

# 博士論文

論文題目 補助人工心臓患者における脳卒中合併症の解析

氏 名 恩田 泰光

# 補助人工心臓患者における脳卒中合併症の解析

脳神経外科学

齋藤 延人

恩田 泰光

## 目次

I. 要旨.....	1
II. 序文.....	2
A. 補助人工心臓.....	2
B. 補助人工心臓の適応と実施基準.....	4
C. 補助人工心臓患者における脳卒中合併症.....	6
D. 補助人工心臓患者における従来法での脳卒中リスク評価の限界.....	6
E. エクソソーム.....	7
F. エクソソームと心疾患.....	8
G. エクソソームと脳卒中.....	9
H. エクソソームの精製法・解析法.....	9
I. 本研究の目的.....	10
III. 方法.....	12
A. 東京大学病院における補助人工心臓患者に関する脳卒中合併症の後方視的解析 .....	12
1. 対象.....	12
2. 対象疾患・補助人工心臓の選定と本解析における脳卒中合併症の定義 .....	12
3. 方法.....	12

4. 統計解析.....	15
B. 補助人工心臓患者のエクソソーム精製と測定.....	16
1. 対象.....	16
2. 倫理的配慮.....	17
3. 血液サンプル収集 .....	18
4. 超遠心法.....	19
5. ウェスタンブロット法.....	20
6. ナノ粒子追跡解析.....	22
7. 質量分析法.....	24
8. 健常者検体での精製と測定.....	26
9. 健常者、脳神経外科通院患者、補助人工心臓患者での検討.....	26
10. 補助人工心臓設置前後での検討.....	26
11. 質量分析法を用いたエクソソームのタンパク質解析.....	27
12. 統計解析.....	27
IV. 結果.....	28
A. 東京大学病院における補助人工心臓患者に関する脳卒中合併症の後方視的解析 .....	28
B. 補助人工心臓患者のエクソソーム精製と測定.....	36

1. 健常者検体での精製と測定.....	36
2. 健常者、脳神経外科通院患者、補助人工心臓患者での検討.....	37
3. 補助人工心臓設置前後での検討.....	41
4. 質量分析法を用いたエクソソームのタンパク質解析.....	43
V. 考察.....	50
A. 本研究の意義.....	50
B. 東京大学病院における補助人工心臓患者に関する脳卒中合併症の後方視的解析 .....	51
C. エクソソームの単離精製法と血液サンプルの選択.....	53
D. 精製サンプルと質量分析.....	55
E. 補助人工心臓患者とエクソソーム.....	56
F. 補助人工心臓前後でのデータの変異.....	57
G. Mucin-2.....	58
H. 本研究の限界.....	60
A. 東京大学病院における補助人工心臓患者に関する脳卒中合併症の後方視的解析 .....	60
B. 補助人工心臓患者のエクソソーム精製と測定.....	60
I. 今後の研究の展望.....	61

VI. 結語.....	62
VII. 謝辞.....	63
VIII. 引用文献.....	64



## I. 要旨

補助人工心臓治療は日本における重症心不全治療にはなくてはならない治療法である。ただ補助人工心臓患者の最も多い死因に脳卒中合併症がある。今回我々は今まで行われていなかった東京大学病院における補助人工心臓患者における脳卒中合併症の解析を行った。その結果、一年脳卒中発生率は21.6%で術後敗血症の合併がリスク因子であることが分かった。補助人工心臓患者の病態・病勢の複雑さから従来法での脳卒中合併症のリスク評価は困難であったため新たなマーカーであるエクソソームに注目した。補助人工心臓患者と健常者のエクソソームを比較検討したところエクソソームは補助人工心臓患者で有意に増加しており、病的状態を反映していることが判明した。

## II. 序文

### A. 補助人工心臓

重症心不全の唯一の治療法は心臓移植である<sup>1</sup>。しかし、国内では心臓移植に適応するドナーが現れるまでに長い待機時間を要するという問題がある。公益社団法人日本臓器移植ネットワーク (<http://www.jotnw.or.jp/index.html>) の報告では2015年7月時点で心臓移植希望者は423名登録されていた。そのうち待機期間は1年未満が158名、1年～2年未満が103名、2年から3年未満が80名、3年～4年未満22名、4年～5年未満が19名、そして5年以上が41名であった。

長期間の待機に耐えられない重症心不全患者にとって補助人工心臓 (Ventricular assist device; VAD) 治療はなくてはならない治療法である。重症心不全患者に関しては薬物療法単独より薬物療法に補助人工心臓を併用するほうが、予後が良いことも報告されており<sup>2</sup>、補助人工心臓は心臓移植まで患者の心臓を補助する治療として行われている<sup>3</sup>。

VAD は心臓の補助する部位により区別され、心臓の左室を補助する左室補助人工心臓 (Left ventricular assist device : LVAD)、右室を補助する右室補助人工心臓 (Right ventricular assist device : RVAD)、両心室を補助する両室補助人工心臓 (Bi-ventricular assist device:BiVAD) に分けられる。VAD はそれぞれ補助する心臓部位に脱血管を挿入、胸部大動脈に送血管を接続し人工ポンプを用いて心臓の機能を補助する。そのポンプの設置場所が体外にあるものを体外設置型 VAD、体内に植え込まれている植込型 VAD に区別される。VAD 設置術と

は別に体外設置式 VAD 装着中の患者が心臓移植登録を終え、長期に心移植を待機する際に植込型 VAD へ付け替えをする Convert 手術がある。(図 1)

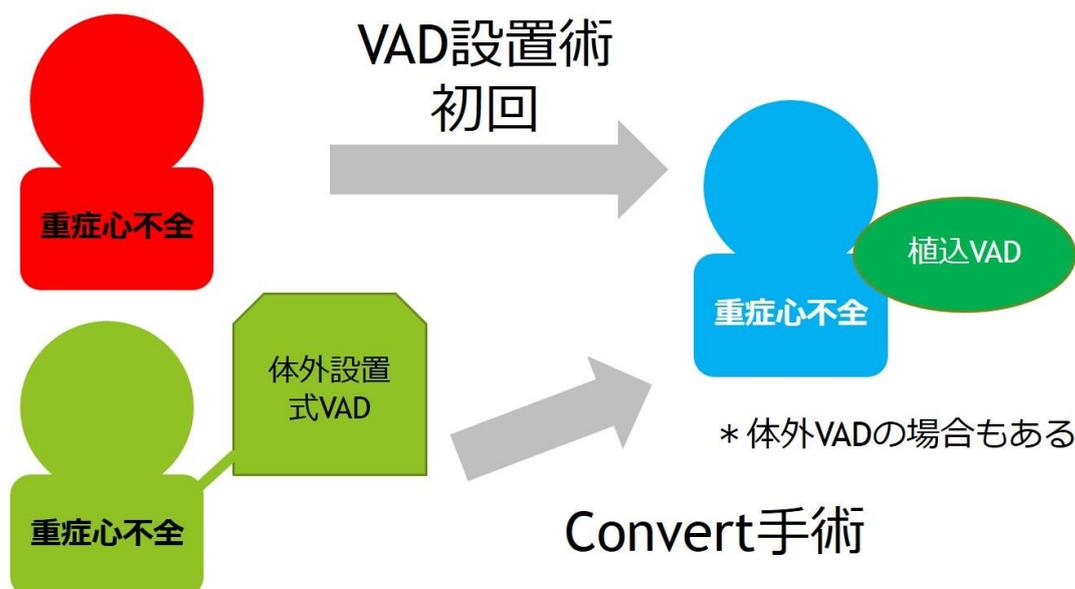


図 1 補助人工心臓における手術の種類

補助人工心臓 (VAD) 設置術とは別に体外設置式 VAD 装着中の患者が植込型 VAD へ付け替えをする Convert 手術がある。

補助人工心臓装着中の主な合併症に感染症、脳卒中、不整脈、大量出血、静脈血栓症などがあり VAD 装着後は血栓症予防の観点から抗凝固薬と抗血小板薬の使用が必須である<sup>4</sup>。一般的にワーファリンはプロトロビン時間国際標準化比 (PT-INR) を指標に調整される。管理目標は使用する VAD の種類により多少異なるが PT-INR の管理目標は体外設置型 VAD で 3.0~4.0、植込型 VAD で 2.5~3.0 で調整される<sup>5</sup>。抗血小板薬はアスピリンを用いることを基調と

し、症状の有無などにより抗血小板薬の増減もしくは他の抗血小板薬を併用し血栓症の予防をする。

## **B. 補助人工心臓の適応と実施基準**

補助人工心臓の適応は体外設置型 VAD と植込型 VAD によって異なる。体外設置式 VAD の適応は自己心機能回復を目指した補助、両心補助、小児例や小柄な体格の症例、多臓器不全合併例、植込型 VAD 準備中の急性憎悪があげられる<sup>6</sup>。植込型 VAD の適応は心臓移植適応の末期的重症心不全で心臓移植登録が前提での適応となり、その基礎疾患には、拡張型および拡張相肥大型心筋症や虚血性心筋疾患や弁膜症、先天性心疾患などが含まれる<sup>4</sup>。

また、補助人工心臓治療は日本のどの病院でも受けられる治療ではなく限られた施設で施される治療法である。とりわけ植込型 VAD においては施設基準が厳しく、2014 年時点で 33 施設のみが認定されている。また執刀する実施医までも厳しい実施医基準を設けられている<sup>4</sup>。(表 1)

実施施設認定基準		実施医基準	
1	心臓血管外科を標榜している心臓血管外科専門医認定修練基幹施設で、開心術の症例が年間100例以上ある。	1	心臓血管外科専門医、または日本胸部外科学会指導医、または日本心臓血管外科学会国際会員である。
2	補助人工心臓の装着手術が過去5年間に3例以上あり、内1例ではその後連続して90日以上管理を行い、その間にベッド外でのリハビリを行った経験がある。	2	日本胸部外科学会、日本心臓血管外科学会、日本人工臓器学会に所属している。
3	心臓移植実施認定施設あるいは実施認定施設と密接に連携を取れる施設である。なお、連携とは、適応判定、植込型補助人工心臓装着手術ならびに装着後管理の指導ならびに支援が受けられる条件にあることを意味する。	3	使用する植込型補助人工心臓システムについての研修プログラムを受講している。
4	補助人工心臓（体外設置型）に関する施設基準を満たし、体外設置型補助人工心臓による緊急時の装着がいつでも施行可能である。	4	術者または指導的助手として3例以上の補助人工心臓装着手術経験を持つ。
5	植込型補助人工心臓装着手術実施医基準を満たす常勤医が1名以上いる。	5	上記基準に基づき、補助人工心臓治療関連学会協議会植込型補助人工心臓実施基準管理委員会による認定を受けている。
6	所定の研修を終了している医療チーム（医師（循環器内科を含む）、看護師、臨床工学技士を含む）があり、人工心臓管理技術認定士が1名以上いる。		
7	補助人工心臓装着の適応を検討する施設内委員会があり、補助人工心臓装着患者を統合的に治療・看護する体制が組まれている。		
8	補助人工心臓装着患者の在宅治療管理体制が組め、緊急対応が取れる。		
9	施設認定を申請する段階でJapanese registry for Mechanically Assisted Circulatory Support (J-MACS) への参加に同意を示すこと。		
10	補助人工心臓治療関連学会協議会植込型補助人工心臓実施基準管理委員会における認定・評価を受けること。なお、評価を受けることの同意、並びに、評価にて重大な問題点を指摘された場合には、管理中の患者に不利益が生じないようにすべき措置を速やかにとることに同意を示すこと。		

表1 「植込型補助人工心臓」 実施基準（文献4より引用改変）

### C. 補助人工心臓患者における脳卒中合併症

東京大学病院は補助人工心臓治療を行える数少ない病院の一つである。補助人工心臓治療を行う当院では補助人工心臓患者の脳卒中合併症を時折経験する。

補助人工心臓患者に併発する脳卒中は通常脳卒中とは違った印象を受ける。特に開頭血腫除去術など脳神経外科的治療が必要となった際に、通常手術とは異なる印象を受ける。慢性心不全により脳血流量が減少し慢性虚血状態にさらされているせいか<sup>7</sup>、血液脳関門（Blood brain barrier）が脆弱になっているのか組織自体が脆弱である印象を受ける。また抗凝固薬の内服の影響もあり止血操作そのものが非常に難しく治療に難渋するケースもある。

補助人工心臓患者にとって脳卒中合併症が最も多い死因とする報告もある<sup>8</sup>。脳卒中合併症の諸外国からの報告では補助人工心臓患者における脳卒中合併症率は1.3から34.8%と報告されている<sup>2,9-12</sup>。一方日本からの報告では補助人工心臓患者における脳卒中合併症率は53.6%と報告されている<sup>13</sup>。

### D. 補助人工心臓患者における従来法での脳卒中リスク評価の限界

脳卒中のリスク評価としてよく使用されるモダリティとしては頭部磁気共鳴映像法（頭部 magnetic resonance imaging：頭部 MRI）検査がある。特に T2\*撮影法で検出可能な脳微小出血の存在は脳出血の極めて強い危険因子であることが知られている<sup>14</sup>。しかし補助人工心臓患者には金属である VAD が植え込まれているため補助人工心臓患者での MRI 施行は禁忌である。

脳単一光子放射断層撮影（Single photon emission computed tomography：

SPECT) により脳血流の状態を把握することが可能であり、脳血流が低灌流の部位は脳卒中のリスクが高いことが知られている<sup>15</sup>。しかし SPECT 検査は撮影時間が長く VAD 装着中に長時間臥位をとる必要があり、重症心不全患者にとって大きな負担を強いることになる。その一方で撮影時間の短い造影頭部コンピュータ断層撮影（造影頭部 Computed Tomography: CT）は大量の造影剤を使用することにより血流状態を描出できるが大量の造影剤を急速に血管内に投与することによる心臓負荷や大量の造影剤を投与することは腎不全のリスクもあり侵襲性が高いと考えられる。そのため、SPECT や造影 CT は補助人工心臓患者にとって侵襲性が高く不適切な検査であると考えられる。

## E. エクソソーム

このように補助人工心臓患者は VAD により病態・病勢は複雑であり、かつ制限が多く従来の評価手法では脳卒中のリスクを評価することに限界があるため今回我々は血液中のエクソソームに注目した。

エクソソームとは大きさ 40~100nm 程度の微小胞で、昨今注目されているマーカーである<sup>16, 17</sup>。エクソソームは細胞内小胞体である多胞性エンドソームの中で産生される。エクソソームは脂質二重膜で囲まれた膜小胞で、分泌された細胞由来の膜タンパク質と細胞質成分で構成される<sup>18</sup>。血小板、T 細胞、単細胞、神経細胞、心筋細胞、内皮細胞などから分泌され<sup>9, 11, 19-21</sup>、体液、血液、唾液、尿、唾液、乳、羊水、腹水、脳脊髄液などに存在することが知られている<sup>22-30</sup>。

エクソソームの膜タンパク質には CD9, CD63, CD81, CD82 という四回膜貫通

タンパク質 (テトラスパニン) が存在する<sup>31</sup>。健常者の血中エクソソームのほとんどは血小板由来のエクソソームであることは知られており<sup>32</sup>、血小板由来エクソソームの膜タンパク質には CD61,CD62,CD42,CD42a,CD41,CD31 が存在する。

エクソソームの排出機構は多胞性エンドソームが細胞膜と融合することにより細胞外に放出され<sup>18</sup>、その際に内包される物質がエクソソームの細胞質成分となる。その内包物質には microRNA や messenger RNA, non-coding RNA などの核酸やタンパク質 (TSG101、Alix など) があり<sup>33,34</sup>、それらを介し細胞間コミュニケーションを行っている<sup>20,35-38</sup>。

その他エクソソームは凝固系、がん細胞の浸潤・転移<sup>39</sup>や免疫調整<sup>40</sup>などに関与しているほか<sup>41</sup>、脳卒中・心疾患を含む様々な疾患との関連性が報告されている<sup>42</sup>。またエクソソームは補助人工心臓患者でも注目されているマーカーの一つでもあり<sup>43</sup>、我々はエクソソームに補助人工心臓患者の複雑な病態・病勢を解き明かす可能性を感じ、エクソソームに注目し研究を行った。

## **F. エクソソームと心疾患**

エクソソームと心疾患に関して多く報告されており、心筋梗塞や心筋障害<sup>44</sup>や心不全<sup>45</sup>、急性冠症候群<sup>46,47</sup>などとの関連性が報告されている。また内皮細胞や血小板からのエクソソーム数が心筋梗塞の重症度と相関するといった報告もある<sup>48,49</sup>。

