

2012 年度
共同研究等助成事業報告集

財団法人 日中医学協会

財団法人 日中医学協会

2012 年度共同研究等助成事業報告集目次

1. 調査・共同研究

迫	康仁	中国で蔓延している人獣共通寄生虫症（囊虫症）の迅速・簡便な検査法の開発・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・	1
田中	英明	毛髪形成維持に関わる神経軸索ガイダンス分子 draxin の機能解析・・	7
横山	耕治	フサリウム症原因菌と畑土壌のフサリウム属菌の生態に関する研究・調査・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・	11
陳	昱	耳音響放射検査による幼児中耳貯留液診断の生体力学基礎のシミュレーション解析・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・	16
小野	直樹	多孔質マイクロ流路による腫瘍血管内の血流力学挙動に関する研究・・	24
羽尾	裕之	循環器疾患の病態に関与する新規バイオマーカーの探索・・・・・・・・	33
王	立楠	CEA 特異的キメラ抗原受容体導入 T 細胞を用いたがんに対する養子免疫療法の開発・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・	37
袁	博	フラボノイド併用による三酸化ヒ素の新規抗がん作用に関する基盤的研究・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・	42
西岡	安彦	Focal adhesion kinase を標的とした肺線維症に対する分子標的治療の開発・・	48
秦	亮	中国上海市中病院における <i>Acinetobacter baumannii</i> の水平伝播及び薬剤耐性状況についての研究・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・	52
國土	典宏	システムバイオロジーを駆使した肝細胞癌の病態制御機構の総括的解析	57
鈴木	康夫	鳥インフルエンザウイルスのヒト適応変異におけるウイルスヘマグルチニンおよび受容体破壊酵素（ノイラミニダーゼ）の役割に関する研究・・	64

左	一八	受容体糖鎖構造に基づくウイルス機能阻害剤探索	69
井上	孝	歯牙形成におけるシグナルカスケードの解析と、生体外による歯牙硬組織、 歯牙再生に関する研究	74
八若	保孝	機能性ナノ材料および生体化学物質を応用した新しい修復材料の応用と評 価	76
片田	範子	肥満児童の体質と血圧との関連に関する日中比較研究	81

2. トラベルグラント

山内	広平	第62回日本アレルギー学会秋季学術大会	88
----	----	---------------------	----

財団法人 日中医学協会

2012 年度共同研究等助成金報告書－調査・共同研究－

2013 年 3 月 8 日

財団法人 日中医学協会 御中

貴財団より助成金を受領して行った調査・共同研究について報告いたします。

添付資料：研究報告書

受給者氏名： 迫 康仁
所属機関名： 旭川医科大学
所属部署名： 寄生虫学講座 職名： 講師
所在地： 旭川市緑が丘東 2 条 1 丁目
電 話： 0166-68-2422 内線：



1. 助成金額： 1,000,000 円

2. 研究テーマ

中国で蔓延している人獣共通寄生虫症(囊虫症)の迅速・簡便な検査法の開発

3. 研究組織：

日本側研究者氏名： 迫 康仁	職名： 講師
所属機関名： 旭川医科大学	部署名： 寄生虫学講座
中国側研究者氏名： 李 調英	職名： 教授
所属機関名： 四川省疾病管理予防センター	部署名： 寄生虫病研究所

4. 当該研究における発表論文等

研究成果の一部を International Symposium on Cestode Zoonoses Control

(Oct. 29-30, Shanghai, China)および Joint International Tropical Medicine

Meetin 2012 (Dec. 12-14, Bangkok, Thailand)で口頭発表した。

現在、投稿準備中である。

中国で蔓延している人獣共通寄生虫症(囊虫症)の迅速・簡便な検査法の開発

研究代表者 迫 康仁
所属機関 旭川医科大学寄生虫学講座
中国共同研究者 李 調英
中国研究機関 四川省疾病管理予防センター

要旨：

有鉤囊虫症(cysticercosis cellulosa)は、有鉤条虫(*Taenia solium*)の幼虫である囊虫が筋肉、皮下、脳などに寄生することにより引き起こされる疾患であり、豚とヒトとの間で感染環が維持されている致死的人畜共通感染症である。また、本症は流行地域における癲癇発作の主な病因と考えられている。有鉤囊虫症の検査の一つに、ELISA 法やイムノプロット法を用いて特異抗体を検出する血清検査法がある。現行の血清検査法は、信頼できる検査結果を提供するが、一方、特殊な設備とある程度の経験が必要であるため、臨床現場や流行現場で迅速な検査を行うことが出来ないという問題点がある。したがって、新たな血清検査法の開発が望まれている。最近、迅速・簡便な検査を提供できる汎用性の高い検査法として、イムノクロマトグラフィー(ICT)法が注目されている。そこで、本研究では、組換え有鉤囊虫症血清抗原を用いたイムノクロマトグラフィー法の開発を行った。その結果、従来の ELISA 法と同程度の検査性能を持つ血清検査法を開発することが出来た。今後、安定性・再現性に関する検討を、より多くの血清を用いて行う必要がある。

key words：有鉤囊虫症、血清検査、組換え抗原、イムノクロマトグラフィー法

緒言：

有鉤囊虫症は、有鉤条虫(*Taenia solium*)囊虫の感染に起因する疾患である。*T. solium*の終宿主はヒトであり、中間宿主は豚であるが、ヒトは偶発的に有鉤条虫の虫卵を経口摂取した場合あるいは自家感染により中間宿主となり有鉤囊虫症を引き起こす。特に神経症状を引き起こす脳有鉤囊虫症は临床上重要であり、流行地域における癲癇発作の主な病因となっている(1)。

本症の診断には、主に CT、MRI などの画像診断が適用されており、その有用性が示されているが、寄生虫の寄生数が少ない場合あるいは典型的な画像所見を示さない場合はその感染を見逃す可能性が高い。また、コストの点より流行地域、特に発展途上国において画像診断を適用することは困難である。したがって、患者血清中の有鉤囊虫特異抗体を検出する免疫学的診断法は、確定診断を行うための補助情報を提供する重要な役割を担っている(2)。以前、我々は有鉤囊虫に特異的な組換え抗原を用いた ELISA 法およびイムノプロット法による血清検査法を開発し、その有用性を示した(3)。しかしながら、通常の検査で使用している ELISA 法および IB 法は、特殊な器具を使用する必要があり、臨床現場で

の使用が制限されている。それに対し、イムノクロマトグラフィー法(ICT法)に基づく検査法は、特別な器具を必要とせず、さらに迅速・簡便に、病原体の抗原あるいは病原体に対する抗体を検出出来る方法として知られている。本研究では、イムノクロマトグラフィー法を用いた有鉤囊虫症の抗体検出検査法を開発し、ELISA法との検査性能に関する比較を行った。

対象と方法：

血清：解析に用いたヒト血清は、中国・四川省カンゼ・チベット族自治州雅江県(Yajiang)の有鉤囊虫症流行地に於いて行われた住民検診で採取されたものである。四川省疾病管理予防センターのスタッフにより、研究目的が住民に説明され、同意を得た住民の血清のみを使用した。本研究には、有鉤囊虫症特異抗原を用いた検査により陽性を示した血清を用いた。対照として用いた多包虫症血清、単包虫症血清および陰性コントロール血清は、四川省疾病管理予防センターが保有する血清であり、これらも住民の同意を得たものである。

組換え抗原の発現および精製：本研究で使用した抗原は、大腸菌の系を用いて発現させた。有鉤囊虫症特異的抗原である、低分子量抗原 Ag1V1 および Ag2 を用いた(3)。また、有鉤囊虫症血清の一部は、これらの抗原に弱陽性を示すため、同じファミリータンパク質に属する抗原 10kAg-3 ならびに 10kAg-9 も使用した。4 抗原を、グリシン 5 残基をスペーサーとし、連結させたキメラ抗原(Tsol4Ags)として発現させた(図 1. A)。ただし、Ag2 ならびに 10kAg-9 抗原は、全長では大腸菌に毒性を示すため、エピトープ領域解析の結果を基に、Ag2 は N 末端および C 末端領域を、10kAg-9 は中央領域を保持する形で発現させた。発現させた組換えタンパク質は、ニッケルアフィニティークロマトグラフィーにより精製した。

イムノクロマトグラフィー法：精製 Tsol4Ags(1mg/ml)およびウサギ抗ヤギ IgG 抗体(1mg/ml)を、それぞれテストラインおよびコントロールラインとして、約 1mm 幅でニトロセルロース膜上に塗布した。乾燥後、1%スキムミルク溶液に浸漬してブロッキングした後、再び乾燥させた。約 5mm 幅の短冊状に切断した後、抗原塗布面を上にして台紙に貼付し、反応膜とした。その後、吸収パッドおよび基質レザーバーと共に、サンプル添加窓と展開溶液添加窓を持つイムノクロマトグラフィーカセットに装着した。血清 10 μ l とアルカリフォスファターゼ標識ヤギ抗ヒト IgG 抗体(0.1mg/ml)20 μ l をチューブ内で混合後、混合液 20 μ l をサンプル添加窓に添加した。添加後速やか(30 秒以内)に、展開液 200 μ l を展開溶液添加窓に添加し、静置した。20 分後、テストラインおよびコントロールライン部の発色により判定を行った。発色には、5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate (BCIP)を用いた。その後、バンド強度をイムノクロマトリーダーで測定し数値化した。相対バンド強度は、テストラインのバンド強度数値をコントロールラインのバンド強度数値で割ることにより算出した。

統計学的解析：検査性能に対してはマクネマー検定およびカッパー係数の算出により比較を行い、相関の解析はスピアマンの順位相関係数を求めることを行った。

結果：

(1) 組換え抗原の発現および精製

安定した検査法を供給するには、大量の抗原が必要である。そこで、有鉤囊虫症血清診断用抗原として評価の高い、低分子量抗原 Ag1V1 および Ag2、ならびにそのファミリータンパク質 10kAg-3 および 10kAg-9 の大腸菌による発現を試みた。Ag1V1 および 10kAg-3 に関しては、大量発現に成功した。しかしながら、Ag2 および 10kAg-9 は大腸菌に対する毒性が強く、十分量の組換えタンパク質を得ることが出来なかった。Ag2 および 10kAg-9 抗原は、診断用抗原としての能力が高いため、高感度検査法を確立するには必須である。そこで、Ag2 のエピトープ領域は N-および C-末端に、10kAg-9 のエピ

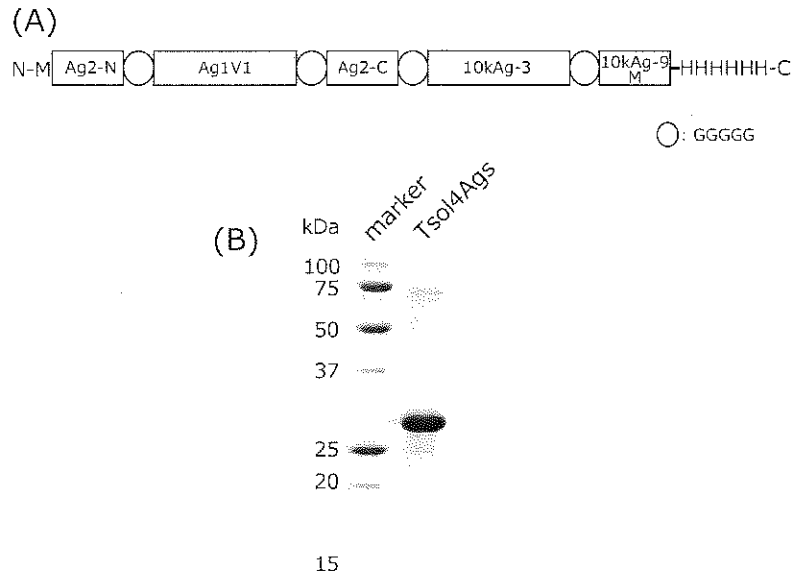


図1. Tsol4Ags の構造 (A) と精製組換え Tsol4Ags の SDS-PAGE 像 (B)

トープ領域は中央部に存在していることが判明していたため(未発表データ)、両抗原エピトープ領域のみの発現を試みた。また、4 種の抗原をそれぞれ発現させるのではなく、全抗原を、グリシン残基をスペーサーとして連結させたキメラ抗原(Tsol4Ags)として発現させた(図1. A)。特に、Ag1V1 抗原を Ag2 抗原の中央部位に挿入し、Ag2 の立体構造の破壊を行うことにより、大腸菌に対する毒性を減弱することが出来るのではないかと予測し、発現実験を行った。その結果、予測分子サイズ 30kDa の組換え抗原の大量発現に成功した(図1. B)。

(2) イムノクロマトグラフィー法に基づく有鉤囊虫症血清検査法の開発

イムノクロマトグラフィー法を用いた血清検査の構築時に、予備実験として、有鉤囊虫の包虫液より精製した native 抗原と組換え Tsol4Ags 抗原との比較を行った。その結果、イムノクロマトグラフィー法の抗原としては、組換え Tsol4Ags が適していることが明らかとなった(未発表データ)。そこで、以降の実験には組換え Tsol4Ags 抗原を用いた。イムノクロマトグラフィー法では、図2に示すように、血清検査陽性の場合テストラインおよびコントロールラインに発色が、血清検査陰性の場合コ

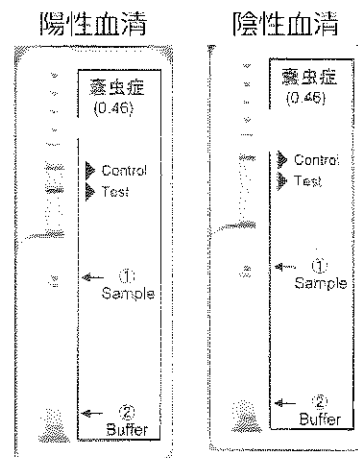


図2. 陽性血清および陰性血清を用いた ICT 法の結果

ントロールラインのみに発色が観測される。

(3) イムノクロマトグラフィー法の評価

本研究で開発したイムノクロマトグラフィー法の有鉤囊虫症血清検査としての評価を、有鉤囊虫症、多包虫症、単包虫症および陰性コントロール血清を用いて行った(表1および表2)。多包虫血清および単包虫症血清は、それぞれの血清診断抗原 Em18 (4)およびAntigenB (5)に強陽性を示したものを使用した。その結果、全ての有鉤囊虫症血清、13.3%の多包虫血清および40%の単包虫症血清が陽性と判断された。また、全ての陰性コントロールは、陰性であった。

検査性能に関して、従来の血清検査法である ELISA 法との間に統計学的差は認められなかった($P = 0.371$)。

また、ELISA 法との一致率は 93.1% (κ 係数 = 0.859) であった。これより、イムノクロマトグラフィー法の有用性が示された。さらに、イムノクロマトグ

ラフィー法で得られた相対バンド強度は、ELISA で得られた吸光度と強い相関を示した(図3. $R_s = 0.732$, $P = 0.0000215$)。

表1. 各血清に対する ICT 法と ELISA 法の結果

血清由来	検体数	ICT 法	ELISA 法
		陽性数(%)	陽性数(%)
有鉤囊虫症	22	22 (100)	22 (100)
多包虫症	15	2 (13.3)	3 (20.0)
単包虫症	15	6 (40.0)	8 (53.3)
陰性コントロール	20	0	0

多包虫症血清および単包虫症血清は、それぞれの診断抗原に強陽性を示しものを使用した。

表2. ICT 法と ELISA 法との比較

ICT 法	陽性数	ELISA 法 陰性数	合計
陽性数	29	1	30
陰性数	4	38	42
合計	33	39	72

一致率 = 93.1% ; κ 係数 = 0.859

考察 :

