

Anthracycline による心毒性の早期検出に関する検討

◎水野麗子¹⁾、藤本眞一²⁾、山崎正晴¹⁾

1)奈良県立医科大学附属病院中央臨床検査部、2)同 教育開発センター

目的：Anthracycline による心毒性は、その本来の有効使用を制限するとともに、原疾患以外に生命予後を規定し得る危険因子となる。従来報告では、450 mg/m² 以上の Anthracycline の投与が心毒性を招来するとされていたが、近年、さらに低用量でも心毒性が生じることが報告されている。そこで、本研究では、心筋ストレインレートイメージングを用いて Anthracycline による心毒性を明らかな臨床症状が出現していない潜在的な段階で検出可能か否かについて検討した。

方法：40 例の非ホジキン悪性リンパ腫患者を対象とした。全ての患者は、1) Anthracycline による治療歴を有する、2) Anthracycline の積算投与量が 450 mg/m² 未満、3) 器質的心疾患の既往を有さない、4) 通常的心エコー検査で異常を認めない、5) 安静時および負荷心電図で異常を認めない、以上の 5 つの条件を満たした。心筋ストレインレートイメージングを用いて右室自由壁、心室中隔、左室側壁における収縮期最大ストレインレートと心電図上の R 波から収縮期最大ストレインレートまでの時間 (T-SR) を計測し、各

計測部位の収縮能と心室間および左室内の mechanical dyssynchrony を評価した。20 例の健常者を対照として用いた。

結果：左室および右室内腔径、駆出率は患者群と健常群で差がなかった。また、いずれの計測部位においても収縮期最大ストレインレートは両群間で差がなかった。一方、各部位における T-SR の差は、健常群に比して患者群で有意に高値を示した。

結論：Anthracycline による心毒性の早期段階では、局所心筋の収縮力が保たれている一方、心室間および心室内での mechanical synchrony が障害されていることが示唆され、本手法による心毒性の早期検出の可能性が示唆される。

パイロシーケンス法を用いた *IFNG* 遺伝子のメチル化率測定系の確立

◎橋本秀美¹⁾、渡邊幹夫¹⁾、井上直哉^{1,2)}、森田詠美¹⁾、日高洋³⁾、岩谷良則¹⁾

1 大阪大学大学院医学系研究科保健学専攻生体情報科学講座

2 大阪大学医学部附属病院 医療技術部

3 大阪大学医学部附属病院 臨床検査部

[背景・目的] 自己免疫性甲状腺疾患 (AITD) にはバセドウ病 (GD) と橋本病 (HD) が存在し、その発症・病態予後には遺伝因子と環境因子が関与している。環境因子による遺伝子発現制御機構のひとつに DNA のメチル化があり、DNA がメチル化すると転写因子の結合が阻害され、遺伝子発現が低下する。IFN- γ は、Th1 細胞や細胞傷害性 T 細胞などにより産生される炎症性サイトカインで、HD の重症群で IFN- γ の遺伝的産生能が高いことをすでに我々は見出している。そこで、本研究では、*IFNG* 遺伝子の DNA メチル化率と AITD の発症・病態予後との関連を調べるために、再現性・定量性の高いパイロシーケンス法を用いた *IFNG* 遺伝子のメチル化測定系を確立することを目的とした。

[対象] 0%および 100%のメチル化コントロール (キアゲン(株))と、それぞれを混和して作製した 25%、50%、75%のメチル化コントロールを使用し、*IFNG* 遺伝子上に存在する CpG 領域を対象として、パイロシーケンス法による DNA メチル化解析法を確立した。

[方法] EDTA 末梢血から DNA を抽出した後、Epitectplus

Bisulfite Kits (キアゲン(株))を用いてパイロセファイト処理を行い、非メチル化シトシンをウラシルに変換し、PyroMark PCR kit (キアゲン(株))により PCR 反応を行った。その後、ビオチン標識した PCR 産物とストレプトアビジンビーズを結合させ、Vacuum Workstation(キアゲン(株))によりビーズを吸着、洗浄し、PyroMark Q24 (キアゲン(株))を用いてパイロシーケンス法によりメチル化率を測定した。[結果] 通常のプロトコールでは、PCR 産物量は少なく、非特異的 PCR 産物の生成が認められたが、5mM の MgCl₂ と Q-solution を加えると十分量の PCR 産物を得ることができた。検量線を作成したところ、100%メチル化コントロールのメチル化率が低値を示したので、タッチダウン PCR を行い、多項式近似で補正した。今回確立した測定系を用いて AITD 患者における *IFNG* 遺伝子のメチル化率を定量した結果、信頼性のある結果が得られ、臨床検体を十分測定可能であった。

