

5 1. 体位性頻脈症候群 (POTS) におけるアドレナリン受容体抗体の研究

佐藤恭子^{1,2}

(¹東医療センター・リハビリテーション科、²東医療センター・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。有病率は 1/500 人で、若年の女性に好発する。発症機序として交感神経の過緊張、急性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 患者においてアドレナリン受容体自己抗体の関与が注目されているが、国内で実施できる自己抗体検査はなく、病因の特定や治療選択の点で大きな課題となっている。これまでの報告では POTS 患者における抗アドレナリン受容体抗体 ($\alpha 1$ 、 $\alpha 2$ 、 $\beta 1$ 、 $\beta 2$) の関与¹⁾のほか、自己免疫性自律神経節障害患者においても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陽性例が知られている²⁾⁻⁴⁾。今回の検討ではアドレナリン受容体に対する IgG 自己抗体に焦点を置き、自律神経機能、神経液性因子による循環動態と、臨床的フェノタイプとの関連を調査する。

〔方法〕 【被験者登録とスクリーニング検査の施行】

これまで東京女子医科大学東医療センターで登録された約 60 名及び新しく発症した POTS 患者の中で、臨床検査参加の同意を頂いた者を対象とし、3 年間の研究期間内に 30 名の患者登録を目指す。具体的には、立位時の症状が 6 ヶ月以上続いており、原因となる他の疾患や服薬などが無いもので、起立試験にて立位 10 分以内に心拍が安静臥位より 30bpm 以上上昇する対象者を組み入れる。登録者には担当医による病歴聴取・診察の後、スクリーニング検査として一般生化学検査、12 誘導心電図、起立試験を行う。年齢・性別をマッチさせた健常人も同様にスクリーニング検査を施行する。

	ベースライン (5分間臥位安静)
	0.1 Hz 呼吸統制 (3分間深呼吸):洞性不整脈 ・ 副交感神経(心臓迷走神経)の評価
	過呼吸 (30秒間): ・ 呼吸性アルカローシスによる脳血管収縮誘発→ 遠心性交感神経低下→血圧低下と末梢血管拡張
	Valsalva試験 (15秒間いきみ) ・ 圧受容器反射弓の評価
	ハンドグリップ試験 (3分間) ・ 筋肉、心臓への交感神経遠心路
	寒冷昇圧試験 (1分間) ・ 交感神経遠心路

【循環自律神経機能評価】自律神経機能検査 (AFT, 図 1): 検査当日、被験者は心電図、連続血圧測定装置を装着され、図 1 に示すプロトコルに従い AFT が行われる。本検査は米国 Vanderbilt 大学 Autonomic Dysfunction Center にて長年定型的な心臓自律神経機能法として用いられている方法である。深呼吸、過呼吸、バルサルバ試験、ハンドグリップ、寒冷昇圧試験により、心臓迷走神経、交感神経遠心路、圧受容器反射弓を評価する。

図 1. 自律神経機能検査(AFT)

【起立試験】AFT終了後に被験者の立位負荷に対する心拍血圧応答の評価を行う。心電図、連続血圧モニターを装着の上採血のための留置カテーテルを前腕部に挿入する。20分以上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する。採血後、被験者に能動的立位を取ってもらい、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う。能動的立位負荷は最長30分間施行する。終了時もしくは症状出現して中止する直前に起立前と同様の採血を行う。また、起立試験前後で9項目10段階評価による起立不耐症症状評価票にて症状の評価を行う。

【アドレナリン受容体自己抗体測定実験】

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 (β_1) や血管平滑筋 (α_1 , β_2) に存在し中枢神経系シナプス前 (α_2) にも存在する。それぞれの抗アドレナリン受容体 IgG 抗体をウエスタンブロッティング法 (WB) より検討する^{5),6)}。実際には既に WB でアドレナリン受容体発現が確認されている A-375 (human melanoma, skin lymph node)、Hs294T (human melanoma, skin)、SK-N-MC (human neuroblastoma) の細胞ライセートを電気泳動し、WB 用のメンブレンにトランスファーし患者血清とインキュベートする。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) を用いて血清中の抗アドレナリン受容体自己抗体の存在の有無を検討する。陽性コントロールとしては市販の抗ヒトアドレナリン受容体抗体を用いて WB を行う。

【データマネジメントと統計処理】

得られた全てのデータは連結可能匿名化された後、リレーショナルデータベースに入力され、R(version 4.1.1.)、JMP Pro (version 16) によって統計処理される。検査結果報告書、症例報告書等個人情報が入力された書類は東医療センター内科にある施錠可能な保管庫にて保存する。

〔結果〕 WB 実験では POTS 患者 5 名の血清サンプルの提供を受けた。現在、このサンプルを用いて実験中である。

〔考察〕 今後、このサンプルを用いて実験系の最適化を行い、臨床データ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. β -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 2 . Serum Tryptase Levels as a Biomarker for Anaphylaxis in Pediatric Patients

Tomoko Otani, Midori Kotani, Norihiko Azuma, Yuko Kunii, Sachiyo Hagiwara and Shigetaka Sugihara

(Department of Pediatrics, Tokyo Women's Medical University Medical Center East)

[Purpose] Background: This study aimed to examine the clinical characteristics and symptoms of immediate food-related allergic reactions in pediatric patients in order to evaluate the validity of using serum tryptase level measurements to diagnose anaphylaxis in these patients.

[Methods] Methods: Twenty-five subjects were retrospectively enrolled from patients who presented to the pediatric department of Tokyo Women's Medical University Medical Center East with immediate food-related allergic reactions. Their serum tryptase levels were measured, and the underlying allergens were detected. The patients' medical records were retrospectively investigated for relevant clinical characteristics and symptoms. Patient symptoms were scored using the Anaphylaxis Scoring Aichi (ASCA), and ROC curve analysis was used to determine the diagnostic validity of using serum tryptase levels for determining anaphylaxis.