本研究では、大腸菌に対する毒性が強かったために、大量調製が困難であった有鉤囊虫症診断用抗原の大量発現に成功した。また、それを用いたイムノクロマトグラフィー法に基づく迅速・簡便な有鉤囊虫症血清検査法を開発した。

開発したイムノクロマトグラフィー法の検査性能を、有鉤囊虫症血清、多包虫症血清、単包虫血清および陰性コントロール血清を用いて評価した

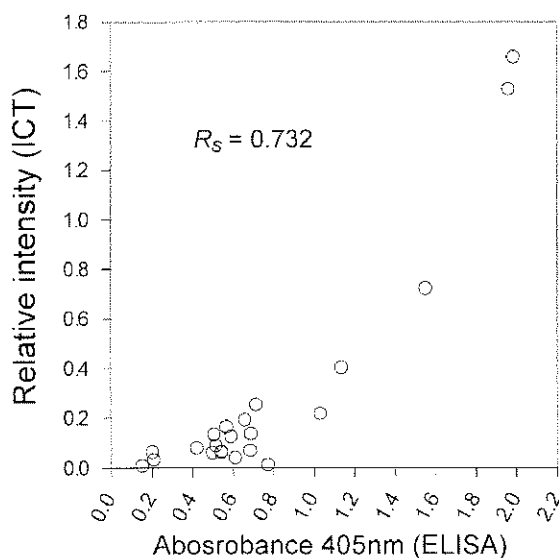


図3. 相対バンド強度(ICT法)と吸光度(ELISA法)の散布図
有鉤囊虫症血清 (20例) を用いた結果。スピアマン順位相関係数($R_s = 0.732$)

ところ、従来の血清検査に用いられている ELISA 法と同程度の検査性能を持つことが明らかとなった。本研究で用いた血清は、それぞれの血清診断抗原に陽性を示すものである。つまり、血清選択の際に、ある程度のバイアスが存在しており、本来の各疾患の集団を反映しているものではない。したがって、今後、さらに多くの血清を用いて評価を行わなければならない。

イムノクロマトグラフィー法は、①専門知識、経験および特別な器具が必要ない、②比較的短時間(20 分)で検査結果を得ることが出来る、などの利点を持っている。そのため、イムノクロマトグラフィー法は、臨床現場における迅速かつ適切な治療の提供を可能とする検査法であり、また、設備の乏しい流行地現場でのスクリーニングツールとして使用できる検査法であると考えられる。今後、イムノクロマトグラフィー法の安定性・再現性に関して検討しなければならない。

参考文献：

1. Mahanty, S., Garcia, H.H. (2010) Cysticercosis and neurocysticercosis as pathogens affecting the nervous system. *Prog Neurobiol* 91, 172-184.
2. Ito, A., Craig, P.S. (2003) Immunodiagnostic and molecular approaches for the detection of taeniid cestode infections. *Trends Parasitol* 19, 377-381.
3. Sako, Y., Nakao, M., Ikejima, T., Piao, X.Z., Nakaya, K., Ito, A. (2000) Molecular characterization and diagnostic value of *Taenia solium* low-molecular-weight antigen genes. *J Clin Microbiol* 38, 4439-4444.
4. Sako, Y., Nakao, M., Nakaya, K., Yamasaki, H., Gottstein, B., Lightowers, M.W., Schantz, P.M., Ito, A. (2002) Alveolar echinococcosis: characterization of diagnostic antigen Em18 and serological evaluation of recombinant Em18. *J Clin Microbiol* 40, 2760-2765.
5. Mamuti, W., Yamasaki, H., Sako, Y., Nakao, M., Xiao, N., Nakaya, K., Sato, N., Vuitton, D.A., Piarroux, R., Lightowers, M.W., Craig, P.S., Ito, A. (2004) Molecular cloning, expression, and serological evaluation of an 8-kilodalton subunit of antigen B from *Echinococcus multilocularis*. *J Clin Microbiol* 42, 1082-1088.

財団法人 日中医学協会

2012年度共同研究等助成金報告書—調査・共同研究—

2013年 3月 6日

財団法人 日中医学協会 御中

貴財団より助成金を受領して行った調査・共同研究について報告いたします。

添付資料：研究報告書

受給者氏名：田中英明

所属機関名：熊本大学大学院生命科学研究部

所属部署名：神経分化学分野 職名：教授

所在地：熊本市中央区本荘1-1-1

電話：096-373-5292 内線：5292



1. 助成金額： 100万 円

2. 研究テーマ

毛髪の形成維持に関わる神経軸索ガイダンス分子draxinの機能解析

3. 研究組織：

日本側研究者氏名：田中英明

職名：教授

所属機関名：熊本大学大学院生命科学研究部

部署名：神経分化学分野

中国側研究者氏名：蘇 玉紅

職名：副教授

所属機関名：中国河北医科大学

部署名：人体解剖学教研室

4. 当該研究における発表論文等

未発表

毛髪の形成維持に関わる神経軸索ガイダンス分子 draxin の機能解析

研究者氏名

教授 田中英明

日本所属機関

熊本大学大学院生命科学研究部神経分化学分野

中国研究者氏名

副教授 蘇 玉紅

中国所属機関

河北医科大学人体解剖学教研室

〈要 旨〉

我々の脳機能は、発生過程において正しく形成される神経回路網に依存する。発生過程の神経細胞はお互いに連結することが運命付けられた神経細胞に向かって軸索を伸ばし、軸索ガイダンス分子群の制御によってこの軸索成長は可能となり、正しい標的細胞に到達する。我々は、分子探索によって、draxinと命名した新規の分泌型タンパクである軸索ガイダンス分子を見出し、その受容体が DCC(Deleted in Colorectal Carcinoma)であることを明らかにした。さらに、DCC が生体内で受容体として機能するかどうかを明らかにするため、draxin(+/*LacZ*)とDCC(+/-)のダブルヘテロマウス draxin(+/*LacZ*)/DCC(+/-)を作製したところ、それぞれの単独ヘテロマウスでは観察されない脳梁形成異常が観察され、DCC が Draxin 受容体として働いていると結論した。

この研究過程で、ダブルヘテロマウス draxin(+/*LacZ*)/DCC(+/-)のヒゲが消失することを見出した。draxin の発現を*LacZ* の染色で確認したところ、draxin は毛の根本にある毛乳頭に選択的に発現し、DCC は毛根から毛母全体に発現しているものの、毛乳頭には発現していない。毛乳頭は発毛と育毛にとって重要な栄養素や酵素、BMP のようなシグナル伝達分子を分泌する細胞であり、Draxin もそのような役割を果たしていることが推察された。

〈Key Words〉

毛髪、毛球、毛乳頭、draxin、DCC(Deleted in Colorectal Carcinoma)

〈本文〉

緒 言

軸索ガイダンス分子探索過程から draxin を発見し(1)、その受容体が DCC(Deleted in Colorectal Carcinoma)であることを明らかにした過程から(5)、ダブルヘテロマウス draxin(+/*LacZ*)/DCC(+/-)のヒゲが消失することを見出し、そのメカニズムを解析することを計画した。

研究対象と方法

マウスのヒゲ領域を対象にして、免疫組織化学、電気穿孔法による遺伝子導入を、野生型マウス、draxin(+/*LacZ*)か DCC(+/-)のシングルヘテロマウス、ダブルヘテロマウス draxin(+/*LacZ*)/DCC(+/-)を対象にして解析する。

結 果

1)野生型や DCC と draxin の単独ヘテロ、draxin のホモマウスでは正常ながら(図1左)、ダブルヘテロマウス DCC(+/-)/draxin(+/-)ではヒゲが脱落し、皮膚が見えている(図1右)。

2) マウスを固定し、皮膚を LacZ の酵素反応染色をすると、毛の根本の毛乳頭に選択的に色素が沈着する(図2右)。ホールマウント観察から、ヒゲの太い毛の毛乳頭では大きな染色像が得られ、体毛で小さな染色が観察された(図2左)。

図 1

(+/+), DCC(+/-), draxin(+/-), draxin(-/-) マウス

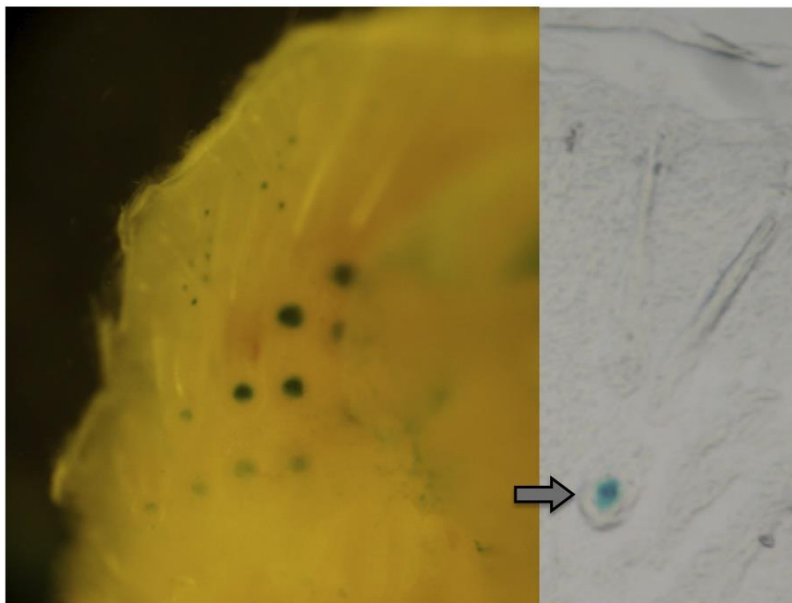
DCC(+/-)/draxin(+/-) マウス



図 2 LacZ 染色

ホールマウント皮下から観察

切片像



考 察 :

我々が発見した軸索ガイダンス分子 draxin は全脳の交連神経(脳梁、海馬交連、前交連)形成に必須である重要な分子であるが(1、6)、軸索ガイダンスばかりではなく、神経冠細胞の移動(2)や脊髄介在神経の移動(4)も調節している。さらには、draxin 遺伝子欠損マウスの海馬では神経細胞死が誘導され海馬が萎縮することから、栄養因子的な働きもしている(3)。今回の研究から、draxin は毛髪の成長維持にも関与することが明らかとなり、幅広い生物活性を持つ重要な因子であることが明らかになった。さらに、毛髪での draxin 受容体としても DCC である可能性が高いと思われる組織分布が既に報告されている(7)。今後は、draxin によってどのようなシグナルが入るのか、draxin タンパクが発毛を増進する塗り薬とし

て使えるのかどうかなど、興味深い疑問点を明らかにする予定である。

参考文献：

1. Islam S.M., Shinmyo, Y., Okafuji, T., Su, Yuhong., Naser I.B., Ahmed, G., Zhang, S., Chen, S., Ohta, K., Kiyonari, H., Abe, T., Tanaka, S., Nishinakamura, R., Terashima, T., Kitamura, T. and Tanaka, H. (2009).

Draxin, a Repulsive Guidance Protein for Spinal Cord and Forebrain Commissures.

Science 323, 388–393.

2. Su, Yuhong, Naser, I. B., Islam, S. M., Zhang, S., Ahmed, G., Chen, S., Shinmyo, Y., Kawakami, M., Yamamura, K.-I., Tanaka, H. (2009)._Draxin, an axon guidance protein, affects chick trunk neural crest migration.

Dev Growth Differ. 51, 787–796.

3. Zhang, S., Su, Yuhong, Shinmyo, Y., Islam, S. M., Naser, I. B., Ahmed, G., Tamamaki, N., Tanaka, H. (2010). Draxin, a repulsive axon guidance protein, is involved in hippocampal development.

Neurosci. Res. 66, 53–61.

4. Su Yuhong, Zhang, S., Islam, S. M., Shinmyo, Y., Naser, I. B., Ahmed, G., Tanaka, H. (2010). Draxin is involved in the proper development of the dl3 interneuron in chick spinal cord.

Dev Dyn. 239, 1654– 1663.

5. Ahmed G., Shinmyo Y., Ohta K., Islam S., Hossain M., Naser IB., Asrafuzzaman R., Su Y., Zhang S., Tessier-Lavigne M. & Tanaka H. (2011). Draxin Inhibits Axonal Outgrowth through the Netrin Receptor DCC.

J. Neurosci. 31, 14018–14023.

6. Hossain M, Ahmed G, Bin Naser I, Shinmyo Y, Ito A, Asrafuzzaman Riyadh M, Felemban A, Song X, Ohta K, Tanaka H. (2013). The combinatorial guidance activities of draxin and Tsukushi are essential for forebrain commissure formation.

Dev Biol. 374, 58–70.

7. Combates NJ., Chuong C-M., Stenn KS., Prouty SM. (1997). Expression of Two Ig Family Adhesion Molecules in the Murine Hair Cycle: DCC in the Bulge Epithelia and NCAM in the Follicular Papilla.

J Invest. Dermatol. 109, 672–678.

作成日：2013年3月6日

財団法人 日中医学協会


2012 年度共同研究等助成金報告書－調査・共同研究－

2013 年 3 月 11 日

財団法人 日中医学協会 御中

貴財団より助成金を受領して行った調査・共同研究について報告いたします。

添付資料：研究報告書

受給者氏名： 横山 耕治 
所属機関名：千葉大学 真菌医学研究センター
所属部署名：病原機能研究分野 職名：准教授
所在地：千葉市中央区亥鼻 1-8-1
電話：043-226-2789 (直) 内線：5917

1. 助成金額： 90 万 円

2. 研究テーマ

フサリウム症原因菌と畑土壌のフサリウム属菌の生態に関する研究・調査

3. 研究組織：

日本側研究者氏名： 横山 耕治	職名：准教授
所属機関名：千葉大学 真菌医学研究センター	部署名：病原機能
中国側研究者氏名： 王 麗	職名：教授
所属機関名：吉林大学 白求恩医学院	部署名：病原生物学 教室

4. 当該研究における発表論文等

Dan He, Jilong Hao, Bo Zhang, Yangiu Yang, Wengang Song, Yunfeng Zhang, Koji Yokoyama, and Li Wang : Pathogenic Spectrum of Fungal Keratitis and Specific Identification of *Fusarium solani*. Immunology and Microbiology Investigative Ophthalmology & Visual Science, 52(2011),5,2804-2808

フザリウム症原因菌と畑土壌のフザリウム属菌の生態に関する 研究・調査

研究者氏名	准教授 横山 耕治
日本所属機関	千葉大学 真菌医学研究センター
中国研究者氏名	教授 王 麗
中国所属機関	吉林大学 白求恩医学院

調査概要：

フザリウム属菌は、角膜真菌症を起こし、*Fusarium solani* によることが多い。本菌属は抗真菌剤に対して抵抗性を示し抗真菌剤による治療を難しくしている。更に、本菌属には植物病原菌を含み、作物に大きな被害を出すことから、多量の農薬を使うことがあり、薬剤に対する耐性を獲得し更に薬剤耐性を高めていると考えられる。従って、フザリウム症原因菌と畑土壌のフザリウム属菌の生態を調査、研究する必要性と緊急性が求められている。本研究課題は吉林大学王教授と2006年以来継続して行っており、本研究助成により中国山西省、甘粛省の調査、日本飛騨、能登の調査を行なった。

中国で66試料、日本国内16試料を採取した。菌の分離作業は続いているが、現在までに分離した菌は、中国で156株、日本で15株を分離した。本調査対象であったフザリウム属菌18株、*Aspergillus niger* 近縁株33株であった。遺伝子型の解析は現在進行中である。

Key Words：フザリウム症原因菌、フザリウム属菌の生態

調査目的：

フザリウム属菌は、病原菌、植物病原菌を含み、真菌の中でも重要な菌群であり、植物病原菌は作物に大きな被害を出すことがあり、特に重要視されている。また、病原真菌として角膜真菌症を引き起こす菌を含んでおり医真菌の分野でも重要な菌群である。

