

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患政策研究事業）
難治性血管炎の医療水準・患者QOL向上に資する研究班
分担研究報告書

令和5年度 臨床病理分科会活動報告

上気道生検組織指標を用いた OMAAV の鑑別

研究分担者：

宮崎 龍彦 東海国立大学機構 岐阜大学医学部附属病院 教授
石津 明洋 北海道大学大学院 保健科学研究所 教授

研究協力者：

小川 弥生 北海道腎病理センター 副理事長
中沢 大悟 北海道大学病院 リウマチ・腎臓内科 助教
武曾 恵理 財) 田附興風会医学研究所北野病院 腎臓内科 客員研究員
黒川真奈絵 聖マリアンナ医科大学大学院疾患バイオマーカー・標的分子制御学 大学院教授

研究要旨 血管炎病理組織学的診断における未解明問題として、AAVの上気道生検組織の病理学的特徴を明らかにする課題に取り組んだ。成人の難治性中耳炎のなかにもGPAと同一機序で発症するANCA関連血管炎性中耳炎(otitis media with ANCA associated vasculitis (OMAAV))があり、GPAとの異同が論議されている。OMAAVは進行してから診断されることが多く、早期の診断パラメーターの発見も望まれる。そこで、OMAAVの組織学的診断パラメーターを抽出し、診断基準の策定を行うことを企図して解析に取り組んだ。プレリミナリーな解析では、AAVの上気道生検組織の特徴として、1) 筋性動・静脈炎、2) 筋性動・静脈の閉塞、の2点が正の相関を示すパラメーターとして、3) 浮腫、4) 好酸球浸潤、5) 形質細胞浸潤が負の相関を示すパラメーターとして挙げられた。次に、これらのパラメーターの妥当性を統計学的に検証するため、研究分担者、研究協力者で全組織像をシェアして評価するにあたり、対象症例を training set と、検出したパラメーターを validate する testing set にほぼ偏り無く分け得た。この後の評価者教育用に、上記のパラメーターを解説する動画を作成した。WG各施設にグループ分けしたバーチャルスライドデータと解説動画を配布し、training set を一度回答した後に解説動画を試聴し、もう一度 training set の回答を行い、さらに testing set の回答を行うという方法で、これらのグループ分けを使って、WG各施設の計18名による検証実験を行った。その結果、解説動画試聴前後で有意に正答率は向上し、testing set においてもこれらのパラメーターが OMAAV の診断に相関する傾向を認めた。また、OMAAV か否かを判定する AI を二種類開発し、それらの結果から新たな診断パラメーターがフィードバックされた。今後、これらのパラメーターも含めて診断マーカーとしての有意性

A. 研究目的

ANCA 関連血管炎 (AAV) には GPA など上気道の壊死性肉芽腫性病変を形成するものがある。成人

の難治性中耳炎のなかにも同一機序で発症する ANCA 関連血管炎性中耳炎(otitis media with ANCA associated vasculitis (OMAAV))があり、GPA との異同

が論議されている。OMAAV は早期診断が難しく、重篤な合併症を生じたり、致死的になったりすることもある。GPA が鼻、耳、眼、上気道および肺の壊死性肉芽腫性病変、全身の中小血管の壊死性肉芽腫性血管炎、腎の壊死性半月体形成性腎炎をトリアスとするが、GPA に伴う中耳炎では顔面神経麻痺や肥厚性硬膜炎を合併することが多い。また、MPO-ANCA 陽性で急激に進行する感音性難聴や顔面神経麻痺を伴う中耳炎もある。これら ANCA 関連血管炎に伴う中耳炎を OMAAV と呼ぶ。しかし、OMAAV の組織学的な特徴や診断基準は未だ確立されていない。また、生検診断がなされる場合の多くは、既に病気が進行しており、早期から診断できる組織学的診断パラメーターの確率が望まれている。そこで、我々は臨床病理分科会メンバーで OMAAV の組織学的パラメーターを抽出し、GPA, MPA との異同を含む診断基準の策定を行うことを企図し、OMAAV 症例の組織学的特徴の解析に取り組んでいる。本年度はプレリミナリーな解析から得られたパラメーターの検証と、OMAAV か否かを判定する AI の開発を行った。

