

Figure 4 (a–d) Immunohistochemistry employing with anti-CD31 antibody for specimens of inoculated tumors of MIAPaCa2 (a), MIAPaCa2H(12)-3 (b), PCI-35 (c) and PCI-35H(12)-1 (d) ($\times 400$). (e, f) Quantification of CD31-positive areas by counting pixels in digitally imported images. (e) MIAPaCa2 (MW) and MIAPaCa2 hybrid clones (M1, M2 and M3). (f) PCI-35 (PW) and PCI-35 hybrid clones (P1 and P2). Asterisks denote statistically significant differences ($P < 0.05$).

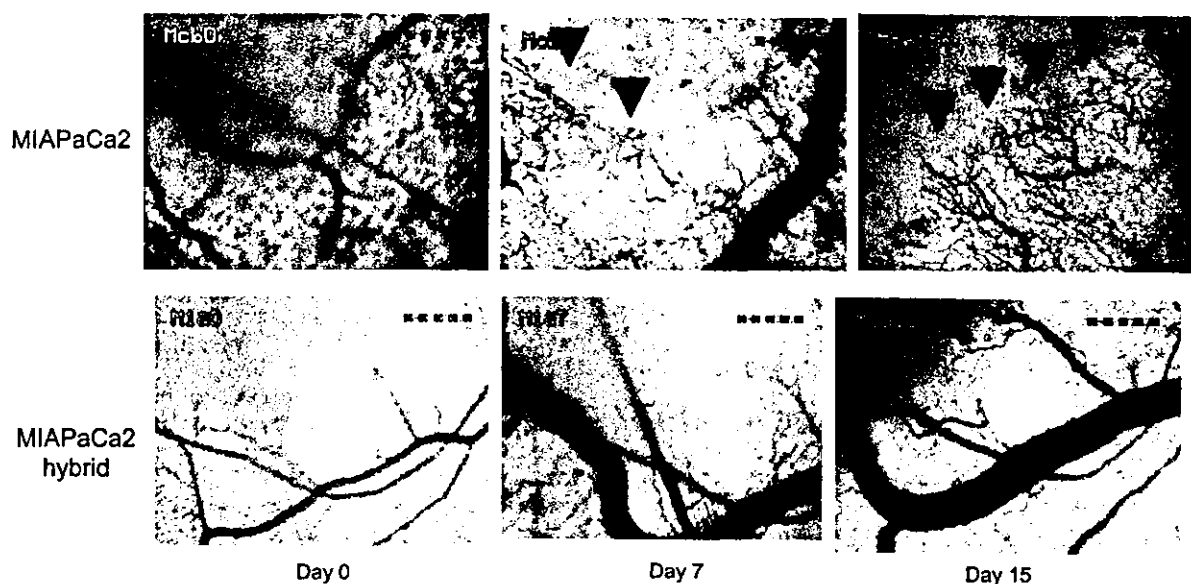


Figure 5 *In vivo* microscopy images of the dorsal skin chamber to monitor angiogenesis. The formation of microvessels indicated active vascularization (arrowheads). Upper panels, MIAPaCa2. Lower panels, MIAPaCa2 hybrid.

was observed in tumors derived from MIAPaCa2 parental cells. On the other hand, tumors of hybrid clones showed very sparse vessel formation (see Figure 5). These results indicated that some of the hybrid cells had a significant reduction in *in vivo* tumorigenic activity, which could be accounted for by the suppression of angiogenesis.

Next, we performed a cDNA microarray analysis to determine the differences in gene expression profiles between the parental MIAPaCa2 and its hybrid clones, because significant phenotypic differences were observed in this set. We employed a cDNA microarray platform consisting of 23 040 genes commercially available from Amersham

Table 2 Differentially expressed genes between MIAPaCa2 clones-1 and -3 and their parental cell

Accession no.	P-value	Normalized ratio	Locus	Description	GO ontology
NM_033111.2	0.046	1.7	13q12	LOC88523: CG016	Unknown
NM_005347.2	0.044	2.1	9q33	HSPA5: heat shock 70 kDa protein 5	ATP binding
NM_006067.3	0.042	0.6	16q24	NOC4: neighbor of COX4	Mitochondrion
BX647106.1	0.040	2.5	6q27	MRNA: cDNA DKFZp686N23124	Unknown
NM_006088.3	0.036	1.9	6p25	TUBB2: tubulin,beta,2	Structural constituent of cytoskeleton
NM_006082.1	0.026	1.6	12q13	K-ALPHA-1: tubulin, alpha, ubiquitous	Microtubule
NM_001614.2	0.022	1.8	17q25	ACTG1: actin, gamma 1	Structural constituent of cytoskeleton
AK057366.1	0.021	1.6	7q11	Homo sapiens cDNA FLJ32804 fis	Unknown
NM_002392.1	0.014	1.8	12q14	MDM2: Mdm2, transformed 3T3 cell double minute 2,	Cell growth and maintenance
NM_006203.2	0.011	1.5	5q12	PDE4D: phosphodiesterase 4D, cAMP-specific	Signal transduction
NM_002898.1	0.010	1.6	12q13	RBMS2: RNA-binding motif, single-stranded interacting protein 2	RNA binding
NM_002715.1	0.010	1.9	5q23	PPP2CA: protein phosphatase 2, catalytic subunit, alpha isoform	RNA splicing
NM_014865.2	0.009	1.6	12p13	CNAP1: chromosome condensation-related SMC-associated protein1	Cell cycle
NM_003977.1	0.008	0.4	11q13	AIP: aryl hydrocarbon receptor interacting protein	Signal transduction
NM_001763.1	0.007	1.6	1q22	CD1A: CD1A antigen, a polypeptide	Immune response
NM_005914.2	0.006	1.6	8q12	MCM4: minichromosome maintenance deficient 4	ATP binding
NM_006824.1	0.005	2.0	1q35	EBNA1BP2: EBNA1-binding protein2	Membrane fraction
NM_021947.1	0.005	1.8	17p13	SRR: Serin racemase	Amino-acid metabolism
NM_003057.2	0.005	2.4	6q26	SLC22A1: solute carrier family 22, member 1; synonyms	Membrane fraction
NM_003380.1	0.004	0.7	10p13	VIM: vimentin	Structural constituent of cytoskeleton
NM_005159.2	0.003	2.4	15q11	ACTC: actin,alpha,cardiac muscle	Actin filament
BC063863.1	0.001	1.7	19p13	KIAA0892 protein	Unknown
NM_001712.2	0.001	1.6	19q13	CEACAM1: carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1	Immune response
NM_001743.3	0.001	1.7	2p21	CALM2: calmodulin 2 (phosphorylase kinase, delta)	Calcium ion binding

Biosciences (Piscataway, NJ, USA) and performed a comparative hybridization analysis between the parental cells and their hybrids with suppressed tumorigenicity phenotype. The results give us information about differentially expressed genes, theoretically caused by the introduction of chromosome 12. We selected genes with differential values of more than 1.5-fold and showed statistically significant differences. Among the results, we found that 24 genes met the criteria (see Table 2). Predicted functions were annotated based on the Gene Ontology database.

Next, we compared the expression profiles between MIAPaCa2H(12)-2 and MIAPaCa2H(12)-3. Although both were MMCT hybrid clones, the former lost its growth-suppressive activity, while the latter retained it after inoculation into SCID mice. This comparison may give significant information of genes accounting for the tumor-suppressive phenotype without a noise of MMCT technique itself. We found that 18 genes showed more than a 1.5-fold difference in expression level, which is a statistically significant difference (Table 3). These genes could account for the differences in tumorigenic and angiogenic phenotypes between the clones.

Not only genes on chromosome 12 that were expressed differentially beyond our criteria but also those that were expressed below the criteria could produce the tumor-suppressive phenotype, because the addition of one allele to the existing three alleles on chromosome 12 may not result in a significant difference in expression levels in some genes, especially in those supposed to be functionally altered by structural alteration. Therefore, we searched for all expressed genes beyond background levels in hybrids of MIAPaCa2H(12)-1 and -3, both of which showed the suppressed tumorigenic phenotype, and found 25 genes on chromosome 12 according to the annotated information as listed in Table 4.

