

the use of interrupted duct-to-mucosa sutures and coverage of the entire cut surface of the pancreas with the seromuscular layer of the jejunum. Closed suction drains were placed in the vicinity of the pancreaticojejunal and choledochojejunal anastomosis. Pancreatic consistency was evaluated subjectively as soft or hard by the surgeon during the operation. POPF was defined according to the classification of the International Study Group on Pancreatic Fistula.<sup>21</sup>

**Measurement of the EM of the resected pancreas.** After the PD specimen had been resected, it was immediately subjected to *ex vivo* measurement. The EM, also known as Young's modulus, is a measure of the stiffness of an elastic material.<sup>6</sup> It is defined as the ratio of the stress along an axis over the strain along that axis within the range of stress covered by Hooke's law. Stress is the degree of compressive loading and strain is the amount of deformation, both of which are generated by external force imposed on a material. The EM can be derived experimentally from a stress-strain curve generated by conducting tensile testing of a material sample.

In a model for which Hooke's law holds, the EM is a characteristic of an elastic material determined from the distortion resulting from loading and the recovery observed upon unloading. According to the contact stress theory of Hertz,<sup>22,23</sup> when an elastic material is compressed vertically by a rigid spherical probe, the EM ( $E$ ) of the material is defined by the following formula, based on the relationships among force ( $F$ ), Poisson's ratio ( $\nu$ ), a variant of compression ( $t$ ), and the radius ( $R$ ) of the rigid spherical probe compressing the material vertically (Fig 1, A).

$$E = \frac{3}{4} \cdot F \cdot (1 - \nu^2) \cdot t^{-\frac{3}{2}} \cdot R^{-\frac{1}{2}}$$

The EM of the resected pancreas was measured using a Venustron (Axiom, Koriyama, Japan) automatic indentation apparatus<sup>24</sup> (Fig 1, B), based on Hooke's law and Hertz's contact stress theory.<sup>6,22,23</sup> The whole specimen was placed on a board with sufficient stability, and the pancreatic cut edge was directed just upward so that the probe could be directed vertically toward the organ

surface. A rigid spherical probe with a radius ( $R$ ) of 2.5 mm indented the pancreatic cut edge vertically for 4.0 mm after making contact with the surface, and then released, at a computer-controlled constant velocity (1.5 mm/s). The initial contact pressure was set at 1.0 gf/mm<sup>2</sup> by a built-in motor. The EM of the specimen was calculated for every 0.005 mm of indentation depth, and the EM at a loading depth of 1.25 mm was used for the analysis. Poisson's ratio was set at 0.49.<sup>7,25,26</sup>

Consecutive measurements of the EM were performed three times at each of three points on the pancreatic cut surface, and the average value of the three median values for each point was then used for the analysis. Before the start of this trial, silicon objects with a tactile sensation similar to that of the human pancreas were used to calibrate the experimental apparatus with appropriate values, and 10 resected pancreatic specimens were tested preliminarily to provide a learning curve for the measurement procedure. In every case, the measurement procedure and circumstances were standardized, and all experiments were performed by a single investigator (M.S.).

**Histologic evaluation.** Formalin-fixed, paraffin-embedded specimens obtained from a pancreatic stump were cut into 3- $\mu$ m-thick serial sections. The sections were stained with hematoxylin and eosin (HE) and azan-Mallory (azan) and by immunohistochemistry for  $\alpha$ -smooth muscle actin ( $\alpha$ -SMA) and CD31. Immunohistochemical staining for  $\alpha$ -SMA and CD31 was performed automatically on a Ventana Benchmark ULTRA (Ventana Medical Systems, Tucson, AZ). Monoclonal antihuman  $\alpha$ -SMA antibody (Dako, Glostrup, Denmark) was used at a dilution of 1:100, and the conditions for antigen retrieval and primary antibody incubation were set at 91°C for 8 minutes and 35°C for 60 minutes, respectively. Antihuman CD31 antibody (Dako, Glostrup, Denmark) was used at a dilution of 1:200, and antigen retrieval and primary antibody incubation were performed at 95°C for 8 minutes and 35°C for 60 minutes, respectively.

The slides were photographed using a NanoZoomer Digital Pathology Virtual Slide Viewer (Hamamatsu Photonics, Hamamatsu, Japan) and subjected to morphometric analysis. In loupe

immunohistochemical staining for  $\alpha$ -smooth muscle actin ( $\alpha$ -SMA). (F) The  $\alpha$ -SMA-positive area was identified as *bright green* using the color-detecting algorithm of the software. The  $\alpha$ -SMA-positive ratio was 10.7%, calculated as the percentage area of  $\alpha$ -SMA-positive in an entire cut surface. (G) Loupe image of immunohistochemical staining for CD31. (H) Immunohistochemical staining for CD31 at  $\times 4.0$  magnification in the *blue square* shown in (G). The number of vessels was counted in terms of the CD31-immunopositive luminal structures visible in each field. The total number of vessels in an entire cut surface was 1,010, and the vessel density was 2.8/mm<sup>2</sup>.

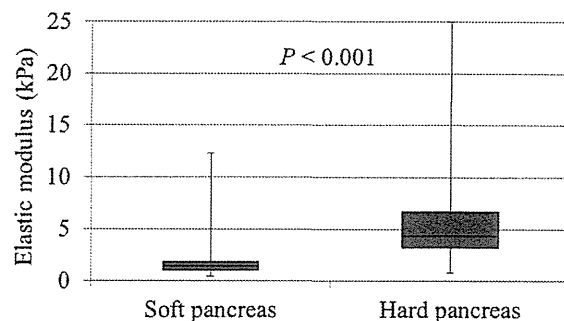
images of HE-stained slides, the outer circumference of the entire cut surface and inner circumference of the main pancreatic duct (MPD) lumen were automatically outlined, and their areas were calculated using the tracing algorithm of the WinROOF version 6.5 software (Mitani Corporation, Tokyo, Japan). HE- and azan-positive areas and  $\alpha$ -SMA-immunopositive areas were identified and calculated on the loupe image, using each color-detecting algorithm of the software.

The area of fat was defined as the area of an entire cut surface minus the MPD area and HE-positive area, and the lobular area was defined as the HE-positive area minus the azan-positive area. The number of vessels was counted manually as CD31-immunopositive luminal structures detectable at a magnification of  $\times 4.0$  in an entire cut surface. The MPD ratio was calculated as MPD area/area of an entire cut surface  $\times 100$ , the fat ratio as (area of an entire cut surface - MPD area - HE-positive area)/area of an entire cut surface  $\times 100$ , the azan-positive ratio as azan-positive area/area of an entire cut surface  $\times 100$ ,  $\alpha$ -SMA-positive ratio as  $\alpha$ -SMA-positive area/area of an entire cut surface  $\times 100$ , vessel density as number of vessels/area of an entire cut surface  $\times 100$ , and lobular ratio as (HE-positive area - azan-positive area)/area of an entire cut surface  $\times 100$ . Histological analyses of a case are shown in Fig 2. One investigator (M.S.) performed all of the histological analyses under the supervision of an experienced pathologist (M.K.).

**Statistical analysis.** Data for the EM of the resected pancreatic cut surface were compared between patients whose pancreatic consistency palpated intraoperatively was soft and hard, using Mann-Whitney  $U$  test. Correlation between EM and histological findings was evaluated with Spearman correlation coefficient  $\rho$ . Histological data were compared between the cases showing low and high EM by use of the Mann-Whitney  $U$  test. The Mann-Whitney  $U$  test also was used to compare the EM between patients who did and did not develop POPF after PD. Logistic regression analysis was used to evaluate the risk of POPF occurrence. Numerical data were expressed as median  $\pm$  SD. All  $P$  values were based on two-sided statistical tests, setting the significance level as .05. All statistical analyses were performed using the SPSS Statistics version 19.0 software (SPSS, Chicago, IL).

## RESULTS

**Correlation between EM and tactile sensation of the pancreas.** The median EM of the pancreatic cut edge for 59 cases was  $2.0 \pm 4.3$  kPa. The



**Fig 3.** Correlation between elastic modulus and pancreatic consistency was evaluated using the Mann-Whitney  $U$ -test.

pancreas was palpated as soft for 31 patients and as hard for 28 patients. The EM of the pancreas in cases that were judged as soft and hard was  $1.4 \pm 2.1$  kPa and  $4.4 \pm 5.1$  kPa, respectively ( $P < .001$ ) (Fig 3). Because the EM was strongly correlated with the tactile sensation felt by surgeons, the EM cut-off value was determined using the receiver operating characteristic curve for its relationship with the tactile sensation. The area under the receiver operating characteristic curve for the correlation between the EM and tactile sensation of the pancreas was 0.862. When 3.0 kPa was set as the cut-off value for the EM, sensitivity, specificity, positive predictive value, and negative predictive value were 75.0%, 90.3%, 87.5%, and 80.0%, respectively.

### Correlation between EM and histologic findings.

The EM was positively correlated with the ratio of azan positivity ( $\rho = 0.381$ ,  $P = .003$ ), the ratio of  $\alpha$ -SMA positivity ( $\rho = 0.369$ ,  $P = .004$ ), and vessel density ( $\rho = 0.559$ ,  $P < .001$ ), and negatively correlated with lobular ratio ( $\rho = -0.323$ ,  $P = .013$ ). No correlation was observed between the EM and area of an entire cut surface ( $\rho = 0.015$ ,  $P = .910$ ), MPD ratio ( $\rho = 0.175$ ,  $P = .184$ ), or fat ratio ( $\rho = 0.244$ ,  $P = .062$ ).

Using the aforementioned EM cut-off value, we discovered the data for histologic parameters between EM values below and above 3.0 kPa as follows: azan positivity ratio,  $6.5 \pm 9.3\%$  versus  $14.2 \pm 10.2\%$  ( $P = .003$ );  $\alpha$ -SMA positivity ratio,  $5.8 \pm 11.5\%$  versus  $14.1 \pm 14.0\%$  ( $P = .006$ ); lobular ratio,  $73.8 \pm 18.7\%$  versus  $60.6 \pm 16.0\%$  ( $P = .021$ ); vessel density,  $1.4 \pm 1.4/\text{mm}^2$  versus  $2.8 \pm 1.5/\text{mm}^2$  ( $P < .001$ ) (Table).

### Correlation between EM and occurrence of

**POPF.** POPF occurred in 23 (International Study Group on Pancreatic Fistula Grade A in 11; Grade B in 11; Grade C in 1) of the 59 patients. The EM of the pancreas in cases without POPF was  $3.5 \pm 4.9$  kPa, whereas that in cases associated

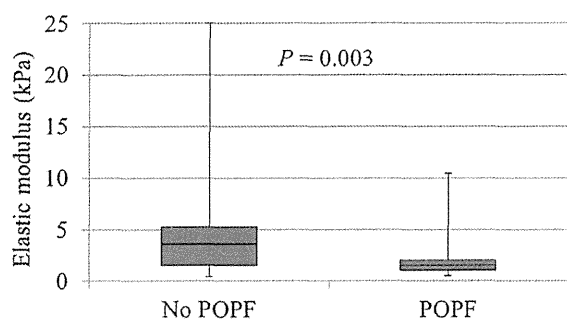
**Table.** Relationship between the EM with a cut-off at 3.0 kPa and histologic findings

|  | EM < 3.0 kPa  | EM > 3.0 kPa  | P value |
|--|---------------|---------------|---------|
| Area of an entire cut surface, mm <sup>2</sup> | 250.1 ± 106.6 | 234.3 ± 82.3  | .517    |
| MPD ratio, %                                   | 0.168 ± 0.982 | 0.430 ± 1.140 | .066    |
| Azan-positive ratio, %                         | 6.5 ± 9.3     | 14.2 ± 10.2   | .003*   |
| α-SMA-positive ratio, %                        | 5.8 ± 11.5    | 14.1 ± 14.0   | .006*   |
| Lobular ratio, %                               | 73.8 ± 18.7   | 60.6 ± 16.0   | .021*   |
| Fat ratio, %                                   | 15.4 ± 15.7   | 20.8 ± 12.4   | .195    |
| Vessel density,/mm <sup>2</sup>                | 1.4 ± 1.4     | 2.8 ± 1.5     | <.001*  |

\**P* < .05.

