

p.1-5 A comment on the relationship of forces with stress tensors for fluids in a tube.  
Fukuo Yoshida

p.6-12 Stage C 前立腺癌に対する内分泌ホルモン療法併用強度変調放射線治療 (IMRT) の中期治療成績  
河野直明, 邵 啓全, 津川拓也, 村田喜代史, 野間和夫, 本多恵理子, 橋本恵次, 近藤康雄, 牛田 博, 岡本圭生, 岡田裕作

p.13-16 腹壁全層吊り上げ単孔式腹腔鏡下開窓術を施行した感染性肝嚢胞の一例  
岡内 博, 下松谷匠

p.17-22 骨盤内臓器の位置評価における体位の影響の検討  
二宮早苗, 森川茂廣, 遠藤善裕, 正木紀代子, 斉藤祥乃, 土川 祥, 森みどり, 岡山久代

p.23-27 マンモグラフィと超音波検査併用乳癌検診における総合判定の有用性について  
田中彰恵, 梅田朋子, 小島真世, 柳 直子, 河原絵里, 中島佐恵, 野々村 愛, 河合由紀, 森 毅, 阿部 元, 藤山佳秀, 谷 徹

p.28-35 麻酔科主導の術前経口補水療法の導入と標準化: 国立病院機構滋賀病院での取り組み  
藤野能久, 本間恵子, 曾我真弓, 千原孝志, 内藤裕子, 菊地克久, 堤 泰彦, 尾崎良智, 佐藤浩一郎, 井上貴至, 井上修平, 野坂修一, 来見良誠

p.a1-a19 第9回基礎・臨床融合の学内共同研究発表会  
再生医療のための次世代薬物輸送システム 平成24年10月29日

ナノダイヤモンドのドラッグキャリアへの応用

小松直樹, Zhao Li

分子 ZIP コード標識による超ウイルスベクターを用いたピンポイント遺伝子輸送

寺島智也, 小島秀人, 大井二郎, 川合寛道, 前川 聡

ファージディスプレイ法を用いた分子標的造影剤の開発: マウス膵臓のβ細胞の造影

椎野顯彦, 小島秀人, 小松直樹, 小畑利之, 寺島智也, 前川 聡, 犬伏俊郎, 柏木厚典

肝血管走行改変と遺伝子治療による全膵機能再生の試み

藤野和典, 小島秀人, 松村一弘, 樫 美和子, 寺島智也, 小川暢弘, 江口 豊

糖尿病合併症を誘導する異常骨髄幹細胞の同定と新規治療の開発

小島秀人, 樫 美和子, 寺島智也, 前川 聡, 木村 博

p.a20-a31 第8回基礎・臨床融合の学内共同研究発表会  
がんにおける遺伝子異常と予後因子について 平成24年7月17日

drs 癌抑制遺伝子による癌化抑制機構

旦部幸博, 井上寛一

診療に於ける新規マーカーの探索と適用

茶野徳宏

ゲノム解析に基づいた統合的がん分子病態診断システムの開発研究

醍醐弥太郎

# A comment on the relationship of forces with stress tensors for fluids in a tube

Fukuo Yoshida

Department of Physics, Division of Fundamental Bioscience  
Shiga University of Medical Science  
Seta Tsukinowa-cho, Otsu, Shiga 520-2192, Japan

**Abstract** The force for fluid elements in a tube is discussed by considering a net force in an infinitesimal volume in incompressible fluids. An expression for it in terms of stress tensors is obtained in cylindrical coordinates, and it is critically compared with Zamir's results in a pulsating flow .

**Keyword** fluids , force, stress tensors , cylindrical coordinates

## 1. Introduction

The Navier-Stokes equation is of fundamental importance to the fluid dynamics in various fields [1-3]. For instance, in biophysics, the pulsating flow in a tube was studied by Zamir [4], adopting cylindrical coordinates. To obtain an explicit expression for the equation of motion in curvilinear coordinates, one can apply a formal mathematical procedure to the vector Laplacian [5]. Alternatively, it is derived physically by considering the meaning of a net force per unit volume. These are equivalent, but the latter approach would be useful to investigate how each stress component on a surface effectively contributes to the force in a specified geometry.

In this note, we discuss a force per unit volume for incompressible fluids in a tube. Considering forces on a pair of surfaces in an infinitesimal volume, we obtain an expression of the net force in terms of stress tensors in cylindrical coordinates. The physical content of this is discussed in comparison with the Zamir's results [4].

## 2. Force per unit volume and stress tensors in cylindrical coordinates

In cartesian coordinates, the stress tensor  $\sigma_{ij}$  in incompressible viscous fluids [1] is given in terms of the viscosity coefficient  $\eta$ , pressure  $p$  and the fluid velocity  $\mathbf{v}$  by

$$\sigma_{ij} = -p\delta_{ij} + \eta \left( \frac{\partial v_j}{\partial x_i} + \frac{\partial v_i}{\partial x_j} \right) \quad i, j = 1-3 \quad (1)$$

The quantities  $v_1, v_2, v_3$  stand for  $x, y, z$  components of the fluid velocity, respectively. With the use of the stress tensor (1) the force per unit volume is cast into the form

$$\mathbf{f} = -\nabla p + \eta \nabla^2 \mathbf{v} \quad (2)$$

The force  $\mathbf{f}$  divided by the fluid density appears in the Navier-Stokes equation for the velocity, in incompressible fluids.

In the circular cylindrical coordinates, the parameters  $\ell, \varphi, z$  are related to the cartesian coordinates ( $x, y, z$ ) by

$$x = \ell \cos \varphi, \quad y = \ell \sin \varphi, \quad z = z \quad (3)$$

The unit base vectors  $\mathbf{e}_\ell, \mathbf{e}_\varphi, \mathbf{e}_z$  are defined by using the position vector  $\mathbf{r}$  as

$$\mathbf{e}_\ell = \frac{\partial \mathbf{r}}{\partial \ell}, \quad \mathbf{e}_\varphi = \frac{1}{\ell} \frac{\partial \mathbf{r}}{\partial \varphi}, \quad \mathbf{e}_z = \frac{\partial \mathbf{r}}{\partial z} \quad (4)$$

Then, the velocity and the force are represented in the form

$$\mathbf{v} = v_\ell \mathbf{e}_\ell + v_\varphi \mathbf{e}_\varphi + v_z \mathbf{e}_z, \quad (5)$$

$$\mathbf{f} = f_\ell \mathbf{e}_\ell + f_\varphi \mathbf{e}_\varphi + f_z \mathbf{e}_z$$

where  $v_\ell, v_\varphi, v_z$  and  $f_\ell, f_\varphi, f_z$  are the physical components of  $\mathbf{v}$  and  $\mathbf{f}$ , respectively.

The components of stress tensors in cylindrical coordinates are  $\sigma_{\ell\ell}, \sigma_{\ell\varphi} = \sigma_{\varphi\ell}, \sigma_{\ell z} = \sigma_{z\ell}, \sigma_{\varphi\varphi}, \sigma_{\varphi z} = \sigma_{z\varphi}, \sigma_{zz}$ ; the quantity  $\sigma_{\alpha\beta}$  represents the force per unit area along  $\mathbf{e}_\alpha$  on the infinitesimal surface perpendicular to the direction of  $\mathbf{e}_\beta$ , with  $\alpha, \beta = \ell, \varphi, z$ . We consider a point specified by the parameters  $\ell, \varphi, z$ , and also an infinitesimal region R around it by giving infinitesimal increments  $\Delta\ell, \Delta\varphi, \Delta z$  to these parameters. The volume of the region R is  $\delta V = \ell \Delta\ell \Delta\varphi \Delta z$ .

In the first place, we consider a pair of the infinitesimal surface defined by the fixed values of  $\ell$  and  $\ell + \Delta\ell$ . At the point  $(\ell, \varphi, z)$ , the surface of the area  $\ell \Delta\varphi \Delta z$  is perpendicular to the direction of  $\mathbf{e}_\ell$ . Since  $\sigma_{\ell\ell}, \sigma_{\varphi\ell}, \sigma_{z\ell}$  are the  $\ell, \varphi, z$  components of the stress on the surface, respectively, the force acting on the surface corresponding to  $\ell$  is given by

$$\mathbf{F}^{(\ell)}(\ell) = (\sigma_{\ell\ell}\boldsymbol{\varepsilon}_\ell + \sigma_{\varphi\ell}\boldsymbol{\varepsilon}_\varphi + \sigma_{z\ell}\boldsymbol{\varepsilon}_z)\ell\Delta\varphi\Delta z \quad (6)$$

The superscript  $(\ell)$  indicates the contribution from the surfaces perpendicular to  $\boldsymbol{\varepsilon}_\ell$ . Similarly, the force acting on the other surface corresponding to  $\ell + \Delta\ell$  is

$$\begin{aligned} \mathbf{F}^{(\ell)}(\ell + \Delta\ell) = & ([\ell\sigma_{\ell\ell}]_{\ell+\Delta\ell}\boldsymbol{\varepsilon}_\ell + [\ell\sigma_{\varphi\ell}]_{\ell+\Delta\ell}\boldsymbol{\varepsilon}_\varphi \\ & + [\ell\sigma_{z\ell}]_{\ell+\Delta\ell}\boldsymbol{\varepsilon}_z)\Delta\varphi\Delta z \end{aligned} \quad (7)$$

where the notation such as  $[\ell\sigma_{\ell\ell}]_{\ell+\Delta\ell}$  indicates that the value of  $\ell\sigma_{\ell\ell}$  is evaluated at the point  $(\ell + \Delta\ell, \varphi, z)$ . The difference  $\delta\mathbf{F}^{(\ell)} = \mathbf{F}^{(\ell)}(\ell + \Delta\ell) - \mathbf{F}^{(\ell)}(\ell)$  between these two forces is the net force for the fluid element in the region R. Dividing  $\delta\mathbf{F}^{(\ell)}$  by  $\delta V$ , we obtain the force per unit volume  $\mathbf{f}^{(\ell)} = \delta\mathbf{F}^{(\ell)} / \delta V$  as

$$\mathbf{f}^{(\ell)} = \frac{\partial}{\partial\ell}(\sigma_{\ell\ell})\boldsymbol{\varepsilon}_\ell + \frac{\partial}{\partial\ell}(\sigma_{\varphi\ell})\boldsymbol{\varepsilon}_\varphi + \frac{\partial}{\partial\ell}(\sigma_{z\ell})\boldsymbol{\varepsilon}_z \quad (8)$$

Secondly, we consider a pair of the infinitesimal surfaces defined by the fixed values of  $\varphi$  and  $\varphi + \Delta\varphi$ . The force acting on the surface of the area  $\Delta\ell\Delta z$  is given by  $\mathbf{F}^{(\varphi)}(\varphi) = (\sigma_{\ell\varphi}\boldsymbol{\varepsilon}_\ell + \sigma_{\varphi\varphi}\boldsymbol{\varepsilon}_\varphi + \sigma_{z\varphi}\boldsymbol{\varepsilon}_z)\Delta\ell\Delta z$  just as in equation (7), omitting the subscript  $\varphi$ . But, for the force  $\mathbf{F}^{(\varphi)}(\varphi + \Delta\varphi)$  acting on the surface corresponding to  $\varphi + \Delta\varphi$ , we have to take into account the fact that the unit vectors  $\boldsymbol{\varepsilon}_\ell$  and  $\boldsymbol{\varepsilon}_\varphi$  given by equation (4) themselves depend on the variable  $\varphi$ . As a consequence, it is appropriate to write  $\bar{\mathbf{F}}^{(\varphi)}(\varphi + \Delta\varphi)$  as

$$\begin{aligned} \bar{\mathbf{F}}^{(\varphi)}(\varphi + \Delta\varphi) = & ([\sigma_{\ell\varphi}]_{\varphi+\Delta\varphi}[\boldsymbol{\varepsilon}_\ell]_{\varphi+\Delta\varphi} \\ & + [\sigma_{\varphi\varphi}]_{\varphi+\Delta\varphi}[\boldsymbol{\varepsilon}_\varphi]_{\varphi+\Delta\varphi} + [\sigma_{z\varphi}]_{\varphi+\Delta\varphi}\boldsymbol{\varepsilon}_z)\Delta\ell\Delta z \end{aligned} \quad (9)$$

Then, to evaluate the difference between  $\bar{\mathbf{F}}^{(\varphi)}(\varphi + \Delta\varphi)$  and  $\bar{\mathbf{F}}^{(\varphi)}(\varphi)$  we make use of the relationship

$$\frac{\partial \mathbf{a}_\ell}{\partial \varphi} = \left\{ \begin{matrix} \alpha \\ \ell \varphi \end{matrix} \right\} \mathbf{a}_\alpha, \quad \frac{\partial \mathbf{a}_\varphi}{\partial \varphi} = \left\{ \begin{matrix} \alpha \\ \varphi \varphi \end{matrix} \right\} \mathbf{a}_\alpha$$

for the differentiation of the base vectors  $\mathbf{a}_\ell$  and  $\mathbf{a}_\varphi$  with respect to the parameter  $\varphi$ . Here, the quantity with three indices is the Christoffel's symbol of the second kind in tensor analysis [6], and the summation is implied for the repeated index  $\alpha = \ell, \varphi, z$ . It is found by using the relationships  $\mathbf{a}_\ell = \boldsymbol{\varepsilon}_\ell$ ,  $\mathbf{a}_\varphi = \ell\boldsymbol{\varepsilon}_\varphi$ ,  $\mathbf{a}_z = \boldsymbol{\varepsilon}_z$  and the values of the Christoffel's symbol that these are explicitly given as

$$\frac{\partial \boldsymbol{\varepsilon}_\ell}{\partial \varphi} = \boldsymbol{\varepsilon}_\varphi, \quad \frac{\partial \boldsymbol{\varepsilon}_\varphi}{\partial \varphi} = -\boldsymbol{\varepsilon}_\ell \quad (10)$$

Utilizing this relationship (10), we obtain the difference  $\delta\mathbf{F}^{(\varphi)} = \bar{\mathbf{F}}^{(\varphi)}(\varphi + \Delta\varphi) - \bar{\mathbf{F}}^{(\varphi)}(\varphi)$  as

$$\begin{aligned} \delta\mathbf{F}^{(\varphi)} = & \left[ \frac{\partial}{\partial\varphi}(\sigma_{\ell\varphi})\boldsymbol{\varepsilon}_\ell + (\sigma_{\ell\varphi})\boldsymbol{\varepsilon}_\varphi + \frac{\partial}{\partial\varphi}(\sigma_{\varphi\varphi})\boldsymbol{\varepsilon}_\varphi \right. \\ & \left. - (\sigma_{\varphi\varphi})\boldsymbol{\varepsilon}_\ell + \frac{\partial}{\partial\varphi}(\sigma_{z\varphi})\boldsymbol{\varepsilon}_z \right] \Delta\varphi\Delta\ell\Delta z \end{aligned} \quad (11)$$

It is then found that the force per unit volume  $\mathbf{f}^{(\varphi)} = \delta\mathbf{F}^{(\varphi)} / \delta V$  is

$$\begin{aligned} \mathbf{f}^{(\varphi)} = & \frac{1}{\ell} \frac{\partial}{\partial\varphi}(\sigma_{\ell\varphi})\boldsymbol{\varepsilon}_\ell + \frac{\sigma_{\ell\varphi}}{\ell}\boldsymbol{\varepsilon}_\varphi + \frac{1}{\ell} \frac{\partial}{\partial\varphi}(\sigma_{\varphi\varphi})\boldsymbol{\varepsilon}_\varphi \\ & - \frac{\sigma_{\varphi\varphi}}{\ell}\boldsymbol{\varepsilon}_\ell + \frac{1}{\ell} \frac{\partial}{\partial\varphi}(\sigma_{z\varphi})\boldsymbol{\varepsilon}_z \end{aligned} \quad (12)$$

Finally, a pair of the infinitesimal surfaces corresponding to the fixed values of  $z$  and  $z + \Delta z$  is considered to obtain the force  $\mathbf{f}^{(z)}$  per unit volume. Following the same procedure as for  $\mathbf{f}^{(\ell)}$ , we obtain

$$\mathbf{f}^{(z)} = \frac{\partial}{\partial z}(\sigma_{\ell z})\boldsymbol{\varepsilon}_\ell + \frac{\partial}{\partial z}(\sigma_{\varphi z})\boldsymbol{\varepsilon}_\varphi + \frac{\partial}{\partial z}(\sigma_{zz})\boldsymbol{\varepsilon}_z \quad (13)$$

The summation of these three forces  $\mathbf{f}^{(\ell)}$ ,  $\mathbf{f}^{(\varphi)}$ ,  $\mathbf{f}^{(z)}$  is equal to the force  $\mathbf{f}$  in equation (2):

$$\mathbf{f} = \mathbf{f}^{(\ell)} + \mathbf{f}^{(\varphi)} + \mathbf{f}^{(z)} \quad (14)$$

It is then straightforward to find the three components  $f_\ell$ ,  $f_\varphi$ ,  $f_z$  in the direction of  $\boldsymbol{\varepsilon}_\ell$ ,  $\boldsymbol{\varepsilon}_\varphi$ ,  $\boldsymbol{\varepsilon}_z$ , respectively,

from  $\mathbf{f}$ . The results are

$$f_\ell = \frac{1}{\ell} \frac{\partial}{\partial \ell} (\ell \sigma_{\ell\ell}) + \frac{1}{\ell} \frac{\partial}{\partial \theta} \sigma_{\ell\varphi} + \frac{\partial}{\partial z} \sigma_{\ell z} - \frac{1}{\ell} \sigma_{\varphi\varphi} \quad (15)$$

$$f_\varphi = \frac{1}{\ell} \frac{\partial}{\partial \ell} (\ell \sigma_{\varphi\ell}) + \frac{1}{\ell} \frac{\partial}{\partial \varphi} \sigma_{\varphi\varphi} + \frac{\partial}{\partial z} \sigma_{\varphi z} + \frac{1}{\ell} \sigma_{\ell\varphi}$$

$$f_z = \frac{1}{\ell} \frac{\partial}{\partial \ell} (\ell \sigma_{z\ell}) + \frac{1}{\ell} \frac{\partial}{\partial \varphi} \sigma_{z\varphi} + \frac{\partial}{\partial z} \sigma_{zz}$$

We consider the equilibrium state as a special case; the stress tensors in cartesian coordinates are diagonal and static ( $\sigma_{ij} = -p\delta_{ij}$  with constant  $p$ ). It is necessary that the force vanishes at equilibrium, as found from equation (2). By substituting  $\sigma_{\alpha\beta} = -p\delta_{\alpha\beta}$  in equation (15), we easily find that the three components  $f_\ell$ ,  $f_\varphi$ ,  $f_z$  vanish, or  $\mathbf{f} = 0$ . For  $f_\ell$ , the first term is cancelled out by the last term. It is noted that the results given by equation (2.6.4) in [4] do not satisfy this requirement.

### 3. Force per unit volume in terms of space derivatives of the velocity

The velocity satisfies the continuity equation of the form

$$\nabla \cdot \mathbf{v} = 0 \quad (16)$$

in incompressible fluids. This gives the constraint for velocity components, whereby  $v_\ell$ ,  $v_\varphi$ ,  $v_z$  are not independent. In order to write equation (16) in cylindrical coordinates, we consider three pairs of the infinitesimal surface as mentioned above, and take the scalar products of  $\mathbf{v}$  with outer normal vectors by definition of divergence as  $\boldsymbol{\varepsilon}_\ell \cdot \mathbf{v} \Delta S_\ell = v_\ell \ell \Delta \varphi \Delta z$ ,  $\boldsymbol{\varepsilon}_\varphi \cdot \mathbf{v} \Delta S_\varphi = v_\varphi \Delta \ell \Delta z$ ,  $\boldsymbol{\varepsilon}_z \cdot \mathbf{v} \Delta S_z = v_z \ell \Delta \ell \Delta \varphi$ . It is then found by following the same procedure as shown to obtain  $\mathbf{f}$  that  $\nabla \cdot \mathbf{v}$  can be written with space derivatives of the velocity as

$$\nabla \cdot \mathbf{v} = \frac{1}{\ell} \frac{\partial}{\partial \ell} (\ell v_\ell) + \frac{1}{\ell} \frac{\partial v_\varphi}{\partial \varphi} + \frac{\partial v_z}{\partial z} \quad (17)$$

Substituting six components of the stress tensor [2] given

by

$$\begin{aligned} \sigma_{\ell\ell} &= -p + 2\eta \frac{\partial v_\ell}{\partial \ell}, \\ \sigma_{\ell\varphi} = \sigma_{\varphi\ell} &= \eta \left( \frac{\partial v_\varphi}{\partial \ell} + \frac{1}{\ell} \frac{\partial v_\ell}{\partial \varphi} - \frac{v_\varphi}{\ell} \right), \\ \sigma_{\ell z} &= \eta \left( \frac{\partial v_z}{\partial \ell} + \frac{\partial v_\ell}{\partial z} \right) \quad (18) \\ \sigma_{\varphi\varphi} &= -p + 2\eta \left( \frac{1}{\ell} \frac{\partial v_\varphi}{\partial \varphi} + \frac{v_\ell}{\ell} \right), \\ \sigma_{\varphi z} = \sigma_{z\varphi} &= \eta \left( \frac{1}{\ell} \frac{\partial v_z}{\partial \varphi} + \frac{\partial v_\varphi}{\partial z} \right), \\ \sigma_{zz} &= -p + 2\eta \frac{\partial v_z}{\partial z} \end{aligned}$$

into equation (15) and using equation (16), we are able to show that the force per unit volume is written in terms of the space derivatives of the velocity as

$$f_\ell = -\frac{\partial p}{\partial \ell} + \eta \left[ \left( \nabla^2 - \frac{1}{\ell^2} \right) v_\ell - \frac{2}{\ell^2} \frac{\partial v_\varphi}{\partial \varphi} \right],$$

$$f_\varphi = -\frac{1}{\ell} \frac{\partial p}{\partial \varphi} + \eta \left[ \left( \nabla^2 - \frac{1}{\ell^2} \right) v_\varphi + \frac{2}{\ell^2} \frac{\partial v_\ell}{\partial \varphi} \right], \quad (19)$$

$$f_z = -\frac{\partial p}{\partial z} + \eta \nabla^2 v_z,$$

$$\text{with } \nabla^2 = \frac{1}{\ell} \frac{\partial}{\partial \ell} \ell \frac{\partial}{\partial \ell} + \frac{1}{\ell^2} \frac{\partial^2}{\partial \varphi^2} + \frac{\partial^2}{\partial z^2}$$

The equation (19) agrees with the results from a direct application of formal mathematical procedures to the vector Laplacian  $\nabla^2 \mathbf{v}$ . It means that without the last term of  $\sigma_{\ell\varphi}/\ell$  in  $f_\varphi$  in equation (15) one could not arrive at the expression of  $f_\varphi$  in equation (19).

In summary, we have discussed the physical significance of the net force in an infinitesimal volume, and obtained equation (15) as its expression in terms of stress tensors. The last terms  $-\sigma_{\varphi\varphi}/\ell$  in  $f_\ell$ , and  $\sigma_{\ell\varphi}/\ell$  in  $f_\varphi$  in equation (15) are not involved in the Zamir's results

of equation (2.6.4). It is because he just applied the procedure for the divergence of vectors in the cartesian coordinates, and did not take into consideration the so-called covariant derivative of vectors in curvilinear coordinates. We have pointed out the physical importance of these terms by considering its consequence in the case of static constant pressures. It would be interesting to investigate to what extent they are quantitatively important, compared to other terms, in dynamical problems.

## References

- [1] P. K. Kundu and I. M. Cohen : Fluid Mechanics (Academic Press, New York, 2008) 4th ed., Chap. 4.
- [2] S. F. Borg : Matrix-Tensor Methods in Continuum Media (World Scientific, Singapore, 1990), 2nd ed.
- [3] L. D. Landau L D and E. M. Lifshitz : Fluid Mechanics (Butterworth-Heinemann, Oxford, 1987) 2nd ed., Chap. 2.
- [4] M. Zamir : 2000 The Physics of Pulsatile Flow (AIP Press, New York, 2000) Chap.6.
- [5] G. Arfkan : Mathematical Methods for Physicists (Academic Press, New York, 1966) Chap. 2.6.
- [6] I. S. Sokolnikoff : Tensor Analysis (John Wiley & Sons, New York, 1951) Chap.3.

## Stage C 前立腺癌に対する内分泌ホルモン療法併用 強度変調放射線治療 (IMRT) の中期治療成績

河野 直明<sup>1)</sup>, 邵 啓全<sup>1)</sup>, 津川 拓也<sup>1)</sup>, 村田 喜代史<sup>1)</sup>  
野間 和夫<sup>2)</sup>, 本多 恵理子<sup>2)</sup>, 橋本 恵次<sup>2)</sup>, 近藤 康雄<sup>2)</sup>  
牛田 博<sup>3)</sup>, 岡本 圭生<sup>3)</sup>, 岡田 裕作<sup>3)</sup>

1) 滋賀医科大学 放射線科

2) 滋賀医科大学 放射線部

3) 滋賀医科大学 泌尿器科

## Results of IMRT Following Neoadjuvant Hormone Therapy for Clinical Stage C Prostate Cancer

Naoaki KONO, Keizen SHO, Takuya TSUGAWA, Kiyoshi MURATA,  
Kazuo NOMA, Eriko HONDA, Keiji HASHIMOTO and Yasuo KONDO  
Hiroshi USHIDA, Keisei OKAMOTO and Yusaku OKADA  
Department of Radiology, Shiga University of Medical Science  
Department of Urology, Shiga University of Medical Science

**Abstract** We report the 5-year prostate-specific antigen (PSA) relapse-free survival outcome and incidence of toxicity for patients with clinically Stage C prostate cancer treated with intensity-modulated radiation therapy (IMRT) in our institute. A total of 35 patients with Stage C prostate cancer were treated with IMRT between July 2003 and November 2007. All patients were treated to a dose of 74Gy prescribed to the planning target volume and received neoadjuvant hormone therapy. The median age was 71 years (range: 50 to 80 years). 3 patients (8.6%) had Gleason scores  $\leq 6$ , 14 patients (40.0%) had Gleason scores 7, 18 patients (51.4%) had Gleason scores  $\geq 8$ . The median pretreatment PSA level was 28.0 ng/mL (range: 5.1 to 160.0 ng/mL). Patients were characterized as having high risk disease if their pretreatment PSA level was  $>20$ ng/ml and Gleason score  $\geq 8$ . PSA relapse-free survival rate were calculated and toxicity data were scored according to the Common Terminology Criteria for Adverse Events Version 3.0. The median follow-up time was 58 months (range 7 to 84). 11 patients (31.4%) developed a PSA relapse, and the 5-year PSA relapse-free survival rate was 66.3%. The 5-year PSA relapse-free survival rates for high risk patients and others were 39.2% and 85.7%, respectively ( $p=0.0098$ ). The likelihood of acute grade 2 urinary and rectal toxicity was 14.2% and 11.4%. No grade 2 late complications have been observed. These results indicated that 74Gy IMRT is well tolerated and is associated with good PSA relapse-free survival outcomes in patients with Stage C prostate cancer, especially non-high risk patient.

**Key words** Prostate Cancer, Intensity Modulated Radiation Therapy, IMRT

### はじめに

前立腺特異抗原 (Prostate Specific Antigen : PSA) 検査の普及に伴って早期前立腺癌症例の割合が増加しているものの、依然として我が国においては、Stage C のような進行した症例も相当の割合を占めているのが現状である。従って Stage C の前立腺癌に対して適切な加療を行うことは重要な課題である。Stage C の前立腺癌は、いわゆる局所進行前立腺癌であり、NCCN (National Comprehensive Cancer Network) のリスク分

類においても高 (～超高) リスク群の前立腺癌として分類される。これらに対する前立腺全摘術による治療成績は決して良好とは言えないが、その主な理由は、前立腺被膜外浸潤による切除断端陽性やリンパ節転移のリスクが高いことにある。そのため、Stage C をはじめとする高リスク群の前立腺癌に対しては、内分泌ホルモン療法を併用した放射線治療が行われることが多い。

限局性前立腺癌に対する放射線治療には、外照射と組織内照射 (低線量率・高線量率)、あるいは両者を組

み合わせる方法がある。最近では、低線量率組織内照射（ヨード 125 密封小線源永久刺入療法）を中心とした加療が本邦でも盛んに行われるようになり、中にはこれらのリスクの高い限局性前立腺癌を加療の対象とするような流れもあるが[1-2]、基本的に Stage C をはじめとする高リスク群の前立腺癌に対する加療には、3次元原体照射を中心とした外照射が、以前より行われてきた。しかしながら、外照射の照射方法（照射野にリンパ節領域を含めるか否か）・照射線量に関して、あるいは併用する内分泌ホルモン療法の期間に関しては必ずしもコンセンサスは得られていない。

今回、我々は当院にて加療を行った Stage C 前立腺癌で、ネオアジュバント内分泌ホルモン療法を併用し強度変調放射線治療（Intensity Modulated Radiation Therapy：IMRT）による根治的な放射線治療を施行した症例について、その治療成績を疾患特異生存率と PSA 非再発生存率、また、有害事象に関して後ろ向きに検討した。

## 対象および方法

Stage C の限局性前立腺癌に対し、ネオアジュバント内分泌療法を併用し、2003 年 7 月から 2007 年 11 月の間に当院にて IMRT を施行した 35 症例を対象とした。年齢は 50 才～80 才（中央値 71 才）で、PS は 0～1、診断は全例、当院もしくは紹介先医療機関の泌尿器科にて行われ、生検・CT・MRI・TRUS(経直腸超音波検査)・骨シンチ・直腸診により、Stage C の限局性前立腺癌と診断されている。

内分泌ホルモン療法は、注射製剤である LH-RH アナログ（酢酸ゴセレリン）および、抗アンドロゲン薬（ビカルタミド）の内服による Combined Androgen Blockade(CAB)もしくは LH-RH アナログ単独によるネオアジュバント内分泌ホルモン療法が行われ、内分泌ホルモン療法開始より 3 ヶ月から 6 ヶ月後に IMRT による治療を引き続き開始している。また、IMRT 治療終了時には基本的に内分泌ホルモン療法は中止、アジュバントの内分泌ホルモン療法は行っていない。ネオアジュバント内分泌ホルモン療法は 35 例全例で施行され、内訳としては CAB が 31 例で行われており、LH-RH アナログ単独での加療が 4 例に行われていた。また、内分泌療法の期間は 4～20 ヶ月（中央値 7 ヶ月）であった。

表 1 StageC 前立腺癌症例(35例)背景因子

年齢(歳)	50 ~ 80 (中央値 71 歳)	
臨床病期	cT3a	29例
	cT3b	5例
	cT4	1例
初診時 PSA(ng/ml)	5.1 ~ 160 (中央値 28.0 ng/ml)	
	≤10	2例
	10.1~19.9	10例
	20~100	20例
	100<	3例
生検 Gleason Score	≤6	3例
	7	14例
	8	4例
	9	14例
観察期間(ヶ月)	7 ~ 84ヶ月 (中央値 58ヶ月)	

IMRT の計画は、専用の放射線治療計画装置（Cad Plan - Helios system）を用いて行い、前立腺および精嚢を Target Volume とし、マージンは Target Volume の左右方向・背腹方向に 7mm、頭尾方向に 8mm と設定、照射門数 5 門(45°105°180°255°315°)の Sliding Window 法を基本とした。IMRT の照射は、固定具を用いた仰臥位で行い、1 回線量は 2Gy とし、総照射線量は 74Gy（アイソセンター処方）で行った。CT による前立腺位置確認を週に 1～2 回は施行し、前立腺の左右方向、頭尾方向、背腹方向への動きを確認の上、必要に応じてアイソセンターの位置調節を行った。

35 例の初診時 PSA 値は 5.1ng/ml～160.0ng/ml(中央値 28.0ng/ml)で、10ng/ml 以下が 2 例、10-20ng/ml が 10 例、20ng/ml 以上が 23 例であった。Gleason Score は 6 以下が 3 例、7 が 14 例、8 以上が 18 例であった。PSA 値が 20ng/ml 以上で、かつ、Gleason Score が 8 以上の症例を高悪性群と定義し、高悪性群 14 例とそれ以外の 21 例につき検討を行った。経過観察は放射線治療終了時点からとし、経過観察期間は 7～84 ヶ月（中央値 58 ヶ月）であった（表 1）。

また、PSA は高感度の前立腺癌腫瘍マーカーであり、臨床的には再発の早期発見に役立つものであるが、現在では、前立腺癌治療後の PSA 値にカットオフ値を設け、これを超える場合を一般的に PSA 再発と呼び、PSA

非再発生存率は、前立腺癌制御の指標として用いられることが多い。ここでの PSA 再発の基準は ASTRO (American Society for Radiation Oncology) の Phoenix の定義に従い、PSA nadir より 2.01ng/ml 以上の上昇を基本としたが、PSA の上昇が 2.01ng/ml 未満でもサルベージの内分泌ホルモン療法が開始されている症例については、その時点で PSA 再発とした。PSA 非再発生存率に関する検討には Kaplan-Meier 法を、その検定には Log-rank 法を用いた。有害事象は CTCTAE (Common Toxicity Criteria for Adverse Events) version3.0 に準拠し評価した。つまり内科的な投薬を必要とするもの、直腸出血であれば小規模の内視鏡的な焼灼処置を必要とするようなものは基本的に Grade2 の有害事象とし、導尿、輸血、IVR、内視鏡的加療、もしくは外科的な処置を必要とするような場合 Grade3、それ以上の生命を脅かすレベルの有害事象を Grade4 とした。

結果

経過観察中に 35 例中 11 例が PSA 再発と判定され、その全 11 例にサルベージの内分泌ホルモン療法が開始された。その内訳は、以下の表 2 に示すように、PSA  $\geq 20$ ng/ml が 9 例、Gleason Score  $\geq 8$  が 8 例と大部分を占め、11 例のうちこの両条件を満たす高悪性群は 8 例であった。また、PSA 値の上昇が 2.01ng/ml 未満でサルベージの内分泌ホルモン療法が開始されている症例は 4 例にみられた。再発形式としては、臨床的再発が 1 例（骨転移）に認められたが、経過観察中に死亡した症例はなかった。

表 2 PSA 再発症例 (11例)

臨床病期	cT3a	9例
	cT3b	1例
	cT4	1例
初診時 PSA(ng/ml)		
	$\leq 10$	0例
	10.1~19.9	2例
	20~100	6例
	100<	3例
生検 Gleason Score		
	$\leq 6$	0例
	7	3例
	8	1例
	9	7例
Salvage 内分泌治療開始時		
PSA 上昇幅 (ng/ml)	<2	4例
	$2 \leq$	7例

Kaplan-Meier 法による 5 年累積の疾患特異生存率は 100%、PSA 非再発生存率は 66.3%であった (図 1)。5 年累積 PSA 非再発生存率に関しては、Gleason Score 7 以下で 82.3%、Gleason Score 8 以上では 55.5%と (図 2)、有意差はないものの Gleason Score 8 以上で不良な傾向であった (P=0.13)。同様に、初診時 PSA 値 20ng/ml 未満で 83.3%、20ng/ml 以上では 60.8%と (図 3)、これも有意差はないものの PSA 20ng/ml 以上で不良な傾向となった (P=0.20)。また、非高悪性群と高悪性群との比較では、非高悪性群で 85.7%、高悪性群では 39.2%と (図 4)、5 年累積 PSA 非再発生存率は高悪性群にて有意に不良であった (P=0.0098)。

