

たため評価が困難であった。このため、MRIの画像データは各施設からDICOMデータで提供してもらった。画像の評価方法を再検討した上で、次年度に検討を施行する予定である。

2. 本年度は、各施設から提供されたMRIの画像データを対象として、Gd-EOB-DTPA (EOB)を用いた造影MRIの肝細胞造影相における画像所見に関して、肝細胞癌の分化度との対比を行ったが、施設間での装置や撮像パラメーターの差異が大きく信頼性の高い結果が得られなかった。そこで、当院では独自に、従来の細胞外液性造影剤とEOBとを用いたダイナミックMRIで比較し、肝、脾、大動脈、門脈、肝静脈に及ぼす造影効果の差異を検討した。その結果、動脈優位相および門脈相ではすべての臓器でEOBより細胞外液性造影剤の方が造影効果が強いことが明らかとなった。しかしながら、後期相では脾、大動脈、門脈、肝静脈の造影効果は細胞外液性造影剤の方が強かったものの、肝の造影効果については両者間で有意差が認められなかった。

3-6. 臨床研究に関しては、研究期間が短く現在症例を蓄積中である。

#### D. 考察

1. の拡散強調像と病理像の対比、2. のEOBを用いた造影MRIと病理像との対比については、施設間で撮像機種が異なることに加え、撮像パラメーターの違いが信号に及ぼす影響が大きく、定量的な検討は断念した。したがって、いずれも次年度に視覚的な評価を行うことを課題とした。また、2. のEOBを用いた造影MRIと病理像との対比については、単一施設内であれば撮像機種もパラメーターも固定することで信号強度の定量化が可能であ

ることから、検討可能な施設毎で行うこととした。

細胞外液性造影剤とEOBを用いたダイナミックMRIの比較に関しては、EOBは細胞外液性造影剤に比して濃度および使用量がそれぞれ1/2であるため、造影効果が弱いことが予想されていた。EOBは細胞外液性の性質と肝細胞特異性の性質を併せ持つが、我々の結果からは臨床的にも細胞外液性造影剤の造影効果に比して、EOBの細胞外液性造影効果が弱いことが証明された。肝に関しては、EOBがどの時相まで細胞外液性造影剤として振る舞い、どの時相から肝細胞性の造影効果を示すのかが、明らかとなっていなかったが、本研究の結果から、造影120-180秒後に撮像される後期相にて、肝にはすでに肝細胞特異性造影剤としての影響が生じていることが明らかとなった。

#### E. 結論

EOBを用いたダイナミックMRIは従来の細胞外液性造影剤を用いたダイナミックMRIより造影効果が弱く、肝腫瘍の質的診断に際しては、細胞外液性造影剤で得られたエビデンスが後期相では使えない可能性がある。

#### F. 健康危険情報

総括研究報告書を参照。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

上田和彦, 柳澤 新, 山崎幸恵, 山田 哲, 渡辺智治, 松下 剛, 黒住昌弘, 平瀬雄一, 藤永康成, 角谷眞澄, 川森康博, 松井 修: コロナ濃染の今日的意義. 肝胆膵画像. 2009; 11: 25-31.

上田和彦, 柳沢 新, 山崎幸恵, 渡辺智

治, 山田 哲, 松下 剛, 平瀬雄一, 黒住明子, 黒住昌弘, 藤永康成, 角谷眞澄 : 多段階発癌・早期肝細胞癌の画像診断と病理・病態-CT・動注 CT-. 画像診断. 2009; 29: 571-576.

角谷眞澄, 佐藤守男 : 肝細胞癌の診断と治療-最新動向と将来展望 はじめに. 臨床放射線. 2009; 54: 335-337.

山田 哲, 角谷眞澄, 上田和彦, 藤永康成, 黒住昌弘, 黒住明子, 平瀬雄一, 松下 剛, 渡辺智治, 柳沢 新, 山崎幸恵, 大彌 歩 : 肝細胞癌の診断と治療-最新動向と将来展望 MRI. 臨床放射線. 2009; 54: 345-356.

塚原嘉典, 角谷眞澄 : CT・MRI の動向 腹部 : 肝臓. medicina. 2009; 46 (2009 増刊号) : 254-262.

## 2. 学会発表

Kadoya M: (Member of Workshop) 1. the role of Primovist MRI in the evaluation of hepatocellular borderline in cirrhotic patients. 2. Learning to interpret atypical lesions with Primovist versus ECCM and how prevent pitfalls. 3. Functional assessment of the liver (including biliary imaging). 4. Multiparametric evaluation of HCC using Primovist MRI. The 3rd International Forum for Liver MRI (Rome, Italy), 2009.10. 9, 10

## H. 知的財産の出願・登録状況

平成 21 年度なし。

厚生労働科学研究費補助金（肝炎等克服緊急対策研究事業）  
分担研究報告書

動脈乏血性結節の早期幹細胞癌の診断アルゴリズムについて  
Gd-EOB-DTPA と造影超音波を含んだ解析

研究分担者 泉 並木 武蔵野赤十字病院消化器科部長

研究要旨：動脈乏血性の非典型像を示す肝内結節については、科学的根拠に基づく肝癌診療ガイドラインでは、いくつかのオプション検査が羅列されているのみであり、それをどのように組み合わせて肝細胞癌の診断をくださのかについて診断体系を作成する必要がある。Gd-EOB-DTPA は肝細胞特異的 MRI 造影剤であるが、動脈血流が低下する前の脱分化した早期肝細胞癌で陽性であり、最も早期に診断できる。しかし、Gd-EOB-DTPA で低信号であっても肝細胞癌でない症例があった。造影超音波の後期相で低エコーとなる結節では CD68 で染色した Kupffer 細胞数が減少していたが、造影超音波 Kupffer 相で欠損となった場合には、中分化肝細胞癌のことが多く、確定診断に用いるべきである。

共同研究者

土谷 薫 武蔵野赤十字病院消化器科  
安井 豊 武蔵野赤十字病院消化器科

A.研究目的

早期肝細胞癌は、肝硬変から一部の結節が脱分化して発生すると考えられる。脱分化の過程で動脈血流が低下し、門脈血流が減少し、さらに Kupffer 細胞数が減少する。さらに最近用いられるようになった Gd-EOB-DTPA 造影 MRI はきわめて早期の肝細胞癌を診断できると報告されている。そこでこれらを組み合わせて早期肝細胞癌の診断体系を作っていることが必要である。

B.研究方法

(1) 2008年4月から2009年8月までダイナミック CT スキャンにて発見された肝腫瘍性結節について、Gd-EOB-MRI 造影 MRI (EOB-MRI) と造影超音波を施行し、

