

伴侶動物の自然発生腫瘍に対する遺伝子治療の前臨床的研究

分担研究者 辻本 元

(東京大学大学院農学生命科学研究科獣医内科学教室)

研究要旨

本年度は、昨年度作製したイヌ *p53* 遺伝子発現アデノウイルスベクター (AxCA-cp53) および本年度作製した antisense-*mdm2* 遺伝子を組み込んだアデノウイルスベクター (Ad-m2a) について、イヌの各種腫瘍細胞株に対する増殖抑制効果の検討した。その結果、AxCA-cp53、Ad-m2a ともに骨肉腫および乳腺腫瘍由来の細胞株に対して明らかな増殖抑制効果を示すことが示された。さらに AxCA-cp53 と Ad-m2a を同時感染させることによって、より効果的な細胞増殖抑制を誘導することが確認され、今後 *p53* および antisense *mdm2* の同時導入による遺伝子治療の可能性が示された。

A, 研究目的

近年の臨床獣医学の進歩に伴って動物の寿命が延びたことにより、悪性腫瘍をはじめとする難治性疾患の増加が重大な問題となってきた。このような背景をもとに、動物の難治性疾患、とくに自然発生悪性腫瘍に対する遺伝子治療の臨床応用のためのベクターの開発を行い、その有効性の評価法を確立し、その系をヒトの抗癌治療の動物モデル系として活用することを目的として本研究を企画した。

B・C, 研究方法と結果

(1) イヌ *p53* 遺伝子発現アデノウイルスベクター (AxCA-cp53) の *in vitro* における抗腫瘍効果の検討: AxCA-cp53 の *in vitro* での抗腫瘍効果を、イヌの骨肉腫細胞株 (HOS, OOS) および乳腺腫瘍細胞株 (cHMp, cIPm, cNMm) を用いて検討した。AxCA-cp53 はいずれの腫瘍細胞株に対しても明らかな増殖抑制効果を示した (図1) が、この効果は、腫瘍細胞における *p53* 遺伝子の変異の有無に関わらず認められ、アデノウイルスの感染効率に依存することが示された。

次にイヌ *p53* 遺伝子発現アデノウイルスベクターによる細胞増殖抑制効果の機構を検討するため、細胞 DNA 量を測定するフローサイトメトリーによって細胞周期を、ま

た TUNEL 法によってアポトーシスを検出した。イヌ *p53* 遺伝子発現アデノウイルスベクター感染 1 日後には、S 期にある細胞の減少および G1 期にある細胞の増加が認められ、さらに時間に経過とともに死細胞である Sub-G1 細胞の増加が認められた。また *p53* 遺伝子の導入により TUNEL 陽性細胞の増加が認められた (図 2)。このことから、イヌ *p53* 遺伝子発現アデノウイルスベクターによる細胞増殖抑制は、G1 期での細胞周期の停止およびアポトーシスの誘導 (図3) によるものと考えられた。

(2) イヌ antisense *mdm2* 遺伝子発現アデノウイルスベクター (Ad-m2a) の作製および *in vitro* における抗腫瘍効果の検討: イヌ *mdm2* cDNA の全領域を antisense 方向にアデノウイルスベクターに組み込んだ Ad-m2a を作製した。Ad-m2a をイヌの骨肉腫細胞株 (HOS, OOS) および乳腺腫瘍細胞株 (cHMp, cIPm, cNMm) に感染させたところ、MDM2 タンパクの発現低下およびアポトーシスの誘導を伴う細胞増殖抑制効果が認められた。しかし antisense *mdm2* の導入のみでは P53 タンパクの発現量に変化は認められなかった。そこで次に、治療効果を上げる目的で、AxCA-cp53 と Ad-m2a の同時感染を行ったところ、単独感染に比較して強い細胞増殖抑制効果が認められ、MDM2 タンパクの発現低下および

P53 タンパクの発現誘導が確認された。

(3) AxCA-cp53 の腫瘍症例に対する試験的臨床応用: 乳腺腫瘍の 1 症例 (PCR-SSCP では *p53* 遺伝子の変異は認められない症例) に AxCA-cp53 (10^{11} PFU/2.5 ml) を 1 回投与した (右側乳腺 3, 4, 5 番の腫瘍のうち 4 番)。投与による副反応は認められず、発熱はなく、肝酵素および腎機能に変化を認めなかった。血中には投与後 10 分後にの時アデノウイルス DNA が PCR 法によって検出され、少なくとも 3 日目までは陽性を示した (図 4)。6 日後にはアデノウイルス DNA は検出されなくなった。また、試験期間中、尿中にはアデノウイルス DNA は検出されなかった。腫瘍は投与 3 日後にやや縮小したが、7 日後には投与時と同程度の大きさとなった。投与 7 日後に右側乳腺の全摘出を行い、ウイルスゲノムの検出、ウイルス由来 *p53* mRNA の検出、P53 蛋白の免疫染色を行った。ウイルスゲノムは投与部位 (4 番) とともに別の腫瘍からも検出された。付属して摘出した皮膚からはウイルスゲノムは検出されなかった。ウイルス由来 *p53* mRNA は、腫瘍組織からは検出されず、付属リンパ節から検出された。ウイルス由来 *p53* mRNA が投与部位の腫瘍で検出できなかった理由は不明であるが、細胞死による RNA の変性または投与してからの時間経過によるものと考えられた。また投与量が腫瘍容積と比較して多く、腫瘍外の皮下や血中に漏出した量が多かった可能性もあげられる。ウイルス蛋白の免疫染色においても、同様に付属リンパ節にのみ陽性細胞が検出された。

D, 考察

以上の結果から、アデノウイルスベクターを用いた *p53* 遺伝子および antisense *mdm2* の導入が犬の腫瘍細胞株に対して増殖抑制効果を示すことが明らかとなり、腫瘍症例に対するこれら遺伝子治療を臨床的に検討する価値があることが示された。また、*p53* 遺伝子の変異を持たない腫瘍細胞株に対しても AxCA-cp53 が増殖抑制効果を示したことから、*p53* 遺伝子変異のな

い腫瘍症例においても *p53* 遺伝子導入による抗腫瘍効果を期待できるものと考えられた。さらに *p53* および antisense *mdm2* の両方を同時に遺伝子導入することでより効率的に抗腫瘍効果が得られることも判明した。以上の成果を踏まえ、投与方法、投与量などについて検討を進めるとともに、投与可能な腫瘍症例の検索に努めている。

今後の展望としては、現在行われている通常の腫瘍治療法に遺伝子治療を組み合わせによるより、効果的な治療の開発を目指したい。具体的には、イヌの腫瘍細胞株にアデノウイルスベクターを用いた *p53* および antisense *mdm2* の遺伝子導入を行い、放射線治療に関する感受性、および抗癌剤に対する感受性の変化を細胞増殖率により検討する予定である。

さらに *p53* および antisense *mdm2* 遺伝子導入アデノウイルスベクターを用いた遺伝子導入の安全性の検討するため、正常実験犬において作成したアデノウイルスベクターを経皮的に各種臓器に直接投与し、*in vivo* での感染効率および遺伝子の発現動態を検討する予定である。ウイルス投与による毒性の評価を血液検査および血液化学検査を行うことによって観察する。また数回の投与を考慮し、ウイルスベクターに対する抗体の産生状況を抗体価の測定によって検討する。

実際の臨床症例への適応としては、手術が適応でなく、また放射線照射、抗癌剤への反応性も乏しい症例で、腫瘍サイズの縮小がみられれば QOL の改善する症例に対して、*p53* による遺伝子治療 (単独または放射線照射、抗癌剤との併用) を行う。具体的には、で気道圧迫がある頸部腫瘍、胆嚢、尿管を巻き込む右葉肝臓の腫瘍、骨盤腔内の腫瘍、骨盤腔内や下顎に発生した骨肉腫、口腔内腫瘍、放射線治療が無効な肛門周囲腺癌等をその適応疾患と考えている。効果の判定のため、一般状態、腫瘍の大きさ、およびバイオブシー材料における細胞死および導入遺伝子の発現について検討する予定である

E, 研究業績

論文発表

Setoguchi, A., Sakai, T., Okuda, M., Minehata, K., Yazawa, M., Ishizaka, T., Watari, T., Nishimura, R., Sasaki, N., Hasegawa, A. and Tsujimoto, H. Aberration of the *p53* tumor suppressor gene in various tumors in dogs. *Am. J. Vet. Res.* 62: 433-439 (2001).

