

# 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.9 / December 2021

日本大学医学部総合医学研究所

Research Institute of Medical Science, Nihon University School of Medicine

## 目 次

術中迅速病理診断における遺伝子変異・マーカー分子簡易検出技術の実用化に向けた研究 .....	羽尾裕之 他	1
免疫性腎炎に対する DFAT 細胞療法の治療効果と安全性の検討 .....	阿部雅紀 他	4
GOD-POD-UnaG 法を用いた血中アンバウンドビリルビン自動測定機器の開発 .....	森岡一朗 他	10
重症アレルギー疾患患者に対する抗 IgE 抗体治療のコンパニオン診断薬の開発 .....	岡山吉道 他	13
心不全患者における超音波エラストグラフィー法により測定した脾硬度の臨床的意義に関する研究 .....	齋藤佑記	17
カラー静止画像を用いた新生児ビリルビン測定システムの実用化に向けた臨床研究 .....	岡橋 彩 他	20
高強度の頭低位負荷による脳循環の経時変化 .....	加藤智一 他	23
遺伝子改変糖尿病ブタを用いた糖尿病網膜症および腎症の経時的変化の検討 .....	長岡泰司 他	26

## INDEX

Development of new technology for intra-operative rapid pathological diagnosis .....	Hiroyuki HAO et. al	1
Evaluation of efficacy and safety of the dedifferentiated fat cells therapies for the immune-induced nephritis .....	Masanori ABE et. al	4
Development of the automated serum unbound bilirubin measurement instrument using GOD-POD-UnaG method .....	Ichiro MORIOKA et. al	10
Development of companion diagnostics for treatment of patients with severe allergic diseases with anti-IgE antibody .....	Yoshimichi OKAYAMA et. al	13
Study on Clinical Significance of Spleen Stiffness in Heart Failure .....	Yuki SAITO	17
A clinical study for practical application of bilirubin measurement system using color pictures of newborns .....	Aya OKAHASHI et. al	20
Time course of changes in cerebral circulation during 30-degree head-down tilt .....	Tomokazu KATO et. al	23
The Longitudinal Evaluation of diabetic retinopathy and nephropathy in the transgenic pigs .....	Taiji NAGAOKA et. al	26

# 術中迅速病理診断における 遺伝子変異・マーカー分子簡易検出技術の実用化に向けた研究

羽尾裕之<sup>1)</sup>, 橋本伸哉<sup>2)</sup>, 吉野篤緒<sup>1)</sup>, 角光一郎<sup>1)</sup>, 相澤 信<sup>1)</sup>, 浅野正岳<sup>3)</sup>,  
久山佳代<sup>4)</sup>, 末光正昌<sup>4)</sup>, 藤田博仁<sup>2)</sup>, 山田清香<sup>1)</sup>, 右田 卓<sup>1)</sup>, 八木千裕<sup>1)</sup>

## Development of new technology for intra-operative rapid pathological diagnosis

Hiroyuki HAO<sup>1)</sup>, Shinya HASHIMOTO<sup>2)</sup>, Atsuo YOSHINO<sup>1)</sup>, Koichiro SUMI<sup>1)</sup>,  
Shin AIZAWA<sup>1)</sup>, Masatake ASANO<sup>3)</sup>, Kayo KUYAMA<sup>4)</sup>, Masaaki SUEMITSU<sup>4)</sup>,  
Hiroto FUJITA<sup>2)</sup>, Sayaka YAMADA<sup>1)</sup>, Suguru MIGITA<sup>1)</sup>, Chihiro YAGI<sup>1)</sup>

### 要旨

腫瘍におけるゲノム解析は急速に進歩し、病理診断においてもゲノム情報の重要性は日増しに高まっている。このような背景から病理診断において、遺伝子変異やマーカー分子などの分子情報が短時間で得られれば、診断の精度向上や個別化医療・精密医療と言われている患者ごとに最も適切な治療が直ちに開始できることとなる。このことで患者が得られる利益は大きく、社会的にも重要な意義がある。現在の技術では採取した検体から手術中に短時間で遺伝子情報やマーカー分子の発現を検索することは基本的に不可能である。特に遺伝子変異の検索にはコストやスペースの問題から、一般的な普及は困難である。専用の計測機器や高度な専門技術を必要としない簡易検出技術は、病理検体処理を担当する病理検査室という様々な制約がある環境下でも実施が可能であり、診断における応用・普及の可能性が見込まれる。本学文理学部で開発が進められている Signal Amplification by Ternary Initiation Complexes 法は標的分子の迅速な検出技術であり、本研究ではこの技術の病理診断への応用を検討している。

### 1. 緒言

2003年にヒトゲノム計画が完了し、その後個人ゲノムの解読がなされた。さらには次世代型シーケンサーの登場によって全ゲノム解析が容易に行われるようになり、多くの腫瘍のゲノム情報が公開されている。ゲノム情報から、発癌のドライバー遺伝子変異に対する分子標的治療薬の適応を決める個別化医療の時代から、さらには一人の患者の変異遺伝子を網羅的に検出し、より適切な治療を選択する精密医療の時代へと突入しつつある。精密医療による治療を睨んだ病理検体からの情報解析が、今後さらに発展し盛んに行われることは間違いなく、さらに従来からの顕微鏡を用いたスライドガラスの観察によって得られる形態学的な情報と合わせて、分子生

物学的な解析結果により、より精度の高い病理診断が可能となった。しかし、現在の技術をもってしても、この遺伝子情報の解析には一定のコストと時間が必要である。

従来の検出法では標的の核酸鎖を認識し、何らかの方法でシグナルとして検出する過程を等温で 1 tube, 1 step で行える方法は存在しなかった。Signal Amplification by Ternary Initiation Complexes (SAT-IC) 法は1本のチューブ内で検体と環状DNA、プライマー、蛍光試薬を37℃で混入するとポリメラーゼによる複製反応が起こり、立体構造を持ったグアニン四重鎖が多数生成される反応を応用している。検体中に標的分子が存在していると蛍光試薬はグアニン四重鎖と反応し約20-30分で発色反応が起こる

1) 日本大学医学部  
2) 日本大学文理学部  
3) 日本大学歯学部  
4) 日本大学松戸歯学部  
羽尾裕之: hao.hiroyuki@nihon-u.ac.jp



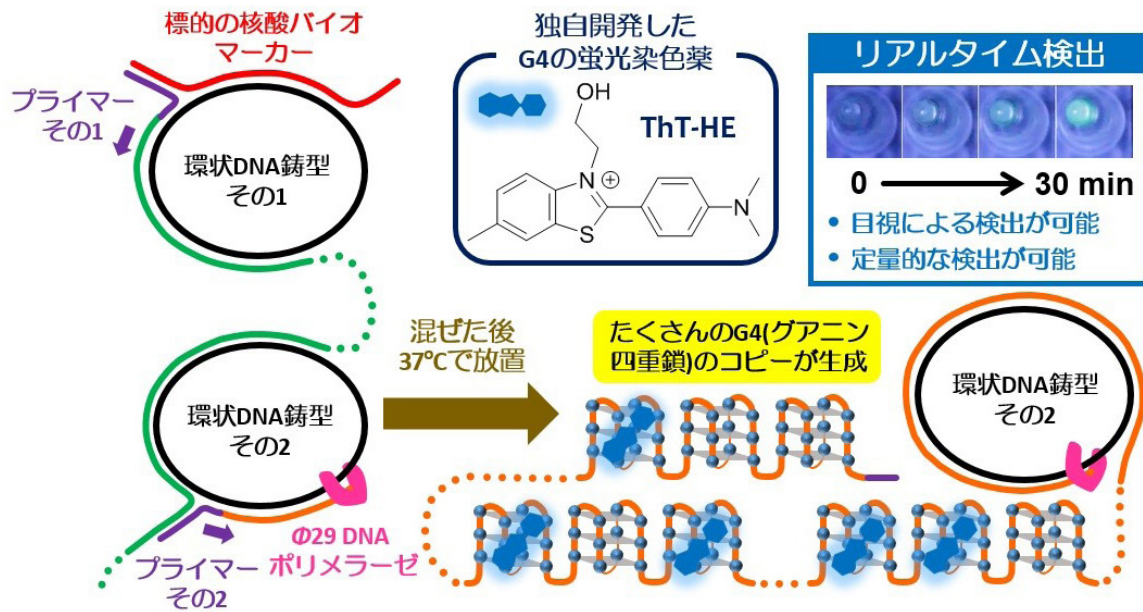


図 1

(図1)<sup>1)</sup>。この技術を用いることで、ゲノムDNA、mRNAなどの様々なバイオマーカーの検出が可能である。mRNAの検出感度の検討では1-5000 pMの濃度範囲で定量測定が可能である。さらに、miRNAなどの短いRNA鎖やその変異、タンパク質やメタボライトなどの検出が可能である<sup>2)</sup>。

SATIC法は5件の特許があり、うち3件はJSTの外国出願支援制度の審査を経て、出願支援が採択されPCT出願を行った。さらにそのうち1件は、指定国移行についてもJSTの支援審査を通過し米国に出願中である。PCT出願をした2件については順次支援申請を行う予定である。このことから本技術は独創的、先進的技術であることが分かる。SATIC法の病理診断への応用はこれまで試みられたことがなく、本研究で得られる成果が大いに期待される。今回我々は病理組織検体を用いて短時間・低コスト・簡便に遺伝子変異やマーカー分子の発現を検出する技術を開発し、病理診断においてより正確な診断や治療に直結するゲノム情報の提供を可能とする新技術の開発の検証を行っている。

## 2. 研究進捗状況

昨年はSATIC法の検出感度の向上のための改良を行った。知的財産権や論文公表前の新規技術であるため現時点での詳細な公表は避ける。口腔内悪性

腫瘍において約半数で認められるp53遺伝子変異について、SATIC法での遺伝子変異の検出が可能かどうか、ヒト口腔扁平上皮癌細胞株SAS、Ca9-22、HSC4を用いて変異の検出感度について検討している。今後は日本大学歯学部および松戸歯学部において、病理組織検体を用いてSATIC法による変異検出の検討を行う。また、脳腫瘍において生じる遺伝子変異の検出の可能性について検討するため、ヒト由来脳腫瘍細胞株T98G (p53変異型)、A172 (p53野生型)を用いて、遺伝子シーケンスによる変異を確認している。脳腫瘍細胞株においてもSATIC法で遺伝子変異の検出が可能かを検討する。今後は手術で得られた脳腫瘍組織検体からSATIC法での変異検出の可能性を検討する。さらに、骨軟部腫瘍の遺伝子変異の検出として、骨巨細胞腫で高率に認められる遺伝子変異H3F3AのSATIC法による変異検出の可能性を検討する目的で、手術症例の選別とこれらの腫瘍の変異の有無について検討している。本腫瘍についてもSATIC法での病理組織切片上での変異の検出の可能性について検討を行う。

本年は口腔細胞診におけるSATIC法での特定遺伝子配列の検出を目的として、はじめに口腔細胞診検体上でのGAPDH mRNAの検出を予定している。本検出に用いる環状DNAと特異的primerの設計及び合成が終了しており、現在は試薬類の至適濃度の

検討を行っておりターゲット濃度 100fM までの検出を確認している。

### 3. 考 察

短時間・低コスト・簡便な SATIC 法の特徴を最大限に利用し、術中迅速病理組織診断に応用した検討はこれまで世界的にも全く行われていない。本技術の病理組織検体を用いた遺伝子変異の検出や標的分子の同定が可能となれば、遺伝子検査における新たなブレイクスルーとなりえる。さらに、本検出方法の装置化によって、低コストでゲノム・遺伝子変異・蛋白質やメタボライトなどの非核酸標的の検出が可能となる。本研究は医療診断分野において広く使われている、抗体を用いた免疫組織化学やポリメラーゼ連鎖反応法 (PCR) などの技術に匹敵する革新的診断技術開発の基礎となると考える。本学のスケールメリットを活かし、医学部、歯学部、松戸歯学部の医歯系の部科校および文理学部における先進的な分析化学の技術の応用によって、全く新しい診断技術の開発を行っている。

SATIC 法には、検出を試薬の反応によって生じた凝集物確認する方法と反応によって生じた蛍光物質を確認する方法とがある。tube 内で行う場合には、いずれの方法も可能である。しかし、凝集物を確認する方法は検出ターゲットが空間を自由に移動可能な検出環境しか適用できず、細胞診や組織診等のスライドガラス上での検出には不向きである。従って、スライドガラス上での検出を念頭に置いてある迅速病理診断への応用は、現段階では反応によって生じた蛍光物質を確認する方法が最適であると考えられる。

また、SATIC 法の検出感度については、前述の如く 1pM へとされている。しかし、スライドガラス上における検出の如くターゲット分子が自由に移動できない環境では、想定通りターゲット分子を検出できない可能性があった。そこで、検出感度を上げる目的で GAPDH mRNA 検出の為の特異的環状 DNA 及び primer の至適濃度の検討を行い現時点で前述の 1pM を上回る 100fM の検出が可能なることを確認しており、スライドガラス上でのターゲット分子検出の期待が高まった状態となっている。

今後は、実際にスライドガラス上での検出を目指し、同試薬を用いた SATIC 法にて tube 内での GAPDH オリゴ DNA (40 塩基) の検出、細胞診検体から抽出された totalRNA における GAPDH mRNA の tube 内での検出、そして細胞診検体においてスライドガラス上での GAPDH mRNA の検出を予定している。

### 謝 辞

本研究は日本大学学術研究助成 [総合研究] を受けて行われたものであり、謝意を表します。

### 文 献

- 1) Fujita H et al. Novel one-tube-one-step real-time methodology for rapid transcriptomic biomarker detection: signal amplification by ternary initiation complexes. *Anal Chem.* 88,7137-7144, doi:10.1021/acs.analchem.6b01192 (2016).
- 2) Fujita H et al. Specific light-up system for protein and metabolite targets triggered by initiation complex formation. *Sci Rep.* 7:15191, doi: 10.1038/s41598-017-15697-8 (2017).

