

	P (n=8)	P+IUGR (n=7)	IUGR (n=6)	Control (n=12)
PP5/TFPI-2	2.16 ± 0.39*	4.86 ± 1.43	6.31 ± 0.95	4.33 ± 0.85
Glypican-3	3.25 ± 0.62**	3.64 ± 0.79	5.36 ± 1.62	5.22 ± 0.77
Syndecan-1	6 ± 0.74****	5.89 ± 1.12	7.57 ± 1.07****	3.8 ± 0.53

Fig. 3. Comparison of the immunohistochemical scores for PP5/TFPI-2, glypican-3, and syndecan-1 in the placental samples. Data are expressed as the mean ± SE. Student's *t* test was used for all comparisons. **p* = 0.035, compared to the Control, and *p* = 0.001, compared to Group IUGR, ***p* = 0.045, compared to the Control, ****p* = 0.023, compared to the Control, and *****p* = 0.003, compared to the Control.

and Group P + IUGR, the maternal serum PP5/TFPI-2 levels and placental immunohistochemical intensities of PP5/TFPI-2 were comparable to the Control. Although the patients in Group P and Group P + IUGR had preeclampsia to the same severity, they were not the same in the status of PP5/TFPI-2. The reason of the different status of PP5/TFPI-2 between preeclampsia and IUGR, as well as its relation to the clinical symptoms, is not known. Further studies would provide some available information on the pathogenesis of preeclampsia and IUGR.

Finally, we found that the umbilical serum levels of PP5/TFPI-2 were too low to be measured. The PP5/TFPI-2 levels were decreased in the maternal serum samples obtained 4 days after delivery, in agreement with another report [30].

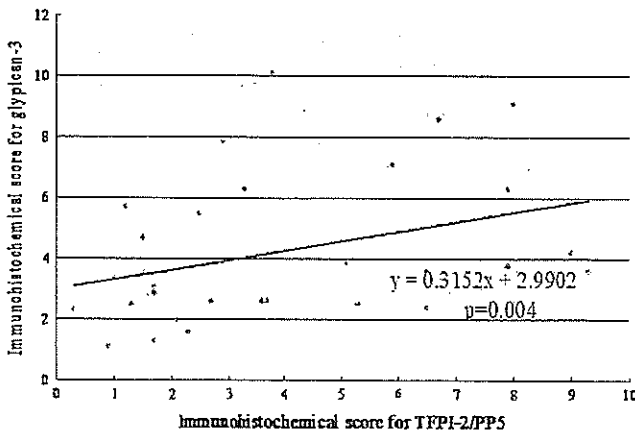


Fig. 4. Correlation between the immunohistochemical scores for PP5/TFPI-2 and those for glypican-3. C.I. = 0.506, *p* = 0.004 (Spearman's correlation test).

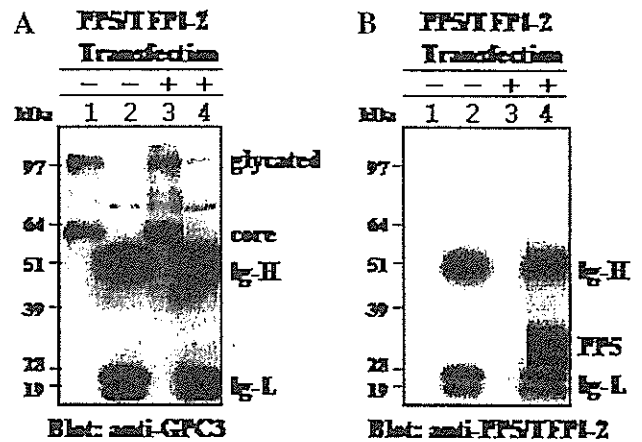


Fig. 5. Interaction of PP5/TFPI-2 and glypican-3 by immunoprecipitation experiments. HepG2 cell lysates from the PP5/TFPI-2 expression vector transfectant or the empty vector one were prepared as described in the text. Ten microliters of each sample before immunoprecipitation was loaded as input. Ten microliters from each 50 μl immunoprecipitation was also loaded. (A) Immunoblotted with anti-glypican-3 antibody and (B) with anti-PP5/TFPI-2. Molecular size from the marker bands was presented on the left side of each panel. Lanes 1 and 3, inputs; Lanes 2 and 4, immunoprecipitants. Ig-H, immunoglobulin heavy chain; Ig-L, immunoglobulin light chain; glycosylated, the glycosylated form of glypican-3; and core, the core protein of glypican-3.

The role of PP5/TFPI-2 in pregnancy is not yet fully understood, but it is certain that PP5/TFPI-2 functions within the maternal serum and/or in the placenta, rather than in the fetal side. Our hypothesis has been that PP5/TFPI-2 works as an anticoagulant on the villous surface, which is not verified yet. Another group [47] has shown that the cognate tissue factor initiated coagulation inhibitor TFPI (or TFPI-1) is responsible for inhibiting coagulation in the placenta. Our finding in the present study, demonstrating the loss of PP5/TFPI-2 in the syncytium of the patients with preeclampsia, might imply its anticoagulant feature, because preeclampsia often encounters with elevated coagulation activity. Measuring the parameters of maternal coagulation activation in parallel with the examinations of placental events *in situ* should be considered as a further step to answer these questions.

In summary, the interaction of PP5/TFPI-2 with glypican-3 has been demonstrated from our studies. In patients with preeclampsia, there was a discrepancy in the PP5/TFPI-2 level in maternal serum, and the immunohistochemical intensity of the protein in the placenta. A decrease in the amount of glypican-3 in the placenta seems to hold the key for the discrepancy, but further studies are necessary to clarify the facts. Preeclampsia and IUGR, often regarded to share the same pathological basis, appeared to be totally distinct in terms of PP5/TFPI-2 distribution.

Acknowledgments

We would like to thank Mr. Yoshiyasu Nakamura (for his assistance in staining procedures) and Mrs. Hiroko Matsubara (for her assistance in Western blotting) at Kanagawa Cancer

Center Research Institute, and all the staffs in Maternity and Neonate Center for their help in collecting samples.

References

- [1] Dekker GA, Robillard PY. Pre-eclampsia: a couple's disease with maternal and fetal manifestations. *Curr Pharm Des* 2005;11:699–710.
- [2] Kaufmann P, Black S, Huppertz B. Endovascular trophoblast invasion: implications for the pathogenesis of intrauterine growth retardation and preeclampsia. *Biol Reprod* 2003;69:1–7.
- [3] Redman CW, Sargent IL. Latest advances in understanding preeclampsia. *Science* 2005;308:1592–4.
- [4] Bohn H, Winckler W. Isolation and characterization of the placental protein pp5. *Arch Gynakol* 1977;223:179–86.
- [5] Miyagi Y, Koshikawa N, Yasumitsu H, Miyagi E, Hirahara F, Aoki I, et al. cDNA cloning and mRNA expression of a serine proteinase inhibitor secreted by cancer cells: identification as placental protein 5 and tissue factor pathway inhibitor-2. *J Biochem* 1994;116:939–42.
- [6] Sprecher CA, Kisiel W, Mathewes S, Foster DC. Molecular cloning, expression, and partial characterization of a second human tissue-factor-pathway inhibitor. *Proc Natl Acad Sci* 1994;91:3353–7.
- [7] Petersen LC, Bjorn SE, Oisen OH, Nordfang O, Norris F, Norris K. Inhibitory properties of separate recombinant Kunitz-type-protease-inhibitor domains from tissue-factor-pathway inhibitor. *Eur J Biochem* 1996;235:310–6.
- [8] Than G, Seppala M, Csaba I, Iino K, Briese V. Placental protein 5 in benign and malignant ovarian cyst fluids. *Tumour Biol* 1987;8:230–1.
- [9] Rao CN, Reddy P, Liu Y, O'Toole E, Reeder D, Foster DC, et al. Extracellular matrix-associated serine protease inhibitors (Mr 33,000, 31,000, and 27,000) are single-gene products with differential glycosylation: cDNA cloning of the 33-kDa inhibitor reveals its identity to tissue factor pathway inhibitor-2. *Arch Biochem Biophys* 1996;335:82–92.
- [10] Crawley J, Goulding DA, Ferreira V, Severs NJ, Lupu F. Expression and localization of tissue factor pathway inhibitor-2 in normal and atherosclerotic human vessels. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002;22:218–24.
- [11] Herman MP, Sukhova GK, Kisiel W, Foster D, Kehry MR, Libby P, et al. Tissue factor pathway inhibitor-2 is a novel inhibitor of matrix metalloproteinases with implications for atherosclerosis. *J Clin Invest* 2001;107:1117–26.
- [12] Jin M, Udagawa K, Miyagi E, Nakazawa T, Hirahara F, Yasumitsu H, et al. Expression of serine proteinase inhibitor PP5/TFPI-2/MSPI decreases the invasive potential of human choriocarcinoma cells in vitro and in vivo. *Gynecol Oncol* 2001;83:325–33.
- [13] Rao CN, Lakka SS, Kin Y, Konduri SD, Fuller GN, Mohanam S, et al. Expression of tissue factor pathway inhibitor 2 inversely correlates during the progression of human gliomas. *Clin Cancer Res* 2001;7:570–6.
- [14] Konduri SD, Tasiou A, Rao CN, Chandrasekar N, Rao JS. Overexpression of tissue factor pathway inhibitor-2 (TFPI-2), decreases the invasiveness of prostate cancer cells in vitro. *Int J Oncol* 2001;18:127–31.
- [15] Sato N, Parker AR, Fukushima N, Miyagi Y, Iacobuzio-Donahue CA, Eshleman JR, et al. Epigenetic inactivation of TFPI-2 as a common mechanism associated with growth and invasion of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Oncogene* 2005;24:850–8.
- [16] Shinoda E, Yui Y, Hattori R, Tanaka M, Inoue R, Aoyama T, et al. Tissue factor pathway inhibitor-2 is a novel mitogen for vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* 1999;274:5379–84.
- [17] Tanaka Y, Utsumi J, Matsui M, Sudo T, Nakayama N, Mutoh M, et al. Purification, molecular cloning, and expression of a novel growth-promoting factor for retinal pigment epithelial cells, REF-1/TFPI-2. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2004;45:245–52.
- [18] Udagawa K, Miyagi Y, Hirahara F, Miyagi E, Nagashima Y, Minaguchi H, et al. Specific expression of PP5/TFPI-2 mRNA by syncytiotrophoblasts in human placenta as revealed by in situ hybridization. *Placenta* 1998;19:217–23.
- [19] Udagawa K, Yasumitsu H, Esaki M, Sawada Y, Nagashima Y, Aoki I, et al. Subcellular localization of PP5/TFPI-2 in human placenta: a possible role of PP5/TFPI-2 as an anti-coagulant on the surface of syncytiotrophoblasts. *Placenta* 2002;23:145–53.
- [20] Mast AE, Higuchi DA, Huang ZF, Warshawsky I, Schwartz AL, Broze Jr GJ. Glypican-3 is a binding protein on the HepG2 cell surface for tissue factor pathway inhibitor. *Biochem J* 1997;327:577–83.
- [21] Wun TC, Kretzmer KK, Girard TJ, Miletich JP, Broze Jr GJ. Cloning and characterization of a cDNA coding for the lipoprotein-associated coagulation inhibitor shows that it consists of three tandem Kunitz-type inhibitory domains. *J Biol Chem* 1988;263:6001–4.
- [22] Khan S, Blackburn M, Mao DL, Huber R, Schlessinger D, Fant M. Glypican-3 (GPC3) expression in human placenta: localization to the differentiated syncytiotrophoblast. *Histol Histopathol* 2001;16:71–8.
- [23] Crescimanno C, Marzoni D, Paradinas FJ, Schürs B, Muhlhauser J, Todros T, et al. Expression pattern alterations of syndecans and glypican-1 in normal and pathological trophoblast. *J Pathol* 1999;189:600–8.
- [24] Lee JN, Salem HT, Huang S, Ouyang PC, Seppala M, Chard T. Placental protein 5 (PP5) in severe pre-eclampsia and eclampsia. *Int J Gynaecol Obstet* 1981;19:65–7.
- [25] Salem HT, Westergaard JG, Hindersson P, Lee JN, Grudzinskas JG, Chard T. Maternal serum levels of placental protein 5 in complications of late pregnancy. *Obstet Gynecol* 1982;59:467–71.
- [26] Takayama M, Soma H, Isaka K, Okudera K, Ogawa T, Ueda A. Serum concentration of placental proteins (PP5 and PP10) in toxemia of pregnancy as related to intrauterine growth retardation. *Gynecol Obstet Invest* 1987;23:89–96.
- [27] Nisbet AD, Bremner RD, Jandial V, Sutherland HW, Horne CW, Bohn H. Placental protein 5 (PP5) in complicated pregnancies. *Br J Obstet Gynaecol* 1981;88:492–9.
- [28] Nisbet AD, Horne CH, Jandial V, Bremner RD, Cruickshank N, Sutcliffe RG. Measurement of placental proteins and estriol in the detection of intrauterine growth retardation. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 1982;13:333–42.
- [29] Obierkwe B, Pendlebury DJ, Gordon YB, Grudzinskas JG, Chard T, Bohn H. The radioimmunoassay of placental protein 5 and circulation levels in maternal blood in the third trimester of normal pregnancy. *Clin Chim Acta* 1979;95:509–16.
- [30] Nisbet AD, Bremner RD, Herriot R, Jandial V, Horne CW, Bohn H. Placental protein 5 (PP5): development of a radioimmunoassay and measurement of circulating levels in normal pregnancy. *Br J Obstet Gynaecol* 1981;88:484–91.
- [31] Report of the National High Blood Pressure Education Program Working Group on high blood pressure in pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 2000;183:S1–22.
- [32] Sakata Y, Nishida H. Comparison of two fetal growth curves in screening for high risk neonates. *Acta Paediatr Jpn* 1996;38:629–33.
- [33] Krajewska M, Krajewski S, Epstein JI, Shabai A, Sauvageot J, Song K, et al. Immunohistochemical analysis of bcl-2, bax, bcl-X, and mcl-1 expression in prostate cancers. *Am J Pathol* 1996;148:1567–76.
- [34] Soslow RA, Dannenberg AJ, Rush D, Woerner BM, Khan KN, Masferrer J, et al. Cox-2 is expressed in human pulmonary, colonic, and mammary tumors. *Cancer* 2000;89:2637–45.
- [35] Shim V, Gauthier ML, Sudilovsky D, Mantei K, Chew KL, Moore DH, et al. Cyclooxygenase-2 expression is related to nuclear grade in ductal carcinoma *in situ* and is increased in its normal adjacent epithelium. *Cancer Res* 2003;63:2347–50.
- [36] Blanc WA. Pathology of the placenta, membranes and umbilical cord in bacterial, fungal, and viral infections in man. In: Naeye RL, Kissane JM, Kaufmann P, editors. *Perinatal diseases*. Baltimore/London: Williams and Wilkins; 1981. p. 67–132.
- [37] Bernfield M, Gotte M, Park PW, Reizes O, Fitzgerald ML, Lincecum J, et al. Functions of cell surface heparan sulfate proteoglycans. *Annu Rev Biochem* 1999;68:729–77.
- [38] Bersinger NA, Odegard RA. Second- and third-trimester serum levels of placental proteins in preeclampsia and small-for-gestational age pregnancies. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2004;83:37–45.