Setoguchi, A., Okuda, M., Nishida, E., Yazawa, M., Ishizaka, T., Hong, S.-H., Hisasue, M., Nishimura, R., Sasaki, N., Yoshikawa, Y., Masuda, K., Ohno, K. and Tsujimoto, H. Results of hyperamplification of centrosomes in naturally developing tumors of dogs. *Am. J. Vet. Res.* 62: 1134-1141 (2001).

Yazawa, M., Okuda, M., Setoguchi, A., Iwabuchi, S., Nishimura, R., Sasaki, N., Masuda, K., Ohno, K. and Tsujimoto, H. Telomere length and telomerase activity in canine mammary gland tumors. *Am. J. Vet. Res.* 62: 1539-1543 (2001).

Kanaya, N., Okuda, M., Toyama, N., Oikawa, T., Inokuma, H., Morimoto, M., Hayashi, T., Une, S., Nakaichi, M., Taura, Y., Tsujimoto, H. and Onishi, T. Detection of the anti-P53 antibodies in a dog with tumor. *J. Vet. Med. Sci.* 64: 973-979 (2002).

Yazawa, M., Setoguchi, A., Hong, S.H., Uyama, R., Nakagawa, T., Kanaya, N., Nishimura, R., Sasaki, N., Masuda, K., Ohno, K. and Tsujimoto, H. An adenoviral vector expressing canine *p53* inhibits cell growth of canine osteosarcoma and mammary adenocarcinoma cell lines. *Am. J. Vet. Res.* In press

(2003).

学会発表

矢澤 光弘、奥田 優、瀬戸口 明日香、西村 亮平、佐々木 伸雄、増田 健

一、大野 耕一、辻本 元 イヌ腫瘍細胞株に対する *p53* 遺伝子発現アデノウイルスベクターの抗腫瘍効果の検討 第 132 回 日本獣医学会学術集会、2001 年 10 月、岩手大学

辻本 元、矢澤 光弘 動物の腫瘍に対する遺伝子治療開発の試み 第 134 回 日本獣医学会学術集会ワークショップ、2002 年 9 月、岐阜大学

図1 p53遺伝子の導入による犬腫瘍細胞株の増殖抑制

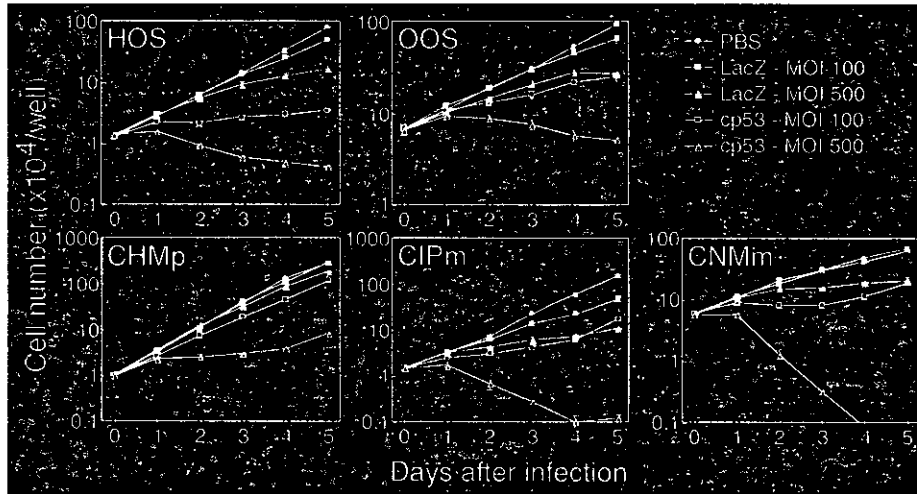


図2 p53遺伝子導入による細胞周期の変化

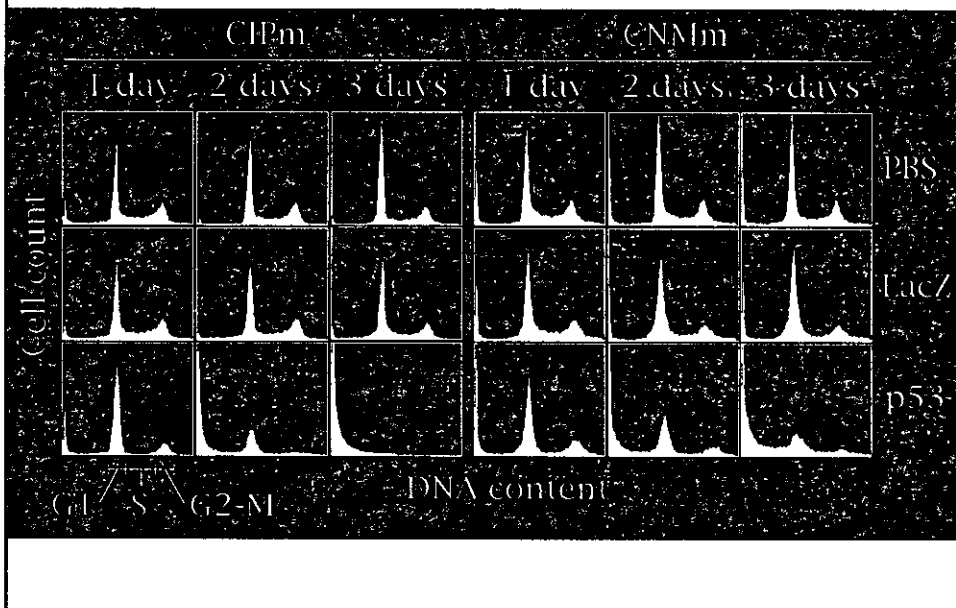
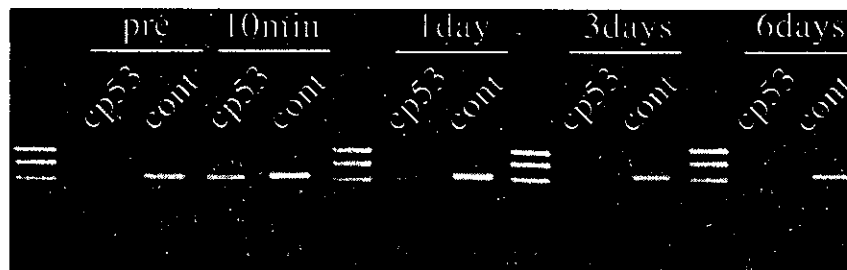


