宮城県立がんセンター年報

第　1　号

(平成5年度)

宮城県立がんセンター

序

宮城県立がんセンター年報ができあがりましたので、お届けいたします。

四半世紀にわたり皆さま方のご指導とご協力をいただいてまいりました宮城県立成人病センターが、この度本県におけるより鋭角的ながん制圧拠点施設の必要性から全面的に改組・改築されて、平成５年４月から新しく宮城県立がんセンターとして発足いたしました。

本年報は、がんセンター年報の第１号であり、平成５年４月１日から同６年３月31日までの資料をまとめたものであります。

昨年度は新センター開設元年の年であり、いろいろの意味であわただしい一年でありましたので、年報も満足のいくものとはなりませんでしたが、お目通しいただければ幸いと存じます。

旧センター時代に賜りました数々のご厚情に感謝申し上げるとともに、新センターに対しましても一層のご指導、ご鞭撻の程をお願い申し上げます。

平成６年９月

宮城県立がんセンター

総長 涌井　昭

目　　次

序

総　括　編

第１章　　がんセンターの概況 …… 1

１．現　　況 …… 1

２．病院の沿革 …… 2

３．施設・設備 …… 4

(1)　土地・建物 …… 4

(2)　主要備品 …… 6

４．組織・機構 …… 9

５．職種別・組織別職員数 …… 10

６．経理状況 …… 11

第２章　　がんセンター内活動状況 …… 12

１．会議及び各種委員会 …… 12

２．各種委員会報告 …… 13

第３章　　研究所の活動状況 …… 20

１．研究所会議 …… 20

２．動物実験施設 …… 20

３．ＲＩ研究施設 …… 20

４．がんセンターセミナー …… 21

統　計　編

第１章　　医療統計 …… 23

１．内視鏡検査数 …… 23

２．部位別手術件数 …… 24

３．検査延件数 …… 25

４．画像診断・放射線治療件数 …… 26

５．患者食数と材料費 …… 27

６．栄養指導状況 …… 27

７．血液使用状況 …… 27

８．医薬品購入状況 …… 28

第2章　患者統計 …… 29
1．登録患者の市町村別分布状況 …… 29
2．登録患者数の状況 …… 31
(1) 患　者　数 …… 31
(2) 外来患者数 …… 31
(3) 入院患者数 …… 31
3．登録患者の主要病類・性・住所地別状況 …… 32
4．登録患者の主要病類・性・年齢別状況 …… 33
5．悪性新生物数 …… 34

研　究　編

第1章　学会発表 …… 35
第2章　論文発表 …… 40
第3章　著　　書 …… 43
第4章　講　　演 …… 44
第5章　論文別刷集 …… 46

職　員　名　簿 …… 219

総　　括　　編

第１章　がんセンターの概況

１．現　　況

（平成６年３月31日現在）

項　　目	内　　容
名　　称	宮城県立がんセンター
所　在　地	宮城県名取市愛島塩手字野田山47－１ （〒981－12）（TEL 022－384－3151　FAX 022－381－1168）
開　設　者	宮城県知事　浅　野　史　郎
管　理　者	総　　長　涌　井　　昭
開設年月日	昭和42年4月1日
病　床　数	358床（一般病床）
特　　色	本県におけるがんの制圧拠点として、がんに関する専門的かつ高度な診療機能を確保するとともに、臨床研究を中心とする研究所を併設し、研究機能の充実を図る。
診療科名	内科、呼吸器科、外科、整形外科、脳神経外科、泌尿器科、婦人科、眼科、耳鼻咽喉科、放射線科、麻酔科
指定医療	健康保険法による保険医療機関（42．４．１）、国民健康保険法による療養取扱機関（42．４．１）、生活保護法による医療機関（42．４．１）、結核予防法による医療機関（42．８．１）
診療点数表	甲表採用
基準サービス	基準看護 特２類、基準寝具、基準給食
臨床実習指定	宮城県高等看護学校、宮城県立名取病院付属准看護学校
環　　境	名取駅の西方約２㎞、小高い丘の上に位置し、周囲は田園と緑に囲まれた自然環境に恵まれたところである。
診　療　圏	県内一円（仙台市14.5%、県南地区70.6%、県北地区5.8%、県外等9.1%）
施設の状況	敷地の面積　69,289.72㎡ 建物延面積　29,413.87㎡
医療機器	コンピューター断層撮影装置（ＣＴ）、リニアック、ガンマカメラ、ＭＲＩ、術中ＩＣＵ用超音波診断装置、ジャイロ式Ｘ線テレビ、超音波診断装置、放射線画像処理装置、自動血球計数器、血液像自動分類装置外
職　員　数	職員　270人　　非常勤　３人
交通機関	①　ＪＲ東日本…東北本線名取駅下車、仙台市営バス（名取駅前、名取市農協前、大手町の各停留所を利用）またはタクシーを利用 ②　仙台市営バス利用…名取駅前から「がんセンター」行を利用（所要時間約10分） ③　高速道路…仙台南インターより県道仙台岩沼線を経て約20分

2．病院の沿革

年　月　日	事　　項
昭和　35.12. 3	宮城県経済長期計画に成人病対策の一環として成人病センターの建設が計画された。
36. 8. 1	県経済振興審議会に成人病センターの建設を諮問
38. 5.18	成人病センター建設促進世話人、同専門調査員を委嘱
39. 6.23	県経済振興審議会より「成人病センター設立基本構想」答申
39. 7.13	成人病センター敷地を名取市野田山地内に内定、買収を宮城県開発公社に依頼し取得
40. 3.17	建設敷地造成工事完了
40. 4.12	成人病センター建設設計完了
40. 7.24	成人病センター起工式、着工
41.11. 1	成人病センター準備事務局設置（昭和41年宮城県告示第264号）
41.12. 1	病院建設竣工
42. 4. 1	宮城県立成人病センター開設（昭和41年宮城県条例第38号）
	診療科　　内科、外科、婦人科、放射線科、眼科、耳鼻咽喉科
	病床数　　50床
	初代院長　　医学博士　黒川　利雄　就任
〃	保険医療機関の指定
〃	国民健康保険療養取扱機関の指定
〃	生活保護法による医療機関の指定（宮城県指令第8420号）
〃	診療報酬点数表　甲表採用
42. 4. 5	診療業務開始
42. 6. 1	基準看護１類、基準給食、基準寝具実施承認（宮城県指令第9960号）
42. 6.16	第２代院長　医学博士　武藤　完雄　就任
42. 8. 1	結核予防法による医療機関の指定（宮城県指令第13281号）
43. 4. 1	看護婦宿舎、医師住宅新築
44. 6.30	東病棟新築（50棟）
44.10. 1	病床変更（50床→100床）
45. 3.25	放射線特殊診療棟新築
45. 9. 7	西病棟（100床）、管理棟新築
〃	看護婦宿舎新築（北棟）
45.10. 1	病床変更（100床→200床）
47. 6. 1	基準看護変更承認（１類看護→特類看護）（宮城県指令第2502号）
47. 6.21	第３代院長　宮城県衛生部長事務取扱　茂庭　秀高　就任
47. 8.16	第４代院長　医学博士　二階堂　昇　就任
48. 1. 1	診療科　循環器科、呼吸器科増設

年　月　日	事　　項
49.10. 1	基準看護変更承認（特類看護→特２類看護）（宮城県指令第9708号）
55. 3.30	新リニアック棟新設
56. 4. 1	第５代院長　医学博士　庄司　忠實　就任
56. 8. 1	病室の内、特別室使用料廃止
56. 9. 1	重症者の看護及び重症者の収容の基準実施承認（９床）（宮城県指令第4337号）
56.12.10	カルテ保管棟新設
57. 3. 1	重症者の看護及び重症者の収容の基準実施追加承認（５床）（宮城県指令第12630号）
58. 3.15	コンピューターの断層撮影棟新設
62.10. 5	成人病センター整備懇談会設置
62.12. 7	成人病センター整備懇談会より知事に対し、「宮城県立成人病センターの整備に関する意見」具申
63. 5.30	成人病センター整備専門委員会設置
63.12. 1	成人病センター整備専門委員会より知事に対し「がんセンターの整備に関する意見」具申
平成　元. ～	県立がんセンター（仮称）整備事業、実施計画、造成設計、造成工事を施工
2.12.	県立がんセンター（仮称）建設工事着工
4.12.25	県立がんセンター（仮称）建設竣工
5. 4. 1	県立がんセンターと名称変更し、研究所を新設。総長　涌井　　昭　就任 診療科　循環器科を内科に吸収、整形外科、脳神経外科、泌尿器科、麻酔科を増設
5. 4.30	新センターに移転（200床→308床）
5. 5.10	外来診療業務開始

3．施設・設備

(1) 土地・建物

敷地面積　　69,289.72㎡

建築延面積　　29,413.87㎡

（単位：㎡）

区分	面積	区分	面積
地下1階	2,921.69	3階	2,387.42
調理部門	550.36	東病棟部門	1,042.91
物品管理部門	439.82	共用	301.60
薬剤部門	142.39	西病棟部門	1,042.91
解剖部門	198.60	4階	2,387.42
管理部門	758.78	東病棟部門	1,042.91
共用	831.74	共用	301.60
1階	6,159.12	西病棟部門	1,042.91
管理部門	727.56	5階	2,387.42
医事部門	363.48	東病棟部門	1,042.91
薬剤部門	358.69	共用	301.60
放射線診断部門	1,483.02	西病棟部門	1,042.91
生理検査部門	162.77	6階	1,661.99
臨床検査部門	72.78	病棟部門	1,661.99
内視鏡部門	239.94	7階	743.53
看護部門	31.12	管理部門	743.53
共用	1,683.56	塔屋	183.18
外来診療部門	1,036.20	管理部門	183.18
2階	4,654.21		
事務局部門	526.81		
医局部門	462.81		
看護部門	103.06		
臨床検査部門	646.17		
手術部門	1,091.48		
RI病棟部門	118.26		
HCU部門	269.38		
共用	1,436.24	小計	23,485.98

（単位：㎡）

区　　分	面　積	区　　分	面　積
研究棟地下２階	1,162.40	そ　の　他	499.04
管　理　部　門	1,162.40		
研究棟地下１階	1,555.21		
放射線治療部門	707.71		
核医学部門	176.38		
研　究　所			
ＲＩ研究部門	311.19		
共　用	359.93		
研究棟１階	1,123.61		
管　理　部　門	409.20		
人文科学研究部門	63.42		
疫学研究部門	351.29		
共　用	299.70		
研究棟２階	1,123.61		
病理学研究部門	360.71		
生化学研究部門	387.98		
免疫学研究部門	95.04		
共　用	279.88		
研究棟３階	90.29		
管　理　部　門	90.29		
動物実験棟	373.73		
動物実験部門	373.73		
小　計	5,428.85	合　計	29,413.87

(2) **主要備品**（取得価格1,000万円以上）

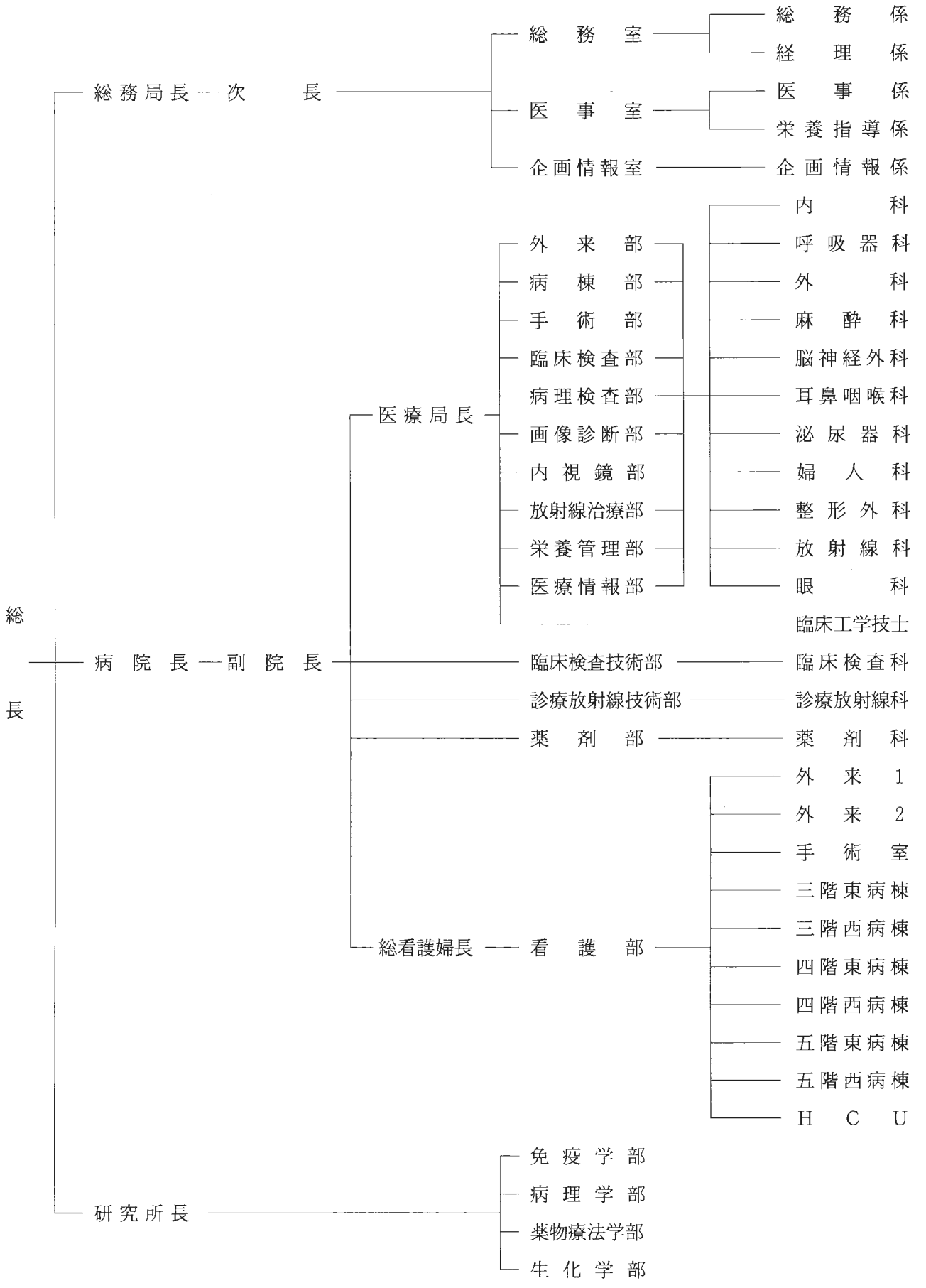
区　　分	構　　造	取得年月日	数量	メーカー	部　　署
コンピューター断層撮影装置	SOMATOM DR−3	58. 3. 31	1	シーメンス社	診療放射線部
近接型X線テレビ	GCS	59. 1. 31	1	東　　芝	診療放射線部
島津胸部X線装置	SHD 150G	59. 3. 21	1	島　　津	診療放射線部
消化管検査用X線テレビ装置	ZS30	60. 3. 15	1	島　　津	診療放射線部
腹部超音波診断装置	SSA−90A	60. 3. 15	1	東　　芝	診療放射線部
患者監視装置	MG143	60. 3. 15	1	フクダ電子	病　　棟
腹部血管撮影装置	KXO−2050	61. 3. 31	1	東　　芝	診療放射線部
ジャイロ式万能X線テレビ装置	UG	61. 3. 31	1	東　　芝	診療放射線部
血流イメージング超音波診断装置	SSH−65A	61. 3. 31	1	東　　芝	臨床検査部
放射線画像処理装置	CR−201	62. 3. 31	1	東　　芝	診療放射線部
総合呼吸機能解析システム	65	62. 3. 31	1	チェスタック	臨床検査部
自動血球計数器	S−PN	62. 3. 31	1	コールター	臨床検査部
日立血液像自動分類装置	8200型	63. 3. 25	1	日　　立	臨床検査部
ガンマーカメラシステム	ZLCDIG TRAC型	1. 3. 7	1		診療放射線部
全自動免疫血清検査装置	COBASU MIRA型	1. 3. 8	1		臨床検査部
自動錠剤分包機	ATC型	1. 3. 10	1		薬　剤　部
医療用NDヤグレーザー	メデイラス 2型	1. 3. 17	1		内　視　鏡
自動化学分析装置	JCA−RX 20S型	1. 3. 31	1		臨床検査部
超音波内視鏡診断システム	EU−M3	2. 2. 6	1		内　視　鏡
超音波診断装置	SSA−270A	2. 2. 28	1		外　　来
内視鏡ビデオ情報システム	SDF−3D	2. 3. 19	1		内　視　鏡
微生物分類同定装置	バイテックジュニア	2. 3. 23	1		臨床検査部
レーザープリンター	コダック	2. 3. 24	1		診療放射線部
医用画像ファイリングシステム	東芝	2. 3. 24	1	東　　芝	診療放射線部
臨床検査システム	K−670	2. 3. 24	1		臨床検査部
超音波内視鏡システム	EU−M3	3. 2. 28	1	オリンパス	内　視　鏡
外軌道X線診断撮影装置	HLZ−110	3. 3. 25	1	島津メディカル	診療放射線部
画像ファイリングシステム	SDF−3D	3. 3. 25	1	オリンパス	内　視　鏡
消化管用X線テレビ装置	MEDEX 250シリーズ	3. 3. 25	1	日立メディカル	診療放射線部
人工呼吸器	サーボベンチレーター900	4. 3. 16	1	シーメンス社	MEセンター
酸化エチレンガス滅菌器	5XL−10J	5. 3. 10	1	スリーエム	中央材料室
高圧蒸気滅菌装置	ΣIIR−GO9W	5. 3. 10	2	サクラ精機	中央材料室
高圧蒸気滅菌装置	FLC−S12 S30	5. 3. 10	1	サクラ精機	研　究　所
高圧蒸気滅菌装置	FLC−M09W P3T	5. 3. 10	1	サクラ精機	研　究　所

区　　分	構　　造	取得年月日	数量	メーカー	部　　署
腔内治療装置	ラルストロン 20B	5. 3. 10	1	島津	診療放射線部
腔内治療位置決定装置	CH50	5. 3. 10	1	島津	診療放射線部
CTシュミレーター	GS20X SAT−20	5. 3. 10	1	島津	診療放射線部
放射線治療計画装置	M2000	5. 3. 10	1	兼松	診療放射線部
泌尿器X線TV装置	DHF−A−155H	5. 3. 10	1	日立メディコ	診療放射線部
リニアック	ML−20MDX型	5. 3. 10	1	三菱電機	診療放射線部
CT	ゾマトムPLUS	5. 3. 10	1	シーメンス社	診療放射線部
MRI	MRT−200FX／3	5. 3. 10	1	東芝	診療放射線部
骨部撮影装置	DC−50F	5. 3. 10	1	東芝	診療放射線部
尿検査分類装置	UA−1000	5. 3. 10	1		臨床検査部
手術用手洗装置	TU−2AP 3AP	5. 3. 10	4		手術室
洗浄滅菌装置	ΣⅡWV−H06	5. 3. 10	2		手術室
X線フィルム自動現像機	SRX−503	5. 3. 10	3		診療放射線部
自動化学分析装置	TBA−30FR	5. 3. 10	1	東芝	臨床検査部
血清分注装置	PREP−A1	5. 3. 10	1		臨床検査部
薬袋印字システム	KC−2000P	5. 3. 10	1		薬剤部
画像解析システム一式	TRI	5. 3. 25	1	ケイエスオリンパス	病理検査室
透過型電子顕微鏡	JEM−1200EX2	5. 3. 25	1		病理検査室
走査型電子顕微鏡	JSM−5400LV	5. 3. 25	1		病理検査室
電子顕微鏡資料作成装置	ULTRACUT−S	5. 3. 25	1		病理検査室
細胞自動解析装置	FACS CAN	5. 3. 25	1		研究所
プロテインシーケンサー	476A	5. 3. 18	1		研究所
自動細胞解析分取装置	コールターエピックスリート	5. 3. 25	1		研究所
画像処理装置	FCR−7000 FCR−7501	5. 3. 25	3		診療放射線部
染色体画像解析装置	サイトスキャンRK−1	5. 3. 25	1		研究所
DNAシーケンサー	ファルマシアALF 373A−18	5. 3. 24	1		研究所
バイオイメージアナライザー	BAS−2000	5. 3. 25	1		研究所
多機能超遠心器	XL−70	5. 3. 25	2		研究所
カテーテル検査装置	レーカー	5. 3. 25	1	シーメンス社	診療放射線部
超音波洗浄システム	MU−1100	5. 3. 25	2		手術室・中央材料室
全自動免疫血清検査装置	ポセイドンⅡ	5. 3. 25	1	アロカ	臨床検査部
ベータカウンター	ファルマシア1450	5. 3. 25	1		研究所
デジタル血管撮影装置	DEP−2000A	5. 3. 30	1		診療放射線部
二方向X線テレビ装置	DCW−15A	5. 3. 30	1		診療放射線部
超音波装置用ハードコピー	LI−10A	5. 3. 30	1	コニカ	診療放射線部

区　　分	構　　造	取得年月日	数量	メーカー	部　　署
移動型X線テレビ装置	ジレモビール2000	5. 3. 30	1		手術室
超音波診断装置	SSD－2000 SSA－260A	5. 3. 30	1		外来1
純水製造装置	MF－4000CN	5. 3. 30	1		中央材料室
全自動洗浄乾燥器	WDLS－76CS	5. 3. 30	1		中央材料室
液体シンチレーションカウンター	パッカード1900－TR	5. 3. 30	1		研究所
定位脳手術装置	モデルG MR対応型	5. 3. 30	1		診療放射線部
放射線手術装置	KMM－1000A	5. 3. 30	1		診療放射線部
手術用顕微鏡等	WILD－M690	5. 3. 30	2		手術室（脳外科）
コンタクトレーザー	SLTジャパン	5. 3. 30	1		手術室
循環器用超音波診断装置	YHP77035A	5. 3. 30	1		臨床検査部
病棟血圧モニター	BX－2 セントラル2	5. 3. 30	42		病棟
病棟心電図モニター	ダイナスコープ3400	5. 3. 30	34		病棟
患者監視モニター	YHP	5. 3. 30	26		HCU／手術室／病棟
麻酔器	PH－5F2	5. 3. 30	12		手術室
全自動血液ガス電解質	スタットプロファイル5	5. 3. 30	2		手術室
人工呼吸器	EVT－1000	5. 3. 30	5		MEセンター
総合情報システム一式		5. 3. 31	1	NEC	企画情報室
カルテ管理システム一式		5. 3. 31	1	NEC	企画情報室
物品管理システム一式		5. 3. 31	1	NEC	企画情報室
マイコン心電計	FCP－4301	6. 1. 26	3	フクダ電子	病棟
内視鏡検査ビデオシステム	MD－194	6. 3. 25	2	オリンパス光学	内視鏡
超音波診断装置	SSA－260A	6. 3. 25	1	東芝メディカル	画像診断
自動血球計算器	STKS	6. 3. 25	1	コールター	臨床検査部
自動錠剤分包機	ATC－240	6. 3. 25	1	産洋電気特	薬剤部
共焦点レーザースキャン顕微鏡	LSM310	6. 3. 23	1	カールツアイス	研究所（病理）
ジャイロ式X線TV装置	DT－UG－4	6. 3. 25	1	東芝メディカル	画像診断
術中ICU用超音波診断	HPSONOS1500	6. 3. 25	1	横河ヒューレットパッカード	手術室
画像表示端末装置	PACS－DIT	6. 3. 25	1	NEC	画像診断

4．組織・機構

（平成６年３月31日現在）



5．職種別・組織別職員数

（平成6年3月31日現在）

職種＼組織		総務局				病															院													研究所					合計
						医療局												臨床検査技術部	診療放射線技術部	薬剤部	看護部																		
		総務室	医事室	企画情報室	小計	内科	呼吸器科	外科	整形外科	脳神経外科	泌尿器科	婦人科	耳鼻咽喉科	放射線科	麻酔科	その他	小計				総看護婦長	主任看護婦長	外来1	外来2	手術室	3階東病棟	3階西病棟	4階東病棟	4階西病棟	5階東病棟	5階西病棟	HCU	小計	免疫学部	病理学部	薬物療法学部	生化学部	小計	
事務吏員		10	3	3	16																																		16
技術吏員	医師					13	5	8	2	2	1	1	2	5	3		42																	1	2	2	1	6	48
技術吏員	看護婦 正																				1	1	6	5	10	17	17	17	17	18	17	12	138						138
技術吏員	看護婦 准																						3	3	2	2	2	2	2	2	2	2	22						22
技術吏員	看護婦 計																				1	1	9	8	12	19	19	19	19	20	19	14	160						160
技術吏員	臨床検査技師																	15																1		1	1	3	18
技術吏員	放射線技師																		11																				11
技術吏員	薬剤師																			7																			7
技術吏員	栄養士		3		3																																		3
技術吏員	臨床工学技士															1	1																						1
小計		10	6	3	19	13	5	8	2	2	1	1	2	5	3	1	43	15	11	7	1	1	9	8	12	19	19	19	19	20	19	14	160	2	2	3	2	9	264
労務職員		(運転) 1	(庁務) 2		3													(検査補助) 1										(看護補助) 1			(看護補助) 1		2						6
合計		11	8	3	22	13	5	8	2	2	1	1	2	5	3	1	43	16	11	7	1	1	9	8	12	19	19	20	19	20	20	14	162	2	2	3	2	9	270
非常勤			1	1	2	1											1																						3
摘要		局長・次長を含む				総長・院長・局長を含む		副院長を含む						副院長を含む																									

6．経　理　状　況

(1)　損益計算書（平成５年４月１日～６年３月31日）

（単位：円）

科目	金額	科目	金額
医業費用	5,909,950,582	医業収益	2,775,741,787
給与費	2,259,776,996	入院収益	1,943,251,161
材料費	1,132,593,483	外来収益	804,264,327
経費	799,613,142	その他医業収益	28,226,299
減価償却費	1,257,722,794		
資産減耗費	406,881,667	医業外収益	1,922,591,710
研究研修費	53,362,500	受取利息配当	43,888,659
医業外費用	745,448,659	補助金	2,172,000
利息企業費	680,206,615	負担金交付金	1,849,000,000
その他医業外費用	65,242,044	その他医業外収益	27,531,051
特別損失	1,227,541		
特別損失	1,227,541	特別収益	0
当年度純利益	△1,958,293,285		
合計	6,656,626,782	合計	4,698,333,497

(2)　貸借対照表（平成６年３月31日）

科目	金額	科目	金額
（資産の部）		（負債の部）	
固定資産	20,228,179,096	固定負債	500,000,000
有形固定資産	20,227,927,596	企業債	0
土地	344,566,607	他会計借入金	500,000,000
建物	14,136,922,444	流動負債	799,815,988
建築物	626,531,306	未払金	776,003,152
器械備品	5,119,585,164	未払費用	0
車両	161,200	その他の流動負債	23,812,836
放射性同位元素	160,875	（資本の部）	
		資本金	17,150,916,228
建設仮勘定	0	自己資本金	601,760,021
無形固定資産	251,500	借入資本金	16,549,156,207
電話加入権	251,500	剰余金	4,152,288,016
流動資産	2,374,841,136	資本剰余金	6,679,173,000
現金預金	200,090	国庫補助金	134,639,000
未収金	542,349,686	県費補助金	762,532,000
貯蔵品	38,264,405	県費負担金	5,780,866,000
その他の流動資産	1,794,026,955	受贈財産評価額	1,136,000
		利益剰余金	△2,526,884,984
資産合計	22,603,020,232	負債・資本合計	22,603,020,232

第２章　がんセンター内活動状況

１．会議及び各種委員会

会議及び委員会	構成委員	備　　考
管理運営会議	8名	必要の都度
運営調整会議	10名	〃
情報管理運営委員会		
電算システム管理委員会	19名	必要の都度
医学資料管理委員会	15名	〃
癌登録委員会	16名	〃
編集委員会	10名	〃
診療管理運営委員会		
外来委員会	9名	必要の都度
病棟診療連絡委員会	13名	〃
臨床検査	10名	〃
手術	11名	〃
画像診断	8名	〃
内視鏡管理運営委員会	7名	〃
経営管理委員会		
経営改善委員会	6名	必要の都度
診療報酬委員会	8名	奇数月１回
委託業務委員会	8名	必要の都度
施設・資産管理委員会	10名	〃
医療機器・診療材料整備委員会	10名	〃
薬事委員会	11名	奇数月第４木曜日
栄養委員会	16名	偶数月第３金曜日
感染対策委員会	10名	奇数月第２金曜日
防災対策委員会	18名	必要の都度
治験審査委員会	9名	毎月第１月曜日
交通安全対策委員会	10名	必要の都度
医療事故防止対策委員会	8名	〃
放射線安全管理委員会	10名	〃
衛生委員会	5名	〃
医学倫理委員会		
医療ガス安全対策委員会	6名	必要の都度

2．各種委員会報告

◎　電算システム管理委員会

全病院規模のトータル・オーダリングシステム実施については、旧成人病センター時代から検討を進め、5月10日の開院時に全部門一斉実施に踏み切った。4月までの間に成人病センターの医療情報の新システムへの移転切替え、予約入力等を進めると同時に、職員の習熟練習を実施した。

当委員会では、更に作業部会を中心として稼働後のシステムの点検評価、ソフトウェアの改善に努めるなど、オーダリングシステムの円滑な運用と適確な医療情報管理システムの確立に向けて検討と改善を行ってきた。　　（中　野　　昇）

◎　癌登録委員会

新しい情報システムの導入に伴い、院内の癌登録業務も新システムに切替えた。従来の手作業による方法と異なり、症例の抽出はコンピューターに登録されている各個人の病名から拾い出し、悪性腫瘍例はデータベースに永久保存することになった。昨年度までの登録との大きな違いは、重複癌はそれぞれに番号を付すことになったこと、登録には、入院例は退院日の翌月、外来例は初診から3ヶ月後の翌月とすることになったことである。

地域がんセンターとしての癌登録システムをより充実したものにする努力は常に必要と考えるが、例えば、悪性腫瘍例の抽出に必要な病名登録がシステム上の問題から完全に行われていない現状もあって、ある程度の手作業も行っているなど、まだ解決を要する諸問題が残されている。　　（松　田　　堯）

◎　編集委員会

平成5年6月10日開催の編集委員会において、編集委員会の性格付けと5年度の活動方針について検討し、以下のように取りまとめた。

1）本委員会では宮城県立がんセンターにおける事業報告書（年報）、および学術雑誌の発行について検討する。

2）平成4年度の報告書の発行（年報第10号）は、本来、成人病センターの仕事であるが、同センターがすでにがんセンターに移行していることを考慮し、現編集委員会の責任で発行する。具体的には総務局で昨年度の編集方針を踏襲して、7月31日を目安にして原稿を集め、本委員会メンバーを編集委員として編集会議を開催する。

3）学術雑誌の発行について。宮城県および東北地方における本センターの役割を考えると、医学論文を発表する独自の医学雑誌を発行することが望ましい。発行実務においては学術誌として中央に登録された雑誌とすることが必要であり、そのためには新たに編集委員を編成して検討する必要がある。

4）実際に学術雑誌を発行するか否かについては、研究所も含めた病院全体の問題であるが、発行には予算要求が関係するので、早急に具体策を検討する必要がある。

以上の活動方針に沿って、まず学術誌の発行について全国のがんセンター、成人病センター関連施設にアンケート調査した。その結果、21施設のうち16施設より回答があり、この内、学術誌としての体裁を整えた雑誌を発行していたのは3施設（大阪成人病センター、兵庫県立成人病センター、山形県立中央病院）

であった。このなかで学術誌を積極的に発行している施設では専任職員を置いており、年間予算も500万円以上が計上されている。本センターにおいては年間予算は60万前後であり、図書管理職員を始めとして、専任職員の配置は期待できない状態にある。以上のことから、本施設で学術雑誌を独自に発行することは現状では困難であり将来の検討事項とした。

年報は『宮城県立成人病センター年報　第10号（平成４年度)』として平成６年３月に発行された。

（桑　原　正　明）

◎　外来委員会

宮城県立がんセンターが平成５年４月開設されたが、５月の新病院診療開始までの約１ヶ月間は病院全体のオーダーリングの開院時同時立ち上げというシステムの変更のための準備に追われ、かつ、その後の新システムによる診療体制確立のための対応が急務の１年で、基本的には個々の問題を関係する部門が集まり、その都度解決するよう努力した。開院時、前身の宮城県立成人病センターの医療情報の新システムへの組み入れと外来患者全員の処方内容の主治医による入力、前病院全外来患者の予約システムへの組み入れ、外来予約診療での診療量の開院時での決定等と、混乱しながらも病院職員全員と委託業者の協力を得て、外来診療を行うことができた。

開院してからの大きな問題は、

(1)　予約制による新患患者と再来患者の予約枠設定とやむを得ないある程度の制限であるが、外来患者数の低下に繋がったと考えられ、その後の関係者の努力により新患患者の診療制限は完全に解除されている。

(2)　全診療科中、毎日診療している科は内科、外科、呼吸器科のみで、その他の診療科は週２～４日の診療日であるため、外来診療日でない日に来院された患者さんの取り扱いについての問題が生じている。（これは、平成６年度に来院目的の診療科医師に連絡する、診察できないときは内科または外科で診察して、次回来院診療科の診察を受けるように決定している。）

(3)　外来専属看護婦が十分ではなく、病棟看護婦が交替で担当する場合が恒常化しており、外来看護婦増員を要望した。

(4)　外来処置室では採血業務、処置業務以外の業務について、特に点滴～注射業務は手一杯になっており、今後に問題を残した。

(5)　予約診療とオーダリングの採用によって、受付、外来診療、会計、投薬受取に要する時間の短縮が期待されているが、未だその期待に十分答えているとは言えない。なお、平成５年度は以下の診療実績を残し得た。

平成５年度　外来診療実績

内科	呼吸器科	外科	整形外科	脳神経外科	泌尿器科	婦人科	眼科	耳鼻咽喉科
35,168	5,832	10,111	1,062	301	1,565	1,833	950	1,507

放射線科	麻酔科	合　計
1,949	159	60,437人

（中　野　　昇）

◎　病棟診療連絡委員会

新病院開院後まもなく委員会を開き、主として、入院カルテの様式、綴じ込み順などについて検討した。綴じ込み順について、院内で規格化した方がよいとの方向で、具体例が提示された。その後、カルテの用紙の種類が増え、今後、再検討が必要となっている。　（松　田　　堯）

◎　内視鏡管理運営委員会

内視鏡検査については、その準備～オーダリング研修（指示の仕方、その受け方、実施入力等）と検査実施能力の予想とそのコントロール等と多忙であった。その後も問題が出てくる度に、内視鏡関係者、ＮＥＣ、ＪＭＳ等の関係者が集まり、連絡し合って改善してきた。

新システムに習熟する間もなく、宮城県立成人病センター時代より継続実施してきた名取市胃２次集検を開始、当センター、名取市役所、宮城県対がん協会、名取医師会の関係者が互いに協力～調整して、平成５年４月５日より５月14日まで375名について２次精密検査を実施した。その実績は下記に示す通り。

しかし、手術室開設が若干遅れていたため、外科手術患者は他病院に依頼せざるを得ない時期で、かつ、新患患者診察数を制限している時期でもあり、一般内視鏡患者の少ない時期にかかわらず、オーダリングシステム採用により、内科外来診察により多くの内科医師がとられ、また新システムに慣れていないことも重なり、一般の上部消化管内視鏡検査は予約してから約３～４週後に検査する事態となり、多くの問題を残した。

名取市胃２次集検予定者387人、受診者375人（受診率97.4％）

発見された疾患

胃癌　　７人、胃潰瘍　15人、胃ポリープ　40人、十二指腸潰瘍　16人、食道癌　１人　等

名取市２次胃集検終了後、これも宮城県立成人病センター時代より継続してきた大腸癌２次精密検査を、当センター関係者、名取市役所、宮城県対がん協会、名取医師会の関係者が協力～調節して、平成５年10月より12月まで、70名を精密検査し、その結果大腸～直腸癌９人、大腸～直腸ポリープ28人が発見された。

更に、肺癌２次検診は当センター呼吸器科、宮城県結核予防協会、宮城県対がん協会、各市町村役場、各保健所の連携により、成人病センターからの継続事業として実施した。

発見患者は当院にて多く治療された。

以上の集検を行う一方、本来の当院業務を次第に拡張～充実しつつ、問題点は関係者が協議して一つ一つ改善してきた。平成５年度の内視鏡部門の業務実績は下記に示す。

平成５年度　内視鏡検査実績（Ｈ５．４～Ｈ６．３）

上部消化管	4,132件	（生検	1,160件）	他に細胞診　多数件
下部消化管	1,181件	（生検	538件）	同　上
気管支鏡	162件	（生検	6件）	同　上
ポリペクトミー（上部～下部消化管）			226件	
超音波内視鏡（上部～下部消化管）			31件	
ＥＲＣＰ			13件	
食道拡張術			4件	
レザー			23件	
食道静脈瘤硬化療法			4件	
エタノール局注			10件	
ＰＣ局注			26件	
色素散布			53件	
マーキング			10件	
その他			11件	
合　計			7,590件	

（中　野　　昇）

◎　医療機器・診療材料整備委員会

各部署責任者と第２次ヒアリングまで行い、がんセンターとして必須と決定したものから機種選定資料の作成、選定委員会の議を経て発注処理を執行した。　（武　田　鐵太郎）

◎　栄養委員会

本委員会は副院長を委員長とし、医療局、総務局、および看護部からの委員16名で構成される。法的に設置されなければならない委員会である。

偶数月、第３金曜日に定例委員会が開催された（平成５年度は５回）。

栄養士を中心とし、医療局の栄養管理部および看護部と提携して、治療の一貫としての患者給食、患者の栄養管理指導を行うことを主な目的としている。

がんセンター発足初年度のため、昨年度の準備期間に続いて、新しく始められた業務、大幅に改変された組織、体制の整備に忙殺された一年であった。

主な活動は、「宮城県立がんセンター栄養委員会要領」の設置と、新約束食事箋の採用と実施である。後者では新食糧構成等のマニュアルを採用した。

また、トータルオーダーリングシステムが実施されたため、従来のシステムから運用上、操作上、大幅な変更を余儀なくされ、その調整に多くの時間が費やされた。

患者に好評な行事食の提供、嗜好調査を主体とした調査研究も、旧成人病センター時代と替わりなく実施された。

組織、制度上で大きな変更は、病院給食業務の一部委託である。委託業者は、日清医療食品㈱に決定した。より良い供食と、公務員の人員削減が目的である。

患者給食は治療の一環である。給食メニューの多様化、メニューの患者選択、給食時間の改善、保温給食の実施、更には運用上の簡略化など解決しなければならない問題は数多い。患者さんを中心に考え、衆知を集めて解決していきたいと思っている。今後共、職員皆様の御協力をお願いする次第である。

（浅　川　　洋）

◎　感染対策委員会

各部署に下部組織としての感染対策委員を置き、機能的かつ迅速な対応を図る事とした。

これまで手術時の感染症対象としてきたＨＢＶ、ＨＣＶ、ＨＩＶ、ＭＲＳＡ、Ｗａ－Ｒのうち、運用効率の観点からＷａ－Ｒ陽性を除外することとした。

職員のＨＢ検査と第１次、第２次予防接種を実施した。

職員のＭＲＳＡ検査を実施した。受検者370名中陽性４名で、除菌指導を行った。　（武　田　鐵太郎）

◎　防災対策委員会

災害発生時における患者と職員の安全確保と迅速な避難を行うための訓練を２回実施した。「６・12宮城県防災の日」の訓練として、６月11日に、また、名取市消防署の指導による防火管理体制指導マニュアル訓練を12月９日に、それぞれ一部患者や警備等の業務委託企業の職員も含む全部門参加のもとに実地訓練を行った。当委員は、その準備と評価反省を目的に４回開催し、訓練の実効をあげるため万全を期した。

（佐々木　勝　典）

◎　治験審査委員会

委託研究申込45件を審査し、44件を承認した。第１～２相臨床試験の１件については、管理運営会議の決議を経た上で承認した。その際、下記の基準が確認された。

(1)　第１相治験は、当分の間、原則として対象から除外する。

(2)　ただし、第１相治験でも、すでに臨床治験が行われ、安全性の認められたものは検討の対象とする。

（武　田　鐵太郎）

◎　交通安全対策委員会

冬道の運転による事故防止並びに飲酒運転の防止を呼びかけるとともに、もしも事故が発生した場合の事故現場での処理、事故発生に係る連絡体制の周知徹底を図った。　（松　木　親　夫）

◎　放射線安全管理委員会

本委員会は病院長を委員長とし、委員９名から構成される。法的に設置されなければならない委員会である。

旧成人病センターでは、高エネルギー放射線発生装置と密封小線源のみが対象とされた。

がんセンターでは新たに、研究所で使用される非密封線源もその対象となり、本委員会で管理される対象は、画像診断部、放射線治療部、研究所実験室、ＲＩ病室と、著しく拡大された。

本委員会の目的は、放射線発生装置、放射性物質を安全に管理し、放射線を取り扱う職業人を放射線の被曝から守り、放射線障害を防止することにある。更に、患者を含めた一般の人に対しても、放射線障害を防止することを目的としている。

上記の目的を達成するため、第一に、「宮城県立がんセンター放射線障害予防規定」を定めた上で施行した。本規定は12章から成り、安全管理組織図、責任者の役割分担、管理区域の設定、安全委員会要領、作業環境測定要領、点検維持管理要領、緊急作業要領、緊急時における連絡網、安全作業基準などが含まれる。

第二に、予防規定に基づいて、先ず放射線業務従事者を承認し、研究所ではＲＩ施設利用に基づく講習会、病院では放射線安全管理講習会を開催した。また、ＲＩ実験従事者並びに放射線業務従事者の健康診断を実施した。

第三に、予防規定に基づいて、種々の業務を千代田保安用品㈱に委託した。その主な内容は、次の如くである。⑴医療法、放射線障害防止法、作業環境測定法に従った、汚染、線量当量率、漏洩線量、空気中および排水中の放射線濃度の測定、⑵放射性廃棄物処理補助業務、⑶排水設備清掃および点検作業、⑷放射線業務従事者の被曝線量測定など。

放射線診療は現在の医療では欠くことのできないもので、また、医学研究においても放射線の利用は極めて有用な手段である。放射線障害予防規定を遵守し、放射線を安全に利用して、放射線診療並びに研究が活性化し、益々発展することを願っている。　　（浅　川　　洋）

◎　衛生委員会

当委員会は安全衛生法に基づく職員安全衛生管理規程に基づいて設置されているもので、安全衛生管理者、衛生管理者、作業主務者、衛生管理者、産業医より構成されている。

当委員会の仕事を大別すると、

⑴　センター内外の就労環境の安全性、より良い環境の整備

⑵　センター職員の健康管理

⑶　その他の関連事項

平成５年度は宮城県立がんセンター開設年に当たり、他の各種委員会との連携によりその都度問題点の改善を図ってきた。その主たる問題の１つは、感染対策委員会（問題解決の中心となる。）との関連での院内の清掃と清潔の保持であり、より一層の改善策が必要と考えられ、今後の問題として残っている。

また、院内保育所は新築開設しているが、焼却炉の煙が風力、風向によって、保育所に流れて行くことがあり、最近院内ごみが多くなり焼却炉の能力を越えて燃やさざるを得ない現状では、不完全燃焼のガスと黒煙の排出も当然増えるものと考えられ、今後医療廃棄物委員会と連携して、解決していく必要がある。

職員の健康管理のため毎年実施してきた職員健康診断は、院外検診機関（本庁での契約）が採血～尿、胸部ｘ－Ｐ、心電図、視力～眼底検査、身長体重測定、内科診察等のほか、今年度より眼機能検査を希望者に実施した。問題は検診日が１日だけのため、看護婦等の勤務の都合で全員が受診しにくい事があげら

れる。今後の解決策として、当院での補充日での検診を考えたい。

2次検診は各人の責任で、主として当院で受診しており、その後の健康管理の役に立っているものと考えられる。

（中　野　　昇）

◎　薬事委員会

1．平成5年度薬事委員会：4回（6月、8月、10月、12月）

2．委　員

医師8名、看護婦1名、総務1名、医事1名、薬剤師2名

3．主な協議事項

(1)　常備医薬品の選定

新設科の薬品として93品目臨時購入。

本年度申請医薬品は、74品目のうち、67品目を採用。(160品目購入)

前年度より9品目削除。不動薬品は19品目あり、次回削除品としたい。

(2)　麻薬について

麻薬（塩酸モルヒネ注、フェンタネスト注）の使用量が増加した。緊急、夜間、休日用として手術室とＨＣＵに金庫を備え、定数補充制をとり、使用分を麻薬処方策に記載、台帳と共に翌日薬剤部に提出し、管理者確認のうえ使用数量を補充する。

(3)　ソリブジン（ユースビル：日本商事）の扱いについて

抗がん剤との併用による薬害禍により、全国で15名の死者を出した薬剤だが、センターでも100錠購入した。しかし申請医師が相互作用を補充承知しており未使用であった。緊急安全情報を各医師、外来、各病棟関係部署に配布し、出荷停止、在庫品回収に伴い返品処理をし、本庁にもこの旨を報告した。

4．院外処方箋について

- 会営薬局（日本薬剤師会）がセンター近くに移転した。
- 処方箋枚数は少ないが、応需薬局は月平均35ヶ所。

5．医薬品の薬効別使用状況

平成5年度から管理システムの変更に伴い、薬効分類の見直しを実施した。

（荘　司　良　子）

第３章　研究所の活動状況

研究所の活動は研究編にまとめてあるように学会発表、論文発表が中心である。それ以外の一般活動状況について記載する。

１．研究所会議（委員長　海老名　卓三郎）

研究所の管理・運営に関する全ての問題に関しては研究所部長会が代行して討議を行い意思決定を行った。

出席者は海老名卓三郎、立野紘雄、氏家重紀、宮城妙子、涌井昭（総長兼所長）の５名で、おおむね２週毎の火曜日の午後３時30分から、全員が出席出来るよう日程を調整し、平成５年度は以下の日に行った。平成５年４月20日、５月11・25日、６月８・22日、７月６・20日、８月３・31日、９月14日、10月19日、11月２・24日、12月７・20日、平成６年１月11日、２月２・15日、３月１・15日。

（海老名　卓三郎）

２．動物実験施設

当センター研究所の設立に伴い、研究所入口と屋根で繋がった平屋の動物実験施設が建設された。施設は空調系統の違いから３区域に分けられ、コンベ域には管理室、洗浄室、ニワトリ飼育室などが、クリーン域にはマウス飼育室、ラット飼育室、モルモット飼育室、ウサギ飼育室、実験室１、２が、感染域にはマウス、ラット感染飼育室、感染実験室などがあり、小動物並びに中動物の実験が可能な施設となっている。

動物の日常飼育管理は委託業者の２名の方に委託してある。施設利用の実験者は動物実験取扱者講習を受講した人に施設入口の磁気カードを交付し、利用出来るようになっている。現在研究所並びに医療局合わせて18名に磁気カードを交付している。

また、平成６年３月７日（月）午後４時30分から、動物実験施設玄関前において、平成５年度実験動物慰霊祭を行った。涌井昭総長、庄司忠實病院長、吉田協一総務局長をはじめ30名が出席、研究のため尊い生命を捧げてくれたマウス、ラット、ハムスター、ウサギの霊に黙祷し、慰霊の言葉を捧げ、献花して冥福を祈った。

（海老名　卓三郎）

３．ＲＩ研究施設

研究所の設立に伴い、平成５年４月、研究棟地下１階に、ＲＩ研究施設が設置された。実際に利用可能となってからほぼ１年になる。施設は、ＲＩ実験と管理のためのスペースから成っており、前者には、測定室、低・高レベル一般実験室、組換えＤＮＡ実験室、細胞培養室、動物実験室などが含まれる。

施設利用に関しては、放射線障害予防規定に基づき、利用者にはＲＩ講習会受講及び健康診断が義務づけられており、承認された後、入室のための個人カードの発行を受け、規定に従って使用できることになっている。過去１年間の利用状況を調べると、毎月約３～４件のＲＩ実験試薬の搬入があり、ほとんど連日利用されてきている。規定を守りつつ、癌制圧のための基礎研究に積極的に利用したいものである。

（宮　城　妙　子）

4．がんセンターセミナー

がんセンター大会議室において午後５時30分から午後６時30分まで以下の演者、演題でがんセンターセミナーを開催した。

第１回　　平成５年７月７日（水）

演者：海老名　卓三郎 博士（研究所・免疫学部長）

演題：ＢＲＭによる局所免疫療法

第２回　　平成５年７月16日（金）

演者：日向野　修　一 博士（放射線科・医師）

演題：ＭＲＩの基礎

第３回　　平成５年９月27日（月）

演者：涌　井　　昭 博士（がんセンター・総長）

演題：癌の薬物療法、特に Biochemical modulation について

第４回　　平成５年10月18日（月）

演者：宮　城　妙　子 博士（研究所・生化学部長）

演題：癌とシアル酸

第５回　　平成５年11月18日（木）

演者：金　丸　龍之介 博士（東北大学・加齢研・教授）

演題：癌遺伝子と癌抑制遺伝子の臨床応用

第６回　　平成５年12月８日（水）

演者：菊　池　寛　昭 博士（研究所・薬物療法学・研究員）

演題：癌の薬剤感受性試験

第７回　　平成６年１月19日（水）

演者：立　野　紘　雄 博士（研究所・病理学部長）

演題：トロトラスト症の病理

第８回　　平成６年２月22日（火）

演者：松　野　正　紀 博士（東北大学・第一外科・教授）

演題：膵癌の診断と治療の進歩

第９回　　平成６年３月22日（火）

演者：橋　本　嘉　幸 博士（東北大学・薬学部・教授）

演題：がん研究の流れ

（氏　家　重　紀）

統　　計　　編

第1章　医療統計（平5．4．1～6．3．31）

1．内視鏡検査数

種別	件数	種別	件数
気管支ファイバースコープ	162（6）	ポリペクトミー	214
胃ファイバースコープ		パピロトミー	0
十二指腸ファイバースコープ	4,016（1,160）	食道拡張術	7
電子内視鏡		直腸拡張術	0
パンエンドファイバースコープ		食道内異物除去術	0
シグモイドファイバースコープ	1,182（537）	腹腔鏡	0
大腸ファイバースコープ		色素散布	110
エコー内視鏡	29	食道静脈瘤硬化療法	6
レーザー	23		
ERCP	15		5,764（1,703）

（　）書きは生検数で内数

2．部位別手術件数

部位別＼月別		4	5	6	7	8	9	10	11	12	1	2	3	計	備　考
中枢神経系	脳・骨髄			1	3	2	2	2	1	1	4	2	2	20	
	その他														
頭頸部	喉頭			1	4	4	3		4	5	1	4	3	29	
	咽頭								(1)	(1)			(1)	3	
	口腔				1	(1)		2(1)			1		3(1)	10	
	鼻・副鼻腔					1		1		1	2	1	1	7	
	甲状腺				1		2	1	1	1	1	2	1	10	
	唾液腺				1	1	1		1		1		2	7	
	顔面・頸部				1					1		1	(1)	4	
	その他				1	2	3		1	3	2	3	3	18	
乳腺	乳房（切除）	4		2	10	6	5	2	9	4	5	3	6	56	
	その他	1		1				2			1	1		6	
呼吸器系	肺			1	7	7	7	6	9	7	7	7	7	65	
	縦隔									1	1		1	3	
	胸壁								1					1	
	その他										1	1	1	3	
消化器系	食道				1	1		1	1		1			5	
	胃	5			6	9	15	12	9	13	13	13	5	100	
	小・大・直腸	3			1	6	8	9	4	9	7	10	7	64	
	肝・胆道・膵	3			5	3	5	4	5	5	6	2	5	43	
消化器	腹壁								2	2				4	
	その他				2	1	1	2	1			1	1	9	
泌尿生殖器系	副腎											1		1	
	腎				4	1	3	1	3	1		1	1	15	
	尿管						1						1	2	
	膀胱				1		1			1	2	1	1	7	
	前立腺			2	1				1			2		6	
	尿道・陰茎				2						2			4	
	睾丸														
	子宮														
	子宮付属器														
	その他														
運動器系	脊椎			1			2	2	2	3	2	2	3	17	
	四肢				2	4	2	7	3	2	2	1	4	27	
	体幹			1						1				2	
皮膚															
リンパ・造血器															
その他															
計		16		10	54	49	61	55	59	62	62	59	61	548	

※　臓器が重複する場合には、それぞれの臓器に分けて記載。

※　（　）内は切除、再建例。

※　その他は、試験切除を含む。

3．検査延件数

部門＼月別	4 月	5 月	6 月	7 月	8 月	9 月	10 月	11 月	12 月	1 月	2 月	3 月	合 計
一 般 検 査	10,288	9,315	15,521	15,611	13,807	16,024	15,964	16,865	16,108	16,784	15,686	17,345	179,318
生化学検査	26,812	18,269	32,249	33,911	33,942	36,534	35,956	40,597	37,751	37,992	36,666	42,547	413,226
血 液 検 査	10,933	8,977	15,822	16,608	16,118	17,951	17,813	19,832	18,535	18,436	18,061	21,272	200,358
血 清 検 査	976	769	1,800	1,800	1,700	1,705	1,834	2,078	1,787	1,836	1,872	2,296	20,453
輸 血 検 査	782	411	967	1,719	1,644	1,374	1,798	1,556	2,057	2,869	2,271	2,503	19,951
細 菌 検 査	629	481	1,230	1,330	1,296	1,612	1,335	2,251	2,165	2,396	2,442	2,730	19,897
生 理 検 査	833	516	863	1,040	870	1,007	1,095	1,363	1,096	1,078	1,158	1,166	12,085
病 理 検 査	478	134	530	1,037	1,016	1,041	1,115	1,124	1,193	1,157	1,190	1,047	11,062
細胞診検査	476	303	605	728	564	891	1,124	1,257	1,265	1,095	940	924	10,172
合 計	52,207	39,175	69,587	73,784	70,957	78,139	78,034	86,923	81,957	83,643	80,286	91,830	886,522
解 剖	0	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	0	5
受 託 検 査	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
委 託 検 査	554	529	1,241	1,063	1,001	1,163	1,271	835	1,240	1,533	1,068	1,389	12,887
職員HBS－AG	0	0	0	0	0	0	227	0	0	0	0	0	227
職員HBS－AB	0	0	0	0	0	0	227	0	0	0	0	0	227
院内細菌検査	0	0	0	0	0	0	0	0	0	14	0	0	14

4．画像診断、放射線治療件数

区分／月別	画像診断											放射線治療				合計
	単純撮影	断層撮影	上部消化管撮影	下部消化管撮影	血管撮影	造影特殊撮影	超音波検査	CT検査	MRI検査	核医学検査	小計	リニアック	ラルストロン密封小線源	放射線治療計画	小計	
5年4月	857	44	79	79	7	52	297	114	0	0	1,529	266	0	13	279	1,808
5月	600	30	28	38	0	39	137	86	20	18	996	138	0	7	145	1,141
6月	974	39	71	86	6	44	320	185	46	59	1,830	300	3	18	321	2,151
7月	1,003	45	100	96	11	47	240	201	59	67	1,869	452	2	17	471	2,340
8月	1,010	48	93	91	6	32	321	184	58	68	1,911	399	3	21	423	2,334
9月	1,204	61	100	97	9	53	326	238	72	68	2,228	513	7	13	533	2,761
10月	1,269	54	107	136	18	53	340	258	86	60	2,381	365	6	12	383	2,764
11月	1,391	57	115	135	15	43	351	248	95	77	2,527	553	2	28	583	3,110
12月	1,365	57	105	140	11	48	386	221	77	72	2,482	543	5	22	570	3,052
6年1月	1,437	44	102	114	13	44	324	269	93	80	2,520	465	4	11	480	3,000
2月	1,362	54	89	117	13	43	368	279	82	80	2,487	450	6	26	482	2,969
3月	1,591	46	86	128	19	57	403	320	101	71	2,822	518	1	24	543	3,365
計	14,063	579	1,075	1,247	128	555	3,813	2,603	789	720	25,582	4,962	39	212	5,213	30,795

5．患者食数と材料費

区分 / 月別		患者食数 普通食	患者食数 特別食 加算	患者食数 特別食 その他	検食等	給食数 合計	給食材料費 購入費	給食材料費 1食当り	給食材料費 1人1日当り
5年4月		4,131食	4,433食	3,009食	270食	11,843食	3,002千円	254円	761円
5月		2,671	1,780	1,803	372	6,626	2,582	390	1,170
6月		5,893	2,739	2,559	360	11,551	3,232	280	840
7月		10,163	2,396	3,329	372	16,260	4,641	286	857
8月		10,748	3,421	3,353	372	17,894	5,140	288	862
9月		10,158	4,322	3,607	360	18,447	4,760	258	775
10月		10,573	4,763	3,933	372	19,641	5,242	267	801
11月		11,677	4,387	3,998	360	20,422	5,040	247	741
12月		11,126	4,421	4,450	372	20,369	5,116	252	754
6年1月		10,769	4,384	3,981	372	19,506	4,480	230	689
2月		9,375	5,037	4,297	336	19,045	4,788	252	754
3月		10,143	4,789	5,095	372	20,399	5,442	267	800
計		107,427	46,872	43,414	4,290	202,003	53,466	265	794
年度別	4	62,966	61,318	41,025	3,117	168,426	41,450	246	630
	3	69,544	52,155	48,390	3,294	173,383	43,079	248	650

6．栄養指導状況

病態別 / 年度	個人指導 外来 糖尿病	高血圧症	高脂血症	肝臓病	心臓病	腎術後食	小計	個人指導 入院時・入院中・退院時 糖尿病	高血圧症	心臓病	腎臓病	喉頭術後食	小計	合計	集団指導 入院時・入院中・退院時 糖尿病昼食会	糖尿病教室	合計	総計
5	783	2	7	2	2	1	802	245	2	1	1	1	250	1,052	13	56	69	1,121

7．血液使用状況

単位（1単位200mℓ）

項目	4月	5月	6月	7月	8月	9月	10月	11月	12月	1月	2月	3月	合計
生血	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
保存血	7	0	5	4	4	12	4	4	0	3	6	4	53
新鮮血	0	0	0	0	0	10	0	0	0	0	0	0	10
濃厚赤血球	40	30	57	146	115	137	221	185	249	249	127	238	1,794
洗浄赤血球	111	40	78	60	49	45	48	36	96	56	50	36	705
凍結人血漿	30	0	7	110	110	270	160	240	390	356	210	130	2,013
濃厚血小板	326	394	352	280	505	163	135	248	170	205	156	50	2,984
合計	514	464	499	600	783	637	568	713	905	869	549	458	7,559

8．医薬品購入状況（薬効別）

（単位：購入額：千円、構成比：％）

上段：平成５年度（平成５年４月～平成６年３月）、下段：平成４年度（平成４年４月～平成５年３月）

科目別 / 薬効分類	内用薬		外用薬		注射薬		合計	
	購入額	構成比	購入額	構成比	購入額	構成比	購入額	構成比
中枢神経系薬	8,082	3.55	4,212	9.62	1,308	0.46	13,602	2.46
	10,301	2.83	5,579	14.19	4,276	2.05	20,156	3.29
末梢神経用薬	1,752	0.77	343	0.78	2,611	0.93	4,705	0.85
	2,026	0.56	219	0.56	1,130	0.54	3,375	0.55
感覚器官用薬	87	0.04	675	1.54			762	0.14
循環器官用薬	58,420	25.63	7,104	16.22	10,647	3.78	76,171	13.77
	110,104	30.25	9,986	25.39	12,835	6.16	132,925	21.72
呼吸器官用薬	3,767	1.65	2,201	5.02	200	0.07	6,169	1.11
	9,474	2.60	757	1.92	130	0.06	10,631	1.69
消化器官用薬	34,332	15.06	854	1.95	6,581	2.34	41,767	7.55
	52,048	14.30	677	1.72	2,637	1.27	55,362	9.04
ホルモン剤（抗ホ剤含む）	5,277	2.31	88	0.20	17,340	6.16	22,705	4.10
	2,382	0.65	3	0.01	17,364	8.33	19,695	3.21
泌尿生殖器官及び肛門用薬	2,181	0.96	594	1.35			2,775	0.50
外皮用薬			9,855	22.50			9,855	1.78
			6,710	17.06			6,710	1.09
ビタミン剤	1,746	0.77			1,772	0.63	3,518	0.64
	3,934	1.08			4,889	2.35	8,833	1.44
滋養強壮変質剤	6,469	2.84			19,355	6.88	25,824	4.67
	6,009	1.65			27254	13.08	33,263	5.43
血液及び体液用剤	3,626	1.59	1,806	4.12	32,402	11.51	37,834	6.84
	3,554	0.98	5,946	15.12	14,367	6.89	23,867	3.90
人工灌流用剤					16	0.01	16	0.00
その他の代謝性医薬品	8,678	3.81	68	0.16	13,401	4.76	22,147	4.00
	16,007	4.40	15	0.04	21,479	10.31	37,501	6.12
腫瘍用薬	70,628	30.98	200	0.46	26,022	9.24	96,851	17.50
	113,528	31.19	808	2.05	16,748	8.03	131,284	21.45
アレルギー用薬	1,852	0.81			15	0.01	1,867	0.34
漢方製剤	7,342	3.22					7,342	1.33
	16,945	4.65					16,945	2.76
抗生物質製剤	3,080	1.35			30,109	10.70	33,188	6.00
	3,022	0.83			52,979	25.42	56,001	9.15
化学療法剤	3,676	1.61	70	0.16	3,172	1.13	6,918	1.25
	4,572	1.26	47	0.12	619	0.30	5,238	0.85
生物学的製剤					86,334	30.67	86,334	15.60
					9,708	4.66	9,708	1.58
調剤用薬	3	0.00	1,156	2.64	641	0.23	1,800	0.33
診断用薬	1,508	0.66	6	0.01	27,653	9.82	29,168	5.27
	3,711	1.02	5	0.01	19,712	9.46	23,428	3.82
その他治療を目的としない医薬品	919	0.40	9,525	21.74			10,444	1.89
	6,448	1.77	8,574	21.80	2,088	1.00	17,110	2.79
アルカロイド系製剤（天然麻薬）	4,552	2.00	546	1.25	1,768	0.63	6,866	1.24
非アルカロイド系麻薬					158	0.06	158	0.03
その他			4,504	10.28			4,504	0.81
合計	227,976	100.00	43,806	100.00	281,507	100.00	553,289	100.00
	364,011	100.00	39,326	100.00	208,425	100.00	611,762	100.00

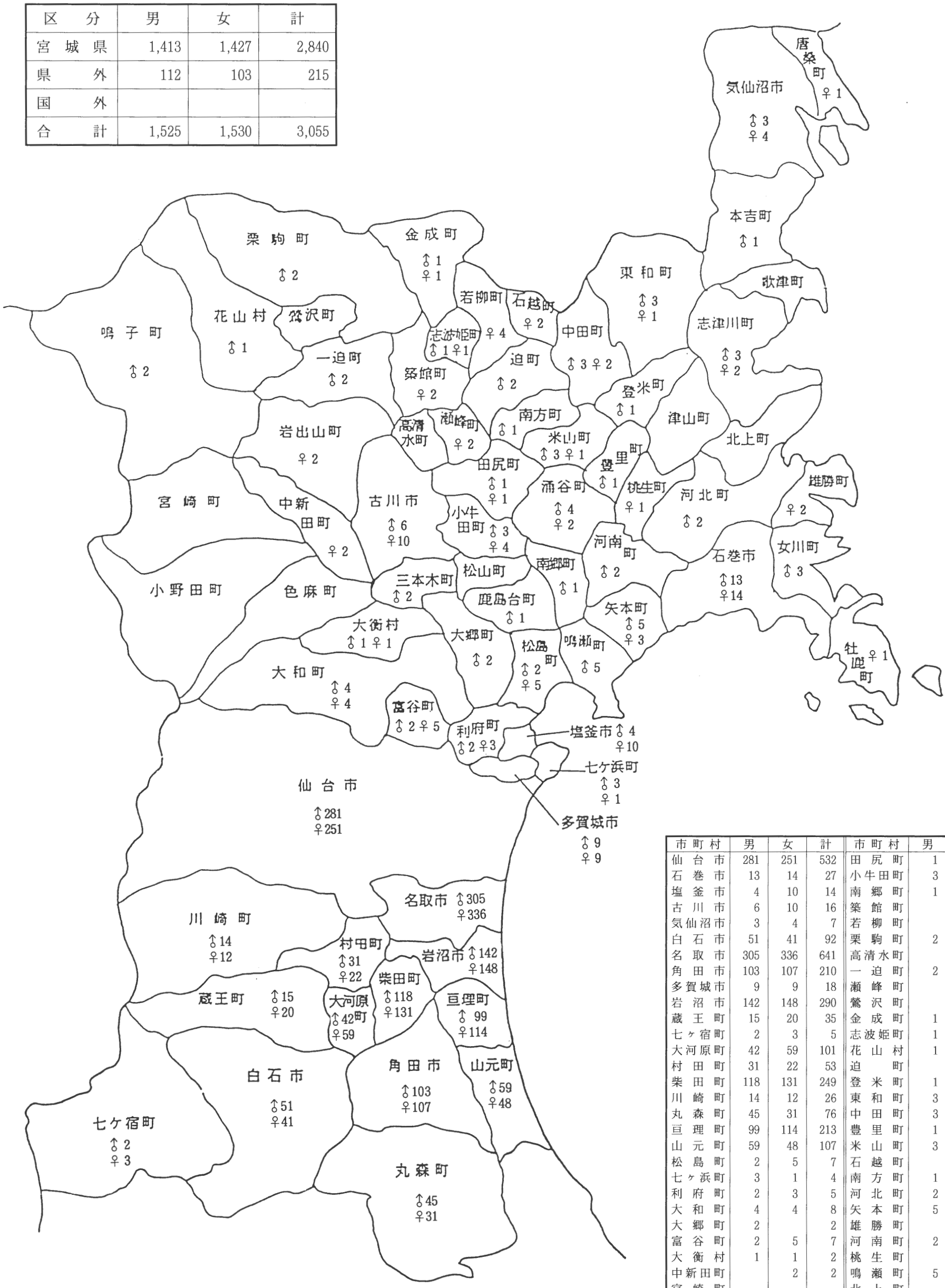
(注) 1．この表には、保存血関係は除外している。

2．平成５年度から管理システム変更に伴い、薬効分類の見直しを実施した。

第2章　患者統計（平5.4.1～6.3.31）

1．登録患者の市町村別分布状況

区　分	男	女	計
宮城県	1,413	1,427	2,840
県　外	112	103	215
国　外			
合　計	1,525	1,530	3,055



市町村	男	女	計	市町村	男	女	計
仙台市	281	251	532	田尻町	1	1	2
石巻市	13	14	27	小牛田町	3	4	7
塩釜市	4	10	14	南郷町	1		1
古川市	6	10	16	築館町		2	2
気仙沼市	3	4	7	若柳町		4	4
白石市	51	41	92	栗駒町	2		2
名取市	305	336	641	高清水町			
角田市	103	107	210	一迫町	2		2
多賀城市	9	9	18	瀬峰町		2	2
岩沼市	142	148	290	鶯沢町			
蔵王町	15	20	35	金成町	1	1	2
七ヶ宿町	2	3	5	志波姫町	1	1	2
大河原町	42	59	101	花山村	1		1
村田町	31	22	53	迫町		2	2
柴田町	118	131	249	登米町	1		1
川崎町	14	12	26	東和町	3	1	4
丸森町	45	31	76	中田町	3	2	5
亘理町	99	114	213	豊里町	1		1
山元町	59	48	107	米山町	3	1	4
松島町	2	5	7	石越町		2	2
七ヶ浜町	3	1	4	南方町	1		1
利府町	2	3	5	河北町	2		2
大和町	4	4	8	矢本町	5	3	8
大郷町	2		2	雄勝町		2	2
富谷町	2	5	7	河南町	2		2
大衡村	1	1	2	桃生町			
中新田町		2	2	鳴瀬町	5		5
宮崎町				北上町			
色麻町				女川町	3		3
松山町	1		1	牡鹿町		1	1
三本木町	2		2	志津川町	3	2	5
鹿島台町	1		1	津山町			
岩出山町		2	2	本吉町	1		1
鳴子町	2		2	唐桑町		1	1
涌谷町	4	2	6	歌津町			

2．登録患者数の状況

(1) 患 者 数

（単位：人）

診療日数		外来患者				入院患者						外来入院患者合計 (A)＋(B)	1日平均入院外来患者数
外来	入院	新患	再来（含再来初診）	計(A)	1日平均患者数	入院	退院	延患者数(B)	1日平均患者数	平均在院日数	病床利用率		
241	365	6,295	54,142	60,437	251	1,583	(169) 1,493	77,973	214	50.7	71.2	138,410	465

（注）（ ）書は死亡退院で内書

(2) 外来患者数

（単位：人）

区分＼年度・月別		4年度	5年度	5年								6年		
		総数	総数	4	5	6	7	8	9	10	11	12	1	2	3
初診患者	新規登録患者	2,546	3,055	120	203	352	325	247	284	287	286	260	228	206	257
	再来初診患者	3,074	3,844	146	162	438	483	294	391	352	373	320	282	287	316
再来患者		65,517	54,142	5,600	3,032	4,615	4,809	4,474	4,680	4,936	5,052	4,309	4,116	4,046	4,473
（外来患者延数）		71,055	60,437	5,826	3,389	5,300	5,509	4,954	5,261	5,529	5,645	4,840	4,607	4,518	5,059
1日平均患者数		269.1	251	291	212	252	250	225	263	276	282	255	230	238	230

(3) 入院患者数

（単位：人）

区分＼年度・月別	4年度	5年度	5年								6年		
	総数	総数	4	5	6	7	8	9	10	11	12	1	2	3
入院患者	1,203	1,583	60	63	131	135	135	129	147	177	130	160	146	170
退院患者	1,208	1,493	159	30	60	99	118	104	162	146	167	129	160	159
（同上中死亡）	163	169	9	13	15	9	11	12	14	16	16	21	12	21
入院患者延数	65,788	77,973	4,475	2,523	4,138	5,984	6,853	6,940	7,453	7,859	8,210	7,937	7,392	8,209
1日平均患者数	180.2	214	149	81	138	193	221	231	240	262	265	256	264	265
病床利用率（%）	90.1	71.2	49.7	27.1	46.0	64.3	73.7	77.1	80.1	87.3	88.3	85.3	88.0	88.3
平均在院日数（日）	54.6	50.7	40.9	54.3	43.3	51.1	54.2	59.6	48.2	48.7	55.3	55.0	48.3	50.0

3．登録患者の主要病類・性・住所地別状況

（単位：人）

住所地		性	合計	Ⅰ	Ⅱ1	Ⅱ2	Ⅲ1	Ⅲ2	Ⅳ	Ⅴ	Ⅵ	Ⅶ	Ⅷ	Ⅸ	Ⅹ	Ⅺ	Ⅻ	ⅩⅢ	ⅩⅣ	ⅩⅤ	ⅩⅥ	ⅩⅦ
県内	仙台市	男	281	13	76	35	3	7	1	1	6	7	36	63	9		5	5	1		6	7
		女	251	9	46	61	5	5	2	2	8	11	21	40	21		2	4			9	5
		計	532	22	122	96	8	12	3	3	14	18	57	103	30		7	9	1		15	12
	仙台市以外	男	1,132	45	216	162	22	37	6	1	17	49	118	343	47		3	29	2		22	13
		女	1,176	36	148	253	30	28	14	3	20	58	84	298	119	1	6	30	8		34	6
		計	2,308	81	364	415	52	65	20	4	37	107	202	641	166	1	9	59	10		56	19
	合計		2,840	103	486	511	60	7	23	7	51	125	259	744	196	1	16	68	11		71	31
県外		男	112	1	28	16			1		3	3	19	30	7			2			2	
		女	103	2	18	31	2		1			3	8	23	13		1	1				
		計	215	3	46	47	2		2		3	6	27	53	20		1	3			2	
総計		男	1,525	59	320	213	25	44	8	2	26	59	173	436	63		8	36	3		30	20
		女	1,530	47	212	345	37	33	17	5	28	72	113	361	153	1	9	35	8		43	11
		計	3,055	106	532	558	62	77	25	7	54	131	286	797	216	1	17	71	11		73	31

(注)　3及び4表中「主要病類」の分類は次のとおりである。

Ⅰ．伝染病および寄生虫病
Ⅱ1．悪性新生物
Ⅱ2．良性および物質不詳の新生物
Ⅲ1．内分泌・栄養および代謝の疾患
Ⅲ2．糖　尿　病
Ⅳ．血液および造血器の疾患
Ⅴ．精 神 障 害
Ⅵ．神経系および感覚器の疾患
Ⅶ．循環器系の疾患
Ⅷ．呼吸器系の疾患
Ⅸ．消化器系の疾患
Ⅹ．性尿器系の疾患
Ⅺ．妊娠・分娩および産褥の合併症
Ⅻ．皮膚および皮下組織の疾患
ⅩⅢ．筋骨格系および結合織の疾患
ⅩⅣ．先 天 異 常
ⅩⅤ．周産器疾病および死亡の主要原因
ⅩⅥ．症状および診断不明確の状態
ⅩⅦ．不慮の事故・中毒および暴力

4．登録患者の主要病類・性・年齢別状況

（単位：人）

性	主要病類 / 年齢	合計	Ⅰ	Ⅱ1	Ⅱ2	Ⅲ1	Ⅲ2	Ⅳ	Ⅴ	Ⅵ	Ⅶ	Ⅷ	Ⅸ	Ⅹ	Ⅺ	Ⅻ	ⅩⅢ	ⅩⅣ	ⅩⅤ	ⅩⅥ	ⅩⅦ
男	10才未満	18						2		3	1	2	1	2						1	3
	10～19才	51	4	2	5		1	2	1	3	5	6	9	7			2	1		1	2
	20～29才	114	7	3	13					6	3	21	41	9			3	1		6	1
	30～39才	178	10	7	25	9	4			5	7	20	73	6			5			5	2
	40～49才	320	15	30	42	6	7	2		5	12	36	122	13		4	11	1		7	7
	50～59才	256	8	49	38	7	9	1	1	1	11	30	80	8		1	6			4	2
	60～69才	347	9	118	50	3	15	1		2	11	33	85	9		2	3			4	2
	70才以上	241	6	111	37		8			1	9	25	25	9		1	6			2	1
	計	1,525	59	320	213	25	44	8	2	26	59	173	436	63	0	8	36	3	0	30	20
女	10才未満	11			2					1	1	3		2				1		1	
	10～19才	49		2	9			3	2	4	1	5	11	3		1	1	1		2	4
	20～29才	154	10		37			2	1	3	4	12	47	18	1	4	3	1		9	2
	30～39才	200	8	13	62	13	2	3		3	7	14	42	20		2	7			3	2
	40～49才	357	11	36	106	5	4	2		3	9	33	70	63		1	5	1		6	2
	50～59才	278	7	44	52	10	5	4	1	5	16	16	77	24			5	2		9	1
	60～69才	286	8	61	50	6	16	3		7	15	16	75	12		1	8			7	1
	70才以上	195	3	56	27	3	6		1	2	19	14	39	11			6	2		6	
	計	1,530	47	212	345	37	33	17	5	28	72	113	361	153	1	9	35	8	0	43	11
合計	10才未満	29	0	0	5	0	0	2	0	4	2	5	1	4	0	0	0	1	0	2	3
	10～19才	100	4	4	14	0	1	5	3	7	6	11	20	10	0	1	3	2	0	3	6
	20～29才	268	17	3	50	0	0	2	1	9	7	33	88	27	1	4	6	2	0	15	3
	30～39才	378	18	20	87	22	6	3	0	8	14	34	115	26	0	2	12	0	0	8	3
	40～49才	677	26	66	158	11	11	4	0	8	21	69	192	76	0	5	16	2	0	13	9
	50～59才	534	15	93	90	17	14	5	2	6	27	46	157	32	0	1	11	2	0	13	3
	60～69才	633	17	179	100	9	31	4	0	9	26	49	160	21	0	3	11	0	0	11	3
	70才以上	436	9	167	64	3	14	0	1	3	28	39	64	20	0	1	12	2	0	8	1
	総　計	3,055	106	532	558	62	77	25	7	54	131	286	797	216	1	17	71	11	0	73	31

5．悪性新生物数

病名		食道癌	気管支及び肺癌	胃癌	乳癌	肝癌	胆のう及び胆管癌	膵癌	直腸癌	結腸癌
件数	男	14 (2)	62 (4)	68	2	16	5	2 (1)	16	13
	女	2 (1)	18 (2)	38 (1)	54 (1)	7	7 (2)		6 (1)	10

子宮癌	甲状腺癌	舌癌	鼻腔癌	喉頭癌	前立腺癌	膀胱癌	その他の癌	合計	総計
	5	7	4	23 (2)	13 (1)	8	62	320	532
14	6	5		3		5	37	212	

㈱　（　）内は重複癌を示す。

研　　究　　編

第1章　学 会 発 表

平成5年度（平成5年4月～6年3月）

a．国際学会発表

◦研究所・免疫学部門

1）Ebina, T., Murata, K., Wakui, A. : Antitumor effect of intratumoral administration of PSK, a Coriolus preparation : Induction of immunosuppressive acidic protein. 18th International Congress of Chemotherapy, Stockholm, Sweden, 1993. 6

2）Ebina, T., Murata, K. : Antitumor cytokine network by intratumoral administration of biological response modifiers. Anmual Meeting of the International Society for Interferon and Cytokine Research, Tokyo, Japan, 1993. 10

3）Ebina, T. : Prevention of rotavirus infection by colostrum IgG and egg yolk IgY. The 5th China-Japan International Congress of Microbiology. Shanghai, China, 1993. 8

◦研究所・生化学部門

1）Miyagi T., Sato K., Yasui A., Emori Y., Kawasaki H., Suzuki K., Tsuiki S. : Cloning and expression of the rat cytosolic sialidase. The 12th International Symposium on Glycoconjugates. Krakow, Poland, 1993. 8

2）Hata K., Konno K. and Miyagi T. : Purification and characterization of ganglioside-hydrolyzing sialidase from bovine brain. The 12th International Symposium on Glycoconjugates. Krakow, Poland, 1993. 8

3）Miyagi T., Sato K., Hata K., Wada T. and Yasui A. : Primary structure and tissue-specific expression of rat cytosolic sialidase. The 8th Rinshoken International Conference. Tokyo, Japan, 1993. 9

◦医療局・内科

1）M. Kambe, A. Wakui, I. Nakao, et al. : A late phase II study of irinotecan (CPT-11) in patient with advanced gastric cancer. 29th American Society of Clinical Oncology. Orlando, USA, 1993. 5

2）Y. Sakata, A. Wakui, I. Nakao, et al. : A late phase II study of irinotecan (CPT-11) in advanced pancreatic cancer. 29th American Society of Clinical Oncology. Orlando, USA, 1993. 5

3）A. Wakui. : Colorectal cancer chemotherapy by a new topoisomerase inhibitor. 18th International Congress of Chemotherapy. Stockholm, Sweden, 1993. 6

4）T. Taguchi, S. Tsukagoshi, A. Wakui, et al. : An early phase II trial of oral menogaril. 18th International Congress of Chemotherapy. Stockholm, Sweden, 1993. 6

5）K. Futatsuki, A. Wakui, I. Nakao, et al. : Irinotecan (CPT−11) in the treatment of advanced gastric cancer. 18th International Congress of Chemotherapy. Stockholm, Sweden, 1993. 6

◦医療局・脳神経外科

1） Katakura, R. : Surgical management of dural arterio-venous malformation. X International Congress of Neurological Surgery, Acapulco, Mexico, 1993. 10

b．国内学会発表

◦研究所・免疫学部門

1）海老名卓三郎、村田和子：各種ＢＲＭ腫瘍内投与による抗腫瘍効果の差異：血清ＩＡＰの誘導、第15回癌局所療法研究会、久留米、1993. 5.

