

図

右) Bモードでは、分葉エコーや索状高エコーが観察されている。
 左) 同一症例を Elastography で観察すると、膵実質は多様な色が混在してまだらに観察されている。

まだらに観察された(図)。

各高エコー所見について検討してみると、同一患者内でも点状・索状高エコー、膵管辺縁高エコーのトランスデューサー側の領域は、青で表示される部分と黄緑の部分があった。一方、分葉エコーは全例で高エコーで囲まれた内部が青主体で表示された。

D. 考察

慢性膵炎の EUS 所見については未だ曖昧な部分は残されているが、EUS 所見と組織所見との対比に関するこれまでの報告では、両者はおおむね一致するとされている。Varadarajulu ら³⁾は、早期の慢性膵炎例では EUS での実質所見と膵管所見はともに有意に組織所見に一致していたとし、また、Bhutani ら⁴⁾は、犬の膵管にステントを留置して慢性膵炎モデルを作成して EUS 所見と組織所見を比較検討しているが、同様の結果を報告している。しかしながら、EUS で観察されていた高エコー所見と組織所見を 1 対 1 対応で評価することは困難であり、各症例で観察される高エコー所見の厳密な裏付けは難しい。

今回の検討では、Bモードで観察される高エコー所見のうち、点状高エコー、索状高エコー、膵管辺縁高エコーについては、そのトランスデューサー側が必ずしも青(弾性がない)で表示された訳ではなく、高エコーに観察される所見の中には線維化以外のもの(現時点ではそれが何を反映しているかははっきり論ずることはできないが)も含まれている可能性がある。すなわち、分葉エコー以外の所見についてはその意義について再検討が必要かもしれない。し

かしながら、正常例では均一な緑・黄に観察され、早期慢性膵炎(またはその疑い)症例では全例でまだらに観察(青と緑・黄の混在)されたことから、観察している膵全体の評価といった観点から考えると、現行の早期慢性膵炎診断基準における EUS 診断項目が妥当であることは十分に考えられる。また、現行の早期慢性膵炎診断における EUS 所見には、その捉え方に術者間の相違があり曖昧な部分もある。EUS-Elastography はその曖昧さを補う意味でも有用であると考えられる。

E. 結論

早期慢性膵炎の画像診断といった観点からは、Bモード画像の曖昧さを補うことから EUS-Elastography による膵実質観察の意義はあると思われる。

F. 参考文献

1. 入澤篤志. Rosemont 分類と早期慢性膵炎 EUS 所見. 膵臓2009; 24: 685-693.
2. 厚生労働省難治性膵疾患に関する調査研究班, 日本膵臓学会, 日本消化器病学会. 慢性膵炎臨床診断基準2009. 膵臓 2009; 24: 645-646.
3. Varadarajulu S, Eltoun I, Tamhane A, et al. Histopathologic correlates of noncalcific chronic pancreatitis by EUS: a prospective tissue characterization study. *Gastrointest Endosc.* 2007; 66: 501-9.
4. Bhutani MS, Ahmed I, Verma D, Xiao SY, Brining D. An animal model for studying endoscopic ultrasound changes of early chronic pancreatitis with histologic correlation: a pilot study. *En-*

doscopy. 2009; 41: 352-6.

G. 研究発表

1. 論文発表 該当なし
2. 学会発表
 - 1) 阿部洋子, 入澤篤志, 渋谷悟朗, 二階堂暁子, 山部茜子. EUS Elastography による早期慢性膵炎の評価 —Bモード画像との対比—. 日本膵臓学会大会. 山形. 2012年6月29日
 - 2) 阿部洋子, 入澤篤志, 渋谷悟朗, 二階堂暁子, 山部茜子. EUS Elastography による早期慢性膵炎 EUS 所見の観察 —True or Fake—. 第99回日本消化器病学会総会. 鹿児島. 2013年3月23日

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)

1. 特許取得 該当なし
2. 実用新案登録 該当なし
3. その他 該当なし

Twinkling artifact は慢性膵炎の膵機能画像として使えるのか

研究報告者 阪上順一 京都府立医科大学大学院医学研究科消化器内科学 講師

共同研究者

保田宏明，十亀義生，加藤隆介，土井俊文，伊藤義人
(京都府立医科大学大学院医学研究科消化器内科学)

片岡慶正 (大津市民病院，京都府立医科大学大学院医学研究科消化器内科学)

【研究要旨】

慢性膵炎の診断において膵石の確認は重要な診断根拠となる。慢性膵炎の臨床症状・徴候があった場合，最初に行われる画像診断は腹部超音波検査であるが，Bモードのみによる膵石エコーの確認は必ずしも容易でない。本各個研究プロジェクトでは，近年提唱されているカラードプラ法による twinkling artifact が膵石エコーの診断上どのような役割を果たすかを確認した。ファントム実験では，膵石の主成分である炭酸カルシウム50 mg 以上，300%(w/w)以上で twinkling artifact を認めた。PFD 試験とグルカゴン負荷試験を実施した膵石症例(男女比=22:10，年齢=64.2±12.0歳)の59.3%に twinkling artifact を認めた。Twinkling artifact を認めた膵石症例は認めなかった症例に比して，PFD 試験での尿中 BAPA 排泄率が低下傾向(57.4±21.2% vs 62.4±18.7%，P=0.29)，グルカゴン負荷試験での Δ CPR(6分)が低下(1.71±1.50 ng/ml vs 3.35±1.23 ng/ml，P=0.0026)していた。

Twinkling artifact は簡便，無侵襲，短時間で確認可能である。Twinkling artifact は結晶化した微量の膵石でも視認できる可能性があり，慢性膵炎の診断効率を向上させうる。また，twinkling artifact が確認できた場合，膵外分泌機能は低下傾向にあり，膵内分泌機能が低下していることが多いので，膵機能が低下した慢性膵炎の見逃しを防止しうる。

A. 研究目的

2001年慢性膵炎臨床診断基準において，「腹部超音波検査(US)において，音響陰影を伴う膵内の高エコー像(膵石エコー)が描出される」あるいは「X線CT検査(CT)において膵内の石灰化が描出される」ことが慢性膵炎の確診所見と定義されていた。しかし，2009年慢性膵炎臨床診断基準では，「膵管内の結石」，「膵全体に分布する複数ないしび漫性の石灰化」が慢性膵炎の確診所見と定義された。このため，膵実質に部分的に存在する膵石は慢性膵炎の診断根拠とならず，膵石の存在が慢性膵炎の存在と同義ではなくなったが，依然として，膵石の確認は慢性膵炎の診断において重要な役割を担っている。

一方，慢性膵炎を疑った場合に最初に行う画像診断は腹部超音波検査である¹⁾。しかし，膵石のもつ臨床的意義は大きい，腹部超音波検査 Bモードにおいて膵内の高輝度病変が膵石

か否か判断に苦慮する場合が多い²⁾。

1996年に腹部超音波検査 Bモードにカラードプラ法を追加することで各種石灰化病巣に twinkling artifact が発現することが報告され³⁾，膵石でも twinkling artifact がみられることが報告されている⁴⁾。

本各個研究プロジェクトは，膵石症における twinkling artifact の出現が慢性膵炎診断にどのような意義を持つのかを確認することを目的とした single center study である。

B. 研究方法

1. ファントム実験

膵石の主成分であるカルサイト型炭酸カルシウム⁵⁾ 1 mg，5 mg，10 mg，50 mg を設置し，twinkling artifact の有無を検討した。

他方，セクレチン負荷後の内視鏡採取でえられたヒト純粋膵液に懸濁し，1%，5%，50%，100%，200%，300%(W/W)を50 mg 設置し，

twinkling artifactの有無を検討した。いずれの検討も炭酸カルシウムの視野深度は45 mmに設置した。

2. Twinkling artifact 発現の有無の検討

PFD試験とグルカゴン負荷試験を行った膵石症32例(男女比=22:10, 年齢=64.2±12.0歳)における twinkling artifact 出現の有無を検討した。PFD試験は6時間蓄尿中のPABA排泄率を求めた。グルカゴン負荷試験はグルカゴン1mg 静注前, 静注6分後の血中CPRを測定し, Δ CPRを求めた。

超音波機器はAplioXG, EUB8500, α 10, SSD6500のいずれかで実施した。

C. 研究結果

1. ファントム実験

炭酸カルシウム1mg, 5mg, 10mgでは twinkling artifactの出現はみられなかったが, 50mgで出現した。ヒト純粋膵液に懸濁した炭酸カルシウムでは, 1%, 5%, 50%, 100%, 200% (w/w)では twinkling artifactの出現はみられなかったが, 濃度300% (w/w)で twinkling artifactを認めた。(図1, 図2)

