冲中記念成人病研究所　年報47

2020年度
（令和２年度）

公益財団法人 冲中記念成人病研究所
Okinaka Memorial Institute for
Medical Research

令和２年度年報の刊行にあたって

代表理事　　大　内　尉　義

令和２年度の、冲中記念成人病研究所の年報をお届けいたします。当研究所の研究活動の成果と、運営状況に関する主な内容が記載されておりますので、ご覧頂ければ幸いに存じます。

当研究所の研究活動につきましては、引き続き活発に行われ、本年度申請の科学研費補助金につきましては、新たに基盤(C)２件、若手研究１件が採択され、継続の基盤(C)５件、若手研究９件、研究活動スタート支援１件と合わせて、計18件の採択となっています。研究助成事業につきましては、研究所専任研究員による基礎研究３件、および助成研究への応募119件のうち、厳正な審査で採択された30件について助成を行いました。いずれも素晴らしい研究計画内容ですが、それだけに採択率は25.2％と年々狭き門になってきています。なお、本年３月６日に予定されていた研究報告会は、昨年に引き続き、COVID-19の影響で中止されましたが、本年報にその成果が掲載されています。これら、研究所の活動状況につきましては、ホームページにも掲載してありますので、ご参照いただければと存じます。

最後になりましたが、この一年間、研究所の事業運営のために貴重なご寄付をいただきました企業、団体、および個人の方々に、研究所を代表して、厚く御礼申し上げます。また、内閣府を始めとする関係省庁およびご支援をいただいた方々のご指導に対して、深甚なる謝意を表し、令和２年度の年報発刊のご挨拶といたします。

令和３年５月

目　　次

1．2020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…… 1

B　研究助成者による研究…… 11

(1)血液疾患 …… 11

(2)内分泌・代謝疾患 …… 19

(3)呼吸器疾患 …… 34

(4)肝疾患 …… 44

(5)腎疾患 …… 51

(6)循環器疾患 …… 76

(7)消化器外科疾患 …… 79

(8)間脳下垂体疾患 …… 93

(9)感染症疾患 …… 95

(10)高齢者・認知症疾患…… 98

(11)神経内科疾患…… 100

(12)腫瘍性疾患…… 103

(13)脳神経外科疾患…… 111

(14)免疫疾患…… 113

(15)皮膚疾患…… 120

2．科学研究費その他の助成による研究…… 122

3．講演会　－冲研公開セミナー …… 122

4．業績目録 …… 123

5．補助金・助成金 …… 134

6．整備研究機器一覧 …… 134

7．寄附金 …… 135

8．理事会・評議員会・評議員選定委員会 …… 136

9．人事 …… 137

役員名簿…… 138

評議員名簿…… 139

1．2020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

機械学習を用いて、腫瘍の良性・悪性を決定する手法について

雨宮 三千代

【要旨】

コロナ禍の事情により、東京医科歯科大学大学院の医療・創薬データサイエンスコンソーシアムで、機械学習やAIの勉強をすることとした。機械学習用の教材データ（biopsy_cancer_diagnosis.csv）を用いて、腫瘍が良性か悪性かを判断するモデルの作成を試みた。当報告では、1）良性か悪性かの判断に必要な特徴量を選択し、1次多項式の線形モデルの作成、2）教師あり学習について全ての特徴量を考慮し、ランダムフォレストによる良性か悪性かの予測、3）多重共線性を考慮した2）の予測を検討した。

【背景】

ビックデータの利用が可能となり、人工知能（AI）が知識を獲得する機械学習が実用化され、第3次AIブームが到来している。

機械学習やAIは、一部のコンピューターサイエンスの専門家の学問とも思える。しかし、我々の身近にあるデータ（例えばカルテの情報）を、机上のコンピューターに学習させることにより、人間が眺めていたならば気づかないような結果を返し、医療分野では、診断方法の論理的根拠や、新たな診断方法の確立に繋がる可能性がある。

コロナ禍で、ステイホームやテレワークが続いたため、分院にある冲中研究所は、移転が完了せず、本院のときのようなwetの実験が困難な状況にある。そこで、東京医科歯科大学大学院の医療・創薬データサイエンスコンソーシアムを2020年7月より受講し、機械学習と人工知能について勉強を始めた。その中で学んだ、機械学習を用いた腫瘍の良性・悪性を判断する方法の一部についてまとめた。

【目的】

診療カルテのデータをコンピューターに機械学習させ、病気の診断モデルを作成する。

人間が一瞥しただけでは、特徴量（データ）の関連性を認識することは困難だからである。

【方法】

機械学習用の教材データ（biopsy_cancer_diagnosis.csv）を用いて以下の解析を行った。

（1）良性か悪性かの判断に必要な特徴量をReliefにより抽出選択する。
（2）Reliefによる抽出をした結果から、PythonのLinearRegressionによる1次多項式の線形モデルを作成する。
（3）教師あり学習について、全ての特徴量を考慮し、ランダムフォレストによる良性か悪性かの予測をする。
（4）多重共線性を考慮した、2）のランダムフォレストによる予測をする。

コードは、RまたはPythonで作成した。

【結果】

1. データを眺める

683人の患者の腫瘍について、9つの特徴量が記載されている（**表1**）。

（1）clump thickness（塊の厚さ）
（2）uniformity of cell size（細胞のサイズの均一性）
（3）uniformity of cell shape（細胞の形態の均一性）
（4）marginal adhesion（限界接着）

(5) single epithelial cell size（単一の上皮細胞のサイズ）
(6) bare nuclei（裸核）
(7) bland chromatin
(8) normal nucleoli（正常の核小体）
(9) mitoses（有糸分裂）

10番目のclassは、予測の対象であり、腫瘍が良性（benign）か悪性（malignant）かに分類されている。なお、患者数は欠番が除かれている。各特徴量の値は、学習用データのため、既にスケーリングされている（**表1**）。

2. 特徴量を抽出する

全ての特徴量を加味すると、モデルの予測精度が下がるため、特徴量の抽出を行う。

(1) Reliefによる抽出

モデルの予測精度を上げるために、Reliefを用いて、9つの特徴量の内、予測に有用でない特徴量を選択する。

（原理）Reliefは、次のstep1から3までを10000回繰り返す。

Step1: 患者をランダムに一人選ぶ。

Step2: 選択された患者と同じクラスおよび反対のクラスに属するものの中で、一番近い二人の患

表 1　biopsy_cancer_diagnosis.csvの結果
699名中、欠測値を抜いた683名について解析している

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
No.	clump thickness	uniformity of cell size	uniformity of cell shape	marginal adhesion	single epithelial cell size	bare nuclei	bland chromatin	normal nucleoli	mitoses	class
1	5	1	1	1	2	1	3	1	1	benign
2	5	4	4	5	7	10	3	2	1	benign
3	3	1	1	1	2	2	3	1	1	benign
4	6	8	8	1	3	4	3	7	1	benign
5	4	1	1	3	2	1	3	1	1	benign
6	8	10	10	8	7	10	9	7	1	malignant
7	1	1	1	1	2	10	3	1	1	benign
8	2	1	2	1	2	1	3	1	1	benign
9	2	1	1	1	2	1	1	1	5	benign
10	4	2	1	1	2	1	2	1	1	benign
698	4	8	6	4	3	4	10	6	1	malignant
699	4	8	8	5	4	5	10	4	1	malignant

```
#Relief code:
data_biopsy<- read.table("biopsy_cancer_diagnosis.csv",
                         header=T, sep=",",row.names = 1)
head(data_biopsy)
data_biopsy$class<- as.factor(data_biopsy$class)
head(data_biopsy)
install.packages("CORElearn")
library("CORElearn")
FeatureWeight<- attrEval("class",data_biopsy,
                         estimator="Relief",ReliefIterations=10000)
FeatureWeight
Ranking<-sort(FeatureWeight,decreasing=TRUE)
Ranking
data_selected<-cbind(data_biopsy[,names(Ranking[1:3])],data_biopsy$class)
head(data_selected)
```

図 1　Reliefによる抽出のRのコード

者を見つける。

Step3: 各特徴量に対する重みを、一定の式のもとに更新し、それぞれの特徴量の重みが一定の値に収束するまで繰り返す。

重みを計算して、有用な特徴量を選択する。

Rのコードを**図1**に示す。

（結果）

Reliefによる各特徴量の重みを**表2**に示す。

この内、重みの値が大きい6番目のbare nuclei（0.587）、1番目のclump thickness（0.545）、7番目のbland chromatin（0.378）が、腫瘍の良性・悪性を決定する有用な特徴量と判断された。

3. 抽出した特徴量を用いて重回帰分析のモデル式を作成する

教師あり学習について重回帰分析を行い、良性・悪性を判断する線形モデル式を作成した。

Reliefの結果から判断された有用な特徴量、“bare nuclei”、“clump thickness”、“bland chromatin” について、“y=ax1+bx2+cx3+d” という1次多項式を仮定する。それぞれの実測値を、x1, x2, x3の変数とした（標的配列）。また、yは良性を0、悪性を1とした（目的配列）。

PythonのLinearRegressionを用いて、係数a, b, cと切片dを求めた。

phthonのコードを**図2**に示す。

この結果、a, b, cのmodel.coef_は[−0.0478, −0.0599, −0.0565]、dのmodel.interceptは1.269であり、“y=−0.0478×x1+(−0.0599)×x2+(−0.0565)×x3+1.269” という式が返された。

これにより、新規患者の “bare nuclei”、“clump thickness”、“bland chromatin” の実測値をx1、x2、x3に代入することで、数式上、良性か悪性かの判断をすることができる。なお、モデルの精度の検証は、現在勉強中である。

表２　Reliefの結果

1	2	3	4	5	6	7	8	9
clump thickness	uniformity of cell size	uniformity of cell shape	marginal adhesion	single epithelial cell size	bare nuclei	bland chromatin	normal nucleoli	mitoses
0.545	0.214	0.212	0.340	0.287	0.587	0.378	0.275	0.051

```
（Jupyter notebook/Python を使用）
import pandas as pd　#pandas を呼び込む
import numpy as np　#numpy を呼び込む

biopsy2=pd.read_csv("biopsy_cancer_diagnosis-5.csv", sep=",")　#data を呼び込む
biopsy2　#data のチェック
y=biopsy2["class"]　#class の値を y(目的配列)とする

biop1=biopsy2.drop("class", axis=1)　#class を除いた特徴量だけの表に作り直す
biop1　# data のチェック

from sklearn.linear_model import LinearRegression　#sklearn の linearRegression を呼び込む
model=LinearRegression(fit_intercept=True)
model
model.fit(biop2, y)　#特徴量（x1,x2,x3）と目的配列（y）から回帰式を作成してもらう
model.coef_　#係数 a,b,c を求める
model.intercept_　#切片を求める
```

図２　PythonのLinearRegressionのコード

```
(予測モデルの作成)
RMSE was used to select the optimal model using the smallest value.
The final value used for the model was mtry = 2.

data_biopsy3<- read.table("biopsy_cancer_diagnosis-3.csv",
                                    header=T, sep=",",row.names = 1)
head(data_biopsy3)
library("caret")
set.seed(3)
trainIndex<- createDataPartition(data_biopsy3$class, p=0.8, list=FALSE,time=1)
biopsyTrain<- data_biopsy3[trainIndex,]
biopsyTest <- data_biopsy3[-trainIndex,]
library(hydroGOF)
library("randomForest")
fitControl<- trainControl(method="cv",number=10)
modelBest<- train(class~., data=biopsyTrain, metric="RMSE", method="rf",
                          trControl=fitControl, tuneLength=5)
modelBest
```

図３　RandomForestのＲのコード

表３　RandomForestの結果

mtry	RMSE	Rsquared	MAE
2	0.1646661	0.8731764	0.06915484
3	0.1658175	0.8710867	0.06772737
5	0.1696929	0.8656318	0.06808910
7	0.1719265	0.8621238	0.06775569
9	0.1737987	0.8587735	0.06868502

RMSE was used to select the optimal model using the smallest value.
The final value used for the model was mtry = 2.

4. RandomForestによる回帰モデルの構築

683人の患者について、9つの特徴量から、腫瘍が良性か悪性かを予測する回帰モデルを、RandomForestで構築した。

教師あり学習をするため、80％を学習用データ（546人分）、20％をテストデータ（137人）に分割した。分割は乱数を用いた。9つの特徴量について、クロスバリデーションを10回行い、最小自乗誤差（RMSE）を予測評価制度に用いた。なお、classはカテゴリカル変数のため、良性を1、悪性を0と量的変数に変換した。

Ｒのコードを**図3**に示す。

80％の学習用データを学習させた結果、最小自乗誤差（RMSE）が最も小さい（0.1646661）、mtry=2がモデルに用いられた（**表3**）。

次に20％のテストデータを用いて、予測（Prediction）を行った（**図4**）。

ランダムに抽出されたテストデータについて、1（良性）または0（悪性）の値が返される。

予測の結果、最初の6人分を示すと、患者18番は0.999…で1に近く「良性」と予測され、class=良性という結果と一致した。患者21番（悪

A

```
> Prediction<-predict(modelBest, biopsyTest)
> head(Prediction)
        18        21        32        35        37        45
0.9999502 0.1380333 0.9999502 0.9999930 0.0133333 0.03716667

> cor.test(Prediction,biopsyTest[,"class"])
cor       0.9785919

> rmse(Prediction, biopsyTest[,"class"])
0.1104678
```

B

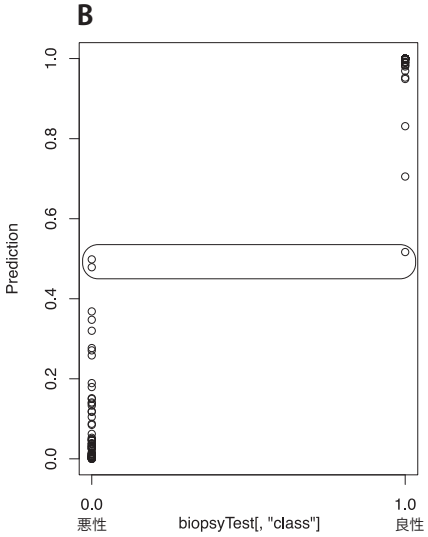


図 4

A　教師あり学習について、RandomForestによる予測の結果。乱数で選択された患者の悪性（0）か良性（1）かの判断を示す

B　教師あり学習についてのRandomForestによる予測
悪性は0、良性は1を示す。だ円は誤認識の可能性の高いもの

A

```
result<- lm(class~., data=data_biopsy3)
require(car)
vif(result)
clump.thickness        uniformity.of.cell.size      uniformity.of.cell.shape
       1.905699                       7.194723                      6.549805
marginal.adhesion single.epithelial.cell.size                   bare.nuclei
       2.466275                       2.556334                      2.597163
bland.chromatin                normal.nucleoli                      mitoses
       2.879024                       2.431402                      1.396579
```

B

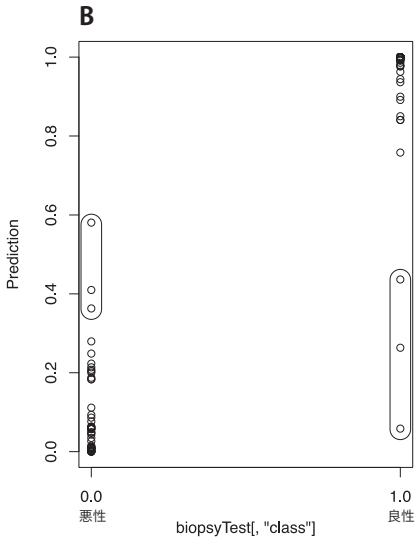


図 5

A　多重共線性を考慮し、削除すべき特徴量の抽出

B　多重共線性を考慮した教師あり学習についてのRandomForestによる予測
悪性は0、良性は1を示す。だ円は誤認識の可能性の高いもの

性）は0.138….で0に近く、「悪性」と予測され、class=悪性という結果と一致した。予測値と結果の相関係数は0.978であった。テストデータの最小自乗誤差（RMSE）は0.110であり、トレイニングデータのRMSEより小さく、モデルによく適合している（**図4A**）。全体のばらつきを見ると、良性(0)または悪性(1)に、それぞれデータがまとまっているが、Prediction=0.5の点で、良性・悪性の判断を誤る可能性のある点がある（**図4B**）。

5. 多重共線性について

特徴量の中で相互に相関するものがあると、モデルの予測精度が低下するといわれている。

その指標であるVIF（Variable inflation factor）を求めたところ、5以上の値であるuniformity of cell sizeとuniformity of cell shapeについて、多重共線性をもたらす可能性が示唆された（**図5A**）。そこで、これらの二つを削除し、7つの特徴量について、再度RandomForestを行った。

7つの特徴量を用いた結果、相関係数が0.9501069、RMSEは0.150487であった。これらの値は、先の9つの特徴量の全てを加味して構築したモデルよりも悪い結果となった。

また、テストデータのバラツキが**図4B**に比べて大きく、だ円に示すようにPredictionの値が重なっている点が複数検出されるため、良性と悪性を誤って判断する割合が大きい（**図5B**）。従って、多重共線性の問題はあるが、特徴量を削減せず、9つの特徴量全てを加味したモデルの方が、予測の精度は高いといえる。

【結論】

機械学習は、机上のパソコンで簡単にでき、数秒で答えを返してくれるため、安易な方法とも思える。しかし、精度の高いモデルの構築が要求され、数学の知識（微分積分、ベイズ統計学）が必要となる。種々のアルゴリズムを試して、職人的な技を磨き、予測の精度を高め、医療情報から機械学習を用いて、新たな診断方法を確立したり、バイオマーカーを探索することに役立てたい。

糖尿病と認知機能-10
-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】

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知られている[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ことを基に、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、これまでに明らかにしてきた。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、これらラットの脳から海馬を単離し、Steinerの方法[4)]によっ

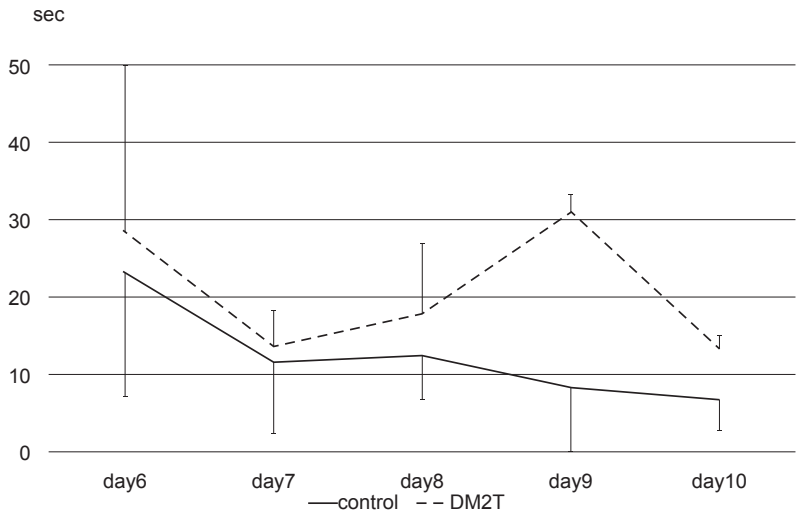


図 1a　ゴール到達時間（秒）

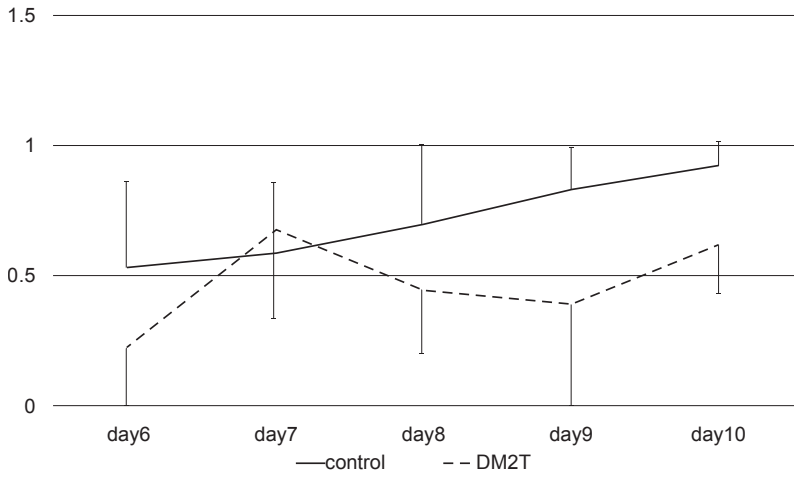


図１b　行動効率

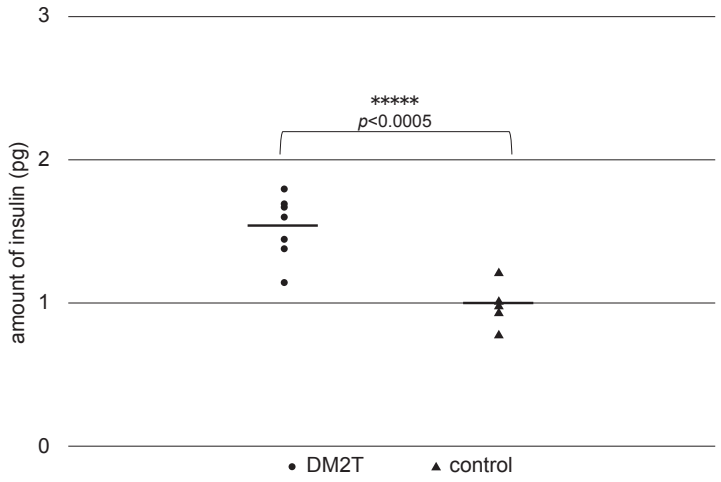


図２a　１海馬当たりのインスリン量

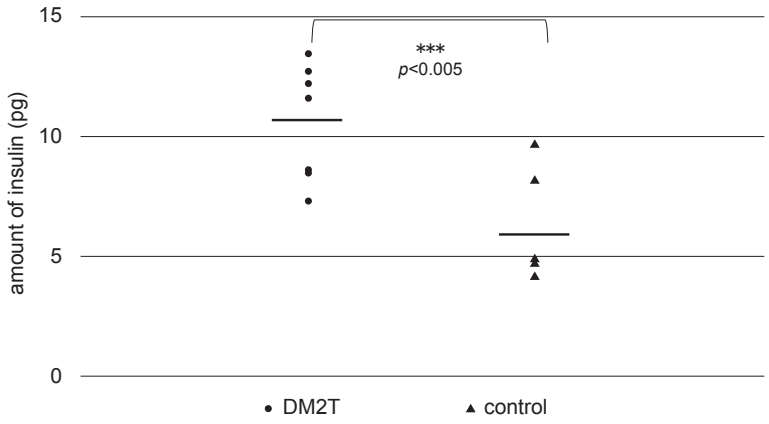


図２b　海馬１mg当たりのインスリン量

て、インスリンを抽出した。測定にはレビス®インスリンーラット（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 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 signalling 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

慢性骨髄性白血病のTreatment free remissionの可否にNK細胞の制御因子であるkiller immunoglobulin-like receptorの遺伝子多型が寄与するか

嬉野　博志
佐賀大学血液腫瘍内科

【要旨】

慢性骨髄性白血病（CML）とは、フィラデルフィア（Ph）染色体に起因する造血器腫瘍である。ABLチロシンキナーゼ阻害剤（TKI）の登場により劇的に予後が改善した。深い分子遺伝学的寛解（deep molecular response; DMR）に達した患者の約40-60％はTKIを中止してもTreatment free remission（TFR）を維持できることが複数の臨床試験で示され、一定期間のTKI治療でCMLでは治癒も期待できるようになってきた。しかしながら、どのような症例で高率にTFRに至るかのバイオマーカーはほとんど存在せず、臨床上はDMRを達成した症例で一定の地固め療法期を経て、一様にTKIの中止にチャレンジするしかない。本研究の目的はCMLにおいてTFRの維持に寄与するバイオマーカーを発見することである。我々は以前Killer immunoglobulin-like receptor（KIR）　とhuman leukocyte antigen（HLA）の多型がCMLにおけるTKI治療効果に相関することを報告しており、この多型がTFRにおいても意義を持つか解析を行った。33例の患者がTKI中止を行い、21例がTFRを達成した（63.6%, 95% CI, 44.9-77.5%）。多変量解析において男性（HR, 0.157; 95% CI, 0.031-0.804; p=0.003）及びHLA-A*02:01, *11:01または*24:02を有する症例（HR, 6.386; 95% CI, 1.701-23.980; p=0.006）が予後良好であることが分かった。DMRを達成しTKI中止ができた患者は、できなかった患者より高いNK細胞活性状態を示した。一方でTKI中止ができた患者群でTFRを達成した症例と再発症例ではNK細胞活性に違いはなかった。これらの結果からNK細胞の活性化がDMR達成に寄与するのに対して、T細胞免疫がTFRに寄与することが分かった。

【目的】

KIR及びHLAの多型がCMLにおけるTFR達成に意義を持つかを明らかにする。

【方法】

1. KIR/HLA解析

患者末梢血よりDNAを抽出し、Illumina社製のIllumina MiSeqを用いて次世代シークエンシング（NGS）で解析を行う。KIR genotypingについてはKIR IGS kit version 1.0（Scisco Genetics Inc.）を、HLA genotypingについてはHLA version 3.0 IGS kit（Scisco Genetics Inc.）を用いる。既報の通りHLA-A, B, Cについてはexons 1 to 7を、HLA-DRB1, DRB3, DRB4, DRB5, DQA1, DPA1, DPB1については exon 1から4を、KIR geneについてはexon 3-5とexon 9について解析する。各々のアリルのハプロタイプの解析にはHaplo.stats software（version 1.7.7）を用いる。

2. NK細胞活性解析

末梢血単核球とK562細胞株（HLAを欠失したCML細胞株）をE:T=10:1で6時間共培養行いNK細胞のCD107a脱顆粒及び IFN γ産生性をフローサイトメトリーで解析しNK細胞の活性化の評価を行う。

【結果】

1. 患者背景

33例のTKI中止症例を解析した。患者年齢中央値は65歳（39-86歳）で観察期間中央値は7.61年（4.37-16.30年）であった。男女比は概ね1:1であった（男性17人、女性16人）。Front-line TKIは17例がイマチニブ、11例がダサチニブで5例がニロチニブ、中止前TKIは9例がイマチニブ、17例がダサチニブ、7例がニロチニブであった。21/33例でTFRを達成した（63.6%; 95% CI, 44.9%-77.5%）。

2. 男性が良好なTFRを達成する

臨床情報による患者背景からの単変量解析では、男性の方が女性より有意に分子再発のリスクが低かった（HR, 0.141; 95% CI, 0.031-0.645; p=0.012）。その他、年齢、Sokal-risk score、Front-line TKI、中止前のTKIの種類、中止までのTKIの治療期間やDMR期間は分子再発のリスクと相関しなかった（**表1**）。

3. HLA-A 02:01, 24:02もしくは11:01を持たないことは分子再発のハイリスクである

次に、KIR/HLAアリルタイピング結果による分子再発リスクを解析した。KIR genotype 及びalleletypeはいずれも分子再発リスクとならなかった。一方で、HLA-A*02:01、24:02、もしくは11:01を持たないことは分子再発の高リスクであることが分かった（HR, 5.546; 95% CI, 1.885-20.092; P < 0.001）（**表1**）。

4. 男性もしくはHLA-A*02:01、24:02もしくは11:01を有する症例は良好なTFRを達成する

TFR達成について多変量解析を行うと男性であること（HR, 0.157; 95% CI, 0.031- 0.804;

表 1　単変量解析における分子再発のリスク

Variable	n	Estimated treatment-free remission at 12 months (%, 95% CI)	P	Hazard ratio (95% CI)	P
KIR2DL1					
1	4	75.0 (12.8-96.1)		1	
2	29	62.1 (42.1-76.9)	0.57	1.792 (0.231-13.89)	0.577
KIR2DL2					
0	28	60.7 (40.4-76.0)		1	
1	5	80.0 (20.4-96.9)	0.394	0.423 (0.055-3.277)	0.41
KIR2DL3					
1	5	80.0 (20.4-96.9)		1	
2	28	60.7 (40.4-76.0)	0.394	2.366 (0.305-18.35)	0.41
KIR2DL5					
0	18	66.7 (40.4-83.4)		1	
1, 2	15	60 (31.8-79.7)	0.702	1.019 (0.927-1.119)	0.703
KIR2DS1					
0	19	68.4 (42.8-84.4)		1	
1, 2	14	57.1 (28.4-78.0)	0.517	1.031 (0.939-1.119)	0.703
KIR2DS2					
0	28	60.7 (40.4-76.0)		1	
1	5	80.0 (20.4-96.9)	0.394	0.423 (0.055-3.277)	0.41
KIR2DS4					
0	27	66.7 (45.7-81.1)		1	
1, 2	6	50 (11.1-80.4)	0.319	1.048 (0.909-1.207)	0.521
KIR2DS5					
0	24	62.5 (40.3-78.4)		1	
1	9	66.7 (28.2-87.8)	0.721	0.789 (0.213-2.916)	0.722
KIR3DL1					
0, 1	14	57.1 (28.4-78.0)		1	
2	19	68.4 (42.8-84.4)	0.517	0.954 (0.829-1.010)	0.521
KIR2DL1-HLAC2					
Positive	3	66.7 (5.4-94.5)		1	
Negative	30	63.3 (43.6-77.8)	0.99	1.013 (0.131-7.854)	0.99
KIR2DL2-HLAC1					
Positive	5	80.0 (20.4-96.9)		1	
Negative	28	60.7 (40.4-76.0)	0.394	2.366 (0.305-8.345)	0.41
KIR2DL3-HLAC1					
Positive	32	62.5 (43.5-76.7)		1	
Negative	1	NA	0.497	<0.001	0.998
KIR3DL1-HLABw4					
Positive	28	64.3 (43.8-78.9)		1	
Negative	5	60.0 (12.6-88.2)	0.798	1.219 (0.267-5.568)	0.799

Variable	N	Estimated treatment-free remission at 12 months (%, 95%CI)	P	Hazard ratio (95% CI)	P
KIR2DL1,2, 3DL1 ligands					
0	4	50.0 (5.8-84.5)		1	
1	23	65.2 (42.3-80.8)	0.514	0.600 (0.127-2.838)	0.520
2	5	60.0 (12.6-88.2)	0.667	0.807 (0.302-2.160)	0.670
3	1	NA (NA)	0.445	0.001 (0-Inf)	1.000
KIR2DL4*005/011 or *008					
Positive	17	64.7 (37.7-82.3)		1	
Negative	16	62.5 (34.9-81.1)	0.895	1.079 (0.348-3.349)	0.895
KIR2DS4*003 or *007/010					
Positive	7	57.1 (17.2-83.7)		1	
Negative	26	65.4 (44.0-80.3)	0.703	0.776 (0.209-2.879)	0.705
KIR3DL1*005					
Positive	6	66.7 (19.5-90.4)		1	
Negative	27	63.0 (42.1-78.1)	0.882	1.121 (0.245-5.125)	0.882
KIR3DL2*009 or *010					
Positive	12	66.7 (33.7-86.0)		1	
Negative	21	61.9 (38.1-78.8)	0.742	1.222 (0.368-4.065)	0.744
KIR3DL1-HLA-Bw interaction					
Strong	16	68.8 (40.5-85.6)		1	
Weak	12	58.3 (27.0-80.1)	0.590	1.403 (0.405-4.857)	0.593
Non	5	60.0 (12.6-88.2)	0.716	1.356 (0.262-7.013)	0.717
KIR3DL1 high allele					
0	8	50.0 (15.2-77.5)		1	
1	15	73.3 (43.6-89.1)	0.180	0.400 (0.099-1.134)	0.198
2	10	60.0 (25.3-82.7)	0.679	0.748 (0.185-7.610)	0.683
HLA-Bw					
Bw4-80I	19	78.9 (53.2-91.5)		1	
Bw4-80T	3	33.3 (0.9-77.4)	0.889	4.030 (0.734-22.13)	0.109
Bw6	11	45.5 (16.7-70.7)	0.043	3.496 (0.980-12.48)	0.054
HLA-C					
C1C1	30	63.3 (43.6-77.8)		1	
C1C2	2	50.0 (6.0-91.0)	0.584	1.760 (0.226-13.7)	0.593
C2C2	1	NA	0.503	3.969×10^{-8} (0.00-inf)	0.998
HLA-A*02:01 or *24:02 or *11:01					
Positive	26	76.9 (55.7-88.9)		1	
Negative	7	14.3 (0.7-46.5)	<0.001	6.154 (1.885-20.092)	0.003
HLA-A*02:01, *24:02, *11:01 allele					
Homo	12	91.7 (53.9-98.8)		1	
Hetero	14	64.3 (34.3-83.3)	0.12	4.519 (0.527-38.760)	0.156
Negative	7	14.3 (0.7-46.5)	<0.001	15.98 (1.872-136.4)	0.032

Note: Patients who carried at least one *KIR2DL1, KIR2DL3, KIR2DS4*, or *KIR3DL1* gene were segregated into two subgroups: (i) those with two allelic types of those genes and (ii) those with zero or one allele. Patients with one *KIR2DL2, KIR2DS2*, or *KIR2DS5* gene were segregated into two subgroups: (i) those with no allele and (ii) those with one allele. During NK cell licensing, KIRs recognize their target cells by interacting with HLA-C ligands (e.g., *KIR2DL1* recognizes *HLA-C2*), and the licensing status of multiple KIRs reflects the overall licensing of NK cells. Patients with licensed *KIR2DL1, KIR2DL2*, or *KIR3DL1*-positive NK cells were segregated into four groups. *HLA-B* alleles can be divided into Bw4 or Bw6 subtypes, and HLA-Bw4 is further subdivided into Bw4-80I (isoleucine) and Bw4-80T (threonine) subtypes. KIR3DL1 and HLA-Bw interaction avidities (strong, weak, or non) were determined by interacting combinations of *KIR3DL1* (high, low, or null) subtypes and *HLA-B* subtypes (HLA-Bw4-80T, 80I, or Bw6). For example, KIR3DL1-high binds HLA-Bw4-80I more strongly than HLA-Bw4-80T. Abbreviation: NA, not available.

P=0.003)、HLA-A*02:01、24:02もしくは11:01を有すること（HR, 6.386; 95% CI, 1.701-23.980; P=0.006）は独立した良好なTFR因子であることが分かった（**表2**）。

5. NK細胞活性化はTKI中止を可能にするための良好なDMR達成に必要であるが、TFR維持には関係ない

フローサイトメトリーによるNK細胞分画の活性解析より、TKI中止可能になった症例とならなかった症例では中止が可能となった症例でNK細

表２　多変量解析における分子再発のリスク

Variable	n	Hazard ratio (95% CI)	*P*
Sex			
Female	16	1	
Male	17	0.157 (0.031–0.804)	0.003
HLA-A*0201 or *2402 or *1101			
Positive	26	1	
Negative	7	6.386 (1.701–23.980)	0.006
HLA-Bw			
80I	19	1	
80T	3	4.553 (0.767–27.04)	0.095
Bw6	11	1.307 (0.337–5.063)	0.699

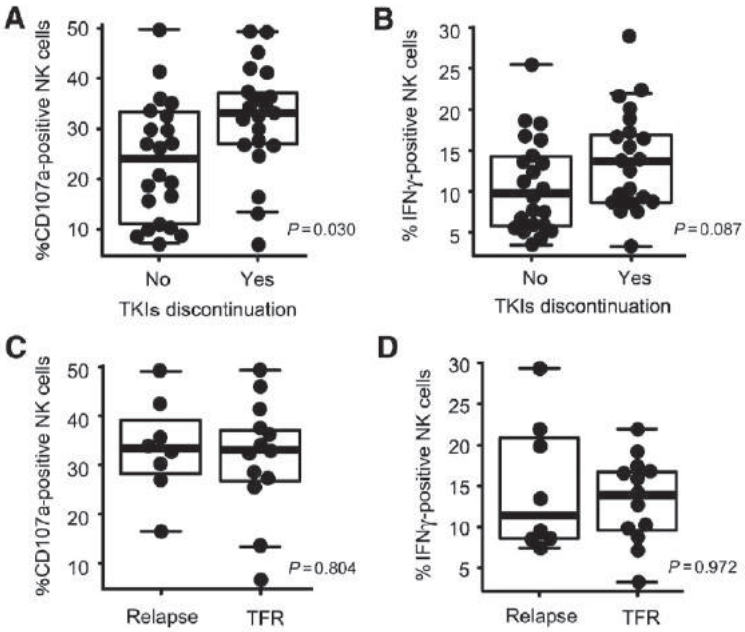


図１　NK細胞の活性化状態の評価をNK細胞分画におけるCD107aの脱顆粒とIFN-γの産生性にて評価した。TKI中止症例では非中止症例と比較し有意にCD107aの脱顆粒が強かった（A, B）。しかしTKI中止症例においてはTFR達成症例と分子再発症例でNK細胞の活性化に違いはなかった（C, D）。

胞活性が高かった（**図1A, B**）。一方で中止症例の中ではTFR達成症例と、分子再発症例でNK細胞活性については違いがなかった（**図1C, D**）。このことからDMR達成について、我々が以前報告したようにNK細胞免疫が関わるが、NK細胞免疫はTFRには関与しないことが分かった。

【考察】

CMLにおけるTKI中止症例の臨床データ及びKIR/HLAタイピング、NK細胞活性化評価を行うことで、TFR達成のためのサロゲートマーカーが分かった。T細胞は抗原刺激を受け活性化し対象を攻撃した後、その一部はメモリーT細胞となり、長期に生存し獲得免疫の中心として働く。そのT細胞活性はHLAクラスIアリルに規定される。我々の結果からHLAクラスIアリル多型がTKI中止後のTFR維持に関与していることから、T細胞による獲得免疫が重要であることが分かった。またTKI治療時のDMR獲得までにはNK細胞免疫が働くことがわかり、NK細胞免疫とT細胞免疫はCMLの各治療過程において機能分担をしていることが示唆された。このことについては今後、初診時からの網羅的なNK/T細胞免疫の解析を行う必要がある。各治療過程における免疫細胞賦活化を惹起するような治療戦略を立てることで更なるTFRの向上を目指したい。

【発表に関すること】

1. Ureshino H, et al.: HLA polymorphisms are associated with treatment-free remission following discontinuation of tyrosine kinase inhibitors in chronic myeloid leukemia. Mol Cancer Ther 20: 142-149, 2021
2. Ureshino H: Treatment free remission and immunity in chronic myeloid leukemia. Int J Hematol: in press

同種造血幹細胞移植における侵襲性真菌感染症の二次予防に関する研究

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】

侵襲性真菌症（Invasive fungal disease: IFD）の既往がある患者に対する同種造血幹細胞移植は、高度の免疫不全状態下における再燃のリスクがあるため、厳重なモニタリングと抗真菌薬による二次予防が必要だが、その具体的な方法はまだ十分に確立されていない。本研究では既往がある患者におけるIFDの発症率及び予後に関する後方視的解析を行った。全1400例中162例で発症を認め、5年累積発症率は11.5%、移植から発症までの期間の中央値は27.5日だった。既往例の発症は162例中49例で、既往例の累積発症率は非既往例と比較して有意に高かったが、特にactive diseaseでの発症が多く、stable diseaseでの発症率は非既往例とほぼ同等であった。Active diseaseでは抗真菌薬による二次予防を行っても移植後の再燃率が60%であるのに対し、抗真菌薬治療に外科的切除を組み合わせてstable disease に至った9例（侵襲性アスペルギルス症（Invasive aspergillosis: IA）6例、ムーコル症（Mucormycosis）3例）や十分な治療によりstable diseaseとなった侵襲性カンジダ症6例では、移植後の再燃は認められなかった。既往例と非既往例における5年生存率に有意差はなく、active diseaseでの生存率が、stable disease や非既往例と比較して有意に低かった。以上より既往例であっても移植前の十分な制御及び移植時の適切な再燃予防対策がなされれば、移植後の再燃を抑えられ、かつその手段としての外科的切除の有用性が示唆された。

【目的】

同種造血幹細胞移植後は、大量の抗がん剤等による好中球減少や、移植片対宿主病及びそれに対する免疫抑制療法などにより高度の免疫抑制状態が持続するため、IFDの既往がある患者では再燃が懸念される。以前は、IFD既往例は移植適応外と判断される場合も多かったが、診断技術の向上や広いスペクトラムを有する抗真菌薬の開発により、必ずしも禁忌ではないとの見解が明らかになってきた[1, 2]。しかし、既往例に対する同種移植の報告は、大規模疫学的調査は実施されているものの[2, 3]、どの菌種・病型のIFDがどの程度制御でき、かつどのような二次予防を行えば再燃のリスクを最小限に抑えられるのか等の詳細に関するエビデンスはまだ十分でない。本研究では、IFD既往例と非既往例における同種移植後のIFDの発症率及び予後に関して比較検討すると共に、既往例における真菌種、病型、予防対策等の相違が移植後IFDの発症率や予後に与える影響を評価した。

【方法】

2002年1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。IFDの診断にはEORTC/MSGの診断基準を用いた[4]。移植日前日までに当該診断基準で確定診断例（Proven diagnosis）又は臨床診断例（Probable diagnosis）と診断された症例をIFD既往例と定義した。移植日当日に活動性のある感染症が持続している場合を active disease、既に改善傾向で活動性がない場合をstable diseaseと定義した。IFDの累積発症率を、非発症死亡を競合因子として、Gray's法を用いて評価し、生存率をKaplan-Myer法にて解析した。

【結果】

解析対象は1400例で、男性が886例及び女性が514例、年齢の中央値は55（20-82）才で、臍帯血移植が903例、非血縁者間移植が394例、血縁者間移植が203例だった。フォローアップ期間の中央値は、234（1-5868）日だった。移植後に

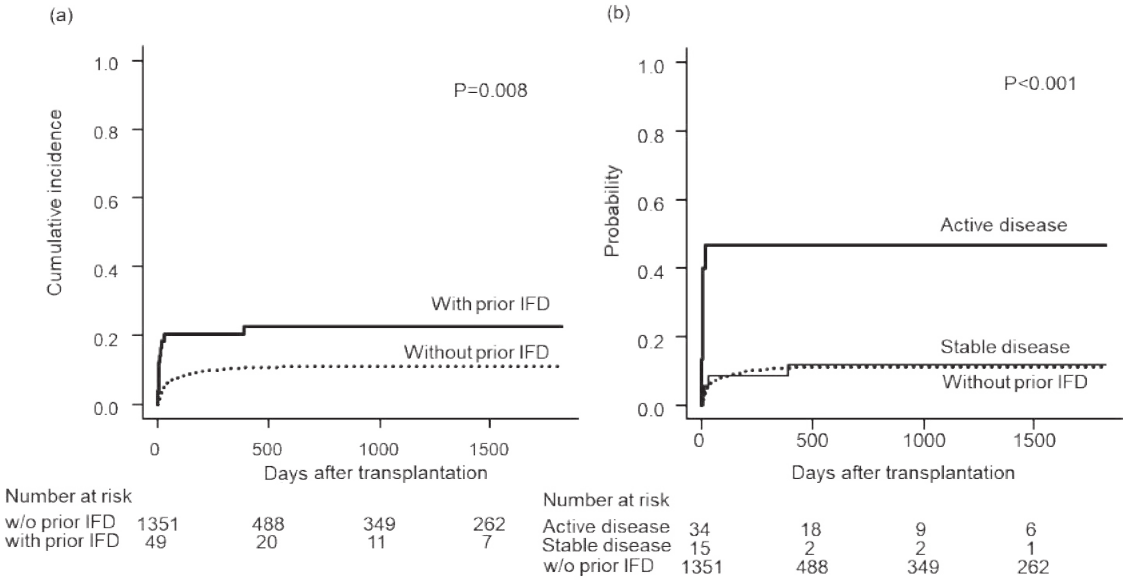


図 1　侵襲性真菌症の移植後５年累積発症率
（a）既往例と非既往例の比較
（b）Active diseaseとstable diseaseの比較

表 1　IFD既往例の予後

		侵襲性アスペルギルス症		侵襲性カンジダ症	ムーコル症	菌種同定不能	合計
		Proven	Probable				
Active	抗真菌薬	—	6/11 (54.5%)	2/2 (100%)	—	1/2 (50%)	9/15 (60%)
Stable	抗真菌薬	1/1 (100%)	1/16 (6.3%)	0/6 (0%)	—	0/2 (0%)	2/25 (8%)
	抗真菌薬+外科的切除	0/6 (0%)	—	—	0/3 (0%)	—	0/9 (0%)
合計		1/7 (14.3%)	7/27 (25.9%)	2/8 (25%)	0/3 (0%)	1/4 (25%)	11/49 (22.4%)

IFDを発症した症例は162例で、5年累積発症率は11.5%、移植から発症までの期間の中央値は27.5（0-2982）日だった。IFDの既往があったのは49例で、Provenが20例、Probableが29例で、active disease及びstable diseaseがそれぞれ15例と34例だった。真菌種別では、*Aspergillus spp.*が34例、*Candida spp.*が8例、*Mucor spp.*が3例、菌種同定不能が4例であった。移植後5年のIFDの累積発症率は、既往群では非既往群と比較して有意に高かった（22.6% vs 11.1%, P=0.008, **図1(a)**）。Proven IFDの既往群とProbable IFDの既往群で、5年累積発症率に有意差を認めなかったが（27.6% vs. 15.4%, P=0.242）、active disease 群の発症率は、stable disease群と比較して有意に高く（46.7% vs. 12.0%, P=0.004）、一方、stable disease群と非既往群の発症率はほぼ同等だった（12.0% vs. 11.1%, P=0.881, **図1(b)**）。

既往のIFDに対しては、40例で抗真菌薬単独による治療、9例で抗真菌薬と外科的切除の組み合わせが実施された（**表1**）。11例で移植後に

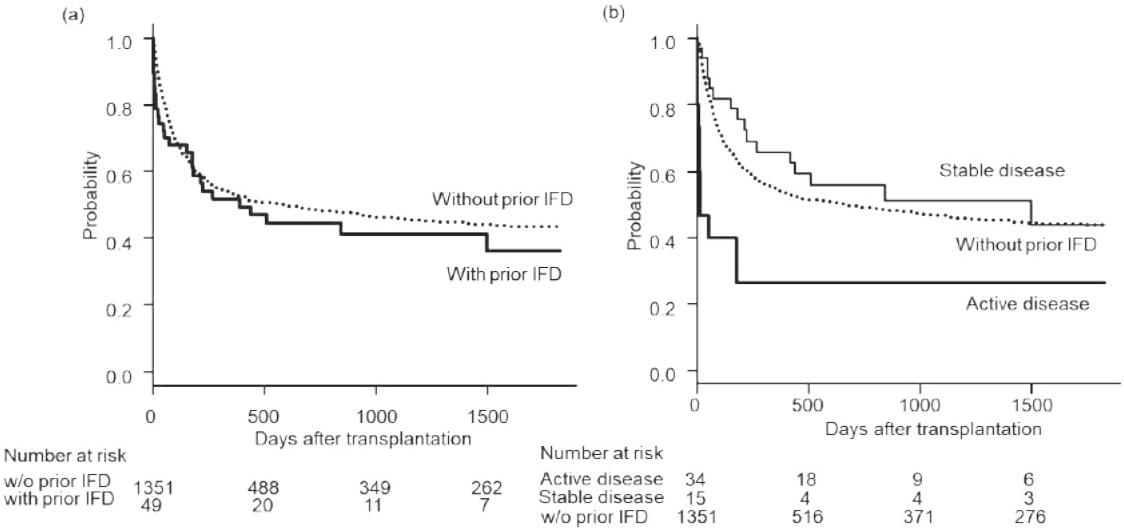


図２　移植後５年生存率
（a）既往例と非既往例の比較
（b）Active diseaseとstable diseaseの比較

IFDの発症を認め、active diseaseでの移植では60％で再燃を認めた。一方、外科的切除を実施した9例（IA 6例，ムーコル症 3例）と、stable disease に至った侵襲性カンジダ症6例ではIFDの再燃を認めなかった。