Relationship between EM with a cut-off at 3.0 kPa and histologic findings was evaluated using the Mann-Whitney *U*-test.

Azan, azan-Mallory; EM, elastic modulus; MPD, main pancreatic duct; α-SMA, α-smooth muscle actin.



**Fig 4.** Correlation between elastic modulus and the occurrence of postoperative pancreatic fistula was evaluated using the Mann-Whitney *U*-test. *POPF*, Postoperative pancreatic fistula.

with POPF was  $1.5 \pm 2.0$  kPa ( $P = .003$ ) (Fig 4). Univariate logistic regression analysis showed that patients with an EM of less than 3.0 kPa had an increased risk of POPF with a hazard ratio of 9.333 (95% confidence interval 2.342–37.196;  $P = .002$ ).

## DISCUSSION

The present study has demonstrated for the first time that it is possible to measure the EM of a pancreatic cut edge objectively and quantitatively and that the value is strongly correlated with the tactile sensation felt by surgeons. The EM cut-off value of 3.0 kPa was a good clinical benchmark for tactile sensation and histological findings, as well as the occurrence of POPF after PD.

In surgery, a normal healthy pancreas generally is palpated intraoperatively as soft, whereas a diseased or inflamed pancreas often is palpated as hard. However, tactile assessment of the pancreas is an ill-defined issue, because it is performed only by skilled abdominal surgeons, and the intrinsic nature of pancreatic consistency has never been fully investigated. Detailed histologic examinations using computer-based morphometric image analysis<sup>26,27</sup>

have revealed that the features associated with elevation of the EM of the pancreatic cut edge included an increased proportion of azan- and α-SMA-positive components, a decrease of lobules, and an increase of vessel density in the pancreatic parenchyma. The azan positivity ratio, as demonstrated by aniline blue staining, reflects the amount of collagen fibers and reticular fibers in the tissue,<sup>28</sup> and the α-SMA positivity ratio reflects the fibrotic response activated by myofibroblasts.<sup>29,30</sup> Increased vessel density represented by CD31 positivity, which showed a positive correlation with a greater EM, was considered to reflect neovascularization. Irreversible destruction of the exocrine parenchyma associated with fibrosis and neovascularization is a characteristic feature of chronic pancreatitis.<sup>31,32</sup> The data that have accumulated so far suggest that chronic inflammatory changes in the pancreatic parenchyma might result in the formation of a more tenacious pancreatic tissue structure associated with decreased secretion of pancreatic juice, and that this type of tissue may be better able to tolerate surgical suture placement, thus posing a lower risk of POPF after PD.

In a clinical setting, the measured EM value as an objective parameter of pancreatic consistency may facilitate a more definitive assessment of the risk of POPF after PD and may also allow meaningful comparisons among different institutions and studies, rather than subjective tactile sensation. Although there are no established reconstructive procedures or types of perioperative management to reduce the incidence of POPF after PD, countermeasures for a soft pancreas may differ from those for a hard pancreas because the former requires far more caution. Assessment of the EM may have potential to stratify patients according to the risk of POPF in prospective trials aimed at establishing definitive forms of patient care. Moreover, in the near future, accumulation of data

obtained by direct measurement of the EM of the pancreatic parenchyma may contribute to the preoperative assessment of pancreatic texture, POPF risk, and even lesion diagnosis, using elastographic imaging modalities.

The present study had certain limitations. First, the number of patients was relatively small. Second, although measurement of the EM was performed with an automatic indentation apparatus based on well-established physical rules,<sup>6</sup> reproducibility is an important consideration. The surface of the pancreas is not completely flat, and the aqueous component of interstitial tissue at the indentation point may disperse into the surrounding area. Physical characteristics that are not reflected in histologic features might create marked variability of data between cases. Moreover, the presence of plastic deformation and viscosity in the pancreatic specimen cannot be ruled out, and in fact this is a characteristic of human organs. Further accumulation of cases and validation with a modeling process may help to clarify how characteristics other than pure elasticity account for the properties of pancreatic tissue.

Third, although elevation of the EM was correlated with histologic findings such as chronic inflammation and a lower risk of POPF, pancreatic exocrine function was not investigated sufficiently. The relationships among fibrotic change, decrease of lobules, elevation of the EM, and exocrine function parameters should be the next focus of investigation. Furthermore, the utility of the EM for prediction of POPF was not evaluated adequately in this study. Because the EM of the pancreas showed a strong association with tactile sensation, multivariate predictive analysis for POPF including parameters possibly influencing each other could not be performed. A larger study will be needed to examine the value of the EM for prediction of POPF in comparison with other clinicopathologic parameters.

In conclusion, the present study has demonstrated that the EM of the cut edge of a resected pancreas represents the intraoperative tactile sensation felt by surgeons and reflects histologic findings including pancreatic fibrosis. The value of the EM also was correlated with the occurrence of POPF after PD. Measurement of the EM of the pancreas may facilitate an objective and quantitative assessment of pancreatic texture and a better understanding of the process of disease affecting the pancreatic parenchyma.

The authors wish to express special thanks to Toshio Ito of AXIOM Corporation for technical assistance with

the Venustron device used for measurement of EM. Thanks are also extended to Prof. Subaru Kudo, Department of Science and Technology, Ishinomaki Senshu University, for his support with verification of the physical rules applied, and Kenta Okaya, Mitani Corporation, for support with image analysis of the histological specimens.

## REFERENCES

1. Kawai M, Kondo S, Yamaue H, Wada K, Sano K, Motoi F, et al. Predictive risk factors for clinically relevant pancreatic fistula analyzed in 1,239 patients with pancreaticoduodenectomy: multicenter data collection as a project study of pancreatic surgery by the Japanese Society of Hepato-Biliary-Pancreatic Surgery. *J Hepatobiliary Pancreat Sci* 2011;18:601-8.
2. Hashimoto Y, Traverso LW. Incidence of pancreatic anastomotic failure and delayed gastric emptying after pancreaticoduodenectomy in 507 consecutive patients: use of a web-based calculator to improve homogeneity of definition. *Surgery* 2010;147:503-15.
3. Ansoorge C, Strömmer L, Andrén-Sandberg Å, Lundell L, Herrington MK, Segersvärd R. Structured intraoperative assessment of pancreatic gland characteristics in predicting complications after pancreaticoduodenectomy. *Br J Surg* 2012;99:1076-82.
4. Callery MP, Pratt WB, Kent TS, Chaikof EL, Vollmer CM Jr. A prospectively validated clinical risk score accurately predicts pancreatic fistula after pancreaticoduodenectomy. *J Am Coll Surg* 2013;216:1-14.
5. Lin JW, Cameron JL, Yeo CJ, Riall TS, Lillemoe KD. Risk factors and outcomes in postpancreaticoduodenectomy pancreaticocutaneous fistula. *J Gastrointest Surg* 2004;8:951-9.
6. Feynman RP. Elasticity. In: Feynman RP, Leighton RB, Sands M, editors. *The Feynman lectures on physics*, Vol. 2. Reading, MA: Addison-Wesley; 1964. p. 2-12.
7. Pailler-Mattei C, Bec S, Zahouani H. In vivo measurements of the elastic mechanical properties of human skin by indentation tests. *Med Eng Phys* 2008;30:599-606.
8. Hara Y, Masuda Y, Hirao T, Yoshikawa N. The relationship between the Young's modulus of the stratum corneum and age: a pilot study. *Skin Res Technol* 2013;19:339-45.
9. Diridollou S, Vabre V, Berson M, Vaillant L, Black D, Lagarde JM, et al. Skin ageing: changes of physical properties of human skin in vivo. *Int J Cosmet Sci* 2001;23:353-62.
10. Tilleman TR, Tilleman MM, Neumann MH. The elastic properties of cancerous skin: Poisson's ratio and Young's modulus. *Isr Med Assoc J* 2004;6:753-5.
11. Leng H, Reyes MJ, Dong XN, Wang X. Effect of age on mechanical properties of the collagen phase in different orientations of human cortical bone. *Bone* 2013;55:288-91.
12. Samani A, Zubovits J, Plewes D. Elastic moduli of normal and pathological human breast tissues: an inversion-technique-based investigation of 169 samples. *Phys Med Biol* 2007;52:1565-76.
13. Kaster T, Sack I, Samani A. Measurement of the hyperelastic properties of ex vivo brain tissue slices. *J Biomech* 2011;44:1158-63.
14. Itoh Y, Itoh A, Kawashima H, Ohno E, Nakamura Y, Hiramoto T, et al. Quantitative analysis of diagnosing pancreatic fibrosis using EUS-elastography (comparison with surgical specimens). *J Gastroenterol* [Epub ahead of print].

15. Doherty JR, Trahey GE, Nightingale KR, Palmeri ML. Acoustic radiation force elasticity imaging in diagnostic ultrasound. *IEEE Trans Ultrason Ferroelectr Freq Control* 2013;60:685-701.
16. D'Onofrio M, Crosara S, De Robertis R, Canestrini S, Demozzi E, Pozzi Mucelli R. Elastography of the pancreas. *Eur J Radiol* 2014; 83:415-9.
17. Iglesias-Garcia J, Domínguez-Muñoz JE, Castiñeira-Alvariño M, Luaces-Regueira M, Lariño-Noia J. Quantitative elastography associated with endoscopic ultrasound for the diagnosis of chronic pancreatitis. *Endoscopy* 2013;45:781-8.
18. Itokawa F, Itoi T, Sofuni A, Kurihara T, Tsuchiya T, Ishii K, et al. EUS elastography combined with the strain ratio of tissue elasticity for diagnosis of solid pancreatic masses. *J Gastroenterol* 2011;46:843-53.
19. Săftoiu A, Vilman P, Gorunescu E, Janssen J, Hocke M, Larsen M, et al, European EUS Elastography Multicentric Study Group. Accuracy of endoscopic ultrasound elastography used for differential diagnosis of focal pancreatic masses: a multicenter study. *Endoscopy* 2011;43:596-603.
20. Sugimoto M, Takahashi S, Gotohda N, Kato Y, Kinoshita T, Shibasaki H, et al. Schematic pancreatic configuration: a risk assessment for postoperative pancreatic fistula after pancreaticoduodenectomy. *J Gastrointest Surg* 2013;17: 1744-51.
21. Bassi C, Dervenis C, Butturini G, Fingerhut A, Yeo C, Izbicki J, et al, International Study Group on Pancreatic Fistula Definition. Postoperative pancreatic fistula: an international study group (ISGPF) definition. *Surgery* 2005;138:8-13.
22. Hertz H. Über die Berührung fester elastischer Körper. *Journal für die reine und angewandte Mathematik* 1881; 92:156-71.
23. Polyakov P, Soussen C, Duan J, Duval JF, Brie D, Francius G. Automated force volume image processing for biological samples. *PLoS One* 2011;6:e18887.
24. Yamaoka H, Asato H, Ogasawara T, Nishizawa S, Takahashi T, Nakatsuka T, et al. Cartilage tissue engineering using human auricular chondrocytes embedded in different hydrogel materials. *J Biomed Mater Res A* 2006;78:1-11.
25. Choi AP, Zheng YP. Estimation of Young's modulus and Poisson's ratio of soft tissue from indentation using two different-sized indentors: finite element analysis of the finite deformation effect. *Med Biol Eng Comput* 2005;43:258-64.
26. Glozman T, Azhari H. A method for characterization of tissue elastic properties combining ultrasonic computed tomography with elastography. *J Ultrasound Med* 2010;29: 387-98.
27. Tsujino T, Seshimo I, Yamamoto H, Ngan CY, Ezumi K, Takemasa I, et al. Stromal myofibroblasts predict disease recurrence for colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 2007;13: 2082-90.
28. Mallory FB. A contribution to staining methods. *J Exp Med* 1900;5:15-20.
29. Cherng S, Young J, Ma H. Alpha-smooth muscle actin ( $\alpha$ -SMA). *J Am Sci* 2008;4:7-9.
30. Storch KN, Taatjes DJ, Bouffard NA, Locknar S, Bishop NM, Langevin HM. Alpha smooth muscle actin distribution in cytoplasm and nuclear invaginations of connective tissue fibroblasts. *Histochem Cell Biol* 2007;127:523-30.
31. Sarles H, Bernard JP, Johnson C. Pathogenesis and epidemiology of chronic pancreatitis. *Annu Rev Med* 1989;40:453-68.
32. Friess H, Malfertheiner P, Isenmann R, Kühne H, Beger HG, Büchler MW. The risk of pancreaticointestinal anastomosis can be predicted preoperatively. *Pancreas* 1996;13:202-8.