腫瘍生検または手術にて病理学的に最終診断が得られた連続67症例を対象とした。男性42例、女性25例でC型肝炎48例、B型8例を含む。腫瘍径は10から29mm(平均19.9mm)であった。すべての症例に対してダイナミック CT スキャン、Gd-EOB-DTPA 造影 MRI、ソナゾイド造影超音波を施行し、とくに Gd-EOB-DTPA による MRI では投与10分以降の肝細胞造影相を評価した。

(2) 腫瘍生検の病理では、全例 CD68 を用いた酵素抗体法にて Kupffer 細胞の染色を施行した。HE 染色は病理専門医が判定した。

C.研究概要

(1) ダイナミック CT スキャンと EOB MRI

ダイナミック CT スキャンにて多血性と診断された結節が43例、乏血性と判定

されたのが 27 例であった。多血性腫瘍のなかで EOB MRI 肝細胞相で低信号であった結節は 43 例であり、病理学的に高分化肝細胞癌と診断されたのが 9 例、24 例が中分化肝細胞癌と診断された。感度 91%であった。一方、乏血性結節は 27 例であり、全例 EOB MRI は低信号であった。このうち 21 例(78%)が肝細胞癌と診断された。病理学的に高分化型と診断されたのが 17 結節であり中から低分化肝細胞癌と診断されたのが 4 結節であった。肝細胞癌でなかったのは胆管細胞癌 2 例、肝細胞腺種が 1 例、炎症性偽腫瘍が 1 例、過形成結節が 2 例であった。したがって乏血性結節では胆管細胞癌が除外できれば全例が良性であった。

#### (2)EOB MRI と造影超音波

EOB MRI 肝細胞相で低信号を呈した 70 結節に対して造影超音波(CEUS)を施行し病理組織所見と対比した。EOB MRI で低信号であった 63 例のうち、CEUS の postvascular phase で欠損となったのが 53 例であり、19 結節が高分化肝細胞癌、26 例が中から低分化肝細胞癌であった。肝細胞癌でなかったのは胆管細胞癌 2 例、悪性リンパ腫 1 例、肝腺種様過形成 1 例、再生結節が 1 例であった。一方 EOB MRI で低信号の 10 結節のうち 9 結節が CEUS で欠損とならなかったが、9 例(90%)が肝細胞癌であった。EOB で高信号であった 3 結節はすべて CEUS で欠損の所見であり、全例が中分化型肝細胞癌であった。

#### (3) ダイナミック CT スキャン乏血性かつ EOB MRI で低信号結節の例の CEUS との関連

乏血性で EOB MRI 低信号であった 27 結節について CEUS の postvascular phase の欠損との比較検討を行った。20 例が CEUS で欠損となり、14 結節が肝細胞癌と診断された。このうち 11 結節では高分化肝細胞癌であった。CEUS で欠損であったが、肝細胞癌でなかったのは 6 例であり、病理学的に 2 例は胆管細胞癌、炎症性偽腫瘍 1 例、過形成結節 1 例、肝細胞腺種 1 例、再生結節 1 例であった。しかし CEUS で欠損とならないものが 7 結節みられ、すべて病理学的に肝細胞癌と診断され、1 例の中分化を除いてすべて高分化型肝細胞癌であった。

#### (4) CEUS の欠損所見と腫瘍生検の CD68 染色

CEUS の postvascular phase で欠損であった結節では、大多数が CD68 で染色される Kupffer 細胞数が減少しており、CEUS の欠損の所見は腫瘍内の Kupffer 細胞数を表していると考えられた。

#### D. 考察

(1) EOB MRI の肝細胞相で低信号を呈した場合には、肝細胞癌と診断できる感度が高く、とくに乏血性腫瘍では 78%が肝細胞癌であった。さらに CEUS の postvascular phase で欠損であった例では CD68 染色による Kupffer 細胞数の減少を認めた。しかし EOB MRI の肝細胞造影相で低信号であった結節で CEUS の postvascular phase で欠損を示さない結節は、CD68 陽性の Kupffer 細胞数の低下はみられなかった。この Kupffer 細胞数が低下していない結節は、病理学的に

高分化型肝細胞癌と診断される結節が多かった。したがって EOB MRI の肝細胞造影相での低信号となる結節は、Kupffer 細胞が減少するよりも早期の肝細胞癌を診断できるものと考えられた。

(2) EOB 造影 MRI の肝細胞造影相は、脱分化過程の中で早期肝細胞癌のもっとも初期の変化を捉えられると考えられ、血流診断や Kupffer 細胞の多寡をみるソナゾイド造影超音波よりも有用であると考えられる。しかし、胆汁産生や排泄障害を伴う腫瘍や OTAP の表出が亢進した肝細胞癌では、例外的に EOB 造影 MRI が低信号とならないことがあることに注意が必要である。この例外的な症例は典型的な動脈血流が hypervascular であり、他の方法で十分肝細胞癌と診断できる。

(3) EOB MRI 肝細胞相で欠損であっても、非特異的病理所見を呈するものがあり、肝細胞相が低信号であったからといって、全例肝細胞癌とは言い切れないことを明記しておく必要がある。

#### E. 結論

Gd-EOB-DTPA 造影 MRI によって従来診断困難であった早期肝細胞癌を、より早い段階で診断できるようになった。ただし、この検査の限界を知っておくことが重要である。造影超音波は汎用性があり有用であるが、Kupffer 細胞数が減少した、やや脱分化が進んだ肝細胞癌で陽性所見を呈する。

#### F.健康危険情報

総括研究報告書参照。

#### G.研究発表

##### 1.論文発表

1) Izumi N, Nishiguchi, Hino K, Suzuki F, Kumada K, Itoh Y, Asahina Y, Tamori A, Hiramatsu N, Hayashi N, Kudo M. Management of Hepatitis C: Consensus of Japan Society of Hepatology 2009 Hep Res in press.

2) Kurosaki M, Matsunaga K, Hirayama I, Tanaka T, Sato M, Yasui Y, Tamaki N, Hosokawa T, Ueda Tsuchiya K, Nakanishi H, Ikeda H, Itakura J, Takahashi Y, Asahina Y, Higaki M, Enomoto N, Izumi N A Predictive Model of Response to Peginterferon Ribavirin in Chronic Hepatitis C using Classification and Regression Tree Analysis. Hep Res in press.