図3 p53遺伝子導入によるアポトーシスの誘導

	Day 1			Day 2			Day 3		
	PBS	LacZ	cp53	PBS	LacZ	cp53	PBS	LacZ	cp53
HOS									
-	99.5	99.7	98.6	99.6	99.4	61.7	99.6	97.1	33.9
+	0.50	0.37	1.43	0.37	0.66	38.5	0.41	2.99	66.2
OOS									
-	99.9	99.8	99.4	99.7	99.7	98.2	99.8	99.6	88.1
+	0.15	0.16	0.62	0.29	0.27	1.87	0.17	0.45	12.0

図4 血中アデノウイルスの検出



脳虚血モデルにおけるセンダイウイルスベクターを用いた遺伝子治療に関する研究

分担研究者 久和 茂 (東京大学大学院農学生命科学研究科)

協力研究者 白倉雅之 (DNAVEC 研究所、東京大学大学院農学生命科学研究科)

研究要旨

センダイウイルス (SeV) ベクターを用いて、スナネズミ脳虚血モデルに対する遺伝子治療について検討した。スナネズミ両側総頸動脈を 5 分間結紮することにより、海馬 CA1 領域の錐体細胞は選択的に細胞死 (アポトーシス) に至る。野生型 SeV に治療用遺伝子を搭載した付加型 SeV ベクター、F 遺伝子欠失センダイウイルスに治療用遺伝子を搭載した F 遺伝子欠失型 SeV ベクター、あるいは MF 両遺伝子を欠失したセンダイウイルスに治療用遺伝子を搭載した MF 両遺伝子欠失型 SeV ベクターに、グリア細胞由来神経栄養因子 (GDNF) などの遺伝子を搭載し、脳虚血モデルスナネズミの脳室内に投与した。脳虚血前に GDNF 遺伝子搭載付加型 SeV ベクターを投与することにより、錐体細胞の細胞死は抑制された。また、ウイルス粒子が放出されない、GDNF 遺伝子搭載 MF 両遺伝子欠失型 SeV ベクターを虚血 4 時間後に投与した場合においても高い神経細胞保護効果が認められ、今後の臨床応用の可能性が示唆された。

A. 研究目的

SeV ベクターを用いた脳虚血遺伝子治療の可能性を探るために、スナネズミ脳虚血モデルにおいて評価を実施した。スナネズミ両側総頸動脈を 5 分間結紮することにより、海馬 CA1 領域の錐体細胞が選択的に細胞死に至る。この細胞死は虚血 2-3 日後に生じることから、遅発性神経細胞死と呼ばれる。そこでこの神経細胞死の防御を指標として評価を行った。

B. 材料・方法

スナネズミの両側総頸動脈を 5 分間結紮し、脳虚血モデルを作製した。SeV ベクターとして、以下の 3 種類のベクターを用いた。野生型 SeV に治療用遺伝子を搭載した付加型 SeV ベクター。F 遺伝子欠失センダイウイルス

に治療用遺伝子を搭載した F 遺伝子欠失型 SeV ベクター。この型のベクターは F 遺伝子を欠失しているため、初代ウイルス粒子は放出されるが、ウイルス外被蛋白は細胞膜と融合できないため、その粒子は非感染性粒子であり、安全性が高いと考えられる。3 つ目は MF 両遺伝子を欠失したセンダイウイルスに治療用遺伝子を搭載した MF 両遺伝子欠失型 SeV ベクターである。このベクターは M 遺伝子を欠失させることによりウイルス粒子の放出が検出されず、免疫原性が軽減されることが予想される。搭載する遺伝子としては、神経細胞保護作用を有することが知られ、神経変性疾患治療の候補因子であるグリア細胞由来神経栄養因子 (GDNF)、神経成長因子 (nerve growth factor: NGF)、脳由来神経栄養因子 (brain-derived neurotrophic

factor: BDNF)、インスリン様成長因子 (insulin-like growth factor I: IGF1) および血管内皮増殖因子 (vascular endothelial growth factor: VEGF) などの遺伝子を用いた。SeV ベクター (5×10^6 pfu) を、虚血前あるいは虚血後に、スナネズミの左側脳室内に投与した。病理組織学的検索により、神経細胞の保護効果を評価した。

C. 結果

- 1) GFP 搭載付加型 SeV ベクターの脳室内投与を行ったところ、脳室上衣細胞において強い GFP 発現が観察された。
- 2) GDNF 搭載付加型 SeV ベクターによる虚血実施 4 日前投与での評価を行ったところ、海馬 CA1 領域の神経細胞を保護することが確認された(図 1)。
- 3) 神経細胞保護効果を有すると報告されている神経成長因子 (nerve growth factor: NGF)、脳由来神経栄養因子 (brain-derived neurotrophic factor: BDNF)、インスリン様成長因子 (insulin-like growth factor I: IGF1) および血管内皮増殖因子 (vascular endothelial growth factor: VEGF) をそれぞれ搭載した付加型 SeV ベクターを用いて、虚血実施 30 分後に投与を試みた。その結果、GDNF、NGF および BDNF 搭載付加型ベクターで保護効果が得られた (図 2)。

- 4) 虚血 4 時間後投与または 6 時間後投与による検討を実施したところ、GDNF および NGF 搭載付加型 SeV ベクターによって保護効果が確認された。
- 5) GDNF および NGF 搭載 F 遺伝子欠失型 SeV ベクターは虚血 4 時間後投与において有意な保護効果が得られた。しかし、GDNF および NGF 搭載付加型ベクター投与群と比較して、保護効果は弱まった。また、保護効果の持続性を検討するために実施した 28 日後評価群では、保護効果はほとんど見られなかった (図 3)。
- 6) GDNF 搭載 MF 両遺伝子欠失型 SeV ベクターで高い神経細胞保護効果が得られた (図 4)。また、GDNF 発現量においても付加型 SeV ベクターと同程度であった。さらに、脳内における病理組織学的検索を行った結果、組織傷害性が軽減されていた (図 5)。

D. 考察

SeV ベクターが中枢神経系において高効率、高発現能を持つことが明らかになり、SeV ベクターを用いた脳虚血遺伝子治療の可能性を示唆した。また、SeV ベクターは中枢神経系において非常に高い発現能を有することから、他の神経変性疾患の治療への応用が可能であると考えられる。