- [39] Merviel P, Muller F, Guibourdenche J, Berkane N, Gaudet R, Breart G, et al. Correlations between serum assays of human chorionic gonadotrophin (hCG) and human placental lactogen (hPL) and pre-eclampsia or intrauterine growth restriction (IUGR) among nulliparas younger than 38 years. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2001;95:59–67.
- [40] Chandra S, Scott H, Dodds L, Watts C, Blight C, Van Den Hof M. Unexplained elevated maternal serum alpha-fetoprotein and/or human chorionic gonadotropin and the risk of adverse outcomes. *Am J Obstet Gynecol* 2003;189:775–81.
- [41] Manuelpillai U, Schneider-Koisky M, Dole A, Wallace EM. Activin A and activin receptors in gestational tissue from preeclamptic pregnancies. *J Endocrinol* 2001;171:57–64.
- [42] Bersinger NA, Groome N, Muttukrishna S. Pregnancy-associated and placental proteins in the placental tissue of normal pregnant women and patients with pre-eclampsia at term. *Eur J Endocrinol* 2002;147:785–93.
- [43] Barros JS, Baptista MG, Bairos VA. Human chorionic gonadotropin in human placentas from normal and preeclamptic pregnancies. *Arch Gynecol Obstet* 2002;266:67–71.
- [44] Casagrandi D, Bearfield C, Geary J, Redman CW, Muttukrishna S. Inhibin, activin, follistatin, activin receptors and beta-glycan gene expression in the placental tissue of patients with pre-eclampsia. *Mol Hum Reprod* 2003;9:199–203.
- [45] Ezimokhai M, Mensah-Brown EP, Agarwal M, Rizk DE, Thomas L. Renal handling of endogenous human chorionic gonadotrophin in preeclampsia. *Hypertens Pregnancy* 1999;18:129–37.
- [46] Jokimaa VIS, Kuraji HP, Ekholm EMK, Inki PJK, Anttila L. Placental expression of syndecan 1 is diminished in preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 2000;183:1495–8.
- [47] Aharon A, Brenner B, Katz T, Miyagi Y, Lanir N. Tissue factor and tissue factor pathway inhibitor levels in trophoblast cells: implications for placental hemostasis. *Thromb Haemost* 2004;92:776–86.

日本がん検診・診断学会誌



JAPANESE ASSOCIATION FOR CANCER DETECTION AND DIAGNOSIS 第13巻 第2号

日本がん検診・診断学会

肺癌CT検診受診者コホートの追跡調査

A follow-up study of the cohort population who had a checkup in lung cancer CT screening program

岡本直幸¹⁾, 田中利彦²⁾

¹⁾ 神奈川県立がんセンターがん予防・情報研究部門

²⁾ (財)神奈川県予防医学協会CT診断室

Naoyuki Okamoto¹⁾, Toshihiko Tanaka²⁾

¹⁾ Division of Cancer Prevention and Cancer Control, Kanagawa Cancer Center

²⁾ Division of CT Examination, Association of Kanagawa Preventive Medicine

Abstract

An evaluation study about the effectiveness of lung cancer screening program using a low-dose CT has been carried out. The object of this study is a cohort population with 1,936 who received CT screening more than once at the Association of Kanagawa Preventive Medicine for periods from a CT screening start point in time of April, 1996 to August, 2002. A follow-up survey about lung cancer incidence, mortality, and moving to outside the Kanagawa Prefecture has been conducted chronologically. Twenty-six lung cancer patients were checked from this cohort population by CT screening. The follow-up survey by inquiry to the government office of cities, towns and villages until the end of December, 2002, the dead of 37 examples and the persons on moving to outside of 27 examples were confirmed. Inspecting the death certification with permission of Japanese Government, the cause of death was revealed and all cancer death was 22 examples including lung cancer of 5 examples. The analysis was executed by the standardized detection ratio (SDR) and the O/E ratio using the person-years method. As a result, the SDR of lung cancer incidence was a high value of 3.78 ($p < 0.01$). The O/E ratios of the all death, the all cancer death and the lung cancer death were 0.41 ($p < 0.01$), 0.63 ($p < 0.05$), and 0.72, respectively. In spite of the high SDR, the lung cancer mortality rates do not decrease at all. It is necessary to extend an observation period of this cohort and to confirm a decrease effect of the lung cancer mortality in future.

Key Words: CT screening, follow-up study, evaluation

1. はじめに

近年、わが国においてCTを導入した肺癌検診が多くの医療機関や検診機関で行われるようになってきた¹⁻⁴⁾。今後も積極的な導入が推測されているが、このCT検診の導入によって肺癌検診の主目的である肺癌死亡率を減少させる効果が有るか否かは、未だ明確ではない。従来型の胸部X線による肺癌検診は、当該医師会が積極的に取り組んでいる地域の個別検診、受診率が高い市町村主導型の集団検診、健康管理を積極的に実施している職域の肺癌検診については、いくつかの症例-対照研究によってオッズ比が約0.5~0.6と算定されており、肺癌死亡率を40~50%減少させる寄与効果があることが示唆さ

れている⁵⁻⁸⁾。しかし、それらの地域や職域はわが国のごく一部にしか過ぎず、わが国全体をみると最終目標である“肺癌死亡数・率の減少”という点では、肺癌検診がその有効性を示すまでには至っていないのが実状である⁹⁾。このような状況において、精度が高いと称されているCT検診を新たに導入することは望まれるところであるが、その有効性を評価し、確認する必要がある。

神奈川県予防医学協会では、従来型の胸部X線撮影による肺癌検診よりも精度が高いCTによる肺癌検診を導入することによって、早期肺癌の発見率を向上させ、肺癌の死亡数・率の減少を目指すことを目的として、8年前よりCTを用いた肺癌検診を実施している。導入後のこれまでの経過については、CT検診による発見肺癌の臨床像に関する報告^{4, 10, 11)}やcost-effectivenessに関する

報告^{12,13)}を、機会をとらえて行ってきたところである。現在、CTを用いた肺癌検診の有効性評価を実施するために、これまでのCT検診受診者をコホートとした観察的研究を開始しているところである。本報告では、この研究に基づいて実施した“コホート構成者の追跡調査”の結果について述べる。

