

# 日本大学医学部 総合医学研究所紀要

---

Bulletin of The Research Institute of Medical Science,  
Nihon University School of Medicine

Vol.7 / December 2019

日本大学医学部総合医学研究所

Research Institute of Medical Science, Nihon University School of Medicine

## 日本大学医学部総合医学研究所紀要の発行によせて

「日本大学医学部総合医学研究所紀要 Volume 7」を発行する運びとなりました。日本大学医学部は大正14年の創立以来、大正、昭和、平成の時代を通じ『醫明博愛』の理念のもと医学の発展に寄与してまいりました。医学に関する我々の学理・技術の総合的研究の実践結果については、「日本大学医学部総合医学研究所紀要」を通じその一端を広く発信しております。

昨年から年号も令和へと変わりました。人生100年時代、と言われる昨今ですが時代は変われども人類の健康維持に関する期待と関心は普遍的であります。また、人々の医療に対する期待値は年々高まり、かつ多様化の様相を見せていると言えましょう。グローバル化の実現により医学の発展に関する人々の知識と情報量は飛躍的に伸びておりますが、未だ期待のすべてに込んでいるとは言えません。今後も我々は社会の要請に応えるべく研究進展に向け不断の努力を続けて参ります。この紀要を通じ一人でも多くの皆様に日本大学医学部総合医学研究所の研究成果が伝わり役立てていただけること、また日本大学医学部における研究の更なる発展の一助になる事を期待しております。

未筆ながら、執筆頂いた関係諸先生方に心より御礼を申し上げます。

日本大学医学部総合医学研究所 所長 槇島 誠

## 目 次

自己免疫・アレルギー疾患の難治化におけるマスト細胞の役割の解明 .....	岡山 吉道 他	1
新規腎保護因子 HCaRG/COMMD5 を標的とした腎臓病及び腎癌の治療法の開発 .....	松田 裕之 他	5
吸入療法支援のためのクラウド型在宅医療連携モデルに関する研究 .....	伊藤 玲子 他	13
病理診断ガイドアプリケーションシステムの構築 .....	中西 陽子 他	21
広範な血管内容血を生じたウェルシュ菌株のヒト血球に対する障害作用 .....	須崎 愛 他	25
神経芽腫における CHK1 阻害剤の治療効果予測マーカーの開発 .....	安藤 清宏 他	28
慢性血栓塞栓性肺高血圧症の肺動脈内膜における蛋白・遺伝子発現解析 .....	帯包 妃代 他	31
LAMP法を用いた Guiana extended-spectrum (GES) 型メタロ $\beta$ -ラクタマーゼ遺伝子検出法の開発 .....	早川 智 他	36
吸引脂肪組織を利用した脱分化脂肪細胞の調製法と機能解析 .....	風間 智彦 他	39
難治性免疫・アレルギー疾患の病態の解明と新規治療法の開発 .....	照井 正 他	43
実験用ブタの微生物学的統御とローソニア感染症 .....	藤田 順一 他	48
医学研究支援部門の利用に関する成果・業績等一覧.....		50

## INDEX

Elucidation of roles of mast cells in the pathogenesis of refractory autoimmune and allergic diseases .....	Yoshimichi OKAYAMA et. al	1
The therapeutic development targeting HCaRG/COMMD5 for kidney injuries and kidney cancers .....	Hiroyuki MATSUDA et. al	5
Study on home medical care cooperation system for inhalation therapy using the cloud type service .....	Reiko ITO et. al	13
Construction of an application for efficient pathological diagnosis .....	Yoko NAKANISHI et. al	21
Cytotoxic effects of <i>Clostridium perfringens</i> derived from massive intravascular hemolysis cases on human peripheral blood cells .....	Ai SUZAKI et. al	25
Identification of a predictive marker for response to CHK1 inhibitor in neuroblastoma therapeutics .....	Kiyohiro ANDO et. al	28
Protein and gene expression in pulmonary artery of chronic thromboembolic pulmonary hypertension .....	Hiyo OBIKANE et. al	31
A loop-mediated isothermal amplification method detecting the Guiana extended-spectrum (GES) type $\beta$ -lactamase gene .....	Satoshi HAYAKAWA et. al	36
Preparation method and functional analysis of dedifferentiated fat cells derived from liposuction fat .....	Tomohiko KAZAMA et. al	39
Development of new therapeutic strategy and investigation of the pathogenesis of severe immunological and allergic diseases .....	Tadashi TERUI et. al	43
Microbiological control of laboratory swine and Lawsonia infection .....	Junichi FUJITA et. al	48
Lists of publication and results from Utilization in Medical Research Center .....		50

# 自己免疫・アレルギー疾患の難治化における マスト細胞の役割の解明

岡山吉道<sup>1)</sup>, 豊島翔太<sup>1)</sup>, 伊崎聡志<sup>1)</sup>, 遠藤嵩大<sup>1)</sup>, 柏倉淳一<sup>2)</sup>, 布村 聡<sup>3)</sup>, 中村亮介<sup>4)</sup>,  
秋山晴代<sup>5)</sup>, 鐘ヶ江加寿子<sup>1)</sup>, 高橋恭子<sup>6)</sup>, 葉山惟大<sup>1)</sup>, 吉原重美<sup>7)</sup>, 斎藤 修<sup>1)</sup>, 照井 正<sup>1)</sup>

## Elucidation of roles of mast cells in the pathogenesis of refractory autoimmune and allergic diseases

Yoshimichi OKAYAMA<sup>1)</sup>, Shota TOYOSHIMA<sup>1)</sup>, Satoshi IZAKI<sup>1)</sup>, Takahiro ENDO<sup>1)</sup>,  
Jun-ichi KASHIWAKURA<sup>2)</sup>, Satoshi NUNOMURA<sup>3)</sup>, Ryosuke NAKAMURA<sup>4)</sup>,  
Haruyo AKIYAMA<sup>5)</sup>, Kazuko KANEGAE<sup>1)</sup>, Kyoko TAKAHASHI<sup>6)</sup>, Koremasa HAYAMA<sup>1)</sup>,  
Shigemi YOSHIHARA<sup>7)</sup>, Shu SAITO<sup>1)</sup>, Tadashi TERUI<sup>1)</sup>

### 要旨

一部の慢性特発性蕁麻疹患者血清中にはIgEに対する自己抗体（抗IgE抗体）あるいは高親和性IgE受容体（FcεRI）α鎖に対する自己抗体（抗α鎖抗体）が存在することが報告されているが、これら自己抗体によるマスト細胞活性化能は明らかにされていない。さらに、これら自己抗体のマスト細胞活性化能と臨床症状との関連性は不明である。そこで、CSU患者の抗IgE抗体、抗α鎖抗体のマスト細胞活性化能と臨床的特徴の関連性およびその役割を調べることを第一の目的とした。ウイルス感染は、喘息発作の誘因であり喘息の難治例では、感染型喘息も多く、ウイルス感染はその重要な誘因である。そこでRSウイルスによるヒトマスト細胞の活性化機序を明らかにすることを第二の目的とした。慢性特発性蕁麻疹患者群の抗IgE抗体の濃度およびマスト細胞活性化能は、健常コントロール群と比較して有意に高値であり、慢性特発性蕁麻疹の病態に関与していることが示唆された。マスト細胞にRSVを暴露すると、おそらくRSVがマスト細胞に接着し、これによってIgE依存性のIL-8産生を増強させた。従ってRSVによる急性細気管支炎罹患時にアレルゲンに暴露されると気道炎症が増強されることが示唆された。

### 1. はじめに

免疫・アレルギー疾患の難治化の病態解明、さらには難治例の治療薬の開発には、疾患モデル動物の解析のみならず、重症患者の組織、血液や鼻汁などを用いた病変部の直接的な解析が必須である。慢性特発性蕁麻疹（chronic spontaneous urticarial; CSU）や気管支喘息の難治化は、患者のQOLを著しく低下させることから社会的な問題となっており、高額な医療費が掛かる点から医療経済学的にも解決すべき課題となっている。

CSUは、原因が不明な6週間以上持続する蕁麻疹であり、マスト細胞の活性化が病態の本態であるが、マスト細胞の活性化機構は解明されていない。私達は、CSUに関しては、substance Pの新規受容体MrgX2が重症CSU患者のマスト細胞に高発現していることおよびsubstance Pのみならず好酸球顆粒タンパクが皮膚マスト細胞上のMrgX2を介して活性化することを報告した<sup>1)</sup>。一方、CSU患者血清の5～10%にIgEに対する自己抗体（抗IgE抗体）、30～45%に高親和性IgE受容体（FcεRI）α鎖に対す

1) 日本大学医学部  
2) 北海道大学大学院薬学研究院衛生化学研究室  
3) 佐賀大学医学部分子医化学分野  
4) 国立医薬品食品衛生研究所医薬安全科学  
5) 帝京平成大学薬学部薬学科  
6) 日本大学生物資源科学部  
7) 獨協医科大学医学部小児科  
岡山吉道：okayama.yoshimichi@nihon-u.ac.jp

る自己抗体（抗 $\alpha$ 鎖抗体）が存在することが報告されているが、これら自己抗体によるマスト細胞活性化能は明らかにされていない。さらに、これら自己抗体のマスト細胞活性化能と臨床症状との関連性は不明である。そこで、CSU患者の抗IgE抗体、抗 $\alpha$ 鎖抗体のマスト細胞活性化能と臨床的特徴の関連性およびその役割を調べることを第一の目的とした。

気管支喘息・喘鳴に関しては、乳幼児の反復喘鳴を起こすbiomarkerとして鼻汁中のMIP-1 $\alpha$ が有意に高いこと、初回喘鳴の段階ですでに鼻汁中にマスト細胞のメディエーターであるtryptaseやRSVウイルス（RSV）に対するIgE抗体が存在している例があることを発見した<sup>2)</sup>。ウイルス感染は、喘息発作の誘因であり喘息の難治例では、アレルゲンの明らかでない所謂、非アトピー型喘息（感染型喘息とも言う）も多く、ウイルス感染はその重要な誘因である。そこでRSVによるヒトマスト細胞の活性化機序を明らかにすることを第二の目的とした。

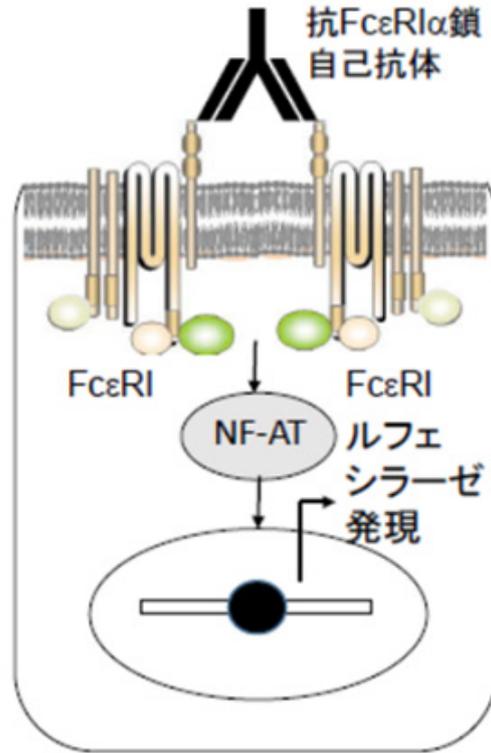


図1 改良型EXiLE法の原理

## 2. 対象及び方法

**倫理的考慮**：生命倫理に関しては、日本大学医学部倫理委員会および臨床研究委員会に研究倫理および臨床研究審査申請書を提出し、当委員会の承認を得ている（RK-15908-12, RK-160112-2およびRK-100910-11）。安全対策に関しては、日本大学医学部バイオセーフティ委員会の承認を受けて実施した。

**対象**：CSU患者108人、健常者コントロール（NC）56人の血清からIgG分画を精製した。

**抗IgE抗体、抗 $\alpha$ 鎖抗体濃度の測定**：酵素免疫測定法により、精製IgG分画中の抗IgE抗体および抗 $\alpha$ 鎖抗体濃度を測定した。抗 $\alpha$ 鎖抗体のIgG1分画とIgG4分画およびavidityも測定した。

**抗 $\alpha$ 鎖抗体および抗IgE抗体によるFceRIの架橋能の測定**：IgE crosslinking-induced luciferase expression (EXiLE) 法を用い、CSU患者群とNC群の抗 $\alpha$ 鎖抗体および抗IgE抗体によるFceRIの架橋能（マスト細胞活性化能）を測定し、それぞれを比較した。図1は、改良型EXiLE法の原理である。ラット好塩基球白血病細胞にヒト高親和性IgE受容体FceRIとNF-AT-responsive ルシフェラーゼreporter遺伝子を強制発現させた細胞を用いると抗FceRI  $\alpha$ 鎖自己抗体によるFceRIの架橋能を簡便かつ高感度に測定できる。抗IgE自己抗体の場合、IgEで感作した後、

患者の精製IgGを添加する。

**細胞**：ヒト末梢血および臍帯血培養マスト細胞はすでに報告した方法を用いて樹立した<sup>3)</sup>。ヒト末梢血より単核球を分離し、単核球からlineage negative細胞（CD4<sup>-</sup>, CD8<sup>-</sup>, CD11b<sup>-</sup>, CD14<sup>-</sup>, CD16<sup>-</sup>, およびCD19<sup>-</sup>細胞）を分離した後、臍帯血ではCD34<sup>+</sup>細胞を分離した後、stem cell factor（SCF; 200 ng/ml, PeproTech EC Ltd, London, UK）とIL-6（50 ng/ml, PeproTech EC Ltd）を含んだ無血清培地（Iscove methylcellulose medium, Stem Cell Technologies Inc., Vancouver, BC, CanadaとIscove's modified Dulbecco's medium [IMDM]）で培養した。42日目にPBSでIscove methylcellulose mediumを洗浄し、SCF（100 ng/ml）とIL-6（50 ng/ml）を含んだIMDMで培養した。ヒト滑膜マスト細胞は、滑膜組織から分離培養した<sup>4)</sup>。できるだけ新鮮な滑膜組織を採取後ただちに2% FCS + 100 U/L streptomycin/penicillin + 1% fungizoneを含んだIMDMに入れ、はさみを用いてできるだけ細切した。collagenaseとhyaluronidaseを用いて細胞を酵素的に分散させた。赤血球を除去した後、SCF（200 ng/ml）とIL-6（50 ng/ml）を含んだ無血清培地（Iscove methylcellulose medi-

umとIMDM)で培養した。42日目にPBSでIscove methylcellulose mediumを洗浄し、SCF (100 ng/ml)とIL-6 (50 ng/ml)を含んだIMDMで培養した。

**RT-PCR**：ヒト培養マスト細胞にRSV (long strain, ATCC<sup>®</sup>, Manassas, VA)を添加した後、マスト細胞の総RNAは、RNeasy mini kit (Qiagen, Valencia, CA)を用いて抽出し、精製した。500 mg/mL oligo (dT<sub>12-18</sub>) primer (Invitrogen, Carlsbad, CA), 10 mM dNTP mix (Invitrogen), 5 x first strand buffer (Invitrogen), 0.1 M DTT (Invitrogen), SuperScript III RNase H-Reverse Transcriptase (Invitrogen) および RNase OUT (Invitrogen) を用いてcDNAに逆転写を行った。RSV Fusion (F) proteinのprimerとprobeは、F, 5'-GCCAGAAGAGA ACTACCAAGGTTTAT-3'; R, 5'-CTGGCGATTGCAGATCCAA-3'; probe, 5'-ACCAAAAAACCAATGTAAC-3'を使用した。GAPDHおよびIL-8のprimerとprobeは、Applied Biosystems社 (Foster City, CA) から購入した。

**免疫化学組織染色による解析**：ヒト培養マスト細胞にRSVを添加し、RSV Fタンパク質に対する抗体を用いた免疫染色を行った。ヒト培養マスト細胞を固定して、膜の穴あけをした後、FITC標識抗RSV Fタンパク質モノクローナル抗体 (IMAGEN<sup>™</sup>, Dako-Cytomation, Glostrup, Denmark) およびアイソタイプコントロールマウスIgG1とインキュベートした。

**マスト細胞の活性化**：IgE感作したヒト培養マスト細胞にRSVを添加し、3時間インキュベートした後、細胞を洗浄した。その細胞を0.1, 1.0, 10 mg/mlの抗FceRIaモノクローナル抗体 (クローンCRA1) あるいはカルシウムイオノフォアA23187 (10<sup>-6</sup>M)で30分間あるいは24時間刺激した。ヒスタミン遊離とPGD<sub>2</sub>産生を測定するためその細胞上清あるいは細胞ペレットを回収した。サイトカイン測定では24時間刺激後、細胞上清を回収した。

**脱顆粒, PGD<sub>2</sub>産生, サイトカイン産生測定**：ヒスタミン遊離とPGD<sub>2</sub>産生は酵素免疫法, サイトカイン産生はELISA法を用いた。

**統計解析**：臨床データの2群間の統計学的解析は、Mann-Whitney U testまたはFisher's exact testを用いた。in vitroの実験の群間の統計学的解析は、Two-way ANOVA and Sidak's testsを用いた。P < 0.05を有意とした。

### 3. 結果

#### 慢性特発性蕁麻疹におけるマスト細胞活性化機構の解明 慢性蕁麻疹 (CSU) 患者における抗IgE自己抗体および抗FceRIa鎖 (α鎖) 自己抗体の臨床的意義

抗IgE抗体濃度は、CSU患者群の方がNC群よりも統計学的に有意に高値だった (P < 0.0001, cutoff value: 0.558 mg/mL)。抗IgE抗体濃度のcutoff値以上と未満のCSU患者の臨床的特徴を比較すると、cutoff値以上の患者で罹病期間が有意に長かった。抗α鎖抗体濃度は両者間に統計学的な有意差はなかった。EXILE法によるマスト細胞活性化能はCSU患者群の抗IgE抗体の方がNC群よりも統計学的に有意に高値であった (P = 0.0106, 図2)。抗α鎖抗体のIgG1/IgG4比はCSU患者群の方がNC群よりも統計学的に有意に高値だったが、avidityには有意差はなかった<sup>5)</sup>。

#### 感染型気管支喘息におけるマスト細胞活性化機構の解明 RSウイルス暴露によるヒトマスト細胞からのIgE依存性のIL-8産生の増強

RSVを暴露したマスト細胞においてRSV Fタンパク質は検出されず、RSV RNAの増幅も見られなかった。RSVの暴露によってマスト細胞からのIgE依存性ヒスタミン遊離の増強はみられなかったが、刺激12時間後にIgE依存性のIL-8 mRNAの発現は増強され、刺激24時間後にIgE依存性のIL-8産生は増強された。

### 4. 考察

CSU患者群の抗IgE抗体の濃度およびマスト細胞活性化能は、NC群と比較して有意に高値であったことから、CSU患者群の抗IgE抗体は、NC群と何か質的な違いがあることが示唆された。CSU患者において抗IgE抗体濃度と抗IgE鎖抗体によるマスト細胞活性化能には相関がなかったことから抗IgE抗体の一部がマスト細胞活性化能を有していることが示唆された。マスト細胞活性化能の機序としては、抗IgE抗体のエピトープの違い、avidityの違いやアイソタイプの違いなど様々な要因の結果である。

RSVは、ヒトマスト細胞に感染しないが、ヒトマスト細胞表面上のCX3CR1やTLR4を介して接着して細胞の活性化を増強した可能性がある。

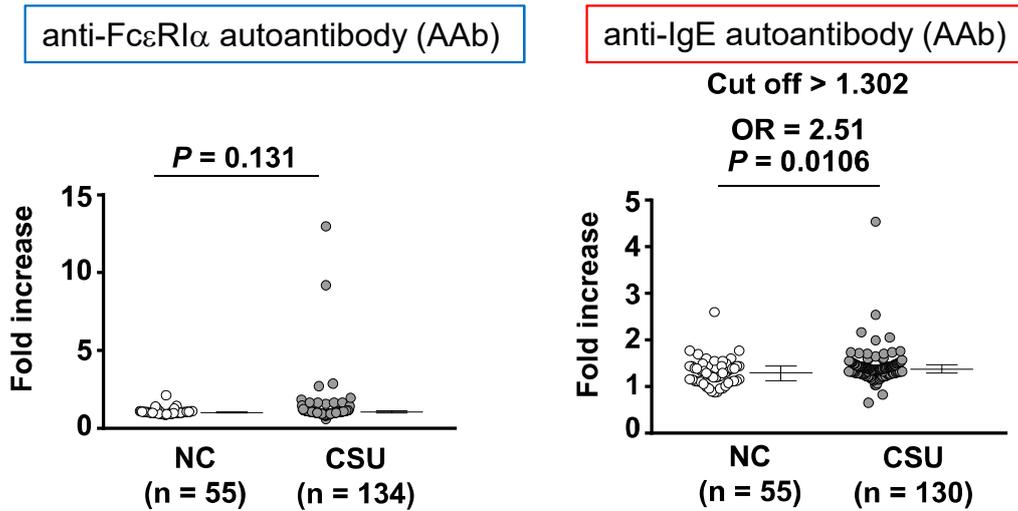


図2 抗 $\alpha$ 鎖抗体と抗IgE抗体によるマスト細胞活性化能  
CSU患者の抗IgE自己抗体によるFceRIの架橋能がNC群に比較して有意に高いことが判明した(B)。  
非刺激のfold increaseを1とした。

## 5. 結語

1. CSU患者群の抗IgE抗体の濃度およびマスト細胞活性化能は、NC群と比較して有意に高値であり、CSUの病態に関与していることが示唆された。
2. マスト細胞にRSVを暴露すると、おそらくRSVがマスト細胞に接着し、これによってIgE依存性のIL-8産生を増強させた。従ってRSVによる急性細気管支炎罹患時にアレルギーに暴露されると気道炎症が増強されることが示唆された。

## 謝辞

本研究の成果は、平成30年度日本大学学術研究助成金〔総合研究〕の支援によりなされたものであり、ここに深甚なる謝意を表します。

## 文献

- 1) Fujisawa D, Kashiwakura J, Kita H, et al. Expression of Mas-related gene X2 on mast cells is upregulated in the skin of patients with severe chronic urticaria. *J Allergy Clin Immunol* 134:622-33 e9, 2014.
- 2) Sugai K, Kimura H, Miyaji Y, et al. MIP-1alpha level in nasopharyngeal aspirates at the first wheezing episode predicts recurrent wheezing. *J Allergy Clin Immunol* 137:774-81, 2016.
- 3) Saito H, Kato A, Matsumoto K, et al. Culture of human mast cells from peripheral blood progenitors. *Nat Protoc* 1:2178-83, 2006.
- 4) Okamura Y, Mishima S, Kashiwakura JI, et al. The dual regulation of substance P-mediated inflammation via human synovial mast cells in rheumatoid arthritis. *Allergol Int* 66S:S9-S20, 2017.
- 5) Izaki S, Toyoshima S, Endo T, et al. Differentiation between control subjects and patients with chronic spontaneous urticaria based on the ability of anti-IgE autoantibodies (AAbs) to induce FcepsilonRI cross-linking, as compared to anti-FcepsilonRIalpha AAbs. *Allergol Int*, 2019 In press.

# 新規腎保護因子HCaRG/COMMD5を標的とした 腎臓病及び腎癌の治療法の開発

松田裕之<sup>1)</sup>, 舩廣善和<sup>2)</sup>

## The therapeutic development targeting HCaRG/COMMD5 for kidney injuries and kidney cancers

Hiroyuki MATSUDA<sup>1)</sup>, Yoshikazu MASUHIRO<sup>2)</sup>

### 要旨

Hypertension-related, calcium-regulated gene (HCaRG) は主に腎尿細管に強く発現し、腎虚血障害後の治癒過程において、尿細管上皮細胞の再分化を促進し、尿細管の治癒を促す分子である。今回、HCaRGの尿細管保護メカニズムを解明するために、近位尿細管特異的HCaRG高発現マウスを用いてシスプラチン腎症を作製し、実験を行った。HCaRG高発現マウスでは、シスプラチン投与後の腎機能障害・尿細管組織障害・アポトーシスが、野生型マウスに比べ有意に軽減されており、E-cadherinの発現は保たれていた。さらに、HCaRGは近位尿細管だけでなく、遠位尿細管の障害も抑制されていた。以上より、近位尿細管におけるHCaRGは、直接近位尿細管上皮細胞の保護・修復を促進するだけでなく、遠位尿細管の障害を軽減し、遠位尿細管による近位尿細管修復機構の維持に寄与することで、尿細管の恒常性を保ち、腎障害や癌の進展を抑制していると考えられた。

### 1. 緒言

日本における高血圧症、糖尿病、高脂血症患者を合わせると、延べ9000万人以上と言われ、これらの生活習慣病は心血管系臓器障害や腎臓障害を引き起こすことが知られている。特に、進行性腎臓障害は、未だ有効な治療法が確立されていないアンメット・メディカル・ニーズ疾患である。また、生活習慣病の患者は、2～4倍も腎癌のリスクが高く、腎癌の危険因子であることが報告されている。

Hypertension-related, calcium-regulated gene (HCaRG/COMMD5) は、Montreal大学のTremblay教授らにより2000年に初めて報告された新規遺伝子で、腎臓の尿細管に強く発現しており、細胞の増殖・分化・移動などに関与している<sup>1)</sup>。近位尿細管特異的HCaRG高発現遺伝子改変マウスを用いて行われた腎虚血再還流モデルの実験では、HCaRGはp21の発現誘導を介して、障害を受け脱分化した尿

細管上皮細胞の間葉上皮移行を促し、尿細管の修復を促進し、腎障害後の生存率を2.5倍も改善した<sup>2)</sup>。そこで、HCaRGの間葉上皮移行促進作用に着目し、癌細胞と正常細胞でHCaRGの発現を比べたところ、癌細胞でHCaRGの発現が低下していることが分かった。次に、腎癌患者の病理標本を用いてHCaRGの発現を解析したところ、腎癌だけでなく、腫瘍径が大きく予後不良であった患者の正常尿細管でもHCaRGの発現が低下しており、正常尿細管のHCaRGレベルが高いほど5年生存率が良いことが分かった<sup>3)</sup>。また、HCaRGを腎癌細胞に高発現させると、癌細胞の分化が促され、細胞周期が抑制され、細胞死が誘導された。このHCaRG高発現癌細胞を野生型マウスの皮下に移植したところ、腫瘍増大や腫瘍血管新生が抑制された。メカニズム的には、正常尿細管上皮細胞から分泌されたHCaRGが、腎癌細胞のErbB受容体の発現を抑制し、腫瘍細胞の生

1) 日本大学医学部

2) 日本大学生物資源科学部

松田裕之: hiroyuki.mazda.jpn@gmail.com

存・増殖の主要伝達経路であるMAPKやPI3K/AKTシグナルの活性化を抑制していることが明らかになった。

これらの知見から、生活習慣病患者の腎臓は、慢性的なストレスに曝されており、常に尿細管の保護と修復のためHCaRGの発現が亢進しているのではないかと考えた。そして、過度な障害による尿細管上皮細胞の脱落でHCaRGの発現が失われた場合に、尿細管上皮バリアー機構が失われ慢性腎臓病に進展し、障害細胞の癌細胞化が起こるのではないかとこの仮説を立てた。

## 2. 概要

HCaRGの持つ腎保護作用や発癌抑制作用を明らかにするために、HCaRGによる尿細管上皮細胞の間葉上皮移行やオートファジーの制御メカニズムの解明を目的とした。また、残腎機能を評価するバイオマーカーや、腎癌における予後予測因子としてのHCaRGの可能性を検証しようと考えた。そして、新規の分解耐性膜透過性HCaRGタンパクの利用を含め、HCaRGをターゲットとした腎臓病や腎癌の新たな診断・治療法を開発する目的で、以下の実験を計画した。

### 血液及び尿中HCaRGレベルと腎機能、腎癌の進展や予後との関係

これまでの研究で、正常尿細管から分泌されたHCaRGが癌の進展を抑制している可能性が示唆されたので、モデル動物やヒトの血液中や尿中のHCaRGをELISAキットを用いて測定し、腎臓組織内のHCaRG発現レベルや腎機能、病理組織像との相関を解析し、HCaRGが残腎機能や癌のリスクを評価するためのバイオマーカーとして有用であるのかを明らかにしようと試みた。

### 分泌型HCaRGタンパクが腎癌の進展を抑制

近位尿細管特異的HCaRG高発現マウスを用いて、マウスの腎皮膜下に癌細胞を移植し、近位尿細管上皮細胞から分泌された内因性HCaRGが、腎癌の進展を抑制するのかどうかを検証した。また、HCaRGによるSphere形成の抑制が癌幹細胞の減少を引き起こし、発癌や再発のリスクが低下するのかを明らかにしようと試みた。

### HCaRGが腎尿細管上皮バリアー機構を維持し、急性腎障害を抑制

虚血や薬剤曝露にさらされた尿細管では、ミトコンドリア機能不全が引き起こされ、酸化ストレスが上昇し、尿細管上皮細胞が障害を受ける。そこで、HCaRGを高発現させた細胞や、ノックダウンした細胞に、抗癌剤であるシスプラチンの投与や、過酸化水素曝露による酸化ストレス負荷を行い、尿細管上皮細胞間の構造変化やオートファジーを介したHCaRGの腎保護効果を検討した。

### 分解耐性膜透過性HCaRGタンパク質の合成

細胞内タンパク質安定化タグ (Stabilon) や、細胞膜透過性タグ [11R (アルギニン)] を用いることで、細胞内で安定的に発現可能なタンパク質を合成することが出来る。そこで、Stabilonや11Rを結合させた分解耐性膜透過性ヒトHCaRGタンパクの合成を行い、合成HCaRGタンパクが、尿細管上皮細胞や癌細胞内に取り込まれ、安定的に発現し、内因性HCaRGと同様に間葉上皮移行の促進やオートファジーの制御、癌細胞の増殖抑制作用などを示すのかどうかを検証し、HCaRGタンパクを用いた治療の可能性を探索する計画を予定した。