急性期有害事象は Grade2 が尿路で 5 例 (14.2%)、直腸で 4 例 (11.4%) に認められた。Grade3 以上のもは認められなかった。晩期有害事象は Grade2 以上のもは認められなかった。

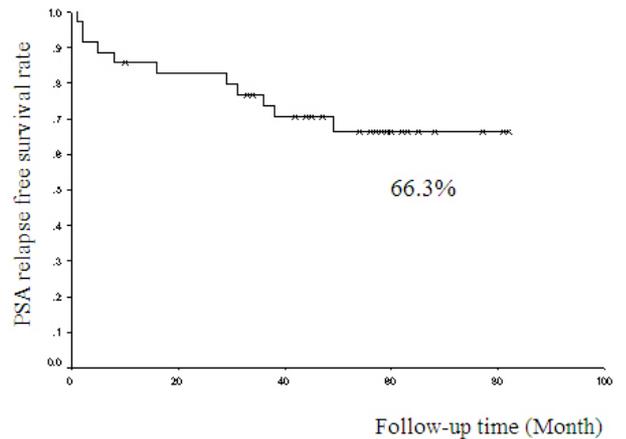


図1 PSA 非再発生存率 (全症例)

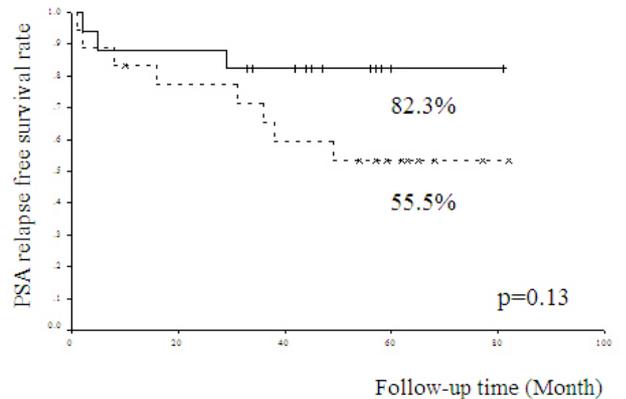


図2 PSA 非再発生存率 (Gleason Score 別)

実線(上) : Gleason Score  $\leq 7$  点線(下) :  $8 \leq$  Gleason Score

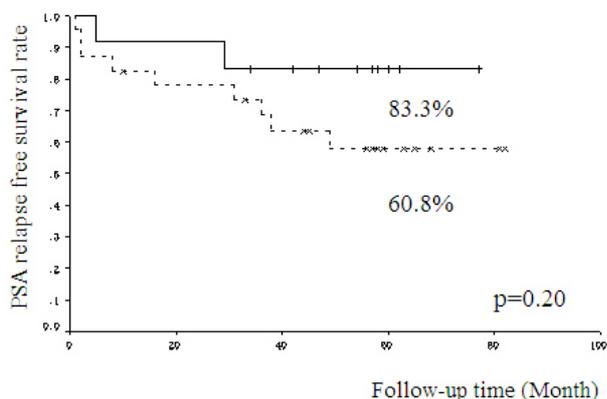


図3 PSA 非再発生存率 (PSA 別)  
 実線 (上) : PSA<20 点線 (下) : 20≦PSA

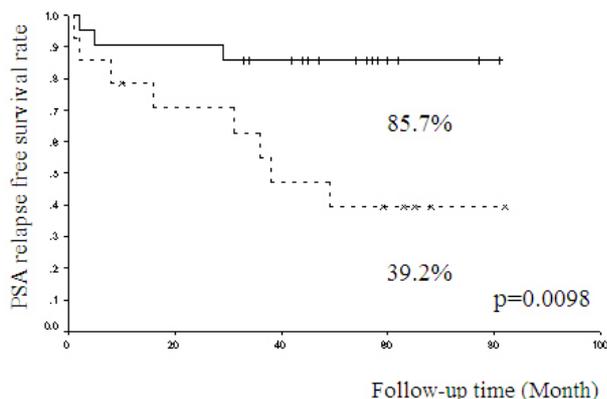


図4 PSA 非再発生存率 (群別)  
 実線 (上) : 非悪性群 点線 (下) : 悪性群

## 考察

限局性前立腺癌に対して行われる内分泌ホルモン療法併用の放射線治療に関しては、1997年のBollaらの内分泌ホルモン療法併用放射線治療と放射線単独治療の比較試験の結果から、NCCNのガイドラインにおいても、この治療が推奨はされているが、ここにおける放射線治療の照射線量は70Gy程度となっており、これらは1世代前の放射線治療の結果にもとづくものとなっている[3]。しかしながら、近年では新たな照射法として、強度変調放射線治療(Intensity Modulated Radiation Therapy: IMRT)が広く普及し用いられて来ており、70Gyより高い線量の放射線治療が行われるようになりつつある。

IMRTは、「(Inverse Planに基づき)空間的、時間的に不均一な放射線強度を持つビームを多方向から照

射することにより、病変部に最適な線量分布を得る放射線治療法」と定義される照射法である。この照射法は、通常の高エネルギーX線を用い、腫瘍への線量集中性を高める手法として開発されたもので、以前から行われている3次元原体(腫瘍形状に合わせこむ)照射の進化形であるが、照射野内の線量強度を変化させることで、周辺のリスク臓器への照射線量を増やすことなく(場合によっては低減させ)Target Volumeへの高線量照射を実現できる。IMRTを前立腺癌に用いた場合、近接する膀胱・直腸への線量を極力減少させ、前立腺および精囊へより多くの線量を照射することが可能となる。結果、高いグレードの尿路・直腸有害事象を避けつつ、高い治療効果が望めることとなり、治療効果、副作用の両面において、従来の3次元原体照射に勝るとされる。特に、中リスクから高リスク群の前立腺癌では、IMRTを用いた線量増加により局所制御率のみならず、生存率などの治療成績向上が期待されている。

一方で、内分泌ホルモン療法には、診断時にすでに存在する可能性のある微小な転移巣を消滅させることで遠隔転移のリスクを減少させることと、放射線治療の効果を増強させることにより遠隔転移の原因となる局所再発のリスクを減少させるという2つの効果があると考えられている。従って、これらは前立腺癌の中でも局所進行前立腺癌(T3a/b~T4)、特にGleason Scoreが8を超える、あるいはPSAが20ng/mlを超えるようなリスクの高い前立腺癌において、放射線治療に併用して行う非常に有効な治療手段と考えられる。

IMRTを用いた高線量の外照射については、Zelefskyらが限局性前立腺癌に対する81GyのIMRTでの加療報告の中で、101例の高リスク群(NCCN分類)前立腺癌に対して90%以上に内分泌ホルモン療法を併用し加療をおこなっているが、その8年PSA非再発生存率は67%であった。直腸有害事象もGrade3以上のものは晩期のもので0.1%、尿路有害事象は3%と報告している[4]。また、Meerleerらは、133例の限局性前立腺癌に対する加療報告にて、43例の高リスク群に内分泌ホルモン療法を併用し74Gy~76GyのIMRTを行っているが、その5年PSA非再発生存率は74%であった。Grade3の有害事象についても全体で1~3%と報告している[5]。今回我々が検討をおこなったのは、Stage C前立腺癌の症例群であり、NCCN分類における高リスク群、あるいは超高リスク群に該当する為、基本的にこれらの報告と同様にリスクの高い前立腺癌を対象としているが、PSA非再発生存率は5年で66.3%であり、その成績は諸家の報告と遜色ないものと思われる。しかしながら、我々の定義した高悪性群(Gleason Score ≧ 8かつPSA ≧ 20ng/ml)の前立腺癌に限って言えば、

PSA 非再発生存率は5年で39.2%であり、その成績は必ずしも十分なものと言い難い。PSA 非再発生存率は、前立腺癌制御の指標とされるが、PSA 非再発生存率の向上には、まず前立腺における局所制御向上が重要であり、これには放射線治療において局所への線量を増加させる必要がある[6]。

線量増加を行う上では、その安全性が問題となるが、今回の検討における直腸と尿路の有害事象は、急性期はいずれも Grade3 以上のものはなく、晩期に関しても Grade2 以上のものは認めなかったことから、これら有害事象も諸家の報告と遜色なく、十分に許容内のものと考えられた。我々はこれらの安全性に基づき、前立腺癌に対する IMRT において2008年より照射総線量を74Gyから76Gyへと増加させて加療を開始しており、加療成績の改善が期待される。将来的には照射総線量を76Gyから78Gyへと更に Dose escalation させて、より前立腺局所への加療強度を上げていく予定である。

また一方で、高悪性群 (Gleason Score  $\geq 8$  かつ PSA  $\geq 20\text{ng/ml}$ ) の限局性前立腺癌には潜在的な転移巣が含まれるケースも少なくないことから、前立腺局所にある程度の高線量を与えたとしても、これだけでは加療成績は必ずしも良好なものになるとは言えないと考えられる。従って、更なる治療成績向上のためには、追加併用するアジュバント内分泌ホルモン療法の検討、また IMRT においては局所への照射線量のみならず、リンパ節領域への照射も検討する余地があると言える。

追加併用するアジュバント内分泌ホルモン療法に関して、Bolla らは2002年 (EORTC22863) に415例の局所進行前立腺癌にて検討を行っているが、高リスク群において放射線治療単独群と3年間の内分泌ホルモン療法 (LH-RH アナログ) を追加併用する群とで比較し、5年 PSA 非再発率 (62% vs 78%)、疾患特異生存率 (40% vs 70%) のいずれも追加併用群で有意に良好であったと報告している[7]。また、Horwitz らの2008年 (RTOG9202) の報告では、T2c-T4 かつ PSA  $< 150\text{ng/ml}$  の前立腺癌に対して、放射線治療開始前～治療中の4ヶ月間に内分泌ホルモン療法を加える短期内分泌ホルモン療法併用群と、これに加えて LH-RH アナログによる2年間のアジュバント内分泌ホルモン療法を追加して行う長期内分泌ホルモン療法併用群とでランダム化比較試験を行ったところ、疾患特異的な10年生存率において長期内分泌ホルモン療法併用群で有意な改善が認められたとしており、特に Gleason Score 8~10 症例のサブセット解析では、長期内分泌ホルモン療法群で有意に全生存の改善 (31.9% vs 45.1%) が認められたとしている[8]。

従って、今回我々の定義した高悪性群 (Gleason Score  $\geq 8$  かつ PSA  $\geq 20\text{ng/ml}$ ) の限局性前立腺癌の加療成績

向上には、IMRT に引き続きアジュバント内分泌ホルモン療法を行うのが選択肢のひとつと考えられる。

しかしながら、アジュバント内分泌ホルモン療法の期間や時期には必ずしも決まったものはない。2005年の山中らによる多施設ランダム化比較試験では、局所進行前立腺癌に6ヶ月間のネオアジュバント内分泌ホルモン療法を行い、その後72Gyの外照射、引き続きアジュバントの内分泌ホルモン療法を継続的に行う群と間欠的に行う群で比較するという非常に興味深いものであるが、観察期間は短いものの、サルベージのホルモン療法を早期に介入させることで、間欠的なアジュバント内分泌ホルモン療法でも疾患特異生存率は保たれる可能性を示している[9]。今回の我々の検討症例においてはアジュバントの内分泌ホルモン療法は原則として行われておらず、PSA 再発を契機にサルベージのホルモン療法が行なわれていることが多かったが、結果として Stage C の局所進行前立腺癌であっても、疾患特異生存率は5年で100%と、非常に高く維持されていた。この結果は、待機的なあるいは間欠的なアジュバント内分泌療法の可能性を支持するものと考えられる。間欠的なアジュバント内分泌ホルモン療法には、その副作用や医療費の軽減といった面で十分にメリットがあり、今後の長期経過観察を経て、更にその有効性を検討する必要がある。

次にリンパ節領域への照射であるが、その有用性はいまだ賛否両論あるのが現状である。Roach らは2003年 (RTOG9413) に1323例のリンパ節転移の可能性が高い (PSA  $\leq 100\text{ng/ml}$  かつ15%程度のリンパ節転移の可能性のある) 限局性前立腺癌に対して、内分泌ホルモン療法を併用した外照射の検討を行っているが、ネオアジュバント内分泌ホルモン療法を併用した場合、骨盤照射群と前立腺局所照射群との比較で、PSA 非再発生存率を含めた4年の Progression-free survival は前者で有意に良好な結果となり (59.6% vs 44.3%)、その有用性を支持している[10]。また、前述の Bolla の試験 (EORTC22863) でも、外照射は骨盤照射が採用されているが、外照射単独群でもリンパ節再発は208例中6例、内分泌ホルモン療法を併用した群の207例に至っては、リンパ節再発は認められていない。以上のことから骨盤リンパ節転移の可能性が高いと考えられる、高 Gleason Score、高 PSA の前立腺癌に限れば、内分泌ホルモン療法を併用した骨盤リンパ節領域の照射は有用性が示されていると考えて良いと思われる。

この骨盤リンパ節領域の照射は以前より全骨盤照射という形で行われてきたものの、消化管の耐用線量がリミテイングファクターとなり、50Gy 程度の線量以上は照射が困難であった。しかしながら、最近になって前立腺局所への高線量投与と骨盤リンパ節領域へ

の十分な予防照射を同時に行う Simultaneous Integrated Boost IMRT (以下 SIB-MRT) という新たな IMRT の方法が臨床にも徐々に応用されつつある。この SIB-IMRT は、強度変調放射線療法 (IMRT) の進化した形で、肉眼的腫瘍体積 (ここでは前立腺と精嚢) と臨床標的体積 (ここではリンパ節領域) の 1 回線量を変えて照射を行う技術であり、標的体積内同時ブースト (SIB) 法と呼ばれている。また、照射範囲に含まれる正常組織への線量低減も同時に行うことが出来、骨盤領域のみならず、頭頸部癌の領域でも普及しつつある照射技術である。

この SIB-IMRT を用いることで、具体的には、骨盤内リンパ節転移を伴う、あるいは伴う可能性のあるような進行前立腺癌であっても、前立腺と精嚢には今まで通りの 78Gy (2Gy × 39 fractions) の照射を行いつつ、骨盤内のリンパ節転移にはこれまで一般的であった全骨盤照射線量である 50Gy 以上の 66.3Gy (1.7Gy × 39 fractions) を、骨盤内の予防的なリンパ節領域にも 58.5Gy (1.5Gy × 39 fractions) を同時に照射することが出来る。これは消化管への照射線量を従来の全骨盤照射と比べて十分に低い線量に抑えることが可能な為で、消化管の有害事象も、これまでの全骨盤照射と同等、もしくはそれ以下に低減される。つまり、SIB-IMRT を用いるようになれば、前立腺局所とリンパ節領域に十分な線量投与が行うことが可能となる。

従って、今回我々の定義した高悪性群 (Gleason Score  $\geq 8$  かつ PSA  $\geq 20$ ng/ml) の限局性前立腺癌の加療成績向上には、骨盤リンパ節領域への照射を SIB-IMRT にて行うことも選択肢のひとつと考えられる。今後はその安全性を十分に検討し、症例に応じて SIB-IMRT の導入も考慮する余地があるものと思われる。

## 結語

当院での Stage C 前立腺癌に対する内分泌ホルモン療法を併用した IMRT は、重篤な有害事象もなく、安全な治療法と考えられ、諸家の報告と比較しても、中期成績としては遜色ないものと考えられた。しかしながら、PSA 非再発生存率という点からはその治療成績は必ずしも十分とは言えず、特に高悪性群 (Gleason Score  $\geq 8$  かつ PSA  $\geq 20$ ng/ml) の前立腺癌の治療成績向上のためには、追加併用するアジュバント内分泌ホルモン療法に関して検討する余地があると思われる。また、IMRT においては、前立腺局所の照射線量を安全に増加させると共に、骨盤の領域リンパ節への照射も視野に入れて今後の加療に取り組む必要があるものと思われる。

## 参考文献

- [1] Stock GR, Cahlon O, Cesaretti AJ. Combined modality treatment on the management of high-risk prostate cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 59(5):1352-59, 2004
- [2] Copp H, Bissonette EA, Theodorescu D. Tumor control outcomes of patients treated with trimodality therapy for locally advanced prostate cancer. *Urology.* 65(6):1146-51, 2005
- [3] Bolla M, et al. Improved survival in patient with locally advanced prostate cancer treated with radiotherapy and goserelin. *N Engl J Med.* 337: 295-300, 1997
- [4] Zelefsky MJ, et al. Long-term outcome of high dose intensity modulated radiation therapy for patients with clinically localized prostate cancer. *The Journal of Urology.* 176: 1415-1419, 2006
- [5] Gert O. De Meerleer, et al. Intensity-modulated radiation therapy for prostate cancer: Late morbidity and results on biochemical control. *Radiotherapy and Oncology.* 82:160-166, 2007
- [6] Hanks GE, et al. Dose escalation with 3D conformal treatment: five year outcomes, treatment optimization, and future directions. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 41(3):501-10, 1998
- [7] Bolla M, et al. Long-term results with immediate androgen suppression and external irradiation in patients with locally advanced prostate cancer (an EORTC study); a phase III randomized trial. *Lancet* 360: 103-106, 2002
- [8] Horwitz EM et al. Ten-year follow-up of Radiation Therapy Oncology Group Protocol 92-02: A phase III trial of the duration of elective androgen deprivation in locally advanced prostate cancer. *J Clin Oncol.* 20: 2497-2504, 2008
- [9] Yamanaka H et al. Effective of Adjuvant Intermittent Endocrine Therapy Following Neoadjuvant Endocrine Therapy and External Beam Radiation Therapy in Men With Locally Advanced Prostate Cancer. *The Prostate.* 63: 56-64, 2005
- [10] Roach M 3<sup>rd</sup> et al. Phase III trial comparing whole-pelvis versus prostate-only radiotherapy and neoadjuvant versus adjuvant combined androgen suppression; Radiation Therapy Oncology Group 9413. *J Clin Oncol.* 21: 1904-1911, 2003

## 和文要旨

ネオアジュバント内分泌ホルモン療法併用 IMRT にて当院で加療を行った Stage C 前立腺癌 35 例につき、治療成績を検討した。観察期間は 7~84 ヶ月 (中央値 58 ヶ月)、Kaplan-Meier 法による 5 年 PSA 非再発生存率は 66.3% で、臨床的再発を 1 例に認めた。PSA 20ng/ml 以上、かつ、Gleason Score 8 以上を高悪性群と定義し、高悪性群 14 例とそれ以外 21 例につき検討を行うと、5 年 PSA 非再発生存率は、高悪性群で 39.2%、それ以外で 85.7% となり、高悪性群が有意に不良であった (P=0.0098)。急性期有害事象は Grade 2 のものが尿路で 14.2%、直腸で 11.4% に認められたが、Grade 3 以上のも

のは認めなかった。晩期有害事象に関しては Grade2 以上のものは認めなかった。急性期、晩期有害事象は共に許容内で、前立腺癌への IMRT は安全な照射法であることが確かめられた。また、諸家の報告と比較しても、中期成績としては遜色ないものと考えられた。局所制御向上には Dose escalation の必要性があるが、この安全性と治療成績に基づき、当院では 2008 年より照射総線量を 74Gy から 76Gy へ増加させ加療を行っており、加療成績の改善が期待される。また、高悪性群 (Gleason Score  $\geq 8$  かつ PSA  $\geq 20$ ng/ml) の前立腺癌には潜在的転移巣が含まれるケースも少なくはなく、これらの症例に対しては、アジュバント内分泌ホルモン療法を追加する必要性につき検討の余地があるものと思われる。加えて、局所の高線量照射と骨盤リンパ節領域の予防照射を同時に行う Simultaneous Integrated Boost IMRT を用いた骨盤リンパ節領域への照射も視野に入れ、今後は加療に取り組む必要があると思われる。

## 腹壁全層吊り上げ単孔式腹腔鏡下開窓術を 施行した感染性肝嚢胞の一例

岡内 博<sup>1)</sup>, 下松谷匠<sup>2)</sup>

1) 独立行政法人国立病院機構滋賀病院 外科

2) 長浜赤十字病院 外科

## A CASE OF INFECTED HEPATIC CYST TREATED BY SINGLE-INCISION LAPAROSCOPIC FENESTRATION WITH ABDOMINAL WALL LIFTING USING TWO BARS

Hiroshi OKAUCHI<sup>1)</sup>, Takumi SHIMOMATSUYA<sup>2)</sup>

1) Department of Surgery, National Hospital Organization Shiga Hospital

2) Department of Surgery, Nagahama Red Cross Hospital

**Abstract** A 77-years-old man visited our hospital because of upper abdominal pain and general fatigue. Abdominal computed tomography scan showed an infected hepatic cyst 12cm in diameter and cholecystolithiasis. The percutaneous drainage of the cyst guided by ultrasonography disclosed that the cyst contained brown milky fluid, and the cultures for bacteria of the fluid yielded MRSA. However, due to increased in a short period of time after the drainage, we performed a single-incision laparoscopic fenestration and cholecystectomy with abdominal wall lifting using two bars. Our lifting method enables us to use usual operating instruments because the space for instruments was not so limited, and was convenient for aspiration and washing. The surgical site infection was complicated and the patient was discharged from our hospital on the 23<sup>th</sup> postoperative day. Six months after surgery, the cyst was 9mm in diameter. At present, there is no evidence of recurrence of the infected hepatic cyst.

**Key words** infected hepatic cyst, single-incision laparoscopic surgery, abdominal wall lifting

### はじめに

単孔式内視鏡手術は多くの施設では気腹法により行われているが、その手技や視野展開の制限などにより術中の術者のストレスも決して少なくない。また専用のトロッカーや屈曲鉗子などの使用によりコストも増加し、病院経営にとってもよいとはいえない。

当科では西井式腹壁全層吊り上げ法<sup>1)</sup>を用い、炭酸ガス気腹を行わずに単孔式腹腔鏡下胆嚢摘出術を行っている<sup>2)</sup>。今回我々は、感染性肝嚢胞に対し、本術式にて開窓術を行い、良好な結果を得たので報告する。

### 症例

**患者**：77歳，男性。

**主訴**：全身倦怠感，腹満，上腹部痛。

**家族歴**：特記すべきことなし。

**既往歴**：60代，慢性腎不全。73歳，右無機能腎，左尿管狭窄に対し，尿管ステント留置，以後定期交換中。MRSA尿路感染症。

**現病歴**：左尿管ステント定期交換後3日目より上腹部痛出現し，炎症反応の上昇および画像上肝嚢胞の感染が疑わ

Received November 28, 2012

Correspondence: 独立行政法人国立病院機構 滋賀病院 外科 岡内 博

〒527-8505 東近江市五智町 255 番地 [okauchi-hiroshi@shiga-hosp.jp](mailto:okauchi-hiroshi@shiga-hosp.jp)

れた。外来にて保存的加療を行っていたが、腹痛が悪化したため入院加療を行った。入院後、肝嚢胞の増大により腹満が増悪したため、超音波ガイド下に経皮的穿刺吸引ドレナージ術を施行し、茶白色の膿汁が約 800ml 吸引され症状は一時軽快した。しかし、1 週間程度で再度腹満が増悪したため保存的治療の限界と判断し、手術療法目的で当科紹介となった。尚、膿汁の細菌培養では MRSA が検出された。

**入院時現症：**身長 164cm, 体重 62kg, BMI 22.3, 体温 37.0°C, 血圧 152/81mmHg, 脈拍 89/分。上腹部に軽度膨満および筋性防御を伴う圧痛あり。

**入院時検査所見：**WBC 8,500/mm<sup>3</sup>, CRP 27.3mg/dl と炎症反応の上昇を認め、肝胆道系酵素の軽度上昇を認めた。BUN 値と CRE 値の高値および貧血は従来値と同等であった (表 1)。

表 1: 入院時血液生化学検査所見

WBC	8500 /mm <sup>3</sup>	CHE	38 IU/L
RBC	3.15x10 <sup>6</sup> /mm <sup>3</sup>	LDH	178 IU/L
Hb	9.8 g/dl	AMY	159 IU/L
Ht	28.2 %	BUN	46.9 mg/dl
Plt	219x10 <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup>	CRE	3.91 mg/dl
TP	6.4 g/dl	Na	135.8 mEq/l
Alb	2.6 g/dl	K	5.04 mEq/l
T-Bil	0.8 mg/dl	Cl	112.3 mEq/l
GOT	51 IU/L	CRP	27.36 mg/dl
GPT	63 IU/L	CEA	2.1 ng/ml
ALP	435 IU/L	CA19-9	5.3 U/ml
γ-GTP	148 IU/L	AFP	4.0 ng/ml

**腹部単純CT所見：**初診時には、肝左葉に周囲脂肪織の濃度上昇を伴う長径 12cm の肝嚢胞を認め、肝嚢胞の感染が疑われた。また、胆石を認めた(図 1A)。この 10 日後の腹満増悪時には肝嚢胞は長径 15cm に増大、上腹部が前方に突出するようになった(図 1B)。

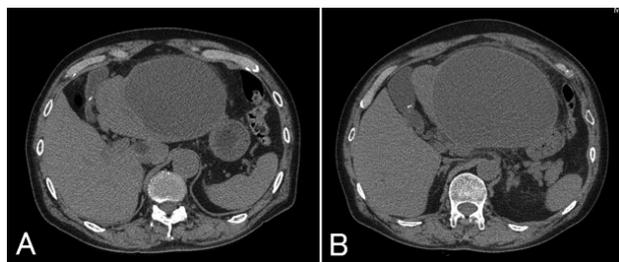


図 1: 腹部 CT 検査所見。A: 初診時。肝左葉に周囲脂肪織の濃度上昇を伴う長径 12cm の肝嚢胞および胆石を認めた。B: 入院後。肝嚢胞は 15cm に増大し、上腹部腹壁を圧排していた。

**腹部 MRCP 所見：**穿刺吸引より 7 日後の腹満再増悪時には肝嚢胞のサイズは穿刺前のサイズに戻っていた。また肝嚢胞と胆道との明らかな交通は認めなかった(図 2)。

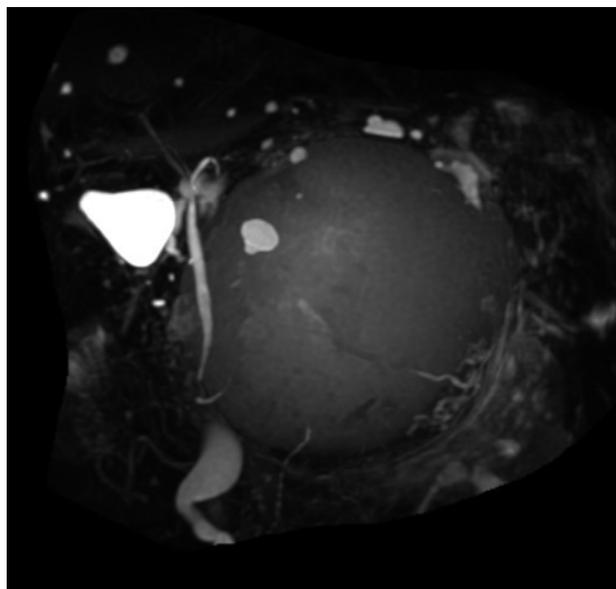


図 2: 腹部 MRCP 検査所見。肝嚢胞は 15cm に再増大した。肝嚢胞と胆道との明らかな交通は認めなかった。

以上より感染性肝嚢胞、胆石症に対し、単孔式内視鏡手術による肝嚢胞開窓術、胆嚢摘出術を行うこととした。

**術式：**開脚位。臍を縦方向に 2cm 切開し開腹、5mm の flexible scope で腹腔内を観察しながら金属の吊り上げ鉤 (図 3A) を左肋骨弓を超えるまで挿入し、抗研式肩胛骨保持牽引器を用いて左頭側に腹壁を全層で吊り上げた。しかし嚢胞壁が巨大で、かつ腹壁に癒着し術野確保が困難であったため、まず経皮的穿刺排膿後に 2 ないし 3 本の鉗子および超音波凝固切開装置で癒着剥離を行った。そしてもう 1 本の吊り上げ鉤を肝円索の左側に挿入し右頭側に挙上し術野を確保した(図 3B,C)。超音波凝固切開装置を用い炎症で肥厚した嚢胞壁を切開し開窓術を行った。開窓術終了後、吊り上げ鉤の位置を右肋骨弓と肝円索右側の胆嚢摘出の位置に変更し、型のごとく胆嚢摘出を行った。標本を臍部の小開腹創より摘出後、開窓部直上よりペンローズドレーンを留置し手術を終了した。手術時間は 3 時間 38 分 (うち胆嚢摘出は 62 分)、出血は 100g であった。回収した膿汁は約 1600ml で細胞診は陰性で、細菌培養は前回同様 MRSA が検出された。

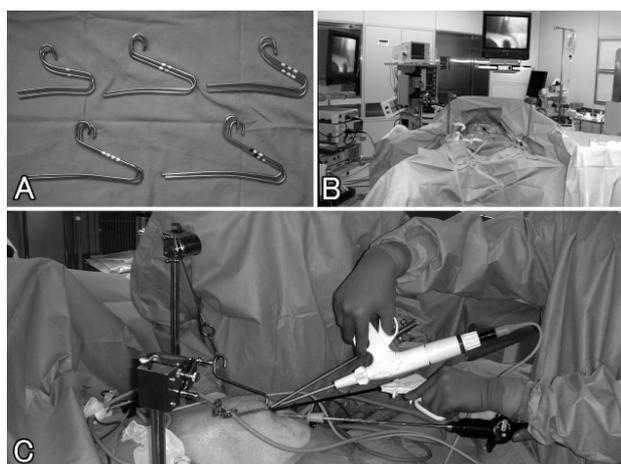


図 3: A: 西井式吊り上げ鉤。腹壁の吊り上げ部分の長さが 14-22cm あり、体型に合わせて適切な長さのものを使用する。B: 患者は開脚位とし、吊り上げ鉤を接続した牽引器のウインチを巻き上げ腹壁を吊り上げる。C: 5mm の flexible scope, 2 ないし 3 本の鉗子および超音波凝固切開装置等を用い手術を進める。

**摘出標本:** 摘出した嚢胞壁は 95x40x10mm で、感染による化膿性炎症を伴う上皮の消失した単純嚢胞であった。明らかな悪性所見はなかった。また胆嚢は慢性胆嚢炎の所見であった。

**術後経過:** 術後創感染およびドレーンよりの排膿が続いたため、術後 2 3 日に退院となった。術後半年では肝嚢胞は 9mm 大と極めて縮小し、その後再発を認めていない。

## 考察

肝嚢胞は日常診療で比較的良好に見られる疾患でその多くは治療対象とならないが、感染、出血、巨大化による圧迫症状などは治療の対象となる。治療法は超音波ガイド下経皮経肝ドレナージ<sup>[3]</sup>が主流だが、これに加えて無水エタノール<sup>[4]</sup>や塩酸ミノサイクリン<sup>[5]</sup>の注入を行うこともある。さらに、これら保存的治療の効果が乏しい場合には肝切除術<sup>[6]</sup>、嚢胞開窓術<sup>[7]</sup>などの手術療法の適応となる。

肝嚢胞の中でも感染性肝嚢胞は比較的まれな疾患であり、感染経路としては、胆道系、門脈系、菌血症による血行性、近隣の感染巣からの直接波及、外傷性、不明などが考えられている<sup>[8]</sup>。本症例では MRSA が検出されており、MRSA 尿路感染症の既往があることより、血行性感染が疑われる。

医学中央雑誌で 1983 年から 2012 年の 30 年間の会議録を除き検索すると、肝嚢胞の報告は 1300 例以上認めたのに対

し、感染性肝嚢胞は 41 例のみである。そのうち手術療法を行った症例は 10 例で、腹腔鏡下手術を行った症例は 5 例<sup>[9-13]</sup>認めた。しかし本症例のように感染性肝嚢胞に対し、単孔式腹腔鏡手術を行った症例は認めなかった。

当院では西井式腹壁全層吊り上げ法<sup>[1]</sup>による単孔式腹腔鏡手術<sup>[2]</sup>を行っており、腹腔内の展開については、気腹法によるドーム型空間構築と比べると制限はあるものの、筋鉤を用いた「点」による吊り上げ法に比べると、二本の吊り上げ鉤により形成される「面」による吊り上げにより十分な空間が構築される。そして、気腹法による SILS port<sup>®</sup>などのプラットホームを用いる方法や low profile のトロッカーを用いた multi-trocar 法<sup>[4]</sup>と比べ、細径の鉤により臍部の小開腹創が左右に牽引されることにより、スペースに余裕が生まれ、鉗子操作の干渉が少なくなり、従来の鉗子を用いたパラレル法<sup>[4]</sup>にて手術が行える。そのうえ気腹を保つ必要が無いため、ガーゼの出し入れ、吸引、洗浄、標本の牽出等が術野を崩すことなく行える。実際、本症例では限られた腹腔内スペースでの癒着剥離操作を要したが、鉗子の干渉による操作困難は少なく、また、膿汁の吸引や大量の腹腔内洗浄が必要であったが、一度も術野が崩れることなく、ストレス無く手術を進めることができた。

## 結語

感染性肝嚢胞に対し、腹壁全層吊り上げ法による単孔式腹腔鏡手術にて肝嚢胞開窓術と胆嚢摘出術を同時に行った。本術式は胆嚢摘出術のみならず、肝嚢胞開窓術に対しても有効な術式と考えられた。

なお、本論文の要旨は第 7 3 回日本臨床外科学会総会にて報告した。

## 文献

- [1] 小原弘嗣, 西井宏有, 平井利幸他: 吊り上げ鉤を 2 本用いた腹腔鏡下胆嚢摘出術. 外科治療, 77:731-735, 1997
- [2] 下松谷匠, 長門優, 谷口正展他: 吊り上げ鉤を用いた腹壁全層吊り上げ法による単孔式腹腔鏡下胆嚢摘出術. 日内視鏡外会誌, 16:757-761, 2011
- [3] 大澤 武: 経皮経肝嚢胞穿刺吸引を施行した感染性肝嚢胞の 1 例. 日本腹部救急医学会雑誌, 30:69-72, 2010
- [4] 鈴木和夫, 藤元治朗: 経皮経肝ドレナージ・エタノー

- ル注入が奏効した感染性肝嚢胞の1例. 日臨外会誌, 67:2670-2674, 2006
- [5] 川瀬直登, 野田久嗣, 鈴木雄一朗他: 腹膜炎を併発した感染性巨大肝嚢胞の1例. 肝臓, 51:41-47, 2010
- [6] 阿部徹, 小林正史, 日向理他: 肝切除により完治した感染性肝嚢胞の1例. 日臨外会誌, 72:2889-2893, 2011
- [7] 村瀬茂, 平山亮一: 感染性肝嚢胞の1例. 日本外科系連合学会誌, 33:777-780, 2008
- [8] 池田奈保子, 二村貢, 谷藤正人他: 胆管との交通を認めた感染肝嚢胞の1例. 胆と膵, 18:1227-1230, 1997
- [9] 黒川勝, 田代聖子, 山本大輔他: 腹腔鏡下開窓術で治療した感染性肝嚢胞の1例. 石川県立中央病院医学誌, 32:25-28, 2010
- [10] Yamada T, Furukawa K, Yokoi K, et al: Liver Cyst with Biliary Communication Successfully Treated with Laparoscopic Deroofing: A Case Report. Journal of Nippon Medical School, 76:103-108, 2009
- [11] 川崎篤史, 三松謙司, 大井田尚継他: 腹腔鏡天蓋切除術が有用であった巨大肝嚢胞の1例. 日本外科系連合学会誌, 32:799-802, 2007
- [12] 植木智之, 谷口史洋, 加藤雅也他: 薬物療法後の感染性肝嚢胞に対して腹腔鏡下手術が有効であった1例. 日臨外会誌, 67:865-869, 2006
- [13] 片山義雄, 切塚敬治, 西崎浩他: 肝嚢胞に対するミノサイクリン注入療法後に発生した胆道交通の1例. 神戸市立病院紀要, 38:57-59, 2000
- [14] 山形基夫, 松田年, 高山忠利: 単孔式内視鏡手術の概念と現況. 消化器外科, 33:1355-1363, 2010

## 骨盤内臓器の位置評価における体位の影響の検討

二宮 早苗<sup>1),2)</sup>, 森川 茂廣<sup>3)</sup>, 遠藤 善裕<sup>2)</sup>,  
正木 紀代子<sup>2)</sup>, 斉藤 祥乃<sup>4)</sup>, 土川 祥<sup>5)</sup>, 森 みどり<sup>4)</sup>, 岡山 久代<sup>2)</sup>

- 1) 京都光華女子大学 健康科学部看護学科
- 2) 滋賀医科大学 医学部看護学科 臨床看護学講座
- 3) 滋賀医科大学 医学部看護学科 基礎看護学講座
- 4) 滋賀医科大学大学院 医学系研究科
- 5) 滋賀医科大学医学部附属病院 母子・女性診療科

## The influence of posture on evaluation of pelvic organ position

Sanae NINOMIYA<sup>1),2)</sup>, Sigehiro MORIKAWA<sup>3)</sup>, Yoshihiro ENDO<sup>2)</sup>, Kiyoko MASAKI<sup>2)</sup>,  
Yoshino SAITO<sup>4)</sup>, Sachi THUCHIKAWA<sup>5)</sup>, Midori MORI<sup>4)</sup> and Hisayo OKAYAMA<sup>2)</sup>

- 1) Department of Nursing, Kyoto Koka Women's University
- 2) Department of Clinical Nursing, Shiga University of Medical Science
- 3) Department of Fundamental Nursing, Shiga University of Medical Science
- 4) Graduate School of Medicine, Shiga University of Medical Science
- 5) Shiga University of Medical Science Hospital

**Abstract** The influence of the gravity should be considered for the evaluation of pelvic organ positions. This study investigated the influence of posture on pelvic organ positions. Bladder neck position and mobility, and internal uterine os position in the supine, sitting, and standing postures were compared in 9 parous women (28–48 years). Sagittal T<sub>1</sub>-weighted images and T<sub>2</sub>-weighted images of the pelvis were acquired for evaluating the bladder neck position at rest and at pelvic strain, and the internal uterine os position at rest, respectively, using a GE SIGNA SP/2 open-configuration magnetic resonance system. The distance from the pubococcygeal line to the bladder neck and the internal uterine os were measured, and both of positions were shown as being higher (+) or lower (-) than the pubococcygeal line. Median bladder neck position in the supine posture at rest was +15.6 mm (range, +9.3 – +23.4). The bladder neck position was significantly lower in the sitting than in the supine (difference, 6.9 mm; 95% CI, 3.6 to 13.6 mm;  $p < 0.016$ ) or standing (difference, 15.2 mm; 95% CI, 10.0 to 22.9 mm;  $p < 0.016$ ) postures. Similarly, the internal uterine os positions were also low in the order of supine, sitting, and standing postures. The position of bladder neck and internal uterine os showed positive correlation ( $r = 0.63$  to  $0.88$ ,  $p < 0.01$ ). Bladder neck mobility did not differ among postures. But, the bladder neck position at pelvic strain was also low in the order of supine, sitting, and standing postures. Thus, we suggest that the posture should be considered for the evaluation of pelvic organs.