2. 資料と方法

(財)神奈川県予防医学協会(予医協)では、1996年4月より低線量CTを用いた肺癌検診を開始している。CT検診の対象者は、人間ドック受診者、会員制の対癌グループ(anti-cancer club)の定期的検診受診者、一般のがん検診(職域を含む)受診者の3種を含んでいるが、受診者はすべて自ら希望してCTによる肺癌検診を受診した方である。現在使用しているCTはXvisio/GXで、120 kV, 50 mA, 寝台移動2 cm/秒, 10 mm再合成, 20~30秒で1呼吸停止中に撮影を終わるように設定している。撮影中に疑問の陰影が生じた場合には、可能な限り、その時点で2mmTSCT(Thin Section CT)を追加している。観察は主としてフィルムで行い、必要に応じCRTによる読影を加えている。判定は2重読影とし、3次読影は神奈川県立がんセンター(KCC)の呼吸器科に依頼して

いる。最終的にがんを疑う症例は、症例の分散を避けるため、精密検査以降を可能な限りKCCに依頼している。

CT検診受診者のコホートは、CT検診の開始時点から2002年8月までの期間に1度以上CTによる肺癌検診を受診した延べ7,619(男5,523,女2,096)人の資料をもとに、個人同定による重複受診の確認や居住地の確認(神奈川県在住のみを対象とした)を行い、最終的に1,936(男1,378,女558)人がコホートとして追跡調査や解析の対象となった(表1)。

コホートの追跡調査による観察は、2002年12月末まで行った。期間中の死亡者・転出者の確認は、コホート構成者が居住する神奈川県内の当該市区町村への住民票照会による問い合わせによって実施した。死亡が確認された症例については総務省の許可を得て、当該保健所保管の死亡小票の閲覧を行い、照合作業によってそれぞれの死因の確認を行った。

解析は、初回受診時の年齢から2002年12月末までの人年を個人別に計算し(表2)、観察人年法に従って行った。肺癌罹患の期待値(E)の計算には、神奈川県地域がん登録による1999年の性別年齢階級別肺癌罹患率を基準として用い、標準化発見比(the Standardized Detection Ratio:SDR)を計算した。また、全死亡、全がん死亡、肺癌死亡の期待値の算出には、1999年の全国の性別年齢階級別死亡率(全死亡、全がん、肺癌)を基準死亡率として用い、実測死亡数(O)との比較(O/E比)による解析を行った。また、有意差の判定はポアソン分布を仮定して行い、性別やステージ別の分布の検定にはフィッシャーの直接確率法を用いた。

3. 結果

表1にCT検診受診者コホートの初回受診時の性別・年齢階級別分布を示した。男では50~69歳が62.7%、女では45~64歳が70.4%を占めていた。また、対象者のCT受診歴をみると(表2)、開始年の1996年と最終調

表1 初回受診時の性別年齢階級別対象者数

年齢階級	男 (%)	女 (%)	合計 (%)
35~39	70 (5.1)	26 (4.6)	96 (5.0)
40~44	127 (9.2)	61 (10.9)	188 (9.7)
45~49	197 (14.3)	88 (15.8)	285 (14.7)
50~54	226 (16.4)	126 (22.6)	352 (18.2)
55~59	258 (18.7)	99 (17.7)	357 (18.4)
60~64	238 (17.3)	80 (14.3)	318 (16.4)
65~69	146 (10.6)	42 (7.5)	188 (9.7)
70~74	73 (5.3)	23 (4.1)	96 (5.0)
75~79	30 (2.2)	10 (1.8)	40 (2.1)
80~84	13 (0.9)	3 (0.5)	16 (0.8)
合計	1,378(100.0)	558(100.0)	1,936(100.0)

表2 暦年別性別初回受診者数と割合

暦年	男		女		合計	
	延受診数	初回 (%)	延受診数	初回 (%)	延受診数	初回 (%)
1996*1	279	279 (100.0)	82	82 (100.0)	361	361 (100.0)
1997	433	275 (63.5)	139	102 (73.4)	572	377 (65.9)
1998	527	238 (45.2)	169	98 (58.0)	696	336 (48.3)
1999	581	221 (38.0)	182	85 (46.7)	763	306 (40.1)
2000	528	147 (27.8)	171	75 (43.9)	699	222 (31.8)
2001	543	121 (22.3)	197	67 (34.0)	740	188 (25.4)
2002*2	394	97 (24.6)	148	49 (33.1)	542	146 (26.9)
合計	3,285	1,378 (41.9)	1,088	558 (51.3)	4,373	1,936 (44.3)

*1: 1996.04.01 ~ 1996.12.31 の期間

*2: 2002.04.01 ~ 2002.08.31 の期間

査年の2002年は1年間の観察期間では、毎年500人以上の受診者が登録されている。そのなかで、初回の受診者を別掲すると、1996年は全員が初回受診者であるが、1997年以降は初回受診者の割合が減少し、2002年には受診者の1/4、女では1/3まで初回受診者が減少していた。次に、コホート対象者の喫煙状況を表3に示した。喫煙者は男59.4%、女19.4%で、喫煙指数(本数×喫煙年数)をみると600以上の重度喫煙者が男では約40%、女も約30%を占めていた。

期間中のCT肺癌検診によって発見された肺癌患者は26名であった(表4)。発見された肺癌は腺癌19例(73.1%)、扁平上皮癌3例(11.5%)、小細胞癌4例(15.4%)であった。TNMによる肺癌の進展度をみると、T₁N₀M₀ 20例(76.9%)であった。また、発見された肺癌症例のなかで、観察期間の2002年12月末までに死亡が確認されたのは7例であった。T₁N₀M₀ 5例死亡(25%)、T₃N₂M₀ 1例死亡(33.3%)、T₄N₂M₀ 1例(100%)であった。これらの死亡者の確認は、市町村への住民票紹介と死亡小票照合による死因の確認を行ったが、T₁N₀M₀

表3 対象者の喫煙指数

喫煙指数	男 (%)	女 (%)	合計 (%)
0	559 (40.6)	450 (80.6)	1,009 (52.1)
1~199	42 (3.0)	17 (3.0)	59 (3.0)
200~599	235 (17.1)	60 (10.8)	295 (15.2)
600~1199	384 (27.9)	25 (4.5)	409 (21.1)
1200+	158 (11.5)	6 (1.1)	164 (8.5)
合計	1,378(100.0)	558(100.0)	1,936(100.0)

表4 CT発見肺癌の進展度、組織型および生死の状況

ステージ	TNM	組織型			合計
		腺癌	扁平上皮癌	小細胞癌	
I	1.0.0	18 (2*)	0 (-)	2 (0)	20 (2*)
	2.0.0	0 (-)	1 (0)	0 (-)	1 (0)
IIA	3.2.0	0 (-)	1 (1)	2 (2)	3 (3)
IIIB	4.2.0	0 (-)	1 (1)	0 (-)	1 (1)
IV	X.3.1	1 (1)	0 (-)	0 (-)	1 (1)
計	-	19 (3)	3 (2)	4 (2)	26 (7*)

() 内は死亡

*: 肺癌以外の死因による死亡2例を含む

表7 人年法によるO/E比

死因	男			女			合計		
	実測 (O)	期待 (E)	O/E	実測 (O)	期待 (E)	O/E	実測 (O)	期待 (E)	O/E
肺癌罹患	21	7.02	2.99**	5	0.62	8.03**	26	7.64	3.40**
全死因	31	79.5	0.39**	6	11.6	0.52**	37	91.1	0.41**
全癌	18	30.4	0.59*	4	4.5	0.89	22	34.9	0.63*
肺癌	5	6.4	0.79	0	0.52	-	5	6.92	0.72

*p < 0.05, **p < 0.01

での5例中の2例は肺癌以外の死因(腎不全1例、食道癌1例)であった。また、肺癌以外の死因や転居についても調べたところ(表5)、県外への転居が27件(1.4%)あり、全死亡37件(1.9%)、そのうち全がん死亡22件(59.5%、22/37)で、肺癌に関しては5例(22.7%、5/22)の死亡が確認された。

本コホート集団のCT検診による肺癌の罹患率(新規発見率)や死亡率の状況を解析するために、観察人年法を用いて一般住民の肺癌罹患率や死亡率と比較を行った。観察人年は表6に示すように、男で5,524.3人年、女で2,086.6人年であった。この性別・5歳階級別人年を基準に用い、1999年の神奈川県地域がん登録による性別・5歳階級別肺癌罹患率と、同年の全国の性別・5歳階級別全死亡率、全がん死亡率、肺癌死亡率を標準の率として、観察人年法による期待値を算出し、実測値との比較を行った(表7)。

表5 追跡調査の結果

状況	男 (%)	女 (%)	合計 (%)
生存中	1,324 (96.1)	548 (98.2)	1,872 (96.7)
県外転居	23 (1.7)	4 (0.7)	27 (1.4)
死亡	31 (2.2)	6 (1.1)	37 (1.9)
全癌死(再)	18 (1.3)	4 (0.7)	22 (1.1)
肺癌死(再)	5 (0.4)	0 (0.0)	5 (0.3)
計	1,378(100.0)	558(100.0)	1,936(100.0)

注: 全癌死, 肺癌死は再掲

表6 性別年齢階級別観察人年

年齢	男	女	合計
35~39	139.0	49.4	188.4
40~44	360.7	155.5	516.2
45~49	611.9	282.6	894.5
50~54	862.9	398.0	1,260.9
55~59	907.1	416.7	1,323.8
60~64	1,036.3	345.7	1,382.0
65~69	805.2	245.5	1,050.7
70~74	485.7	120.9	606.6
75~79	203.9	42.6	246.5
80~84	111.6	29.7	141.3
合計	5,524.3	2,086.6	7,610.9

肺癌罹患の標準化発見比 (SDR) は3.40 (男2.99, 女8.03) と有意に高い値であった。逆に、死亡に関しては全死亡, 全がん死亡, 肺癌死亡のO/E比が, それぞれ, 0.41 (男0.39, 女0.52), 0.63 (男0.59, 女0.89), 0.72 (男0.79, 女-) であった。また, 全死亡, 全がん死亡のO/E比が統計的に有意であった。

4. 考 察

1996年4月より低線量CTを用いた肺癌検診を開始した予医協の資料を用いて, 2002年8月までの受診者1,936人をコホートに設定し, 2002年12月末までの追跡調査を実施した。市町村への住民票照会による追跡と死亡小票閲覧による死因の確認調査から, 27名(1.4%)の転居者, 37名(1.9%)の死亡者が確認された。両者で3.3%と5%にも満たないが, 観察人年法による解析を行う場合には転居者や死亡者の確認が不十分である場合, 人年を過大に推計することによって標準化発見比やO/E比の値が大きく異なる場合があるため, 十分な追跡調査による確認が重要である。今回の追跡では, 市町村照会による転居や死亡の確認を行い, 死亡者については死亡小票による死因の確認まで実施していることから, 信頼性の高い人年が算出されていると思われる。