## 3. 方法及び結果

### 血液及び尿中HCaRGレベルと腎機能、腎癌の進展や予後との関係

これまでの研究では、腎細胞癌の摘出手術を受けた患者の病理標本でHCaRGの発現を比較すると、正常尿細管でHCaRGの発現が高い患者群では、HCaRGの発現が低下している患者群よりも手術時の腫瘍径が小さく予後も良好であった (図1, 2)<sup>3)</sup>。また、尿細管上皮細胞株の培養液中でHCaRGタンパク分泌されていることが確認され、正常尿細管から分泌されたHCaRGが、癌の進展を抑制している可能性が示唆された。今回、薬剤性腎障害モデルや糖尿病性腎症モデルのマウスの血液や尿検体を用いてHCaRGを測定し、HCaRGと残腎機能の関係を明らかにしようと試みた。薬剤性急性腎障害モデルとして、抗がん剤であるシスプラチンをHCaRG高発現遺伝子改変マウスに腹腔内投与 (20 mg/kg) し、腎障害の程度を確認した。シスプラチン投与5日後の血清クレアチニンは、HCaRG高発現マウスで $0.70 \pm 0.34SD$  mg/dl、野生型マウスで $2.73 \pm 0.96SD$  mg/dlと有意 ( $P < 0.01$ ) な低下が見られた。組織学的にも尿細管障害は、野生型マウス (non-Tg mice) に比

べHCaRG高発現マウス (HCaRG-Tg mice) において軽減されていた (図3)。

腎組織中のHCaRG発現は尿細管上皮細胞の脱落とともに低下していた。現在、これらのマウスの血液・尿サンプルを回収し、市販のELISAキットを用いたHCaRGタンパクの測定を検討している。次に、ストレプトゾシンを用いてI型糖尿病マウスを作製

した。糖尿病性腎症の発症を確認するため、ストレプトゾシン投与6ヶ月後に血清クレアチニン及び、尿中タンパク、微量アルブミンの測定を行ったところ、血糖値の上昇は継続していたが、腎機能の悪化や尿中タンパクの上昇は認めなかった。現在、ストレプトゾシンを投与し、糖尿病発症後12ヶ月経過したマウスでの評価を行っている。

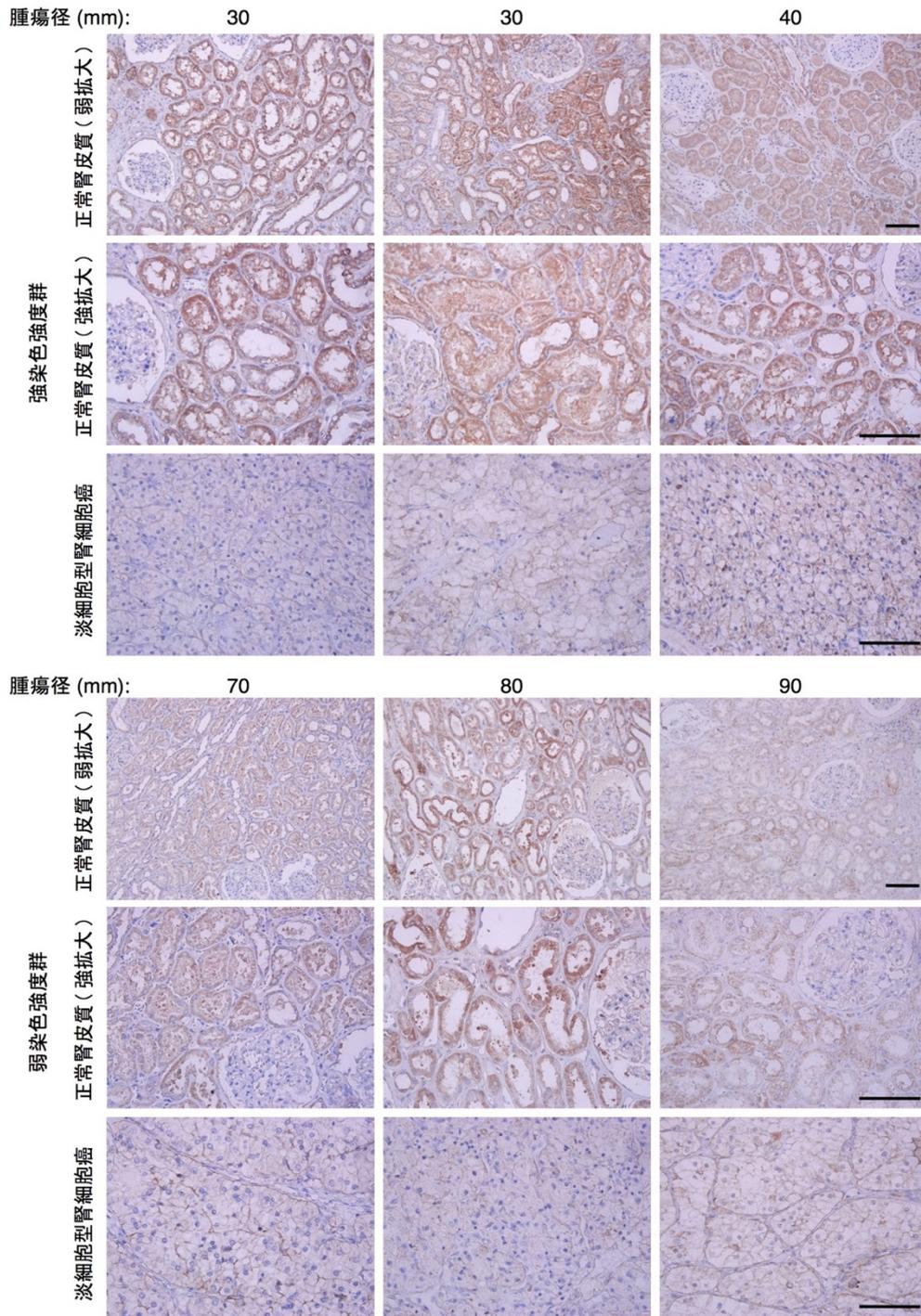


図1 淡明細胞型腎細胞癌患者の腎細胞癌と正常腎皮質におけるHCaRG免疫組織染色像<sup>3)</sup>。Scare bar = 0.1 mm。

また、残腎機能を評価するためのバイオマーカー、及び腎細胞癌の予後予測因子や、術後の腎細胞癌の再発リスクを評価するバイオマーカーとしての有用性を検討するために、日本大学医学部附属板橋病院と研究協力施設において、腎機能障害の患者

及び、腎癌にて手術を受けた患者約130名の同意を得、血液・尿検体をこれまでに確保した（臨床研究RK-170912-4）。今後、これらのヒト検体においてもHCaRGタンパクの測定を行い、臨床上有用なバイオマーカーとして可能性を検証する予定である。

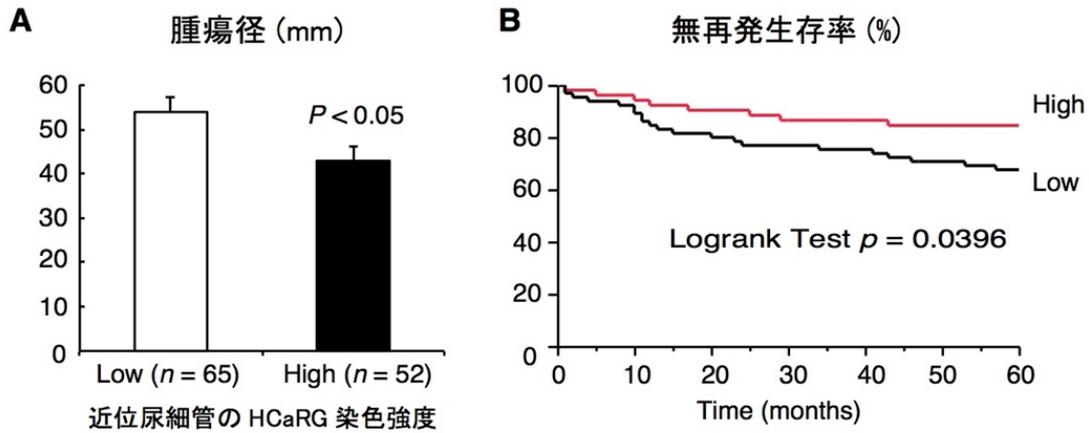


図2 近位尿細管におけるHCaRG高発現群では、腫瘍径は小さく、予後も改善<sup>3)</sup>。  
 A) 正常近位尿細管におけるHCaRG高発現群 (High) では低発現群 (Low) に比べ、腫瘍径は有意に小さかった。B) HCaRG高発現群 (High) では低発現群 (Low) に比べ、5年無再発生存率は有意に改善していた。

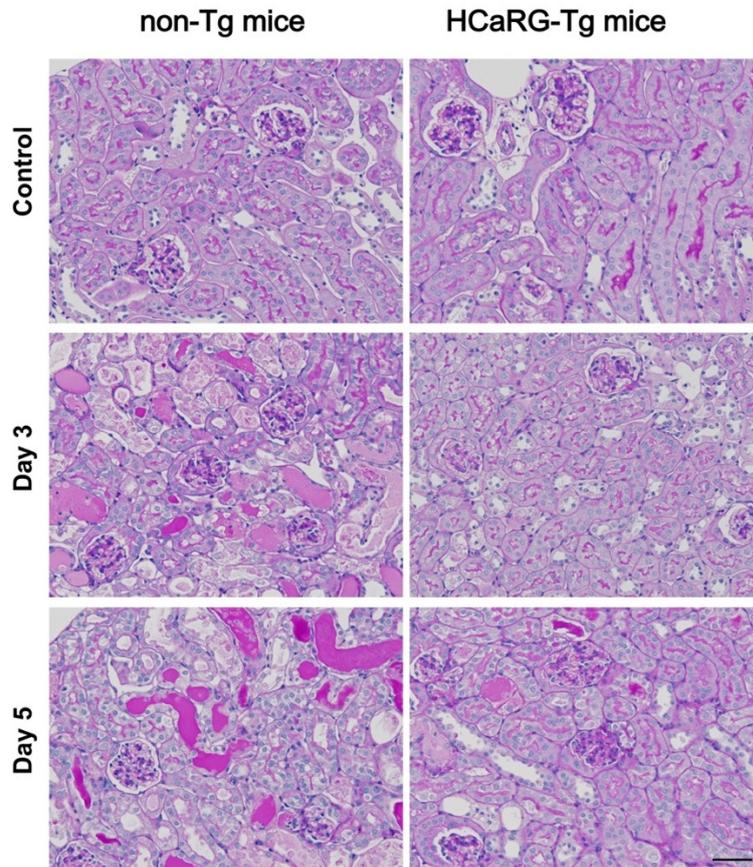


図3 HCaRG高発現遺伝子改変マウスを用いたシスプラチン腎症モデルの腎臓のPAS。(Periodic acid-Schiff) 染色像。  
 Scare bar = 0.1 mm.

### 分泌型HCaRGタンパクが腎癌の進展を抑制

これまでの研究で、HCaRGを遺伝子導入した癌細胞を野生型マウスの皮下に同種移植すると、腫瘍の増大や腫瘍血管新生が抑制されることが明らかになっている<sup>3)</sup>。この研究の中で、正常尿細管上皮細胞から分泌されたHCaRGタンパクが、癌細胞のEGFRを含むErbB受容体ファミリーの発現を抑制している可能性を示した。今回、内因性HCaRGが、細胞骨格の構成因子であるアクチンとRab5に結合し、EGFRの細胞内輸送及びリサイクリングをコントロールしていることを報告した<sup>4)</sup>。次に、分泌型HCaRGが癌の発生・維持や、再発・治療抵抗性に関係しているとされる癌幹細胞にも作用し、癌抑制効果を示しているのかを検討した。癌細胞株にHCaRGを遺伝子導入し、腎癌の癌幹細胞表面マーカーであるCD133の陽性細胞数の変化を測定したが、同定することが出来なかった。そこで、腎癌幹細胞の評価を、Sphere formation assayとAldehyde Dehydrogenase (ALDH) activity assayの組み合わせを用いて行った。HCaRG導入癌細胞や、分泌型HCaRGタンパクを多く含む培養液中で培養した癌細胞では、コントロール細胞に比べSphere形成が抑制され、HCaRGノックダウン癌細胞では、コントロール細胞に比べSphere形成が促進した(図4)。

さらに、HCaRG導入癌細胞では、ALDH activityが低下していた。以上の結果から、内因性HCaRG及び、尿細管上皮細胞から分泌されたHCaRGは、培養細胞実験において腎癌幹細胞を減少させる効果があることが明らかになった(論文投稿準備中)。今後、腎細胞癌で手術を受けた患者の病理標本を用いて、正常尿細管におけるHCaRG発現と癌幹細胞の関係を免疫染色法にて検証する予定である。

生体内における分泌型HCaRGの癌抑制効果を検討するために、HCaRG高発現遺伝子改変マウスの腎皮膜下にマウス癌細胞株であるRenca細胞を移植した。腫瘍形成を確認するために、先行実験として野生型マウスの腎皮膜下に異なる細胞数のRenca細胞を移植したが、Renca細胞は生着しなかった。これは、使用するHCaRG高発現遺伝子改変マウスとRenca細胞のマウスの系統が異なることが原因ではないか考えた。今後、分解耐性膜透過性HCaRGを合成した後に、Renca細胞を同系統のマウスの皮下に移植したモデルを作製し、合成HCaRGタンパ

クを投与する実験を計画している。

### HCaRGは腎尿細管上皮バリアー機構を維持し、急性腎障害を抑制

これまでの研究において、HCaRGが障害により脱分化した尿細管上皮細胞の間葉上皮移行を促進することや<sup>2)</sup>、低栄養下ではオートファジーを誘導し、細胞の生存率を改善させることを見出している。今回、培養尿細管上皮細胞に薬剤暴露を行い、HCaRGの細胞保護メカニズムを検討した。HCaRGは、シスプラチン暴露下の尿細管上皮細胞において速やかにp21の発現を増強し、p21の発現増強後にE-cadherinの発現ピークが観察された(図5)。

この遺伝子発現の経過中、p21の転写因子の一つであるFoxOタンパクのリン酸化が抑制され、FoxOのトータルタンパク量が増加していた。HCaRGを抑制したところ、核内FoxOのリン酸化亢進により、FoxOが分解され、p21の低下によりE-cadherinの発現が抑制されていることが分かった。HCaRGをノックダウンした尿細管上皮細胞のタイトジャンクション機能を、電気抵抗指数を用いて測定すると、電気抵抗は低下していた。これらの知見から、HCaRGは、E-cadherinの発現を亢進させ、細胞間接着構造を増強し、尿細管上皮バリアー機構を強化することにより、腎障害を予防しているのではないかと考えられた。HCaRG高発現遺伝子改変マウスを使った実験では、シスプラチン投与後の腎機能・組織障害がHCaRG高発現マウスで有意に軽減されているのに加え、E-cadherinの発現は、特にHCaRG高発現マウスの遠位尿細管で保たれていた(図6)。

各尿細管セグメントの遺伝子発現を解析したところ、HCaRG高発現遺伝子改変マウスでは遠位尿細管が障害されていなかった。野生型マウスでは、 $\alpha$  Klothoなどの遠位尿細管由来の腎保護因子が低下していたが、HCaRG高発現マウスでは保たれていた。以上より、近位尿細管におけるHCaRGは、直接近位尿細管上皮細胞の保護・修復を促進するだけでなく、パラクリン機構により遠位尿細管の障害を軽減し、尿細管相互作用による恒常性維持に寄与し、腎障害の進展を抑制していると考えられた。今後、近位尿細管特異的HCaRGノックアウトマウスを作製し、近位尿細管由来のHCaRGに遠位尿細管保護作用があるのかどうかを検討する計画である。

また、HCaRGを遺伝子導入した尿細管上皮細胞

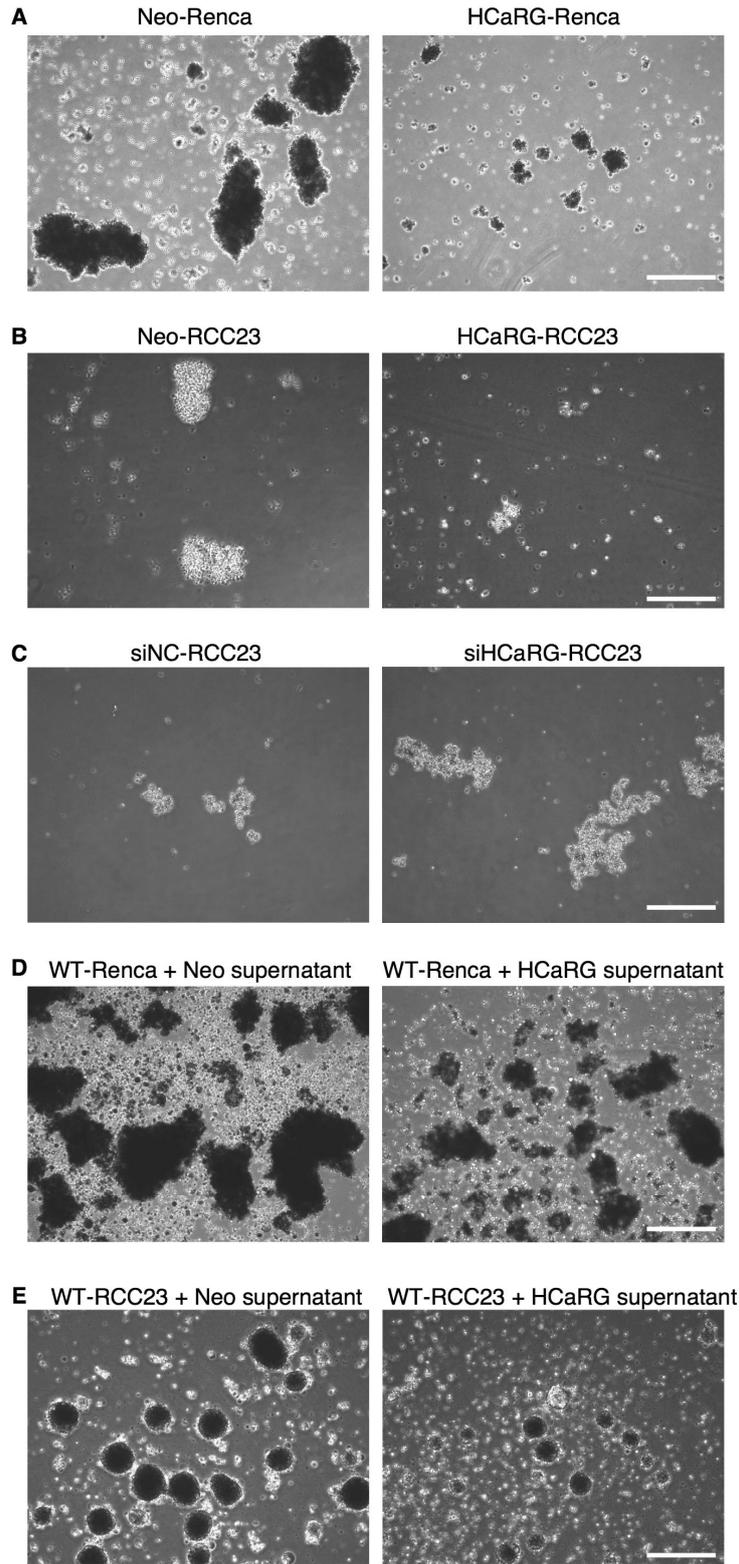


図4 HCaRGは癌細胞の Sphere 形成を抑制した。

A) HCaRG 高発現 Renca 細胞 (HCaRG-Renca) では、コントロール細胞 (Neo-Renca) に比べて Sphere 形成が抑制されていた。B) HCaRG 高発現 RCC23 細胞 (HCaRG-RCC23) でも、コントロール細胞 (Neo-Renca) に比べて Sphere 形成が抑制されていた。C) HCaRG のノックダウンを行った siHCaRG-RCC23 細胞ではコントロール細胞 (siNC-RCC23) に比べて、sphere 形成が増加していた。D) HCaRG 含有培養液中 (HCaRG supernatant) で培養された野生型 (WT) -Renca 細胞では、コントロールの培養液中 (Neo supernatant) で培養された細胞に比べて、sphere の数は少なかった。E) HCaRG 含有培養液中で培養された WT-RCC23 細胞でも、コントロールの培養液中で培養された細胞に比べて、sphere の数は少なかった。

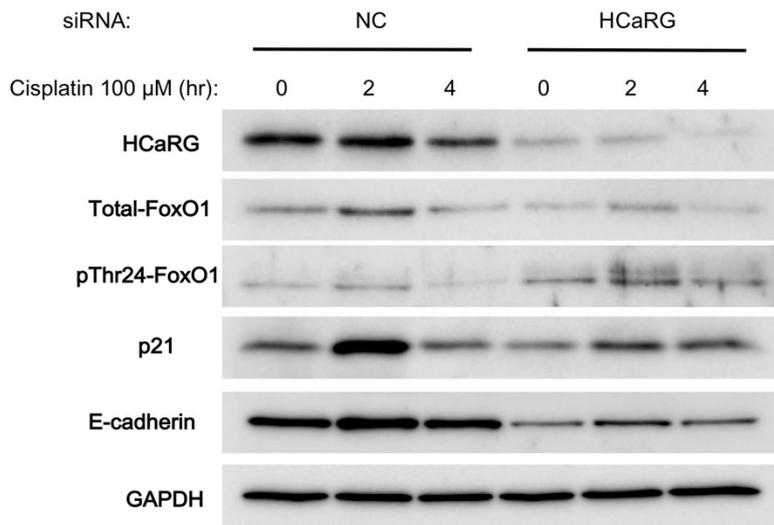


図5 尿細管上皮細胞 (HK-2) にシスプラチン処理を行った際のWestern blot像。NC細胞 (non-target controlを導入) とHCaRG細胞 (HCaRG標的siRNAを導入) を用いて経時的なタンパク発現の変化を比較した。

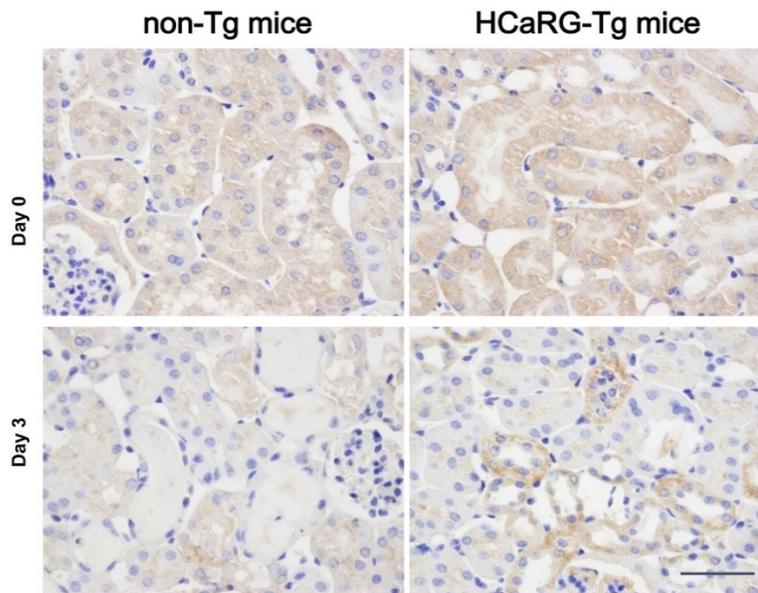


図6 HCaRG高発現遺伝子改変マウスを用いたシスプラチン腎症モデルの腎臓のE-cadherin免疫染色像。Scale bar = 0.1 mm。

に、過酸化水素処理を行い、細胞死やオートファジーに与える影響について検討した。コントロール細胞では曝露12時間後までオートファジーが遅延し、細胞死が増加していたが、HCaRGは速やかに過剰なオートファジーを抑制し、ATP産生などミトコンドリア機能を保護し、細胞生存率を改善していた。このことから、HCaRGは過剰なオートファジーを介した細胞死を抑制し、尿細管上皮細胞を保護し

ている可能性を考えた。今後、前述の遺伝子改変マウスやノックアウトマウスを用いて、HCaRGのオートファジー制御メカニズムを探索する予定である。**分解耐性膜透過性HCaRGタンパク質の合成**

HCaRGは、アクチンやRab5と相互作用があることを報告したが<sup>4)</sup>、HCaRGの相互因子や受容体の存在など、まだ明らかになっていない点が多くある。今回、HCaRGの関わる新たな伝達経路を明らかに

する目的で、HCaRGの相互因子の探索を行った。ヒトHCaRG-Flagタグ及びFlagタグ-ヒトHCaRG合成タンパク発現プラスミドを作製し、ヒト胎児腎臓由来のHEK-293細胞に遺伝子導入を行った。この遺伝子導入された細胞のタンパク質を用いて免疫沈降と質量分析を行ったところ、HCaRGの結合タンパクの候補として、新たに23のタンパク質が同定された(論文投稿準備中)。これらの候補タンパク質の中には、HCaRG以外のCOMMDファミリーや、細胞内輸送に関わるタンパク複合体、遺伝子制御に関わる核内分子などが含まれており、今後、細胞内でのHCaRGとの結合や、相互作用を検討していく計画である。さらに、現在3種類の細胞透過性ヒトHCaRGタンパク発現プラスミドを合成しており、プラスミド合成後に細胞透過性ヒトHCaRGタンパクを精製し、合成タンパク質の生理活性を確認する予定である。

#### 4. 考察

近年、日本の人工透析患者は32万人を超え、医療費の増加は社会的問題になっている。現在、AKI to CKD progressionという考えが提唱され、末期腎不全患者を減らすために、いかに慢性腎臓病(CKD)への進行を食い止めるかということに注目が集まっている。しかしながら、可逆的と考えられていた急性腎障害(AKI)から、慢性腎臓病に進展するメカニズムについては未だ不明な点が多い。

今回我々は、近位尿細管におけるHCaRGがE-cadherinの発現を亢進させ、細胞間接着構造を増強し、尿細管上皮バリアー機構を強化することにより、近位尿細管の障害を軽減することを見出した。

また、近位尿細管の障害を軽減することで、遠位尿細管が保護され、尿細管相互作用による恒常性維持機構により急性腎障害の進展が抑制されている可能性が示唆された。そして、尿細管上皮細胞の細胞死の抑制にはHCaRGを介したオートファジーの制御が関与していると考えられた。このようなHCaRGによる尿細管の恒常性維持が、腎障害や腎癌の進展を予防しているのではないかと考えられ、今後新たな治療法の開発へと応用を目指して本研究を推進していく予定である。

#### 謝辞

本研究の共同研究者は日本大学医学部 内科学講座総合診療学分野の池田迅先生、小笠原茉衣子先生、日本大学医学部 泌尿器科学系泌尿器科学分野の高橋悟教授、山口健哉先生、八戸学院大学健康医療学部 人間健康学科の遠藤守人教授、佐々木研究所附属 杏雲堂病院の相馬正義先生である。また本研究は、日本大学学術研究助成金[総合研究](No. 総18-013)を受けて行われた。

#### 文献

- 1) Solban, N. *et al.* HCaRG, a novel calcium-regulated gene coding for a nuclear protein, is potentially involved in the regulation of cell proliferation. *J. Biol. Chem.* **275**, 32234-32243, doi:10.1074/jbc.M001352200 (2000).
- 2) Matsuda, H., Lavoie, J. L., Gaboury, L., Hamet, P. & Tremblay, J. HCaRG accelerates tubular repair after ischemic kidney injury. *J. Am. Soc. Nephrol.* **22**, 2077-2089, doi:10.1681/ASN.2010121265 (2011).
- 3) Matsuda, H. *et al.* HCaRG/COMMD5 inhibits ErbB receptor-driven renal cell carcinoma. *Oncotarget*, doi:10.18632/oncotarget.18012 (2017).
- 4) Campion, C. G. *et al.* COMMD5/HCaRG Hooks Endosomes on Cytoskeleton and Coordinates EGFR Trafficking. *Cell Rep* **24**, 670-684 e677, doi:10.1016/j.celrep.2018.06.056 (2018).

