360 度回転させることができる機構と超電導マグネットを前後に 10cm 以上移動できる機構を備えており、微細内視鏡に作用させる磁界の強さと方向を、超電導マグネットの励磁電流を一定のままで変化させることができる。超電導マグネットが磁界を発生させている時でも可動機構が正常に動作することは確認されている。

試作した超電導マグネットを用いて微細内視鏡の屈曲角度の測定を行った。屈曲の様子の一例を図９に示す。

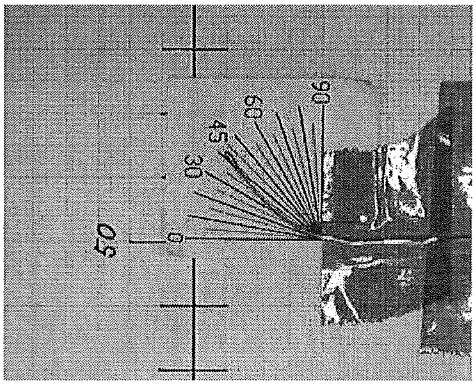


図９　微細内視鏡屈曲角度測定の一例

測定結果について、図１０に超電導マグネットの表面からの設置位置による比較を、図１１に微細内視鏡の先端に装着した磁性体と PTFE 保護チューブの有無の組み合わせによる比較を、それぞれ示す。

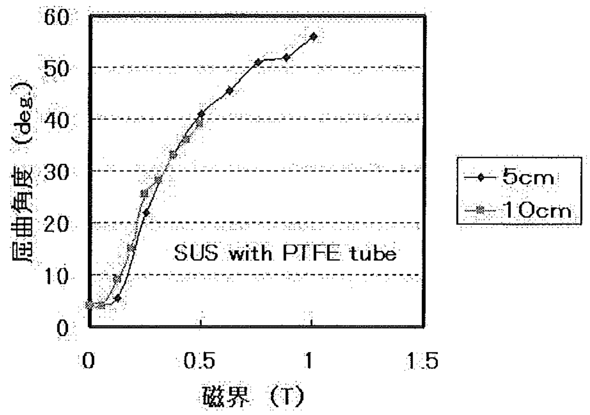


図１０　設置位置による比較

微細内視鏡の設置位置が 5cm の場合と 10cm の場合では、同じ磁界でも、磁気勾配は２倍程度異なる。微細内視鏡の屈曲に関係する作用としては、磁界のみに主に依存する磁気トルクと、磁界と磁気勾配の両方に大きく依存する磁気勾配力の２つが考えられる。図１０に示されるように、微細内視鏡の位置が異なっても、磁界と屈曲角度の依存性はほぼ同一であることから、微細内視鏡の屈曲に主に作用するのは磁気トルクであることが考察される。詳細な説明は省略するが、実験から求めたチューブの柔らかさと磁性体の磁気特性と固定ばりの簡単な屈曲モデルを用いた計算からの予測では、45 度の屈曲が得られる磁界は、微細内視鏡を設置した位置が 5cm のときでは 0.8T、10cm のときでは 1.2T であったので、実測結果の 0.6T とは一致しない。その理由は、屈曲するにつれて磁性体が超電導マグネットの表面に近づくことと関係しているかもしれない。

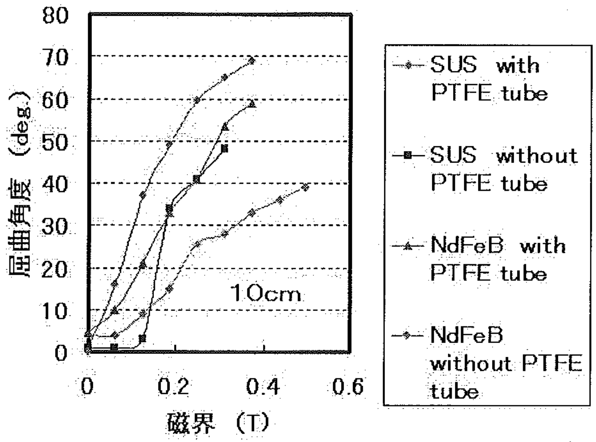


図１１　磁性体の種類と保護チューブの有無による比較

図１１に示されるように、同一の作用磁界でも、磁性体が NdFeB 磁石である方が磁性ステンレスよりも著しく大きな屈曲角度を得ることができ、また、同一の作用磁界でも PTFE チューブを装着した場合には屈曲角度が著しく小さくなる。

45 度の屈曲が得られる磁界は、固定ばりの簡単な屈曲モデルを用いた計算では、PTFE チューブを装着しない磁性ステンレスの場合で 0.40T、PTFE チューブを装着した NdFeB 磁石の場合で 0.36T、PTFE チューブを装着しない NdFeB 磁石の場合

で0.19Tであったが、実測結果はそれぞれ、0.28T、0.27T、0.17Tであったので、傾向は一致している。

実測結果とモデル計算から、微細内視鏡の屈曲角度は、先端に装着する磁性体の特性と微細内視鏡の柔らかさに大きく依存するので、小さな作用磁界でもより大きな屈曲角度の得られる微細内視鏡の開発は重要な技術開発であることが推論される。

なお、磁性ステンレスを微細内視鏡に装着した場合には、最初に超電導マグネットの表面に平行に設置するときの平行度のわずかなずれから、調度磁気アンカーの尾部（磁性体の微細鉗子が連結された方向）が挙上されるのに似て、微細内視鏡の先端が超電導マグネットとは反対の方向に屈曲した状態を保持する現象が見られた。そして、ある程度大きな磁界が作用したときに、恐らく磁気勾配力に起因して、突然に超電導マグネット側に大きく屈曲する現象も見られた。この現象の対策を講ずることは、今後の課題である。

（3）容量法による交流磁界に応答した被磁気誘導素子の振動の振幅測定

検討課題（ア）「磁歪の静特性と交流磁界応答変位との対応がリーズナブルなものになっているかどうかを検証する。」について

外径φ3mm、長さ4.9mmの超磁歪材料であるTerfenol－Dの試料について、径方向に印加した静磁界に対する軸方向の変位の特性を容量法で測定した結果を図12に示す。

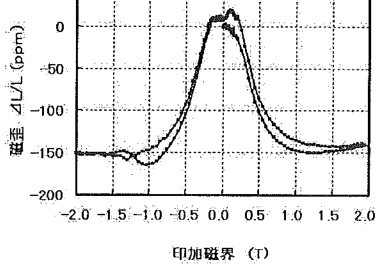


図１２ Terfenol-Dの変位の静磁界特性

印加磁界が0.3Tにおける磁界に対する変位の変化率の平均を計算すると、-0.35ppm/mTであった。

同一の試料に対して、径方向に0.3Tのバイアス磁界および交流磁界を印加した場合の交流磁界に応答した振動の振幅の測定結果を表２に示す。

表２ Terfenol-Dの交流磁界応答

周波数	磁界	検出信号	変位量	変位量
Hz	mT r.m.s	mV r.m.s	nm r.m.s	ppm/mT
1	6.42	27.59	10.21	0.32
10	2.09	9.02	3.34	0.33
20	1.31	8.5	3.15	0.49
30	0.98	3.71	1.37	0.29
50	0.69	3.29	1.22	0.36
100	0.46	2.42	0.90	0.40
150	0.44	2.47	0.91	0.43
200	0.42	4.44	1.64	0.79
250	0.37	5.11	1.89	5.09
300	0.32	2.29	0.85	2.68
350	0.31	2.57	0.95	3.10
400	0.30	2.89	1.07	3.53
450	0.30	3.21	1.19	3.94
500	0.30	3.28	1.21	4.03

（バイアス磁界 0.3T）

表２に示されるように、150Hz程度までは静磁界特性と同程度の変位量であるが、200Hz以上では大きく値が異なる。

さらに200Hzから250Hzの間の領域を詳しく測定すると、図１３に示すように、低周波領域の変位の５０倍にも相当する大きなピークが測定された。

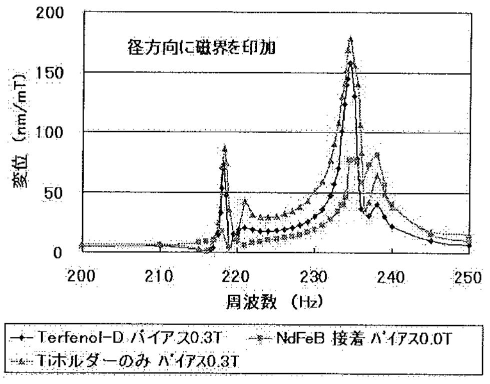


図１３ 変位スペクトル(径方向磁界印加)