2. Twinkling artifact 発現の有無の検討

膵石症例32例中19例(59.3%)に twinkling artifactを認めた。Twinkling artifactを認めた膵石症例は認めなかった症例に比して, PFD試験での尿中BAPA排泄率が低下傾向(57.4±21.2% vs 62.4±18.7%, P=0.29), グルカゴン負荷試験での Δ CPR(6分)が低下(1.71±1.50 ng/ml vs 3.35±1.23 ng/ml, P=0.0026)していた。(図3)

D. 考察

2009年慢性膵炎臨床診断基準では, 「膵管内の結石」, 「膵全体に分布する複数ないしび慢性的石灰化」が慢性膵炎の確診所見と定義されるようになり, 部分的な「膵実質内石灰化」は慢性膵炎の確診所見ではなくなった。膵石灰化に検出率の高い方法はX線CTであるが, 慢性膵炎の拾い上げ診断は経腹超音波画像である。腹部臓器の点状石灰化の検出に twinkling artifactが有効である報告がある。膵石の59.3%に twinkling artifactを認め, 通常のB mode画像より飛躍的に視認性が向上した。ヒト膵液と炭酸カルシウムを用いたファントム実験では, 50mg 300% (w/w)以上で twinkling artifactが出現した。このことは, 比較的結晶化した膵石

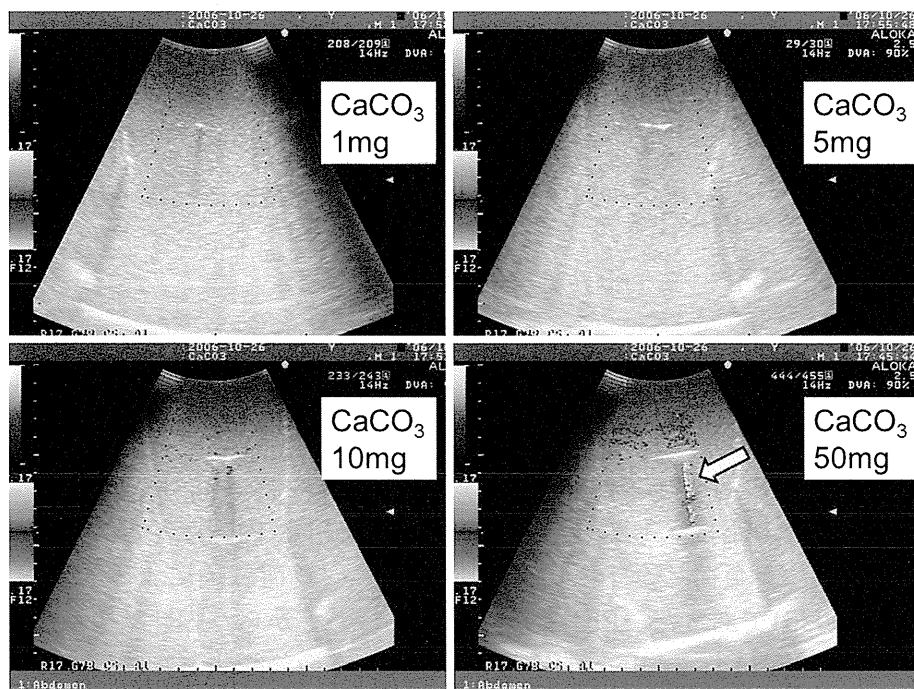


図1 炭酸カルシウムの質量による twinkling artifact 出現の有無
矢印; twinkling artifact

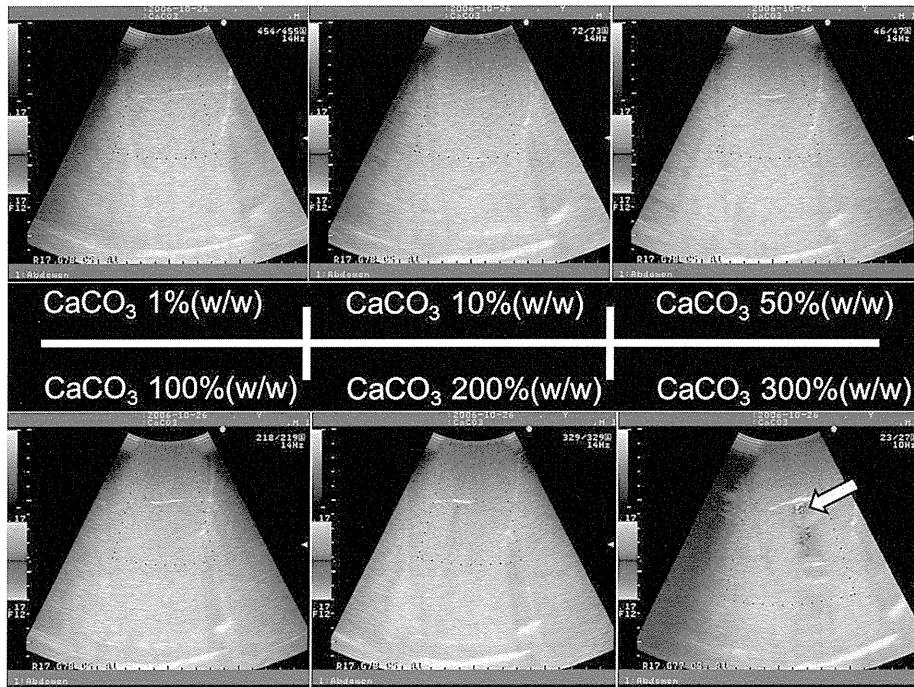


図2 炭酸カルシウムの濃度による twinkling artifact 出現の有無
矢印； twinkling artifact

外分泌(PABA) 内分泌(Δ CPR)

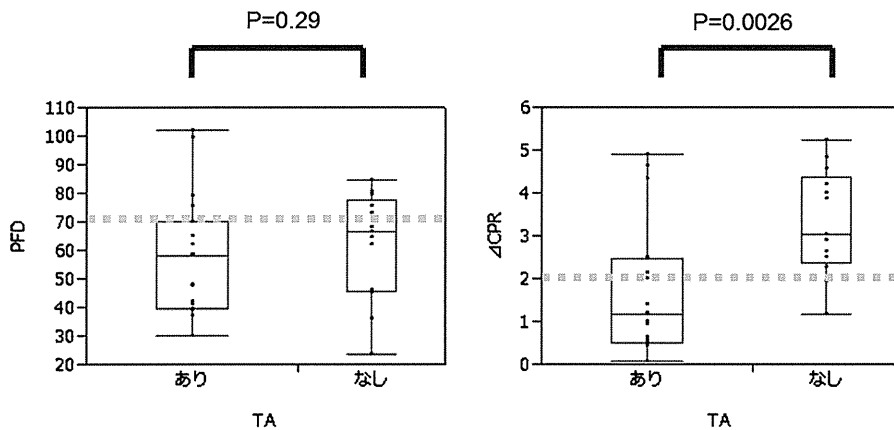


図3 Twinkling artifactの有無によるPFD試験，グルカゴン負荷試験の成績
PFD；尿中PABA排泄率(%)
 Δ CPR；グルカゴン負荷前と6分後の血中CPRの差(ng/ml)
点線；カットオフ値(PFD 70%， Δ CPR 2 ng/ml)

が50 mg 以上という微量の存在で twinkling artifact が検出可能である可能性を示唆している。

twinkling artifact(+)の膵石症例は twinkling artifact(-)の膵石症例に比して，PFDが低下傾向(P=0.29)，グルカゴン負荷試験での Δ CPRで有意に低下(P=0.0026)であった。PFD試験の結果から，膵石の存在は twinkling artifactの有無にかかわらず，膵外分泌機能が低下していることを示唆するが，twinkling artifactが

確認されれば，より高度な障害がある可能性がある。

今回の検討では，twinkling artifactのある膵石症例では内因性インスリン分泌能を示すグルカゴン負荷試験による Δ CPRが有意に低値であることから，膵性糖尿病の拾い上げに対する機能画像診断法として期待できる。

E. 結論

膵石エコーを疑った場合に、twinkling artifactを確認することは簡便、無侵襲、短時間で検索可能である。Twinkling artifactは結晶化した微量の膵石で確認できる可能性があり、慢性膵炎の診断効率を向上させることが期待できる。また、twinkling artifactが確認できた場合、膵外分泌機能は低下傾向にあり、膵内分泌機能が低下していることが多いので、膵機能が低下した慢性膵炎の見逃しを防止しうる可能性がある。

2. 実用新案登録 該当なし
3. その他 該当なし

F. 参考文献

1. 慢性膵炎診療ガイドライン2009. 日本消化器病学会編. 南江堂.
2. Bolondi L, Li Bassi S, Gaiani S, et al. Sono graphy of chronic pancreatitis. Radiol Clin North Am. 27: 815-833, 1989.
3. Rahmouni A, Bargoin R, Herment A, et al. Color Doppler twinkling artifact in hyperechoic regions. Radiology. 199: 269-271, 1996.
4. Tsao TF, Kang RJ, Tyan YS, et al. Color Doppler twinkling artifact related to chronic pancreatitis with parenchymal calcification. Acta Radiol. 47: 547-548, 2006.
5. Moore EW, Verine HJ. Pancreatic calcification and stone formation: a thermodynamic model of calcium in pancreatic juice. Am J Physiol. 252: G707-G718, 1987.