# 腫瘍類似病変

## 疾患の概要

- 膵領域においては腫瘍を形成する腫瘍類似病変が存在し、腫瘍との鑑別が困難な症例がみられる。
- 腫瘍類似病変の代表的なものとしては、自己免疫性膵炎 (autoimmune pancreatitis : AIP) と非自己免疫性慢性膵炎 (non AIP chronic pancreatitis : non-AIP CP) がある (表1)。炎症性偽腫瘍の少なくとも一部は自己免疫性膵炎と考えられる。その他、過誤腫性病変や外傷性神経腫などの報告が散見されるが非常にまれである。
- 非自己免疫性慢性膵炎の多くはアルコール性であるが、特発性や遺伝性も少なからず存在する。自己免疫性膵炎は臨床病理学的に異なる1型、2型が存在するが、わが国においてはそのほとんどが1型である。
- 非自己免疫性慢性膵炎の2007年における新規発症患者数は15,200人、2002年の1年間における「自己免疫性膵炎臨床診断基準2006」に合致する患者数は953人であり、その一部は臨床的に腫瘍類似病変を呈すると思われる。海外からの報告では臨床的に腫瘍を疑われて手術された症例の16.6%、1996～2006年の国立がん研究センター東病院における手術症例では10.3%が腫瘍類似病変と考えられ、そのうち非自己免疫性慢性膵炎が53.3%、自己免疫性膵炎が46.7%であった。

## 臨床所見

### ■ 好発年齢、性

- 非自己免疫性慢性膵炎は50～60代の男性に多くみられ、大酒家が多く、喫煙率が高い。
- 1型自己免疫性膵炎はやや高齢の60～70代の男性に好発し、飲酒歴を有さないことが多い。
- 2型自己免疫性膵炎は欧米に多く、わが国ではきわめて少ない。1型と比較して若年者に多く、炎症性腸疾患の合併率が高い。

### ■ 臨床症状

- 非自己免疫性慢性膵炎においては上腹部痛、腰背部痛を呈することが多く、嘔気・嘔吐、腹部膨満感や全身倦怠感などがみられる。病態が進行すると膵機能の低下により、脂肪便、体重減少や糖尿病による症状が出現する。
- 自己免疫性膵炎では強い腹痛を認めることは少なく、軽い心窩部痛程度が多い。

表1 自己免疫性膵炎臨床診断基準 2011

| A. 診断項目   |  |
|---|--|
| I. 膵腫大  | a. びまん性腫大 (diffuse)<br>b. 限局性腫大 (segmental/focal)  |
| II. 主膵管の不整狭細像   | ERP  |
| III. 血清学的所見   | 高 IgG4 血症 ( $\geq 135\text{mg/dL}$ )   |
| IV. 病理所見  | ①高度のリンパ球, 形質細胞の浸潤と, 線維化<br>②強拡大視野当たり 10 個を超える IgG4 陽性形質細胞浸潤<br>③花むしる状線維化 (storiform fibrosis)<br>④閉塞性静脈炎 (obliterative phlebitis)              |
| 右の所見のうち   |  |
| a. 3 つ以上を認める  |  |
| b. 2 つを認める  |  |
| V. 膵外病変   | a. 臨床的病変<br>臨床所見および画像所見において, 膵外胆管の硬化性胆管炎, 硬化性涙腺炎・唾液腺炎 (Mikulicz 病) あるいは後腹膜線維症と診断できる。<br>b. 病理学的病変<br>硬化性胆管炎, 硬化性涙腺炎・唾液腺炎, 後腹膜線維症の特徴的な病理所見を認める。 |
| 硬化性胆管炎  |  |
| 硬化性涙腺炎・唾液腺炎   |  |
| 後腹膜線維症  |  |
| 〈オプション〉ステロイド治療の効果   |  |
| 専門施設においては, 膵癌や胆管癌を除外後に, ステロイドによる治療効果を診断項目に含むこともできる。悪性疾患の鑑別が難しい場合は超音波内視鏡下穿刺吸引 (EUS-FNA) 細胞診まで行っておくことが望ましいが, 病理学的な悪性腫瘍の除外診断なく, ステロイド投与による安易な治療的診断は避けるべきである。 |  |
| B. 診断   |  |
| I. 確診   | ①びまん型: Ia+〈III/IVb/V (a/b)〉<br>②限局型: Ib+II+〈III/IVb/V (a+b)〉の 2 つ以上<br>または Ib+II+〈III/IVb/V (a/b)〉+オプション<br>③病理組織学的確診: IVa                     |
| II. 準確診   | 限局型: Ib+II+〈III/IVb/V (a+b)〉   |
| III. 疑診*  | びまん型: Ia+II+オプション<br>限局型: Ib+II+オプション  |

自己免疫性膵炎を示唆する限局性膵腫大を呈する例で ERP 像が得られなかった場合, EUS-FNA で膵癌が除外され, III/IVb/V (a+b) の 1 つ以上を満たせば, 疑診とする。さらに, オプション所見が追加されれば準確診とする。

疑診\*: わが国ではきわめてまれな 2 型の可能性もある。+; かつ, /; または

(日本膵臓学会・厚生労働省難治性膵疾患に関する調査研究班。報告 自己免疫性膵炎臨床診断基準 2011。膵臓 2012; 27; 19 より抜粋)

約半数に閉塞性黄疸が出現する。また, しばしば涙腺炎や後腹膜線維症を合併する。

### ■ 画像所見

- 非自己免疫性慢性膵炎では, 膵管内の結石および膵全体に分布する複数ないしびまん性の石灰化を認める。
- 自己免疫性膵炎ではびまん性あるいは限局性の膵腫大が特徴的であり, 主膵管の拡張は伴わないことが多い。限局性病変や非典型的な症例においては膵癌との鑑別が困難なことがある。

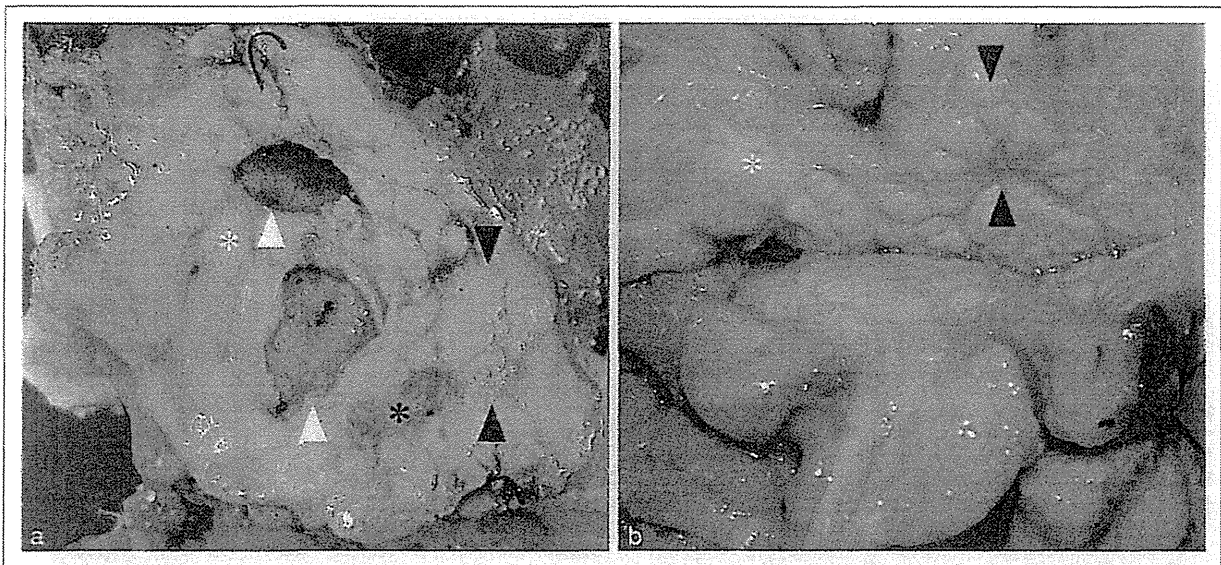
### ■ 血液生化学所見

- 非自己免疫性慢性膵炎において血中膵酵素の上昇が特徴である。
- 自己免疫性膵炎における膵酵素上昇の頻度は低いが, 血清  $\gamma$  グロブリン, IgG, IgG4, 抗核抗体, リウマトイド因子の上昇が高頻度でみられる。2 型では IgG4 上昇率が低い。

## 病理所見

### 肉眼所見

- 非自己免疫性慢性膵炎では白色の線維化を伴う病変として認められる。線維化はびまん性で膵組織を置換するパターンや小葉周囲にみられる場合などがある。出血、壊死、偽嚢胞、膵石などを伴う。腫瘍類似病変として切除される症例においても、白色の線維化や黄色調の脂肪壊死、小さな嚢胞や石灰化などがみられることが多い **図1**。
- 自己免疫性膵炎は例外を除き、壊死、膿瘍、膵石を認めない。膵癌と同様に線維化がみられ、組織全体が置換されていることが多いが、部分的に膵小葉が線維化に囲まれて残存してみられることもある **図2**。



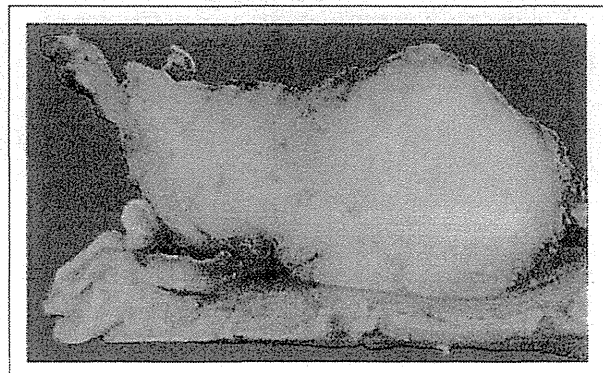
**図1** 非自己免疫性慢性膵炎の肉眼像

- a: 肉眼像において多彩である。線維化は、びまん性線維化 [\* (白)]、や小葉周囲性にみられることが多い (▶)。そのほか肉芽組織 [\* (黒)] や嚢胞形成がみられる (▷)。
- b: びまん性線維化 [\* (白)] および小葉周囲性線維化 (▶)。