この現象は何らかの共振現象が発生していることを示していると思われるが、図１３に合わせて示されているように、サンプルを装着しない非磁性の Ti ホルダーのみで測定を行った場合にも、ほぼ同位置に同程度のスペクトラムが得られていることから、試料自体に起因した共振ではなく、板バネなどのキャパシタンスセル自体に関係した共振現象である可能性が高いと考えられる。また、非磁性の Ti ホルダーのみでも大きな振動が得られていることから、交流磁界の印加によって金属部分に発生する渦電流が関与している可能性が高いことが予想される。

しかし、いくつかの理由がよくわからない現象もある。

例えば、図１４にスペクトラムのピーク位置の周波数の一定の交流磁界印加における変位のバイアス磁界依存性を測定した結果を示すが、これから明らかなように、変位とバイアス磁界とはほぼ完全な比例関係にあって、これは渦電流とバイアス磁界との相互作用に起因して振動が発生していることを予想させる。ところが、NdFeB 磁石の場合には、バイアス磁界が 0.0T の場合でも、大きな変位のピークが発生している。NdFeB 磁石の寸法と板ばねとの距離などを考えると、NdFeB 磁石から発生して板ばねに作用するバイアス磁界の大きさは 0.3T より遥かに小さいし、磁界が作用する範囲もかなり小さいと考えられるので、大きな振動が発生する機構について不可解さを感じる。

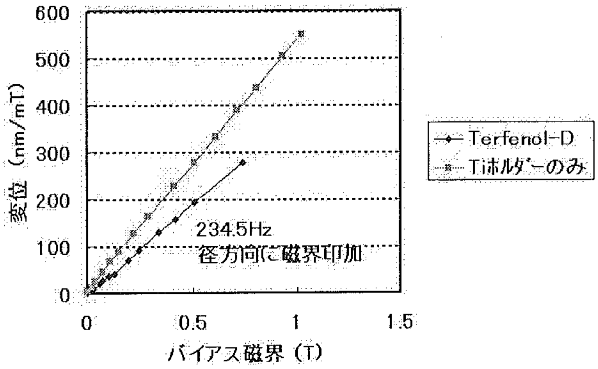


図１４ 変位のバイアス磁界依存性

また、図１５には、サンプルの軸方向に磁界を印加した場合の、変位スペクトラムを示すが、径方向に磁界を印加した場合と同程度の変位が発生していることが示されている。

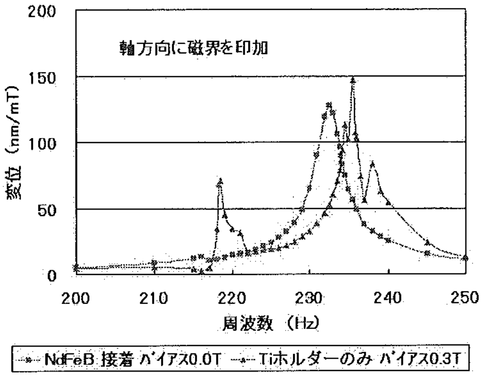


図１５　変位スペクトル(軸方向磁界印加)

板ばねの厚み方向に対して、垂直な方向と平行な方向に磁界を印加した場合には、板ばねに発生する渦電流の大きさは大きく異ことが予想されるので、この結果は渦電流が大きな変位のピークに関係していることと矛盾するように思われる。

このように大きな変位のスペクトラムにピークが発生する機構については不明なことが多いが、この機構を利用して振動を発生させることで磁気誘導の補助を行うことに結びつく可能性もあると考えられるので、この現象の解明について調査を行うことは意義のあることだと考えられる。

検討課題（イ）「NdFeB 磁石をゴムを介して固定したものでは磁気トルクによる交流磁界変位応答が主体であり、接着剤を使用して固定した場合には磁歪による交流磁界変位応答が主体となっていると考えられる測定結果が得られるかどうか検証する。」について

200Hz から 250Hz の間で主に発生する原因不明のスペクトラムの変位ピークの影響が小さいと考えられる周波数の小さい領域において、NdFeB 磁石を接着剤を用いずゴムを介して固定した場合と、接着剤を使用してしっかり固定した場合の変位の比較を表３にまとめた。

表３　NdFeB 磁石接着方法による変位の比較（バイアス磁界 0.0T）

	径方向に磁界印加		軸方向に磁界印加	
	接着せず	接着	接着せず	接着
周波数	変位量	変位量	変位量	変位量
Hz	nm/mT	nm/mT	nm/mT	nm/mT
1	9.02	1.24	0.02	0.37
10	8.21	1.38	0.09	0.47
20	8.45	1.22	0.11	0.42
30	8.17	1.41	0.20	0.40
50	8.22	1.57	0.34	0.50
100	8.19	1.65	0.71	0.89

径方向に磁界を印加した場合、試料を接着剤で試料台にしっかりと固定することで、変位量が７分の１に減少している。このことは、磁気トルクに起因した試料の可動が減少したと考えることで十分に納得ができる。

しかし、接着後でも、Terfenol-D と同程度の 1.2nm/mT もの大きな変位が測定されているが、これは磁歪現象に起因するものではなく、やはり磁気トルクに起因するものだと考えられる。その理由の一つはやはり変位が大きすぎることで、磁歪（変位）の静特性の測定では、1,5T の印加磁界で恐らく強いトルクによって試料が試料台から接着していたのにもかかわず外れるまで、磁歪がきれいに印加磁界に比例して直線的に増加し続けたからである。このときの変位の磁界に対する比例係数は 3.2nm/mT と低周波における交流磁界の応答よりも大きな値であった。また、外径がφ5mm で厚さが 1mm の径方向が着磁方向である NdFeB 磁石の厚み方向に磁界を作用させたときの低周波における交流磁界に対する変位の応答は 1.2～1.3nm/T であった。もしも変位が磁歪に起因するものであるならば、試料の厚みが５分の１であるだけ変位が小さくなるものと考えられる。恐らく、キャパシタンスセルの機械的な強度が不足していて、試料に働く磁気トルクの作用で、試料台を支えているフレーム自体が可動しているものと思われる。

正確な測定を行うために、固定電極と試料台を支えているフレームを電気的な絶縁を行いながら連結するなど、キャパシタンスセルの機械的な強度を増加させる改造を行うことが必要不可欠であると考えられる。

軸方向に磁界を印加した場合、むしろ試料を試料台にしっかり接着した方が変位量が増加した。このことは予測と異なるがその理由は不明である。

検討課題（ウ）「磁気トルクが主体と思われる交流磁界変位応答について、交流磁界の方向やバイアス磁界の大きさや方向に依存して交流磁界変位応答が大きく変化するか検証する。」

表３に示されるように、径方向に磁界を印加した場合の方が、軸方向に磁界を印加した場合よりも顕著に変位が小さい。

この試料は軸方向が着磁方向であるので、それに直交する径方向に交流磁界を作用させたときに磁気トルクの影響が最大になると考えられるので、この実験結果は、予測と一致するものである。

試料を接着していない場合で、横方向に磁界を印加させるときに、0.10T のバイアス磁界を作用させると、低周波での交流磁界応答変位が 0.56～0.63nm/mT と測定された。

0.10T の大きさのバイアス磁界を加えると交流磁界を加えても試料の左右で外部磁界の極性が反転することはなくなるので磁気トルクに起因した変位は著しく低減することを予測していたが、減少する傾向にはあるものの予測していたほどの顕著な減少は生じなかった。

容量法による交流磁界応答変位測定は、基本的には、種々のパラメータに対する交流磁界に対する応答変位を感度よく定量的に行うことができる方法であるので、今後キャパシタンスセルの機械的強度の増加やキャパシタンスセルの構造に起因したスペクトラムの変位ピークの出現の機構の解明と除去、交流磁界の発生に対応したコイルを用いた交流磁界の印加など、装置の改善

を行った上で、より正確な評価を行っていきたい。

D. 結論

胃の内視鏡的粘膜下層剥離術の臨床試験に、国立がんセンター側の研究者とともに機器装置の運用を行い、装置の有用性・安全性を継続的に検証している。次に開発する磁気アンカー誘導装置の仕様について、臨床試験の結果を十分に参考にし、医療側共同研究者とよく協議して作成を行う。

脳腫瘍治療に用いる微細内視鏡を誘導するための小型超電導マグネットの試作を行い、目標としていた容器表面から10cm 離れたところで 0.5T の磁界を発生させることに成功した。また、微細内視鏡を用いた脳腫瘍治療の模擬試験に用いるための、超電導マグネットを脳モデルの周囲に回転させることができるとともに、超電導マグネットと脳モデルとの距離を調節できる架台を製作した。ただし、超電導マグネットについて、構造の最適化を図るための検討事項が数多く残っているので、引き続き開発をすすめて性能の向上を行う。

容量法を用いた交流磁界に応答した磁気素子の振動測定を試みた。正しい知見を得るためには装置の改善を行う必要があることが明らかになった。改良した測定装置を用いて、正確な測定を行い、交流磁界印加による誘導補助の効率的な実現を目指したい。

