

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.3 / December 2015

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あたって

今年度の「日本大学医学部総合医学研究所紀要」をお届けいたします。

この紀要は、医学に関する学理・技術についての総合的研究の成果や報告による外部情報発信を主たる目的とし、もって社会の要請に応じることを目指しています。この紀要に掲載されている内容は、日本大学医学部総合医学研究所に係る研究活動の成果であり、日本大学医学部さらには日本大学全体で行われている研究の一端です。今年度は本研究所の医学研究支援部門による報告も多く掲載され、医学研究支援部門における活動を窺い知ることができます。全ての研究を掲載・紹介するのは難しく、この紀要を通じて、日本大学医学部で実施されている研究を一人でも多くの皆様に認識いただければ幸いです。

現在、この紀要は、ホームページ上で公開する形態となっています。原稿については、執筆者や著者の責任の下、その意思を尊重し、原則として査読を行わず、編集委員による体裁確認を経ることとしています。執筆いただいたご関係の皆様にお礼を申し上げます。

今後も、研究所として、社会からの要請やニーズに応えられるように努めてまいります。この紀要が、日本大学医学部における研究の発信、各研究者の更なる研究進展に寄与することを願っております。

日本大学医学部総合医学研究所長 杉谷雅彦

目 次

「ミクロゲノミクス」から、がん heterogeneity の分子基盤を解明する……………	江角真理子 他	1
気管支喘息の病態形成と細菌鞭毛タンパク フラジェリンの役割……………	丸岡秀一郎 他	7
健常者における Holter ECG を用いた T 波オルタナンスの日内変動と心拍数及び自律神経活動との関連 ……………	橋本賢一 他	10
心房細動維持における自律神経叢 (ganglionated plexi) と心臓周囲脂肪の役割……………	奥村恭男 他	15
膵頭十二指腸切除後の脂肪肝の発生と制御……………	山崎慎太郎	22
パーキンソン病の罹病期間による STN-DBS の効果の違い ……………	深谷 親 他	27
前立腺癌新規治療薬の開発……………	大日方大亮 他	29
小児キャンピロバクター下痢症における迅速遺伝子診断の有用性に関する研究……………	Trinh Duy Quang 他	32
喘息及び COPD 患者における電子媒体を用いた吸入指導研究 ……………	伊藤玲子 他	35
動脈硬化における超音波を用いた血管内皮・平滑筋機能に関する研究……………	藤岡和美	38
冠血行再建術後の心血管イベントリスクと心筋血流 SPECT 所見との関連 ……………	依田俊一 他	41
星状神経節ブロック及び星状神経節照射による僧帽筋血流と筋硬度の変化……………	近藤裕子 他	44
血中 CRP 複合体のプロテオーム解析 ……………	小倉彩世子 他	46
糞便検体におけるノロウイルス迅速検出法の研究……………	早川 智 他	49
冠動脈不安定プラークの発展及び破綻のメカニズム……………	平山篤志	51
インフルエンザウイルスと口腔・気道細菌との相互作用の機序と呼吸器疾患重症化の病態の解明 ……………	山本樹生 他	54
TGF β 抑制ピロール・イミダゾール・ポリアミドの前臨床試験		
一皮膚肥厚性癬痕に対する効果の検討……………	相馬正義 他	60
脊髄刺激療法を用いた minimally conscious state の治療 ……………	山本隆充 他	66
マウス脱分化脂肪細胞の血管新生作用に関する研究……………	松本太郎 他	71
デジタル化がもたらす環境変化と業務の拡張……………	井上広一 他	77
大判プリンター Canon Image PROGRAF iPF9400 による発表用ポスターの作成支援とエクステンション支援 ……………	黒江裕子 他	80
医学研究支援部門循環機能室に設置された、エックス線循環器診断システムの現状……………	谷口由樹 他	83
医学研究支援部門 形態系 電子顕微鏡室の紹介と心臓移植時代の電子顕微鏡を用いた心筋超微形態観察の有用性 ……………	地家豊治 他	87
医学部研究支援部門の利用に関する成果・業績等一覧……………		91

INDEX

Molecular basis of cancer heterogeneity determined by 'microgenomics'	Mariko ESUMI et. al	1
The role of bacterial flagellin in the pathogenesis of asthma	Shuichiro MARUOKA et. al	7
Circadian variation of Holter-based T wave Alternans and association with heart rate and autonomic nerve system in normal heart subjects	Kenichi HASHIMOTO et. al	10
Role of Ganglionated Plexi and Epicardial Adipose Tissue in the Maintenance of Atrial Fibrillation	Yasuo OKUMURA et. al	15
Postoperative liver steatosis in pancreatoduodenectomy: treatment strategy	Shintaro YAMAZAKI	22
Influence of duration of Parkinson disease on outcome of STN - DBS	Chikashi FUKAYA et. al	27
The development of novel prostate cancer therapeutic agents	Daisuke OBINATA et. al	29
Study on the rapid molecular diagnosis on pediatric <i>Campylobacter colitis</i>	Trinh Duy Quang et. al	32
Study of the teaching inhalation with digital media to patients with asthma and COPD	Reiko ITO et. al	35
Study on the vascular endothelial and smooth muscle cell function using ultrasonography in atherosclerosis	Kazumi FUJIOKA	38
Relationship between Myocardial Perfusion SPECT and Cardiac Event Risk after Revascularization	Shunichi YODA et. al	41
The change in trapezius-muscle blood flow and hardness during stellate ganglion block and linear polarized light irradiation near the stellate ganglion	Yuko KONDO et. al	44
Proteome analysis of C - Reactive Protein (CRP) binding protein	Sayoko OGURA et. al	46
Study on the rapid detection for Norovirus genome in stool samples	Satoshi HAYAKAWA et. al	49
The mechanism of the progress and rupture of coronary artery unstable plaque	Atsushi HIRAYAMA	51
Study on the mechanism of exaggeration by both influenza virus and oral/respiratory tract bacteria and the pathogenesis of exaggeration for respiratory disease	Tatsuo YAMAMOTO et. al	54
Pre-clinical study of pyrrole imidazole polyamide targeting TGF β - Analysis of its effects on hypertrophic scars	Masayoshi SOMA et. al	60
Spinal cord stimulation for minimally conscious state	Takamitsu YAMAMOTO et. al	66
Study on angiogenic activity in mouse dedifferentiated fat cells	Taro MATSUMOTO et. al	71
Effects of digitization for the change of environment and the expansion of work in Multimedia Studio	Koichi INOUE et. al	77
Support for the poster creating and extended use from graphics of the large format printer with the Canon Image PROGRAF iPF9400	Hiroko KUROE et. al	80
Medical research support center, Laboratory for animal experiments setting apparatus, conditions of X - ray diagnostic apparatus	Yoshiki TANIGUCHI et. al	83
Introduction to Electron Microscopy Laboratory, Morphological Section of Research Institute of Medical Research Support Center, and The Usability of Ultrastructural Morphometrical Study using Endomyocardial Biopsy in the Era of Heart Transplantation	Toyoharu JIKE et. al	87
Lists of publication and results from Utilization in Medical Research Center		91

「ミクロゲノミクス」から、がんheterogeneityの 分子基盤を解明する

江角眞理子¹⁾, 山口裕美¹⁾, 栄永直樹¹⁾, 中山裕貴¹⁾, 高山忠利¹⁾, 杉谷雅彦¹⁾,
野田博子¹⁾, 増田しのぶ¹⁾, 末光正昌²⁾, 久山佳代²⁾, 吉田明生¹⁾, 徳橋泰明¹⁾

Molecular basis of cancer heterogeneity determined by ‘microgenomics’

Mariko ESUMI¹⁾, Hiromi YAMAGUCHI¹⁾, Naoki EINAGA¹⁾, Yuki NAKAYAMA¹⁾,
Tadatoshi TAKAYAMA¹⁾, Masahiko SUGITANI¹⁾, Hiroko NODA¹⁾, Shinobu MASUDA¹⁾,
Masaaki SUEMITSU²⁾, Kayo KUYAMA²⁾, Akio YOSHIDA¹⁾, Yasuaki TOKUHASHI¹⁾

要旨

がんのheterogeneityの分子基盤とは、がんの分子進化を明らかにすることにある。そのためには、1つの癌症例にみられる多彩な病理組織像を顕微鏡下で採取し、それぞれにある遺伝子変異を明らかにしなければならない。本研究では、ホルマリン固定パラフィン包埋 (FFPE) 組織から、次世代シーケンサー解析ができるように、組織の処理方法とDNAの抽出方法を確立した。さらに肝癌症例、乳癌症例、舌癌症例、転移癌症例を対象に、各がんのheterogeneityと前癌病変を材料として、次世代シーケンサー解析結果から分子進化の解明を試みた。ラット自然発症肝癌モデルでは、生来の遺伝子変異が複数見つかかり易発がん性の遺伝素因が示唆された。乳癌の多様性や、舌癌の浸潤度の違いには、複数の特徴的な遺伝子変異が関与する可能性が示された。肺小細胞癌の多臓器転移の様式も、各臓器に特徴的な変異の付加が観察され、それぞれに転移クローンの起源が異なることも示唆された。

1. はじめに

次世代シーケンサーの急速な進歩により、がんゲノム全体像が明らかとなってきた。一つの腫瘍をとっても10~200個の遺伝子突然変異が見つかる¹⁾。一塊の腫瘍から数カ所とってみると、変異が異なることもわかってきた²⁾。もはや臨床癌は切除された時点では単一クローンではない、多様な変異パターンをもつがん細胞のヘテロな集団と理解される。転移に至っては、原発腫瘍とはさらに異なる変異パターンを示し、がんのゲノム進化が個々の症例で理解されるようになってきた²⁾。このように予想以上のがんheterogeneityが明確になったものの、何ががん発生のdriver mutationで、何が転移のdriver mutationか、また転移腫瘍の臓器親和性は何で決まるのかは、まだわかっていない。本研究では、この新たな問題を解明すべく、新たな手法でがんのゲノ

ム進化を明らかにする。それは、病理組織像から多彩ながん組織像や前癌病変をとらえ、これらを個別に対象としゲノム進化を解析することである。具体的にはホルマリン固定パラフィン包埋組織 (FFPE) を対象とし、レーザーマイクロダイセクションにより標的細胞集団を採取し、網羅的変異解析をする。ここでは、これを「ミクロゲノミクス」と呼ぶ。FFPE DNAは新鮮凍結組織DNAとは異なり、ホルマリン固定によるDNAの損傷が新たな問題となっている。そこで本研究では、ミクロゲノミクスが可能な次世代シーケンシングプロトコルを確立する。その上で、同一症例内にみられる肝癌の前癌病変と肝癌の比較、乳癌症例にみられる多様な癌組織像の比較、口腔癌と前癌病変との比較、多臓器転移腫瘍と原発腫瘍との比較を、研究課題として実施する。

1) 日本大学医学部

2) 日本大学松戸歯学部

江角眞理子: esumi.mariko@nihon-u.ac.jp

2. 材料と方法

(1) 固定包埋条件とDNA抽出方法

①ホルマリン濃度と固定時間

3頭のラット肝臓組織を用いて、それぞれ新鮮凍結およびホルマリン固定を行った。固定については、更に組織を分割し、ホルマリン濃度及び固定時間を変えて固定を行った。各条件固定後、更に組織を半割し、半分をパラフィン包埋した。ヒト生検のFFPE組織については、20%ホルマリン固定7例と10%ホルマリン中性緩衝液固定20例を用いて比較した。

②DNA抽出条件

ラット肝臓FFPE薄切組織について、DNA抽出キット4社とマニュアルプロトコル法（界面活性剤/proteinase Kによる55℃一晩溶解>フェノール/クロロフォルム抽出>RNase A処理>フェノール/クロロフォルム抽出）により、DNAを抽出した。ラット肝臓新鮮凍結組織からも、マニュアル法でDNAを抽出した。どの抽出方法も、DNA溶液は最後エタノール沈殿にて精製した。FFPE DNA収量は、組織切片面積あたりで評価した。質については、ラット及びヒトの *glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (Gapdh or GAPDH)* 遺伝子の定量PCR (qPCR) を行い、凍結組織由来のDNAを1とする相対値で表記した。

③FFPEによる人工変異

3頭のラット肝臓組織を10%ホルマリン中性緩衝液で4日間固定したFFPE組織と新鮮凍結組織とからDNAを抽出し、比較した。4例のヒト大腸癌の肝転移切除例の非癌部正常肝組織を同様に固定したFFPE組織とその新鮮凍結組織とからDNAを抽出し、比較した。KRASコドン12および13の3箇所のG>A変異について、ラット *Kras* はSYBR green allele-specific qPCRを構築し、ヒト *KRAS* はTaqMan mutation detection assayにより定量評価した。同じヒト肝臓組織については、409がん関連遺伝子のアンプリコンについても、次世代シーケンサーを用いて変異解析を行った。

(2) 肝臓癌と前癌病変

①ラット肝臓癌自然発症モデル

Long Evans Cinnamon (LEC) ラット4週齢, 13週

齢, 25週齢, 73週齢, 97週齢より各臓器を採取し、凍結及びホルマリン固定し保存した。コントロールとして4週齢正常肺, 4週齢の肝炎のない肝臓, 73週齢の肝内胆管癌, 及びその非癌部慢性肝炎組織, 97週齢の肝細胞癌の5検体からDNAを抽出し、次世代シーケンサーを用いて全ゲノム解析を行った。

②ヒト肝細胞癌早期再発症例の非癌部と癌組織

C型肝炎ウイルス陽性の初期肝細胞癌で、2年以上早期再発例3例を対象に、初発癌切除時の癌部および非癌部FFPEを用いた。薄切切片からレーザーマイクロダイセクションにて標的部位（前癌病変様組織部位及び癌部）を採取し、DNAを抽出する。409がん関連遺伝子のアンプリコンから、次世代シーケンサーによる変異解析を行う。

(3) 多様な乳癌および増殖性病変

48歳乳癌症例で、乳管癌と小葉癌が同時発生していた症例を対象とした。組織病理学的検討から、主要な腫瘍部位には隣接して浸潤性小葉癌 (ILC), 非浸潤性小葉癌 (LCIS), 浸潤性乳管癌 (IDC), 非浸潤性乳管癌 (DCIS) がみられ、8cm離れた摘出辺縁部には非浸潤性乳管癌 (DCIS-2) が、また乳房全体には乳管内上皮増殖性変化 (AT) が観察された。各部位及び正常乳管上皮 (NB) をFFPEからレーザーマイクロダイセクションにて採取し、また乳房正常皮膚 (S) 及び正常腋窩リンパ節 (LN) はFFPE薄切切片を採取し、DNAを抽出した。上記のうち、ILC, IDC, DCIS-2, LNの4部位について409がん関連遺伝子のアンプリコンシーケンスを行った。

(4) 口腔内扁平上皮癌と異形成病変

62歳男性の舌扁平上皮癌症例を対象とした。腫瘍部には浸潤度分類が異なる癌組織像YK-2, YK-3, YK-4Cが混在し、周囲には異形成病変 (DP) が観察された。これら癌部及びDP, 健常舌上皮 (NE) をFFPEからマイクロダイセクションにて採取し、また健常結合組織 (C) をコントロールとしてFFPE薄切切片より採取し、DNAを抽出した。このうち、YK-2, YK-3, DP, NE, Cの5検体について、409がん関連遺伝子のアンプリコンシーケンスを行った。

(5) 多臓器転移腫瘍

77歳男性, 入院時生検にて肺小細胞癌と診断さ

れ治療を開始したが、2ヶ月後死亡。剖検にて肺小細胞癌の多臓器転移が認められた症例を対象とした。原発生検肺癌組織と剖検肺癌組織、転移癌組織として肺門リンパ節、縦隔、肝臓の右葉と左葉、胸骨、腰椎の6カ所について、FFPE薄切切片からレーザーマイクロダイセクションにて材料を採取した。コントロールとして健常な腎組織を、FFPE薄切切片から採取した。各材料からDNAを抽出し、50個のがん体細胞変異のホットスポットについてアンプリコンシーケンスを行った。得られた結果についての検証は、直接塩基配列決定で定性評価し、TaqMan SNP genotyping assay、及びTaqMan mutation detection assayを用いたqPCRで定量評価した。

なお当該遺伝子解析研究については、医学部及び松戸歯学部倫理委員会にて承認を受け実施している。また動物実験についても、日本大学動物実験実施規程に基づき実施している。

3. 結果と考察

(1) FFPE DNAの特徴³⁾

①ホルマリン濃度と固定時間

ラット肝臓組織を10%および20%ホルマリン中性緩衝液で1日固定した結果、抽出DNAの質をqPCR値で評価すると、凍結組織DNAを1とした場合平均0.17および0.06となった。DNAの質はかなり低下し、20%固定ではその低下が著しいことがわかった。また10%ホルマリン中性緩衝液で1日、2日、3日、4日の固定を比較すると、平均0.22, 0.20, 0.17, 0.15と徐々に低下し、パラフィン包埋ではそれぞれ、0.10, 0.06, 0.05, 0.03と更に質は悪化した。

病院病理検査室のヒト生検組織FFPEでも、10%ホルマリン中性緩衝液固定では平均0.18に対し、20%ホルマリン固定では平均0.004と、著しく質は低下していた。以上のように、遺伝子検索には組織固定液として、10%ホルマリン中性緩衝液を用いる必要性が示された。

②DNA抽出条件

FFPE DNA抽出法をDNA収量とqPCR値で評価した結果、マニュアル法が最も優れていた。キット4社のうち2社は、マニュアル法と変わらないqPCR値を示したが、DNA収量が約60%と低かった。他の1社はプロトコルを改変することにより、qPCR値に改善がみられ、量質ともにマニュアル法に匹敵

する方法であった。マニュアル法に比べ、短時間でできることから、以後、FFPE DNAの抽出には、このキットを改変プロトコル下で使用した。その改善点は、マニュアル法と同様、組織溶解後、95°C 30分処理を追加することである。この熱処理を行った後DNAを抽出した場合は、行わずに抽出した場合に比べ、ラット組織で平均2.8倍、ヒト組織でも平均2.2倍のqPCR値の上昇を認めた。回収されるDNA量には、熱処理の有無で変化はなかった。

③FFPEによる人工変異

ラット肝臓組織及びヒト肝臓組織について、それぞれ3例と4例のFFPE DNA：新鮮凍結組織DNAのペア解析をした。KRAS変異で知られるコドン12および13の3箇所のG>A変異は、1%以上の頻度では起こっていなかった。FFPEによるKRAS人工変異については、大腸癌症例で報告がある⁴⁾。平均4.6回の反復検査を行うと、4.7% (53サンプル) で再現性のない結果がでるといえる。アンプリコンサイズを変えると消えてしまうことより、人工変異と言っている。本研究のように一定の固定条件下で、変異頻度を測定した報告はない。10%ホルマリン中性緩衝液で4日間までの固定であれば、1%の頻度では起こらないといえる。但し、ごく限られたピンポイント遺伝子での検討で限界はある。そこで、更に網羅的に調べるため、同じヒト肝臓組織4ペアについて409がん関連遺伝子のアンプリコンを次世代シーケンサーで読んでみた。約200万塩基配列を約500回カバーするように読んでみた。FFPE側に優位に検出される変異—single nucleotide variant (SNV) /insertion and deletion (INDEL) /multiple nucleotide variant (MNV)—は数十見つかった。そのうち6個は2例もしくは3例に共通の変異であった。頻度も3%—30%と高かった。100—400回読んで3%—4%の頻度で見つかる変異も5個見つかった。T>C (3), C>A (4), A>T (2), G>C (1), G>A (1)と置換の種類は様々で、遺伝子座位も染色体1, 3, 5, 6, 7, 14, 19, Xと散在していた。一方コピー数変化 (CNV) も複数箇所見付き、すべて増幅であった。中には2例で共通する箇所もあった。新鮮凍結組織DNAでは増幅しにくいところでも、FFPE DNAでは他の領域同様に、平均的に増幅できる変化が起きている可能性がある。

以上より、FFPE DNAはホルマリン固定の段階

で、明らかに質の低下を起こすことがわかった。150bpサイズのPCRでも約1/10近くにまで、効率は下がっていた。断片化や化学修飾による変化がその原因と考えられる。一方でそのようなDNAを鋳型に次世代シーケンシングすることは、可能であることが示された。しかしミスリードする可能性も示唆された。今後、これらを検証し、ミスリードの頻度や特徴を明らかにする必要がある。

(2) 肝臓癌と前癌病変

①ラット肝臓癌自然発症モデルにおける前癌病変と肝細胞癌と胆管癌の全ゲノム比較⁵⁾

LECラットは、銅輸送ポンプ*Atp7b*遺伝子の一部欠失による、ヒトウィルソン病のモデル動物である。と同時に、肝臓癌自然発症モデル動物でもある。肝への銅異常蓄積が、慢性肝障害とその再生の繰り返しを促し、高率に肝臓癌をもたらしと考えられている。しかし、LECラットにおける癌の発生・進展に関わる遺伝子変異はまだ明らかになっていない。本研究では、LECラットの様々な病態の新鮮凍結肝組織からDNAを抽出し、全ゲノムシーケンス解析により遺伝子変異候補を明らかにする。さらにこれら候補遺伝子のミクロゲノミクス解析から、前癌病変の有無、その局在と組織像を明らかにする。今回は、5検体—正常肺、肝炎のない肝組織、慢性肝炎のある非癌部肝組織、肝細胞癌、肝内胆管癌—の比較ゲノミクスを行った。

平均リード数1,075,293,298、平均マップ率97.9%で変異解析を行ったところ、5検体でそれぞれ約440万ヶ所のhomozygousなSNVが検出された。INDELは平均43万個、structural variantは平均14万個に及んだ。これら変異の数は、検体間で大きな差はなかった。LECラットはレファレンスであるBrown Norway (BN) ラットに対し、大きな系統間の差を有していると思われた。これらの変異のうち5検体に共通した変異が、既知の癌関連遺伝子3つに見つかった。染色体安定性、DNA二本鎖切断修復に必要な遺伝子、細胞増殖や癌への形質転換に関わる遺伝子、DNAのメチル化に関与する遺伝子である。これらの変異は、いずれも機能変化をもたらす変異であった。更には、細胞増殖制御やDNA修復などが癌抑制的な遺伝子5つで、ナンセンス変異またはノンストップ変異が見られた。このように、LECラッ

トは、*Atp7b*の欠失だけでなく、複数の遺伝子の変化をもち、易発がん性の背景をもつ可能性が示された。

肝細胞癌に特異的な変異として、26.1%の頻度で細胞周期関連遺伝子が1つ見つかった。G2/M期への移行に必要な遺伝子であるが、一方他のタンパク質と複合体形成し、他遺伝子の発現制御や癌抑制の役割も担っている。更に、ヒトの複数の癌でその発現が低下しているとの報告もあり、肝細胞癌の発現にこの遺伝子変異が関与している可能性が示された。一方、肝内胆管癌においては非癌部と共通して、約50%の頻度で、変異がある遺伝子が見つかった。が、機能は未だに不明である。肝内胆管癌特異的な遺伝子変異は見つかっていない。

このように、LECラットの発癌メカニズムは特定の遺伝子のSNVだけでは説明できず、遺伝子の転座や欠失、重複など、よりダイナミックな変異が関与する可能性がある。また高メチル化に関与する遺伝子が、5検体共通の変異をもっていたことより、エピジェネティックなレベルで癌に関連する遺伝子の発現量変化が、易発がん性に関与しているかもしれない。

②ヒト肝細胞癌早期再発症例の非癌部前癌病変様組織と癌組織における変異比較

C型肝炎ウイルス陽性の初期肝細胞癌で早期再発例では、初発癌切除時の非癌部および癌部周囲にCK19陽性細胞の増生がみられる。これは前癌病変様領域と思われる部位で、これらの領域および癌部領域を、FFPE薄切切片からレーザーマイクロダイセクションにて採取し、変異解析を行う。これによって、前癌病変に特徴的な変異を明らかにする。今回は、対象症例3例のFFPE DNAが、次世代シーケンサー解析の対象となりうるかを検討した。3つの癌部FFPE DNAについて、10%以上の頻度で見つかる変異は、各9個、9個、5個で、そのうち3個は共通変異であった。対象3症例のFFPE DNAは今後解析可能であること、候補となる遺伝子変異が複数あること、また頻度は低い共通変異が存在する可能性も示唆された。今後、対照となる各症例の非癌部と比較し、変異候補を明確にする必要がある。またミクロゲノミクスを実施すれば、非癌部の詳細な解析により、前癌病変における変異の有無も明確にできる。

(3) 多様な乳癌および増殖性病変⁶⁾

乳管癌と小葉癌が同時発生した乳癌の乳房全摘症例から、ILC, IDC, DCIS-2, LNの4部位について、409がん関連遺伝子のアンプリコンを平均470回(429-514回)の深さで読んだ。LNを対象としてペア解析し、3つの癌の変異を比較した。合計74個のSNV/INDEL/MNVと4箇所のCNVが見いだされた。100回以上読んで変異頻度10%以上のもので、かつLNでは変異0であった遺伝子は、5個となった。ILCに2個、IDCに1個、DCIS-2に3個見つかった。IDCの1個はILCと共通であった。またコピー数変化については、3つの癌に共通する増幅が1か所、ILCとDCIS-2に共通の欠失が1か所、ILCにはさらに単独の欠失が2か所見出された。

これらの変異から癌の分子進化を予測することができる。IDCは最も初期の癌クローンを維持し、第一変異をもつ。が、それ以上の進化はみつからない。一方ILCは、同じ第一変異をもつが、その変異部位を含む染色体領域を欠失する。その際、変異型アレルと野生型アレルは、ランダムに欠失するため、2種類の細胞クローンが生じる。半分は変異のない欠失クローンとなり、その一部がDCIS-2へと進化するとも考えられる。DCIS-2は独自の変異を獲得しその細胞クローンは多様である。その3変異のうち2変異は、癌にみられる典型的な変異で、同じポジションのアミノ酸変異は、変異陽性例の中の6割から9割を占める。これらの変異が第2の場所へ住処を変えるきっかけになったかもしれない。ILCは、IDCのそばではあるが、さらに染色体2カ所の欠失および遺伝子変異を起こす。これらの3つの癌の起源は1つであるとも考えられ、多様な変異により多様ながん細胞クローンを生み出していると思われる。IDCとILCの分岐点で、ILCとDCIS-2の分岐点で、それぞれに特異的な変異がこれらの進化を決めている可能性がある。今後、これらの変異を検証するとともに、他のDCIS部位、散在するATについてもこれらの変異についてqPCR系を構築し検討する。多様な組織像がみられたこの症例について、前癌病変から癌への進化を明確にすることができると思われる。

(4) 口腔内扁平上皮癌と異形成病変⁶⁾

浸潤度分類が異なる癌組織像が混在する舌扁平上

皮癌症例について、YK-2癌、YK-3癌、DP異形成病変、NE健常上皮、C健常結合組織の5検体DNAを対象に、409がん関連遺伝子のアンプリコンを平均440回(323-565回)の深さで読んだ。Cを対象としてペア解析し、2つの癌とDP、NEの変異を比較した。合計178個のSNV/INDEL/MNVと15箇所のCNVが見いだされた。100回以上読んで変異頻度10%以上のもので、かつCでは変異0であった遺伝子は、9個となった。DPに1個、YK-2癌部に5個、YK-3癌部にも5個の変異を見つけた。癌部2領域に共通の変異は2個見つかった。コピー数変化CNVもYK-2癌部に9領域、YK-3癌部に8領域見付き、そのうち2領域は共通であった。YK-2では欠失が7領域と多く、YK-3では増幅が5領域と多かった。

これらの変異から各部位の細胞クローンの分子進化を予測することができる。今回のDPはYK-3に隣接するが、独自の変異をもち、癌部と共通する変異はなかった。他の部位のDPを検討する必要がある。1.5 cmしか離れていない2つの癌部でも、単一クローン性と他クローン性の両者をもち合わせていた。2つの共通変異も、中心部のYK-2では0.64と0.37の頻度であるのに対し、舌先端に近い部位のYK-3では0.41と0.28の頻度となっていた。独自の変異3つについては、それぞれ、YK-2では0.38, 0.30, 0.17であるのに対し、YK-3では0.28, 0.21, 0.15であった。変異の頻度の高い順から、変異が蓄積されていったと考えると、中央部YK-2の近くに、共通変異2つと共通領域の増幅と欠失をもつ細胞が起源となり、YK-2とYK-3が進化して生じたと思われる。途中で獲得する変異が異なり、同時期に別の遺伝子変異を生じて進化していったと考えられる。それら独自の変異の中には、浸潤度の違いを説明できる遺伝子変異があるかもしれない。今後、これらの変異を検証すると同時に、YK-4C癌部や他の部位の癌部、DPも検討すれば、同一症例内の癌および前癌病変について、分子進化を明らかにすることができる。

(5) 生検原発腫瘍と剖検時の多臓器転移腫瘍⁷⁾

多臓器に転移を示した肺小細胞癌症例について、2つの原発癌組織と6カ所の転移癌組織、そして健常腎組織からDNAを抽出した。qPCR値は、生検原発腫瘍が0.08に対し、剖検転移腫瘍は、0.001-0.02

と著しく低下していた。それでも、生検原発腫瘍に加え肝転移腫瘍、健常腎組織からのDNAでアンブリコンシーケンスをすることができた。qPCRにて検証した結果、検出された変異候補には擬陽性もあったが、全ての癌組織で *TP53* の点突然変異を認めた。しかもヘテロ接合型よりホモ接合型の異変がメジャーとなっていた。更に *KIT*, *PDGFRA*, *KDR*, *FLT3* の4遺伝子に mono-allelic loss を認めた。また、これらの4遺伝子5領域に bi-allelic loss を認め、その頻度と組み合わせは癌組織により異なっていた。なお *PDGFRA* 遺伝子内では2カ所のSNPで個別に allelic loss を検出したので、それぞれを *PDGFRA* (c), *PDGFRA* (g) と区別した。以下にその bi-allelic loss パターンを示す。

肺生検：*PDGFRA* (c)

縦隔と肝臓：低頻度で *KIT*+*PDGFRA* (c)

肺門リンパ節：*KIT*+*PDGFRA* (c) +*PDGFRA* (g)

胸骨：*KIT*

腰椎：*KIT*+ *PDGFRA* (c) +*PDGFRA* (g) + *FLT3*

肺剖検時：*KIT*+*PDGFRA* (c) +*PDGFRA* (g)

+*FLT3*+*KDR*

この結果からがんの進化について、以下のように考察できる。肺で発生した原発腫瘍は、4遺伝子5領域の mono-allelic loss と *TP53* 点突然変異をヘテロおよびホモ接合型でもち、一部は *KIT* および *PDGFRA* (c) の bi-allelic loss も起こっていたと思われる。縦隔、肝臓、胸骨には、これら bi-allelic loss 頻度の低い段階で、腫瘍細胞が転移した。その後、原発肺腫瘍を含め、各臓器で独自のクローン選択があり、bi-allelic loss が加わっていた。肺の原発巣では剖検に至るまでに、*PDGFRA* の2領域と *KIT*, *FLT3*, *KDR4* を加えた計5領域に bi-allelic loss をもつ変異が蓄積し、各発生途中段階のクローンが、肺門リンパ節や腰椎に転移したと考えられる。

以上のように、原発腫瘍と転移腫瘍の、多領域での bi-allelic loss パターンを比較することにより、本症例でのがんの進化過程が示唆された。

4. 結 語

FFPE DNA について、評価方法を確立し、次世代シーケンサー解析できる条件を見つけた。これは、

FFPE DNA が PCR を基礎とするあらゆる解析に応用できることを示す。今後、病理検体を用いた遺伝子診断に、大いに利用できる技術を確立したことになる。また、がんの heterogeneity から分子進化を導き出すことも、生検例だけでなく、剖検例からも可能であることを示した。

今回、目的半ばとなっている癌症例については、見いだした変異について qPCR 系を構築し、複数の前癌病変や部位の異なる複数の癌について変異定量することになる。最終的には、検索組織内に分布する多様な病変の分子進化を明らかにし、各癌の形質にかかわる driver mutation を導き出し、今後の診断、治療に役立つ分子を明らかにする。

文献及び学会発表

- 1) Vogelstein B, Papadopoulos N, Velculescu VE, Zhou S, Diaz LA, Jr., Kinzler KW: Cancer genome landscapes. *Science* **339**:1546-1558, 2013.
- 2) Gerlinger M, Rowan AJ, Horswell S, Larkin J, Endesfelder D, Gronroos E, Martinez P, Matthews N, Stewart A, Tarpey P, Varela I, Phillimore B, Begum S, McDonald NQ, Butler A, Jones D, Raine K, Latimer C, Santos CR, Nohadani M, Eklund AC, Spencer-Dene B, Clark G, Pickering L, Stamp G, Gore M, Szallasi Z, Downward J, Futreal PA, Swanton C: Intratumor heterogeneity and branched evolution revealed by multiregion sequencing. *N Engl J Med* **366**:883-892, 2012.
- 3) Einaga N, Yamaguchi H, Yoshida A, Suemitsu M, Noda H, Kawaji Y, Hirofumi Y, Esumi M: Mutation analysis of DNA extracted from formalin-fixed, paraffin-embedded (FFPE) tissues. 第37回日本分子生物学会年会, 横浜, 11月, 2014.
- 4) Lamy A, Blanchard F, Le Pessot F, Sesboue R, Di Fiore F, Bossut J, Fiant E, Frebourg T, Sabourin JC: Metastatic colorectal cancer KRAS genotyping in routine practice: results and pitfalls. *Mod Pathol* **24**:1090-1100, 2011.
- 5) Yamaguchi H, Einaga N, Nakayama Y, Esumi M: Liver cancer genomics of Long Evans Cinnamon (LEC) rat. 第74回日本癌学会総会学術集会, 名古屋, 10月, 2015.
- 6) Esumi M, Noda H, Suemitsu M, Kuyama K, Masuda S: Molecular evolution of cancer and cancer-related regions investigated by genomics of microdissected FFPE samples. 第74回日本癌学会総会学術集会, 名古屋, 10月, 2015.
- 7) Yoshida A, Obana Y, Nagaoka M, Tokuhashi Y, Esumi M: Cancer genomics in multiple metastatic tumors of small cell lung cancer by using microdissected FFPE samples. 第73回日本癌学会学術総会, 横浜, 9月, 2014.

気管支喘息の病態形成と 細菌鞭毛タンパク フラジェリンの役割

丸岡秀一郎¹⁾, 権 寧博¹⁾, 岡山吉道²⁾

The role of bacterial flagellin in the pathogenesis of asthma

Shuichiro MARUOKA¹⁾, Yasuhiro GON¹⁾, Yoshimichi OKAYAMA²⁾

要旨

気管支喘息は、遺伝因子と環境因子が相互作用し、病態を形成している。ハウスダストは、喘息を誘導する代表的な環境因子である。筆頭著者は、ハウスダストの中に細菌構造物質フラジェリン(FLA)が存在すること、抗原に対するアジュバント効果を有し、マウスに喘息様病態を引き起こすことを報告した。本研究の目的は、血清中抗FLA抗体を用いて、ヒト喘息病態におけるFLAの臨床的意義を見出すことである。喘息患者群及び健常者群の血清中抗FLA抗体を測定し、比較検討した結果、統計学的有意差を認めなかったが、喘息患者の抗FLA抗体高値群と低値群の比較では、気道流速制限(50%肺活量及び25%肺活量の気量位における気速)に有意差を認めた。抗FLA抗体は喘息病態を把握するバイオマーカーとしての可能性が示唆されたが、更なる検討を要すると考えられる。

1. はじめに

気管支喘息は、遺伝要因と環境要因が相互作用することにより自然免疫反応及び獲得免疫反応に影響を与え、アレルギー性気道炎症、気道粘液産生亢進、気道過敏性亢進、気管支平滑筋収縮などを引き起こし、喘鳴を伴う呼吸困難を生じる疾患である。これまで様々な環境因子が発症及び増悪因子として研究されている。中でもハウスダストは、ダニ抗原をはじめとしたアレルゲンや細菌構造物質であるリポ多糖(Lipopolysaccharide:LPS)などを含有し、喘息の発症機序において最も強く関連が指摘されている環境因子である。筆頭著者は、ハウスダストの中に細菌の鞭毛構造物質フラジェリン(FLA)が存在し、喘息の病態に関与することを報告した¹⁾。また、FLAは、抗原(卵白アルブミン)に対するアジュバントとして働き、マウスに喘息様病態(アレルギー性気道炎症、気道粘液産生亢進、気道過敏性亢進など)を引き起こす。更に、軽症から中等症の喘息患者の血清中の抗FLA抗体を測定したところ健常者

群よりも有意に増加していたことから、診断、治療への応用が期待できる結果となった。しかし、検体数が限られていたこともあり、詳細な検討が必要であった。

近年、気管支喘息発症メカニズムに外来病原細菌だけではなく、生体内の細菌叢(気道、腸管など)が深く関与しているとの報告が相次いでいる²⁾。鞭毛を有する細菌は、生体内の細菌叢にも存在していることから、FLAがハウスダストを介して外部からだけではなく生体内からも喘息発症に影響していることが推測される。本研究の目的は、血中抗FLA抗体を測定することによりFLAがどのように生体に作用し、喘息を発症させているのかを明らかにするとともに診断、治療につながる臨床的意義を見出すことである。

2. 対象及び方法

1) 対象

日本大学医学部附属板橋病院呼吸器内科に通院

1) 日本大学医学部内科学系呼吸器内科学分野
2) 日本大学医学部医学教育企画推進室
丸岡秀一郎: maruoka.shuichiro@nihon-u.ac.jp

し、呼吸器専門医が喘息と診断した喘息患者群 (n=63) 及び非喘息患者群 (健常ボランティアを含む) (n=18) を対象とした。健常ボランティア及び患者からの血液採取に際しては、被験者より文書同意を取得し、「臨床研究に関する倫理指針」及びヘルシンキ宣言を遵守する。検体採取の対象、方法、検体の保管管理、患者情報の管理、情報開示などに関するあらゆる項目を日本大学医学部の倫理委員会の承認を受けるとともに日本大学医学部附属板橋病院臨床研究審査委員会の承認後、施行した。

2) 呼吸機能検査

呼吸機能検査は、日本大学医学部附属板橋病院、呼吸機能検査室においてCHESTAC-8800 (チェスト社、東京) を用いて測定した。測定項目は以下の通りである。肺活量: vital capacity (VC), 努力肺活量: forced vital capacity (FVC), 1秒率: forced expiratory volume % in 1 second (FEV_{1.0}) / FVC × 100, 気道気流制限は、50% VCの気量位における気速: flow at 50% FVC (V₅₀), 25% VCの気量位における気速: flow at 25% FVC (V₂₅), V₅₀/V₂₅。

3) Enzyme-linked immunoassay法による抗FLA抗体測定

リコンビナントFLA (invivoGen, CA, USA) を96ウェルプレートに100ng/ウェルの濃度で固相化し、一晚4°Cで静置した。検体 (血清500倍希釈) を添加し、攪拌しながら2時間反応させる。洗浄後、0.5ug/mlのhorseradish peroxidase conjugated anti-human IgG (Thermo Scientific, MA, USA) を添加し、1時間後、洗浄した。SureBlue TMB Microwell Peroxidase Substrate (KPL, MD, USA) を加え攪拌し、反応停止液を添加し、MULTISKAN GOマイクロプレートリーダー (Thermo Scientific, MA, USA) を用いて吸光度450nmで測定した。

データは、平均値±標準誤差値 (SEM) で記載した。実験群間の統計学的有意性は、Mann-Whitney U検定を用いて評価し、P < 0.05を有意とした。データはGraphPad Prism Software, (La Jolla, CA) を用いて解析した。

3. 結果

喘息患者群及び健常者群の血清中抗FLA抗体を測定し、比較検討した結果、統計学的有意差は認められなかった。また、喘息患者の抗FLA抗体値を中央値で高値群 (high) と低値群 (low) に分け、一秒率を比較検討したところ、有意差を認めなかった (図1)。しかし、気道気流制限で比較したところ、50% VCの気量位における気速 (V₅₀) (p=0.0178), 25% VCの気量位における気速 (V₂₅) (p=0.0096) で、統計学的有意差を認めた (図2)。末梢気道気流制限をより反映するといわれているV₅₀/V₂₅については統計学的な有意差は認められなかった (図2)。

4. 考察

今回、喘息患者群の血清中抗FLA抗体値は、非喘息患者群の血清中抗FLA抗体値と比較して、有意な上昇は認めなかった。しかし、喘息患者の血清中抗FLA抗体値が高値のときは、気道の気流制限を認める可能性が示唆された。

筆頭著者が行った先行研究では、軽症から中等症の喘息患者12人、健常ボランティア12人の血清中抗フラジェリン抗体のみを測定した。呼吸機能を含めた臨床データとの相関関係については検討がなされていなかったため、今回、同様の測定方法を用いて、抗FLA抗体測定及び呼吸機能を比較検討した。先行研究¹⁾の結果では、喘息患者群の抗FLA抗体値は、健常群と比較して有意に上昇が認められたが、

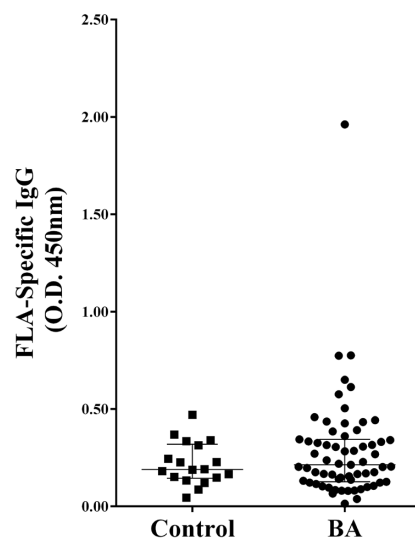


図1 非喘息群 (Control), 喘息群 (BA) の血清中抗FLA抗体値の比較

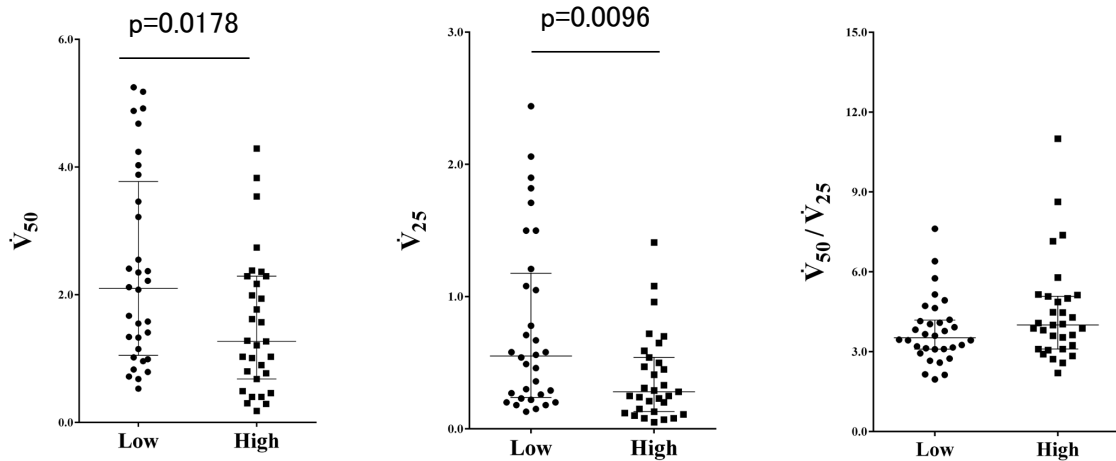


図2 喘息患者の血清中抗FLA抗体値による気道気流制限の変化

本研究では認められなかった。この結果の相違を認めた要因は、先行研究の対象喘息患者は軽症から中等度の喘息であり、無治療および気管支拡張薬単剤の治療が中心であったのに対し、本研究では、喘息患者のほぼ全例が吸入ステロイド単剤あるいは吸入ステロイド、長時間作用型気管支拡張薬合剤による治療介入があり、安定期にある患者が中心であった。治療による改善が、抗FLA抗体値の先行研究の結果との相違の原因と考えられる。今後は、継続して症例数を積み重ねていくとともに治療導入前と

導入後及び発作時と非発作時についても比較検討を行う予定である。

文 献

- 1) Wilson, R.H., *et al.* The Toll-like receptor 5 ligand flagellin promotes asthma by priming allergic responses to indoor allergens. *Nature medicine* **18**, 1705-1710 (2012).
- 2) Hansel, T.T., Johnston, S.L. & Openshaw, P.J. Microbes and mucosal immune responses in asthma. *Lancet* **381**, 861-873 (2013).

健常者におけるHolter ECGを用いたT波オルタナンスの 日内変動と心拍数及び自律神経活動との関連

橋本賢一¹⁾, 笠巻祐二²⁾, 奥村恭男²⁾, 大久保公恵²⁾, 中井俊子²⁾, 國本 聡²⁾,
渡辺一郎²⁾, 平山篤志²⁾, 永島正明³⁾, 中山智祥³⁾, 小澤友紀雄⁴⁾, 相馬正義¹⁾

Circadian variation of Holter-based T wave Alternans and association with heart rate and autonomic nerve system in normal heart subjects

Kenichi HASHIMOTO¹⁾, Yuji KASAMAKI¹⁾, Yasuo OKUMURA²⁾, Kimie OKUBO²⁾,
Toshiko NAKAI²⁾, Satoshi KUNIMOTO²⁾, Ichiro WATANABE²⁾, Atsushi HIRAYAMA²⁾,
Masaaki NAGASHIMA³⁾, Tomohiro NAKAYAMA³⁾, Yukio OZAWA⁴⁾, Masayoshi SOMA¹⁾

要旨

【背景・目的】

マイクロボルトレベルT波オルタナンス(TWA)は心臓突然死や致死性心室性不整脈のリスク層別化因子として有用だが、TWA日内変動と心拍数、自律神経活動との関連に関する検討はない。

【方法】

心臓健常者30人を対象としてのスペクトラル法によるTWAの解析をHolter ECGを用いて行った。

0-6時(A)、6-12時(B)、12-18時(C)、18-24時(D)各区間から、最大値をMaxオルタナンス値とした。同時にRR intervalより周波数解析による心拍変動解析を行った。

【結果】

12-18時(C)がTWA値 $20.47 \pm 8.31 \mu V$ と最大で、0-6時(A)が $8.1 \pm 2.4 \mu V$ で最低であった(A vs. C; $P < 0.0001$)。

TWAとLF/HFと心拍数(HR)の間に正相関を認めた($p < 0.0001, r = 0.462$) ($p < 0.0001, r = 0.5970$)。

【結論】

健常者におけるTWAは日内変動を有しHRによる影響と交感神経指標と相関を認めた。

1. 背景

心臓突然死(Sudden cardiac death) SCDには日内変動があり、午前から午後の比較的早い時間の死亡率が高く、夕方から夜間にかけては死亡率が低い^{1, 2)}。SCDの原因疾患として最も頻度が高いものは虚血性心疾患(Ischemic heart disease; IHD)であり、35才以上のSCD剖検例による検討では76%にIHDが認められる事が報告されている³⁾。人間がSCDに至る厳密な発症メカニズムやトリガーの詳細はまだ分かっていないところが多いが、自律神経や血圧、心拍数の日内変動が重要な要素の一つである可能性が考えられている²⁾。

心電図上のT波オルタナンスはマイクロボルトレベルのT波のmorphologyの交互現象であり、再分極の異常により電氣的に不安定である事を表している。TWAは心臓突然死や致死性心室性不整脈のリスク層別化因子としてRosenblumら⁴⁾の報告以来有用であるとの報告が多くなされている。すなわち、TWA陽性はIHDにおいて致死性不整脈予知の指標になることや、SCDの予測に有用である^{4, 5)}ことが報告されている。

近年フクダ電子社で新規開発されたHolter心電計により、スペクトラル法のアルゴリズムで24時間TWAが測定可能となった。本法によるTWAの検討

1) 日本大学医学部内科学系総合内科・総合診療医学分野

2) 日本大学医学部内科学系循環器内科学分野

3) 日本大学医学部病態病理学系臨床検査医学分野

4) MJG心血管研究所

橋本賢一: E-Mail: hashimotok@ndmac.ac.jp

は検査精度そのものを高くする可能性があると考えられる。

一方、TWAは心拍数(HR)増加や自律神経の影響を受けることが報告されている。ペースングや、運動負荷により心拍数を増加させたり、メンタルストレスによりTWAが上昇したり、 β blockerでTWAが減弱することが示されているが^{6, 7)}、日常生活での健常者におけるTWAと心拍数の増加、自律神経との関連は現在まで明らかではない。

さらに我々の調べた限りではHRVでTWAと自律神経の各パラメータとの関連性を定量的に評価した研究はない。

2. 方法

1) 対象患者

日本大学板橋病院に胸部症状(i.e. 胸痛, 動悸, 背部痛, めまい, ふらつき, 失神)のため受診した81人にHolter ECGを施行した。

標準12誘導心電図, 胸部レントゲン, 心エコー図検査にて明らかな異常を認めず, ホルター心電図検査で心室期外収縮が500回/日以下の患者がエントリーされた。

2) Holter ECG 計測

本研究ではルチーンのHolter ECG解析(総心拍数, 最大心拍数, 最小心拍数, 平均心拍数, 心房期外収縮, 心室期外収縮数, ST-T変化の評価), TWA解析, HRVによる自律神経活動の計測はすべてHolter ECG 端末FM180S (Fukuda Denshi Co, Ltd, Tokyo Japan) を使用し, 解析は専用解析器SCM 8000 (Fukuda Denshi Co, Ltd, Tokyo Japan) を使用した。

3) TWA 計測

本研究のTWA解析はスペクトラル法を用いて行われた。

スペクトラル法によるTWAは以前にも報告されている手法と同様である^{4, 5)}。

0-6時(A), 6-12時(B), 12-18時(C), 18-24時(D)それぞれの時間区間にわけて, alternans値がノイズレベルの3SD以上で約1分以上持続し, かつノイズレベルは $20 \mu V$ 以下の箇所を各時間における最大値をMaxオルタナンス値として採用した。

心拍変動解析 (Heart rate variability: HRV)

これまでに報告されている手法と同様にRR intervalより周波数解析を行い, 心拍変動解析より自律神経活動の評価を行った⁸⁾。

HFに関してはデータが歪曲しているため自然対数によるlog値を求めた(LnHF)。

4) 統計解析

統計解析にはSPSS ver22を使用した。データはすべて平均±標準偏差で表した。

0-6時(A), 6-12時(B), 12-18時(C), 18-24時(D)各区間のMax TWA オルタナンス値の分散分析はANOVAを用いた。

TWAのマグニチュードと自律神経活動(LF/HF, LnHF)及び心拍数の2変量解析はPearsonの相関係数を用いた。P<0.05を統計学的有意とした。

3. 結果

1) 患者背景

胸部症状のため外来を受診した81人中51人は, 虚血性心疾患, 高血圧性心疾患Brugada症候群, 早期再分極症候群, 鬱病, 統合失調症, 房室ブロック, 心室期外収縮(500/日以上), 発作性心房細動による疾患のため除外された。

最終的に30人がエントリーし, 平均年齢 44.5±8.4才(男性18人)であった。

2) TWAの各区間の平均値

6時間区切りの時間帯別 [(0-6時; (A), 6-12時; (B), 12-18時; (C), 18-24時; (D)]の最大オルタナンスは日内変動を認めた(Fig1)。

時間帯(C)がオルタナンス値 $20.47 \pm 8.31 \mu V$ と最大で, 次に時間帯(B)が $16.2 \pm 8.1 \mu V$ で次に(D)のオルタナンス値 $14.2 \pm 6.8 \mu V$, (A)が $8.1 \pm 2.4 \mu V$ で最低であった。(A vs. C; P<0.0001, A vs. B; P<0.001, C vs. D; P<0.001, A vs. ; P<0.05)

3) TWAと自律神経の相関

次に終日におけるTWAのマグニチュードと自律神経活動の指標(LF/HF, LnHF)及びTWAのマグニチュードとHRの相関を検討した。

TWAと交感神経指標(LF/HF)との間に中等度の正相関を認めた(p<0.0001, r=0.462.) (Fig2- (a))。

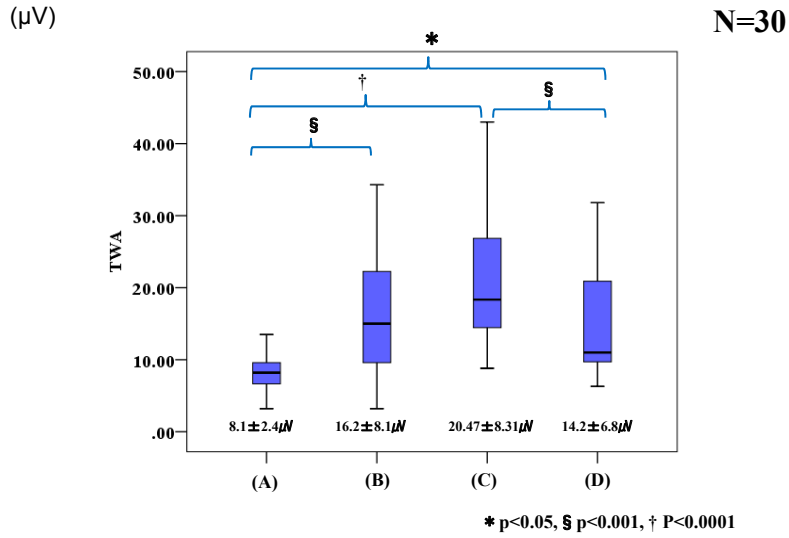


Fig.1 各時間帯のTWAマグニチュード

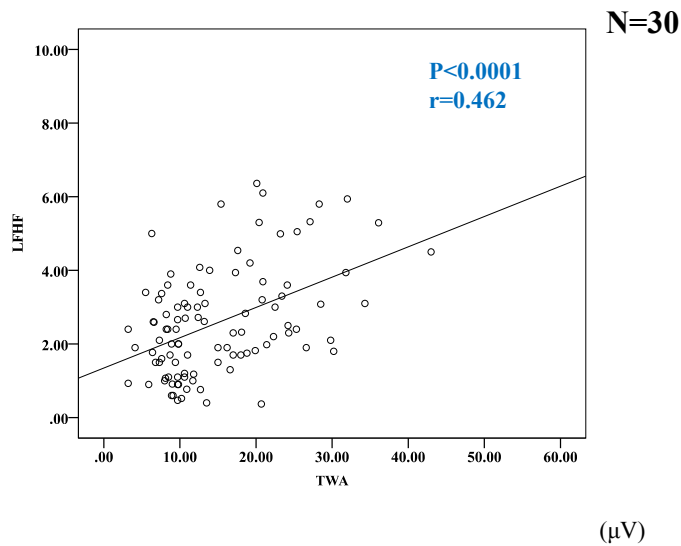


Fig.2 - (a) TWAとLF/HFの2変量相関

一方TWAと副交感神経指標 (LnHF) との間には低い逆相関を認めた ($p < 0.003, r = 0.294$.) (Fig 2- (b)).