病原真菌の中でフザリウム属菌は治療に用いられる抗真菌剤に対して抵抗性を示し、治療を難しくしている。更に、農業分野では大量の農薬を使用することにより、薬剤耐性菌の出現が懸念されている。

従って、フザリウム症原因菌と畑土壌のフザリウム属菌の生態を調査、研究は緊急の課題になっている。一方、本属菌は、形態的な特徴に乏しく形態的な分類が困難な菌属でもある。本菌属の分類、同定にはDNA解析が不可欠である。我々は、ミトコンドリア・チトクローム b 遺伝子の部分解析により病原真菌と近縁菌の遺伝子分類を進めてきた。このチトクローム b 遺伝子（約400bp）の解析で、真菌の同定が可能で、種内の変異も解析できることを示してきた。

本調査では、山西省、河南省、甘粛省の土壌を採取し、吉林大学で菌の分離を行い、日本での調査は飛騨、能登の土壌を採取し千葉大真菌医学研究センターで菌の分離を行い、中国と日本で分離した菌株は、吉林大学と千葉大学で保存し、千葉大で遺伝子の解析を行うこととした。

本研究調査とこれまでに継続してきた研究調査を含めてフザリウム属菌の遺伝子解析と薬剤耐性を調べることで、臨床分離株と環境分離株の遺伝子分類による株間遺伝子型と薬剤耐性の関係を明らかにしたい。

調査方法：

吉林省、貴州省の試料は、吉林大学で採取し、山西省（平成24年6月11日～17日）、河南省・甘粛省（平成24年9月9日～20日）、王教授を招へい（平成24年11月8日～15日）し、飛騨、能登の調査を行った。

フザリウムの選択培地として、知られる駒田培地を市販が中止された農薬（PCNB：75%水和剤）に変えて、その主成分であったPentachloronitrobenzene 22mgをDMSO（Dimethyl sulfoxide）1mlに溶解し500mlにくわえて変法駒田培地として、フザリウム選択培地として使用した。

変法駒田培地組成、作成法：組成（500ml水溶液中）

A液：300mlの脱塩水に
10g D(+)-ガラクトース
1g L-アスパラギン(1水和物)
1g KH₂PO₄
250mg KCl
250mg MgSO₄・7H₂O
5mg Fe(III)-EDTA
7.5g 寒天

オートクレーブ滅菌後約60℃まで冷ます。

B液：200mlの脱塩水に
250mg コール酸ナトリウム(=オックスゴール)
0.5g Na₂B₄O₇・10H₂O
150mg ストレプトマイシン硫酸塩
を溶解し、ポアサイズ0.2μmのフィルターで除菌したものを
A液（約60℃）に加える。

C液：22mg PCNB(Pentachloronitrobenzene)を
1ml DMSO(Dimethyl sulfoxide)に溶解し、
A+B液にC液を加える。

この時点で、pH6.8位なので、10%リン酸（約2ml）を加え、10%リン酸でpH3.8に調整する。シャーレーに流し込んで固化させる。

採取した土壌は1gを10mlの滅菌水に懸濁し、PDA(ポテトデキストロース寒天)培地及び変法駒田培地プレートに0.1mlを均一に塗布し、25℃にて培養後生育してきたコロニーから菌を分離した。

分離菌は、吉林大学と千葉大学で保存し、遺伝子解析は千葉大学真菌医学研究センターで行った。

調査地、土壌採取地：

表 1

地名	日付
山西省調査試料採取	
山西省洪洞	H24. 6. 12
山西省臨汾	H24. 6. 12
山西省 王家大院1, 2, 3	H24. 6. 13
山西省 五台山2, 3, 4	H24. 6. 14
山西省 大同五台山	H24. 6. 14
山西省 吉県	H24. 6. 15
山西省 懸空寺1, 2	H24. 6. 15

表 2

地名	日付
河南省、甘肅省調査試料採取	
河南省 洛陽 龍門石窟 1, 2, 3, 4, 5	H24. 9. 11
甘肅省 天水市麦積山1, 2, 3, 4, 5	H24. 9. 12
甘肅省 甘谷大像山1, 2, 3, 4, 5	H24. 9. 13
甘肅省 武山水簾洞1, 2, 3, 4, 5	H24. 9. 13
甘肅省 永靖炳靈寺	H24. 9. 15
甘肅省 蘭州 蘭山	H24. 9. 15
甘肅省 張掖丹霞山1, 2	H24. 9. 16
甘肅省 張掖馬蹄寺1, 2	H24. 9. 16
甘肅省 張掖大佛寺1, 2	H24. 9. 16
甘肅省 嘉峪関文殊山	H24. 9. 17
甘肅省 嘉峪関長城第一墩	H24. 9. 17
甘肅省 敦煌榆林1, 2	H24. 9. 18
甘肅省 敦煌陽関1, 2, 3	H24. 9. 18
甘肅省 敦煌莫高窟1, 2, 3	H24. 9. 19

調査結果：

調査地(表 1 - 4)に示す調査地点で合計82試料を採取し、表5に示すように分離株180株、*Fsarium*属菌18株、2006年以来継続して行っている*A. niger* 33株を分離した。

表 3

地名	日付
王麗教授招へい調査	
高山市郊外	H24. 11. 12
飛騨古川駅	H24. 11. 12
飛騨古川大銀杏下	H24. 11. 12
荘川桜	H24. 11. 12
御母衣	H24. 11. 12
白川郷 展望台	H24. 11. 12
五箇山 相倉合掌集落	H24. 11. 13
五箇山 ダム湖	H24. 11. 13
五箇山 菅沼集落	H24. 11. 13
金沢市郊外	H24. 11. 13
能登 柳田	H24. 11. 13
輪島	H24. 11. 14
輪島 白米町 千枚田	H24. 11. 14
能登	H24. 11. 14
能登 三崎町	H24. 11. 14
能登 見附島	H24. 11. 14

表 4

吉林大学 採取

試料採取地
長春 実験室浮遊菌 1, 2
重慶 武隆土壌 1, 2
貴陽 盆景園土壌 1, 2
吉林 長白山積雪草土壌 1, 2
吉林 長春 南湖土壌 1, 2
吉林 三角龍湾土壌 1, 2
吉林 長春 花園土壌

<i>F. solani</i>	2株
<i>F. oxysporum</i>	5株
<i>F. poae</i>	2株
<i>F. semitectum</i>	2株
<i>F. tricinctum</i>	1株
<i>Fusarium</i> sp.	6株

表 5

は、それぞれに同定された。

分離株180株で未同定株については、遺伝子解析を進める。

A. niger に関しては継続的にチトクローム b 遺伝子とリボゾーム遺伝子のD1D2領域を調べ、遺伝子型の分類と地域特性について解析を進める。

調査に関する考察：

F. solani は臨床分離株として高頻度に分離され、*F. oxysporum* は、植物病原菌として高頻度に分離される。今後継続して、これらの菌の薬剤感受性試験を行い、薬剤耐性菌の出現率や体性の程度を把握し、*Fusarium* 属菌の生態とともに明確にしていく。

本研究課題は、本年の研究助成以前から吉林大学王麗教授との共同研究で進められており、その成果は、Investigative Ophthalmology & Visual Science, April

2011, Vol. 52, No. 5. P2804-2808 に、角膜真菌症の原因菌種のスペクトラムと原因菌である*F. solani* の迅速同定プライマーについて報告した。

本研究成果は、*Fusarium* 属菌の生態と薬剤耐性菌の分布、耐性メカニズムの解明に貢献できると確信している。

発表論文：

Dan He, Jilong Hao, Bo Zhang, Yangiu Yang, Wengang Song, Yunfeng Zhang, Koji Yokoyama, and Li Wang : Pathogenic Spectrum of Fungal Keratitis and Specific Identification of *Fusarium solani*. Immunology and Microbiology Investigative Ophthalmology & Visual Science, 52(2011), 5, 2804-2808

作成日：2013年 3月12日

採取土壌数			
	吉林、貴州	15	
	山西省	12	
	甘肅省	39	66
	飛驒、能登	16	
		合計	82
分離株数			
	吉林、貴州	22	
	山西省	28	
	河南、甘肅省	115	165
	飛驒、能登	15	
		合計	180
<i>Fusarium</i> 属菌			
	吉林、貴州	8	
	山西省	1	
	河南、甘肅省	9	
	飛驒、能登	0	
		合計	18
<i>A. niger</i>			
	吉林、貴州	8	
	山西省	1	
	河南、甘肅省	6	15
	飛驒、能登	18	
		合計	33

財団法人 日中医学協会

2012 年度共同研究等助成金報告書－調査・共同研究－

2013 年 3 月 15 日

財団法人 日中医学協会 御中

貴財団より助成金を受領して行った調査・共同研究について報告いたします。

添付資料：研究報告書

受給者氏名：陳 昱
所属機関名：東京大学大学院新領域創成科学研究科
所属部署名：人間環境学専攻 職名：准教授
所 在 地：千葉県柏市柏の葉 5-1-5
電 話：04-7136-4603 内線：



1. 助成金額： 900,000 円

2. 研究テーマ

耳音響放射検査による乳児中耳貯留液診断の生体力学基礎のシミュレーション解析

3. 研究組織：

日本側研究者氏名：陳 昱	職名：准教授
所属機関名：東京大学大学院新領域創成科学研究科	部署名：人間環境学専攻
中国側研究者氏名：黄 麗輝	職名：研究員
所属機関名：首都医科大学附属同仁医院	部署名：北京市耳鼻咽喉科研究所

4. 当該研究における発表論文等

なし

耳音響放射検査による乳児中耳貯留液診断の生体力学基礎のシミュレーション解析

研究者氏名	准教授 陳 昱
日本所属機関	東京大学新領域創成科学研究科
中国研究者氏名	研究員 黄 麗輝
中国所属機関	北京市耳鼻咽喉科研究所

要旨

長期的な中耳貯留液の存在は乳児の聴覚、言語、知能と心理の成長に対して悪影響を与えることから、新生児を対象とする中耳貯留液の早期検出は临床上に重要な意義を持つ。乳児の難聴スクリーニング検査に用いられる一般的な手法である耳音響放射(OAE)だけでは中耳貯留液の診断に有効でないことが知られている。新生児の大規模なグループを対象とする中耳貯留液のスクリーニング検査方法として、7ヶ月以内の新生児に対して特定な高周波数のティンパノメトリーと OAE を併用する方法を提案したい。この提案は既存の研究結果に基づく発想であるが、実用化されるまで2つの問題を解決することが必要である。1つは実証研究により正常と非正常の新生児のティンパノメトリー検査結果の違いの確認である。もう1つは生体力学の基礎シミュレーションによって新生児に対する高周波数ティンパノメトリーの有効性の背後に働くメカニズムの解明である。本研究は以上の2つの問題解決を目的とする。研究の結果、正常の新生児に対して、高周波数 1kHz ティンパノメトリーの結果は最も安定で、基準化されやすいシングルピークの音響アドミタンスグラフを確認した。中耳貯留液の患児に対して同じ周波数での検査結果にはピーク値の著しい低下も観測できた。一方、外耳道、鼓膜及び鼓室を単純化した体系において多相流体中の音波の伝播現象の格子ボルツマンシミュレーションを行い、高周波数のティンパノメトリーの有効性の要因は主に耳構造の幾何学的効果であることがわかった。

Key Words ティンパノメトリー、OAE、中耳貯留液、新生児、格子ボルツマン法、音波

緒言：

新生児の中耳貯留液は、羊水や、間葉細胞や、骨髄などの未吸収に起因した液体[1]が新生児の中耳腔に貯留していることを指す。長期間を渡って中耳貯留液の存在は滲出性中耳炎を引き起こし、乳児の聴覚、言語、知能と心理の成長に対して悪影響を与えるとともに、胆脂瘤や耳管機能障害[2]につながる。早期かつ有効的乳児の中耳貯留液の検出は、临床上に重要な意義を持つことに間違いない。

先行研究[3]により、先天性聴力損失の発生率は約千分の一～三である。新生児の難聴スクリーニング検査は聴力損失を早期に発見するための主要な方法である。このスクリーニング検査中に用いられる一般的な手法は耳音響放射(OAE)法である。OAE 検査とは、耳の中から外に向かってエコーが返ってくる現象を利用して、内耳蝸牛の病態を知る検査であり、その快速性と安全性が確認されている。一方、従来の難聴スクリーニング検査で異常を発見した新生児に対して、3か月後に聴性脳幹反応(ABR)や、OAE などの追加検査を行い、最終的に中耳貯留液の存在が診断された者は約 64.5%を占める[4]。OAE 検査は中耳貯留液存在と内耳の損害を区別しにくい理由は、新生児の中耳腔の容積が小さくて、貯留液は外から刺激音の伝播に妨げるだけでなく、蝸牛から外耳道への音声エネルギーの伝導にも影響することにある。従って、新生児の中耳貯留液の高精度の早期検出に適しないことが言える。临床上での中耳貯留液の確実な検出手法は側頭骨の CT と耳 MRI である[5]。診断費用と時間の面を考えると CT や MRI などの医療画像による診断手法は大規模なグループ検査に向いていない。

新生児の大規模なグループを対象にして中耳貯留液を早期に検出するために、簡単、快速かつ有効なスクリーニング検査方法の開発が必要である。ASHA(America Speech-Language-Hearing Association)と AAA(America

Academy of Audiology)は慢性的な中耳貯留液の検出を目的とするスクリーニング検査を提案したことがある。提案手法のガイドラインによれば、ティンパノグラムの特徴(音響アドミタンスのピーク値及びパノグラムの幅)を中耳貯留液の検出指標にすることが薦められている。しかし、この提案の検査対象は7月以上の児童を対象としていた。7月以下の乳児を対象外にする理由は、新生児に対するティンパノメトリー検査の結果について、正常か否かを判断する基準はまだ確立されていないことにある。一方、Swanepoelらの研究[6]は、従来の低周波数(226Hz)のティンパノメトリーの新生児の中耳貯留液に対する感度が悪く、高周波数(1kHz)ティンパノメトリー検査の結果に中耳貯留液の存在が反映されることを報告した。この観測にベースとして、効率的にかつ高精度で新生児の中耳貯留液を検出するために、7月以内の乳児に対して特定な高周波数(1kHz)でのティンパノメトリーとOAEを併用する検査方法を提案したい。

一方、提案手法を実用化する前に2つの問題を解決する必要がある。1つの問題はグループ実験により正常と非正常の新生児の高周波数ティンパノメトリー検査結果の違いの解明であり、もう1つの問題は新生児の中耳検査にとって高周波数ティンパノメトリーの有効性の背後に働くメカニズムの解明である。まず、OAE検査を通った新生児を対象にして異なる周波数のティンパノメトリー検査を行い、統計的手法を用いて正常の新生児のティンパノグラムの基準を確立する。次に高周波数のティンパノメトリーによって中耳貯留液の存在を既に確認した新生児に対して実施し、正常児の検査結果に比べて音響アドミタンスなどの変化を観察する。2つ目の問題を解決するには、耳中の音波シミュレーションのための格子ボルツマン多相流体モデルを構築し、外耳道、鼓膜及び鼓室を単純化した体系において多相流体中の音波の伝播現象のシミュレーションを行う。パラメータサーベーターなどを通してメカニズムを究明していく。