B. 研究方法

対象症例：旭川医科大学で 2000 年から 2017 年までに生検された OMAAV 病変 34 例、および対照症例として慢性副鼻腔炎 32 例、慢性中耳炎 5 例、喉頭肉芽腫 10 例。合わせて 81 症例、206 プレパラートを解析対象とした。解析方法 プレリミナリーな解析として、二重盲検法にて、岐阜大学医学部附属病院病理部の若手病理専門医 4 名がダブルチェックで組織学的パラメーターについて定性的もしくは半定量的に評価した。組織学的パラメーターは、①びらん、②浮腫、③炎症細胞浸潤全体、④線維化、⑤リンパ球浸潤、⑥好中球浸潤、⑦好酸球浸潤、⑧形質細胞浸潤、⑨マクロファージ浸潤を半定量 (0~3 の 4 段階) で評価し、①表層の壊死物、②小血管壁の炎症細胞浸潤、③血管内皮へのアンカリング、④肉芽腫形成、⑤筋性動・静脈の閉塞、⑥筋性動静脈の血管炎、⑦小血管増生、⑧不整な血管増生、⑨肉芽様隆起性病変を定性的に評価 (あり = 1, なし = 0)、さらに①壊死物の厚み、②ラッセル小体の強拡

大 1 視野あたりの数を定量的に評価した。また、①線維化のパターン、②被覆上皮の種類、③主な浸潤細胞については、記述としてデータを蓄積した。

次の段階として、研究分担者・研究協力者でその組織像をシェアし、プレリミナリーな解析で見いだしたパラメーターが反映されるか否かを解析すべく、対照群を Training set と Testing set に分けた。この後の評価者教育用に、上記のパラメーターを解説する動画を作成した。WG 各施設にグループ分けしたバーチャルスライドデータと解説動画を配布し、training set を一度回答した後に解説動画を視聴し、もう一度 training set の回答を行い、さらに testing set の回答を行うという方法で、これらのグループ分けを使って、WG 各施設の計 18 名による検証実験を行った。

さらに、検体のバーチャルスライド画像を用いて、OMAAV を検出、OMAAV ではないものを検出する二種類の AI を開発した。

(倫理面への配慮)

人を対象とする生命科学・医学系研究に関する倫理指針に則って実施した。

C. 研究結果

WG メンバー各施設、計 18 人による解析では、解説動画視聴前後で有意に正答率は向上し、testing set においてこれらのパラメーターが OMAAV の診断に相関する傾向を認めた。(図 1)

Training group vs Validation group

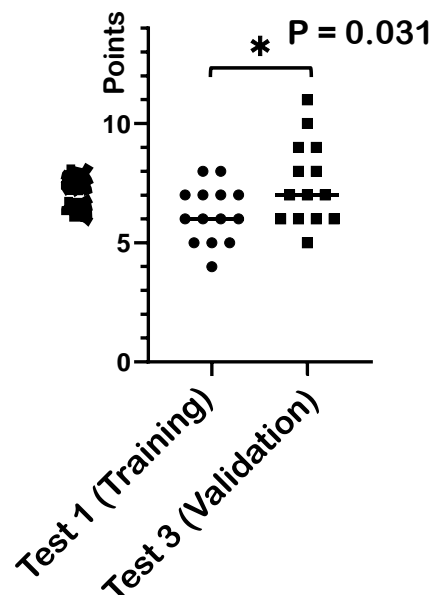


図 1 他施設間共同による Training set と Validation set の正答得点の分布

また、OMAAV か否かを判定する AI を二種類開発した。これらは自動で有意に OMAAV と non-OMAAV を有意差を以て弁別することは学習画像が少なく困難であったが、その heat map から、新たな組織学的パラメーターとして、炎症細胞が巻き込まれて核線を引くような線維化が OMAAV らしいもの、正常な分泌腺と扁平上皮が OMAAV らしくないもの、壊死性デブリスや好酸球浸潤、フィブリン沈着が non-OMAAV らしくないもの、リンパ球浸潤、正常な分泌腺と扁平上皮が non-OMAAV らしいものとして抽出された。それらの結果から新たな診断パラメーターがフィードバックされた。