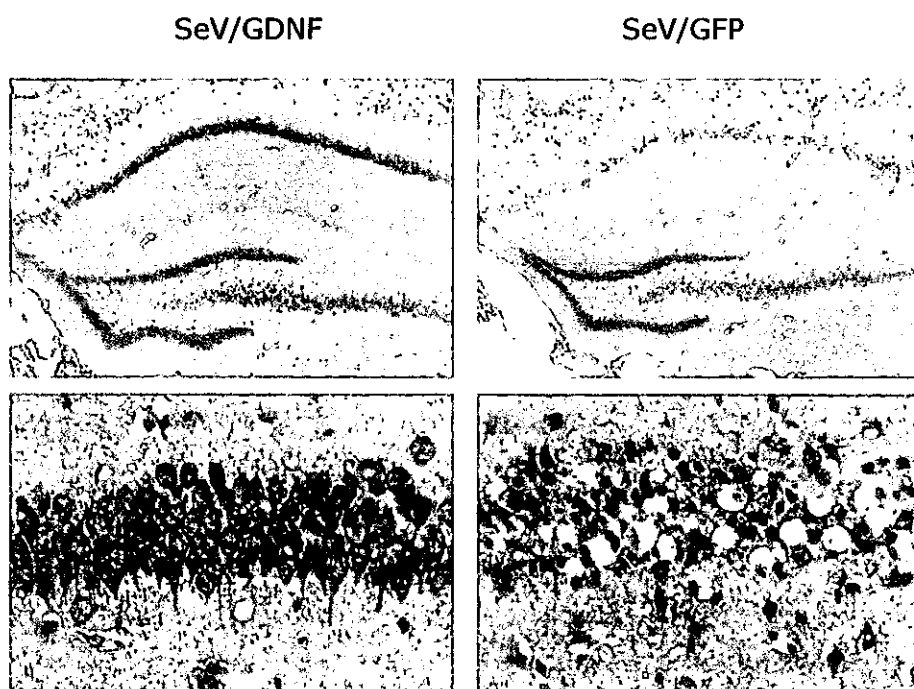


図 1. GDNF 搭載 SeV ベクター (SeV/GDNF) あるいは GFP 搭載 SeV ベクター (SeV/GFP) を虚血 4 日前投与した脳虚血スナネズミの海馬 CA1 領域の錐体細胞

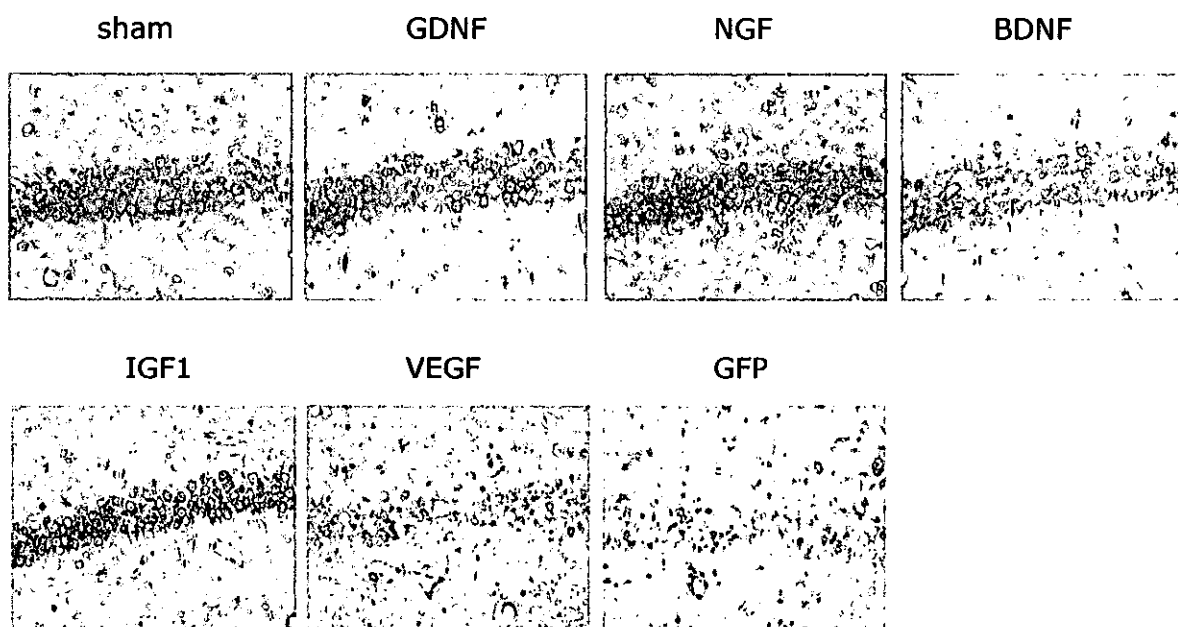


図 2. 種々の遺伝子を搭載した付加型 SeV ベクターを虚血 30 分後投与した脳虚血スナネズミの海馬 CA1 領域の錐体細胞

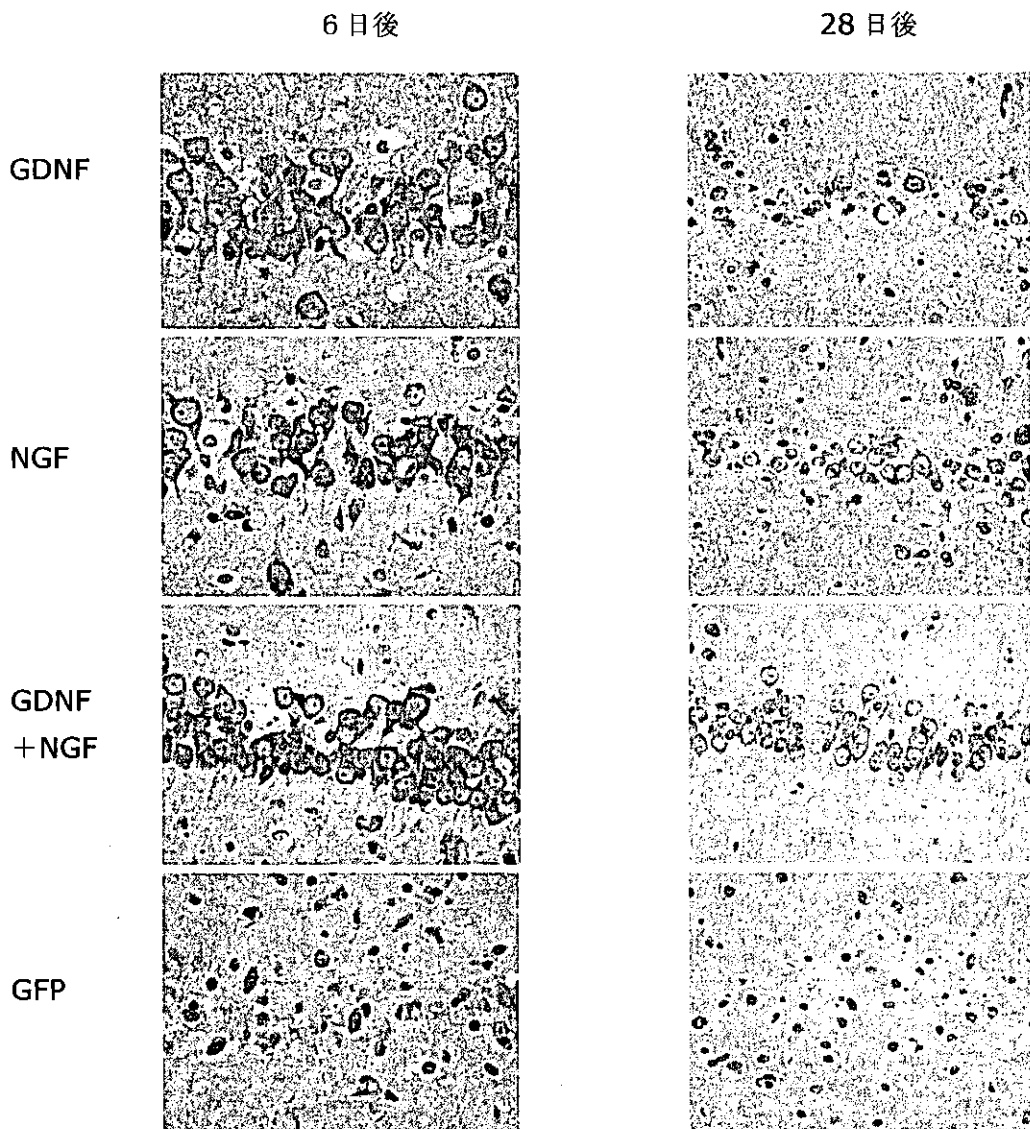


図 3. GDNF、NGF および GFP 搭載 M 欠失型 SeV ベクターを虚血 4 時間後投与したスナネズミの 6 日後および 28 日後の海馬 CA1 領域の錐体細胞

