

【核酸医薬】

ジーンデザイン社にて合成された凍結 microRNA 阻害剤 (S-TuDantimiR-133a) を使用した。

室温下では不活化する為、生理食塩水 (大塚製薬、東京、日本) に溶解し、1mg/ml の溶液に調整し、 -80°C で保存した。

【抗がん剤】

Carboplatin (CBDCA) を主に用いた。製剤はカルボプラチン点滴静注液 150mg 「サワイ」 (沢井製薬、大阪、日本) を使用した。その他に症例の状態により Cisplatin (CDDP)、Cyclophosphamide (CPA)、Doxorubicin (DXR)、ならびに Etoposide (VP-16) を用いた。製剤はそれぞれ、ランダ注 (日本化薬、東京、日本)、エンドキサン注 (塩野義製薬、大阪、日本)、アドリアシン注 (協和発酵、東京、日本)、ならびにベプシドカプセル (ブリストルマイヤーズ、東京、日本) を用いた。

【投与方法】

原則として実験前に考案された投与プロトコルに沿って投与された (表 4)。

術前投与が可能であった症例には、術前に S-TuD を $0.1\text{mg}/\text{kg}$ を計 2 回、最低 24 時間以上間隔を空けて静脈内投与した。術後の投与は原則として抜糸後 (約 2 週目)、CBDCA と併用して S-TuD $0.1\text{mg}/\text{kg}$ を、4 回を目安として投与した。投与回数や投与開始日、投与間隔、CBDCA の用量は症例の状態に応じて異なり、表 6 に示した。投与方法は静脈カテーテルを留置し、CBDCA をボラス投与した後に、生理食塩水をカテーテル

内洗浄の目的で少量静脈内投与し、その後 S-TuD を投与した。なお、S-TuD 投与量はルシフェラーゼ発現ヒト骨肉腫高転移株を移植したヌードマウスでの評価試験を参考にした [3]。

術前投与が出来なかった症例に対しては、状態を見て抗がん剤投与に耐えられると判断された時に CBDCA と併用して、S-TuD $0.1\text{mg}/\text{kg}$ を血管内投与した。術後の投与方法は、動注カテーテルを留置した症例には動注カテーテルから CBDCA の投与終了後に、生理食塩水を洗浄目的で注入し、その後 S-TuD を投与した (表 3、6)。

なお、全ての症例で、初回投与の前に飼い主に今回の試験についての目的および実験動物での安全性を説明し、投与の同意を頂いた上で、投与プロトコルを開始した。

【身体検査】

来院時の身体検査項目として体温、体重測定を行い、家庭での一般状態の聴取を実施した (排尿、排便、活動性、食欲の様子やその他飼い主の気づいた変化等)。これらは S-TuD 投与直前から、S-TuD の投与プロトコル終了まで実施した。

【病理検査】

東京農工大学農学部臨床腫瘍学研究室およびノースラボ (北海道、日本) に病理検査依頼 (図 1)。

【X 線・CT 検査】

レントゲン検査、あるいはコンピュー

タ断層撮影(CT)検査により、術前の腫瘍の確認、術後の再発や転移の有無を確認した。(表 4、図 2)

【血液検査】

症例の静脈から採血された血液を用いて検査を実施した。血液検査は S-TuD ならびに抗がん剤投与の前後に実施した。詳細を表 6 に示す。

検査方法は、全血の一部 0.3~0.5ml を EDTA 採血管(K₂EDTA、日本 BD、福島、日本)に保存し、血球計算機にて完全血球計算(CBC)を行った。全血球計算には NIHON KOHDEN Celltac αME を用いた。

全血約 0.5ml はヘパリンチューブ(富士フィルム、東京、日本)にて血漿分離を行った。

分離は 3,000rpm、5min で行った。血漿は主にアルカリフォスファターゼ(ALP)の推移を観察する目的で血液化学検査を実施した。その他に血糖値(GLU)、血液尿素窒素(BUN)、血漿クレアチニン(CRE)、アスパルテートアミノトランスフェラーゼ(AST)、アラニンアミノトランスフェラーゼ(ALT)、総ビリルビン(T-BiL)、総コレステロール(T-Cho)、血中総蛋白(TP)、アルブミン(Alb)、血中電解質(Na-K-Cl)、カルシウム(Ca)、リン(P)、および C 反応性蛋白(CRP)の測定を、症例の状態を鑑みながら測定した。血液化学検査には FUJI DRI CHEM 7000V を用いた。