期間中に発見された肺癌患者は26人で, 観察人年に基づいて標準化発見比を計算すると3.40という高い値であった。従来の胸部X線の間接法を用いた肺癌検診の標準化発見比は, 大阪府で0.78¹⁴⁾, 高知県で0.98¹⁵⁾, 岡山県で0.62¹⁶⁾, 鹿児島県で0.28¹⁷⁾, との報告と比較すると, 今回のCT検診による肺癌の発見率は従来の検診よりも精度が数倍高いことが推測される。さらに, 発見された肺癌26症例のなかでステージIの早期がん(T₁N₀M₀+T₂N₀M₀)の症例が80.8%(21/26)で, 小細胞癌2例を除いても73.1%と高い割合であった。この早期がんの発見割合から, がん検診の目的に1つである早期発見に合致した検診が実施されたと思われる。しかし, この早期癌発見割合にはselection bias, length bias, over-diagnosis bias, lead-time biasが含まれている可能性が高く, がん検診の有効性を示す指標としては不十分であると思われる。とくに, T₁N₀M₀の症例20例中の死亡例をみると, 5例の死亡が確認されている。癌死以外の2例を除いても, 3例(腺癌1例, 小細胞癌2例)の死亡を数えていることは, 早期発見された症例であってもすべての症例が生存するわけではないことが推測される。また, 早期がんの発見率が高まれば, その後の進行がんの発見率は減少すると予測され^{18, 19)}, より一層の長期の追跡が必要となろう。さらに, 組織型別では腺癌が73.1%(19/26)であったが, 発見肺癌の中で腺癌の発見率が高いとover-diagnosisの割合も高いという考察²⁰⁾もある

ことから, 早期肺癌の発見率では検診の有効性を示すことはできない。

全死亡や全がん死亡に関しては, いずれのO/E比も有意に低く, 従来から指摘されている検診受診者のself-selection biasの存在が指摘される。しかし, 肺癌死亡のO/E比は0.72と算出されたが, その値は有意ではなかった。今回の追跡調査では, CTによる肺癌検診の有効性を示す結果は得られなかった。その原因として, 観察期間の短さ(平均4年)や初回受診者に有病者が含まれていた可能性も考えられる。この点の解決には, 観察期間を延伸して確認することや他施設との共同によってコホート対象者の増加を行う必要がある。現在, 厚生労働省の研究班が多施設共同調査を実施しており²¹⁾, その結果が待たれるところである。

この研究の一部は厚生労働科学研究費補助金(効果的医療の確立推進臨床研究事業)による「がんの罹患高危険群の抽出と予後改善のための早期診断及び早期治療に関する研究」(主任研究者:鈴木隆一郎)の支援を受けて実施した。

文 献

- 1) 中山富雄, 楠 洋子, 鈴木隆一郎, 他: 低線量らせんCT車による肺癌スクリーニングの成績, 胸部CT検診: 2001, 8(2): 98-107.
- 2) Sone S, Li F, Yang Z-G, et al: Results of three-year mass screening programme for lung cancer using mobile low-dose spiral computed tomography scanner, Br J Cancer: 2001, 84: 25-32.
- 3) 滝口祐一, 潤間隆宏, 長尾啓一: らせんCTによる肺癌検診, 診断と治療: 2002, 89: 667-671.
- 4) 田中利彦, 山田耕三, 岡本直幸, 他: 肺癌のCT検診の精度について—3年間の経験から—, メディカルレビュー: 1999, 75: 61-68.
- 5) Okamoto N, Sekimoto M, Suzuki T, et al: Evaluation of a clinic-based screening program for lung cancer with a case-control design in Kanagawa, Japan, Lung Cancer: 1999, 25: 77-85.
- 6) Nishi K, Ueda H, Kiura K, et al: A case-control study of lung cancer screening in Okayama Prefecture, Japan, Lung Cancer: 2001, 34: 325-332.
- 7) Sagawa M, Tsubono Y, Saito Y, et al: A case-control study for evaluating the efficacy of mass screening program for lung cancer in Miyagi Prefecture, Japan, Cancer: 2001, 92: 588-594.
- 8) 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: 2001, 85: 1326-1331.
- 9) 金子 聡, 祖父江友孝: 肺癌の今後, 最新医学: 2003, 58: 2462-2469.
- 10) 田中利彦, 岡本直幸, 山田耕三, 他: 肺癌CT検診の有効性と評価, 日本がん検診・診断学会: 2001, 8: 72-75.
- 11) 田中利彦, 岡本直幸, 山田耕三, 他: 肺癌CT検診

- の有効性について“とくに生存率を中心に”，胸部CT検診：2002, 9: 250-255.
- 12) 田中利彦，岡本直幸，山田耕三，他：CT肺がん検診の費用効果分析—ヘリカルCTによる肺がん検診の費用効果分析—，日本胸部臨床：1999, 58: 150-156.
- 13) Okamoto N: Cost-effectiveness of lung cancer screening in Japan, *Cancer*: 2000, 89: 2489-2493.
- 14) 松田 実，鈴木隆一郎，祖父江友孝，他：大阪肺癌集検研究班による肺癌検診，*肺癌*：1992, 32: 1007-1015.
- 15) 田村哲生，山下英俊，筒井大八，他：高知県宿毛市の肺癌検診の有用性の評価，*肺癌*：1995, 35: 735-747.
- 16) 守谷欣明：肺がん検診—さらなる飛躍を—，*複十字*：2001, 278: 19-21.
- 17) 副島賢忠：鹿児島県における肺癌集団検診の評価—検診目的達成度の検討—，*鹿児島大学医学雑誌*，2004, 56: 1-12.
- 18) Black WC, Welch HG: Advances in diagnostic imaging and overestimations of disease prevalence and the benefits of therapy, *N Engl J Med*: 1993, 328: 1237-1243.
- 19) Obuchowski NA, Graham RJ, Baker ME, et al: Ten criteria for effective screening: their application to multislice CT screening for pulmonary and colorectal cancers, *AJR Am J Roentgenol*: 2001, 176: 1357-1362.
- 20) Swensen SJ, Jet JR, Hartman TE, et al: CT screening for lung cancer: five-year prospective experience, *Radiology*: 2005, 235: 259-265.
- 21) 鈴木隆一郎：肺癌CT検診の有効性評価研究班について，*胸部CT検診*：2002, 9(3): 238-241.

要旨

日本がん検診・診断学会誌 13: 167-171. 2006

肺癌CT検診受診者コホートの追跡調査

岡本直幸，田中利彦

著者らは，CTを用いた肺癌検診の有効性に関する評価研究を実施している。対象は，(財)神奈川県予防医学協会において1996年4月のCT検診開始時点から2002年8月までの期間に1度以上CT検査を受けた1,936人をコホートとしている。経年的に，肺癌罹患，死亡，転居などの追跡調査を行っている。このコホート集団からCT検診によって26例の肺癌患者が診断された。また，2002年12月末までの市町村照会による追跡調査によって，37例の死亡者，27例の転居者を確認した。死亡者については国の許可のもとで死亡票を閲覧し，死因の確認を行い全癌死亡22例，そのうち肺癌死亡5例であった。解析は，観察人年法（平均追跡期間は約4年）による標準化発見比とO/E比によって行った。その結果，肺癌罹患の標準化発見比は3.78 ($p < 0.01$)という高い値であった。全死亡，全癌死亡，肺癌死亡のO/E比はそれぞれ0.41 ($p < 0.01$)，0.63 ($p < 0.05$)，0.72であった。現在までの追跡結果から，CT検診受診者コホートの標準化発見比は有意に高いが，肺癌死亡の減少にまでは至っていない。今後，このコホートの観察期間を延長して，死亡率の減少効果を確認する必要がある。

キーワード：CT検診，フォローアップ研究，評価

がん対策と経済学①

米国における保険者のがん検診サービスの枠組みに関する調査 経営的視点に焦点を当てて

大重 賢治¹⁾ 岡本 直幸²⁾ 水嶋 春朔³⁾

わが国においては、早期発見・早期治療を行う目的で、公的な保健事業として各種のがん検診が実施されてきた。公的な事業として行われる以上、その支出に見合うだけの効果が得られているかを評価することは重要なことである。

保健事業の経済的評価の手法としては、費用効果分析、費用便益分析などがあり¹⁻⁴⁾、多くの研究にて活用されている。がん検診の場合、「効果」の指標は、がん検診を行うことによって獲得された余命年数 (life-year saved) や質調整生存年数 (quality-adjusted life years) であり⁵⁻⁷⁾、「便益」の指標は、がん検診に対して住民が支払っても良いと考える (willingness-to-pay) 金額の総和となる⁸⁻¹⁰⁾。すなわち、がん検診を経済学的に評価するためには、がん検診の「効果」や「便益」を数値で表すことが基本条件となる。しかしながら、これらを定量的に示すことが難しいこともあって、わが国においては、がん検診の経済的評価はまだ十分にされていないのが現状である。

「効果」や「便益」が、がん検診に投じた費用に見合っているかは、経済的に非常に重要な視点であるが、その他、もう1つ重要な視点(もしかしたら、政府や保険者にとっては最も重要な視点?)として、がん検診事業を行うことによって、将来の医療費が抑制されるか否か、がある。

経済的評価の手法としては費用分析の範疇に入

り²⁾、検診事業を行う場合の費用と行わない場合の費用をいわば金銭的損得の観点から検討するものである。保険者が営利企業の場合、検診事業を行わない場合の費用が行う場合の費用を上回ると考えられる場合、保険者に検診事業を行う経済的インセンティブが発生する。逆に言うと、補助金などの制度がない限り、赤字になるような事業には取り組みにくいというのが現実であろう。たとえ保険者が、非営利団体であったとしても、恒常的に赤字を生み出すような事業には積極的にはなれないと考えられる。

われわれは、平成17年度厚生労働科学研究費補助金特別研究「がん検診の経済的効果及び制度の在り方に関する研究(主任研究者：水嶋春朔)」の一環として、医療が市場経済の仕組みの中で動いている米国において、がん検診がどのように提供されているかを調査した。米国の医療制度では、主体が、保険者およびサービス供給者ともに民間であることから、がん検診に対する考え方の中に経営的視点が反映されているのではないかと考えたからである。最も確認したかったのは、米国におけるがん検診が、政府の指導のもとにしぶしぶ行われているのか、それとも事業として積極的に行われているのかという点である。調査結果については、厚生労働科学研究費補助金特別研究報告書にて報告¹¹⁾を行っているが、本稿では、そ