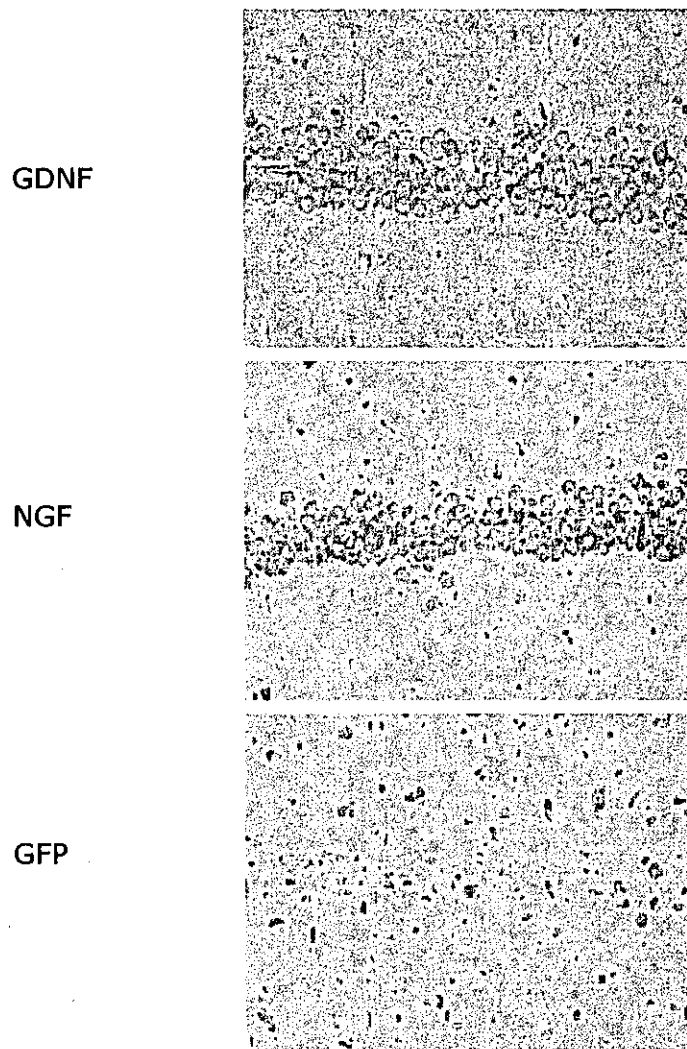
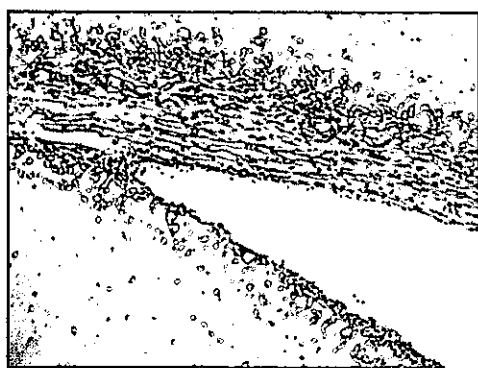
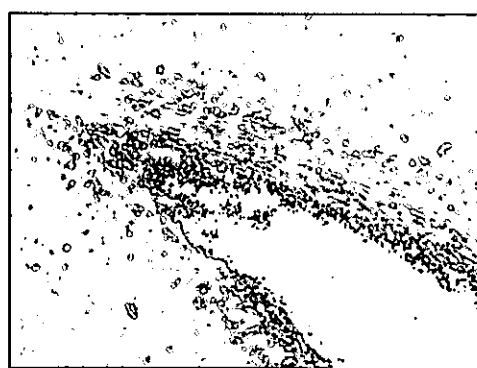


図 4. GDNF、NGF および GFP 搭載 MF 欠失型 SeV ベクターを虚血 4 時間後投与したスナネズミの 6 日後の海馬 CA1 領域の錐体細胞



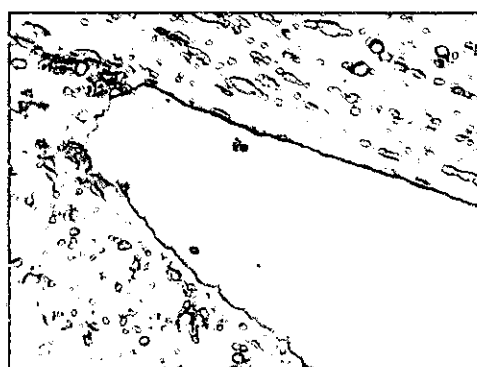
付加型 SeV



F 欠失型 SeV



MF 両欠失型 SeV



生理食塩水

図 5. GDNF 搭載付加型 SeV ベクター、同 F 欠失型 SeV ベクター、同 MF 両欠失型 SeV および生理食塩水のスナネズミ脳に対するの組織傷害性

資料：カニクイザルを用いた骨髄還流置換法マニュアル

目 的

骨髄幹細胞を標的とした遺伝子治療では、遺伝子導入する骨髄細胞の採取と遺伝子導入細胞の移植操作は不可欠である。従来の骨髄移植では、1) 腸骨から骨髄穿刺による骨髄採取が汎用されているため、骨髄採取により骨髄末梢血管を損傷し採取した骨髄に末梢血が混合すること、および2) 目的とする細胞を骨髄中に定着させるため、X線照射などの骨髄廃絶処理が必要であり、患者の負担は著しかった。最近、より侵襲性の低い骨髄採取、移植法として「骨髄還流弛緩法 (Bone Marrow Replacement, BMR)」が報告された。この方法は、四肢の長骨両端を穿刺し、一方から磷酸緩衝液を流入させて他方から骨髄を採取するとともに、骨髄還流採取で生じた骨髄中のスペースに目的の細胞を移植する方法である。この方法は骨髄採取時に骨髄穿刺で生じる末梢血の混入を防止するとともに、細胞移植時に骨髄廃絶処理をしないで骨髄内に移植スペースが確保できる利点を有する。ここでは、BMRを用いた遺伝子治療法の評価系を確立するために、カニクイザルを対象とした骨髄還流弛緩技術のマニュアルを作成し、本法の有用性評価をおこなった。

方 法

1) 四肢長骨の還流による骨髄採取法

1. ケタラル麻酔したカニクイザルに挿管を行い、イソフルランによる全身麻酔を行う (A.D.S.1000; 新鋭工業)。
2. 採取する大腿骨もしくは上腕骨を剃毛し、ヨード系消毒薬で患部を消毒する。
3. ECG、血圧、CO₂、SPO₂などのバイタルモニターを接続し、モニターを開始する。
4. 電気メスにより大腿部もしくは上腕部の皮膚を切開し、筋層を鈍性に剥離しながら各長骨の両端を露出させる。
5. 露出した骨表面を搔爬した後、骨膜を剥離し穿刺部位をマークする。
6. 骨用ドリルに骨髄穿刺針 (1.2ml-勝沼式骨髄穿刺針) を接続し (図1)、髓腔内に達したところで穿刺針を留置する。
7. 両端に留置された穿刺針の近位端に PBS の満たされた 20ml シリンジ、遠位端に骨髄採取用 20ml シリンジを取り付ける (図2参照)。
8. 髓腔内が陽圧にならないよう遠位端のシリンジを吸引しながら、近位端のシリンジから滅菌 PBS を還流させる (図2)。
9. 約 50ml を還流したところで採取を終了する。