また, TWAと心拍数 (HR) との間には正相関を認めた ($p < 0.0001, r = 0.5970$.) (Fig2- (c)).

4. 考察

今回我々は初めてスペクトラル法で24時間のHolter based TWAの検討を行い, 我々が得た主な新しい知見は以下の2つである。

1) M-TWAは日内変動を認め 12-18時, 6-12時, 18-24時, 24-6時の時間帯の順で高く各時間帯において有意差を認めた。

2) TWAはHRと交感神経指標 (LF/HF) と正の相関を認め, 副交感神経指標 HFとは低い逆相関を認めた。

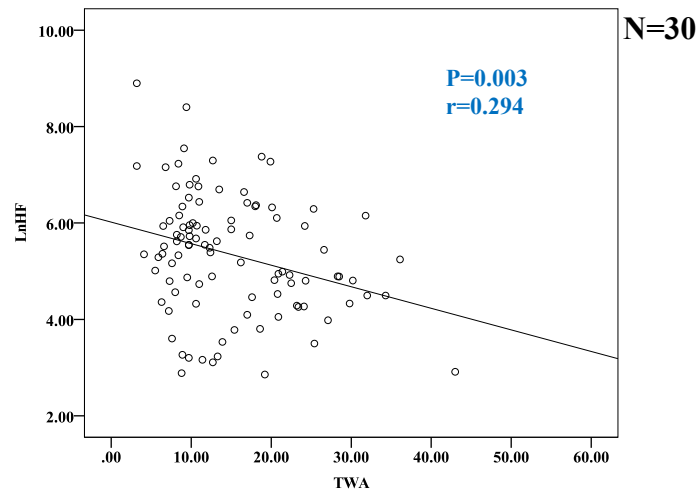


Fig.2 - (b) TWAとLnHFの2変量相関

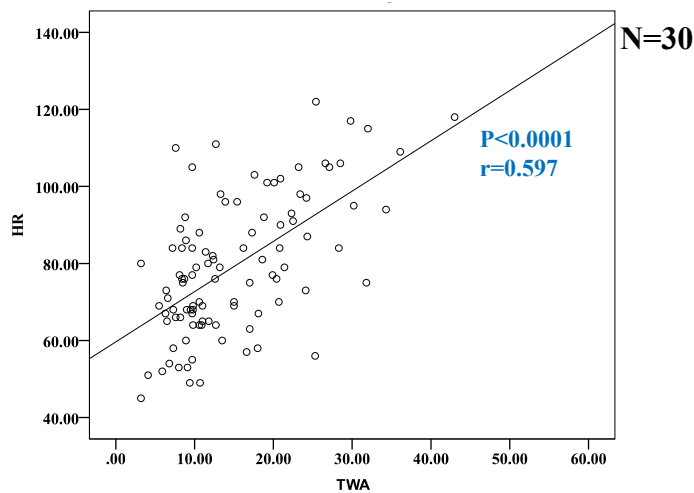


Fig.2 - (c) TWAとHRの2変量相関

1) Holter based TWAの日内変動について

SCD好発時間帯のepidemiologyを研究することは、以下の2つのメリットがあると考えられる。¹⁾ SCDにおけるVF、VT発症のメカニズムやトリガーを解明することにつながる可能性がある。2) 心臓突然死予防や対策の助けとなる。例えば着脱型日中に着用して、夜間とは異なるなどのICDなど、またICD、CRTDなどの動作設定や選択などの心疾患ごと、或いは個々の症例において貴重なデータを提供することとなる。

今回の我々のTWAの日内変動の分布は、SCDの日内変動と似ている。

SCDの最も多い原因はIHDであり⁹⁾、IHD発症時間帯と平行である可能性がある。健常者でTWAの日内変動を明確に報告したのは我々が初めてであり、疾患ごとのSCD発症時間帯の病因を検討する際に基礎的なデータとなるかもしれない。

2) Holter based TWAと自律神経、HRの影響について

今回の我々の検討では24時間日常生活の中でTWAのalternans値は、それぞ

れが自律神経とHRの影響を受けていることを証明した。TWAは原則的に心拍数を110-120 b.p.m.に上昇させて検出し、また、120 b.p.m.以上では偽陽

性の確率も高くなる¹⁰⁾。Smithらは犬の心筋虚血モデル実験で、TWAはHR上昇に伴ってalternans値が上昇することを報告し⁴⁾、また健常人においてもHRはTWAのalternans値に影響を与える因子として最も重要と考えられる¹⁰⁾。心拍数が増加した時にTWAが増加する機序とQu Z¹¹⁾らは以下のように説明している。

Luo-Rudyコンピューターシミュレーションモデルにて、活動電位時間 (APD) と拡張期間隔 (DI) で作成される回復曲線 (restitution curve) は、心拍数の増加によりDIが短縮するに伴って急峻化する。このために心拍数が増加すると、不応期のdispersionが増大し結果としてAPDの交互現象が出やすくなり、心室性不整脈の受攻性が高まる。

前述のように臨床的にも、基礎実験検討でも、TWAは自律神経の影響と、HRによる影響を受けていることはこれまでに報告されている。

TWAと自律神経についての検討でRashabaらの報告では交感神経遮断薬エスモロールはコントロールと比較して有意にTWAを減少させたが、副交感神経遮断薬アトロピンではHR100.109.120すべてのペーシングモードでTWAを変化させなかった⁶⁾。この報告のようにリアルタイムTWAの臨床研究では明らかに自律神経の影響を受けたことが報告されている。

今回の我々の検討はHolter ECGを用いて人間の日常生活の中で、TWAは自律神経の影響、特に交感神経活動、HRによる影響を受けていることを明らかにした。今回の我々のstudyの結果はこれまでの臨床的、基礎実験におけるリアルタイムのTWAでの結果と矛盾しないものであり、これをHolter based TWAにup gradeさせた形で新たな知見が得られたと考える。今後各心疾患における24時間TWAの検討が必要であるが、TWA陽性者はβブロッカーによって心臓突然死のリスクを軽減できる可能性が示唆された。

5. 結 論

健常者におけるTWAには日内変動を認めオルタナンス値は日中が高く夜間に低かった。健常者の制限のない日常生活におけるalternans値の日内変動はHRによる影響と交感神経活動との影響を受けていた。

文 献

- 1) Mahmoud, K. D., B. J. de Smet, et al. (2011). "Sudden cardiac death: epidemiology, circadian variation, and triggers." *Curr Probl Cardiol* 36(2): 56-80.
- 2) Arntz, H. R., S. N. Willich, C. Schreiber, T. Bruggemann, R. Stern, and H. P. Schultheiss. "Diurnal, Weekly and Seasonal Variation of Sudden Death. Population - Based Analysis of 24,061 Consecutive Cases." *Eur Heart J* 21, no. 4 (2000): 315-20.
- 3) Tsukada, T., T. Ikeda, H. Ishiguro, A. Abe, M. Miyakoshi, Y. Miwa, H. Mera, S. Yusu, Y. Yamaguchi, and H. Yoshino. "Circadian Variation in out-of-Hospital Cardiac Arrests Due to Cardiac Cause in a Japanese Patient Population." *Circ J* 74, no. 9 (2010): 1880-7.
- 4) Smith, J. M., E. A. Clancy, C. R. Valeri, J. N. Ruskin, and R. J. Cohen. "Electrical Alternans and Cardiac Electrical Instability." *Circulation* 77, no. 1 (1988): 110-21.
- 5) Rosenbaum, D. S., L. E. Jackson, J. M. Smith, H. Garan, J. N. Ruskin, and R. J. Cohen. "Electrical Alternans and Vulnerability to Ventricular Arrhythmias." *N Engl J Med* 330, no. 4 (1994): 235-41.
- 6) Rashba, E. J., M. Cooklin, et al. (2002). "Effects of selective autonomic blockade on T-wave alternans in humans." *Circulation* 105(7): 837-842.
- 7) Klingenhoben, T., G. Gronefeld, et al. (2001). "Effect of metoprolol and d, l-sotalol on microvolt-level T-wave alternans. Results of a prospective, double-blind, randomized study." *J Am Coll Cardiol* 38(7): 2013-2019.
- 8) Mizumaki, K., A. Fujiki, et al. (2004). "Vagal activity modulates spontaneous augmentation of ST elevation in the daily life of patients with Brugada syndrome." *J Cardiovasc Electrophysiol* 15(6): 667-673.
- 9) Chugh, S. S., J. Jui, K. Gunson, E. C. Stecker, B. T. John, B. Thompson, N. Ilias, C. Vickers, V. Dogra, M. Daya, J. Kron, Z. J. Zheng, G. Mensah, and J. McAnulty. "Current Burden of Sudden Cardiac Death: Multiple Source Surveillance versus Retrospective Death Certificate-Based Review in a Large U.S. Community." *J Am Coll Cardiol* 44, no. 6 (2004): 1268-75.
- 10) Cheung, M. M., A. M. Davis, et al. (2001). "T wave alternans threshold in normal children." *J Cardiovasc Electrophysiol* 12(4): 424-427
- 11) Qu, Z., A. Garfinkel, P. S. Chen, and J. N. Weiss. "Mechanisms of Discordant Alternans and Induction of Reentry in Simulated Cardiac Tissue." *Circulation* 102, no. 14 (2000): 1664-70.

心房細動維持における自律神経叢 (ganglionated plexi) と 心臓周囲脂肪の役割

奥村恭男, 渡邊一郎, 永嶋孝一, 真野博明, 園田和正, 古川力丈,
佐々木直子, 高橋啓子, 磯 一貴, 大久保公恵, 中井俊子, 平山篤志

Role of Ganglionated Plexi and Epicardial Adipose Tissue in the Maintenance of Atrial Fibrillation

Yasuo OKUMURA, Ichiro WATANABE, Koichi NAGASHIMA, Hiroaki MANO,
Kazumasa SONODA, Rikitake KOGAWA, Naoko SASAKI, Keiko TAKAHASHI,
Kazuki ISO, Kimie OHKUBO, Toshiko NAKAI, Atsushi HIRAYAMA

要旨

心房周囲脂肪 (epicardial adipose tissue: EAT) には心臓自律神経叢である ganglionated plexi (GP) が含まれており, この両者と心房細動の病態の進行との関連性が近年示唆されている。本研究では, 心房細動患者40例において, これまでに報告されている5つの主要GP領域に一致して, 三次元構築されたEATが高率に存在することを明らかにした。一方, EAT存在部位では, 実際の心房高頻度刺激により同定されたGPや心房細動の維持に重要とされる心房細動中の分裂電位 (complex fractionated atrial electrogram: CFAE) が高率に認められた。また, 持続性心房細動患者10例において, 拡大肺静脈隔離術施行後, EATに近接した心房内膜へのアブレーションを行うと, 術前に同定されたGP部位でのGP反応はほぼ消失し, 心房細動中の細動周期は大幅に延長した。これらの所見は, EATとGPの密接な関連を示しており, また, これらが心房細動の発症・維持に強く影響している事を示唆している。

1. はじめに

心臓の働きは, 外因性及び内因性自律神経系により支配されている。内因性自律神経系のうち, 心臓周囲に存在する自律神経叢である ganglionated plexi (GP) は, 独自に心房筋に作用し, 心房細動 (AF) の発症・維持に関連していると報告されている^{1,2)}。GPは心房周囲脂肪 (epicardial adipose tissue: EAT) 内に多く存在することが知られているが, 近年, 心房EATもAFの発症・維持に関連しているとの報告が散見される³⁻⁵⁾。しかしながら, 心房EATとGPとの関連性, 及びこれらが如何にAFの発症・維持に寄与しているかは不明である。そのため本研究では, 心房EATとGPがAFの発症・維持に関与する機序を解明するための足掛かりとして, GP存在部位と左房EAT (LA-EAT) との局在を詳細に検討し,

LA-EATの近接する心房筋への高周波アブレーションがGP及びAFの発症・維持に与える影響を調査した。

2. 対象及び方法

AFに対するカテーテルアブレーション目的に入院したAF患者連続40例 (平均年齢 61 ± 10 歳, 男性30例, 発作性AF [PAF] 26例, 持続性AF [PerAF] 14例, 平均左房径 41 ± 6 mm, 平均左室駆出率 $66 \pm 7\%$) を対象とした。全例で, 術前に心臓CTを施行し, CT画像を解析用にZio workstation (ZIO M900 QUADRA; Amin Co, Ltd, Tokyo, Japan) に取り込んだ。-200 ~ -50のHounsfield unitsに基づいてEATを描出し, 心室側から僧房弁輪, 右房側, 冠静脈洞周囲のEATを徒手的に削除して, LA-EAT容積を算出した。ま

た、同時に造影撮像CT画像をEnsite NavXマッピングシステム (St. Jude Medical Inc, Minneapolis, MN) 内のCT構築ソフト (EnSite Verismo; St. Jude Medical) にも取り込み、アブレーション術中に使用する左房 (LA) および肺静脈 (PV) の三次元 (3D) 画像を作成した。さらに、上記と同様の手順で3D構築したLA-EATを、その3D LA及びPV画像上に描出した。

心臓電気生理学的検査

デクスメトミジン、プロポフォール及びフェンタニールの併用による鎮静および鎮痛下に、右内頸静脈から冠静脈洞にカテーテルを留置した。続いて、右大腿静脈から3本のロングシースを挿入し、左大腿静脈から挿入した心腔内エコーガイド下に心房中隔を穿刺後、LA内に20極リング状電極カテーテル (1.5-mm interelectrode distance; Livewire Spiral HP catheter; St. Jude Medical) を挿入した。さらに、Ensite NavXシステムを用いて、リング状カテーテルでLA及び4本のPVの心内膜面を描出し、3D LA/PV画像を構築した。

GPの同定

アブレーション治療前に、NavX上で作成した3D LA/PV画像ガイド下に、従来から報告されている5つの主要なGP領域 [superior left GP (SLGP), Marshall tract GP, right anterior GP (ARGP), inferior right GP (IRGP), inferior left GP (ILGP)]^{1, 2)} (図1) にアブレーション用カテーテル (4 mm tip, Safire BLU®, St. Jude Medical Inc., St. Paul, Minnesota) を留置し、刺激頻度、出力及び刺激幅を50Hz, 25mA, 10msに設定した高頻度・高出力の心房刺激を5秒間、各GP領域につき3箇所で行った。洞調律またはAF中の刺激直前10心拍のRR間隔の平均と比較して、刺激後にRR間隔が50%以上延長した場合を迷走神経反射陽性とし、各GP領域内の1箇所以上で迷走神経反応が陽性的場合をGP陽性部位と定義した。解析用の記録として、同定された各GP部位を3D LA/PV画像上に示した。

3D voltage map, CFAE mapの作成

洞調律中のLAの各部位 (中隔、前壁、後壁、底部、天蓋部、左心耳 (LAA)、僧帽弁輪峡部 (MI)、各4本のPVの前庭部前壁および後壁) (図1) におけるbipolar電位波高を記録し、3D LA及びPV画像上に

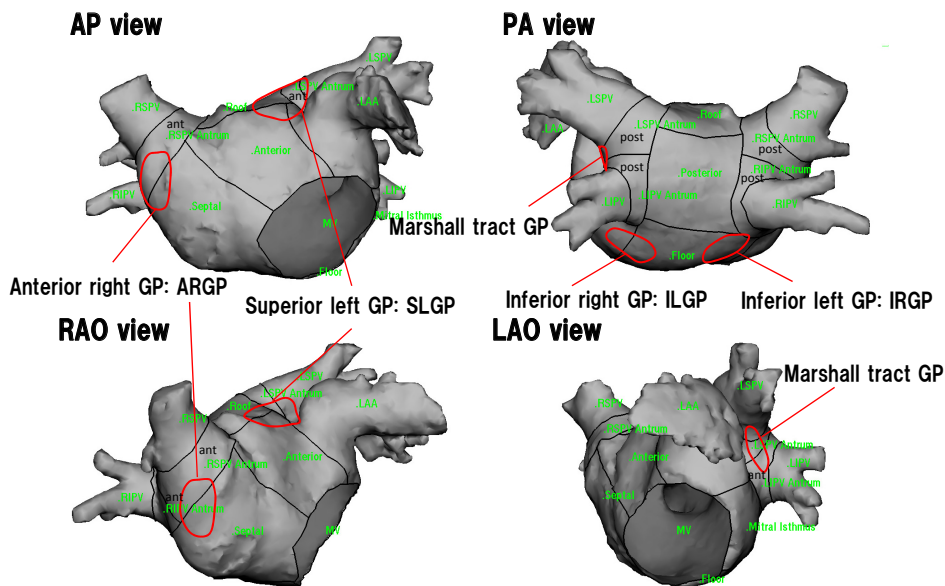


図1 5つの主要GP領域と解析用に15区画に分割されたLA及びPV前庭部
赤線で囲まれた部位は5つの主要GP領域を示す。GP= ganglionated plexi, RS= 右上, RI= 右下, LS= 左上, LI= 左下, LA= 左房, LAA= 左心耳, PV= 肺静脈, Antrum= 前庭部, AP= 前後, PA= 後前, RAO= 右前斜位, LAO= 左前斜位。

描出し3D voltage mapを作成した。bipolar電位波高が0.5mV未満の部位を低電位領域（low voltage zone: LVZ）と定義した。さらに、冠静脈洞開口部から高頻度心房ペースングを行い、AFが誘発されて持続した場合、AF中のLAの各部位におけるCFAE（分裂電位：AF中に5秒間記録した局所電位の平均周期が120ms以下を示す部位）を記録し、3D CFAE mapを作成した。

GP部位とLA-EAT, CFAE部位の関連性およびLVZとLA-EAT, CFAE部位の関連性の検討

NavX上で作成した3D LA/PV画像を、術前に構築した3D CT画像と統合し、GP, CFAE, LVZおよびLA-EATの局在及びそれらの関連性を評価した。まず、全症例で主要な5つのGP領域におけるGP陽性部位、LA-EAT, CFAE部位の出現頻度を評価した。次に、各主要GP領域においてGP陽性部位を認めた症例で、LA-EAT及びCFAE部位の出現頻度を算出した。LVZおよびCFAE部位とLA-EATとの関連性に関しては、電位記録を行った前述のLA内15部位で、全症例におけるそれぞれの指標の分布を評価した。また、各部位においてLA-EATを認めた

症例で、LVZ及びCFAE部位の出現頻度を算出した。

カテーテルアブレーション

対象患者40例中10例において、GP陽性部位における拡大PV隔離術及び3D構築されたLA-EATを指標としたLAアブレーション（EAT-based ablation）⁶⁾の効果を調査した。拡大PV隔離術は、3D画像ガイド下にアブレーション用カテーテル（Safire BLU Duo[™], St. Jude Medical）を用い、最大出力30W、温度上限41℃、イリゲーションフロー13-20 mL/min、通電時間30秒の通電設定で施行した。拡大PV隔離術後、術前GP陽性部位におけるGP反応を再度高頻度・高出力心房刺激により評価した。続いて、EAT-based ablationを施行した後（図2）、拡大PV隔離術後に認めたGP陽性部位で、再度GP反応を評価した。また、アブレーション前、拡大PV隔離術後、EAT-based ablation後において、AF中に冠静脈洞内カテーテルで記録された電位の10秒間の平均AF周期を評価した。

3. 解析

連続変数は平均値±標準偏差あるいは中央値と

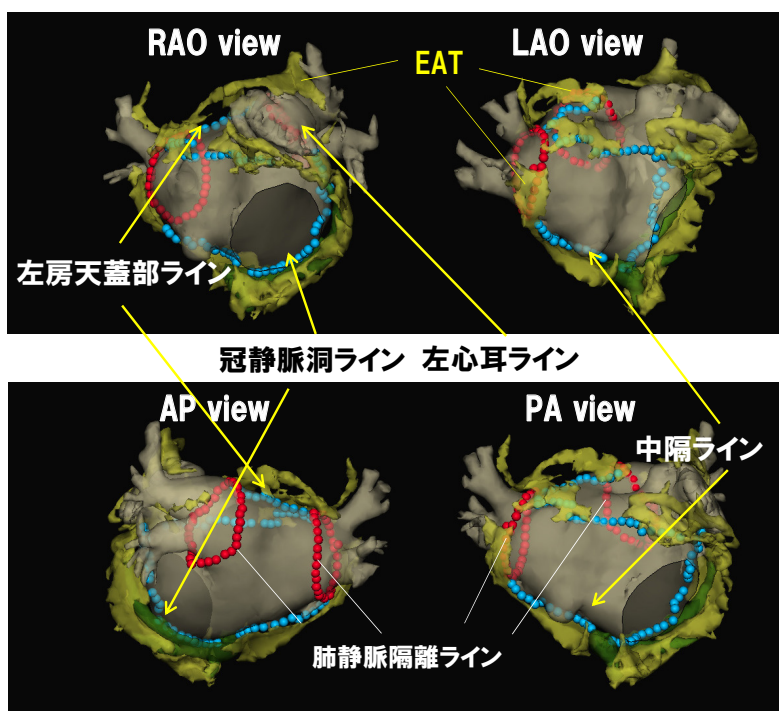


図2 EAT-based ablation法
 拡大肺静脈隔離後に、三次元に構築した心房周囲脂肪（EAT）を指標に左房焼灼を行う。AP=前後, PA=後前, RAO=右前斜位, LAO = 左前斜位

四分位範囲で示した。二群間の比較には、ある指標が正規分布している場合はt検定を用い、右肩あがりの分布では、Wilcoxonの符号付順位和検定を用いた。P値0.05未満を統計学的に有意とした。全ての解析にはJMP 10 software (SAS Institute, Cary, North Carolina)を使用した。

4. 結果

全体の平均LA-EAT容積は $64.1 \pm 21.1 \text{ cm}^3$ であり、PerAF群はPAF群に比してやや大きい傾向を示した($71.8 \pm 19.9 \text{ cm}^3$ vs. $60.3 \pm 21.0 \text{ cm}^3$, $P = 0.1251$)。5つの主要GP領域におけるGP陽性部位、LA-EAT、CFAEの分布の一例を図3に、全体の分布を図4に示す。各主要GP領域でのGP陽性部位の出現頻度は、SLGPで40例中25例(63%)、Marshall tract GPで29例(73%)、ARGPで29例(73%)、IRGPで36例(90%)、ILGPで31例(78%)であり、一症例あたりの5つの主要GP領域におけるGP陽性部位出現率は80(60-100)%であった。

CFAEに関しては、40例中24例でCFAE mapの作成が可能であり、そのうちSLGPで22例(92%)、Marshall tract GPで17例(71%)、ARGPで18例(75%)、IRGPで19例(79%)、ILGPで16例(67%)と、一症

例あたりの各主要GP領域におけるCFAE部位の出現頻度は80(60-100)%とGP陽性部位とほぼ同程度であった($P = 0.7445$)。一方、LA-EATは、各主要GP領域のうちLSGP、Marshall tract GP、IRGP、ILGPにおいては90%以上の症例で認められ、ARGP領域においても83%で認められた。一症例あたりの各主要GP領域にLA-EATを認める頻度は100(80-) %であり、GP陽性部位やCFAE部位よりも高率であった(vs. GP陽性部位, $P = 0.0056$; vs. CFAE部位, $P = 0.0249$)。また、GP陽性部位とLA-EATとの関連性に関しては、主要GP領域においてGP陽性部位を認めた症例では、90%以上の症例でLA-EATが高率に存在し、CFAEも68-93%と多くの症例で認められた。

次に、LA-EATとLVZおよびCFAEの局在との関係を図5に示す。各部位でのLA-EATは、左上PV前庭部前壁、左下PV前庭部前壁、右上PV前庭部前壁、LA天蓋部、底部、中隔、MI、LAAで高率(全症例の60%以上と定義)に認められた。LVZはLA前壁に最大で45%認められたのみであり、その他の部位では10-30%しか認められなかった。一方、CFAEは左上PV前庭部前壁、左下PV前庭部前壁、右上PV前庭部前壁、LA天蓋部、底部に高率に認め

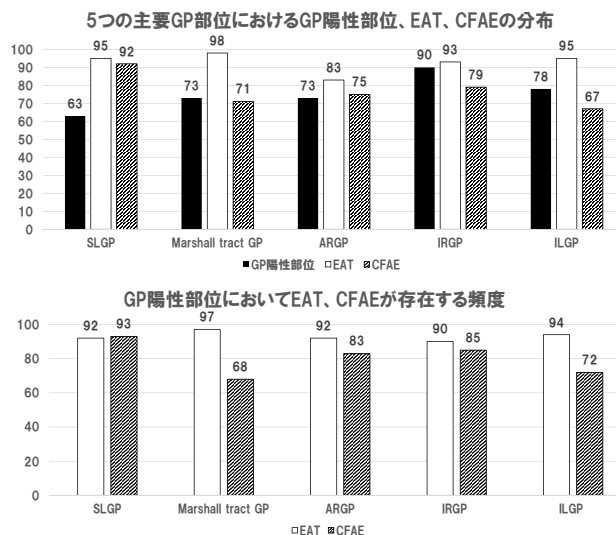


図3 5つの主要GP領域におけるGP反応陽性部位とLA-EATの分布(上段)およびCFAE部位(下段)の分布。本症例ではARGP、Marshall tract GP、ILGP、IRGPにおいてGP反応を認めるが、SLGPには認めない。5つの主要GP領域におけるGP陽性部位の頻度は80%である。LA-EATはすべての主要GP領域に分布しているため、頻度は100%である。CFAE(白~赤)も同様の分布を示し、SLGP以外のすべての主要GP領域に認められており、5つの主要GP領域におけるCFAEの頻度は80%である。点線で囲まれた部位は5つの主要GP領域を示す。LA-EAT = 左房 epicardial adipose tissue, SLGP=superior left GP, ARGP = anterior right GP, ILGP=inferior left GP, IRGP =inferior right GP, GP=ganglionated plexi, CFAE=complex fractionated atrial electrogram, AP=前後, PA=後前, RAO=右前斜位, LAO = 左前斜位。

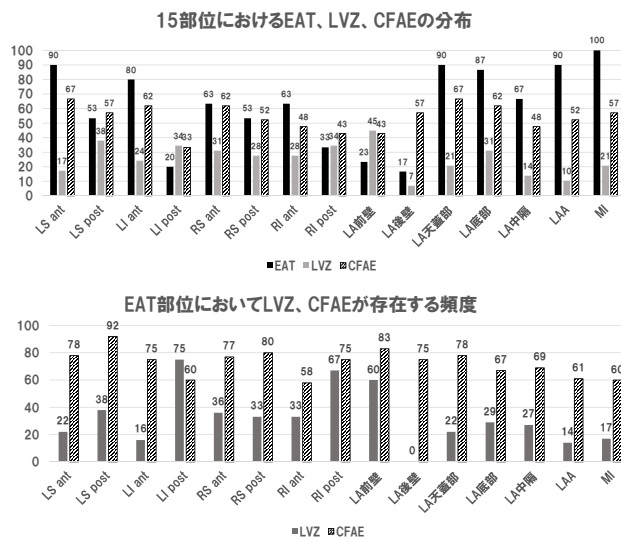


図 4 5つの主要GP領域におけるGP反応陽性部位とLA-EATおよびCFAE部位の分布（上段）およびGP陽性部位においてLA-EAT、CFAE部位が存在する頻度（下段）
 LA-EAT = 左房 epicardial adipose tissue, SLGP=superior left GP, ARGP = anterior right GP, ILGP=inferior left GP, IRGP =inferior right GP, GP=ganglionated plexi, CFAE=complex fractionated atrial electrogram.

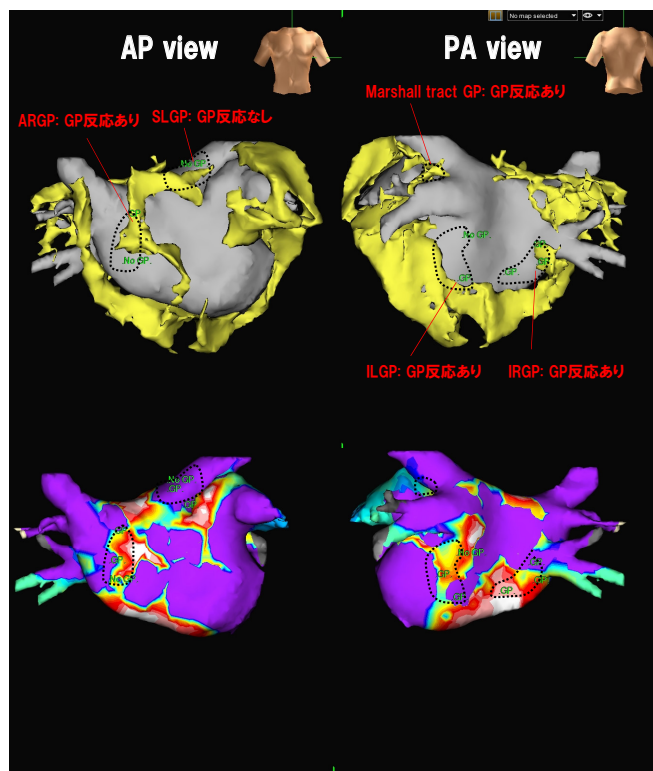


図 5 15部位におけるLA-EAT、LVZおよびCFAE部位の分布（上段）およびLA-EATにおいてLVZ、CFAE部位が存在する頻度（下段）
 LA-EAT = 左房 epicardial adipose tissue, LVZ=low voltage zone, CFAE=complex fractionated atrial electrogram, LS=左上肺静脈前庭部, LI = 左下肺静脈前庭部, RS= 右上肺静脈前庭部, RI = 右下肺静脈前庭部, ant = 前壁, post=後壁, LA = 左房, LAA= 左心耳, MI= 僧房弁輪峡部

られ、その局在はLA-EATの分布と類似していたが、LA-EATがない部位も含めて、CFAEがLA全体に存在する症例も多かった。また、LA-EATとLVZとの関連性に関しては、LA-EAT部位にLVZが存在する頻度は、最大で左下PV前庭部後壁、右下PV前庭部後壁及びLA前壁で60-75%であったが、多くの部位では30%程度と低率であった。一方CFAEに関しては、LA-EATのすべての部位において60-80%の頻度でCFAEを認めた。

アブレーションのGPに対する影響

AF患者10例におけるアブレーション前のGP陽性部位は、一つの主要GP領域で3箇所高頻度刺激(合計:5主要GP領域×3箇所×10例=150箇所)を行い85箇所(8.5±3.0箇所/症例)であったが、拡大PV隔離術後は59箇所(74.7%)(5.9±2.4箇所GP陽性/症例)、EAT-base ablation後はさらに、残りのGP部位26箇所中24箇所が消失した(消失率97.6%)。最終的に、GP陽性部位は一症例のみにIRGP 2箇所を認めた。また、冠静脈洞内で記録されたAF周期長は術前では159±25.6 msであったが、拡大PV隔離術により176±24.1 ms(14.0±11.6%延長, P=0.0432 vs. アブレーション前)、EAT-based ablationにより191±25.8 ms(21.6±12.6%延長, P=0.000298 vs. アブレーション前)と段階的に延長した。10例中2例はEAT-based ablation中にAFが自然停止した。

5. 考察

本研究では、GPとLA-EAT, CFAE, LVZの局在およびそれらの関連性を明らかにした。さらに拡大PV隔離術及びEAT-based ablationがGP反応およびAF周期に及ぼす影響を明らかにした。

従来から報告されている5つの主要GP領域には高率にLA-EATが存在したが、GP反応を示す頻度は中央値で80%と、LA-EATの出現頻度に比較し低率であった。この結果に影響した因子として、二つの可能性が考えられる。一つは、高頻度刺激によるGP同定の方法論的な限界である。GPは心外膜側に存在することが知られており、今回使用した刺激出力ではGPまで刺激が到達しなかった可能性がある。また、GPはある程度の広がりを持って分布するため、各主要GP領域の3箇所の評価のみではGPの存

在を把握しきれなかった可能性も考えられる。もう一つは、個々の症例におけるGPの高頻度刺激に対する感受性低下あるいは機能低下である。動物実験において、心房高頻度刺激によるAFモデルでは、GPに存在する交感神経節あるいは副交感神経節が通常よりも増大していることが報告されている⁷⁾。従って、GP反応性に関しても、個々の症例で刺激に対する感受性や機能に相違がある可能性がある。本研究のサブ解析としてGP反応性の有無に関して検討した結果、GP反応性とPAF群およびPerAF群やLA-EAT容量との関連性は認められておらず(データ不記載)、この点に関してはさらなる検討が必要と考えられる。以上より、LA-EATは従来報告されている主要なGP領域をほぼ網羅しているが、高頻度刺激に対する反応のみではGPを完全に同定できない可能性がある。

GP陽性部位とLA-EATおよびCFAEとの関係に関して、GP陽性部位ではLA-EATおよびCFAEが高率に分布していた。特に各主要GP領域に、GP陽性部位を認めた症例の90%以上でLA-EATも同様に認められ、80%程度の症例においてCFAEも認められた。GP反応を認めた主要GP領域においてGPの活動性が高いか否かは不明であるが、これらの所見は、LA-EATやCFAEがGP活動と強く関連していることを示唆していると考えられる。LA-EATとLVZおよびCFAEとの関係に関しては、LA-EAT部位には30%程度しかLVZが存在しなかったが、以前我々が報告したように、LA-EAT部位には高率にCFAEが存在した^{6,8)}。従って、LA-EATに近接する心房壁は、その多くが比較的正常な心筋により構成されているが、AF中に機能的な伝導ブロックやanisotropic conductionを生じ、CFAEに代表される局所異常電位を発生させる基質を有していると考えられる。逆に、LA後壁を中心に存在するCFAEは、LA-EATや主要GP領域の分布とは異なる分布であることから、AFの発症・維持に関連のないbystander CFAEである可能性がある。EATは多くのサイトカインを含んでおり、近接する心筋に障害を与え、炎症や線維化を惹起するとの報告がある一方、褐色脂肪細胞としての機能を有し、心筋組織を保護するUCP-1などのタンパクが高率に発現しているとの報告もある⁹⁾。しかしながら、LA-EATがサイトカインを介して心房の線維化を引き起こすという見解

だけでは、電気生理学的な観点において、EATがAFの発症・維持に關与する機序は説明できない。主要GP領域におけるCFAEとGPの分布が80%の症例で一致していることから、LA-EATの心房筋に対する作用は、直接的なものだけではなく、LA-EATに存在するGPが、心外膜側から心房筋に間接的に作用してcritical CFAEを形成し、AFを進行させている可能性がある。さらに、本研究ではEATに近接するLA壁へのアブレーションの効果についても検討した。拡大PV隔離術によりGP陽性部位の多くは消失し、AFを規定するAF周期は14.0±11.6%延長した。近年、GPはPVおよびPV前庭部付近からのfiringに強く関連していると報告されており^{1,2)}、図1に示すように主要GPのうちSLGP, Marshall tract GPおよびARGPはPV前庭部を含む拡大PV隔離術の焼灼ラインと重複していることから、拡大PV隔離術を行うことにより、GPやGPと関連するCFAEが修飾されたと考えられる。さらに、EAT-based ablation後ではGP陽性部位はほぼ消失し、AF周期も更なる延長を認めており、EAT-based ablationが、拡大PV隔離術では網羅しきれないIRGPやILGP、EATに近接したCFAEを修飾したと考えられる。以前に我々は、PerAF患者に対して拡大PV隔離術後にEAT-based ablationを行い、平均16カ月の観察期間で78%と高い成功率を示したと報告した⁶⁾。本研究の結果は、EAT-based ablationが高い有効性を示した機序の一部を証明していると考えられる。

6. 結 語

本研究では、主要GP領域におけるGP反応陽性部位は約80%の症例にのみ存在していたが、LA-EATは主要GP部位の90%以上に高率に分布していた。また、LA-EATに近接するLA壁は、CFAEが多く存在するにもかかわらず、比較的 normal 電位波高を呈していた。拡大PV隔離術後のEATに近接するLAへのアブレーションは、GPやAF周期を修飾し、AFの発症・維持に抑制的に働いた。これらは、LA-EATがGPやCFAEの局在の指標となるだけでなく、AFの発症・維持に何らかの影響を与えていることを示唆していると考えられた。

文 献

- 1) Nakagawa H, Scherlag BJ, Patterson E, Ikeda A, Lockwood D, Jackman WM. Pathophysiologic basis of autonomic ganglionated plexus ablation in patients with atrial fibrillation. *Heart Rhythm*. 2009; **6**:S26-34.
- 2) Armour JA, Murphy DA, Yuan BX, Macdonald S, Hopkins DA. Gross and microscopic anatomy of the human intrinsic cardiac nervous system. *Anat Rec*. 1997; **247**:289-298.
- 3) Katritsis DG, Pokushalov E, Romanov A, Giazitzoglou E, Siontis GC, Po SS, Camm AJ, Ioannidis JP. Autonomic denervation added to pulmonary vein isolation for paroxysmal atrial fibrillation: a randomized clinical trial. *J Am Coll Cardiol*. 2013; **62**:2318-25.
- 4) Al Chekatie MO1, Welles CC, Metoyer R, Ibrahim A, Shapira AR, Cytron J, Santucci P, Wilber DJ, Akar JG. Pericardial fat is independently associated with human atrial fibrillation. *J Am Coll Cardiol*. 2010; **56**:784-8.
- 5) Nagashima K, Okumura Y, Watanabe I, Nakai T, Ohkubo K, Kofune T, Kofune M, Mano H, Sonoda K, Hirayama A. Association between epicardial adipose tissue volumes on 3-dimensional reconstructed CT images and recurrence of atrial fibrillation after catheter ablation. *Circ J*. 2011; **75**:2559-2565.
- 6) Nakahara S, Hori Y, Kobayashi S, Sakai Y, Taguchi I, Takayanagi K, Nagashima K, Sonoda K, Kogawa R, Sasaki N, Watanabe I, Okumura Y. Epicardial adipose tissue-based defragmentation approach to persistent atrial fibrillation: its impact on complex fractionated electrograms and ablation outcome. *Heart Rhythm*. 2014; **11**:1343-1351.
- 7) Yu Y, Wei C, Liu L, Lian AL, Qu XF, Yu G. Atrial fibrillation increases sympathetic and parasympathetic neurons in the intrinsic cardiac nervous system. *Pacing Clin Electrophysiol*. 2014; **37**:1462-1469.
- 8) Nagashima K, Okumura Y, Watanabe I, Nakai T, Ohkubo K, Kofune M, Mano H, Sonoda K, Hiro T, Nikaido M, Hirayama A. Does location of epicardial adipose tissue correspond to endocardial high dominant frequency or complex fractionated atrial electrogram sites during atrial fibrillation? *Circ Arrhythm Electrophysiol*. 2012; **5**:676-683.
- 9) Hatem S, Sanders P. Epicardial adipose tissue and atrial fibrillation. *Cardiovascular Research*. 2014; **102**:205-213.

膵頭十二指腸切除後の脂肪肝の発生と制御

山崎 慎太郎

Postoperative liver steatosis in pancreatoduodenectomy: treatment strategy

Shintaro YAMAZAKI

要旨

膵頭十二指腸切除後の患者が数か月の間に肝の脂肪化が高率かつ急速に起こる現象に着目し、肝脂肪化の原因を突き止め、脂肪肝の発生を考察し治療に結び付ける事を目的とする。膵頭十二指腸切除後は、過大侵襲と消化経路の大幅な人為的変更のために、代謝経路が大きく変化する。また、摂食障害と膵機能不全が急激におこり、これが栄養失調としての肝の脂肪化を引き起こすと考えられている。高力価膵酵素とアミノ酸製剤の投与により本病態を改善し患者のQOL向上に貢献できた。

1. はじめに

ヒトにおける代謝異常研究のほとんどのアプローチは、肝生検などの組織診断を行い、これと臨床データや背景因子と比較する後ろ向きの研究である。代謝異常に対して確立された治療薬は無く、血中脂質や糖尿病治療および食事療法と運動療法が治療の基本で、その副次的効果として脂肪肝の治療を期待する方法がスタンダードである。

しかし、疫学的な後ろ向きデータの集積では個体の発症と進行の起点が明らかにされる事は無く病態や成因が明らかにされず根本的治療が確立されない。

同一人物が、短期間の間に急速に肝臓が脂肪化することは通常の臨床では考えにくく、そのような病的状況を人間で解析する事は臨床的・倫理的に不可能と考えられてきた。

しかし、我々は手術を契機として急速に肝脂肪化がすすむ事に注目した。これは、同一の人間が短期間で脂肪代謝、アミノ酸代謝、糖質代謝が劇的に変化する事に由来する。つまり通常臨床ではおおよそ得られない検体を定期的に、確実に入手できることで脂肪肝、各種のアミノ酸代謝の変化を遺伝子レベ

ルで解析することが可能である。

我々は、膵頭十二指腸切除後の患者が高率に脂肪肝に起こることに注目した。膵頭十二指腸切除術における脂肪肝の原因は不明であるが、摂食が良好で健康な患者にも高率に起こっている。これらの患者は短期間で①高率に脂肪肝を発症する。②治療に抵抗性であり薬物療法も著効しない。③栄養状態や脂肪肝が免疫力の低下を引き起こしている。という現実には代謝疾患に非常に近接した状態が、通常的生活を送っている中で短期間に発症し進行している点に着目しこの解析を逆向きに治療に応用する事を目的とすることは他の研究とは域を異にする独創的な研究である。

2. 対象・方法

対象患者

2008年から2014年に日本大学医学部 外科学系 消化器外科分野で肝胆膵悪性腫瘍によって膵頭十二指腸切除術を施行した患者を対象とした。患者の術前・膵頭十二指腸切除周術期、術後1か月、膵-空腸吻合術後(膵外瘻後3か月)、外瘻終了後3か月および6カ月の合計8点を基準に経時的に血液サ

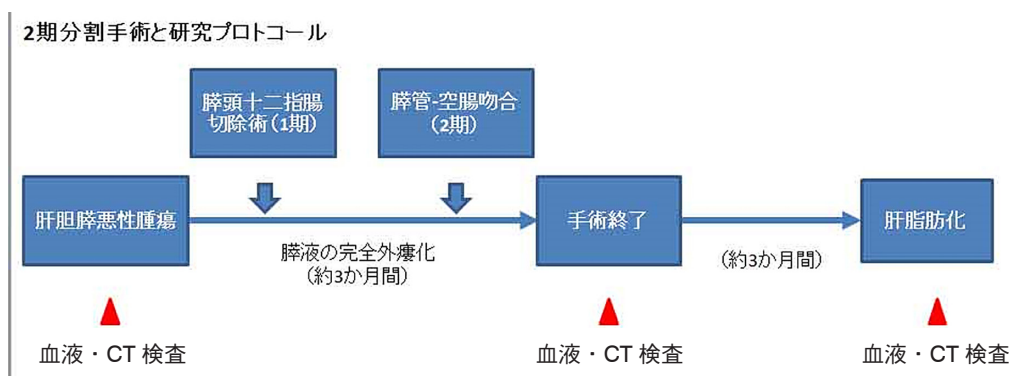


図1 本試験における分割膵頭十二指腸切除のプロトコール

ンプルを収集する。又、血液以外の客観的な指標として肝臓のCT値を測定した。本研究は日本大学板橋病院IRBで承認された。

介入

高力価の膵酵素製剤とアミノ酸の早期投与の効果を判定する。

分割膵頭十二指腸切除（二期手術）のプロトコール（図1）

二期分割による膵頭十二指腸切除術は、第一期目に消化管吻合および胆管吻合を行い膵液は完全外瘻とし肝障害度の判定のために肝の一部を楔状切除する。第二期目に膵管-空腸の吻合を行い、術中超音波を用いて肝の脂肪化の程度をエコー・レベルで判定後、脂肪沈着の一番高度な部分より肝生検を行う。二期手術までの待機期間は2～3ヶ月とし、定期採血と、各時点のCT撮影を行い、血液生化学データと画像診断で、肝の脂肪化を判定する。

CT値の計測

正常肝では肝臓のCT値は約60HU程度である。また、脾臓のCT値は約50HUである。脂肪肝では、肝実質への脂肪沈着がすすみ、肝実質と肝内脈管のCT値が逆転して、脈管が高CT域としてみえる。結果、肝臓のCT値が脾臓と逆転する。CT画像から肝臓・脾臓両断面の存在する1枚を選び、肝臓・脾臓それぞれを約30mm²の円形に3点抽出し、その平均CT値を測定した。次に肝臓・脾臓それぞれの3点の平均値の比より、脂肪肝の評価を行った。

血液検査

非アルコール性の脂肪肝では、ASTやALTが基準値の2倍から4倍程度に上昇していることが多く、さらにはALT>ASTのことが多い特徴を持つ。さらに、血清総蛋白、アルブミン値もまた、患者の周術期の栄養状態、または、代謝異常を示すパラメーターとして重要である。これらを経時的に計測することにより高力価の膵酵素製剤とアミノ酸の早期投与の効果を判定する。

3. 結果

本研究期間に膵頭十二指腸切除術を行った患者は139例であった。胃切除の既往のあり患者（11名）、アミノ酸製剤による下痢（4名）、高度肥満患者（1名、肝硬変患者（1名）を除く122名を対象に解析をおこなった。アミノ酸製剤+高力価膵酵素補充薬のコンビネーションは2012年4月より膵頭十二指腸切除後の早期経腸栄養治療として移行31名に投薬された。それ以前の患者データはコントロール（91名）として使用した。術前の腫瘍条件、栄養障害の程度、血液生化学的所見に有意差を認めなかった。（表1）

膵頭十二指腸切除周術期データを投与群とコントロール群で比較した。（表2）介入群では100%の高力価膵酵素補充剤が投与されていたが、コントロール群では79例（86.8%）の患者に術後低力価の膵酵素補充剤が投与されていた（P=0.03）ことを除けば周術期データ（手術時間、出血量、膵実質の堅さ、術後膵液瘻の発生頻度、下痢、感染性合併症、および術後在院日数）に有意差を認めなかった。

表 1 patient characteristics

		Pancrelipase+BCAA (n=31)	Control (n=91)	p value
Age*	(year)	70 (47-79)	66 (33-83)	0.07
Gender Male	(%)	20 (64.5)	59 (64.8)	0.93
Body mass index*	(Kg/m ²)	23.0 (15.5-30.5)	22.7 (16.9-34.8)	0.82
Metabolic syndrome	(%)	9 (29.0)	22 (24.2)	0.59
Diabetes	(%)	9 (29.0)	23 (25.3)	0.68
Preoperative biliary drainage	(%)	20 (64.5)	63 (69.2)	0.88
Histopathology				
Pancreatic cancer		13	32	
Bile duct cancer		10	31	
Adenocarcinoma of papilla of Vater		3	20	
Duodenal cancer		1	4	
Neuroendocrine tumor		1	2	
Intraductal papillary carcinoma		2	0	
Gastrointestinal stromal tumor		1	1	
Others		0	1	
Hemoglobin*	(g/dL)	12.6 (7.9-15.7)	12.4 (10.2-16.0)	0.54
Platelets*	(mm ³ /μL)	19.2 (10.7-51.0)	17.9 (9.1-67.1)	0.43
Total protein*	(g/dL)	7.0 (4.9-8.0)	6.7 (3.5-8.4)	0.15
Albumin*	(g/dL)	3.1 (1.7-4.5)	3.4 (2.1-4.9)	0.25
Aspartate aminotransferase*	(IU/L)	39 (19-52)	42 (17-73)	0.68
Alanine aminotransferase*	(IU/L)	39 (19-59)	38 (22-57)	0.89
Cholinesterase*	(IU/L)	257 (128-405)	256 (58-510)	0.88
Bilirubin*	(mg/dL)	1.13 (0.31-4.29)	0.99 (0.25-7.75)	0.29
Total cholesterol*	(mg/dL)	194 (92-341)	180 (100-337)	0.20
Triglyceride*	(mg/dL)	129 (52-564)	86 (76-269)	0.54
Insulin*	(μU/ml)	11.5 (3.8-20.9)	8.8 (1.2-15.4)	0.43
HbA1c*	(%)	5.7 (3.7-8.4)	5.6 (3.7-14.9)	0.59
Prothrombin INR*		0.99 (0.85-1.44)	1.01 (0.87-1.27)	0.27

*: median with range,

表 2 Perioperative outcomes

		Pancrelipase+BCAA (n=31)	Control (n=91)	p value
Operation time*	(min)	520 (362-986)	558 (365-864)	0.26
Intraoperative blood loss*	(mL)	370 (155-1375)	450 (148-1220)	0.41
Blood transfusion	(%)	7 (16.1)	18 (19.8)	0.57
Pancreas parenchymal texture	(soft)	9 (29.0)	29 (31.9)	0.63
Post operative pancreatic fistula	(%)	8 (25.8)	26 (28.6)	0.77
Grade B		7	21	
Grade C		1	5	
Delayed Gastric emptying	(%)	6 (19.4)	23 (25.3)	0.76
Infectious complication	(%)	8 (25.8)	36 (39.6)	0.25
abdominal abscess		1	8	0.27
surgical site		5	16	0.85
drain fluid		4	19	0.33
Clavien-Dindo ≥3	(%)	7 (16.1)	18 (19.8)	0.57
Postoperative hospital stay*	(day)	28 (15-61)	23 (14-125)	0.11
Pancreatic juice output (1M)*	(mL)	146 (68-880)	91 (4-320)	0.04
Pancreatic duct diameter (Pre)*	(mm)	2.3 (1.2-8.2)	2.8 (1.3-9.9)	0.43
Pancreatic duct diameter (3M)*	(mm)	1.9(1.2-3.8)	2.1 (1.3-4.2)	0.62