1) おおしげ けんじ：横浜市立大学医学部社会予防医学教室準教授 連絡先：☎ 236-0004 横浜市金沢区福浦 3-9

2) おかもと なおゆき：神奈川県立がんセンター臨床研究所がん予防・情報研究部門長

3) みずしま しゅんさく：国立保健医療科学院人材育成部長

表 マネージドケア型組織 HMO と PPO の比較(文献¹³⁾より)

	HMO	PPO
名称	Health Maintenance Organization	Preferred Provider Organization
主目的	医療費のコントロール	医療費のコントロール
特徴	医療機関と財政機関の両方を組織内に併せ持つ。組織外で行われた医療サービスには保険は支払われない。	医療保険者が独立した医療機関と契約を結び医療ネットワークを形作る。契約を行った医療機関は通常よりも安い金額で医療サービスを提供する。患者がネットワーク以外の医療機関を受診した場合、給付水準が減額される。
経済的インセンティブ	費用効果的なサービスを行おうとするインセンティブが働く	費用効果的なサービスを行おうとするインセンティブが働く
ゲートキーパーの存在	医療サービスの提供をコントロールする(ゲートキーパーの役割を担う)医師が存在する。ゲートキーパーである医師を介さない医療サービスには保険が支払われない。	ゲートキーパーの役割は存在しない。
医師の関わり方	組織に直接雇用される形態と、雇用ではなく契約を結ぶ形態がある。	組織と医師・医療機関との間で契約が結ばれる
組織の例	Keiser Parmanente 等	Health Net Inc. 等

註) この表は典型的な組織形態の比較であり、実際にはバリエーションが存在する。

の概要について紹介したい。

米国の医療保険者

米国では、高齢者と障害者を対象とした医療制度(メディケア)と貧困者のための医療制度(メディケイド)を除いては、医療は私的なサービスとして提供されている。医療保険は、主に福利厚生の一環として企業によって購入されてきた。

米国の国民医療費の対 GDP 比は、先進国の中でもずば抜けて高く、医療費の上昇は、医療保険の購入者である企業にとっても大きな負担となっていた。そのため 1980 年代頃より、医療費の抑制(企業側からみれば負担する保険料の抑制)に対して効果の期待できるマネージドケア型の医療システムが発達し、現在では、米国における民間医療保険の大部分が、この型のヘルスプランを採用している¹²⁻¹⁵⁾。

マネージドケア型の医療システムの特徴は、保険者が、供給する医療、利用方法、価格などを一定の管理状態に置くところにある。このシステムの具体的な形態として、健康維持組織(Health Maintenance Organization: HMO)がある。HMO の基本的な形は、保険者と医療提供者(病院/医師)が一体となっているものである。

マネージドケア型の医療システムの形態にはバリエーションがある。例えば PPO (Preferred Provider Organization) のように、保険者が特定の医療サービス機関と契約を交わし、保険加入者にそれらのネットワーク内の医療機関を利用するよう奨励するシステムや、Point of Service (POS) Plan のように、HMO と PPO を併せたようなシステムもある(表)¹³⁾。

調査地

2006 年 3 月、米国カリフォルニア州においてヘルスプランを提供しているマネージドケア型の組織を訪れ、がん検診サービスのあり方に関して聞き取り調査を行った。同州は、マネージドケア型の医療システムが最も発達している州の 1 つである¹⁶⁾。訪問した機関は、HMO 型の Keiser Parmanente¹⁷⁾(以下、Keiser と略)と、PPO ネットワーク型の Health Net Inc.¹⁸⁾(以下、Health Net と略)である。聞き取り調査の相手は、両組織共に医師であり、Keiser の担当者の職位は、Assistant Medical Director for Quality and Clinical Analysis、Health Net の担当者の職位は、Regional Medical Director であった。

調査結果

1. がん検診の実施状況

両組織とも、がん検診は、United States Preventive Task Force¹⁹⁾と American Cancer Society²⁰⁾のガイドラインに沿って実施していた。実施対象のがんも共通しており、積極的な検診の対象としているのが乳がん、子宮頸がん、大腸がんである。前立腺がん検診に関しては、「50歳以上の男性、ハイリスクの場合には45歳以上の男性に対して、PSA (prostate specific antigen) テストを、益と害を理解してもらった上で、希望があれば提供している (Keiser)」、 「50歳以上の男性に対して、直腸診検査を毎年受けることを勧めている。PSA 検査に関しては、まだ具体的な方針は立っていない。擬陽性が多いため判断保留中である (Health Net)」との回答であった。肺がん検診と胃がん検診は、有効性に関するエビデンス不足ということで、両組織とも実施を勧めていないとのことであった。

1) 乳がん検診の状況

Keiser では、50～69歳の女性に対して2年に1度のマンモグラフィーによる検診を推奨している (40～49歳に関しては専門家との相談の上で実施)。受診率は最新の結果で84%とのことである (2年に1度の受診で、“受診者”にカウントされるため、対象者の84%が1年間に受診しているというわけではない。以下同様)。

Health Net では、20～40歳の女性には3年に1度、40歳以上には毎年、医師による診察を受けるよう推奨している。また、40歳以上の女性にはマンモグラフィーによる検査を、1年もしくは2年に1回受けるよう推奨している。超音波検査は、ルーティンの検査としては行われていない。2005年、カリフォルニアにおける検診受診率 (2年間で1回でも受診したものは、74.9%であった)。

2) 大腸がん検診の状況

Keiser では、50歳以上に対して、年に1度の便潜血テスト、5年に1度のS状結腸内視鏡検査

(Flexible Sigmoidoscopy)による検査、10年に1度の大腸内視鏡 (Colonoscopy)による検査を推奨している。受診率は最新の結果で45%である。

Health Net における大腸がん検診の取り組みも、Keiserと同様である。既往歴、家族歴があるような人には、より頻回の大腸内視鏡検査を勧めているという。2005年、カリフォルニアにおける検診受診率は45.7%であった。

3) 子宮頸がん検診の状況

Keiser では、30～64歳までの女性に対して、3年に1度のPAPテストとHPV (human papilloma virus) 検査を行うことを推奨している。18～29歳にも3年に1度のPAPテストを実施し、陽性者に対してHPV検査を追加して行うことを勧めている。受診率は最新の結果で79%である。

Health Net では、21～65歳までの女性に対して、PAPテストを少なくとも3年に1回は行うように勧めている。2005年、カリフォルニアにおける検診受診率は、81.9%であった。

2. がん検診の経済的側面

検診受診料に関しては、「契約している医療保険の内容によって異なっており、無料から多少料金のかかる場合もある (Keiser)」、 「どのような契約を行っているかによってバリエーションが多く、一概には言えないが、乳がん、大腸がん、子宮頸がん検診の受診者負担は大きくはない。無料の場合もある (Health Net)」との回答であった。

がん検診の実施に関して国の法律はあるか、という問いに対して、カリフォルニアの州法では「規定がある。また、パブリックリポート (保険契約の際の情報となる。毎年作成し加入者に配布) として出す必要がある (Keiser)」との回答を得た。がん検診の実施にあたっての政府の経済的援助は、「ない。ただし、メディケアの場合は、公的な枠組みの中で行われている (Health Net)」とのことである。がん検診に医療費抑制効果があるかという問いには、「ある。進行したがんになった場合、抗がん剤がものすごく高い。乳がんの化学療法のコストは、だいたい25万ドルぐらいかかる。がん検診は、とても費用効果的である

(Keiser)、「ある。進行がんの場合、抗がん剤治療や集中治療など、医療費は莫大なものとなる。検診のコストのほうがはるかに安い(Health Net)」と、明確な回答が返ってきた。

3. 受診率向上の取り組み

がん検診の受診率を上げるためにはどうしたらよいかという問いに対して、「第一に、検診の重要性を会員ならびに医師に認識してもらうことである。特に現場の医師が検診の有効性に確信を持っていることが重要である。医師の認識を高めるための経済的インセンティブも必要である。第二に、がん検診受診勧奨の宣伝をメディアを利用して積極的に行うことが大切である。特に、有名人のがん罹患や死亡の発表に併せたキャンペーンは効果的である。第三に、がん検診の有効性に関するエビデンスを構築する必要がある。そのためには評価研究が欠かせない(Keiser)」、「教育が最も大事である。新聞、雑誌、TVなどを使って、がん検診の大切さについて教育を行っている。医師への教育も重要である。また、医師に対しては、検診受診率を高めるため、経済的なインセンティブが考えられている(Health Net)」との回答を得た。

患者(加入者)に対する経済的なインセンティブは、「グループ購入の場合など(企業による保険購入などを指す)、そのグループの受診率によって、保険料が変更されることもある。これも契約の内容による(Health Net)」とのことであった。検診を受けないことに対する患者側へのペナルティおよび医師側へのペナルティは「ない(Health Net)」ということである。

考察

今回の調査では、非営利組織と営利組織の両方の情報を得ることができた。若干の相違はあるものの、がん検診の取り組みはほぼ同様であった。有効性が明らかであるがん検診(乳がん検診、子宮頸がん検診、大腸がん検診)は強力に推進するが、有効性が十分に明らかにされていない検診の実施に関しては消極的であることも共通していた。

営利・非営利の違いがあるとはいえ、両組織とも民間の組織であり、米国の自由市場的な医療制度の中で、魅力的な保険料(保険購入者にとっては安いほうが魅力的)と魅力的なサービス提供で競争を行っている。がん検診は、医療費を抑え保険料を安くするという意味でも、消費者の満足度を高めるという意味でも、経営戦略的に重要な事業のようである。

まとめ

米国のマネージドケア型の組織を訪問し、がん検診サービスのあり方について聞き取り調査を行った。がん検診のサービスは、US Preventive Task Force 等から出されているガイドラインに基づいて提供されており、乳がん検診、子宮頸がん検診に関しては、高い受診率が達成されていた。訪問した2つの組織の担当者とも、乳がん検診、子宮頸がん検診、大腸がん検診には、医療費抑制効果があるとの認識であった。がん検診の実施は、医師-患者関係の中で決定されており、検診の受診率を高めるための方策として、両組織の担当者とも、教育の重要性を強調していた。また、医師に対する経済的なインセンティブも重視していた。

文献

- 1) Gold MR, et al: Cost-effectiveness in Health and Medicine. Oxford University Press, New York, 1996
- 2) Drummond MF, et al: Methods for the Economic Evaluation of Health Care Programmes (2nd ed). Oxford University Press, New York, 1997
- 3) Drummond MF, et al: Economic evaluation in health care. Merging theory with practice. Oxford University Press, New York, 2001
- 4) Boardman AE, et al: Cost-Benefit Analysis; Concepts and Practice. Prentice Hall, Upper Saddle River, 1996
- 5) Neville AM, et al: An alternative cost effectiveness analysis of ThinPrep in the Australian setting. Aust N Z J Obstet Gynaecol 45(4): 289-294, 2005
- 6) Shen Y, et al: A model-based comparison of breast cancer screening strategies; Mammograms and clinical breast examinations. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 14(2): 529-532, 2005
- 7) Pignone M, et al: Cost-effectiveness analyses of colorectal cancer screening; A systematic review for the U.S. Preventive Services Task Force. Ann Intern