全1400例における5年生存率は43.1％で、IFDの既往群と非既往群で生存率に有意差を認めなかった（36.2％ vs. 43.4％, P=0.366，**図2(a)**）。Proven IFD既往群とProbable IFD既往群で、生存率に有意差を認めなかったが（42.6％ vs. 31.8％, P=0.291）、active disease群の生存率は、stable disease群と比較して有意に低く（26.7％ vs. 43.8％, P=0.011）、一方stable disease群の生存率は非既往群とほぼ同等であった（43.8％ vs. 43.9％, P=0.461，**図2(b)**）。

【考察】

本研究における移植後IFDの5年累積発症率は、非既往群で11.1％であり、本邦のレジストリーデータの解析とほぼ同等であった[5]。一方、IFDの既往群での発症率は22.6％と高かったが、既往があってもstable diseaseであれば、発症率及び生存率は非既往群とほぼ同等であった。これについては、福田らが、抗真菌薬による十分な治療期間が確保され胸部レントゲン検査が正常に至った症例での発症率は、既往がない群とほぼ同等と報告しており[6]、本研究の結果と一致する。ただし本研究では、抗真菌薬による十分な治療以外にも、外科的切除を組み合わせた治療によりIFDの再燃を抑えられることが明らかになった。外科的切除は、局所性病変を完全に除去可能かつ確定診断も可能というメリットがあり、ムーコル症で推奨されている[7,8]。一方、IAでは、病巣部位、切除範囲、外科的介入による治療遅延の可能性、併存疾患、Performance status、切除意義などを考慮し個々に決定することが推奨されている[1]。本研究では、外科的切除を行った9例全例でIFDの再燃を認めておらず、高率にIFDの再燃を抑制できるという画期的な結果が得られ、非常に有力な治療選択肢の1つと考えられる。一方、active diseaseの場合は、移植後の再燃率は高く、生存率についても非既往群やstable disease群と比較して有意に低い結果となった。移植前に治療薬として用いた抗真菌薬による再燃予防の有効性を評価した研究では、active diseaseの再燃は抗

真菌投与終了後に多いと報告されており[9]、投与期間の十分な延長により再燃率を減らせる可能性はあるが、投与下での進行性増悪も起こり得るため、菌量を減らす目的での外科的介入や複数の抗真菌薬の組み合わせによる治療など、更なる工夫が必要と考えられた。

【文献】

1. Patterson TF, Thompson GR, 3rd, Denning DW, Fishman JA, Hadley S, Herbrecht R, et al.: Practice Guidelines for the Diagnosis and Management of Aspergillosis: 2016 Update by the Infectious Diseases Society of America. Clin Infect Dis 63: e1-e60, 2016
2. Maziarz RT, Brazauskas R, Chen M, McLeod AA, Martino R, Wingard JR, et al.: Pre-existing invasive fungal infection is not a contraindication for allogeneic HSCT for patients with hematologic malignancies: a CIBMTR study. Bone marrow transplant 52: 270-278, 2017
3. Penack O, Tridello G, Hoek J, Socie G, Blaise D, Passweg J, et al.: Influence of pre-existing invasive aspergillosis on allo-HSCT outcome: a retrospective EBMT analysis by the Infectious Diseases and Acute Leukemia Working Parties. Bone marrow transplant 51: 418-423, 2016
4. Donnelly JP, Chen SC, Kauffman CA, Steinbach WJ, Baddley JW, Verweij PE, et al.: Revision and Update of the Consensus Definitions of Invasive Fungal Disease From the European Organization for Research and Treatment of Cancer and the Mycoses Study Group Education and Research Consortium. Clinical Infect Dis 71: 1367-1376, 2020
5. Oshima K, Taniguchi S, Kurosawa S, Ogawa H, Ohashi K, Eto T, et al.: Invasive fungal infections after allogeneic haematopoietic stem cell transplantation in Japan. Bone marrow transplant 48 (suppl 2): S55. Abstract O364, 2013
6. Fukuda T, Boeckh M, Carter RA, Sandmaier BM, Maris MB, Maloney DG, et al.: Risks and outcomes of invasive fungal infections in recipients of allogeneic hematopoietic stem cell transplants after nonmyeloablative conditioning. Blood 102: 827-833, 2003
7. Skiada A, Lanternier F, Groll AH, Pagano L, Zimmerli S, Herbrecht R, et al.: Diagnosis and treatment of mucormycosis in patients with hematological malignancies: guidelines from the 3rd European Conference on Infections in Leukemia (ECIL 3). Haematologica 98: 492-504, 2013
8. Cornely OA, Arikan-Akdagli S, Dannaoui E, Groll AH, Lagrou K, Chakrabarti A, et al.: ESCMID and ECMM joint clinical guidelines for the diagnosis and management of mucormycosis 2013. Clinical Microbio Infect 20 Suppl 3: 5-26, 2014
9. Liu Q, Lin R, Sun J, Xiao Y, Nie D, Zhang Y, et al.: Antifungal agents for secondary prophylaxis based on response to initial antifungal therapy in allogeneic hematopoietic stem cell transplant recipients with prior pulmonary aspergillosis. Biol Blood Marrow Transplant 20: 1198-1203, 2014

（2）内分泌・代謝疾患

脂質異常症の原因についての研究

大久保　実

【要約】

臨床的に家族性高コレステロール血症ヘテロ接合体と診断した患者のLDL受容体遺伝子の遺伝子解析を行った。患者5家系から、4つの異なる遺伝子変異を同定した。原発性高脂血症の遺伝子解析により変異を同定することが、正確な診断と治療方針の決定に役立つ。

【目的】

脂質異常症の原因は、環境因子（食事・運動）と遺伝素因に大別される。遺伝素因として血清LDLコレステロール値に大きな影響を与えている遺伝子座には、LDL受容体遺伝子（*LDLR*）、アポ蛋白B、アポ蛋白E、PCSK9がある。

臨床的に家族性高コレステロール血症（familial hypercholesterolemia: FH）と診断できる患者は一般人口の200-500人に1人と高頻度であり、若年から虚血性心疾患を発症することが多い。本研究では、FHの遺伝子変異検索を行った。

【方法】

FHの臨床診断は、日本動脈硬化学会の診断基準に拠った[1)]。

高コレステロール血症患者の末梢血からDNAを調製し、Hobbsらの方法に従い[2)]、*LDLR*の18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、*LDLR*変異を検索した。

【結果】

患者1では、*LDLR*のエクソン4にミスセンス変異（p.E140K）を同定した（**表1**）。*LDLR* cDNA上418番目の塩基が、正常ではグアニン（G）であるがアデニン（A）へと点変異していた（c.418G>A）。この点変異によりLDL受容体タンパクの140番目のアミノ酸がグルタミン酸（E: Glu）からリジン（K: Lys）に置換される。

患者2では、エクソン9に5塩基の配列が重複していた。*LDLR* cDNA上1245番目から1249番目までの5塩基が重複していた（c.1245_1249

表 1　本研究で同定した*LDLR*変異

Patient number	変異の状態	変異の種類	変異が起こった領域	変異した塩基	変異の結果	日本人での初出報告
1	ヘテロ接合体	ミスセンス変異	Exon 4	c.418G>A	140番目のグルタミン酸がリジンにアミノ酸置換 (p.E140K)	Maruyama et al.
2	ヘテロ接合体	5塩基重複	Exon 9	c.1245_1249 dupCCGGA	frameshiftにより早期終止コドン出現	Yamakawa-Kobayashi et al.
3	ヘテロ接合体	1塩基挿入	Exon 11	c.1687insC	frameshiftにより早期終止コドン出現	Hattori et al.
4	ヘテロ接合体	スプライシング変異	Intron 12	IVS12+2T>C	スプライシング障害	Maruyama et al.
5	ヘテロ接合体					

dupCCGGA)。すなわち、正常は5'-CCGGA-3'であるが、患者では5'-CCGGACCGGA -3'になっていた。このため、アミノ酸の読み取り枠がずれて（frameshift)、早期の終止コドンが出現する。

患者3では、エクソン11に1塩基が挿入されていた。*LDLR* cDNA上1687番目にシトシン(C)が挿入されていた（c.1687insC)。このため、frameshiftが起こって早期の終止コドンが出現する。

患者4では、イントロン12にスプライシング変異があった。イントロン12のsplice donor siteの+2位の塩基に点変異（T→C）があった(IVS12+2T>C)。この変異のために、正常なスプライシングが障害される。

患者5は、患者4とは血縁関係はない独立の家系であるが、同じIVS12+2T>Cのスプライシング変異があった。

さらに、患者3（発端者）の家系調査（cascade screening）を行うと、高コレステロール血症を呈していた家族3人に同じ変異（c.1687insC）を認めた。

【考察】

臨床的にFHと診断された患者の遺伝子解析では、世界中で2000種以上の*LDLR*遺伝子変異が報告されている。日本でも多施設から変異が報告されている。本研究では、患者5家系から、4つの異なる遺伝子変異を同定した。患者1の変異は、最初にHobbsらにより米国人で報告[2]され、Maruyamaらにより日本人でも報告[3]されている。患者2の変異はYamakawa-Kobayashiらの報告[4]があり、患者3の変異は、Hattoriらにより日本人で報告[5]されている。患者4の変異はMaruyamaらにより日本人で報告[3]されてから、日本の他施設の報告でもこのIVS12+2T>C変異の頻度が最も多い[6,7]。こうした原発性高脂血症に対しては、遺伝子解析により変異を同定することが、正確な診断と治療方針の決定に役立つ。

東京地区では多様な*LDLR*変異が存在していた。家族歴を聴取すると、両親の出身地は関東に限らず全国各地で、多様な*LDLR*遺伝子変異が東京地区で見られたことに合致していた。

【文献】

1. 日本動脈硬化学会. 動脈硬化性疾患予防ガイドライン（2017年版). 2017
2. Hobbs HH, et al.: Molecular genetics of the LDL receptor gene in familial hypercholesterolemia. Hum Mutat 1: 445-466, 1992
3. Maruyama T, et al.: Common mutations in the low-density-lipoprotein-receptor gene causing familial hypercholesterolemia in the Japanese population. Arterioscler Thromb Vasc Biol 15: 1713-1718, 1995
4. Yamakawa-Kobayashi K, et al.: A novel complex mutation in the LDL receptor gene probably caused by the simultaneous occurrence of deletion and insertion in the same region. Hum Genet 93: 625-628, 1994
5. Hattori H, et al.: Identification of recurrent and novel mutations in the LDL receptor gene in Japanese familial hypercholesterolemia. Hum Mutat 14: 87, 1999
6. Doi T, et al.: Patients With LDLR and PCSK9 Gene Variants Experienced Higher Incidence of Cardiovascular Outcomes in Heterozygous Familial Hypercholesterolemia. J Am Heart Assoc 10: e018263, 2021
7. Tada H, et al.: Prognostic impact of cascade screening for familial hypercholesterolemia on cardiovascular events. J Clin Lipidol: in press

有酸素運動における間質中グルコース値の妥当性の検討

佐藤　啓介[1]、石岡　彩佳[2]、平野　勇志[3]、佐藤　明紀[6]
高野　善成[4]、大灘　嘉浩[5]、木島　弘道[4]
国家公務員共済組合連合会斗南病院リハビリテーション部[1]、
看護部[2]、検査部[3]、糖尿病・内分泌内科[4]、整形外科[5]
北海道文教大学人間科学部理学療法学科[6]

【要約】

本研究は、有酸素運動時の間質中グルコース値の妥当性を明らかにすることを目的とした。対象は2020年4月～2020年12月までの期間で、糖尿病の診断を受けていない当院の男性職員のうち、FreeStyleリブレ®が装着可能なものとした。測定は有酸素運動を30分間実施し、運動開始直前、運動終了直後、15分後、30分後にFlash Glucose Monitoring（FGM）測定値、静脈採血の血糖値（血糖値）、自己血糖測定（SMBG）値を測定した。有酸素運動は2回行い、それぞれFGM測定値、血糖値、SMBG値の平均値からコンセンサスエラーグリッドを用いて、有酸素運動におけるFGM測定値の妥当性を検討した。FGM測定値と血糖値、FGM測定値とSMBG値を比較検討し、全ての時間帯でコンセンサスエラーグリッドのゾーンAおよびBに該当した。運動療法におけるFGM測定値は血糖値やSMBG値と同等に妥当であると示唆された。また運動による血糖降下をリアルタイムに可視化することで、高いモチベーションを保ち、運動療法の継続率向上につながる可能性がある。

【目的】

フラッシュグルコースモニタリング（Flash Glucose Monitoring 以下、FGM）は、皮下の間質グルコース値を持続的に測定し、センサーにリーダーをかざすことでその値を確認できる医療機器であり、痛みのある指先穿刺を行うことなく、血糖値の変動（血糖トレンド）を継続的に把握することが可能であるうえに、従来の自己血糖測定（以下、SMBG）とほぼ同様の精確性と評価されており、今後ますます臨床で広く用いられることが期待されている[1-3]。しかしながら、運動療法実施下でのFGM測定値の精確性は十分に検証されていない。本研究は、有酸素運動時のFGM測定値に対する静脈採血の血糖値（以下、血糖値）とSMBG値を比較し、FGM測定値の妥当性を明らかにし、適切で安全な運動療法を実施する一助とすることを目的とする。

【方法】

対象は2020年4月～2020年12月までの期間で、糖尿病の診断を受けていない当院の男性職員のうち、FreeStyleリブレ®が装着可能なものとした。除外基準は、FreeStyleリブレ®の装着期間内にセンサーが外れてしまったもの、皮膚トラブルを生じたもの、運動開始時のSMBG値が70mg/dL以下、または250mg/dL以上のものとした。測定には、FGMはAbott社製FreeStyleリブレ®、SMBGはAbott社製FSプレシジョン血糖測定電極を用いてFreeStyleリブレ®リーダーで測定した。自転車エルゴメーターはフクダ電子製well bike BE-260を使用した。FreeStyleリブレ®装着後2日間はSMBG値との誤差が大きいため[2]、初回の有酸素運動はFreeStyleリブレ®着用から3日目以降とし、運動療法の急性効果を考慮して48時間以上の間隔を空けて2回実施した。運動負荷は初回のみHR100-120bpmを目安にWattを設定し、2回目は初回と同様のWattに設定した。測定当日は運動開始30分前から安静座位を保った後に、有酸素運動を30分間実施し、運動終了後に30分間の安静座位とした。運動開始直前、運動終了直後、15分後、30分後にそれぞれ

FGM測定値、血糖値、SMBG値を測定した。測定の時間は2回とも同一の時間帯、かつ糖質代謝を考慮して食後5時間以上を空け、直前の昼食は可能な範囲で同一の内容となるよう被検者に考慮して頂いた。FreeStyleリブレ®センサーは被検者自身が装着した。採血は医師または看護師、血液検査は臨床検査技師が実施した。SMBGは糖尿病療養指導ガイドブック2018に準じて、看護師の指導のもと被検者自身が実施した。同意説明書を用いて口頭で説明し、同意書に署名を頂き同意を得た。これらの方法で得たFGM測定値、血糖値、SMBG値からコンセンサスエラーグリッド[4)]を用いて、有酸素運動におけるFGM測定値の妥当性を検討した。コンセンサスエラーグリッドとは、自己検査用グルコース測定器承認基準（ISO 15197 2013年度版）に用いられる指標で、ゾーンA～Eに分類される。ゾーン毎にA（治療への影響なし）、B（治療の変更にほとんどもしくは全く影響がない）、C（治療の変更を引き起こす可能性がある）、D（治療の変更により重大なリスクを及ぼす可能性がある）、E（治療の変更により危険な影響がある）と定義され、血糖測定機器の精確性は99％以上がコンセンサスエラーグリッドのゾーンAおよびBに該当する必要がある。

【結果】

対象者は23名で、平均年齢29.4±5.7歳、平均HbA1c5.3±0.2％、平均BMI22.3±2.8kg/m^{2}で、除外基準に該当する者はいなかった。平均FGM測定値は、直前79.9±12.1mg/dL、直後74.3±8.0mg/dL、15分後73.2±9.0mg/dL、30分後75.0±9.7mg/dLであった。平均血糖値は、直前92.5±6.4mg/dL、直後87.2±4.7mg/dL、15分後87.2±5.1mg/dL、30分後88.8±4.0mg/dLであった。平均SMBG値は、直前85.4±8.5mg/dL、直後78.2±6.7mg/dL、15分後79.9

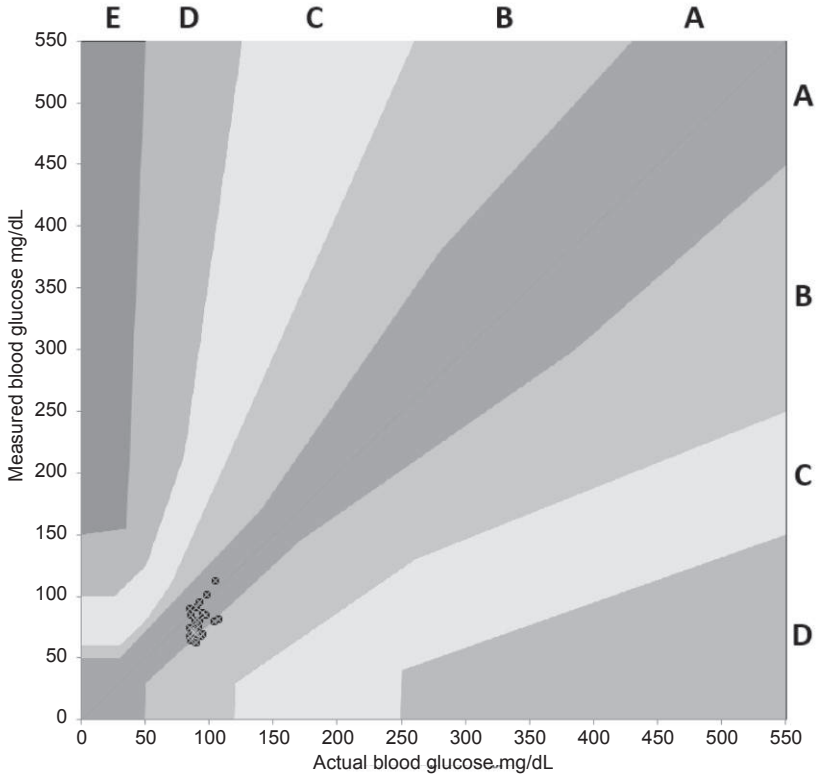


図１　コンセンサスエラーグリッド　FGM測定値と血糖値の比較　運動直前

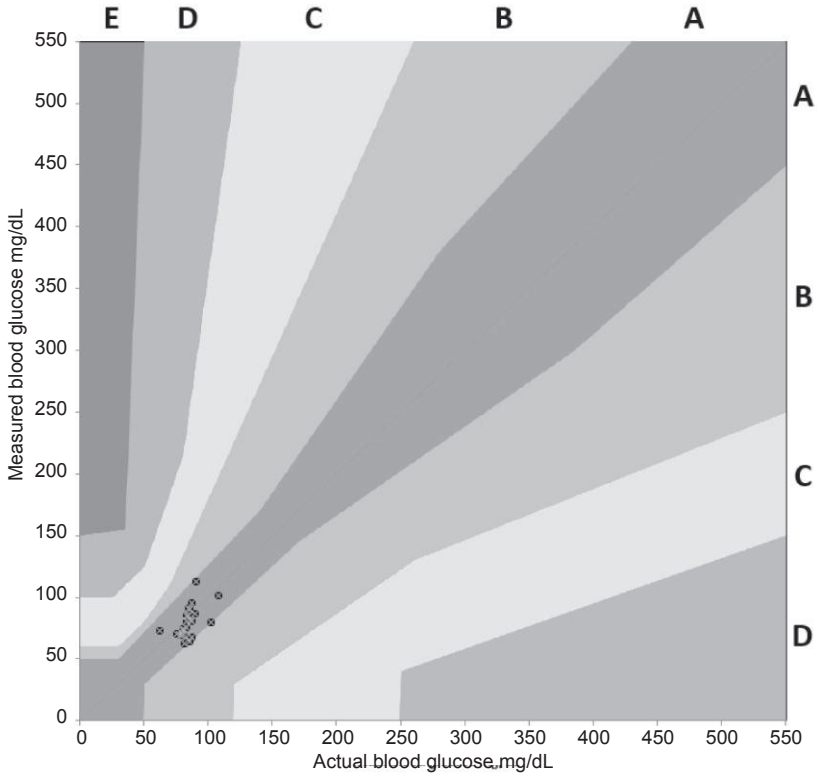


図２　コンセンサスエラーグリッド　FGM測定値とSMBG値の比較　運動直前

±6.0mg/dL、30分後81.3±6.4mg/dLであった。コンセンサスエラーグリッドを用いてFGM測定値と血糖値（**図1**）、FGM測定値とSMBG値（**図2**）を比較検討し、全ての時間帯でゾーンAおよびBに該当した。全ての時間帯の結果がコンセンサスエラーグリッドのゾーンAおよびBに該当したため、運動直前の結果のみ図で示した。

【考察】

コンセンサスエラーグリッドでFGM測定値と血糖値、FGM測定値とSMBG値を比較検討し、全ての時間帯でゾーンAおよびBに該当した。Timothyら[5]は、FGM測定値とSMBG値を比較したコンセンサスエラーグリッドで、ゾーンAおよびBの割合が99.7%だったと報告しており、本研究でも同様の結果が得られたことから、運動療法におけるFGM測定値は血糖値やSMBG値と同等に妥当なものであると示唆された。さらに、FGMでは間質中のグルコース値を測定しているため、SMBG値の経時的な変動に対して10～15分程度遅れて変動すると報告されている[6]。しかし、本研究では運動後の全ての時間帯でコンセンサスエラーグリッドのゾーンAおよびBに該当したことから、10～15分の遅延自体が運動療法に与える影響は少なく、運動療法による血糖値の変動をリアルタイムに把握することで、より適切で安全な運動療法ができる可能性が示唆された。また運動による血糖降下をリアルタイムに可視化することで、高いモチベーションを保ち、運動療法の継続率向上につながる可能性が高い。

本研究は限られた症例数の健常男性を対象としたため、性差や糖尿病患者への妥当性が今後の検討課題である。

【文献】

1. Bolonder J, et al.: Novel Glucose-sensing technology and hypoglycaemia in type 1 diabetes: a multicentre, non- maked, ran-

domized controlled trial. Lancet 388: 2254-2263, 2016
2. Haak T, et al.: Flash glucose-sensing technology as a replacement for blood glucose monitoring for the management of insulin-treated type 2 diabetes: a multicenter. Open-label randomized controlled trial. Diabetes Ther 8: 55-73, 2017
3. Haak T, et al.: Use of Flash Glucose-sensing Technology for 12 months as a Replacement for Blood Glucose Monitoring in Insulin-treated Type 2 Diabetes. Diabetes Ther 8: 573-586, 2017
4. Andreas P, et al.: Technical Aspects of the Parkes Error Grid. J Diabetes Sci Technol 7: 1275-1281, 2013
5. Timothy B, et al.: The Performance and Usability of a Factory-Calibrated Flash Glucose Monitoring System. Diabetes Technol Ther 17: 787-794, 2015
6. Rebrin K, et al.: Use of subcutaneous interstitial fluid glucose to estimate blood glucose: revisiting delay and sensor offset. J Diabetes Sci Technol 4: 1087-1098, 2010

先端巨大症の男性患者における成長ホルモン過剰と性腺機能低下症との関連性の検討

竹下　章、辰島　啓太、福原　紀章、岡田　満夫
西岡　宏、山田　正三[1]、竹内　靖博
森山脳神経センター病院[1]

【要約】

背景: 先端巨大症の男性患者では、性腺機能低下症を有することが多い。しかし、実際に過剰な成長ホルモン（GH）が性腺機能低下に関与しているかどうかは明らかではない。

方法: 我々は、高プロラクチン血症を伴わない先端巨大症の男性患者112人と非機能性下垂体腺腫（NFPA）の男性患者100人との間で、血清の総テストステロン（TT）および遊離テストステロン（FT）値と関連する臨床検査所見を後ろ向きに評価した。

結果: 腫瘍最大径中央値（14.4mm vs 26.5mm）と鞍上伸展率（33% vs 100%）はNFPAに比し先端巨大症の方が低値であったが、LH、FSH、TT、FT値に有意差は認められなかった。先端巨大症では、TTは57%が300ng/dL以下、FTは77%で年齢別基準値以下であった。TTとFTはGH、IGF-1、腫瘍サイズと負の相関を、LHと正の相関を認めた。一方、NFPAでは下垂体機能低下症を反映し、TTとFTはIGF-1、LH、FSH、ACTH、コルチゾール、遊離T4と正の相関を認めた。重回帰分析の結果、先端巨大症ではGHがTTおよびFTと最も強い関連を示し、NFPAではLHと最も強い関連を示した。先端巨大症において下垂体手術によりGHは低下し、フォローアップ患者56例中87.5%で内分泌学的な寛解が得られた。また術後LHは有意に増加し、TTとFTはそれぞれ80.4%、87.5%の患者で増加した。先端巨大症では、術後のTT（FT）の増加（ΔTTおよびΔFT）は、LH反応性の仮想パラメータとして用いたTT（FT）/LH比の術前後の増加度と相関したが、LHの術前後の増加度とは相関しなかった。一方、NFPAではΔTTおよびΔFTは両者いずれの増加度とも相関しており、先端巨大症とNFPAでは性腺機能低下症の成因が異なると考えられた。

結語: NFPAでは腫瘍の正常下垂体の圧迫による下垂体機能低下症として性腺機能低下が生じるのに対し、先端巨大症では過剰なGHにより、LH分泌の抑制のほかLH反応性の低下をきたし、性腺機能低下をきたす可能性が示唆された。

【目的】

GH産生下垂体腺腫が原因の先端巨大症では、性腺機能低下症を高頻度に合併する[1,2]。先端巨大症に伴う性腺機能低下の原因として、腫瘍の正常下垂体の圧排によるLH・FSHの分泌低下[3]、高プロラクチン（PRL）血症の合併によるGnRH[4]および5αリダクターゼ酵素活性の抑制[5]など、いくつかの機序が想定されている。しかしながら、高PRL血症の合併のない場合や、正常下垂体を圧排しない1cm以下の小さな腫瘍の先端巨大症であっても性腺機能低下が高頻度に認められる[1,2]。また手術やランレオチドによる薬物治療でGHが低下すると、総テストステロン（TT）、DHT、精子の数と運動性が増加することが報告されている[2]。したがって、ゴナドトロピンおよびPRL値とは無関係に、過剰なGH自体が、先端巨大症における性腺機能低下症の発症に重要な役割を果たしている可能性があるが詳細は不明である。

一方、生理学的にGHは小児における性腺の発達や成人における性腺機能の維持に重要である[6]。成人GH分泌不全患者では精子数が減少し

ておりGH補充療法により精子数が改善することが報告されている[7)]。したがってGHの欠乏と過剰のいずれもが男性性腺機能低下症の原因となりうる。

男性先端巨大症における性腺機能低下に影響を与える重要な因子を同定するための大規模な研究はこれまで行われていない。そこで本研究では、未治療の男性先端巨大症におけるTTと遊離テストステロン（FT）に影響を与える臨床的特徴を、非機能性下垂体腺腫（NFPA）の男性と比較して検討した。

【方法】

2009年から2015年に虎の門病院で先端巨大症に対し手術した成人男性患者（21 ～ 59歳）181例のうち、PRL値が基準値上限（31.2ng/mL）を超えた24例、薬物治療を受けた34例、再手術の9例、下垂体卒中の2例を除外した112人の患者で検討した。対照として、2011年から2015年の間に虎の門病院でNFPAに対し手術した126例の成人男性患者（21 ～ 59歳）のうち、26例（再手術8例、PRLが基準値上限以上13例、腫瘍の免疫染色で無症候性GHまたは無症候性TSH腺腫と診断された5症例）を除外した。従って病理学的にゴナドトロピン陽性腺腫または前葉ホルモン陰性腺腫のいずれかのNFPA100例を対照とした。

正規分布のデータは平均値 ± SD、非正規分布のデータは中央値とIQRで示した。後者のデー

表 1　先端巨大症と非機能性下垂体腺腫（NFPA）の臨床的特徴の比較

	Acromegaly (n=112)		NFPA (n=100)		*p*
	Median (IQR)	Mean ± SD	Median (IQR)	Mean ± SD	
Age (y.o.)	40 (33 – 50)	41 ± 10	49 (43 - 55)		<0.001$^{\dagger\dagger a}$
BMI (kg/m2)	25.6 (23.1 - 27.1)		24.4 (22.4 – 26.4)	24.5 ± 2.8	0.01$^{\dagger a}$
GH (ng/mL)	12.4 (5.3 - 21.7)		0.10 (0.05 – 0.29)		<0.001$^{\dagger\dagger a}$
IGF-1 (ng/mL)	699 (570 – 916)	736 ± 255	108 (88 – 140)	114 ± 42	<0.001$^{\dagger\dagger a}$
IGF-1 (Z-score)	7.65 (5.83 – 9.34)	7.70 ± 2.57	-1.22 (-2.13 – -0.33)	-1.33 ± 1.28	<0.001$^{\dagger\dagger a}$
LH (IU/L)	2.2 (1.6 - 3.5)		2.1 (1.4 - 3.0)		0.108
FSH (IU/L)	7.9 (5.7 - 11.4)		8.1 (5.1 – 12.3)		0.814
Total testosterone (TT) (ng/dL)	263 (189 - 379)		269 (109 - 372)		0.113
Free testosterone (FT) (pg/mL)	5.4 (3.7 - 7.5)		5.6 (2.6 – 8.2)		0.7
PRL (ng/mL)	10.3 (7.6 - 15.4)		13.6 (9.9 – 19.8)		0.006
ACTH (pg/mL)	36.4 (28.0 - 51.2)		27.5 (19.8 – 34.9)		<0.001$^{\dagger\dagger a}$
Cortisol (μg/dL)	10.0 (7.3 – 12.6)	10.2 ± 4.1	9.1 (6.4 – 12.4)	9.3 ± 4.4	0.136
TSH (μIU/mL)	0.69 (0.40 - 0.96)		1.03 (0.74 – 1.76)		<0.001$^{\dagger\dagger a}$
Free T4 (ng/dL)	1.04 (0.93 - 1.12)		0.82 (0.66 – 0.93)	0.81 ± 0.20	<0.001$^{\dagger\dagger a}$
Maximum tumor diameter (mm)	14.4 (11.6 - 18.7)		26.5 (22.3 – 31.0)	27.0 ± 6.3	<0.001$^{\dagger\dagger a}$
Microadenoma (<10mm)	16 (14.3%)		0 (0%)		<0.001$^{\dagger\dagger b}$
Macroadenoma (≧10mm)	96 (85.7%)		100 (100%)		
Suprasellar extension	37 (33.0%)		100 (100%)		<0.001$^{\dagger\dagger b}$
Knosp classification	1 (0-2)		1 (1-2)		<0.001$^{\dagger\dagger b}$
0	45 (40.2%)		8 (8%)		
1	34 (30.4%)		47 (47%)		
2	21 (18.8%)		29 (29%)		
3	11 (9.8%)		14 (14%)		
4	1 (0.9%)		2 (2%)		

正規分布のデータは平均値±SD、非正規分布のデータは中央値とIQRで示した。

[a] Mann-Whitney *U* test.　[b] Fisher's exact test.　†<0.05, ††<0.01

タは、対数データに変換後に統計解析を行った。様々な内分泌学的パラメータをStudentのt検定またはMann-Whitney U検定を用いて検討した。多重共線性の仮定については、独立変数間のピアソン相関係数を用いて評価した。

本研究は、虎の門病院の臨床研究審査委員会（承認番号: 1781）の承認を得て行った。

【結果】

先端巨大症患者とNFPA患者の特徴を**表1**に示す。先端巨大症の年齢中央値は、NFPAよりも9歳若かった（40歳vs49歳、p<0.001）。BMIは、先端巨大症がNFPAよりも有意に高かった（25.6 vs 24.4 kg/m^2、p=0.01）。先端巨大症のGH中央値は12.4 ng/mLでIGF-1はZスコアが7.70±2.57と高値であった。一方、NFPAは、GH中央値は0.10 ng/mLであり、IGF-1は低値であった（Zスコア、-1.33±1.28）。また、ACTHと遊離T4はNFPAで有意に低値であり、NFPAでは下垂体機能低下症の頻度が高いことが示唆された。先端巨大症では、LH値中央値は基準値内低値（2.2 IU/L、IQR 1.5～3.5 IU/L）であった。TT中央値は263 ng/dLで、112例中43例（38.4%）が230 ng/dL以下、64例（57.1%）が300 ng/dL以下であった。FT中央値は5.4 pg/mLであり、112例中86例（76.8%）が日本人の年齢別基準値以下であった。血清LH、FSH、TT、FTは先端巨大症とNFPAで有意差は認められなかった。腫瘍の大きさは、先端巨大症がNFPAよりも有意に小さかった（最大腫瘍径中央値14.4 mm vs 26.5 mm、p<0.001）。最大腫瘍径が1cm未満の微小腺腫の頻度は先端巨大症の14.3%、NFPAでは0%だった。鞍上部伸展率は先端巨大症で33%、NFPAで100%であった。Knosp分類のグレードはNFPAが有意に高かった。

血清TTまたはFTと相関のある臨床パラメータを同定するため、単回帰分析またはMann-

表２　先端巨大症と非機能性下垂体腺腫（NFPA）における総テストステロン（TT）および遊離テストステロン（FT）の相関解析

	Acromegaly (n=112)				NFPA (n=100)			
	TT		FT		TT		FT	
Variables	*r*	*p*[a]	*r*	*p*[a]	*r*	*p*[a]	*r*	*p*[a]
Age	−0.005	0.958	− 0.25	0.008††	−0.182	0.0697	−0.232	0.020†
BMI	−0.301	<0.001††	−0.115	0.228	−0.180	0.075	−0.145	0.151
GH	−0.557	<0.001††	−0.493	<0.001††	0.19	0.059	0.118	0.244
IGF-1	−0.405	<0.001††	−0.196	0.039†	0.408	<0.001††	0.415	<0.001††
IGF-1 (Z-score)	−0.426	<0.001††	−0.225	0.017†	0.41	<0.001††	0.411	<0.001††
LH	0.35	<0.001††	0.292	0.002††	0.41	<0.001††	0.47	<0.001††
FSH	0.04	0.676	−0.099	0.298	0.293	0.003††	0.247	0.013†
PRL	0.107	0.263	0.086	0.369	−0.200	0.046†	−0.281	0.005††
ACTH	−0.006	0.948	0.107	0.268	0.397	<0.001††	0.363	<0.001††
Cortisol	0.064	0.504	0.108	0.257	0.332	<0.001††	0.499	<0.001††
TSH	0.154	0.106	0.226	0.017†	−0.155	0.133	−0.132	0.202
Free T4	0.011	0.905	−0.079	0.407	0.544	<0.001††	0.6	<0.001††
Maximum tumor diameter	−0.434	<0.001††	− 0.39	<0.001††	−0.125	0.216	−0.156	0.122
	r	*p*[b]	*r*	*p*[b]	*r*	*p*[b]	*r*	*p*[b]
Knosp classification	−0.181	0.056	−0.129	0.175	−0.016	0.878	−0.106	0.294
	Median (IQR)	*p*[c]	Median (IQR)	*p*[c]				
Suprasellar extension −	291 (201-425)	0.031†	6.1 (3.8-8.5)	0.014†				
Suprasellar extension +	227 (157-321)		4.6 (3.2-6.3)					

非正規分布のデータは対数データに変換後ピアソンの相関係数分析を行った。

[a] Pearson's correlation coefficient.

[b] Spearman's correlation coefficient.

[c] Mann-Whitney U test.

†<0.05, ††<0.01

Whitney U検定を用いて、TTまたはFTと、年齢、BMI、内分泌機能、最大腫瘍径、Knosp分類、および鞍上伸展の有無を含む臨床パラメータとの相関を検討した（**表2**）。先端巨大症では、GH、IGF-1、IGF-1（Zスコア）、LH、および最大腫瘍径のすべてがTTおよびFT値と相関した。鞍上部伸展も、TTおよびFT値の低下と関連していた。TTとFTに相関する最も強い因子は、両者ともGHであった（TT *vs* GH: r = -0.577、p<0.001、FT *vs* GH: r = -0.493、p<0.001）。BMIはTTと相関したが、FTとは相関しなかった。年齢およびTSHはFTと相関したが、TTとは相関しなかった。これらの因子のうち、年齢、BMI、GH、IGF-1、LH、PRL、TSHおよび最大腫瘍径を独立変数として選択し、重回帰分析（ステップワイズ法）を用いて、TTおよびFTに関連する因子を検討したところ、GHがTTおよびFTと最も強い相関を示した（TTとGHの標準化偏回帰係数（β）は-0.387、p<0.001、FTとGHの（β）は-0.384、p<0.001）（**表3上段**）。NFPAでは、TTおよびFT はIGF-1、IGF-1（Zスコア）、LH、FSH、PRL、ACTH、コルチゾール、遊離T4と相関していた（**表2右側**）。TTおよびFTは、先端巨大症ではIGF-1やIGF-1（Zスコア）と負の相関を呈したが、NFPAでは正の相関を呈した。年齢はFTと相関したが、TTとは相関しなかった。TTやFTと相関する最も強い因子は遊離T4であった（TT *vs* 遊離T4: r = 0.544、p<0.001）、FT *vs* 遊離T4: r = 0.600、p<0.001）。したがって、NFPAでは、下垂体機能低下症がTTおよびFTと関連していた。独立変数として年齢、BMI、GH、IGF-1、LH、FSH、PRL、ACTH（TTの場合）、コルチゾール（FTの場合）、遊離T4を選択し、重回帰分析を行ったところ、LHがTTおよびFTと最も強い相関を示した（TTの標準化偏回帰係数（β）0.349、p<0.001、FTの（β）0.373、p<0.001）（**表3下段**）。

術後6ヵ月以上当院で経過観察した先端巨大症は112例中56例であった。手術により56例中49例（87.5%）で内分泌学的寛解が得られた。**表4**は、術前と術後6ヶ月から12ヶ月に同時採血し比較した様々なホルモン値を示している。手術後、ランダムGHは中央値13.5（IQR 5.6 ～ 24.6）か

表３　先端巨大症と非機能性下垂体腺腫（NFPA）における総テストステロン（TT）および遊離テストステロン（FT）の重回帰分析

Acromegaly (n=112)					
	TT			FT	
Independent variables	Standardized partial regression coefficient (β)	*p*	Independent variables	Standardized partial regression coefficient (β)	*p*
GH	−0.387	<0.001††	GH	−0.384	<0.001††
BMI	−0.290	<0.001††	Age	−0.370	<0.001††
LH	0.255	0.001††	LH	0.22	0.004††
Maximum tumor diameter	−0.172	0.049†	TSH	0.181	0.015†
			Maximum tumor diameter	−0.200	0.024†

NFPA (n=89)					
	TT			FT	
Independent variables	Standardized partial regression coefficient (β)	*p*	Independent variables	Standardized partial regression coefficient (β)	*p*
LH	0.349	<0.001††	LH	0.373	<0.001††
Free T4	0,284	0.003††	Cortisol	0.33	<0.001††
Age	−0.207	0.012††	Age	−0.302	<0.001††
ACTH	0.204	0.017†	Free T4	0.271	0.001††
BMI	−0.162	0.05			

†<0.05, ††<0.01

表４　先端巨大症56例および非機能性下垂体腺腫（NFPA）60例における術前後の各種ホルモン値の変化

	Acromegaly (n=56)			NFPA (n=60)			p^c (Acromegaly *vs* NFPA)	
Age (y.o.)	39 (33 - 51)			48 (41 - 54)				
	Before surgery	After surgery	p^a	Before surgery	After surgery	p^b	Before surgery	After surgery
GH (ng/mL)	13.5 (5.6 - 24.6)	0.4 (0.1 - 1.5)	<0.001††	0.1 (0.05 - 0.3)	0.1 (0.05 - 0.3)	0.747	<0.001††	<0.001††
IGF-1 (ng/mL)	693 (601 - 931)	185 (158 - 226)	<0.001††	118 (93 - 149)	122 (93 - 155)	0.76	<0.001††	<0.001††
IGF-1 (Z-score)	7.64 (5.85 - 9.77)	0.63 (−0.41 - 1.25)	<0.001††	−0.91 (−1.84 - −0.19)	−0.91 (−1.84 - −0.13)	0.771	<0.001††	<0.001††
PRL (ng/mL)	10.6 (7.3 - 17.0)	7.2 (6.1 - 8.8)	<0.001††	14.2 (9.9 - 19.8)	7.7 (6.3 - 9.5)	<0.001††	0.064	0.481
free T4 (ng/dL)	1.02 (0.92 - 1.12)	1.12 (1.04 - 1.23)	<0.001††	0.86 (0.74 - 0.99)	0.99 (0.89 - 1.06)	<0.001††	<0.001††	<0.001††
LH (IU/L)	2.3 (1.6 - 3.3)	2.7 (1.9 - 3.7)	0.024†	2.0 (1.4 - 3.0)	2.3 (1.8 - 3.2)	<0.001††	0.295	0.252
FSH (IU/L)	7.9 (5.4 - 11.3)	7.3 (5.3 - 10.3)	<0.001††	7.9 (6.2 - 10.8)	6.5 (5.1 - 9.3)	<0.001††	0.908	0.744
TT (ng/dL)	267 (211 - 358)	458 (311 - 535)	<0.001††	290 (146 - 418)	338 (279 - 465)	<0.001††	0.695	0.015†
FT (pg/mL)	5.7 (3.8 - 7.5)	9.0 (7.8 - 11.5)	<0.001††	6.1 (3.6 - 8.4)	8.9 (6.7 - 11.2)	<0.001††	0.675	0.347

術後6ヵ月から12ヵ月の同時採血のデータ(中央値とIQR)。術前と術後の変化の統計解析はWilcoxon 符号順位検定(aとb)を用いた。 先端巨大症とNFPAの比較はMann-Whitney U検定を用いた(c)。

†<0.05, ††<0.01

ら0.4（IQR 0.1 ～ 1.5）ng/mLに有意に低下し、IGF-1値の中央値も693（IQR 601 ～ 931）から185（IQR 158 ～ 226）ng/mLに有意に低下した。術後TTは45例（80.4%）で増加し、TT中央値は267（IQR 211 ～ 358）から458（IQR 311 ～ 535）ng/dLに有意に増加した（p<0.001）。TT値が300ng/dL未満の性腺機能低下症は術前56例中34例（60.7%）から術後56例中11例（19.6%）に減少した。同様に、FTは49人（87.5%）で増加し、FT中央値は5.7（IQR 3.8 ～ 7.5）から9.0（IQR 7.8 ～ 11.5）pg/mLに有意に増加し（p<0.001）、年齢別基準値未満は術前56人中44人（78.6%）から術後9人（16.1%）に減少した。LH値は2.3（IQR 1.6 ～ 3.3）から2.7（IQR 1.9 ～ 3.7）IU/L（p = 0.024）に有意に増加し、一方でFSHは7.9（IQR 5.4 ～ 11.3）から7.3（IQR 5.3 ～ 10.3）IU/L（p<0.001）に有意に低下した。NFPAの術後データは100例中60例（TTは60例、FTは58例）で得られた。TTは60人中47人（78.3%）で術後増加し、TT中央値は術前290（IQR 146 ～ 418）から術後338（IQR 279 ～ 465）ng/dLに有意に増加した（p<0.001）。TTが300ng/dL以下は術前の60人中32人（53.3%）から術後20人（33.3%）に減少した。同様に、FTは58人中45人（77.6%）で増加し、FT中央値は6.1（IQR 3.6 ～ 8.4）から8.9（IQR 6.7 ～ 11.2）pg/mLに有意に増加した（p<0.001）。FTが年齢別基準値未満の数は、術前59人中37人（62.7%）から術後20人（34.5%）に減少した。LHは2.0（IQR 1.4 ～ 3.0）から2.3（IQR 1.8 ～ 3.2）IU/Lに有意に増加し（p<0.001）、FSHは7.9（IQR 6.2 ～ 10.8）から6.5（IQR 5.1 ～ 9.5）IU/Lに有意に減少した（p<0.001）。術前の性腺機能（LH、FSH、TT、FT）は両群で有意差を認めなかった。術後もLH、FSH、FTは有意差を認めなかったが、TTは先端巨大症が有意に高値であった。両群間における術後TTの有意差の原因は不明であるが、先端巨大症では術後GHが低下することでSHBGが増加したことが一因である可能性がある。

先端巨大症では、術後にLHが増加したのは36例（64.3%）で、うちTT増加が30例（83.3%）、FT増加が33例（91.7%）で認められた。一方、術後にLHが減少した19例（33.9%）でもTT増加が14例（73.7%）、FT増加が15例（78.9%）で認められた。術後にLHが減少した患者の多くでもTTとFTが増加しており、術後のTTとFTの改善を術後のLHの上昇でのみ説明することは困難でありLHの生理活性や精巣のLHに対する反応性を示すLH応答性の改善も要因として考えられた。そこで、LH応答性の仮想パラメータとしてTT/LHを検討し、術前と術後の比を比較した。TT/LHは39例（69.6%）、FT/LHは40例（71.4%）で術後に増加し、それぞれ1.50 ± 0.84（p=0.02）、1.68 ± 1.05（p<0.001）倍に増加した。