## G. エクソソームと脳卒中

脳卒中とエクソソームの関連性もあり脳卒中でエクソソームが増加することが報告されている<sup>31</sup>。CD63 陽性エクソソームが上昇することや CD42a、CD42、CD61、CD62P 陽性のエクソソームが増加することで脳卒中リスクになるといった報告がある<sup>50-53</sup>。

## H. エクソソームの精製法・解析法

エクソソームの単離精製方法は大きく分けて分画遠心法とアフィニティー精製法がある<sup>54</sup>。また、アフィニティー精製のなかにビーズ法やマイクロ流体デバイスの利用などがある。その中でもっとも一般的な単離精製法に超遠心法である<sup>10,54</sup>。超遠心法は他の手法に比べて時間を要するなどの欠点があるが、確実にエクソソーム分画を得られる方法である。ただ、超遠心法のプロトコールは現在のところいまだ定まっておらず<sup>55</sup>、各研究室からの報告により様々なのが現状である。

また、エクソソームの計測・解析法に関しては大きくオミクス解析と物理化学的計測がある。オミクス解析の中にトランスクリプトーム解析、プロテオーム解析、グライコーム解析などがあり、物理化学的計測のなかに粒径を求める電子顕微鏡やナノ粒子追跡解析やゼータ電位を調べる電気泳動法などがある<sup>54</sup>。

## I. 本研究の目的

本研究の目的の一つは、東京大学病院における補助人工心臓患者における脳卒中合併症を後方視的に解析することである。当院における脳卒中合併症率がどの程度頻度で生じているのか、またどのような因子が脳卒中合併症と関連するのかを検討する。当院での補助人工心臓患者の脳卒中合併症の特徴やリスク因子などを多角的に解析・検討することにある。対象疾患の選定に関しては、脳卒中と虚血性心疾患との関連性は報告されていることを勘案し<sup>56</sup>、虚血性因子を排除するために対象疾患を拡張型心筋症に限定した。さらに補助人工心臓は、左室補助人工心臓（LVAD）に限定した。脳卒中合併症に関しては、補助人工心臓装着後から脳卒中合併症発生率に関する時間的解析と、出血性と虚血性脳卒中とに区別した脳卒中合併症の種類別での解析を行い、脳卒中合併症のリスクファクターについても解析した。

また補助人工心臓患者の脳卒中合併症に関するリスク評価は前述したとおりMRI、SPECT、造影CTなどの従来法では困難であり、限界を感じざるをえない。そこで臨床的に血液検査のように手軽にその病勢・病態などが把握できるようなマーカーが望ましい。そこで我々は新たなマーカーとして血液中にあるエクソソームというナノ粒子に注目した。

エクソソームは様々な疾患と関連が報告されて始めている細胞間コミュニケーションの要になるナノ粒子である。エクソソームの精製方法に関して統一したプロトコールはなく<sup>10</sup>、各研究室それぞれの精製プロトコールで行われているのが現状である。そこでまず先行する文献を参考に東京大学医学部・工学部で

協議し作成した精製プロトコールに則り、エクソソームの精製を行い、ウェスタンブロット法にてエクソソームであるかを確認し、エクソソーム精製の手法を確立する。

血中エクソソーム数・濃度が各群間で違いがあれば脳卒中合併症の予測因子などのマーカーになる可能性が考えられる。健常者と脳神経外科通院患者、補助人工心臓患者の各群間で血中エクソソーム数・濃度がどの程度違うのかを定量し検討することにより血中エクソソーム数が病的状態を反映しているのかを検討することを第一の目的とした。

エクソソームはその内部にタンパク質や核酸を包含し、それらを介して遠隔な細胞間コミュニケーションを実現している。その中でも特にタンパク質に注目し、エクソソーム内のタンパク質に関して質量分析法（液体クロマトグラフィー）を用いた解析によりバイオマーカーの候補を探索することである。健常者と補助人工心臓患者間での違いを検討し、補助人工心臓患者に特徴的に存在するタンパク質が同定された場合、そのタンパク質が補助人工心臓患者の病態に強く関与している可能性があると考えられる。そういったバイオマーカーの候補となるタンパク質の有無を検討した。

### Ⅲ. 方法

#### A. 東京大学病院における補助人工心臓患者に関する脳卒中合併症の後方視的解析

##### 1. 対象

2002年1月から2013年5月までに東京大学病院で補助人工心臓患者とした。

##### 2. 対象疾患・補助人工心臓の選定と本解析における脳卒中合併症の定義

脳卒中と虚血性心疾患との関連性は報告されているため<sup>56</sup>、虚血性因子を排除するために対象疾患を拡張型心筋症に限定し、左室補助人工心臓に限定した。

本解析における脳卒中合併症の定義は臨床上神経学的異常所見を認め、頭部CTにて確認できた脳梗塞、脳出血、クモ膜下出血とした。また、一過性脳虚血発作と無症候性脳梗塞・脳出血に関しては除外した。

##### 3. 方法

観察期間は2013年9月までとし、エンドポイントを脳卒中合併症発生までかもしくは観察期間終了までとした。対象症例は99例あり、うち54例が拡張型心筋症で、そのうち2例が両室補助人工心臓患者であったため除外し対象症例は52例となった。(図2)。観察期間は $466 \pm 340$ 日間で年齢は $38.3 \pm 13.5$ 歳で男性が36で女性が16例で患者背景は表2に記す。

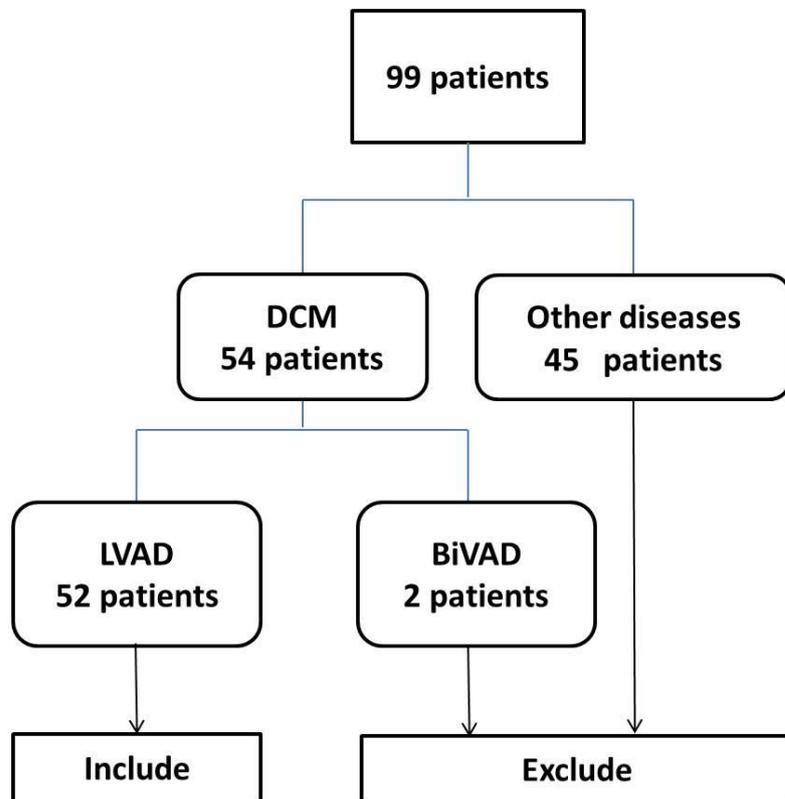


図2 患者抽出のフローチャート

対象症例は99例あり、うち54例が拡張型心筋症であった。そのうち2例が両室補助人工心臓患者であったため除外し本研究に登録した症例は52例となった。

表 2 補助人工心臓患者の患者背景 (n=52)

Age, year	38.3±13.5
Sex, male/female	36/16
Left ventricular ejection rate, %	18.0±7.83
Brain natriuretic peptide, pg/mL	1041±926
Albumin, g/dL	3.46±0.62
Aspartate aminotransferase, U/L	76.7±215
Alanine aminotransferase, U/L	105±352
Total bilirubin, mg/dL	2.82±4.46
Direct bilirubin, mg/dL	2.20±4.29
Red blood cell, x10000/μL	380±65.6
Hemoglobin, g/dL	11.3±1.77
Hematocrit, %	33.9±5.69
White blood cell, ×1000/μL	7.60±3.47
PT-INR	1.88±0.72
APTT, sec	41.3±17.8
Body mass index	19.1±2.7
INTERMACS profile	
Profile 1, Pulsatile flow device	19
Profile 2, Continuous flow device	15
Profile 2, Pulsatile flow device	12
Profile 3, Continuous flow device	6
Follow-up period, day	466±340
Postoperative sepsis	12

Data given as mean ± standard deviation or n.

APTT, activated partial thromboplastin time; INTERMACS, Interagency Registry for Mechanically Assisted Circulatory Support; LVAD, left ventricular assist device; PT-INR, international normalized rate of prothrombin time.

#### 4. 統計解析

脳卒中発症率と補助人工心臓装着後から脳卒中発症までの期間の解析は Kaplan-Meier 解析を行い、その因子解析を Log-rank 検定にて行った。補助人工心臓装着後から脳卒中発症までの日数と脳卒中の種類間で t 検定を行った。脳卒中のリスク因子と LVAD 装着後から脳卒中発症までの日数との解析は Kaplan-Meier 解析を行い、リスク因子の検定を Cox-Hazard model を用いた単変量回帰にて検定を行った。統計解析はすべて JMP Pro version 9.0 (SAS Institute, Inc., Cary, NC)を用いて行い、P 値<0.05 を統計学的に有意とした。

## B. 補助人工心臓患者のエクソソーム精製と測定

### 1. 対象

2014年12月から2015年10月にかけて研究の趣旨に賛同し、同意を得られた健常者ボランティア13例（男性11例、女性2例、年齢 $36.3 \pm 4.81$ 歳）を対象とした。研究の趣旨に賛同し、補助人工心臓設置手術予定の重症心不全患者12例の患者から同意が得られた。そのうち2例がConvert手術の症例があったため、Convert手術症例は解析から除外した。

患者群は男性6例、女性4例の10例で年齢は $36.8 \pm 12.1$ 歳で基礎疾患は拡張型心筋症7例で、急性心筋梗塞、アドリアマイシン心筋症、拡張相肥大型心筋症はそれぞれ1例ずつであった。

術後評価ポイントを全身状態が安定しリハビリテーションが開始される術後14日目とし、その時点で10mlの採血を行いエクソソームの精製・測定・解析を行った。

また、補助人工心臓患者以外の疾患群として同様に研究の趣旨に賛同し同意を得られた東京大学病院脳神経外科通院中の外来患者ら9名を比較対象とした。脳神経外科患者群は男性5名、女性4名で年齢 $56 \pm 16.2$ 才で基礎疾患の内訳は未破裂動脈瘤3例、脳髄膜腫2例、中大脳動脈狭窄症2例、脳海綿状血管腫2例であった。

## 2. 倫理的配慮

本研究は東京大学医学部倫理委員会の承認を得ている（承認日：2014年5月29日 承認番号 10489）。また東京大学工学部倫理委員会でも同様に承認を得ている。（承認日：平成26年6月11日 承認番号 KE14-5）

担当医師は対象になる患者に対し、下記の内容について患者用説明文書に基づき十分に説明したうえで、本研究への参加について患者本人もしくは代諾者の自由意思による同意を文書で得ることとした。またその際には可能な範囲において家族内の血縁者との話し合いを促すこととした。

- 1) 研究の目的・計画
- 2) 研究協力の任意性と撤回の自由
- 3) 研究計画書の開示・資料提供・研究成果の開示
- 4) 資料提供によりもたらされる利益と不利益
- 5) 個人情報保護、研究成果の公表
- 6) 研究から生じる知的財産権の帰属
- 7) 本研究終了後の資料の取り扱いの方針
- 8) 費用負担に関する事項

未成年者、成人で十分な判断能力のない場合、そして成人で意識のない場合は倫理的な配慮を必要とする。未成年に関しては体重20kg以上の患者を対象とした。採血量は医学的妥当な範囲内で行い、体重が20kg以上であっても医学的、倫理的に考慮の上不適当と思われる患者に関しては研究の対象者から除外する。対象者に分かりやすい言葉で十分な説明を行い、理解が得られるよう努

めることとした。また、対象者が 16 歳以上の場合には、保護者（代諾者）等とともに本人からも研究参加について同意を得ることとした。

任意後見人、親権者、後見人や保佐人が定まっているときはその人。いないときは、提供者本人の配偶者、成人の子、父母、成人の兄弟姉妹もしくは孫祖父母、同居の親族またはそれらの親近者に準ずる人の中から関係者間で協議して選定してもらい担当医より説明を行うこととした。

健常者ボランティアに関しては上記の内容について患者用説明文書に基づき十分に説明したうえで、本研究への参加について強制的ではなく本人の自由意思による同意を文書で得ることとした。

### 3. 血液サンプル収集

健常者ボランティアのうち 8 例に対して、静脈採血を行い血漿用採血管と血清用採血管の 2 つの採血管にそれぞれ 10ml ずつ合計 20ml の採血を行った。得られた検体を 2000G 15 分の遠心分離し血清をクライオチューブに分注し、次の実験まで - 80 度に冷凍保存した。

その他の健常者ボランティアと患者に対しては静脈採血を行い血漿用採血管に 10ml の採血を行った。得られた検体を 2000G 15 分の遠心分離し血清をクライオチューブに分注し、次の実験まで - 80 度に冷凍保存した。

#### 4. 超遠心法

遠心機 BECKMAN COULTER Optima XE-100 で SW-32 Ti ローターを用いて超遠心を行った超遠心のプロトコールはヒト血液検体からエクソソーム精製を行っている先行する文献を参考にプロトコールを組んだ<sup>20</sup>。

Optima XE-100 にあう専用プラスチックチューブに血清 1ml をいれ、100nm のフィルターでろ過した PBS (Filtered PBS : F-PBS) で懸濁し、4°C 下 12,000G で 100 分の遠心ののちに、上清を再度 4°C 下 110,000G で 200 分遠心したのち上清を破棄し、同一プラスチックチューブに新たに F-PBS を満たし、さらに 4°C 下 110,000G で 200 分の遠心を行った。(図 7)上清を破棄し、プラスチックチューブ底に付着したナノ粒子を F-PBS200 $\mu$ l に懸濁させて、エクソソームサンプルを調整した。精製したエクソソーム試料は 4°C で保存もしくは - 80°C で冷凍保存し、後に示す実験に使用した。

## 5. ウェスタンブロット法

健康者ボランティア 8 名（6 例が男性、2 例が女性、年齢：37.7±5.7 歳）から超遠心法にて得られた精製画分にエクソソームが含まれていることを示すために、エクソソームに特異的に発現しているテトラスパニン CD9、CD63、CD81<sup>36</sup>、<sup>37</sup>のうち CD9 と CD81 に対するウェスタンブロットを下記の手順で行った。なお、実験は東京大学工学系研究科バイオマテリアル専攻一木研究室で行った。

ウェスタンブロットの手順を以下に記す。精製画分の電気泳動はドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法 (SDS-PAGE) にて行った。まず精製画分サンプルと Tris/Glycine/SDS buffer (BIO RAD, Cat. No: #161-0732) をマイクロチューブ内で 1 : 1 の比率で混合した後、95°C、5 分間の熱処理を行った。熱処理後の精製画分サンプルおよび分子量マーカー (バイオラッド社、Precision plus dual colour protein standard) を、各々 10 uL 及び 5 uL を 5-20% グラジエントゲル e-PAGEL, E-R520L (アトー株式会社、Cat. No: 2331730) に滴下し 20mA/枚、40 分間の条件で電気泳動した。2-メルカプトエタノール(2-ME)やジチオトレイトール(DTT)などの還元剤は使用していない。

ブロッティング試薬は EzBlot (アトー株式会社、Cat. No: AE-1460) を用いて、試薬添付プロトコールに従って以下の操作を行った。まず、ろ紙 2 枚をトランスバッファ- Ez-BlotA 液に、ろ紙 1 枚をトランスバッファ- Ez-BlotB 液に、ろ紙 3 枚をトランスバッファ- Ez-BlotC 液にそれぞれ浸した。その後、陽極側から順番に、A 液に浸したろ紙 2 枚、B 液に浸したろ紙 1 枚、親水化した PVDF 膜 (PVDF Blocking Reagent for Can Get Signal、東洋紡株式会社、Cat. No: NYPBR01)