3) Itakura J, Kurosaki M, Itakura Y, Maekawa S, Asahina Y, Izumi N, Enomoto N. Reproducibility and usability of chronic virus infection model using agent-based simulation; comparing with a mathematical model. Biosystems 2009 12.

4) Asahina Y, Nakanishi H, Izumi N. laparoscopic radiofrequency ablation for hepatocellular carcinoma. Dig Endosc 2009;21:67-72.

##### 2.学会発表

(1) 佐藤光明、土谷薫、朝比奈靖弘、玉城信治、田中智大、平山慈子、安井豊、細川貴範、池田裕喜、上田研、中西裕之、板倉潤、黒崎雅之、榎本信幸、泉並木. GD=EOB-DTPA 造影 MRI の肝腫瘍性病変の画像診断における臨床的有用性 第 45 回日本肝臓学会総会 一般演題 2009

(2) 土谷薫、小無田美奈、玉城信治、佐藤光明、田中智大、平山慈子、安井豊、細川田貴範、池田裕喜、上田研、中西裕之、板倉潤、朝比奈靖弘、黒崎雅之、坂元亨宇、泉並木. Progenitor cell feature marker は肝細胞癌に対する RFA 治療後の再発と関連する. 第 45 会日本肝臓学会総会ワークショップ 2009.

(3) 中西裕之、朝比奈靖弘、玉城信治、平山慈子、田中智大、安井豊、佐藤光明、細川貴範、上田研、池田裕喜、土谷薫、板倉潤、高橋有香、黒崎雅之、泉並木. 肝細胞癌に対する腹腔鏡下 RFA と人工胸腹水下 RFA の長期予後を含めた検討 第 45 回日本肝臓学会総会一般演題

H. 知的財産権の出願・登録状況

今回の研究内容については特になし。

厚生労働科学研究費補助金（肝炎等克服緊急対策研究事業）  
分担研究報告書

肝癌早期発見を目的とした分子マーカーおよび画像診断システムの開発

研究分担者 高山 忠利（日本大学 医学部消化器外科 教授）

研究要旨

- (1) 2cm 以下単発肝細胞癌に対する手術成績の検討
- (2) 術前CTから肉眼分類が予測できるか
- (3) 高感度 AFP-L3 分画の意義

A.研究目的

- (1) 画像診断の進歩により、2cm 以下単発肝細胞癌の検出率が向上した。治療は手術、Ablation therapy が適応となりうる。2cm 以下単発肝細胞癌の手術成績を検討した。
- (2) 術前CT画像より肝細胞癌の肉眼形態を予測する。これにより悪性度、脈管侵襲が予測可能か検討する。
- (3) 高感度 AFP-L3 分画の意義を明らかにする。

B.研究方法

- (1) 2001年1月より2006年12月までに2cm 以下単発肝細胞癌で当科にて初回治療として手術を行った20例を対象とした。
- (2) 術前CT画像より腫瘍辺縁のトレースを行い、計測を行う。これをもとに切除標本との整合性を確かめる。
- (3) 術前術後に測定された高感度 L3 のデータと切除標本より得られた各腫瘍因子との関連を検討する。

C.研究概要

- (1) 2002年1月より2008年3月までに2cm 以下単発肝細胞癌で当科にて手術を行った

症例は49例であった。男性35例、女性14例で手術時年齢の中央値は68歳(36—81歳)であった。肝障害度A39例、B10例に肝切除が施行された。18%にvp, 4%にimが認められた。Fc-inf(+)は31例、(-)は14例だった。術後合併症は19例(39%)に認められたが、在院死はなかった。15例に再発を認めたが、再発時期は1年以内7例、1-2年4例、2年以上4例であった。2cm 以下単発肝細胞癌の無再発3, 5年生存率は92.3%、79.1%であったが、肝切除後3, 5年生存率はそれぞれ87.5%、87.5%であった。

(2) 画像解析中。

(3) 当科においてはすでに100例の症例集積を行っており、現在も症例集積中である。

D.考察

(1) 再発群と無再発群を検討したところ有意な再発危険因子は fc-inf( $p=0.0253$ )であると思われた。

E.結論

(1) 初回治療として肝切除を行うことにより長期生存が望める。

(3) 62例までのデータの間解分析では有意

に術後L3は低下していた。今後さらに解析を進め、発表予定である。

#### F.健康危険情報

総括研究報告書を参照。

#### G.研究発表

##### 1.論文発表

未発表、症例集積ののち発表予定

##### 2.学会発表

2cm 以下単発肝細胞癌に対する手術成績  
の検討

第 45 回 日本肝癌研究会

#### H.知的財産の出願・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



肝細胞癌切除患者に対するソナゾイド術中造影超音波と Gd-EOB-DTPA-MRI の  
肝腫瘍診断能の比較

研究分担者 國土 典宏 東京大学医学部附属病院肝胆膵・移植外科教授

**研究要旨：**【目的】肝細胞癌患者におけるソナゾイド使用術中造影超音波と Gd-EOB-DTPA-MRI (EOB-MRI) の各肝腫瘍に対する画像所見を比較する。【方法】2008 年 5 月から 2009 年 8 月までに EOB-MRI を術前に行い、ソナゾイド術中造影超音波を行った 45 人の肝細胞癌患者の全肝腫瘍について検討した。ソナゾイド投与後約 1 分間を早期相とし、15-20 分以降をクッパー相と定義し、画像所見を記録した。EOB-MRI の肝細胞相所見を記録した。切除腫瘍は組織学的検査を、非切除腫瘍は 12 ヶ月後の造影 CT により最終診断とした。【結果】全 109 個の結節が指摘され、うち 62 個が切除され 47 個が経過観察された。59 個の切除腫瘍が HCC の病理診断であった。経過観察された肝腫瘍のうち 12 ヶ月間の CT で増大あるいは古典的肝細胞癌化したものはなかった。感度、特異度、正診率のいずれも、ソナゾイド術中造影超音波のクッパー相が、同早期相と EOB-MRI 肝細胞相に比較して高かった。高分化 HCC に対する感度は EOB-MRI が最も高かった。EOB-MRI 陽性非典型腫瘍 15 個を検討、切除した 3 個中 2 個は高分化 HCC であり、経過観察された 12 個はいずれも増大あるいは古典的肝細胞癌化しなかった。【結論】EOB-MRI で高分化肝細胞癌を拾い上げ、ソナゾイド術中造影超音波で術中に鑑別診断することの有用性が示唆された。

