

## 5 1 . Proteasome inhibitors prevent tumor cell proliferation in HHV-8-unrelated PEL-like lymphoma

Toshie Ogasawara

(Tokyo Women's Medical University Adachi Medical Center, Department of Medicine)

[Purpose & Methods] HHV-8-negative PEL-like lymphomas (PEL-LL) is a rare type of lymphoma distinct from PEL that shows heterogeneous clinical behavior. Some patients present with a mild PEL-LL disease course, whereas others present with an aggressive course. However, the specific clinicopathological features and effective treatments for PEL-LL remain unclear. We have previously established an OGU1 cell line derived from a patient with PEL-LL who presented with massive lymphomatous ascites and an aggressive disease course with chemotherapy refractoriness. Vascular endothelial growth factor is involved in the growth of OGU1 and other PEL-LL-derived cell lines. Herein,

We further investigated the signaling pathways involved in the growth and survival of OGU1 cells and tested the in vitro effects of 2 and 20 µg/mL concentrations of rituximab, an anti-CD20 monoclonal antibody. Furthermore, we investigated the effect of inhibitors of the MAPK or PI3K pathways, which are the major pathways involved in tumor proliferation, such as lymphoid tumors. Finally, we examined the effects of proteasome inhibitors on OGU1 cell growth.

[Results] The results (rituximab) demonstrated no significant inhibitory effect on OGU1 cell growth.

Inhibitors targeting MEK (PD98059), p38 MAPK (SB203580), and PI3K (LY294002) did not significantly inhibit cell growth. Similarly, bortezomib (Ki: 0.6 nM), another highly selective proteasome inhibitor, completely inhibited OGU1 cell growth and reduced cell viability at a concentration as low as 10 nM for 72 h.

[Discussion] Our findings suggest that proteasome inhibitors are effective against the OGU1 cell line derived from PEL-LL, particularly in patients refractory to chemotherapy.

[Conclusions] Although these data are based on an in vitro cell growth study, they indicate that proteasome inhibitors, such as bortezomib, are promising therapeutic agents for aggressive PEL-LL.

### [Reference]

- 1) WHO Classification of Tumours Editorial Board, WHO Classification of Tumours: Hematolymphoid Tumours, 5th ed, IRAC, Lyon, 2024, p. 11.
- 2) W. Wu, W. Toun, S.A. Rezk, X. Zhao, Human herpesvirus 8-unrelated primary effusion lymphoma-like lymphoma: report of a rare case and review of 54 cases in

the literature, *Am. J. Clin. Oathol.* 140 (2013) 258–273.

- 3) S. Alexanian, J. Said, M. Lones, S.T. Pullarkat, KSHV/HHV-8-negative effusionbased lymphoma, a distinct entity associated with fluid overload states, *Am. J. Surg. Pathol.* 37 (2013) 241–249.
- 4) S. Gupta, C. Graham, P.A. Haddad, Primary effusion lymphoma (PEL) and primary effusion-like lymphoma (PEL-LL): a comparative study of clinicopathologic features and outcomes, *Blood* 142 (2023) 4477.
- 5) K. Kawauchi, T. Ogasawara, M. Aiba, M. Fijibayashi, T. Sanaka, H. Sakura, M. Shibuya, Establishment and characterization of a novel VEGF-producing HHV-8-unrelated PEL-like lymphoma cell line, OGU1, *Eur. J. Haematol.* 96 (2016) 144–151.
- 6) F. Ogasawara, T. Higuchi, T. Nishimori, Y. Hashida, K. Kojima, M. Daibata, Targeting VEGF with bevacizumab inhibits malignant effusion formation of primary human herpesvirus 8-unrelated effusion large B-cell lymphoma in vivo, *J. Cell Mol. Med.* 26 (2022) 5580–5589.
- 7) K. Kawauchi, T. Ogasawara, M. Yasuyama, K. Otsuka, O. Yamada, Regulation and importance of the PI3K/Akt/mTOR signaling pathway in hematologic malignances, *Anti Cancer Agents Med. Chem.* 9 (2009) 1024–1038.
- 8) A.R. Hussain, M. Ahmed, S.O. Ahmed, S. Al-Thari, A.S. Khan, S. Razack, L. C. Plataniias, K.S. Al-Kurrayya, S. Uddin, Proteasome inhibitor MG-132 mediated expression of p27Kip1 via S-phase kinase protein 2 degradation induces cell cycle coupled apoptosis in primary effusion lymphoma cells, *Leuk. Lymphoma* 50 (2009) 1204–1213.
- 9) T. Robak, H. Huang, J. Jin, J. Zhu, T. Liu, O. Samoilova, H. Pylypenko, G. Verhoef, N. Sirtanarakul, E. Osmanov, J. Alexeeva, J. Pereira, J. Drachi, J. Mayer, X. Hong, R. Okamoto, L. Pei, B. Rooney, H. van de Velde, F. Cavalli, LYM-3002 Investigators. Bortezomib-based therapy for newly diagnosed mantle-cell lymphoma, *N. Engl. J. Med.* 372 (2015) 944–953.
- 10) K.A. Sarosiek, L.E. Cavallin, S. Bhatt, N.L. Toomey, Y. Natkunam, W. Blasini, A. J. Gentles, J.C. Ramos, E.A. Mesri, I.S. Lossos, Efficacy of bortezomib in a direct xenograft model of primary effusion lymphoma, *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 107 (2010) 13069–13074.

[Article]

- 1) K.Kawauchi et al., Proteasome inhibitors prevent tumor cell proliferation in HHV-8-unrelated PEL-like lymphoma, *Leukemia Research Reports* 23 (2025).