*: median with range,

一方、術後1か月後の膵液量 (P=0.03)、10%以上の体重減少頻度 (P=0.02)、又、術後3か月後におけるCT値におけるNAFLD (非アルコール性脂肪肝) の発生頻度 (P < 0.001) と投与群において良好な結果を得た。

術前後のCT値の変化を投与群、コントロール群別に示す。(図2) 術前の肝臓のCT値は投与群、コントロール群において有意差を認めなかった。一方、術後3か月のCT値では、投与群においてCT値は術前と同様に保たれており、コントロール群

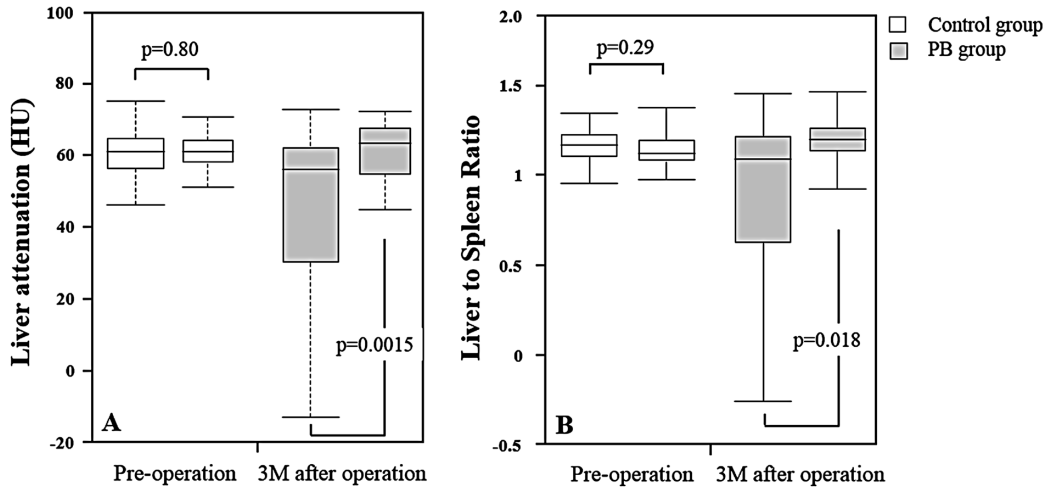


図2 術前後における肝CT値と肝臓/脾臓CT値の変化

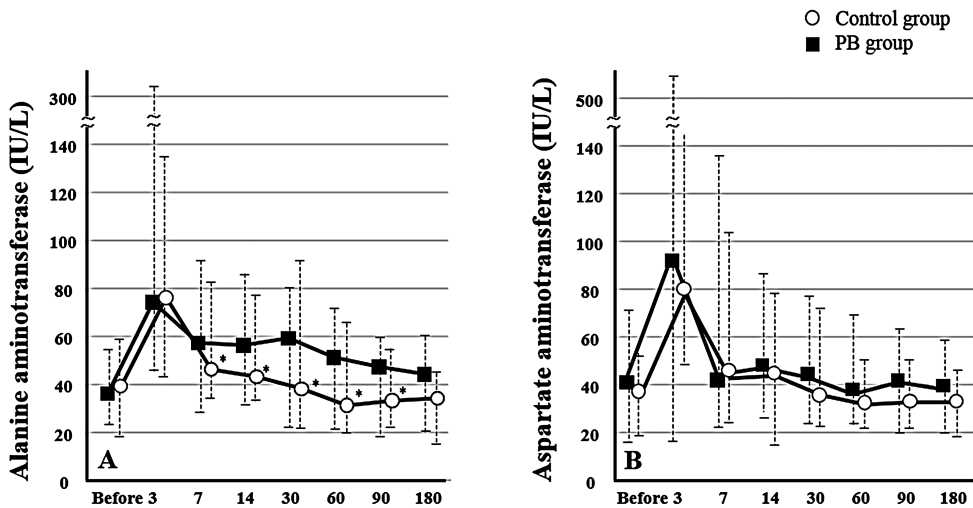


図3 各群における肝機能の推移

と比較さいて有意差をもって良好であった。[56 HU (-13-73) vs. 61 (26-69), $p=0.015$] 投与群のCT値における肝臓/脾臓比も有意差をもって保たれていた。[1.12 (-0.38-1.48) vs. 1.24 (0.89-1.49), $p=0.018$] また、alanine aminotransferaseの推移は投与群で有意差をもって良好であった。($p < 0.05$, at POD 14, 30, 60 and 90)。 (図3)

4. 考察

早期経腸栄養は、膵頭十二指腸切除などの、過大侵襲手術では一般的となっている管理法である。早期栄養による腸管免疫の維持や、消化管機能低下の防止に貢献すると言われている。膵臓切除は、膵癌

や胆管癌などよりの閉塞性の慢性膵炎などが併存するケースが多く、慢性的な膵外分泌機能不全がベースである事が多い。さらに、膵切除による侵襲によりさらに膵機能が一時的に低下することによって更なる、栄養代謝障害が起こると予想される。また、膵頭十二指腸切除術では、胃内容の排泄遅延が20-30%程度の患者に起こると言われている。長期の摂食障害により術後の栄養低下が予想される病態であり、本手術を受けた患者集団は膵機能・摂食が同時に一定期間障害を受けた状態といえる。よって、積極的に本病態を改善することで、患者のベネフィットにつながると考えられる。

5. 結 語

本研究により，高力価膵酵素補助薬＋アミノ酸製剤による早期経腸栄養の効果が示された。

文 献

- 1) Kato H, Nakao A, Kishimoto W, Nonami T, Harada A, Hayakawa T, Takagi H. 13C - labeled trioctanoin breath test for exocrine pancreatic function test in patients after pancreaticoduodenectomy. *Am J Gastroenterol.* 1993; **88**:64 - 69.
- 2) Cahen DL, Gouma DJ, Nio Y, Rauws EA, Boermeester MA, Busch OR, Stoker J, Laméris JS, Dijkgraaf MG, Huijbregtse K, Bruno MJ. Endoscopic versus surgical drainage of the pancreatic duct in chronic pancreatitis. *N Engl J Med.* 2007; **356**:676 - 684.
- 3) Riediger H, Adam U, Fischer E, Keck T, Pfeffer F, Hopt UT, Makowicz F. Long - term outcome after resection for chronic pancreatitis in 224 patients. *J Gastrointest Surg.* 2007; **11**:949 - 959.
- 4) Tran TC, van 't Hof G, Kazemier G, Hop WC, Pek C, van Toorenenbergen AW, van Dekken H, van Eijck CH. Pancreatic fibrosis correlates with exocrine pancreatic insufficiency after pancreaticoduodenectomy. *Dig Surg.* 2008; **25**:311 - 318.
- 5) Lindkvist B, Domínguez - Muñoz JE, Luaces - Regueira M, Castiñeiras - Alvaríno M, Nieto - García L, Iglesias - García J. Serum nutritional markers for prediction of pancreatic exocrine insufficiency in chronic pancreatitis. *Pancreatol.* 2012; **12**:305 - 310.
- 6) Sikkens EC, Cahen DL, van Eijck C, Kuipers EJ, Bruno MJ. The daily practice of pancreatic enzyme replacement therapy after pancreatic surgery: a northern European survey: enzyme replacement after surgery. *J Gastrointest Surg.* 2012; **16**:1487 - 1492.
- 7) Tanaka N, Horiuchi A, Yokoyama T, Kaneko G, Horigome N, Yamaura T, Nagaya T, Komatsu M, Sano K, Miyagawa S, Aoyama T, Tanaka E. Clinical characteristics of de novo nonalcoholic fatty liver disease following pancreaticoduodenectomy. *J Gastroenterol.* 2011; **46**:758 - 768.
- 8) Nakagawa N, Murakami Y, Uemura K, Sudo T, Hashimoto Y, Kondo N, Sasaki H, Okano K, Sueda T. Nonalcoholic fatty liver disease after pancreaticoduodenectomy is closely associated with postoperative pancreatic exocrine insufficiency. *J Surg Oncol.* 2014; **110**:720 - 726.
- 9) Sato R, Kishiwada M, Kuriyama N, Azumi Y, Mizuno S, Usui M, Sakurai H, Tabata M, Yamada T, Isaji S. Paradoxical impact of the remnant pancreatic volume and infectious complications on the development of nonalcoholic fatty liver disease after pancreaticoduodenectomy. *J Hepatobiliary Pancreat Sci.* 2014; **21**:562 - 572.
- 10) Nomura R, Ishizaki Y, Suzuki K, Kawasaki S. Development of hepatic steatosis after pancreaticoduodenectomy. *Am J Roentgenol.* 2007; **189**:1484 - 1488.
- 11) Yu HH, Shan YS, Lin PW. Effect of pancreaticoduodenectomy on the course of hepatic steatosis. *World J Surg.* 2010; **34**:2122 - 2127.
- 12) Kato H, Isaji S, Azumi Y, Kishiwada M, Hamada T, Mizuno S, Usui M, Sakurai H, Tabata M. Development of nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) and nonalcoholic steatohepatitis (NASH) after pancreaticoduodenectomy: proposal of a postoperative NAFLD scoring system. *J Hepatobiliary Pancreat Sci.* 2010; **1**:296 - 304.
- 13) Nagai M, Sho M, Satoi S, Toyokawa H, Akahori T, Yanagimoto H, Yamamoto T, Hirooka S, Yamaki S, Kinoshita S, Nishiwada S, Ikeda N, Kwon AH, Nakajima Y. Effects of pancrelipase on nonalcoholic fatty liver disease after pancreaticoduodenectomy. *J Hepatobiliary Pancreat Sci.* 2014; **21**:186 - 192.
- 14) Miyagawa S, Makuuchi M, Kawasaki S, Ogiwara M. Second - stage pancreatojejunostomy following pancreaticoduodenectomy in high - risk patients. *Am J Surg.* 1994; **168**:66 - 68.
- 15) Hasegawa K, Kokudo N, Sano K, Seyama Y, Aoki T, Ikeda M, Hashimoto T, Beck Y, Imamura H, Sugawara Y, Makuuchi M. Two - stage pancreatojejunostomy in pancreaticoduodenectomy: a retrospective analysis of short - term results. *Am J Surg.* 2008; **196**:3 - 10.
- 16) Nakamura H, Murakami Y, Uemura K, Hayashidani Y, Sudo T, Ohge H, Sueda T. Reduced pancreatic parenchymal thickness indicates exocrine pancreatic insufficiency after pancreaticoduodenectomy. *J Surg Res.* 2011; **171**:473 - 478.
- 17) Ahmad SA, Edwards MJ, Sutton JM, et al. Factors influencing readmission after pancreaticoduodenectomy: a multi - institutional study of 1302 patients. *Ann Surg.* 2012; **256**:529 - 537.
- 18) Nakamura H, Murakami Y, Uemura K, Hayashidani Y, Sudo T, Ohge H, Sueda T. Predictive factors for exocrine pancreatic insufficiency after pancreaticoduodenectomy with pancreaticogastrostomy. *J Gastrointest Surg.* 2009; **13**:1321 - 1327.
- 19) Song SC, Choi SH, Choi DW, Heo JS, Kim WS, Kim MJ. Potential risk factors for nonalcoholic steatohepatitis related to pancreatic secretions following pancreaticoduodenectomy. *World J Gastroenterol.* 2011; **17**:3716 - 3723.
- 20) Whitcomb DC, Lehman GA, Vasileva G, Malecka - Panas E, Gubergrits N, Shen Y, Sander - Struckmeier S, Caras S. Pancrelipase delayed - release capsules (CREON) for exocrine pancreatic insufficiency due to chronic pancreatitis or pancreatic surgery: A double - blind randomized trial. *Am J Gastroenterol.* 2010; **105**:2276 - 2286.

パーキンソン病の罹病期間によるSTN-DBSの効果の違い

深谷 親¹⁾, 山本隆充¹⁾

Influence of duration of Parkinson disease on outcome of STN-DBS

Chikashi FUKAYA¹⁾, Takamitsu YAMAMOTO¹⁾

要旨

近年STN-DBSをより早期に導入した方が、薬物療法単独で治療した場合より機能予後が良好に維持される可能性が高いことが示唆され、適切な導入時期に関する論議が盛んになっている。我々は、101例を対象に術前罹病期間9年未満の比較的早期にSTN-DBSを導入したearly群(n=34)と9年以上の罹病期間を有するlate群(n=67)に分け機能予後の差異を検討した。結果としてearly群の方が有意に良好な状態が維持される傾向にあった。したがって従来考えられていたより早期にSTN-DBSを導入した方が、その有用性をより高く発揮できると考えられた。

1. はじめに

脳深部刺激療法(Deep brain stimulation: DBS)は、パーキンソン病治療の重要な治療選択肢の一つであることがすでによく知られている。これまでの研究から、ドパ反応性が高くwearing-offのon-periodの質の高い症例がよい適応となることが明らかとなっている。しかし、個々の症例においてどういったかたちで手術介入すると効果を最大化することができるのか、という点については十分な知見は見出されていない。

従来、DBSは薬物療法が限界に達した症例に施行すべきであるとの考えが主流であったが、EARLYSTIM Studyの結果が報告され、STN-DBSをより早期に導入した方が薬物療法単独よりも機能予後が良好に維持される可能性が示唆された。これ以来、STN-DBSの適切な導入時期は論議の的となっている。本研究では、EARLYSTIM Studyとはやや異なった視点から適切な手術時期についての検討を行った。本研究の結果は、手術効果を最大化する上で重要な要因となる手術時期を考える上での一助となると考える。

2. 対象および方法

当院にてSTN-DBSを施行し術前から術後3年目までUPDRSおよびMMSE(Mini-Mental State Examination)、HDS(Hamilton Depression Rating Scale)などの神経心理学的検査のfollow-upがなされている101例を対象とした。これらの症例を罹病期間9年未満の比較的早期にSTN-DBSを導入したearly群(n=34)と9年以上の罹病期間を有するlate群(n=67)に分け機能予後の差異について検討した。

3. 結果

術前のUPDRS、MMSEおよびUPDRSには、両群間で有意な差は認められなかった。術前のLED(Levodopa equivalent dose)はlate群で有意に高かった($p<0.05$)。術後1年以内に評価されたUPDRS totalの改善率は、on時ではearly群が有意に良好であったが($p=0.047$)、off時には有意差はなかった(図1)。術後3年目の比較でも、on時にはearly群の方が、有意に改善率がよかった($p=0.019$)。off時にもearly群の方が良好な傾向はみられたものの有意ではなかった($p=0.056$) (図2)。また1年以内に評

1) 日本大学医学部脳神経外科学系応用システム神経科学
深谷 親: fukaya.chikashi@nihon-u.ac.jp

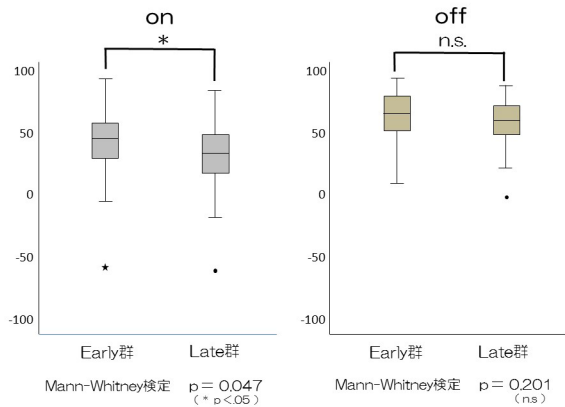


図1 術直後のUPDRS totalの改善率

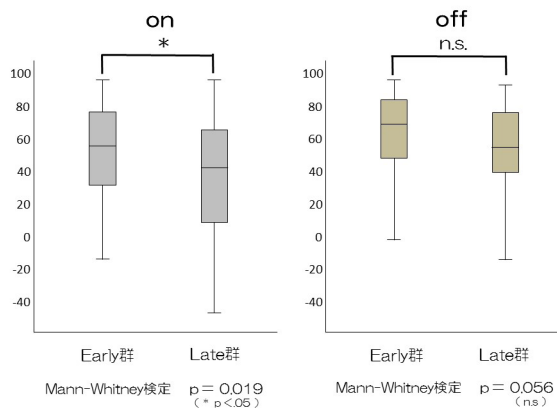


図2 術後3年目のUPDRS totalの改善率

価されたHDSの改善率もearly群において有意に良好であった(p=0.04)。

4. 考察

2013年に発表されたEARLY STIM studyでは¹⁾、平均罹病期間7.5年、平均年齢52歳の251症例を対象に、早期にDBSを導入した群と薬物療法をそのまま続行した群で2年後の機能予後を比較している。結果としてDBSを導入した群の方が、有意にmotor disability, ADL, DOPA誘発性の運動合併症, DOPA誘発性ジスキネジアがみられないonの時間が良好であった。この結果から、より早期にDBSを導入した方がパーキンソン病患者の機能予後を良好に保つことができるのではないかとの考えが優勢となってきた。

また、Charlesら²⁾の54症例をもとにした検討でもDBSの良好な効果を予測する因子として有意な

ものはドパ反応性と手術時の年齢が若いことであった。Walterら³⁾は41症例の結果からSTN-DBSの良好な予後を予測する有意な因子は、手術時年齢(56歳未満)と短い罹病期間(16年未満)であったと報告している。また、高齢者の方が有意に無為などの精神症状の出現率が高く、電極挿入術による脳内出血の発生率も高かったとの報告もある⁴⁾。

こうした結果から、若く罹病期間の比較的短い症例に手術利益が高いのではないかとの推測がなされていた。これに対する一定の答えがEARLY STIM studyによってもたらされたわけだが、手術適応症例の問題などいくつかの疑問も提唱されている。我々の研究では、手術vs薬物療法という視点ではなく、DBSを早期に行った症例と標準的な時期に行った症例を比較した。両群間の術前のUPDRSには有意な差はなかったことから早期群のほうがむしろ進行ははやい群であったと考えられる。それにもかかわらず早期群の方が、機能予後が良好であったということは注目に値する。

5. 結語

罹病期間9年未満の早期にSTN-DBSを導入した群の方が、より長い罹病期間を有する群より良好な状態が維持される傾向にあった。従来考えられていたより早期にSTN-DBSを導入した方がその有用性をより高く発揮できると考えられた。

文献

- 1) Keller DL: Neurostimulation for Parkinson's disease with early motor complications. N Engl J Med. 2013; 368:2037-2038.
- 2) Charles PD, Van Blercom N, Krack P, Lee SL, Xie J, Besson G, Benabid AL, Pollak P: Predictors of effective bilateral subthalamic nucleus stimulation for PD. Neurology. 2002; 59: 932-934.
- 3) Welter ML, Houeto JL, Tezenas du Montcel S, Mesnage V, Bonnet AM, Pillon B, Arnulf I, Pidoux B, Dormont D, Cornu P, Agid Y: Clinical predictive factors of subthalamic stimulation in Parkinson's disease. Brain. 2002; 125: 575-583.
- 4) Ory-Magne F, Brefel-Courbon C, Simonetta-Moreau M, Fabre N, Lotterie JA, Chaynes P, Berry I, Lazorthes Y, Rascol O: Mov Disord. Does ageing influence deep brain stimulation outcomes in Parkinson's disease? 2007; 22:1457-163.

前立腺癌新規治療薬の開発

大日方大亮¹⁾, 藤原恭子²⁾, 高山賢一³⁾, 浦野友彦³⁾, 山口健哉¹⁾,
上野高浩⁴⁾, 福田昇⁴⁾, 井上聡⁵⁾, 高橋悟¹⁾

The development of novel prostate cancer therapeutic agents

Daisuke OBINATA¹⁾, Kyoko FUJIWARA²⁾, Ken-ichi TAKAYAMA³⁾,
Tomohiko URANO³⁾, Kenya YAMAGUCHI¹⁾, Takahiro UENO⁴⁾,
Noboru FUKUDA⁴⁾, Satoshi INOUE⁵⁾, Satoru TAKAHASHI¹⁾

要旨

前立腺細胞においてアンドロゲンおよびアンドロゲンレセプター (AR) は細胞増殖, さらには細胞癌化と密接に関係している。最近, 前立腺癌において染色体再配列によりアンドロゲン応答遺伝子TMPRSS2と癌原遺伝子ERGが融合し, 進行ならびに治療抵抗性に関与することが注目されている。今回, 大豆イソフラボンの活性体であるエコールと我々が開発した融合遺伝子抑制PIポリアミドを用い, 前立腺癌細胞増殖と, 融合遺伝子の発現頻度の差を検討したところ, 融合遺伝子発現と前立腺癌細胞増殖において有意な抑制が認められた。エコールならびにPIポリアミドは, 融合遺伝子の発現を抑制することにより前立腺癌の発癌ならびに進行を抑制しており, 新規治療薬剤のマテリアルとしての可能性が示唆された。

1. はじめに

前立腺細胞においてアンドロゲンおよびアンドロゲンレセプター (AR) は細胞増殖, さらには細胞癌化と密接に関係している。臨床的に汎用される前立腺癌治療法の一つにアンドロゲン除去療法があり, AR作用の抑制を介して前立腺癌の進行を抑制させる。しかし, 治療経過とともに, 癌細胞の形質が変化し, アンドロゲン除去療法が無効 (castration-resistant) になり, その後の治療に難渋することが多いことが問題点となっている。

最近, 前立腺において染色体再配列によりアンドロゲン応答遺伝子TMPRSS2と癌原遺伝子ETS familyが融合し, 細胞の癌化, または癌の悪性度およびアンドロゲン感受性が変化することが報告され, 注目されている¹⁾。興味深いことに欧米の前立腺癌症例の約80%に発現が認められたとの報告がある一方,

本邦における発現率は約16%前後と低く, 地域/人種差が認められている。この地域/人種差を決定する要因の一つとして食習慣の差が考えられ, 中でも欧米人と日本人の間で摂取量の差が約700倍と言われている大豆イソフラボン (ゲニステイン, ダイゼイン, グリステイン) は有力な原因因子である。本研究において, 大豆イソフラボンの活性体であるエコールを用い, 前立腺癌に与える影響, 特に増殖能力と, 融合遺伝子の発現頻度の差を検討し, さらにエコールと相乗効果のある化学物質を見出し, 将来の副作用の少ない前立腺癌新規治療薬の開発を目指した。

2. 方法

ヒト前立腺癌細胞株LNCaP細胞 (アンドロゲン刺激を行わないとTMPRSS2融合遺伝子を発現しな

1) 日本大学医学部泌尿器科学系泌尿器科学分野
2) 日本大学医学部内科学系総合内科学分野
3) 東京大学医学部附属病院老年病科
4) 日本大学医学部内科学系腎臓高血圧内分泌内科学分野
5) 東京大学大学院医学系研究科抗加齢医学講座
大日方大亮: obinata.daisuke@nihon-u.ac.jp

いことが知られている) をエコール投与群と非投与群に分け、既報を参考にDehydrotestosterone (DHT) を用いたアンドロゲン刺激を行い、それぞれの群で融合遺伝子ならびに下流遺伝子の発現量と細胞増殖能/遊走能を測定した。

融合遺伝子の発現量はLNCaPからRNAを抽出後、cDNAを作製しTMPRSS2-ERGと下流遺伝子であるERGを対象としたqRT-PCRを行った。また細胞増殖能および遊走能は、MTSアッセイおよびCell migrationアッセイを用いて検討した。

3. 結果

まずLNCaP細胞にエコール1 μ Mならびに5 μ Mを投与した結果、TMPRSS2-ERG遺伝子の発現抑制が確認された。同遺伝子の標的遺伝子であるERGに加え、アンドロゲン応答遺伝子であるPSAの発現がエコール5 μ M投与で抑制された(図1)。

MTSアッセイではDHT刺激後4日目のエコール5 μ M投与された細胞群において有意に細胞増殖抑制効果が認められた(図2)。

遊走能アッセイにおいても同様に有意な抑制効果が得られた。続いて、我々が開発したTMPRSS2-ERG抑制ポリアミド²⁾を用いて同様の検討をLNCaP細胞ならびに、もともとTMPRSS2-ERGが発現している前立腺癌細胞株VCaP細胞に対し行ったところ、LNCaP細胞においてはエコールと同様の融合遺伝子発現及び増殖抑制効果を示す一方、VCaP細胞には影響が認められなかった²⁾。

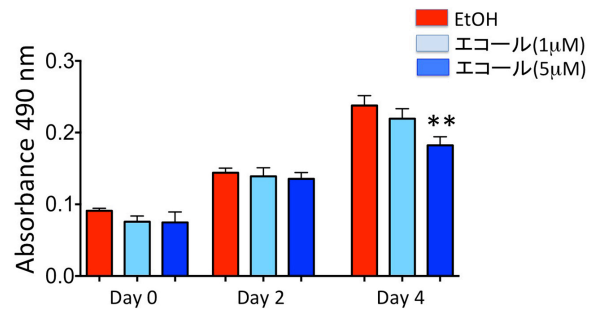


図2 エコールは前立腺癌細胞増殖を抑制させる。図1と同様にアンドロゲン抑制培地で培養したLNCaP細胞にDHT 100 nMならびにEtOHもしくはエコールを投与し指定された時間後MTSアッセイを行い、それぞれの生細胞数を測定、比較した。

4. 考察

アンドロゲン応答遺伝子TMPRSS2および癌原遺伝子ERGのイントロン内にあるAREとARが結合する際に、近傍にある共通配列が切断され、遺伝子転座ならびに融合遺伝子を発生させることが報告されている³⁾。イソフラボンは前立腺癌においてAR活性を抑制させる方向に働くことが過去の報告で認められている⁴⁾。本検討によりイソフラボンはARを抑制させることにより、TMPRSS2-ERG遺伝子を抑制する可能性が示唆された。さらにTMPRSS2-ERG抑制ポリアミドは共通配列を標的としており、VCaP細胞のようにすでに発現している融合遺伝子には影響を与えない代わりに、染色体転座抑制による融合遺伝子の新規発生を減少させ、細胞増殖能に影響を与えることが判明した。結論としてエコールおよびPIポリアミドを併用することにより、相互

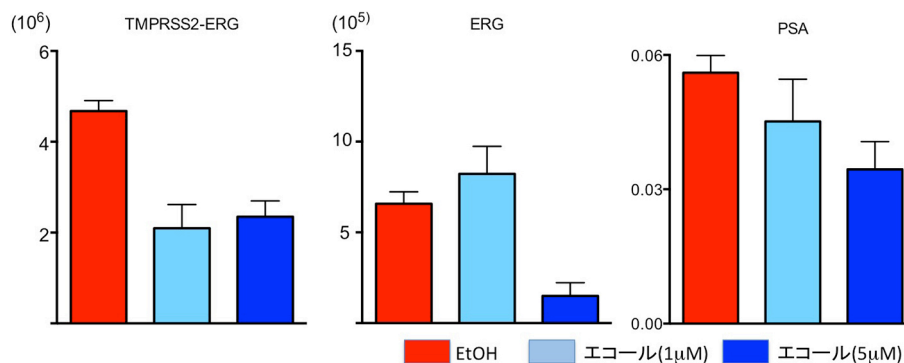


図1 エコールはAR陽性前立腺癌細胞LNCaPにおいてTMPRSS2-ERG融合遺伝子の発現を抑制する。アンドロゲン抑制培地で培養したLNCaP細胞にDHT 100 nMおよびEtOHもしくはエコールを投与、48時間後RNAを回収し、それぞれqRT-PCRを行った。

の抑制機序を補える強力な癌細胞増殖抑制効果が得られる可能性が示唆された²⁾。

文 献

- 1) Tomlins SA, Rhodes DR, Perner S et al. Recurrent fusion of TMPRSS2 and ETS transcription factor genes in prostate cancer. *Science*. 2005; **310**: 644-8.
- 2) Obinata D, Ito A, Fujiwara K et al. Pyrrole-imidazole polyamide targeted to break fusion sites in TMPRSS2 and ERG gene fusion represses prostate tumor growth. *Cancer Sci*. 2014; **105**: 1272-8.
- 3) Lin C, Yang L, Tanasa B et al. Nuclear receptor-induced chromosomal proximity and DNA breaks underlie specific translocations in cancer. *Cell*. 2009; **139**: 1069-83.
- 4) Li Y, Wang Z, Kong D, Li R, Sarkar SH, Sarkar FH. Regulation of Akt/FOXO3a/GSK-3beta/AR signaling network by isoflavone in prostate cancer cells. *J Biol Chem*. 2008; **283**: 27707-16.

小児キャンピロバクター下痢症における 迅速遺伝子診断の有用性に関する研究

Trinh Duy Quang^{1)*}, Ngan Thi Kim Pham^{1)*}, Pattara Khamrin²⁾, Niwat Maneekarn²⁾,
相澤(小峯)志保子¹⁾, 沖津祥子¹⁾, 牛島廣治¹⁾, 早川 智¹⁾

Study on the rapid molecular diagnosis on pediatric *Campylobacter colitis*

Trinh Duy Quang^{1)*}, Ngan Thi Kim Pham^{1)*}, Pattara Khamrin²⁾, Niwat Maneekarn²⁾,
Shihoko AIZAWA¹⁾, Shoko OKITSU¹⁾, Hiroshi USHIJIMA¹⁾, Satoshi HAYAKAWA¹⁾

要旨

キャンピロバクターは細菌性下痢症の原因菌として一般的なもののひとつである。しかし、他の細菌性下痢症やウイルス性下痢症との鑑別は容易ではない。培養による同定には一定の時間と施設を要し、PCR法も一定の設備が必要なため、迅速診断は困難である。我々は、キャンピロバクターの中でも代表的な *Campylobacter jejuni* と *Campylobacter coli* を特殊な器械を要しないLAMP法で検出する方法を確立し、151例の小児下痢症の患者でPCRあるいは培養法と比較してその有用性を検討した。その結果、タイでは小児下痢症の8.6%がキャンピロバクターによるものであり、LAMP法の検出感度・特異性はPCRにほぼ匹敵すること、二種類の菌種を容易に鑑別できることを明らかにした。さらに、キャンピロバクターと下痢症ウイルスの混合感染が半数にみられ、両者を念頭に置いた治療戦略の重要性が示唆された¹⁾。

1. はじめに

キャンピロバクター属は螺旋状のグラム陰性桿菌で現在18種が知られている。多くの動物の消化管に常在するが、獣医学領域では流産の原因菌として知られていたが、ヒトでも1980年代以降下痢症の原因菌として注目されるに至った。その大部分は *Campylobacter jejuni subsp. jejuni* (以下 *C. jejuni*) であるが、一部は *Campylobacter coli* (以下 *C. coli*) である。一方、敗血症や髄膜炎、膿瘍などの検査材料から分離されるキャンピロバクターは *C. fetus subsp. fetus* であることが多く、生物学的性状を異にする。菌の同定には培養法が一般的であるが、数日の期間と培養設備のある細菌検査室が必要である²⁾。特に中央検査室のない一般診療所や検査施設へのアクセスが難しい途上国ではベッドサイドで迅速に確定診断を得る必要がある。本研究で我々はタイ王国の小児糞便検体を用い、Loop-mediated Isothermal Amplification (LAMP) 法による迅速診断の応用を試みた。

2. 対象と方法

タイ王国 Chiang Mai にある Nakornping 病院において、2012年に1月から10月に同病院の倫理委員会と患者・保護者の同意を得て採取した151例の小児下痢症糞便検体を対象とした。対象は全て5歳以下で急性下痢症で同病院に入院した他に大きな合併症や既往歴のない患者である。検体は同病院において不活化しDNAの簡易抽出を行った。LAMP法による検出はLoopamp DNA Amplification Kit (栄研科学・栃木) を用い、添付文書に従って増幅した。*C. jejuni* 及び *C. coli* についてはPCRによる確認を行った。*C. jejuni* の hippurate (hipO) 遺伝子に由来する344bpフラグメント、*C. coli* に特異的な aspartate kinase (ask) に由来する502bpフラグメントを増幅する primer を作成し、^{3,4)} さらに検出困難例では nested PCRにより我々の独自のプライマーによる確認を行った⁵⁾。PCRの後ダイレクトシーケンスで目的としたフラグメントの増幅を確認した。ウイルスの

1) 日本大学医学部病態病理学系微生物学分野

2) Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Chiang Mai University, Chiang Mai, Thailand

Trinh Duy Quang : trinh.duyquang@nihon-u.ac.jp

*第一著者と第二著者は同等の貢献をしている

混合感染を検討するため、我々の開発した MultiplexPCR法によって group A rotavirus, enteric adenovirus, norovirus, sapovirus, astrovirus, Aichi virus, enterovirus, bocavirus, and human parechovirus の検出を行った⁶⁾。尚、本研究は日本大学医学部の倫理委員会承認を受けている (Nos. 22-15 and 25-13-0)。

3. 結果

小児下痢症患者151例の糞便検体で13例 (8.6%) がカンピロバクター陽性であった。この結果は我々の日本人における結果とほぼ一致するが、下痢

症の18%がカンピロバクターだったというタイプにおける過去の報告⁷⁾の1/3であり、地域差や年代の相違が影響している可能性がある。LAMP法による検出結果は、PCR・ダイレクトシーケンス法に一致し、本法が十分な感度と特異性を有することが示唆された。13例中10例 (77%) は1月と2月に集中しており、雨季に多い可能性がある。患児の平均月齢数は13ヶ月 (5ヶ月から34ヶ月) 半数は12-14月齢であった。これは、過去の報告に一致する (10)。興味深いことに13例中7例 (54%) で下痢症ウイルスが陽性であった。すなわち、3例は group A rotavirus, norovirus GII, enteric adenovirus 各2例である。

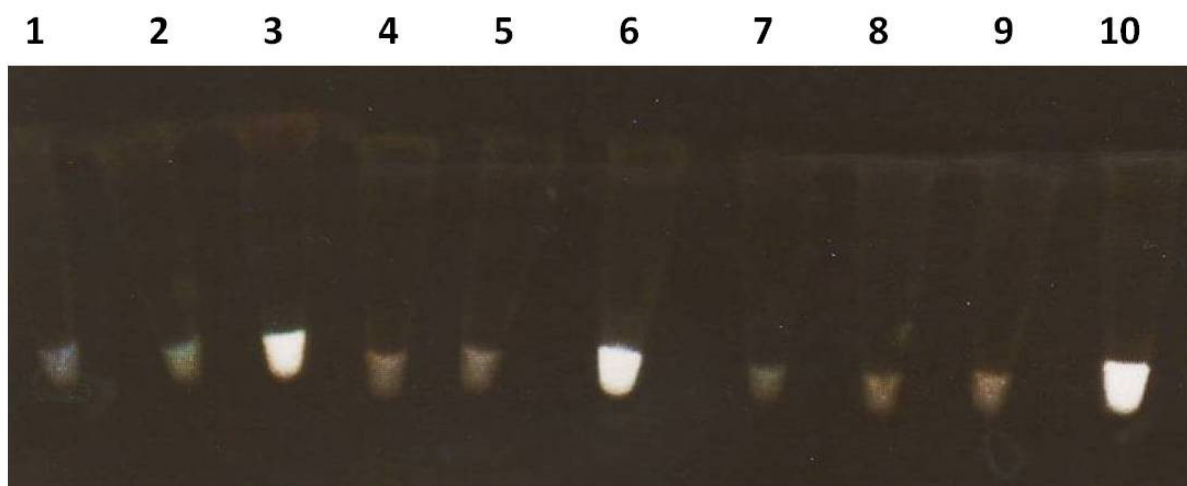


図1 LAMP results (lane 9: negative control, lane 10: positive control)

表1 Summary of LAMP and PCR positive samples

Case No.	Sample No.	Month of specimen collection	Age (month)	LAMP	PCR	Co-infection
1	CMHN 1/12	Jan	13	+	<i>C. jejuni</i>	
2	CMHN 2/12	Jan	13	+	<i>C. coli</i> ¹⁾	
3	CMHN 5/12	Jan	12	+	<i>C. jejuni</i>	Adenovirus
4	CMHN15/12	Jan	8	+	<i>C. jejuni</i>	
5	CMHN21/12	Jan	5	+	<i>C. jejuni</i>	
6	CMHN31/12	Jan	11	+	<i>C. jejuni</i>	Rotavirus A
7	CMHN53/12	Feb	34	+	<i>C. coli</i>	
8	CMHN54/12	Feb	13	+	<i>C. jejuni</i>	
9	CMHN64/12	Feb	14	+	<i>C. jejuni</i>	Rotavirus A
10	CMHN69/12	Feb	9	+	<i>C. jejuni</i>	Rotavirus A
11	CMHN124/12	Aug	14	+	<i>C. jejuni</i>	Norovirus GII
12	CMHN127/12	Aug	12	+	<i>C. coli</i>	Norovirus GII
13	CMHN152/12	Sep	12	+	<i>C. jejuni</i>	Adenovirus

4. 考 察

C. jejuni は *C. coli* と共に1982年、食中毒起因菌に指定されているが、本邦においてサルモネラ、腸炎ビブリオ、黄色ブドウ球菌に次ぐ発生頻度を示し、近年増加傾向にある⁸⁾。東南アジアでは旅行者下痢症の代表的なものであり、成人においては基本的に予後良好であるが、小児では稀に敗血症を来すことや脱水から生命に関わることもある。培養によるキャンピロバクターの細菌学的同定は3-5日を要し、迅速診断は臨床的に極めて価値が高い。重篤な症状や敗血症などを呈した患者では、対症療法と共に適切な化学療法が必要である。我が国の外来でもっとも多く処方されるセフェム系抗菌薬に対しては自然耐性を示すため、第一選択薬剤としてマクロライド系抗菌薬が推奨される。ニューキノロン系に対しては近年耐性菌が増加しており、世界的な問題となっている。我々の研究で特に注目すべき点はキャンピロバクター陽性例の半数に下痢症ウイルスが検出されたことである。

キャンピロバクターは哺乳類腸管の常在菌であり、ヒトでも無症候性キャリアーが偶々ウイルス腸炎に罹患して受診した可能性は否定出来ない。一方、ウイルス腸炎も無症候性に経過することは少なくないが、キャンピロバクターの混合感染でより重篤化する可能性もある。本研究は外国施設で過去に採取された糞便DNAを元にした研究であるため、十分な臨床情報が得られず、これ以上の解析は不可能であった。腸管における粘膜免疫と防御機構の解明のため、さらなる研究が必要である。

5. 結 語

糞便を用いたLAMP法によってキャンピロバクターによる小児下痢症の迅速診断が可能である。タ

イ王国の検体ではキャンピロバクターと下痢症ウイルスの混合感染が高頻度にみられ、ウイルスと細菌が相互に増悪因子となっている可能性が示唆された。

文 献

- 1) Pham NT, Trinh QD, Khamrin P, Ukarapol N, Kongsricharoern T, Yamazaki W, Komine-Aizawa S, Okitsu S, Maneekarn N, Hayakawa S, Ushijima H. Application of the LAMP method for the detection of *Campylobacter jejuni* and *C. coli* from Thai children with diarrhea. *Jpn J Infect Dis.* 2015 Sep 18; **68** (5): 432-3.
- 2) Yamazaki W, Taguchi M, Kawai T, et al. Comparison of loop-mediated isothermal amplification assay and conventional culture methods for detection of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in naturally contaminated chicken meat samples. *Appl Environ Microbiol.* 2009; **75**: 1597-603.
- 3) Yamazaki W. Sensitive and rapid detection of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* using loop-mediated isothermal amplification. *Methods Mol Biol.* 2013; **943**: 267-77.
- 4) Persson S, Olsen KE. Multiplex PCR for identification of *Campylobacter coli* and *Campylobacter jejuni* from pure cultures and directly on stool samples. *J Med Microbiol.* 2005; **54**: 1043-7.
- 5) Ushijima H, Nishimura S, Thongprachum A, et al. Sensitive and rapid detection of *Campylobacter* species from stools of diarrheal children in Japan by LAMP method. *Jpn J Infect Dis.* 2014; **67**: 374-8.
- 6) Saikruang W, Khamrin P, Suantai B, Okitsu S, Hayakawa S, Ushijima H, Maneekarn N. Detection of diarrheal viruses circulating in adult patients in Thailand. *Arch Virol.* 2014 Dec; **159**(12):3371-5. doi: 10.1007/s00705-014-2191-3. Epub 2014 Jul 31.
- 7) Padungtod, P, Kaneene JB. *Campylobacter* in food animals and humans in northern Thailand. *J Food Prot.* 2005; **68**: 2519-26.
- 8) 国立感染症研究所感染症情報センター キャンピロバクター http://idsc.nih.go.jp/idwr/kansen/k05/k05_19/k05_19.html

喘息及びCOPD患者における電子媒体を用いた吸入指導研究

伊藤玲子, 権 寧博, 古川典子, 丸岡秀一郎, 服部知洋, 橋本 修

Study of the teaching inhalation with digital media
to patients with asthma and COPDReiko ITO, Yasuhiro GON, Noriko KOGAWA,
Syuichiro MARUOKA, Tomohiro HATTORI, Shu HASHIMOTO

要旨

吸入薬を用いて治療を行っている喘息・COPD患者に対して行う吸入指導は十分な治療効果を得て、アドヒアランスを維持するために重要である。電子媒体 (iPad など) を用いて吸入指導を行うウェブアプリ「吸入レッスン」を作製し、iPad を用いて視聴する吸入指導の効果を評価した。説明書を用いる従来法群と吸入レッスンを視聴するiPad群の2群に盲検化し各群における吸入手技の改善を検討した。初回吸入指導により患者の吸入手技は従来法群で7項目中1項目、iPad群で3項目が改善した。再診時に手技を確認したところiPad群でのみ改善した手技が維持されていた。

「吸入レッスン」kyunyu.com

1. はじめに

吸入薬は喘息や慢性閉塞性肺疾患 (chronic obstructive pulmonary disease COPD) の治療にとって欠かせない治療方法である。しかし、適切に吸入が行われない場合には期待した効果が得られない。これまでの報告によると4~94%の患者に吸入手技の間違いがある¹⁾。吸入薬を処方すると同時に吸入指導を行う必要がある。しかし、臨床の現場では吸入指導に費やす時間や方法、指導内容の質などの様々な問題があり、充分に行われているとは言い難い。

一方、正しい吸入方法を習得していても治療継続期間が長くなるにつれ、手技は自己流となり、誤りが見られるようになる。修正の為に繰り返しの吸入指導を行っている調剤薬局薬剤師は44.7%でしかない²⁾。

これらの問題を解決し、時間をかけずに一定レベルの吸入指導を繰り返し施行可能なツールとして、iPadやスマートフォンを用いて吸入指導を行うウェブアプリ「吸入レッスン」(kyunyu.com)を作製した。本ウェブアプリは、吸入器の正しい使い方を説

明した4分程度の動画と、間違いやすい手技を二者択一問題にした復習テストからなる。患者は動画で学習し、復習テストで理解度を評価することができる。インターネット環境があればどこでも使用可能である。今回、このウェブアプリを用いて吸入指導を行いその有効性を評価することを目的とした。

2. 対象及び方法

対象は平成26年10月から平成27年3月において本研究参加の承諾を得られたタービュヘイラー製剤を1ヵ月以上使用している喘息及びCOPDの患者。吸入器の使用説明書を用いた従来法により吸入指導を受ける群 (従来法群) とiPadを用いて吸入レッスンを視聴する群 (iPad群) の2群に無作為に割り付けた。初回吸入指導を行った3-6か月後に2回目の吸入指導を行った。初回指導前後、2回目指導前後の吸入手技の正確さを「完全にできる2点」、「複数回施行で誤りあり1点」、「できない0点」でスコア化し評価を行った。評価内容は①吸入器のセット、②吸入器を縦に持つ、③上部、下部の吸入口を手や

口でふさがない, ④十分に息を吐いてから吸入口をくわえる (吸入口に息を吹きかけない), ⑤深く早く胸いっぱい吸い込む, ⑥うがいができる, ⑦トレーナーがなる, の7項目。初回吸入指導で得られた効果の2回目受診時における持続性について評価した。

統計処理は (GraphPad Prism 6 for Windows ver.6.02) を使用し, 有意差はMann-Whitney検定を使用 $p < 0.05$ を有意とした。なお, 本研究は日本大学板橋病院臨床研究審査委員会の承認を得ている。

3. 結果

58名がエントリーされた。吸入手技に誤りのなかった5名を除いた53名を従来法群 (25名), iPad群 (23名) に割り付けた。年齢, 性別, 吸入器の使用期間に両群間で有意差はなかった。吸入指導前の手技スコアも両群間で差はなかった。吸入指導により従来法群では, ②吸入器を縦に持つ ($p=0.0083$) 項目で手技の改善があった。iPad群では①吸入前の薬のセット ($p=0.0094$), ③上部, 下部の空気口を手や口でふさがない ($p=0.0425$), ④十分に息を吐

いてから吸入口をくわえる ($p=0.0403$) の3項目で手技スコアの改善があった (表1)。次に, 3-6か月後の再診時に2回目の吸入指導を行った。従来法群14名, iPad群18名であった。患者背景に2群間の差はなかった。従来法群では初回吸入指導前と比較し, 改善していた項目はなかった。iPad群では初回指導で手技の改善傾向があった①吸入前の薬のセット ($p=0.014$), ③上部, 下部の空気口を手や口でふさがない ($p=0.0388$), ④十分に息を吐いてから吸入口をくわえる ($p=0.0139$) で2回目指導前の手技スコアの改善が有意に維持されていた。(表2)

4. 考察

本研究はタブレット端末を使った吸入指導の初めての報告である。iPadを使って吸入指導を受けた群で従来法群と比べて, 2回目の指導前まで有意に改善した手技が持続していた。理由として, ウェブアプリの親しみやすさに加え, コンテンツの工夫により簡単に理解できる内容となっていたことが挙げられる。タブレット端末を使うことは理解度を助ける以外にも画面をタップする動作や, インタラクティ

表1 初回吸入指導前・後における吸入手技スコア

	従来法 (n=25)			ipad (n=28)		
	平均		P値	平均		P値
	前	後		前	後	
①吸入前の薬のセット	1.76	1.88	0.5312	1.61	1.96	0.0094*
②吸入器を縦に持つ	1.08	1.64	0.0083*	1.46	1.71	0.1888
③上部, 下部の空気口を手や口でふさがない	1.20	1.56	0.1196	1.04	1.46	0.0425*
④十分に息を吐いてから吸入口をくわえる (吸入口に息を吹きかけない)	0.64	1.08	0.1157	0.75	1.25	0.0403*
⑤深く, 早く胸いっぱい吸い込む	1.80	1.88	0.75.3	1.64	1.75	0.6033
⑥うがいができる	1.84	2.00	0.4898	1.75	1.96	0.1362
⑦トレーナーが鳴る	1.80	1.88	0.8046	1.93	1.89	>0.9999
全体	1.45	1.70	0.1742	1.45	1.71	0.1999

表2 初回・2回目吸入指導前における吸入手技スコア

	従来法 (n=14)			ipad (n=18)		
	平均		P値	平均		P値
	1st	2nd		1st	2nd	
①吸入前の薬のセット	1.78	1.50	0.3762	1.44	1.94	0.0140*
②吸入器を縦に持つ	1.29	1.43	0.6473	1.61	1.61	>0.9999
③上部、下部の空気口を手や口でふさがない	1.57	1.71	0.4197	1.06	1.61	0.0388*
④十分に息を吐いてから吸入口をくわえる (吸入口に息を吹きかけない)	0.71	0.79	0.8887	0.61	1.39	0.0139*
⑤深く、早く胸いっぱい吸い込む	1.86	1.71	0.7304	1.50	1.83	0.1553
⑥うがいができる	1.71	1.77	>0.9999	1.61	1.83	0.3569
⑦トレーナーが鳴る	1.86	1.86	>0.9999	1.89	1.89	>0.9999
全体	1.54	1.54	0.8024	1.39	1.73	0.1031

ブに復習テストの結果が示されるといった要素が加わり、より記憶に残りやすかった可能性がある。

これまでもコンピュータープログラムを使った吸入指導の有用性の報告はあるが³⁾、場所や環境が限定されたものであった。いつでもどこでも使えて、個人で所有しているデバイスでも繰り返し視聴できるタブレット端末を患者教育に導入することで、今後、アドヒアランス向上につながるか研究する必要がある。

5. 結 語

タブレット端末を用いて動画と復習テストからなるウェブアプリ「吸入レッスン」を視聴する吸入指導は、吸入手技を改善し、その持続性の評価におい

ても従来法と比較して効果的であった。

文 献

- 1) Lavorini F, Magnan A, Christophe Dubus J, Voshaar T, Corbetta L, Broeders M, et al. Effect of incorrect use of dry powder inhalers on management of patients with asthma and COPD. *Respiratory Medicine*. 2008 Apr; **102**(4):593-604.
- 2) 長瀬 洋, 林 悦, 小林 章. 気管支喘息のアドヒアランス改善のための実態調査: 患者および薬剤師へのインターネットを利用した調査からの検討. *アレルギー・免疫*. 2013/09; **20**(9):1332-47.
- 3) Navarre M, Patel H, Johnson CE, Durance A, McMorris M, Bria W, et al. Influence of an interactive computer-based inhaler technique tutorial on patient knowledge and inhaler technique. *The Annals of pharmacotherapy*. 2007 Feb; **41**(2):216-21.