全血 5~6ml を真空採血管(BD バキューティナ採血管、日本 BD、福島、日本)にて血清分離を行い、落谷・根津らとともに

miR-133a を定量した。測定するまで分離した血清は-80℃にて保存した。なお、分離は 3000rpm、10min で行った。

【腫瘍組織採材】

外科手術にて摘出した腫瘍組織の一部を採材し、液体窒素に 10 秒間浸漬して、急速凍結させ保存した。検体は miR-133a を定量するまで-80℃で保存した。

【リアルタイム定量 PCR(qRT-PCR)】

以下のプロトコールは分担研究者である落谷・根津らと共同で行ったものである。結果については落谷・根津らの報告書に記載されている。

組織：組織は凍結したままマルチビーズショッカー(安井機器)により粉碎後、QIAzol Lysis Reagent(QIAGEN) 700μl に溶解。更に miRNeasy Mini Kit(QIAGEN)を使用して total RNA を抽出。primer は hsa-miR-133a(cfa-miR-133a と同源性あり、Mature miRNA sequence UUGGUCCCCUUCAACCAGCUGU) を用いた。

inner control として、RNU6B を用いた。

血清：S-TuD 術前投与が可能だった症例には、S-TuD 投与前、手術前、術後 1.5 ヶ月、および術後 3 ヶ月時点の血清を用いて miR-133a を定量した。術前投与が行えなかった症例に関しては、術後 1.5 ヶ月、術後 3 ヶ月時点での血清を用いて miR-133a を定量した。症例 D は、術後 9 ヶ月、12 ヶ月時点での血清で定量

した。

採取した血液を 10,000rpm、10min、4°Cで遠心し、上清 200 μ L を使用し、miRNeasy Mini Kit を用いて、QIADEN Supplementary Protocol(Purification of total RNA、including small RNAs、from serum or plasma using the miRNeasy Mini Kit)に従い total RNA 抽出した。

primer は has-miR-133a、および cel-miR-39(Mature miRNA sequence UCACCGGGUGUAAAUCAGCUUG) を用いた。Taqman プローブはそれぞれに特異的なものを用いた。

血清、組織共に、RNA 逆転写は Taqman microRNA Reverse Transcription Kit を用い、qRT-PCR には Taqman 2X Universal PCR Master Mix, No AmpErase UNG を用いた。

【データ解析】

血清サンプルおよび組織サンプルにおける発現量の解析には Comparative Ct 法を用いた。

(倫理面への配慮)

本学の動物実験小委員会へ申請、承認を得ている。

C. 研究結果

【一般状態】

全症例において、S-TuD 投与に起因すると思われる副作用は確認されなかった。局所再発が認められた症例 H、と症例 I、および肺転移が起こり死亡した症例 D を(表 3)除き、投与症例群に、体温、体重、排尿、排便、活動性、食欲に大きな変動

は認められなかった(表 5)。

【治療経過】

全症例において、S-TuD 治療投与プロトコルが完了、あるいはプロトコル途中で死亡している(表 5)。

症例 A,B,C,F,および G は投与プロトコルを完遂し、転移や再発は現在認められていない。

症例 E は投与プロトコルを完遂後、術後 1 年で右腎臓への転移を認めた。

症例 H は外科手術で腫瘍を完全切除できず、再発を認めた。

症例 D,I は術後早期に、S-TuD 治療投与プロトコル中に死亡した。

【血液検査】

全血球計算：症例 H では術後、局所再発した腫瘍からの出血が著しかったことに起因すると思われるヘマトクリット値の低下が起きた。症例 E では術後から血小板の値が低下した(全身状態に異常は認めなかった)。それ以外の症例では特に大きな問題は認められなかった(表 6)。

血液化学検査：術前に ALP が正常値(<254 IU/L)を越えていた症例は、症例 H の 1 例を除き術後には正常値に帰した。腫瘍を除去し切れなかった症例 H の ALP 値は一定して高値を推移し、症例 I の ALP 値は再発が発覚した頃に急激に上昇した(表 6)。

【X 線・CT 検査】

術後に X 線および CT 検査にて再発や転移は 3 症例で認められた。転移症例は症例 D(肺転移)、症例 I(胸腔内再発)、お

よび症例 E(右腎臓への転移)であった。その他の 6 例では、現在までの術後 3 ヶ月～1 年に渡って転移は認められていない(外科手術で腫瘍を除去し切れなかった症例 H を含む)(図 2)。

D. 考察

S-TuD を始めとする「核酸医薬」が臨床に応用されるまでには、標的とする microRNA が腫瘍細胞内で発現が亢進しているか、標的 microRNA の機能阻害によって転移を抑制することが可能なのか、を検証することが重要となる。犬の骨肉腫は、ヒトのそれと比較してステージの進行や肺への転移が早い為、miR-133a 阻害剤による転移抑制の有効性を比較的早期に評価できる。獣医療の臨床現場において、ヒトより先行して検証し、その成果を人医療に還元することで双方の発展が期待できる。そこで鈴木らは、ビーグル犬を用いた S-TuD の安全性試験を実施した。S-TuD の副作用として一過性の下痢が認められたが、下痢は投薬で対処可能なものであった。その他に、血液検査では一過性の CRP の上昇が認められたが、その後正常値に帰している。各臓器の病理組織学的検査の結果、すべての投与群で異常所見は認められなかった(未発表)。このことから、犬における S-TuD の安全性が確認できたため、犬の骨肉腫 8 例、悪性間葉系腫瘍 1 例について S-TuD の臨床への有効性を評価した。

今回、核酸医薬(S-TuD)を用いた犬骨肉腫の転移抑制を目標に、症例の転移や再発の有無を追跡調査した。また、S-TuD および抗がん剤の投与後における血清中の miR-133a の発現量の推移や