II) 四肢長骨への骨髓細胞移植法

10. 還流後の長骨への細胞の移植は、1ml に懸濁した細胞浮遊液を充填した 2.5ml シリンジを骨髓遠位端に取り付け、近位端に取り付けた空のシリンジに陰圧をかけ、末梢血流にリークしないよう髓腔内に細胞を移植する。
11. 移植後、各腸骨の穿刺孔をボーンワックスで閉鎖し、細胞および骨髓液の漏出を防止する。
12. 漏出が無いことを確認した後、剥離した筋層を縫合し、皮膚を縫合する。
13. 以上の操作を四肢すべての長骨に行う。
14. 動物の覚醒を確認し、抗生物質、痛み止め（ブトルファノール；0.02mg/kg）の投与を術後3日間行う。

備考：髓腔内圧測定による安全性の確認：

目的：還流法による骨髓採取の場合、髓腔内に陽圧がかかる場合には骨髓細胞や間質系細胞が末梢血に漏出し、血栓塞栓症等を来す恐れがある。そこで、還流法による骨髓採取法として陰圧採取の妥当性を実証するため、還流中には髓腔内の圧力を連続モニターするとともに末梢血中への骨髓細胞の流入について以下の方法で検討した。

1. 還流中の骨髓圧力の測定は、圧トランスデューサー（図 3：DX100；日本光電）を用いて長骨の中央に穿刺した穿刺針に接続し、ポリグラフ（図 3：LEG-1000 システム；日本光電）と接続し、両端の穿刺針で実際に還流しながら骨髓内圧を記録した（図 4）。
2. 陽圧還流と陰圧還流の是非を検討する目的で、両者での還流時骨髓内圧の変化と、末梢血への影響を検討した。陽圧還流の場合には、左側の大腿骨および上腕骨の近位端に穿刺した 25ml シリンジに圧力をかけ、PBS を押し出しながら遠位端から細胞を採取した。移植時にも 2.5ml のシリンジを使用し、同様の方法で陽圧をかけ細胞を移植した。陽圧還流、移植時の骨髓内圧の変化を図 5 に示す。
3. 続いて、陰圧をかけた際の採取および移植を行った。各長骨のシリンジを 2.5ml に換え、遠位端のシリンジに陰圧をかけながら細胞を採取および移植を行った。陰圧還流、移植時の骨髓内圧の変化を図 6 に示す。
4. 骨髓内圧測定後、反対側の大腿骨に 2.5ml のシリンジをセットし、遠位端より造影剤を陽圧下に還流させ、レントゲン装置（SIREMOBIL 2000; siemens）により撮影した。

骨髓還流置換マニュアルの安全性の総括

- 1) 吸入麻酔による全身麻酔下で骨髓還置換緩法によるカニクイザルの骨髓採取および移植技術を確立した。
- 2) 骨髓採取時および移植時に長骨穿刺部位皮膚・筋肉を切開し、長骨を露出させる事で確

実に採取、移植ができること、その後ボーンワックスで穿刺孔を閉鎖することにより採取後の出血、移植後の細胞の漏出を防ぐことができることから、安全で確実な方法が確立できた。

3) 髄腔内の圧力測定では陽圧をかけた場合、骨髄還流中に最大 450mmHg、細胞移植時で 250mmHg 程度の圧力がかかることが判明した (図5)。

4) 一方、陰圧をかけた場合には、骨髄採取時および移植時共に髄腔内には 20mmHg 程度の圧力しかかからず (図6)、骨髄細胞の末梢血管中へのリークによる塞栓症の危険性が回避できることが実証された。

5) 血管造影によって、陽圧下で近位方向の末梢血に造影剤が漏出する事が確認された (図7)。このことから、骨髄還流法による骨髄採取および骨髄移植を陰圧下で行う妥当性があきらかになった。

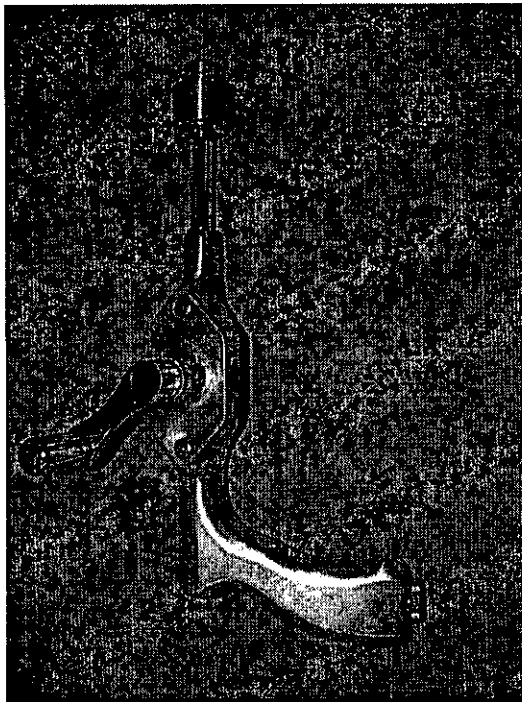
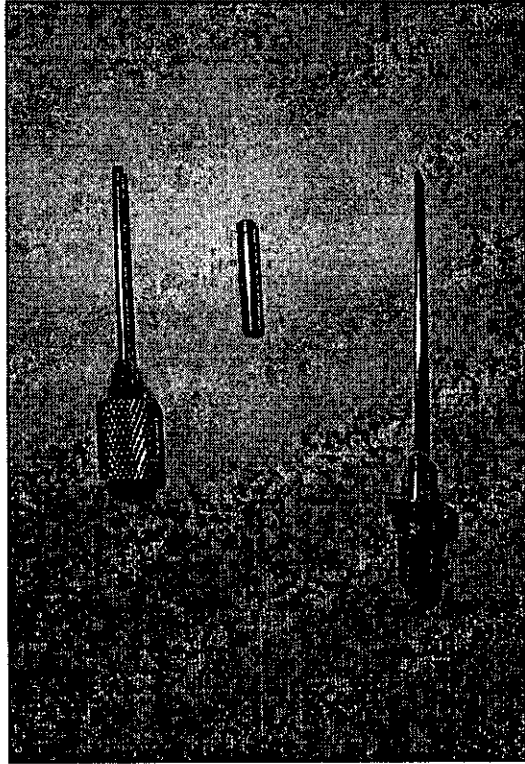