We validated the results of alterations of expressions detected in the microarray experiment by the semiquantitative RT-PCR method (see Figure 6). Although the results of semiquantitative RT-PCR were not completely consistent with the corresponding data of microarray experiment in the magnitude of change in expression level, the direction of change, either upregulation or down-regulation, in each case was retained. Among these, the *RAB21* gene, one of the candidate genes selected by microarray analysis and located on chromosome

Table 3 Differentially expressed genes between suppressed and unsuppressed tumorigenic phenotypes

Accession no.	Locus	P-value	Fold change	Description	GO ontology
NM_015004.2	3p21	0.0273	32.5	KIAA0116: Human mRNA for KIAA0116 gene, partial cds	Exonuclease activity
AF086240.1	18q21	0.01	5.03	Homo sapiens full-length insert, cDNA clone ZD28F11	Unknown
BX116634.1	1p21-p22	0.007	3.91	Homo sapiens transcribed sequence	Unknown
NM_001776.2	10q24	0.0277	3.90	ENTPD1: ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase 1	Cell-cell signalling
BC039676.1	11q24	0.0269	3.65	Homo sapiens, clone IMAGE: 5173389, mRNA	Unknown
AI827562.1	15q22	0.0061	3.01	Homo sapiens transcribed sequence	Unknown
NM_005736.2	10q24	0.0377	2.92	ACTR1A: ARP1 actin-related protein 1 homolog A, centractin alpha (yeast)	Structural constituent of cytoskeleton
NM_004745.3	8p23	0.0168	2.60	DLGAP2: discs, large (Drosophila) homolog-associated protein 2	Protein binding
NM_005276.2	12q12	0.0425	2.10	CPD1: glycerol-3-phosphatide hydrogenase 1	Carbohydrate metabolism
NM_005244.3	20q13	0.0391	2.08	EYA2: eyes absent homolog 2 (Drosophila);	Development
L08438.1	5q35	0.0026	1.96	Human autonomously replicating sequence (ARS)	Unknown
NM_194261.1	16p13	0.0035	1.91	UBE1: ubiquitin-conjugating enzyme E2f (UBC9 homolog, yeast)	Ubiquitin cycle
NM_005159.2	15q11	0.0452	1.89	ACTC: Action, alpha, cardiac muscle	Structural constituent of cytoskeleton
NM_005594.1	12q23	0.0097	1.84	NACA: nascent-polypeptide-associated complex alpha polypeptide	Unknown
NM_006067.3	16q24	0.0223	1.70	NOC4: neighbor of COX4	Mitochondrion
NM_004595.2	Xp22	0.0148	1.52	SAS: spermine synthase	Transferase activity
NM_005720.2	7q22	0.0153	0.63	ARPC1B: actin-related protein 2/3 complex, subunit 1B, 41 kDa	Structural constituent of cytoskeleton
XM_371546	2q12	0.0454	0.51	Human sequence similar to elongation factor-1 alpha (ef-1) mRNA, 3' end	Unknown

arm 12q, showed a higher expression in MIAPaCa2 hybrids than in their parental cells. The results of microarray analysis were reconfirmed by the quantitative real-time RT-PCR method (see Figure 7).

Discussion

Several lines of evidence, as we described in the Introduction, have suggested that chromosome 12q may carry a TSG(s) that plays a role in the development and/or progression of pancreatic cancer. We aim to gather functional evidence for the existence of TSG(s) and refine candidate(s) yet to be identified on the 12q arm. We transferred a normal copy of chromosome 12 into pancreatic cancer cell lines by the microcell-mediated chromosome transfer (MMCT) technique^{16,17} and analyzed its phenotype. MMCT has been proven to be a useful tool providing functional evidence for identification of TSG in a variety of cancers such as pancreatic cancer,²¹ colon cancer,^{26,27} prostate cancer,²⁸ Wilms' tumor,²⁹ and melanoma.³⁰ This technique also led the way to the isolation of the *NBS* gene.³¹

The derived hybrids of chromosome 12 showed clear differences from parental cells not in *in vitro* but *in vivo* tumorigenic study. The *in vitro* studies of anchorage-dependent and -independent cell proliferations showed no remarkable differences.

However, the inoculation of the hybrid cells MIAPaCa2H(12) into SCID mice strikingly showed a significant suppression of tumorigenesis when compared with parental cells of MIAPaCa2. The hybrid cells of the PCI-35 lineage did not show such a phenotype. These results were of particular interest because MIAPaCa2 was partially defective for chromosome 12q, but PCI-35 was not.¹⁸ These results suggested that newly introduced genes on chromosome 12 overcame defective functions of existing genes in MIAPaCa2 but not in PCI-35. One clone of hybrid of MIAPaCa2, MIAPaCa2H(12)-2, did not show a suppressive phenotype. We suspected that this clone lacked some important portions of the introduced allele. However, we could not detect differences in genotypes regarding chromosome 12 among hybrids derived from MIAPaCa2 in our panel of microsatellite analysis, mainly because of similarities in the number of repeats, which consisted of the microsatellites between the existing alleles and the introduced allele.

We found a remarkable suppression of angiogenesis in and surrounding the inoculated tumors of hybrids in examinations employing quantitative vessel counting with immunohistochemical labeling and an *in vivo* microscopy system. The suppression of angiogenesis could account for the suppressive phenotype of *in vivo* tumorigenesis. These facts indicated a potential interposition of

Table 4 Differentially expressed genes on chromosome 12 among MIAPaCa2 hybrids

Accession no.	Locus	Description	GO ontology
NM_004982.2	12p11	<i>KCNJ8</i> : potassium inwardly rectifying channel, subfamily J, member 8	Voltage-gated ion channel activity
NM_003213.1	12p13	<i>TEAD4</i> : TEA domain family member 4	RNA polymerase II transcription factor activity
NM_005768.4	12p13	<i>C3F</i> : putative protein similar to nesy (<i>Drosophila</i>)	Unknown
NM_006170.1	12p13	<i>NOL1</i> : nucleolar protein 1, 120 kDa	Positive regulation of cell proliferation
NM_002831.3	12p13	<i>PTPN6</i> : protein tyrosine phosphatase, nonreceptor type 6; synonyms	Protein tyrosine phosphate activity
L16783.1	12p13	<i>FOXM1</i> : forkhead box M1	RNA polymerase II transcription factor activity
NM_005276.2	12q12	<i>GPD1</i> : glycerol-3-phosphate dehydrogenase 1	Carbohydrate metabolism
NM_02898.1	12q13	<i>RBMS2</i> : RNA-binding motif, single-stranded interacting protein 2	RNA-binding activity
NM_021019.2	12q13	<i>MYL6</i> : myosin, light polypeptide 6, alkali, smooth muscle and nonmuscle; synonyms	Structural constituent of muscle
NM_002475.2	12q13	<i>MLC1SA</i> : myosin light chain 1 slow a	Structural constituent of muscle
NM_006576.2	12q13	<i>AVIL</i> : advillin	Actin binding
NM_006082.1	12q13	<i>K-ALPHA-1</i> : tubulin, alpha, ubiquitous	Structural molecule activity
NM_000289.3	12q13	<i>PFKM</i> : phosphofructokinase, muscle	Transferase activity
NM_000239.1	12q14	<i>LYZ</i> : lysozyme (renal amyloidosis)	Hydrolase activity
NM_002392.1	12q14	<i>MDM2</i> : Mdm2, transformed 3T3 cell double minute 2, p53-binding protein (mouse); synonym	Oncogenesis
NM_014999.1	12q15	<i>RAB21</i> : RAB21, member RAS oncogene family	GTP-binding activity
NM_005123.1	12q23	<i>NR1H4</i> : nuclear receptor subfamily 1, group H, member 4	Transcription factor
NM_006700.1	12q23	<i>FLN29</i> gene product	Unknown
NM_000970.2	12q24	<i>RPL6</i> : ribosomal protein L6	Ribosome
NM_031954.2	12q24	<i>KCTD10</i> : potassium channel tetramerization domain containing 10(MSTP028)	Voltage-gated ion channel activity
NM_001516.3	12q24	<i>GTF2H3</i> : general transcription factor IIIH, polypeptide3	Damaged DNA binding
NM_000617.1	12q24	<i>SLC11A2</i> : solute carrier family 11 (proton-coupled divalent metal ion transporters), member 2	Iron ion transporter
NM_005594.2	12q24	<i>NACA</i> : nascent-polypeptide-associated complex alpha polypeptide	Protein biosynthesis
NM_019086.2	12q24	Hypothetical protein FLJ20674	Unknown
NM_020993.2	12q24	<i>BCL7A</i> : B-cell CLL/Lymphoma 7A, mRNA	Actin binding

putative TSGs at chromosome 12 playing suppressive roles, not in proliferation of the tumor itself in an early phase, but in angiogenesis in a later phase of tumorigenesis. Angiogenesis is a key factor for tumorigenesis, and its suppression plays a major role in a tumor-suppressive activity.³²⁻³⁴ The suppressive activity of introduction of chromosome 12 in the later phase of pancreatic tumorigenesis could explain our previous finding of significant association of loss of chromosome 12q with poor prognoses in patients with pancreatic cancer.¹²

We further analyzed a total of 23 040 unique human genes in this study to search for genes closely associated with tumorigenesis by altering expression and successfully grasped gene expression profiles of hybrids in comparison to parental cells. Although the possibility of missing important genes cannot be excluded because of the limited number we examined, about two-thirds of the total human genes that were analyzed, this method is one of the best ways to explore the genes that play important roles in pancreatic carcinogenesis. Using this method, detection of genes that lose their function by structural alterations cannot be detected either. However, this technique enabled us to obtain valuable information from various aspects such as examinations of the TGF-beta/SMAD4 pathway³⁵ or

introduction of a DNA methylation inhibitor or a selective COX-2 inhibitor in pancreatic cancer cells.^{36,37} Discovery of various overexpressed genes in pancreatic cancer cells was also reported by this method; sea urchin fascin homolog, heat shock protein,³⁸ *ABL2*, *Notch4*, *SOD1*,³⁹ *c-myc* and *Rad51*.⁴⁰ We report herein the first results of microarray analysis of the comparison between parental cells and their hybrids after introduction of chromosome 12 using the MMCT technique.