## 5 2. 体位性頻脈症候群 (POTS) におけるアドレナリン受容体抗体と循環自律神経機能

佐藤恭子<sup>1,2</sup>

(<sup>1</sup>足立医療センター・リハビリテーション科、<sup>2</sup>足立医療センター・内科)

〔目的〕 体位性頻脈症候群 (postural tachycardia syndrome, POTS) は、起立時に 30 拍/分以上の著明な心拍数の増加と立ちくらみやめまい、疲労感や睡眠障害等の多彩な症状を呈する病態である。発症機序として交感神経の過緊張、末梢自律神経ニューロパチー、循環血漿量の低下の関与が指摘されているが、その病態生理と予後はいまだ明らかではない。

近年 POTS 患者における抗アドレナリン受容体抗体 ( $\alpha 1$ 、 $\alpha 2$ 、 $\beta 1$ 、 $\beta 2$ )<sup>1</sup>のほか、自己免疫性自律神経節障害患者にみられるアセチルコリン受容体抗体や抗ムスカリン性アセチルコリン受容体抗体が発症に関係する可能性があるとされている<sup>2-4</sup>。

アドレナリン受容体はアドレナリン、ノルアドレナリンを始めとするカテコラミン類によって活性化される G 蛋白共役型の受容体である。主に心筋 ( $\beta 1$ ) や血管平滑筋 ( $\alpha 1$ 、 $\beta 2$ ) に存在し中枢神経系シナプス前 ( $\alpha 2$ ) にも存在する。 $\alpha$  および  $\beta$  アドレナリン受容体の分子量はそれぞれ 45-49 kDa, 60-65 kDa である。 $\alpha 1$ 、 $\alpha 2$  アドレナリン受容体は SK-N-MC (human neuroblastoma) 細胞、 $\beta 1$  アドレナリン受容体は A-375 (human melanoma, skin lymph node) および Hs294T (human melanoma, skin) 細胞膜上に多く発現することが知られている。

今回の検討ではアドレナリン受容体に対する IgG 自己抗体と、循環自律神経機能および神経液性因子による循環動態の調節を評価した。

〔方法〕 東京女子医科大学附属足立医療センターを受診した POTS 患者の中で、臨床研究参加の同意が得られた 5 名を対象とした。

抗アドレナリン受容体 IgG 抗体の検出には、ウェスタンブロッティング法 (WB) を用いた<sup>5,6</sup>。具体的には既に WB でアドレナリン受容体発現が確認されている A-375、Hs294T、SK-N-MC 細胞の細胞ライセートの電気泳動を行い、WB 用のメンブレンにトランスファーしたのちに患者血清とインキュベートした。メンブレンを洗浄後ペルオキシダーゼ標識二次抗体と ECL システム (GE ヘルスケア) を用い、血清中の細胞ライセートに対する抗体反応性を検討した。また、市販されている抗ヒトアドレナリン受容体抗体を陽性コントロールとして使用した。

【自律神経機能検査 (AFT)】被験者に心電図、連続血圧モニターを装着の上、5 分間安静臥位での記録の後、3 分間の 0.1Hz 呼吸統制による洞性不整脈の評価、過呼吸前後の血圧変化、バルサルバ試験、ハンドグリップ試験、寒冷昇圧試験を行った。

【ヘッドアップチルト試験 (HUT)】AFT 終了に続いて、被験者の立位負荷に対する心拍や血圧の変化を記録した。採血のための留置カテーテルを前腕部に挿入し、20 分以上のチルトテーブル上での安静臥位後に留置カテーテルより採血を行い、血漿カテコラミン、レニン、アルドステロン濃度を測定した。採血終了後に 60 度までチルトテーブルを挙上し、連続血圧、心電図記録のほか直後、3 分後、5 分後、10 分後、以後 5 分おきに上腕での血圧測定を行った。HUT は最長 30 分間施行された。終了時もしくは

は症状が出現して中止する直前に起立前と同様の採血を行った。

〔結果と考察〕  $\alpha$  および  $\beta$  アドレナリン受容体の分子量はそれぞれ 45-49 kDa, 60-65 kDa である。今回の被検者での検討では、50kD 付近に A375 で 2 名、Hs294T に 4 名、SK-N MC に 3 名バンドの検出が確認された。これらのバンドが全く検出されなかった症例は 1 名のみであった。

A375 で 50kD 付近にバンドが確認された患者では、検出されなかった者と比較して心臓迷走神経活動遠心路の指標である洞性不整脈比の有意な低下が認められた (1.35 vs. 1.76,  $p=0.0083$ )。

これらのパイロットデータをもとにして、今後はアドレナリン受容体の cDNA を導入した細胞を用いた実験により、今回認められたバンドが抗アドレナリン受容体抗体であることを確認し、マイクロニューログラフィー法を用いた筋交感神経活動と合わせた解析を予定している。

#### 〔文献〕

- 1) Li H, Yu X, Liles C, Khan M, Vanderlinde-Wood M, Galloway A, Zillner C, Benbrook A, Reim S, Collier D, Hill MA, Raj SR, Okamoto LE, Cunningham MW, Aston CE, Kem DC. Autoimmune basis for postural tachycardia syndrome. *J Am Heart Assoc*. 2014;3:e000755.
- 2) Yu X, Stavrakis S, Hill MA, Huang S, Reim S, Li H, Khan M, Hamlett S, Cunningham MW, Kem DC. Autoantibody activation of beta-adrenergic and muscarinic receptors contributes to an “autoimmune” orthostatic hypotension. *J Am Soc Hypertens*. 2012;6:40–47.
- 3) Gibbons CH, Freeman R. Antibody titers predict clinical features of autoimmune autonomic ganglionopathy. *Auton Neurosci*. 2009;146:8–12.
- 4) Campos LA, Pereira VL Jr, Muralikrishna A, Albarwani S, Bras S, Gouveia S. Mathematical biomarkers for the autonomic regulation of cardiovascular system. *Front Physiol*. 2013;4:279.
- 5) Kurose H, Arriza JL, Lefkowitz RJ. Characterization of alpha 2-adrenergic receptor subtype-specific antibodies. *Mol Pharmacol*. 1993;43:444–450.
- 6) Moretti S, Massi D, Farini V, Baroni G, Parri M, Innocenti S, Cecchi R, Chiarugi P.  $\beta$ -adrenoceptors are upregulated in human melanoma and their activation releases pro-tumorigenic cytokines and metalloproteases in melanoma cell lines. *Lab Invest*. 2013;93:279.