対象と方法：

1) 実験研究

正常の新生児のティンパノグラムの基準を確立するための実験対象は北京市海淀区婦幼保健医院に生まれた新生児の55名で、その内男児は32名、女児は23名である。測定時期は生後2d-9dで、その平均3.16dである。これらの新生児に対してまずOAE検査を行い、検査結果は正常であることを確認する。OAE検査に用いられる測定機器はMadsen社製のCAPELLAで、測定基準は先行研究のもの[6]を参考する。次にこれらの新生児にGSI社製のGSI-33中耳分析機器を用いて、226Hz、678Hz及び1000Hzの周波数のティンパノメトリー検査を実施する。測定開始時の圧力は+200dbPa、終了時圧力は-400dbPa、圧力の変化速度は50daPa/sの設定である。得られるティンパノグラムの特徴を統計し、最も安定的で、かつ判別しやすいティンパノグラムを正常時の基準とし、この基準値を得た時に使われる周波数を今後新生児の中耳貯留液検査における標準周波数とする。

続いてOAEと標準周波数のティンパノメトリー検査の併用によって中耳貯留液の検出の実験を行う。実験の対象は生まれた三日間でOAE及び標準周波数のティンパノメトリー検査に異常を発見した1人の患児である。この患児に対して0歳6ヶ月までOAEとティンパノメトリーの併用による追跡検査(42日間、3ヶ月、6ヶ月)を行い、最終的に側頭骨のCTによって中耳貯留液の有無を確認し、提案検査手法の検証を行う。

2) シミュレーション研究

生体力学シミュレーションの対象は中耳貯留液の存在を考慮した外耳道、鼓膜および鼓室内の音波伝播現象である。人の耳の内部構造は複雑で、細部をすべて反映する完全なシミュレーションはほぼ不可能だと言える。また、シミュレーションの目的は新生児に対して高周波数ティンパノメトリーの有効性のメカニズムを説明することである。この目的を果たすには、耳の内部構造を図1のように単純化することが考えられる。図の中のAの部分外耳道で、空気が満たしている。Bの部分は鼓室で、貯留液を含む混合流体が入っている。AとBの界面は鼓膜の存在を表している。領域の左の境界には音源を置き、音波は右方向に伝播していく。AとB領域に入っている流体の音速は異なることから、鼓膜内外の音響インピーダンスがミスマッチし、音響エネルギーの一



図1.単純化された耳の内部構造

部は反射され、もう一部は鼓室内部に伝わる。よって、ティンパノメトリーで測定した音響アドミタンスは A と B の中の音波の振動エネルギー、即ち振幅の比で定性的に表せる。また、図1に示された寸法は成人の耳のみであり、新生児の場合は領域の幅と高さをともに3/5にする。

本シミュレーションに用いる手法は格子ボルツマン法 (lattice Boltzmann Method, LBM) [7]である。LBMとは、現実の流体を空間格子上で運動しているミクロな仮想粒子で構成させ、多数の仮想粒子運動の集計を現実流体のマクロ流れと同じ振舞いをさせる流体モデルである。格子上の仮想粒子のミクロ運動方程式は以下に示す。

$$f_i(\mathbf{x} + \mathbf{e}_i, t + 1) - f_i(\mathbf{x}, t) = -\frac{1}{\tau}(f_i - f_i^{eq}), i = 0, 1, \dots \quad (1)$$

ここで、 $f_i(\mathbf{x}, t)$ は仮想粒子の空間格子点 \mathbf{x} 、時刻 t での粒子密度の分布関数である。ベクトル \mathbf{e}_i は格子点間のリンクで、仮想粒子の運動速度を表す。従って、(1)式の左辺は単位時間間隔あたり、仮想粒子は現在の格子点 \mathbf{x} から隣の格子点 $\mathbf{x} + \mathbf{e}_i$ へ飛んでいくことを示している。(1)式の右辺にあるパラメータ τ は緩和時間で、上付き指標の eq は平衡状態の分布関数を示し、合わせて格子点 \mathbf{x} での仮想粒子間の衝突の効果、つまり分布関数は局所的平衡状態に近づくことを表している。一方、仮想粒子の運動の集計は分布関数を通して計算される。

$$\rho = \sum_i f_i, \quad \rho \mathbf{u} = \sum_i f_i \mathbf{e}_i \quad (2)$$

ここで ρ は流体の質量密度で、 \mathbf{u} は流れの速度である。これらの物理量と重み因子 ω_i を持って、平衡分布関数をマックスウェル・ボルツマン分布の2次展開として定式化する。

$$f_i^{eq} = \omega_i \rho \left[1 + 3(\mathbf{e}_i \cdot \mathbf{u}) + \frac{9}{2}(\mathbf{e}_i \cdot \mathbf{u})^2 - \frac{3}{2}u^2 \right] \quad (3)$$

離散運動論 (discrete kinetic theory) と (3)式を用い、(1)式から仮想粒子に構成される仮想流体の連続の式と運動方程式を導出できる。

$$\partial_t \rho + \nabla \cdot (\rho \mathbf{u}) = 0, \quad \partial_t (\rho \mathbf{u}) + \nabla \cdot (\rho \mathbf{u} \mathbf{u}) = \nabla (c_s^2 \rho) + \nu \nabla^2 (\rho \mathbf{u}) \quad (4)$$

上式中 c_s は仮想流体の音速で、 $\nu = (\tau - 0.5)/3$ は動粘度である。流体密度に極めて小さな摂動を与え、即ち $\rho = \rho_0 + \Delta \rho$ (ρ_0 は定数、 $\Delta \rho \ll 1$)、かつ流れはほぼない ($\mathbf{u} \approx 0$) 場合、(4)式から $\Delta \rho$ に関する波動方程式を導く。

$$\partial_{tt}^2 (\Delta \rho) = c_s^2 \nabla^2 (\Delta \rho) \quad (5)$$

(5)式の導出は格子ボルツマン法が音波伝播現象のシミュレーションに適用出来る理由になる。

LBMを図1に示す体系に適用するには、更に幾つの拡張が必要である。第一、二種類の流体を表す必要がある。これを実現するために、2種類の仮想粒子を導入し、その分布関数も2種類、即ち $f_i^\sigma(\mathbf{x}, t)$, ($\sigma = A, B$)にする。第二、A流体の仮想粒子とB流体の仮想粒子間の衝突をモデル化する必要がある。運動量の交換は平衡分布関数((3)式)中の流速 \mathbf{u} をA、B流体の共同流速 $\tilde{\mathbf{u}}$ に置き換えること[8]によって実現できる。共同流速は下式になる

$$\tilde{\mathbf{u}} = \sum_\sigma \frac{\rho_\sigma \mathbf{u}_\sigma}{\tau_\sigma} / \sum_\sigma \frac{\rho_\sigma}{\tau_\sigma}, \quad \text{with } \rho_\sigma = \sum_i f_i^\sigma \quad \text{and} \quad \rho_\sigma \mathbf{u}_\sigma = \sum_i f_i^\sigma \mathbf{e}_i \quad (6)$$

第三、AとB流体に異なる音速をもたらす必要がある。先行研究[9]によって仮想粒子の運動方程式の右辺に $\beta(\nabla \rho_\sigma \cdot \mathbf{e}_i)/3$ という項を加える。但し、パラメータ β は以下に定義する

$$\beta = \begin{cases} 0 & \rho_A > 0.5 \\ \alpha & \rho_A \leq 0.5 \end{cases} \quad (7)$$

(7)式によって、A流体の音速は c_s 、B流体の音速は $\sqrt{c_s^2 - \alpha}$ となる。第四、鼓膜のモデル化が必要である。In Vivoの鼓膜の物性は把握されていない現状から、正確なモデリングは非常に困難だと言える。本研究ではAとB流体の間に表面張力を入れることによって形成する界面を鼓膜と見なす簡略化モデルを考案した。表面張力の導入は、仮想粒子の運動方程式の右辺に遠隔粒子間の相互作用項[8]

$$F_i^\sigma = 3\omega_i g_\sigma \cdot (\mathbf{e}_i - \tilde{\mathbf{u}} + 3\mathbf{e}_i \mathbf{e}_i \cdot \tilde{\mathbf{u}}), \text{ with } g_\sigma = -\rho_\sigma(\mathbf{x}) \sum_{\bar{\sigma}, i} \omega_i G_{\sigma\bar{\sigma}} \rho_\sigma(\mathbf{x} + \mathbf{e}_i) \mathbf{e}_i \quad (8)$$

を導入する必要がある。(8)式の中にあるパラメータ $G_{\sigma\bar{\sigma}}$ は表面張力の強さを調整するもので、ラプラス則によってAB流体間の圧力差も調整できる。また、壁面とA、B流体間の相互作用項(G_{AS} と G_{BS})を導入し、 G_{AB} と合わせて鼓膜と壁のなす角を調整できる。第一から第四項までをまとめて、格子ボルツマン法による多相流体中の音波シミュレーションの支配方程式は次式になる。

$$f_i^\sigma(\mathbf{x} + \mathbf{e}_i, t + 1) - f_i^\sigma(\mathbf{x}, t) = -\frac{1}{\tau_\sigma} [f_i^\sigma(\mathbf{x}, t) - f_i^{\sigma, eq}(\rho_\sigma, \tilde{\mathbf{u}})] + \frac{1}{3} \beta (\nabla \rho_\sigma \cdot \mathbf{e}_i) + F_i^\sigma, \sigma = A, B, i = 0, 1, \dots \quad (9)$$

シミュレーションの準備として、上式を用いて中耳構造の簡素化モデルとしての計算領域を生成できる。3つの相互作用項の調整により、図2に示す異なる鼓膜と壁のなす角の体系が形成される。シミュレーションに使用されるのは実際の鼓膜と外耳道のなす角度に最も近い45度(図2(b))のみである。

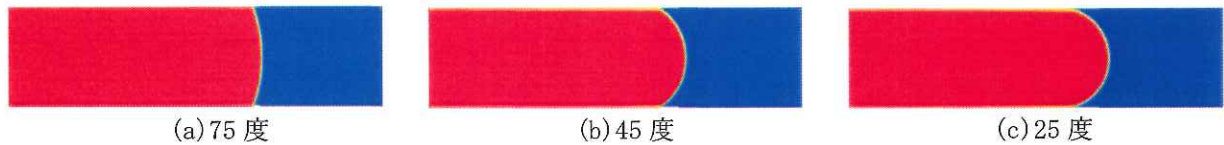


図2. シミュレーション体系の生成。領域の大きさは 300×100 で、赤色の部分の流体密度は $\rho_A = 0.94, \rho_B = 0.06$ 、青色の部分の流体密度はそれと逆である。モデルのパラメータは $G_{AB} = 2.0, G_{AS} = -0.02, \alpha = -0.2$ で、鼓膜と壁のなす角は75度の場合 $G_{BS} = 0.50$; 45度の場合 $G_{BS} = 1.39$; 25度の場合 $G_{BS} = 1.79$ である。

仮想流体の時間、空間、流速、密度等の量は無次元である。現実の体系の単位に変換する場合、音波現象を支配する無次元数に合わせる必要がある。波動方程式(5式)から無次元数 $c_s T/L$ を導出できる。空気の実音速 $c_s \approx 340\text{m/s}$ 、音波の周期 $T = 0.001\text{s}$ (1kHzの場合)、外耳道の長さ $L = 0.02\text{m}$ で、無次元数の値は17になる。一方、仮想流体Aの音速 $c_s \approx 0.577$ 、外耳道の長さ $L = 200$ から、シミュレーションの単位時間は実時間の約 $1.7 \times 10^{-7}\text{s}$ と見積もることができる。従ってLBMシミュレーションには大量な計算時間が必要である。本研究は助成金で購入したGPUカード(TESLA2070)を利用し、通常CPUの計算速度の150倍で計算できている。但し、本研究の目的は現象のメカニズムの説明にあつて、以下の結果は実単位に換算しないままで示す。

結果:

1) 実験の結果

OAE検査をパスし、中耳貯留液のない正常児に周波数1000Hz, 678Hz, 226Hzのティンパノメトリーを実施した結果は図3に示す。高周波数(1kHz)の場合、音響アドミタンスにシングルピークの存在するケースが一番多く、全体の96.4%を占める。低周波数(226Hz)の場合、ダブルピークの結果が一番多く、全体の90.0%に達している。図3(b)に示したように、中間的な周波数の結果は最も不安定である。シングルピークは全体の62.7%、ダブルピークは全体の34.6%になる。

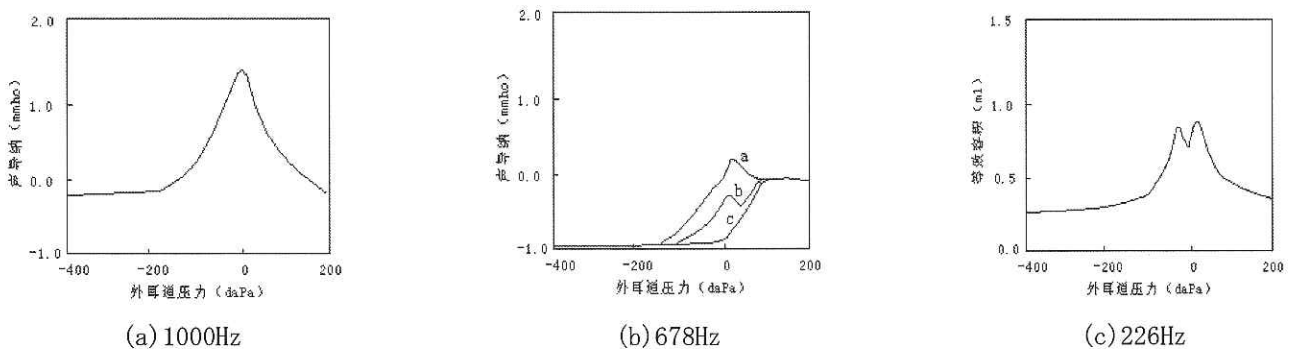


図3. 正常児に対する異なる周波数のティンパノメトリーから得た典型的な音響アドミタンス。

OAE 検査に問題のあった患児に対して、高周波数 (1kHz) のティンパノメトリーの追跡検査を行った。生まれた 3 日の結果は左右両方のティンパノグラムにシングルピークが現れず、生後 42 日及び 3 ヶ月での検査でもこの状況に変化が見られなかった。生後 6 ヶ月の検査では、左の耳の検査結果にシングルピークが現れ、右の耳の検査結果は蝶型になり、シングルピークの確認出来なかった。更に側頭骨 CT 検査を行い、左右の耳の中耳腔内の密度増加の有無を観測した。その結果、左の耳の中耳貯留液が吸収され、中耳貯留液の存在を確認できた。これらの結果は図 4 に示す。

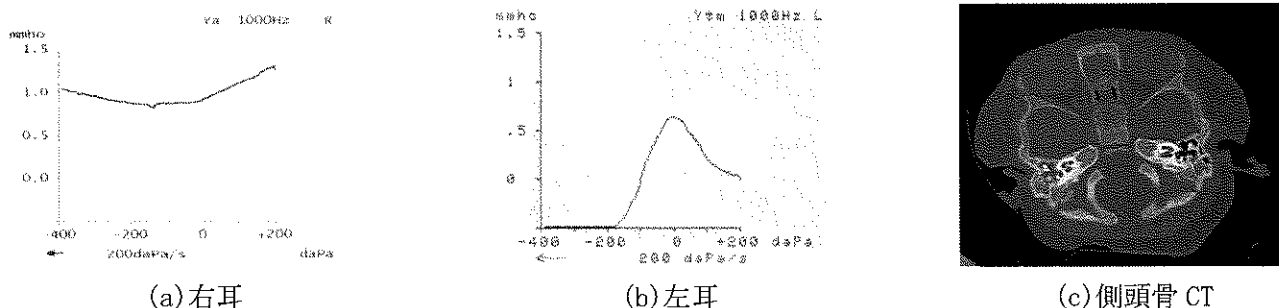


図 4. OAE 検査に異常が現れた患児に対する高周波数ティンパノメトリーの追跡検査結果及び側頭骨 CT の結果。中耳貯留液のある右耳の音響アドミタンスに正常児のシングルピークが現れなかった。