動脈硬化における超音波を用いた 血管内皮・平滑筋機能に関する研究

藤岡 和美

Study on the vascular endothelial and smooth muscle cell function using ultrasonography in atherosclerosis

Kazumi FUJIOKA

要旨

動脈硬化は血管内皮機能障害を端に発症・進展し、複雑で多彩な経路と multifactorial な病因・病態が交絡する全身性疾患である。これまで flow-mediated vasodilation (FMD) , nitroglycerin-mediated vasodilation (NMD) を含む brachial artery measures と動脈硬化の古典的生化学 markers (内皮・脂質・糖質・肝腎・尿酸・炎症) や全身性の chronic low-grade inflammatory states を現す adiposity markers 間の相関について報告し、内皮・平滑筋機能が全身の動脈硬化の multifactorial な病因・病態を反映することを示唆してきた。今後、さらに多変量解析を用いた検討を行うことで、心腎連関を超える臓器連関を成す複雑で多面的な全身性疾患である動脈硬化の様相について解析を加える。

1. はじめに

「A man is as old as his arteries」はウィリアム・オスラーの有名な言葉だが、21世紀は動脈硬化・抗加齢への関心は以前にもまして非常に高い。動脈硬化は metabolic syndrome 等を基盤とする血管内皮機能障害 (endothelial dysfunction: ED) を端に発症し、atherosclerosis, arteriosclerosis の2つの異なる vascular pathologies を基盤に進展する。FMD, NMD は1990年代に Corretti¹⁾らにより確立された検査法であり、これまで動脈硬化の予防・早期発見・治療効果判定に有用とされてきた。これまで、動脈硬化が複雑で多彩な経路を併せ持つ疾患であり、multifactorial な病因・病態が交絡することの報告²⁻⁶⁾を行い、平成26年2月、第33回日本画像医学会 (会長 松永尚文 山口大学大学院医学系研究科放射線学分野教授) においては「IMTとeGFR間の逆相関、FMDとeGFR間の正相関、FMDとIMT間の逆相関」の演題に対し、会長賞 (写真1) の受賞を得た。今回、平成26年度小澤研究にて採択された、研究課題「Community-based studyにおけるestimated glomerular filtra-

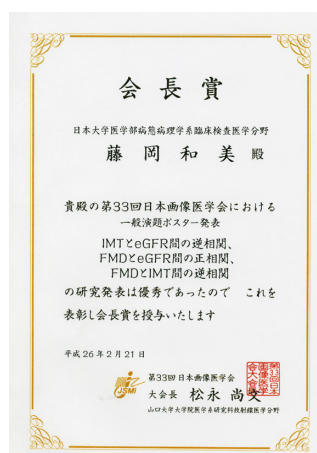


写真1 第33回日本画像医学会 会長賞

tion rate (eGFR) と血管内皮機能の相関についての研究」について報告する。

2. 研究概要

目的

FMDは血管内皮機能をNMDは血管平滑筋機能を反映するmarkerである。また、brachial artery diameter (BAD) は血管構造の形態学的変化をとら

えるとともに血管機能も提供するとされる。最近の報告では, post-nitroglycerin-mediated vasodilation (P-NTGD) はBADよりも厳密な血管径を反映するとされる。さらに, FMD/NMD ratioはFMDよりも鋭敏に内皮機能を示すとされる。さて, EDとchronic kidney disease (CKD) 間の相関は既知の報告であるが, 最近, community-based populationにおいてmild renal dysfunctionを示す症例の中からearly atherosclerosis detectionの重要性が注目されている。これらの報告に基づき明らかな腎疾患のない症例を対象にFMDを含むbrachial artery measuresとeGFR間に相関がみられるか否かの検討を行った。

対象及び方法

内科外来を受診した明らかな腎疾患のない症例64人について検討を行った。FMDの測定は超音波診断装置を用い, 右上腕動脈にて施行した。測定方法はInternational Brachial Artery Reactivity Task Forceのガイドラインに従い, 上腕駆血解放によるFMDとnitroglycerin舌下エアゾール(1噴霧0.3mg)による血管拡張NMDを測定した。また, eGFRは日本腎臓学会の推算式にて算出した。

成績

統計学的検討では相関の検定にSpearmanの相関係数とFisherのr to z変換を用い $p < 0.05$ を統計学的に有意と判定した。1) FMDとeGFR間 ($r = 0.321$, $p = 0.012$) の有意な正相関。2) BADとeGFR間 ($r = -0.233$, $p = 0.073$) には相関を認めなかった。3) NMDとeGFR間 ($r = 0.002$, $p = 0.991$) には相関を認めなかった。4) P-NTGDとeGFR ($r = -0.253$, $p = 0.053$) 間には相関を認めなかった。5) FMD/NMDとeGFR間 ($r = 0.272$, $p = 0.037$) の有意な正相関。

考察

CKD stages 3-5 ($eGFR < 60 \text{ ml/min/1.73m}^2$) 症例では, eGFRとED間の相関は既知の報告であるが, community-based studyでの報告はほとんどなされていない。最近, community-based populationにおいてmild renal dysfunctionを示す症例の中からearly atherosclerosis detectionの重要性が注目されている⁷⁾。今回の検討から, 明らかな腎疾患のない

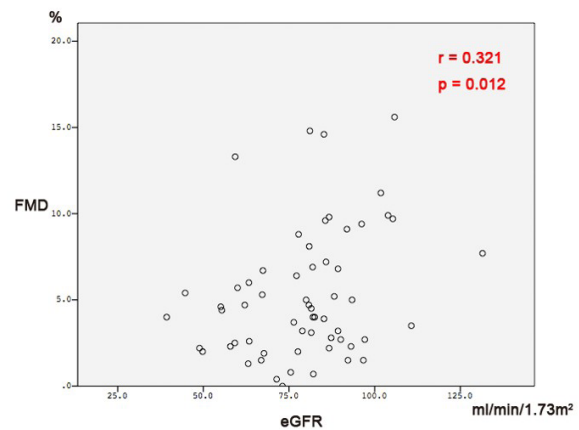


図1 FMDとeGFR間の相関

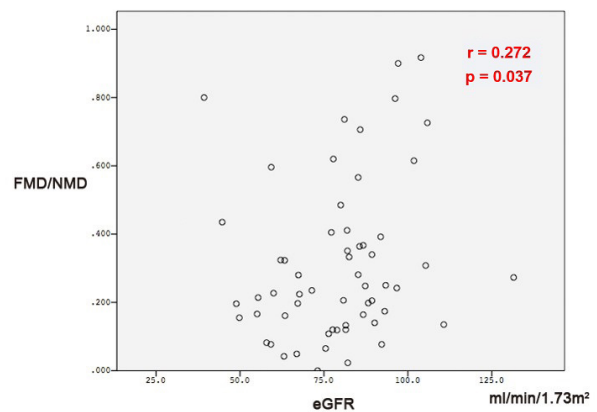


図2 FMD / NMDとeGFR間の相関

症例においてもCVD surrogate markerであるFMDとCKD predictorであるeGFR間に正相関(図1), FMD/NMDとeGFR間に正相関(図2)を各々認め, eGFRが内皮機能を反映する可能性が示唆され, mild renal dysfunctionの中からearly atherosclerotic detectionの重要性を考えた。

結論

明らかなCKDのない症例においてもeGFRが内皮機能を反映する可能性が示唆された。

3. 今後の研究展望

今後, 症例数の蓄積とともに $eGFR < 60 \text{ ml/min/m}^2$ がraised CVD riskとする報告⁸⁾に基づくeGFRのthresholdの検討も重要な課題としたい。また, こ

れまでの単変量解析に多変量解析の検討を行うことで心腎連関を超える臓器連関を成す全身性疾患である動脈硬化の様相について解析を加える。さらに、FMDに加えて新規検査法⁹⁾、reactive hyperemic peripheral arterial tonometry (RH-PAT) 検査による指尖動脈拍動の血流量の変化をreactive hyperemic index (RHI) による(反応性血管拡張指数, 反応性充血指数)で捉えるendo-PATの検討も行うことでさらなる研究の発展に寄与したいと考える。

文 献

- 1) Corretti MC, Anderson TJ, Benjamin EJ, et al. Guideline for the ultrasound assessment of endothelial-dependent flow-mediated vasodilation of the brachial artery: a report of the International Brachial Artery Reactivity Task Force. *J Am Coll Cardiol* 2002; **39**:257-265.
- 2) 藤岡和美, 大石 実, 亀井 聡, 他. FMDとPWV間の逆相関, FMDとIMT間の逆相関. 日本超音波医学会第82回学術集会プログラム・講演抄録集2009; **36**:S333.
- 3) 藤岡和美, 大石 実, 矢野希世志, 他. 頸動脈内膜中膜複合体厚 (intima-media thickness:IMT) と血清尿酸値の正相関. 日本超音波医学会第85回学術集会プログラム・講演抄録集2012; **39**:S541.
- 4) 藤岡和美, 大石 実, 中山智祥, 他. FMDとeGFR間の正相関. FMD/NMD ratioとeGFR間の正相関. 日本超音波医学会第86回学術集会プログラム・講演抄録集2013; **40**:S618.
- 5) 藤岡和美, 大石 実, 中山智祥, 他. FMDとeGFR間の正相関. FMDとSUA間の逆相関. SUAとeGFR間の逆相関 (女性例での検討). 日本超音波医学会第87回学術集会プログラム・講演抄録集2014; **41**:S678.
- 6) 藤岡和美, 大石 実, 中山智祥, 他. 血清ALT, 血管内皮機能, adiposity markers間の相関について. 日本超音波医学会第88回学術集会プログラム・講演抄録集2015; **42**:S519.
- 7) Reffelmann T, Krebs A, Ittermann T, et al. Mild renal dysfunction as a non-traditional cardiovascular risk factor? - Association of cystatin C-based glomerular filtration rate with flow-mediated vasodilation. *Atherosclerosis* 2010; **211**:660-666.
- 8) Foundation NK. K/DOQJ clinical practice guidelines for chronic kidney disease: evaluation, classification, and stratification. *Am J Kidney Dis* 2002; **39**:51-266.
- 9) McCue MC, Marlatt KL, Kelly AS, et al. Evaluation of gender differences in endothelial-independent dilation using peripheral arterial tonometry. *Clin Physiol Funct Imaging* 2012; **32**:94-98.

冠血行再建術後の心血管イベントリスクと 心筋血流SPECT所見との関連

依田俊一¹⁾, 堀 祐輔¹⁾, 田野絢子¹⁾, 中西可苗¹⁾,
鈴木康之¹⁾, 松本直也¹⁾, 平山篤志¹⁾

Relationship between Myocardial Perfusion SPECT and Cardiac Event Risk after Revascularization

Shunichi YODA¹⁾, Yusuke HORI¹⁾, Ayako TANO¹⁾, Kanae NAKANISHI¹⁾,
Yasuyuki SUZUKI¹⁾, Naoya MATSUMOTO¹⁾, Atsushi HIRAYAMA¹⁾

要旨

我が国における心筋血流SPECTで評価した血行再建術後の虚血の改善と予後との関連は不明である。そこで2004年10月から2011年3月の間に安静時TI-負荷時Tc tetrofosmin 心筋血流SPECTを施行し、虚血の確認後CAG/PCIが施行され且つ慢性期にSPECTを行った483例を対象として予後追跡調査を行った。追跡期間に45例に心事故が認められ、内訳は心臓死 (n=13)、非致死的心筋梗塞 (n=3)、不安定狭心症 (n=29) であった。多変量解析の結果から Δ SDS%と負荷時EFが独立した心事故予測因子として抽出され、5%以上の虚血改善群は非改善群と比較して有意に予後良好であった。以上から血行再建術後の虚血の改善は予後改善に寄与し、心筋血流SPECTから得られる虚血改善指標は心事故予測に有用であると考えられた。

1. はじめに

米国のマルチセンタートライアル¹⁾で安定労作性狭心症患者において血行再建術 (PCI) 後に5%以上虚血が改善した患者では予後が改善すると報告されたが、我が国において冠血行再建術後の虚血改善と心事故予測における報告はないため検討を行った。

2. 対象及び方法

虚血性心疾患の既往もしくは疑いにて、2004年10月から2011年3月の間に当院にて安静時TI-負荷時Tc-tetrofosmin dual isotope 心筋血流SPECT²⁻⁴⁾を施行し5%以上の虚血を確認後、冠動脈造影 (CAG) が施行され、冠動脈に75%以上の狭窄病変を有し、治療後慢性期にSPECTを再検した483例を対象に1年以上の予後追跡調査を行った。20歳以下の患者、肥大型・拡張型心筋症の患者、重篤な弁膜症患者、NYHA III以上の心不全患者、SPECTにて虚血が5%未満の患者は対象から除外した。

心電図同期心筋血流SPECT

全例、安静時に²⁰¹Tl (111 MBq) を投与し10分後に16分割心電図同期心筋血流SPECTを撮像し、その後エルゴメーター負荷またはアデノシン負荷を施行し、^{99m}Tc-tetrofosmin (740 MBq) を投与後、30～60分後に16分割心電図同期心筋血流SPECTを撮像した。SPECT血流画像は20分割5段階評価にて視覚的にスコアリングしsummed stress score (SSS)、summed rest score (SRS) を算出し、SSSとSRSの差からsummed difference score (SDS) を算出した。さらにSSS、SRS、SDSを20セグメントモデルの最大スコアの80で割りvisual % myocardiumを算出し、治療前後のSDS%の差から Δ SDS%を算出した。

予後追跡とエンドポイント

全例、慢性期SPECT後から1年以上 (平均追跡期間33.4 ± 16.4月) の予後追跡を行い、エンドポイントは心臓死、非致死性心筋梗塞、不安定狭心症と定義した。

1) 日本大学医学部内科学系循環器内科学分野
依田俊一: Yoda.shunichi@nihon-u.ac.jp

3. 結果

追跡期間に45例に心事故が認められ、内訳は心臓死 (n=13)、非致死的心筋梗塞 (n=3)、不安定狭心症 (n=29) であった。心イベントの有無による患者背景の比較では年齢、性別、心筋梗塞や血行再建の既往、リスクファクター、内服薬、CAG上の病変枝数、治療内容には両群間で有意差を認めなかった。心イベントの有無による核医学的虚血指標および心機能指標の治療前後の推移の比較を表1に示す。SSS%とSDS%は治療前後では両群間で有意に改善していたが、 Δ SDS%はイベント非発生群で有意に大であった (8.3 ± 8.9 vs. 4.4 ± 7.1 ; $p = 0.0037$)。負荷時および安静時の心機能指標 (EDV, ESV, EF) はイベント発生群では変化がなかったが、非発生群では有意な改善を認めた。単変量解析の結果、治療後のSDS%、 Δ SDS%、5%以上の虚血改善、安静時と負荷時の治療後のLVEF、治療後の負荷時LVESVが有意な心事故予測因子であり、多変量解析の結果、 Δ SDS%と負荷時EFが独立した心事故予測因子として抽出された。またカプランマイヤー解析の結果、治療により5%以上の虚血改善が得られた群では、虚血改善が無い群に比して、有意な予後の改善を認め、残存虚血の無い群は、残存虚血があった群に比して、有意な予後の改善を認めた。

4. 考察

本研究において日本人の虚血性心疾患患者においても治療後に5%以上の虚血改善が得られた場合に予後改善を認め、核医学的虚血改善量である Δ SDS%と治療後のLVEFが独立した心事故予測因子であることが明らかになった。5%以上の虚血改善が予後改善につながる結果は、米国のCOURAGE Nuclear substudyと同様の結果であり、この“5%”は人種に関係なく血行再建による虚血改善治療の際の目標値として設定されるべき数字である。しかしCOURAGE Nuclear substudyはあくまでサブ解析のためPCI後の虚血改善を目的としたものではないこと、症例数 (n = 314) も少なく、治療前の虚血量は約8%と比較的軽症虚血例での検討である。また安定労作性狭心症患者を対象としているため、日常臨床では除外することのできない心筋梗塞既往例やより重症例にこの結果を当てはまることは出来ないデメリットがある。本研究は単施設の後ろ向き予後調査研究であるが症例数 (n = 483) も多く、治療前の虚血量は平均で14%と高度虚血例が多く含まれ、心筋梗塞の既往を有する患者にも適用できるモデルであり、本研究結果が日常診療での冠血行再建治療に与える意義は大きいと考えられる。

表1 心イベントの有無による核医学的虚血指標および心機能指標の治療前後の推移の比較

	心イベント (+) N=45		Pvalue	心イベント (-) N=438		Pvalue
	治療前	治療後		治療前	治療後	
SSS%	18.2 ± 11.4	14.0 ± 11.1	0.0025	19.5 ± 11.0	11.5 ± 11.8	<0.0001
SRS%	6.0 ± 7.4	6.1 ± 8.6	0.8580	5.3 ± 8.1	5.7 ± 9.1	0.1458
SDS%	12.3 ± 6.2	7.9 ± 7.3	0.0002	14.2 ± 7.5	5.9 ± 6.4	<0.0001
0%	0	6		0	148	
	0%	13%		0%	34%	
1-4.9%	0	9		0	55	
	0%	20%		0%	13%	
≥5%	45	30		438	235	
	100%	67%		100%	54%	
LVEF						
安静時	53.7 ± 13.7	53.7 ± 14.1	0.9842	56.9 ± 13.9	58.8 ± 14.0	<0.0001
負荷時	50.7 ± 13.4	51.5 ± 13.4	0.5796	54.1 ± 13.5	57.2 ± 13.6	<0.0001
LVEDV						
安静時	97.2 ± 51.4	96.1 ± 44.4	0.7924	93.0 ± 42.9	91.0 ± 42.7	0.0469
負荷時	117.2 ± 54.0	112.8 ± 50.6	0.3732	110.4 ± 47.3	105.3 ± 47.4	<0.0001
LVESV						
安静時	50.9 ± 44.7	49.8 ± 41.1	0.7594	44.9 ± 36.4	42.4 ± 36.7	0.0062
負荷時	64.3 ± 48.2	61.1 ± 46.9	0.4245	55.9 ± 40.8	50.2 ± 40.1	<0.0001

5. 結 語

冠血行再建術後の虚血の改善は予後改善に寄与し、負荷心筋血流SPECTから得られる虚血改善指標は心事故予測に有用であった。

文 献

- 1) Shaw LJ, Berman DS, Maron DJ, Mancini GBJ, Hayes SW, Hartigan PM, et al. Optimal medical therapy with or without percutaneous coronary intervention to reduce ischemic burden: results from the clinical outcomes utilizing revascularization and aggressive drug evaluation (COURAGE) trial nuclear substudy. *Circulation* 2008; **117**: 1283-91.
- 2) Berman DS, Kiat H, Friedman JD, Wang FP, Train KV, et al. Separate acquisition rest thalium-201/stress technetium-99m sestamibi dual-isotope myocardial perfusion single-photon emission computed tomography: A clinical validation study. *J Am Coll Cardiol* 1993; **22**:1455-64.
- 3) Matsumoto N, Sato Y, Suzuki Y, Kunimasa T, Yoda S, Iida J, et al. Prognostic value of myocardial perfusion single-photon emission computed tomography for the prediction of future cardiac events in a Japanese population – A middle-term follow-up study. *Circ J* 2007; **71**:1580-5.
- 4) Yoda S, Nakanishi K, Tano A, Kasamaki Y, Kunimoto S, Matsumoto N, et al. Diagnostic value of automated quantification of nuclear cardiology in Japanese patients with single vessel coronary artery disease: Comparison between Japanese and American normal databases. *J Cardiol* 2013; **62**: 224-9.

星状神経節ブロック及び星状神経節照射による 僧帽筋血流と筋硬度的変化

近藤裕子¹⁾²⁾, 廣瀬倫也²⁾, 前田 剛¹⁾²⁾, 鈴木孝浩²⁾, 吉野篤緒¹⁾

The change in trapezius-muscle blood flow and hardness during stellate ganglion block and linear polarized light irradiation near the stellate ganglion

Yuko KONDO¹⁾²⁾, Noriya HIROSE²⁾, Takeshi MAEDA¹⁾²⁾,
Takahiro SUZUKI²⁾, Atsuo YOSHINO¹⁾

要旨

緊張型頭痛の患者を対象に、低反応レベルレーザーの星状神経節照射 (SGL) 前後における僧帽筋血流と筋硬度的変化を測定した。SGL施行前に比較し、施行後には総ヘモグロビン (Hb) 濃度は有意に低下し、組織酸素化指数 (TOI) は有意に上昇した。SGL施行前後の筋硬度的には有意な変化は認められなかった。SGLは僧帽筋の硬さには影響を及ぼさないが、筋組織のうっ血を改善し、酸素化を上昇させる可能性がある。

1. はじめに

緊張型頭痛は有病率の高いもっとも一般的な頭痛である。その病因は、精神的、身体的ストレスに伴う頭頸部組織の局所循環不全により、頭頸肩部の筋 (僧帽筋、頭板状筋、側頭筋など) に異常緊張が生じるためであると考えられている。ペインクリニック領域における治療としては従来、星状神経節ブロック (SGB) や低反応レベルレーザーの星状神経節照射 (SGL) が行われており、その有用性が認められている¹⁾。これらSGBおよびSGL施行後の症状改善効果は、頭頸肩部筋組織の血流改善に伴う筋緊張緩和により得られると推測されているが、実際に治療前後における頭頸部筋の血流および筋硬度的変化について検討した報告はない。

緊張型頭痛に対して行われる SGB および SGL が僧帽筋の血流改善や筋緊張緩和への有効性を明らかにする目的で、緊張型頭痛を有する患者を対象に SGB および SGL 前後における僧帽筋の血流変化および筋硬度的変化について、近赤外分光法 (NIRS) お

よび筋硬度的計を用いて評価した。本研究は研究遂行中であるため、SGLの研究結果についてのみ報告する。

2. 対象および方法

院内臨床研究倫理審査承認のもと、本研究の同意を得た緊張型頭痛の診断基準 (ICHD-II) を満たした6名 (31 ± 6.2歳) を対象とした。SGL 施行前に安静座位での同側の僧帽筋の筋硬度的を手動組織硬度的計 (PEK-MP: 井元製作所) を用いて測定した。同じ部位にNIRS (NIRO-200NX: 浜松フォトニクス社製) のプローブを貼り付け、安静時仰臥位にて測定を開始し、SGL施行直前の値を基準値とした。NIRSの測定項目は、組織血流量の指標となる総Hb濃度と組織の酸素化の指標となるTOIとした。SGLはスーパーライザーPX (東京医研株式会社) を用い、出力100%、1秒照射、4秒停止のサイクルで10分間片側に照射した。SGL施行直前から施行終了5分後まで、NIRSの測定を継続した。筋血流測定終了後

1) 日本大学医学部脳神経外科学系神経外科学分野

2) 日本大学医学部麻酔科学系麻酔科学分野

近藤裕子: kondo.yuko@nihon-u.ac.jp

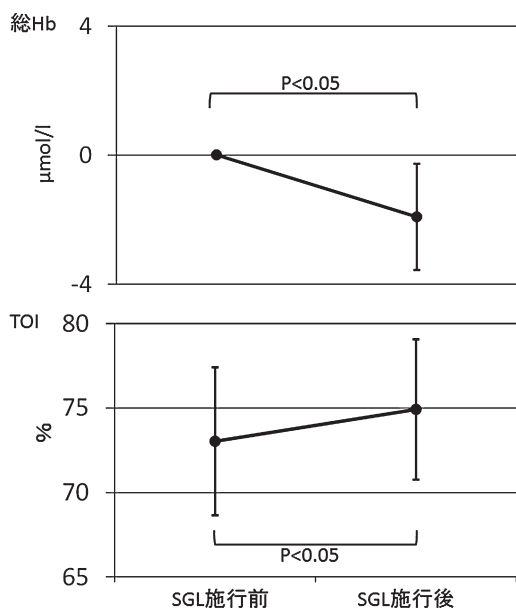


図1 SGL前後での総Hb濃度とTOIの変化

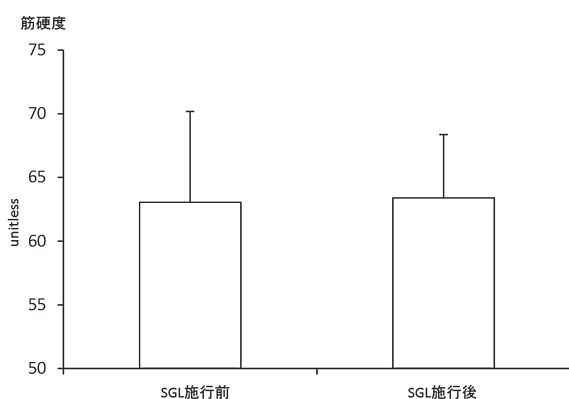


図2 SGL前後での筋硬度変化

にNIRSのプロープを剥がし、同部位の安静座位での筋硬度を測定した。筋硬度はSGL施行前後でそれぞれ3回ずつ測定し、平均値を算出した。

SGL施行前と施行5分後の総Hb濃度とTOI、および筋硬度の変化をpaired t-testを用いて比較した。

3. 結果

図1にSGL施行前後での総Hb濃度変化とTOIを示した。総Hb濃度は施行後に有意に低下し ($P = 0.035$)、TOIは有意に上昇した ($P = 0.006$)。図2にSGL前後での筋硬度の変化を示した。SGL前後で有意な変化は認められなかった ($P = 0.776$)。

4. 考察

本研究では、SGL施行後において僧帽筋組織のTOIが上昇し、総Hb濃度が減少した。この結果は、SGLにより僧帽筋組織の血流量は減少するが、酸素化は上昇することを示すものである。一般的に、SGLは星状神経節での交感神経活動の抑制を介して組織血流量を増加させるが^{1,2)}、本研究では逆に組織血流量の減少が認められた。NIRSによる組織循環評価では、今回の結果のように血流量の減少とともに酸素化が上昇する場合は、組織でのうっ血状態の改善が推定される。以上より、本研究結果からは、緊張型頭痛患者の僧帽筋組織はうっ血状態に陥っており、SGLはそのうっ血状態を改善する効果を有することが示唆された。

5. 結語

緊張型頭痛の患者を対象に、SGL前後での僧帽筋血流と筋硬度変化を測定した。SGLには僧帽筋のうっ血改善を介して、組織の酸素化を改善する効果がある可能性がある。

文献

- 1) 輪島善一郎, 設楽敏朗, 井上哲夫, 他: 直線偏光型近赤外線治療器 (スーパーライザーTM) による星状神経節近傍照射の皮膚温, 皮膚血流量に及ぼす影響. 麻酔 **45**: 433-438, 1996
- 2) 平野真由美, 藤江 透, 中村治正, 他: 直線偏光型近赤外線の星状神経節近傍照射の上肢交感神経活動に与える影響. ペインクリニック **16**: 689-692, 1995

血中CRP複合体のプロテオーム解析

小倉彩世子¹⁾, 中山智祥^{1,2)}, 下澤達雄³⁾

Proteome analysis of C-Reactive Protein (CRP) binding protein

Sayoko OGURA¹⁾, Tomohiro NAKAYAMA^{1,2)}, Tatsuo SHIMOSAWA³⁾

要旨

C-reactive protein (CRP) は肝臓で産生され、炎症などの刺激によって数百倍にも産生が増加し、血清中のCRP濃度は感染症の重症度や組織傷害の有無の判定に広く用いられている。CRPは多糖体やリン酸などと結合しており、複合体を形成していることが報告されている。これらのCRPの複合体についてはいくつか測定報告があるが、臨床的意義および病態との関連については不明なことも多い。CRPに結合している複合体および、CRPとの結合しているcomplexを抗CRP抗体で免疫沈降したものとNegative control (mouse IgG) で免疫沈降したもので比較した。さらにCRP正常、および高値の血清を免疫沈降したものを二次元泳動し、質量分析装置を用いてタンパク質の解析を行った。その結果、新たにCRPに結合するタンパク質としてVitamin D binding proteinが同定された。

1. はじめに

C-reactive protein (CRP) は肝臓で産生され、炎症などの刺激によって数百倍にも産生が増加し、血清中のCRP濃度は感染症の重症度や組織障害の有無の判定に広く用いられている。一方正常血清中にも微量ながら存在しており、その意義に興味もたれている。近年では動脈硬化や冠動脈疾患の早期診断・治療の経過観察として高感度CRP測定法の開発などが行われてきた。CRPは多糖体やリン酸などと結合しており、複合体を形成していることが報告されている¹⁾。これらのCRPの複合体についてはいくつか測定報告があるが、臨床的意義および病態との関連については不明なことも多い。近年CRPとβ2-glycoproteinが酸化LDLと複合体を形成していることがわかり、この複合体は動脈硬化性疾患である糖尿病患者血中、特にIntima media thickness (IMT) で診断される動脈硬化陽性患者で特異的に検出され、急性炎症性のCRP陽性患者では検出さ

れないことが報告された²⁾。さらに、この複合体は高感度CRPと高い相関性を示し、高感度CRPの本体が複合体であると考えられている。よってCRP複合体が慢性炎症マーカーになりうることが今後期待されている。本研究の目的は、CRP複合体のプロテオーム解析を行い、CRP複合体を構成するタンパク質を特定し、病態との関連性を明らかにすることによって、新たな慢性炎症マーカーを臨床検査に応用する事である。

2. 対象及び方法

対象として2012年から2014年に駿河台日本大学病院を受診した外来・入院患者残余血清を用いた。本研究を遂行するにあたって当該倫理委員会に申請し承認を得た。使用まではプール凍結し保存した。Magnetを用いた免疫沈降法で抗CRP抗体 (Thermo Fisher Scientific社) とNegative control (mouse IgG, Santa Cruz社) をおよびProtein A/G ビーズ (Pierce

1) 日本大学医学部 病態病理学系 臨床検査医学分野

2) 日本大学医学部 病態病理学系 コンパニオン診断学分野

3) 東京大学医学部附属病院 検査部

小倉彩世子: ogura.sayoko@nihon-u.ac.jp

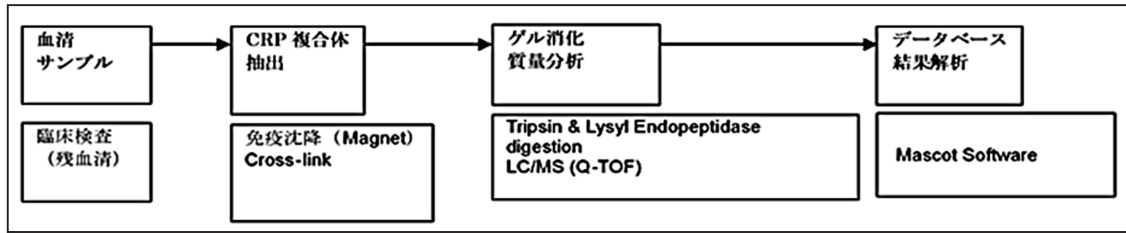


図1 CRP複合体検出の流れ

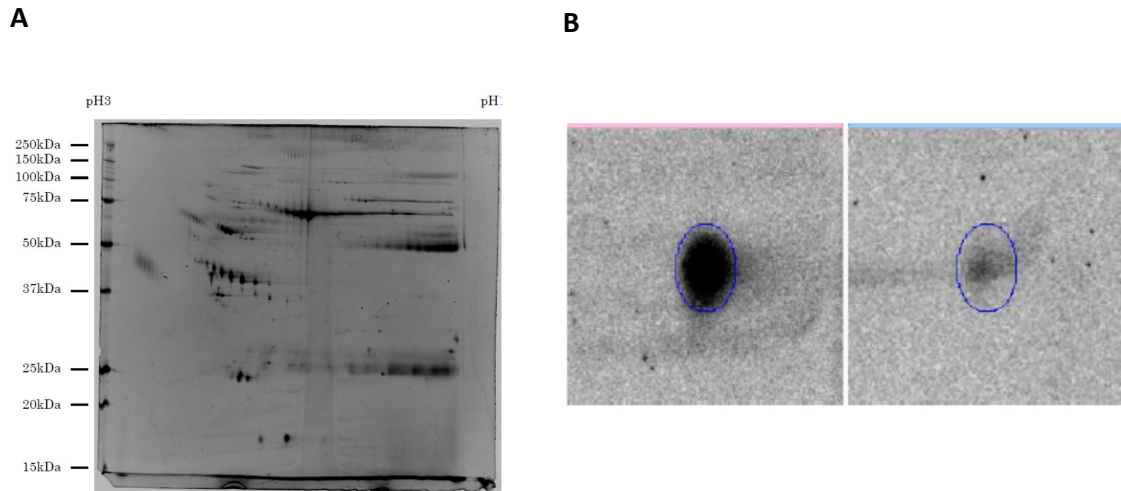


図2A・B 2次元電気泳動 ゲルスロット解析

社)を結合させ、その後血清とともに1時間培養した。結合した蛋白を2次元電気泳動 (pH3-10) にて泳動し、Gel spotを画像解析ウェア (SameSpots) にて解析し、発現量の違いの認められるスポットを切り出し、LC-MS/MS解析を行った。質量分析から得られたデータはMascot software (Matrix Science社) にてデータベースと照合し同定を行った。

3. 結果

抗CPR抗体で免疫沈降したものとNegative control (mouse IgG) で免疫沈降したものをそれぞれLC/MSにて解析を行ったがいずれもHuman IgGやAlbuminなどの血中蛋白が多く、違いを見つけるのは困難であった。その為IgGやAlbuminを除去するDepletion カラムの使用を試みた。しかしSDS page電気泳動にて、DepletionカラムによってCRPと結合する蛋白の減少が認められることが確認された。そのため、Depletionカラムは用いず免疫沈降を行い、2次元電気泳動によってスポット解析を行う事

とした。2次元電気泳動 (pH 3.0-10) では免疫沈降後も数多くのスポットが検出された (図2A)。CRP陽性プール血清とCRP陰性プール血清の電気泳動の結果をゲルスロット解析したところ、3つのスポットに変化が認められた。発現変化の強いスポット (図2B) をLC-MS/MS解析を行った。幾つかの既知の蛋白が検出され (表1)、そのうち2次元電気泳動の泳動結果と一致するVitamin D binding protein 53kDが同定された。

4. 考察

今回の結果からCRP複合体としてVitamin D binding proteinが新たに同定された。Vitamin D binding proteinはビタミンDと結合し、血中でのVitamin Dの濃度やVitamin D binding proteinの濃度は冠動脈疾患と相関があるとの報告がある³⁾。今後はCRP複合体としてのVitamin D binding protein量を測定し、臨床的意義を検討する。

表1 LC-MS/MSによって同定された蛋白

Identified Proteins	Accession Number	Molecular Weight
Vitamin D-binding protein OS=Homo sapiens GN=GC PE=1 SV=1	sp P02774 VTDB_HUMAN	53 kDa
Haptoglobin OS=Homo sapiens GN=HP PE=1 SV=1	sp P00738 HPT_HUMAN	45 kDa
Alpha-1-antitrypsin OS=Homo sapiens GN=SERPINA1 PE=1 SV=3	sp P01009 A1AT_HUMAN	47 kDa
Angiotensinogen OS=Homo sapiens GN=AGT PE=1 SV=1	sp P01019 ANGT_HUMAN	53 kDa
Ig gamma-1 chain C region OS=Homo sapiens GN=IGHG1 PE=1 SV=1	sp P01857 IGHG1_HUMAN (+1)	36 kDa

謝辞

本研究は平成26年度日本大学医学部学術研究助成金「土岐研究」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) Chang MK, Binder CJ, Torzewski M, Witztum JL: C-reactive protein binds to both oxidized LDL and apoptotic cells through recognition of a common ligand: Phosphorylcholine of oxidized phospholipids. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2002) **99**(20):13043-13048.
- 2) Tabuchi M, Inoue K, Usui-Kataoka H, Kobayashi K, Teramoto M, Takasugi K, Shikata K, Yamamura M, Ando K, Nishida K, Kasahara J et al: The association of C-reactive protein with an oxidative metabolite of LDL and its implication in atherosclerosis. *J Lipid Res* (2007) **48**(4):768-781.
- 3) Rocchiccioli S, Andreassi MG, Cecchetti A, Carpegiani C, L' Abbate A, Citti L: Correlation between vitamin D binding protein expression and angiographic-proven coronary artery disease. *Coron Artery Dis* (2012) **23**(7):426-431.

糞便検体におけるノロウイルス迅速検出法の研究

Pattara Khamrin^{1,2)}, Aksara Thongprachum²⁾, Niwat Maneekarn¹⁾,
沖津祥子²⁾, 牛島廣治²⁾, 早川 智²⁾

Study on the rapid detection for Norovirus genome in stool samples

Pattara Khamrin^{1,2)}, Aksara Thongprachum²⁾, Niwat Maneekarn¹⁾,
Shoko OKITSU²⁾, Hiroshi USHIJIMA²⁾, Satoshi HAYAKAWA²⁾

要旨

ノロウイルス感染は小児あるいは成人における急性下痢症の原因として極めて重要である。本症自体は予後良好の疾患であるが、感染力が強く迅速な確定診断にも基づく適切な衛生管理が要求される。本研究ではヒト糞便検体を用いRT-PCRダイレクトシークエンス法とイムノクロマトグラフィ法と比較を行い、後者が十分な感度と特異性を有することを明らかにした¹⁾。

1. はじめに

ノロウイルスはエンベロープを持たない直径30-38 nmの正二十面体ウイルス粒子に7,500塩基対のプラス鎖の一本鎖RNAゲノムを有する一群のウイルスである。近縁に同じくカリシウイルス科のサポウイルスがあり、ともに経口感染によって小児・成人に嘔吐、下痢などの急性胃腸炎症状を起こす。ノロウイルス感染は全世界的に分布し、年間2億人以上が罹患する²⁻⁴⁾。多くは数日の経過で自然に回復するが時に重篤化し、感染力が強いことから秋口から春先に集団発生することも多い。感染者の糞便・吐瀉物およびこれらに汚染された物品類、汚染された食品（特に加熱不十分な場合）が感染源の代表的なものであるが、稀に飛沫感染の報告もある。老人施設や医療機関などでの集団発生も多く、迅速な診断と衛生管理が要求される。ノロウイルスは培養細胞や実験動物への感染がいまだに成功していないため、診断にはウイルス遺伝子やウイルスタンパクの検出が必須である。我々は本研究において、現時点でベッドサイドでの応用が可能な三つのイムノクロマトグラフィとRT-PCR法の感度と特異性を比較検討した。

2. 対象と方法

本人と採取医療機関、日本大学医学部倫理委員会、バイオリスク管理委員会の許諾を得て、2011年から2012年に日本国内の7箇所の医療機関で採取された50例のウイルス腸炎の糞便検体を対象とした。（ノロウイルス30例非ノロウイルス20例）対象は全て急性下痢症の他には大きな合併症や既往歴のない患者である。検体は採取後に不活化し既に報告した方法に従って日本大学でRNAの簡易抽出、逆転写とPCR増幅を行った⁵⁾⁶⁾。ノロウイルスの遺伝子解析はWeb-based NoV genotyping toolを用いた。さらにウイルスの混合感染を検討するため、我々の開発したMultiplexPCR法によってgroup A rotavirus, enteric adenovirus, norovirus, sapovirus, astrovirus, Aichi virus, enterovirus, bocavirus, and human parechovirusの検出を行った。ノロウイルスタンパクの検出は国内で市販される3つのイムノクロマトキット（GEテスト イムノクロマトーノロ（ニックスイ）、イムノキャッチ®ーノロ（栄研）、クイックナビ™ーノロ（デンカ生研））を使用した。

1) チェンマイ大学医学部微生物学講座

2) 日本大学医学部病態病理学系微生物学分野

早川 智 : hayakawa.satoshi@nihon-u.ac.jp

表 3 つのイムノクロマト法によるノロウイルス検出結果

NoV IC	ImmunoCatch-Noro	Quick Navi-Noro 2	GE test Noro Nissui
Sensitivity (%)	96.7	96.7	93.3
Specificity (%)	100	100	100
Positive predictive value (%)	100	100	100
	Positive/Negative	Positive/Negative	Positive/Negative
NoV GII.3 (n=2)	2/0	2/0	1/1
NoV GII.4 (n=24)	23/1	23/1	23/1
NoV GII.4 + HBoV (n=1)	1/0	1/0	1/0
NoV GII.14 (n=2)	2/0	2/0	2/0
NoV GII.14 + HBoV (n=1)	1/0	1/0	1/0
Non-NoV (n=20)	0/20	0/20	0/20
Total (n=50)	29/21	29/21	28/22

3. 結果

ノロウイルス感染がPCRで確認できた30検体において、GEテスト イムノクロマトーノロ、イムノキャッチ®ーノロ、クイックナビ™ーノロは各々29,28,29例が陽性であり、感度は96.7, 96.7,93.3%であった。非ノロウイルス腸炎では全てが陰性であり、特異性はいずれも100%であった。ノロウイルス陽性例では3つの遺伝子型すなわちGII.3, GII.4, GII.14のいずれかを検出したが、2例はボカウイルス(HBoV)とGII.4あるいはGII.14の混合感染であった。

4. 考察

ノロウイルスの培養が現時点では不可能なことから、RT-PCRとダイレクトシークエンスが確定診断の決め手であるが、核酸抽出とPCR増幅、シークエンスは第一線の市中病院では容易になし得るものではない。固相化した抗体の発色反応を利用したイムノクロマト法は近年、インフルエンザやB型肝炎など多くのウイルス感染症のベッドサイド診断に応用されているが、本研究より市販されているキット全てが高い感度と特異性を有することが判明した。各々1-2例の偽陰性例が存在したが陰性例ではウイルスコピー数が少なく、検出感度に達しなかった可能性がある。この点を考慮すると、臨床的にノロウイルス感染が疑われる場合は複数回の検査を繰り返すことが重要と考えられた。

5. 結語

糞便を用いたノロウイルスの迅速診断にはイムノクロマト法が有用であるが、感度の点でRT-PCRに及ばない事がある。臨床的に強くこれを疑う場合は複数回の解析を行うことが推奨できる。

文献

- 1) Khamrin P, Thongprachum A, Okitsu S, Maneekarn N, Hayakawa S, Ushijima H. Comparison of three rapid tests for detection of norovirus in stool samples of acute gastroenteritis pediatric patients. *J Trop Pediatr*. 2014 Dec; **60**(6): 481-3. doi: 10.1093/tropej/fmu046.
- 2) Bitler EJ, Matthews JE, Dickey BW, et al. Norovirus outbreaks: a systematic review of commonly implicated transmission routes and vehicles. *Epidemiol Infect* 2013; **141**: 1563-71.
- 3) Donaldson EF, Lindesmith LC, Lobue AD, et al. Norovirus pathogenesis: mechanisms of persistence and immune evasion in human populations. *Immunol Rev* 2008; **225**: 190-211.
- 4) 国立感染症研究所感染症情報センターノロウイルス <http://idsc.nih.go.jp/disease/norovirus/>
- 5) Pham NT, Trinh QD, Chan-It W, et al. A novel RT-multiplexPCR for detection of Aichi virus, human parechovirus, enteroviruses, and human bocavirus among infants and children with acute gastroenteritis. *J Virol Methods* 2010; **169**: 193-7.
- 6) Yan H, Yagyu F, Okitsu S, et al. Detection of norovirus(GI, GII), Sapovirus and astrovirus in fecal samples using reverse transcription single-round multiplex PCR. *Journal of Tropical Pediatrics* Vol. 60, No. 6 *J Virol Methods* 2003; **114**: 37-44.

冠動脈不安定プラークの発展及び破綻のメカニズム

平 山 篤 志

The mechanism of the progress and rupture of coronary artery unstable plaque

Atsushi HIRAYAMA

要旨

我々の講座では、不安定冠動脈プラークの発展と退縮のメカニズムに関して、長年にわたって研究を行っている。研究者を招へいすることにより、より早く研究を進める事が期待される。カテーテル治療を受ける冠動脈疾患の患者から採血し、血管内イメージング検査で得られたプラークの特性とマルチバイオマーカーの相関を分析し、不安定プラークの予知とプラークの進展、改善に関連するバイオマーカーを探す。また急性心筋梗塞における冠動脈責任病変プラークの特徴の検討するため、AMIで緊急カテーテル治療を受けた患者の血管内超音波（IVUS）画像を解析し、完全閉塞病変、破綻したプラークの特徴、また破綻部位等を検討する。

1. 招へい概要

我々の講座では、多種類の血管内イメージング法を用いて冠動脈プラークの発展と退縮のメカニズムに関して、長年にわたって研究を行っている。画像解析、またサンプルの調整には多くの人員と時間が必要であり、招へい研究者により、解析をより迅速に行って、より早く研究を進める事が出来る。

招へい研究者 鄭桂安（中国福建医科大学附属漳州市病院 循環器内科）

招へい者（受入れ研究者）

平山篤志（日本大学医学部内科学系循環器内科学分野）

招へい期間

平成26年4月1日～平成27年3月31日

研究日程・体制

日本大学医学部内科学系循環器内科学分野、および先端心血管画像解析学分野（寄附講座）にて研究を行う。研究は循環器内科学分野平山篤志（教授）、廣高史（准教授）、高山忠輝（准教授）、先端心血管画像解析学分野李予昕（助教）の指導の下で行う。

定期的に、研究ミーティングを行い、研究の進捗を把握する（写真1、研究ミーティングの様子）。

最初の3ヶ月間、毎週の月、火、木曜日に臨床カテーテル治療現場で見学し、カテーテル治療と血管内イメージングを習得する。その後の1ヶ月間、血管内イメージングの解析を学習する。血管内イメージングの解析を完全習得後、独立で解析を行う。最後の3ヶ月間解析データをまとめ、論文を作成する。

2. 研究目的と方法

血管内超音波、血管内視鏡、OCT等冠動脈血管内イメージングの進歩は著しく、冠動脈プラークの器質の変化をより正確に検出することができるようになってきているが、血管内イメージングは侵襲的な検査であり、かつ高額な費用であるため、カテーテル治療を受ける患者以外に施行することはできない。代謝異常、機能異常を反映しているバイオマーカーが冠動脈粥腫の性状を反映できるかはまだ分かっていない。我々は血管内イメージングで得られた冠動脈プラークの器質の変化とバイオマーカーか

ら得られた代謝、機能の異常の変化の関連性を検討し、プラークの特性とバイオマーカーの相関性を証明し、バイオマーカーを複数用いることにより、プラークの特性と不安定プラークを予知する。

急性心筋梗塞の発症は冠動脈不安定プラークの破綻、侵蝕とそれに伴い血栓が形成し、血管が塞がれることで起こることが明らかになってきたが、冠動脈造影における完全閉塞病変と不完全閉塞病変のプラークの特徴、また、破綻したプラークの特徴、破綻部位など詳しいメカニズムはまだわかっていない。我々はAMIで緊急カテーテル治療を受けた患者の血管内超音波(IVUS)画像を解析し、完全閉塞病変、破綻したプラークの特徴、また破綻部位等を検討する。

3. 研究実施内容

冠動脈造影とカテーテル治療を受ける冠動脈疾患の患者から採血し、様々なマルチバイオマーカーを測定する。また、血管内超音波、血管内視鏡、OCTなどの血管内イメージング検査を用いて、冠動脈プラークの特性を定性かつ定量的に解析する(写真2, 血管内超音波画像を解析する様子)。経時的に3年

後まで調査し、期間内に冠動脈造影が必要となった場合、上記の採血と血管内イメージング検査を施行する。プラークの特性、進展、改善とマルチバイオマーカーの相関を分析し、不安定プラークの予知とプラークの進展、改善に関連するバイオマーカーを探す。

後ろ向き観察研究で、急性心筋梗塞で緊急カテーテル治療を受けた患者の血管内超音波画像を解析し(写真2)、造影上病変狭窄度、責任病変の血管内腔面積/体積、血管面積/体積、粥腫面積/体積、線維、脂質、壊死コア、石灰化等の粥腫成分(iMAP-IVUS)の量と立体構造、破綻部位等を検討する。

4. 研究成果

冠動脈責任病変の粥腫量と粥腫成分は血中HbA1C、HDL-C、白血球レベルなどと相関していた。血中HDL-Cレベルは病変の狭窄度とプラークの量などと逆相関した。

急性心筋梗塞責任病変の粥腫形態と成分は粥腫の破綻と冠動脈完全閉塞において重要な役割を果たした。壊死コア一番大きい所は破裂可能性が最も高いであり、破綻は殆ど最大プラークバーデンと最小内腔面積より近位で行う。

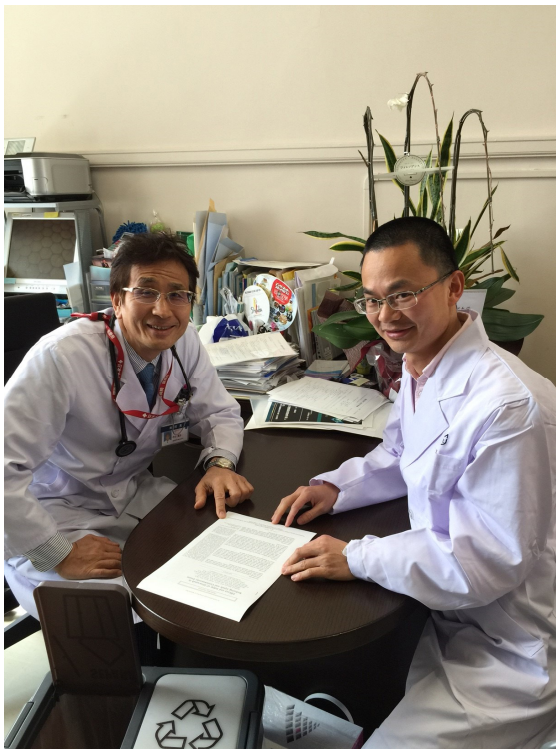


写真1

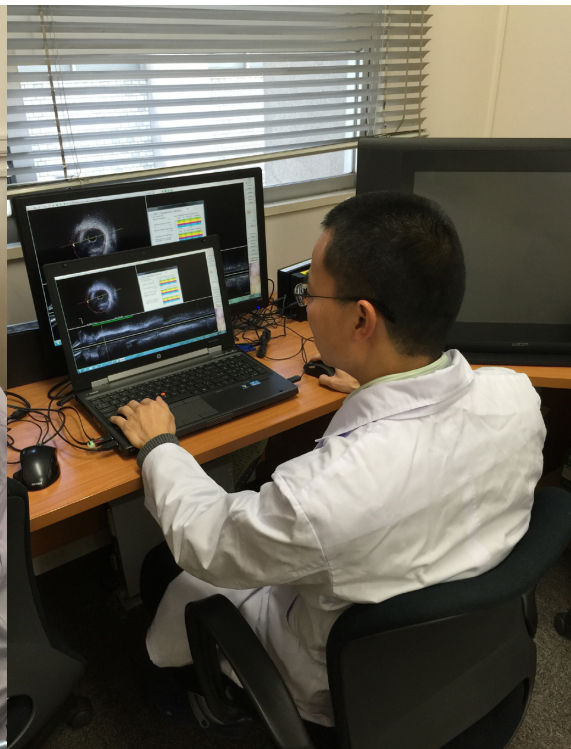


写真2

研究発表

- 1) Guian Zheng, Yuxin Li, Takafumi Hiro, Tadateru Takayama, Yoshiharu Higuchi, Daisuke Fukamachi, Hironori Haruta, Mitsumasa Sudo, Toshihiko Nishida, Satoshi Saito, Atsushi Hirayama. The role of plaque morphology, plaque composition and spatial distribution of plaque vulnerabilities in plaque rupture and coronary occlusion in patients with acute myocardial infarction. 投稿中
- 2) Guian Zheng, Yuxin Li, Huishan Huang, Jinghan Wang, Atsushi Hirayama, Jinxiu Lin. The Effect of Statin Therapy on Coronary Plaque Composition Using Virtual Histology Intravascular Ultrasound: A Meta-analysis. Plos One. 2015 Jul30; 10(1); e0133433
- 3) Guian Zheng, Xudong Ma, Yuxin Li, Jingcong Zhuang, Atsushi Hirayama. Efficacy and Safety of Riociguat treatment versus Placebo in Pulmonary Hypertension: A Systematic Review and Meta-analysis of Randomized Controlled Trials. 投稿中
- 4) Yuxin Li, Takafumi Hiro, Guian Zheng, Qing-Fei Lin, Tadateru Takayama, Yoshiharu Higuchi, Daisuke Fukamachi, Mitsumasa Sudo, Toshihiko Nishida, Satoshi Saito, Tsutomu Hirano, Atsushi Hirayama. The different roles of small dense low-density lipoprotein-cholesterol and high-density lipoprotein-Cholesterol subfractions on plaque morphology and composition in coronary culprit lesions. 論文作成中

インフルエンザウイルスと口腔・気道細菌との相互作用の機序と呼吸器疾患重症化の病態の解明

山本樹生¹⁾, 黒田和道²⁾

Study on the mechanism of exaggeration by both influenza virus and oral/respiratory tract bacteria and the pathogenesis of exaggeration for respiratory disease

Tatsuo YAMAMOTO¹⁾, Kazumichi KURODA²⁾

要旨

インフルエンザの病態悪化の機構を解明し、有効な対策を提案することが本プロジェクトの目的であった。平成 22 年のプロジェクト開始から 5 年が経過し、平成 27 年 3 月をもって本プロジェクトは終了した。本プロジェクトの最重要課題は、口腔・気道の細菌や体液中阻害因子がインフルエンザウイルス感染にどのような影響を与えるかを明らかにすることであったが、この目的はほぼ達成された。インフルエンザ重症化のメカニズムに関しても重要な知見が蓄積された。例えば、マウスをモデルとした、インフルエンザの危険因子としての妊娠の問題を解明するための研究の成果が挙げられる。また、インフルエンザ感染重症化に係わる基礎疾患としてよく知られる、慢性閉塞性肺疾患 (COPD)、気管支喘息および間質性肺炎についての研究の進展も重要な成果である。さらに、インフルエンザ重症化の機構を理解するためには、インフルエンザウイルス感染機構の詳細な理解が不可欠であるが、これに関連し、宿主因子とインフルエンザウイルス遺伝子産物との相互作用に注目した研究が大きな成果をあげた。また、インフルエンザの流行を考えると、日本国内のみの流行動態だけでなく海外の状況にも注目する必要がある。そのためには、海外とのネットワークの構築が必要であるが、海外で収集した臨床材料を用いた解析を行った。