膵

**図2** 自己免疫性膵炎の肉眼像

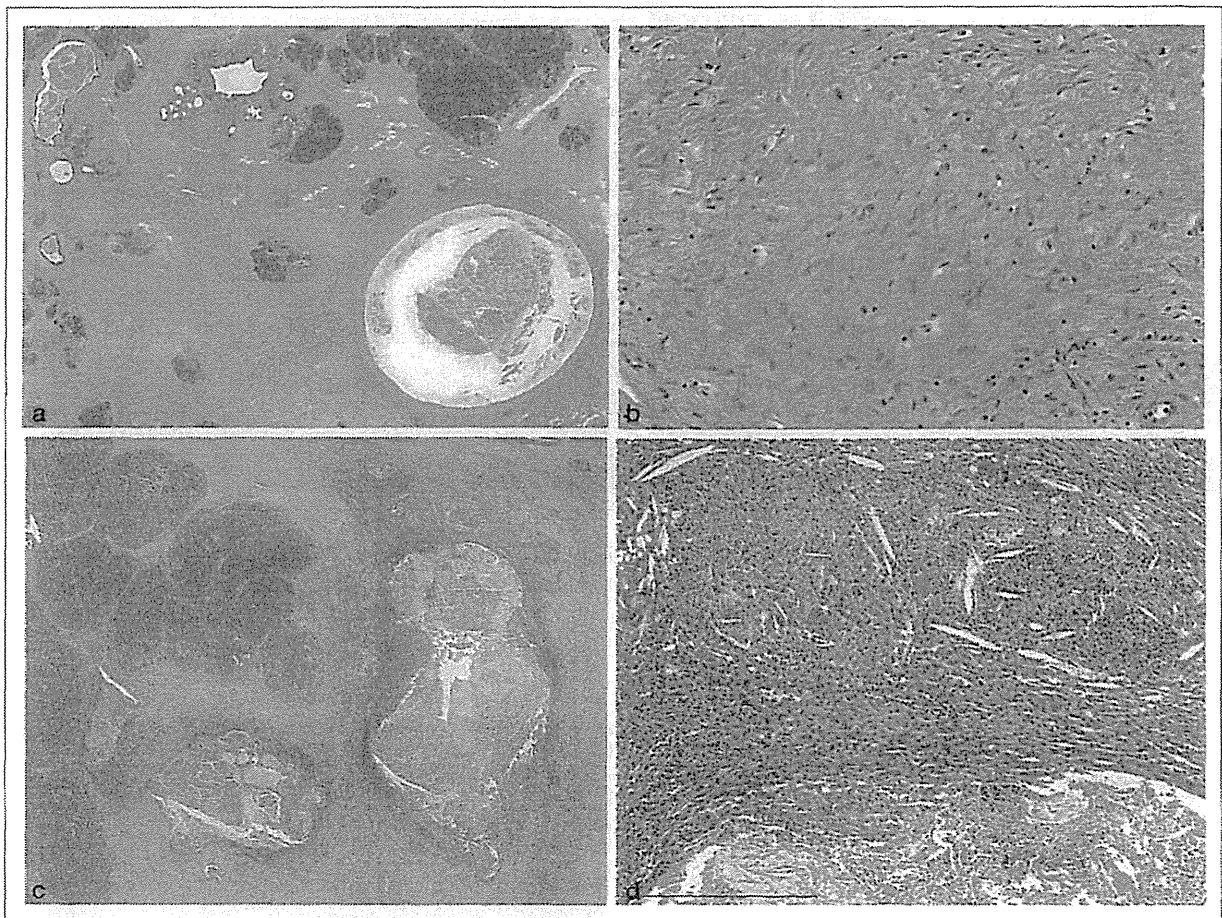
切除症例においては境界の比較的明瞭な場合が多い。線維化はびまん性にみられるが、辺縁部には小葉の残存がみられる。





## 組織学的所見

- 非自己免疫性慢性膵炎 **図3** では出血、壊死、偽嚢胞、膵石を認めることが多い。肉眼的に膵石が認められない場合でも、拡張した膵管内に小さな蛋白栓をしばしば多数認める。膵管は拡張、蛇行し、上皮が脱落している部分も多い。線維化巣は細胞が疎で基質に富む。炎症細胞浸潤は比較的乏しく、膵管周囲、壊死部、石灰化の周囲などに局在する。ヘモジデリン貪食組織球もしばしばみられる。糖尿病を合併した症例では Langerhans 島の硝子化もみられることがある。
- 1型自己免疫性膵炎では非自己免疫性慢性膵炎と比較すると炎症細胞浸潤を伴っており、間質細胞は密である **図4a**。炎症細胞はリンパ球、形質細胞が主体であり膵管周囲に線維化を伴ってみられる **図4b**。線維化は storiform fibrosis が基本であり、膵周囲にも線維化が及ぶことがある **図4c, d**。また、血管周囲や神経周囲にも炎症細胞浸潤がしばしばみられる **図4e, f**。出血、壊死、偽嚢胞、膵石は基本的には認めない。
- 2型自己免疫性膵炎においては壊死や嚢胞、石灰化を認めない点は1型と類似しているが、以下の相違がある。まず、好中球浸潤が目立ち、上皮内への浸潤もみられ、上皮の脱落を伴う。この所見は granulocytic epithelial lesion (GEL) と



**図3** 非自己免疫性慢性膵炎

- a: 弱拡大において基質に富む線維化がみられ、拡張した膵管が蛋白栓を含有してみられる。  
 b: 線維化巣は基質に富み、細胞成分は少ない。  
 c: 膵管内に蛋白栓と膵管上皮の脱落がみられる。  
 d: 上皮の脱落した膵管周囲には壊死やコレステリン間隙がみられる。

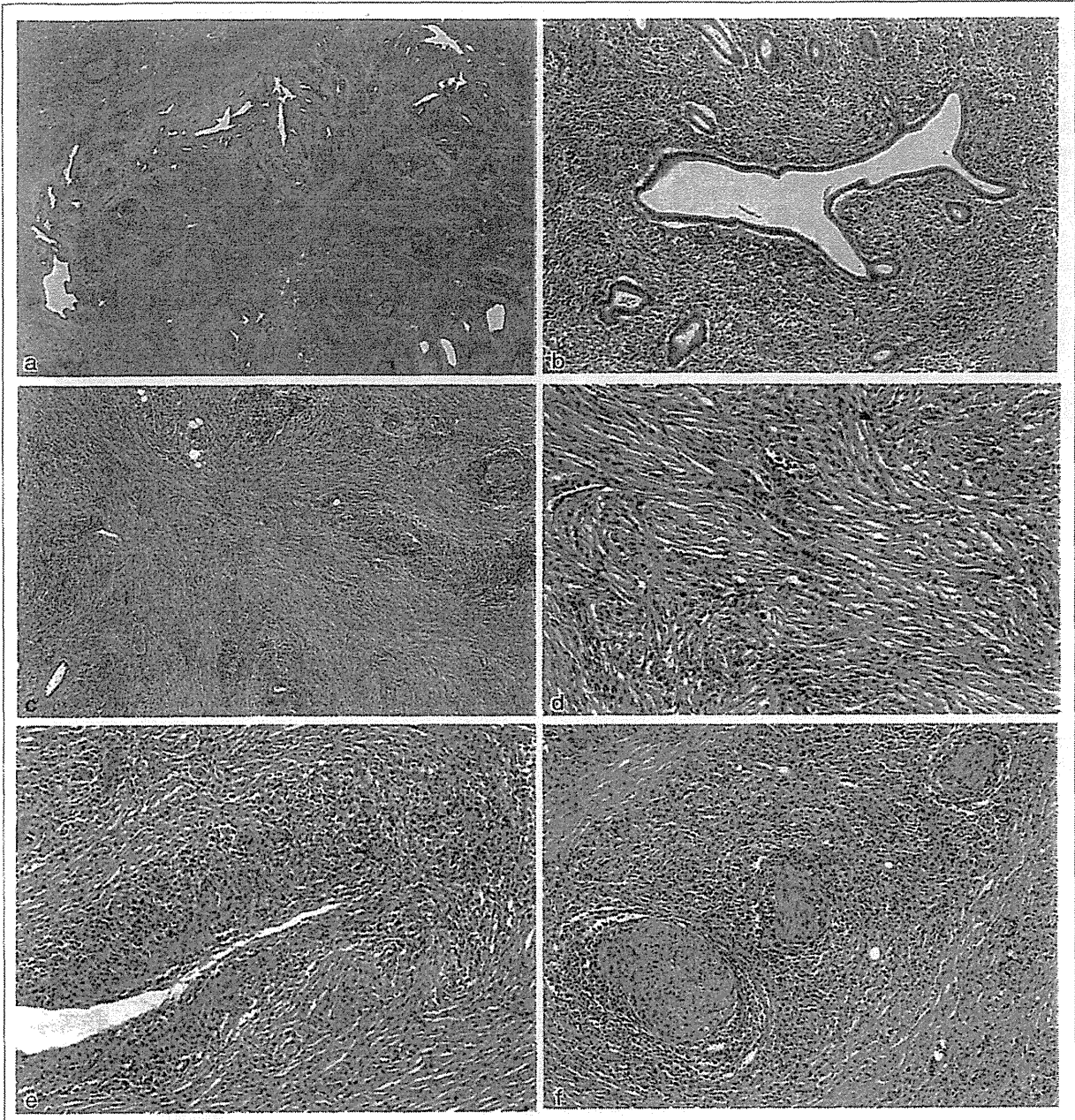


図4 1型自己免疫性脾炎

- a: 弱拡大において炎症細胞浸潤を伴う線維化がみられる。全体として細胞成分に富む。
- b: 脾管周囲に線維化を伴う炎症細胞浸潤がみられる。
- c, d: 間質の線維化はリンパ球などの炎症細胞浸潤を含み、細胞密度が高く、花むしろ状の配列を呈する。
- e, f: 静脈周囲や神経周囲にもリンパ球、形質細胞浸潤がみられる。

呼ばれる **図5**。線維化は周囲脂肪組織には及ばず、程度も軽度であることが多い。血管周囲の炎症も乏しい。組織内の IgG4 陽性細胞数も少ない傾向がある。1型と2型の鑑別には組織学的検索が重要と考えられる。

### 免疫組織化学

- 自己免疫性脾炎では IgG4 陽性リンパ球がびまん性にみられる。強拡大1視野10以上が判定の目安となる。癌に随伴する炎症でも IgG4 陽性細胞浸潤がみられることがあるが、血管周囲などに限局しており、浸潤細胞数も少ない。