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 阪上順一. やれば面白い膵疾患の経腹超音波診断～膵エコーを敬遠しないで！超音波検査技術 2013; 38: 648-649.

2. 学会発表

- 1) 阪上順一. 胆膵：スクリーニング超音波 & ちょっと一工夫した超音波. 日本超音波医学会第40回関西地方会 講習会. 大阪. 2013年11月9日

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)

1. 特許取得 該当なし

十二指腸切除術後の膵液瘻予測因子としての内臓脂肪の重要性

研究報告者 竹山宜典，近畿大学医学部外科学肝胆膵部門 主任教授

共同研究者

荒木麻利子，亀井敬子，中多靖幸，石川 原，中居卓也
(近畿大学医学部外科学肝胆膵部門)

【研究要旨】

膵頭十二指腸切除術後の膵液瘻(pancreatic fistula: PF)は膵頭十二指腸切除術の10-30%に発生するとされ、時に致命的経過をたどり、未だ克服し得ない合併症である。一般に、腹部手術における合併症発生リスク因子として肥満症が知られているが、肥満の中でもメタボリックシンドロームと言われる内臓脂肪過多の評価は不明である。本研究では、膵頭十二指腸切除術症例における術後のPF発生と、術前の内臓脂肪量を含めた代謝栄養状態や周術期の臨床データなどとの関連を検討した。その結果、内臓脂肪量 104 cm² 以上を cut-off 値と定めると、感度0.857，特異度0.784で術後のPF合併が予測可能であった。内臓脂肪量が膵頭十二指腸切除術後のPFの術前予測因子として有用であることが示された。内臓脂肪過多がPFを引き起こす機序に関しては現時点では不明であり、今後の検討課題と考えられる。

A. 研究目的

近年、食生活の変化や運動不足に伴い肥満症例に対して手術を行う機会が増加している。以前より、腹部外科手術において周術期合併症と肥満症との関連が指摘されており¹⁻⁷⁾、膵切除術においても同様の報告が数件認められる⁸⁻¹²⁾。しかし、その大半が欧米からの報告であり、主にその指標としてBMIが用いられている。我々アジア人においてはBMI \geq 30の超肥満者は限られており、本邦で実際の臨床で対象となる症例には参考とし難い可能性も否定できない。また、肥満にはメタボリックシンドロームに定義されるような内臓脂肪型のタイプと、一般に女性に多いとされる皮下脂肪型のタイプとがあり、メタボリックシンドロームは糖尿病や動脈硬化性疾患の危険性を高め本邦でもその予防や治療力が注がれている。日本のメタボリックシンドロームの診断基準には内臓脂肪面積 \geq 100 cm²に相当するものとしてウエスト周囲径(男性 \geq 85 cm，女性 \geq 90 cm)が必須項目となっている。今回、我々は膵頭十二指腸切除術後のPFの術前予測因子としての肥満の意義を内臓脂肪に注目して、周術期危険因子と

ともに検討を行った。

B. 研究方法

対象は、2011年7月から2013年2月の期間中に近畿大学医学部附属病院外科・肝胆膵部門で膵頭十二指腸切除術を施行した症例のうち44症例である。

肥満の評価は①体重，②Body mass index (BMI)，CT検査での臍の高さにおける③皮下脂肪面積，④内臓脂肪面積を使用した。CTにおける脂肪面積の計測はAZE株式会社AZE VirtualPlace WSシリーズ，面積測定ソフトウェアを用い測定した。CTは術前検査(術前1ヶ月以内)として撮影された画像を使用した。BMIは手術目的に外科入院1ヶ月前以内の測定値を元に計算した。PFの定義は200年に発表されたInternational Study Group on Pancreatic Fistula (ISGPF)の定義¹³⁾に従った。検討症例における膵切除後の再建方法は膵胃合陥入法30例，膵空腸粘膜吻合法が14例であった。

解析数値は、平均値 \pm 標準偏差で示した。統計学的解析は、2群間の平均値の差にはMann-Whitney(両側)検定、頻度の差には χ^2 検定を

用いた. $p < 0.05$ を有意差有りとして判定した. 肥満の各指標の PF 予測に対する有用性の検討は受信者動作特性曲線(receiver operator characteristic curve: ROC 曲線)を用いて, ROC 曲線下の面積(Area under the curve: AUC)を計測することにより至適 cut-off 値を決定した. 統計解析ソフトは, SPSS II(SPSS Inc, Chicago, IL)を用いた.

C. 研究結果

44症例(男性22例, 女性22例)に対して膵頭十二指腸切除術が施行され, 平均年齢は66.6歳であった. 疾患背景は, 膵癌が43%, IPMN 及び IPMC が16%, 胆管癌や乳頭部癌などその他の症例が41%であった. (表)

PF 合併群は 8 例, 対照群は36例で, PF は全体の18%に認められ, 一般に報告されている頻度と相応の結果であった. 両群の年齢, 疾患背景に差はなく, 術前状態としては, Triglyceride 値の上昇, 内臓脂肪面積及び内臓脂肪割合高値症例において, PF 発生が多い結果であった.

上記より, 今回の検討では PF 発生の術前リスク因子として内臓脂肪高値と血清 triglyceride 高値が有用である可能性が示された. それらは同一のメタボリックシンドロームの病態を反映している可能性が考えられ, BMI では評価し得ない内臓脂肪型肥満の影響を推察する結

果であった. 内臓脂肪面積について ROC 曲線を作成し(図 1), 至適 cut-off 値を求め, PF との関連を検討した. Cut-off 値 104 cm^2 以上の症例において, PF ($p = 0.015$)の発生も有意差をもって認められた. (図 2)また, データは示さないが内臓脂肪面積高値と手術時間など術中因子との関連は認められなかった.

D. 考察

今回の検討で, 術前のパラメーターで PF 発生に有意に寄与していたのは, 性別(男性), 血清トリグリセリド, 内臓脂肪面積, 内臓脂肪割合であり, 一般的な栄養指標である BMI, Alb, 総コレステロール, リンパ球数, 皮下脂

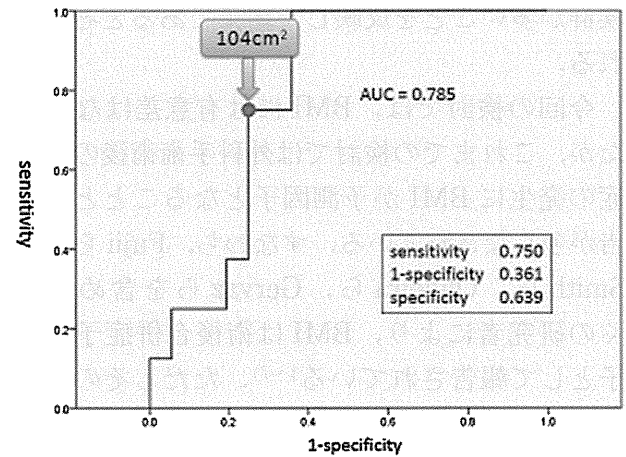


図 1 膵液漏発生予測における内臓脂肪面積の至適 cut-off 値(ROC 解析)

表 術前栄養指標・体脂肪量と膵液漏

パラメーター	全体 44例	PFあり 8例(18%)	PFなし 36例(82%)	P value
BMI	22.5±3.0	24.1±4.2	22.1±2.7	0.235
血清 Alb(g/ml)	4.0±0.7	4.2±0.5	4.0±0.7	0.604
血清 総コレステロール(mg/dl)	210±42	215±49	210±42	0.915
血清 トリグリセリド(mg/dl)	148±82	210±85	134±75	0.006
末梢血リンパ球数(/mm ³)	1992±834	2114±994	1965±808	0.584
HbA1c(%)	6.4±1.1	6.8±0.7	6.4±1.2	0.316
糖尿病	10(23%)	3(38%)	7(19%)	0.355
皮下脂肪面積(cm ²)	135±62	134±42	132±63	0.927
内臓脂肪面積(cm ²)	97±44	134±42	89±41	0.013
全体脂肪面積(cm ²)	222±55	272±82	213±69	0.187
内臓脂肪割合(%)	43.0±12.7	51.6±8.9	41.0±12.7	0.045