A. 研究目的

肝細胞癌患者に対する肝切除術において第二世代超音波造影剤であるソナゾイドを使用した術中造影超音波は、通常の術中超音波で発見される新結節に対する唯一の鑑別診断手段である。また、ソナゾイドには肝クッパー細胞に蓄積する性質があるため、術中超音波でも発見できない新たな肝細胞癌が発見されることもある。一方、異なる画像検査法としての MRI にも肝細胞特異性を持つ造影剤である Gd-EOB-DTPA が登場し、それをを用いた MRI (EOB-MRI) により、非常に早期の高分化型肝細胞癌が鋭敏に指摘される。本研究は肝細胞癌患者に

対して、術前に EOB-MRI を行い、さらに肝切除術中にソナゾイド術中造影超音波を行ない、全ての肝結節において、各々の画像検査で得られる所見を記載し、比較検討した。本研究の結果により、従来の画像検査では診断出来なかった早期肝細胞癌や、逆に切除不要な高度異形成結節を鑑別診断する方法が開発されるため、厚生労働行政の課題である「肝癌早期発見を目的とした分子マーカーおよび画像診断システムの開発」に直結するものと考えられる。

B. 研究方法

2008 年 5 月から 2009 年 8 月の間に肝切

除術を受けた 130 人のうち、Gd-EOB-MRI 検査を術前に行い、かつ全ての結節が切除されたか 12 ヶ月以上経過観察がなされた 45 人の HCC 患者を対象とした。CE-IOUS は全 HCC 切除例で行っている。EOB-HB で低信号を呈する場合、CE-IOUS 早期相で hypervascular な場合、CE-IOUS クッパー相で hypoechoic である場合をそれぞれ陽性とし、それ以外を陰性として、全ての結節に対する所見を判断した。手術では、造影 CT で古典的パターンを呈する結節と、CE-IOUS クッパー相陽性の結節を原則として切除した。非切除結節は 12 ヶ月間の造影 CT で古典的パターンを呈するものを Potential HCC と判断した。病理で HCC と診断された結節と経過観察で Potential HCC と診断された結節を最終診断陽性と定義し、各画像所見の感度、特異度、正診率を計算した。また、造影 CT で古典的パターンを呈さず、EOB-HB で陽性であった結節の CE-IOUS 所見と最終診断とを比較した。

#### C. 研究結果

全 45 人の患者背景は男性 37 人、年齢 70 (33-82) 才 (中央値 [範囲])、HBV 単独/HCV 単独/いずれも陽性/いずれも陰性が 11/21/0/13 人、肝病理は肝硬変/慢性肝炎/正常肝が 20/22/3 人、病理 HCC 個数は 1 個/2 個/3 個が 35/6/4 人であった。全 109 個の結節が指摘され、切除された 62 個のうち 59 個が病理で HCC と診断され、経過観察された 47 個のうち Potential HCC と診断された結節はなかった。各画像の感度/特異度/正診率は

EOB-HB が 92%/46%/71%、CE-IOUS 早期相が 78%/94%/72%、CE-IOUS クッパー相が 93%/98%/96%であり、いずれの数値も CE-IOUS クッパー相が最も高かった。中低分化 HCC に対する各画像所見は大きな差はないが、高分化 HCC 10 個に対する感度は EOB-HB が 90%で最も高かった。造影 CT で古典的パターンを呈さず、EOB-HB で陽性の結節は 15 個 (8 人) であり、CE-IOUS クッパー相では全て陰性であった。15 個中 3 個は主腫瘍近傍に存在したため切除され、病理で 2 個は高分化 HCC、1 個は再生結節と診断された。残り 12 個は経過観察されたが Potential HCC と診断された結節はなかった。

#### D. 考察

EOB-HB の所見に関わらず、CE-IOUS クッパー相は切除すべき結節を高い精度で鑑別診断する能力を持つと考えられた。EOB-HB は高分化 HCC に対して高い感度を持つが分かったが、境界病変や長期変化のない高分化 HCC に対してもしばしば陽性を呈することが示唆された。術前に EOB-HB を行うことで、従来は指摘されなかった高分化 HCC と高度異形成結節を把握することが出来る。これらの結節を CE-IOUS で観察することで切除すべきかどうかの判断が出来るものと考えられた。

#### E. 結論

EOB-HB 陽性を呈する非典型的結節を CE-IOUS クッパー相で鑑別することの臨床的有用性が示唆された。

F. 研究危険情報

総括研究報告書参照。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Akai H, Kiryu S, Takao H, Tajima T, Shibahara J, Imamura H, Kokudo N, Akahane M, Ohtomo K. Efficacy of double-arterial phase gadolinium ethoxybenzyl diethylenetriamine pentaacetic acid-enhanced liver magnetic resonance imaging compared with double-arterial phase multi-detector row helical computed tomography. *J Comput Assist Tomogr* 2009; 33:887-92.
2. Hasegawa K, Kokudo N. Surgical treatment of hepatocellular carcinoma. *Surg Today* 2009; 39:833-43.
3. Hasegawa K, Kokudo N, Sano K, Makuuchi M. Single HCC between 2 and 5 cm: the grey zone : Surgeon's perspective. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 2009.
4. Hashimoto M, Sugawara Y, Tamura S, Kaneko J, Matsui Y, Kokudo N, Makuuchi M. Pseudomonas aeruginosa infection after living-donor liver transplantation in adults. *Transpl Infect Dis* 2009; 11:11-9.
5. Ikeda M, Hasegawa K, Sano K, Imamura H, Beck Y, Sugawara Y, Kokudo N, Makuuchi M. The vessel sealing system (LigaSure) in hepatic resection: a randomized controlled trial. *Ann Surg* 2009; 250:199-203.
6. Inagaki Y, Tang W, Xu HL, Guo Q, Mafune K, Konishi T, Nakata M, Sugawara Y, Kokudo N. Localization of N-myc downstream-regulated gene 1 in gastric cancer tissue. *Dig Liver Dis* 2009; 41:96-103.
7. Inoue Y, Hasegawa K, Ishizawa T, Aoki T, Sano K, Beck Y, Imamura H, Sugawara Y, Kokudo N, Makuuchi M. Is there any difference in survival according to the portal tumor thrombectomy method in patients with hepatocellular carcinoma? *Surgery* 2009; 145:9-19.
8. Inoue Y, Sugawara Y, Tamura S, Ohtsu H, Taguri M, Makuuchi M, Kokudo N. Validity and feasibility of transient elastography for the transplanted liver in the peritransplantation period. *Transplantation* 2009; 88:103-9.
9. Ishizawa T, Bandai Y, Kokudo N. Fluorescent cholangiography using indocyanine green for laparoscopic cholecystectomy: an initial experience. *Arch Surg* 2009; 144:381-2.
10. Ishizawa T, Fukushima N, Shibahara J, Masuda K, Tamura S, Aoki T, Hasegawa K, Beck Y, Fukayama M, Kokudo N. Real-time identification of liver cancers by using indocyanine green fluorescent imaging. *Cancer* 2009; 115:2491-504.
11. Ishizawa T, Hasegawa K, Kokudo N, Sano K, Imamura H, Beck Y, Sugawara Y, Makuuchi M. Risk factors and management of ascites after liver resection to treat hepatocellular carcinoma. *Arch Surg* 2009; 144:46-51.
12. Ishizawa T, Hasegawa K, Tsuno NH, Tanaka M, Mise Y, Aoki T,