# 吸入療法支援のための クラウド型在宅医療連携モデルに関する研究

伊藤玲子<sup>1)</sup>, 権 寧博<sup>1)</sup>, 丸岡秀一郎<sup>1)</sup>, 肥田不二雄<sup>2)</sup>, 中川一人<sup>3)</sup>, 戸田 健<sup>4)</sup>

## Study on home medical care cooperation system for inhalation therapy using the cloud type service

Reiko ITO<sup>1)</sup>, Yasuhiro GON<sup>1)</sup>, Shuichiro MARUOKA<sup>1)</sup>,  
Fujio KOEDA<sup>2)</sup>, Kazuto NAKAGAWA<sup>3)</sup>, Takeshi TODA<sup>4)</sup>

### 要旨

喘息やCOPD (chronic obstructive pulmonary disease) 患者の吸入治療における問題を解決し、新しい技術を用いて、効果的な吸入治療の継続を可能とするツールの開発を目的に以下の7つの研究が行われた。1. 加圧式定量噴霧吸入器 (pMDI : pressurized metered dose inhaler) 用新型スパーサーのプロトタイプ開発。2. スパーサーを用いた吸入粒子のモニタリング。3. pMDIの吸入タイミングのモニタリング。4. 高齢者の吸入手技と認知機能に関する検討。5. タブレット端末を使った吸入指導支援ツール (ウェブアプリ「吸入レッスン」kyunyu.com) のアクセス解析。6. 吸入療法支援のための吸入指導病薬連携システム「吸入カルテ」におけるデータマイニング。7. 吸入治療支援アプリケーション「わたしの喘息カルテ (ゼンカル)」開発。今後は各研究の成果を統合し、新たな在宅医療連携システムの構築を実現させる。

### 1. はじめに

喘息や慢性閉塞性肺疾患 (COPD) 患者数は近年増加の一方であり、高齢患者の割合も増加している。認知機能の低下や身体機能の低下により、吸入器が正しく継続して使用できないことも多い。一方、医師や薬剤師、介護者が毎日患者を見守り、正しく吸入できているかをモニタリングする方法は現在のところ存在しない。近年医療現場にも導入され始めたセンサーやスマートフォン等の携帯端末を利用してこれらの問題を解決することができれば、呼吸器疾患における患者管理の質を改善させる大きな一歩となると考えられる。本研究は吸入介助機能を持つ通信型スパーサーと症状を記録するアプリケーションを作成し、患者の吸入を介助し、状態のモニ

タリングを行うシステムを作成したのち、得られたデータを分析し、より良い治療方法の選択やアドヒアランスの向上のための情報を蓄積することで喘息、COPD患者の在宅医療継続に関する問題を解決することを目的とした。

### 2. 研究成果と実装

#### 2-1 スパーサーの開発:プロトタイプの作成

加圧式定量噴霧吸入器 (pMDI : pressurized metered dose inhaler) 用通信型スパーサーの試作を計画した。まず、スパーサーの開発を行った。pMDI製剤は吸入口を咥えて、ポンベの底を押すと同時に噴霧された薬剤を吸入することで、薬剤を気道へ到達させる仕組みになっている。小児や高齢者では握

1) 日本大学医学部  
2) 日本大学芸術学部  
3) 日本大学生産工学部  
4) 日本大学理工学部  
伊藤玲子 : ito.reiko@nihon-u.ac.jp

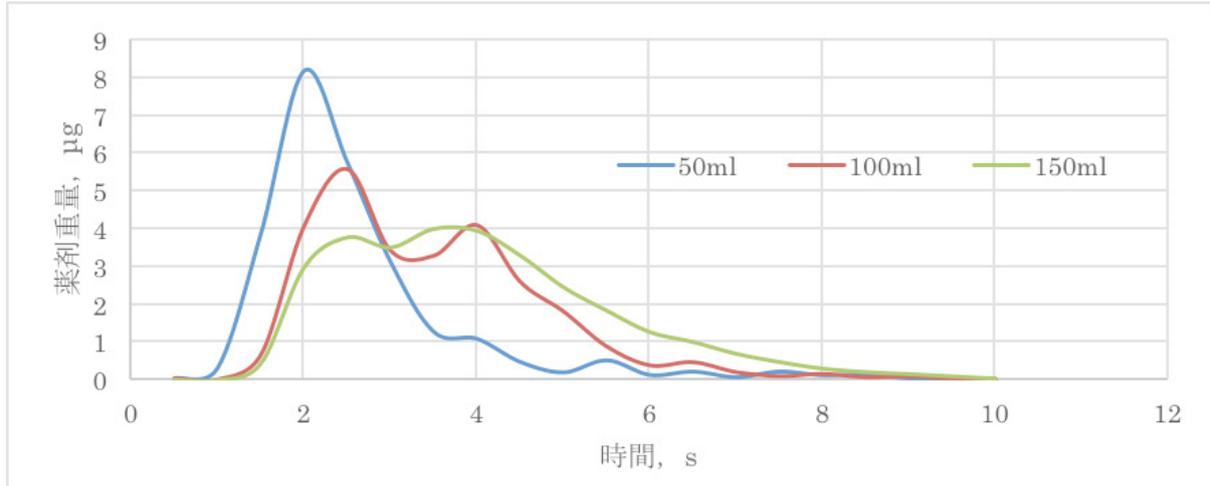


図1 スターチャーチャンバー容量別薬剤粒子量の経時的変化

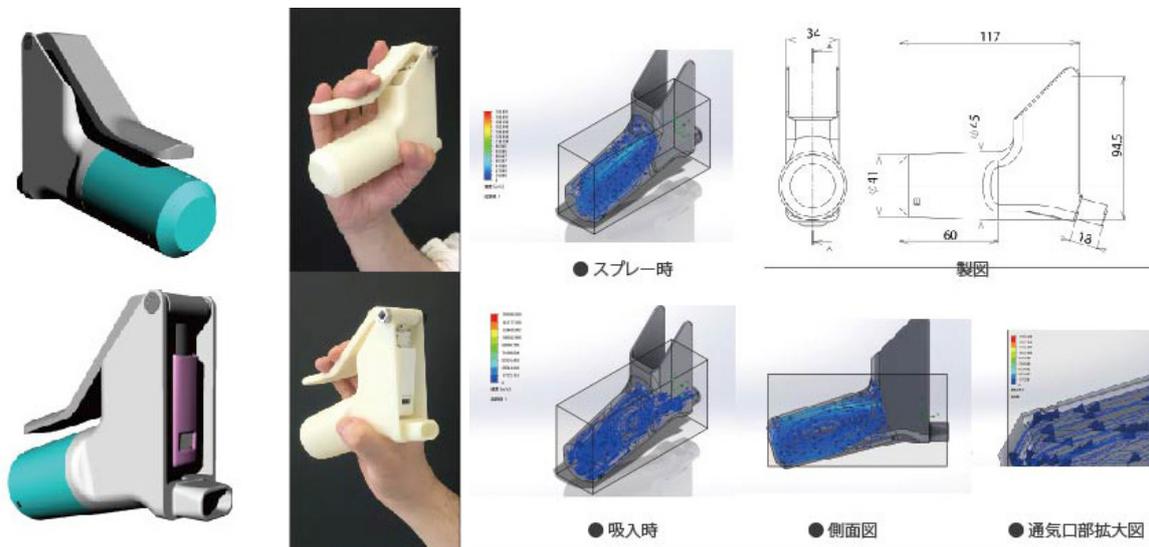


図2 新型スパーサーのプロトタイプと3D CADデータによるチャンバー内の流体解析  
文献2) より一部改変

力が弱く、十分にポンペを強く押せないことで薬剤噴霧量が減少すること、噴霧と吸入のタイミングが合わないなどの問題点がある。主にこの2点を解決するため、従来の約3分の1の握力で薬剤噴霧が可能となるデザインの新型のマルチ対応型pMDI吸入スパーサー（新MA・pMDIスパーサー）のプロトタイプを先行研究として作成した。（平成27年度、28年度日本大学学術研究助成金総合研究 研究代表者 芸術学部 肥田不二夫）

次に、チャンバーの最適容量決定のため50ml、100ml、150mlの3サイズでチャンバー内に噴霧された薬剤の時間経過による消失率の検討を行った。そ

の結果、吸入された薬剤のチャンバー内の量は各々時間経過とともに変化した。吸入終了時は3タイプいずれにおいても80%が消失しており（図1）、50ml程度でも従来のスパーサーとほぼ同量の薬剤量を吸入できる事が確認された<sup>1)</sup>。把握した際に手のひらに収まり、軽量化も可能となるため、チャンバー容量は50mlと決定した。

設計したスパーサーを使って、チャンバー内の流体解析を3D CADデータをもとに行った。噴霧された薬剤は外気を取り込む空気孔の有無にかかわらず、一ヶ所に滞ることなくスムーズに移動していることが確認された。

以上の実験結果から、新型スパーサーのプロトタイプが決定した(図2)<sup>2)</sup>。本案はその新規性から日本大学産官学連携知財センター(NUBIC)を通し、特許出願中である。

## 2-2 スパーサーの開発:吸入状況のモニタリング

このスパーサーにおいて吸入速度の設定が必要かを判断するため、微差圧センサをpMDIスパーサーに装備し、吸入速度の測定を行なった。被験者はpMDI噴霧と同時にスパーサーの吸入口から薬剤(プラセボ)を吸入した。一回目は深呼吸、2回目は3~5秒かけて吸入、3回目は目標吸入速度(0.0003m<sup>3</sup>/s)を与え、被験者はモニターでスピードを確認しながら吸入を行った。3回目は吸入速度が目標速度に近い値で推移したが、吸入スピードを被験者が確認できなかった1回目、2回目では吸入速度が徐々に遅くなるなど不安定な吸入となった<sup>3)</sup>。吸入状況をモニターで見ながら吸入できればより効果的な吸入ができる可能性がある。

さらに、吸入速度とチャンバー内での吸入粒子量の関係を測定した。チャンバー内への粒子の付着およびエアゾルの沈下により滞在時間の経過に伴い、流出する粒子量の減少が認められ、0sと比較すると3sでは75%、5sでは45%であった。薬剤吸入量を多くするためには噴霧後短時間で吸入する必要がある<sup>3)</sup>。

## 2-3 加圧式定量噴霧吸入器の吸入タイミングのモニタリング

加圧式定量噴霧吸入器の吸入タイミングのモニタリングを吸入状況の把握を含めた、介助の仕組みとして開発を行った。2つのフォトリフレクタを用いた簡易計測法を用いて測定を行なった。2つのフォトリフレクタ出力電圧波形のピーク差より薬剤噴霧速度を算出した結果の一例23.4 m/sはレーザドップラー流速計による測定結果の一例25.8 m/s<sup>3)</sup>と比べ約9%の差となった。しかし、被験者4人に6日間にわたり噴霧のみの流速の測定を行った結果、噴霧速度には広がりがあることがわかった。吸入器のポンベの押し方の違いに起因する違いと考えられたが、実際レーザドップラー流速計による測定結果においても同様の広がりが見られた。また噴霧のみ及び噴霧と吸入をした場合の噴霧速度の差をピーク時

間差から算出した結果、吸入時の薬剤速度は噴霧薬剤のみの速度と比べ4.6 m/s速くなった。この結果より、本システムにより吸入による薬剤の加速を観測することができた<sup>4)</sup>。

## 2-4 高齢者の吸入手技に関する検討

高齢者における吸入指導、吸入手技習得の実態を医学部附属板橋病院において調査し、高齢者の吸入指導に対する意識と、効果に対する検討を行った。(日本大学医学部附属板橋病院臨床研究倫理審査委員会承認番号RK-160308-01)

当院で吸入指導を受けた60歳上の患者97名を対象とした。吸入遵守率と認知機能検査MMSE(Mini-Mental State Examination)の点数で階層的クラスター分析を行い、各クラスターの特徴を抽出、解析を行った。吸入指導による吸入手技の習得率、ASK-20(Adherence Starts with Knowledge-20)スコア、呼吸機能について評価した。

解析により3つのクラスターに分類された。(図3)クラスター1は全体的に良好なアドヒアランスで吸入手技を習得していた。クラスター2は高いアドヒアランスと低い吸入手技の習得を示した。クラスター3は低いアドヒアランスと低い吸入手技の習得率であった。MMSEはクラスター2で最も低く、ASK-20の障壁数はクラスター3で有意に高かった<sup>5)</sup>。

より年齢が高く、認知機能が低下しているクラスターにおいて、吸入手技が誤っているにも関わらず良好なアドヒアランスで治療を継続していることがわかった。このクラスターに属する患者においては、十分な吸入薬の効果が得られていない可能性があり、正確な吸入手技を習得できれば、投与薬剤を減らせることが期待される。この結果から従来の吸入指導では手技の誤りを認識できていない高齢患者へのアプローチが必要であることが判明した。そこで、吸入指導を受けない場合にも吸入をより効果的に行うことが可能となる吸入介助を目的としたマウスピースの開発を予定している。

## 2-5 タブレット端末を使った吸入指導支援ツール(ウェブアプリ「吸入レッスン」kyunyu.com)のアクセス解析

吸入薬の使用方法を動画とセルフチェックで習得することを目的に作成したウェブアプリ「吸入レッ



	クラスター1	クラスター2	クラスター3
人数(n)	53	35	9
MMSE	29.0	23.3	26.2
吸入遵守率 (%)	98.9	98.0	70.0

	クラスター1	クラスター2	クラスター3	$\chi^2$ 検定
度数	53	35	9	
吸入手技が正確な割合	79.0%	45.7%	55.6%	p = 0.05
年齢	72.7	76.6	78.4	p=0.012
ASK-20障壁数	2.83	3.62	4.78	p=0.048
% FEV1.0	93.3	78.5	79.9	p=0.018

図3 吸入アドヒアランスと認知機能におけるクラスター分析

スン」(図4)は、吸入指導の補助的なツールとして利用する事で、従来の紙媒体の説明書を用いた指導と比較し、吸入手技習得とその習得した手技の定着において、優位性が報告されている<sup>6)</sup>。日本大学医学部、芸術学部と共同で開発し、ウェブ上に無料公開されている。このウェブアプリの利用と利用者を検討するため、アクセス解析を行なった。2015年4月1日から2018年3月31日の3年間のウェブサイトへのアクセスをGoogle Analyticsを用いて解析し、サイト内のアンケート結果から利用者の属性や復習テストの正解率を検討した。アクセス総数は9万1861件、52.3%がリピーターであった。携帯端末からのアクセス数が増加しており、直接サイトへのアクセスが41%、検索エンジンからが31%、他のサイトのリンクからが26%であった。動画の再生回数はシムビコートが最も多く、次いで、レルベア、イナビルの順であった。サイト内のアンケートによる利用者は患者40.9%、薬剤師42.9%、医師・看護師7%であった。60歳以上の利用が2割程度あり、アンケートの回答フォームにも適切に入力がなされていることから、比較的高齢者でもタブレットを使って吸入手技の習得が可能であると考えられた。

「復習テスト」の回答では、DPI製剤では吸い方、pMDI製剤では交換時期に関するテストに誤解答が多かった。また、利用後のアンケートでは、「患者」の74.5%が「非常にわかりやすかった。」と回答していた。このことより、公開後3年で年齢にかかわらず、患者、医療者にも幅広く利用され、新たな利用者を獲得しつづけていることがわかった。なお、「吸入レッスン」は喘息予防管理ガイドライン2018<sup>7)</sup>に吸入指導に有用なツールとして紹介された。

#### 2-6 吸入療法支援のための吸入指導票約連携システム「吸入カルテ」におけるデータマイニング(マシンラーリングを用いた報告指導内容の予測の可能性)

吸入指導に積極的に取り組んでいる診療所・保険薬局を対象に、医師・看護師・薬剤師全員が吸入指導を行うことを考慮し、新たな吸入指導支援システムを用いた病薬連携スキームが検討された。「吸入カルテ」はタブレット端末を用いて、吸入指導の依頼と指導内容の報告書の作成をクラウドを介して行うシステムであり、前述の「吸入レッスン」と連動して、吸入指導もタブレット端末で行うことができ



図4 吸入指導支援ツール (ウェブアプリ「吸入レッスン」kyunyu.com)

る。医療機関と、吸入指導を行なった保険薬局とがクラウドシステム上で情報を共有できる、吸入指導に特化したクラウド型システムである。(図5)

試験導入は2017年5月1日より岐阜県瑞浪市の東濃中央クリニックおよび、いきいき健康薬局（一般財団法人 吸入療法アカデミー会員施設）で開始されていた。蓄積されたデータを用いて、システム内に埋め込まれたログデータから情報システム工学上のデータ解析を行った<sup>8)</sup>。得られた情報の解析については、「吸入カルテ」のアクセスログ解析による

ユーザビリティ評価から、操作時間およびエラー率ともに実用的許容範囲に収まった。また、返率は先行システム（56.3%）を大幅に改善した（92.2%）。これらのことから試作システムの有効性および効率性が示され、提案スキームの有用性が示された。一方ユーザインターフェース（webアプリケーション）は大手2社のスマートフォンiPhoneおよびAndroid端末実機で評価し正常動作を確認した。さらに病薬連携システム「吸入カルテ」において吸入指導報告書の予測を目的に、吸入指導報告書のデータに対し項

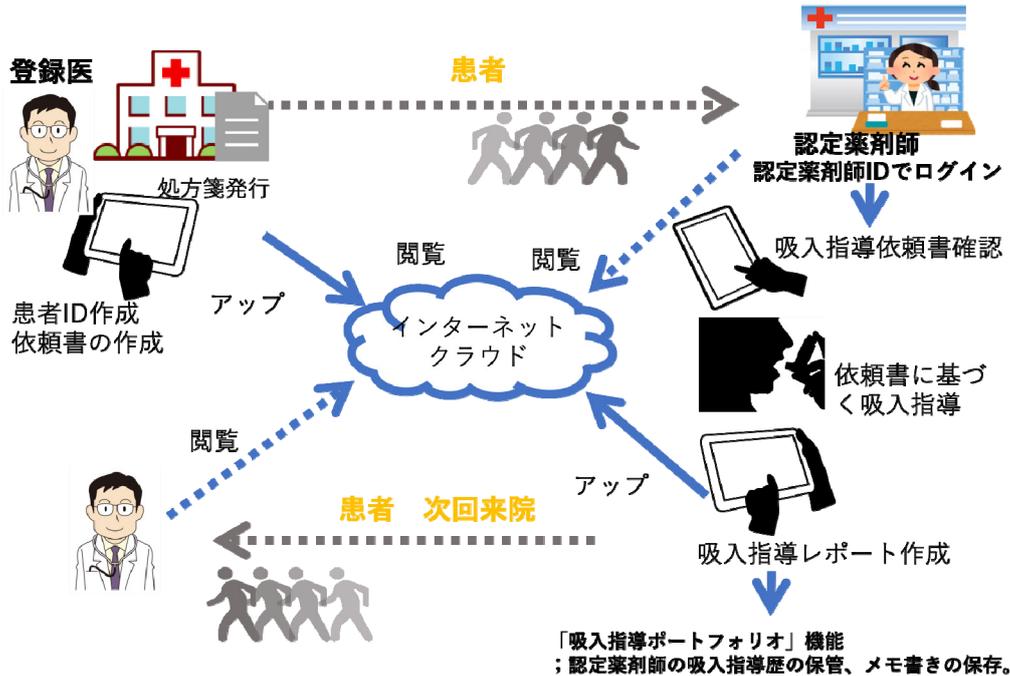


図5 吸入療法支援のための吸入指導票約連携システム「吸入カルテ」運用図

目間の相関特性が求められ、相関が高い項目に対し機械学習方法としてDecision tree, Random Forest, XGBoostの3手法を用いて予測を行った。相関分析は吸入指導報告書同士の相関係数が比較的に高いことを示していた。そのうち相関の比較的高い「確認事項」の3項目と「薬剤師からの伝言と提案」の5項目を各手法で予測を行った。Random Forestでの予測結果がDecision treeの予測結果を1項目を除き、全ての項目で同等か上回った。XGBoostは1つの項目以外は他の解析方法より低い値になっていた。項目によって再現率と適合率の大小が似通っていた。Random ForestはDecision treeをbaggingしたものであるため似た結果になったと思われる。全ての解析方法で精度は7割以上であった。

## 2-7 吸入治療支援アプリケーション「わたしの喘息カルテ（ゼンカル）」開発

喘息治療においては、コントロール状況に基づいた治療方法の変更や、調整といった長期の管理が重要である<sup>7)</sup>。喘息患者は自己管理のツールとして、日々の症状や、喘息管理に用いられるピークフロー値を「喘息日誌」に記録している。この記録は症状増悪前にピークフロー値の低下や自覚症状の変化が

記録されるため、増悪を予防する目的で主治医からあらかじめ指示されているアクションプランを実行する指標となっている。また、セルフモニタリングを行うことで、患者自身が自分の症状と気候や体調との関連性を見いだすことが可能である。継続された記録は、ビジュアルフィードバックされることで、自己効力感を高めて、治療行動を強化するのに有効である<sup>7)</sup>とされており、優れた管理ツールであると言える。しかし、現行の喘息日誌の問題点としては、受診時に日誌を持参する必要があること、日々の評価は受診時に主治医によって行われ、過去のピークフロー値や症状コントロールを評価するためには、日誌の記録を全て確認後、主治医がサマライズし、患者に解説、説明をする必要があることなどが挙げられる。そこで、これら問題点を解決する手段として、吸入治療支援アプリケーション「私の喘息カルテ（ゼンカル）」以下「ゼンカル」を設計した。（図6）「ゼンカル」はスマートフォンやタブレット端末で利用でき、個人情報の入力が必要としない。インターネットに繋がっていない状態でも入力が可能であり、入力情報はまとめて、クラウドに保存されいつでも取り出すことができる。以下のシステムを実装している。

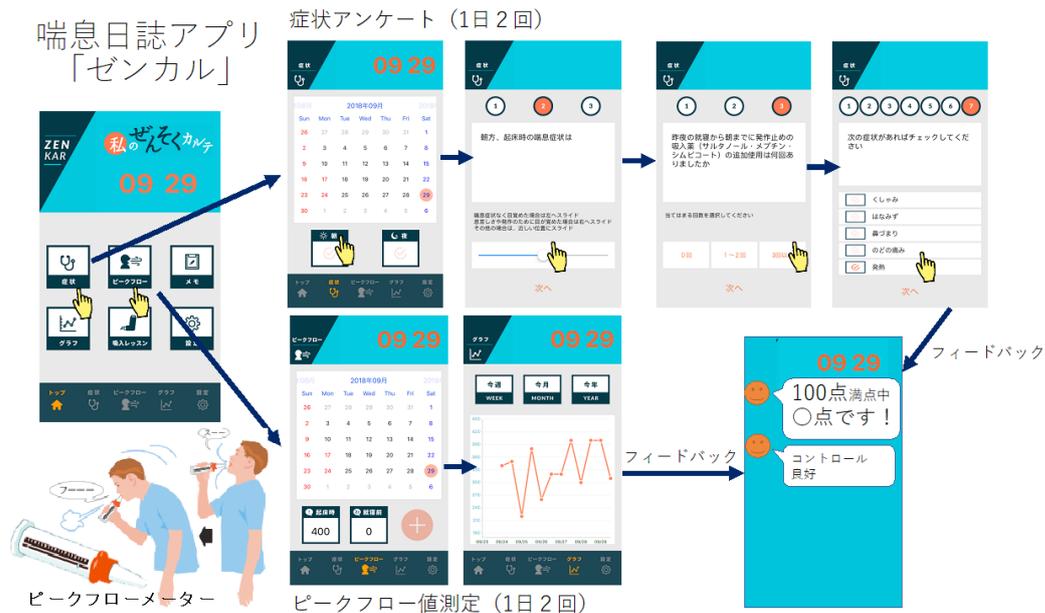


図6 吸入治療支援アプリケーション「わたしの喘息カルテ (ゼンカル)」のインターフェイス

1. リマインダー：吸入時間の設定を行うと、毎日決まった時間にスマートフォンの画面に吸入と、ピークフロー測定、症状を入力するよう促すメッセージが表示される。
2. ピークフローメーターの記録：従来の喘息日誌と同様に起床時、就寝前のピークフロー値を入力でき、グラフとして表示される。グラフの表示期間の変更が可能であるため、過去一週間、一ヶ月、一年などの経過をグラフで表示できる。この表示により患者の季節性の変化や、治療効果の長期的評価を感覚的に確認できる。
3. 症状入力とフィードバックシステム：起床時と就寝前に疾患のコントロール状況を評価する質問に対して入力を行うと、回答内容が点数化される。ピークフロー値の変動率も加味して使用者のコントロール状態を100点満点で評価しアプリ上にフィードバックして1日毎、一週間毎の入力内容を総括して点数表示する。
4. 「吸入レッスン」と連動：使用する吸入器の使用方法をいつでも確認できるように前述の「吸入レッスン」をアプリ上から視聴することができる。
5. メモ機能の利用：診察時に主治医に伝えたい内容や、メモをスマートフォン上のメモアプリ

ケーションに連動して保存する。入力した日付と時間がアプリケーション上に自動で記録されるため、受診間隔の長い患者であっても、在宅治療中の疑問などを診察時、主治医に質問することができる。吸入治療の空白を埋めて円滑なコミュニケーションに役立てることが可能となると期待される。

本アプリケーションを用いたユーザビリティと継続性について、次年度、医学部附属板橋病院で臨床研究を行い検証する予定である。

### 3. 考察

本研究は呼吸器疾患における「治療の空白」を改善することを目標としている。pMDIスパーサーの開発は、ユニバーサルデザインの視点からデザインされ、従来とは全く違った発想によりこれまでにない小型スパーサーとなったが、チャンバー内の流体力学的解析でも吸入効率は吸入スピードに左右されないことが確認された。新型スパーサーはこれまでより弱い力で薬剤噴霧が可能となり、握力の弱い高齢者や小児でも独力で噴霧吸入が行える仕様となった。今後は本スパーサーに通信 (Bluetooth) 機能を付加し、「ゼンカル」との連動をはかって、在宅での吸入状況をモニタリング可能となるよう計画して

いる。

吸入を介助する機能を実装する目的で、pMDI吸入タイミングをフォトリフレクタを用いて測定し、噴霧速度に合わせるのに適した吸入スピードを検討した。吸入スピードと噴霧スピードから吸入によって薬剤移動速度の加速が確認された。この測定にも広がりがあり、ポンペを正しく押せなかった場合には予想される加速が得られないと考えられた。

高齢者の吸入指導による手技習得はその認知機能と年齢で各クラスター間に差があり、良好なアドヒアランスを申告していても、認知機能のある患者では吸入手技に問題がある割合が高いことがわかった。日常診療における認知機能評価は困難であるが、認知機能低下が疑われる高齢者に対する吸入指導は繰り返し行うべきである。

ウェブアプリ「吸入レッスン」は広く日本全国で利用されていることがわかった。患者のみならず医療者にも利用されており、幅広い年齢で利用されている。高齢であっても、タブレットを使って薬局や自宅で繰り返し吸入方法を確認できるため、今後も利用者が増加することが予測される。さらなるコンテンツの充実が求められている。

吸入指導の病薬連携クラウドシステム「吸入カルテ」の運用により得られたデータから、マシンラーニングの手法で行なった指導内容の予測率は7割以上となっていた。テストはデータ数29件で行ったため、テストデータ数が多ければさらに多様性が生まれ、精度が低下するとも考えられる。「吸入カルテ」を運用し続けることでデータは蓄積し、より多くのデータを用いて予測・解析が可能となる。また、この学習結果を本アプリケーションに組み込み、リアルタイムで予測を行い、項目のチェック忘れ等の防止機能を加える予定である。

吸入治療支援アプリケーション「わたしの喘息カルテ(ゼンカル)」の特徴はこれまでになかった、症状、ピークフローなどからの記録からのフィードバックが自動で行われる点である。データの蓄積が

進めば、気象情報や地理情報などと合わせて分析することで、今後出現する症状の増悪の予測が可能となる。

#### 4. 結 語

このような吸入療法の在宅服薬管理モデルを構築し、広く医療現場に導入することができれば、在宅医療・居宅療養における「吸入治療の空白」を改善することが期待できる。

※本研究は日本大学学術研究助成金【社会実装研究】(課題番号 社18-006)により行われた。

#### 文 献

- 1) 中川一人, 肥田不二夫, 伊藤玲子: 微差圧センサを備えた pMDI (加圧式定量噴霧式吸入器) 用吸入デバイスによる吸入状況のモニタリングおよび吸入治療への応用, 日本機械学会2018年度年次大会講演論文集2019年9月12日
- 2) 肥田不二夫: 呼吸器プロダクトの新たな可能性について (2), 日本大学芸術学部 紀要「論文編」第69号, 2019年3月
- 3) Johal Bajinder, et al. Plume characteristics of fluticasone propionate/ formoterol pMDI compared with fluticasone propionate/salmeterol pMDI. P4132, European Respiratory Society Annual Congress 2013
- 4) 滝島翔太, 村下陽, 戸田健, 中川一人, 肥田不二夫, 伊藤玲子, 丸岡秀一郎, 権寧博: フォトリフレクタを用いた加圧式定量噴霧吸入器の吸入タイミング簡易測定システムのパイロットテスト, 電気学会産業計測制御研究会資料 (高度センサ情報処理技術とその応用), 2018年11月
- 5) 伊藤玲子, 権寧博, 坪井絵莉子, 橋本修: 高齢患者吸入指導におけるクラスター分析の試み, 第28回日本呼吸ケア・リハビリテーション学会学術集会, 2018年9月
- 6) Reiko Ito, Yasuhiro Gon, et al. Utility of electronic tablet-based inhaler technique training. OA3195, European Respiratory Society Annual Congress 2017
- 7) 「喘息予防・管理ガイドライン2018」作成委員. 喘息予防・管理ガイドライン2018. 協和企画. 2018年6月
- 8) 山内智史, 芳村賢士郎, 入江泰生, 梁島一哉, 戸田健, 大林浩幸, 伊藤玲子, 権寧博: 吸入療法支援のための病薬連携システムにおけるデータマイニングの試み—マシンラーニングを用いた吸入報告指導内容の予測可能性—, 第62回日本大学理工学部学術講演会, L-10, 2018年12月

## 病理診断ガイドアプリケーションシステムの構築

中西陽子<sup>1)</sup>, 五味悠一郎<sup>2)</sup>, 根東義明<sup>3)</sup>, 増田しのぶ<sup>1)</sup>

### Construction of an application for efficient pathological diagnosis

Yoko NAKANISHI<sup>1)</sup>, Yuichiro GOMI<sup>2)</sup>, Yoshiaki KONDO<sup>3)</sup>, Shinobu MASUDA<sup>1)</sup>

#### 要旨

An accurate and rapid differential diagnosis is required for personalized cancer treatment. However, there are lots of immunohistochemical markers and genetic tests to decide a pathology diagnosis. Pathologists need time to search what markers to select, and confirm the results of them. We present a guideline-based decision support system that provides to pathologists easily investigation of immunohistochemical markers and genetic tests for effective differential diagnostic workflow.