# 免疫性腎炎に対するDFAT細胞療法の治療効果と安全性の検討

阿部雅紀<sup>1)</sup>, 丸山高史<sup>1)</sup>, 福田 昇<sup>2)</sup>, 福家吉伸<sup>1)</sup>,  
逸見聖一郎<sup>1)</sup>, 松本太郎<sup>2)</sup>, 加野浩一郎<sup>3)</sup>

## Evaluation of efficacy and safety of the dedifferentiated fat cells therapies for the immune-induced nephritis

Masanori ABE<sup>1)</sup>, Takashi MARUYAMA<sup>1)</sup>, Noboru FUKUDA<sup>2)</sup>, Yoshinobu FUKU<sup>1)</sup>,  
Seiichiro HEMMI<sup>1)</sup>, Taro MATSUMOTO<sup>2)</sup>, Koichiro KANO<sup>3)</sup>

### 要旨

本学で開発された脱分化脂肪細胞 (dedifferentiated fat cell; DFAT) は障害組織を修復するとされる間葉系幹細胞に類似した性質を持つ。一方、腎臓疾患は慢性化すると根治的治療が困難な場合が多く、経時的に悪化して腎予後や生命予後が不良となる。今回、このDFATの移植により慢性腎障害を来す疾患の中でも特に生命予後不良であるANCA関連腎炎に対する新しい治療法として期待できる結果が得られたので紹介する。

### 1. はじめに

本学生物資源科学部の加野らは皮下成熟脂肪細胞を脱分化させDFAT (dedifferentiated fat cell) を得る技術を開発、特許化した (特願平10-378013)。これまでDFATを再生医療の移植細胞源として骨、軟骨、筋、上皮および神経細胞などに分化転換させる技術の開発や間葉系幹細胞と同等の性質を有している事も解明してきた。間葉系幹細胞は多分化能を示し、再生医療分野において細胞移植源として期待されている。

DFATは、局所麻酔下に1gの脂肪組織を採取できれば調製可能であるため、侵襲や組織破壊が非常に少なく、心不全患者や高齢患者からも採取・調製が可能である。進行性腎障害に罹患した場合、根治的治療はなく透析療法を余儀なくされる事も少なくない。透析療法は週3回、1回あたり4時間拘束され患者自身のQOLが低下する。また、わが国の国民医療費に占める割合も年間1兆円以上と高額である。さらに、わが国の慢性腎臓病の患者数は1330

万人と推計されており、国民8人に1人が慢性腎臓病患者である。そのため、慢性腎臓病に対する根治的治療としての再生医療が期待されている。

一方、免疫性腎炎である慢性腎炎の治療はステロイド療法が主体であるが、長期ステロイド内服による感染症、骨粗鬆症、糖尿病などの副作用が出現することも多く、最終的には末期腎不全に至る予後不良な疾患であり、代表的な透析導入の原疾患の一つでもある。われわれはDFAT細胞移植の進行性腎障害に対する作用を検討し、DFATは間葉系幹細胞と同様に免疫抑制作用を介して、免疫性腎炎である慢性腎炎モデルの病態を改善することを報告した<sup>1)</sup>。その機序の一つとして、TSG-6 (Tumor necrosis factor-stimulated gene-6) が関与していることが明らかとなった。しかし、DFAT移植による詳細な免疫抑制作用機序は不明であり検討する必要がある。

ヒトにDFAT細胞移植を行う場合、基本的には患者自身の細胞、血清を用いてDFATを作成、培養、増殖させて移植に役立てる計画であるため拒絶反応

1) 日本大学医学部内科学系腎臓高血圧内分泌内科学分野  
2) 日本大学医学部機能形態学系細胞再生・移植医学分野  
3) 日本大学生物資源科学部応用生物科学科  
阿部雅紀: abe.masanori@nihon-u.ac.jp



などの免疫毒性の副作用は考えにくいと思われる。しかし、多彩な細胞への分化能を有する幹細胞の一種であるDFATを移植した場合、何らかの部位に生着し、異所性組織形成を起こす可能性や形質転換による癌化の可能性も完全には否定できない。DFATは他の再生医療の移植細胞源と比較し、これらの可能性が低いと考えられる。しかし、自家移植の場合であってもこれらの安全性の検証も必要である。また、緊急度が高い疾患の場合、患者自身のDFATを作製する時間がなく、他人由来の凍結保存DFATを利用する、つまり他家移植を行う可能性も考えられる。

そのため、DFATを臨床応用するために移植による免疫毒性、異所性組織形成・癌化などの安全性についても検討する必要がある。

## 2. 対象及び方法

- 1) SCG/ThpNkc マウスは他のマウスと異なり、生命力の弱いマウスである。そのため、同マウスを輸入後は体力低下でそのまま死亡することもまれでなく、実験で使用する場合は輸入後、良好な環境におきその後繁殖した次世代マウスを使用することが必要になった。また繁殖後も本マウスは約8週齢より糸球体腎炎および血管炎を発症するため、雌親の授乳が困難であるため、ddy マウスを同時期に同数交配し里親として使用した。5週齢のSCG/ThpNkc マウスを一週間の順化期間後、繁殖し、実験用マウスを作出する。繁殖では1回の繁殖で約5頭の出産が予想されることから、実験に使用する41頭を得るためにはメス9頭の交配が必要となった。
- 2) 7週齢のSCG/ThpNkc マウスにddy マウス由来DFATをそれぞれ $1 \times 10^6$ 個/頭、 $1 \times 10^5$ 個/頭、 $1 \times 10^4$ 個/頭の割合で各4頭ずつ静脈より細胞移植を行った。さらに移植後の体内分布を検討するため、PKH26GLでラベルしたDFATを $10^5$ 個/頭の割合で移植した。
- 3) 細胞移植後1カ月飼育した。その間1週間おきに体重測定、畜尿を施行した。1日尿蛋白量と定性試験にて潜血反応の経過を観察した。
- 4) 移植1カ月後、ddy マウス由来DFATを移植した群では生化学的検査として血液中のBUN, Cre, ANCA, ANA, WBC, CRP, IL-1, 6, 8, TNF- $\alpha$ , TSG-6濃度をELISA法で測定した。腎臓と肺に

ついてReal-time PCR解析、Western blot法を用いて免疫制御分子としてTSG-6・IDOを、Th1-type cytokineとしてIFN- $\gamma$ ・TNF- $\alpha$ を、M1マクロファージ関連サイトカインとしてMCP-1・IL-6・IL-12をM2マクロファージ関連サイトカインとしてCCL17・IL-4・IL-10・mannose receptorの発現の変化を観察した。これによりDFAT細胞移植が免疫系のどの部位に作用するかを検討した。また移植片対宿主病(graft-versus-host disease; GVHD)の症状としての皮膚病変、消化器病変、肝臓病変の有無についても検討した。

## 3. 結果

移植後のDFATの体内分布について、PKH26GLでラベルしたDFATは投与後1時間においてDFATの肺でのトラップが確認され、その他の臓器への分布は認めなかった。その後1週間、2週間と徐々に肺にトラップされDFAT数は減少していったが、この間その他の臓器への移行は認めなかった(図1)。移植細胞数については $1 \times 10^5$ 個/頭投与した群が最も生存率、治療成績が良く今回の結果ではこの方法が最適と考えられた。以下の結果はDFATを $1 \times 10^5$ 個/頭投与した結果について述べる。

生存率についてはDFAT投与群が移植2か月後89%であったが、腎炎群(非移植群)が67%と低下しており、生存率の改善を認めた(図2)。尿蛋白排泄量はDFAT移植群で有意な低下を認めた。腎臓組織の評価として、組織GIS(Glomerulus injury score; 糸球体障害指数)は腎炎群と比較し、DFAT投与群で改善を認めた(図3)。一方、尿細管障害指数であるTIS(Tubulointerstitial injury score)では2群間において有意な差は認めなかった。

腎臓でのTSG-6のmRNA発現は腎炎群と比較し、DFAT投与群において有意な発現の亢進( $P=0.041$ )を認めた(図4)。TSG-6の発現を免疫組織学的に観察した。染色性は腎炎群とDFAT投与群で糸球体において同等であった。一方、腎間質でのTSG-6の染色性は、腎炎群と比較し、DFAT投与群において、近位尿細管と遠位尿細管の両者において亢進を認めた。またCD44の発現は、DFAT投与群で低下傾向であった。免疫調整物質であるIL-10の発現はDFAT投与群で増加傾向であり、PGE2の発現は、腎炎群と比較し、DFAT投与群で増加傾向であった。



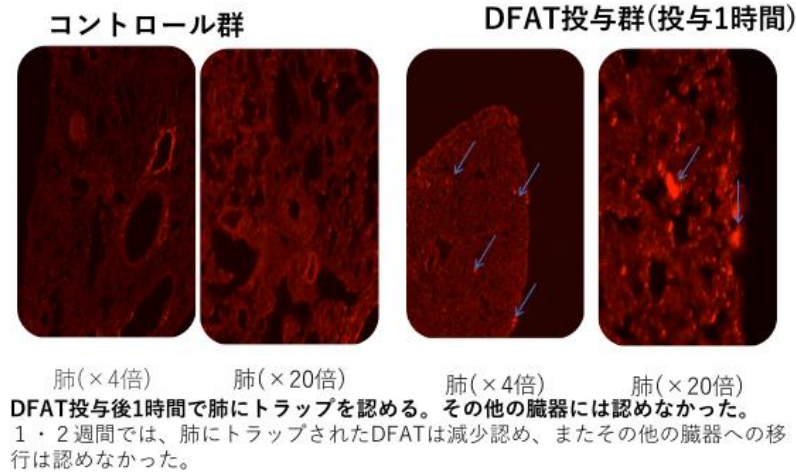


図1 DFATの肺への分布

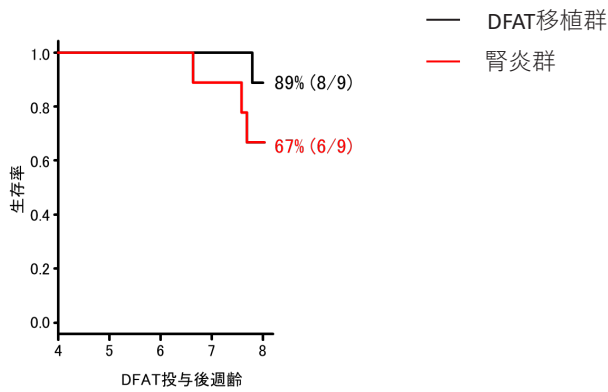


図2 2群間の生存率

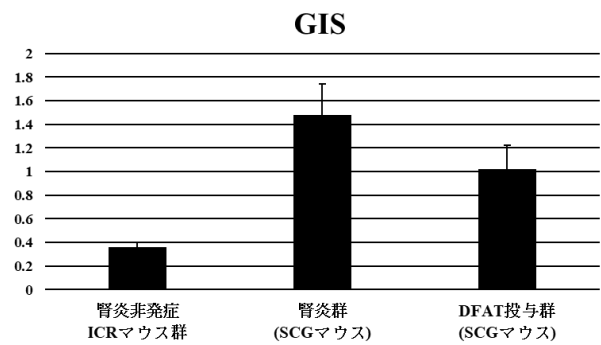


図3 GISの比較

IL-1 $\beta$ の発現は両群で差を認めず、TNF- $\alpha$ の発現は腎炎群と比較しDFAT投与群で低下傾向であった。またM1マクロファージのケモカインであるMCP-1の蛋白発現は、腎炎群と比較し、DFAT投与群において有意な発現低下 (P=0.04) を認めた(図5)。M2マクロファージに発現するケモサイトカインであるCCL-17の蛋白発現は、腎炎群と比較してDFAT投与群で有意な発現亢進 (P=0.04) を認めた(図6)。real-time PCR法でICAM、VCAMにおいては両群に優位な発現の差を認めず、脾臓細胞におけるActivated Tregの発現は両群に有意差を認めなかった。

以上より、DFATが免疫性腎炎を改善する機序として、抗炎症作用をもつTSG-6の発現亢進と、M1マクロファージからM2マクロファージへの形質変換の誘導が病態の改善に関与していると考えられた。