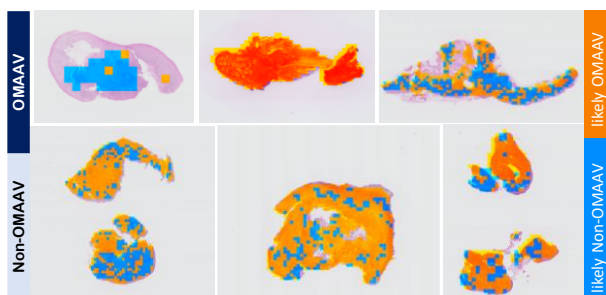


図 2 OMAAV および non-OMAAV 検出 AI におけるヒートマップ

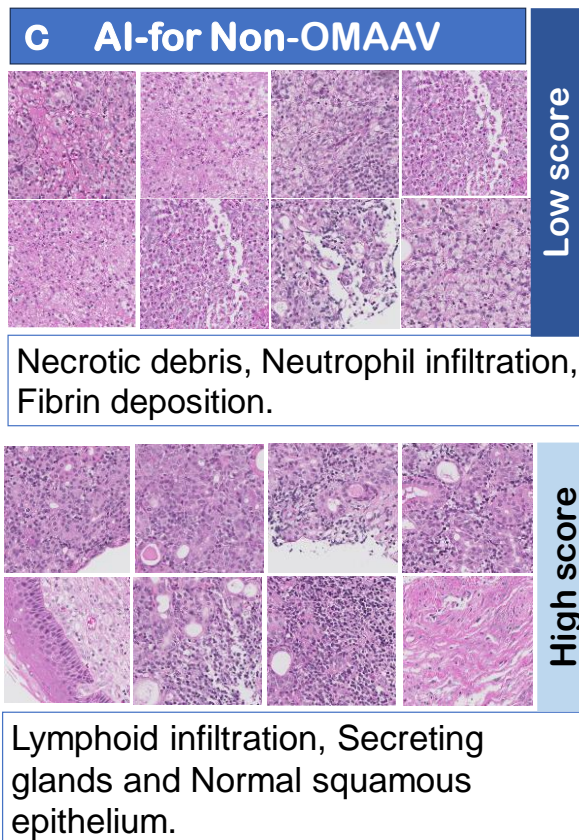
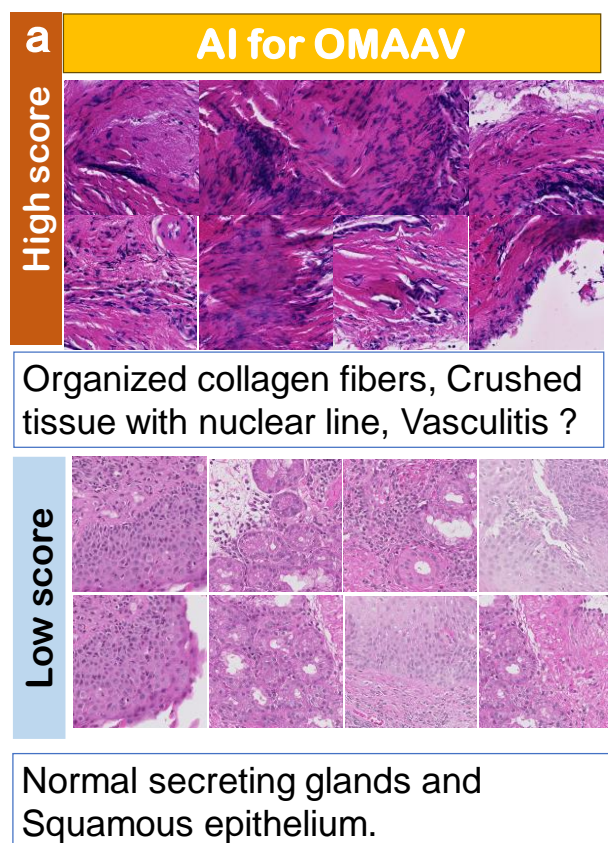


図 3 AI のヒートマップからフィードバックされた組織学的パラメーター a) OMAAV を弁別する AI からのフィードバック。上が OMAAV らしい、したが OMAAV らしくない。b) non-OMAAV を弁別する AI からのフィードバック。上が non-OMAAV らしくない、したが non-OMAAV らしいと判定されたもの。

これら各パラメーターの妥当性を検証するために、Training Set と Testing set に分けた。同一患者からの複数生検があるものに関しては、検体を絞り込み、OMAAV 症例数を当初の 34 例から 17 例に訂正した。男女比ほぼ同じで、平均年齢も ± 2 歳以内に収めることができた。(図 3)