E. 研究発表

なし

F. 知的所有権の取得状況

1．特許取得（出願）

1) 医療用器具および医療用器具振動システム。特願 2005-320383、平成 17 年 11 月 4 日（国立がんセンター及びペンタックス株式会社との共同出願）
2) 磁気誘導装置及び磁場変調装置。特願 2005-367430、平成 17 年 12 月 21 日（国立がんセンター及びペンタックス株式会社との共同出願）
3) 磁界発生装置およびその制御方法。特願 2005-370063、平成 17 年 12 月 22 日（国立がんセンター及びペンタックス株式会社との共同出願）
4) 磁気誘導装置。特願 2006-10569、平成 18 年 1 月 19 日（国立がんセンター及びペンタックス株式会社との共同出願）

2．実用新案登録

なし

3．その他

なし

厚生労働科学研究費補助金（萌芽的先端医療技術推進研究事業）
分担研究報告書

微細鉗子・カテーテルを応用した医療技術開発についての研究

分担研究者　　荒井保明　国立がんセンター中央病院　放射線診断部 部長

研究要旨
経頚静脈経肝的腹水―静脈シャント造設術用留置カテーテルの逆流防止機能を開発し、臨床試験によりその安全性、臨床的有効性を評価した。臨床試験は継続中であるが、安全性、操作性、強度、機能は許容されるものであり、抗血栓性の向上が今後の課題と判断された。

A. 研究目的

腹水の静脈還流法として新たに開発された経頚静脈経肝的腹水―静脈シャント造設術（TTPVS: Transjugular Transhepatic Peritoneal- Venous Shunt)に使用する留置カテーテルの逆流防止機能を開発し、その安全性と有効性を臨床試験により評価する。

B.研究方法

経頚静脈経肝的腹水―静脈シャント造設術は、すでにIVRの確立した手技となっている経頚静脈経肝的門脈―静脈シャント造設術（TIPS）に準じて頚静脈から肝静脈を介して肝静脈末梢の肝実質を穿破して腹腔に至るルートを作成し、ここに静脈系から腹腔方向への血液の流出を制御する逆流防止機能を有す１０Fr径のカテーテル(TTPVSカテーテル）を留置するものである。この機構により、腹腔内に貯留した腹水は腹水―中心静脈の圧較差により静脈系に還流する。TTPVSカテーテルの具備すべき条件としては、挿入に際し０．０３５inchガイドワイヤーと１２Frイントロデューサーを用いるため、１）０．０３５inchガイドワイヤーが内腔を容易に通過し、かつ１２Frイントロデューサー内を容易に通過できる外径の範疇、２）僅かな腹水と中心静脈圧の圧格差（５～２０ｃｍ水柱）で確実に機能する逆流防止機能、３）長期の血管内留置において血栓の付着による閉塞あるいは逆流防止機能の障害が発生しない、の３点であり、これらの条件を満足することを目的に逆流防止機能を有した弁構造の開発を行った。なお、腹水は頚静脈より腹腔に留置されたカテーテル内を上行し、右房近傍でカテーテルのサイドホールより上大静脈内に還流するため、側孔弁を基本型として検討を行った。また、本器材ならびに手技全般の安全性ならびに有効性を評価するために第Ｉ/Ⅱ相臨床試験（primary endpoint：安全性の評価、secondary endpoints：臨床的有効性の評価、有害事象の発現頻度と程度、予定登録数３３例）を行った。なお、対象は、１）難治性腹水を有し、その腹水による症状が患者のＱＯＬを低下させる原因となっている、２）ＣＴにより上大静脈、肝静脈の開存が確認されている、３）腹腔試験穿刺により，腹水の性状が淡黄色，清明であることが確認されている、４）主要臓器機能が保持されている、５）P.S.（ECOG)：０，１，２，３、６）４週間以上の生存が見込める、７）患者本人から文書による同意が得られている、の適格条件を満たす症例とした。

（倫理面への配慮）

ヘルシンキ宣言を遵守し、これをプロトコールに明記の上、文書を用いて説明を行い患者本人から文書により同意を取得した。また、プロトコールは日本血管造影・ＩＶＲ学会倫理委員会ならびに施設の施設倫理審査委員会あるいはＩＲＢにて承認を得た。個人情報の保護については、試験の信頼性を確保するためオンライン登録時にのみ個人情報を使用し、以後はすべて試験番号－症例登録番号のみで運営することとした。

C.研究成果

複数の実験の結果、側孔弁は、右房に一

致する部位に設けた複数の側孔を薄い被膜様のシートで覆い、その被覆シートの側孔に一致しない部位にスリットを設けることにより、腹水が流出する場合には被覆シートがカテーテルから浮上し、スリットを介して静脈内に流出し、かつ腹水と中心静脈の圧較差が消失あるいは逆転した場合には、被覆シートがカテーテルに圧着されて血液がカテーテル内に流入しない構造とした。被覆シートの素材ならびに厚さについては、留置操作における必要強度も考慮して種々の候補を検討し、最終的に２ｃｍ水柱圧力で機能する側孔弁を完成した。なお、カテーテルならびに側孔弁は抗血栓性の点から、全体を親水性ポリマーを塗布した。第Ｉ／Ⅱ相臨床試験にはこれまでに２５例が登録され、第Ｉ相試験部分を終了し、第Ⅱ相試験部にて登録を継続している。技的成功率２５/２５、臨床症状改善率１９/２５であり、有害事象として血液稀釈によるヘモグロビン低下、フィブリンシースならびにカテーテル閉塞によるシャント機能不全等が見られたが重篤な有害事象の発現はなかった。カテーテル周囲のフィブリンシース形成が8/２５に見られ、うち７例は血小板数４０万以上であり、担がんによる血液凝固能の亢進の存在が疑われた。

D.考察

TTPVS カテーテルの逆流防止機構については、その操作性ならびに強度の点で臨床使用に十分耐えうるものであり、また臨床的に許容される２ｃｍ水柱で機能するという点からも、側孔弁としての基本構造は獲得できたと考えられる。臨床試験については、第Ｉ相試験部分が終了したことで、一定の安全性については担保されたと考えられるが、有効性の評価は未だ症例集積中であり時期尚早である。他方、カテーテル周囲に発生するフィブリンシースの解決は極めて重要な課題であり、高頻度に血液凝固能亢進が見られる担がん患者の流血中に留置するカテーテルの素材ならびにコーティングについて、視点を大きく変えた新たな開発が必要と考えられた。

E.結論

経頚静脈経肝的腹水—静脈シャント造設術用留置カテーテルの逆流防止機能を開発した。臨床試験において評価を継続しているが、抗血栓性の向上に課題が残された。

F.健康危険情報

G.研究発表

1.論文発表

1)Y.Shimizu, Y.Arai, et al.:Late complication in patients undergoing pancreatic resection with intraoperaive radiation therapy: Gastrointestinal bleeding with occlusion of the portal system. Journal of Gastroenterology and Hepatology 20: 1235-1240, 2005

2)A.Hosokawa, Y.Arai, et al.:Hepatic Hemangioma Presenting Atypical Radiologic Findings:A Case Report. Radiation Medicine 23: 371-375, 2005

3)U. Tateishi, Y. Arai, et al.: Prediction of Lung Adenocarcinoma Without Vessel Invasion: A CT Scan Volumetric Analysis. Chest Nov128: 3276-83, 2005

4)U. Tateishi, Y.Arai,et al.: MRI features of extraskeletal myxoid chondrosarcoma. Skeletal Radiol. Oct 12:1-7, 2005

5)U. Tateishi, Y. Arai, et al.: Incidence of multiple primary malignancies in a cohort of adult patients with soft tissue sarcoma. Jpn J Clin Oncol. Aug35: 444-52, 2005

6)U.Tateishi, Y.Arai, et al.: Myxo-inflammatory Fibroblastic Sarcoma: MR Appearance and Pathologic Correlation. AJR Am J Roentgenol Jun 184: 1749-53, 2005

7)G.Iinuma, Y.Arai, et al.: Recent Advances in Radiology for the Diagnosis of Gastric Carcinoma. The Diversity of Gastric Carcinoma. Pathogenesis, Diagnosis, and Therapy. M.Kaminishi,K.Takubo,K.Mafune(Eds.) Springer: 221-232, 2005

8)U. Tateishi, Y. Arai, et al.:Glut-1

Expression and enhanced glucose metabolism are associated with tumor grade in bone and soft tissue sarcomas: a prospective evaluation by [F-18]-fluorodeoxyglucose positoron emission tomography. Eur J Nucl Med Mol Imaging (in press)
9) 荒井保明：消化器癌肝転移に対する動注化学療法. 臨牀消化器内科 20:189-197, 2005
10) 楠本昌彦、荒井保明、他：肺腫瘤病変に対する生検の適応についての考え方－肺癌術前に確定診断は全例に必要か－. IVR 20:58-59, 2005
11) 荒井保明：序文－臨床試験技術習得のススメ. IVR 20:p42, 2005
12) 荒井保明、佐竹光夫、他：癌緩和医療における Interventional Radiology (IVR). 癌の臨床 51:213-220, 2005
13) 荒井保明：IVR（インターベンショナル・ラジオロジー）. がん看護 10:261-266, 2005
14) 荒井保明：大腸癌・肝動注化学療法. 綜合臨床 54:2081-2082, 2005
15) 荒井保明、山本清一郎：臨床研究に必要な統計「以前」の知識. IVR 会誌 20: 371-375, 2005
16) 荒井保明：大腸癌肝転移に対する肝動注化学療法の位置づけ. 大腸疾患 NOW 93-99, 2005