For analyzing the data of the microarray, we first selected genes whose expressions were significantly different statistically and more than 1.5-fold differentially expressed genes between the parental cell and hybrid clones were picked up. These data gave information about alteration of gene expression by introduction of the additional copy of chromosome 12. According to our FISH results, the majority of hybrid cells harbored one additional copy of the chromosome 12 to tri- and tetraploid cells, MIAPaCa2 and PCI-35, respectively. Although we could not precisely estimate alterations of expressions of genes between parental cells with three or four alleles and cells with one additional allele in them, it is probable that the differences may be small. Therefore, we used only statistical methods for data analysis without cutting off the data in large-fold

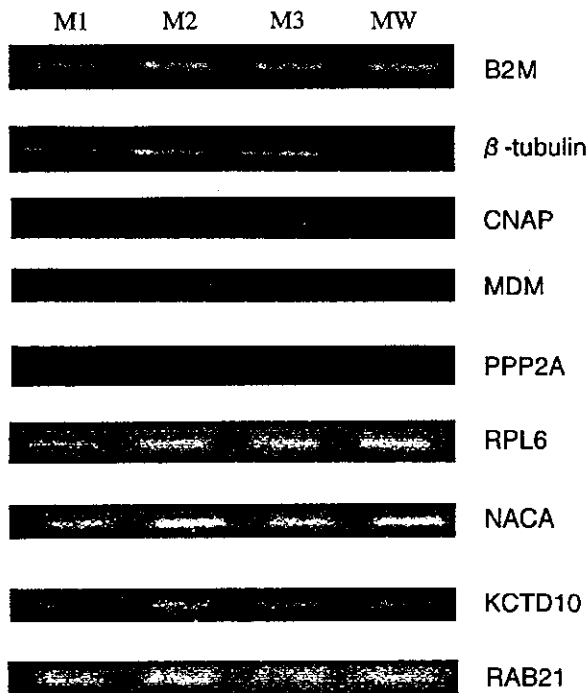


Figure 6 Semireal-time quantitative RT-PCR for MIAPaCa2 parental cell and its derived hybrid clones. β 2-Microglobulin mRNA was used as the control to adjust the concentrations of template cDNAs. PCR was performed in minimum cycles and results were confirmed by ethidium bromide staining after agarose gel electrophoresis. Lanes MW, MIAPaCa2 parental cell; M1, hybrid clone 1; M2, hybrid clone 2; M3, hybrid clone 3.

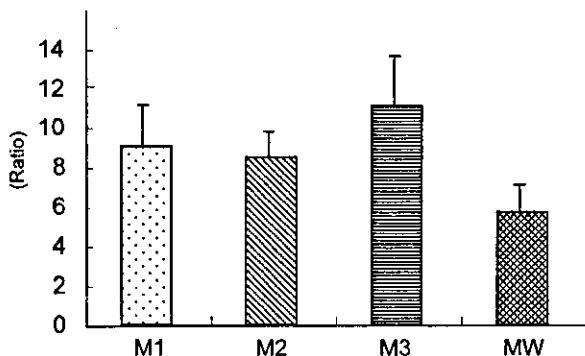


Figure 7 Real-time quantitative RT-PCR assay for RAB21 in MIAPaCa2 (MW) and MIAPaCa2 hybrid clones (M1, M2 and M3). The vertical scale shows the ratio of RAB21 to β 2-microglobulin, the internal control.

increases of expression levels as described in other reports; we applied 1.5-fold as the cutoff. We obtained 24 genes that were differentially expressed between the MIAPaCa2 and its derived hybrid clones with suppressed tumorigenicity. These 24 genes are predicted to function in a variety of pathways and situations, potentially indicating complicated molecular networks underlying

cellular phenotypes triggered by genes on the transferred chromosome and/or the effect of introduction of one additional allele itself. Since we applied the strict statistical method to select genes to avoid false positives, and because we excluded ESTs without annotated information, the total number of genes listed is not large. Among those selected genes, several interesting genes have been reported in association with cell proliferation. PPP2CA comprises a diverse family of phosphoserine- and phosphothreonine-specific enzymes ubiquitously expressed in eukaryotic cells, and regulates a diverse set of cellular processes such as metabolism, cell cycle, signal transduction, differentiation, and oncogenic transformation.⁴¹ CNAP1 is one of the essential components of the chromosome condensation complex in the mitotic process, and a mutant CNAP1 was unable to associate with mitotic chromosomes.⁴²

Gene expression profiles between the two typical hybrid clones of MIAPaCa2, one of which lost growth-suppressive activity (MIAPaCa2H(12)-2) and the other that retained it (MIAPaCa2H(12)-3), could give us valuable information about genes accounting for the difference of phenotype. The 18 selected, differentially expressed genes were scattered on various chromosomes and had a variety of functions; some important clues may be hidden in the function of these genes.

The 25 expressed genes on chromosome 12 in MIAPaCa2H(12)-1 and -3 potentially include genes functioning in the tumor-suppressive pathway in pancreatic cancer. The ranges of expression levels were between 0.31 and 3.86 when compared with parental cells; downregulation of genes on chromosome 12 could be a result of direct or indirect trans-suppression by introduced genes. Some of these 25 genes on chromosome 12 already showed evidence of suppressor activity in pancreatic cancer. TGF pathway components may use a motor protein light chain as a receptor for the recruitment and transport of specific cargo along microtubules.⁴³ PRPN6 encodes the protein tyrosine phosphatase of nonreceptor type 6, which is shown to be suppressed in leukemic cells and correlated with patients' prognosis.⁴⁴ Among these genes on chromosome 12, RAB21 was upregulated 1.68-fold higher in hybrids, and this fold change was reconfirmed by quantitative PCR. RAB21 is a member of a subfamily of small GTP-binding protein of the Ras superfamily that has been revealed to play a role in the regulation of vesicular transport in polarized intestinal epithelial cells.⁴⁵ Phenotypes related to the carcinogenesis of this gene are yet to be investigated.

In previous works, we have found that expression of DUSP6 at 12q21-q22 is suppressed in pancreatic cancer cells, and exogenous restoration of the gene revealed a tumor-suppressive phenotype.^{13,14} It is notable that suppressed expression of DUSP6 was not recovered after restoration of chromosome 12. Probably, an epigenetic mechanism silenced the

DUSP6 gene expression of the newly introduced chromosome 12. The roles of other candidate genes in tumor suppressions remain to be explored.

The hybrid cells revealed the suppressive phenotype of angiogenesis: therefore, molecules predicted to be involved in angiogenic process are of particular interest. The microarray we employed contained several genes related to angiogenesis, including *ANGPT2*, *TNFSF12*, *SH2D2A*, *ANG*, *ANPEP*, *VEGFC*, and *PGF*. We found that these genes were expressed at levels less than the background in both parental and hybrid cells. Therefore, there is little possibility, if any, that they play a role in the angiogenic phenotypes observed in the present study. Further detailed examination of other angiogenesis-related molecules is needed.

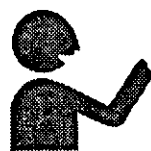
Acknowledgements

We thank Dr Barbara Lee Smith Pierce (Adjunct Professor, University of Maryland University College) for editorial work in the preparation of this manuscript. This work was supported by the Japanese Ministries of Education, Culture, Sports, Science and Technology, and Health, Labor and Welfare, Vehicle Racing Commemorative Foundation, and Foundation for Promotion of Cancer Research in Japan.