術後のLH分泌の改善とLH応答性の改善という2つの要因がテストステロン値の回復にどのように関与しているかを明らかにするために、横軸に術前後のLHの増加比を、縦軸に術前後のTT/LHまたはFT/LHの増加比をプロットし、**図1**に示した。術後TTまたはFTの増加度（ΔTTまたはΔFT）に応じ、変化なしあるいは悪化した患者は白丸で、増加した患者はその程度により灰または黒色の丸で示した。先端巨大症ではLHの増加比はTT/LH（r = −0.607、p<0.001）またはFT/LH（r = −0.610、p<0.001）の増加比と負の相関を示した。手術後に両方の因子が増加した場合には、良好な回復を示す患者が多く認められた。一方の因子が術後に減少した場合は術後のテストステロン分泌の改善には他方の因子の増加が必要であった。TT/LHおよびFT/LHの増加比は、それぞれΔTT（r = 0.546、p <0.001）およびΔFT（r = 0.475、p <0.001）と正の相関を示したが、LHの増加比とΔTTやΔFTに相関は認められなかった。NFPAでは、LHの増加比とTT/LH、FT/LHの増加比との間に相関は認められなかった。しかしTT/LHおよびFT/LHの増加比は、それぞれΔTT（r = 0.697、p <0.001）およびΔFT（r = 0.719、p <0.001）と正の相関を示した。さらに、LHの増加比もΔTT（r = 0.356、p = 0.005）およびΔFT（r = 0.419、p <0.001）

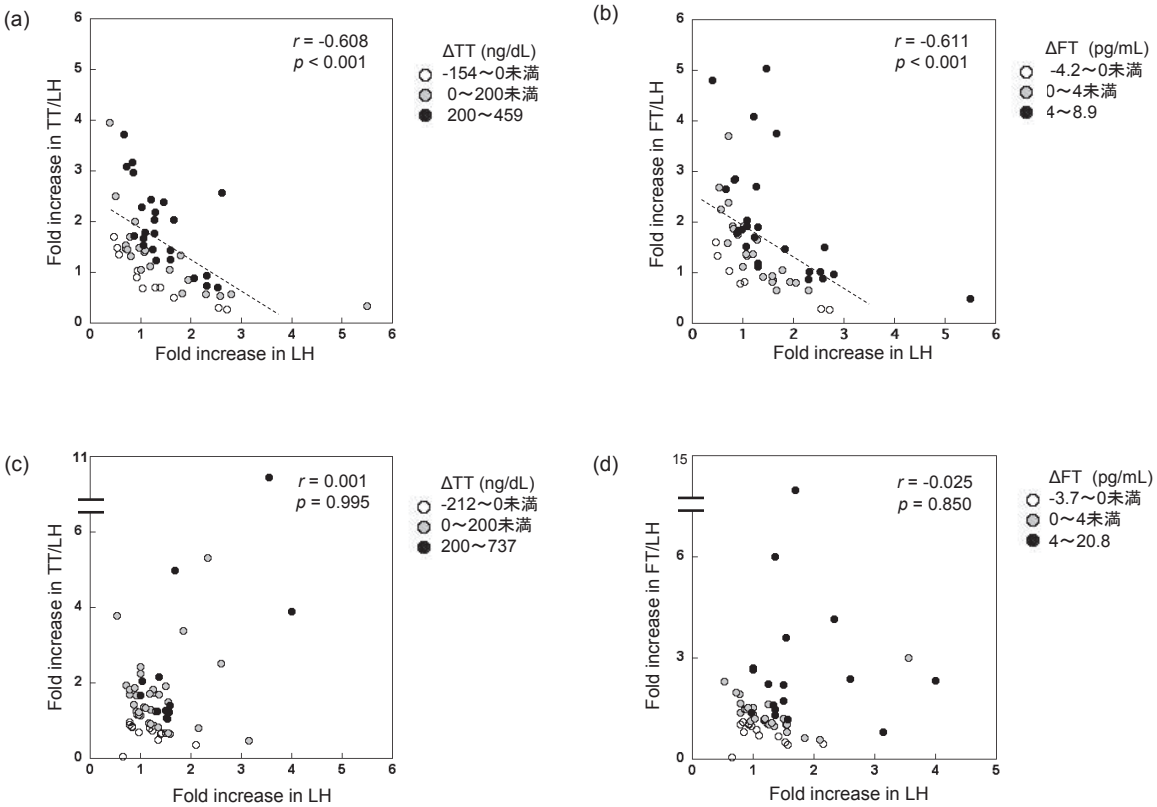


図1　先端巨大症56人および非機能性下垂体腺腫60人におけるLHおよびLH応答性（TT/LHまたはFT/LH）の術前後の増加比とテストステロン値の変化との関係
横軸に術前後のLHの増加比を示す。縦軸に先端巨大症のTT/LH増加比(a)、先端巨大症FT/LH増加比(b)、NFPAのTT/LH増加比(c)、またはNFPAのFT/LH増加比(d)を示す。手術後のTT(a、c)またはFT(b、d)の増加（ΔTTまたはΔFT）を程度により白、灰、黒丸で表した。相関はスピアマンの相関係数で評価した。

と正の相関を示した。したがって、先端巨大症では、LHは術後増加する症例が多いものの、テストステロンの回復は、LHのレベルの上昇よりもLH応答性の改善によってより説明された。一方、NFPAでは、LHレベルの上昇とLHと応答性の改善の両者がテストステロンの回復と関連した。

【考察】

本研究では、先端巨大症の男性における性腺機能低下を評価するために、血清TTとFTを測定した。TTにはSHBGとアルブミンに結合したテストステロンが含まれ、約2%がFTである。SHBGは加齢、甲状腺機能亢進症、高エストロゲン血症で増加し、GH過剰、肥満、インスリン抵抗性で減少する。血清TT値の基準値は、SHBGが加齢とともに増加するため年齢特異的な基準値がないが、血清FT値は、SHBGの増加とは無関係に加齢とともに減少するため年齢特異的な基準値が存在する。したがって、**表2**の単相関分析ではBMIはTTのみ逆相関し、年齢はFTのみ逆相関した。FTは年齢のほかTSHと正の相関を示したが原因は不明である。

明確なTTの基準値の下限値はない。しかし、一般的にTT値が230ng/dLより低い場合はテストステロン補充の恩恵を受け、350ng/dLより高ければ補充を必要としないというコンセンサスがある[8)]。過去の先端巨大症男性を対象とした報告では、TT値が300ng/dL未満の頻度は49%[1)]、あるいは350ng/dL未満の頻度は42.8%との報告がある[2)]。本研究では、TTが230ng/dL未満は38.4%、300ng/dL未満は57.1%であった。本研究における頻度が高いのは、人種の違い、過剰なGHの程度、肥満の程度、あるいはテストステロン測定キットの違いによるものなどが考えられる。FTが年齢別基準値未満の頻度は76.8%でありTT<300 ng/dL（57.1%）より著しく高頻度であった。今回の結果から、TT値は年齢依存的にFT値に比して若干高値をとっており、TT値が基準値内でもFT値が低い患者は高齢者で多く認められた。本邦ではSHBGの測定は保険適用外のため測定できていないが、年齢に依存したSHBGの上昇が関係する可能性が考えられた。

本研究の重回帰分析により先端巨大症ではTTとFTに最も強い影響を与える因子がGHであることが判明したが、過剰なGHによる性腺機能低下の病態メカニズムは、まだ解明されていない。養殖として利用されているティラピア[9)]やサケ[10)]などのGH遺伝子組み換え魚類などを使った研究で、過剰なGHの性腺機能への影響が報告されている。魚類におけるGHを介した生殖腺制御のメカニズムは哺乳類とは異なるかもしれないが、慢性的に過剰なGHは下垂体からのゴナドトロピンの分泌を抑制し、精巣の老化を促進し、ライディッヒ細胞のLHに対する精巣の反応低下と関連していることが報告されている。

本研究では、87.5%の患者が手術寛解を達成し、80%以上の患者でTTおよびFT値が上昇した。術後には、テストステロン分泌の改善とともにLH値の有意な上昇が観察された。しかしながら術後にLHが低下した患者の7割以上でテストステロン分泌の改善を認めたことから、過剰なGHによるLH分泌の抑制のみで、先端巨大症における性腺機能低下の機序を説明することは困難である。GH過剰による精巣の老化促進については、術後1年以内にテストステロン値が上昇しており、GH過剰は少なくとも不可逆的な精巣の老化は誘発しないと考えられる。ライディッヒ細胞におけるLH低反応性については、今回の研究では約70%の患者で術後にTT/LH、FT/LH比の上昇が認められた。ライディッヒ細胞ではLHに対する精巣の反応性が低下している可能性があるが、過剰なGHによりLHに対する精巣の反応性が低下するマウスでの研究結果と合致している[11)]。NFPAにおける中枢性甲状腺機能低下症は、TSHの糖鎖の異常によって引き起こされ、免疫学的活性は正常であるが、TSHの生物学的活性は低下することが知られている[12)]。LHはTSHと同じαサブユニットを共有しているため、NFPAでも生理活性の低い異常LHが分泌されうる。しかしながら、先端巨大症において過剰なGHが生理活性の低いLH分泌を誘導するかどうかは現在のところ不明である。

本研究のlimitationをいくつかあげる。まず単一施設で実施された後方視研究である。性腺機能低下症の診断には、血清TT値とFT値に加えて、

勃起不全、性欲減退などの臨床症状や精子所見など他の臨床データも性腺機能低下症の評価に重要であるが今回の検討項目に含まれていない。先端巨大症とは無関係な精巣疾患などの性腺機能低下症の合併症の可能性について検討していない。先端巨大症患者の病脳期間に関する情報が不十分であり今回の解析項目に含まれていない。本研究では術後評価を行った患者は約50％であり充分とは言えない。術後のTTおよびFTレベルの改善が性腺機能低下症の臨床症状の軽減に影響するか検討していない。最後に、本研究ではLHの生物活性の評価は未施行である。

【結語】

高PRL血症を伴わない先端巨大症の男性では、過剰なGH自体がテストステロンの減少と最も強い相関関係を示した。先端巨大症では過剰なGHにより、LH分泌の抑制だけでなく、LH反応性の低下（LHの生理活性の低下および精巣のLHに対する反応性の低下）をきたしている可能性があり、これらの障害は手術により改善すると考えられる。

【文献】

1. Katznelson L, Kleinberg D, Vance ML, Stravou S, Pulaski KJ, et al.: Hypogonadism in patients with acromegaly: Data from the multi-centre acromegaly registry pilot study. Clin Endocrinol (Oxf) 54: 183-188, 2001
2. Colao A, Rosa MDE, Pivonello R, Balestrieri A, Cappabianca P, et al.: Short-term suppression of GH and IGF-I levels improves gonadal function and sperm parameters in men with acromegaly. J Clin Endocrinol Metab 87: 4193-4197, 2002
3. Arafah BM: Reversible hypopituitarism in patients with large nonfunctioning pituitary adenomas. J Clin Endocrinol Metab 62: 1173-1179, 1986
4. Sarkar DK, Yen SSC: Hyperprolactinemia decreases the luteinizing hormone-releasing hormone concentration in pituitary portal plasma: A possible role for β-endorphin as a mediator. Endocrinology 116: 2080-2084, 1985
5. Magrini G, Ebiner JR, Burckhardt P, Felber JP: Study on the relationship between plasma prolactin levels and androgen metabolism in man. J Clin Endocrinol Metab 43: 944-947,1976
6. Galdiero M, Pivonello R, Grasso LFS, Cozzolino A, Colao A: Growth hormone, prolactin, and sexuality. J Endocrinol Invest 35: 782-794, 2012
7. Carani C, Granata ARM, De Rosa M, Garau C, Zarrilli S, et al.: The effect of chronic treatment with GH on gonadal function in men with isolated GH deficiency. Eur J Endocrinol 140: 224-230, 1999
8. Wang C, Nieschlag E, Swerdloff R, Behre HM, Hellstrom WJ, et al.: Investigation, treatment and monitoring of late-onset hypogonadism in males: ISA, ISSAM, EAU, EAA and ASA recommendations. Eur J Endocrinol 159: 507-514, 2008
9. Rahman MA, Ronyai A, Engidaw BZ, Jauncey K, Hwang G-L, et al.: Growth and nutritional trials on transgenic Nile tilapia containing an exogenous fish growth hormone gene. J Fish Biol 59: 62-78, 2001
10. Devlin RH, Biagi CA, Yesaki TY: Growth, viability and genetic characteristics of GH transgenic coho salmon strains. Aquaculture 236: 607-632, 2004
11. Piotrowska K, Sluczanowska-Glabowska S, Kucia M, Bartke A, Laszczynska M, et al.: Histological changes of testes in growth hormone transgenic mice with high plasma level of GH and insulin-like growth factor-1. Folia Histochem Cytobiol 53: 249-258, 2015
12. Beck-Peccoz P, Rodari G, Giavoli C, Lania A: Central hypothyroidism - a neglected thyroid disorder. Nat Rev Endocrinol 13: 588-598, 2017

13. Nishio R, Takeshita A, Uchida T, Herai T, Sakamoto K, et al.: GH-induced LH hyporesponsiveness as a potential mechanism for hypogonadism in male patients with acromegaly, Endocr J 2021: in press.

【発表に関する事項】

1. 西尾理恵、竹下章、他: 男性の先端巨大症ではLH分泌の抑制と性腺におけるLH反応性の低下がテストステロン分泌の低下に関与する. 第93回日本内分泌学会学術総会　2020年（WEB開催）

(3) 呼吸器疾患

造血幹細胞移植後の肺病変に関する臨床的・病理学的検討

宇留賀 公紀、藤井　丈士、西田　彩
内田　直之、谷口　修一、髙谷　久史

【要約】

目的: 造血幹細胞移植後を含む血液疾患を有する症例に対する気管支鏡検査の安全性や有用性は十分に検討されていない。今回、当院での症例における安全性とそれに影響する因子について検討した。更に、経気管支肺生検により組織学的診断を行った症例を検索した。

方法: 2009年1月から2018年12月までの間に、血液疾患を有し、内視鏡室で気管支鏡検査を施行した症例を対象とし、合併症の頻度、それに影響した臨床背景や検査手技、ならびに病理学的診断について検討を行った。

結果: 282症例に対して、316回の気管支鏡を施行した。132例(46.8%)が造血幹細胞移植を受け、73例（23.1%）が0.5-6 L/分の酸素吸入をしていた。合併症は、気胸が7例（2.2%)、48時間以内に侵襲的人工呼吸器管理を必要とした症例が2例（0.6%)、48時間より長時間の呼吸状態の悪化を認めた症例が12例(3.8%)に認めた。多変量解析では、ミタゾラムを使用することで呼吸状態の遷延が有意に減少した（$p=0.03$, ハザード比 0.28、95%信頼区間0.09-0.85)。血痰は35例（11.1%）に認め、経気管支肺生検の実施で有意にリスクが高く（$p=0.00$、ハザード比 10.40、95%信頼区間4.18-25.90)、ミタゾラムの使用で有意に低かった（$p=0.01$、ハザード比 0.31、95%信頼区間0.14-0.73)。移植後180日以内に気管支鏡検査を行った52例中、経気管支肺生検による組織採取は19例で行われて、3例で器質化肺炎、2例で真菌性肺炎と組織学的に診断され、それぞれ治療に反映された。

結論: 血液疾患を有する症例に対する気管支鏡は比較的安全であったが、検査後の呼吸状態の悪化や血痰については十分に注意する必要がある。ミタゾラムなどの適切な鎮静剤の使用は、患者さんの検査中の快適性の向上や、合併症の減少に繋がる可能性が示された。経気管支肺生検により組織学的に診断された症例も認めたが、血痰を有意に増加させることが示され、手技の実施については十分な注意が必要である。

【目的】

造血幹細胞移植後の肺病変は約25-50%に出現し、死亡の約50%に関与する重篤な合併症である[1)]。特に移植後120日以内の非感染性肺障害はidiopathic pneumonia syndrome（IPS）と呼ばれ、合併した場合の死亡率は60-80%と高率である。また、移植後6カ月以降も器質化肺炎が1-10%、閉塞性細気管支炎が2-26%に合併し、移植晩期死亡の原因となる。この様に、移植後の肺病変は時期に関わらず起き、死亡につながる重篤な合併症である。しかし、造血幹細胞移植後の肺病変に対する気管支鏡検査などによる病理学的検索は、血小板数が少ないこと、呼吸状態が悪いことが多いことから実施できないことが多く、報告は限られている。今回、血液内科と共同で、血液疾患を有する症例における気管支鏡検査の安全性、並びに肺病変に関する臨床的･病理学的検討を行った。

【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。2009年1月から2018年12月までの間に、血液疾患を有し、内視鏡室で気管支鏡検査を施行した症例を対象とした。集中治療室で気管支鏡検査を行った症例は除外した。それぞれの症例について年齢、性別、背景の血液疾患、血小板数、検査前日または当日の血小板輸血の有

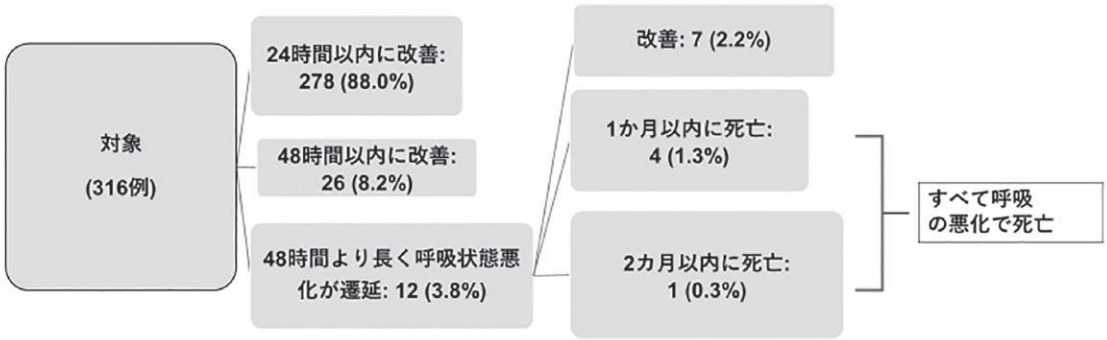


図 1　気管支鏡検査後の呼吸状態の変化のフローチャート

無、好中球数（500/μl以下）、造血幹細胞移植後の日数（180日以内）、酸素吸入の量（(≥5 L/分)、気管支鏡の手技（気管支洗浄、気管支肺胞洗浄（Bronchoalveolar lavage : BAL）、経気管支肺生検（Trans-bronchial lung biopsy: TBLB））、検査中の鎮静剤（ミタゾラム、ペチジン、硫酸アトロピン）、病理検査結果について後方視的に検討した。ミタゾラムについては、2011年から気管支鏡検査中の鎮静剤として使用されるようになった。検査後の呼吸状態の悪化の遷延は、48時間を経過しても検査前より吸入酸素量が多い状態と定義した。統計学的な解析は、SPSS statistical software（version 18.0, SPSS Inc., Chicago, IL）を用いて、単変量解析はFisherの正確検定またはMann-Whitney U検定、多変量解析は多重ロジスティック回帰分析により施行した。

【結果】

282症例に対して、316回の気管支鏡を施行した。背景は、男性 207例、女性 75例、年齢中央値 61歳であった。疾患としては、急性骨髄性白血病（Acute myeloid leukemia: AML）が134症例（47.5%）と最も多く認めた。132例（46.8%）が造血幹細胞移植を受け、内訳は臍帯血移植 69例、非血縁者間骨髄移植 35例、血縁者間骨髄移植 1例、非血縁者間末梢血幹細胞移植 15例、血縁者間末梢血幹細胞移植 12例であった。血小板数中央値は91,000/μL（3,000-568,000）で、134例（42.4%）が検査前日または当日に血小板輸血を受けていた。73例（23.1%）が0.5-6 L/分の酸素吸入をしていた。気管支鏡中の手技は、気管支洗浄 201例（63.6%）、BAL 104例（32.9%）、TBLB 125例（39.6%）、キュレット 6例（1.9%）、endobronchial ultrasound-guided transbronchial needle aspiration（EBUS-TBNA）2例（0.6%）であった。鎮静剤は、ペチジン261例（82.6%）、ミタゾラム 235（74.4%）、硫酸アトロピン 291（92.1%）が使用されていた。

合併症については、気胸 7例（2.2%）（その内、4例は胸腔ドレナージを実施）に認めた。呼吸状態については、2例（0.6%）は48時間以内に侵襲的人工呼吸器管理を必要とし、12例（3.8%）において48時間より長時間の悪化を認めた（**図1**）。呼吸状態悪化の遷延に影響する因子について単変量解析を行い、血小板数≤20×10^3/μl（$p=0.05$）、ミタゾラムの投与（$p=0.01$）が統計学的に有意であった。多変量解析ではミタゾラムを投与されていることで有意にリスクが減少していた（$p=0.03$, ハザード比 0.28、95%信頼区間0.09-0.85）（**表1**）。12例中の5例は最終的に改善せずに死亡され、死因としてはアスペルギルス感染 2例、CMV感染 2例、不明 1例であった。血痰は35例（11.1%）に認め、単変量解析においてはTBLBの実施のみが有意な因子であった（$p=0.00$）。多変量解析では、TBLBを実施することで有意にリスクが増加し（$p=0.00$、ハザード比 10.40、95%信頼区間4.18-25.90）、ミタゾラムを投与することで有意にリスクが減少していた（$p=0.01$、ハザード比 0.31、95%信頼区間

表 1　呼吸状態悪化遷延のリスク因子の検討

背景因子	呼吸状態悪化遷延群 (n=12)	呼吸状態悪化非遷延群 (n=304)	単変量解析 (*p* 値)	多変量解析 (*p* 値)	ハザード比 (95% 信頼区間)
年齢 ≤70 歳	0	39	0.37		
性別（男性/女性）	10/2	225/79	0.74		
AML・MPAL	9	153	0.09	0.19	
血小板数（≤20 × 10^3/μl）	3	26	0.05	0.12	
血小板輸血	7	127	0.26		
好中球数（≤500個）	2	61	1.00		
180日以内BMT（PBSCTを除く）	3	58	0.71		
酸素吸入（≥5 L/分）	1	5	0.10	0.31	
気管支洗浄	9	192	0.55		
BAL	3	101	0.76		
TBLB	2	119	0.14	0.15	
ミタゾラムの使用	5	230	0.01	0.03	0.28（0.09-0.85）
ペチジンの使用	10	251	1.00		
アトロピン硫酸塩の使用	10	281	0.24		

表 2　血痰のリスク因子の検討

背景因子	血痰あり (n=35)	血痰なし (n=281)	単変量解析 (*p* 値)	多変量解析 (*p* 値)	ハザード比 (95% 信頼区間)
年齢 ≤70 歳	3	36	0.60		
性別（男性/女性）	29/6	206/75	0.22		
AML・MPAL	17	145	0.74		
血小板数（≤20 × 10^3/μl）	1	28	0.23	0.69	
血小板輸血	17	117	0.43		
好中球数（≤500個）	9	54	0.36		
180日以内BMT（PBSCTを除く）	4	57	0.21		
酸素吸入（≥5 L/分）	0	6	1.00		
気管支洗浄	15	164	0.26		
BAL	10	79	0.59		
TBLB	28	93	0.00	0.00	10.40（4.18-25.90）
ミタゾラムの使用	22	213	0.10	0.01	0.31（0.14-0.73）
ペチジンの使用	32	259	0.75		
アトロピン硫酸塩の使用	30	231	0.61		

0.14-0.73）（**表2**）。移植後180日以内に気管支鏡検査を行った52例中、TBLBによる組織採取を19例で行われ、3例で基質化肺炎、2例で真菌性肺炎と組織学的に診断され、それぞれ治療に反映された。

【考察】

今回、当院における10年間の血液疾患を有する282症例に対する316回の気管支鏡検査を検討

した。12例（3.8%）が検査後48時間以上の呼吸状態の悪化を認め、多変量解析においてはミタゾラムを使用することで有意にリスクが減少していた。また、血痰は35例（11.1%）に合併し、多変量解析においてはTBLBの実施とミタゾラムを使用していないことが有意なリスク因子であった。移植後180日以内にTBLBを行った症例では、器質化肺炎と真菌性肺炎がそれぞれ組織学的に診断された。

造血幹細胞移植症例の気管支鏡検査の安全性については、Harrisら[2]による固形臓器移植を含めた総説では、出血が1.5-15%、気胸が0-4%であった。また、Yanikら[3]は自施設における444例を後方向視的に検討し、全合併症が3.6%、呼吸状態の悪化が1.8%、検査後48時間以内の人工呼吸器装着が2%、出血が1.7%、血圧低下が0.2%に認めたとしている。今回の当院での検討はこれらの既報告とほぼ一致していた。また、ミタゾラムの使用が呼吸状態悪化の遷延や血痰を減少される有意な因子であった。ミタゾラムの使用は血液疾患以外の気管支鏡検査において、検査中の血行動態の変動や呼吸状態の悪化を少なくすることが報告されている[4-6]。これらの結果は、血液疾患を有する症例においても同様であることが本研究で初めて示された。

診断については、Patelら[7]は造血幹細胞移植後の169症例に気管支鏡を施行し、34-50%で診断が可能であり、合併症は9%であったと報告している。これらの肺病変には移植された造血幹細胞由来のT細胞や、その結果として Tumor Necrosis Factor α（TNF α）などのサイトカインの増加などの関与が疑われているが、不明な部分も多い[8]。本研究では、器質化肺炎と真菌性肺炎を組織学的に診断した症例を認めたが、いずれも少数であり、今後も症例の集積を行いたい。

今回の検討で、血液疾患を有する症例に対する気管支鏡は比較的安全であることが示されたが、検査後の呼吸状態の悪化や血痰については十分に注意する必要がある。ミタゾラムなどの適切な鎮静剤の使用は、患者さんの検査中の快適性の向上や、合併症の減少に繋がる。TBLBは血痰のリスクを増加させるため、検査の実施には十分な注意が必要である。

【文献】

1. Yoshihara S, Yanik G, Cooke KR, et al.: Bronchiolitis obliterans syndrome（BOS), bronchiolitis obliterans organizing pneumonia（BOOP), and other late-onset noninfectious pulmonary complications following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. Biol Blood Marrow Transplant 13: 749-759, 2007
2. Harris B, Lowy FD, Stover DE, et al.: Diagnostic bronchoscopy in solid-organ and hematopoietic stem cell transplantation. Ann Am Thorac Soc 10: 39-49, 2013
3. Yanik GA, Ho VT, Levine JE, et al.: The impact of soluble tumor necrosis factor receptor etanercept on the treatment of idiopathic pneumonia syndrome after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. Blood 112: 3073-3081, 2008
4. Crawford M, Pollock J, Anderson K, et al.: Comparison of midazolam with propofol for sedation in outpatient bronchoscopy. Br J Anaesth 70: 419-422, 1993
5. Rolo R, Mota PC, Coelho F, et al.: Sedation with midazolam in flexible bronchoscopy: a prospective study. Rev PortPneumol 18: 226-232, 2012
6. Contoli M, Gnesini G, Artioli D, et al.: Midazolam in flexible bronchoscopy premedication: effects on patientrelated and procedure-related outcomes. J Bronchology Interv Pulmonol 20: 232-240, 2013
7. Patel NR, Lee PS, Kim JH, et al.: The influence of diagnostic bronchoscopy on clinical outcomes comparing adult autologous and allogeneic bone marrow transplant patients. Chest 127: 1388-1396, 2005
8. Panoskaltsis-Mortari A, Griese M, Madtes DK, et al.: An official American Thoracic Society research statement: noninfectious lung injury after hematopoietic stem cell

transplantation: idiopathic pneumonia syndrome. Am J Respir Crit Care Med 183: 1262-1279, 2011

【発表に関連する事項】

1. Uruga H, Sato T, Nishida A, Uchida N, Tsuji M, Moriguchi S, Takahashi Y, Ogawa K, Murase K, Hanada S, Takaya H, Miyamoto A, Morokawa N, Kimura M, Araoka H, Tsuchihashi R, Asano-Mori Y, Wake A, Taniguchi S, Kishi K: Safety of bronchoscopy in patients with malignant hematologic disorders. BMC Pulm Med 20: 243, 2020
2. 西田彩、宇留賀公紀、三ツ木崇、湯浅光博、景山康生、梶大介、田矢祐規、石綿一哉、高木伸介、山本久史、森有紀、山本豪、内田直之、荒岡秀樹、米山彰子、牧野茂義、髙谷久史、和氣敦、谷口修一: 同種造血幹細胞移植後早期の肺合併症に対する気管支鏡検査の意義. 第42回日本造血細胞移植学会総会（2020年3月）

Multidisciplinary discussionにより診断された特発性肺線維症症例における気管支肺胞洗浄液所見の意義に関する研究

宮本　篤、片岡　健介[1]、後藤　禎人[2]、江頭　玲子[3]
橋迫 美貴子[4]、近藤　康博[1]、中山　健夫[2]、穂積　宏尚[5]
藤澤　朋幸[5]、須田　隆文[5]、高谷　久史
公立陶生病院呼吸器・アレルギー疾患内科[1]
京都大学大学院医学研究科社会健康医学系専攻健康情報学分野[2]
佐賀大学医学部放射線医学教室[3]
九州大学病理診断科・病理部[4]
浜松医科大学内科学第二内科[5]

【要約】

現行の特発性肺線維症（idiopathic pulmonary fibrosis: IPF）ガイドラインに沿って、多職種による検討と合議（multidisciplinary discussion: MDD）により診断されたIPF患者の気管支肺胞洗浄液（bronchoalveolar lavage fluid: BALF）所見を解析した。Cox Regression Hazard modelを用いて予定されていた変数にて多変量解析モデルを作成し多変量解析を実施したところ、BALF白血球分画好中球（Neu)>5%は独立した予後不良因子であることがわかった。

【背景】

特発性肺線維症（idiopathic pulmonary fibrosis: IPF）の気管支肺胞洗浄液（bronchoalveolar lavage fluid: BALF）では一般に正常BALFを呈する[1)]。2011年のATS/ERS/JRS/ALAT合同国際ガイドライン[2)]において、BALを実施することは積極的に推奨されておらず、これまでのところ気管支肺胞洗浄（bronchoalveolar lavage: BAL）を実施することは、BALを実施しない場合と比較して予後に関連するかどうか十分な根拠がない。IPFの診断確定には多職種による検討と合議（multidisciplinary discussion: MDD）が必要とされるが、MDDにおけるBALの位置づけは明確ではない。2011年の現行のガイドラインにそって診断され、外科的肺生検（surgical lung biopsy: SLB）が行われた多数例コホートでの解析はこれまでにない。

2018年9月に発表されたATS/ERS/JRS/ALATのIPF診断ガイドラインupdate[3)]では、IPFにおいてBALの実施が予後と関係するかを検討した論文は見出せず、IPFとそれ以外のびまん性肺疾患と診断を鑑別することができるかはわからないと記載された。HRCT（high resolution computed tomography）画像診断上IPFの確定診断に必要なusual interstitial pneumonia（UIP）patternを呈する場合はBALの実施を推奨していない。Possible UIP pattern, indeterminate for UIP patternに分類されるような典型像とは少し所見が異なる症例において検討の余地があると記載されている。

【目的】

本研究はSLBが行われかつびまん性肺疾患を専門とする医師によるMDDの結果IPFと診断され、その後の予後が追跡されている既報のコホート[4)]を利用し、多数例を後方視的に検討することによりガイドラインの記載を検証し、BALの有用性を実証できるか検討する。

【方法】

厚生労働省難病対策事業びまん性肺疾患調査研究班（稲瀬班）と、AMED（須田班）により症例が集積され、先に発表された特発性間質性肺

炎（idiopathic interstitial pneumonias: IIPs）のコホート498例[4]のうち、IPFとMDD診断された症例195例を用いた。BALを実施した群（BAL群）としなかった群（非BAL群）に分け、そしてBAL群のうち非典型的なBAL所見を呈する群（すなわち、リンパ球、好中球、好酸球増多を示す症例: 非典型群）と典型的BAL所見（すなわち正常BAL所見*: 典型群）を呈する群を比較し、予後因子について解析し、診断時BALを実施することの有用性を検討した。

BAL群および非BAL群の群間比較は、連続係数の場合t-test、カテゴリー変数の場合はχ^2検定を実施した。予後解析はKaplan-Meier法を用いて予後曲線を作成し、有意差検定はWilcoxon log-rank検定を行った。予後解析はあらかじめ補正する因子を検討した。既報よりIPF患者の予後に関連すると報告されている、GAPスコア（gender, age, physiologic test[%FVC, %DLco]）およびHRCTにおける線維化パターンであるUIPパターンを補正因子としてCox Regression Hazard modelを用い多変量解析を行った。これらの変数は解析前に著者らが既報を元に最も臨床的に重要な変数としてあらかじめ定めた。いずれの検討も$p<0.05$を有意差ありと判定した。

【結果】

BAL群（144例、平均年齢65±7歳、男:女=96:48）と非BAL群（51例、平均年齢65±8歳、男:女=41:10）の患者背景の比較を**表1**に示す。ATS/ERS/JRS/ALAT合同IPF国際ガイドラインにおけるHRCTのパターンの分布に有意差が認められた。

表 1　Patient Characteristics

Characteristic	BAL（+）n=144	BAL（-）n=51	p Value
Age, yr	65±7	65±8	0.646
Gender, No.（%）			
Men	96（67）	41（80）	0.075
Women	48（33）	10（20）	
Smoking status, No.			
Never-smoker	48（34）	9（18）	0.078
Former smoker	79（55）	36（72）	
Current smoker	16（11）	5（10）	
Baseline pulmonary function test results			
FVC, % predicted	82±18	88±18	0.059
FEV_1, % predicted	87±19	89±20	0.399
DLCO, % predicted	69±22	73±19	0.367
Baseline O_2 saturation, %	95±11	96±2	0.446
PaO_2（Room Air）, %	84±12	85±15	0.512
Baseline $PaCO_2$, %	44±34	42±5	0.66
HRCT, No.（%）			
UIP pattern	25（17）	16（31）	0.048
Possible UIP pattern	98（68）	32（63）	
Inconsistent with UIP pattern	21（15）	3（6）	
Serum laboratory markers			
KL-6, U/ml	1,435±1589	1,076±593	0.121
SP-D, ng/ml	262±198	191±119	0.035
LDH, IU/l	234±44	229±49	0.523
6MWT			
Distance, m	478±139	465±142	0.727
Lowest SpO_2, %	89±6	90±7	0.914

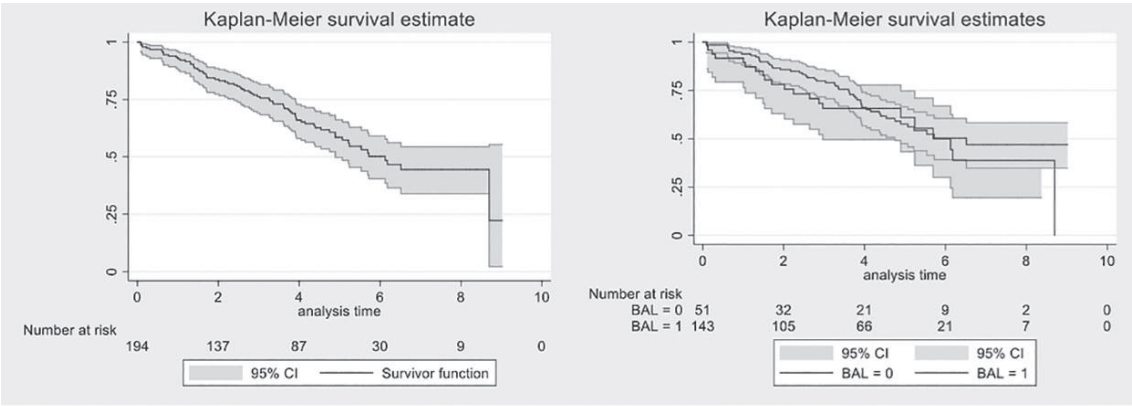
外科的肺生検実施日を起算日とする予後（全生存）をKaplan-Meier法で検討したところ（**図1**）、BAL実施の有無は予後に寄与しなかった。

BALFの白血球分画正常値はATSのガイドラインではリンパ球（Lyn）≦15%、好中球（Neu）≦3%、好酸球（Eos）≦1%とされており、本邦でもこのカットオフ値は広く受け入れられている。これらのカットオフ値でBAL実施群を分けて検討したところ、いずれの白血球分画においても予後に違いが認められなかった（Lyn：≦15% vs >15%, median［IQR］=9.7［3-19.8］: p=0.56; Neu：≦3% vs >3%, median［IQR］=1.7［0.7-4］: p=0.58; Eo：≦1% vs >1%；median［IQR］= 1［0.2-3］: p=0.94）。そこで、探索的にカットオフ値を変化させ、予後に違いが認められるかどうかを検討した結果、リンパ球では予後に違いが認められなかった。好中球、好酸球ともに5%をカットオフ値としたときに、予後に有意差を認めた（Neu：≦5% vs >5%, median［IQR］=1.7［0.7-4］: p=0.022; Eo：≦5% vs >5%；median［IQR］= 1［0.2-3］: p=0.42）。

予後因子の同定のためにCox Regression Hazard modelにて単変量解析を実施したところ、リンパ球、好酸球は有意差がなかった。予定されていた変数にて多変量解析モデルを作成し、多変量解析を実施したところ、BALF Neu>5%は独立した予後不良因子であることがわかった（HR1.06, 95%CI 1.01-1.10, p=0.008）（**表2**）。

【考察】

MDD診断は、IPF患者の正確な診断のためのゴールドスタンダードとして確立している。Fujisawaら[4]はびまん性肺疾患の専門家によるMDD診断が、各施設の主治医による診断と比較してより正確に予後予測できることを示し、MDDを実行するためのクラウドを利用した統合データベースシステムでの有用性を証明した。このコホート498例は全例でSLBが実施された。さらにMDD診断がIPFでBALも実施された症例とBALが実施されなかった症例を本研究に利用して解析を行った。本研究の結論は、1）BAL実



Group	n	平均観察期間	50%生存期間
Total	195	3.61 (0.03-9.01)	6.12
BAL: Yes	144	3.69(0.04-9.02)	6.52
BAL: No	51	3.38(0.03-8.70)	5.69

図１　全生存（外科的肺生検日－死亡日時）
コホート全体およびBAL施行の有無による全生存曲線。

表 2　Multivariate Cox Regression Hazard Model

Model	% Lymphocyte (Doubling)			% Eosinophil (Doubling)			% Neutrophil (Doubling)		
	HR	95%CI	p Val	HR	95%CI	p Val	HR	95%CI	p Val
Unadjusted	1.02	0.77-1.34	0.89	1.31	0.94-1.82	0.11	1.51	1.11-2.05	0.007
Adjusted	1.04	0.77-1.41	0.80	1.28	0.90-1.82	0.16	1.54	1.12-2.06	0.004
Variable									
Age	1.01	0.96-1.05	0.74	1.01	0.96-1.06	0.44	1.01	0.96-1.05	0.76
Gender	4.77	1.83-12.5	0.001	4.61	1.78-11.9	0.002	5.44	2.08-14.2	0.001
Smoking	0.50	0.22-1.13	0.10	0.58	0.25-1.34	0.20	0.54	0.24-1.21	0.13
FVC%	1.00	0.99-1.02	0.65	1.00	0.99-1.02	0.70	1.00	0.99-1.02	0.65
DLCO	0.99	0.98-1.00	0.38	0.99	0.98-1.01	0.43	0.99	0.98-1.01	0.30
HRCT	0.71	0.42-1.20	0.20	0.74	0.43-1.26	0.27	0.71	0.44-1.17	0.18

施の有無ではIPF患者の予後には有意差がなかった。2）単変量解析ではガイドラインで推奨するカットオフ値では各白血球分画における予後の検討で有意差がなかったが、好中球、好酸球白血球分画では高値群（>5%）で予後不良であった。3）年齢、性別、肺機能、HRCTパターンで補正した多変量解析の結果、BALF白血球分画Neu>5%は有意な予後不良因子であった、の3点である。

IPF患者のBALFにおけるリンパ球の上昇は、正常なBALFリンパ球を示す患者よりも生存率が高く、BALFの好酸球または好中球の上昇は生存率の低下と関連しているという報告が散見される[5, 6]。Kinderら[7]はIPF156例のBAL所見を解析し、BALF中好中球の割合増加は診断後1年死亡における独立した危険因子であるが、BALF中リンパ球、好酸球では有意差がなかったとした。これら研究のほとんどは、IPFの現在の分類と定義が世界的なコンセンサスとして確立された2011年より前に行われた。Kinderらの研究は1982年から1996年に診断されたIPFを対象としており、かつ、その当時の技術的な問題として現在のような精度の高いHRCTは存在せず、現在のIPF診断で重要な位置を占めるHRCTにおける画像所見とBALF所見の関係は評価されていない。この事実は、解析対象となったIPFが現在のガイドラインに基づいて診断されていないことを意味しており、前述のBALFの細胞分画の所見と予後との関連性が現在のガイドラインで診断されるIPF症例でも同じと解釈することはできない。その点、本研究はHRCTパターンを多変量解析に組み込んでも、BALF好中球の増加がIPFの予後と相関することを示したことに意義があると考えられる。

本研究にはLimitationが存在する。IPF患者の大多数はHRCT診断に基づいてUIPパターンと判断され、病理学的診断なしに診断される。また、全身状態不良の症例はSLBが選択されない。従って、SLBが実施される患者はHRCT診断がUIPパターン以外の非典型的で、全身状態良好と選択的な症例であるので、IPF患者全体において同じように結論して良いか不明瞭である。

【文献】

1. Meyer KC, Raghu G, Baughman RP, Brown KK, Costabel U, du Bois RM, et al.: An official American Thoracic Society clinical practice guideline: the clinical utility of bronchoalveolar lavage cellular analysis in interstitial lung disease. Am J Respir Crit Care Med 185: 1004-1014, 2012
2. Raghu G, Collard HR, Egan JJ, Martinez FJ, Behr J, Brown KK, et al.: An official ATS/ERS/JRS/ALAT statement: idiopathic pulmonary fibrosis: evidence-based guidelines for diagnosis and management. Am J

Respir Crit Care Med 183: 788-824, 2011
3. Raghu G, Remy-Jardin M, Myers JL, Richeldi L, Ryerson CJ, Lederer DJ, et al.: Diagnosis of Idiopathic Pulmonary Fibrosis. An Official ATS/ERS/JRS/ALAT Clinical Practice Guideline. Am J Respir Crit Care Med 198: e44-e68, 2018
4. Fujisawa T, Mori K, Mikamo M, Ohno T, Kataoka K, Sugimoto C, et al.: Nationwide cloud-based integrated database of idiopathic interstitial pneumonias for multidisciplinary discussion. Eur Respir J 53: 1802243, 2019
5. Ryu YJ, Chung MP, Han J, Kim TS, Lee KS, Chun EM, et al.: Bronchoalveolar lavage in fibrotic idiopathic interstitial pneumonias. Respir Med 101: 655-660, 2007
6. Watters LC, Schwarz MI, Cherniack RM, Waldron JA, Dunn TL, Stanford RE, et al.: Idiopathic pulmonary fibrosis. Pretreatment bronchoalveolar lavage cellular constituents and their relationships with lung histopathology and clinical response to therapy. Am Rev Respir Dis 135: 696-704, 1987
7. Kinder BW, Brown KK, Schwarz MI, Ix JH, Kervitsky A, King TE, Jr: Baseline BAL neutrophilia predicts early mortality in idiopathic pulmonary fibrosis. Chest 133: 226-232, 2008

（4）肝疾患

Direct-acting antivirals治療効果におけるHCV薬剤耐性と宿主要因のインパクト

芥田　憲夫、鈴木　文孝

【要約】

C型肝炎における直接作用型抗ウイルス薬（DAAs; Direct-acting antivirals）のグレカプレビル/ピブレンタスビル併用療法は98％の高率な治癒率を達成した。Genotype 1の非治癒3例は1b型で12週間治療の再治療例であった。Genotype 2/3の非治癒3例は初回治療例であった。Genotype 1b再治療でNon SVR 3例の特徴として、治療開始時にDirect sequence、Ultra-deep sequence、市販の測定系の何れもNS5A領域のL31/Y93におけるアミノ酸が野生型であり、宿主遺伝子要因の*IL28B* rs8099917遺伝子多型は難治なTG型であった。DAAs再治療における難治要因としてウイルスと宿主要因が影響することが確認された。

【目的】

C型肝炎治療は2014年から副作用軽減かつ高い治癒率を可能とした経口剤のみの直接作用型抗ウイルス薬（DAAs; Direct-acting antivirals）併用療法の時代となった。DAAsの問題点としては、HCV非構造領域（NS5A領域）の薬剤耐性ウイルスの有無で治療効果が異なる上に、非治癒例からは新たな薬剤耐性ウイルスが出現することが挙げられる[1)]。更に、治療効果にはウイルス要因だけで無く、肝線維化や遺伝子多型等の宿主要因も影響する可能性が報告されている[2)]。今回はDAAs併用療法の治療効果、特に難治例における薬剤耐性ウイルスと宿主要因のインパクトを検討した。

【方法】

虎の門病院でDAAs併用療法のグレカプレビル/ピブレンタスビル（G/P）8週間もしくは12週間治療を行ったC型肝炎393例（Genotype 1/2/3; 225例/151例/17例）を対象とした。〔検討1〕G/P全体の治癒率（SVR率;治療終了後12週経過時点までHCV RNA陰性持続率）とGenotype別に見たSVR率を検討した。特に、Non SVR例における難治要因の解析を行った。〔検討2〕Genotype 1におけるDAAs再治療難治要因の解析を行った。特に、NS5A領域の薬剤耐性変異をDirect sequence（DS）、Ultra-deep sequence（UDS）、市販の測定系で評価した。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0.2％以上を有意な変異とした[3)]。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（研究番号1147-H・B）。

【結果】

〔検討1〕DAAs全体のSVR率は98％、Genotype 1/2/3のSVR率は99％/99％/88％であった（**図1**）。Non SVR 6例はGenotype 1/2/3で3例

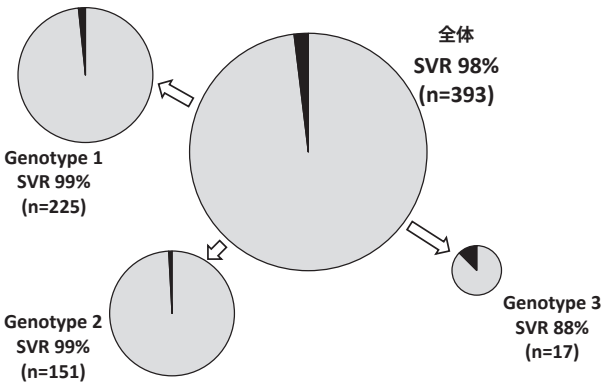


図1　虎の門病院でマヴィレット®配合錠の8週間・12週間治療を開始した症例におけるGenotype別に見たSVR率

表１　虎の門病院でマヴィレット®配合錠治療で治癒していない６例の背景

Genotype	Case	性別	年齢	Geno type	*IL28B* rs8099917	FIB-4 index	DAA 既往歴	治療期間
1	1	女	56	1b	TG	3.50	1回	12週
	2	男	56	1b	TG	1.32	2回	12週
	3	男	57	1b	TG	1.41	1回	12週
2	4	男	64	2b	TG	3.15	無し	8週
3	5	女	46	3b	TT	1.23	無し	8週＃
	6	女	56	3k	TT	1.56	無し	12週