- Imamura H, Beck Y, Sugawara Y, Makuuchi M, Takahashi K, Kokudo N. Predeposit autologous plasma donation in liver resection for hepatocellular carcinoma: toward allogenic blood-free operations. *J Am Coll Surg* 2009; 209:206-14.
13. Ishizawa T, Mise Y, Aoki T, Hasegawa K, Beck Y, Sugawara Y, Kokudo N. Surgical technique: new advances for expanding indications and increasing safety in liver resection for HCC : The Eastern perspective. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 2009.
14. Ishizawa T, Tamura S, Masuda K, Aoki T, Hasegawa K, Imamura H, Beck Y, Kokudo N. Intraoperative fluorescent cholangiography using indocyanine green: a biliary road map for safe surgery. *J Am Coll Surg* 2009; 208:e1-4.
15. Kaneko J, Sugawara Y, Matsui Y, Sakata H, Kokudo N. Comparison of near-infrared spectroscopy and laser Doppler flowmetry for detecting decreased hepatic inflow in the porcine liver. *J Invest Surg* 2009; 22:268-74.
16. Kaneko J, Sugawara Y, Tamura S, Kokudo N, Makuuchi M. Left liver with right paramedian sector--can it be an option in living donor liver transplantation? *Transplantation* 2009; 88:952; author reply 953.
17. Kishi Y, Imamura H, Sugawara Y, Sano K, Kaneko J, Kokudo N, Makuuchi M. Evaluation of donor vasculobiliary anatomic variations in liver graft procurements. *Surgery* 2010; 147:30-9.
18. Kishi Y, Kokudo N, Tamura S, Makuuchi M. Viable liver parenchyma in a living donor liver graft: an "egg of Columbus" or a challenge to an axiom of liver surgery? *Hepatogastroenterology* 2009; 56:174-5.
19. Koga R, Yamamoto J, Saiura A, Natori T, Katori M, Kokudo N, Makuuchi M, Yamaguchi T. Clamp-crushing pancreas transection in pancreatoduodenectomy. *Hepatogastroenterology* 2009; 56:89-93.
20. Kokudo N, Makuuchi M. Evidence-based clinical practice guidelines for hepatocellular carcinoma in Japan: the J-HCC guidelines. *J Gastroenterol* 2009; 44 Suppl 19:119-21.
21. Kyoden Y, Imamura H, Sano K, Beck Y, Sugawara Y, Kokudo N, Makuuchi M. Value of prophylactic abdominal drainage in 1269 consecutive cases of elective liver resection. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 2009.
22. Kyoden Y, Tamura S, Sugawara Y, Matsui Y, Togashi J, Kaneko J, Kokudo N, Makuuchi M. Incidence and management of biliary complications after adult-to-adult living donor liver transplantation. *Clin Transplant* 2009.
23. Ma M, Qu XJ, Mu GY, Chen MH, Cheng YN, Kokudo N, Tang W, Cui SX. Vitamin K2 inhibits the growth of hepatocellular carcinoma via decrease

- of des-gamma-carboxy prothrombin. *Chemotherapy* 2009; 55:28-35.
24. Masuzaki R, Yamashiki N, Sugawara Y, Yoshida H, Tateishi R, Tamura S, Kaneko J, Hasegawa K, Kokudo N, Makuuchi M, Omata M. Assessment of liver stiffness in patients after living donor liver transplantation by transient elastography. *Scand J Gastroenterol* 2009; 44:1115-20.
  25. Midorikawa Y, Yamamoto S, Tsuji S, Kamimura N, Ishikawa S, Igarashi H, Makuuchi M, Kokudo N, Sugimura H, Aburatani H. Allelic imbalances and homozygous deletion on 8p23.2 for stepwise progression of hepatocarcinogenesis. *Hepatology* 2009; 49:513-22.
  26. Saiura A, Yamamoto J, Kokudo N, Koga R, Seki M, Hiki N, Yamada K, Natori T, Yamaguchi T. Intrahepatic cholangiocarcinoma: analysis of 44 consecutive resected cases including 5 cases with repeat resections. *Am J Surg* 2009.
  27. Seyama Y, Kokudo N. Assessment of liver function for safe hepatic resection. *Hepatol Res* 2009; 39:107-16.
  28. Seyama Y, Kokudo N, Makuuchi M. Radical resection of biliary tract cancers and the role of extended lymphadenectomy. *Surg Oncol Clin N Am* 2009; 18:339-59, ix.
  29. Takao H, Akai H, Tajima T, Kiryu S, Watanabe Y, Imamura H, Akahane M, Yoshioka N, Kokudo N, Ohtomo K. MR imaging of the biliary tract with Gd-EOB-DTPA: Effect of liver function on signal intensity. *Eur J Radiol* 2009.
  30. Tamura S, Sugawara Y, Yamashiki N, Kaneko J, Kokudo N. The urgent need for evaluating recurrent primary sclerosing cholangitis in living donor liver transplantation. *Liver Transpl* 2009; 15:1383-4; author reply 1385.
  31. Tamura S, Sugawara Y, Yamashiki N, Kaneko J, Kokudo N, Makuuchi M. Pre-emptive antiviral therapy in living donor liver transplantation for hepatitis C: observation based on a single-center experience. *Transpl Int* 2009.
  32. Tanaka M, Fukushima N, Noda N, Shibahara J, Kokudo N, Fukayama M. Intraductal oncocytic papillary neoplasm of the bile duct: clinicopathologic and immunohistochemical characteristics of 6 cases. *Hum Pathol* 2009; 40:1543-52.
  33. Wang SB, Cheng YN, Cui SX, Zhong JL, Ward SG, Sun LR, Chen MH, Kokudo N, Tang W, Qu XJ. Des-gamma-carboxy prothrombin stimulates human vascular endothelial cell growth and migration. *Clin Exp Metastasis* 2009; 26:469-77.
  34. Xu HL, Inagaki Y, Seyama Y, Sugawara Y, Kokudo N, Nakata M, Wang FS, Tang W. Expression of KL-6 mucin, a human MUC1 mucin, in intrahepatic cholangiocarcinoma and its potential involvement in tumor cell

