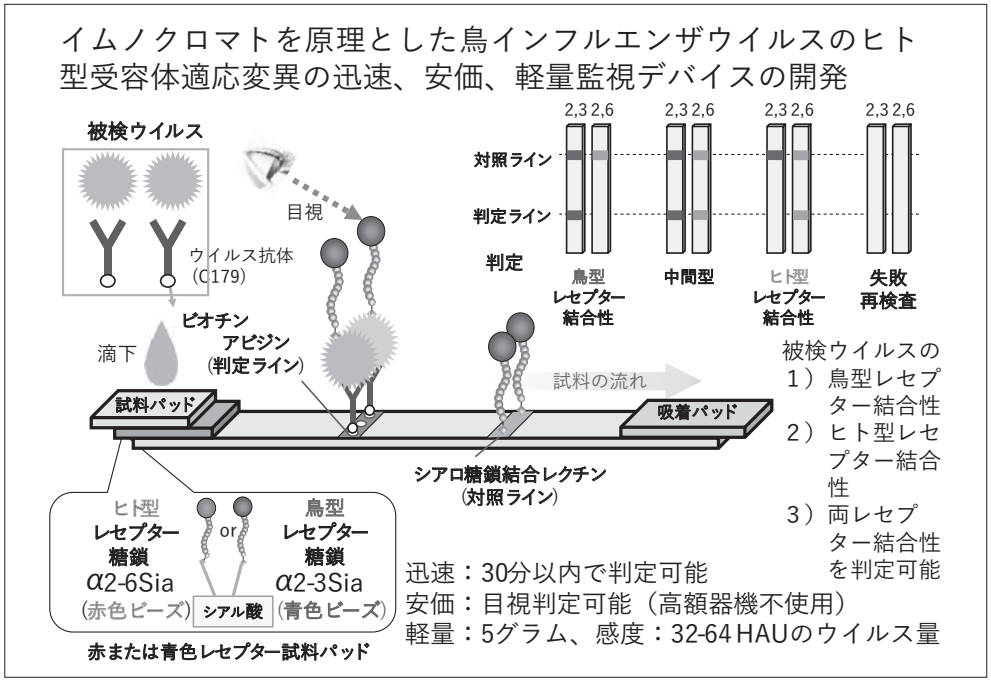


図２　イムノクロマトを原理とした鳥インフルエンザウイルス（H5N1）のヒト型レセプター適応変異の迅速、安価、軽量デバイスの開発

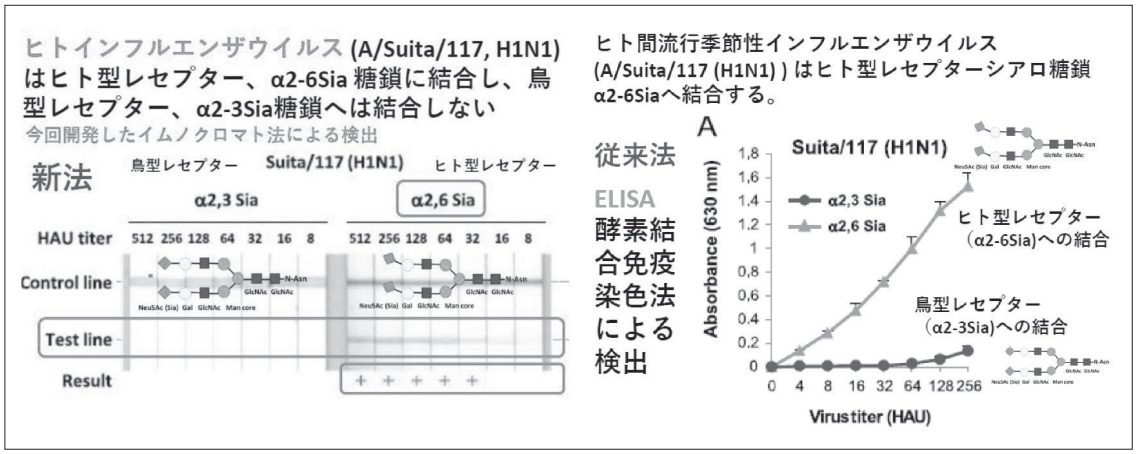


図３　今回試作したイムノクロマトを原理とした鳥インフルエンザウイルス（H5N1）のヒト型レセプター適応変異診断デバイスのヒトインフルエンザウイルスに対する反応性（左）および同一ウイルスを従来法（ELISA法）で測定した反応性（右）の比較