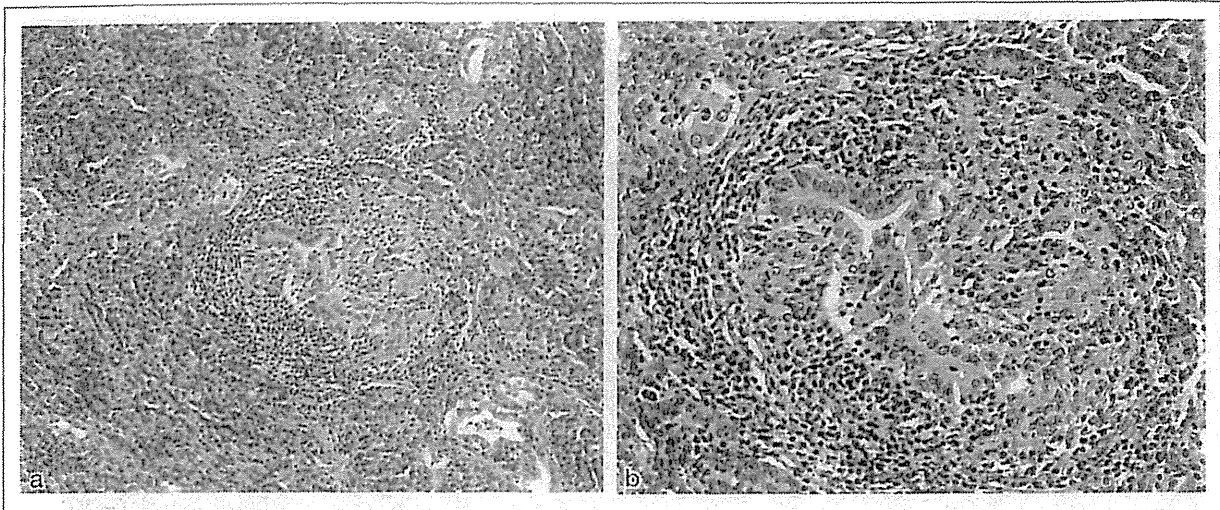
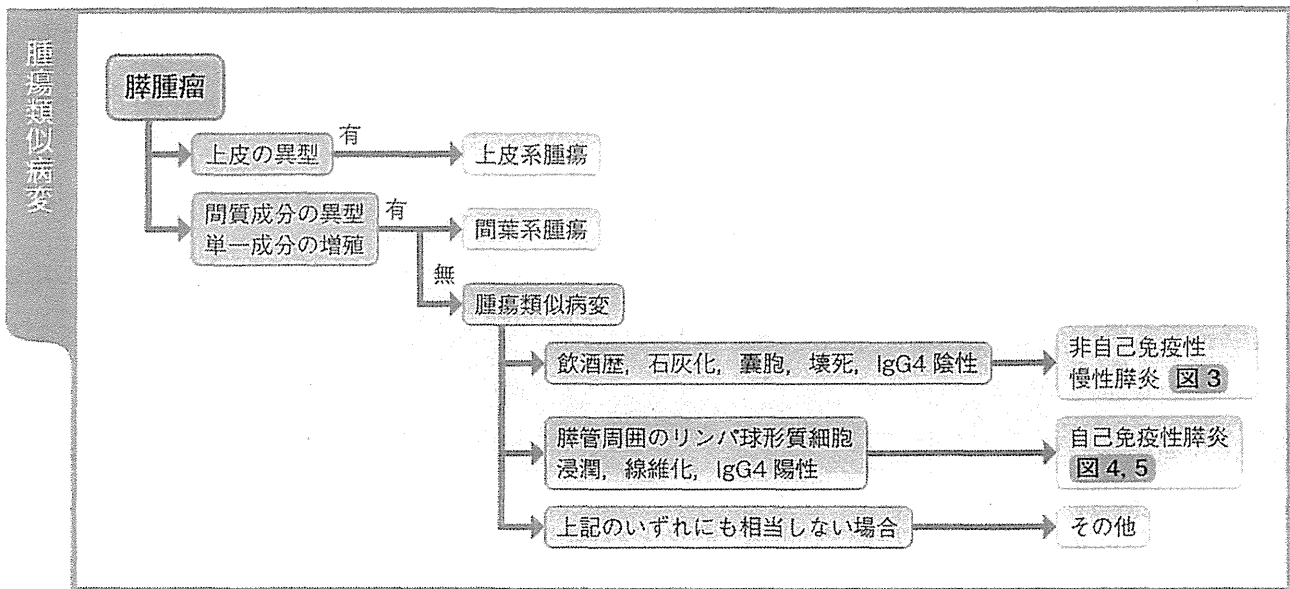


図5 2型自己免疫性膵炎における GEL  
膵管上皮内に好中球を含む炎症細胞浸潤がみられ、上皮の脱落を伴っている (a: 弱拡大, b: 強拡大)。

## 鑑別診断



### 診断のポイント

- ・膵腫瘍を臨床的に疑って切除や生検が施行される症例のなかには非腫瘍性、腫瘍類似病変が存在することを念頭に置く。
- ・まれではあるが膵原発、間葉系腫瘍も存在することを念頭に置く。
- ・腫瘍類似病変の多くは自己免疫性膵炎と非自己免疫性慢性膵炎であり、わが国における自己免疫性膵炎のほとんどが1型自己免疫性膵炎である。
- ・自己免疫性と非自己免疫性の鑑別には石灰化、嚢胞、壊死などの肉眼所見、リンパ球、形質細胞浸潤などの組織学的所見のほか、IgG4陽性形質細胞の確認が有用である。一方、2型自己免疫性膵炎などIgG4陽性形質細胞が少ない自己免疫性膵炎も存在するので注意が必要である（あくまでも診断補助マーカーである）。

- まれではあるが腭原発の間葉系腫瘍が存在する。そのうち特に充実性で紡錘形細胞からなる腫瘍は腫瘍類似病変との鑑別に挙がる。

▶ 神経鞘腫 (schwannoma)

- 腭原発 schwannoma の頻度は低い。
- 紡錘形細胞が palisading pattern を呈してみられる場合には神経系マーカーの免疫染色が必須である。一部の症例では嚢胞性変化などの二次的変化を生じることもある。

▶ 炎症性筋線維芽細胞性腫瘍 (inflammatory myofibroblastic tumor) および悪性線維性組織球腫 (malignant fibrous histiocytoma)

- いずれもまれな疾患であるが、線維芽細胞に異型や核分裂像がみられる場合は鑑別に挙げるべきである。
- p53 免疫染色は腫瘍性の判定に有用と報告されている。

(小嶋基寛)

## 膵・胆道癌診療の新時代へ—診断と治療の新たな展開—

## 何故、牛蒡子か？

池田 公史<sup>1)</sup>・江角 浩安<sup>2)</sup>

要約：膵癌が極めて予後不良である原因の一つは、乏血管性により抗癌剤が到達しにくく、低酸素と低栄養のため抗癌剤が効果を発揮しにくいことである。この栄養飢餓耐性を獲得した癌細胞に有効な薬剤として、アルクチゲニンを同定した。アルクチゲニンの抗腫瘍性を膵癌細胞株およびゼノグラフトで再確認し、毒性試験にて毒性がないことを確認した。アルクチゲニンを多く含む牛蒡子エキス剤を製剤化（GBS-01）し、ゲムシタピン不応膵癌患者を対象として、GBS-01の第Ⅰ相試験を施行した。GBS-01と関連のある有害事象はほとんど無く、ゲムシタピンとS-1併用療法に不応の患者1名に部分奏効が得られた。現在、ゲムシタピンとフツ化ピリミジン系抗癌剤に不応の膵癌患者を対象として、多施設共同第Ⅱ相試験が進行中である。GBS-01は、栄養飢餓状態で有効性を発揮するという独創的なコンセプトを持つ抗癌剤であり、今後もさらなる開発を進めていく予定である。

Key words：牛蒡子，アルクチゲニン，栄養飢餓耐性，ミトコンドリア複合体Ⅰ

## はじめに

進行膵癌に対する化学療法は、ゲムシタピン+エルロチニブ療法、FOLFIRINOX療法やゲムシタピン+ナブパクリタキセル療法の延命効果が示され、近年、急速に進歩している。しかし、これらの治療法でも効果が得られなかったり、耐性を示したりと、その治療効果はまだ十分ではなく、膵癌患者の予後は不良である。その理由として、大部分の膵癌では、血管造影、造影CT、MRIなどによって乏血管性が認められ、血流が少ないために酸素が十分供給されない低酸素環境下となり、それによって抗癌剤の抗腫瘍効果が減弱する可能性が指摘されている。牛蒡子の主成分であるアルクチゲニンは、これらの低酸素・低栄養状態の癌細胞に対して選択的な抗腫瘍効果を示すことが判明し、膵癌に対して有効性が期待できると考え、臨床研究を進めている。本稿では、膵癌に対する牛蒡子のこれまでの開発の経緯について、解説する。

Why is Goboushi ?

Masafumi Ikeda et al

1) 独立行政法人国立がん研究センター東病院肝胆膵内科 (〒277-8577 千葉県柏市柏の葉 6-5-1)

2) 学校法人東京理科大学生命医科学研究所

## Ⅰ. 何故、牛蒡子か？

膵癌の一つの大きな特徴は、乏血管性である。一般に、腫瘍が増殖進展する時には盛んな増殖を支えるため腫瘍血管の増生が必要とされている。肝癌や腎癌はその典型であり、盛んな腫瘍血管増生が癌化の目印である。細胞が分裂するためには細胞の構成成分であるDNA、RNAはもとより、タンパク質、脂質、糖タンパクなどすべてが2倍になる必要があり、これらを合成するための莫大なエネルギーがATPの形で必要である。そこで、膵癌のように乏血管性、血流不足の状態では、如何にして可能なのか？という疑問が生じた<sup>1)</sup>。一般に、癌が乏血管性、血流不足の状態になると、下記のような状態が生じてくる。

①膵癌に限らず多くの固形癌は強い低酸素状態にあり、低酸素と悪性度が相関する。

②固形癌組織のメタボローム解析をすると、グルコース濃度が多くの場合極めて低い<sup>2)</sup>。

③膵癌細胞株などは栄養欠乏に耐性を示す<sup>3)</sup>。

④グルコース依存性の癌細胞でも低酸素にすると、耐性を誘導できる<sup>4)</sup>。

⑤既存の抗癌剤は低酸素・低栄養条件では効果が失われる<sup>5)</sup>。

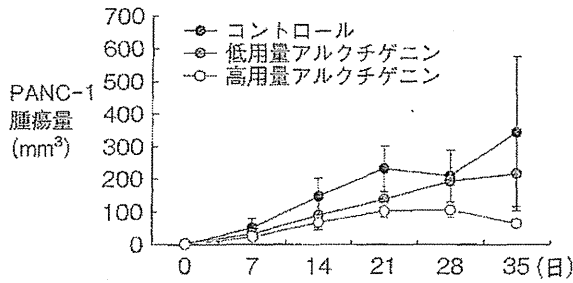


図1 ゼノグラフトでのアルクチゲニンの抗腫瘍性

これらのことから、低酸素・低栄養状態で抗腫瘍性を示す抗癌剤の開発が必要と考え、癌細胞の示す栄養飢餓耐性を解除する化合物をスクリーニングした。各種の化合物ライブラリーや放線菌の培養濾液などをスクリーニングし、現在までに20種類以上の候補を見出している。その中で、約500種類の伝統薬の阻抽出液の活性を調べた時に、最も活性の高かったのが牛蒡子であった。富山医科薬科大学(当時)和漢薬研究所 Suresh Awale 博士、門田重雄教授との共同研究で牛蒡子の活性本体がリグナン的一种アルクチゲニンであることを突き止めた<sup>6)</sup>。アルクチゲニンはベトリ皿の中では血清の存在で活性が低下するが、アルクチゲニンの IC<sub>50</sub> が 1 μM 程度であり、活性が低下しても十分に効果が期待できると考えた。動物でも、数種類のヒト肺癌細胞株のゼノグラフトで抗腫瘍性を示した(図1)。アルクチゲニンは、グルコースなど栄養が十分に存在すれば毒性を示さなかったため、生体では低毒性と予想した。実際、マウスで4週間の毒性試験を行ったが、抗腫瘍性を示す投与量の100倍まではさしたる影響を認めなかった。

## II. アルクチゲニンはどのように抗腫瘍効果を示すか?

アルクチゲニンは、培養細胞ではグルコース欠乏時に選択毒性を強く示す(図2)。細胞をグルコース欠乏培地に置くと極めて速やかに PI3K/AKT 系の活性化が起こる。この活性化は、グルコース代謝の中間産物の減少により引き金を引かれる NOX4 による H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> の産生により引き起こされることが分かっている。当初、アルクチゲニンの存在下では PI3K/AKT の活性化が強く抑制されるので、PI3K/AKT 系による生存シグナルの抑制が細胞死のメカニズムではないかと考えていた。その後、アルクチゲニンはミトコンドリアの複合体 I を阻害すること、グルコース欠乏下では強く活性酸素を産生することが明らかになった<sup>7)</sup>。グル