またDFATについての催奇形性であるが、肺には

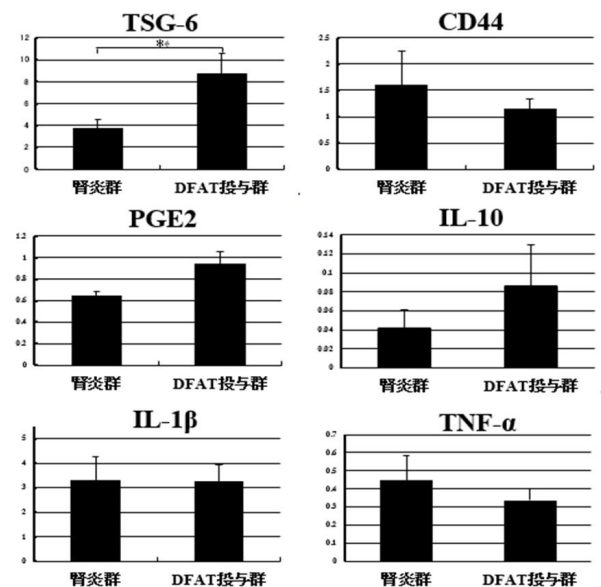


図4 DFAT投与後の腎におけるreal-time PCR

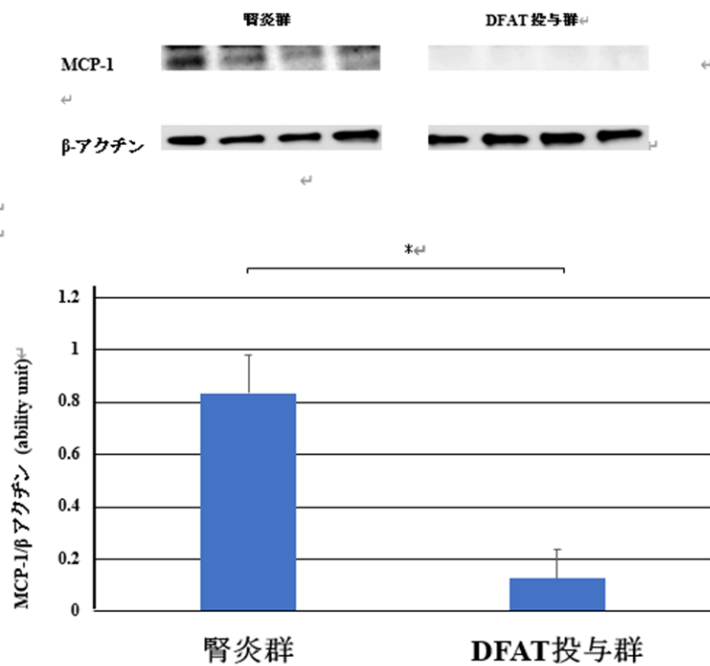


図5 MCP-1の発現

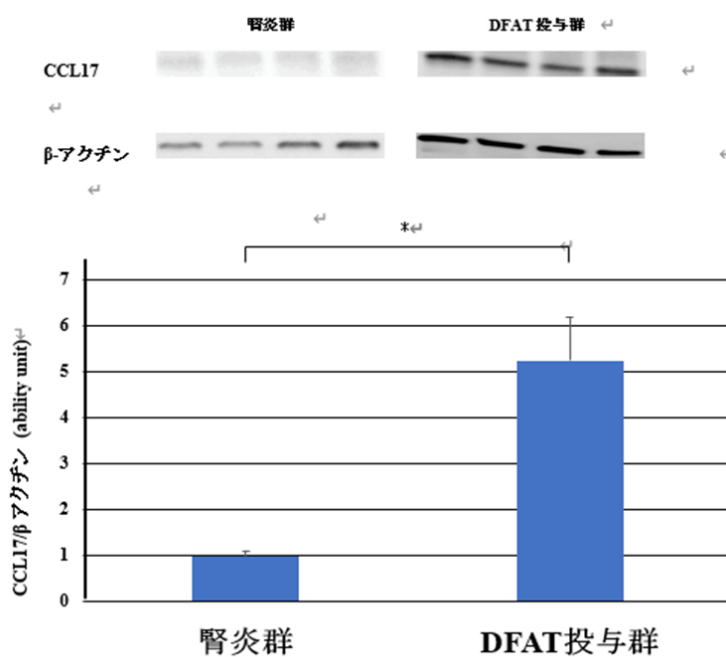


図6 CCL17の発現

DFATがトラップされた後も肺への腫瘍形成などは認められず、現時点でのDFATによる催奇形性は認められなかった。また、GVHDが移植後に観察されることはなかった。これらより、DFATの細胞移植が難治性の自己免疫性腎炎に治療効果、副作用の両

面から考えても臨床応用が可能であることが示唆された。

#### 4. 考 察

厚生労働省進行性腎障害調査研究班と日本腎臓学会の指針では、「腎炎を示す尿所見を伴い、数週から数ヶ月の経過で急速に腎不全が進行する症候群」と定義される急速進行性糸球体腎炎 (Rapidly progressive glomerulonephritis; RPGN) は、近年患者数が増加しており、またわが国の新規透析導入原疾患の第5位を占めている<sup>2)</sup>。ANCA関連腎炎はRPGNをきたす原疾患のなかで、最も頻度が高い疾患である<sup>3)</sup>。また、ANCA関連腎炎はステロイド治療により一時的に軽快しても再発を繰り返し、生命予後不良な疾患である。本研究は、ANCA関連腎炎に対して、新たな免疫抑制療法としてのDFAT移植療法の効果をANCA関連腎炎モデルマウスであるSCGマウスを用いて検討を行った。Lee等はMSCを経静脈的に全身投与すると、その大多数が肺にトラップされ、24時間でトラップされた細胞が約半数となり、またその他の臓器への移行はごく僅かであることを報告している<sup>4)</sup>。本研究においても、DFAT投与後1時間で肺へのトラップを認めたが、その他の臓器へのトラップはほとんど認めなかった。その後、肺におけるDFATの数は徐々に減少していったが、その他の臓器への移行は認めなかった。

続いて、SCGマウスがANCA関連腎炎を発症していることを確認した。機能的には尿蛋白量の増加を12週齢では認めなかったものの、形態学的に糸球体の半月体形成像を認めANCA関連腎炎の腎組織障害の所見であった。さらに血中MPO-ANCA濃度が腎炎を発症しないICRマウスよりも高く、SCGマウスの腎炎がANCA関連腎炎であることを確認した。

このSCGマウスのANCA関連腎炎に対してDFAT移植の効果を検討した。DFAT投与群では腎炎群と比較し、GIS評価で抑制傾向を認め、TIS評価ではDFAT投与による変化を認めなかった。これらの結果はDFAT投与が、ANCA関連腎炎における糸球体での半月体形成を含む糸球体障害の抑制効果を有する可能性を示唆する一方、DFAT投与による腎臓の尿管間質傷害に対する効果は弱いと考えられた。

DFAT移植後の腎機能の検討では、尿蛋白定量や血清Cr値、血清MPO-ANCA値でDFAT投与群と腎炎群の間に差を認めなかった。しかしNeumannらは、SCGマウスでは16週齢までは週齢が高くなるのに応じて病理像での半月体形成が増加することを

報告している<sup>5)</sup>。今後の研究でSCGマウスの週齢が高くなることで腎炎が進行していけば、DFAT移植による効果が出現する可能性が考えられる。本研究の観察期間が短期間であったため、今後は期間をより延長して腎炎発症に伴う変化を検討する必要がある。ProckopはMSCが免疫調整能を発揮する機序として、2種類の機序について報告している<sup>6)</sup>。一つは、TSG-6を分泌することにより、T細胞上に存在する接着因子のCD44を抑制し、T細胞活性化や細胞浸潤を抑制することで免疫調整作用を発揮すると報告がある<sup>7)</sup>。もう一つの機序としては、PGE2の分泌をすることにより、M1マクロファージからM2マクロファージへの形質転化を誘導することで炎症反応調整が制御されているとの報告である<sup>8)</sup>。本研究において、腎炎群と比較し、DFAT投与群では、抗炎症性作用を有するTSG-6の腎臓でのmRNAの有意な発現亢進を認め、蛋白発現量も増加を認めた。またCD44のmRNA発現においては腎炎群と比較し、DFAT投与群では低下を認めた事より、DFATがT細胞活性化や細胞浸潤を抑制することで免疫調整作用を発揮する可能性が示唆された。今後CD4<sup>+</sup>T細胞とCD8<sup>+</sup>T細胞の分布の比較を免疫染色やフローサイトメトリーで検証していく必要がある。また間葉系幹細胞がPGE2やIL-6依存性に、免疫抑制物質であるIL-10を産生する免疫調整性マクロファージを腎炎部位で誘導することにより、抗糸球体基底膜抗体型腎炎において腎保護作用を発揮することが報告されている<sup>9)</sup>。今回の研究においても腎臓でのmRNA発現において、抗炎症性メディエーターであるPGE2の腎での発現は、腎炎群と比較しDFAT投与群で増加傾向を認めた。同じく抗炎症性サイトカインであるIL-10のmRNA発現において、腎炎群と比較し、DFAT投与群で増加傾向を認めた。また腎炎群と比較し、DFAT投与群においてM1マクロファージの発現するケモカインであるMCP-1の蛋白発現低下を認め、M1マクロファージの産生する炎症性サイトカインであるTNF- $\alpha$ のmRNA発現は低下傾向を認めている。さらにM2マクロファージに発現するケモカインであるCCL17の蛋白発現が増加していることより、DFATが免疫調整能を発揮する機序の一つとして、M1マクロファージからM2マクロファージへの形質変換を誘導し、その結果IL-10等の抗炎症性サイトカインが産生されるなど

の機序を介して関与していることが示唆された。今後、DFAT投与により浸潤性マクロファージと免疫調整性マクロファージの分布にどのような差があるのかを検証していく必要がある。

今後の課題としては、安全性の確認のためには、さらに長期間の観察の必要性がある。SCGマウスは平均生存日数が120日であるため、今回の観察は12週齢までとした。しかし生存率や、DFAT投与後の副作用や催腫瘍性の確認のためにはより長期間の観察が必要である。

臨床でのGVHD等に対する間葉系幹細胞に対する免疫抑制療法や癌に対する活性化自己リンパ球療法が免疫抑制細胞療法として実地医療として行われているが、細胞療法の安全性確保のため、厚生労働省は臨床治験や再生医療等製品として患者に投与される細胞製品については、平成25年に医薬品医療機器等法を制定し、さらに平成30年に改正をした。その中で細胞移植も、薬剤と同様に投与量の設定が必要となった。本実験では、DFAT  $1 \times 10^5$  個/頭の経静脈投与では明らかな有害事象を認めなかったが、今後はさらなる投与量の調整を行っていく必要がある。また間葉系幹細胞の免疫調整能を發揮するメカニズムとして、液性成分による免疫担当細胞への影響のほかに、T細胞のアポトーシスが誘導され、その結果免疫応答を制御する制御性T細胞が増加することで免疫寛容を獲得することも報告されている<sup>9)</sup>。DFATは調整が容易で安全性も高く、自己移植と比較して同種移植での安全性・効果の非劣勢も証明されている。DFAT移植の免疫性腎炎への実用化に向けて、その免疫調整能の機序についてさらなる検証が必要である。

## 5. 結語

本研究により、ANCA腎炎モデルSCGマウスへの経静脈的DFAT移植では、腎組織像において半月体形成を含む糸球体障害を抑制する効果を認め、その機序として、腎臓でのTSG-6発現亢進による抗炎症作用と、単核球系でのM1マクロファージからM2

マクロファージへの形質変換を介した全身性の免疫調整能が関与している可能性が考えられた。このことは本疾患に対してDFATを用いた免疫抑制細胞療法確立の可能性を示唆するものとする。

## 謝辞

本研究は、「令和2年度日本大学学術研究・総合研究」の助成により実施しました。本研究にあたり、研究の機会を与えて頂いた本学に感謝致します。研究全般においてご指導いただきました医学部 福田 昇 研究所教授、松本太郎教授、生物資源学科 加野浩一郎教授に心から感謝致します。そして、多くのご援助をいただきました日本大学医学部内科学系腎臓高血圧内科学分野 医局員、ご協力いただきました皆様に深く感謝致します。

## 文 献

- 1) Maruyama T, Fukuda N, Matsumoto T, et al. Systematic implantation of dedifferentiated fat cells ameliorated monoclonal antibody 1-22-3-induced glomerulonephritis by immunosuppression with increases in TNF-stimulated gene 6. 2015; 6: 80.
- 2) 新田孝作, 政金生人, 花房規男, 他. 我が国の慢性透析療法の現況2017. 透析会誌. 2018; 51: 699-766.
- 3) 丸山彰一監修. エビデンスに基づく急速進行性腎炎症候群 (RPGN) 診療ガイドライン2017. 東京医学社. 2017.
- 4) Lee RH, Pulin AA, Seo MJ, et al. Intravenous hMSCs improve myocardial infarction in mice because cells embolized in lung are activated to secrete the anti-inflammatory protein TSG-6. Cell Stem Cell. 2009; 5: 54-63.
- 5) Neumann I, Birck R, Newman M, et al. SCG/Kinjoh mice: a model of ANCA-associated crescentic glomerulonephritis with immune deposits. Kidney Int. 2003; 64: 140-148.
- 6) Prockop DJ. Concise review: Two negative feedback loops place mesenchymal stem/stromal cells at the center of early regulators of inflammation. Stem Cells. 2013; 31: 2042-2046.
- 7) Kato T, Okumi M, Tanemura M, et al. Adipose tissue-derived stem cells suppress acute cellular rejection by TSG-6 and CD44 interaction in rat kidney transplantation. Transplantation. 2014; 98: 277-284.
- 8) Furuhashi K, Tsuboi N, Shimizu A, et al. Serum-Starved Adipose-Derived Stromal Cell Ameliorate Crescentic GN by Promoting Immunoregulatory Macrophages. J Am Soc Nephrol. 2013; 24: 587-603.
- 9) 秋山謙太郎, 古味桂子, 窪木拓男. 間葉系幹細胞の新しい機能—免疫調節細胞としての間葉系幹細胞—. 日補綴会誌. 2016; 8: 346-353.