はじめに

インフルエンザは、高齢罹患患者において重症化率・致死率が著しく高まることが知られており、高齢化社会を迎えている日本では、インフルエンザに対する有効な対策の確立は喫緊の課題と考えられる。特に、インフルエンザ重症化の機構の解明は、高齢患者の救命率の上昇につながることを期待される。そこで、インフルエンザの病態悪化の機構を解明し、有効な対策を提案することが本プロジェクトの目的であった。そこで、インフルエンザの病態悪化の機構を解明し、有効な対策を提案することが本プロジェクトの目的であった。平成 22 年にプロジェクトは開始され、平成 27 年 3 月をもってプロジェクトの終了を迎えた。この間プロジェクト参加

者各位の協力により着実な成果を蓄積できたと考えている。ここにその成果の一端を紹介したい。

1. インフルエンザウイルスと口腔・気道細菌との相互作用の解明

インフルエンザウイルスのノイラミニダーゼ (NA) はウイルスの HA が認識して吸着する細胞上のレセプターを破壊する酵素活性を持つ。これにより子孫ウイルスは感染細胞から遊離し、感染を新しい細胞に広げることができる。また、体液中に含まれるレセプター様物質を破壊することにより、これらの物質によるインフルエンザウイルス感染抑制効果を減弱する役割も担っている。現在広く処方されている抗インフルエンザ薬であるタミフルやリレン

1) 日本大学医学部産婦人科学系産婦人科学分野

2) 日本大学医学部病態病理学系微生物学分野

山本樹生 : yamamoto.tatsuo@nihon-u.ac.jp

ザなどはインフルエンザNAの特異的な阻害薬であり、これらの働きを抑えることにより抗ウイルス効果を発揮する。インフルエンザウイルスと細菌の相互作用を考える時の注目すべき点として、一部の細菌が、インフルエンザNAと酵素学的に同様なノイラミニダーゼ活性を持つタンパク質を、分泌することが挙げられる。この細菌ノイラミニダーゼのインフルエンザウイルス感染での役割を解明する目的で、まず、細菌由来ノイラミニダーゼがNA阻害薬存在下でウイルスの増殖を回復することができるかどうかを培養細胞の感染系で検討した。

i) ノイラミニダーゼ分泌口腔・気道細菌の同定

ヒト口腔および上気道に存在する13菌種34菌株の培養上清のノイラミニダーゼ活性を測定し、6菌種9菌株で活性を検出した。肺炎球菌では特に高く、インフルエンザウイルス感染細胞上清と同レベルを示した。さらに、口腔細菌に関して詳細な検討を行ったところ、歯垢中に検出される細菌である *Streptococcus ovaris* と *Streptococcus mitis* とに属する細菌株の中に、その培養上清中に高いノイラミニダーゼ活性を示すものを見出した。インフルエンザNA阻害薬ザナミビルはインフルエンザウイルスNAに非常に特異性が高く、IC50は、ウイルスNAに対しては1 nM前後であったが、細菌ノイラミニダーゼに対してはその百万倍の1 mM前後であった。

ii) 細菌由来ノイラミニダーゼによるインフルエンザウイルスNAの代役

ザナミビルは、感染細胞からの増殖ウイルスの放出に働くウイルスNA活性を阻害し、細胞から細胞へのウイルス感染の伝播を抑制する。その結果、ウイルス産生は抑制される。ここにザナミビルで阻害されない肺炎球菌由来NAを添加すると感染の伝播やウイルス産生が回復した。細菌NAがウイルスNAの代わりにウイルス放出に働くことが示された。

iii) 唾液中インフルエンザウイルス阻害物質

ヒト唾液中にインフルエンザウイルスのHA活性および感染性を抑制する物質が存在すること、さらに、この抑制活性はノイラミニダーゼ処理感受性で

あり、ウイルスや細菌ノイラミニダーゼ活性により失活することを明らかにした。すなわち、ウイルスNA活性が抑制されるザナミビル存在下では、唾液の感染性中和活性は薬剤非存在下に比べて著しく増強された。しかし、ザナミビルにより阻害されない細菌NAを加えると感染中和活性は著しく減少した。インフルエンザの治療に広く用いられているインフルエンザNA阻害薬の効果に、ウイルス放出阻害作用に加えて、唾液中中和活性の増強作用が寄与していることが示唆された。

iv) インフルエンザNA阻害薬の効果に対する細菌由来ノイラミニダーゼの影響

インフルエンザNA阻害薬存在下で細菌由来ノイラミニダーゼがウイルスNAの役割を果たし、ウイルスの増殖を助けることが明らかになった。従ってNA阻害薬の効果は細菌由来ノイラミニダーゼ存在下では著しく減弱することになり、薬剤投与時の口腔管理による細菌対策の重要性が示唆された。

v) 鼻粘液の抗インフルエンザウイルス活性

鼻粘液中にインフルエンザウイルスに対する赤血球凝集抑制活性および感染中和活性があることを明らかにした。これらは唾液中のものより約10倍活性が高く、NA処理感受性で熱安定性であった。電気泳動により4種類のウイルス結合性タンパク質が検出された。

vi) 細菌由来ノイラミニダーゼによるインフルエンザウイルス感染促進

高いノイラミニダーゼ活性を示した *Streptococcus ovaris* および *Streptococcus mitis* に属する菌株培養上清をインフルエンザウイルス感染細胞に添加したところ、感染細胞上清中のウイルス量が增大することを見出した。さらに、インフルエンザウイルス感染巣の拡大が観察された。このことは、細菌が産生するノイラミニダーゼがインフルエンザウイルス感染を促進することを示している。インフルエンザウイルスNA阻害薬の存在下だけでなく、通常の感染においても細菌ノイラミニダーゼがインフルエンザ重症化に関与する可能性を示唆する結果であり、今後のインフルエンザ対策を考える上で考慮すべき結果である。

vii) NA および HA 遺伝子上の連動変異による機能的新型インフルエンザウイルスの出現

一人のインフルエンザ感染患者の中で、通常 HA に担われているレセプター結合活性が NA に担われている全く新しい型のウイルスが出現したことを明らかにした。NA は D151N 変異によりレセプター結合能を獲得した。これに連動して HA に L221P 変異が起こり、HA はレセプター結合能を喪失し、同時に粘液中のウイルス阻害物質に対する抵抗性を獲得した。このようなウイルス進化の原動力は細菌由来のノイラミニダーゼと粘液中のインフルエンザウイルス阻害物質であることが考えられた。

2. インフルエンザ重症化の病態解明

i) NS1 遺伝子点突然変異による弱毒性インフルエンザウイルスの強毒化

インフルエンザウイルスを感染させた重度免疫不全 NOG マウスではウイルス増殖が長期間持続し、最終的に肺での増殖性を増大した変異ウイルスが出現し、マウスは致死に至ることが明らかとなった。この時いずれのマウス個体でもウイルス変異は NS1 遺伝子上に見出された。これらの変異は、宿主 mRNA 前駆体ポリ A 部位切断反応の抑制に係わる NS1 の CPSF30 結合ドメインに生じていた。このことはウイルスの増殖性や病原性が NS1 により制御されていることを強く示唆している。

ii) 強毒インフルエンザウイルスによるサイトカイン産生の高進

重度免疫不全 NOG マウスのインフルエンザウイルス感染において、強毒変異ウイルスの出現に伴ってサイトカイン産生の亢進が見られた。特に LIF と IL-12 では顕著であった。強毒変異は宿主細胞の遺伝子の発現を抑制するウイルス NS1 の機能喪失変異であることが示唆された。

iii) 選択的スプライシングの誘導

インフルエンザウイルスの NS1 がポリ A 部位切断反応を阻害することで選択的スプライシングを引き起こし、下流の遺伝子の発現を誘導することを見出した。この現象によりプリオン遺伝子の約 20 kbp 下流に位置するドッセル遺伝子の発現がインフルエンザウイルス感染により異常に高進することが

示された。

iv) 合併症

インフルエンザ脳症の病態として、髄液中の IL10 や TNF α の上昇を伴わない IL6 の上昇が観察された。またインフルエンザ感染後に抗 GQ1b 抗体陽性を伴うミラー・フィッシャー症候群やオプソクローヌス・ミオクローヌス症候群の合併が新たに認められた。

v) 妊娠とインフルエンザ

2009年の新型 H1N1 インフルエンザウイルスによるパンデミックにおいて、妊娠がインフルエンザ重症化の危険因子として注目された。妊娠が危険因子となり得ることは、2009年パンデミック以前から指摘されてきたことであるが、このパンデミックの初期における米国での死亡例において、妊婦が多く含まれたことから特に注目された。実際、2009年パンデミックにおいて、インフルエンザによる妊婦の死亡率の上昇、未熟児や出生時低体重の発生率の上昇など、インフルエンザが妊婦に与える悪影響が報告されている (Memoli et al. (2013) *Influenza in pregnancy. Influenza and Other Respiratory Viruses* 7(6) 1033-1039.)。少子化に直面する日本においては、妊婦の危険因子を減少させることは必須の課題であり、インフルエンザが妊婦に与える影響の詳細な解析が望まれる。妊娠がインフルエンザ重症化の危険因子であるとの報告はあるものの、それをもたらす機構の詳細については不明な点が多い。そこで本プロジェクトでは、妊娠マウスを用いたインフルエンザウイルス感染モデル系を確立し、インフルエンザの妊娠への影響を解析することとした。インフルエンザウイルス感染マウスモデルにおいて、ウイルス接種量は重要な因子である。大量に接種すれば、全てのマウスが死亡し、少な過ぎれば感染そのものが成立しなくなる。検討の結果、 5×10^4 pfu をマウスに接種することで、死に至らずに、マウスの体重減少 (インフルエンザウイルス感染進行の指標として用いられる) が観察された。そこで、この量を妊娠マウスに接種し、胎児への影響を検討した。非接種妊娠マウスと比較し、胎児の死亡、早期産の上昇などの異常は観察されなかった。しかしながら、胎児重量に関しては、非接種群に比べ50%程

度の減少が観察された。ヒトにおいても、妊婦のインフルエンザウイルス感染が出生時の体重減少をもたらすとの報告があることから、興味深い結果である。現在、妊娠マウスのインフルエンザウイルス感染における体内サイトカインの変化を検討し、重症例では IL6 など炎症性サイトカインの異常高値、Treg 細胞の異常高値が認められ、重症化に対するさらなる詳細な解析を進めている。

vi) インフルエンザ重症化に係る慢性呼吸器疾患

慢性閉塞性肺疾患 (COPD) と気管支喘息は、どちらも高い発症率を示す common disease である。COPDは、日本人の40歳以上での有病率が8.6%で、患者数は530万人と推定されており、世界12地域の40歳以上の有病率は10.1%と報告されている。気管支喘息は、世界で3億人の患者がいると言われており、わが国では全人口の3-6%の有病率が報告されている。これら疾患に加えて難病のひとつである間質性肺炎を加えた慢性呼吸器疾患は、インフルエンザ感染重症化に係わる基礎疾患であり、予後不良因子であることが知られる。COPD、気管支喘息は、気道の慢性炎症性疾患であるが、その発症メカニズムには気道のバリア障害が関係していることが指摘されている。PCDH1は喘息の疾患感受性遺伝子の一つであるが、この分子が気道のバリア機能障害に大きな役割を果たしていることが明らかとなった。PCDH1は上皮細胞のバリア形成に伴い発現が上昇し、また、PCDH1の発現をsiRNAによって抑制するとバリア機能形成が阻害されることを見出した。さらに、喘息患者の気道上皮細胞においては、アレルギー炎症部位におけるPCDH1の発現が減弱していることも明らかとなった。よって、PCDH1の発現制御は、気管支喘息の発症や重症化に関係している可能性が示唆された。また、マウス喘息モデルにおいて、アレルギー性炎症が、繰り返される刺激によって増強されるメカニズムについて解析を行った。マウスへのハウスダスト暴露により増強される遺伝子を網羅的遺伝子解析により検討したところ、TLR4のアダプター分子であるMD2が同定された。ハウスダスト刺激によるアレルギー性炎症の形成において、TLR4シグナルが必須であることが知られており、繰り返されるアレルゲン刺激により増強されるMD2発現が、アレルギー性炎症

の増幅回路として機能している可能性が考えられ、喘息重症化に関係している可能性が示唆された。さらに、感染の重症化因子として、上皮細胞間のタイトジャンクションがTLR3/TRIF経路を介して障害を受けること、NDRG1の機能の変調がこの障害に関与することがわかった。逆にステロイドやTLR9リガンドがタイトジャンクション形成促進作用を持ち、治療に資する可能性が示唆された。

vii) 宿主応答

感染応答遺伝子UBE2L6およびIFIT1の過剰発現によるインフルエンザウイルス増殖の抑制が示された。ウイルス感染で起こる小胞体ストレスに対する応答としてIntegrated stress responseがあるが、その活性分子候補としてZCCHC12を同定した。5FU, LPSなどによるバイオストレス存在下において骨髄と脾臓の肥満細胞造血が異なる反応を示し、ストローマ細胞による調節機構の違いが示唆された。

絨毛系細胞において抗 β 2-GPI抗体に対するTLRによる過剰な応答を認め、流産や胎児発育不全などとの関連が示唆された。この際に、STAT系、NF- κ Bなどの関与が示唆された。TLR4を介した子宮内膜症・PGE2による免疫抑制・骨盤腔感染症の悪循環経路が浮かび上がった。妊娠高血圧腎症(PE)において胎盤におけるplacenta growth factor, sFlt-1の変化とPE患者血清因子および低酸素応答因子の関連が明らかになった。PE患者におけるsoluble endoglin高値とheme oxygenase 1活性低下、eNOS活性低下の関与、さらにPE患者血清IgG分画、とくにAT1-AAが関与することが示唆された。

viii) 遺伝子発現変化

マイクロアレイ解析から、喫煙において酸化ストレス応答・炎症・サーカディアンリズムに関連する遺伝子の変動が見られ、インフルエンザ重症化との関連が示唆された。VDRとI κ B α 発現などの関連が見られ、炎症性反応への関与が示唆された。

3. 口腔管理 (口腔ケア) のインフルエンザ対策としての有効性の検証

口腔管理の有効性を検証するために、インフルエンザ罹患者の咽頭ぬぐい液中のインフルエンザウイルスと細菌の解析を行った。ウイルス分離と細菌の

総数および菌種のあいだに特定の相関は見出せなかった。一方、口腔ケアにより口腔内細菌数が顕著に減少し、細菌数の減少とインフルエンザ罹患率の減少の相関性が特別養護ホームにおける連携疫学調査（日本歯科医師会日本歯科総合研究機構）で示された。

4. その他の関連研究

i) カリン中ポリフェノール画分による新型インフルエンザウイルスの感染抑制効果

カリンに含まれるポリフェノールが2009年に出現したブタ由来新型インフルエンザウイルスの感染抑制活性を持つことを明らかにした。

ii) センダン植物の抗インフルエンザウイルス活性

センダン葉の抽出液が高い抗インフルエンザウイルス活性を持つことを明らかにした。抽出液処理によりウイルス粒子表面のHAとNAからなるスパイクが欠落することを電子顕微鏡観察により示した。

iii) サークルプラズマによるインフルエンザウイルスの不活化効果

RT-PCR法とプラークアッセイ法により、空中浮遊インフルエンザウイルスのサークルプラズマ装置による不活化性能の評価を行った。この装置により効率よく空中ウイルスを不活化できることが示された。

iv) インフルエンザウイルスの動物種特異性

HA タンパク質の B-loop の 88 番目のアミノ酸残基が種トロピズムに関与することを明らかにした。

v) ウイルス宿主相互作用

新規抗インフルエンザウイルス薬の開発など、新たなインフルエンザ対策を樹立するためには、ウイルス感染過程の詳細な理解が必須である。ウイルス感染細胞内においては、ウイルスタンパク質の産生とそれに対する宿主細胞側の応答が起こる。つまり、ウイルス因子と宿主因子が常に相互作用を行い感染過程が進行する。ウイルスタンパク質の機能を理解するためには、そのタンパク質が相互作用する宿主因子を同定し、その相互作用の帰結を解明する必要がある。本プロジェクトでは、インフルエン

ザウイルス M1 タンパク質に注目した解析を行ってきた。M1 タンパク質が感染後期において核内構造体 ND10 (PML ボディ) に集積することは既に報告した (Shibata T et al. (2009) Immunofluorescence imaging of the influenza virus M1 protein is dependent on the fixation method. J Virol Methods. 156 (1-2) 162-165.)。この集積の意義を明らかにするために、M1 タンパク質上で ND10 への集積に必要な部位を、種々の欠失変異体を作成することで明らかにすることを試みた。M1 は、大きく N 末端側と C 末端側の 2 つの領域に分けられる。この 2 つの領域のそれぞれを単独で発現させると、N 末領域のみが ND10 への集積を示した。この N 末領域に関しては立体構造が明らかになっている。9本の α ヘリックスが短いループで繋がれており、 α ヘリックス同士は互いに相互作用をしている構造である。 α ヘリックスを 1 本でも欠失させると全体の構造が大きく変化することが予想された。実際、そのような変異体では、発現量が大きく低下することが観察され、欠失変異体の不安定さが示唆された。そこで、ループ領域に注目した。ループの欠失も大きな構造変化をもたらすことが予想されたので、各ループのアミノ酸を Ala に置換した変異体を作成し、それらの ND10 への集積の有無を検討した。これらの変異 M1 の中で、ループ 5 の Ala 置換体のみが ND10 への集積能を欠失した。さらに、ループ 5 の各アミノ酸を個々に Ala に置換した変異体について検討したところ、D89A 変異体において ND10 への集積能の欠失が観察された。一アミノ酸置換により、M1 タンパク質が ND10 への集積能を欠失することが明らかとなった。そこで、この変異を導入したインフルエンザウイルスの作出を現在試みている。その様なウイルスが得られれば、M1 タンパク質の ND10 への集積のウイルス感染過程における意義について有益な情報を得ることが期待できる。

C型肝炎ウイルス (HCV) 非構造タンパク質 4B (NS4B) が N 及び C 両末端領域の両親媒性ヘリックスを介して脂肪滴膜へ結合し、ウイルス粒子産生に重要な役割を果たすことが明らかになった。HCV ゲノムマイナス鎖がタンパク質発現制御に関連する可能性が示唆された。また細胞膜セリンプロテアーゼ TMPRSS2 が HCV 感染の制御に関与していることを明らかにした。HCV 感染肝におけるウイルス量や

発癌の指標遺伝子の候補として胆管増生などに関連するタンパク質群が同定された。HCV感染における鉄・亜鉛などの微量元素の影響を臨床的に検討するとともに、*in vitro* 実験系においてメカニズムを検討した。

vi) ベトナムにおけるインフルエンザ流行状況

インフルエンザは、パンデミック時だけでなく毎年の流行においても、世界中で患者の発生が見られる。特に、H3N2 亜型の流行に関しては東南アジアでの抗原性変異株の発生とその世界への伝播が提唱されている。したがって、インフルエンザの流行動態を理解するためには、単に日本国内のみを対象とした解析では不十分であると考えられる。新型あるいは抗原変異株の発生を素早く捉え、効果的なワクチンを準備することが、インフルエンザ対策として最も重要なことの一つであり、これまで十分な解析が行われてこなかった東南アジアでのインフルエンザ流行動態調査は、非常に重要な課題の一つと考えられる。本プロジェクトでは、ベトナムにおけるインフルエンザ流行の分子疫学的解析を行うこととした。2010-2011 年にかけてベトナムで採集された吸器感染症患者の試料（鼻咽頭スワブ，1082 例）について、種々のウイルス特異的PCRを行い、35 例のインフルエンザウイルス感染試料を同定した。その

内、14 例が H1N1pdm09 亜型、21 例が H3N2 亜型であった。これらの試料に関し、HA および NA 遺伝子の塩基配列を決定し、これまで報告されたウイルスと比較し進化系統樹解析を行ったところ、ベトナム由来のウイルスが独自の位置にあることが示された。今後もこのような解析を行うことで、日本における流行とベトナムを含む東南アジアでの流行の間に何らかの相関、例えば、日本での流行の前駆となる流行が見出される可能性が期待される。

おわりに

本プロジェクトは平成22年度から26年度の5年に亘って日本大学医学部総合医学研究所において実施されたものである。その成果の一端を上記したが、細菌とインフルエンザウイルスとの相互作用、そしてインフルエンザ重症化機構について多くの新しい知見が得られたと自負している。これらの成果は、実際にプロジェクトに参加した研究者だけでなく、文部科学省および本学並びに医学部、さらに関係共同機関の方々の長期に亘るプロジェクトに対する支援の賜物である。これを基盤にさらなるインフルエンザウイルスと口腔・気道細菌との相互作用の機序と呼吸器疾患重症化の病態の解明が進むことを期待する。最後に御支援いただいた皆様に心よりお礼申し上げたい。

TGF β 抑制ピロール・イミダゾール・ポリアミドの前臨床試験 — 皮膚肥厚性癬痕に対する効果の検討

福田 昇¹⁾²⁾, 中井茂樹³⁾, 藤原恭子³⁾,
齋藤孝輔³⁾, 上野高浩¹⁾, 相馬正義³⁾

Pre-clinical study of pyrrole imidazole polyamide targeting TGF β — Analysis of its effects on hypertrophic scars

Noboru FUKUDA¹⁾²⁾, Shigeki NAKAI³⁾, Kyoko FUJIWARA³⁾,
Kosuke SAITO³⁾, Takahiro UENO¹⁾, Masayoshi SOMA³⁾

要旨

TGF- β 1は細胞外基質の増生, 線維芽細胞の遊走に関与し, 腎炎, 血管狭窄, 肝硬変症, 肺線維症などの線維性疾患の責任分子として知られているが, 未だにTGF- β 1を効果的に抑制する実地薬剤は実用化されていない。我々はこれまでにDNAに対し配列特異的に結合する性質を持つ低分子有機化合物ピロール・イミダゾール (PI) ポリアミドを用いたTGF- β 1の発現抑制剤の開発を行ってきた。現在までにTGF- β 1抑制PIポリアミドが各種線維性疾患に対して治療効果を持つ事を, マウス, ラットの疾病モデルを用いて解析し報告してきた。今回我々は, ヒトとのゲノム相同性が高い霊長類コモン・マーモセットを用いてTGF- β 1抑制PIポリアミドの前臨床試験を行い, 同分子がマーモセット皮膚のTGF- β 1の発現を抑制し, 皮膚肥厚性癬痕の形成を顕著に抑制することを明らかにした。

1. はじめに

分子標的治療は疾病に関連した分子の発現や機能を制御する薬剤を用いた治療法であり, 低分子化合物, 抗体, 核酸薬などが治療薬として主に用いられている。近年, 癌や高血圧など難治性疾患の発症メカニズムが分子レベルで解明されるようになり, 多くの薬剤の開発が進んでいるが, 抗体や核酸薬は生体内での安定性の面で課題が多く, 現時点では製造コストが高いという難点もある。低分子化合物は生体への取り込みや安定性の面では優れており製造コストも低い, 化合物によっては標的外の分子に干渉するオフターゲット効果による副作用の問題が懸念される。

日本大学医学部戦略的研究基盤形成支援事業「ゲノム化学に基づく先進医療開発研究拠点」プロジェクトでは, 配列特異的なDNA結合能を持つピロール・イミダゾール・ポリアミド (PIポリアミド) を用いて, 疾患特異的に発現異常を起こしている遺伝

子の転写調節能を持つ分子を設計し, 治療薬としての可能性について検討している。

PIポリアミドは芳香族アミノ酸 N-methylpyrrole (Py) および N-methylimidazole (Im) で構成される低分子有機化合物であり, 配列特異的にDNAに結合する性質を持つ¹⁾。現在我々が主に開発対象としているPIポリアミドは, PyとImが鎖状につながり, 鎖の中央部に配置した γ -diaminobutyric acid の部分で屈曲したヘアピン構造を取る。この屈曲により分子内で向き合うPIポリアミドのペアごとに, 認識するDNA塩基が決まっており, Py・PyのペアはATまたはTAを, Py・ImはCGをIm・PyのペアはGC塩基対を認識する。ImとPyの組み合わせ次第で多様な配列のDNAに結合させることが可能であり, 遺伝子プロモーター領域の転写因子結合部位に対して設計した場合は, 転写因子の結合を競合的に阻害し, 下流の遺伝子発現を抑制することが可能となる。特別なDrug Delivery Systemがなくても細胞

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) 日本大学大学院総合科学研究科
3) 日本大学医学部内科学系総合内科・総合診療医学分野,
相馬正義: souma.masayoshi@nihon-u.ac.jp

の核内に取り込まれ、核酸分解酵素やタンパク分解酵素による分解を受けず、生体内にて安定に存在できることから、PI ポリアミドは新規の転写阻害剤として期待される分子である。

これまでに我々の研究では、疾病特異的に発現異常を示している遺伝子のプロモーター領域に対してPI ポリアミドを設計し、標的遺伝子の発現抑制による治療効果を検証してきた。今までに、MMP-9 抑制PI ポリアミドが、ヌードマウス脾臓に移植したヒト大腸癌細胞株の肝臓への転移を抑制すること²⁾、E-box 認識PI ポリアミドが、骨肉腫細胞に対し *in vitro*, *in vivo* の両方で抗腫瘍効果を示すこと³⁾、酸化低密度リポ蛋白 (LDL) 受容体 (LOX-1) に対するPI ポリアミドがヒト血管内皮細胞の酸化LDLの取り込みを抑え、その結果細胞死を抑制する効果を示すこと⁴⁾ などについて報告を行っている。本紀要では、transforming growth factor- β (TGF β) の発現を抑制し、TGF β 関連疾患の治療薬として期待できるPI ポリアミドの開発状況について報告する。

2. TGF β 抑制PI ポリアミドの開発

1) 背景

TGF- β は線維芽細胞が足場非依存性増殖を獲得する際に必要な因子として発見されたサイトカインであるが、細胞増殖、分化、運動性の制御を行うなど多彩な機能を持つ。また細胞外基質の増生、線維芽細胞の遊走に関与し創傷治癒の際に機能していることも知られている。一方、疾病においては、腎炎、血管狭窄、肝硬変症、肺線維症、皮膚肥厚性癬痕などの線維性疾患の責任分子の1つであることが判っている。これらの疾患においては、TGF- β 1の発現・機能の抑制を行うことが治療効果につながる事が期待されるが、未だにTGF- β 1を効果的に抑制する実地薬剤は実用化されていない。これまでに動物モデルを用いて進行性腎障害⁵⁾や肝硬変、肺線維症、皮膚癬痕⁶⁾、腹膜硬化症⁷⁾などの線維性疾患に対するTGF- β 1抑制PI ポリアミドの遺伝子治療効果を確認してきた。例えば、ラットの背部皮膚に皮筋層に至る深さの切創を作り肥厚性癬痕を形成させる場合、皮膚切開直後に切創周辺に皮下注射によりTGF β 1抑制PI ポリアミドを投与すると、TGF β 1や間葉系細胞のマーカーであるVimentinの発現が非投与群と比べて明らかに抑制されていた。また癬痕

の形成も明らかに抑制されていたことから、TGF β 1抑制PI ポリアミドはTGF β 1の発現を抑制し、線維性疾患の治療に役立つ可能性が強く示唆された。しかしながら、これらの解析はラット、マウスを用いたものであるため、ヒトを対象とした薬剤を開発する上では、よりヒトに近いゲノム構造を持ったモデル動物を用いた全臨床試験が必要となる。そこで、我々は霊長類であるコモン・マーモセット (*Callithrix jacchus*) に着目した。

コモン・マーモセットは新世界猿に属する霊長類であり、体重300g、体長20cm 前後と小さく、ゲノム構造もヒトとの類似性が高いことから、実験動物として非常に適している。また、繁殖力も旺盛であり、旧世界猿であるアカゲザルやカニクイザルが性成熟に3年ほど要し、一生の産仔数が10頭前後であるのに対し、マーモセットは妊娠期間144日、性成熟に達するまでの期間が12~18ヶ月と短く、一生の間に40~80頭の子供を産出する。この点も実験動物として非常に理想的である。このような利点があることから、公益財団法人・実験動物中央研究所(実中研)では近年、コモン・マーモセットを飼養し、動物実験を行う体制を確立している⁸⁾。近年我々も薬剤開発を行う上で、マーモセットを用いた全臨床試験の必要性を痛感していたものの、日本大学医学部においてはマーモセットをはじめとした霊長類の飼養・実験設備がなく、実験は不可能であった。そこで、実中研の実験施設において、実中研が飼養しているコモン・マーモセットの皮膚肥厚性癬痕に対するTGF β 1抑制PI ポリアミドの効果の検討を行った⁹⁾。本紀要ではその成果について報告する。

2) ヒトTGF- β 1に対するPI ポリアミドの設計と機能解析

まず最初に、ヒトTGF- β 1プロモーター(転写開始点を起点として、558塩基上流から516塩基下流の部分)に対し、複数のPI ポリアミドGB1101~GB1107を設計した(図1)。GB1101は転写因子FSE2結合サイト、GB1105とGB1106は転写因子AP1結合サイトに近く、GB1107は転写因子NF-1の結合サイトに近い。これらのPI ポリアミドを10nMから10 μ Mの範囲で培養ヒト血管平滑筋細胞に投与し、TGF- β 1の発現量をreal time PCRにより定量したところ、GB1101, GB1105, GB1106の3つが非投

```

-592 ACAGGAGGCTGCTTAGCCACATGGGAGGTGCTCAGTAAAGGAGAGCAATTCTTACAGGTGCTGCTGCCTCCT
      FSE2      GB1101
-522 GACCCTTCCATCCCTCAGGTGCTCTGTGCCCCCTCTCCCACTGACACCCCTCCGGAGGCCCCCATGTTG
-452 ACAGACCTCCTTCTCCTACCTTGTGTTCCAGCTGACTCTCCTCCGTTCTGGGTCCCCCTCCTCTGGT
      AP-1      GB1105
-382 CGGCTCCCTGTGTCTCATCCCCCGGATTAAGCCTTCTCCGCCTGGTCTCTTCTCTGGTGACCCACAC
      GB1106  AP-1
-312 CGCCCGCAAAGCCACAGCGCATCTGGATCACCCGCTTGGTGGCCTTGGCCGCCAGGAGGCAGCACCCCT
      NF-1      GB1107
-242 GTTTGCGGGGCCGAGCCGGGAGCCCGCCCTTCCCCAGGGCTGAAGGGACCCCCCTCGGAGCCCGC
      SP-1      SP-1
-172 CCACGCGAGATGAGGACGGTGGCCAGCCCCCATGCCCTCCCCCTGGGGCCGCCCGCTCCGCC
      SP-1      SP-1
-102 CTGTCGCTTCTGGGTGGGGCCGGGGCGGCTTCAAAACCCCCTGCCGACCCAGCCGGTCCCCGCCGCCG
      GB1102      ↓ GB1103
-32  CCGCCCTTCGCGCCCTGGGCCATCTCCCTCCACCTCCCTCCGCGGAGCAGCCAGACAGCGAGGGCCCCG
+39  GCCGGGGCAGGGGGGACGCCCCGTCGGGGCACCCCCCGGCTCTGAGCCGCCCGGGGGCCGGCCTCG
+109 GCCCGGAGCGGAGGAAGGAGTCGCCGAGGAGCAGCTGAGGCCCCAGAGTCTGAGACGAGCCGCCGCCG
+179 CCCCGCCACTGCGGGGAGGAGGGGGAGGAGCGGGAGGAGGACGAGCTGGTCCGGAGAAGAGGAAAA
+249 AAACTTTTGAGACTTTCCGTTGCCGCTGGGAGCCGGAGGCGGGGACCTTGGCGCGACGCTGCCCC
      GB1104      (+840-Met)
      +271
    
```

図1 ヒトTGF-β1のプロモーター配列と、PIポリアミドの認識部位
TGF-β1抑制PIポリアミドGB1101～GB1107の認識部位を下線で、転写因子の結合サイトを黒枠で示す。

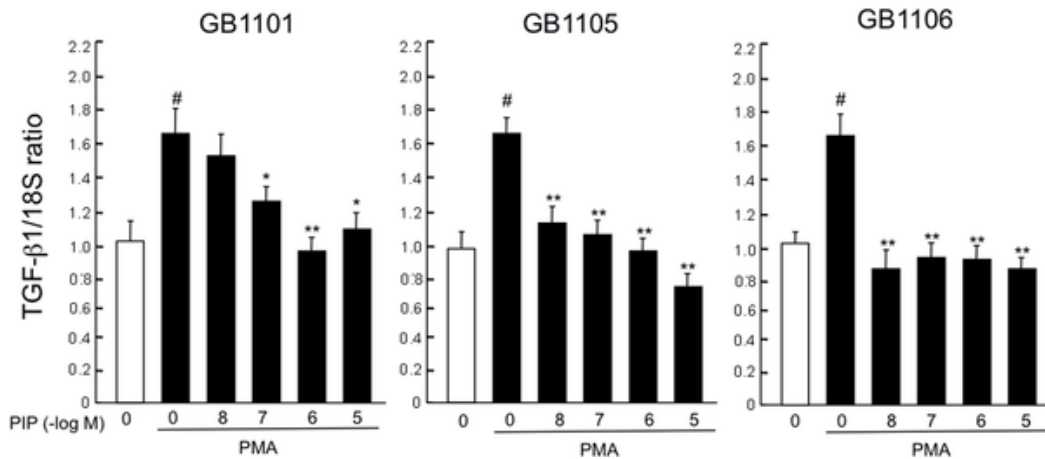


図2 TGF-β1PIポリアミドによるTGF-β1の発現抑制効果
血管平滑筋細胞にPhorbol 12-myristate 13-acetate (PMA)を添加するとTGF-β1の発現が上昇するが、ポリアミドGB1101, GB1105, GB1106の投与により、有意に発現が抑制された。

与群と比較して有意なTGF-β1発現抑制効果を示した(図2)。

BLAST解析の結果、このTGF-β1プロモーター領域のヒトとマウスの相同性は39.5%程度であるのに対し、ヒトとマーモセットの間では86%と高い相同性が見られることが確認された。詳細に配列を比

較したところ、上記の3つのPIポリアミドのうち、GB1101とGB1106の結合領域のDNA配列がヒトとマーモセットで共通であった。そこで、マーモセット皮膚より樹立した繊維芽細胞株に対するこれらのPIポリアミドの効果を調べたところ、GB1101が有意なTGF-β1発現抑制効果をしめしたことから、以降

の *in vivo* における解析はGB1101 について行った。

3) マーモセット皮膚癢痕に対するTGF-β1抑制PIポリアミドの作用の確認

成体の雄マーモセットの腹部皮膚の片側に、200 μg/ml の濃度のGB1101, もう片側に同じ濃度の mismatch 配列PIポリアミドもしくは水を500 μl 皮下注射し, その後, 各領域に長さ2cm, 皮筋層に達する切創を1本ずつ作成した。その後観察を行ったところ, 水投与部位と mismatch PIポリアミド投与部位では明確な皮膚の肥厚が見られたが, GB1101 投与部位においては肥厚化はほぼ完全に抑制されていた。図3 Aに切創作成後21日目と35日目の各切創の画像を示す。35日目に皮膚を生検し組織像を観察したところ, GB1101投与部位では他の2部位と比較して表皮層の肥厚化が有意に抑制されていた

(図3 B, C)。

組織の免疫染色の結果, GB1101投与部位においては, 水投与部位と比較してTGF-β1の発現低下が見られ, 更に間葉系マーカーであるVimentin 陽性部位の面積も低下していた(図3 D, E)。

以上の結果から, GB1101はマーモセットの皮膚切創において, TGF-β1の発現上昇とそれに伴う線維化を阻害し, 肥厚性癢痕の形成を抑制できることが証明された。

4) 軟膏を用いたGB1101の投与法の検討

GB1101を実際に人の肥厚性癢痕の治療に用いる場合は, 軟膏に溶解した状態で投与する必要があることから, 最も適した軟膏基剤を選定する実験を行った。5種類の軟膏基剤 (Vaseline, Plastibase, Hydrophilic ointment, Solbase, HPMC) に対し蛍光物

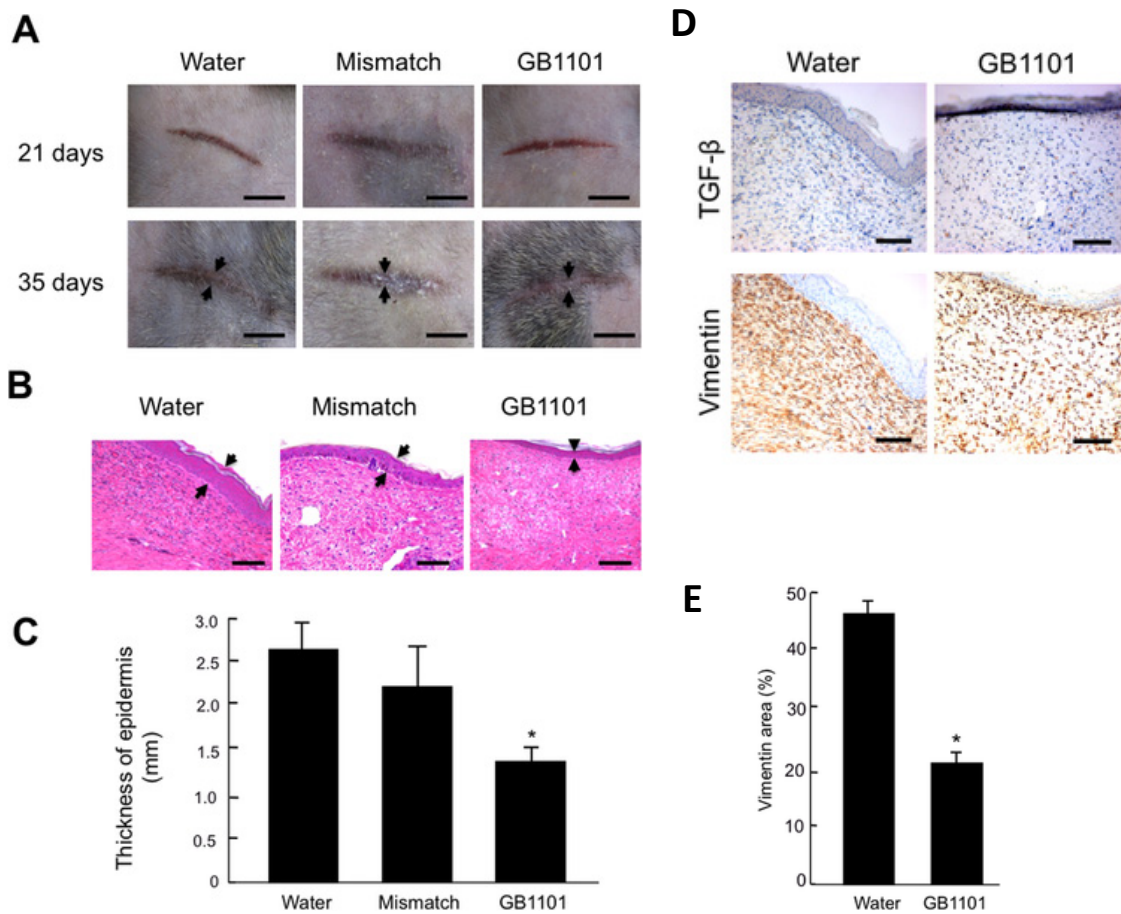


図3 TGF-β1PIポリアミドGB1101のマーモセット皮膚癢痕に対する効果

A: PIポリアミド投与および切創作成後21日目と35日目の患部の像, B: 患部の断面 (HE染色, 35日目), C: 表皮の厚さの計測値, D: 免疫染色によるTGF-β1とVimentinの検出, E: 免疫染色により検出されたVimentin陽性領域の面積

質FITCをラベルしたGB1101を溶解した。ラットの皮膚切創にGB1101入り軟膏を塗布し(GB1101の投与量は10 μ g)、24時間後と48時間後に皮膚切片を蛍光顕微鏡下で観察し、FITC-GB1101の細胞内への取り込みを確認したところ、Solbaseを用いた群において、GB1101の核への取り込みが顕著であった。この結果に基づき、マーモセット皮膚切創に対して、Solbaseに溶解したGB1101を30 μ g投与したところ、肥厚性癬痕の形成が抑制され、また真皮層のVimentin陽性部位の現象が観察された。以上の結果からSolbaseに溶解したGB1101は肥厚性癬痕の治療薬として有望であることが示された⁹⁾。

3. 考察

以上の結果より、TGF- β 1抑制PIポリアミドであるGB1101が皮膚肥厚性癬痕の形成する作用を持つ事が、マーモセットを用いた前臨床試験で確認できた。GB1101はマーモセットとヒト両方のTGF- β 1プロモーター領域を認識することから、そのままヒトのTGF- β 1発現抑制剤として使用することが可能であり、今回の成果はPIポリアミドの実用化に大きく一歩近づいた成果であると言える。現在ところ、肥厚性癬痕の治療薬としてはTGF- β 1の機能を阻害する機能のあるトラニラストと副腎皮質ホルモンの二つが臨床の現場で使われているが、トラニラストの作用はTGF- β 1特異的なものでなく効果も弱いことから、これらの治療薬は肥厚性癬痕を完治させるには至らない。そのためGB1101は新規の肥厚性癬痕治療薬候補として非常に期待できると考えている。

4. 今後の展望

今回の報告では、観察が容易な皮膚病変について検討したが、TGF- β 1が原因となっている他の線維性疾患に対してもGB1101を適用するために、ラット・マウスを用いた解析同様、マーモセットモデルを用いた検討が必要となる。モデル動物として歴史が浅く、確立された疾病モデルの種類が少ないこと、飼育費用が高い点など、実現には困難を伴うが、現在、免疫抑制剤シクロスポリンAを用いたマーモセットの腎症モデルの確立を急いでいる。現在までにマーモセットの腎症モデルを作成した例はなく、GB1101のヒト腎症に対する治療効果を調べる上で、

非常に効果的である。

また、以上の研究と並行して、我々はTGF- β 1抑制PIポリアミドを用いたiPS細胞の高効率な誘導法の開発も行っている。分化した多細胞に初期化因子(Oct3/4, Sox2, Klf4, c-Myc等)を導入すると、細胞が初期化され多能性を持ったiPS細胞となるが、この際E-Cadherinの増加とTGF- β 1の抑制による、間葉細胞の上皮化(mesenchymal-epithelial transition:MET)が多能性獲得のためのカギとなるステップとなることが判ってきた。そこでGB1101を併用して、簡便で高効率なiPS細胞誘導を行うためのプロトコルの確立を行った(Saito, in preparation)。

これらの研究を通じて、TGF- β 1抑制PIポリアミドの医療応用および研究ツールとしての活用を実現していきたいと考えている。

参考文献

- 1) Dervan PB. Molecular recognition of DNA by small molecules. *Bioorg Med Chem.* 2001; **9**(9):2215-35.
- 2) Wang X, Nagase H, Watanabe T, et al. Inhibition of MMP-9 transcription and suppression of tumor metastasis by pyrrole-imidazole polyamide. *Cancer Sci.* 2010; **101**(3):759-66.
- 3) Taniguchi M, Fujiwara K, Nakai Y, Ozaki T, Koshikawa N, Toshio K, Kataba M, Oguni A, Matsuda H, Yoshida Y, Tokuhashi Y, Fukuda N, Ueno T, Soma M, Nagase H. Inhibition of malignant phenotypes of human osteosarcoma cells by a gene silencer, a pyrrole-imidazole polyamide, which targets an E-box motif Original Research Article. *FEBS Open Bio* 2014; **4**: 328-334
- 4) Ueno T, Fukuda N, Tsunemi A, et al. A novel gene silencer, pyrrole-imidazole polyamide targeting human lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1 gene improves endothelial cell function. *J Hypertens.* 2009; **27**(3):508-16.
- 5) Matsuda H, Fukuda N, Ueno T, et al. Transcriptional inhibition of progressive renal disease by gene silencing pyrrole-imidazole polyamide targeting of the transforming growth factor- β 1 promoter. *Kidney Int.* 2011; **79**(1):46-56.
- 6) Washio H, Fukuda N, Matsuda H, et al. Transcriptional inhibition of hypertrophic scars by a gene silencer, pyrrole-imidazole polyamide, targeting the TGF- β 1 promoter. *J Invest Dermatol.* 2011; **131**(10):1987-95.
- 7) Serie K, Fukuda N, Nakai S, Matsuda H, Maruyama T, Murayama Y, Omata S. Pyrrole-imidazole polyamide targeting transforming growth factor β 1 ameliorates encapsulating peritoneal sclerosis. *Perit Dial Int.* 2012; **32**(4):462-72.

- 8) Sasaki E, Suemizu H, Shimada A, Hanazawa K, Oiwa R, Kamioka M, Tomioka I, Sotomaru Y, Hirakawa R, Eto T, Shiozawa S, Maeda T, Ito M, Ito R, Kito C, Yagihashi C, Kawai K, Miyoshi H, Tanioka Y, Tamaoki N, Habu S, Okano H, Nomura T. Generation of transgenic non-human primates with germline transmission. *Nature*. 2009; **459**(7246):523-528
- 9) Igarashi J, Fukuda N, Inoue T, Nakai S, Fujiwara K, Matsuda H, Ueno T, Matsumoto Y, Watanabe T, Nagase H, Bando T, Sugiyama H, Itoh T, Soma M. Preclinical Study of Novel Gene Silencer Pyrrole - Imidazole Polyamide Targeting Human TGF - β 1 Promoter for Hypertrophic Scars in a Common Marmoset Primate Model. *PLoS One*. 2015; **10**(5):e0125295.