＃中止例

Genotype 1は再治療例で、Genotype 2・3は初回治療でマヴィレット®難治例を確認した

/1例/2例。Genotype 1のNon SVR 3例における背景の共通点は、何れも1b型で12週間治療の再治療例であった。Genotype 2/3のNon SVR 3例の背景の共通点としては、何れも初回治療例であった（**表1**）。〔検討2〕Genotype 1b再治療でNon SVR 3例の特徴として、G/P開始時にDS、UDS、市販の測定系の何れもNS5A-L31/Y93のアミノ酸が野生型であり、宿主遺伝子要因の*IL28B* rs8099917遺伝子多型は難治なTG型であった。NS5A領域の薬剤耐性変異として、Case 1はP32 deletion、Case 2はL28M/R30E/Q54H/A92K、Case 3はL28M/R30Q/Q54Y/A92Tといったl31/Y93以外の部位に複数個の薬剤耐性変異が確認された。

【考察】

今回多数のC型肝炎症例に基づく実臨床データからG/PのSVR率が良好な成績であることが確認されたが、DAAs難治要因に関する詳細な検討はこれまでされていなかった。NS5A領域のL31/Y93アミノ酸置換を有する症例では治療効果が低下することが報告されているが[4]、ウイルス要因だけの検討で治療効果を予測することは不十分である。今回の検討では、宿主遺伝子要因である*IL28B* rs8099917遺伝子多型も治療効果に影響することを示した。

NS5A領域のP32 deletionは強力な薬剤耐性ウイルスで有効な治療法が存在しないのが現状である[2]。また、P32 deletionを有する症例の背景には難治な宿主要因の肝組織や*IL28B*遺伝子多型が関与することも報告されている[2]。即ち、DAAs難治要因はウイルスのみの検討では不十分であり、宿主要因との組み合わせて検討していく必要があることを示している。今後の検討課題としては、治療開始後の薬剤耐性ウイルス出現の指標としてUDSを用いた微量な薬剤耐性ウイルスの測定が有用であるのか、また非治癒例、再治療例の様な難治症例において薬剤耐性ウイルスが宿主要因に影響されながら経時的に如何なる変化を示すか検討する必要がある。そして将来的には、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. Akuta N, Suzuki F, Seko Y, Kawamura Y, Sezaki H, Suzuki Y, Hosaka T, Kobayashi M, Hara T, Kobayashi M, Saitoh S, Arase Y, Ikeda K, Kumada H: Emergence of telaprevir-resistant variants detected by ultra-deep sequencing after triple therapy in patients infected with HCV genotype 1. J Med Virol 85: 1028-1036, 2013
4. Kumada H, Suzuki Y, Ikeda K, Toyota J, Karino Y, Chayama K, Kawakami Y, Ido A, Yamamoto K, Takaguchi K, Izumi N, Koike K, Takehara T, Kawada N, Sata M, Miyagoshi H, Eley T, McPhee F, Damokosh A, Ishikawa H, Hughes E: Daclatasvir plus asunaprevir for chronic HCV genotype 1b infection. Hepatology 59: 2083-2091, 2014
5. Kanwal F, Kramer J, Asch SM, Chayanupatkul M, Cao Y, El-Serag HB: Risk of hepatocellular cancer in HCV patients treated with direct-acting antiviral agents. Gastroenterology 153: 996-1005, 2017

B型肝炎症例に対するテノホビルディポキシルフマレイト（TDF）治療の長期成績と効果に関係する因子の検討

鈴木　文孝

【要約】

B型慢性肝疾患に対する治療として核酸アナログ製剤が使用されている。このうち抗ウイルス効果が最も強いテノホビル製剤の1つであるテノホビルディポキシルフマレイト（TDF）の長期的な抗ウイルス効果について検討した。またラミブジン、アデホビル、エンテカビルなどの核酸アナログ製剤の長期使用例では耐性ウイルスの出現を認めることがあり、多くの症例でTDFが使用されている。TDF治療では耐性ウイルスについての報告は少なく、当院で経験しTDF治療中にviral breakthroughを認めた症例のHBV DNAの遺伝子学的検討を行った。TDFの治療成績; naïve例（134例）でのHBV DNA陰性化率（< 2.1 Log copies/mL）は、1年目76%、2年目95%、3年目96%、4年目97%であった。HBs抗原量の減少量は、1年目-0.23（Log IU/mL）、3年目-0.34、4年目-0.41であった。HBs抗原陰性化は1例（0.7%）で認められた。他治療（ラミブジン+アデホビル、エンテカビルなど）からの切り替え例400例では、13例（3.3%）でHBs抗原の陰性化が認められた。次に51歳女性、ラミブジン、エンテカビル投与後にTDFとエンテカビルを投与中にviral breakthroughを認めた症例のHBV DNA polymeraseのreverse transcriptase（rt）領域の遺伝子配列を継時的に検討した。rtS106C, rtD134N, rtL180M, rtS202G, rtM204V, rtL269I mutationsがTDF投与中のviral breakthroughに関係していた。B型慢性肝疾患のnaïve例に対するTDF治療におけるHBV DNAの陰性化率は、エンテカビルと同様に高率であった。一方、HBs抗原の陰性化例は少なく、TDFに切り替え例においてもHBs抗原量が少ない症例でのみHBs抗原の陰性化を認めていた。TDF治療におけるviral breakthroughおよび耐性ウイルスの検討では、Park ES, et al.による報告と類似したmutationsが認められた。In vitroでの基礎的な研究とさらなる症例の蓄積や解析が今後必要である。

【目的】

B型慢性肝疾患に対する治療として核酸アナログ製剤が使用されている。このうち抗ウイルス効果が最も強いテノホビル製剤の1つであるテノホビルディポキシルフマレイト（TDF）の長期的な抗ウイルス効果については日本での報告は少ない。またラミブジン、アデホビル、エンテカビル[1-3]などの核酸アナログ製剤の長期使用例では耐性ウイルスの出現を認めることがあり、多くの症例でTDFが使用されている。TDF治療では耐性ウイルスについての報告は少なく、日本のデータは明らかになっていない。しかし当院ではTDFの効果不良例を認めており、その原因についても研究が必要である。TDF治療における全体の長期的な抗ウイルス効果を明らかにするとともに、核酸アナログ耐性ウイルスに対するTDF治療の効果をウイルス学的に明らかにすることが目的である。

【対象と方法】

対象; 当院にてテノホビルディポキシルフマレイト（TDF）治療を施行した544症例

①過去に核酸アナログ製剤を使用していない初回治療（naïve）例と核酸アナログ製剤（ラミブジン、アデホビル、エンテカビル）使用例に対するTDFへの切り替え（switch）例の抗ウイルス効果（HBV DNA陰性化率、HBs抗原陰性化率など）について解析した。

②ラミブジンとアデホビル併用療法にて耐性ウイルスが出現している症例またはエンテカビル（+アデホビル）治療にて耐性ウイルスが出現している症例から、TDF治療に移行した症例の内、TDF治療中にviral breakthroughを認めた症例において、PCR direct-sequence

法にてHBV DNA polymerase領域のreverse transcriptase（RT）の遺伝子配列を決定した。測定方法は、既報の方法に準じた[4]。Park ES, et al.の報告[5]と、遺伝子変異の比較を行った。当研究は、虎の門病院研究倫理審査委員会（No.1047）の承認を得ている。

【結果】

①TDFの治療成績; naïve例（134例）でのHBV DNA陰性化率（< 2.1 Log copies/mL）は、1年目76%、2年目95%、3年目96%、4年目97%であった。HBe抗原陽性/陰性では、それぞれ1年目56%/100%、2年目94%/96%、3年目94%/97%、4年目94%/100%であった。HBs抗原量の減少量は、1年目-0.23（Log IU/mL）、2年目-0.23、3年目-0.34、4年目-0.41であった。HBs抗原陰性化は1例（0.7%）で認められた。他治療（ラミブジン+アデホビル、エンテカビルなど）からの切り替え例400例では、13例（3.3%）でHBs抗原の陰性化が認められた。HBs抗原の陰性化が認めらた症例の特徴は、TDF治療開始時HBe抗原陰性例12例、HBs抗原量は全例が170 IU/mL未満であった。

②51歳女性、ラミブジン、エンテカビル投与後にTDFとエンテカビルを投与中にviral breakthroughを認めた症例のHBV DNA polymerase のRT領域の遺伝子配列を継時的に検討した。経過表を**図1**に示す。①ラミブジン治療開始時、②エンテカビル切り替え時、③エンテカビル投与中、④外来中断後の再来院後エンテカビル再開時、⑤TDF開始時、⑥TDF開始後、⑦TDF投与中viral breakthrough時、⑧-⑪その後経過。**図2**にRT領域の遺伝子配列を検討した。治療開始時よりrtS106C, rtD134N, rtL269I mutationsが存在していたが、2007年10月②ラミブジン耐性のrtM204I mutationが出現、2009年2月③エンテカビル耐性rtL180M, rtS202G, rtM204V mutationsが出現した。2010年6月⑤rtL180M, rtT184I, rtM204V mutationsとrtL180M, rtT184M, rtM204V mutations が検

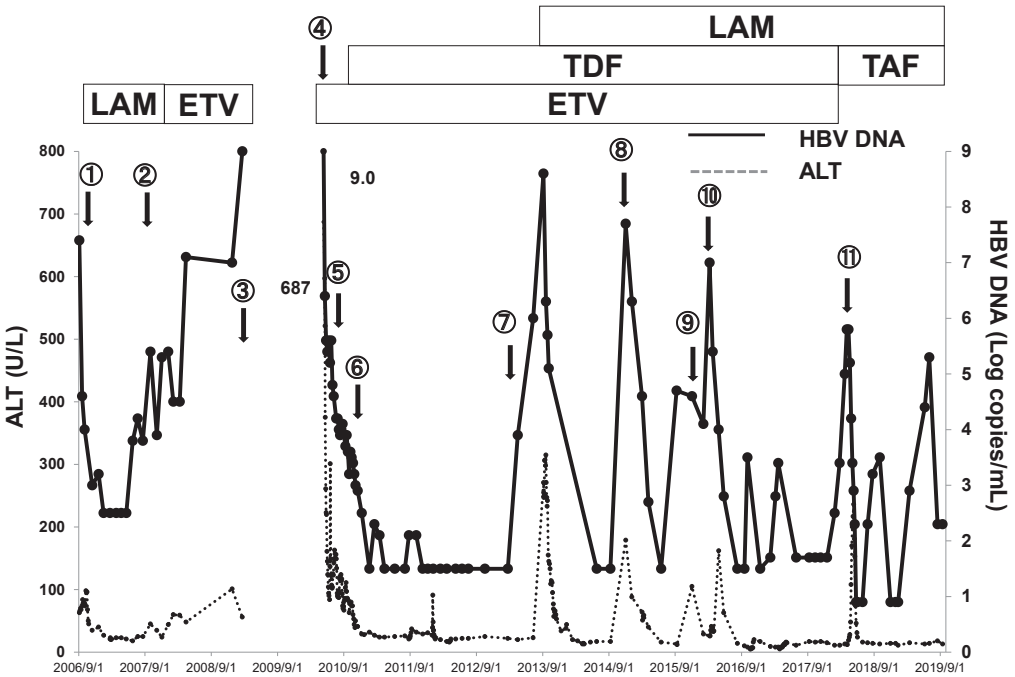


図１　症例の臨床経過：文献７より引用

```
Amino acid (rt) 1                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                
AB033550   EDWGPCTEHG EHNIRIPRTP ARVTGGVFLV DKNPHNTTES RLVVDFSQFS RGSTHVSWPK FAVPNLQSLT NLLSSNLSWL SLDVSAAFYH IPLHPAAMPH 100
AP007263   ------G--- --H------- ---------- -------A-- ---------- --I-R----- ---------- ---------- ---------- ----------
LC500247   ------A--- --R--T---- ---------- ---------- ---------- K-N-R-F--- ---------- ---------- ---------- ----------

①Sep 2006  ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----Q----- ---------- ---------- ---------- ----------
②Oct 2007  ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------V ---------- ----------
③Feb 2009  ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------V ---------- ----------
④May 2010  ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------
⑤Jun 2010-1 ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------
⑤Jun 2010-2 ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----Q----- ---------- ---------- ---------- ----------
⑥Oct 2010  ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------
⑦Apr 2013  ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------
⑧Des 2014  ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------
⑨Des 2015  ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------
⑩Mar 2016  ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------
⑪Apr 2018  ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------

           101  106                 126       134                                                  180  184            200

AB033550   LLVGSSGLPR YVARLSSTSR NNNYQHGTMQ DLHDSCSRNL YVSLLLLYKT FGRKLHLYSH PIILGFRKIP MGVGLSPFLL AQFTSAICSV VRRAFPHCLA
AP007263   --I-----S- -------N-- I--N-Y---- N-------Q- ----M----- Y--------- --V------- ---------- ---------- ----------
LC500247   --------S- ------YN-- II-H------ ---N------ ----M----- Y--------- --V------- ---------- ---------- ----------

①Sep 2006  -----C---- ---------- -I-------- ---N------ ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------
②Oct 2007  -----C---- ---------- ---------- ---S------ ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------
③Feb 2009  -----C---- ---------- ---------- ---N------ ---------- ---------- ---------- ---------M ---------- ----------
④May 2010  -----C---- ---------- -IK------- ---N------ ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------
⑤Jun 2010-1 -----C---- ---------- -I-------- ---N------ ---------- ---------- ---------- ---------M ---I------ ----------
⑤Jun 2010-2 -----C---- ---------- -I-------- ---N------ ---------- ---------- ---------- ---------M ---M------ ----------
⑥Oct 2010  -----C---- ---------- -IK------- ---N------ ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------
⑦Apr 2013  -----C---- ---------- -I-------- ---N------ ---------- ---------- ---------- ---------M ---------- ----------
⑧Des 2014  -----C---- ---------- -I-------- ---N------ ---------- ---------- ---------- ---------M ---------- ----------
⑨Des 2015  -----C---- ---------- -I-------- ---S------ ---------- ---------- ---------- ---------M ---------- ----------
⑩Mar 2016  -----C---- ---------- -I-------- ---S------ ---------- ---------- ---------- ---------M ---------- ----------
⑪Apr 2018  -----C---- ---------- -I-------- ---S------ ---------- ---------- ---------- ---------M ---------- ----------

           201 204
Amino acid (rt) 202                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                
                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                
                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                
                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                
                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                
                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                
                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                
AB033550   FSYMDDVVLG AKSVQHLESL FTSITNFLLS LGIHLNPNKT KRWGYSLNFM GYVIGSWGTL PQEHIVRKLK QCFRKLPVNR PIDWKVCQRI VGLLGFAAPF 269 300
AP007263   ---------- ---------- Y-AV------ ---------- ---------- --I------- --D---Q-I- H--------- ---------- ----------
LC500247   ---------- ----H----- YAAV------ -------H-- ---------- ---------- ----V-Q-I- L--------- ---------- ----------

①Sep 2006  ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ------Q-I- ---------- ---------- ----------
②Oct 2007  ---I------ ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ------Q-I- ---------- ---------- ----------
③Feb 2009  -G-V------ ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ------Q-I- ---------- ---------- ----------
④May 2010  ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ------Q-I- ---------- ---------- ----------
⑤Jun 2010-1 ---V------ ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ------Q-I- ---------- ---------- ----------
⑤Jun 2010-2 ---V------ ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ------Q-I- ---------- ---------- ----------
⑥Oct 2010  ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ------Q-I- ---------- ---------- ----------
⑦Apr 2013  -G-V------ ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ------Q-I- ---------- ---------- ----------
⑧Des 2014  -G-V------ ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ------Q-I- ---------- ---------- ----------
⑨Des 2015  -G-V------ ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ------Q-I- ---------- ---------- ----------
⑩Mar 2016  -G-V------ ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ------Q-I- ---------- ---------- ----------
⑪Apr 2018  -G-V------ ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ------Q-I- ---------- ---------- ----------

           301

AB033550   TQCGYPALMP LYACIHSKQA FTFSPTYKAF LCKQYLHLYP VARQ      HBV DNA level(Log copy/mL)
AP007263   ---------- -----QA--- ---------- -S---MN--- ----
LC500247   ---------- -----QA--- ---------- -S----T--- ----

①Sep 2006  ---------- -----Q---- --------T- ------N--- ----                 7.4
②Oct 2007  ---------- -----Q---- --------T- ------N--- ----                 5.4
③Feb 2009  ---------- -----Q---- --------T- ------N--- ----                 9.0<
④May 2010  ---------- -----Q---- --------T- ------N--- ----                 9.0<
⑤Jun 2010-1 ---------- -----Q---- --------T- ------N--- ----                 5.2
⑤Jun 2010-2 ---------- -----Q---- --------T- ------N--- ----
⑥Oct 2010  ---------- -----Q---- --------T- ------N--- ----                 3.4
⑦Apr 2013  ---------- -----Q---- --------T- ------N--- ----                 3.9
⑧Des 2014  ---------- -----Q---- --------T- ------N--- ----                 7.7
⑨Des 2015  ---------- -----Q---- --------T- ------N--- ----                 4.6
⑩Mar 2016  ---------- -----Q---- --------T- ------N--- ----                 7.0
⑪Apr 2018  ---------- -----Q---- --------T- ------N--- ----                 5.8
```

図２　症例のHBV DNA polymerase領域のreverse transcriptase の遺伝子配列: 文献７より引用

出された。2013年4月⑦、rtL180M, rtS202G, rtM204V mutationsが検出された。経過中rtS106C, rtD134N, rtL269I mutationsは持続的に検出された。最終的にはrtS106C, rtD134N, rtL180M, rtS202G, rtM204V, rtL269I mutationsがTDF投与中のviral breakthroughに関係していた[6,7]。

【考察】

B型慢性肝疾患のnaïve例に対するTDF治療におけるHBV DNAの陰性化率は、エンテカビル[1-3]と同様に高率であった。またHBs抗原量の減少量は、エンテカビル（-0.08 Log IU/mL / year）よりも多く認められたが、より長期的な効果を検討する必要がある。一方、HBs抗原の陰性化例は少なく、TDFに切り替え例においてもHBs抗原量が少ない症例でのみ、HBs抗原の陰性化を認めていた。この点は、当院のエンテカビル投与例と同様の傾向であった[1-3]。

TDF治療におけるviral breakthroughおよび耐性ウイルスの検討では、韓国のPark ES, et al.による報告[5]がなされている。RtS106C, rtH126Y, rtD134E, rtM204I/V, rtL269I mutationsが、in vitroの検討ではIC50で15.3倍、IC90で26.3倍耐性と報告されている。当院の症例では、rtS106C, rtD134N, rtL180M, rtS202G, rtM204V, rtL269I mutationsが認められ、rtH126Yのmutationは認められなかった。しかしエンテカビル耐性のrtL180M, rtS202G, rtM204V mutationsが認められたことが、TDF耐性に関係していると考えられた。In vitroでの基礎的な研究とさらなる症例の蓄積と解析が今後必要である。

【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. Ono A, Suzuki F, Kawamura Y, et al.: Long-term continuous entecavir therapy in nucleos（t）ide-naïve chronic hepatitis B patients. J Hepatol 57: 508-514, 2012
3. Hara T, Suzuki F, Kawamura Y, et al.: Long-term entecavir therapy results in falls in serum hepatitis B surface antigen levels and seroclearance in uncleos（t）ide-naïve chronic hepatitis B patients. J Viral Hepat 21: 802-808, 2014
4. Suzuki F, Akuta N, Suzuki Y, et al.: Clinical and virological features of non-breakthrough and severe exacerbation due to lamivudine-resistant hepatitis B virus mutants. J Med Virol 78; 1025-1034, 2006
5. 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. Suzuki F, Sezaki H, Akuta N, et al.: Virologic breakthrough in a patient with chronic hepatitis B by combination treatment with tenofovir disoproxil fumarate and entecavir. Drug Des, Devel Ther 8: 869-873, 2014
7. Suzuki F, Sezaki H, Hosaka T, et al.: Virologic analysis of tenofovir resistance in a patient with chronic hepatitis B experiencing viral breakthrough during combination treatment with tenofovir disoproxil fumarate and entecavir. Hepatol Res: in press

【発表に関する事項】

1. Suzuki F, Hosaka T, Kumada H: Long-term outcome of nucleos（t）ide analogue treatment of chronic hepatitis B patients and efficacy of Peg-IFN add-on therapy, *IS-PD1*. 第28回日本消化器関連学会週間（JDDW）2020（神戸）

（5）腎疾患

Body mass index（BMI）が常染色体優性多発性嚢胞腎（ADPKD）の進行速度に及ぼす影響について～米国と日本の国際比較研究～

諏訪部 達也

【要約】

常染色体優性多発性嚢胞腎（ADPKD）の腎腫大を抑制する治療法は確立していない。近年、動物モデルで、カロリー摂取量の制限により、多発性嚢胞腎の進行が抑制されることが報告された。人間のADPKD患者でカロリー制限が、疾患の進行に影響するかは不明である。一般的にbody mass index（BMI）はカロリー摂取量に相関すると言われており、米国人は日本人に比べて、カロリー摂取量が多いと言われてる。我々は、食生活の異なる日本と米国でADPKDのESRD到達年齢に差があるのか、BMIがERSD到達時の年齢の有意な因子となるかについて、United States Renal Data System（USRDS）と日本透析医学会（JSDT）のデータを利用して研究することにした。

2006年と2007年に本邦で透析導入した患者967人で解析したところ、BMIと悪性腫瘍は、単変量解析でも多変量解析でも透析導入年齢に影響する有意な変数となった。2006年と2007年に米国で人工透析または腎移植を導入された患者1,308人で解析したところ、BMI、Hb、性別、慢性心不全、悪性腫瘍、ASO、虚血性心疾患、糖尿病は、単変量解析でも多変量解析でも透析導入年齢に影響する有意な変数となった。我々の予想通り、日本でも米国でもBMIが高ければ高いほど、透析導入年齢が速くなることが示された。米国と日本の平均透析導入年齢を単純比較すると、57.0歳と65.9歳であり、予想通り米国の方が透析導入年齢が若いという結果であった。今後、両国の背景の違いを調整して、両国の透析導入年齢に差があるのか研究を続けたい。

【研究目的】

常染色体優性多発性嚢胞腎（ADPKD）は、常染色体優性遺伝形式を示す頻度の最多の遺伝性疾患で、本邦では毎年約500人が透析導入となっている。しかし、ADPKD患者の腎腫大を抑制する治療法は確立していない。近年、マウスのADPKDモデルで、カロリー投与量を減らすことで、有効に腎嚢胞の成長を遅くすることが報告された[1, 2]。食事摂取量を減らすことで、B1/AMP-activated protein kinase経路や、rapamycin経路の抑制を介して、ADPKDの進行を抑制すると考えられた。これらの研究結果は、食事制限がADPKDの斬新な治療方法になり得ることを示唆している。近年、比較的小規模なスタディで、肥満がADPKDの進行の危険因子と報告されたが[3]、人間のADPKD患者におけるデータは不足している。

一般的に日本人と米国人の食生活は異なっており、20歳以上の成人のカロリー摂取量は、米国では2,141 kcal/day、日本では1,898 kcal/dayと報告されている。しかし、これらの食生活の違いが、ADPKDの進行の違いに関係しているかは不明である。Body mass index（BMI）は、摂取カロリーに相関すると言われている。50～59歳の成人男性の平均BMIは、米国で29.1、日本では23.9と報告されている。しかし、両国のADPKD患者のBMIに違いがあるのか、その違いがADPKDの進行に影響しているのかは、不明である。そこで我々は、食生活の異なる日本と米国でADPKDのESRD到達年齢に差があるのか、BMIがERSD到達時の年齢の有意な因子となるか、について研究を行う事とした。

JSDTのデータベースは、USRDSと同等に信頼性の高いデータベースと考えられる。また、日本は先進国の中で最も平均のBMIが低い国とし

て知られており、食生活が米国とは非常に異なることが知られており、ADPKDの進行に対する食事やBMIの違いを評価するには、米国と比較する国として最も適していると考えられる。大規模なデータベースを使って、カロリー制限がADPKDの進行を遅くするという仮説を裏付けることができる。

ADPKD患者の食事療法の有用性については、今だに議論の分かれるところである。この研究によりADPKDの食事療法の常識が大きく変わる可能性がある。さらにこの機序を介した新しい創薬のきっかけにもなると考えられる。

【方法】

A．研究デザイン: 後ろ向き観察研究

B．データソース: United States Renal Data System（USRDS）と日本透析医学会（JSDT）のデータベース

C．対象患者: 2006年1月から2007年12月に日本または米国で透析導入された患者で、JSDTまたはUSRDSのデータベースに登録されているADPKD患者を対象とする。JSDTでは、通常、透析導入時の患者の特徴を調べていないが、2006年と2007年には全国調査を行い、透析導入時の患者の臨床情報を収集しているので、この年度のデータを用いて分析をする。

D．研究方法

主要評価項目: 透析導入時の患者年齢

副次評価項目: 患者BMI

透析導入時の２群間での患者年齢比較（日本人 vs 米国人、日本人 vs 米国のアジア人）を透析導入時のeGFRで調整して重回帰分析で行う。

日本、米国それぞれで、BMIとeGFR調整年齢との関係の単変量解析（ピアソン相関係数）と多変量解析（重回帰分析）にて解析を行う。日本の患者での多変量解析の調整因子は、性別、併存疾患、収縮期血圧、Hb値、血清Alb値、CRP値。

透析導入時併存疾患 : 心筋梗塞、鬱血性心不全、四肢切断の既往、またはASOの合併、あるいは6cm以上の大動脈瘤、脳梗塞の既往もしくはTIAの存在、認知症、慢性肺疾患、膠原病、消化性潰瘍、慢性肝疾患（門脈圧亢進がない）もしくは慢性肝炎、糖尿病（末期臓器障害なし。食事療法のみは該当せず）、片麻痺、糖尿病（重症な網膜症・神経障害・腎障害・ブリットル型糖尿病）、悪性腫瘍（転移がない、診断後5年を経過したものは除く）、白血病（急性・慢性）、リンパ種、中等度・末期肝疾患、転移性悪性腫瘍、AIDS。

JSDTのデータは、血液透析、腹膜透析の患者のみが含まれるが、USRDSのデータには、血液透析、腹膜透析、腎移植の患者が含まれる。そのため、ESRDに至った段階の腎機能が両国間で多少違うと考えられ、透析導入時または腎移植時のeGFRで調整して比較を行う。eGFR調整ESRD到達年齢については、日本人と米国人全体、さらに日本人と米国のアジア人で比較を行う。さらに、日本、米国それぞれで、BMIと透析導入年齢に関係があるかを単変量解析（ピアソン相関係数）と多変量解析（重回帰分析）を用いて解析する。

【これまでの進捗状況】

Mayo Clinic IRB、The United States Renal Data System（USRDS）IRBの倫理審査で承認を得て、2019年1月にUSRDSから患者データの提供を受けた。JSDT解析小委員会、統計調査委員会、理事会、JSDT倫理委員会で承認を得て、2020年8月JSDT統計調査委員会より患者データの提供を受けた。厚生労働省進行性腎障害調査研究多発性嚢胞腎研究班の協力を得て、2020年10月よりデータ解析を開始した。2021年２月までに、日本、米国それぞれのデータベース内での解析がほぼ終了した。

【結果】

(1) 日本の透析患者での解析

①対象患者

2006年透析導入患者

35,538人中、多発性嚢胞腎　493人

2007年透析導入患者

36,097人中、多発性嚢胞腎　474人

合計　多発性嚢胞腎患者

967人（男627　女338　不明2）

②説明変数の選択

- JRDRデータとUSRDSデータで共通して記録されている変数を選択（**表1**）

透析導入時年齢、ALB、BMI、BUN、Hb、

表１　透析導入時の臨床所見

説明変数	統計量
透析導入時年齢	65.9 ± 12.2
ALB	3.4 ± 0.6
BMI	22.9 ± 3.9
BUN	88.0 ± 31.5
Hb	8.5 ± 1.6
SCr	8.6 ± 3.1
ASO	13（5.3%）
悪性腫瘍	20（8.2%）
慢性心不全	50（20.5%）
脳血管障害	42（17.2%）
糖尿病	99（40.6%）
虚血性心疾患	21（8.6%）

SCr、性別、慢性心不全、悪性腫瘍、ASO、虚血性心疾患、糖尿病、脳血管障害

ただし他の変数に比べて欠測が多い「併存疾患AIDSの有無」は除外

③単変量回帰分析（有意差のあった項目のみ）（**図1**）

④重回帰分析の結果（目的変数：透析導入時年齢）（**表2**）

(2) 米国の患者での解析

①対象患者

下記の条件を満たすものを対象とした（**表3**）。

疾患コードが75313

透析導入年が2006/2007年

以下の変数に、欠測がなかった症例1,308件に対して分析を行った（**表4**）。

透析導入時年齢、ALB、BMI、Hb、SCr、性別、

表３　患者の人種

人　　種	人　　数
American Indian	3
Asian	28
Black American	237
Native Hawaiian	8
Other	3
White	1,029

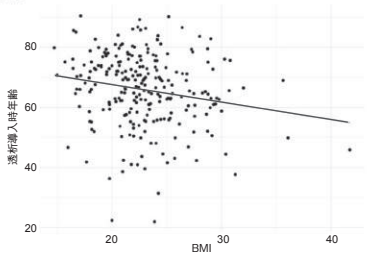
表４　透析導入時の患者の臨床所見

説明変数	統計量
透析導入時年齢	57.0±13.4
ALB	3.7± 0.7
BMI	28.0± 7.1
Hb	11.2±10.3
SCr	7.9±12.4
ASO	67（5.1%）
悪性腫瘍	54（4.1%）
慢性心不全	132（10.1%）
脳血管障害	77（5.9%）
糖尿病	147（11.2%）
虚血性心疾患	138（10.6%）

表２　重回帰分析の結果（目的変数：透析導入時年齢）

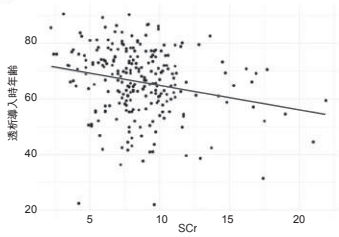
変　数	回帰係数	標準化回帰係数	P値	有意差
（定数）	95.29	−0.22	0.00	＊
ALB	−2.50	−0.12	0.05	
BMI	−0.60	−0.19	0.00	＊
BUN	0.03	0.07	0.31	
Hb	−0.69	−0.09	0.17	
SCr	−0.74	−0.19	0.01	＊
性別	−0.44	−0.04	0.78	
慢性心不全	3.23	0.26	0.08	
悪性腫瘍	6.29	0.51	0.02	＊
ASO	3.59	0.29	0.28	
虚血性心疾患	4.82	0.39	0.07	
糖尿病	1.45	0.12	0.35	
脳血管障害	3.79	0.31	0.06	

BMI



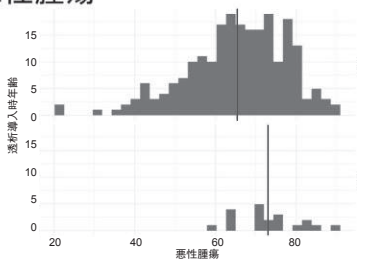
変数	回帰係数	正規化回帰係数	P値	有意差
(定数)	79.27	0.00	0	*
BMI	-0.58	-0.19	0	*

SCr



変数	回帰係数	正規化回帰係数	P値	有意差
(定数)	73.32	0.00	0	*
SCr	-0.86	-0.22	0	*

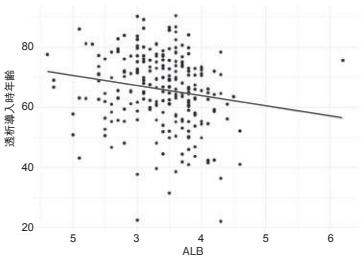
悪性腫瘍



変数	回帰係数	正規化回帰係数	P値	有意差
(定数)	65.29	-0.05	0.00	*
悪性腫瘍	7.72	0.63	0.01	*

ALB

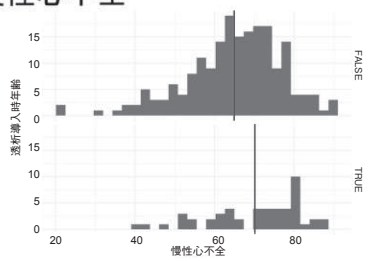
重回帰分析では有意差消失
BMIなどでリスク調整後は差がない



変数	回帰係数	正規化回帰係数	P値	有意差
(定数)	77.42	0.00	0.00	*
ALB	-3.40	-0.17	0.01	*

慢性心不全

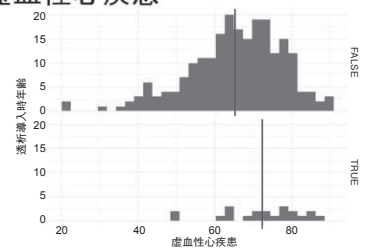
重回帰分析では有意差消失
BMIなどでリスク調整後は差がない



変数	回帰係数	正規化回帰係数	P値	有意差
(定数)	64.86	-0.09	0.00	*
慢性心不全	5.20	0.43	0.01	*

虚血性心疾患

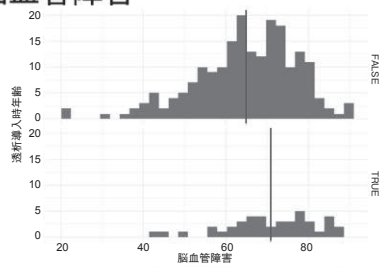
重回帰分析では有意差消失
BMIなどでリスク調整後は差がない



変数	回帰係数	正規化回帰係数	P値	有意差
(定数)	65.31	-0.05	0.00	*
虚血性心疾患	7.10	0.58	0.01	*

脳血管障害

重回帰分析では有意差消失
BMIなどでリスク調整後は差がない



変数	回帰係数	正規化回帰係数	P値	有意差
(定数)	64.91	-0.08	0	*
脳血管障害	5.91	0.48	0	*

図１　単変量回帰分析（有意差のあった項目のみ）

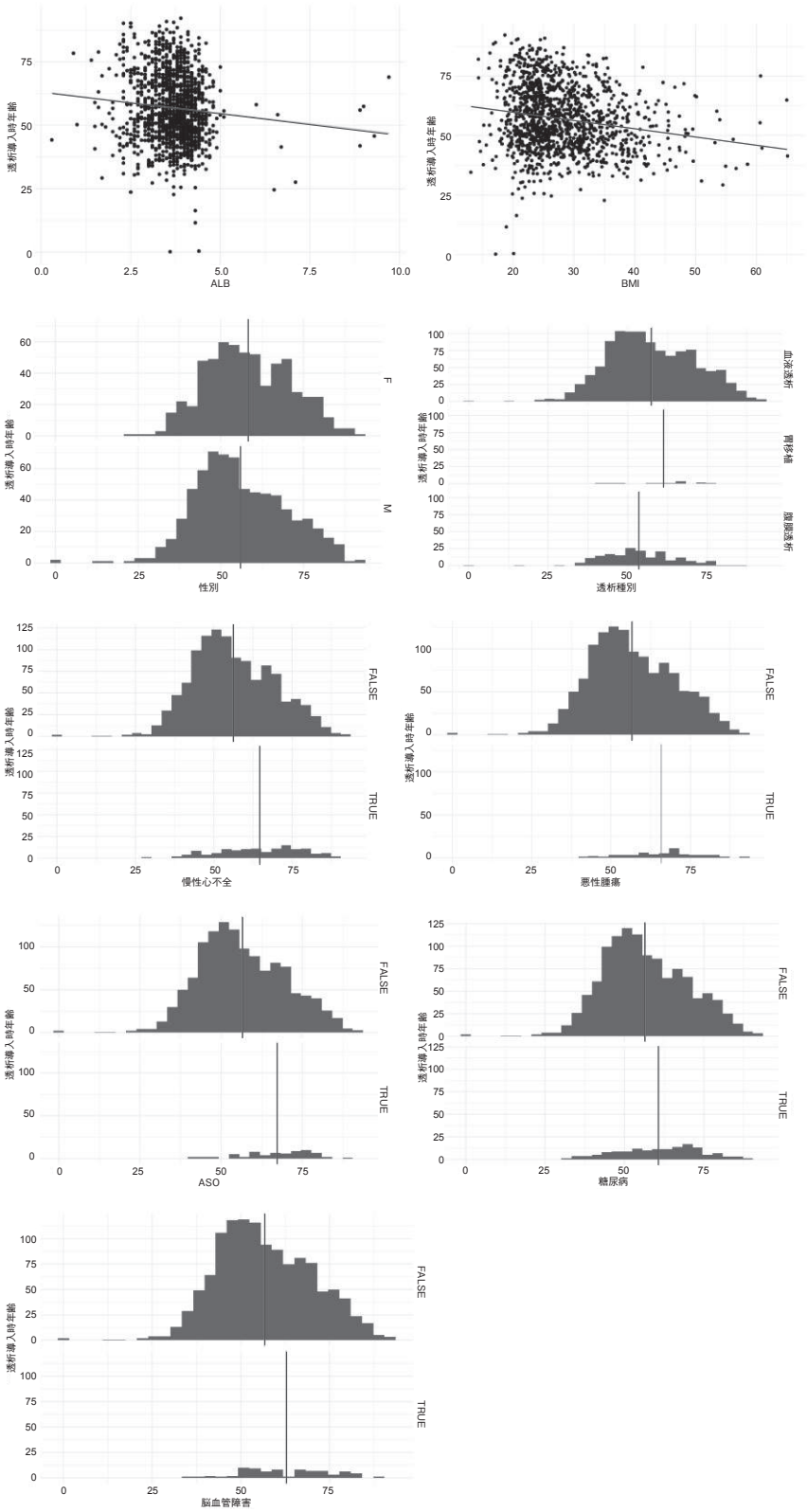


図２　単変量回帰分析（有意差のあった項目のみ）

表５　重回帰分析の結果（目的変数：透析導入時年齢）

変　数	回帰係数	標準化回帰係数	Ｐ値	有意差
（定数）	68.20	−0.02	0.00	＊
ALB	−0.62	−0.03	0.20	
BMI	−0.34	−0.18	0.00	＊
Hb	0.07	0.05	0.04	＊
SCr	−0.02	−0.02	0.40	
性別	−3.33	−0.25	0.00	＊
透析種別腎移植	2.03	0.15	0.57	
透析種別腹膜透析	−2.58	−0.19	0.01	＊
慢性心不全	5.48	0.41	0.00	＊
悪性腫瘍	7.43	0.56	0.00	＊
ASO	4.78	0.36	0.00	＊
虚血性心疾患	6.52	0.49	0.00	＊
糖尿病	3.51	0.26	0.00	＊
脳血管障害	2.47	0.18	0.10	

調整済み決定係数　0.1480735

慢性心不全、悪性腫瘍、ASO、虚血性心疾患、糖尿病、脳血管障害、透析種別、欠測有無患者数

欠測あり　1061

変数に欠測なし　1308

②単変量回帰分析（有意差のあった項目のみ）（**図2**）

③重回帰分析の結果（目的変数：透析導入時年齢）（**表5**）

【まとめ】

2006年と2007年に本邦で人工透析を導入された患者で、導入年齢に影響する因子を解析したところ、BMIと悪性腫瘍は、単変量解析でも多変量解析でも透析導入年齢に影響する有意な変数となった。

2006年と2007年に米国で人工透析または腎移植を導入された患者で、導入年齢に影響する因子を解析したところ、BMI、Hb、性別、慢性心不全、悪性腫瘍、ASO、虚血性心疾患、糖尿病は、単変量解析でも多変量解析でも透析導入年齢に影響する有意な変数となった。

以上より本邦でも米国でも、BMIが高ければ高いほど、透析導入年齢が速くなることが示された。

【考察】

我々の予想通り、本邦でも米国でもADPKD患者で、BMIが大きいほど透析導入年齢が低いという結果になった。

米国と日本を比較すると平均透析導入年齢は、57.0歳と65.9歳であり、予想通り米国の方が透析導入年齢が若いという結果であった。しかし、日本はほとんどが血液透析患者なのに対して、米国では、腹膜透析や腎臓移植患者がある程度含まれていた。また併存疾患の頻度も両国でかなり異なる。これらの背景の違いを調整して、両国の透析導入年齢に差があるのか研究を続けたい。

【文献】

1. Warner G, et al.: Food Restriction Ameliorates the Development of Polycystic Kidney Disease. J Am Soc Nephrol 27: 1437−1447, 2016
2. Kipp KR, et al.: A mild reduction of food intake slows disease progression in an orthologous mouse model of polycystic kidney disease. Am J Physiol Renal Physiol 15: 310 F726−F731, 2016
3. Nowak KL, You Z, Gitomer B, et al.: Overweight and Obesity Are Predictors of Progression in Early Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease. J Am Soc Nephrol 29: 571−578, 2018

多発性嚢胞腎患者における遺伝子変異と脳動脈瘤の関係性について

関根　章成、星野　純一

【要約】

常染色体優性多発性嚢胞腎（ADPKD）は腎外合併症をきたすことが知られており、特に脳動脈瘤は生命予後を規定するために重要とされる。脳動脈瘤の合併が多いことは知られているが、その詳細については明らかにされていない。今回我々は、遺伝学的背景の明らかとなっているADPKD患者のうち頭部MRI検査にて脳動脈瘤の有無を評価された患者101名において、脳動脈瘤合併の有無を遺伝学的背景（*PKD1*群, *PKD2*群, 非*PKD1/2*群）を含めた各種臨床データと比較した。脳動脈瘤の家族歴を有した18名を除いた83名の解析の結果、10名に脳動脈瘤の合併を認めた。10名中9名が女性であり、遺伝子変異別では、*PKD1*群7名、*PKD2*群0名、　非*PKD1/2*群3名であった。非*PKD1/2*群では特に、身長補正両側腎容積の大きさが有意に脳動脈瘤と関係していた。

【目的・方法】

常染色体優性多発性嚢胞腎（ADPKD）は、肝嚢胞、脳動脈瘤、心臓弁膜症や大腸憩室など腎外合併症をきたすことが知られており、特に脳動脈瘤は生命予後を規定するために重要とされる[1)]。脳動脈瘤保有（ないし保持・発生）の危険因子は一般的に、女性、加齢、喫煙、高血圧、飲酒、くも膜下出血の既往、くも膜下出血の家族歴、そしてADPKDといわれている[2)]。2011年に報告されたメタ解析では、併存疾患を有さない集団の未破裂動脈瘤の有病率は3.2％であり、ADPKDと併存疾患を有さない集団との年齢および性別を補正した有病率の比は、6.9％（95％CI: 3.5-14.0）と有意に高いことが報告されている[3)]。ただし、その詳細とくに遺伝学的背景との関係については明らかにされていない。今回我々は、遺伝学的背景の明らかとなっているADPKD患者のうち頭部MRI検査にて脳動脈瘤の有無を評価された患者101名において、脳動脈瘤合併の有無を遺伝学的背景（*PKD1*群, *PKD2*群, 非*PKD1/2*群）を含めた各種臨床データと比較した。脳動脈瘤を径2mm以上のものと定義した。頭部MRIを数回施行している症例がほとんどであるが、脳動脈瘤を認めた症例は脳動脈瘤を認めた最初のMRI撮影時点、脳動脈瘤を認めていない症例は最終のMRI撮影時点における、性別・年齢・身長補正両側腎容積を比較した。

【結果・考察】

脳動脈瘤の家族歴腎を有した18名を除いた83名の解析の結果、10名に脳動脈瘤の合併を認めた。10名中9名が女性であり、性別の有意性は明らかであった。遺伝子変異別でみると、*PKD1*群39名中7名、*PKD2*群19名中0名、非*PKD1/2*群25名中3名に脳動脈瘤の合併を認めた。*PKD1*群39名における解析では、性別のみが脳動脈瘤と有意に関係していた（p=0.03）が、非*PKD1/2*群25名における解析では身長補正両側腎容積のみが脳動脈瘤と有意に関係していた（身長・年齢で補正してp=0.002）。遺伝子変異や身長補正両側腎容積と脳動脈瘤の関係性は新たな知見である。ただし今回の検討は遺伝学的検査を施行された患者（多くはADPKDの家族例を有さない患者）に限られたものであり症例数が多くない。今後、症例数を増やして検討したい。現時点では、ADPKDにおける頭部MRI検査（脳動脈瘤スクリーニング）の対象を「全例」とするか「限定的」とするかは国際的に一定の見解は得られていない[1)]。本検討、さらに症例数を増やした検討における知見により、現状況を打開できると思われる。

【文献】

1. エビデンスに基づく多発性嚢胞腎（PKD）診療ガイドライン 2020, 東京医学社

2. Rinkel GJ: Natural history, epidemiology and screening of unruptured intracranial aneurysms. J Neuroradiol 35: 99–103, 2008
3. Vlak MH, et al.: Prevalence of unruptured intracranial aneurysms, with emphasis on sex, age, comorbidity, country, and time period: a systematic review and meta-analysis. Lancet Neurol 10: 626–636, 2011

腎不全患者におけるデノスマブ投与後のカルシウム変動と血管石灰化の検討

星野　純一

【要約】

目的: 慢性腎不全患者は骨折リスクが極めて高いものの、薬剤蓄積性の懸念等から有効な骨粗鬆症治療薬が存在しなかった。近年開発された完全ヒトRANKL抗体製剤デノスマブは、我々の検討を含む多くの知見により、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薬剤であるが、デノスマブ投与後のカルシウム変動・PTH変動によって血管石灰化亢進が懸念される。今回、同剤が血管石灰化に与える影響を評価した。

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血清カルシウムの変化を検討し、さらに血管石灰化スコアの画像評価を行った。

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61 ml/min/1.73 m^2）にデノスマブ治療が行われた。

デノスマブ投与後の血清カルシウム値の変化は、投与3日後に−0.44±0.53 vs −0.15±0.33 mg/dL（p<0.001）、7日後に−0.68±0.85 vs −0.25±0.49 mg/dL（p<0.001）、14日後に−0.45±0.99 vs −0.11±0.36 mg/dL（p<0.001）であり、投与後約1週間目の透析例で有意に血清カルシウム値の低下を認めた。また、投与前後1年の間に経時的にCT撮像を行った症例はなく、X線によるAortic Arch Calcification Score（AACS）を用いて5段階評価を行ったところ、gradeが変化した症例は認めなかった。