[Results] Results: Ten cases (40%) were diagnosed as anaphylaxis. The median serum tryptase level in the anaphylaxis cases was 12.7 µg/L, significantly higher than the median of 6.2 µg/L in the non-anaphylaxis cases ($p < 0.0043$). Significant correlations were observed between serum tryptase levels and ASCA total scores ($p = 0.007$). Ten of 11 cases (90.9%) with an ASCA total score of 40 or higher were anaphylaxis cases.

Additionally, the ROC curve of the serum tryptase levels in the diagnosis of anaphylaxis was prepared. The cut off serum tryptase level was 7.0 µg/L.

[Conclusions] Conclusions: Serum tryptase levels correlate with immediate food-related allergic reactions in pediatric patients, and measurement of serum tryptase levels in these patients may prove useful for the diagnosis of anaphylaxis.

[Conference Presentation]

日本アレルギー学会演題採択、発表予定。

5.3. 希釈性凝固障害モデルにおける APTT 凝固波形解析

市川順子、小森万希子

(東医療センター・麻酔科)

〔目的〕 活性化部分トロンボプラスチン時間 (APTT) の凝固波形解析 (CWA) による凝固能評価は血友病の重症度診断や血栓症や播種性血管内凝固症候群の補助的診断に用いられる。APTT-CWA が大量出血時の凝固機能評価としてどのくらい有用であるか未だ不明である。そこで、我々は、*in vitro* で希釈性凝固障害モデルを作成し、APTT-CWA の各パラメータと凝固因子濃度との関連を明らかにした。

〔対象と方法〕 健常者ボランティア 10 人を対象として、肘静脈より採血を行い、3.2%クエン酸 Na 入り採血管に注入後、遠心分離 (2000 g、20 分) を行い、少血小板血漿 (PPP) を作成した。PPP に 0.9%生理食塩水を添加し、10、20、30、40、50、60、70 から 80%までの希釈性凝固障害モデルを作成した。各検体において第 II、VIII、IX、X 凝固因子活性及び APTT-CWA のパラメータである最大凝固速度 (min1)、最大凝固加速度(min2)を CS-2000 (Sysmex) で測定し、両者の相関につき評価した。

〔結果〕 希釈前の凝固因子活性は正常であり、4 つの凝固因子活性は希釈度に応じて一直線上に変化した (図 1)。PPP の 60%希釈により、凝固因子活性が正常下限の 40%に達する一方、APTT 値は 30%希釈により基準値と比較して有意に延長し、40%希釈で異常値になり (表 1)、線形ではなく曲線状の変化を示した。一方、APTT-CWA パラメータである min1、min2 はそれぞれ 10%、20%の希釈で基準値と比較して有意に変化し、希釈度に応じた線形変化を示した。各凝固因子活性と APTT 値との相関は約 0.51~0.78 と有意であったが、CWA パラメータである min1、min2 は第 II、IX、X 凝固因子活性と強い相関があり (表 2)、低濃度の凝固因子活性も反映した。

〔考察〕 CWA は光の透過度の経時的な変化を波形で表示し、血餅形成の全過程を反映する。この波形を特徴づける 4 つのパラメータとして光の透過度が減少始める時間に相当する APTT、波形の加速度や減速度を表す min1,min2 透過度の変化を表す delta などがある。今回の研究で、波形の加速度や減速度を表すパラメータは凝固因子活性と強い相関を示し、時間のパラメータである APTT とは異なる指標であることが示唆された。APTT 値はフィブリン形成を最初に認めた時点であり、全トロンビンの 5% が生成したに過ぎず、フィブリンポリマー形成はそれ以降とされる¹⁾。凝固因子の補充の指標として、PT-INR が 2.0 以上、APTT が基準の上限の 2 倍以上とされるが、これらは出血量を反映する指標としては相関が小さく²⁾、加速度や減速度の指標も含めた APTT-CWA パラメータは血液製剤投与の指標としてより有用な可能性がある。

〔結語〕 *In vitro* の希釈性凝固障害のモデルにおいて、APTT-CWA のパラメータである min1 および min2 は凝固因子活性と相関して変動し低濃度の凝固因子活性も鋭敏に反映した。

[文献]

- 1) Claude Negrier, Midori Shima, Maureane Hoffman. (2019) Blood Rev. PMID: 31164248
- 2) Wolberg AS.(2010) Haemophilia. 16 Suppl 3:7-12.