2）海老名卓三郎、村田和子：セファランチンの抗腫瘍効果－腫瘍免疫増強機構、第19回アルカロイド研究会、大阪、1993. 6.

3）海老名卓三郎、村田和子：ＢＲＭによる抗腫瘍免疫サイトカインネットワーク、第４回日本生体防御学会、東京、1993. 7.

4）村田和子、海老名卓三郎：担子菌製剤の抗腫瘍効果：血清ＩＡＰ誘導の差異、第47回日本細菌学会東北支部総会、十和田、1993. 9.

5）海老名卓三郎、村田和子、田村啓二：担子菌製剤ＰＳＫによる腫瘍免疫増強機構：血清ＩＡＰの誘導、第52回日本癌学会総会、仙台、1993. 10.

6）海老名卓三郎：ヒトロタウイルス下痢症予防効果を持つ牛初乳からの特異抗体の分離、第41回日本ウイルス学会総会、札幌、1993. 10.

7）村田和子、海老名卓三郎、田村啓二：ＢＲＭによる抗腫瘍免疫増強機構：各種ＢＲＭ腫瘍内投与による血清ＩＡＰ誘導の差異、第23回日本免疫学会総会、仙台、1993. 11.

8）海老名卓三郎、村田和子：担子菌製剤ＰＳＫによる腫瘍免疫増強機構：血清ＩＡＰの誘導、第６回ＪＢＲＭ学会学術集会総会、福岡、1993. 12.

9）海老名卓三郎、村田和子：細菌製剤並びに担子菌製剤による抗腫瘍免疫増強機構（第３報）血清ＩＡＰ誘導の差異、第67回日本細菌学会総会、東京、1994. 3.

10）宋項光、金丸義敬、長岡　利、源　宣之、島村誠一、海老名卓三郎：正常ウシ初乳抗体のヒトロタウイルス感染症予防への利用性、第88回日本畜産学会、藤沢、1994. 3.

◦研究所・病理学部門

1）立野紘雄、佐藤郁郎：胆嚢に発生した低悪性型線維性組織球腫の１切除例、第83回日本病理学会総会、1994. 3.

2）立野紘雄、佐藤郁郎：小児脳腫瘍の１例、第20回東北新潟病理検討会、1994. 1.

◦研究所・薬物療法学部門

1）菊池寛昭（氏家重紀、伊藤友美、涌井　昭）：抗癌剤感受性試験・organoid 形成法の基礎的研究、第５回白布癌シンポジウム、1993. 7.

◦研究所・生化学部門

(1) 宮城妙子、佐藤　馨、秦　敬子、安井　明、秋田博敏、加賀山学：ラット骨格筋シアリダーゼの構造と細胞内局在、日本生化学会東北地方会、仙台、1993. 5.

(2) 宮城妙子、佐藤　馨、秦　敬子、安井　明：ラット細胞質シアリダーゼの組織特異的発現機構と機能の解析、第15回糖質シンポジウム、仙台、1993. 7.

(3) 秦　敬子、今野公男、宮城妙子：ガングリオシドのみを水解する形質膜シアリダーゼの精製と性状解析、第52回日本癌学会総会、仙台、1993. 10.

(4) 宮城妙子、佐藤　馨、秦　敬子、安井　明：ラット肝癌における細胞質シアリダーゼの遺伝子発現、第52回日本癌学会総会、仙台、1993. 10.

(5) 佐藤　馨、秦　敬子、和田　正、安井　明、宮城妙子：ラット細胞質シアリダーゼの組織特異的発現様式の検討、第66回日本生化学会大会、東京、1993. 10.

(6) 秋田博敏、加賀山学、宮城妙子：ゲッシ類の菌髄におけるシアル酸含有複合糖質と細胞質シアリダーゼのレクチンおよび免疫組織化学的局在、第99回日本解剖学会大会、1993. 10.

◦医療局

1）庄司忠實、浅川　洋：全国がん（成人病）センター協議会加盟施設における診療の年次推移、第28回日本成人病学会、1994. 1.

◦医療局・内科

1）高橋　豊、磨伊正義、涌井　昭、田口鐵男：再発・進行胃癌に対する塩酸イリノテカン（ＣＰＴ－11）の後期第Ⅱ相臨床試験、第31回日本癌治療学会、大阪、1993. 10.

2）高橋　弘、及川博介、涌井　昭、他：癌診断能向上を目的としたγ線検出プローブの研究、第31回日本癌治療学会、大阪、1993. 10.

3）武田鐵太郎：教育講演・甲状腺の細胞診、第34回日本臨床細胞学会総会、1993. 5.

4）武田鐵太郎：特別講演・甲状腺の細胞診、第30回日本臨床細胞学会東北支部学術集会、1993. 7.

5）小野寺博義（鵜飼克明、中野　昇、武田鐵太郎、庄司忠實）：肝炎多発地域での肝癌の1.5次予防のためのハイリスク群の設定、第32回日本消化器集団検診学会総会、1993. 4.

6）小野寺博義：ワークショップ「導入法からみた超音波集検発見癌の実態と問題点」、超音波集検発見癌の実態からみた今後の施策展開、第31回日本消化器集団検診学会秋季大会、1993. 9.

7）小野寺博義（鵜飼克明）：肝炎多発地域における肝細胞癌の1.5次予防を目的とした肝集検、日本超音波医学会第63回研究発表会、1993. 11.

8）小野寺博義（鵜飼克明、中野　昇、武田鐵太郎、庄司忠實）：Ｃ型肝炎多発地区における肝細胞癌の1.5次予防を目的としたハイリスク群の設定、第４回日本疫学会総会、1994. 1.

9）鵜飼克明 etc.：胆嚢内出血を経時的に観察しえた胆嚢癌の一症例、日本超音波医学会第62回研究発表会、1993. 5.

10）鵜飼克明 etc.：腹部超音波検査が診断に有用であった肝のう胞破裂の一例、第146回日本消化器病学会東北支部例会、1993. 6.

11）鵜飼克明 etc.：Ｃ型慢性肝炎に対するインターフェロン療法後に認めた小肝癌の２例、第148回日本消化器病学会東北支部例会、1994. 2.

◦医療局・外科

1）菅原　暢：乳癌組織型の変遷、福島宮城乳腺疾患研究会、1993. 8.

2）藤谷恒明：高齢者大腸癌ルウスの１例、第14回仙台地区臨床外科医会、1993. 10.

3）富永　剛、藤谷恒明、小野日出麿、菅原　暢、大内清昭、中村雍志、高橋通宏、吉田弘一、鵜飼克明：術前下血を来した出血性胆嚢癌の１例、第６回東北膵・胆道癌研究会、1993. 5.

◦医療局・呼吸器科

1）高橋里美、松田　堯、他：宮城県肺癌集検10年間の発見成績、日本肺癌学会総会、1993. 11.

2）高橋里美、松田　堯、他：肺癌死亡数からみた肺癌集団検診の評価、日本肺癌学会総会、1993. 11.

3）小犬丸貞裕、小池加保児、岡部　健、岩渕　悟、松田　堯：ⅢＡ期（N_2）肺癌の治療成績、日本肺癌学会東北支部会、1993. 7.

◦医療局・放射線科

1）菱沼民生（中嶋美佳、日向野修一、小田和浩一、浅川　洋）：Locoregional recunence に対する放射線治療成績、第17回福島宮城乳腺疾患研究会、1994. 3.

2）菱沼民生（中嶋美佳、日向野修一、小田和浩一、浅川　洋）：子宮体癌に対するＭＰＡ（Medroxy Progesterone Acetate）併用放射線治療の成績、第88回日本医学放射線学会北日本地方会、1993. 7.

◦医療局・泌尿器科

1）桑原正明、大川順正：難渋する疾患－診断と治療－、第81回日泌尿総会、京都、1993. 4.

2）桑原正明、星　宣次、庵谷尚正：ＶＸ２腎癌自然転移モデルにおける転移抑制の検討、第81回日泌尿総会、1993. 4.

3）庵谷尚正、折笠精一、桑原正明：水中衝撃波の変異原性に関する検討、第81回日泌尿総会、1993. 4.

4）斎藤敏典、折笠精一、星　宣次、鈴木謙一、桑原正明：ＶＸ２膀胱癌に対する水中衝撃波の影響－透過電子顕微鏡による観察、第81回日泌尿総会、1993. 4.

5）桑原正明、星　宣次、鈴木謙一：腎癌、－肺転移の動物実験モデル作製とヘパチニールグリシンの転移抑制作用について、第52回日本癌学会総会、仙台、1993. 10.

6）鈴木謙一、折笠精一、星　宣次、桑原正明：マウス膀胱癌（ＭＢＴ－２）皮下移植腫瘍に対する高エネルギー水中衝撃波の効果、第52回日本癌学会総会、1993. 10.

7）星　宣次、折笠精一、鈴木謙一、桑原正明：水中衝撃波によるＶＸ２膀胱癌の治療－血管新生阻害剤ＴＮＰ－470との併用療法、第52回日本癌学会総会、1993. 10.

8）桑原正明、高橋とし子：兎腎癌モデルにおける桃核承気湯の肺転移抑制効果についての検討、第２回東北大学漢方研究会、1993. 4.

◦医療局・麻酔科

1）山室　誠：術後疼痛の管理、日本外科系連合学会総会シンポジウム、1993. 6.

2）山室　誠：癌性疼痛について、日本臨床麻酔学会総会シンポジウム「ペインクリニックの新展望」、1993. 11.

◦医療局・整形外科

1）村上　享：仙骨腫瘍の一例、第324回東北大学整形外科談論会、1994. 2.

2）橋本禎敬、村上　享、他：大腿骨頭すべり症に対する予防的 pinning の検討、第４回日本小児整形

外科学会、1993. 11.

◦臨床検査技術部

1）小室邦子、大沼真喜子、村田孝次、佐藤裕美子、武田鐵太郎、小野寺博義、松田　堯、斉藤博之、中村克宏：有茎性ポリープ型早期胆嚢癌4例の細胞所見、日本臨床細胞学会総会、1993. 5.

2）小室邦子、武田鐵太郎、小野寺博義、大沼真喜子、村田孝次、松田　堯、斉藤博之、中村克宏：中皮細胞と腺癌細胞の銀染色について、日本臨床細胞学会東北支部連合会、1993. 7.

3）小室邦子、武田鐵太郎、小野寺博義、大沼真喜子、村田孝次、松田　堯、斉藤博之、中村克宏：銀染色による中皮細胞同定の試み、日本臨床細胞学会秋期大会、1993. 10.

4）大沼真喜子、小室邦子、村田孝次、長谷とみよ、武田鐵太郎、小野寺博義、松田　堯、斉藤博之、中村克宏：充実腺癌細胞の細胞所見、第34回日本臨床細胞学会総会、1993. 5.

5）大沼真喜子、小室邦子、村田孝次、植木美幸、阿部美和、武田鐵太郎、小野寺博義、村田　堯、佐藤郁郎、立野紘雄：腎癌に併発した腎oncocytomaの1例、日本臨床細胞学会宮城県支部学術集会、1994. 2.

◦診療放射線技術部

1）小山　洋、千葉俊雄、本田悦雄、早川博文：宮城県立がんセンターにおけるＨＩＳ／ＲＩＳ／ＰＡＣＳ（第1報)、日本放射線技師会総合学術大会、1993. 9.

2）熊谷祐子、千葉俊雄、小山　洋、本田悦雄、今野千香子、早川博文：宮城県立がんセンターにおけるＨＩＳ／ＲＩＳ／ＰＡＣＳ（第2報）－オーダーリングを中心に－、宮城県技師会総合学術大会、1994. 2.

3）小山　洋、千葉俊雄、早川博文、日向野修一：Fast FE法における肝ダイナミックＭＲＩ、宮城県技師会総合学術大会、1994. 2.

4）千葉俊雄、小山　洋、熊谷優子、本田悦雄、今野千香子、早川博文：宮城県立がんセンターにおけるＨＩＳ／ＲＩＳ／ＰＡＣＳ（第3報）－ＰＡＣＳを中心に－、宮城県技師会総合学術大会、1994. 2.

5）渡辺ヒサ子、千葉俊雄、金子美和子、今野千香子、早川博文、松田　堯、岡部　健：肺集検（二次検診）へのスパイラルＣＴの検討、宮城県技師会総合学術大会、1994. 2.

6）荒ふみ子、島倉満男、渡辺信二、千葉俊雄、早川博文、菱沼民生、片倉隆一：リニアックによるラジオサージェリーの紹介、宮城県技師会総合学術大会、1994. 2.

◦看護部

1）阿部京子、冨田きよ子、高橋美佐子、今野とし子、足沢孝子、吉田弘一、小野日出麿：宮城ストーマケア研究会の歩み－アンケート調査から－、宮城ストーマケア研究会、1993. 10.

第2章　論 文 発 表

a. 英 文 誌

◦ **研究所・免疫学部門**

1) Ebina, T., Murata, K. and Tamura, K. : Antitumor effect of intratumoral administration of biological response modifiers : Induction of immunosuppressive acidic protein, a type of α_1-acid glycoprotein, in mice. *Jpm. J. Cancer Res.* **85**, 93−100, 1994.

2) Hatta, H., Tsuda, K., Akachi, S., Kim, M., Yamamoto, T. and Ebina, T. : Oral passive immunization effect of anti-human rotavirus IgY and its behavior against proteolytic enzymes. *Biosci. Biotech. Biochem.* **57**, 1077−1081, 1993.

◦ **研究所・病理学部門**

1) M. Sawada, A. Takada, I. Ohwaki, N. Takahashi, H. Tateno, J. Sakamoto and R. Kannagi : Specific expression of a complex sialyl lewis X antigen on high endothelial venules of human lymph nodes : Possible Candidate for L-Selectin Ligand. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **193**. 337−347. 1993.

◦ **研究所・生化学部門**

1) Miyagi T., Hata K., Hasegawa A. and Aoyagi T. : Differential effect of various inhibi tors on four types of rat sialidase. *Glycoconjugate J.* **10**, 45−49. 1993.

2) Miyagi T., Konno K., Emori Y., Kawasaki H., Suzuki K., Yasui A. and Tsuiki S. : Molecular cloning and expression of cDNA encoding rat skeletal muscle cytosolic sialidase. *J. Biol. Chem.* **268**, 26435−26440, 1993.

◦ **医療局・内科**

1) T. Yoshida, M. Ogawa, K. Ota, Y. Yoshida, A. Wakui. et al : Phase 11 study of NK 313 in malignant lymphomas : an NK 313 malignant lymphoma study group trial. Cancer Chemother. Pharmacol. **31** : 445−448, 1993.

2) M. Tada, R. Iwata, H. Sugiyama, A. Wakui, et al : A rapid synthesis of 〔fluoroacetyl^{18}-F〕 fluoromelatonin (N^{ω}-〔^{18}F〕fluoroacetyl−5−methoxylryplamine), a potential diagn ostic imaging agent. J. Labelled compds. Radiopharm. **32** : 601−606, 1993.

◦ **医療局・泌尿器科**

1) Kuwahara, M. : Tissue injuries during extracorporeal Jpn. shock wave lithotripsy from the standpoint of basic physics and experimental pathophysiology. *J. Endourol. ESWL.* **6** : 5−12. 1993.

2) Takayama, K., Nagoya, H., Obara, T. and Kuwahara, M. : Application of holographic interferometric studies of underwater shock wave focusing to medicine. Society of photo-Optical Instrumentation Engineers. **1801**. 1029−1034, 1993

◦医療局・整形外科

1）Rijal, K. P., Kokubun, S., Sakurai, M., Murakami, T. and Ishi, Y.：Results of operative treatment for severe scoliosis. 脊柱変形（*Spiral Deformity*）**8**, 4－20, 1993.

b．邦 文 誌

◦研究所・免疫学部門

1）海老名卓三郎：機能性食品－免疫抗体、*BIOmedica*、**8**、45－48、1993.

2）海老名卓三郎、村田和子：各種ＢＲＭ腫瘍内投与による抗腫瘍効果の差異：血清ＩＡＰの誘導、癌と化学療法、**20**、1453－1456、1993.

3）海老名卓三郎、村田和子：セファランチンの抗腫瘍効果－腫瘍免疫増強機構、アルカロイド研究会報告集、**19**、1－9、1993.

4）海老名卓三郎：癌の免疫療法、名取岩沼医師会報、**42**、2－4、1994.

5）海老名卓三郎、村田和子：担子菌製剤ＰＳＫによる腫瘍免疫増強機構：血清ＩＡＰの誘導、Biotherapy **8**、315－316、1994.

◦研究所・薬物療法学部門

1）菊池寛昭、氏家重紀、伊藤友美、涌井　昭：抗癌剤感受性試験・organoid 形成法の基礎的研究、癌と化学療法、**21**、351－362、1994.

◦研究所・生化学部門

1）宮城妙子：動物シアリダーゼ－その性状、構造、機能について、細胞工学、G、733－739、1993.

◦医療局

1）庄司忠實、浅川　洋：地域医療計画の策定に伴う地域がん診療施設の整備拡充に関する研究、がん診療体系における大学病院の立場、厚生省がん研究助成金による報告集、1993.

2）浅川　洋、庄司忠實：宮城県における高額医療機器の実態調査、厚生省がん研究助成金による報告集、1993.

◦医療局・内科

1）涌井　昭、漆崎一朗、古江　尚、他：手術不能スキルス胃癌に対するレンチナンの無作為化比較試験、Biotherapy、**7**：1224－1233、1993.

2）涌井　昭：癌化学療法のあゆみと研究の現況、癌治療と宿主、**6**：94－96、1994.

3）涌井　昭、横山正和：進行胃癌に対する Mitomycin（MMC）、Carmofur（HCNU）の２剤併用、新薬と臨床、**43**：261－266、1994.

4）佐藤由紀、武田鐵太郎：妊娠期・授乳期の乳腺細胞所見、日本臨床細胞学会雑誌、**32**：386－391、1993.

5）小野寺博義、鵜飼克明、中野　昇、武田鐵太郎、庄司忠實：医療システム構築による肝癌検診体系の確立に関する研究、消化器集団検診（日消集検誌）、31(3)、38－44、1993.

6）小野寺博義、鵜飼克明、大方俊樹、鈴木　裕、本島　正、桑島一郎、中野　昇、氏家重紀、武田鐵太郎、庄司忠實：PTCD 前後におけるCA－50とCA19－9の変動、臨床と研究、**70**、2834－2836、1

993.

7）小野寺博義、鵜飼克明、中野　昇、鈴木　裕、大方俊樹、本島　正、桑島一郎、武田鐵太郎、庄司忠實：肝硬変における凝固能異常に対するメシル酸ガベキサートの効果、現代医療、**26**、873～876、1994.

8）小野寺博義：C型肝炎多発地域における肝細胞癌予防のための医療システムに関する研究、厚生省がん研究助成金による報告集、1993.

◦**医療局・泌尿器科**

1）桑原正明、星　宣次、庵谷尚正：衝撃波の生体に及ぼす影響：兎腎癌モデルにおける検討、平成4年度衝撃波シンポジウム論文集、151－154、1993.

2）相田　聡、藤本克彦、柴田真理子、松本俊一、桑原正明：衝撃波による結石破砕メカニズムに関する検討、平成4年度衝撃波シンポジウム論文集、163－166、1993.

3）星　宣次、折笠精一、鈴木謙一、桑原正明：家兎膀胱癌に対する衝撃波と抗癌剤の併用療法、平成4年度衝撃波シンポジウム論文集、167－170、1993.

4）鈴木謙一、星　宣次、折笠精一、桑原正明：マウス膀胱癌（ＭＢＴ－２）皮下移植癌に対する高エネルギー水中衝撃波の効果、平成4年度衝撃波シンポジウム論文集、171－174、1993.

5）斎藤敏典、折笠精一、星　宣次、桑原正明：ＶＸ２癌超微細構造への衝撃波の影響、平成4年度衝撃波シンポジウム論文集、635－638、1993.

6）庵谷尚正、折笠精一、桑原正明：水中衝撃波の変異原性の有無に関する検討、平成4年度衝撃波シンポジウム論文集、685－688、1993.

7）石橋義治、相田　聡、桑原正明：アニュラーアレーを用いた衝撃波焦点制御法の検討、平成4年度衝撃波シンポジウム論文集、543－546、1993.

8）鈴木謙一、折笠精一、星　宣次、桑原正明：高エネルギー水中衝撃波による家兎ＶＸ２膀胱癌の治療－衝撃波とＴＨＰ－ＡＤＭ併用後のＴＨＰ－ＡＤＭ組織内濃度について、日泌尿学会雑誌、**84**：1007－1012、1993.

9）桑原正明、高橋とし子：兎腎癌モデルにおける桃核承気湯の肺転移抑制効果についての検討、Pharma Medica、**11**：271－274、1993.

◦**医療局・麻酔科**

1）山室　誠、他：地域におけるターミナル・ケアの会について、日本臨床麻酔学会誌、**13**：78－81、1993.

2）山室　誠：癌性疼痛管理に内科医はどのように参加できますか？、治療、**75**：97－100、1993.

3）山室　誠：終末期がん患者の疼痛治療とＱＯＬ、生命の科学、**2**：10－11、1993.

◦**臨床検査技術部**

1）大沼真喜子、小野寺博義、武田鐵太郎、小室邦子、村田孝次、中村克宏、松田　堯：膵ラ島腫瘍4例の細胞所見、日本臨床細胞学会雑誌、**32**：1037～1041、1993.

第3章　著　　書

◦**研究所・免疫学部門**

1）海老名卓三郎：癌用語辞典（斉藤達雄、小池克郎、涌井　昭、中尾　功 編）、医薬ジャーナル社、34、36、37、45、67、81、110、112、139、194、200、245、255、261、272、296、302、1993.

◦**研究所・病理学部門**

1）佐藤郁郎：実験ノートのグラフ化技法と最新解析法、山海堂、B 5 版、236ページ、1994.

◦**研究所・生化学部門**

1）宮城妙子：シアリダーゼ遺伝子、糖鎖Ⅰ、糖鎖と生命（永井克孝編）東京化学同人、東京、186－195、1994.

2）宮城妙子：シアリダーゼ遺伝子、グリコバイオロジーシリーズ・グリコジーンとその世界（箱守仙一郎、永井克孝、木幡　陽編）講談社、東京、186－197、1994.

◦**医療局**

1）斉藤達雄、小池克郎、涌井　昭、中尾　功 編：癌用語事典、医薬ジャーナル社、1994.

2）吉田弘一、武田鐵太郎：図説臨床〔癌〕シリーズ・乳癌、メジカルビュー社、72－76、1993.

3）吉田弘一、武田鐵太郎：乳腺疾患、金原出版、改訂第 2 版、167－182、1993.

4）武田鐵太郎：乳腺の細胞診、武藤化学、8－21、23、36、59－67、1993.

◦**医療局・外科**

1）高橋通宏：在宅静脈栄養法ハンドブック、自己出版、1993.

◦**医療局・泌尿器科**

1）福崎　篤、桑原正明、折笠精一：泌尿器科領域における各種内視鏡手術の最近の進歩－停留精巣の内視鏡診断と治療、オペナーシング、8：48－50、1993.

◦**医療局・麻酔科**

1）山室　誠、他：術後痛に対する硬膜外鎮痛法、檀健二郎監修「術後痛」：15－42、克誠堂出版、東京、1993.

◦**医療局・脳外科**

1）片倉隆一：（脳腫瘍）癌用語事典、医薬ジャーナル社、157－158、1993.

第４章　講演（特別・招請・依頼）

◦研究所・免疫学部門

１）海老名卓三郎：ＢＲＭによる腫瘍免疫増強機構、九州胃癌免疫化学療法研究会、宮崎、1993. 7. 16

２）海老名卓三郎：ウイルス病の新展開、日衛協東北支部検査月間大会、仙台、1993. 11. 20

３）海老名卓三郎：癌と免疫、名取市医談会勉強会、名取、1993. 10. 29

４）海老名卓三郎：癌の免疫療法、大崎地区医師会連合会学術講演会、古川、1994. 1. 25

◦研究所・生化学部門

１）宮城妙子：複合糖質シアル酸残基の機能と代謝、日本薬学会医薬化学部会第93－7回創薬懇話会、仙台、1993. 11.

２）宮城妙子：動物シアリダーゼーその性状、構造、機能、青森県産業技術開発センター先端技術研修会、1993. 12.

◦医療局・内科

１）涌井　昭：インターフェロンによるがん治療開発の道程と展望、第７回神奈川県医師会がん検診研究会、平成５．４．11

２）鵜飼克明：医療従事者のための感染事故防止－ウイルス性肝炎を中心に－、名取・亘理地区地域医療対策委員会、1993. 9

◦医療局・放射線科

１）浅川　洋：放射線治療の現況、仙南消化器研究会、1993. 7. 28

２）浅川　洋：病院経営における放射線科（経済性を重視した放射線業務の合理化)、日本病院会、1993. 10. 22

◦医療局・泌尿器科

１）桑原正明：高齢者の尿路管理、仙南高齢者医談話会、1993. 6. 16

◦医療局・麻酔科

１）山室　誠：中国・四国ペインクリニック研究会、特別講演「ペインクリニック20年の苦い経験」、1993. 5. 15

２）山室　誠：仙台企業倫理委員会、依頼講演「癌性疼痛とターミナル・ケア」、1993. 7. 1

３）山室　誠：秋田ターミナル・ケア研究会、特別講演「癌性疼痛とターミナル・ケア」1993. 8. 28

４）山室　誠：石巻赤十字看護専門学校同窓会、特別講演「癌性疼痛とターミナル・ケア」1993. 8. 29

５）山室　誠：仙台ライオンズクラブ、依頼講演「癌性疼痛とターミナル・ケア」1993. 9. 3

６）山室　誠：国立仙台病院看護研修会、依頼講演「癌性疼痛とターミナル・ケア」、1993. 9. 24

７）山室　誠：仙台市立病院看護研修会、依頼講演「癌性疼痛とターミナル・ケア」、1993. 10. 27

８）山室　誠：宮城県医療整備企画課研修会、依頼講演「癌性疼痛とターミナル・ケア」、1993. 11. 26

９）山室　誠：宮城県自治会病院連合会、特別講演「癌性疼痛とターミナル・ケア」、1994. 2. 9

10）山室　誠：北上市医師会研修会、依頼講演「癌性疼痛の治療」、1994. 3. 18

◦**医療局・脳外科**

1）片倉隆一：脳腫瘍における最近の知見、仙南脳卒中懇話会、1993. 4. 19

◦**医療局・整形外科**

1）村上　享：高齢者の骨折について、仙南高齢者医療談話会、1993. 11. 25

◦**診療放射線技術部**

1）早川博文：宮城県立がんセンター概要、宮城県保健所放射線技師会、1993. 10

2）千葉俊雄：宮城県立がんセンターの概要と放射線技術部の役割、宮城県保健所放射線技師会、1993. 10

第5章　論文別刷集

Jpn. J. Cancer Res. 85, 93–100, January 1994

Antitumor Effect of Intratumoral Administration of Biological Response Modifiers: Induction of Immunosuppressive Acidic Protein, a Type of α_1-Acid Glycoprotein, in Mice

Takusaburo Ebina,[1,3] Kazuko Murata[1] and Keiji Tamura[2]

[1]*Division of Immunology, Research Institute Miyagi Cancer Center, 47-1 Nodayama, Medeshima-shiode, Natori, Miyagi 981-12 and* [2]*Saikinkagaku Institute Co., Ltd., 5-12 Hayamacho, Aoba-ku, Sendai, Miyagi 981*

The antitumor effects of biological response modifiers (BRMs) in an experimental mouse model, the "double grafted tumor system" were analyzed. Male BALB/c mice received simultaneous inoculations of Meth-A fibrosarcoma cells on the right flank (10^6 cells) and left flank (2×10^5 cells) on day 0, and BRMs were injected intratumorally into the right tumor on days 3, 4 and 5. PSK (a protein-bound polysaccharide preparation), interleukin-1 (IL-1) and cepharanthin (CR) cured not only the right, but also the left, non-treated tumor in a double grafted tumor system. OK-432 (a *Streptococcus* preparation) and BCG and tumor necrosis factor (TNF) cured the right tumor and inhibited the growth of the left tumor. Lentinan (a polysaccharide preparation) and IL-6 inhibited neither the right nor the left tumor. Immunosuppressive acidic protein (IAP) in serum was increased transiently soon after intradermal injection of PSK, CR, OK-432 and TNF in BALB/c mice. Lentinan, however, did not induce IAP. IAP in serum was gradually increased after intradermal inoculation of Meth-A tumor in BALB/c mice. The biochemical difference between PSK-induced IAP (early, inflammatory IAP) and Meth-A-induced IAP (late, tumor-induced IAP) was investigated by crossed affinity immunoelectrophoresis with concanavalin A. IAP of murine serum was separated into 4 peaks. IAP in normal mouse was rich in high-mannose type sugar chain (Peak 3) and contained no hybrid-type sugar chain (Peak 4), which was present in inflammatory and tumor-induced IAP. Inflammatory IAP was rich in biantennary sugar chain (Peak 2) and tumor-induced IAP was rich in tri-tetraantennary sugar chain (Peak 1).

Key words: Biological response modifier — Intratumoral administration — Immunosuppressive acidic protein — Activated macrophage — Cytokine network

In our previous papers,[1-8] the antitumor effects at a distant site of PSK,[4] a protein-bound polysaccharide preparation, and recombinant human IL-1β were analyzed by using the double grafted tumor system in which male BALB/c mice received simultaneous intradermal inoculations of Meth-A tumor in the right (10^6 cells) and the left (2×10^5 cells) flanks and were then injected with PSK or IL-1β in the right-flank tumor on days 3, 4 and 5. Among several BRMs examined, PSK and IL-1β significantly inhibited the growth of not only the right but also the left (non-treated) tumor.

Our previous studies on the antitumor effect of PSK and IL-1 in the double grafted tumor system showed that the intratumoral administration of PSK and IL-1 first induces neutrophils in the right tumor via an IL-8-like factor and then macrophages are induced by an MCF produced by tumor cells and neutrophils. Then Lyt-1 (L3T4)-positive cells are induced in the right regional lymph nodes and in the spleen, probably via IL-1, which might be produced from macrophages in contact with tumor cells. Subsequently, Lyt-1-positive and L3T4-positive cells in the spleen reach the left tumor through the blood stream, come into contact with Meth-A cells and then produce MCF. Intratumoral administration of PSK and IL-1 in the right tumor thus induces activated macrophages in the left, non-treated tumor, thereby bringing about the regression of the distant tumor.

α1-AG is one of the major acute phase proteins in plasma which increases dramatically in inflammation, pregnancy and cancer.[9] Many sera and ascitic fluids obtained from cancer patients contained dramatically increased amounts of α1-AG.[10,11] Furthermore, α1-AG from cancer patients exhibited a different composition of pI subspecies when compared with those derived from healthy or pregnant donors.[12] We purified the major subspecies of α1-AG from cancer ascitic fluids to apparent

[3] To whom requests for reprints should be addressed.

[4] The abbreviations used are: PSK, polysaccharide Kureha; BRM, biological response modifier; IAP, immunosuppressive acidic protein; CR, cepharanthin; IL-1β, interleukin-1β; TNF, tumor necrosis factor; LNT, lentinan; CAIE, crossed affinity immunoelectrophoresis; Con A, concanavalin A; MCF, macrophage chemotactic factor; α1-AG, α_1-acid glycoprotein.

homogeneity (MW: 50 kDa, pI: 3.0). This α1-AG was designated IAP,[13] since a high dose of it (>1 mg/ml) exhibited irreversible immunosuppressive activity towards various immunological responses *in vitro*[13] and *in vivo*,[14, 15] enhanced tumor growth in mice,[16] and induced suppressor macrophages.[14] On the other hand, preliminary experiments showed that an inflammatory drug, carrageenan[15] and a Streptococcal preparation, OK-432[17] induced a low level of IAP (<1 mg/ml) transiently soon after an intraperitoneal administration. Such a low dose of IAP did not show immunosuppression.[14] IAP was produced by liver cells, neutrophils and activated macrophages.[15] Therefore, IAP in serum of BRM-treated mice was measured as a marker protein of activated macrophages and neutrophils. The first purpose of the present paper is to show that the induction of inflammatory IAP in serum is an important trigger of antitumor effect caused by the intratumoral injection of BRMs. The second purpose is to clarify the biochemical difference between the PSK-induced IAP (early, inflammatory IAP) and Meth-A-induced IAP (late, tumor-induced IAP). CAIE with Con A was used for fractionation and for structural studies of asparagine-linked sugar chains of IAP.

MATERIALS AND METHODS

Mice and tumor Six-week-old male BALB/c (+/+) and BALB/c (*nu/nu*) mice were obtained from Shizuoka Laboratory Animal Center, Hamamatsu. Meth-A, a methylcholanthrene-induced fibrosarcoma, was administered to syngeneic BALB/c mice in solid form by intradermal inoculation.

BRMs PSK was purified from a hot water extract of cultured mycelia from *Coliolus versicolor*, which belongs to Basidiomycetes. The average molecular weight is about 100,000 and its protein content is about 38%. The main glycoside portion of PSK is β-D-glucan. PSK was supplied by Kureha Chemical Industry Ltd., Tokyo. LNT was extracted from fruit bodies of *Lentinus edodes* (Berk) and is a β-1,3-glucan with average molecular weight of 500,000 daltons. LNT is composed of only glucose with no other sugar component and was supplied by Yamanouchi Pharmaceutical Co., Ltd., Tokyo. OK-432 (Chugai Pharmaceutical Co., Tokyo) is a penicillin- and H_2O_2-killed lyophilized preparation of Su strain of *Streptococcus pyogenes*. Recombinant TNF (2.1×10^6 units/mg protein) was kindly donated by Asahi Chemical Industry Co., Ltd., Tokyo. The stock solution of rTNF was 10^5 units/ml of 5 m*M* phosphate-buffered saline, pH 7.4, containing 0.1% gelatin. CR is an extract from the root of *Stephania cepharantha* HAYATA, consisting of 6 kinds of biscoclaurine alkaroid and was provided by Kaken Shoyaku Co., Ltd., Tokyo. BCG was supplied with Koseikai BCG Laboratories, Sendai. Recombinant human IL-6 was supplied by Toray Industries, Inc., Kamakura.

Double grafted tumor system As described in previous papers,[1-8] we devised the double grafted tumor system as a new experimental tumor model. BALB/c mice receive simultaneous intradermal inoculation of Meth-A tumor cells in both the right (1×10^6 cells, primary region) and the left (2×10^5 cells, distant region) flanks. Drugs are injected into the right-flank tumor on days 3, 4 and 5, and the left (non-treated) tumor is observed for 21 days. As there is a possibility that drugs in the right tumor may directly affect the left tumor via the blood stream, we devised as a control the single tumor system in which mice received intradermal inoculations of 2×10^5 Meth-A tumor cells only in the left flank, and then were injected subcutaneously with drugs into the right flank on day 3 and observed for 18 days.

Evaluation of antitumor activity Tumor diameter was measured 3 times a week with calipers and the tumor size was calculated as the square root of the long diameter $\times$ short diameter (mm). After 3 weeks, the animals were

Table I. Anti-Meth-A Effect of Cepharanthin in the Double Grafted Tumor System

Group	Right tumor (1×10^6 cells)		Left tumor (2×10^5 cells)	
	Tumor-free /tested	Tumor weight (g±SD)	Tumor-free /tested	Tumor weight (g±SD)
Double-tumor				
Control	0/8	5.3±1.34	0/8	3.1±0.50
Cepharanthin 0.5 mg×3 d3, 4, 5	3/8	1.2±0.60	2/8	2.5±0.88
Single-tumor				
Control	–	–	0/8	4.2±0.82
Cepharanthin 0.5 mg×3 d3, 4, 5	–	–	0/8	2.5±1.19

SD: standard deviation.

killed and each tumor was weighed to obtain the mean value(g) ± standard deviation. Each experimental and control group consisted of 6 to 9 mice. The difference in tumor growth (tumor size or tumor weight) between the control and experimental groups was tested statistically by using the Student's *t* test. The differences in cure rates were statistically evaluated by means of the chi-square test.

Determination of mouse IAP The serum concentration of IAP was determined with a single radial immunodiffusion method using rabbit anti-mouse IAP serum (Mouse IAP plate, Sanko Junyaku, Tokyo). The calibration curve with purified IAP was linear between 30 and 1,500 μg/ml.

CAIE with Con A Microheterogeneity of IAP was determined by CAIE.[18] Electrophoresis was performed at 15°C in 1% agarose in Tris/Veronal buffer, pH 8.6. The thickness of the gels was 1.5 mm. First dimension electrophoresis was performed with 3 μl of sample serum in a gel containing 0.5 mg/ml of Con A (Seikagaku Kogyo, Tokyo) at 10–15 V/cm until a mixture of bromophenol blue and serum had migrated 4.5 cm. In addition to antibodies against mouse IAP (Saikin Kagaku, Sendai), the second dimension gel contained 4% α-D-methylglucopyranoside in 1% agarose. Second dimension electrophoresis was performed for 16–18 h at 2·V/cm. The gels were washed, pressed, dried, and stained with Coomassie brilliant blue R-250. The areas below the immunoprecipitates were measured by semiautomatic planimetry, and each peak was expressed as a percentage of the total area enclosed.

RESULTS

Antitumor effect of four different BRMs in the double grafted tumor system The antitumor effects of PSK,[1-3, 5, 6, 8] OK-432,[1, 5] IL-1,[4, 7] IFN,[1, 4, 5] TNF,[4] IL-2,[4] MMC (mitomycin C)[1, 5] and NCS (neocarzinostatin)[5] in the double grafted tumor system have been reported previously. As shown in Table I, a plant alkaloids preparation, CR (0.5 mg × 3), inhibited the growth of not only the right but also the left, non-treated tumor. However, no tumor-free mice were found in the single tumor system with CR injection. These results show that CR itself does not directly affect the opposite flank and that intratumoral CR immunotherapy in the primary region does affect tumor growth in the distant region. In BALB/c nude mice, CR inhibited the growth of the right tumor but not that of the left tumor (Fig. 1a). Therefore, the antitumor activity of CR on the left tumor in the double grafted tumor system is associated with a sequential immune mechanism in which T cells may play an important role. The antitumor effect of CR on the right tumor is a direct cytotoxic effect. As shown in Table II, BCG

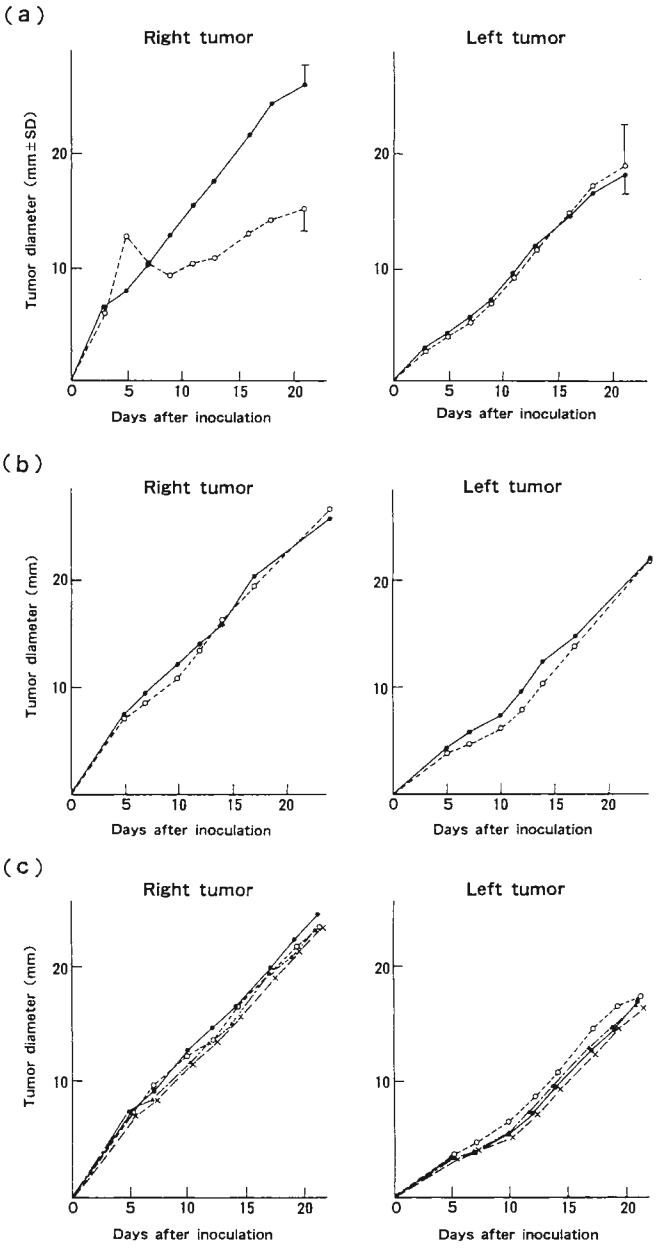


Fig. 1. Effect of several BRMs in the double grafted tumor system. (a) Cepharanthin, BALB/c nude mice. ● control, ○ cepharanthin. Bars show standard deviation. (b) Lentinan, BALB/c mice. ● control, ○ lentinan (0.1 mg × 3). (c) IL-6, BALB/c mice. ● control, ○ IL-6 (0.2 μg × 3), ▲ Il-6 (1 μg × 3), × IL-6 (5 μg × 3).

(5 mg × 3) completely cured the right tumor in the double grafted tumor system and inhibited the growth of the left tumor, as was the case with OK-432.[5] On the

other hand, β-1,3-glucan, LNT (0.1 mg × 3) was effective on neither the right nor the left tumor in this system, as shown in Fig. 1b. Moreover, another cytokine, rIL-6 did not show any antitumor effect (Fig. 1c). The present and previous results show that there are notable differences in antitumor effect among BRMs, as summarized in Table III.

Induction of IAP by BRM treatment IAP was found to be produced by liver cells, neutrophils and macrophages.[14, 15] Therefore, IAP in serum of BRM-treated mice was measured as a marker protein of activated macrophages and neutrophils. IAP in serum increased dramatically soon after intradermal injection of PSK (Fig. 2a, 880 μg/ml), CR (Fig. 2b, 840 μg/ml), rTNF (990 μg/ml) or OK-432 (520 μg/ml). An inflammatory drug, carrageenan, also induced IAP in serum after intradermal injection (650 μg/ml). LNT did not induce IAP, as shown in Fig. 2c.

On the other hand, IAP in serum gradually increased after intradermal inoculation of Meth-A tumor in BALB/c mice (Fig. 3). At 21 days after tumor inoculation, IAP in serum reached a maximum level (300 μg/ml). The serum IAP level of Meth-A bearing mice as well as that of normal mice increased after the intratumoral injection of PSK, as shown in Fig. 3. At 21 days after tumor inoculation, IAP in PSK-treated mice returned to the normal level. Therefore, the biochemical difference between PSK-induced IAP (early, inflammatory IAP) and Meth-A-induced IAP (late, tumor-induced IAP) was next investigated.

Microheterogeneity of sugar chains in IAP Various immobilized lectins can be used for fractionation and for structural studies of asparagine-linked sugar chains of glycoprotein.[19] The biochemical heterogeneity between PSK-induced IAP and Meth-A-induced IAP was investigated by CAIE with Con A. CAIE revealed at least four subfractions (Peaks 1–4) in IAP molecules: a Con A non-reactive fraction, the most anodic (P1), a Con A weakly reactive fraction (P2), a Con A-reactive fraction (P3) and a strongly reactive fraction (P4) (Fig. 4). Areas under the peaks give a semiquantitative measurement of the proportion of each population of IAP molecules

Table II. Antitumor Effect of BCG in the Double Grafted Tumor System

Group	Right tumor			Left tumor		
	Tumor-free /tested	Tumor diameter (mm±SD)	Tumor weight (g±SD)	Tumor-free /tested	Tumor diameter (mm±SD)	Tumor weight (g±SD)
Control	0/6	24.5±1.3	4.7±0.3	0/6	18.7±2.9	2.8±0.8
BCG						
0.5 mg×3	1/9	9.7±5.0	0.6±0.5	0/9	10.1±3.3	0.7±0.5
5 mg×3	9/9	0	0	0/9	10.9±3.7	0.8±0.5

SD: standard deviation.

Table III. Characterization of Various BRMs in the "Double Grafted Tumor System" and "Single Tumor System"

Category	Drug	Dose	Double Tumor		Single Tumor
			Right	Left	Left
Immunopotentiators	PSK	5 mg×3	++	++	−
	CR	0.5 mg×3	++	++	+
	OK-432	0.1 mg×5	++	+	−
	BCG	5 mg×3	++	+	ND
	LNT	0.1 mg×3	−	−	−
Cytokines	IL-1	0.2 μg×3	++	++	−
	IFN	10^5 U×8	++	++	+
	TNF	3×10^3 U×3	++	−	ND
	IL-2	10^4 U×10	−	−	−
	IL-6	5 μg×3	−	−	−
Chemotherapeutics	MMC	100 μg×1	++	+	+
	NCS	10 U×1	++	−	−

Scoring: ++, tumor rejection; +, growth inhibition; −, no effect; ND, not done.

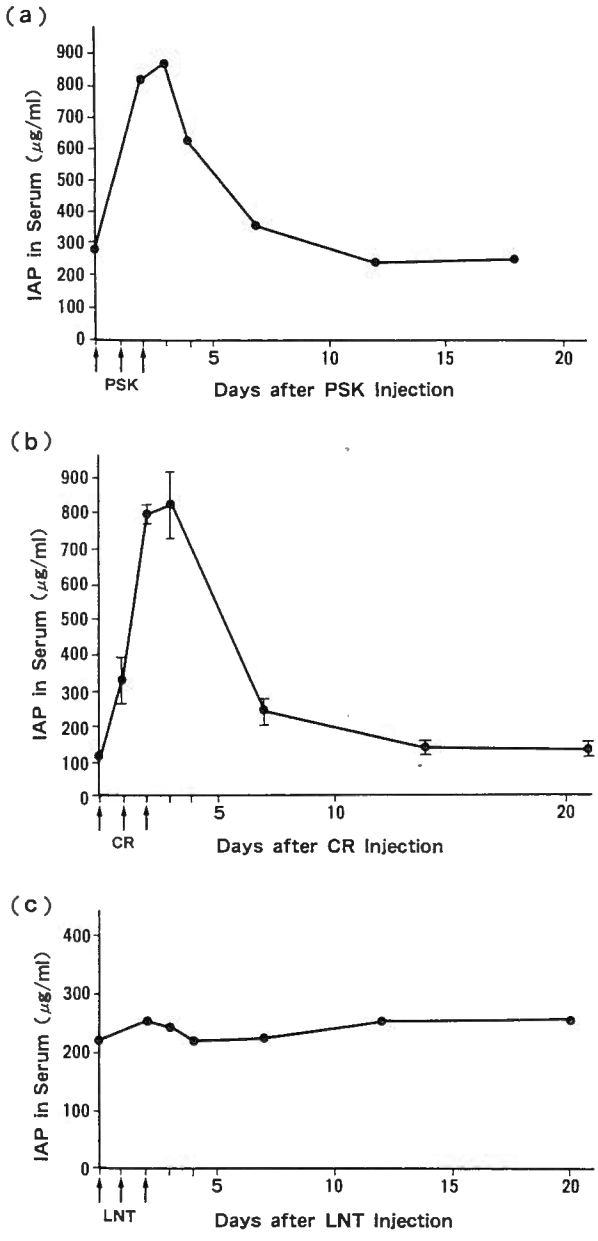


Fig. 2. Change of serum IAP levels in BALB/c mice after intradermal injections of several BRMs. (a) PSK, (b) CR, (c) LNT.

(Fig. 5). Agneray[20] has concluded that P1 is a glycopeptide with tri- and tetra-antennary complex-type sugar chains, and that P2 is a glycopeptide with biantennary complex-type sugar chain. P3 is a glycopeptide with high-mannose type sugar chain and P4 is one with hybrid-type sugar chain.

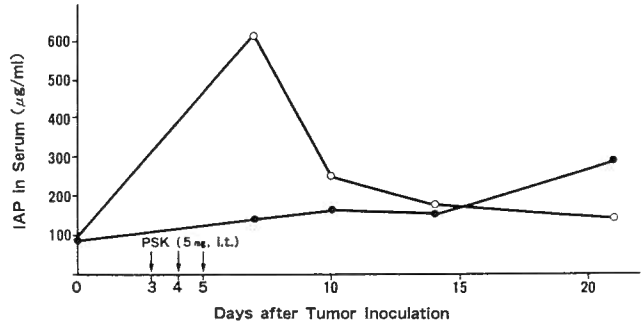


Fig. 3. Change of serum IAP levels in PSK-treated (○) and untreated (●) Meth-A-bearing mice after an intratumoral injection of PSK.

As shown in Figs. 4 and 5, IAP in normal mouse contained no P4 (hybrid type). The Con A strongly reactive P4 appeared in PSK-injected mouse and Meth-A-bearing mouse. The proportion of P3 (high-mannose type) decreased progressively in PSK-injected mouse and tumor-bearing mouse. In PSK-injected mouse undergoing an acute inflammatory process, P2 (biantennary complex) type of IAP is predominant. On the other hand, in Meth-A bearing mouse the Con-A nonreactive P1 (tri- and tetra-antennary complex type) is predominant. These results clearly showed that sugar chains of IAP are different among normal, inflammatory and tumor-bearing mice.

DISCUSSION

IAP was first discovered in the sera of cancer patients and found to suppress both phytohemagglutinin-induced lymphocyte blast formation and mixed lymphocyte reaction *in vitro*. Purification and characterization of IAP from the ascitic fluid revealed that this acidic protein belonged to the α-1 group of glycoproteins usually found in healthy individuals, but this type differed in its gel isoelectric focusing behavior, molecular weight, and carbohydrate content.[13] *In vivo* analysis reconfirmed that IAP was increased in tumor-bearing mice and a close correlation between IAP level and the induction of suppressor macrophages was reported.[14] In humans, IAP was also purified from ascitic fluids developed from cancer of the lung, colon, and breast.[21] High serum IAP levels were observed in patients with head and neck cancer,[22] ovarian cancer,[11] and gastric cancer[12] and it is speculated that serum IAP values are closely correlated with the growth of the tumor and changes in the host immune responses. Sakamoto *et al.*[23] examined the prognostic value of IAP in a prospective randomized trial

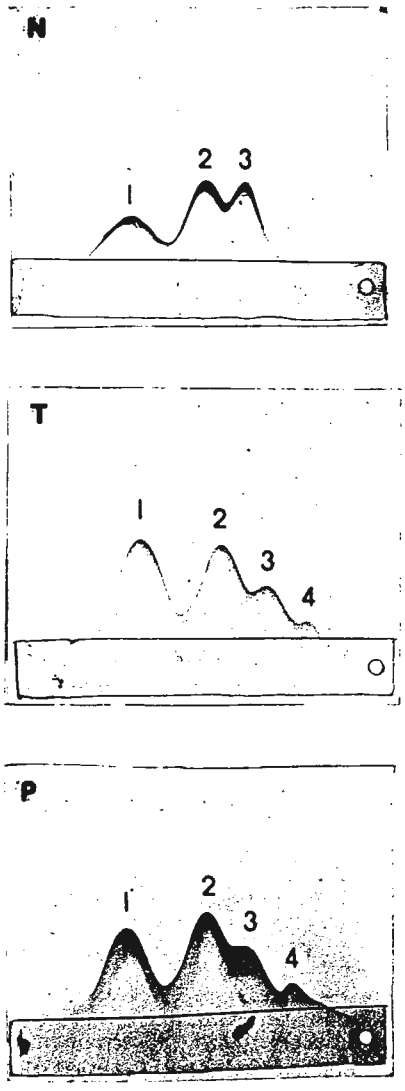


Fig. 4. Con A-CAIE patterns of murine serum IAP. (N) Normal BALB/c, 8-week male mice. (T) Meth-A tumor-bearing mice, 24 days after tumor inoculation. (P) PSK-treated mice, one day after PSK injection.

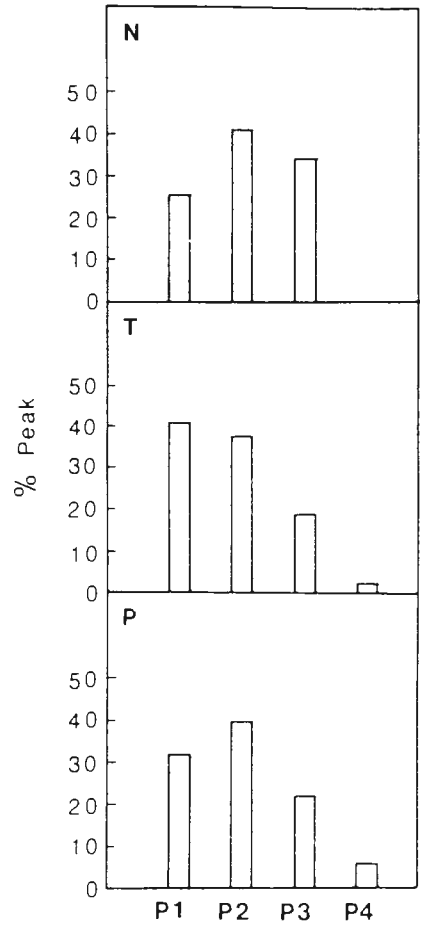


Fig. 5. Relative amount of IAP subfractions in normal (N), tumor-bearing (T) and PSK-treated (P) mice. Proportion of each peak is given as percent of total amount.

of avanced gastric cancer patients, designed to evaluate the effect of PSK. Preoperative serum IAP levels were determined in patients who received radical gastric resection. All patients were followed up for 24 months or more. There was an overall significant difference in disease-free survival time in favor of the PSK-treated group compared with the control group. Preoperative IAP values were strongly associated with disease-free survival time. The most significant difference was observed at the threshold value of 580 μg/ml. Patients in the PSK-treated group with a pre-operative IAP of lower than 580 μg/ml showed improved disease-free survival (P=0.029), whereas no significant difference was seen between the two groups when the pre-operative IAP exceeded the threshold level. From these results, 580 μg/ml is postulated to be the most appropriate threshold value for predicting the prognosis of advanced gastric cancer patients, and it is suggested that PSK would be most effective in patients whose preoperative IAP level is lower than the threshold level.

The present report clearly shows that a tumor-induced IAP differs biochemically from an inflammatory IAP in the mouse (Figs. 4 and 5). Therefore, it may be suggested that preoperative serum IAP should be different immunologically between a tumor-induced IAP and an inflammatory IAP. In the present study, the correlation between the induction of inflammatory IAP in serum of mice and the antitumor effect of BRMs in these mice was

compared. PSK (a protein-bound polysaccharide preparation) and cepharanthin (a plant alkaloids preparation, Table I) cured not only the right, but also the left, non-treated tumor in a double grafted tumor system. OK-432 (a *Streptococcus* preparation) and BCG (Table II) cured the right tumor and inhibited the growth of the left tumor. TNF cured the right tumor only. Lentinan (a polysaccharide preparation, Fig. 1b) and IL-6 (Fig. 1c) inhibited neither the right nor the left tumor. Several BRMs were injected intradermally three times and the inflammatory IAP serum level was measured. Clear IAP induction was observed in serum of PSK- (Fig. 2a), CR- (Fig. 2b), TNF- and OK-432-treated mice. However, IAP induction was not observed in serum of LNT-treated mice (Fig. 2c). These results show that the antitumor effect of BRM is correlated with the induction of an inflammatory IAP in serum and that the activation of macrophages and neutrophils in tumor tissue is an important trigger of the antitumor cascade reaction caused by intratumoral BRM treatment in the double grafted tumor system.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors wish to express their gratitude to Miss Eiko Ohkubo for editorial help. This work was supported in part by a grant from the Sendai Institute of Microbiology.

(Received August 9, 1993/Accepted October 14, 1993)

REFERENCES

1) Ebina, T., Kohya, H., Yamaguchi, T. and Ishida, N. Antimetastatic effect of biological response modifiers in the "double grafted tumor system." *Jpn. J. Cancer Res.*, 77, 1034–1042 (1986).
2) Ebina, T. and Kohya, H. Antitumor effector mechanism at a distant site in the double grafted tumor system of PSK, a protein-bound polysaccharide preparation. *Jpn. J. Cancer Res.*, **79**, 957–964 (1988).
3) Ebina, T., Kohya, H. and Ishikawa, K. Antitumor effect of PSK: role of regional lymph nodes and enhancement of concomitant and sinecomitant immunity in the mouse. *Jpn. J. Cancer Res.*, **80**, 158–166 (1989).
4) Ebina, T. and Ishikawa, K. Antitumor effect of interleukin-1β in the double grafted tumor system. *Jpn. J. Cancer Res.*, **80**, 570–576 (1989).
5) Kohya, H., Ebina, T., Yamaguchi, T. and Ishida, N. The "double grafted tumor system," proposed to find effector cells in the analyses of antitumor effect of BRMs. *Biotherapy*, **1**, 139–151 (1989).
6) Ebina, T. and Murata, K. Antitumor effect of PSK at a distant site: inductions of interleukin-8-like factor and macrophage chemotactic factor in murine tumor. *Jpn. J. Cancer Res.*, **81**, 1307–1313 (1990).
7) Ebina, T. and Murata, K. Antitumor effector mechanism of interleukin-1β at a distant site in the double grafted tumor system. *Jpn. J. Cancer Res.*, **82**, 1292–1298 (1991).
8) Ishikawa, K., Majima, T. and Ebina, T. Antitumor effect of a *Coliolus* preparation, PSK: induction of macrophage chemotactic factor (MCF) in spleens of tumor bearing mice. *Biotherapy*, **5**, 251–258 (1992).
9) Bacchus, H. Serum glycoproteins in cancer. *Prog. Clin. Pathol.*, **6**, 111–135 (1975).
10) Matsuno, S., Kobari, M., Matsuda, Y. and Saito, T. Diagnosis of carcinoma of the pancreas by assay of immunosuppressive acidic protein. *Tohoku J. Exp. Med.*, **136**, 1–10 (1982).
11) Sawada, M., Okudaira, Y., Matsui, Y. and Shimizu, Y. Immunosuppressive acidic protein in patients with ovarian cancer. *Cancer*, **52**, 2081–2085 (1983).
12) Sakita, M., Torii, T., Imaki, S., Kasuga, M., Tamai, M., Suzuki, G., Kano, M., Fujita, Y. and Majima, S. Immunosuppressive activity of sera from gastric cancer patients. *Jpn. J. Surg.*, **14**, 127–134 (1984).
13) Tamura, K., Shibata, Y., Matsuda, Y. and Ishida, N. Isolation and characterization of an immunosuppressive acidic protein from ascitic fluids of cancer patients. *Cancer Res.*, **41**, 3244–3252 (1981).
14) Shibata, Y., Tamura, K. and Ishida, N. *In vivo* analysis of the suppressive effects of immunosuppressive acidic protein, a type of alfa-1 acid glycoprotein, in connection with its high level in tumor-bearing mice. *Cancer Res.*, **43**, 2889–2896 (1983).
15) Ishida, N., Shibata, Y. and Tamura, K. Serum protein factors against self-defense which are activated in cancer patients. *In* "Self-Defense Mechanisms, Role of Macrophages," ed. D. Mizuno, Z. A. Cohn, K. Takeya and N. Ishida, pp. 239–250 (1982). University of Tokyo Press, Tokyo.
16) Matsuno, S., Ejiri, T., Kobari, M., Yamauchi, H. and Sato, T. Effect of immunosuppressive acidic protein on DMBA-induced pancreatic cancer in rats. *Tohoku J. Exp. Med.*, **144**, 189–202 (1984).
17) Fujimura, H., Nanjo, M., Tamura, K., Saito, M., Ebina, T. and Ishida, N. Effect of OK-432, a Streptococcal preparation, on serum immunosuppressive acidic protein in tumor-bearing mice. *J. Clin. Exp. Med.*, **152**, 675–676 (1990).
18) Hansen, J-E. S., Iversen, J., Lihme, A. and Bog-Hanse, T. C. Acute phase reaction, heterogeneity, and micro-heterogeneity of serum proteins as nonspecific tumor markers in lung cancer. *Cancer*, **60**, 1630–1635 (1987).
19) Osawa, T. and Tsuji, T. Fractionation and structural assessment of oilgosaccharides and glycopeptides by use of immobilized lectins. *Ann. Rev. Biochem.*, **56**, 21–42 (1987).
20) Agneray, J. "Alpha 1-Acid Glycoprotein: Genetics, Bio-

chemistry, Physiological Functions, and Pharmacology," pp. 47–64 (1989). Alan R. Liss, Inc., New York.
21) Chandrasekaran, E. V., Davila, M., Nixon, D. and Mendicino, J. Structures of the oligosaccharide chains of two forms of alpha-1 acid glycoprotein purified from liver metastasis of lung, colon and breast tumors. *Cancer Res.*, **44**, 1557–1567 (1984).
22) Yamanaka, N., Harabuchi, Y., Himi, T. and Kataura, A. Immunosuppressive substance in the sera of head and neck cancer patients. *Cancer*, **62**, 1293–1298 (1988).
23) Sakamoto, J., Koike, A., Saji, S., Teramukai, S. and Ohashi, Y. Preoperative serum immunosuppressive acidic protein (IAP) test for the prognosis of gastric cancer: a statistical study of the threshold level and evaluation of the effect of the biological response modifier PSK. *Surg. Today*, **22**, 530–536 (1992).