#### 1. 研究の背景

がんの適切な診療には適切な診断が必須である。がんは日本人の死因の第一位であり、その割合は年々増加している。しかし、分子生物学の発展によって手術困難な進行がんや再発がんに対しても様々な治療が効果を示すようになってきたことから、がんの診断は、顕微鏡下の形態学的診断にタンパク発現や遺伝子情報を加えたより詳細な情報提供の必要性が生じている。しかしながら我が国では、患者数当たりの病理医数は米国の5分の1とされていた<sup>1)</sup>上、一人が全診療科および全臓器に対応しなければならない。臓器毎の診断基準や治療法の変遷は速く、このため多くの診療ガイドラインが存在し、頻回に改訂される。最新版の癌取り扱い規約の確認作業の負荷も指摘されてきた<sup>2)</sup>。本研究では、病理学分野における臨床意思決定支援システム (Clinical Decision Support System: CDSS) として、鑑別診断のための免疫染色ならびに遺伝子検査情報を集

約したアプリケーションシステムの開発を試みた。

CDSSは、診療において様々な意思決定を支援するコンピューターシステムであり、患者データの取得補助、さらに取得したデータに基づく適切な決定を下すことができるコンピュータープログラムのことであると、1969年にGoertzelが提唱している<sup>3)</sup>。慢性的な医師不足による医師の業務負担を軽減するため、CDSSによる構造化された診療情報の必要性もすでに指摘されていた<sup>3)</sup>。

病理学分野における試みとしては、Whole slide imageなどのイメージングと患者データを組み合わせた個別化治療への取り組み<sup>4)</sup>、Free textで表記される病理診断レポートの自然言語処理による情報抽出<sup>5)</sup>や、コード利用による分類を行う試みなどが報告されている<sup>6)</sup>。しかしながら、いずれも規制上の障害、標準化の欠如、相互利用の乏しさによる利用拡大の困難さが課題とされている。本邦では癌取り扱い規約に準じた病理診断報告書作成支援システムが

1) 日本大学医学部病態病理学系腫瘍病理学分野

2) 日本大学理工学部

3) 日本大学医学部社会医学系医療管理学分野

中西陽子：nakanishi.youko@nihon-u.ac.jp

報告されている<sup>2)</sup>。本研究では、病理診断ワークフローにCDSSを応用して、個人の経験や知識に寄らず、エビデンスに基づいた免疫染色を比較的簡便に選択できるシステムを構築し、病理診断業務の効率化と均てん化に貢献することを目的とした。

## 2. 目的

本研究では、病理診断のために提出された臓器情報から候補となる診断名を表示し、鑑別診断を行う際に必要な、あるいは参考となる免疫染色や遺伝子検査の項目を、エビデンスに基づいて簡便に表示する病理診断業務支援システムの構築を試みることを目的とした。

## 3. 方法

### 3-1 本システムの位置づけ

がん診療のおおまかな流れをTable 1に示す。問診から検査、病理診断、治療へと進む。病理診断業務の中では、標本作製、鏡検、鑑別診断が必要な際の免疫染色、遺伝子検査の実施と評価、最終診断となる。本システムは特に候補となる鑑別診断名とそれに必要な免疫染色ならびに遺伝子検査情報、さら

に想定される結果を表示させることとした。

(例：肺腺癌 TTF1：陽性 p40：陰性 など)

医療系システム開発では個人情報セキュリティへの配慮が最も重要であるため、本システムはFigure 1に示す通り、病院情報システムが有する患者情報とは、完全に遮断された状態とした。これにより、既存システムの違いや利用場所、利用者の制限なく利用可能と考えられる。

### 3-2 本システムの構築方法

#### 1) アルゴリズムの検討

本研究では、病理診断業務に沿ったシステム構築を目指すため、以下のようなアルゴリズムを作成した。



#### 2) データの抽出および蓄積

エビデンスに基づいた、標準化された情報提供を目指すため、データの抽出源は、各種癌取扱い規約、診療ガイドライン、腫瘍病理鑑別診断アトラス、

Table 1 Flowchart of cancer diagnosis and the role of the present system

Order	Patients	Clinicians	Pathologists	The present system
1	<ul style="list-style-type: none"> <li>Visiting</li> <li>Consultation</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Interview</li> <li>Clinical examination</li> </ul>		
2	<ul style="list-style-type: none"> <li>Undergo some examinations</li> <li>Undergo surgery</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Cytology</li> <li>Biopsy</li> <li>Surgery</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Pathological diagnosis request form</li> </ul>	
3			<ul style="list-style-type: none"> <li>Specimen preparation</li> <li>Microscopic examination</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Show necessary additional examination</li> </ul>
			<ul style="list-style-type: none"> <li>Review guidelines, authorized classification books, journals</li> </ul>	
			<ul style="list-style-type: none"> <li>Additional examination (Immunohistochemistry, genetic analysis, etc.)</li> </ul>	
			<ul style="list-style-type: none"> <li>Review guidelines, authorized classification books, journals</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Show candidate diagnosis</li> </ul>
4	<ul style="list-style-type: none"> <li>Undergo treatment</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Decision of treatment strategies</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Final diagnosis</li> </ul>	

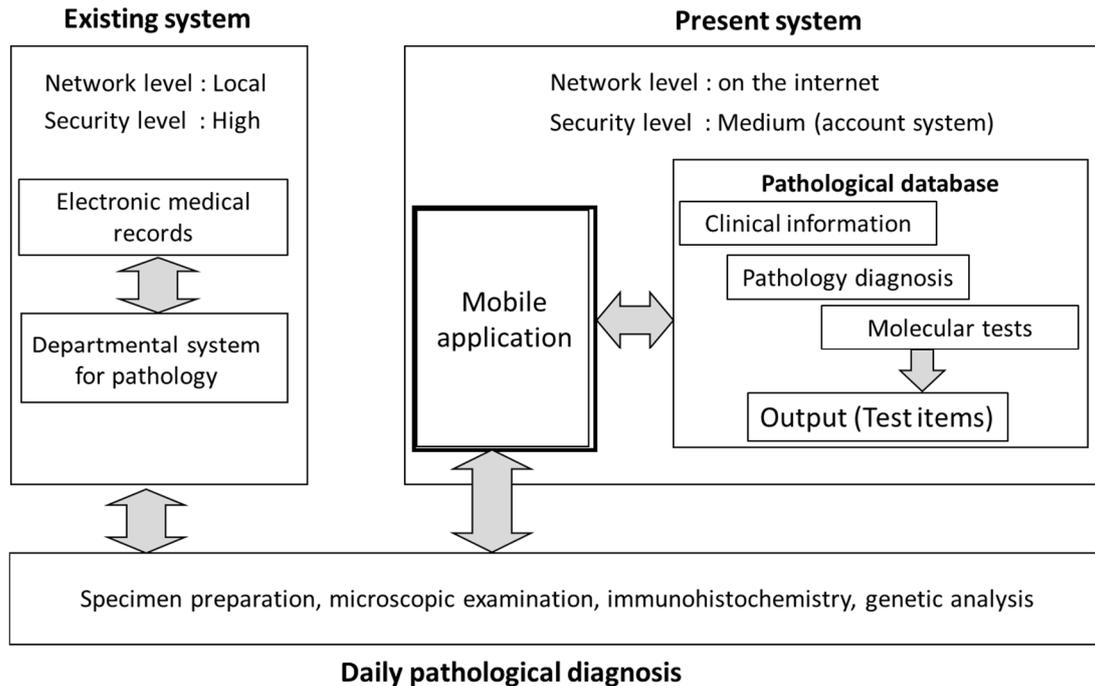


Figure 1 Position of the present system in daily diagnostic work

WHO Classificationの各最新版とした。これらの資料より、1に示した各情報を単語単位で切り出し、独自のコードを付与した後、CSVベースのマスターファイルとしてローカルサーバに蓄積した。

### 3) 意思決定処理方法

日常の病理診断ワークフローに即した手順で、各項目を選択し、鑑別診断のための免疫染色を提示させる処理方法として、マスターのシーケンシャルファイルにアクセスするWebフォーム形式を採用した。

### 4) ユーザーインターフェースの検討

電子カルテなどの病院情報システムと切り離し、フリーのネットワーク環境での使用を想定しているため、患者情報やID番号などのフリーテキスト入力できない、完全選択式のインターフェースとして検討した。

### 5) プロトタイプの実装と内部テスト

まず、肺癌を対象としたプロトタイプを作成し、動作確認と施設内小集団を対象としたデモテストおよびアンケート調査を実施した。

### 6) システムの改訂

プロトタイプの実装の結果をもとに、主にユーザーインターフェースのデザインと表示方法を改訂した。また、免疫染色結果の画像表示に対する

要望が多かったため、独自の染色写真の蓄積も開始した。

## 4. 結果

### 4-1 システムの実装

病理診断ガイドアプリケーション eVico (evidence based companion pathological diagnosis support system) <https://nsp.ce.cst.nihon-u.ac.jp/evico/> を Figure 2の通り実装した。

本システムでは、提出された依頼書などをもとに、臓器情報を選択し、HE染色の組織所見から得られる情報を選択して候補となる鑑別診断名を表示させる。調べたい診断名を選択すると、推奨される免疫染色や遺伝子検査とその出典が表示される。選択した染色ワークシートが作成されるため、免疫染色のオーダー用紙としての利用も可能であることが確認された。

## 5. 考察

病理診断では最新版の規約を確認する作業の負荷が指摘されている<sup>2)</sup>。これは鑑別診断に適切な免疫染色を選択する際にも同様である。近年、人工知能(AI)による診断支援システムの開発が着目されて



Figure 2 Top page of the present system

いるが、そのアルゴリズムはブラックボックスである場合も多い。本システムは、規約やガイドラインを元に、診断ワークフローに比較的忠実かつ明確なアルゴリズムを採用している。本システムをiOSなどで利用することにより、鑑別に推奨されている免疫染色を出典情報とともに比較的簡便に選択できることに加えて、鑑別診断名の辞書的な活用の有用性も期待される。今後は内容の充実とパフォーマンスの向上、病理学会発表を活用した希少がんへの情報提供ツールの追加を検討していく予定である。

#### 謝辞

本研究は、2018～2019年度日本大学社会実装研究ならびに2018～2022年度科学研究費（JP 18H03497）の助成により実施しています（特許出願中）。

本研究において多大なご助言、ご指導賜りましたスクラファインテックジャパン株式会社 芳賀拓也氏に深謝申し上げます。

#### 文献

- 濃沼信夫：病理医をめぐる課題と医療制度改革の展望. 病理と臨床 2005;23:025-1030.
- 谷山清己：がん取扱い規約病理支援ソフト呉（KUSS）の紹介. 病理と臨床 2015;33:1034-1035.
- Goertzel G. Clinical decision support system. Ann N Y Acad Sci 1969;161:689-93.
- Hanna MG, Pantanowitz L. The role of informatics in patient-centered care and personalized medicine. Cancer Cytopathol 2017;125:494-501.
- Kasthurirathne SN, Dixon BE, Grannis SJ. Evaluating methods for identifying cancer in free-text pathology reports using various machine learning and data pre-processing approaches. Stud Health Technol Inform 2015;216:1070.
- Oleynik M, Finger M, Patrão DF. Automated classification of pathology reports. Stud Health Technol Inform 2015;216:1040.

# 広範な血管内容血を生じた ウェルシュ菌株のヒト血球に対する障害作用

須崎 愛<sup>1)</sup>, 相澤志保子<sup>2)</sup>, Trinh DuyQuang<sup>2)</sup>

## Cytotoxic effects of *Clostridium perfringens* derived from massive intravascular hemolysis cases on human peripheral blood cells

Ai SUZAKI<sup>1)</sup>, Shihoko AIZAWA<sup>2)</sup>, Trinh DuyQuang<sup>2)</sup>

### 要旨

集団食中毒やガス壊疽の起因菌であるウェルシュ菌 (*Clostridium perfringens*) には、頻度は少ないものの広範な血管内容血を生じ電撃的な経過で死に至る敗血症の病態がある。症例数が少なく生前診断が困難なことから、血管内容血については未だ詳細不明なため、我々は劇症型血管内容血性敗血症例から分離した臨床株を用いて、ヒト血球に対する細胞障害作用を非溶血群との間で比較検討した。有意差はでなかったものの、溶血群では末梢単核球への障害作用が強い傾向があり、菌体が産生する毒素の量または種類に非溶血群と異なる可能性が示唆された。

### 1. はじめに

ウェルシュ菌 (*Clostridium perfringens*) は、破傷風菌と同じクロストリジウム属の芽胞形成性偏性嫌気性菌で、ヒトや動物の腸管内、土壌などの自然界に広く分布し、ヒトを含む動物に対して強い病原性を持つ。ヒトに対しては、集団食中毒やガス壊疽の起因菌としてよく知られている。ウェルシュ菌による敗血症は、食中毒やガス壊疽に比べて頻度は低いが致死率の高い疾患で、特にこの菌により血管内容血が生じた場合は電撃的な経過をとり、抗菌薬の効果を待つ間もなく死に至る重篤な疾患である<sup>1)</sup>。

ウェルシュ菌は4種類の主要毒素 $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\epsilon$ ,  $\iota$ の産生性によってA, B, C, D, Eの5つの型に分類されるが、ヒトから分離されるウェルシュ菌の殆どが $\alpha$ 毒素を産出するA型菌である。 $\alpha$ 毒素はホスホリパーゼCで、細胞膜を破壊し溶血作用や組織の壊死を起こすため、ガス壊疽の病態に関与していると考えられている<sup>2)</sup>。広汎な血管内容血を生じる敗血症の病態も $\alpha$ 毒素によると考えられているが、ヒト

に感染するA型ウェルシュ菌の殆どが $\alpha$ 毒素を産生するため、 $\alpha$ 毒素だけでは必ずしも病態を説明できない。広汎な血管内容血を呈する敗血症症例が少ないことや、発症後電撃的な経過を取るなど生前診断も困難なため、今までの報告は殆どが一例報告にすぎず、現在まで血管内容血を生じる病態についての詳細な検討はなされていない。

本研究は、ウェルシュ菌敗血症時の致死性血管内容血機序を解明する目的で、広範な血管内容血を生じた敗血症例の血液由来株と溶血を生じなかった症例の血液由来株を用いて、ヒト赤血球に対する溶血作用とヒト末梢単核球への細胞障害作用を比較検討し、両群の臨床像の差異が菌株そのものの違いによるものかどうかを検討した。

### 2. 対象及び方法 菌株及び培養上清

日本大学病院に凍結保存されていたウェルシュ菌臨床株のうち、劇症型の血管内容血群5株と非溶血

1) 日本大学医学部内科学系総合診療学分野  
2) 日本大学医学部病体病理学系微生物学分野  
須崎 愛 : suzaki.ai@nihon-u.ac.jp

群4株の血液由来株を使用した。9株はいずれもα毒素を産生するA型菌であった。培養上清は、ヒツジ血液寒天培地で起こした臨床分離株をGAM培地で培養し、それぞれの菌数を揃えた時点で遠心分離し採取した。

#### ヒト血球

倫理委員会で承認された研究内容に基づいてインフォームドコンセントを行なった健康ボランティアから、実験当日に採取した末梢血を使用した。ヒト赤血球はO型血を使用した。ヒト末梢単核球はLymphoprep™を用いて分離した。

#### 溶血実験

1%のヒトO型血と2倍希釈系列したウェルシュ菌培養上清を37℃で60分間培養し、溶血率を測定した。

#### 末梢血単核球障害作用

分離した末梢単核球に、ウェルシュ菌培養上清を1%、5%になるように加えて37℃で4時間培養し、細胞数をコントロール群と比較した。

### 3. 結果

#### 溶血実験

ウェルシュ菌培養上清によるヒト赤血球の溶血作用は強く、64倍希釈した菌培養上清でも50%の溶血率を呈した。溶血群と非溶血群では溶血群に1%ヒト赤血球への溶血作用が強い傾向があったが、非溶血群に属する菌株間の特性の違いが大きく、有意差は認められなかった(図1)。

#### 末梢血単核球障害作用

1%と5%濃度のウェルシュ菌培養上清がヒト末梢血単核球へ及ぼす細胞障害作用を検討した。溶血群の菌株から採取した培養上清は、1%の濃度でもコントロールに比べて80%に、5%濃度では60%へと明らかに細胞数を減じ(p<0.01)、溶血群の菌株培養上清には、ヒト末梢血単核球へ細胞障害作用を及ぼす要因があることが判った。非溶血群の培養上清は、1%の濃度で95%、5%濃度でも84%と末梢血単核球数への障害作用が比較的良かった。溶血群と非溶血群では溶血群に単核球細胞障害作用が強かったが、両群間で有意差は認められなかった(図2)。

### 4. 考察

ウェルシュ菌は多数の毒素・酵素を産生し、体内

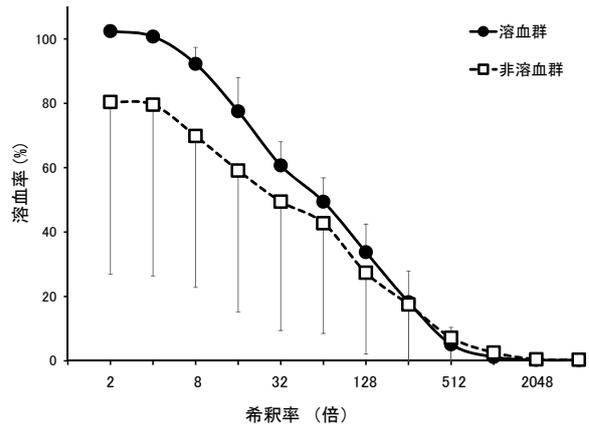


図1 ウェルシュ菌培養上清のヒト赤血球に対する溶血作用

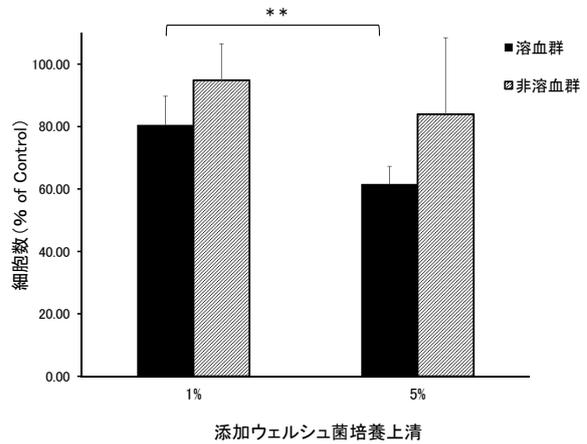


図2 ウェルシュ菌培養上清のヒト末梢単核球に対する障害作用

で多くの細胞障害作用を呈することにより、様々な病態を呈する。今回、劇症型血管内容血性敗血症例から分離した貴重な臨床株を用いて、非溶血群との間で菌培養上清による細胞障害作用を比較検討したところ、有意差はでなかったが溶血群で末梢単核球の障害作用が強い傾向が示された。

### 5. 結語

ウェルシュ菌による劇症型血管内容血性敗血症の病態には、末梢単核球に細胞障害作用を及ぼす菌体産生成分が関与していると考えられた。

文 献

- 1) van Bunderen CC, Bomers MK, Wesdorp E, *et al.* Clostridium perfringens septicaemia with massive intravascular haemolysis: a case report and review of the literature. Neth J Med. 2010; 68 (9) : 343-6.
- 2) Uzal FA, Freedman JC, Shrestha A, *et al.* Towards an understanding of the role of Clostridium perfringens toxins in human and animal disease. Future Microbiol. 2014; 9 (3) : 361-77.

# 神経芽腫におけるCHK1阻害剤の治療効果予測マーカーの開発

安藤清宏<sup>1)</sup>, カサレスヴェルナ<sup>1)</sup>, 横山 淳<sup>2)</sup>, 上原秀一郎<sup>3)</sup>,  
金田英秀<sup>3)</sup>, 槇島 誠<sup>1)</sup>, 越永従道<sup>3)</sup>

## Identification of a predictive marker for response to CHK1 inhibitor in neuroblastoma therapeutics

Kiyohiro ANDO<sup>1)</sup>, Verna CAZARES<sup>1)</sup>, Shuichiro UEHARA<sup>2)</sup>,  
Hide KANEDA<sup>2)</sup>, Makoto MAKISHIMA<sup>1)</sup>, Tsugumichi KOSHINAGA<sup>2)</sup>

### 要旨

Checkpoint kinase 1 (CHK1) 蛋白質に対する阻害剤は、神経芽腫を含む様々ながんの治療薬となる可能性が期待されて臨床試験が進められている。本研究は、臨床応用に向けたCHK1阻害剤がもつ癌細胞の増殖抑制効果の分子機構の解析およびその感受性を決定しうるバイオマーカーの探索を目的とした。CHK1阻害剤に感受性の低いNB-39-nu細胞においてCHK1阻害剤処理によって癌遺伝子MDM2の発現上昇が誘導されることに着目して、CHK1阻害剤の存在下にMDM2と複合体を形成するタンパク質を探索し、その候補から神経芽腫の予後と関連するASAP1およびCEP131を同定した。

### 1. はじめに

細胞周期のS/ G<sub>2</sub>/ M期に中心的な役割を担うCheckpoint kinase 1 (CHK1) 蛋白質に対する阻害剤は、様々ながんの横断的な治療薬となる可能性が期待されて10年来開発が進められている<sup>1)</sup>。近年、神経芽腫を含むいくつかのがん種の非臨床において、CHK1阻害剤の単剤での有効性が報告されており、小児がん領域においてもCHK1阻害剤の第I相および第II相海外臨床試験がすすめられている。しかしながら、CHK1阻害剤単剤での抗腫瘍効果の分子機構については未だ不明な点が多く、さらに臨床応用のためには感受性を決定しうるバイオマーカーの同定が急務の課題である。本研究は、CHK1阻害剤による神経芽腫細胞株の増殖抑制効果の分子機構の解明と臨床応用が可能な効果予測マーカーを開発することによって、難治性神経芽腫に対する治療成績の向上に寄与することを目的として行った。

### 2. 対象及び方法

これまでの研究において、CHK1阻害剤 (PF-477736) に比較的に感受性の低い神経芽腫NB-39-nu細胞株ではCHK1阻害剤処理に応答してp53の下流遺伝子の一つであり癌遺伝子として広く知られているMDM2の発現が亢進することが判明した。本研究ではNB-39-nu細胞におけるMDM2の発現をsiRNAによって抑制した際に細胞増殖に及ぼす影響を対照群と比較することによってCHK1阻害剤に対する感受性の変化の有無を検討した。さらに、CHK1阻害剤処理に応答してMDM2タンパク質と複合体を形成する分子を免疫沈降法により回収してSDS-PAGEにより分離、Coomassie Brilliant Blue (CBB) 染色を行なった。CHK1阻害剤処理によって、無処理の対照と比較して強く染色されたバンドをゲルより切り出したのち質量分析によって同定した。同定されたMDM2結合分子を公開されている

1) 日本大学医学部生体機能医学系生化学分野

2) 東北大学大学院分子内分生物学

3) 日本大学医学部外科学系小児外科分野

安藤清宏: kiyohiroan@med.showa-u.ac.jp

データベース (R2: Genomics Analysis and Visualization Platform) を用いて神経芽腫の予後との関連の有無を検討した。

### 3. 結果

NB39-nu細胞におけるMDM2の発現をsiRNAによって抑制したところ、CHK1阻害剤の細胞増殖抑制効果が減弱したことから、MDM2はCHK1阻害剤による細胞増殖抑制効果に必要な分子であることが判明した (図1)。

次に、CHK1阻害剤処理に応答してMDM2と共沈

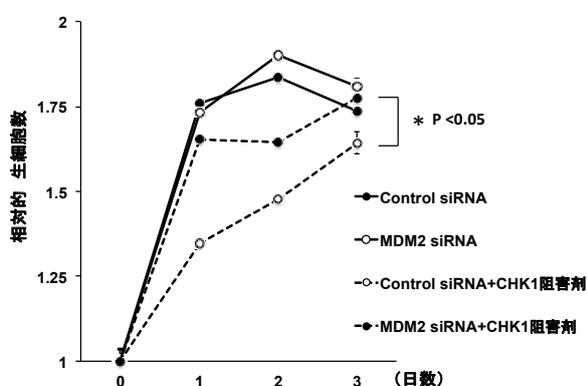


図1 MDM2はNB-39-nu細胞におけるCHK1阻害剤の細胞増殖抑制効果に必要な構成分子である。

するタンパク質を展開した結果、100-150 kDa付近に濃染するバンドが観察された (図2A: 赤矢印)。質量分析により同定された当該バンドに含まれる分子の候補からデータベース解析によって神経芽腫の予後と関わる分子であるASAP1およびCEP131が同定された (図2B)。

### 4. 考察

p53のもつ転写活性化能の標的遺伝子の一つであるMDM2は、さまざまな種類の癌においてその遺伝子座の増幅や転写産物の高発現が報告されており、さらにその機能が癌抑制遺伝子p53のタンパク質分解に関わるユビキチンリガーゼであることから、癌遺伝子の一つと考えられている<sup>2)</sup>。しかしながら本研究において明らかとなったCHK1存在下におけるMDM2の細胞増殖抑制効果の分子機構は、p53蛋白質の分解に関わる機能だけでは説明が困難と考えられた。CHK1阻害剤処理によってMDM2との複合体形成が増強されたASAP1およびCEP131は、いずれもmRNAの高発現と神経芽腫の不良な予後に相関する傾向が示されたが、両者はいくつかの成人の癌においても腫瘍の進展・転移・予後不良等に関連することが報告されている癌関連遺伝子であった<sup>3) 4)</sup>。これらの結果より、MDM2はCHK1阻害剤処理に応答して両分子との結合を介してそれら

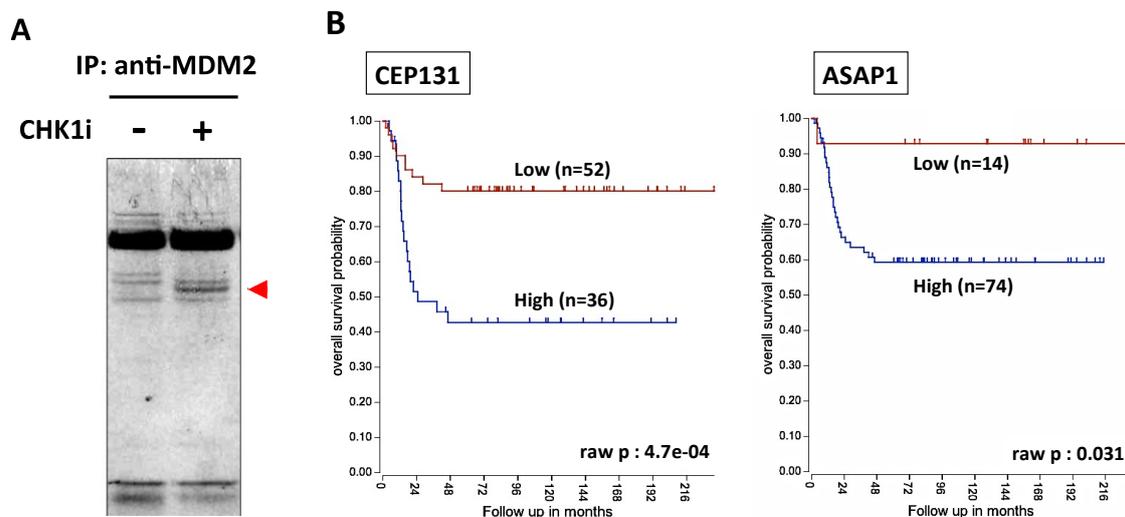


図2 CHK1阻害剤によりMDM2との結合が誘導されるCHK1阻害剤感受性決定分子の同定。A, NB-39-nu細胞を無処理 (-) およびCHK1阻害剤 (CHK1i) あり (+) の条件で抗MDM2抗体を用いて免疫沈降 (IP) を行い、展開した産物を染色した。B, CEP131およびASAP1と神経芽腫の予後との関連。

の機能を抑制することで神経芽腫の細胞増殖を抑制する可能性が推察された。今後は、両分子とMDM2との機能的相互作用の解析を進めることで、その分子機構の面からの検討を行い、難治性神経芽腫に対するCHK1阻害剤治療の効果予測バイオマーカーの開発を進めてゆく。

#### 4. 結 語

CHK1阻害剤の感受性に関わるMDM2結合分子としてCEP131およびASAP1を同定した。

#### 文 献

- 1) Bartek J and Lukas J. *Nature*. **2003**, 421, 486-488.
- 2) Jan-Philipp Kruse and Wei Gu. *Cell*. **2009**, 137, 609-622.
- 3) Müller T1, Stein U, Poletti A, Garzia L, Rothley M, Plaumann D, Thiele W, Bauer M, Galasso A, Schlag P, Pankratz M, Zollo M, Sleeman JP. *Oncogene*. **2010**, 29, 2393-403.
- 4) Liu XH, Yang YF, Fang HY, Wang XH, Zhang MF and Wu DC. *Int J Biochem Cell Biol*. **2017**, 90, 1-8.