# GOD-POD-UnaG法を用いた 血中アンバウンドビリルビン自動測定機器の開発

森岡一朗<sup>1)</sup>, 長野伸彦<sup>1)</sup>, 桃木恵美子<sup>1)</sup>, 岡橋 彩<sup>1)</sup>

## Development of the automated serum unbound bilirubin measurement instrument using GOD-POD-UnaG method

Ichiro MORIOKA<sup>1)</sup>, Nobuhiko NAGANO<sup>1)</sup>, Emiko MOMOKI<sup>1)</sup>, Aya OKAHASHI<sup>1)</sup>

### 要旨

我々は新しくグルコースオキシダーゼ-ペルオキシダーゼ (GOD-POD) 法と非抱合型ビリルビンと特異的に結合して蛍光を発するタンパク質 (UnaG) を組み合わせることにより、微量血中のアンバウンドビリルビン (UB) を測定することができる画期的な方法を確立した (GOD-POD-UnaG法)。2019年度に、Digital Microfluidics技術とGOD-POD-UnaG法を組み合わせることで自動測定プロトタイプ機器が作成できた。2020年度は、実際の新生児血を用いて、本自動測定系の精度検証を行った。①新生児血中UB値と蛍光強度の相関は、決定係数 ( $R^2$ ) が0.9871と強い正の相関関係を確認した。②自動測定機器で測定した血中UBの高値 (2.19  $\mu\text{g}/\text{dL}$ ) と低値 (0.23  $\mu\text{g}/\text{dL}$ ) の変動係数は、各々15.4%と10.5%であった。③新生児血における既存のUB値測定機器であるUBアナライザーのUB値と比較では、 $y = 0.99x + 0.01$ ,  $R^2 = 0.9514$ で強い相関を確認した ( $n = 9$ )。

### 1. はじめに

新生児のビリルビンによる脳障害 (ビリルビン脳症) は脳性麻痺や心身障害の主要因の一つで、少子化時代の我が国において克服すべき疾患である。我々は、血中のアルブミンと結合していない非抱合型ビリルビン (アンバウンドビリルビン, UB) を測定すれば、この脳障害の発症を高率に予測できることを明らかにしてきた<sup>1)</sup>。現在のUB測定機器は、1980年代に開発された吸光度測定を用いたグルコースオキシダーゼ-ペルオキシダーゼ (GOD-POD) 法 (UBアナライザー, アローズ社, 大阪) である。しかし、このGOD-POD法を用いた血中UB測定は、抱合型 (直接) ビリルビンやヘモグロビン (溶血) の血液では誤値が生じるという臨床上大きな問題があり普及には至っていない<sup>2), 3)</sup>。我々は新しくGOD-POD法と非抱合型ビリルビンと特異的に結合して蛍光を発するタンパク質 (UnaG) を組み

合わせることにより、抱合型ビリルビンやヘモグロビンの影響を受けずに微量血中のUBを測定することができる画期的な方法を確立した (GOD-POD-UnaG法: 特許第6716108号, 2020年6月12日)<sup>2), 3)</sup>。本研究では、このGOD-POD-UnaG法を用いた自動測定機器を開発し、実用化を行う。

本装置がPoint-of-careの体外臨床検査診断として実用化されれば、現在では見逃してしまうビリルビン脳症発症のハイリスク新生児が検出できるようになる。そして、世界中でビリルビン脳症という脳性麻痺や心身障害の発症抑制に大きく貢献できる。脳性麻痺や心身障害児は生涯に渡って療育や福祉支援が必要であり巨大な医療費や福祉費用がかかっている。その費用を減少させることができ、医療経済上、大きな効果となる。

2019年度は、アトムメディカル社および米国のノースカロライナ州にあるBaebies社を連携組織と

1) 日本大学医学部小児科学系小児科学分野  
森岡一朗: morioka.ichiro@nihon-u.ac.jp

して進め、その結果、Baebies社の保有するDigital Microfluidics技術とGOD-POD-UnaG法を組み合わせた機器の実現性ができた<sup>4)</sup>。2020年度は、実際の新生児血を用いて、精度の検証を行った。

## 2. 方法

我々は、2019年度に、Digital Microfluidics技術とGOD-POD-UnaG法を組み合わせることで自動測定プロトタイプ機器が作成できた<sup>4)</sup>。この自動測定機器は、UB以外に、アルブミンおよび総ビリルビン(TSB)と合わせて、すべてを50 $\mu$ Lの全血で測定できる。すべての測定は、使い捨てのDMFカートリッジで自動的に実行される(図1)。

予備的な測定系の検証として、①血中UB値と蛍光強度の相関、②血中UBの高値(2.19  $\mu$ g/dL)と低値(0.23  $\mu$ g/dL)で、同一検体を用いた繰り返し測定(6回以上)を行い、変動係数(CV)を求めた。血中UB値の定量性の確認のため、③既存のUB値測定機器であるUBアナライザーのUB値と比較検討した。



図1 UB測定のための自動測定プロトタイプ機器

## 3. 結果

### ① 新生児血中UB値と蛍光強度の相関

新生児血中のUB値はUBアナライザーで確認後、異なるUB値と蛍光強度の相関関係を調べた。結果、図2に示すように、決定係数( $R^2$ )が0.9871と強い正の相関関係を確認した。

### ② 血中UBの高値(2.19 $\mu$ g/dL)と低値(0.23 $\mu$ g/dL)のCV

自動測定機器で測定した血中UBの高値(2.19  $\mu$ g/dL)と低値(0.23  $\mu$ g/dL)のCVは、各々15.4%と10.5%であった。

### ③ 既存のUB値測定機器であるUBアナライザーのUB値と比較

図3に示すように、新生児血における既存のUB値測定機器であるUBアナライザーのUB値と比較では、 $y=0.99x+0.01$ 、 $R^2=0.9514$ で強い相関を確認した( $n=9$ )。

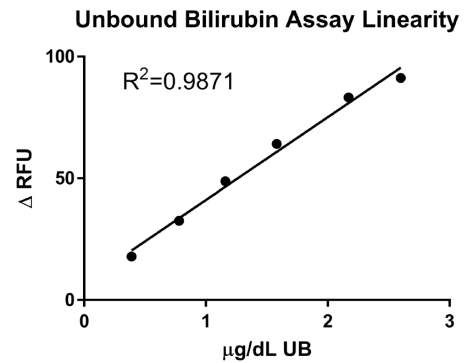


図2 新生児血中UB値と蛍光強度の相関

### Unbound Bilirubin Method Comparison

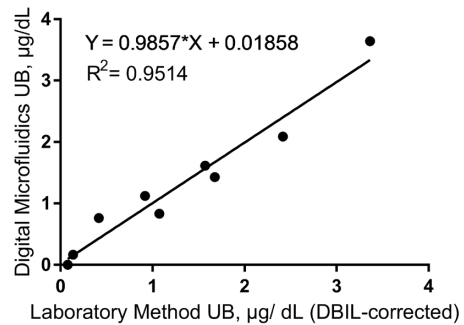


図3 既存のUB値測定機器であるUBアナライザーのUB値との比較

Digital Microfluidics UB: 自動測定機器, Laboratory Method UB: UBアナライザー(アローズ社, 大阪), DBIL: 直接ビリルビン

#### 4. 今後の計画

国際共同産学連携社会実装開発研究のため、2020年度は新型コロナウイルスの流行に大きな影響を受けた。社会実装のため、以下の課題が残されている。

- 1) 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規定を順守し（2020年6月19日付承認、RK-200414-2）、日本大学医学部附属板橋病院総合周産期母子医療センターに入院した黄疸発症新生児の通常診療で採取された血清の残余を100検体確保している（抱合型（直接）ビリルビンやヘモグロビン（溶血）含有検体は除く）。その際、通常の保険診療で測定された血中UB濃度（既存のUBアナライザー、GOD-POD法（アローズ社、大阪）で測定したデータも収集し、比較検討する。その一致率および相関関係を示す解析結果が、体外診断用医薬品の承認基準となることを確認している（厚生労働省医薬食品局長、平成27年1月20日通知 薬食発0120第1号）。相関関係は、相関係数と相関式を求め、評価は相関係数が0.9以上、相関式は $y = 1.0x + 0$ に近い結果となることで行う。
- 2) その他の解析として、
  - A) 新血中UB自動測定機器で測定した血中UB濃度の精度を検証する。CVは5%未満となることを目指す。
  - B) 日内変動分析および日間変動分析：同一検体を用いた繰り返し測定（6回以上）を行い、CVを求める。測定者によるばらつきを検討：医師、研修医、看護師、検査技師が繰り返し測定（6回以上）を行い、CVを求める。
  - C) 既存のUBアナライザーの欠点である抱合型（直接）ビリルビンやヘモグロビン（溶血）含有の血清検体を新血中UB自動測定機器で測定し、測定値に影響がないことを確認させる。評価は、そのほかのパラメータである総ビリルビン/アルブミン比と比較することで確認できる。
- 3) 以上の成果に基づいて、アトムメディカル社とともに薬事承認申請を行う。体外診断医薬品・医療機器として承認されれば、保険診療点数の確保のための申請を行う。

#### 5. 結 語

Digital Microfluidics技術とGOD-POD-UnaG法を組み合わせた新血中UB自動測定機器で、実際の新生児血を用いて精度の検証を行い、高精度であることを確認した。今後、日本での多数例の検証を行い、体外診断医薬品・医療機器としての社会実装を目指す。

#### 文 献

- 1) Morioka I, Nakamura H, Koda T, et al. Serum unbound bilirubin as a predictor for clinical kernicterus in extremely low birth weight infants at a late age in the neonatal intensive care unit. *Brain Dev* 2015; 37: 753-757.
- 2) Iwatani S, Nakamura H, Kurokawa D, et al. Fluorescent protein-based detection of unconjugated bilirubin in newborn serum. *Sci Rep.* 2016; 6: 28489.
- 3) Iwatani S, Yamana K, Nakamura H, et al. A novel method for measuring serum unbound bilirubin levels using glucose oxidase-peroxidase and bilirubin-inducible fluorescent protein, UnaG: No influence of direct bilirubin. *Int J Mol Sci* 2020; 21: 6778.
- 4) 森岡一朗, 長野伸彦, 桃木恵美子ら. GOD-POD-UnaG法を用いた血中アンバウンドビリルビン自動測定機器の開発. *日本大学医学部総合医学研究所紀要* 2020; 8: 27-30.

# 重症アレルギー疾患患者に対する 抗IgE抗体治療のコンパニオン診断薬の開発

岡山吉道<sup>1)</sup>, 豊島翔太<sup>1)</sup>, 坂本朋美<sup>1)</sup>, 高橋恭子<sup>2)</sup>,  
葉山惟大<sup>1)</sup>, 木澤靖夫<sup>3)</sup>, 丸岡秀一郎<sup>1)</sup>, 権寧博<sup>1)</sup>

## Development of companion diagnostics for treatment of patients with severe allergic diseases with anti-IgE antibody

Yoshimichi OKAYAMA<sup>1)</sup>, Shota TOYOSHIMA<sup>1)</sup>, Tomomi SAKAMOTO<sup>1)</sup>, Kyoko TAKAHASHI<sup>2)</sup>,  
Koremasa HAYAMA<sup>1)</sup>, Yasuo KIZAWA<sup>3)</sup>, Shuichiro MARUOKA<sup>1)</sup>, Yasuhiro GON<sup>1)</sup>

### 要旨

重症喘息, 重症慢性特発性蕁麻疹および重症花粉症患者に対してomalizumabがわが国で使用されているが, 投与中の薬剤減量の目安となるbiomarkerは存在せず年余に渡り投与されている。既に私達は, omalizumabの投与中の薬剤減量の目安となるbiomarkerであるfree IgE値の測定系を実験室レベルで確立しており, 今回さらに感度が5倍高く安定した測定系(コンパニオン診断薬)を確立させた。今後omalizumabによる治療効果と治療後の血清free IgE値との関係を明らかにすることによって治療効果が有効となるfree IgE値が明らかとなり重症喘息, 重症慢性特発性蕁麻疹および重症花粉症患者へのomalizumab投与量を減らすことができ, 患者の負担額と副作用の頻度が減少できると思われる。

### 1. はじめに

我が国の全喘息患者(300万人)のなかで高容量吸入ステロイド薬と長時間作用性β刺激薬等の長期管理薬の併用でも効果不十分な難治性喘息は, 約34~35万人いる。この患者の治療費は全喘息患者の治療費の七割を占めているため難治性喘息患者の医療費の削減が喫緊の課題である。難治性喘息患者の治療薬として使用されているヒト化抗IgE抗体(omalizumab)は, 日本での売上額は50億円であり, 患者の1カ月の医療費は30万円にもおよび, 投与中の薬剤減量の目安となるbiomarkerは存在せず年余に渡り投与されている。従って副作用の頻度も上昇する。さらに, 我が国で慢性特発性蕁麻疹と診断された患者の中で重症患者は5~6万人と推定されており, omalizumabは重症患者に適応があり, その患者の約7000人に年余に渡り投与されており, その減薬方法は確立されていない。我が国にて2019