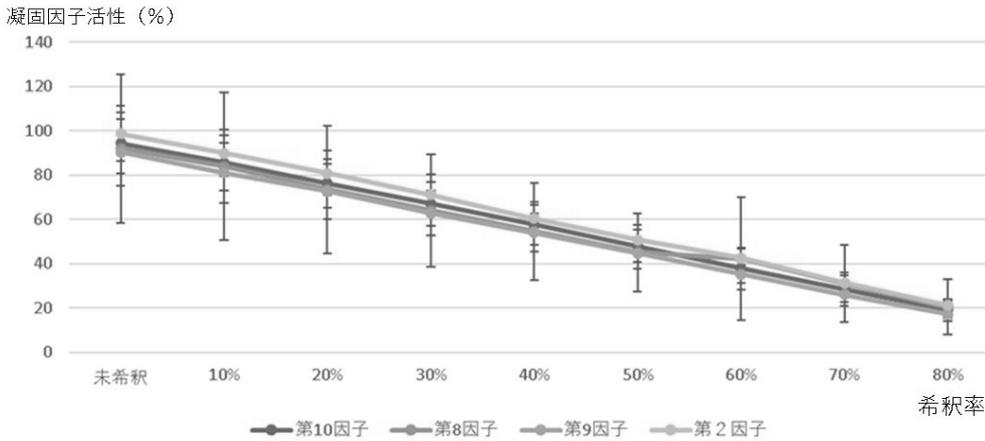


図 1. 生理食塩水による希釈が凝固因子活性に及ぼす影響

表 1. 生理食塩水による希釈が血液凝固機能検査および APTT-CWA のパラメータに及ぼす影響

	PT	PT-INR	APTT	Fib	AT3	最大速度	最大加速度
未希釈	11.5±0.7	0.99±0.07	32.8±2.5	224.9±41.6	98.2±7.2	3.25±0.65	0.48±0.10
10%	11.9±0.8	1.03±0.09	33.6±2.6	199.4±37.9	87.6±7.8*	2.95±0.61*	0.43±0.10
20%	12.5±1.1*	1.09±0.11*	34.6±3.3	179.5±40.5*	80.3±12.7*	2.65±0.68*	0.39±0.11*
30%	13.4±1.2*	1.18±0.12*	37.6±3.9*	153.2±30.8*	67.6±7.9*	2.20±0.56*	0.32±0.09*
40%	15.1±1.0*	1.35±0.10*	42.7±4.8*	125.0±20.4*	55.2±4.3*	1.68±0.39*	0.24±0.06*
50%	17.0±1.3*	1.54±1.36*	51.2±6.9*	105.7±16.5*	44.8±4.2*	1.23±0.31*	0.16±0.05*
60%	19.6±1.7*	1.81±0.19*	62.3±9.5*	93.6±12.5*	36.8±2.7*	0.86±0.17*	0.10±0.03*
70%	25.0±2.7*	2.38±0.31*	93.1±16.1*	73.3±9.4*	26.8±2.7*	0.40±0.08*	0.04±0.01*
80%	37.0±4.8*	3.71±0.58*	105.6±67.2*	44.4±18.6*	16.0±1.7*	0.15±0.02*	0.01±0.03*

平均値±標準偏差 *P<0.05 vs 未希釈

表 2. 各凝固因子活性と APTT-CWA パラメータの相関(r)

	第Ⅹ凝固因子	第Ⅷ凝固因子	第Ⅸ凝固因子	第Ⅱ凝固因子
APTT(s)	-0.775*	-0.514*	-0.728*	-0.770*
最大速度(% Ts-1)	0.888*	0.418*	0.866*	0.906*
最大加速度(%Ts-2)	0.896*	0.444*	0.875*	0.909*

*P<0.0001

5 4. 食道癌におけるテロメラーゼ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

(東医療センター・外科)

〔目的〕 従来のテロメラーゼ活性測定法は、煩雑で解析に必要な組織量が多いなどの欠点があった。これに対し、リアルタイム PCR を用いる測定法は、コンタミネーションが低く、簡便で迅速に定量的な測定が可能である。今回われわれは、食道癌症例の内視鏡下の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テロメラーゼ活性値を測定し、臨床病理学的因子との関連を検討した。

〔方法〕 測定した組織は、生検：13 例、切除標本：2 例、生検および切除標本：10 例。測定法は、(1) 凍結保管した組織を Quantitative Telomerase Detection キット(QTD)中の Lysis Buffer で溶解、(2) BCA 法にてタンパク質量を測定、(3) 組織上清と QTD Pre-mix を反応させ、Ct 値を測定し、QTD キット中の標準物質から換算しテロメラーゼ活性値を求めた。

〔結果〕 正常粘膜組織のテロメラーゼ活性値は 0.001 ± 0.001 amol/ μ l、腫瘍組織では 0.165 ± 0.218 amol/ μ l であり、正常粘膜組織では極めて低値で、腫瘍組織では非常に高値であった。cStage 別では、I: 0.465、II: 0.024、III: 0.163、IVa: 0.197、IVb: 0.070 と差はみられなかった。正常粘膜組織にはテロメラーゼ活性はほとんどなく、腫瘍組織では有意に高値であった。死亡例では活性値は有意に高値であった。生検組織と切除標本の活性値はほぼ一致した。予後との関連でみると死亡例： 0.194 ± 0.239 、生存例： 0.033 ± 0.056 と死亡例で有意に高値であった。

〔結論〕 本法によれば生検組織でも、正確にテロメラーゼ活性値を測定できる。さらに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。

〔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。

現在も凍結標本を蓄積中です。但し一部試薬が入手困難となり、直ぐには再測定ができない状況です。

55. トリプルネガティブ乳癌における PD-L1 発現と化学療法の治療効果および予後に関する検討

湯川寛子、平野明、黒住昌史

(東医療センター・乳腺診療部)

〔目的〕 トリプルネガティブ乳癌における腫瘍細胞および腫瘍浸潤免疫細胞の PD-L1 発現状況と Atezolizumab を用いない従来の化学療法効果および予後との相関を明らかにする。

〔方法〕 予後の判明している 2008 年から 2014 年の間に当院で治療したトリプルネガティブ乳癌における腫瘍細胞および腫瘍浸潤免疫細胞の PD-L1 発現状況と化学療法効果および予後について検討する。さらに腫瘍浸潤免疫細胞は T-cell, cytotoxic T-cell, マクロファージのマーカーである CD3,CD8,CD68 の染色を行い、各陽性細胞の数を測定する。

〔結果〕 抗 PD-L1 抗体による免疫染色を完了し、陽性細胞の測定中である。

〔考察〕 未

〔結論〕 未

5.6. 免疫学的便潜血装置の性能評価に関する検討

土屋蘭菜¹、武田孝太¹、林信子¹、植村文江¹、山田辰一¹、三浦ひとみ^{1,2}、加藤博之¹
 (1 東医療センター・検査科、2 中央検査部)