# 慢性血栓塞栓性肺高血圧症の肺動脈内膜における 蛋白・遺伝子発現解析

帯包妃代<sup>1)</sup>, 本間 琢<sup>1)</sup>, 山田清香<sup>1)</sup>, 羽尾裕之<sup>1)</sup>

## Protein and gene expression in pulmonary artery of chronic thromboembolic pulmonary hypertension.

Hiyo OBIKANE<sup>1)</sup>, Taku HOMMA<sup>1)</sup>, Sayaka YAMADA<sup>1)</sup>, Hiroyuki HAO<sup>1)</sup>

### 要旨

慢性血栓塞栓性肺高血圧症は、器質化血栓により肺動脈が慢性的に閉塞する予後不良の病態である。治療法として肺動脈血栓内膜摘除術 (PEA) が有効であるが、PEA 標本に対する病理学的検討は文献上少ない。今回我々は PEA 標本の病理組織像と術後経過との関連性、およびこれらの組織における蛋白・遺伝子発現について検討した。

術後経過良好群の PEA 標本では、経過不良群に比べ、分化した平滑筋細胞を伴う再疎通血管集簇像が有意に多く認められ、術後経過予測に重要な所見と考えられた。蛋白・遺伝子検索では、血栓形成部位での酸化・抗酸化機構の関与が示唆された。また、再疎通血管集簇部での血管収縮物質・エンドセリンの上昇、分化した平滑筋細胞のエンドセリン受容体 ET-a の発現が見られ、病状増悪に関与すると考えられた。

### 1. はじめに

慢性血栓塞栓性肺高血圧症 (Chronic thromboembolic pulmonary hypertension: CTEPH) は、肺動脈内に発生した器質化血栓により肺動脈が慢性的に閉塞・狭窄し、肺高血圧ひいては右室不全を引き起こす予後不良の病態であり、本邦でも特定疾患に指定されている。

CTEPH に対する現在の治療法は、血栓の再発予防の抗凝固療法と肺高血圧症に対する肺血管拡張剤使用などの薬剤療法の他、肺動脈血栓内膜摘除術 (Pulmonary thromboendarterectomy: PEA) やバルーン肺動脈形成術が有効な外科的治療法として知られている<sup>1)</sup>。

CTEPH に関して、PEA の効果や術式に関する研究は多いが、病変摘除検体に対する病理学的検討は

文献が少なく、病変の評価法も確立していない<sup>2)</sup>。

そこで、本研究では CTEPH 症例の PEA 標本を用いて、病理組織標本を客観性のある指標で分類し、臨床所見・術後データ等との関連性を検討した。また、組織形態と蛋白・遺伝子発現を比較・検討し、CTEPH における病変増悪のメカニズムについて考察した。

### 2. 対象及び方法

#### 2-1 対象

共同研究施設である東京医科大学病院で平成 25 年 2 月から平成 29 年 3 月までに採取された CTEPH 50 症例の PEA 検体について検討した。

組織学的・免疫組織化学的検索についてはホルマリン固定・パラフィン包埋標本を用いた。遺伝子・

1) 日本大学医学部病態病理学系人体病理学分野  
帯包妃代: obikane.hiyo@nihon-u.ac.jp

蛋白解析に関しては、平成26年6月から平成29年3月までに上記施設に提出された27症例から材料を採取し、解析可能であった109個のサンプルを用いた。

尚、PEA適応となる症例は、いずれも術前に、中枢型もしくは中枢型+末梢型の肺動脈血栓症と判断されている。また、過去に採取された検体のホルマリン固定・パラフィン包埋ブロックを使用する後ろ向き研究に関しては、文書掲示によるオプトアウトの実施を行い、新たに採取される検体を用いた前向き研究に関しては、全例主治医よりインフォームドコンセントを取得した（東京医大・医学研究倫理審査委員会で承認済み。受付番号No.2694およびNo.2752）。

## 2-2 方法

### 1) CTEPH症例の臨床データ解析

全症例の術前後の右心カテーテルデータを確認し、術後肺高血圧残存のない経過良好群と、術後肺高血圧残存例および死亡例を含む術後経過不良群に分け、両群における患者背景、臨床指標に違いがないか検討した。なお、術後残存肺高血圧の定義は文献に基づき、肺血管抵抗 (pulmonary vascular resistance:PVR)  $\geq 500 \text{ dynes} \cdot \text{sec}^{-1} \cdot \text{cm}^5$ とした<sup>2)</sup>。

### 2) 病理組織像と術後経過との関連性の検討

PEA標本の組織像を、再疎通血管の集簇像 (Colander lesion)・新鮮血栓・器質化初期像・粥腫の4群に分類し、標本上の総病変数/総剖面数を算出した。各所見が術後経過良好群・不良群とで差が見られるか検討した。

### 3) 免疫組織化学的検討

① 平滑筋細胞分化マーカー ( $\alpha$ -smooth muscle actin:  $\alpha$ -SMA, h-caldesmon,), マクロファージマーカー (CD68), 酸化・抗酸化マーカー (Thioredoxin interacting protein: TXNIP, thioredoxin: TRX), エンドセリン受容体A (ET-a) の抗体を用い、免疫染色を行った。

② 組織像と比較し、蛋白を発現している細胞の種類や分布を検討した。

### 4) 遺伝子発現解析

採取サンプルからのRNA抽出を行い、酸化・抗酸化マーカーであるTXNIP, TRXおよび血管収縮物質 endothelin-1のmRNAの発現をRT-PCRで解析した。内因性コントロールにはGAPDHを用い、 $\Delta$ CT

法で評価した。いずれもTaq-Man Probeを使用し、計測にはQuantStudio3を使用した。

サンプル採取時にはその対面を組織標本とし、組織像を確認し遺伝子発現と検討した。

### 5) 統計解析

統計解析ソフトSPSSを使用し、Mann-whitney U検定, student-T検定,  $\chi^2$ 検定を行った。

## 3. 結果

### 3-1 全患者の背景と臨床検査データ・心臓カテーテル検査結果の比較

全症例の臨床背景、術前後の各種指標を表1-aに示す。全50症例のうち術後経過不良例は8例見られた。PEA後にPVRが500以上である残存肺高血圧症例は7例、術後死亡例は1例（術後PVR測定前）であった。経過不良群は全て女性で年齢がやや高かった。また、予後良好群と比較し術前PVRは有意に高く、術前心拍出量は有意に低下していた ( $P < 0.05$ )。

その他の背景（凝固異常の有無、深部静脈血栓の有無）、BNP等の各指標についてはいずれも両群間で有意差が見られなかった。

### 3-2 病理組織像と術後経過との関連性の検討

#### (表1-b)

PEA標本の各所見について、術後経過良好群・不良群間での比較を図1に示す。術後経過良好群のPEA標本では、術後経過不良群に比較し、Colander lesionが有意に多く認められた。その他の器質化初期像、新鮮血栓、粥腫については、両群間で有意差が見られなかった。

### 3-3 免疫組織化学的検討 (図1)

器質化血栓内の平滑筋細胞の性質、酸化・抗酸化マーカーについて検討した。

免疫組織化学的には、Colander lesionの再疎通血管を取り囲むように $\alpha$ -SMA (+) /h-caldesmon (+)となる高分化な平滑筋細胞の増生が確認できた。新鮮血栓や器質化初期の血栓では $\alpha$ -SMA (+) /h-caldesmon (-)の脱分化した平滑筋細胞のみがみられ、血栓器質化が進むにつれ平滑筋細胞の分化が進むことがCTEPH病理像の特徴と考えられた。

この高分化平滑筋細胞には血管収縮物質エンドセリンの受容体, ET-aも確認できた。

酸化・抗酸化マーカーであるTXNIPとTRXは浸

表 1-a 患者の背景と臨床検査データ

	総 数	術後経過良好群 (PVR<500)	術後経過不良群 (PVR ≥ 500 or 死亡)
症例数	50例	42例	8例(死亡例1例)
平均年齢	60.4 ± 13.6	58.3 ± 13.3 *	69.1 ± 12.0 *
男女比(人数)	17:33	17:25 *	0:8 *
凝固異常の診断あり	22.0%	19.5%	37.5%
深部静脈血栓の有無	70.0%	68.3%	75.0%
術前平均肺動脈圧 (mmHg)	41.7 ± 9.8	41.5 ± 10.3	42.9 ± 7.4
術前心拍出量 (L/min)	4.02 ± 1.35	4.20 ± 1.32 *	3.07 ± 1.19 *
術前肺血管抵抗 (dyne · sec · cm <sup>-5</sup> )	781.3 ± 412.	725.1 ± 383.8 *	1076.1 ± 457.4 *
術前BNP (pg/ml)	184.7 ± 201.0	178.2 ± 213.2	216.0 ± 134.4
術前6分間歩行 (m)	326.4 ± 109.2	330.0 ± 110.0	300.0 ± 110.7
術後平均肺動脈圧 (mmHg)	21.2 ± 8.3 **	19.3 ± 7.2 **	32.6 ± 5.0 **
術後心拍出量 (L/min)	4.13 ± 1.34	4.32 ± 1.36	3.00 ± 0.29
術後肺血管抵抗 (dyne · sec · cm <sup>-5</sup> )	280.9 ± 181.8 **	219.4 ± 102.2 **	649.9 ± 87.9 **
術後BNP (pg/ml)	131.6 ± 156.9	91.0 ± 73.3	334.2 ± 279.8
術後6分間歩行 (m)	340.8 ± 108.2	355.3 ± 106.6	245.0 ± 65.4

Mean ± SD, \* :p<0.05 (Mann-Whitney U test), \*\* :p<0.01 (術前後の比較, Student T test)

表 1-b 病理組織像と術後経過

(病巣数/剖面数)	術後経過良好群 (PVR<500)	術後経過不良群 (PVR ≥ 500 or 死亡)
再疎通血管集簇像	0.689 ± 0.427 **	0.129 ± 0.334 **
器質化初期像	0.440 ± 0.352	0.292 ± 0.261
新鮮血栓	0.582 ± 0.389	0.540 ± 0.408
粥状硬化	0.267 ± 0.353	0.264 ± 0.141

Mean ± SD, \*\* :p<0.01 (Mann-Whitney U test)

潤するマクロファージ・内皮細胞・平滑筋細胞に発現していたが、Colander lesionの高分化な平滑筋細胞では発現が低下していた。

### 3-4 遺伝子発現解析(図2)

27症例から得られた検体より解析可能であった109個のサンプルについて、その組織像からColander lesion, 新鮮血栓・初期器質化をみる血栓病変, 粥腫を伴った内膜の3群に分類した。それぞれの群での酸化マーカー (TXNIP), 抗酸化マーカー (TRX), 血管収縮物質 (Endothelin-1) のmRNA発現を比較した結果を図2に示す。Colander lesionを含むサンプルにおいてEndothelin-1の発現が、他の群に比較し有意に上昇していた。TRX発現は全群で有意差が確認できなかったが、TXNIPは再疎通血管で新鮮血栓よりも有意に増加しており、その他の群と比較しても増加傾向がみられた。

## 4. 考 察

### 4-1 術後肺高血圧残存の指標

臨床指標において、術後経過不良を予測しうる因子として、年齢、性別(女性)、術前PVR、術前心拍出量が挙げられた。ただしCTEPHは元来女性に多く、また術前状態の悪い症例で術後経過不良である例が多い結果と考えられ、これのみでの術後経過予測は困難であると思われる。

術後経過良好群のPEA標本の病理学的検討では、Colander lesionが有意に多く認められた。このことより、CTEPHに特徴的とされるColander lesionが病状を決定する責任病変であり、これを取り除くことがPEA術後肺高血圧残存を防ぐのに重要であると考えられた。病理組織学的にColander lesionの有無を確認することで、術後経過が予測できると考える。

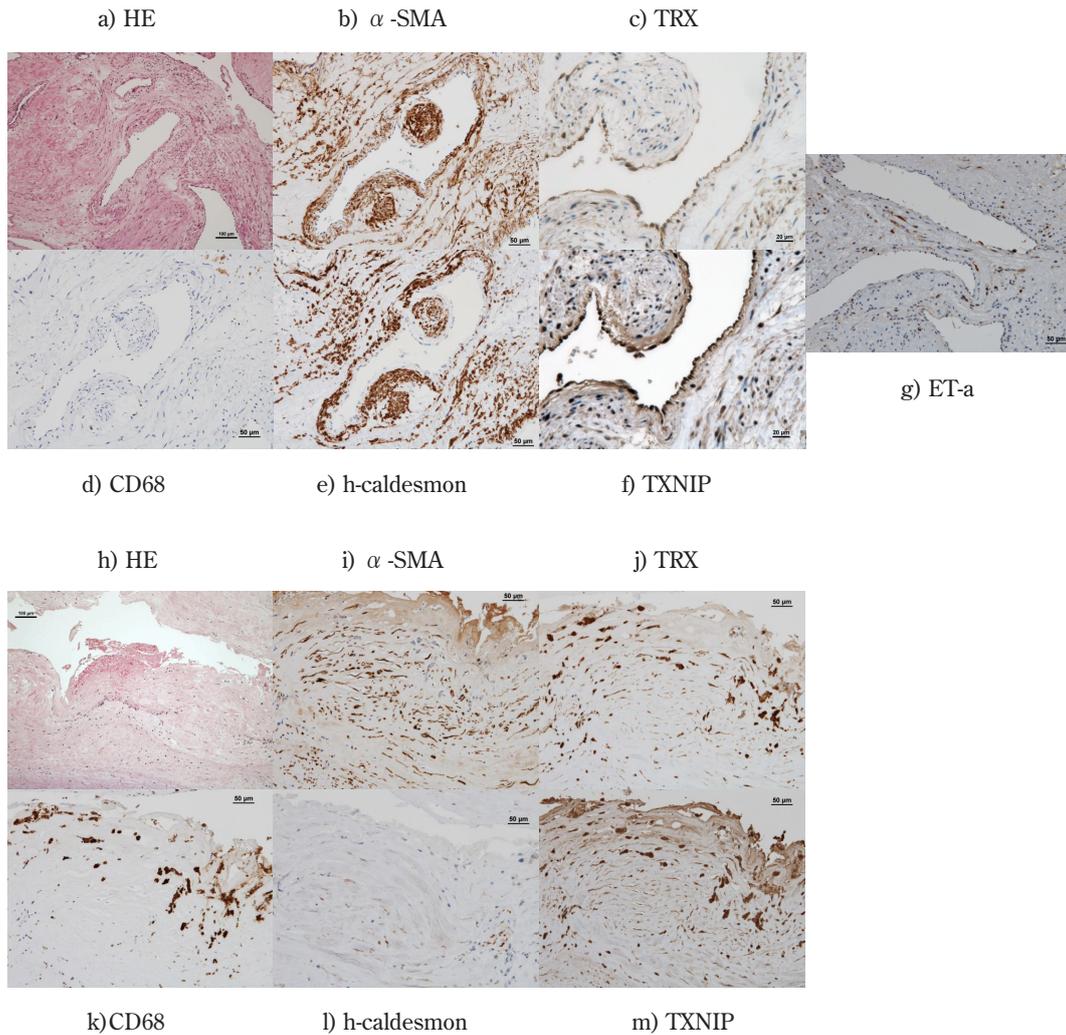


図1 PEA標本の免疫組織化学的検討

a) ~ g) は colander lesion (再疎通血管集簇部), h) ~ m) は器質化初期像  
 TRX: Thioredoxin, TXNIP: Thioredoxin-interacting protein,  
 ET-a: Endothelin receptor A

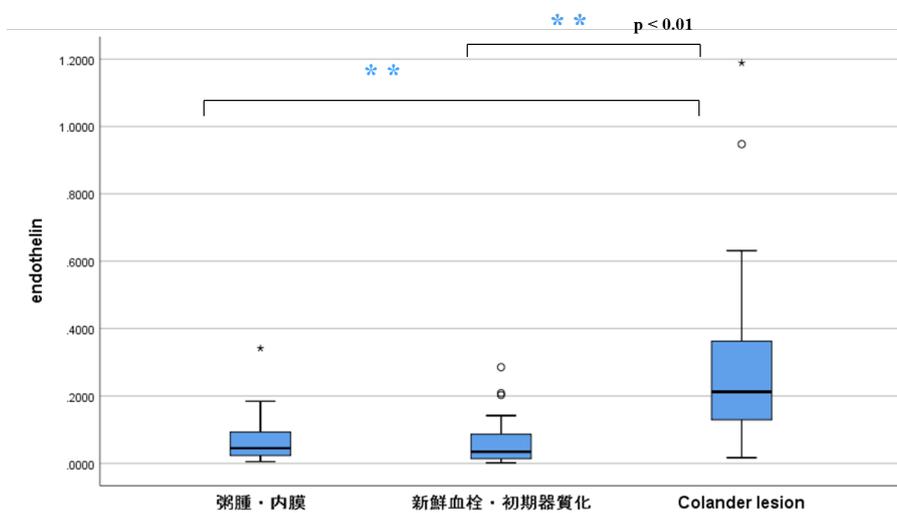


図2 PEA検体におけるEndothelin-1のmRNA発現  
 $\Delta$ CT法

#### 4-2 血栓の器質化維持機構の推測（平滑筋細胞の分化と酸化・抗酸化機構の関与・病状増悪因子について）

器質化血栓および再疎通血管では、血栓器質化が進むにつれ平滑筋細胞の分化がみられ、再疎通血管周囲の高分化な平滑筋細胞はh-caldesmon (+), ET-a (+) で収縮能を有していることが示された。一方で、酸化・抗酸化マーカーであるTXNIPとTRXはマクロファージ・内皮細胞・器質化初期の平滑筋細胞に発現していたが、高分化な平滑筋細胞では発現が低下していた。

過去の文献より、TRXは低酸素下状態でHIF活性化を介して肺動脈平滑筋細胞増殖に関与する事<sup>3)</sup>、血管新生およびNF $\kappa$ Bを介して血管平滑筋細胞の増殖に関わる事が知られている<sup>4)</sup>。他方、TXNIPはTRXを抑制することが知られている<sup>5)</sup>。このことを併せ、器質化初期の内皮細胞・マクロファージ・脱分化した平滑筋細胞から分泌されるTRXが平滑筋細胞増殖に関与し、それに伴いTXNIPも動員されていると推測される。増殖した平滑筋細胞は血圧や血流の影響により、h-caldesmonおよびET-a陽性の収縮能を有する高分化な平滑筋細胞へと形質が転換し、それに伴い高分化な平滑筋細胞でのTRX、TXNIPの発現が低下したと考える。

再疎通血管サンプルのmRNA解析では新鮮血栓・器質化初期血栓に比べendothelin-1の発現が上昇していたが、これは再疎通血管の内皮細胞から産生されていると考えられる。このendothelin-1が再疎通

血管周囲の高分化な平滑筋細胞に局在するET-aに結合することにより平滑筋収縮が起これ病状増悪に関与すると考える。

尚、TRXの mRNA発現は全群で有意差が確認できなかったが、TRXはその発現量よりも活性化が重要<sup>5)</sup>であるとされており、酸化・抗酸化機構の関与を否定するものではないと考える。

#### 5. 結 語

CTEPHでは、血栓形成部で酸化・抗酸化機構の関与の下、器質化・再疎通の過程を経て高分化平滑筋細胞を有する再疎通血管が形成される。この分化した平滑筋細胞はエンドセリン受容体を有し、内皮細胞から分泌されるエンドセリンに反応し収縮することで、肺高血圧の増悪が起きていると推測される。PEA標本の観察では、この成熟平滑筋を伴う再疎通血管集簇像の確認が重要である。

#### 謝 辞

この研究の一部は、小澤研究の助成を受け行われた。

#### 文 献

- Moser KM, et al. *Ann Intern Med* 1987;107:560-65.  
 Hosokawa K, et al. *Int Heart J* 2011;52 (6):377-81.  
 Chen B, et al. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2013 Sep;305 (5):L389-95  
 Schulze PC, et al. *Circ Res*. 2002 Oct 18;91 (8):689-95.  
 Madrigal-Matute J, et al. *Oxid Med Cell Longev* 2012; 232464.

# LAMP法を用いたGuiana extended-spectrum (GES) 型 メタロβ-ラクタマーゼ遺伝子検出法の開発

Dong Wook Kim<sup>1), 2)</sup>, 早川 智<sup>1)</sup>, 関 みつ子<sup>1), 3)</sup>

## A loop-mediated isothermal amplification method detecting the Guiana extended-spectrum (GES) type β-lactamase gene

Dong Wook KIM<sup>1), 2)</sup>, Satoshi HAYAKAWA<sup>1)</sup>, Mitsuko SEKI<sup>1), 3)</sup>

### 要旨

正確・簡便な遺伝子増幅法Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) 法を用いて、昨今その流行が報告されているGuiana extended-spectrum (GES) 型メタロβ-ラクタマーゼ遺伝子 (*bla<sub>GES</sub>*) を有する細菌感染例の検出法を開発した。さらに、同法を用いてカルバペネム分解能を有する *bla<sub>GES</sub>* の同定も試みた。開発された方法は、海外において分離・収集されたサンプルを用いて評価し、その有用性を確認した。

### 1. はじめに

Guiana extended-spectrum (GES) 型 β-lactamase は2000年にフランス領ギアナではじめて報告されたclass A型の基質拡張型β-lactamaseで<sup>1)</sup>、表1に示すように我が国でも分離が報告されている。GES型βラクタマーゼ遺伝子 (*bla<sub>GES</sub>*) のうち、単一のミスセンス変異 (G493A) を有するものはカルバペネム分解能を有し、我が国でも問題になっている<sup>2,4)</sup>。薬物耐性の迅速かつ確実な同定は臨床において重要であるが、標準的に用いられるのは培養法であり、様々なバリエーションの同定には直接シーケンス法による塩基配列決定が必要である。

Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) 法は日本で開発された、迅速、簡易、精確な遺伝子増幅法である<sup>5)</sup>。この方法ではサンプルと試薬を混合し、一定温度 (65°C付近) で反応が進み、検出までの工程を1ステップで行える。特別な試薬、機器を使用せず、コストの低減等、ベッドサイドや途上国において非常に有望な検出法で、日本のみならず国際的にも注目されている。我々はLAMP法による *bla<sub>GES</sub>* およびカルバペネム分解能を有する *bla<sub>GES</sub>* の迅速検出法を開発したので報告する。

表1 我が国のGES型多剤耐性菌による院内感染事例

GES-type (菌種)	発症年および事例	
GES-4 (肺炎桿菌)	2009-10	三次病棟院内感染 <sup>2)</sup>
GES-5 (緑膿菌)	2013-4	慢性期病棟院内感染 <sup>3)</sup>
GES-24 ( <i>Aeromonas hydrophila</i> )	2016	一般病床 <sup>4)</sup>

1) 日本大学医学部

2) College of Pharmacy, Hanyang University

3) 明海大学歯学部

早川 智 : hayakawa.satoshi@nihon-u.ac.jp

表2 臨床緑膿菌分離株を用いた評価

緑膿菌臨床 分離株 no.	Origin of Isolate		Genotype	Meropenem	Assays		
	地域	Anatomical site			PCR	<i>bla</i> <sub>GES</sub> -LAMP	Carba- <i>bla</i> <sub>GES</sub> -LAMP
<i>bla</i> <sub>GES</sub> -producing strains							
14831	南米	気道感染	<i>bla</i> <sub>GES</sub> -1	(S)	(+)	(+)	(-)
14948	南米	腹腔内感染	<i>bla</i> <sub>GES</sub> -5	(R)	(+)	(+)	(+)
13856	インド	unknown	<i>bla</i> <sub>GES</sub> -7	(S)	(+)	(+)	(-)
13848	インド	unknown	<i>bla</i> <sub>GES</sub> -9	(S)	(+)	(+)	(-)
13880	メキシコ	unknown	<i>bla</i> <sub>OXA-2</sub> , <i>bla</i> <sub>GES-19</sub> , <i>bla</i> <sub>GES-20-like</sub>	(R)	(+)	(+)	(+)
Nine other β-lactamase-producing strains					(-)	(-)	(-)

## 2. 対象及び方法

1) *bla*<sub>GES</sub> のコンセンサス配列に対して LAMP プライマーの設計を行い, *bla*<sub>GES</sub> を含む8つの β-lactamase 遺伝子を有する基準株を用いて, 設計されたプライマーの特異性を評価した。また, 検出限界は, 精製した DNA および DNA を添加した臨床サンプル (尿, 痰, および血液) を使用して評価した。さらに, 2003年から2012年の間に世界中の様々な地理的環境から分離・収集され, 次世代シーケンサーによりその特徴が明らかにされた β-lactamase 遺伝子を有する臨床分離株計14株<sup>6)</sup>を用い, LAMP法の臨床的評価をおこなった。結果は従来法である PCR法<sup>7)</sup>と比較した。

2) *bla*<sub>GES</sub> に単一のミスセンス変異 (G493A) を有するバリエーションを検出するため, PCR の変法である Amplification Refractory Mutation System (ARMS) を LAMP プライマーの設計に応用した<sup>5)</sup>。*bla*<sub>GES</sub> (*bla*<sub>GES</sub> -1, 5, 7, 9, 19/20) 産生菌6株, およびその他の β ラクタマーゼ産生菌16株を用いて評価した。

## 3. 結果

1) 表2および3に結果を示す。*bla*<sub>GES</sub> の LAMP 検出法の特異性は良好で, 反応当たりの検出限界は DNA 10コピーまでと PCR法より10倍優れていた。臨床分離株を用いた評価でも *bla*<sub>GES</sub> のみを正確に検出した。LAMP法の感度は, 尿, 痰, および血液へ DNA を添加し, 鋳型として用いた場合でも, 精製した DNA と同様に *bla*<sub>GES</sub> を検出した。PCR法は血液サンプル中の *bla*<sub>GES</sub> を検出できなかった。

2) *bla*<sub>GES</sub> に単一のミスセンス変異 (G493A) を有するバリエーションの LAMP 検出法では, 最小 DNA 10<sup>4</sup> コピーまでの検出が可能で, メロペネムに耐性を示

表3 PCRおよびLAMPアッセイの検出限界

	PCR	<i>bla</i> <sub>GES</sub> -LAMP
Purified DNA	10 <sup>2</sup> copies <sup>a</sup>	10
DNA Spiked specimens 尿 <sup>b</sup>	10 <sup>2</sup>	10
喀痰 <sup>c</sup>	10 <sup>2</sup>	10
血液 <sup>c</sup>	> 10 <sup>5</sup>	10

<sup>a</sup> Amount of DNA per reaction; <sup>b</sup> Supernatant data obtained after boiling and centrifugation; <sup>c</sup> Samples prepared via Loo-pamp™ PURE DNA extraction kit (Eiken Chemical Co.).

す *bla*<sub>GES</sub> (*bla*<sub>GES</sub>-5, 19/20) のみを検出したが, その他の β ラクタマーゼとの交差反応は示さなかった (表2)。

## 4. 考察

本研究では, *bla*<sub>GES</sub> を検出する新たな LAMP 検出法を開発した。*bla*<sub>GES</sub> のうち複数のバリエーションはカルバペネム分解能を有し, また, β-ラクタマーゼ遺伝子は伝達性のプラスミドにより他の菌株や菌種に, 伝達, 拡散する。したがって, グラム陰性桿菌がこのタイプの β-ラクタマーゼを獲得すると, 致命的な院内感染症を引き起こす可能性がある。抗菌薬の適正使用のためには, 薬物感受性の迅速かつ確実な識別が必要である。

本研究で開発された *bla*<sub>GES</sub> の LAMP 検出法は PCR 法と同等の高い特異性と PCR法より10倍優れた検出限界を示した。DNA を添加した臨床サンプルを鋳型として用いた場合であっても, LAMP 反応は問題なく進行し, 精製された DNA を鋳型として用いた場合に匹敵する結果であった。対照的に, PCR 反応では, 血液採取の際に用いるヘパリンとタンパク質等による阻害が認められ, 検出不可能であった。

さらに, 本研究では ARMS を用いて *bla*<sub>GES</sub> のミス

センス変異 (G493A) に特異的なプライマーを設計した。ARMSは1989年にPCR法で初めて用いられ、2007年に、池田らがLAMPのプライマー設計に適用し、特定の点突然変異の検出に成功している<sup>5)</sup>。変異特異的プライマーの検出限界はやや高めであるが、カルバペネム分解能を有するバリエーションがLAMP法によって検出可能であることが示された。臨床応用には、より多くの**blac<sub>ES</sub>**のバリエーションを有するサンプルを用いた検討が必要である。

従来の**blac<sub>ES</sub>**の検出法は、ランニングコストが高く、設備の整った研究室が必要であったが、LAMP法はこれらの問題を解決することができることから、臨床現場や途上国での応用が期待される。

## 5. 結 語

LAMP法による**blac<sub>ES</sub>**およびカルバペネム分解能を有する**blac<sub>ES</sub>**バリエーションの迅速診断法を開発した。開発された**blac<sub>ES</sub>**検出法は感度、特異度ともに高く、血液や喀痰DNAなどに含まれる反応阻害物質の影響も受けにくいことが示された。LAMP法はPCR法に比べ簡便かつ迅速であり、迅速診断の有用なツールとなる可能性が示唆された。

## 文 献

- Poirel L, Le Thomas I, Naas T, et al. Biochemical sequence analyses of GES-1, a novel class A extended-spectrum beta-lactamase, and the class 1 integron In52 from *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 44: 622–632.
- Yamasaki K, Komatsu M, Ono T, et al. Nosocomial spread of *Klebsiella pneumoniae* isolates producing **blac<sub>ES-4</sub>** carbapenemase at a Japanese hospital. *J Infect Chemother* 2017; 23: 40–44.
- Kanayama A, Kawahara R, Yamagishi T, et al. Successful control of an outbreak of GES-5 extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* in a long-term care facility in Japan. *J Hosp Infect* 2016; 93: 35–41.
- Uechi K, Tada T, Sawachi Y, et al. A carbapenem-resistant clinical isolate of *Aeromonas hydrophila* in Japan harbouring an acquired gene encoding GES-24  $\beta$ -lactamase. *J Med Microbiol* 2018; 67: 1535–1537.
- Takano C, Seki M, Kim DW, et al. Development of a Novel Loop-Mediated Isothermal Amplification Method to Detect Guiana Extended-Spectrum (GES)  $\beta$ -Lactamase Genes in *Pseudomonas aeruginosa*. *Front Microbiol* 2019; 10: 25.
- Kos VN, Déraspe M, McLaughlin RE, et al. The resistome of *Pseudomonas aeruginosa* in relationship to phenotypic susceptibility. *Antimicrob Agents Chemother* 2015; 59: 427–436.
- Monteiro J, Widen RH, Pignatari AC, et al. Rapid detection of carbapenemase genes by multiplex real-time PCR. *J Antimicrob Chemother* 2012; 67: 906–909.