結語: 透析・非透析例ともに、デノスマブ投与後約1週間で最も血清カルシウム値が低下する。透析例では有意に低下するため十分に注意が必要である。しかし今回の検討の範囲では、血清カルシウム変動およびPTH変動に伴う血管石灰化の亢進は認められなかった。

【目的】

脆弱性骨折は腎不全患者の治療上の大きな課題である。例えば、透析患者では一般住民に比べて男性で6倍、女性で5倍の骨折リスクであり[1)]、慢性腎不全は骨粗鬆症および脆弱性骨折のhigh risk集団であることが明らかになっている。一方、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、エビデンスもほとんどない[2)]。このように、CKD患者に対する骨粗鬆症は治療の必要性は大きい一方で安全に使用可能な薬剤は限定されている現状がある。

完全ヒト型抗RANKL抗体のデノスマブ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、既存報告や我々の検討によって健常人とほぼ同等の骨密度改善効果を期待できることが明らかになり[3−7)]、近年透析患者を含む多くのCKD患者で積極的に使用されるようになった。

一方で腎不全患者とくに透析患者においては投与後の低カルシウム血症イベントが有意に多く、多くの場合は投与前後のカルシウム製剤・ビタミンD投与が必要になる[3)]。デノスマブ投与後の血清カルシウム濃度やCa・P積の変化は血管石灰化に影響を及ぼす可能性があるが[8)]、投与後の血管石灰化の変化は明らかになっていない。また、デノスマブ投与後のCa低下に伴い一過性にPTH濃度が上昇することが明らかとなっているが、PTH上昇が動脈石灰化に影響を及ぼす可能性も指摘されている。

そこで、今回、デノスマブ使用例における大動脈石灰化の変化を検討した。

【方法】

2013年以降に当院で骨粗鬆症治療目的にデノスマブおよびコントロールとしてビスフォスフォネート製剤を投与された腎不全患者(CKDG3b-5D、透析患者を含む、腎移植後の患者は含まない)を対象としたretrospective cohort study。

治療開始時の患者背景および開始後の臨床検査所見（年齢、性、透析歴、血清Alb, Ca, P, ALP, iPTH, 骨型ALP, TRACP5b, Mg, DEXA法による腰椎/大腿骨頚部/前腕骨密度)、投薬、およびABI/TBI、CTに関するデータを収集する。

動脈硬化・血管石灰化の評価は、治療前および治療開始1年後のABI/TBI、PWV、およびCT等画像にて血管石灰化評価が可能な症例については、Agatston scoreによる冠動脈硬化の変化を用いて血管石灰化の推移を評価をした。観察期間内に複数回のCT撮像が行われていなかった症例については、単純X線を用いたAortic arch calcification score（AACS）[9]による5段階評価の変化で評価した。

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。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。

②投与後の血清カルシウム値の変動

透析例、非透析例における、デノスマブ投与後の血清カルシウム値の変化は、投与3日後に-0.44±0.53 vs -0.15±0.33 mg/dL（p<0.001)、7日後に-0.68±0.85 vs -0.25±0.49 mg/dL(p<0.001)、14日後に-0.45±0.99 vs -0.11±0.36 mg/dL（p<0.001）であり、投与後約1週間目の透析例で

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（%）	60.3%	85.0%	<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

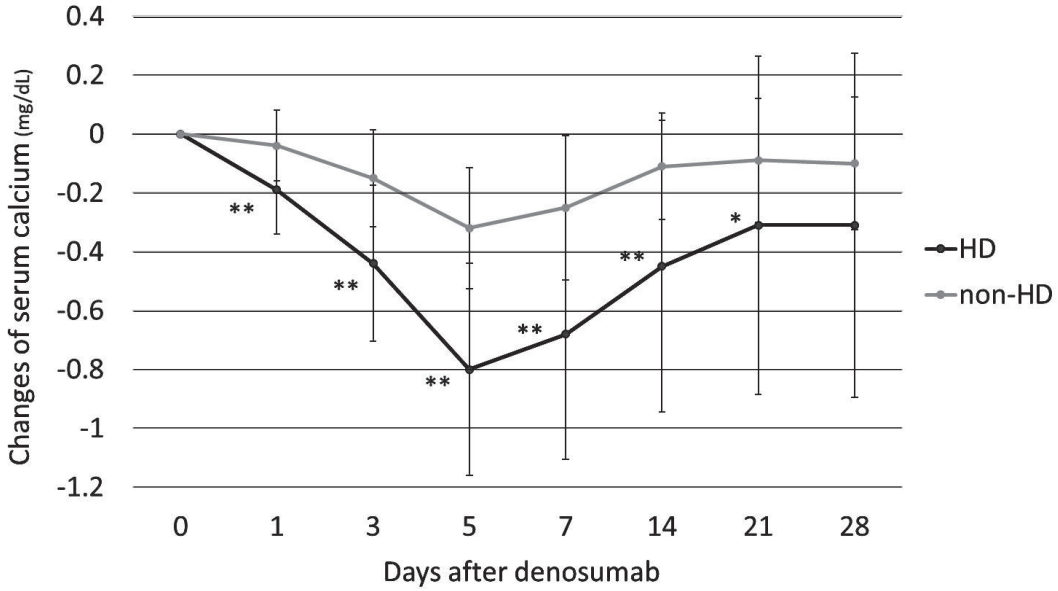


図 1　透析群（HD）、非透析群（non-HD）におけるデノスマブ投与後の血清カルシウムの変化

有意に血清カルシウム値の低下を認めた（**図1**）。

③投与後の血管石灰化の評価

今回後ろ向き観察研究を行った症例において、デノスマブ投与前および一年後に連続的ＣＴ評価を施行した症例はなかった。そのため、単純Ｘ線を用いたAACSにて血管石灰化の変動を評価した。その結果、デノスマブ投与前に比べ、1年後に血管石灰化スコアが変化した症例は認めなかった。

【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[2)]。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、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）であった。

デノスマブ投与後に血清カルシウム変動とともにPTHが変動する現象はよく知られている。透析患者では、2次性副甲状腺機能亢進症がほぼ必発であるが、PTH分泌亢進は、初期は、高リン血症と低カルシウム血症に対する代償機構であるが、やがて高PTHは、骨痛、骨折、筋力低下、心血管疾患、性機能、血栓止血、免疫機能、異所性石灰化などを惹起するトキシンとして作用するとされている[10)]。しかし、近年のCRIC研究によれば、CKD患者の血管石灰化指数に相関するとされているFGF23は、血清リンで補正すると相関性が消失する、つまり血管石灰化にはリン濃度が極めて重要であり、FGF23はリンの交絡によって相関性があるように見えていたという結果であった[11)]。PTHと血管石灰化の関係性も同様なことが言える可能性があり、一過性のPTH変動は血管石灰化亢進には無関係な可能性が高い。むしろデノスマブ投与後に血清リンは上昇しないことから、血管石灰化亢進の方向に働かなかった可

能性もある。

本研究の限界として、観察研究のためCTによる大動脈石灰化測定が行えなかった点と、観察期間が短かったことが挙げられる。今後は観察期間と症例数を増加させることで、真実に近づくことが出来る可能性があると考えている。

今回、透析例を含むCKD患者における血清カルシウム濃度と血管石灰化変化の評価を行った。観察期間中の撮像の限界のため胸部X線での評価となったが、有意な血管石灰化変動は認めなかった。今後さらに症例数や検査精度を高めた検討や、長期間のhard outcomeを対象とした研究を行っていくことが望まれる。

【文献】

1. Wakasugi M, Kazama JJ, Taniguchi M, et al.: Increased risk of hip fracture among Japanese hemodialysis patients. J Bone Miner Metab 31: 315-321, 2013
2. 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
3. Kunizawa K, Hiramatsu R, Hoshino J, et al.: Denosumab for dialysis patients with osteoporosis: A cohort study. Scientific reports 10: 2496-2496, 2020
4. Chen CL, Chen NC, Liang HL, et al.: Effects of Denosumab and Calcitriol on Severe Secondary Hyperparathyroidism in Dialysis Patients With Low Bone Mass. The Journal of clinical endocrinology and metabolism 100: 2784-2792, 2015
5. Nitta K, Yajima A, Tsuchiya K: Management of Osteoporosis in Chronic Kidney Disease. Intern Med 56: 3271-3276, 2017
6. Takami H, Washio K, Gotoh H: Denosumab for Male Hemodialysis Patients with Low Bone Mineral Density: A Case-Control Study. International journal of nephrology 2017: 6218129, 2017
7. 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
8. Masuda H, Kaga K, Inahara M, et al.: Severe Hypophosphatemia Following Denosumab Administration in a Hemodialysis Patient with Progressive Prostate Cancer. Urology case reports 13: 63-65, 2017
9. Shigematsu T, Kono T, Satoh K, et al.: Phosphate overload accelerates vascular calcium deposition in end-stage renal disease patients. Nephrol Dial Transplant 18 Suppl 3: iii86-89, 2003
10. Ketteler M, Block GA, Evenepoel P, et al.: Executive summary of the 2017 KDIGO Chronic Kidney Disease-Mineral and Bone Disorder (CKD-MBD) Guideline Update: what's changed and why it matters. Kidney Int 92: 26-36, 2017
11. Scialla JJ, Lau WL, Reilly MP, et al.: Fibroblast growth factor 23 is not associated with and does not induce arterial calcification. Kidney Int 83: 1159-1168, 2013

ANCA関連血管炎における血小板Toll様受容体を介したNETosisの分子機構解明

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（anti-neutrophil cytoplasmic antibody: 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[1)]。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、AAVのNETosis形成が血小板のToll様受容体（Toll-like receptor: TLR）－液性因子CXCL4からなるパスウェイを介して誘導されることを明らかとし、報告した[2)]（**図1**）。血小板由来液性因子CXCL4を阻害することがAAVの治療剤標的となる可能性について、動物モデルを用いた検討を進行中である。

【目的】

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、NETosisが病態に寄与する報告がある。細菌感染症では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[3)]、膠原病における血小板の役割は未だ解明されていない。我々は、昨年度（2019年度）

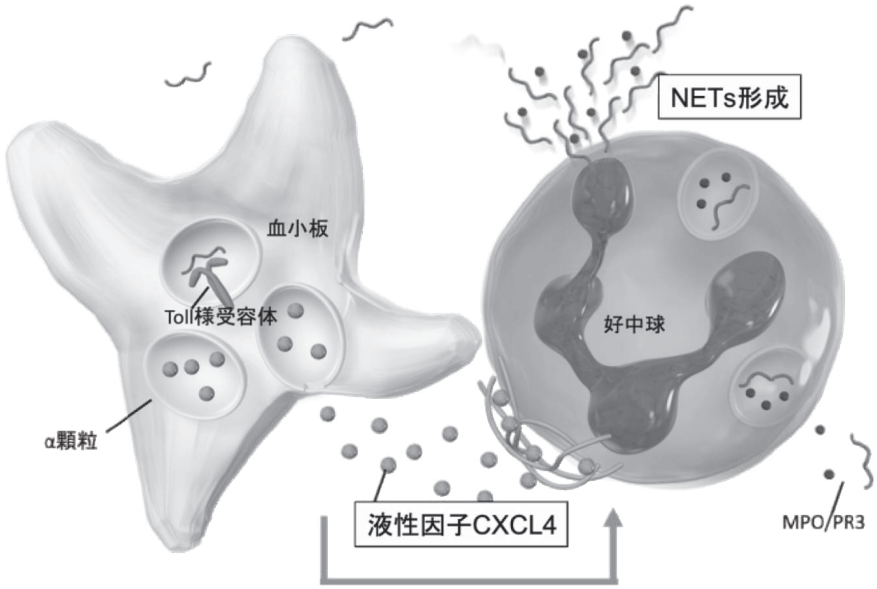


図 1　ANCA関連血管炎における液性因子CXCL4によるNETosis誘導

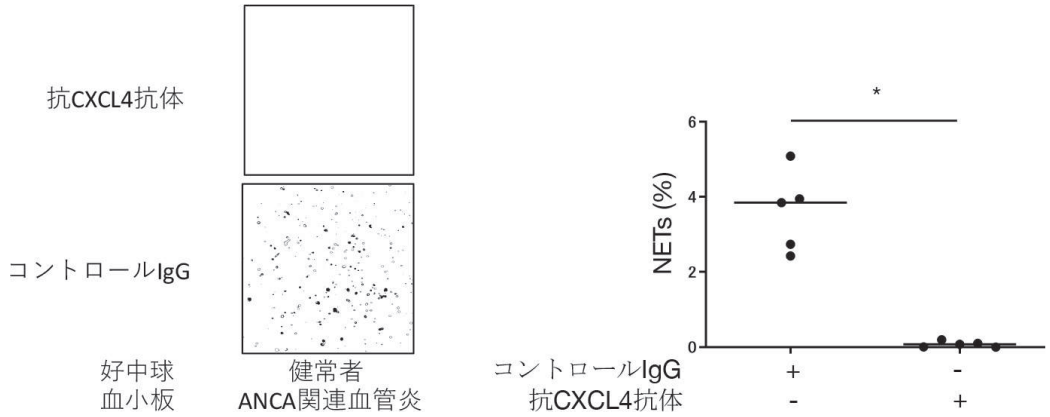


図２　抗CXCL４抗体による血小板介在NETsの阻害

助成研究の中で、AAV患者由来血小板が、健常人および疾患コントロールと比較して有意に高いNETosis誘導能をもつことを明らかにした。さらに、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。本研究は、AAVの病態形成に関与する血小板由来液性因子を同定することを目的とする。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。

【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。AAV由来血小板を用いたマイクロアレイ解析（アジレント社）を実施し、候補となる血漿中の液性因子を測定することで、NETs形成に関与する血小板由来液性因子を同定した。さらに、同定した血小板由来液性因子を用いて末梢血好中球を刺激し、NETs形成を誘導、また、液性因子に対する抗体を添加して活性を阻害することでNETs形成が抑制されるかどうか検討した。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。

【結果】

マイクロアレイ解析の結果、AAV患者由来血小板は健常人由来血小板と比べてTLRシグナルが亢進していることに加えて、液性因子分泌に関連するパスウェイが亢進していることを明らかにした。複数種の液性因子を対象としたスクリーニングの結果、AAVの血漿中CXCL4濃度は健常人や疾患コントロールと比較して高く、CXCL4がAAV由来血小板によるNETs誘導に関連した。CXCL4はTLR9の刺激によって血小板から分泌され、CXCL4は濃度依存性にNETs形成を誘導した。AAV由来血小板によって誘導されたNETs形成は、CXCL4の阻害剤によって抑制されることを明らかとし（**図2**）、報告した[2)]。さらに、CXCL4を阻害することがAAVの治療剤となる可能性について、用途特許を出願した（発明の名称:『ANCA関連血管炎の治療剤』出願人:学校法人慶應義塾　発明者:竹内勤、松本紘太郎、吉本桂子、鈴木勝也　特願:2019-174234）。

【考察】

我々は、血小板由来液性因子CXCL4がNETosisを誘導すること、血小板TLR9刺激がCXCL4産生を促進すること、CXCL4の阻害がAAV由来血小板によって誘導されたNETs形成を抑制することを明らかとした。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. Kessenbrock K, Krumbholz M, Schönermarcket U, et al.: Netting neutrophils in autoimmune small-vessel vasculitis. Nat Med 15: 623-625, 2009
2. Matsumoto K, Yasuoka H, Yoshimoto K, Suzuki K, Takeuchi T: Platelet CXCL4 mediates neutrophil extracellular traps formation in ANCA-associated vasculitis. Sci Rep 11: 222, 2021
3. 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

【発表に関する事項】

1. Matsumoto K, Yasuoka H, Yoshimoto K, Suzuki K, Takeuchi T: Platelet CXCL4 mediates neutrophil extracellular traps formation in ANCA-associated vasculitis. Sci Rep 11: 222, 2021
2. 出願人: 学校法人慶應義塾　発明者: 竹内勤、松本紘太郎、吉本桂子、鈴木勝也　発明の名称:『ANCA関連血管炎の治療剤』　特願: 2019-174234

生体内のプリン代謝制御における腸内細菌叢の関与

三島　英換
東北大学病院腎高血圧内分泌科

【要約】

腸内細菌叢の変化は腎臓病の病態に関与すること知られている。我々は以前に腸内細菌叢が消失した無菌マウスではアデニン誘発性腎不全の病態がより重症化することを報告しているがその機序は不明であった。この機序を明らかにするため本研究では腸内細菌叢が担う生体内プリン代謝および免疫応答それらの腎障害への影響を検討した。無菌マウスではプリン体代謝酵素であり、アデニンから腎毒性物質2,8-DHAへの変換も担うキサンチン還元酵素（XDH）の発現が上昇していることを見出した。また無菌マウスは通常マウスと比較してプリン体最終代謝物である尿中アラントインの増加に加え糞便中のプリン代謝物に大きな変化が生じていた。以上から、無菌環境による腸内細菌の消失はプリン代謝酵素の発現増加を介してアデニンから腎毒性物質2,8-DHAへの変換を促進し、その結果アデニン腎障害の病態を悪化することを明らかにした。本知見はプリン体代謝制御における腸内細菌の新たな関与機序を明らかにしたものである。

【目的】

尿酸を含むプリン体の代謝異常は痛風のみならず動脈硬化性の心血管疾患や慢性腎臓病における残余リスクとして重要である。したがって生体内の尿酸を含むプリン核酸の制御メカニズムの解明

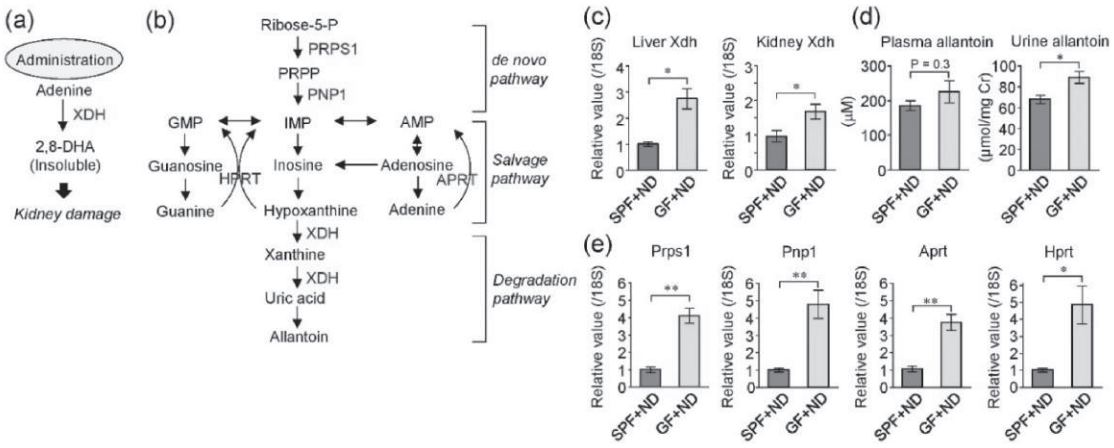


図１　無菌環境飼育マウスはプリン体代謝酵素の発現を増加させる
(a) アデニン投与による腎障害発症機序　2,8-DHA, 2,8-dihydroxyadenine; XDH, xanthine dehydrogenase (b) プリン体の代謝機序　PRPS1, phosphoribosyl pyrophosphate synthetase 1; PNP1, purine nucleoside phosphorylase 1; APRT1, adenine phosphoribosyl transferase; HPRT1, hypoxanthine phosphoribosyl transferase (c) マウス肝臓と腎臓でのXDH mRNAの発現量比較　Specific-pathogen-free（SPF）+ ND, SPF mice with normal diet; GF + ND, germ-free mice with normal diet (d) 血中および尿中のアラントイン濃度 (e) 肝臓におけるプリン代謝酵素 mRNAの発現量 * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$（t-test）n = 4 in SPF + ND and GF + ND groups

は臨床的に重要な課題である。尿酸を含む生体内のプリン代謝は食事摂取、生体内産生、腎排泄、腸管排泄が主な規定因子とされてきた。しかし近年、腸内細菌叢も生体内プリン・尿酸代謝に関わることが示唆されている。申請者はこれまで腎臓病における腸内細菌叢の関与を腸管と腎臓の臓器連関「腸腎連関」の観点から研究を進めてきたが[1,2]、その過程で通常マウスと腸内細菌叢を有さない無菌マウスをそれぞれアデニン誘発性の腎不全状態にすると無菌マウスでは腎障害がより高度になることを見出しているがその機序は不明であった[2]。アデニン誘発腎不全モデルはプリン塩基であるアデニンを経口過剰負荷することでキサンチン脱水素酵素（XDH）を介して代謝された不溶性代謝物2,8-DHAが腎臓に蓄積し腎障害を引き起こすモデルである（**図1**）。したがって、腸内細菌叢の有無がプリン体であるアデニン代謝自体に影響を及ぼすことで腎障害悪化に寄与している可能性が考えられる。本研究ではその機序を解析することを通して生体内のプリン・尿酸代謝制御における腸内細菌叢の役割を明らかにすることを目的とした。

【方法】

通常環境で飼育したマウスと無菌環境で飼育したマウスのサンプル（腎臓、肝臓）を用いてサンプルを回収した。アデニン誘発腎不全はマウスに0.2%アデニン混食を5週間投与することで作成した。各臓器内の遺伝子発現量は定量PCRで評価した。血漿、尿、糞便中のプリン核酸代謝物濃度はキャピラリー電気泳動-飛行時間型質量分析

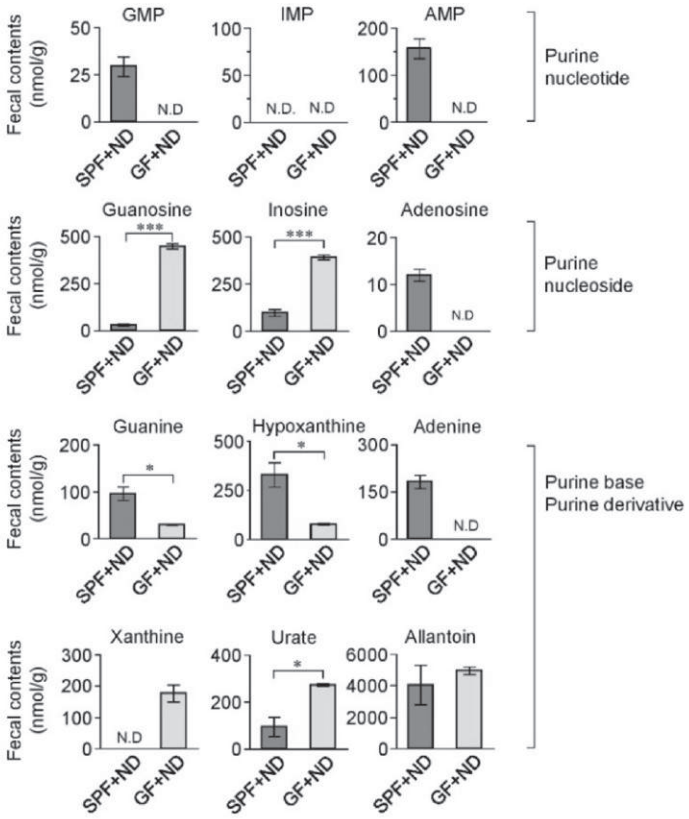


図２　無菌マウスとSPFマウスの糞便中の核酸代謝物の濃度比較
Specific-pathogen-free（SPF）+ ND, SPF mice with normal diet; GF + ND, germ-free mice with normal diet　*P < 0.05, ***P < 0.001 compared between indicated groups（t-test）N.D, not detectable

計（CE-TOFMS）によるメタボローム解析で評価した。

【結果】

まず腸内細菌叢を通常通り有するSPF環境で飼育されたマウスと、無菌環境で飼育され腸内細菌叢が消失したマウス（germ free［GF］マウス）のXDH遺伝子発現量を比較した。その結果、腎臓、肝臓におけるXDH発現量がGFマウスで有意に上昇していた。またマウスにおけるプリン体の最終代謝産物であるアラントインの尿中濃度もGFマウスで高値であった。さらにXDH以外にもPRPS1, PNP1, APRT, HPRTといったプリン代謝に関わる酵素の遺伝子発現も同様にGFマウスでSPFマウスよりも高値であった（**図1**）。

次に、腸内細菌叢が生体内プリン代謝に与える影響をさらに検討するためにGFマウスとSPFマウスの糞便中の核酸代謝物の濃度を比較した（**図2**）。その結果、両群間に糞便中プリン体代謝物に大きな違いを認めた。糞便中のグアノシン、イノシン、キサンチン、尿酸濃度はGFマウス群で有意に高値であった。一方、GMP、AMP、グアニン、アデノシン、アデニン、ヒポキサンチンの濃度はGFマウス群で有意に低値であった。

次に、無菌環境がアデニン誘発性腎障害に与える影響を評価するため、i）SPFマウス＋通常食、ii）GFマウス＋通常食、iii）SPFマウス＋アデニン食、iv）GFマウス＋アデニン食の4群の腎臓障害の解析をおこなった（**図3**）。アデニン食はSPFマウス、GFマウスいづれでも腎障害を惹起させたが、BUNおよび血中クレアチニン濃度SPFマウスよりもGFマウスで有意に高値であった。組織学的にも尿細管障害およびマクロファージ集族の程度もGFマウス群で高度であった。また、線維化関連遺伝子（Col1a1, Tgfb1, Fn1）

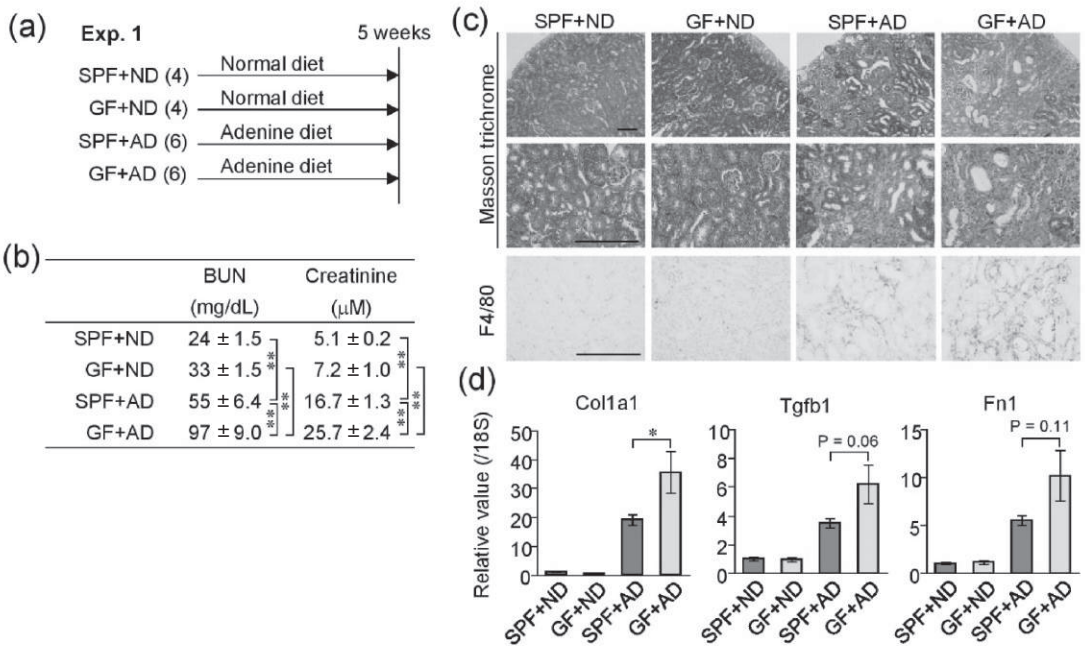


図３　無菌環境はアデニン誘発性腎障害を悪化させる

(a) 実験タイムコース ND, normal diet; AD, adenine diet (b) 血中尿素窒素（BUN）とクレアチニン濃度（mean ± S.E.M）(c) 腎臓組織所見　Masson's trichrome 染色とF4/80免疫染色 Scale bar, 200 μm (d) 線維化関連遺伝子の腎臓内mRNA発現量 *P < 0.05, **P < 0.01 compared between indicated groups（ANOVA）

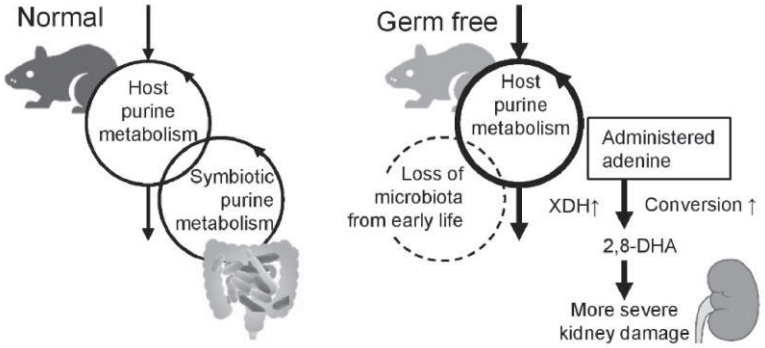


図４　腸内細菌がいる通常状態と、無菌環境飼育による腸内細菌が消失した状態での体内プリン体代謝の違い

についてもGFマウス群でSPF群よりも有意に上昇していた。

【考察】

本研究から、GFマウスではXDHを含むプリン代謝酵素の発現量が増加していること、および腸内細菌細菌叢がホストの生体内におけるプリン体代謝に影響することを明らかにした。XDHによるアデニンから2,8-DHAの変換はアデニン誘発腎障害発症のkey stepであるためXDHの活性はその腎障害の程度に影響を与えうる。過去の報告では高尿酸血症の治療薬として使用されるアロプリノールをはじめとするXDH阻害薬やXDH発現が低いマウスではアデニン誘発性腎障害が軽減することが知られている。したがって腸内細菌叢の消失によるXDHの発現増加がアデニン誘発性腎障害を悪化させる要因になっていると考えられた（**図4**）[3]。

腸内細菌叢はホストの生体内の各種代謝酵素の発現量に影響を与えることが知られている[4]。本研究でもGFは、マウスでは、XDH以外のプリン体代謝酵素の発現量増加も認めた。腸内細菌叢はそれ自身がnucleosidase活性を有しており腸管内でプリン体代謝を行うことが報告されている。本研究でもSPFマウスとGFマウスで糞便中のプリン核酸に大きな違いをみとめ、これは腸内細菌叢による腸管内のプリン体代謝の有無を反映していると考えられる。GFマウスでは腸内細菌叢が本来担うべき腸管内でのプリン体代謝が消失しているため、その代償としてホスト側が代謝すべきプリン体量が増加し、その結果としてホストの生体内におけるXDHをはじめとする各種プリン体代謝酵素の発現が亢進している可能性が考えられた（**図4**）。

以上から、本研究は生体内プリン代謝制御機構における腸内細菌叢の新たな影響を明らかにしたものであり、生体内のプリン体制御および高尿酸血症といったプリン体代謝異常症におけるさらなる腸内細菌叢の関与機序の解明が望まれる。

【文献】

1. Mishima E, Fukuda S, Shima H, Hirayama A, Akiyama Y, Takeuchi Y, Fukuda N N, Suzuki T, Suzuki C, Yuri A, et al.: Alteration of the Intestinal Environment by Lubiprostone Is Associated with Amelioration of Adenine-Induced CKD. J Am Soc Nephrol 26: 1787-1794, 2015
2. Mishima E, Fukuda S, Mukawa C, Yuri A, Kanemitsu Y, Matsumoto Y, Akiyama Y, Fukuda N N, Tsukamoto H, Asaji K, et al.: Evaluation of the impact of gut microbiota on uremic solute accumulation by a CE-TOFMS-based metabolomics approach. Kidney Int 92: 634-645, 2017
3. Mishima E, Ichijo M, Kawabe T, Kikuchi K, Akiyama Y, Toyohara T, Suzuki T, Suzuki C, Asao A, Ishii N, Fukuda S, Abe T: Germ-

Free Conditions Modulate Host Purine Metabolism, Exacerbating Adenine-Induced Kidney Damage. Toxins 12: 547, 2020
4. Toda T, Saito N, Ikarashi N, Ito K, Yamamoto M, Ishige A, Watanabe K, Sugiyama K: Intestinal flora induces the expression of Cyp3a in the mouse liver. Xenobiotica 39: 323-334, 2009

糖尿病性腎臓病におけるアルブミン尿の経時的変化と腎・生命予後との関係: 全国腎生検コホート解析

山内　真之、星野　純一、澤　直樹、乳原　善文、和田　隆志[1]
金沢大学腎臓内科学[1]

【要約】

糖尿病性腎臓病においてアルブミン尿は末期腎不全および全死亡の独立危険因子であることが知られている。しかしながら、アルブミン尿は様々な修飾を受けて臨床経過中に変化することが報告されており、一点のみのアルブミン尿を用いた末期腎不全および全死亡のリスク評価は時間の経過とともに変化する可能性がある。そこで我々は、公的研究班で収集された腎生検にて糖尿病性腎臓病と診断された895例のうち、2年間のアルブミン尿の経時変化を追跡できた391例を対象として、糖尿病性腎臓病におけるアルブミン尿の経時変化と腎予後（透析導入）・生命予後（全死亡）との関連を検討した。Joint latent class mixed modelを用いた解析の結果、末期腎不全および全死亡と関連する3通りのアルブミン尿の経時変化パターン（高値増加群（305例; 78%）、高値減少群（31例; 8%）、低値維持群（55例; 14%））が同定された。さらに、低値維持群を比較対照として、交絡因子を調整した多変量ハザードモデルを用いて解析した腎イベントのハザード比（95%信頼区間）は高値増加群6.6（4.2, 10.3）、高値減少群 2.0（1.3, 3.3）であった。同様に死亡イベントのハザード比も高値増加群で最大であった。また、アルブミン尿の経時変化パターンは、単回計測のアルブミン尿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、糖尿病性腎臓病において2年間のアルブミン尿の経時変化を観察することで、より優れた腎・生命予後のリスク評価ができる可能性が示唆された。

【目的】

糖尿病性腎臓病においてアルブミン尿は末期腎不全および全死亡の独立危険因子である[1-5]。しかしながら、アルブミン尿は様々な修飾を受けて臨床経過中に変化することが知られている[6-11]。したがって、一点のみのアルブミン尿を用いた末期腎不全や全死亡のリスク評価は時間の経過とともに変化する可能性がある。そこで我々は、糖尿病性腎臓病におけるアルブミン尿の経時変化と腎予後（透析導入）・生命予後（全死亡）との関連を検討した。

【方法】

（デザイン）後ろ向きコホート研究

（対象）公的研究班で収集された腎生検にて糖尿病性腎臓病と診断された895例のうち、2年間のアルブミン尿の経時変化を追跡できた391例

（臨床評価項目）年齢、性別、BMI、糖尿病罹病期間、喫煙有無、降圧薬内服有無、血圧、HbA1c、中性脂肪、LDLコレステロール、尿酸値、eGFR（推定糸球体濾過率）、UACR（尿中アルブミン量）、RAS系降圧薬、血糖降下薬、スタチン、心血管病の既往など

（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）全死亡

（除外基準）2年間の観察期間内に透析・死亡イベントを起こした症例あるいは打ち切り症例、他の腎症の合併症例、移植腎生検症例

（統計解析）

1）Joint latent class mixed modelを用いて、2年間のアルブミン尿の経時変化のパターンを同定した。

2）Kaplan-Meier法、単変量および多変量回帰モデルを用いて、2年間のアルブミン尿の経時変化のパターンと腎・生命予後との関係を評価した。

3）Net reclassification improvement、Integrated discrimination indexを用いて、アルブミン尿の単一計測に対する2年間の

アルブミン尿の経時変化のパターンの腎予後予測能の付加価値を評価した。

【結果】

(1) 腎・生命予後と関連する3つのアルブミン尿の経時変化パターン（高値増加群（305例; 78%）、高値減少群（31例; 8%）、低値維持群（55例; 14%）が同定された（**図1**）。

(2) 5年の中央観察期間中に透析イベント109例

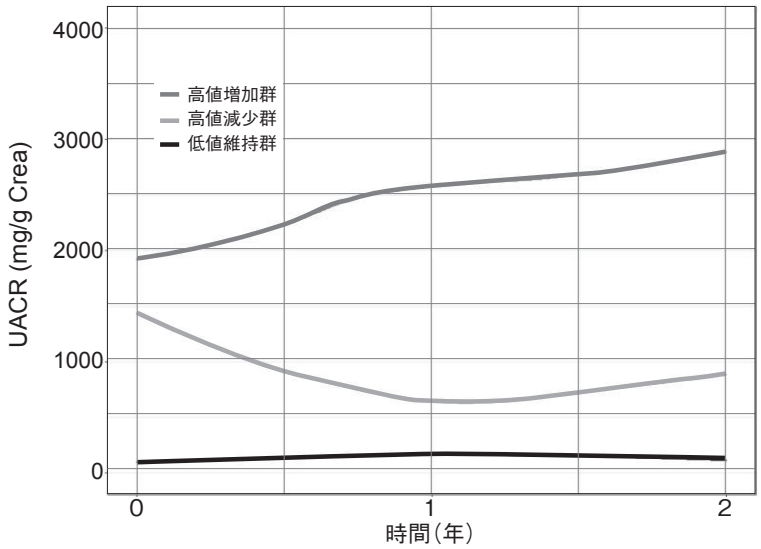


図 1　2年間のアルブミン尿の経時変化パターン

表 1　アルブミン尿の経時的変化パターンと腎・生命予後

	Model 1		Model 2		Model 3	
末期腎不全						
アルブミン尿の経時的変化パターン	ハザード比（95% 信頼区間）	*P* value	ハザード比（95% 信頼区間）	*P* value	ハザード比（95% 信頼区間）	*P* value
"低値維持群"	Reference		Reference		Reference	
"高値減少群"	6.10（4.71, 7.81）	<0.001	4.13（2.87, 5.96）	<0.001	2.03（1.25, 3.29）	0.004
"高値増加群"	11.24（8.81,14.33）	<0.001	8.22（5.78, 11.70）	<0.001	6.55（4.19, 10.25）	<0.001
全死亡						
アルブミン尿の経時的変化パターン	ハザード比（95% 信頼区間）	*P* value	ハザード比（95% 信頼区間）	*P* value	ハザード比（95% 信頼区間）	*P* value
"低値維持群"	Reference		Reference		Reference	
"高値減少群"	0.73（0.43, 1.26）	0.259	0.46（0.27, 0.79）	0.005	0.48（0.28, 0.81）	0.006
"高値増加群"	3.02（2.06, 4.42）	<0.001	1.97（1.33, 2.92）	0.001	2.03（1.36, 3.02）	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、RAS系阻害薬、血糖降下薬、スタチン、喫煙、心血管病の既往で調整）、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）

(27.9%)、死亡イベント27例(6.9%)を認めた。低値維持群を比較対照として、交絡因子を調整した競合ハザードモデルを用いて解析した腎イベントのハザード比（95％信頼区間）は高値増加群6.6（4.2, 10.3）、高値減少群 2.0（1.3, 3.3）であった。同様に死亡イベントのハザード比も高値増加群で最大であった（**図2、表1**）。

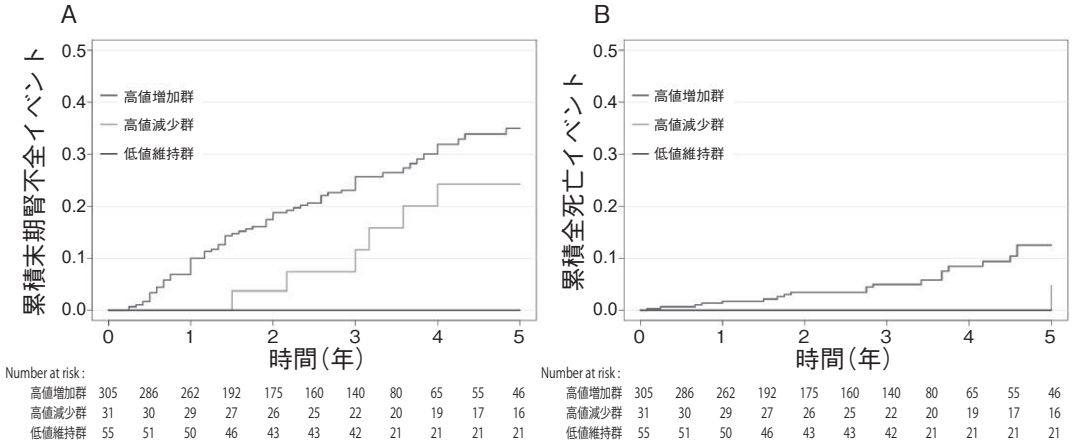


図２　２年間のアルブミン尿の経時変化パターンと累積末期腎不全・全死亡イベント発生
A: 累積末期腎不全イベント発生率　B: 累積全死亡イベント発生率

表２　アルブミン尿の単一計測に対する２年間のアルブミン尿の経時変化のパターンの腎予後予測能の付加価値

	Reclassified predicted risk with 2-year UACR trajectory measures			%(n)of patients reclassified with		
Predicted risk with baseline UACR category measures	"低値維持群"	"高値減少群"	"高値増加群"	Increased risk	Decreased risk	Net correctly reclassified（%）
イベントあり（n = 136）						
Normoalbuminuria（UACR <30）	2	0	0	4.4（6）	12.5（17）	-0.081
Microalbuminuria（UACR 30-300）	4	0	6			
Macroalbuminuria（UACR ≥300）	0	13	111			
イベントなし（n = 255）						
Normoalbuminuria（UACR <30）	6	0	0	7.5（19）	23.9（61）	0.164
Microalbuminuria（UACR 30-300）	42	0	19			
Macroalbuminuria（UACR ≥300）	1	18	169			
Net reclassification improvement（95% CI）						0.083(0.064, 0.102) *P* <0.001
Integrated discrimination index（95% CI）						0.028(0.024, 0.032) *P* <0.001

(3) アルブミン尿の経時変化パターンを用いた予後予測能はベースラインのアルブミン尿を用いたそれよりも優れていた（**表2**）。

【結論】

糖尿病性腎臓病において2年間のアルブミン尿の経時変化を観察することで、より優れた腎・生命予後のリスク評価ができるかもしれない。

【文献】

1. Nelson RG, Bennett PH, Beck GJ, Tan M, Knowler WC, Mitch WE, Hirschman GH, Myers BD: Development and progression of renal disease in Pima Indians with non-insulin-dependent diabetes mellitus. Diabetic Renal Disease Study Group. N Engl J Med 335: 1636-1642, 1996
2. Adler AI, Stevens RJ, Manley SE, Bilous RW, Cull CA, Holman RR: Development and progression of nephropathy in type 2 diabetes: the United Kingdom Prospective Diabetes Study (UKPDS 64). Kidney Int 63: 225-232, 2003
3. Packham DK, Alves TP, Dwyer JP, Atkins R, de Zeeuw D, Cooper M, Shahinfar S, Lewis JB, Lambers Heerspink HJ: Relative incidence of ESRD versus cardiovascular mortality in proteinuric type 2 diabetes and nephropathy: results from the DIAMETRIC (Diabetes Mellitus Treatment for Renal Insufficiency Consortium) database. Am J Kidney Dis 59: 75-83, 2012
4. Ninomiya T, Perkovic V, de Galan BE, Zoungas S, Pillai A, Jardine M, Patel A, Cass A, Neal B, Poulter N, Mogensen CE, Cooper M, Marre M, Williams B, Hamet P, Mancia G, Woodward M, Macmahon S, Chalmers J: Albuminuria and kidney function independently predict cardiovascular and renal outcomes in diabetes. J Am Soc Nephrol 20: 1813-1821, 2009
5. Scirica BM, Mosenzon O, Bhatt DL, Udell JA, Steg PG, McGuire DK, Im K, Kanevsky E, Stahre C, Sjöstrand M, Raz I, Braunwald E: Cardiovascular Outcomes According to Urinary Albumin and Kidney Disease in Patients With Type 2 Diabetes at High Cardiovascular Risk: Observations From the SAVOR-TIMI 53 Trial. JAMA Cardiol 3: 155-163, 2018
6. Bentata Y, Karimi I, Benabdellah N, El Alaoui F, Haddiya I, Abouqal R: Albuminuria in type 2 diabetes mellitus: from remission to progression. Ren Fail 38: 481-483, 2016
7. Yokoyama H, Araki S, Honjo J, Okizaki S, Yamada D, Shudo R, Shimizu H, Sone H, Moriya T, Haneda M: Association between remission of macroalbuminuria and preservation of renal function in patients with type 2 diabetes with overt proteinuria. Diabetes Care 36: 3227-3233, 2013
8. Rossing K, Christensen PK, Hovind P, Parving HH: Remission of nephrotic-range albuminuria reduces risk of end-stage renal disease and improves survival in type 2 diabetic patients. Diabetologia 48: 2241-2247, 2005
9. Araki S, Haneda M, Sugimoto T, Isono M, Isshiki K, Kashiwagi A, Koya D: Factors associated with frequent remission of microalbuminuria in patients with type 2 diabetes. Diabetes 54: 2983-2987, 2005
10. Gaede P, Tarnow L, Vedel P, Parving HH, Pedersen O: Remission to normoalbuminuria during multifactorial treatment preserves kidney function in patients with type 2 diabetes and microalbuminuria. Nephrol Dial Transplant 19: 2784-2788, 2004
11. Coresh J, Heerspink HJL, Sang Y, Matsushita K, Arnlov J, Astor BC, Black C, Brunskill NJ, Carrero JJ, Feldman HI, Fox CS, Inker LA, Ishani A, Ito S, Jassal S, Konta T, Polkinghorne K, Romundstad S, Solbu MD, Stempniewicz N, Stengel B, Tonelli M, Umesawa M, Waikar SS, Wen CP, Wetzels JFM,

Woodward M, Grams ME, Kovesdy CP, Levey AS, Gansevoort RT: Chronic Kidney Disease Prognosis Consortium and Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration. Change in albuminuria and subsequent risk of end-stage kidney disease: an individual participant-level consortium meta-analysis of observational studies. Lancet Diabetes Endocrinol 7: 115-127, 2019

（6）循環器疾患

尿酸と骨粗鬆症との関係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、骨折は主な介護が必要となる要因となることから、重要な問題となっている。骨粗鬆症は骨折の主な原因であり、骨粗鬆症のリスク因子についての検討が求められている。骨粗鬆症の評価項目としては、骨密度検査が有効とされており、健康診断などで広く使用されている。過去の研究で、血清尿酸値と骨折の頻度との関連性を示した報告はあるが、血清尿酸値と骨密度の関係を調べた検討は数少ない。本研究では、虎の門病院の健康診断データを用いて、血清尿酸値と骨密度との関係性を明らかにするための研究を行った。