〔目的〕 便中 Hb 測定は、免疫学的便潜血検査として大腸がん検診のスクリーニングや下部消化管疾患の診断補助検査として広く普及している。当施設では栄研化学（株）の自動分析装置 OC-SENSOR io（以下 io）を使用しているが、後継機として OC-SENSOR Ceres（以下 Ceres）が開発され、性能評価を行ったので報告する¹⁾。

〔方法〕 検討機器は Ceres で専用試薬として OC-ヘモディアオートⅢ‘栄研’（R1, R2 セット品）、Hb キャリブレーション C6 ‘栄研’ および OC-マルチ検体希釈液 ‘栄研’ を用いた。対精度管理用コントロール用試薬には Hb コントロール ‘栄研’ L、L を 2 倍希釈した N、Hb コントロール ‘栄研’ H および高濃度 Hb 試料（Hb 濃度 544,000ng/mL）を使用した。

性能評価の検討項目として併行精度試験、室内再現精度試験、直線性試験、検出限界および定量限界、プロゾーン試験、キャリーオーバー試験、自動希釈精度試験を行った。io との相関性試験の対象には同意が得られた当院の患者の残余検体 150 件を用いた。（倫理委員会承認番号 5400）

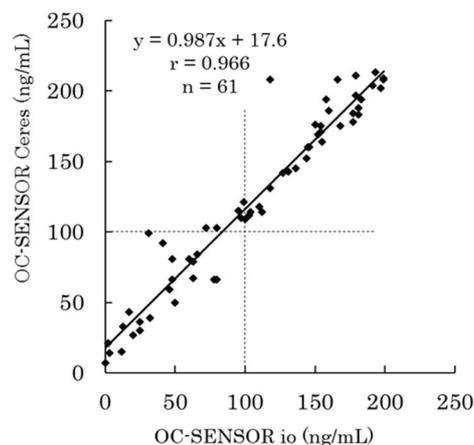


図 1. 相関性試験（カットオフ値付近）

〔結果〕 併行精度試験は各コントロールを 20 回連続測定し、CV は 1.1~3.1%であった。室内再現精度試験は、1 日 2 回、10 日間、各々 2 重測定し、CV は 2.0~5.2%であった。直線性試験はキャリブレーションの 10 段階希釈系列を作製し各々 3 重測定した。測定上限 1,000ng/mL まで原点を通る直線性を示した。

表 1. カットオフ値を 100ng/mL とした時の一致率

		OC-SENSOR Ceres		
		+	-	total
OC-SENSOR io	+	123	0	123
	-	5	22	27
	total	128	22	150

ブランク上限値（LOB）は、検体希釈液を連続 12 回、5 日間測定し、検出限界（LOD）および定量限界（LOQ）は、50ng/mL 試料の 5 段階希釈系列を作製し、1 日 2 回 5 日間測定した。バリデーション算出プログラム²⁾より求めた結果、ノンパラメトリック法で、LOB は 2.0ng/mL、LOD は 6.7ng/mL であり、CV10%点における LOQ は 29.4ng/mL であった。

プロゾーン試験は、高濃度 Hb 試料を倍々希釈し測定した結果、1,000ng/mL 以上はオーバーレンジとなり偽低値化はなく、プロゾーン現象は認められなかった。キャリーオーバー試験は、高濃度 Hb 試料の後に、検体希釈液の 2 回測定を 3 回繰り返した結果、キャリーオーバー率は 0.0013%以下であった。

自動希釈精度試験は、5,440ng/mL の Hb 溶液を 10 倍、20 倍の自動希釈にて 5 回測定し、54,400ng/mL 溶液を 100 倍、200 倍、400 倍の自動希釈にて 5 回測定した。CV は 0.6~2.1%、理論濃度に対する回収

率は93.5～105.2%であった。

相関性試験は、対照機器との相関性を評価した。また、カットオフ値を100ng/mLとした時の一致率を求めた。全体の相関では、相関係数 $r=0.994$ 、回帰式 $y=0.933x+24.7$ であった。カットオフ値100ng/mL付近の相関については、相関係数 $r=0.966$ 、回帰式 $y=0.987x+17.6$ であった(図1)。一致率は、96.7%であったが、判定不一致は5件で、全てCeres陽性、io陰性であり、その逆はなかった(表1)。

〔考察〕 検討機器の測定原理は、ラテックス凝集反応を用いた免疫比濁法である。ラテックス表面に結合させた抗ヒトHbウサギポリクローナル抗体と検体中のHbが反応し、凝集する。この反応を660nmの波長における濁度変化として捉え、既知濃度標準の検量線により検体中のHb濃度が得られる。

Ceresの性能評価はいずれも良好な結果で、追加機能の「試薬保冷機能」により、試薬の劣化による影響が回避されたためと考える。測定範囲内で原点を通る直線性が得られ、検出限界(LOD)、定量限界(LOQ)は、当施設のカットオフ値100ng/mLからみても問題ない結果であった³⁾。プロゾン現象は認められず、キャリアオーバー率も全く影響ないレベルであった。自動希釈精度は、各希釈倍率で理論値に対して良好な回収率が得られた。従来機器では、高濃度検体の希釈をマニュアルで行っているため、利便性が向上し、業務の効率化が期待できる機能であると考ええる。

対照機器とのカットオフ値付近での相関性も良好であり、一致率は、96.7%と高かった。判定不一致は5件で、便検体の中の夾雑物など検体の性状も関与していると考えられるが、大きな乖離ではなかった。スクリーニング検査として、発見の機会を向上させ、精査に繋げることも重要な役割であり、上記結果より、測定機器として使用することは問題ないと考ええる。