年秋にomalizumabは, 既存薬で効果が不十分な重症花粉症の適応となり, その患者数は国内に200~300万人いると推定されている。既に私達は, omalizumabの投与中の薬剤減量の目安となるbiomarkerであるfree IgE値の測定系を実験室レベルで確立しており<sup>1)</sup>, 今回さらに感度が高く安定した測定系(コンパニオン診断薬)を確立させた。

### 2. 対象及び方法

#### 2-1 倫理的配慮

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小臨床試験の新規申請をし, 承諾を得た(RK-150908-12)。

#### 2-2 対象

現在, 日本大学医学部附属板橋病院皮膚科外来に通院中でomalizumab治療中の重症慢性特発性蕁麻疹

1) 日本大学医学部

2) 日本大学生物資源科学部

3) 日本大学薬学部

岡山吉道: okayama.yoshimichi@nihon-u.ac.jp



疹患者28名および健常人4名を対象とした。末梢血2 mlをomalizumab投与前後の2回採血させていただいた。

## 2-3 free IgE 測定ELISAの最適化

### 2-3-1 プレートに固定化するリコンビナント可溶性FcεRIα鎖濃度の最適化

- (1) リコンビナント可溶性FcεRIα鎖をプレートに固定化するが、種々濃度のリコンビナント可溶性FcεRIα鎖(0.03~0.50 μg/well)を含むコーティングバッファーを調製した。リコンビナント可溶性FcεRIα鎖は、CHO細胞にFcεRIα鎖を強制発現させて、その細胞上清をconcentratorにより濃縮後、抗FcεRIα鎖抗体(clone CRA1)とaffinity columnを用いて精製した。ウエスタンブロットング法で精製を確認した<sup>2)</sup>。
- (2) 各濃度の等容量をプレートへ添加して、ELISAを実行した。
- (3) シグナルとバックグラウンドを確認した。

### 2-3-2 ブロッキングバッファーの最適化

- (1) 種々のブロッキング溶液(種々の濃度のFBS/PBS, BSA/PBSなど)を調製した。
- (2) それぞれ等容量をプレートへ添加して、ELISAを実行した。
- (3) シグナルとバックグラウンドを確認した。

### 2-3-3 サンプル濃度の最適化

- (1) サンプルのマトリックスに極力近い標準希釈液を調製した。
- (2) それぞれ等容量をプレートへ添加して、ELISAを実行した。
- (3) 標準曲線で適切なダイナミックレンジを確認し、サンプルの希釈直線を確認した。
- (4) スパイク回復または希釈直線試験を行った。マトリックス効果を示す干渉物質の除去を行った。

### 2-3-4 検出抗体濃度と酵素複合体の最適化

- (1) 種々の濃度の検出抗体(種々のcloneやpolyclonalのHRP標識抗IgE抗体)を含む標準希釈液を調製した。各基質に対する濃度範囲内の濃度に設定した。各種酵素複合体結合抗IgE

抗体としてclone 4F4, clone 1A2, clone 4C3, clone M94176, polyclonal抗体を用いた。

- (2) 各濃度の等容量をプレートへ添加して、ELISAを実行した。
- (3) シグナルとバックグラウンドを確認した。

### 2-3-5 シグナル検出と希釈標準液の最適化

- (1) サンプル中の抗原想定量や、使用機器による抗原検出能力に基づいて、基質を選択した。
- (2) 作業溶液をプレートへ添加して、ELISAを実行した。
- (3) 抗原が全ダイナミックレンジにわたり確実に検出可能か検討した。
- (4) 種々濃度の酵素複合体を含む標準希釈液を調製した。各基質に対する濃度範囲に対応した濃度に設定した。
- (5) 各濃度の等容量をプレートへ添加して、ELISAを実行した。
- (6) シグナルとバックグラウンドを確認した。

## 2-4 ELISAの分析法バリデーション

最適化したELISAの分析法バリデーションを評価した。分析法バリデーション試験は以下の省令やガイダンスに従った。

- ・厚生省令第21号「医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準に関する省令」(平成9年3月26日、一部改正 厚生労働省令第114号 平成20年6月13日) 準用
- ・「トキシコキネティクス(毒性試験における全身的曝露の評価)に関するガイダンスについて(平成8年7月2日薬審第443号)」準拠

以下の項目について評価した。

### 2-4-1 検量線の作製

### 2-4-2 定量下限の決定

### 2-4-3 日内・日差再現性

### 2-4-4 感度

3. 結果

3-1 ELISAの最適化

3-1-1 プレートに固定化するリコンビナント可溶性FcεRIα鎖濃度の最適化

リコンビナント可溶性FcεRIα鎖の至適濃度は0.50 μg/well (PBSで希釈)であった。至適インキュベーション温度と時間は、4℃にて16時間であった。

3-1-2 ブロッキングバッファーの最適化

ブロッキングバッファーの最適条件は、PBS/0.5% Casein, Wash Bufferは、PBS/0.05% Tween-20と決定した。至適インキュベーション温度と時間は、25℃にて16時間であった。

3-1-3 サンプル濃度の最適化

血清をSample Diluent (PBS/0.05% Tween-20, 0.5% Casein)で希釈し、オマリズマブ投与前は血清を40倍希釈。オマリズマブ投与後は血清を10倍希釈が至適条件であった。至適インキュベーション温度と時間は、4℃にて16時間であった。

3-1-4 検出抗体濃度と酵素複合体の最適化

検出抗体HRP標識マウス抗ヒトIgE抗体をPBS/0.5% Caseinで1/1000に希釈が至適条件と決定した。至適インキュベーション温度と時間は、25℃にて1時間であった。

3-1-5 シグナル検出と希釈標準液の最適化

TBS (Sera Care, Milford, MA, USA)を用いて至適インキュベーション温度と時間は、25℃にて30分であった。

3-2 ELISAの分析法バリデーションの評価

3-2-1 検量線の作製

検量線の作製にはヒトIgEを用いた、300 ng/mLから150 ng/mL, 75 ng/mL, 37.5 ng/mL, 18.75 ng/mL, 9.375 ng/mL, 4.688 ng/mL, 2.344 ng/mLと段階希釈して使用した。

3-2-2 定量下限の決定

定量下限は、検量線から2.344 ng/mLと決定した。

sample #	1回目free IgE測定値 (IU/ml)	2回目free IgE測定値 (IU/ml)
N96	102.89732	95.6919546
N99	207.93215	325.946815
N101	41.487436	47.3377897
N102	952.29925	1181.83206

図1 free IgE測定値の再現性

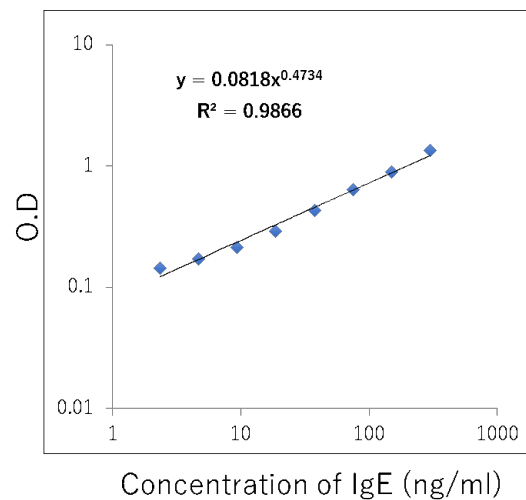


図2 free IgEの検量線

3-2-3 日内・日差再現性

左の表は、1週間の間隔をあけて2回同一のサンプルのfree IgE値 (IU/ml)を測定した結果である。Nはnormal healthy control (健常人)を指す。健常人4名において日差の再現性は確認できた (図1)。

3-2-4 感度

検量線スタンダードの最小値の1/2である1.17 ng/mLを感度とした (図2)。

4. 考察

ヒト化抗IgE抗体 (omalizumab) は、血清中のIgEを捕獲し、さらにマスト細胞や好塩基球の高親和性IgE受容体 (FcεRI) に結合したIgEをも解離させ捕獲することを機序とした抗体療法である<sup>3)</sup>。omalizumabに結合していないfreeのIgEがアレルギー

ギー疾患の病態に関与しているので<sup>1,3,4)</sup>、理論的には、このfreeのIgEを0にすればよい訳である。既に私達はこのfreeのIgEの測定系を実験室レベルで確立しており<sup>1)</sup>、今回、測定感度を5倍まで上げることに成功した。以上より高感度free IgE測定系(コンパニオン診断薬)は、確立できた。

今後ELISAの分析法バリデーションの評価のためにさらに確認アッセイ、抗体価算出、凍結融解安定性および選択性の検討を進める。そして、omalizumabによる治療効果と治療後の血清free IgE値との関係を明らかにする予定である。その結果、このコンパニオン診断薬によって重症喘息、重症慢性特発性蕁麻疹および重症花粉症患者へのomalizumab投与量を減らすことができ、患者の負担額と副作用の頻度が減少する。omalizumabの投与量を漸減あるいは、中止できれば我が国の医療費削減に結び付くと考えている。

## 5. 結語

高感度free IgE測定系(コンパニオン診断薬)は、確立できた。今後omalizumabによる治療効果と治療後の血清free IgE値との関係を明らかにすること

によって治療効果が有効となるfree IgE値が明らかとなり重症喘息、重症慢性特発性蕁麻疹および重症花粉症患者へのomalizumab投与量を減らすことができ、患者の負担額と副作用の頻度が減少できると思われる。

## 謝辞

本研究の成果は、令和2年度日本大学学術研究助成金[社会実装]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) Ito R, Gon Y, Okayama Y, et. al.: Development of assay for determining free IgE levels in serum from patients treated with omalizumab. *Allergol Int* 2014; 63 (Suppl 1):37-47.
- 2) Ra C, Kuromitsu S, Hirose T, et. al.: Soluble human high-affinity receptor for IgE abrogates the IgE-mediated allergic reaction. *Int Immunol* 1993; 5:47-54.
- 3) Okayama Y, Matsumoto H, Odajima H, et. al.: Roles of omalizumab in various allergic diseases. *Allergol Int* 2020; 69: 167-177.
- 4) Gon Y, Ito R, Maruoka S, et. al.: Long-term course of serum total and free IgE levels in severe asthma patients treated with omalizumab. *Allergol Int* 2018; 67: 283-285.

# 心不全患者における超音波エラストグラフィ法により 測定した脾硬度の臨床的意義に関する研究

齋藤佑記<sup>1)</sup>

## Study on Clinical Significance of Spleen Stiffness in Heart Failure

Yuki SAITO<sup>1)</sup>

### 要旨

Aims congestive splenomegaly is a classic sign of organ congestion in acute decompensated heart failure (ADHF). Shear wave elastography (SWE) allows the measurement of spleen stiffness (SS). We hypothesized that SS could quantify the severity of splenic congestion and predict adverse events in ADHF. Methods and Results This study included two cohorts: a haemodynamic cohort (62 HF patients) and an outcome cohort (115 ADHF patients). SS was measured by two-dimensional SWE on the same day of right heart catheterization in the haemodynamic cohort. Right atrial pressure (RAP) independently correlated with SS ( $\beta$  ¼ 0.32,  $P$  ¼ 0.002). SS was measured in the outcome cohort before discharge. The 115 patients were divided into three groups on the basis of the tertile value of SS. The third tertile SS group had a higher prevalence of severe tricuspid regurgitation, higher N-terminal B-type natriuretic peptide (NT pro-BNP), and larger right ventricular diastolic diameter, than had the first tertile group and the second tertile group. During a median follow-up period of 105 (77–135) days, adverse events occurred in 25 patients (one death and 24 rehospitalizations for HF). The third tertile SS group had a significantly higher rate of adverse events ( $P < 0.001$ ). A higher SS was independently associated with adverse events after adjusting for conventional validated risk score, liver function test, liver stiffness, and estimated RAP. Conclusions The degree of SS at discharge can be used as a marker of residual splenic congestion, which is predictive of adverse events in patients with ADHF.