2) シミュレーションの結果

まず図 2 (b) の領域において、鼓室内と外耳道の圧力の一定の場合での音波の伝導様子を確認する。音源としての左境界の流体 A に、密度振幅 1%、周波数 200Hz のサイン関数的な強制振動を与えた。この密度の振動によって音波が発生し、右方向に伝播していく。定常時、鼓膜を通して鼓室内に伝わった音波と外耳道中音波の様子の比較は図 5 (a) に示す。鼓室内外の音響インピーダンスの相違 ($\alpha = -0.2$) によって、一部の音響エネルギーは反射され、鼓室内の振幅が小さくなる原因である。次に、音源の周波数を変えながら、外耳道中の音波の振幅と鼓室内の音波の振幅の比を調べる。周波数 1200Hz から 200Hz まで減少するとともに、振幅比は小さくなり、音波の鼓室への伝導は良くなることを意味している。また、周波数が 400Hz のところ、振幅比に極小値が存在する。この極小値の現れる原因はこの周波数の音波の波長と耳構造の幾何学的特徴にマッチした結果と推測できる。50Hz-200Hz 間の振幅比の降下はモデル化された鼓膜の性質によるもので、実際の耳で起きるかどうかは更なる実験の検証が必要である。

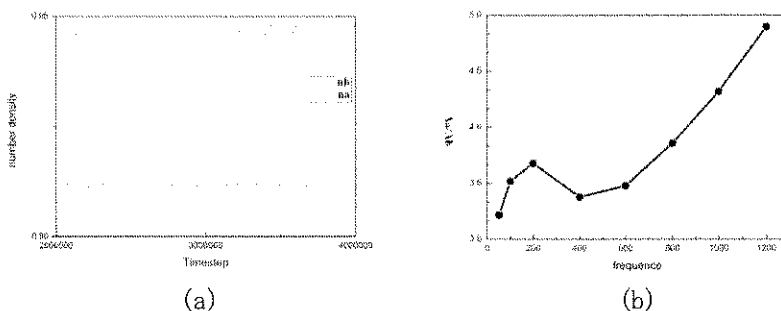


図 5. 成人の耳構造をモデル化した領域中の音波の伝播現象のシミュレーション。(a) 外耳道と鼓室内の音波の振動の様子。(b) 音源の周波数によって、外耳道と鼓室内の音波の振幅比の変化。シミュレーションのパラメータは図 2 (b) のと同じである。

次にティンパノメトリー検査のように、鼓室内と外耳道の圧力の差 ($P_B - P_A$) を変化して、鼓膜を通して鼓室に伝わった音響エネルギーを振幅 A_B で評価する。成人の耳、外耳道と直径だけを 3/5 にしたもの及び新生児の耳という 3 つの幾何学形状のモデルを用意した。シミュレーションの結果は図 6 (a), (b), (c) に示す。鼓室と外耳道の圧力差は前述のようにモデルのパラメータ G_{AB} によって調整できる。具体的には、 $G_{AB} = 1.3, 1.4, 1.5, 1.6, 1.7$ の時、内外の圧力差は $P_B - P_A = -1.759 \times 10^{-3}, 2.316 \times 10^{-3}, 5.515 \times 10^{-3}, 8.690 \times 10^{-3}, 1.485 \times 10^{-2}$ となる。

ただし、図 6 のグラフの横軸の実際のティンパノメトリーの定義と逆になっているため、各曲線はティンパノグラム（左半分（負圧の領域））に相当するものになる。ティンパノグラムの右半分（正圧の領域）のシミュレーションについて、計算中流体 B が流体 A に溶解してしまうために行わなかった。つまり、本研究で提案した簡略化モデルではこのような状況に対応できなく、更なるモデルの改良は必要である。

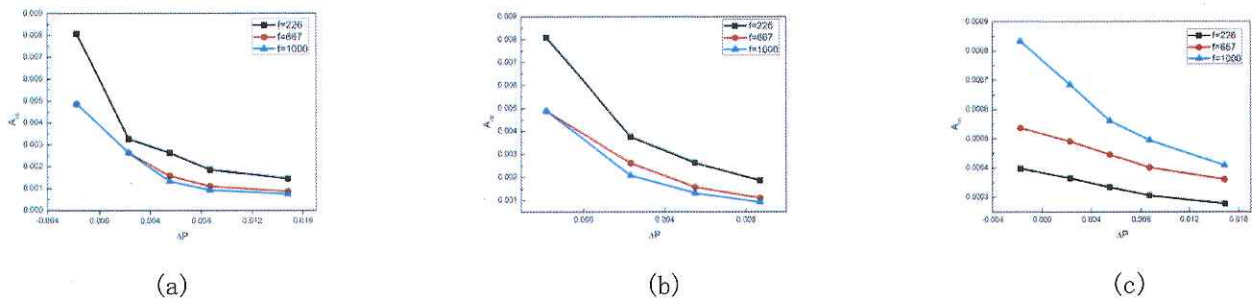


図 6. 3つの幾何学形状のモデルを用いたティンパノメトリーのシミュレーション。(a)成人の耳のモデル(300×100)；(b)外耳道半径だけ縮小した耳(300×60)；(c)新生児の耳モデル(180×60)

図 6 に示すシミュレーションの結果は定性的に実験で得られたティンパノグラムに一致した。外耳道の負圧が減少につれ、音波は鼓室に伝わりやすくなるため、鼓室内の振幅は大きくなっていく。成人の耳構造の場合、低周波数(226Hz)の音波による鼓室への音響エネルギーの伝達は一番しやすくなり、圧力差のゼロの付近での振幅は最も大きい。また、圧力差による振幅の変化も際立って、即ち外耳道の圧力変化による音響アドミタンスの変化は最も顕著である。外耳道と鼓室の直径のみを縮小してもこの傾向は変わらない。一方、新生児の耳構造において、全体的に音波は鼓室への伝達しにくくなるが、高周波数(1kHz)の方が逆転して鼓室に伝達する音響エネルギーが一番大きくなる。また図 6(c)に示すように、鼓室内の周波数 667Hz と 226Hz の場合の圧力差の変化による振幅の変化は平坦であり、中、低周波数の音波にとって外耳道の圧力変化による音響アドミタンスの変化は顕著ではないと言える。

考 察：

1) 実験についての考察

正常の新生児に対する異なる周波数のティンパノメトリーの結果から、使用周波数は 1kHz で、シングルピークの音響アドミタンスのグラフを新生児ティンパノメトリーの正常基準とするのは適当だと言える。理由は 1kHz のティンパノグラムは最も安定でかつ判別しやすいシングルピークとなっていることにある。低周波数(226Hz)の結果も安定しているが、音響アドミタンスは判別しにくいダブルピークになっている。中間的な周波数の結果は不安定で、採用しない。

中耳貯留液の患児に対する追跡検査の結果から、新生児に対する OAE と高周波数ティンパノメトリー検査の併用は早期に新生児から中耳貯留液を検出する有効な手段の一つであることが分かったが、この手法の有効性と信頼性についての定量的な評価は必要で、今後大規模なグループ実験で統計的に検証する必要がある。

2) シミュレーションについての考察

鼓室と外耳道の圧力差を考えない場合のシミュレーション結果から、鼓膜を通す音響エネルギーの効率的な伝導には、耳の幾何学的構造と音波の波長のマッチが必要であることが分かる。また、シミュレーションの計算領域では成人の耳構造をモデル化したものから、成人のティンパノメトリーは低周波数(226Hz)で行う理由の説明にもなる。新生児に対する高周波数のティンパノメトリーの有効性の理由に関して、これまでの複数の推測があった。新生児と成人の耳構造の違いや、新生児の柔らかい外耳道の音波に対する吸収によるものなどは典型的な説である。本研究のシミュレーション結果から、外耳道長さや鼓室の容積は支配的な要因であることが明らかになった。

今後、鼓膜を含めて正確な中耳モデルの構築や、どのような外部条件（例えば、これまで使用する音源の範

圏外の周波数)でティンパノグラムの特徴はもっとも顕著になることや、耳の内部条件の変化(中耳貯留液の量と存在の部位、新生児の成長による中外耳構造の変化)によるティンパノグラムの特徴はどのように変化することなどについて更に研究を深める必要がある。

参考文献：

1. Doyle KJ, Kong YY, Strobel K, Dallaire P, Ray RM. Neonatal middle ear effusion predicts chronic otitis media with effusion. *Otol Neurotol*, 2004, 25(3):318-322.
2. Ni DF, Infant diagnosis and treatment of otitis media. *J Clinical Otolaryngology*, 2005, 19: 577-579. (in Chinese)
3. Holster IL, Hoeve LJ, Wieringa MH, Willis-Lorrier RM, DeGier HH. Evaluation of hearing loss after failed neonatal hearing screening. *J Pediatr*, 2009, 155 (5): 646-650.
4. Boonea RT, Bowera CM, Martine PF. Failed newborn hearing screens as presentation for otitis media with effusion in the newborn population. *International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology*, 2005, 69(3), 393-397.
5. Sano M, Kaga K, Mima k. MRI findings of the middle ear in infants. *Acta Otolaryngol*, 2007, 127(8) : 821-824.
6. Han DM, *Hearing Screening for Newborns and Infants*, People's Health Publishing House, Beijing, 2003, 103-112. (in Chinese)
7. Chen SY and Doolen GD, Lattice Boltzmann method for fluid flows, *Annual Review of Fluid Mechanics*, 1998, 30, 329-364.
8. Shan XW, Multicomponent lattice Boltzmann model from continuum kinetic theory, *Physical Review E*, 2010, 81:045701(R).

財団法人 日中医学協会

2012 年度共同研究等助成金報告書－調査・共同研究－

2013 年 3 月 8 日

財団法人 日中医学協会 御中

貴財団より助成金を受領して行った調査・共同研究について報告いたします。

添付資料：研究報告書

受給者氏名： 小野直樹 
所属機関名： 芝浦工業大学
所属部署名： 工学部 職名： 教授
所在地： 東京都江東区豊洲 3-7-5
電話： 03-5859-8061 内線： 8061

1. 助成金額： 900,000 円

2. 研究テーマ

「多孔質マイクロ流路による腫瘍血管内の血流力学挙動に関する研究」
3. 研究組織：

日本側研究者氏名： 小野直樹	職名：教授
所属機関名：芝浦工業大学	部署名：工学部
中国側研究者氏名：Ying He (賀 纓)	職名：教授
所属機関名：中国科学技術大学	部署名：近代力学系

4. 当該研究における発表論文等

1. Li, F., Hu, RQ, He, Y., Yamada, T. Ono, N., In-vitro Modeling of Red Blood Cell Distribution Basing on a Microchannel Network, Oral Presentation, The 10th National Conf. on Biomech. and the 12th National Conf. on Biorehology Chengdu, Oct. 11-15, 2012

2. Li, F., et al, J. Med. Biomech. 2013 (in Chinese) (予定)

多孔質マイクロ流路による腫瘍血管内の血流力学挙動に関する研究

研究者氏名 小野直樹

所属機関 芝浦工業大学 工学部教授

中国側共同研究代表者 賀纒

所属機関 中国科学技術大学 近代力学系 教授

要旨

腫瘍組織における流体流れは多孔質流れとされている。本報では、腫瘍血管をモデル化した多孔質マイクロチャンネルをシリコン樹脂で作製し、そこを通過する赤血球溶液の流れ挙動を観察し、体外で擬似腫瘍微小循環を構築することを目的としている。そのため、まず、 $250\mu\text{m}$ の多孔質マイクロチャンネルを半導体微細加工技術で加工した。次に、ラットの血液を採取し、遠心力装置によって赤血球を取り出し、生理塩水と混合し、異なるヘマトクリット(Hct)の赤血球溶液を作った。その次、人工多孔質マイクロチャンネル内の赤血球の流動分布状態を顕微鏡で観察した。さらに、マイクロチャンネルにおける流れの圧力損失測定も試みた。その結果、同じ流量に対し、ヘマトクリット(Hct)が大きくなるにつれ、マイクロチャンネル内の赤血球流速が大きくなることが示された。また、各分岐における赤血球流れの速度分布はHctによって不均一性が示され、赤血球はより低い流速のチャンネルに集合する様子が示された。

Key Words 多孔質マイクロ流路、腫瘍微小循環、赤血球分布、不均一性、Fahraeus 効果

1. はじめに

癌組織は酸素と栄養を取るため、血管内皮細胞増殖因子を分泌し、新生血管を作り、周囲の血管から血液を引いてくるのである。新生血管は短時間で形成されたため、正常な血管とは異なり、血管の構造は不均一性を示している。すなわち、血管の分岐や太さなど不規則したり、ねじれがあったり、血管壁の浸透性が高かったりしている。このような異常な血管構造は腫瘍組織への血液供給に影響し、低酸素領域と高い間質流体圧力 (Interstitial Fluid Pressure) が生じてしまうケースが多い。結果として、抗がん剤の移流と拡散により癌組織への到達を妨げて、効果的ながん治療が得られない。

これまで、いろいろ新生阻害薬 (たとえば、**combretastatin**, **neffinavir**) が開発されてきたが、それらの効果は定量的に予測することは容易ではない。したがって、コンピューターあるいは体外モデリング手法によって腫瘍微小循環を模擬する必要がある。**Pozrikidis**^[1]は腫瘍組織を通す血管網を構築し、血液と間質流体流れを境界積分方程式により定式化し、間質流体圧力と血管浸透性のプラズマ流体に及ぼす影響を考察した。**Chapmann**^[2]は腫瘍組織における流体流れを考察するため、マルチスケールモデルを提案した。このモデルには、マクロスケールの腫瘍組織に対して、均一連続体として扱い、そこに毛細血管は極めてうすいため、その働きは流体の線ソースになる。一方、マイクロ領域に対して、毛細血管を囲む円柱形モデルを提案した。その解析の結果は血管ネットワークと間質における流れ挙動は多孔質流れと考えられる。**Jain**^[3]のモデルには浸透性と弾性のある微小血管は縦と横に四方形多孔質腫瘍組織に配列される。血管内の流れはポアズ流とし、血管壁面を通す流れは **Starling** 法則により定められ、腫瘍組織における流れは **Darcy** 流れとされる。

以上の研究から、腫瘍組織における流れは多孔質流れとして扱われることが多いことが分かった。これまで、Yamada ら^[4]はフォトリソグラフィ PDMS を利用してマイクロ混合器に関する研究を行ってきた。そこで、本研究では、腫瘍血管をモデル化した多孔質マイクロチャンネルをシリコン樹脂で作製し、そこを通過する赤血球浮遊液の流れ挙動を観察し、体外で擬似腫瘍循環を構築することを目的としている。本報では、赤血球浮遊液は多孔質マイクロチャンネルを通過する過程に着目し、その様子を画像解析から、赤血球の流速を測定した。その上、マイクロチャンネルにおける圧力損失の測定も試みた。

2. 実験装置と方法

2.1 多孔質マイクロチャンネル 本研究で用いた PDMS 製のマイクロチャンネルの流路部分は Fig. 1 に示す。この流路の断面は $250\mu\text{m} \times 35\mu\text{m}$ の長方形で、流路の中に $100\mu\text{m} \times 50\mu\text{m} \times 35\mu\text{m}$ のブロックが六つ配列され、ブロックとブロック間の幅は $50\mu\text{m}$ である。1 枚のチップに二つの多孔質流路を持つ。このチップをガラス基板に接着することにより、漏れの無い流路を形成した。

2.2 血液サンプルの作製 ラットから採血直後に、0.9%生理塩水を添加し、遠心分離装置に置き、1000 rpm の回転速度で 10 分間回転させた。赤血球のみを取り出し、再び生理塩水を添加し、Hct=1,2,3,5% の赤血球浮遊液を作製した。