脊髄刺激療法を用いた minimally conscious state の治療

山本隆充¹⁾, セデキ・ジャンウフル¹⁾, 深谷 親¹⁾, 渡辺 充²⁾, 角光一郎²⁾,
四條克典²⁾, 大淵敏樹²⁾, 加納利和²⁾, 小林一太²⁾, 大島秀規²⁾, 吉野篤緒²⁾, 関口真一³⁾

Spinal cord stimulation for minimally conscious state

Takamitsu YAMAMOTO¹⁾, Sidikejiang WUPUER¹⁾, Chikashi FUKAYA¹⁾, Mitsuru WATANABE²⁾,
Koichiro SUMI²⁾, Katsunori SHIJO²⁾, Toshiki OBUCHI²⁾, Toshikazu KANO²⁾,
Kazutaka KOBAYASHI²⁾, Hideki OSHIMA²⁾, Atsuo YOSHINO²⁾, Shinichi SEKIGUCHI³⁾

要旨

私立大学戦略的基盤形成支援事業の研究拠点を形成する研究（ニューロモデュレーションセンターの構築と医療連携）において、脳神経外科学系で行なっている minimally conscious state (MCS) に対する脊髄刺激療法について報告する。いわゆる MCS に頸髄レベルで脊髄刺激療法を行い、10 例中 7 例が MCS から回復した。回復例は、脳幹電位の第 V 波と体性感覚誘発電位の N 20 が記録され、Pain-related P250 が $7 \mu V$ 以上の大きさに記録され、脳波連続周波数分析で速波化する周波数変動を認めた症例であった。MCS からの回復例は機能予後も良好であり、MCS は脊髄刺激療法の良い適応であると考えられる。

1. はじめに

私立大学戦略的基盤形成支援事業の研究拠点を形成する研究（ニューロモデュレーションセンターの構築と医療連携）では、慢性植込み型脳脊髄刺激装置、植込み型髄腔内薬液注入ポンプ、高頻度経頭蓋磁気刺激装置などを用いたニューロモデュレーション技術を用いて、難治性疼痛、不随意運動、運動麻痺、意識障害、痙縮、癲癇などの治療に臨床応用している。さらに、ニューロモデュレーションセンターを構築し、新たな脳脊髄機能制御・再建のための研究拠点を形成することを目的としている。このため、脳神経外科学系応用システム神経科学分野と神経外科学分野、神経内科学分野、ペインクリニック分野、リハビリテーション医学分野、精神医学分野、泌尿器科学分野などの研究者が連携して研究をおこなっている。

重症脳損傷後に、救命はされても意識障害が遷延

し、いわゆる植物状態（vegetative state）¹⁻³⁾ となる患者も少なくない。また、vegetative state (VS) から明確に区別できる状態として、minimally conscious state (MCS) ⁴⁾ の概念がアメリカ神経学会から提唱されている（表 1）。私どもは、VS には脳深部刺激療法、MCS には脊髄刺激を主に選択している⁵⁻⁷⁾。本稿では、脳神経外科学系で行なっている脊髄刺激療法を用いた minimally conscious state (MCS) の治療について報告する。

2. 方法

1) 対象

対象は脳損傷後 3 か月を経過しても MCS の状態を呈した 10 例で、頭部外傷 6 例、脳炎 1 例、血管疾患 3 例の合計 10 例に脊髄刺激をおこなった。性別は男性 8 例、女性 2 例で、年齢は 16 歳～67 歳（平均 32 ± 15.9 ）であった（表 2）。

1) 日本大学医学部脳神経外科学系 応用システム神経科学分野

2) 神経外科学分野

3) 医学研究支援部門医用電子系医用電子室

山本隆充：yamamoto.takamitsu@nihon-u.ac.jp

表 1 植物症と minimally conscious state の定義

A: Multi-Society Task Force on PVS (1994) による植物症の定義

- 1) 自己ならびに周囲を認識していると判断できる所見を認めず、意思の疎通性もない。
- 2) 視覚, 聴覚, 触覚, 侵害刺激に対して、持続的で再現性があり、意味のある自発的な行動を認めない。
- 3) 言語を理解したり使用することができない。
- 4) 睡眠-覚醒サイクルに伴う覚醒反応を認める。
- 5) 医療行為や看護によって、生存できるだけの視床, 脳幹機能が残存している。
- 6) 便, 尿失禁を認める。
- 7) 脳神経反射, 脊髄神経反射が部分的にたもたれている。

B: Minimally Conscious State の定義 (アメリカ神経学会)

- 持続的ではないが、何らかの意志を示す動作を確認できる。
- 昏睡状態, 植物症とは明確に区別できる。

Minimally Conscious State から脱却の定義

- 機能的な相互の意思疎通が可能
- 異なった2つの物を機能的に使用することができる

補足

- 機能的な意思疎通とは、1) あなたは椅子に座っていますか？ 2) 私は天井を指していますか？のように、基礎的な状況判断を必要とする項目で、2つの関連する項目を評価できるような質問において、6問中6問をイエス・ノーで、明らかに正答できる。
- 2つの物の機能的使用とは、1) くしを手に取り、頭に持って行く、2) 鉛筆を手に取り、紙の上に持って行くなど、最低でも2つ以上のものを目的に合った形で使用することができる。

表 2 対象症例一覧
症例 7, 9, 10 を除く 7 例が MCS から回復した。

Case No.	Age/ Sex	Cause of brain injury	Start of chronic SCS after initial brain injury	Positive Elector physiological items	Long-term follow-up results after SCS
1	36 M	Head Injury: cerebral contusion	9 Months	EEG, ABR, SEP, Pain-related P250	Recovered from MCS Use wheelchair by himself
2	35 M	Head Injury: cerebral contusion acute subdural hematoma	9 Months	EEG, ABR, SEP, Pain-related P250	Recovered from MCS Use wheelchair by himself
3	16 M	Head Injury: diffuse brain injury	3 Months	EEG, ABR, SEP, Pain-related P250	Recovered from MCS Walk by himself
4	23 M	Head Injury: diffuse brain injury	3 Months	EEG, ABR, SEP, Pain-related P250	Recovered from MCS Use wheel chair by himself
5	28 M	Head Injury: diffuse brain injury	3 Months	EEG, ABR, SEP, Pain-related P250	Recovered from MCS Use wheelchair by himself
6	53 M	Head Injury: cerebral contusion acute subdural hematoma	3 Months	EEG, ABR, SEP, Pain-related P250	Recovered from MCS Difficult to use wheelchair by himself
7	19 F	Inflammatory acute disseminated encephalomyelitis	53 Months	EEG, ABR, Pain-related P250	Consciousness level: MCS Conscious but inconsistent
8	57 M	Vascular intracerebral hemorrhage	8 Month	EEG, ABR, SEP, Pain-related P250	Recovered from MCS Difficult to use wheelchair by himself
9	67 F	Vascular subarachnoid hemorrhage	13 Months	EEG, ABR, SEP, Pain-related P250	Consciousness level: MCS Conscious but inconsistent
10	50 M	Vascular rupture of cerebral AVM	11 Months	EEG, ABR, SEP,	Consciousness level: MCS Conscious but inconsistent

2) 電気生理学的検査の記録法

聴性脳幹反応の記録は、90dBのクリック音を用いて両耳刺激を行い、頭頂正中部 (Cz) に探查電極、耳朶に基準電極を配置し、前頭極正中部に接地電極

した。低周波フィルターを10Hz, 高周波フィルターを3KHzとして2000回の加算をした。

体性感覚誘発電位は手関節部で正中神経刺激を行い、低周波フィルター5~50Hz, 高周波フィルター

1.5～3.0KHzで記録した。接地電極を刺激の中枢側に置き、刺激と反対側上肢の体性感覚野付近に探查電極、刺激と反対側の耳朶に基準電極を配置した。両側のErb点に探查電極と基準電極を配置して同時記録を行なった。

痛み関連電位はリング電極を用いて指尖部に逃避反射を認める刺激強度の痛覚刺激を与え、C3, C4, Czで両耳朶結合を基準として単極導出し、低域フィルター0.5Hz、高域フィルター500Hzとして16回の加算を行なった。

脳波連続周波数分析は、脳波を頭頂部と耳朶との間の単極導出として連続記録し、ファーストフーリエ変換を用いてcompressed spectral arrayとして表示した。

3) 電気生理学的評価法

MCSにおいては、神経学的評価のみで残存する脳機能評価を行なうことは困難であり、電気生理学的な残存脳機能の評価が重要である。電気生理学的評価法としては、聴性脳幹反応(ABR)、体性感覚誘発電位(SEP)、脳波連続周波数分析、Pain-related P250(痛み関連電位)を記録した⁵⁻⁸⁾。ABRでは第V波、またSEPではN20が記録されるか否かに

ついて検討した。Pain-related P250では、指先に与えた疼痛刺激の約250msecに出現する陽性波の振幅が7 μ V以上の振幅で記録されるか否かについて検討した。脳波連続周波数分析では、速波化する周波数変動の有無について検討した。

4) 脊髄刺激療法

脊髄刺激電極には、4極～8極のメドトロニック社製シリンダー型脊髄刺激電極セットを用いた。また、このセットに含まれる脊髄硬膜外針を用いて電極の挿入を行った。レントゲン透視下に腹臥位で、第7頸椎棘突起と第1胸椎棘突起の間から脊髄硬膜外針を用いて、脊髄刺激電極を頸髄硬膜外に挿入し、第2から第4頸椎レベルに留置した(図1)。

刺激は、遷延性意識障害患者の関節拘縮や筋の廃用性萎縮を防ぐ目的で、5Hz程度の低頻度刺激を用いて上肢のmuscle twitchを誘発する程度の刺激強度を選択した⁶⁾。

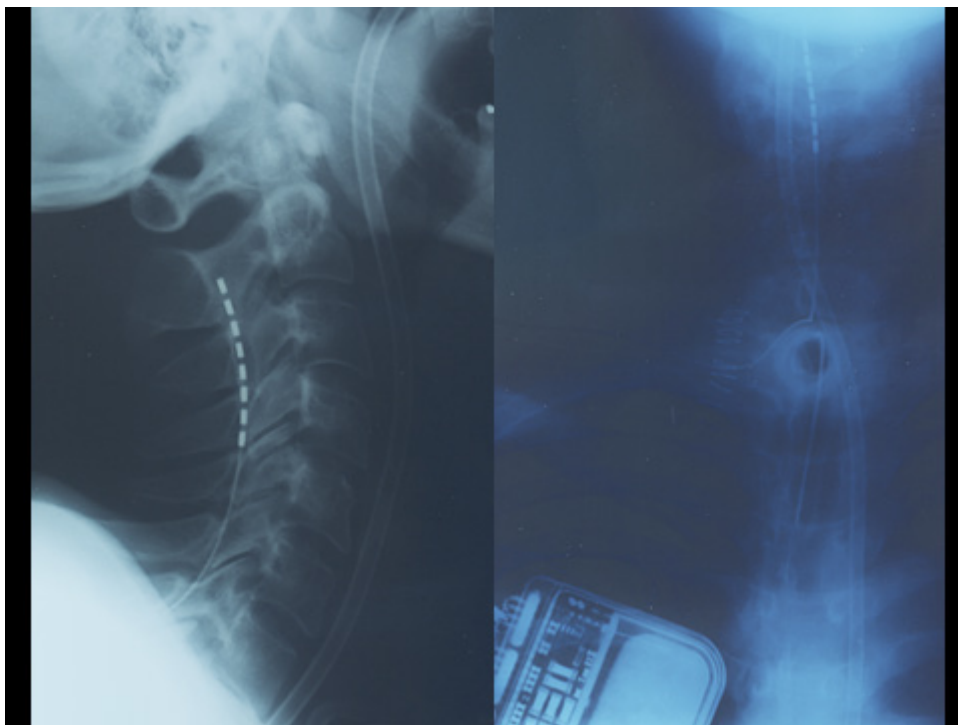


図1 脊髄硬膜外刺激電極
頸部X-Pの側面像(左)と前後像(右)

3. 結果

1) 5Hz 脊髄刺激の効果

8例で施行したSPECTでは、脊髄刺激がOFFの状態に比較して脊髄刺激がONの状態では、平均で22.2%脳血流が増加した ($p < 0.01$, paired t-test) (図2)。

MCSの症例に対して5Hz脊髄刺激を頸髄レベルで施行した10例中8例でABRの第V波、SEPのN20が記録され、Pain-related P250が $7\mu V$ 以上の振幅で記録され、脳波連続周波数分析では、速波化する周波数変動を認めた。また、この8例中7例がMCSから回復した。

MCSから回復した7例中1例は独歩可能となったが、6例は刺激開始後12ヶ月の時点でも車椅子生活で、歩行のためのリハビリテーションを継続中であった。しかし、6例ともに上肢の運動機能回復は著しく、下肢の運動機能回復とは明らかな差を認めた。これは、5Hzの上位脊髄刺激によって上肢の muscle twitch を連日誘発したことによって、運動機能を回復させたものと考えられた。

4. 考察

MCSにおいては、神経学的評価のみでは残存する脳機能評価を行なうことが困難であるので、電気

生理学的評価が重要である^{8,9)}。聴性脳幹反応では脳幹機能の評価、体性感覚誘発電位では視床から大脳皮質機能の評価、脳波連続周波数分析では脳幹と大脳皮質の関連についての評価、痛み関連電位では高次脳機能の評価することを意図している。また、意識の回復を目的とした脳脊髄刺激療法の適応を決定する方法^{7,10-14)}としては、最も重要であると考えている。

私どもは、これまでのVSに対する脳深部刺激療法の結果から、1) 脳波連続周波数分析で周波数変動と速波化(脱同期化)を認め、2) 潜時が遅延しても聴性脳幹反応のV波と体性感覚誘発電位のN20を認め、3) Pain-related P250が $7\mu V$ 以上で記録される症例を、脳深部刺激療法の適応としている⁵⁾。このような条件に一致する症例は、これまでの検討では、VSで107例中16例(15%)、MCSで21例中15例(71%)であった。

MCSに対する脊髄刺激療法の方法について決まった方法はなく、各施設で独自の方法を用いている^{7,10-14)}。私どもは、遷延性意識障害患者の関節拘縮や筋の廃用性萎縮を防ぐ目的で、5Hz程度の低頻度刺激を用いている⁷⁾。5Hz程度の低頻度刺激であれば muscle twitch を誘発することができるが、15Hzでは muscle contraction を誘発してしまうため

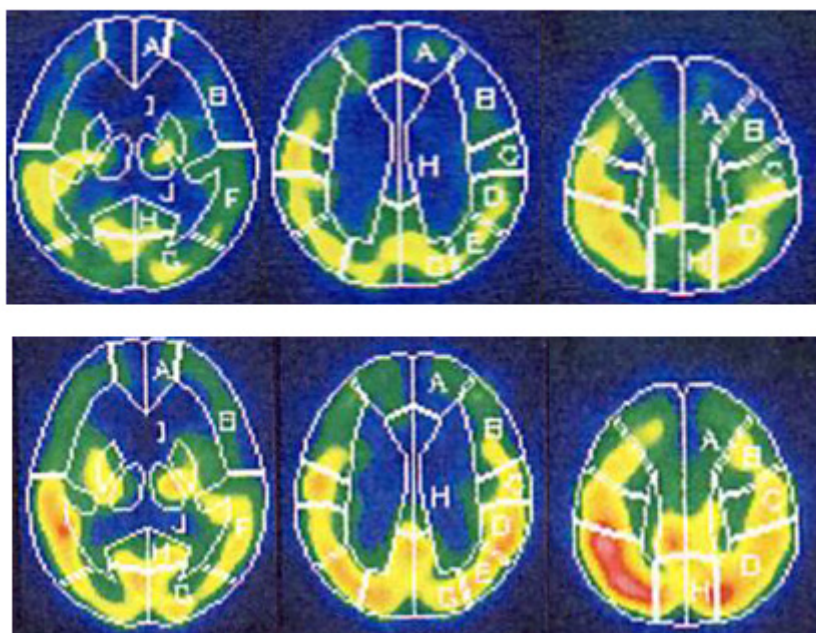


図2 SPECT検査
SCSの刺激OFF時(上段)と刺激ON時(下段)の比較

である。また、脊髄刺激では脳深部刺激療法のような激しい覚醒反応を誘発することはできないが、今回の検討で刺激中に脳血流が22.2%増加することが明らかとなった。

私どものこれまでの経験では、VSに対する脊髄刺激療法の有効例は僅かであるが、MCSに対しては有効な治療法となると考えられる。10例中7例がMCSから回復し、1例は独歩可能となったが、6例は刺激開始後12ヶ月の時点でも車椅子生活で、歩行のためのリハビリテーションを継続中であった。しかし、車椅子生活を強いられていた6例全例で上肢の運動機能回復は著しく、下肢の運動機能回復とは明らかな差を認めた。これは、5Hzの上位脊髄刺激によって上肢のmuscle twitchを連日誘発したことによって、運動機能を回復させたものと考えられ、5Hzでmuscle twitchを誘発する脊髄刺激の方法は、新たな神経リハビリテーションとして期待される。

文 献

- 1) Jennett B, Plum F: Persistent vegetative state after brain damage. *Lancet* **1**: 734-737, 1972
- 2) The Multi-Society Task Force on PVS: Medical aspects of the persistent vegetative state. (First of two parts). *N Engl J Med* **330**: 1499-1508, 1994
- 3) The Multi-Society Task Force on PVS: Medical aspects of the persistent vegetative state. (Second of two parts). *N Engl J Med*. **330**: 1572-1579, 1994
- 4) Giacino JT, Ashwal S, Childs N, et al: The minimally conscious state: Definition and diagnostic criteria. *Neurology*. **58**: 349-353, 2002
- 5) Yamamoto T, Katayama Y, Kobayashi K, et al: Deep brain stimulation for the treatment of vegetative state. *Eur J Neurosci* **32**: 1145-1151, 2010
- 6) Yamamoto T, Katayama Y, Obuchi T, et al: Deep brain stimulation for vegetative state and minimally conscious state. *World Neurosurg* **80**: S30.e1-9, 2013
- 7) Yamamoto T, Katayama Y, Obuchi T, et al: Spinal cord stimulation for treatment of patients in the minimally conscious state. *Neurol Med Chir (Tokyo)* **52**: 475-81, 2012
- 8) Yamamoto T, Katayama Y: Deep brain stimulation therapy for the vegetative state. *Neuropsychological Rehabilitation* **15**: 406-413, 2005
- 9) Yamamoto T, Katayama Y, Oshima H, et al: Deep brain stimulation therapy for a persistent vegetative state. *Acta Neurochir (Suppl)* **79**: 79-82, 2002
- 10) Fujii M, Sadamitsu D, Maekawa T, et al: Spinal cord stimulation therapy at an early stage for unresponsive patients with hypoxic encephalopathy. *No Shinkei Geka* **26**: 315-321, 1998 (Jpn, with Eng abstract)
- 11) Funahashi K, Komai N, Ogura M, et al: Effects and indications of spinal cord stimulation on the vegetative syndrome. *No Shinkei Geka* **17**: 917-923, 1989 (Jpn, with Eng abstract)
- 12) Kanno T, Morita I, Yamaguchi S, et al: Dorsal column stimulation in persistent vegetative state. *Neuromodulation* **12**: 33-38, 2009
- 13) Liu JT, Tan WC, Liao WJ: Effects of electrical cervical spinal cord stimulation on cerebral blood perfusion, cerebrospinal fluid catecholamine levels, and oxidative stress in comatose patients. *Acta Neurochir Suppl* **101**: 71-76, 2008
- 14) Matsui T, Asano T, Takakura K, et al: Beneficial effects of cervical spinal cord stimulation (cSCS) on patients with impaired consciousness: a preliminary report. *Pacing Clin Electrophysiol* **12**: 718-725, 1989

マウス脱分化脂肪細胞の血管新生作用に関する研究

渡邊拓史¹⁾, 萩倉一博²⁾, 風間智彦²⁾, 高橋昌里¹⁾, 松本太郎²⁾

Study on angiogenic activity in mouse dedifferentiated fat cells

Hirofumi WATANABE¹⁾, Kazuhiro HAGIKURA²⁾, Tomohiko KAZAMA²⁾,
Shori TAKAHASHI¹⁾, Taro MATSUMOTO²⁾

要旨

脂肪組織由来幹細胞 (Adipose-derived stem cell: ASC) は高い血管新生能を有し、虚血性疾患に対する細胞治療に用いられている。一方、ASCに類似した多能性をもつ脱分化脂肪細胞 (Dedifferentiated fat cell: DFAT) の血管新生メカニズムは十分に解明されていない。本研究では、マウス脂肪組織よりDFATとASCを調製し、それぞれ血管内皮細胞と共培養する事により、血管内皮細胞の遊走能や増殖能、管腔形成能の変化を比較検討し、さらに血管構成細胞の1つであるペリサイトへの分化を検討した。その結果、DFATは血管内皮細胞の細胞増殖能、遊走能、管腔形成能を促進した。また、血管内皮細胞との直接および間接的共培養によりペリサイトへ分化した。一方、ASCは血管内皮細胞に対しDFATと同等の細胞増殖能・管腔形成能を示すが、細胞遊走能やASCのペリサイトへの分化能は、DFATに比べ低いことが示された。DFATはASCと同様に血管新生細胞治療の有効な細胞ソースとなりうる可能性がある。

1. はじめに

既存の血管より生理的・病的条件下に新たな血管が発生する現象を血管新生という。この血管新生に関与している分子機序や細胞動態を応用して、虚血組織の血流を確保し、組織障害や壊死を軽減させようとする治療法は、治療的血管新生と呼ばれている。その歴史は血管新生因子の遺伝子治療から始まり、現在は骨髄単核球細胞や間葉系幹細胞 (Mesenchymal stem cell: MSC) などの移植による細胞治療が期待され、臨床研究も開始されている²⁻⁵⁾。

Matsumotoら⁶⁾は脂肪組織より単離した成熟脂肪細胞を天井培養という方法を用いて、体外で脱分化培養する事により生じてくる繊維芽細胞様の形態をした細胞群が高い増殖能とMSCと同等の多分化能を示すことを明らかにした。この成熟脂肪細胞に由来する多能性細胞は、脱分化脂肪細胞 (Dedifferentiated fat cell: DFAT) と呼ばれている。DFATを虚血

部位へ移植するとバラクライン的に種々の血管新生因子が放出され、血管新生が誘導されることが確認されている⁷⁾。DFATは遺伝子操作やウイルスベクターを用いない安全かつ簡便な方法で短期間に大量調製が可能であるため、治療用細胞ソースとして早期の臨床応用が期待できる。

末梢動脈疾患 (Peripheral arterial disease : PAD) や Buerger病、虚血性心筋症などの難治性虚血性疾患において、DFATを用いた細胞治療は有効な治療法となる可能性がある。一方で、DFATの血管新生メカニズムに関しては十分に解明されていない。本研究は、DFATと血管内皮細胞を共培養する事により、細胞間相互作用による血管内皮細胞の遊走能や増殖能、管腔形成能の変化を脂肪組織に存在するMSCである脂肪組織由来幹細胞 (Adipose-derived stem cell: ASC) と比較して検討した。さらに血管内皮細胞との共培養により、DFATが血管構成細胞の

1) 日本大学医学部小児科学系小児科学分野

2) 日本大学医学部機能形態学系細胞再生・移植医学分野
松本太郎 : matsumoto.taro@nihon-u.ac.jp

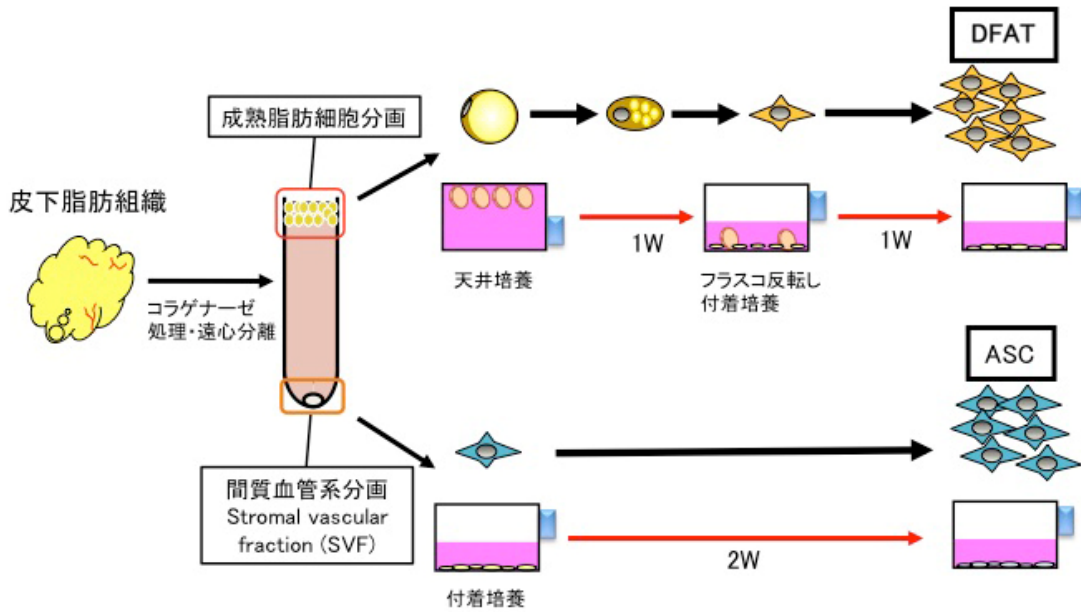


図1 脱分化脂肪細胞 (DFAT), 脂肪組織由来幹細胞 (ASC) の調製法

1つであるペリサイトへ分化する可能性について ASCと比較して検討した。

2. 対象及び方法

DFAT・ASCの調製

Green fluorescent protein (GFP) 標識DFATおよびASCは, GFPトランスジェニックマウス皮下脂肪組織から調製され, 凍結保存された細胞を解冻, 培養して実験に使用した。DFATおよびASC調整法の概略を図1に示す。増殖培地は20% 胎児ウシ血清含有 CSTI303-MSC (Cell Science & Technology Institute) を用い, 3-4日毎に培地交換を行った。

血管内皮細胞の増殖に対するDFAT・ASCの共培養の影響の検討

セルカルチャーインサート (BD Falcon) 内にマウスDFATあるいはASCを 1×10^4 , プレート底面にマウス血管内皮細胞 (MS1) 5×10^3 を播種し, 48時間共培養した。血管内皮細胞の核染色を行い, 蛍光顕微鏡にて撮影し, ランダム5視野内にある血管内皮細胞数をカウントし, MS1単独 (Control群), DFAT共培養 (DFAT群), ASC共培養 (ASC群) で比較した。実験はtriplicated dishで行った。

血管内皮細胞の遊走に対するDFAT・ASCの共培養の影響の検討

セルカルチャーインサート内に血管内皮細胞 (MS1) 5×10^3 , プレート底面にDFATあるいはASC 2×10^4 を播種し, 8時間共培養した。セルカルチャーインサート裏面に遊走した血管内皮細胞の核染色を行い, 蛍光顕微鏡を用いて撮影した。ランダム5視野内にある血管内皮細胞数をカウントし, 非共培養群と共培養群で比較した。実験はtriplicated dishで行った。

血管内皮細胞管腔形成に対するDFAT・ASCの共培養の影響の検討

コラーゲンボール (Cytodex3, GE Helthcare) 3,000個を含む10%胎児ウシ血清含有 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Invitrogen) 内にMS1を 8×10^5 播種し, 震とうすることによりコラーゲンボールにMS1を付着させた。このMS1の付着したコラーゲンボール50個をDFATまたはASC 5×10^3 を含浸させたコラーゲンゲル (Collagen I rat tail, BD Bioscience), またはコラーゲンゲルのみで7日間三次元培養し, MS1の管腔形成を経時的に位相差顕微鏡を用いて観察した。以上の実験はtriplicated dishで行った (図2)。

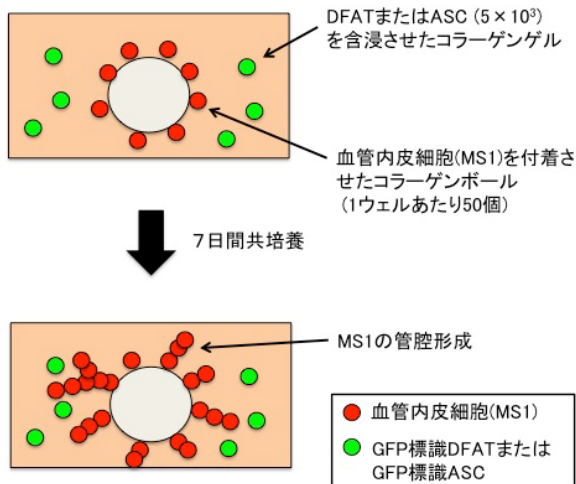


図2 コラーゲンボールを用いた血管内皮細胞管腔形成アッセイ

血管内皮細胞との共培養によるペリサイトマーカーの免疫組織染色を用いた発現解析

GFP-DFATあるいはGFP-ASCとMS1を間接的または直接的に72時間共培養を行い、4%パラホルムアルデヒドにより固定した。固定したDFATあるいはASCを、マウス抗NG2抗体(1:200, Millipore), マウス抗CD31抗体(1:200, BD Pharmingen)を用いて免疫染色を行った。Hoechst33342で核染色を行った後に、作成した標本を共焦点レーザー走査型顕微鏡(FV10i-DOC, Olympus)を用いて観察した(図3)。またGFP-DFATあるいはGFP-ASCとMS1を間接的または直接的に72時間共培養を行った後、Total RNAを抽出し、ペリサイトマーカー遺伝子の発現をリアルタイムRT-PCR法を用いて解析した。ペリサイトマーカー遺伝子としてNG2(MM_00507257), RGS5(MM_00654112), PDGFR β (MM_00435546)を検討した。 β アクチン(MM_00607939)の発現を同様に測定し、内部標準とした。各サンプルはtriplicateで測定し、 β アクチンmRNAに対する相対的定量解析(Comparative Ct法)を行った。

統計処理

実験により得られた定量結果はmean \pm SDにて表した。2群間の比較にはMann-Whitney U test, 3群間の比較にはone-way ANOVA, Tukey's Multiple Comparisonにて統計解析を行った。P < 0.05を統計

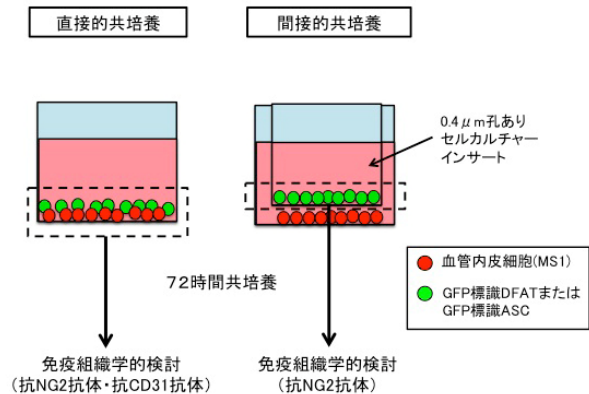


図3 血管内皮細胞との共培養によるペリサイト分化能の検討

学的有意差とした。統計処理はPRISM5(GraphPad Software)を用いて行った。

3. 結果

血管内皮細胞の増殖に対するDFAT・ASCの共培養の影響の検討

DFAT群, ASC群はControl群に比べてそれぞれ3.2倍, 2.6倍と有意にMS1の細胞数が増加した(p < 0.05)。一方, DFAT群とASC群との間には有意差は認められなかった。以上の結果より, DFAT・ASCは血管内皮細胞の増殖を刺激する事が明らかになった。

血管内皮細胞の遊走に対するDFAT・ASCの共培養の影響の検討

DFAT非共培養群と比較してDFAT共培養群ではMS1の遊走能が1.5倍と有意に高まった(p < 0.05)。一方, ASC非共培養群とASC共培養群との比較では有意差が認められなかった。以上の結果より, DFATは血管内皮細胞の遊走を刺激するが, ASCではその効果は認められなかった。

血管内皮細胞管腔形成に対するDFAT・ASCの共培養の影響の検討

コラーゲンボールに付着させたMS1管腔形成アッセイでは, DFAT群, ASC群はControl群に比べ明らかにコラーゲンボールから派生する発芽的管腔

形成が促進する所見が認められた。この結果より DFAT および ASC は血管内皮細胞の管腔形成を促進することが明らかになった。

血管内皮細胞との共培養によるペリサイトマーカーの発現解析

①免疫組織学的検討

DFAT 単独培養では全ての DFAT が GFP を発現しており、NG2 は陰性であった。MS1 との 72 時間の間接的共培養により、約 10% の DFAT が NG2 を発現した。MS1 との 72 時間の直接的共培養では NG2 陽性を示す DFAT が高頻度（約 20%）に認められた

(図 4)。NG2 陽性を示す細胞はすべて内皮細胞マーカー CD31 陰性であり、内皮細胞はペリサイトに分化しない事を確認した。一方、ASC 単独培養では全ての ASC が GFP 陽性であり、共培養前より一部の細胞に NG2 陽性細胞が認められた。MS1 との 72 時間の間接的および直接的共培養にて GFP 陽性かつ NG2 陽性細胞が検出されたが、その出現率は共培養前に比べ明らかな差は認められなかった。

②リアルタイム RT-PCR

DFAT における NG2 の mRNA の発現は Control と比較し間接的および直接的共培養において有意に増

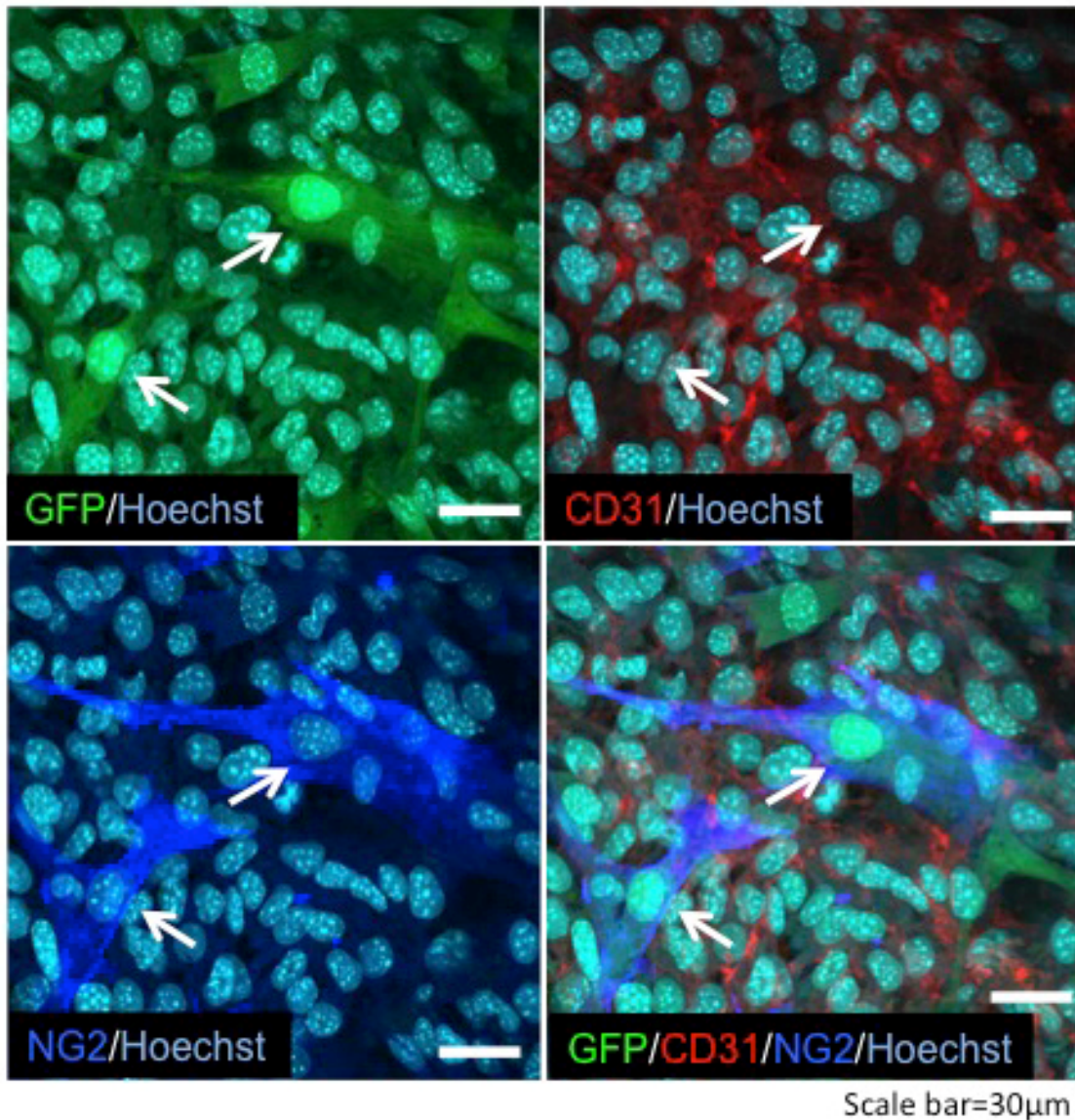


図 4 血管内皮細胞との直接的共培養による GFP-DFAT のペリサイトマーカー NG2 の発現 (矢印は NG2 を発現した GFP-DFAT を示す。)

加した ($p < 0.05$)。間接的共培養と直接的共培養間の比較においては直接的共培養のほうが有意にNG2発現が増加していた ($p < 0.05$)。RGS5のmRNAの発現はControlと比較し、間接的および直接的共培養において有意に低下した ($p < 0.05$)。間接的、直接的共培養間の比較においてはRGS5発現に有意差は認められなかった。PDGFR β mRNAの発現はControlと比較し間接的および直接的共培養において有意に増加した ($p < 0.05$)。間接的、直接的共培養間の比較においては直接的共培養のほうが有意にPDGFR β 発現が増加していた ($p < 0.05$)。ASCにおいては、全体的にNG2, RGS5, PDGFR β の発現はDFATと比較すると低い傾向が認められた。以上の結果より血管内皮細胞との共培養により、DFATがペリサイトの形質を獲得する事が示された。一方、ASCはその一部にペリサイトの混入が疑われ、内皮細胞との共培養による明らかなペリサイト分化の所見は得られなかった。

4. 考察

DFAT, ASCともに細胞間相互作用による血管内皮細胞の増殖能、管腔形成能を増加させる事が明らかになった。一方、血管内皮細胞に対する遊走能においてはDFATがASCに比べ有意に高い事が明らかになった。DFATとASCのサイトカイン発現プロファイルは類似している事が報告されている⁹⁾が、遊走活性を制御する因子において何らかの差異があると思われる。

またDFATは内皮細胞との共培養によりペリサイトへの分化の可能性が示された。一方、ASCは内皮細胞との共培養にてペリサイト分化の傾向を示さなかった。ASCがペリサイトへの分化傾向を示さなかった理由として、ASCではDFATに比べ未分化ペリサイトマーカー⁹⁾であるRGS5の基礎発現が低く、またペリサイト分化に重要なシグナルを伝達するPDGFR β の発現誘導が低いという形質に起因している可能性がある。ASCはin vitroおよびin vivoにおいて高い血管新生作用¹⁰⁻¹²⁾が知られており、虚血性疾患に対する血管新生を目的とした臨床研究も始まっている。今後、ASCとDFATのin vivoにおける血管新生効果を直接比較する前臨床試験を行い、両者の治療用細胞としての有用性を評価する必要がある。

5. 結語

DFATは血管内皮細胞に作用し、その細胞増殖能、遊走能、管腔形成能を促進する事が明らかになった。また、血管内皮細胞との直接的および間接的共培養によりペリサイトへ分化する可能性が示唆された。一方、ASCは血管内皮細胞に対しDFATと同等の細胞増殖能・管腔形成能を示すが、細胞遊走能は低い事が明らかになった。また、ASCのペリサイトへの分化能は、DFATに比べ高くないことが示された。DFATはASCと同様に治療的血管新生における有用な治療用細胞ソースとなりうる可能性がある。

文献

- 1) Carmeliet, P. (2000). Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nature Medicine*, 6(4), 389-395. doi:10.1038/74651
- 2) Matoba, S., Tatsumi, T., Murohara, T., Imaizumi, T., Katsuda, Y., Ito, M., et al. (2008). Long-term clinical outcome after intramuscular implantation of bone marrow mononuclear cells (Therapeutic Angiogenesis by Cell Transplantation [TACT] trial) in patients with chronic limb ischemia. *American Heart Journal*, 156(5), 1010-1018. doi:10.1016/j.ahj.2008.06.025
- 3) Lunde, K., Solheim, S., Aakhus, S., Arnesen, H., Abdelnoor, M., Egeland, T., et al. (2006). Intracoronary injection of mononuclear bone marrow cells in acute myocardial infarction. *The New England Journal of Medicine*, 355(12), 1199-1209. doi:10.1056/NEJMoa055706
- 4) Rosenzweig, A. (2006). Cardiac cell therapy—mixed results from mixed cells. *The New England Journal of Medicine*, 355(12), 1274-1277. doi:10.1056/NEJMe068172
- 5) Schächinger, V., Erbs, S., Elsässer, A., Haberbosch, W., Hambrecht, R., Hölschermann, H., et al. (2006). Intracoronary bone marrow-derived progenitor cells in acute myocardial infarction. *The New England Journal of Medicine*, 355(12), 1210-1221. doi:10.1056/NEJMoa060186
- 6) Matsumoto, T., Kano, K., Kondo, D., Fukuda, N., Iribe, Y., Tanaka, N., et al. (2008). Mature adipocyte-derived dedifferentiated fat cells exhibit multilineage potential. *Journal of Cellular Physiology*, 215(1), 210-222. doi:10.1002/jcp.21304
- 7) Jumabay, M., Matsumoto, T., Yokoyama, S.-I., Kano, K., Kusumi, Y., Masuko, T., et al. (2009). Dedifferentiated fat cells convert to cardiomyocyte phenotype and repair infarcted cardiac tissue in rats. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 47(5), 565-575. doi:10.1016/j.yjmcc.2009.08.004
- 8) Kikuta, S., Tanaka, N., Kazama, T., Kazama, M., Kano, K., Ryu, J., et al. (2013). Osteogenic effects of dedifferentiated fat cell transplantation in rabbit models of bone defect and ovariectomy-induced osteoporosis. *Tissue Engineering Part A*, 19(15-16), 1792-

- 1802.doi:10.1089/ten.TEA.2012.0380
- 9) Arnold, C., Feldner, A., Pfisterer, L., Hödebeck, M., Troidl, K., Genové, G., et al. (2014). RGS5 promotes arterial growth during arteriogenesis. *EMBO Molecular Medicine*, **6**(8), 1075-1089. doi:10.15252/emmm.201403864
 - 10) Miranville, A., Heeschen, C., Sengenès, C., Curat, C. A., Busse, R., & Bouloumié, A. (2004). Improvement of postnatal neovascularization by human adipose tissue-derived stem cells. *Circulation*, **110**(3), 349-355. doi:10.1161/01.CIR.0000135466.16823.D0
 - 11) Piccinno, M. S., Veronesi, E., Loschi, P., Pignatti, M., Murgia, A., Grisendi, G., et al. (2013). Adipose stromal/stem cells assist fat transplantation reducing necrosis and increasing graft performance. *Apoptosis*: **18**(10), 1274-1289. doi:10.1007/s10495-013-0878-7
 - 12) Yoo, J. H., Shin, J. H., An, M. S., Ha, T. K., Kim, K. H., Bae, K. B., et al. (2012). Adipose-tissue-derived stem cells enhance the healing of ischemic colonic anastomoses: An experimental study in rats. *Journal of the Korean Society of Coloproctology*, **28**(3), 132-139. doi:10.3393/jksc.2012.28.3.132

デジタル化がもたらす環境変化と業務の拡張

井上広一¹⁾, 黒江裕子¹⁾, 杉谷雅彦²⁾, 石井敬基²⁾

Effects of digitization for the change of environment and the expansion of work in Multimedia Studio

Koichi INOUE¹⁾, Hiroko KUROE¹⁾, Masahiko SUGITANI²⁾, Yukimoto ISHII²⁾

1. はじめに

近年、カメラといえばデジタルカメラが当たり前の時代となったが、二十年前の1995年頃は、まだフィルムカメラが一般的であった。

一般カメラ市場においてフィルムカメラとデジタルカメラの占める割合が、ほぼ半々となったのが2000年頃といわれている。そして2008年頃になるとデジタルカメラが一般カメラ市場のほぼ100%を占めるようになった(図1)。

急速にカメラのデジタル化が進む中、写真関連企業はシステムの変更や機器の入れ替えだけでなく、企業自体の統合や廃業など大きくその様を変えていった。

こうして、1839年のダゲレオタイプから続いてきた感光材料へ画像を定着させるというプロセスは、20年に満たない時間の中でそのほとんどがデジタルへと変わってしまったのである。約170年という時の流れからすれば一瞬の出来事だといっても過言ではない。そこで本稿では、中央写真室の事例をもとにデジタルカメラの進化とデジタル化移行への問題点、さらにそこから学んだことを述べる。

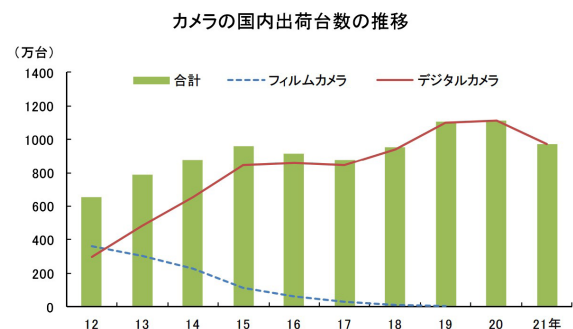
2. 中央写真室におけるデジタル化の流れ

20年前のデジタルカメラはフィルムの画質には程遠く、フィルムカメラに変わる存在となるには、かなりの時間を要すると思われていた。

1995年以前、中央写真室(以下、写真室)の主な

業務内容は、病棟・外来での患者撮影、術中撮影、標本撮影、レントゲンや書籍などの複写、光学顕微鏡撮影、などが中心で写真撮影については100%フィルムカメラを使用していた(図2)。さらに、当時は写真プリントや引き伸ばしも行っており、病院・スタジオ・暗室を一日に何度も行き来していた。

そして1995年、中央写真室では初めてデジタルカメラKodak DCS420を導入した。デジタルカメラの導入理由は、1) 既に手術などの映画撮影は16mmシネフィルムからビデオ(VHS)に移行していること、2) LFRで35mmスライドへのレーザー出力を行なっていること、3) 写真においてもこの先デジタル化が進むこと、などによるものである。当時業務用として使用できるデジタルカメラは、高額でありフィル



(注)1. フィルムカメラのデータは、銀塩カメラ(12~19年)を使用した。
2. デジタルカメラのデータは、デジタルスチルカメラ(12~21年)を使用した。
資料:「カメラ映像機器工業会統計」(一般社団法人カメラ映像機器工業会)

図1 カメラの国内出荷台数の推移
「経済産業省:産業活動分析(平成22年4~6月期)」より出典

1) 日本大学医学部総合医学研究所医学研究支援部門中央写真室
2) 日本大学医学部総合医学研究所医学研究支援部門
井上広一: inoue.koichi@nihon-u.ac.jp



図2 フィルムカメラNikon F3
1995年当時、まだ中央写真室の主力機であった。



図3 中央写真室導入初期と現在のデジタルカメラ
左) Kodak DCS420 右) Nikon D5300

ムカメラと比較すると画質が悪いなどの理由から、導入時期についてはスタッフ間でも意見が分かれていたが、様々な要因からこの時期の導入となった。

導入したデジタルカメラのKodak DCS420は、カメラ部がNikon製・記録部がKodak製というもので、当時の納入価格は135万円(付属品含む)、画素数は150万画素であった(図3)。また、導入したデジタルカメラの用途としては、レントゲンフィルムやプレバートを撮影しPhotoshopなどに挿入する画像データ作製や、35mmスライドをデジタルデータ化するなどの作業が中心であった。そのため、カメラはコピースタンドに固定、パソコンとはSCSIケーブルで接続していたため、複写専用カメラというイメージであった。その後、数台のデジタルカメラを導入し、徐々に用途を広げていった。

2000年以降、デジタルカメラが一般的にも普及してきたことから、写真室でも2004年にフィルムカメラからデジタルカメラへの完全移行に向けて準備を開始した。具体的には、時期を設定し一斉に切り替える計画であった。その準備段階では、手術や

生体写真をフィルムカメラとデジタルカメラの両方で撮影し、利用者に見比べてもらい意見を集約するという作業を行った。その中で一部の診療科から「患部の色が分かりにくい」との意見があった。原因を調べたところPC用プロジェクターの機種によっては赤色が滲む傾向があることがわかった。当時のPC用プロジェクターは、まだ輝度も低く色再現も今ほど綺麗ではなかったため、このようなことが起こることもあった。加えて、その他にも様々な理由から、従来のスライド(ポジフィルム)を希望するニーズもあったことから、利用者側の関連機器や周辺環境が整備されるまで、1年程度の時間をかけて段階的に移行することに計画を変更した。この段階的移行期間は、フィルムカメラとデジタルカメラを科別・用途別に使い分けるようにしたことで、作業負担は大きくなったが可能な限り利用者の利便性を優先した。その後、2005年にフィルムカメラからデジタルカメラへ完全移行することができた。

3. 機器およびシステムの環境

上述した事例から、デジタルカメラだけが進化しても、関連する機器や環境(システムや施設など)が整備されなければその良さが発揮されないことを、準備段階から学んだ。

フィルムカメラ時代の作業フローは、「撮影」→「現像」→「スライド/プリント」であり、デジタル化した現在でも「撮影」→「画像編集」→「データ/プリント」であり、全体の流れはほとんど変わっていない。これは、デジタルカメラがフィルムカメラをもとに作られたことにより、フィルムの処理工程をデジタルに置き換えたことによると考えられる。

特に、デジタルカメラとパソコンの関係は密接であり、現在、写真室で撮影した画像の90%以上はパソコン上で編集(補正)作業を行なっている。パソコンでの画像編集作業は、フィルムの暗室ワークに相当するものといえるだろう。

しかし、暗室用品は数年あるいは数十年と同じ道具を使うことができるが、デジタルカメラの場合はカメラの画質が向上することでデータ容量が増加したり、新機能がソフトウェアに対応していないなど様々なことが起こり得る。こうした状況にパソコンやソフトウェアも対応していかなければならず、デジタルカメラとパソコン・ソフトウェアは常にセッ

表1 DCS420とD5300の仕様比較

	Kodak DCS420	Nikon D5300
発売年	1994年	2013年
価格(付属品含む)	135万円	4万9千円
画素数	150万画素	2416万画素
センサーサイズ	18.1×13.5mm	23.5×15.6mm
記録メディア	PCカード	SDカード
その他機能		WiFi / GPS

トで考えていく必要がある。

ここで、1995年導入のKodak DCS420と、2015年に一般記録用として導入したNikon D5300の簡単な性能比較を表1に示す。まず大きな性能の違いは、イメージセンサーサイズが大きくなり、それに伴い画素数も向上したことである。このことで高解像度な画像を得ることができるようになった。被写体の細部まできれいに写しだされるようになったことで、特にマクロ撮影や顕微鏡撮影においてその違いを実感できた。単純な記録画像から細部まで表現できる画像へとデジタルカメラはフィルムカメラに替わる存在としてその地位を確立したといえよう。その高画素化への背景には、イメージセンサーの生産技術が大きな要因であり、高画素化だけでなくデジタルカメラの低価格化へ大きく影響している。さらに20年前のDCS420には搭載されていないWiFiやGPSといった機能がD5300には搭載されている。WiFiは、コードレスでパソコンやスマートフォンに画像データを転送する機能で、一般的には撮影した画像をシェアしたりスマートフォン経由でSNSに投稿するといった使い方がされているが、写真室では隔離室内の撮影者が部屋を出ることなく室外のスタッフへ画像データを渡すことができるなど、撮影シーンによっては便利な機能である。GPSについては、撮影場所の緯度経度を画像データとともに記録するため、パソコン上の地図に撮影地点を表示することができる。これらの新機能はパソコンやプリンター、AV機器など周辺機器と連携するようになっているものが多い。したがって、デジタルカメラ単体の進化だけでなく周辺機器の変化により、デジタルカメラに搭載されるケースも少なくない。この20年間でデジタルカメラの機能は向上し、価格は下がっている。その一方で、新機能を使用する場合や周辺機器との連携を図るためには、新機能を搭載した新たなデジタルカメラの導入が必要となる。デ

ジタルカメラの新機種導入サイクルはフィルムカメラに比べるとかなり短くなっている。

4. 業務環境の変化

フィルムカメラ時代は、撮り直しがきかない手術や実験などの撮影は、写真室へ依頼するというケースが非常に多かった。フィルムカメラは、現像が終わらない限り撮影結果が得られず、数時間～数日を要していた。そのため、再撮影できないものについては複数台のカメラで撮影するなど写真室でも二重三重の対応策を講じていた。

しかし、最近のデジタルカメラでは、誰でもほとんど失敗無く撮影ができるようになった。さらに撮影現場で確認（プレビュー）できるので、撮り直しもその場で行なうことができる。それにより撮影者のプレッシャーもかなり軽減されるようになった。

現在、写真室ではフィルムカメラ時代に比べ、臨床現場での撮影が極端に減少した。これは、デジタルカメラの性能が良くなり簡単に撮影ができるようになったため、診療時に医師が撮影を行うケースが増えたことによるものである。患者さんのプライバシーなどの面を考慮しても、診察スタッフが撮影することが望ましいと考える。

5. まとめ

2005年に完全デジタル化から10年を経て、写真室での業務の中心は写真撮影からデジタル編集（静止画・動画）や大判ポスター印刷などへシフトしてきた。これらのことは、今まで近くにありながら別の領域として見えない境界線を感じていたが、デジタル化という流れの中でその境界線は無くなりつつあるといえよう。デジタル化で変わったものはカメラだけではなく、関連する周辺機器や環境によって業務の中心や領域までもが変化したのである。

2013年、中央写真室の英語表記を「MEDICAL PHOTOGRAPHY」から「MULTIMEDIA STUDIO」へ変更した。「MULTIMEDIA」という単語は、「デジタル大辞泉」によれば、『文字・動画・静止画・音声・グラフィックスなど、多様な表現を統合的に用いる情報媒体』と記載されている。したがって、境界線が無くなりつつある中で、今後も積極的に隣接領域に目を向けていくことで新たな視覚伝達の可能性を見出していきたいと考えている。

大判プリンター Canon Image PROGRAF iPF9400 による 発表用ポスターの作成支援とエクステンション支援

黒江裕子¹⁾, 井上広一¹⁾, 杉谷雅彦²⁾, 石井敬基²⁾

Support for the poster creating and extended use from graphics of the large format printer with the Canon Image PROGRAF iPF9400

Hiroko KUROE¹⁾, Koichi INOUE¹⁾, Masahiko SUGITANI²⁾, Yukimoto ISHII²⁾

1. はじめに

2004年頃から学会発表のスタイルとしてポスターセッションが増加し、それに伴い2007年、中央写真室では大判プリンター Canon Image PROGRAF iPF8000 (以下iPF8000) を導入した (図1)。この大判プリンターの写真室での出力件数は年々増加しており、2014年度においては総出力長が700mを超える状況である。これはA0 (幅84.1cm×高さ118.9cm) サイズで約590枚分に相当する。

併せて、利用者から海外のポスターセッションに合うサイズでの出力要望が増加し、さらに現有のiPF8000の購入から既に8年以上経過していた。そこで、不具合が発生するという可能性も考慮して、Canon Image PROGRAF iPF9400 (以下iPF9400) を2015年に導入した (図2)。

このiPF9400はiPF8000と同様、任意の長さでカットできるロール状の紙を使用することには変わりはないが、最大60インチ (150cm) 幅までの出力が可能であることが大きな特徴である。

iPF8000では、最大用紙サイズが44インチ (111.8cm) 幅であり、国際学会などで多く使用される短辺120cm×長辺240cmサイズの出力に数センチ足りない状態であったが、iPF9400ではこれに対応することが可能となった。このことによって、日本国内だけでなく国際レベルでも対応できるようになった。

ところで、このiPF8000とiPF9400はともに12色の顔料インクを使用する仕様となっている。顔料イ

ンクは様々な用紙にプリントすることができ、色の見え方に環境光による影響が少ないという特徴を持っている。したがって、蛍光灯などの光の写り込みがしにくく、ポスター発表に適しているといえる。

加えてiPF9400では、色域が従来のインクよりも広がったこと、黒の表現力・暗部の階調表現が高くなったことで、さらに写真の表現力を高められ、より引き締まった表現が可能となった。これは例えば、病理検体では色再現が豊かに、またレントゲン・MRI等写真においては、モノクロの階調を精度高いトーンで表現できるということである。なお、iPF9400の特徴の詳細については、Canonのホームページ ([http://cweb.canon.jp/imageprograf/lineup/ipf9400/features](http://cweb.canon.jp/imageprograf/lineup/ipf9400/features.html#highquality)

.html#highquality) で確認することができる。

2. 大判ポスター原稿の作成から仕上がりまで

医学研究支援部門の中央写真室で出力する場合は、以下のような手順で原稿作成するとスムーズである。

- ① 原稿作成ソフトウェアは、Microsoft Power Point を推奨する。
- ② 『ページ設定』→『ユーザー設定』で「幅」と「高さ」を仕上がりサイズに設定する。ただし、長辺が142cmを超える場合は「幅」「高さ」とともに半分 (1/2) に設定する。改行が行われていないと文字ズレする可能性があるため、文章が二行以上に

1) 日本大学医学部総合医学研究所医学研究支援部門中央写真室
2) 日本大学医学部総合医学研究所医学研究支援部門
黒江裕子 : kuroe.hiroko@nihon-u.ac.jp



図1 iPF8000

(日本国内では短辺90cm×長辺180～210cmが多い)



図2 iPF9400

(海外では短辺120cm×長辺210cmが多い)

なる場合は必ず改行 (Enter) して区切る。

- ③ 写真や図などを挿入した場合は、作成した原稿を200～400%拡大しモニター上で画質を確認する。解像度が低い場合は、ボケが生じ画質の荒い状態になることがある。
- ④ USB、CD等各種メディアへデータを保存し、中央写真室へ直接持参して受付する。通常、4種類の用紙を用意しており、用紙の種類等必要事項を専用伝票へ記入する。
- ⑤ 原則として、午前中受付の原稿は当日仕上がりとなるが、学会シーズン等の繁忙期や他の業務により希望に添えない場合があるため、時間に余裕をもって申し込む。受取りは業務時間内に受け取るようにする。