〔結論〕 Ceresの性能評価は良好な結果であり、日常検査における基本性能を有することが確認できた。また、処理能力や操作性の向上に加え、検査項目の拡充や、新たに試薬管理機能の搭載がされていることから有用性が増しており、免疫学的便潜血検査において、広く活用されることが期待される。

〔文献〕

- 1) 藤森勲、梅原貴子、坪地利美、他。(1996) 免疫学的便潜血検査. 検査と技術 24(8): 607-611
- 2) 山本慶和、細萱茂美、桑克彦、他。(2011) 日本臨床化学会クオリティマネジメント専門委員会. 定量測定法に関するバリデーション指針. 臨床化学 40(2): 149-157
- 3) 加藤博之。(2013) 潜血陽性の有無を正しく判定するためのサンプリング、保存安定性、病態識別値. 臨床検査 57(11): 1216-1217

〔発表論文〕

- 1) 土屋蘭菜、武田孝太、林信子、他。(2021) 免疫学的便潜血装置の性能評価の検討. 医療と検査機器・試薬 44(3): 265-270

〔学会発表〕

- 1) 土屋蘭菜、武田孝太、林信子、他. 新規開発された免疫学的便潜血小型装置の基本性能評価. 第52回日本医療検査科学会、横浜、2020/10

57. 血中ウロモジュリンの臨床的意義に関する研究

臼井亮介¹、小川哲也²、新田孝作³、小池美菜子¹

(¹八千代医療センター・腎臓内科、²東医療センター・内科、³腎臓内科学)

〔背景・目的〕 近年、血中ウロモジュリン (serum uromodulin: sUmod) が新規腎バイオマーカーとして注目されている。我々もこれに注目し、独自に ELISA キットを樹立した。続いて、多施設共同臨床研究 (「血中ウロモジュリンの臨床的意義に関する研究 (承認番号: 4602)」) を展開し、第一報として sUmod 値が推算糸球体ろ過量 (eGFR) と正の高相関関係にあること、また、クレアチニン (Cr) では検出できないより早期の腎機能低下を検出し得ることを報告した¹⁾。これまでの sUmod 研究は、他研究グループ含めて、全身状態が安定している時の sUmod 値がバイオマーカーとして有用であるというものである。一方で、急性腎障害 (AKI) 時の sUmod に関する知見はまだ得られていない。現在、AKI の病態における sUmod 測定の臨床的意義につき検証を進めており、本稿ではその一部を報告する。

〔方法〕 AKI 症例において sUmod の測定と評価を行った。本稿では紙幅の関係上、2 症例概要のみ提示する。sUmod 値はオリジナル ELISA キットを使用して測定した。図は各症例の sUmod 値と Cr 値の推移を記したものである。表に我々のキットによる推算 GFR 値に対する sUmod 値を示す¹⁾。

〔結果〕 症例 1 は 70 歳男性で、薬剤性横紋筋融解症による AKI 症例である (Cr 2.44mg/dL, CK 85528IU/L)。AKI 発症直前の腎機能は、Cr 0.9mg/dL, eGFR 64ml/min/1.73m² であった。当該薬の中止と治療輸液により腎機能は改善した。sUmod 値は入院後上昇した後に下降に転じ、その後安定推移した。

症例 2 は熱中症・脱水症による腎前性 AKI 症例である。AKI 発症直前の腎機能は、Cr 0.8-0.9mg/dL, eGFR 65-75ml/min/1.73m² であった。腎機能は治療輸液を行い速やかに改善した。sUmod 値は低下した後に、上昇に転じ、その後安定化した。

〔考察〕 症例 1 は横紋筋融解症による急性尿細管障害 (acute tubular injury: ATI) で AKI を来した症例である。横紋筋融解症における AKI の原因は筋由来内因性蛋白質ミオグロビンによる強い尿細管毒性による。ミオグロビンは ATI を来すが糸球体障害や間質性腎炎は来さない。ATI の代表的な動物実験モデルは、腎虚血再灌流モデルであり、その急性期に sUmod 値が上昇することが報告されている²⁾。本症例の sUmod は入院後に上昇し、ヒト ATI でも sUmod が上昇することが初めて観察された。

また、表を参照し、AKI 発症前の腎機能 (eGFR64ml/min/1.73m²) と治療後の腎機能 (eGFR57ml/min/1.73m²) から治療後 sUmod 値を見ると、治療後 sUmod 値は腎機能から推定される sUmod 値と比べて低値に見える。sUmod は生存ネフロン数を反映しているとされていることから、高度な ATI により尿細管障害が不可逆的となりウロモジュリン発現量の恒常的な低下に至れば sUmod 値も低くなると予想される。この仮説が正しければ、AKI 発症前の sUmod 値を把握できる症例においては、AKI エピソードによって失われたネフロン量の評価や、AKI 治療の評価マーカーとして sUmod を利用できる可能性が考えられる。なお、周知の事実だが、通常診療における腎機能マーカーである Cr では尿細管障害を評価できず、Cr 値がブライント領域に入る症例においては AKI 後遺症の評価はでき

ない。

症例2は腎前性AKIの症例である。腎再灌流の遅れはATIに至り、その重症度が腎機能改善やAKI後遺症に影響を及ぼすため、腎前性AKIの治療方針は、腎再灌流を可及的速やかに進めることである。症例1や参考文献2からは、ATIに至った場合にsUmod値は上昇することが理解できるが、症例2では入院時と治療後sUmod値が同程度であることからATIに至っていないことが予想される。つまり、症例1では入院時にはすでにATIに至っていたこと、症例2ではATIに至る前に治療輸液が開始されたことを意味するのかもしれない。症例2におけるsUmod値の推移は、腎虚血による尿細管でのウロモジュリン発現量の低下からsUmodが次第に低下し、その後再灌流が得られたことによるウロモジュリン発現量の回復によりsUmod値が元に戻ったと考えられる。