- Med 137:96-104, 2002
- 8) Pauly MV: Valuing health care benefits in money terms. Sloan FA (ed): Valuing Health Care: Costs, Benefits, and Effectiveness of Pharmaceuticals and Other Medical Technologies. Cambridge University Press, Cambridge, 1995
 - 9) Clarke PM: Cost-benefit analysis and mammographic screening; A travel cost approach. J Health Econ 17 (6): 767-787, 1998
 - 10) Ohshige K, et al: Willingness to pay for a public health checkup program; Assessment by the travel cost method. Jpn J Public Health 51(11): 938-944, 2004
 - 11) 研究班報告書: 平成 17 年度厚生労働科学研究費補助金厚生労働科学特別研究事業「がん検診の経済的効果及び制度のあり方に関する研究」(主任研究者: 水嶋春朔) 総括・分担研究報告書, 2006
 - 12) 漆博雄(編): 医療経済学. 東京大学出版, 1998
 - 13) Folland S, et al: The Economics of Health and Health Care (3rded). Prentice-Hall, New Jersey, 2001
 - 14) 速藤久夫: マネジドケアの基本特性とその功罪. 医療と社会 8: 7-19, 1993
 - 15) 川淵孝一: 米国におけるマネジドケアの現状と課題. 医療と社会 8: 53-71, 1993
 - 16) The Office of the Patient Advocate
<http://www.opa.ca.gov>
 - 17) Kaiser Permanente
<http://www.kaiserpermanente.org/>
 - 18) Health Net Inc
<https://www.healthnet.com/portal/member/home.do>
 - 19) U.S. Preventive Services Task Force (USPSTF)
<http://www.ahrq.gov/clinic/uspstfix.htm>
 - 20) American Cancer Society
<http://www.cancer.org/docroot/home/>



TECHNICAL REPORT

Genome-wide profiling of promoter methylation in human

I Hatada^{1,2}, M Fukasawa^{1,2}, M Kimura^{1,2}, S Morita^{1,2}, K Yamada³, T Yoshikawa³, S Yamanaka^{4,5}, C Endo⁴, A Sakurada⁴, M Sato⁴, T Kondo⁴, A Horii⁵, T Ushijima⁶ and H Sasaki^{7,8}

¹Laboratory of Genome Science, Biosignal Genome Resource Center, Department of Molecular and Cellular Biology, Gunma University, Maebashi, Japan; ²PRESTO, Japan Science and Technology Corporation (JST), Kawaguchi, Japan; ³Laboratory for Molecular Psychiatry, RIKEN Brain Science Institute, Wako, Japan; ⁴Department of Thoracic Surgery, Institute of Development, Aging and Cancer, Tohoku University, Sendai, Japan; ⁵Department of Molecular Pathology, Tohoku University School of Medicine, Sendai, Japan; ⁶Carcinogenesis Division, National Cancer Center Research Institute, Chuo-ku, Tokyo, Japan; ⁷Division of Human Genetics, Department of Integrated Genetics, National Institute of Genetics, Research Organization of Information and Systems, Mishima, Japan and ⁸Department of Genetics, School of Life Science, Graduate University for Advanced Studies, Mishima, Japan

DNA methylation in the promoter region of a gene is associated with a loss of that gene's expression and plays an important role in gene silencing. The inactivation of tumor-suppressor genes by aberrant methylation in the promoter region is well recognized in carcinogenesis. However, there has been little study in this area when it comes to genome-wide profiling of the promoter methylation. Here, we developed a genome-wide profiling method called Microarray-based Integrated Analysis of Methylation by Isoschizomers to analyse the DNA methylation of promoter regions of 8091 human genes. With this method, resistance to both the methylation-sensitive restriction enzyme *HpaII* and the methylation-insensitive isoschizomer *MspI* was compared between samples by using a microarray with promoter regions of the 8091 genes. The reliability of the difference in *HpaII* resistance was judged using the difference in *MspI* resistance. We demonstrated the utility of this method by finding epigenetic mutations in cancer. Aberrant hypermethylation is known to inactivate tumour suppressor genes. Using this method, we found that frequency of the aberrant promoter hypermethylation in cancer is higher than previously hypothesized. Aberrant hypomethylation is known to induce activation of oncogenes in cancer. Genome-wide analysis of hypomethylated promoter sequences in cancer demonstrated low CG/GC ratio of these sequences, suggesting that CpG-poor genes are sensitive to demethylation activity in cancer.

Oncogene (2006) 25, 3059–3064. doi:10.1038/sj.onc.1209331; published online 9 January 2006

Keywords: DNA methylation; genome-wide profiling; epigenetics; microarray

Microarray-based methods of comparing differences in DNA methylation in the genome of two samples using methylation-sensitive restriction enzymes (Yan *et al.*, 2001; Hatada *et al.*, 2002) have two problems. The first is that the microarrays contain clones from libraries of CpG islands. CpG islands are CpG-rich regions of the genome originally thought to be associated with the 5' region of genes. There were several approaches using CpG islands libraries for microarrays (Yan *et al.*, 2001; Hatada *et al.*, 2002; Heisler *et al.* 2005; Weber *et al.*, 2005). Although 60% of human genes have CpG islands in the promoter or first exon, more than 80% of all CpG islands have no relation to genes and are unlikely to regulate gene expression (Takai and Jones, 2002). To solve this problem, we used a microarray with 60-mer oligonucleotides derived from promoter regions of 8091 human genes. DNA methylation in promoter regions is most important for the regulation of gene expression. The second problem is the risk of false positives resulting from restriction site polymorphisms and/or incomplete digestion of DNA. To resolve this issue, we developed a new method called Microarray-based Integrated Analysis of Methylation by Isoschizomers (MIAMI). We utilized resistance to a methylation-insensitive restriction enzyme, *MspI*, to judge the false-positive results for resistance to the methylation-sensitive isoschizomer *HpaII* (Figure 1a). If two samples have a restriction site polymorphism at an *HpaII* site and/or one of the samples has incomplete digestion at a *HpaII* site, they will differ in resistance to *HpaII*. However, in this case the resistance to methylation-insensitive *MspI* at this site will also differ between samples because both enzymes recognize the same recognition site, CCGG. Therefore, we can treat such changes as false positives based on *MspI* resistance (MR).

We constructed a 60-mer-oligonucleotide microarray containing portions of *HpaII* fragments located in promoter regions of 8091 genes. We targeted the region from 600 base pairs upstream to 200 base pairs downstream of the transcriptional start sites for genes whose start sites were characterized on the basis of the

Correspondence: Dr I Hatada, Department of Molecular and Cellular Biology, Gunma University, 3-39-15, Showa-machi, Maebashi, Gunma 371-8512, Japan.

E-mail: ihatada@showa.gunma-u.ac.jp

Received 25 August 2005; revised 31 October 2005; accepted 17 November 2005; published online 9 January 2006