図1：骨用ドリルと骨髓穿刺針

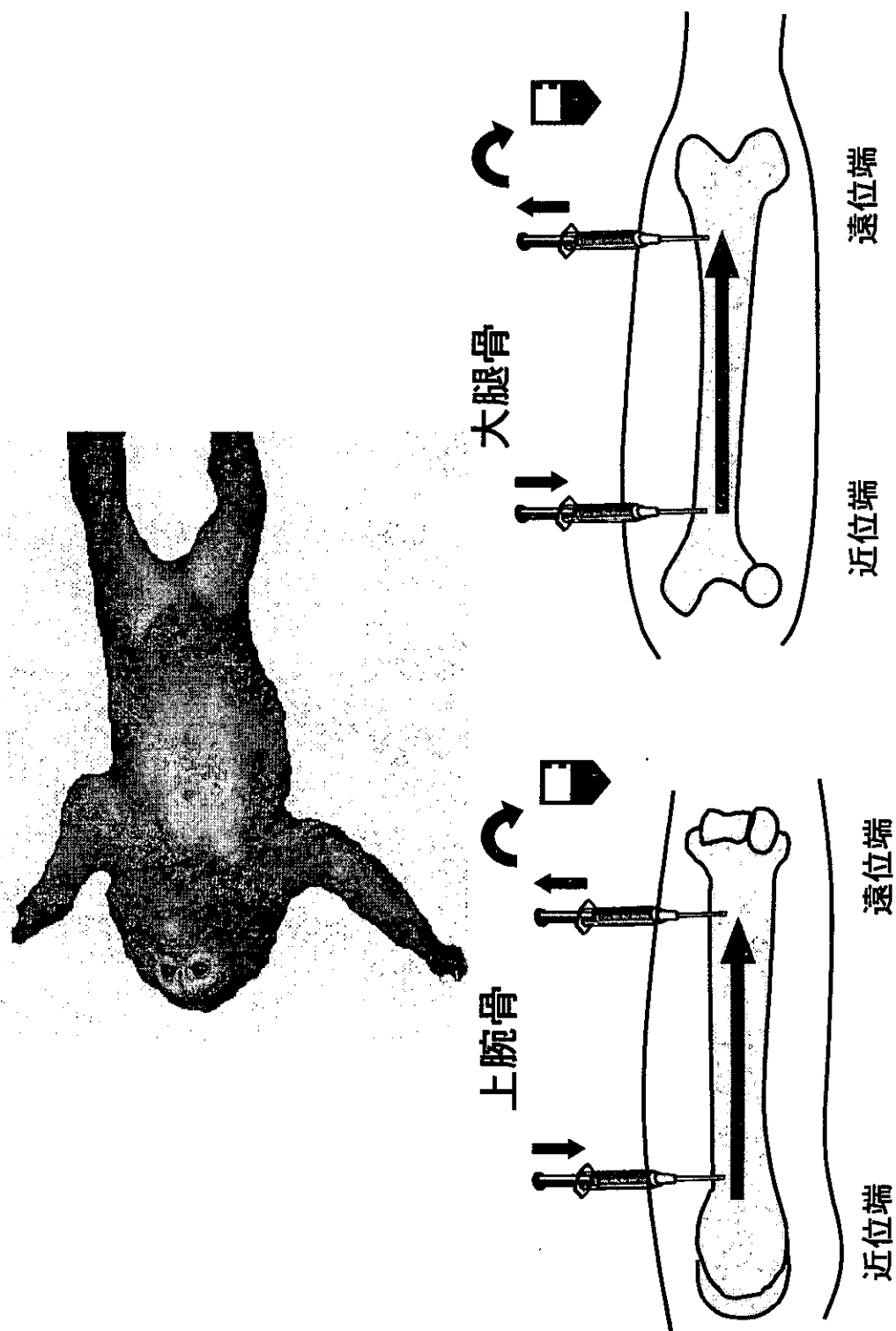
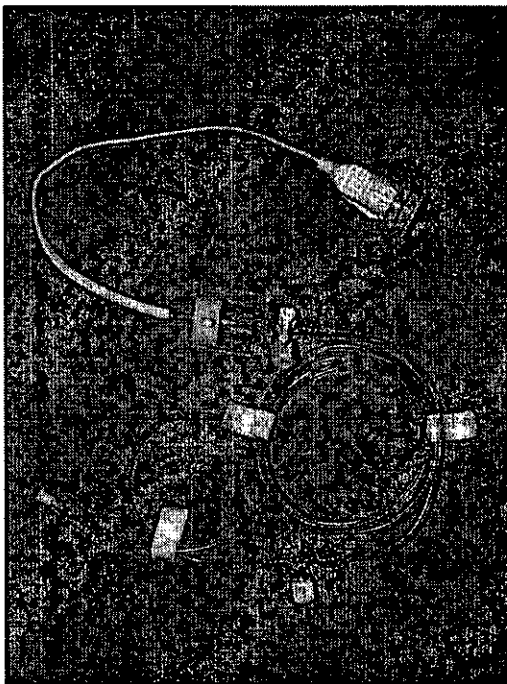
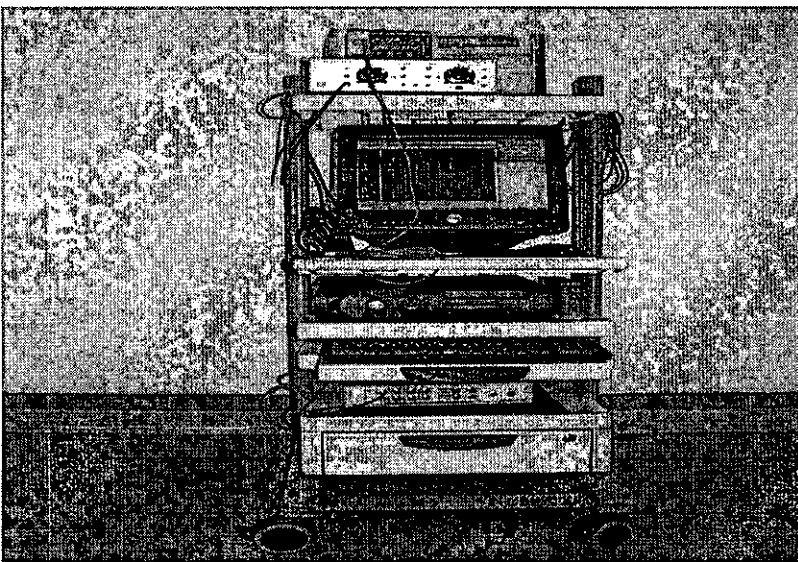
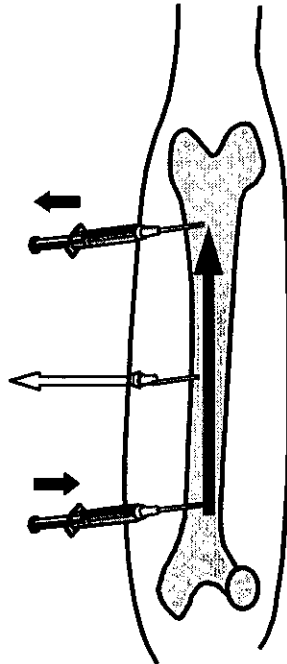