本研究の最大のlimitationはAKI発症前のsUmod値が把握できなかったことである。AKIの発症頻度は低くないが、発症前から前向きに観察することは難しい。しかし、縦断データから多数の仮説が得られ、今後の検証に役立つと考えられる。

表1. sUmod値とeGFR値

CKD stage	median sUmod (ng/mL)
non-CKD	257.7
eGFR \geq 90	256.3
90 > eGFR \geq 60	248.3
60 > eGFR \geq 45	165.9
45 > eGFR \geq 30	119.3
30 > eGFR \geq 15	56.7
15 > eGFR	32.9

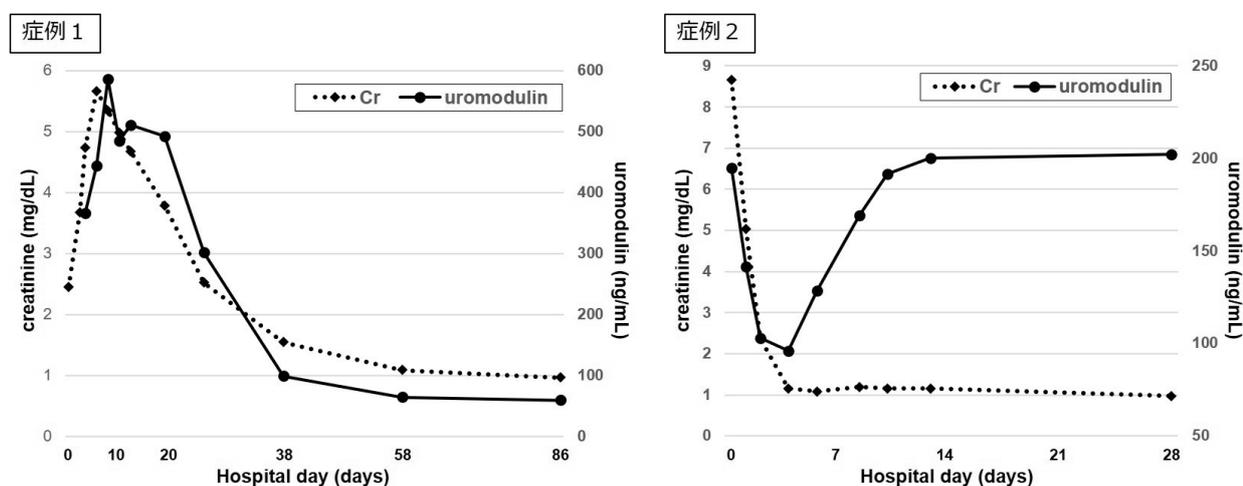


図1. sUmod値とCr値の経過表

〔結論〕 AKIにおいて特徴的なsUmodの推移が確認された。sUmodは病態把握や治療評価等に利用できるツールとなる可能性があり、引き続きsUmod測定 of 臨床的意義につき検証を続ける。

〔文献〕

- 1) Usui R, Ogawa T, Takahashi H, et al.(2021)Clin Exp Nephrol25:28-36
- 2) El-Achkar TM, McCracken R, Liu Y. et al. (2013)Am J Physiol Renal Physiol.304:F1066-1075

58. 甲状腺未分化癌における T-cell immunoreceptor with immunoglobulin and tyrosine-based inhibitory motif domains (TIGIT) 蛋白の発現

中澤匡男

(八千代医療センター・病理診断科)

〔はじめに〕 甲状腺未分化癌は最も予後の悪い上皮性悪性腫瘍の一つとして広く知られており、有効とみなされる治療法は現在までない。近年の免疫療法の進歩・発展により、甲状腺未分化癌に対してもそれらの効果が期待される¹⁾。甲状腺癌においては代表的な免疫チェックポイント蛋白である PD-1/PD-L1 に関して、いくつかの報告がなされているが、それ以外の検討は少ない^{2,3)}。未分化癌の腫瘍細胞形態は多彩であり、一般的に好中球主体であるものの炎症細胞を多く含むものが多い。また、腫瘍発生に複数の経路のゲノム、エピゲノム異常が関与していることを考慮すると、腫瘍免疫に係する微小環境も他の良性腫瘍や分化癌とは異なる、と推定される。本研究の目的は最近注目されている新しい免疫チェックポイント蛋白 TIGIT の発現を未分化癌で明らかにすることである。

〔材料と方法〕 材料は生検もしくは切除により得られた甲状腺結節のホルマリン固定パラフィン包埋組織である。前年度に検討した症例の内訳は腺腫様甲状腺腫 7、濾胞腺腫 13、濾胞癌 17、乳頭癌 24 例であったが、今年度は低分化癌 12 例を加えた。方法は市販の一次抗体である抗 TIGIT ウサギポリクローナル抗体 (Abcam 社、製品番号 ab243903) を用いて免疫組織化学法を行った。

〔結果〕 非腫瘍性甲状腺組織内での免疫細胞ではマクロファージ、少数のリンパ球に陽性を示した。腫瘍組織での染色性は非腫瘍性組織での結果と有意な差は認めなかった。腫瘍細胞においては、腺腫様甲状腺腫、濾胞腺腫、分化癌は陰性。未分化癌 34 例中 19 例、55.4%に陽性であった(表 1)。陽性症例の未分化癌では多形/巨細胞型の腫瘍細胞の一部に弱～強陽性像が観察された。一方、上皮様、紡錘形の腫瘍細胞には陰性であった。低分化癌では、12 例中 3 例、25.0%に陽性であった(図 1)。