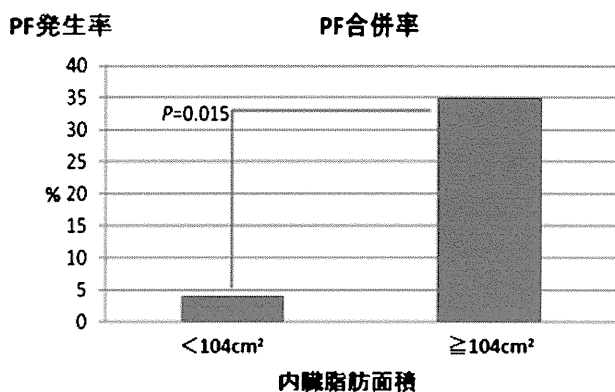


図2 内臓脂肪面積によるPF合併率の差異

肪面積，総脂肪面積には腓液漏発生の有無で有意差を認めなかった。

性別が有意な因子となっていることは，女性に皮下脂肪型肥満が多いのに対して，男性では内臓脂肪型肥満が多いいわゆるメタボリック症候群が多いことを反映した結果であると考えられる。

今回の検討では，BMIには有意差はなかったが，これまでの検討では外科手術後の合併症の発生にBMIが予測因子となることとの報告が多くなされている。すなわち，Fujiiらや，Smithら，Oliveiraら，Gervazらを含めた多くの研究者により，BMIは術後合併症予測因子として報告されている^{1~7)}。ただしその多くは，結腸切除を対象としたものであり，さらに最近の報告の多くが鏡視下手術を対象としている。結腸手術などの下腹部の手術では，内臓脂肪というよりは，厚い皮下脂肪が操作の妨げになることが考えられる。

一方，腓手術の術後合併症と術前BMIの相関に関しては，支持する報告と支持しない報告に分かれているが，Williamsらは，BMIの増加が，単なる手術創の感染ではなく，腹腔内の重篤な合併症発生と相関し，それは手術時間と出血量の増加によるものと考察している⁸⁾。

しかし，今回の結果では，BMIはPF発生に関与せず内臓脂肪量増加が関与するという結果であった。その機序として，炎症反応の修飾の関与の可能性も考慮すべきである。今回の我々の内臓脂肪面積のカットオフ値104cm²は，内臓脂肪型肥満の定義である内臓脂肪面積100cm²以上とほぼ一致した結果であり¹⁴⁾，い

わゆるメタボリック症候群が惹起されていると考えるべきである。内臓脂肪型肥満では脂肪細胞とマクロファージの相互作用により常に慢性炎症反応が励起されていると考えられるが，内臓脂肪過多はマクロファージ反応をはじめとする局所の炎症反応を促進して，吻合部の治癒過程に影響した可能性がある。今後，ドレーン排液中の炎症マーカーなどの測定を行って，詳細な解析を行う予定である。また，今回の解析では，術前血清トリグリセリド値も，PF予測因子として有用である可能性が示された。しかし，血清トリグリセリドはコレステロールとは異なり，測定前の食事に大きく影響を受ける指標である。これを，PF予測指標として良いかは，その測定条件などの詳細な検討が必要であると考えている。

E. 結論

内臓脂肪面積の増加が，腓頭十二指腸切除後のPF発生を予測しえることが示され，術前の手術リスクを判定するうえで有用な情報になると考えられた。

F. 参考文献

1. Bardou, M., A. N. Barkun, and M. Martel, Obesity and colorectal cancer. *Gut*, 2013; 62(6): 933-947.
2. Kartheuser, A. H., et al., Waist circumference and waist/hip ratio are better predictive risk factors for mortality and morbidity after colorectal surgery than body mass index and body surface area. *Ann Surg*, 2013; 258(5): 722-30.
3. Yanquez, F. J., et al., Synergistic effect of age and body mass index on mortality and morbidity in general surgery. *Journal of Surgical Research*, 2013; 184(1): 89-100.
4. Bhayani, N. H., et al., Effect of metabolic syndrome on perioperative outcomes after liver surgery: A National Surgical Quality Improvement Program (NSQIP) analysis. *Surgery*, 2012; 152(2): 218-226.
5. Amri, R., et al., Obesity, outcomes and quality of care: body mass index increases the risk of

wound-related complications in colon cancer surgery. The American Journal of Surgery, 2013.

6. Khavanin, N., et al., The influence of BMI on perioperative morbidity following abdominal hysterectomy. Am J Obstet Gynecol, 2013; 208(6): p. 449 e1-6.
7. Svatek, R. S., et al., Age and Body Mass Index Are Independent Risk Factors for the Development of Postoperative Paralytic Ileus After Radical Cystectomy. Urology, 2010; 76(6): 1419-1424.
8. Williams, T. K., et al., Impact of Obesity on Perioperative Morbidity and Mortality after Pancreaticoduodenectomy. Journal of the American College of Surgeons, 2009; 208(2): 210-217.
9. Muscari, F., et al., Risk factors for mortality and intra-abdominal complications after pancreaticoduodenectomy: multivariate analysis in 300 patients. Surgery, 2006; 139(5): 591-8.
10. Ho Kyoung Hwang¹, J. S. P., Chan-il Park², Jae Keun Kim¹, Dong Sup Yoon¹, Y.U.C.o.M. Departments of ¹Surgery and ²Pathology, and S.K. Seoul, The Impact of Body Mass Index on Pancreatic Fistula After Pancreaticoduodenectomy in Asian Patients on the Basis of Asia-Pacific Perspective of Body Mass Index. JOP. J Pancreas (Online) 2011 Nov 10; 12(6): 586-592.
11. Roger Noun¹, E. R., Claude Ghorra², Thierry Yazbeck¹, Cyril Tohme¹, et al., The Impact of Obesity on Surgical Outcome after Pancreaticoduodenectomy. JOP. J Pancreas (Online) 2008; 9(4): 468-476.
12. Gaujoux, S., et al., Fatty pancreas and increased body mass index are risk factors of pancreatic fistula after pancreaticoduodenectomy. Surgery, 2010; 148(1): 15-23.
13. Bassi, C., et al., Postoperative pancreatic fistula: an international study group (ISGPF) definition. Surgery, 2005; 138(1): 8-13.
14. 日本肥満学会編. 肥満症の診断基準. 肥満症診

断基準ガイドライン2011. 肥満研究 2011; 17 (臨時増刊号): 9-28.

G. 研究発表

1. 論文発表 該当なし
2. 学会発表 該当なし

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)

1. 特許取得 該当なし
2. 実用新案登録 該当なし
3. その他 該当なし

膵性糖尿病治療におけるインクレチン関連薬の位置づけ

研究報告者 丹藤雄介 弘前大学大学院保健学研究科医療生命科学領域 講師

共同研究者

柳町 幸, 今 昭人, 近澤真司, 佐藤江里, 松本敦史, 松橋有紀, 田中 光

(弘前大学医学部附属病院内分泌代謝内科学)

中村光男 (弘前市医師会検診センター)

【研究要旨】

膵性糖尿病は膵疾患に伴う2次性糖尿病であり、膵内外分泌機能障害の両者が存在する。食事制限による低栄養やインスリン治療中の低血糖発作が発症しやすく、1次性糖尿病よりも高めの血糖値にコントロールされる場合が多い。しかし、膵性糖尿病も1次性糖尿病と同様、細小血管障害や大血管障害の発症や進展を予防することが必要である。消化酵素補充療法に加え、段階的な糖尿病治療強化が必要である。現在の膵性糖尿病治療において、インクレチン関連薬の明確な位置づけはされていない。そこで、今年度はインスリンとの併用治療が可能であるDPP-4阻害薬の膵性糖尿病治療における位置づけについて検討した。対象とした膵性糖尿病4症例すべてにおいて血糖コントロールの改善が得られた。また、僅かではあるがインスリン分泌能を示すCPI(C-peptide index)の上昇を認めた。膵性糖尿病治療にDPP-4阻害薬を用いることで血糖コントロール改善に加え、インスリン分泌能の改善が得られる可能性が示唆された。