### 5 3 . The effect of laxatives on reducing serum phosphate levels on three-combination probiotic in hemodialysis patients: A subanalysis of RCT

Tetsuya Ogawa, Eriko Hirasawa, Yoko Nishizawa, Kiyotsugu Omae and Nobuo Nagano  
(Department of Medicine, Tokyo Women's Medical University Adachi Medical Center)

[Purpose] Dysbiosis of the intestinal microbiota in chronic kidney disease increases uremic toxin, which damage the epithelial tight junctions and increase the permeability of the intestinal wall via endotoxemia and systemic inflammation. Some articles reported that probiotics reduced the uremic toxin and decreased inflammation biomarkers in CKD patients <sup>1),2)</sup> Meanwhile, we have already reported that oral administration of *Bifidobacterium longum* in a gastro-resistant seamless capsule decreases serum phosphate levels in patients receiving hemodialysis<sup>3)</sup>. In addition, in this congress, we reported that three-combination probiotics decreased serum phosphate levels. Meanwhile, some articles reported the relationship hypophosphatemia and laxative abuse. The aim of this subanalysis study is to evaluate the efficacy on laxatives of reducing serum phosphate levels of three-combination probiotic in patients receiving hemodialysis.

[Methods] A 6-month prospective, randomized, double-blind, placebo-controlled study was conducted at three hemodialysis centers. As probiotic therapy, of three-combination probiotics (Bio-Three) tablets, each containing 2 mg of lactomin (*Streptococcus faecalis* T-110), 10 mg of *Clostridium butyricum* TO-A, and 10 mg of *Bacillus mesentericus* TO-A, were used. The patients receiving hemodialysis were randomly assigned to the Bio-Three group (n=37) and the placebo group (n=36). In both the Bio-Three group and the placebo group, patients orally received 6 tablets 3 times daily. We evaluated the effect of probiotic on serum serum phosphate level and gut microbioma before and 6 months after the start of treatment. The gut microbioma composition was analyzed by a 16s rRNA gene-based sequencing protocol. In addition, in patients with laxative (n=24), we evaluate the effect of probiotic on serum serum phosphate levels and gut microbioma.

[Results] The serum phosphate levels in the Bio-Three group significantly decreased after 6-month treatment, while did not change in the placebo group. Furthermore, the serum phosphate level in patients with Bio-Three and laxative additionally decreased. In a 16s rRNA gene-based sequencing protocol analysis, serum phosphate levels were positively correlated with the occupancy ratio of *Erysipelotrichaceae*, *Lachnospiraceae*, *Oscillospiraceae*, *Ruminococcaceae*, and *Sutterellaceae* and were negatively correlated with the occupancy ratio of *Leuconostocaceae* and *Lachnospiraceae* in patients with Bio-Three and laxatives.

[Discussion] In the present study, 24-week probiotics administration in patients on maintenance dialysis did not change the high-sensitivity CRP level and CRP/albumin ratio. Since we included

patients with normal level of CRP ( $\leq 1.0$  mg/dL), this can be considered as the main reason for the mean CRP at baseline being within the normal range.

[Conclusions] In this subanalysis study, the effect of reducing serum phosphate levels on three-combination probiotic might be augmented by laxatives and the specific bacteria in the gut microbioma might contribute to the decrease of serum phosphate levels. Administration of *Bifidobacterium longum* to patients on maintenance dialysis for 4 weeks has been shown to significantly reduces serum phosphorus levels. In our study, serum phosphorus levels were significantly reduced after 16 and 24 weeks in the probiotics group with laxatives compared to those in the placebo group ( $p=0.049$  at Week-16 and  $p=0.014$  at Week-24). Additionally, the probiotics group without laxatives showed significantly reduced serum phosphorus levels from baseline ( $p = 0.006$  at 16 weeks and  $p = 0.027$  at 2 weeks). These results suggest that administration of probiotics may reduce serum phosphorus levels, with this effect being more pronounced in patients treated with laxatives. Probiotics administration may correct dysbiosis of the intestinal environment by the symbiotic action of three active probiotics in the growth regions of aerobic bacteria, facultative anaerobic bacteria, and obligate anaerobic bacteria, as well as correct the dysbiosis of butyric acid bacteria, especially in the growth region of obligate anaerobic bacteria. In the probiotics group, butyric acid bacteria showed a positive correlation with a decrease in serum phosphorus, suggesting that multiple butyric acid bacteria may be involved in the decrease in serum phosphorus levels.

[Reference]

- 1) Rooks MG, Garrett WS.(2016) Gut microbiota, metabolites and host immunity. Nat Rev Immunol. 16: 341-352.
- 2) Raphael KL. (2019) Metabolic Acidosis in CKD: Core Curriculum 2019. Am J Kidney Dis. 74: 263-275.
- 3) Ogawa T, Shimada M, Nagano N, Ito K, et al. (2012) Oral administration of Bifidobacterium longum in a gastro-resistant seamless capsule decreases serum phosphate levels in patients receiving haemodialysis. Clin Kidney J. 5: 373-374.

[Conference Presentation]

- 1) Ogawa T, Hirasawa E., Nagano N., et al. The effect of laxatives on reducing serum phosphate levels on three-combination probiotic in hemodialysis patients: A suanalysis of RCT. 61st ERA Congress, Stockholm, Sweden, 2024/5

#### 5 4 . A non-epidermolytic keratinocytic epidermal nevus associated with a post-zygotic mutation in the gene encoding the epidermal growth factor receptor

Noriko Umegaki-Arao

(Department of Dermatology, Tokyo Women's Medical University Adachi Medical Center)

[Purpose] Non-epidermolytic keratinocytic epidermal nevi (KEN) are benign congenital skin lesions characterized by linear distribution along the lines of Blaschko. Here, we describe a case of non-epidermolytic KEN exhibiting characteristic clusters of velvet-like whitish papules along the lines of Blaschko associated with a postzygotic mutation in *EGFR*.

[Methods] A 6-year-old boy without a family history presented with widespread whitish papules on his trunk from the age of 3 months. A biopsy showed acanthosis and basal melanosis without granular degeneration, combined with the hyperpigmented network by dermoscopy. These findings suggested that the irregular reflection of visible light at the surface of the hyperkeratotic stratum corneum may have produced the whitish appearance.