H. 知的所有権の出願・登録状況

1. 特許取得

経頚静脈経肝的腹腔—静脈シャント造設術に用いるＴＴＰＶＳカテーテルについて、製造企業より日、独、伊、仏、米に申請中。

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

厚生労働科学研究費補助金(萌芽的先端医療技術推進 研究事業)
分担研究報告書

微細鉗子・カテーテルとその操作技術の開発

分担研究者 佐竹 光夫 国立がんセンター東病院 放射線部医長

研究要旨
本研究は画像診断や組織に用いられる鉗子・カテーテルの操作技術の標準化をはかり客観的に評価できる操作技術の開発を行うことで精度・効率の向上を目指すものである。

A. 研究目的

経皮的骨形成術は転移性骨腫瘍の治療として疼痛緩和に即効性があり、かつ、罹患骨の補強に役立つため、単独あるいは放射線治療の補助両方として適応が拡大しつつある。現在経皮的骨形成術に使用されている医療用のセメントには、①リン酸カルシウム系セメント、②PMMA（ポリメチルメタクリール酸アクリレート）系セメントの２系統がある。①は生体適合性が良い利点がある一方で、固まるのが遅く、最高強度(80MPa)に達するのに時間を要する（1週間以上）。また流動性が悪く、注入するには、ある程度のスペースが必要である。
②は流動性が良く、すぐに重合する（直ちに最高強度 100MPa に達する。）利点を有するが、モノマーに毒性があり、血圧低下・ショック等の死亡原因となることが報告されている。重合時、発熱（70~80℃）し生体適合性は①に比べて低い。経皮的骨形成術には、手技や操作性より主に②が使用されているが、硬化時間が早く（3～5分）、準備時間（操作余裕時間）が限られる。また、未反応 MMA モノマーの残留が生体毒性を惹起する可能性がある点を考慮し、操作性向上のために操作時間の延長と視認性（X線不透過性）が良好で、生体毒性を低減できる骨セメントが必要である。骨セメント（PMMA）自体は、X線透視下では見えにくく（現状は、硫酸バリウムを重合前に添加している）視認性（X線不透過性）が不良である。今回、視認性向上のための開発を行い、実験動物へ開発品の応用を行った。

B. 研究方法

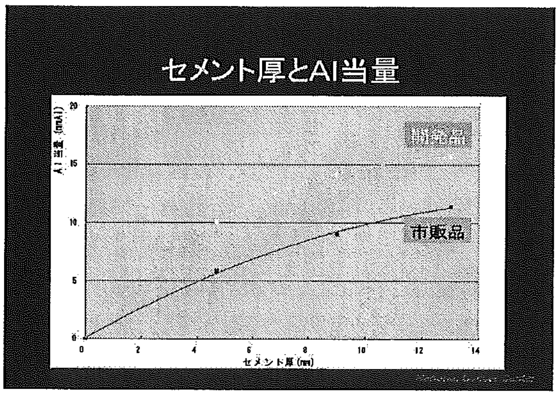
1) 操作余裕時間の延長
・操作時間の延長：粘度の測定には溶融粘弾性測定装置 ARES を用い、分子量分布の測定には GPC を用いた。
2) 生体毒性の軽減
・残存モノマー量測定方法：DSC（示差走査熱量測定装置）を用いて、発熱量を測定。測定装置は、セイコーインスツルメンツ社製 SSC5200 及び RDC220 を使用した。
3) 骨セメント X 線不透過性の評価
・シリンジ内に、開発品と市販品をそれぞれシリンジ容量／内径は①5.0ml／13.0mm, ②2.5ml／9.0mm, ③1.0ml／4.7mm に充填した。これらを X 線視認性の評価のために、アクリル板 10cm を上下に置き、Al 階段と並列に並べて、71.2kV 516.4mA 24.9msec Filter 0.1mmCu の DA 撮影条件で撮影した。
・CT 値の測定は、開発品と市販品をそれぞれシリンジ容量／内径は①5.0ml／13.0mm, ②2.5ml／9.0mm, ③1.0ml／4.7mm に充填し、120kV 140mAs 0.5sec/r 10mm thickness の CT 撮影条件で撮影した。
4) ブタ腰椎に骨欠損を作成し、CT ガイド下に市販品と開発品の骨欠損部への充填を行い、直後と２ヶ月後に骨セメントの分布評価を行った。
（倫理面への配慮）
本研究での倫理面の配慮として動物実験では各動物実験施設の実験動物取り扱い倫理規定に準拠して行う。また、臨床応用症例では第三者の立会いのもとに口頭及び文章によるインフォームド・コンセントを行い、承諾書を作成する。さらに各施設での倫理委員会の承

諾を得ることを基本とする。対象患者のプライバシーに対する配慮として個人を特定できる情報はすべて削除して使用する。

C. 研究結果

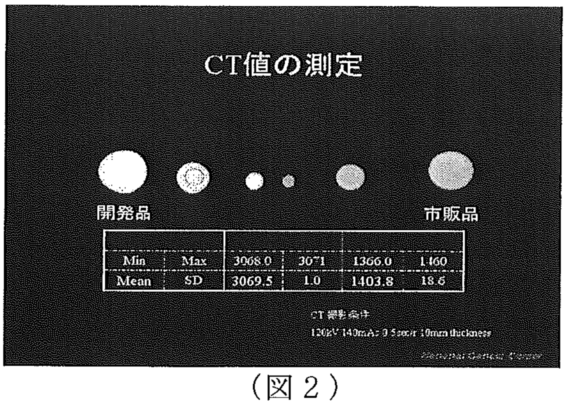
動粘度は、粘度平衡（硬化時間）は 10〜11 分であることが判明し、注入可能時間（操作余裕時間）は、5〜7 分が可能になった。市販品の 3.5 分より延長した。混和開始後、温度がピークを示すまでの時間である硬化時間は 10 分で、混和開始後のピーク温度は 85℃で、市販品とほぼ同等であった。残存モノマー量は 7 分 45 秒後：50%残存、9 分後：20%残存、14 分 17 秒後：5%残存、17 分 37 秒後：2.5%残存であった。

骨セメント X 線不透過性のうち、X 線視認性の評価のためのセメント厚と Al 当量では、市販品では①12.0mmAl,②9.0mmAl, ③6.0mmAl であるのに対し、開発品は①16.0mmAl,②14.0mmAl, ③10.0mmAl と良好な視認性を示していた。(図 1)



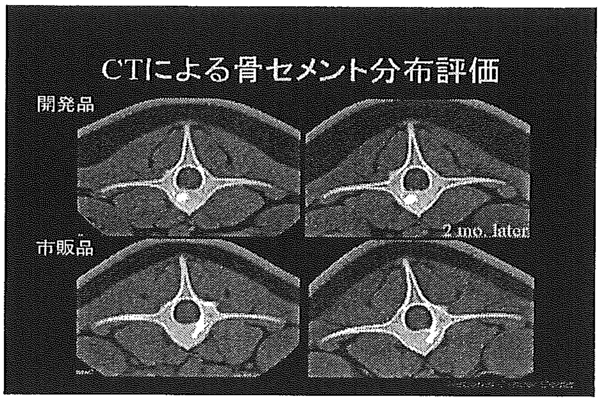
（図１）

CT 値の評価では、市販品では最小 CT 値が 1366.0HU、最大 CT 値が 1460.0HU, 平均が 1403.8HU, SD が 18.6 であり、開発品は最小 CT 値が 3068.0HU, 最大 CT 値が 3071.0HU, 平均が 3069.5HU、SD が 1.0 であり、開発品の方が CT 値は優位に高かった。(図 2)



（図２）

2ヶ月後に骨セメントの分布評価では、同等の結果が得られた。(図 3)