A. 研究目的

膵性糖尿病治療におけるDPP-4阻害薬の位置づけについて検討した。

B. 研究方法

対象は当科外来通院中の膵性糖尿病4症例(男性3例, 女性1例), 年齢は 61 ± 13 歳(50~80歳)である(表1)。原因疾患はアルコール性慢性膵炎2例, 膵切除術後が2例, 全例インスリン治療をおこなっていた(表1)。インフォームドコンセントにより承諾が得られた後, DPP-4阻害薬を投与した。

DPP-4阻害薬投与前と投与後で以下の項目

を測定, 調査した。

1) 身長, 体重を測定し, Body mass index (BMI)を算出。

2) 栄養指標として血中アルブミン値(ALB)を測定。

3) インスリン分泌能の評価はCPI(C-peptide index)を用いた¹⁾。

$CPI = C\text{-peptide}(\text{ng/ml}) \times 100 / \text{血糖値}(\text{mg/dl})$

4) 血糖コントロールの評価はHbA1c(NGSP)を用いた。

5) インスリン必要量は投与インスリン総量(U)/体重(kg)で評価した。

4) に関しては投与開始から2013年1月までの

Table 1 膵性糖尿病症例の背景

症例	性別	年齢(歳)	原因疾患	投与インスリン	経口薬
1	F	58	膵切除術後	ヒューマログミックス50	シタグリブチン50 mg
2	M	50	アルコール性慢性膵炎	ヒューマログミックス50 レベミルフレックスペン	アログリブチン12.5 mg
3	M	80	膵切除術後	ノボリン30R ノボリンR	シタグリブチン25 mg
4	M	56	アルコール性慢性膵炎	ノボラビッド70ミックス ノボラビッド30ミックス	アカルボース150 mg シタグリブチン25 mg

経過を追跡した。1), 2), 3), 5) に関しては、投与前と投与5ヶ月後の結果を比較した(症例2は3ヶ月後)。

症例1はDPP-4阻害薬投与前後にCGMs (continuous glucose monitoring system) を施行し、血糖変動の違いについても比較検討した。

C. 研究結果

DPP-4阻害薬投与前、BMIは $24.6 \pm 0.6 \text{ kg/m}^2$ とやや高値、ALB値は $4.07 \pm 0.25 \text{ g/dl}$ と正常で栄養状態は良好であった。CPIは 0.54 ± 0.26 と低下し、体重1kgあたりの使用インスリン量は $0.53 \pm 0.25 \text{ U/kg}$ と1型糖尿病患者の必要インスリン量と同程度であった。HbA1cは $8.32 \pm 0.49\%$ と血糖コントロールは不可の状態であった。DPP-4阻害薬投与後、4症例ともHbA1c値は低下傾向を示した(図1a)。BMIは $24.1 \pm 0.8 \text{ kg/m}^2$ と著変なかったが、ALB値は測定し得た3例中2例で低下していた(図1b)。CPIは 0.62 ± 0.49 と軽度上昇していたものの有意な変化ではなかった(図1b)。体重1kgあたりの使用インスリン量も $0.54 \pm$

0.30 U/kg と著変なかった(図1b)。低血糖発作の回数は、減少1例、不変3例であった。症例1でCGMを施行した。DPP-4阻害薬の投与後にインスリン投与量は減量し得たが、朝昼夕食後の血糖値上昇を抑制することはできなかった。また、血糖値が70~200 mg/dlの範囲でコントロールされていた割合は投与前71%、投与後69%とほとんど差はなかった(図2)。

D. 考察

膵性糖尿病は膵内外分泌機能障害の両者が存在するため、食事制限による低栄養発症リスクの上昇やインスリン治療中の低血糖発作の発症リスクが高く、1次性糖尿病よりも高めに血糖値をコントロールする人が多い。しかし、膵性糖尿病患者においても長期予後を良好に保つためには、1次性糖尿病同様、細小血管障害や大血管障害の発症、進展を予防する血糖コントロールが必要である。膵性糖尿病治療では消化酵素補充療法に加え、1次性糖尿病と同様に段階的な治療強化が必要であるが、多くはインスリン分泌能の低下を認めるため治療開始当初からインスリン治療を行う場合が多い。インスリ

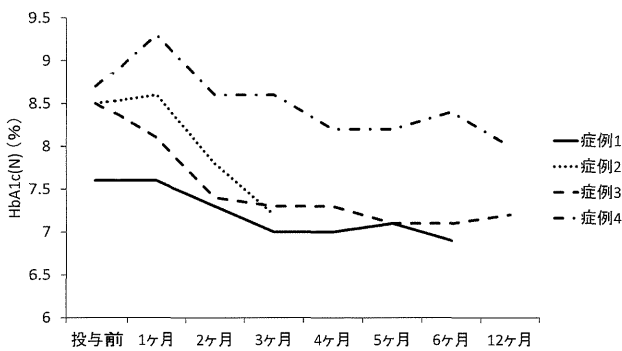


図 1a DPP-4 阻害薬投与前後の HbA1c の変動

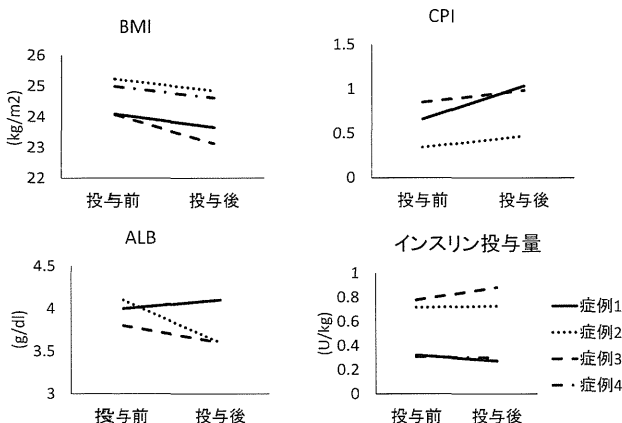


図 1b DPP-4 阻害薬投与前後の各項目の変動

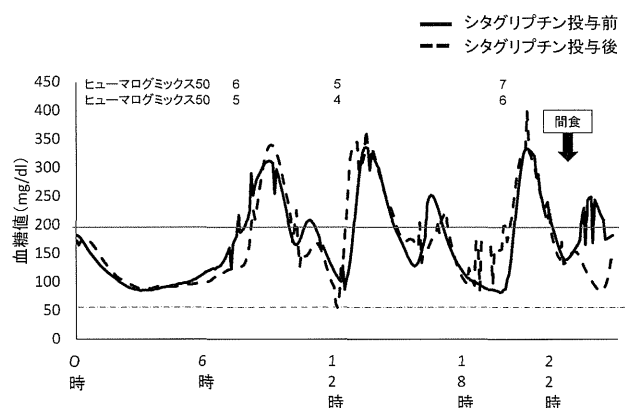
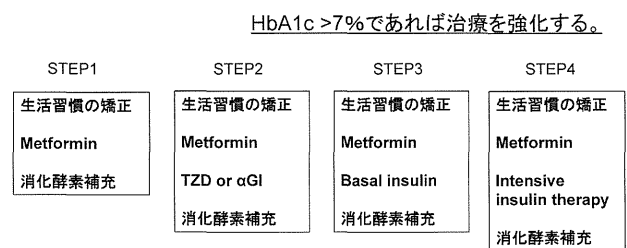


図 2 症例1におけるDPP-4阻害薬投与前後での血糖変動



DPP-4阻害薬、GLP-1アナログの投与は記載なし

図 3 膵性糖尿病治療

ン治療により血糖コントロールを良好に保つことが望まれるが、①インスリン増量による低血糖リスクが上昇すること、②慢性膵炎が原因の場合、膵実質の線維化によって膵β細胞が経過とともに減少し、1型糖尿病同様の不安定な血糖コントロールになりやすく、α細胞の減少によりインスリン治療中の重症低血糖リスクが上昇することなどから、HbA1c<7.0%を目指す治療は難しい^{2,3)}。今回対象とした症例もインスリン治療中であったが、HbA1c>7.5%と血糖コントロールは不良であり、さらなる治療強化が必要であったため、DPP-4阻害薬を追加投与した。