Biosci. Biotech. Biochem., 57 (7), 1077–1081, 1993

Oral Passive Immunization Effect of Anti-Human Rotavirus IgY and Its Behavior against Proteolytic Enzymes

Hajime HATTA, Ken TSUDA, Shigemitsu AKACHI, Mujo KIM, Takehiko YAMAMOTO,* and Takusaburo EBINA**

Central Research Laboratories, Taiyo Kagaku Co., Ltd., Yokkaichi-shi, Mie 510, Japan
** Department of Biotechnology, Fukuyama University, Fukuyama-shi, Hiroshima 729–02, Japan*
*** Division of Immunology, Research Institute Miyagi Cancer Center, Natori-shi, Miyagi 980–12, Japan*
Received October 29, 1992

The neutralization titer of anti-human rotavirus (HRV) IgY was completely inactivated by pepsin at pH 2.0. However, it was not significantly affected by trypsin or chymotrypsin under certain conditions. The immunological activity of the IgY was observed in the intestine of suckling mice for 2 h after oral administration and the activity rapidly decreased thereafter. The effects of oral supply of IgY were thus estimated for HRV-induced diarrhea in suckling mice and it was found that a previous supply of the IgY (1 h before HRV infection) completely prevented the HRV-induced diarrhea. The preventive effect was decreased as the time gap between IgY administration and HRV infection was longer. However, the oral supply of the IgY within 24 h after HRV infection was still effective and decreased the incidence of HRV diarrhea in suckling mice.

Human rotavirus (HRV) was found in 1973 by Bishop *et al.*[1] and is a major pathogen of infectious gastroenteritis in infants and young children. HRV infection is characteristically localized to epithelial cells of the intestinal tract, and causes severe diarrhea with vomiting. It has been presumed that more than 2 million infant deaths annually are due to HRV diarrhea disease, mainly in developing countries.[2]

Vaccination trial for HRV infection has remained unsuccessful because it is difficult to introduce the active antibody into the intestinal tract of the infants whose immunity generally has not developed yet.[3] As an alternative to vaccination, oral passive immunization has been investigated for prevention of HRV infectious disease. Several researchers demonstrated that oral administration of anti-rotavirus IgG or egg yolk IgG (called IgY[4]) was effective in controlling rotaviral diarrhea using several animal models.[5–10] However, for the practical application by oral administration a relatively large amount of active antibody will be necessary. In addition, information about stability of the antibody against heat, pH, digestive enzymes, etc. are also necessary for practical applications of this strategy.

We have previously reported a large-scale purification method of IgY from egg yolk by using λ-carraggenan, as a lipoprotein precipitant.[11] We have found that the productivity of anti-HRV IgY by a hen immunized with HRV Mo strain (one year) was 120 times as more as that of an immunized rabbit with regard to the neutralization titer of the antibodies.[12] This potential productivity of antibody of hen egg suggests that the anti-HRV IgY might be practical for prevention of HRV infection by its oral administration.

This paper deals with the behavior of anti-HRV IgY against several digestive enzymes. Also, the study of the effects of oral passive immunization of the IgY on suckling mice infected with HRV is described in relation to the anti-HRV IgY activity in the digestive tract.

Materials and Methods

Materials. Human rotavirus Mo strain (serotype 3) and MA104 cell (an established cell line derived from rhesus monkey kidney) were of those preserved at the Department of Bacteriology, Tohoku University School of Medicine. Anti-HRV(Mo) IgY was purified from yolk of eggs laid by hens immunized with HRV (Mo strain) as described in a previous paper.[12] Pregnant BALB/c mice were purchased from the Shizuoka Breeding Farm for Laboratory Animals, Hamamatsu, Japan. Pepsin (from porcine stomach mucosa, 2× crystallized, 3,700 units/mg protein), trypsin (from bovine pancreas, 2× crystallized, 7,710 BAEE units/mg protein), and α-chymotrypsin (from bovine pancreas, 3× crystallized, 54 units/mg protein) were obtained through Sigma Chemical (U.S.A.). All the reagents used were of chemical grade.

ELISA and neutralization titer measurement. The methods of ELISA and neutralization titer measurement were described previously.[12]

Protein measurement and SDS-PAGE. The protein content of IgY solution was determined by measuring the absorbance at 280 nm, assuming its absorption constant to be 13.5 for 1% protein at 280 nm.[13] The IgY incubated with proteolytic enzymes was electrophoresed on a linear-gradient (4–20%) polyacrylamide gel plate (Daiichi pure chemicals) by the method of Laemmli.[14]

Examination of the effects of proteolytic enzymes. Pepsin was dissolved in 0.07 M sodium acetate buffer (pH 2.0 or 4.0, pH was adjusted by 1 N HCl) at a concentration of 5 μg/ml. Immediately after dissolving the enzyme, the solution was mixed with anti-HRV(Mo) IgY solution (10 mg/ml distilled water). The mixture (weight ratio of pepsin to IgY, 1/200) was incubated at 37°C at pH 2.0 or 4.0. After appropriate incubation periods for 0–4 h, a 0.45-ml sample of the mixture was mixed with 0.05 ml of 5.0% sodium carbonate (incubated mixture at pH 2.0) or with that of 1.0% solution (incubated mixture at pH 4.0) for inactivation of the enzyme. The remaining anti-HRV IgY activity was measured by the neutralization titer method.

For the examination of the effects of trypsin and chymotrypsin, the anti-HRV(Mo) IgY was dissolved in 50 mM Tris buffer containing 10 mM $CaCl_2$, pH 8.0, at a concentration of 2 mg/ml. Trypsin or chymotrypsin was dissolved at a concentration of 2 mg/ml of the Tris buffer, and immediately mixed with the IgY solution in the ratio of one enzyme to 20 of IgY by weight. After the mixtures were incubated at 37°C for appropriate periods between 0–8 h, a 0.45-ml sample of the incubation

mixture was mixed with 0.05 ml of phenylmethyl sulfonyl fluoride solution (40 mM in isopropanol) to inactivate the enzyme. The remaining anti-HRV IgY activity of the mixture was measured by the neutralization titer method.

Measurement of anti-HRV IgY activity in intestinal tract. Four suckling mice (6 days old) of each group, which were orally administered with 50 μl of anti-HRV(Mo) IgY solution (225 μg IgY/mouse), were dissected at the desired time, and the whole intestinal tract of each mouse was removed. Two ml of cold phosphate buffered saline (PBS: 10 mM phosphate, 0.15 mM NaCl, pH 7.2) and 2 ml of 1,1,2-trichloro-1,2,2-trifluoroethane were added to each intestinal tract. The mixture was homogenized and centrifuged at 10,000 $\times g$ for 10 min. The resulting supernatant was filtered through a membrane filter of 0.45 μm pore size and the filtrate was serially diluted ($\times$ 10) with the PBS. Anti-HRV IgY activities of the diluted samples were measured by the ELISA end point test. The anti-HRV IgY activity was expressed as the value of the highest dilution rate that was measured by the intensity of the color developed at 405 nm (values > 0.2) by the ELISA end point test.

Observation of dye transit in digestive tract. Two suckling mice (6 days old) of each group were orally administered with 100 μl of 0.1% trypan blue in PBS. Mice were dissected at the desired time after administration of the dye. Stomach and intestinal tract of each mouse were removed to inspect the portions colored in the digestive tract.

HRV infection procedure and anti-HRV IgY treatment. The HRV challenge test developed by Ebina *et al.*[10] was used with a slight modification using suckling mice. Six-day-old mice (8–16 mice/group) were inoculated orally with 50 μl of 1.8–3.5 $\times 10^7$ fluorescent cell focus forming units (FCFU) of HRV Mo strain. Anti-HRV(Mo) IgY solution (50 μl) was also orally administered to the mice at the desired time before or after HRV inoculation. The mice were inspected daily for diarrhea by gentle palpation of the abdomen, and the incidence of diarrhea was analyzed using the results 48 h after HRV inoculation.

Histopathological experiment. Fresh specimens of small intestine of suckling mice were fixed in 10% formalin, and embedded in paraffin wax. Sections (3 μm) were cut with a microtome and stained with hematoxylin and eosin. The small intestinal sections thus stained were inspected under a microscope (50 $\times$).

Results

Behavior of IgY against pepsin

The value of neutralization titer of IgY was almost lost on incubation with pepsin at pH 2.0, while 91% of the activity remained after 1 h of incubation with the enzyme at pH 4.0. Even after 4 h of incubation under these conditions, 63% remaining activity was found by neutralization titer (Table I). SDS-PAGE profiles of IgY after incubation with pepsin showed that IgY at pH 2.0 was digested to small peptides and no bands corresponding to IgY were detected after 1 h of incubation in the test by 4–20% linear-gradient polyacrylamide gel electrophoresis (Fig. 1). On the contrary, the incubation with pepsin at pH 4.0, heavy(H)- and light(L)-chain of IgY were clearly observed after 4 h of incubation, although some new bands appeared between H- and L-chains.

Behavior of IgY against trypsin and chymotrypsin

The changing patterns of neutralization titer of the IgY were almost the same when incubated with trypsin and chymotrypsin. After 8 h of incubation, 39% and 41% of the activity of IgY by neutralization titer remained for the mixture with trypsin and chymotrypsin, respectively (Table II). SDS–PAGE profiles of IgY incubated with trypsin or chymotrypsin are shown in Fig. 2. On incubation with trypsin, the IgY H-chain disappeared, and several bands between the H- and L-chains on SDS-PAGE appeared. In the case with chymotrypsin, both H- and L-chains of IgY remained unchanged, although a small band below the H-chain was observed.

IgY activity in intestinal tract

The anti-HRV(Mo) IgY activity in the intestinal tract of

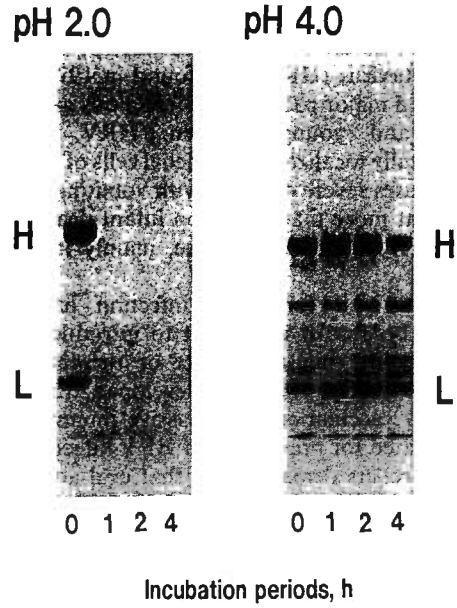


Fig. 1. SDS–PAGE Profiles of Anti-HRV(Mo) IgY Incubated with Pepsin at pH 2.0 and 4.0.
H and L show heavy and light chains of IgY, respectively. See Table I.

Table I. Changes in Neutralization Titer of Anti-HRV(Mo) IgY during Incubation (37°C) with Pepsin[a]

Incubation period (h)	pH 2.0		pH 4.0	
	Titer	Recovery (%)	Titer	Recovery (%)
0	3200	100	3200	100
1	< 10	0	2900	91
2	< 10	0	2300	72
4	< 10	0	2000	63

[a] Enzyme: anti-HRV(Mo) IgY by weight = 1 : 200, see the text.

Table II. Changes in Neutralization Titer of Anti-HRV(Mo) IgY during Incubation (37°C) with Trypsin or Chymotrypsin[a]

Incubation period (h)	Trypsin		Chymotrypsin	
	Titer	Recovery (%)	Titer	Recovery (%)
0	5600	100	5600	100
1	4500	80	4000	71
4	3700	66	3000	54
8	2200	39	2300	41

[a] Enzyme: anti-HRV(Mo) IgY by weight = 1 : 20, see the text.

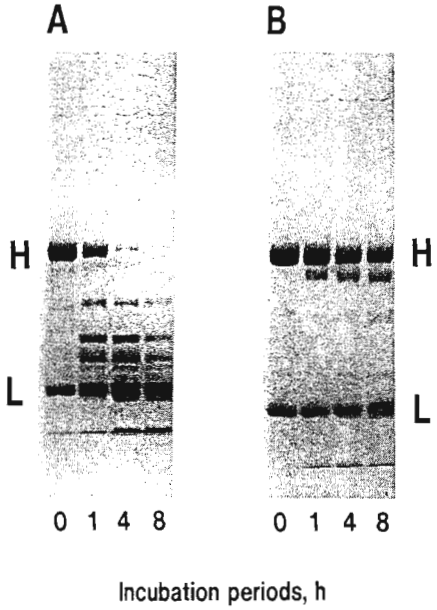


Fig. 2. SDS–PAGE Profiles of Anti-HRV(Mo) IgY incubated with Trypsin (A) and Chymotrypsin (B).
H and L show heavy and light chains of IgY, respectively. See Table II.

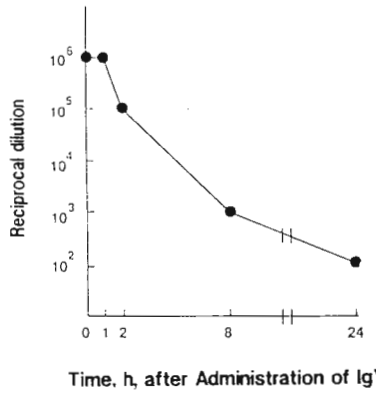


Fig. 3. Anti-HRV(Mo) IgY Activity in Intestinal Tract of Suckling Mice Administered Orally with the IgY.

suckling mice after oral administration of the IgY was measured by the ELISA end point method (positive reaction, absorbance at 405 nm > 0.2, Fig. 3). The reciprocal value of the maximum dilution for the test with the homogenate of intestinal tract was 10^6 either immediately after (indicated as 0 h in Fig. 3) or 1 h after administration of IgY. The value at 2 h after the administration, however, decreased significantly, and it was 10^2 after 24 h.

Transit of dye to intestinal tract

The color intensity by staining of the digestive tract after administration of dye to suckling mice is shown in Table III. A strong color was observed in both stomach and upper intestinal tract portions immediately after the dye administration (indicated as 0 h in Table III). The zones stained were found to be in the upper intestinal tract at 1 and 2 h, and in the lower intestinal tract at 4 and 8 h after the dye administration, respectively.

Table III. Intensity[a] of Orally Administered Dye in Digestive Tract of Suckling Mice

Post administration, h	Stomach	Intestinal tract[b]	
		Upper	Lower
0	++	++	−
1	++	++	+
2	+	++	+
5	−	+	++
8	−	+	++
24	−	+	+

[a] Color intensity estimated was expressed as follows: ++, strong; +, moderate; −, weak.
[b] Intestinal tract was divided into upper and lower parts.

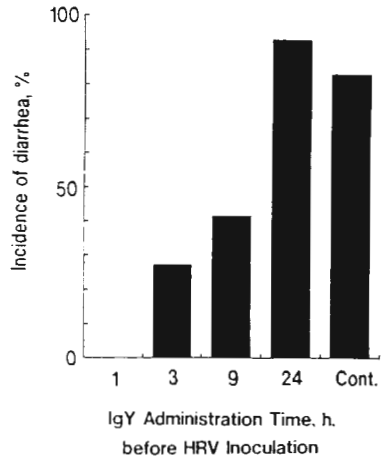


Fig. 4. Passive Immunization Effect of Anti-HRV IgY Administered to Suckling Mice Previous to Inoculation of HRV.

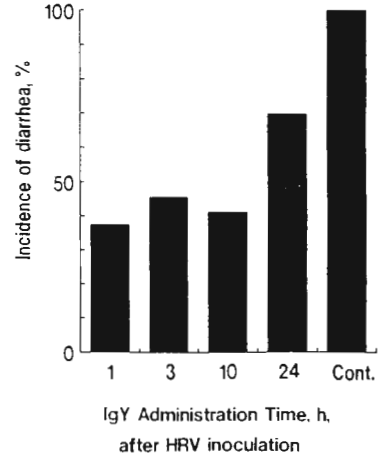


Fig. 5. Passive Immunization Effect of Anti-HRV IgY Administered to Suckling Mice after Inoculation of HRV.

Passive immunization with IgY against HRV infection

Suckling mice (11–16 mice/group) were inoculated with HRV Mo strain (3.5×10^7 FCFU/mouse) at 1, 3, 9, and 24 h after oral administration of anti-HRV(Mo) IgY (225 μg IgY/mouse). No incidence of diarrhea were observed in all the mice that were administered with IgY at 1 h before HRV inoculation (Fig. 4). However, the mice administered with

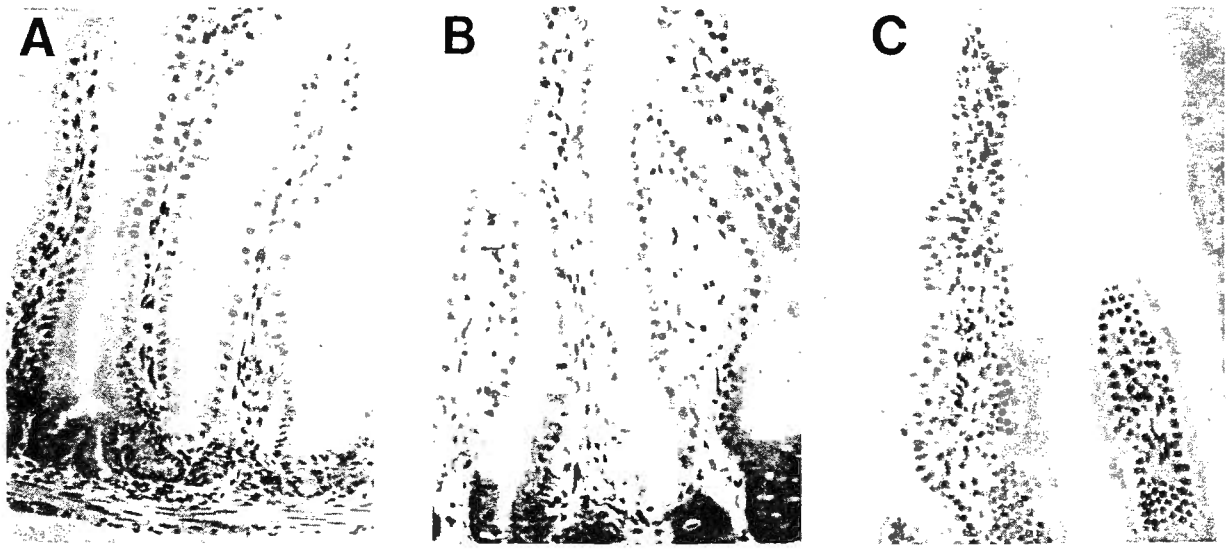


Fig. 6. Histological Observation of Epithelial Tissue Cells of Small Intestine of Suckling Mice with or without Infection with HRV.
A, normal tissue; B, tissue infected with HRV; C, tissue of the mouse administered orally with anti-HRV IgY.*
*See the text.

IgY at 3, 9, and 24 h before HRV inoculation suffered from diarrhea with incidence of 27.3, 41.7, and 93.3%, respectively. In the positive control group, the incidence of diarrhea was 83.3%.

Anti-HRV(Mo) IgY (225 μg/mouse) was orally administered to suckling mice (8–12 mice/group) at 1, 3, 10, and 24 h after inoculation of HRV Mo strain (3.0×10^7 FCFU/mouse). All the mice of the positive control group suffered from diarrhea. On the other hand, the incidence of diarrhea of the mice which were given the IgY at 1, 3, 10, and 24 h after HRV inoculation, were 37.5, 45.5, 41.2, and 70.0%, respectively (Fig. 5).

Histopathological view of intestinal section

Photographs of sectioned small intestine of suckling mice are shown in Fig. 6. Morphologically, expansion and vacuolation of cells and destruction of villus tips were observed in the sectioned small intestine of the suckling mice that severely suffered from diarrhea caused by HRV infection (1.8×10^7 FCFU/mouse). However, the sections of those of mice which were prevented from HRV diarrhea by oral administration of anti-HRV IgY (225 μg IgY/mouse) 1 h before HRV inoculation (1.8×10^7 FCFU/mouse), were morphologically the same as those of non-inoculated control mice.

Discussion

Several researchers demonstrated that rotaviral diarrhea was prevented by administration of IgY specific to rotavirus using the HRV infection model in suckling mice.[7–10] However, to our knowledge, no information is available about the stability of IgY, especially of that in digestive tract in regard to the activity of antibody.

Shimizu *et al.*[15] reported that the activity of IgY specific to *E. coli* examined by competitive ELISA was quite stable on incubation with trypsin or chymotrypsin but it was sensitive to pepsin especially at pHs lower than 4.5. Ohtani *et al.*[16] also reported that IgY specific to α_{s1}-casein was relatively resistant to trypsin and chymotrypsin while it was quite sensitive to pepsin. We previously reported the pH stability of an anti-HRV IgY. About 85% of the initial neutralization titer remained at pHs between 4.0 to 9.0, but about 10% of the titer remained at pH 2.0 after 8 h of incubation.[12] In this investigation, stability of the anti-HRV IgY against digestive enzymes were estimated by neutralization titer.

The activity measured by neutralization titer of anti-HRV IgY was completely lost by peptic digestion at pH 4.0 in the same digestive conditions (enzyme/substrate = 1/20, 37°C, 4 h) as those of Shimizu *et al.*[15] (data not shown). However, a considerable extent of neutralization titer of anti-HRV IgY (63% of the initial value) remained on incubation with pepsin (E/S = 1/200, 37°C, 4 h) at pH 4.0, although the titer decreased to almost zero at pH 2.0 (Table I). Therefore, the stability of IgY against pepsin seems to be highly dependent on pH and the enzyme/substrate ratio. Nakai[16] reported that the pH values of gastric juice of infants of less than 5 months old generally are between 4–5 during 2–3 h after intake of milk. Therefore, it is likely that anti-HRV IgY administered orally to infants reaches the small intestine without severe damage by gastric enzymes, if the pepsin concentration against the IgY (E/S ratio) in the stomach is lower enough not to severely digest the IgY.

The neutralization titer of the IgY on incubation with trypsin or chymotrypsin was found to gradually decrease with both the enzymes, though SDS–PAGE profiles of the IgY incubated with trypsin or chymotrypsin were significantly different. H-chain of IgY was degraded to peptides when incubated with trypsin, while there was not a similar type of digestion with chymotrypsin (Fig. 2). These results are coincident with those reported by Shimizu *et al.*[15] Therefore, it is noted that trypsin and chymotrypsin do not completely degrade the active site of the IgY. The difference in the digestion pattern of IgY found between the two enzymes could be due to the difference in their specificities on the IgY H-chain, although more evidence

and clarification are necessary.

The neutralization titer of anti-HRV IgY in the intestinal tract of suckling mice could not be measured in this report because of the extract of the intestinal tract had cytotoxicity to MA 104 cells. We have previously reported that the stability of anti-HRV IgY under various pH values measured by ELISA is slightly more sensitive than that measured by neutralization titer.[12] Therefore, in this report, the ELISA activity of anti-HRV IgY in the intestinal tract of suckling mice was measured. It was found that the ELISA activity of IgY was retained for 1 h after the IgY administration (Fig. 3). This together with the result of the transit of dye through the intestinal tract (Table III) indicate that the IgY administered orally swiftly reaches the intestine of suckling mice, retaining the anti-HRV activity. It is likely that rotaviral diarrhea induced by HRV in suckling mice is almost completely prevented by the oral supply of IgY 1 h before the infection by the virus (Figs. 4, 6).

The neutralization titer of anti-HRV IgY incubated with intestinal enzymes was retained at nearly a half of the initial at even 8 h later (Table II). However, the anti-HRV activity by ELISA found in the intestinal tract of suckling mice was only 10^{-1}, 10^{-3}, and 10^{-4} of the initial activity at 2, 8, and 24 h after the IgY administration, respectively (Fig. 3). This decrease of the activity seems to correlate with observation of dye transit (Table III) in which the color intensity of dye swiftly moved toward the lower part of the intestine. There may be a possibility that a substantial portion of IgY administrated orally had been excreted out of the intestinal tract of suckling mice, retaining its activity.

Formerly, we reported that oral administration of IgY (225 μg/mouse) 1 h before viral inoculation completely prevented HRV diarrhea. However, a dose having the concentration of 10^{-2} and 10^{-3} of that of IgY resulted in incidence of diarrhea of 25.0 and 42.9%, respectively.[10] In this investigation, the preventive effect from HRV diarrhea of suckling mice was found to decrease as the time gap between IgY administration and HRV inoculation was prolonged (Fig. 4). This result together with that of decrease of IgY activity in intestinal tract (Fig. 3) seems to be in accordance with our former result[10] in which the effect of dose-response of anti-HRV(Mo) IgY on infection by HRV was examined. Both the results indicate that the effectiveness of IgY for prevention from HRV diarrhea depends very much on the time that IgY is administered before infection by HRV.

There seem to be no reports published on the therapeutic effects of IgY on HRV diarrhea induced in suckling mice. This paper demonstrated that oral administration of anti-HRV(Mo) IgY within 24 h after HRV infection was very effective to decrease the number of animals suffering from HRV-induced diarrhea in suckling mice (Fig. 5).

Ebina *et al.*[18] have reported that oral administration of anti-HRV antibodies (skimmed colostrum) protected several infants from rotavirus-induced gastroenteritis. This strongly suggests that HRV infection of infants can be prevented by oral administration of anti-HRV IgY, if the IgY is introduced into the small intestine without a significant loss of activity caused by gastric enzymes. This investigation showed that anti-HRV IgY reached the small intestine of suckling mice a short time after oral administration. Therefore, oral administration of anti-HRV IgY at certain times may lead to the practical application for prevention from HRV-induced diarrhea in human infants.

References

1) R. F. Bishop, G. P. Davidson, I. H. Holmes, and B. J. Ruck, *Lancet*, **2**, 1281–1283 (1973).
2) G. Zoppi, G. Ferrarini, F. Rigolin, H. Bogaerts, and F. E. Andre, *Heiv. Peadiat. Acta*, **41**, 203–208 (1986).
3) P. DeMol, G. Zissis, J. P. Butzler, A. Mutwewingabo, and F. E. Andre, *Lancet*, **2**, 108 (1986).
4) G. A. Leslie and L. W. Clem, *J. Exp. Med.*, **130**, 1337–1352 (1969).
5) D. R. Snodgrass and P. W. Wells, *Arch. Viol.*, **52**, 201–205 (1976).
6) D. R. Snodgrass and P. W. Wells, *Ann. Rech. Vet.*, **9**, 335–336 (1978).
7) P. A. Offit, R. D. Shaw, and H. B. Greenberg, *J. Virol.*, **58**, 700–703 (1986).
8) C. R. Bartz, R. H. Conklin, C. B. Tunstall, and J. H. Steele, *J. Infect. Dis.*, **142**, 439–441 (1980).
9) R. H. Yolken, F. Leister, S. Wee, R. Miskuff, and S. Vonderfecht, *Pediatrics*, **81**, 291–295 (1988).
10) T. Ebina, K. Tsukada, K. Umezu, M. Nose, K. Tuda, H. Hatta, M. Kim, and T. Yamamoto, *Microbiol. Immunol.*, **34**, 617–629 (1990).
11) H. Hatta, M. Kim, and T. Yamamoto, *Agric. Biol. Chem.*, **54**, 2531–2535 (1990).
12) H. Hatta, K. Tsuda, S. Akachi, M. Kim, and T. Yamamoto, *Biosci. Biotech. Biochem.*, **57**, 450–454 (1993).
13) H. S. Tenenhouse and H. F. Deutsch, *Immunochemistry*, **3**, 11–20 (1966).
14) U. K. Laemmli, *Nature* (London), **227**, 680–685 (1970).
15) M. Shimizu, R. C. Fitzsimmons, and S. Nakai, *J. Food Sci.*, **53**, 1360–1366 (1988).
16) H. Ohtani, K. Matsumoto, A. Saeki, and A. Hosono, *Lebensm. Wiss. Technol.*, **24**, 152–158 (1991).
17) S. Nakai, Ph. D. thesis, The Uni. of Tokyo, Tokyo (1962).
18) T. Ebina, A. Sato, K. Umezu, N. Ishida, S. Ohyama, A. Oizumi, K. Aikawa, S. Katagiri, N. Katsushima, A. Imai, S. Kitaoka, H. Suzuki, and T. Konno, *Med. Microbiol. Immunol.*, **174**, 177–185 (1985).

Vol. 193, No. 1, 1993
May 28, 1993

BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS
Pages 337-347

SPECIFIC EXPRESSION OF A COMPLEX SIALYL LEWIS X ANTIGEN ON HIGH ENDOTHELIAL VENULES OF HUMAN LYMPH NODES: Possible Candidate for L-Selectin Ligand

Mikiko Sawada[1], Akiko Takada[1], Ichiroh Ohwaki[1], Naofumi Takahashi[1], Hiroo Tateno[2], Junichi Sakamoto[3], and Reiji Kannagi[1,*]

Departments of [1]Experimental Pathology, [2]Pathology, and [3]Gastroenterological Surgery, Aichi Cancer Center, Nagoya, 464, Japan

Received April 15, 1993

SUMMARY: L-selectin is a cell adhesion molecule that mediates homing of lymphocytes to the peripheral lymph nodes and is speculated to bind to the carbohydrate determinant which is specifically expressed by the endothelial cells of high endothelial venules (HEVs) in the peripheral lymph nodes. One of the murine monoclonal antibodies (2H5, IgM, κ), which was raised against sialyl Le^x-active glycolipids which have long and complicated carbohydrate structures, was found to react strongly to the HEV endothelial cells of the human peripheral lymph nodes, while the typical anti-sialyl Le^x antibodies SNH-3, FH-6 and CSLEX-1 failed to detect the antigen on HEV under the same condition. This new antibody was reactive to essentially all endothelial cells of HEV in the peripheral lymph nodes, and moderately to some endothelial cells in Payer's patches and appendices, but never reacted with the endothelial cells of post capillary venules in the spleen, thymus, or other organs. The 2H5 antibody detected three major glycoproteins of 90, 110 and 250 kDa, the most abundant molecular species being 110 kDa, in the stroma of human lymph nodes. In Stamper-Woodruff assays employing cryostat sections of human lymph nodes, the 2H5 antibody significantly inhibited the adhesion of peripheral lymphocytes to the endothelial cells of HEV. These results indicate that the carbohydrate antigens defined by the 2H5 antibody, most probably sialyl Le^x determinants having complex carbohydrate structures, serve as the ligand for L-selectin on HEV endothelial cells. © 1993 Academic Press, Inc.

L-selectin (LECAM-1, LAM-1, Mel-14), a member of the selectin family, is thought to mediate homing of lymphocytes to the peripheral lymph nodes in both human and murine systems (1-3). The endothelial cells of high endothelial venules (HEVs) in lymph nodes are thought to express a carbohydrate ligand which binds to the L-selectin.

* Correspondence: Reiji Kannagi, M.D., Ph.D. Department of Experimental Pathology, Research Institute, Aichi Cancer Center, 1-1 Kanokoden, Chikusaku, Nagoya, 464, JAPAN.

Abbreviations used: HEV, high endothelial venule; Le^x, Lewis X; Le^a, Lewis A.

0006-291X/93 $4.00
Copyright © 1993 by Academic Press, Inc.
All rights of reproduction in any form reserved.

The ligand carbohydrates for members of the selectin family are considered to be very similar, if not the same, because of high homology in their carbohydrate recognition domains. Ever since the ligands for E-selectin were first shown to be sialyl Le^x and sialyl Le^a (4-8), these carbohydrate ligands have been tested for the possibility of serving also as ligands for P- and L-selectins, mainly by *in vitro* experiments employing the pure carbohydrate ligand and the recombinant selectin molecules or cells transfected with selectin cDNAs (9-11). It was clearly shown from these experiments that P- and L-selectins are also capable of binding to the sialyl Le^x and sialyl Le^a determinants.

However, a problem concerning L-selectin ligands has been that the human HEV endothelial cells do not appear to appreciably express the sialyl Le^x antigen, if typical anti-sialyl Le^x antibodies, such as SNH-3, FH-6 and CSLEX-1, are used for detection. Both SNH-3 and FH-6 failed to stain the endothelial cells of HEV in human lymph nodes in our preliminary experiments. Some investigators reported that CSLEX-1 also failed to detect reactive antigens in human HEV (11,12), while others could detect the antigen using a higher concentration of the antibody (13). With regard to the other ligand candidate, sialyl Le^a, some investigators reported its presence on HEV (13), while others could not (10). These findings led some invetigators to propose other ligand candidates, like sulfated Le^x and other sulfated carbohydrate determinants, as specific ligands for L-selectin (13,14).

All these preceding observations, which partly conflict, imply that the situation is rather complicated in the case of the L-selectin ligand expressed on HEV, when compared to the E-selectin ligand carried by granulocytes and monocytes which is readily detectable with typical anti-sialyl Le^x antibodies. It is well known that the Le^x or sialyl Le^x determinant is carried by multiple molecular species of glycolipids and glycoproteins, and that their antigenicity is considerably affected by the linkage, length, branching or other modification in the core carbohydrate structure which carries the antigenic determinant (15-17). Kojima et al. more recently proposed that these factors may also affect binding specificities of the carbohydrate determinants towards selectins (18). In this study, we generated a series of monoclonal antibodies against long-chain sialyl Le^x glycolipids having complicated carbohydrate structures, and tested the reactivity of these antibodies against the HEV endothelial cells of human peripheral lymph nodes.

Materials and Methods

Preparation of sialyl Le^x-active complex glycolipids: Human colon carcinoma cells LS174T were cultured in Dulbecco's modified MEM supplemented with 10% fetal calf serum. The tumors xenografted to nude mice served as starting

materials for the preparation of glycolipids from these cells (19). Briefly, total lipids were extracted from these tissues with isopropanol/ hexane/ water (55:20:25, v/v/v). The glycolipids in the upper layer fraction of the Folch's partition were subjected to DEAE-Sephadex A-25 (Pharmacia, Uppsala, Sweden) column chromatography. The neutral glycolipids were eluted with chloroform/ methanol/ water (30:60:8, v/v/v, fraction A), and gangliosides were then eluted with chloroform/ methanol/ 0.8N sodium acetate (30:60:8, v/v/v, fraction B). The gangliosides in the fraction B were further separated by TLC using the solvent system; chloroform/ methanol/ 2% $CaCl_2$ (60:35:8, v/v/v), and immunostained with the antibody FH6. TLC-immunostaining was performed using an HPTLC plate (Si-HPF plate 7011-3, J. I. Baker Chemical Co., Phillipsburg, NJ) and ^{125}I-protein A (Dupont, Boston, MA) as described (20). The several glycolipids having more than 10 sugar residues that were cross-reactive to the FH-6 antibody were pooled and used for the immunization of BALB/c mice for the generation of monoclonal antibodies. These glycolipids are the sialyl Le^x-active glycolipids which contain branched core structures as ascertained by the reactivity with an anti-I antibody (IgM-Ma), and their carbohydrate structures are much longer and more complicated than the well-known short-chain sialyl Le^x active glycolipid, which has only 6 sugar residues and has been widely used for *in vitro* experiments involving selectins in preceding papers.

Generation of the 2H5 monoclonal antibody: Hybridoma cells which secrete monoclonal antibodies directed to these sialyl Le^x-active complex glycolipids were generated according to the method described by Köhler and Milstein (21), and subsequently modified for anti-carbohydrate antibodies (20). Briefly, the sialyl Le^x-active glycolipids prepared as described above were absorbed to *Salmonella minnesota R595 strain* and used for repeated intraperitoneal immunizations of BALB/c mice on day 0 (7μg glycolipid), day 7 (15μg), day 14 (23μg) and day 28 (23 μg). Three days after the final immunization, the spleen cells were harvested and fused with mouse myeloma P3/X63-Ag8U1 (P3U1). The sialyl Le^x-active complex glycolipids were used as the antigen in solid phase enzymo-immunoassays of hybridoma culture supernatants for the cloning procedures. Six positive hybridoma clones, 2H5, 4F9, 5A12, 9B1 and 10A4 (all IgM) were obtained, with only the 2H5 antibody showing a strong reactivity to HEV.

Immunohistochemical methods: Monoclonal antibodies SNH-3 (IgM) and FH-6 (IgM) were supplied by Dr. Sen-itiroh Hakomori, Biomembrane Institute, Seattle, WA) and were purified from ascitic fluids as described previously (2,21). The 2D3 antibody (IgM) specific to the sialyl Le^a antigen was prepared in our laboratory as described previously (7,22). Human peripheral lymph nodes and other tissue samples were obtained at therapeutic operation or autopsy at Aichi Cancer Center Hospital. Consecutive sections of 4 μm thickness were prepared from formalin-fixed and paraffin-embedded tissue samples. The avidin-biotin complex technique for the immunohistochemical study was performed as described in the instructions for the kits (Vectastain) provided by Vector Inc. (Burlingame, CA)(23).

Assessment of specificity of monoclonal antibodies against various glycolipids: ELISA was performed using glycolipid antigens which were immobilized at the bottom of 96-well culture plates, by a standard method described previously (19). Peroxidase-conjugated goat anti-mouse IgM (μ-chain specific) was obtained from Cappel Inc., (Malvern, PA). The pure synthetic sialyl Le^x glycolipid used as the antigen in ELISA had the structure, NeuAcα2→3Galβ1→4(Fucα1→3)GlcNAcβ1→3Galβ1→4Glcβ1→1Cer (16). The pure sialyl Le^a glycolipid having the structure, NeuAcα2→3Galβ1→3(Fucα1→4)GlcNAcβ1→3Galβ1→4Glcβ1→1Cer was prepared from human cultured colon cancer cells Colo201 as described previously (24).

Western blotting analysis of lymph node stromal glycoproteins: SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of stromal proteins of human peripheral lymphocytes was performed using 10% resolving gels and 3% stacking gels according to the procedure of Laemmli (25) under reducing conditions. Proteins were transferred to a nitrocellulose membrane (Schleicher & Schnell, FRG) for immunoblotting (26). The membrane was first incubated with murine monoclonal antibodies, followed by the addition of peroxidase-conjugated goat anti-murine IgM

(μ-chain specific). The membrane was developed using 3,3'-diamino-benzidine. Cell adhesion experiments using cryostat sections of human lymph nodes: Cryostat sections of 10 μm thickness were prepared from the human lymph nodes freshly obtained at therapeutic surgical operation at Aichi Cancer Center Hospital and were fixed with 1.0% paraformaldehyde at 4 °C for 20 min. The sections were pretreated with the 2H5 antibody solution or the class-matched control antibody (MK1-8) solution (100 μg/ml) for 30 min at room temperature. To this, human lymphocytes prepared from peripheral blood of healthy individuals by Ficoll/Hypaque method as described below, were over-laid at the concentration of $5x10^7$/ml, and incubated for 30 min at 4°C with continuous rotation (60 rpm)(27). The lymphocytes were freed of thrombocytes by repeated centrifugation at 100xg, and treated with neuraminidase from *Arthrobacter ureafaciens* (0.05 unit/ml, Nakarai Co. Ltd., Kyoto, Japan) according to the method of Stoolman et al. (28). The sections were then fixed with 3% glutaraldehyde at 4 °C for 20 min, followed by staining with 0.5% Toluidine blue in 20% ethanol. The number of lymphocytes attached to endothelial cells of HEV was counted under a microscope, and was expressed as the number of attached lymphocytes per unit area of the HEV.

Results

Specific expression of the complex sialyl Le^x-like antigen defined by the 2H5 antibody in endothelial cells of HEV in human peripheral lymph nodes: By immunohistochemical examinations of the human lymph nodes including cervical, lung hilar, parastomach and mesenteric lymph nodes, essentially all endothelial cells in HEV were strongly stained by the 2H5 antibody, with a typical example shown in panel *A* of Fig. 1. Staining of the HEV endothelial cells with 2H5 was completely abolished by pretreatment of the sections with neuraminidase, indicating that the detected carbohydrate antigen carried a sialic acid terminus. The 2H5 antibody also stained granulocytes and monocyte-like cells present in the sections.

On the other hand, the hitherto known typical anti-sialyl Le^x antibodies SNH-3 and FH-6 did not stain any of the endothelial cells of HEV in peripheral lymph nodes, with typical examples shown in panels *B* and *C* of Fig. 1. The only cells positively stained with these antibodies were granulocytes and monocyte-like cells. The CSLEX-1 antibody did not stain HEV when used at concentrations up to 10 μg/ml, and only a faint staining of HEV was observed at concentrations above 20 μg/ml. In contrast, a strong staining was readily obtained with 2H5 at concentrations of 0.1 μg/ml or even below. No positive staining was observed with the anti-sialyl Le^a antibody 2D3 in any of the lymph nodes studied (Panel *D*, Fig. 1).

Staining patterns of the endothelial cells in post-capillary venules of various lymphoid organs with these antibodies are summarized in Table 1. The 2H5 antibody stained the endothelial cells of most HEV in the tonsils strongly (Fig. 1, panel *E*), and the endothelial cells of some HEVs in the Payer's patches (Fig. 1, panel *F*) and appendices (photograph not shown) moderately. These endothelial cells were not stained with the antibodies SNH-3, FH-6 or

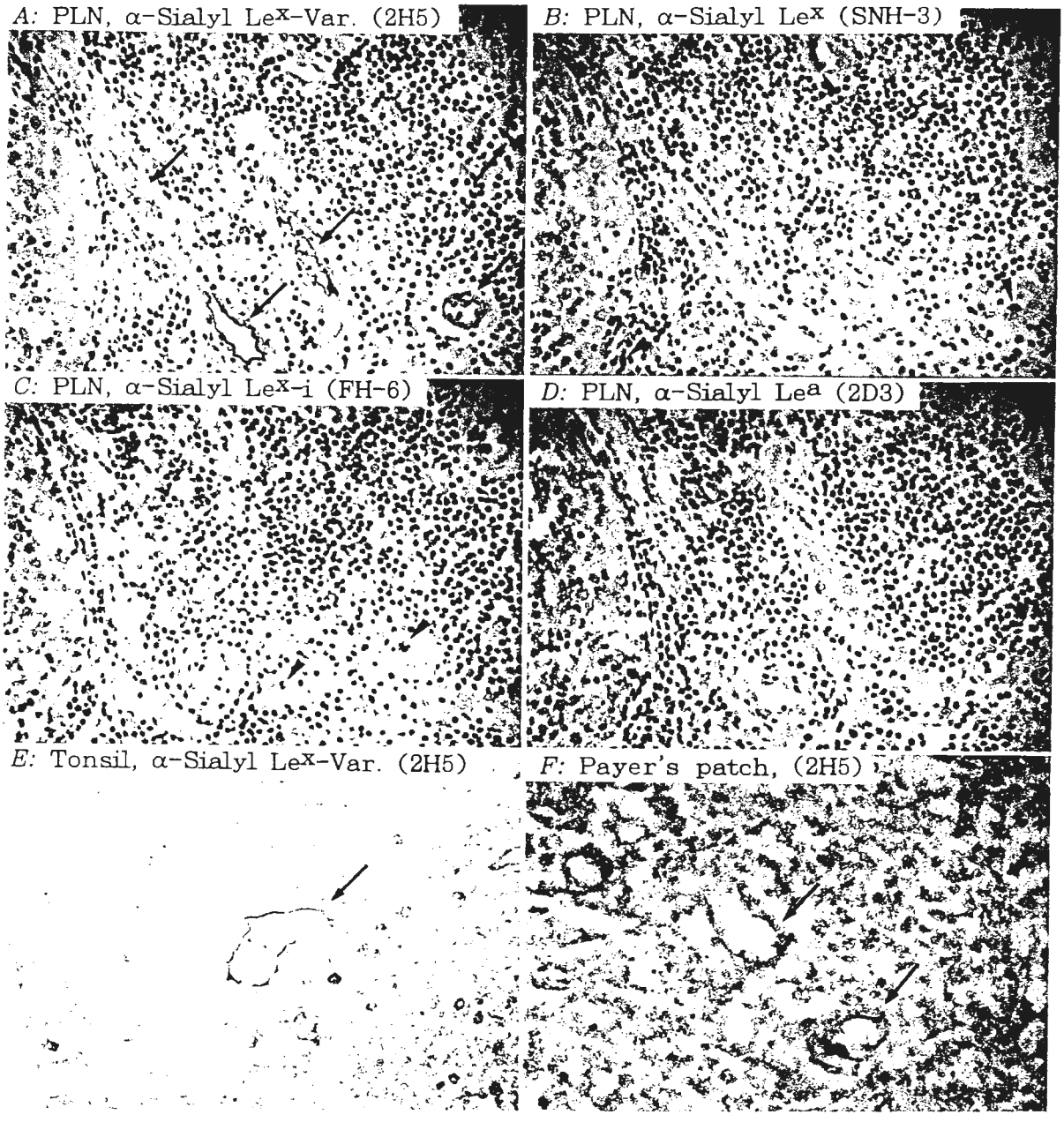


Fig. 1. Immunohistochemical detection of the 2H5-defined carbohydrate antigen in HEV of lymphoid organs. Panels *A–D*; immunohistochemical detection of sialyl Le^x-like antigen defined by the 2H5 (panel *A*), SNH-3 (panel *B*), and FH-6 antibodies (panel *C*), or detection of sialyl Le^a antigen defined by the 2D3 antibody (panel *D*), in a section of a human peripheral lymph node. Arrows indicate HEV; arrowhead, granulocytes. Panels *E* and *F*; Immunohistochemical detection of sialyl Le^x antigen defined by the antibody in a section of tonsil (panel *E*) or Payer's patch (panel *F*).

2D3. The antibody CSLEX-1 failed to stain HEVs in the Payer's patches or appendices even at concentrations above 20 μg/ml. The endothelial cells in the spleen and thymus were not stained with the 2H5 antibody, or the SNH-3, FH-6 and 2D3 antibodies (Table 1).

Table 1. Expression of sialyl Le^x, sialyl Le^a and related antigens in endothelial cells of venules in various organs

Organs		Staining with the antibody[a] (No. of Positive Cases / No. of Tested Cases)					
		2H5	SNH-3	FH-6	CSLEX-1 1μg/ml	CSLEX-1 20μg/ml	2D3
Lymphoid Tissues	Lymph Node	7/7	0/7	0/7	0/5	2/3	0/5
	Tonsil	4/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4
	Payer's Patch	3/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3
	Appendix	2/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2
	Spleen	0/6	0/6	0/6	0/5	n.t.[b]	0/5
	Thymus	0/1	0/1	0/1	n.t.	n.t.	0/1
Other Organs	Esophagus	0/1	0/1	0/1	n.t.	n.t.	0/1
	Stomach	0/3	0/3	0/3	0/1	0/1	0/3
	Intestine	0/6	0/6	0/6	0/4	0/4	0/5
	Liver	0/6[c]	0/6	0/6	0/5	0/5	0/6
	Pancreas	0/3	0/3	0/3	0/1	0/1	0/2
	Lung	0/6[d]	0/6	0/6	0/5	0/5	0/5
	Kidney	0/2[e]	0/2	0/2	0/2	0/1	0/1
	Skin	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5

a The results when used at the concentration of 1 μg/ml are shown for the 2H5, SNH-3, FH-6 and 2D3 antibodies. For the CSLEX-1 antibody, the results obtained at the concentrations of both 1 μg/ml and 20 μg/ml are shown.

b n.t., Not tested.

c The liver parenchymal cells and Kupffer cells sometimes showed significant staining, but essentially no staining was observed on the endothelial cells of blood vessels including sinusoids.

d The bronchial gland cells sometimes showed positive staining, but no staining was observed on the endothelial cells of blood vessels.

e The epithelial cells of the proximal convoluted tubules showed positive staining, but essentially no staining was observed on the endothelial cells of blood vessels including the glomerulus.

Table 1 also summarizes reactivity of the 2H5 and other antibodies with endothelial cells of the various organs other than lymphoid organs, such as the liver, stomach, large and small intestine, kidney, lung and skin. None of the endothelial cells of small vessels in these organs were stained with any of these antibodies.

Specificity of the 2H5 antibody against glycolipid and glycoprotein sialyl Le^x antigens: The 2H5 antibody was strongly reactive to the sialyl Le^x-active complex glycolipids which were used to raise this antibody. The antibody was also significantly cross-reactive to the short-chain sialyl Le^x glycolipid, and was not reactive to sialyl Le^a glycolipid as shown in Fig. 2, panels *A* and *B*. Reactivity of 2H5 against the short chain sialyl Le^x glycolipid was essentially the same as that of the antibody SNH-3. On the other hand, the typical anti-sialyl Le^a antibody 2D3, which served as a control antibody in these experiments, was reactive only to sialyl Le^a and was not reactive to sialyl Le^x Fig. 2).

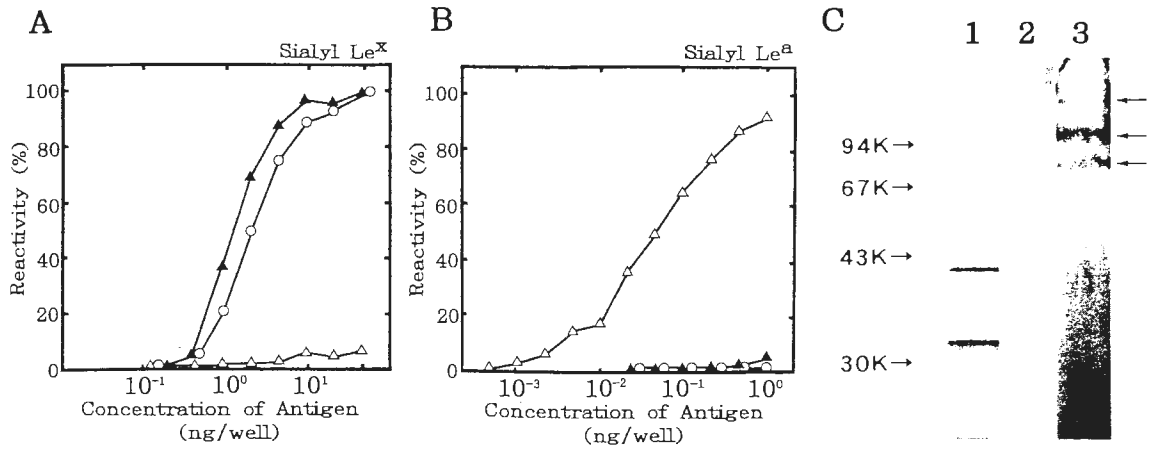


Fig. 2. Reactivity of the 2H5 antibody against glycolipids and glycoproteins. Panels *A* and *B*; Comparison of the reactivity of the 2H5 antibody with that of the SNH-3 (typical anti-sialyl Le^x) and 2D3 (typical anti-sialyl Le^a) antibodies towards a short-chain sialyl Le^x glycolipid (panel *A*) or sialyl Le^a glycolipid (panel *B*) as ascertained by ELISA. The structures of the glycolipid used for the immobilized antigen were sialyl Le^x glycolipid (synthetic), NeuAcα2→3 Galβ1→4(Fucα1→3)GlcNAcβ1→3Galβ1→4Glcβ1→1Cer; sialyl Le^a glycolipid (purified from Colo201 cells), NeuAcα2→3Galβ1→3(Fucα1→4)GlcNAcβ1→3Galβ1→4Glcβ1→1Cer.
Panel *C*; Western blotting analysis of human peripheral lymph node stroma proteins with the SNH-3 and 2H5 antibodies. Lane 1, protein staining; lane 2, staining with SNH-3; lane 3, staining with 2H5.

When the reactivity of glycoproteins in the human peripheral lymph node stroma were tested by Western blotting technique with these antibodies, only the 2H5 antibody detected a set of the glycoproteins as indicated by arrows in lane 3 of panel *C* of Fig. 2. The molecular masses of the major three reactive glycoproteins were estimated to be 250, 110 and 90 kDa, respectively. The most abundant molecular species was 110 kDa. No positive bands were observed with the SNH-3 antibody tested under the same condition (lane 2 of panel *C*, Fig. 2), or with the FH-6, CSLEX-1, or 2D3 antibodies.

Inhibition of lymphocyte adhesion to HEV by the 2H5 antibody: In order to know whether the carbohydrate determinants detected on HEV by the 2H5 antibody are involved in the L-selectin-mediated adhesion of human lymphocytes to HEV, cryostat sections of human peripheral lymph node were pretreated with 2H5 and tested in Stamper-Woodruff assays. As shown in Fig. 3, considerable inhibition of adhesion was observed in the sections pretreated with the 2H5 antibody, compared to the sections pretreated with class-matched control antibody MK1-8, which was directed against an unrelated carbohydrate antigen, G_{M2}. The HEVs in the frozen lymph node sections treated with the control antibody adhered as many as 22.6 ± 4.2 lymphocytes/kunit HEV area on average, while the HEVs in the frozen sections treated with the 2H5 antibody adhered only 5.5 ± 3.2 lymphocytes/kunit HEV area on average (these results

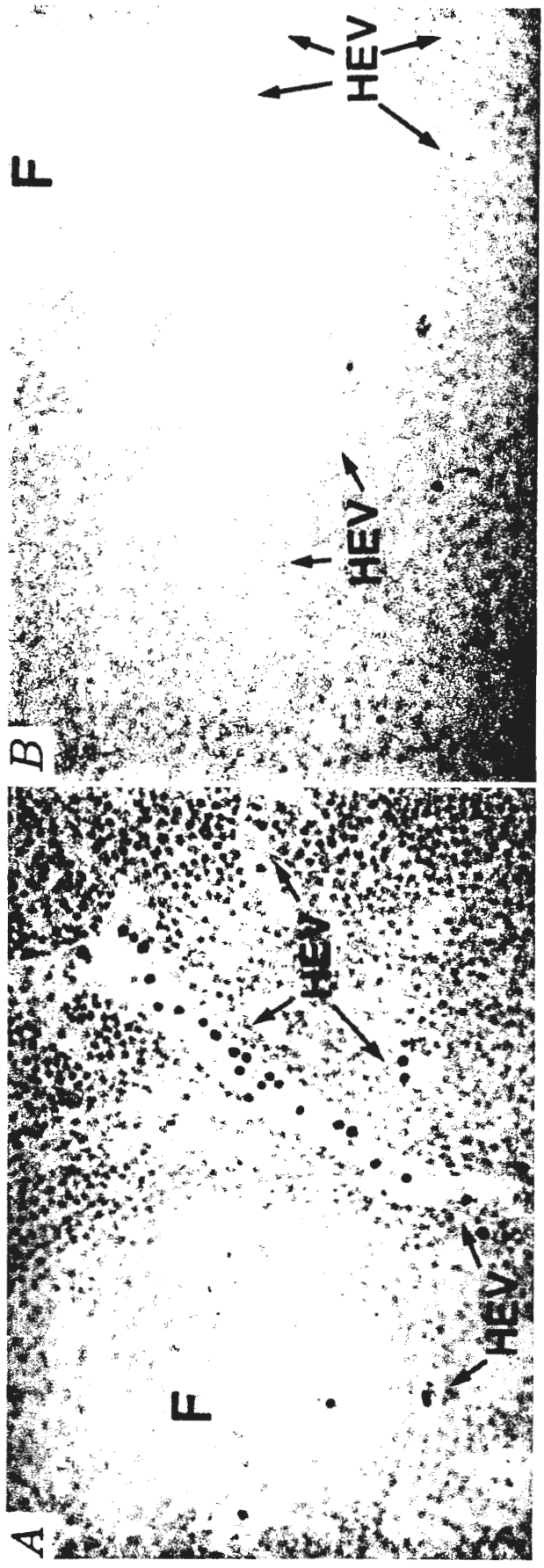


Fig. 3 Inhibition of lymphocyte adhesion to HEV of a human peripheral lymph node by the 2H5 antibody. Results of a typical experiment are shown. Panel *A*, the lymph node frozen section was pretreated with the control antibody MK1-8; panel *B*, the section was pretreated with the 2H5 antibody.

represent the mean of calculations on 6 independent microscopical fields). The reduction of the lymphocyte adhesion to HEV by the 2H5 antibody pretreatment was 75 %, and the difference was statistically significant at $P<0.001$ by the Student's *t*-test.

Discussion

Our present results indicated that a sialyl Le^x-like carbohydrate determinant is expressed in HEV of the human peripheral lymph nodes, and this determinant is efficiently detected by the newly established antibody 2H5. This 2H5-defined sialyl Le^x-like determinant seems to serve, at least partly, as a ligand for L-selectin, as ascertained by the clear inhibition of adhesion by the addition of the antibody in the Stamper-Woodruff assay. This L-selectin ligand detected in peripheral lymph nodes seems to be significantly different from the conventional E-selectin ligand sialyl Le^x expressed at the surface of the granulocytes; only the 2H5 antibody effectively detects the former ligand, while the latter is quite readily detected with almost every typical anti-sialyl Le^x antibody ever reported.

Sialyl Le^a as well as sialyl Le^x is known to bind to L-selectin from *in vitro* experiments employing recombinant L-selectin and/or L-selectin transfected cells (9,10). However, we tentatively conclude that the 2H5-defined determinant is most probably complex carbohydrates which carry the sialyl Le^x-like determinant, and not the sialyl Le^a determinant, for the following reasons. First, the antibody 2H5 which efficiently detects this determinant was successfully obtained by immunization of the sialyl-Le^x-active complex glycolipid fraction; second, this antibody has a specificity to sialyl Le^x hapten and has no cross-reactivity to sialyl Le^a; and third, even the CSLEX-1 at very high concentrations could detect this determinant, while an anti-sialyl Le^a antibody 2D3 failed to detect any reactive antigen on HEV.

We could detect significant expression of the 2H5-defined sialyl Le^x-like determinant also in HEV of the Payer's patches and appendices, although less strongly than in HEV of the peripheral lymph nodes. It had been postulated that L-selectin is an adhesion molecule which specifically mediates homing of lymphocytes to the peripheral lymph nodes, and that homing of the gut-associated lymphocytes to the Payer's patches and appendices is mediated by an entirely different molecular mechanism (1-3). The ligand for L-selectin had been assumed to be present only in HEV of the peripheral lymph nodes but not in HEV of the Payer's patches or appendices. However, a recent study indicated that the L-selectin molecules are partly involved in homing of the gut-associated lymphocytes (27). The determinant detected by 2H5 in the Payer's patches and appendices is probably the carbohydrate ligand also

operating as a ligand for L-selectin, and this determinant is not detectable by the conventional anti-sialyl Le^x antibody CSLEX-1 even at higher concentrations.

The 2H5 antibody could detect sialyl Le^x-like determinants on stromal glycoproteins in human peripheral lymph nodes, while other antibodies fail to detect the antigen under the same condition. These proteins seem to carry the complex sialyl Le^x-active carbohydrate determinants which are most probably similar in their carbohydrate structure to the carbohydrate determinants carried by the complex glycolipids used as immunogens to raise the 2H5 antibody. A recombinant human L-selectin was shown to detect two major glycoproteins SGP50 (50 kDa) and SGP90 (90 kDa) on HEV of murine lymph nodes (28). SGP50 was named as GlyCAM-1, and cDNA for this molecule was cloned (28). On the other hand, Berg et al. identified 65, 90, 105, 150 and 200 kDa proteins in human lymph nodes as the L-selectin ligands using the MECA-79 antibody (29). Our 2H5 antibody detected glycoproteins of 250, 110 and 90 kDa in human peripheral lymph nodes. No explanation for these discrepancies in molecular mass is yet available.

Acknowledgments: We thank Dr. Sen-itiroh Hakomori for the gifts of monoclonal antibodies. This work was supported in part by a Grant-in-aid for Scientific Research from the Ministry of Education, Science and Culture, Japan (04253245).

References

1. Stoolman, L.M. (1989) *Cell* 56, 907-910.
2. Springer, T.A. (1990) *Nature* 346, 425-434.
3. Lasky,L.A. (1992) *Science* 258, 964-969.
4. Lowe J.B., Stoolman L.M., Nair R.P., Larsen R.D., Berhend T.L., and Marks R.M. (1990) *Cell* 63, 475-484.
5. Phillips M.L., Nudelman E., Gaeta F.C.A., Perez M., Singhal A.K., Hakomori S., and Paulson J.C. (1990) *Science* 250, 1130-1132.
6. Waiz .G., Aruffo A., Kolanus W, Bevilacqua M., and Seed B. (1990) *Science* 250, 1132-1135.
7. Takada A., Ohmori K., Takahashi N., Tsuyuoka K., Yago K., Zenita K., Hasegawa A., and Kannagi, R. (1991) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 179, 713-716.
8. Berg, E.L., Robinson, M.K., Mansson, O., Butcher, E.C., and Magnani, J.L. (1991) *J. Biol. Chem.* 266, 14869-14872.
9. Berg, E.L., Magnani, J., Warnock, R.A., Robinson, M.K., and Butcher, E.C. (1992) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 184, 1048-1055.
10. Foxall, C., Watson, S.R., Dowbenko, D., Fennie, C., Lasky, L.A., Kiso, M., Hasegawa, A., Asa, D., and Brandley, B.K. (1992) *J. Cell Biol.* 117, 895-902.
11. Handa, K., Nudelman, E.D., Stroud, M.R., Shiozawa, T., and Hakomori, S. (1991) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 181, 1223-1230.
12. Paavonen, T., and Renkonen, R. (1992) *Am. J. Pathol.* 141, 1259-1264.
13. Green, P.J., Tamatani, T., Watanabe, T., Miyasaka, M., Hasegawa, A., Kiso, M., Yuen, C.-T., Stoll, M.S., and Feizi,T. (1992) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 188, 244-251.

14. Suzuki, Y., Toda, Y., Tamatani, T., Watanabe, T., Suzuki, T., Nakao, T., Murase, K., Kiso, M., Hasegawa, A., Tadano-Aritomi, K., Ishizuka, I., and Miyasaka, M. (1993) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 190, 426-434.
15. Kannagi, R., Nudelman, E., Levery, S. B., and Hakomori, S. (1982) *J. Biol. Chem.* 257, 14865-14874.
16. Hanisch, F.G., and Uhlenbruck, G. (1988) *Carbohydrate Res.* 178, 29-47.
17. Capon, C., Leroy, Y., Wieruszeski, J-M., Ricart, G., Strecker, G., Montreuil, J., and Fournet, B. (1989) *Eur. J. Biochem.* 182, 139-152.
18. Kojima, N., Handa, K., Newman, W., and Hakomori, S-I. (1993) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 189, 1686-1694.
19. Hakomori, S., and Kannagi, R. (1986) In *Handbook of Experimental Immunology* (D. M. Weir, L. Herzenberg, L.A. Herzenberg and C. Blackwell. Eds.), Vol. 1, pp. 9.1-9.39. Blackwell Scientific Pub. Inc., Boston.
20. Kannagi, R., and Hakomori, S. (1986) In *Handbook of Experimental Immunology* (D. M. Weir, L. Herzenberg, L.A. Herzenberg and C. Blackwell. Eds.), Vol. 4, pp. 117.1-117.21. Blackwell Scientific Pub. Inc., Boston.
21. Ohmori, K., Takada, A., Yoneda, T., Buma, Y., Hirashima, K., Tsuyuoka, K., Hasegawa, A., and Kannagi, R. (1993) *Blood* 81, 101-111.
22. Takada, A., Ohmori, K., Yoneda, T., Tsuyuoka, K., Hasegawa, A., Kiso, M., and Kannagi, R. (1993) *Cancer Res.* 53, 354-361.
23. Tuo, X.-H., Itai, S., Nishikata, J., Mori, T., Tanaka, O., and Kannagi, R. (1992) *Cancer Res.* 52, 5744-5751.
24. Kameyama, A., Ishida, H., Kiso, M., and Hasegawa, A. (1991) *Carbohydrate Res.* 209, C1-C4.
25. Laemmli, U. K. (1970) *Nature* 227, 680-685.
26. Towbin, H., Staehelin, T., and Gordon, J. (1979) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 76, 4350-4354.
27. Stamper, H.B.Jr., and Woodruff, J.J. (1976) *J. Exp. Med.* 144, 828-833.
28. Stoolman, L.M., Yednock, T.A., and Rosen, S.D. (1987) *Blood* 70, 1842-1850.
29. Hamann, A., Jablonski-Westrich, D., Jonas, P., and Thiele, H.-G. (1991) *Eur. J. Immunol.* 21, 2925-2929.
30. Lasky, L.A., Singer, M.S., Dowbenko, D., Imai, Y., Henzel, W.J., Grimley, C., Fennie, C., Gillett, N., Watson, S.R., and Rosen, S.D. (1992) *Cell* 69, 927-938.
31. Berg, E.L., Robinson, M.K., Warnock, R.A., and Butcher, E.C. (1991) *J. Cell Biol.* 114, 343-349.

Reprinted from Biochemical and Biophysical Research Communications 193, 337-347 (1993)
Copyright © 1993 Academic Press, Inc. Printed in U.S.A.

THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY
© 1993 by The American Society for Biochemistry and Molecular Biology, Inc.
Vol. 268, No. 35, Issue of December 15, pp. 26435–26440, 1993
Printed in U.S.A.

Molecular Cloning and Expression of cDNA Encoding Rat Skeletal Muscle Cytosolic Sialidase*

(Received for publication, March 4, 1993, and in revised form, August 17, 1993)

Taeko Miyagi‡§, Kimio Konno¶, Yasufumi Emori‖, Hiroshi Kawasaki, Koichi Suzuki‡‡, Akira Yasui¶, and Shigeru Tsuiki§§**

*From the ‡Research Institute, Miyagi Cancer Center, Natori, Miyagi 981-12, the ¶Institute of Development, Aging and Cancer, Tohoku University, Sendai 980, the ‖Faculty of Science and the ‡‡Institute of Applied Microbiology, University of Tokyo, Tokyo 113, **The Tokyo Metropolitan Institute of Medical Science, Tokyo 113, and the §§Tohoku College of Pharmacy, Sendai 981, Japan*

We have isolated a cDNA clone encoding the cytosolic sialidase of rat skeletal muscle. Degenerate oligonucleotides, based on amino acid sequence data for the purified enzyme, were used as primers to amplify fragments of the gene from rat skeletal muscle cDNA by the polymerase chain reaction. The amplified cDNA fragment was then applied as probe to screen a rat skeletal muscle cDNA library. The longest cDNA clone thus isolated was incomplete at the 5′-end, and therefore an amplified cDNA from the 5′-end portion of the gene was further generated by polymerase chain reaction. These two cDNAs were used to construct a cDNA encoding the entire sequence of rat sialidase. The composite sequence encodes an open reading frame of 379 amino acids that include all sequenced peptides. Although the deduced amino acid sequence is not largely similar to those of bacterial and parasite sialidases, it contains two Asp blocks, the conserved sequence of the sialidases from these microorganisms. When the cDNA was inserted into an expression vector followed by transformation in *Escherichia coli*, sialidase activity appeared in the cell extract. The sialidase could be completely immunoprecipitated by antiserum against the cytosolic sialidase of rat skeletal muscle.

The removal of sialic acid residues from glycoproteins and glycolipids, catalyzed by sialidase (EC 3.2.1.18), is an initial step for degradation of the glycoconjugates. This reaction is thought to be important to many biological phenomena (1). To obtain further insights into the significance and the regulation mechanism of physiological desialylation, we have been investigating sialidases of mammalian origin, earlier demonstrating that rat liver contains at least four types of sialidase: intralysosomal (2), cytosolic (3), and two membrane-associated sialidases I and II (4, 5), which differ in subcellular location and in catalytic and immunological properties from one another. Rat brain also possesses four types of sialidase identical in every aspect (4). Membrane sialidase I is located mainly in the plasma membrane, and membrane sialidase II is located in the lysosomal membrane. Their substrate specificities differ markedly, and immunoprecipitation studies have revealed that each sialidase is specifically precipitated only by its respective antibody. The finding that these sialidases are distinct proteins and thus may be the products of distinct genes suggests that each plays a unique role depending on its unique subcellular location and catalytic property. Although the two lysosomal sialidases (located in the matrix and membrane) are likely to be engaged in lysosomal catabolism of glycoconjugates, the physiological functions of sialidases in the cytosol and in the plasma membrane are entirely unknown. Cloning of the genes for these low abundance proteins is required for studying their structures and functions in order to elucidate the significance and regulation mechanism of physiological desialylation.

Most attempts to purify extensively mammalian sialidase have so far been unsuccessful, primarily due to their extreme instability and low activity. Of the four types of sialidases, we were able to purify the cytosolic sialidase to an apparent homogeneity from both rat liver cytosol (3) and skeletal muscle cytosol (5), the enzyme from the two sources being immunologically identical (5). Since a tissue distribution study showed its activity to be about 16-fold greater in skeletal muscle than in liver (6), we purified skeletal muscle sialidase for preparation of antibody and for analysis of partial amino acid sequence.

Although a number of sialidases from microorganisms, including viruses (7–17), bacteria (18–23), and protozoa (24, 25), have already been cloned and/or sequenced, no cDNAs encoding mammalian sialidase have been described to date. Unlike higher animals, microorganisms hardly synthesize sialoglycoconjugate substrate, despite production of sialidase, raising questions about the function and origin of these microbial sialidases. A possible role has been speculated in nutrition or pathogenesis. Comparison of primary sequences has lead to the proposal of a monophyletic origin (23, 26), due to the presence of homologous sequences such as an Asp block (-Ser-*X*-Asp-*X*-Gly-*X*-Thr-Trp-) in all cases (26). In the present study, we cloned the cDNA encoding rat cytosolic sialidase and expressed it in *Escherichia coli*.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Amino Acid Sequencing of Peptides Derived from Cytosolic Sialidase—Rat cytosolic sialidase was purified from 4 kg of frozen skeletal muscle using the method described previously for the liver enzyme (2) with some modifications (4). Analysis of the purified sialidase on SDS-polyacrylamide gel electrophoresis revealed essentially a single band with an apparent molecular mass of 43 kDa. Edman degradation

* This work was supported in part by grants-in-aid for cancer research and scientific research from the Ministry of Education, Culture and Science of Japan. The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked "*advertisement*" in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

The nucleotide sequence(s) reported in this paper has been submitted to the GenBank™/EMBL Data Bank with accession number(s) D16300.