**Key word** pelvic relaxation, position of pelvic organ, mobility of bladder neck, magnetic resonance, parous women.

---

Received: January 15, 2013. Accepted: February 15, 2013.

Correspondence: 京都光華女子大学 健康科学部看護学科 二宮 早苗

〒615-0082 京都市右京区西京極葛野町 38 ninomiya@belle.shiga-med.ac.jp

## はじめに

女性の骨盤底は、その解剖学的特性に加えて、妊娠・分娩、肥満、加齢、閉経などの影響を受け弛緩しやすい。骨盤底が弛緩すると、骨盤内臓器は下垂し、腹圧性尿失禁（Stress Urinary Incontinence ; SUI）や骨盤臓器脱（Pelvic Organ Prolapse ; POP）などを引き起こす[1]。SUIやPOPの症状は、日中活動時に生じやすく臥床時に生じにくいことから、重力の影響が大きいと考えられる。したがって、骨盤内臓器の位置を評価するには、重力のかかる方向、すなわち体位を考慮する必要があると推察される。しかし、画像診断法では、座位や立位などの体位における評価は難しく、臥位での評価が一般的である[2]。滋賀医科大学では、臥位のみでなく、座位や立膝位（以下、立位とする）での撮影が可能なオープン核磁気共鳴画像装置（Magnetic Resonance Imaging, GE Healthcare 社製、0.5テスラ SIGNA SP/2, 以下オープンMRとする）を有しており、女性の骨盤内臓器の位置やSUIの評価に関する研究を行っている[3-4]。本研究では、骨盤内臓器の位置評価における体位の影響を検討することを目的として、MRI画像を用いて臥位・座位・立位における膀胱頸部の位置と可動性、内子宮口の位置を比較検討することとした。

## 方法

分娩経験を有する20~40歳代の一般女性9名を対象とした。対象の選定基準は、最終分娩後1年以上経過し、Body Mass Indexが25.0未満で、未閉経の女性とした。対象者には、国際尿失禁会議質問票日本語版ショートフォーム（ICIQ-SF）[5]を用いて、尿失禁症状の有無と種類を判別した。

MRI画像は、オープンMRを用いて臥位・座位・立位における骨盤内の矢状断面をグラディエントエコー法によるT<sub>1</sub>強調ならびにファーストスピンエコー法によるT<sub>2</sub>強調にて撮像した。臥位と立位の撮像には下腹部と臀部を挟むフレックスコイルを使用し、座位の撮像には座面からの圧迫のない便座型表面コイルを使用した。T<sub>1</sub>強調画像の撮像条件は、繰り返し時間68ms、エコー時間4.3ms（インフェーズ）、フリップ角90度、撮像範囲350×350mm<sup>2</sup>、スライス厚8mmを3画像、観測マトリックス256×128、イメージマトリックス256×256として、安静時および腹圧負荷時を一動作9秒間で撮像した。T<sub>2</sub>強調画像の撮像条件は、エコー時間68ms、フリップ角90度、撮像範囲350×350mm<sup>2</sup>、スライス厚8mmを5画像、観測マトリックス256×128、イメージマトリックス256×256として、安静時のみ

32秒間で撮像した。撮像には造影剤を用いず、膀胱に尿が充満した状態でいった。また、各体位の撮像はそれぞれ10分間程度であり、1時間以内にすべての撮像を終えるように配慮した。

膀胱頸部の位置は、T<sub>1</sub>強調の3画像のうち正中の画像を選択し、恥骨下端と第2尾骨を結ぶ恥骨尾骨ライン（Pubococcygeal Line, 以下PCラインとする）を基準点（0点）として、膀胱頸部までの垂直距離を計測し[6]、PCラインより頭側を（+）、足側を（-）として表した。膀胱頸部の可動性は、安静時を基準とした腹圧負荷による足側への下垂量とした。内子宮口の位置は、T<sub>2</sub>強調の5画像のうち正中の画像を選択し、膀胱頸部の位置と同様にPCラインから内子宮口までの垂直距離を計測した。計測はすべて、1人の研究者が行い、1画像につき2度計測し、その平均値を算出した。

得られたデータの解析には、統計パッケージソフトSPSS20.0 J for Windowsを用いた。基本統計量の算出を行い、各体位間の比較にはWilcoxon Signed-ranks testを用いた後、多重比較法としてBonferroniの補正により有意水準を $\alpha = 0.05/3 = 0.016$ とした。また、各体位の差の区間推定にはHodges - Lehman estimatorを用いた。同体位における安静時と腹圧負荷時の比較にはWilcoxon Signed-ranks test、各体位の位置の関連性の分析にはSpearmanの順位相関係数を用い、いずれも有意水準を $p = 0.05$ もしくは $p = 0.01$ とした。

本研究は、ヘルシンキ宣言に則り、対象者のインフォームドコンセントを得て行った。また、滋賀医科大学倫理委員会の承認を得た（23-119-1）。

## 結果

対象者の特性を表1に示した。対象者9名のうち、1名が混合性尿失禁の症状を有していた。

安静時における膀胱頸部と内子宮口の位置を表2に示した。臥位における膀胱頸部の位置は+15.6mm（中央値、範囲+9.3~+25.5）であり、臥位よりも座位が6.9mm低く（中央値の差、95%信頼区間；Confidence

表1. 対象者の特性

n = 9	
項目	中央値（範囲）
年齢（歳）	40.0 (27-48)
Body mass index (kg/m <sup>2</sup> )	21.5 (18.4-24.2)
分娩回数（回）	2.0 (1-3)
最終分娩後経過年数（年）	4.5 (1-16)
尿失禁症状の有無（人数%）	
有	1 (11.1)
無	8 (89.9)

表 2. 安静時における膀胱頸部と内子宮口の位置

n = 9

	膀胱頸部の位置 (mm)			内子宮口の位置 (mm)		
	位置	臥位との位置の差		位置	臥位との位置の差	
	中央値 (範囲)	p 値 <sup>†</sup>	差 [95% CI] <sup>‡</sup>	中央値 (範囲)	p 値 <sup>†</sup>	差 [95% CI] <sup>‡</sup>
臥位	+15.6 (+9.3, +25.5)		—	+44.3 (+32.5, +59.3)		—
座位	+11.9 (-6.5, +19.3)	0.008*	-6.9 [-3.7, -13.6]	+41.3 (+22.9, +50.6)	0.028	-5.9 [-0.5, -11.3]
立位	+4.6 (-20.0, +14.5)	0.008*	-15.2 [-10.0, -22.9]	+25.3 (+11.8, +46.5)	0.008*	-18.7 [-14.6, -26.0]

CI: Confidence Interval.

<sup>†</sup> Wilcoxon signed-ranks test and Bonferroni correction; \* $p < 0.016$ . <sup>‡</sup> Hodges-Lehman estimator.

表 3. 各体位における安静時の膀胱頸部と内子宮口の位置の関連性

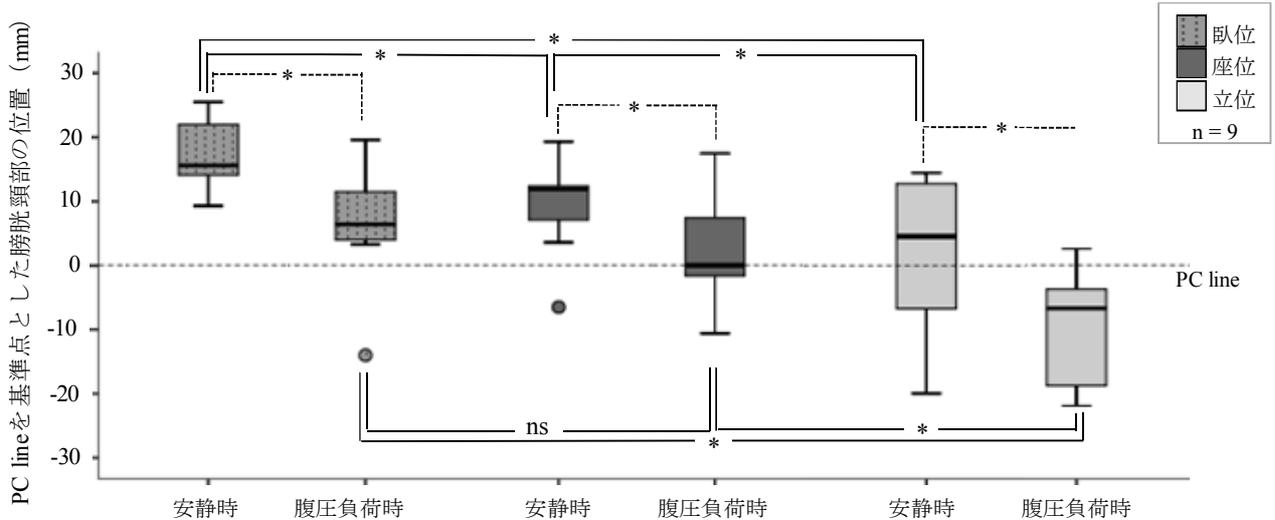
n = 9

	膀胱頸部の位置			内子宮口の位置		
	臥位	座位	立位	臥位	座位	立位
膀胱頸部の位置						
臥位	1.00					
座位	0.62	1.00				
立位	0.80**	0.72*	1.00			
内子宮口の位置						
臥位	0.63	0.72*	0.70*	1.00		
座位	0.42	0.85**	0.57	0.77*	1.00	
立位	0.60	0.73*	0.88**	0.68*	0.68*	1.00

Spearman's rank correlation coefficient: \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ .

Interval (CI); 3.7~13.6,  $p < 0.016$ ), 立位では 15.2 mm とさらに低かった (95% CI; 10.0~22.9,  $p < 0.016$ ). 臥位における内子宮口の位置は+44.3 mm (+32.5~+59.3) であり、臥位よりも座位が 5.9 mm 低い有意差はなく (95% CI; 0.5~11.3,  $p > 0.016$ ), 立位では 18.7 mm 低かった (95% CI; 14.6~26.0,  $p < 0.016$ ).

次に、各体位における安静時の膀胱頸部と内子宮口の位置の関連性を表 3 に示した。膀胱頸部の位置では、各体位間の相関係数が  $r = 0.62 \sim 0.80$  であり、臥位と立位間 ( $p < 0.01$ )、座位と立位間 ( $p < 0.05$ ) で有意な正の相関を示した。内子宮口の位置では、各体位間の相関係数が  $r = 0.68 \sim 0.77$  であり、いずれも有意な正の相関を示した ( $p < 0.05$ )。また、同体位における膀胱頸部と内子宮口の位置の相関係数は  $r = 0.63 \sim 0.88$  であり、座位・立位においていずれも正の相関を示し



実線: Wilcoxon signed-ranks test and Bonferroni correction; \* $p < 0.016$ , ns = not significant.

点線: Wilcoxon signed-ranks test; \* $p < 0.05$ .

図 1. 各体位における安静時と腹圧負荷時の膀胱頸部の位置比較

た ( $p < 0.01$ )。以上の結果から、安静時において、膀胱頸部と内子宮口の位置は関連し、いずれも臥位・座位・立位の順に低くなることが明らかとなった。

各体位における安静時と腹圧負荷時の膀胱頸部の位置を図 1、膀胱頸部の可動性を表 4 に示した。いずれの体位においても、腹圧負荷により膀胱頸部は有意に下垂するが ( $p < 0.05$ , 図 1)、各体位間における膀胱頸部の可動性には有意な差はないことから ( $p > 0.016$ , 表 4)、可動性の評価には体位の影響は少ない

ことが明らかとなった。しかし、腹圧負荷時の膀胱頸部の位置は、臥位・座位・立位の順に低く、臥位と立位間、座位と立位間に有意な差を認めた ( $p < 0.016$ , 図 1)。

また、各体位における安静時の膀胱頸部の位置は、臥位・座位・立位の順にばらつきが大きくなる傾向を認めた (表 2、図 1)。

各体位における安静時の T<sub>2</sub> 強調画像の一例を図 2-1、図 2-2 に示した。各体位の画像から、膀胱底部はいず

表 4. 各体位における膀胱頸部の可動性の比較

n = 9

	膀胱頸部の可動性 (mm)	臥位との差 (mm)		座位との差 (mm)	
	中央値 (範囲)	p 値 <sup>†</sup>	差 [95% CI] <sup>‡</sup>	p 値 <sup>†</sup>	差 [95% CI] <sup>‡</sup>
臥位	10.7 (3.8, 23.3)	—	—	—	—
座位	8.7 (1.8, 14.2)	0.038	2.8 [0.3, 5.9]	—	—
立位	10.2 (1.9, 20.9)	0.859	0.45 [-7.5, 8.8]	0.314	2.8 [-4.1, 9.5]

<sup>†</sup>Wilcoxon signed-ranks test and Bonferroni correction; 有意水準:  $\alpha = 0.05/3 = 0.016$ . <sup>‡</sup>Hodges-Lehman estimator.

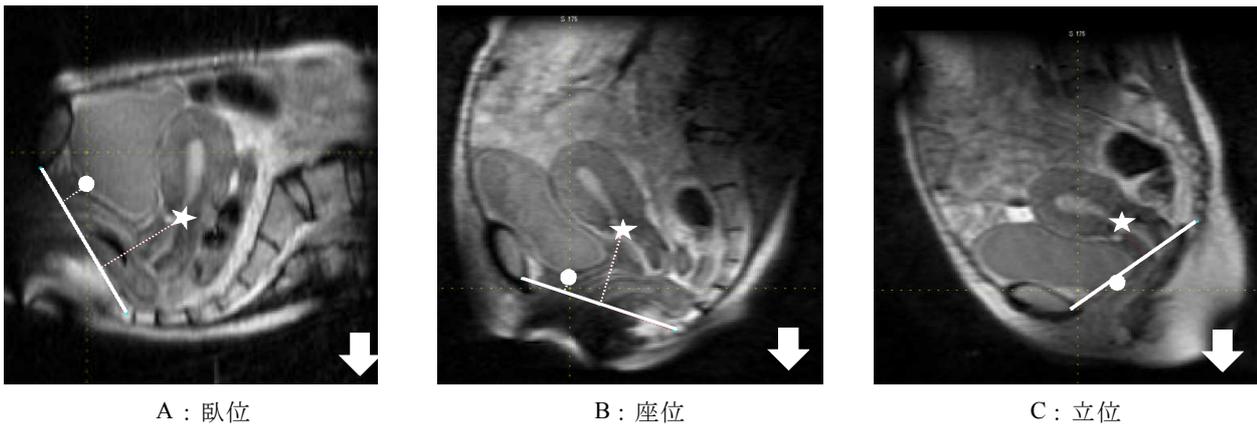


図 2-1. 各体位における安静時の T<sub>2</sub> 強調画像の一例 (40 歳女性)

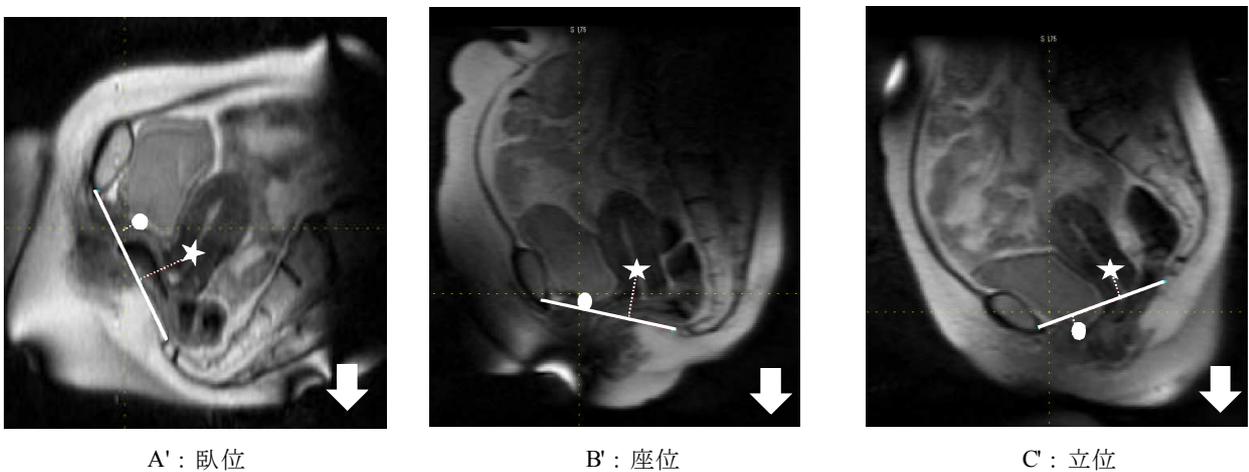


図 2-2. 各体位における安静時の T<sub>2</sub> 強調画像の一例画像の一例 (48 歳女性)

白線は恥骨尾骨ライン、丸印は膀胱頸部、星印は内子宮口、白矢印は重力の方向を示す。

れの体位においても重力側へ伸展し、膀胱頸部は、臥位では膀胱底部より上方に位置するが、座位・立位では重力側の最下方に位置することが明らかとなった。

## 考察

MRI 画像を用いて、臥位・座位・立位における膀胱頸部の位置と可動性、内子宮口の位置を比較した結果、安静時の膀胱頸部と内子宮口の位置は関連し、いずれも臥位・座位・立位の順に低くなることが明らかとなった。また、腹圧負荷による膀胱頸部の可動性には体位の影響は少ないが、腹圧負荷時の膀胱頸部の位置は、安静時と同様に臥位・座位・立位の順に低くなることが示された。さらに、膀胱底部はいずれの体位においても重力側へ伸展し、座位・立位では膀胱頸部が重力側の最下方に位置することが明らかとなった。

本研究では、SUI や POP の症状が生じやすい座位や立位における骨盤内臓器の位置について、オープン MR を用いて評価した。オープン MR の構造上、成人では正しい立位姿勢での撮像は不可能であるが、骨盤内臓器の位置評価には、立膝位でも立位とほぼ同様の結果が得られたと考える。

先行研究において、分娩経験を有する一般女性 34 名（平均年齢 48.9 歳）の安静時における臥位の膀胱頸部の位置は  $19.9 \pm 4.9$  mm（平均値  $\pm$  SD）であった[7]。また他の先行研究では、同条件の女性 55 名（年齢の中央値 41.0 歳）の安静時における座位の膀胱頸部の位置は  $+8.5$  mm（中央値、範囲  $-18.7 \sim +22.6$ ）であった[8]。これらと本研究の結果が異なる理由として、膀胱頸部の位置は個体差が大きい[8]ことに加えて、本研究の対象者は 9 名と少ないことから、偏りが生じていた可能性が推察される。しかし、本研究では、同じ対象者において、各体位における MRI 画像を断続的に撮像したことから、偏りによる結果への影響は少ないと考える。

安静時における膀胱頸部と内子宮口の位置は、いずれも臥位・座位・立位の順に低かった。また、各体位における安静時の膀胱頸部の位置は、同順にばらつきが大きくなる傾向を認めた。尿道は遠位部 1/3 で固定されているが、膀胱底部や近位 2/3 の尿道は骨盤底で支持されている[9]。したがって、骨盤底の支持を必要としない臥位では、一定の範囲内に位置するが、骨盤底の支持を必要とする座位や立位では、骨盤底の支持力の個体差によって位置の下垂量が大きく異なるのではないかと考える。

同体位における安静時の膀胱頸部と内子宮口の位置の関連性について、座位・立位では有意な強い相関を示したが、臥位では有意な相関はなかった。骨盤底は吊橋に例えられ、構造の一部でも弱くなれば全体が

弛緩することから[10]、骨盤底に共に支持されている膀胱と子宮の位置は関連すると考えられる。今回の検討では対象者数が少ないことから、相関係数が中程度であっても有意となりにくい可能性が推察される一方、骨盤底の支持を必要としない臥位では、双方の位置の関連性が低くなる可能性も示唆された。

また、各体位間における膀胱頸部の可動性には、有意な差はなかったことから、腹圧は重力よりも強く、体位による影響を受けにくいことが推察された。しかし、腹圧負荷時の膀胱頸部の位置は、安静時の位置と同様に、臥位・座位・立位の順に低く、腹圧負荷による膀胱頸部の位置を含めた評価の際には、体位を考慮する必要がある。

さらに、膀胱底部はいずれの体位においても重力側へ伸展し、膀胱頸部は、臥位では膀胱底部より上方に位置するが、座位・立位では重力側の最下方に位置することが明らかとなった。この結果から、座位・立位では腹圧などによる負荷が膀胱頸部に荷重されやすく、SUI などの評価にはこれらの体位が有用であることが示唆された。

本研究では膀胱内蓄尿量の一定化は行わず、膀胱に尿を充満させ、1 時間以内にすべての撮像を終えるように配慮した。我々は先行研究[4]において、膀胱内蓄尿量は座位の膀胱頸部の位置評価に影響しない可能性を示唆している。臥位や立位での検討はされていないが、本研究において撮像時間中に膀胱内蓄尿量が大きく増大した例はなく、蓄尿量による結果への影響は少ないと考える。

今回の検討では対象者数が少なく、一定条件下の一般女性を対象としていることから、結果を一般化するのは難しい。また、SUI や POP などの骨盤底弛緩症状を有する対象者では、異なる結果を示す可能性がある。しかしながら、臥位・座位・立位の骨盤内臓器を MRI 画像により比較した報告はなく、本研究は骨盤内臓器の位置評価において、体位の影響を考慮する必要があることを改めて示した。

## 結語

骨盤内臓器の位置評価における体位の影響を検討することを目的として、MRI 画像を用いて臥位・座位・立位における膀胱頸部の位置と可動性、内子宮口の位置を比較検討した。結果、安静時の膀胱頸部と内子宮口の位置は関連し、いずれも臥位・座位・立位の順に低くなることが明らかとなった。また、腹圧負荷による膀胱頸部の可動性には体位の影響は少ないが、腹圧負荷時の膀胱頸部の位置は、安静時と同様に臥位・座位・立位の順に低くなることから、骨盤内臓器の位置

評価の際には、体位の影響を考慮する必要性があることが示された。さらに、座位・立位では、腹圧などによる負荷が膀胱頸部に荷重されやすく、SUIなどの評価にはこれらの体位が有用であることが示唆された。

## 文献

- [1] 中田真木：妊娠・出産と尿失禁. *Current Therapy*. 19(12), 51-54, 2005.
- [2] 嘉村泰邦. *Functional cine MRI*. 日本女性骨盤底医学会誌. 9(1), 23-26, 2012.
- [3] 二宮早苗, 岡山久代, 正木紀代子, 他. 子宮摘出術後の腹圧性尿失禁にサポート下着が有用であった1症例. *滋賀医科大学看護学ジャーナル*. 8(1), 43-46, 2010.
- [4] 二宮早苗, 齋藤いずみ, 遠藤善裕, 他. 縦型オープンMRを用いた膀胱頸部位置の評価に影響を与える要因の検討. *日本女性骨盤底医学会誌*. 9(1), 60-63, 2012.
- [5] 後藤百万, Dunavan D, Corcos J, 他. 尿失禁の症状・QOL 質問票：スコア化 ICIQ-SF. *日本神経因性膀胱学会誌*. 12(2), 227-231, 2001.
- [6] Fielding JR: Practical MR imaging of female pelvic floor weakness. *Radiographics*. 22(2): 295-304. 2002.
- [7] 長島玲子, 蔵本美代子, 合田典子, 酒井康生. 女性の腹圧性尿失禁に対する骨盤底筋訓練開始前の評価—シネMRIによる骨盤底筋群の動態分析—. *日本助産学会誌*. 21(1), 60-67, 2007.
- [8] Masaki K, Okayama H, Ninomiya S, et al. Comparison of bladder neck position in nulliparous and parous women using MR images in the sitting position. *Proceeding of the 50th JSMBE*. 2011.
- [9] 野村昌良. 女性泌尿器科とは 女性骨盤底障害と排尿障害. *泌尿器ケア*, 冬季増刊, 184-197, 2008.
- [10] Petros PP. インテグラル理論から考える女性の骨盤底疾患. (井上裕美, 加藤久美子, 嘉村泰邦, 関口由紀訳), 東京, シュプリンガー・ジャパン, 2006.

## 和文抄録

骨盤内臓器の位置評価における体位の影響を検討することを目的として、核磁気共鳴画像(MRI)を用いて臥位・座位・立位(以下、立位とする)における膀胱頸部の位置と可動性、内子宮口の位置を比較検討した。分娩経験を有する女性9名(28~48歳)を対象として、臥位・座位・立位における骨盤内の矢状断面をオープンMR装置(GE Healthcare社製, 0.5テス

ラ, SIGNA SP/2)を用いて撮像した。安静時・腹圧負荷時の膀胱頸部の位置はT<sub>1</sub>強調画像、安静時の内子宮口の位置はT<sub>2</sub>強調画像を用いて、恥骨尾骨ラインからの垂直距離を計測し、頭側を(+)、足側を(-)として表した。結果、安静時の膀胱頸部と内子宮口の位置は関連し( $r = 0.63 \sim 0.88$ )、いずれも臥位・座位・立位の順に低くなることが明らかとなった。また、腹圧負荷による膀胱頸部の可動性は、いずれの体位間においても差はなく、可動性の評価には体位の影響は少ないことが示された。しかし、腹圧負荷時の膀胱頸部の位置は、安静時と同様に臥位・座位・立位の順に低くなることから、骨盤内臓器の位置評価の際には、体位の影響を考慮する必要性があることが示された。また、座位・立位では、膀胱頸部が重力側最下方に位置することから、腹圧などによる負荷が膀胱頸部に荷重されやすく、腹圧性尿失禁などの評価にはこれらの体位が有用であることが示唆された。

**キーワード**：骨盤底弛緩, 骨盤内臓器の位置, 膀胱頸部の可動性, MRI, 経産婦

## マンモグラフィと超音波検査併用乳癌検診における 総合判定の有用性について

田中彰恵<sup>1) 3)</sup>、梅田朋子<sup>2)</sup> 小島真世<sup>1) 3)</sup>、柳 直子<sup>1) 3)</sup>、河原絵里<sup>1) 3)</sup>、  
中島佐恵<sup>4)</sup>、野々村愛<sup>4)</sup>、  
河合由紀<sup>2)</sup>、森 毅<sup>2)</sup>、阿部 元<sup>2)</sup>、藤山佳秀<sup>3)</sup>、谷 徹<sup>2)</sup>

1) 草津総合病院 健康管理センター

2) 滋賀医科大学 外科学講座 消化器・乳腺一般外科

3) 滋賀医科大学 内科学講座 消化器・血液内科

4) 草津総合病院 検査科

## Effectiveness of the comprehensive evaluation based on the combinatorial analysis using mammography and ultrasonography in breast cancer screening

Akie TANAKA<sup>1) 3)</sup>, Tomoko UMEDA<sup>2)</sup>, Masayo KOJIMA<sup>1) 3)</sup>, Naoko YANAGI<sup>1) 3)</sup>,  
Eri KAWAHARA<sup>1) 3)</sup>, Sae NAKAJIMA<sup>4)</sup>, Ai NONOMURA<sup>4)</sup>,

Yuki KAWAI<sup>2)</sup>, Tsuyoshi MORI<sup>2)</sup>, Hajime ABE<sup>2)</sup>, Yoshihide FUJIYAMA<sup>3)</sup> and Tohru TANI<sup>2)</sup>

1) Health Care Center, Kusatsu General Hospital

2) Department of Surgery, Division of General Surgery, Shiga University of Medical Science

3) Department of Internal Medicine, Gastroenterology and Hematology, Shiga University of Medical Science

4) Department of Clinical Laboratory Medicine, Kusatsu General Hospital

**Abstract** An effective breast cancer screening require the efficiency in reducing the death rate without including unnecessary examinations. The highest incidence rate of breast cancer is distributed around late 40s in our country. Nevertheless, the breast cancer detection rate by the mammography (MMG) screening of 40s is low compared to that of over 50s. By adding up the ultrasonography (US) to MMG, the detection rate will increase but the recall rate will also increase when one examiner determines them individually. On the other hand, if the examiner determines them by comprehensive evaluation based on the findings of MMG and US together, the screening can be performed more accurately.

We carried out a breast cancer screening with 248 females, which used MMG and US simultaneously, from April 2009 to March 2012. The individual screening of MMG and US achieved the recall rates of 14.1% and 10.1%, respectively. The recall rate when determined independently of each test becomes 21.8% although the final recall rate dropped to 10.5% based on the comprehensive evaluation using combinatorial methodology using the overall findings of MMG and US simultaneously. Moreover, the recall rate dropped further in each age group from 20s to 60s, These results clarified the effectiveness of this comprehensive evaluation based on the combinatorial methodology using both MMG and US in breast cancer screening.