表 1. 腫瘍細胞 (上皮) での TIGIT 発現

組織型	症例数	陽性例 (%)
腺腫様甲状腺腫	7	0
濾胞腺腫	13	0
濾胞癌	11	0
乳頭癌	26	0
低分化癌	12	3 (25.0%)
未分化癌	34	19 (55.9%)

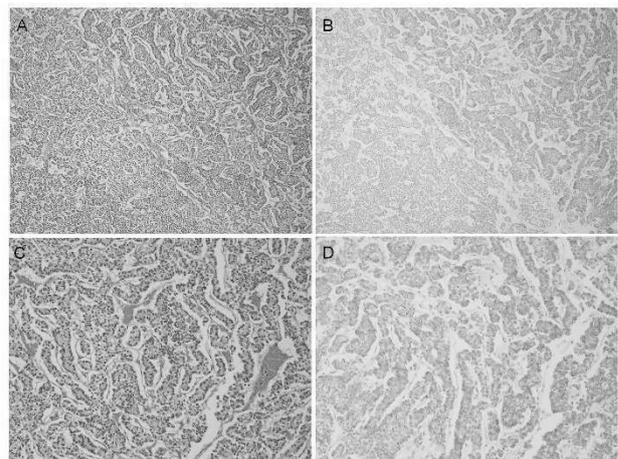


図 1. 甲状腺低分化癌における TIGIT 免疫染色

〔考察〕 TIGIT は PD-1 や CTLA-4 と同様、チェックポイント蛋白の受容体として機能する。T 細胞などの免疫担当細胞に発現することで腫瘍免疫の回避に作用することは一般的であるが、腫瘍細胞での発現の意義は十分に解明されていない。しかしながら本研究結果と同様の腫瘍細胞での受容体発現が複数報告されており、阻害剤による抗腫瘍効果も証明されている^{4,5)}。また、CTLA-4 においてはリガン

ドとの相互作用でアポトーシスを促進することが培養細胞を用いた実験で示されている⁵⁾。本研究では甲状腺未分化癌の多くに TIGIT の発現がみられ、特定の細胞形態を示す腫瘍細胞には特に高発現がみられた。今回追加で検討した低分化癌は乳頭癌、濾胞癌などの予後良好な癌と未分化癌の中間的な生物学的態度を示す甲状腺癌として知られており、TIGIT 蛋白の発現もそれを反映する結果であった。以上より、腫瘍細胞における TIGIT の発現は腫瘍免疫療法のターゲットの候補になり得ると思われた。さらに病理診断的価値を有するとともに、甲状腺癌の予後因子としても有用であると思われた。

〔文献〕

- 1) Rosenberg SA, Restifo NP. Adoptive cell transfer as personalized immunotherapy for human cancer. *Science*. 2015;348:62-68
- 2) Chintakuntawar AV, Rumila KM, Smith CY, *et al*. Expression of PD-1 and PD-L1 in anaplastic thyroid carcinoma patients treated with multimodal therapy: results from a retrospective study. *J Clin Endocrinol Metab*. 2017;102:1943-1950
- 3) Ahn S, Kim TH, Kim SH, *et al*. Comprehensive screening for PD-L1 expression in thyroid cancer. *Endocr Relat Cancer*. 2017;24:97-106
- 4) D'Incecco A, Andreozzi M, Ludovini V, *et al*. PD-1 and PD-L1 expression in molecularly selected non-small-cell lung cancer patients. *Br J Cancer*. 2015;112:95-92
- 5) Contardi E, Palmisano GL, Tazzari PL, *et al*. CTLA-4 is constitutively expressed on tumor cells and can trigger apoptosis upon ligand interaction. *Int J Cancer*. 2005;117:538-50

〔発表論文〕

- 1) 未 (英文誌に投稿、査読中)

〔付記〕

1. 東京女子医科大学臨床研究倫理委員会 承認番号 5580. タイトル「甲状腺未分化癌における腫瘍免疫機構の解明」.
2. 伊藤病院病理診断科 加藤良平先生との共同研究 (利益相反なし)
3. 文部科学省科学研究費 基盤(C) 課題番号/領域番号 19K07432. タイトル「甲状腺未分化癌の新しい腫瘍免疫プログラム」研究代表者 中澤 匡男

〔図 1 の figure legend〕

図 1. 甲状腺低分化癌における TIGIT 免疫染色. A) 腫瘍細胞が充実性もしくは索状に増殖している (HE 染色標本). B) これらの細胞の一部に TIGIT 陽性 (右上). C) 腫瘍細胞の核は円形～卵円形、細胞質は好酸性 (HE 染色標本). D) TIGIT は陽性で、染色強度は弱～中等度.

5.9. 薬理活性化合物の作用機序解析を志向した細胞表現型プロファイリングの比較

田邊賢司

(総合研究所研究部)

〔目的〕 低分子化合物や天然化合物を含む多くの薬理活性化合物が、基礎と臨床の両研究分野で開発、利用されている。しかし化合物の正確な作用機序を解明することは難しい。その要因として、生体内には数万種類に及ぶタンパク質、脂質が存在するため、その全てに対する薬理活性を生化学的に検証することは現実的に不可能であること、たとえ薬理活性が認められたとしても、その活性と生体の示す表現型が直接結びつくかは別問題であることなどが挙げられる。そこで近年、化合物が引き起こす表現型を統計的に解析することでその薬理活性を効率的に解明するアプローチがとられている。我々も最近、化合物に暴露された細胞の表現型を画像解析で定量化し、得られた特徴量を統計的に解析することで作用機序を明らかにする手法を開発した^{1),2)}。本手法では、上皮成長因子による刺激下での表現型に着目することで、特定のシグナル伝達経路に関連した作用機序を明らかにした。その一方、米国のグループからは複数のオルガネラの形態に着目したプロファイリング手法である「CellPainting」が開発され³⁾、成果が上げられている⁴⁾。本研究では、我々が構築したプロファイリング手法と、CellPaintingを比較することで、両者の特徴を明らかにする。