[Results] An exome sequencing using genomic DNA purified from the lesional epidermis detected a heterozygous c.2582T>A (p.L861Q) variant in *EGFR*, with no variants in any of the genes previously associated with KEN. Sanger sequencing followed by digital polymerase chain reaction analysis revealed the heterozygous *EGFR* c.2582T>A (p.L861Q) variant in the lesional epidermis, but not in the lesional dermis or white blood cells. Immunohistochemical staining revealed aberrant EGFR activation in the basal layer. We conclude that the *de novo* constitutive-active EGFR variant caused the non-epidermolytic KEN. The p.L861Q variant has been reported as an activating mutation of EGFR kinase in malignant tumors.

[Discussion and Conclusions] A lower incidence of EGFR mutations was also reported in seborrheic keratosis and cutaneous squamous cell carcinoma<sup>1,2)</sup>. However, to the best of our knowledge, this is the first report of a somatic *EGFR* mutation in non-epidermolytic KEN.

#### [Reference]

- 1) Hafner C, Toll A, Fernandez-Casado A *et al.* Multiple oncogenic mutations and clonal relationship in spatially distinct benign human epidermal tumors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2010; **107**: 20780-5.
- 2) Georgieva IA, Mauere A, Groesser L *et al.* Low incidence of oncogenic EGFR, HRAS, and KRAS mutations in seborrheic keratosis. *Am J Dermatopathol* 2014; **36**: 635-42.

[Article]

- 1) Umegaki-Arao N, Ono N, Tanaka R, Sasaki T, Fujita H, Shiohama A, Aoki S, Amagai M, Kubo A. A nonepidermolytic keratinocytic epidermal naevus associated with a postzygotic mutation in the gene encoding epidermal growth factor receptor. *Br J Dermatol*. 2019 Nov 20. doi: 10.1111/bjd.18729. (PMID : 31745974)

[Conference Presentation]

- 1) Umegaki-Arao N, Ono N, Tanaka R, Sasaki T, Fujita H, Shiohama A, Amagai M, Kubo A. A non-epidermolytic epidermal nevus associated with a postzygotic EGFR mutation. 1st. International Societies for Investigative Dermatology Meeting, Tokyo, Japan, 2023.05.10-13

## 5 5. 下大静脈腫瘍塞栓を伴う腎細胞癌摘出症例の周術期の凝固線溶機能

市川順子、清水恵利香

(足立医療センター・麻酔科)

〔目的〕 悪性腫瘍は組織因子を介したトロンビン生成、血管内皮細胞の生理的な抗凝固活性の低下、線維素溶解の異常などを生じやすく<sup>1)</sup>、腫瘍栓が術前に形成されている場合、術中操作による遊離で肺塞栓症を起こす症例もある。そこで、線溶遮断も評価できる血液粘弾性装置である ClotPro を用いて周術期の凝固線溶機能を評価した。

〔対象と方法〕 下大静脈腫瘍塞栓を伴う腎細胞癌摘出術を予定した患者 35 名を対象にして、手術室入室後、退室前、術後 1、2、3 日目に採血を行い、Clotpro による血液粘弾性検査、凝固や線溶機能検査をした。すべての患者において血栓予防のために、術後 1 日目に低分子ヘパリン 20 mg/日の皮下投与を開始した。TPA テストの線溶時間 (LT) が 300 秒よりも長い場合に、線溶抵抗ありと評価し、線溶抵抗の有無による凝固や線溶機能検査を比較検討した。

〔結果〕 フィブリノゲン濃度、フォン・ウィルブランド因子(vWF)活性、第 VIII 因子活性は基準値と比較して術後に有意に上昇した。血小板は入室時から退室時にかけて減少したのみで、術前と比較して有意差はみられなかった。フィブリノゲン・フィブリン分解産物 (FDP)、D ダイマーは術前から基準値を上回っていたが、術後にさらに上昇した。アンチトロンビン活性は退室時に有意に低下した一方、アンチプラスミン活性は術後に有意に上昇した。プラスミン- $\alpha$ 2 プラスミンインヒビター複合体 (PIC) は術後 3 日目に有意に上昇し、プラスミノゲンアクチベーターインヒビター1 (PAI-1) は退室時に有意に上昇し、術後に低下した (表 1)。術後 2 日目に TPA-test の線溶時間 LT が有意に延長し、5 名の患者の TPA-LT が 300 秒より大きかった (表 2)。

〔考察〕 IVC 塞栓を有する腎細胞癌患者では、術後に TPA-LT が経日的に延長し、術直後の PAI-1 の高値、PIC、FDP、D ダイマーの軽度の上昇があり、初期の凝固・線溶の亢進から術後数日に線溶抵抗に転じることが示唆された。TPA-LT は tPA を 650~700  $\mu$ g/ml 添加し、血餅形成後の線溶反応を開始させ、線溶遮断を評価できる<sup>2)</sup>。TPA-LT は血餅形成から血餅強度 50%に減じるまでの時間である。本研究では線溶遮断を健常者の平均から 4 SD 上回った値で線引きした過去の研究を参考にした。炎症反応により  $\alpha$ 2 アンチプラスミンなどの急性相タンパク質が上昇し、線溶抵抗に関与した可能性がある。

〔結語〕 IVC 塞栓患者では初期の凝固・線溶の亢進から術後数日に線溶抵抗に転じ、炎症性サイトカインにより発現が惹起される  $\alpha$ 2 アンチプラスミンなどの関与が予想された。

〔文献〕

- 1) Mukai, M. Oka, T., Mechanism and management of cancer-associated thrombosis, J Cardiol 72, 89-93, 2018.

2) Yoshii, R., Sawa, T., Kawajiri, H. et al. A comparison of the ClotPro system with rotational thromboelastometry in cardiac surgery: a prospective observational study. Sci Rep 12, 17269 (2022). <https://doi.org/10.1038/s41598-022-22119-x>

[学会発表]

1) 清水 恵利香, 市川 順子, 竹中 享利, 福田 友樹, 向山 瑤子, 小森 万希子.下大静脈腫瘍塞栓を伴う腎細胞癌摘出症例の周術期の凝固線溶機能. 第 71 回日本麻酔科学会学術集会、神戸、2024/6

表 1. 術前後の血液凝固機能の経日的変化.