References

- Parkin DM, Pisani P, Ferlay J. Estimates of the worldwide incidence of 25 major cancers in 1990. *Int J Cancer* 1999;80:827-841.
- Ariyama J, Suyama M, Ogawa K, *et al*. The detection and prognosis of small pancreatic carcinoma. *Int J Pancreatol* 1990;7:37-47.
- Berube NG, Speevak MD, Chevrette M. Suppression of tumorigenicity of human prostate cancer cells by introduction of human chromosome del(12)(q13). *Cancer Res* 1994;54:3077-3081.
- Luu HH, Zagaja GP, Dubauskas Z, *et al*. Identification of a novel metastasis-suppressor region on human chromosome 12. *Cancer Res* 1998;58:3561-3565.
- Fey MF, Hesketh C, Wainscoat JS, *et al*. Clonal allele loss in gastrointestinal cancers. *Br J Cancer* 1989;59:750-754.
- Sano T, Tsujino T, Yoshida K, *et al*. Frequent loss of heterozygosity on chromosomes 1q, 5q, and 17p in human gastric carcinomas. *Cancer Res* 1991;51:2926-2931.
- Schneider BG, Pulitzer DR, Brown RD, *et al*. Allelic imbalance in gastric cancer: an affected site on chromosome arm 3p. *Genes Chromosomes Cancer* 1995;13:263-271.
- Murty VV, Houldsworth J, Baldwin S, *et al*. Allelic deletions in the long arm of chromosome 12 identify sites of candidate tumor suppressor genes in male germ cell tumors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;89:11006-11010.
- Kimura M, Abe T, Sunamura M, *et al*. Detailed deletion mapping on chromosome arm 12q in human pancreatic adenocarcinoma: identification of a 1-cM region of common allelic loss. *Genes Chromosomes Cancer* 1996;17:88-93.
- Fukushige S, Waldman FM, Kimura M, *et al*. Frequent gain of copy number on the long arm of chromosome 20 in human pancreatic adenocarcinoma. *Genes Chromosomes Cancer* 1997;19:161-169.
- Heidenblad M, Jonson T, Mahlamaki EH, *et al*. Detailed genomic mapping and expression analyses of 12p amplifications in pancreatic carcinomas reveal a 3.5-Mb target region for amplification. *Genes Chromosomes Cancer* 2002;34:211-223.
- Yatsuoka T, Sunamura M, Furukawa T, *et al*. Association of poor prognosis with loss of 12q, 17p, and 18q, and concordant loss of 6q/17p and 12q/18q in human pancreatic ductal adenocarcinoma. *Am J Gastroenterol* 2000;95:2080-2085.
- Furukawa T, Yatsuoka T, Youssef EM, *et al*. Genomic analysis of *DUSP6*, a dual specificity MAP kinase phosphatase, in pancreatic cancer. *Cytogenet Cell Genet* 1998;82:156-159.
- Furukawa T, Sunamura M, Motoi F, *et al*. Potential tumor suppressive pathway involving *DUSP6*/*MKP-3* in pancreatic cancer. *Am J Pathol* 2003;162:1807-1815.
- Sun C, Yamato T, Furukawa T, *et al*. Characterization of the mutations of the *K-ras*, *p53*, *p16*, and *SMAD4* genes in 15 human pancreatic cancer cell lines. *Oncol Rep* 2001;8:89-92.
- Koi M, Morita H, Yamada H, *et al*. Normal human chromosome 11 suppresses tumorigenicity of human cervical tumor cell line SiHa. *Mol Carcinog* 1989;2:12-21.
- Fournier RE, Ruddle FH. Stable association of the human transgenome and host murine chromosomes demonstrated with trispecific microcell hybrids. *Proc Natl Acad Sci USA* 1977;74:3937-3941.
- Kimura M, Furukawa T, Abe T, *et al*. Identification of two common regions of allelic loss in chromosome arm 12q in human pancreatic cancer. *Cancer Res* 1998;58:2456-2460.
- Youssef EM, Kaneko K, Yatsuoka T, *et al*. Human BAC contig covering the deleted region in pancreatic cancer at 12q21. *DNA Seq* 2001;11:541-546.
- van Golen KL, Wu ZF, Qiao XT, *et al*. *RhoC* GTPase, a novel transforming oncogene for human mammary epithelial cells that partially recapitulates the inflammatory breast cancer phenotype. *Cancer Res* 2000;60:5832-5838.
- Lefter LP, Furukawa T, Sunamura M, *et al*. Suppression of the tumorigenic phenotype by chromosome 18 transfer into pancreatic cancer cell lines. *Genes Chromosomes Cancer* 2002;34:234-242.
- Duda DG, Sunamura M, Lozonschi L, *et al*. Direct *in vitro* evidence and *in vivo* analysis of the antiangiogenesis effects of interleukin 12. *Cancer Res* 2000;60:1111-1116.
- Schuler GD, Boguski MS, Stewart EA, *et al*. A gene map of the human genome. *Science* 1996;274:540-546.
- Mori Y, Shiwaku H, Fukushige S, *et al*. Alternative splicing of *hMSH2* in normal human tissues. *Hum Genet* 1997;99:590-595.
- Yunis AA, Arimura GK, Russin DJ. Human pancreatic carcinoma (MIA PaCa-2) in continuous culture: sensitivity to asparaginase. *Int J Cancer* 1977;19:218-235.

- 26 Tanaka K, Oshimura M, Kikuchi R, *et al*. Suppression of tumorigenicity in human colon carcinoma cells by introduction of normal chromosome 5 or 18. *Nature* 1991;349:340-342.
- 27 Tanaka K, Yanoshita R, Konishi M, *et al*. Suppression of tumorigenicity in human colon carcinoma cells by introduction of normal chromosome 1p36 region. *Oncogene* 1993;8:2253-2258.
- 28 Padalecki SS, Johnson-Pais TL, Killary AM, *et al*. Chromosome 18 suppresses the tumorigenicity of prostate cancer cells. *Genes Chromosomes Cancer* 2001;30:221-229.
- 29 Weissman BE, Saxon PJ, Pasquale SR, *et al*. Introduction of a normal human chromosome 11 into a Wilms' tumor cell line controls its tumorigenic expression. *Science* 1987;236:175-180.
- 30 Trent JM, Stanbridge EJ, McBride HL, *et al*. Tumorigenicity in human melanoma cell lines controlled by introduction of human chromosome 6. *Science* 1990;247:568-571.
- 31 Matsuura S, Tauchi H, Nakamura A, *et al*. Positional cloning of the gene for Nijmegen breakage syndrome. *Nat Genet* 1998;19:179-181.
- 32 Folkman J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J Med* 1971;285:1182-1186.
- 33 St Croix B, Rago C, Velculescu V, *et al*. Genes expressed in human tumor endothelium. *Science* 2000;289:1197-1202.
- 34 Bergers G, Javaherian K, Lo KM, *et al*. Effects of angiogenesis inhibitors on multistage carcinogenesis in mice. *Science* 1999;284:808-812.
- 35 Holloway S, Davis M, Jaber R, *et al*. A clinically relevant model of human pancreatic adenocarcinoma identifies patterns of metastasis associated with alterations of the TGF-beta/Smad4 signaling pathway. *Int J Gastrointest Cancer* 2003;33:61-69.
- 36 Tseng WW, Deganutti A, Chen MN, *et al*. Selective cyclooxygenase-2 inhibitor rofecoxib (Vioxx) induces expression of cell cycle arrest genes and slows tumor growth in human pancreatic cancer. *J Gastrointest Surg* 2002;6:838-843.
- 37 Sato N, Fukushima N, Maehara N, *et al*. SPARC/osteonection is a frequent target for aberrant methylation in pancreatic adenocarcinoma and a mediator of tumor-stromal interactions. *Oncogene* 2003;22:5021-5030.
- 38 Maitra A, Iacobuzio-Donahue C, Rahman A, *et al*. Immunohistochemical validation of a novel epithelial and a novel stromal marker of pancreatic ductal adenocarcinoma identified by global expression microarrays: sea urchin fascin homolog and heat shock protein 47. *Am J Clin Pathol* 2002;118:52-59.
- 39 Crnogorac-Jurcevic T, Efthimiou E, Nielsen T, *et al*. Expression profiling of microdissected pancreatic adenocarcinomas. *Oncogene* 2002;21:4587-4594.
- 40 Han H, Bearss DJ, Browne LW, *et al*. Identification of differentially expressed genes in pancreatic cancer cells using cDNA microarray. *Cancer Res* 2002;62:2890-2896.
- 41 Zolnierowicz S. Type 2A protein phosphatase, the complex regulator of numerous signaling pathways. *Biochem Pharmacol* 2000;60:1225-1235.
- 42 Ball AR, Schmiesing JA, Zhou C, *et al*. Identification of a chromosome-targeting domain in the human condensation subunit CNAP1/hCAP-D2/Eg7. *Mol Cell Biol* 2002;22:5769-5781.
- 43 Tang Q, Staub CM, Gao G, *et al*. A novel transforming growth factor-beta receptor-interacting protein that is also a light chain of the motor protein dynein. *Mol Biol Cell* 2002;13:4484-4496.
- 44 Oka T, Ouchida M, Koyama M, *et al*. Gene silencing of the tyrosine phosphatase SHP1 gene by aberrant methylation in leukemias/lymphomas. *Cancer Res* 2002;62:6390-6394.
- 45 Opdam FJ, Kamps G, Croes H, *et al*. Expression of Rab small GTPases in epithelial Caco-2 cells: Rab21 is an apically located GTP-binding protein in polarised intestinal epithelial cells. *Eur J Cell Biol* 2000;79:308-316.