§ To whom correspondence should be addressed: Division of Biochemistry, Research Inst., Miyagi Cancer Center, 47-1 Nodayama, Medeshima-shiode, Natori, Miyagi, 981-12, Japan. Tel.: 81-22-384-3151 (ext. 910); Fax: 81-22-381-1195.

of the purified sialidase (5 μg) yielded no amino-terminal sequence. The sialidase (~30 μg) was digested with trypsin (Wako) after treatment with 2 M urea for 30 min at room temperature. Alternatively, the enzyme (~20 μg) was digested with endolysylpeptidase (*Achromobacter* protease I, Wako) directly after separation by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis as described by Kawasaki *et al.* (27). The peptides generated were separately fractionated by reverse-phase high performance liquid chromatography on a Wakosil 5C18 (Wako) column (4 × 150 mm). The column was eluted by a 60-min linear gradient of acetonitrile in the presence of 0.1% trifluoroacetic acid at a flow rate of 0.5 ml/min. For the digests with endolysylpeptidase, DEAE-Toyopearl (Tosoh) precolumn (4 × 50 mm) was connected in series to the Wakosil 5C18 column to remove SDS from the peptides. Well resolved peaks were subjected to sequencing by automated Edman degradation on an Applied Biosystems model 470A sequenator.

Oligonucleotides and Polymerase Chain Reaction—Two groups of polymerase chain reaction (PCR)[1] experiments were performed: one for obtaining a cDNA probe by amplifying sequences between two primers and the other for 5′-end amplification. The former was carried out as follows. Based on the amino acid sequences of three peptides (Table I) derived from the purified cytosolic sialidase, six degenerate oligonucleotides of both sense and antisense strands were synthesized with deoxyinosine substitution as indicated in Table II. First strand cDNA was synthesized from oligo(dT)-selected rat liver RNA (see below) using murine leukemia virus reverse transcriptase (Life Technologies, Inc.) and random primers as described by Moremen (28). They were used for the PCR reaction carried out in a final volume of 50 μl containing 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl (pH 8.3), 1.5 mM $MgCl_2$, 0.01% gelatin, 0.2 mM of each of the four dNTPs, 0.5 μM of each oligonucleotide primer, 50 ng of the first strand cDNA as template, 1.25 units of *Thermus aquaticus* (*Taq*) polymerase (Perkin-Elmer Cetus Instruments), and 50 μl of mineral oil. The samples were subjected to a temperature-step cycle of 94 °C (0.5 min), 50 °C (1 min), and 72 °C (2 min) for a total of 40 cycles, followed by a 10-min extension at 72 °C after the final cycle. For 5′-end amplification, the procedure for "rapid amplification of cDNA ends" described by Frohman *et al.* (29) was employed with a slight modification. $(dT)_{17}$ adaptor (5′-GACTCGAGTCGACATCGATTTTTTTTTTTTTTTT-3′), adaptor (5′-GACTCGAGTCGACATCG-3′), and two oligonucleotides (4AS and 5AS in Table II) specific to cytosolic sialidase were used as primers. Template cDNA was synthesized by reverse transcription of rat skeletal muscle poly(A)$^+$ RNA (1 μg) using the sialidase-specific primer 4AS, followed by addition of a poly(A) tail through the terminal deoxynucleotidyltransferase reaction as described (29). The cDNA (a 10th aliquot of the cDNA pool synthesized above) as template, $(dT)_{17}$ adaptor (10 pmol), and the sialidase-specific oligonucleotide 4AS primer (25 pmol) were used for amplification as described for the degenerate primers. A 2-μl sample of the above product was reamplified in a 50-μl volume with adaptor primer (25 pmol) and a nested specific primer (oligonucleotide 5AS, 25 pmol) under the same PCR conditions, except for annealing at 55 °C. The sialidase-specific primers 6AS and 7S were used for amplification of cDNA (PSD3 in Fig. 3) covering sequences of both cDNA obtained with degenerate primers (PSD1) and that with 5′-end amplification (PSD2). The DNA was then blunt end-ligated either to the *Sma*I or to the *Hinc*II site of pUC18 vector for further analysis.

Isolation of cDNA Clones from a cDNA Library—The 450- and 550-bp cDNAs obtained by PCR amplification with degenerate primers were sequenced and found to contain the primer sequences at the ends. In addition, the deduced amino acid sequences of the cDNAs contained the sequences of peptides T4, E3, and E4. The 550-bp cDNA was therefore radiolabeled with [α-^{32}P]dCTP (3000 Ci/nmol, DuPont NEN) using a random primer DNA labeling kit (Takara, Japan) and then used as a probe for screening of a cDNA library constructed as follows. Double strand cDNA was synthesized by reverse transcription of rat skeletal muscle poly(A)$^+$ RNA with oligo(dT) primers using an Amersham Corp. cDNA synthesis kit, ligated with phosphorylated *Eco*RI linker (Promega), digested with *Eco*RI, ligated to *Eco*RI-digested λgt10, and then packaged *in vitro* using a packaging kit from Stratagene. Approximately 2 × 10^6 recombinant phages were screened with the above labeled cDNA probe by plaque hybridization. Hybridization was carried out with nylon membrane (Hybond N$^+$, Amersham Corp.) according to the procedures recommended by the supplier. Three positive plaques λSD1, λSD2, and λSD3 obtained were subcloned into pUC18 vectors by *Eco*RI digestion.

DNA Sequencing—The subclones of PCR products were sequenced by the dideoxy chain termination method from both insert directions using Sequenase version 2.0 (U. S. Biochemical Corp.). The subclones obtained with the library screening were sequenced by the Erase-a-Base system (Promega) and dideoxy chain termination method (30).

Northern Blot Analysis—Total RNA was prepared from rat skeletal muscle by the low temperature guanidinium thiocyanate extraction procedure (31). Poly(A)$^+$ RNA was purified by oligo(dT)-cellulose column chromatography. Total RNA (10 μg) and poly(A)$^+$ RNA (5 μg) were denatured in 50% (v/v) formamide, 6% (v/v) formaldehyde, 20 mM MOPS (pH 7.0) at 65 °C, electrophoresed in a 1% agarose gel containing 6% (v/v) formaldehyde, and transferred to a nitrocellulose filter. The filter was hybridized with the labeled cDNA probe at 42 °C in a solution containing 5× saline/sodium/phosphate/EDTA, 50% (v/v) formamide, 5× Denhardt's solution, 0.2% SDS, and 0.2 mg/ml salmon sperm DNA. The filter was washed in 2× SSC, 0.1% SDS, and finally in 0.2× SSC, 0.1% SDS at 55 °C.

Construction of Cytosolic Sialidase cDNA in the Expression Vector—The sequence encoding the entire open reading frame was constructed in pKMC2, a derivative of pKK233-2 (Pharmacia LKB Biotechnology Inc.), by inserting the *Pst*I-*Eco*RI fragment of clone λSD3 into the multicloning site followed by insertion of the *Nco*I-*Kpn*I fragment from the PSD3 clone behind the promotor resulting in a pKMC-SD plasmid. The 1.5-kilobase cDNA from pKMC-SD was subcloned between *Nco*I and *Bam*HI sites of expression vector pET3d (Novagen) that is under the control of the phage T7 promoter (pET3d-SD). Cytosolic sialidase cDNA was also constructed in expression vector pGEX-2T (Pharmacia) for glutathione *S*-transferase fusions as follows. The region containing the open reading frame of pKMC-SD was amplified by PCR using a sense primer at nucleotide 193 with a *Bam*HI site and an antisense primer at nucleotide 1512 in the 3′-untranslated region with a *Eco*RI site. PCR was carried out as described above with an annealing temperature at 55 °C, and the product was subcloned into *Bam*HI-*Eco*RI sites of pGEX-2T (pGEX-2T-SD).

Expression of Cytosolic Sialidase cDNA in E. coli—*E. coli* BL21 (DE3) harboring pLysS was transformed with pET3d-SD or expression vector pET3d alone. The cells were grown in LB medium containing ampicillin (50 μg/ml) and chloramphenicol (60 μg/ml) at 37 °C to midlog phase before addition of isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside (IPTG) to 1 mM. After a further 2–4 h of growth, cells were pelleted and suspended in a [1/50] volume of phosphate-buffered saline containing 5 mM EDTA and 0.5 mM phenylmethanesulfonyl fluoride. Cells lysed by sonication were centrifuged at 1,000 × *g* for 10 min, and the supernatant was further centrifuged at 10,000 × *g* for 10 min. The resulting supernatant was assayed for sialidase activity using 4MU-Neu5Ac as substrate as described previously (2). In addition, the recombinant plasmid pGEX-2T-SD was introduced into *E. coli* JM 109, and the transformed cells grown in LB-ampicillin medium were collected after induction of the fusion protein by IPTG. Crude extracts of the cells were prepared and assayed for sialidase activity. Glutathione Sepharose 4B (Pharmacia) was used to purify glutathione *S*-transferase fusion protein. Immunoprecipitation studies of sialidase expressed in *E. coli* were performed as described previously (5, 6).

RESULTS

Amino Acid Sequence Determination and Preparation of cDNA Probe by Polymerase Chain Reaction—Attempts were made to determine the amino-terminal sequence of the intact cytosolic sialidase, but the amino acid terminus appeared to be blocked. To obtain internal amino acid sequence data, purified cytosolic sialidase was therefore digested with trypsin or endolysylpeptidase. Amino acid sequences determined for four tryptic peptides and five endolysylpeptidase-treated peptides are shown in Table I. Three peptides, T1, E1, and E2, were chosen as degenerate oligonucleotides for sense and antisense primers. In order to obtain longer oligonucleotide primers as shown in Table II, deoxyinosine was substituted in positions where the codon degeneracy was >2 (28) and where a single amino acid could not be assigned with certainty.

[1] The abbreviations used are: PCR, polymerase chain reaction; 4MU-Neu5Ac, 4-methylumbelliferyl *N*-acetylneuraminic acid; bp, base pair(s); MOPS, 4-morpholinepropanesulfonic acid; IPTG, isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside.

TABLE I

Amino acid sequence data for peptides from rat skeletal muscle cytosolic sialidase

Peptides treated with trypsin or endolysylpeptidase are designated T1–T4 or E1–E5. The amino acid sequences are written using the single letter code. *X* indicates the amino acid residues that could not be assigned. Amino acids within parentheses are tentative identifications. Residues underlined indicate discrepancies from those predicted by the cDNA sequence.

Peptide	Amino acid sequences
T1	*XX*HPVHKPTPFAF*XX*
T2	*X*QAQSPN*XX*LXFQ*XX*
T3	VVYLNAR
T4	AGSLLVPAYAYR
E1	*X*ASRTDE*X*AELIVL*XX*A(S)YN
E2	(E)TLFFT(T)EVYAY*X*(I)P
E3	(A)QPEEVA
E4	TLLAFAE*XXX*
E5	(Q)AFPTV*XX*(A)Q*X*

TABLE II

Oligonucleotide primers for the PCR experiments to isolate cDNA clones

Degenerate oligonucleotides 1, 2, and 3 were driven from the sequences of peptides E1, E2, and T1, respectively. Oligonucleotides 4, 5, and 6 were prepared on the basis of the sequence of cDNA obtained from library screening, and oligonucleotide 7 was based on the cDNA sequence obtained with 5′-end amplification. S indicates "sense," and AS indicates "antisense" directions. Superscripts refer to the nucleotide position in the deduced cDNA sequence.

1S	5′-AGIACIGACGAAIIIGCIGAACTIATIGTICT-3′
1AS	5′-AAIACIATIAACTCIGCIIICTCATCIGT-3′
2S	5′-ACICTITTCTTCACIACIGAAGTITACGC-3′
2AS	5′-TAIGCATAIACTTCIGTIGTAAAAAA-3′
3S	5′-CACCIGTICACAAACCIACICCITTCGC-3′
3AS	5′-AAIGCAAAIGGIGTIGGCTTATGIACIGG-3′
4AS	5′-^{488}AGGAAGAGGGTCTTTGTTTG-3′
5AS	5′-^{473}GTTTGCTTGTCATACAAGGGA-3′
6AS	5′-^{740}AGCTTCCGGTAGGCATAAGC-3′
7S	5′-^{50}GGTTAGCAGCTGAAGGTTGTCA-3′

Three possible pairs of sense and antisense primers were used in the PCR reactions with rat skeletal muscle random-primed cDNA as template. Two of the six reactions, 1S-3AS and 2S-3AS, produced cDNA fragments of 450 and 550 bp, respectively (Fig. 1). When both fragments were subcloned and sequenced, the 550-bp fragment was found to overlap with the 450-bp fragment with an extension at the 5′-end of 99 nucleotides. The deduced amino acid sequences of the cDNAs contained the peptide sequences for E3, T5, and E4, suggesting that the cDNA indeed encodes a part of the target gene.

Northern Blot Analysis—The 550-bp fragment was used as a probe to determine the size of the corresponding mRNA from rat skeletal muscle. Northern blot analysis of total RNA and poly(A)$^+$ RNA from rat skeletal muscle demonstrated the hybridizing transcript to be about 1.8 kilobases as shown in Fig. 2. The same result was later obtained when a cDNA covering the entire coding region was isolated and used as the probe.

Isolation of a cDNA Encoding Rat Cytosolic Sialidase—The 550-bp cDNA was used to screen a rat skeletal muscle λgt10 library (2 × 10^6 plaques), and three independent positive clones were obtained (λSD1, λSD2, and λSD3 in Fig. 3). The longest clone λSD3 was found to contain almost all the

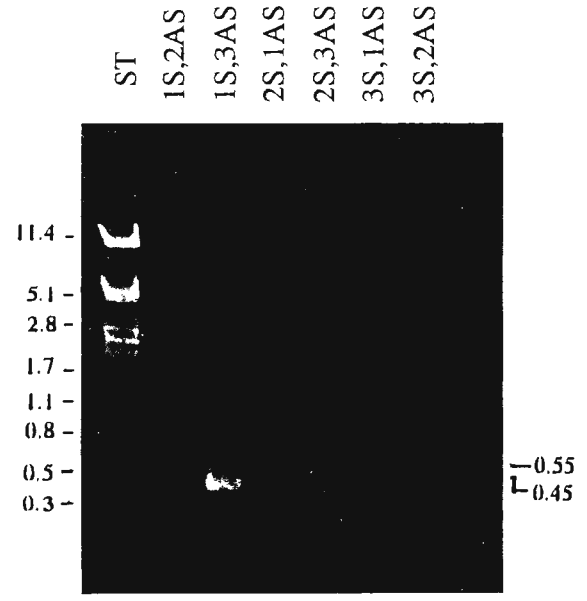


FIG. 1. **Agarose gel electrophoresis of PCR products with rat skeletal muscle cDNA as template.** The combinations of oligonucleotide primers were 1S-2AS, 1S-3AS, 2S-1AS, 2S-3AS, 3S-1AS, and 3S-2AS. The gel (1%) was stained with ethidium bromide. Size standards are derived from a *PstI* digest of λ phage DNA in kilobases.

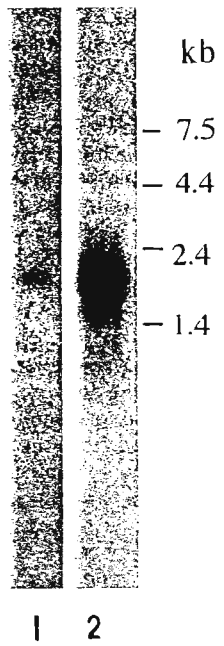


FIG. 2. **Northern blot analysis of RNA from rat skeletal muscle.** Total RNA (10 μg) and poly(A)$^+$ RNA (5 μg) (*lanes 1* and *2*) from rat skeletal muscle were used for the analysis as described under "Experimental Procedures." The *numbers* indicate size standards. *kb*, kilobases.

sequence of 550-bp cDNA and a consensus polyadenylation signal. However, all three clones isolated were incomplete in the 5′-end. To isolate cDNA harboring an extended 5′-end, the 5′-end of cDNA primed with oligonucleotide 4AS (in Table II) was PCR-amplified using a nested type primer (5AS in Table II) and nonspecific adaptor primer as described under "Experimental Procedures." A single visible band of 500 bp was generated, and the sequence of the amplified cDNA

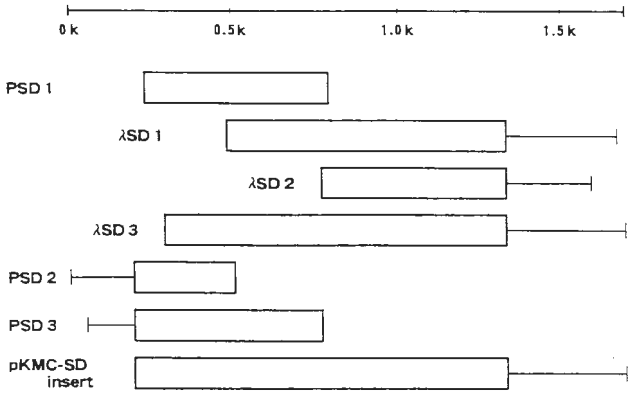


FIG. 3. **Schematic representation of cytosolic sialidase cDNA clones.** PSD1 is the 550-bp PCR product obtained with degenerate oligonucleotide primers. PSD2 and PSD3 are cDNA clones obtained by PCR amplifications with 5′-end amplification and with nondegenerate primers specific to sialidase, respectively. λSD1, λSD2, and λSD3 are cDNA clones gained from cDNA library screening. The *pKMC-SD* insert is a composite cDNA clone of PSD3 and λSD3. A scale in kilobases (*k*) is shown at the *top*. The *boxes* represent the coding region.

(PSD2 in Fig. 3) was found to overlap with the 5′-region of clone λSD3 by 206 nucleotides and to have an extended 5′-end of 267 nucleotides with an in-frame putative initiation methionine. Given the relatively high error of *Taq* polymerase, we confirmed the sequence by isolating and sequencing several clones obtained under the same PCR conditions. Clone PSD3, covering the sequences of clones PSD1 and PSD2, was used to construct the complete cDNA in the pKMC2 vector, together with clone λSD3.

The nucleotide sequence of the composite cDNA, shown in Fig. 4, consisted of 1675 nucleotides with a putative initiator codon at 190 and a TGA stop codon at 1327, having an open reading frame encoding 379 amino acid residues with a molecular mass of 42,381 Da in good agreement with the value obtained with the purified protein of skeletal muscle (5). A polyadenylation signal was located at nucleotide 1644 followed by poly(A) tracts. The 1675-bp cDNA length is consistent with the observed mRNA size (Fig. 2), indicating that the cDNA is nearly full-length. All the sequenced peptides shown in Table I were identified in the deduced amino acid sequence of the cDNA. There were five discrepancies between the amino acid sequences deduced from the cDNA and obtained by peptide analysis. Histidine 14 replacement of phenylalanine and threonine residues in the deduced sequence of cDNA seemed crucial. The nucleotide sequence was confirmed by the sequencing of several independent cDNA clones obtained by PCR amplification of a random-primed cDNA and an oligonucleotide 4AS-primed cDNA. This suggests that phenylalanine and threonine residues gave rise to protein sequencing errors because of the small amount of sample analyzed. Four potential sites of *N*-glycosylation were found although the purified sialidase hardly bound to lectin columns, such as concanavalin A-, wheat germ agglutinin-, and *Ricinus communis* agglutinin-agarose,[2] suggesting a possibility that the enzyme protein may be functionally glycosylated. This rat sialidase, in comparison with bacterial, viral, and protozoan sialidases previously reported (7–25), does not have a sequence similarity in overall structure but contains two Asp block sequences (26) at amino acid residues 129–137 and 199–206. Like the microorganism sialidases, the rat sialidase has high contents of cysteine residues (nine cysteines) and of β-sheet

[2] K. Yamashita, K. Hata, and T. Miyagi, unpublished observations.

```
GTCGGACAGCTGCAGAGAGCCACTTAGCAAGCTCCTCTACTCTCCTCAGGGTTAGCAGCT   60
GAAGGTTGTCACACATCTGTTGTGAGGGGAACTGGTTATGGCAGGAATCTATACAAAACC  120
CACTTTTTCGATTCTTGGGTAGAAGACTGCCAGGACGCTACAGCAGCACTGGCGAACGAT  180
CTCAGGCCCATGGAGACCTGCCCCGTCCTCCAGAAAGAGACGCTGTTCCACACAGAAGTC  240
          M  E  T  C  P  V  L  Q  K  E  T  L  F  H  T  E  V
TATGCTTACAGAATCCCTGCTCTGCTCTACCTGAAGAAGCAGAAGACCCTGCTGGCCTTT  300
18  Y  A  Y  R  I  P  A  L  L  Y  L  K  K  Q  K  T  L  L  A  F
GCAGAAAAGCGAGCCAGCAGGACGGATGAGCATGCTGAGTTGATTGTCCTGCGAAGAGGG  360
38  A  E  K  R  A  S  R  T  D  E  H  A  E  L  I  V  L  R  R  G
AGCTACAATGGAGCCACCAACCATGTCAAGTGGCAACCTGAGGAAGTGGTGACCCAAGCC  420
58  S  Y  N  G  A  T  N  H  V  K  W  Q  P  E  E  V  V  T  Q  A
CAGCTGGAGGGCCACCGCTCCATGAATCCATGTCCCTTGTATGACAAGCAAACAAAGACC  480
78  Q  L  E  G  H  R  S  M  N  P  C  P  L  Y  D  K  Q  T  K  T
CTCTTCCTTTCTTCATTGCTGTCCCTGGGCGTGTATCAGAACAGCATCAGCTCCAAACT  540
98  L  F  L  F  F  I  A  V  P  G  R  V  S  E  Q  H  Q  L  Q  T
AGGGTTAATGTCACACGGCTATGCCGTGTCACCAGCACCGATTATGGGATGAACTGGAGC  600
118 R  V  N  V  T  R  L  C  R  V  T  S  T  D  Y  G  M  N  W  S
                                   *                 *
CCCGTCCAGGACCTCACAGAGACCACCATTGGCAGCACCCACCAGGACTGGGCCACATTT  660
138 P  V  Q  D  L  T  E  T  T  I  G  S  T  H  Q  D  W  A  T  F
GCTGTGGGTCCAGGGCACTGTCTGCAGCTGCGGAACAGAGCTGGGAGCCTGCTGGTACCT  720
158 A  V  G  P  G  H  C  L  Q  L  R  N  R  A  G  S  L  L  V  P
GCTTATGCCTACCGGAAGCTGCACCCTGTCCATAAACCTACCCCCTTTGCCTTCTGCTTC  780
178 A  Y  A  Y  R  K  L  H  P  V  H  K  P  T  P  F  A  F  C  F
ATCAGCCTTGACCACGGACACACGTGGGAACTAGGGAACTTTGTGTCTGAGAACTCACTG  840
198 I  S  L  D  H  G  H  T  W  E  L  G  N  F  V  S  E  N  S  L
GAGTGTCAGGTGGCTGAGGTTGGCACTGGTGCTCATAGGGTGGTATATCTCAATGCTAGG  900
218 E  C  Q  V  A  E  V  G  T  G  A  H  R  V  V  Y  L  N  A  R
AGCTTCATAGGAGCTAGAGTCCAGGCACAAAGTCCTAACGATGGCCTGGATTTCCAGGAC  960
238 S  F  I  G  A  R  V  Q  A  Q  S  P  N  D  G  L  D  F  Q  D
AACCAGGTAGTAAGTAAGCTTGTAGAGCCCCCCCACGGGTGTCATGGAAGTGTGGTCGCC 1020
258 N  Q  V  V  S  K  L  V  E  P  P  H  G  C  H  G  S  V  V  A
TTCCACAGCCCCACCTCTAAGCCAGATTGCCTTAGACATGTGGCTGCTTATACCCACCCT 1080
278 F  H  S  P  T  S  K  P  D  C  L  R  H  V  A  A  Y  T  H  P
ACGGACTCCAGGAATAGAACCAACCTGGGCGTGTACCTCAACCAGACGCCACTAGATCCC 1140
298 T  D  S  R  N  R  T  N  L  G  V  Y  L  N  Q  T  P  L  D  P
                  *                          *
ACAGCCTGGTCAGAGCCCACCCTGCTAGCCACGGGCACCTGTGCCTACTCAGACTTGCAG 1200
318 T  A  W  S  E  P  T  L  L  A  T  G  T  C  A  Y  S  D  L  Q
ATATGGGGCCTTGGCCCTGATGGGTCCCCACAGTTTGGGTGCCTGTACGAATCAGGTAAC 1260
338 I  W  G  L  G  P  D  G  S  P  Q  F  G  C  L  Y  E  S  G  N
TATGACGAGATCATTTTCCTCATGTTCACCCTGAAGCAAGCTTTTCCCACAGTACATGGT 1320
358 Y  D  E  I  I  F  L  M  F  T  L  K  Q  A  F  P  T  V  H  G
GCTCAGTGACCTCATTGCATGTGGCTTCCAAAGGGCTTCCTGTGCTTCAGAACACCCGTC 1380
378 A  Q
TCTCTTTCCTTCCAGCATCCTCTGGACTCTTGAATCCAGCTCTTGGGTCTGTTCCTTGGG 1440
AGTATACAGAGAGTTTGGTCTCTTGACTCTTAGCAAGTTTTGTTCTTTCAGCCTCCGAAA 1550
GTGGGTTCTATTTTCAGCCCAGAAATCAAAGGAGCCTGACTTTCCTCAGCCTGTATGTAT 1560
AAAGGCTGCCACTCTGCATGTTGGCTGTCACTATGTTAGCTTAACCTGCCTGTTTCCCCA 1620
TGCCTAGTTTTTGGATGAATATTAATAAATTAATTATCCTAAAAAAAAAAAAAAA
```

FIG. 4. **Nucleotide and deduced amino acid sequence of the rat cytosolic sialidase.** The predicted amino acid sequence is shown by the single letter amino acid code under the nucleotide sequence, and numbers are indicated on the *left*. The positions of the nine peptide sequences obtained by digestion of the purified sialidase are *underlined* with a *single solid line*. The Asp block sequences are *boxed*. The consensus polyadenylation signal is *underlined* with a *double line*. *Asterisks* indicate the possible sites for *N*-glycosylation.

structure. Searches for sequence homology of cytosolic sialidase in the GenBank nucleotide data base (release 72) and in the National Biomedical Research Foundation (release 33) revealed no significant similarities to other sequences.

Expression of Cytosolic Sialidase in E. coli—To demonstrate that the isolated cDNA clone encodes cytosolic sialidase, plasmids were constructed as described under "Experimental Procedures." The cloned gene was expressed by T7 promotor or as glutathione *S*-transferase fusion proteins as shown in Table III. Extracts of *E. coli* cells harboring pET3d-SD showed sialidase activity toward 4MU-Neu5Ac substrate while neither cells transformed with pET3d vector alone nor cells without plasmid possessed any sialidase activity. Induction by IPTG increased the activity 5–6-fold in the cells with pET3d-SD above that of cells without IPTG treatment. The sialidase activity was also found in *E. coli* cells after transformation with pGEX-2T-SD, the glutathione *S*-transferase fusion construct. A new protein band with a molecular mass of ~70 kDa appeared on SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of the transformed cell extracts, indicating the expression of glutathione *S*-transferase-sialidase fusion protein (data not shown). The sialidase activity level in the cells expressing the fusion protein was much lower than that in the pET3d-SD-

TABLE III

Expression of sialidase activity in E. coli

E. coli cells were transformed as described under "Experimental Procedures" with expression vectors, and the extracts were assayed for sialidase activity at pH 5.5 using 4MU-NeuAc as substrate.

E. coli	Plasmid	IPTG	Exp. I	Exp. II
			nmol/h/mg protein	
BL21	pET3d	−	0	0
		+	0	0
	pET3d-SD	−	321	784
		+	1958	4234
JM109	pGEX2T	−	0	0
		+	0	0
	pGEX2T-SD	−	39	52
		+	125	108

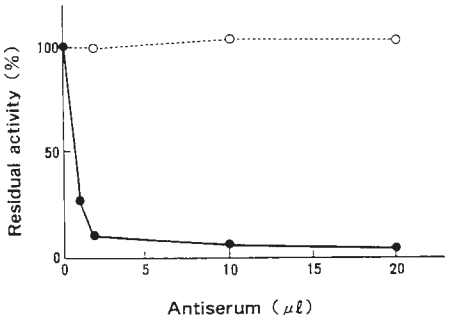


FIG. 5. **Immunoprecipitation of sialidase expressed in *E. coli* with antiserum against rat cytosolic sialidase.** Crude extracts of pET3d-SD-transformed cells with 20 units of sialidase activity were incubated at 37 °C for 30 min with the indicated volumes of antiserum (●) or control serum (○) prebound to protein A adsorbent. After centrifugation of the mixture, the resulting supernatant was assayed for sialidase activity with 4MU-Neu5Ac as substrate (5, 6).

transformed cells, due to the lower potency of the promotor in the former case and probably due to glutathione *S*-transferase fusion to the upstream region of the sialidase 5′-end because the purified glutathione *S*-transferase-sialidase fusion protein showed much less specific activity than the enzyme purified from skeletal muscle. Like the skeletal muscle sialidase, the enzyme expressed in *E. coli* showed an optimum pH of about 6.5 and could desialylate fetuin and gangliosides as well as 4MU-Neu5Ac. Further evidence for authenticity of the isolated cDNA clones was obtained by immunoprecipitation with antiserum specific to skeletal muscle sialidase. Fig. 5 illustrates that the sialidase from pET3d-SD-transformed cells was immunoprecipitated completely with the antiserum but not with control serum. Similar results were obtained with pGEX-2T-SD-transformed cells. These findings demonstrate that the isolated cDNA encodes a protein with sialidase activity.

DISCUSSION

In the present study a complete cDNA clone encoding cytosolic sialidase was constructed from two cDNAs isolated from a rat skeletal muscle λgt10 cDNA library and obtained by amplification of the cDNA 5′-end. This cDNA was shown to encode a structural gene for rat sialidase by (i) identification of nine peptide sequences from the purified enzyme in the deduced amino acid sequence, (ii) appearance of the sialidase activity when it was expressed in *E. coli*, and (iii) complete immunoprecipitation of the sialidase expressed in *E. coli* with antiserum specific to the purified sialidase.

The putative initiation codon, beginning at nucleotide 190, and its neighboring nucleotides are not in perfect context with the consensus sequence for translation initiation (32). However, the presence of an in-frame stop codon at nucleotides 25–27 supports the assignment of Met at 190–193 as the translation initiation codon. The absence of a purine in position −3 relative to the AUG may in particular be related to the fact that this sialidase is expressed at only a relatively low abundance. The fact that a long stretch of hydrophobic amino acid residues representing the transmembrane domain or targeting signal to some membranes was not found in the sequence is compatible with recovery mainly from the tissue cytosol. The presence of hydrophobic regions at amino acid residues 97–107, 190–200, and the carboxyl terminus suggests that they could serve as the membrane anchor domain since sialidase activity has been partially found in microsomes (3).

Information on the sequences of microbial sialidases has been accumulating, and detailed comparative sequence analysis of sialidases from *Salmonella*, *Clostridium*, *Bacteroides*, and *Trypanosoma cruzi* by Hoyer *et al.* (23) demonstrated similarities in the primary sequences, including codon usage, as well as the predicted secondary structure. The present rat sialidase was found to have less than a 20% amino acid identity by aligning the most conserved residues; 19, 17, and 17% identities were observed within 308, 195, and 157 amino acid residues near the amino termini of the sialidases of *Clostridium perfringens* (18), *Salmonella typhimurium* (23), and *T. cruzi* (24), respectively. The rat sialidase contains two Asp block sequences, whereas bacteria were described to possess four (18, 20) or five (21), and *T. cruzi* has two (24) or four (25). The distance of 62 amino acid residues between the two Asp blocks is comparable with the distance between Asp block II and III that is highly conserved in bacterial sialidases (26). A characteristic feature of the sequence from the rat sialidase is that the lysine residue in the second position of Asp block, which is always conserved in one of the blocks of microorganisms (24), is replaced by threonine or leucine. Other residues similar to the sequences often found in bacterial sialidases were also found to be present; 3 residues beginning at Arg-21 and 4 residues ending at Gly-162 were aligned with the respective similar residues in bacterial sialidases (22, 23), and, in addition, their distances from the first Asp block were close to those from block III in bacteria.

Although the similarity in partial sequence and structure indicates that the rat sialidase is a protein related to microbe sialidases, it is too early to conclude that it shares a common origin. Nevertheless, the present findings do provide support for a monophylogeny of sialidase with two open possibilities of how the microbe sialidase arose. Many of the bacteria expressing sialidase do not themselves synthesize sialic acids, but most are pathogenic for mammals. Therefore, their sialidases could be considered as an adaptation assisting their spread in host cells, which raises the intriguing possibility that the enzyme may have been acquired. In this case a mammalian sialidase could be the ancester of sialidases now expressed in pathogenic microbes. An alternative possibility is that both sialic acids and sialidase may have arisen early in evolution. Sialic acids were thought to be present limited to Echinodermata and higher vertebrates, but they have recently also been detected in an insect, *Drosophila melanogaster* (33), and in nonvertebrate-associated bacteria (34), supporting the hypothesis (23) that sialic acids evolved early but that most lineages lost this biosynthetic ability and only retain the catabolic enzyme. Whichever is correct, the rat cytosolic sialidase is likely a candidate as "the prototype enzyme" of mammalian sialidases, not only due to the presence of the Asp block sequence but also due to similarities in

catalytic properties to those of microbes.

Of the four types of rat sialidase, the cytosolic sialidase has been proven to possess the closest catalytic properties to those of microorganisms. Like bacterial and protozoan sialidases, it can hydrolyze oligosaccharides, glycoproteins, and gangliosides (3), irrespective of the structure of the non-sugar portion of substrate. In contrast, a prior fragmentation of glycoprotein substrate into glycopeptides is essential for hydrolysis by intralysosomal sialidase (2), and a ceramide moiety is required for preferential hydrolysis of gangliosides by the two membrane-associated sialidases (4). In common with microorganisms the cytosolic sialidase is inhibited most potently by reagents such as 2-deoxy 2,3-dehydro-*N*-acetylneuraminic acid and *N*-acetylneuraminic acid, and additionally by thiol-modifying 4-hydroxymercuribenzoate and heavy metal ions (35). From this viewpoint, the three other sialidases appear to be a more differentiated type. Sequence comparisons with other mammalian sialidases are necessary to elucidate the structural relationship. It is of particular interest to ascertain what structural basis exists for determination of substrate specificity and what causes differences in subcellular location of the four types of rat sialidase. There is an intriguing report by Potier *et al.* (36) that anti-prosaposin antibody reacts with human lysosomal sialidase and inhibits its activity. The rat sialidase cloned here showed no homology to mammalian prosaposin with regard to its primary sequence. The elucidation of its function is now in progress using the cloned cDNA as a probe.

Acknowledgments—We gratefully acknowledge Dr. Yasuhiro Hashimoto, The Tokyo Metropolitan Institute of Medical Science, and Dr. Yoichi Matsubara, School of Medicine, Tohoku University, for helpful advice regarding PCR. We would also like to thank F. Hayasaka for typing the manuscript.

REFERENCES

1. Schauer, R. (1985) *Trends Biochem. Sci.* **10,** 357–360
2. Miyagi, T., and Tsuiki, S. (1984) *Eur. J. Biochem.* **141,** 75–81
3. Miyagi, T., and Tsuiki, S. (1985) *J. Biol. Chem.* **260,** 6710–6716
4. Miyagi, T., Sagawa, J., Konno, K., Handa, S., and Tsuiki, S. (1990) *J. Biochem. (Tokyo)* **107,** 787–793
5. Miyagi, T., Sagawa, J., Konno, K., and Tsuiki, S. (1990) *J. Biochem. (Tokyo)* **107,** 794–798
6. Dairaku, K., Miyagi, T., Wakui, A., and Tsuiki, S. (1986) *Biochem. Int.* **13,** 741–748
7. Fields, S., Winet, G., and Brownlee, G. C. (1981) *Nature* **290,** 213–217
8. Hiti, A. L., and Nayak, D. P. (1982) *J. Virol.* **41,** 730–734
9. Markoff, L., and Lai, C.-J. (1982) *Virology* **119,** 288–297
10. Shaw, M. W., Lamb, R. A., Erickson, B. W., Briedis, D. J., and Choppin, P. W. (1982) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **79,** 6817–6821
11. Steuler, H., Rohde, W., and Scholtissek, C. (1984) *Virology* **135,** 118–124
12. Miura, N., Nakatani, Y., Ishiura, M., Uchida, T., and Okada, Y. (1985) *FEBS Lett.* **188,** 112–116
13. Dale, B., Brown, R., Miller, J., Tyler, R. T., Air, G. M., and Cordell, B. (1986) *Virology* **155,** 460–468
14. Air, G. M., Webster, R. G., Colman, P. M., and Laver, W. G. (1987) *Virology* **160,** 346–354
15. Jorgensen, E. D., Collins, P. L., and Lomedico, P. T. (1987) *Virology* **156,** 12–24
16. Harley, V. R., Ward, C. W., and Hudson, P. J. (1989) *Virology* **169,** 239–243
17. Air, G. M., Laver, W. G., Luo, M., Stray, S. J., Legrone, G., and Webster, R. G. (1990) *Virology* **177,** 578–587
18. Roggentin, P., Rothe, B., Lottspeich, F., and Schauer, R. (1988) *FEBS Lett.* **238,** 31–34
19. Vimr, E. R., Lawrisuk, L., Galen, J., and Kaper, J. B. (1988) *J. Bacteriol.* **170,** 1495–1504
20. Rothe, B., Roggentin, P., Frank, A., Blocker, H., and Schauer, R. (1989) *J. Gen. Microbiol.* **135,** 3087–3096
21. Russo, T. A., Thompson, J. S., Godoy, V. G., and Malamy, M. H. (1990) *J. Bacteriol.* **172,** 2594–2600
22. Rothe, B., Roggentin, P., and Schauer, R. (1991) *Mol. & Gen. Genet.* **226,** 190–197
23. Hoyer, L. L., Hamilton, A. C., Steenbergen, S. M., and Vimr, E. R. (1992) *Mol. Microbiol.* **6,** 873–884
24. Kahn, S., Colbert, T. G., Wallace, J. C., Hoagland, N. A., and Eisen, H. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **88,** 4481–4485
25. Pereira, M. E. A., Mejia, S., Ortega-Barria, E., Matzilevich, D., and Prioli, R. P. (1991) *J. Exp. Med.* **174,** 179–191
26. Roggentin, P., Rothe, B., Kaper, J. B., Galen, J., Lawrisuk, L., Vimr, E. R., and Schauer, R. (1989) *Glycoconjugate J.* **6,** 349–353
27. Kawasaki, H., Emori, Y., and Suzuki, K. (1990) *Anal. Biochem.* **191,** 332–336
28. Moreman, K. W. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **86,** 5276–5280
29. Frohman, M. A., Dush, M. K., and Martin, G. R. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **85,** 8998–9002
30. Sanger, F., Nicklab, S., and Coulson, A. R. (1977) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **74,** 5463–5467
31. Han, J. H., Stratowa, C., and Rutter, W. J. (1987) *Biochemistry* **26,** 1617–1625
32. Kozak, M. (1989) *J. Cell Biol.* **108,** 229–241
33. Roth, J., Kempf, A., Reuter, G., Schauer, R., and Gehring, W. J. (1992) *Science* **256,** 673–675
34. Krauss, J. H., Reuter, G., Schauer, R., Weckesser, J., and Mayer, H. (1988) *Arch. Microbiol.* **150,** 584–589
35. Miyagi, T., Hata, K., Hasegawa, A., and Aoyagi, T. (1993) *Glycoconjugate J.* **10,** 45–49
36. Potier, M., Lamontagne, S., Michaud, L., and Tranchemontagne, J. (1990) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **173,** 449–456

Glycoconjugate Journal (1993) **10**:45–49

Differential effect of various inhibitors on four types of rat sialidase

TAEKO MIYAGI[1]*, KEIKO HATA[1], AKIRA HASEGAWA[2] and TAKAAKI AOYAGI[3]

[1] *Division of Biochemistry, Research Institute, Miyagi Cancer Center, 47-1 Nodayama, Medeshima-Shiode, Natori-shi, Miyagi-ken, 981-12 Japan*

[2] *Department of Applied Bio-organic Chemistry, Gifu University, Gifu 501-11, Japan*

[3] *Institute of Microbial Chemistry, Kamiosaki, Shinagawa-ku, Tokyo 141, Japan*

Received 6 November 1992, revised 18 December 1992

The inhibitory effect of various compounds on the activities of four types of rat sialidase was investigated. 2-Deoxy-2,3-dehydro-*N*-acetylneuraminic acid and *N*-acetylneuraminic acid were competitive inhibitors for the sialidases. The former was effective against cytosolic sialidase and intralysosomal sialidase more than two membrane-associated sialidases I and II, the latter being a much weaker inhibitor. A heavy metal ion such as Cu^{2+} (1 mM) and thiol-modifying 4-hydroxymercuribenzoate (50 μM) caused complete inhibition of the activities of cytosolic sialidase and membrane sialidase I, while no decrease in the activities of intralysosomal sialidase and membrane sialidase II was observed. When 4-nitrophenyloxamic acid and siastatin B, inhibitors of bacterial sialidases, and synthetic thioglycoside GM3 analogue Neu5Acα-s-(2-6)Galβ(1-4)Glcβ(1-1) ceramide, an inhibitor of influenza virus sialidase, were tested, they did not affect any activity of the rat sialidases. By the differential effect of these inhibitors, the four types of rat sialidase could be discriminated from one another and furthermore from viral and bacterial sialidases.

Keywords: rat sialidase, sialidase inhibitor

Abbreviations: Neu5Ac, *N*-acetylneuraminic acid; Neu5Ac2en, 2-deoxy-2,3-dehydro-*N*-acetylneuraminic acid; 4MU-Neu5Ac, 4-methylumbelliferyl-α-*N*-acetyl-D-neuraminic acid.

Introduction

We have previously demonstrated that rat liver contains at least four types of sialidase differing in subcellular location and in catalytic and immunological properties. They are intralysosomal [1], cytosolic [2] and membrane-associated sialidases I and II [3, 4]. Membrane sialidase I is located mainly in the plasma membrane and membrane sialidase II in the lysosomal membrane. Rat brain also possesses the four types of sialidase which have been proved to be identical to the respective enzymes of rat liver in every aspect [3]. Intralysosomal sialidase shows narrow substrate specificity and only oligosaccharides, glycopeptides and a synthetic substrate, 4-methylumbelliferyl-*N*-acetylneuraminic acid (4MU-Neu5Ac) have been shown to be hydrolysed [1]. Sialidase found in the cytosol is also capable of desialylating glycoproteins and gangliosides at near neutral pH [2]. These two sialidases are distinct from membrane-associated sialidases in that the latter requires detergents for solubilization and hydrolyses gangliosides preferentially. Membrane sialidase I hydrolyses only gangliosides, whereas membrane sialidase II also acts on oligosaccharides, glycoproteins and 4MU-Neu5Ac [3]. Although the finding that these sialidases are distinct proteins suggests that each one plays a unique role depending on its unique subcellular location and substrate specificity, no evidence clarifying the physiological function of the sialidases can be offered at present.

Inhibitors for sialidases of different origin have been found to be useful tools in characterization of the enzymes and in elucidation of their biological functions. Of those inhibitors reported so far [5, 6], we employed seven compounds to test their influence on the four types of sialidase and whether they can be used to discriminate the different sialidase molecules. Here we report the results of comparative inhibition studies on *N*-acetylneuraminic acid (Neu5Ac) [7, 8], 2-deoxy-2,3-dehydro-*N*-acetylneuraminic acid (Neu5Ac2en) [8, 9], Cu^{2+} [10, 11], and 4-hydroxymercuribenzoate [11], on three synthetic compounds, 4-nitrophenyloxamic acid [8, 13], and a thioglycoside GM3 analogue Neu5Acα-s-(2-6)Galβ(1-4)Glcβ(1-1)ceramide [14], and on

* To whom correspondence should be addressed.

0282-0080 © 1993 Chapman & Hall

siastatin B [15], a compound from the culture filtrate of streptomyces.

Materials and methods

Substrate and inhibitors

4MU-Neu5Ac was purchased from Nakarai (Japan). Bovine mixed gangliosides, bovine colostrum sialyllactose and fetuin (type IV) were from Sigma (USA). GM3 was isolated from dog erythrocytes. GM3 labelled in the Neu5Ac moiety was synthesized from lactosylceramide (Sigma) and CMP-[^{14}C]Neu5Ac (New England Nuclear, USA) using the Golgi fraction of rat AH-109A ascites hepatoma as the source of GM3 synthase and diluted with nonradioactive GM3 to give a final radioactivity of 1000 counts min^{-1} $nmol^{-1}$. The procedure has been described in detail previously [16].

Neu5Ac and Neu5Ac2en were obtained from Sigma. 4-Nitrophenyloxaminic acid was a generous gift from Dr R. Schauer, Christian-Albrechts-Universität, Kiel, Germany. Thioglycoside GM3 analogue Neu5Acα-s-(2-6)Galβ(1-4)-Glcβ(1-1)ceramide was synthesized as described previously [17]. Siastatin B was purified from the culture filtrate of streptomyces [18]. 4-Hydroxymercuribenzoate was purchased from Sigma, and other thiol reagents were from Wako (Japan).

Sialidase preparations

Cytosolic sialidase was partially purified from rat liver or from rat skeletal muscle by the procedure described previously [2, 4] until the CM-cellulose step. Intralysosomal sialidase was prepared from rat liver as described previously [1]. The membrane sialidases I and II of rat brain were purified according to the procedures described previously [3] except that steps 5–7 were omitted. The membrane sialidase I was also prepared from the plasma membrane fractions isolated from rat liver as described [4].

Sialidase assay

The standard assay mixture contained 100–200 nmol (as bound sialic acid) of substrate, appropriate amount of inhibitor, 0.2 mg bovine serum albumin, 15 μmol sodium acetate, pH 5.5 or pH 4.5, and enzyme (7 to 10 units) in a final volume of 0.2 ml. The buffer of pH 5.5 was used for cytosolic sialidase and of pH 4.5 for the other three sialidases, unless stated otherwise. The substrates employed here were 4MU-Neu5Ac, fetuin and bovine mixed gangliosides for cytosolic sialidase, 4MU-Neu5Ac for intralysosomal sialidase and gangliosides for membrane sialidases I and II, respectively, since they were hydrolysed effectively by the respective enzymes [1–3]. With gangliosides as substrate, the assay mixture contained 0.1 mg sodium cholate for cytosolic sialidase and 0.1 mg Triton X-100 for membrane sialidases. After incubation at 37 °C for 1 h, the sialic acid released was determined by the thiobarbituric acid method of Warren [19], and 4-methylumbelliferone released using a spectrofluorometer [2].

When the inhibitory effect of Neu5Ac was tested with the ganglioside substrate, 10 nmol GM3 ^{14}C labelled in the Neu5Ac moiety was included as the substrate in a half volume of the reaction mixture for non-radioactive substrate. The mixture was incubated at 37 °C for 1 h, and the reaction was terminated by adding 1 ml 5% (*w/v*) trichloroacetic acid containing 1% (*w/v*) phosphotungstic acid. The sialic acid released was then determined as described previously [16]. One unit of sialidase was defined as the amount of enzyme which catalysed the release of 1 nmol sialic acid in 1 h.

Results and discussion

Five specific inhibitors of sialidase, Neu5Ac2en, Neu5Ac, 4-nitrophenyloxamic acid, siastatin B and a thioglycoside GM3 analogue Neu5Acα-s-(2-6)Galβ(1-4)Glcβ(1-1)-ceramide, were examined for inhibitory activity first by using cytosolic sialidase prepared from rat skeletal muscle or from rat liver. 4MU-Neu5Ac was used as substrate except when testing 4-nitrophenyloxamic acid, in which case sialyllactose was used, since this inhibitor has been reported to cause quenching with 4MU-Neu5Ac substrate [12]. Of the five inhibitors, only Neu5Ac and Neu5Ac2en were found to affect cytosolic sialidase. When heavy metal ions such as Cu^{2+} and Hg^{2+} and thiol-modifying 4-hydroxymercuribenzoate were tested, they caused a marked inhibition of cytosolic sialidase.

To determine if different substrates and pHs influence the inhibitory activities, the activity of cytosolic sialidase of skeletal muscle was measured at increasing concentration of inhibitors using 4MU-Neu5Ac, fetuin or gangliosides as substrate at pH 5.5 or pH 4.5 (Fig. 1). With ganglioside substrate, the inhibitory effect of Neu5Ac2en and Neu5Ac was less pronounced than with fetuin or 4MU-Neu5Ac. The lower effectiveness is not due to sodium cholate added in the assay with ganglioside substrate, since it did not alter even when sodium cholate was added to the reaction mixture with fetuin or 4MU-Neu5Ac substrate; but is probably due to their micellar structure, as suggested by the experiment showing the inhibitory activities measured with α(2-3) sialyllactose were higher than those with GM3, even though the former is just the sugar moiety of the latter. Unlike these inhibitors, Cu^{2+} and 4-hydroxymercuribenzoate affected similarly the sialidase activity assayed with every substrate. Shifting pH 5.5 to pH 4.5 in the reaction resulted in little change in the inhibitory activities as demonstrated with Neu5Ac2en and 4-hydroxymercuribenzoate (Fig. 1(a, b)). Replacing the detergent, sodium cholate, by TritonX-100 in the assay with ganglioside substrate had no influence on the inhibitory activities (data not shown). Cytosolic sialidase

Table 1. Comparative studies on inhibition of four types of rat sialidase by four compounds.

Inhibitors (mM)	*Substrate*	*Intralysosomal sialidase*	*Cytosolic sialidase*	*Membrane sialidase*	
				I	*II*
			Residual activity (%)		
Neu5Ac2en (0.1 mM)	4MU-Neu5Ac	47	2	–	65
	Gangliosides	–[a]	30	82	78
Neu5Ac (2 mM)	4MU-Neu5Ac	50	38	–	95
	Gangliosides	–	68	100	100
4-Hydroxymercuribenzoate (10 μM)	4MU-Neu5Ac	136	0	–	97
	Gangliosides	–	0	28	100
Cu^{2+} (0.5 mM)	4MU-Neu5Ac	100	0	–	ND[b]
	Gangliosides	–	0	45	100

[a] Due to the inability to hydrolyse the substrate by the sialidase indicated, the values were not determined.
[b] Not determined.

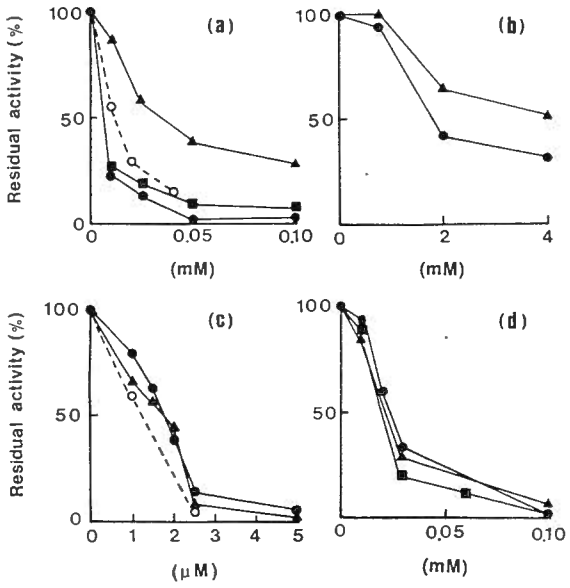


Figure 1. Inhibition of cytosolic sialidase by (a) Neu5Ac2en, (b) Neu5Ac, (c) 4-hydroxymercuribenzoate, and (d) $CuCl_2$ using ●, ○, 4MU-Neu5Ac, ■, fetuin or ▲, gangliosides as substrate. For ganglioside substrate, bovine mixed gangliosides were used in (a), (c) and (d), and [^{14}C]GM3 in (b). The assay was conducted mostly at pH 5.5 and exceptionally at pH 4.5 (○).

prepared from rat liver gave the same results as the muscle sialidase.

Under the appropriate conditions demonstrated above, the inhibitory effect of those compounds against the four types of sialidase was compared as shown in Table 1. Based on the substrate preference of these enzymes, the inhibition of the activities of cytosolic sialidase and membrane sialidase II was measured with the two substrates, 4MU-Neu5Ac and gangliosides, and intralysosomal sialidase and membrane sialidase I were assayed with 4MU-Neu5Ac and with gangliosides, respectively. Neu5Ac2en affected all four types of sialidase and inhibited cytosolic sialidase most effectively of the four sialidases. Neu5Ac was also active against cytosolic and intralysosomal sialidases at concentrations as high as 10^{-3} M, but inactive against the two membrane sialidases. The most potent inhibition by Cu^{2+} was observed with cytosolic sialidase and somewhat less with membrane sialidase I. However, no inhibition was obtained using the two lysosomal sialidases, viz., intralysosomal sialidase and membrane sialidase II. Hg^{2+} caused inhibition similar to that seen by Cu^{2+} (data not shown). Thiol-modifying reagents also affected sialidase activity. 4-Hydroxymercuribenzoate strongly inhibited the activities of cytosolic sialidase and membrane sialidase I, while the reagent was not an inhibitor for the two lysosomal sialidases; intralysosomal sialidase was slightly activated rather than inhibited by the reagent. *N*-Ethylmaleimide and 5,6'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid) were effective only at a much higher concentration (5 mM) than was used with 4-hydroxymercuribenzoate. The inhibition by either the thiol reagent or Cu^{2+} was reversed by subsequent addition of dithiothreitol (2 mM) or EDTA (5 mM), respectively. These results, together with the inhibition caused by heavy metal ions, suggest that free sulfhydryl groups are essential for the catalytic activities of cytosolic sialidase and membrane sialidase I. It should be noted that the results obtained with brain membrane sialidase I were essentially the same as those with the enzyme from liver plasma membrane, independent of tissue source of sialidase.

In contrast to the above compounds, 4-nitrophenyl oxamic acid, siastatin B and a thioglycoside GM3 analogue, Neu5Acα-s-(2-6)Galβ(1-4)Glcβ(1-1) ceramide were ineffective against any of the rat sialidases at the concentration shown. 4-Nitrophenyl oxamic acid (3 mM) exhibited no inhibitory activity, whereas the K_i value for *Vibrio cholerae*

Table 2. K_i values for Neu5Ac2en and Neu5Ac obtained with four types of rat sialidase.

Inhibitor	*Substrate*	*Intralysosomal sialidase*	*Cytosolic sialidase*	*Membrane sialidase*	
				I	*II*
			(M)		
Neu5Ac2en	4MU-Neu5Ac	3.0×10^{-5}	1.2×10^{-6}	–[a]	ND[b]
	GM3	–	3.3×10^{-5}	2.8×10^{-4}	2.3×10^{-4}
Neu5Ac	4MU-Neu5Ac	2.4×10^{-3}	1.3×10^{-3}	–	ND

[a] Due to the inability to hydrolyse the substrate by the sialidase indicated, the values were not determined.
[b] Not determined.

sialidase was described to be 0.58 mM [13]. At the concentration *Clostridium perfringens* sialidase was inhibited completely (100 and 500 μg/ml), siastatin B failed to inhibit the rat sialidases; the GM3 analogue had no significant effect on the sialidases even though a 20-fold higher concentration (0.3 mM) than the K_i value for influenza virus sialidase was tested.

To examine the mechanism of inhibition of Neu5Ac2en or Neu5Ac, cytosolic sialidase, which was found most sensitive to the inhibitors, was assayed with increasing concentrations of 4MU-Neu5Ac substrate in the presence or absence of the inhibitors. Figure 2 (a, b) shows that they were competitive inhibitors, as reported previously for bacterial and viral sialidases [8, 9, 13]. The K_i values for Neu5Ac2en and Neu5Ac were calculated from Dixon plots [20] as shown in Fig. 2 (c, d). The values obtained with the four types of sialidase were compared in Table 2. Marked differences were found in the values for Neu5Ac2en: the K_i for intralysosomal sialidase was about 20-fold higher than that for cytosolic sialidase with 4MU-Neu5Ac substrate, and those for two membrane sialidases were 10 times that of cytosolic enzyme when gangliosides were substrate. The K_m values were 0.11 mM for cytosolic sialidase and 0.17 mM for intralysosomal sialidase with 4MU-Neu5Ac, and the values with GM3 were 0.59 mM for cytosolic sialidase, 0.13 mM for membrane sialidase I and 0.022 mM for membrane sialidase II. These results indicate that under the appropriate assay conditions the sialidase specific inhibitors such as Neu5Ac and Neu5Ac2en can discriminate cytosolic and intralysosomal sialidases from the two membrane sialidases, and that heavy metal ions and thiol-modifying reagents, on the other hand, can discriminate between the non-lysosomal enzymes and the two lysosomal enzymes. Consequently, the four types of rat sialidase are distinguishable from one another by the use of two inhibitors, either Neu5Ac2en or Neu5Ac and Cu^{2+} or 4-hydroxymercuribenzoate. In comparison with sialidases of bacterial and viral origins, the degree of inhibition of cytosolic sialidase by Neu5Ac2en or Neu5Ac was comparable to those obtained with sialidases of non-animal origin: in previous

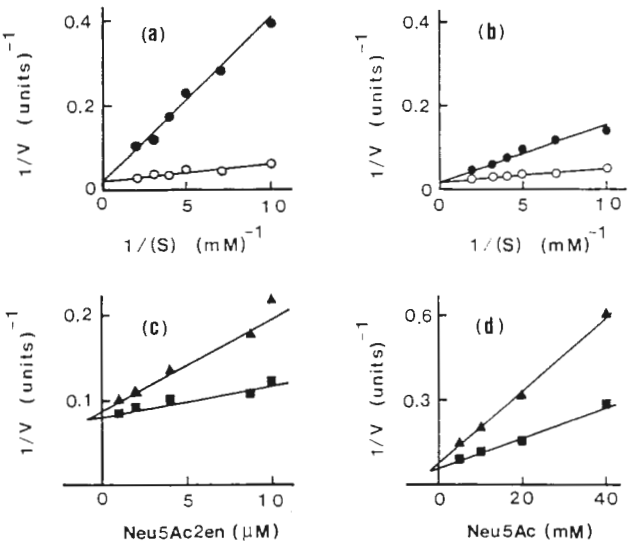


Figure 2. The effects of Neu5Ac2en and Neu5Ac on the hydrolysis of 4MU-Neu5Ac by cytosolic sialidase. The sialidase activity was assayed ○ in the absence, and ● in the presence, of (a) 0.04 mM Neu5Ac2en or (b) 10 mM Neu5Ac (b). Dixon plots were obtained from the data on the effects of (c) Neu5Ac2en and (d) Neu5Ac on the sialidase activity at the different concentrations of 4MU-Neu5Ac (▲, 0.15 mM; ■, 0.30 mM).

observations, K_i values were calculated as 4.88 mM for Neu5Ac with *Vibrio cholerae* sialidase [21] and 0.79 μM for Neu5Ac2en with influenza virus sialidase [9]. Cytosolic sialidase, however, was not affected by 4-nitrophenyloxamic acid, siastatin B and a GM3 thioanalogue as described above, which are potent inhibitors for bacterial and viral sialidases, indicating that the enzyme is clearly discriminated from the sialidases of bacterial and viral origins in the behaviour towards the inhibitors. In this connection, it is interesting to note that cytosolic sialidase appears to be closely related to a sialidase from *Trypanosoma brucei* which has been described to be inhibited by Neu5Ac2en and 4-hydroxymercuribenzoate but not by 4-nitrophenyl oxamic acid [12].

As expected from the previous studies on catalytic properties and antigenic specificity, the four types of sialidase were demonstrated to behave differently towards the inhibitors tested, presenting further evidence that the enzymes are distinct from one another. The results also support the idea that the structure of the active site may be different in these sialidases. The structures and functions of these enzymes remain to be elucidated.

Acknowledgements

We wish to express our gratitude to Dr Roland Schauer for providing 4-nitrophenyloxamic acid. We also thank Miss Fumie Hayasaka for her skillful assistance.

References

1. Miyagi T, Tsuiki S (1984) *Eur J Biochem* **141**:75–81.
2. Miyagi T, Tsuiki S (1985) *J Biol Chem* **260**:6710–16.
3. Miyagi T, Sagawa J, Konno K, Handa S, Tsuiki S (1990) *J Biochem (Tokyo)* **107**:787–93.
4. Miyagi T, Sagawa J, Konno K, Tsuiki S (1990) *J Biochem (Tokyo)* **107**:794–98.
5. Corfield AP, Michalski J.-C., Schauer R (1981) In *Sialidases and Sialidoses* (Tettamanti G, Durand P, Di Donato S, eds) pp 3–68. Milan: Editiones Ermes.
6. Corfield AP, Schauer R (1982) In *Sialic Acids, Cell Biol Monographs* 10 (Schauer R, ed.) pp 13–261. Vienna: Springer-Verlag.
7. Drzeniek R (1973) *Histochem J* **5**:271–90.
8. Veh RW, Schauer R (1978) *Adv Exp Med Biol* **101**:447–62.
9. Meindl P, Bodo G, Palease P, Schulman J, Tuppy H (1974) *Virology* **58**:457–67.
10. Tulsiani DRP, Carubelli R (1970) *J Biol Chem* **245**:1821–27.
11. Visser A, Emmelot P (1973) *J Membrane Biol* **14**:73–84.
12. Engstler M, Reuter G and Schauer R (1992) *Mol Biochem Parasitol* **54**:21–30.
13. Brossmer R, Keilich G, Ziegler D (1977) *Hoppe-Seylers Z Physiol Chem* **358**:391–96.
14. Suzuki Y, Sato K, Kiso M and Hasegawa A (1990) *Glycoconjugate J* 7:349–56.
15. Aoyagi T, Komiyama T, Nerome K, Takeuchi T, Umezawa H (1975) *Experientia* **31**:896–98.
16. Miyagi T, Tsuiki S (1986) *FEBS Lett* **206**:223–28.
17. Hasegawa A, Morita M, Ito Y, Ishida H, Kiso M (1990) *J Carbohydr Chem* **9**:369–92.
18. Umezawa H, Aoyagi T, Komiyama T, Morishima H, Takeuchi T (1974) *J Antibiotics* **27**:963–66.
19. Warren L (1959) *J Biol Chem* **234**:1971–75.
20. Dixon M (1953) *Biochem J* **55**:170–71.
21. Khorlin AY, Privalova IM, Zakstelskaya LY, Molibog EV (1970) *FEBS Lett* **8**:17–19.

Japanese Journal of
Endourology and ESWL
Vol. 6 No. 1 1993

REVIEW ARTICLES

Tissue Injuries During Extracorporeal Shock Wave Lithotripsy from the Standpoint of Basic Physics and Experimental Pathophysiology

MASA-AKI KUWAHARA

To elucidate the mechanism of shock wave injury to tissues or organs, the aspects of high pressure phenomena relating to material injury, e. g. cavitation, temperature, liquid jet, free radicals, liquid flow, a compression and tensile stress, were reviewed. Their relationship to cellular and tissue injuries induced by shock wave, and key factors for further refinement and improvement in the safety of extracorporeal shock wave lithotripsy were discussed.

Key words: Shock wave, Cavitation, Tissue injury, Mechanism, ESWL

Introduction

Extracorporeal shock wave lithotripsy (ESWL) was developed for the "destruction of renal calculi without direct contact"[1]. Since the first clinical application of the Dornier machine in 1980[2], its clinical effectiveness has been widely recognized, and it is now the preferred treatment for urinary stones.

The most characteristic feature of ESWL is that renal stones can be disintegrated without kidney injury. In fact, initial animal studies showed that the shock waves disintegrated the stone selectively with virtually no tissue injury, and the report of the United States Cooperative Study on ESWL using the Dornier apparatus in 1986[3] showed that complications from ESWL were infrequent (but not negligible). Nevertheless, in 1989 a two case-report of severe hemorrhage after ESWL[4] attracted attention, since it revealed that life threatening complications could develop after ESWL, and several animal experiments disclosed that the focused shock wave did induce a degree of tissue injury.

At present, more than fifteen types of modified ESWL machines are clinically available and each machine has advantages as well as disadvantages. To conduct ESWL safely and effectively, understanding the physical property of shock waves and the mechanism of tissue injury by focused shock waves is essential.

Physical Aspects of High Pressure Phenomenon

Presently available ESWL machines use various energy sources for shock wave generation, i. e. high voltage spark-gap, microexplosion, piezoelectric, and electromagnetic element. However, each machine has adopted the same principle to obtain the sufficiently high pressure required to disintegrate stones (usually ranging between 50-70 MPa), that is, the focusing of shock waves. Tissue injury is definitely related to the high pressure phenomena induced by shock wave focusing.

1. Cavitation phenomenon

When pressure in a liquid decreases below a certain amplitude, small bubbles appear even at room temperature. The subsequent motion of the bubbles (growth and collapse) produces on a microscopic scales drastic effects, i. e. the erosion of solid material and initiation of chemical reactions. These observable effects are characteristic of a physical phenomenon called cavitation. Cavitation bubbles appear when the liquid pressure decreases below the vapor pressure of a liquid, or when, the liquid is exposed to a very rapid change in pressure. Cavitation can be described as boiling at an ambient temperature.

There is an upper limit to the pressure decrease capable of generating cavitation. This limit is called the tensile strength of a liquid in a homogenous condition. The

Department of Urology, Tohoku University School of Medicine
Received 24 November 1992; accepted in final form 10 December 1992

tensile strength of a liquid is defined as the limiting negative pressure that the clusters of liquid molecules will rupture. In most liquids in which experiments are performed, and even in biological fluids like blood or urine, the pressures at which cavitation develops is far below this limiting value, because the liquids are inhomogenous and already contain numerous "nuclei" or "microbubbles" filled with a mixture of gas and vapor. When exposed to a negative pressure greater than the difference between the ambient pressure and the pressure inside the nuclei, the nuclei grow to relatively large bubbles.

After growing to a maximum, the bubble contracts as the rapidly accelerating bubble interface converts its potential energy to kinetic energy, and collapses to a very small size. After this, it rebounds to attain a second maximum, and this cyclic bubble motion repeats several times. Otherwise, it may fragment into a cluster of many small bubbles, depending upon the effects of boundary conditions on the bubbles. Even though the total energy associated with the collapse of a bubble is small, the convergence of a spherically collapsing bubble can result in an enormous energy density. The temperature and pressure can easily reach 10,000 K and 1,000 MPa, respectively[5].

In Rayleigh's classic 1917 paper[6] on collapsing bubbles, cavitation damage was thought to occur only during the bubble collapse. However, since the whole process of cavitation bubble growth and collapse usually occurs in a very short period, 10^{-6} to 10^{-3} sec, and since all of the interesting features have submicroscopic dimensions, it has been difficult to study the relationship between cavitation processes and objective damage. Recently, Chen and Israelachvili[7] studied the effects of shock waves in liquids of very high viscosities and demonstrated that high viscosity slowed the whole process of shock wave behavior. From their observations, they concluded that damage is more likely to occur during bubble formation than during the collapse of cavities. This concept is not generally accepted at present, but, may warrant further study to elucidate whether it applies to cavitation damage in water.

Historically, cavitation phenomena were mainly studied in underwater acoustics and hydraulic machinery. In the case of acoustic waves, the sound wave has a sinusoidal form in principle where positive and negative waves appear repeatedly in a specified frequency. A shock wave propagated at faster than the speed of sound in water, has a very steep positive pressure rise without repetition. It is thin, presumably not more than several molecules in diameter. However, a recent survey of the acoustic output of commercial extracorporeal shock wave lithotripters with various energy sources[8] indicated that each focused shock wave consisted of both positive and negative pressures of up to 114 MPa and 10 MPa, respectively. This clearly shows that the cavitation phenomenon inevitably occurs in the focal region of any ESWL machine.

2. High pressure and temperature

A computer simulation showing the response of a cavitation bubble to a single acoustic pressure pulse demonstrated that even with a modest negative pressure amplitude of 0.175 MPa, temperatures of the order of magnitude of 1,000 K can be obtained[9]. Another report stated that at a frequency of 1 MHz and a pressure amplitude of 0.6 MPa, a nucleus with an initial radius of 1 μm would expand 7.4 times while rising to a maximum pressure of 2,800 MPa and a maximum temperature of 10,000 K[10]. However, it should be noted that for this calculation, various assumptions were made and the results are subsequently valid only for the range of the parameters used.

Flint and Suslick[11] stated recently that most previous experimental attempts to measure cavitation temperatures proved unreliable for many reasons. They measured the temperature of cavitation by sonoluminescence spectra in silicon oil and reported that the effective cavitation temperature was 5,075 ±156 K[12]. Filipcxynski and Wojcik[13] determined temperature by solving the equation of thermal conductivity. The maximum temperature increase during lithotripsy was estimated to be less than 1°C when 3,000 of shock waves were applied at a repetitive rate of 1 or 2 Hz. They assumed that the temperature elevation in the patient's body would be less due to tissue attenuation and the cooling effect of blood perfusion, thus, they excluded the possibility of any hazardous effect caused by temperature elevation during ESWL. However, considering that the temperature increase induced by cavitation takes place in microseconds, the problem remains unsolved and needs further investigation.

3. Liquid jet

When a cavitation bubble collapses from intense shock loading, an enormously high energy density is released as mentioned above. Shock waves have been presume responsible for cavitation damage since the pioneering work on shock waves by Lord Rayleigh[6]. Recently, however, liquid jets (liquid microjets) were postulated as the principal mechanism of damage[5, 9].

Generally, when the interface of a collapsing bubble is unstable, any small disturbance near the bubble initiates bubble deformation. Accordingly, when the bubble decreases to minimum volume, the deformed side of the bubble plunges to the other side of the bubble forming a high speed liquid jet. In other words, the liquid jet is generated by an asymmetrically collapsing bubble. This condition is encountered in various situations, especially in bubbles adjacent to solid walls and/or in a pressure gradient[14]. The liquid jet is accelerated to extremely high speeds (100-200 m/sec), because most of the kinetic energy of the collapsing bubble interface is converted to form the liquid jet. The liquid jet penetrates not only the bubbles but also pierces the wall surface through direct impact.

The existence of the liquid jet phenomenon was confirmed by Naude and Ellis[15] with high speed photo-

graphic observations in the mid-60's. Demonstrable pictures were also taken by Benjamin and Ellis[16] in 1966. In these pictures, the jet penetrates the bubble from one side and leads to a funnel-shape protrusion on the other side of the bubble wall. Our recent investigation[17] revealed that, when bubbles 1-3 mm in diameter attached to a gelatin surface were exposed to a shock wave of 11 MPa, the liquid jets penetrated the gelatin approximately twice the depth of the initial bubble diameter. However, direct evidence showing this phenomenon in the living tissue has not yet been provided.