|                           | 入室時         | 退室時         | POD1        | POD2        | POD3        | p値     |
|---------------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|--------|
| CRP(mg/dL)                | 1.78±3.39   | 1.62±2.50   | 11.73±5.89  | 20.98±9.48  | 21.50±11.21 | <0.001 |
| WBC( $10^9/\mu\text{L}$ ) | 52.3±13.5   | 72.9±25.5   | 103.7±26.7  | 106.5±24.4  | 87.4±31.5   | <0.001 |
| RBC( $10^9/\mu\text{L}$ ) | 335.9±68.0  | 313.7±60.2  | 378.8±62.5  | 352.3±55.4  | 336.0±103.6 | 0.024  |
| Hb(g/dL)                  | 9.55±2.10   | 9.02±1.78   | 10.91±1.74  | 10.19±1.53  | 10.40±2.05  | 0.051  |
| Ht(%)                     | 29.34±5.86  | 27.87±5.21  | 34.01±5.15  | 32.12±43.48 | 32.48±5.82  | <0.001 |
| Plt( $10^9/\mu\text{L}$ ) | 21.21±10.22 | 15.73±5.80  | 19.10±7.29  | 18.00±7.18  | 19.03±10.42 | 0.004  |
| PT-INR                    | 2.31±4.21   | 1.25±0.19   | 1.17±0.16   | 1.14±0.08   | 1.12±0.10   | 0.051  |
| PT(秒)                     | 15.72±9.77  | 14.34±2.12  | 13.46±1.92  | 13.16±0.80  | 12.79±1.22  | 0.046  |
| APTT(秒)                   | 56.3±85.5   | 36.9±10.3   | 31.9±6.1    | 32.9±4.4    | 32.5±5.1    | 0.124  |
| フィブリノゲン<br>(mg/dL)        | 362.5±145.4 | 251.5±107.7 | 405.5±145.0 | 562.3±118.5 | 650.4±146.0 | <0.001 |
| アンチトロンビン<br>(%)           | 72.5±19.3   | 55.9±18.5   | 73.1±20.0   | 72.8±14.7   | 73.4±17.9   | <0.001 |
| FDP( $\mu\text{g/mL}$ )   | 5.06±2.97   | 12.94±12.37 | 15.35±9.43  | 14.31±6.69  | 15.62±5.46  | 0.004  |
| Dダイマー( $\mu\text{g/mL}$ ) | 2.67±2.21   | 4.80±3.41   | 13.97±17.45 | 13.45±20.49 | 10.32±5.09  | <0.001 |
| アンチプラスミン<br>活性(%)         | 79.2±18.9   | 60.2±18.4   | 83.7±10.4   | 93.1±11.7   | 95.6±13.5   | <0.001 |
| vWF活性(%)                  | 234.2±306.6 | 134.5±50.1  | 288.9±112.6 | 308.6±83.0  | 326.8±147.0 | <0.001 |
| 第VIII因子活性<br>(%)          | 149.1±76.8  | 147.6±80.0  | 234.4±99.1  | 248.3±80.7  | 251.1±94.4  | <0.001 |
| PTC( $\mu\text{g/mL}$ )   | 0.93±0.43   | 1.23±0.43   | 1.32±0.37   | 1.58±0.59   | 2.02±0.76   | 0.011  |
| PAI-1(ng/mL)              | 25.7±14.9   | 73.5±57.2   | 38.2±9.8    | 33.5±11.7   | 27.3±6.4    | 0.024  |
| プラスミノゲン<br>(mg/dL)        | 10.30±1.24  | 8.28±1.60   | 9.20±1.16   | 8.70±1.71   | 9.57±2.27   | 0.129  |

表 2. 術前後の Clopro の経日的変化

|     |                      | 入室時            | 退室時            | POD1           | POD2       | POD3       | p値     |
|-----|----------------------|----------------|----------------|----------------|------------|------------|--------|
| EX  | CT(秒)<br>38-65       | 65.8±24.3      | 62.1±6.5       | 61.7±13.8      | 61.3±8.2   | 64.4±13.3  | 0.761  |
|     | MCF(m<br>m)<br>53-68 | 62.6±7.9       | 55.5±9.1       | 61.3±6.5       | 62.8±6.4   | 63.6±4.0   | <0.001 |
| Fib | CT(秒)<br>55-87       | 62.9±27.3      | 73.2±17.2      | 67.8±14.9      | 69.4±13.9  | 68.0±14.9  | 0.461  |
|     | MCF(m<br>m)<br>9月27日 | 24.4±12.5      | 15.9±7.5       | 22.3±7.6       | 29.5±5.6   | 31.5±4.6   | <0.001 |
| TPA | CT(秒)<br>30-59       | 56.1±24.2      | 52.5±10.1      | 54.2±13.2      | 57.3±19.5  | 53.9±13.8  | 0.923  |
|     | MCF(m<br>m)<br>21-43 | 32.3±15.0      | 28.7±12.9      | 32.9±11.8      | 37.9±11.9  | 41.5±9.3   | 0.004  |
|     | LT(秒)                | 208.8±<br>92.4 | 171.9±<br>52.6 | 226.5±<br>77.7 | 298.5±84.8 | 319.4±77.8 | <0.001 |
|     | ML(%)<br>92-100      | 94.3±2.9       | 78.5±33.8      | 88.2±22.5      | 91.5±13.6  | 91.2±16.8  | 0.005  |
| RVV | CT(秒)<br>48-77       |                |                |                | 100.8±26.0 | 110.9±40.2 | 0.248  |
|     | MCF(m<br>m)<br>54-68 |                |                |                | 60.5±5.2   | 61.2±4.1   | 0.622  |

5 6 . The efficacy of the HISCL™-5000 SARS-CoV-2 antigen assay for preliminary testing of employees in close contact with COVID-19 patients before returning to work

Kenji Kawaguchi, Chihiro Muramatsu, Tomoyuki Fujiwara, Naohito Asano,  
Yoshihiro Furuichi, Hiroo Tokoro, Koichiro Sato, Tatsuichi Yamada and Hiroyuki Kato  
(Department of Clinical Laboratory, Tokyo Women's Medical University)

[Purpose] A reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) is the gold standard for negative confirmation of SARS-CoV-2 and has the highest detection sensitivity<sup>1)</sup>. However, it is expensive, and the long testing time (1-5 h) requires specialized equipment and skilled technicians to prevent contamination at the genetic level. Therefore, in this study, we retrospectively studied the concordance rate between RT-PCR tests and antigen quantification tests of employees at our hospital, the incidence of false positives and their causes, examined their efficacy.