### 1. はじめに

急性心不全は右房圧の上昇に伴い肝腫大や脾腫などに代表される臓器うっ血をきたす<sup>1)</sup>。臓器うっ血は心不全の予後に強く関わる重要な因子であるが、その正確な評価は難しい。重度のうっ血性心不全では、上昇した右房圧は肝うっ血をきたし、門脈圧上昇をきたす。以前より超音波検査で観察される門脈圧の波形が心不全の重症度に関連することが報告されている<sup>2)</sup>。しかし、脾臓自体の浮腫の程度を測定する方法はこれまで存在しなかった。

近年、超音波エラストグラフィ法が開発されたことで肝臓や脾臓の実質の硬さを測定することが可能となった。消化器内科領域において、肝硬度や脾硬度は慢性肝疾患症例において測定されている<sup>3)</sup>。

また、最近の臨床研究では肝硬度が心不全患者において、肝うっ血の重症度を反映することが報告されている。しかし、急性心不全患者において、超音波エラストグラフィ法により測定した脾硬度の臨床的意義は明らかでない。本研究では、脾硬度と心不全の血行動態や予後との関連を検討するため、2つの研究を行った。研究1の目的は、脾硬度と右心カテテル検査で測定された血行動態との関連を調査すること。研究2の目的は、脾硬度と心不全の予後との関連を調査することである。

### 2. 対象及び方法

本研究は単施設の前向き観察研究である。日本大学医学部附属板橋病院の臨床研究倫理委員会で承認

1) 日本大学医学部内科学系循環器内科学分野  
齋藤佑記: saito.yuki@nihon-u.ac.jp



されている (RK-200218-04)。研究1は、2019年9月から2020年2月に日本大学医学部附属板橋病院にて右心カテーテル検査を施行された心不全症例を対象とした。肥満、肝疾患、血液骨髄疾患、エコーでの脾臓の描出が困難な症例は除外とした。62例を対象とした。右心カテーテル検査での血行動態の評価と同日に超音波エラストグラフィ法による肝硬度、脾硬度の測定を行った。超音波エラストグラフィ法による脾硬度の測定を図1に示す。

研究2は2019年9月から2020年2月に日本大学医学部附属板橋病院に入院した急性非代償性心不全症

例を対象とした。除外基準は研究1と同様である。115例を対象とした。心不全退院時に超音波エラストグラフィ法による肝硬度、脾硬度の測定を行い、経過を観察した。エンドポイントを全死亡と心不全再入院と設定した。

### 3. 結果

#### 3-1 研究1

約60%の症例は高血圧を合併しており、約30%の症例は虚血性心疾患を基礎心疾患としていた。脾硬度の中央値は14.5 (12.7-19.5) kPaであった。脾硬度

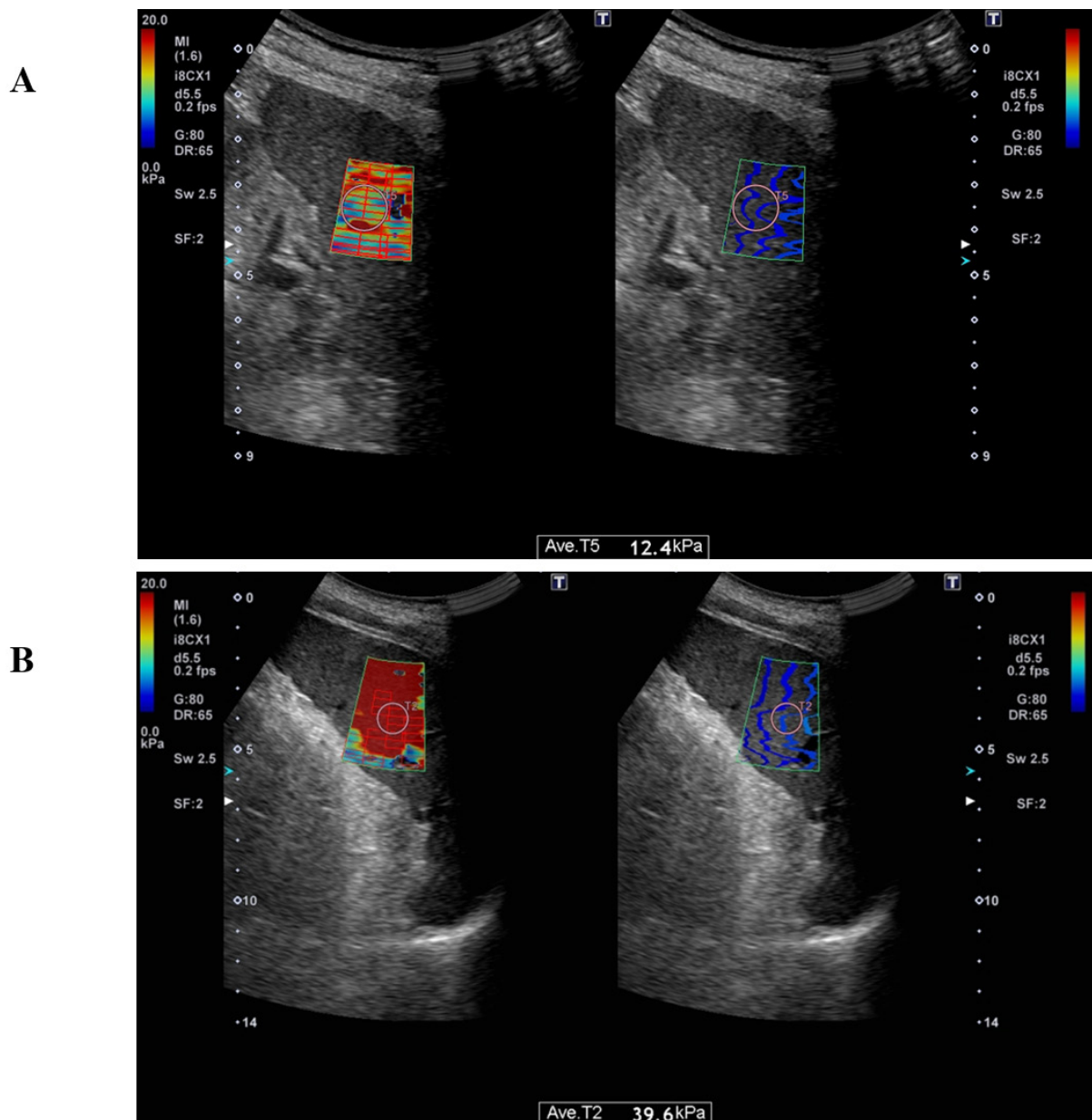


図1 超音波エラストグラフィ法による脾硬度の測定

は、右心カテーテル検査での肺動脈楔入圧 ( $r=0.37$ ,  $p=0.003$ ), 肺動脈収縮期圧 ( $r=0.48$ ,  $p<0.001$ ), 平均肺動脈圧 ( $r=0.45$ ,  $p<0.001$ ), 右房圧 ( $r=0.47$ ,  $p<0.001$ ) と有意な相関関係を認めた。心拍出量 ( $p=0.11$ ), 心係数 ( $p=0.34$ ) とは相関を認めなかった。重回帰分析にて、脾硬度は右房圧と有意な相関関係を認めた ( $\beta=0.32$ ,  $p=0.002$ )。ROC分析にて、右房圧 $\geq 10$ mmHgを予測する脾硬度のカットオフ値は28.0kPa (area under curve:0.76, 感度72%, 特異度94%)であった。

### 3-2 研究2

115例の対象症例を心不全退院時の脾硬度の三分位値で3群に分けた：第一分位群（脾硬度13.8kPa以下, 症例数38例）, 第二分位群（脾硬度13.8kPa以上18.9kPa未満, 症例数38例）, 第三分位群（脾硬度18.9kPa以上, 症例数39例）。脾硬度が28.0kPa以上の症例は28例（24.3%）であった。第三分位群では、有意にNYHA心機能分類が高く、BMIが低く、より高用量の利尿薬を必要としていた (all  $p<0.05$ )。また、AST, ALT,  $\gamma$ GTP, fibrosis-4 index, NT pro-BNPが高値であった (all  $p<0.05$ )。さらに、心臓超音波検査で測定された三尖弁逆流圧較差、推定右房圧が有意に高値であり、中等度以上の三尖弁逆流を呈している症例の割合も高率であった (all  $p<0.05$ )。

観察期間中央値105 (77-135) 日の期間で、25例の心イベント（1例の死亡と24例の心不全再入院）が発生した。生存時間分析にて、第三分位群で有意にイベントの発生率が高率であった (log-rank  $p<0.001$ , 図2)。多変量解析にて、従来から用いら

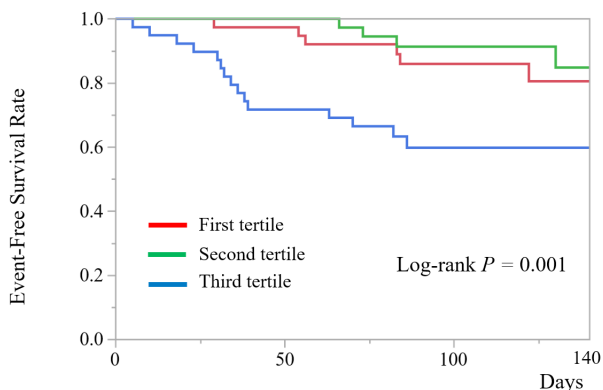


図2 生存時間分析

れている心不全リスクスコア (MAGGIC risk score), 肝酵素や肝硬度, 推定右房圧で補正しても、脾硬度は有意に心イベントの発生を予測する因子であった。

### 4. 考察

本研究は心不全患者における超音波エラストグラフィ法で測定した脾硬度と血行動態や予後との関連を調査した初めての検討である。次の3つの知見を得た。まず、脾硬度は肺動脈楔入圧や肺動脈圧、右房圧と有意な相関関係を呈し、特に右房圧と独立して関連が認められた。次に、脾硬度の高い心不全症例は、より重度の心不全を呈しており、肝うっ血や右心不全を合併していることが示唆された。さらに、脾硬度は心不全の予後と強い関連が認められた。脾硬度は、心不全退院時の臓器うっ血の残存を反映し、退院後のリスクの層別化に有用であることが示唆された。

### 5. 結語

心不全患者において、超音波エラストグラフィ法により測定した脾硬度は、右房圧上昇、心不全の重症度、肝うっ血や右心不全の重症度と強く関連し、予後予測に有用であることが示唆された。

### 謝辞

この研究は、令和2年度医学部50周年共同研究の助成金交付により研究が遂行されたものです。この場を借りて深く御礼申し上げます。

### 文献

- 1) Allen LA, Felker GM, Pocock S, McMurray JJ, Pfeffer MA, Swedberg K, Wang D, Yusuf S, Michelson EL, Granger CB. Liver function abnormalities and outcome in patients with chronic heart failure: data from the Candesartan in Heart Failure: Assessment of Reduction in Mortality and Morbidity (CHARM) program. *Eur J Heart Fail* 2009; 11: 170-177.
- 2) Moriyasu F, Nishida O, Ban N, Nakamura T, Sakai M, Miyake T, Uchino H. "Congestion index" of the portal vein. *Am J Roentgenol* 1986; 146: 735-739.
- 3) Ma X, Wang L, Wu H, Feng Y, Han X, Bu H, Zhu Q. Spleen stiffness is superior to liver stiffness for predicting esophageal varices in chronic liver disease: a meta-analysis. *PloS One* 2016; 11: e0165786.

# カラー静止画像を用いた 新生児ビリルビン測定システムの実用化に向けた臨床研究

岡橋 彩<sup>1)</sup>, 長野伸彦<sup>1)</sup>, 今泉隆行<sup>1)</sup>, 小松篤史<sup>2)</sup>, 森岡一朝<sup>1)</sup>

## A clinical study for practical application of bilirubin measurement system using color pictures of newborns

Aya OKAHASHI<sup>1)</sup>, Nobuhiko NAGANO<sup>1)</sup>, Takayuki IMAIZUMI<sup>1)</sup>,  
Atsushi KOMATSU<sup>2)</sup>, Ichiro MORIOKA<sup>1)</sup>

### 要旨

本研究の目的は、「単にカラー写真を撮るだけで新生児のビリルビンが測定できる技術を実用化する」ための臨床研究を行うことである。在胎35週以上の新生児98例、のべ411測定を対象とし、既存の経皮黄疸計(JM-105)測定によるTranscutaneous bilirubinometer値と専用カメラでのカラー画像写真による算出したE値との相関関係を調べた。カラー画像写真は新生児の前胸部を1回撮影し、画像から $E = \text{Median}(B) / \text{Median}(G)$ を算出しE値とした。この両者の相関は、光線療法のない状態では決定係数( $R^2$ )は0.839で良い相関関係が得られた。一方、光線療法後24時間以降の $R^2$ は0.625と相関関係の低下が見られた。カラー静止画像から経皮ビリルビンが測定できることを実臨床で明らかにできた。

### 1. はじめに

新生児黄疸(高ビリルビン血症)は、出生後の生理的現象であるが、適切にスクリーニングされ、診断・治療が行われないとビリルビン脳症という脳性麻痺、難聴、眼球運動障害の重篤な神経学的後遺症を残す<sup>1,2)</sup>。それゆえ、この新生児高ビリルビン血症を適切にモニタリングする必要がある。高ビリルビン血症の診断のゴールドスタンダードは、血清総ビリルビン値である。しかし、血中総ビリルビンを測定するには採血する必要があり、新生児にとって痛みがあり侵襲を伴う。また、頻回に血液検査を行うと貧血となることが临床上、課題となっている。それゆえ、これからの新生児医療では、採血をせず全く侵襲なしに、新生児のビリルビンを測定する必要があると考えた。

我々は、アトムメディカル社と共同で、C. E. Shannon

のチャンネル容量の法則とRGB Color Depth方式を画像に適応し、環境光源の影響、皮膚表面の反射光、深部反射光を判別し、緑色光と赤色光からの深部反射光の差分を検出することでカラー静止画像からビリルビンを測定できる技術の開発に成功した<sup>3)</sup>。そこで、本研究の目的は、世界で初めて「単にカラー写真を撮るだけで新生児のビリルビンが測定できる技術を実用化する」ための臨床研究を行うことであった。

### 2. 対象及び方法

- (1) 研究実施期間：2020年3月1日～2020年12月31日
- (2) 研究の種類・デザイン  
非対照、非盲検
- (3) 対象：在胎35週以上の新生児 98例