In ESWL, the number of shock wave exposures vary according to the size and hardness of the stone, usually from 300 shots in microexplosive ESWL and from 5,000 shots in piezoelectric ESWL. On each occasion the shock wave is applied repetitively. If the cavitation bubbles induced by the first shock wave remain for a relatively longer period and are exposed to the second shock wave, the primary bubble is collapsed by the second shock wave and generates a new shock wave. Furthermore, the second shock wave also induces asymmetrical bubble collapse. Therefore, in repetitive shock wave application, liquid jets may play a decisive role in tissue injury. The duration of a cavitation bubble has generally been considered to range in the order of milliseconds. However, a recent report indicated that cavitation bubbles remained in water for more than 500 msec[18]. Accordingly, the process described above can occur, especially when the rate of shock wave application exceeds 2 Hz.

4. Generation of free radicals

Inside a collapsing bubble, the pressure and temperature generated can induce homolytic cleavage of molecules and lead to the formation of free radicals. These radicals are thought to show the same biological effect as those induced by therapeutic radiation and may be related to tissue injury in ESWL.

Morgan et al.[19] studied free radical production of shock waves (Dornier Lithotripter) and compared it with that of ionizing irradiation using Fricke chemical dosimetry, the standard technique for measuring ionizing radiation. They showed that free radical production was significant and the reaction was dose dependent. However, when the biological effect was compared to that of cobalt-60 ionizing irradiation by clonogenic assay in Chinese hamster cells, the effect produced by shock waves was slight. Therefore, they suggested that the chemical effects produced by shock waves were either absent or attenuated in the cells, or were inherently less toxic than those produced by ionizing irradiation.

Suhr et al.[20] also investigated free radicals using suspended bladder carcinoma cells and demonstrated free radical production in a medium that the cells survived longer in the presence of exogenous scavengers (cysteamine or cystamine), than in controls without scavengers. However, they could not rule out effects from nonspecific inhibition of the scavengers. Recently, Smith et al.[21] reported that fewer free radicals were produced by a piezoelectric lithotripter (18,000 shots, EDAP LT01) than by the equivalent value of 250 rad gamma radiation which was significantly lower than the 1,140 rad produced by electrohydraulic shock waves (1,000 shots, Dornier HM3)[19]. They suggested that the mechanism of in vitro cytotoxicity differs between piezoelectric and electrohydraulic shock waves.

According to these investigations, free radicals are, more or less, induced by focused shock waves, but the biological effects seem to be too slight to cause tissue injury.

5. Liquid flow

When shock waves propagate in air, it also induces a flow velocity which races behind it. In this case, the flow is called a blast, and acts as a primary force in destroying materials. The flow velocity of the blast is enormous, because of the high degree of compressibility of air, but in water the liquid flow is much smaller, because of the limited compressibility of water. Nevertheless, as long as liquid flow exists behind the underwater shock wave, it may be a factor in tissue injury.

In experimental conditions, liquid flow was observed by an ultrasonic diagnostic system as a shifting hyperechoic region around the focal region[22]. Its moving speed, when measured by an ordinary videocamera, was about 30 mm/sec for the first 0.3 seconds. A recent numerical simulation[23], however, indicated that the maximum velocity of the liquid flow exceeded 30 m/sec, and its direction was not only parallel, but also perpendicular to the shock wave propagation. These flows, especially, in the radiating direction from the axis of shock wave propagation may induce a shear force and cause tissue injury.

6. Compression and tensile stress

Several reports[24, 25, 26] indicate that the fracture of the renal calculi was related to the compression and tensile stress induced by changes in the acoustic impedance encountered by the shock wave as it entered and left the stone. Since the acoustic impedance of the stone is greater than that of the surrounding biological liquid (urine, in most instances), the shock wave separates into two components, one penetrating the stone and the other being reflected when it encounters the stone (liquid-solid interface). The former component transmits through the stone with a high pressure front, and if the pressure exceeds the compression strength of the stone, the internal structure is broken. Similarly, when the shock wave leaves the stone, the shock wave again separates into two components. However, in this case, the reflecting shock wave within the stone changes its sign (negative pressure) because of the reverse interface (solid-liquid interface). If the internal structure of the stone does not have an uniform acoustic property, tensile stress will occur at each interface. The tensile stress plays a major role in breaking the stone because the tensile strength is generally less than the compression strength[27].

Compression and tensile stress may also participate in tissue injury when there are differences in acoustic

impedance, either in organs, or even in the cells composing the organ. The fact that each organ can be visualized and differentiated by an ultrasonic diagnostic system indicates that the acoustic impedance of each organ differs. However, the contribution of compression and tensile stress to tissue injury during shock wave exposure has not been clarified.

Evidence of Cavitation in ESWL Machines

The presence of significant amounts of violent cavitation in the focal region of ESWL machines has been confirmed by the following experiments: surface erosion of an artificial stone[28] or of photographic copyfilm[29], deformity of alminum foil[9, 22], color discharge from a pressure sensitive sheet[22] and sounds analysis in the focal region[28, 30]. Cavitation bubbles were visualized as a hyperechoic region by an ultrasound diagnostic system[22, 31], or directly observed by high-speed photographic techniques including conventional photography[32, 33, 34], shadowgraphy[32], or holography[34]. These reports are in line with evidence showing that the cavitation phenomena take place in the focal region using any ESWL machine and play a role not only in tissue injury, but also in stone disintegration.

In contrast to the studies of cavitation in water, no direct evidence of cavitation bubbles in living tissue or organs has been documented. Williams et al[35] tried to detect cavitational activity in the intact vascular systems of dogs using a resonant bubble detector, but their method was technically limited, making it impossible to prove, in an absolute sense, that arterial blood is or is not cavitated.

Kuwahara et al.[31] used a diagnostic ultrasound system to the in situ dog kidney and reported that a hyperechoic area appeared for 1-2 seconds in the kidney. Since the tissue injury observed in the excised kidney corresponded exactly to the hyperechoic area, they concluded that the hyperechoic area was an image of the cavitation bubbles, and that the cavitational activity was definitely related to tissue injury. This in situ experimental result together with many other supporting in vitro observations indicates that cavitation bubbles develop in the focal region of the living tissue or organ.

Cellular Injury Induced by Focused Shock Waves In Vitro

Chaussy et al.[24] investigated the effects of shock waves on full blood and mixed lymphocyte culture before the clinical application of ESWL. Plasma hemoglobin concentration (hemolysis) increased linearly in relation to the number of shock wave exposures, but neither systematic hemolysis or changes in the number of lymphocytes were noted. From this result, they concluded that there were no deleterious side effects of shock waves. However, subsequent reports indicating cytotoxic effects of shock waves have successively appeared, especially in tumor cells[36-47].

Recently, Smith et al.[21] compared the effects of piezoelectric and electrohydraulic shock waves on cell suspensions of Chinese hamster ovary. They reported that both machines exhibited dose-dependent cytotoxity. Interestingly, there was a discrepancy in the clonogenic survival curves, i.e. the curve of piezo-electric machine superimposed upon the curve for % intact cells, but that of the electrohydraulic machine had no such discrepancy. They attributed this difference to the grade of free redical formation in the two machines. The role of free radicals may be questionable as stated above, nevertheless, their report suggested that there are some differences in the property of shock waves generated by electrohydraulic compared to piezoelectric shock waves.

Differences in cellular effects of shock waves from various ESWL machines are generally attributable to at least two factors. One is related to variations in shock wave parameters such as unit energy, focal size, peak pressure, pressure rise time, extent of negative pressures, rate of application, etc. The other is concerned with various biological conditions of cells. As to the latter, Smits et al.[45] and Laudone et al.[40] pointed out that the results are determined by the experimental set-up including cell-lines or -types, cell concentration, form of cell condition (pellet or suspension), and the presence or absence of acoustic interfaces around the cells. Therefore, experimental conditions should be carefully considered in interpreting or comparing in vitro results.

Tissue Injury Induced by Focused Shock Waves in Animal Experiments

After the development of the ESWL machine, many animal experiments were conducted to investigate tissue injury, especially in the kidney. Among such works, Delius et al.[48-50] systematically studied the relationship between tissue injury and shock wave parameters, i.e. pressure, dose and shot rates. In their first work[48] the relationship between pressure amplitude and lung injury was examined. Since the lung was injured at a pressure of 10 MPa but not at 2 MPa, they concluded that the biological effects of shock waves was pressure dependent. In their second work[49], the effect of shock waves on dog kidneys was examined in three groups of dogs whose kidneys were exposed to 500, 1,500 or 3,000 shock waves at 80-100 MPa. The shock waves caused hemorrhages in all kidney structures and the pathological changes were dose-dependent. The third work[50] dealt with the rate of shock wave administration. Dog kidneys were examined in two groups. In one group, the kidneys were exposed to a total of 3,000 shock waves at the usual clinical shot rate (almost same as a heart rate), and in group 2, the kidneys were exposed to the same shot number at a rate of 100 or 1 shot per second. Since pathological changes were most severe at a shot rate of 100 Hz, they concluded that kidney injury was rate-dependent. They confirmed the rate-dependency in an additional experiment[51].

Shock wave pressure- and dose-dependency of the tissue injury are understandable and well in accord with

other reports. Rate-dependency also seems reasonable considering interaction of shock waves and cavitation bubbles. However, there is a discrepancy in the rate-dependency compared to our in vitro experimental result. In our in vitro experiments, the pressure in the focal region decreased and the stone was less disintegrated when the rate of shock wave administration increased[52]. This low effectiveness of shock waves at a high shot rate seems to be attributable to the life-span of bubbles which interfere in shock wave propagation, and, subsequently, in the efficiency of shock wave focusing. The latter factors are likely to modulate the interaction between shock waves and cavitation bubbles. Our animal experiment performed with a piezoelectric shock wave generater equipped with ultrasound localization could not show a clear-cut difference in tissue injury between low and the high shot rates of shock wave exposure (unpublished data). One problem in the reports of Delius et al. may be the exact way the kidney was targeted during shock wave exposure. In their experiments, the kidney was targeted intermittently by two-dimensional X-ray. In this method, targeting of the kidney was less precise than that continuous using the ultrasound diagnostic system. Moreover, kidney movement during the animal's breathing was not controlled and the size of the focal region of their shock wave generator (Dornier HM 2) was much larger than that of the piezoelectric machine[53]. Therefore, the possibility that the results merely reflect the increased number of hit-shocks at a high shot rate than at a low shot rate cannot be ruled out. For example, when shock waves are applied at 100 Hz for 1 sec. to the moving kidney, 100% of the shots may hit the kidney, but when it is applied at 1 Hz for 1 sec., the second shot, even the first shot, may miss the kidney.

Almost all pathologycal reports on kidney injury agree that hemorrhage occurs in the acute stage and fibrosis in the chronic stage[54-59]. Ioritani et al.[52] studied the relationship between the parameters (shot number and pressure) of piezoelectric shock waves and the grade of tissue injury in the dog kidney. Tissue injury was evaluated by either the area of macroscopic hematoma or the area of microscopic extravasation of radio-contrast material in microangiography. Hematoma rarely developed at lower pressures (less than 50 MPa), but at higher pressures the number of shots necessary for hematoma formation decreased in proportion to the increase in pressure. Extravasation showed a similar tendency to the hematoma, though the border line between its presence and absence was not as clear as in hematoma. It is noteworthy, however, that extravasation first appeared at lower pressure (20 MPa with 50 shots) compared to hematoma. Additionally, they showed that the model stones were disintegrated at pressures higher (more than 70 MPa) than those causing tissue injury. This result suggests there is no safe range of shock waves where stones are destroyed and renal tissue is protected. Therefore, in order to conduct ESWL more safely, it may be necessary to do something other than change the parameters of shock waves. This problem will be discussed in a later section 7.

Tissue Injury in Clinical Cases

Morphological changes in the kidney after ESWL treatment were first systematically observed by Kaude et al[60] by excretory urography, quantitative radionuclide renography, and magnetic resonance imaging (MRI). MRI disclosed the following abnormalities in 63% of treated kidneys: loss of corticomedullary differentiation, perirenal fluid, subcapsular hematoma, hemorrhage of renal cyst, and unexplained abnormalities. Their results indicate that morphological changes can be detected more precisely and more frequently by MRI than by the conventional X-ray method, e. g. they reported subcapsular hematoma in 27% of patients as compared to 0.6% in a previous report[61]. Lingeman et al.[62] in reviewing the clinical side effects of ESWL observed that one or more forms of morphological renal trauma occurred in 63-85% of all ESWL patients. It can reasonably be assumed that pathological changes would be detected in a biopsy specimen of each kidneys.

From the clinical standpoint, whether those tissue injuries cause significant complications is important. Short-term and mid-term follow-up studies of urinary enzymes as a marker of renal parenchymal damage have shown that the enzyme elevated transiently for several days after ESWL, but generally returned to the normal range after 7-28 days[63-65]. In a recent long-term follow-up study of renal function[66], there were no significant changes in renal function.

These follow-up studies indicated that renal tissue injuries due to shock waves were usually reversible. However, fibrosis or scarring is generally considered an irreversible function-dropout in the kidney. In such cases, the function-loss may be masked by other functioning parts of the kidney. Because of this, ESWL can be performed in general without affecting renal function. This concept is supported by the fact that the deteriorated renal function becomes manifest after ESWL in patients whose renal function was already impaired (serum creatinin > 3 mg/dl), rather than in patients with normal or mild renal insufficiency (serum creatinin < 3 mg/dl)[67].

Prevention of Tissue Injury During ESWL

Morphological and/or functional abnormalities after ESWL seem to be dependent on the total shock wave energy (number and pressure of shock waves). Clinically, a larger and harder stone requires more energy for pulverization. In consideration of the inverse correlation between stone disintegration and tissue protection, a dilemma exists, i. e. an increase in the total energy is needed for such stones while a decrease is required to protect the tissue.

As described in the previous section 5, renal tissue injury is likely to occur at a pressure lower than that needed to disintegrate the calculi. If this result is appli-

cable to clinical ESWL, the kidney tissue is inevitably injured when shock waves are erroneously focused on it. This condition probably occurs using each type ESWL machine, because the kidney moves during breathing[68, 69]. Therefore, continuous targeting of the stone is extremely important in protecting the kidney.

To target the stone more accurately, many recently developed machines have adopted an ultrasound localization system[53]. The physical property of ultrasound can be used to selectively target the stone. That is application of reflected sound. Ryan et al.[70] observed that characteristic sounds were audible when shock waves struck the calculus, and this acoustic signal could be identified and applied to a real-time sound detector. Kuwahara et al.[71, 72] applied this concept using an anti-miss-shot control device and installed the device on a new-type piezoelectric ESWL machine. Its effectiveness in animal experiments has been encouraging.

Conclusion

Numerous studies have documented some degree of tissue injury using every type of ESWL equipment. The mechanism of tissue injury cannot be understood without a basic understanding of high pressure phenomena. This knowledge is also necessary in performing ESWL safely, and for improving the technique. However, the basic problem of enhancing stone fragmentation while minimizing tissue injury has not yet be answered.

Acknowledgment

Author thanks to Prof. K. Takayama, Institute of Fluid Science, Tohoku University, and Prof. S. Orikasa, Department of Urology Tohoku University, for their advice in preparing this manuscript. This work was supported by a grant from The Ministry of Education, Science and Culture, Japan (Grant-in-Aid for Scientific Research B 2, No. 03454382 and Grant-in-Aid for Scientific Research on Priority Area, No. 04222102).

References

1) Chaussy, Ch., Eisenberger, F., Wanner, K., et al.: The use of shock waves for the destruction of renal calculi without direct contact. Urol. Res., 4 : 181, 1976.
2) Chaussy, Ch., Brendel, W. and Schmiedt, E.: Extracorporeally induced destruction of kidney stones by shock waves. Lancet, 2 : 1265-1268, 1980.
3) Drach, G.W., Dretler, S., Fair, W., et al.: Report of the United States cooperative study of extracorporeal shock wave lithotripsy. J. Urol., 135 : 1127-1133, 1986.
4) Stoller, M.L., Litt, L. and Salazar, R.G.: Severe hemorrhage after extracoroporeal shock-wave lithotripsy. Ann. Int. Med., 111 : 612-613, 1989.
5) Crum, L.A.: Cavitation microjets as a contributory mechanism for renal calculi disintegration in ESWL. J. Urol., 140 : 1587-1590, 1988.
6) Rayleigh, Lord.: On the pressure development in a liquid during collapse of a spherical cavity. Phil. Mag., 34 : 94-98, 1917.
7) Chen, Y.L. and Israelachvili, J.: New mechanism of cavitation damage. Science, 252 : 1157-1160, 1991.
8) Coleman, A.J. and Saunders, J.E.: A survey of the acoustic output of commercial extracorporeal shock wave lithotripters. Ultrasound Med. Biol., 15 : 213-227, 1989.
9) Coleman, A.J., Saunders, J.E., Crum, L.A. et al.: Acoustic cavitation generated by an extracorporeal shockwave lithotripter. Ultrasound Med. Biol., 13 : 69-76, 1987.
10) Flynn, H.G.: Generation of transient cavities in liquid by microsecond pulses of ultrasound. J. Acous. Soc. Am., 72 : 1926-1932, 1982.
11) Flint, E.B. and Suslick, K.S. Sonoluminescence from alkalimetal solutions. J. Phys. Chem., 95 : 1484-1488, 1991.
12) Flint, E.B. and Suslick, K.S.: The temperature of cavitation. Science, 253 : 1397-1399, 1991.
13) Filipczynski, L. and Wojcik, J.: Estimation of transient temperature elevation in lithotripsy and in ultrasonography. Ultrasound Med. Biol., 17 : 715-721, 1991.
14) Lauterborn, W. and Hentschel, W.: Cavitation bubble dymanics studied by high speed photography and holography: part one. Ultrasonics: November 260-268, 1985.
15) Naude, C.F. and Ellis, A.T.: On the mechanism of cavitation damage by nonhemispherical cavities collapsing in contact with a solid boundary. Trans. Am. Soc. Mech. Engrs. Series D, J. Basic Eng. 83 : 648-656, 1961.
16) Benjamin, T.B. and Ellis, A.T.: The collapse of cavitation bubbles and the pressure thereby produced against solid boundaries. Phil. Trans. Roy. Soc. (London), Series A, 260 : 221-240, 1966.
17) Lush, P.A., Tomita, Y., Onodera, O., et al.: Air bubble-shock wave interaction adjacent to gelatin surface. AIP Conf. Proc., 208 : 831-835, 1990.
18) Kuwahara, M., Ioritani, N., Kambe, K., et al.: Acoustic cavitation bubbles in the kidney induced by focused shock waves in extracorporeal shock wave lithotripsy (ESWL). AIP Conf. Proc., 208 : 173-178, 1990.
19) Morgan, T.R., Laudone, V.P., Heston, W.D.W., et al.: Free radical production by high energy shock waves-comparison with ionizing irradiation. J. Urol., 139 : 186-189, 1988.
20) Suhr, D., Bruemmer, F. and Huelser, D.F.: Cavitation-generated free radicals during shock wave exposure: investigations with cell-free solutions and suspended cells. Ultrasound Med. Biol., 17 : 761-768, 1991.
21) Smith, F.L., Carper, S.W., Hall, J.S., et al.: Cellular effects of piezoelectric versus electrohydaulic high energy shock waves. J. Urol., 147 : 491-495, 1992.
22) Kuwahara, M., Ioritani, N., Saito, T., et al.: Effects

of focused shock waves on the biological tissues: cavitation in the prefocal region and the fluid flow in the focal region. In: Shock Waves, Proc., Sendai, Japan 1991/Vol.II, Berline, Heidelberg, New York, London, Paris, Tokyo, Hong Kong, Barcelona, Budapest, Springer-Verlag, pp. 41-48, 1992.

23) Obara, T.: Basical research of shock wave focusing for medical application. Doctoral thesis, Postgraduated School, Tohoku University, chap.3, pp. 50-60, 1992.
24) Chaussy, Ch., Schmiedt, E., Jocham, D., et al.: Extracorporeal shock wave lithotripsy. Basel, München, Paris, New York: Karger, pp.8-36, 1982.
25) Kambe, K., Kuwahara, M., Orikasa, S. et al.: Mechanism of fragmentation of urinary stones by underwater shock wave. Urol. Inter., 43 : 275-281, 1988.
26) Whelan, J.P. and Finlayson, B.: An experimental model for the systematic investigation of stone fracture by extracorporeal shock wave lithotripsy. J. Urol., 140 : 395-400, 1988.
27) Kaneko, H., Watanabe, H., Takahashi, T. et al.: Studies on the application of microexplosion to medicine and biology. IV. Strengrh of wet and dry urinary calculi. Jpn. J. Urol., 70 : 61-66, 1979.
28) Holmer, N.G., Almquist, L.O., Hertz, T.G., et al.: On the mechanism of kidney stone disintegration by acoustic shock waves. Ultrasound Med. Biol., 17 : 479-489, 1991.
29) Geise, R.A., Hobbie, R.K., Lee, T.S., et al.: Erosion of thin films by shock waves from an extracorporeal lithotripter. J. Lithotripsy Stone Dis., 2 : 289-297, 1990.
30) Olson, L., Almquist, L.O., Grennberg, A. et al.: Analysis and classification of secondary sounds from the disintegration of kidney stones with acoustic shock waves. Ultrasound Med. Biol., 17 : 491-495, 1991.
31) Kuwahara, M., Ioritani, N., Kambe, K., et al.: Hyperechoic region induced by focused shock waves in vitro and in vivo: possibility of acoustic cavitation bubbles. J. Lithotrpsy Stone Dis., 1 : 282-288, 1989.
32) Fisher, N., Muller, H.M., Gulhan, A., et al.: Cavitation effects: possible cause of tissue injury during extracorporeal shock wave lithotripsy. J. Endourol., 2 : 215-220, 1988.
33) Sass, W., Baeunlich, M., Dreyer, H.P., et al.: The mechanisms of stone disintegration by shock waves. Ultrasound Med. Biol., 17 : 239-243, 1991.
34) Kuwahara, M. and Takayama, K.: Extracorporeal microexplosive lithotripter. State of art-extracorporeal shock wave lithotripsy. Mount Kisco, New York: Futura Pub. Comp., pp. 111-145, 1987.
35) Williams, A.R., Delius, M., Miller, D.L., et al.: Investigation of cavitation in flowing media by lithotripter shock waves both in vitro and in vivo. Ultrasound Med. Biol., 15 : 53-60, 1989.
36) Russo, P., Stephenson, R.A., Mies, C., et al.: High energy shock waves suppress tumor growth in vitro and in vivo. J. Urol., 135 : 626-628, 1986.
37) Russo, P., Mies, C., Huryk, R., et al.: Histopathologic and ultrastructural correlates of tumor growth suppression by high energy shock waves. J. Urol., 137 : 338-341, 1987.
38) Randazzo, R.F., Chaussy, C.G., Fuchs, G.J., et al.: The in vitro and in vivo effects of extracorporeal shock waves on malignant cells. Urol. Res., 16 : 419-426, 1988.
39) Oosterhof, G.O.N., Smits, G.A.H.J., Ruyter, A.E., et al.: The in vitro effects of electromagnetically generated shock waves (Lithostar) on the Dunning R3327 PAT-2 rat prostatic cencer cell-line. Urol. Res., 17 : 13-19, 1989.
40) Laudone, V.P., Morgan, T.R., Huryk, R.F., et al.: Cytotoxicity of high energy shock waves: methodologic considerations. J. Urol., 141 : 965-968, 1989.
41) Dongen, J.W., Steenbrugge, G.J., Romijn, J.C., et al.: The cytocidal effect of high energy shock waves on human prostatic tumour cell lines. Eur. J. Cancer Clin. Oncol., 25 : 1173-1179, 1989.
42) Berens, M.E., Welander, C.E., Griffin, A.S., et al.: Effect of acoustic shock waves on clonogenic growth and drug sensitivity of human tumor cells in vitro. J. Urol., 142 : 1090-1094, 1989.
43) Oosterhof, G.O.N., Smits, G.A.H.J., Ruyter, A.E., et al.: In vivo effects of high energy shock waves on urological tumours: an evaluation of treatment modalities. J. Urol., 144 : 785-789, 1990.
44) Kohri, K., Uemura, T., Iguchi, M., et al.: Effect of high energy shock waves on tumor cells. Urol. Res., 18 : 101-105, 1990.
45) Smits, G.A.H.J., Oosterhof, G.O.N., Ruyter, A.E., et al.: Cytotoxic effects of high energy shock waves in different in vitro models: Influence of the experimental set-up. J. Urol., 145 : 171-175, 1991.
46) Debus, J., Peschke, P., Hahn, E.W., et al.: Treatment of the Dunning prostate rat tumor R3327-AT1 with pulsed high energy ultrasound shock waves (PHEUS): growth delay and histomorphologic changes. J. Urol., 146 : 1143-1146, 1991.
47) Kaver, I., Koontz, W.W., Wilson, J.D., et al.: Effects of lithotriper-generated high energy shock waves on mammalian cells in vitro. J. Urol., 147 : 215-219, 1992.
48) Delius, M., Enders, G., Heine, G., et al.: Biological effects of shock waves: lung hemorrhage by shock waves in dogs-pressure dependence. Ultrasound Med. Biol., 13 : 61-67, 1987.
49) Deilus, M., Enders, G., Xuan, Z., et al.: Bilogical efects of shock waves: kidney damage by shock waves in dogs-dose dependence. Ultrasound Med. Biol., 14 : 117-122, 1988.
50) Delius, M., Jordan, M., Eizenhoefer, H., et al.: Biological effects of shock waves: kidney haemorrhage by shock waves in dogs-administration rate depencence. Ultrasound Med. Biol., 14 : 689-694, 1988.
51) Delius, M., Mueller, W., Goetz, A., et al.: Biological

effects of shock waves: kidney hemorrhage in dogs at a fast shock wave administration rate of fifteen herz. J. Lithotripsy Stone Dis., 2 : 103-110, 1990.
52) Ioritani, N., Kuwahara, M., Kambe, K., et al.: Renal tissue damage induced by focused shock waves. AIP Conf. Proc., 208 : 185-190, 1990.
53) Higashihara, E., Kuwahara, M. and Baba, S.: Comparison of various extracorporeal shockwave lithotripters. Jpn. J. Endourol. ESWL., 3 : 11-13, 1990.
54) Abrahams, C., Lipson, S. and Ross, L.: Pathologic changes in the kidneys and other organs of dogs undergoing extracorporeal shock wave lithotripsy with a tubless lithotripter. J. Urol., 140 : 391-394, 1988.
55) Jaeger, P., Redha, F., Uhlschmid, G., et al.: Morphologic changes in canine kidneys following extracorporeal shock wave treatment. J. Endourol., 2 : 205-213, 1988.
56) Jaeger, P., Redha, F., Uhlschmid, G., et al.: Morphological changes in canine kidneys following extracorporeal shock wave treatment. Urol. Res., 16 : 161-166, 1988.
57) Gunasekaran, S., Donovan, J.M., Chvapil, M., et al.: Effects of extracorporeal shock wave lithotripsy on the structure and function of rabbit kidney. J. Urol., 141 : 1250-1254, 1989.
58) Hill, D.E., McDougal, W.S., Stephens, H., et al.: Physiologic and pathologic alterations associated with ultrasonically generated shock waves. J. Urol., 144 : 1531-1534, 1990.
59) Weber, C., Moran, M.E., Braun, E.J., et al.: Injury of rats renal vessels following extracorporeal shock wave treatment. J. Urol., 147 : 476-481, 1991.
60) Kaude, J.V., Williams, C.M., Millner, M.R., et al.: Renal morphology and function immediately after extracorporeal shock-wave lithotripsy. AJR., 145 : 305-313, 1985.
61) Chaussy, C. and Schmiedt, E.: Extracorporeal shock wave lithotripsy (ESWL) for kidney stones. An alternative to surgery? Urol. Radiol., 6 : 80-87, 1984.
62) Lingeman, J.E., McAteer, J.A., Kempson, S.A., et al.: Bioeffects of extracorporeal shock wave lithotripsy. J. Endourol., 1 : 89-98, 1987.
63) Assimos, D.G., Boyce, W.H., Furr, E.G., et al.: Selective elevation of urinary enzyme levels after extracorporeal shock wave lithotripsy. J. Urol., 142 : 687-690, 1989.
64) Karlin, G.S., Schulsinger, D., Urivetsky, M., et al.: Absence of persisting parenchymal damage after extracorporeal shock wave lithotripsy as judged by excretion of renal tubular enzymes. J. Urol., 144 : 13-14, 1990.
65) Recker, F., Hofmann, W., Bex, A., et al.: Quantitative determination of urinary marker proteins: a model to detect intrarenal bioeffects after extracorporeal lithotripsy. J. Urol., 148 : 1000-1006, 1992.
66) Zanetti, G.R., Montanari, E., Guarneri, A., et al.: Long-term followup after extracorporeal shock wave lithotripsy treatment of kidney stones in solitary kidney. J. Urol., 148 : 1011-1014, 1992.
67) Chandhoke, P.S., Albala, D.M. and Clayman, R.V.: Long-term comparison of renal function in patients with solitary kidneys and/or moderate renal insufficiency undergoing ESWL or percutaneous nephrolithotomy. J. Urol., 145 : 323A, 1991.
68) Kuwahara, M., Ioritani, N., Kambe, K., et al.: A new overhead-type extracorporeal shock wave lithotripter with an anti-miss-shot control device: study on kidney movement and reflected acoustic signals from stones. Jpn. J. Endourol. ESWL, 3 : 171-178, 1990.
69) Ioritani, N., Orikasa, S., Kuwahara, M., et al.: The correct targeting rate in ESWL treatment measured by an anti-miss-shot control device. Jpn. J. Endourol. ESWL, 3 : 179-186, 1990.
70) Ryan, P.C., Rice, H., Young, P., et al.: Acoustic signal analysis: a new aid for detection and monitoring of calculi during piezo-electric lithotripsy (EDAP LT1. 01). J. Urol., 141 : 339A, 1989.
71) Kuwahara, M., Ioritani, N., Kabme, K. et al.: Anitimiss-shot control device for selective stone disintegration in extracorporeal shock wave lithotripsy. Shock Waves, 1 : 145-148, 1991.
72) Kuwahara, M., Kambe, K., Taguchi, K., et al.: Initial experience using a new type extracorporeal lithotripter with an anti-miss-shot control device. J. Lithotripsy Stone Dis., 3 : 141-146, 1991.

Application of holographic interferometric studies of underwater shock wave focusing to medicine

K. Takayama[1], H. Nagoya[1], T. Obara[2] and M. Kuwahara[3]

[1] Shock Wave Research Center, Institute of Fluid Science, Tohoku University, 2-1-1 Katahira, Aoba, Sendai, JAPAN

[2] Department of Mechanical Engineering, Saitama University, Urawa, JAPAN

[3] School of Medicine, Tohoku University, 1-1 Seiryo, Aoba, Sendai, JAPAN

ABSTRACT

Holographic interferometric flow visualization was successfully applied to underwater shock wave focusing and its application to extracorporeal shock wave lithotripsy (ESWL). Real time diffuse holograms revealed the shock wave focusing process in an ellipsoidal reflector made from PMMA and double exposure holographic interferometry also clarified quantitatively the shock focusing process. Disintegration of urinary tract stones and gallbladder stones was observed by high speed photogrammetry. Tissue damage associated with the ESWL treatment was discussed in some detail.

1. INTRODUCTION

Underwater shock wave focusing has been successfully applied to a non-invasive disintegration of human caliculi, which is called extracorporeal shock wave lithotripsy (ESWL) by Chaussy (1983)[1]. Remarkable results of its clinical success all over the world have been reported by Kandell (1992)[2]. Recently, by usage of controlled tissue damage which inevitably occurs during ESWL treatments, an attempt is made of destroying cancer cells by means of ultra-sound wave focusing (Kuwahara 1992)[3].

In the Shock Wave research Center, Institute of Fluid Science Tohoku University, a fundamental research has been carried out under close collaboration with the School of Medicine of Tohoku University. As energy sources, microexplosives of silver azide pellets or lead azide pellets were used. As a part of basic research holographic interferometry has been intensively used in order to visualize underwater shock wave propagation, reflection and focusing. The underwater shock wave was generated at one focal point inside a semi-ellipsoidal cavity and focused at the second focal point outside the cavity.

The process of shock wave focusing and disintegration of human calculi in vitro were also visualized by high speed photogrammetry. Subsequent tissue damage was, by high speed photogrammetry, investigated in a simulation experiment in which an air bubble was placed on a gelatine layer and a shock was loaded on it. It was found that upon the shock loading the bubble contracted and pierced into the gelatine layer. This implies that the ESWL treatment effectively disintegrated and removed human calculi but always followed by tissue damage.

2. HIGH PRESSURE GENERATION

Figure 1 is an image hologram taken immediately after shock focusing. A 10 mg lead azide pellet was used as energy source. At the first focal point, the gas bubble produced by the detonation can be seen as a dark shadow. However, high pressure causes an outward motion of the walls which induces cavitation bubble clouds as shown by many dark spots on the

0-8194-0999-5/93/$4.00

hologram. The cavitation bubbles collapsed to generate micro shock waves which appeared to be small ring shapes on the hologram.

A transparent ellipsoidal reflector made from PMMA enabled the observation of shock wave focusing by means of real time holographic interferometry. Figure 2 shows sequential real time holograms in which a source laser beam was diffused by transmitting through a smoked glass plate placed in front of the test section. A 5 mg lead azide pellet was pasted on a tip of optical fibre inserted from the end wall of the ellipsoidal reflector and placed at the first focal point. Detonation of the pellet was conducted by transmitting a Q-switched laser beam through the optical fibre. A direct wave convex to the direction of propagation and its reflected wave from the ellipsoidal reflector concave to the direction of propagation can be clearly seen.A stress wave in the PMMA reflector appeared and shock focusing is accompanied by many wavelets and cavitation bubble generation. It is one of the advantages of holographic interferometry that visualizes three-dimensional images of shock wave interactions in transparent media.

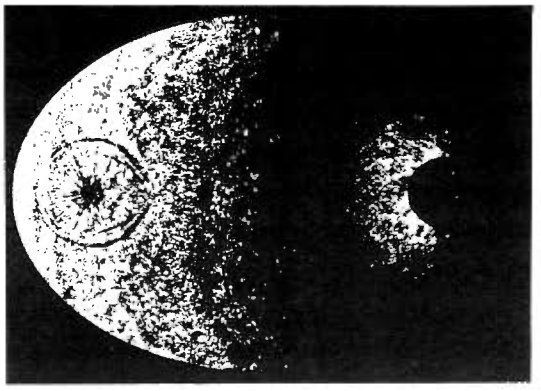


Fig. 1. Image hologram.

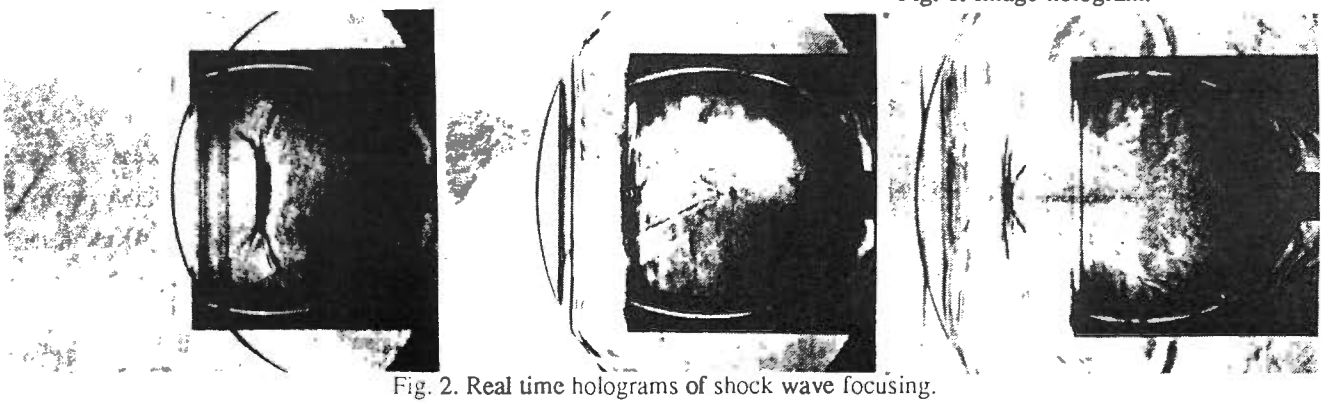


Fig. 2. Real time holograms of shock wave focusing.

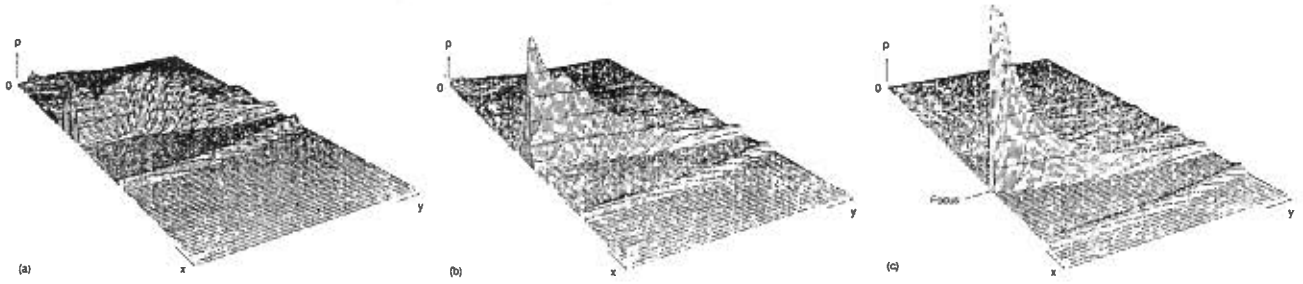


Fig. 3. Numerical simulation.

In Fig. 3 a TVD finite difference numerical simulation of the process of shock focusing by using a semi-ellipsoidal reflector is presented. The pressure profile in the x-y plane is shown. An underwater explosion was simulated by an instantaneous release of an imaginary sphere containing high pressure water. The total energy of this pressurized water sphere was assumed to be nearly identical to that of the explosive. The conversion efficiency of the explosive to shock formation was empirically determained to be approximately 0.3. It is clearly seen that a reflected shock gradually increases its peak pressure while

propagating towards the second focal point. The pressure at the second focal point, when the reflected shock converged, is a maximum.

Double exposure holographic interferograms of shock focusing at the second shock focal point are shown in Fig. 4. Very dense accumulation of the fringes clearly indicated high pressure generation in the neighbourhood of the second focal point. High pressure was instantaneously generated at the second focal point and immediately decreased to ambient pressure soon after the head of expansion wave, originating from the exit of the ellipsoidal reflector, caught up the second focal point.

Figure 5 summarizes measured peak pressure distributions along the axis. The vertical and horizontal axes show the peak pressure and the distance along the axis, respectively. The origine of the horizontal axis presents the second focal point. The ellipsoidal reflector used here had major and minor diameters of 268 mm and 186 mm, respectively. However, the diameter of the reflector exit was 178 mm so that the distance between the reflector and the second focal point was 130 mm. The pressure distribution predicted by the numerical simulation is also shown in Fig. 5 as well for the axis (y=0) as for the parallel line y=5, 10 mm.

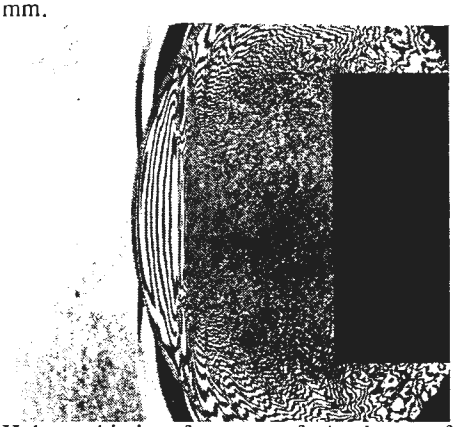


Fig. 4. Holographic interferogram of shock wave focusing.

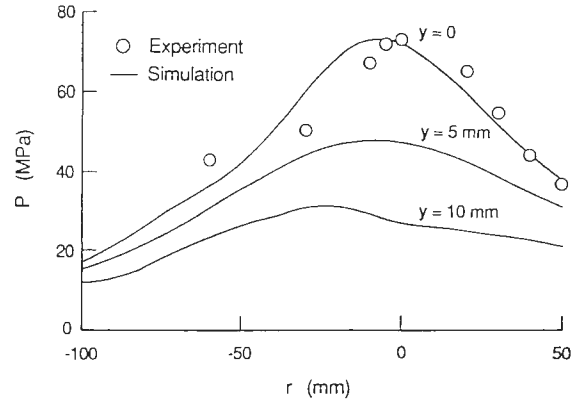


Fig. 5. Comparison of peak pressure distributions between experiment and computation.

In order to demonstrate the usefulness of high pressure generation by means of shock wave focusing, in Fig. 6(a) a kidney stone was placed at the second focal point of a semi-ellipsoidal reflector whose characteristics are shown in Fig. 5. The kidney stone, an ammonium-calcium-phospherate stone having approximately an ellipsoidal shape of 25 mm and 15 mm in major and minor diameters, had been extracted from a patient's body by surgical operation. A shock wave generated by a 20 mg lead azide pellet was exposed on the stone and the entire process of shock wave loading and stone disintegration was observed by high speed cinematography of 8,000 frames/sec. When the shock wave was loaded, the stone momentarily reduced in size, which was followed immediately by expansion. Meantime many cracks were generated on the front surface of the stone. The entire stone volume was oscillating even though with a very small amplitude and a disintegration appeared at the second expansion phase. Immediately after the shock loading on the stone, cavitation bubbles appeared. The cavitation phenomenon always occurs when the pressure drops from a high to a low value in the focus region.

In Fig. 6(b), another high speed cinematographic observation of a gallbladder stone was shown. The framing speed was 8,000 frames/sec. A pure cholesterol stone having an ellipsoidal shape of 15 mm and 10 mm in major and minor diameters was placed in a gelatine block. Again, using the same reflector shown in Fig. 5 and 10 mg silver azide pellets as energy source, shock waves were focused on the stone successively for 40 times. Figure 6(b) shows the 40th shock exposure. At the first

shock exposure, the front surface of the stone on which the shock wave was focused was already damaged. Cracks were generated at an early stage mainly over the front face of the stone and at a later stage over the rear face. The reason why stones are selectively disintegrated was briefly explained by Chaussey (1983)[4].

It is noticed that cavitation bubbles always appears immediately after shock focusing in water as shown in Fig. 6(a) and even in gelatine layer as in Fig. 6(b). The contribution of cavitation bubbles to stone disintegration has been discussed by Crum (1988)[5]. However, its effect can not be a major factor of stone disintegration (Tomita et al. 1993)[6]. High speed cinematographic observation is very helpful in understanding the entire sequence of stone disintegrating by shock wave focusing.

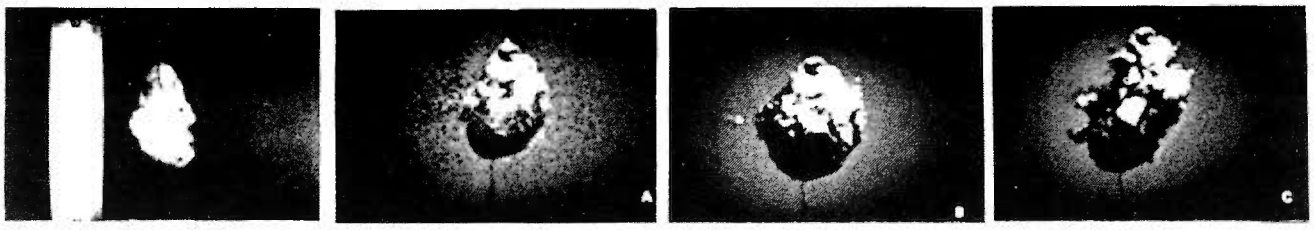


Fig. 6. (a)Disintegration of Magnesium-Ammonium-Phosphate of 20 mm × 35 mm, 35 g (7,000 frames/sec).

Generation of cavitation bubbles is of particular importance, since the cavitation bubbles play a rather decisive role in tissue damage in the ESWL treatment. In Fig. 7 a single exposure hologram of an in vitro experiment is presented. A semi-ellipsoidal reflector having a 90 mm minor axis and a ratio of major to minor diameters of 1.41 was used. A model stone, a 10 mm diameter sintered aluminium oxide, was placed at the second focal point of the reflector. This hologram was taken soon after the shock wave focusing on the model stone. The many dark spots on this hologram are cavitation bubbles. Cavitation now appears as a cloud of many minute bubbles whereas in Fig. 6, the cavitation bubbles seemed to have larger diameter. This is simply due to the difference of exposure time of optical observation. In Fig. 6, the exposure time was approximately 2.5 × 10^{-5} sec whereas in Fig. 7 it was 2.5 × 10^{-8} sec. Consequently, because of the random displacement of the bubbles, with a longer exposure time, cavitation bubbles of enormous size seem to attach the stone surface. In reality, as shown by the very short exposure time pictures, bubbles are very small and densely distributed in the vicinity of the stone and rarely distributed in far distance from the stone.

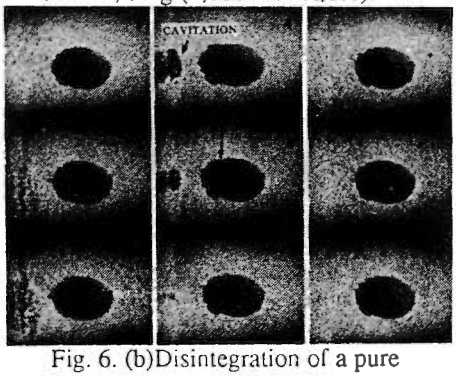


Fig. 6. (b)Disintegration of a pure cholesterol stone of 25 mm × 20 mm (8,000 frames/sec).

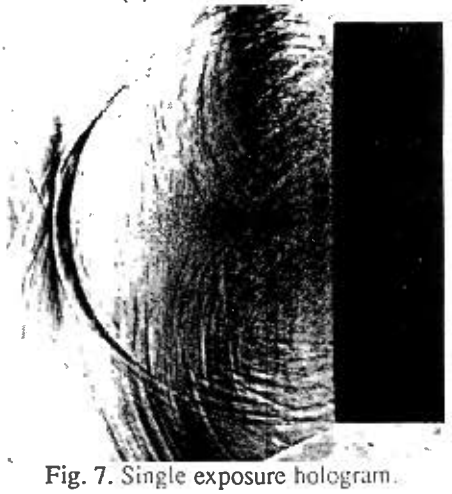


Fig. 7. Single exposure hologram.

When compression waves hit the cavitation bubbles some of the bubbles start collapsing. As to be observed in Fig. 7 an reflected expansion wave flow are generated when a compression wave hit the bubble. It is well known that when a cavitation bubble is hit by a shock wave, it starts contracting, simultaneously the surface of the bubble on which the shock first impinges becomes flat and the pressure gradually increases on that surface. This high pressure subsequently deformes the bubble surface and results in a

micro liquid jet which penetrates the other side of the bubble. Detailed flow visualization of shock/bubble interaction was reported by Takayama (1987)[7] and the behavior of cavitation bubbles associated with the ESWL was reported by Tomita et al. (1993)[6]. Figure 7 also presents evidence that the cavitation bubble inevitably appears whenever the shock is focused.

Figure 8 shows sequential interferograms of underwater shock reflection from air/water interface. A 10 mg lead azide pellet was detonated in water at depth of 10 mm. When the spherical underwater shock was reflected from the interface, a reflected expansion wave was formed. Since by air shock loading the air/water interface is forced to move towards air, the sudden volume expansion results in an enormous tensile force behind the reflected expansion wave which subsequently induces a pressure decrease and many cavitation bubbles. At an early stage of reflection, the interface deformation was hardly noticeable even though cavitation bubbles appeared. Later due to the high pressure behind the initial reflected shock the interface deformation was accelerated and became a catastrophic splash. This is an interaction of a spherical shock with a plane air/water interface and physically analogous to a case that a plane shock hits a spherical cavitation bubble. Splash formation on the interface is equivalent to micro water jet generation. If in ESWL treatments shock waves impinge or pass through a gas/tissue interface such as lung or intestine containing gases, a similar shock interface interaction as shown in Fig. 8 can appear and induce noticeable tissue damage.

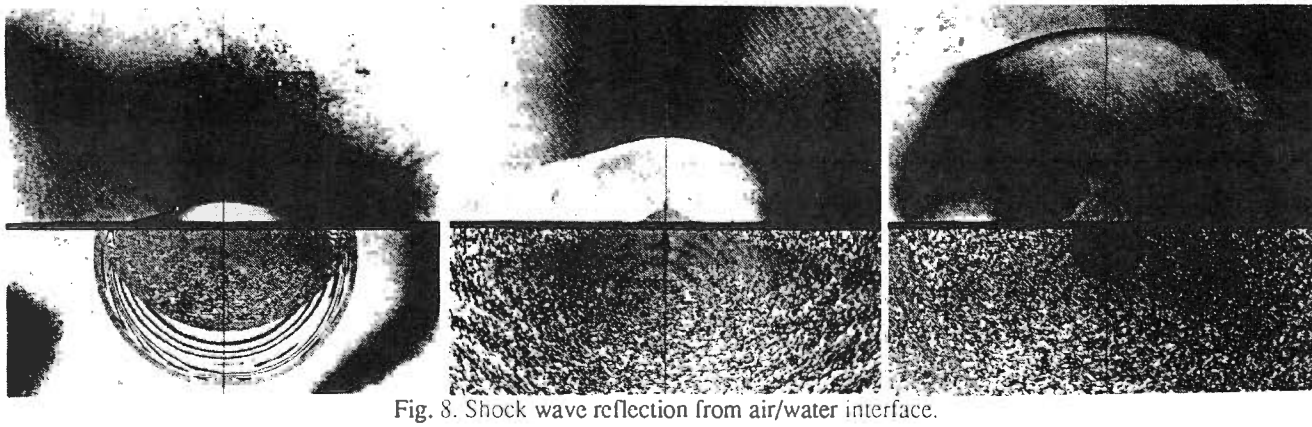


Fig. 8. Shock wave reflection from air/water interface.

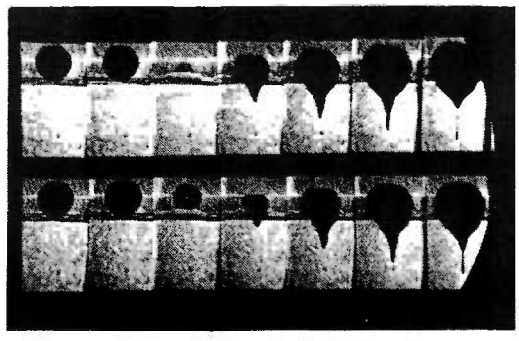


Fig. 9. Air bubble penetration into a gelatine layer.

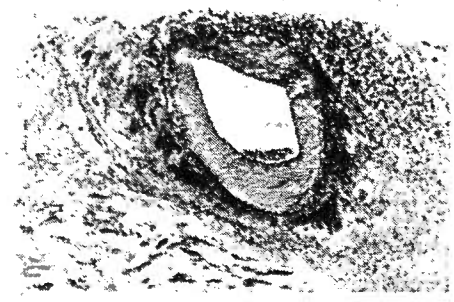


Fig. 10. Tissue damege in an artery of dog kidney.

Figure 9 shows a high speed cinematographic observation, demonstrating possible tissue damage due to cavitation. Observation was conducted in shadowgraph by using Ima-Con high speed camera (John Hadland Photonics Model 790) and framing speed of 10^5 frames/sec. An air bubble of 1.5 mm in diameter was attached to a gelatine block and exposed to a shock wave having an overpressure of 20 MPa. Similarly to shock/bubble interactions, upon shock loading the air bubble

started contracting and a micro jet pierced into the gelatine layer. Piercing speed of microjets was estimated from this high speed photographs to be approximately 100 m/sec. Consequently, the stagnation pressure created with this jet speed could be easily 1.5×10^3 kg/cm^2.

Therefore, the microjet, if induced during the ESWL treatment, can easily pierce human tissue. Then, when cavitation bubbles re-expand, the microjet disappears and leave its trace of piercing in the gelatine layer. As seen in Figs. 6 and 7, cavitation bubbles always followed shock focusing and the same trend appeared in human body during the ESWL treatments. It is also true that, in Figs. 6(b) and 8, collapsing cavitation bubbles by shock or compression wave loading created microjets piercing human tissue to which the bubbles were attached.

Figure 10 shows a microscopic observation of an artery of a dog's kidney which was exposed repeatedly to focusing of a single pulse ultrasound wave. The artery was punctured indicating that a micro jet once pierced. Indeed, the ESWL is a very useful clinical treatment for removing human calculi. However, this method accompanies more or less tissue injury. Ioritani et al. (1990)[8] revealed that there is no pressure range nor shock repetition in which human calculi were selectively disintegrated without causing any tissue injury. Probably, the best way to minimize the tissue damage would be to make the number of shock exposures minimum.

3. CONCLUSION

For these fundamental studies of the ESWL and its development, it is emphasized that optical flow visualization and holographic interferometry contributed very successfully.

4. REFERENCES

1. Ch. Chaussy, Extracorporeal Shock Wave Lithotripsy, Karger, 1982.

2. L. B. Kandell, "Research issues of concern: Scientific and medical," *Proceedings of 18th International Symposium on Shock Waves*, pp. 17-18, 1992.

3. M. Kuwahara et al., "Effects of focused shock waves on biological tissues: Cavitation in the prefocal resion and the fluid flow in the focal region," *Proceedings of 18th International Symposium on Shock Waves*, pp. 41-48, 1992.

4. Ch. Chaussy, "Shock Wave Treatment for Stones in the Upper Urinary Tract," *The Urologic Clinics of North America*, Vol. 10 No.4, pp. 743-750, November 1983.

5. L. Crum, "Cavitation Microjet as a Contributory Mechanism for Renal Calculi Disintegration in ESWL," *The Journal of Urology*, Vol. 140, pp. 1587-1590, December 1988.

6. Y. Tomita et al., "Cavitation Phenomena in Extracoporeal Microexplosion Lithotripsy," *Shock Waves*, 1993.

7. K. Takayama et al., "Holographic Interferometric Observation of Shock Wave Focusing to Extracorporeal Shock Wave Lithotripsy", *Proceedings of 19th International Congress on High-Speed Photography and Photonics, SPIE*, Vol. 135 Part2, pp. 1180-1180, 1990.

8. N. Ioritani et al., "Renal Tissue Damage Induced by Focused Shock Waves," *Proceedings of 17th International Symposium on Shock Waves and Shock Tubes*, pp. 185-190, 1989.

Results of Operative Treatment for Severe Scoliosis

Kiran Prasad Rijal* Shoichi Kokubun* Minoru Sakurai*
Takashi Murakami** and Yushin Ishii**

Key words; severe scoliosis, operative treatment, result

Introduction

For severe scoliosis, there has been a great challenge to the operative management. Many surgeons have attempted correction of severe scoliosis by staged operation[1,7] with variable results. In this study, we reviewed seventeen patients with a severe scoliosis due to varying etiologies who had been treated by either one-, two- or three-stage operation.

Materials and Methods

One hundred and twenty-six patients suffering from scoliosis were surgically treated at the Nishitaga National Hospital from 1973 to 1990. Seventeen patients had a severe scoliosis with Cobb angle greater than 90 degrees. These patients are the subjects of this study.

The preoperative angle was 101 degrees on average (range, 90 to 142 degrees). There were five males and 12 females. The average age at operation was 13 years (range, four to 22 years). They were followed for a period ranging from one to 17 years (average, nine years). Etiologies were idiopathic in six (including infantile in two), congenital in three and secondary to diseases in eight patients (three Marfan's syndrome, three neurofibromatosis and two poliomyelitis).

The analysis was focused on the number of operations, approaches employed, instrumentation used, correction of deformities and complications.

Operative Techniques

All patients treated with staged operation underwent pre-, intra- and inter-operative halo-traction for elongation of the curve. Until 1982, preoperative halo-pelvic traction was used in six patients. Since many complications were associated with halo-pelvic, it was replaced by halo-femoral in 10 patients afterwards.

One-stage operation was performed in two cases. Correction by excision of double hemivertebrae at T_{11} and L_1 was performed in a patient of congenital scoliosis. The gap thus produced

* Department of Orthopaedic Surgery, Tohoku University School of Medicine
** Department of Orthopaedic Surgery, Nishitaga National Hospital

Table 1 Results of operation by different stages in severe scoliosis

Cases	Preop Angle (Degree)	Postop Angle (Degree)	Correction Gain	Follow-up Angle (Degree)	Loss of Correction
One-stage 2	90	42	48(52%)	49	7(16%)
Two-stage 14	109	53	56(52%)	64	11(20%)
Three-stage 1	135	102	33(25%)	108	6(18%)

was closed by simultaneous anterior and posterior compressions with Dwyer's assembly and Cotrel DTT, respectively. A patient of idiopathic thoracic scoliosis having 90-degree flexible curve underwent one-stage correction using Luque's SSI.

Two-stage operation was performed in fourteen patients with various etiologies. Posterior release was carried out in the first stage. Fusion was performed by using various distraction devices in the second stage. Instrument used was Harrington rod in ten, Cotrel rod in three and Luque SSI in one patient.

Three-stage operation was done in a patient of congenital scoliosis with tethered cord syndrome. The major curve from T_8 to L_2 consisting of non-anomalous vertebrae measured 135 degrees and the lesser curve with fused T_{4-5} vertebrae measured 84 degrees. Posterior release from T_2 to T_{11} was performed in the first stage. In the second stage anterior release and wedge osteotomy from T_1 to L_1 combined with bone grafting were attempted to obtain flexibility. Little correction, however, was obtained due to the rigidity of spine. Finally in the third stage, fusion in situ was performed using Cotrel rod and Harrington compression system. Postoperatively, body cast and brace for 6 months each were applied in every case.

Results

1) Correction of deformities

The results of operative correction in different stages, with pre- and post-operative angles and angles at follow-up and loss of correction are shown in Table 1. Overall correction after surgery in this series averaged 44 degrees and the correction rate was 43%. At follow-up, loss of correction was 12 degrees on average and the rate of loss of correction was 18% (Fig. 1).

The angle in two patients treated by one-stage operation averaged 90 degrees preoperatively (Fig. 2A) and 42 degrees postoperatively (Fig. 2B), with a correction of 48 degrees and 52%. At follow-up, the angle measured 49 degrees on average with a loss of correction of 7 degrees Fig. 2C).

The angle in patients treated by two-stage operation averaged 109 degrees preoperatively (Fig. 3A) and 53 degrees post- operatively (Fig. 3B) with a correction of 56 degrees and 52%. At follow-up, the angle was 64 degrees on average (Fig. 3C) with a loss of correction of 11 degrees.

Preoperative angle was 135 degrees (Fig. 4A) in a patient treated by three-stage operation and it became 102 degrees postoperatively (Fig. 4B). The correction obtained was 33 degrees and 25%.

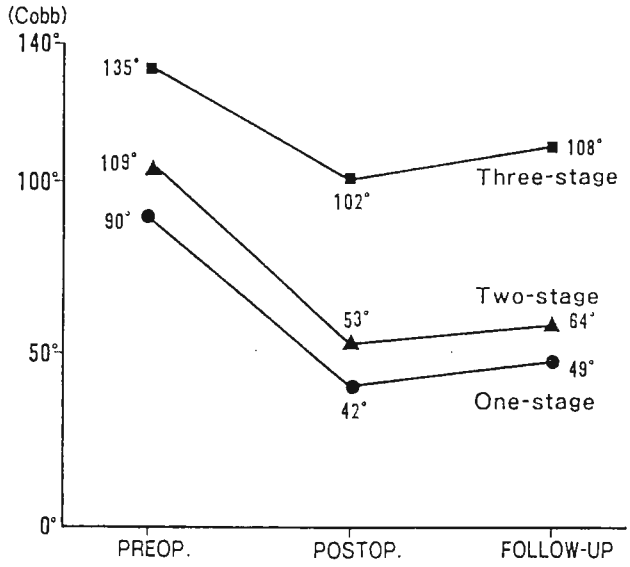
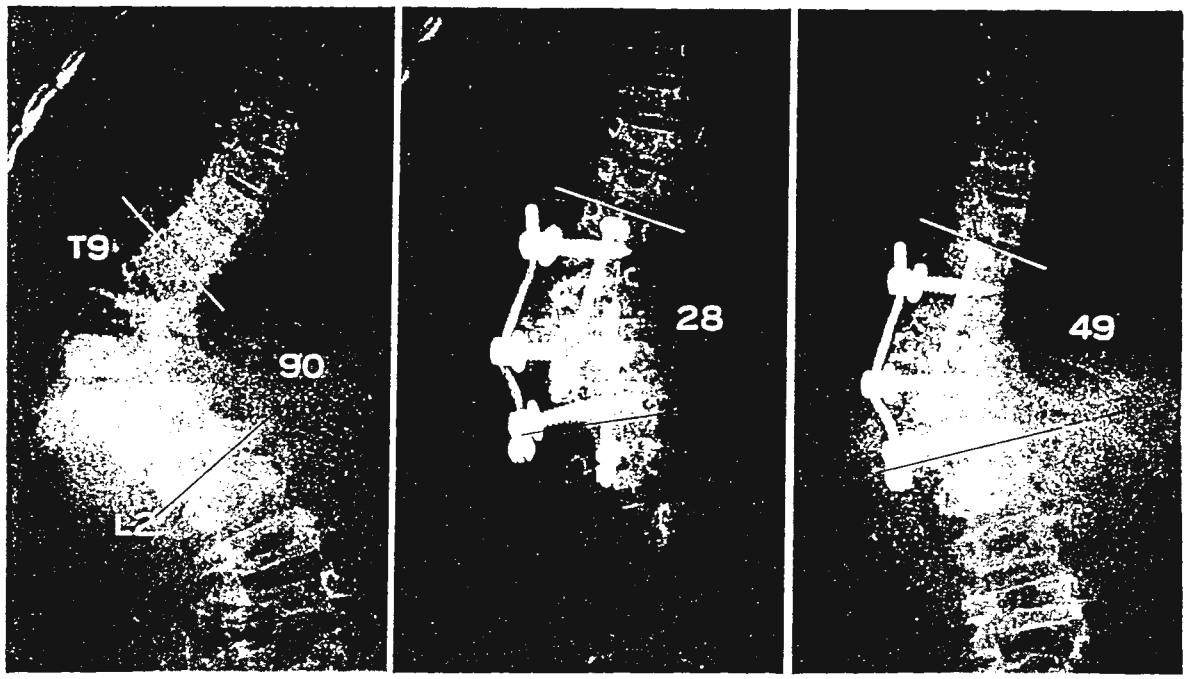


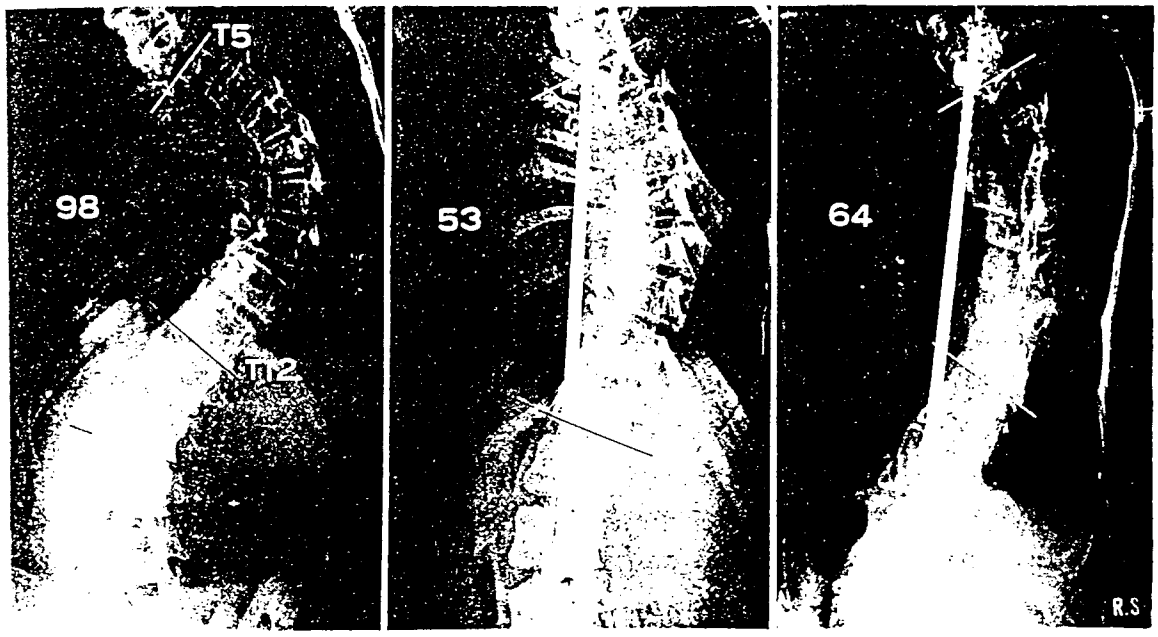
Fig. 1 Average pre- and post-operative angles and angle at follow-up. Circle denotes one-stage, Triangle two-stage and Rectangle, the three-stage operation cases.



A B C

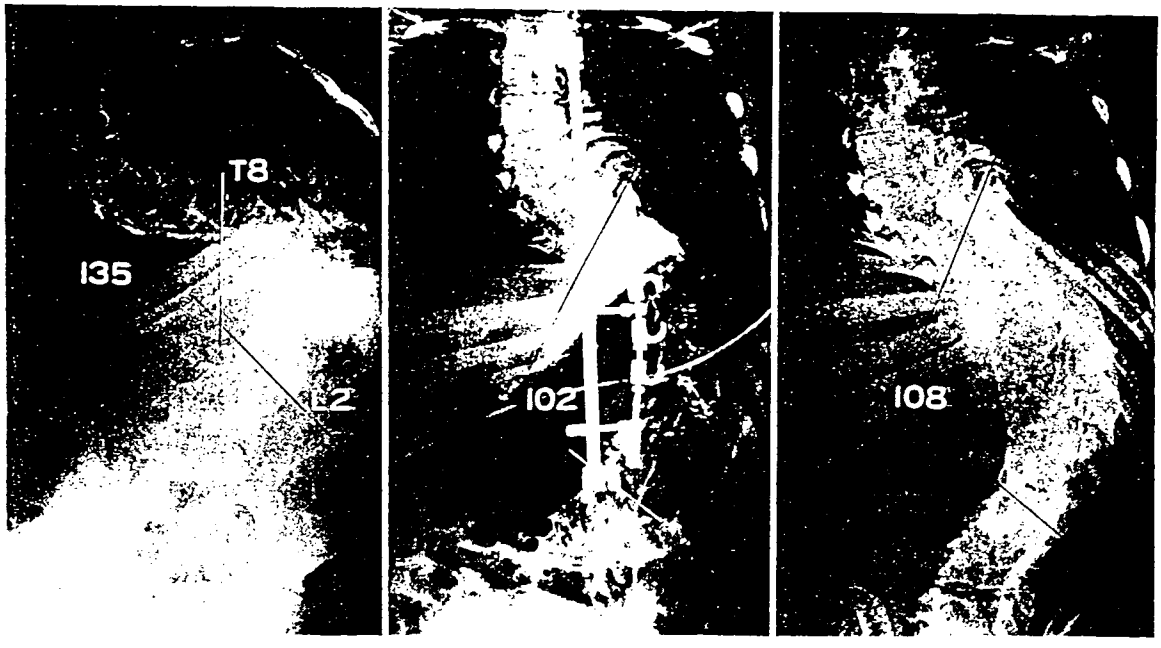
Fig. 2 One-stage operation case: Four-year-old male with congenital scoliosis due to double hemivertebrae of T_{11} and L_1. One-stage excision of hemivertebrae and simultaneous closure of the gap by compressions anteriorly with Dwyer's assembly and posteriorly with Cotrel DTT was performed. A preop. angle 90 degrees, B. Postop. angle 28 degrees and C 43 degrees at follow-up.

At follow-up, the angle measured 108 degrees (Fig. 4C) and the loss of correction was 6 degrees. Fusion was achieved in all except one patient with infantile idiopathic scoliosis treated by correction without fusion.



A　B　C

Fig. 3 Two-stage operation case: 11-year-old female with Marfan's syndrome. Firstly, posterior release and rib osteotomy and secondly, fusion by Harrington rod without ZTT. A Preop. angle 98 degrees, B. Postop. angle 53 degrees and C 64 degrees at follow-up.



A　B　C

Fig. 4 Three-stage operation case: Seven-year-old female with congenital scoliosis due to fused vertebra $T_{4,5}$. Firstly, posterior release and multiple rib osteotomies were performed. In the second stage, anterior release and fusion by bone grafting after spinal wedge osteotomy were added. Finally in the third stage, fusion by Harrington rod and Cotrel ZTT. A Preop. angle 135 degrees, B Postop. angle 102 degrees and C 108 degrees at follow-up.

Fig. 5 Stress fracture of the sternum (white arrow) in a patient with idiopathic(infantile) scoliosis as a result of progression of upper secondary kyphosis.

2) Complications

There were dislodgement of hooks in three patients who were treated by a two-stage operation with Harrington instrumentation. As a result of fracture of the laminae, hooks were needed to be placed on the upper and lower vertebrae in two patients intraoperatively. Dislodgement of the hook resulted a loss of correction of 13 degrees in one patient. Further correction was not attempted in this patient, because fusion of the spine was confirmed on radiographs.

There were major complications as stress fracture of the sternum and progressive thoracic myelopathy. Stress fracture of the sternum occurred in a patient of idiopathic (infantile) scoliosis three years after the correction of the primary curve wihtout fusion as a second operation (Fig. 5). This was thought to be the result of progression of kyphosis of the upper secondary curve. Progressive thoracic myelopathy occurred five years after the operation in a patient of congenital scoliosis and tethered cord syndrome. Decompression surgery of the spinal cord did not change her paraparesis.

Discussion

Yokochi[10] et al. reported severe scoliosis with the curve 74 degrees in a patient of progressive muscular dystrophy. Shen[8] presented the end-fusions in the treatment of severe scoliosis in childhood, but lacked the criteria to explain the severity. In this series, we have analyzed the cases

with a curve of 90 degrees or greater as a severe scoliosis because they had more difficulties in preoperative planning of staging of operation, selection of surgical approaches and halo-traction.

In general, idiopathic scoliosis outnumbers other type of scoliosis. While in our series, disease-associated severe scoliosis outnumbered idiopathic scoliosis. Progress of the deformities to severe form was found to be commoner in scoliosis due to diseases such as Marfan's syndrome, neurofibromatosis and poliomyelitis and in congenital scoliosis.