【背景】

高齢化に伴い、骨粗鬆症、骨折の患者は増加しており、骨折・転倒は、本邦において介護が必要となった原因の12.5％を占め、４番目に多い原因となっている[1)]。また、骨粗鬆症は日本で1,000万人以上にもなるといわれている（日本整形外科学会）[2)]。骨粗鬆症の予防には、食事療法・運動療法が最も大切とされているが、骨粗鬆症のリスク因子、予防因子についてはまだ不明な点が多く、骨粗鬆症と関係する因子についての解明が求められている。過去の研究で、血清尿酸値と骨折の頻度との関連性を示した報告はあるが[3, 4)]、血清尿酸値と骨密度の関係を調べた検討は数少ない。本研究では、虎の門病院の健康診断データを用いて、血清尿酸値と骨密度との関係性を明らかにするための研究を行った。

【目的】

血清尿酸値と骨粗鬆症（骨密度）との関係性を明らかにする。

【方法】

研究①：横断研究。2017年に虎の門病院付属健康管理センターを受診し、骨密度検査を受けた30歳以上を対象とし、検討を行った。骨粗鬆症の評価方法としては、一般的に使用されているDXA法による腰椎の骨密度測定を用いた。健康診断受診時の血清尿酸値と骨密度の関係について、男女別に、年齢を調整の上、重回帰分析にて検討を行った。さらに、骨密度測定における、T-score −2.5以下を骨粗鬆症、−1.0 ～ −2.5を骨減少症と定義し、骨粗鬆症、骨減少症に対する血清尿酸値のオッズ比（OR）を、ロジスティック回帰分析で求めた。

研究②：加齢に伴い、血清尿酸値が変化する可能性を検討するため、５年間のコホート研究を行った。聖路加国際病院予防医療センターを2004年と2009年に共に受診した65歳以上（2004年時点）を対象とした。血清尿酸値に影響を与える可能性を除外するため、各年のそれぞれの時点における、慢性腎臓病患、高血圧、糖尿病、脂質異常症、高尿酸血症で治療中の患者を除外し、(1) 男女別に2004年と2009年の血清尿酸値を対応のあるｔ検定で比較した。(2) 65歳から75歳までを前期高齢者群、75歳以上を後期高齢者群と分類し、各群での血清尿酸値の変化について追加解析を行った。

なお、両研究共に、検定についてはIBM SPSS Statistics 22を使用した。

【結果】

研究①：本研究の対象者は727人（男性185人、女性542人）で、平均年齢は59.8 ± 11.1歳（男性59.9 ± 12.3歳、女性59.7 ± 10.7歳）であった。血清尿酸値は男性で5.91 ± 1.23 mg/dL、女性で4.79 ± 1.06 mg/dL、骨密度のT-score（若いときと比べた指標）は男性で−0.71 ± 1.26SD、女性で−1.29 ± 1.37SD、YAM（young adult mean）

は男性が90.0±17.2%、女性が85.8±15.0%、Z-score（同年代と比べた指標）は男性で-0.15±1.13、女性で0.18±1.02であった。骨粗鬆症は男性11人（5.9%）、女性103人（19.0%）、骨減少症は男性88人（47.6%）、女性338人（62.3%）であった。年齢を考慮した血清尿酸値とT-scoreの関係は、男性で扁回帰係数0.264（95%信頼区間0.117-0.411, p<0.001）、女性で0.182(0.078-0.286, p<0.001）と有意に血清尿酸値高値がT-score高値と関係していた。さらに、血清尿酸高値は、骨減少症の防御因子として働いており、1 mg/dL増加ごとのORは、男性で0.655（95%信頼区間: 0.501-0.854）、女性で0.808(0.676-0.966)であった。骨粗鬆症についても、男女共に血清尿酸値増加に伴うORは低かったが（男性で0.678、女性で0.809)、有意差は認めなかった（男性でp=0.16, 女性でp=0.053)。加齢については、女性では骨粗鬆症（1歳ごとにOR: 1.059, 1.035-1.084）と骨減少症（1歳ごとにOR: 1.071, 1.051-1.091）の有意なリスクとなったが、男性では骨粗鬆症には有意差は認めず（p=0.69)、骨減少症の防御因子（1歳ごとにOR: 0.965, 0.940-0.991）となった。

研究②：加齢に伴う血清尿酸値の変化が、上記結果にも影響している可能性を考慮して、加齢と血清尿酸値の変化について、5年間のコホート研究で追加の検討を行った。2004年の時点で65歳以上1,841人（女性757人）のうち、慢性腎臓病（推算糸球体濾過量< 60 mL／分／1.73m²)、高血圧症、糖尿病、脂質異常症、高尿酸血症・痛風のいずれかで治療を受けている者を除いた、502人（女性221人）で検討を行った。年齢は2004年時点で69.2±3.8歳（65-84歳）であった。5年間の血清尿酸値の変化は、男性で5.686 mg/dLから5.417 mg/dL、女性で4.682 mg/dLから4.530 mg/dLに有意に低下していた（共にp<0.001）（**図1**)。65歳から74歳までの前期高齢者における血清尿酸値は、5年間で、男性で5.679 mg/dLから5.438 mg/dL（p<0.001)、女性で4.675 mg/dLから4.561 mg/dL（p=0.006）と共に低下していたが、75歳以上の後期高齢者における、男性の5.733 mg/dLから5.264 mg/dL（p=0.004)、女性の4.758 mg/dLから4.195 mg/dL(p=0.002）と比べると、低下の割合が小さかった。

【考察】

血清尿酸値と骨密度との間に、正の相関関係を認めることが示され、血清尿酸高値が骨粗鬆症に対しては、予防的に働く可能性が示唆された。本研究結果は、過去の研究において、血清尿酸値と骨折との関連性を示した報告と合致する内容であり[3, 4]、骨密度低下が骨折にも関係している可能性が示唆された。一方で、高尿酸血症によって引き起こされる痛風と、骨折（骨盤骨折）との関係

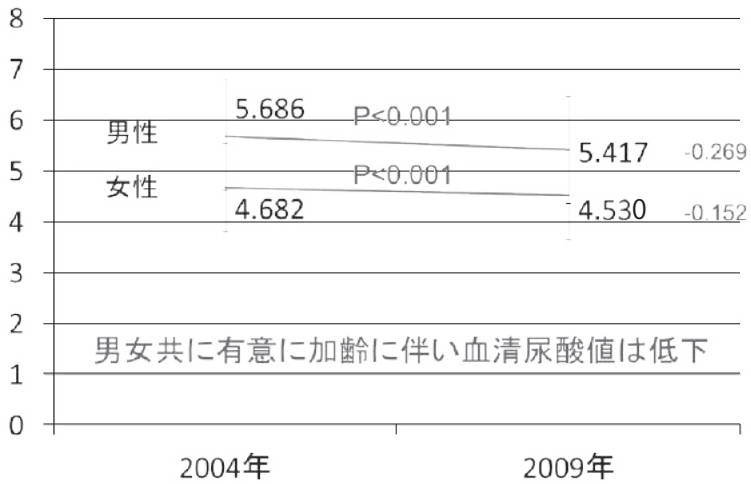


図１　５年間の加齢に伴う血清尿酸値の変化（65歳以上）

性については、女性において痛風の既往が骨盤骨折のリスクと関係しているとの報告もあり[5]、痛風が生じた場合には骨が脆くなることが考えられることから、高尿酸血症が良いとは言えない点に注意が必要と考えられる。また、本研究は横断研究であるため、あくまで血清尿酸値と骨密度との関係性を示したのみであり、血清尿酸値が高いことが将来的な骨折予防に関わるかについては明らかではなく、コホート研究での追加検討が必要と考えられる。

本研究では、追加の検討をとして、聖路加国際病院における健康診断の5年間のコホートデータベースを用いて、加齢に伴う血清尿酸値の変化についても検討を行っている。高齢者における血清尿酸値は、男女共に5年間で有意な低下を認め(**図1**)、後期高齢者群では、前期高齢者群よりも、男女共に血清尿酸値の低下の割合が大きかった。本結果より、高齢になるほど、加齢による血清尿酸値の低下が大きくなることが明らかとなり、骨密度の低下にも血清尿酸値の低下が関係している可能性も示唆された。現在、虎の門病院の健康診断データを用いて、10年間のマッチングを行うことで、さらなるコホート研究での検討を進めている。

血清尿酸値は食事などの生活習慣にも大きく影響を受けるため、栄養状態の悪い対象者が、血清尿酸値が低くなり、骨密度も低くなっている状態を見ている可能性はある。食事情報を含めた検討が望ましいが、本内容については本研究のLimitationとなると考えられる。また、本研究では尿酸降下薬などの内服薬について検討できておらず、今後は尿酸降下療法により骨密度に変化が生じるかについても、更なる検討が必要と考えられる。今後、高尿酸血症に伴う骨密度高値が、骨折の予防につながるかについての検討も行う必要があると考えられた。

本研究により、血清尿酸値は骨密度と関連していることが示され、血清尿酸値と骨密度との間には正の相関関係があることが示された。

【文献】

1. 厚生労働省　2019年国民生活基礎調査（最終確認日 2021.3.8） https: //www.mhlw.go.jp/toukei/saikin/hw/k-tyosa/k-tyosa19/index.html
2. 公益社団法人日本整形外科学会ホームページ（最終確認日 2021.3.8）https: //www.joa.or.jp/public/sick/condition/osteoporosis.html
3. Lane NE, Parimi N, Lui L-Y, Wise BL, Yao W, Lay Y-AE, Cawthon PM, Orwoll E: Osteoporotic Fractures in Men Study Group Association of serum uric acid and incident nonspine fractures in elderly men: the Osteoporotic Fractures in Men（MrOS）study. J Bone Miner Res 29: 1701-1707, 2014
4. Mehta T, Bůžková P, Sarnak MJ, Chonchol M, Cauley JA, Wallace E, Fink HA, Robbins J, Jalal D: Serum urate levels and the risk of hip fractures: data from the Cardiovascular Health Study. Metabolism 64: 438-446, 2015
5. Paik JM, Kim SC, Feskanich D, Choi HK, Solomon DH, Curhan GC: Gout and Risk of Fracture in Women: A Prospective Cohort Study. Arthritis Rheumatol 69: 422-428, 2017

（7）消化器外科疾患

食道癌治療中のQOL変化と精神的ストレスとの関連に関する検討

大倉　遊、上野　正紀、宇田川晴司

【要約】

食道癌の治療を受けている患者は、様々な臨床的因子や周囲の環境などの影響を受け、抑うつや転移・再発、さらには死への恐怖などの感情を抱いている。本研究では、周術期に精神的ストレスを与える因子を検討するとともに、特に治療の各ポイントにおける精神的ストレスとQOLとの関連を調べた。その結果、患者の感情状態は食道癌の全治療過程を通じて精神的ストレスの危険因子になっていることが分かった。全般的QOLや食道癌そのものに関連した症状などの機能的スケールは主に手術前の精神的ストレスに影響を与えるのに対し、手術そのものによる食事方法や食習慣の変化は、主に手術後の精神的ストレスに影響を与えていることがわかった。食道癌は手術侵襲が大きく、患者に与える精神的ストレスも大きい。それぞれの治療経過に合った精神的ケアが、精神的ストレス軽減やQOL改善に寄与する可能性が示唆された。

【目的】

消化器癌の中でも特に食道癌は最も悪性度の高い癌の一つであり、手術侵襲も最も大きいことから、食道癌患者に与える精神心理的な影響は極めて大きいことが推察される。過去の報告では、食道癌術後1年で、64％が抑うつ感を自覚、また転移・再発・死への恐怖を80％が抱いているとされている[1)]。また特に食道癌術後患者は、QOLの回復がゆっくり、長くかかるとされる[2－7)]。胃癌患者では、精神的ストレスとQOLとの関連が示されている一方で、食道癌患者に対する精神的ストレスとQOLとの関連は未だ示されていない[8)]。これらの関連が確認できれば、QOLが低下した患者に対する早期精神的サポートを行いやすく、またQOLの改善が精神的ストレス軽減を予測するいい指標になると考えられる。そこで、今回、食道癌周術期のQOLの変化と精神的ストレスの変化を調べ、それぞれの関連を調べることとした。

【方法】

2017年4月から2019年4月まで、虎の門病院消化器外科外来を受診し、以下に示す適格基準を満たした症例を対象とした。適格基準は、年齢20歳から85歳の食道癌（Siewert type Ⅰ/Ⅱの接合部癌も含む）、Performance status 0-2、同意取得可能、の3つである。また、重篤な精神疾患を有する患者、医療者が調査困難と判断した患者は対象外とした。なお、手術拒否症例も除外した。基準を満たした患者に対し、①Time 1: 治療方針を決定する前（外来もしくは検査入院中）、②Time 2: 精査の結果、最終病期・治療方針決定後、③Time 3: 外科的切除施行後～最終病理結果まで（約1ヶ月）の間、④Time 4: 最終病理確定後、⑤Time 5: 外科的切除後3か月後の外来受診時、の計5ポイントで、自己記入式質問紙調査を行った。質問紙にはHADS（Hospital anxiety and depression scale: 身体的疾患を有する患者の精神状態（抑うつおよび不安）の指標）[9－11)]およびEORTC QLQ-C30/OES18（European Organization for Research and Treatment of Cancer QLQ-C30/OES18：QOLを評価する30の質問表および食道癌患者のQOLを評価する18の質問表）を用いた[12－15)]。なお、先行研究に従いHADSが11点以上を精神的ストレスありとした。周術期の精神的ストレスとQOLとの関係について、背景因子や臨床データ、病理組織学的因子を含めて解析を行った。

【結果】

外来受診した全152人中、質問紙データが不十分であった27例、参加を拒否した11例、食道切除術を施行しなかった11例、精神疾患を有し治療中である1例を除いた102例を解析対象とした。対象の年齢中央値は68.2歳で86人（83.7%）が男性であった。このうち、他癌既往は23.5%、手術既往は35.3%であった。飲酒歴や喫煙歴を有する患者はそれぞれ86.3%、85.3%であった。手術術式は、胸部操作では胸腔鏡が88例（86.3%）、腹部操作では用手補助腹腔鏡が47例（46.1%）、腹腔鏡が31例（30.4%）、開腹が24例（23.5%）であった。術後合併症は22例(21.6%)に出現した。各治療ポイントで精神的ストレスを有する患者はTime 1 : 37例（36.3%）、Time 2 : 41例（40.2%）、Time 3 : 48例（47.1%）、Time 4 : 44例（43.1%）、Time 5 : 35例（34.3%）であった。

EORTC-QLQ C30 : 機能スケール（身体・役割・認知・情緒・社会・全般的QOL）はHADS≧11の精神的ストレスが高い群で数値が低く、QOL低下が認められた。一方、症状スケール（倦怠感・悪心/嘔吐・痛み・呼吸困難・睡眠障害・食欲不振・下痢・経済状態）は、精神的ストレスが高い群で数値が高く、有意に症状が強いことが認められた。

EORTC-QLQ OES18 : 食道癌に特有な症状スケールである嚥下、食事、逆流、食道痛、そして唾液嚥下困難、喉の詰まり、口腔内乾燥、味覚、咳嗽、発声の指標はいずれも精神的ストレスが高い群で数値が高く、術後のQOL低下と関連していることが分かった。

周術期の精神的ストレスの危険因子を解析したところ、感情状態は周術期のすべてのポイントにおいて精神的ストレスに影響を与える因子であった。機能スケールの中の身体状態や全般的QOL、さらに症状スケールの中の倦怠感は術前段階での危険因子として挙げられた。体重減少や嚥下困難といった食事に関連した因子は、主に術後1か月における危険因子であることが分かった。さらに食事に関連した因子と並び、機能スケールの社会状況も術後の危険因子として挙げられた。

術式に関しては、開腹や開胸手術は、胸腔鏡や腹腔鏡手術と比較し、術後身体的症状が有意に強く出ることが分かった。郭清範囲に関しては、QOLとの有意な相関は認めなかった。術後合併症との関連では、QOLと縫合不全や術後肺炎といったいくつかの項目との間に関連が見られたが、合併症発生率が低く、より詳細な解析は困難であった。

【考察】

本研究では、手術を中心とした食道癌患者の治療経過の中で、QOLの低下が患者に与える精神的ストレスを予測する因子になることが判明した。特に治療前は、機能スケールや全般的QOL、症状スケールといった食道癌そのものの存在に関連した指標が精神的ストレスを引き起こす因子となっているのに対し、手術治療が進むにつれて、術後は手術そのものに関連した食事スケールが精神的ストレスと強く関連していることが分かった。本検討は食道癌患者のQOLと精神的ストレスの関連について前向きデータとして検討した最初の研究となった。過去、食道癌術後1年で64%が抑うつ、80%が転移や死への恐れを抱いていると報告されている。こうした感情は術後のQOLと有意に関連している可能性も報告されている。しかしながら、一連の食道癌治療の中で、精神的ストレスとQOLがどのような相互関係があるかについてはいまだ不透明である。そこで今回各治療ポイントでの精神的ストレスとQOLの関係について前向きに検討した。

まず、HADスコアが11以上、すなわち精神的ストレスが高い患者では、手術前後の各ポイントにおいて、ほぼすべてのQOLスコアの項目で、QOLが悪いという結果であった。つまり、精神的なストレスの軽減へのアプローチが術後の症状緩和に繋がる可能性が示唆された。

2つ目として、感情状態は、周術期を通じて精神的ストレスに対する有意な危険因子になることがわかった[16)]。また、機能スケールの中の身体状態や全般的QOL、疲労感、経済状況といった指標に関しては術前に受ける精神的ストレスの危険因子になることが分かった[17)]。過去の報告でも同様の結果が得られており、また周術期の精神的ストレスはその後の追加治療にも影響を与え、不安・抑うつが癌による死亡率の増加につながると

の報告もなされている。 そのため、治療開始前から精神的なケアが、周術期の感情の浮き沈みを軽減し、精神的なストレスの軽減に寄与すると考えられた。一方で、食事に関連した項目が術後に精神的ストレスを与える危険因子になることが分かった。ひとつの原因として、手術前後の食事の仕方や飲み込み具合の変化に苦しむことが原因と考えられる。消化器外科領域で最も侵襲の高い手術のひとつである食道切除後の食事の仕方や手術の影響について、術前に丁寧に説明することで、そうしたギャップを軽減することができると考えられる。

3つ目としては、経済的な側面が治療直前に受ける精神的ストレスの危険因子となることである。治療前の患者は、多くの時間と費用がかかる多角的な食道癌治療に対する大きな不安を抱いていることが原因と考えられる。同時に癌という確定診断がつくことにより、それまで感じていた飲み込みづらさがより強くなり、治療前の精神的ストレスの危険因子となると予想される。一方、最終病理確定後には食事と同様に、社会状況も精神的ストレスの危険因子のひとつになることが分かった。原因のひとつが、術前に予想していた術後経過と実際の経過とのギャップによるものである。また、病理確定時には、多くの患者が既に退院し、自宅での生活を送っている。そのため、食事に関連した多くの問題や術前治療の副作用等による身体的問題が、家族に対する後ろめたさや申し訳なさを生じると考えられる。食道切除後は、他の術式と比較し、術後の回復に時間を要する。そのため、患者本人の精神的ストレスを軽減するには、周術期を通じて、家族を含めた周囲のサポートも極めて重要となると考えられる。

【結語】

外科的切除を行った食道癌患者の周術期の精神的ストレスは、各治療ポイントでのQOLと有意な相関があることが示唆された。

【文献】

1. Hellstadius Y, Lagergren P, Lagergren J, et al.: Aspects of emotional functioning following oesophageal cancer surgery in a population-based cohort study. Psycho-Oncology 24: 47-53, 2015
2. Hamer M, Chida Y, Molloy GJ: Psychological distress and cancer mortality. Journal of Psychosomatic Research 66: 255-258, 2009
3. Silver JK, Baima J, Mayer RS: Impairment-driven cancer rehabilitation: An essential component of quality care and survivorship. CA Cancer J Clin 63: 295-317, 2013
4. Subramaniam S, Kong YC, Chinna K, et al.: Health-related quality of life and psychological distress among cancer survivors in a middle-income country. Psycho-oncology 27: 2172-2179, 2018
5. Lagergren P, Avery KNL, Hughes R, et al.: Health-related Quality of Life Among Patients Cured by Surgery for Esophageal Cancer. Cancer 110: 686-693, 2007
6. Hulbert-Williams N, Neal R, Morrison V, et al.: Anxiety, depression and quality of life after cancer diagnosis: what psychosocial variables best predict how patients adjust?. Psycho-Oncology 21: 857-867, 2012
7. Ochiai Y, Kobori A, Nukariya K: Psychological Risk Factor of Postoperative Delirium in Patients with Gastrointestinal Cancer. Jikeikai Med J 63: 37-43, 2016
8. Hong J, Wei Z, Wang W: Preoperative psychological distress, coping and quality of life in Chinese patients with newly diagnosed gastric cancer. Journal of Clinical Nursing 24: 2439-2447, 2015
9. Zigmond AS, Snaith RP: The hospital anxiety and depression scale. Acta Psychiatr Scand 67: 361-370, 1983
10. Kugaya A, Akechi T, Okuyama T, et al.: Screening for psychological distress in Japanese cancer patients. Jpn J Clin Oncol 28: 333-338, 1998
11. Kitamura T: Hospital Anxiety and Depression Scale. Seisinka Sindangaku 4: 371-372, 1993
12. Tabano M, Condosta D, Coons M: Symp-

toms Affecting Quality of Life in Women with Gynaecologic Cancer. Seminarsin Ontology Nursing 18: 223－230, 2002
13. Fayers PM, Aaronson NK, Bjordal K, et al.: The EORTC QLQ C30 Scoring Manual (3rdEdition). European Organisation for Research and Treatment of Cancer (Brussels), 2001
14. Ayana BA, Negash S, Yusuf L, et al.: Reliability and Validity of Amharic Version of EORTC QLQ-C 30 Questionnaire among Gynecological Cancer Patients in Ethiopia. PLoS ONE 11: e0157359, 2016
15. Fujita T, Okada N, Sato T, et al.: Translation, validation of the EORTC esophageal cancer quality-of-life questionnaire for Japanese with esophageal squamous cell carcinoma: analysis in thoraco-laparoscopic esophagectomy versus open esophagectomy. Japanese Journal of Clinical Oncology 46: 615－621, 2016
16. De Boer AG, Genovesi PI: Quality of life in long-term survivors after curative transhiatal oesophagectomy for oesophageal carcinoma. Br J Surg 87: 1716－1721, 2000
17. Kim SH, Oh EG, Lee WH: Symptom experience, psychological distress, and quality of life in Korean patients with liver cirrhosis: a cross-sectional survey. International Journal of Nursing Studies 43: 1047－1056, 2006

肝切除術周術期におけるトルバプタンの安全性および有用性の検討

小林　祐太、進藤　潤一、大久保 悟志、橋本　雅司

【要約】

ウィルス性肝炎、肝硬変などにより、背景肝に障害を有する患者の肝切除の周術期において利尿剤の適切な選択はenhanced recovery after surgery（ERAS）を実践するうえで重要である。従来はループ利尿剤やアルブミン製剤に依存した術後管理法を行ってきたが、経口バソプレシンV2受容体阻害薬であるトルバプタン（Tol）の早期投与プロトコルを導入し、周術期管理における安全性と有用性について検討した。

方法: 2018年1月から2019年7月の期間に肝切除を施行した肝細胞癌の全症例を対象とした。2019年1月以前の従来プロトコルで術後管理を行った群と、2019年2月以降の、術後0日目から7日目までTol 7.5mgを投与する新プロトコルを適用した群の術後短期パラメータを比較した。

結果: Tol群32例と従来群83例を比較検討した。両群の背景因子に有意差は無かった。Tol群において術後体重増加量は1, 2, 3日目において有意に小さく（いずれも$p<0.05$）、尿量/kg/dayは1-6日目において有意に多かった（いずれも$p<0.05$）が、術後のeGFR値推移は両群間で差は無かった。術後腹水量/日と血清Alb 値推移は両群間で差が無かったが、アルブミン製剤とフロセミドの追加投与はTol 群で有意に少なかった（中央値0 vial vs.1 vial, $p=0.033$; 3.5% vs. 22.0%, $p=0.023$）。Clavien-Dindo grade 3以上の合併症頻度は両群において有意差は認めず、Tol関連の腎機能障害、副作用は見られなかった。

結語: 肝切除周術期において、Tolの早期投与は安全であり、利尿と体液管理において優れた効果を示した。

【目的】

肝細胞癌（HCC）に対する肝切除術の周術期管理は近年目覚ましく発達し、肝硬変や慢性肝炎といった背景肝の患者に対しても安全に手術が行えるようになった[1)]。こうした肝障害を有する患者はしばし門脈圧亢進症がみられ、またレニン-

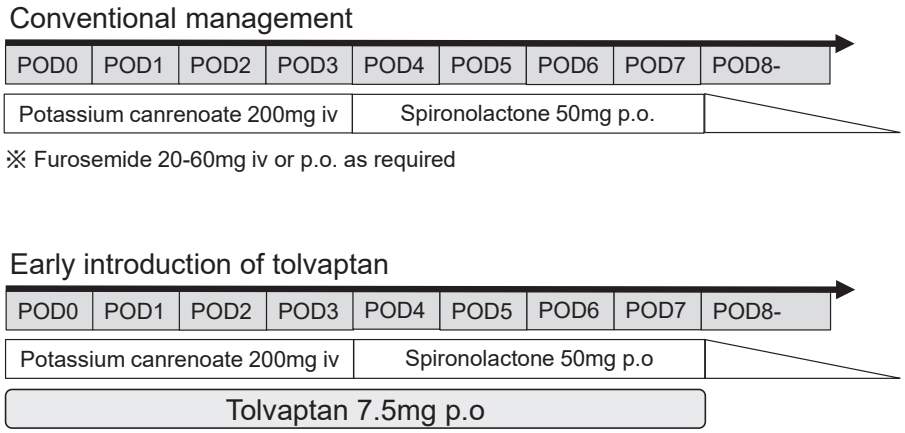


図 1　Postoperative protocols for diuretics after liver resection

アンジオテンシン-アルドステロン系・自律神経系の亢進や、バソプレシン分泌による体液中の水分、Na貯留傾向がみられる[2,3]。こうした患者は術後の体液バランス管理が難しく、難治性腹水や腎機能障害のリスクが高い。近年のenhanced recovery after surgery（ERAS）コンセプトにおいては、こうした肝障害患者に対して適切な利尿剤を選択することが重要な戦略である[4,5]。近年使用可能になったトルバプタン（Tol）はループ利尿薬に代わって、腎機能を保護しながら優れた利尿効果を示している。Tolはこれまで内科領域の慢性肝障害の治療に関する報告がほとんどであり、外科周術期使用に関するエビデンスは無かった[6-9]。従来のループ利尿薬、スピロノラクトンを中心とした管理法と比較して、Tolによる術後管理の安全性と有用性についての新たな知見を得ることを本研究の目的とした。

【方法】

2018年1月から2019年7月までの期間にHCCに対する肝切除術を実施した患者全例を対象とした。2018年1月から12月の期間、従来法による術後管理を行った群（従来群）と、2019年1月か

表１　周術期成績

	Control group N=83	Tolvaptan group N=32	*p*
Major/ minor resection [a]	11(13.3)/ 72(86.7)	1(3.1)/ 31(96.9)	0.174
Open/ laparoscopic approach	72(86.8)/ 11(13.2)	27(84.4)/ 5(15.6)	0.768
Percentage of remnant liver volume, %	94.8(38.5-99.8)	95.7(59.7-99.8)	0.965
Operation time, min	151(40-860)	152(53-278)	0.560
Estimated blood loss, ml	260(0-13200)	218(0-1335)	0.322
Transfusion	9（10.8）	2（6.3）	0.725
Additional diuretics/albumin			
Albumin preparation, vial	1（0-100）	0（0-14）	0.033
Use of furosemide	18（22.0）	1（3.5）	0.023
Peak total bilirubin	1.5（0.5-26）	1.2（0.7-3.1）	0.036
Any complication	70（41.9）	20（37.7）	0.748
Bile leakage	10（12.1）	1（3.1）	0.286
Refractory ascites [b]	6（10.2）	4（21.1）	0.246
Pleural effusion [c]	20（24.1）	2（6.3）	0.034
Respiratory complication	6（7.2）	1（3.1）	0.671
Portal vein thrombosis	5（6.0）	2（6.3）	1.000
Hypernatremia requiring intensive care	0	0	
Hemodynamic failure requiring intensive care	1（1.2）	0	1.000
Postoperative hepatic insufficiency [d]	2（2.4）	0	1.000
90-day Mortality [e]	1（1.2）	0	1.000
Major complication [f]	7（8.4）	0	0.188
Postoperative stay	10（4-198）	9（4-37）	0.485

Abbreviation: PHI, postoperative hepatic insufficiency

[a] Major resection is defined as resection of two segments or more. Minor resection is defined as resection of less than two segments.

[b] Refractory ascites was defined as more than 10ml /kg/day with drainage tube. Number excluding patients who did not have drainage tube.

[c] Pleural effusion which required additional use of diuretics or drainage.

[d] Peak total bilirubin≧7mg/dL at POD7

[e] One patients died from aspiration pneumonia.

[f] Clavien-Dindo grade Ⅲ or greater. Aspiration pneumonia（n=1）, postoperative hepatic insufficiency（n=1）, abdominal abscess（n=1）, bile leakage which required drainage（n=4）.

ら7月の期間にTolを用いた新しい管理法を行った群（Tol群）の術前の患者背景、周術期短期生成期を後方視的に比較・検討した（**図1**）。合併症に関してはClavien-Dindo分類を用いた[10]。（院内倫理委員会審査番号: No1831）

【結果】

従来群83例、Tol群32例を比較した。患者背景について、年齢中央値（69歳対68歳）、男女比（74 : 26対78 : 28）、肝硬変（F4）（43％対38％）、F2/3（57％対63％）でいずれもp>0.05で有意差はなく、またChild分類、ALBI、PALscore、ICG15分値で評価しても肝機能に有意差は認めなかった。腫瘍条件については腫瘍個数中央値（1個対1個）、最大腫瘍径中央値（22㎜対19㎜）、術前Alb、総ビリルビン、血小板、PT-INRいずれにおいても有意差を認めなかった。また術前利尿剤導入率（17％対10％、p=0.548）であった。周術期成績については、切除範囲（Major切除率13％対3％）、開腹/腹腔鏡比（87％対84％）、残肝容量/全肝容量比（95％対96％）、手術時間（151分対152分）、出血量（260ml対218ml）でいずれも有意差を認めなかった。周術期のアルブミン製剤輸血率については1vial対0vial（p=0.033）、ループ利尿薬の追加投与率は22%対4%（p=0.023）であった。術後合併症については、全合併症率は42％対38％（p=0.748）、Claviein dindo grade3以上の合併症率は8.4％対0％（p=0.188）、術後在院日数は10日対9日（p=0.485）であった（**表1**）。術後の各種パラメータについて、体重増加量は1-3日目でTol群が有意に少なく（p<0.05）、1-6日目においてTol群で有意に尿量が多かった。腹水量、術後Alb推移、eGFR推移については有意差を認めなかった（**図2**）。

【考察】

本研究は肝臓外科周術期におけるTol使用の臨床像について示す初の報告である。早期のTol導

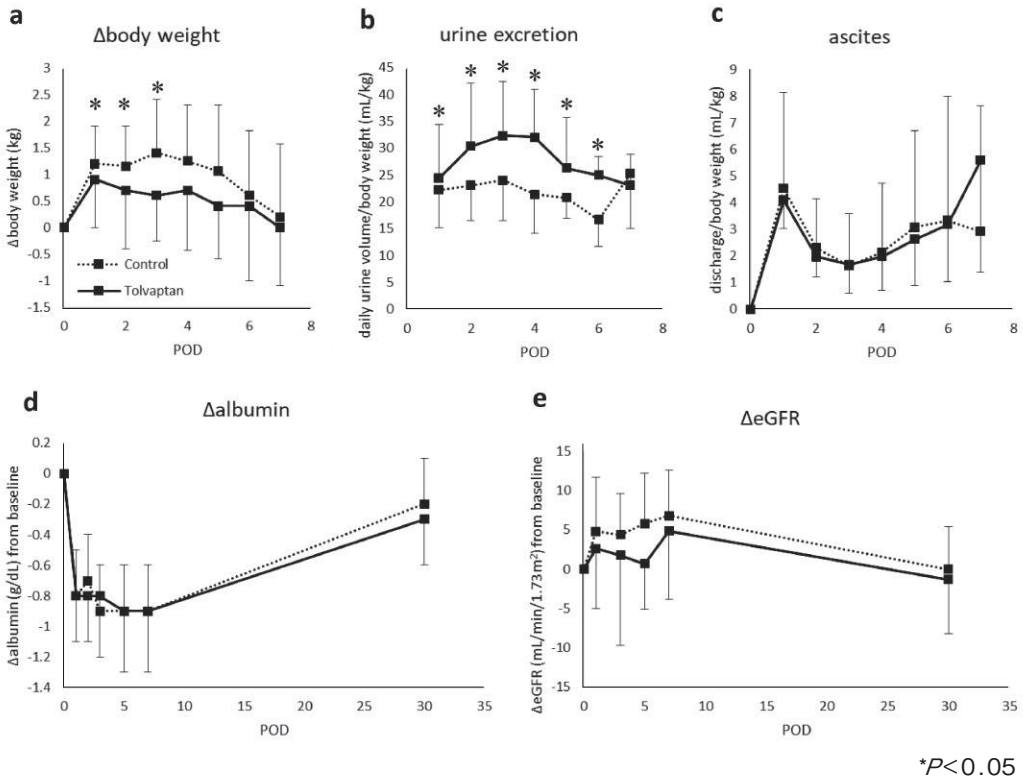


図2　Postoperative trends in clinical parameters

入による有害事象は見られず、安全に使用できることが分かった。また、従来の管理法と比較して、術後早期から優れた利尿効果を発揮し、体重増加を抑制することができた。背景に障害肝を有する患者は術後体液貯留傾向がみられ、乏尿や加体重増加が遷延することが多い。Tol群では体内の余剰な自由水を術後早期から排出させた結果、ドライサイドでの管理ができたと考える。またこれに伴う腎機能障害や電解質異常は認めず、術後胸水も24％対6％（p=0.034）と減少したのは、優れた利尿効果の反映であろう。周術期のアルブミン使用量が削減できたことも、医療経済の観点からも好ましい結果であった。従来の肝切除後はアルブミン製剤を多用することがしばしあったが、今後はアルブミン製剤に頼らない術後管理がスタンダードになるであろう。

また集学的治療の観点から、良好な腎機能を維持することは化学療法を行ううえでも、再肝切除を行ううえでも重要である。ループ利尿薬の濫用は腎障害を惹起するので、ループ利尿薬使用を削減し、Tolに代替していくことが望ましい[11, 12]。本研究の結果からはTolはループ利尿薬に代わって周術期に安全に使用でき、優れた利尿効果、体重抑制効果を示した。

本研究は後方視的研究でサンプルサイズが小さいが、両群の背景はほぼ同等であり、術後利尿剤プロトコルはTolの導入以外には変更していないため、選択バイアスは少ないと考えられる。しかし本研究はpreliminaryな結果ではあるため、将来的には前向きの試験デザインでより多くの患者を層別化して検討すべきである。

【文献】

1. Shindoh J, Makuuchi M, Matsuyama Y, et al.: Complete removal of the tumor-bearing portal territory decreases local tumor recurrence and improves disease-specific survival of patients with hepatocellular carcinoma. J Hepatol 64: 594-600, 2016
2. Angeli P, Wong F, Watson H, et al.: Hyponatremia in cirrhosis: Results of a patient population survey. Hepatology 44: 1535-1542, 2006
3. Runyon BA, Committee APG: Management of adult patients with ascites due to cirrhosis: an update. Hepatology 49: 2087-2107, 2009
4. Melloul E, Hubner M, Scott M, et al.: Guidelines for Perioperative Care for Liver Surgery: Enhanced Recovery After Surgery (ERAS) Society Recommendations. World J Surg 40: 2425-2440, 2016
5. Wang C, Zheng G, Zhang W, et al.: Enhanced Recovery after Surgery Programs for Liver Resection: a Meta-analysis. J Gastrointest Surg 21: 472-486, 2017
6. Gheorghiade M, Orlandi C, Burnett JC, et al.: Rationale and design of the multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled study to evaluate the Efficacy of Vasopressin antagonism in Heart Failure: Outcome Study with Tolvaptan (EVEREST). J Card Fail 11: 260-269, 2005
7. Decaux G, Soupart A, Vassart G: Non-peptide arginine-vasopressin antagonists: the vaptans. Lancet 371: 1624-1632, 2008
8. Veeraveedu PT, Watanabe K, Ma M, et al.: Effects of nonpeptide vasopressin V2 antagonist tolvaptan in rats with heart failure. Biochem Pharmacol 74: 1466-1475, 2007
9. Gheorghiade M, Konstam MA, Burnett JC, Jr., et al.: Short-term clinical effects of tolvaptan, an oral vasopressin antagonist, in patients hospitalized for heart failure: the EVEREST Clinical Status Trials. JAMA 297: 1332-1343, 2007
10. Clavien PA, Barkun J, de Oliveira ML, et al.: The Clavien-Dindo classification of surgical complications: five-year experience. Ann Surg 250: 187-196, 2009
11. Felker GM, Lee KL, Bull DA, et al.: Diuretic strategies in patients with acute decompensated heart failure. N Engl J Med 364: 797-805, 2011
12. Gross P: Treatment of hyponatremia. Intern

Med 47: 885-891, 2008

【発表に関する事項】

小林祐太、進藤潤一、大久保悟志、橋本雅司：肝切除周術期におけるトルバプタン（サムスカ®）の有用性、および安全性の検討．第75回日本消化器外科学会総会（和歌山）

肝細胞癌に対する解剖学的切除の意義に関する検討

進藤　潤一、橋本　雅司

【要約】

肝細胞癌に対する担癌門脈領域の解剖学的切除は微小転移を含めた切除を可能とする点において、根治性の面で有利な術式と考えられているが、その予後改善効果についてはいまだコンセンサスが得られていない。そこで本研究では、解剖学的切除の予後への影響を明らかにするとともに、予後改善をもたらすメカニズムの解明を目的とした検討を行った。当院における単発、5cm以内の初発肝細胞癌症例のうち、技術的な観点から解剖学的切除、非解剖学的切除（＝小範囲の部分切除）のいずれでも切除可能と判断される203症例を対象とし、解剖学的切除を選択した場合と非解剖学的切除を選択した場合の予後を比較検討した。背景因子はstabilized IPTW法を用いて統計学的に調整を行い、再発後の生存パターンについては離散時間の有限マルコフモデルを用いて解析を行った。解剖学的切除を行った群では、非解剖学的切除群と比較して無再発生存期間（HR, 0.51; 95% CI 0.28-0.91; P=0.023）、治療介入成功期間（HR, 0.08; 95% CI, 0.01-0.60; P=0.014）、全生存期間（HR, 0.11; 95% CI, 0.01-0.79; P=0.029）のいずれにおいても有意な延長を認め、競合リスクモデルを用いた多変量解析において局所再発率を有意に低減することが示された（HR 0.13; 95% CI, 0.02-0.97; P=0.047）。マルコフモデルを用いた再発後の腫瘍進展パターンの解析では、初回切除で解剖学的切除を選択した症例において、根治的治療の対象となるearly recurrence stageから根治的治療対象外であるintermediate recurrence stageへの遷移率が年率9.0% vs. 35.6%（P=0.027）と有意に低率であった。以上から、解剖学的切除は初発・単発の肝細胞癌における局所制御率を高め、再発後の腫瘍進展を遅らせることによって肝細胞癌患者における予後の改善をもたらす可能性が示された。

【目的】

肝細胞癌は予後不良な癌腫の1つであり、患者の長期生存を期待するために様々な切除アプローチが開発されてきた。肝細胞癌は再発が多く、再発形式が治療選択や予後に強く影響するため、適切な切除術式の選択は、肝癌治療全体を見渡した際に非常に重要な意味をもつ。初発・単発の肝細胞癌に対しては担癌門脈領域を系統的に切除する術式（解剖学的切除）が理論的に有利な術式と考えられ、長期予後の改善をもたらす可能性が報告されているが[1, 2]、一方で解剖学的切除に予後改善効果はないとする報告も散見され、その腫瘍学的観点からみた意義についてはいまだコンセンサスが得られていない。そこで本研究では、初発・単発の肝細胞癌をモデルとして解剖学的切除の意義を再検証するとともに、再発形式や再発後の癌の進行パターンの解析を通じて、手術術式が予後の差をもたらすメカニズムに迫ることを企図した。

【方法】

本検討では肝細胞癌に対する解剖学的切除の純粋な効果を検討するため、虎の門病院において2011年～2017年に肝細胞癌に対する根治的切除を行った484例のうち、初発、単発、5cm以内でCouianudの1区域内に限局し、肉眼的腫瘍栓がなく、Child-Pugh A、ICG15分値35%以内の症例を選択し、技術的に解剖学的切除、非解剖学的切除（＝小範囲の部分切除）のいずれにおいても切除可能と判断された203例を対象として解析を行った。背景因子はstabilized IPTW法を用いて統計学的に調整を行い、解剖学的切除を選択した症例（AR群）と非解剖学的切除を選択した症例（nonAR群）で予後の比較を行うとともに、両群の再発後の生存パターンについて離散時間の有限マルコフモデルを用いた解析を行った。

【結果】

表1に背景因子の比較を示す。年齢、性別、AFP値、ALT値、血小板数、ICG15分値に両群で差を認めないが、AR群では肝線維化スコアが低く、腫瘍が大きく、微小血管浸潤、低分化癌が多く、DCP値が高い傾向を認めた。腫瘍の存在部位に両群で有意差は認めないものの、AR群では手術時間が長く、出血量が多い傾向を認めた。術後合併症率に差は認めず、R1切除率も群間で差を認めなかった。Stabilized IPTW法を用いてこれら背景因子の差を統計学的に調整し、予後を比較した結果を**図1**に示す。AR群では無再発生存期間（HR, 0.51; 95% CI 0.28-0.91; P=0.023）、全生存期間（HR, 0.11; 95% CI, 0.01-0.79; P=0.029）、治療介入成功期間（time-to-interventional failure）（HR, 0.08; 95% CI, 0.01-0.60; P=0.014）のいずれにおいてもnonAR群と比較して有意に良好な結果が確認された。

表 1　背景因子の比較

	AR（n=38）	non-AR（n=165）	*P*
Age [a]	65(32-82)	67(39-87)	0.238
Gender（male）	28(74)	116(70)	0.679
HBsAg positive	20(53)	43(26)	0.001
HCV-Ab positive	11(29)	94(57)	0.002
AFP（ng/mL）[b]	6(3-79)	9(4-37)	0.510
DCP（mAu/mL）[b]	43(17-154)	26(16-49)	0.081
ALT（U/L）[b]	25(17-39)	27(19-45)	0.311
Platelet（10^4/mm^3）[b]	15.5(12.1-19.5)	15.3(10.9-18.9)	0.381
ICG-R15（%）[b]	11.9(6.8-19.0)	15.0(8.0-21.0)	0.167
Tumor size（mm）[a]	23(8-41)	18(2-50)	0.004
Tumor differentiation			
Well/moderate/poor	5(13)/20(53)/13(34)	14(8)/124(75)/27(16)	0.042
Microvascular invasion	14(37)	32(19)	0.021
Fibrosis grade [c] ≥3	19(50)	113(68)	0.031
Location of tumor			
S1/S2/S3/S4	0(0)/0(0)/1(3)/6(16)	5(3)/7(4)/19(12)/26(16)	0.573
S5/S6/S7/S8	12(32)/6(16)/8(21)/5(13)	29(18)/20(12)/26(16)/33(20)	
Operation time（min）[b]	176(145-201)	121(94-151)	<0.001
Estimate blood loss（mL）[b]	314(169-582)	114(7-263)	<0.001
R1 resection	1(3)	13(8)	0.475
Any complication	4(11)	14(8)	0.751
Major complication	1(3)	1(1)	0.340
Year of surgery			
2011-2013	18(15)	98(85)	0.177
2014-2017	20(23)	67(77)	

Parenthesis indicates percentage unless indicated. [a] median（range）, [b] median（interquartile range）. [c] Fibrosis grade 3（severe fibrosis）or 4（cirrhosis）according to the classification of Liver Cancer Study Group of Japan. *Abbreviations*. AR, anatomic resection; HBsAg, hepatitis B surface antigen; HCV-Ab, anti-hepatitic C antibody; AFP, alpha fetoprotein; DCP, des-gamma-carboxyprothrombin; ALT, alanine aminotransferase; ICG-R15, indocyanine green retention rate at 15 minutes.

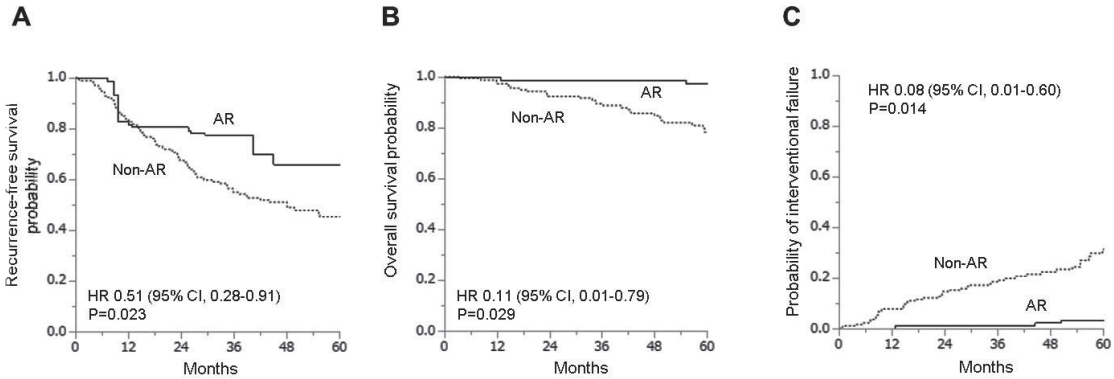


図 1　初発肝細胞癌における解剖学的切除（AR）と非解剖学的切除（nonAR）の予後の比較
A. 無再発生存率、B. 全生存率、C. 根治的治療不能再発割合（time-to-interventional failure）

表 2　競合リスクモデルを用いた再発形式に関する多変量解析

	HR（95% CI）*	*P*
Local recurrence		
Hepatitis C	5.28（1.62-17.21）	0.006
Anatomic resection	0.13（0.02-0.97）	0.047
Hepatitis B	2.49（0.75-3.57）	0.140
Fibrosis grade F3-4	1.62（0.73-3.57）	0.230
Age >65	0.65（0.33-1.31）	0.230
Male gender	1.73（0.71-4.18）	0.230
Poor tumor differentiation	1.63（0.66-4.02）	0.290
Tumor size >2 cm	1.30（0.61-2.79）	0.490
Microvascular invasion	1.32（0.54-3.19）	0.540
ICG-R15 >15%	0.92（0.47-1.81）	0.800
Other types of recurrence		
Tumor size >2 cm	0.51（0.29-0.90）	0.020
ICG-R15 >15%	1.76（1.03-2.99）	0.039
Microvascular invasion	1.80（1.02-3.20）	0.044
Hepatitis B	0.54（0.26-1.14）	0.110
Hepatitis C	0.66（0.34-1.27）	0.210
Anatomic resection	0.71（0.34-1.51）	0.370
Fibrosis grade F3-4	1.18（0.65-2.17）	0.590
Age >65	0.87（0.49-1.55）	0.640
Male gender	1.13（0.61-2.11）	0.690
Poor tumor differentiation	0.89（0.46-1.70）	0.720

*Estimated by Fine & Gray model setting the other patterns of recurrence as a competing event.
Abbreviations. HR, hazard ratio; 95% CI, 95% confidence interval; AR, anatomic resection; ICG-R15, indocyanine green retention rate at 15 min.