なお、料金等の詳細は医学部ホームページから「研究」→「医学研究支援部門」→「中央写真室」でアクセスすることができる。

3. 大判プリンターの応用例

大判プリンターの活用には、ポスター以外の用途もいくつか考えられるが、ここでは、子供を対象としたペーパークラフト作製、ワークショップを提案して紹介する。

通常、家庭でクラフト作製をする際は、家庭用プリンターで出力するためA4サイズが限界であるが、大判プリンターではA4サイズ以上の大きいサイズを出力できるという特徴がある。このことを利用して、ペーパークラフトを作製することができる。

具体的には、幼稚園・保育所・児童館・病院小児病棟などにおいて、グループワークを行うことで、仲間の個性を認め受け入れることや、協力すること

の大切さ、また皆で作りに上げることの楽しさや喜び、達成感が得られることも考えられよう。加えて同時に、はさみなど道具の使い方も学べることも考えられる。

次に、七夕飾りを事例として、作製手順を以下に示す。大まかな流れは、1) ペーパークラフトデータの出力とカット、2) 貼り付け、3) 組み立てと飾りつけの順である。

<手順- (七夕飾りの場合) >

クラフトデータは、インターネットから無料でダウンロードできるものを使用した。今回は、キリンビバレッジペーパークラフト (<http://www.kirin.co.jp/entertainment/kids/papercraft/summer/tanabata.html>) から「七夕～星に願いを～」を用いて作製した。

1) ペーパークラフトデータの出力とカット

ここでは、ハサミやカッターなどを用意する。



図3 出力したペーパーと各パーツ
(○で囲んだペーパーの大きさはA4サイズ)

- ① 大判プリンターで出力し、各パーツを丁寧にカットする(図3)。
- ② はじめは大まかに切り、後で細かい部分を切ると切り抜きやすい。

2) パーツの作成

ここでは、のりやテープなどを用意する。



図4 のりづけの様子

- ① のりしろを貼り合わせ、パーツを立体化する(図4)。
- ② 折り線部分に定規を当てると、きれいに折り曲げることができる。
- ③ 他のパーツも同様にして作成する。

3) 組み立てとレイアウト



図5 完成イメージ

- ① 各パーツを組み立て、飾りつけをする。
- ② オプションで短冊などをつけ加える。

- ③ 目的に応じてレイアウトする。図5は、中央写真室の入口にレイアウトした例である。

以上のように作成すると、通常は卓上サイズのものでも、大判プリンターを活用して出力することにより、高さ120cmを超えるサイズで作ることが可能となる。このことは、大判プリンターの用途が学会発表用ポスターの出力のみならず、多様な用途への可能性を示唆するものであり、大判プリンターの新たな活用例を示すものと考えられる。

4. まとめ

中央写真室は、新しいiPF9400を導入したことで、既存のiPF8000が何らかのトラブルで使用できなくなった場合でも、業務に支障をきたすことなく迅速に対応することが可能な環境を整備することができた。

また、大判プリンターの応用では既存データを用いて出力したが、Microsoft Power PointやAdobe Illustrator等のソフトウェアを使えばオリジナルのペーパークラフト作製も可能である。実際の現場においてワークショップなど、様々なアイデアを出し合って、皆で楽しんでもらうことを願っている。

さらに、iPF9400の導入によって、高精細で豊かな色再現が可能となったことから、利用者が研究成果を発表することにふさわしい状態であると考えられる。また、最大出力用紙幅が60インチになったことで、日本国内だけでなく国際レベルでも対応できるようになった。

今後は、iPF8000とiPF9400の2台を併用していくことで利用者のニーズに対応することを考えている。

医学研究支援部門循環機能室に設置された、 エックス線循環器診断システムの現状

谷口由樹¹⁾，藤田順一¹⁾，松本 明²⁾，黒田和道^{1),3)}

Medical research support center, Laboratory for animal experiments setting apparatus, conditions of X-ray diagnostic apparatus

Yoshiki TANIGUCHI¹⁾, Junichi FUJITA¹⁾, Akira MATSUMOTO²⁾, Kazumichi KURODA^{1),3)}

1. はじめに

医学研究支援部門内における動物実験室は、小動物(マウスやラット)を対象とした小動物実験室と、中型動物(ウサギ、イヌ、ブタ、ヤギ)を対象とした動物実験室(循環機能室)がある。

動物実験室にはエックス線アンギオ装置が1997年より設置され、これまでに多くの実験、研究に利用されてきた。しかしながら、導入時には最新の機種であったが、年月の経過とともに新たな機能を搭載したエックス線装置が登場し、現在主流である装置に比べると劣っていることが否めない。そこで、本施設に設置している機種の現状と、現在主流といわれている機種について、その違いを検討する。

2. エックス線装置の比較

1) 現有機種

現在使用している機種(KXO-80C:東芝メディカルシステムズ)を図1に示す。本装置は1997年に導入され、18年が経過している。この間に大きな故障はなく2005年に管球交換を行ったのみである。基本性能は、視野サイズが9インチの円形(直径23cm)、検出器はI. I.(エックス線イメージンテンシフィア)を採用し、モニタはブラウン管、記録はシネフィルム(現在使用していない)、VHSビデオでの記録となっている(表1)。

2) 現在の主流機種

現在、エックス線装置は様々なメーカーから目的に応じて多くの機種が販売されている。その中でも現有機種と類似し、比較的安価なモデルである東芝メディカルシステムズのINFX-8000Fを例に、ここでは取り上げる。この機種は血管撮影装置として必要な機能をコンパクトにまとめたベーシックモデルである。装置の基本性能は、視野サイズ12 x 12インチ正方形(直径30cm)、検出器はFPD(Flat Panel Detector)、モニタは液晶モニタであり画質もよい(表1)。記録方法は医用画像機器間で通信・保存する方法を定めた国際標準規格であり、CTやMRIなどで撮影した医療用画像のフォーマットと同様DICOM(Digital Imaging and Communication in Medicine)形式である。

3. INFX-8000Fの特徴

1) 透視下における照射線量の低減

エックス線を低減する方法として、パルス透視が利用されている。パルス透視は一般的に1秒間当たり30フレームの画像を表示するのが基本¹⁾で、一般に30pulse/secのパルス透視は連続透視の線量とほぼ同じに設定されている。しかし、パルス透視を用いることにより、照射線量の低減を図ることができる。

一般的に、パルス透視は少ないパルスを利用し照

1) 日本大学医学部医学研究支援部門ラボラトリーアニマル系

2) 日本大学医学部医学研究企画・推進室

3) 日本大学医学部病態病理学系微生物学分野

谷口由樹: taniguchi.yoshiki@nihon-u.ac.jp



図1 現有設置機種KXO-80C

射線量の低減を図るが、残像やコマ落ちにより手技が妨げられないことが条件となる。またパルスあたりの照射線量を低減することで被爆をさらに軽減できるが、線量不足によるノイズ量の増大はデバイスが十分に視認できるところまでが条件となる²⁾。東芝のPureBrain³⁾は、超低線量設定でも手技を妨げない透視画像を得ることができ、照射線量は標準設定と比べ78%低減することができる²⁾。さらに、パルスレートを30/20/15/10/7.5/5/3/2/1ppsと細かく設定することが可能で、パルスレートを落としても残像がほとんどない透視画像が得られる。

2) 照射範囲の限定による面積線量（照射面積）の低減

照射範囲の限定は従来からエックス線絞りが用いられているが、エックス線絞りには、絞りエリアが黒くなり術者が不安を抱く。また絞ることにより、システムがエックス線不足と感知し、線量が増加してしまい、上下、左右にしか絞ることができず観察部位を中央に置く必要がある問題点があった。しかし、新しく開発された「スポット照射」は、エック

表1 現有装置と新装置との比較

	現装置 (KXO-80C)	新装置 (INFX-8000F)	備考
視野サイズ	9インチ円形 (直径23cm)	12インチ正方形 (直径30cm)	視野サイズが大きくなり、また視野形状が正方形になることで一度に描出できる範囲が広がる。
検出器	画像劣化あり (I.I.: Image Intensifier)	画像劣化なし (FPD: Flat Panel Detector)	現在の装置は導入後18年が経過しており、画像の劣化が激しくなっている。また新装置に搭載されているFPDは、画像の劣化もほとんどなく長期間安定して利用できる。
画質	普通	良い (PureBrain搭載)	PureBrain搭載により、透視・撮影画像ともに大幅な画質向上が可能である。
被ばく	多い	少ない	現在の装置は劣化が進んでおり、使用者の被ばくが増大している。
モニター	ブラウン管(CRT)	液晶モニター(LCD)	ブラウン管ではメンテナンスがしにくいだけでなく画像が観察しにくい。
X線管容量	1800kHU	1800kHU	同等
テーブル可動性	長手動:1350mm 横手動:400mm	長手動:1350mm 横手動:400mm	同等
今後拡張性	なし	3D撮影機能	2D撮影ではなく3Dができることにより研究用途が広がる。

ス線を照射したい部分に設定すると、その部分のみを透視し、照射部以外は直前の透視のラストイメージホールド画像を表示することができる。そのためスポット透視は被爆低減に有用性がある²⁾。

3) FPD (Flat Panel Detector) の搭載

循環器領域の手技に求められる深い角度付けにも画質を損なわない。これは従来のI. I.搭載機の弱点であったが、FPDを搭載することで、術者の視野が開け、手技向上に役立ち、手技時間や透視時間の短縮にもつながり⁴⁾被爆線量の低減に有用である。

4) DSA (Digital Subtraction Angiography) ～デジタル差分血管造影法

血管内に造影剤を注入する前後のエックス線画像をコンピューターで解析し、血管以外の骨を差し引くことにより、血管のみをリアルタイムに描出することができる。この技術により、診断能の向上とともに検査時間が短縮した。また最大の利点は被爆量が低減できることが挙げられる。

4. 提言

医療機器や診断装置は年々進化している。購入時は最新といわれた機器も、数年後にはいわゆる「型落ち」になってしまう。これはある程度は仕方のないことだが、使用する研究者の求めているレベルが変化しない限り「型落ち機器」であっても使用可能である。しかしながら、医療技術や診断技術の進歩に伴い、研究者が求める実験結果は、医療・診断技術の進歩と同等、もしくはそれ以上のレベルが要求される。その結果、現行機種の結果に疑問が生じ、研究遂行が不可能となる。例えば、従来の機種では見えなかったものが、新しい機種では見えれば、従来の機種寿命はまだ先でも、機械の「性能」としての寿命は尽きたことになり、最先端の研究で使うことは難しくなる。

現在、医学研究支援部門の動物実験室（循環機能室）に設置してあるエックス線装置は、導入して既に18年が経過している。この間に大きな故障はなく、2005年に管球交換をただで現在も運用されている。管球はエックス線を発生させる重要な部分で、管球の構造は一体型になっておりパーツのみの交換はできない。また寿命は使用頻度および画像の

劣化状況にもよるが、稼働率が高い場合3～5年といわれている。既に現在、画像がやや不鮮明な描写となっている。

現在の機種は設置後8年で管球交換を行ったが、前回の交換から既に10年が経過しているため、管球がいつ故障するか分からない状態である。また数年前に管球を検査したところ、エックス線の出力が70%まで低下しており、描写される画像も悪くなってきている。このことから現在、管球の交換を考える時期にきているものの、このエックス線装置は販売後年月が長期に経過しているため、メーカーの保守部品の保有期限が2014年3月31日で終了しており、保有部品が存在する場合に限って修理対応という状況である。なお、管球は現在メーカーの在庫が無く、管球が故障した時点で使用不可能となる。したがって、いつ使用不可能となるか分からない状況であり、使用できなくなった場合、遂行中の研究に多大なる損害が生じる。特に、エックス線装置の使用を前提とした寄付口座や公的研究費取得者もあり、現装置が使用できなくなった場合、進行中の研究だけでなく将来の研究計画にも影響を及ぼすことは明らかである。

現有機種と現在販売されている機種には基本的性能にも違いがある。最も重要な点は照射線量の低減である。エックス線装置は、体の内部をエックス線が透過する際、体の内部構造により減弱されて出てくる差を見るのもので、臨床の現場では診断および治療に幅広く使われている。エックス線装置の使用は、患者さんも被爆することは避けられないが、エックス線検査は被爆のマイナス面よりプラス面が大きいため使用されている。

エックス線を使用する場合、診断や治療における有用性を除くと、医療従事者側へのプラス面はない。そのため、無用な被爆を避けることが求められる。これは実験においても同様であり、実験者は被爆を防止するため、防護衣や防護手袋、ネックガード、防護メガネなどの装着によりエックス線装置を使って実験するが、被爆を完全になくすることはできない。エックス線装置は得られるメリットは大きいですが、体への負担、特にエックス線を使用する側には体への影響という意味でマイナス面が大きい。このことから、被爆線量低減のため、メーカー側はさまざまな改良を行っている。単純に被爆量を抑えるに

は、照射線量、照射時間を減らす必要がある。照射線量はスポット照射することにより線量を低減することができる。高橋²⁾はスポット透視の線量低減効果について、照射野サイズの面積比を、Fullを1とした場合、それぞれ0.25, 0.11, 0.0625となるようにし、面積線量はFullを100%とした場合、それぞれ27%, 15%, 11%程度まで減少でき、また術者被爆となる散乱線も減少し、Fullを100%とした場合、それぞれ52%, 34%, 28%まで低減可能と述べている(エックス線管から50cm離れ、床から150cmの高さで測定)²⁾。

デジタル撮影技術は、従来のシネフィルムよりも低い線量で撮影記録が可能となっている。照射線量は現在の主流機種ではパルスレートを落とすことで減らすことができ(パルスレートを落とすことによる残像がほとんどない透視画像が得られる)、またクリアな画像を得られれば透視時間(エックス線を用いた手技時間)の短縮にも大きな改善がみられる。設置機種は現在の主流機種に比べると施設担当者及び利用者に負担のかかる機械となっており、故障の懸念や利用者の負担を考慮すると、設置機種更新の必要性が強く求められる。

5. まとめ

現在、医学研究支援部門の循環機能室に設置して

あるエックス線装置は購入から18年経過している。その間に機器は進歩し「性能」の寿命も近づき、また製品として機械の寿命も近づいてきている。現在の主流機種は線量の低減も進んでおり、利用者の負担軽減にもなる。そのため早急な機器の更新が望まれる。

参考文献

- 江口陽一：DF装置を使用する人が知っておきたいこと。日本放射線技術学会雑誌 56巻11号 1321-1331, 2000.
- 高橋 淳：不整脈治療および末梢血管インターベンションにおける被ばく低減の試み。INNERVISION Vol.27 No.5 118-119, 2012.
- 長岡秀樹：Angioの技術進歩と被ばく低減への取り組み-血管撮影装置の進化：PureBrainが導く被ばく低減の試み。INNERVISION Vol.26 No.5 56-59.
- 上杉道伯, 竹中和幸：FPD搭載型血管撮影装置の有用性。映像情報メディカル Vol47 No.2 87-92.

医学研究支援部門 形態系 電子顕微鏡室の紹介と心臓移植時代の 電子顕微鏡を用いた心筋超微形態観察の有用性

地家豊治¹⁾, 大矢俊之²⁾, 加藤真帆人²⁾, 高山忠輝²⁾, 廣 高史²⁾,
楠美嘉晃³⁾, 山田 勉⁴⁾, 石井敬基¹⁾, 杉谷雅彦^{1,5)}, 平山篤志²⁾

Introduction to Electron Microscopy Laboratory, Morphological Section of Research Institute of Medical Research Support Center, and The Usability of Ultrastructural Morphometrical Study using Endomyocardial Biopsy in the Era of Heart Transplantation

Toyoharu JIKE¹⁾, Toshiyuki OHYA²⁾, Mahoto KATO²⁾, Tadateru TAKAYAMA²⁾,
Takafumi HIRO²⁾, Yoshiaki KUSUMI³⁾, Tsutomu YAMADA⁴⁾, Yukimoto ISHII¹⁾,
Masahiko SUGITANI^{1,5)}, Atsushi HIRAYAMA²⁾

1. 電子顕微鏡室の紹介

医学研究支援部門 形態系 電子顕微鏡室では、形態学的観点から、電子顕微鏡および全自動免疫染色装置を用いた研究支援を行っている。当室に設置されている電子顕微鏡関係の機器は、透過電子顕微鏡2台、走査電子顕微鏡1台、それらの試料作製を行うための周辺機器、更に2011年にはin situ Hybridizationと免疫染色が全自動で施行可能なベンタナXTシステム ディスカバリーが導入されている。

透過電子顕微鏡は日本電子のJEM-1200EXおよびJEM-1200EX IIの二台が設置され、通常観察倍率は800～60万倍である。走査電子顕微鏡は日立S-4000が設置され、観察倍率は25～30万倍である。電子顕微鏡を用いた超微形態観察においては観察対象組織・細胞の試料作製が肝要で、特に組織・細胞の固定法については観察目的にそった固定を選択しなければ正確な所見は得られない。当室にて電子顕微鏡観察を行う際、試料の種類・観察対象や目的を担当者にお知らせいただければ、最適な試料作製法・固定液の選択や以降の実験研究過程に於ける様々な示唆を提供している。ただ、当室の電子顕微

鏡は1990年前後に購入され、撮影記録媒体が銀塩フィルムを用いており、いまだにデジタル化がなされておらず、経年からメーカーにおいてもすでに修理対象外となっている。機器の老朽化は否めないが、試料作製の確かな技術・経験を活かし「より正確な観察」を施行し、できうる限りの研究支援を行っている。

ベンタナXTシステム ディスカバリーはin situ Hybridizationや免疫染色などをランダムアクセスで処理できる全自動染色システムで、研究用に開発された機器である。脱パラフィン、熱処理・酵素処理などの賦活化からプローブ添加、変性、ハイブリダイゼーション、洗浄、発色、対比染色までの一連の工程を自動処理可能で、反応温度も個別に設定でき、30種類の異なる条件を同時に処理できる。そのため、非常に手間と時間のかかる反応条件の検索も一度の処理で行える。FISHはもちろんTUNEL法や免疫染色も自動化、DNAチップなどのハイブリダイゼーションにも応用可能である。受け付けた免疫染色に関しては病理医の指導の下、適切に施行している。

1) 日本大学医学部 総合医学研究所 医学研究支援部門
2) 同 内科学系 循環器内科学分野
3) 病態病理学系 腫瘍病理学分野
4) 同 人体病理学分野
5) 同 形態機能病理学分野
地家豊治: jike.toyoharu@nihon-u.ac.jp

本稿では当電子顕微鏡室を頻繁に利用している循環器内科学分野（大矢俊之）による研究を次に紹介する。

2. 電子顕微鏡を用いた心筋超微形態観察の有用性

重症心不全治療において2010年代は飛躍の年であった。世界的には標準的治療であった心臓移植は1999年に本邦に於いて再開されたものの移植件数は年に数人であった。しかし、2010年臓器移植法改正後、心臓ドナー数は急激に増加（図1）、心臓移植は「ごく一部の患者が行う治療法」から「誰もが適応を考えうる治療選択肢の一つ」へと変わった。また、2011年には植え込み型人工心臓という新たなデバイスが認可され、重症心不全の治療にさらなる選択肢が広がった。日本大学医学部附属板橋病院も2013年9月より植え込み型人工心臓移植の認定施設となり、重症心不全患者の希望となりつつある。しかし、心臓に関してはドナー数が増えたとはいえ未だ需要に対する供給数は十分とはいえず、数多いレシピエントの中から心臓移植の適応を決定し選定をする必要がある。その際「検討患者の不全心臓は本当に不可逆的な変化が起きているのか？」という命題に対して客観的なDataを提示することは移植優先順位選定に大きな影響を与える。

心不全心筋の病態病理を把握するためには心臓超

音波、心臓MRIなど様々な検査方法があるものの、決定的な心筋の不可逆性変化は光学顕微鏡・電子顕微鏡による組織形態の観察で得られると考えられている。しかし、電子顕微鏡を用いた心筋評価には高度なシステムが必要であるにもかかわらず、長い期間心臓移植が困難な時代が続いたため、検査システムの破綻した施設は多く、現時点で心筋の超微形態を評価できる施設は全国的にも数少なくなってしまった。

そこで、我々は2010年より動物及びヒト心筋の超微形態学的な評価を可能にするため、大阪国立循環器病センター、大分医大、北里大学、大阪大学、国立国際医療センターの諸先生方に御指導を受けながらシステムの構築と研究を進めている。動物を用いた心筋細胞の基礎Dataの蓄積（図2, 3）はもとより、現在では年間40-50件、延べ164名の心筋生検検体が電子顕微鏡標本に作製され、その全ての検体を、循環器医、小児医、病理医が集まり心筋生検臨床病理カンファレンスとして定期的に評価している（図4, 5）。

これにより得られた結果を基に、心臓移植検討委員会での移植適応判断のDataとして、また、重症心不全患者の診断における特定心筋疾患の鑑別を行い、ミトコンドリア心筋症、アミロイドーシス、巨細胞性心筋炎、Fabry病などを検出している。また、

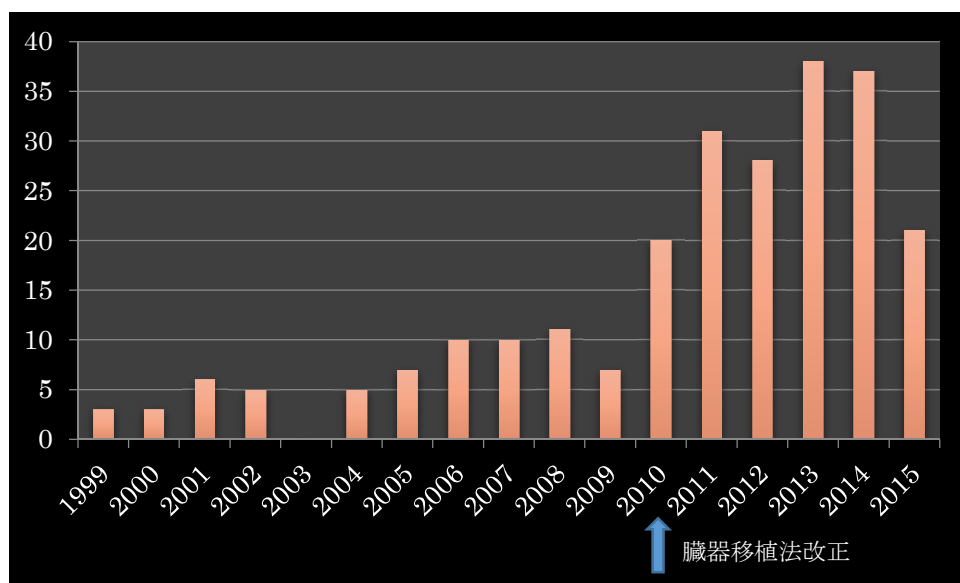


図1 我が国における心臓移植件数

矢印：2010年臓器移植法改正。2010年度は改正後の件数、2015年は6月までの半年間の件数。（公社）日本臓器移植ネットワーク <https://www.jotnw.or.jp> 資料より作成。

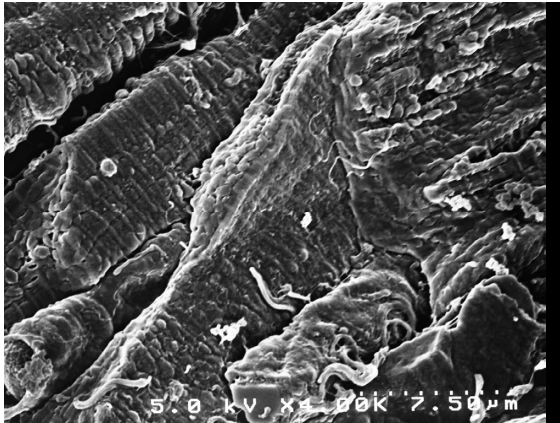


図2 モルモット心筋像 (SEM HITACHI S4000)
モルモット心筋走査型電子顕微鏡 (SEM) 像。凍結判断法により得られた心筋をSEMを用いて撮像した。走行する心筋細胞を認める。

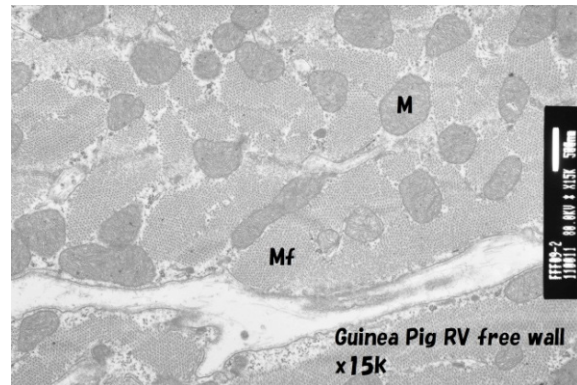


図3 モルモット心筋像 (TEM JOEL JEM-1200EX II)
モルモット心筋透過型電子顕微鏡 (TEM) 像。モルモット右室筋をグルタルアルデヒド、オスミウムを用いて固定し超薄切後TEMを用いて撮像した。心筋細胞の横断面を示している。M：ミトコンドリア，Mf：筋原線維

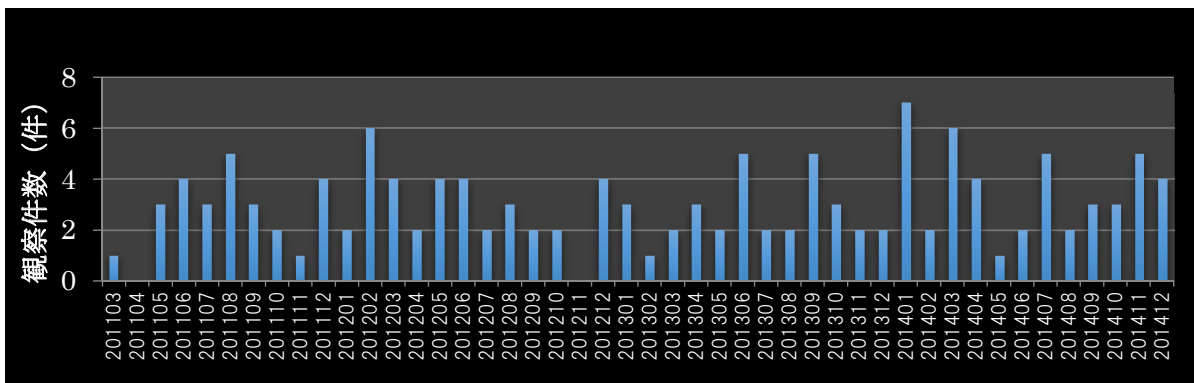


図4 日本大学医学部における心筋生検電子顕微鏡標本観察件数
日本大学医学部付属板橋病院で行われた経皮的な心筋生検の内、電子顕微鏡標本を作製した件数。

表1 心筋生検関連発表

院内検討会	心臓移植検討委員会 (第1回～第6回) 心筋生検臨床病理カンファレンス (第1回～第17回)
学会発表	心筋生検研究会 (第34回, 第35回, 第36回, 第37回) 第46回日本臨床分子形態学会 第29回医学生物学電子顕微鏡技術学会 AECVP conference 2014 日本大学例会 (第510回) 他 症例発表
研究会発表	東京心臓病理フォーラム (第9, 10, 11, 12回) 他

その際検討された新たな知見を国内外に発信している。(表1)

結語

電子顕微鏡を用いた動物およびヒト心筋細胞の観察システムを開発した。基礎・臨床研究、心不全患者の鑑別診断、心臓移植検討の資料として有用であった。

謝辞

未経験の状態から電子顕微鏡技術につき懇切丁寧にご指導いただきました宮澤七郎先生、島田達生先生、根本典子先生、植田初江先生、廣江道昭先生に感謝致します。また、心筋生検を施行していただいた内科学系循環器内科の諸先生方、循環器・小児科の病棟医の先生方、病理部の関係者の方々、また、カンファレンスに御参加いただき貴重な御意見を賜りました先生方に感謝の意を表します。

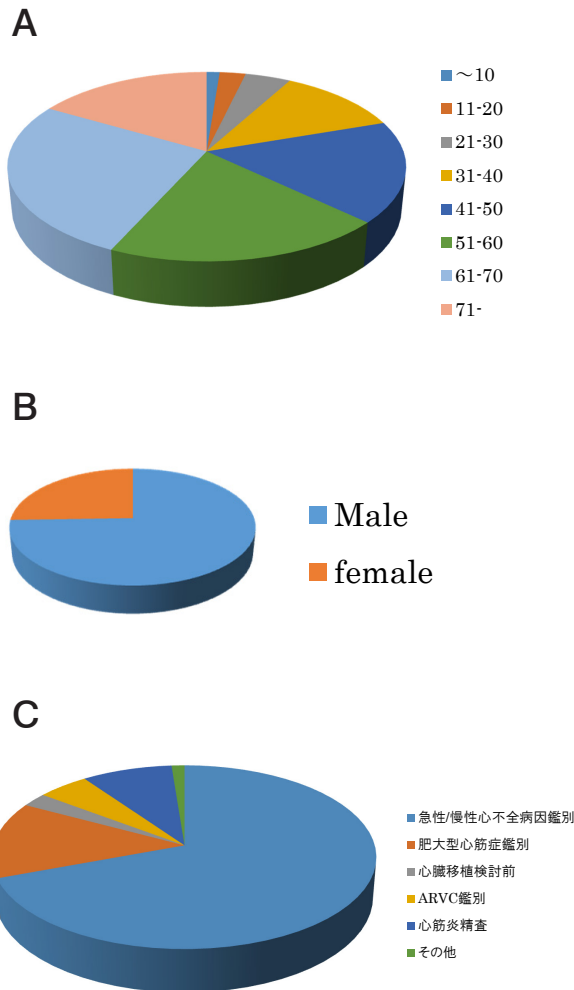


図5 日本大学医学部附属板橋病院における心筋生検電子顕微鏡標本作製患者年齢・性別構成 (2011/3-2015/5)

日本大学医学部附属板橋病院で行われた心筋生検うち、電子顕微鏡標本作製した症例。A) 患者年齢構成, B) 男女比, C) 依頼目的

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26年度 年間処理枚数/依頼件数

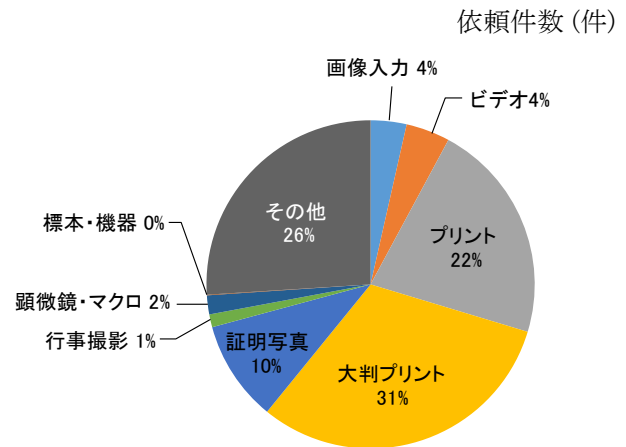
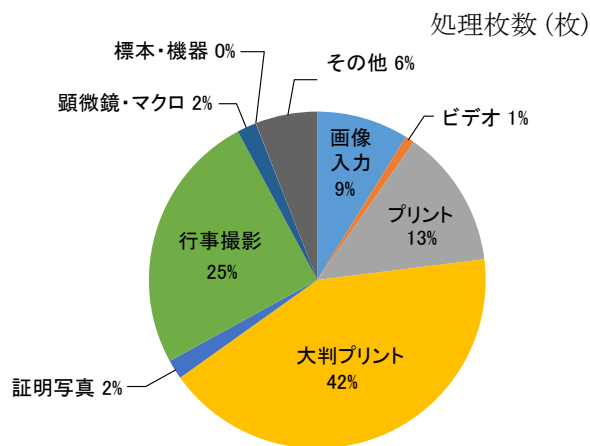
	画像入力	ビデオ	プリント	大判プリント	証明写真	行事撮影	顕微鏡・マクロ	標本・機器	その他	年間合計
処理枚数(枚)	1507	155	2273	7197	318	4302	317	3	1016	17088
依頼件数(枚)	53	65	327	468	149	19	28	1	390	1500

※1「ビデオ」は処理時間30分を1枚として換算

155枚 = 77.5時間

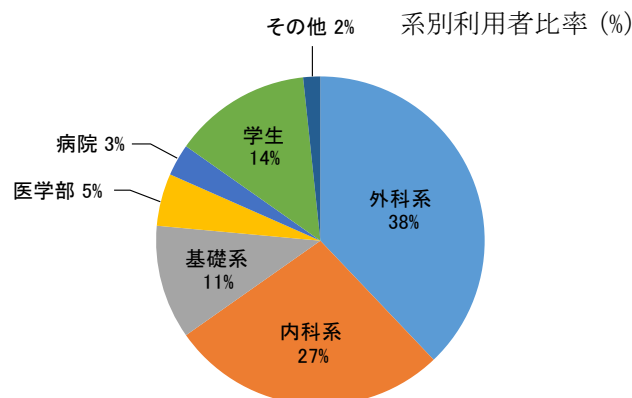
※2「大判プリント」は料金単位10cmを1枚として換算

7197枚 = 719.7m



平成26年度 年間利用者数(人)

外科系	内科系	基礎系	医学部	病院	学生	その他	合計
338	244	100	46	28	121	15	892



【電子顕微鏡室】

論文

形成外科学分野

Soejima K, Kashimura T, Asami T, Kazama T, Matsumoto T, Nakazawa H: Effects of mature adipocyte-derived dedifferentiated fat (DFAT) cells on generation and vascularisation of dermis-like tissue after artificial dermis grafting. J Plast Surg Hand Surg 49(1):25-31,2014.

学会発表

形成外科学分野

Soejima K : Panel Discussion Basic Research and Stem cell : Effects of mature adipocyte-derived dedifferentiated fat (DFAT) cells on skin reconstruction. The 12th Korea-Japan Congress of Plastic and Reconstructive Surgery, 2014.

副島一孝, 櫻村勉, 山本改, 風間智彦, 松本太郎, 今田正人, 仲沢弘明: シンポジウム「幹細胞の研究」脱分化脂肪 (DFAT) 細胞の自家培養表皮移植時の生着促進効果に関する実験的検討 第23回日本形成外科学会基礎学術集会 2014.

副島一孝, 櫻村勉, 山本改, 浅見崇, 風間智彦, 松本太郎, 今田正人, 仲沢弘明: パネルディスカッション熱傷基礎研究の最前線 創傷治療に対する脱分化脂肪 (DFAT) 細胞の効果 第40回日本熱傷学会総会・学術集会 2014.

副島一孝, 櫻村勉, 浅見崇, 風間智彦, 松本太郎, 仲沢弘明: 脱分化脂肪細胞 (DFAT cell) による皮膚再建時の血管新生促進療法 第13回日本再生医療学会総会 2014.

副島一孝: 脱分化脂肪 (DFAT) 細胞による皮膚・創傷の血管新生促進療法 第18回循環器再生医療研究会 2014.

特許出願

形成外科学分野

副島一孝: 自家培養表皮生着向上効果を有する脱分化脂肪細胞を含有した真皮再建テンプレート. 特願

2014-226599 (NUBIC 案件番号: 11877).

医用電子系

【医用電子室】

論文

神経外科学分野

小松一俊, 辻井岳雄, 酒谷薫: 中高年女性の抑うつに対する運動のリラクセーション効果. 自律神経 (0288-9250) 50巻3号 Page219-223 (2013. 9).

応用システム神経科学分野

山本隆充, セデキジャン・ウフル, 深谷親, 渡辺 充, 角光一郎, 四條克典, 大淵敏樹, 加納利和, 小林一太, 大島秀規, 吉野篤緒, 関口真一: 脳脊髄刺激療法を用いた運動麻痺の治療. 日本大学医学部総合医学研究所紀要2巻 Page81-86 (2014. 12).

山本隆充, セデキジャン・ウフル, 深谷親, 渡辺 充, 角光一郎, 四條克典, 大淵敏樹, 加納利和, 小林一太, 大島秀規, 吉野篤緒, 関口真一: 脳脊髄刺激療法を用いた運動麻痺の治療. 日本大学医学部総合医学研究所紀要2巻 Page81-86 (2014. 12).

総合医学研究所 医学研究支援部門

山本隆充, 深谷親, セデキジャン・ウフル, 松村祐平, 関口真一, 石井敬基: 脳卒中後疼痛に対する大脳皮質運動野の経頭蓋磁気刺激の効果 ドラッグチャレンジテストとの比較から. 日本大学医学部総合医学研究所紀要2巻 Page98-103 (2014. 12).

山本隆充, セデキジャン・ウフル, 松村祐平, 原元彦, 関口真一, 石井敬基: 高頻度経頭蓋磁気刺激による運動野刺激の効果 F波の変化についての検討. 日本大学医学部総合医学研究所紀要1巻 Page129-132 (2013. 12).

総説, 解説

応用システム神経科学分野

山本隆充, 吉野篤緒: 「痛みのマネジメント update 基礎知識から緩和ケアまで」痛みの治療法 経頭蓋磁気刺激療法 (解説/特集), 日本医師会雑誌 (0021-4493) 143巻特別1 PageS204-S205 (2014. 06).

山本隆充, 深谷親, 吉野篤緒:「最近話題の疼痛に関する診断機器と治療機器2014」電気刺激療法(SCS)機器(解説/特集), Source:麻酔(0021-4892)63巻7号Page775-782(2014.07)

深谷親, 山本隆充:「DBSとrTMSの最近の進歩」DBSの非運動症状への影響(解説/特集), 神経内科(0386-9709)80巻5号Page541-546(2014.05)

付属板橋病院 小児・新生児病科

藤田之彦, 遠藤あゆみ, 神山八弓:「子どもの不定愁訴 35倍よくわかる!小児心身医学会ガイドライン」起立性調節障害の病態 脳血流の変化(Q&A/特集), 小児科学レクチャー(2186-0254)4巻1号Page82-87(2014.02)

高橋桃子, 佐藤菜穂, 笹川彩, 佐久間祐衣, 小平隆太郎, 淵上達夫, 藤田之彦, 高橋昌里. 発達障害児の表情認知に関する検討(会議録):子どもの心とからだ(0918-5526)23巻3号Page351(2014.11)

生物化学系

【化学分析室】

【感染症ゲノム研究室】

総説, 解説

血液膠原病内科学分野

武井正美:関節リウマチの原因としてのEpstein-Barrウイルス, 日大医学雑誌, 2014;73(1):45-49.

呼吸器内科学分野

神津悠, 権寧博, 橋本修:気道のレジデント細胞による炎症調節Up-To-Date, 喘息, 27(1):36-40, 2014.

権寧博, 伊藤玲子, 橋本修:IgE血清濃度とオマリズマブ血清濃度の関係. 臨床免疫・アレルギー科, 62(3):281-285, 2014.

水村賢司, 橋本修:呼吸器疾患とオートファジー, 呼吸と循環, 62(1):55-60, 2014.

丸岡秀一郎:衛生仮説再考(総説), 呼吸と循環, 62

(2):165-170, 2014.

丸岡秀一郎, 権寧博, 橋本修:環境因子と気管支喘息, 呼吸と循環, 62(10):933-939, 2014.

伊藤玲子, 権寧博, 橋本修:フリーIgE測定の意義, 呼吸と循環, 62(12):1150-1154, 2014.

整形外科学分野

加藤有紀, 押田翠:高齢者屍体膝より観察した半月板の自然経過と変形性膝関節症との関係. Bone Joint Nerve 4(1):17-22, 2014. 1.

関雅之, 斎藤修, 石井隆雄, 穂坂邦大, 鈴木元, 菊田晋祐, 及川昇, 藤巻裕久, 徳橋泰明:高度臼蓋形成不全股に対する人工股関節全置換術—骨盤内板穿破手技. 別冊整形外科65:113-116, 2014. 4.

斎藤修, 徳橋泰明:リウマチ治療の進歩と手術療法の変化. 日大医学雑誌 73(3):140-144, 2014. 6.

臨床検査医学分野

中山智祥:ハプロタイプを用いた関連解析の効用.(総説)日本臨床検査自動化学会会誌39(2):157-165, 2014. 4.

中山智祥:遺伝子医療の現状とゲノム医療の近未来, 遺伝子医療・ゲノム医療を支える社会基盤, 人材養成4:ジェネティックエキスパート. 週刊医学のあゆみ 第1土曜特集号, 医歯薬出版, 250(5):453-455, 2014. 8. 2.

中山智祥:認定制度ジェネティックエキスパートの立ち上げ 臨床病理レビュー特集第153号コンパニオン診断の進展2014-2015—個別化医療を進めるために—95-98, 2014. 臨床病理刊行会.

中山智祥:ジェネティックエキスパート認定制度—遺伝子診療への貢献を目指して—43(3), 2014 Medical Technology 医歯薬出版株式会社.

論文

呼吸器内科学分野

Ito R, Gon Y, Nunomura S, Atsuta R, Harada N, Hattori T, Maruoka S, Okayama Y, Ra C, Hashimoto S : Development of assay for determining free IgE levels in serum from patients treated with omalizumab, *Allergol Int*, 2014, 63 Suppl(1) : 37-47.

細胞再生・移植医学分野

Mikami Y, Matsumoto T, Kano K, Toriumi T, Somei M, Honda MJ, Komiyama K. Current status of drug therapies for osteoporosis and the search for stem cells adapted for bone regenerative medicine. *Anatomical Science International* 89(1) : 1-10, 2014.

Kono S, Kazama T, Kano K, Harada K, Uechi M, Matsumoto T: Phenotypic and functional properties of feline dedifferentiated fat cells and adipose-derived stem cells. *The Veterinary Journal* 199(1) : 88-96, 2014.

小児・乳腺内分泌外科学分野

Uekusa S, Kawashima H, Sugito K, Yoshizawa S, Shinjima Y, Igarashi J, Ghosh S, Wang X, Fujiwara K, Ikeda T, Koshinaga T, Soma M, Nagase H: Nr4a3, a possible oncogenic factor for neuroblastoma associated with CpG methylation within the third exon. *Int J Oncol*. 2014 May;44(5) : 1669-77. doi: 10.3892/ijo.2014.2340. Epub 2014 Mar 13.

臨床検査医学分野

Tanaka K, Nakayama T, Mori R, Sato N, Kawamura A, Yuzawa M: Associations of complement factor B and complement component 2 genotypes with subtypes of polypoidal choroidal vasculopathy. *BMC Ophthalmology* 14 : 83, 2014.6 doi: 10.1186/1471-2415-14-83.

Takeuchi Y, Mishima E, Shima H, Akiyama Y, Suzuki C, Suzuki T, Kobayashi T, Suzuki Y, Nakayama T, Takeshima Y, Vazquez N, Ito S, Gamba G, Abe T. Exonic Mutations in the SLC12A3 Gene Cause Exon Skipping and Premature Termination in Gitelman

Syndrome. *Journal of the American Society of Nephrology* 2014 Jul 24. pii: ASN.2013091013. [Epub ahead of print]

Fuwa K, Hosono S, Nagano N, Munakata S, Fukamachi R, Okada T, Talahashi S, Takahashi S, Sato N, Nakayama T: A novel SLC26A3 gene mutation in a Japanese boy with congenital chloride diarrhea. *Pediatrics international* 2015 in press.

法医学分野

Isobe E, Taniguchi Y, Uchigasaki S: Effects of intestinal motility on ethanol absorption in small intestine. *Alcohol and Alcoholism*, 2014; 49S1: p159.

学会発表

血液膠原病内科学分野

佐藤洋隆, 安部昌子, 大貫哲男, 吉田稔, 黒田和道, 武井正美, 長澤洋介, 山本樹生, 間洋子: HIV-アクセサリー白質Vprを標的とした新規抗HIV治療薬スクリーニング系の構築, 第62回日本ウイルス学会学術集会, 横浜, 2014. 11.

Uchino Y, Iriyama N, Hatta Y, Takei M. : G-CSF potentiates ATRA-induced granulocytic differentiation through the JAK-STAT pathway in HT93A, 第76回日本血液学会総会, 大阪, 2014.11.

Y Nagasawa, N Ikumi, T Nozaki, H Inomata, K Imadome, N Kitamura, M Iwata, S Fujiwara, M Takei. : Human Osteoclasts Are Mobilized in Erosive Arthritis of Epstein-Barr Virus-Infected Humanized NOD/Shi-Scid/IL-2R γ null Mice, American College of Rheumatology Annual Meeting. (ACR) , Boston, 2014.11.

呼吸器内科学分野

Gon Y, Maruoka S, Shintani Y, Koyama D, Sekiyama T, Hiranuma H, Shikano S, Hashimoto S : Release Of miRNAs Targeting Th2 Immune Genes Via Exosome In A Murine Asthma Model, The 110th American Thoracic Society International Conference, San Diego, USA, 2014.5.18.

Ito R, Gon Y, Kogawa N, Sekiyama T, Hiranuma H, Maruoka S, Hattori T, Hashimoto S : Does Omalizumab Reduce Serum Free IgE Below The Goal Level In Asthmatic Patients?, The 110th American Thoracic Society International Conference, San Diego, USA, 2014.5.18.

Mizumura K, Cloonan SM, Nakahira K, Bhashyam AR, Cervo M, Owen CA, Mahmood A, Washko GR, Hashimoto S, Ryter SW, Choi AM : Mitophagy-Regulated Necroptosis Contributes To The Pathogenesis Of Chronic Obstructive Pulmonary Disease, The 110th American Thoracic Society International Conference, San Diego, USA, 2014.5.19.

Maruoka S , Gon Y, Shikano S , Shintani Y, Koyama D, Sekiyama T, Hiranuma H , Inoue T, Takeshita I, Tsuboi E , Soda K , Hashimoto S : Exosomal MicroRNAs In The Serum Are Potential Real-Time Biomarkers For Allergic Inflammation In The Airway Of Mice, The 110th American Thoracic Society International Conference, San Diego, USA , 2014.5.20.

Koyama D , Maruoka S, Gon Y, Shintani Y, Sekiyama T, Hiranuma H, Shikano S, Takeshita I, Tsuboi E, Soda K, Hashimoto S : Myeloid Differentiation-2 Is A Potential Biomarker For The Amplification Process Of Allergic Sensitization In House Dust Mite-Sensitized Mice, The 110th American Thoracic Society International Conference, San Diego, USA, 2014.5.20.

Shintani Y : Nuclear Factor, Erythroid Derived 2, Like 2 (Nrf2) Regulates Airway Epithelial Barrier Function, The 110th American Thoracic Society International Conference, San Diego, USA, 2014.5.21.

Maruoka S, Gon Y, Shikano S, Shintani Y, Koyama D, Sekiyama A, Hiranuma H, Inoue T, Takeshita I, Tsuboi E, Soda K, Hashimoto S : Exosomal MicroRNAs In The Serum Are Potential Real-Time Biomarkers For Allergic Inflammation In The Airway Of Mice, European Respiratory Society Annual Congress, Munich, Germany, 2014.9.7.

Shintani Y, Maruoka S, Gon Y, Koyama D, Yoshida A, Koza Y, Takeshita I, Eriko T, Soda K, Hashimoto S : Nuclear factor, erythroid derived 2, like 2 (Nrf2) regulates airway epithelial barrier function. 第54回日本呼吸器学会学術講演会, 大阪, 2014.4.25.

Koyama D, Maruoka S, Gon Y, Shintani Y, Sekiyama T, Hiranuma H, Takeshita I, Eriko T, Soda K, Hashimoto S : Myeloid differentiation-2 is a potential biomarker for the amplification process of allergic airway sensitization in mice. 第54回日本呼吸器学会学術講演会, 大阪, 2014.4.27.

Maruoka S, Gon Y, Sekiyama T, Koyama D, Shintani Y, Inoue T, Takeshita I, Eriko T, Soda K, Hashimoto S : Exosomal MicroRNAs in the Serum Are Potential as A Real-Time Biomarker for Allergic Inflammation in the Airway of Mice. 第54回日本呼吸器学会学術講演会, 大阪, 2014.4.27.

丸岡秀一郎, 権寧博, 鹿野壮太郎, 井上寿男, 関山忠孝, 平沼久人, 新谷榮崇, 小山大輔, 竹下郁子, 坪井絵莉子, 曾田香織, 橋本修 : 血清中エクソソームmiRNAはダニアレルゲンによる気道炎症のバイオマーカーとなりうるか? 第26回日本アレルギー学会春季臨床大会, 京都, 2014. 5. 9.

熱田了, 伊藤玲子, 権寧博, 原田園子, 石森絢子, 桂蓉子, 糸魚川幸成, 牧野文彦, 伊藤潤, 原田紀宏, 橋本修, 高橋和久 : 長期Omalizumab投与時の喘息患者におけるFree IgE. 第26回日本アレルギー学会春季臨床大会, 京都, 2014. 5. 9.

伊藤玲子, 権寧博, 丸岡秀一郎, 服部知洋, 葉山惟大, 照井正, 橋本修 : 重症持続型喘息に対してオマリズマブ治療を行い, 慢性蕁麻疹症状にも効果を認めた一例. 第26回日本アレルギー学会春季臨床大会, 京都, 2014. 5. 9.

権寧博 : 間質性肺炎のバイオマーカーとしての新規自己抗体の同定. 第13回国際バイオテクノロジー展/技術会議, 東京, 2014. 5. 15.

深野義人, 宮澤由妃, 見越大樹, 井上寿男, 丸岡秀一郎, 黒田和道, 権寧博, 橋本修, 山岸賢司: 次世代シーケンサーを用いたRNA-seq解析手法の確立と呼吸器疾患症早期診断システムへの展開. 第3回生命医薬情報学連合大会, 仙台, 2014. 10.

深野義人, 宮澤由妃, 見越大樹, 井上寿男, 丸岡秀一郎, 黒田和道, 権寧博, 橋本修, 山岸賢司: 次世代シーケンサーを用いたRNA-seq解析手法の確立と呼吸器疾患症早期診断システムへの展開II. 日本コンピュータ化学会2014秋季年会, 郡山, 2014. 10.

宮澤由妃, 深野義人, 見越大樹, 井上寿男, 丸岡秀一郎, 黒田和道, 権寧博, 橋本修, 山岸賢司: NGSデータ解析環境の導入と新規遺伝子候補の探索. 日本コンピュータ化学会2014秋季年会, 郡山, 2014. 10.

新谷榮崇, 丸岡秀一郎, 権寧博, 小山大輔, 関山晶子, 神津悠, 竹下郁子, 坪井絵莉子, 曾田香織, 橋本修: 気道上皮バリア形成におけるNrf2の役割. アレルギー, 好酸球研究会2014, 東京, 2014. 10. 4.

小山大輔, 丸岡秀一郎, 権寧博, 平沼久人, 関山忠孝, 新谷榮崇, 鹿野壮太郎, 竹下郁子, 坪井絵莉子, 曾田香織, 橋本修: ダニアレルゲンによる気道感作増幅過程におけるMD-2の役割. アレルギー, 好酸球研究会2014, 東京, 2014. 10. 4.

生体構造医学分野

吉川雅朗, 平林瑞紀, 伊藤遼多, 尾崎繁, 増田知之, 松川睦, 今田正人, 先崎浩次, 相澤信, 志賀隆. マウス胎仔舌下神経ニューロンの部位特異的な軸索投射におけるRunx1の役割. 第119回日本解剖学会総会・学術集会2014. 3.