〔方法〕 ヒト肺がん由来細胞株 A549 を 384 ウェルプレートに播種し、DMEM+10%FBS に抗生物質（ペニシリン、ストレプトマイシン、アンホテリシン B）を加えた培地で二日間培養した。その後、既存薬理活性化合物 361 種を含む SCADS ライブラリーに 1 時間暴露した。それぞれの化合物は最終濃度 10 μ M となるように添加した。化合物暴露 30 分後に MitoTracker Deep Red (Invitrogen) を添加し、さらに 37°C で 30 分培養を行った。その後、3.2%パラホルムアルデヒドにて 20 分間固定、0.1% Triton X-100 で 10 分間透過処理を行なった。続いて染色液 (Alexa568-Phalloidin、Alexa488-Concanavalin A、Hoechst 33342、Alexa555-WGA、SYTO14、全て Invitrogen) にて 30 分間室温で反応させ、洗浄後、撮影まで 4°C で保存した。撮影は ImageXpress micro XLS (Molecular Device 社) で 20 倍の対物レンズを用いて行なった。全ての操作について、独立した 2 回の実験によって再現性を確認した。

〔結果〕 384 ウェルプレート 2 枚について、1 ウェルにつき 9 視野ずつ 5 色を撮影し、計 34,560 枚の画像を得た。コントロール (DMSO 添加) のサンプルから得られた写真を図 1 に示す。核と小胞体、ミトコンドリアはそれぞれ単独で検出される一方、核小体と RNA、アクチンとゴルジ体、細胞膜は複数の対象物が重ね合わさった形で検出された。CellPainting によるシグナルは細胞の種類によって大きく異なるが、本研究で用いている A549 細胞においては過去の報告³⁾と概ね一致しており、実験系は問題なく稼働したと考えられる。現在、得られた画像を用いて CellProfiler 及び CellProfiler analyst (Broad Inst., USA) による画像解析を進めており、我々のプロファイル手法との違いについて検証を進めている。

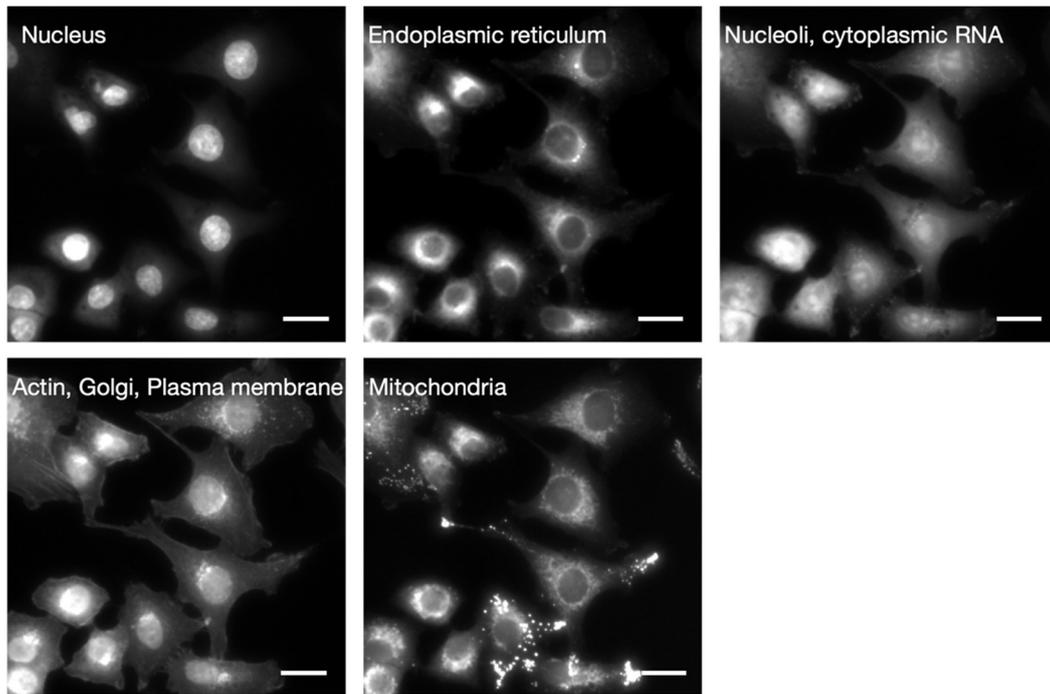


図1. CellPainting 法による細胞内小器官の染色. 核(Nucleus)を Hoechst 33342、小胞体(Endoplasmic reticulum)を Alexa 488-ConcanavalinA、核小体(Nucleoli)と細胞質 RNA を SYTO14 で、アクチン(Actin)を Alexa568-Phalloidin)、ゴルジ体(Golgi)と細胞膜(Plasma membrane)を WGA、ミトコンドリア(Mitochondria)を Mitotracker deep red で染色した。(スケールバー=20 μ m)

〔文献〕

- 1) Tanabe. (2016) Sci. Rep. 6: 25095
- 2) Tanabe. (2021) BioRxiv. 440090
- 3) Bray MA, Singh S, Han H, et al. (2016) Nat. Protocols. 11: 1757-74
- 4) Nyffeler J, Willis C, Lougee R, et al. (2020) Toxicology and Applied Pharmacology. 389: 114876