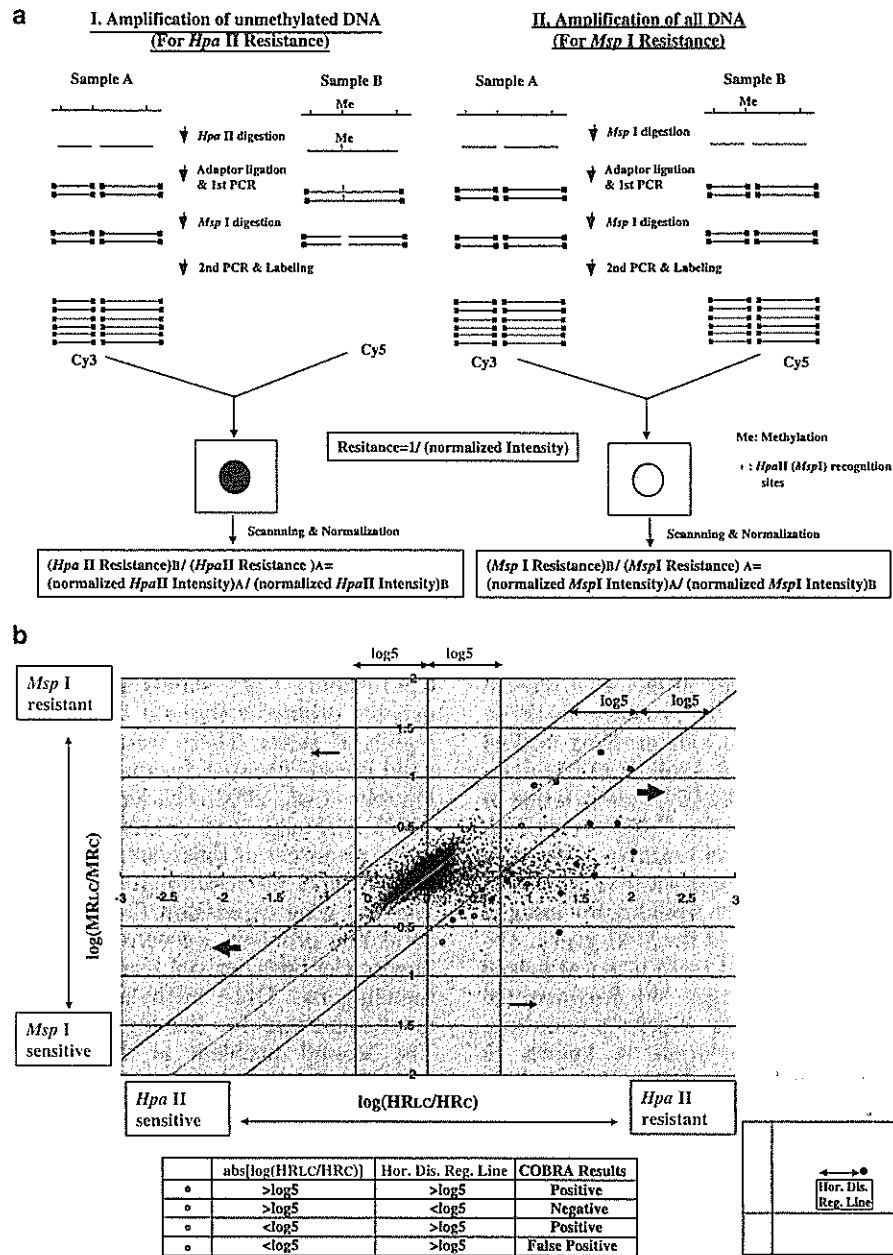


Figure 1 MIAMI. (a) Schematic flowchart for the MIAMI method for comparison of sample A and sample B. Details were described in the text. (b) Application of the MIAMI method to a lung cancer cell line (1–87, abbreviated as LC) and a normal lung (abbreviated as C). Values for $\log(HR_{LC}/HR_C)$ are plotted on the x-axis and $\log(MR_{LC}/MR_C)$ are plotted on the y-axis. Green lines are located \log_5 of the horizontal distance from the y-axis. The regression line is in yellow and red lines are located \log_5 of the horizontal distance from this line. Points located more than this distance right of the regression line are judged as hypermethylated. Points located more than \log_5 of the horizontal distance left of the regression line are judged as hypomethylated. Genes indicated by red and green circles are located more than this distance from the y-axis. Hypermethylation was confirmed for genes indicated by red circles that were found to meet the criteria. Hypermethylation was not confirmed for genes indicated by green circles that did not meet the criteria, although they were located \log_5 of the horizontal distance from the y-axis. Orange and blue circles meet the criteria but are less than \log_5 of the distance from the y-axis. Hypermethylation was confirmed for genes indicated by orange circles but not blue circles. (c) Summary of methylation changes in a lung cancer cell line (1–87, abbreviated as LC) compared to a normal lung (abbreviated as C). Methylation change (horizontal distance from the regression line) for each gene is plotted on the y-axis. Red broken lines indicate the threshold we used (\log_5). Genes are placed in order of position along x-axis. (d) Average ratio of CpG contents to GC contents (CG/GC) and average ratio of AT contents to TA contents (AT/TA) were calculated for hypermethylated, unchanged, and hypomethylated genes.

National Center for Biotechnology Information annotation and/or Database of Transcriptional Start Sites. The probe nearest to a transcriptional start was selected on

the condition that it does not have self-complementarity (Primer 3 program; Rozen *et al.*, 2000) and homology to the human genome (megaBlast program; Altschul *et al.*,

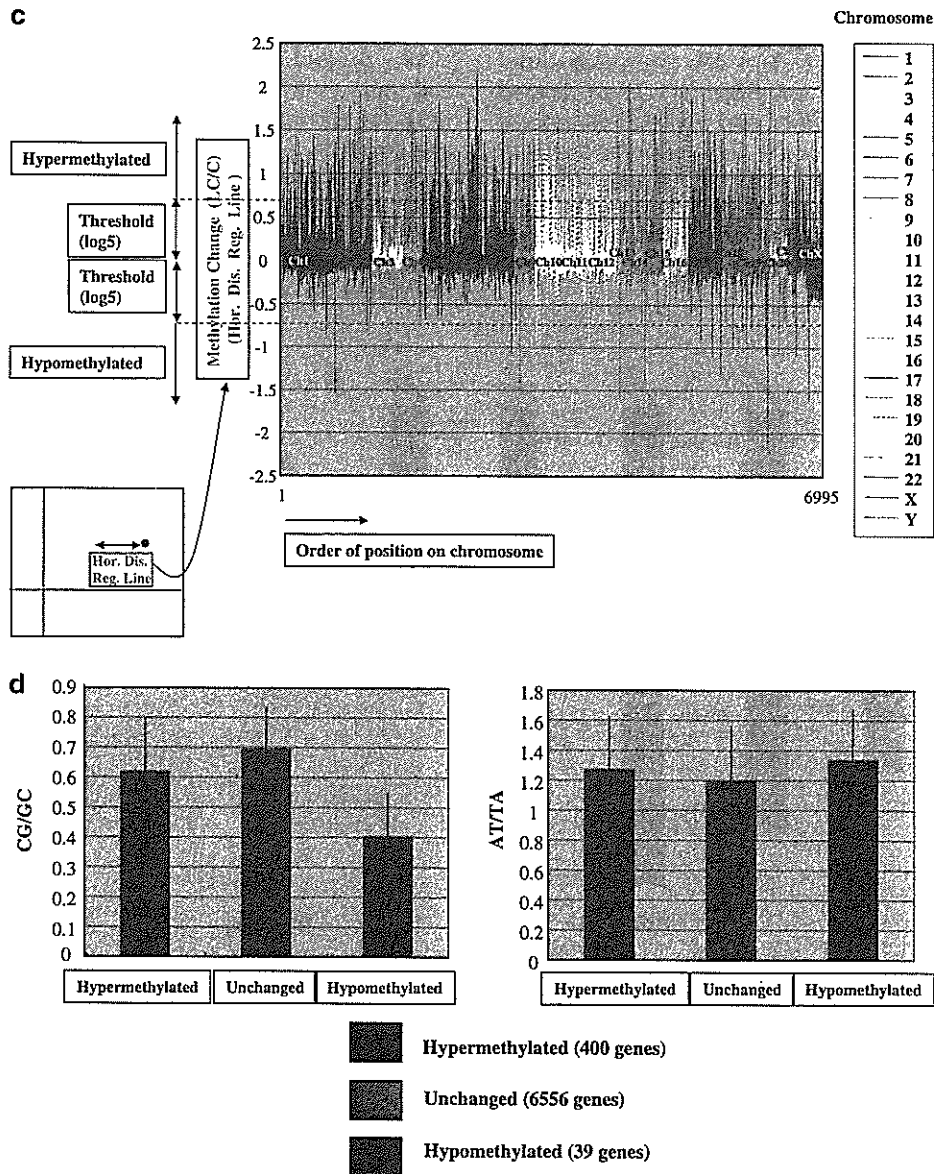


Figure 1 Continued.

1990). Microarrays were made using an ink-jet oligonucleotide synthesizer as described (Hughes *et al.*, 2001). Average position of the 8091 probes was 36 base pairs upstream of the transcription start sites. Average GC content of the probes was 65%. All probes were included in the *HpaII* fragments less than 600 base pairs. Average fragment length of the probe containing *HpaII* fragments was 194 base pairs.

We defined resistance as reciprocal of sensitivity. Therefore, *HpaII*-sensitive (cleavable) DNA and *MspI*-sensitive (cleavable) DNA were amplified and used for calculating the *HpaII* resistance (HR) and MR, respectively. For HR, *HpaII*-cleavable unmethylated DNA was amplified (I). *HpaII*-cleaved DNA fragments were ligated to an adaptor and subjected to first PCR (Figure 1a). At this stage, only DNA fragments that

had methylated internal *HpaII* sites before the PCR retained *HpaII* (*MspI*) sites. Therefore, *MspI* digestion made it impossible to amplify these methylated fragments. In the second main PCR, only unmethylated DNA fragments were amplified. Amplified unmethylated *HpaII*-cleaved DNA fragments from two samples were labeled with Cy3 and Cy5, respectively, and co-hybridized to the microarray with 60-mer oligonucleotides from promoter regions of 8091 genes. After hybridization, the microarray was scanned and fluorescence intensities on a scanned image were quantified, corrected for background noise, and normalized with the software DNASIS Array (Hitachi Software Engineering). Spots with both Cy3 and Cy5 signals less than 0.001% of total signals were removed before analysis. HR was defined as $1/(\text{normalized } HpaII \text{ intensity})$. Therefore, the ratio of

HR of two samples (HR_B/HR_A) can be represented by $(\text{normalized } HpaII \text{ intensity})_A / (\text{normalized } HpaII \text{ intensity})_B$. For MR, all *MspI*-cleavable DNA (unmethylated plus methylated) was amplified (II). *MspI*-cleaved DNA fragments were amplified and labeled similarly as *HpaII*-cleaved DNA fragments then co-hybridized to another microarray with the same 8091 genes. MR was defined as $1 / (\text{normalized } MspI \text{ intensity})$. Therefore, the ratio of MR of two samples (MR_B/MR_A) can be represented by $(\text{normalized } MspI \text{ intensity})_A / (\text{normalized } MspI \text{ intensity})_B$. Details for all procedures are described in Supplementary information 1.

We applied the MIAMI method to a lung cancer cell line (1-87, abbreviated as LC) and a normal lung (abbreviated as C). Values for $\log(HR_{LC}/HR_C)$ and $\log(MR_{LC}/MR_C)$ are plotted on the x and the y-axis, respectively, of Figure 1b. Various genes whose HR changed more than fivefold ($|\text{abs}[\log(HR_{LC}/HR_C)] > \log 5$, areas more than $\log 5$ of the horizontal distance from the y-axis) were selected as candidates (indicated by red and green circles in Figure 1b and