腫瘍の局所制御能に関する検討において、AR群の局所再発率は2.6% vs. 20.6%（P=0.007）とnonAR群に比較して有意に低率であり、競合リスクモデルを用いた多変量解析においても解剖学的切除は局所再発を有意に抑制することが示された（HR 0.13; 95% CI, 0.02-0.97; P=0.047）。一方でその他の再発形式における初回切除術式の影響は確認されなかった（**表2**）。

次に、再発後の進行のパターンから予後の差をもたらすメカニズムを解析するため、①切除後R0状態、②early recurrence stage（根治的治療の対象となる3cm3個以下の再発）、③intermediate recurrence stage（4個以上、3cm以上、切除可能な肝外転移のいずれか）、④advanced recurrence stage（主要脈管の腫瘍栓、切除不能肝外転移、Child C症例）、⑤死亡の5つの状態に分類し、それぞれの状態間の遷移率を離散時間の有限マルコフモデルにて解析してみると、AR群では術後R0状態からearly recurrence stageへの遷移率が年率5.1%であるのに対し、nonAR群では12.5%（P=0.033）と有意に高率であった。さらにearly recurrence stageからintermediate recurrence stageへの遷移率も9.0% vs. 35.6%（P=0.027）とAR群で有意に低率であることが示され、初回治療で解剖学的切除を選択していることが無再発生存期間の延長のみならず、再発後の腫瘍進展（根治的治療不能となるまでの期間）に影響を与えている可能性が示唆された。

【考察】

本研究では初発肝細胞癌に対する解剖学的切除の意義を解析した。単発、5cm以下の初発肝細胞癌においては、解剖学的切除を選択することにより、局所再発を抑制し、無再発生存期間を有意に延長できること、さらに、解剖学的切除による肝細胞癌の局所制御能の向上が、再発後の腫瘍進展を遅らせ、根治的治療介入成功期間、ひいては全生存期間の延長につながっている可能性が示唆された。

外科分野における術式選択の効果については盲見化が難しいことや倫理的な観点から無作為化比較試験による証明が困難であるため、本検討のように統計手法を駆使した観察研究で検討を行っていくことが必要となる。また本検討で取り上げた解剖学的切除は、肝臓外科分野で「高難度手術」に分類される術式であり、施設間での臨床ポリシーの違いや手術の流儀の差異などが手術のクオリティに影響し、多施設共同研究を行うことが必ずしも研究の質の向上を担保するわけではないという問題もある。したがって、一定の診療方針で手術のクオリティを担保可能なhigh volume centerでの検討が必須となる。解剖学的切除を提唱した東京大学のグループは、1990年代から一貫した診療ポリシーで肝細胞癌に対する手術の質の担保を図っており[3]、同グループからのこれまでの報告[1,4]が、肝細胞癌に対する解剖学的切除の効果に関する一応のランドマークとなる報告であり、同様の結果は後の国際多施設共同研究[2]でも確認されている。しかし解剖学的切除がなぜ、無再発生存のみならず全生存期間の延長までもたらすのか。初回再発形式や再発時の治療選択以外にその具体的なメカニズムにまで迫った報告はこれまで皆無であった。

本検討のノイエスと言える点は、適切に選択された患者集団において解剖学的切除の予後改善効果をvalidationするとともに、再発後の腫瘍の進展形式の差が最終的な予後の差を生み出している可能性を初めて示したところにある。本検討結果はあくまで初発・単発の肝細胞癌に対する外科切除術式の効果を証明したものに過ぎないが、多発肝癌や再発腫瘍といった、より複雑な背景をもつ患者集団の外科治療を考えていく上で基礎となる知見が得られたといえる。

以上、本研究において担癌門脈領域の解剖学的切除は、初発・単発の肝細胞癌における局所制御率を高め、腫瘍の再発進展を遅らせることにより、予後の改善をもたらす可能性が示された。肝細胞癌の分野では手術の質が患者の予後や運命に直結する可能性があり、腹腔鏡手術の時代においても、安全かつ精密な手術手技の開発が重要であると考えられる。

【文献】

1. Shindoh J, Makuuchi M, Matsuyama Y, et al.: Complete removal of the tumor-bearing portal territory decreases local tumor re-

currence and improves disease-specific survival of patients with hepatocellular carcinoma. J Hepatol 64: 594-600, 2016
2. Kaibori M, Kon M, Kitawaki T, et al.: Comparison of anatomic and non-anatomic hepatic resection for hepatocellular carcinoma. J Hepatobiliary Pancreat Sci 24: 616-626, 2017
3. Makuuchi M, Kosuge T, Takayama T, et al.: Surgery for small liver cancers. Semin Surg Oncol 9: 298-304, 1993
4. Hasegawa K, Kokudo N, Imamura H, et al.: Prognostic impact of anatomic resection for hepatocellular carcinoma. Ann Surg 242: 252-259, 2005

（8）間脳下垂体疾患

中枢性尿崩症で発症した下垂体炎の病態解析: IgG4、抗rabphilin-3A抗体、MRI所見、組織所見の検討

西岡　宏、井下　尚子[1]
東京都健康長寿医療センター病理部[1]

【要約】

血中IgG4や 抗R-3A抗体などの検索だけでなく、生検を行っても診断確定が困難な尿崩症発症「下垂体炎」症例がみられる。尿崩症のみを呈する症例の中には血中IgG4高値と抗R-3A抗体陽性がオーバーラップする例があり、現時点ではIgG4値、抗R-3A抗体やIgG4免疫組織化学など各単独の陽性所見のみでの診断やステロイド投与例の評価は慎重に行う必要がある。

【目的】

中枢性尿崩症で発症する下垂体の慢性非特異的炎症性疾患はリンパ球性漏斗後葉炎（LINH）、汎下垂体炎（LPH）やIgG4関連下垂体炎を含む2次性下垂体炎など多彩であり、臨床的に鑑別診断が困難なことが少なくない。外科手術を行い組織診断が得られている症例の臨床所見、抗rabphilin-3A抗体、IgG4や組織のIgG4免疫組織化学などから、これらの多彩な病態を明らかにすることを目的とする。

【対象】

対象は尿崩症で発症し経鼻的生検術を行い下垂体炎（非特異的慢性炎症）と診断された12例（**表1**）。年齢は 36-72歳、男性7例、女性5例。尿崩症のみを呈し前葉機能低下症を認めなかった5例（A群）と前葉機能低下症も認めた7例（B群）に分けられた。12例中6例には生検術までの経過中にステロイド投与が行われていた。臨床経過、組織所見、IgG4免疫組織化学、血中IgG4値および

表 1

	Hypo -pit	Serum IgG4	IHC IgG4	R3A antibody	Complication（s）	Final diagnosis
1）72M	−	High	(+)	(+)	Rec	IgG4-itis
2）58F*	−	High	(±)	(+)	Rec	IgG4-itis
3）58M	−	N	(−)	(+)	−	LINH
4）37M	−	High	(±)	(−)	−	IgG4-itis
5）76M	−	N	(−)	(−)	−	LINH s/o
6）42M*	+	N	(±)	(+)	Retroperit fibrosis	LINH s/o
7）36F*	+	N	(±)	NE	SJS（SS-A+), Rec	IgG4-itis s/o
8）56F*	+	N	(±)	NE	−	LPH s/o
9）51F	+	N	(−)	(−)	−	LPH s/o
10）58M*	+	N	(−)	NE	−	LPH s/o
11）48M*	+	N	(−)	(−)	ICA stenosis	Pachymeningitis
12）68F	+	N	(−)	(−)	double vision	Pachymeningitis

R3A: Rabphilin-3A, LPH: Lymphocytic panhypophysitis, *: steroidsused before biopsy

抗rabphilin-3A抗体（抗R-3A抗体）を検討し診断確定の問題点を考察した。

【結果】

血中IgG4高値（>135 mg/dl）を認めたのは12例中3例（全てA群）。そのうちの2例は下垂体茎の腫大がステロイド治療後に改善したが、その再燃とともにIgG4高値を示した（症例1と2）。組織学的に種々の程度のリンパ球・形質細胞浸潤を全例に認めたが、IgG4高値の2例（症例2と4）でもIgG4陽性細胞は少数であり、IgG4関連下垂体炎と組織診断できたのは1例（症例1）だけだった。一方、抗R-3A抗体は検索したA群5例中3例とB群4例中1例で陽性であった。A群の2例ではIgG4高値かつ抗R-3A抗体陽性であった。症例数は少ないがステロイド使用と抗R-3A抗体陽性には相関を認めなかった。

【考察】

尿崩症で発症する下垂体炎症例に対する生検術はジャーミノーマや転移性腫瘍などの腫瘍性病変との鑑別には有効であり、また特異的な組織像が得られればランゲルハンス組織球症などの肉芽腫性疾患の確定診断が得られる。これに対して非特異的な炎症所見のみであった場合、安易にLINHと診断するべきではないがその原因病変・疾患の鑑別は困難なことが少なくない。

LINHには「診断の手引き（日本内分泌学会）」が報告されているが、診断にもっとも重要なのは他疾患・病変の除外である。近年、感度・特異度の高いLINHの診断マーカーとして抗R-3A抗体が本邦で報告され[1)]、診断だけでなく病勢のフォローや病態解析などへの利用が期待されている。一方、IgG4関連疾患も本邦から発信された新たな疾患概念であり、その一部分症であるIgG4関連下垂体炎も「診断の手引き（日本内分泌学会）」が報告されている。IgG4関連病変を他組織に認める場合の診断は容易だが、下垂体炎単独発症例では診断は困難ことが多い。今回の検討では尿崩症のみで発症する下垂体炎の中には血中IgG4高値と抗R-3A抗体陽性がオーバーラップする症例を2例認めた。IgG4関連下垂体炎も自己免疫機序が推測されており[2)]、両者は異なる疾患単位ではあるが共通する病態の関与が示唆された。

今回、血中IgG4高値3例の中でIgG4陽性形質細胞を多数認めたのは1例のみであった。これまでも同様な傾向が報告されており、生検前の（補充目的を含めた）ステロイドの影響が指摘されている。しかし今回ステロイド非使用例の1例でもIgG4陽性細胞はごく少数であり（症例4）、下垂体と他の組織におけるIgG4関連炎症性病変との組織像の違いが示唆された。

一方、頭蓋咽頭腫やラトケ嚢胞などに伴う非特異的な慢性炎症でもIgG4陽性形質細胞はしばしば集簇して認められることがある[3)]。このためIgG4免疫組織化学の陽性所見のみからIgG4関連下垂体炎の診断を行うには注意が必要である。

【結語】

血中IgG4や抗R-3A抗体などの検索だけでなく生検を行っても診断確定が困難な尿崩症発症「下垂体炎」症例がみられる。特に尿崩症のみを呈する症例の中には血中IgG4高値と抗R-3A抗体陽性がオーバーラップする例が存在する。現時点ではIgG4値、抗R-3A抗体やIgG4免疫組織化学など各単独の陽性所見のみでの診断やステロイド投与例の評価は慎重に行う必要があり、今後さらに多数例での詳細な解析が必要である。

【文献】

1. Iwama S, Sugimura Y, Kiyota A, et al.: Rabphilin-3A as a targeted autoantigen in lymphocytic infundibulo-neurohyophysitis. J Clin Endocr Metab 100: E946-E954, 2015
2. Takahashi Y: Mechanisms in endocrinology. Autoimmune hypopituitarism: novel mechanistic insights. Eur J Endocrinol 182: R59-R66, 2020
3. Nishioka H, Shibuya M, Haraoka J: Immunohistochemical study for IgG4-positive plasmacytes in pituitary inflammatory lesions. Endocr Pathol 21: 236-241, 2010

（9）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。虎の門病院で分離された*H. cinaedi* 91株について、倫理委員会通過後、愛知学院大学へ送付し、共同研究の形で解析中である。16S rRNAによる菌株の同定と、MLST（multilocus sequencing typing）などを用いた菌株の相同性の検証、また正確なMIC値を測定し、最適な抗菌薬治療の確立を目指す。

また、*H. cinaedi* 18株についてパルスフィールドゲル電気泳動法（PFGE法）で菌株の相同性を検証したところ、2組の患者間でほぼPFGEパターンが類似していた。1組（2名）の患者は同じ時期に同じ病室に入院していたが、別の1組（2名）の患者は虎の門病院本院と虎の門病院分院に入院していた患者であった。2名の関連性はなく、院内感染伝播のみでは説明がつかず、市中に本菌による感染が拡散している可能性が示唆された。

【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)]。近年血液培養から本菌が分離される頻度は増加している。しかしながら、同一施設内において分離された多数の菌株の遺伝的多様性を明らかにし、感染の経緯や時期別の遺伝子学的変遷について検討した研究はほとんどない。

臨床分離された*H. cinaedi* 菌株を用いた分子疫学的研究を実施することによって、*H. cinaedi* 感染症に対する疫学情報の確立に寄与することを目的とする。さらには、菌株のMIC値を測定し、最適な抗菌薬治療の確立を目指す。

【方法】

2009年3月から2018年12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* 菌株を対象とした。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[2, 3)]（195 bp; forward primer: 5'-AGGGATTCCACAAAGTGAGC-3'; reverse primer: 5'-TCTTGTCCTGTGCGTTCATC-3'）とした。

菌血症の原因となった菌株について、遺伝子の塩基配列解析（16S rRNAなど）、multilocus sequence typing（MLST）、clustered regularly interspaced short palindromic repeat（CRISPR）、pulsed-field gel electrophoresis（PFGE）などを用いた分子疫学的検討を愛知学院大学薬学部微生物学講座との共同研究として行った。

PFGE法は以下の条件で実施した[4)]。制限酵素はSpe I（Takara Bio Inc.）を用いた。20 unitの制限酵素で37℃、一晩反応させた。電気泳動は以下の条件で行った。電圧 6 V/cm, 120° included angle, スイッチングタイム2.9-17.4 seconds, 泳動時間27時間, 1% agarose gels, 0.5 × TBE buffer。

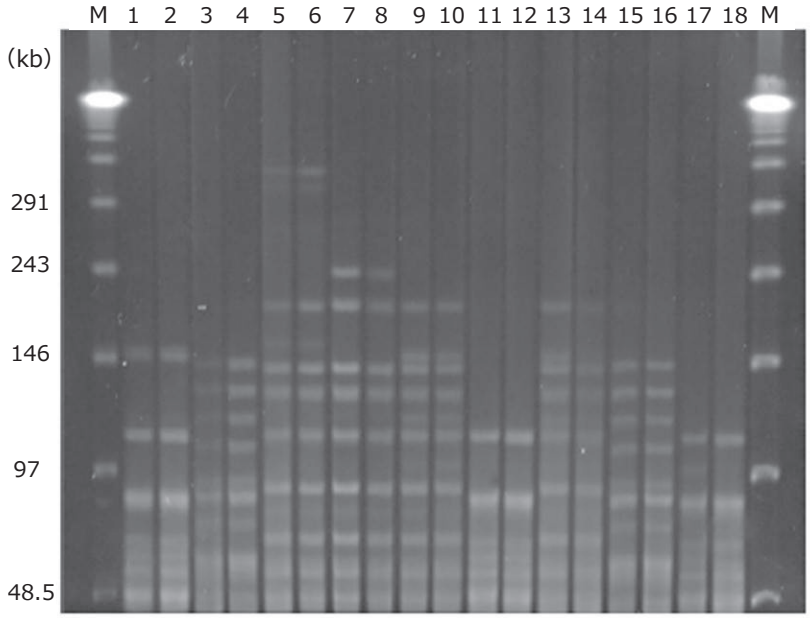


図１　９患者18株の*Helicobacter cinaedi*のパルスフィールドゲル電気泳動法解析結果
Lines 1/2, No. 1患者の血液/便由来検体; lines 3/4, No. 2患者の血液/便由来検体; lines 5/6, No. 3患者の血液/便由来検体; lines 7/8, No. 4患者の血液/便由来検体; lines 9/10, No. 5患者の血液/便由来検体; lines 11/12, No. 6患者の血液/便由来検体; lines 13/14, No. 7患者の血液/便由来検体; lines 15/16, No. 8患者の血液/便由来検体; lines 17/18, No. 9患者の血液/便由来検体; line M, lambda ladder（Bio-Rad）.

【結果】

研究期間中に168人から得られた、*H. cinaedi* 253株を対象とし、うち60人、91株について、倫理委員会通過後、愛知学院大学へ送付し、共同研究の形で解析中である。16S rRNAによる菌株の同定と、MLST（multilocus sequencing typing）などを用いた菌株の相同性の検証、また正確なMIC値を測定し、最適な抗菌薬治療の確立を目指す。残る162株についても、菌株を今後速やかに送付予定である。

また、*H. cinaedi* 9患者18株についてPFGE法で菌株の相同性を検証したところ、2組の患者間（No. 5患者とNo. 7患者、No. 6患者とNo. 9患者）でPFGEパターンが類似していた（**図1**）。No. 5患者とNo. 7患者は3か月の時期のずれがあったものの、同じ病棟の同室に入院していた。No. 6患者とNo. 9患者は虎の門病院本院と虎の門病院分院という異なる病院での入院であり、接点は認めなかった。

【考察】

次年度、本研究をさらに推進し、計253株の解析を行う予定である。そのなかで、菌株の相同性の検証を多方面から行い、また当院での患者の動きと照合し、市中感染や院内感染の評価を行う。また、菌株のMIC値を測定することで、最適な抗菌薬選択の確立を目指す。

今回、パイロット的に施行した9患者18菌株のPFGE法の結果において、少なくとも2組の患者間でPFGEパターンが類似していた。その2組の患者の動きを追ってみると、1組は院内での水平伝播が示唆され、残る1組は院内での接点がなく、市中に本菌による感染が拡散している可能性が考えられた。よって、多方面から検証を進めて、本菌の感染経路の解明を行うことが必要である。

【文献】

1.　Araoka H, Baba M, Kimura M, Abe M, In-

agawa 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: 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

3. 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

4. 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

（10）高齢者・認知症疾患

アルツハイマー型認知症のエクソソーム解析による発症素因と臨床的バイオマーカーの検索

井桁　之総、植田　幸嗣[1]、湯山　耕平[2]、逸見　功[3]
公益財団法人がん研究会、がんプレシジョン医療研究センター[1]
北海道大学大学院先端生命科学研究院・生体機能化学研究室[2]
日本赤十字看護大学[3]

【背景】

アルツハイマー型認知症（AD）ではアミロイドβ蛋白質（Aβ）とリン酸化タウ蛋白質（pTau）の神経毒性が発症に関与する。髄液Aβ42はAD発症の約25年前から低下しpTauは10年前から上昇する。2010年米国国立加齢研究所/米国アルツハイマー病協会（NIAAA）はADの全経過をPreclinicalAD、MCI due to AD、AD dementiaに分類した。2018年には臨床症状に関係なくA（Aβ低下）、T（pTau上昇）、N（総Tau上昇:神経変性）で分類するATN分類が提唱された。AD脳ではAβとTauの伝播が拡大し症状が進行するが、その機序は不明である。細胞外小胞エクソソームはAβやtauを含有/結合しこの伝播に関わるが、AD患者の体液中エクソソームの学術研究はない。

【目的】

正常、MCI、ADと診断した患者の髄液・血液エクソソーム内蛋白質からAD発病素因分子/病態修飾分子を同定し発症バイオマーカーを同定する。 同蛋白に連動する臨床的診断マーカー（骨格筋量、インスリン抵抗性、嗅覚能）を同定し、エクソソーム解析よらず臨床的バイオマーカーによるADの超早期診断を試みる。

【方法】

2017/7月から2018/6月に外来受診した40歳以上80歳までの患者60人をNIA-AA診断基準でAD、MCI、正常の3群に分けた。①WMSR、WAIS-III、MMSE、HDS-Rなど高次脳機能検査、嗅覚検査、In bodyによる骨格筋量の測定、HOMA-R/-βを測定した。髄液は0.5ccずつ分注し、血漿は分離後分注しそれぞれ-80℃で保存した。ELISAで髄液/血漿のAβ42、pTau、総Tauを測定しAD群と正常間でCut Off値を決めATN分類を行った。髄液500ulからEV Second L70カラムでエクソソームを単離しトリプシン消化後、LC/MS解析（液体クロマトグラフィー質量分析）し、蛋白質同定定量解析しプロファイル解析で候補蛋白を挙げた。その後、患者募集を2020/6月まで延期し、別検体で検証実験とし、AD 30例、MCI 13例、正常37例、計80例のCSF 500μL、血漿 400μLを超遠心法でエクソソームを調整し、各蛋白のELISAを行い、候補蛋白が実存するか検討、ADと正常で疾患特異性を検討した。一方、AD（n=23）、MCI（14）、正常（23）に分類した上記外来患者60人（平均年齢71.8±7.3）をMMSE、HDS-R、FAB、ADAS-cog、CDT、WMSRの論理的記憶IIと嗅覚能（Open essence）を評価し、髄液および血漿のAβ42、pTau、tTauとの相関を調べた。

【結果】

髄液Aβ42 535pg/ml以下、pTau 81.0pg/ml以上、総Tau 790pg/ml以上とCut off値を定め、ATN分類を行った。Pilot studyとして20検体をA+T+N+4例、A+T-N-8例、A-T+N+4例、A-T-N-4例に分類し、髄液エクソソームを分離した。その後、LC/MS解析を行い、1,756種のエクソソーム蛋白質を同定した。1）ADで1.5倍以

上増加し有意差がある検体 2）ADで0.75倍以下に減少し有意差がある検体 3）ADのみで検出された検体 4）健常のみで検出された検体の4群が有力候補であり、A+T+N+とA-T-N-で有意差がある50種類、A+T+N+のみで検出された21種類の蛋白質を検出し、A-T-N-のみで検出された4種類の計75種類を候補蛋白質とした。さらに、統計学的および過去の報告から4種の蛋白質に絞り込んだ。その後、検証実験として別検体を含むA+T+N+11例、A+T-N+7例、A+T-N- 12例、A-T+N+10例、A-T-N-30例、A-T-N+10例の髄液と血漿のエクソソームを精製し、各候補蛋白質がELISAで検出できるかを検討している。一方、臨床的バイオマーカーとして嗅覚障害のみが有用で嗅覚障害は髄液Aβ42低下、pTau/Aβ42 ratioおよび各高次脳機能検査と相関があった。ROC分析ではAD診断の髄液Aβ42低下はAUC 0.8、感度0.7、特異度0.86、同pTau/Aβ42はAUC 0.76、感度0.48、特異度0.92であり、嗅覚能はAUC 0.76、感度0.57、特異度0.84であった。AUCの差の検討では髄液Aβ42（p=0.65）とpTau/Aβ42と嗅覚能でも有意差がなく(p=0.96)、嗅覚能は髄液Aβ42やpTau/Aβ42に代用できると判断した。嗅覚能は遅延再生障害やFAB、CDTとも相関し、大脳辺縁系から前頭葉・頭頂葉の皮質に至るまでの広範な障害を示唆した。

【考察】

嗅覚能が臨床的バイオマーカーとして有用であり、エクソソーム蛋白質でAD発症に関わる候補として4種類を挙げた。

【発表に関する事項】

1. 井桁之総、逸見功、今井昌康、他: アルツハイマー型認知症の診断において嗅覚能は髄液Aβ42低下の代用になり得る. Dementia Japan 34: 136, 2020
2. 井桁之総: アルツハイマー病. 味と匂いのニューロサイエンス. CLINICAL NEUROSCIENCE 39: 228-231, 2021

（11）神経内科疾患

意欲を生み出す神経回路の解明: モデル動物を用いた研究

山田　洋
筑波大学医学医療系

【要約】

現代社会では、ヒトはお金などの報酬を得るために働き、また、競馬や競艇などのギャンブルに興じる。これらの金銭の欲求を満たすために行動する際には、効率的にお金を稼ぐことが重要である。例えば、ギャンブルであれば、過去の経験から脳が当たりの期待値を計算することで、どの程度の金額が得られそうかを予測し、賭けを行う。本研究では、報酬への欲求を満たす際に脳がどの様に働くのかを知るために、脳が当たりの期待値（確率×量）を計算する仕組みを明らかにするための研究を行った。脳の神経細胞活動を記録するための実験動物としてヒトに最も近いサルを対象に、報酬のジュースの量とその当たり確率が示されたくじを提示し、そのくじをサルが見た際に観察される脳の神経細胞活動を、大脳皮質と皮質下領域から測定した。報酬の知覚や物の良し悪しの判断に関わると考えられる脳の領域のうち、4つの領域（前頭眼窩野中央部、前頭眼窩野内側部、背側線条体、腹側線条体）の活動を比較したところ、前頭眼窩野と腹側線条体の2つの領域が期待値を計算するための活動を示すことがわかった。これらの期待値の活動は、前頭眼窩野で急速に形成されたのに対し、腹側線条体では前頭眼窩野よりも遅れて徐々に活動が形成された。この2 つの脳の領域は、解剖学的に繋がりがあることが知られており、大脳皮質とその入力を受け取る皮質下領域が協調して期待値を計算することが明らかとなった。

【背景と目的】

現代社会においては、日々の生活を送るために生涯を通してお金を稼ぐ。また、宝くじや競馬や競輪などの娯楽は、生活を豊かにする役目を果たしている。これらの金銭の欲求を満たすために行動を行う際には、利得を増やし損失を減らすことで、儲けを最大化することが重要である。利得を最大化するには、平均的に得られる利得として期待値（確率×金額）を計算することが重要であり[1)]、我々の脳はこの利益の最大化を実現するために期待値の計算を行う仕組みを備えると考えられる[2)]。この期待値の計算を行う仕組みを明らかとするために、ヒトと同じようにギャンブルを行うように訓練した実験動物のサルの脳活動を調べた。具体的には、実験動物のマカクザルにギャンブル課題を訓練し、くじを見ている最中のサルの脳から神経細胞活動の記録を行った。

【方法】

10 ヶ月ほどかけて2頭のサルにギャンブル課題（**図1**）を訓練した。訓練後、核磁気共鳴装置を用いて、脳の4つの領域（前頭眼窩野中央、前頭眼窩野内側部、背側線条体、腹側線条体）を同定し（**図2**）、各領域から150個から200個程度の単一神経細胞活動の記録を行った。

【結果】

記録した細胞は、刺激が提示されてからくじの結果が与えられるまでの間に、様々なタイミングで活動を示した。それぞれの脳領域が期待値の計算を行うかを明らかとするために、主成分分析を応用した解析技術を適用したところ、前頭眼窩野中央（cOFC）と腹側線条体（VS）が、期待値の計算を意味するベクトル方向（45度）を示した（**図3**）。従って、ジュースの価値と確率を等しく統合するこの脳の2つの領域が期待値を計算することで、くじの良し悪しを評価することが明らかとなった。

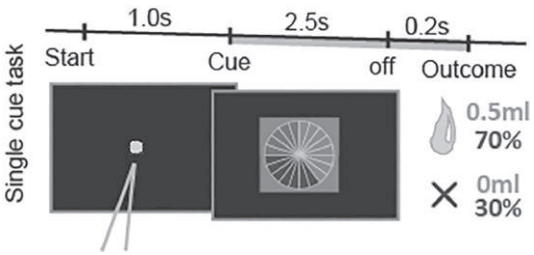


図１　ギャンブル課題

図1は、サルに提示された行動課題の流れを示す。サルが中央の点に注視すると、手がかり刺激が現れる。その後、刺激が消え、くじの結果が与えられる。手がかり刺激の上半分の緑色の区画はジュースの量を意味する。１つのパイの区画が0.1mlを意味し、0.1ml（1つ）から1.0ml（10個）まで区画の個数が変化する。下半分の青色の区画は、提示されたジュースの量が当たる確率を意味する。この図の例では、0.5mlのジュースが、70％の確率で当たることを意味する。残りの30％の確率でサルはジュースを得ることができない。サルは手がかり刺激が2つ提示された場合には、手がかり刺激から期待値を計算し、期待値の高い選択肢を選んだ。

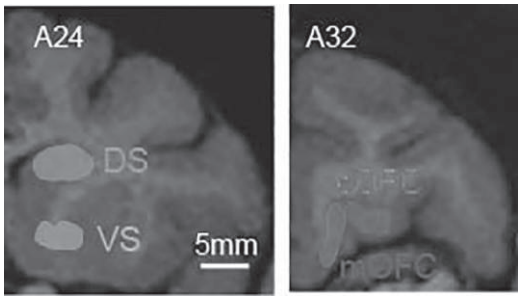


図２　神経活動の記録部位

図2は、核磁気共鳴装置を用いて測定した、1頭の動物の脳の構造画像。耳から前方方向に24ミリと32ミリの画像を示した。前頭眼窩野中央部（cOFC）、前頭眼窩野内側部（mOFC）、背側線条体（DS）、腹側線条体（VS）はそれぞれ、細胞記録を行った領域の位置を示している。

【考察】

これらの結果から、前頭眼窩野中央部-腹側線条体が期待値を生み出し、期待値の計算に関わることが明らかとなった。大脳皮質-線条体投射は様々な認知機能に関わることが知られているが[3]、この限局された脳神経回路が期待値の計算に寄与することが明らかとなり、これらの脳部位の活動の異常は、ギャンブル依存症などの金銭欲求の異常と関わる可能性が示された。

今後、この研究成果を元に、期待値の計算を健常に行うことができなくなる仕組みを明らかにすることが期待される。例えば、この前頭眼窩中央部-腹側線条体の神経回路に直接的に働きかける神経伝達物質としてドーパミンが挙げられる[4]。ドーパミン細胞の減少により発症するパーキンソン病では、その治療と症状の緩和を行う際にドーパミンの作動薬を用いる。その際に、ギャンブル依存症が併発してしまうことが知られている。ドーパミンは神経活動修飾因子として神経細胞の活動の可塑性の調節に関わることが知られており[5]、前頭眼窩中央部－腹側線条体の神経回路に

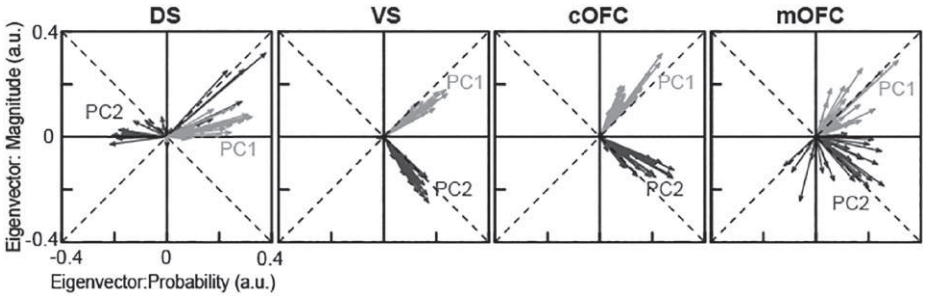


図３　集団解析

図3はそれぞれの脳の領域の集団活動から得られた固有ベクトルを示した。固有ベクトルが45°の方向を示すcOFCとVSが期待値を表した。

おけるドーパミンの働きを操作することで、ギャンブル依存症のモデルを作成することができるかもしれない。ヒトに最も近い実験動物のサルを用いてギャンブル行動のモデルを確立することで、疾患の操作や治療薬の試験をより効果的に行うことが可能になると期待される。

【文献】

1. Von Neumann J, Morgenstern O: Theory of Games and Economic Behavior. Princeton Univ Press, 1944
2. Glimcher PW, Camerer CF, Fehr E, Poldrack RA: Neuroeconomics: Decision Making and the Brain. Elsevier, 2008
3. Haber SN, Kim KS, Mailly P, Calzavara R: Reward-related cortical inputs define a large striatal region in primates that interface with associative cortical connections, providing a substrate for incentive-based learning. J Neurosci 26: 8368-8376, 2006
4. Schultz W, Dayan P, Montague PR: A neural substrate of prediction and reward. Science 275: 1593-1599, 1997
5. Reynolds JN, Hyland BI, Wickens JR: A cellular mechanism of reward-related learning. Nature 413: 67-70, 2001

【発表に関する事項】

1. Yamada H, Imaizumi Y, Matsumoto M: Neural Population Dynamics Underlying Expected Value Computation. J Neurosci, 41: 1684-1698, 2021

（12）腫瘍性疾患

がん抑制遺伝子*PHLDA3*の機能欠損を伴った神経内分泌腫瘍の新規細胞株樹立と解析

大木理恵子
国立がん研究センター研究所

【要約】

希少がんである神経内分泌腫瘍（NeuroEndocrine Tumor: NET）は、全身の様々な臓器に生じる。NET研究は、NETの適切な細胞株がないため困難であり、腫瘍発生機序が十分に解明されていない。我々は、p53標的遺伝子として、世界に先駆けて*PHLDA3*遺伝子を同定し、*PHLDA3*ががん抑制遺伝子であり、Akt抑制因子をコードしていることを明らかにした。また、①膵NET症例解析から、おおよそ7割の症例で*PHLDA3*機能が失われていること、②*PHLDA3*機能が失われている膵NET患者の予後は不良で、がんの悪性度が高いことを示した。本研究では、我々が独自に作製したヒトNETを模倣する*PHLDA3*遺伝子欠損悪性NETマウスモデル（膵臓・下垂体・甲状腺）由来のNET細胞株を樹立する。樹立した細胞を用いて、正常な神経内分泌組織が悪性NETへと変化する過程を分子レベルで解析し、NET発症の進行とともにどのような細胞内シグナルの異常が生じるか、その分子メカニズムを解明する。細胞株を用いて得られた結果は、我々が保有する550症例以上からなる世界最大級のヒトNETコホートを用いた網羅的ゲノム解析の結果と比較検証する。

【目的】

毎年の病気の発生率が人口10万人あたり6人未満と規定される希少がんの研究は、5大がんと比較し大きな遅れを取っている。希少がんの1つにNET（NeuroEndocrine Tumor）という全身に分布する神経内分泌系の細胞から発生するがんがある。肺または膵、消化管において最も頻繁に認められるが、肺、下垂体、甲状腺、副腎、卵巣、および精巣などにも見つかる。いずれの臓器のNETも希少がんであり、NET症例の収集には多大な努力を要する。我々を含む研究グループが症例を収集し、膵臓、肺、下垂体NETのゲノム解析を進めた結果、これらのNETでは代表的ながん遺伝子やがん抑制遺伝子の機能異常がないことが示された。一方でNET発症は我々が同定した*PHLDA3*を始めとしたNET独特のがん関連遺伝子により制御されており、NETの発生機序は他のがん種とは大きく異なることが判明してきた。しかし、未だにNETの適切なモデル動物や細胞株がないため、NET研究は困難であり、腫瘍発生機序が十分に解明されていない。2008年の米国からの発表では、最近30年間に、NET患者の総数が5倍以上に増加したとされており、世界レベルでNET患者が増加している。また、日本の膵NET患者は米国の3倍であるという報告もあり、特に日本で研究すべき疾患である。2011年には膵NETの全ゲノム配列が解析されたが、未だに未解明な事が多い。患者の生命を救うためにも、さらなるNETの研究は必須である。*PHLDA3*遺伝子はNETの抑制において重要な役割を果たすため、本研究を遂行する事で、NETの発症メカニズム解明に加え、NETの予後診断・治療と結びつく結果を得る。

【方法】

これまでの我々の研究によって以下のことが明らかになっている:

①ヒト膵臓・下垂体NET症例解析の結果、これらのNETでは代表的ながん関連遺伝子の異常は認められず、NETの発生機序は他のがん種とは大きく異なると予測された。

②ヒト肺・膵臓・直腸・下垂体NET症例解析の結果、これらのNETで*PHLDA3*遺伝子の高頻度（40～70%）の異常が認められる。
③ヒトNET症例では、NETの悪性化と*PHLDA3*遺伝子異常が関連する。
④*PHLDA3*欠損マウスでは、いくつかの組織の神経内分泌細胞の前がん病変や悪性度の低いNETが高頻度で発生する。
⑤*PHLDA3*欠損マウスと*MEN1*あるいは*RB*との二重欠損マウスは、6ヶ月以内にほぼ全ての個体が膵臓・下垂体・甲状腺に悪性のNETを発症する。
⑥NETマウスモデルでは、NET悪性化に伴い神経内分泌細胞の分化異常が認められる。

以上のことから、我々は、発生する臓器は違っていても神経内分泌細胞に由来するNETには共通のがん化・悪性化の経路があり、*PHLDA3*がその経路を抑制することでNET共通のがん抑制遺伝子として機能している、と考えている。さらには、臨床研究から悪性NETにはAkt経路阻害剤であるエベロリムスが著効することが明らかになっており、NET悪性化にはAkt経路が重要な役割を果たすことが示唆されている。そこで、我々は、*PHLDA3*がAkt抑制因子であることから、NETでは*PHLDA3*機能が失われることでAktが異常に活性化し、その結果として神経内分泌細胞の分化異常を伴ったがん化・未分化あるいは幹細胞的な性質の獲得が起こり、NET発症と悪性化に繋がるのではないかとの仮説を立てた。

しかし、*PHLDA3*機能喪失とAktの活性化が、細胞内のどのようなシグナル経路の異常を引き起こし、NET発症と悪性化に繋がるのか、その詳細な分子メカニズムは解明できていない。そこで、本研究では、我々が独自に樹立した膵・甲状腺・下垂体NETマウスモデルから細胞株を樹立し、その詳細な解析を行う。得られた結果は、世界最大級の様々な臓器由来のヒトNETコホート症例解析の結果と比較することで、臓器を超えたNET共通のがん化メカニズムを解明する。

【結果】

これまでにヒトNETゲノム異常を模倣する新規の膵臓・下垂体・甲状腺NETマウスモデルの樹立に成功した。さらに、我々はこれまでに膵NETマウスモデル由来の細胞株樹立に成功した。NET細胞の培養は非常に難しく、世界的に見てもヒト・マウスを合わせてNET細胞株は数えるほどしか存在しない。我々が樹立した細胞はヒト膵NETのゲノム異常を模倣するマウスモデル由来の細胞であり、このような細胞は世界でも他に例はない。膵臓以外の下垂体・甲状腺NETについても細胞株の樹立を進めている。また、得られた膵NET細胞株の遺伝子発現解析を行った。今後、他の臓器のNET由来の細胞株の遺伝子発現解析を行うことで各臓器のNETの性質を反映した細胞であるか詳細に解析する予定である。また樹立した細胞をマウスに移植し、元のNETの性質を受け継いだallograftを形成するか解析したいと考えている。

【考察】

独自に開発したNETマウスモデル由来の細胞株を樹立し、その細胞株を用いた解析を進めた。今後さらに研究を進め、希少がんである神経内分泌腫瘍の本態解明と、新しい予後・治療法選択のための診断法開発を目指す[1,2]。

【文献】

1. Chen Y, Ohki R: p53-*PHLDA3*-Akt Network: The Key Regulators of Neuroendocrine Tumorigenesis. Int J Mol Sci 21: 4098, 2020
2. Capodanno Y, Chen Y, Schrader J, Tomosugi M, Sumi S, Yokoyama A, Hiraoka N, Ohki R: Cross-talk among *MEN1*, p53 and Notch regulates the proliferation of pancreatic neuroendocrine tumor cells by modulating INSM1 expression and subcellular localization. Molecular Oncology: in press

【発表に関する事項】

1. Capodanno Y, Chen Y, Hiraoka N, Yokoyama A, Schrader J, Ohki R: Investigating the crosstalk between *MEN1*, p53 and Notch reveals biomarkers of formation of primary pancreatic neuroendocrine tumors. The 17th Annual ENETS conference 2020年3月（スペイン、バルセロナ）

2. Ohki R: A novel p53 downstream tumor promotion pathway, p53-IER5- HSF1 pathway, that contributes to stress resistance and tumor progression. 第43回日本分子生物学会年会 2020年12月（オンライン開催）
3. 大木理恵子: 発見後40年経過した、最も有名なガン抑制遺伝子p53の新機能. 鶴岡カンファレンス2020 2020年11月（鶴岡）

頭頸部原発神経内分泌がんの遺伝学的背景に関する研究

大本　晃弘
がん研究会有明病院総合腫瘍科

【要約】

頭頸部原発神経内分泌がん症例全27例を対象にして臨床病理学的特徴を後方視的に解析し、そのうち解析に適した14症例に対して523種類のがん関連遺伝子に関するターゲットシーケンスを施行した。局所進行例のうち根治を目指した集学的治療が施行された17例では、3年生存率53%と神経内分泌がんとしては良好な予後が得られた。ターゲットシーケンスでは11例（79%）において何らかの病的意義のある変異が検出された。*TP53*、*RB1*の病的変異の頻度は43%、21%であり、小細胞肺がんの既報告に比較すると低かった。また一部の症例において*PIK3CA*関連遺伝子や*FGFR3-TACC3*融合遺伝子が検出され、頻度は低いながら分子標的薬の奏効が期待される症例が抽出された。

【目的】

頭頸部原発神経内分泌がんは、頭頸部悪性腫瘍全体の0.3%程度と希少な疾患である[1)]。本疾患の臨床病理学的特徴ならびにその遺伝学的背景は十分に明らかとなっていない。

【方法】

報告者らは、がん研究会有明病院にて過去15年間に頭頸部原発の神経内分泌がんと診断された全27例を後方視的に解析した。全例に関して病理診断結果の確認を行い、病理学的に低分化型の小細胞がんもしくは大細胞型神経内分泌がん、かつ3種の神経内分泌マーカー（クロモグラニン、シナプトフィジン、CD56）のいずれかが陽性の症例を解析の対象とした。患者の背景情報、治療、生存期間ならびに根治的治療が行われた症例については無再発生存期間をカルテ情報により抽出した。また、病理学的サブタイプの評価を行い、Ki-67 index、p53、Rbの免疫染色を行った。加えてゲノム解析に適した切除もしくは生検標本が存在する14例についてDNA、RNA抽出を行い、523種類のがん関連遺伝子に関するターゲットシーケンスをTruSight Oncology 500（イルミナ社）を使用して行った。DNAからはsingle nucleotide variantに加えtotal mutational burden（TMB）、microsatellite instability（MSI）、RNAからはfusion geneに関する解析を施行した。variantの評価にあたってはCOSMIC、ClinVarに加え、アミノ酸変異に伴うタンパク構造の変化を考慮してpathogenic/likely pathogenic、variant of unknown significance（VUS）、benign/likely benignの3段階に分類した。またTMB ≥ 10 mut/MbをTMB-Highと判定し、MSI statusについては全130箇所のMSIマーカーサイトのうち、不安定性を有するサイトの比率を定量スコアとして算出した。

【結果】

全27例の診断時年齢は中央値64歳であり、主たる原発巣は副鼻腔（33%）、中咽頭（19%）であった（**表1**）。診断時病期については22例（81%）が局所進行例、4例が遠隔転移例であった。局所進行例のうち17例に根治を目指した集学的治療が施行され、遠隔転移例では2例に当院で化学療法が施行された。全症例の3年全生存率は39%であり、集学的治療が行われた局所進行例については3年生存率53%と神経内分泌がんとしては良好な予後であった（**図1A-C**）。局所進行例17例の3年無増悪生存期間は27%であった。生存期間に関する予後因子解析では、初発診断時の遠隔転移の存在が唯一の有意な不良因子として抽出された（ハザード比 5.1、P = 0.02）。病理学的評価では、小細胞がんが10例（42%）、大細胞型神経内分泌がんが14例（58%）であり、Ki-67 indexは中央値85%（59-99%）であった。p53過剰発現は18例（95%）、Rb陰性は6例（38%）

表 1　頭頸部原発神経内分泌がん27例の臨床的特徴

Variables	Number　(%)
Age	Median 64 (39-88)
Gender	
Male	20 (74%)
Female	7 (26%)
Smoking	
Yes	19/24 (79%)
Alcohol	
Yes	15/24 (63%)
Past history of any cancer	6/24 (25%)
Tumor location	
Paranasal	9 (33%)
Oropharynx	5 (19%)
Nasal	4 (15%)
Salivary	3 (11%)
Hypopharynx	3 (11%)
Oral cavity	1 (4%)
Larynx	2 (7%)
Clinical stage (AJCC stage)	
III	4 (15%)
IVA	14 (52%)
IVB	4 (15%)
IVC	4 (15%)
NA	1 (4%)
Initial treatment	
(Locally advanced disease)	
OP/RT/CT	4 (15%)
OP/RT	2 (7%)
OP/CT	1 (4%)
RT/CT	6 (22%)
OP	4 (15%)
CT	3 (11%)
BSC	2 (7%)
(Metastatic disease)	
CT	2 (7%)
NA	2 (7%)

OP, operation; RT, radiation therapy; CT, chemotherapy; BSC, best supportive care; NA, not available.