**Keyword** breast cancer screening, mammography, ultrasonography, comprehensive evaluation

## はじめに

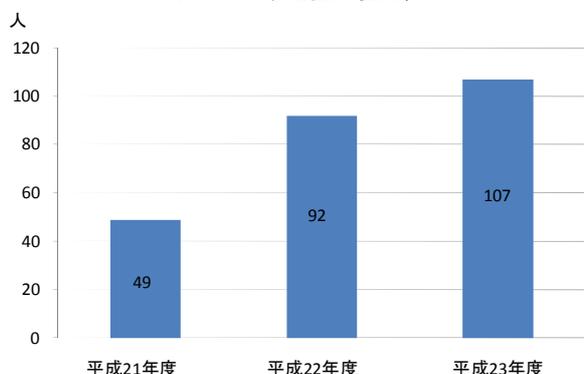
乳癌検診においては、死亡率減少効果とともに、不要な精密検査が少ない検診効率の向上が求められている。一方、我が国の乳がん罹患率のピークは40歳代後半にあるが、40歳代のマンモグラフィ（以下MMG）では高濃度・不均一高濃度乳腺が多く、MMG併用検診の乳癌検出率は50歳代以上に比べて低い<sup>[1]</sup>。MMGに超音波検査（以下US）を上乗せすることによって、乳癌発見率が高くなることが報告されている<sup>[2-11]</sup>が、それぞれ独立して判定し要精検者を決定すると要精検率が高くなる<sup>[11-12]</sup>。一方、両者の所見を総合的に判断することによって要精検者を決定すれば、乳癌発見率の上昇とともに要精検率の低下が期待でき、精度の高い検診が行える。そこで乳腺甲状腺超音波診断学会（以下JABTS）乳癌検診研究班より「マンモグラフィと超音波検査の総合判定基準」<sup>[13]</sup>が作成され平成24年に発表された。当センターでは平成21年度よりMMGとUSの併用検診において、ほぼ上記基準と同様の基準を用いて総合判定を行ってきた。この総合判定の有用性についてレトロスペクティブに検討した。

## 対象と方法

### 1. 対象

平成21年4月1日から平成24年3月31日の3年間に当センターでMMGとUSの併用検診（MMG+US+視触診）受診者のべ248名（図1）の女性。はじめからMMGとUSの併用検診を申し込んだ女性が多くを占めるが、一部MMG併用検診（MMG+視触診）で申し込んだが、MMGで境界明瞭な腫瘤や局所的非対称陰影を認めたため、USを追加した女性を含む。年齢は24歳から84歳、平均46.0歳あった。

図1 受診者数



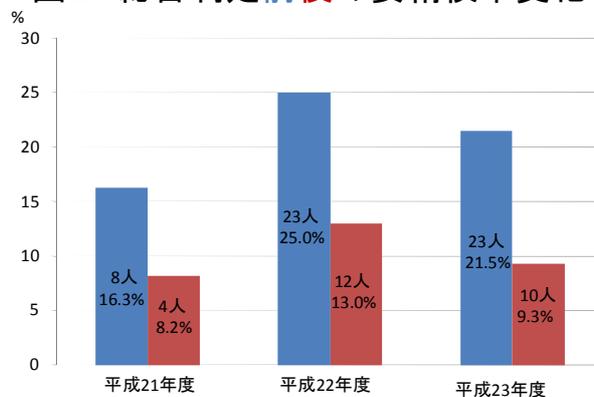
### 2. 方法

当センターにおけるMMGとUSの併用検診の工程は、①MMG撮影、②MMG読影、③視触診、④MMG所見を参照しながらUS検査、⑤総合判定であり、①はマンモグラフィ検診精度管理中央委員会（以下精中委）認定放射線技師が、②③⑤は精中委認定・JABTS講習会終了医師が、④はJABTS講習会終了医師、またはJABTS講習会終了臨床検査技師が行っている。また、対象期間前に受診歴ある場合は②MMG読影、④US検査は過去画像と比較しながら行った。⑤の総合判定とはMMGの要精検者について、MMGで異常所見指摘部位のUS所見によって精密検査の要・不要を判定することである。各検査ごとの要精検率と、MMG・USそれぞれを独立して判定した（総合判定前）要精検率、総合判定後の要精検率を算定し、その変化と内容について検討した。

## 結果

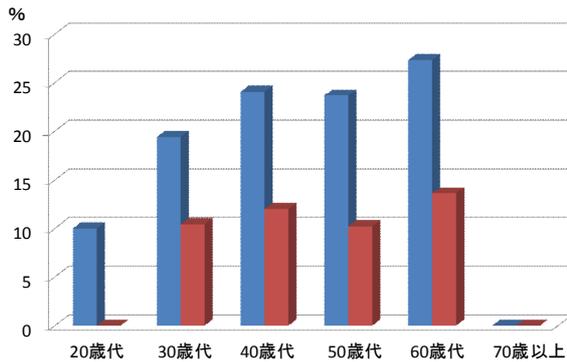
各年度の総合判定前後での要精検率の変化を（図2）に示す。

図2 総合判定前後の要精検率変化



3年間の合計ではMMGの要精検率14.1%、USの要精検率10.1%、MMG・USそれぞれを独立して判定した総合判定前要精検率21.8%であったが、総合判定後の要精検率は10.5%に低下した。対照として当センターの平成23年度乳癌検診要精検率はMMG併用検診（MMG+視触診）で8.0%（受診者数1558人）、US併用検診（US+視触診）で7.3%（受診者数452人）であった。MMGとUS併用検診発見癌は平成22年度に1例（38歳女性）でUSのみで所見を認め、最終診断が非浸潤性乳管癌（DCIS）であった。年齢別総合判定前後の要精検率変化を（図3）に示す。

図3 年齢別総合判定前後の要精検率変化



当センターのMMGとUS併用検診の要精検率は30歳代から60歳代までほぼ同程度で、各年齢層とも総合判定で約半分に低下した。

総合判定では 1) MMG で境界明瞭平滑な腫瘤があり、US で明らかな良性病変（嚢胞や線維腺腫）であることが確認できれば要精密検査としない(10人)、2) MMG で局所的非対称性陰影が認められるが、US で正常乳腺であることが確認できれば要精密検査としない(16人)、3) MMG でカテゴリー3にするか2にするか迷うような量の少ない石灰化が認められるが、US で同部位に病変が確認できない場合は要精密検査とせず、次年度も検診を受診するよう説明(2人)とし、合計28名が総合判定で精検不要となった(表1)。

表1 総合判定で精検不要とした各検査所見と人数

MMG 所見	MMG 異常指摘部位の US 所見	人数
境界明瞭な腫瘤	嚢胞または線維腺腫	10
局所的非対称性陰影	正常乳腺	16
量の少ない石灰化	病変を指摘できず	2

対象期間3年間における各検査ごとの総合判定前後の要精検者数を(図4, 5)に示す。総合判定前の要精検者はMMGのみに所見を認めた29人、USのみに所見を認めた19人、MMG・US両検査で所見を認めた6人の合計54人であったが、総合判定を行うことによってMMGのみに所見を認めたもののうち28人が精検不要となったため、最終的にMMGのみに所見を認めた1人、USのみに所見を認めた19人、MMG・US両検査で所見を認めた6人の合計26人が要精検となった。総合判定で精検不要となった28人のうち21人が継続して乳癌検診を受診しており、所見の増悪は認めていない。

図4 3年間の総合判定前検査別要精検者数

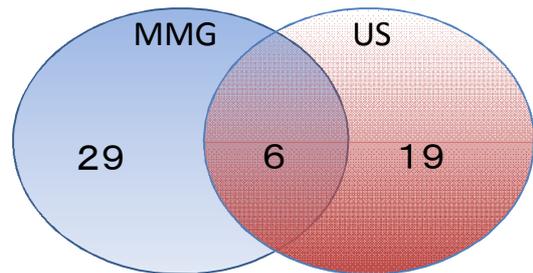
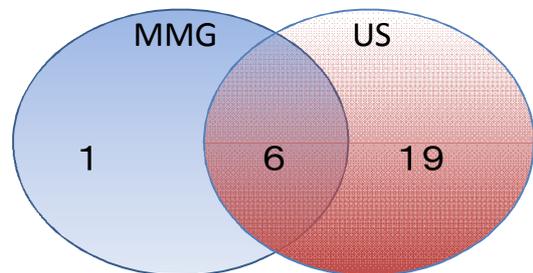


図5 3年間の総合判定後検査別要精検者数



## 考察

乳癌は1994年以降、女性癌の罹患率1位であり、特に40歳代での乳癌発症の増加は日本人のライフスタイルの変化と関連し、今後も増加が予測されている[17-19]。

一方、乳腺組織の量は年齢によって大きく異なり、思春期から増加し、妊娠期から授乳期に最も多く、乳房のほとんどを占める。そして授乳期が終わると萎縮していく。この萎縮は閉経後加速するが、萎縮の程度、速度には個人差がある。乳癌はマンモグラム上、軟部組織濃度を呈する。一般には同量の乳腺よりやや高濃度であるが、等濃度であることも多い。そこで乳腺の多い若年者や、高齢でも乳腺が多く残存する乳房では乳癌の検出が難しい[18]。地域がん登録と照合し、中間期癌を正確に把握した宮城県の112,071人データでも、MMG併用検診(MMG+視触診)の乳癌検出率は、40歳代は71.4%で50歳代の85.8%、60歳代の87.2%に比べて低い[1]。しかしMMGにUSを上乗せすることによって、乳癌発見率の上昇が期待できる[2-11]。そのため、現在40歳代にMMGとUSの併用検診の有効性がJ-STARTで検討されており[19]、今後40歳代の受診者を中心にMMGとUSの併用検診が広まることが予想される。

MMGとUSの併用検診における問題として、要精検者をそれぞれのモダリティ(MMG, US)を独立して

判定すると要精検率が高くなることが挙げられる。偽陽性者に対する不要な不安感、そしてそれにより惹起される社会的不利益、また過剰な精密検査に要する医療資源あるいは医療費の消耗など、さまざまな個人的、社会的悪影響が考えられる<sup>[11-12]</sup>。

JABTS の「マンモグラフィと超音波検査の総合判定基準」<sup>[13]</sup> は「マンモグラム所見を参照しながら超音波検査を行うこと」を推奨しており、当センターでも MMG 撮影を先に行い、MMG 所見を参照しながら視触診と US を行っている。この方法であれば総合判定時に「MMG で局所的非対称性陰影が認められるが、US で正常乳腺であることが確認できれば要精密検査としない」と判定することが容易であり、実際この基準が最も要精検率低下に寄与した。結果として、総合判定後要精検率は 10.5% で、US 併用しているにもかかわらず、MMG 単独の要精検率よりも低くすることができていた。日本乳癌検診学会 2011 年全国集計報告によると、MMG と US の併用検診 (MMG+US+視触診) の要精検率は 8.4% であった<sup>[20]</sup>。MMG で境界明瞭な腫瘤や局所的非対称性陰影を認める女性が追加されていることを考慮すると、当センターの要精検率は遜色ないのではないかと考えられる。しかも、今回の検討において総合判定での要精検率低下は 20 歳代から 60 歳代までの各年齢層において認められ、若年者のみならず高齢者であっても MMG と US 併用検診における総合判定の有用性が示唆された。各年齢層において「MMG で境界明瞭な腫瘤があり、US で明らかな良性病変 (嚢胞や線維腺腫) であることが確認できれば要精密検査としない」「MMG で局所的非対称性陰影が認められるが、US で正常乳腺であることが確認できれば要精密検査としない」と判定できることがその理由として考えられる。つまり、MMG の所見を参考にしながら US を行えば、JABTS の総合判定基準は若年者から高齢者まで有効であることが示せたと考えられる。

総合判定で精検不要になった受診者のうち、継続して乳癌検診を受診した者の所見の増悪は認めなかったが、継続受診していない者も存在する。宮城県のデータでも MMG 併用検診 (MMG+視触診) の乳癌検出率は、40 歳代は 71.4%、50 歳代 85.8%、60 歳代 87.2% であり、MMG 併用検診には 12.8~28.6% 程度の偽陰性が存在する。これについては十分な検討はできておらず、今後も経過を追う必要がある。

今回の検討で全員に MMG と US の併用検診をするべきであるとの結論には至らない。脂肪性乳腺で MMG 所見に異常がない場合は US 併用のメリットはほとんど考えにくいので、このような場合は MMG のみの併用検診で良いと考えられる。US 併用の意義は、若年者に多い高濃度乳腺における乳癌発見率を上げることと、MMG で境界明瞭平滑な腫瘤や局所的非対称性陰影が認められる場合の要精検率を下げることにあると考えられる。よって、MMG 読影時に US が必要か否かを判定できれば、必要な場合にのみ US を追加す

るので、経済的・時間的負担を最小限にできる可能性がある。この US 追加の判定基準については今のところ学会等で認められたものは無く、今後の検討課題であると考えられる。

## 文献

- [1] Suzuki A, Kuriyama S, Kawai M, Amari M, Takeda M, Ishida T, Ohuchi N: Age-specific interval breast cancer in Japan: estimation of the proper sensitivity of screening using a population-based cancer registry. *Cancer Sci*, 99:2264-2267, 2008
- [2] 武部晃司、中村光次、三竿貴彦. 40 歳代以下の若年女性における whole breast scanning を用いた乳癌検診の有用性. *日本乳癌検診学会誌*, 9(2) 155-160, 2000
- [3] 土屋十次、浅野雅嘉、立花 進、竹村茂之、西尾公利、右納 隆、下川邦泰, 49 歳, 以下の乳癌検診における超音波検査の有用性について. *日本乳癌検診学会誌*, 10(2) 185-193, 2001
- [4] 山崎美樹、那須 繁、古賀 淳、森 寿治. 40 歳代の検診発見乳癌におけるマンモグラフィ、超音波検査の検出率. *日本乳癌検診学会誌*, 11(3) 265-269, 2002
- [5] 増岡秀次、森 満、野村直弘、工平美和子、桜井美紀、吉田佳代、岩渕由希子、青木典子、白井秀明、山崎弘資、下川原 出、浅石和昭. 乳癌検診における超音波 (US) の有用性について. *日本乳癌検診学会誌*, 16(1) 52-59, 2007
- [6] 武部晃司、何森亜由美、安毛直美. 当院における MMG・超音波検査併用検診の実際 - 非触知・小型浸潤癌の検出を中心に -. *日本乳癌検診学会誌*, 16(1) 60-65, 2007
- [7] 濱田郁代、渡邊良二、川原奈津子、船越健彦、山崎昌典、深水康吉、中島裕一、森 寿治、稲村篤子. 当施設におけるマンモグラフィ・超音波併用乳がん検診成績 ~ 過去 14 年間のモダリティ別癌検出率の推移 ~. *日本乳癌検診学会雑誌*, 18(3) 373, 2009
- [8] 三浦由美、剣吉真弓、関村典子、相馬明美、佐々木教子、佐藤 務、太田睦子、御供陽二、大貫幸二. 3 法併用検診において超音波検査のみが指摘しえた乳癌症例の報告 (第 2 報). *日本乳腺甲状腺超音波診断会議雑誌*, 13(1) 150, 2010
- [9] 岩間 寛、松村武明、松本和久、福井知成、佐藤洋史. 超音波・マンモグラフィにおける乳腺腫瘍カテゴリ分類の比較検討. *日本乳腺甲状腺超音波診断会議雑誌*, 13(2) 106, 2010
- [10] 柄松章司、大藤千秋、滝野好美. マンモグラフィでカテゴリ 1 であった乳癌症例の検討. *日本乳腺甲状腺超音波診断会議雑誌*, 13(2) 107, 2010

- [11]森久保 寛、阿部聡子.乳房超音波併用検診におけるプロセス評価.日本乳癌検診学会誌,21(3) 250-258,2012
- [12]森久保 寛、市村みゆき、阿部聡子.当施設における乳がん超音波検診システムの現状と将来.日本乳癌検診学会誌,20(3) 168-177,2011
- [13]大貫幸二、角田博子、東野英利子、飯郷宇多子、遠藤登喜子、大岩幹直、尾羽根範員、加奥節子、梶原崇恵、加藤正仁、河合賢朗、河内伸江、栗田武彰、久留島幸路、桑島章、斉藤シズ子、佐久間 浩、鈴木咲子、恒川美香子、中島一毅、中谷守一、橋本秀行、林 幸子、坂 佳奈子、藤本泰久、森久保 寛、安田秀光、山田 稔、渡辺隆紀、渡邊朋子、和田博司.マンモグラフィと超音波検査の併用検診における総合判定基準—JABTS 乳癌検診研究班からの報告—.日本乳癌検診学会誌,21(3) 273-279,2012
- [14]宇佐美 伸、大貫幸二.超音波検査技師に対するマンモグラフィ読影試験—同時併用検診で感度は上昇するか—.日本乳癌検診学会誌,20(3) 161-167,2011
- [15]大島 明、黒石哲生、田島和雄(編).がん・統計白書—罹患・死亡・予後—2004.篠原出版社,97-160,2004
- [16]田島和雄、広瀬かおる.わが国における乳がんの疫学.日本臨床,65(6) 15-21,2007
- [17]南 優子、角川陽一郎、大内憲明.ライフスタイルの変化と乳癌疾患.日本臨床,65(6) 213-219,2007
- [18]東野英利子、角田博子、秋山 太.マンモグラフィ診断の進め方とポイント.東京,金原出版,7-9,2001
- [19] Ohuchi N,Ishida T,Kawai M,Narikawa Y,Yamamoto S,Sobue T: Randomized controlled trial on effectiveness of ultrasonography screening for breast cancer in women aged 40-49(J-START):research design. Jpn J Clin Oncol,41:275-277,2011
- [20] 笠原善郎、辻 一郎、市村みゆき、上尾裕昭、大貫幸二、岡崎 稔、鯉淵幸生、古川順康、村田陽子、森田孝子.乳癌検診全国集計報告(2011年).日本乳癌検診学会誌,21(1)48-58,2012

まう。一方、両者の所見を総合的に判断することによって要精検者を決定すれば、乳癌発見率の上昇とともに要精検率の低下が期待でき、精度の高い検診が行えるものと考えられる。草津総合病院健康管理センターにおいて、平成21年4月1日から平成24年3月31日の3年間に、MMGとUS併用乳癌検診(MMG+US+視触診)をのべ248名に行った。その結果、MMGの要精検率は14.1%、USの要精検率は10.1%であり、それぞれの検査を独立して判定した場合の要精検率は21.8%であったが、MMGの要精検者についてMMGで異常所見指摘部位のUS所見によって精密検査の要・不要を判定する総合判定を行ったところ、要精検率は10.5%まで低下した。しかも、総合判定での要精検率の低下は20歳代から60歳代までの各年齢層において認められ、若年者のみならず高齢者であってもMMGとUS併用検診における総合判定の有用性が示唆された。

キーワード：乳癌検診、マンモグラフィ、超音波検査、総合判定

## 和文抄録

乳癌検診においては、死亡率減少効果とともに、不要な精密検査が少ないといった精度の高さが求められている。一方、我が国の乳癌罹患率のピークは40歳代後半であるが、40歳代のマンモグラフィ(MMG)併用検診の乳癌検出率が50歳代以上に比べて低いという問題がある。MMGに超音波検査(US)を上乗せすることによって、乳癌発見率の上昇が期待できるが、それぞれ独立して判定すると要精検率も上昇してし

## 麻酔科主導の術前経口補水療法の導入と標準化 国立病院機構滋賀病院での取り組み

藤野 能久<sup>1,8,10)</sup>, 本間 恵子<sup>9)</sup>, 曾我 真弓<sup>8)</sup>, 千原 孝志<sup>9)</sup>, 内藤 裕子<sup>2)</sup>, 菊地 克久<sup>3,10)</sup>,  
堤 泰彦<sup>4,10)</sup>, 尾崎 良智<sup>5,10)</sup>, 佐藤 浩一郎<sup>6,10)</sup>, 井上 貴至<sup>7,10)</sup>, 井上 修平<sup>5,10)</sup>,  
野坂 修一<sup>8)</sup>, 来見 良誠<sup>6,10)</sup>

国立病院機構滋賀病院 1) 麻酔科 2) 栄養管理室 3) 整形外科 4) 歯科口腔外科 5) 呼吸器外科 6) 外科  
7) 産婦人科 滋賀医科大学 8) 麻酔科 9) 手術部 10) 総合外科学講座

## Preoperative Oral Rehydration Therapy Introduced and Systematized under the Initiative of Anesthesiologists

### Endeavours at National Hospital Organization Shiga Hospital

Yoshihisa FUJINO<sup>1,8,10)</sup>, Keiko HONMA<sup>9)</sup>, Mayumi SOGA<sup>8)</sup>, Takashi CHIHARA<sup>9)</sup>, Yuko NAITO<sup>2)</sup>,  
Katsuhisa KIKUCHI<sup>3,10)</sup>, Yasuhiko TSUTSUMI<sup>4,10)</sup>, Yoshitomo OZAKI<sup>5,10)</sup>,  
Koichiro SATO<sup>6,10)</sup>, Takashi INOUE<sup>7,10)</sup>, Shuhei INOUE<sup>5,10)</sup>, Shuichi NOSAKA<sup>8)</sup>  
and Yoshimasa KURUMI<sup>6,10)</sup>

1) Department of Anesthesiology, 2) Division of Nutritional Management, 3) Department of Orthopaedic Surgery,  
4) Department of Oral and Maxillofacial Surgery, 5) Department of General Thoracic Surgery,  
6) Department of Surgery, 7) Department of Obstetric and Gynecology, National Hospital Organization Shiga Hospital  
8) Department of Anesthesiology, 9) Division of Surgical Center, 10) Department of Comprehensive Surgery,  
Shiga University of Medical Science

### Abstract

Preoperative oral rehydration therapy has been introduced to all surgical departments in our hospital over a relatively short period under the initiative of the Department of Anesthesiology, and it has become a usual preoperative procedure in the one year since its introduction. The main point of the therapy is to simplify the preoperative procedures. The therapy also has many other benefits. For example, it not only prevents preoperative dehydration, but also improves patients' preoperative comfort and postoperative recovery from surgery, cutting down on the workload, improving medical safety on a hospital ward, and increasing efficiency. The main anxiety after the induction of this therapy might be increasing the risk of aspiration on the induction of general anesthesia. However, we can overcome this anxiety as long as there is careful selection of patients for the therapy, sufficient explanation for the patients at the medical examination by anesthesiologists, and strictly controlling patients' water drinking. Accordingly, we recommend that the therapy be introduced under the initiative of anesthesiologists, and it is important to repeatedly explain to and closely observe patients.

**Keyword** Preoperative oral rehydration therapy, Medical safety, Preoperative comfort, Cutting down on the workload, Enhanced recovery after surgery

---

Received: December 25, 2012 Accepted: April 3, 2013

Correspondence: 独立行政法人 国立病院機構滋賀病院 (現・東近江総合医療センター) 麻酔科 藤野 能久  
〒527-8505 滋賀県東近江市五智町 255 番地 fujino@belle.shiga-med.ac.jp

## 緒言

術前経口補水療法(以下 ORT : oral rehydration therapy)は術前の脱水を予防するだけでなく、患者の快適性や医療の安全性の向上、医療従事者の業務量減少の他、術後早期回復に関与するなどさまざまな効果が期待され、本邦でも次第に広がりを見せている。2012年7月には日本麻酔科学会より術前経口補水に関するガイドライン[1]も発表され、益々普及に弾みがつくと考えられる。当院では2011年1月より術前ORTを一部で開始し、短期間で関連外科系全科に導入でき、当院の術前標準療法とすることができた。当院の2011年の術前ORT導入状況を報告する。

## 対象と方法

### 対象

対象は当院の2011年において術前に原則問題なく経口飲水可能な麻酔科管理予定全症例としたが、緊急手術・腸閉塞患者・循環器系や腎臓など主要臓器に重篤な合併症を持つ患者や認知症患者の一部など麻酔科医が判断して当療法が不適切と考えられる症例は除外した。具体的には、腸閉塞は原則適応外であるが、飲水許可され問題なく飲水可能で嘔吐のない下部消化管の軽度の腸管通過障害患者に関しては適応とした。逆流性食道炎に関しても、症状が軽度であり誤嚥の既往がない患者に関しては適応とした。認知症があっても適切に飲食が可能で誤嚥を起こしていない患者は適応とした。全身性の疾患があっても飲水制限されていない軽症例は適応とした。すなわち、当療法の非適格条件は①緊急手術、②認知症で適切に飲食できない場合、③全身性の重篤な合併症の存在などにより自らの意思で自由に飲食を許可されていない場合、④術前に嘔吐や誤嚥を起こしている場合である。

### 方法

方法は当療法の解説書[2, 3]を原則参考にしておこなった。成人では手術前日夕食後から就眠時まで経口補水液(以下ORS : oral rehydration solution)の一種としてOS-1®(大塚製薬工場、徳島)を500mlと手術当日は起床時から指定される絶飲時刻までにさらに同500~1000mlを時間をかけて少量ずつゆっくり飲むように指導した。手術前日の夕食から就寝時までOS-1を500ml以外に自由に他の飲料の飲水も許可した。手術当日の飲水量は手術室入室予定時刻が9時から13時までには500ml、入室予定が13時以降の場合は1000mlを供給した。当日指定される絶飲時刻とは手術室入室時刻が決定している場合は入室の2時間前、それ以外

のオンコール症例は予測入室時刻の概ね2~3時間前に設定した。午後から手術室へ入室する症例でも病棟で点滴を確保せず、OS-1のみで対応した。前の手術が延長しているなどの理由で予定入室時刻が大幅に遅れることがわかった場合も病棟では点滴を確保せず、OS-1の追加処方でも対応した。具体的には入室が13時までと予定されていたにもかかわらず13時以降に変更になる場合は当日飲水供給量を急遽500mlから1000mlに増やした。さらに入室時刻が17時以降にずれ込むようなことがあれば当日供給量は1500mlを増やすように計画した。逆に予定入室時刻が早まりそうな状況において絶飲時刻を繰り上げられる場合は繰り上げ、繰り上げが困難な場合は絶飲後1時間30分までは入室を待たせた。麻酔科術前診察時に麻酔科医が上記に示すORTの適応を判断して患者に直接説明し、OS-1の処方と絶飲の時刻を術前指示簿に記載した。OS-1は朝食や昼食の一形態として食事箋で病院栄養管理室より供給された。また、麻酔科医が手術前日夕方と手術当日早朝にOS-1がどの程度飲んでいるかをそれぞれの患者の状態とともに確認しながら回診した。

### ORSの飲み方

この麻酔科医による手術前日夕方と手術当日早朝の回診時に再度患者に説明するORSの飲み方の要点としては、①できるだけゆっくりと時間をかけて少量ずつ飲むこと、②飲みたくない、もしくは飲めない場合は全部飲まなくても飲める量だけで良いこと、③手術前日はOS-1以外に飲みたい飲料があれば自由に好きなだけ飲むことが可能であることを伝える一方、手術当日の飲料はOS-1に限定するように伝えた。そして④指定された絶飲時刻だけは守るように伝え、丁寧に繰り返し説明した。実際のOS-1供給時には病棟看護師が絶飲時刻が書かれたプレートを手渡し再度同様の説明を繰り返した。

### 調査項目

- ① 2011年における麻酔科管理全症例数と緊急手術症例数、ORT適応症例数、実際のORT施行症例数。
- ② 2011年中の月別のORT実施状況。
- ③ ORT実施症例における飲水状況。
- ④ ORT実施による当院の2011年の食費増収。

## 結果

### ORT施行症例数

2011年麻酔科管理全371症例のうち、緊急手術60症例を除く予定手術311症例のうち257症例で術前ORTが実施された(図1)。

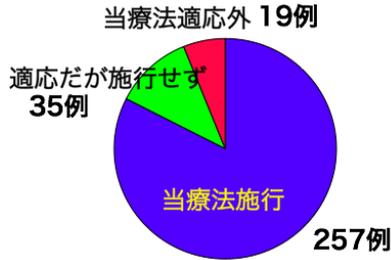


図1 2011年当院での麻酔科管理予定全311症例  
2011年の麻酔科管理予定全311症例のうち術前ORT施行は257症例

### 月別のORT実施状況

当療法に伴う誤嚥などの合併症は1件も発生せず、全症例円滑に麻酔導入できた。2011年の月別の当療法導入状況を図2と図3に示す。

当療法を開始した2011年1月時点で当院の麻酔科関連の外科系は歯科口腔外科、呼吸器外科、消化器外科の3科のみであった。当療法導入時には、比較的若年者の患者の比率が高く事故が起こりにくいと考えられた歯科口腔外科手術症例から開始した。次の月には呼吸器外科手術症例を追加した。3ヶ月目には消化器外科症例を追加し、4ヶ月目には開設されたばかりの婦人科少数例を含めORT適応症例の90%以上でORTを施行し、以後麻酔科管理手術症例のORT適応患者のうち毎月95%以上でORTを施行し続けている。ORTを導入した10ヶ月目には整形外科が開設されたと同時に術前ORTを開始したが、円滑に導入できた。術前ORT導入2年程度経った後も、引き続き当療法関連の事故の発生が皆無であるだけでなく、主治医や病棟の受け入れも良好となり、当院での麻酔科管理症例の標準療法となった。

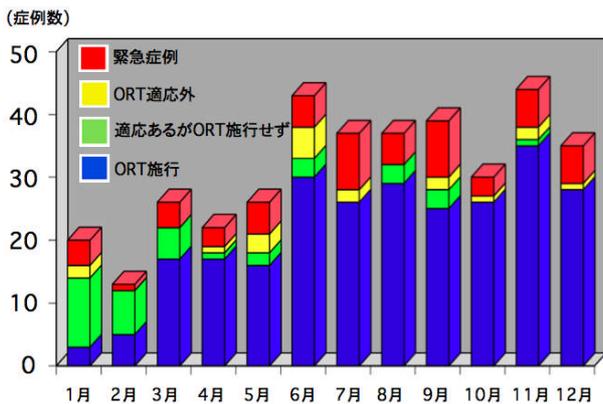


図2 2011年当院での月別麻酔科管理手術件数とORT施行数  
手術件数および術前ORT施行数とも次第に増加している

### ORS 飲水状況

当院では、朝一番の手術室入室時刻は午前9時のため、この場合の絶飲時刻は2時間前の午前7時となる。

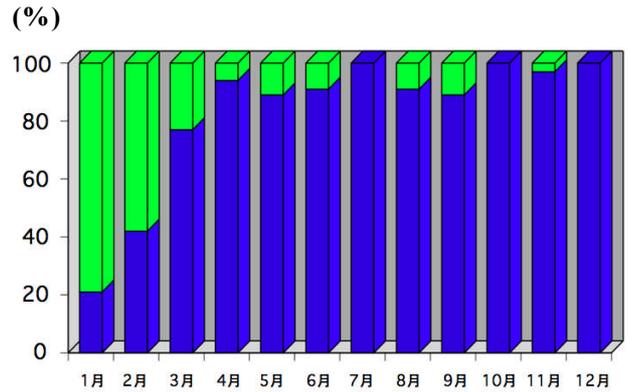


図3 2011年月別術前ORT適応症例中実際の施行割合  
1月から開始した術前ORTはすでに4月の段階でORT適応症例の90%以上で施行するようになり、以後90%以上を維持できていた  
凡例は図2と共通

従って、当日起床後に飲水できる時間はそれほど長くなく、飲水のための時間が不足し、飲水量が減少することが懸念されたため、9時入室の症例のグループとそれ以降に入室するグループに分けて飲水量を検討した。また、16歳未満の小児例や設定全飲水量500ml以下の12例を飲水状況の検討対象から除外した。従ってORT実施全症例257例からこの12例を除く245例を以下の3グループに分けて飲水状況を調査した。  
A群：7時が絶飲時刻（予定入室時刻が9時）でORSは全量が1000ml、89例、B群：7時以降11時が絶飲時刻（予定入室時刻が9時以降13時まで）でORSは全量が1000ml、143例、C群：11時以降が絶飲時刻（予定入室時刻が13時以降）でORSは全量が1500ml、13例（表1）。

A, B, C群の年齢、身長、体重、平均飲水量を表1に示す。また、各群における飲水量の状況を図4から6に示す。

症例数	年齢 (歳)	身長 (cm)	体重 (kg)	設定ORS量 (ml)	ORS飲水量 (ml)
A群 89	59±18 (17-83)	162±9 (137-181)	58±10 (33-87)	1000	946±151 (250-1000)
B群 143	55±20 (16-96)	161±9 (128-179)	58±12 (35-101)	1000	965±118 (300-1000)
C群 13	51±20 (17-79)	166±11 (141-184)	61±12 (48-89)	1500	1469±111 (1100-1500)

表1 ORS 飲水状況

A群、B群、C群の各群間の年齢・身長・体重に有意差はなかった。ORS平均飲水量は各群とも一部をのぞき概ね全量飲水できていたことを示している。値は平均±標準偏差が示されており、その下の括弧内は最小値と最大値を示す。

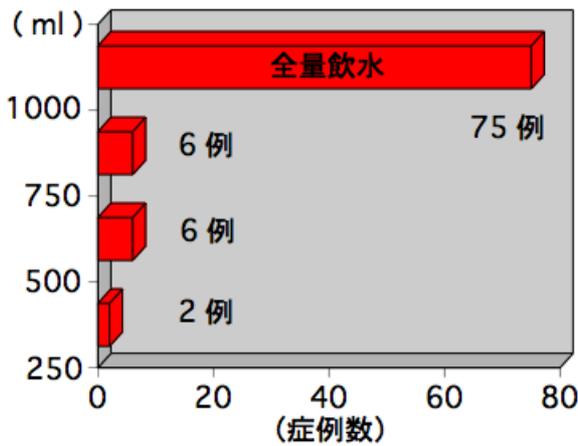


図4 A群（7時が絶飲時刻）の飲水量別の症例数  
多くは全量飲水できている。ほとんどは半量(500cc)以上  
飲水できており、半量未満は2例のみである。

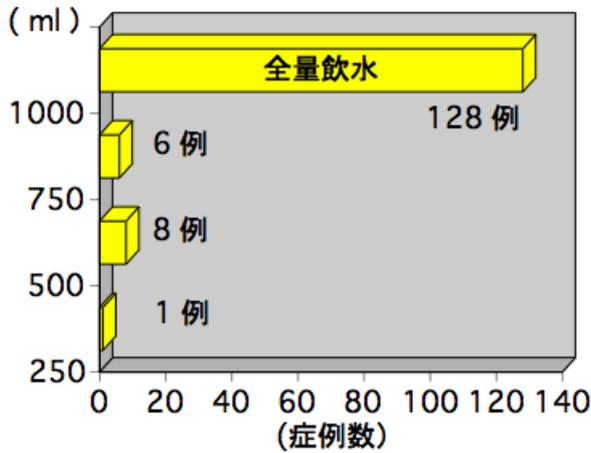


図5 B群（7時以降11時までが絶飲時刻）の飲水量別の症例数  
多くは全量飲水できている。ほとんどは半量(500cc)以上  
飲水できており、半量未満は1例のみである。

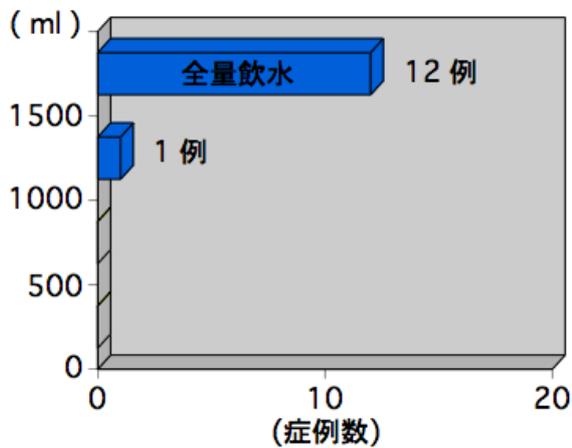


図6 C群（11時以降が絶飲時刻）の飲水量別の症例数  
ほぼ全量飲水できている。全量未満は1例のみである。

A群では89例中全量飲水は75例(84%)、半量以上飲水は87例(98%)で半量未満の飲水は2例(2%)のみであった。B群では143例中全量飲水は128例(90%)、半量以上飲水は142例(99%)で半量未満の飲水は1例(1%)のみであった。C群では13例中全量飲水は12例(92%)、半量以上飲水は13例(100%)で半量未満の飲水例はなかった。従って、A・B・C全群の245例中全量飲水は215例(88%)、半量以上飲水は242例(99%)で半量未満の飲水は3例(1%)のみであった。

### 病院収入の増加

当院が2011年中に術前ORT実施によって得た増収分を以下に示す。術前ORTを実施しない場合の手術当日は絶食となって食事が運ばれないため、食費を請求することはできない。しかし、ORTに用いるOS-1は食事の種類として取り扱うことができるため、術前ORTを施行すると朝食や昼食として食費を請求することができる。

上記A群（7時が絶飲時刻）89例とB群（7~11時が絶飲時刻）143例の場合、当日朝食分としてOS-1（500ml ペットボトル）2本を前日夕食時に供給する。C群（11時以降が絶飲時刻）の場合、OS-1を3本（朝食分で2本、昼食分で1本）供給する。一方、当院では一食あたり食費として656円請求している。また、OS-1（500ml）1本の定価は200円であり、A群とB群（計232例）においては1症例あたり、 $656 - (200 \times 2) = 256$ 円の増収となる。従ってA・B群全体の一年間の増収は小計  $256 \text{円} \times 232 \text{例} = 59,392$ 円であった。一方、C群(13例)においては1症例あたり  $652 - (200 \times 3) = 704$ 円の増収となり、C群全体の一年間の増収は小計  $704 \text{円} \times 13 \text{例} = 9,152$ 円となる。当院はDPC（Diagnosis Procedure Combination: 診断群分類包括評価）認可病院ではないのでA・B・C群全体245例の術前ORT導入による2011年の増収は  $59,392 + 9,152 = 68,544$ 円のみである。もしも当院がDPC認可病院であったとすると、術前ORT施行によって病棟での術前点滴を削減することができるため、さらにその分の病院の持ち出し分が節約できる。例えば、当院において仮に術前ORTを導入せずにソルアセットD®(500ml輸液剤：薬価195円)を病棟で術前点滴としてAおよびB群(232例)では1本、C群(13例)では2本用いたと想定すると  $195 \text{円} \times 232 \text{例} = 45,240$ 円および  $(195 \text{円} \times 2) \times 13 \text{例} = 5,070$ 円の輸液製剤の経費が発生するが、術前ORTを施行するとこれらの分が節約される。従って、もしも当院がDPC認可病院であったとすればOS-1導入による食費の2011年の増収分の68,544円に加えて、さらに輸液製剤の想定病院持ち出し分の  $45,240 + 5,070 = 50,310$ 円の節約によって合計118,854円の増収が得られたことにな