2.3 実験方法と画像処理

赤血球浮遊液をシリンジポンプで多孔質流路に注入して、赤血球が流路を通過していく様子をハイスピードカメラで撮影した。実験パラメーターは表 1 に示す。収集された微小流路内に赤血球が流れる画像をもとに、画像解析ソフトを用いて解析し、流れ場を算出した。

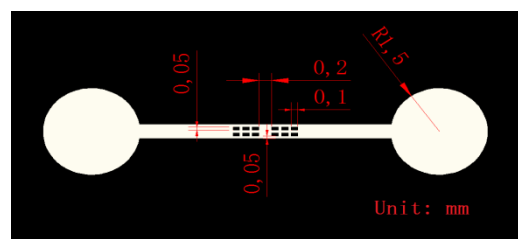


Fig.1 The Photograph of the Porous Micro-channel

表 1 多孔質流路に注入する赤血球浮遊液の流量と Hct

Hematocrit	Flow Rate (ml/h)		
Hct:1%	0.05	0.10	0.20
Hct:3%	0.05	0.10	0.20
Hct:5%	0.05	0.10	0.20

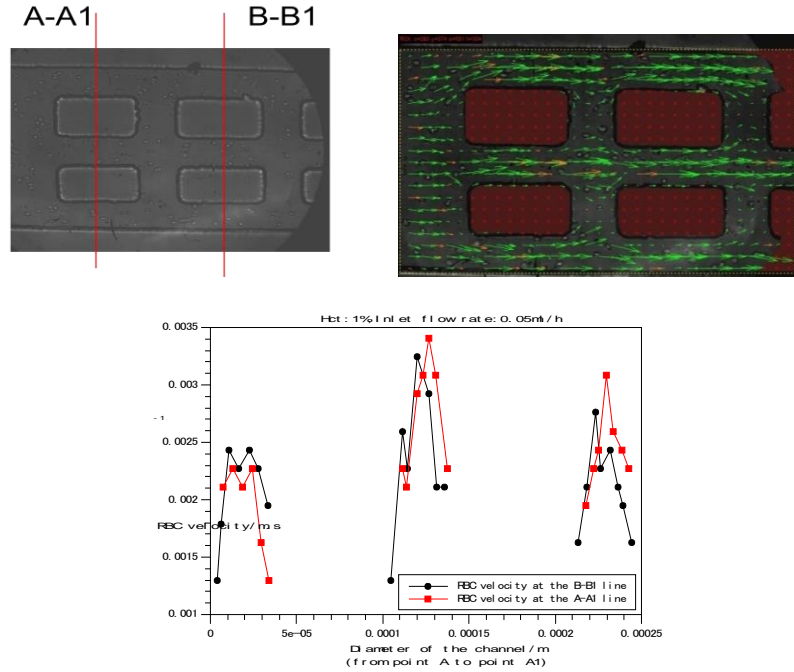


Fig. 2a. The Velocity Field of the RBCs Solution
 b. Velocity Profiles in Cross Sections of A-A1 and B-B1
 c. The image of RBCs through a Porous Microchannel
 (Hct=1%, $Q_{in}=0.05\text{ml/h}$)

3 実験結果

Fig. 2 a は $Hct=1\%$ 、入り口流量 $Q_{in}=0.05\text{ ml/h}$ を設定する時、赤血球浮遊液が多孔質流路を通過する時の画像を示す。赤血球流れ場は Fig.2b に示す。赤血球は流れ方向の三分岐チャンネルを通し、流れ方向に垂直するチャンネルに赤血球の流入は観察されなかった。Fig2 c は断面 A-A1 と B-B1 における赤血球速度分布を示す。断面 A-A1 における三分岐の溶液速度変化は小さく、中間断面と両側断面の最大速度差は約 0.001 m/s であり、断面 B-B1 における流速も A-A1 の流速とほぼ同じである。

Fig.3a は入口流量を 0.1 ml/h 、ヘマトクリットを 3 と 5% と設定する時、赤血球浮遊液は断面 A-A1 の各分岐を通過する時の赤血球速度分布を示す。 $Hct=1\%$ 時の均一な速度分布とは異なり、各分岐の赤血球流れ速度差が大きくなり、中間分岐における速度の上昇が一番大きいである。比較するため、断面 C-C1 の赤血球速度を Fig.3b に示す。断面 A-A1 と同じように、 $Hct=3\%$ と 5% の時の赤血球速度はかなり大きくなる。流量 Q をマイクロ流路断面積で割れば、赤血球溶液の平均速度を求められる。 $Hct=1\%$ 時の赤血球速度は溶液の平均速度とほぼ同じであることが分かる。しかし、ヘマトクリットは 3 と 5% の時の赤血球速度は溶液平均流速の約三倍になる。赤血球の相互作用が大きくなり、赤血球の Fahraeus 効果が表していると考えられる。

太い血管内のヘマトクリット (H_b) と細いヘマトクリット H_t の比は次式で表す^[5]

$$\frac{H_T}{H_D} = \frac{U_m}{U_c} \quad (1)$$

U_m と U_c はそれぞれ溶液と赤血球の平均速度である。 0.1 ml/h の入口流量に対して、ヘマトクリットが異なっても、断面 C-C1 の溶液平均速度は同じである。実験結果から、入口のヘマトクリットが大きくなるにつれ、断面 C-C1 の赤血球平均速度は大きくなる。したがって、入口のヘマトクリットが大きくなるにつれ、断面 C-C1 の H_T/H_D は小さくなる。また、Fig. 3a に示された

ように、Hct=5%の時、中間チャンネルの赤血球速度が一番早い。したがって、断面 A-A1 の中間チャンネルの H_T/H_D は両側チャンネルの H_T/H_D より小さいことが分かった。実験では、Hct=5%の時、赤血球は中間チャンネルから両側に流入する様子が観察された。

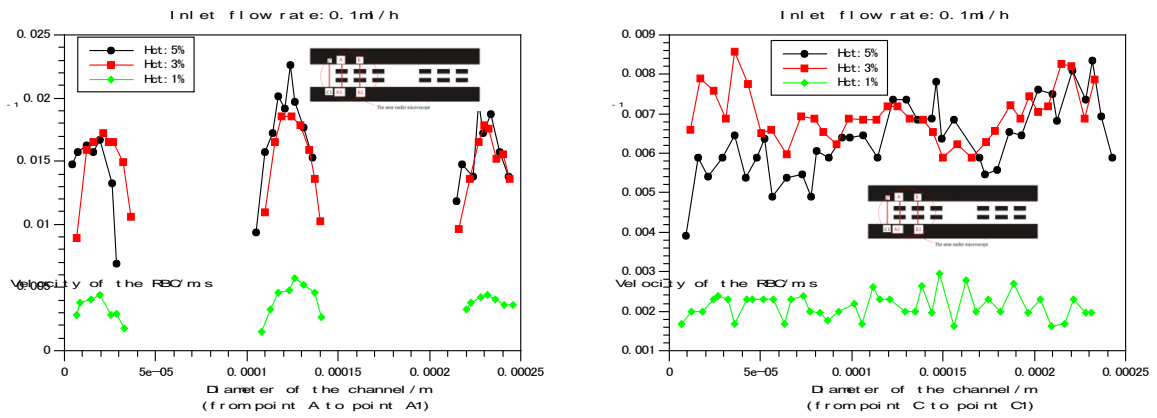


Fig. 3a. Velocity Profiles at Cross-section of A-A1
 b. Velocity Profiles at Cross-section C-C1
 (Hct=1,3,5%, $Q_{in}=0.1\text{ml/h}$)

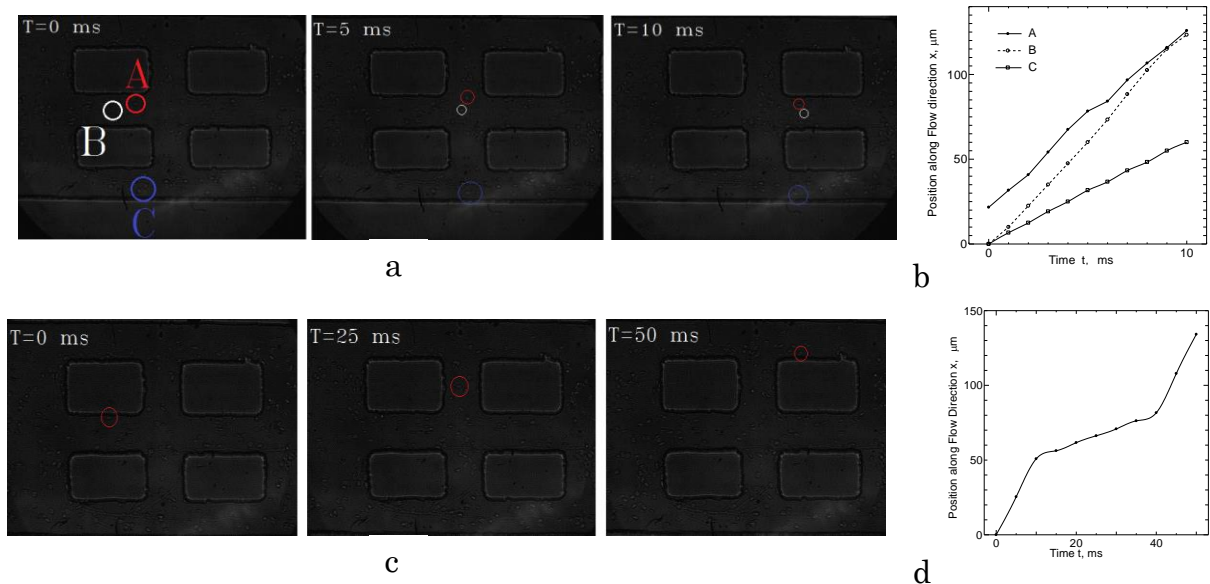


Fig. 4 a. Sequential Images of RBCs Flowing Straight Forward. b. Different Trajectories of RBCs in Fig. 4a
 c. Sequential Images of RBCs shifting toward the lateral channel d. Trajectory of the RBC shifting toward the lateral channel (Hct=2%, $Q_{in}=0.05\text{ml/h}$)

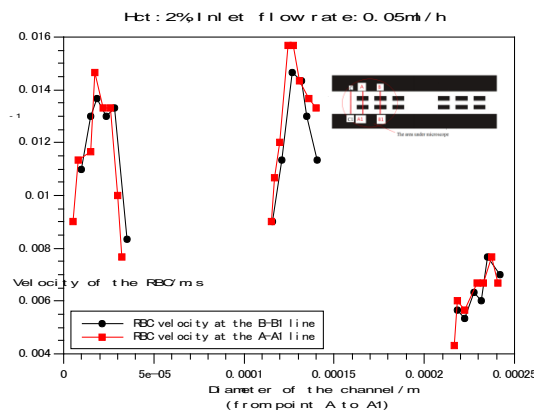


Fig. 5 Velocity Profiles of RBCs in the Cross-Section A-A1 and B-B1
 (Hct=2%, $Q_{in}=0.05\text{ml/h}$)

Fig 4 a と b に赤血球が多孔質マイクロチャンネルを通過する時の軌跡を示す。この時 Hct=2% である。色線で囲んだ赤血球の軌跡を注目すると、赤血球 A,B と C は全部下流の直線流路に入るが、下側のチャンネルの赤血球速度が一番遅いことが分かった。Fig 4 c には赤血球は横側のチャンネルを通す様子を示す。上側のチャンネルに流入したため、同じ時間で通す距離はかなり短くなる(Fig.4d)。この現象は Hct=5%の時にも観察された。Fig. 5 には Hct=2%時断面 A-A 1 と B-B1 の赤血球速度分布を示す。Fig.3a の Hct=5%時の速度分布と同様に、中間チャンネルの赤血球速度と両側チャンネルの赤血球速度差は大きいことが分かった。分岐管の赤血球速度差は赤血球分布の不均一性に影響があると考えられる。今の段階では、赤血球の分布は一定の不規則性を示しているが、Zhang^[6]らは分岐血管における赤血球分離のシミュレーションを行った結果によると、変形しにくい赤血球は流量の低い分岐に入りやすく、プラズマ流体の粘性は高い時、赤血球は流量の高い分岐に入りやすいとされる。したがって、赤血球の分布は赤血球変形の影響もあると考えられる。今後には、両側チャンネルの圧力損失を測り、流体抵抗に対する粘性効果を考察する予定である。

4. 圧力特性評価の試み

圧力特性評価のための流動実験は赤血球流動分布実験と同様な流動システムに圧力差を測定するための差圧計 (Testo) を取り付けておこなう。本報では気液界面の表面張力を利用して、マイクロチャンネル内の流れの圧力測定方法を用いた^[7]。マイクロ流路に流入させる液体は赤色の色水を用い、主流流路と垂直する流路に空気を注入する。側面流路と主流流路との合流部での気液界面の様子を顕微鏡から観察し、気液界面の形状が同じになるように空気の注入を調整する。界面が安定してから、差圧計で圧力測定する。Fig. 5a は圧力を測定する時の気液界面を示す。Fig. 5b は純水をマイクロ流路を通す時、入り口流量による圧力差を示す。直線の勾配を表し、測定方法が妥当である。今後には、赤血球浮遊液を用い、マイクロ流路における圧力変化と赤血球分布の関係を考察することができる。

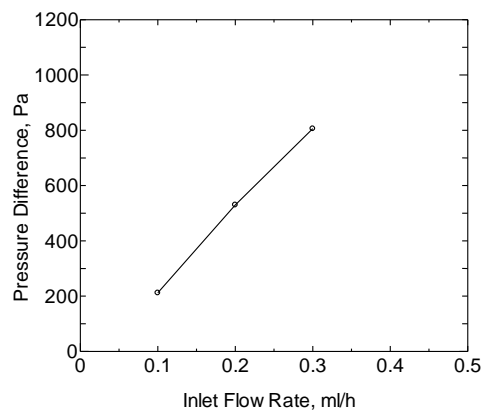
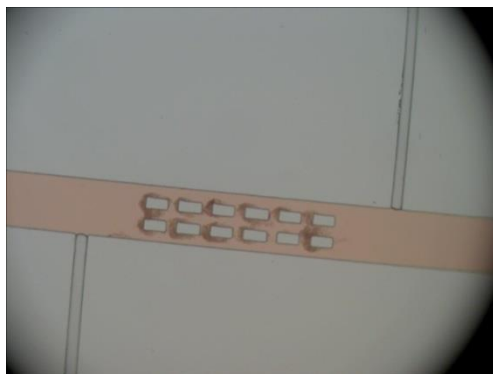


Fig. 5a Gas-liquid Interface for Measuring the Pressure Drop across the Microchannel
b Channel Pressure Drop versus Flow Rate for Water

5. まとめ

微小血管網をモデル化する多孔質マイクロチャンネルを用い、赤血球溶液の流動実験を行った結果、以下の通りになった。

- 1) ヘマトクリットが大きくなるにつれ、各分岐チャンネルの赤血球流速の差が大きくなる。流速の差がある程度大きくなる時、赤血球は側面チャンネルに集合する様子があった。し

かし、赤血球は側面流路に流入するケースは $Hct = 2$ と 5% の時であり、一定の不規則性が示されている。今後、赤血球の分布は溶液と赤血球の流速と赤血球の変形性などに対する依存性を考察し、腫瘍血管網内での赤血球の不均質分布を引き起こす原因をさらに探求する。

- 2) 同じ入り口流量に対して、ヘマトクリットが大きくなるにつれ、赤血球平均流速が大きくなる。赤血球溶液は太いチャンネルから細いチャンネルに流入する時、Fahreus 効果を紹介して、流動抵抗が緩和されたと考えられる。
- 3) 多孔質マイクロ流路内の圧力測定方法が確定され、赤血球溶液の流動実験に応用できる。したがって、マイクロ流路内での流動抵抗が定量的に測定できる。これまで得られた結果はまだ初期段階の結果であるが、今後、多孔質マイクロ流路における赤血球分布と圧力-流量関係をさらに考察する予定である。