話題

EBMの手法による肺がん 診療ガイドライン*

桜田 晃** 佐藤雅美** 近藤 丘** 藤村重文***

Key Words : evidence-based medicine, lung cancer

はじめに

「Evidence-based Medicine (EBM)の手法による肺癌の診療ガイドライン策定に関する研究」(主任研究者: 藤村重文)は平成13年厚生労働省科学研究補助金21世紀型医療開拓推進事業として開始され, 翌年に厚生労働省科学研究補助金医療技術評価総合研究事業に事業が引き継がれ, 2年間の研究を終了した。その報告書を要約したものが, 「EBMの手法による肺がんの診療ガイドライン」として, 2003年11月に出版された¹⁾。本稿では, 本ガイドライン作成の手順について解説し, その使用方法に関する注意点, 今後の課題などについて述べる。

ガイドライン作成手順について

研究班は, 呼吸器内科, 呼吸器外科, 放射線科を含む肺がん診療の専門家と疫学の専門家合計50名により組織し, 日本肺癌学会, 日本呼吸器学会, 日本呼吸器外科学会, 日本外科学会, 日本胸部外科学会, 日本癌治療学会, 日本放射線学会, 日本呼吸器内視鏡学会(旧日本気管支学会)と連携して作成を進める体制をとった。作成の手順としては, 厚生労働省より示された指針(診療ガイドラインの作成の手順, 表1)ののっとり行った。初年度は各専門分野別に分担してガイドラインを作成し, 翌年には, 使用する場合

表1 診療ガイドライン作成手順

- ・ 臨床上の疑問点の抽出
- ・ 各疑問点に対する文献検索
- ・ 採用文献の批判的吟味
- ・ 各疑問点に対するエビデンスとそのレベルを決める
- ・ 各疑問点に対する勧告(推奨)とその強さを決める
- ・ すべての疑問点に関するエビデンスや勧告を網羅した診療ガイドラインをまとめる
- ・ ガイドラインの内容の第三者評価
- ・ 3年を目途に改訂必要性の検討

の利便性を考慮し, 非小細胞肺がん, 小細胞肺がんそれぞれについての病期別ガイドラインの作成を行った。ガイドラインの章立てについては, 表2,3のとおりである。章ごとの分担を決定し, まず, その分野に特有な臨床的疑問点の抽出を行った。それら疑問点の妥当性について全体で審議した後, 疑問点に関連する文献の検索を行った。文献の検索にあたっては, 用いたデータベース, 検索を行った年代の範囲, 検索を行った年月日, 検索に用いたキーワード, 文献の取捨選択方法を明記することを原則とした。本ガイドラインの作成にあたっては, 4万編を超える論文が吟味され, その中から1,142編が採択された。採択にあたっては, 表4に示すように論文のデザインに基づくエビデンスレベルを勘案して, なるべくエビデンスレベルの高いものを採用することを原則としたが, そうした論文

* An evidence-based clinical guideline for lung cancer.

** Akira SAKURADA, M.D., Masami SATO, M.D. & Takashi KONDO, M.D.: 東北大学加齢医学研究所呼吸器再建研究分野(〒980-8575 仙台市青葉区星陵町4-1); Department of Thoracic Surgery, Institute of Development, Aging and Cancer, Tohoku University, Sendai 980-8575, JAPAN

*** Shigefumi FUJIMURA, M.D.: 東北厚生年金病院

表2 診療・治療別ガイドライン

肺がん診断
肺がん化学療法
肺がん放射線治療
肺がん外科治療
肺がん術前・術後治療
肺門部早期がん診断・治療
肺がん胸腔鏡下手術

表3 組織型・病期別ガイドライン

非小細胞がん	小細胞がん
・ I期	・ LD
・ II期	・ ED
・ III期	・ I期
・ IV期	

が存在しない場合は、エビデンスレベルⅢ,Ⅳのものも採用した。これら採択した論文について図1に示すようなアブストラクトテーブルを作成し、原則として複数のレビュアーによるコメントを加えた。その上で、個々の疑問点についての推奨を決定し、グレードを定めた。推奨のグレードは、厚生労働省より示された指針(表5)にしたがってAからDの4段階の中から該当するものを選択した。ここまでの作業はEBMの手法にのっとり淡々と進め、最終的にすべての推奨について全体で討議を行い、推奨のグレードや文言についての決定を行った。エビデンスが存在しない、あるいは少数であるが有効性が自明なものに関する治療については、この段階で推奨の強さを適切と考えられるものに変更した。本ガイドラインでは、グレードAが56、グレードBが60、グレードCが48、グレードDが11で合計175の推奨を行う結果となった。これら推奨の記載と同時に、それぞれの推奨を導く根拠となったエビデンスを併記した。推奨を記載するのがふさわしくないと考えられる項目については、エビデンスの記載のみにとどめた。

非小細胞肺がんI期の項を例にとって述べたい。非小細胞肺がんI期に関しては、表6に示すように、自然史と治療に項目を分け、治療についてはさらに、外科治療、術前術後治療、放射線治療という項目を設けた。非小細胞肺がんI期に関連のある文献を、表7に示すような基準で検索した。610編に及ぶ文献を検索し、その中から、

表4 エビデンスのレベル分類

・ I : システマティックレビュー/メタ分析
・ II : 1つ以上のランダム化比較試験による
・ III : 非ランダム化比較試験による
・ IV : 分析疫学的研究(コホート研究や症例対照研究)による
・ V : 記述研究(症例報告やケース・シリーズ)による
・ VI : 患者データに基づかない、専門委員会や専門家個人の意見

重要なものとして163編を採択した。自然史については、推奨を述べるのがそぐわないと判断し、エビデンスのみの記載とした。治療については、全体についての推奨およびそれを導くに至ったエビデンスを表8に示すように記載した。エビデンスは少ないものの、手術の有効性が自明であるという理由から、グレードAとしている。

このように、本ガイドラインを完成させるにあたっては、純粋なEBMの手法による作業と、現実的に適応可能なものにするための作業の組み合わせを行っており、こうした全体としての作業が、EBMの実践であると認識している。大切なのは、こうした過程を検証に耐えうる形で記録しておくことであり、新たなエビデンスをもとに後に改訂を行う場合に、今回行った作業が効率的に活用可能な資源となるよう意図して作業を進めた。

ガイドラインを利用する場合の注意

1. グレードCの扱い

先に述べたように、今回のガイドラインでは推奨のグレードが4段階に分けられている。グレードA,グレードC,グレードDについては、解釈の問題が生じることはないものと考えられるが、解釈によって誤解をまねく可能性があるのがグレードCである。これは、まだ結論を出すだけのエビデンスが十分そろっていないという現状を示すものであることは、EBMの手法に関して知識のある読者であれば当然理解の範疇にあるわけであるが、そうした知識をもたない読者が、推奨の一文のみを抜粋するような用い方をする場合には、ある治療法が「有効でない」というような誤った捉え方をされることが危惧

ガイドライン項目	鏡視下手術	疑問点	VATSは開胸と比較して出血量に差があるか、手術時間、術後合併症に差があるか、在院日数に差があるか、疼痛に差があるか、術後肺機能に差があるか、術後死亡率に差があるか
作成者	分担者A		
日本語表題	Video-assisted minithoracotomy versus muscle-sparing thoracotomy for performing lobectomy		
英語表題	Video-assisted minithoracotomy versus muscle-sparing thoracotomy for performing lobectomy		
著者	Giudicelli R, Ann Thorac Surg	58	712-718 頁 1994年
研究施設	Sainte-Marguerite University Hospital		研究デザイン 非ランダム化比較研究
研究目的	VATS下の肺癌手術が鏡視開胸に比較して出血量、手術時間、在院日数、疼痛、術後肺機能、術後合併症、術後死亡率に差があるか		
対象	67名の肺癌切除手術例 (原発性肺癌50例)		
介入 (研究方法)	67名を医師の決定で2群に分けた。筋温存手術23例、VATS44例で比較した。性・年齢・肺機能・切除量・病期・病期・組織型に差はなかったが、腫瘍径には有意差があった(2.9cm×4.2cm)。VATSの方法は開胸器を用いるもの。両群とも肺癌例は縦断切開を施行。		
主要評価項目とそれに用いた統計学的手法	Primary end point: 出血量、手術時間、在院日数、疼痛、術後肺機能、術後合併症、死亡率、統計学的手法は検定とカイ2乗検定。		
結果	手術時間はVATS群が有意に長かった。出血量に2群間で有意差はなかった。術後死亡率は3例であったが有意差はなく、また、内2例は着床後からの心臓発作によるものであった。疼痛に関連する術後合併症の頻度はVATS群の方が少なかったが有意差はなく、また、全術後合併症の頻度には差はなかった。術後8日目までの疼痛はVATS群の方が少なかった。術後8日目までの肺機能には有意差はなかった。気漏の期間、ドレナージ期間、在院日数は、いずれもVATS群が少なかったが有意ではなかった。		
アブストラクトコメント	前向き研究だが、無作為化しておらず比較群に疑問が残る。肺癌以外も少なくない。サンプルサイズが小さいため検出力が低かった可能性がある。		
reviewer A	アブストラクターのコメントは妥当と思われず	レビュアーコメント	reviewer D 非ランダム化比較であるので、両群の背景因子が若干異なる可能性があることはいえない。また、術後早期の肺機能の点ではVATSの方が優れていたという報告もある。このstudyでは何かの背景因子が異なることについてその結論は44例のVATS中に術後死亡が8例もあるのは、たまたまかもしれないが、studyの質の問題がある可能性がある。少なくともVATSが術後死亡率を減らすことにはならなかったという結果ともされる。
reviewer B	エビデンス レベル 4	reviewer C	比較試験の方法に問題あり。