せず、重さも5グラム程度であり、現場まで自由に持ち運びできる。用いるウイルス量は、赤血球凝集阻止活性（HA）単位として32-64で測定可能である。

(2) 試作したイムノクロマトを原理とする鳥インフルエンザウイルス（H5N1）のヒト型レセプター適応変異診断デバイスの反応特異性

①ヒトインフルエンザウイルスに対する反応特異性

ヒト間で流行を繰り返している季節性ヒトインフルエンザウイルスはヒト型レセプター（α2-6シアロ糖鎖）へ結合するが、鳥型レセプター（α2-3シアロ糖鎖）への結合性は極めて弱い。

今回試作したデバイスがヒトおよび鳥型レセプターをきちんと識別できるか否かを先ず季節性ヒトインフルエンザウイルスを用いて評価した。その結果、ヒト間で流行する季節性インフルエンザウイルス（A/Suita/117（H1N1）は、本デバイスを用いた場合ヒト型レセプター（α2-6シアロ糖鎖）のみへ結合し、鳥型レセプター（α2-3シアロ糖鎖）へは結合しなかった（**図3左**）。この結果は、これまで用いてきた従来法のELISA法（酵素結合免疫染色法）による結果（**図3右**）と良く一致しており、本デバイスは、ヒトインフルエンザウイルスのレセプター結合特異性を的確に識別できていることを証明した。

②鳥インフルエンザウイルスに対する反応特異性

鳥間で流行を繰り返している鳥インフルエンザウイルスは鳥型レセプター（α2-3シアロ糖鎖）へ結合するが、ヒト型レセプター（α2-6シアロ糖鎖）への結合性は極めて弱い。そこで、今回試作したデバイスがヒトおよび鳥型レセプターをきちんと識別できるか否かを実際に鳥から分離され、現在も発生している高病原性鳥インフルエンザウイルスH5N1亜型（A/EG/D1（H5N1））を用いて評価した（エジプトおよび京都府立医科大学との共同研究）。その結果、高病原性鳥インフルエンザウイルス（A/EG/D1（H5N1））は、本デバイスを用いた場合、鳥型レセプター（α2-3シアロ糖鎖）のみへ結合し、ヒト型レセプター（α2-6シアロ糖鎖）へは結合しなかった（**図4左**）。この結果は、これまで用いてきた従来法のELISA法（酵素結合免疫染色法）による結果（**図4右**）と良く一致しており、本デバイスは、ヒトインフルエンザウイルスのレセプター結合特異性を的確に識別できていることを証明した。

③高病原性鳥インフルエンザウイルス（H5N1）検体中のヒト型レセプター結合特異性変異を遂げたウイルスの検索

インドネシアでは2005年以降、高病原性鳥イ

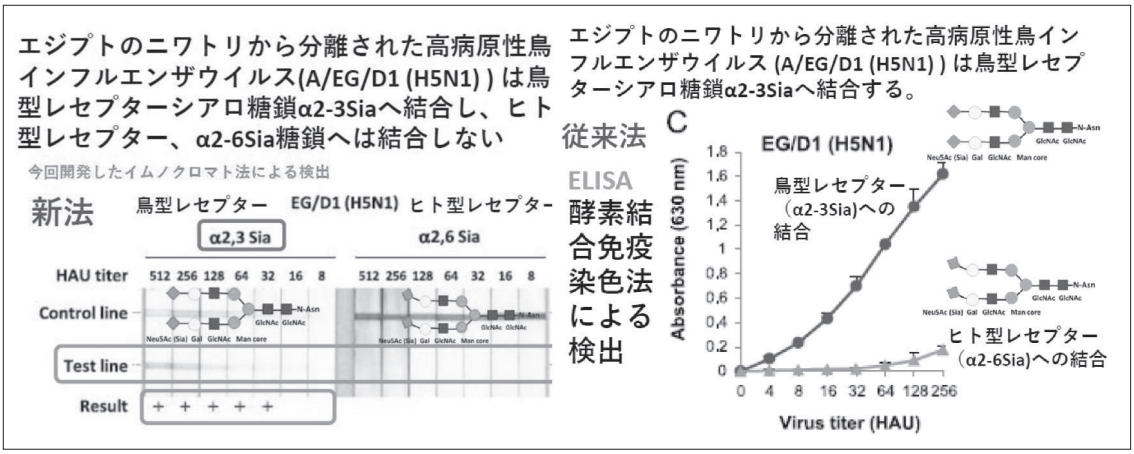


図４　今回試作したイムノクロマトを原理とする高病原性鳥インフルエンザウイルス（H5N1）のヒト型レセプター適応変異診断デバイスのエジプトで分離された鳥インフルエンザウイルス（A/EG/D1（H5N1））に対する反応性（左）および同一ウイルスを従来法（ELISA法で）測定した反応性（右）の比較