D. 考察

プレリミナリーな解析で得られた組織学的診断マーカーの候補の有意性について、他施設間の賢者による検証でもこれらパラメーターを学習した後に、統計的に有意に診断適中率が上がったことで、これらのパラメーターが有意なものであることが明らかとなった。

一方、AI の開発は学習画像の不足で、自動的に OMAAV およびのん-OMAAV を有意に弁別するに

は至っていないが、学習画像を増やすことによって、有効なツールとして開発出来る可能性がある。また、それらのヒートマップからフィードバックされた組織学的診断パラメーターに関しては、今後検証を行って、今回証明されたものに付け加えられることが期待できる。

病理医が診断するための組織学的パラメーターをAIからのフィードバックで得ることは、今後の病理形態学におけるトレンドになる可能性もある。今後さらに解析を進め、OMAAVの、出来れば早期からの確な診断を導き出せる組織学的診断パラメーターを明らかにし、耳鼻科医に早期かつ適切な生検を啓発することにより、OMAAVの早期診断・早期治療が可能になることが期待される。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

・論文発表

1. Kawakami T, Yokoyama K, Ikeda T, Nishibata Y, Sakiko M, Tomaru U, [Ishizu A](#). Similar deposition of neutrophil extracellular traps in the dermis among COVID-19-associated IgA vasculitis, post-COVID-19 vaccination IgA vasculitis, and COVID-19-unrelated IgA vasculitis. *J Dermatol* 50(5): e151-e152, 2023.
2. Inoue D, Uchida T, Komatsu S, Sugisaki K, Yamada M, Ogawa H, [Ishizu A](#), Oda T. Anti-PLA2R Antibody Development During NELL1-Associated Membranous Glomerulonephritis Treatment: A Case Report. *Kidney Med* 5(5): 100625, 2023.
3. Shiratori-Aso S, Nakazawa D, Kudo T, Kanda M, Ueda Y, Watanabe-Kusunoki K, Nishio S, Iwasaki S, Tsuji T, Masuda S, Tomaru U, [Ishizu A](#), Atsumi T. CD47 blockade ameliorates autoimmune vasculitis via efferocytosis of neutrophil extracellular traps. *JCI Insight* 8(15): e167486, 2023.
4. [Nakazawa D](#), Takeda Y, Kanda M, Tomaru U, Ogawa H, Kudo T, Shiratori-Aso S, Watanabe-Kusunoki K, Ueda Y, Miyoshi A, Hattanda F, Nishio S, Uozumi R, [Ishizu A](#), Atsumi T. Inhibition of Toll-like receptor 4 and Interleukin-1 receptor prevent SARS-CoV-2 mediated kidney injury. *Cell Death Discov* 9(1): 293, 2023.
5. Sato M, Nishibata Y, Masuda S, Nagamori T, Ishibazawa E, Yoshida Y, Takahashi H, [Ishizu A](#), Takahashi S. Demonstration of equivocal anti-glomerular basement membrane antibody positivity as a non-specific reaction through multiple immunologic assays in a case of pediatric asymptomatic hematuria. *Clin Biochem* 120: 110650, 2023.
6. Nakade I, Tamura Y, Hashimoto F, Ariza Y, Hotta S, Fujigaya H, Arai S, Taniguchi M, Ogawa H, Nishibata Y, Masuda S, [Nakazawa D](#), Tomaru U, [Ishizu A](#). Bruton's tyrosine kinase is a possible therapeutic target in microscopic polyangiitis. *Arthritis Res Ther* 25: 215, 2023.
7. Mikami-Saitoh Y, Kyoyama H, Hirata Y, Kikuchi S, Sakai K, Mikami S, Moriyama G, Koyama N, Higashi M, [Ishizu A](#), Uematsu K. Anti-neutrophil Cytoplasmic Antibody-negative Granulomatosis with Polyangiitis Manifesting Pulmonary Nodules and Genital Lesion. *Respir Med Case Rep* 46: 101951, 2023.
8. Kawakami T, Ikeda T, Yokoyama K, Nishibata Y, Masuda S, Tomaru U, [Ishizu A](#). The presence of neutrophil extracellular traps in different forms of pyoderma gangrenosum. *J Cutan Immunol Allergy* 6: 241-244, 2023.
9. Ogawa H, Yokota S, Hosoi Y, Shindo A, Ogawa N, Yamamura R, Shimizu T, Nakade I, Arai S, Taniguchi M, Nishibata Y, Masuda S, [Nakazawa D](#), Tomaru U, Iwasaki N, [Ishizu A](#). Methylprednisolone pulse enhanced neutrophil extracellular trap formation in mice with imiquimod-induced lupus-like disease,