写真1 Prof. Dong Wook Kim (中央)

## 吸引脂肪組織を利用した脱分化脂肪細胞の調製法と機能解析

風間智彦<sup>1)</sup>, 山元智衣<sup>1)</sup>, 長岡悠紀<sup>1)</sup>, 萩倉一博<sup>1)</sup>, 加野浩一郎<sup>2)</sup>, 相川佳之<sup>3)</sup>, 松本太郎<sup>1)</sup>

### Preparation method and functional analysis of dedifferentiated fat cells derived from liposuction fat

Tomohiko KAZAMA<sup>1)</sup>, Chii YAMAMOTO<sup>1)</sup>, Yuki NAGAOKA<sup>1)</sup>, Kazuhiro HAGIKURA<sup>1)</sup>,  
Koichiro KANO<sup>2)</sup>, Yoshiyuki AIKAWA<sup>3)</sup>, Taro MATSUMOTO<sup>1)</sup>

#### 要旨

我々は成熟脂肪細胞に由来する脱分化脂肪細胞 (dedifferentiated fat cell: DFAT) が間葉系幹細胞 (mesenchymal stem cell: MSC) に類似した多能性を示すことを報告してきた。今回、ヒト吸引脂肪サンプルを用いてDFATを調製し、調製に必要な至適組織量、細胞純度、造腫瘍性の有無などについて検討を行った。その結果、約2 mLの吸引脂肪組織から異種細胞混入率0.1%未満といった高純度のDFATを大量調製することに成功した。調製されたDFATは骨、軟骨、脂肪への多分化能を示し、また軟寒天コロニー形成試験や免疫不全マウスへの移植実験にて造腫瘍性を示さないことを明らかにした。DFATは低侵襲的で安全性が高い細胞治療を可能とする細胞源として期待できる。

#### 1. はじめに

我々は、成熟脂肪細胞を天井培養することにより得られる脱分化脂肪細胞 (dedifferentiated fat cell: DFAT) が、高い増殖能と間葉系幹細胞 (mesenchymal stem cell: MSC) に類似する多分化能を示すことを明らかにした<sup>1)</sup>。皮下脂肪組織は、油滴を豊富に含む成熟脂肪細胞に加え、結合組織や神経、血管を豊富に含む組織である。そのため、皮下脂肪組織から成熟脂肪細胞を単離するためには、まず組織を機械的に細切後、コラゲナーゼ処理にて消化し、成熟脂肪細胞を単離する必要がある。我々は、ドナーの負担が少なく、より簡便で効率的なDFAT調製法を模索し、瘦身目的などで行なわれる脂肪吸引法に着目した。そして切除脂肪組織のみならず吸引脂肪組織より単離した成熟脂肪細胞からDFATが調製可能であることを明らかにした。脂肪吸引法による脂肪組織採取の利点として、採取に伴う皮膚切開が3

～4 mm径と小さく、低侵襲で感染のリスクが低いことや、前処置としてエピネフリン・キシロカイン添加生理食塩水 (チューメセント液) を脂肪組織へ注入し膨潤させるため、成熟脂肪細胞の単離が容易なゲル状の脂肪組織が採取できることが挙げられる。

今回、DFATを細胞源とする細胞治療の臨床応用に向け、脂肪吸引法により採取されたヒト吸引脂肪組織を用いて、DFAT調製に必要な至適組織量、調製されたDFATの細胞特性、造腫瘍性の有無などについて検討を行なった。

#### 2. 対象及び方法

本研究は日本大学医学部附属板橋病院臨床研究倫理審査委員会の承認を得て行った (承認番号RK-160209-6)。脂肪吸引を受ける患者からインフォームドコンセントを得た上で、破棄予定の吸引脂肪組織の提供を受け、DFAT調製に用いた。コラゲナー

1) 日本大学医学部機能形態学系細胞再生・移植医学分野

2) 日本大学生物資源科学部応用生物科学科

3) 湘南美容クリニック

松本太郎: matsumoto.taro@nihon-u.ac.jp

ぜ処理を行う脂肪組織の量を1~5 mLに設定し、単離される成熟脂肪細胞の数を定量評価後、天井培養によるDFATの調製を行った。DFATおよび脂肪組織由来幹細胞 (adipose-derived stem cell: ASC) の調製は既報<sup>1)</sup>に従い実施した。同一ドナーに由来する吸引脂肪組織よりDFATならびにASCを調製し、細胞純度解析として、初代 (P0) から第3継代 (P3) 細胞のMSC陽性マーカー (CD73, CD90, CD105) ならびに陰性マーカー (CD31, CD45, HLA-DR) の陽性細胞率をフローサイトメトリーにて計測した。また多分化能解析として、DFATを脂肪、骨、軟骨分化誘導培地にてそれぞれ3週間培養し、脂肪分化はオイルレッドO染色、骨分化はアルカリフォスファターゼ染色及びアルザリンレッドS染色、軟骨分化はペレット培養による軟骨様細胞凝集体の形成を評価した。DFATの軟寒天コロニー形成試験は、0.2%アガー含有専用培地に懸濁したDFATを96穴マイクロプレートに播種し、14日間培養後、形成されるコロニー数を計測した。陽性コントロールとしてHela S3細胞、陰性コントロールとしてヒト線維芽細胞 (WI-38細胞) を同時に評価した。マウス皮下移植による造腫瘍性試験 (公益財団法人実験動物中央研究所に委託実施) では、DFATまたはASCを免疫不全NOGマウスの右側腹部皮下にそれぞれ1 x

10<sup>7</sup> cells/頭ずつ移植した (DFAT群 n=7, ASC群 n=10)。移植日から観察期間終了まで、週1回、体重測定と腫瘍の有無の確認を行った。16週間後に剖検および移植部位の病理組織学的検査を行った。また抗ヒトビメンチン抗体を用いた免疫組織染色により移植部位におけるヒト由来細胞の有無を評価した。個体数、投与経路、移植細胞数などはWHOガイドラインTRS978で推奨されている方法に準拠して実施した。

### 3. 結果

DFAT調製に必要な吸引脂肪組織の至適組織量を検討した結果、組織量2 mLから機械的細切を必要とせず、コラゲナーゼ処理のみで、容易に成熟脂肪細胞を単離することが可能であった。2 mLの吸引脂肪組織からは、約200 mLの成熟脂肪細胞浮遊液が採取でき、この中には約2 x 10<sup>5</sup>個の成熟脂肪細胞が存在することが明らかになった。単離された成熟脂肪細胞を用いて天井培養すると、培養4日後に成熟脂肪細胞はフラスコ天井面に接着し、培養10日後には成熟脂肪細胞よりDFATのコロニー形成が確認された (図1)。細胞純度解析を行った結果、この方法にて調製したDFATのMSC陽性マーカーの陽性率は90%以上であり、MSC陰性マーカーの陽

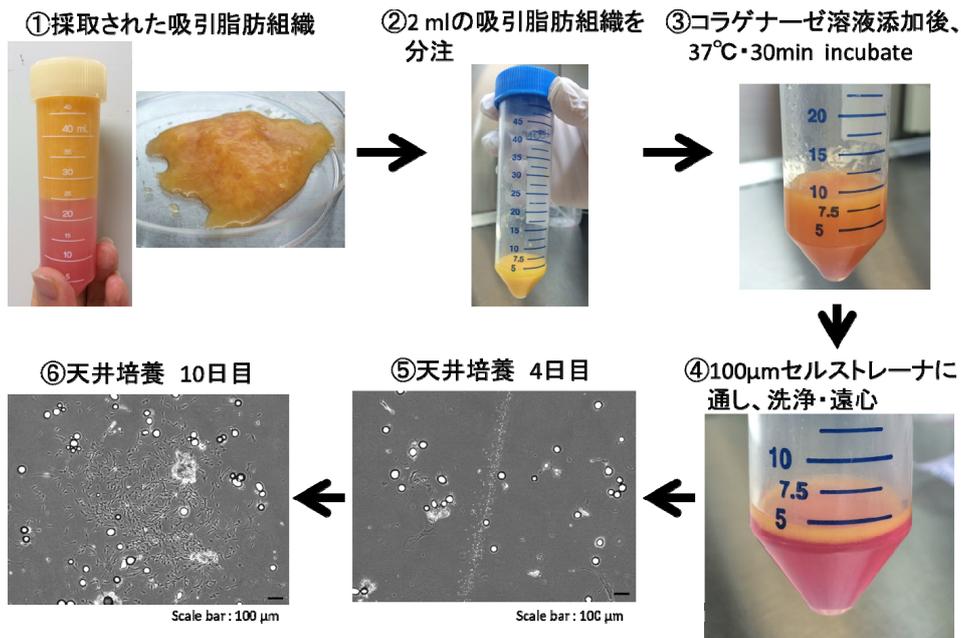


図1 ヒト吸引脂肪組織からのDFATの調製と細胞の形態変化

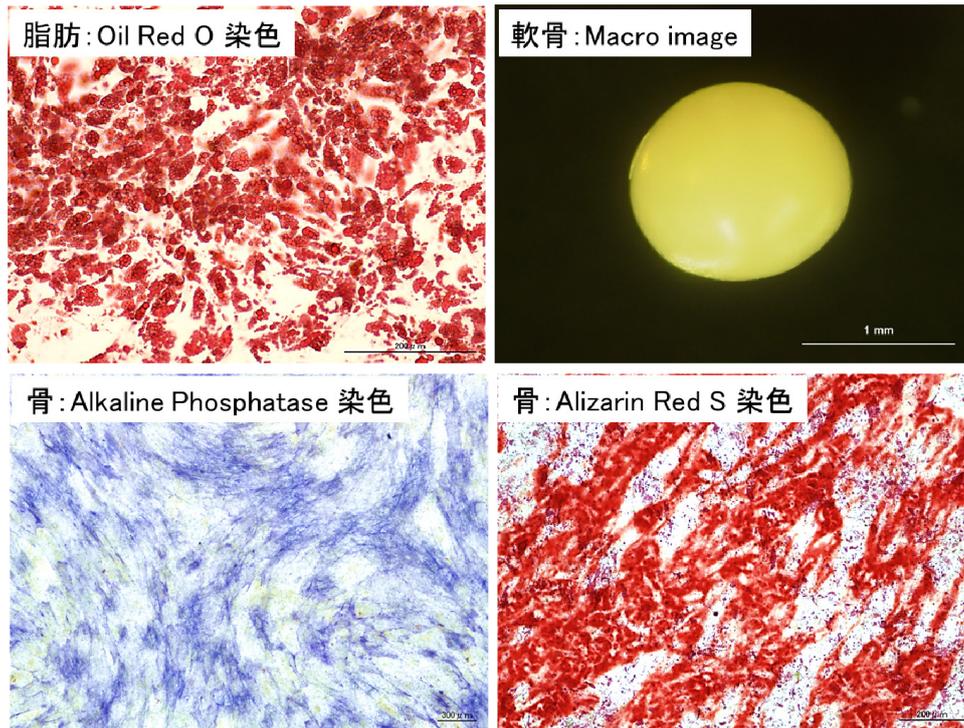


図2 ヒト吸引脂肪組織より調製したDFATの多分化能解析

性率は0.1%未満であった。一方同一組織から調製したASCではP0において陰性マーカーの陽性率がDFATに比べて有意に高い傾向にあった。多分化能解析を行った結果、この方法にて調製したDFATは、脂肪、骨、軟骨への高い分化能を示すことが確認された(図2)。軟寒天コロニー形成試験では、DFATは2回の試験共にすべてのウェルでコロニー形成は確認されなかった。NOGマウス皮下移植による造腫瘍性試験では、16週の観察期間終了時においてDFAT群、ASC群ともに腫瘍形成は認められなかった。また病理組織学的検査においても腫瘍性変化及び細胞の増殖性を示す所見は認められなかった。移植部皮膚では、DFAT群、ASC群ともに抗ヒトビメンチン抗体陽性細胞が確認された。以上の結果よりDFAT細胞はASCと同様に造腫瘍性はないと判定した。

#### 4. 考察

本研究では、約2 mLの吸引脂肪組織から機械的な細切を必要とせず、コラゲナーゼ処理のみで約 $2 \times 10^5$ 個の成熟脂肪細胞を単離することができ、この成熟脂肪細胞からDFATの製造が可能であることを明らかにした。この結果とDFATの増殖特性から勘

案すると、5~10 mLの吸引脂肪組織を採取すれば、通常の細胞治療に必要な細胞数( $10^7 \sim 10^8$  cells)を第3継代以内に獲得できると推測される。5~10 mLの吸引脂肪組織は、局所麻酔下にカニューラ付き20 mLシリンジといった簡便な医療器具を用いて、閉鎖系で低侵襲性に採取することができる。このように少量の脂肪吸引法を用いて調製されたDFATは、組織採取に伴う患者の負担を最小限とし、汚染の可能性が低く安全に調製できるといった点で、既存の治療用細胞に比べても優位性が高いと考えられる。

ヒト吸引脂肪組織より調製したDFATの特性解析を行った結果、DFATは、MSCに特徴的に発現する細胞表面マーカー(CD73, CD90, CD105)を高発現するとともに、骨、脂肪、軟骨への多分化能を示し、国際細胞治療学会(International Society for Cellular Therapy: ISCT)で定義されているヒトMSCの基準を満たしていた<sup>2)</sup>。また異種細胞の混入を示す陰性マーカー(CD31, CD45, HA-DR)の陽性率はいずれも0.1%未満であり、ASCに比べて有意に低かった。これはDFATが成熟脂肪細胞を単離してから調製されるため、血液細胞や血管構成細胞などの混入が起こりにくいことに起因していると考えられる。高純

度の細胞を培養初期から得られるといったDFATの特性は、この細胞を自家細胞医薬品として開発する上で有利に働くと思われる。ヒト細胞加工製品の安全性指標としては、特に腫瘍原性に関する安全性評価が重要であり、造腫瘍性試験の実施が求められている。今回、吸引脂肪組織より調製したDFATの軟寒天コロニー形成試験ならびにNOGマウス皮下移植による造腫瘍性試験を行なった結果、ヒト吸引脂肪組織より調製したDFATに造腫瘍性が認められないことを確認するに至った。DFATはすでに臨床使用されているASCと同様に、移植安全性の高い細胞であることが予想される。今後、DFAT細胞治療の臨床研究開始に向け、脂肪吸引法を用いた臨床グレードDFATの製造法を確立するとともに、より詳細な安全性試験や性能試験の実施が望まれる。

## 5. 結 語

約2mlという少量の吸引脂肪組織から高純度かつ多分化能を有するDFATを大量調製できることが明らかとなった。また、ヒト吸引脂肪組織より調製されたDFATは造腫瘍性を認めず、安全に移植できることが示唆された。DFATは低侵襲性で安全性が高い細胞治療を可能とする細胞源として期待できる。

## 文 献

- 1) Matsumoto T, Kano K, Kondo D, et al. Mature adipocyte-derived dedifferentiated fat cells exhibit multilineage potential. *J Cell Physiol* 2008; 215: 210-222.
- 2) Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 2006; 8: 315-317.

## 難治性免疫・アレルギー疾患の病態の解明と新規治療法の開発

岡山吉道<sup>1)</sup>, 豊島翔太<sup>1)</sup>, 佐野有隆<sup>1)</sup>, 都築 広<sup>1)</sup>, 高橋恭子<sup>2)</sup>, 浅野正岳<sup>3)</sup>, 李 賢鎬<sup>1)</sup>, 斎藤 修<sup>1)</sup>, 松本健治<sup>4)</sup>, 村上 誠<sup>5)</sup>, 武富芳隆<sup>5)</sup>, 三木寿美<sup>5)</sup>, 伊東真奈<sup>1)</sup>, 伊崎聡志<sup>1)</sup>, 西盛信幸<sup>1)</sup>, 遠藤嵩大<sup>1)</sup>, 葉山惟大<sup>1)</sup>, 藤田英樹<sup>1)</sup>, 坂本朋美<sup>1)</sup>, 鐘ヶ江佳寿子<sup>1)</sup>, 羅 智靖<sup>1)</sup>, 岩田光浩<sup>1)</sup>, 内野慶人<sup>1)</sup>, 濱田高志<sup>1)</sup>, 入山規良<sup>1)</sup>, 高橋宏通<sup>1)</sup>, 北村 登<sup>1)</sup>, 福田麻佐美<sup>1)</sup>, 山田志保<sup>1)</sup>, 丸岡秀一郎<sup>1)</sup>, 八田善弘<sup>1)</sup>, 中山智祥<sup>1)</sup>, 武井正美<sup>1)</sup>, 徳橋泰明<sup>1)</sup>, 権 寧博<sup>1)</sup>, 照井 正<sup>1)</sup>

## Development of new therapeutic strategy and investigation of the pathogenesis of severe immunological and allergic diseases

Yoshimichi OKAYAMA<sup>1)</sup>, Shota TOYOSHIMA<sup>1)</sup>, Yutaka SANNO<sup>1)</sup>, Hiroshi TSUZUKI<sup>1)</sup>, Kyoko TAKAHASHI<sup>2)</sup>, Masatake ASANO<sup>3)</sup>, Kenko Li<sup>1)</sup>, Shu SAITO<sup>1)</sup>, Kenji MATSUMOTO<sup>4)</sup>, Makoto MURAKAMI<sup>5)</sup>, Yoshitaka TAKETOMI<sup>5)</sup>, Yoshimi MIKI<sup>5)</sup>, Mana ITOU<sup>1)</sup>, Satoshi IZAKI<sup>1)</sup>, Nobuyuki NISHIMORI<sup>1)</sup>, Takahiro ENDO<sup>1)</sup>, Koremasa HAYAMA<sup>1)</sup>, Hideki FUJITA<sup>1)</sup>, Tomomi SASAKI-SAKAMOTO<sup>1)</sup>, Kazuko KANEGAE<sup>1)</sup>, Chisei RA<sup>1)</sup>, Mitsuhiro IWATA<sup>1)</sup>, Yoshihito UCHINO<sup>1)</sup>, Takashi HAMADA<sup>1)</sup>, Noriyoshi IRIYAMA<sup>1)</sup>, Hiromichi TAKAHASHI<sup>1)</sup>, Noboru KITAMURA<sup>1)</sup>, Asami FUKUDA<sup>1)</sup>, Shiho YAMADA<sup>1)</sup>, Shuichiro MARUOKA<sup>1)</sup>, Yoshihiro HATTA<sup>1)</sup>, Tomohiro NAKAYAMA<sup>1)</sup>, Masami TAKEI<sup>1)</sup>, Yasuaki TOKUHASHI<sup>1)</sup>, Yasuhiro GON<sup>1)</sup>, Tadashi TERUI<sup>1)</sup>

## 要旨

## 1. 整形外科分野

変形性関節症患者と関節リウマチ患者滑液中の脂質メディエーターを網羅的に比較すると、関節リウマチ患者では、炎症性脂質メディエーターも抗炎症性の脂質メディエーターも有意に高値であり、炎症の増悪が抗炎症性脂質メディエーターも増加させている可能性が示唆された。

## 2. 皮膚科分野

CSUにおけるシクロスポリンの治療反応性のバイオマーカーとして自己血清皮内テスト (ASST) が陽性であること、血清IgE値が低値であることが示唆された。

## 3. 血液膠原病内科分野

①MHCマウスにヒトHLA-DR4陽性造血幹細胞を移植し、作製した免疫系ヒト化MHCマウスでのGVHDモデルを作成した。

②特徴的な染色体転座を有するALL細胞の解析によりZNF362/MAML3という新たなキメラ遺伝子が同定された。

## 4. 呼吸器内科分野

気管支喘息は、いまだに不明な点が多く、現行の治療に抵抗性を示す重症患者も少なくない。新規治療薬となる標的分子や新たな病態解明について研究を行なっている。

## I. はじめに

罹患率が増加し社会問題にもなっている免疫・アレルギー疾患は、遺伝因子と環境因子が複雑に関与

した多因子疾患である。近年、疾患モデル動物の解析により免疫・アレルギー疾患の病態の解明が進み治療法の開発が進んでいるが、未だに既存の治療法

1) 日本大学医学部

2) 日本大学生物資源科学部

3) 日本大学歯学部

4) 独立行政法人国立成育医療研究センター

5) 東京大学大学院医学系研究科疾患生命工学センター

照井 正: terui.tadashi@nihon-u.ac.jp

では効果が少ない難治例が存在する。難治例の病態解明には、個々の疾病の臨床検体からの取り組みが必須である。本事業は、免疫・アレルギー疾患を扱う4つの臨床各科のベットサイドから得られた臨床検体を基に臨床医、免疫・アレルギー学者と生物学者が連携し研究拠点を形成し、難治性免疫・アレルギー疾患の予防と治療に資する研究を行うことを目的とした。具体的な目的は、1. 免疫・アレルギー疾患の病態におけるマスト細胞の役割の解明 2. 感染による関節リウマチ、気管支喘息の発症と増悪の機序の解明である。

また各分野の研究に際して倫理的配慮を行っている。生命倫理に関しては、日本大学医学部倫理委員会および臨床研究委員会に研究倫理および臨床研究審査申請書を提出し、当委員会の承認を得ている。安全対策に関しては、日本大学遺伝子組換え実験実施規定に定める学長の確認を受けて実施している。以下に各領域の研究の概要について述べる。

## II. 整形外科領域

### 関節リウマチにおける滑膜マスト細胞の特徴

#### 1. 背景

関節リウマチ (RA) は、複数の遺伝的要因に環境因子が加わり自己免疫応答が惹起され、結果として慢性の炎症が複数の滑膜組織に生じ、進行性の破壊性関節炎に至る疾患と考えられている。エイコサノイド経路は、RAの病態において重要な役割を果たしている。RA患者の滑液中のPGD<sub>2</sub>、PGE<sub>2</sub>およびLTB<sub>4</sub>は変形性関節症 (OA) 患者と比較して有意に高いこと<sup>1)</sup>、PGE<sub>2</sub>とLTB<sub>4</sub>は炎症の増悪に関与していること<sup>2)</sup>が報告されている。RAの病態においては、cyclooxygenase (COX) と5-lipoxygenase (5-LO) の経路の過剰な発現が認められ、これらの過剰発現は、methotrexateなどのDMARDs、抗TNF- $\alpha$ 抗体治療やB細胞除去療法では、抑制できないことが報告されており<sup>3,5)</sup> 亜臨床的な炎症や再発に関与していると示唆されている。また、抗炎症性脂質メディエーターの関節炎への関与が示唆されるが、DHAやEPA代謝物に関しては解析がほとんどされてなく、OA患者と比較した脂質メディエーターの網羅的比較解析はなされていない。

#### 2. 目的

RAにおいて、関節液中の脂質メディエーターの量

的、質的な変化をリポミクスの手法を用いて解析し、プロファイルを明らかにすることを目的とした。

#### 3. 対象及び方法

倫理的考慮：生命倫理に関しては、日本大学医学部倫理委員会および臨床研究委員会に研究倫理および臨床研究審査申請書を提出し、当委員会の承認を得ている (RK-160112)。

対象：人工膝関節置換術時に18例のRA患者の関節滑液と26例のOA患者の関節滑液を採取し、滑液をヒアルロニダーゼで処理した。

リポミクス：関節液は20mM Tris-HCl (pH 7.4) にて10倍に希釈した。固相抽出法で酸化脂肪酸を抽出した。4000Q-TRAP quadrupole-linear ion trap hybrid mass spectrometer (AB Sciex) と液体クロマトグラフィー (liquid chromatography [LC]; NexeraX2 system; Shimadzu) を用いて網羅的に酸化脂肪酸を比較解析した。脂質メディエーター量は、multiple reaction monitoring (MRM) transition のピークの下面積から算出した。標準量が手に入るものは絶対量を算出した。

統計解析：臨床データの2群間の統計学的解析は、Kruskal-wallis testを用いた。相関の評価には、Spearmanの順位相関係数を用いた。 $p$ 値が0.05未満の場合を統計学的に有意な差が認められると判断した。統計学的解析は、GraphPad Prism 7 (MDF, Tokyo, Japan) を使用した。

#### 4. 結果

アラキドン酸由来の脂質メディエーターでは、PGD<sub>2</sub>、PGE<sub>2</sub>、PGF<sub>2 $\alpha$</sub> 、15-HETE、5,6-EETおよび11-HETE等が、OA患者よりもRA患者において有意に高値であった。抗炎症性の脂質メディエーターであるDHA由来の脂質メディエーターでは、RvD2および10-HDoHE等が、EPA由来の脂質メディエーターでは、PGE<sub>3</sub>およびPGF<sub>3 $\alpha$</sub> 等がOA患者よりもRA患者において有意に高値であった。

#### 5. 結論

OA患者と比較すると、RA患者滑液中では、炎症性脂質メディエーターも抗炎症性の脂質メディエーターも高値であった。炎症の増悪が抗炎症性脂質メディエーターも増加させている可能性が示唆された。

1) Bombardieri S, et al: Br J Pharmacol 73:893-901, 1981

2) Ricciotti E, FitzGerald GA: Arterioscler Thromb

Vasc Biol 31:986-1000, 2011

- 3) Korotkova M, et al: Arthritis Rheum 52:3439-47, 2005
- 4) Gheorghie KR, et al: PLoS One 6:e16378, 2011
- 5) Gheorghie KR, et al: Arthritis Res Ther 14:R121, 2012

### Ⅲ. 皮膚科領域

#### 慢性特発性蕁麻疹患者に対するシクロスポリンの治療効果を評価するバイオマーカー

##### 1. 背景

慢性特発性蕁麻疹 (chronic spontaneous urticaria, CSU) 患者の一部は自己の血清を皮内に注射する自己血清皮内テスト (autologous serum skin test, ASST) を行うと陽性になり, 血清中に誘発因子が存在すると考えられている<sup>1)</sup>。抗ヒスタミン薬の治療抵抗性の患者においてシクロスポリンやオマリズマブが用いられる。オマリズマブの治療反応性のバイオマーカーとしてASST陰性や血清IgE値が高値であることなどが報告されている。しかし, シクロスポリンの治療の効果を予測するバイオマーカーはまだ明らかになっていない。

##### 2. 目的

本研究では, CSUのシクロスポリンの治療効果を予測するためのバイオマーカーを調べることを目的とした。

##### 3. 方法

抗ヒスタミン薬の2倍量の加療にて効果不十分のCSU患者34名 (女性20人, 男性14人) を対象とした。シクロスポリンは3mg/kg/dayで約4週間の投与を行った。治療前後の蕁麻疹の重症度はUrticaria Activity Score 7 (UAS7) を用いて評価した。治療後のUAS7が6以下を効果ありとした。男女比, 年齢, 重症度 (UAS7), 罹患期間, ASST, 血清IgE値, 末梢血好塩基球数, 抗核抗体陽性率, 抗サイログロブリン抗体陽性率, 抗マイクロゾーム抗体陽性率を比較した。抗FcεRI α鎖自己抗体および抗IgE抗体自己濃度をELISA, これら自己抗体のFcεRI架橋能をIgE crosslinking-induced luciferase expression (EXiLE) 法で測定し<sup>2)</sup>, 比較した。統計学的解析はMann-Whitney-U testまたはFisher's exact testを用いた。p < 0.05を統計学的に有意とした。

本研究は日本大学医学部附属板橋病院臨床研究倫

理審査委員会に承認されている (RK-150908-12: 慢性蕁麻疹の病態解明のための研究)。

##### 4. 結果

シクロスポリン投与によってASST陽性群のUAS7 ≤ 6になった割合は, ASST陰性群よりも有意に高値であった (p = 0.0048)。シクロスポリンの治療後UAS7 ≤ 6群では治療後UAS7 > 6群と比較し, 血清IgEが有意に低値であった (p = 0.0003)。ROC曲線から得られた最適なカットオフ値は88.5 IU/mLであった。血清IgE値 ≤ 88.5群と血清IgE値 > 88.5群のASST陽性率を比較したが, 両群において有意な差はみられなかった (p = 0.727)。

##### 5. 考察

CSU患者においてASST陽性と血清IgE値がカットオフ値以下であることがシクロスポリンの治療効果の予測のバイオマーカーになることが新たに判明した。CSUの治療においてASST陽性・血清IgE低値群はシクロスポリン, ASST陰性・血清IgE高値群はオマリズマブが勧められる。<sup>3)</sup>

- 1) Sabroe RA, et al: J Allergy Clin Immunol 110: 492-9, 2002
- 2) Nakamura R, et al: Allergy 65: 1266-73, 2010
- 3) Endo T et al: Allergol Int 68:270-3, 2019

### Ⅳ. 血液膠原病内科領域

#### ① HLA-DR4 transgenic NOD/Shi-scid, IL-2Rγ null マウスとGVHD

##### 1. 背景と目的

近年, ヒト免疫系の研究ツールとして免疫系ヒト化マウスの重要性が高まっている。特に, HLA-DR4 transgenic NOD/Shi-scid/IL-2Rγ null マウス (以下MHCマウス) にヒトHLA-DR4陽性造血幹細胞を移植し作製した免疫系ヒト化MHCマウスでは細胞性免疫と液性免疫系の両者を再現することができる。造血幹細胞移植の合併症では移植片対宿主病 (以下GVHD) が重要で, 特に慢性GVHDは移植後の晩期死亡原因の第4位 (11%) を占める重要な合併症であり, 最近の研究から発症に液性免疫系の関与が重要であることが分かった。慢性GVHDの動物モデルの報告はマウス間で脾臓や骨髄細胞を移植する系のみで, 病態の解明や治療の発展のために新たな動物モデルの確立が必要と考える。免疫系ヒト化マウスの作製には造血幹細胞移植が必要であり, 免疫系

ヒト化マウスにGVHDを発症するかどうかは興味深い。免疫系ヒト化マウスがGVHDを発症するかどうかは明らかにされていないが、液性免疫系が機能している免疫系ヒト化MHCマウスでは慢性GVHDを発症する可能性がある。今回我々は免疫系ヒト化MHCマウスに慢性GVHD様の生体反応が起きるかどうかを検討した。