1) 日本大学医学部小児科学系小児科学分野  
2) 日本大学医学部産婦人科学系産婦人科学分野  
岡橋 彩：okahashi.aya@nihon-u.ac.jp

(4) 方法：

日本大学医学部附属板橋病院臨床研究倫理委員会の承認（番号：RK-200114-2，承認日：2020年1月31日）のもと，両親の同意を得て，通常診療のタイミングで新生児に既存の経皮黄疸計（コニカミノルタ社製黄疸計 [JM-105]）測定に加えて，専用カメラ（図1）での撮影を同時に実施した。この測定は，同一の新生児に対して退院まで，通常5日の間で行った。

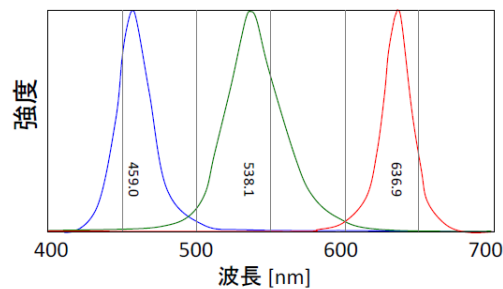
既存の経皮黄疸計（JM-105）は一度の測定で，前胸部において3回の測定を行い，それらの中央値を Transcutaneous bilirubinometer (TcB) 値として採用した。専用カメラでのカラー画像写真は新生児の前胸部を1回撮影し，画像を4分割し，それぞれで， $E = \text{Median (B)} / \text{Median (G)}$  を算出し，E値とした（図2）。この両者の相関関係を調べた。

臨床情報として，在胎週数，出生体重，光線療法の施行の有無，コニカミノルタ社製黄疸計（JM-105）の経皮ビリルビン値（TcB）を収集した。

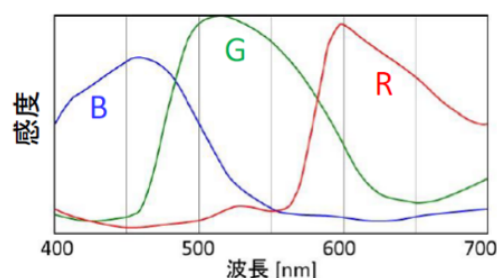
i 特性を持つ照明により皮膚へ照射し，ii のイメージセンサーで画像データとして獲得した。入射光は皮下組織で散乱し，皮下組織に存在するビリルビンによる黄染を青色光（B），緑色光（G），赤色光（R）の減衰した戻り光をカメラで画像として獲得した。得られた画像から光学濃度差（B，G，Rの差）を解析してE値を算出した<sup>3)</sup>。

3. 結果

対象は，在胎35週以上の新生児98症例で，在胎週数  $37 \pm 1.8$  週，出生体重  $2728 \pm 502$  g，男児57例



i. 照明の光学特性



ii. イメージセンサーの光学特性

図2 カメラの光学特性とカラー画像による算出

(58%) であった。のべ411回のJM-105によるTcB測定と専用カメラ測定を行った。TcB値とE値との相関関係を調べた。

図3に示すように，光線療法のない状態では，決定係数 ( $R^2$ ) は0.839で良い相関関係が得られた。一方，光線療法の施行中の $R^2$ は0.543，光線療法後24時間以内の $R^2$ は0.483，光線療法後24時間以降の $R^2$ は0.625と相関関係の低下が見られた。



図1 カメラの外観



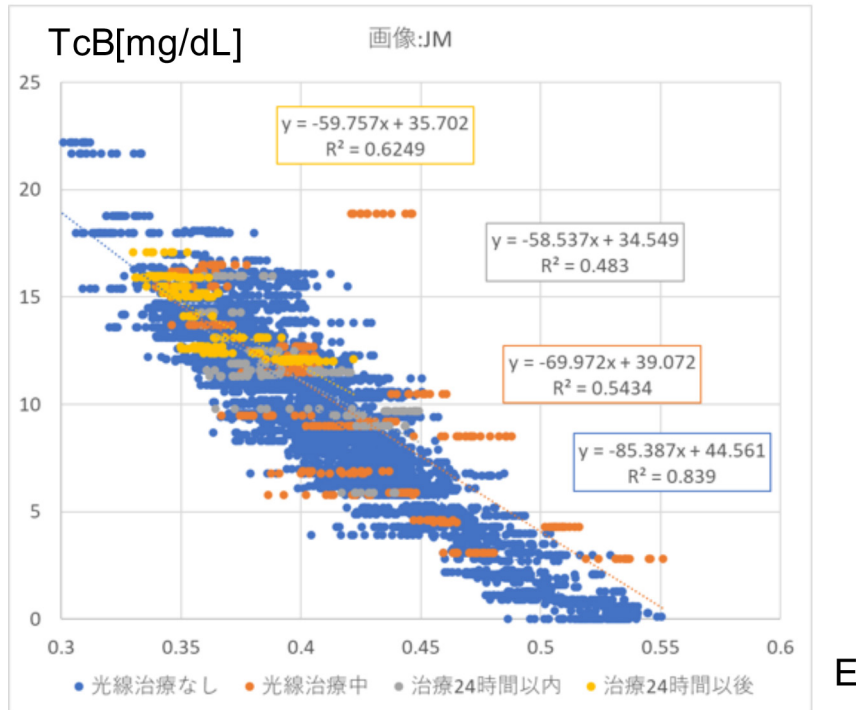


図3 JM-105によるTcB値と専用カメラのE値との相関関係

#### 4. 考 察

今回初めて、C.E.Shannonのチャンネル容量の法則とRGB Color Depth方式を画像に適応し、環境光源の影響、皮膚表面の反射光、深部反射光を判別し<sup>3)</sup>、緑色光と赤色光からの深部反射光の差分を検出することでカラー静止画像から経皮ビリルビンが測定できることを実臨床で明らかにできた。

新生児黄疸は、重症になると、光線療法を一般に治療として行われる。光線療法が行われない状態では高い相関が得られた一方、一度光線療法が行われると24時間経過してもその相関関係は低下した。このまま実臨床に応用すると考えた場合、光線療法を施行されない症例のみに限ってこのカラー画像による経皮ビリルビン(E)値を使用できるということではできないだろう。これでは、臨床での使用には限界があることは明らかである。一般に光線療法後24時間以降経過すれば、経皮と血液のビリルビンの相関関係は戻るため<sup>4)</sup>、光線療法後24時間以降の相関関係があがるように、カメラおよびE値解析のアルゴリズムの改変等を行っていく必要がある。

#### 5. 結 語

C. E. Shannonのチャンネル容量の法則とRGB Color Depth方式を画像に適応し、カラー静止画像から経皮ビリルビンが測定できることを実臨床で明らかにできた。しかしながら、光線療法後24時間経過してもその相関関係に大きく影響を及ぼし続けることが明らかになった。

#### 文 献

- 1) Morioka I, Iwatani S, Koda T, et al. Disorder of bilirubin binding to albumin and bilirubin-induced neurological dysfunction. *Semin Fetal Neonatal Med* 2015; 20: 31-36.
- 2) Morioka I, Nakamura H, Iwatani S, et al. International Perspectives: Clinical kernicterus in preterm infants in Japan. *NeoReviews* 2016; 17: e124-e130.
- 3) 上田智章, 鈴木雅弘. まずはイメージ・センサ計測のポテンシャルを知る. *Interface*, 2018; 5月号: 17-19.
- 4) Kurokawa D, Nakamura H, Yokota T, et al. Screening for hyperbilirubinemia in Japanese very low birth-weight infants using transcutaneous bilirubinometry. *J Pediatr* 2016; 168: 77-81.

# 高強度の頭低位負荷による脳循環の経時変化

加藤智一<sup>1)</sup>, 小西 透<sup>1)</sup>, 田子智晴<sup>1)</sup>, 小川洋二郎<sup>1)</sup>,  
北島 治<sup>2)</sup>, 高木俊一<sup>2)</sup>, 鈴木孝浩<sup>2)</sup>, 岩崎賢一<sup>1)</sup>

## Time course of changes in cerebral circulation during 30-degree head-down tilt

Tomokazu KATO<sup>1)</sup>, Toru KONISHI<sup>1)</sup>, Chiharu TAKKO<sup>1)</sup>, Yojiro OGAWA<sup>1)</sup>,  
Osamu KITAJIMA<sup>2)</sup>, Shunichi TAKAGI<sup>2)</sup>, Takahiro SUZUKI<sup>2)</sup>, Ken-ichi IWASAKI<sup>1)</sup>

### 要旨

手術支援ロボットを使用した腹腔鏡下手術で用いられる傾斜角度30°以上の高強度頭低位は、脳循環に悪影響を及ぼす可能性があり、周術期管理の観点から、脳循環に関する基礎生理学的知見がもとめられている。現状、高強度頭低位の開始直後からの脳循環の経時変化に焦点を当てた報告は非常に少ない。本研究では、「10分間の高強度頭低位(-30°)において、負荷開始直後は、急速な脳灌流圧の増加に対して脳血管収縮能の反応が間に合わず、脳血流が一過性に増加し、その後、脳血流が負荷前の水準に回復するか」を検証した。結果、負荷開始直後から脳灌流圧は増加するが、予想に反して、負荷開始直後から脳血管収縮能が十分に作用し、脳血流は一定に維持されることが示唆された。

### 1. はじめに

近年、泌尿器科領域では手術支援ロボット「ダヴィンチ (da Vinci)」を用いた腹腔鏡下手術が普及してきた。この手術方法は、傾斜角度30°以上の高強度頭低位で実施されるため、脳循環への悪影響が懸念されている。一方、宇宙医学領域では無重力環境による頭部方向への体液シフトを地上で模擬するために、傾斜角度が6～10°の緩やかな頭低位負荷が研究に用いられてきた<sup>1)</sup>。しかし、傾斜角度の大きい高強度頭低位において、特に負荷開始直後からの脳循環の経時変化に焦点を当てた報告は非常に少ない。過去の類似した研究結果から推測すると、高強度頭低位によって脳灌流圧が増加するため、負荷開始直後に脳血流が増加し、その後、脳血管収縮能によって負荷前の水準に回復すると考えられる<sup>2)</sup>。高強度頭低位によって過度に脳血流が増加すると、脳血管に負荷をかけるだけでなく、頭蓋内圧亢進や

眼圧亢進など患者に重篤な合併症を招く可能性がある。従って、高強度頭低位の負荷開始直後からの経時変化を明らかにすることは、高強度頭低位を伴う周術期管理においても有益な情報になると思われる。

### 2. 目的

本研究では、「10分間の高強度頭低位(-30°)において、負荷開始直後は、急速な脳灌流圧の増加に対して脳血管収縮能の反応が間に合わず、脳血流は一過性に増加するが、その後、脳血管収縮能によって脳血流が負荷前(水平位)の水準に回復するか」を検証した。

### 3. 対象及び方法

#### 3-1 倫理

本研究は、日本大学医学部倫理委員会の承認(承

1) 日本大学医学部社会医学系衛生学分野  
2) 日本大学医学部麻酔科学系麻酔科学分野  
加藤智一: kato.tomokazu@nihon-u.ac.jp

認番号P20-02-0, 承認日 令和2年5月7日) を受け, 大学病院医療情報ネットワークセンター (UMIN) 臨床試験登録システムに登録した (UMIN000040757)。

### 3-2 実験手順

実験は, 室温 20-26℃ かつ二酸化炭素濃度 1000ppm 以下に管理された実験室で実施された。健康成人被験者 10 名を対象に, 水平位の電動ティルトベッド上に仰臥位安静にさせ, 心電図計および血中酸素飽和度モニタ, 血圧測定用カフ (Lifescope BSM-3800; Nihon Kohden, Tokyo, Japan), 非観血的連続血圧計 (Lifescope BSM-3800; Nihon Kohden, Tokyo, Japan), 呼気炭酸ガスモニタ (OLG-2800; Nihon Kohden, Tokyo, Japan) を装着した (図)。右中大脳動脈の脳血流速度波形を測定するために, 経頭蓋ドプラ (EZ-Dop; Compumedics Germany GmbH, Sipplingen, Germany) を使用した。負荷中に経頭蓋ドプラのプロープの位置が移動しないように, 歯科用印象材を用いて各被験者の右側頭部と右外耳の形状に合致した固定具を作成した。図に実験風景を示す。



図 実験風景

仰臥位開始から 15 分以上の経過を確認し, 水平位で負荷前データの測定を開始した。続いて, 電動ティルトベッドの傾斜角度を  $-30^\circ$  に変更し, 10 分間の頭低位負荷を開始し, 負荷中データを記録した。ティルトベッドの傾斜角度変更は電動制御で, 水平位から頭低位完了までの所要時間は全実験一律 25 秒だった。頭低位データ測定終了後, 電動ティルトベッドを水平位に戻し, バイタルサインに問題ないことを確認して実験終了とした。

### 3-3 データ解析

負荷開始直前の 1 分間のデータを負荷前データとした。10 分間の頭低位負荷中データは, ティルトベッドの傾斜角度が  $-30^\circ$  に達した時点から, 0-1 分区分間, 1-2 分区分間, 2-3 分区分間, 3-4 分区分間, 4-5 分区分間, 5-6 分区分間, 6-7 分区分間, 7-8 分区分間, 8-9 分区分間, 9-10 分区分間の 10 区分間に分けた。負荷前データの 1 区分間と負荷中データの 10 区分間の計 11 区分間で, 各変数を算出した。