る。

## 考察

### 周術期の合併症予防・早期回復と術前 ORT

周術期における早期回復・入院期間短縮を目ざす取り組みは、主に医療費削減の目的から欧米ではかなり以前より通常の戦略となっており、その概念は米国では Fast Track Recovery [4]、欧州においては ERAS (Enhanced Recovery After Surgery) [5] と呼ばれ、積極的に推進されている。近年、本邦においても医療費抑制のため、また DPC (Diagnosis Procedure Combination: 診断群分類包括評価) 制度導入などによる病院経営の面からも、周術期において合併症を予防するだけでなく積極的に早期回復・入院期間短縮の推進が強く求められるようになった。このような周術期における合併症予防や早期回復を求める研究で得られた結果の1つとして、周術期の絶飲食期間の短縮が、近年特に注目されている。例えば、腸管は栄養分や水分の吸収を行う役割を果たすだけでなく、体内における最大の免疫担当臓器とされ、経口摂取することが免疫力を高めるとされている [6, 7]。また、術前に炭水化物を経口摂取すると静脈内投与に比べて術後のインスリン抵抗性が抑制されるなどの効果も指摘されている [8]。すなわち、飲食をして腸管を活動させることが免疫力を上げ、感染症などの合併症を発生しにくくしたり、身体に加わる手術などの侵襲に対する回復力を上げる効果があることが示唆されている。ところが、手術直前まで経口摂取して胃内容物が残存していると、手術のために行われる全身麻酔導入時に誤嚥を起こしやすくなり、窒息や術後肺炎を併発する危険性がある。そのため、この誤嚥を避けるために術前の長時間の絶飲食を強いて、その代わりに術前の輸液を行うことが本邦での従来の術前管理のスタンダードであった。しかしながら、表-2 に示すように、近年の研究によると飲食物の胃内滞留時間はそれほど長いものではなく、特に清澄水に関しては飲水後2時間以内に胃内から排出されることがわかってきた [9]。

	清澄水	母乳	牛乳/軽食	脂肪/肉類食
乳児	2	4	6	8
幼児	2	4	6	8
成人	2	—	6	8

表2 アメリカ麻酔科学会絶飲食ガイドライン [9]

全身麻酔導入までの必要な絶飲食時間 (単位は時間)

### 術前 ORT と ORS の種類

術前 ORT の主な目的は術前絶飲食に伴う軽度脱水

の補正や体内エネルギー代謝の改善および術後の早期回復である。さらに当療法に使用される ORS は飲水後速やかに吸収され、胃内から速やかに消失することが条件となる。これらの目的を満たす当療法普及が先行する欧米で術前 ORT に用いられている ORS は preOp® (Nutricia, Zoetermeer, the Netherlands) と呼ばれる飲料が多く、この飲料を用いた研究で多くの効果が示されている [5, 7, 8]。従って、本来であれば術前 ORT にはこの preOp® を用いるべきと思われるが、本邦では発売されていない。また、WHO や欧州小児栄養消化器肝臓学会 (ESPGHAN) などで提唱されている ORS 組成の飲料も本邦では発売されていない。ORS であることの厳密な条件としては Na とブドウ糖 (炭水化物) を含み、小腸において SGLT-1 (Sodium glucose co-transporter 1, Na-ブドウ糖共役輸送担体) [10] の作用を介して速やかに吸収される飲料で、その浸透圧は 200~270 mOsm/L と血液浸透圧 (280 mOsm/L) よりもやや低いことである。このような条件に合う本邦で入手可能な ORS はソリタ顆粒 (T2 号または T3 号、味の素ファルマ、医薬品)、OS-1 (大塚製薬工場、病者用食品) およびアクアライト ORS (和光堂) の3種類のみである [10]。ソリタ顆粒は蒸留水に溶解させる必要があり、術前 ORT に使用するには手間がかかり現実的ではない。OS-1 とアクアライト ORS に関してはその組成を表-3 に示す。OS-1 は米国小児科学会経口補水療法指針に基づいて開発された飲料で、一方アクアライト ORS は OS-1 より若干塩分を控えめに炭水化物を多くし、さらにリンゴ風味にして飲みやすくしている。

ラット小腸を用いた研究では OS-1 とアクアライト ORS いずれも極めて水分吸収が速やかであることが示されているが、OS-1 の方がより速いことが示されている [10]。腹部エコーを用いた臨床研究でも OS-1 は摂取 30 分後にはすでにほとんど胃内に残存していないと報告 [11] されており、少なくとも摂取 2 時間後には胃内に残存しておらず、安全に麻酔導入できると報告されている [12]。OS-1 含有の炭水化物は 1000ml 中 25g であるがブドウ糖としては 18g であり、OS-1 のブドウ糖とナトリウムの含有モル比は 2:1 である。ブドウ糖とナトリウムのモル比が 2:1 を越えないことが胃からの吸収・排出が促進されることが報告されており [13]、このことも OS-1 の胃からの消失が非常に速い理由となっている。

ところで OS-1 は 500ml と 200ml のペットボトルに入っている。欧米での ORT 施行における飲水量は術前日が 800ml で術当日手術 2 時間前まで 400ml と記載されている [5]。OS-1 は胃からの消失が極めて速いためにより安全であることや、欧米人と邦人との体格差、ペットボトルであれば簡便に行えること、当院では成

人の手術が主に施行されていることなどから、以上を考慮し、当院での ORS は OS-1 (500ml ペットボトル) を採用するに至った。なお、OS-1 はこのように吸収が速く胃からの排泄が極めて速い特徴があるため、本邦市販の ORS の中で術前の ORS としての利用が最適であると考えられるが、欧米で主に採用されている preOp®と比較して熱量がかなり少なく(表-3)、周術期の熱量補給の目的に対しては十分ではないと考えられる。

えている。このような理由から、少しでも飲水できていれば本人の自然な欲求が反映されていると考え、当療養は施行できたと考えた。実際は多くの症例(88%)で全量飲水できていた(表-1, 図 4-6)。半量以上飲水の割合は 99%であった(表-1, 図 4-6)。ちなみに先行する欧米での ORT 施行における飲水量は術前日が 800ml で術当日手術 2 時間前まで 400ml と記載されているだけで体重あたりの飲水量などは定めていない [5]。

## 術前 ORT 導入による文献的効果報告

### 1) 術前病棟業務量の削減

谷口ら [15] は自施設の病棟看護師 106 名を対象に術前における従来の輸液管理による業務時間(輸液管理)と経口的な飲料摂取管理による業務時間(経口管理)についての調査をおこなった。輸液管理による業務時間は輸液路を準備して患者に確保し輸液を開始するまでの時間とした。経口管理による業務時間は経口飲料を準備し患者に提供し飲水方法を説明し終えるまでの時間とした。この結果、従来の輸液管理では 1 症例当たり 10.5±6.0 分を要したのに対し、経口管理は 4.9±3.6 分しか要しなかった。この差は 5%未満の危険率で有意であった [15]。このように術前経口補水療法を導入すると術前の病棟業務が削減され、本来のより質の高い業務に割く時間を増やすことができると考えられる。

### 2) 医療安全の向上

谷口ら [15] は自施設の術前輸液を止めて術前経口補水療法を導入する前後 1 年間のインシデント数について調査した。従来の術前輸液を施行していた 1 年間における月当たりの平均入院患者数は 364±16 人/月に対して総インシデント報告数は 140±35 件であったが、術前経口補水療法を開始後の 1 年間における月当たりの平均入院患者数は 351±12 人/月と若干減少したにもかかわらず、総インシデント報告数は 155±25 件と増加していた。このように総インシデント数が増加したにもかかわらず、輸液関連のインシデント数は逆に 27±9 件から 15±9 件に 5%未満の危険率で有意に低下した [15]。このことから経口補水療法を導入したことにより病棟での特に輸液関連の医療安全が向上したと考えられた。術前の輸液を扱うことがなくなればその関連のインシデントも減るのは極めて当然の結果である。

### 3) 患者快適性の向上

Hausel ら [16] は胆嚢摘出術予定患者(174 名)と結腸手術予定患者(78 名)の計 252 名を対象として術前補水療法として①preOp®と呼ばれる ORS を用いた

	preOp (Nutricia)	OS-1 (大塚製薬工場)	アクアライト ORS (和光堂)	Arginaid Water (ネスレ日本)
熱量(Kcal)	500	100	160	800
アミノ酸(g)	0	0	0	20
炭水化物(g)	126	25	40	180
ナトリウム(mg)	500	1150	805	0
カリウム(mg)	1220	780	780	0
クロール(mg)	60	1770	1240	0
カルシウム(mg)	60	0	0	0
マグネシウム(mg)	10	24	0	0
リン(mg)	10	62	0	1800
亜鉛(mg)	0	0	0	80
銅(mg)	0	0	0	8
浸透圧(mOsm/L)	260	270	200	720

表 3 ORS などの組成・1000ml における含有量

一部の施設で ORS と誤解されて術前に利用されている Arginaid Water の組成も示した。Arginaid Water はナトリウムが含まれず、浸透圧が高いため下痢を誘発させる可能性もあり ORS とは言えない。アミノ酸も含まれており、胃内滞留時間が長くなることも報告されている [14]。

## 術前 ORT における ORS の飲水量

われわれが施行している術前 ORT では「飲める量だけゆっくりと飲んでください。無理に全部飲む必要はありません。全部飲める場合は飲んでください。」と指導し、すべての対象患者がもともと全量飲むことを想定していない。また、術前日は OS-1 以外に別の飲料も自由に飲むことを許可している。従って本法は患者の欲求に依存している部分がある。このような方法は一見粗雑に感じられるかもしれないが、患者の脱水の程度により患者自身が自然にほぼ適正に補正できるように飲水量が決められる事が期待される。さらに、強制ではなく、患者の欲求を第一にすることによって患者の快適性にも配慮している。たとえ摂取しすぎたとしても、腎機能が正常であれば体液量は自然に補正される。一方、飲水量が少なかったとしても本人の口渇感を信用すれば極度の脱水状態にまではならないと考

群(ORS 群、n=80)、②プラセボ飲料 (preOp®と二重盲検法で区別できないほど同様に味付けした水)を用いた群(プラセボ群、n=86)、③術前夜から絶飲食を続けた群(絶飲群、n=86)に分けて手術当日朝に飲水後(絶飲群は飲水せず)の a)空腹感、b)口渇感、c)不安感、d)不快感、e)疲労感、f)集中力の欠如、g)脱力感、h)不健康感などについて VAS (Visual Analogue Scale)を用いて経時的に調査した。結果は 1)ORS 群は他の 2 群に比較して 5%未満の危険率で有意に空腹感や不安感が少なかった。2)ORS 群とプラセボ群は絶飲群に比べて 0.01%未満の危険率で有意に口渇感が少なかった。3)飲水後の時間経過による傾向に関して ORS 群は一貫して口渇感、空腹感、不安感、不快感、不健康感が 5%未満の危険率で有意に減少していた。4)プラセボ群は不健康感や不快感は減少したが、悪心・疲労感や集中力の欠如は 5%未満の危険率で有意に増加していた。5)絶飲群は空腹感、口渇感、疲労感、脱力感や集中力の欠如が 5%未満の危険率で有意に増加していた。以上から術前 ORT の施行は空腹感や口渇感の改善のみならず、不安感や不快感を改善し、プラセボ群や絶飲群に比較して疲労感や集中力の欠如に影響を与えないことが示された。

一方、Taniguchi [17] らは乳房切除予定の婦人患者 50 名を対象に、25 名を術前点滴群 (フルクトラクト®500ml)、残りの 25 名を ORT 群( OS-1®500ml)に分け、手術前の空腹感、口渇感、術前の身体拘束感についてそれぞれ質問したところ、それぞれ 4%、0.1%、0.1%未満の危険率で有意に ORT 群の方が勝っていた。以上の結果からも、術前 ORT の施行は空腹感や口渇感のみならず、術前の身体拘束感をも改善し、総じて術前の快適性向上にも寄与すると考えられた。

#### 4) 病院収入の増加

本院が平成 23 年に ORT を施行したことによる栄養管理室での増収は結果に示すとおり、施行数 250 例程度でおよそ 7 万円程度であった。もしも本院が DPC 認可病院であったとすると、さらにおよそ 5 万円分の輸液製剤の病院持ち出し分が削減でき、合計およそ 12 万円分の増収となる。わずかな増収ではあるが、業務量が削減され、医療安全性が向上し、患者の快適性が向上した上での増収であるので当療法を導入する上で意義は大きいと考えられる。

#### 麻酔科主導の ORT 導入時の工夫や注意点

新システムである術前 ORT 導入初期の混乱を最小限にするために比較的導入しやすいと思われる診療科

から一ヶ月に一科ずつ増やす方法で慎重に開始したので、導入初期には当療法適応であっても当療法を控える症例があったり、転任してきた直後の外科系主治医に十分な説明をする時間がなく、主治医のそれまでの習慣で術前点滴をオーダーされていた患者さんに当療法を控えたりしていたため、当療法適応患者であっても当療法を施行しない症例が何例かは存在した。しかし、次第に適応症例は必ず当療法を施行するようになり、およそ 1 年後には麻酔科管理の術前 ORT 適応症例すべての標準療法となった。その理由として、導入前には麻酔科医が個別に各科長医師や病棟看護師長と詳細を調整するのみならず、医局会や院内研究発表会の機会を利用して院内職員に説明し、周知を行った上で職員用の説明書も配布し、さらに実際の ORT 導入時には繰り返し病棟に足を運び、確認と説明を患者と職員に繰り返し行うことによって導入が円滑におこなわれたと考えられた。具体的には麻酔科術前診察時だけでなく手術前日の夕食前後や手術当日早朝に病棟回診を行い、ORS の飲水状況を確認し、ORS の飲み方や絶飲時間について病棟看護師と患者に直接丁寧に繰り返し説明した。また、病棟での術前指示票を改変し新たに術前経口補水療法の項目を作成した。さらに ORS の病棟からのオーダー方法も調整して栄養管理室の協力も得た。

以上のように、当院では麻酔科が主導して直接患者にきめの細かい説明を繰り返し行いながら術前 ORT を導入したことによって、関連外科系診療全科にわたり短期間で円滑に当療法が導入できたと考えられた。平成 24 年時点において術前の ORT を施行している施設は全国で相当な数に上っていると推定され、術前のスタンダードな処置になりつつある。しかしながら、導入されている施設においても一部の外科系診療科に限られていることが多く、外科系全科に導入されている施設は意外と少数と聞く。当院のように外科系全科に術前 ORT を導入することによって病棟での術前処置として標準化され、病院全体として統一した術前処置を行うことができるようになり、看護師サイドの対応も統一化され、病棟での医療安全上も利点が大きいと考えられた。

術前に絶飲期間を短縮して懸念されることは、胃内容残存物存在の可能性に伴う全身麻酔導入時の誤嚥の危険性である。従って麻酔科が責任を持って主導して術前 ORT を推進したことが比較的短期間に導入できた理由の 1 つであったと考えられた。一般に、病院全体に新しい方法を導入するときにはリスク・業務量や費用が増える事が多く、メリットを予想できても進めることが困難なことがある。今回の術前 ORT の導入の場合、全身麻酔導入時の誤嚥のリスクは麻酔科が負う

一方、病棟での医療安全は向上し、業務量に関しては病棟では減少し、麻酔科や手術部では若干は増え、必要な費用はむしろ減少し病院の増収になる。このことから麻酔科が主導して導入することが最も円滑に導入できると考えられた。

### ORT 導入の効果を評価するための指標

ORT 導入の目的は術前の脱水を予防するだけでなく、患者の快適性や医療安全の向上、医療従事者の業務量減少の他、術後早期回復とされている。このようにいくつもの評価項目がある。今後 ORT 導入の効果を客観的にさらに評価していくには、それぞれの評価項目について具体的な数値が必要となる。例えば、術後早期回復について言えば、術後感染や術後縫合不全の頻度はどうであったかとか、術後何時間で飲食できたとか、術後何時間で歩いてトイレに行けたとか、退院のためのいくつかの指標が何時間で得られたかなどの数値が術後回復程度を知る指標として重要と考える。

### まとめ

当療法導入の要点は術前処置簡素化であるが、患者の術前脱水を予防するだけでなく、術前快適性および術後回復力向上、病棟での医療従事者業務量削減と医療安全の向上、病院収入の増加など多岐に渡り、導入効果は大きい。一方、当療法を導入して最も懸念されることは全身麻酔導入時の誤嚥の危険性の増加と思われる。しかし、麻酔科術前診察時の慎重な患者選択と、患者への十分な説明および絶飲から麻酔導入まで決められた時間を守る限り、この懸念は解消される [9]。従って、当療法導入時には麻酔科主導が望ましく、患者への繰り返し丁寧な説明と監視が大切であると思われる。

当院では麻酔科が主導して術前経口補水療法を関連外科系全科に亘り比較的短期間に導入でき、1年後には当院での術前の標準療法になった。

利益相反はなし。

本論文の要旨は第 16 回京滋 NST 研究会にて発表した。

### 文献

- [1] 公益社団法人日本麻酔科学会 術前絶飲食ガイドライン. [http://www.anesth.or.jp/guide/pdf/guide-line\\_zetsuinshoku.pdf](http://www.anesth.or.jp/guide/pdf/guide-line_zetsuinshoku.pdf)
- [2] 天谷文昌. 手術前の体液管理における術前経口補水療法. (監修: 谷口英喜、佐和貞治). 京都、京都第一赤十字病院麻酔科作成
- [3] 谷口英喜. すぐに役立つ経口補水療法ハンドブック—脱水症状を改善する「飲む点滴」の活用法. 東京、日本医療企画、2010
- [4] Engelman RM, Rousou JA, Flack JEIII, Deaton DW. Fast-track recovery of the coronary bypass patient. *Ann Thorac Surg*, 58: 1742-1746, 1994
- [5] Fearon KCH, Ljungqvist O, Von Meyenfeldt M, Revhaug A, Dejong CHC, Lassen K, Nygren J, Hausel J, Soop M, Andersen J, Kehlet H. Enhanced recovery after surgery: A consensus review of clinical care for patients undergoing colonic resection. *Clinical Nutrition*, 24: 466-477, 2005
- [6] 野村秀明. 生体における腸管免疫の重要性—臨床栄養法 (経静脈栄養、経腸栄養) に関する検討—. 神戸常盤大学紀要, 4: 1-9, 2011
- [7] Melis GC, van Leewwen PAM, von Blomberg-van der Flier BME, Goedhart-Hiddinga AC, Uitdehaag BMJ, Streak van Schijndel RJM, Wuisman PIJM, van Bokhorst-de van der Schueren MAE. A carbohydrate-rich beverage prior to surgery prevents surgery-induced immunodepression: A randomized controlled clinical trial. *J Parenter Enteral Nutr*. 30: 21-26, 2006
- [8] Svanfeldt M, Thorell A, Hausel J, Soop M, Nygren J, Ljungqvist O. Effect of “preoperative” oral carbohydrate treatment on insulin action – a randomized cross-over unblinded study in healthy subjects. *Clinical Nutrition*, 24: 815-821, 2005
- [9] The American Society of Anesthesiologists. Practice Guidelines for Preoperative Fasting and the Use of Pharmacologic Agents to Reduce the Risk of Pulmonary Aspiration: Application to healthy Patients Undergoing Elective Procedure. *Anesthesiology*, 114: 495-511, 2011
- [10] 金子一成. 経口補水療法—わが国における現状と今後の展望—小児の輸液療法. *小児科臨床*, 61: 13-23, 2008
- [11] 三村文昭, 桜井康良, 内田倫子, 愛波淳子, 山口翠. 経口補水液 OS-1 は術前患者に clear fluid として安全に使用できる. *麻酔*, 60: 615-620, 2011
- [12] Itou K, Fukuyama T, Sasabuchi Y, Yasuda H, Suzuki N, Hinenoya H, Kim C, Sanui M, Taniguchi H, Miyao H, Seo N, Takeuchi M, Iwao Y, Sakamoto A, Fujita Y, Suzuki T. Safety and efficacy of oral rehydration therapy until 2h before surgery: a multicenter randomized controlled trial. *J Anesth*, 26: 20-27, 2012
- [13] 向井浄, 藤原寛, 石井権二. ヒマシ油誘発下痢ラットにおける OS-1 の水・電解質補給効果 (第 2 報). *JJPEN*, 24: 41-47, 2002
- [14] 白畑敦, 千葉正博, 日比健志, 原田芳邦, 岩崎拓也, 真田裕, 川野晋也, 岩久建志. 健康成人を対象とした術前飲料の違いによる胃排泄時間への影響—ERAS プロトコルと関連して—. *臨床栄養*, 118: 83-87, 2011
- [15] 谷口英喜, 佐々木俊郎, 藤田久栄. 全身麻酔前の絶飲食—周術期の栄養・体液管理—. *臨床麻酔*, 34: 1397-1406, 2010
- [16] Hausel J, Nygren J, Lagerkranser M, Hellstrom PM, Mammqvist F, Almstrom C, Lindh A, Thorell A, Ljungqvist O. A carbohydrate-rich drink reduces preoperative discomfort in elective surgery patients. *Anesth Analg*, 93: 1344-1350, 2001
- [17] Taniguchi H, Sasaki T, Fujita H, Takamori M, Kawasaki R, Moriyama Y, Takano O, Shibata T, Goto T. Preoperative fluid and electrolyte management with oral rehydration therapy. *J Anesth*, 23: 222-229, 2009

## 第9回 基礎・臨床融合の学内共同研究発表会

再生医療のための次世代薬物輸送システム

「Intelligent Drug Delivery System (DDS) for Regenerative Medicine」

日時： 平成24年10月29日（月）16時～18時

場所： 管理棟3階 大会議室

研究責任者： 小松 直樹、 木村 隆英 （生命科学講座）  
寺島 智也、 前川 聡 （内科学講座）  
椎野 顯彦、 犬伏 俊郎 （MR 総合研究センター）  
藤野 和典、 江口 豊 （救急集中治療医学講座）  
小島 秀人、 木村 博 （生化学・分子生物学講座）  
柏木 厚典 （病院長）

司会： 小笠原 一誠 （疾患制御病理学）

### 講演者と演題：

小松 直樹 ナノダイヤモンドのドラッグキャリアへの応用

寺島 智也 分子ZIPコード標識による超ウイルスベクターを用いたピンポイント遺伝子輸送

椎野 顯彦 フェージディスプレイ法を用いた分子標的造影剤の開発 -マウス膵臓の $\beta$ 細胞の造影-

藤野 和典 肝血管走行改変と遺伝子治療による全膵機能再生の試み

小島 秀人 糖尿病合併症を誘導する異常骨髄細胞の同定と新規治療の開発

### はじめに

再生医療とは「損傷を受けた生体機能を、幹細胞などを用いて復元させる医療」と定義される。具体的には、幹細胞からの臓器の分化誘導とその移植、遺伝子や薬物による *in vivo* での体性幹細胞への治療、がんや遺伝子異常症の遺伝子治療、さらにこれらを融合させたものであり、夢の医療への期待はすべての診療科へと膨らんでいる。しかし、実用化のためには根幹を成

す二つの基本要素の完成が必須である。第一は安全に取り扱える幹細胞、第二は *in vivo* で遺伝子や薬物を確実に標的細胞へと運べる薬物輸送システム（drug delivery system: DDS）である。

第一の要素である幹細胞については、ES細胞やiPS細胞などでは培養状態で細胞に遺伝子や薬剤を加えることで分化・増殖を制御し、目的細胞へと誘導し、そこに先端技術を駆使した新たな利用法が次々と開発されている。しかし、体の中に隠れて存在する体性幹細

胞や、一旦移植した幹細胞に操作を加える場合には、目的細胞だけにアプローチする良い手段がない。例えば、がんや一部の慢性進行性疾患では、根治標的であるがん幹細胞や変異幹細胞は、現在の技術では所在が確定できない。たとえ推定できても、小さい病変の画像化には限界がある。さらに、体内で直接臓器再生を目指す場合にも、輸送標的である体性幹細胞はごく微量である。予期せぬ副作用を避けるためには、目的細胞のみを確実に標的化できる技術が鍵となる。

この研究グループでは、体内の特定の細胞に対し、分子住所コード (molecular ZIP-code) と名付けたアミノ酸7桁の分別コードを採取する。それをトランスレショナル・リサーチで生み出される画期的な薬物と一体化させ、郵便番号のように使用して分子イメージング、治療、さらに臓器再生への利用を試みる(図1)。

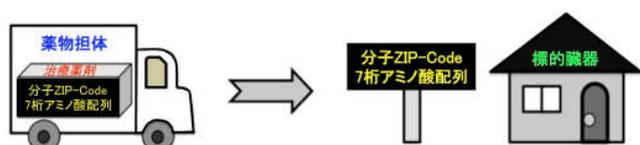


図1. 分子住所コードの概念図

今回の発表では、まだ分別コードは基礎研究段階としか言えないが、今後の発展しだいでは、個別化医療の担い手として再生医療の実現に貢献できるのではないかと考えている。

すべての研究は始まったばかり。今後、多くの研究者が参加し、再生医療の未来を切り開く滋賀医科大学発の新しい治療戦略となることを念じている。

(文責、小島秀人)

# ナノダイヤモンドのドラッグキャリアへの応用

小松直樹, Zhao Li

滋賀医科大学 生命科学講座・化学

## Nanodiamond as a multifunctional vehicle for DDS

Naoki KOMATSU and Li ZHAO

Department of Chemistry, Shiga University of Medical Science

**Abstract** Biomedical applications of nanoparticles have been attracting growing interest as a drug carrier and an imaging probe. In this context, we are focusing on the nanodiamond because of the low-toxic and surface-modifiable nature. In this paper, we will report on the progress on the application of nanodiamond and other nanoparticles as a drug carrier and an imaging probe; 1) solubilization in a physiological environment by surface functionalization with polyglycerol, 2) size separation by size exclusion chromatography, 3) immobilization of targeting moiety such as peptide, and 4) drug and gene loading, shipping, and releasing.

**Keyword** Nanodiamond, drug carrier, drug delivery, gene delivery

### はじめに

遺伝子を含むさまざまな薬剤を輸送する手段は drug delivery system (DDS) と総称される。これには、一般治療薬の輸送のみならず、体性幹細胞を標的として臓器再生を目指す遺伝子治療なども含まれる。このような次世代先端医療を支える新しい DDS デバイスの条件として、日常臨床に直結する安全なものであると同時に、確実に標的を捉えられる新手法の開発が期待されている。我々のグループでは、独自に開発したナノダイヤモンドの修飾法に新たな標的化技術を加え、様々な用途に対応できる、拡張性、柔軟性、汎用性を兼ね備えた DDS “ナノ” デバイスの合成法を確立したので、報告する。

### ナノダイヤモンドの可溶化およびサイズ分離

酸化処理のなされたナノダイヤモンドは、純水中では、安定な溶液を形成するものの、イオン存在下では、すぐに凝集が起こり沈降する[1]。即ち、ナノダイヤモンドの生体環境下での溶解性はきわめて低く、これがボトルネックとなって、本格的な生体イメージング素子への展開は未だなされていない。実際、蛍光ナノダイヤモンドの応用は、細胞ラベリングに関する多くの

例と透明な線虫のイメージングが一例報告されているのみである [2]。このような背景において、ナノダイヤモンドの真の生物医療応用を目指す第一歩として、ナノダイヤモンドの表面をポリグリセロールにより修飾することで、生体環境下でも十分な溶解性を持つナノダイヤモンドを作成することに成功した [3]。また、この高い溶解性を活かして、ナノダイヤモンドのサイズ排除クロマトグラフィー (SEC) によるサイズ分離にも成功した [3-10]。同様の方法論は、ナノダイヤモンドのみならず、金属酸化物のナノ粒子にも適用可能であることが明らかとなった。具体的には、酸化亜鉛ナノ粒子 [11]、酸化鉄ナノ粒子なども [12]、ポリグリセロールにより被覆され、高い溶解性を示すこと、さらに、ナノダイヤモンドと同様、SEC によりサイズ分離がなされることを明らかとした。

### 標的指向性部位の結合

生体環境下で溶解したナノダイヤモンド、もしくはナノ粒子を狙ったところに送り込むためには、特定の組織や細胞、あるいは、そこに偏在するタンパク質等に親和性のある標的指向性部位をナノ粒子上に結合させる必要がある。そのため、図 1 に示すような古典的な有機合成反応により、ポリグリセロールの水酸基を変換し、最終工程では、クリックケミストリーと呼ば

Received November 20, 2006

Correspondence: 滋賀医科大学 生命科学講座・化学 小松 直樹

〒520-2192 大津市瀬田月輪町 nkomatsu@belle.shiga-med.ac.jp

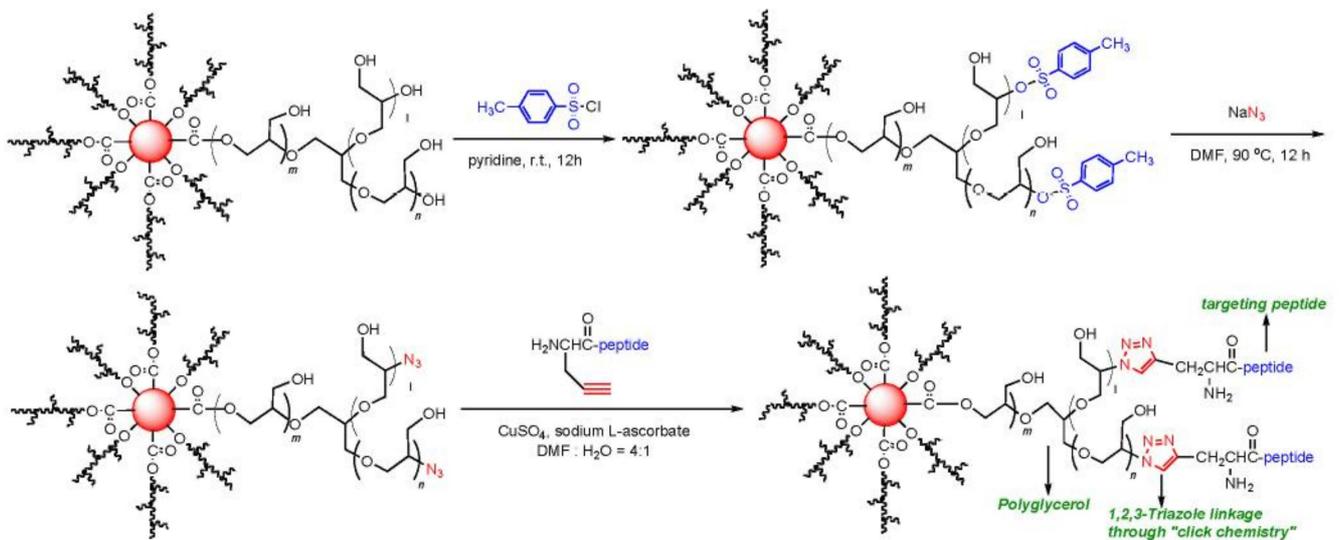


図1 ポリグリセロール上での官能基変換に基づく標的指向性部位の結合

れる反応を用い、各種ペプチドをナノ粒子最表面に、共有結合を介して固定する方法論を確立した[12]。本法により RGD ペプチドを固定した酸化鉄ナノ粒子を作成し、これをガン細胞 (HeLa, U87MG, A549) 培養液中に共存させ、よく洗浄した後、鉄染色を行ったところ、RGD ペプチドの受容体である  $\alpha_v\beta_3$ -integrin が過剰に発現している U87MG, A549 では、鉄由来の青色が確認された。一方、HeLa は、ほとんど染色されなかった[12]。ナノ粒子上に固定したペプチドの標的指向性を *in vitro* で確認した。

## 薬剤の担持、運搬、徐放

DDS の完成を目指し、抗ガン剤を配位結合により担持したナノダイヤモンドやプラスミドをイオン結合により担持したナノ粒子など、薬剤を担持した各種ナノ粒子を合成した。これを用いて、今後、*in vitro*, *in vivo* での検討を行う。それと同時に、蛍光ナノダイヤモンドや磁性ナノ粒子を用いた光、MRによるイメージングについても検討していく予定である。

## 文献

- [1] Takimoto, T, Chano, T, Shimizu, S, Okabe, H, Ito, M, Morita, M, Kimura, T, Inubushi, T, Komatsu, N Preparation of fluorescent diamond nanoparticles stably dispersed under physiological environment through multi-step organic transformations. *Chem Mater*, 22: 3462-3471, 2010.
- [2] Mohan, N, Chen, C-S, Hsieh, H-H, Wu, Y-C, Chang, H-C In vivo imaging and toxicity assessments of fluorescent nanodiamonds in *caenorhabditis elegans*. *Nano Lett*, 10: 3692-3699, 2010.
- [3] Zhao, L, Takimoto, T, Ito, M, Kitagawa, N, Kimura, T, Komatsu, N Chromatographic separation of

highly soluble diamond nanoparticles prepared by polyglycerol grafting. *Angew Chem Int Ed*, 50: 1388-1392, 2011.

- [4] 小松直樹. ナノ炭素材料 (カーボンナノチューブ、ナノダイヤモンド) を仕分ける. *粉体技術*, 2: 28-36, 2010.
- [5] 瀧本竜哉, 森田陽一, 門田直樹, 青沼秀児, 木村隆英, 小松直樹. 医療応用を目指したナノダイヤモンドの表面官能基化とサイズ分離. *ケミカルエンジニアリング*, 54: 947-951, 2009.
- [6] 小松直樹. ナノダイヤモンドの医学的応用. *機能材料*, 29: 23-29, 2009.
- [7] 小松直樹. 生物・医療応用を目指したナノダイヤモンド粒子のサイズ分離と表面化学修飾. *表面科学*, 30: 273-278, 2009.
- [8] 小松直樹. 医療応用. *ダイヤモンド技術総覧*, 第9章 3・7: 683-687, 2007.
- [9] 小松直樹. ナノ医療を目指したナノ炭素材料科学. *ケミカルエンジニアリング*, 51: 941-944, 2006.
- [10] 小松直樹, 門田直樹, 木村隆英. ナノダイヤモンドの表面化学修飾とその物性に与える影響. *New Diamond*, 83: 24-25, 2006.
- [11] Zhao, L, Takimoto, T, Kimura, T, Komatsu, N Polyglycerol functionalization of zno nanoparticles for stable hydrosol in physiological media. *J Indian Chem Soc*, 88: 1787-1790, 2011.
- [12] Zhao, L, Chano, T, Morikawa, S, Saito, Y, Shiino, A, Shimizu, S, Maeda, T, Irie, T, Aonuma, S, Okabe, H, Kimura, T, Inubushi, T, Komatsu, N Hyperbranched polyglycerol-grafted superparamagnetic iron oxide nanoparticles: Synthesis, characterization, functionalization, size separation, magnetic properties, and biological applications. *Advanced Functional Materials*, 22: 5107-5117, 2012.