1枚、ゲル、C液に浸したろ紙3枚の順に重ねて空気を抜き陰極板をセットした。次に、ゲル面積当たり 2mA/cm<sup>2</sup>、通電時間 30 分の条件で、ブロッティング装置（アトー株式会社、Cat. No: WSE-4020）を用いてゲルから PVDF 膜状にバンドを転写した。転写終了後、PBS-T (0.05%Tween20 in PBS)で転写後 PVDF 膜を 5 分間振とう洗浄した。

ブロッキング後の転写後 PVDF 膜をハイブリダイゼーション用ヒートシールポリエチレンバッグに投入し、一次抗体を Can Get Signal, solution1 を用いて終濃度 0.2 ug/mL に希釈した一次抗体懸濁液を適量加えて、室温、1 時間振とうさせた。その後、PBS-T で PVDF 膜を 10 分 3 回の振とう洗浄した。

ブロッキング後の転写後 PVDF 膜をハイブリダイゼーション用ヒートシールポリエチレンバッグに投入し、一次抗体を Can Get Signal, solution1 を用いて終濃度 0.2 ug/mL に希釈した一次抗体懸濁液(希釈率 1:1,000)を適量加えて、室温、1 時間振とうさせた。その後、PBS-T で PVDF 膜を 10 分 3 回の振とう洗浄した。

なお、一次抗体として CD9 抗体（SCB 社、sc-59140）,CD81 抗体（SCB 社、sc-23962）を用いた。次に、二次抗体を Can Get Signal, solution2 を用いて希釈率 1:2000 に希釈した二次抗体懸濁液を適量加えて、室温、1 時間振とうさせた。その後、PBS-T で PVDF 膜を 10 分 3 回の振とう洗浄した。なお、二次抗体として Rabbit Anti-mouse IgG secondary antibody (Pierce 社、PA1-28902)を用いた。

検出は ECL select（GE ヘルスケア株式会社、Cat. No:RPN2235）, solution A と solution B を 1:1 で混合し PDVF 膜に ECL 混合液を上から滴下し、室温で 5 分静置した。その後 PDVF 膜上の ECL 混合液を除去したのち、ImageQuant LAS500

で撮像した。

## 6. ナノ粒子追跡解析

エクソソームの計測・解析法の中でも特性評価法としてナノ粒子追跡解析 (Nano Tracking Analysis) がある。ナノ粒子追跡解析はナノ粒子のブラウン運動をリアルタイムで観察し、粒子の分散・凝集を個々に解析することができる。サンプル中に存在するナノ粒子にレーザー光線を照射し、ナノ粒子からの側方散乱光を対物レンズで集光し、カメラで撮像することによってパソコンディスプレイ上に可視化し粒子の個数から濃度を求めることができる。溶液中の各粒子はビデオ録画され、粒子のブラウン運動による移動距離を測定しストークス・アインシュタインの式を用いて粒子の粒径を算出することができる。ストークス・アインシュタインの式は拡散係数  $D_t = \text{ボルツマン定数} \times \text{絶対温度} / (6 \times \pi \times \text{粘度} \times \text{球体粒子の半径})$  で表される。

今回我々はナノ粒子追跡解析を行うため Nanosight® LM10 を用いて各サンプル間の粒子濃度を測定した。粒子濃度の中でも粒径 1000nm 以下のすべての粒子の濃度である総粒子濃度 Total Concentration とエクソソームの大きさに合わせ 40-100nm のサイズに設定したエクソソーム濃度 Selected Concentration を測定した (図 3)。

使用するサンプルは超遠心後に精製したものを PBS で 100 倍希釈したものをを用いて Nanosight® LM10 で総粒子濃度とエクソソーム濃度を測定し、同一検体を 5 回測定し、その平均をデータとした。

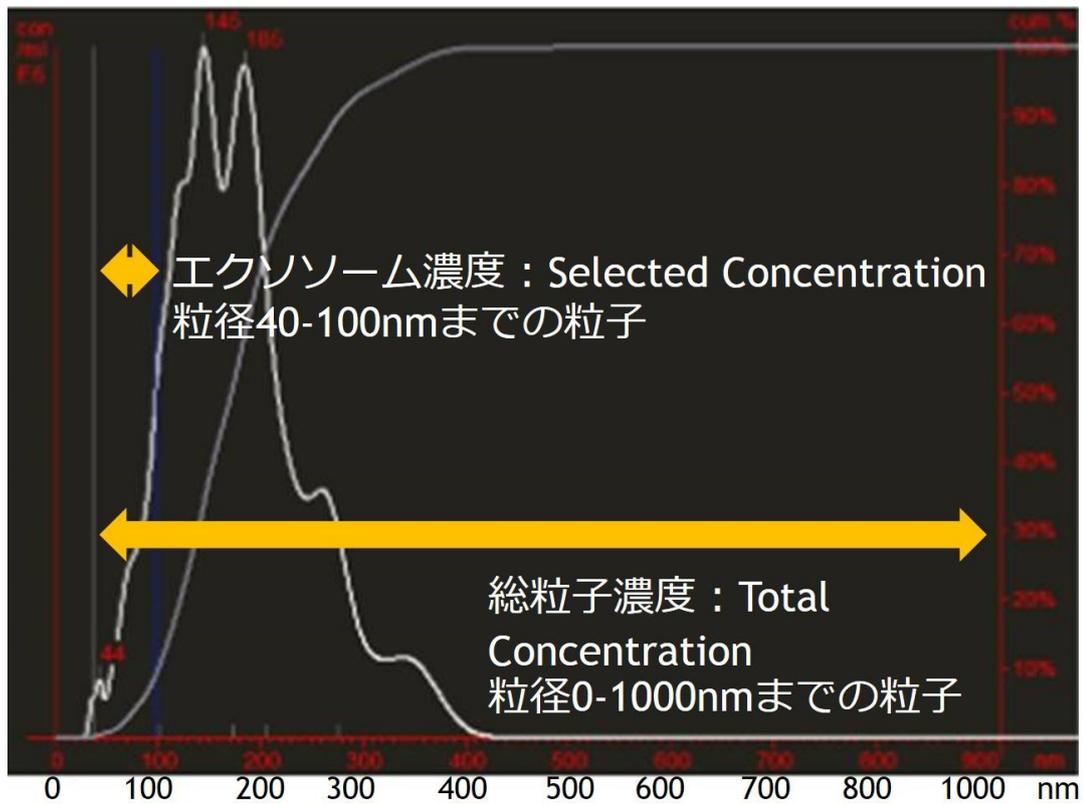


図3 Nanosight®LM10による粒径分布

Nanosight®LM10により粒径 1000nm 以下のすべての粒子の濃度である総粒子濃度 Total Concentration とエクソソームの大きさに合わせ 40-100nm のサイズに設定したエクソソーム濃度 Selected Concentration を測定した。

## 7. 質量分析法

得られたサンプルの解析する方法として質量分析法、その中でも液体クロマトグラフィー質量分析 (LC-MS) を用いて健常者検体 13 例、患者検体手術前後のペアである 7 セットを解析した。質量分析は研究協力機関である公益財団法人がん研究会ゲノムセンターで行った。以下の手法で LC-MS を行った。

- 80°C で保管されていた超遠心精製エクソソーム懸濁液を解凍し減圧遠心乾燥機を用いてサンプルを凍結乾燥した。その後乾燥エクソソームに[12 mM デオキシコール酸、12 mM N-ラウロイルサルコシン酸、50 mM HEPES-NaOH (pH = 8.0)]を添加し、再溶解し終濃度 10mM のジチオスレイトールを添加し、100°C、10 分間還元することによって、システイン残基間のジスルフィド結合を切断した。終濃度 2.5 mM のヨードアセトアミドを添加し、暗所で室温 4.5 分間反応させ、解離させたチオール基をアルキル化保護した。終濃度 10 mM のジチオスレイトールを添加し、室温 5 分間アルキル化反応停止させた。[50 mM HEPES-NaOH (pH = 8.0)]で 5 倍希釈し[50 mM HEPES-NaOH (pH = 8.0)]で平衡化した Immobilized trypsin (Thermo Scientific) で 1000 rpm、37°C、4 時間、振盪インキュベーションした。消化後のペプチド溶液に終濃度 1.2%トリフルオロ酢酸、およびペプチド溶液と等量の酢酸エチルを添加し、激しく混和し 15000 rpm、4°C、2 分間遠心し、上層除去した。その後サンプルと等量の酢酸エチルを添加し、激しく混和し 15000 rpm、4°C、2 分間遠心し、上層除去した。

その後サンプルを凍結乾燥したのちサンプルを[0.1% トリフルオロ酢酸、2% アセトニトリル]で再溶解し、Oasis HLB micro-elution plate (Waters)を用いて脱塩

精製を行い再度凍結乾燥させた。その後サンプルを[0.1% トリフルオロ酢酸、2% アセトニトリル]で再溶解し、質量分析に供した。

こうして得られたペプチド混合物は C<sub>18</sub> 逆相キャピラリーカラム中で極性の違いによって分離されながら質量分析計に導入される。質量分析計には LTQ-Orbitrap-Velos (Thermo Scientific)、ナノフローHPLC には Ultimate3000 RSLC (Dionex)を使用した。その後ペプチドはイオン源で高電圧を印加され、陽イオン化した状態で電位差のある真空質量分析機内へはいる。その後電場型フーリエ変換質量分析器 (Orbitrap®) に導入され、イオン化したペプチドは中心電極の周りを周回する。軽いイオンが生じる周波数の高い誘導電流、重いイオンが生じる周波数の低い誘導電流を合成波として観測し、それをフーリエ変換することで質量スペクトルを得ることが可能である。得られた質量分析データについて Sequest database search により False Discovery Rate (FDR) <1%の精度でタンパク質同定、および定量解析を行った。

## 8. 健常者検体での精製と測定

超遠心法にて精製後、ナノ粒子追跡解析により健常者 8 例に関しては血漿用採血管と血清用採血管それぞれのサンプルから総粒子濃度とエクソソーム濃度を測定しどちらの検体の実験に適しているかを検討した。つぎにその健常者 8 例に関して超遠心法にて精製後にウェスタンブロット法にてサンプルがエクソソームであるかを確認した。

## 9. 健常者、脳神経外科通院患者、補助人工心臓患者での検討

超遠心法にて精製後ナノ粒子追跡解析を用いて健常者、脳神経外科通院患者、補助人工心臓患者のそれぞれの総粒子濃度とエクソソーム濃度を求め比較検討した。

その後質量分析法にてエクソソームのテトラスパニン CD9,CD63, CD81,CD82 と血小板由来エクソソームの膜タンパク質である CD42,CD42a, CD62P, CD61 の定量値を求めた。

## 10. 補助人工心臓設置前後での検討

超遠心法にて精製後、ナノ粒子追跡解析を用いて補助人工心臓設置前後のそれぞれ状態において総粒子濃度とエクソソーム濃度を求め比較検討した。また、質量分析法にてエクソソームのテトラスパニン CD9,CD63,CD81,CD82 と血小板由来エクソソームの膜タンパク質である CD42,CD42a, CD62P, CD61 の定量値を補助人工心臓設置前後で比較検討した。

## 1 1. 質量分析法を用いたエクソソームのタンパク質解析

超遠心法にて精製後の健常者と補助人工心臓患者のサンプルを LC/MS を行い、どのようなタンパク質が存在するかを同定した。健常者と補助人工心臓患者での同定タンパク質がどのように違うか検討し、補助人工心臓患者でのバイオマーカーになりうるタンパク質の検討を行った。

## 1 2. 統計解析

健常者と補助人工心臓患者間での検討ではノンパラメトリック解析の Mann-Whitney の U 検定にて検定を行った。健常者、脳神経外科通院患者、補助人工心臓患者間での検定は健常者を基準とし Steel 検定を行った。補助人工心臓設置前後の解析では補助人工心臓装着前後での解析は Wilcoxon の符号付順位和検定を行った。すべての解析は JMP Pro version 9.0 (SAS Institute, Inc., Cary, NC)を用いて行った。P 値<0.05 を統計学的に有意とした。

## V. 結果

### A. 東京大学病院における補助人工心臓に関する脳卒中合併症の後方視的解析

東京大学病院における補助人工心臓に関する脳卒中合併症の後方視的解析の結果、補助人工心臓患者における脳卒中合併症は観察期間中 11 例認められた。脳卒中合併症の内訳として出血性脳卒中合併症が 5 例（クモ膜下出血 2 例、脳出血 3 例）であった。また虚血性脳卒中合併症は 6 例で全例脳梗塞であった。

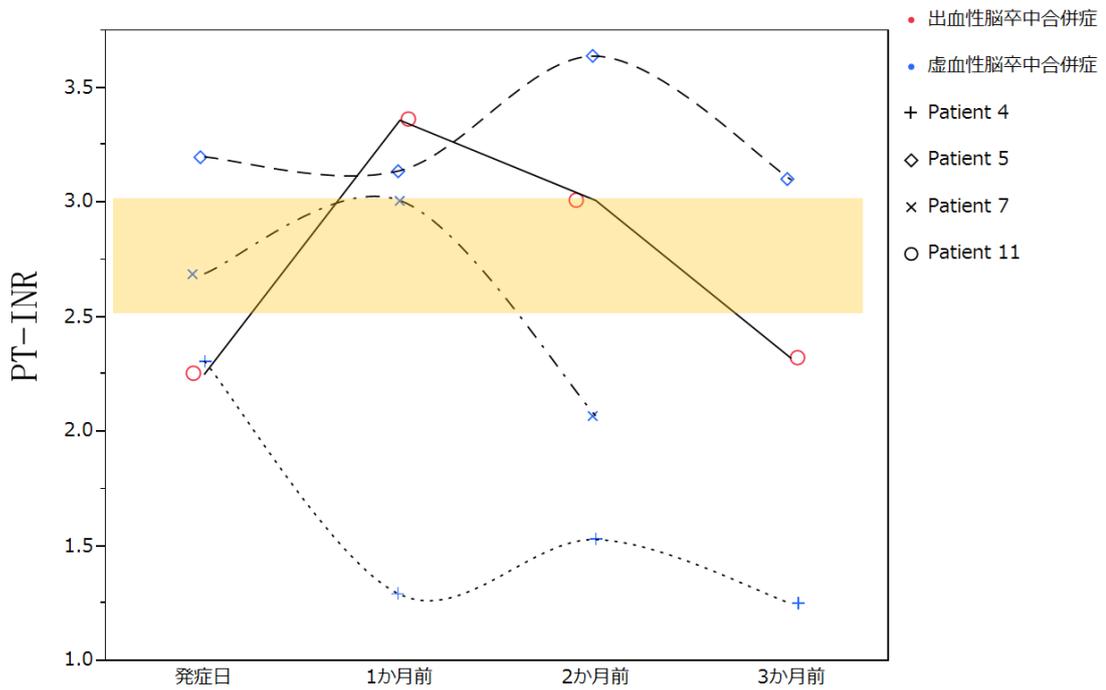
PT-INR に関して脳卒中合併症例について脳卒中合併症発症日、その 1 か月、2 か月、3 か月前の PT-INR の推移は表 3、図 4 にまとめた。脳卒中発症時の PT-INR は植込み型補助人工心臓患者で  $2.61 \pm 0.43$ 、体外設置型補助人工心臓患者で  $2.09 \pm 0.76$  であった。PT-INR 以外の凝固系マーカーは activated partial thromboplastin time (APTT) 以外測定されていなかった。

PT-INR に影響を与える薬剤として抗生物質があり、脳卒中合併症発症日から 3 か月前までに抗生物質を投与されていた患者は 11 例中 6 例で脳卒中合併症例中 54.5%であった。抗生物質の内訳は Patient 1 はバンコマイシン、アルベカシン（ハベカシン®）、テイコプランニン（タゴシット®）、Patient 2 はイミペネム（チエナム®）、タゾバクタム-ピペラシリン（ゾシン®）、セファメジン（セファメジン α®）、Patient 4 はアンピシリン-スルバクタム（ユナシン®）、Patient 5 はバンコマイシン、アンピシリン-スルバクタム（ユナシン®）、セフトジジム（モダシン®）、Patient 9 セファメジン（セファメジン α®）、メロペネム（メロペン®）、Patient 11 はセファピム（マキシピーム®）であった。