図 1

表5 推奨(勧告)グレードの分類

・A: 行うよう強く勧められる
・B: 行うよう勧められる
・C: 行うよう勧めるだけの根拠が明確でない
・D: 行わないよう勧められる

表6 非小細胞肺癌I期の検討項目

・自然史	・縮小手術(肺切除量縮小)
・治療	・胸腔鏡下手術
<外科治療>	・再発
・臨床病期I期と病理病期I期	・術後経過観察
・予後因子	<術前・術後治療>
・T因子, 腫瘍径	・術後免疫療法
・組織型	・術後放射線療法
・分化度, 脈管侵襲	・術後化学療法
・手術	・術後chemoprevention
・標準術式	<放射線単独治療>
・リンパ節郭清	

表7 非小細胞肺癌I期の文献検索方法

- ・Ovid medlineを用い, 検索年代を2002年7月までとし, 検索は2002年9月24日に行った。
- ・検索語としては, carcinoma, non-small-cell lung [Mesh] AND stage I [text]により610編に絞り, その抄録より診断, 予後, 治療に関連する, comparative study, prospective study, retrospective studyを抽出した。

される。決定された推奨の中には、経験的に有効であると見なされ定着している医療行為であるにもかかわらず、エビデンスがあまり存在しないために推奨のレベルがグレードCに分類されたものも含まれているが、そうした場合、誤った解釈をされると、あたかも有効ではない治療が流布しているような誤解を生じることになる。また、新たな治療法でその効果が有望視されているものの、ガイドラインを作成した時点においては、臨床試験が進行中であるといったものもグレードCに含まれる。したがって、分子標的薬剤についても、ガイドライン作成当時のエビデンスに基づいてグレードCとされている。こうしたグレードCの性質を正しく理解してガイドラインを用いて頂く必要がある。

本来、本ガイドラインの対象は、主に肺癌診療に携わる専門医であることが巻頭に明記されている。一般人がこれを目にする場合は専門医とともに読み、正しい理解をして頂きたいと

表8 非小細胞肺癌I期治療の推奨とエビデンス

- <推奨>
- 機能的に耐術可能な場合、I期非小細胞肺癌には外科治療が第一選択である(グレードA)
- <エビデンス>
- I期非小細胞肺癌の術後5年生存率は下記に記すように、臨床病期で50%、病理病期で65%程度であり(IV)、手術以外の治療法との直接の比較試験は存在しないが、他の治療法との差異は明らかである

願うものである。

2. ガイドラインの改訂について

ガイドラインの一般的な性質として、最新の医療状況に即したものであることが求められる。本ガイドラインも同様の性質を有していることは言うまでもなく、3年後を目途に改訂を行うことを前提として作成されている。ガイドラインは検索を行った時点のエビデンスをもとに作成されているため、出版の時点で報告されている最新のエビデンスが含まれていない。たとえば、2003年のASCO(米国臨床腫瘍学会)で報告された肺癌の術後化学療法に関する最新の知見は含まれておらず、今後、新たに蓄積されたエビデンスを加えて再検討し、改訂を行っていく必要がある。

ガイドラインの今後

本ガイドラインは肺癌診療を網羅するガイ

ドラインとしてはわが国初めてのものであり、多数の専門家の多大な労力の賜である。これに基づいて今後のわが国におけるEBMに基づく肺がん診療が進められることで、多くの患者に利益がもたらされるものと信ずるが、現在のガイドラインの形態が最善というわけではない。今後、ガイドラインの利用者からの意見および最新の知見を集約して改訂を行い、また、今回は時間的制約から取り組むことができなかった患者向けのガイドラインを整備する必要がある。膨大な情報量をもつガイドラインを患者に理解しやすく、かつ誤解を受けない形にまとめるには、十分な審議をつくす必要があるが、情報化の進む現代社会においては、可能な限り迅速にそうした作業を進めることが求められているといえよう。厚生労働省によるガイドライン事業の方向性として、最新の医学情報を蓄積し、インターネットなどを利用して、全国の医療者、国民、研究者への医療情報サービスを提供することが示されており、日本医療機能評価機構がこれに中心的な役割を果たすことが決定し準備が進められている。

一方、ガイドラインの作成は従来専門家を中心に作業が進められることが多かったが、患者参加型の診療ガイドラインの作成を推進する活動やその成果が英国より報告され²⁾、わが国においてもこうした取組みを行う市民団体の活動が活発化してきている。患者が医療に参加することはinformed consentを基本として進められている従来の医療から、一歩踏み出して、より患者の満足度の高い医療を提供することを目指すものであるといえるが、そのためには参加

する患者自身の努力とそれを支援するための仕組みが必要であると指摘されている。EBMが普及し始めて日が浅いわが国においては、患者参加型の診療ガイドラインを、一朝一夕に進めるとは行かないのが現実であるが、こうした体制の整備を着実に進めていく一方で、普段の診療において目の患者にEBMを実践していくにあたっての原則を忘れないことが重要であろうと考える。すなわち、研究から得られた根拠research evidence、患者の好みpatient preference、臨床経験clinical expertiseの3つの要素をバランスよくまとめることである。それは、とりもなおさず、完成したガイドラインを画一的に患者に適用するのではなく、患者の意志を反映させるという態度にほかならない。

おわりに

肺癌診療ガイドラインの作成の過程と、使用することにあたっての注意点を解説した。本ガイドラインがわが国におけるEBMの普及ならびに、今後の肺がん診療の質の向上に貢献することを願って稿を終える。

文 献

- 1) EBMの手法による肺癌の診療ガイドライン策定に関する研究班. EBMの手法による肺癌の診療ガイドライン2003版. 東京: 金原出版; 2003.
- 2) Wersch AV, Eccles M. Involvement of consumers in the development of evidence based clinical guidelines: practical experiences from the North of England evidence based guideline development programme. *Auality in Health Care* 2001; 10: 10.

* * *

ガイドラインからみた肺癌外科の構築

2. 中心型早期肺癌のガイドライン

東北大学加齢医学研究所呼吸器再建研究分野（東北大学病院呼吸器外科）

桜田 晃，遠藤 千顕，佐藤 雅美，近藤 丘

特集

ガイドラインからみた肺癌外科の構築

2. 中心型早期肺癌のガイドライン

東北大学加齢医学研究所呼吸器再建研究分野 (東北大学病院呼吸器外科)

桜田 晃, 遠藤 千顕, 佐藤 雅美, 近藤 丘

キーワード 肺癌, ガイドライン, 中心型, 早期肺癌

I. 内容要旨

厚生労働省主導の肺癌ガイドライン作成事業の成果として、「EBMの手法による肺がんの診療ガイドライン」が平成15年秋に出版された。トピックとして中心型早期肺癌のガイドラインの項が設けられているが、本稿では、この項で扱われている中心型早期肺癌の特性、診断、治療における推奨とその根拠となったエビデンスについて解説を行った。また、グレードCの解釈にあたっての注意点や、本分野における今後の課題についても述べた。

II. はじめに

「Evidence-based Medicine (EBM)の手法による肺癌の診療ガイドライン策定に関する研究」(主任研究者：藤村重文)は平成13年厚生労働省科学研究補助金21世紀型医療開拓推進事業として開始され、翌年に厚生労働省科学研究補助金医療技術評価総合研究事業に引き継がれ、2年間の研究を終了した。その報告書を要約したものが、「EBMの手法による肺がんの診療ガイドライン」として、平成15年10月に出版された。診療分野別のガイドラインが7項目、病期別のガイドラインが7項目合計14章という章立てになっているが、診療分野別のガイドラインの中でトピックの一つとして中心型早期肺癌の診断・治療が取り上げられている¹⁾。本稿では、その内容を解説する。

III. ガイドライン作成の手順

紙面の制約上、作成手順の詳細を述べることはできないため、他稿を参照されたい²⁾³⁾。基本的には厚生労働省より示された作成手順に従って作成を行った。推奨グレードやその表現方法に関して、班会議全体で討議して、現実に適応可能と考えられる形態に整えた。また、我が国におけるエビデンスを含んだガイドラインの作成が求められたため、文献の採用、また推奨の審議にあたって、そのことに留意した。中心型早期肺癌に関する論文の検索には、2001年12月1日時点で“PubMed”を対象に検索を行って文献を抽出した後、邦文の文献で重要なものを加え、のべ3,196編の文献の中から絞り込みを行った。その結果41編が採用され、これらをもとに診断および治療に関する推奨が決定された。

IV. 中心型早期肺癌の特性

中心型肺癌とは区域気管支より中枢側に発生した肺癌と定義され、そのうち早期癌は、癌の浸潤が組織学的に気管支壁を超えず、かつリンパ節転移や遠隔転移がないものとされている。中心型早期肺癌の内視鏡基準としては、表1に示す条件を満たすこととされている⁴⁾。本疾患の特性として、同時性・異時性の多発病変が20-30%の症例に見られることが指摘されており、治療方法の選択や治療後の経過観察に注意を要する。

MANAGEMENT OF CENTRAL-TYPE EARLY LUNG CANCER: AN EVIDENCE-BASED CLINICAL GUIDELINE

Akira Sakurada, Chiaki Endo, Masami Sato and Takashi Kondo

Department of Thoracic Surgery, Institute of Development, Aging and Cancer, Tohoku University