## 分子 ZIP コード標識による超ウイルスベクターを用いた ピンポイント遺伝子輸送

寺島 智也<sup>1)</sup>, 小島 秀人<sup>2)</sup>, 大井 二郎<sup>1)</sup>, 川合 寛道<sup>1)</sup>, 前川 聡<sup>1)</sup>

1) 滋賀医科大学 内科学講座 (糖尿病・腎臓・神経内科)

2) 滋賀医科大学 分子遺伝医学講座

## Super viral vector for pinpoint gene transfer by molecular ZIP-code

Tomoya TERASHIMA<sup>1)</sup> Hideto KOJIMA<sup>2)</sup>, Jiro OI<sup>1)</sup>, Hiromichi KAWAI<sup>1)</sup> and Hiroshi MAEGAWA<sup>1)</sup>

1) Department of Medicine, Shiga University of Medical Science

2) Department of Molecular Genetics in Medicine, Shiga University of Medical Science

### Abstract

"Molecular ZIP-code" is very small size of peptide, which be able to target to specific tissues or cells, recently considered as one of the remarkable material for molecular imaging or therapy. In this study, we engineered the new therapeutic strategy to realize pinpoint gene transfer with "Molecular ZIP-code" inserted into helper-dependent adenovirus vectors (HDAd). We identified three different types of dorsal root ganglion (DRG) "Molecular ZIP-code" which could specifically bind to DRG neurons. Each ZIP-code were separately inserted into the fiber of helper virus detargeted for its native tropism (coxsackie and adenovirus receptor and heparan sulfate proteoglycan binding site). We generated the DRG-targeting HDAd with the use of DRG-targeting helper virus, injected the HDAd into intrathecal lesion of mice and evaluated the transduction efficiency. Most effective HDAd produced a 100-fold higher transduction of DRG neurons than non-targeting vector and three different kinds of DRG-targeting HDAd showed the different transduction patterns in the cell size distribution of DRG neurons. We succeeded to develop a new strategy to produce HDAd that specifically target DRG neurons. The development of the strategy in this communication using the much more versatile and far less toxic HDAd should facilitate its possible application in clinical trials for DRG neuropathies in the near future.

**Keyword** Molecular ZIP-code, helper-dependent adenovirus vectors (HDAd), gene transfer, dorsal root ganglion (DRG)

### 1. はじめに

近年、全身臓器または組織は非常に短鎖なペプチドで標識されることが報告され、それらペプチドが生体内で臓器の場所を示すことから、体内の郵便番号のように捉え、「Molecular ZIP-code (分子 ZIP コード)」と称され、分子診断や分子治療への応用性が期待されている[1]。

そこで、我々はこの「分子 ZIP コード」を用いて組織特異的遺伝子治療ベクターの開発に着手することにした。使用するベクターとしては、以前より安全性が

高いことで注目されている「ヘルパー依存型アデノウイルスベクター」[2]である。また、標的組織としては、以前より我々が精通している後根神経節 (DRG) [3,4]を用いた。

具体的には、①DRG 標的分子 ZIP コードの同定、②ZIP コードのアデノウイルス (ヘルパーウイルス) への挿入、③DRG 標的ヘルパー依存型アデノウイルスベクターの作成および効果判定、の順に検討を行った。

### 2. DRG 標的分子 ZIP コードの同定

Received November 30, 2012

Correspondence: 滋賀医科大学内科学講座 (糖尿病・腎臓・神経内科) 寺島 智也

〒520-2121 大津市瀬田月輪町 tom@belle.shiga-med.ac.jp

組織標的ペプチドを検索するために、ファージライブラリーキット (New England BioLab) を用いた *in vitro* ファージディスプレイ (図 1) [1] を行った。このキットは、ファージの親和性を決定していると言われる先端部に 7 つのアミノ酸をランダムに発現するように調整されている。このファージ  $10^{12}$  pfu を神経細胞以外の細胞に吸収させ、結合しなかったファージを DRG ニューロンと反応、結合したファージを回収、増幅を行った。この過程を 5 回繰り返し、DRG に対して親和性、特異性の高いファージを決定し、そのアミノ酸配列の同定を行った。

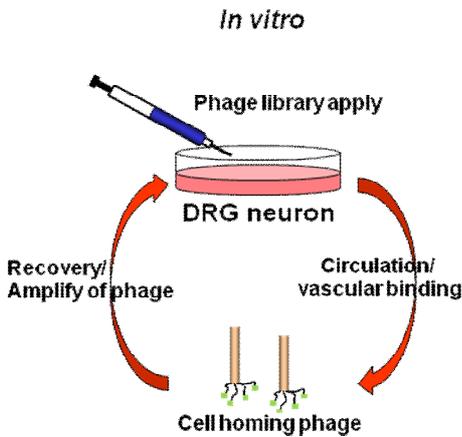


図 1. ファージディスプレイ法を用いた DRG 標的分子 ZIP コードの同定

その結果、DRG1:C-SPGARAF-C, DRG2:C-DGPWRK M-C, DRG3:C-FGQKASS-C, の三種類の DRG 標的分子 ZIP コードを同定した[5]。

### 3. ZIP コードのアデノウイルス (ヘルパーウイルス) への挿入

同定した DRG 標的分子 ZIP コードをアデノウイルスに挿入するが、一般的にアデノウイルスが感染する際に結合する部位が分子 ZIP コードの効果を低下させてしまうと考え、共通結合部位を改変したものを用いることとした。アデノウイルスには、ファイバーと呼ばれる構造があり、その先端に近いノブ部分 (fiber knob) にコクサッキーアデノウイルスレセプター (CAR) 結合部位を、シャフトの部位 (fiber shaft) にへ

パラン硫酸塩 (heparan sulfate) 結合部位を有している。それらの結合能力を欠失させたファイバー遺伝子をプラットフォームとして用いることとした (図 2) [6]。

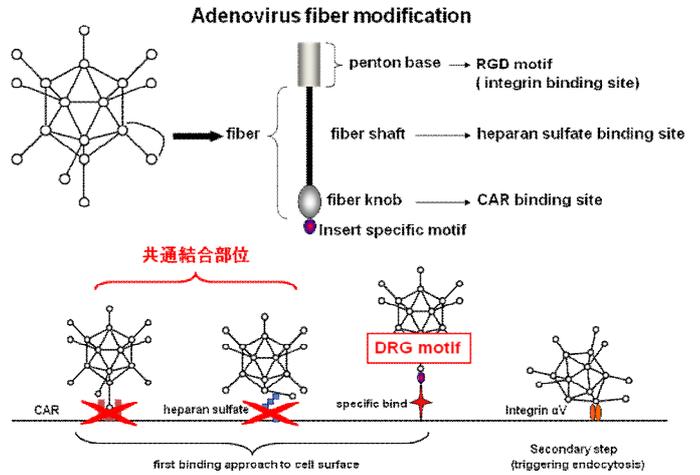


図 2. アデノウイルスへの DRG 標的分子 ZIP コードの挿入

またファイバーの基部であるペントンベース (penton base) に存在する RGD モチーフ (インテグリン結合部位) については、ウイルスパーティクルが細胞内に取り込まれるために必須であり、温存とした(図 2) [7]。目的の DRG 標的分子 ZIP コードは、ファイバーノブの先端部分に制限酵素サイトを作成後に遺伝子配列の改変を行うことにより挿入した。

次に、DRG 標的分子 ZIP コードを挿入したアデノウイルスベクターのターゲティング効果を確認するために、改変したアデノウイルスベクターをマウス髄腔内への注射を行った。その結果、投与 2 日後の DRG 組織で、改変ウイルスベクターが見事にターゲティングし、輸送遺伝子 (この場合 lacZ のレポーター遺伝子) から合成された蛋白が発現していることが分かる (図 3)。実体顕微鏡下にて、神経線維部分での発現はほとんど認められず、神経節のみで発現を認め、さらには神経細胞の形態が丸く観察される (詳細は、切片で確認済み)。発現程度は、DRG1>DRG2>DRG3 の順に高発現を認めた[8]。

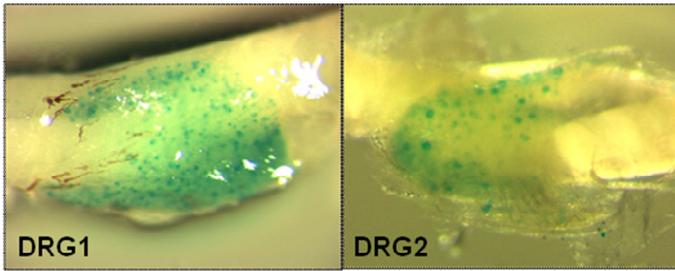


図 3. DRG 標的アデノウイルスの発現効果  
(青色: X-gal 染色、実体顕微鏡下にて)

#### 4. DRG 標的ヘルパー依存型アデノウイルスベクターの作成および効果

DRG 標的化アデノウイルスベクターが組織特異的遺伝子輸送に効果的であることより、安全性の高いヘルパー依存型アデノウイルスベクターへの応用が可能であると考え、DRG 標的ヘルパー依存型アデノウイルスベクターの作成を行った。作成したベクターをアデノウイルスの際と同様に、髄腔内に投与し、ターゲティングの効果を判定した。図 4 に示されるように、DRG1-3 の DRG 標的分子 ZIP コードにて標的化したヘルパー依存型ウイルスベクターは、野生型(WF)に比較し、GFP 蛋白の強い発現を認め、その程度は、特に DRG1, DRG2 にて強い傾向にあった[8]。

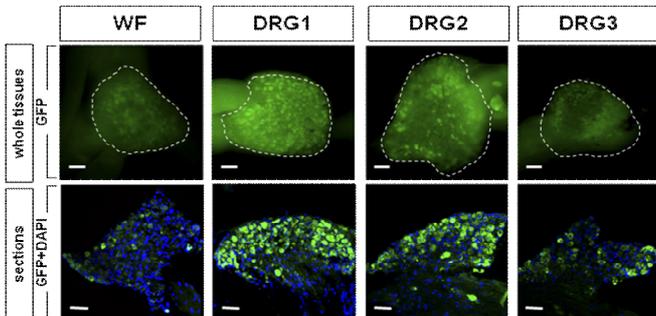


図 4. DRG 標的ヘルパー依存型アデノウイルスベクターによるターゲティング(上段:実体顕微鏡(DRG 組織)、下段:蛍光顕微鏡(DRG 切片))

#### 5. 超ウイルスベクター(組織特異的標的ヘルパー依存型アデノウイルスベクター)の有用性

今回、我々は、分子 ZIP コードを利用して、組織特異的標的ヘルパー依存型アデノウイルスベクターの作成に成功した。このウイルスベクターシステムは、効

率よく目的の臓器(組織)のみに遺伝子を輸送できるため、最小限のベクター量にて高蛋白発現(遺伝子治療効果)が期待できる。更に、他の臓器(組織)への副作用を最小限に抑えられるだけでなく、目的臓器(組織)に対しても、ウイルス毒性などの影響を最小限にとどめることを可能とする”超ウイルスベクター”である。今回の検討では、DRG を標的としたが、全身の各臓器(組織)の分子 ZIP コードが明らかになれば、目的の遺伝子を目的の部位のみに運ぶ理想的な遺伝子輸送システムの構築も可能とするものと考えられる。

#### 文献

- [1] Giordano RJ, Cardó-Vila M, Lahdenranta J, Pasqualini R, Arap W. Biopanning and rapid analysis of selective interactive ligands. *Nat Med*, 7(11):1249-53, 2001
- [2] Oka K, Chan L. Construction and characterization of helper-dependent adenoviral vectors for sustained in vivo gene therapy. *Methods Mol Med*, 108:329-50, 2005
- [3] Terashima T, Yasuda H, Terada M, Kogawa S, Maeda K, Haneda M, Kashiwagi A, Kikkawa R. Expression of Rho-family GTPases (Rac, cdc42, RhoA) and their association with p-21 activated kinase in adult rat peripheral nerve. *J Neurochem*, 77(4):986-93, 2001
- [4] Terashima T, Kojima H, Fujimiya M, Matsumura K, Oi J, Hara M, Kashiwagi A, Kimura H, Yasuda H, Chan L. The fusion of bone-marrow-derived proinsulin-expressing cells with nerve cells underlies diabetic neuropathy. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102(35):12525-30, 2005
- [5] Oi J, Terashima T, Kojima H, Fujimiya M, Maeda K, Arai R, Chan L, Yasuda H, Kashiwagi A, Kimura H. Isolation of specific peptides that home to dorsal root ganglion neurons in mice. *Neurosci Lett*, 434(3):266-72, 2008
- [6] Kritz AB, Nicol CG, Dishart KL, Nelson R, Holbeck S, Von Seggern DJ, Work LM, McVey JH, Nicklin SA, Baker AH. Adenovirus 5 fibers mutated at the putative HSPG-binding site show restricted retargeting with targeting peptides in the HI loop. *Mol Ther*, 15(4):741-9, 2007
- [7] Koizumi, N, Mizuguchi, H, Sakurai, F, Yamaguchi, T, Watanabe, Y and Hayakawa, T. Reduction of natural tropism to mouse liver by fiber-shaft exchange in combination with both CAR- and  $\alpha$  v integrin-binding ablation. *J Virol*, 77:13062-72, 2003
- [8] Terashima T, Oka K, Kritz AB, Kojima H, Baker AH, Chan L. DRG-targeted helper-dependent adenoviruses mediate selective gene delivery for therapeutic rescue of sensory neuropathies in mice. *J Clin Invest*, 119(7):2100-112, 2009

## ファージディスプレイ法を用いた分子標的造影剤の開発 マウス膵臓の $\beta$ 細胞の造影

椎野顯彦<sup>1)</sup>, 小島秀人<sup>2)</sup>, 小松直樹<sup>3)</sup>, 小畑利之<sup>4)</sup>, 寺島智也<sup>4)</sup>, 前川聡<sup>4)</sup> 犬伏 俊郎<sup>1)</sup>  
柏木厚典<sup>5)</sup>

- 1) 滋賀医科大学 MR 医学総合研究センター
- 2) 同 医学部 生化学、分子生物学講座
- 3) 同 医学部 生命科学講座
- 4) 同 医学部 内科学講座
- 5) 同 附属病院 病院長

## Development of molecular contrast agent using phage display MR imaging of mouse pancreatic beta-cells

Akihiko Shiino<sup>1)</sup>, Hideto Kojima<sup>2)</sup>, Naoki Komatsu<sup>3)</sup>, Toshiyuki Obata<sup>4)</sup>, Tomoya Terashima<sup>4)</sup>, Hiroshi Maegawa<sup>4)</sup>, Toshiro Inubushi<sup>1)</sup> and Atsunori Kashiwagi<sup>3)</sup>

- 1) Biomedical MR Science Center, Shiga University of Medical Science
- 2) Department of Molecular Genetics in Medicine, Shiga University of Medical Science
- 3) Department of Chemistry, Shiga University of Medical Science
- 4) Department of Medicine, Shiga University of Medical Science
- 5) University Hospital, Shiga University of Medical Science

### Abstract

We developed molecular contrast agent for mouse pancreatic beta-cells. Peptide targeting beta-cells have been selected by phage display method. For MR contrast, we conjugated the peptide probe with superparamagnetic iron oxide. After tail vein injection of the agent, MR images of normal and streptozotocin-induced diabetic mice were acquired by 7T MR scanner. The pancreas of the normal mice was well enhanced 30 to 60 minutes after the injection, but the pancreas of diabetic mice was not. These results indicate that the contrast agent has effectively enhance pancreatic beta-cells and has potential for clinical use.

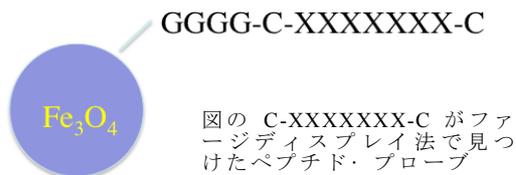
**Keyword** Molecular target, Magnetic resonance imaging, phage display, pancreatic beta-cell

## 1. はじめに

癌やリウマチの治療に分子標的薬が開発され、臨床の場で大きな成果が得られている。これらの薬は標的細胞がもつ特異的な構造物を分子レベルでとらえ、それを標的として効率よく作用するように開発されている。我々のグループが目指しているものは、分子標的プローブの生体内での動態を可視化することにより、**drug delivery system(DDS)**を含めたより効率的な診断や治療に役立つ物質を開発することである。例えば、糖尿病における膵臓のβ細胞の画像化と定量化ができれば、診断や治療効果の判定に極めて有用であるばかりではなく、残存するβ細胞に選択的な治療物質を送り込むことにより新しい治療の開発も可能になる。我々はファージディスプレイ法で発見したペプチドをプローブとして用いることにより、マウスの膵β細胞の描出がMR装置で可能であるかどうかを検討した。

## 2. 方法と結果

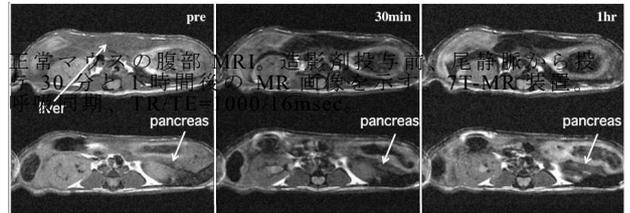
ファージディスプレイ法は、任意のペプチド遺伝子をファージのカプシド構成タンパク質の遺伝子(pIII)に組み込むことによって、標的分子に結合するペプチドや抗体(Fc領域)を提示する方法で、1985年にGeorge P. Smithによって報告された<sup>1)</sup>。7つのアミノ酸を挿入した場合には、アミノ酸20種類の7乗(20<sup>7</sup>)、約10億種類のペプチドをファージに表出させることが可能となる。我々はこの手法を用いてマウスのβ細胞に特異的に結合するペプチド・プローブの配列を発見し、病理組織学的にこのプローブがβ細胞周辺の血管内皮に特異的に結合していることを確認した。ファージディスプレイ法の詳細は、別記、寺島らの報告を参照されたい。次にこのプローブにリンカーを介してsuperparamagnetic iron oxide(SPIO)に結合させることによりMRI用の造影剤を作製した。造影剤のためのnano-particleの詳細は、別記、小松らの報告を参照されたい。



このように作製された造影剤をマウスの尾静脈から投与し、1時間ごとに内臓を摘出しMRIで撮像した結果、膵臓が造影されていることを確認した。病理組織標本

で、造影剤静注後30分から1時間でSPIOの濃度が膵臓で高いことを確認した。

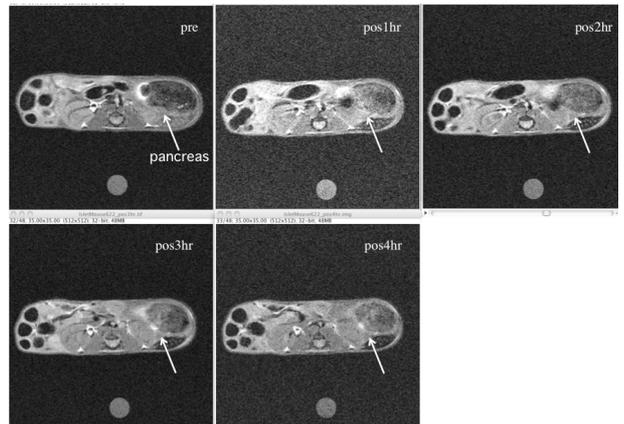
次に生体マウスにおけるMR造影効果を調べてみた。結果、図に示すように肝臓と脾臓の他、膵臓が造影されていることが判明した。



同様にストレプトゾトシン(STZ)で処理した糖尿病マウスで撮像してみると、図のように投与後4時間経過しても膵臓の造影は認められなかった。造影剤投与後のマウスは、実験から1週間以上経過しても状態に変化なく、元気であった。

## 3. 考察

MRIの分子イメージングで問題となるのは造影効果の検出感度が低いことである。造影剤が標的に集まる濃度を同じと考えた場合、MRIはPETの1万分の1程度の感度しかない。細胞膜のレセプターの密度は10<sup>-9</sup>-10<sup>-13</sup>mol/g of tissue程度であり、MRIで検出できる



STZマウスの腹部MRI。造影剤投与前、投与1から4時間後のMR画像を示す。膵臓右したの脾臓は造影されているにもかかわらず、膵臓が造影されていないことがわかる。7T-MR装置。呼吸同期、TR/TE=1000/16msec。

造影剤の最低濃度は、Gadoteridol(ProHance®)で5\*10<sup>-7</sup>mol/g、G6デンドリマー(200程度のGd-DTPA)で1.9\*10<sup>-10</sup>mol/g、SPIOで1.6\*10<sup>-11</sup>mol/gと言われている<sup>2)</sup>。解決策として数多くのGdを付着させることにより造影効果を高める手法が考案され、その担体とし

は、デンドリマー、リポソーム、ミセル、アポフェリチン、ナノチューブや量子ドットなどのナノ粒子がある。しかしながら、Gd の数が多くなるほど分子量も大きくなる傾向があり、標的組織への誘導が難しくなる。そこで我々は、造影物質として Gd は困難と考えマグネタイトを用いることにした。マグネタイトは強磁性体であり、MRI の磁場に強い変化をもたらすため、T<sub>2</sub> 強調画像では信号強度の低下をもたらす。今回の結果は、プローブのない SPIO では肝臓と脾臓のみが造影され、脾臓が造影されないこと、STZ 処理をした糖尿病マウスにおいては、健常マウスと比較して脾臓の造影が悪かったことから、病理の結果もふまえて、この分子標的造影剤が脾臓の  $\beta$  細胞に関連した造影効果を示している可能性は十分あると思われる。今後、 $\beta$  細胞やインスリン分泌量と造影効果との相関の有無やこのプローブがヒトの  $\beta$  細胞にも適応できるかの検討が必要である。

## 文献

- [1] Smith GP. Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science*, 14(228):1315-1317, 1985.
- [2] Geraldès CF, Laurent S. Classification and basic properties of contrast agents for magnetic resonance imaging. *Contrast Media Mol Imaging*, 4:1-23, 2009.

## 肝血管走行改変と遺伝子治療による全膵機能再生の試み

藤野 和典<sup>1)</sup>, 小島 秀人<sup>2)</sup>, 松村 一弘<sup>1)</sup>, 樫 美和子<sup>2)</sup>, 寺島 智也<sup>3)</sup>, 小川 暢弘<sup>3)</sup>  
江口 豊<sup>1)</sup>

1) 救急集中治療医学講座

2) 分子遺伝医学講座

3) 内科学講座

## Regeneration of a whole pancreatic function by a bloodstream modification and a specific gene transfer to the liver

Kazunori FUJINO<sup>1)</sup>, Hideto KOJIMA<sup>3)</sup>, Kazuhiro MATSUMURA<sup>1)</sup>, Miwako Katagi<sup>3)</sup>, Tomoya TERASHIMA<sup>2)</sup>, Nobuhiro OGAWA<sup>2)</sup> and Yutaka EGUCHI<sup>1)</sup>

1) Critical and Intensive Care Medicine

2) Department of Molecular Genetics in Medicine

3) Department of Medicine

It has been reported that both pancreatic transplantation and islet cell transplantation are beneficial for patients following an extensive pancreatectomy and for patients who have type 1 diabetes mellitus. However, after transplantation, these patients experience the side effects of immunosuppressants and the rejection response. A new therapy to replace transplantation for pancreatic insufficiency is strongly desired. We are seeking a method to regenerate complete pancreatic function using the liver, because the liver and pancreas have the same embryological origin. In our previous studies, we produced a virus vector with the pdx-1 gene, which is well known to be a master gene for pancreatic differentiation, cloned into the helper-dependent adenovirus, and we then administered it to diabetic mice. Although we found cells that produced both insulin and trypsin in the liver portal area, these mice died of fulminant hepatitis because of the pancreatic exocrine enzyme produced by the regenerated cells. Therefore, we think that changing the mode of administration from the tail vein to the bile duct in retrograde fashion to part of the liver might prevent the onset of hepatic failure. The most important difference between the liver and pancreas is that the liver receives its blood supply from the portal vein. To regenerate a pancreas in the liver, we observed that changes occurred in the liver after ligation of the right portal vein. Surprisingly, cell clusters that produced both insulin and trypsin were observed, but these cells were undifferentiated. These results suggest that modification of blood flow is necessary for the differentiation of the pancreas, and gene therapy is also needed for maturation to pancreatic cells. We are trying to regenerate complete pancreatic function in the liver as a therapy to replace transplantation for pancreatic insufficiency.

### 1. はじめに

膵臓での広範な外科的切除にともなう膵内外分泌不全患者や、毎日のインスリン自己注射が必要な1型

糖尿病患者においては、膵移植ならびに膵島移植による治療の有用性が報告されている[1]。本邦においても、2000年に最初の膵移植が行われた後、脳死移植を中心に増加しており、近年の報告では5年生着率73.3%と

Received January 15, 2013 Accepted: February 20, 2013

Correspondence: 滋賀医科大学救急集中治療医学講座 藤野 和典

〒520-2121 大津市瀬田月輪町 kfujino@belle.shiga-med.ac.jp

欧米と比べて遜色の無い成績を残している[2]。しかし、増え続ける I 型糖尿病患者に対しては、圧倒的にドナー不足の状態が続いていること、免疫抑制剤を使用しつづければならないことが問題点として挙げられる。膵島移植に関しては、2000 年に Edmonton プロトコール[3]が発表された後世界的な広がりを見せ、本邦でも 2004 年に最初の膵島移植が行われたが、5 年インスリン離脱率は 10%しかなく[4]、長期成績不良であった。近年の免疫抑制剤の変更により離脱率は上昇傾向にあるものの、膵移植と同様に免疫抑制剤が必要であることは変わりなく、膵移植、膵島移植のいずれの治療法においても、完全な治療法には至っていないのが現状であり、膵機能不全に対する移植以外の新しい治療法が望まれている。そこで我々は、外科的切除後患者、I 型糖尿病患者の両者に有用である全膵機能再生を試みているが、まだ取りかかったばかりである。今回の報告では、現時点までに達成した結果と、今後の目標につき説明する。

## 2. 膵内分泌細胞の再生

膵臓の再生を考えるに当たり、膵臓以外で膵機能を再生させるための臓器が必要である。そこで我々は、その臓器として肝臓に注目した。肝臓と膵臓は前腸の内胚葉上皮より生じる肝芽、膵芽に由来し、特に腹側膵芽は胆管より発生するとされている。このことから、肝臓と膵臓は発生学的に非常に近い存在であることが示唆され、肝臓は膵臓に分化する能力が備わっているのではと考えた。そして我々は、分化誘導因子である Neuro D ならびに膵島増殖ホルモンである betacellulin の遺伝子を組み込んだ、肝臓に親和性の高いヘルパー依存型アデノウイルス (helper-dependent adenovirus: HDAd) をベクターとして作成し、糖尿病マウスの尾静脈より全身投与を行った。その結果、肝臓内に膵島が再生され、糖尿病マウスの血糖値を正常まで低下させることに成功した[5]。同時に、膵臓再生のマスター遺伝子として知られる分化誘導遺伝子である Pdx-1 を組み込んだ HDAd-Pdx-1 を投与した場合には、インスリン陽性細胞が門脈近傍に出現したものの、その細胞は外分泌酵素であるトリプシンも陽性であった。投与後の血糖値は軽度低下したが、肝逸脱酵素の上昇、ビリルビンの上昇を認め、劇症肝炎に伴う肝不全により、投与後 20 日にて死亡してしまった[5]。

## 3. 全膵機能再生のために

我々はこの一連の研究結果を参考とし、全膵機能を再生させる方法があるのではないかと考えた。まず、

導入すべき遺伝子は、内分泌外分泌ともに再生した Pdx-1 が必要である。しかし、以前の研究に於いては HDAd-Pdx-1 を経静脈的に投与したため、肝全域にわたる遺伝子導入が行われてしまい、肝炎から肝不全に陥ってしまった。この問題の解決策として、HDAd-Pdx-1 の投与範囲を限局することにより、肝不全を予防することが出来るのではないかと考えた。また、投与方法を経静脈的より経胆管的に変更することにより、再生された膵外分泌細胞より分泌される酵素が、胆管を経由して消化管に誘導できるのではないかと考えた。具体的には、マウス肝右葉は比較的他の葉から独立しており (他の葉との融合が殆ど見られない)、右葉のみ HDAd-Pdx-1 投与を行うことが可能である。また、経胆管的に投与するためには、胆嚢にカニュレーションした後、経胆嚢管的に右肝管を経由して、遺伝子治療ベクターを肝右葉のみに投与することが可能であると考えている (図 1)。

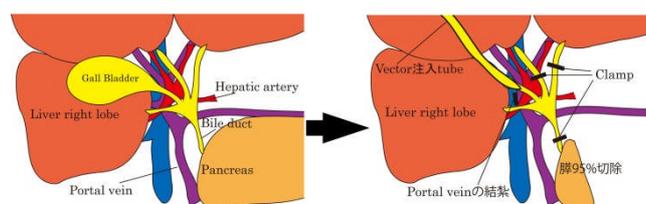


図 1 : マウス肝右葉は他の葉との融合が少なくほぼ独立している (図 1 左)。膵 95% 切除を行い、膵内外分泌不全マウスを作製。その後右門脈を結紮し肝動脈よりのみの血流支配とし (肝血流変化)、胆嚢にカニュレーションを行い、胆嚢管を経由して右肝管に遺伝子治療ベクターを投与する (遺伝子治療) (図 1 右)。

## 4. 門脈血遮断による肝臓の変化

もう一つの問題点として、再生された膵細胞が肝臓内で長期に存続できるか否かが挙げられる。肝臓と膵臓は発生学的に近い存在であるにもかかわらず、成熟臓器としては全く異なっている。他にも発生学的に近い存在として、腸管が挙げられるが、腸管における迷入膵は存在するが、肝内の迷入膵の存在は皆無と言ってよい。また、膵島移植にて肝臓内に移植された細胞は維持されるのが難しいことが報告されており、(移植後 5 年でインスリン注射不要例は 10% (4)) 肝臓には膵臓への分化を抑制する力が働いている可能性が考えられる。肝臓と膵臓のもっとも大きな違いは、膵臓は門脈の上流に存在する一方、肝臓は門脈の下流に存在することであり、門脈血の供給を受けていることにある。我々は、門脈血に膵臓への分化を抑制する働きがあると仮定し、肝臓への血流が動脈血のみになった

場合、つまり肝臓の一つの葉に供給している門脈を結紮遮断することにより、肝内でどのような変化が生じるかを観察した。すると驚いたことに、門脈結紮を行ったマウスにて、遺伝子治療を行っていないにもかかわらず、肝内に膵内外分泌細胞の細胞塊が出現した(図2)。また、2ヶ月(2M)後にはより鮮明となるが、インスリンとトリプシンが局在せず同一細胞に同様に染色されており、未分化な状態であることが示唆された。門脈血液中には、やはり肝臓を膵臓へと分化させないための何かが存在することが強く示唆され、肝臓にて膵臓を再生させる場合には、門脈結紮が必要と考えられた。

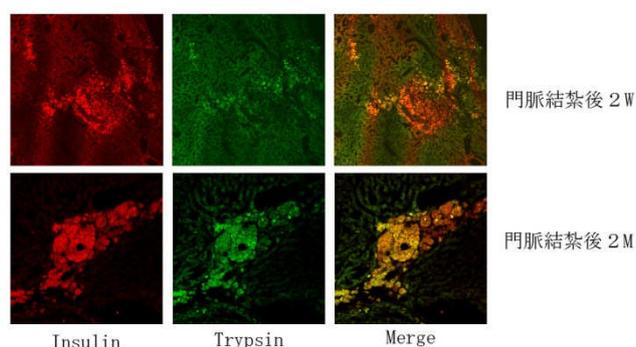


図2：門脈結紮後2週間(2W)にて肝内に出現した細胞塊。抗インスリン抗体、抗トリプシン抗体共に陽性で内外分泌細胞であると考えられる。また、その細胞塊は門脈結紮後2ヶ月(2M)にてより鮮明となったが、インスリンとトリプシンは同一細胞で同様に染色されており、未分化な状態であることが示唆される。

## 5. 今後の展望

以上の結果から、遺伝子治療ベクターの投与法を限局的に、経胆管的に変更することで、肝不全を防ぐことが出来、膵外分泌酵素は消化管へ導かれるようになり、肝血流を改変することにより、再生された膵内外分泌細胞の維持が可能となり、目標とする全膵機能の再生が可能になるのではないかと考えている。今後、マウス膵内外分泌不全モデルマウスを作製し、右門脈結紮による肝右葉の肝血流改変術+右胆管よりの限局的遺伝子治療を行い、全膵機能再生を目指して行きたい。

## 文献

[1] Gruessner A, Sutherland D: Pancreas transplant outcomes for United States(US) and non-US cases as

reported to the United Network for Organ Sharing (UNOS) and the international Pancreas Transplant Registry (IPTR) as of June 2004. Clin Transplant, 19: 433-455, 2005.

- [2] 伊藤壽記、石橋道男：本邦における膵臓移植の現況。膵臓, 26:125-131, 2011.
- [3] Shapiro AM, Lakey JR, Ryan EA, Korbutt GS, Toth E, Warnock GL, Kneteman NM, Rajotte RV: Islet transplantation in seven patients with type 1 diabetes mellitus using a glucocorticoid-free immunosuppressive regimen. N Engl J Med, 343: 289-290, 2000
- [4] Ryan EA, Paty BW, Senior PA, Alfadhli E, Kneteman NM, Lakey JR, Shapiro AM: Five-year follow up after clinical islet transplantation. Diabetes, 54: 2060-2069, 2005.
- [5] Kojima H, Fujimiya M, Matsumura K, Younan P, Imaeda H, Maeda M, Chan L: NeuroD-beta-cellulin gene therapy induces islet neogenesis in the liver and reverses diabetes in mice. Nat Med, 9:596-603, 2003.

## 糖尿病合併症を誘導する異常骨髄幹細胞の同定と新規治療の開発

小島 秀人<sup>1)</sup>, 檜 美和子<sup>1)</sup>, 寺島 智也<sup>2)</sup>, 前川 聡<sup>2)</sup>, 木村 博<sup>1)</sup>

1) 生化学・分子生物学講座

2) 内科学講座

### Erase the evil within the stem cells in diabetes mellitus

Hideto KOJIMA<sup>1)</sup>, Miwako KATAGI<sup>1)</sup>, Tomoya TERAHIMA<sup>2)</sup>,

Hiroshi MAEGAWA<sup>2)</sup> and Hiroshi KIMURA<sup>1)</sup>

1) Department of Biochemistry and Molecular Biology

2) Department of Medicine

#### Abstract

Diabetes therapy has dramatically progressed, but the chronic complications such as microvascular and macrovascular complications are still the important causes of morbidity and mortality rates in diabetic patients. Metabolic perturbations such as oxidative stress, advance glycation end product formation, protein kinase C and NF $\kappa$ B activation, increased polyol flux, and poly(ADP-ribose) polymerase-1 (PARP-1) activation play key roles in the onset of the chronic complications. However, the direct cause is not discovered. Thus, the treatments for the purpose to cure the complications are not established. Recently, we found bone marrow-derived cells that have abnormal characteristics in their stem cell phase, and were related to the onset of the diabetic complications. Here we show some evidences that the abnormal bone marrow-derived cells were formed under the high-glucose toxic condition in the bone marrow stem cells, which was produced by diabetic hyperglycemia, and played a major role as an important pathogenesis of the chronic complications in diabetes mellitus. Based on those results, we will describe some strategies that lead to the development of new treatments against their evil characteristics of the diabetic bone marrow stem cells.