- resulting in ischaemia of the femoral head cartilage. *Lupus Sci Med* 10: e001042, 2023.
10. Makiyama A, Abe Y, Furusawa H, Kogami M, Ando T, Tada K, Onimaru M, Ishizu A, Yamaji K, Tamura N. Polyarteritis nodosa diagnosed in a young male after COVID-19 vaccine: A case report. *Mod Rheumatol Case Rep* 8(1): 125-132, 2023.
 11. 川上民裕, 有村義宏, 池田高治, 石黒直子, 石津明洋, 伊藤吹夕, 猪原登志子, 沖山奈緒子, 小野さち子, 要 伸也, 岸部麻里, 小寺雅也, 渋谷倫太郎, 菅原弘二, 鈴木和男, 清島真理子, 田中麻衣子, 辻本 康, 長谷川 稔, 張田 豊, 古川福実, 宮脇義亜, 山口由衣, 吉崎 歩. 皮膚血管炎・血管障害診療ガイドライン 2023—IgA 血管炎, クリオグロブリン血症性血管炎, 結節性多発動脈炎, リベド様血管症の治療の手引き 2023. *日本皮膚科学会雑誌* 133(9): 2079-2134, 2023.
- ・学会発表
1. Kawakami T, Yokoyama K, Ikeda T, Nishibata Y, Masuda S, Tomaru U, Ishizu A. The relationship of neutrophil extracellular traps in superficial venous thrombosis of Behcet's disease. The 5th International Conference on Cutaneous Lupus Erythematosus (ICCLE2023), Tokyo.
 2. Kawakami T, Nakade I, Tamura Y, Ito F, Nishibata Y, Masuda S, Tomaru U, Ishizu A. Rat model with typical cutaneous small-vessel vasculitis induced by combined injection of anti-phosphatidylserine/prothrombin complex antibody and anti-LAMP-2 antibody. The 5th International Conference on Cutaneous Lupus Erythematosus (ICCLE2023), Tokyo.
 3. Kawakami T, Yokoyama K, Ikeda T, Nishibata Y, Masuda S, Tomaru U, Ishizu A. Neutrophil extracellular traps in superficial venous thrombosis of Behcet's disease. International Societies for Investigative Dermatology (ISID) 2023, Tokyo.
 4. Kawakami T, Nakade I, Tamura Y, Ito F, Nishibata Y, Masuda S, Tomaru U, Ishizu A. Characterization of a rat model with typical cutaneous small-vessel vasculitis induced by combined injection of an anti-phosphatidylserine/prothrombin complex antibody and an anti-LAMP-2 antibody. International Societies for Investigative Dermatology (ISID) 2023, Tokyo.
 5. 石津明洋. ANCA 関連血管炎の病態と治療の Up-to-Date. 第 43 回日本サルコイドーシス/肉芽腫性疾患学会総会シンポジウム
 6. 石津明洋. ANCA 関連血管炎の病態に即した新規治療戦略の提言. 第 38 回日本臨床リウマチ学会シンポジウム
 7. 中沢大悟. ANCA 関連血管炎 (EGPA 含む) の早期診断, 早期治療のために. 第 28 回日本血管病理研究会シンポジウム
 8. 宮崎龍彦, 小林一博, 酒々井夏子. 組換え近交系マウス MXH に観られる多彩な血管炎とその感受性因子について. 第 28 回日本血管病理研究会モーニングセミナー
 9. 川上民裕. 皮膚科医の立場から見た EGPA の診断のポイント. 第 28 回日本血管病理研究会ランチョンセミナー
 10. 石津明洋. 人工知能による皮膚壊死性動脈炎の鑑別—全身型か皮膚限局型か. 第 28 回日本血管病理研究会スイーツセミナー
 11. 中沢大悟. ANCA 関連血管炎モデル—能動免疫, 受動免疫, 自然発症モデルの使い分けと応用. 第 5 回血管炎病因病態研究会シンポジウム
 12. 西端友香, 荒井粹心, 谷口 舞, 小川帆貴, 益田紗季子, 中沢大悟, 外丸詩野, 清水喬史, William Sinko, 長倉 延, 寺田 央, 石津明洋. ANCA 関連血管炎能動免疫モデルを用いた好中球機能障害の評価. 第 5 回血管炎病因病態研究会シンポジウム
 13. 西端友香, 益田紗季子, 外丸詩野, 石津明洋. ANCA 関連血管炎における intermolecular epitope spreading による抗 GBM 抗体の産生. 第 112 回