（図３）

D. 考察

腫瘍の進展した状態である転移性骨腫瘍は、骨性疼痛のため担がん患者の quority of life に大きく影響する病態である。この疼痛緩和のため放射線治療が行われるのが一般的であるが、放射線治療は疼痛緩和の効果発現には即効性が低く、罹患骨の外圧に対する抵抗力の補強には寄与しない。経皮的骨形成術は疼痛緩和の効果発現には即効性が高く、かつ、罹患骨の補強硬化も兼ね備えている。経皮的骨形成術では X 線透視や CT 装置を駆使して(X 線装置と CT 装置が一体化した装置も用いられている)標的病変に対して安全かつ正確に到達できるようになってきている。しかし、整形外科領域で直視下に用いる骨セメントを援用し注入しているのが現状である。経皮的骨形成術で用いる骨セメントに必要な条件は 1. 硬化時間が長い（操作余裕時間の延長)、2. 生体毒性の低減（未反応 MMA モノマーの減少)、3. 視認性良好(X 線不透過性)を満たすことである。1. に関しては転移性骨腫瘍は多発することが多く、多発病変が対象となることを想定しなければならない。2. は整形外科領域の使用量と比較すれば少量であるが、未反応 MMA モノマーの減少が有害事象の低減には必要である。3. は標的病変以外への骨セメントの逸脱を回避するためと標的部位への集積の把握には重要である。

前回の報告で 1, 2. については、操作余裕時間の延長と未反応 MMA モノマーの減少について報告したが、今回、視認性（X 線不透過性）の改善として現行品では硫酸バリウムの含有量は 10％以下

であるのに対し PMMA 粉末内に 28.8% の硫酸バリウムを含ませた開発品と市販品の X 線不透過性の評価を行った。
骨セメントの X 線下視認性は、Al 当量の比較でも市販品より開発品の方が高い数値を示し、明らかに市販品より開発品の方が良好であった。CT 値では、市販品より開発品の方が2倍以上の値を示し、これは、椎体中の骨セメント分布の把握や椎体外への流出や脊髄腔や神経根への影響を早期に検出することが可能になり、骨セメントによる有害事象の軽減に大きく貢献することが期待される。少量の骨セメントの標的外流出を検出するために、有利であると考えられる。今回、実験動物への応用を行い、生体内での骨セメント注入時の操作性は現行品より容易で、視認性が優れていることを実感できた。さらに骨セメント注入 2 ヶ月後の再検査 CT 像で良好な骨親和性を示し、骨の補強に充分対応できると考えられた。基礎的実験結果を集積し、今後臨床応用のための可能性を検討する。

E. 結論

開発中の骨セメントは、注入可能時間の延長により操作性が向上と生体毒性を低減でき、さらに、X 線学的視認性の向上を確認でき、動物実験では良好な結果が得られた。

F. 研究発表

1. 論文発表（17 年度分）

1) Satake, M., Tateishi, U., et al.: Percutaneous Transhepatic Portal Vein Embolization: Effectiveness of Absolute Ethanol Infusion with Balloon Catheter in a Pig Model. Acta Radiologica. 46(4):344-352, 2005.
2) Sugiura, S., Satake, M., et al.: Size control of calcium alginate beads containing living cells using micro-nozzle array. Biomaterials, 26: 3327-3331, 2005.
3) Tateishi, U., Satake, M., et al.: Myxoinflammatory Fibroblastic Sarcoma: MR Appearance and Pathologic Correlation. AJR 184: 1749-1753, 2005.
4) Tateishi, U., Satake, M., et al.: Prediction of Lung Adenocarcinoma Without Vessel Invasion: A CT Scan Volumetric Analysis. Chest. 128(5): 3276-3283, 2005.
5) Tateishi, U., Satake, M., et al.: Incidence of Multiple Primary Malignancies in a Cohort of Adult Patients with Soft Tissue Sarcoma. Japanese Journal of Clinical Oncology. 35(8): 444-452, 2005.
6) Tateishi, U., Satake, M., et al.: Mucin-Producing Adenocarcinoma of the Lung:Thin-Section Computed Tomography Findings in 48 Patients and Their Effect on Prognosis. Journal of Computer Assisted Tomography. 29(3):361-368, 2005.
7) 荒井保明、佐竹光夫、他：癌緩和医療における Interventional radiology(IVR)．癌の臨床, 51(3): 213-220, 2005.

2. 学会発表

なし

G. 知的財産権の出願・登録状況
（予定を含む）

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

厚生労働科学研究費補助金（萌芽的先端医療技術推進研究事業）
分担研究報告書
「微細鉗子・カテーテルとその操作技術の開発」に関する研究

分担研究者：角　美奈子（国立がんセンター中央病院　放射線治療部医長）

研究要旨

磁気を応用した診断・治療装置と高線量率イリジウム遠隔操作装置の組み合わせによる、肺癌の小線源治療に必要な三次元治療計画の標準化を検討した。本年度は放射線治療計画時間の短縮を図るための、治療計画方法と評価について検討を行った。

小線源治療の三次元治療計画に利用するparameterの検討により、臨床応用に際しての問題点の一つである治療計画およびその最適化に関する時間の短縮が可能となった。また、定位放射線治療をはじめとする外部照射で使用されるparameterの応用により、小線源治療と他の放射線治療方法の治療計画上の比較が可能となった。小型肺癌をはじめとする小さな腫瘍の放射線治療にはさまざまな選択肢が可能であり、その治療選択に際し客観的な評価が可能となることにより適切な治療選択が可能となり、小線源治療の特徴を活用した治療方法の選択を容易にすることが期待される。

A.研究目的

肺悪性腫瘍に対する従来の放射線治療の主体は外照射であり、治療効果の向上と副作用の軽減をめざして、化学放射線療法や分割照射方法の検討が施行されてきた。一方で、小型肺癌をはじめとする肺の小病変に対する放射線治療方法の研究としては、重粒子線・陽子線などの粒子線治療や定位放射線治療などの研究が現在進行中である。

本研究では、肺の小病変に対して磁気を応用した診断・治療装置と高線量率イリジウム遠隔操作装置の組み合わせによる小線源治療を応用し、病巣に線量を集中する放射線治療方法の最適化を図ることを目的としている。最適な治療方法を選択するための手段として、外部照射による他の放射線治療との客観的比較方法の確立が必要である。本研究では、肺癌をはじめとした小型腫瘍に対する小線源治療に必要な治療計画の標準化を行っているが、特に治療計画方法のシステム化と治療内容の客観的な評価方法を検討している。平成16年度までの研究では、小線源治療に必要な治療計画の標準化で重要な適切な線量分布を得るための治療計画方法について検討を行い、小線源治療で適切な線量分布を取得するための最適化法として、Inverse planning（IP）法が本治療方法で応用が可能であることを示した。しかし、治療計画に要する時間が臨床応用上は問題であり、時間の短縮および治療計画のQA・QCについての検討が課題となっている。

治療計画をGeometrical optimization法やDose point optimization法で行う場合は最適化に2時間程度必要であったが、IP法では最適化作業の計算待ち時間は5分以内と短縮されている。

ここで問題となるのが治療計画に必要な標的体積とrisk臓器（食道、心臓、亜区域気管支、肺動静脈、大動脈、脊髄）の輪郭抽出作業に要する時間であり、治療計画parameterの選択である。従来の検討で輪郭抽出作業には25～45分必要であることが判明しており、臨床応用上は治療計画に要する時間はより短い方法が望まれている。

磁気を応用した診断・治療装置により小線源治療用アプリケータを適切に配置した後に治療計画を行うことを想定すると、治療計画に要する時間は30分前後の

短時間であることが理想的であり、治療計画時間短縮のための検討が必要である。

このような現状に対し本研究では、磁気を応用した診断・治療装置と高線量率イリジウム遠隔操作装置の組み合わせによる、肺癌をはじめとした小型腫瘍に対する小線源治療に必要な治療計画の標準化を行ってきた。今回特に治療計画上重要な最適化に関する因子を検討し、parameter の選択による客観的評価方法の検討を計画した。治療計画 parameter の適切な選択により、治療計画に要する時間の短縮をはかることを目的として検討を行った。

B. 研究方法

^{192}Ir マイクロ線源を使用する高線量率イリジウム遠隔操作装置（^{192}IrHDR-RALS）による高線量率組織内照射を用いる、磁気を応用した診断・治療装置と高線量率イリジウム遠隔操作装置の組み合わせによる小線源治療への応用を目的に、ファントムを用いた治療計画の解析を行った。

治療計画の比較検討を行うために、標的体積と risk 臓器のそれぞれに対する容積線量ヒストグラム（Dose-Volume Histogram; DVH）を作成した。治療計画の比較検討に使用する parameter について、特に外部照射との比較検討が可能な parameter を中心にその有用性について検討した。

CT 上腫瘍と考えられる部位を GTV（Gross tumor volume）とし、GTV に 5mm マージンをつけて CTV（Clinical target volume）とした。PTV= CTV として治療計画を行った。治療計画では、V100（PTV 内部において処方線量以上で照射された体積）が PTV の 90％となり、D90（PTV の 90％以上の体積が照射される線量）= 処方線量として検討した。

検討した parameter は以下の定義を用いた。

①Homogeneity Index (HI):
PTV 内最高線量／PTV 内最低線量
HI が低いほうが腫瘍内が均一に照射されていると評価される。

②Conformity Index (CI):
$CI_{RTOG}=V_{pi}/V_T$（1.0 が perfect）
V_{pi}=Volume enclosed by the prescription isodose
V_T =Target volume
CI の定義は、論文により異なり統一されていないが、本研究では Radiation Therapy Oncology Group の定義に従った。