[結語] 臨床検体の測定に適用可能なパイロシーケンス法による *IFNG* 遺伝子のメチル化率測定系を確立した。

自己免疫性甲状腺疾患の病態と *AGO2* 遺伝子多型との関連

◎時吉恵奈¹⁾、渡邊幹夫¹⁾、井上直哉^{1)、2)}、日高洋³⁾、岩谷良則¹⁾

- 1) 大阪大学大学院医学系研究科保健学専攻生体情報科学講座
2) 大阪大学医学部附属病院 医療技術部
3) 大阪大学医学部附属病院 臨床検査部

〔背景・目的〕microRNA(miRNA)とは 21-23 塩基からなる non-coding RNA であり、標的となる mRNA の 3' 非翻訳領域に結合することで翻訳を抑制する。生成された miRNA は RISC(RNA-induced silencing complex)に取り込まれる。この RISC において中心的な役割を果たす AGO タンパク (Argonaute protein) は、ヒトでは、4 種類存在する。中でも AGO2 は唯一触媒活性を持ち、標的 mRNA に結合して完全に切断する特徴を持つ。*AGO2* 遺伝子の多型が miRNA の機能に影響を与え、疾患の表現型に影響を及ぼす可能性を考え、本研究では自己免疫性甲状腺疾患(AITD)の疾患感受性や病態予後と、*AGO2* 遺伝子の一塩基多型である rs7005286 との関連を検討した。

〔対象〕バセドウ病 (GD) 患者は TRAb 陽性かつ甲状腺中毒症の病歴を持つこと、橋本病(HD)患者は TgAb または McAb が陽性であることで診断した。GD 患者のうち、5 年以上の抗甲状腺薬治療でも TRAb が陰性化せず、寛解導入しない群を難治群、5 年未満に寛解導入し、2 年以上無投薬でも TRAb が陰性のままである群を寛解群とした。また、50 歳以下で甲状

腺機能低下症を発症した HD を重症群、未治療かつ 50 歳以上で甲状腺機能正常である群を軽症群とした。これらの分類に従い、健常人 121 例、GD 177 例 {難治群 84 例、寛解群 40 名を含む}、HD 151 例 {重症群 82 例、軽症群 56 例を含む} を対象とし、一塩基多型のタイピングを行った。甲状腺機能が正常で、甲状腺自己抗体が陰性である群を健常人とした。

〔方法〕*AGO2* rs7005286 C/T 多型は PCR-RFLP 法によってタイピングした。EDTA 処理末梢血から DNA を抽出した後、PCR によって目的配列を含む DNA 断片を増幅した。対象とした各群における遺伝子型の頻度の違いについては χ^2 適合度検定により検定を行った。

〔結果〕*AGO2* rs7005286 C/T 多型の genotype および allele 頻度は、GD 患者・HD 患者・健常群の間、GD の難治群と寛解群の間、HD の重症群と軽症群の間にいずれも有意な差は見られなかった。

〔結語〕*AGO2* rs7005286 多型と AITD の疾患感受性や GD の難治性、HD の重症度に大きな関連はなかった。

112

2 型糖尿病患者における Endo-PAT2000 を用いた血管内皮機能検査と TBI (Toe-Brachial Pressure Index) の関連性および薬剤の影響について

◎古田眞智¹⁾、山岡博之¹⁾、寺尾圭子¹⁾、瀧口良重²⁾、大石博晃²⁾、三家登喜夫³⁾、赤水尚史^{1)、4)}

和歌山県立医科大学医学部臨床検査医学¹⁾、和歌山県立医科大学中央検査部²⁾、生長会府中病院糖尿病研究所³⁾、和歌山県立医科大学医学部内科学第一講座⁴⁾

外来通院中の 2 型糖尿病患者(T2DM)で Endo-PAT2000 を用いて血管内皮機能検査を施行した患者のうち、同時期に末梢動脈疾患 (PAD) の検査である TBI (Toe-Brachial Pressure Index) を測定した 74 名の患者について、血管内皮機能の指標である PAT ratio と TBI 測定値の関連について検討した。対象者の平均 PAT ratio は 1.58 ± 0.41 (Mean \pm SD) であり、PAT ratio の健常者下限である 1.67 以下の患者が全体の 74% 存在した。また、対象者のうち TBI が正常値(0.6 以上)の 61 例における PAT ratio は、大血管障害非合併者(N=49、PAT ratio 1.59 ± 0.34)に比し大血管障害合併者(N=12、PAT ratio 1.42 ± 0.28)と有意に低値であり($p=0.04$)、TBI 値と PAT ratio は有意な正の相関($p<0.05$)を認め、PAT ratio は末梢動脈疾患を評価する検査値と有意な相関を呈することが示された。ところが一方、今回の対象者のうち TBI が 0.6 未満の症例で、PAD が存在するにも関わらず PAT ratio が正常値を示す症例が 10 例存在した。それらの症例では、末梢血管拡張作用を有する何らかの薬剤が投与されていた。PAT ratio を測定する際は原則的に内服薬を中止して測

定しているが、PAT ratio のみで血管拡張反応を検査する場合、薬剤によっては薬効が 3 日から 1 週間程度持続するものがあり、薬剤の作用による偽正常値が存在することに注意を要すると思われた。