图 2：長骨穿刺部位と還流法



トランスデューサー



近位端 遠位端

図3：骨髓内圧モニター装置



図4：骨髓還流法での骨髓採取

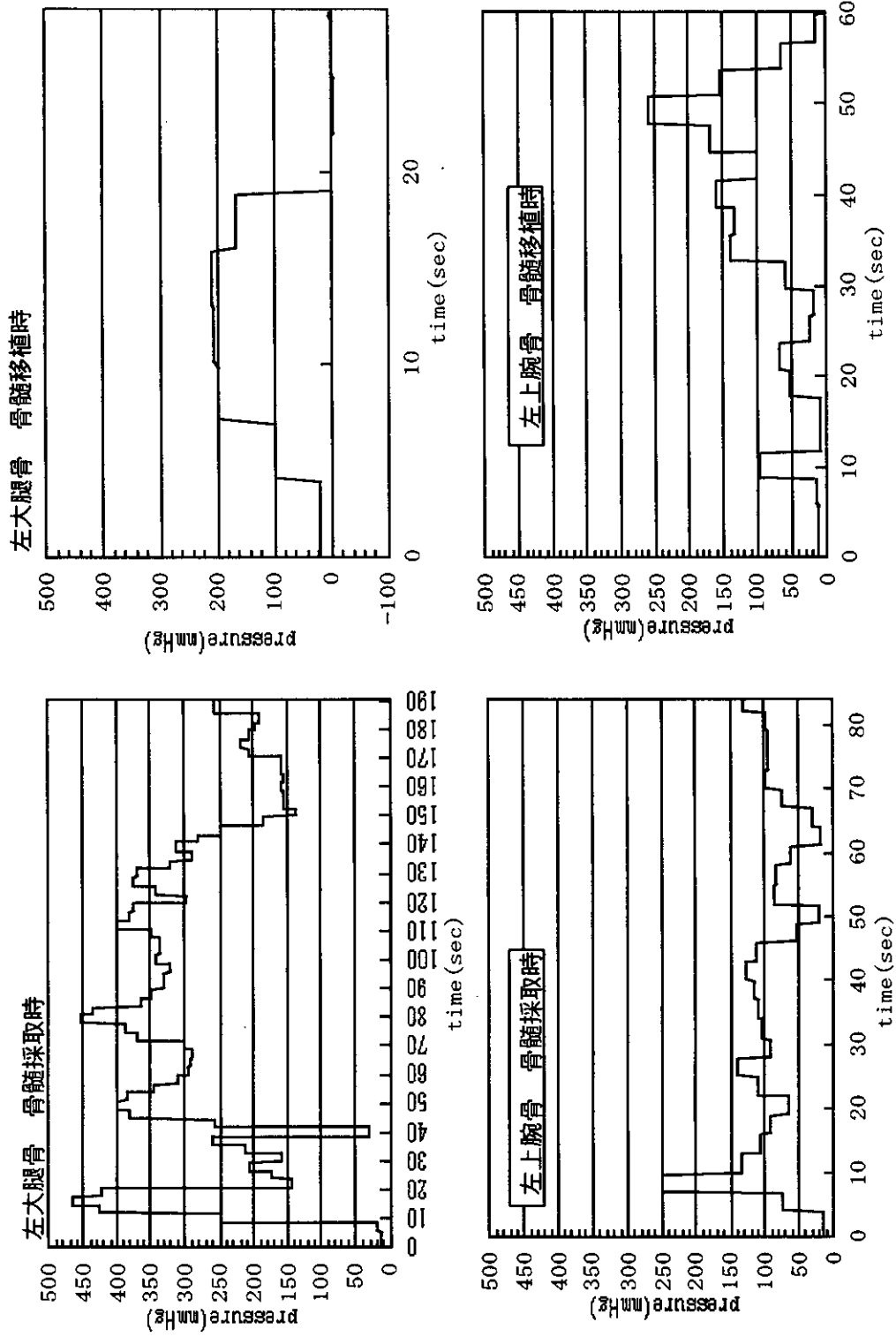


図5：陽圧還流、移植時の骨髓内圧変化

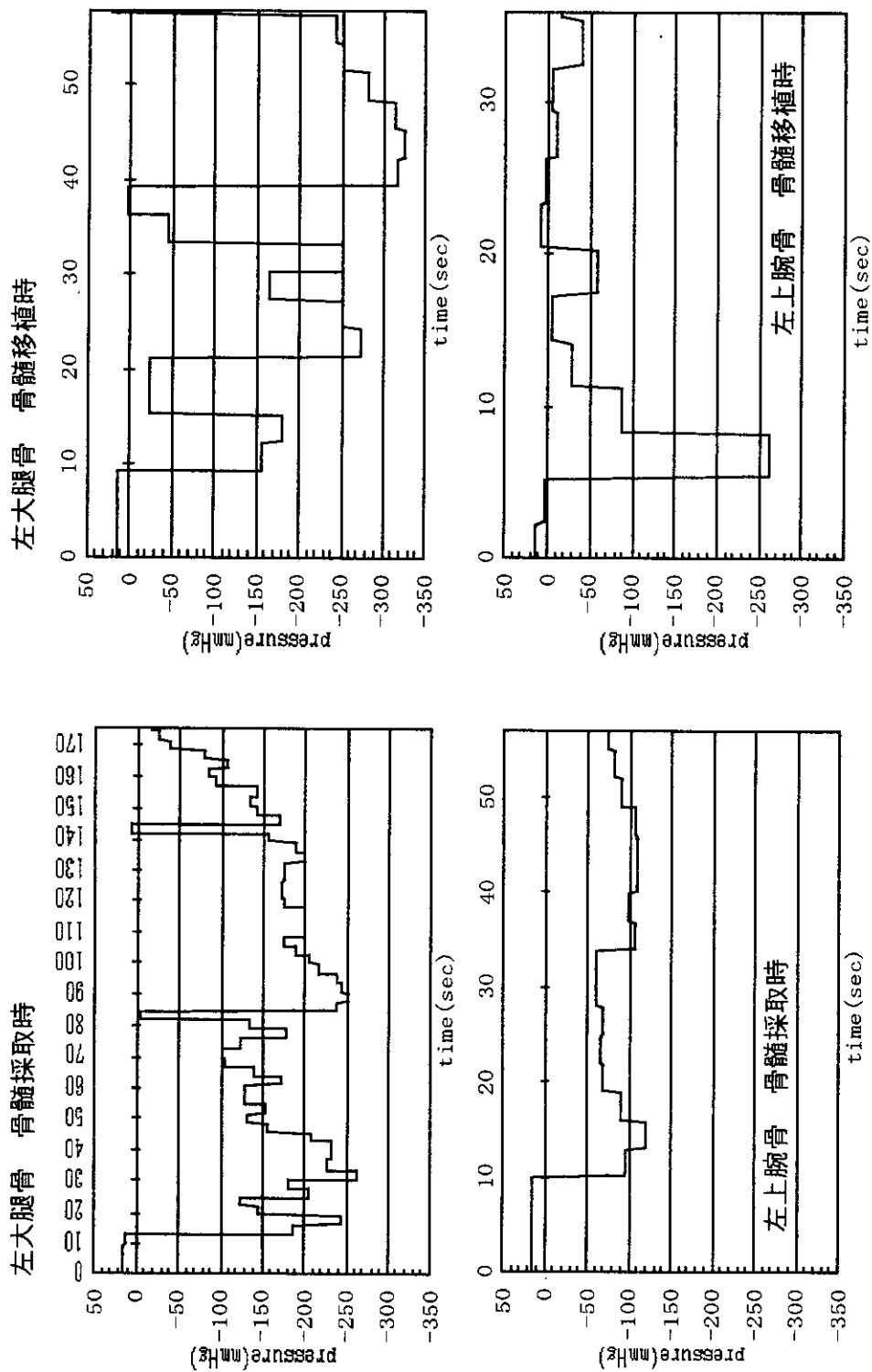


図6：陰圧還流、移植時の骨髓内圧変化