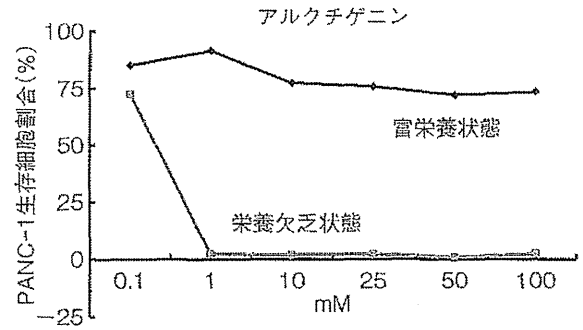


図2 アルクチゲニンの抗腫瘍性

コース欠乏条件ではミトコンドリアへの依存性が高くなると予想され、ミトコンドリア複合体 I の阻害によるエネルギー枯渇が細胞死の原因と考えられた。しかし、活性酸素の発生を抑えることにより細胞死は強く抑制されたため、細胞死の直接の原因は強い活性酸素の発生と考えている。

乏血管性の悪性腫瘍はどこでも低酸素・低グルコース状態であろうか? たとえ乏血管性の腫瘍の典型である肺癌でも血流の盛んな腫瘍血管の周りや毛管から距離のある、あるいは血流の極めて悪い部分とは入り交じっており、腫瘍の微小環境は多彩 (heterogenous) である。アルクチゲニンは、この多彩な組織の中で、灌流の悪い部分に、より強い効果を示すと考えられる。アルクチゲニンとよく似た作用を示すキガマイシン D で治療すると microvessel density は却って高くなり抗 VEGF 抗体による normalization のような効果が観察されている<sup>8)</sup>。

抗癌剤や各種の治療に抵抗性を示す“癌幹細胞”は、低酸素・低栄養ニッチに存在するという考えがある。実際、われわれの用いているヒト肺癌細胞株でもこの様な条件にすると CD44, CD24, CD133 などの幹細胞マーカーの発現が増加する。アルクチゲニンは、実は癌幹細胞フラクションにより強い効果を示すのではないかと考え、*in vitro* およびゼノグラフトモデルで検討した結果、予想通り癌幹細胞マーカー陽性細胞の強い減少をみる事ができた。その作用メカニズムから考えてもアルクチゲニンは単剤で用いるよりも、抗 VEGF 抗体と同じように抗癌剤との併用に強い効果が期待される。実際、M1APACA2 などを用いたゼノグラフトではイリノテカンとの併用で有意に腫瘍の消失が認められている。

## III. GBS-01 とは?

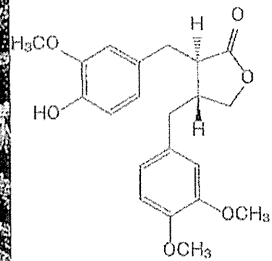
このように、アルクチゲニンが肺癌に対して抗腫瘍



Arctium lappa(牛蒡子)



牛蒡子  
GoBouShi



Arctigenin

→GBS-01

図3 アルクチゲニン

性を示すことが明らかになり、肺癌患者を対象として、アルクチゲニンの臨床試験を行うこととなった。しかし、アルクチゲニンを精製して、薬剤化することはすぐには困難であるため、アルクチゲニンを多く含有する牛蒡子を用いることとなった。牛蒡子は第十六改正日本薬局方に収載されている生薬であり、*Arctium lappa Linne* の果実である。牛蒡子を含む漢方製剤は、一般用医薬品、医療用医薬品として製造販売され、広く国内の臨床現場で使用されている。また、臨床研究において牛蒡子エキス量として4.0 g/日までの忍容性が確認されており、特記すべき毒性所見が認められていない。この牛蒡子の抽出液を減圧濃縮し、噴霧乾燥ののち賦形剤を加えて顆粒とした牛蒡子エキス製剤がGBS-01 (GoBouShi) である(図3)。

#### IV. GBS-01 の臨床試験

まずは、GBS-01の安全性を確認する目的で、第I相臨床試験を計画した<sup>9)</sup>。主要評価項目はGBS-01の投与量規制毒性とし、投与量規制毒性を含めて有害事象を検討し、第II相臨床試験での推奨用量を決定することとした。副次的に有効性も評価した。対象は、病理組織学的に診断された進行肺癌で、ゲムシタピン不応の進行肺癌患者とした。

GBS-01は、レベルを3段階に設定し、各レベル3名の用量漸増試験を行った。レベル1:2包(牛蒡子エキスとして1.0 g)/回、レベル2:5包(牛蒡子エキスとして2.5 g)/回、レベル3:8包(牛蒡子エキスとして4.0 g)/回とし、GBS-01を1日1回連日経口投与することとした。投与量規制毒性はGBS-01投与後28日

までのGrade 4の血液毒性、Grade 3以上の非血液毒性とした。有害事象はCTC AE ver 4.0、抗腫瘍効果はRECIST1.1にて判定した。

レベル1:3名、レベル2:3名、レベル3:9名、計15名が登録された。レベル3で投与量規制毒性の評価不能であった3名を除く6名において、投与量規制毒性の発現は認めなかった。主なGrade 3以上の有害事象については、 $\gamma$ GTP上昇(46.7%)、高血糖(33.3%)、ビリルビン増加(20.0%)、AST増加(6.7%)、ALT増加(6.7%)、ALP増加(6.7%)が認められた(表1)が、いずれも原病に起因すると考えられた。また、有効性に関しては、15名中1名[ゲムシタピン+S-1療法施行後、増悪を認めた症例に部分奏効(PR)(5ヵ月継続)]、4名において安定(SD)が認められた。無増悪生存期間の中央値は1.05ヵ月、全生存期間は5.68ヵ月であった。

栄養飢餓耐性を標的としたGBS-01は第I相試験の結果、レベル3(牛蒡子エキスとして4.0 g)の忍容性が確認され、推奨用量は牛蒡子エキスとして4.0 gと判断された。また、第I相試験でPR例も認められており、有効性も示唆された。今後、第II相試験に進み、有効性と安全性を確認する意義は十分であると考えている。

このように、ゲムシタピン不応の進行肺癌患者に対して、GBS-01の忍容性は良好で、腫瘍縮小効果も確認されたため、現在、ゲムシタピンならびにフッ化ピリミジン系抗癌剤に不応の進行肺癌患者に対してGBS-01の多施設共同の第II相試験を行っている(UMIN000010111)。主要評価項目は、8週の病勢制御割合とし、副次評価項目は、有害事象、奏効割合、無

表 1 GBS-01 の主な有害事象

| CTC-AE4.0 | Level 1 (n=3) |    |    | Level 2 (n=3) |    |    | Level 3 (n=9) |    |    |
|-----------|---------------|----|----|---------------|----|----|---------------|----|----|
|           | G1-2          | G3 | G4 | G1-2          | G3 | G4 | G1-2          | G3 | G4 |
| 好中球数減少    | 0             | 0  | 0  | 1             | 0  | 0  | 1             | 0  | 0  |
| 貧血        | 2             | 0  | 0  | 3             | 0  | 0  | 3             | 0  | 0  |
| 血小板減少     | 0             | 0  | 0  | 0             | 0  | 0  | 1             | 0  | 0  |
| 下痢        | 0             | 0  | 0  | 0             | 0  | 0  | 4             | 0  | 0  |
| 嘔気        | 0             | 0  | —  | 1             | 0  | —  | 5             | 0  | —  |
| 嘔吐        | 0             | 0  | 0  | 1             | 0  | 0  | 3             | 0  | 0  |
| 食欲不振      | 1             | 0  | 0  | 1             | 0  | 0  | 6             | 1  | 0  |
| 倦怠感       | 1             | 0  | 0  | 1             | 0  | 0  | 2             | 2  | 0  |
| ビリルビン上昇   | 0             | 0  | 0  | 0             | 0  | 0  | 2             | 1  | 0  |
| AST 上昇    | 2             | 0  | 0  | 1             | 0  | 0  | 7             | 1  | 0  |
| γGTP 上昇   | 1             | 1  | 0  | 1             | 0  | 0  | 3             | 5  | 0  |
| 高血糖       | 2             | 1  | 0  | 1             | 2  | 0  | 7             | 2  | 0  |

増悪生存期間, 全生存期間, 薬物動態学的パラメータとして行い, 現在までに第II相試験の計39名の患者の登録も終了し, 近日中に結果が明らかになる予定である。

### おわりに

アルクチゲニンを多く含む牛蒡子エキス製剤である GBS-01 は低酸素, 低栄養条件下で抗腫瘍活性を呈する薬剤として, 開発された。最近の研究で, アルクチゲニンはミトコンドリア複合体 I を阻害することが判明した。また, 癌幹細胞様細胞に対する効果も確認され, アルクチゲニンによる抗腫瘍活性の機序も徐々に明らかにされている。そして, GBS-01 の臨床試験でも良好な腫瘍縮小効果が得られた症例も認めており, 進行膵癌に対する GBS-01 の有効性が期待されている。

### 参考文献

- 1) 江角浩安: がん細胞の代謝を標的とした薬剤開発. 腫瘍内科 13: 458-463, 2014.
- 2) Hirayama A, Kami K, Sugimoto M, et al.: Quantitative metabolome profiling of colon and stomach cancer microenvironment by capillary electrophoresis time-of-flight mass spectrometry. *Cancer Res* 69: 4918-4925, 2009.
- 3) Izuishi K, Kato K, Ogura T, et al.: Remarkable tolerance of tumor cells to nutrient deprivation: possible new biochemical target for cancer therapy. *Cancer Res* 60: 6201-6207, 2000.
- 4) Esumi H, Izuishi K, Kato K, et al.: Hypoxia and nitric oxide treatment confer tolerance to glucose starvation in a 5' -AMP-activated protein kinase-dependent manner. *J Biol Chem* 277: 32791-32798, 2002.
- 5) Onozuka H, Tsuchihara K, Esumi H: Hypoglycemic/hypoxic condition in vitro mimicking the tumor microenvironment markedly reduced the efficacy of anticancer drugs. *Cancer Sci* 102: 975-982, 2011.
- 6) Awale S, Lu J, Kalauni SK, et al.: Identification of arctigenin as an antitumor agent having the ability to eliminate the tolerance of cancer cells to nutrient starvation. *Cancer Res* 66: 1751-1757, 2006.
- 7) Owada S, Shimoda Y, Tsuchihara K, et al.: Critical role of H2O2 generated by NOX4 during cellular response under glucose deprivation. *PLoS One* 8: e56628, 2013.
- 8) Jain RK: Normalizing tumor microenvironment to treat cancer: bench to bedside to biomarkers. *J Clin Oncol* 31: 2943-2948, 2013.
- 9) Ikeda M, Sato A, Mochizuki N, et al.: A phase I trial of GBS-01 for advanced pancreatic cancer refractory to gemcitabine. *J Clin Oncol* 31: suppl; abstr 2559 2013.