近年、糖尿病治療においてインクレチン関連薬 (GLP-1 作動薬, DPP-4 阻害薬) が用いられるようになり、1次性糖尿病での治療効果が注目されている。DPP-4 阻害薬はインスリン治療との併用が可能となり、1次性糖尿病の血糖コントロール改善に有用であると報告されている⁴⁾。DPP-4 阻害薬は GIP, GLP-1 濃度を上昇させ、グルコース濃度依存性のインスリン分泌能を促進する効果を有することに加え、膵β細胞の保護、増加効果も有することが示されている⁵⁾⁶⁾。膵性糖尿病ではインスリン増量による低血糖リスクが高いことや膵β細胞数が減少していることから、グルコース依存性にインスリン分泌を促進し、残存膵のβ細胞保護、増加効果が期待される DPP-4 阻害薬を治療に用いることは有用である可能性が示唆される。今回検討した症例において DPP-4 阻害薬の投与後に CPI がわずかに上昇したのみであり、長期的に投与することで CPI が更に改善するかについては検討が必要であると考えられた。

今回の検討では、インスリン治療に DPP-4 阻害薬を追加投与した後、HbA1c は 0.5~1.0% の低下が得られており DPP-4 阻害薬の膵性糖尿病治療における有効性が示唆された。ただし、Knop ら⁷⁾ が、糖尿病を有する慢性膵炎患者において、血糖値上昇に伴い GLP-1 や GIP 濃度は上昇するものの、これらインクレチンによるインスリン分泌促進効果はほとんど認められないと報告しており、膵性糖尿病ではインクレチン関連薬単独での治療効果を得ることは難

しく、今回の結果も考慮するとインスリン治療との併用療法が有用である可能性が考えられた。また、DPP-4 阻害薬にメトホルミンを併用することで血糖コントロールを改善するのみならずβ細胞機能の改善も得られるとの報告⁸⁾があり、膵性糖尿病のインスリン治療に DPP-4 阻害薬とメトホルミンの併用が有用な治療になる可能性が期待される。

今回の検討で、ALB 値が低下傾向であったことは、今後の検討課題である。長期的に低 ALB 血症が持続するか、食事摂取量や体組成成分に変化が認められるかについても評価していく必要がある。

E. 結論

膵性糖尿病治療において、DPP-4 阻害薬はインスリン治療との併用が有用である可能性が示唆されたが、現段階では膵性糖尿病治療における明確な位置づけはできなかった。今後は、DPP-4 阻害薬を長期的に膵性糖尿病の良好な血糖コントロールを維持できるか、インスリン分泌能の温存が可能かについて追跡する必要がある。また、栄養状態への影響についての評価も必要であると考えられた。

F. 参考文献

1. Saito Y, Kou K, Tanaka K, Abe T, Shimada A, Kawai T, Itoh H. Association between beta cell function and future glyceamic control in patients type 2 diabetes. *Endocr J* 2012.
2. 中村光男, 丹藤雄介. 特集: 慢性膵炎の断酒・生活指導指針. 15. 膵性糖尿病患者への対応. *膵臓* 25: 658-659, 2010.
3. Cui YF, Andersen DK. Pancreatogenic diabetes: special considerations for management. *Pancreatol* 11: 279-294, 2011.
4. Foseca V, Shweizer A, Albercht D, Baron MA, Chang I, Dejager S. Addition of vildagliptin to insulin improves glyceamic control in type 2 diabetes. *Diabetologia* 50: 1148-1155, 2007.
5. Pospisilic JA, Martin J, Doty T, EhsesJA, Pamir N, Lynn FC, Piteau S, Demuth HU, McIntosh CHS, Penderson RA. Dipeptidyl peptidase IV

inhibitor treatment stimulates β cell survival and islet neogenesis in streptozotocin-induced diabetic rats. *Diabetes* 52: 741-750, 2003.

6. Mu J, Woods J, Zhou YP, Roy RS, Li Z, Zycband E, Feng Y, Zhu L, li C, Howard AD, Moller DE, Thornberry NA, Zhang BB. Chronic inhibition of dipeptidyl peptidase-4 with a sitagliptin analog preserves pancreatic β -cell mass and function in a rodent model of type 2 diabetes. *Diabetes* 55: 1695-1704, 2006.
7. Knop FK, Vilsboll T, Hojberg PV, Larsen S, Madsbad S, Volund A, Holst JJ, Krarup T. Reduced incretin effect in type 2 diabetes. Cause or consequence of the diabetic state? *Diabetes* 56: 1951-1959, 2007.
8. Derosa G, Ragonesi PD, Carbone A, Fogari E, Bianchi L, Bonaventura A, Romano D, Cicero AFG, Maffioli P. Vildagliptin added to metformin on β -cell function after a euglycemic hyperinsulinemic and hyperglycemic clamp in type 2 diabetes patients. *Diabetes Technol Therapeutics* 14: 475-484, 2012.

G. 研究発表

1. 論文発表 該当なし
2. 学会発表 該当なし

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)

1. 特許取得 該当なし
2. 実用新案登録 該当なし
3. その他 該当なし

慢性膵炎患者における *CFTR* 遺伝子の解析

研究報告者 成瀬 達 みよし市民病院 院長

共同研究者

藤木理代，北川元二（名古屋学芸大学管理栄養学部管理栄養学科）

石黒 洋，山本明子（名古屋大学総合保健体育科学センター）

中莖みゆき，近藤志保（名古屋大学大学院健康栄養医学）

洪 繁（慶應義塾大学医学部システム医学）

【研究要旨】

膵導管細胞において $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ 輸送を担う *CFTR* の遺伝子多型と慢性膵炎との関連を，慢性膵炎患者（アルコール性70人，特発性18人）および健常人180人を対象に解析した．その結果，遺伝子多型 L1156F のアレル頻度が，アルコール性慢性膵炎患者では5.0%であり，健常群の0.6%に比べ有意な高値を示した ($p < 0.01$)．L1156F を持つ者の汗中 Cl^- 濃度は，アルコール性慢性膵炎患者4名のうち3名が基準値以上 ($60 \text{ mM} <$) で，特発性慢性膵炎患者1名は境界値 (58.9 mM) であった．L1156F を有する者は M470V も有していた．L1156F および M470V を強制発現させた HEK293 細胞では，野生型に比べ，*CFTR* タンパクの発現量が減少していた．この傾向は，L1156F または M470V 単独よりも，両者をもつ場合に顕著であった．

A. 研究目的

Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (*CFTR*) は上皮細胞に発現する cAMP 依存性のイオンチャンネルで， Cl^- および HCO_3^- 輸送を担っている．膵嚢胞性線維症 (cystic fibrosis; CF) は *CFTR* 遺伝子の変異によって発症する常染色体劣性疾患で，気道，腸管，膵管，胆管，汗管，輸精管などのイオンおよび水輸送が障害される¹⁾．*CFTR* は汗腺では Cl^- の再吸収に必要なため，*CFTR* 機能が低下すると汗の Cl^- 濃度が高くなる．慢性膵炎患者の約半数の汗中 Cl^- 濃度は，基準値 (60 mM) を超える高濃度を示す²⁾．

私たちはこれまでに，日本人の慢性膵炎患者における *CFTR* 遺伝子多型を解析してきた³⁾．本研究では，アルコール性慢性膵炎患者に多く見られる L1156F 多型と疾患との関連を解析した．

B. 研究方法

インフォームドコンセント（名古屋大学医学研究科倫理委員会にて承認を得た「慢性膵炎に

おける膵炎関連遺伝子の検討」，承認番号 114-2) を得た慢性膵炎患者（アルコール性70人，特発性18人），健常人180名を対象に，末梢血から白血球由来の DNA を抽出した．*CFTR* 遺伝子翻訳領域を PCR 法により増幅し，直接シーケンス法で遺伝子配列を決定した．汗中 Cl^- 試験は，親指の指腹からの自然発汗の Cl^- 濃度を高感度 Cl^- 電極を用いて測定した．*CFTR* タンパクの発現は，HEK293 細胞に野生型または変異型 *CFTR* を強制発現させ，ウエスタンブロッティングで検出した．統計解析には χ^2 検定を用いた．

C. 研究結果

L1156F のアレル頻度 (表 1)

L1156F のアレル頻度は，アルコール性慢性膵炎患者では5.0%であり，健常群の0.6%に比べ有意な高値を示した ($p < 0.01$)．

汗中 Cl^- 濃度 (表 2)

L1156F を持つ者の汗中 Cl^- 濃度は，アルコール性慢性膵炎患者4名のうち3名が基準値以上 ($60 \text{ mM} <$) で，特発性慢性膵炎患者1

名は境界値(58.9 mM)であった。

L1156F 多型を持つ患者の遺伝子型(表 2)

L1156F を有する者 8 名は、全員 M470V も有していた。また、8 名中 2 名は Q1352H 多型を有していた。

CFTR タンパクの発現(図 1)