（倫理面への配慮）
本研究における技術的な検討においてはファントムを用いて検討した。今後の臨床への応用においては、臨床試験を計画し IRB の審査を経て十分に倫理的な配慮を尽くして行うことを計画している。

C. 研究結果

応用を検討した parameter において Homogeneity Index (HI) と Conformity Index (CI) に注目して解析を行った。いずれも小線源治療について算出可能であり、三次元治療計画装置を用いた治療計画時間への影響は、5 分以内に留まった。

①HI を応用して小線源治療と定位放射線治療の治療計画の客観的比較を検討した。腫瘍径毎に HI を両治療方法で比較したが、小線源治療は直径 2cm 以下の腫瘍では、定位放射線治療より優れていた。本研究の対象とする小型肺癌をはじめとする、小さな腫瘍に対する小線源治療の有用性が parameter 解析上も明らかとなった。

②CI を応用して同様に小線源治療と定位放射線治療の治療計画の客観的比較を検討した。小線源治療では腫瘍径が大きくなると、CI を理想的な 1.0 に近接することが困難となることが判明した。

以上の結果より、HI および CI は小線源治療と定位放射線治療などの治療方法の客観的比較に応用可能であり、治療計画時間を延長することなく利用できることが明らかとなった。

D. 考察

小型肺癌をはじめとする小さな腫瘍の放射線治療には、さまざまな選択肢が考えられる。病巣の位置や形態により、治療方法の選択が制限される場合もあるが、多くは複数の治療が選択肢として考えられる。その場合、より適切と考えられる治療の選択には客観的な指標の使用が望ましい。

昨年までの本研究では、小線源治療における、より適切な線量分布を取得するための最適化法として、Inverse planning 法の本治療への応用を可能とした。磁気を応用した診断・治療装置による悪性腫瘍の小線源治療への応用により、Inverse planning 法による最適化された治療計画が実現され、高線量率組織内照射の特徴をより強調した、効果の向上と副作用の軽減を実現する放射線治療が可能となってくると考えられる。治療選択に際し客観的な評価が可能となることにより、より適切な治療選択が可能となり小線源治療の特徴を活用した選択を容易にすることが期待される。臨床応用に関しての問題点としては治療計画に要する時間があるが、輪郭抽出を中心とした治療計画時間の短縮と治療計画のQA・QC システムの確立により、臨床応用が可能となると考えられる。

Inverse planning 法は現在さまざまな部位を対象とした放射線治療において広範に応用が検討されており、治療計画時間の短縮と QA・QC システムの確立は Image-guided Radiotherapy の実施においてますます重要な課題となっている。本研究の内容は小線源治療のみならず放射線治療の各分野で、広く応用が可能と考えられる。

E. 結論

小線源治療の三次元治療計画において利用する parameter の検討により、臨床応用に際しての問題点の一つである治療計画およびその最適化に必要である時間の短縮が可能となった。本研究では、肺癌をはじめとした小型腫瘍に対して、最適な放射線治療を提供する方法の開発を目的としており、治療方法の選択に寄与しうる治療方法の評価は重要な課題の一つである。定位放射線治療をはじめとする外部照射で使用される parameter の応用により、小線源治療と他の放射線治療方法の治療計画上の比較が可能となり、治療方法の選択において重要な情報の提供が可能となった。今後、小型肺癌をはじめとする小さな腫瘍の放射線治療には、さまざまな選択肢が考えられるが、その治療選択に際し客観的な評価が可能となることにより、より適切な治療選択が可能となり小線源治療の特徴を活用した選択を容易にすることが期待される。

F. 研究発表

1. 論文発表

Yonemori K, Sumi M, Fujimoto N, Ito Y, Imai A, Kagami Y, Ikeda H: Pro-gastrin-releasing peptide as a factor predicting the incidence of brain metastasis in patients with small cell lung carcinoma with limited disease receiving prophylactic cranial irradiation. Cancer, 104: 811-816, 2005.

Matsubara H, Makimoto A, Higa T, Kawamoto H, Sakiyama S, Hosono A, Takayama J, Takaue Y, Murayama S, Sumi M, Kaneko A, Ohira M: A multidisciplinary treatment strategy that includes high-dose chemotherapy for metastatic retinoblastoma without CNS involvement. Bone Marrow Transplant, 35: 763-766, 2005.

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Nakagawa T, Kakizoe T, et al.	DNA hypomethylation on pericentromeric satellite regions significantly correlates with loss of heterozygosity on chromosome 9 in urothelial carcinomas.	J Urol	173	243-246	2005
Yamanata H, Kakizoe T, et al.	Effectiveness 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
Ichihara T, Kakizoe T, et al.	Lack of chemoprevention or promotion effects of docosahexaenoic acid on small intestine, colon, liver, lung, thyroid, esophagus, kidney, and forestomach carcinogenesis in a rat medium-term multi-organ carcinogenesis model.	J Thoxicol Pathol	18	53-59	2005
Hamaguchi T, Kakizoe T, et al.	NK105, a paclitaxel-incorporating micellar nanoparticle formulation, can extend in vivo antitumour activity and reduce the neurotoxicity of paclitaxel.	Bri J Cancer	92	1240-1246	2005
Nakagawa T, Kakizoe T, et al.	DNA hypermethylation on multiple CpG islands associated with increased DNA methyltransferase DNMT1 protein expression during multistage urothelial carcinogenesis.	J Urol	173	1767-1771	2005
Chihara Y, Kakizoe T, et al.	Loss of blood group A antigen expression in bladder cancer caused by allelic loss and/or methylation of the ABO gene.	Lab Invest	85	895-907	2005
Ishikawa H, Kakizoe T, et al.	Randomized trial of dietary fiber and lactobacillus casei administration for prevention of colorectal tumors.	Int J Cancer	116	762-767	2005
Uchino H, Kakizoe T, et al.	Cisplatin-incorporating polymeric micelles (NC-6004) can reduce nephrotoxicity and neurotoxicity of cisplatin in rats.	Bri J Cancer	93	678-687	2005
Uchida T, Kakizoe T, et al.	Transrectal high-intensity focused ultrasound in the treatment of localized prostate cancer: a multicenter study.	Acta Urol Jpn	51	651-658	2005
Matsushita H, Kakizoe T, et al.	A new method for isolating colonocytes from naturally evacuated feces and its clinical application to colorectal cancer diagnosis.	Gastroenterology	129(6)	1919-1927	2005
Pu YS, Kakizoe T, et al.	The 18th international symposium: controversies in prostate cancer diagnosis and treatment.	Jpn J Clin Oncol	35(11)	680-689	2005

Yamada D, Kakizoe T, et al.	Promoter hypermethylation of the potential tumor suppressor DAL-1/4.1B gene in renal clear cell carcinoma.	Int J Cancer	118	916-923	2006
垣添忠生	尿道カテーテルについて	治療学	39	11	2005
Kobayashi T, Kakizoe T, et al.	A flexible endoscopic surgical system: First report on a conceptual design of the system validated by experiments.	Jpn J Clin Oncol	35(11)	667-671	2005
Nomori H, Kobayashi T, et al.	^{11}C-Acetate positron emission tomography imaging for lung adenocarcinoma 1 to 3 cm in size with ground-grass opacity images on computed tomography.	Ann Thorac Surg	80	2020-2025	2005
Iinuma G, Kobayashi T, et al.	Recent advances in radiology for the diagnosis of gastric carcinoma.	Divers Gastric Carcinoma		221-232	2005
Iinuma G, Satake M, Kobayashi T, et al	Vascular virtual endoluminal visualization of invasive colorectal cancer on MDCT colonography.	Am J Roentgenol	184	1194-1198	2005
小林寿光，ほか	肺腫瘍のCTガイド下気管支鏡検査.	からだの科学 増刊「高度先進医療」		13-16	2005
菅原明彦，小林寿光，ほか	CTガイド下極細径気管支鏡検査.	呼吸器科	8(3)	266-272	2005
菅原明彦，小林寿光	磁気を応用した微細鉗子・内視鏡の開発.	日本臨牀	64(2)	353-357	2006
Kikuchi K, Ishiyama K, et al.	Fabrication of a spiral type magnetic micromachine for trailing a wire.	IEEE Trans Magn	41	4012-4014	2005
Yamazaki A, Ishiyama K, et al.	Wireless magnetic micromachine of planar structure with magnetic thin film.	IEEE Trans Magn	41	4021-4023	2005
山崎彩，石山和志，ほか	平面型構造の磁気マイクロマシンの試作.	日本応用磁気学会誌	29	157-160	2005
久富伸一，石山和志，ほか	スパイラル型磁気マイクロマシンを用いたマイクロポンプ.	日本応用磁気学会誌	29	161-164	2005
菊地健司，石山和志，ほか	ワイヤを牽引する磁気マイクロマシンの試作.	日本応用磁気学会誌	29	176-179	2005
横田周子，石山和志，ほか	磁性薄膜を用いた片持ち梁型磁気アクチュエータに関する検討.	日本応用磁気学会誌	30	302-305	2006
Shimizu Y, Arai Y, et al.	Late complication in patients undergoing pancreatic resection with intraoperaive radiation therapy: Gastrointestinal bleeding with occlusion of the portal system.	J Gastroenterol Hepatol	20	1235-1240	2005
Hosokawa A, Arai Y, et al.	Hepatic hemangioma presenting atypical radiologic findings: A case report.	Radiat Med	23	371-375	2005
Tateishi U, Arai Y, et al.	Prediction of lung adenocarcinoma without vessel invasion: A CT Scan volumetric analysis.	Chest	128(Nov)	3276-3283	2005