	補助人工心臓	脳卒中合併症	3ヶ月前	2ヶ月前	1ヶ月前	発症日	抗生物質 使用
<b>Patient 1</b>	体外設置型	SAH	3.25	3.24	3.33	1.24	(+)
<b>Patient 2</b>	体外設置型	SAH	6	4.03	3.19	2.49	(+)
<b>Patient 3</b>	体外設置型	脳出血	2.19	3.4	3.5	2.07	(-)
<b>Patient 4</b>	植込型	脳梗塞	1.25	1.53	1.29	2.31	(+)
<b>Patient 5</b>	植込型	脳梗塞	3.1	3.64	3.14	3.06	(+)
<b>Patient 6</b>	体外設置型	脳梗塞	—	—	1.1	1.16	(-)
<b>Patient 7</b>	植込型	脳梗塞	—	2.07	3.01	2.69	(-)
<b>Patient 8</b>	体外設置型	脳梗塞	—	1.46	1.08	3.05	(-)
<b>Patient 9</b>	体外設置型	脳梗塞	—	1.01	1.58	2.94	(+)
<b>Patient 10</b>	体外設置型	脳出血	3.8	3.27	3.17	3.38	(-)
<b>Patient 11</b>	植込型	脳出血	2.32	3.01	3.36	2.25	(+)

表3 脳卒中合併症発症日までのPT-INRの推移

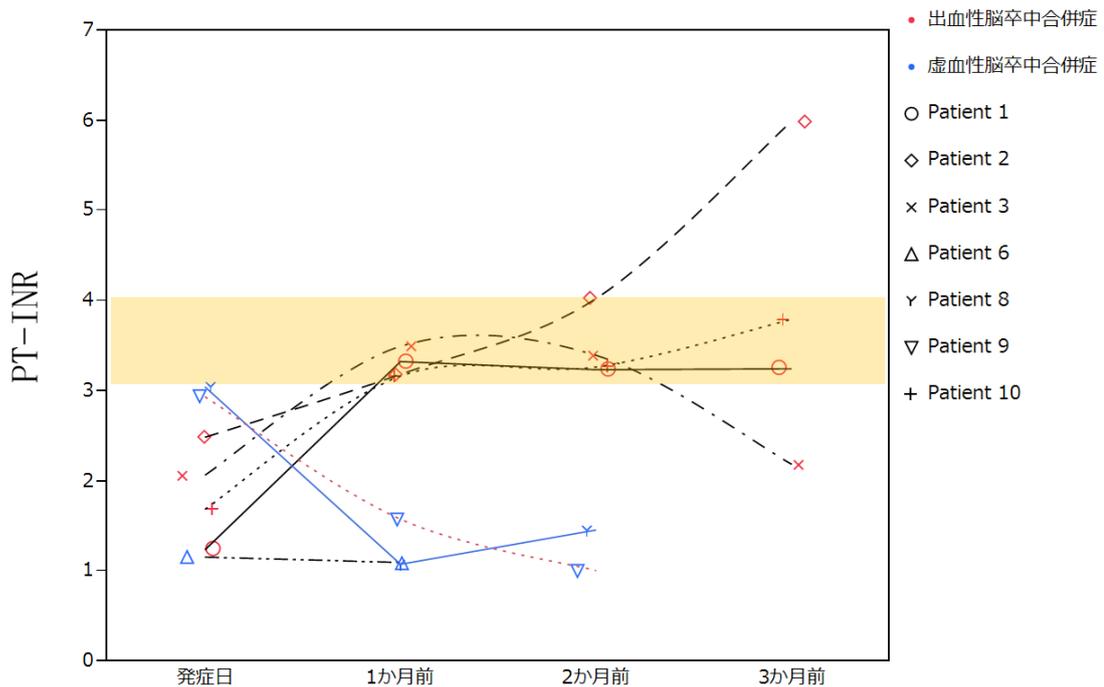
SAH：クモ膜下出血。Patient 6,7,8 は補助人工心臓装着後早期に脳卒中合併症を発症していた。



PT-INRの測定時期

図 4-A 植込型補助人工心臓患者での脳卒中合併症発症までの国際標準化プロトロンビン時間 (PT-INR) の推移

網掛け部は植込型補助人工心臓患者の PT-INR 管理目標 (2.5-3.0) を表示している。赤いマークは出血性脳卒中合併症、青いマークは虚血性脳卒中合併症を表している。ワーファリン関連脳出血は認めていなかった。Patient7 以外の患者は脳卒中発症日以前の 3 か月間の中に抗生物質の投与が行われている。



### PT-INRの測定時期

図 4-B 体外設置型補助人工心臓患者での脳卒中合併症発症までの国際標準化プロトロンビン時間 (PT-INR) の推移

網掛け部は体外設置型補助人工心臓の PT-INR 管理目標 (3.0-4.0) を表示している。赤いマークは出血性脳卒中合併症、青いマークは虚血性脳卒中合併症を表している。Patient 1、Patient2、Patient9 の患者は脳卒中発症日以前の 3 か月間の中に抗生物質の投与が行われている。ワーファリン関連脳出血は認められていなかった。

Kaplan-Meier 解析の結果、一年脳卒中発生率は 21.6%で二年脳卒中発生率は 35.2%であった。(図 5)

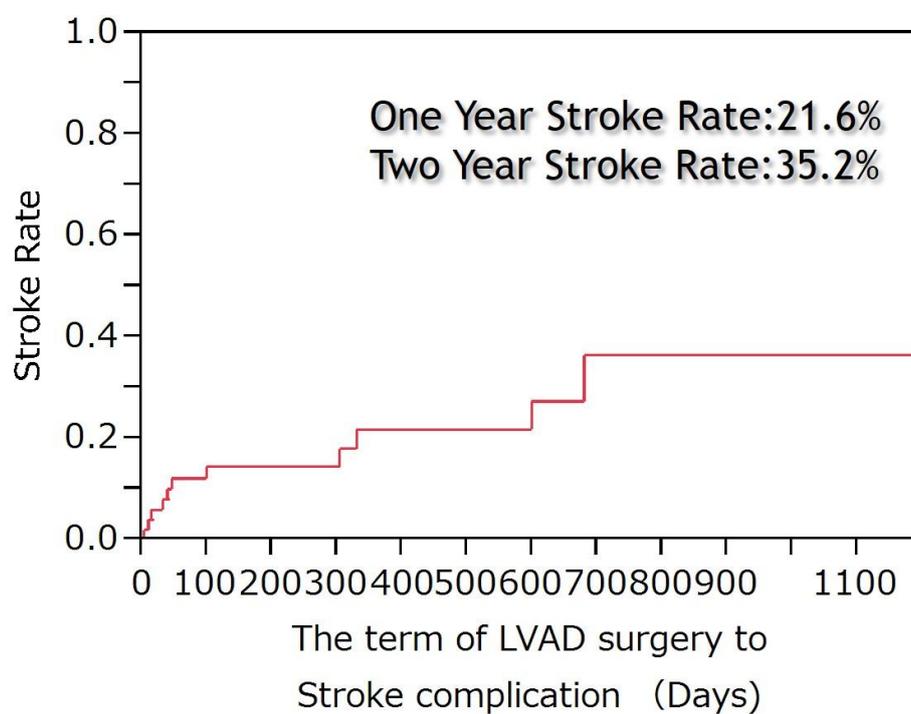


図 5 東京大学病院における補助人工心臓患者の脳卒中合併率  
1 年脳卒中合併症率 21.6%、2 年脳卒中合併症率 35.2%であった。

脳卒中の病型ごとに検討したところ虚血性脳卒中合併症においては  $24 \pm 17$ .

3 日間で出血性脳卒中合併症においては  $402 \pm 235$  日間で病型によって補助人工心臓装着から脳卒中まで期間に違いを認めた。(t-test,  $P < 0.05$ ) (図 6)

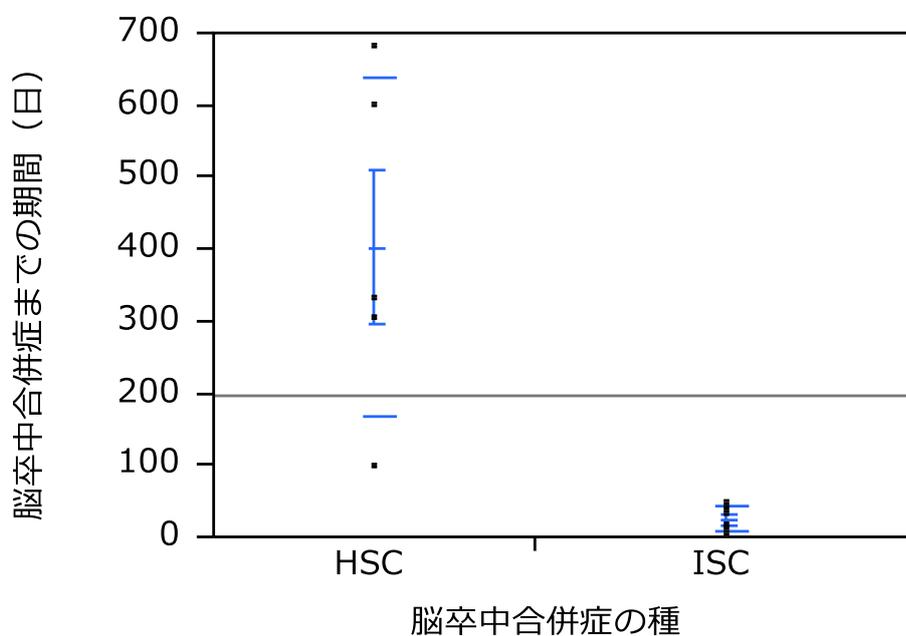
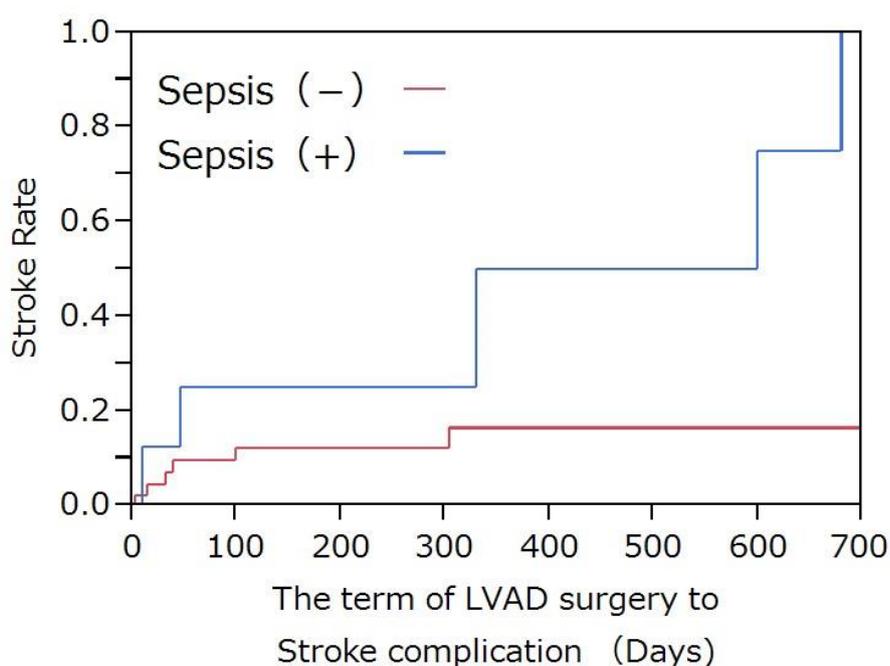


図 6 補助人工心臓装着から脳卒中合併までの期間と脳卒中合併症の種類  
HSC : 出血性脳卒中合併症 ISC : 虚血性脳卒中合併症 LVAD:左室補助人工心臓。LVAD 装着から脳卒中発症までの時間は  $353 \pm 325$  日間で脳卒中の病型ごとに検討したところ ISC においては  $24 \pm 17.3$  日間で出血性脳卒中合併症においては  $402 \pm 235$  日間で病型によって LVAD 装着から脳卒中まで期間に有意差を認めた。(t-test,  $P < 0.05$ )

また、補助人工心臓患者において代表的な合併症に感染症がある。感染症の中でも特に術後に敗血症を合併の有無を検討したところ、敗血症を合併した例は8例認めた。脳卒中合併症と術後敗血症の有無とで、術後敗血症合併症例において有意に脳卒中合併症率の増加を認めた。(log-rank test,  $p=0.0035$ ) (図7)

Cox Hazard model を用いて単変量回帰にて脳卒中のリスク因子を検討したところ、術後敗血症がリスク因子であった。(表4)



**Number of patients at risk**

	0	100	200	300	400	500	600	700
<b>Sepsis(+)</b>	8	6	5	4	3	3	2	1
<b>Sepsis (-)</b>	44	33	29	22	17	14	12	7

図7 脳卒中合併症と術後敗血症の関係  
 LVAD：左室補助人工心臓。術後敗血症合併例では有意に脳卒中合併症率を増加させた。(log-rank test,  $p<0.05$ )

因子	Hazard 比	95%信頼区間	P-value
術後敗血症の合併	4.94	1.42 -16.40	0.013*
年齢	1.01	0.96 -1.06	0.61
性別			
male/female	1.63	0.41 -10.80	0.50
VAD の拍出形態			
continuous flow/pulsatile flow	0.64	0.17 -2.14	0.48
アルブミン	0.44	0.13 -0.14	1.27
Body mass index	1.04	0.73 -0.81	1.30
総コレステロール	0.99	0.31 -0.97	1.00
HDL コレステロール	1.00	0.96 -0.95	1.05
LDL コレステロール	0.98	0.22 -0.92	1.01
INTERMACS Profile**			
Profile 2/Profile 1	1.33	0.37 -6.16	0.67
Profile 1/Profile 2	0.75	0.16 -2.67	0.67

表 4 単変量回帰による補助人工心臓患者における脳卒中合併症のリスク因子

\*術後敗血症の合併が補助人工心臓患者における脳卒中合併症のリスク因子であった。(p<0.05,Cox-Hazard)

Body mass index =体重 (kg) /[身長(m)]<sup>2</sup>

\*\*INTERMACS Profile は心不全の重症度分類である。Profile 3 に関しては脳卒中合併症がないため、解析は行っていない。

## B. 補助人工心臓患者のエクソソーム精製と測定

### 1. 健常者検体での精製と測定

ナノ粒子追跡解析の結果、血漿用採血管を用いて得た血漿からは総粒子濃度は  $3.32 \times 10^{10}$  (Particles/ml) であった。血清用採血管を用いて得た血清からは総粒子濃度は  $1.56 \times 10^{11}$  (Particles/ml) であった。

ウェスタンブロット法の結果は全例で CD9, CD81 が検出された。(図 8)

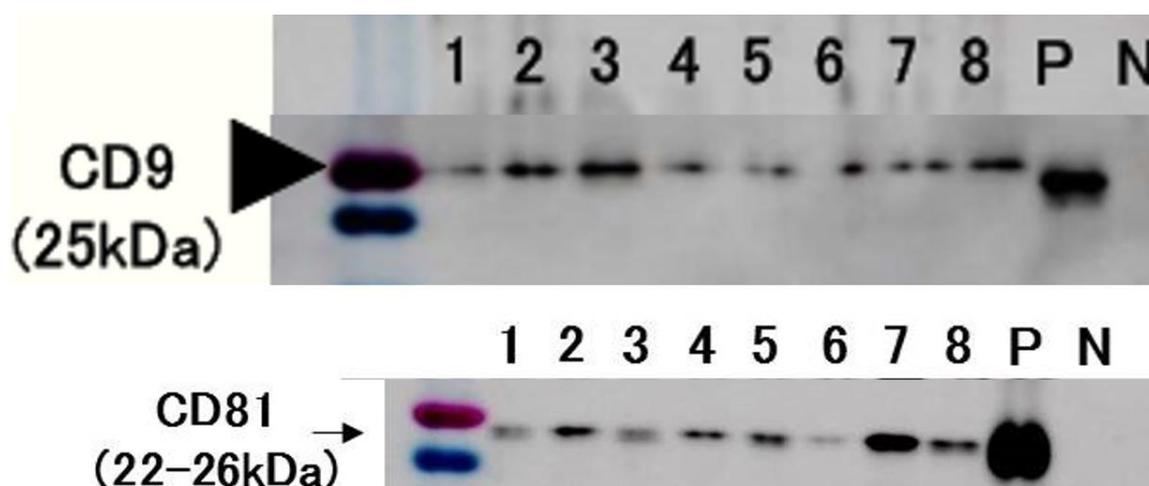


図 8 健常者血液検体から精製したナノ粒子を用いたウェスタンブロット法の結果

P: positive control: HEK 細胞の培養上清から超遠心法にて抽出したエクソソーム (粒子数:  $1 \times 10^8$ /lane) N: negative control: PBS