\* \* \*



## III 分子イメージングの臨床への展開

## 2. がんの分子イメージングの現状と展望

藤井 博史 独立行政法人 国立がん研究センター東病院臨床開発センター機能診断開発分野

## がん治療の発展と画像検査の役割の変化

がんの根治には、がん細胞を体内から完全に排除することが必要であり、治療の開始前にがんの進展範囲の評価、すなわち病期診断（ステージング）を正確に行うことが重要である。多くのがんの病期診断にはTNM分類が用いられ、原発巣の進展範囲（T因子）、所属リンパ節への転移の有無（N因子）および遠隔転移の有無（M因子）が評価されているが、これには従来よりX線CT検査、MRI検査などの画像検査が重要な役割を果たしてきた。

さらに、今日ではがんを根治させるだけでなく、治療後の患者の生活の質（quality of life : QOL）の担保も求められるようになってきている。そのためには、できるだけ小さい侵襲で高い治療効果の得られる治療法を選択することが大事であり、がんの形態学的な特徴だけでなく、がんの性状も評価することが必要になっている。最近の分子生物学的手法を駆使した研究から、がんの本態が、遺伝情報の変異が原因で無秩序な増殖を行うようになった細胞集塊であることが明らかになったため、がんの遺伝子情報や遺伝子変異に関連して生じる代謝変化などを可視化することによって、がんの性状を評価する手法が研究されるようになってきている。このような生体内の分子動態を引き起こす生化学現象などを可視化する画像診断技術は“分子イメージング”と称され、さまざまな画像診断モダリティ

に関して新技術の開発が精力的に進められている<sup>1)</sup>。こうした新規技術を臨床応用することにより、がん治療の最適化、低侵襲化が進むものと考えられる。

## がんの診断精度を向上させるための分子イメージング

最近の多列X線CT装置や高磁場MRI装置の開発は、診断画像の画質を改善させたが、同時に放射線科医が読影しなければならぬ画像量も著しく増加させてしまった。もし、がん病巣を選択的に周囲の健常組織とは異なる信号で描画することができれば、がん病巣の診断効率の改善につながる。ブドウ糖の類似化合物である<sup>18</sup>F-fluorodeoxyglucose (FDG)を用いたPET検査は、組織の糖代謝活性の評価が可能で、周囲の健常組織よりも糖代謝活性が亢進することが多いがん病巣を高いコントラストで描画するため、がん病巣の診断精度の向上に貢献している（図1）。<sup>18</sup>F-FDG-PET検査は、糖代謝活性を反映する分子プローブを用いた画像診断検査であり、現時点において最も重要な“臨床分子イメージング検査”と言える。

## 外科治療の低侵襲化のための分子イメージング

がんの進展範囲が確認できれば、それに基づいて至適な治療法を選択することになるが、がん病巣を物理的に摘除する外科治療は最も根治性の高い治療法で

ある。しかし、がんの外科的切除に伴う病巣周囲の健常組織の損傷は、治療後の患者のQOLの低下につながるおそれがあるため、切除範囲を最低限にとどめることが重要である。

術中にがん病巣の境界を明瞭に描出することができれば、過不足のないがん病巣の摘出が可能となる。外科的治療では、もともと体深部に位置する病巣を近距離から視覚で確認しながら治療を進めるため、吸収や散乱により体表からの観察に利用することが難しい光イメージング技術を活用することができる。光イメージングは時間分解能に優れ、リアルタイムで信号変化を観察することが可能であるため、光イメージング技術を併用することで、手術時間に影響を与えることなく精度の高い手術を施すことが可能となる。イメージングプローブの安全

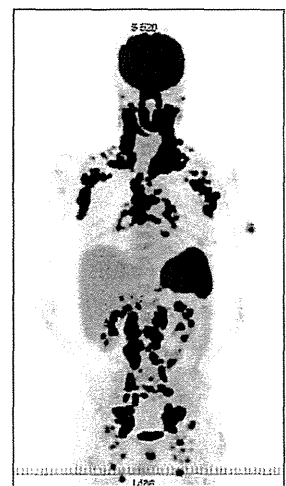


図1 <sup>18</sup>F-FDG-PET画像  
70歳代、男性。悪性リンパ腫（stage III）。

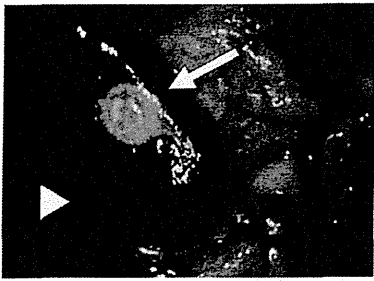


図2 ICGによる大腸がん肝転移病巣  
辺縁の術中イメージング  
◀: 転移病巣, ▶: 正常肝臓  
(参考文献2)より引用転載)



a: 白色光での観察 b: レーザー光による暗視野での観察 c: 摘出後  
図3 5-ALAによる膠芽腫の術中イメージング  
(画像ご提供: 国立がん研究センター中央病院脳脊髄腫瘍科・成田喜孝先生)

性が担保されれば、臨床応用は比較的容易である。具体的な例として以下のようなものがある。

肝腫瘍の病変切除時に、肝機能検査薬であるindocyanine green (ICG)を投与すると、がん病巣の周囲の肝組織にICGが停滞し、がん病巣との間に良好なコントラストを呈する。ICGは生体からの自家蛍光の乏しい近赤外線光領域でも蛍光を発することから、術中に近赤外線光領域の波長を観察することにより、より明瞭にがん病巣の境界を判断することができる<sup>2)</sup>(図2)。また、5-aminolevulinic acid (ALA)はアミノ酸の1つで、生体内では赤色の蛍光を発するprotoporphyrin IXに代謝される。膠芽腫病巣には正常脳組織よりも多くprotoporphyrin IXが停滞するため、術前に5-ALAを服用させておくと膠芽腫病巣と正常脳組織との間にコントラストが生じ、両者の境界の判断に役立つ<sup>3)</sup>(図3)。

所属リンパ節の郭清も手術侵襲に大きく影響する。多くのがんでは、所属リンパ節の転移状態が重要な予後因子となっており、所属リンパ節の転移状態の評価のため所属リンパ節の郭清が実施されることが多いが、これによりリンパ浮腫などの後遺症に悩まされることがある。このため、最小限の侵襲で所属リンパ節の転移状態を評価する技術が期待されている。これまでの研究から、多くのがんで所属リンパ節への転移が、原発巣からのリンパ流を直接受けるリンパ節であるセンチネルリンパ節(SN)にリンパ節転移が初発することが明らかとなった(SN concept)。この概念が成立するがんに対しては、まず、SNを生検し、

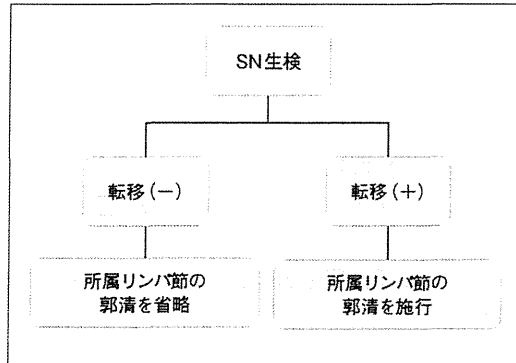


図4 sentinel node navigation surgeryの概要

その転移状態を評価することにより、そのほかの所属リンパ節の転移状態を予測することができ、ひいてはその郭清を省略することも可能となる sentinel node navigation surgery (SNNS)を実施することができる(図4)。SNNSの成功には、SNの確実な同定が重要である。リンパ移行性を示すイメージングプローブを原発巣周囲に投与し、その動態を観察することによりSNを同定することができる。現在、わが国では、乳がんと悪性黒色腫のSN検索に対して、2種類の青色色素および2種類の放射性薬剤が保険適用となっているが(図5)、頭頸部がんや胃がんに対しても保険適用をめざした臨床研究が進められている。このほかの泌尿器科がんや婦人科がん、肺がんに対しても、SN conceptが成立すると報告が認められる。米国では、リンパ節内のマクロファージに発現するマンノース受容体に親和性を示す<sup>99m</sup>Tc標識tilmanoceptが承認されるなど、SN検索を目的とする分子プローブの開発も進められているが、SN生検の目的はその転移状態を知ることであるため、分子イメージング研究のテーマとしては、SN内の小転移病巣の可視化の方が興味

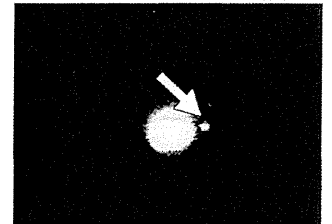


図5 <sup>99m</sup>Tc標識フチン酸リンバ  
シンチグラフィによる悪性  
黒色腫のSN検索  
原発巣は下腹部の正中よりやや  
右寄りに位置したが、SN(↓)  
は左鼠径部に見つかった。  
(画像ご提供: 帝京大学皮膚科・  
小林孝志先生)

深い。

2000年代の初めに、超常磁性体酸化鉄(USPIO)造影MRIにより、リンパ節内の小転移病巣を陰性に描画させる方法が考案され、注目を集めたが<sup>4)</sup>(図6)、USPIOの安全性の問題やリンパ節内のマクロファージの分布が非転移領域においても均等ではないことによる偽陽性所見が少なからず認められることなどから、実用化には至っていない。今後の研究の進展により、SN内の免疫状態の可視化などにより予後の増悪に関係する転移病巣が描画できるようになれば、臨床的有用性は高いと考えている。

## 放射線治療の最適化のための分子イメージング

手術によるがん病巣の摘除によってQOLを損なう危険性が高ければ、放射線治療や化学療法などの非外科的治療を施すことも賢明な選択である。最近の放射線治療技術の進歩は目覚ましく、強度変調放射線治療(IMRT)や粒子線治療などが導入され、がん病巣に高い選択性で線量を集中させる治療計画が可能となっている。がん病巣の放射線

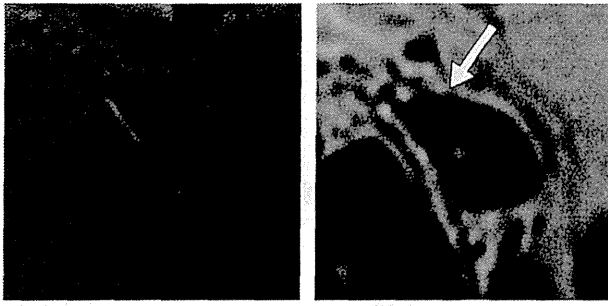


図6 USPIO造影MRIによる前立腺がんのリンパ節内転移病巣の描出  
正常リンパ節組織 (b ↓) の信号が低下して、相対的に転移病巣が高信号に描出される。  
(画像ご提供: Massachusetts総合病院放射線科・Harisinghani先生)

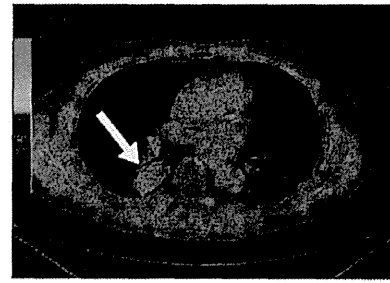


図7  $^{18}\text{F}$ -FAZA-PETによる肺がん低酸素イメージング  
60歳代、男性。右肺がん (→)。

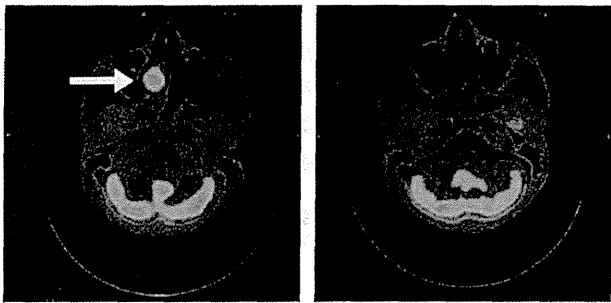


図8  $^{18}\text{F}$ -FDG-PET/CT検査による治療効果判定  
50歳代、男性。右鼻腔がん (a→)。aは治療前。bは陽子線治療後。軟部組織の残存を認めるが、FDG集積は消失し、がん病巣は制御された。

a: 治療前 b: 陽子線治療後

治療感受性を治療前に評価できれば、放射線治療のさらなる最適化が期待できる。放射線生物学的研究から、がん病巣内の低酸素領域は放射線治療に対する感受性が不良であることが示されており、治療前にがん病巣内の低酸素領域の分布を把握できると放射線治療計画の最適化に役立つ<sup>5)</sup>。がん病巣内の酸素分圧はプローブの刺入により測定することができるが、侵襲的であり、がん病巣全体の評価が困難である。このため、低酸素細胞内に過還元状態であることを利用して、低酸素細胞内に停滞するPETプローブが複数開発されており、その臨床的有用性に関する検討が進められている。