- adhesion and invasion. *Life Sci* 2009; 85:395-400.
35. Yamamoto K, Imamura H, Matsuyama Y, Hasegawa K, Beck Y, Sugawara Y, Makuuchi M, Kokudo N. Significance of alpha-fetoprotein and des-gamma-carboxy prothrombin in patients with hepatocellular carcinoma undergoing hepatectomy. *Ann Surg Oncol* 2009; 16:2795-804.
36. Yamashiki N, Sugawara Y, Tamura S, Kaneko J, Matsui Y, Togashi J, Kokudo N, Omata M, Makuuchi M. Double-dose double-phase use of second generation hepatitis B virus vaccine in patients after living donor liver transplantation: Not an effective measure in transplant recipients. *Hepatol Res* 2009; 39:7-13.
37. Yamashiki N, Sugawara Y, Tamura S, Kaneko J, Matsui Y, Togashi J, Ohki T, Yoshida H, Omata M, Makuuchi M, Kokudo N. Noninvasive estimation of hepatic steatosis in living liver donors: usefulness of visceral fat area measurement. *Transplantation* 2009; 88:575-81.
38. Yoshimi A, Nannya Y, Ueda K, Asano D, Yamamoto G, Kumano K, Hangaishi A, Matsui Y, Takahashi T, Imai Y, Sugawara Y, Kokudo N, Kurokawa M. Successful hematopoietic stem cell transplantation from an HLA-identical sibling in a patient with aplastic anemia after HLA-haploidentical living-related liver transplantation for fulminant hepatitis. *Biol Blood Marrow Transplant* 2009; 15:389-90.
39. Zhang K, Tang W, Qu X, Guo Q, Inagaki Y, Seyama Y, Abe H, Gai R, Kokudo N, Sugawara Y, Nakata M, Makuuchi M. KL-6 mucin in metastatic liver cancer tissues from primary colorectal carcinoma. *Hepatogastroenterology* 2009; 56:960-3.
2. 学会発表
1. 國土典宏 肝癌外科治療の最近の話題 第90回 北海道外科学会 2009年2月21日 会場 かでる 2.7 札幌
  2. 國土典宏 特別講演 肝癌治療ガイドラインと最近の話題 第65回北九州肝腫瘍研究会 (味の素ファルマ (株)) 2009年3月5日 九州厚生年金会館
  3. 國土典宏 特別講演 肝臓外科の進歩 第6回 外科学フォーラム 2009年4月17日 福岡
  4. 國土典宏 特別講演 生体肝移植—最新の話 丸亀市医師会学術講演会 2009年4月28日 香川 丸亀市
  5. 國土典宏 肝癌ガイドラインの改訂作業の概要について 第45回日本肝臓学会総会 2009年6月4-5日 神戸ポートピアホテル・神戸国際展示場 肝臓 50 SUPPI(1) : 43
  6. 國土典宏、長谷川 潔、菅原寧彦 CM3-6 肝細胞癌に対する外科治療 第45回日本肝臓学会総会 2009年6月4-5日 神戸ポートピアホテル・神戸

- 国際展示場 肝臓 50 SUPPI(1) : A46
7. Norihiro Kokudo Diagnostic and Treatment Algorithm (Use of Q&A Analyzer System) Sponsored by Chugai Pharmaceutical Co.,LTD 第3回国際肝癌シンポジウム KOBE 2009 年6月6-7日 神戸ポートピアホテル (International Kobe Liver Symposium on HCC with a JSH-ILCA Joint Scientific Session)
  8. 國土典宏 東大式右葉切除 第21回日本肝胆膵外科学会・学術集会 2009年6月10-12日 ウェスティンナゴヤキャッスル
  9. 國土典宏 肝癌診療ガイドライン改訂の概要 第45回日本肝癌研究会 2009年7月3-4日 福岡国際会議場
  10. 國土典宏 早期肝細胞癌は治療すべきか? -治療 VS 経過観察- 第9回 関西肝血流動態イメージ研究会 2009年7月11日 大阪 オーバルホール
  11. Norihiro Kokudo Diagnostic and Treatment Algorithm 第3回国際肝癌シンポジウム KOBE 2009.6月6-7日 神戸
  12. Norihiro Kokudo, Kiyoshi Hasegawa, Yusuke Inoue, Masatoshi Makuuchi, Surgical Treatment of hepatocellular Carcinoma accompanied by portal vein tumor thrombus Asian-pacific hepato-Pancreato-Biliary Association March 25-27 2009
  13. N Kokudo, T Aoki, K Hasegawa, Y Inoue Liver resection for HCC with portal vein invasion XII corso Di aggiornamento A,C,O,I in chirurgia epatica トリノ 5/20-22 2009 Associazione Chirurghi Ospedalieri Italiani
  14. N Kokudo, T Aiki, K Haegawa, S Hata The Tokyo experience XII corso Di aggiornamento A,C,O,I in chirurgia epatica トリノ 5/20-22 2009 Associazione Chirurghi Ospedalieri Italiani
  15. N kokudo, T Aoki, K Hasegawa, T Ishizawa ICG fluoroscscopy in liver surgery XII corso Di aggiornamento A,C,O,I in chirurgia epatica トリノ 5/20-22 2009 Associazione Chirurghi Ospedalieri Italiani
  16. 國土典宏, 青木 琢、長谷川 潔、田村純人、幕内雅敏 肝癌診療ガイドラインの現状と問題点 第64回日本消化器外科学会総会 2009.7月16-18日 大阪国際会議場 (日消外会誌 42(7))
  17. Norihiro Kokudo Recent Advances in Preoperative Simulation and Navigation for Hepatobiliary Surgery 19th World Congress of the International Association of Surgeons and Gastroenterologists, and Oncologists September 23-26, 北京
  18. Norihiro Kokudo Can we Extend indication of liver Transplantation for Extra-Milan HCC Cases? 19th World Congress of the International Association of Surgeons and Gastroenterologists, and Oncologists September 23-26, 北京
  19. 國土典宏 肝細胞癌外科治療と診療ガイドライン 第13回 いわたの肝胆膵フォーラム 2009年11月7日 岩手