8 例全例とも CD9、CD81 が確認され精製されたサンプルがエクソソームであることを確認した。

## 2. 健常者、脳神経外科通院患者、補助人工心臓患者での検討

健常者ボランティアのうち 1 例がエクソソームを示す膜タンパク質が検出されなかったため、その 1 例を除外し健常者 12 例、脳神経外科通院患者 9 例、補助人工心臓患者 10 例の結果を表 4、図 9 に示す。ナノ粒子追跡解析の結果、補助人工心臓患者は総粒子濃度  $4.18 \pm 2.34$  ( $\times 10^8$  Particles/ml)、エクソソーム濃度  $0.76 \pm 0.22$  ( $\times 10^8$  Particles/ml)、脳神経外科通院患者は総粒子濃度  $2.47 \pm 0.67$  ( $\times 10^8$  Particles/ml)、エクソソーム濃度  $0.44 \pm 0.18$  ( $\times 10^8$  Particles/ml) であった。健常者の総粒子濃度  $1.63 \pm 1.22$  ( $\times 10^8$  Particles/ml)、エクソソーム濃度  $0.234 \pm 0.225$  ( $\times 10^8$  Particles/ml) という結果に対して脳神経外科通院患者、補助人工心臓患者は総粒子濃度、エクソソーム濃度ともに有意に高値であった。(Steel 検定,  $p < 0.05$ , 表 4, 図 9)

	総粒子濃度 ( $\times 10^8$ Particles/ml)	健常者との比較 (p 値)
健常者	1.52 $\pm$ 1.24	-
補助人工心臓患者	4.19 $\pm$ 2.34	0.003
脳神経外科通院患者	2.48 $\pm$ 0.68	0.044

	エクソソーム濃度 ( $\times 10^8$ Particles/ml)	健常者との比較(p 値)
健常者	0.22 $\pm$ 0.22	-
補助人工心臓患者	0.76 $\pm$ 0.4	0.0025
脳神経外科通院患者	0.44 $\pm$ 0.18	0.002

表 4 脳神経外科通院患者・補助人工心臓患者と健常者の総粒子濃度とエクソソーム濃度 ( $\times 10^8$ Particles/ml)

健常者は総粒子濃度 1.63 $\pm$ 1.22 ( $\times 10^8$ Particles/ml)、エクソソーム濃度 0.234 $\pm$ 0.225 ( $\times 10^8$ Particles/ml)、脳神経外科通院患者は総粒子濃度 2.47 $\pm$ 0.67 ( $\times 10^8$ Particles/ml)、エクソソーム濃度 0.44 $\pm$ 0.18 ( $\times 10^8$ Particles/ml)であった。補助人工心臓患者は総粒子濃度 4.18 $\pm$ 2.34 ( $\times 10^8$ Particles/ml)、エクソソーム濃度 0.76 $\pm$ 0.22 ( $\times 10^8$ Particles/ml)であった。健常者を基準とした Steel 検定を用いて、 $P < 0.05$  を有意とした。

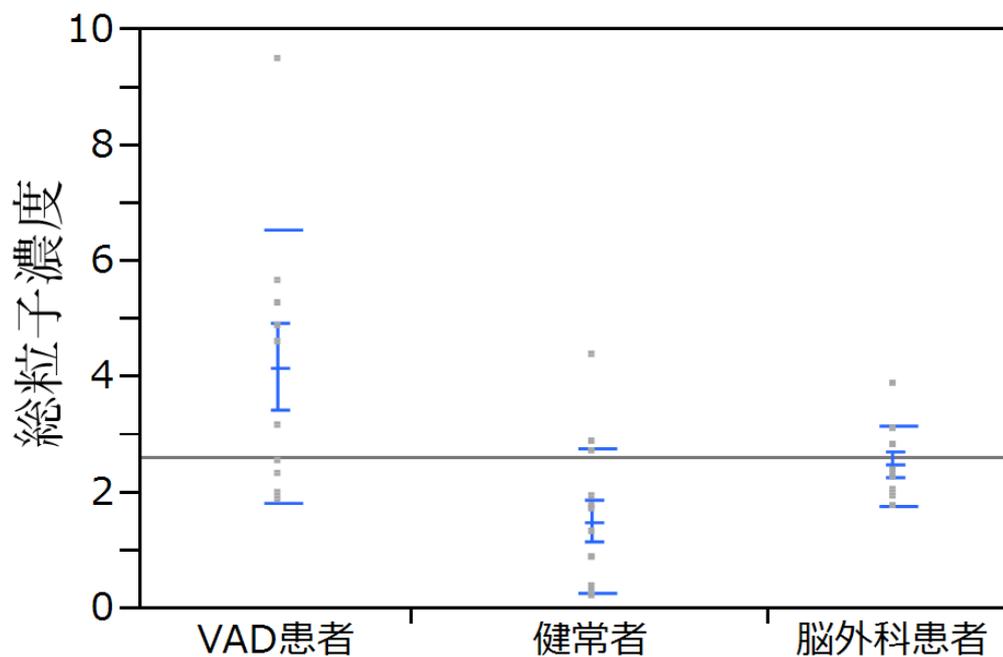


図 9-A 脳神経外科通院患者・補助人工心臓患者と健常者の総粒子濃度 (×10<sup>8</sup>Particles/ml)

VAD 患者：補助人工心臓患者。総粒子濃度は健常者：1.63±1.22 (×10<sup>8</sup>Particles/ml)、脳神経外科通院患者：2.47±0.67 (×10<sup>8</sup>Particles/ml)、補助人工心臓患者：4.18±2.34 (×10<sup>8</sup>Particles/ml) であった。脳神経外科通院患者、補助人工心臓患者はそれぞれ健常者よりも有意に総粒子濃度が上昇していた。統計解析は健常者を基準とした Steel 検定を用いて、P<0.05 を有意とした。

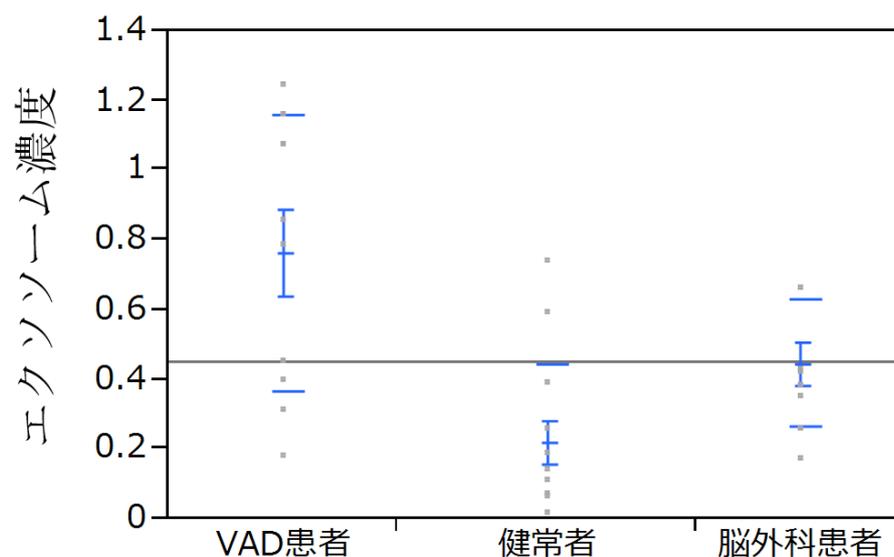


図 9-B 脳神経外科通院患者・補助人工心臓患者と健常者のエクソソーム濃度 (×10<sup>8</sup> Particles/ml)

VAD 患者：補助人工心臓患者。エクソソーム濃度はそれぞれ健常者：0.234±0.225 (×10<sup>8</sup> Particles/ml)、脳神経外科通院患者：0.44±0.18 (×10<sup>8</sup> Particles/ml)、補助人工心臓患者：0.76±0.22 (×10<sup>8</sup> Particles/ml)であった。脳神経外科通院患者、補助人工心臓患者はそれぞれ健常者よりも有意にエクソソーム濃度が上昇していた。統計解析は健常者を基準とした Steel 検定を用いて、P<0.05 を有意とした。

### 3. 補助人工心臓設置前後での検討

手術前後での血清学的検査を表5にまとめた。血清学的検査では血小板、C反応性タンパク質(C reactive protein:CRP)が術後で有意に増加しており、アルブミン、アスパラギン酸アミノ基転移酵素 (Aspartate aminotransferase:AST)、尿素窒素が有意に低下していた。(Wilcoxon の符号付順位和検定,  $p<0.05$ )

	Pre-Operation n =10	Post-Operation n =10	p-value
White blood cell, ×1000/μL	7.67±3.33	8.98±1.93	0.32
Hemoglobin, g/dL	9.88±1.33	9.46±1.65	0.61
Platelet	15.1±8.07	34.34±14.1	0.001*
Albumin, g/dL	3.47±0.60	3.04±0.18	0.025*
Aspartate aminotransferase, U/L	70.1±48.3	27.5±16.9	0.003*
Alanine aminotransferase, U/L	27.3±22.2	34.2±53.5	0.71
Total bilirubin, mg/dL	1.59±0.72	1.21±0.948	0.35
Blood Urea Nitrogen	19.8±12.1	11.0±3.50	0.02*
Creatine	0.973±0.40	0.7±0.186	0.07
C reactive protein	1.06±1.13	4.26±2.62	0.006*

Data given as mean ± standard deviation or n.

表5 補助人工心臓装着手術前後での血清学的検査

\* : Wilcoxon の符号付順位和検定にて有意差を認めた。

補助人工心臓設置手術前後でナノ粒子追跡解析の結果を検討したところ総粒子濃度は術前  $2.03 \pm 1.33$  ( $\times 10^8$  Particles/ml)、術後  $4.19 \pm 2.34$  ( $\times 10^8$  Particles/ml)であった。エクソソーム濃度に関しては術前  $0.33 \pm 0.16$  ( $\times 10^8$  Particles/ml)、術後  $0.76 \pm 0.40$  ( $\times 10^8$  Particles/ml)であり、補助人工心臓設置後に総粒子濃度、エクソソーム濃度ともに有意に増加していた。(Wilcoxon の符号付順位和検定,  $p < 0.05$ , 図 10)

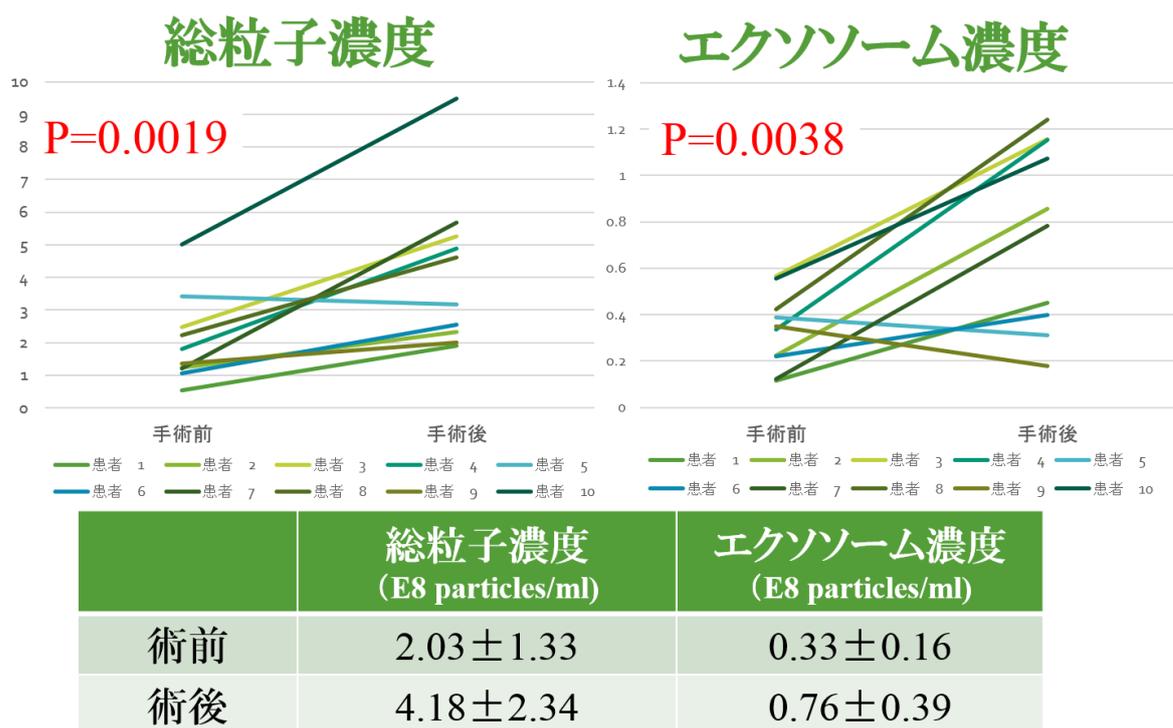


図 10 手術前後でのナノ粒子追跡解析の結果  
手術前後で総粒子濃度とエクソソーム濃度が有意に補助人工心臓装着後に増加していた。(Wilcoxon の符号付順位和検定,  $p < 0.05$ )

#### 4. 質量分析法を用いたエクソソームのタンパク質解析

補助人工心臓患者の超遠心法を用いて精製した試料を質量分析にて解析した結果、健常者では 844 種類のタンパク質が検出され、補助人工心臓患者では 1197 種類のタンパク質が検出された。そのうち 579 種類のタンパク質が共通に検出されていた。エクソソームのテトラスパニンを比較したところ CD63 が有意に補助人工心臓患者で増加していた。(p<0.05, U-test, 表 6, 図 11) また血小板由来エクソソーム膜タンパク質に関して検定したところ CD42a が補助人工心臓患者で有意に増加した。(p<0.05, U-test, 表 6, 図 12)

Case	Status	CD9	CD63	CD81	CD82
Normal 1	Normal	0.00E+00	0.00E+00	4.07E+02	0.00E+00
Normal 2	Normal	9.35E+02	0.00E+00	4.61E+02	8.66E+01
Normal 3	Normal	1.39E+03	0.00E+00	1.48E+03	1.20E+02
Normal 4	Normal	7.65E+02	0.00E+00	6.56E+02	1.03E+02
Normal 5	Normal	3.93E+02	0.00E+00	2.09E+03	9.72E+01
Normal 6	Normal	0.00E+00	0.00E+00	1.26E+02	4.43E+00
Normal 7	Normal	6.70E+02	0.00E+00	1.03E+03	1.42E+01
Normal 8	Normal	4.41E+03	3.97E+02	2.44E+03	8.06E+02
Normal 9	Normal	1.06E+03	0.00E+00	0.00E+00	1.93E+01
Normal 10	Normal	0.00E+00	0.00E+00	5.97E+02	5.37E+00
Normal 11	Normal	0.00E+00	0.00E+00	6.41E+02	4.13E+00
Normal 12	Normal	0.00E+00	0.00E+00	4.45E+02	0.00E+00
Patient 1	Pre-Operation	4.78E+03	2.94E+03	5.57E+02	3.91E+02
Patient 2	Pre-Operation	5.84E+03	2.63E+03	8.78E+02	9.09E+02
Patient 3	Pre-Operation	0.00E+00	0.00E+00	7.15E+02	0.00E+00
Patient 4	Pre-Operation	0.00E+00	0.00E+00	3.84E+02	1.74E+01
Patient 5	Pre-Operation	0.00E+00	0.00E+00	1.98E+02	1.66E+01
Patient 6	Pre-Operation	0.00E+00	0.00E+00	7.24E+02	1.28E+02
Patient 7	Pre-Operation	1.88E+02	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00
Patient 1	Post-Operation	1.41E+03	8.83E+02	8.37E+02	4.40E+02
Patient 2	Post-Operation	7.34E+03	2.63E+03	4.63E+02	8.06E+02
Patient 3	Post-Operation	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00
Patient 4	Post-Operation	1.11E+03	2.84E+02	3.01E+02	3.63E+02
Patient 5	Post-Operation	2.20E+03	3.62E+02	7.84E+02	2.25E+01
Patient 6	Post-Operation	0.00E+00	5.96E+01	1.67E+02	2.68E+01
Patient 7	Post-Operation	0.00E+00	0.00E+00	2.17E+02	1.11E+01

表 6-A 質量分析による検出された四回膜貫通タンパク質の標準化定量値(×1000)

健常者 13 例、補助人工心臓患者 7 例に関してエクソソームに存在する特徴的な膜タンパク質を質量分析にて解析したところ、健常者ボランティアのうち 1 例はエクソソームのテトラスパニンが検出されなかったため除外している。