細胞再生・移植医学分野

下澤克宜, 大熊啓嗣, 河野正太, 西川英里, 石毛美夏, 谷ヶ崎博, 風間智彦, 麦島秀雄, 松本太郎: ヒト臍帯, 胎盤組織由来幹細胞の免疫原性および免疫制御能の解析 (ポスター発表) 第13回日本再生医療学会総会, 京都, 2014. 3. 4

丸山高史, 福田昇, 松本太郎, 渡辺めぐみ, 阿部雅

紀, 上野高浩, 遠藤守人, 岡田一義, 相馬正義, 河内裕: 免疫性腎炎, 非免疫性腎炎へのDFAT細胞移植の効果. (口頭発表) 第13回日本再生医療学会総会, 京都, 2014. 3. 5

澤田浩克, 風間智彦, 新井嘉則, 本田雅規, 加野浩一郎, 徳橋泰明, 松本太郎: マウス大腿骨骨折モデルに対するヒト脱分化脂肪細胞移植の効果. (口頭発表) 第13回日本再生医療学会総会, 京都, 2014. 3. 5

木下豪紀, 風間智彦, 新井嘉則, 長岡正宏, 徳橋泰明, 加野浩一郎, 松本太郎: ラット難治性骨折モデルにおける脱分化脂肪細胞と副甲状腺ホルモン投与による治療効果. (口頭発表) 第13回日本再生医療学会総会, 京都, 2014. 3. 5

中山潤志, 風間智彦, 加野浩一郎, 徳橋泰明, 松本太郎: ラット変性椎間板モデルに対する脱分化脂肪細胞移植の検討. (口頭発表) 第13回日本再生医療学会総会, 京都, 2014. 3. 6.

河野正太, 松本太郎, 風間智彦, 加野浩一郎, 原田佳代子, 上地正実: ネコにおける脱分化脂肪細胞(DFAT) および脂肪由来幹細胞(ASC) の調製と特性解析. (ポスター発表) 第13回日本再生医療学会総会, 京都, 2014. 3. 4.

風間智彦, 菊田晋祐, 田中伸明, 風間美奈子, 徳橋泰明, 加野浩一郎, 松本太郎: 骨欠損および骨粗鬆症に対する脱分化脂肪細胞(DFAT) 自家移植の効果. (ポスター発表) 第13回日本再生医療学会総会, 京都, 2014. 3. 5.

細川崇, 小沼憲祥, 橋本真, 大橋研介, 杉藤公信, 池田太郎, 越永従道, 加野浩一郎, 松本太郎: 新規ラット肛門括約筋障害モデルの作製と脱分化脂肪細胞(DFAT) を用いた細胞移植の検討. (ポスター発表) 第13回日本再生医療学会総会, 京都, 2014. 3. 5.

西川英里, 松本太郎, 谷ヶ崎博, 高橋昌里: ヒト胎児付属物由来幹細胞による臍帯造血細胞維持能の検討. (口頭発表) 第36回日本造血細胞移植学会総会, 沖縄, 2014. 3. 8.

Kikuta S, Tanaka N, Kazama T, Kazama M, Kano K, Ryu J, Tokuhashi Y, Matsumoto T: Osteogenic effects of dedifferentiated fat cell transplantation in rabbit models of bone defect and ovariectomy-induced osteoporosis. (Poster presentation) ORS 2014 Annual Meeting, New Orleans, USA, 2014. 3 15.

大熊啓嗣, 西川英里, 谷川俊太郎, 金澤剛二, 下澤克宜, 風間智彦, 松本太郎, 高橋昌里: 臍帯・胎盤羊膜由来MSCの造血細胞支持能の比較検討. (ポスター発表) 第35回日本炎症・再生医学会, 沖縄, 2014. 7. 1.

澤田浩克, 風間智彦, 新井嘉則, 本田雅規, 加野浩一郎, 徳橋泰明, 松本太郎: 免疫不全マウス大腿骨骨折モデルにおけるヒト脱分化脂肪細胞の骨再生効果検討. (ポスター発表) 第35回日本炎症・再生医学会, 沖縄, 2014. 7. 1.

風間智彦, 木下豪紀, 新井嘉則, 長岡正宏, 徳橋泰明, 加野浩一郎, 松本太郎: ラット難治性骨折モデルに対する脱分化脂肪細胞と副甲状腺ホルモン投与による骨折治癒効果の検討. (ポスター発表) 第35回日本炎症・再生医学会, 沖縄, 2014. 7. 1.

丸山高史, 福田昇, 渡辺めぐみ, 阿部雅紀, 上野高浩, 松本太郎, 遠藤守人, 岡田一義, 松本紘一, 相馬正義, 河内裕: 脱分化脂肪細胞 (DFAT) の全身投与はTSG-6を介して免疫性糸球体腎炎を改善した. (ポスター発表) 第37回日本高血圧学会総会, 横浜, 2014. 10. 17.

片川まゆみ, 福田昇, 常見明子, 渡辺めぐみ, 上野高浩, 森真理, 家森幸男, 松本太郎, 相馬正義: ヒトおよびSHRにおけるタウリン及びマグネシウム摂取による血管内皮前駆細胞 (EPC) 機能に対する効果. (ポスター発表) 第37回日本高血圧学会総会, 横浜, 2014. 10. 17.

木下豪紀, 風間智彦, 新井嘉則, 長岡正宏, 徳橋泰明, 加野浩一郎, 松本太郎: ラット難治性骨折モデルにおける脱分化脂肪細胞と副甲状腺ホルモン投与による治療効果. (口頭発表) 第29回日本整形外科

学会基礎学術集会, 鹿児島, 2014. 10. 9.

澤田浩克, 風間智彦, 新井嘉則, 本田雅規, 加野浩一郎, 徳橋泰明, 松本太郎: ヒト脱分化脂肪細胞移植による骨折治癒促進効果の検討. (口頭発表) 第29回日本整形外科学会基礎学術集会, 鹿児島, 2014. 10. 9.

中山潤志, 風間智彦, 加野浩一郎, 徳橋泰明, 松本太郎: ラット変性椎間板モデルに対する脱分化脂肪細胞移植および再生医療への展望. (口頭発表) 第29回日本整形外科学会基礎学術集会, 鹿児島, 2014. 10. 9.

松本太郎, 風間智彦, 萩倉一博, 渡邊拓史, 小宮山翔吾, 加野浩一郎, 福田昇: 脱分化脂肪細胞の血管新生作用と治療用細胞としての効果評価. (口頭発表) 第37回日本高血圧学会総会, 横浜, 2014. 10. 17.

小児・乳腺内分泌外科学分野

Yoshizawa S, Sugito K, Ishizuka Y, Hoshi R, Watanabe Y, Uekusa S, Kawashima H, Furuya T, Masuko T, Koshinaga T, Fujiwara K, Fujiwara K, Nagase H: Pyrrole-Imidazole polyamides targeting KCNQ1OT1 induce apoptosis in Wilms' tumor cell line. International Society of Paediatric Oncology, Toronto, 2014.10.

吉澤信輔, 杉藤公信, 星玲奈, 植草省太, 川島弘之, 大橋研介, 池田太郎, 越永従道, 藤原恭子, 相馬正義, 永瀬浩喜: 腎芽腫におけるKCNQ1OT1遺伝子を標的としたPYRROLE-IMIDAZOLE POLYAMIDE (PIP) の抗腫瘍効果の検討. 第114回日本外科学会総会, 京都, 2014. 10.

星玲奈, 杉藤公信, 渡邊揚介, 吉澤信輔, 植草省太, 川島弘之, 大橋研介, 池田太郎, 越永従道, 藤原恭子, 永瀬浩喜: ヒト神経芽腫の新規腫瘍関連遺伝子の探索. 第114回日本外科学会総会, 京都, 2014. 10.

橋本真: 脱分化脂肪細胞 (dedifferentiated fat cell: DFAT) から誘導したiPS細胞 (induced pluripotent stem cell) の誘導効率の検討. 第114回日本外科学

会総会, 京都, 2014. 10.

花田学: 肛門周囲膿瘍に対する排膿散及湯を用いた多施設共同前向き観察研究. 第114回日本外科学会総会, 京都, 2014. 10.

細川崇, 小沼憲洋, 橋本真, 大橋研介, 杉藤公信, 池田太郎, 越永従道, 松本太郎, 加野浩一郎: 新規ラット肛門括約筋障害モデルの作製と肛門括約筋障害に対する脱分化脂肪細胞 (DFAT) 移植の検討. 第13回日本再生医療学会総会, 京都, 2014. 3.

星玲奈, 杉藤公信, 渡邊揚介, 吉澤信輔, 植草省太, 川島弘之, 大橋研介, 池田太郎, 越永従道: DNAメチル化解析によるヒト神経芽腫の新規腫瘍関連遺伝子の探索. 第51回日本小児外科学会総会, 大阪, 2014. 5.

星玲奈: マウス皮膚腫瘍特異的DNAメチル化領域を用いた新規ヒト神経芽腫関連遺伝子の探索. 第56回日本小児血液・がん学会学術集会, 2014. 11.

整形外科学分野

齋藤修, 石井隆雄, 関雅之, 鈴木元, 菊田晋祐, 山田賢鎬, 徳橋泰明, 田中伸明, 石神等: 両側TKAにおけるトラネキサム酸関節内投与の有用性 (左右差の検討). 第43回日本リウマチの外科研究会, 大阪, 2014. 8.

石井隆雄, 齋藤修, 角野隆信, 鈴木元, 清水学, 山田賢鎬, 木下豪紀, 小島啓, 長谷川太志, 徳橋泰明: 当科におけるTEAの機種選択と術後成績. 第42回日本関節病学会, 東京, 2014. 11.

関雅之, 齋藤修, 石井隆雄, 穂坂邦大, 鈴木元, 及川昇, 藤巻裕久, 徳橋泰明: 骨盤内板穿破設置をした白蓋Componentの中期成績. 第44回日本人工関節学会, 沖縄, 2014. 2.

加藤有紀, 押田翠, 龍啓之助, 洞口敬, 斉藤明義, 相澤信, 徳橋泰明: 外側円板状半月膝の解剖学的観察—半月損傷と関節症性変化の検討—. 第87回日本整形外科学会, 神戸, 2014. 5.

石井隆雄, 齋藤修, 関雅之, 鈴木元, 菊田晋祐, 山田賢鎬, 木下豪紀, 長谷川太志, 徳橋泰明: 当科におけるTKA後深部感染に対する治療戦略—人工関節を温存するためには—. 第37回日本骨・関節感染症学会, 東京, 2014. 6.

加藤有紀, 永井悠, 布袋屋浩, 平良勝章, 森本祐介, 後藤文聖, 白田智彦, 洞口敬, 徳橋泰明: 前十字靭帯損傷膝における半月板損傷形態および処置, 再発例についての検討. 第6回日本関節鏡・膝・スポーツ整形外科学会, 広島, 2014. 7.

海老原貴之, 沼口俊平, 及川久之, 徳橋泰明: 骨脆弱性を伴う完全不安定型骨盤輪骨折に対しCBTを用いて脊椎骨盤固定術を施行した2例. 第23回日本脊椎インストゥールメンテーション学会, 浜松, 2014. 8.

関雅之, 齋藤修, 石井隆雄, 鈴木元, 菊田晋祐, 山田賢鎬, 木下豪紀, 長谷川太志, 徳橋泰明: Trabecular metal acetabular shellの固定性. 第63回東日本整形災害外科, 東京, 2014. 9.

Masayuki Seki, Shu Saito, Takao Ishii, Gen Suzuki, Shinske Kikuta, Noboru Oikawa, Hyunho Lee, Gouki Kinoshita, Takashi Hasegawa, Yasuaki Tokuhashi: Chronological Evaluation of Radiological Findings of a Trabecular Metal Modular Acetabular System. 24th International Society for Technology in Arthroplasty, Kyoto, 2014.9.

関雅之, 齋藤修, 石井隆雄, 鈴木元, 菊田晋祐, 山田賢鎬, 木下豪紀, 長谷川太志, 徳橋泰明: Trabecular metal acetabular shellの経時的X線学的所見の検討. 第41回日本股関節学会学術集会, 東京, 2014. 10-11.

及川昇, 平良勝成, 根本菜穂, 張英士, 長尾聡哉, 山口太平, 徳橋泰明: DDHに対する開排位持続牽引法の導入後の症例とその問題点. 第25回日本小児整形外科学会, 千葉, 2014. 11.

海老原貴之, 徳橋泰明, 上井浩, 大島正史, 間世田

優文, 及川久之: 骨粗鬆症性椎体骨折後偽関節に対するPTH製剤の治療成績—保存治療と手術治療の比較—. 第22回日本腰痛学会, 千葉, 2014. 11.

及川昇, 齋藤修, 石井隆雄, 関雅之, 穂坂邦大, 鈴木元, 藤巻裕久, 龍順之助, 徳橋泰明: 片側TKAにおける出血に対してトラネキサム酸の効果. 第44回日本人工関節学会, 沖縄, 2014. 2.

石井隆雄, 齋藤修, 関雅之, 穂坂邦大, 鈴木元, 及川昇, 藤巻裕久, 龍順之助, 徳橋泰明: RA膝に対するFNKの術後中期成績. 第87回日本整形外科学会, 神戸, 2014. 5.

関雅之, 齋藤修, 石井隆雄, 穂坂邦大, 鈴木元, 藤巻裕久, 徳橋泰明: 骨盤骨切り術後THAにおけるacetabularcup設置位置の検討. 第87回日本整形外科学会, 神戸, 2014. 5.

生体構造医学分野

下川敏文, 布村聡, 藤澤大輔, 羅智靖: 好中球分化におけるC/EBPaのC末端領域の解析. 第76回日本血液学会学術集会, 大阪, 2014. 10.

症例報告

整形外科学分野

菅順一郎, 大幸俊三, 鱒淵秀男, 吉田明生, 大滝宗典, 横井隆明: 大菱形骨と膝蓋骨に転移したまれな腎細胞癌の1例. 東日本整形災害外科学会雑誌 26(4): 459-464, 2014. 12

臨床検査医学分野

Kitano H, Koyama Y, Komiya M, Sato N, Nakayama T: Basal cell nevus syndrome: New mutation of the patched homologue 1 gene. Journal of Oral and Maxillofacial Surgery 2015 in press.

シンポジウム・ワークショップ

呼吸器内科学分野

権寧博, 丸岡秀一郎, 橋本修: エクソソームの呼吸器疾患への応用, 第54回日本呼吸器学会学術講演会, 大阪, 2014. 4. 25.

伊藤玲子, 権寧博, 古川典子, 平沼久人, 関山忠孝, 服部知洋, 丸岡秀一郎, 橋本修: Measurement of serum free IgE and free omalizumab in the patients treated with omalizumab, 第54回日本呼吸器学会学術講演会, 大阪2014. 4. 26.

丸岡秀一郎: 自然免疫から喘息難治化をみる, 第26回日本アレルギー学会春季臨床大会, 京都, 2014. 5. 9.

田尻智子, 松本久子, 権寧博, 伊藤玲子, 出原裕美, 金光禎寛, 長崎忠雄, 岩田敏之, 井上英樹, 小熊毅, 伊藤功朗, 新実彰男, 三嶋理晃: 重症喘息における血清free IgE値とomalizumab反応性との関連, 第26回日本アレルギー学会春季臨床大会, 京都, 2014. 5. 11.

丸岡秀一郎: 気管支喘息とエピジェネティクス, 第30回日本ストレス学会学術総会, 東京, 2014. 11. 8.

丸岡秀一郎, 権寧博, 黒田和道, 井上寿男, 曾田香織, 坪井絵莉子, 竹下郁子, 橋本修: マウス気管支喘息モデルを用いた血清中エクソソームmiRNAの網羅的解析., 平成25年度学長特別研究成果報告会「高齢化社会におけるインフルエンザ感染および重症化対策の総合的研究」公開シンポジウム, 東京, 2014. 3. 14.

井上寿男, 権寧博, 黒田和道, 丸岡秀一郎, 曾田香織, 坪井絵莉子, 竹下郁子, 橋本修: LPS誘導性肺炎モデルマウスにおける肺胞洗浄液中エクソソームの解析., 平成25年度学長特別研究成果報告会「高齢化社会におけるインフルエンザ感染および重症化対策の総合的研究」公開シンポジウム, 東京, 2014. 3. 14.

細胞再生・移植学分野

Matsumoto T: Dedifferentiated fat cells as a new cell source for therapeutic angiogenesis and regenerative medicine. (Invited lecture, English), 3rd Chiba-Uppsala Academia Joint Workshop, Chiba, 2014. 2. 21.

松本太郎: 脱分化脂肪細胞による再生医療. (シンポ

ジウム), 第35回日本肥満学会, 宮崎, 2014. 10. 25.

松本太郎: 脂肪酸摂取バランスによる心血管疾患予防戦略. (プレナリー). 第18回循環器再生医療研究会, 東京, 2014. 11. 8.

依頼講演

呼吸器内科学分野

Maruoka S: The extracellular vesicle in the animal model of asthma: Message in a bottle, Meet the Expert, 東京, 2014.10.20.

著書

血液膠原病内科学分野

Iriyama N, Yuan B, Yoshino Y, Hatta Y, Horikoshi A, Aizawa S, Takei M, Takeuchi J, Takagi N, Toyoda H: Enhancement of differentiation induction and up-regulation of CCAAT/enhancer-binding proteins and PU.1 in NB4 cells treated with combination of ATRA and valproic acid, International Journal of Oncology, 2014: 44(3):865-73.

Iriyama N, Hatta Y, Takei M: ETV6/ARG oncoprotein confers autonomous cell growth by enhancing c-Myc expression via signal transducer and activator of transcription 5 activation in the acute promyelocytic leukemia cell line HT93A, *Leukemia & Lymphoma* 2014: 4:1-8.

臨床検査医学分野

中山智祥: 遺伝子・DNA利用の製品研究開発における規制・倫理対応と解析, 操作技術のトラブル対策7章 各疾患における遺伝子治療, 遺伝子診断の現状と今後有望な開発ターゲットの考察, 第1節 遺伝カウンセリング, 遺伝学的検査現状と今後の課題. 遺伝子治療診断の最先端技術と新しい医薬品・診断薬の開発. 技術情報協会 pp. 291-299. 2014. 5. 30

中山智祥: 内分泌・代謝疾患. 新・検査値のみかた. 中外医学社 2014.

原著

整形外科学分野

加藤有紀, 布袋屋浩, 後藤文聖, 永井悠, 平良勝章, 森本祐介, 洞口敬, 斎藤明義, 徳橋泰明: 解剖学的二重束前十字靭帯再建術における経ポータル法にて作成した大腿骨孔長の検討. JOSKAS 39 (1): 164-165, 2014. 4.

柳澤正彦, 中島伸哉, 菅野剛, 矢作宏, 徳橋泰明: 鎖骨遠位端骨折転位例に対するロッキングプレート固定の治療経験. 関東整形災害外科学会雑誌 45 (2): 73-76, 2014. 4.

ラジオアイソトープ・環境保全系

【R I 実験室】

論文

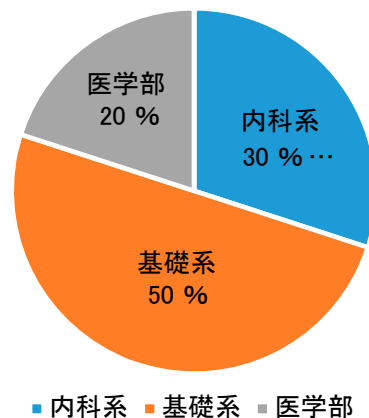
糖尿病代謝内科学分野

Yuichiro Otsuka, Suguru Yamaguchi, Asami Furukawa, Minami Kosuda, Mitsuhiro Nakazaki and Hisamitsu Ishihara: Addition of sitagliptin or metformin to insulin monotherapy improves blood glucose control via different effects on insulin and glucagon secretion in hyperglycemic Japanese patients with type2 diabetes. *Endocrine Journal.* 2015,62(2),133-143.

平成26年度 R I 実験室登録者数

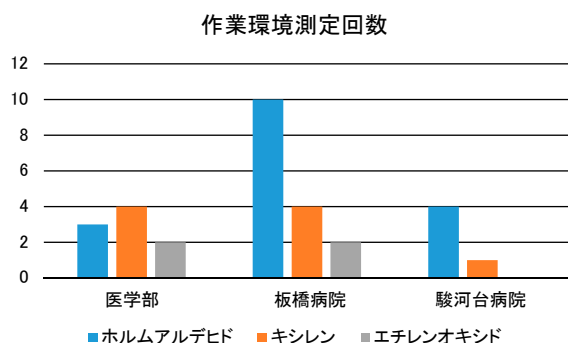
内科系	基礎系	医学部	合計
3	5	2	10

系別利用者比率



平成26年度 作業環境測定の実績
作業環境測定の種類・場所・測定回数

	医学部	板橋病院	駿河台病院	合計
ホルムアルデヒド	3	10	4	17
キシレン	4	4	1	9
エチレンオキシド	2	2	0	4
合計	9	16	5	30



ラボラトリーアニマル系

【動物飼育室】

【動物実験室】

論文

循環器内科学分野

Nakamura M, Nanto S, Hirayama A, Takayama T, Nishikawa M, Kimura K, Morita S, Aizawa T, Asano R, Matsumaru Y, Hamada C, Isshiki T. OPERA Steering Committee and Investigators. Optimal duration of dual antiplatelet therapy following treatment with the endeavor zotarolimus-eluting stent in real-world Japanese patients with coronary artery disease (OPERA): study design and rationale. *Catheter Cardiovasc Interv.* 2014 Sep 1;84(3):368-74. doi: 10.1002/ccd.25282.

Fujii K, Hao H, Imanaka T, Kawano T, Takayama T, Hirayama A, Yamada T, Ishibashi-Ueda H, Hirota S, Masuyama T. In-stent thin-cap fibroatheroma after drug-eluting stent implantation: ex-vivo evaluation of optical coherence tomography and intracoronary angiography. *JACC Cardiovasc Interv.* 2014 Apr;7(4):446-7. doi: 10.1016/j.jcin.2013.07.018. Epub

2014 Mar 19.

Takayama T, Hiro T, Ueda Y, Saito S, Kodama K, Komatsu S, Hirayama A. Remodeling pattern is related to the degree of coronary plaque regression induced by pitavastatin: a sub-analysis of the TOGETHAR trial with intravascular ultrasound and coronary angiography. *Heart Vessels.* 2015 Mar;30(2):169-76. doi:10.1007/s00380-014-0468-9. Epub 2014 Jan 25. Erratum in: *Heart Vessels.* 2015 Mar;30(2):177. PubMed PMID: 24463843.

Hiro T, Hirayama A, Ueda Y, Komatsu S, Matsuoka H, Takayama T, Ishihara M, Hayashi T, Saito S, Kodama K: ZIPANGU investigators. Rationale and design of a randomized clinical study to investigate the effect of ezetimibe, a cholesterol absorption inhibitor, on the regression of intracoronary plaque evaluated by non-obstructive angiography and ultrasound: The ZIPANGU study. *J Cardiol.* 2014 Dec;64(6):501-7. doi: 10.1016/j.jjcc.2014.02.026. Epub 2014 Apr 13.

Higuchi Y, Hiro T, Takayama T, Kanai T, Kawano T, Fukamachi D, Sudo M, Nishida T, Iida K, Saito S, Hirayama A. Impact of coronary plaque burden and composition on periprocedural myocardial infarction and coronary flow reserve after percutaneous coronary intervention. *Int Heart J.* 2014;55(5):391-6.

Sudo M, Hiro T, Takayama T, Iida K, Nishida T, Kawano T, Kanai T, Higuchi Y, Hirayama A. Multimodality visualization with 3-dimensional reconstruction of neointimal plaque rupture after bare-metal stent implantation. *JACC Cardiovasc Interv.* 2014 Oct;7(10):e163-5. doi: 10.1016/j.jcin.2014.04.023. Epub 2014 Sep 17.

Hao H, Fujii K, Imanaka T, Kawakami R, Kawano T, Takayama T, Hirayama A, Ishibashi-Ueda H, Masuyama T, Hirota S. Neointimal hemorrhage after drug-eluting stent implantation: possible role for development of neoatherosclerosis. *JACC Cardiovasc Interv.* 2014 Oct;7(10):1196-7. doi: 10.1016/j.

jcjn.2014.02.022. Epub 2014 Sep 17.

Hiro T, Takayama T, Haruta H, Mitsumori M, Tanaka K, Kawanabe J, Noji S, Hirayama A. 3D image reconstruction of histopathological structure of atherosclerotic plaque using a novel technique with film tomography. *JACC Cardiovasc Imaging*. 2014 Dec;7(12):1283-5. doi: 10.1016/j.jcmg.2014.04.028.

Cardiovasc Imaging. 2014 Dec;7(12):1283-5. doi: 10.1016/j.jcmg.2014.04.028.

奥村恭男, 渡邊 一郎, 永嶋 孝一, 真野博明, 園田和正, 古川力丈, 佐々木直子, 高橋啓子, 磯一貴, 大久保公恵, 中井俊子, 平山篤志: 高脂肪食がブタ心房筋の電氣的, 構造的リモデリングに及ぼす影響. 日本大学医学部総合医学研究所紀要 2巻 (2014. 12).

皮膚科学分野

布村聡, 岡山吉道, 羅智靖, 照井正: 自己炎症性症候群マウスモデルにおけるマスト細胞活性化機構の解明: 日本大学医学部総合医学研究所紀要 2巻 p48-49, 2014.

形成外科学分野

Soejima K, Kashimura T, Asami T, Kazama T, Matsumoto T, Nakazawa H: Effects of mature adipocyte-derived dedifferentiated fat (DFAT) cells on generation and vascularisation of dermis-like tissue after artificial dermis grafting. *J Plast Surg Hand Surg* 49(1):25-31, 2014.

神経外科学分野

Masahiro Tado, Tatsuro Mori, MD, PhD, Masamichi Fukushima, Hideki Oshima, Takeshi Maeda, Atsuo Yoshino, Shin Aizawa, and Yoichi Katayama Increased Expression of Vascular Endothelial Growth Factor Attenuates Contusion Necrosis without Influencing Contusion Edema after Traumatic Brain Injury in Rats *JOURNAL OF NEUROTRAUMA* 31:1-8, 2014.

眼科学分野

吉田圭, 庄司純, 石森秋子, 中島基宏, 稲田紀子, 澤充: 結膜上皮細胞における dectin-1 および BAFF 発現の検討. *日本眼科学會雑誌* 118 (4): 368-

377, 2014.

吉田圭, 稲田紀子, 石森秋子, 庄司純: カードラン点眼で誘導されるマウス結膜の病態生理学的変化の検討. *あたらしい眼科* 31 (11): 1667-1673, 2014.

生体構造医学分野

Taki M, Tsuboi I, Harada T, Naito M, Hara H, Inoue T, Aizawa S. Lipopolysaccharide reciprocally alters the stromal cells-regulated positive and negative balance between myelopoiesis and B-lymphopoiesis in C57BL/6 mice. *Biological & Pharmaceutical Bulletin* 37:1872-1881, 2014.

Harada T, Tsuboi I, Hirabayashi Y, Okamura T, Kosaku K, Naito M, Hara H, Inoue T, Aizawa S. Decrease ineffective erythropoiesis preserves polycythemia in mice long-term hypoxia. *Clinical and Experimental Medicine* 15:179-188, 2015.

生化学分野

Uno S, Sakurai K, Nebert DW, Makishima M. Protective role of cytochrome P450 1A1 (CYP1A1) against benzo[a]pyrene-induced toxicity in mouse aorta. *Toxicology*. 316: 34-42, 2014.

梅田(遠藤)香織, 中島弘幸, 関修司, 榎島誠: 肝免疫系細胞における脂質代謝及び自然免疫調節機構に対する核内受容体 LXR の影響. 日本大学医学部総合医学研究所紀要, 2: 61-62, 2014.

法医学分野

Tie J, Uchigasaki S, Haseba T, Cui F, Ohno Y, Isobe E, Isahai I. Distribution of phytoplankton DNA in drowned rabbit tissues. 9th International Symposium on Advances in Legal Medicine (ISALM). *The Japanese Journal of Legal Medicine*. 2014; 68: p115.

Isobe E, Taniguchi Y, Uchigasaki S. Effects of intestinal motility on ethanol absorption in small intestine. 16th International Society of Addiction Medicine Annual Meeting (ISAM). *Alcohol and Alcoholism*.

2014; 49S1: p159.

日本大学大学院総合科学研究科

Ikeda K, Fukuda N, Ueno T, Endo M, Kobayashi N, Soma M, Matsumoto K. Role of complement 3a in the growth of mesangial cells from stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Clinical and Experimental Hypertension*. 2014;36(1):58-63.

Tsunemi A, Ueno T, Fukuda N, Watanabe T, Tahira K, Haketa A, Hatanaka Y, Tanaka S, Matsumoto T, Matsumoto Y, Nagase H, Soma M. A novel gene regulator, pyrrole-imidazole polyamide targeting ABCA1 gene increases cholesterol efflux from macrophages and plasma HDL concentration. *Journal of Molecular Medicine (Berl)*. 2014 May;92(5):509-21.

Kojima T, Wang X, Fujiwara K, Osaka S, Yoshida Y, Osaka E, Taniguchi M, Ueno T, Fukuda N, Soma M, Tokuhashi Y, Nagase H. Inhibition of Human Osteosarcoma Cell Migration and Invasion by a Gene Silencer, Pyrrole-Imidazole Polyamide, Targeted at the Human MMP9 NF- κ B Binding Site. *Biol Pharm Bull*. 2014; 37:1460-1465

Obinata D1, Ito A, Fujiwara K, Takayama K, Ashikari D, Murata Y, Yamaguchi K, Urano T, Fujimura T, Fukuda N, Soma M, Watanabe T, Nagase H, Inoue S, Takahashi S. Pyrrole-imidazole polyamide targeted to break fusion sites in TMPRSS2 and ERG gene fusion represses prostate tumor growth. *Cancer Sci*. 2014 Oct;105(10):1272-8.

Fukuda N, Kobayashi N, Nagase A, Suzuki R, Ueno T, Ishimitsu T. Olmesartan improves the formation of impaired EPCs and renal degeneration through activation of the ACE2/Ang-(1-7)/Mas receptor axis in SHR. *Journal of Hypertension Open Access*. 2014/03

Taniguchi M, Fujiwara K, Nakai Y, Ozaki T, Koshikawa N, Toshio K, Kataba M, Oguni A, Matsuda H, Yoshida Y, Tokuhashi Y, Fukuda N, Ueno T, Soma M,

Nagase H. Inhibition of malignant phenotypes of human osteosarcoma cells by a gene silencer, a pyrrole-imidazole polyamide, which targets an E-box motif. *FEBS Open Bio*. 2014 Mar 13;4:328-34

総合医学研究所 医学研究支援部門

谷口由樹, 藤田順一, 黒田和道, 石井敬基: 冠動脈起始異常を示すブタとの遭遇について. 日本大学医学部総合医学研究所紀要 2巻 (2014. 12).

学会発表

循環器内科学分野

Takayama T, Yoda S, Kunimoto S, Kanai T, Hirayama A Effects of the T/L-type calcium channel blocker benidipin on renal function and augmentation index in patients with chronic kidney disease 第78回日本循環器学会 2014年 3月21日 東京.

Takayama T, Hirayama A, Seino Clinical feasibility of high-sensitive troponin T in patients with acute coronary syndrome -a sub-analysis of iNET study- 第78回日本循環器学会 2014年 3月22日 東京.

Takayama T, Hiro T, Higuchi Y, Hirayama A Impact of Heart Team on the strategy for coronary revascularization in our hospital 第78回日本循環器学会 EBMに基づく冠動脈血行再建: PCIとCABGの協調 2014年 3月23日 東京.

Tadateru Takayama¹, Yoshisato Shibata², Takahito Sone², Kazuo Kimura², Shigeru Fukuzawa², Yasuharu Nakama², Haruo Hirayama², Toshiaki Yokoi³, Atsushi Hirayama¹ A prospective randomized trial to assess infarct size reduction of hydrophilic Na/H exchanger inhibitor in patients with STEMI - AMITY - 第23回 日本心血管インターベンション治療学会 AMIに残された課題 2014年7月24日 名古屋 国際会議場.

Nishida T, Hiro T, Takayama T and Hirayama A Significance of Micro-vessels Within Atherosclerotic Coronary Plaques: a Color-coded Intravascular Ultrasound AHA 2014 2014年11月16日 シカゴ

米国.

高山忠輝, 廣高史, 樋口義治, 平山篤志: 薬剤溶出性ステント時代における急性冠症候群における抗血小板療法について, 第28回日本冠疾患学会 抗血栓フォーラム 臨床 口演 2014年12月16日 東京ステーションカンファレンス 東京.

春田裕典, 廣高史, 須藤晃正, 深町大介, 西田俊彦, 李予昕, 平山篤志, 高山忠輝: 遺伝性高コレステロール血症ウサギWHHL-MIにおけるHMG-CoA還元酵素阻害薬ピタバスタチンによる動脈硬化性プラーク進展抑制のメカニズム, 第62回日本心臓病学会学術集会 (2014. 09).

腎臓高血圧内分泌内科学分野

丸山高史: 単クローン1-22-3抗体誘発腎炎, アドリアマイシン腎症へのDFAT細胞移植効果 第57回日本腎臓学会 2014 (7月6日).

丸山高史, 発表タイトル: 脱分化脂肪細胞 (DFAT) の全身投与はTSG-6を介して免疫性腎炎系球体腎炎を改善した 第37回日本高血圧学会総会, 2014 (10月17日).

丸山高史: 脱分化脂肪細胞 (DFAT) 移植のTSG-6を介した単クローン抗体 1-22-3 誘発腎炎の改善効果 第5回腎不全研究会, 2014 (12月13日).

心臓血管・呼吸器・総合外科学分野

飯田絢子, 折目由紀彦, 中田金一: IABPが冠動脈バイパスグラフト流量波形に及ぼす影響に関する実験的検討. 第19回日本冠動脈外科学会学術大会 (2014. 07).

皮膚科学分野

布村 聡: オキシステロールによるLXR依存性および非依存性のマスト細胞活性化抑制機構の解析: 2014年度 細胞センサーの分子機構・相互関連・ネットワーク研究会, 岡崎, 2014. 12. 5.

Nunomura S, Okayama Y, Terui T, Ra C: FcR γ promotes contact hypersensitivity to oxazolone without

affecting the contact sensitization process: 第43回日本免疫学会総会・学術集会, 京都, 2014.12.10.

布村聡, 梅田香織, 岡山吉道, 松本健治, 照井正, 槇島誠, 羅智靖: LXRを介したマスト細胞における炎症性サイトカイン産生の抑制: アレルギー好酸球研究会2014, 東京, 2014. 10. 4.

阿部幸一郎, 谷河麻耶, 布村聡, 羅智靖: 自己炎症性症候群モデルマウス, Ali18における標的免疫細胞の同定と発症分子機構の解析: 第61回日本実験動物学会, 札幌, 2014. 05. 16.

形成外科学分野

Soejima K: Panel Discussion Basic Research and Stem cell: Effects of mature adipocyte-derived differentiated fat (DFAT) cells on skin reconstruction.

The 12th Korea - Japan Congress of Plastic and Reconstructive Surgery, 2014.

副島一孝, 榎村勉, 山本改, 風間智彦, 松本太郎, 今田正人, 仲沢弘明: シンポジウム「幹細胞の研究」脱分化脂肪 (DFAT) 細胞の自家培養表皮移植時の生着促進効果に関する実験的検討 第23回日本形成外科学会基礎学術集会 2014.

副島一孝, 榎村勉, 山本改, 浅見崇, 風間智彦, 松本太郎, 今田正人, 仲沢弘明: パネルディスカッション熱傷基礎研究の最前線 創傷治療に対する脱分化脂肪 (DFAT) 細胞の効果 第40回日本熱傷学会総会・学術集会 2014.

副島一孝, 榎村勉, 浅見崇, 風間智彦, 松本太郎, 仲沢弘明: 脱分化脂肪細胞 (DFAT cell) による皮膚再建時の血管新生促進療法 第13回日本再生医療学会総会 2014.

副島一孝: 脱分化脂肪 (DFAT) 細胞による皮膚・創傷の血管新生促進療法 第18回循環器再生医療研究会 2014.

Tsutomu Kashimura, Kazutaka Soejima, Takashi Asami, Katsumi Shimoda, Tomohiko Kazama, Taro Mat-

sumoto, Hiroaki Nakazawa, THE EFFECT OF MATURE ADIPOCYTE-DERIVED DEDIFFERENTIATED FAT (DFAT) CELLS ON A DORSAL SKIN FLAP MODEL., AIPRAS2014, 2014.

樫村勉, 副島一孝, 下田勝巳, 仲沢弘明, 風間智彦, 松本太郎, 小沼憲祥, 石岡茂樹: 脱分化脂肪細胞 (DFAT) による凍結保存同種皮膚移植片に対する免疫抑制効果の検討, 第23回日本形成外科学会基礎学術集会, 2014.

神経外科学分野

福島匡道^{1,2)}, 田原潤一²⁾, 田戸雅宏²⁾, 茂呂修啓²⁾, 森達郎²⁾, 前田剛²⁾, 川又達朗²⁾, 吉野篤緒²⁾, 片山容一²⁾ 1) 春日市立病院 脳神経外科 2) 日本大学医学部 脳神経外科 ラット脳挫傷モデルにおけるシロスタゾールの効果 Cilostazol reduces contusion volume and protects blood-brain barrier integrity following cerebral contusion in rats 日本脳神経外科学会第73回学術総会, 2014, 10, 11.

Masamichi Fukushima¹, Jyunichi Tahara¹, Takeshi Maeda¹, Atsuo Yoshino¹, Yoichi Katayama¹ ¹Department of Neurological Surgery, Nihon University School of Medicine, Tokyo, Japan: Cilostazol reduces contusion volume and protects blood-brain barrier integrity following experimental cerebral contusion in rats 第16回 International Brain Edema Symposium (Brain Edema 2014), 2014年9月27-30.

熊川貴大, 茂呂修啓, 前田剛, 平山晃康, 吉野篤緒, 片山容一: Talk and deteriorate の検討: 日本脳神経外傷学会頭部外傷データベースプロジェクト2009の結果から 第20回日本脳神経外科救急学会2014.

熊川貴大, 前田剛, 田戸雅広, 四條克倫, 茂呂修啓, 福島匡道, 森達郎, 川又達朗, 吉野篤緒, 片山容一: 頭部外傷データベースプロジェクトの現在と過去のtalk and deteriorate症例の比較 日本脳神経外科学会第73回学術総会 東京2014. 10. 9-11.

熊川貴大, 田戸雅広, 四條克倫, 茂呂修啓, 福島匡道, 森達郎, 前田剛, 吉野篤緒, 片山容一 Talk

and deteriorate 192症例の検討: 日本脳神経外傷学会頭部外傷データベースプロジェクト2009からの報告 日本脳神経外科学会第73回学術総会 東京2014. 10. 9-11.

整形外科学分野

中山潤志, 風間智彦, 加野浩一郎, 徳橋泰明, 松本太郎: ラット変性椎間板モデルに対する脱分化脂肪細胞移植の検討. 第13回日本再生医療学会総会 (2014. 03).

木下 豪紀, 風間 智彦, 新井 嘉則, 長岡 正宏, 徳橋泰明, 加野 浩一郎, 松本 太郎: ラット難治性骨折モデルにおける脱分化脂肪細胞と副甲状腺ホルモン投与による治療効果. 第87回 日本整形外科学会総会 (2014. 08).

眼科学分野

庄司純, 石森秋子, 稲田紀子: アトピー性角結膜炎モデルマウスにおけるinducible CALTの検討. 第38回日本角膜学会総会, 2014.

庄司純, 中西陽子, 石森秋子, 稲田紀子, 根本正道: アトピー性角結膜炎の分子形態学的解説 - モデルマウスからヒトへ - (ワークショップ2 眼科診療における新しい形態学的アプローチ). 第46回日本臨床分子形態学会総会・学術集会, 2014.

生体構造医学分野

Harada T, Tsuboi I, Naito M, Kosaku K, Hara H, Aizawa S. Preserved polycythemia in mice under long-term hypoxia. The 120th Annual meeting of the Japanese association of anatomists and 92th annual meeting of the physiological society of Japan Kobe 2015.

細胞再生・移植医学分野

丸山高史, 福田昇, 松本太郎, 渡辺めぐみ, 阿部雅紀, 上野高浩, 遠藤守人, 岡田一義, 松本紘一, 相馬正義, 河内裕 免疫性腎炎, 非免疫性腎炎へのDFAT細胞移植の効果 第13回再生医療学会 2014.

丸山高史, 福田昇, 渡辺めぐみ, 阿部雅紀, 上野高

浩, 松本太郎, 遠藤守人, 岡田一義, 松本紘一, 相馬正義, 河内裕 脱分化脂肪細胞 (DFAT) の全身投与はTSG-6を介して免疫性糸球体腎炎を改善した 第37回日本高血圧学会総会 2014.

片川まゆみ, 福田昇, 常見明子, 渡辺めぐみ, 上野高浩, 森真理, 家森幸男, 松本太郎, 相馬正義 ヒトおよびSHRにおけるタウリン及びマグネシウム摂取による血管内皮前駆細胞 (EPC) 機能に対する効果 第37回日本高血圧学会総会 2014.

丸山高史, 福田昇, 渡辺めぐみ, 阿部雅紀, 上野高浩, 松本太郎, 遠藤守人, 岡田一義, 松本紘一, 相馬正義, 河内裕 脱分化脂肪細胞 (DFAT) 移植のTSG-6を介した単クローン抗体1-22-3誘発腎炎の改善効果 第5回腎不全学会 2014.

生化学分野

宇野茂之; Cyp1 ファミリー遺伝子欠損マウスを用いた多環芳香族炭化水素の代謝機構の解明. 日本薬学会第134年会, 2014.

梅田 (遠藤) 香織, 中島弘幸, 関 修司, 榎島 誠; 高脂肪高コレステロール付加肝障害モデルにおける核内受容体LXRの脂質代謝及び自然免疫調節機構の解明. 第37回日本分子生物学会年会, 2014.

梅田 (遠藤) 香織; 肝臓免疫系細胞の自然免疫調節機構に対する核内受容体LXRの役割. 細胞センサーの分子機構・相互関連・ネットワーク研究会, 2014.

Endo-Umeda K, Nakashima H, Seki S, Makishima M. Liver X receptor modulates innate immune response in hepatic mononuclear cells. 第43回日本免疫学会学術集会, 2014.

石澤通康, 水島優介, 風間智彦, 松本太郎, 池田和正, 榎島誠; 脱分化脂肪細胞の形成におけるビタミンDシグナルの影響. 日本レチノイド研究会第25回学術集会, 2014.

石澤通康, 水島優介, 風間智彦, 松本太郎, 池田和

正, 榎島誠; 成熟脂肪細胞の脱分化過程におけるビタミンD受容体の関与. 平成26年度日本大学学部連携研究推進シンポジウム 第3回日本大学幹細胞研究フォーラム, 2015

日本大学大学院総合科学研究科

福田昇; 腎尿細管上皮間葉化による腎臓内レニン・アンジオテンシン系の亢進. 第43回 日本心脈管作動物質学会, 神戸, 2014. 2. シンポジスト

丸山高史, 福田昇, 松本太郎, 渡辺めぐみ, 阿部雅紀, 上野高浩, 遠藤守人, 岡田一義, 松本紘一, 相馬正義, 河内裕; 免疫性腎炎, 非免疫性腎炎へのDFAT細胞移植の効果. 第13回 日本再生医療学会総会, 京都, 2014. 3. 口演

田口紋子, 上野高浩, 藤原恭子, 福田昇, 相馬正義; TGF- β 抑制PIポリアミドによる神経膠腫に対する腫瘍化抑制効果の検討. 第13回 日本再生医療学会総会, 京都, 2014. 3. ポスター

藤原恭子, 大日方大亮, 伊藤亜希子, 高山賢一, 浦野友彦, 井上聡, 相馬正義, 高橋悟, 永瀬浩喜, 福田昇; ピロール・イミダゾール・ポリアミド (PIP) を用いた前立腺癌関連融合遺伝子の発現抑制法の検討. 第87回 日本内分泌学会, 福岡, 2014. 4. ポスター

Yusuke Murata, takahiro Ueno, Sho Tanaka, Noboru Fukuda, Masayoshi Soma. Expression profiles of target genes of circadian clock in the kidney of spontaneously hypertensive rats. The 16th International SHR Symposium, Rome, 2014.6. Oral

Sho Tanaka, Takahiro Ueno, Yusuke Murata, Noboru Fukuda, Masayoshi Soma. Circadian genes expression profiles in the kidney of spontaneously hypertensive rats. The 16th International SHR Symposium, Rome, 2014.6. Poster

Eriko Negishi, Noboru Fukuda, Takahiro Ueno, Masayoshi Soma. Complement 3 is involved in hypertension by activation of renal RA systems in SHR. The 16th International SHR Symposium, Rome, 2014.6

Noboru Fukuda. Mesenchymal tissue dedifferentiation activating the local RAS in SHR. The 16th International SHR Symposium, Rome, 2014.6. Symposium

五十嵐潤, 福田昇, 齋藤孝輔, 上野高浩, 相馬正義; ヒトTGF- β 1に対する新規バイオ医薬PIポリアミドの創薬開発. 第57回 日本腎臓学会, 横浜, 2014. 7. 口演

丸山高史, 福田昇, 阿部雅紀, 上野高浩, 松本太郎, 遠藤守人, 岡田一義, 松本紘一, 相馬正義, 河内裕; 単クローン1-22-3抗体誘発腎炎, アドリアマイシン腎症へのDFAT細胞移植の効果. 第57回 日本腎臓学会, 横浜, 2014. 7. 口演

松田裕之, 福田昇, 相馬正義, Hamet Pavel, Tremblay Johanne; HCaRGは腎細胞癌の増殖を抑制する: 高血圧症と腎癌発症リスクの新たな関連性. 第57回 日本腎臓学会, 横浜, 2014. 7. ポスター

上野高浩, 北森一哉, 福田昇, 相馬正義, 並河徹, 家森幸男; 非アルコール性脂肪性肝疾患モデルSHRSP5/Dmcrの肝遺伝子発現解析. 第37回 日本高血圧学会, 横浜, 2014. 10. 主要講演

根岸英理子, 福田昇, 片川まゆみ, 上野高浩, 小松一俊, 相馬正義, 真下知士; 高血圧自然発症ラット(SHR)の高血圧発症および病態における補体C3の役割. 第37回 日本高血圧学会, 横浜, 2014. 10. 口演

田中翔, 上野高浩, 村田悠輔, 常見明子, 小林洋輝, 畑中善成, 田平和宣, 羽毛田公, 福田昇, 相馬正義; SHR腎臓における生体内時計関連遺伝子の発現解析. 第37回 日本高血圧学会, 横浜, 2014. 10. 口演

五十嵐潤, 福田昇, 齋藤孝輔, 青山隆彦, 松本宜明, 上野高浩, 相馬正義; 進行性腎障害に対する新規転写抑制薬ヒトTGF- β 1のPIポリアミドの創薬開発. 第37回 日本高血圧学会, 横浜, 2014.10. 口演
丸山高史, 福田昇, 渡辺めぐみ, 阿部雅紀, 上野高浩, 松本太郎, 遠藤守人, 岡田一義, 松本紘一, 相

馬正義, 河内 裕; 脱分化脂肪細胞(DFAT)の全身投与はTSG-6を介して免疫性糸球体腎炎を改善した. 第37回 日本高血圧学会, 横浜, 2014. 10. ポスター

片川まゆみ, 福田昇, 常見明子, 渡辺めぐみ, 上野高浩, 森真理, 家森幸男, 松本太郎, 相馬正義; ヒトおよびSHRにおけるタウリン及びマグネシウム摂取による血管内皮前駆細胞(EPC)機能に対する効果. 第37回 日本高血圧学会, 横浜, 2014. 10. ポスター

根岸英理子, 福田昇, 片川まゆみ, 上野高浩, 相馬正義; 補体C3は高血圧自然発症ラット(SHR)の間葉系組織を脱分化し組織RA系を介して高血圧を引き起こす. 第18回 日本心血管内分泌代謝学会, 横浜, 2014. 11. 口演

田中翔, 上野高浩, 村田悠輔, 常見明子, 小林洋輝, 畑中善成, 田平和宣, 羽毛田公, 福田昇, 相馬正義; SHR副腎皮質における生体内時計関連遺伝子の発現解析. 第18回 日本心血管内分泌代謝学会, 横浜, 2014. 11. ポスター

根岸英理子, 福田昇, 片川まゆみ, 上野高浩, 相馬正義, 真下知士; SHR/Izm全ゲノムシーケンスでの補体C3構造とジンクフィンガーヌクレアーゼ(ZFN)法によるC3ノックアウトSHR/Izmの病態解析. 第50回 高血圧関連疾患モデル学会, 和歌山, 2014. 12. 口演

池田迅, 松田裕之, 藤原恭子, Suzanne Cossette, Louis Gaboury, 山口健哉, 福田昇, 相馬正義, Pavel Hamet, Johanne Tremblay; 高血圧関連遺伝子HCaRGの腎細胞癌における予後予測因子として有用性と腫瘍形成抑制作用. 第50回 高血圧関連疾患モデル学会, 和歌山, 2014. 12. 口演

村田悠輔, 上野高浩, 田中翔, 岡村雅広, 逸見聖一朗, 矢吹美奈子, 福家吉伸, 福田昇, 藤田宜是, 相馬正義; SHR腎臓で発現し, 尿細管細胞にて概日リズムを示す血圧関連遺伝子の探索. 第50回 高血圧関連疾患モデル学会, 和歌山, 2014. 12. 口演

田中翔, 上野高浩, 村田悠輔, 常見明子, 小林洋輝,
畑中善成, 田平和宣, 羽毛田公, 福田昇, 相馬正義;
SHR/Izmの副腎における生体内時計関連遺伝子の
発現解析. 第50回 高血圧関連疾患モデル学会,
和歌山, 2014. 12. ポスター

片川まゆみ, 福田昇, 常見明子, 渡辺めぐみ, 上野
高浩, 森真理, 家森幸男, 松本太郎, 相馬正義;
SHRにおけるタウリン及びマグネシウム摂取によ
る血管内皮前駆細胞 (EPC) 機能に対する効果. 第
50回 高血圧関連疾患モデル学会, 和歌山, 2014.
12. ポスター

総合医学研究所 医学研究支援部門

藤田順一, 石田和久, 松本明, 石井敬基: 実験用ブ
タの環境エンリッチメントと順化の一例. 第2回実
験用ブタ勉強会, 佐倉, 2014. 10.

博士課程

外科系 整形外科学専攻

木下豪紀: ラット難治性骨折モデルにおける脱分化
脂肪細胞移植と副甲状腺ホルモン投与による治療効
果. 日本大学大学院医学研究科博士課程外科系整形
外科学専攻

外科系 整形外科学専攻

中山渕志: ラット椎間板変性モデルに対する 脱分
化脂肪細胞 (DFAT) 移植の治療効果. 日本大学大
学院医学研究科博士課程外科系整形外科学専攻

外科系 循環器外科学専攻

飯田絢子: IABPが冠動脈バイパスグラフト流量波
形に及ぼす影響に関する実験的検討. 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

NUBIC技術移転

総合医学研究所 医学研究支援部門

石田和久, 藤田順一, 石井敬基: ブタ飼育ケージ用
垂木. 日本大学産官学連携知財センター (NUB I
C) 2014. 3.

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 杉谷雅彦
委員 石井敬基, 内山 真, 黒田和道, 嶋村政男, 原留弘樹, 間崎武郎,
村岡幸雄, 村上芳孝, 山本隆充
幹事 井上広一, 烏山芳織, 竹田亮介, 平井孝政, 藤田順一

(50音順)

Editorial Board

Editor-in-Chief Masahiko SUGITANI
Associate Editors Yukimoto ISHII, Makoto UCHIYAMA, Kazumichi KURODA,
Masao SHIMAMURA, Hiroki HARADOME, Takero MAZAKI,
Yukio MURAOKA, Yoshitaka MURAKAMI, Takamitsu YAMAMOTO
Managing Editors Koichi INOUE, Yoshiori UYAMA, Ryosuke TAKEDA,
Takamasa HIRAI, Jun-ichi FUJITA

発行者 日本大学医学部総合医学研究所長 杉谷雅彦
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 Masahiko SUGITANI
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