**Keyword** chronic diabetic complications, bone marrow, neuropathy, osteoporosis, proinsulin

#### 1. はじめに

糖尿病は放置すれば死に至る重篤な合併症を併発する。合併症には糖尿病性昏睡のように急性の代謝障害で生じる急性合併症と、大小血管障害や骨粗鬆症な

どのように長期間の高血糖状態が持続することにより出現する慢性合併症に分けられる。近年では新しいインスリン製剤ならびにインスリン治療用デバイスの発達がめざましく、さらに、患者さんへの教育法の進歩もあり、急性合併症のために死に至る例は激減した。しかし、慢性合併症は減るどころか、逆に増加してい

---

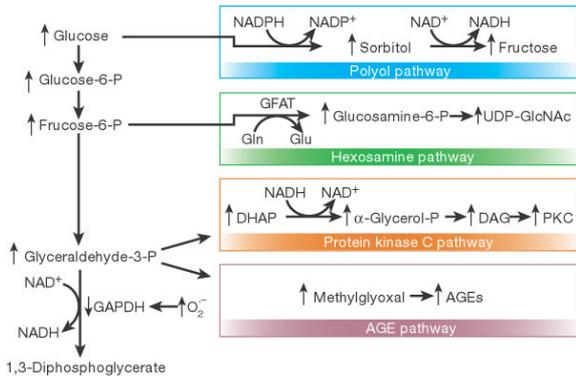
Received January 9, 2013 Accepted: February 20, 2013

Correspondence: 滋賀医科大学生化学・分子生物学講座 小島 秀人

〒520-2121 大津市瀬田月輪町 kojima@belle.shiga-med.ac.jp

る。この原因は、慢性合併症を引き起こす根本的な要因が同定されていないからと考えられる。

慢性合併症の原因としては、酸化ストレスの亢進、糖化最終産物の増加、C-キナーゼと NF $\kappa$ B の活性化、ポリオール経路の亢進、さらに、最近ではポリ(ADP-リボース)ポリメラーゼ-1 (PARP-1) などが報告されてきた。確かにこれらの変化は高血糖状態に伴う代謝異常が原因として起こってくるものである(図 1) [1]。



(Nature 2001 より改変)

図 1. 高血糖状態に伴う代謝異常と合併症に関与するとされる様々な成因の関係

しかし、これらは糖代謝を是正すると元に戻る可能性が高い。したがって、これらの要因をもって、一旦発症すると進行性で治療困難な糖尿病合併症の病態をすべて説明するのは困難である。

## 2. プロインスリン産生細胞の発見

我々は、ストレプトゾトシン (STZ) によって作成した糖尿病マウスにおいて、遺伝子治療により肝臓内でインスリンを産生する膵島を新生させ、糖尿病を治療させる研究を行っていた。幸い、膵島発生に重要な転写因子である NeuroD1、ならびに膵島の増殖因子 betacellulin の遺伝子治療により、肝被膜下に半月状の膵島をたくさん作り出すことに成功し、マウスのインスリン欠乏型糖尿病は治療した[2]。しかし、驚いたことに、遺伝子治療を全くしていないコントロール糖尿病マウスの肝臓でもインスリンが染色されたのである。ただし、それはインスリンとしての活性をほとんど持たないプロインスリンであった(図 2) [2]。

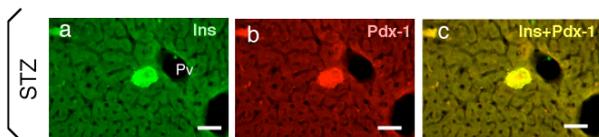


図 2. STZ マウス肝臓におけるプロインスリン産生細胞。インスリンの発現に関与する転写因子 Pdx-1 も同時に陽性を示す。

この現象は、これまで全く報告されていない不思議な現象であった[3]。そこで、STZ 糖尿病だけでなく、遺伝性肥満糖尿病モデルである ob/ob マウス (Ob/Ob)、高脂肪食負荷糖尿病マウス (HFD) などを用いて、様々な臓器でプロインスリンの発現を調べた[4]。その結果、このプロインスリン産生細胞は糖尿病マウスの肝臓だけでなく、脂肪組織や骨髄、脾臓でも出現していた。もちろんすでに報告があるとおり、胸腺では糖尿病、非糖尿病 (Nondiabetic) とともに発現していた (図 3)。

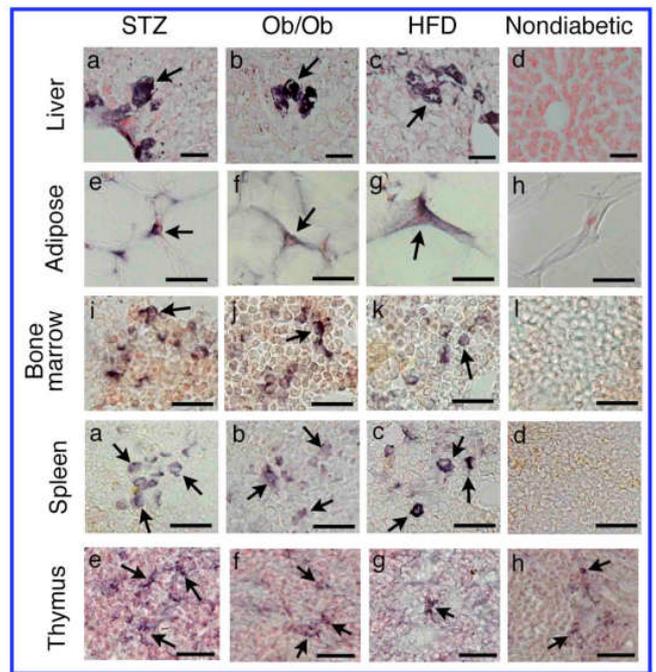


図 3. 糖尿病マウスにおけるプロインスリン陽性細胞の発現。

## 3. プロインスリン産生細胞の病的意義

糖尿病で出現するプロインスリン陽性細胞は決して糖尿病の高血糖を改善させる方向へと働くものではない。このことは、この細胞が出現したからといって血糖値が良くなるわけではないことから明らかである。

では、この細胞はどこから来て何をしようとしているのであろうか? 詳細な検討にて、プロインスリン陽性細胞が本来インスリンを発現するはずのない脂肪組織や肝臓からも出現していることが明らかとなった。そこで、この細胞は他の臓器から遊走してきた細胞である可能性を考え、その臓器とは骨髄由来ではないか

と仮説を立て検討した。放射線照射により、骨髄幹細胞を死滅させたマウスに緑色蛍光色素タンパク質 (GFP) トランスジェニック (TG) マウス骨髄移植を行った後、STZ 糖尿病を作成した。このマウスの臓器を調べたところ予想通り、肝臓、脂肪組織、胸腺、脾臓などに GFP 陽性細胞が染色され、骨髄由来の細胞であることが明らかとなった。しかし、この細胞は、肝臓では肝臓内にある肝細胞やクッパー細胞、さらに星細胞[4-5]、脂肪組織では脂肪細胞[4]というように、臓器本来の主たる細胞の形態をしていた。骨髄幹細胞が様々な臓器へ遊走し、そこでその臓器特異的な細胞へと分化する可能性については報告されている。しかし、ここではその数があまりに多い。さらに肝臓で見られた細胞はたいへん大きく、明らかに異常である。そこで、糖尿病の合併症に関連するような異常な形質を作り出すものではないかと考え、典型的な合併症臓器である末梢神経において骨髄由来の細胞の有無とその性質についての詳細を検討した。

#### 4. 異常な細胞融合現象の発見

非糖尿病マウスでは GFP マウスからの骨髄移植を行っても、傷害のない末梢神経組織(脊髄後根神経節、DRG)では骨髄由来を示す GFP 陽性細胞はほとんど見られない。しかし、糖尿病マウスでは GFP 陽性で、形態学的にも明らかに神経の形態をした細胞がたくさん認められた。骨髄由来の細胞が神経へと遊走し、そこで神経細胞へとどんどん分化しているとは考えにくい。

そこで、細胞融合を証明するために骨髄移植を行う際のレシピエントとして  $\beta$ -ガラクトシダーゼ ( $\beta$ -gal)・トランスジェニックマウス (ROSA マウス)、ドナーとして GFP マウスからの骨髄移植を行い、そのマウスを STZ にて糖尿病として観察した。また、神経細胞の証明は神経特異的なマーカーであるニューロフィラメント (NF) を用いた (図 4)。共焦点顕微鏡での蛍光観察にて、GFP を緑、 $\beta$ -gal を赤、NF を青で示している。光の三原色である緑、赤、青が重なるものは白となり、その細胞が神経細胞で、骨髄から遊走してきた細胞と融合したものであることを示す[6]。

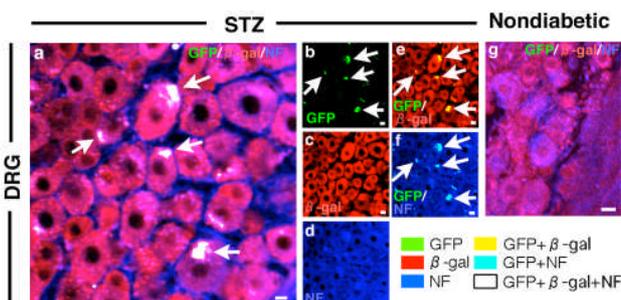


図 4. DRG における神経細胞と骨髄由来細胞の細胞融合。融合細胞を白↓で示す。

図から明らかなように、非糖尿病では白く染色される細胞は全く見られないが、糖尿病では 5-10%の細胞が白く染色されている。

次にこの細胞融合の特徴を検討したところ、以下のような現象が認められた。

- (1) 融合細胞の数は糖尿病罹病期間が長くなるほど増加した。
- (2) 融合細胞ではプロインスリンの発現が陽性であった。
- (3) 糖尿病マウスの DRG 神経細胞を単離しその機能を調べたところ、融合していない細胞では異常が認められなかったが、融合細胞では KCl 刺激による細胞内  $Ca^{2+}$  代謝の異常を認めた。
- (4) 融合細胞からは  $TNF\alpha$  の発現が見られた。
- (5) 融合細胞の発現数と神経伝導速度の低下は罹病期間に比例して変化した。

これらのことから、骨髄細胞との細胞融合により神経細胞に持ち込まれる情報は正常な神経機能を阻害する可能性が示された。

#### 5. 合併症の誘導機序

以上の検討から少なくとも、糖尿病においては、肝臓[5]と神経[6]では骨髄由来でプロインスリンを産生する細胞が臓器固有の細胞と細胞融合しそこで  $TNF\alpha$  を発現し、臓器の機能異常 (脂肪肝や神経障害など) をもたらす可能性が示された。我々はこの他にも脂肪組織において同じようにプロインスリン産生細胞が発現していることを見出している[2]。従って、このような骨髄細胞由来の  $TNF\alpha$  の発現は、インスリン抵抗性の主たる原因となっていることが十分に想定される。

では、この骨髄由来の細胞は他の臓器でも同じように遊走して合併症に関与する異常を作り出しているであろうか。

糖尿病患者では骨折した時には、その回復障害が出現することが知られている[7]。骨折の治癒に働く細胞としては骨芽細胞と破骨細胞が重要とされる。これらは近年では骨髄の間葉系幹細胞に由来するのではないかとの仮説もある。もしそうなら、糖尿病では、骨髄由来の骨芽細胞や破骨細胞に異常があるのではないかと考えた。そこで、糖尿病でこれらの細胞がどのようなになっているのかを検討した[8]。

- (1) GFP マウスから骨髄移植をし、そのマウスを STZ にて糖尿病としたのち、大腿骨骨折を

誘導し、その回復過程を非糖尿病マウスと比較検討した。

- (2) 糖尿病、非糖尿病に関わらず、骨髄由来細胞に比率では破骨細胞の 70-80%、骨芽細胞の 20%が骨髄由来であった。
- (3) 糖尿病では骨芽細胞に明らかな機能変異は見られなかった。しかし、骨折からの治癒起点である仮骨の吸収が遅れ、それにもない治癒の遅延が見られた。このことは破骨細胞の機能低下を意味する。
- (4) そこで、破骨細胞を観察すると、本来細胞融合より細胞体の大きなものがたくさん出現するはずであるが、糖尿病では融合がほとんど起こらず、小さい細胞がほとんどであった。これにより仮骨の吸収が遅くなったものと考えられる。
- (5) この破骨細胞の融合障害の原因として、融合タンパク質の 1 つである DC-STAMP の発現が低下していた。
- (6) 一方、肝臓や神経で見られたプロインスリン陽性細胞の出現は全く認められなかった。

以上より、糖尿病では骨髄幹細胞に由来する破骨細胞の機能障害が生じており、その原因として本来融合すべき細胞が融合せず、十分な機能を発揮できていない可能性が示された。

次に、糖尿病では糖尿病性胃腸障害 (diabetic gastroenteropathy) の 1 つとして消化管の運動障害が知られている。その原因はもっぱら神経障害が主たるものとされてきた。しかし、近年、消化管運動のリズム制御に関わる細胞としてカハールの間質細胞 (interstitial cell of Cajal, ICC) が重要な役割を持つことが報告されている。ICC は自律神経からの刺激を受けペースメーカーとして働き、腸の運動を制御する。その際、Ca<sup>2+</sup>のシグナルによるお互いに刺激を連結して伝えるネットワークを形成している。この腸管の ICC は特異的なマーカーとして c-KIT の染色が用いられている。実際、糖尿病患者では大腸における c-KIT 陽性細胞の数を調べて、ICC の数の減少が報告されている [9]。そこで、これまでの研究と同様に GFP マウスからの骨髄移植モデルを用いて、糖尿病において骨髄由来の細胞が腸管の ICC の発現異常に関与しているかどうかを検討し、以下のような結果を得た [10]。

- (1) 腸管の部位により多少の差はあるものの、糖尿病マウスでは骨髄由来と考えられる GFP 陽性細胞の出現率が低下していた。
- (2) GFP 陽性細胞は c-Kit が陽性のものでないものがあるが、糖尿病では c-Kit 陽性細胞の総和、ならびに GFP 陽性かつ c-Kit 陽性細胞が

減少していた。

- (3) c-Kit ノックアウトマウスでは腸管の動きが障害されることが報告されている。従って、糖尿病では骨髄からの c-Kit 陽性細胞の遊走が低下していることが腸管運動能低下に関与している可能性がある。
- (4) 骨と同様に、肝臓や神経で見られたプロインスリン陽性細胞は全く見られなかった。

上記より、糖尿病性胃腸障害の一部にも、骨髄由来 ICC の減少と機能の変化が関与している可能性が明らかとなった。

以上のことから、糖尿病合併症の発症に関与すると思われる骨髄由来細胞に起きている変化としては以下のようにまとめられる。

- (1) 本来持っていない (細胞融合して融合相手細胞内で TNF $\alpha$  などの細胞傷害性のサイトカインを発現するなど) 機能が発現する。
- (2) 本来の機能が制限され、十分に発揮できない。
- (3) 骨髄から各臓器に遊走して働く細胞の数が減少する。

すべての合併症について検討したわけではないが、これまでの結果より類推すると、正常骨髄から特定の細胞が様々な臓器へと遊走しそこで重要な役割をしている。それらは独自に機能分化した重要な働きを持っている可能性がある。肝臓のクッパー細胞や星細胞、消化管の ICC、脂肪組織の脂肪細胞、骨組織の破骨細胞などがそれである。

一方、これらとは別に、糖尿病では糖尿病特異的に TNF $\alpha$  を産生し、神経細胞や肝細胞と特異的に細胞融合する異常な細胞が出現している。さらに、これに呼応するかのようには、上記に述べた正常状態で常に出現し、様々な臓器内で役割を果たしている骨髄由来の細胞が機能を失ったり、数の減少を来したりしている。このことは高血糖下に骨髄内でこれらの細胞のもとになる細胞、すなわち骨髄幹細胞 (造血幹細胞と間葉系幹細胞を含む) に異常が生じていることを示唆する。

## 6. 合併症は治療できるのか？

ここで話を糖尿病性神経障害に戻す。神経障害では骨髄由来の異常な細胞が DRG 神経細胞に細胞融合し、そこに本来神経で発現するはずのない TNF $\alpha$  の遺伝子を強制発現させ、融合細胞だけでなく、まわりの細胞にも TNF $\alpha$  の悪影響を与えることになる。そのような、半ば外界から加えられた異常な遺伝子発現を元に戻し、神経の正常な機能の回復は可能であろうか？

この点について検討する目的から、すでに慢性関節リュウマチに対する新しい分子標的薬として開発され

ている抗 TNF $\alpha$  抗体薬 (infliximab) のマウス糖尿病性神経障害に対する治療効果を検討した[11]。

- (1) STZ 糖尿病マウスを作成し、すでに神経障害のために坐骨神経の神経伝導速度が低下したマウスに infliximab を投与して2週間の経過を観察した。
- (2) Infliximab は糖尿病マウスの神経障害を完全に治癒させた。
- (3) Infliximab は糖尿病マウスの神経組織で発現している細胞融合によりもたらされた異常な TNF $\alpha$  -mRNA の発現を消失させた (図 5)。

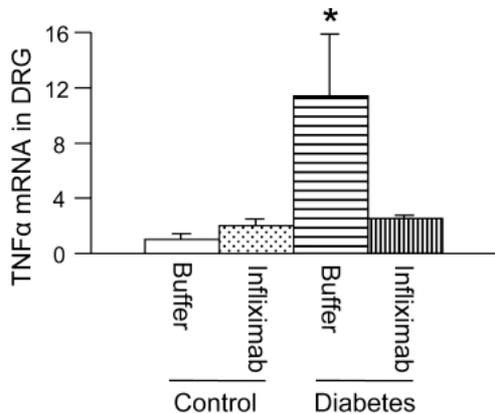


図 5. 糖尿病 DRG 神経細胞での TNF $\alpha$  -mRNA 発現に対する抗 TNF $\alpha$  抗体の作用

以上より、抗 TNF $\alpha$  抗体は神経組織中の TNF $\alpha$  タンパク質を低下させただけでなく、おそらく膜結合型 TNF $\alpha$  に接着し、細胞内の reverse signaling を介して DRG 内で発現している TNF $\alpha$  -mRNA の発現を抑制したことが想定される。また、poly(ADP-ribose) polymerase-1 (PARP-1) 阻害剤にても同様な効果が見られることを報告した[12]。

これらのことは、神経障害が実際に治癒可能な病態であることを明らかにしたものと考えられる。

## 7. 骨髄の異常への標的治療と今後の展望

糖尿病で起こる上記の異常を確実に捉えるためには、正常では出現せず、糖尿病で特異的に現れる細胞を抽出し、異常の正体を明らかにしなくてはならない。この場合、明らかな異常細胞はプロインスリンと TNF $\alpha$  を発現し、神経や幹細胞と細胞融合する能力を持つ細胞である。従って本来では出現するはずのない異常な分化を遂げた細胞が出現していることから、骨髄幹細胞内で、この異常を持つ細胞が無いかどうかを検討

することが重要と考えた。そうすれば、高血糖が正常細胞内に引き起こすより早期の障害を捉えることができ異常細胞の除去するための方法につながると考えた。

現在、骨髄幹細胞分画を採取し、上記で述べてきたプロインスリンや TNF $\alpha$  などの異常な遺伝子発現をマーカーとして解析を進めている。我々は、現在、標的とする細胞のみに遺伝子や薬物を輸送し、治療を行う全く新たな手法を開発しているところである[13]。これにより、実際に神経細胞などと細胞融合する異常細胞や、正常に分化することができない骨髄幹細胞を捉えることができれば、少なくとも一過性に糖尿病ならびに合併症を治癒へと導く治療法の開発も夢ではないと考える[14]。ただし、食事療法と運動療法を守ることができるという条件はいつの時代でも変わらず必須であると考えているのではあるが。

## 文献

- [1] Brownlee M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature*, 414(6865):813-820, 2011.
- [2] Kojima H, Fujimiya M, Matsumura K, Younan P, Imaeda H, Maeda M, Chan L. NeuroD-beta cellulin gene therapy induces islet neogenesis in the liver and reverses diabetes in mice. *Nat Med* 9(5):596-603, 2003.
- [3] Kojima H, Fujimiya M, Terashima T, Kimura H, Chan L. Extrapancratic proinsulin/insulin-expressing cells in diabetes mellitus: is history repeating itself? *Endocr J* 53(6):715-722.
- [4] Kojima H, Fujimiya M, Matsumura K, Nakahara T, Hara M, Chan L. Extrapancratic insulin-producing cells in multiple organs in diabetes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(8):2458-2463.
- [5] Fujimiya M, Kojima H, Ichinose M, Arai R, Kimura H, Kashiwagi A, Chan L. Fusion of proinsulin-producing bone marrow-derived cells with hepatocytes in diabetes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(10):4030-4035, 2007.
- [6] Terashima T, Kojima H, Fujimiya M, Matsumura K, Oi J, Hara M, Kashiwagi A, Kimura H, Yasuda H, Chan L. The fusion of bone-marrow-derived proinsulin-expressing cells with nerve cells underlies diabetic neuropathy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(35):12525-12530, 2005.
- [7] Inzerillo AM and Epstein S. Osteoporosis and diabetes mellitus. *Rev endocr Metab Disord* 5(3):261-268, 2004.
- [8] Kasahara T, Imai S, Kojima H, Katagi M, Kimura H, Chan L, Matsusue Y. Malfunction of bone marrow-derived osteoclasts and the delay of bone fracture healing in diabetic mice.
- [9] Nakahara M, Isozaki K, Hirota S, Vanderwinden JM, Takakura R, Kinoshita K, Miyagawa J, Chen H, Miyazaki Y, Kiyohara T, Shinomura Y, Matsuzawa Y. Deficiency of KIT-positive cells in the colon of patients with diabetes mellitus. *J Gastroenterol*

Hepato 17(6):666-670, 2002.

- [10] Li Y, Kojima H, Fujino K, Matsumura K, Katagi M, Urabe H, Chan L, Eguchi Y, Zhao L, Kimura H. Homing of the bone marrow-derived interstitial cells of Cajal is decreased in diabetic mouse intestine. *J Gastroenterol Hepatol* 26(6):1072-1078, 2011.
- [11] Yamakawa I, Kojima H, Terashima T, Katagi M, Oi J, Urabe H, Sanada M, Kawai H, Chan L, Yasuda H, Maegawa H, Kimura H. Inactivation of TNF- $\alpha$  ameliorates diabetic neuropathy in mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 301(5):E844-852, 2011.
- [12] Terashima T, Kojima H, Chan L. Bone marrow expression of poly(ADP-ribose) polymerase underlies diabetic neuropathy via hematopoietic-neuronal cell fusion. *FASEB J* 26(1): 295-308, 2012.
- [13] Terashima T, Oka K, Kritiz AB, Kojima H, Baker AH, Chan L. DRG-targeted helper-dependent adenoviruses mediate selective gene delivery for therapeutic rescue of sensory neuropathies in mice. *J Clin Invest* 119(7):2100-2112, 2009.
- [14] Chan L, Terashima T, Urabe H, Lin F, Kojima H. Pathogenesis of diabetic neuropathy: bad to the bone. *Ann N Y Acad Sci* 1240:70-76, 2011.

## 第8回 基礎・臨床融合の学内共同研究発表会

### がんにおける遺伝子異常と予後因子について

日時： 平成24年 7月17日（火）

場所： 大会議室（管理棟3階）

司会： 富岡 昌邦（研究協力課課長補佐）

#### 講演者と演題

1. 旦部 幸博 病理学講座（微生物感染症学部門） 学内講師  
「Drs 癌抑制遺伝子による癌化抑制機構」
2. 井上 寛一 病理学講座（微生物感染症学部門） 准教授  
「Cyclin D1b 遺伝子による直腸腫瘍発生機構」
3. 茶野 徳宏 臨床検査医学講座 准教授  
「診療に於ける新規マーカーの探索と適用」
4. 醍醐 弥太郎 臨床腫瘍学講座 教授  
「ゲノム解析に基づいた統合的がん分子病態診断システムの開発研究」

#### はじめに

研究活動推進室（服部隆則副学長）による基礎医学講座と臨床医学講座が融合した学内共同研究プロジェクト推進のため第8回学内共同研究発表会を開催したので報告する。

平成24年 7月17日(火)16時より大会議室（管理棟3階）で、『がんにおける遺伝子異常と予後因子について』というテーマで、旦部幸博先生（病理学講座微生物感染症学部門 学内講師）、井上寛一先生（病理学講座微生物感染症学部門 准教授）、茶野徳宏先生（臨床検査医学講座 准教

授）、醍醐弥太郎先生（臨床腫瘍学講座 教授）に講演いただいた。

馬場忠雄学長はじめ基礎・臨床あわせて31名の出席があり、各演者の講演終了後には、参加者から活発な質疑がなされ、今後の新たな研究の展開や方向性について手掛かりが得られた。

## *drs* 癌抑制遺伝子による癌化抑制機構

旦部 幸博<sup>1)</sup>, 井上 寛一<sup>1)</sup>

1) 病理学講座微生物感染症学部門

## Function of Tumor Suppressor Gene, *drs*

Yukihiro TAMBE<sup>1)</sup> and Hirokazu INOUE<sup>1)</sup>

1) Division of Microbiology and Infectious Disease, Department of Pathology

**Abstract** The *drs* gene was originally isolated as a suppressor of *v-src* transformation. Expression of *drs* mRNA is markedly downregulated in a variety of human cancer cell lines and tissues. Ectopic expression of the Drs protein induced apoptosis in human cancer cell lines via the novel pathway initiated from the endoplasmic reticulum (ER), involving the binding to ASY, apoptosis-inducing proteins localized in ER, and activation of caspase-12, -9, and -3. We generated *drs* knockout (KO) mice and showed that malignant tumors including lymphomas, lung adenocarcinomas and hepatomas were generated in about 30% of *drs* KO mice. These results indicate that *drs* contributes to the suppression of malignant tumor formation, and this suppression is closely correlated with *drs*-mediated apoptosis. We also investigated the physiological roles of *drs* gene by using mouse embryonic fibroblast (MEF) cells derived from *drs* KO mice, and found that *drs* is associated with Rab24, autophagy regulating protein, and regulates autophagy maturation under low serum culture conditions. Furthermore, *drs* suppresses viral replication via mTOR-dependent pathway. These results suggest that *drs* is involved in the protective responses of the cells against the carcinogenesis and viral infection.

**Keyword** *drs*, tumor suppressor gene, knockout mouse, autophagy, anti-viral activity.

### はじめに

本稿は、平成 24 年 7 月 17 日に開催された「第 8 回基礎臨床融合研究発表会：がんにおける遺伝子異常と予後因子について」において発表された「Drs 癌抑制遺伝子による癌化抑制機構」の講演内容をまとめたものである。

*drs* (down-regulated by *v-src*) は、ウイルス癌遺伝子 *v-src* によって mRNA の発現が抑制されるものとして発見された新規癌抑制遺伝子である[1]。我々はこの *drs* 遺伝子の機能に着目して研究を行ってきた。特に *drs* ノックアウト(KO)マウスを本学で独自に作製し、それを用いて *drs* の癌抑制遺伝子としての機能を解明し、またその生理機能について検討を行ってきた。本稿では、これまでの研究成果を総合的に紹介する。

### *drs* 遺伝子

#### 1. 発見の経緯

癌の発症は、癌遺伝子の活性化や癌抑制遺伝子の不活化が細胞ゲノムに蓄積されて生じる「多段階発癌」と呼ばれるメカニズムで進行することが知られている[2, 3]。ras や src などの癌遺伝子、p53 や Rb などの癌抑制遺伝子をはじめ、数多くの癌関連遺伝子が発見されてきた。井上ら[4]は、ウイルス癌遺伝子 *v-src* による癌化機構を研究する過程で、NIH3T3 や 3Y1、F2408 などのげっ歯類の線維芽細胞由来の培養細胞株が *v-src* によって容易に transform するのに対して、正常な初代ラット胎児線維芽細胞(REF)は、*v-src* 単独では transform しないことを見いだした。さらに、*v-src* で transform させた F2408 細胞を、正常な F2408 または REF と細胞融合させたところ、前者の融合細胞は

Received November 20, 2006

Correspondence: 滋賀医科大学病理学講座微生物感染症学部門 旦部 幸博

〒520-2192 大津市瀬田月輪町

tambe@belle.shiga-med.ac.jp  
a21

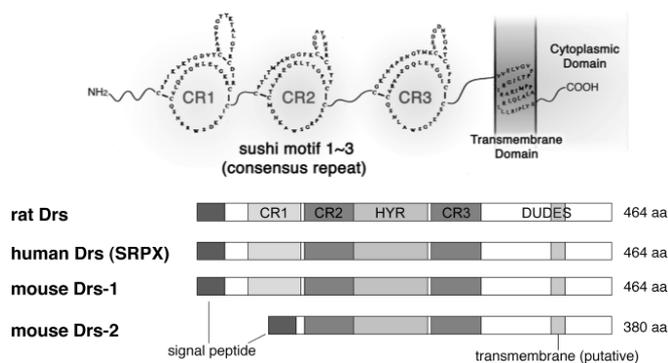


図 1. Drs タンパク質の構造模式図[1, 6].

transform したのに対し、後者では正常型の phenotype を示した。すなわち、正常な REF においては *v-src* に拮抗する何らかの癌抑制遺伝子が発現していると考えられた。そこで REF の cDNA ライブラリを作製して、*v-src* 癌化細胞への DNA transfection によってその癌化形質を発現抑制する活性を持った遺伝子のスクリーニングを行った。その結果、発見されたのが *drs* 遺伝子である[1]。

## 2. Drs の構造と特徴

*drs* 遺伝子は X 染色体上(Xp21.1)に位置し、464 アミノ酸からなる Drs タンパク質をコードする。Drs タンパク質は、N 末端にシグナルペプチド、C 末端付近に putative な transmembrane (TM) 領域を一つ有している (図 1)。培養細胞への遺伝子導入実験の結果も、小胞体と細胞膜上に発現する 1 型膜タンパク質であることを示した。また、構造上の大きな特徴として、TM 領域より N 端側に「Sushi モチーフ」と呼ばれる consensus repeats (CRs) を 3 つ有している。Sushi モチーフは、セレクトインファミリーやインターフェロン受容体、補体結合タンパクなどにも見られる、リガントとの結合などタンパク間相互作用に関与するドメイン構造であり、Drs においても何らかのタンパク間相互作用に関与していると考えられる。この他、CR2 と CR3 の間には hyalin repeat (HYR) と呼ばれる consensus repeat が 1 つあり、また TM 領域を含む C 末端側について、別の癌抑制遺伝子である DRO-1 をはじめとするいくつかのタンパク質との相同性が見られ、DUDES repeat と名付けられた[5]。ただし HYR や DUDES repeat の機能についてはまだ十分には判っていない。

*drs* 遺伝子は、これまでにラット[1]、マウス[6]、ヒト[7]をはじめ、多くの哺乳動物、ニワトリ、ゼブラフィッシュから分離されている。ヒトの *drs* ホモログは SRPX(sushi-repeated protein on chromosome X)とも呼ばれている。これらはいずれも非常に高い相同性を示す。例えばマウス *drs* はアミノ酸レベルで、ラットと 97.4%、ヒトと 92.9% 同一である[6]。また、*drs* mRNA はヒトやマウスの様々な正常組織では、ほぼ ubiquitous に発

現しており[6, 8]、生物間で高度に保存された遺伝子であることと合わせて、何らかの基本的な生理機能に関与すると考えられる。

## *drs* の腫瘍抑制作用の解析

### 1. ヒト癌における *drs* mRNA の発現

*drs* mRNA は大部分の正常細胞で発現しているが、*v-src*, *v-fps*, *v-ras*, *v-mos*, *v-sis*, *v-abl* などのレトロウイルス癌遺伝子を導入すると、mRNA レベルで発現が抑制される[1]。そこで実際のヒト癌においても、*drs* mRNA の発現が抑制されているかどうかについて、検討した[8-12]。種々のヒト癌細胞株を用いて Northern blotting によって解析した結果、大腸癌、肺癌、精巣癌、直腸癌、卵巣癌、子宮頸癌、膵臓癌、上皮癌、胃癌、膀胱癌など様々な癌細胞株において、*drs* mRNA 発現の減少や消失が認められた[8]。そこで実際のヒトがん組織における *drs* mRNA 発現を、*in situ* ハイブリダイゼーションによって検討した[9-12]。例えば、大腸癌[9]では、一人の大腸癌患者から切除した腫瘍組織のうち悪性度の異なる三箇所(軽度異型性腺腫、中度異型性腺腫、腺癌)、および付随した正常大腸組織(normal colon)について、それぞれ *drs* mRNA の発現を検討した結果、正常組織や悪性度の低い腺腫では *drs* mRNA の発現が認められたが、悪性度の高い腺腫や癌組織では発現が消失していた。このことから、正常組織で発現している *drs* mRNA が、大腸癌の悪性化に伴って発現消失すると考えられた。この他、肺腺癌[10]、前立腺癌[11]、ATL リンパ腫[12]でもほぼ同様に、悪性化に伴って *drs* mRNA 発現が抑制された。このことから、さまざまなヒト癌発症に *drs* mRNA の発現抑制が関与している可能性が示唆された。

### 2. *drs* の *in vitro* 腫瘍抑制作用

*drs* は、*v-src* によって mRNA レベルで発現抑制される一方、*v-src* の導入によって引き起こされる focus 形成などの細胞癌化(悪性化)形質を抑制する活性を示す[13]。またヒト癌細胞株にレトロウイルスベクターを用いて *drs* を遺伝子導入すると、癌細胞の悪性化形質の一つである足場非依存性増殖が抑制された[8]。また、DNA トランスフェクションによって *drs* 遺伝子を一過性大量発現させた癌細胞にはアポトーシスが誘導された[14]。このとき、Drs は小胞体に局在するアポトーシス関連分子である ASY/Nogo-B と相互作用し、Caspase-12 を活性化する新規の小胞体関連アポトーシスの誘導に関与すると考えられた。また、*drs* が完全に欠損した LC-T1 癌細胞株(後述)に、レトロウイルスベクターを用いて再導入を行うと、低血清ストレス条件下で Caspase-12 の活性化を伴うアポトーシス誘導が認められた[15]。以上の結果から、*drs* はアポトーシ

ス誘導を介して癌化抑制に関与していると考えられる。

### 3. *drs* ノックアウトマウスにおける発癌

*drs* が癌抑制遺伝子であることを直接証明するために、我々は *drs* KO マウスを作製した[15]。出生から半年の間に、*drs* KO マウスには野生型(WT)と比べて特に差は見られなかったが、生後 7-12 ヶ月を経過した *drs* KO マウスの約 30% (14/46) に、リンパ腫(6 例)をはじめ、肺腺がん(4 例)、肝がん(3 例)、肉腫(1 例)と、様々な種類の腫瘍が発生した。このとき、対照の WT マウスには生後 12 ヶ月までに一例の腫瘍も発生しなかった(0/23)。この結果から、*drs* の欠損が *in vivo* において悪性腫瘍の発生に癌抑制遺伝子として働くことを明らかにした。また *drs* KO マウスの 30% のみに癌が発生したことは、癌の発生には他の癌関連遺伝子の変化も必要であることが考えられるが、少なくとも *drs* の発現消失が多段階発癌の一ステップになりうると考えられた。