L1156F および M470V を強制発現させた HEK293 細胞において、CFTR タンパクの発現量は、野生型に比べ $60 \pm 10\%$ に有意に減少していた ($p < 0.01$)。L1156F または M470V

の単独発現の場合は減少傾向にあったが有意ではなかった。

D. 考察

日本における CF の発症率は極めて低く⁵⁾、これまで報告のある日本人の CFTR 遺伝子変異も世界的に極めて稀なタイプのものである^{6~8)}。私たちはこれまでに日本人の慢性膵炎患者の CFTR 機能(汗中 Cl^- 濃度測定)²⁾ や CFTR 遺伝子多型を解析し、日本における慢性膵炎と CFTR 遺伝子との関連を示してきた^{2,3,9)}。

L1156F は他の人種では報告が無く、日本人に特異的な多型である⁹⁾。L1156F をもつ患者は M470V も有していた。CFTR タンパクの発現量は、L1156F または M470V の単独よりも、両者をもつ場合に減少が顕著であった。これまでに報告のある Q1352H および R1453W においても、M470V を合わせ持つことで CFTR

表 1 L1156F 多型のアレル頻度

	ACP N=140	ICP n=36	NS n=360
L1156F			
Leu	133(95.0%)	35(97.2%)	358(99.4%)
Phe	7(5.0%)*	1(2.8%)	2(0.6%)

* : $p < 0.01$ vs. NS by Yates Chi square test

ACP: alcoholic chronic pancreatitis

ICP: idiopathic chronic pancreatitis

NS: normal subjects

表 2 L1156F 多型を持つ患者の遺伝子型および特徴

	CFTR genotypes	Sex	Age	Etiology	Pancreatic Stone	Sweat[Cl^-]
1	L/F1156+V/V470+Q/H1352	M	59	alcoholic	+	
2	L/F1156+V/V470	M	65	alcoholic	+	42.0
3	L/F1156+V/V470	M	49	alcoholic		
4	L/F1156+M/V470+Q/H1352	M	57	alcoholic	+	88.9
5	L/F1156+M/V470	M	60	alcoholic	+	67.0
6	L/F1156+M/V470	M	56	alcoholic	+	98.9
7	L/F1156+M/V470	M	51	alcoholic	+	
8	L/F1156+M/V470	F	73	idiopathic	+	

Genotypes of CFTR indicate presence of L1156F, Q1352H, and M470V.

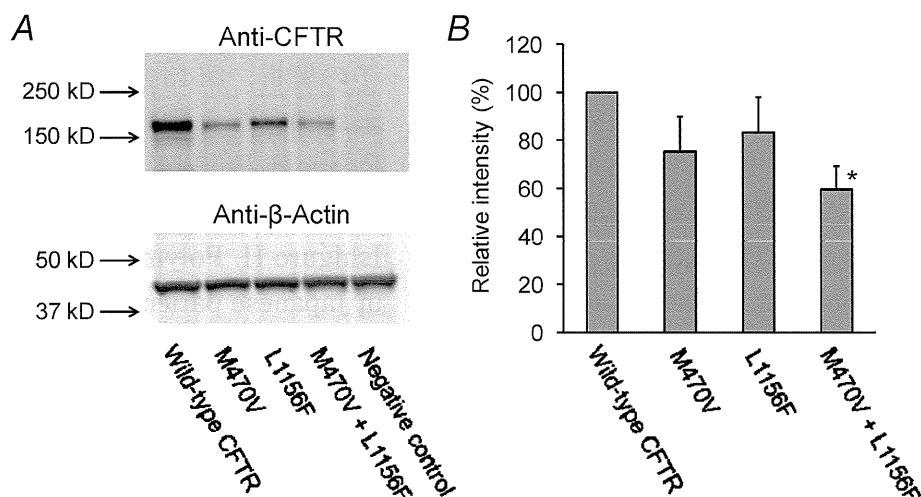


図 1 HEK293 細胞における変異 CFTR タンパクの発現

チャンネル機能が更に低下することが報告されている⁴⁾。実際 L1156F+M470V を持つ者の汗中 Cl⁻ 濃度は、アルコール性慢性膵炎患者 4 名のうち 3 名が基準値以上(60 mM<)であった。

M470V + L1156F はアルコール性慢性膵炎患者に多く見られたことから、疾患との関連が示唆された。

E. 結論

M470V+L1156F を持つことで起こる CFTR の機能低下が、日本人におけるアルコール性慢性膵炎の発症リスクであることが示唆された。

F. 参考文献

1. 厚生労働科学研究費補助金難治性疾患克服研究事業 難治性膵疾患に関する調査研究班. 膵嚢胞線維症の診療の手引き(大槻眞, 成瀬達編). アークメディア 2008.
2. Naruse S, Ishiguro H, Suzuki Y, Fujiki K, Ko SB, Mizuno N, Takemura T, Yamamoto A, Yoshikawa T, Jin C, Suzuki R, Kitagawa M, Tsuda T, Kondo T, Hayakawa T. A finger sweat chloride test for the detection of the high-risk group of chronic pancreatitis. *Pancreas* 2004; 28: e80-5.
3. Fujiki K, Ishiguro H, Ko SBH, Mizuno N, Suzuki Y, Takemura T, Yamamoto A, Yoshikawa T, Kitagawa M, Hayakawa T, Sakai Y, Takayama T, Saito M, Kondo T, Naruse S. Genetic evidence for CFTR dysfunction in Japanese: background for chronic pancreatitis. *J Med Genet* 2004; 41: e55.
4. Lee JH, Choi JH, Namkung W, Hanrahan JW, Chang J, Song SY, Park SW, Kim DS, Yoon JH, Suh Y, Jang IJ, Nam JH, Kim SJ, Cho MO, Lee JE, Kim KH, Lee MG. A haplotype-based molecular analysis of CFTR mutations associated with respiratory and pancreatic diseases. *Hum Mol Genet.* 2003; 12: 2321-2332.
5. 成瀬 達, 石黒 洋, 玉腰暁子, 吉村邦彦, 大槻 眞: 第 3 回膵嚢胞線維症全国疫学調査の集計結果について「難治性膵疾患に関する調査研究」平成17年度総括, 分担研究報告書 2006:

123-130.

6. 吉村邦彦, 安斎千恵子, 衛藤義勝: わが国の嚢胞線維症症例における CFTR 遺伝子変異に関する解析「難治性膵疾患に関する調査研究」平成18年度総括, 分担研究報告書 2007: 261-264.
7. Nakakuki M, Fujiki K, Yamamoto A, Ko SB, Yi L, Ishiguro M, Yamaguchi M, Kondo S, Maruyama S, Yanagimoto K, Naruse S, Ishiguro H. Detection of a large heterozygous deletion and a splicing defect in the CFTR transcripts from nasal swab of a Japanese case of cystic fibrosis. *J Hum Genet.* 2012; 57: 427-33.
8. Cystic Fibrosis Mutation Database. <http://www3.genet.sickkids.on.ca/cftr/app>
9. 成瀬 達, 藤木理代, 北川元二, 石黒 洋, 中莖みゆき, 近藤志保, 山本明子 厚生労働省科学研究費補助金 難治性疾患克服研究事業 難治性膵疾患に関する調査研究 慢性膵炎患者における CFTR 遺伝子の解析 平成23年度 総括・分担研究報告書 2012: 207-209.

G. 研究発表

1. 論文発表 該当なし
2. 学会発表
 - 1) 藤木理代, 石黒 洋, 中莖みゆき, 近藤志保, 山本明子, 洪 繁, 北川元二, 成瀬 達. 慢性膵炎における CFTR 遺伝子の関与. 第42回日本膵臓学会大会. 弘前. 2011年7月29-30日
 - 2) 藤木理代, 石黒 洋, 中莖みゆき, 近藤志保, 山本明子, 洪 繁, 北川元二, 成瀬 達. 慢性膵炎における CFTR 遺伝子の解析. 第43回日本膵臓学会大会. 山形. 2012年6月28-29日
 - 3) Kondo S, Fujiki K, Nakakuki M, Yamamoto A, Ko S, Kitagawa M, Naruse S, Ishiguro H. Polymorphisms of CFTR gene in Japanese patients with chronic pancreatitis. Joint APA/IAP Annual Meeting. Miami, Florida. 2012.10.31-11.3.
 - 4) 藤木理代, 石黒 洋, 中莖みゆき, 近藤志保, 山本明子, 洪 繁, 北川元二, 成瀬 達. わが国の慢性膵炎患者の