参考文献

1. Pozrikidis, C., Numerical Simulation of Blood and Interstitial Flow through a Solid Tumor, *J. Math. Biol.*, 2010, 60: 75-94
2. Chapman, SJ, Shipley, TJ, Jawad, R, Multiscale Modeling of Fluid Transport in Tumors, *Bulletin Math. Biol.*, 2008, Vol. 70(8): 2334-2357.
3. Baish, JW, Netti, PA, Jain, RK, Transmural Coupling of Fluid Flow in Microcirculatory Network and Interstitium in Tumors, *Microvas. Research*, 1997, 53: 128-141.
4. Yamada, T., Osato, N., Watanabe, Y., Ono, N., Experimental and Numerical Study on Micromixing by Utilizing the Movement of Gas-liquid Free Interface, *J. Fluid Science and Technology*, 2011, Vol. 6(2): 128-138
5. Pozrikidis, C., Axisymmetric motion of a file of red blood cells through capillaries, *Physics of Fluids*, 2005, Vol. 17, 031503-1-14
6. Xiong, WJ, Zhang, J., Two-dimensional Lattice Boltzmann Study of Red Blood Cell Motion through Microvascular Bifurcation :Cell Deformability and Suspending Viscosity Effects, *Biomech. Model. Mechnobiol.*, 2012, Vol. 11: 575-583
7. 鈴木剛史、気液自由界面を利用したマイクロ混合に関する研究、芝浦工業大学大学院修士論文、2007年度。

中国科学技術大学／芝浦工業大学 合同研究報告会

企画 芝浦工業大学 小野直樹

日時:2013年2月28日(木) 15:00~17:40

場所:芝浦工業大学 豊洲校舎 405教室

参加者(予定):

杉山博士(理化学研究所), 賀櫻先生(中国科学技術大学), Changjin 氏(中国科学技術大学), 小野研究室学生3名(山田(D1), 竹田(M2), 野中(B4)), 小野

プログラム:

15:00~15:30(質疑応答含む)

賀櫻先生(中国科学技術大学):「中国科学技術大学／芝浦工業大学の共同研究報告」

*** 本共同研究は, (財)日中医学協会の支援を受けて実施したものです.**

15:30~16:25(質疑応答含む)

<招待講演>杉山博士(理化学研究所情報基盤センター):「Full Eulerian approach for solving fluid-structure interaction problems (toward multiscale thrombosis simulator)」

16:25~16:35 休憩

16:35~17:00(質疑応答含む)

Changjin 氏(中国科学技術大学博士課程):「On the modeling of pressure drop in stenotic flows」

17:00~17:20(質疑応答含む)

野中厚佑(芝浦工業大学小野研究室 B4):「液膜を利用したマイクロ混合器における流れの解析」

17:20~17:40(質疑応答含む)

小野直樹(芝浦工業大学):「小野研究室の研究テーマ紹介」

以上

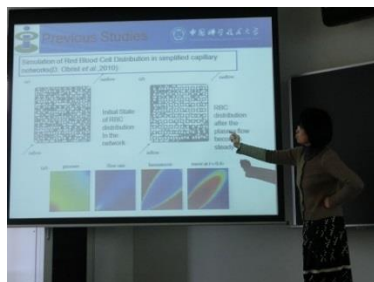
(その他の活動報告)

(1) 中国科学技術大学／芝浦工業大学 合同研究報告会

前頁のプログラムのように、2013年2月28日(木)に、今回の(財)日中医学協会殿からの助成によって展開した研究および関連の研究のまとめとして合同研究報告会を開催した。纒教授のお知り合いの杉山博士(理化学研究所)にもご講演頂き、この分野の研究の知見を深めることができた。また日本(芝浦工業大学の小野研究室)および中国(中国科学技術大学の纒研究室)の学部生および大学院生にも発表してもらい、学生間の交流も行い親交を深めることができた。



報告会の様子



纒教授の講演



小野の講演

(2) 中国科学技術大学での共同実験作業

日本(芝浦工業大学の小野研究室)側の博士課程の学生(山田君)が2012年7月に、中国(中国科学技術大学の纒研究室(中国合肥))側に行き、共同研究に必要な実験技術に関する議論と準備のための実験等を実施した。

(3) 芝浦工業大学での共同実験作業

中国(中国科学技術大学の纒研究室)側から、修士課程の学生(Hu君)とポスドク研究員(Liさん)の2名が2012年8月に、日本(芝浦工業大学の小野研究室)側に来られ、小野研究室の実験施設にて、共同での実験と得られたデータに関する議論を実施した。

以上
文責 小野直樹

財団法人 日中医学協会


2012 年度共同研究等助成金報告書－調査・共同研究－

2013 年 3 月 10 日

財団法人 日中医学協会 御中

貴財団より助成金を受領して行った調査・共同研究について報告いたします。

添付資料：研究報告書

受給者氏名： 羽尾 裕之	
所属機関名： 兵庫医科大学	
所属部署名： 病院病理部	職名： 准教授
所在地： 兵庫県西宮市武庫川町 1-1	
電話： 0798-45-6667	内線：

1. 助成金額： 800,000 円

2. 研究テーマ

循環器疾患の病態に関与する新規バイオマーカーの検索

3. 研究組織：

日本側研究者氏名： 羽尾 裕之	職名： 准教授
所属機関名： 兵庫医科大学	部署名： 病院病理部
中国側研究者氏名： 俞 梦越	職名： 副主任医師
所属機関名： 阜外心血管病医院	部署名： 心内科

4. 当該研究における発表論文等

現在のところなし。

循環器疾患の病態に関与する新規バイオマーカーの検索

研究者氏名	准教授 羽尾裕之
日本所属機関	兵庫医科大学 病院病理部
中国研究者氏名	副主任医師 俞 梦越
中国所属機関	阜外心血管病医院

要 旨

我々はこれまで、心臓における冠状動脈の粥状動脈硬化の進展と血栓形成に至る粥状動脈硬化病変の破綻に小胞体ストレスが関与していることを世界に先駆けて報告し、急性心筋梗塞や不安定狭心症、心臓突然死を含む急性冠症候群の病態の一部を明らかにした。本研究ではこれらの知見を活かし、急性心筋梗塞、心筋炎、大動脈瘤などの循環器疾患における小胞体ストレス関連分子の病態への関与を検討し、更にこれらの疾患における小胞体ストレス関連分子のバイオマーカーとしての可能性について検討した。病理解剖症例や動物モデルを使って、心筋梗塞・心筋炎・大動脈瘤の組織における小胞体ストレス関連分子の分布を免疫組織化学によって検討した。これらの疾患の心筋や血管壁において、小胞体ストレスシャペロン分子 GRP78 や低酸素誘導性小胞体酸化還元酵素 Ero1 の発現が認められた。当院及び阜外心血管病医院における急性心筋梗塞患者の急性期における小胞体ストレスシャペロン分子 GRP78 の血中濃度を ELISA 法で測定した。現在までのところ健常者コントロール群と比較してやや高値を示すものの有意差を認めなかった。今後、症例数を増やして更に検討を重ねる予定である。

Key Words 急性心筋梗塞, 心筋炎, 大動脈瘤, 小胞体ストレス, バイオマーカー

緒 言 :

小胞体は分泌蛋白質を合成する細胞内小器官で、全蛋白質の約 30%を産生している。新たに合成された分泌蛋白質は、小胞体内でシャペロンや酸化還元酵素により折りたたまれた後に分泌経路に運ばれる。一方、低酸素刺激は高次構造上の異常蛋白質の小胞体内蓄積を引き起こし、これを小胞体ストレスと呼ぶ。この小胞体ストレスに対する細胞応答として、蛋白質折りたたみを担う小胞体シャペロンが誘導され、同時に新規蛋白質の翻訳が抑制され小胞体への負荷を軽減させる。しかし、ミスフォールド蛋白質蓄積が小胞体応答による対応能力を逸脱した時、小胞体よりアポトーシスシグナルが発信される。現在では小胞体は細胞の生死を決定する重要な細胞内小器官として注目されている。近年ミスフォールド蛋白質蓄積が神経変性疾患や糖尿病・脂肪肝などの疾患に関与することが明らかになり、世界中で活発な研究が行われている。

我々はこれまで、冠状動脈の粥状動脈硬化の進展と血栓形成に至る動脈硬化病変の破綻に小胞

体ストレスが関与していることを世界に先駆けて報告した¹⁾。しかし循環器疾患と小胞体ストレスの関連についての研究は十分されていないのが現状である。本研究では循環器疾患として重要な位置を占めている急性心筋梗塞・心筋炎・大動脈瘤などにおける小胞体ストレス関連分子の病態への関与を検討し、更にこれらの疾患における小胞体ストレス関連分子のバイオマーカーとしての可能性について模索した。

対象と方法：

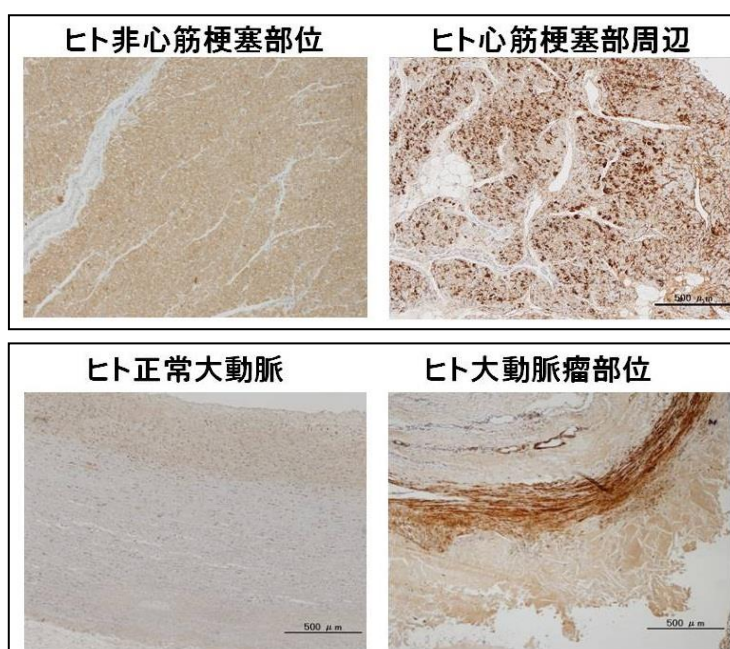
病理解剖症例の組織を用いて、心筋梗塞・心筋炎・大動脈瘤の組織における小胞体関連分子の分布を免疫組織化学によって検討した。小胞体関連分子として小胞体ストレスシャペロンである GRP78 および GRP94、低酸素誘導性小胞体酸化還元酵素である endoplasmic reticulum oxidoreductin 1 (Ero1) について、ホルマリン固定パラフィン包埋切片を用いて酵素抗体法により、これらの蛋白の分布について検討した。

大動脈瘤については、動物モデルにおいてこれらの分子の分布を検討するため、Apolipoprotein E (ApoE) 欠損マウスに対する Angiotensin II 持続投与モデルを用いて腹部大動脈瘤モデルを作製し、大動脈瘤モデル動物における小胞体ストレス関連分子の発現についても検討した。

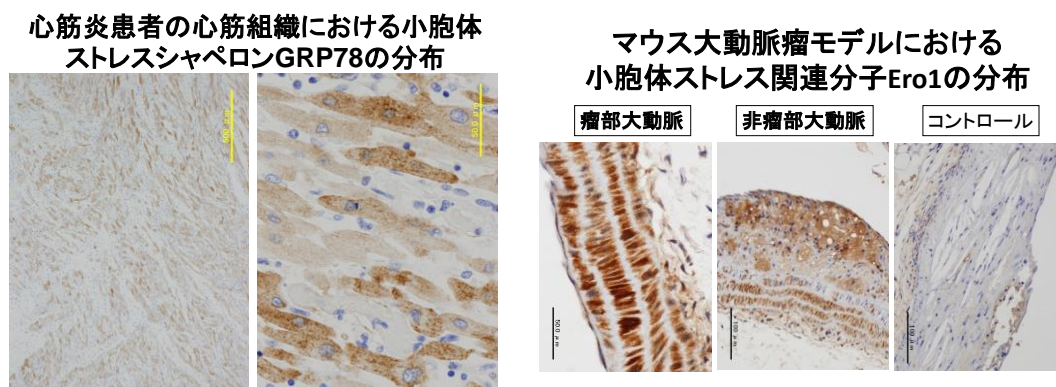
更に小胞体ストレス関連分子のうち ELISA 法にて測定可能な GRP78 (HSPA5) 測定キットを用いて、当院の 20 例及び阜外心血管病医院 15 例の急性心筋梗塞患者の血清中の GRP78 の濃度を測定した。

結果：

心筋梗塞病変において免疫組織化学で Ero1 の分布が正常の非梗塞部位の心筋組織と比較して強く認められた（下図）。この結果より Ero1 が心筋梗塞の病態に関与している可能性が示唆された。さらに大動脈組織と腹部大動脈瘤組織での Ero1 の分布を検討したところ、正常大動脈では発現が認められなかったが、大動脈瘤壁で Ero1 蛋白が広く分布していた（右図）。大動脈瘤の病態にも Ero1 が関与している可能性が考えられた。また心筋炎患者における GRP78 の分布では心筋細胞の細胞質内に GRP78 の分布が認められ、心



筋炎にて障害された心筋細胞では、小胞体ストレスの過剰状態で、そのシャペロン分子である GRP78 の過剰発現が起こっていると考えられた（下左図）。



ApoE 欠損マウスに対する Angiotensin II 持続投与による腹部大動脈瘤モデルでもヒト大動脈瘤同様にコントロール<非瘤部大動脈<瘤部大動脈の順で Ero1 の発現は増強していた（上右図）。

そこで我々は心筋梗塞の急性期の血清中の小胞体ストレスシャペロン GRP78 の血中濃度の測定を ELISA 法で行った。これまでのところ日本・中国あわせて 35 症例の血清について検討したが、やや心筋梗塞症例で高値を示したものの、正常コントロール群と有意な差は認められなかった。

考 察：

今回我々は心筋梗塞や心筋炎・大動脈瘤といった循環器疾患でも特に生命予後を左右する重要な疾患において、小胞体ストレス関連分子が発現していることを同定した。さらに大動脈瘤においては、動物モデルでも小胞体酸化還元酵素 Ero1 の発現が増強しており、病態に深く関与している可能性が示唆された。現在さらにラット心筋梗塞モデルおよび心筋炎モデルを作製しており、これらのモデル動物において病変の組織中・血清中の小胞体関連分子の分布や動態を検討する予定である。患者血清の検討では残念ながら今回の報告までの症例数では、正常群と患者群において血中 GRP78 の濃度は有意な差を認めなかった。しかし今後更に共同研究を継続して中国においても心筋梗塞患者の血清を確保し、血中の小胞体ストレス関連分子の動態について検討したい。さらに阜外心血管病医院は北京の循環器疾患専門病院であり、多くの心疾患患者の治療に当たっているため、急性心筋梗塞のみならず心不全・心臓弁膜症・心筋炎などの重症循環器疾患患者の血清についても同様の検討を行って、同分野の診断や治療に応用できるバイオマーカーの検索を行っていきたい。

参考文献：

1. Myoishi M, Hao H, et al: Increased endoplasmic reticulum stress in atherosclerotic plaques associated with acute coronary syndrome. *Circulation* 116:1226-1233, 2007.