Rigid scoliosis has been managed under a staged operation[2,6] in order to obtain better correction by reducing a chance of pseudoarthrosis and neurological complication. In, 1975, O'Brien et al[7]. described a two-stage operation for severe scoliosis due to poliomyelitis and they obtained 80% correction. To avoid pseudoarthrosis, they fused the apical vertebra with Dwyer's instruments through an anterior approach, followed by posterior fusion with a Harrington rod for better correction. In 1991 Boachie-Adjei et al[1]. reported an aggressive two-stage vertebral column resection, which is a complete circumferential release with a fulcrum of the posterior longitudinal ligament to correct complicated spinal deformities. The correction rate by this operation was 43%. The overall correction rate in our series with a simpler operative procedures correspond to that of Boachie-Adjei et al.

A reasonable correction of 52% could be obtained by employing a two-stage operation for severe scoliosis in our series. Extensive posterior release in the first stage of operation contributed to better correction. Pre-, intra- or inter-operative halo-traction increased the correction and served as a monitor of spinal cord during distraction. The halo-apparatus we have recently been using a halo-femoral. The halo-pelvic traction had a merit of ambulation. But we replaced it with halo-femoral traction since complications like avascular necrosis of the odontoid process[9] and early spondylotic changes of the cervical spine were reported by Tredwell et al.

Many complications were encountered in our series of severe scoliosis than less severe ones. Minor complications such as dislodgement of the hooks could be managed by surgery, but major complications such as stress fracture of the sternum and progressive thoracic myelopathy were resistant to treatment. Both the major complications were thought to be the result of progression of kyphosis.

Leatherman[5] in 1979 reported a two-staged anterior and posterior wedge resection of the vertebral body for severe deformities in congenital scoliosis. We have been performing correction of congenital scoliosis due to hemivertebra by shortening the spine from 1977 onward. In 1991[3,4] Kokubun reported better correction (67～85%) with one-stage excision of hemivertebra in thirteen patients than with multi-stage elongation procedure using halo-pelvic (correction 42%) in three patients. This means shortening the spine results better correction and would never stretch and endanger the spinal cord and has distinct advantage over elongation procedure. Thus it is thought that a concept of shortening the spine could be applied to severe scoliosis due to other etiology.

Summary

1) Seventeen cases of severe scoliosis were reviewed in terms of their operative techniques including stages of operation, pre-, post-operative and follow-up Cobb angles and complications.

2) Reasonable correction was obtained by a combination of halo-traction, posterior or anterior release and posterior fusion with instrumentation.

3) A case of double hemivertebrae was treated by one-stage excision with a good result.

References

1) Boachie-Adjei, O., et al.: Vertebral column resection and arthrodesis for complex spinal deformities. J. Spinal Disord., 4: 193-202, 1991.
2) Hall, J.E., et al.: Surgical treatment of congenital scoliosis with or without Harrington instrumentation. J. Bone Joint Surg., 63A: 608-619, 1981.
3) Kokubun, S., et al.: Operative technique of one-stage anterior and posterior excision of hemivertebra. J. Jpn. Scoliosis Soc., 6: 193-201, 1991.
4) Kokubun, S., et al.: Operative correction of congenital scoliosis due to hemivertebra. J. Jpn. Scoliosis Soc., 6: 186-191, 1991.
5) Leatherman, K., et al.: Two -stage corrective surgery for congenital deformities of the spine. J. Bone Joint Surg., 61-B: 324-328, 1979.
6) Moe, J.H., et al.: Idiopathic scoliosis. Moe's Textbook of Scoliosis and Other Spinal Deformities. W.B. Saunders Company, Philadelphia, 225, 1987.
7) O'Brien, J.P., et al.: Combined staged anterior and posterior correction and fusion of the spine in scoliosis following poliomyelitis. Clin. Orthop., 110: 81-89, 1975.
8) Shen, Y.S., et al.: End-fusions in the treatment of severe scoliosis in childhood. J. Jpn. Scoliosis Soc., 2: 93-100, 1987.
9) Tredwell, S.J., et al.: Avascular necrosis of the proximal end of the dens. J. Bone Joint Surg., 53-A: 332-336, 1975.
10) Yokochi, K., et al.: Congenital muscular dystrophy with severe infantile scoliosis. Brain Dev., 7: 492-495, 1985.

7 免疫抗体

■海老名（えびな） 卓三郎（たくさぶろう）
宮城県立がんセンター研究所免疫学部門

海老名　卓三郎
昭和41年東北大学医学部卒業，昭和46年東北大学大学院医学研究科修了，医学博士。同年東北大学医学部細菌学講座助手，米国ペンシルバニア大学ウイスター研究所留学，49年医学部講師，55年医学部助教授を経て，平成5年4月より宮城県立がんセンター研究所免疫学部長。専門は微生物学，腫瘍免疫学。

はじめに

生体防御機能を有する食品成分を見い出し，それを用いた食品を創製することは機能性食品研究の最も重要な領域である。現在機能性食品の条件として

①明確な作製目標を有すること。
②構造が解明されている機能性因子を含むこと。
③食品中での存在形態と量が明確であること。
④機能性因子の作用機作が解明されていること。
⑤安定性が高いこと。
⑥食品中で機能性因子が安定に存在し得ること。
⑦食品として受諾性を有すること。

の7条件があげられている。我々はこのいずれの条件も完全に満たす機能性食品としてウイルス免疫抗体を確立したのでまとめてみたい。すなわちヒトロタウイルス（HRV）性下痢症の予防食として，機能性因子Ig（免疫抗体）を含む，HRV免疫牛初乳並びに鶏卵抗体について解説する。

1．ウイルス性下痢症とは

昭和20年代までは下痢症といえば赤痢を代表とする細菌性下痢症が中心であった。その後抗生物質の出現と衛生栄養環境の好転により細菌性感染症は減少し，代わりにかつて“白痢”と呼ばれたロタウイルス下痢症を中心としたウイルス性下痢症が増加してきた。日本では小児期腸管感染症は昭和10年代までは消化不良性中毒症などといわれ，致命率78%という非常に恐ろしい病気であったが，昭和50年代の急性胃腸炎としては致命率0.2%以下となり全体的に軽症化が目立っている。また季節的にも昔は夏に多かったが(90%)，最近の乳幼児下痢症は冬に多く(80%)，病原が細菌によるものからウイルスによるものへの変遷が明らかである。日本では細菌性20～30%，ウイルス性70～80%（そのうちロタウイルス80%，小型球形ウイルス10～15%，アデノウイルス5～10%）となっている。ところが現在でも世界全体でみると様相が異なり，WHOの調べによると世界中の死亡原因の第1は心臓血管疾患であるが，第2位が他の感染症やがんを抜いて下痢症で，毎年500万人の人々が死亡している。世界的には下痢症の原因は細菌性とウイルス性が半々と考えられており，世界中で両下痢症の制圧を目指して研究が進んでいる。細菌性下痢症は抗生物質に感受性であるが，ウイルス性下痢症の場合はまったく無効で，かえって症状を悪化させることがあるので注意が必要である。

ウイルス性乳幼児下痢症の病原検索の変遷をたどると，1950年以前はコレラ，赤痢，サルモネラなど病原細菌が陰性の下痢症の発生が報告・記載され，日本では症状として“白痢”を特徴とすることがいわれていた。1950年代になりウイルス学が進歩すると，下痢便から組織培養法によりウイルス分離が行えるようになり試験管内培養が可能なエンテロウイルス，アデノウイルスなどが分離された。1970年代になると試験管内培養が不可能であったNorwalk因子とロタウイルスが電顕並びに免疫電顕法により直接ウイルス粒子が確認されるようになった。

一般にウイルス感染を予防するには能動ワクチンが考えられ，世界中で試みられているが，その開発は難しい。第1にインフルエンザウイルスと同じく最初から遺伝子が分節しており変異を起こしやすい。第2にインフルエンザウイルスと同様ウシ，ブタ，トリなど動物にヒトと同様のロタウイルスがあり，動物ウイルスとの混合感染により

新しい株（reassorted strain）が出現する可能性が高い。第3にヒトロタウイルスは現在6つの血清型があることが知られ，その発生・流行する型は年によって異なり，すべての型に共通する中和抗体を産生させることは難しい。第4にロタウイルス下痢症の多くが，1才未満の免疫学的に未熟な乳児に発症することから，能動ワクチンによって高力価の中和抗体を体内で産生させることが難しくなっている。そこで我々は能動ワクチンに代わり受動免疫による予防を目指した。

2．ロタウイルス免疫牛初乳による下痢症予防

従来牛の初乳は常乳と成分が異なるため牛乳として使われず捨てられていた。ところが牛の初乳中にはIgG，IgA，IgMが常乳に比して100倍以上多く含まれ，特にIgAはタンパク分解酵素に抵抗性で，ウイルスに対する中和抗体価の比活性も高いことがわかった[1]。そこで今まで捨てられていた初乳を利用すべく妊娠8カ月のホルスタイン乳牛にヒトロタウイルスWa株（血清型1），KUN株（血清型2），MO株（血清型3）をそれぞれ3～4回皮下免疫し出産後，1，2，3日目の初乳を採取した。この初乳を遠心により脂肪分を取り除き，20mlずつ凍結乾燥品としてバイアルに保存した。この牛初乳製剤のヒトロタウイルス血清型4種に対する中和抗体価を測定したところ表1に示すようにほぼ同じように高い中和抗体価を得ることができた。一方非免疫初乳では中和抗体価は100以下であった。

もう1つロタウイルスの研究が遅れていたのはヒトロタウイルスの実験感染動物モデルがなかったことで，下痢発症の詳しい機序がわからなかった。そこで我々は当教室で，分離したヒトロタウイルスMO株（血清型3）[2]を生後5日齢のBALB/c仔マウスに経口感染させることにより90％のマウスに3日間下痢を起こさせることを日本ではじめて成功した。

そこでマウスの実験系にそれぞれ50μlの初乳を感染1時間前に投与したところ表2に示すようにロタウイルス免疫初乳はいずれも下痢発症を予防した。一方非免疫対照初乳投与では下痢発症を予防しなかった。さらに感染8時間前投与では下痢便を軟便に変えていた。そこでMO株で免疫して高力価の中和抗体価を持った牛初乳（lot 3-16）を20mlずつバイアルに凍結乾燥し，乳児院にて経口投与によるロタウイルス下痢症の予防実験を行った。表3に示すように1991年1月21日より軟便の発症が始まったので，25日より初乳20mlずつの飲用を開始した。20名を4群にわけ，牛初乳非投与群では10名中7名が下痢を発症し，症状が現われてから飲用を開始した4名は全て下痢の発症を防げなかった。一方毎日20mlずつ飲用させた3名は下痢の発症はなく，1日おきに飲用させた3名中1名が発症した。すなわち下痢発症直前から毎日牛初乳を飲用させればロタウイルスによる下痢発症は予防され，血清学的に抗体価は上昇し，ワクチン効果があることが示された[3]。

次に免疫初乳からProtein G-Sepharoseを使ってIgGを精製し，リン酸緩衝液で最終透析したもの5 mg/ml溶液を作り，MO株に対しての中和抗体価を測定したところ3600倍あった。そこで*in vivo*

表1　免疫牛初乳のヒトロタウイルスに対する中和抗体価

Neutralizing antigen (serotype)	Cow Colostrum				
	Wa-immune W-350	KUN-immune K-428	MO-immune 3-16-A	MO-immune 3-16-P	unimmunized
Wa (1)	3200	8000	35,000	32,000	<100
KUN (2)	150	800	88,000	54,000	<100
MO (3)	1120	4200	92,000	110,000	<100
ST3 (4)	4300	6000	16,000	8,200	<100

抗体価は1視野当りの蛍光抗体陽性細胞フォーカス単位（FCFU）を50％減少させる初乳の希釈倍数の逆数で表わす。

表2　MO株誘発下痢症に対する：免疫牛初乳の予防効果

Colostrum	Litter	No. of mice	No. with diarrhea	Diarrhea / total	% with diarrhea
W-350	A	5	0	0 / 10	0
	B	5	0		
K-428	C	5	0	0 / 10	0
	D	5	0		
3-16-A	E	9	0	0 / 16	0
	F	7	0		
3-16-P	G	10	0	0 / 15	0
	H	5	0		
unimmunized colostrum	I	5	5	10 / 10	100
	J	5	5		
control MEM	K	8	7	21 / 23	91.3
	L	8	8		
	M	7	6		

ヒトロタウイルスMO称を10^6FCFU感染させる1時間前に50μlの初乳を経口的に5日齢のBALB/c乳飲みマウスに投与して下痢発症の有無を4日間観察する。

表3　免疫牛初乳の投与を受けた子供の臨床経過と血清反応

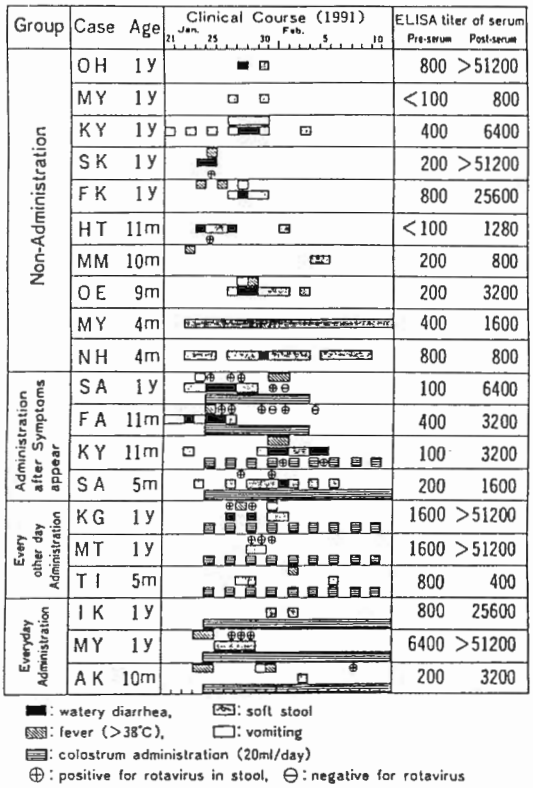


表4　免疫牛初乳から精製したIgGの用量依存的下痢予防効果

Sample (Concentration)	Litter	No. of mice	No. with diarrhea (days after infection) 1	2	3	4	No. with (affected / total)	%with diarrhea
Control MEM	A	6	3	6	6	1	14/16	87.5
	B	10	2	8	5	1		
IgG(10mg/ml)	C	7	0	0	0	0	0/14	0
	D	7	0	0	0	0		
IgG(5mg/ml)	E	6	0	0	0	0	0/14	0
	F	8	0	0	0	0		
IgG(1mg/ml)	G	6	0	0	1	0	1/14	7.1
	H	8	0	0	0	0		
IgG(0.5mg/ml)	I	7	1	3	5	0	6/15	40.0
	J	8	0	0	1	0		

ヒトロタウイルスMO株感染1時間前に50m*l* のIgG溶液を5日齢のBALB/cマウスに経口投与し，下痢発症を観察した。

における下痢予防効果を調べたところ表4に示すように用量依存的に下痢を予防し，免疫初乳のIgGも機能性食品として十分に使えることがわかった。

さらに最近牛初乳だけでなく，分娩牛に追加免疫することにより常乳中にも高力価の抗体価を持った抗体を得る方法を確立したので，今後検討を加えていきたい。

3．鶏卵抗体による下痢症予防

次により簡単に大量のIgを採取する方法としてニワトリを用いることを考えた。すなわち150日齢の白色レグホン鶏にヒトロタウイルスWa株並びにMO株を完全アジュバンドと共に筋肉内に免疫し，毎日鶏卵の卵黄を分離し，そこからIgを精製し，卵黄Ig(IgY)を凍結乾燥品として得た。IgYは哺乳動物のIgGと比較すると補体結合能がないことと，分子量がやや大きいことを除いてほぼ同じ性状と見てよい。精製IgYの収量は1 m*l* の卵黄から6.5mgのIgYが得られ，1個の鶏卵から約100 mgのIgYを得ることができる。1羽の鶏を免疫することにより1年間で最低150個の卵を産むので，1羽の鶏から最低15gのIgYを得ることができた。IgYの中和抗体価はWaで免疫したものでWaに対する価は8 mg/m*l* の溶液で90,000に，MO株で免疫したIgYはMOに対して110,000に上昇していた。非免疫鶏卵IgYは100以下であった。そこで実験感染マウスモデルを使いMO株を感染させる1時間前にMO株を免疫して得た精製抗MO・IgYの各濃度を50μl 溶液として経口投与したところ表5のように用量依存的に下痢発症を予防した。さらに感染9時間前の投与でも予防するが，感染24時間前では予防しないことを確かめた。次にWa株で免疫して得た精製抗Wa・IgYによるMO株感染マウスの下痢発症予防効果を検討したところ原液（8 mg/m*l*）の50μl 投与では予防したが，10倍希釈すると予防効果は得られなかった。そこで *in vitro* におけるMO株，Wa株に対する中和抗体価と *in vivo* における50%のマウスの下痢発症を予防するIgYの希釈倍数の価（感染予防価）を比較した。その結果表6に示すように *in vitro* におけるMO株に対する中和抗体価と *in vivo* における感染予防価はほぼ平行していることがわかった[4]。

4．最後に

以上ロタウイルス免疫牛初乳並びに鶏卵抗体によるロタウイルス下痢症の予防について述べたが，我々は最近さらに卵白から分離したシステイン・プロテアーゼ阻害剤であるオボシスタチンによる下痢症の治療効果についても見い出したので[5]，今

表 5　免疫鶏卵抗体から精製した IgY の用量依存的下痢発症予防効果

Concentration of Anti-MO IgY[a]	Litter	No. of mice	No. with diarrhea (hours after infection) 24	48	72	Diarrhea (affected /total)	Percentage with diarrhea
365 μg/mouse	A	11	0	0	0	0/18	0
	B	7	0	0	0		
36.5 μg/mouse	C	5	0	0	0	0/14	0
	D	9	0	0	0		
3.65 μg/mouse	E	3	0	0	0	2/11	25
	F	8	1	2	1		
0.365 μg/mouse	G	3	1	1	0	3/7	42.9
	H	4	1	2	0		
Control MEM	I	10	7	6	0	16/18	88.9
	J	8	1	8	3		

ヒトロタウイルス MO 株の10^6FCFU を感染させる 1 時間前に50μl の IgY 溶液を 5 日齢の BALB/c マウスに経口投与し，下痢発症有無を観察する。

表 6　免疫鶏卵抗体 IgY の中和抗体価と下痢予防効果

IgY[a]	Neutralizing[b] titer against MO	Wa	In vivo protective[c] titer against MO challenge
Anti-MO IgY	110,000	13,000	1,000
Anti-Wa IgY	150	90,000	5
Control IgY	<100	<100	<1

a）ヒトロタウイルス MO 株並びに Wa 株で免疫した IgY，非免疫 IgY の 8 mg/ml を使用した。
b）1 視野当りの FCFU 単位を50%減少させる IgY の希釈倍数の逆数で中和抗体価を表わす。
c）10^6FCFU の MO 株感染乳飲みマウスの50%を下痢発症予防する IgY の希釈倍数の逆数で下痢予防価を表わす。

後これらの生物製剤の飲用により，ロタウイルス下痢症の予防と治療に向けた機能性食品の開発にあたっていきたい。

参考文献

1）Ebina, T., Sato, A. et al:Med. Microbiol. Immunol. **174**：177-185, 1985
2）Kutsuzawa, T., Konno, T. et al:J. Clin. Microbiol. **16**：727—730, 1982
3）Ebina, T., Ohta, M. et al: J. Med. Virol. **38**：117-123, 1992
4）Ebina, T., Tsukada, K. et al:Microbiol. Immunol. **34**：617-629, 1990
5）Ebina, T., and Tsukada, K.: Microbiol. Immunol. **35**：583-588, 1991

＜特集＞ 癌局所療法研究会

各種BRM腫瘍内投与による抗腫瘍効果の差異：血清IAPの誘導

海老名卓三郎 村田 和子*

要旨 われわれが考案したマウス“二重移植腫瘍系”で各種 BRM の抗腫瘍作用機序を解析した。BALB/c マウスに Meth-A 腫瘍細胞を右側腹皮内に 10^6，左側腹皮内に 2×10^5 個接種し，3日目から3日間 BRM を右側腫瘍に投与し，投与していない左側腫瘍の増殖を21日間観察する系である。その結果，PSK や IL-1 などの BRM の腫瘍内投与療法は遠隔腫瘍の増殖を抑制することがわかった。その作用機序として，BRM 投与担癌マウスの血中免疫抑制酸性蛋白（IAP）の誘導能について検討した。その結果，PSK，OK-432，TNF は IAP の増加が認められたが，Lentinan では認められなかった。すなわち，BRM が Mφ ならびに好中球を活性化して IAP の産生という炎症反応を起こすことが，抗腫瘍効果に結び付くことを見いだした。さらに炎症性 IAP と腫瘍性 IAP では糖鎖の違いのあることを見いだした。

〔癌と化学療法 20(11)：1453-1456，1993〕

はじめに

各種 BRM を原発腫瘍内に投与すると，原発腫瘍のみならず，遠隔転移腫瘍まで治癒させるもののあることを，われわれが考案したマウス“二重移植腫瘍系”で明らかにしてきた[1-4]。そこで，BRM 間での抗腫瘍効果の差異を求めるため今回は血中免疫抑制酸性蛋白（IAP）の誘導能について検討を加え，さらに BRM 投与による炎症性 IAP と担癌後期に出現する腫瘍性 IAP の物性の違いについても報告する。IAP は癌や炎症などの急性期に増加する α_1-acid glycoprotein（α_1-AG）の一成分であり，マイトジェン反応の抑制，natural killer（NK）細胞活性の抑制，腫瘍の生着や増殖の促進作用，抑制性マクロファージ（Mφ）の誘導などの作用を有する免疫抑制蛋白質として知られている。また，IAP は主にマクロファージ（Mφ），好中球，肝細胞が産生することがわかっているので，活性化 Mφ の指標として測定した。

I. 材料と方法

1. マウスと腫瘍

東北大学医学部附属動物実験施設から購入した7週齢雄 BALB/c マウスを使用した。腫瘍は，BALB/c マウスと同系の Meth-A 線維芽肉腫細胞を使用した。

2. 二重移植腫瘍系

BALB/c マウスの右側腹皮内に 10^6，左側皮内に 2×10^5 の Meth-A 細胞を移植し，右側の大きな腫瘍（原発巣）が指で触れるようになる3日目より，腫瘍内に薬剤を3日間投与することにより治療し，左側の遠隔腫瘍（転移巣）も退縮させる系。

3. 血清 IAP 値測定

BRM 間での作用機序の差異を調べるため BRM を投与した担癌マウスならびに非担癌対照マウスに BRM を皮内注射した時の血清 IAP 値

* 宮城県立がんセンター研究所・免疫学部門

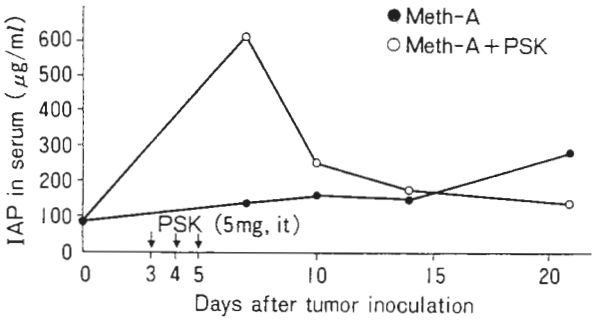


図 1 Change of serum IAP levels in Meth-A-bearing BALB/c mice after PSK injection

を，single radial immunodiffusion (SRID) 法を用い測定した。

4. IAP の物性検討

マウス血清中の IAP の heterogeneity に関して Con A を使った crossed immunoaffino electrophoresis (CIAE) により解析した。

II. 実験結果ならびに考察

1. BRM の腫瘍内投与による抗腫瘍効果

“二重移植腫瘍系”で BRM のうち蛋白結合多糖体 PSK，セファランチン，サイトカイン IL-1 は原発腫瘍のみならず，遠隔転移腫瘍も治癒させた。溶連菌製剤 OK-432，BCG は原発腫瘍を治癒させ遠隔腫瘍は増殖抑制だけがみられた。TNF は原発腫瘍だけを治癒させた。多糖体 Lentinan，サイトカイン IL-2，IL-6，IL-8，CSFs はいずれも左右腫瘍ともにまったく抗腫瘍効果は認められなかった。

2. BRM 投与による IAP の誘導

各 BRM を投与した非担癌マウスの IAP 値を測定したところ PSK 5 mg，TNF 3×10^3 単位 OK-432 0.1 mg 投与でいずれも 400～1,000 μg/ml の IAP 産生の増加がみられた。一方，Lentinan 0.1 mg 投与では 200 μg/ml で著明な増加は認められなかった。次に担癌マウスに BRM を腫瘍内投与したところ TNF で 2,500 μg/ml，PSK で 600 μg/ml，OK-432 で 420 μg/ml の IAP 値の増加が認められ，その後腫瘍の縮小に伴い急速に減少した（図 1）。一方，非治療担癌マウスでは徐々に IAP 値は上昇し，担癌 21 日目には 300 μg/ml に達した。PSK の投与時期を遅らせても IAP の上昇は認められたが，その後の回復は遅

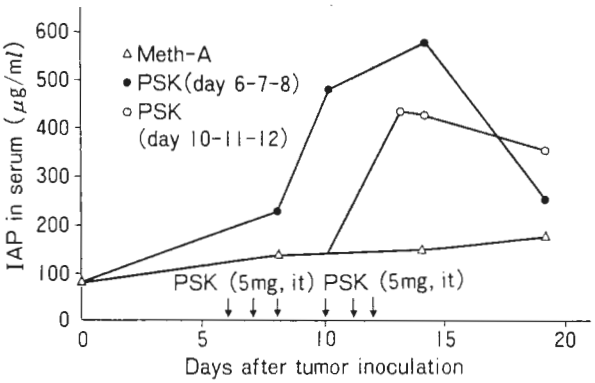


図 2 Effect of time of PSK treatment on serum IAP levels in Meth-A-bearing BALB/c mice

表 1 Effect of time of PSK treatment on antitumor activity

Days of PSK treatment	Tumor diameter (mm±SD)	Spleen weight (g±SD)
3—4—5	0	0.16±0.07
4—5—6	0	0.19±0.01
6—7—8	0	0.29±0.09
8—9—10	13.95±2.05	0.39±0.13
10—11—12	23.75±2.74	0.36±0.04
None	23.90±5.52	0.31±0.11

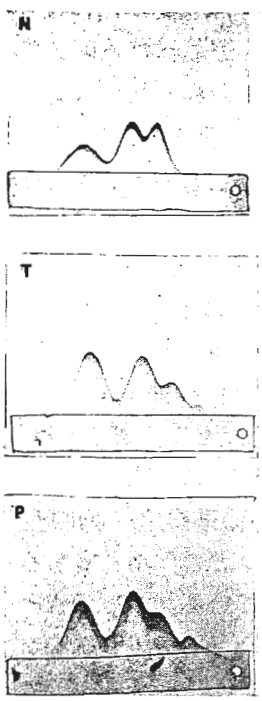


図 3

表 2 Comparative percentages of mouse IAP subfraction in Con A-CIAE and serum IAP levels in mouse

Mouse	% Peak				Concentration of serum IAP (μg/ml)
	F-1	F-2	F-3	F-4	
Normal	25.0	41.1	33.9	0.0	140
Tumor-bearing mouse	40.7	37.5	19.4	2.4	430
PSK injected mouse	32.1	39.6	22.4	4.88	575

く抗腫瘍効果は認められなかった（図2，表1）。すなわち，IAP 値の増加という Mφ の活性化により BRM が炎症反応を起こすことが，抗腫瘍効果につながるということが示唆された。

3. 炎症性 IAP と腫瘍性 IAP の物性の差異

炎症性 IAP と腫瘍性 IAP の物性の違いを Con A-CIAE で検討した結果，正常血清 IAP にはない F4（hybrid type 糖鎖）が両者とも出現し，炎症性 IAP では F2（biantennary 糖鎖）が増加し，腫瘍性 IAP では F1（tri-tetraantennary 糖鎖）が増加していることがわかった（図3，表2）。

すなわち，IAP の糖鎖部分が正常から炎症性に変わる時，炎症性から腫瘍性に変わる時にそれぞれ変化し，生体に微妙な影響を与えていることが示唆された。

本研究の一部は（財）仙台微生物研究所の研究助成金により行った。

文 献

1) Ebina, T., Kohya, H. and Ishikawa, K.: Antitumor effect of PSK: Role of regicnal lymph nodes and enhancement of concomitant and sinecomitant immunity in the mouse. *Jpn. J. Cancer Res.* 80: 158-166, 1989.
2) Ebina, T. and Murata, K.: Antitumor effect of PSK at a distant site: Induction of interleukin-8-like factor and macrophage chemotactic factor in murine tumor. *Jpn. J. Cancer Res.* 81: 1307-1313, 1990.
3) Ebina, T. and Murata, K.: Antitumor effector mechanism of interleukin-1β at a distant site in the double grafted tumor system. *Jpn. J. Cancer Res.* 82: 1292-1298, 1991.
4) Ebina, T. and Murata, K.: Antitumor effect of PSK at a distant site: Tumor-specific immunity and combination with other chemotherapeutic agents. *Jpn. J. Cancer Res.* 83: 775-782, 1992.

Summary

〔*Jpn J Cancer Chemother* 20(11): 1453-1456, *August*, 1993〕

DIFFERENCES IN ANTITUMOR EFFECT OF VARIOUS BRMs BY INTRATUMORAL ADMINISTRATION: INDUCTION OF IMMUNOSUPPRESSIVE ACIDIC PROTEIN

Takusaburo Ebina and Kazuko Murata

Division of Immunology, Research Institute, Miyagi Cancer Center

The antitumor effects of biological response modifiers (BRM) in a new experimental mouse model, the "double grafted tumor system", were analysed. BALB/c mice received simultaneous inoculations of Meth-A fibrosarcoma cells on right flank (10^6 cells) and left flank (2×10^5 cells) on day 0, and BRMs were injected intratumorally into right tumor on day 3, 4 and 5. The growth of the left-flank tumor was the real target for the evaluation of a given drug after 21 days. PSK (a protein-bound polysaccharide preparation), IL-1 and Cepharanthin, cured not only the right, but also the left, non-treated tumor in a double grafted tumor system. OK-432 (a *Streptococcus* preparation) and BCG cured the right tumor and inhibited the growth of the left tumor. Lentinan (a polysaccharide preparation) inhibited neither the right nor the the left tumor. Immunosuppressive acidic protein (IAP) in serum was increased transiently soon after intradermal injection of PSK, OK-432 and TNF in BALB/c mice. But Lentinan did not induce IAP. IAP in serum was gradually increased after intradermal inoculation of Meth-A tumor in BALB/c mice. At 21 days after tumor inoculation, IAP in serum reached a maximum level (300 μg/ml). The serum IAP level of Meth-A-bearing mice as well as that of normal mice increased after the intratumoral injection of PSK. At 21 days after tumor inoculation, IAP in PSK-treated mice returned to normal level. The biochemical differences between PSK-induced IAP (early, inflammatory IAP)

and Meth-A-induced IAP (late, tumor-induced IAP) was investigated by crossed immunoaffino electrophoresis (CIAE). Inflammatory IAP was rich in biantennary sugar chain, and tumor-induced IAP was rich in tri-tetraantennary sugar chain.

Key words: Biological response modifier (BRM), Intratumoral administration, Immunosuppressive acidic protein (IAP)

I　悪性腫瘍治療とセファランチン

1）セファランチンの抗腫瘍効果－腫瘍免疫増強機構－

宮城県立がんセンター研究所免疫学部門
海老名卓三郎、村田和子

われわれはBRMの抗腫瘍効果を検討するため図1．に示すような〝二重移植腫瘍系〟（double grafted tumor system）を考案した。すなわちBALB/cマウスに同系の腫瘍であるMeth-A線維芽肉腫を右側腹皮内に1×10^6個、左側腹皮内に2×10^5個接種し、3日目に大きくなった右側腫瘍内にBRMを投与し、特に治療していない左側腫瘍に注目して21日間観察する系である。対照の系として右側腫瘍に投与した薬剤が血流を介して左側腫瘍に達し、直接作用で腫瘍の増殖を抑制する可能性があるので、Single tumor systemとして左側腹皮内にだけ2×10^5の腫瘍を接種し、3日目に右側皮下に薬剤を投与する系である。この系で植物性アルカロイド製剤であるセファランチン（CE）を0.5mgずつ腫瘍接種3、4、5日と投与したところ、二重移植腫瘍系で、表1．に示すように右側腫瘍で8匹中3匹で腫瘍の消失がみられ、左側でも8匹中2

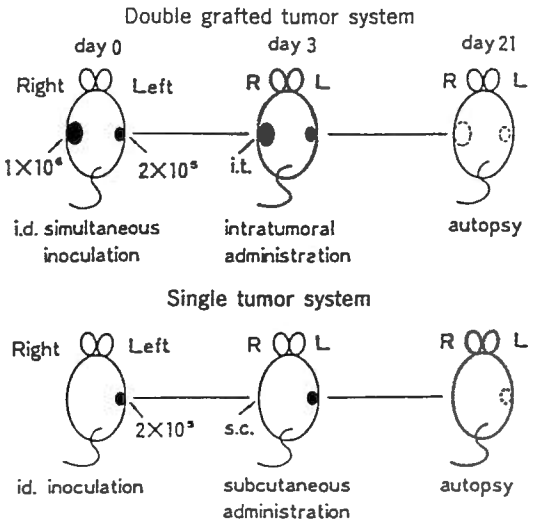


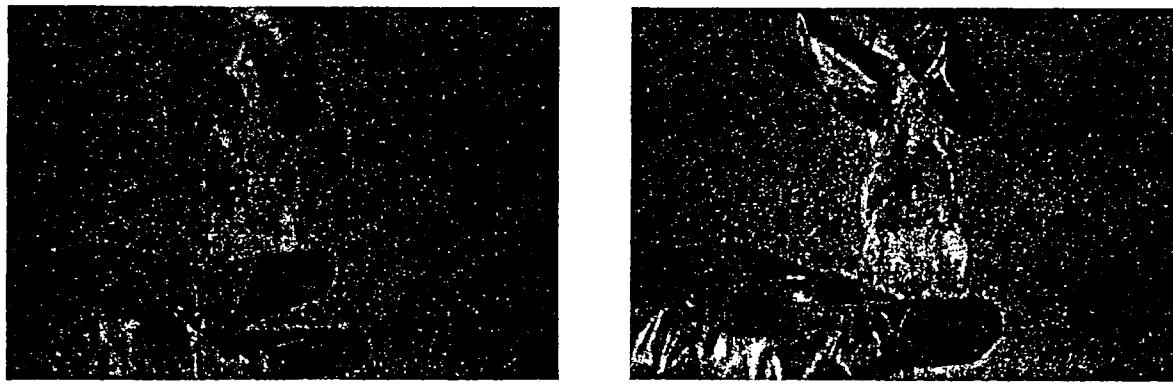
図1

表1．Anti-Meth-A effect of Cepharanthin on "double grafted tumor system"

Group	Right tumor(1×10^6 cells)		Left tumor(2×10^5 cells)	
	Tumor free /tested	Tumor weight (g±S.D.)	Tumor free /tested	Tumor weight (g±S.D.)
Double-tumor				
Control	0/8	5.3±1.34	0/8	3.1±0.50
Cepharanthin 0.5 mg×3 d3, 4, 5	3/8	1.2±0.60	2/8	2.5±0.88
Single-tumor				
Control	−	−	0/8	4.2±0.82
Cepharanthin 0.5 mg×3 d3, 4, 5	−	−	0/8	2.5±1.19

匹で腫瘍の消失がみられた。一方Single tumor systemでは腫瘍の消失はみられなかった。すなわち腫瘍内投与療法により、遠隔地の腫瘍の増殖が抑制されることを見いだした。実際の腫瘍の写真を示すと図2(A)が対照14日目の腫瘍であるが、CEを右側腫瘍内に投与すると図2(B)に示すように両腫瘍とも消失している。ところがヌードマウスを使って実験を行うと図3．に示すように左側腫瘍の増殖は全くおさえられず、右側腫瘍を治癒させているのは宿主のTリンパ球が働いていることを示唆した。実際の写真を示すと、対照の腫瘍が図4(A)に示すように大きくなっているのに対し、CEを右側腫瘍内に投与すると、右側腫瘍は完全に治癒するが、左側腫瘍は全く治癒しないでいる。

そこで次にその作用機作を解明するため、CEを3、4、5日目に0.5mgずつ腫瘍内投与した14日目の脾臓細胞を採取し、その2×10^7を別のマウスの腫瘍内に投与するadoptive



(A) Control (14 days)　　(B) CE (14days)

図2

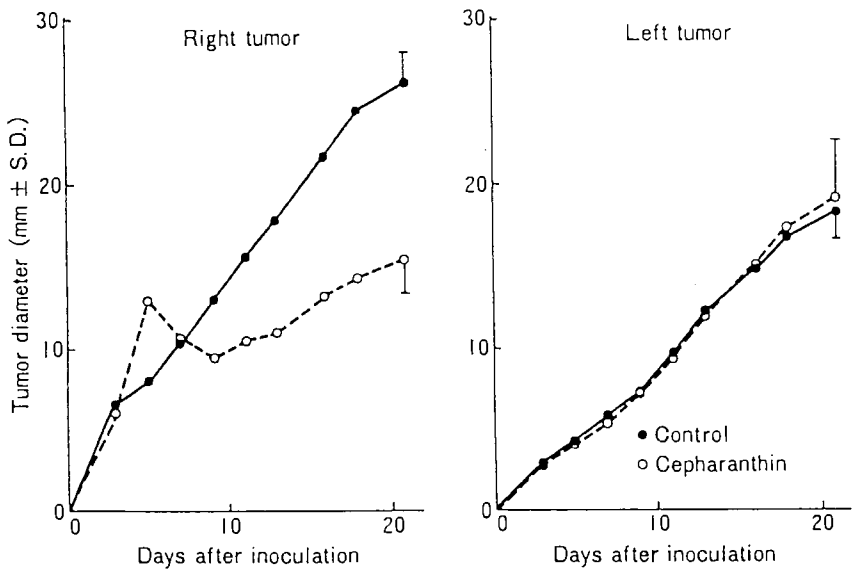
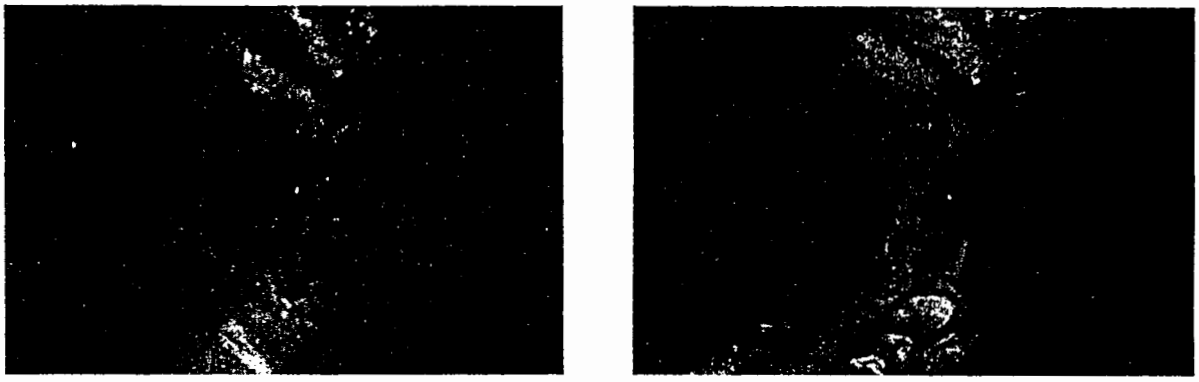


図3．Antitumor Effect of Cepharantin in the Double Grafted Tumor System of BALB／C Nude Mice



（A） Nude Mouse, Control(21days)　　（B） Nude Mouse, CE(21days)

図 4

transfer実験を行ったところ、図５．に示すように有意に腫瘍の増殖を抑制した。更にその脾臓細胞を抗体と補体で処理したところ表２．に示すように抗Lyt-1抗体で処理すると活性が落ちることから、effector細胞はLyt-1陽性ヘルパーT細胞であることが示唆された。

次に腫瘍内浸潤リンパ球（TIL）をCE投与した左右の腫瘍から採取し、Meth-A腫瘍細胞と５：１の割合で混合し、BALB/cマウスに接種するWinn assayを行ったところ、表３．の通り、左右腫瘍のTILとも抗腫瘍効果が見いだされた。

次に最近ヒトの細胞において好中球走化活性を持ったIL－８と単球走化活性を持ったMCAFが遺伝子工学的に取り出され、表４．

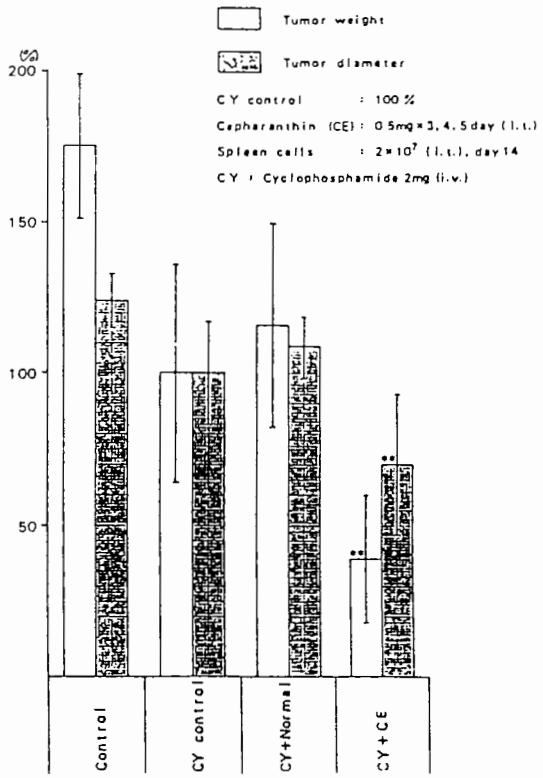


図５． Adoptive Transfer Experiment

表２． Intratumoral Adoptive Immunotherapy with Cepharanthin (CE) immunized Spleen Cells

Group	Tumor free /tested	Tumor diameter (mm±S.D.)	Tumor weight (g±S.D.)
Control	0/10	24.07±2.33	4.15±0.72
CY control	0/ 7	20.77±0.87	2.57±0.22
CY+whole (CE) cell	2/ 4	5.00±2.12**	0.11±0.11**
CY+āLyt-1 (CE) cell	2/ 6	14.53±5.69	1.32±1.08
CY+āLyt-2 (CE) cell	3/ 6	10.17±3.33**	0.58±0.38**
CY+āAGMI (CE) cell	1/ 6	10.68±3.77**	0.64±0.58**

Significant difference from CY control ; ** $p<0.01$
CY : cyclophosphamide (2 mg/mouse) i.v. injection 1 hr before spleen cells injection
CE : Cepharanthin immunized spleen cells (2×10^7) were taken from mice 14 days after tumor inoculation

のごとき性質のあることがわかった。それぞれはマウスのマクロファージ炎症蛋白（MIP－2，MIP－1）と似ているものであることがわかってきている（表5）。

表3．Winn Assay of TIL from Cepharanthin(CE)Treated Meth-A

	Tumor free /tested	Tumor diameter (mm±S.D.)	Tumor weight (g±S.D.)
Control	0/6	16.57±2.02	2.26±0.62
TIL・Control	0/6	16.13±1.23	1.88±0.40
TIL・CE・Right	3/9	9.59±7.68*	1.00±0.94*
TIL・CE・Left	7/8	1.34±3.89**	0.08±0.22**

Significant difference from the control ; * $p<0.05$, ** $p<0.01$
TIL/Meth-A ratio=5 (1.25×10^6) : 1 (2.5×10^5)

表4

	Interleukin-8 (IL-8)	Monocyte Chemotactic and Activating Factor (MCAF)
Nomenclature	Monocyte-Derived Neutrophil Chemotactic Factor (MDNCF) Neutrophil Activating Protein-1 (NAP-1)	Monocyte Chemoattractant Protein-1 (MCP-1), Macrophage Chemotactic Factor (MCF)
Producer	PBMC, Monocytes, Fibloblast Keratinocytes, Endothelial cells	PBMC, Tumor cells, Fibloblast Keratinocytes, Endothelial cells
Inducer	LPS, IL-1, TNF, PHA, PSK	LPS, IL-1, TNF, PHA OK-432, PSK, PPD
Chemotactic for	Neutrophils, Lymphocytes	Monocytes, Macrophages
DNA	chr.4, 1.6Kb, 4exons	0.65Kb
Protein	99a.a. (cell associated) 72a.a. (mature protein) 8KD, pI8.5	99a.a. (cell associatod) 76a.a. (mature protein) 15KD
Receptor	60～65KD, Kd＝10^{-10}M 20,000/cell	

表5．Macrophage Inflammatory Protein (MIP-1, MIP-2)

○LPS-stimulated murine macrophages secrete 2 heparin binding proteins containing 4 cysteines.
○S.C. or I.D. administration causes PMN infiltration followed by Mϕ infiltration.

	MIP-1	MIP-2
Protein	8KD, 69a.a., acidic protein doublet form (MIP-1α, β)	6KD, basic protein
Cell source	Mϕ, Tcells, Fibloblasts	Mϕ
Biological activity	induce superoxide generation, pyrogen	chemotactic for human neutrophils
Chromosome	murine chr.11 (TCA-3, JE)	
Homology	human MCAF human LD78, RANTES murine TCA-3 murine JE	human IL-8 (NAP-1) human IP-10 platelet factor-4 (PF-4) growth regulated gene product (GRO, mKC)

そこでCEを右側腫瘍内に接種した時の左右腫瘍組織を採取し、48時間培養した時のその培養上清の好中球走化活性（表6）、単球走化活性(表7)を調べたところ、右側腫瘍では好中球走化活性が、左側腫瘍では単球走化活性が有意に上昇していることがわかった。

以上の結果を他のBRMの結果と併せて考えると図6．のようになる。すなわちCEを右側腫瘍に投与するとIL－8(好中球走化因子)が誘導され好中球が浸潤し、その好中球がMCAF（単球走化活性因子)を誘導し活性化Mφが浸潤し、このMφが右側腫瘍を殺すようになる。このMφがIL－1を産生し局所リンパ節ならびに脾臓細胞にLyt-1陽性、L3 T4陽性ヘルパーT細胞が増加してくる。このT細胞が血流を介して左側腫瘍に達するとMCAFを誘導し、活性化Mφが浸潤し左側腫瘍を殺すようになる。

表6．Neutrophil Chemotactic Factor Produced from CE-treated Tumor Tissue

Culture Supernatant	No. of Migrated Neutrophil per a Visual Field (×1000)
Medium Control	2.4 ± 1.5
Meth—A Tumor	4.6 ± 1.9
CE—treated Meth—A tumor Right Tumor	18.3 ± 6.2**
CE—treated Meth—A tumor Left tumor	3.8 ± 1.3

Culture Condition : Kurabo Chemotaxicell (5μm) in CO_2 incubator for 2h
Cell : Murine PEC induced by proteose peptone (5×10^5 cells/200μl)
Chemotactic factor : Culture supernatant (200μl) of CE—treated Meth—A (6days) 48hrs after incubation (RPMI 1640 with 10%FCS)
Significant difference from the Meth—A tumor : **P<0.01

表7．Macrophage Chemotactic Factor Induced from CE-treated Tumor Tissue

Culture Supernatant	No. of Migrated Cells ± S.D./a Field (×1000)
Medium Control	1.0 ± 0.7
Control Tumor	6.4 ± 2.8
CE—treated Right Tumor	4.6 ± 2.6
CE—treated Left Tumor	9.6 ± 3.7*

Culture condition : Kurabo Chemotaxicell (5μm) in CO_2 incubator for 3hr.

Cell : PEC induced by 3% thioglycolate (5×10^5 cells/200μl).

Chemotactic factor : culture supernatant (200μl) of tumor tissue (6days) 48hrs after incubation

* Significant difference from control tumor : P<0.05

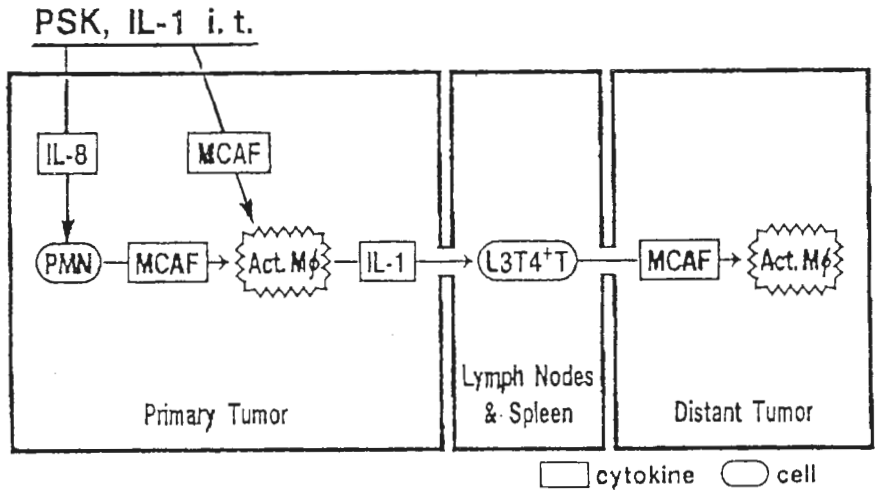


図6. Antitumor Mechanism of PSK and IL-1
in the Double Grafted Tumor System

更に最近活性化Mφならびに好中球が産生すると考えられる免疫抑制酸性蛋白(IAP)がCE投与により血中に誘導されることを見いだしたので(図7)、以上の考えを支持するものと考える。

一方CEは図8.に示すように6種類のアルカロイドから成ることがわかっているので、それぞれのアルカロイドを精製し、どの成分が特に抗腫瘍効果を持っているか検討した。精製したCepharanthine 0.5mg 3回の投与では右側腫瘍は著明な抗腫瘍効果を認めたが、

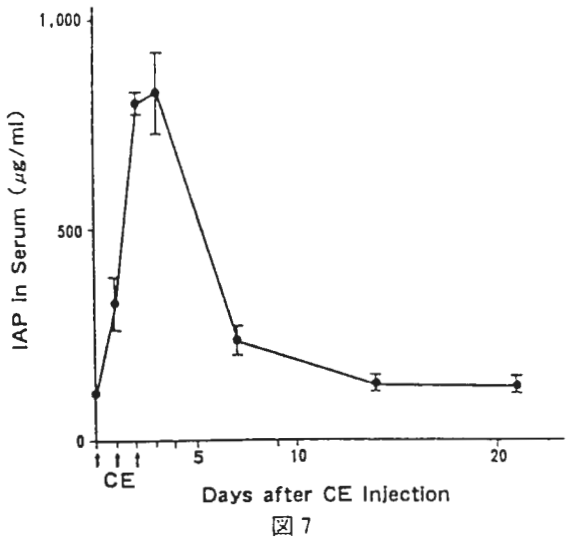
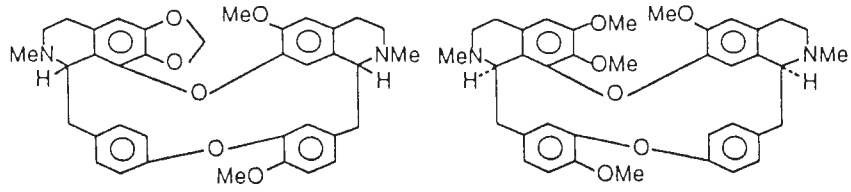


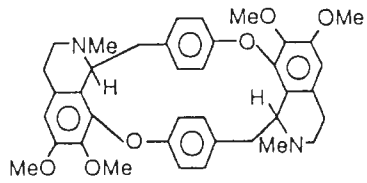
図7

左側腫瘍ではみられなかった(図9、表8)。Isotetrandrine, Cycleanine, Berbamine投与ではあまり著明な抗腫瘍効果が認められなかった(図10、表9)。残るHomoaromoline, Cepharanolineも同様に調べたところ図11、表10に示すようにHomoaromolineが右側腫瘍を有意に増殖抑制した。以上の結果からCE投与による右側腫瘍はCepharanthineならびにHomoaromolineによる直接作用で説明がつくが、左側腫瘍はアルカロイド成分の混合による立体構造によるものか、未知の成分によって増殖抑制を示しているのか、今後の研究課題となった。

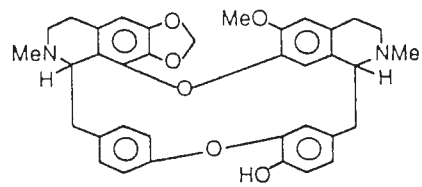


Cepharanthine

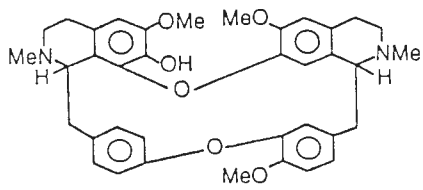
Isotetrandrine



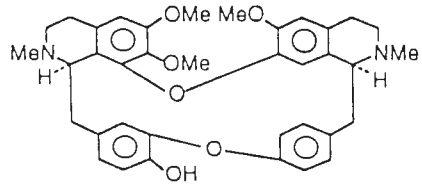
Cycleanine



Cepharanoline



Homoaromoline



Berbamine

図 8. Structures of Six Bisbenzylisoquinoline Alkaloids in Cepharanthin™

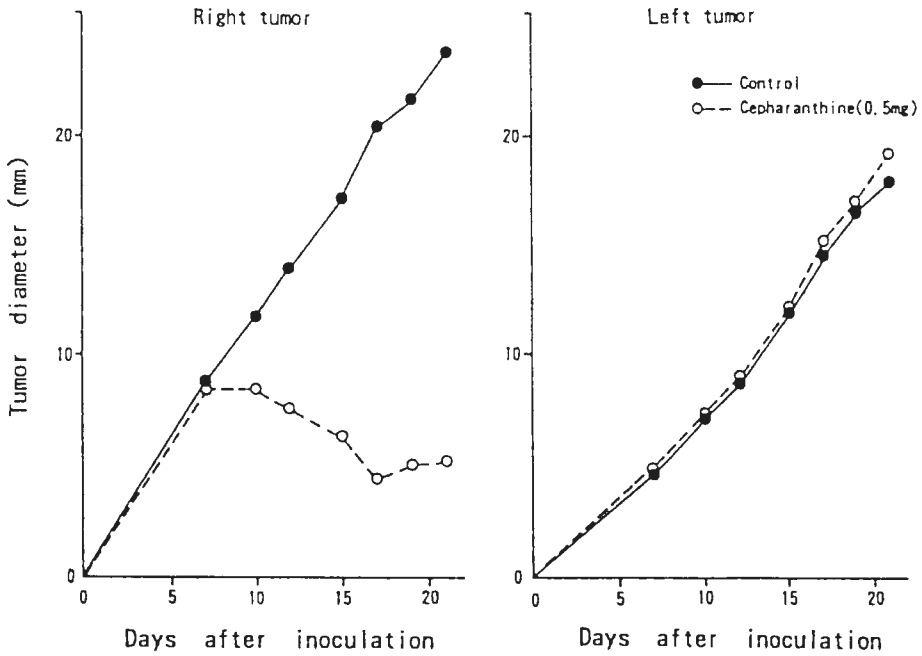


図 9. Antitumor Effect of Cepharanthine in the Double Grafted Tumor System

表8. Antitumor Effect of Cepharanthine in the Double Grafted Tumor System

Group	Right Tumor			Left Tumor		
	Tumor free/ Mice	Tumor diameter (mm±S.D.)	Tumor Weight (g±S.D.)	Tumor free/ Mice	Tumor diameter (mm±S.D.)	Tumor weight (g±S.D.)
Control	0/ 6	23.63±2.35	4.71±0.84	0/ 6	17.85±1.53	2.65±0.50
Cepharanthine (0.5mg×3)	5/10	5.24±6.58 *	1.34±2.76 *	0/10	19.26±1.89	3.19±0.97

Significant difference from the control group : *P<0.01

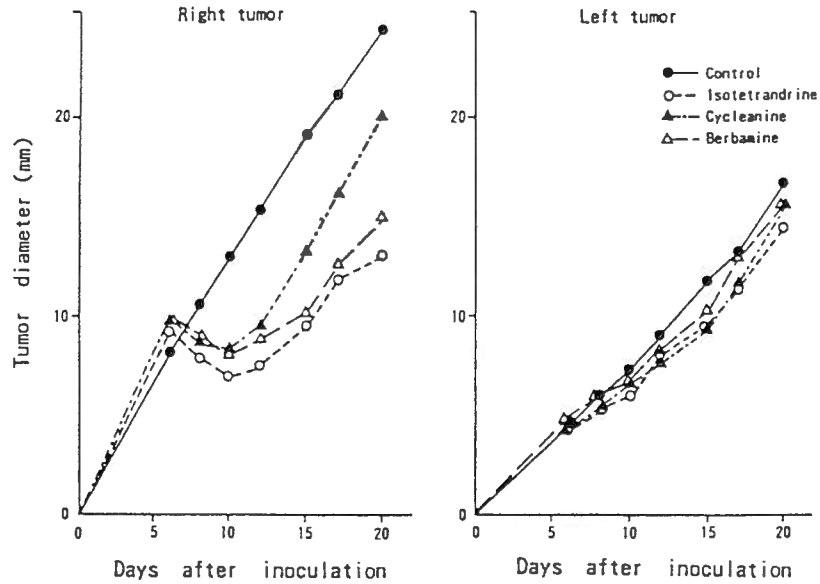


図10. Antitumor Effect of Biscoclaurine Alkaloids in the Double Grafted Tumor System

表9. Antitumor Effect of Biscoclaurine Alkaloids in the Double Grafted Tumor System

Alkaloids	Tumor	Tumor Free/ Tested	Tumor diameter (mm±S.D.)	Tumor weight (g±S.D.)
Control	Right	0/6	24.6±1.7	4.6±0.7
	Left	0/6	16.7±1.9	1.9±0.5
Isotetrandrine (0.5mg×3)	Right	1/6	13.0±8.5	2.0±1.5
	Left	1/6	14.4±7.5	1.8±1.1
Cycleanine (0.5mg×3)	Right	0/6	20.0±2.7	2.9±0.8
	Left	0/6	15.6±6.0	2.0±1.2
Berbamine (0.5mg×3)	Right	1/6	15.0±8.0	2.0±1.3
	Left	1/6	15.7±4.1	1.9±1.0

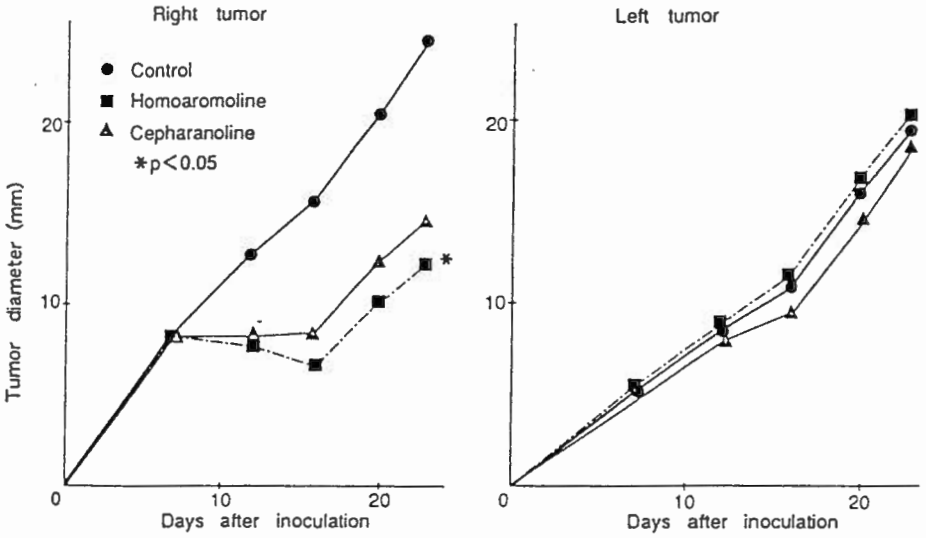


図11. Antitumor Effect of Homoaromoline and Cepharanoline in the Double Grafted Tumor System

表10. Antitumor Effect of Homoaromoline and Cepharanoline in the Double Grafted Tumor System

Alkaloids	Right tumor			Left tumor		
	tumor free / tested	Tumor diameter (mm±S.D.)	Tumor weight (g±S.D.)	Tumor free / tested	Tumor diameter (mm±S.D.)	Tumor weight (g±S.D.)
Control	0/6	24.1± 0.4	3.9± 0.9	0/6	19.3± 2.9	2.5± 0.9
Homoaromoline (0.5mg/mouse)	2/6	12.0± 9.4*	1.6± 1.4**	0/6	20.1± 2.4	2.7± 0.6
Cepharanoline (0.5mg/mouse)	2/6	14.5±11.6	2.2± 2.0	0/6	18.3± 4.8	2.3± 1.1

Significant difference from the control group : *p<0.05 **p<0.01

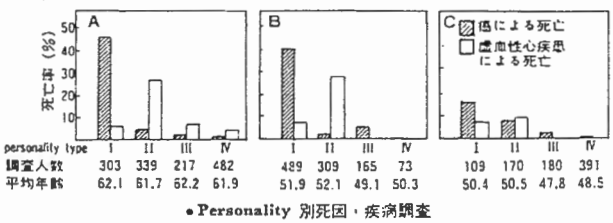
“癌の免疫療法”

宮城県立がんセンター研究所
免疫学部長　海老名　卓三郎

Ⅰ．はじめに

どのような性格の人が癌にかかりやすく、死亡する割合が高いかについて10年以上にわたる旧ユーゴスラビアとドイツ・ハイデルベルグでの調査結果がある。性格を依存性が強くストレスやトラブルにさいし絶望感や無力感に陥りやすいタイプⅠ型、依存性は強いがストレスやトラブル時に怒りや攻撃に走りやすいタイプⅡ型、Ⅰ型とⅡ型の両面性をもつ一応正常だがやや性格障害的タイプⅢ型、自律性があってストレスをうまく処理できる正常タイプⅣ型にわけると図1．Aに示すように癌死がタイプⅠ型から、虚血性心疾患死がタイプⅡ型からでていることが明らかになった。更に常にストレスにさらされていると健常群に比して図1．B，Cに示すように、より顕著にその傾向があらわれることがわかった。何故タイプⅠ型に癌死が多いかについては、抑うつ状態が免疫能を低下させているのではないかと考えられる。そこで癌患者に精神療法を行い精神的な安定と積極的な生活を行うよう治療した結果図2．に示すように精神療法を行った方が生存率に有意な差が出ることがわかった。すなわち精神療法を行うことによって免疫能が高まることが示唆されている。それでは免疫能と日常の生活習慣とどのような関係にあるかをリンパ球機能の1つであるＮＫ活性で調べてみると図3．に示すように豆腐などの大豆製品を毎日摂っている人の方が週に1回以下しか摂ってない人に比べてＮＫ活性が有意に高いことがわかっている。更に図4．に示すように heavy smoker はＮＫ活性が有意に低いが、お酒はある程度飲んだ方がＮＫ活性が高いことがわかっている。

図1



• Personality 別死因・疾病調査

A：ユーゴスラビア調査，B：ハイデルベルク調査（ストレス群），
C：ハイデルベルク調査（健常群）

図2

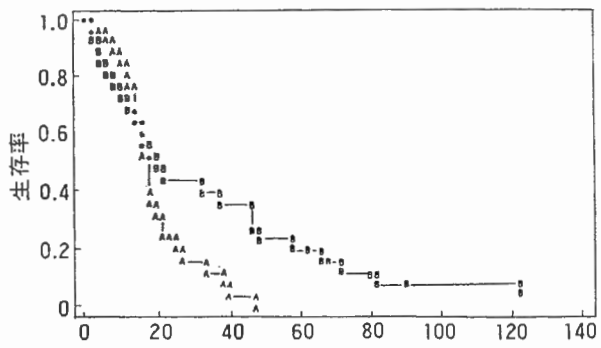


図3　大豆製品摂取者のＮＫ活性

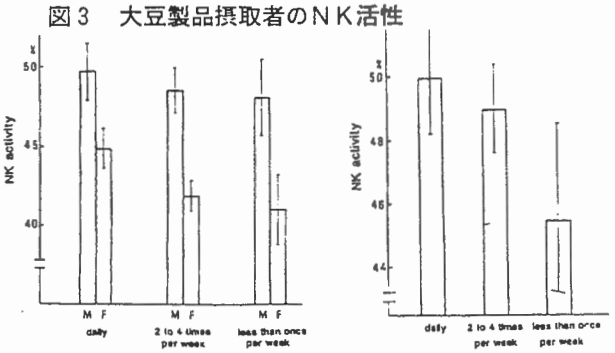
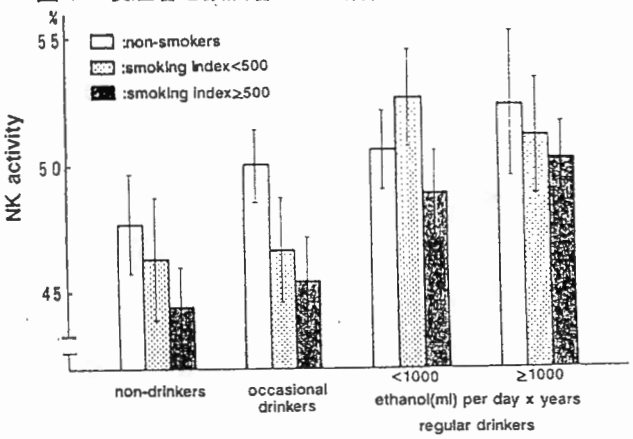


Fig. 2. NK activity (means, bars 95% CI) in relation to green vegetables intake (M: males, F: females).

Fig. 3. NK activity (means, bars 95% CI) in relation to soyabean products intake among males.