腫瘍組織中の発現量を測定し、臨床への有効性を評価すると共に、犬骨肉腫症例における miR-133a の予後や診断におけるバイオマーカーとしての有用性を評価した。

手術前に S-TuD 単独で投与された 4 例における一般状態や臨床症状の悪化、および下痢などの消化器症状などの有害事象は認められなかった。また、抗がん剤を併用した、手術前に単剤投与を行った 4 症例を含む 9 症例においても同様であった。このことから、S-TuD の骨肉腫担がん犬における生体への一定の安全性が確認された。

血液検査では、術前に ALP 値が正常値(<254 IU/L)を越えていた症例は 9 例中 5 例(症例 A,E,F,H,I)であった。但しこれは腫瘍による強い疼痛により、コルチゾール分泌が起こり、分解の為に肝臓に負担がかかり ALP 値が上昇した可能性も否定できず、腫瘍性の上昇とは限らない。骨肉腫では術後の ALP 値が予後の指標になることが報告されているが [8][13]、術後の経時的モニタリングにより正常値を上回った例は 3 例(症例 D,H,I)あり、いずれも転移や再発を起こした(表 5、7)。術前に ALP 値が高値を示した症例 A,E,F は術後正常値に帰し、転移や再発は現在まで認められない。

四肢に発生した症例群の S-TuD 投与を注した 1 頭を除いた現時点での、無症候期間は 8 カ月～1 年以上を経過している。この結果は外科手術を施し補助療法で CBDCA を単独で投与した犬骨肉腫症例群の無転移期間を越している [3][18]。S-TuD の有効性評価には今後も定期検

査を行い、転移や再発の有無の追跡調査を要する。早期に転移を起こした症例 D、再発を起こした症例 I は、その早さから S-TuD 投与時点で既に転移巣や再発病巣の形成が起こっていた可能性が考えられる。特に症例 I は初診時既に肺への浸潤が確認されており(図 2)、既に胸膜播種を起こしていた可能性もある。マウスにおける試験で確かめられた S-TuD の有効性は転移抑制のみであり、犬骨肉腫においても既に一定の大きさの転移巣を形成している場合の有効性には疑問が残る結果となった。

血清中の miR-133a は、全ての症例で認められた(図 3)。また、転移や再発に伴い上昇する症例(D,E)もあり、予後や再発の判定のバイオマーカーとしての可能性が示唆された。現在転移がない症例群においても、血清中 miR-133a の数値は下降している症例(A,C,G,H)、上昇している症例(B,F)に分かれており、今後も推移を調査し、転移や再発の有無を調べ、相関性を調査する必要があると思われる。今後、血清中 miR-133a が上昇した症例で転移や再発が認められ、下降した症例では認められないようであるならば、血清中 miR-133a が ALP より優れた腫瘍マーカーとして利用できる可能性が出てくると思われる。

症例 E は、左後肢腫瘍の病理組織検査により悪性線維性組織球肉腫の可能性が高いと診断され、右腎臓の転移発見時に血清中 miR-133a の発現の上昇が確認されており、骨肉腫以外の腫瘍においても miR-133a が転移に関与している可能性が示唆され、S-TuDantimiR-133a の適

応対象が拡大する可能性が示唆された。肺への浸潤を起こした症例 I では血清内 miR-133a の値は S-TuD 投与にもかかわらず常に一定であり、かつ早期再発を起こしたことから、再発を予兆していたことが考えられる。

症例 A、症例 G は、術前から血清中 miR-133a の発現量が低下し、術後も低い値を保っており、症例 C は術後の S-TuD 投与から、miRNA-133a の発現量の低下が見られたが、これは S-TuD 投与によるものと思われる。一方、S-TuD 投与を中止した症例を除く 4 症例の無病期間は現在 8~19 ヶ月であり、術後 CBDCA を用いた骨肉腫における無腫瘍期間中央値(137 日)を既に過ぎていることからその有効性は極めて高いと推察される[3][18]。今後の定期的観察により、血清中 miR-133a 発現量の低下と予後の相関性を確かめていく必要がある。

また術後早期に局所再発を起こした症例 I の生存期間(112 日)は、大型種犬の軸性骨格骨肉腫の平均中央生存期間(137 日)を越しておらず、S-TuD の有効性を評価することは出来なかった[14]。

今回の S-TuD および CBDCA の投与量はルシフェラーゼ発現ヒト骨肉腫高転移株を移植したヌードマウスでの評価試験[3]を参考にしており、転移や再発を起こした症例 D,I の例を考慮すると、犬骨肉腫症例においては投与量が不十分な可能性も考えられる。今後症例を重ね、至適な抗がん剤用量、回数および S-TuD の用量を模索していく必要があると思われる。