に認めた（**表2**）。ターゲットシーケンスでは、*TP53*、*RB1*、*PIK3CA*関連遺伝子（*PREX2*、*PIK3CA*、*PTEN*）、*NOTCH1*、*SMARCA4*におけるpathogenic/likely pathogenic variantを各々6例（43%）、3例（21%）、2例（14%）、2例（14%）、1例（7%）に検出した。免疫染色との比較においては、*RB1*変異を有する3例はいずれもRb陰性であり、*TP53*変異を有する6例のうち5例ではp53が過剰発現していた。TMBについては14例中3例が10 mut/Mb以上であったが、MSI定量スコアの分布は0.000-0.058でありMSI-Highに該当する症例は認めなかった。融合遺伝子については*FGFR3-TACC3*を1例に検出した。生存期間に関する単変量解析においてはTMB-Highの3症例とTMB-Lowの11症例では有意差はなく、*TP53*変異を有する6例と有さない8例、もしくは*TP53*もしくは*RB1*変異を有する7例といずれも有さない7例では、いずれも変異を有する症例群で予後不良な傾向があった（3年生存率　33% vs. 50%, $P = 0.10$、3年生存率21% vs. 57%, $P = 0.08$）。

【考察】

本研究は頭頸部原発神経内分泌がんに対する、遺伝学的背景を含めた初の包括的な検討である。Ki-67 indexが高値であり病理学的には高悪性度の腫瘍にも関わらず、とりわけ局所進行例においては臨床的な予後は比較的良好であった。

遺伝子解析の結果では11例（79%）の症例において何らかの病的意義を有する変異が検出された。肺の神経内分泌がんである小細胞肺癌ではほぼ必発する*TP53*、*RB1*変異の頻度は、今回の検討ではさほど高頻度ではなく、形態学的に類似する神経内分泌がんの遺伝学的な多様性を示唆する所見と考えられる[2,3]。また頻度は高くはないものの、*PIK3CA*関連遺伝子変異や*FGFR3*融合遺伝子を有する症例についてはmTOR阻害薬、FGFR阻害薬[4,5]の臨床的効果が期待されるところである。本解析で*SMARCA4*変異を検出した1例については免疫染色ではBRG1の蛋白も欠損しており、病理学的にSMARCA4-deficient sinonasal carcinomaとの鑑別が議論される[6]。臨床的予後の点からは*TP53*、*RB1*変異といった小

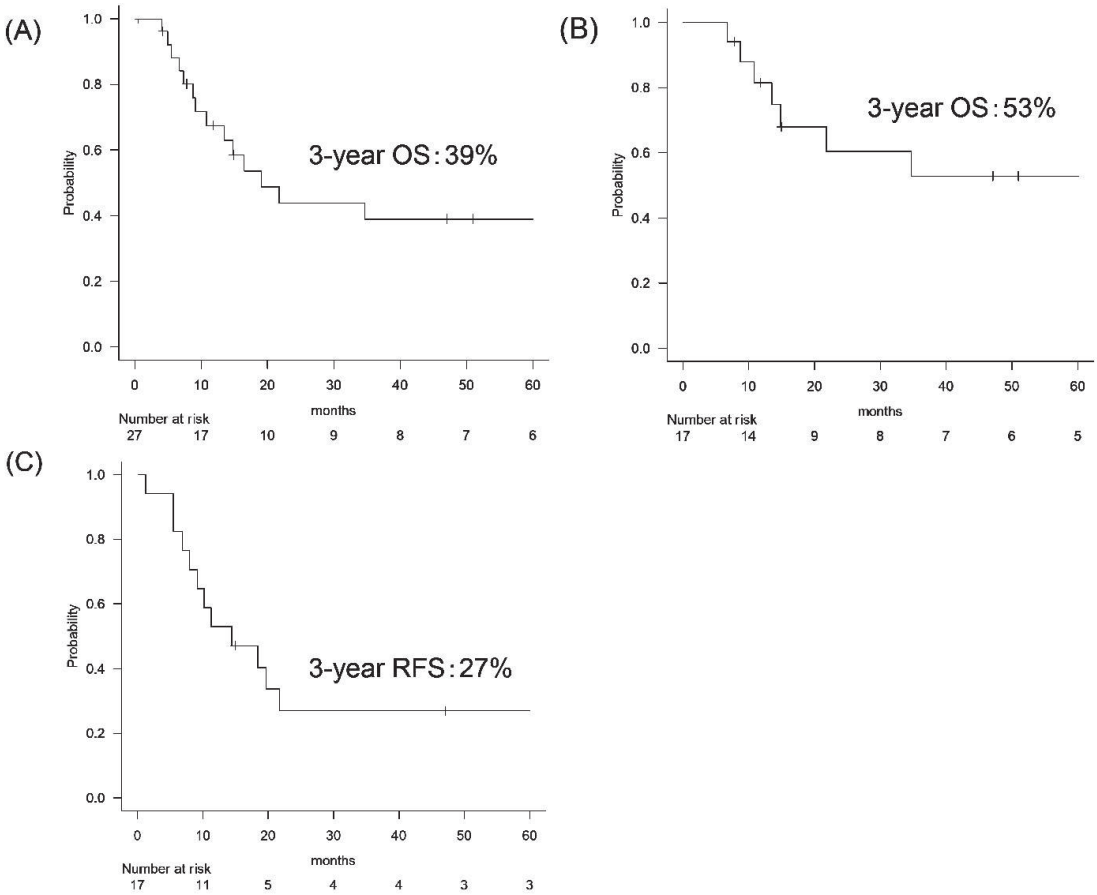


図１　頭頸部原発神経内分泌がんの臨床的予後
（A）全27例の生存期間データ
（B）集学的治療が行われた局所進行例17例の生存期間データ
（C）集学的治療が行われた局所進行例17例の無増悪生存期間データ
*OS（overall survival）: 全生存期間、RFS（relapse-free survival）：無増悪生存期間

細胞肺癌に特徴的な遺伝子プロファイルを有する症例群で生存期間が不良な傾向があり、両者は異なる生物学的特徴をもつ可能性が考えられる。この点については更なる検討が必要である。

TMBとMSIは共に免疫療法（免疫チェックポイント阻害薬）の適応を考慮する上で重要な指標であるが、両者の乖離については実臨床においてもしばしば認められる。計11,000例の悪性腫瘍例を対象にしてTMBとMSIを比較した報告によると、大腸癌では両者は95％一致したのに対して、神経内分泌腫瘍では少数例ながら一致率は40％程度であった[7]。このことは神経内分泌がんにおいては免疫療法の適応は、より複合的な指標で判断される必要性を示唆している。本疾患ではTMB-Highの3例ともに、Brinkman Index 200以上の喫煙者であった。

従来、全身の各種臓器に発症する神経内分泌がんについては概ね小細胞肺がんに準じた治療方針が採られてきたが、その基礎的データは乏しい。今後の個別化医療、新規治療の開拓を視野において、肺外神経内分泌がんの原発臓器毎の臨床病理学的、分子遺伝学的な差異を今後明らかにしてい

表２　切除・生検検体24例の病理学的特徴

Sample ID	Available tumor specimen	Pathological subtype	Ki-67 index	Rb expression	p53 overexpression	RB1 mutation	TP53 mutation
1	Biopsy	SCC	NA	NA	Pos	Not analyzed	Not analyzed
2	Biopsy	LCNEC	66%	Pos	Pos	Neg	Neg
3	Biopsy	SCC	81%	Neg	NA	Pos	Pos
4	Biopsy	LCNEC	85%	Neg	Pos	Pos	Neg
5	Biopsy	SCC	NA	NA	Pos	Not analyzed	Not analyzed
6	Biopsy	LCNEC	91%	Neg	Pos	Neg	Neg
7	Resection	LCNEC	NA	NA	Neg	Not analyzed	Not analyzed
8	Biopsy	LCNEC	99%	Neg	Pos	Neg	Pos
9	Biopsy	SCC	NA	NA	NA	Not analyzed	Not analyzed
10	Biopsy	SCC	NA	NA	NA	Not analyzed	Not analyzed
11	Biopsy	LCNEC	72%	Pos	Pos	Neg	Neg
12	Biopsy	SCC	NA	NA	NA	Not analyzed	Not analyzed
13	Biopsy	LCNEC	84%	Neg	Pos	Pos	Pos
14	Biopsy	SCC	64%	Pos	Pos	Neg	Neg
15	Resection	SCC	59%	Pos	Pos	Neg	Pos
16	Biopsy	SCC	NA	NA	NA	Not analyzed	Not analyzed
17	Biopsy	LCNEC	NA	Neg	Pos	Not analyzed	Not analyzed
18	Resection	LCNEC	87%	Pos	Pos	Neg	Neg
19	Biopsy	LCNEC	92%	Pos	Pos	Neg	Neg
20	Biopsy	LCNEC	93%	Pos	Pos	Neg	Neg
21	Resection	LCNEC	NA	Pos	Pos	Not analyzed	Not analyzed
22	Resection	LCNEC	96%	Pos	Pos	Neg	Pos
23	Biopsy	SCC	NA	NA	Pos	Not analyzed	Not analyzed
24	Resection	LCNEC	60%	Pos	Pos	Neg	Pos

SCC, small cell carcinoma; LCNEC, neuroendocrine large cell carcinoma; NA, not available; Pos, positive; Neg, negative.

く必要があるものと考える。頭頸部原発例を対象とした本研究の成果は、その基盤的な知見として重要である。

【文献】

1. Dasari A, Mehta K, Byers LA, Sorbye H, Yao JC: Comparative study of lung and extrapulmonary poorly differentiated neuroendocrine carcinomas: A SEER database analysis of 162,983 cases. Cancer 124: 807-815, 2018
2. George J, Lim JS, Jang SJ, Cun Y, Ozretić L, Kong G, et al.: Comprehensive genomic profiles of small cell lung cancer. Nature 524: 47-53, 2015
3. Bergsland EK, Roy R, Stephens P, Ross JS, Bailey M, Olshen A: Genomic profiling to distinguish poorly differentiated neuroendocrine carcinomas arising in different sites. J Clin Oncol 34 (suppl): abstr 4020, 2016
4. Loriot Y, Necchi A, Park SH, Garcia-Donas J, Huddart R, Burgess E, et al.: Erdafitinib in locally advanced or metastatic urothelial

carcinoma. N Engl J Med 381: 338-348, 2019
5. Abou-Alfa GK, Sahai V, Hollebecque A, Vaccaro G, Melisi D, Al-Rajabi R, et al.: Pemigatinib for previously treated, locally advanced or metastatic cholangiocarcinoma: a multicentre, open-label, phase 2 study. Lancet Oncol 21: 671-684, 2020
6. Agaimy A, Jain D, Uddin N, Rooper LM, Bishop JA: SMARCA4-deficient Sinonasal Carcinoma: A Series of 10 Cases Expanding the Genetic Spectrum of SWI/SNF-driven Sinonasal Malignancies. Am J Surg Pathol 44: 703-710, 2020
7. Vanderwalde A, Spetzler D, Xiao N, Gatalica Z, Marshall J: Microsatellite instability status determined by next-generation sequencing and compared with PD-L1 and tumor mutational burden in 11, 348 patients. Cancer Med 7: 746-756, 2018

【発表に関する事項】

1. Ohmoto A, Sato Y, Fujiwara Y, Fukuda N, Wang X, Urasaki T, Hayashi N, Sato Y, Nakano K, Yunokawa M, Ono M, Tomomatsu J, Takahashi S: Clinicopathological and genomic features in patients with head and neck neuroendocrine carcinoma. North American Neuroendocrine Tumor Society (NANETS) Multidisciplinary NET Medical Virtual Symposium 2020: abstract B-11, 2020

（13）脳神経外科疾患

脊髄損傷モデルに対するヒトMuse細胞の亜急性移植効果の検証

遠藤　俊毅、新妻　邦泰
東北大学大学院医学系研究科神経外科先端治療開発学分野

【要約】

Multilineage-differentiating stress enduring cell（以下Muse細胞）は骨髄由来の多能性幹細胞である。Muse細胞は、経静脈的投与で、体内の損傷部位を認識し遊走し、組織修復を行う特徴を有する。しかし、Muse細胞による脊髄損傷の治療効果は未知である。本研究ではラット脊髄損傷モデルに対して、脊髄損傷翌日にMuse細胞を経静脈的に投与し、Muse細胞移植治療による神経機能回復を検討した。

ラットの中位胸髄損傷モデルを作成し、損傷1日目にMuse細胞を含有する臨床製剤「CL2020」を経静脈的に投与した。脊髄損傷ラットはCL2020群（n = 11）と対照群（n = 15）に分けた。脊髄損傷後8週間にわたる行動評価を行ったところ、CL2020投与後の後肢運動機能は劇的に改善した。本研究の結果より、急性期脊髄損傷において、Muse細胞は経静脈的投与により脊髄損傷部に遊走し、神経細胞に分化し、神経機能回復に寄与する可能性が示された。脊髄損傷に対する臨床治療にMuse細胞の経静脈投与治療が応用できる可能性がある。

【目的】

本研究の目的は、臨床治験に使用予定であるMuse細胞含有臨床製剤「CL2020」を用いて、脊髄損傷ラットモデルを損傷1日目に経静脈的投与し、行動および組織学的評価により、脊髄損傷に対するCL2020の治療効果を実証することである。

【方法】

（1）実験動物

本研究で使用した動物は東北大学のガイドラインに従って扱われ、動物実験プロトコールは東北大学大学院医学系研究科倫理委員会の承認のもとに実施された。動物は体重 200 - 230 gの成体Sprague-Dawleyラット（日本エスエルシー株式会社、静岡、日本）を使用した。

（2）脊髄損傷

ラットに30 %の酸素と70 %の亜酸化窒素中に2.0 %のイソフルランで麻酔をかけた。手術中はフィードバック調節式加温パッド（BWT-100、バイオリサーチセンター株式会社、名古屋、日本）を用いて直腸温を37.0 ± 0.5℃に維持した。ラットを腹臥位にして、第9胸椎棘突起を触知して確認した。第9胸椎棘突起上の皮膚を剃毛し、感染症を予防するために消毒と洗浄を行った。背側正中切開を行い、第9胸椎弓を切除し背側脊髄を広範に露出した。次に、Infinite Horizon（IH）-impactor（Precision System and Instrumentation, LLC., Lexington, KY, USA）を使用し、IH-impactor テーブルに脊髄が平行になるようにラットを置いて、200 kdyneの力とdwell timeを0秒に設定した状態で脊髄に圧挫傷を加えた。

（3）CL2020の経静脈投与

脊髄損傷後1日目に、ヒト由来Muse細胞を含有する臨床製剤「CL2020」（株式会社生命科学インスティテュート、東京、日本）（CL2020群、n = 11）とDulbecco's Phosphate Buffed saline（D-PBS、フナコシ株式会社、東京、日本）（対照群、n = 15）を経静脈的に投与した。CL2020治療群には、各ラットの尾静脈から30万のMuse細胞を投与した。全てのラットに免疫抑制剤（プログラフ 0.5 mg/kg）（アステラス製薬株式会社、東京、日本）を1日おきに8週間後まで皮下投与した。

（4）行動評価

全ての動物（n = 26）の後肢運動機能を脊髄損

傷前、損傷後1日目、5日目、7日目、その後8週間目まで毎週、Basso、Beattie、Bresnahan（BBB）運動評価尺度[1]を用いて評価した。BBBスコアは各々のラットで記録して、盲目的に評価を行った。CL2020治療群と対照群との間のBBBスコアを多重測定分散分析（ANOVA）とBonferroni post hoc テストで解析を行った。全ての値は平均±標準偏差で示している。

【結果】

CL2020静脈投与による後肢運動機能の改善:

脊髄損傷後1日目にCL2020を経静脈的に投与した。CL2020治療群のラットは対照群と比較して、BBBスコアが改善した（脊髄損傷後2週から8週目）。脊髄損傷後8週目の平均BBBスコアはCL2020治療群で9.7±3.3で、対照群は6.2±3.7であった。

【考察】

本研究により、臨床製剤「CL2020」が脊髄損傷1日目に経静脈的投与されると、含有されるMuse細胞が脊髄損傷部に遊走、生着し、8週間にわたって後肢運動機能を改善させることが実証された。

Muse細胞による機能回復:

本研究では、CL2020を移植したラットは有意な運動機能改善を示した。経静脈投与したCL2020が運動機能の回復に直接寄与したか否かを評価するために、ジフテリア毒素を投与[1,3]し、移植されたヒト由来のMuse細胞を選択的に除去する方法があり今後これを行う予定である。これまでの脊髄損傷の研究により、移植された神経細胞は内因性ニューロンとシナプス結合を形成し、脊髄の神経回路を再構築することが報告されている[2,4]。また、経静脈的にMuse細胞投与した脳卒中モデルでも皮質ニューロンの順行性マーカーにより、皮質脊髄路の再構築が確認されている[3]。脊髄損傷におけるCL2020の明確な機能改善メカニズムはいまだ解明されていないが、Muse細胞が介在ニューロンに分化し、運動機能を改善したと推測される。

今回、我々は脊髄損傷に対する製剤「CL2020」による急性期静脈投与治療の効果を証明し、将来の脊髄損傷患者に対する臨床治験に向けた重要なproof of conceptを提供することができた。

【文献】

1. Basso DM, Beattie MS, Bresnahan JC: A sensitive and reliable locomotor rating scale for open field testing in rats. J Neurotrauma 12: 1-21, 1995
2. Abematsu M, Tsujimura K, Yamano M, Saito M, Kohno K, Kohyama J, et al.: Neurons derived from transplanted neural stem cells restore disrupted neuronal circuitry in a mouse model of spinal cord injury. J Clin Invest 120: 3255-3266, 2010
3. Uchida H, Niizuma K, Kushida Y, Wakao S, Tominaga T, Borlongan CV, et al.: Human Muse Cells Reconstruct Neuronal Circuitry in Subacute Lacunar Stroke Model. Stroke 48: 428-435, 2017
4. Aizawa-Kohama M, Endo T, Kitada M, Wakao S, Sumiyoshi A, Matsuse D, et al.: Transplantation of bone marrow stromal cell-derived neural precursor cells ameliorates deficits in a rat model of complete spinal cord transection. Cell Transplant 22: 1613-1625, 2013

【発表に関する事項】

1. Kajitani T, Endo T, Iwabuchi N, Inoue T, Takahashi Y, Abe T, Niizuma K, Tominaga T: Association of intravenous administration of human Muse cells with deficit amelioration in a rat model of spinal cord injury. J Neurosurg Spine Jan:1-8, 2021

（14）免疫疾患

肺滞在型メモリーCD8T細胞インフレーション機構の解明

高村　史記
近畿大学医学部免疫学教室

【要旨】

アデノウイルスベクターを経鼻免疫すると肺にて局所感染防御を担う滞在型メモリーCD8T細胞（CD8 T_{RM}）が継続的に増殖・維持（インフレーション）されるが、その機構は明らかとなっていない。本研究にて、肺細気管支周囲がCD8 T_{RM}インフレーション誘導の場であること、また、局所にて樹状細胞もしくは間質マクロファージが抗原再刺激及び1型インターフェロン等を供給することがCD8 T_{RM}インフレーション誘導に重要であることが示唆された。本成果を基にCD8 T_{RM}インフレーション誘導ワクチンの開発が望まれる。

【目的】

滞在型メモリーCD8T細胞（CD8 T_{RM}）は粘膜局所に定着し、二次感染時に感染細胞を早期破壊することで防御免疫の最先端を担っている。従って、世界的なパンデミックを引き起こしている新型コロナウイルスや、将来的なパンデミック発生が懸念されている高病原性鳥インフルエンザウイルスに対して肺CD8 T_{RM}を効果的に誘導・維持するワクチン開発が急務である。

申請者はマウスインフルエンザウイルス感染モデルを用いて、肺組織傷害後に形成される修復巣が肺実質CD8 T_{RM}分化・維持の場であることを世界で初めて特定し、この部位をRepair-associated memory depot（RAMD）と命名した[1)]。また、感染防御の最前線を担う肺気道CD8 T_{RM}もRAMDから持続的に補われていることを報告した[2)]。しかしながら、RAMD及び肺CD8 T_{RM}は治癒に伴い早期に消失してしまうことも判明した。一方、申請者はアデノウイルスベクター経鼻免疫マウスにて、通常CD8 T_{RM}とは独立して維持される循環型メモリーCD8T細胞が、感染後長期間にわたり肺CD8 T_{RM}へと増殖を伴い分化し続ける、即ち、RAMD非依存的に莫大な数のCD8 T_{RM}が肺に蓄積することを発見した[3)]。本研究ではこの肺限局的CD8 T_{RM}増殖（インフレーション）機構を解明し、ワクチン開発に応用することを目的とする。

【方法】

1. アデノウイルスベクター接種後の肺における抗原発現部位の解析

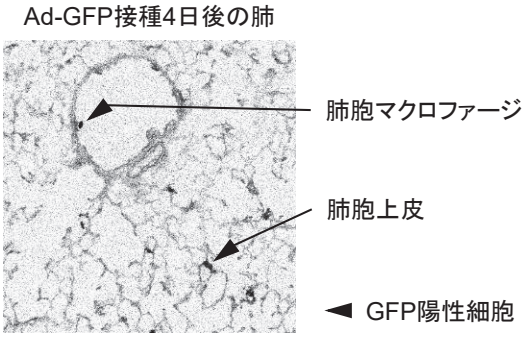
GFP発現アデノウイルスベクター（大阪大学薬学部・水口裕之教授より供与）をマウスに経鼻接種し、経時的に肺組織を採取して凍結切片を作成。多重蛍光免疫組織化学にて肺におけるGFP発現細胞を検出・同定した。

2. 肺におけるCD8 T_{RM}インフレーション誘導部位の同定

インフルエンザウイルスNPタンパク発現アデノウイルスベクター（Ad-NP）をマウスに経鼻免疫し42日後に肺を採取、HE染色にて形態を確認した。また、多重蛍光免疫染色にて増殖マーカーであるKi-67とCD8発現を指標に肺CD8 T_{RM}インフレーション部位を調べると共に、増殖CD8T細胞と接着している細胞集団の同定も試みた。

3. インフレーションを起こした肺CD8 T_{RM}の性状解析

インフルエンザウイルス×31株（H3N2）感染マウス、Ad-NP経鼻免疫マウスを感染（もしくは免疫）30日後（メモリー形成後）にパラビオーシス法にて結合し（これにより循環型と滞在型メモリーCD8T細胞の識別が可能となる）、14日後にx31感染マウスの脾臓と肺、



（蛍光免疫染色）

図 1　GFP発現アデノウイルスベクターを用いた抗原発現細胞の同定

Ad-NP経鼻免疫マウスの肺よりセルソーターを用いて抗原特異的CD8T細胞を採取し、シングルセルRNAシーケンスを行った。

【結果】

Ad-GFP経鼻免疫マウス肺の多重免疫染色にて、肺胞に存在するCD11c陽性細胞（肺胞マクロファージ）や細気管支上皮細胞及び肺胞上皮細胞にてGFPの発現が認められた（**図1**、写真は都合上白黒反転しており、GFP発現細胞を矢印で示す）。これらの細胞集団がウイルス抗原発現細胞であると考えられる。しかしながら、GFP発現は免疫12日目以降には観察されず、レポーターを用いた感染細胞検出は免疫直後にのみ有効であることが解った。

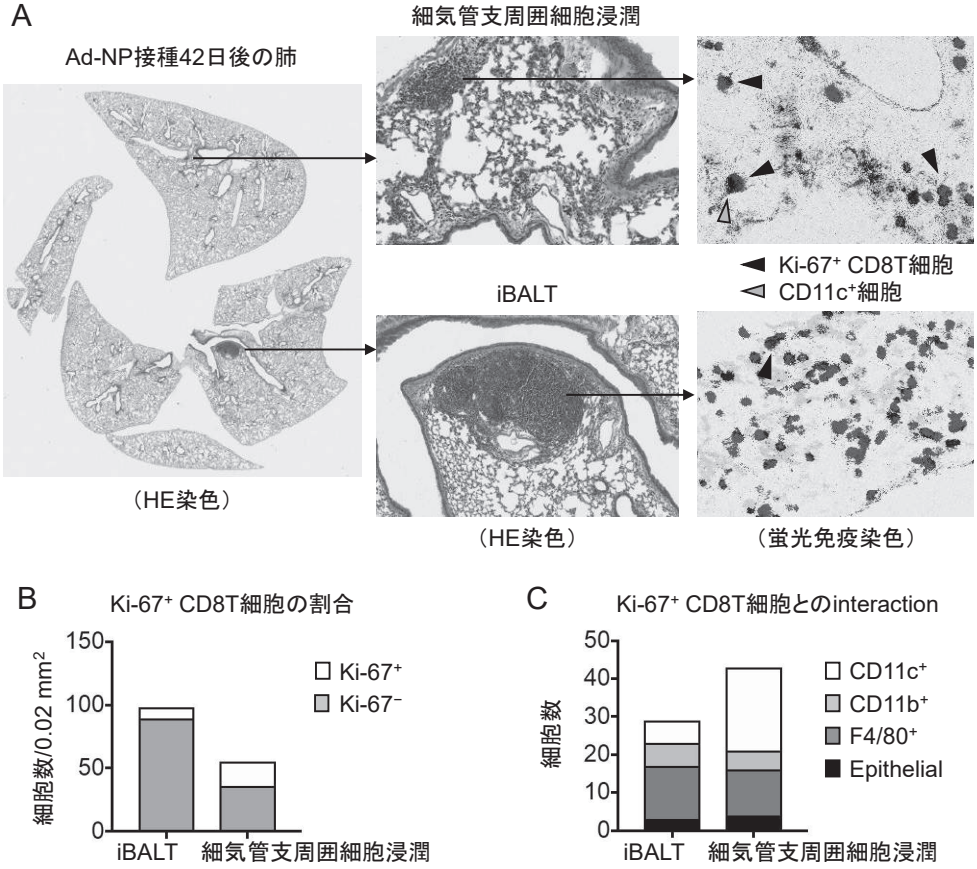


図２　アデノウイルスベクター経鼻免疫後の肺におけるCD８ T_{RM} インフレーション誘導部位の同定：
A　アデノウイルスベクター接種後の組織像及び増殖中の（Ki-67⁺）CD８T細胞免疫染色
B　各部位における増殖CD８T細胞の割合　C　増殖CD８T細胞との接着が見られた細胞の数

肺CD8 T_{RM}インフレーションが誘導されているAd-NP経鼻免疫マウスの肺（免疫後42日目）では広範囲にわたり細気管支周囲に細胞浸潤がみられ、異所性リンパ節様構造（iBALT）の形成も確認された（**図2A**）。両部位にて増殖マーカーであるKi-67発現CD8T細胞が確認されたが、その頻度は細気管支周囲細胞浸潤巣にて高かったことより、この部位が主要な肺CD8 T_{RM}インフレーション誘導部位であると示唆される（**図2A、2B**）。また、この部位に存在するKi-67発現CD8T細胞の多くがCD11c陽性樹状細胞、もしくはF4/80陽性肺間質マクロファージと近接していたことより、これらの細胞集団が局所抗原刺激を供給し、メモリーCD8T細胞の増殖（インフレーション）を誘導しているものと示唆された。

インフルエンザウイルス感染マウス、もしくはAd-NP経鼻免疫マウスより採取した肺CD8 T_{RM}のシングルセルRNAシーケンスでは、既存の知見と同様、Ad-NP経鼻免疫マウス肺CD8 T_{RM}にて強い増殖傾向が見られた（**図3A**及びデータ省略）。また、Ad-NP経鼻免疫にて誘導された肺CD8 T_{RM}はインフルエンザウイルス感染により誘導された肺CD8 T_{RM}と比較し、CD8T細胞機能を抑制する各種免疫チェックポイント因子（Haver2、Lag3、Rgs16、Klrc1、Klrd1等）発現が亢進しており、局所における抗原再刺激の影響であると考えられた（**図3B**）。更に、1型インターフェロンやIL-27等で発現誘導され、T細胞疲弊の軽減や増殖、機能亢進、長期生存にも関与する遺伝子群の発現上昇も確認され（Stat1、Ifi27L2a、Ly6a、Ccl5、AW12010等）、T_{RM}インフレーションの誘導には局所抗原刺激のみならず、これらサイトカインの刺激も関与していることが示唆された（**図3B**）。

【考察】

本研究の成果より、アデノウイルスベクターを経鼻免疫することで、初期には主に肺胞マクロファージや細気管支上皮などでウイルス抗原が発現するが、おそらく上皮などターンオーバー率が低い細胞にて抗原発現がある程度持続し、それを局所の樹状細胞やマクロファージが提示することで細気管支周囲に存在するCD8 T_{RM}を活性化し増殖（インフレーション）を誘導していることが示唆された。また、このときに1型インターフェロンやIL-27などのサイトカイン刺激も加わることが機能維持に関わっていることも示唆された。アデノウイルスベクターを用いた肺への遺伝子導入は安全面の懸念よりヒトでの応用が困難であると予測されるため、今後は今回の結果を踏まえたデリバリーツールの開発が望まれる。

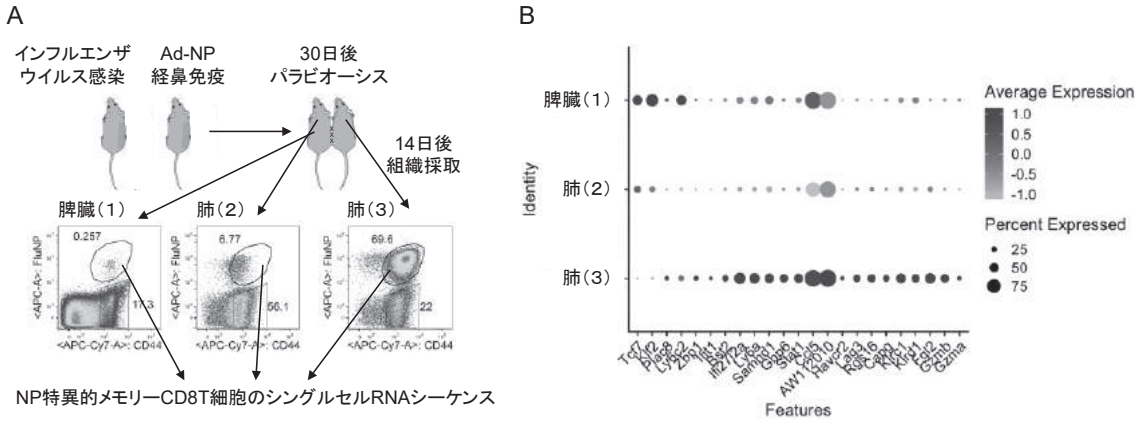


図３　インフレーションを起こした肺CD8 T_{RM}(3)の性状解析（通常のメモリーCD8T細胞（1及び2）との比較）：
Ａパラビオーシスを用いた実験系概要及び抗原特異的メモリーCD8T細胞の採取
Ｂ各群にて顕著な発現の差が見られた遺伝子とその発現量及び発現頻度

【文献】
1. Takamura S, Yagi H, Hakata Y, Motozono C, McMaster SR, Masumoto T, Fujisawa M, Chikaishi T, Komeda J, Itoh J, Umemura M, Kyusai A, Tomura M, Nakayama T, Woodland DL, Kohlmeier JE, Miyazawa M: Specific niches for lung-resident memory CD8+ T cells at the site of tissue regeneration enable CD69-independent maintenance. J Exp Med 213: 3057-3073, 2016
2. Takamura S, Kato S, Motozono C, Shimaoka T, Ueha S, Matsuo K, Miyauchi K, Masumoto T, Katsushima A, Nakayama T, Tomura M, Matsushima K, Kubo M, Miyazawa M: Interstitial-resident memory CD8+ T cells sustain frontline epithelial memory in the lung. J Exp Med 216: 2736-2747, 2019
3. Uddback I, Cartwright EK, Scholler AS, Wein AN, Hayward SL, Lobby J, Takamura S, Thomsen AR, Kohlmeier JK, Christensen JP: Long-term maintenance of lung resident memory T cells is mediated by persistent antigen. Mucosal Immunol 14: 92-99, 2021

【発表に関する事項】
1. Takamura S: Impact of multiple hits with cognate antigen on memory $CD8^+$ T cell fate. Int Immunol 32: 571-581, 2020

ヒト肺における滞在型メモリーＴリンパ球形成・集積部位の検討

宮澤　正顯[1]、大谷　明夫[2]
近畿大学医学部免疫学教室[1]
水戸済生会総合病院病理診断科[2]

【要約】
マウスのインフルエンザ感染モデルで滞在型メモリーＴ細胞の誘導部位と考えられる「修復関連メモリー集塊」と同等の組織構造が、ヒトの肺にも見出されるかを検討した。一部の切除肺には、気道粘膜上皮から離れた部位に既知の三次リンパ組織（iBALT）とは異なるリンパ球集塊が見出され、その多くは肉芽腫性病変を伴っていたが、全く肉芽腫のない肺胞間質に小さなリンパ球集塊が見出される例もあり、ヒトの修復関連メモリー集塊である可能性が考えられた。

【目的】
メモリーＴ細胞には、全身を循環して高内皮細静脈からリンパ節への出入りを繰り返すセントラルメモリー細胞と、高内皮細静脈には接着せず、末梢組織の炎症部位で細静脈から遊出するエフェクターメモリー細胞がある[1)]。最近の研究では、この他に皮膚や消化管粘膜組織に滞在型（レジデント）メモリーＴ細胞が存在し、全身を循環することなく、以前同一抗原が侵入した局所で長期にわたり再侵入に備えていることが明らかになっている[2)]。

季節性のインフルエンザウイルスは、一般成人の感染においては急激な全身症状を伴う上気道炎を起こすが、乳幼児や高齢者では致死的な肺炎を誘発することがあり、肺炎発症に対する抵抗性には、メモリーＴ細胞が関与しているとの報告がある[3)]。我々は、マウスのインフルエンザウイルス感染実験系において、肺炎病巣の修復巣に集積する上皮マーカー陽性細胞の集塊内に、メモリーＴ細胞が多数存在することを見出し、「修復関連メモリー集塊」と名付けた[4)]。この細胞集塊が、肺における滞在型メモリーＴ細胞の形成維持に関与していると考えられる[5)]。

ヒトやマウスの気道粘膜には元々粘膜関連リンパ組織は存在せず、感染や炎症刺激に伴い、三次リンパ組織として、上皮下にリンパ濾胞と高内皮細静脈を伴うinducible bronchus-associated lymphoid tissue（iBALT）が形成される[6)]。我々がマウスの肺に見出した修復関連メモリー集塊は、その気道粘膜から離れた部位や、Ｂリンパ球の濾胞を含まない点でiBALTとは異なるが[4)]、そもそもヒトの肺に同様の滞在型メモリーＴ細胞集積叢が形成されるか否かは検討されていない。

本研究は、ヒト肺に修復関連メモリー集塊に相当する組織構造が見出されるか否かを明らかにすることを目的とした。

【方法】
水戸済生会総合病院病理診断科が管理する剖検例及び肺切除症例から、気道系を含む肺組織標本約150例を抽出し、ヘマトキシリン・エオジン染色標本を確認、肺癌や転移癌など、肺組織の構築に影響が生じると考えられる病変のあるもの、及び広汎な誤嚥性肺炎のあるものを除外して、免疫組織学的解析の対象を選んだ。

リンパ球集簇巣の認められる例については、免疫組織化学的手法によりＴリンパ球、Ｂリンパ球、及び樹状細胞と上皮細胞系の分化マーカー、及び滞在型メモリーＴ細胞の表現型とされるCD69、CD49a、CD103の検出を試みた。

【結果】
大多数の剖検例では、種々の程度の誤嚥性肺炎、または二次性の細菌性肺炎を合併しており、感染に対する直接の炎症反応を、修復関連メモリー集塊の可能性がある組織反応と区別することが困難であると考えられた。そこで、解析の重点を手術による切除肺に移した。その結果、これまでに4

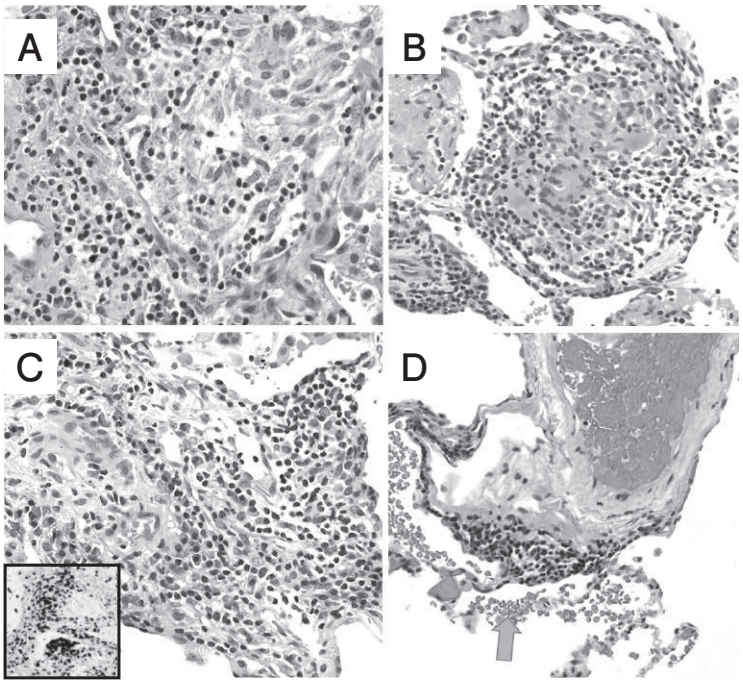


図１　気管支粘膜上皮下に形成されるiBALTとは異なるリンパ球集簇巣が認められた、肺切除標本の組織像。A, 74歳女性、肺巨細胞癌切除例の非腫瘍部。B, 67歳女性、粘液性上皮内癌の非腫瘍部。C, 77歳男性、IgG４関連疾患。肺CT検査で見出された奇形腫の非腫瘍部。左下の挿入像はCD３陽性細胞。D, 44歳女性、上皮内腺癌の非腫瘍部。

症例の肺において、マウスで観察された修復関連メモリー集塊とある程度類似した組織変化を見出すことができた（**図1**）。

Ａは肺巨細胞癌の切除例で、肉眼的に正常な上葉組織内に類上皮肉芽腫様病変を認め、リンパ球が浸潤していた。Ｂは上皮内癌の切除例で、腫瘍とは離れた肺組織内の肺胞腔内に類上皮肉芽腫様の病変を認めた。ＣはIgG４関連疾患の症例で、肺に奇形腫が認められた。腫瘍とは離れた部位に末梢気道周辺のリンパ球集簇巣が多数認められたが、Ｔリンパ球が主体であるものの、IgG４陽性の形質細胞も含まれていた。

これら肉芽腫性病原とは別に、Ｄの肺癌症例では腫瘍から離れた肉眼的に正常な肺組織で、肺胞間質に小さなリンパ球集簇巣が複数見られた。

【考察】

今回手術例で見られたリンパ球集簇巣は、何れも気管支粘膜の上皮から離れた部位に存在し、濾胞構造も含まず、iBALTとは異なる。肉芽腫性の変化を伴うものについては、何らかの感染または免疫異常に伴った組織病変の可能性があるが、症例Ｄのリンパ球集簇巣は、マウスで見られた修復関連メモリー集塊に類似した組織構造である可能性がある。今後、より多くの症例を観察するとともに、免疫組織学的解析を加え、ヒトにおける修復関連メモリー集塊の有無を明らかにしたい。

【文献】

1. 宮澤正顯: 免疫解明病理学第3版（青笹克之, 加藤光保, 菅野祐幸編）. 医歯薬出版: 89-136, 2017
2. Takamura S: Niches for the long-term maintenance of tissue-resident memory T cells. Front Immunol 9: 1214, 2018
3. Miyazawa M: Immunopathogenesis of

SARS-CoV-2-induced pneumonia: Lessons from influenza virus infection. Inflammation Regeneration 40: 39, 2020
4. Takamura S, Yagi H, Hakata Y, Motozono C, McMaster SR, Masumoto T, Fujisawa M, Chikaishi T, Komeda J, Itoh J, Umemura M, Kyusai A, Tomura M, Nakayama T, Woodland DL, Kohlmeier JE, Miyazawa M: Specific niches for lung-resident memory CD8+ T cells at the site of tissue regeneration enable CD69-independent maintenance. J Exp Med 213: 3057-3073, 2016
5. Takamura S, Kato S, Motozono C, Shimaoka T, Ueha S, Matsuo K, Miyauchi K, Masumoto T, Katsushima A, Nakayama T, Tomura M, Matsushima K, Kubo M, Miyazawa M: Interstitial-resident memory CD8+ T cells sustain frontline epithelial memory in the lung. J Exp Med 216: 2736-2747, 2019
6. Hwang JY, Randall TD, Silva-Sanchez A: Inducible bronchus-associated lymphoid tissue: Taming inflammation in the lung. Front Immunol 7: 258, 2016

【発表に関する事項】

1. Miyazawa M: Immunopathogenesis of SARS-CoV-2-induced pneumonia: Lessons from influenza virus infection. Inflammation Regeneration 40: 39, 2020

（15）皮膚疾患

エピゲノム制御に着目した悪性黒色腫の治療戦略

福本　毅、錦織 千佳子
神戸大学皮膚科学教室

【要約】

クロマチンリモデリング複合体の1つである、SWI/SNF複合体のAT-rich interactive domain-containing protein 2（ARID2）は、悪性黒色腫で高頻度に変異を認める[1)]。最近の多くの報告で、SWI/SNF複合体が腫瘍免疫を調節することが示されている[2, 3)]。2018年に代表的な2本の論文が報告され、まずPanらは、CRISPR/Cas9システムによるゲノムスクリーニングを使用して、抗腫瘍免疫で重要な働きをする細胞傷害性T細胞に対する腫瘍細胞の抵抗性に関する機序を報告した[2)]。彼らの報告によると、SWI/SNF複合体のサブユニットであるPBRM1の不活性化により、マウスの悪性黒色腫細胞は免疫チェックポイント阻害剤に良好な反応性を示すようになる[2)]。さらに、Miaoらは腎細胞癌の患者検体から全エクソーム解析を行うことで、PBRM1の機能不全のある患者群で、免疫チェックポイント阻害剤による腫瘍縮小効果と全生存期間が良いことを見出した[3)]。悪性黒色腫では、ARID2の変異はPBRM1の変異よりも高頻度に認められ[1)]、申請者らは悪性黒色腫ではARID2が患者層別バイオマーカーとして使用できるのではないかと注目していた。この研究では、ARID2の不活性化により、マウスの悪性黒色腫細胞が免疫チェックポイント阻害剤へ良好な反応を示すようになることを示した[4)]。機序として、ARID2の不活性化は、シグナル伝達タンパク質であるsignal transduction and activator of transcription1（STAT1）を活性化し、CXCL9、CXCL10、CCL5などの細胞傷害性T細胞を誘引するケモカインの発現を増加させ、腫瘍組織へ誘発された細胞傷害性T細胞が良好な免疫反応に関与している可能性を検証した[4)]。

【目的】

悪性黒色腫は最も死亡数の多い皮膚がんであり、現在第一選択薬である免疫チェックポイント阻害剤や分子標的薬の開発後も、自己免疫学的な副作用や薬剤耐性の問題が残っており、持続した効果や継続的な投与が期待できない症例も多い。また、非常に高額である免疫チェックポイント阻害剤は、最適な患者層別マーカーが存在せず費用対効果の低さが医療経済の問題となっている。そのため本研究では、悪性黒色腫に対する患者特性に併せた選択的治療戦略の確立に繋がる研究を目指し、その一つの解決策となり得る、免疫チェックポイント阻害剤の患者層別バイオマーカーの探索を行った[4)]。実臨床で使用されている患者層別バイオマーカーである腫瘍細胞のProgrammed death-ligand 1（PD-L1）発現に追加することが出来る新たなバイオマーカーの確立を目指すことで、より正確に患者特性に併せた治療戦略の選択を可能とし、医療経済の観点からも意義のある、臨床への橋渡し研究を行うことを目的とした[4)]。

【方法】

クロマチンリモデリング複合体の1つであり悪性黒色腫で約20％と変異率が高いARID2を悪性黒色腫細胞株で不活化させ、遺伝子発現を解析した。

次に、ARID2変異型悪性黒色腫細胞での免疫チェックポイント阻害剤への反応性をマウス実験で検証し、ARID2の不活化の免疫環境への影響を調べた。

その中で、ARID2が直接制御している標的候補としてSTAT1を特定し、ARID2のSTAT1への制御機構を、エピゲノム制御の観点から検証した。

【結果】

先行論文に報告されていた通り[2)]、ARID2変異型悪性黒色腫細胞では、Interferon-γ刺激に対する反応が変化していることを確認した。つまり、ARID2変異型悪性黒色腫細胞では、ARID2野生型悪性黒色腫細胞に比べ、Interferon-γ刺激によってPD-L1を高発現する[2,4)]。

そこで、ARID2変異型悪性黒色腫細胞とARID2野生型悪性黒色腫細胞を皮下接種し、腫瘍を作成したマウスに対して、免疫チェックポイント阻害剤の投与を行ったところ、ARID2野生型悪性黒色腫細胞を皮下接種したマウスでは腫瘍縮小が認められなかったが、ARID2野生型悪性黒色腫細胞を皮下接種したマウスでは腫瘍縮小を認めた[4)]。それら腫瘍組織を用いて行ったfluorescence-activated cell sorting（FACS）解析で、腫瘍縮小が認められたARID2変異型悪性黒色腫細胞を摂取したマウスの腫瘍で、細胞傷害性T細胞が多く浸潤していることが確認された[4)]。

その結果と一致して、ARID2の不活化によって、CXCL9、CXCL10、CCL5などの細胞傷害性T細胞誘引ケモカインの高発現を、腫瘍組織でも、また培養細胞でも確認した[4)]。

これら細胞傷害性T細胞誘引ケモカインの高発現は、ARID2の不活化によって活性化されたSTAT1によって生じていることを確認した[4)]。

最後に、ARID2のSTAT1への制御機構について検証するために、クロマチン免疫沈降（Chromatin immunoprecipitation, ChIP）を行い、ARID2がSTAT1を直接制御していることを示した[4)]。

【考察】

悪性黒色腫は皮膚がんの中でも最も死亡者数が多い難治性がんであり、国内年間死亡者数は約600名に上る。現在、病期Ⅳのメラノーマの一次治療として、免疫チェックポイント阻害剤が推奨されており、高い治療効果が認められる患者群が存在する。しかしながら治療効果予測が困難であり、奏効率は単剤使用において20-40％程度に留まるのが現状である。そこで、抗cytotoxic T-lymphocyte antigen 4（CTLA-4）抗体や抗PD-1抗体に加えて、抗PD-L1抗体の悪性黒色腫への適応拡大が米国で始まって、その効果が期待されている[4)]。しかし一方で、高額であるため費用対効果の課題は残されており、今後、免疫チェックポイント阻害剤の患者層別バイオマーカーの同定はより重要になると考えられる。

そのような実臨床の急務に対して本研究では、悪性黒色腫で高頻度に変異が認められるARID2の患者層別バイオマーカーとしての良好な可能性を示した[4)]。

ただし、本研究は主にマウスの悪性黒色腫細胞を用いた研究であり、今後はヒトサンプルを用いて、より実臨床に近い実験系での検証が必要である。

【文献】

1. Palmieri G, et al.: Molecular Pathways in Melanomagenesis: What We Learned from Next-Generation Sequencing Approaches. Curr Oncol Rep 20: 86, 2018
2. Pan D, et al.: A major chromatin regulator determines resistance of tumor cells to T cell-mediated killing. Science 359: 770-775, 2018
3. Miao D, et al.: Genomic correlates of response to immune checkpoint therapies in clear cell renal cell carcinoma. Science 359: 801-806, 2018
4. Fukumoto T, et al.: ARID2 deficiency correlates with the response to immune checkpoint blockade in melanoma. J Invest Dermatol: in press