[Methods] A total of 1642 SARS-CoV-2 antigen tests (589 participants) were conducted at our hospital between March and November, 2022. The employee self-collected nasopharyngeal swab fluid on the same day before starting work and were allowed to work if they tested negative.

The HISCL™ SARS-CoV-2 Ag reagent from Sysmex Corporation was used as the primary reagent. The analytical instrument used was a fully automated immunoassay system HISCL™-5000 (Chemiluminescent Enzyme Immunoassay, Sysmex Corporation). Negative and positive results were defined by the following criteria: cut-off index (C.O.I.) < 1.0 and  $\geq 1.0$ , respectively, according to the user manual<sup>3)</sup>. Nucleic acid detection test Xpert® Xpress SARS-CoV-2 "Cepheid" ("RT-PCR") was used to detect SARS-CoV-2 (N2 and E genes) in biological samples via RT-PCR combined with a fluorescent probe. The measurement results were judged as positive (+) if the threshold cycle value (Ct value) was  $\leq 45$  and negative (-) if  $> 45$  or undetectable<sup>4)</sup>.

All statistical analyses were performed using EZR software (v. 1.61). Student's t-test or the Mann-Whitney U-test was used to evaluate significant differences, with  $p < 0.05$  considered statistically significant. Pearson's product-moment correlation coefficient (r) was used to evaluate correlations.

[Results] The number of antigen quantification tests performed during the study period was 1,642 (589 participants), with 1-20 tests performed per participant (average 2.8 tests). Of these, 39 tested positive, yielding a positive rate of 2.38%. And, 13 were negative by RT-PCR testing, with a positive concordance rate of 66.6% (33.3% false-positive rate for antigen testing) (Table 1). In the antigen positive cases, the mean antigen test C.O.I. of 26 PCR-positive cases (26 participants) was 4080.9 (3.7-34,010), and that of 13 PCR-negative cases (six participants) was 3.7 (1.2-17.2). Thirteen false positives (six participants) were observed. Of the six participants, three had multiple false positives. The mean antigen C.O.I. for three participants was 2.5 (1.0-5.8)

The cut-off value for antigen levels obtained in ROC analysis was 4.90 (sensitivity: 84.6%; specificity: 84.6%), and the AUC was 0.9 (95% CI: 0.783-0.913), higher than the cut-off value of 1.0 recommended

by the manufacturer (Fig. 1). Whereas the specificity reached 100% when the C.O.I. was 19.2.

Table 1. Results of RT-PCR and antigen quantification tests

|          | Cut-Off Index (C.O.I.)     | RT-PCR test |          |
|----------|----------------------------|-------------|----------|
|          |                            | Negative    | Positive |
| Positive | $\geq 10,000$              |             | 4        |
|          | $\geq 1,000 \sim < 1,0000$ |             | 1        |
|          | $\geq 100 \sim < 1,000$    |             | 6        |
|          | $\geq 10 \sim < 100$       | 1           | 10       |
|          | $\geq 2 \sim < 10$         | 5           | 5        |
|          | $\geq 1 \sim 2$            | 7           |          |
| Negative | $< 1$                      | 1,603       |          |

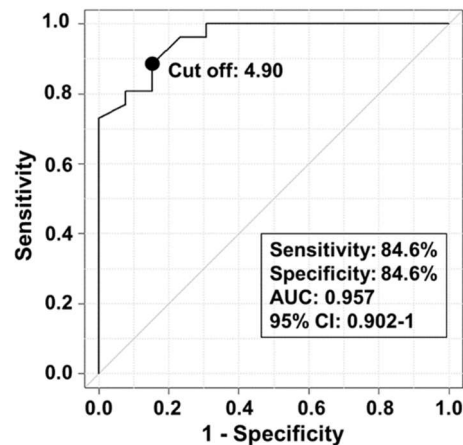


Fig.1. ROC curve of the antigen test

[Discussion] Our validation results suggest that the SARS-CoV-2 antigen assay using the HISCLTM 5000 antigen quantification test may be a more effective screening method, with an improvement in sensitivity and specificity when a positive test score of 4.90 is obtained. This was relatively consistent with a report (test score of 3.90) that conducted a similar study [8]. Furthermore, when focusing only on specificity, the specificity was 100% at C.O.I.  $\geq 19.2$ . This suggests that a diagnosis may be possible without the need for retesting with RT-PCR.

[Conclusions] The HISCL™-5000 antigen quantification test is simple and can be performed quickly (a minimum of 17 min), making it highly effective as a preliminary test for staff before starting work.

#### [Reference]

- 1) Kato H, Yamada T, Sato K, et al. Study of the Asymptomatic person's Specificity of Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction for the Diagnosis of Coronavirus Disease 2019 (COVID-19). JJSLM. 2021; 69:498-501.
- 2) Sysmex. HISCLTM SARS-CoV-2 Ag reagent attachment. [https://www.pmda.go.jp/PmdaSearch/ivdDetail/ResultDataSetPDF/480585\\_30200EZX00078000\\_A\\_04\\_01](https://www.pmda.go.jp/PmdaSearch/ivdDetail/ResultDataSetPDF/480585_30200EZX00078000_A_04_01). Accessed MAR 2023.
- 3) BECKMAN COULTER. Nucleic acid detection test Xpert Xpress SARS-CoV-2 "Cepheid" attachment. <https://www.cepheid.com/Package%20Insert%20Files/Xpress-SARS-CoV-2/Xpert%20Xpress%20SARS-CoV-2%20JA%20Package%20Insert%20302-3997-JA%2C%20Rev.%20E.pdf>. Accessed 21 OCT 2023.