E. 結論

今回の試験の結果、犬骨肉腫組織内および血清に、miR-133a が発現していることが明らかになり、それが予後の指標になり得ることが示唆された。更に S-TuD の投与により、標的とする miRNA の血中量を低下できる可能性も示唆された。S - TuD 投与を中止した症例を除く 4 症例の無病期間は現在 8~19 ヶ月であり、術後 CBDCA を用いた骨肉腫における無腫瘍期間中央値（137 日）を既に過ぎていることから、その有効性は極めて高い。このことから、人医療で用いられている核酸医薬が獣医療にも適用でき、またその成果が人医療に還元できる可能性が示唆され、今回得られた結果が今後、担がん犬における核酸医薬の臨床応用での一助になり得る。

F. 研究発表

1. 論文発表
関連論文なし
2. 学会発表
関連発表なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得
特になし。
2. 実用新案登録
特になし。
3. その他
特になし。

VI.付録

番号	犬種	病理組織 検査結果	発生部位	転移の有無 ()内は 術後の期間	局所再発 ()内は 術後の期間	S-TuD 術前投与
A	パグ	骨肉腫	大腿骨 近位	なし (11ヶ月)	なし (11ヶ月)	2回 (経静脈)
B	ジャーマン・ シェパード	骨肉腫	橈骨 遠位	なし (15ヶ月)	なし (15ヶ月)	2回 (経静脈)
C	ウィペット	骨肉腫	右大腿骨 骨頸部	なし (8ヶ月)	なし	なし
D	アイリッシュ ユ・セッター	骨肉腫	左上腕骨近 位端	肺転移 右大腿骨 骨頭部転移 (3ヶ月)	なし (3ヶ月)	2回 (経静脈) 治療中止
E	チワワ	悪性間葉 系腫瘍	大腿骨遠位	右腎 (19ヶ月)	なし (19ヶ月)	なし
F	ミニチュア・ シュナウザー	骨肉腫	左下顎骨 近位	なし (11ヶ月)	なし (11ヶ月)	なし
G	ゴールデン・ レトリバー	骨肉腫	左下顎骨 近位	なし (10ヶ月)	なし (10ヶ月)	2回 (経静脈)
H	雑種	骨肉腫	上顎骨遠位	局所増大 再発・死亡 (8ヶ月)	あり (原発巣を除去 しきれず)	なし
I	ドーベルマン	骨肉腫	右第5肋骨	肺への局所 浸潤・死亡 (4ヶ月)	なし	なし

表1：S-TuD 投与症例

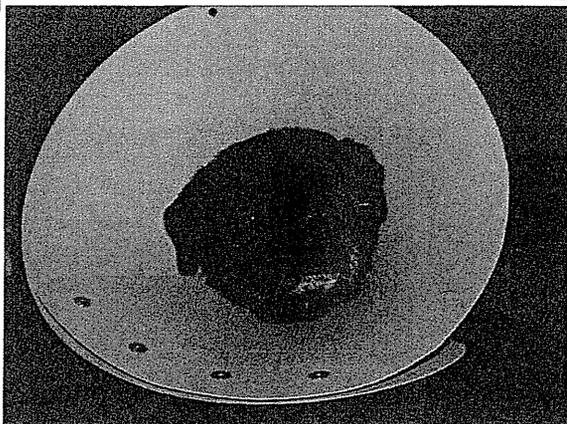
犬種	パグ	
年齢	11 歳	
性別	避妊雌	
体重	7.5kg	
発生部位	左大腿骨近位	
腫瘍のサイズ	2cm×3cm×3cm	
リンパ転移	無し	
肺転移	無し	
S-TuD 投与開始日	2014 年 3 月 13 日	
手術日	2014 年 3 月 19 日	
既往歴	6 歳頃体表マス切除、病理では良性。数ヶ月齢に皮膚病。避妊手術	
臨床経過	1 月上旬より室内歩行時に後肢跛行次第に悪化し、2 月には完全に 3 本足で歩行するようになった。患部に疼痛有り	
備考		

表 2-1：症例別術前情報(初診時)；症例 A

犬種	ジャーマン・シェパード	
年齢	9 歳	
性別	去勢雄	
体重	33kg	
発生部位	左前肢遠位	
腫瘍のサイズ	4.7cm×3cm×3cm	
リンパ転移	無し	
肺転移	無し	
S-TuD 投与開始日	2013 年 11 月 1 日	
手術日	2013 年 11 月 6 日	
既往歴	去勢手術	
臨床経過	2013 年 10 月頃より跛行を認め、X 線検査にて左橈骨遠位部にコッドマン三角の充実性滑膜反応を認めた。	
備考		

表 2-2：症例別術前情報(初診時)；症例 B

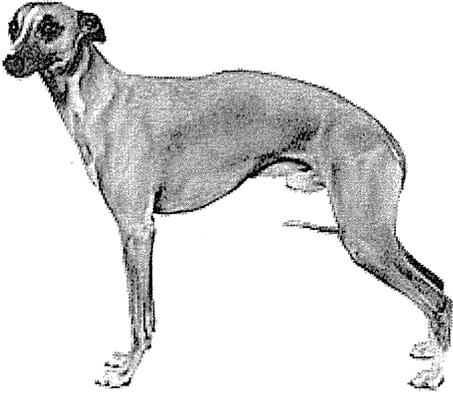
犬種	ウィペット	
年齢	12歳	
性別	避妊雌	
体重	9.0kg	
発生部位	右大腿骨骨頸部	
腫瘍のサイズ	2cm×2cm×2cm	
リンパ転移	無し	
肺転移	無し	
S-TuD 投与開始日	2014年7月4日	
手術日	2014年6月18日	
既往歴	避妊手術	
臨床経過	2014年5月26日、右後肢跛行で来院。レントゲン検査にて右大腿骨骨頸部の骨吸収像と増殖像の混合所見を確認。	
備考		