Case	Status	CD61	CD62P	CD41	CD42a
Normal 1	Normal	3.04E+02	0.00E+00	3.12E+02	0.00E+00
Normal 2	Normal	7.81E+02	0.00E+00	6.85E+02	0.00E+00
Normal 3	Normal	1.29E+03	0.00E+00	1.06E+03	0.00E+00
Normal 4	Normal	1.78E+03	0.00E+00	1.76E+03	0.00E+00
Normal 5	Normal	5.42E+03	0.00E+00	3.54E+03	1.26E+02
Normal 6	Normal	3.02E+02	0.00E+00	1.58E+02	0.00E+00
Normal 7	Normal	1.12E+03	0.00E+00	8.20E+02	0.00E+00
Normal 8	Normal	4.53E+03	0.00E+00	3.32E+03	7.53E+02
Normal 9	Normal	2.76E+03	0.00E+00	2.07E+03	3.30E+02
Normal 10	Normal	1.12E+03	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00
Normal 11	Normal	2.93E+02	0.00E+00	1.51E+02	0.00E+00
Normal 12	Normal	7.57E+02	0.00E+00	7.90E+02	0.00E+00
Patient 1	Pre-Operation	2.18E+04	1.60E+03	1.67E+04	3.44E+03
Patient 2	Pre-Operation	4.57E+03	2.92E+02	9.62E+03	2.55E+03
Patient 3	Pre-Operation	5.53E+02	0.00E+00	3.89E+02	0.00E+00
Patient 4	Pre-Operation	7.81E+02	0.00E+00	5.06E+02	0.00E+00
Patient 5	Pre-Operation	3.72E+02	0.00E+00	2.59E+02	0.00E+00
Patient 6	Pre-Operation	0.00E+00	0.00E+00	4.18E+02	0.00E+00
Patient 7	Pre-Operation	1.73E+02	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00
Patient 1	Post-Operation	5.96E+03	0.00E+00	5.28E+03	1.35E+03
Patient 2	Post-Operation	4.03E+04	4.18E+03	2.99E+04	1.39E+04
Patient 3	Post-Operation	1.37E+03	0.00E+00	8.47E+02	2.57E+02
Patient 4	Post-Operation	1.34E+03	0.00E+00	1.19E+03	5.54E+01
Patient 5	Post-Operation	8.08E+03	0.00E+00	7.34E+03	3.02E+03
Patient 6	Post-Operation	2.98E+02	0.00E+00	3.12E+02	0.00E+00
Patient 7	Post-Operation	1.58E+02	0.00E+00	2.02E+02	0.00E+00

表 6-B 質量分析による検出された血小板由来エクソソームマーカーの標準化定量値 (×1000)

健常者 13 例、補助人工心臓患者 7 例に関して血小板由来エクソソームに存在する膜タンパク質を質量分析にて解析した。

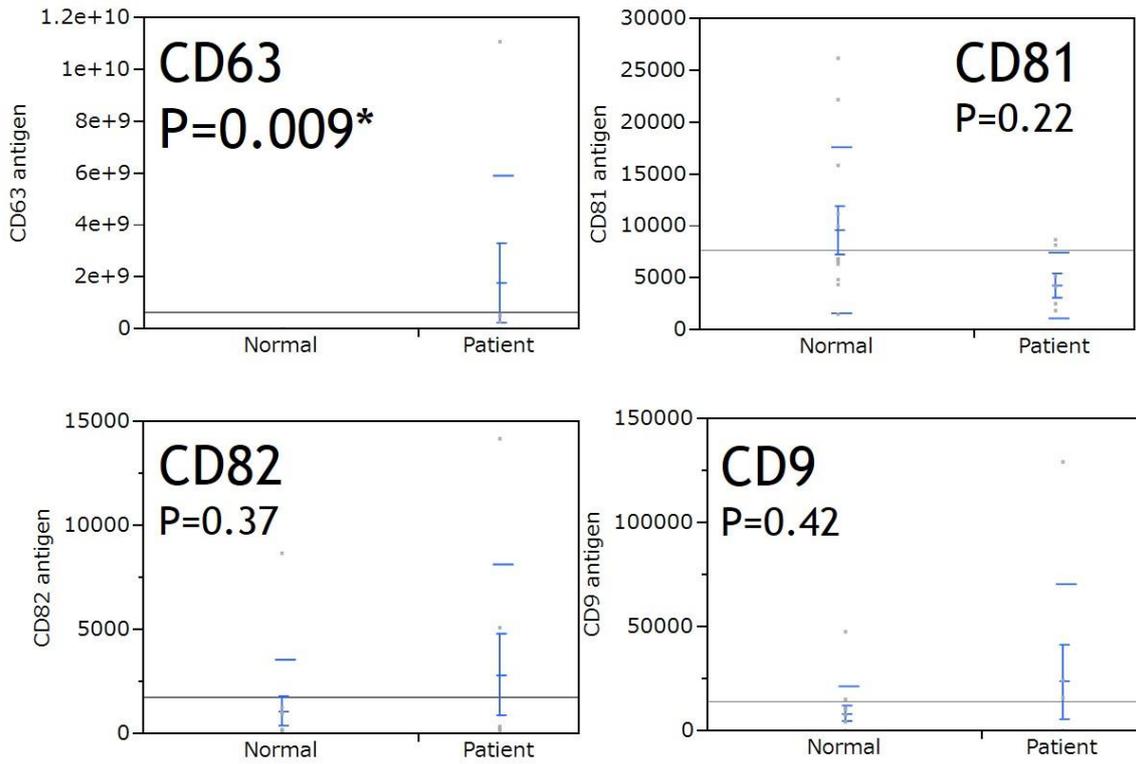


図 11 健常者と補助人工心臓患者との間でのエクソソームマーカーの比較  
 CD63 は補助人工心臓患者で有意に増加していた。統計解析はすべて U-test にて検定している。

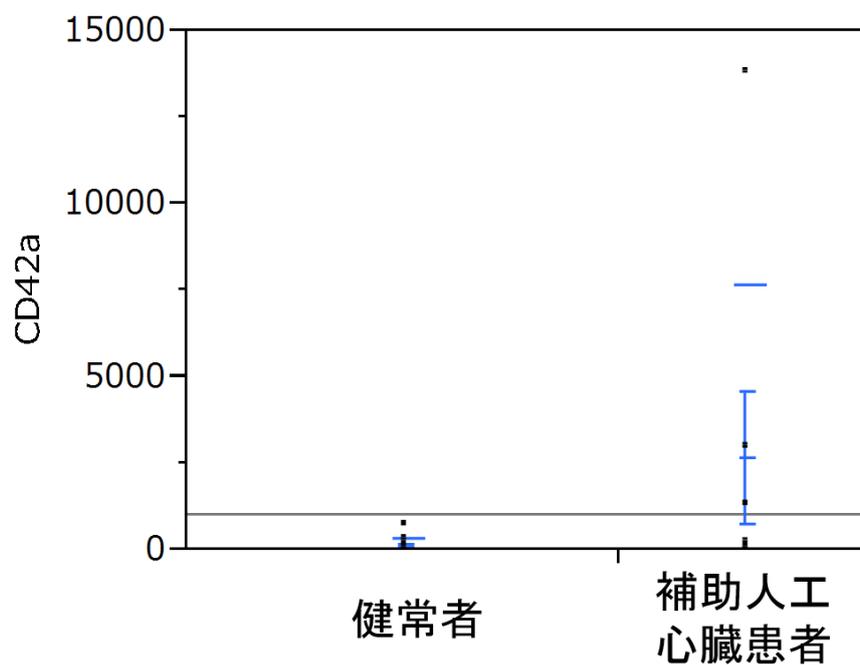


図 12 健康者と補助人工心臓患者との間での血小板由来エクソソームの膜タンパク質 CD42a に関して補助人工心臓患者に有意に増加していた。(U-test,  $p=0.043$ )

また、バイオマーカーの候補を模索するため補助人工心臓患者にのみ検出されているタンパク質の上位は表 7 にまとめた。その中で機能面より Mucin-2 に注目した。Mucin-2 は健常者には検出されておらず、補助人工心臓患者 7 例中 5 例（約 71%）に認め、その標準化定量値は  $7.54 \pm 15.8$  であり健常者に比べ有意に増加していた。（図 13、U-test,  $p=0.0038$ ）

タンパク質	標準化平均値
Pregnancy zone protein	25.888
Glycerokinase 3	12.232
Mucin-2	7.536
Galectin-3	3.37
MHC class I antigen Cw 6	2.052

表 7 補助人工心臓患者にのみ検出されたタンパク質の検出率順上位 5 位のタンパク質

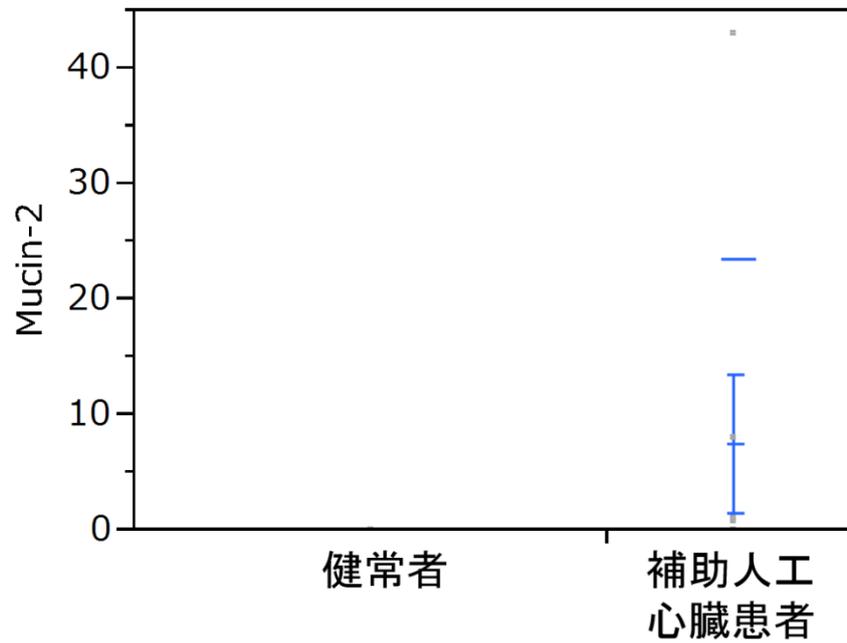


図 13 健常者と補助人工心臓患者での Mucin-2 の検出量の比較  
 健常者では Mucin-2 は検出されず、補助人工心臓患者では  $7.54 \pm 15.8$  検出されていた。U-test にて有意に補助人工心臓患者で増加していた。(p=0.0038)

## VI. 考察

### A. 本研究の意義

本研究の重要な結果は大きく 3 つある。第一に今まで明らかにされていなかった東京大学病院での補助人工心臓患者における脳卒中合併症の発生率とリスク因子を明らかになったことにある。脳卒中合併症率は 21.1%で一年脳卒中発生率は 21.6%であった。また脳卒中合併症のリスクファクターは術後敗血症の合併であることが分かった。このことにより補助人工心臓患者の脳卒中合併症の予防として術後感染症コントロールが重要であることが分かった。

もう一つは新たな血液中のマーカーであるエクソソームに注目したところ、エクソソーム濃度が健常者に比べ補助人工心臓患者では有意に増加していることが分かった。さらに脳神経外科通院患者においても健常者と比べ増加していることが判明した。このことより血中エクソソームが病的状態を反映していることを意味している。

また最後に血中エクソソームを質量分析法で解析した結果、健常人には認めず補助人工心臓患者に高頻度で検出されている Mucin-2 というタンパク質が浮き彫りになった。この Mucin-2 が将来研究を続けていくにつれ補助人工心臓患者における重要なバイオマーカーと考える。

## B. 東京大学病院における補助人工心臓患者に関する脳卒中合併症の後方視的解析

院内の後方視的解析により補助人工心臓患者の一年脳卒中発生率 21.6%という結果を得た。この結果は過去の諸外国からの報告では 1.3~34.8%<sup>57-61</sup>と同程度であり、過去の報告が確証される結果となった。その一方で本邦からの報告で Sasaoka らは 53.6%の脳卒中合併症率と報告しており<sup>13</sup>、本研究の結果よりも高率な脳卒中合併症率であった。その原因を考察すると Sasaoka らの報告は全例体外設置式 VAD であることや、本研究での全身感染症である敗血症合併率は 15.3%であるのに対して Sasaoka らの報告では全身感染症合併症率が 76.8%と高い感染率であったため脳卒中合併症率に差が生じたと考えられる。

本研究では脳卒中合併症のリスク因子に関しては補助人工心臓設置後に敗血症を合併することは脳卒中合併症の発症率を有意に増加させるリスク因子であった。敗血症により血小板が活性化され<sup>62</sup>、血管内皮の機能障害を生じるため<sup>63</sup>脳出血や脳塞栓症が生じやすいと報告されている。一方クモ膜下出血に関しては細菌性動脈瘤の発症により、クモ膜下出血との関連が報告されている<sup>64</sup>。

脳卒中合併症患者の PT-INR は安定せず、有効なコントロール域にとどまっている症例が少なかったことが本研究で明らかになった。(図 4) その原因に関して考察すると敗血症やそれに伴う抗生剤投与が影響を与えていると考えられる。ワーファリンは相互作用が多い薬剤で抗生物質との併用では併用注意と記載されている。抗生物質による腸内細菌の減少に伴うビタミン K の低下が主な機序と考えられている。ワーファリンと抗生物質を併用すると出血イベントリスク

が増加するという報告もある。抗生物質併用後、3-14 日以内に PT-INR を測定すると重篤な出血リスクが減少させるという報告もあり<sup>65</sup>、ワーファリンコントロールが困難な症例では採血検査を適宜行い細心の注意をはらい PT-INR の調整することが必要であると考えられる。

術後感染リスクに関して過去の報告では補助人工心臓適応患者では術前に肝機能障害や低栄養状態、高度浮腫などを合併していることが多く、通常の開心術と比較し、術後感染症を合併するリスクが高いと報告されている<sup>66,67</sup>。本研究の患者群においても Albumin :  $3.46 \pm 0.62$  g/dL、Aspartate aminotransferase :  $76.7 \pm 215$  U/L、Alanine aminotransferase :  $105 \pm 352$  U/L、Total bilirubin :  $2.82 \pm 4.46$  mg/dL と低栄養、肝機能障害を認めていたため術後感染症リスクは高いと考えられる。(表 2) 出血性脳卒中合併症において補助人工心臓に関する敗血症合併症例において発症リスクが 8 倍であると報告されている<sup>68</sup>。一方虚血性脳卒中においては炎症と感染症合併例においては発症リスクを増加させると報告されている<sup>69</sup>。本研究の結果も過去の報告を確証した。

<sup>70</sup> 補助人工心臓患者における虚血性脳卒中合併症の原因として抗リン脂質抗体症候群や急性ヘパリン起因性血小板減少症が挙げられ<sup>43</sup>、出血性脳卒中合併症の原因として人工物使用による血小板機能障害、後天的 von Willebrand's disease、pulse pressure の減少、抗凝固薬の過剰投与などが報告されている<sup>71</sup>。その中でも抗凝固薬の過剰投与に関して本研究で脳卒中合併症発症時の PT-INR を調べたところ、抗凝固薬の過剰投与は認めずワーファリン関連脳出血は認めなかった。(図 4)

血栓症の診断に関して有用な検査に D ダイマーなどの線溶系マーカーが知られている<sup>73</sup>。本研究では後方視的解析において PT-INR, APTT 以外の凝固系マーカーは測定されていなかった。D ダイマーは深部静脈血栓症などの診断にも使用されているマーカーであり補助人工心臓患者における血栓の形成など脳卒中合併症の予測に D ダイマーなどの線溶系マーカーが有用である可能性が高いと考えられる。

### C. エクソソーム単離精製法と血液サンプルの選択

エクソソームの単離精製手法の標準的手法は超遠心法であるが、精製プロトコールに統一した見解は現在も認めていない<sup>10</sup>。今回我々はエクソソームを測定のためにエクソソームを研究している東京大学工学部一木准教授らと共同で臨床研究を行った。一木研究室においてヒト血液検体からのエクソソーム精製は行った経験がなかったためヒト検体からエクソソーム単離精製が可能かどうかをまず検討する必要性が生じ、血清か血漿からエクソソームを精製すべきかの検討と精製したものがエクソソームであるかの確認が必要であった。

サンプルを血清から精製した研究が多いが、サンプルを血漿、血清どちらから採取するのがよい選択なのかという議論に関してもいまだに結論が出ていない<sup>10</sup>。今回我々は血漿を用いて実験を行った。一般的に濃度という観点から見ると、高濃度の検体の方が研究には適している。本研究でも 8 例のボランティア検体の結果より血漿から得られた総粒子濃度  $3.32 \times 10^{10}$  (Particles/ml)の方が血清より得られた総粒子濃度  $1.56 \times 10^{11}$  (Particles/ml)よりも低かった。血清の方が高濃度