## 2. 方法

HLA-DR4陽性ヒト臍帯血から採取したCD34陽性細胞を、生後8週のMHCマウスに経尾静脈的に投与して移植した。移植後の体重変化や全身状態を観察し、26週後に解剖した。移植後の経過や各臓器の組織所見を非移植MHCマウスと比較、検討した。本研究は日本大学本部動物実験委員会に承認されている(動物実験承認番号;AM18MED009-2, AM18MED010-1)。

## 3. 結果

免疫系ヒト化MHCマウスと非移植MHCマウスで移植後の体重の推移に差を認めなかった。免疫系ヒト化MHCマウスの組織像では、皮膚に硬化性変化、細気管支周囲に線維化を認めた。

## 4. 考察

皮膚硬化性病変や細気管支周囲の線維化などは慢性GVHDに矛盾のない所見であり、免疫系ヒト化MHCマウスはGVHDを発症すると考えた。免疫系ヒト化MHCマウスを利用したGVHDモデルの報告はこれまでになく、今後は免疫系ヒト化MHCマウスについて臓器病変の経時変化、自己抗体の有無についてさらなる検討を行う予定である。

## 5. 結語

HLA-DR4 transgenic NOD/Shi-scid/IL-2R $\gamma$  null マウス(以下MHCマウス)にヒトHLA-DR4陽性造血幹細胞を移植し作製した免疫系ヒト化MHCマウスでのGVHDモデルを作成した。

## ② 急性リンパ性白血病における新規融合遺伝子の解明

### 1. 背景

急性リンパ性白血病は成人において予後不良な造血器悪性腫瘍の一つであり、現在も化学療法単独での長期生存率は満足のいくものではない。一方、一部の急性白血病においては、腫瘍増殖に関わるシグナルを阻害する分子標的治療薬の登場により予後の

改善が認められており、腫瘍化の機序のより詳細な解明が待たれる。

今回我々は、これまで報告の無い染色体転座を伴った急性リンパ性白血病を経験し、発症機序の解明を行っている。

## 2. 症例

50代男性。20XX年8月、発熱で近医を受診した際に汎血球減少を認め、血液内科にて骨髓穿刺し、ペルオキシターゼ陰性の芽球が骨髓有核細胞の20%以上を占めていたことから急性白血病の診断で加療目的に当院紹介受診となった。当院にて再度施行した骨髓穿刺により得られた芽球細胞の表面マーカー解析結果よりB細胞性急性リンパ性白血病の診断となった。この際同時に提出した骨髓染色体分析の結果で46, XY, t(1;4)(p34;q31)の染色体異常を20細胞中15細胞で認めた。この染色体異常はBFM骨格による寛解導入療法以降、完全に消失し、骨髓染色体分析の結果は正常核型となった。

## 3. 考察

白血病の寛解達成に伴い、発症時に認めていた染色体異常が消失していることから、この染色体異常は白血病細胞に由来するものと考えられた。次世代シーケンサーを用いた解析により、この染色体異常により産生されるキメラ遺伝子の候補としてZNF362/MAML3が挙げられた。さらにPCRダイレクトシーケンス法によりこのキメラ遺伝子が実際に転写されていることが確認された。

## 4. 結語

新規の染色体転座を伴った急性リンパ性白血病を経験した。さらに解析を進めることにより、新たな白血病発症機序の解明に結びつけたい。

## V. 呼吸器内科領域

### ① ダニアレルゲン(HDM)によるマウス喘息モデルにおけるアンジオテンシン変換酵素2(angiotensin converting enzyme 2; ACE2)の役割

#### 1. 研究背景, 目的

気管支喘息(以下、喘息)の病態は、ハウスダストダニアレルゲン(house dust mite; HDM)に代表される環境因子により誘導されるアレルギー性気道炎症といわれているが、いまだに不明な点が多く、現行の治療に抵抗性を示す重症患者も少なくない。新たな治療につながる病態解明は急務である。これ

までHDM誘導性マウス喘息モデルを用いて、HDM感作によるアレルギー性気道炎症の増幅機序を解明してきたが、治療標的となりうる分子の同定には至っていない。本研究の目的は、HDMによるアレルギー性気道炎症の増幅過程で発現が変動する分子群から、新たな治療標的となりうる分子を同定し、新規喘息治療薬を見出すことである。

## 2. 方法

C57BL/6JマウスにHDMを3回（第0, 7, 14日）経気道的に投与した。第0, 3, 7, 10, 14, 17日にマウス肺組織を採取し、そこから全RNAを抽出し、マイクロアレイを用いて網羅的遺伝子発現解析を行い、発現が変動する標的分子を同定した。同様にHDMを3回経気道的に投与したC57BL/6Jマウスに、同定した標的分子に作用する薬剤を第10～16日に腹腔内投与し、第17日に解剖を行い、HDMによるアレルギー性気道炎症への影響を検証した。

本研究は日本大学本部動物実験委員会に承認されている（動物実験承認番号：AP17M061-1, AP18MED065-1, AP19MED011-1）。

## 3. 結果

マイクロアレイのチップに実装されている28944遺伝子から、網羅的遺伝子発現解析を行い、第17日のコントロール群とHDM群を比較し、有意に変動している遺伝子を9293同定した。5倍以上発現が減少していた17遺伝子の1つとして、ACE2を同定した。ACE2はアンジオテンシンIIをアンジオテンシン(1-7)/Mas receptor経路を介して抗炎症作用や抗線維化作用を示す。ACE2の活性化物質であるdiminazene aceturate (DIZE)の腹腔内投与群は、コントロール群と比較してHDMによる肺胞洗浄液中の好酸球浸潤やIL-5の発現、肺組織への炎症細胞の浸潤や粘液産生細胞の過形成を有意に抑制した。

## 4. 結論

HDM誘導性マウス喘息モデルを用いて、網羅的遺伝子発現解析からACE2を同定した。ACE2は

HDM誘導性アレルギー性気道炎症を抑制的に制御している可能性が示唆された。ACE2活性化薬であるDIZEは喘息の新規治療薬となる可能性がある。

## ② NOG hIL-3/GM-CSF/IL-5 Tgマウスを用いたIL-33, ダニ誘導型ヒト喘息モデルの開発

### 1. 目的

喘息病態の再現や特定のアレルギー吸入がどのようにアレルギー性気道炎症を誘導しているのかを経時的に解析することはヒトにおいては非常に困難であるため、ヒトの免疫系を有した動物モデルが必要不可欠である。我々はこれまで、hIL-3/GM-CSF/IL-5 Tg NOGマウス（トリプルTg）を作製し、自然免疫型喘息に重要なIL-33によるヒト好酸球性気道炎症誘導を検討してきた。今回、hIL-33誘導性ヒト喘息モデルの病態を詳細に検証するとともに、HDMによるヒト好酸球性気道炎症誘導についても検討した。

### 2. 方法

ヒト造血幹細胞を移入してヒト化したトリプルTgに、hIL-33を3日連続で気管内投与し、24時間後の気道過敏性、肺組織中ヒト細胞浸潤（2型自然リンパ球（ILC2）など）などを検証した。また、HDMを第0,7,14日に気管内投与し、第17日に好酸球性気道炎症の有無を評価した。

本研究は日本大学本部動物実験委員会に承認されている（動物実験承認番号：AP13M003-3, AP17M044-2, AP18MED077-2）。

### 3. 結果

hIL-33投与により気道過敏性亢進、肺組織における軽度のILC2浸潤を認めた。HDM投与によりBALF中のヒトIL-5やヒトIL-13が上昇し、ヒト好酸球浸潤を誘導し、喘息患者に特徴的な好酸球性気道炎症像を再現することができた。

### 4. 考察

トリプルTgは、hIL-33だけではなくHDM投与でもヒト好酸球浸潤を伴う喘息病態を再現でき、抗喘息薬の創薬に応用できる可能性が示唆された。

## 実験用ブタの微生物学的統御とローソニア感染症

藤田順一<sup>1)</sup>, 谷口由樹<sup>1)</sup>, 高橋理恵<sup>1)</sup>, 本田元巳<sup>1)</sup>,  
廣田成美<sup>1)</sup>, 原 弘之<sup>1)2)</sup>, 石井敬基<sup>1)3)</sup>

### Microbiological control of laboratory swine and Lawsonia infection

Junichi FUJITA<sup>1)</sup>, Yoshiki TANIGUCHI<sup>1)</sup>, Rie TAKAHASHI<sup>1)</sup>, Motomi HONDA<sup>1)</sup>,  
Narumi HIROTA<sup>1)</sup>, Hiroyuki HARA<sup>1)2)</sup>, Yukimoto ISHII<sup>1)3)</sup>

#### 1. 背景

実験用ブタを扱う施設は、その動物の特性から家畜伝染病予防法に基づく適正な管理<sup>1)</sup>が必須の条件であるが、施設や研究の目的に合った実験動物としての微生物学的統御も重要な課題である。そこで実験結果に対する感染症の影響を防ぐため、また動物福祉の観点からもSPF (Specific pathogen free) のブタを実験に使用する事は3Rsの原則に基づくことであり重要である。しかし実験用ブタのSPFの基準については統一が図られてないのが現状であり、多くの実験動物施設がLWD (Landrace pig, Middle White pig, Duroc pig) 等の家畜ブタを導入する際は畜産を目的としたSPF認定農場の基準を参考していると思われる。この基準とは「日本SPF豚協会」が作成した認定基準であり、感染症に関連する項目としてコマーシャル (CM) 農場においては、オーエスキー病 (*Aujeszky's Disease*; AD), 萎縮性鼻炎 (*Atrophic Rhinitis*; AR), 豚マイコプラズマ肺炎 (*Mycoplasmal Pneumonia of Swine*; MPS), トキソプラズマ病 (*Toxoplasmosis*) の排除が条件とされている。このSPFブタ認定制度は、疾病リスクを低減し、ブタ肉の生産効率を高め、肉質を向上させる産業目的<sup>2)</sup>であり、実験動物としてのSPFとは目的が異なる。実験動物施設として統御する必要があると思われる感染症は複数あるが、その中でも今回はローソニア感染症を発症し実験遂行に支障をきたし

た経験を紹介する。

#### 2. ローソニア感染症

ローソニア感染症 (*Lawsonia intracellularis*: 以下 *Li*) は、偏平細胞内寄生体で細胞内 *Campylobacter* 属様のグラム陰性小桿菌であり、ブタ増殖性腸炎 (Porcine Proliferative Enteropathy:PPE) を引き起こす<sup>3)</sup>。*Li*は感染力が強く不顕性感染として殆どの農場に浸潤していると思われ<sup>4)</sup>、PPE (顕性型) の主な症状としては、腸管内出血による出血性下痢 (タール便)、重度の貧血、体重低下などの急性型と、発育不良や慢性もしくは間欠性の下痢などの慢性型に分けられ、PPE (不顕性型) の場合は、排泄物の異常や体調面の変化はみられない<sup>5)</sup>。古くから知られている疾病であるが、人工的な培養ができず菌分離が困難であることから、解明が進まない感染症であった。様々な感染要因を排除した後に最後に残るのが *Li* と言われており、清浄度の高い施設で発症する傾向にあると考える。PPE発症はストレスや免疫力低下等も要因であることから、実験処置や輸送のストレスによって急性型を発症する場合がある。畜産業界で発症した場合は、経済的損失を防ぐ目的から安楽死処置など早期の対応を図るが、実験動物施設においては、その目的から菌保有の事前確認と実験への使用の有無や開始後の治療を視野に入れる必要性があり、特に注意が必要な感染症である。

1) 日本大学医学部 総合医学研究所 医学研究支援部門

2) 日本大学医学部 機能形態学系 生体構造医学分野

3) 日本大学医学部 医学研究企画・推進室

藤田順一: fujita.junichi@nihon-u.ac.jp

### 3. 症 例

ミニブタ30kgオス1頭が、搬入13日目に水溶性出血性タール状便。翌日より食欲低下、体温低下、貧血症状。4日目に糞便の肉眼的所見にて、腸内壁の壊死と思われる内容物を確認。抗菌剤エンロフロキサシンを筋肉内投与したが発症から5日後に死亡した。原因究明のため死亡翌日に解剖を実施した。なお菌拡散防止のため腸管は切開せず腹腔内のみ観察。検体の採取として、肛門から直腸にかけてタール便を-80℃にて保存した。その後の死体処理は、腸管に液体窒素を散布し、次亜塩素酸ソーダ浸漬の吸水シートで体を包み、ビニール袋で密封後冷凍保存し感染性廃棄物として処理した。

発症状況と施設の対応は以下の通りである。

### 4. 対 応

発症が確認された飼育室は、発症直後から入室制限を実施し、消毒、作業動線と緊急連絡網を再確認した。室内滅菌衣はディスポに変更し、次亜塩素酸ソーダ消毒槽に浸漬後廃棄した。飼育ケージ内に次亜塩素酸ソーダを散布した。なお同室で飼育中のブタ8頭は発症ケージから遠ざけ、全頭に抗生物質チアムリン油性注射液0.05ml/kgを3日間筋肉内投与、抗生物質チアムリンフマル酸塩散300mg/給餌量1kgを2週間経口投与した。

抗生物質投与により10kg以下の個体は軟便が確認されたため、整腸剤ミヤゴールドを併用。その後全頭に異常は見られず同フロア内の飼育室にも感染は認められなかった。感染症同定のため、発症したブタの糞便はPCR法により*Li*の発現が認められた。また飼育中と新規搬入ブタ全ての検査を継続した。発症より約1年後に新規搬入ブタの検査で陽性反応が検出された。事前に確認ができたことから、研究者に報告し実験用として使用しない対応を取ることが可能であった。

### 5. 考 察

ローソニア感染症はイヌ、ウサギ、齧歯類等にも感染することから<sup>6)</sup>、施設導入時の検疫や*Li*保有ブタ発見時の初期対応が特に重要である。

*Li*の感染予防については生産業者も出荷前より対応をしており、ブタは全頭に抗生物質チアムリンを投与している施設からの導入であったが、*Li*は完

全な駆除が難しく輸送や環境の変化によるストレスが要因となり、発症したと思われる。*Li*感染およびPPE発症後の初期対応は、施設の管理体制と担当者の適格な判断が重要であり、各施設においては緊急時に備えた抗生物質や整腸剤等を常備する等の対応が管理上必須と考える。また、実験に影響のない範囲でワクチンの接種<sup>7)</sup>についても検討が必要と思われる。実験動物施設における実験用ブタの微生物学的統御は可能な範囲で統一することが望ましく、生産業者との連携にも繋がることから今後も検討を進めていく予定である。

### 文 献

- 1) ブタ・ミニブタ実験マニュアル編集委員会：ブタ・ミニブタ実験マニュアル，アドスリー，東京16-18，2017.
- 2) 赤池洋二：我が国におけるSPF養豚の現状，日豚会誌 39：79-101，2002.
- 3) Gebhart CJ, Lin GF, McOrist SM, Laeson GH, Murtaugh MP: Cloned DNA probes specific for the intracellular *Campylobacter*-like organism of porcine proliferative enteritis, J Clin Microbiol 29: 1001-1015, 1991.
- 4) 川本千代美, 河村美登里, 森本和秀, 久保田泰徳：豚増殖性腸炎の発生と*Lawsonia intracellularis*の浸潤状況，広島獣医学会誌，21：28-31，2006.
- 5) 清水悠記臣, 小沼 操, 菅野康則, 赤石博臣, 沢田拓士：動物の感染症，近代出版，東京238-239，2004.
- 6) Collins AM, Fell S, Pearson H, Toribio JA: Colonisation and shedding of *Lawsonia intracellularis* in experimentally inoculated rodents and in wild rodents on pig farms. Vet Microbiol 150: 384-388. 2011.
- 7) 佐藤裕夫, 井戸徳子, 平間ちが：豚増殖性腸炎ワクチンの効果検証，岩獣会報, Vol. 39：57-60，2013.

## 医学研究支援部門の利用に関する成果・業績等一覧

### Lists of publication and results from Utilization in Medical Research Center

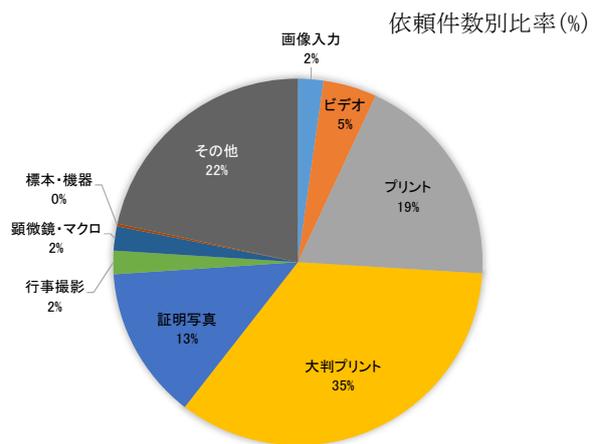
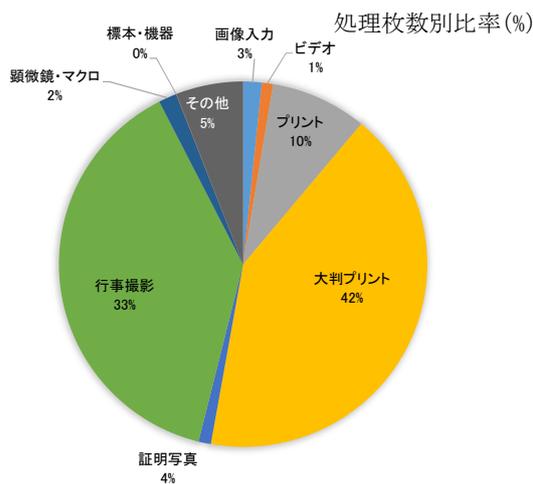
#### 形態系

##### 【中央写真室】

##### 平成30年度 年間処理枚数/依頼件数

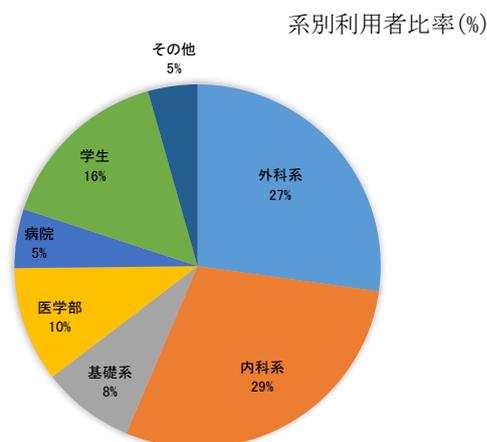
	画像入力	ビデオ	プリント	大判プリント	証明写真	行事撮影	顕微鏡・マクロ	標本・機器	その他	年間合計
処理枚数(枚)	350	210	1821	8978	234	8294	342	8	1270	21507
依頼件数(件)	26	62	313	422	204	36	31	3	446	1543

※1「ビデオ」は処理時間30分を1枚として換算 210枚=105時間  
※2「大判プリント」は料金単位 10cmを1枚として換算 8978枚=897.8m



##### 平成30年度 年間利用者数(人)

所属	外科系	内科系	基礎系	医学部	病院	学生	その他	合計
人数	242	259	73	91	47	138	39	889



【電子顕微鏡室】

論文

Itoi M, Okazawa A, Yamaura J, Maki S, Komatsu T, I. Maurin, E. Codjovi, K. Boukhedaden, Kojima N : Structural Insight into Order-Disorder Transition and Charge-Transfer Phase Transition in an Iron Mixed-Valence Complex (n-C<sub>3</sub>H<sub>7</sub>)<sub>4</sub>N[Fe<sup>II</sup>Fe<sup>III</sup>(dto)<sub>3</sub>] with a Two-Dimensional Honeycomb Network. *Inorg. Chem*; 57 (21) : 13728-13738, 2018.

Kosaku K, Harada H, Jike T, Tsuboi I, and Aizawa S: Long-Term Hypoxic TOLERANCE in Murine Cornea. *HIGH ALTITUDE MEDICINE & BIOLOGY*; Volume 19, Number 1: 35-41, 2018.

野田直紀：繊毛のはたらき 繊毛表面に沿った細胞の一方方向性運動. 日本大学医学部一般教育研究紀要；台46号：p.9-20, 2018.

学会発表

Hayashi K, Goto F, Kishino A, Nomura Y, Kanzaki S, Ogawa K : Crosstalk between Toll-like receptor 7-mediated autophagy and apoptosis in auditory cells – A miRNA let-7b-based therapeutic strategy for inner ear protection – . 6th East Asian Symposium on Otology. Seoul, Korea SP01 Basic Research 1, 2018.

浅居僚平, 原田英誉, 風間智彦, 松崎洋海, 大島猛史, 松本太郎：コラーゲンゲル充填シリコンチューブ架橋によるラット反回神経再生モデルの確立. 第17回日本再生医療学会総会. 横浜, 2018.

浅居僚平, 松崎洋海, 牧山 清, 大島猛史：反回神経切除ラットにおける再生可能な神経欠損距離の検討. 第30回日本喉頭科学会・学術講演会. 高知, 2018.

浅居僚平, 松崎洋海, 牧山 清, 大島猛史：咽頭・喉頭乳頭腫—2017年手術例の検討—. 第80回耳鼻咽喉科臨床学会総会・学術講演会. 横浜, 2018.

Kishino A, Hayashi K, Hidai C, Nomura Y, Oshima T : The regulation of ER stress-induced autophagy

through XBP1-FoxO1 interaction in auditory cells. Association for Research in Otolaryngology 41st Annual MidWinter Meeting. San Diego USA, 2018.

岸野明洋, 林 賢, 野村泰之, 大島猛史：内耳感覚細胞におけるJNK阻害剤による小胞体ストレス誘導性アポトーシスの抑制. 第119回日本耳鼻咽喉科学会通常総会・学術講演会. 横浜, 2018.

岸野明洋, 林 賢, 野村泰之, 大島猛史：内耳感覚細胞におけるXBP1 mRNAスプライシングによる小胞体ストレス誘導性オートファジーの制御. 第28回日本耳科学会総会・学術講演会. 大阪, 2018.

Kishino A, Hayashi K, Oshima T: Endoplasmic Reticulum-induced Apoptosis and Necroptosis in Auditory Cells. The 122nd American Academy of Otolaryngology - Head and Neck Surgery Foundation Annual Meeting & OTO Experience. Atlanta USA, 2018.

岸野明洋, 林 賢, 増田 毅, 野村泰之, 斎藤雄一郎, 大島猛史：内耳感覚細胞におけるBeclin-1を介した小胞体ストレス誘導性オートファジーとアポトーシスのクロストーク. 第77回日本めまい平衡医学会総会・学術講演会. 山口, 2018.

副島一孝, 樫村 勉, 風間智彦, 松本太郎, 菊池雄二, 仲沢弘明：シンポジウム 再生医療の現況と将来性 自家培養表皮移植 (CEA) による広範囲熱傷治療の現況と将来展望. 第61回日本形成外科学会総会学術集会. 博多, 2018.

副島一孝, 樫村 勉, 吉田光徳, 堀米迪生, 竹田昌平, 菊池雄二, 仲沢弘明：パネルディスカッション 培養表皮移植の進歩 人工真皮上への自家培養表皮生着率向上のための試み. 第44回日本熱傷学会総会学術集会. 東京, 2018.

Soejima K, Kashimura T, Kazama T, Matsumoto T, Nakazawa H : Effects of matured adipocyte-derived dedifferentiated fat (DFAT) cells on skin. reconstruction using artificial dermis in wound management Stem Cells 2018 Winter Symposium. Miami

FL USA, 2018.

副島一孝：皮膚再建の再生医療・現状と展望. 第39回日本炎症・再生医学会. 東京, 2018 イブニングセミナー 教育講演

#### 招待講演

岸野明洋：内耳感覚細胞における小胞体ストレスとオートファジー —電子顕微鏡による微細構造の観察—. 第151回電子顕微鏡技術研究会. 東京, 2018.

#### 招待講演関連発表

地家豊治：寒天を用いた浮遊細胞の試料作製法. 第151回電子顕微鏡技術研究会. 東京, 2018.

#### 著書

宮澤七郎・島田達生 監修 医学生物学電子顕微鏡技術学会 編 和泉伸一 編集責任：マイクロワールド人体大図鑑 脳と感覚器 考えて感じるしくみ. 株式会社小峰書店, 2018.

#### 受賞

Best Basic Science Award at the the 122nd American Academy of Otolaryngology - Head and Neck Surgery Foundation Annual Meeting & OTO Experience.

Kishino A, Hayashi K, Oshima T: Endoplasmic Reticulum-induced Apoptosis and Necroptosis in Auditory Cells.

### 医用電子系

#### 【医用電子室】

##### 総説・解説

##### 小児科学分野

藤田之彦, 石井和歌子, 福田あゆみ：発達障害とOD合併例に対する治療の取り組み. 子どもの心とからだ (0918-5526) 27巻2号 Page236. 2018, 8.

石井和嘉子, 藤田之彦, 高橋昌里：起立性調節障害患者における抑うつ・不安と腸内フローラに関する検討. 日本小児科学会雑誌 (0001-6543) 122巻2号 Page354. 2018, 2.

石井和嘉子, 藤田之彦：起立性調節障害 (OD) -病態理解と診断・治療はどこまで進んでいるか 起立性調節障害における脳血流変化. 子どもの心とからだ (0918-5526) 26巻4号 Page374-376. 2018, 2.

#### 神経外科学分野

山本隆充, 渡辺 充, 小林一太, 大島秀規, 深谷親, 吉野篤緒：脳卒中後疼痛研究の最前線 脳卒中後疼痛に対するニューロモデュレーション治療. PAIN RESEARCH (0915-8588) 33巻2号 Page89. 2018, 6.

### 生物化学系

#### 【化学分析室】

#### 【感染症ゲノム研究室】

#### 原著論文

##### 臨床検査医学部門

Sinya K, Nakayama T, Nakayama T, Yamamoto T: A Case-control Study between the STIM1 Gene and Hypertensive Disorders of Pregnancy. Hypertension Research; 41(1):39-44, 2018.

Ochiai Y, Sano E, Okamoto Y, Yoshimura S, Makita K, Yamamuro S, Ohta T, Ogino A, Tadakuma H, Ueda T, Nakayama T, Hara H, Yoshino A, Katayama Y: Efficacy of ribavirin against malignant glioma cell lines. Follow-up study. Oncol Rep; 39 (2) : 537-544, 2018.

Fujioka K, Oishi M, Fujioka A, Nakayama T: Increased nitroglycerin-mediated vasodilation in migraineurs without aura in the interictal period. Journal of Medical Ultrasonics; 45 (4) : 605-610, 2018.

Ohtake S, Takahashi H, Nakagawa M, Uchino Y, Miura K, Iriyama N, Nakayama T, Hatta Y, Takei M: One percent chlorhexidine-alcohol for preventing central venous catheter-related infection during intensive chemotherapy for patients with hematologic malignancies. J Infect Chemother; 24 (7) : 544-548, 2018.

Sunagawa K, Yagoshi M, Suzuki A, Seki T, Nakamura S, Miyazaki Y, Nakayama T, Hashimoto S, Sugitani M: Cytological and molecular detection of *Scedosporium apiospermum* in a patient treated for a *Mycobacterium avium* complex infection. *Diagn Cytopathol*; 46 (7) : 642-644, 2018.

#### 呼吸器内科学分野

Ito R, Maruoka S, Soda K, Katano I, Kawai K, Yagoto M, Hanazawa A, Takahashi T, Ogura T, Goto M, Takahashi R, Toyoshima S, Okayama Y, Izuhara K, Gon Y, Hashimoto S, Ito M, Nunomura S: A humanized mouse model to study asthmatic airway inflammation via the human IL-33/IL-13 axis. *JCI Insight*; 3 (21) : pii: 121580, 2018.

#### IR・医学教育センター

Matsuno T, Toyoshima S, Sasaki-Sakamoto T, Kashiwakura J-I, Matsuda A, Watanabe Y, Azuma H, Kawana K, Yamamoto T, Okayama Y: Characterization of human decidual mast cells and establishment of a culture system. *Allergol Int*; 67: S18-S24, 2018.

#### 生化学分野

Rocio Otero, Michiyasu Ishizawa, Nobutaka Numoto, Teikichi Ikura, Nobutoshi Ito, Hiroaki Tokiwa, Antonio Mouriño, Makoto Makishima, Sachiko Yamada: 5S-Adamantyl-23-yne-26, 27-dinor-1 $\alpha$ , 25-dihydroxyvitamin D3: Synthesis, Tissue Selective Biological Activities, and X-ray Crystal Structural Analysis of Its Vitamin D Receptor Complex. *Journal of Medicinal Chemistry*; 61 (15) : 6658-6673, 2018

#### 学会発表

##### 臨床検査医学部門

中山智祥, 鳴瀬 弘, 寺本紘子, 森田昭彦, 亀井聡, 福田嘉明, 宮下徹夫: Fabry病の遺伝学的検査実施例. 第91回日本内分泌学会総会学術大会, 宮崎, 2018.

福田嘉明, 菅野 希, 勝俣弘巳, 谷田部雄二, 宮下徹夫, 中山智祥, 南 紘子, 亀井 聡: マルベリー小体検出により Fabry 病と診断された一症例. 第

67回日本医学検査学会, 浜松, 2018.

中山智祥, 鳴瀬 弘, 寺本紘子, 森田昭彦, 亀井聡, 福田嘉明, 宮下徹夫: Fabry病の自施設遺伝学的検査実施体制. 第61回日本腎臓学会学術総会, 新潟, 2018.

中山智祥, 鳴瀬 弘, 寺本紘子, 森田昭彦, 亀井聡, 福田嘉明, 宮下徹夫: Fabry病の酵素活性測定, 塩基配列決定から遺伝カウンセリングまで. 第42回日本遺伝カウンセリング学会学術集会, 仙台, 2018.

鳴瀬 弘, 久川 聡, 笹村明香里, 赤澤 論, 堀江一郎, 中山智祥: 脳髄黄色腫症におけるCYP27A1遺伝子の新規変異. 第25回日本遺伝子診療学会大会, 伊勢市, 2018.