表 2-3 : 症例別術前情報(初診時) ; 症例 C

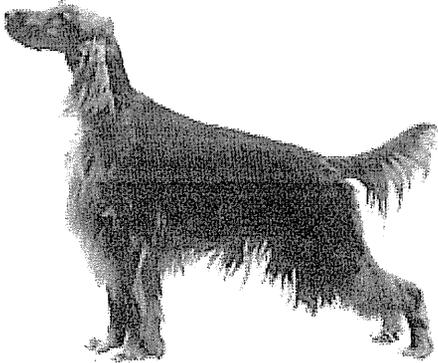
犬種	アイリッシュ・セッター	
年齢	10歳	
性別	去勢雄	
体重	28.1kg	
発生部位	左上腕骨近位端	
腫瘍のサイズ	2cm×2cm×2cm	
リンパ転移	無し	
肺転移	無し	
S-TuD 投与開始日	2014年3月18日	
手術日	2014年3月24日	
既往歴	去勢手術	
臨床経過	2014年3月6日、左前肢跛行で来院。レントゲン検査にて左上腕骨近位端に骨増生を確認。	
備考		

表 2-4 : 症例別術前情報(初診時) ; 症例 D

犬種	チワワ	
年齢	8歳	
性別	雄	
体重	2.2kg	
発生部位	左後肢近位	
腫瘍のサイズ	7.4cm×6.6cm×5.5cm	
リンパ転移	無し	
肺転移	無し	
S-TuD 投与開始日	2013年7月16日	
手術日	2013年7月12日	
既往歴	無し	
臨床経過	4月より後肢を痛がるようになり、その一週間後に小豆大の腫瘍が確認された。5月に近医で腫瘍のFNAを行なったところ、悪性の腫瘍を思わせる細胞が確認できた。7月4日に本医療センターに来院。内服は頓服の痛み止めのみ。食欲や排泄に問題はないが、動きは少ないとのこと。	
備考	本症例は腫瘍の疼痛が強かったため、S-TuD 投与を行わずに手術を先に行いQOLの向上を図った。	

表 2-5 : 症例別術前情報(初診時) ; 症例 E

犬種	ミニチュア・シュнауザー	
年齢	7歳	
性別	避妊雌	
体重	5.8kg	
発生部位	右下顎	
腫瘍のサイズ	4cm×2cm×2cm	
リンパ転移	無し	
肺転移	無し	
S·TuD 投与開始日	2014年4月7日	
手術日	2014年3月17日	
既往歴	2013年8月乳腺腫瘍により、全摘出手術を受けた。病理の結果は不明。避妊手術	
臨床経過	1月の中旬から口を開けると痛がるようになった。2月後半より下顎が腫脹し、近医にてフィロコキシブを処方された。	
備考	右下顎リンパ節に主張が認められたが、FNA サンプルを IDEXX ラボラトリーズ(東京、日本)に送ったところ、過形成と診断された。本症例は術後の組織診断の結果から、S·TuD 投与を行うことになった。	

表 2-6 : 症例別術前情報(初診時) ; 症例 F

犬種	ゴールデン・レトリバー	
年齢	6歳	
性別	去勢雄	
体重	45kg	
発生部位	左下顎骨近位	
腫瘍のサイズ	3cm×3cm×2cm	
リンパ転移	無し	
肺転移	無し	
S·TuD 投与開始日	2014年3月31日	
手術日	2014年4月9日	
既往歴	7ヵ月齢で皮膚マス切除、被囊化血腫との組織診断、去勢手術	
臨床経過	3月21日頃から、涎が薄桃色になることに気づく。投薬はフィロコキシブとアモキシシリンを行っていた。	
備考		