図4　喫煙者と飲酒者のＮＫ活性



次に免疫とは何かについて説明したい。一昔前までは“二度かかりなし”の血清学的考えが中心であったが、現在では免疫とは如何に“非自己（not self）”の物を認識しそれを排除するかという生物学の根本をなす学問と考えていただきたい。免疫を担当しているものにどのようなものがあるかというと、いわゆる白血球でその中に1．好中球など顆粒球系、2．単球・マクロファージ系、3．リンパ球系がある。リンパ球系にもIg産生に関与するＢリンパ球、胸腺にて分化が進むＴリンパ球、細胞質に大きな顆粒を含む前述し

たＮＫ細胞がある。更にＴリンパ球はその表面マーカーの違いからＣＤ４系のヘルパーＴ細胞とＣＤ８系のキラーＴ細胞がある。体の中に非常に微妙な違いの非自己である癌細胞が出現すると、前述した全ての白血球系が働いて癌細胞を殺すように働くことになる。

Ⅱ．ＢＲＭの腫瘍内投与療法

ＢＲＭとは表１．に示すものであるが、従来免疫療法といわれていたものを広く拡大したもので、このうち免疫賦活剤はわれわれのところでインターフェロンを誘起し、ＮＫ細胞やマクロファージを活性化させることの出来る薬剤であると認めたもので、この中に担子菌製剤のＰＳＫやレンチナン、細菌製剤のＯＫ－432やＢＣＧが含まれる。

表１

BRM (biological response modifier)
（生物学的反応修飾剤）

〔癌細胞に対する宿主の応答力を変化させることにより腫瘍と宿主の関係をいい方向に変えさせる物質や方法〕

○免疫賦活剤（PSK, OK-432, BCG）

○サイトカイン（IFN, IL-1, IL-2, TNF, CSF）

○単クローン抗体

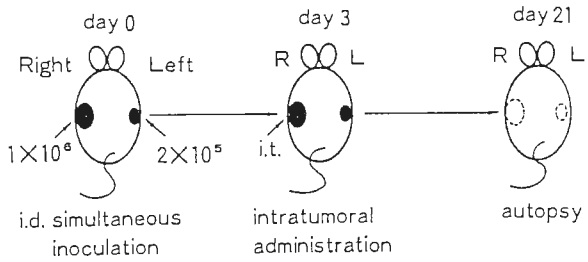
○エフェクター細胞（TIL, LAK）

一方、癌の治療法として手術療法、放射線療法、化学療法、免疫療法がある。癌が原発巣だけであれば、手術で取り除けばいいが、すでに遠隔転移巣がある場合は放射線や化学療法剤で全身の癌細胞をたたくことになる。しかし放射線や化学療法剤は癌細胞を殺すことが出来るが、分裂している正常細胞、特に骨髄系の細胞も殺すため副作用がひどい。そこで考えられたのが宿主の免疫能を高める免疫療法である。免疫療法は副作用が少ない長所があるが、効き目が今一つというところであった。

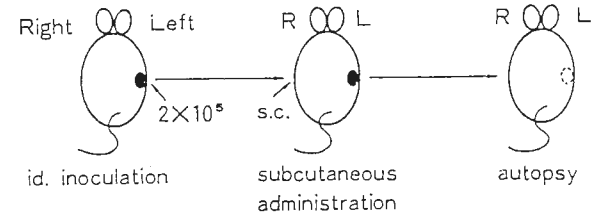
そこで原発固型癌も治癒させ、遠隔転移巣の増殖も抑えることが出来るＢＲＭの治療法を検討した結果、マウスの“二重移植腫瘍系”を考案した（図５）。すなわちＢＡＬＢ／ｃマウスに同系のMeth－Ａ腫瘍細胞を右側腹皮内に10^6（原発巣と想定）、左側腹皮内に２×10^5個（遠隔腫瘍と想定）接種し、３日目から３日間ＢＲＭを右側腫瘍に投与し、投与していない左側腫瘍の増殖を21日間観察する系である。対照として左側腹皮内にだけ２×10^5接種し３日目に右側皮下に薬剤を投与する“Single tumor system”を作り、薬剤が血流を介して左側腫瘍を直接治癒させるものと区別した。

図５

Double grafted tumor system



Single tumor system



その結果表２．に示すように免疫賦活剤の中では担子菌製剤ＰＳＫが、サイトカインの中ではＩＬ－１が“二重移植腫瘍系”で左右の腫瘍を治癒させ、“Single tumor system”では治癒させないことがわかった。すなわち両薬剤は原発腫瘍内に投与することにより宿主の免疫機構が働いて遠隔腫瘍も治癒させることの出来ることを見出した。直接薬剤が遠隔腫瘍に達して作用しているのではなく、原発腫瘍内に投与することにより宿主の細胞系、サイトカイン系が働き遠隔腫瘍を治癒させていることが示唆された。次にその機構について検討を加えた。

表２

Characterization of Various BRMs in the "Double Grafted Tumor System" and "Single Tumor System"

Category	Drugs	Dose	Double Tumor Right	Double Tumor Left	Single Tumor Left
Immunopotentiators	PSK	5 mg x 3	++	++	-
	CR	0.5 mg x 3	++	++	+
	OK-432	0.1 mg x 5	++	+	-
	BCG	5 mg x 3	++	+	ND
	LNT	0.1 mg x 3	-	-	-
Cytokines	IL-1	0.2 mg x 3	++	++	-
	IFN	10^5 U x 8	++	++	+
	TNF	3 x 10^3 U x 3	++	-	ND
	IL-2	10^4 U x 10	-	-	-
	IL-6	5 mg x 3	-	-	-
Chemotherapeutics	MMC	100 mg x 1	++	+	+
	NCS	10 U x 1	++	-	-

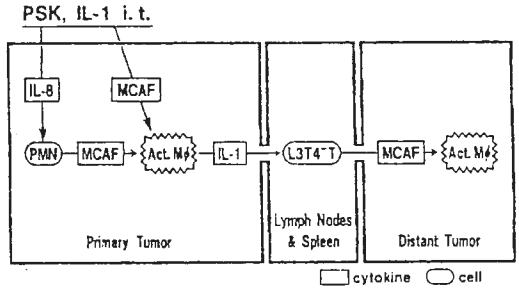
++, tumor rejection; +, growth inhibition; ND, not done

Ⅲ．ＢＲＭ腫瘍内投与による腫瘍免疫増強機構

数多くの実験結果から結論として図６．に示すようになった。すなわちＢＲＭ（担子菌製剤ＰＳＫやサイトカインＩＬ－１など）を原発腫瘍内に投与すると、腫瘍細胞がＩＬ－８（好中球走化因子）とＭＣＡＦ（Mφ走化活性因子）を誘導・産生し、腫瘍内に好中球並びに細胞障害活性を持ったMφが浸潤し、原発腫瘍を殺すようになる。次にこの活性化したMφがＩＬ－１を産生し、リンパ管並びに血流を介して近くのリンパ節並びに脾臓にＬ３Ｔ４陽性のＣＤ４系ヘルパーＴ細胞を誘導増加させる。このヘルパーＴ細胞が血流を介して遠隔転移巣に達すると同じ腫瘍を認識してＭＣＡＦを誘導産生する。このため遠隔転移巣にも細胞障害活性を持ったMφが浸潤し、腫瘍細胞を殺していくものと考えられる。すなわちＢＲＭを腫瘍内に投与すること

図６

Antitumor Mechanism of PSK and IL-1
in the Double Grafted Tumor System

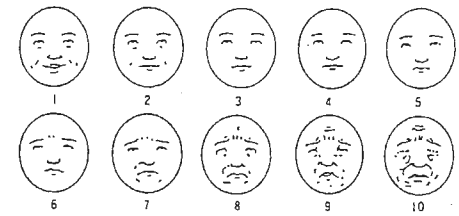


とにより生体内で一連の免疫サイトカイン・ネットワークが働いて腫瘍細胞を排除するようになることがわかった。そのため例えば腫瘍局所のリンパ節を切除すると、かえって遠隔転移巣を治癒させることができなくなることがわかった。又最近ＢＲＭを腫瘍内に投与して癌を治癒させるものは、投与により血中に α_1－acid glycoprotein の一種であるＩＡＰを誘導させていることがわかった。すなわちこのＩＡＰは活性化Mφや好中球が産生しており、腫瘍内にＢＲＭを投与することにより炎症をひきおこし、炎症性ＩＡＰの産生が抗腫瘍効果に結びついていることを示したことになる。

Ⅳ．最　後　に

最近の医学理念として、どのような患者でも最善をつくして一日でも生命を延ばそうという時代から、その生存期間のＱＯＬ（生命の質）を考慮した時代に変わりつつある。又生体内では免疫系、神経系、内分泌系が密接な関係にあることがわかりつつあり、ＢＲＭの投与がこのいずれにもいい方向に働きＱＯＬを高めていることがわかってきている。すなわち放射線や化学療法は腫瘍を治すことは出来ても患者の精神身体状態をよくすることが出来ずＱＯＬが低下したまま亡くなる例がかなりある。一方免疫療法を併用すると腫瘍が完全に治らなくてもＱＯＬを高い状態に保ったままに出来ることがわかってきている。例えば患者さんに現在の気分はどれに相当しますかと図７．のような絵を示し、その番号を記入してもらうなどＱＯＬの７つ位の指標で総合判定するとＰＳＫ投与群が有意にＱＯＬがいい状態になっていることがわかる。更に患者の性

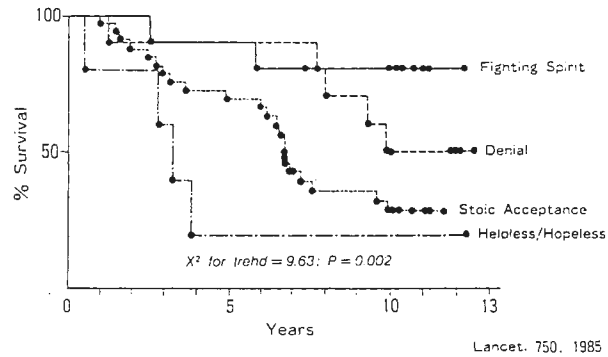
図７



格により図８．に示すように闘争心をもって癌に立ち向かう人は生存率がよく、逆にすぐに絶望感を持つような人は生存率が悪いことが乳癌患者で示されているので、今後このようなＢＲＭと精神神経系との関係の研究も望まれる。

図８

Survival curves for patients dying of breast cancer, according to psychological response.



Lancet. 750. 1985
K.W. Pettingale
Kings College U.K.

第6回JBRM学会学術集会総会

担子菌製剤PSKによる腫瘍免疫増強機構：血清IAPの誘導

海老名 卓三郎　　村田 和子

ANTITUMOR EFFECT OF PSK, A *Coliolus* PREPARATION: INDUCTION OF IMMUNOSUPPRESSIVE ACIDIC PROTEIN, A TYPE OF α_1-ACID GLYCOPROTEIN, IN MICE: The antitumor effect of PSK (a protein-bound polysaccharide preparation) in an experimental mouse model, the "double grafted tumor system" was analysed. Male BALB/c mice received simultaneous inoculations of Meth-A fibrosarcoma cells on right flank (10^6 cells) and left flank (2×10^5 cells) on day 0, and PSK was injected intratumorally into right tumor on days 3, 4 and 5. PSK, cured not only the right, but also the left, non-treated tumor in a double grafted tumor system. Immunosuppressive acidic protein (IAP) in serum was increased transiently soon after intradermal injection of PSK, in BALB/c mice. IAP in serum was gradually increased after intradermal inoculation of Meth-A tumor in BALB/c mice. The biochemical differences between PSK-induced IAP (early, inflammatory IAP) and Meth-A-induced IAP (late, tumor-induced IAP) was investigated by crossed affinity immunoelectrophoresis (CAIE) with concanavalin A (Con A). IAP of murine serum was separated into 4 peaks. IAP in normal mouse was rich in high-mannose type sugar chain (Peak 3) and retained no hybrid-type sugar chain (Peak 4) of which inflammatory and tumor-induced IAP retained. Inflammatory IAP was rich in biantennary sugar chain (Peak 2) and tumor-induced IAP was rich in tri-tetraantennary sugar chain (Peak 1).

〔**Biotherapy** 8 (3) : 315-316, 1994〕

Key words : Biological response modifier (BRM), Intratumoral administration, Immunosuppressive acidic protein, Activated macrophage

緒　言

われわれは免疫賦活剤である担子菌製剤PSKが原発腫瘍のみならず、遠隔転移腫瘍まで治癒させることを、われわれが考案した“二重移植腫瘍系”で明らかにしてきた。すなわちBALB/cマウスにMeth-A腫瘍細胞を右側腹皮内に10^6、左側腹皮内に2×10^5個接種し、3日目から3日間PSKを5mgずつ右側腫瘍内に投与し、投与していない左側腫瘍の増殖まで抑制する系である。そこでその作用機作を検討するため今回は活性化マクロファージ並びに好中球が産生する免疫抑制酸性蛋白（IAP）の誘導能について検討した。さらにBRM投与による炎症性IAPと担癌後期に出現する腫瘍性IAPの物性の違いについても報告する。IAPは癌や炎症などの急性期に増加するα_1-acid glycoprotein (α_1-AG)の一成分であり、マイトジェン反応の抑制、natural killer（NK）細胞活性の抑制、腫瘍の生着や増殖の促進作用、抑制性マクロファージ（Mϕ）の誘導などの作用を有する免疫抑制蛋白質として知られている。また、IAPは主にマクロファージ（Mϕ）、好中球、肝細胞が産生することがわかっているので、活性化Mϕの指標として測定した。

宮城県立がんセンター研究所免疫学
Takusaburo EBINA and Kazuko MURATA
Division of Immunology, Research Institute Miyagi Cancer Center, 47-1 Nodayama, Medeshima-shiode, Natori, Miyagi 981-12, Japan.

I. 材料と方法

1. マウスと腫瘍

日本エスエルシー（株）から購入した7週齢雄BALB/cマウスを使用した。腫瘍は、BALB/cマウスと同系のMeth-A線維芽肉腫細胞を使用した。

2. 二重移植腫瘍系

BALB/cマウスの右側腹皮内に10^6、左側腹皮内に2×10^5のMeth-A細胞を同時に移植し、右側の大きな腫瘍（原発巣）が指で触れるようになる3日目より、腫瘍内に薬剤を3日間投与することにより治療し、左側の遠隔腫瘍（転移巣）の退縮を観察する系。

3. 薬剤

蛋白質結合・β-D-グルカンを主成分とする多糖体である担子菌製剤PSKを呉羽化学工業（株）より恵与を受けた。

4. 血清IAP値測定

ＰＳＫを投与した担癌マウスならびに非担癌対照マウスにＰＳＫを皮内注射した時の血清ＩＡＰ値を、single radial immunodiffusion (SRID) 法を用い測定した。

5. ＩＡＰの物性検討

マウス血清中のＩＡＰのheterogeneityに関してCon Aを使った crossed affino immuno-electrophoresis(CAIE)により解析した。

II. 実験ならびに考察

1. ＰＳＫ投与によるＩＡＰの誘導

ＰＳＫ5mgを投与した非担癌マウスのＩＡＰ値を測定したところ、850μg/mlのＩＡＰ産生がみられた。又起炎剤カラゲナン投与でも650μg/mlのＩＡＰ産生がみられた。次に担癌マウスにＰＳＫを腫瘍内投与したところ、600μg/mlのＩＡＰ値の増加が認められ、その後腫瘍の縮小に伴い急速に減少した。一方、非治療担癌マウスでは徐々にＩＡＰ値は上昇し、担癌21日目には300μg/mlに達した。ＰＳＫの投与時期を遅らせてもＩＡＰの上昇は認められたが、その後の回復は遅く抗腫瘍効果は認められなかった。すなわち、ＩＡＰ値の一時増加というMφの活性化によりＰＳＫが炎症反応を起こすことが、抗腫瘍効果につながるということが示唆された。

2. 炎症性ＩＡＰと腫瘍性ＩＡＰの物性の差異

炎症性ＩＡＰと腫瘍性ＩＡＰの物性の違いをCon A-CAIEで検討した結果、正常血清ＩＡＰにはないＰ４（hybrid type糖鎖）が両者とも出現し、炎症性ＩＡＰではＰ２（biantennary糖鎖）が増加し、腫瘍性ＩＡＰではＰ１（tri-tetraantennary糖鎖）が増加していることがわかった。

すなわち、ＩＡＰの糖鎖部分が正常から炎症性に変わる時、炎症性から腫瘍性に変わる時にそれぞれ変化し、生体に微妙な影響を与えていることが示唆された。

今迄にＩＡＰ値が580μg/ml以下の人はＰＳＫ投与による癌の生存率がいいことがわかっているので今後炎症性ＩＡＰと腫瘍性ＩＡＰを前もって分けて測定することが出来ればより詳細にresponderとnon-responderを前もって知ることが出来るものと期待される。更にＰＳＫの皮内注により血清ＩＡＰの増加する人はＰＳＫの腫瘍内投与に反応し抗腫瘍効果が期待されるので、炎症性ＩＡＰの産生は抗腫瘍のマーカーに使われる可能性が出てきた。

文　献

1) Ebina, T., Kohya, H. and Ishikawa, K.: Antitumor effect of PSK: Role of regional lymph nodes and enhancement of concomitant and sinecomitant immunity in the mouse. *Jpn. J. Cancer Res.* 80: 158-166, 1989.

2) Ebina, T. and Murata, K.: Antitumor effect of PSK at a distant site: Inductions of interleukin-8-like factor and macrophage chemotactic factor in murine tumor. *Jpn. J. Cancer Res.* 81: 1307-1313, 1990.

3) Ebina, T. and Murata, K.: Antitumor effector mechanism of interleukin-1β at a distant site in the double grafted tumor system. Jpn. J. Cancer Res. 82:1292-1298, 1991.

4) Ebina, T. and Murata, K.: Antitumor effect of PSK at a distant site : Tumor-specific immunity and combination with other chemotherapeutic agents. *Jpn. J. Cancer Res.* 83:775-782,1992.

5) Ishikawa, K., Majima, T. and Ebina, T.: Antitumor effect of a Coliolus Preparation, PSK: Induction of macrophage chemotactic factor (MCF) in spleens of tumor bearing mice. *Biotherapy* 5:251-258, 1992.

イルス活性を示すことがわかっている。

近年、臓器移植、AIDS、悪性腫瘍などいわゆるimmunocompromised hostにおける日和見感染としてCMV感染がしばしば起こり、特にCMV肺炎は致命的になることがあり、注意が促されていた。このGANが開発されたことにより、ほぼ七〇％の有効率が示され、有力な抗CMV剤が開発されたことになる。

アジドチミジン（AZT）

化学名 3'azido-3'-deoxythymidine をもつAZTは図２のような構造式をもつ。AZTはヒト免疫不全ウイルス（HIV）感染細胞内で細胞性酵素により燐酸化され、活性型の３燐酸体（AZT・TP）となる。

AZT・TPはウイルス粒子内の逆転写酵素(reverse transcriptase)を競合的に阻害し、またdT・TPの代わりにウイルスDNAに取り込まれて、DNA鎖伸長を停止することによりウイルス増殖を阻害する。

AZTのヒト免疫不全ウイルス（HIV）に対するin vitroにおけるID_{50}値は、T４リンパ球細胞で〇・一三μg／ml以下であった。

日本でもエイズ患者ならびにARC（T４リンパ球数三〇〇／mm^3以下で皮膚粘膜カンジダ症、体重減少、リンパ節腫脹、原因不明の発熱などのHIV感染の徴候を有する患者）に適用が認められた。ただし貧血、好中球減少、白血球減少など副作用も非常に強いことも知られている。

現状

ジダノシン(ddI)

AZTより副作用の少ないヌクレオシド誘導体の研究が進み、その一つとして図２に示すddIが現在、日本でもAIDS並びにAIDS関連症候群に対して長期投与が試みられている。山田兼雄らによると、HIV感染症に対する本剤投与後の生存率は、長期投与例三八例を含む臨床第Ⅰ／Ⅱ相試験の評価対象六五例を対象に算出した。その結果、生存率は二四週後七九％、四八週後八七％、九六週後七〇％であった。病態別九六週後生存率は、AIDS群で五三％、ARCおよびAC群で九一％と、両群間の生存率曲線には有意な差が認められた（$P<0.05$, Log-rank 検定）

以上の結果から本剤は長期投与においても臨床的に有用な薬剤と考えられた。

その他ヌクレオシド誘導体として図２に示すDDCやFDDT、AZU、D４Tなど数々抗HIV剤として試みられている。

アンチセンスDNA

アンチセンスDNA法による遺伝子発現制御は、理論的にはウイルス遺伝子を含んだ全ての遺伝子を可逆的に調節出来る可能性を持っている。

しかし、標的となる核酸DNA／RNAは遺伝子コードとしての働き以外の、ダイナミックな分子としての相互作用（蛋白－核酸、核酸－核酸）を行うための立体構造や特異な配列が存在し、机上で考えるような単純なHybridizationは細胞内では得られないと思われる。どのような因子が主に作用するかを追究することが、アンチセンス療法の進展にとって最も重要であると考えられる。HIVのオリゴヌクレオチドを使った実験が現在行われている。

プロテアーゼ阻害剤

プロテアーゼ（protease；Pr）は触媒基の違いによりserine Pr（trypsin など）、cysteine Pr（Cys Pr；papain など）、aspartic acid Pr（Asp Pr;Pepsin など）、金属 Pr （thermolysin など）に分類されるが、ピコルナウイルスは Cys Pr を、レトロウイルスは Asp Pr を遺伝子としてもっていることがわかっている。このプロテアーゼはウイルス粒子蛋白の切断に働き、ウイルス複製に関与しているので、プロテアーゼ阻害剤が抗ウイルス剤として考えられるようになった。Bjorckら(4)が、単純ヘルペスウイルスとポリオウイルスに対してCys Pr 阻害剤であるヒト由来 cystatin Cを処理してGMK細胞での増殖阻害効果を調べたところ、〇・一三mMな濃度でヘルペスウイルスの増殖を選択的に完全に阻害した。この濃度は前出アシクロビルと同じレベルであった。

一方、センダイウイルスやロタウイルスは、培地中にトリプシンなどプロテアーゼを加えると、ウイルス蛋白の cleavage により感染力が増加することが知られている。本間らは、プロテアーゼ阻害剤 aprotinin投与によりセンダイウイルスによるマウス肺炎の死亡率を減少させることを見出し、筆者らは、ヒトロタウイルスのマウス感染モデルで Cys Pr 阻害剤である E-64-c や鶏卵由来 ovosystatin の経口投与により下痢の完全治癒を認めており、今後毒性などの検討の後、臨床応用も期待される(5)

現在HIVによるAIDSとC型肝炎ウイルス（HIV）による肝炎が最も重要なウイルス感染症であり、この二つのウイルスともプロテアーゼ遺伝子を持っていることから、その阻害剤の開発が進められている。

免疫賦活剤

イソプレノシン（MND－19）

MND－19は図３に示すように inosine と di-methylamino iso pro-panol-p-acetamidobe-nzoate のモル比一対三の複合体である。本剤はヘルペスなどDNAウイルスのみならず、インフルエンザなどRNAウイルスにも有効であると言われており、さらに免疫賦活作用を有することが知られているので、免疫異常の側面をもつ難病の一つであり、遅発性ウイルス感染症である亜急性硬化性全脳炎(SSPE)の治療に試みられた。

SSPEは主として小児期に発症し、重篤な中枢神経症状を呈する予後不良な疾患として知られている。本症は麻疹の既往が認められ、血中および髄液中に麻疹ウイルスに対する抗体が高値を示すこと、さらにSSPE患者の脳からウイルスが分離されたことにより、中枢神経系における麻疹ウイルスの持続感染によると考えられ、そこに宿主側の免疫異常も関与している可能性も高い。そこで日本におけるSSPE一五一例中MND－19投与例八九例、非投与例六二例に関して retrospective に比較したところ、一日二六～一九〇mg／kg平均一・五年のMND－19投与により生存率が有意に増加し、臨床経過も対照群に比して stage の進行が有意に遅く、長期寛解例が多いこと(6)が認められた。従来 in vivo でどのような疾患に有効が認められるかわからなかった、いわゆる orphan drug の一つであったイソプレノシンに光明がさしたようだ。

SSPEのように患者数のあまり多くない難病の薬剤開発に厚生省が援助することが、最近いわれており、今後こういう orphan drug の開発も期待される。

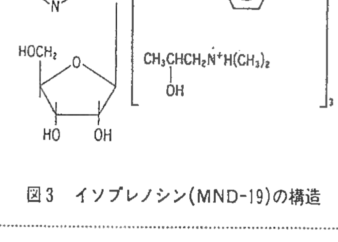


図３　イソプレノシン(MND-19)の構造

インターフェロン（IFN）

IFNは細胞膜上に存在するレセプターを介して抗ウイルス作用、抗腫瘍作用ならびに免疫増強作用と多面的な生物活性を有することが明らかになっている。抗ウイルス活性に関しては、標的細胞のレセプターを介して細胞内に2',5'－オリゴアデニレート合成酵素、プロテインキナーゼ、およびホスホジエステラーゼなどの酵素を誘導し、RNA分解酵素を活性化し、ウイルス蛋白質の合成を阻害する直接作用のあることがわかっている。さらにNK細胞やマクロファージなどの宿主免疫系を活性化し、ウイルス感染細胞を破壊し、ウイルスを排除する間接作用も知られている。

IFNは種特異性があり、ヒトにはヒトIFNしか効果がないが、遺伝子工学により recombinant IFNの量産も可能になり、抗ウイルス剤として最近脚光をあびている。すなわち今まで、HBe抗原陽性でかつDNAポリメラーゼ陽性のB型慢性活動性肝炎のウイルス血症の改善に適応が認められていたが、輸血後肝炎の病原の大部分であることがわかったC型肝炎ウイルスが発見され、C型肝炎の治療薬として、このIFNが大変有効であることがわかってきたからである。ただし、全ての患者がなおるわけではなく、ウイルス量の少ない人ほど奏効することがわかってきたので、今後適切な投与量、投与法の検討が望まれる。

ミノファーゲンC（SNMC）

甘草の有効成分グリチルリチン製剤SNMCは解毒剤、肝機能促進剤として臨床で使用されていた薬剤である。さらにこの薬剤は、われわれのところで、ヒトならびにマウスに投与することによりIFNを誘起し、NK細胞、マクロファージを活性化させることを見出したインターフェロン誘起剤といわれるものであり(7)、現在B型肝炎の治療、C型肝炎の予防、治療にも使われ、更にヒト免疫不全ウイルス（HIV）の in vitro での増殖を抑制していることがわかり、エイズに対する臨床治験も行われている。

最後に

ヘルペスウイルス群、レトロウイルス群並びに肝炎ウイルス群に対しては数々の薬剤が開発され、一部認可を受けたものが出てきたが、インフルエンザウイルスなど大部分のRNAウイルスに対する薬剤はアマンタジンやリバビリンが知られているぐらいで、今後更に選択毒性のよい薬剤、特にウイルス合成に必要な酵素の阻害剤の開発が望まれる。

＝文献＝

(1) T. Ebina et al. : Microbiol. Immunol. 34, 617, 1990

(2) S. D. Marlin et al. : Nature 344, 70, 1999.

(3) J. DeRudder et al. : Antimicrol. Agents Chemother. 16, 578, 1965.

(4) L. Bjorck et al. : J. Virol. 64, 94, 941, 1990.

(5) T. Ebina et al. : Microbiol. Immunol. 35, 583, 1991.

(6) Y. Fukuyama et al. : Brain Development 9, 270, 1987.

(7) N. Abe et al. : Microbiol. Immunol. 26, 535, 1982.

抗ウイルス剤の

宮城県立がんセンター研究所
免疫学部長
海老名 卓三郎

はじめに

アシクロビルが単純ヘルペスウイルスの増殖を選択的に阻害するということが発見されて以来、ふたたび抗ウイルス剤の開発が盛んになってきた。特にHIVによるエイズやHCVによるC型肝炎の発症が明らかになった昨今、世界中で抗ウイルスの研究が進んでいる。

現在抗ウイルス剤を作用機作から分類すると以下の五種が考えられる。

(1)直接ウイルスに結合してウイルスを不活化する薬剤。

(2)ウイルスが標的細胞に結合するのを妨げる薬剤。

(3)ウイルスの核酸合成を阻害し、細胞内でのウイルスの増殖を抑制する薬剤。

(4)ウイルス産生に関与する蛋白質分解酵素の阻害剤。

(5)生体内の免疫機構を強化して、ウイルスを宿主から排除する薬剤で、BRM(生物学的反応修飾剤)がこれに相当する。

以下われわれの研究を含め解説していきたい。

ウイルス不活化剤

クレスチン(PSK)

β-D-グルカンを主成分とする蛋白結合多糖体であるPSKは、担子菌製剤で抗悪性腫瘍製剤として臨床で使用されているBRMの一つである。PSKは二〇g／kgという大量経口投与でも全く毒性を示さず、かつ速やかに腸管に吸収される薬剤であることがわかったため、われわれは乳幼児下痢症の主要病原ウイルスであるロタウイルスに対する活性を検討した。その結果、用量依存的にヒトロタウイルスを不活化し、感染価を弱め、ウイルス産生量を減少させることがわかった。

更にロタウイルスとの結合はα-D-glucanではなく、β-D-glucanが主要な要素になっていることがわかった。次にわれわれが開発したマウス実験感染モデルを使って in vivo における治療効果を調べたところ、用量依存的に下痢発症を抑え、対照マウスでは九〇%下痢が発症するのに対し、マウス当たり二・五㎎経口投与したところ、投与二日目に下痢は完全におさえられ、治療効果が認められた(1)。今後臨床での治験が期待される。

可溶性ウイルス受容体

sICAM-1

ライノウイルスはヒトにおけるもっともポピュラーな疾患の一つである鼻カゼの原因ウイルスであるが、大部分のライノウイルスの受容体(receptor)が細胞表面に存在する接着蛋白であるICAM-1 (intercellular adhesion molecule)であることがわかり、興味深いものとなった。ICAM-1は Ig supergene family の一つであり、白血球細胞膜上にある integrin supergene familyの一つであるLFA-1の ligand である。

そこで、Marlin ら(2)は、90kDa のICAM-1のうち細胞膜埋め込み部分以下をなくした82kDa の可溶性(soluble) ICAM-1を遺伝子工学的に作製し、五μg/mlを HeLa 細胞に処理し各種ウイルスを $100TCID_{50}$ 感染させて四日後のCPE(細胞変性効果)を観察したところ、ICAM-1を受容体としているライノ54型とコクサッキーA13型ウイルスのCPEを完全に抑制し、別の受容体をもっているライノ2型、コクサッキーB、ポリオ、単純ヘルペスウイルスのCPEは抑制しなかった。ICAM-1を受容体としているライノウイルス表面をコンピュータ解析したところ、深さ二・五 nmの"canyon"が六〇個存在し、その穴にICAM-1が入り込んで細胞への感染が成立すると考え、sICAM-1で前もって穴を塞いでしまうことにより、ライノウイルスの感染が阻止されるものと考えられる。

sCD4

AIDSの病原ウイルスであるHIVの感染はヘルパーT細胞表面の受容体CD4への結合で始まる。そこでCD4を可溶化したsCD4を遺伝子工学的に作製し、抗HIV物質として利用したところ一μg/mlの濃度でHIV感染細胞での巨細胞形成が抑制された。現在アメリカとスイスでsCD4の臨床治験が行われている。

ウイルス核酸合成阻害剤

アシクロビル(ACV)

De Rudder ら(3)はヌクレオシドの環状糖側鎖を非環状(acyclic)にすることにより、ウイルスDNA合成を選択的に阻止する抗ウイルス剤を作り出した。その一つがアシクロビル[9-(2-hydroxyethoxymethyl) guanine]である(図1)。

ACVはまずヘルペスウイルス由来のチミヂンキナーゼ(TK)によって燐酸化され(ACV-1燐酸)、以後宿主細胞の酵素によりACV-2燐酸、ACV-3燐酸にまで活性化される。宿主細胞の持つTKでは1燐酸体はできず、非感染細胞ではACVのままで、本剤の優れた選択毒性の根拠の一つはここに存在する。

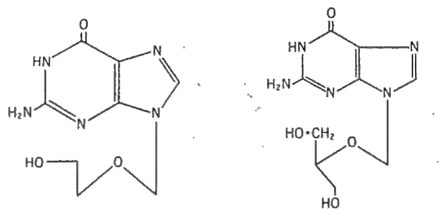
次にACV-3燐酸はヘルペスウイルスのDNAポリメレースを低濃度で抑制するが、宿主細胞のα-DNAポリメレースを抑制するには、その数百倍の濃度を必要とすることがわかっている。さらにACV-3燐酸はウイルスDNAの中にグアノシンの代わりに取り込まれ、ウイルスDNAの合成を阻害する。すなわちACV-3燐酸が、3'-OH 基をもたないためこれ以上DNA鎖が伸長できないからである。

そこで in vitro においてヒトのヘルペスウイルス属五種のACVによる試験管内五〇%増殖防止濃度を調べたところ、特にHSV-1、HSV-2、VZVに対して優れた効果があることがわかる。一方ウイルス特異的TKを有していないサイトメガロウイルスには効果が期待できないことも示している。また各種正常細胞に対しては毒性が非常に弱く、化学療法係数が三〇〇〇以上となる。

ガンシクロビル(GAN)

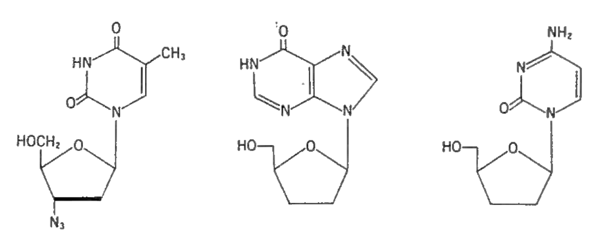
GANは図1に示すようにACVと似た構造を持ち、サイトメガロウイルス(CMV)感染細胞内で、デオキシグアノシン・キナーゼにより燐酸化され、GAN-MPになり、さらに細胞内各種酵素により三燐酸化され、GAN-TPが出来、これがウイルスDNA合成酵素の基質であるdGTPと競合的に拮抗することにより、ウイルスDNA合成を阻害することがわかっている。GANはCMVに対し、前述ACVの約五〇倍の抗ウ

⇦



(A) アシクロビル(ACV)　(B) ガンシクロビル(GAN)

図1 抗ヘルペスウイルス剤



(A) アジドチミヂン(AZT)　(B) ジダノシン(ddI)　(C) DDC

図2 抗HIV剤

＜白布癌シンポジウム＞

抗癌剤感受性試験・Organoid形成法の基礎的研究

菊池　寛昭　　氏家　重紀　　伊藤　友美　　涌井　昭*

要旨　Friedmanらが1988年に報告したorganoid（epithelial cell aggregates）形成法を用いた抗癌剤感受性試験は，plating efficiencyが高率でassay期間が短いなどの利点をもち有用と考えられるので，ヌードマウス可移植性ヒト癌株を用いて基礎的検討を行った。

コラーゲン-Ⅰとウシ血清アルブミンの混合液でシャーレにコーティングし，1時間乾燥させた。続いてBALB/c *nu/nu*マウスの皮下腫瘍を細切し，孔径の異なる2枚のメッシュフィルターを通して得た比較的均一な大きさの細胞塊を撒種し培養した。培地は無血清培地であるNCTC 135培地に，ウシ血清アルブミン，上皮細胞成長因子，インシュリン，トランスフェリン，ハイドロコーチゾン，亜セレン酸ナトリウムなどの増殖因子を添加し，O_2 3%，CO_2 5%，$N_2$92%の低酸素分圧下で培養した。

培養液のpHを6.8に調製して，オートラジオグラムにて標識率（L.I.）の変化を調べると，増殖因子を加えたほうがL.I.の増加が一定で順調な細胞増殖が認められた。培地のpHを6.3，6.8，7.4の3段階に調製しorganoidのL.I.を検討すると，pHが6.8の時L.I.の増加が最も一定であった。

これらの検討で得た結果を基に，3種の細胞株で増殖動態を検討すると，培養24時間後のplating efficiencyはSC-6-JCKで20.8±2.6%，NS-8で37.8±3.8%，PAN-1-RITCでは27.2±1.5%であった。シャーレごとの総organoid数は培養中は軽度に低下したのみだったが，organoidごとの細胞数は培養72時間後まで増加した。またフローサイトメトリーによる検討から，シャーレ内のヒト由来のDNA量に対するマウス由来のDNA量はヌードマウスの皮下にあった時より減少し，培養中さらに低下するのを認めた。マウス由来の間質および反応性細胞は本培養系では増殖し難く，腫瘍細胞が選択的に増殖促進させられるためと考えられた。

SC-6-JCK株ではヌードマウス皮下移植系ではMMCには高感受性だが，ADMには低感受性である。これが本法で再現されるか否かを検討した。シャーレ内の総organoid数の計測では薬剤1時間接触の場合，organoid中の一部の細胞しか影響されないため感受性の判定が困難であった。24時間接触では，本来低感受性であるADMに対してもorganoid数が著しく減少し，MMCとの差が見いだせなくなった。これに対し，シャーレ内の総細胞数を計測すると，薬剤1時間接触では感受性の差が認められなかったが，24時間接触ではMMCとADMの差が的確に再現された。以上の結果より，薬剤24時間接触後シャーレ内の総細胞数の計測を行うことによって，本法は感受性試験として活用できるという結論を得た。

〔癌と化学療法　21(3)：351-362，1994〕

*宮城県立がんセンター・薬物療法部

はじめに

近年，数多くの抗癌剤が開発・研究されてきたが，単独で30%以上の有効率を示す薬剤は極めてまれであるのが現状である。そこで個々の症例において有効な薬剤を選択し，なおかつ無効な薬剤を事前に回避することを目標に様々な感受性試験が考案されてきたが，満足すべきものは未だに得られていない。

固形腫瘍を *in vitro* で初代培養し，抗癌剤感受性を調べる試み[1]は1950年代より行われてきた。その後，*in vitro* 感受性試験において癌細胞の酵素活性[2]や放射性物質の取り込み[3]を指標とする方法などが検討されてきている。しかし，どの方法を採るにせよ，最も重要な問題は腫瘍細胞を生体内と同様の増殖を保ちつつ培養できるかということである。

1977年 Hamburger と Salmon[4]は，腫瘍細胞を単離させ軟寒天培地内でコロニーを形成させる human tumor clonogenic assay（HTCA）を発表し，多施設で研究が続けられたが，コロニー形成率が低いこと，コロニーの定義が曖昧であることなどの問題点[5]が指摘されている。

他の培養法としては，正常乳腺組織から採取した細胞を完全に単離させず，集塊のまま培養するという試みを1980年 Hackett ら[6]が最初に報告し，彼らはその上皮細胞からなる集塊を“organoid”と名付けた。それとは別に Friedman ら[7]は類似した方法により，大腸腺腫から細胞集塊のまま初代単層培養を行った。Buset ら[8]は培養条件の改良を加え，培地の無血清化と低pH化，培養器の酸素分圧の低下などの及ぼす影響について検討し，この方法を大腸癌の臨床例に対する抗癌剤感受性試験に応用する試み[9]も報告している。

本法は第一に plating efficiency が高いのが特徴で，また単層培養であるため薬剤到達性に関して利点をもち，細胞間の接着があるので，ある程度 *in vivo* の状態を反映するものと期待される。筆者らはこの organoid 形成法による感受性試験に着目し，基礎的検討を加え，若干の知見を得たので報告する。

I. 実験材料および方法

1. 腫　瘍

本研究で用いた腫瘍はヌードマウス可移植性ヒト癌株で，胃癌株 SC-6-JCK（中分化型腺癌），NS-8（低分化型腺癌），および膵癌株 PAN-1-RITC（中分化型腺癌），PAN-2-RITC（低分化型腺癌）の4種である。このうち胃癌株はそれぞれ名古屋大学第二外科，奈良県立医科大学第一外科より供与され，当部でヌードマウスに継代移植している。膵癌株は国立仙台病院外科での手術検体を当部においてヌードマウスに継代移植して株化したものである。

2. 動　物

動物は日本クレア㈱から購入した SPF 条件下の4～6週齢の雄性 BALB/c *nu/nu* マウスを用い，飼育中は食餌と水は自由に摂取させた。

3. 抗癌剤

adriamycin（ADM），mitomycin C（MMC）の2種を用いた。これらは PBS に溶解し，0.01～10 μg/m*l* の濃度で培地に添加し，癌細胞に接触させた。

4. 培地および培養条件

本研究では無血清培地として開発された NCTC 135 培地[10]に，1 mg/m*l* のウシ血清アルブミン（BSA）とペニシリン-G（5,000U/m*l*），ストレプトマイシン（5 mg/m*l*）を加えて使用した。増殖因子として，上皮細胞成長因子（EGF）を5 ng/m*l*，ブタ・インシュリンを0.1 U/m*l*，トランスフェリンを2 μg/m*l*，硫酸第一鉄を0.1 μg/m*l*，ハイドロコーチゾンを1 μg/m*l* および亜セレン酸ナトリウム 10^{-7} M を培地に添加して用いた。BSA と抗生物質の他にこれらの増殖因子を加えた培地を，本研究では NCTC 135M とした。また，Dulbecco's modified Eagle's medium（DMEM）と Ham's F 12 培地を1：1（v/v）で混合した DMEM/F12 培地に同量の BSA，ペニシリン-G，ストレプトマイシンを加えたものを用い，これら3種の培地が organoid の形成と増殖に及ぼす影響を比較検討した。培地の pH 調節は，1 M塩酸もしくは1 M水酸化ナトリウムを適宜加えて行った。

培養器はヒラサワ㈱のO_2-CO_2インキュベータ（CPO_2-171M）を用い，37°C，水蒸気飽和，3％O_2，5％CO_2，92％N_2の条件[9]に設定した。

5. Organoidの形成と増殖動態の検討

1）実験方法

コラーゲン-I　150 μg/mlとBSA 50 μg/mlをNCTC 135培地（BSAおよび抗生物質は無添加）に溶解させたものを直径35mmまたは60mmのプラスチック・シャーレ（ファルコン社：No.3001，3002）にそれぞれ0.2ml，または0.4mlずつ注入し，均等に広げコーティングを行い紫外線殺菌灯下で乾燥させた。

続いてヌードマウスから腫瘍を取りだし，被膜，壊死部分を除いた後，NCTC 135培地内で2本のメスを交叉させて約1mm径まで細切した。この細胞塊を含む培地を孔径150 μmおよび100 μmの2枚のナイロンメッシュフィルターにこの順序で通し，100 μmのフィルター上に残った腫瘍細胞塊を培地内に再浮遊させた。ここで2枚のフィルターを用いたのは，まず150 μmのフィルターで大きな細胞塊を除き，100 μmのフィルターの下にsingle cellや数個のみからなる小さな細胞塊を落とすためである。この方法によって100 μmのフィルターの上に適当な大きさの細胞塊が残り，このフィルターを培地内で静かに振盪し，細胞塊を培地内に再浮遊させた。そして倒立顕微鏡下に2mmのグリッドの付いたシャーレで培地0.1ml中の細胞塊数を数え，濃度を調製した。培養前の一部の細胞塊はスライドグラス上に塗抹し，固定後メイ・ギムザ染色して，一つの細胞塊ごとの細胞数を算定した。

前述のごとくコーティングしたシャーレに，細胞塊を含む培地を，直径35mmのものには0.2ml，60mmのものには0.4mlずつ分注し，45～60分間CO_2インキュベータで静置した後，2mlもしくは5mlの培地を静かに加えO_2-CO_2インキュベータに移し培養した。24時間後培地交換を行い，シャーレに付着していない細胞を除去した。そして以下の2）～4）に述べる検討を行った。

本論文では，シャーレに付着する以前のものは“（腫瘍）細胞塊”，付着して増殖しているものについては“organoid”と呼称することにした。

2）増殖曲線

一つのorganoidごとの細胞数は，培養開始後24時間ごとに倒立顕微鏡下に任意の10個のorganoidについて計測した。またシャーレ内の総organoid数は，24時間ごとに培地を除去しPBSで洗浄した後，99％エタノール固定してからギムザ染色を施すことにより，肉眼的に計測した。これらの操作によって，一つのorganoidごとの細胞数とシャーレ内の総organoid数の経時的変化を調べた。

3）オートラジオグラム（ARG）

前述のごとく細胞塊撒種の24時間後に培地交換を行い，その後培地内に，pulse labeling（30分）では370～740 kBq/ml（10～20 μCi/ml），continuous labelingでは74kBq/ml（2 μCi/ml）のmethyl-^{3}H-thymidine（20 Ci/mmol）を加え培養を続けた。終了後シャーレ内の培地を除去しPBSで洗浄した後，99％エタノールで固定し，核乳剤NR-M2でdipping法にて薄層を作り，7日間露出し，現像，定着，水洗後，ギムザ染色を行い，labeling index（L. I.）を算定した。なおL. I.は，1,000個以上の腫瘍細胞を数えることによって求めた。

4）フローサイトメトリー（FCM）

各時点での培養終了後，培地を除去しPBSで洗浄したシャーレに0.025％トリプシン・EDTA溶液を加え，培養器内で4～5分間インキュベートしてから，organoidをピペッティングにてsingle cellとした。遠沈後，70％エタノールで数時間以上固定した。その後再び遠沈してエタノールを除き，propidium iodide(50 μg/ml)にて核染色を行い，cell sorter（EPICS-CS，コールター・エレクトロニクス社）を用いて腫瘍細胞20,000個についてDNA量を測定し，その分布曲線を求めた。

6. 統計処理

計測値はmean±SEで表現した。各群の平均値の差の検定にはt検定を，比率の差の検定にはχ^2検定を用いた。

表1 コーティングしたコラーゲン溶液の至適乾燥時間の検討

		Plating efficiency on day 1 (%)
Time after coating	0 hrs.	10.0±1.79
	1	27.2±1.52
	3	15.0±4.02
	6	6.6±0.7
Collagen-coated dish (CORNING)		9.4±2.9
PRIMARIA (FALCON)		1.8±0.5

* $p < 0.001$
* $p < 0.05$

表2 酵素カクテル処理後の plating efficiency の変化

Enzyme cocktail	: collagenase	5 mg/m*l*
	neuraminidase	5 U/m*l*
	hyaluronidase	1,000 U/m*l*
	DNase	0.1 mg/m*l*

	No. of cell aggregates / g.tissue	Plating efficiency on day 1 (%)
PAN-1-RITC enzyme (+)	11,547	26.4±3.5
enzyme (−)	9,385	42.1±2.4
PAN-2-RITC enzyme (+)	7,240	32.4±6.6
enzyme (−)	2,550	71.8±6.1

*$p < 0.001$

II. 結　果

1. Organoid の形成および増殖とそれに影響する因子の検討

1）コーティングしたコラーゲン溶液の至適乾燥時間（表1）

PAN-1-RITC 株を用い，コーティングしてから培養開始まで0，1，3，6時間を設定し，各シャーレに100個の細胞塊を撒種して，培養24時間後の plating efficiency から至適乾燥時間を検討した。

表1に示すように，乾燥時間が1時間の時に plating efficiency は他に比べ有意に高く，この成績から以後のコラーゲン溶液の乾燥は1時間行うこととした。コーニング社のシャーレはコラーゲン・コートしてあるが（商標名：Collagen-coated dish），完全に乾燥しており，この実験系では plating efficiency は有意に低かった。ファルコン社のシャーレ（商標名：PRIMARIA）はプラスチックが陽性に荷電しているので初代培養に適しているという特徴をもつが，これも plating efficiency は有意に低値であった。

2）酵素カクテルによる細胞分散の影響（表2）

機械的に分散した細胞塊を，コラゲナーゼ（5 mg/m*l*），ノイラミニダーゼ（5 U/m*l*），ヒアルロニダーゼ（1,000U/m*l*），DNase（0.1mg/m*l*）の4種の酵素カクテルで，37°C，30分処理した後，腫瘍1g当たりの organoid 形成率を24時間後の plating efficiency から比較検討した。

酵素処理群では，腫瘍1gから採れる細胞塊数は多かったが，plating efficiency は有意に低か

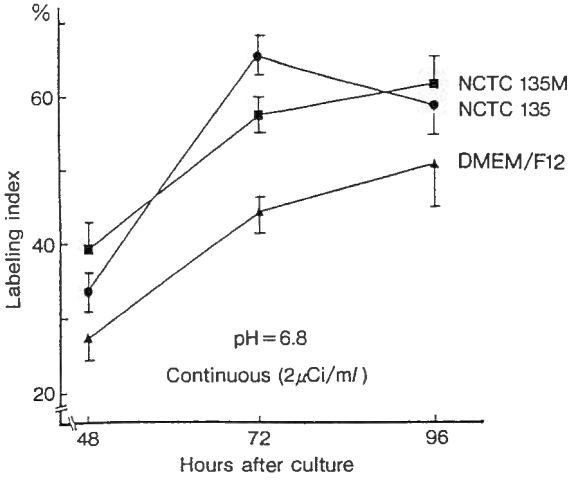


図1　培養液の種類による標識率の変化
（膵癌株 PAN-1-RITC）

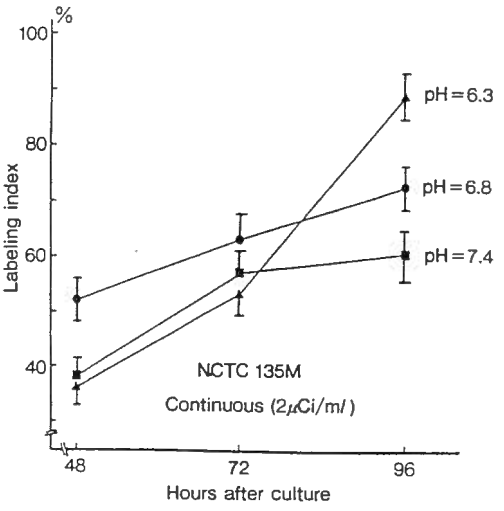


図2　培養液の pH の差による標識率の変化
（膵癌株 PAN-1-RITC）

った。

3）培地の組成による比較（図1）

pH を6.8に調製したNCTC135, NCTC135M, DMEM/F12 の3種の培地について，PAN-1-RITCおよびSC-6-JCKにおいて増殖曲線を求めると，培養72時間後まで一つの organoid ごとの細胞数は NCTC 135M 培地において増加がわずかに速い傾向にあったが，3者間に有意差は認めなかった（data not shown）。

次に PAN-1-RITC で continuous labeling による ARG を行い，この3種の培地間で L. I. を比較した。細胞塊撒種の24時間後に培地交換を行ってから，^{3}H-TdR を培地内に添加し培養を継続

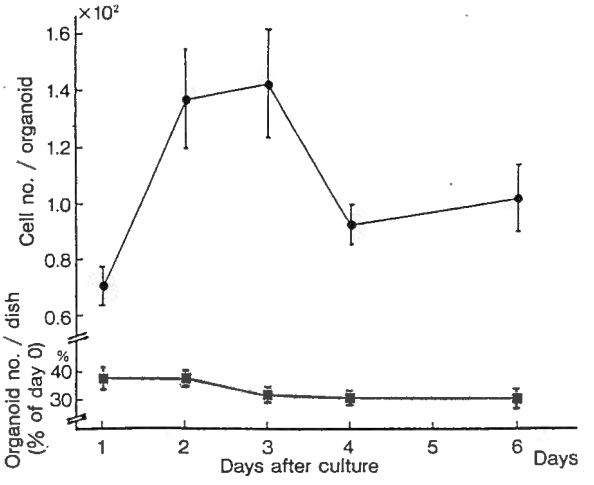


図3　胃癌株 NS-8 の増殖曲線

した。そして添加24時間後，すなわち培養48時間後から L. I. を計測した。培養開始96時間後まで，DMEM/F12 における L. I. は他の2種の培地に比べ有意に低値だったが，NCTC 135 と NCTC 135M の間には差を認めなかった。しかし，NCTC 135M では培養96時間後まで L. I. はほぼ直線的に増加し順調な細胞増殖が認められたので，以下の検討は無血清培地において文献上，基本的に必須といわれる増殖因子[11]を添加した NCTC 135M を用いて行うこととした。

4）培地の pH による比較（図2）

NCTC 135M 培地の pH を6.3, 6.8, 7.4 の3段階に調製し，PAN-1-RITC および SC-6-JCK で plating efficiency と一つの organoid ごとの細胞数の変化を検討したところ，この三つの培地間には培養72時間後まで差を認めなかった（data not shown）。

次に，PAN-1-RITC にて前項と同様の方法で continuous labeling による ARG を行い，三つの培地での L. I. を比較した。培養開始後96時間まで pH＝6.8 の培地内での L. I. が，直線的に増加し細胞増殖が一定なことから，以後の検討において，培地の pH はすべて6.8に調製することにした。

5）1 organoid 中の細胞数とシャーレ内総 organoid 数の経時的変化（図3，4）

図3に NS-8 の増殖曲線を示す。培養開始前の一つの細胞塊当たりの細胞数は67.0±6.5個であ

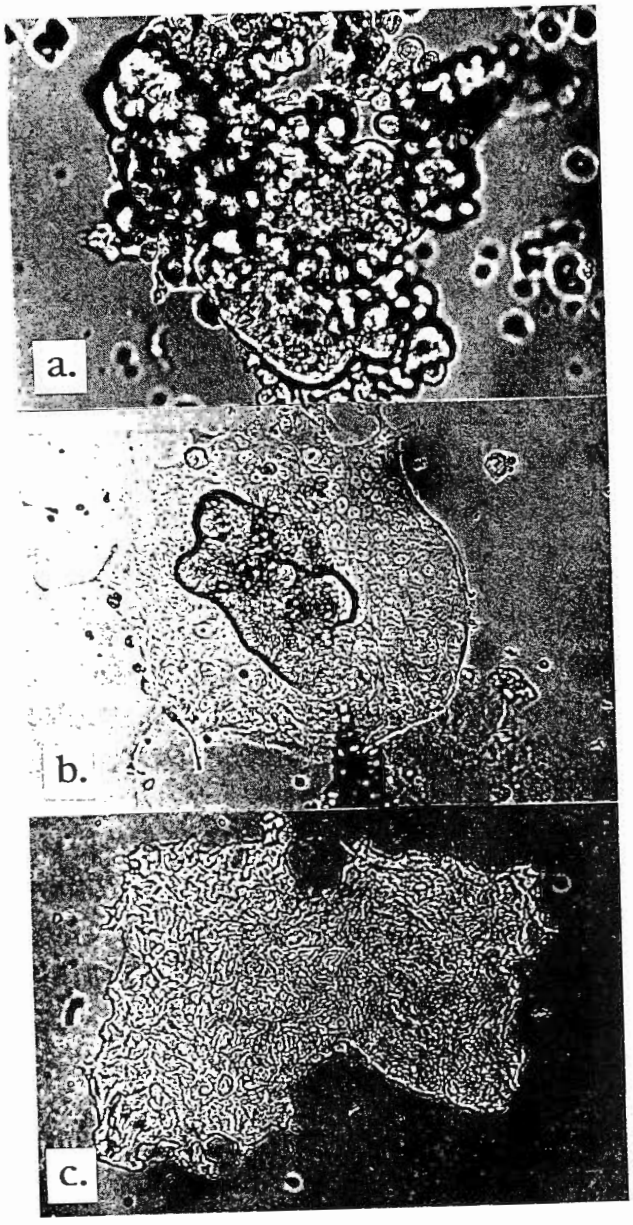


図4　a：ヌードマウスの皮下から採取した固形腫瘍の状態の PAN-1-RITC を細切して得た培養前の細胞集塊で，図のように細胞が3次元的に重なり合っている（×100）。
b：培養24時間後の organoid で，中心部はまだ細胞が重なり合っているが，辺縁部は単層になっている（×40）。
c：培養48時間後では，図のように完全に単層になっている（×40）。

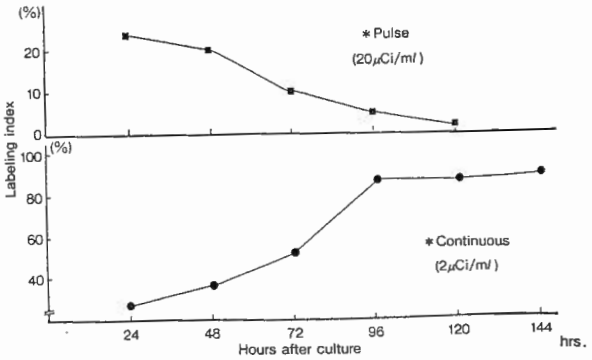


図5　標識率の経時的変化
（膵癌株 PAN-1-RITC）

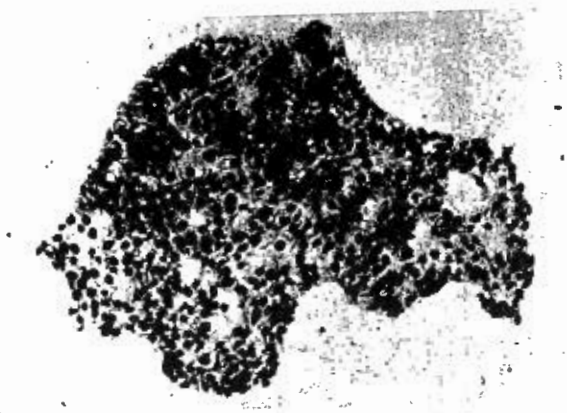


図6　PAN-1-RITC の持続標識による ARG 培養96時間後の状態。図のように organoid の中心部と辺縁部で L.I. に差を認めない（ギムザ染色，×100）。

った。培養開始後，一つの organoid 当たりの細胞数は72時間後まで増加し，その後低下した。シャーレごとの総 organoid 数を plating efficiency として示すと，培養24時間後には37.8±3.8%で，それ以降は軽度に低下したのみであった（図3）。同様にして求めた培養24時間後の plating efficiency は SC-6-JCK，PAN-1-RITC においてそれぞれ20.8±2.6%，27.2±1.5%で，organoid ごとの細胞数の経時的変化は，NS-8 とほぼ同様の結果であった（data not shown）。

図4aは PAN-1-RITC の培養前の細胞塊で，図のように3次元的に重なり合っていた。培養24時間後のものを図4bに示すが，organoid の中心部はまだ重なり合っていたが，周辺部はすでにかなりの部分が monolayer になっていた。図4cは培養48時間後で，この時期以降はほとんどの organoid は図のように完全に monolayer になった。この過程は腫瘍細胞の migration によるものと考えられた。

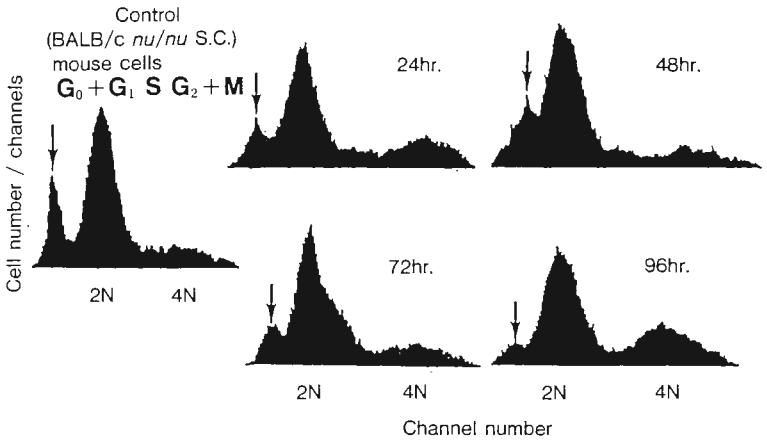


図7　シャーレ内全細胞のDNAヒストグラムの経時的変化
（膵癌株PAN-1-RITC）

6）L.I.の経時的変化（図5）

PAN-1-RITCについて，培養24，48，72，96，120，144時間後までのL.I.の変化を調べた。pulse labelingでのL.I.は細胞周期上S期にある細胞の比率を示すものであるが，培養開始24時間後で最も高値を示し，以降徐々に低下した。

本腫瘍株の*in vivo*（BALB/c *nu/nu*マウス皮下）でのpulse labelingのL.I.は11.6%（データ未発表）であり，本研究での培養条件に移すと，培養48時間後までのL.I.はこれより高値であった。これに対しcontinuous labelingでは，培養開始24時間後に培地交換を行ってから^{3}H-TdRを加え，添加後24時間すなわち培養開始48時間後からL.I.を求めた。L.I.は培養開始後96時間で定常状態に達し，それ以降はほぼ不変であった。定常状態以降にラベルされない細胞はG_0期にあると考えられるので，この実験系でのgrowth fractionは約90%と考えられた。

図6にcontinuous labelingでの培養96時間後のorganoidの写真を示すが，図のようにorganoidの中心部と辺縁部ではL.I.に差は認めなかった。

7）FCMによるDNA量分布曲線（図7）

図7左のcontrolに示すのは，ヌードマウスの皮下に移植したPAN-1-RITCのDNA量分布曲線である。腫瘍細胞由来のDNAの2Nのピークの左方にある矢印で示したピークは，ヌードマウスの間質および反応性細胞に由来するDNAからなるものである。この腫瘍からorganoidを形成させると，シャーレ内のマウス由来のDNA量は，皮下にあった時よりも明らかに低下し，培養を続けるとさらに減少してゆくのが認められた。

2. 抗癌剤感受性試験としてのorganoid形成法の検討

1）シャーレ内総organoid数からの感受性判定の検討—1時間接触と24時間接触（図8）

SC-6-JCK株はヌードマウス皮下移植法（sc-ip系）による検討では，MMCには高感受性であるが，ADMには低感受性[12]である。これがorganoid形成法による感受性試験で再現されるか否かを検討した。

図8左は，SC-6-JCKから採取した細胞塊をシャーレごと100個まき，24時間後ADMとMMCを0.01～10.0μg/m*l*の濃度で1時間接触させてから，培地を交換して薬剤を除き，その後72時間培養を続けた後，ギムザ染色を施したシャーレ内の総organoid数を肉眼的に数えたものである。高い感受性を示すはずのMMCでも，1.0μg/m*l*以上の比較的高濃度において初めて有意差をもってorganoid数の低下を認めた。また薬剤の作用でorganoid中の一部の細胞が脱落したために，顕微鏡を用いても抗腫瘍効果の判定が困難なものも多かった（図9）。ADMでは，高濃度の接触でも有意なorganoid数の低下は認められなかった。

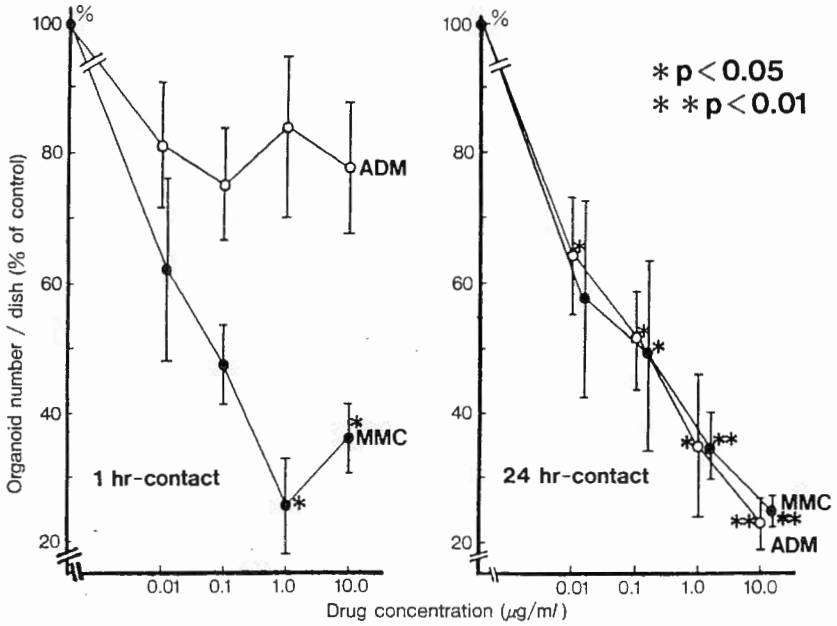


図 8　薬剤接触後の organoid 数の変化
（胃癌株 SC-6-JCK）

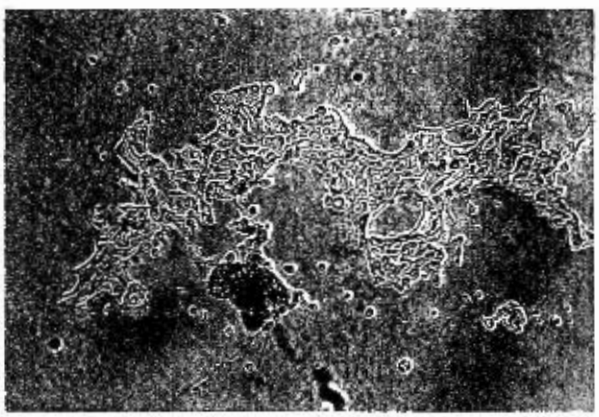


図 9　SC-6-JCK に MMC 1.0μg/m*l* を 1 時間接触させた後，72 時間経過した organoid
図のように一つの organoid の中に健常な細胞と障害を受けた細胞が混在している。

それに対し ADM と MMC を 24 時間接触させてから培地交換によって薬剤を除き，48 時間培養した後に，同様にシャーレ内の総 organoid 数を肉眼的に数えたのが図 8 右である。このような長時間接触では，本来低感受性であるはずの ADM に対して，0.01μg/m*l* という低濃度においてさえも有意に organoid 数が低下し，MMC との差が見いだせなくなった。

本項に示すごとく，シャーレ内の総 organoid 数の肉眼的計測から，感受性を判定するのは困難であった。

2）シャーレ内の総細胞数からの感受性判定の検討―1 時間接触と 24 時間接触（図10）

前項に述べたごとく，organoid 数の計測から感受性を判定するには問題があるので，シャーレ内の総細胞数の計測によって，より正確に感受性判定ができ得るか否かを検討した。同様に SC-6-JCK を用い，総細胞数はシャーレを乾燥

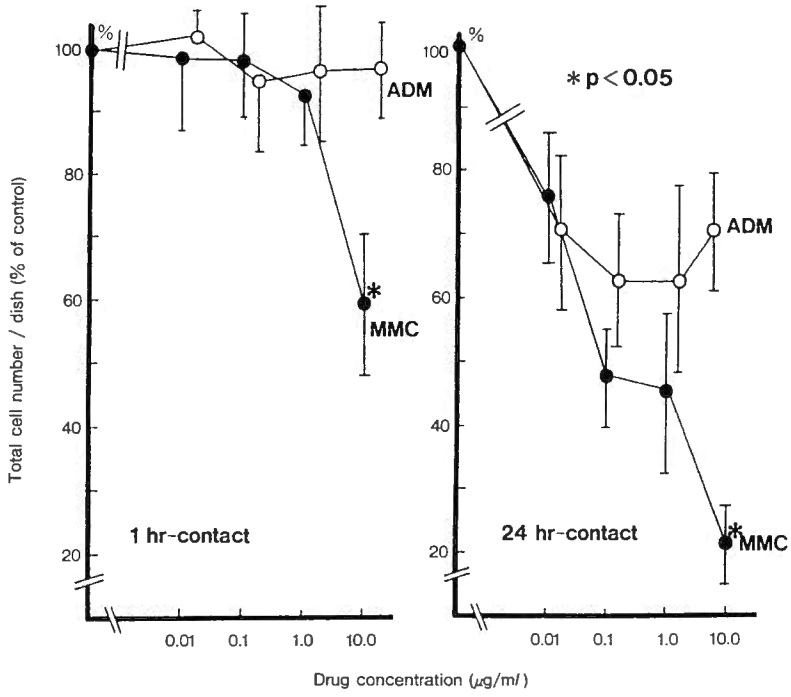


図 10　薬剤接触後の総細胞数の変化
（胃癌株 SC-6-JCK）

後，organoid をギムザ染色し光学顕微鏡にて計測した。薬剤濃度および培養時間は前項と等しくした。

図 10 左は 1 時間接触のもので，MMC 接触群では，10.0μg/m*l* の高濃度でのみ総細胞数が減少した。ADM 接触群では，10.0μg/m*l* までほとんど減少を認めなかった。

図 10 右はこれに対し 24 時間接触させたもので 0.1 μg/m*l* 以上の濃度で，ADM 接触群に比べ MMC 接触群において総細胞数の減少を認め感受性の差を反映する結果を得た。

III. 考　　察

固形腫瘍を *in vitro* に移して培養する試みは数多く行われてきたが，問題となるのは線維芽細胞やリンパ球の増殖が初期に優勢となって，腫瘍細胞の増殖を抑制することである。この理由の一つに培地中に添加した血清が線維芽細胞の増殖を促進させることがあげられ，これに対して無血清培地が用いられるようになったが，その場合，血清中に含まれていたホルモンや微量元素などの細胞増殖因子の補給が必要である。

細胞の種類によって要求する増殖因子は種々異なるが，これまで検討されてきた無血清培地はほとんどがインシュリン，トランスフェリンおよびセレンを含んでいる[11]。その他，グルココルチコイドは細胞のシャーレへの接着を促進する[13]といわれており，EGF も上皮性の細胞の培養において添加されることが多い。また本研究で用いた NCTC 135 培地は鉄を含まないので，これも補給した。今回示した結果では，これらの成長因子を加えても細胞数と L. I. への大きな影響は認めなかったが，細胞の種類によって栄養要求性は異なると考えられるので，今後の検討での未知の細胞への適応を考慮して添加することにした。DMEM/F12 培地[14]も初代培養にはよく用いられるが，本研究では NCTC 135 培地より L. I. は有意に低値であった。NCTC 135 培地[10]は従来のものに比べ，アミノ酸，ビタミン，補酵素などがかなり多く含まれているためかと考えられた。

細胞分散法は，Schroy ら[9]が行ったと同様の酵素カクテルを用いたところ，本研究では plating efficiency の低下をみた。しかし，臨床材料から細胞塊を分散させるには，特に間質成分の豊富な“硬い”腫瘍の場合は酵素による分散も必要になると考えられる。

シャーレの表面をバイオマトリックスでコーティングする方法は，コラーゲン-I[16,17]，フィブロネクチン[16,17]，poly-D-リジン[18]などで検討されてきた。Friedmanら[8]はコロニー形成率とARGの結果より，コラーゲン-IとBSAの混合物でコーティングするのが最良であったと報告した。その乾燥時間については，1～6時間としているが[9]，本研究から1時間が最適であることが示された。

培地のpHについてFriedmanら[8]はpH6.2，6.7，7.6の3段階で比較して，pH6.7が最適であったと報告しており，本研究で得られた結果もほぼ同様であった。一般的に形質転換した細胞は低pHの環境を好む[18]といわれており，それを支持する結果を得た。

また彼らは，酸素分圧については3％が適当[8]であると述べている。一般的に組織内酸素分圧は空気中に比べかなり低く，20％の酸素分圧は細胞障害性に作用するといわれている。この時過剰に発生するフリーラジカルの不活化にglutathione peroxidaseが作用しているが，この酵素の活性化に亜セレン酸が必要[18]であり，無血清培地に好んで添加されている。

本実験系でorganoidが腫瘍細胞のみからなるか否かが最大の問題点であるが，この点についてはFriedmanら[7,9,15]が詳細な報告をしている。それらによると，organoidを形成する細胞には抗サイトケラチン・モノクローナル抗体の付着を認め，また電子顕微鏡下の観察でbrush border，tight junctionの存在を確認しており，organoidは上皮細胞からなると結論している。本研究ではヌードマウス可移植性ヒト癌を用いたが，FCMの結果から培養後は，シャーレ内の全DNAのほとんどがヒト由来のもので，腫瘍間質を構成するマウス由来のDNAの比率はヌードマウスの皮下腫瘍よりかなり少なくなっており，しかも経時的に減少することを認めた。これもorganoidは腫瘍（上皮）細胞によって形成されているということの証左と考える。マウス由来の間質および反応性細胞はシャーレに付着して増殖し得ないため，培地交換の際に除去されたものと考えられる。

本法を抗癌剤感受性試験として応用する際のプロトコールをFriedmanら[8]は提唱しているが，その中では，培養24時間後に培地交換を行った後，薬剤を3日間持続接触させ，シャーレに残っているorganoidについて，その数を計測するとともに，ARGにてL.I.を求め，それらに基づいて薬剤感受性を判定すると述べている。細胞培養条件での培地内の抗癌剤の半減期[19]については詳細な報告があるが，薬剤の種類によって数時間から14日間とかなりの範囲があり，すべての薬剤を一律に3日間持続接触させるのには問題があると考えられる。

本研究では，抗癌剤の接触時間を1時間と24時間の二つについて検討したが，1時間接触では，肉眼的にシャーレ内の総organoid数を数えて感受性を判定するのは困難であったということを述べた。organoid中の細胞はそれぞれ別の細胞周期上にあり，1時間の接触では薬剤の細胞周期特異性によって，ある特定の周期上にある細胞にしか障害を与えられないためと考えられる。また時間依存性である代謝拮抗剤などの感受性判定に際しては，1時間接触では十分な細胞障害性を発揮できないと予想される。

しかし24時間持続接触させると，本来低感受性である薬剤でも低濃度で肉眼的なorganoid数は減少してしまい，偽陽性の結果を得た。したがって，本法で感受性試験を行うには，organoid数の計測のみでは不十分で，シャーレ内の全細胞数を測定するか，さらには^{3}H-TdRなどの核種を用いたオートラジオグラムを併用するべきであると考える。その場合でも，本研究で示したように1時間接触では不十分で，24時間接触が必要であると考えられる。判定はコントロールでの細胞数およびL.I.が定常状態になる以前の，薬剤接触終了後72時間（培養開始後120時間）で行うことが適当と考えられた。

本法やHTCAの他に固形腫瘍の初代培養を行う系として，tumor spheroid[20,21]を形成させる方法や，コラーゲン・ゲル内で1 mm^{3}の腫瘍組織を3次元構築を保ったまま培養する方法[22,23]などが提唱されている。これらに対し本法は固形腫瘍からmonolayerの状態で初代培養を得るものであり，本研究で示したごとく間質細胞の増殖を抑

制し，腫瘍実質細胞を選択的に増殖させ得る系である。plating efficiency について Schroy ら[9]は大腸癌の手術材料を用いて42±9％であったと報告しているが，本研究でも20～40％とかなり高く，single cell からコロニーを形成させるHTCA と単純な比較はできないが，HTCA ではコロニー形成率は0.1％前後であるので，本法の優位性を示している。また single cell でなく細胞集塊として増殖させるので，細胞間の関係が，ある程度は *in vivo* の状態を反映すると期待され，なおかつ monolayer であるので薬剤到達性に関しても利点をもつと考えられる。

文　献

1) Black, M.M. and Speer, F.D.: Further observations on the effect of cancer chemotherapeutic agents on the *in vitro* dehydrogenase activity of cancer tissue. *J. Natl. Cancer Inst.* **14**: 1147-1158, 1984.
2) Kondo, T. : Prediction of response of tumor and host to cancer chemotherapy. *Natl. Cancer Inst. Monogr.* **34**: 251-256, 1971.
3) Bickis, I.J., Henderson, M.D. and Quastel, J.H.: Biochemical studies of human tumors: II. *In vitro* estimation of individual tumor sensitivity to anticancer agents. *Cancer* **19**: 103-113, 1966.
4) Hamburger, A.W. and Salmon, S.E.: Primary bioassay of human tumor stem cells. *Science* **197**: 461-462, 1977.
5) Selby, P., Buick, R.N. and Tannock, I.: A critical appraisal of the "human tumor stem cell assay". *N. Engl. J. Med.* **308**: 129-134, 1983.
6) Stampfer, M., Hallowes, R.C. and Hackett, A.J.: Growth of normal human mammary cells in culture. *In vitro Cell Dev. Biol.* **16**: 415-425, 1980.
7) Friedman, E.A., Higgins, P.J., Lipkin, M. *et al*: Tissue culture of human epithelial cells from benign colonic tumors. *In vitro Cell Dev. Biol.* **17**: 632-644, 1981.
8) Buset, M., Winawer, S. and Friedman, E.A.: Defining conditions to promote the attachment of adult human colonic epithelial cells. *In vitro Cell. Dev. Biol.* **23**: 403-412, 1987.
9) Schroy, P.C., Cohen, A., Winawer, S.J. *et al*: New chemotherapeutic drug sensitivity assay for colon carcinomas in monolayer culture. *Cancer Res.* **48**: 3236-3244, 1988.
10) Price, F.M. and Evans, V.J. : Preparation of medium NCTC 163. Procedure 35714. *TCA Manual.* **3**: 497-501, 1976.
11) Maurer, H.R.: 哺乳動物細胞のための無血清培地作成に向けて．動物細胞培養の実際，丸善，東京，1990. pp. 15-39.
12) 近藤達平，今泉宗久，田口鐵男・他：ヌードマウスを用いた制癌剤感受性試験の効果判定基準に関する研究．癌と化学療法 **14**: 680-686, 1987.
13) Tomooka, Y., Harris, S.E. and McLachlan, J.A.: Growth of seminal vesicle epithelial cells in serum-free collagen gel culture. *In vitro* **21**: 237-244, 1985.
14) Bottenstein, J., Hayashi, I., Hutchings, S. *et al* : The growth of cells in serum-free hormone-supplemented media. *In* : Methods in enzymology, vol.53 (ed. by Jacoby, W.B. and Pastan, I.H.), Academic Press, New York, 1979, pp. 94-109.
15) Friedman, E.A., Thor, A., Hand, P.H. *et al*: Surface expression of tumor-associated antigens in primary cultured human colonic epithelial cells from carcinomas, benign tumors, and normal tissues. *Cancer Res.* **45**: 5648-5655, 1985.
16) Lechner, J.F., Haugen, A. and McClendon, I.A.: Clonal growth of normal adult human bronchial epithelial cells in a serum-free medium. *In vitro Cell Dev. Biol.* **18**: 633-642, 1982.
17) Thompson, A.A., Dilworth, S. and Hay, R.J.: Isolation and culture of colonic epithelial cells in serum-free medium. *J. Tissue Cult. Methods* **9**: 117-122, 1985.
18) Ham, R.G. and McKeehan, W.L.: Media and growth requirements. *In*: Methods in enzymology, vol.53 (ed. by Jacoby, W.B. and Pastan, I.H.), Academic Press, New York, 1979, pp. 44-93.
19) Hildebrand-Zanki, S.U. and Kern, D.H.: A new bioassay for *in vitro* drug stability. *In*: Human tumor cloning (ed. by Salmon, S.E. and Trent, J.M.), Grune and Stratton, Orlando, 1984, pp. 451-458.
20) Yuhas, J.M., Li, A.P., Martinez, A.O. *et al*: A simplified method for production and growth of multicellular tumor spheroids. *Cancer Res.* **37**: 3639-3643, 1977.
21) Tofilon, P.J., Buckley, N. and Deen, D.F.: Effect of cell-cell interactions on drug sensitivity and growth of drug-sensitive and -resistant tumor cells in spheroids. *Science* **226**: 862-864, 1984.
22) Freeman, A.E. and Hoffman, R.M.: *In vivo*-like growth of human tumors *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**: 2694-2698, 1986.
23) Vescio, R.A., Redfern, C.H., Nelson, T.J. *et al*: *In vivo*-like drug responses of human tumors growing in three-dimensional gel-supported primary culture. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**: 5029-5033, 1987.