Tateishi U, Arai Y, et al.	MRI features of extraskeletal myxoid chondrosarcoma.	Skeletal Radiol	12(Oct)	1-7	2005
Tateishi U, Arai Y, et al.	Incidence of multiple primary malignancies in a cohort of adult patients with soft tissue sarcoma.	Jpn J Clin Oncol.	35(Aug)	444-452	2005
Tateishi U, Arai Y, et al.	Myxoinflammatory fibroblastic sarcoma: MR Appearance and pathologic correlation.	AJR Am J Roentgenol	184(Jun)	1749-53	2005
Iinuma G, Arai Y, et al.	Recent advances in radiology for the diagnosis of gastric carcinoma. The diversity of gastric carcinoma.	Pathog Diagn Ther		221-232	2005
荒井保明	消化器癌肝転移に対する動注化学療法	臨牀消化器内科	20(2)	189-197	2005
荒井保明	大腸癌肝転移に対する肝動注化学療法の位置づけ	大腸疾患NOW		93-99	2005
楠本昌彦，荒井保明，ほか	肺腫瘤病変に対する生検の適応についての考え方－肺癌術前に確定診断は全例に必要か－	IVR	20	58-59	2005
荒井保明	序文－臨床試験技術習得のススメ	IVR	20	p42	2005
荒井保明，佐竹光夫，ほか	癌緩和医療における Interventional radiology(IVR)	癌の臨床	51(3)	213-220	2005
荒井保明	IVR（インターベンショナル・ラジオロジー）	がん看護	10(3)	261-266	2005
荒井保明	大腸癌・肝動注化学療法	綜合臨床	54(7)	2081-2082	2005
荒井保明，山本清一郎	臨床研究に必要な統計「以前」の知識	IVR会誌	20	371-375	2005
Satake M, Tateishi U, et al.	Percutaneous transhepatic portal vein embolization: Effectiveness of absolute ethanol infusion with balloon catheter in a pig model.	Acta Radiol	46(4)	344-352	2005
Sugiura S, Satake M, et al.	Size control of calcium alginate beads containing living cells using micro-nozzle array.	Biomaterials	26	3327-3331	2005
Tateishi U, Satake M, et al.	Myxoinflammatory fibroblastic sarcoma: MR appearance and pathologic correlation.	AJR	184	1749-1753	2005
Tateishi U, Satake M, et al.	Prediction of lung adenocarcinoma without vessel invasion: A CT scan volumetric analysis.	Chest	128(5)	3276-3283	2005
Tateishi U, Satake M, et al.	Incidence of multiple primary malignancies in a cohort of adult patients with soft tissue sarcoma.	Jpn J Clin Oncol	35(8)	444-452	2005
Tateishi U, Satake M, et al.	Mucin-producing adenocarcinoma of the lung: Thin-section computed tomography findings in 48 patients and their effect on prognosis.	J Comput Assist Tomogr	29(3)	361-368	2005

荒井保明，佐竹光夫，ほか	癌緩和医療におけるInterventional radiology(IVR)．	癌の臨床	51(3)	213-220	2005
Yonemori K, Sumi M, et al.	Pro-gastrin-releasing peptide asa factor predicting the incidence of brain metastasis in patients with small cell lung carcinoma with limited diseasereceiving prophylactic cranial irradiation	Cancer	104	811-816	2005
Matsubara H, Sumi M, et al.	A multidisciplinary treatment strategy that includes high-dose chemotherapy for metastatic retinoblastoma without CNS involvement.	Bone Marrow Transplant	35	763-766	2005
伊藤芳紀，角美奈子，ほか	骨転移痛治療の新たな展開．骨転移痛に対する放射線療法の現状と新しい試み．	緩和医療学	7	366-373	2005

0022-5347/05/1731-0243/0
THE JOURNAL OF UROLOGY®
Copyright © 2005 by AMERICAN UROLOGICAL ASSOCIATION

Vol. 173, 243–246, January 2005
Printed in U.S.A.
DOI: 10.1097/01.ju.0000141577.98902.49

DNA HYPOMETHYLATION ON PERICENTROMERIC SATELLITE REGIONS SIGNIFICANTLY CORRELATES WITH LOSS OF HETEROZYGOSITY ON CHROMOSOME 9 IN UROTHELIAL CARCINOMAS

TOHRU NAKAGAWA, YAE KANAI,* SAORI USHIJIMA, TADAICHI KITAMURA, TADAO KAKIZOE AND SETSUO HIROHASHI

From the Pathology Division, National Cancer Center Research Institute (TN, YK, SU, SH), Department of Urology, Faculty of Medicine, Tokyo University (TN, TKi) and National Cancer Center (TKa), Tokyo, Japan

ABSTRACT

Purpose: DNA methylation has important roles in genomic stability. Accordingly DNA hypomethylation on pericentromeric satellite regions may induce chromosomal instability through heterochromatin decondensation and chromosomal recombination enhancement. We elucidated the significance of aberrant DNA methylation on pericentromeric satellite regions during urothelial carcinogenesis.

Materials and Methods: We examined DNA methylation status on satellites 2 and 3 by Southern blotting and determined the allelic status of chromosome 9 using 6 microsatellite markers (D9S775, D9S925, D9S304, D9S303, D9S283 and D9S747) in 27 transitional cell carcinomas of the bladder, ureter or renal pelvis and corresponding noncancerous tissues.

Results: DNA hypomethylation on satellites 2 and 3 was detected in 2 (7%) and no (0%) noncancerous tissues, and in 11 (41%) and 12 (44%) urothelial carcinomas, respectively. DNA hypomethylation in urothelial carcinomas significantly correlated with histological grade ($p = 0.0012$ and 0.0043), invasion depth ($p = 0.0055$ and 0.0228) and morphological structure (papillary vs nodular, $p = 0.0161$ and 0.0297) for satellites 2 and 3, respectively. Loss of heterozygosity on at least 1 locus of chromosome 9 was detected in 14 urothelial carcinomas (52%). DNA hypomethylation on satellites 2 ($p = 0.0098$) and 3 ($p = 0.0034$) significantly correlated with loss of heterozygosity on chromosome 9.

Conclusions: DNA hypomethylation on pericentromeric satellite regions may participate in the development and progression of urothelial carcinomas by inducing loss of heterozygosity on chromosome 9.

KEY WORDS: urothelium; carcinoma, transitional cell; DNA methylation; chromosomal instability; loss of heterozygosity

DNA methylation has important roles in transcriptional regulation, chromatin remodeling and genomic stability.[1] Satellites 2 and 3, which are related families containing a frequent 5 bp repeat, are abundant in pericentromeric heterochromatin regions on chromosomes 1, 9 and 16, and heavily methylated in normal somatic cells.[2] DNA hypomethylation on such pericentromeric satellite regions may induce chromosomal instability through heterochromatin decondensation and chromosomal recombination enhancement.[3,4] DNA hypomethylation on satellites 2 and 3 has been reported to cause chromosomal instability, such as the formation of multiradiate chromosomes composed of chromosomes 1, 9 and 16, in ICF (immunodeficiency-chromosomal instability-facial anomalies) syndrome.[2]

In human cancers overall DNA hypomethylation accompanied by region specific hypermethylation is generally observed.[1] Aberrant DNA methylation may be involved in carcinogenesis by at least three possible mechanisms: induction of genomic instability as a result of decreased methylation level,[5–7] increased gene mutagenicity caused by deamination of 5-methylcytosine to thymine and repression of gene transcription through CpG island methylation in specific gene regulatory regions, including tumor suppressor genes.[1] For example, frequent chromosomal 1q copy gain with a pericentromeric break point has been reported in hepatocellular carcinomas showing DNA hypomethylation on satellite 2.[8]

The role of DNA hypomethylation in urothelial carcinomas is not fully understood, although aberrant hypermethylation on CpG islands around the promoter region and decreased expression of tumor suppressor genes, such as the *p16* and *E-cadherin* genes, have been reported.[9,10] In addition, loss of heterozygosity (LOH) on chromosome 9 is the most common genetic abnormality in urothelial carcinomas.[11] Consequently we focused on the clinicopathological significance of DNA hypomethylation on pericentromeric satellite regions in urothelial carcinomas and examined whether this hypomethylation is the underlying mechanism for LOH on chromosome 9 during human urothelial carcinogenesis.