作成日：2013年3月10日

財団法人 日中医学協会

2012 年度共同研究等助成金報告書—調査・共同研究—

2013 年 03 月 13 日

財団法人 日中医学協会 御中

貴財団より助成金を受領して行った調査・共同研究について報告いたします。

添付資料：研究報告書

受給者氏名：王立楠
所属機関名：三重大学
所属部署名：大学院医学系研究科 職名：特任助教
所在地：三重県津市江戸橋 2-174
電話：059-231-5187（直通） 内線：



1. 助成金額： 80 万 円

2. 研究テーマ

CEA 特異的キメラ抗原受容体導入 T 細胞を用いたがんに対する養子免疫療法の開発

3. 研究組織：

日本側研究者氏名：王 立楠	職名：特任助教
所属機関名：三重大学大学院医学系研究科	部署名：遺伝子免疫 細胞治療学
中国側研究者氏名：丁 曉慧	職名：教授
所属機関名：瀋陽医学院	部署名：病理学

4. 当該研究における発表論文等

1. Shirakura, Y., Mizuno, Y., Wang, L., Imai, N., Amaike, C., Sato, E., Ito, M., Nukaya, I., Mineno, J., Takesako, K., Ikeda, H., and Shiku, H. 2011. TCR gene therapy targeting MAGE-A4 inhibits human tumor growth in NOD/SCID/γc(null) mice. Cancer Science, 103(1):17-25.

5. 成果の概要

別紙添付

-日中医学協会助成事業-

CEA 特異的キメラ抗原受容体導入 T 細胞を用いたがんに対する
養子免疫療法の開発

日本研究者氏名 特任助教 王立楠

日本所属機関 三重大学大学院医学系研究科

中国研究者氏名 丁 曉慧

中国所属機関 瀋陽医学院

要旨

本研究では、複数種類のヒトシグナル伝達ドメインを付加した癌胎児性抗原 (CEA) 特異的 CAR のレトロウイルスコンストラクトを用いてヒト末梢血 T 細胞に導入し、*in vitro* における機能評価と NOG マウスを用いて *in vivo* における抗腫瘍効果を評価した。その結果、従来から研究が進められている CD3z と CD28 のシグナル伝達ドメインを含む CAR (28z) に加えて、申請者等が明らかにした CD4T 細胞や CD8T 細胞に制御性 T 細胞抵抗性を付与する GITR シグナル伝達ドメインを付加した CAR (zG) 導入 T 細胞が、極めて有効であることを見いだした。ヒトと同様の CEA 発現パターンを示す CEA トランスジェニックマウスに大腸発がんを誘発し、CEA 特異的 CAR を導入したマウス T 細胞を用いて、さらなる有効性と安全性を評価するための治療モデルを確立する目的で、細胞内シグナル伝達ドメイン (CD3z、CD28、GITR) をマウス型に置き換えたエコトロピックウイルスを作製し、マウス T 細胞を用いてその発現と *in vitro* における機能評価を行った。その結果、マウス T 細胞においても機能的な CAR の発現が誘導できた。

Key Words キメラ抗原受容体、がん治療、複刺激シグナル分子

緒言

本邦における悪性腫瘍による死亡は死亡原因の 30% を超え、既存の治療法の改良に加えて、新規治療法の開発が積極的に行われてきている。なかでも、人工的に腫瘍特異性を付与した T 細胞をがん患者に移入する遺伝子改変 T 細胞輸注療法に期待が集まっている。その一つとして人為的に腫瘍特異性を付与した遺伝子改変 T 細胞を輸注する方法が注目されている¹。これまでは、腫瘍細胞の細胞表面上の主要組織適合性抗原 (MHC) と腫瘍特異的抗原由来のペプチドとの複合体を認識する T 細胞受容体 (TCR) を、ウイルスベクターを用いて導入・改変した自己 T 細胞を利用した臨床試験が行われてきた。しかしながら、この療法には「ある特定の MHC に拘束されるために投与可能な患者数が制限されてしまう」、「MHC を欠落している腫瘍細胞が存在する」という短所がある。この問題を解決するための新たな試みとして、腫瘍細胞表面上に発現されるがん抗原を認識するモノクローナル抗体を T 細胞受容体として用いる方法が開発された。単鎖抗体 (scFv) と T 細胞受容体 (TCR) や副刺激分子のシグナル伝達ドメインからなるキメラ抗原受容体 (Chimeric antigen receptor; CAR) を導入した T 細胞は MHC 非依存性のがん抗原を認識し破壊できることから、対象となるがん抗原を持つより広範囲の患者に適応可能となる長所を持つ。今までに複数の CAR 臨床試験が施行されてきたが、*in vitro* 評価系において優れた機能の発揮する CAR が、必ずしも優れた臨床効果を示していない。即ちこれまでの CAR 遺伝子導入 T 細胞は、*in vitro* での機能評価系を指標に順次開発されてきたものの、*in vivo* である

臨床効果との間に乖離が見られている。また、TCR 遺伝子導入 T 細胞輸注療法で見られた程の有効性が、未だ CAR 臨床試験では確認されていない。このような期待に反する結果の理由として、投与後の抗腫瘍効果を予測するための *in vivo* での機能評価系が未成熟であることが挙げられる。現状では、投与薬剤そのものであるヒト T 細胞生体内細胞やヒトがん細胞は、マウス等の宿主の免疫系により拒絶される為に単純に投与することが出来ず、これまでの改変 T 細胞輸注療法における安全性、薬理薬効はほとんど実験動物では検証されないままに臨床研究が開始されてきた。最近になって、T 細胞移入細胞療法では、移入 T 細胞の生体内における長期生存性が優れた臨床効果を発揮するために必須の条件であることが明らかになり、*in vivo* での評価系が切望されている。本研究では、GITR を含む様々な副刺激分子のシグナル伝達ドメインを付加した癌胎児性抗原 (Carcinoembryonic antigen; CEA) 特異的 CAR 導入 T 細胞を作製し、ヒト T 細胞が生着可能な重度免疫不全マウスである NOD/SCID/ $\gamma c^{-/-}$ (NOG) マウス及び CEA トランスジェニックマウスを用いた *in vivo* 評価系を樹立した。

材料と方法

マウス

8 週令前後の重度免疫不全マウス (NOD/SCID/ $\gamma c^{-/-}$ (NOG)) は公益財団法人実験動物中央研究所より購入、使用した。8 週令前後の C57BL/6 マウスは日本 SLC より購入、使用した。ヒト CEA プロモータ領域を含む CEA トランスジェニックマウス² (C57BL/6 バックグラウンド) は Wolfgang Zimmermann 教授 (Institute of Immunobiology, University of Freiburg, Germany) より御供与いただき、三重大学動物実験施設において飼育・繁殖した。

細胞

同意書による同意を得た上で、健康人末梢血から Ficoll 法により末梢血単核球を分離した。マウス細胞は、マウス脾臓をナイロンメッシュにてほぐし、単一細胞懸濁液を調製した。ヒト由来の CEA 陽性胃癌細胞株 (MKN45) と CEA 陰性胃癌細胞株 (MKN1) は対数増殖期に使用した。

ウイルスコンストラクト

CEA 特異的単鎖抗体に図 1 に示すシグナル伝達分子の細胞内ドメインを付加した CAR コンストラクトを含むレトロウイルスを作製、使用した。

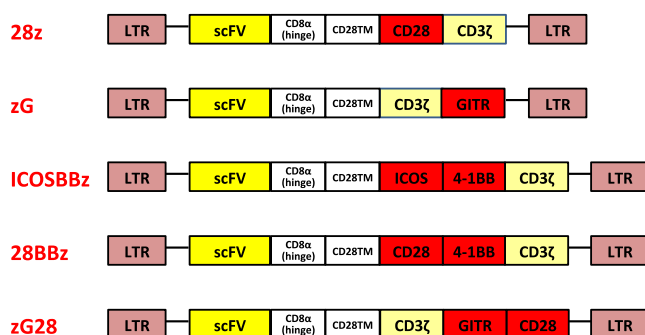


図 1. CARコンストラクト

発がん実験

CEA-Tg マウスに AOM (10 mg/kg) を投与しその 1 週間後に 1% DSS を飲水にて反復投与 (7 日間連続、7 日間休止を 3 サイクル) を開始して、大腸発がんを誘発した。

結果

複刺激分子 GITR と CD28 のシグナル伝達ドメインを含む CEA 特異的 CAR の発現誘導

複刺激分子 CD28、GITR、ICOS、4-1BB のシグナル伝達ドメインを含む CEA 特異的 CAR のヒト末梢血 T 細胞への導入を比較検討した。その結果、CD28 (28z) もしくは GITR (zG) を含む CAR の導入効率が陽性率の面でも発現強度の面でも最も高かった (図 2)。また、その際のレトロウイルスコピー数は最少で (図 3)、安全性が高いことも示唆された。

図 2. CAR 導入ヒト末梢血 T 細胞の CAR 発現

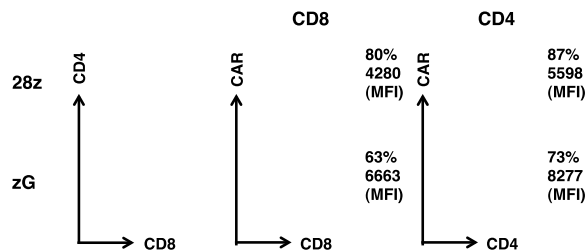
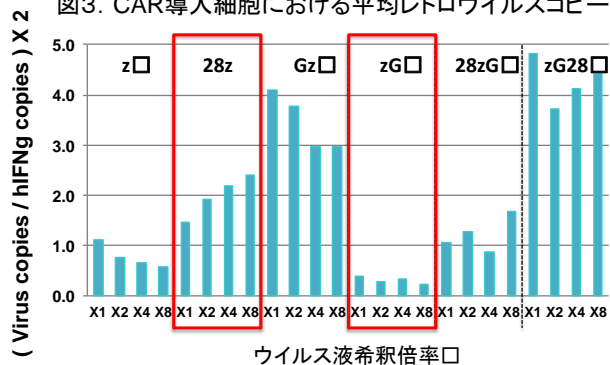


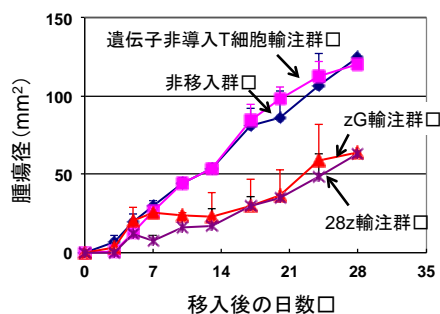
図 3. CAR 導入細胞における平均レトロウイルスコピー数



複刺激分子 GITR と CD28 のシグナル伝達ドメインを含む CEA 特異的 CAR の in vivo での抗腫瘍効果

次に in vivo での有効性を評価する目的で、ヒト癌細胞が生着可能な NOG マウスに CEA 陽性胃癌細胞株 MKN45 を接種すると同時に CEA 特異的 CAR 導入 T 細胞を輸注し、腫瘍縮小効果を評価した。その結果、CD28 (28z) もしくは GITR (zG) を含む CAR を導入したヒト T 細胞は抗腫瘍効果を発揮した (図 4)。

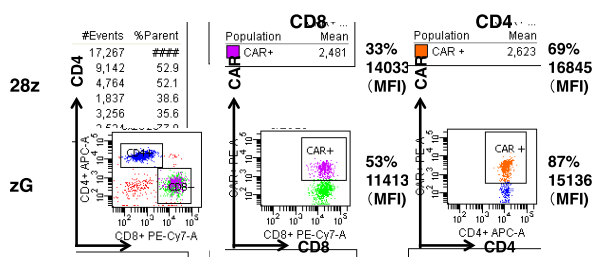
図 4. CAR 導入 T 細胞輸注 NOG マウスにおける CEA 陽性ヒト胃癌細胞株 MKN-45 の増殖抑制



マウス T 細胞への CAR 導入

NOG マウスはヒト細胞が生着可能であるが、ヒト T 細胞を移入した場合は移植片対宿主病を発症してしまし、長期のわたる CAR 導入 T 細胞の有効性やまた安全性を評価することはできない。そこで、マウス T 細胞を用いた治療評価系を樹立する目的で、シグナル伝達ドメインをマ

図 5. CAR 導入マウス脾臓 T 細胞の CAR 発現

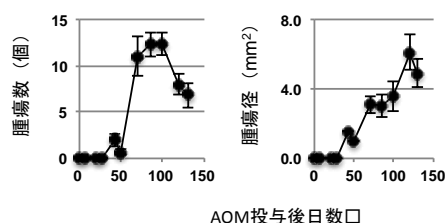


ウス型に置き換えた CAR コンストラクトを作製し、マウス T 細胞への導入効率を検討した。ヒトにおいて導入効率の高かった CD28 (28z) もしくは GITR (zG) を含む CAR を検討対象とした。その結果、マウスにおいても十分に発現が誘導できた (図 5)。

マウス大腸がん系を用いた有効性と安全性評価系の樹立

正常状態でヒトと同様の発現パターン、即ち正常大腸上皮細胞の管腔側に弱く発現しする CEA トランスジェニック (CEA-Tg) マウス (C57BL/6 background) を本研究で用いる (導入・繁殖済み)。このマウスは、アゾキシメタン (AOM) とデキストラン硫酸ナトリウム (DSS) 投与により大腸炎症の再燃と寛解を繰り返す潰瘍性大腸炎に合併する大腸癌を模したモデルを作成すると、発生した大腸癌が CEA を強く発現することが示されている²。したがって、CEA-Tg マウスは T 細胞輸注療法の有効性を発がん系で評価するために格好のモデルマウスである。CAR 導入細胞の輸注による治療モデル作製のためには腫瘍発生時期のその後の腫瘍増殖がわかっていなければならない。そこで、C57BL/6 マウスに AOM (10 mg/kg) を投与しその 1 週間後に 1% DSS を飲水にて反復投与 (7 日間連続、7 日間休止を 3 サイクル) を開始して、大腸発がんを誘発し、大腸癌の発生時期と発生した大腸癌の増殖率を明らかにした (図 6)。

図6. AOM/DSS投与マウスの大腸癌発生時期と大腸癌増殖率



考察

本研究により、レトロウイルスベクターを用いたヒト T 細胞への導入において、CD28 と GITR を含む CAR が低ウイルスコピー数で効率よく発現誘導でき、また、*in vivo* でも抗腫瘍効果を発揮したことから、安全性と効率の面でも高いことが明らかになった。NOG を用いた CAR の *in vivo* 有効性評価には限界があるため、マウス型 CAR を作製し、その発現誘導を確認できた。従来、移植癌を用いた抗腫瘍効果の評価の限界点を超えるため、自家発がん系マウスモデルを作製し、発がんのタイミング等を明らかにできた。この 2 点を明らかにできたことで、今後マウス大腸発がん系を用いた CAR 導入 T 細胞の有効性と安全性評価系を確立していく予定である。

参考文献

1. Johnson LA, Morgan RA, Dudley ME, Cassard L, Yang JC, Hughes MS, Kammula US, Royal RE, Sherry RM, Wunderlich JR, Lee CC, Restifo NP, Schwarz SL, Cogdill AP, Bishop RJ, Kim H, Brewer CC, Rudy SF, VanWaes C, Davis JL, Mathur A, Ripley RT, Nathan DA, Laurencot CM, Rosenberg SA. Gene therapy with human and mouse T-cell receptors mediates cancer regression and targets normal tissues expressing cognate antigen. *Blood* 114, 535–546, 2009.
2. Eades-Perner AM, Vander Putten H, Hirth A, Thompson J, Neumaier M, von Kleist S, and Zimmermann W. Mice transgenic for the human carcinoembryonic antigen gene maintain its spatiotemporal expression pattern. *Cancer Res* 1994;54:4169–76.