V. 中心型早期肺癌に対する検査

中心型早期肺癌に対する検査方法として、喀痰細胞診、気管支鏡検査、蛍光内視鏡検査、気管支超音波検査が取り上げられている。それぞれについて決定された推奨を表2に示す。

喀痰細胞診の有効性については、米国において1970年代から80年代にかけて行われた大規模な無作為化比較試験による報告がある。胸部レントゲン写真に喀痰細胞診を加えることによって肺癌死亡が減少するかどうかの検討がなされ、否定的な結論が報告された⁵⁾⁶⁾。この結果を受けて、欧米ではスクリーニングとして喀痰細胞診を用いることについては否定的な見解が定着している。しかし、これらの比較試験には様々な問題点が指摘されていること⁷⁾⁸⁾、また、我が国においては、複数の症例対照研究によって、胸部レントゲンに喀痰細胞診を併用した検診の有効性が示されていることから⁹⁾¹⁰⁾、こうした形態の肺癌集検が行われている。また、

喀痰細胞診が非侵襲的で中心型早期肺癌の発見方法として唯一のものであることなども考慮され、喀痰細胞診を施行することはグレードBとされた。

中心型早期肺癌の内視鏡所見分類、蛍光内視鏡、超音波内視鏡については、有効性が報告されているが、高いレベルのエビデンスが得られているとは言い難いため、これらについての推奨はグレードCとなっている。

VI. 中心型早期肺癌に対する治療

治療の手段として、外科治療、光線力学的治療(Photodynamic therapy; PDT)、気管支腔内照射が取り上げられた(表3)。中心型早期肺癌に対する外科治療について報告されている成績は、5年生存率が80-100%と良好であり、根治的な治療方法としては外科療法が勧められている。縮小手術の治療成績に関しては報告が少なくグレードCとされている。PDTは、治療後の他病死を除いた5年生存率は90%を超え、腫瘍全体にレーザー照射が可能な長径1cm以内かつ深達度が粘膜下層までの症例を対象に行うよう勧められる(グレードB)とされている。気管支腔内照射については、有用性を示唆する報告はあるものの、現時点では十分なエビデンスが存在しないためグレードCとされている。

VII. グレードCの扱い

中心型早期肺癌は、海外における診断治療数が少ないこともあり、エビデンスとなる論文の総数が少ない。そうした事情により、推奨もエビデンスレベルがCにとどまるものが多い結果となっている。よく指摘されることであるが、グレードCは、その推奨の表現が、

表1 内視鏡的早期肺癌の診断基準

臨床的基準	胸部X線写真(断層、およびCT像を含む)が正常像であること
	通常の病期診断に用いられる方法(CTを含む胸部X線写真、腹部CTおよびエコー、脳CT、骨シンテグラムなど)によりリンパ節および遠隔転移がないこと
内視鏡的基準	気管から亜区域支までに限局する
	病巣の末梢縁が内視鏡的に可視できること
	病巣の長径が2cm以下であること
	組織学的に扁平上皮癌であること

表2 検査方法の推奨

検査法	推奨	推奨グレード
喀痰細胞診	喀痰細胞診は中心型早期肺癌の発見法として唯一の検査である。重喫煙者などの高危険群を対象として行うよう勧められる	B
気管支鏡	喀痰細胞診で異型細胞(D, E判定)が得られた場合、気管支鏡による精査を行うよう勧められる	B
	気管支鏡所見による中心型早期肺癌の判定や分類は気管支鏡所見の捉え方に熟練を要すること、観察者間の不一致があること、分類自体が完璧なものでないことに留意する必要があるため、現時点では行うよう勧めるだけの根拠が明確でない	C
蛍光内視鏡	扁平上皮化生を含む気管支の早期病変の診断に有用とする報告が多いが、少なくとも中心型早期肺癌の診断の優位性において確定的な結論は得られていない。また現時点で保険収載されておらず、探索的医療の範疇に入るものである	C
気管支超音波検査	本検査法は中心型早期肺癌の深達度診断に有益であるか否か現在評価中の段階であり行うよう勧めるだけの根拠が明確でない	C

2. 中心型早期肺癌のガイドライン

表3 治療方法の推奨

治療方法	推奨	推奨グレード
外科治療	中心型肺癌に対しては標準治療として手術を行うよう強く勧められる。5年生存率は80-100%と良好であるが、合併症や手術関連誌の頻度は他の肺癌手術と同等と考えられる	A
	縮小手術の治療成績に関しては確定的な結論は出ておらず行うよう勧めるだけの根拠が明確でない。適応に関し慎重な患者選択が必要である	C
光線力学的治療	本治療後の他病死を除いた5年生存率は90%を超え、侵襲も手術に比し軽微である。しかし内視鏡的中心型早期肺癌のすべてが本治療の適応ではなく、腫瘍全体にレーザー照射が可能な長径1cm以内かつ深達度が粘膜下層までの症例を対象に行うよう勧められる	B
腔内照射	本治療法の臨床的有用性を示唆する報告はあるものの、現時点では行うよう勧めるだけの根拠が明確でない	C

「…勧めるだけの根拠が明確でない」とされているため、EBMの手法について理解が不十分な読者には、否定的な表現として捉えられることが懸念される。実際には、無作為化比較試験などによる高いレベルのエビデンスが存在しないということを事実として示しているに過ぎず、否定的な意味をもつわけではない。グレードCは、得られるエビデンスを参考にして、患者に治療の選択肢を示し治療を選択していくという、担当医の裁量が期待される性格をもつものである。

VIII. 今後の課題

先に述べたように、我が国においては胸部レントゲンと喀痰細胞診を併用した肺癌集検について有効性が証明されているが、全国的にこのシステムが標準化されているとは必ずしも言えないのが現状である。特に喀痰細胞診は受診者数の地域によるばらつきが非常に大きく、発見肺がん数が極端に少ない地域がある。喀痰細胞診の標準化に向けた関係者のさらなる努力が望まれる。一方、近年、CT検診による驚異的な肺癌発見率が報告され、注目を集めているが、CTによるスクリーニングでは中心型早期肺癌の発見は困難である。CT検診によって末梢型肺癌による肺癌死亡を減少させるかどうかは重要な課題であるが、中心型早期肺癌発見のための努力がおろそかになることがあってはならない。

本ガイドラインは3年を目途に改訂をおこなう予定で編集されている。その間に、検討が進むことが予想される課題としては、喀痰細胞診の胸部X線写真あるいはCTへの上乗せ効果の証明、中心型早期肺癌発見のためのバイオマーカー、蛍光内視鏡や超音波内視鏡の性能向上、新たな光感受性物質を用いたPDTなどが挙げられる。

IX. おわりに

「EBMの手法による肺癌の診療ガイドライン」の中の、中心型早期肺癌の診療について解説を行った。本ガイドラインの普及により、中心型早期肺癌をふくむ肺癌診療の標準化と、その恩恵に浴する患者が増えることを願って稿を終える。

文 献

- 1) EBMの手法による肺癌の診療ガイドライン策定に関する研究班：EBMの手法による肺癌の診療ガイドライン2003版，金原出版，pp95—102, 2003.
- 2) EBMの手法による肺癌の診療ガイドライン策定に関する研究班：EBMの手法による肺癌の診療ガイドライン2003版，金原出版，ppiii—vii, 2003.
- 3) 佐藤雅美，桜田 見，遠藤千頭，他：肺癌治療の最新の動向—ガイドライン作成を通じて—。医学と薬学，51：261—267, 2004.
- 4) 日本肺癌学会：肺癌取り扱い規約改訂第6版，金原出版，pp90—91, 2003.
- 5) Frost JK, Ball WC Jr, Levin ML, et al.: Early lung cancer detection: Results of the initial (prevalence) radiologic and cytologic screening in the Johns Hopkins study. *Am Rev Respir Dis*, 130: 549—554, 1984.
- 6) Melamed MR, Flehinger BJ, Zaman MB, et al.: Screening for lung cancer. Results of Memorial Sloan-Kettering study in New York. *Chest*, 86: 44—53, 1984.
- 7) Strauss GM, Gleason RE, Sugarbaker DJ: Screening for lung cancer. Another look: a different view. *Chest*, 111: 754—767, 1997.
- 8) Fontana RS, Sanderson DR, Woolner LB, et al.: Screening for lung cancer. A critique of the Mayo Lung Project. *Cancer*, 67: 1155—1164, 1991.
- 9) Sagawa M, Tsubono Y, Sato M, et al.: A case-control study for evaluating the efficacy of mass screening program for lung cancer in Miyagi prefecture, Japan. *Cancer*, 92: 588—594, 2001.

2. 中心型早期肺癌のガイドライン

- 10) Nishii K, Ueoka H, Kimura K, et al.: A case-control study of lung cancer screening in Okayama prefecture, Japan. *Lung cancer*, 34: 325—323, 2001.
- 11) Tsukada H, Kurita Y, Yokoyama A, et al.: An evaluation of screening for lung cancer in Niigata prefecture, Japan: a population-based case-control study. *Br J Cancer*, 85: 1326—1331, 2001.
- 12) Nakayama T, Baba T, Suzuki T, et al.: An evaluation of chest X-ray screening for lung cancer in Gunma prefecture, Japan: a population-based case-control study. *Eur J Cancer*, 38: 1380—1387, 2003.