#### [Article]

- 1) Journal of Hospital General Medicine, in press

## 5 7. 食道癌における Telomerase 活性の発現と臨床病理学的因子との関連について

島川武

(足立医療センター・外科)

〔目的〕 従来の Telomerase 活性測定法は、TRAP アッセイや ELISA 法が主流で様々な欠点があった。qPCR を用いる測定法は、コンタミネーションリスクが低く、簡便・迅速且つ高感度な測定が可能である。食道癌症例の内視鏡下生検組織と切除標本から得られた腫瘍組織と正常組織の Telomerase 活性を測定し、臨床病理学的因子との関連を検討している。

〔方法〕 測定組織は、生検および切除標本を使用。

＜測定法＞

- (1) 凍結保管 (-80℃) 組織を Quantitative Telomerase Detection Kit (QTD) Lysis Buffer で溶解
- (2) BCA 法にてタンパク質量を Spectrometer で測定
- (3) 組織上清と QTD Pre-mix 反応後 Ct 値を測定。検量線作成し Telomerase 活性を求める

〔結果〕 正常粘膜組織のテロメラーゼ活性値は極めて低値で、腫瘍組織では非常に高値であった。cStage 別では差はなかった。生検組織と切除標本の Telomerase 活性値はほぼ一致した。予後との関連は死亡例で有意に高値であった。

〔結論〕 生検組織でも、正確に Telomerase 活性値を測定可能。症例を蓄積することにより、予後因子としての応用も可能と考える。

〔文献〕

- 1) Piatyszek, M.A. et al. Detection of telomerase activity in human cells and tumors by telomeric repeat amplification protocol (TRAP). Methods in Cell Science 17, 1-15 (1995)
- 2) Shay, J.W. and Wright W.E. Telomerase activity in human cancer. Current Opinion in Oncology 8(1), 66-71 (1996)

〔学会発表〕

- 1) 第 116 回日本外科学会定期学術集会(2016)にて発表。

※現在、凍結標本を蓄積中。

## 58. 大腸癌における口腔内細菌叢および腸内細菌叢の関与

葭葉清香

(足立医療センター・歯科口腔外科)

〔目的〕 本研究では、大腸癌患者における唾液、糞便から検出された DNA について次世代シーケンサーを用いたメタゲノムのショットガンシーケンスを行い、大腸癌患者の病態・進行度に対する口腔および腸内細菌の構成異常の関与を明らかにし、有効な周術期口腔機能管理法の確立を行うことを目的とする。

〔方法〕 対象患者（大腸癌患者・健常者）における唾液と糞便より抽出された DNA について次世代シーケンサーを用いたメタゲノムのショットガンシーケンスを行い、大腸癌における口腔内細菌の病態・進行度への関与を菌種組成や菌叢の持つ機能について着目し解析する。

〔結果〕 2023 年度の進捗状況としては、臨床検体（唾液・糞便）から DNA 抽出を行うプロトコールについて検証した。また、そのプロトコールに沿って、収集した臨床検体から DNA 抽出を開始した。

〔考察〕 ビーズ破碎法を取り入れた DNA 抽出法で、微量臨床検体から DNA を回収するプロトコールを確立した。

〔結論〕 ビーズ破碎法を取り入れた DNA 抽出法で、微量臨床検体から DNA を回収するプロトコールを確立した。次年度の次世代シーケンサー解析に繋げていく予定である。

## 59. 糖鎖分子マーカーを用いた膵腫瘍の高感度診断システムの開発

樋口亮太

(八千代医療センター・消化器外科)

〔背景〕 膵癌は予後不良の癌腫で5年生存率は7.9%、本邦の膵癌死亡者数は35000人/年程度で増加傾向と報告されている(文献1)。最新の画像診断を駆使しても早期発見が難しく、転移を起こしやすいため進行した状態で診断される症例の多いことが予後不良の一因に挙げられている。膵癌治療の成績改善のためには早期発見と治療が重要であるが、既存の腫瘍マーカーは、炎症病態、胆汁うっ滞、糖尿病、喫煙などの影響を受けること、早期病変での診断精度が低いことから早期発見のためのスクリーニング法として十分とはいえない。腫瘍マーカーCarbohydrate antigen (CA) 19-9の感度は70-90%、特異度は68-91%と報告されている(文献2)。

近年、膵上皮内腫瘍性病変(PanIN)は、顕微鏡レベルで観察される、膵管内に生じる円柱上皮性の上皮増殖病変でlow gradeが前癌病変、high gradeは早期の膵癌であり、10年程度で浸潤癌になると考えられている(文献2)。PanINと膵萎縮の関連も指摘され(文献4)、切除例も増加傾向にある。PanInを効率よく診断できれば、治療成績の向上に寄与できると思われる。

〔目的〕 膵癌や膵上皮内腫瘍性病変(PanIN)などの膵腫瘍において、新しい糖鎖分子マーカーであるWFA-sialyl MUC1(Wisteria floribunda agglutinin-sialyl mucin core protein 1, 日本国特許5704570号, Hepatology 52:174-182, 2010)を用いて、多数の生体試料による検証を行う。

〔方法〕 複数の医療機関の協力体制のもとに、膵腫瘍の生体試料(血清, 膵液)と臨床情報を収集してライブラリーを作製し、各症例の血清と膵液におけるWFA-sialyl MUC1を測定する。膵腫瘍検体における、従来の腫瘍マーカー、WFA-sialyl MUC1、WFA-sialyl MUC1と従来の腫瘍マーカー または膵液細胞診のコンビネーション診断の診断感度・特異度の評価、ROC解析、膵腫瘍検体におけるステージ別の検出率評価、膵癌疑診例/ルイス陰性膵癌検体における診断感度と特異度を検討し、WFA-sialyl MUC1が膵腫瘍における実用的な分子マーカーとなりえるかを検証する。

〔文献〕

- 1) [https://ganjoho.jp/reg\\_stat/statistics/stat/summary.html](https://ganjoho.jp/reg_stat/statistics/stat/summary.html) 国立がん研究センターがん情報サービス
- 2) Goonetilleke KS, et al. Eur J Surg Oncol 33: 266-70, 2007.
- 3) Yachida S, et al. Nature 467: 1114-1117, 2010.
- 4) Nakahodo J, et al. Pancreatology 20, 1689-1697, 2020.