20. 國土典宏 特別講演 肝癌外科治療の  
現況 第4回信州肝胆膵外科先端医療  
研究会 2009.12月12日 松本市
21. Norihiro Kokudo 20th Asia Pacific  
Cancer Conference 2009.11-12-14  
筑波
22. Norihiro Kokudo Hepatic Vein  
Reconstruction in Living Donor Liver  
Transplantation IASGO 17th  
International Association for  
Surgeons, Gastroenterologists &  
Oncologists アテネ 2009.12.4-5
23. Norihiro Kokudo Preoperative  
Simulation for Liver Surgery using  
3D Image Processing Software  
IASGO 17th International  
Association for  
Surgeons, Gastroenterologists &  
Oncologists アテネ 2009.12.4-5

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得  
なし
2. 実用新案取得  
なし
3. その他  
なし



厚生労働科学研究費補助金（肝炎等克服緊急対策研究事業）  
分担研究報告書

肝癌早期発見を目的とした分子マーカーおよび画像診断システムの開発

研究分担者 稲澤譲治 東京医科歯科大学難治疾患研究所分子細胞遺伝 教授

**研究要旨：** 肝細胞癌臨床検体を対象に施行した自作 BAC アレイによるゲノムコピー数解析結果から、臨床病理学的因子と関連異常の検出を試みた。また、肝癌細胞株・臨床検体を対象に、CpG island の過剰メチル化を探索することで、診断マーカー・治療標的になり得る新規肝癌抑制性 miRNA として miR-124, miR-203 ならびにとその標的候補遺伝子を同定した。

### A. 研究目的

年間約 4 万人が死亡している肝疾患は我が国の国民病であり、その多くがウイルス性慢性肝障害を基盤とする肝細胞癌（肝癌）である。肝癌の高危険群を分子病理学的に予測する試みがなされ一定の成果をあげてきているが、個性診断に耐えるマーカー群の同定には至らず適切な治療時期を失した患者も多いことから、より精緻で効率のよい早期診断法の開発が喫緊の課題である。本研究では、課題のうち、肝癌の細胞株ならびに臨床検体の包括的な分子病理学的解析に基づき、新規早期発見マーカーの開発を含む肝癌関連遺伝子マーカーの同定とその検出法の開発を目的とする。

### B. 研究方法

**B 1. 肝癌臨床検体におけるゲノム一次構造の解析と臨床・病理学的因子との比較検討：** すでに昨年度に得られている、肝癌臨床検体 100 例を対象にした自作 bacterial artificial chromosome

(BAC) アレイ (MCG Cancer Array-800 ならびに MCG Cancer Array-1500) を用いたアレイ comparative genomic hybridization (CGH) 解析の結果を、その後の追跡調査から得られてきている再発などの臨床病理学的データと比較検討し、各ゲノム一次構造異常（ゲノムコピー数異常）の臨床病理学的予測因子としての有用性を検討した。

**B 2. 新規肝癌抑制マイクロ RNA (miRNA) の同定：** 近傍に CpG アイランドを有する miRNA から、combined bisulfite restriction analysis (COBRA) 法を用いて、非腫瘍部肝組織に比較して、肝癌細胞株において癌部特異的 DNA 高メチル化を示す miRNA をスクリーニングした。抽出された miRNA に関し、発現低下細胞株の 5-aza 2'-deoxycytidine (5-aza-dCyd) 処理による発現回復の評価、臨床検体における癌部特異的発現低下とその DNA メチル化状態との関連を評価することで、DNA メチル化による発現抑制をうける肝癌

抑制 miRNA を同定した。さらに、Pre 型 miRNA ライブラリーを肝癌細胞株へ遺伝子導入した場合の細胞増殖への効果をハイスループットにスクリーニングすることにより、肝癌細胞増殖抑制作用を示す肝癌抑制 miRNA 候補の絞込みを試みた。

### (倫理面への配慮)

本研究においては、事前に患者に対して十分なインフォームドコンセントを交わし、標本データの匿名化と孤立化によりプライバシーの完全な保護を図っている。「ヘルシンキ宣言」、「疫学研究に関する倫理指針」、「臨床研究に関する指針」その他を遵守し、遺伝子研究に際しては科学技術会議生命倫理委員会「ヒトゲノム研究に関する基本原則について」を遵守するとともに「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針（平成 13 年 3 月 29 日 文部科学省、厚生労働省、経済産業省告示）及び平成 13 年 3 月 29 日 1 2 文科振第 266 号文部科学省研究振興局長通知に定める細則に沿い、倫理委員会の審査を経て実施している。

## C. 研究結果

### C 1. 肝癌臨床検体におけるゲノム一次構造の解析と臨床・病理学的因子との比較検討：

自作 BAC アレイ (MCG Cancer Array-800 ならびに Cancer Array-1500) により、肝癌臨床検体においてゲノムコピー数変化が検出された領域について、継時的に更新された臨床病理学的データとの比較検討を行うことで、特定の表現型と関連する異常領域とその標的遺

伝子候補の選択が可能であることが確認された。

### C 2. 新規肝癌抑制マイクロ RNA (miRNA) の同定：

肝癌において異常メチル化により発現抑制を受ける miRNA は、TaqMan アッセイにより発現の評価が可能な miRNA から、ゲノム上近傍 (500 bp 以内) に CpG アイランドを持つ 39 種類 (ゲノム上 43 箇所) から同定を試みた。肝癌細胞株パネルにおいて、正常肝に比較して高頻度に CpG アイランドの高度メチル化が認められる 11 種類の miRNA を選択し、さらに細胞株ならびに肝癌臨床検体 (図 1) において正常肝に比較してメチル化と相関した著明な発現低下が認められる 2 種類の miRNA (miR-124 と miR-203) を同定した (論文発表 1)。

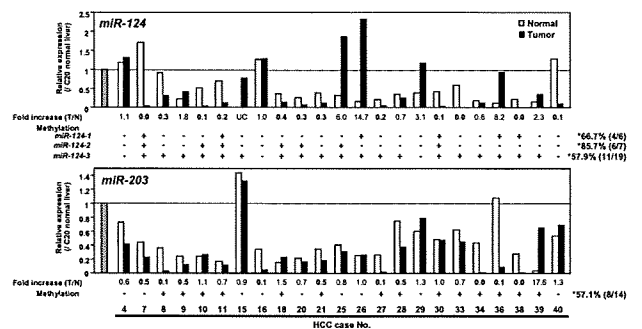


図1. miR-124とmiR-203の肝癌臨床検体におけるメチル化と発現レベル  
同一肝癌症例の腫瘍部 (Tumor) と非腫瘍部 (Normal) のセットにおいて、腫瘍特異的なメチル化の有無と発現レベルの比較を23例について行った。メチル化に伴う腫瘍特異的発現抑制は、50%以上で認められることが確認された。