$^{18}\text{F}$ -fluoromisonidazole (FMISO)-PET検査が最初に始められた低酸素PET検査であるが、常酸素組織からの洗い出しが遅く、低酸素領域を高いコントラストで描画するためには撮像までに長時間を要するという問題点があった。最近、 $^{18}\text{F}$ -fluoroazomycin arabinoside (FAZA) や  $^{62}\text{Cu}$  あるいは  $^{64}\text{Cu}$  標識 copper-diacetyl-bis [N<sub>4</sub>-methylthiosemicarbazone (ATSM)] などの常酸素組織からの洗い出しが良好なPETプロ

ブが開発され、臨床試験が行われている(図7)。これらのPET検査が実地診療に導入されれば、放射線治療の最適化が進むものと考えられる。

陽子線などの高エネルギー放射線で行うがん治療を行うと、放射線が照射された組織が放射化してポジトロン放出核種を生じるため、照射直後にPET撮像を行うと実際の照射野を確認することができ<sup>6)</sup>。この方法は、放射線治療の精度を検証する上で有用な方法と考えられる。また、放射線治療のような非外科的治療を行った場合、治療が奏効してもがん病巣が存在した部位に軟部組織が残存する可能性がある。これは、がん病巣の中に線維成分などの腫瘍細胞以外の成分が含まれていることや、治療に伴う反応性細胞の浸潤などが原因である。このような軟部組織の残存は、形態学的な評価基準で判断すると治療効果判定を誤ってしまう危険性がある。 $^{18}\text{F}$ -FDG-PET検査で病巣のブドウ糖代謝活性を評価することで、より正確に治療効果を判定できる場合もあり(図8)、PERCISTなどの $^{18}\text{F}$ -FDG-PET検査の所見に基づいた治療効果判定基準も提案されている<sup>7)</sup>。

## 化学療法の個別化のための分子イメージング

抗がん剤を用いた化学療法もがんの主要な治療法であるが、抗がん剤はすべてのがんに奏効するわけではない。抗がん剤が奏効しない場合、患者は副作用にさいなまれるだけに終わるので、治療開始前に抗がん剤の感受性を評価することは非常に重要である。これまで、手術あるいは生検により得られた検体を用いた抗がん剤感受性試験が研究されてきたが、がん病巣の不均一性を考えた場合、*in vivo* イメージング検査でがん病巣全体を評価の方が合理的と考えられる。しかし、抗がん剤の耐性機序は複数存在し、画像検査による抗がん剤感受性の評価は容易ではない。アントラサイクリン系抗がん剤など一部の抗がん剤は、がん細胞の細胞膜に発現するP糖タンパク質により細胞内から汲み出され、耐性を示す。このような抗がん剤の耐性を同様にP糖タンパク質により細胞内に汲み出される $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -methoxyisobutylisonitrile (MIBI) の洗い出しにより予測することが試みられている<sup>8)</sup>(図9)。

最近では、がんに比較的特異的な、代謝を阻害することにより抗がん作用を発揮する分子標的薬の開発が進められている。代表的な分子標的薬には、がん細胞表面に発現する抗原や各種の受容体に親和性を示す抗体を利用した製剤(薬剤名がmabで終わる)や、がん細胞でしばしば活性が亢進する tyrosine kinase (TK) を阻害する製剤(薬剤名がnibで終わる)などがある。抗体製剤については、放射性核種で標識した抗体を投与してがん病巣での発現を確認し、感受性予測に役立てようとする研究が進められている<sup>9)</sup>(図10)。一般的に抗体の血中半減期は長いので、放射性核種で

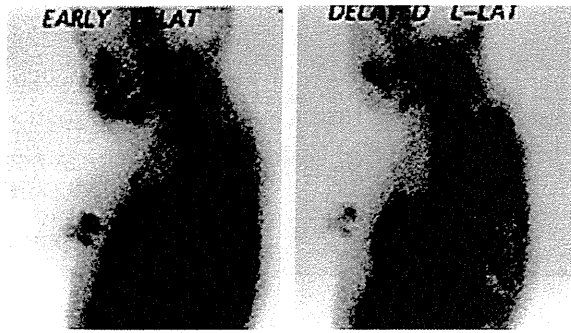


図9  $^{99m}\text{Tc}$ -MIBIによる乳がんのアントラサイクリン系抗がん剤に対する感受性の評価

後期像 (b) では、早期像 (a) に比べて  $^{99m}\text{Tc}$ -MIBI の集積が减弱している。このような症例のアントラサイクリン系抗がん剤に対する感受性は低い。

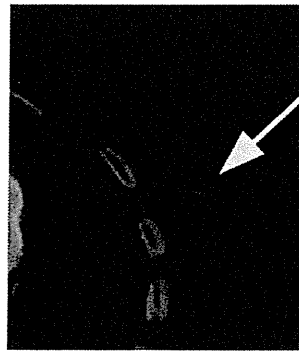


図10  $^{64}\text{Cu}$ -DOTA-trastuzumabによる乳がん病巣のイメージング  
左乳がんのHER2陽性病巣(⇨)に集積が認められた。  
(画像ご提供：国立がん研究センター中央病院放射線診断科・栗原宏明先生)

施され、がんの診断精度の向上やがん治療の最適化に大きく貢献しているが、今後は光イメージング技術の活用による低侵襲外科治療や、各種の核医学検査の応用による放射線治療や化学療法への感受性評価技術の実用化が期待される。

●参考文献

- 1) Weissleder, R., Mahmood, U. : Molecular imaging. *Radiology*, **219**・2, 316 ~ 333, 2001.
- 2) van der Vorst, J.R., Schaafsma, B.E., Hutteman, M., et al. : Near-infrared fluorescence-guided resection of colorectal liver metastases. *Cancer*, **119**・18, 3411 ~ 3418, 2013.
- 3) 成田善孝 : 5-アミノレブリン酸 (5-ALA) による術中蛍光診断 update. *Annual Review 神経* 2013, 鈴木則宏・他 編, 東京, 中外医学社, 156 ~ 162, 2013.
- 4) Harisinghani, M.G., Barentsz, J., Hahn, P.F., et al. : Noninvasive detection of clinically occult lymph-node metastases in prostate cancer. *N. Engl. J. Med.*, **348**・25, 2491 ~ 2499, 2003.
- 5) Padhani, A.R., Krohn, K.A., Lewis, J.S., et al. : Imaging oxygenation of human tumours. *Eur. Radiol.*, **17**・4, 861 ~ 872, 2007.
- 6) Nishio, T., Miyatake, A., Ogino, T., et al. : The development and clinical use of a beam ON-LINE PET system mounted on a rotating gantry port in proton therapy. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, **76**・1, 277 ~ 286, 2010.
- 7) Wahl, R.L., Jacene, H., Kasamon, Y., et al. : From RECIST to PERCIST ; Evolving Considerations for PET response criteria in solid tumors. *J. Nucl. Med.*, **50** (Suppl. 1), 122S ~ 150S, 2009.
- 8) Fujii, H., Nakamura, K., Kubo, A., et al. : Preoperative evaluation of the chemosensitivity of breast cancer by means of double phase  $^{99m}\text{Tc}$ -MIBI scintimammography. *Ann. Nucl. Med.*, **12**・6, 307 ~ 312, 1998.
- 9) Tamura, K., Kurihara, H., Yonemori, K., et al. :  $^{64}\text{Cu}$ -DOTA-trastuzumab PET imaging in patients with HER2-positive breast cancer. *J. Nucl. Med.*, **54**・11, 1869 ~ 1875, 2013.
- 10) Knowles, S.M., Zettlitz, K.A., Tavaré, R., et al. : Quantitative immunoPET of prostate cancer xenografts with  $^{69}\text{Zr}$ - and  $^{124}\text{I}$ -labeled anti-PSCA A11 minibody. *J. Nucl. Med.*, **55**・3, 452 ~ 459, 2014.
- 11) Yano, S., Takeuchi, S., Nakagawa, T., et al. : Ligand-triggered resistance to molecular targeted drugs in lung cancer ; Roles of hepatocyte growth factor and epidermal growth factor receptor ligands. *Cancer Sci.*, **103**・7, 1189 ~ 1194, 2012.

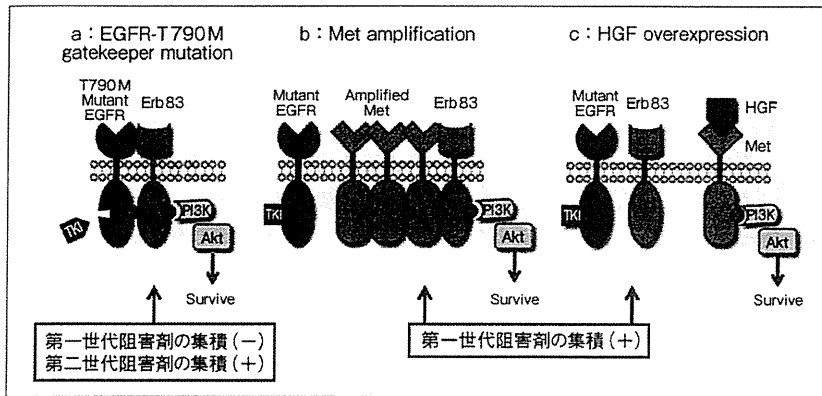


図11 EGFR-TK阻害剤のR1標識製剤による耐性機序の評価

耐性が生じた場合に、第一世代EGFR-TK阻害剤標識体を投与して集積が確認できた場合は、MET増幅やHGF過剰発現といった耐性機序が考えられる (b, c)。第一世代EGFR-TK阻害剤標識体の集積が確認できなかった場合で、第二世代EGFR-TK阻害剤標識体が集積した場合には、T790M変異が考えられる (a)。  
(参考文献11)より引用改変)

標識抗体を投与して、標的組織に結合しない抗体が血中から洗い出され、良好な病変-血液比が得られるまでに長時間を要するため、長半減期核種での標識が必要である。この問題を克服するため、最近では、抗体の抗原親和性を示す部分を取り出して標識したminibody製剤なども研究されている<sup>10)</sup>。

TK阻害剤も数多く開発されている。第一世代の上皮成長因子受容体 (EGFR) -TK阻害剤 (gefitinib など) は、EGFR遺伝子変異を伴った非小細胞肺癌に著効することが報告されているが、数年のうちには耐性を獲得する。これには、T790M変異のような第一世代のEGFR-TK阻害剤が結合できなくなることによるものと、がん遺伝子であるMETの増幅や肝細胞増殖因子 (HGF) 過剰発現のように第一世代のEGFR-TK阻害剤が結合しても阻害作用が発揮されないことによるものがある<sup>11)</sup>。前者

の耐性に対しては、より強い親和性を示す第二世代EGFR-TK阻害剤が期待できる。このため、第一世代EGFR-TK阻害剤と第二世代EGFR-TK阻害剤の両者の放射性核種標識体を作成し、がん病巣への親和性を確認すると、理論的には耐性機序を鑑別することが可能となる (図11)。このような診断技術の臨床応用が期待されている。

化学療法の治療効果の判定には、放射線治療と同様に $^{18}\text{F}$ -FDG-PET検査が有用であるが、現状では、悪性リンパ腫を除いて保険適用とされていない。

◎

がん治療の低侵襲化が進み、がん病巣の形態学的な特徴だけでなく、がん病巣の性状を評価する画像検査への期待が高まっている。これには分子イメージング技術を積極的に臨床応用していくことが有用であると考えられる。すでに、 $^{18}\text{F}$ -FDG-PET検査が保険診療として実