## 60. リ・フラウメニ症候群の日本人親子症例に対する遺伝子解析

郡山峻一<sup>1</sup>、小森明日香<sup>1</sup>、寺田麻貴子<sup>2</sup>、赤川浩之<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>脳神経外科学、<sup>2</sup>総合医科学研究所)

〔目的〕 リ・フラウメニ (Li-Fraumeni) 症候群 (MIM# 151623) は、家族性にがんを多発する常染色体顕性遺伝性疾患である。脳腫瘍や消化器のがんなど、さまざまな種類のがんを一般より若い年齢で発症し (本邦の診断基準では 45 歳未満)、ひとりの人が 2 種のがんを発症する場合もある。TP53 遺伝子に病的変異が検出されることにより診断が確定される。今回、脳腫瘍にて発症した父と息子の例を経験したので、診断および病態の更なる理解のため次世代シーケンシング解析を実施した。

〔方法〕 罹患者の父、非罹患者の母、および罹患者の息子より、書面による同意のもと末梢血 DNA を採取した。また、父と息子の脳腫瘍、および息子の消化器がんの摘出標本からも DNA を採取した。遺伝子解析は、まず発端者である父の末梢血 DNA と脳腫瘍 DNA に対し、全エクソームシーケンシング解析および DNA マイクロアレイ解析を実施した。全エクソームの濃縮は SureSelect Human All Exon キット V5 (アジレント社) にて行い、HiSeq シリーズシーケンサー (イルミナ社) にてシーケンシングを行った。検出されたバリエーションについては、3130xl Genetic Analyzer (サーモフィッシュサイエンティフィック社) を用いてサンガー法による確認を行った。DNA マイクロアレイは GeneChip 250K アレイ (アフィメトリクス社) にて行なった。息子の腫瘍 DNA については、Ion AmpliSeq Cancer Hotspot Panel v2 にてターゲットを濃縮し、次世代シーケンサー Ion PGM システム (サーモフィッシュサイエンティフィック社) にてシーケンシングを行った。

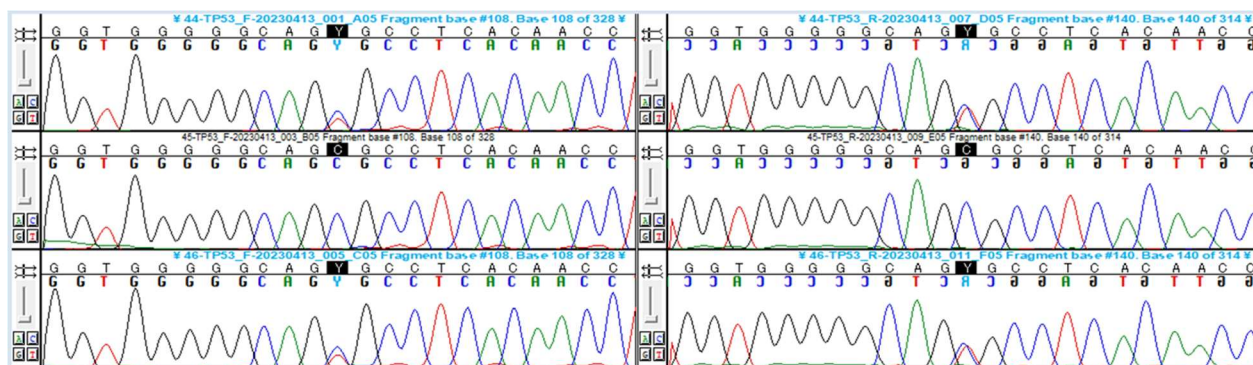
〔結果〕 罹患者の父および息子の末梢血 DNA から TP53 遺伝子に p.Arg175His (NM\_001126112.3:c.524G>A) 変異がヘテロ接合で検出された (図 1)。

図1. ゲノム DNA のシーケンシング結果(両方向から)

上段より、発端者：42 歳男性

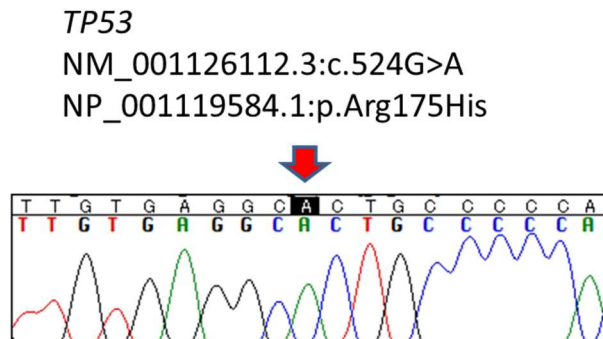
非罹患者家族：女性

罹患者子供：13 歳男児



この変異をサンガー法により父の腫瘍 DNA で確認した。その結果、見かけ上のホモ接合のクロマトグラムを呈した（図 2）。

図2. 発端者父の腫瘍 DNA のシーケンシング結果



〔考察・今後の計画〕 患者親子で検出された p.Arg175His 変異は ClinVar データベース (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>) に”Pathogenic”として収載されている既報の病的変異であり、リ・フラウメニ症候群の診断が確定した。父の腫瘍組織では *TP53* 領域においても一方の対立遺伝子が欠失していて、見かけ上ホモ接合のクロマトグラムを呈していると考えられた。DNA マイクロアレイのデータで検証を行う。また、息子の腫瘍組織 DNA に対する IonPGM シーケンシングも完了し、データを解析中である。病理組織所見も照応して腫瘍発生のメカニズムを詳細に検討する計画である。

〔発表論文〕

- 1) Saito T, Muragaki Y, Ro B, Tsuzuki S, Koriyama S, Masamune K, Horie N, Kawamata T. "Apathetic look" is a valuable indicator of intraoperative supplementary motor area syndrome during awake craniotomy. *Neurosurg Rev.* 2024 Sep 21;47(1):651. doi: 10.1007/s10143-024-02844-9. PMID: 39304542.

〔学会発表〕

- 1) 郡山峻一, 新田雅之, 都築俊介, 小林達弥, 呂聞東, 小森隆司, 増井憲太, 川俣貴一, 村垣善浩:「初発膠芽腫に対する自家腫瘍ワクチン療法のリアルワールドデータと免疫組織学的検討」第 42 回日本脳腫瘍学会学術集会、ポスター、2024 年 12 月 12 日（三重）
- 2) 郡山峻一, 新田雅之, 都築俊介, 呂聞東, 小森隆司, 増井憲太, 村垣善浩, 川俣貴一:「初発膠芽腫に対する自家腫瘍ワクチン療法のリアルワールドデータと免疫組織学的検討」日本脳神経外科学会 第 83 回学術総会、口演、2024 年 10 月 17 日（横浜）