日本病理学会ワークショップ

14. 益田紗季子, 小林優里花, 西端友香, 外丸詩野, 石津明洋. 好中球細胞外トラップに DNase I 抵抗性を付与するタンパクの同定. 第 112 回日本病理学会
15. 柏 航, 菅野祐幸, 高橋 啓, 宮崎龍彦, 池田栄二, 大原関利章, 小川弥生, 鬼丸満穂, 倉田美恵, 石津明洋. 結節性多発動脈炎と皮膚動脈炎の皮膚生検画像の人工知能による鑑別. 第 112 回日本病理学会
16. 益田紗季子, 西端友香, 川邊智宏, 宮前多佳子, 外丸詩野, 石津明洋. ベーチェット病における口内炎の発生原因の解明. 第 67 回日本リウマチ学会
17. 谷口 舞, 益田紗季子, 中村哲朗, 荒井粹心, 西端友香, 外丸詩野, 石津明洋. 好中球細胞外トラップに DNase I 抵抗性を付与するタンパクの同定. 第 67 回日本リウマチ学会
18. 荒井粹心, 西端友香, 谷口 舞, 益田紗季子, 外丸詩野, 石津明洋. C5a 受容体拮抗薬と好中球エラストラーゼ阻害剤の好中球活性化抑制比較. 第 67 回日本リウマチ学会
19. 西端友香, 荒井粹心, 谷口 舞, 益田紗季子, 外丸詩野, 清水喬史, 長倉 延, 寺田 央, 石津明洋. Cathepsin C 阻害による好中球細胞外トラップ形成抑制. 第 67 回日本リウマチ学会
20. 小川帆貴, 横田隼一, 清水智弘, 西端友香, 益田紗季子, 外丸詩野, 岩崎倫政, 石津明洋. SLE モデルマウスへのステロイドパルスは好中球細胞外トラップを誘導する. 第 67 回日本リウマチ学会
21. 原田拓弥, 山下裕之, 上田 聖, 秋山優弥, 小林俊昭, 谷口 舞, 西端友香, 益田紗季子, 石津明洋, 金子礼志. 結腸癌の診断と同時期に発症した抗 LAMP-2 抗体陽性血管炎の 1 例. 第 28 回日本

血管病理研究会

22. 上田雄翔, 中沢大悟, 三好敦子, 麻生里佳, 西尾妙織, 外丸詩野, 石津明洋, 渥美達也. ANCA 関連血管炎における Nrf2 を介した炎症抑制機構. 第 28 回日本血管病理研究会
23. 中沢大悟. COVID-19 の血管内皮障害から急性腎障害に至る機序～基礎的研究から. 第 28 回日本血管病理研究会
24. 福田結以, 遠藤知美, 鹿野友美夏, 三島奈都美, 武曾恵理, 塚本達雄. 半月体様管外病変を伴った悪性高血圧の一例. 第 28 回日本血管病理研究会
25. 三好敦子, 中沢大悟, 上田雄翔, 西尾妙織, 外丸詩野, 石津明洋, 渥美達也. 慢性腎臓病の動脈硬化病変における好中球の役割に関する研究. 第 5 回血管炎病因病態研究会
26. 宮崎龍彦, 小林一博, 酒々井夏子, 丹羽亜弓, 花松有紀. 組換え近交系マウスを用いた血管炎治療モデルの解析について. 第 5 回血管炎病因病態研究会
27. 小林一博, 酒々井夏子, 武曾恵理, 小川弥生, 中沢大悟, 黒川真奈美, 石津明洋, 宮崎龍彦. 知っておきたい抗好中球細胞質抗体 (ANCA) 関連小孔: 臨床と病理 ANCA 関連中耳炎 (OMAAV) の病理. 第 113 回日本病理学会総会 ワークショップ
28. 宮崎龍彦, 小林一博, 酒々井夏子, 松本宗和, 花松有紀, 丹羽亜弓. 病理学総論再考 組換え近交系マウスを用いた膠原病の感受性因子、治療反応性修飾因子の包括的ゲノム解析. 第 113 回日本病理学会総会 ワークショップ

F. 知的財産権の出願・登録

なし。