### ノックアウト細胞による *drs* の機能解析

*drs* は多くの生物種で高度に保存されており、*drs* mRNA が大部分の正常細胞で発現していることから、細胞の持つ基本的な生理機能に関与していることが予想される。しかし *drs* KO マウスには、上述の発癌傾向を除いて目立った異常は認められず、*drs* KO 由来のマウス胎児線維芽細胞(MEF)も、通常の培養条件下においては細胞増殖や細胞老化などに WT MEF との有意な違いは認められなかった。我々は、これまでの研究から *drs* が発癌の比較的后期の、腫瘍の微小環境が悪化して生理的ストレスが高くなる時期に発現消失していることに着想して、さまざまな生理的ストレス負荷状態での WT MEF と *drs* KO MEF に生じる違いを検討した[16, 19]。

#### 1. オートファジー成熟化の調節

我々は既に *drs* KO マウス肺腺癌から樹立した細胞株、LCT1 細胞が、低血清ストレス条件下で培養するとアポトーシスを起こすことと、*drs* 遺伝子を再導入した LCT1 細胞ではこのアポトーシスが抑制されることを明らかにし、*drs* が低血清ストレス応答に関与する可能性を見いだしていた[15]。そこで WT および *drs* KO MEF を用いて低血清ストレスに対する細胞応答を検討した。MEF においては、WT、KO の両細胞において、低血清によるアポトーシスの誘導に差は認められなかった。ところが低血清処理においては、オートファジーが誘導され、WT MEF と *drs* KO MEF ではこのオートファジー成熟化の過程に違いがあることを見い

だした[16]。

オートファジーは、細胞内に生じる二重の膜構造(オートファゴソーム/オートリソソーム)が細胞質中の異常タンパク質やオルガネラを非特異的に取り込んで分解する(バルク分解)生理応答であり、細胞内異物の除去やアミノ酸のリサイクルのために機能すると考えられている[17, 18]。オートファジーは定常状態の細胞でも部分的に起きているが、栄養飢餓や低血清ストレス、異常タンパク質の蓄積、あるいは一部の病原体による感染を受けたときに強く誘導される、細胞のストレス応答機構の一つである。オートファジーの進行は、(1)細胞質での隔離膜の出現、(2)オートファゴソームの形成、(3)オートリソソームの形成(オートファゴソームとリソソームの融合)、(4)オートリソソーム内容物の分解、というステップで進行するが、*drs* KO MEF では(2)から(3)への移行、すなわちオートリソソームの形成が WT MEF に比べて抑制されていることがわかった[16]。*drs* KOMEF に *drs* 遺伝子を再導入すると、この抑制は低減された。また、このとき *Drs* タンパク質じゃ小胞輸送タンパク質 Rab ファミリーの一つ、Rab24 と相互作用してオートファゴソーム上に共局在することを見いだした。以上の結果から、正常細胞においては *drs* が Rab24 と協同して、低血清ストレスにより誘導されるオートファジーの成熟化過程を調節することが明らかになった。このことは *drs* が、癌細胞と正常細胞のどちらにおいても、生理的ストレス応答に関与することを示している。またオートファジーは癌の進行過程においても誘導され、癌細胞の生死の調節にも関与することが報告されている[17, 18]。*drs* が生理的ストレスによって誘導されるオートファジーを調節することで、その癌抑制作用にも関与している可能性が示唆された。

#### 2. 抗ウイルス作用

我々はまた、生理機能解析の過程で、*drs* がウイルス感染防御にも関与していることを明らかにした[19]。

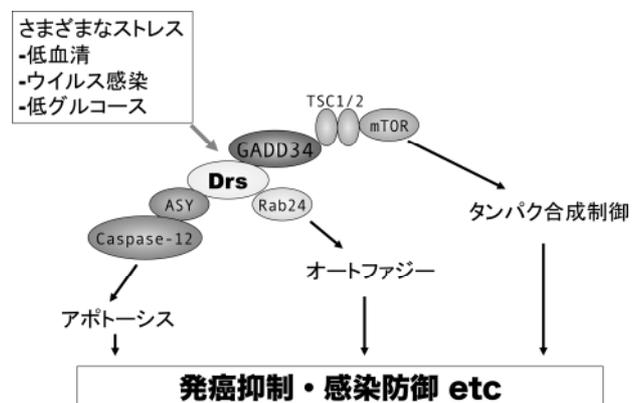


図 2. Drs が関与する生理機能ネットワーク

RNA ウイルスの一種である VSV(水疱性口内炎ウイルス) を感染させると、WT MEF と比べて *drs* KO MEF では、ウイルス増殖が亢進した。*drs* KO MEF に *drs* 遺伝子を再導入すると、この亢進は抑制されたことから、*drs* が VSV の増殖を抑制する抗ウイルス作用を持つことが明らかになった。DNA ウイルスである HSV-1 (単純ヘルペスウイルス 1 型) やレトロウイルスである MRSV (マウス Raus 肉腫ウイルス) でも *drs* KO MEF での増殖亢進が認められたことから、*drs* の抗ウイルス作用はタイプの異なる、種々のウイルスに有効であることが示された。

一般に、ウイルスが感染した細胞にはインターフェロン応答が誘導され、タンパク質合成が mRNA 転写レベルで全体的に抑制されて抗ウイルス状態になることが知られている。しかし *drs* KO MEF ではインターフェロン経路への影響は認められず、宿主細胞の mRNA 転写レベルが抑制される一方で、ウイルスのタンパク質合成が特異的に亢進していた。我々はさらにこのタンパク質合成調節のメカニズムについて検討し、mTOR 経路が関与していることを明らかにした。*Drs* は、ウイルス感染によって誘導されるストレス応答分子 GADD-34 [20] と協調して、mTOR 上流の調節分子 TSC2 のを脱リン酸化して mTOR 経路を抑制的に調節していることがわかった。*drs* KO MEF ではこの調節が失われることで mTOR が活性化して、その下流分子の S6 や eIF4E を介してタンパク質合成が亢進すると考えられた。

## おわりに

我々が作製した *drs* KO マウスおよび KO 細胞を用いた実験によって、*drs* の生理機能 (図 2) と発癌におけるその役割 (図 3) が明らかになってきた。

細胞が低栄養や低血清などの環境ストレスやウイルス感染など、広い意味でのストレスに曝されると、アポトーシスやオートファジーなど細胞自体の生死を決定する生理的応答が惹起される。*drs* 遺伝子は、ASY, Rab24, GADD34 などの分子と相互作用して、アポトーシス、オートファジー、タンパク質合成抑制など、さまざまな生理的ストレス応答を調節する分子であると考えられる。

また、この生理的ストレス応答の調節は、*drs* の癌化抑制機能にも関与すると考えられる。固形腫瘍内部の微小環境は栄養源や酸素、増殖因子などが枯渇し、強い生理的ストレスが誘導された状態になっていることが知られている。癌が進行する初期の段階では、この生理的ストレスによって、前癌状態にある細胞の多くはアポトーシス等によって死滅し、このことが生体の癌化抑制機構の一端を担っていると考えられている。

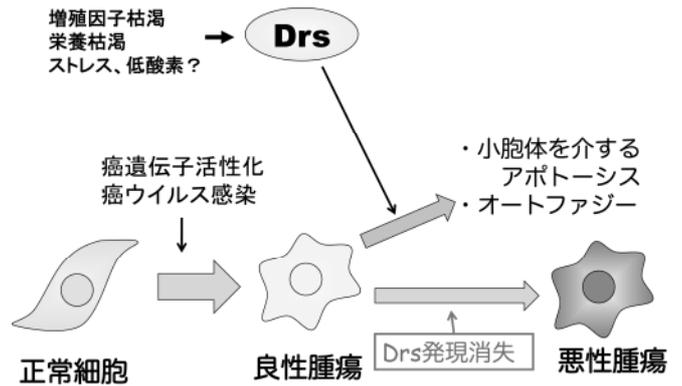


図 3. Drs による癌化抑制機構のモデル

癌細胞の悪性化に伴って *drs* 遺伝子の発現が消失すると、これらの生理的ストレス応答が生じにくく変化し、その結果生き残った、より悪性度の高い癌細胞が増殖することで、癌の悪性化が進行すると考えられた。

*drs* は癌抑制遺伝子であるだけでなく、ウイルス感染に対しても防御的に働くことから、より広い意味での「生体防御分子」として機能している可能性がある。我々が作製した *drs* KO マウスおよび KO 細胞は、*drs* 遺伝子の機能を明らかにする上で重要なツールであるとともに、その研究成果は、発癌やウイルス感染に対する生体防御機構を明らかにする上で有用なものになることが期待される。

## 文献

- [1] Pan J, Nakanishi K, Yutsudo M, Inoue H, Li Q, Oka K, Yoshioka N, Hakura A. Isolation of a novel gene down-regulated by v-src. FEBS Lett. 383:21-25, 1996.
- [2] Vogelstein B, Kinzler KW. The multistep nature of cancer. Trends Genet. 9:138-141, 1993.
- [3] Kinzler KW, Vogelstein B. Lessons from hereditary colorectal cancer. Cell 87:159-170, 1996.
- [4] Inoue H, Tavoloni N, Hanafusa H. Suppression of v-Src transformation in primary rat embryo fibroblast. Oncogene. 11:231-238, 1995.
- [5] Bommer GT, Jäger C, Dürr EM, Baehs S, Eichhorst ST, Brabletz T, Hu G, Fröhlich T, Arnold G, Kress DC, Göke B, Fearon ER, Kolligs FT. DRO1, a gene down-regulated by oncogenes, mediates growth inhibition in colon and pancreatic cancer cells. J Biol Chem. 280:7962-7975, 2005.
- [6] Kawai T, Suzuki Y, Yamashita A, Inoue H. Isolation of a novel mouse variant of the *drs* tumor suppressor gene. Cancer Lett. 183:79-86, 2002.
- [7] Meindl A, Carvalho MR, Herrmann K, Lorenz B, Achatz H, Lorenz B, Apfelstedt-Sylla E, Wittwer B, Ross M, Meitinger T. A gene (SRPX) encoding a sushi-repeat-containing protein is deleted in patients with X-linked retinitis pigmentosa. Hum Mol Genet. 4:2339-2346, 1995.
- [8] Yamashita A, Hakura A, Inoue H. Suppression of anchorage-independent growth of human cancer cell lines by the *drs* gene. Oncogene 18:4777-4787,

1999.

- [9] Shimakage M, Kawahara K, Kikkawa N, Sasagawa T, Yutsudo M, Inoue H. Downregulation of drs mRNA in human colon adenocarcinomas. *Int. J. Cancer* 87:5-11, 2000.
- [10] Shimakage M, Takami K, Kodama K, Mano M, Yutsudo M, Inoue H. Expression of drs mRNA in human lung adenocarcinomas. *Hum. Pathol.* 33:615-619, 2002.
- [11] Kim CJ, Shimakage M, Kushima R, Mukaisho K, Shinka T, Okada Y, Inoue H. Down-regulation of drs mRNA in human prostate carcinomas. *Hum. Pathol.* 34:654-657, 2003.
- [12] Shimakage M, Inoue N, Oshima K, Kawahara K, Yamamoto N, Oka T, Tambe Y, Yasui K, Matsumoto K, Yutsudo M, Inoue H. Down-regulation of drs mRNA is associated with the progression of adult T-cell leukemia/lymphoma. *Int. J. Oncol.* 30:1343-1348, 2007.
- [13] Inoue H, Pan J, Hakura A. Suppression of v-Src transformation by the drs gene, *J. Virol.* 72: 2532-2537, 1998.
- [14] Tambe Y, Isono T, Haraguchi S, Yoshioka- Yamashita A, Yutsudo M, Inoue H. A novel apoptotic pathway induced by the drs tumor suppressor gene. *Oncogene* 23:2977-2987, 2004.
- [15] Tambe Y, Yoshioka-Yamashita A, Mukaisho K, Haraguchi S, Chano T, Isono T, Kawai T, Suzuki Y, Kushima R, Hattori T, Goto M, Yamada S, Kiso M, Saga Y, Inoue H. Tumor prone phenotype of mice deficient in a novel apoptosis-inducing gene, drs, *Carcinogenesis* 28:777-784, 2007.
- [16] Tambe Y, Yamamoto A, Isono T, Chano T, Fukuda M, Inoue H. The drs tumor suppressor is involved in the maturation process of autophagy induced by low serum. *Cancer Lett.* 283:74-83, 2009.
- [17] Mizushima N. Autophagy: process and function, *Genes Dev.* 21:2861-2873, 2007.
- [18] Klionsky DJ. Autophagy: from phenomenology to molecular understanding in less than a decade, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8:931-937, 2007.
- [19] Tambe Y, Okuyama N, Nakagawa T, Muramoto A, Hasebe M, Chano T, Inoue H. Suppression of viral replication by drs tumor suppressor via mTOR dependent pathway. *Cancer Lett.* 314:82-91, 2012.
- [20] Minami K, Tambe Y, Watanabe R, Isono T, Haneda M, Isobe K, Kobayashi T, Hino O, Okabe H, Chano T, Inoue H. Suppression of viral replication by stress-inducible GADD34 protein via the mammalian serine/threonine protein kinase mTOR pathway. *J Virol.* 81:11106-11115, 2007

## 診療に於ける新規マーカーの探索と適用

茶野 徳宏

滋賀医科大学臨床検査医学講座

### Application of novel clinicopathological biomarkers

Tokuhiro CHANO

Department of Clinical Laboratory Medicine, Shiga University of Medical Science

**Abstract** To contribute the order-made medicine for cancer treatments, we have originally searched several biomarkers in the last decade. Some have been used as immunohistochemically novel biomarkers for the cancer diagnosis, and the others have applied to molecular target for the cancer therapy. RB1-inducible coiled-coil 1 (RB1CC1; also known as FIP200) plays important roles in biological pathways such as cell cycle arrest and autophagy, and the nuclear expression has been established as a prognostic predictor in breast and salivary cancer patients. RECQL1 and WRN protein are RecQ DNA helicases that participate in suppression of DNA hyper-recombination and repair. We have found that both proteins are highly expressed and that siRNA-mediated silencing of either gene suppressed head and neck squamous cell carcinomas in vitro and in vivo. The data offer a preclinical proof-of-concept for RecQ proteins as novel therapeutic targets to treat aggressive head and neck squamous cell carcinomas. In testicular germ cell tumors, the fetal-specific methyltransferase-like protein DNMT3L is expressed, and has been used as a novel marker of human embryonal carcinoma. Further elucidation of the roles of DNMT3L in vivo warrants a possible significance as a therapeutic target of embryonal carcinoma. These novel biomarkers such as RB1CC1, RecQ, and DNMT3L provide new insight into cancer diagnosis and therapy; and will help to realize the order-made medicine.

**Keyword** biomarker, RB1CC1, RecQ, DNMT3L

分子生物学的、核酸化学的技術の進歩は目覚ましいものがあり、癌をはじめとする各種疾患に対する診断法、診断技術は、まさに分進秒歩と云うべき発展を遂げつつある。数年のうちには次 n 世代ゲノムシーケンサーの更なる飛躍的技術革新が起こり、「個」のゲノムの時代、100-1000 ドルゲノムの時代が実際に到来すると予想されている。このような時代のうねりにもまれつつ、我々はオーダーメイド医療に即した癌の診断、治療への適用が直近に可能なバイオマーカーの探索を続けてきた。全国全ての病院で、どんな時にでも、と云う“汎用性、簡便性”を第一のキーワードとして、現在まで研究を行ってきた。

我々の研究は、骨肉腫抗癌剤耐性に関連する遺伝子をスクリーニングする過程で偶然同定した RB1CC1 (RB1-inducible coiled-coil 1; 網膜芽細胞腫遺伝子 RB1 誘導蛋白質) の研究より始まる。RB1CC1 は、細胞質、核内の両方に存在するが、核内では p53 や hSNF5、そして PIASy と複合体を形成し、RB1 経路の転写に対して、正の効果をもたらし、細胞増殖を抑制する。乳

癌では、その発現のみられないものや、核内局在の極めて乏しい症例が存在し、これらについては臨床予後が悪い。RB1CC1 は RB1 経路を増強しつつ、p53 とも複合体を形成し、p53 のいくつかの細胞内機能も調整するので、RB1CC1, RB1, p53 の三者を指標として、予後との関連をみると、そのバイオマーカー的意義は顕著であった。RB1CC1, RB1 が核内に存在し、更に p53 の変異、異常発現のない場合は 5- 10 年の長期予後に関して、死亡例は全くなく、予後良好のマーカーであることが明らかになった。乳癌臨床に於いては、ER, PR, HER2 が乳癌細胞の定性診断に適用されており、補助療法選択の観点からも欠かすことはできない。これら三者の発現が乏しい症例は triple-negative cancer と分類され、予後は良くない。Triple-negative cancer の場合、悪性事象は 3- 5 年以内で生じる。しかし、triple-negative でない場合も 5-10 年の長期観察では再発、死亡が生じる。この為、医師、患者の両サイドともに、加療期間をどこまで設定し、治療後の監視をどこまで行うべきなのか、明確な目安がなく、不安とともに加療を継続するケースもあった。RB1CC1, RB1, p53 の三者を指標とし、予後マーカーとして適用した

場合、ER, PR, HER2 を指標とした現存の判定より、特に長期予後、生存を良く示唆できることが明らかとなった。RB1CC1, RB1, p53 の三者のどれかに異常がある場合、特に 5 年以上の長期 follow において、約 4 倍、再発、死亡のリスクが高い。ER, PR, HER2 を指標とした現在の病理学的判定に加えて、RB1CC1, RB1, p53 の乳癌組織に於ける定性診断を行うことで、長期予後もより正確に推測できるのである。他の癌では、唾液腺癌で同様の予後判定が可能で、臨床病理学的なバイオマーカーとして適用できるが、頭頸部癌、肺癌、骨肉腫、大腸癌では臨床上の予後との関連は乏しかった。

頭頸部癌では RB1CC1 は予後マーカーとして機能し得なかったが、その組織評価を行う過程で、下咽頭癌や舌癌に於いて RecQ family helicases の発現レベルが非常に高いことに気付いた。RecQ family helicases は、癌細胞では非常に高い発現状態であり、本ヘリカーゼ依存的な DNA 修復による癌ゲノム維持がなされ、癌細胞の性急な DNA 複製、増殖、生存は維持される。癌細胞の性急な増殖、生存の状態に於いては、RecQ helicases を抑制することによって、癌細胞に特異的な細胞死を誘導することができると考えた。実際、下咽頭癌細胞株、臨床症例に於いて、RecQ family helicases のうち RECQL1, WRN (Werner) helicases は非常に高い発現レベルを示し、RECQL1, WRN ヘリカーゼ依存的な DNA 修復、増殖、生存が行なわれていた。siRNA を用いて、RECQL1, WRN ヘリカーゼ特異的な knockdown therapy を試行してみると、非常に良好な抗腫瘍効果をもたらすことが出来た。Translational research としておこなったマウス in vivo に於ける CDDP との併用療法でも、特に強い抗腫瘍効果を示すことができた。CDDP, WRN-siRNA 併用の治療を行った場合、6 匹中 2 匹のマウスで腫瘍の完全消失を得ることができ、下咽頭癌の新規治療として非常に有望であることを証明した。現在、下咽頭癌等、頭頸部癌では、動脈注入や局所注入等、drug delivery 的な優位性が既に存在する。今後、siRNA drug delivery の改善によって、より多くの癌種にも適用拡大されることを期待している。

精巣腫瘍研究では、そのゲノム DNA の脱メチル化状態に注目し、DNA methyltransferase family; DNA メチル化転移酵素群 (DNMT) の発現スクリーニングを行った。その結果、他の DNMT1, 2, 3A, 3B では ubiquitous な発現状態を示すものの、DNMT3L 分子の transcript だけが精巣腫瘍特異的な発現パターンを示すことを見出した。一方で、正常精巣を含め、他の正常組織、体細胞由来の癌、等では DNMT3L の発現は見られないこと

も確認できた。DNMT3L は精巣腫瘍に特異的なバイオマーカーであることが分かったが、ヒト DNMT3L に特異的、且つ、formalin-paraffin 臨床病理標本の解析に耐え得る抗体は存在しなかった。我々は抗ヒト DNMT3L 特異抗体を作成し、臨床病理検体での評価解析を行った。結果、DNMT3L は胎児性癌細胞の核に特異的に発現していることが明らかとなり、臨床病理レベルに於ける胎児性癌特異的なバイオマーカーであることが分かった。現在、臨床で胎児性癌マーカーとして使用されている CD30 や SOX2 と比較しても、DNMT3L の検出は非常に高感度且つ特異的なマーカーであった。DNMT3L の発現は、正常では出生以前のごく短い胎生期、始原生殖細胞に特異的に発現するのみで、成人の生体内では精巣腫瘍、胎児性癌に発現し、成人の精巣、他の組織、臓器には全く発現しない。非常に理想的な治療標的分子としても期待でき、実際、培養上は DNMT3L の knockdown は細胞死を胎児性癌細胞にもたらず。この点においても、DNMT3L は臨床予後のマーカー、次世代の治療標的として、更に期待の持てる分子と云える。

我々は、これまでオーダーメイド医療に即した癌の診断と治療適用を志向しながら、種々の癌に於ける新規のバイオマーカーを探索してきた。臨床への適用には、探索した分子を用いた診断、主に臨床病理学的、免疫組織化学的な診断が可能となることを目標に解析を続けてきた。既に日常的に臨床適用されており、技術的にも資材的にも優位性が高く、その鑑別診断も客観性を持ちつつ困難でない手法であることを第一に考えてきたからである。分子標的として可能性のある分子については、その治療適応への可否を検討してきた。ここ数年、紹介した分子、RB1CC1, RecQ, DNMT3L について、それぞれ乳癌・唾液腺癌、頭頸部癌、精巣腫瘍での成果を公表することができた。これらについての臨床適用には少し近づいたのかもしれない。分進秒歩で進む核酸・ゲノム解析診断技術の革新のうねりの中で、技術的、資材的なコストも踏まえながら、しかも、迅速に、より広く臨床現場で適用されることを念頭に置いたバイオマーカーの探索は今後も必要と考えている。一つには、病理学を基盤とした癌の臨床診断、治療の概念が、全て、新しい核酸ゲノム診断、治療に入れ替わってしまうことは想像しがたく、核酸ゲノム診断、病理診断の交差・情報交換、並立適用の時代が続くであろうと考えているからである。そして、もう一つには、大規模産業的 massive genome studies、各種-ome studies が隆盛を極め、この主旨にそった研究が high impact journals に掲載され、科学情報として発信され続ける (アメリカン) サイエンスグローバリズムの中で、個人のアイデアに立脚した小規模家内手工

業的研究にもわずかな価値が存在していても良いと考えているからである。

## 文献

- [1] Chano T, Ikegawa S, Kontani K, Okabe H, Baldini N, Saeki Y. Identification of RB1CC1, a novel human gene that can induce RB1 in various human cells. *Oncogene*, 21(8):1295-1298, 2002.
- [2] Chano T, Kontani K, Teramoto K, Okabe H, Ikegawa S. Truncating mutations of RB1CC1 in human breast cancer. *Nature Genetics*, 31(3):285-288. 2002.
- [3] Chano T, Ikebuchi K, Ochi Y, Tameno H, Tomita Y, Jin Y, et al. RB1CC1 activates RB1 pathway and inhibits proliferation and cologenic survival in human cancer. *PLoS One*, 5(6):e11404, 2010.
- [4] Chano T, Ikebuchi K, Tomita Y, Jin Y, Inaji H, Ishitobi M, et al. RB1CC1 together with RB1 and p53 predicts long-term survival in Japanese breast cancer patients. *PLoS One*, 5(12):e15737, 2010.
- [5] Tameno H, Chano T, Ikebuchi K, Ochi Y, Arai A, Kishimoto M, et al. Prognostic significance of RB1-inducible coiled-coil 1 in salivary gland cancers. *Head Neck*, 34(5):674-680, 2012.
- [6] Arai A, Chano T, Futami K, Furuichi Y, Ikebuchi K, Inui T, et al. RECQL1 and WRN proteins are potential therapeutic targets in head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Research*, 71(13):4598-607, 2011.
- [7] Minami K, Chano T, Kawakami T, Ushida H, Kushima R, Okabe H, et al. DNMT3L is a novel marker and is essential for the growth of human embryonal carcinoma. *Clin Cancer Res*, 16(10):2751-2759, 2010.

# ゲノム解析に基づいた統合的がん分子病態診断システムの開発研究

醍醐 弥太郎<sup>1),2),3)</sup>

1) 滋賀医科大学医学部臨床腫瘍学講座、2) 滋賀医科大学医学部附属病院腫瘍内科

3) 滋賀医科大学医学部附属病院腫瘍センター

## Development of Integrated Molecular Pathological Diagnostics based on Genomics Strategy

Yataro DAIGO<sup>1),2),3)</sup>

1) Department of Medical Oncology, Shiga University of Medical Science

2,3) Medical Oncology and Cancer Center, Shiga University of Medical Science Hospital

### Abstract

To identify the molecules applicable as novel tumor biomarkers, we performed gene expression profile analysis of various human cancers whose tumor cells were purified by laser microdissection. Through a subsequent systematic approach using tissue microarray, RNA interference, and high throughput enzyme-linked immunosorbent assay techniques as well as bioinformatics, we have identified a set of molecules that fall into the category of oncoantigens. These molecules are potentially promising candidates for the development of new diagnostic biomarkers. We introduce our sophisticated and integrated cancer genomics strategy for developing new cancer biomarkers.

**Keyword** Genomics, Molecular pathology, Biomarker, Personalized medicine

### はじめに

がんの個別化医療を実現するには、患者の病態に基づいた予後、治療効果・副作用予測が可能な治療の選択指標の開発が必要となる。2005年3月に米国食品医薬品局（FDA）が新薬の開発と既承認薬におけるファーマコゲノミクス（薬の作用とゲノム情報を結びつけて特定の患者の治療効果、副作用に関連する要因を見だし各患者に最適の薬剤を使い分ける研究）のデータ提出を推奨するガイダンスを公表し、さらに2007年には新薬の臨床開発コストの削減の切り札として先端的な分子バイオマーカーの探索・開発・応用を提唱した Critical Path Opportunity プログラムを開始し、産学官が一体となったバイオマーカーコンソーシアムの設立を進めてきたことが示すとおり、がんの診断・治療に応用可能なバイオマーカーはがん克服に向けた最有力の基盤資源と認識されている。また、2011年7月

に FDA は、コンパニオン診断薬（治療標的分子の発現や遺伝子変異の有無、薬物代謝酵素の遺伝子多型などを調べ、薬剤の有効性や副作用を予測するために使われる診断方法であり薬剤とセットで使われる）の同時開発に関するドラフトガイドラインを策定しており、医薬品とそのコンパニオン診断薬を同時承認する事例が続いている。ゆえに、がんの個別化医療の開発には、治療薬の開発と同時に有用なバイオマーカーの探索を進めていく研究・開発戦略が求められている。

本稿では、我々が進めているゲノミクス解析に基づいた統合的ながんの分子病態診断法の開発研究の一端について概説する。

### がんバイオマーカーの探索

我々はがんの発生と悪性化に深く関与し、がんバイオマーカーや分子標的治療薬の開発に有用な標的分子

を同定するために以下に示す探索戦略をとっている[1]。すなわち、(1) レーザーマイクロダイセクション法でがん細胞部分を選択的に採取したがん組織と正常 30 臓器のマイクロアレイ解析によるゲノムワイドの遺伝子発現情報、(2) 各種固形がんを同時に解析可能な組織マイクロアレイシステムによるタンパク質の発現情報、(3) 各がん種数百例のがん患者血清を備えた迅速血清 ELISA システムを用いて臨床病理学的情報と比較解析のなされたがん関連分子の発現情報を取得している。さらに、(4) siRNA や抗体によるがん細胞での機能阻害実験や正常細胞への遺伝子導入実験により、がん細胞の増殖・浸潤に関与すると考えられる遺伝子について、創薬スクリーニング系の構築を念頭にその主要分子経路の機能解析を進めている。(5) またマイクロアレイ情報と臨床情報をバイオインフォマティクス解析することで、抗がん剤感受性やリンパ節・遠隔臓器転移に関わる遺伝子群の同定を試みている。一方、(6) 質量分析計を用いてがん患者と健常者の血清タンパク質量やその糖鎖修飾レベルを比較解析して得られたプロテオーム・グライコーム情報をマイクロアレイデータと統合し、糖鎖修飾を標的とした血清バイオマーカーの開発を進めている。これらの段階を経て同定された候補標的分子の多くはがん細胞の増殖や悪性化に関わる oncoantigen であり、血清・組織を用いたがんの未病状態や早期がん検出、がんの悪性度や抗がん剤感受性などの分子病態診断に有用なバイオマーカーの開発と各種の創薬研究に応用可能である。

## 血清マーカー・予後予測マーカー

難治がんのひとつである肺がんについて、上述の手法で選定された oncoantigen を用いた早期がん診断法の開発を行っている。これまでに 7 種類の血清バイオマーカー (EBI3, Nectin-4, LY6K, DKK1, ADAM8, TGFA, AREG) を同定し、ELISA 法による肺がん診断や抗がん剤感受性予測における有用性を示している[2-4]。さらに、これらのマーカーの組み合わせによる高感度のがん検出法の開発を進めている。

また、新規バイオマーカーや治療標的分子の生物学的・臨床病理学的意義を検討するために組織マイクロアレイを用いて肺がん、食道がんにおけるタンパク質の発現・相関解析を進め、これまでに複数の免疫組織化学的予後予測マーカー (hDUS2, PKP3, ANLN, SEZ6L2, NMU, CDCA1, KNTC2, FGFR1OP, IMP-1, KIF4A, DKK1, CDCA8, AURKB, HJURP, hTERT, LY6K, DLX5, FOXM1, ECT2, Nectin-4, WDHD1, TBC1D7, CDCA5, CSTF2, EBI3, CHODL, TMEM209) を同定するとともに、これらのマーカーの組み合わせによる定量的な予後予測システムの開発を進めている[5-9]。

## 転移診断マーカー

がんの転移治療においては、診断時や病勢モニタリング時における転移の危険性の予知、転移の早期検出とその進展度の正確な把握、そして診断に基づいたすみやかな予防処置、加療が求められるが、現状では切除リンパ節の病理診断と各臓器の画像診断が唯一確立された転移検出法である。我々は非小細胞肺がんの原発巣の 40 個の遺伝子の発現プロファイルのスコア結果からリンパ節転移の有無を検出する診断システムを構築すると共に、非小細胞肺癌の脳転移、小細胞肺癌の遠隔臓器転移に関わる遺伝子群を複数同定している。

## 抗がん剤感受性診断マーカー

これまでに、7 種類の抗癌剤 (docetaxel, paclitaxel, irinotecan, cisplatin, gemcitabine, vinorelbine, gefitinib) に対する肺がんの感受性に関わる遺伝子群を同定している。また進行期非小細胞肺がんの遺伝子発現プロファイル解析を行い、gefitinib 感受性群と耐性群で発現レベルが異なる分子を抽出し、100%近い感度の gefitinib 感受性予測システムを構築した。さらにこれらの中で gefitinib 耐性群の肺がん組織で発現が増加する EGFR のリガンド TGFA (TGF-alpha) と AREG (amphiregulin) の血清高値が gefitinib の低奏効率と予後不良因子であることを明らかにしている[10]。

がんの発症から進行に至る経過を正確に把握する分子病態診断に基づき、あらゆる病期のがんに対応した治療法を選択することに加えて、分子マーカーで高い有効性があらかじめ予測でき副作用の少ない医薬品を開発することは、がんの個別化医療の主要基盤となる。我々は、遺伝子発現情報解析に加えて、質量分析、次世代シーケンシング技術等も用いて新規のがんバイオマーカーの探索を進めており、同定した各種バイオマーカーの特性 (早期がん検出、がんの病態診断: 予後、転移、抗がん剤感受性) を最大限に生かしたがん患者の生命予後の延長に寄与しうる統合的ながん病態診断システムの構築を進めている。

## 文献

- [1] Daigo Y, Nakamura Y. From cancer genomics to thoracic oncology: Discovery of new biomarkers and therapeutic targets for lung and esophageal carcinoma. *Gen Thorac Cardiovasc Surg* 56:43-53, 2008
- [2] Sato N, Yamabuki T, Takano A, Koinuma J,

- Aragaki M, Masuda K, Ishikawa N, Kohno N, Ito H, Miyamoto M, Nakayama H, Miyagi Y, Tsuchiya E, Kondo S, Nakamura Y, Daigo Y. Wnt inhibitor Dickkopf-1 as a target for passive cancer immunotherapy. *Cancer Res* 70:5326-5336, 2010
- [3] Takano A, Ishikawa N, Nishino R, Masuda K, Yasui W, Inai K, Nishimura H, Ito H, Nakayama H, Miyagi Y, Tsuchiya E, Kohno N, Nakamura Y, Daigo Y. Identification of nectin-4 oncoprotein as a diagnostic and therapeutic target for lung cancer. *Cancer Res* 69:6694-6703, 2009
- [4] Ishikawa N, Takano A, Yasui W, Inai K, Nishimura H, Ito H, Miyagi Y, Nakayama H, Fujita M, Hosokawa M, Tsuchiya E, Kohno N, Nakamura Y, Daigo Y. Cancer-Testis Antigen, LY6K is a Serologic and Prognostic Biomarker and a Therapeutic Target for Lung and Esophageal Carcinomas. *Cancer Res* 67:11601-11611, 2007
- [5] Fujitomo T, Daigo Y, Matsuda K, Ueda K, Nakamura Y. Critical Function for Nuclear Envelope Protein TMEM209 in Human Pulmonary Carcinogenesis. *Cancer Res* 72:4110-4118, 2012.
- [6] Nguyen MH, Koinuma J, Ueda K, Ito T, Tsuchiya E, Nakamura Y, Daigo Y. Phosphorylation and activation of cell division cycle associated 5 by mitogen-activated protein kinase play a crucial role in human lung carcinogenesis. *Cancer Res* 70:5337-5347, 2010
- [7] Kato T, Sato N, Hayama S, Yamabuki T, Ito T, Miyamoto M, Kondo S, Nakamura Y, Daigo Y. Activation of Holliday Junction-Recognizing Protein Involved in the Chromosomal Stability and Immortality of Cancer Cells. *Cancer Res* 67:8544-8553, 2007
- [8] Hayama S, Daigo Y, Yamabuki T, Hirata D, Kato T, Miyamoto M, Ito T, Tsuchiya E, Kondo S, Nakamura Y. Phosphorylation and activation of CDCA8 by AURKB plays a significant role in human lung carcinogenesis. *Cancer Res* 67:4113-4122, 2007
- [9] Takahashi K, Furukawa C, Takano A, Ishikawa N, Kato T, Hayama S, Suzuki C, Yasui W, Inai K, Sone S, Ito T, Nishimura H, Tsuchiya E, Nakamura Y, Daigo Y. The neuromedin u-growth hormone secretagogue receptor 1b/neurotensin receptor 1 oncogenic signaling pathway as a therapeutic target for lung cancer. *Cancer Res* 66:9408-9419, 2006
- [10] Kakiuchi S, Daigo Y, Ishikawa N, Furukawa C, Tsunoda T, Yano S, Nakagawa K, Tsuruo T, Kohno N, Fukuoka M, Sone S, Nakamura Y. Prediction of sensitivity of advanced non-small cell lung cancers to gefitinib. *Hum Mol Genet* 13:3029-3043, 2004