MANAGEMENT OF CENTRAL-TYPE EARLY LUNG CANCER : AN EVIDENCE-BASED CLINICAL GUIDELINE

Akira Sakurada, Chiaki Endo, Masami Sato and Takashi Kondo

Department of Thoracic Surgery, Institute of Development, Aging and Cancer, Tohoku University

With the support of the Japan Ministry of Health, Labour and Welfare, clinical guidelines for the management of lung cancer have been completed according to evidence-based methods. In this article, we focus on the guidelines for central-type early lung cancer. Reviewing a total of 3,196 reports that include key words related to central-type early lung cancer, 41 were selected and applied to determine recommendations for diagnostic or therapeutic methods. Among diagnostic methods, sputum cytology for the high-risk group and bronchoscopy for patients with positive sputum cytology were evaluated as recommendable. Among therapeutic methods, surgery and photodynamic therapy were evaluated as recommendable. For some methods, including fluorescence bronchoscopy and endobronchial ultrasonography brachithery, there was insufficient evidence to conclude that they are efficacious. At present, efforts to clarify the efficacy of these methods should be continued.

喫煙が予後に及ぼす影響の性差

—原発性肺癌 2220 切除症例における検討—

山中澄隆¹・佐藤雅美¹・桜田 晃¹・
遠藤千顕¹・半田政志²・近藤 丘¹

¹ 東北大学加齢医学研究所呼吸器再建研究分野；

² 仙台厚生病院外科

Japanese Journal of Lung Cancer

肺 癌 第44巻 第2号 2004年4月

喫煙が予後に及ぼす影響の性差

—原発性肺癌 2220 切除症例における検討—

山中澄隆¹・佐藤雅美¹・桜田 晃¹・
遠藤千頭¹・半田政志²・近藤 丘¹

要旨 — **目的.** 東北大学呼吸器外科および仙台厚生病院にて切除された 2220 症例の肺癌患者を対象に、臨床像ならびに喫煙が予後に及ぼす影響における男女差の検討を行なった。**方法.** 1952 年から 2000 年において、当施設にて切除された原発性肺癌手術症例のうち喫煙指数が把握できた 2220 例 (男性 1617 例, 女性 603 例) を対象とした。**結果.** 女性では男性に比し、腺癌の比率が高く、男性は扁平上皮癌と大細胞癌の比率が高かった。男女とも非喫煙者の 5 年生存率は喫煙者より有意に良好であった。男女とも喫煙指数の増加によって腺癌の比率の減少が認められた。癌死の割合が最も少なく、非癌死の影響を観察するのに適切であると考えられる病理病期 IA 期症例にて検討したところ、男性では全死因にて喫煙者の予後が有意に不良であったが、肺癌死のみで生存曲線を比較すると非喫煙者と同等の予後であった。**結論.** 喫煙と関連して I 期腺癌男性患者にて非癌死が増加することが示された。I 期腺癌女性患者において喫煙の影響は明らかとはならなかったが、喫煙者の全死因での生存率は不良であり、肺癌切除後の予後改善という観点からも両性での禁煙指導の重要性が示された。(肺癌, 2004;44:83-89)

索引用語 — 肺癌, 喫煙, ブリンクマン指数, I 期腺癌

Sex Differentiation of Smoking Effect for Prognosis of Lung Cancer —Study of 2220 Cases of Primary Lung Cancer Undergone Pulmonary Resection—

Sumitaka Yamanaka¹; Masami Sato¹; Akira Sakurada¹;
Chiaki Endo¹; Masashi Handa²; Takashi Kondo¹

ABSTRACT — **Objective.** The objective of this study was to examine the clinical characteristics and the differences between the sexes as to the effects of smoking on the survival rate in lung cancer patients who had undergone lung resection in the Department of Thoracic Surgery of Tohoku University Hospital. **Methods.** The clinical records and Brinkman index values (number of cigarettes for day × years smoked) of 2220 patients, 1617 men and 603 women, who had undergone pulmonary resection from 1952 to 2000 at Tohoku University Hospital were reviewed. **Results.** The ratio of adenocarcinoma patients was higher in women than men, while men had a higher ratio of squamous cell carcinoma and large cell carcinoma. In both sexes, the 5-year survival rates of non-smokers were significantly better than those of smokers. The larger the Brinkman index value was, the lower was the incidence of adenocarcinoma. There was no significant impact of the Brinkman index on stage progression. To clarify the effect of smoking on the survival rate, we reviewed the records of patients with pathological stage IA adenocarcinoma, since most of these patients are ex-

¹ 東北大学加齢医学研究所呼吸器再建研究分野; ² 仙台厚生病院外科。

別刷請求先: 山中澄隆, 東北大学加齢医学研究所呼吸器再建研究分野, 〒980-8575 宮城県仙台市青葉区星陵町 4-1。

¹Department of Thoracic Surgery, Institute of Development, Aging and Cancer, Tohoku University, Japan; ²Department of Surgery,

Sendai Kousei Hospital, Japan.

Reprints: Sumitaka Yamanaka, Department of Thoracic Surgery, Institute of Development, Aging and Cancer, Tohoku University, 4-1 Seiryō-cho, Aoba-ku, Sendai-shi, Miyagi 980-8575, Japan.

Received November 27, 2003; accepted February 16, 2004.

© 2004 The Japan Lung Cancer Society

pected to die from non-cancerous causes. As a result, the outcome in male smokers in terms of overall survival was significantly worse than that in non-smokers. There was no significant difference, however, in survival between smokers and non-smokers, based on death due to lung cancer. **Conclusion.** It is suggested that smoking-related deaths resulting from causes other than cancer were not negligible in male surgically treated lung cancer patients. Although the impact of the effect of smoking on the survival of female patients with stage Ia adenocarcinoma was not clear, the overall survival of lung cancer patients with a history of smoking was worse than that of non-smokers in both sexes. As described above, smoking cessation is still an important issue in Japan. (*JJLC*. 2004;44:83-89)

KEY WORDS — Lung cancer, Smoking, Brinkman index, Stage I adenocarcinoma

はじめに

肺癌死亡が悪性疾患死亡の第1位となる一方、治療技術に breakthrough が見出せない現状において予防医学の重要性が増している。喫煙と肺癌発生の強い相関から禁煙活動が肺癌予防に重要と考えられるが、^{1,3} 本邦での喫煙率は、欧米と比較すると未だ高率である。更に、今後20~30年後、肺癌好発年齢に達すると予想される若年女性喫煙者の増加傾向が指摘されている (JT 全国喫煙者調査)。このような背景を踏まえ、肺癌治療後生存率に対する喫煙の影響を両性にて比較検討することは有用であると考えられる。今回、東北大学加齢医学研究所呼吸器再建研究分野および仙台厚生病院にて切除された2220症例の肺癌患者について検討を行なった。

対象および方法

1952年9月から2000年12月において、東北大学加齢

医学研究所呼吸器再建研究分野および仙台厚生病院にて切除された3530例の原発性肺癌手術症例のうち喫煙指数 (Brinkman index, 以下 BI) が病歴から把握できた2220例 (男性1617例, 女性603例) を対象とした。腫瘍の組織型, 病理病期分類は肺癌取扱い規約第5版⁴ に準拠した。

男女別に BI により 0, 1~399, 400~799, 800 以上の4群に分け, 各組織型, 病理病期の割合を算出し, 患者構成の差異について検討した。統計学的検討では, 2群の比較には Fisher's exact test を, 男女間での BI の比較では unpaired *t* test を用い $p < 0.05$ を有意とした。生存曲線は Kaplan-Meier 法で算出し, log-rank test で検定し $p < 0.05$ を有意とした。

結果

1. 喫煙と性差

対象症例2220例の手術時平均年齢は63.9歳, 男性

Table 1. Patient characteristics (1952-2000)

	Men (%)	Women (%)	p value
Number	1617	603	
Age (mean)	64.5	62.4	NS
Smokers	1497 (92.6)	81 (13.4)	$p < 0.001$
Mean BI among smokers	1004	458	$p < 0.001$
Detected by mass screening	725 (44.8)	325 (53.9)	$p < 0.001$
Histology *			
Squamous cell carcinoma	732 (45.3)	25 (4.1)	$p < 0.001$
Adenocarcinoma	567 (35.1)	510 (84.6)	$p < 0.001$
Small cell carcinoma	53 (3.3)	9 (1.5)	$p = 0.02$
Large cell carcinoma	193 (11.9)	16 (2.7)	$p < 0.001$
Pathological stage †			
I	860 (53.2)	367 (60.9)	$p = 0.001$
II	282 (17.4)	67 (11.1)	$p < 0.001$
III	412 (25.5)	147 (24.4)	NS
IV	30 (1.9)	15 (2.5)	NS

NS: not significant.

* Excluding other histologic types.

† Excluding cases of unknown stage.