表 2-7 : 症例別術前情報(初診時) ; 症例 G

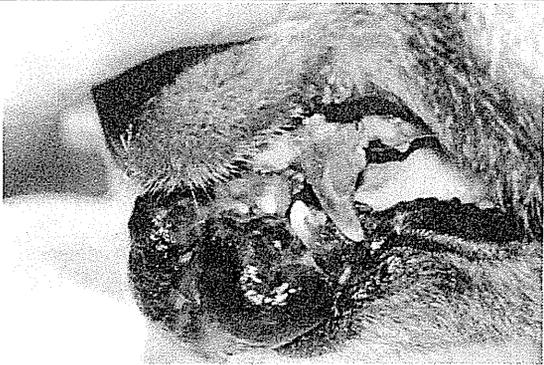
犬種	雑種	
年齢	15歳	
性別	去勢雄	
体重	22.36kg	
発生部位	上顎骨遠位	
腫瘍のサイズ	5cm×4cm×3cm	
リンパ転移	無し	
肺転移	無し	
S-TuD 投与開始日	2014年3月14日	
手術日	2014年2月19日	
既往歴	去勢手術、肝機能低下（投薬は不要のレベル）	
臨床経過	2013年12月11日、深夜に倒れては起き、を繰り返す。眼振も伴っていた。その日の早朝に近医を受診、その時に近医が口腔内腫瘍に気がつく。そこで一週間ほど入院。1月半ばから腫瘍が大きくなってきた。腫瘍からの出血が著しい為、止血剤を投薬していた。	
備考	本症例は上顎の骨肉腫と非典型的な部位に発生し、術前での FNA でも鑑別が不能だったため、手術に先立っての投与は行えなかった。手術は腫瘍の減容積と長期的抗がん剤投与を行うために動注リザーバー設置を行うことになった。	

表 2-8 : 症例別術前情報(初診時) ; 症例 H

犬種	ドーベルマン	
年齢	9歳	
性別	雌	
体重	32.95kg	
発生部位	右第5肋骨	
腫瘍のサイズ	4cm×4cm×3cm	
リンパ転移	無し	
肺転移	無し	
S-TuD 投与開始日	2014年5月30日	
手術日	2013年5月16日	
既往歴	無し	
臨床経過	4月頃より運動不耐症、5月12日に呼吸状況悪化、近医にて胸水を認めためたため抜去（左側から140ml、右側から610ml）	
備考	本症例は CT 検査や FNA にて骨肉腫を疑うものだったが、胸水の貯留が認められ、呼吸障害があったため、手術を優先して行なった。	

表 2-9 : 症例別術前情報(初診時) ; 症例 I

番号	犬種	施術	術後の S-TuD 投与経路	備考
A	パグ	左後肢断脚	静脈	
B	ジャーマン・ シェパード	左前肢断脚	静脈	
C	ウィペット	左後肢断脚	静脈	
D	アイリッシュ ユ・セッター	左前肢断脚	静脈	
E	チワワ	左後肢断脚	静脈	
E'		右腎臓摘出		左後肢断脚の手術より 12ヶ月後
F	ミニチュア・ シュнауザー	右下顎切除 動注カテーテル留置	動脈	
G	ゴールデン・ レトリバー	左下顎切除 動注カテーテル留置	動脈	
H	雑種	上顎腫瘍減容積切除 動注カテーテル留置	動脈	
H'		上顎腫瘍減容積切除		上顎の手術より 5ヶ月後
I	ドーベルマン	右第5肋骨部分切除	静脈	

表3 症例別施術

day	採血	手術	抗がん剤 投与	S-TuD 投与	レントゲン 検査	CT 検査	miR133 定量
0	○ (S-TuD 投与前)			○	○	△	○(血清)
3	○			○			
6	○	○					○(組織)
抜糸処置(術後約 2 週間)							
0 (抗がん剤 投与初日)	○		○	○			
21	○		○	○	○		
42	○		○	○			○(血清)
63	○		○	○	○		
3month					○		○(血清)
6month					○	○	
1year					○	○	○(血清)

○・・・原則として行う。

△・・・可能であれば行う。

表 4 S-TuD 投与プロトコル

症例 A
【一般状態】
術前にあった疼痛は術後に消失した。一般状態は良好で、元気、食欲、排尿、排便異常なし。消化器症状も見られなかった。
【治療経過】
手術 5 日前と 3 日前に S-TuD の静脈投与をし、断脚手術後、22 日、43 日、64 日、および 85 日目に S-TuD と CBDCA 70mg/m ² の静脈投与を行い、術後 113 日目に CBDCA 70mg/m ² を単独で投与し、治療を終了とした(表 7)。
【病理検査結果】
骨肉腫
【病理所見】
中型～大型の核小体を 1～2 個と繊細～細網状のクロマチンを少量～中等量入れた類円系～卵円形核ならびに紡錘形、類円系～卵円形、多角形、星芒状ないしは不整形の両染色～弱好酸性胞体を有する様々な大きさの異型間葉系細胞がシート状に増殖している。核には顕著な異型性が見られ、核分裂像は頻繁に観察される(高倍率 1 視野あたり 4～5 個)。破骨細胞様の多核巨細胞を多数交えている。特徴的所見としてこれらの増殖細胞間に多量の腫瘍性の類骨形成が認められた。以上の特徴的所見から、骨肉腫と診断された。増殖細胞の形態から osteoblastic type (骨芽細胞型) の骨肉腫に分類されるものである。本例の場合は周囲への筋組織へ浸潤性増殖像を伴っていた(図 1)。
【X 線・CT 検査】
断脚術後 6 ヶ月のレントゲン検査では転移は認められない(図 2)。
【血液検査】
術前に若干高値だった ALP(304 IU/L)は術後から低下しだし、数ヶ月後には正常に戻った(術後 4 ヶ月：114 IU/L)。その他に目立った異常は見られなかった(表 6、図 3)。
【miR-133a の発現】
S-TuD 投与開始前の血清中で有意な miR-133a の発現を認めた。 S-TuD 投与以前の時点での血清中 miR-133a の発現量は約 1.24 と高値を示したが、S-TuD 投与後から低下し始め、手術前の時点(S-TuD 初回投与 6 日後)では 0.22 まで低下していた。断脚術後に S-TuD および CBDCA 投与を行った後の発現量も、術後 3 ヶ月で 0.06 と低い水準を維持した(図 4)。S-TuD 投与前の血清中 miR-133a の量は、他の症例と比較しても高次であった。 腫瘍組織には miR-133a の有意な発現(発現量 1.41)が確認された(図 5)。