これらの miRNA は、遺伝子導入により細胞増殖を負に制御すること (図 2)、ならびにこれらの miRNA の新規標的分子として、miR-124 では VIM(vimentin)、SMYD3、E2F6、IQGAP1 を、miR-203 では ABCE1 を同定した。

### D. 考察

肝癌細胞株ならびに臨床検体のゲノム・エピゲノム解析を行うことで、肝癌

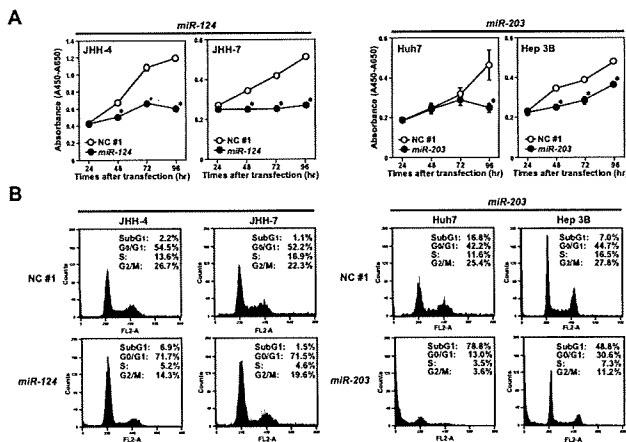


図2. miR-124とmiR-203の肝癌細胞株に対する増殖抑制作用  
 (A) Pre型miRNAの細胞導入後の細胞増殖をMTTアッセイにより評価した。  
 (B) Pre型miRNAの細胞導入72時間後の細胞周期への作用をFACSにより評価した。  
 miR-124が主にG1期での細胞周期停止を生じるのに対し、miR-203はアポトーシス誘導(sub-G1期の増加)を生じる。

特異的あるいは肝癌の悪性形質と関連するゲノムコピー数異常や DNA メチル化異常とその標的 miRNA が同定できることが証明された。新規に同定した肝癌抑制性 miRNA は、今後、肝癌の臨床病理学的因子との関連を明らかにすることでメチル化や発現を指標とした診断マーカーとしての有用性を検証することが必要であるが、一方遺伝子導入により肝癌細胞株の増殖を負に制御しうることから、治療に用いることができる可能性がある。また、miRNA 発現ならびにその DNA メチル化異常は、血中での検出が可能であることから、本課題における目標である早期発見や病態と関連するマーカーとなりうる遺伝子・遺伝子群の同定ならびに検出方法の開発に寄与する可能性が高く、今後キットかを含めた臨床応用について検討して聞くことも課題である。

## E. 結論

肝癌細胞株ならびに臨床検体のゲノム・エピゲノム解析を行うことで、肝癌

特異的あるいは肝癌の悪性形質と関連するゲノムコピー数異常や DNA メチル化異常とその標的 miRNA を同定した。今後更に計画を進めることにより、早期発見や病態と関連するマーカーとなりうる遺伝子・遺伝子群の同定ならびに検出方法の開発を実現する。

## F. 健康危険情報

総括研究報告書を参照。

## G. 研究発表

### G1. 論文発表

1. Furuta M, Kozaki K, Tanaka S, Arii S, Imoto I, Inazawa J: miR-124 and miR-203 are epigenetically silenced tumor-suppressive microRNAs in hepatocellular carcinoma. *Carcinogenesis*. 2009 Oct 20. [Epub ahead of print]
2. Tanaka S, Mogushi K, Yasen M, Noguchi N, Kudo A, Nakamura N, Ito K, Miki Y, Inazawa J, Tanaka H, Arii S. Gene-expression phenotypes for vascular invasiveness of hepatocellular carcinomas. *Surgery*. 2009 Nov 26. [Epub ahead of print]
3. Arai E, Ushijima S, Gotoh M, Ojima H, Kosuge T, Hosoda F, Shibata T, Kondo T, Yokoi S, Imoto I, Inazawa J, Hirohashi S, Kanai Y. Genome-wide DNA methylation profiles in liver tissue at the precancerous stage and in hepatocellular carcinoma. *Int J Cancer*. 2009;125:2854-62.

### G2. 学会発表

1. 井本逸勢、松村聡、小崎健一、有井滋

- 樹、稲澤譲治：ゲノムワイドな統合的 DNA メチル化異常解析による肝癌抑制遺伝子候補探索。日本人類遺伝学会第 54 回大会。東京。2009 年 9 月 26 日
2. 井本逸勢、稲澤譲治：がんの統合的ゲノム・エピゲノム解析。第 68 回日本癌学会学術総会。神奈川。2009 年 10 月 1 日
  3. 小崎健一、稲澤譲治：DNA 過剰メチル化により発現抑制される癌抑制遺伝子型 microRNA。第 68 回日本癌学会学術総会。神奈川。2009 年 10 月 2 日
  4. 田中真二、藍原有弘、茂櫛薫、ヤーセン マームット、野口典男、入江工、工藤篤、中村典明、井本逸勢、三木義男、稲澤譲治、田中博、有井滋樹：肝癌再発ネットワーク解析に基づく Aurora kinase B 分子標的治療の開発。第 68 回日本癌学会学術総会。神奈川。2009 年 10 月 1 日
  5. 新井恵吏、牛島抄織、後藤政広、尾島英知、小菅智男、細田文恵、柴田龍弘、近藤格、横井左奈、井本逸勢、稲澤譲治、廣橋説雄、金井弥栄：肝細胞がんとその前がん状態である慢性肝炎・肝硬変症におけるゲノム網羅的 DNA メチル化プロファイル。第 68 回日本癌学会学術総会。神奈川。2009 年 10 月 2 日
  6. 古田繭子、小崎健一、田中真二、有井滋樹、井本逸勢、稲澤譲治：肝細胞癌において腫瘍特異的 DNA 過剰メチル化により発現抑制される癌抑制 microRNA。第 68 回日本癌学会学術総会。神奈川。2009 年 10 月 2 日
  7. 松村聡、井本逸勢、小崎健一、有井滋

樹、稲澤譲治：肝細胞癌においてエピゲノムで制御されるがん抑制遺伝子の統合的アレイ解析。第 68 回日本癌学会学術総会。神奈川。2009 年 10 月 2 日

## H. 知的財産権の出願・登録状況

### H1. 特許取得

特になし。

### H2. 実用新案登録

特になし。

### H3. その他

特になし。