多チャンネル生体情報取得システム (Notocord-hem 3.3; Notocord, Paris, France) を用いて, 心電図波形および動脈血圧波形, 脳血流速度波形, 呼気

二酸化炭素波形を 1kHz で記録し, 記録された動脈血圧波形と脳血流速度波形から, 一心拍ごとの心臓レベルの平均動脈血圧と平均脳血流速度を検出し, 各区分間での区分間平均値を算出した。同様に, 心電図波形および呼気二酸化炭素波形から, 各区分間での心拍数および呼気二酸化炭素濃度の区分間平均値を算出した。また, 呼気二酸化炭素濃度波形から各区分間の呼吸数をカウントした。

腋窩中線と胸骨剣状突起の交点 (心臓レベル) と耳珠 (中大脳動脈レベル) の高さの差を測定し, 以下の式から, 中大脳動脈レベル-心臓レベル間の血液に換算した静水圧を算出した。

$$\begin{aligned} & \text{静水圧 (mmHg)} \\ & = \text{高さの差 (cm)} \times 1.06/13.6 \times 10 \end{aligned}$$

続いて, 以下の式から, 中大脳動脈レベルの平均動脈血圧の区分間平均値を算出した。

$$\begin{aligned} & \text{中大脳動脈レベルの平均動脈血圧 (mmHg)} \\ & = \text{心臓レベルの平均動脈血圧 (mmHg)} \\ & \quad + \text{静水圧 (mmHg)} \end{aligned}$$

動脈血圧波形と脳血流速度波形を区分ごとに分離

し、数理モデル解析 (ICM+ version 8.1, Cambridge 192 Enterprise: <http://www.neurosurg.cam.ac.uk/icmplus/>, Cambridge, United Kingdom) を用いて、頭蓋内圧推定値を算出<sup>3)</sup>、さらに、以下の式から、脳灌流圧推定値を算出し、脳灌流圧として評価した。

$$\begin{aligned} & \text{脳灌流圧推定値 (mmHg)} \\ & = \text{中大脳動脈レベルの平均動脈血圧 (mmHg)} \\ & \quad - \text{頭蓋内圧推定値 (mmHg)} \end{aligned}$$

脳血管抵抗指数を以下の式から算出し、その変化より脳血管収縮能を評価した。

$$\begin{aligned} & \text{脳血管抵抗指数 (mmHg}\cdot\text{cm}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}) \\ & = \text{脳灌流圧推定値 (mmHg)} \\ & \quad / \text{平均脳血流速度 (cm/s)} \end{aligned}$$

### 3-4 統計解析

正規性及び等分散性が確認できた変数については、データ区間 (全11区間) を因子とした一元配置反復測定分散分析を行った後、事後検定として、Student-Newman-Keuls法で多重比較検定を行った。また、正規性及び等分散性が確認できなかった変数については、データ区間を因子としたFriedman検定を行った後、Student-Newman-Keuls法で多重比較検定を行った。*P*値が0.05未満を統計学的に差が認められると判断した。統計解析には、SigmaPlot version 14.5ソフトウェア (Systat Software Inc, San Jose, CA, USA) を用いた。

## 4. 結果

心臓レベルの平均動脈血圧は全区間において有意な変化は認めなかった。中大脳動脈レベルの平均動脈血圧は負荷前に比較して、負荷0-1分区間以降で有意に増加した。同様に、脳灌流圧推定値は負荷前に比較して、負荷0-1分区間以降で有意に増加した。平均脳血流速度は全区間において有意な変化は認めなかった。脳血管抵抗指数は負荷前に比較して、負荷0-1分区間以降で有意に増加した。心拍数および呼吸数、呼気二酸化炭素濃度は全区間において有意な変化は認めなかった。

## 5. 考察

本研究は、「10分間の高強度頭低位 (-30°) において、負荷開始直後では脳灌流圧の増加に対して、脳血管収縮能による調節が間に合わず、脳血流が一過性に増加し、その後、負荷前の水準に回復する経時変化を示すか」検証した。結果、脳灌流圧推定値は高強度頭低位の負荷開始直後から増加したが、全区間において中大脳動脈の平均脳血流速度は変化しなかった。また、脳血管抵抗指数は負荷開始直後から増加した。本研究から、高強度頭低位の負荷開始直後から脳灌流圧は増加するが、予想に反して、負荷開始直後から脳血管収縮能によって脳血流は一定に保たれることが示唆された。

## 6. 結語

10分間の高強度頭低位 (-30°) において、負荷開始直後から脳灌流圧は増加し持続するものの、負荷開始1分以内で脳血管収縮能が十分に働いて脳血流を一定に保つことができることが示唆された。

## 謝辞

本研究は、令和2年度創立50周年記念研究助成金 (共同研究) の助成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。

## 参考文献

- 1) Kermorgant M, Nasr N, Czosnyka M, et al. Impacts of Microgravity Analogs to Spaceflight on Cerebral Autoregulation. *Front Physiol.* 2020; 11:778.
- 2) Bosone D, Ozturk V, Roatta S, Cavallini A, Tosi P, Micieli G. Cerebral haemodynamic response to acute intracranial hypertension induced by head-down tilt. *Funct Neurol.* 2004; 19(1):31-35.
- 3) Schmidt B, Klingelhöfer J, Schwarze JJ, Sander D, Wittich I. Noninvasive prediction of intracranial pressure curves using transcranial Doppler ultrasonography and blood pressure curves. *Stroke.* 1997; 28(12):2465-2472.



## 遺伝子改変糖尿病ブタを用いた 糖尿病網膜症および腎症の経時的変化の検討

長岡泰司<sup>1)</sup>, 横田陽匡<sup>1)</sup>, 渡部昌久<sup>1)</sup>, 小熊秀隆<sup>2)</sup>, 丸山高史<sup>2)</sup>, 阿部雅紀<sup>2)</sup>

### The Longitudinal Evaluation of diabetic retinopathy and nephropathy in the transgenic pigs

Taiji NAGAOKA<sup>1)</sup>, Harumasa YOKOTA<sup>1)</sup>, Masahisa WATANABE<sup>1)</sup>,  
Hidetaka OGUMA<sup>2)</sup>, Takashi MARUYAMA<sup>2)</sup>, Masanori ABE<sup>2)</sup>

#### 要旨

最近開発された遺伝子改変糖尿病ブタを用いて網膜と腎臓における異常所見を経時的に評価した。高血糖は生後1ヶ月より認め、経過観察期間中持続していた。網膜動脈における血管機能障害は7ヶ月で認められた一方で、網膜毛細血管密度は生後1ヶ月から中間層、その後深層、浅層の順に障害されていた。腎臓も早期から結節性病変を認めた。このモデル動物はヒトにおける2型糖尿病と類似した病態を呈するため、新規診断法および治療法開発に役立つ有益な動物モデルになり得ると考えられた。

#### 1. はじめに

糖尿病細小血管合併症である網膜症・神経症・腎症はそれぞれ失明や人工透析、下肢切断などの重篤な機能障害を引き起こすため、その予防法と治療法の確立は急務である。糖尿病腎症の発症に先行して網膜症が発症すると考えられている。しかし、同じ細小血管障害であるが、これまでの研究は腎症と網膜症は独立してなされており、その発症時期およびその関連については詳細な検討はなされていない。さらに、糖尿病網膜症における網膜循環動態の病期進行に伴う経時的変化については未解明であり、特に網膜症発症前後の網膜循環動態を解明することができれば、循環改善に着目した糖尿病網膜症の新規予防法の確立につながると考えられる。腎症に関しては、腎生検は侵襲的な検査であるがゆえ、高血糖発症からの経時的な病理組織学的変化が十分に解明されていない。網膜循環動態と糸球体病変の関連が明らかになれば網膜病変から腎症の病期および予後予測することが可能になると考えられる。

#### 2. 対象及び方法

対象動物として遺伝子改変糖尿病ブタを用いた<sup>1)</sup>。レーザースペックル血流計を用いて、網膜循環動態と網膜血管構築の経時的に評価し、同時に腎生検、採血採尿を行った。網膜電位図(Electroretinography: ERG)による網膜神経活動、OCTによる網膜神経線維厚の経時的変化とともに、特に網膜神経—血管—グリアネットワークおよび血管内皮機能に着目した負荷試験による網膜血管機能評価を非侵襲的かつ定量的に評価した。

#### 3. 結果

##### 3-1 網膜の解析

遺伝子改変糖尿病ブタは生後1月齢から随時血糖が300-600mg/dlと高血糖を呈しており、経過観察中は無治療で飼育した。摘出網膜血管の血管拡張作用を観察したところ、4月齢の遺伝子改変糖尿病ブタでは正常ブタと比べて有意な差はなかったが、7月齢の遺伝子改変糖尿病ブタではブラジキニンによ

1) 日本大学医学部視覚科学系眼科学分野

2) 日本大学医学部内科学系腎臓高血圧内分泌内科学分野

長岡泰司: nagaoka.taiji@nihon-u.ac.jp

る血管内皮由来一酸化窒素（NO）依存性の血管拡張作用が低下していた。次に共焦点レーザー顕微鏡による層別の網膜血管の全長を算出したところ、遺伝子改変糖尿病ブタでは1月齢において中間毛細血管網の全長が有意に低下し、その後4月齢、7月齢ではさらに顕著になっていた。さらに網膜深層と表層毛細血管網の全長も有意に低下していた。

### 3-2 腎臓の解析

エコーガイド下針生検で得られた腎組織の観察では、正常ブタと比較し、遺伝子改変糖尿病ブタの糸球体において、結節性病変、滲出性病変、びまん性変化といった糖尿病性腎症に矛盾しない変化を認めた。

時系列的な変化に関しては、明らかではなく、数ヶ月での組織的变化は有意に認めなかった。また、血液検査において、正常ブタと比較し、遺伝子改変糖尿病ブタのクレアチニン値は有意に低値であった。また蛋白尿については糖尿病ブタの方が有意に高値であった。

## 4. 考 察

今回我々は遺伝子改変糖尿病ブタを用いた長期経過観察を行い、以下の知見が得られた。

- 1) 網膜血管内皮機能は7月齢で減弱した
- 2) 網膜毛細血管は生後1ヶ月で中間層、4ヶ月で深層、そして7ヶ月では浅層も血管密度が低下した
- 3) 腎臓では早期から結節性病変、滲出性病変、びまん性変化といった糖尿病性腎症に矛盾しない病理学的変化を認めた。糖尿病ブタでは尿蛋白が有意に増えて、血清クレアチニン値は有意に低下していた。

1) に関しては、薬剤誘導1型糖尿病モデルブタで我々と同様の実験方法で検討した結果では、糖尿病発症後2週から12週までブラジキニンによる血管拡張反応は減弱していた<sup>2)</sup>。我々の用いた遺伝子改変糖尿病モデルブタは2型糖尿病モデルであり<sup>1)</sup>、これはモデル動物の違いによる可能性がある。2) に関しては、糖尿病のない病期からすでに中間層および深層の毛細血管密度は低下していることが光干渉断層計（OCT）アンギオグラフィーを用いた臨床研究からも多数報告されており、その結果と一致している。3) に関しては、これまでの2型糖尿病モデル動

物における腎所見と比較して、結節性病変などなど糖尿病性腎症に典型的な所見が早期から見られるのが特徴である。また採血採尿結果はヒトの糖尿病性腎症の極早期でみられる過剰濾過の状態を呈していると考えた。

以上より、今回用いた遺伝子改変糖尿病ブタは2型糖尿病モデル動物としての特徴を多く有しており、網膜症や腎症など糖尿病細小血管合併症の特徴を呈すると考えられた。

## 5. 結 語

これまで糖尿病研究は主にマウスやラットなどの小動物が用いられてきたが、遺伝子改変糖尿病ブタを用いて臨床に近い基礎研究を行うことによって、臨床試験の前段階まで新規糖尿病合併症予防薬の開発を進めることが可能と考えられた。

なお、現在投稿中、投稿準備中のデータが多く含まれているため、一部データの提出を割愛させていただきますことをお断り致します。

## 文 献

- 1) Umeyama K, Nakajima M, Yokoo T, Nagaya M, Nagashima H. Diabetic phenotype of transgenic pigs introduced by dominant-negative mutant hepatocyte nuclear factor 1alpha. *J Diabetes Complications* 2017;31:796-803.
- 2) Hein TW, Potts LB, Xu W, Yuen JZ, Kuo L. Temporal development of retinal arteriolar endothelial dysfunction in porcine type 1 diabetes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2012;53:7943-7949.

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, 西山博孝, 羽尾裕之, 原 弘之,  
深谷 親, 森岡一朗  
幹事 井上広一, 葛西玲広, 正田雅之, 藤田順一

(50音順)

Editorial Board

Editor-in-Chief Makoto MAKISHIMA  
Associate Editors Yukimoto ISHII, Hirotaka NISHIYAMA, Hiroyuki HAO,  
Hiroyuki HARA, Chikashi FUKAYA, Ichiro MORIOKA  
Managing Editors Koichi INOUE, Reo KASAI, Masayuki SHODA, Jun-ichi FUJITA

---

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

---