中山智祥, 鳴瀬 弘, 南 紘子, 森田昭彦, 亀井聡: Fabry病の遺伝子診療実施例 — 臨床検査, 遺伝カウンセリング, 遺伝学的検査まで —. 第25回日本遺伝子診療学会大会, 伊勢市, 2018.

河野 愛, 中山智祥, 中山琢生, 新屋芳里, 山本樹生, 川名 敬: 妊娠高血圧症候群とMyosin Phosphatase Target Subunit 1 遺伝子との関連解析. 第25回日本遺伝子診療学会大会, 伊勢市, 2018.

中山智祥, 鳴瀬 弘, 南 紘子, 森田昭彦, 亀井聡: Fabry病における確定診断のシステム構築. 第28回日本病態生理学会大会, 神奈川, 2018.

中山智祥, 鳴瀬 弘, 南 紘子, 森田昭彦, 亀井聡: Fabry病の検出から遺伝学的検査による確定診断までの実施例. 第58回日本臨床化学会年次学術集会, 名古屋, 2018.

鳴瀬 弘, 久川 聡, 笹村明香里, 赤澤 論, 堀江一郎, 中山智祥: 脳髄黄色腫症におけるCYP27A1遺伝子原因バリエーション検索. 日本人類遺伝学会大会第63回大会, 横浜, 2018.

市川 剛, 中山智祥, 仲尾岳大, 東 裕福, 川名

敬：妊娠中に遺伝カウンセリングを受けた母体骨形成不全症合併妊娠の一例. 日本人類遺伝学会大会第63回大会, 横浜, 2018.

石関 治, 相馬 史, 武居宣尚, 宮下徹夫, 中山智祥: 化学発光酵素免疫測定法 (CLEIA) による抗ENA抗体測定の臨床的有用性. 日本臨床検査自動化学会第50回大会, 神戸, 2018.

相馬 史, 石関 治, 武居宣尚, 宮下徹夫, 中山智祥: 化学発光酵素免疫測定法 (CLEIA) による抗ds-DNA抗体測定の臨床的有用性. 日本臨床検査自動化学会第50回大会, 神戸, 2018.

中山智祥, 鳴瀬 弘, 福田嘉明, 宮下徹夫, 南 紘子, 森田昭彦, 亀井 聡: 臨床検査部での尿所見から塩基配列までFabry病確定診断システム構築. 日本臨床検査自動化学会第50回大会, 神戸, 2018.

Iriyama N, Naruse H, Takahashi H, Miura K, Uchino Y, Nakagawa M, Hamada T, Hatta Y, Nakayama T, Takei M: 均衡型転座t (2;5) (q37;q31) を有する慢性好酸球性白血病における新規融合遺伝子GCC2-PDGFRB. A novel fusion gene involving PDGFRB and GCC2 identified in a patient with chronic eosinophilic leukemia harboring reciprocal translocation, t (2;5) (q37;q31). 第80回日本血液学会学術集会, 大阪, 2018.

中山智祥, 鳴瀬 弘, 南 紘子, 森田昭彦, 亀井 聡: Fabry病の遺伝学的検査体制確立. 第65回日本臨床検査医学会, 東京, 2018.

清原典子, 山川道子, 青木留美子, 西山宏幸, 武居宣尚, 永瀬昌史, 宮下徹夫, 中山智祥: 採血室の業務改善— 待ち時間の短縮と神経損傷事故の防止について —. 第14回 東京都医学検査学会, 東京, 2018.

五十嵐都志子, 寺岡正志, 江副 純, 久川 聡, 志方えりさ, 石毛美夏, 小川えりか, 中山智祥: ダイレクトシーケンシング法で検出されなかったフェニルケトン尿症の原因バリエーション検出. 第36回日

本染色体遺伝子検査学会総会・学術集会, 東京, 2018.

#### IR・医学教育センター

岡山吉道: 慢性特発性蕁麻疹 (CSU) に対する有用性から考えられるオマリズマブの作用機序, 第67回日本アレルギー学会学術大会, 東京, 2018.

岡山吉道: 最新データから考える慢性特発性蕁麻疹の病因・病態とオマリズマブ. 第87回日本皮膚科学会東京支部学術学会, 東京, 2018.

Okayama Y, Fujisawa D, Endo T, Kashiwakura J, Kanegae K, Sakamoto T, Toyoshima S, Hayama K, Ra C, Terui T: Expression of Mas-related gene X2 on mast cells in skin of patients with severe chronic spontaneous urticaria. World Histamine Symposium 2018, 神戸, 2018.

豊島翔太, 坂本朋美, 鐘ヶ江佳寿子, 井上寿男, 権寧博, 羅 智靖, 松本健治, 岡山吉道: 自然免疫及び獲得免疫応答におけるヒトマスト細胞由来エクソソームmicroRNAの網羅的比較解析. 第67回日本アレルギー学会学術大会, 東京, 2018.

遠藤嵩大, 豊島翔太, 葉山惟大, 西盛信幸, 伊崎聡志, 鐘ヶ江佳寿子, 坂本朋美, 照井 正, 岡山吉道: 慢性突発性蕁麻疹 (CSU) 患者の好塩基球におけるIgE依存性の反応性とオマリズマブの治療効果. 第67回日本アレルギー学会学術大会, 東京, 2018. 6. 24.

遠藤嵩大, 豊島翔太, 葉山惟大, 西盛信幸, 伊崎聡志, 鐘ヶ江佳寿子, 坂本朋美, 照井 正, 岡山吉道: 慢性突発性蕁麻疹 (CSU) 患者の抗FcεRIα鎖自己抗体によるFcεRI架橋能とオマリズマブの治療効果. 第67回日本アレルギー学会学術大会, 東京, 2018.

坂本朋美, 豊島翔太, 榎本幸典, 菅井和子, 高増哲也, 吉原重美, 岡山吉道: RSウイルスによるヒトマスト細胞の活性化機構の検討. アレルギー・好酸球研究会2018, 東京, 2018.

遠藤嵩大, 豊島翔太, 伊東真奈, 葉山惟大, 西盛信幸, 伊崎聡志, 鐘ヶ江佳寿子, 坂本朋美, 照井正, 岡山吉道: 慢性突発性蕁麻疹 (CSU) 患者の好塩基球におけるFcεRIを介する刺激に反応する (R) と反応しない (NR) 群のオマリズマブの治療効果. アレルギー・好酸球研究会2018, 東京, 2018.

菅井和子, 坂本朋美, 柏倉淳一, 宮地裕美子, 吉住正和, 木村博一, 吉原重美, 岡山吉道: RSウイルス感染による初回喘鳴児における鼻汁中抗RSV IgE値, TSLPと反復喘鳴の関係. アレルギー・好酸球研究会2018, 東京, 2018.

三嶋信太郎, 柏倉淳一, 豊島翔太, 菅順一郎, 関雅之, 斎藤 修, 徳橋泰明, 松本健治, 岡山吉道: 関節リウマチ (RA) 患者マスト細胞は変形性関節症 (OA) 患者マスト細胞に比較してFcγRを介して有意にprostaglandin D<sub>2</sub>を産生する. 私立大学戦略的研究基盤形成支援事業「難治性免疫・アレルギー疾患の病態の解明と新規治療法の開発」平成29年度報告会, 2018.

豊島翔太, 坂本朋美, 鐘ヶ江佳寿子, 井上寿男, 権寧博, 羅 智靖, 松本健治, 岡山吉道: 自然免疫および獲得免疫応答におけるヒトマスト細胞由来エクソソーム内microRNAの網羅的比較解析. 私立大学戦略的研究基盤形成支援事業「難治性免疫・アレルギー疾患の病態の解明と新規治療法の開発」平成29年度報告会, 2018.

伊崎聡志, 豊島翔太, 遠藤嵩大, 柏倉淳一, 布村 聡, 中村亮介, 秋山晴代, 鐘ヶ江佳寿子, 藤澤大輔, 畠田優子, 葉山惟大, 藤田英樹, 羅 智靖, 照井 正, 岡山吉道: 慢性蕁麻疹 (CSU) 患者の抗FcεRIα鎖 (α鎖) 自己抗体によるFcεRI架橋能とオマリズマブの治療効果. 私立大学戦略的研究基盤形成支援事業「難治性免疫・アレルギー疾患の病態の解明と新規治療法の開発」平成29年度報告会, 2018.

遠藤嵩大, 豊島翔太, 伊崎聡志, 西盛信幸, 葉山惟大, 坂本朋美, 鐘ヶ江佳寿子, 照井 正, 岡山吉道: 慢性特発性蕁麻疹 (CSU) 患者の好塩基球におけるFcεRIを介する反応性の差異とオマリズマブ対す

る治療効果について. 私立大学戦略的研究基盤形成支援事業「難治性免疫・アレルギー疾患の病態の解明と新規治療法の開発」平成29年度報告会, 2018.

## 耳鼻科学分野

浅居僚平, 原田英誉, 風間智彦, 松崎洋海, 大島猛史, 松本太郎: コラーゲンゲル充填シリコンチューブ架橋によるラット反回神経再生モデルの確立. 第17回日本再生医療学会総会, 神奈川, 2018.

浅居僚平, 松崎洋海, 牧山 清, 大島猛史: 反回神経切除ラットにおける再生可能な神経欠損距離の検討. 第30回日本喉頭科学会・学術講演会, 高知, 2018.

岸野明洋: 内耳感覚細胞における小胞体ストレスとオートファジー —電子顕微鏡による微細構造の観察—. 第151回電子顕微鏡技術研究会, 東京, 2018.

岸野明洋: 内リンパ水腫長期観察症例の聴力予後. 第15回東京メニエール病カンファレンス, 東京, 2018.

岸野明洋, 林 賢, 野村泰之, 大島猛史: 内耳感覚細胞におけるJNK阻害剤による小胞体ストレス誘導性アポトーシスの抑制. 第119回日本耳鼻咽喉科学会通常総会・学術講演会, 横浜, 2018.

岸野明洋, 林 賢, 野村泰之, 大島猛史: 内耳感覚細胞におけるXBP1mRNA スプライシングによる小胞体ストレス誘導性オートファジーの制御. 第28回日本耳科学会総会・学術講演会, 大阪, 2018.

岸野明洋, 林 賢, 増田 毅, 野村泰之, 齋藤雄一郎, 大島猛史: 内耳感覚細胞におけるBeclin-1を介した小胞体ストレス誘導性オートファジートアポトーシスのクロストーク. 第77回日本めまい平衡医学会総会・学術講演会, 山口, 2018.

Akihiro Kishino, Ken Hayashi, Chiaki Hidai, Yasuyuki Nomura, Takeshi Oshima: The regulation of ER stress-induced autophagy through XBP1-FoxO1 interaction in auditory cells. Association for Research in

Otolaryngology 41st Annual MidWinter Meeting. USA, 2018.

Akihiro Kishino, Ken Hayashi, Takeshi Oshima : Endoplasmic Reticulum-induced Apoptosis and Necroptosis in Auditory Cells. The 122nd American Academy of Otolaryngology. Head and Neck Surgery Foundation Annual Meeting & OTO Experience, USA, 2018.

島 翔太, 坂本明美, 鐘ヶ江加寿子, 井上寿男, 権寧博, 羅 智靖, 松本健治, 岡山吉道: ミニシンボジウム; 自然免疫および獲得免疫応答におけるヒトマスト細胞由来エクソソーム内 microRNA の網羅的比較解析. 第67回日本アレルギー学会学術大会, 千葉, 2018.

#### 呼吸器内科学分野

飯田由子, 丸岡秀一郎, 権 寧博, 水村賢司, 高橋麻衣, 引地麻梨, 清水哲男, 高橋典明, 橋本 修: スルフォラファンによる小細胞肺癌株に対する鉄代謝を介した新規細胞死フェロトーシス. 第16回日本臨床腫瘍学会学術集会, 神戸, 2018.

丸岡秀一郎, 釋 文雄, 大橋由明, 山本博之, 大賀拓史, 比山英樹, 松田 喬, 由利正利, 村上正人: マルチオミクス解析を用いた心身症への新たなアプローチ. 第23回日本心療内科学会総会・学術大会, 北海道, 2018.

引地麻梨, 権 寧博, 丸岡秀一郎, 水村賢司, 高橋麻衣, 森澤朋子, 大木隆史, 坪井絵莉子, 橋本 修: 特発性肺線維症に特異的な新規血中自己抗体の同定. 私立大学戦略的研究基盤形成支援事業「難治性免疫・アレルギー疾患の病態の解明と新規治療法の開発」. 平成29年度報告会, 東京, 2018.

岡本真一, 丸岡秀一郎, 権 寧博, 津谷恒太, 水村賢司, 神津 悠, 坪井絵莉子, 曾田香織, 竹下郁子, 橋本修: ウイルス感染による気道上皮バリアの脆弱化機構の検討. 私立大学戦略的研究基盤形成支援事業「難治性免疫・アレルギー疾患の病態の解明と新規治療法の開発」. 平成29年度報告会, 東京, 2018.

2. 24.

#### 生化学分野

石澤通康, Rocio Otero, 沼本修孝, 伊倉貞吉, 伊藤暢聡, 常盤広明, Antonio Mourino, 榎島 誠, 山田幸子: 25-Adamantyl-1 $\alpha$ , 25-dihydroxyvitamin D3 誘導体の組織選択的活性. 日本ビタミン学会 第70回大会, 大阪, 2018.

石澤通康, Rocio Otero, 沼本修孝, 伊倉貞吉, 伊藤暢聡, 常盤広明, Antonio Mourino, 榎島誠, 山田幸子. 25位アダマンチルビタミンD誘導体の構造と活性. 第4回 Neo Vitamin D Workshop 学術集会, 東京, 2018.

#### 糖尿病代謝内科学分野

田中 彩, 古川麻美, 小須田南, 山名 碧, 長澤瑛子, 藤城 緑, 山口 賢, 石原寿光: ブドウ糖応答性の異なるMIN6細胞サブクローンのトランスクリプトーム解析によるインスリン分泌に重要な遺伝子の探索. 第61回日本糖尿病学会年次学術集会, 東京, 2018.

山口 賢, 長澤瑛子, 山名 碧, 小須田南, 田中彩, 石原寿光: インスリン分泌におけるCITED4の機能解析. 第61回日本糖尿病学会年次学術集会, 東京, 2018.

#### 症例報告

##### 臨床検査医学部門

Sasamura A, Akazawa S, Haraguchi A, Horie I, Ando T, Abiru N, Takei H, Nittono H, Une M, Kurosawa T, Murai T, Naruse H, Nakayama T, Kotani K, Remaley AT, Kawakami A: Internal Medicine. Late-onset Cerebrotendinous Xanthomatosis with a Novel Mutation in the CYP27A1 Gene. Intern Med; 57: 1611-1616, 2018.

Fujioka K, Fujioka A, Tajima S, Oishi M, Hayashi K, Eto H, Nakayama T: Characteristic Power Doppler Sonographic Imaging of Nodular Fasciitis from a Dermatological Perspective: Another Case and Review of Three Cases. Journal of Clinical Case Re-

ports; 8: 1165, 2018.

総説

IR・医学教育センター

岡山吉道：ヒトマスト細胞とMAS-related gene X2 (MrgX2). 臨床免疫・アレルギー科；69 (3)：277-280, 2018.

岡山吉道：慢性特発性蕁麻疹におけるマスト細胞の活性化機構. アレルギー；67 (3)：192-196, 2018.

岡山吉道：慢性特発性蕁麻疹におけるマスト細胞と好塩基球の活性化の機序に関して. 臨床免疫・アレルギー科；69 (5)：463-467, 2018.

岡山吉道：マスト細胞. 鼻アレルギーフロンティア；18 (2)：76-79, 2018.

岡山吉道：IgE受容体「アレルギー用語解説」シリーズ. アレルギー；67 (9) 1279-1280, 2018.

ワークショップ, 特別講演, 招待講演, 受賞講演  
臨床検査医学部門

中山智祥：教育セッション「教えるための遺伝医学」バリエーションの記載法と評価・解釈. 第63回日本人類遺伝学会, 横浜, 2018.

中山智祥：遺伝子診療における基本的知識. 都民公開講座, 東京, 2018.

IR・医学教育センター

岡山吉道：PAFとアレルギー炎症, 第23回那須ティーチン学術集会, 東京, 2018.

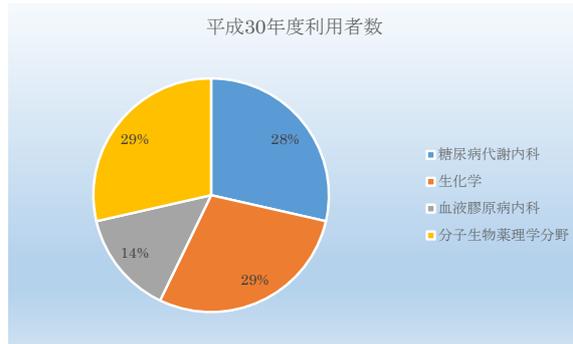
岡山吉道：ウイルス感染と反復喘鳴, 第36回呼吸器・免疫シンポジウム, 東京, 2018.

ラジオアイソトープ・環境保全系

【RI実験室】

平成30年度 RI実験室ガラスバッチ利用者数

分野	糖尿病代謝内科	生化学	血液膠原病内科	細胞分子薬理学分野
人数	2	2	1	2



保有核種数

保有核種	<sup>3</sup> H	<sup>35</sup> S	<sup>14</sup> C	<sup>32</sup> P
個数	2	1	1	1

論文

生化学分野

Rocio Otero, Michiyasu Ishizawa, Nobutaka Numoto, Teikichi Ikura, Nobutoshi Ito, Hiroaki Tokiwa, Antonio Mouriño, Makoto Makishima, Sachiko Yamada: 25S-Adamantyl-23-yne-26, 27-dinor-1 $\alpha$ , 25-dihydroxyvitamin D3: Synthesis, Tissue Selective Biological Activities, and X-ray Crystal Structural Analysis of Its Vitamin D Receptor Complex. Journal of Medicinal Chemistry. 61 (15) : 6658-6673, 2018.

細胞分子薬理学部門

Okubo, Y., Kanemaru, K., Suzuki, J., Kobayashi, K., Hirose, K. and Ino, M. Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor type 2-independent Ca<sup>2+</sup> release from the endoplasmic reticulum in astrocytes. Glia 67: 113-124, 2019.

学会発表

生化学分野

石澤通康, Rocio Otero, 沼本修孝, 伊倉貞吉, 伊藤暢聡, 常盤広明, Antonio Mourino, 榎島 誠, 山田子: 25-Adamantyl-1, 25-dihydroxyvitamin D3 誘導体の組織選択的活性. 日本ビタミン学会 第70回大会. 2018.

石澤通康, Rocio Otero, 沼本修孝, 伊倉貞吉, 伊藤暢聡, 常盤広明, Antonio Mourino, 榎島 誠, 山田幸子: 25位アダマンチルビタミンD誘導体の構造と活性. 第4回 Neo Vitamin D Workshop 学術集会. 2018.

細胞分子薬理学部門

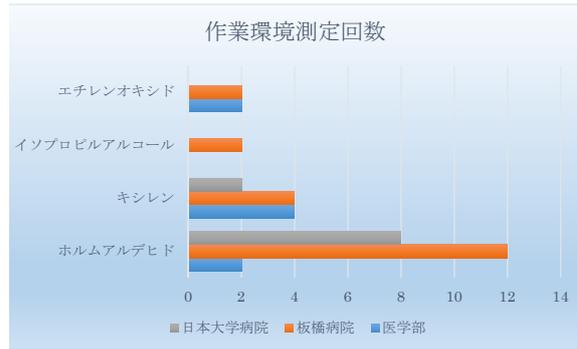
Kanemaru Kazunori, Isamu Taiko, Nami Kitajima, Hiroshi Sekiya, Masamitsu Iino: In vivo Ca<sup>2+</sup> imaging analysis of β-cells using an ultrasensitive Ca<sup>2+</sup> indicator YC-Nano50. 18th WORLD CONGRESS of basic and clinical Pharmacology 2018, 7.

金丸和典, 太向 勇, 飯野正光: 膵β細胞カルシウムシグナルの生体内イメージング解析. 平成30年度生理研研究会「シグナル動態の可視化と操作に基づく多階層機能解析の新展開」2018, 9.

Kazunori Kanemaru, Isamu Taiko, Masamitsu Iino: In vivo Ca<sup>2+</sup> imaging analysis of β-cells with transgenic mouse expressing genetically encoded Ca<sup>2+</sup> indicators. 第92回日本薬理学会年会 2019, 3.

平成30年度 作業環境測定の実績  
測定物質としてイソプロピルアルコールを追加  
作業環境測定の種類・場所・測定回数

	医学部	板橋病院	日本大学病院	合計
ホルムアルデヒド	2	12	8	22
キシレン	4	4	2	10
イソプロピルアルコール	0	2	0	2
エチレンオキシド	2	2	0	4
合 計	8	20	10	38



ラボラトリーアニマル系

[動物飼育室]

[動物実験室]

論文

腎臓高血圧内分泌内科学分野

Negishi E, Fukuda N, Otsuki T, Katakawa M, Komatsu K, Chen L, Tanaka S, Kobayashi H, Hatanaka Y, Ueno T, Endo M, Mashimo T, Nishiyama A, Abe M. Involvement of complement 3 in the salt-sensitive hypertension by activation of renal renin-angiotensin system in spontaneously hypertensive rats. Am J Physiol Renal Physiol. 2018 Sep 26. [Epub ahead of print]

生化学分野

Endo-Umeda K, Nakashima H, Umeda N, Seki S, Makishima M. Dysregulation of Kupffer Cells/ Macrophages and Natural Killer T Cells in Steatohepatitis in LXR α Knockout Male Mice. Endocrinology, 159 (3) : 1419-1432. 2018.

総合医学研究所 医学研究支援部門

谷口由樹, 藤田順一, 原 弘之, 石井敬基: 日本大学における動物実験委員会の概要について Outline of the animal care and use committee at Nihon University. 日本大学医学部総合医学研究所紀要 Vol. 6, pp.41-47. 2017.

学会等発表

循環器内科分野

Takafumi Kurosawa, YuxinLi, Kazuhiro Hagikura, Mitsumasa Sudo, Hironori Haruta, Tadateru Takayama, Takafumi Hiro, Masashi Shiomi, HiroyukiHao, Taro Matsumoto, Atsushi Hirayama : Effects of Res-

veratrol on Atherosclerotic Lesions in Watanabe Heritable Hyperlipidemic Rabbit. 第67回米国心臓病学会. 2018, 3.

Daisuke Kitano, Yuxin Li, Tadateru Takayama, Mitsumasa Sudo, Rie Takahashi, Yoshiki Taniguchi, Takafumi Hiro, Masako Mitsumata, Atsushi Hirayama. Comparison on Stent Thrombus Formation and Endothelialization in 3 months between Rivaroxaban-Clopidogrel combination and Dual Anti-platelet Therapy in pig with Everolimus-eluting Stent. 第82回日本循環器学会学術集会, 大阪. 2018.

Yuxin Li, et al. Aging and Coronary Artery Atherosclerosis: Insight from Clinical Intravascular Imaging Observation and Large Animal Model. Asian Pacific Society of Cardiology Congress 2018, Taipei 2018 May 17-21 (招待講演).

Masaru Arai, Yasuo Okumura, Koichi Nagashima, Ichiro Watanabe, Kazuki Iso, Keiko Takahashi, Yuji Wakamatsu, Sayaka Kurokawa, Kimie Ohkubo, Toshiko Nakai. Influence of Obesity on The Progression of Electrical And Structural Remodeling In A Canine Atrial Fibrillation Model. Heart Rhythm Society 2018, Boston, USA, 2018 May.

Masaru Arai, Yasuo Okumura, Ichiro Watanabe, Koichi Nagashima, Kazuki Iso, Ryuta Watanabe, Yuji Wakamatsu, Sayaka Kurokawa, Kimie Ookubo, Toshiko Nakai, Hiroyuki Hao, Rie Takahashi, Yoshiki Taniguchi, Mizuki Nikaidou, Atsushi Hirayama Influence of Obesity on the Progression of Electrical and Structural Remodeling in a Canine Atrial Fibrillation Model 第65回日本不整脈心電学会学術集会, 東京 2018, 7.

#### 腎臓高血圧内分泌内科学分野

宇都宮慧：免疫異常に起因する進行性腎障害に対する脱分化脂肪細胞を用いた細胞治療の開発, 日本再生医療学会総会. 2018, 3.

宇都宮慧：免疫異常に起因する進行性腎障害に対す

る脱分化脂肪細胞を用いた細胞治療の開発, 日本腎臓学会総会発表. 2018, 6.

#### 糖尿病代謝内科学分野

金丸和典, 太向 勇, 北島奈美, 関谷 敬, 飯野正光：高感度カルシウムインジケータタンパク質 YC-Nano50 を用いた膵β細胞の生体内イメージング解析. 第138回日本薬理学会関東部会, 2018, 3.

Kazunori Kanemaru, Isamu Taiko, Nami Kitajima, Hiroshi Sekiya, Masamitsu Iino: In vivo  $Ca^{2+}$  imaging analysis of  $\beta$ -cells using an ultrasensitive  $Ca^{2+}$  indicator YC-Nano50. 国際薬理学会 WCP2018, 2018, 7.

#### 整形外科科学分野

中山潤志, 小山公行, 風間智彦, 松本太郎, 徳橋泰明：ラット椎間板変性モデルに対する脱分化脂肪細胞 (DFAT) 移植方法による治療効果の検討. 第91回日本整形外科学会総会, 神戸. 2018.

中山潤志, 宮方啓行, 風間智彦, 加野浩一郎, 松本太郎, 徳橋泰明：脱分化脂肪細胞 (DFAT) 移植による椎間板変性症モデルに対する椎間板再生効果. 第47回日本脊椎脊髄病学会学術集会, 神戸. 2018.

#### 形成外科学分野

Kashimura T, Soejima K, Kazama T, Kikuchi Y, Matsumoto T, Nakazawa H EFFECT OF MATURE ADIPOCYTE-DERIVED DEDIFFERENTIATED FAT (DFAT) CELLS ON ISCHEMIC TISSUE OF NORMAL AND DIABETIC RATS. 16th annual international conference IFATS, USA. 2018, 12.

#### 耳鼻咽喉・頭頸部外科学分野

浅居僚平, 松崎洋海, 牧山 清, 大島猛史：反回神経切除ラットにおける再生可能な神経欠損距離の検討. 第30回日本喉頭科学会・学術講演会, 高知. 2018, 3.

浅居僚平, 原田英誉, 風間智彦, 松崎洋海, 大島猛史, 松本太郎：コラーゲンゲル充填シリコンチューブ架橋によるラット反回神経再生モデルの確立. 第17回日本再生医療学会総会, 神奈川, 2018, 3.

### 生体構造医学分野

Masaharu Kotani, Yasunori Sato, Akemichi Ueno, Rina Shibuya, Toshinori Ito, Masato Imada, Kouichi Itoh : Two non-cytotoxic type 2 ribosome-inactivating proteins (Sambucus Sieboldiana lectin and Sambucus Nigra lectin) lead neurosphere cells to caspase-independent apoptosis. Biomedical Research 2018; 29 (8) : 1570-1577.

### 総合医学研究所 医学研究支援部門

藤田順一, 谷口由樹, 高山世絵梨, 本田元巳, ベゼハマリナ, 松本 明, 荒島康友, 石井敬基 : 日本大学医学部における第三者検証と実験動物福祉. 日本実験動物技術者協会関東支部実験動物福祉部会講演会シンポジウム, 東京. 2018, 3.

藤田順一, 谷口由樹, 高山世絵梨, 本田元巳, 船橋英行, 室伏 孝, 岡田直大, 後藤秀都, 廣田成美, 高橋理恵, 松本 明, 石井敬基 : 免疫不全ブタ飼育室と飼育装置. 第6回実験用ブタ勉強会, 東京. 2018, 4.

### 博士課程

#### 外科系 循環器外科学専攻

河野道成 : ウサギ下肢虚血モデルに対する凍結解凍脱分化脂肪細胞自家移植の効果. 日本大学大学院医学研究科博士課程外科系循環器外科学専攻

#### 内科系 循環器内科学専攻

黒澤毅文 : 遺伝性高コレステロール血症ウサギ WHHL-MI の動脈硬化性プラーク伸展に対する DPP-4 阻害薬リナグリプチンの効果 — 血管内エコー法を用いた経時的検討 —. 日本大学大学院医学研究科博士課程内科系循環器内科学専攻

日本大学医学部総合医学研究所紀要  
Bulletin of the Research Institute of Medical Science,  
Nihon University School of Medicine

編集委員会

委員長 槇島 誠  
委員 石井敬基, 内山 真, 嶋村政男, 西山博孝, 羽尾裕之,  
原 弘之, 深谷 親  
幹事 井上広一, 葛西玲広, 藤田順一, 藤原宏樹

(50音順)

Editorial Board

Editor-in-Chief Makoto MAKISHIMA  
Associate Editors Yukimoto ISHII, Makoto UCHIYAMA, Masao SHIMAMURA,  
Hirotaka NISHIYAMA, Hiroyuki HAO, Hiroyuki HARA, Chikashi FUKAYA  
Managing Editors Koichi INOUE, Reo KASAI, Jun-ichi FUJITA, Hiroki FUJIHARA

---

発行者 日本大学医学部総合医学研究所長 槇島 誠  
発行所 日本大学医学部  
〒173-8610 東京都板橋区大谷口上町30-1 TEL.03-3972-8111  
Publisher Makoto MAKISHIMA  
Director, Research Institute of Medical Science,  
Nihon University School of Medicine  
30-1, Ohyaguchi-kamicho, Itabashi-ku, Tokyo 173-8610 JAPAN  
Phone +81-3-3972-8111

---