表 5-1 症例別術後経過：症例 A

症例 B
【一般状態】
術前にあった疼痛は消失した。一般状態は良好で、元気、食欲、排尿、排便異常なし。消化器症状も見られなかった。
【治療経過】
手術 4 日前と 2 日前に S-TuD の静脈投与を行い、左前肢断脚術の抜糸後に、0 日(抜糸当日)、21 日、42 日、および 63 日目に S-TuD と CBDCA 70 mg/m ² の静脈投与を行い、治療を終了とした(表 7)。
【病理検査結果】
骨肉腫
【病理所見】
大小不同の短紡錘形～不整形の腫瘍細胞がびまん性に増殖し、周囲骨組織の骨髓腔への浸潤も認められる。増殖細胞の異型度は高く、分裂像も盛んに見られる。増殖巣内には骨基質の残存が認められ、その周囲には破骨細胞の出現も見られる。出血・壊死も認められる。境界は不明瞭(図 1)。
【X 線・CT 検査】
術後 1 年でのレントゲン検査・CT 検査での転移は認められない(図 2)。
【血液検査】
術前から ALP の値は正常値(53 IU/L)であった。術後は正常値内であるが徐々に上昇(術後 7 ヶ月で 134 IU/L)している。その他の項目に異常は認められなかった(表 6、図 3)。
【miR-133a の発現】
S-TuD 投与開始前の時点での血清中に miR-133a が存在することが確認された。血清中 miR-133a 発現量は手術前は低値(発現量 0.01)であったが、術後 1.5 ヶ月から上昇しだし、術後 3 ヶ月ではやや高い値(発現量 0.12)を示した(図 4)。

表 5-2 症例別術後経過：症例 B

症例 C
【一般状態】
術後に疼痛は消失した。一般状態に大きな問題はない。
【治療経過】
断脚術後 16 日、40 日、68 日、および 89 日目に S-TuD と CBDCA 300mg/m ² を静脈投与し、治療を終了した(表 7)。
【病理検査結果】
骨肉腫
【病理所見】
大腿骨では、本来の骨組織を広範囲に置換するように悪性の非上皮性腫瘍(肉腫)が形成されていた。腫瘍内には豊富な類骨の形成が起こっていることから、骨肉腫と診断された(図 1)。
【X 線・CT 検査】
術後 3 ヶ月のレントゲン検査では転移は認められない(図 2)。
【血液検査】
初診時の ALP は正常値(84 IU/L)であった。術後 1 ヶ月で軽度の上昇(143 IU/L)が見られた。その他の項目に異常は見られなかった(表 6、図 3)。
【miR-133a の発現】
術後、S-TuD 投与前の血液に、miR-133a の存在を確認した(発現量 0.11)。S-TuD 投与後 1.5 ヶ月で発現量の低下(発現量 0.04)が見られ、以降その水準を維持した(図 3)。

表 5-3 症例別術後経過：症例 C

症例 D
【一般状態】
術前に見られた疼痛は消失し、右股関節に転移を起こし跛行を呈すまでは一般状態は良好であった。
【治療経過】
手術の 6 日前と 3 日前に S-TuD を投与し、術後 15 日と 44 日目に S-TuD と CBDCA270mg/m ² の投与を行った。本来は術後 35 日に投与を行う予定であったが、好中球の減少が見られたため、延期となった。その後、術後 71 日目に後肢の跛行を呈し、飼い主との相談の結果緩和療法に切り替え、術後 118 日目に死亡した(表 7)。
【病理検査結果】
骨肉腫
【病理所見】
都合により資料を得られず
【X 線・CT 検査】
術後 2 ヶ月で右大腿骨骨頭に転移が認められ、術後 3 ヶ月で肺に転移像が認められた(図 2)。
【血液検査】
術前の ALP は正常値(197 IU/L)であったが、転移が認められてからは上昇した(術後 3 ヶ月 : 619 IU/L)(図 3)。
【miR-133a の発現】
血清中 miR-133a の発現量は S-TuD 投与前(発現量 0.03)に比較して、転移が認められた術後 2 ヶ月の時点で発現量は増加した(発現量 0.067)(図 4)。