CFTR 遺伝子多型. 第44回日本膵臓学会
大会. 仙台. 2013年7月25-26日

- 5) 近藤志保, 藤木理代, 中莖みゆき, 山本
明子, 洪 繁, 北川元二, 成瀬 達,
石黒 洋. *CFTR* 遺伝子多型 p.L1156F
とアルコール性慢性膵炎の関連につい
て. 第44回日本膵臓学会大会. 仙台.
2013年7月25-26日

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)

1. 特許取得 該当なし
2. 実用新案登録 該当なし
3. その他 該当なし

慢性膵炎合併膵癌における DNA メチル化異常の解析

研究報告者 杉山政則 杏林大学医学部外科 教授

共同研究者

中里徹矢, 鈴木 裕 (杏林大学医学部外科)

【研究要旨】

【背景】慢性膵炎の発癌に関連する遺伝子異常は明らかでない。また、DNA のメチル化異常が発癌に関与するとされる。【目的】慢性膵炎合併膵癌と膵癌、慢性膵炎における各種遺伝子のメチル化異常を解析し差異を明らかにする。【対象と方法】慢性膵炎 4 例、膵癌 40 例、慢性膵炎合併膵癌 4 例の切除例を対象に、MGMT, reprim, p16, ASPP1, ASPP2, RASSF2A の各遺伝子について methylation specific PCR (MSP) 法を行った。【結果】reprim のメチル化は膵癌 95%, 慢性膵炎合併膵癌 100%, 慢性膵炎 20% に認めた。P16 では膵癌 5%, 慢性膵炎合併膵癌 25%, 慢性膵炎 0% にメチル化を認めた。reprim で慢性膵炎に比較し膵癌、慢性膵炎合併膵癌で有意にメチル化頻度が高い結果であった。MGMT, p16 では各群で差が無く、ASPP1, ASPP2, RASSF2A は MSP で検出されなかった。【結語】reprim のメチル化は慢性膵炎と比較し膵癌、慢性膵炎合併膵癌で有意に頻度が高く、癌の進展への関連が示唆された。

A. 研究目的

膵癌は未だに難治性の癌として知られている。分子生物学的手法により発癌のメカニズムや治療法について多くの研究がなされているが明らかにはされていない。また、慢性膵炎は膵癌のリスクファクターとして知られているが、そのメカニズムや関連遺伝子など未だ不明な点が多い。一方では、多くの遺伝子のプロモーター領域のメチル化が蛋白発現抑制に関わり、炎症や発癌、癌の進展に関与するとされる。本研究は慢性膵炎合併膵癌、慢性膵炎、通常型膵癌を対象として、DNA メチル化状態を解析する事によりそれぞれの差違を明らかにし、慢性膵炎の発癌に関わる遺伝子異常を探索する事を目的とする。

B. 研究方法

慢性膵炎合併膵癌、慢性膵炎、通常型膵癌における DNA メチル化解析のために以下の①、②および③の方法により解析を行う。

① 慢性膵炎合併膵癌、慢性膵炎、通常型膵癌例の抽出

手術により切除された症例で、病理学的に確

定診断が為された症例を抽出する。

② 慢性膵炎合併膵癌、慢性膵炎、通常型膵癌例の DNA メチル化解析

病理学の専門家により対象症例のホルマリン固定パラフィン切片のプレパラートを作成し、細胞を分離、DNA を抽出する。

DNA のメチル化解析は MSP (methylation specific PCR) 法により行う。これらの方法により DNA のメチル化発現に関与するとされる既知の遺伝子群 (MGMT, reprim, p16, ASPP1, ASPP2, RASSF2A) を解析する。

③ 各群で差が認められた遺伝子について、蛋白発現を免疫染色で評価する。

(倫理面の配慮)

本研究は平成 23 年 7 月 25 日に杏林大学医学部倫理委員会において「膵腫瘍に関する臨床病理学および分子生物学的研究」として承認された。研究対象患者には説明の上同意を得る。また、個人情報の保護に努める。

C. 研究結果

① 杏林大学病院および関連病院で切除され

た膵手術症例の中から、膵癌40例、慢性膵炎合併膵癌4例、慢性膵炎4例を抽出した。

② MGMT, reprim, p16, ASPP1, ASPP2, RASSF2A の各癌抑制遺伝子について MSP を行った(表1)。MGMT は膵癌5例(13%)にメチル化を認めた。慢性膵炎合併膵癌、慢性膵炎例ではメチル化を認めなかった。reprim では膵癌34例(85%), 慢性膵炎合併膵癌4例(100%), 慢性膵炎1例(25%)にメチル化を認めた。慢性膵炎と比較し膵癌($p=0.005$), 慢性膵炎合併膵癌($p=0.048$)で有意にメチル化頻度が高かった。P16では膵癌2例(5%), 慢性膵炎合併膵癌1例(25%), 慢性膵炎0例(0%)であった。ASPP1, ASPP2, RASSF2A はいずれも MSP ではメチル化が検出されなかった。

③ Reprim 蛋白発現の評価を目的に免疫染色を行った(図1, 表2)。膵癌11例(28%), 慢性膵炎合併膵癌4例(100%), 慢性膵炎4例

(80%)で reprim 蛋白の発現を認めた。慢性膵炎では膵癌と比較し reprim 蛋白発現の頻度が高かった($p=0.019$)。

D. 考察

DNA のメチル化による蛋白発現抑制は遺伝子の変異や欠失等と異なる。いわゆる epigenetics な異常としての DNA メチル化は、主に癌抑制遺伝子のプロモーター領域がメチル化修飾を受けることによりその発現が抑制されている。膵癌を対象とした網羅的なメチル化解析はこれまでに報告されている¹⁻³⁾。しかし、それらで抽出された各種遺伝子の機能解析や臨床病理学的因子との関連については明らかにされていない。

MGMT は DNA 修復酵素であり正常細胞に発現している。膵癌での頻度は0~13%との報告がある。今回の検討では膵癌で13%であった。慢性膵炎合併膵癌と慢性膵炎との比較では差が見られなかった。膵癌の多段階発癌モデルでは早期から異常が見られる p16 遺伝子でも各対象間で差は見られなかった。膵癌における p16 のメチル化頻度は14~18%と報告されているが、今回の検討ではより低い結果であった。

reprim は p53 に関連する遺伝子で、cell cycle G2 phase の停止に関わる。膵癌におけるメチル化頻度は高く、60-86%と報告されている^{2,4)}。今回の検討では膵癌では85%, 慢性膵炎合併膵癌で100%と高頻度にメチル化を認めた。一方で慢性膵炎では20%であり、膵癌、

表1 MGMT, p16, reprim における DNA メチル化陽性例

	MGMT	p16	reprim	
膵癌(40)	5(13%)	2(5%)	34(85%)	} $p=0.006$ } $p=0.048$
慢性膵炎合併膵癌(4)	0(0%)	1(25%)	4(100%)	
慢性膵炎(5)	0(0%)	0(0%)	1(20%)	

表2 reprim 蛋白免疫染色陽性例

	reprim	
膵癌(40)	11(28%)	} $p=0.019$ } $p=0.099$
慢性膵炎合併膵癌(4)	1(25%)	
慢性膵炎(5)	4(80%)	

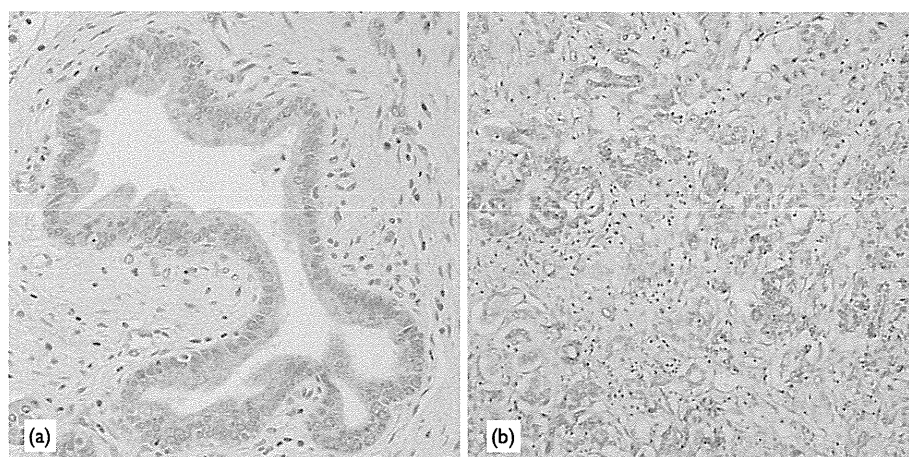


図1 reprim 蛋白の免疫染色 (a) 慢性膵炎. (b) 膵癌