MATERIALS AND METHODS

Patients and tissue samples. Paired specimens of primary urothelial carcinoma and corresponding noncancerous tissue were obtained from surgically resected specimens from 27 patients (U1 to U27) treated at National Cancer Center Hospital, Tokyo, Japan. The patients were 22 men and 5 women with a mean age ± SD of 67.6 ± 10.5 years (range 50 to 85).

Submitted for publication May 20, 2004.
Supported by a Grant-in-Aid for the Second Term Comprehensive 10-Year Strategy for Cancer Control and a Grant-in-Aid for Cancer Research from the Ministry of Health, Labor and Welfare of Japan, and a Research Resident Fellowship from the Foundation for Promotion of Cancer Research in Japan (TN).
* Correspondence: Pathology Division, National Cancer Center Research Institute, 5-1-1 Tsukiji, Chuo-ku, Tokyo 104-0045, Japan (FAX: 81-3-3248-2463; e-mail: ykanai@ncc.go.jp).

The primary tumor sites were the bladder, ureter and renal pelvis in 13, 5 and 9 patients, respectively. Based on histological examination 5 (19%), 10 (37%) and 12 (44%) tumors were classified as G1, G2 and G3–4 transitional cell carcinoma, while 11 (41%) and 16 (59%) were superficial (pTa and pT1) and invasive (pT2 to pT4), respectively.[12] Morphologically 21 tumors (78%) were papillary carcinoma and 6 (22%) were nodular carcinoma. Noncancerous specimens were obtained from the urothelium distant from the carcinoma.[13] In cases of widely spreading carcinomas in situ, as diagnosed histopathologically in preoperative biopsy specimens, the muscle layer of the bladder or the renal parenchyma was collected as noncancerous specimens since macroscopic examination cannot necessarily discriminate noncancerous urothelium from carcinoma in situ.

Southern blotting for pericentromeric satellite regions. High molecular weight DNA was isolated from fresh tissue samples by phenol-chloroform extraction and dialysis. DNA methylation status was assessed by digesting DNA with *Msp* I and *Hpa* II, which cut at the sequence CCGG. *Hpa* II does not cut when the internal cytosine is methylated. High molecular weight DNA (5 μg) was digested for 24 hours with 10 U *Msp* I or *Hpa* II/μg DNA. DNA fragments were separated by electrophoresis, transferred to nitrocellulose membranes and hybridized with ^{32}P labeled DNA probes. Previously described oligonucleotides were used as probes for satellites 2 and 3.[14]

Analysis of LOH on chromosome 9. Genomic DNA was amplified by polymerase chain reaction (PCR) using oligonucleotide primers for 6 microsatellite loci on chromosome 9, namely D9S775, D9S925, D9S304, D9S303, D9S283 and D9S747. Primer sequences were D9S775 (9p23) 5′-AAAGTAGCCATCCGTGTGT-3′ and 5′-GCTTTCTTTGATGGTTTACAG-3′, D9S925 (9p21–22) 5′-GTCTGGGTTCTCCAAAGAAA-3′ and 5′-TGTGAGCCAAGGCCTTATAG-3′, D9S304 (9p21) 5′-GTGCACCTCTACACCCAGAC-3′ and 5′-TGTGCCCACACACATCTATC-3′, D9S303 (9q21) 5′-CAACAAAGCAAGATCCCTTC-3′ and 5′-TAGGTACTTGGAAACTCTTGGC-3′, D9S283 (9q22) 5′-TGCTGGATTTCAGGTAGGG-3′ and 5′-ATGGTTATGCGGGTGTATTTCTC-3′, and D9S747 (9q32) 5′-GCCATTATTGACTCTGGAAAAGAC-3′ and 5′-CAGGCTCTCAAAATATGAACAAAAT-3′. The 5′ ends of forward primers were labeled with 6-carboxyfluorescein and PCR amplifications were performed with 20 ng genomic DNA. Subsequently PCR products were fractionated by electrophoresis (ABI 3100 sequencer, Applied Biosystems, Foster City, California) according to the manufacturer protocol. Data were analyzed with the GeneScan, version 3.7 computer program (Applied Biosystems). When 2 amplified bands per locus were detected in the noncancerous tissue specimen, the case was considered informative for LOH analysis. LOH was recorded when signal intensity for a tumor allele was decreased by more than 50% relative to the matched normal allele in informative cases, as described previously.[15–17] Replication error was identified by the presence of band shifts or the presence of novel bands in PCR products.

Statistics. Correlations between any 2 of DNA methylation status, allelic status and clinicopathological parameters were analyzed by the chi-square test with $p < 0.05$ considered significant.

RESULTS

DNA methylation status on pericentromeric satellite regions and its correlation with clinicopathological parameters. Figure 1 shows examples of Southern blotting. In 25 (93%) and all 27 (100%) noncancerous tissue specimens examined significantly larger DNA fragments were detected in *Hpa* II digests compared with *Msp* I digests at satellites 2 and 3, respectively, indicating that these regions were heavily methylated. In 11 (41%) and 12 (44%) urothelial carcinomas smaller fragments were detected in *Hpa* II digest compared with corresponding normal tissues or *Hpa* II digest showed almost the same hybridization pattern as the *Msp* I digest of the same sample and the corresponding normal tissue, indicating that these regions were hypomethylated. In almost all carcinoma samples in which DNA hypomethylation was detected hypomethylation occurred on satellites 2 and 3.

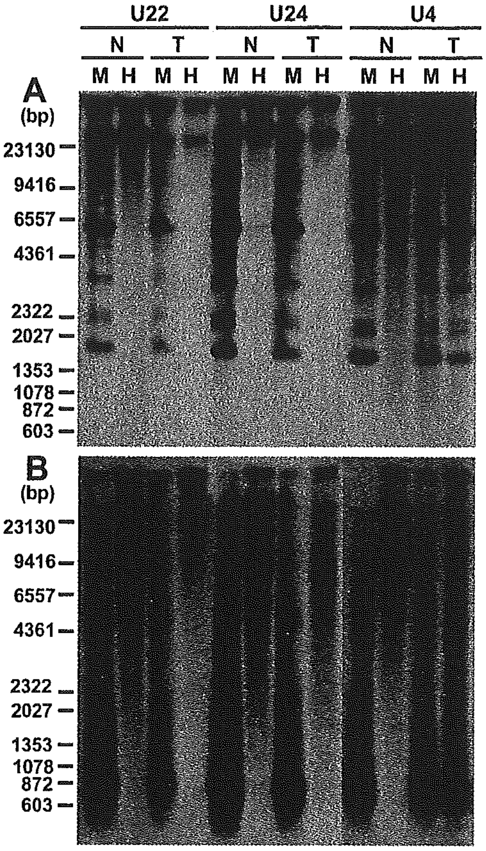


FIG. 1. Examples of Southern blotting for satellites 2 (*A*) and 3 (*B*) in cases of urothelial carcinoma. Methylation status was assessed by digesting DNA with *Msp* I (*Lane M*) and *Hpa* II (*Lane H*). DNA fragments were separated by electrophoresis, transferred to nitrocellulose membranes and hybridized with ^{32}P labeled DNA probes. Larger bands were detected in lane H compared with lane M in all noncancerous tissue (*N*), and in U22T and U24T, indicating that satellite 2 region was heavily methylated (*A*). In U4T lane H showed same hybridization pattern as lane M, indicating that this region was hypomethylated. (*B*) In all noncancerous tissues, and U22T and U24T satellite 3 region was heavily methylated, whereas this region was hypomethylated in U4T. *T*, cancerous tissue.

DNA hypomethylation on pericentromeric satellite regions significantly correlated with histological grade (chi-square test p = 0.0012 and 0.0043), invasion depth (chi-square test p = 0.0055 and 0.0228) and morphological structure (papillary vs nodular chi-square test p = 0.0161 and 0.0297) for satellites 2 and 3, respectively (table 1), but not with age or gender (data not shown).

Allelic status of chromosome 9 and its correlation with clinicopathological parameters. Figure 2 shows examples of electropherograms of PCR products. Figure 3 shows the results of LOH analysis. Table 2 lists the incidence of LOH on each locus. LOH for at least 1 marker was found in 14 of the 27 informative cases (52%) (table 2).

The presence of LOH on at least 1 locus on chromosome 9 significantly correlated with histological grade (chi-square test p = 0.0313, table 3). LOH on at least 1 locus was detected in all 6 nodular carcinomas and its incidence (100%) was significantly higher than in papillary carcinomas (chi-square test p = 0.0074, table 3).

Correlation between DNA methylation status on pericentromeric satellite regions and allelic status of chromosome 9. DNA