表 5-4 症例別術後経過：症例 D

症例 E
【一般状態】
術前は歩行時や安静時にも強い疼痛を伴っていたが、術後は消失し一般状態も改善した。術後 1 年の検査で、右腎臓に転移が確認され摘出手術を行った。その後、食欲の低下が見られたが、退院後には改善した。
【治療経過】
断脚術後、4 日目、11 日目、20 日目に S-TuD と CBDCA50 mg/m ² の静脈投与を行った。その後 CBDCA 50mg/m ² /week の静脈投与を 9 回行い、左後肢に発生した腫瘍の治療を終了した(表 7)。術後 1 年で、転移した右腎臓の除去手術を行った(表 3)。
【病理検査結果】
悪性間葉系腫瘍 (悪性線維性組織球腫を疑う)
【病理所見】
紡錘形～星芒状の間葉系細胞と、小型～中型の両染色性～弱好酸性胞体を有する類円形～卵円形、多角形等様々な独立円系細胞が、緻細な線維性結合を携えつつ、充実性に腫瘍性増殖している。異型性は中度～きわめて重度であり、核の大小不同が目立ち、核分裂像も頻繁に見出され高倍率 1 視野あたり 3～4 個以上より、悪性の間葉系腫瘍であることは確かだが、明瞭な分化傾向が見出されなかったため、これ以上の診断はできなかった小型成熟リンパ球の浸潤も有り、悪性線維性組織球腫の可能性も考えられる。また、切除縁には極わずかの腫瘍細胞が観察された(図 1)。 右腎臓の腫瘍も同様の組織像を呈し、脈管内浸潤が多分に見られたため、転移巣と判断された(図 1)。
【X 線・CT 検査】
術後 9 ヶ月での CT 検査には転移巣は見られなかったが、術後 1 年での CT 検査にて右腎臓に転移が見つかった。肺転移は認められなかった(図 2)。
【血液検査】
術前では ALP は高値(284 IU/L)を示した。術後は徐々に低下し、正常値範囲内に帰した(術後 1 年 : 204 IU/L)。術後 1 年ほど経過した時点で、ALT の軽度の上昇が見られた。(表 6、図 3)
【miR-133a の発現】
血清中 miR-133a の発現量は術後の 9 ヶ月では低値(0.065)であったが、右腎臓に転移が見つかった術後 12 ヶ月の時点では有意に上昇し、やや高い値を示した(発現量 0.32)(図 4)。 また腫瘍組織内では、他の症例に比べやや低いものの、miR-133a の発現が認められ(発現量 0.12)、また、同様に転移巣の方が高値(発現量 0.38)を示した(図 5)。

表 5-5 症例別術後経過：症例 E

症例 F
【一般状態】
腫瘍による疼痛が強かった上に、術後に広範囲の外科的除去の為に壊死が起こった。壊死の脱落后は、疼痛は消失し一般状態も改善した。下顎の広範囲を除去した為、採食出来ない可能性が考慮され、胃チューブ(PEG チューブ)を設置された。その後、自力採食が可能になり、胃チューブは除去された。その後の一般状態は良好である。
【治療経過】
右下顎摘出術を実施し、腫瘍選択的に抗がん剤を投与できるように動注カテーテルが留置された。 術後 21 日目、35 日、52 日、80 日、101 日、122 日、および 143 日目に S-TuD と CBDCA 10mg/head の経動脈投与を行い、術後 164 日目に CBDCA 10mg/head の単独投与を行い、治療を終了とした(表 7)。
【病理検査結果】
骨肉腫
【病理所見】
所見：中型～大型の核小体を 1～3 個と繊細～細網状のクロマチンを少量～中等量入れた類円系～卵円形核ならびに大小さまざまな紡錘形、類円系～卵円形、多角形、星芒状ないしは不整形の両染色～弱好酸性胞体を有する様々な大きさの間葉系細胞がシート状、充実性に腫瘍性増殖している。核には顕著な異型性が見られ、核分裂像は頻りに観察される(高倍率 1 視野あたり 2～3 個)。破骨細胞様の多核巨細胞を多数交えている。特徴的所見としてこれらの増殖細胞間に不整形・島嶼状の腫瘍性類骨組織形成が認められる。以上の特徴的所見から、骨肉腫と診断された。増殖細胞の形態から osteoblastic type (骨芽細胞型) の骨肉腫に分類されるものである。脈管内浸潤は見出されなかった(図 1)。
【X 線・CT 検査】
術後 6 ヶ月の X 線検査では転移は認められなかった(図 2)。
【血液検査】
術前に高値を示した ALP(432 IU/L)は術後から徐々に低下し、術後 4 ヶ月で正常値(201 IU/L)まで下がった。術前血液検査では CRP が非常に高値を示し(>20 mg/dL)、Alb も低下(2.3 mg/dL)したが、CRP は術後低下し、Alb も正常化(術後 1 ヶ月：2.6 mg/dL)した(表 6、図 3)。
【miR-133a の発現】
血清中に miR-133a が存在することが確認された。 S-TuD、CBDCA を頸動脈からのカテーテル経由で同時に投与し、術後 1.5 ヶ月の血清中 miR-133a の発現量は 0.012 であった。しかし、術後 3 ヶ月での血清中 miR-133a の発現量は 0.085 と上昇した(図 4)。

表 5-6 症例別術後経過：症例 F