であり、濃度という観点からはより適したサンプルであるが血清用採血管の中には凝固促進物質（ガラス微粒子など）が封入されている。それにより凝固促進をさせられ、血小板凝集を起こした際に血小板からの分泌顆粒が多数放出される。この分泌顆粒はエクソソームと同程度の粒径をもつため Nanosight®では区別できず過大評価してしまう可能性が考えられる<sup>10</sup>。そのため、本研究では血小板分泌顆粒の影響を除去するため血漿を使用した。

本研究では密度勾配超遠心法は行っていない。超遠心法をすることにより本研究のプロトコールで得られた沈殿物の中にはエクソソームと同程度の大きさのタンパク質や夾雑物が存在する。それらを除去するためにはエクソソームの密度が 1.10~1.21g/mL であることを利用したショ糖密度勾配遠心を行う必要がある<sup>74, 75</sup>。一般的に超遠心法で得られるサンプル濃度と密度勾配超遠心で得られるサンプル濃度では密度勾配超遠心の方が低い<sup>54</sup>。そのため細胞培養などにより濃縮した高濃度のエクソソームサンプルであれば密度勾配遠心法に耐えられるだけのエクソソーム濃度は得られるが本研究のようにヒト血液検体を使用している場合は精製物質の確認ができない可能性がある。つまり密度勾配超遠心を行った結果、ウェスタンブロット法などによりエクソソームの確認の際にウェスタンブロット法の検出限界以下の濃度になってしまう可能性が高く、エクソソームの存在が確認できなくなることが危惧され本研究では密度勾配超遠心は行わなかった。その他に超遠心法のほかにエクソソーム単離精製法にエクソソーム CD9 抗体を用いてエクソソームをトラップし抽出する精製法がある<sup>54, 76</sup>。エクソソームの代表マーカーである CD9, CD63, CD81 などのテトラスパ

ニンに対する抗体をコートした磁気ビーズによりエクソソームを捕捉する方法である。この手法により得られたエクソソームは特異性が高く、フローサイトメトリーなどによる機能評価が容易であるという利点が挙げられるがすべてのエクソソームに特定のマーカーが存在しているわけではないことと超遠心法に比べさらに収量は少なくなることが欠点であり、密度勾配超遠心法と同様に細胞培養などによりエクソソームが高濃度であるサンプルには適した精製法であるが臨床検体の濃度では第一選択にはならないと考えられる。

#### D. 精製サンプルと質量分析

本研究で全 32 例中の 31 例は質量分析法によりエクソソームの膜タンパク質が検出され、エクソソームの存在が確認された。唯一 1 例が CD9,CD63,CD81, CD82 を質量分析法で検出されなかったが同一健常者の検体で行ったウェスタンブロット法では CD9,CD81 は検出されていた。(図 8)質量分析にてテトラスパニンが同定されなかったのは、本サンプルのエクソソーム精製度が低く、結果としてテトラスパニンに由来するペプチドの検出強度、及び MS/MS スペクトルの強度が低かったため Sequest データベース検索の同定有意水準に達しなかったからと考えられる。他のサンプルで同定されているテトラスパニン分子由来ペプチドの MS スペクトルピークは検出されているため、実際には濃度は非常に低いながら発現はしている。

## E. 脳神経外科通院患者、補助人工心臓患者とエクソソーム

脳神経外科通院患者、補助人工心臓患者の総粒子濃度、エクソソーム濃ともに健常者よりも有意に高値であった。(Steel 検定,  $p < 0.05$ , 表 4, 図 9)エクソソームは脳疾患や心疾患など様々な疾患と関連が報告されているため、エクソソームが病的状況を反映していると考えられる。

中大脳動脈狭窄症に関して血中エクソソームが増加することは知られており<sup>77</sup>、本研究の結果は過去の報告を確証した。未破裂動脈瘤<sup>78</sup>や脳髄膜瘤患者<sup>79, 80</sup>に関してはエクソソームに言及する文献は現在のところないがエクソソームが内包する microRNA に関する報告は存在する。一方、脳海綿状血管腫においてエクソソームや microRNA に関する報告は現在知りうる限り存在しない。本研究で脳海綿状血管腫患者を含む脳神経外科通院患者においてエクソソームが増加していることが示された。今回の予備的なデータを元に脳海綿状血管腫に関して症例数を蓄積し、本研究同様に末梢血のサンプリングを行うことによりエクソソームが健常人に比し増加していることを示せる可能性がある。さらにそのエクソソームが内包する microRNA を解析・同定することにより、脳海綿状血管腫の病因の解明、予後予測に有用なバイオマーカーが発見される可能性がある。

また、質量分析法により CD63、CD42a が有意に増加していることが示された。(図 11-12) 過去の報告で CD63、CD42a が増加している例では脳卒中のリスクが高いことが知られており<sup>50-52</sup>、補助人工心臓患者は脳卒中のリスクが高い可能性がある。CD42a は代表的な活性化血小板マーカーとして知られている<sup>81</sup>。血小板活性化の機序として人工物に対する免疫反応や手術による炎症、それに

伴う創傷治癒過程によるものが考えられる。また、血小板活性化の機序として重症心不全患者であることからカテコラミンの増加、レニンアンギオテンシン系の活性化、サイトカイン、血行力学的変化や血管因子によるものなどが考えられる<sup>82</sup>。補助人工心臓患者は術後人工物とともに生活するため血小板が常時活性化されている状態であるならば、脳卒中をはじめとする血栓症のリスクは高く、抗凝固薬、抗血小板薬の適正な管理必要であると考えられる。

#### **F. 補助人工心臓前後でのデータの変異**

補助人工心臓設置術前後での血液データにおいて血小板数とCRPが増加していた。CRPは術後14日目であることや人工物が植え込まれていることを考えると全身的な炎症以外にも送血管、脱血管などへの異物に対する免疫応答や局所的な炎症の要因で増加していることが考えられる。血小板に関しては手術や出血による反応性の血小板増多症と考えられる<sup>83</sup>。一方アルブミンや尿素窒素は術後減少していた。重症心不全患者の一般的な管理として体液バランスをマイナスバランスで管理することから脱水傾向がありアルブミンや尿素窒素は高値であった可能性がある。そのため補助人工心臓装着後は心不全が軽減され、体液量の管理・制限緩和に伴い体液量の増量も術前よりは許容され希釈性に低下したことが考えられる。

本研究では補助人工心臓設置術前後でのナノ粒子追跡解析において総粒子数、エクソソーム粒子数ともに増加を認めた。(図10)過去の報告ではVADを装着することによりエクソソームの増加する原因として循環動態変化や手術に伴う

ストレス、心筋細胞の治癒過程でのリモデリング、心筋虚血障害が報告されている<sup>19, 21, 84, 85</sup>。本研究の結果は過去の報告を確証した。エクソソームは患者の状況に応じて変化していることが分かり、補助人工心臓患者の病態・病勢を表していると考えられる。

## G. Mucin-2

Mucin(ムチン)は粘液として知られている糖タンパク質である。現在は Mucin-1(MUC1)~mucin-20(MUC20)までの 20 種類が報告され、MUC1, MUC3, MUC4 は膜結合型ムチン、MUC2, MUC5AC, MUC5B, MUC6, MUC7 は分泌型ムチンに分類される<sup>86, 87</sup>。

<sup>86, 88, 89</sup>腫瘍(癌や粘液腫など)から分泌される Mucin が塞栓源になり脳卒中が生じるという報告されている<sup>90</sup>。Mucin の中でも MUC1, MUC2 は塞栓症に関与し<sup>91</sup>、Mucin 自体が凝固因子である第 10 因子を活性化することもあり知られている<sup>92</sup>。補助人工心臓患者における脳卒中合併症機序として血栓による心源性脳塞栓症が通常考えやすいが、本研究で Mucin-2 (MUC2) が健常者には検出されず補助人工心臓患者にのみ高頻度に検出されていることから、補助人工心臓患者の脳卒中合併症に関してムチンにより凝固促進され形成された血栓、またはムチン自体による塞栓となり脳卒中合併症を引き起こしている可能性がある。

<sup>93</sup>Mucin-2(MUC2)は分泌型ムチンで主に小腸・大腸(とくに杯細胞)、気道に存在し<sup>86</sup>、腸壁の粘膜上皮を覆い細菌に対するバリアの役目をもつタンパク質であることが知られている<sup>88, 89</sup>。補助人工心臓患者において Mucin-2 が増加して

いる原因として補助人工心臓により腸管循環の変化や術後創傷治癒過程において分泌されているものと推測される。創傷治癒の中でも補助人工心臓患者においては皮膚の創傷治癒や心臓に設置されている脱血管や上行大動脈に設置されている送血管部などの生体と人工物との癒合などがある。いずれかの影響かにより Mucin-2 が多く分泌されていることが推測される。

今後研究が進み本研究で見いだされた Mucin-2 (MUC2)は補助人工心臓患者における脳卒中合併症の予測因子、もしくはその他なんらかの病勢を表すバイオマーカーになえる可能性がある。仮に Mucin が脳卒中の発生に関与するならば、脳卒中合併症の予測には血液検査で行える CA-125 が有用なバイオマーカーなのかもしれない<sup>93</sup>。

## H. 本研究の限界

### A. 東京大学病院における補助人工心臓患者に関する脳卒中合併症の後方視的解析

補助人工心臓には左室補助人工心臓の他に右室補助人工心臓や両室補助人工心臓もありこれらの患者に関しては再度検討する必要がある。原因疾患に関しても補助人工心臓の原因疾患を拡張型心筋症に限定もしくは大多数を占めているため、拡張型心筋症以外の他の原因疾患の場合も検討する必要がある。

### B. 補助人工心臓患者のエクソソーム精製と測定

本研究では血小板分泌顆粒の影響を除去するために全血の血漿にて研究を行った。血漿を選択したことが真に正しい選択であったか血清に関するデータがないために判断できない。そのため、血清のデータも今後同時に測定し比較検討する必要がある。密度勾配超遠心を粒子数が低いため行わなかったが密度勾配超遠心での実験も行い、それにより得られる結果も比較検討する必要がある。

手術前後での血液サンプリングに関して、本研究では術後 14 日目で採血を行ったためそれ以外の推移に関しては言及できない。また、術後 14 日目以外のサンプリングポイントも今後とも検討する必要がある。

血小板活性化状態という観点から脳卒中リスクが高いと考えられるが実際に脳卒中を合併した患者サンプルがないため直接的な脳卒中合併症との関連性は言及できない。そのため、今後補助人工心臓患者で脳卒中合併症を生じた患者のサンプルも収集し解析し、検討する必要がある。

## I. 今後の研究の展望

今後補助人工心臓とエクソソームと補助人工心臓と脳卒中合併症に関する研究を発展させるためには2つの方向を考えている。

1つ目に血液サンプリングタイミングを再検討し、エクソソーム濃度や Mucin-2、CD63、CD42a などのタンパク質を指標に経時的な変化を記述するとともに脳卒中合併例のサンプルも収集し、併せて解析・検討することが必要である。それらと同様に術後管理段階での血栓症サーベイラインスとしての線溶系マーカーである D ダイマーや Mucin-2 に付随した CA125 などの腫瘍マーカーを用いれば一般的な検査項目で補助人工心臓患者の血栓症の予測できる可能性が期待できる。

2つ目にエクソソームの内包する microRNA やタンパク質による検討を行い、補助人工心臓患者における脳卒中合併症を microRNA やタンパク質という切り口でプロファイリングすることにより、補助人工心臓患者にどのような変化が生じて脳卒中合併症を生じたのかを知る手がかりになる可能性がある。

## VI. 結語

東京大学病院における補助人工心臓患者の脳卒中合併症の後方視的解析を行い、脳卒中合併症の特徴やリスク因子などを解析・検討を行った。脳卒中合併症率は 21.1%で、脳卒中合併症のリスクファクターは術後敗血症の合併であることが分かった。このことにより補助人工心臓患者の脳卒中合併症の予防として術後感染症コントロールが重要であることが分かった。補助人工心臓患者の末梢血液中のエクソソームを解析したところ、健常者に比べ補助人工心臓患者においてエクソソームが増加していることが分かった。さらに健常者に脳神経外科通院患者においてもエクソソームが増加していることがわかり、血中エクソソームの増加は、病的状況の一病態を反映している可能性が示唆された。

さらに、増加しているエクソソームを質量分析法にて解析したところ、Mucin-2 というタンパク質が、健常者では検出されず、補助人工心臓患者でのみ高頻度で検出された。末梢血中のエクソソームにおける Mucin-2 は、補助人工心臓患者において何らかのバイオマーカーになりうるという新たな知見を得た。

## VII. 謝辞

本研究をまとめるにあたりご指導を賜りました東京大学大学院医学系研究科脳神経外科学講座教授・斉藤延人先生に深く感謝いたします。研究テーマや論文作成につき具体的なご指導を賜りました東京大学大学院医学系研究科脳神経外科学講座特任講師・今井 英明先生、助教・宮脇 哲先生に深く感謝いたします。研究テーマ、臨床検体の収集に多大なるご尽力を賜りました東京大学心臓外科教授・小野 稔先生、講師・木村 光利先生、助教・木下 修先生に深く感謝いたします。実験計画、論文作成につき具体的なご指導を賜りました東京大学大学院工学系研究科准講師・一木 隆範先生、特任講師・赤木 貴則先生に深く感謝いたします。質量分析法を行うにあたり具体的なご指導と実験協力を賜りました公益財団法人がん研究会ゲノムセンターがんオーダーメイド医療開発プロジェクトプロジェクトリーダー・プロテオミクス解析グループグループリーダーの植田 幸嗣先生に深く感謝いたします。実験結果のデータ解析、統計処理について具体的なご指導を賜りました東京大学大学院医学系研究科健康科学 生物統計学教室助教・篠崎 智大先生に深く感謝いたします。

また、日々の研究現場においてご指導・ご助言を賜りました脳神経外科研究グループの方々、脳神経外科研究技術員の方々、工学部一木研究室のメンバーの方々、公益財団法人がん研究会ゲノムセンターがんオーダーメイド医療開発プロジェクト・プロテオミクス解析グループのスタッフの方々に感謝いたします。最後に貴重な検体を提供していただいたボランティアの方々と研究にご賛同いただけた患者さんに深く感謝いたします。

## VIII. 引用文献

1. Stehlik J, Edwards LB, Kucheryavaya AY, Aurora P, Christie JD, Kirk R, et al. The registry of the international society for heart and lung transplantation: Twenty-seventh official adult heart transplant report-2010. *J Heart Lung Transplant*. 2010;29:1089-1103
2. van Beers EJ, Schaap MC, Berckmans RJ, Nieuwland R, Sturk A, van Doormaal FF, et al. Circulating erythrocyte-derived microparticles are associated with coagulation activation in sickle cell disease. *Haematologica*. 2009;94:1513-1519
3. Kinugawa K. How to treat stage d heart failure? - when to implant left ventricular assist devices in the era of continuous flow pumps? *Circ J*. 2011;75:2038-2045
4. 許 俊鋭. 重症心不全に対する植込型補助人工心臓治療ガイドライン. *Guidelines for Device Therapy: Implantable Left Ventricular Assist Device for Patients with Severe Heart Failure (JCS/JSCVS2013)* . 2014:147-190
5. Aaronson KD, Slaughter MS, Miller LW, McGee EC, Cotts WG, Acker MA, et al. Use of an intrapericardial, continuous-flow, centrifugal pump in patients awaiting heart transplantation. *Circulation*. 2012;125:3191-3200
6. 西村 隆. 植込型補助人工心臓時代における体外式補助人工心臓の役割. 2012:41

7. Ono M, Joshi B, Brady K, Easley RB, Kibler K, Conte J, et al. Cerebral blood flow autoregulation is preserved after continuous-flow left ventricular assist device implantation. *J Cardiothorac Vasc Anesth.* 2012;26:1022-1028
8. Saito S, Matsumiya G, Sakaguchi T, Miyagawa S, Yoshikawa Y, Yamauchi T, et al. Risk factor analysis of long-term support with left ventricular assist system. *Circ J.* 2010;74:715-722
9. Simons M, Raposo G. Exosomes--vesicular carriers for intercellular communication. *Curr Opin Cell Biol.* 2009;21:575-581
10. Witwer KW, Buzás EI, Bemis LT, Bora A, Lässer C, Lötvall J, et al. Standardization of sample collection, isolation and analysis methods in extracellular vesicle research. *J Extracell Vesicles.* 2013;2
11. Théry C, Amigorena S, Raposo G, Clayton A. Isolation and characterization of exosomes from cell culture supernatants and biological fluids. *Curr Protoc Cell Biol.* 2006;Chapter 3:Unit 3.22
12. Shet AS, Aras O, Gupta K, Hass MJ, Rausch DJ, Saba N, et al. Sickie blood contains tissue factor-positive microparticles derived from endothelial cells and monocytes. *Blood.* 2003;102:2678-2683
13. Sasaoka T, Kato TS, Komamura K, Takahashi A, Nakajima I, Oda N, et al. Improved long-term performance of pulsatile extracorporeal left ventricular assist device. *J Cardiol.* 2010;56:220-228
14. Bokura H, Saika R, Yamaguchi T, Nagai A, Oguro H, Kobayashi S, et al. Microbleeds are associated with subsequent hemorrhagic and