ンフルエンザウイルス（H5N1）がヒトから分離されており、2020年1月現在、ヒトへの感染例は200例、うち、死者は168人であり致死率は84％にのぼる（2020年、WHO）。今回、新たに開発したデバイスを用いて、インドネシアでニワトリ、カモから2013年～2015年に分離された高病原性鳥インフルエンザウイルス（H5N1）10株について、ヒト型レセプター（α2-6シアロ糖鎖）結合性変異を遂げたウイルスが存在するか否かにつき調べた結果、ヒト型レセプターへの結合性を獲得した変異株は見いだされなかった（インドネシア国立アイルランガ大学、神戸大学との共同研究）。一方、実際に2006年以降、鳥インフルエンザウイルス（H5N1）のヒトへの伝播が起こっているエジプト（死者120人/感染359人、致死率:33％、2020、WHO）において分離された高病原性鳥インフルエンザウイルス（H5N1）（2007年～2009年カモ、ニワトリ、グースからの分離株）について､ヒト型レセプター（α2-6シアロ糖鎖）への結合性を獲得した変異株を本法により検索した（エジプト・ダマンフール大学、京都府立医科大学との共同研究）。その結果、試験した19株中4株にヒト型レセプターへの結合性を獲得した変異株を見出した（Data not shown）。以上から、本デバイスは、実際に高病原性鳥インフルエンザが発生している国における本ウイルスのヒト適応性変異を監視できるデバイスであることを確認した。

【考察】

今回、イムノクロマトを原理とした高病原性鳥インフルエンザウイルス（H5N1）のヒト型レセプター結合適応性変異獲得の高速・簡便、軽量診断デバイスの試作品の開発に成功した。本デバイスは、重量はわずか5グラムで、持ち運びが可能である。試験の全行程は30分以内で完了できるものであり、これまでにない全く新しい高病原性鳥インフルエンザウイルスのヒト型変異獲得の診断、監視デバイスである。さらに、目視で結果を判定するので、高額な機器は不要であり、実際の鳥、ヒトインフルエンザウイルス分離株に応用できる特長をもつ。本デバイスにより検出可能なインフルエンザウイルスの量は、今のところ、赤血球凝集活性として32～64HAUである。このウイルス量を確保するには、採集したウイルスを、一度、MDCKなどの宿主細胞を用いて培養、増殖させる必要がある。よって、今後、本デバイスの改良する点として、診断に用いるウイルスの量をさらに減らして、より高感度なものにすることである。

以上から、本デバイスは、鳥、ヒトインフルエ

ンザウイルス、さらに鳥型レセプター（α2-3シアロ糖鎖）に結合する鳥インフルエンザウイルスのヒト型レセプター（α2-6シアロ糖鎖）への結合性を獲得したヒト適応性変異株を的確に判定できるデバイスであることを証明した。本技術、デバイスの実用化により、今後起こりうる可能性のある高病原性鳥インフルエンザウイルス（H5N1）および関連する高病原性鳥インフルエンザウイルス（例えば、H7N9亜型）のヒト適応性変異を事前に監視、診断でき、これらのウイルスのヒト世界におけるパンデミック阻止が可能となることが期待される。

本技術は、Siaを含む糖鎖（シアロ糖鎖）はもとより、シアル酸を含まない糖鎖をレセプターとする様々なウイルスや細菌の検出にも応用できるものである。シアロ糖鎖へ結合するウイルスはインフルエンザウイルス以外にも多く知られている。例えば、ヒトへの感染を起こす重要なウイルスとして、コロナウイルス、パラインフルエンザウイルス、アデノウイルス、エンテロウイルス、レオウイルス、パルボウイルス、ムンプスウイルスなどが挙げられる[3)]。本法は、これらのウイルスの迅速検出にも応用できることが期待される。

【文献】

1. Totani K, Kubota T, Kuroda T, Murata T, Hidari K, Suzuki T, Suzuki Y, Kobayashi K, Ashida H, Yamamoto K, Usui T: Chemoenzymatic synthesis and application of glycopolymers containing multivalent sialyloligosaccharides with a poly（L-glutamic acid）backbone for inhibition of infection by influenza viruses. Glycobiology 13: 315-326, 2003
2. Sriwilaijaroen N, Nakakita S-I, Kondo S, Yagi H, Kato K, Murata M, Hiramatsu H, Kawahara T, Watanabe Y, Kanai Y, Ono T, Hirabayashi J, Matsumoto K, Suzuki Y: *N*-glycan structures of human alveoli provide insight into influenza A virus infection and pathogenesis. FEBS J 285: 1611-1634, 2018
3. Sriwilaijaroen N, Suzuki Y: Sialoglycovirology of lectins: sialyl glycan binding of enveloped and non-enveloped viruses. In Lectin Purification and analysis: Methods Mol Biol. 2020; 2132: 483-515. Doi: 10.1007/978-1-0716-0430-4_47.(Hirabayashi J. ed). Humana Press, New York, NY.