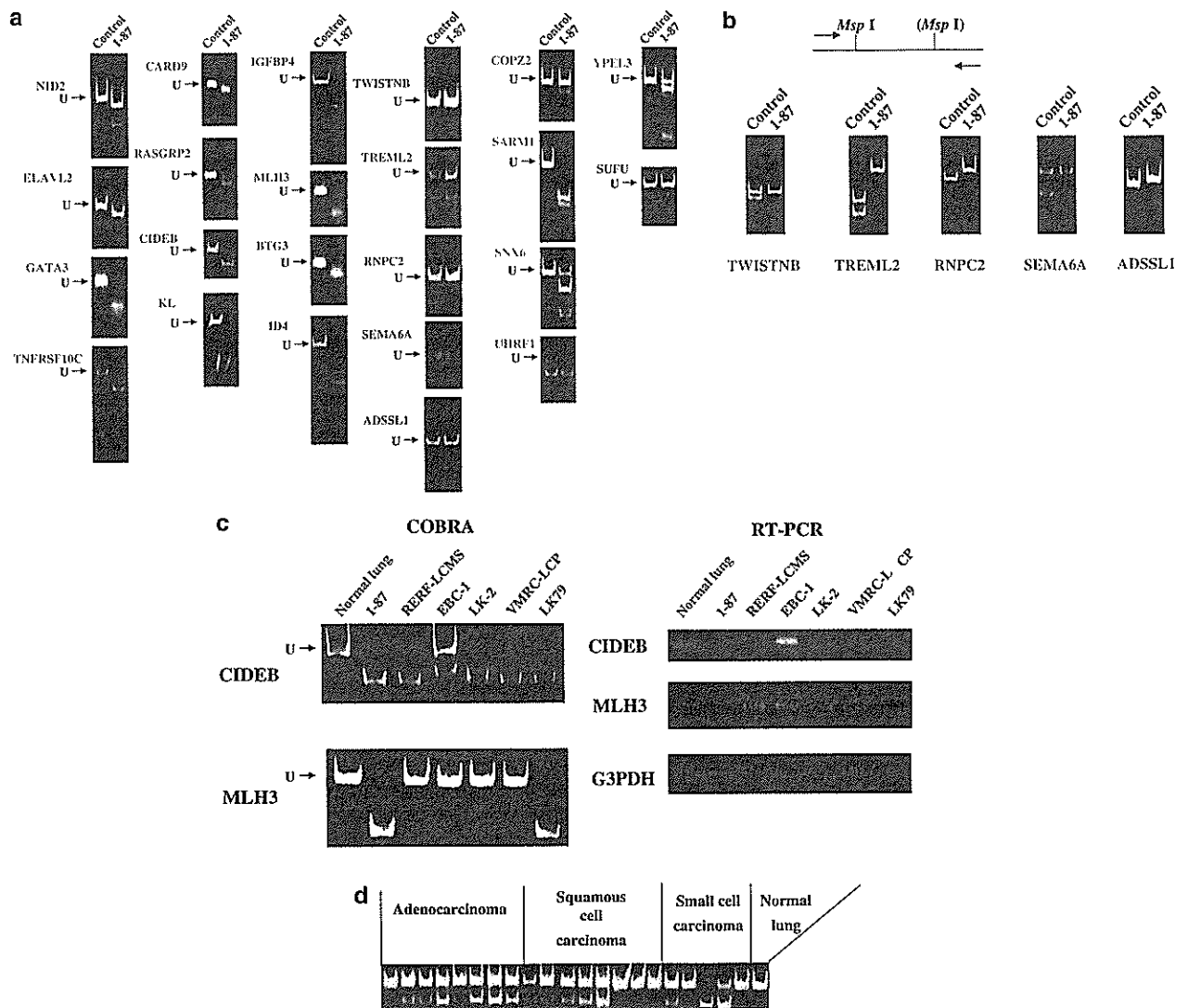


Figure 2 Characterization of genes detected by MIAMI in a lung cancer. The PCR primers used are indicated in Supplementary information 3. (a) COBRA analysis of indicated genes. Genes indicated by red, orange, and blue circles met our criteria whereas indicated by green circles did not. COBRA analysis confirmed hypermethylation for genes indicated in red and orange and not genes indicated by green and blue. U indicates bands originating from unmethylated DNA. Other bands originated from methylated DNA. (b) Characterization of genes not meeting our criteria. *MspI* (*HpaII*) polymorphisms were detected by PCR followed by digestion with *MspI*. All the genes not meeting the criteria have *MspI* (*HpaII*) polymorphisms. (c) COBRA and RT-PCR analysis of CIDEB and MLH3 genes in six lung cancer cell lines (1-87, RERF-LCMS, ERC-1, LK-2, VMRC-LCP and LK79). U indicates bands originating from unmethylated DNA. Hypermethylation was observed for five of six lung cancer cell lines for CIDEB and two of six for MLH3. RT-PCR analysis showed that expression was reduced in all these hypermethylated cell lines. G3PDH was used for a control. (d) COBRA analysis of CIDEB genes in primary tumours. Eight adenocarcinomas, eight squamous cell carcinomas and five small cell carcinomas were used for analysis. Seventy-one per cent (15/21) of primary tumours were hypermethylated.

Supplementary Figure 1). These genes were confirmed to differ in methylation between the cancer and the normal lung by combined bisulfite restriction (COBRA) analysis, with the genes indicated by red circles hypermethylated in the cancer cells and the genes indicated by green circles having no methylation-based changes (Figure 2a). To characterize these false positives without changes in methylation (green circles), PCR was conducted followed by digestion with *HpaII* to test for site polymorphisms. We found these false positives have site polymorphisms between the cancer and the normal lung (Figure 2b). All these false positives were close to the regression line (yellow line in Figure 1b and Supplementary Figure 1) where ideal changes in HR and MR are postulated to be equal. Therefore, we made threshold criteria with which to judge points located more than \log_5 of the horizontal distance from the regression line as altered genes. (Figure 1b and Supplementary Figure 1). Points located more than this distance right of the regression line were judged as hypermethylated and points located more than this distance left of the regression line were judged as hypomethylated. Using our criteria, we could neglect all false positives (green circles) and all genes meeting the criteria (red circles) had methylation changes, indicating our threshold is quite reasonable for selecting methylation-changed genes. Next we chose six genes that were located more than \log_5 of the horizontal distance from the regression line but less than \log_5 from the y -axis (indicated by orange and blue circles in Figure 1b and Supplementary Figure 1). These genes can be judged as hypermethylated using our criteria but their changes in HR are less than fivefold. COBRA analysis indicated that five of the six had actually methylation-based changes (Figure 2a), indicating again our threshold criteria is useful for selecting methylation-changed genes (orange circles indicate positives and blue circles indicates false positive). Conventional, independent COBRA experiments using gene-specific primers confirmed 17 of 18 hypermethylations that were identified by integrated analysis of HR and MR at a threshold of \log_5 . This suggests that our empirical rate of false positives is 6%. We used our threshold criteria to calculate the ratio of changes and found that 5.7% of the promoters of the genes were hypermethylated and 0.6% were hypomethylated in lung cancer (Figure 1c and Supplementary information 2). This frequency is much higher than a previous result in lung cancers (Yan *et al.*, 2001), suggesting high sensitivity. Further improvement such as using linear amplification could make this method more efficient because it is expected that a proportion of fragments will not amplify and give no signal by PCR. Actually we removed 14% of spots with both Cy3 and Cy5 signals less than 0.001% of total signals for analysis to get reproducible results.

Next we analysed the character of 5' sequences (from 1000 base pairs upstream to 200 base pairs downstream of the transcriptional start sites) for these hypermethylated and hypomethylated genes. Average ratio of CpG contents to GC contents (CG/GC) was calculated for hypermethylated, unchanged, and hypomethylated

genes (Figure 1d). We found hypomethylated genes had a low CG/GC ratio compared to genes without methylation change ($P=4.0 \times 10^{-15}$, Figure 1d). However, the AT/TA ratio showed no such tendency (Figure 1d). This suggests that CpG-poor genes are easily demethylated compared to CpG-rich genes. In other words, CpG-poor genes are more sensitive to demethylation activity than to CpG-rich genes. This could be explained by protection of demethylation activity by a methyl-CpG binding protein. Promoters with a low density of methyl-CpGs bind MeCP-1 less strongly than those with a high density of methyl-CpGs (Boyes and Bird, 1992). Therefore, it is intriguing to speculate that CpG-poor genes are less protected by MeCP-1 from demethylation activity. Aberrant hypomethylation is related to the activation of oncogenes. Therefore, our finding of the unique character of hypomethylated genes will help us to understand the mechanism of carcinogenesis.

Aberrant hypermethylation is known to inactivate tumour suppressor genes (Baylin *et al.*, 1997; Ushijima, 2005). Among the hypermethylated genes we identified, further analysis of CIDEB and MLH3 were performed. CIDEB (Cell death-inducing DFFA-like effector b) activates apoptosis in mammalian cells (Inohara *et al.*, 1998) and is located at 14q11 where LOH frequently occurs in lung cancers (Abujiang *et al.*, 1998). MLH3, MutL Homolog 3, is a DNA mismatch repair gene associated with mammalian microsatellite instability (Lipkin *et al.*, 2000). MLH1, from the same family, was frequently mutated in hereditary nonpolyposis colon cancer (Papadopoulos *et al.*, 1994) and was involved in microsatellite instability DNA in colon cancers (Jager *et al.*, 1997). A methylation-based analysis of an additional five lung cancer cell lines using COBRA revealed hypermethylation in five of six for CIDEB and two of six for MLH3 (Figure 2c). RT-PCR analysis showed that expression was reduced in all hypermethylated cancers (Figure 2c), indicating that the expression profile of the genes completely correlated with the methylation profile of the genes. Further methylation analysis was performed for CIDEB in primary tumours using COBRA. We found 71% (15/21) of primary lung cancers were hypermethylated in the promoter of CIDEB (Figure 2d). The present study was approved by the Ethics Committees of Tohoku University School of Medicine and Gunma University. Following a complete description of the research protocol, written informed consent was obtained from each participant.

In conclusion, we conclude MIAMI is a powerful method for genome-wide profiling of promoter methylation in the human genome. This method is useful for epigenetic studies of cancers.

Acknowledgements

This work was supported in part by grants from the Japanese Science and Technology Agency (IH), the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology of Japan (IH), and the Ministry of Health, Labour and Welfare of

Japan (IH). We thank the Cancer Cell Repository (Institute of Development, Aging and Cancer, Tohoku University) for

providing cancer cell lines and Miss Asano for technical assistance.

References

- Abujiang P, Mori TJ, Takahashi T, Tanaka F, Kasyu I, Hitomi S et al. (1998). *Oncogene* **17**: 3029–3033.
- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. (1990). *J Mol Biol* **215**: 403–410.
- Baylin SB, Herman JG, Graff JR, Vertino PM, Issa J-P. (1997) In: Vande W and Klein G (eds). *Advances in Cancer Research*. Academic Press: San Diego. pp 141–196.
- Boyes J, Bird A. (1992). *EMBO J* **11**: 327–333.
- Hatada I, Kato A, Morita S, Obata Y, Nagaoka K, Sakurada A et al. (2002). *J Hum Genet* **47**: 448–451.
- Heisler LE, Torti D, Boutros PC, Watson J, Chan C, Winegarden N et al. (2005). *Nucleic Acids Res* **33**: 2952–2961.
- Hughes TR, Mao M, Jones AR, Burchard J, Marton MJ, Shannon KW et al. (2001). *Nat Biotechnol* **19**: 342–347.
- Inohara N, Koseki T, Chen S, Wu X, Nunez G. (1998). *EMBO J* **17**: 2526–2533.
- Jager AC, Bisgaard ML, Myrholm T, Bernstein I, Rehfeld JF, Nielsen FC. (1997). *Am J Hum Genet* **61**: 129–138.
- Lipkin SM, Wang V, Jacoby R, Banerjee-Basu S, Baxevanis AD, Lynch HT et al. (2000). *Nat Genet* **24**: 27–35.
- Papadopoulos N, Nicolaidis NC, Wei YF, Ruben SM, Carter KC, Rosen CA et al. (1994). *Science* **263**: 1625–1629.
- Rozen S, Skaletsky HJ. (2000) In: Krawetz S and Misener S (eds). *Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology*. Humana Press: Totowa. pp 365–386.
- Takai D, Jones PA. (2002). *Proc Natl Acad Sci USA* **99**: 3740–3745.
- Ushijima T. (2005). *Nat Rev Cancer* **5**: 223–231.
- Weber M, Davies JJ, Wittig D, Oakeley EJ, Haase M, Lam WL et al. (2005). *Nat Genet* **37**: 853–862.
- Yan PS, Chen CM, Shi H, Rahmatpanah F, Wei SH, Caldwell CW et al. (2001). *Cancer Res* **61**: 8375–8380.

Supplementary Information accompanies the paper on Oncogene website (<http://www.nature.com/onc>)