- ischemic stroke in healthy elderly individuals. *Stroke*. 2011;42:1867-1871
15. Ogasawara K, Ogawa A. [jet study (japanese ec-ic bypass trial)]. *Nihon Rinsho*. 2006;64 Suppl 7:524-527
  16. Harding C, Heuser J, Stahl P. Endocytosis and intracellular processing of transferrin and colloidal gold-transferrin in rat reticulocytes: Demonstration of a pathway for receptor shedding. *Eur J Cell Biol*. 1984;35:256-263
  17. Pan BT, Teng K, Wu C, Adam M, Johnstone RM. Electron microscopic evidence for externalization of the transferrin receptor in vesicular form in sheep reticulocytes. *J Cell Biol*. 1985;101:942-948
  18. Raposo G, Stoorvogel W. Extracellular vesicles: Exosomes, microvesicles, and friends. *J Cell Biol*. 2013;200:373-383
  19. Raposo G, Nijman HW, Stoorvogel W, Liejendekker R, Harding CV, Melief CJ, et al. B lymphocytes secrete antigen-presenting vesicles. *J Exp Med*. 1996;183:1161-1172
  20. Burger D, Schock S, Thompson CS, Montezano AC, Hakim AM, Touyz RM. Microparticles: Biomarkers and beyond. *Clin Sci (Lond)*. 2013;124:423-441
  21. Viereck J, Bang C, Foinquinos A, Thum T. Regulatory rnas and paracrine networks in the heart. *Cardiovasc Res*. 2014;102:290-301
  22. Ronquist G, Brody I. The prostasome: Its secretion and function in man. *Biochim Biophys Acta*. 1985;822:203-218

23. Caby MP, Lankar D, Vincendeau-Scherrer C, Raposo G, Bonnerot C. Exosomal-like vesicles are present in human blood plasma. *Int Immunol*. 2005;17:879-887
24. Pisitkun T, Shen RF, Knepper MA. Identification and proteomic profiling of exosomes in human urine. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101:13368-13373
25. Ogawa Y, Miura Y, Harazono A, Kanai-Azuma M, Akimoto Y, Kawakami H, et al. Proteomic analysis of two types of exosomes in human whole saliva. *Biol Pharm Bull*. 2011;34:13-23
26. Admyre C, Johansson SM, Qazi KR, Filen JJ, Laheesmaa R, Norman M, et al. Exosomes with immune modulatory features are present in human breast milk. *J Immunol*. 2007;179:1969-1978
27. Asea A, Jean-Pierre C, Kaur P, Rao P, Linhares IM, Skupski D, et al. Heat shock protein-containing exosomes in mid-trimester amniotic fluids. *J Reprod Immunol*. 2008;79:12-17
28. Andre F, Schartz NE, Movassagh M, Flament C, Pautier P, Morice P, et al. Malignant effusions and immunogenic tumour-derived exosomes. *Lancet*. 2002;360:295-305
29. Vella LJ, Sharples RA, Lawson VA, Masters CL, Cappai R, Hill AF. Packaging of prions into exosomes is associated with a novel pathway of prp processing. *J Pathol*. 2007;211:582-590
30. Masyuk AI, Huang BQ, Ward CJ, Gradilone SA, Banales JM, Masyuk TV, et al. Biliary exosomes influence cholangiocyte regulatory

- mechanisms and proliferation through interaction with primary cilia.  
*Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2010;299:G990-999
31. Colombo E, Borgiani B, Verderio C, Furlan R. Microvesicles: Novel biomarkers for neurological disorders. *Front Physiol.* 2012;3:63
  32. Tushuizen ME, Diamant M, Sturk A, Nieuwland R. Cell-derived microparticles in the pathogenesis of cardiovascular disease: Friend or foe? *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2011;31:4-9
  33. Nolte-t Hoen EN, Buermans HP, Waasdorp M, Stoorvogel W, Wauben MH, t Hoen PA. Deep sequencing of rna from immune cell-derived vesicles uncovers the selective incorporation of small non-coding rna biotypes with potential regulatory functions. *Nucleic Acids Res.* 2012;40:9272-9285
  34. Bellingham SA, Coleman BM, Hill AF. Small rna deep sequencing reveals a distinct mirna signature released in exosomes from prion-infected neuronal cells. *Nucleic Acids Res.* 2012;40:10937-10949
  35. van der Pol E, Hoekstra AG, Sturk A, Otto C, van Leeuwen TG, Nieuwland R. Optical and non-optical methods for detection and characterization of microparticles and exosomes. *J Thromb Haemost.* 2010;8:2596-2607
  36. They C, Ostrowski M, Segura E. Membrane vesicles as conveyors of immune responses. *Nat Rev Immunol.* 2009;9:581-593
  37. Zlotogorski-Hurvitz A, Dayan D, Chaushu G, Salo T, Vered M. Morphological and molecular features of oral fluid-derived exosomes:

- Oral cancer patients versus healthy individuals. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2015
38. Escola JM, Kleijmeer MJ, Stoorvogel W, Griffith JM, Yoshie O, Geuze HJ. Selective enrichment of tetraspan proteins on the internal vesicles of multivesicular endosomes and on exosomes secreted by human b-lymphocytes. *J Biol Chem.* 1998;273:20121-20127
  39. Rak J. Microparticles in cancer. *Semin Thromb Hemost.* 2010;36:888-906
  40. Bobrie A, Colombo M, Raposo G, Thery C. Exosome secretion: Molecular mechanisms and roles in immune responses. *Traffic.* 2011;12:1659-1668
  41. Keller S, Sanderson MP, Stoeck A, Altevogt P. Exosomes: From biogenesis and secretion to biological function. *Immunol Lett.* 2006;107:102-108
  42. Amabile N, Rautou PE, Tedgui A, Boulanger CM. Microparticles: Key protagonists in cardiovascular disorders. *Semin Thromb Hemost.* 2010;36:907-916
  43. Eckman PM, John R. Bleeding and thrombosis in patients with continuous-flow ventricular assist devices. *Circulation.* 2012;125:3038-3047
  44. Corsten MF, Dennert R, Jochems S, Kuznetsova T, Devaux Y, Hofstra L, et al. Circulating microRNA-208b and microRNA-499 reflect myocardial damage in cardiovascular disease. *Circ Cardiovasc Genet.*

- 2010;3:499-506
45. Tijssen AJ, Creemers EE, Moerland PD, de Windt LJ, van der Wal AC, Kok WE, et al. Mir423-5p as a circulating biomarker for heart failure. *Circ Res.* 2010;106:1035-1039
  46. Icli B, Wara AK, Moslehi J, Sun X, Plovie E, Cahill M, et al. MicroRNA-26a regulates pathological and physiological angiogenesis by targeting bmp/smad1 signaling. *Circ Res.* 2013;113:1231-1241
  47. Ren J, Zhang J, Xu N, Han G, Geng Q, Song J, et al. Signature of circulating microRNAs as potential biomarkers in vulnerable coronary artery disease. *PLoS One.* 2013;8:e80738
  48. Mallat Z, Benamer H, Hugel B, Benessiano J, Steg PG, Freyssinet JM, et al. Elevated levels of shed membrane microparticles with procoagulant potential in the peripheral circulating blood of patients with acute coronary syndromes. *Circulation.* 2000;101:841-843
  49. Jung C, Sorensson P, Saleh N, Arheden H, Ryden L, Pernow J. Circulating endothelial and platelet derived microparticles reflect the size of myocardium at risk in patients with st-elevation myocardial infarction. *Atherosclerosis.* 2012;221:226-231
  50. Cha JK, Jo WS, Shin HC, Bae HR, Ho JM, Kim JW. Increased platelet cd63 and p-selectin expression persist in atherosclerotic ischemic stroke. *Platelets.* 2004;15:3-7
  51. Shirafuji T, Hamaguchi H, Kanda F. Measurement of platelet-derived microparticle levels in the chronic phase of cerebral infarction using an

- enzyme-linked immunosorbent assay. *Kobe J Med Sci.* 2008;54:E55-61
52. Pawelczyk M, Chmielewski H, Kaczorowska B, Przybyla M, Baj Z. The influence of statin therapy on platelet activity markers in hyperlipidemic patients after ischemic stroke. *Arch Med Sci.* 2015;11:115-121
53. Cherian P, Hankey GJ, Eikelboom JW, Thom J, Baker RI, McQuillan A, et al. Endothelial and platelet activation in acute ischemic stroke and its etiological subtypes. *Stroke.* 2003;34:2132-2137
54. 一木 隆. 体液エクソソームの診断プラットフォーム. 2013;32:91-95
55. Witwer KW, Buzas EI, Bemis LT, Bora A, Lasser C, Lotvall J, et al. Standardization of sample collection, isolation and analysis methods in extracellular vesicle research. *J Extracell Vesicles.* 2013;2
56. Jansen F, Nickenig G, Petzold GC, Werner N. [acute coronary syndrome in acute stroke]. *Med Klin Intensivmed Notfmed.* 2015
57. Slater JP, Rose EA, Levin HR, Frazier OH, Roberts JK, Weinberg AD, et al. Low thromboembolic risk without anticoagulation using advanced-design left ventricular assist devices. *Ann Thorac Surg.* 1996;62:1321-1327; discussion 1328
58. McCarthy PM, Portner PM, Tobler HG, Starnes VA, Ramasamy N, Oyer PE. Clinical experience with the novacor ventricular assist system. Bridge to transplantation and the transition to permanent application. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1991;102:578-586; discussion 586-577

59. Wagner WR, Johnson PC, Kormos RL, Griffith BP. Evaluation of bioprosthetic valve-associated thrombus in ventricular assist device patients. *Circulation*. 1993;88:2023-2029
60. Farrar DJ, Hill JD. Univentricular and biventricular thoratec vad support as a bridge to transplantation. *Ann Thorac Surg*. 1993;55:276-282
61. Johnson KE, Prieto M, Joyce LD, Pritzker M, Emery RW. Summary of the clinical use of the symbion total artificial heart: A registry report. *J Heart Lung Transplant*. 1992;11:103-116
62. Fitzgerald JR, Foster TJ, Cox D. The interaction of bacterial pathogens with platelets. *Nat Rev Microbiol*. 2006;4:445-457
63. Grandel U, Benkelmann R, Buerke M, Kiss L, Hattar K, Mayer K, et al. Free arachidonic versus eicosapentaenoic acid differentially influences the potency of bacterial exotoxins to provoke myocardial depression in isolated rat hearts. *Crit Care Med*. 2006;34:118-126
64. Clare CE, Barrow DL. Infectious intracranial aneurysms. *Neurosurg Clin NAm*. 1992;3:551-566
65. Lane MA, Zeringue A, McDonald JR. Serious bleeding events due to warfarin and antibiotic co-prescription in a cohort of veterans. *Am J Med*. 2014;127:657-663.e652
66. Lietz K, Long JW, Kfoury AG, Slaughter MS, Silver MA, Milano CA, et al. Outcomes of left ventricular assist device implantation as destination therapy in the post-rematch era: Implications for patient

- selection. *Circulation*. 2007;116:497-505
67. Topkara VK, Dang NC, Barili F, Cheema FH, Martens TP, George I, et al. Predictors and outcomes of continuous veno-venous hemodialysis use after implantation of a left ventricular assist device. *J Heart Lung Transplant*. 2006;25:404-408
68. Aggarwal A, Gupta A, Kumar S, Baumblatt JA, Pauwaa S, Gallagher C, et al. Are blood stream infections associated with an increased risk of hemorrhagic stroke in patients with a left ventricular assist device? *ASAIO J*. 2012;58:509-513
69. Lindsberg PJ, Grau AJ. Inflammation and infections as risk factors for ischemic stroke. *Stroke*. 2003;34:2518-2532
70. Hsich EM, Naftel DC, Myers SL, Gorodeski EZ, Grady KL, Schmuhl D, et al. Should women receive left ventricular assist device support?: Findings from intermacs. *Circ Heart Fail*. 2012;5:234-240
71. Slaughter MS. Hematologic effects of continuous flow left ventricular assist devices. *J Cardiovasc Transl Res*. 2010;3:618-624
72. Baillargeon J, Holmes HM, Lin YL, Raji MA, Sharma G, Kuo YF. Concurrent use of warfarin and antibiotics and the risk of bleeding in older adults. *Am J Med*. 2012;125:183-189
73. 安藤 太, 伊藤 正, 慶儀 成, 小林 隆, 田島 廣, 中西 宣, et al. 肺血栓塞栓症および深部静脈血栓症の診断、治療、予防に関するガイドライン (2009年改訂版) . 2009
74. Kalra H, Adda CG, Liem M, Ang CS, Mechler A, Simpson RJ, et al.

- Comparative proteomics evaluation of plasma exosome isolation techniques and assessment of the stability of exosomes in normal human blood plasma. *Proteomics*. 2013;13:3354-3364
75. Webber J, Clayton A. How pure are your vesicles? *J Extracell Vesicles*. 2013;2
76. Ueda K, Ishikawa N, Tatsuguchi A, Saichi N, Fujii R, Nakagawa H. Antibody-coupled monolithic silica microtips for highthroughput molecular profiling of circulating exosomes. *Sci Rep*. 2014;4:6232
77. Jung KH, Chu K, Lee ST, Park HK, Bahn JJ, Kim DH, et al. Circulating endothelial microparticles as a marker of cerebrovascular disease. *Ann Neurol*. 2009;66:191-199
78. Volný O, Kašíčková L, Coufalová D, Cimřlová P, Novák J. MicroRNAs in cerebrovascular disease. *Adv Exp Med Biol*. 2015;888:155-195
79. Li P, Gao Y, Li F, Pan Q, Liu Z, Lu X, et al. MicroRNA-18a regulates invasive meningiomas via hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$ . *Exp Ther Med*. 2015;10:1165-1170
80. Pardo OE. Meningioma dissemination and growth: A role for microRNAs. *Oncogene*. 2015;34:1743-1744
81. Andrews RK, Lopez JA, Berndt MC. Molecular mechanisms of platelet adhesion and activation. *Int J Biochem Cell Biol*. 1997;29:91-105
82. Chung I, Lip GY. Platelets and heart failure. *Eur Heart J*. 2006;27:2623-2631
83. 清水 隆. 本態性血小板血症. 2010;63:383

84. Sahoo S, Losordo DW. Exosomes and cardiac repair after myocardial infarction. *Circ Res.* 2014;114:333-344
85. Waldenstrom A, Ronquist G. Role of exosomes in myocardial remodeling. *Circ Res.* 2014;114:315-324
86. 堀田 恭, 石原 和. 胃粘液の魅力を探る—最新す法によるムチンの解明. メジカルビュー; 1999.
87. Niv Y. Muc1 and colorectal cancer pathophysiology considerations. *World J Gastroenterol.* 2008;14:2139-2141
88. Johansson ME, Thomsson KA, Hansson GC. Proteomic analyses of the two mucus layers of the colon barrier reveal that their main component, the muc2 mucin, is strongly bound to the fcgbp protein. *J Proteome Res.* 2009;8:3549-3557
89. Chen J, Tellez G, Richards JD, Escobar J. Identification of potential biomarkers for gut barrier failure in broiler chickens. *Front Vet Sci.* 2015;2:14
90. Deck JH, Lee MA. Mucin embolism to cerebral arteries: A fatal complication of carcinoma of the breast. *Can J Neurol Sci.* 1978;5:327-330
91. Chu PH, Jung SM, Yeh TS, Lin HC, Chu JJ. Muc1, muc2 and muc5ac expressions in cardiac myxoma. *Virchows Arch.* 2005;446:52-55
92. Cestari DM, Weine DM, Panageas KS, Segal AZ, DeAngelis LM. Stroke in patients with cancer: Incidence and etiology. *Neurology.* 2004;62:2025-2030

93. Jovin TG, Boosupalli V, Zivkovic SA, Wechsler LR, Gebel JM. High titers of ca-125 may be associated with recurrent ischemic strokes in patients with cancer. *Neurology*. 2005;64:1944-1945