Summary

〔*Jpn J Cancer Chemother* **21**(3) : 351-362, *February*, 1994〕

ORGANOID FORMING METHOD
—A NEW *IN VITRO* CHEMOSENSITIVITY TEST—

Hiroaki Kikuchi, Shigeki Ujiie, Yumi Itoh and Akira Wakui

Division of Drug Therapy, Miyagi Cancer Center Research Institute

In 1988, Friedman and coworkers reported a new chemosensitivity test using "organoids"(epithelial cell aggregates) which had a high plating efficiency and short assay period. The authors recognized this test to be useful and studied it experimentally.

Human tumor xenografts maintained in the subcutis of BALB/c *nu/nu* mice were minced into cell aggregates and filtered, then resuspended in enriched NCTC 135 cell culture medium which contained no serum. Petri dishes were coated with a mixture of collagen-I and bovine serum albumin and dried for an hour. The cell aggregates were seeded in these coated dishes and cultured in a condition of low O_2 tension (3% O_2).

Plating efficiency at 24 hours in cultures of three tumors were 20.8±2.6% on SC-6-JCK (stomach), 37.8±3.8% on NS-8 (stomach) and 27.2±1.5% on PAN-1-RITC (pancreas), respectively. The cell number of each organoid increased until 72 hours in culture, although the organoid number of each dish decreased slightly. Flow cytometrical measurement of total DNA content in dishes showed that the amount of human DNA increased more rapidly than that of mouse DNA which was derived from interstitial and infiltrative cells. This culture system appeared to allow a selective growth of epithelial cells.

Subsequently, some drug sensitivity was tested using this system. SC-6-JCK tumor is sensitive to mitomycin C (MMC), although resistant to adriamycin (ADM) in a test using nude mice (sc-ip system). Organoids were formed from this tumor and chemosensitivity was tested against MMC and ADM from the viewpoint of change in the organoid number in each dish. After one hour of drug exposure, only a part of the cells in organoids was affected. On the contrary, after an exposure of 24 hours, the ADM-treated group showed the same results as the MMC-treated group. Hence this test was considered to become more appropriate by counting not the organoid number but the total cell number in the dish.

Key words: Organoid (epithelial cell aggregates), Chemosensitivity test, Primary culture, Human tumor xenograft

特集 糖鎖遺伝子とその生物機能

動物シアリダーゼ
——その性状と遺伝子クローニング——

宮城妙子*

動物シアリダーゼは，シアル酸残基を除去することによって生理的な異化分解を開始するばかりでなく，分子のコンホメーションや認識機構に影響を与えて重要な生理現象を制御する．動物シアリダーゼには細胞内局在や性状の異なる少なくとも4つの分子種が存在する．このうち，細胞質を主局在とするシアリダーゼの一次構造が初めて明らかになった．

はじめに

シアリダーゼは糖タンパク質，糖脂質，オリゴ糖などの複合糖質糖鎖の非還元末端からシアル酸を遊離するエキソ型の α-グリコシダーゼである．動物シアリダーゼは生理的な糖鎖分解の初発反応をつかさどるだけでなく，多くの機能が期待されるシアル酸残基を脱離することによって種々の生理現象を制御していることが期待される．複合糖鎖分子のシアル酸残基は，糖タンパク質のコンホメーションを変化させたり，認識決定基として，あるいは逆に認識部位の隠蔽により分子の生理機能に関与する．その陰性荷電は気道や消化管などの粘液の粘度形成に寄与し，細菌やウイルスなどによる感染過程や免疫機構，レセプターによる認識機構，さらに細胞接着性などにシアル酸が一役買っている証拠も蓄積しつつある[1)~3)]．

このシアル酸の変化は，シアリダーゼと，シアル酸の付加にあずかるシアリルトランスフェラーゼの動的均衡の変化によって引き起こされるが，シアリダーゼの変化が細胞表層や糖鎖分子のシアル酸変化の主な原因になっている例も少なくない[3)]．

シアリダーゼは最初にウイルスに発見されて以来，細菌，放線菌，マイコプラズマ，原虫，さらに鳥類や哺乳動物の各種臓器に見いだされ，自然界に広く分布する．ウイルスや細菌など微生物シアリダーゼについては早くから高度精製品での詳細な研究がなされており，その構造や遺伝子解析も近年とくに進展している．しかしながら，動物シアリダーゼについてはようやく分離・精製が進み，その多様性が明らかになってきた．酸性グリコシダーゼの1つとして単なるリソソーム酵素と考えられがちであったシアリダーゼが，細胞内でリソソーム以外にも見いだされ，しかも互いに基質特異性などの性状も異なることがわかった．いまやその構造や機能の解明が早急な課題となっている．

動物起源のグリコシダーゼのなかではシアリダーゼがとりわけ分子生物学的研究が遅れていたが，それは活性が低くかつ不安定であるため，cDNA クローニングのプローブ作成に，よい情報源となる精製標品が得難いためであった．筆者らは最近，均一標品を得ることができたラットシアリダーゼの1つのタイプについて cDNA クローニングに成功した．

本稿ではまず動物シアリダーゼの種類と性状につ

Mammalian Sialidase ——its Characterization and cDNA Cloning
* MIYAGI Taeko 宮城県がんセンター研究所 生化学研究部門

て要約し，ついでcDNAクローニングと一次構造について記述し，推察される機能についても言及したい．なお，シアリダーゼの実験法については他書[4]を参考にしていただきたい．

Ⅰ．動物シアリダーゼの種類と性状

動物シアリダーゼは1960年Warrenらによって初めてウシおよびヒトの糖タンパク質Cohn分画Ⅳに検出されたが，引き続き，ラット組織ホモジネートの上清や，ラット肝や腎の顆粒画分に見いだされた．顆粒画分のシアリダーゼは細胞内では主要な活性であって，酸性で働き，その局在がリソソームであることからシアリダーゼのリソソーム酵素としての概念が強調されてきた．その後，形質膜，ゴルジ装置などにも活性が検出されたが，これら活性の真の性状や相互間の異同については不明であった．しかし最近のラットシアリダーゼの研究の進展により，ラット肝や脳には表1のような少なくとも4種のシアリダーゼが存在することがわかった．これらはリソソーム内腔性[5]，リソソーム膜性[6]，細胞質性[7]，形質膜性シアリダーゼ[6]であって，細胞内局在のみでなく，至適pHや基質特異性，キネティックス，活性阻害剤による影響などの点でも異なっており，さらに免疫学的にも互いに区別されることが証明された[8]．ラット肝ゴルジ装置に見いだされたシアリダーゼはリソソーム内腔性酵素と性状が類似しており，ゴルジ装置がリソソーム酵素の輸送経路であることから同一酵素である可能性が強い．以上のような酵素の異同は分離・精製を進めてはじめて明らかになってくるが，これまで高度に精製された動物シアリダーゼは，ラット心筋，ラット肝細胞質，ヒト白血球，ヒト胎盤からの4種にすぎず，ラット肝細胞質以外はリソソーム酵素であるらしい．

動物シアリダーゼの性状について，詳細な解析がなされているヒト胎盤酵素と4種のラット酵素について記述する．ヒト胎盤シアリダーゼは，胎盤を低張溶液中でホモジナイズ後，p-アミノフェノルチオβ-ガラクトシドセファロースのカラムクロマトグラフィーにより精製される[9]．このシアリダーゼはβ-ガラクトシダーゼおよび保護タンパク質と複合体を形成することが証明されたが，それゆえに活性を保持した状態で均一精製品を得ることはできず，抗血清の利用によって，66 kDaのタンパク質が不活性のシアリダーゼに由来することが明らかとなった[10]．

表1 ラットシアリダーゼの種類と性状

	膜シアリダーゼ I	膜シアリダーゼ II	リソソーム内腔シアリダーゼ	細胞質シアリダーゼ
主局在	形質膜	リソソーム膜	リソソーム内腔	細胞質
至適pH	5.0	4.8	4.7	6.5
基　質	ガングリオシド	ガングリオシド シアリルラクトース 4MU-シアル酸 オロソムコイド 顎下腺ムチン	シアリルラクトース 4MU-シアル酸 糖ペプチド	シアリルラクトース 4MU-シアル酸 オロソムコイド フェトイン ガングリオシド (G_{M1}, G_{M2}を除く)
阻　害				
Cu^{2+}(1 mM)	+	−	−	+
Neu5Ac2en (0.1 mM)	−	−	±	+
免疫沈降試験				
抗Ⅰ酵素抗体	+	−	−	−
抗Ⅱ酵素抗体	−	+	−	−
抗細胞質酵素抗体	−	−	−	+

表2 ラット骨格筋細胞質シアリダーゼの精製[9]

ステップ	総タンパク量 (mg)	比活性 (units/mg)	倍率 (倍)	回収率 (%)
78,000×g上清	49,812	28	1	100
硫安分画	21,808	55	2	86
DEAE-セルロース	891	907	32	58
CM-セルロース	4.20	126,000	4,500	38
Blue-セファロース	0.847	341,000	12,200	21
Sephadex G-200	0.181	636,000	22,700	8.2

β-ガラクトシダーゼと保護タンパク質は，シアリダーゼの安定化や活性発現にそれぞれ関与しているらしい．保護タンパク質の異常がシアリドーシスの1つのタイプであるガラクトシアリドーシス患者繊維芽細胞で証明されており，この病態解明に貴重な発見となった．このシアリダーゼはオリゴ糖だけでなく，ガングリオシドや糖タンパク質にも作用する．

ラット肝細胞の主要なシアリダーゼで，広い基質特異性をもつと考えられてきたリソソームシアリダーゼが，実は2種の酸性シアリダーゼから構成されていることがわかった．その1つはリソソーム内腔[5]に，他方はリソソーム膜[6]に局在している．前者はリソソームの低張処理後の上清から部分精製され，オリゴ糖や糖ペプチド，4MU-シアル酸など低分子基質には働くが，糖タンパク質やガングリオシドには働かない酵素である．後者の膜シアリダーゼとは明らかに異なる基質特異性をもち，免疫学的にも完全に区別された．前述のヒト胎盤酵素で認められたβ-ガラクトシダーゼとの複合体形成は，これまでのところ認められていないが，精製過程での極度の不安定性は類似の機構の存在を物語っているのかもしれない．一方，リソソーム膜シアリダーゼは，TritonX-100とデオキシコール酸の併用によって可溶化される．pH 4.5～5.5でガングリオシドを最も効率よく水解するが，糖タンパク質，ムチン，オリゴ糖，4MU-シアル酸のいずれをも分解した．

脳や肝を細胞内分画後，各画分のシアリダーゼ活性をシアリルラクトースで測定すると，中性pHではホモジネートの活性の約80％が細胞質画分に回収される．このシアリダーゼ活性[7]は，細胞質画分から約30,000倍に均一精製され，pH 6.0～6.5を至適とし，オリゴ糖，ガングリオシド，糖タンパク質を基質とした．リソソーム膜および形質膜のシアリダーゼと異なり，ガングリオシドG_{M1}やG_{M2}には作用しない．

ガングリオシドをよい基質とするシアリダーゼ活性[6]が肝形質膜，脳シナプトソームに検出された．この活性は脳顆粒画分からリソソーム膜シアリダーゼとほぼ同様の方法で可溶化された．5.0～5.5付近を至適pHとしてガングリオシドに特異的に働き，糖タンパク質やオリゴ糖，4MU-シアル酸はほとんど基質としない．抗脳形質膜シアリダーゼ抗体を使った免疫沈降試験により，赤血球ゴースト膜，心筋などにも同一酵素が存在すること，また，ヒトやウシの脳や肝にも類似の分子種が存在することが示唆された．

4種のシアリダーゼは，活性阻害剤によっても区別できる[11]．N-アセチルノイラミン酸(2 mM)や，2-デオキシ-2,3-デヒドロ-N-アセチルノイラミン酸(Neu5Ac2en, 0.1 mM)によってリソソーム内腔性および細胞質性シアリダーゼは活性阻害を受けるが，膜シアリダーゼはこの濃度ではほとんど影響をうけない．ところがCu^{2+}(0.5 mM)などの重金属イオンや4-ヒドロキシマーキュリ安息香酸(10 μM)は細胞質性および形質膜性シアリダーゼを阻害するが，2つのリソソームシアリダーゼを阻害することはない．

II．ラット細胞質性シアリダーゼのcDNAクローニング

ラット4種のシアリダーゼ(表1)のうち，すでに

均一精製法が確立されていた細胞質性シアリダーゼのcDNAが最近クローン化され，一次構造が決定された[12]．動物シアリダーゼでは最初の例である．

cDNAクローニングは精製標品のペプチド情報を手掛かりとして進められた．最初に，ペプチド配列から作製したオリゴヌクレオチドをプローブとして，つぎに，抗体をプローブとして，cDNAライブラリーをスクリーニングしたが，これらの試みは失敗に終わり，成功に導いたのは，ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)によって増幅されたcDNA断片をプローブとしてcDNAライブラリーをスクリーニングする方法であった．この酵素の発現量の低さが，前2法によるクローニングを可能としなかった大きな理由であると思われる．

まず，細胞質性シアリダーゼ活性の組織分布を調べると，骨格筋が最も高く，つぎに脳が高い活性をもつことがわかった．これらと免疫学的に完全に交叉する肝酵素の精製法[7]に準じて，骨格筋(3 kg)から表2に示す精製過程を経て，SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動上均一な標品を得た[8]．この半量をトリプシンあるいはエンドリジルペプチダーゼ消化して部分アミノ酸配列決定に用い，残りは家兎に免疫して抗体を作製した．9種のペプチド配列が明らかとなった．そのなかでコドンの縮重の少ないアミノ酸を多く含み，しかも比較的長い配列を有するペプチド3種を選び，PCR反応のためのプライマーを作った．非特異的なアニーリングを少なくするため，アミノ酸のコドンの3番目の塩基をデオキシイノシンに置換してプライマーの縮重を減らし，約30 merの長さのプライマーを設計した．センス，アンチセンス鎖の計6種の混合プライマーを作り，ラット骨格筋mRNAから調製したcDNAを鋳型としてPCRを行った．6組の反応のうち，アンチセンスプライマーを共通とする2組の反応にDNA断片の増幅がみられた．それらは450 bpおよびそれと重複する550 bpのcDNAであったが，これをサブクローニングし，塩基配列を決定すると，推察されるアミノ酸配列にはプライマー作製に利用しなかった3種のペプチドのアミノ酸配列が含まれていた．

得られたcDNA(図1，PSD 1)をマルチプライム法で標識し，これをプローブとしてハイブリダイゼーションによりラット骨格筋λgt 10 cDNAライブラリー(2×10⁶プラーク)をスクリーニングした．3個の陽性クローンを得たが，最長のクローン(λSD)を含むすべてが5′末端を欠失していた．発現量が低いことがわかったので，ハイブリダイゼーションによるスクリーニングをさらに続行することはせず，Frohmanら[13]の“RACE(rapid amplification of cDNA end)”法に従い，5′末端のPCRによる増幅を試みた．$(dT)_{17}$アダプター(5′-GACTCGAGTCGACATCGATTTTTTTTTTTTTTTT-3′)とアダプター(5′-GACTCGAGTCGACATCG-3′)のほかに，すでに決定していたλSDの塩基配列に基づいて2つのアンチセンスプライマー(a, b)を作製した．より3′-側のアンチセンスプライマー(a)を用いてpoly(A)⁺RNAと逆転写酵素によって鋳型DNAを合成し，poly(A)付加後，$(dT)_{17}$アダプターおよびプライマー(a)とともに，PCR法を行った．その反応産物をアダプターとプライマー(b)によって再増幅した(PSD 2)．これらのcDNA(PSD 1, PSD 2)からPCR反応によってPSD 3を得て，ライブラリースクリーニングによって得られたλSDとクローニングベクター上でつなぎ合わせた(pKMC-SD)．

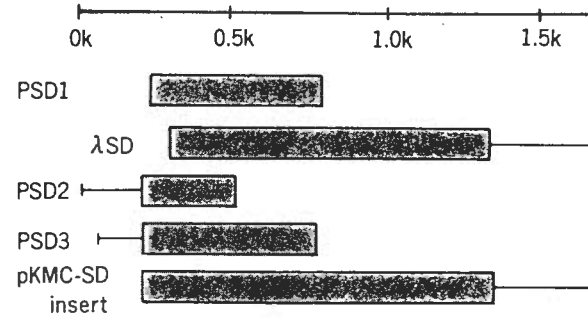


図1 ラット骨格筋細胞質シアリダーゼのcDNAクローン[12]

PSDはPCR法によって，λSDはライブラリースクリーニングによって得られた．pKMC-SDはPSD 3とλSDを継ぎ合わせたクローン．▓：翻訳領域．

つぎにpKMC-MDからの翻訳領域を含むDNA断片をファージT7プロモーター支配下にある発現ベクターpET3d(Novagen)に組み込み，大腸菌(BL21-DE 3)による発現を試みた．イソプロピルチオ-β-グリコシド誘導後の大腸菌を集め，細胞破砕後，ホモジネートでシアリダーゼ活性を測定した．ベクター

のみではまったく活性が検出されなかったが，cDNAを含むものでは明らかにシアリダーゼ活性が出現した．また，グルタチオンS-トランスフェラーゼとの融合タンパク質を発現するベクターpGEX(Pharmacia)に組み込んだ場合もシアリダーゼ活性の発現がみられたが，pET3dベクターを使用したものより活性が低かった．発現されたシアリダーゼ活性は至適pHや基質特異性などの性状が骨格筋酵素と似ており，しかも抗骨格筋酵素抗体によって完全に免疫沈降した．pKMC-SDからのcDNAをプローブとしてノーザンブロット解析すると，約1.8 kb付近に主要なバンドが観察され，単離されたcDNAはほぼ全長を含むことがわかった．

III．ラット細胞質性シアリダーゼの一次構造

クローン化されたcDNAは1,679 bpからなり，379個のアミノ酸をコードする．算出される分子量は42,400で骨格筋酵素のそれにほぼ一致した．推定されるアミノ酸配列には骨格筋酵素標品から決定された9種類のペプチド配列がすべて含まれていた．N-グリコシド糖鎖の結合可能部位が4カ所存在するが，骨格筋酵素は各種レクチンに結合しないことから，実際には糖鎖の付加はないものと考えられる．膜貫通部位や膜へのターゲティングシグナルに対応するような疎水性アミノ酸の伸長は認められないが，C末端を含めた3カ所に9～10残基の短い疎水性アミノ酸配列があった．これらが膜アンカードメインとして働く可能性も否定できない．本酵素は組織や細胞の細胞質画分から主に分離されるが，その一部がミクロゾーム画分からも検出されることと関係があるかもしれない．

一次構造について，これまでに報告されているウイルス，細菌，原虫などの微生物シアリダーゼのそれらとを比較した．一次構造全体については有意の相同性はなく，領域を限局した解析でも19％以下の相同性しか示さなかった．しかしながら，Roggentin[14]らがいくつかの細菌シアリダーゼの一次構造を比較することによって提唱したAsp-blockとよぶ微生物シアリダーゼのコンセンサス配列(Ser-X-Asp-X-Gly-X-Thr-Try)が2カ所に見いだされた．この配列は，細菌シアリダーゼには4個，*Trypanosoma cruzi*では2～4個，インフルエンザA型ウイルスでは不完全な形で1個存在する．これらの微生物酵素では，少なくとも1つのAsp-blockの2番目のアミノ酸をリジンが占めているが，このラット酵素にはこの事実が該当しないことがわかった(表3)．

ところが，ラット酵素に認められる2つのAsp-block間の距離は約60～70アミノ酸残基であって，細菌シアリダーゼ間で保存されているAsp-block IIとIIIの距離にほぼ等しく，システインやβ-シート構造に富む点も微生物酵素と類似しており，これらはシアリダーゼの高次構造がその起源に関わらず保存されている可能性を示唆する．

微生物において，シアリダーゼは宿主細胞への侵入や伝播など病原性と密接する可能性や，栄養に関与する可能性などが提示されているが[15]，この起源に

表3 ラットシアリダーゼと微生物シアリダーゼのコンセンサス配列(Asp-block)の比較

	SXDXGXTW
Clostridium perfringens	IYSKDNGETWT
Clostriduim sordellii	IYSKDNGETWT
Bacteroides fragilis	MYSKDGGKNWK
Salmonella typhimurium	IYSKD-GETWS
Vibrio cholerae	FLSKDGGITWS
Trypanosoma cruzi(SA85)	IYSKDNGSTWS
Influenza A(A/Whale/Maine)	IYGKDNAVRIG
Influenza A(A/PR/8/34)	IYSKDNSIRIG
Rat(cytosolic)	VTSTDYGMNWS

ついては論議の多いところである．シアリダーゼ活性をもつ病原性微生物のほとんどはそれ自身シアル酸を合成せず，シアリダーゼの基質であるシアロ複合糖質ももたない．したがってこれらのシアリダーゼは宿主細胞由来であるとする仮説があり，宿主である動物シアリダーゼの構造解析が待たれていた．また微生物シアリダーゼ間でAsp-blockが見いだされるに及んで，シアリダーゼの単一系統発生説が提出された[14),16)]．微生物のシアリダーゼが宿主から獲得されたものであろうと，逆に宿主動物シアリダーゼが系統発生的に進化してきたものであろうと，両者に共通なAsp-blockの存在や高次構造上の相同性は，単一系統発生説を支持するものであるかもしれない．ただし，この細胞質性シアリダーゼは4種のラットシアリダーゼのなかでは酵素学的性状が最も微生物シアリダーゼに近く，上述のような構造上の類似性はこの酵素に限局した事象である可能性もある．相違点の多いほかの3種のシアリダーゼにも上述のことがあてはまるかどうかはわからない．これらの酵素の構造解析が急がれる．

ヒト胎盤シアリダーゼについてPotierら[17)]が興味ある知見を報告している．ヒト胎盤シアリダーゼのβ-ガラクトシダーゼおよび保護タンパク質との複合体に含まれる60 kDaのタンパク質が，抗プロサポシン抗体と反応し，しかもこの抗体はシアリダーゼ活性を特異的に阻害するという．プロサポシン遺伝子はシアリダーゼ欠損症の形質遺伝子と同じ10染色体に局在し，その一次構造の解析から，糖脂質の加水分解を促進する4つのアクチベーターの前駆体遺伝子であることがすでに明らかになっている．このたびクローン化された細胞質性シアリダーゼの一次構造とプロサポシンのそれとの間に相同性はなく，しかもこの60 kDaのタンパク質はシアリダーゼに由来しないという報告もある[18)]．

IV．動物シアリダーゼの機能

動物シアリダーゼは微生物シアリダーゼと異なり，自身の体内で生理的脱シアリル化を調節している．I節で紹介したような酵素タンパク質分子の基質特異性や細胞内局在に関する情報はシアリダーゼの機能解析に有力な手がかりを提供する．たとえば，ラット肝リソソーム内腔性シアリダーゼの局在や至適pHから，この酵素がリソソームで異化分解に従事していることが窺えるし，基質特異性からは，糖タンパク質の分解がエンドグリコシダーゼやプロテアーゼとの協同作用によってなされていることが推察される．一方，細胞質性シアリダーゼは基質への到達性の点で疑問が残るものの，中性pHで無傷の複合糖質を脱シアリル化できるので，リソソーム内腔性酵素には期待できない複合糖質の機能調節という役割をもつかもしれない．リソソーム膜性シアリダーゼについては，局在と基質特異性から，リソソームでおもにガングリオシドの異化分解にあずかっていると考えられるが，事実，シアリドーシス患者の繊維芽細胞で類似酵素の低下がガングリオシド分解異常を引き起こしている[19)]．ガングリオシドに特異的に働く形質膜性シアリダーゼは，他細胞の表層膜ガングリオシドを認識することによって細胞間相互作用に関わる可能性，あるいはガングリオシドによって調節を受ける膜局在レセプターの機能を修飾し，増殖や情報伝達機構に関わる可能性が期待されている．ブタ脳の形質膜シアリダーゼはホスファチジルイノシトール特異的なホスホリパーゼC(PI-PLC)によって膜から遊離されるようで，グリコシルホスファチジルイノシトール(GPI)アンカーで細胞表層に結合しているらしい[20)]．またシアリダーゼのタイプは同定されていないが，シアリダーゼ阻害剤によって細胞増殖が抑制されたという報告[21)]もある．

動物シアリダーゼの機能については，リソソームシアリダーゼ以外は直接的な証拠が得られている例は少なく，推察の域を出ない．細胞内局在もまた，固定したものではなく，種々の生理条件で局在の移動が起こりうる[22)]ことも考えておかねばならない．

おわりに

単離されたcDNAを利用して，遺伝子の細胞導入やゲノムDNAクローニングを行うことによって，細胞質性シアリダーゼの生理機能や発現機構を解明することが次の課題である．なぜ骨格筋や脳でこの活性が高いのか，がん化で活性減少するのはいかなる機構によるのかなど疑問も多い．さらに，4種のシアリダーゼの細胞内局在や基質特異性の相違がいか

なる構造上の相違に由来するのか，他の動物シアリダーゼの構造解明と相互間の比較も緊急で重要な課題である．単離したcDNAが，他の動物シアリダーゼのcDNAクローニングに有力な武器となることが期待される．

■文献

1) Schauer, R.：*Trends Biochem. Sci.* **10**, 357-360 (1985)
2) Varki, A.：*Glycobiology* **2**, 25-40 (1992)
3) Pilatte, Y., Bignon, J. & Lambre, C. R.：*Glycobiology* **3**, 201-217 (1993)
4) 宮城妙子：シアリダーゼ「脂質III，糖脂質」新生化学実験講座 **4**, 日本生化学会編, pp.392-398 東京化学同人 (1990)
5) Miyagi, T. & Tsuiki, S.：*Eur. J. Biochem.* **141**, 75-81 (1984)
6) Miyagi, T., Sagawa, J., Konno, L., Handa, S. & Tsuiki, S.：*J. Biochem.* **107**, 787-793 (1990)
7) Miyagi, T. & Tsuiki, S.：*J. Biol. Chem.* **260**, 6710-6716 (1985)
8) Miyagi, T., Sagawa, J., Konno, K. & Tsuiki, S.：*J. Biochem.* **107**, 794-798 (1990)
9) Hiraiwa, M., Nishizawa, M., Uda, Y., Nakajima, T. & Miyatake, T.：*J. Biochem.* **103**, 86-96 (1988)
10) van der Horst, G. T. J., Galjart, N. J., d'Azzo, A., Galjaard, H. & Verheijen, F. W.：*J. Biol. Chem.* **264**, 1317-1322 (1989)
11) Miyagi, T., Hata, K., Hasegawa, A. & Aoyagi, T.：*Glycoconjugate J.* **10**, 45-49 (1993)
12) Miyagi, T., Konno, K., Emori, Y., Kawasaki, H., Suzuki, L., Yasui, A. & Tsuiki, S.：*J. Biol. Chem.* (印刷中)
13) Frohman, M. A., Dush, M. K. & Martin, G. R.：*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**, 8998-9002 (1988)
14) Roggentin, P., Rothe, B., Kaper, J. B., Galen, J., Lawrisuk, L., Vimir, E. R. & Schauer, R.：*Glycoconjugate. J.* **6**, 349-353 (1989)
15) Corfield, T.：*Glycobiology* **2**, 509-521 (1992)
16) Hoyer, I. L., Hamilton, A. C., Steenbergen, S. M. & Vimr, E. R.：*Mol.Microbiol.* **6**, 873-884 (1992)
17) Potier, M.：*Biochem. Biophys. Res. Commun.* **155**, 32-37 (1988)
18) Hiraiwa, M., Uda, Y., Tsuji, S. & Miyatake, T.：*Biochem. Biophys. Res. Commun.* **177**, 1211-1216 (1991)
19) Lieser, M., Harms, E., Kern, H., Bach, G. & Cantz, M.：*Biochem. J.* **260**, 69-74 (1989)
20) Chiarini, A., Fiorilli, A., Siniscalco, C., Tettamanti, G. & Venerando, B.：*J. Neurochem.* **55**, 1576-1584 (1990)
21) Usukim, S., Hoops, P. & Sweeley, C. C.：*J. Biol. Chem.* **263**, 10595-10599 (1988)
22) Cross, A. S. & Wright, D. G.：*J. Clin. Invest.* **88**, 2067-2076 (1991)

J. Jpn. Soc. Clin. Cytol. 32(3)：386～391, May, 1993

原　著

妊娠期・授乳期の乳腺細胞所見

宮城県対がん協会細胞診センター
佐藤　由紀　松井　昭義　金野多津子　伊藤　圭子
東岩井　久　武田鐵太郎

妊娠期，授乳期にある乳腺穿刺吸引材料29件（妊娠期12件，授乳期17件），乳頭分泌物46件（妊娠期27件，授乳期19件），計75件の細胞像について検討した．

1）穿刺吸引材料29件中22件に乳管上皮細胞集塊を認めた．集塊は乳頭状・球状を呈する大集塊と，シート状中集塊に大別された．29件中16件，55.2%に大型核小体を有する細胞群を検出した．核小体は主にシート状集塊を形成する細胞と散在性裸核状細胞に観察された．

2）乳頭分泌物46件中31件，67.4%に赤血球を検出した．46件のうち8件に，腺増生あるいは乳頭状増殖を疑わせる乳頭状集塊を認め，そのうちの7件は細胞異型を呈していた．

3）75件69例中5例は病理組織学的に癌が確認され，穿刺細胞診は2例中陽性1例，分泌物細胞診は4例中陽性1例であった．

妊娠期・授乳期には静止期とは異なった形態を示す細胞が出現するため，乳腺細胞診においても，生理的な時期を考慮した判定が肝要と考えられた．

Key words：Breast——Cytology——Nipple discharge——Aspiration biopsy——Pregnancy——Lactation

I. はじめに

乳腺は妊娠期，産褥期や授乳期には種々のホルモン，特にエストロゲン，プロゲステロンの影響を強く受け，静止期とは異なった組織像を示すことが知られている．乳腺炎，血乳などを伴うことも多い．しかし，この時期の細胞像に関しては，悪性細胞と鑑別を要する異型細胞の出現することなど簡単な記載があるのみで，詳細な報告はなされていない[1,4,5,14]．

今回，われわれは妊娠期・授乳期における乳腺穿刺吸引材料および乳頭分泌物の細胞所見について検討したので報告する．

II. 対　　象

対象は宮城県対がん協会乳腺クリニックを受診，または他施設から宮城県対がん協会細胞診センターに細胞診断を委託された，妊娠期・授乳期の穿刺吸引材料29件（妊娠期12件，授乳期17件），乳頭分泌物46件（妊娠期27件，授乳期19件），計75件（69例）である（表1）．染色はPapanicolaou染色（以下Pap.染色）とMay-Grünwald-Giemsa染色（以下M.G.G.染色）を行った．

Breast cytology in pregnancy and lactation
Yuki SATO, C.T., I.A.C., Akiyoshi MATSUI, C.T., I.A.C., Tatsuko KON-NO, C.T., I.A.C., Keiko ITO, C.T., I.A.C., Hisashi HIGASHIIWAI, M.D., F.I.A.C., Tetsutaro TAKEDA, M.D., F.I.A.C.
Center for Clinical Cytology, Miyagi Cancer Society
論文別刷請求先：〒980 仙台市青葉区上杉5の7の30　宮城県対がん協会細胞診センター　佐藤　由紀
平成4年9月17日受付
平成4年12月26日受理

表 1　検討対象（75件）

乳頭分泌物　46件				穿刺吸引物　29件			
妊娠期	27	授乳期	19	妊娠期	12	授乳期	17
前期 2～ 4ヵ月	1	出産～ 1ヵ月	13	前期 2～ 4ヵ月	3	出産～ 1ヵ月	3
中期 5～ 7ヵ月	7	2ヵ月	1	中期 5～ 7ヵ月	4	2ヵ月	1
後期 8～10ヵ月	18	4ヵ月	1	後期 8～10ヵ月	5	3ヵ月	1
不明	1	5ヵ月	2			5ヵ月	1
		不明	2			6ヵ月	2
						10ヵ月	1
						不明	8

表 2　乳管上皮細胞集塊の大きさと性状（穿刺吸引）

性状 / 大きさ	シート状	乳頭状 球状	結合性疎 不規則重積
小（細胞30個以下）	4（件）		
中	8	1	
大（細胞100個以上）	3	9	1 malignant cell

＊集塊を認めたもの22件
- シート状のみ　11
- 乳頭状・球状のみ　6
- シート状と乳頭状・球状　4
- malignant cell　1

＊種々の集塊を認めた場合は大きい方に含む

III. 結　　果

1. 穿刺吸引細胞所見

乳管上皮細胞の検出数は概して少なく，対物レンズ10倍の弱拡大で，一視野100個以下の少数例が29件中16件と過半数を占め，200個以上を検出した多数例は10件のみであった．

29件中22件に乳管上皮細胞集塊が出現していた．集塊の性状は，乳頭状・球状とシート状に大別された（表2）．

乳頭状・球状集塊が出現したのは22件のうち10件，45.5%で，100個以上の細胞からなる大集塊として観察される傾向にあり，そのうち6件では，重積著明で球状を呈し，この球状集塊がさらに多数立体的かつ密に結合し，それぞれの球状集塊間には，間質細胞と思われる小型紡錘形細胞が介在していた．これらの集塊を構成する細胞は，核径8～10 μ 程度の小型円形ないし楕円形を示し，細胞質は狭少不明瞭で，N/C比は大であった．核クロマチンは顆粒状から濃縮状であった（写真1，2）．

シート状集塊は22件中15件，68.2%にみられ，細胞数30～99個の中程度の大きさのものが多かった．

写真 1　N/C比大な小型細胞の球状集塊が，さらに多数立体的に結合して重積著明な大型乳頭状集塊を形成している．出産後4日，穿刺吸引（Pap. 染色，対物20倍）

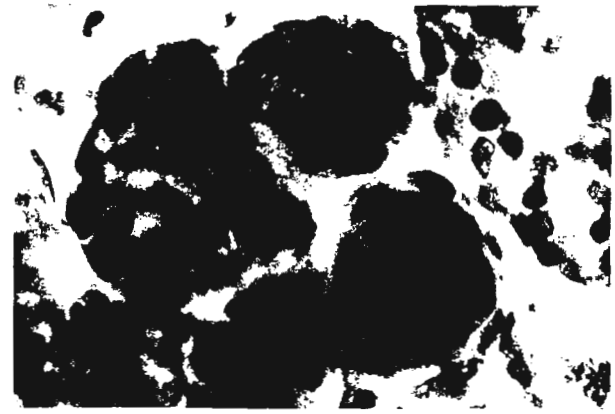


写真 2　写真1と同症例（Pap. 染色，対物100倍）

細胞配列は平面的で，重積は2～3層程度にとどまっていた．核径は10～12 μ 程度，円ないし類円形でクロマチンの増量は認めず，しばしば核小体が観察された（写真3，4）．

このほかに，結合性密な球状ないし乳頭状集塊はみられず，散在傾向を示す不規則重積集塊を認めたものが1件あったが，これは悪性例で癌細胞と判定され

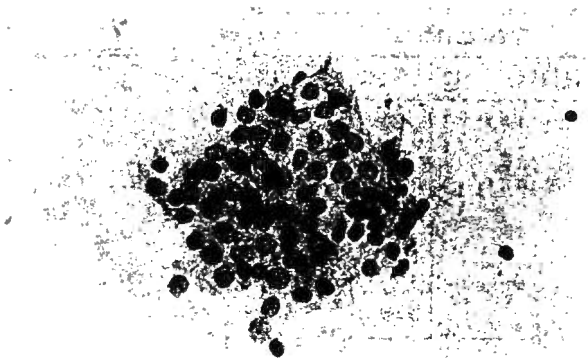


写真 3　平面的なシート状を呈する中集塊．クロマチン微細な類円形核，著明な核小体を認める．出産後2ヵ月，穿刺吸引（Pap. 染色，対物 40 倍）

表 3　核小体(＋)16 件の検出状況（穿刺吸引）

集塊中	散在細胞中	
＋	＋	11 件
＋	－	1
－	＋	4

表 5　血性分泌物 31 件の細胞所見

赤血球のみ	11 件
赤血球＋乳管上皮細胞小集塊	6
赤血球＋好中球	6
赤血球＋乳管上皮細胞乳頭状集塊	7
赤血球＋悪性細胞	1

た．

核小体を明瞭に確認できた細胞群が出現していたのは 29 件中 16 件（癌 1 件を含む），55.2% であった．核小体を持つ細胞の出現形態をみると，集塊中にみられたのは 12 件で，その大部分はシート状集塊であった．散在細胞中にみられたのは 15 件で，シート状集塊を構成する核と類似した核径 10〜12 μ 程度の裸核状細胞が多かった（表 3）．

29 件中 7 件では好中球を多数検出し乳腺炎と診断した．リンパ球を多数検出したのは髄様癌の 1 件のみであった．

2．乳頭分泌物細胞所見

乳頭分泌物 46 件中 9 件は，乳管上皮細胞，泡沫細胞が少数散見されるのみか，あるいは検出細胞成分がごくわずかであった．

赤血球を検出したのは 46 件中 31 件，67.4%（そのうち肉眼的血性 30 件）と高率で，その時期的な内訳は，妊娠期 27 件（前・中期 8 件，後期 18 件，不明 1 件）のうち 16 件，59.3%，授乳期 19 件（出産後 1 ヵ月以内 13 件，その他 6 件）中 15 件，78.9% と授乳期で特に高かった（表 4）．

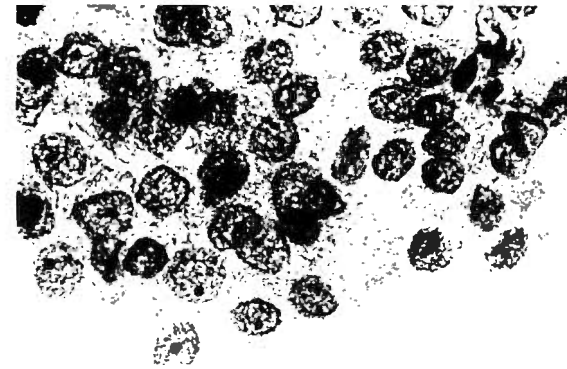


写真 4　写真 3 の強拡大（Pap. 染色，対物 100 倍）

表 4　赤血球の出現頻度（乳頭分泌物）

妊娠期　16 件/27 件 (59.3%)		授乳期　15 件/19 件 (78.9%)	
前期 2〜 4ヵ月	0/1 件	出産〜1ヵ月	10/13 件
中期 5〜 7ヵ月	4/7	2ヵ月	1/1
後期 8〜10ヵ月	12/18	4ヵ月	1/1
不明	0/1	5ヵ月	2/2
		不明	1/2

赤血球がみられた 31 件の細胞所見を検討すると，その他に異常所見を認めなかったもの 11 件，乳管上皮細胞の小集塊の出現を伴ったもの 6 件，好中球が多数出現し炎症に続発した血性分泌と推定されたもの 6 件，乳管上皮細胞の乳頭状集塊も出現し，乳頭腫あるいは乳頭腫症に起因したと思われるもの 7 件，癌細胞を検出したもの 1 件であった（表 5）．

非血性 15 件のうち乳管上皮細胞小集塊を認めたのは 5 件，乳頭状大集塊を認めたのは 1 件であった．

乳管上皮細胞の乳頭状大集塊を検出し，乳頭腫あるいは乳頭腫症の存在を強く疑ったのは乳頭分泌物 46 件中 8 件（血性 7 件，非血性 1 件）であった．このうち 2 件は細胞の大型化，細胞質の空胞形成，配列異常，著明な核小体などの細胞異型を呈していたが，悪性細胞との鑑別は容易であった．5 件は細胞の大型化と細胞質の空胞形成のみを認め，残りの 1 件には異型細胞を検出しなかった（写真 5）．

3．妊娠期・授乳期の乳癌

妊娠期・授乳期で細胞診を施行した 75 件 69 例中 5 例（妊娠期 36 例中 2 例，授乳期 33 例中 3 例）は病理組織学的に癌が確認され，そのうち 2 例は細胞診陽性

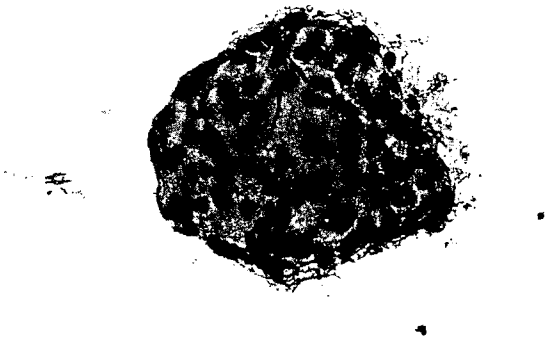


写真 5　不規則な重積を示す乳頭状集塊．核の濃縮像が顕著である．出産後2日，乳頭分泌物（Pap. 染色，対物40倍）

写真 6　配列異常，核クロマチンの増量を認める細胞集塊．微小浸潤癌例．出産後5ヵ月，乳頭分泌物（Pap. 染色，対物40倍）

写真 7　写真6と同症例．核の相互封入像も認める（Pap. 染色，対物100倍）

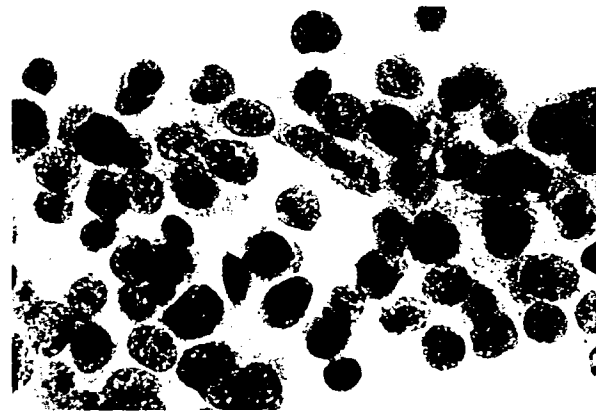


写真 8　不規則な重積を示す細胞集塊．核は円形でクロマチンは粗顆粒状，大型核小体を認める．髄様癌例．出産後6ヵ月，穿刺吸引（Pap. 染色，対物100倍）

であった．5例の臨床所見，細胞所見について述べる．

症例1：29歳，妊娠32週に穿刺吸引細胞診と乳頭分泌物細胞診を施行したが，穿刺吸引スメアには細胞成分を認めず，乳頭分泌物スメアでも，乳管上皮細胞，泡沫細胞が少数みられたのみで，いずれも陰性と判定した．臨床的に癌と診断され，妊娠33週に定型的根治手術を行った．病理組織診断は浸潤性小葉癌，病期は $T_2N_0M_0$ であった．

症例2：34歳，妊娠34週で両側乳頭分泌物細胞診を行ったが，やや大型の乳管上皮細胞が散見されるのみで陰性と判定した．妊娠35週に定型的根治手術を施行し，充実腺管癌で一部にScirrhousな部分を認める $T_2N_0M_0$ の癌であった．

症例3：28歳，出産後9日目の乳頭分泌物細胞診では，異型性に乏しい乳管上皮細胞の小集塊を認めるのみで陰性とした．出産後45日目に手術を行い，充実腺管癌のScirrhous invasion，$T_3N_0M_0$ であった．

症例4：25歳，出産後5ヵ月に血性乳汁を認めた．乳頭分泌物細胞診で多数の悪性細胞を検出した．悪性細胞は小，中の乳頭状集塊，あるいは散在性細胞として出現しており，顕著な配列異常，核形不整，クロマチン増量を認めた．腫瘤を触れなかったため，乳管造影を行い，病変部位を確認してLumpectomyを施行した．病変の大部分は非浸潤癌であったが，1ヵ所に微小浸潤をおもわせる像が認めれた（写真6・7）．

症例5：33歳，出産後4ヵ月頃より腫瘤を自覚し，出産後6ヵ月に施行した穿刺吸引細胞診では，リンパ球を背景に，結合性の低下した不規則重積性を示す悪性細胞の大小の集塊を多数認めた．核は大型円形で，クロマチンの増量，大型核小体を有していた．また，弧在性に50 μ を越す大型多核細胞も出現していた．

同時に行った腋窩リンパ節の穿刺吸引細胞診も癌細胞陽性であった．病理組織診断は髄様癌，進行期は $T_2N_2M_0$ であった（写真8）．

細胞診陽性であった2例に検出された癌細胞と通常の癌細胞との間に明らかな所見の差はみられなかった．

IV. 考　　察

乳腺組織は妊娠により，乳管の増殖と腺房が形成される．妊娠後期，授乳期には腺房は拡張し，内腔に分泌物を貯えている[2,4,8,11,13]．穿刺吸引スメアでは，細胞質が豊富で円形核，著明な核小体を有する細胞が出現し，これは腺房を形成する細胞に一致するといわれている[1,4,12,14]．また，授乳期腺腫でも同様の細胞を認めるとされている[5,7,10]．

われわれの検討では，穿刺吸引スメア上，シート状集塊と乳頭状・球状集塊の2種の細胞集塊を検出した．

核小体は穿刺吸引スメアの55.2%と半数に認めた．これらは主としてシート状集塊中に出現しており，核は類円形であった．このシート状集塊を形成する核小体著明な細胞の大部分は，これまでの報告で言及されているように腺房由来と考えられる．

著明な重積と立体性を示す乳頭状・球状集塊は，腺房細胞に比し細胞質に乏しく，核は小型でクロマチンが顆粒状から濃縮状を呈するなど，様相が異なっている．これは，小葉，小葉内細導管以外の既存の乳管上皮に由来していると考えられる．妊娠期・授乳期の腺房以外の乳管部分の変化については，組織，細胞いずれの分野でも明確に記されている文献はなく，あくまで推測の域をでないが，妊娠・授乳期の乳管上皮細胞の増殖は，二層程度にとどまり，著しい増殖はないと考えられる．つまり，乳頭状・球状を呈する集塊は，妊娠以前から存在した乳管上皮細胞の増殖性病変がホルモンの影響を受け強調されたものと推測される．これらの症例は妊娠中期から出産後1～2ヵ月のものが多く，臨床的には乳腺症，線維腺腫を疑っているものが大部分であった．通常の ductal hyperplasia，線維腺腫などから得られる乳管上皮細胞集塊は，平面的あるいは軽度の重積性を示す集塊として出現する傾向があり，乳頭状・球状集塊のような著しい重積を示す立体的集塊となることはまれである．

乳頭分泌物細胞診で乳頭腫あるいは乳頭腫症を疑った症例は8件あった．大部分は血乳がきっかけで細胞診を行っている．乳汁分泌の豊富なこの時期に細胞診を行うのは，静止期から潜在していた乳管上皮細胞の乳頭状増殖を発見するためには意義あることと考えられる．

妊娠期・授乳期の穿刺吸引スメアに出現する，核小体を有する腺房細胞，著しい重積を示す細胞集塊，乳頭分泌物スメアでしばしばみられる異型乳頭状集塊は，悪性細胞との鑑別という点で問題となる[5,14]．穿刺吸引スメアでの鑑別のポイントとしては，腺房細胞は，1）核は類円形で不整がない，2）核は10～12 μ 程度でクロマチンの増量はみられない，3）背景に散在している細胞は裸核状である（悪性散在性細胞は細胞質を保持する傾向にある）などの点があげられる．重積が著しい集塊は，細胞が小型で，間質細胞が介在するなど良性を示唆する所見がみられる．乳頭分泌物に出現する異型乳頭状集塊を詳細に観察すると，個々の細胞には大小不同があり，細胞質は広く空胞状だが，核は小型均一である．細胞質の境界は不明瞭である．悪性細胞とは，N/C比が小さく，核は小型で細胞相互の結合性が強いなどの点で鑑別可能である．細胞の大型化は，細胞質中の脂肪滴の増加や，乳汁豊富な拡張した乳管中で変性しているのも一因と考えられる．乳頭分泌物細胞診で，赤血球や炎症性細胞を背景とした場合，細胞の膨化，変性による所見の強調を考慮することが大切である．

約40週の妊娠期，その後の授乳期では，その細胞像はそれぞれに異なった像を示すと推測されたが，今回の検討からは，穿刺吸引スメア，乳頭分泌スメアのいずれにも特に時期的な違いを示唆する所見は認めなかった．

妊娠期・授乳期乳癌は，乳癌研究会の報告では，乳癌総症例数の0.76%（妊娠期0.28%，授乳期0.47%）であり，一般の乳癌と比較して，病悩期間が長く，TNM分類上も進行したものが多い傾向にあるとされている[3]．妊娠期・授乳期の乳腺は肥大増殖があるため，静止期乳腺と比べて腫瘤が触れにくく，また，炎症，乳腺症，線維腺腫と癌との鑑別が触診上困難になる．さらにマンモグラフィー，生検の施行も制限される[3,6]．このような状況から細胞診に課せられる期待と責任は重大である．近年，乳癌の罹患率は急増しており，それに伴い若年者の乳癌も増えている．当然，妊娠期・授乳期に合併した乳癌の増加も予想される．乳腺の生理的な変化を捕らえ，時期による細胞の変化を十分に把握した上で細胞診に対処することが肝要と

考えられる．

Summary

A cytologic evaluation was made of 75 mammary samples collected from 69 cases during pregnancy or lactation.

Ductal cell clusters were detected in 22 of 29 aspirates. These were classified into spherical clusters and plane clusters. Enlarged nucleoli were observed in 16 of 29 aspirates. Nucleoli were usually more prominent in plane cell clusters.

Erythrocytes were detected in 31 of 46 nipple discharges. Papillary clusters of epithelial cells were noted in 8 of 46 samples.

Five of 69 cases were diagnosed as cancer histologically; cytology was positive in one of 2 aspirates and in one of 4 nipple discharges.

文　献

1) Chandra, G., 坂井義太郎訳：Colour atlas of breast cytopathology, p 27, 45, 医学書院，東京, 1981.
2) 藤田恒夫，武藤正樹，栗原幸二訳：人体組織図譜，marian SHD Flove atrs de histologia normal, pp 190～193, 南江堂，東京, 1974.
3) 石田常博・他：妊娠と授乳期乳癌，乳癌の臨床，5(4)：639～652, 1990.
4) Koss：Diagnostic cytology and its histopathologic bases, pp 1050～1063, J.B. Lippinctt company, Philadelphia, Tront.
5) 水口國雄監修：実践細胞診カラー図鑑，p 73, HBJ出版局，東京, 1989.
6) 永井　宏・他：妊娠と乳癌，産婦人科の世界40巻，乳癌検診：197～205, 1988.
7) 西国　広：新細胞診のすすめ方一初級者から上級者まで一Text book of clinical Cytology, pp 159～167, 近代出版，東京, 1990.
8) 乳癌研究会編：臨床・病理，乳癌取扱規約，第8版，金原出版，東京, 1986.
9) 坂井義太郎：臨床検査MOOK, 21, 細胞診，pp 128～147, 金原出版, 1985.
10) 関本　弘・他：低分化腺癌と誤診した分娩直前の乳腺線維腺腫の一例，日臨誌(抄)，27：311, 1988.
11) 外野正巳・他：乳癌の細胞診一臨床と形態一，pp 41～48, 金原出版，東京, 1990.
12) 武田鐵太郎：穿刺細胞診による判定基準A良性疾患，臨床病理，64：59～65, 1985.
13) W.A.D. Anderson, John, M. Kissane：Pathology, pp 1777～1801, THE C.V. mosby company, Saint Louis, 1977.
14) 山田　喬，垣花昌彦編：穿刺吸引アトラス，乳腺，pp 97～121, 文光堂，東京, 1984.

〔原　著〕

医療システム構築による肝癌検診体系の確立に関する研究

小野寺博義・鵜飼　克明・中野　昇・武田鐵太郎
庄司　忠實

The screening and follow up system for the prevention of hepatocellular carcinoma in some rural area.

Hiroyoshi ONODERA, Katsuaki UKAI, Noboru NAKANO, Tetsutaro TAKEDA
Tadami SHOJI.

Department of Internal Medicine, Miyagi Cancer Center Hospital.

はじめに

宮城県対がん協会が実施してきた肝胆膵超音波地域集検の結果から，超音波集検では肝細胞癌を目標とし，検診方式としては超音波検査は2次検診で実施するのがよいとの結論に至った[1,2]。一方，肝細胞癌の予防のためには2次予防のみならず1次予防や，肝細胞癌のハイリスク保有者を拾い上げて肝細胞癌への進展を防ぐ1.5次予防も重要[2,3]であると考えられた。

宮城県内のA町では肝疾患を原因とする死亡率が宮城県全体の死亡率よりも高く，1989年の老人保健法による基本健康診査における肝機能異常者（GPTが51以上）の割合も5.0%と，周辺の2市1町の1.4～1.9%に比較して高率である[4]。今回は，このA町において実施した肝機能異常者に対する2次精検の結果について報告し，肝細胞癌の1.5次予防のためのハイリスク群の設定などについて考察を加える。

対象と方法

対象は，1990年と1991年のA町における老人保健法の基本健康診査で，GOT，GPTの一方または両者が51以上であった472例のなかで，2次精検を希望した155例である（表1）。これらの症例について，GOT，GPT，HBs抗原（RIA法），HBs抗体（RIA法），HBc抗体（RIA法），HCV抗体（EIA法，第一世代）を調べるとともに，超音波検査を実施した。1991年の2次精検時にはEIA法の第二世代によるHCV抗体測定が可能となっていたが，今回はEIA法の第一世代での測定結果について集計した。また，肝疾患の既往歴，肝疾患の家族歴，輸血歴，飲酒歴，手術歴，針治療歴，飲料水などの背景因子に関する聞き取り調査も実施した。

今回の検診システムを図1に示した。基本健康診査後の保健指導の場において，2次精検受検希望者を募り，同日に2次精検を実施した。2次精検は宮城県岩沼保健所，A町，A町医師会，宮城県立がんセンターが共同して実施したが，同時に地元医師会員，がんセンター肝臓外来担当医，保健所長，保健婦，栄養士がチームを組み生活調査および患者教育を実施した[4]。2次精検の結果，日常診療が必要であると認められた者は地元医師会員を主治医として紹

表1　A町における基本健康診査受診者数と二次精検受検者数

年齢階級	人口（H3.8.1.）	健康診査受診者数	GOT GPT異常例数	二次精検受検者数
40～49	4,803	1,167	73	19
50～59	3,803	1,444	130	46
60～69	3,769	2,000	194	71
70歳以上	3,145	1,193	75	19
合　計	15,520	5,804	472	155

（文献4より一部改変）

宮城県立がんセンター　内科

図1　肝細胞癌の1.5次予防のための医療システム

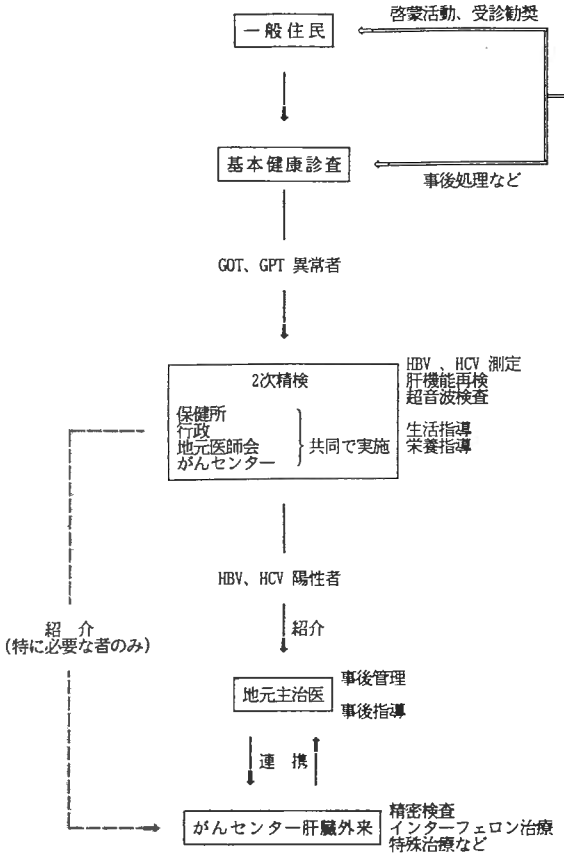


表2　2次精検における超音波検査所見(n＝155)

超音波所見	例数	%
異常なし	50	32.3
脂肪肝	53	34.2
肝嚢胞	14	9.0
慢性肝炎	9	5.8
肝血管腫	3	1.9
肝硬変	2	1.3
肝内結石	1	0.6
胆嚢ポリープ	16	10.3
胆嚢結石	13	8.4
総胆管拡張	2	1.3
膵嚢胞	1	0.6
慢性膵炎	1	0.6
腎嚢胞	7	4.5
水腎症	2	1.3
脾腫	1	0.6
子宮筋腫	1	0.6

介して事後管理と事後指導を依頼した。そして，インターフェロンによる治療や精密検査が必要となるなど何らかの問題が生じた場合には改めてがんセンターを含めた基幹病院を紹介するシステムとした。がんセンターでは，地元医療機関から紹介があった場合，早急に精密検査が必要な場合などには入院して実施し，特に入院が必要でない場合には引き続き地元主治医で経過観察を実施してもらいながら，がんセンター肝臓外来では3ヵ月に一度の診察と血液検査，超音波検査を実施した。なお，2次精検で悪性疾患が疑われて精密検査が必要と判断された場合には，直接がんセンターなどの基幹病院に紹介した。

肝炎ウィルス陽性率は行政区域，すなわち漁港のあるA地区，内陸のO地区，内陸で市街地であるW地区，浜通りのY地区の四つの行政区域ごとに集計した。有意差の検定には χ^2 検定を用い，危険率5％以下のときを有意差ありとした。

結　果

超音波検査では，105例（67.7%）で所見が認められた（表2）。脂肪肝53例（34.2%），胆嚢ポリープ16例（10.3%），胆嚢胞14例（9.0%），胆嚢結石13例（8.4%）などであり，癌は発見されなかった。

HBs抗原，HBs抗体，HBc抗体(以下HBV関連マーカーと記す)とHCV抗体陽性率を表3に示した。A町でのHBs抗原陽性率は2.4%～6.3%であり四地区で有意差はなかった。HBs抗体陽性率はW地区が25.0%で小さい傾向にあったが，その他の地区は40.8

%～43.9%であり有意差はなかった。HBc 抗体陽性率は43.8%～51.2%であり四地区で有意差はなかった。HBV 関連マーカーのうちいずれか一つ以上が陽性である割合は，43.8%～61.0%であり四地区で有意差はなかった。

HCV 抗体陽性率はW地区15.6%，Y地区18.4%と20%以下であるのに対して，O地区は45.5%，A地区が70.7%と高率であり有意差がみられた。

HBV と HCV の重複感染（感染歴）があるか否かを表4に示した。HBV 関連マーカーのみが陽性である割合は，A地区では19.5%で他の地区（27.3%～42.9%）より低率でありY地区との間に有意差がみられた。HCV 抗体のみが陽性であるのはA地区29.3%，O地区15.2%であり，他の二地区より有意に高率であった。HBV 関連マーカーと HCV 抗体がともに陽性であるのはA地区41.5%，O地区30.3%であり，他の二地区より有意に高率であった。HBV 関連マーカーと HCV 抗体がともに陰性であるのはA地区9.8%であったが，他の地区（27.3～53.1%）より有意に低率であった。

表3　A町での二次精検における HCV 抗体および HBV 関連マーカーの陽性率（%）

地　区	症例数	HBs抗原	HBs抗体	HBc抗体	HBV関連マーカー#	HCV抗体
A 地 区	41	2.4 (1)	43.9 (18)	51.2 (21)	61.0 (25)	70.7 (29)
O 地 区	33	6.1 (2)	42.4 (14)	48.5 (16)	57.6 (19)	45.5 (15)
W 地 区	32	6.3 (2)	25.0 (8)	43.8 (14)	43.8 (14)	15.6 (5)
Y 地 区	49	4.1 (2)	40.8 (20)	46.9 (23)	53.1 (26)	18.4 (9)

#：HBs抗原、HBs抗体、HBc抗体のうち一つ以上が陽性である症例　（ ）：症例数

表4　A町での二次精検における HCV 抗体および HBV 関連マーカーの陽性率（%）

地　区	症例数	HBV関連マーカー#のみが陽性	HBV関連マーカーとHCV抗体がともに陽性	HCV抗体のみが陽性	HBV関連マーカーとHCV抗体がともに陰性
A 地 区	41	19.5 (8)	41.5 (17)	29.3 (12)	9.8 (4)
O 地 区	33	27.3 (9)	30.3 (10)	15.2 (5)	27.3 (9)
W 地 区	32	31.3 (10)	12.5 (4)	3.1 (1)	53.1 (17)
Y 地 区	49	42.9 (21)	10.2 (5)	8.2 (4)	38.8 (19)

#：HBs抗原、HBs抗体、HBc抗体のうち一つ以上が陽性である症例
（ ）：症例数

表5　A町での二次精検における年齢別の HCV 抗体および HBV 関連マーカー陽性率（%）

年齢階級	症例数	HBs抗原	HBs抗体	HBc抗体	HBV関連マーカー#	HCV抗体
40～49	19	0 (0)	31.6 (6)	36.8 (7)	42.1 (8)	10.5 (2)
50～59	46	6.5 (3)	32.6 (15)	40.0 (17)	43.5 (20)	43.5 (20)
60～69	71	1.4 (1)	40.8 (29)	52.1 (37)	57.7 (41)	39.4 (28)
70歳以上	19	15.8 (3)	52.6 (10)	68.4 (13)	78.9 (15)	42.1 (8)

#：HBs抗原、HBs抗体、HBc抗体のうち一つ以上が陽性である症例　（ ）：症例数

年齢階級別の陽性率を表5に示した。HBs抗体とHBc抗体は年齢が高くなるとともに陽性率が高値となった。HBV関連マーカーのうちいずれか一つ以上が陽性である割合も年齢とともに高率となり，40歳代（42.1%）と70歳以上（78.9%）の間に有意差がみられた。

HCV抗体陽性率は50歳代43.5%，60歳代39.4%，70歳以上42.1%であり，50歳以上では年齢による差はなかった。しかし，40歳代は10.5%と有意に低率であった。

肝疾患の既往歴，肝疾患の家族歴，輸血歴，飲酒歴，手術歴，針治療歴，飲料水（井戸水，川水，山水の利用の有無）および超音波検査での脂肪肝の有無によるHBV関連マーカー陽性率に有意差はなかった（表6）。HCV抗体陽性率は肝疾患既往歴を有するものおよび超音波検査で脂肪肝のないもので有意に高率であったが，それ以外では有意差はなかった（表7）。

基本診査での拾い上げの際にGOT，GPTに加えてZTTあるいはγ-GTPを用いることにより，脂肪

表6　2次精検受検者における背景因子とHBV関連マーカー陽性率

背景因子		症例数	HBV関連マーカー#陽性数	HBV関連マーカー#陽性率	χ^2検定
肝疾患既往歴	有	96	57	59.4	NS
	無	59	27	45.8	
肝疾患家族歴	有	24	10	41.7	NS
	無	72	41	56.9	
輸血歴	有	9	6	66.7	NS
	無	146	78	53.4	
飲酒歴	有	24	14	58.3	NS
	無	131	70	53.4	
手術歴	有	63	36	57.1	NS
	無	92	48	52.2	
針治療歴	有	50	23	46.0	NS
	無	105	61	58.1	
脂肪肝	有	53	26	49.1	NS
	無	102	58	56.9	
井戸水、川水、山水の利用	有	84	47	56.0	NS
	無	12	4	33.3	

#：HBs抗原，HBs抗体，HBc抗体のうち一つ以上が陽性

表7　2次精検受検者における背景因子とHCV抗体陽性率

背景因子		症例数	HCV抗体陽性数	HCV抗体陽性率	χ^2検定
肝疾患既往歴	有	96	46	47.9	$p<0.005$
	無	59	12	20.3	
肝疾患家族歴	有	24	9	37.5	NS
	無	72	26	36.1	
輸血歴	有	9	4	44.4	NS
	無	146	54	37.0	
飲酒歴	有	24	9	37.5	NS
	無	131	49	37.4	
手術歴	有	63	24	38.1	NS
	無	92	34	37.0	
針治療歴	有	50	17	34.0	NS
	無	105	41	39.0	
脂肪肝	有	53	4	7.5	$p<0.005$
	無	102	54	52.9	
井戸水、川水、山水の利用	有	84	31	36.9	NS
	無	12	4	33.3	

表8　ZTT，γ-GTP と脂肪肝，HBV 関連マーカー，HCV 抗体との関係

	全症例数	ZTTが12.0以上である症例数	ZTTが15.0以上である症例数	γ-GTPが異常である症例数
脂肪肝	53 (100)	11 (20.8)	8 (15.1)	24 (45.3)
HBV 関連マーカー陽性者	84 (100)	42 (50.0)	28 (33.3)	41 (48.8)
HCV抗体陽性者	58 (100)	40 (69.0)	31 (53.4)	28 (48.3)

（　）：%

肝を拾い上げてしまう割合を低下させられないかという点についても検討した（表8）。基本健康診査でのZTTの値が12.0IU/L以上を拾い上げると仮定すると，今回の2次精検で発見された脂肪肝53例中42例（79.2%）を排除でき，15.0IU/L以上とすると45例（84.9%）を排除可能である。しかし，HBV 関連マーカーのうち一つ以上が陽性であった84例中56例（66.7%）がZTT15.0以下であり，42例（50.0%）がZTT12.0以下であった。同様に HCV 抗体が陽性であった58例中27例（46.6%）がZTT15.0以下で，18例（31.0%）がZTT12.0以下であった。一方，γ-GTP が高値を示す脂肪肝は53例中24例（45.3%）にすぎず，HBV 関連マーカーのうち一つ以上が陽性であった84例中41例（48.8%）および HCV 抗体が陽性であった58例中28例（48.3%）でγ-GTP が高値を示していた。

考　察

宮城県対がん協会が実施した肝胆膵超音波地域集検では，40歳から69歳までの全住民に調査票を配布し，肝疾患の既往歴，肝疾患の家族歴，輸血歴，常習性飲酒のうち一つ以上の肝疾患危険因子を有する者を対象として選定した。そして，一次検診で肝機能検査（HBs 抗原およびαフェトプロテインを含む）と超音波検査を併用した[1]。その結果の検討により，超音波集検では肝細胞癌を目標とし，肝疾患危険因子保有者を対象として，この中の肝機能異常者または HBs 抗原陽性者に対してのみ超音波検査を実施すべきであるとの結論に至った[1),2)]。しかし，集検発見肝細胞癌の予後が不良である[5),6)]こと，年一回の経過観察（超音波検査）しか実施していない地域集検発見肝機能異常者よりも3か月に一度の超音波検査を実施している肝臓外来通院患者の方から小さな肝細胞癌が発見されることから，集検では肝細胞癌を拾い上げるにとどまらず，肝機能異常者に対する経過観察の体系確立も重要であると考えられた[3]。

以上のような，今までの地域集検結果の分析と反省にもとづき，われわれは肝炎多発地域における肝機能異常者に対する肝細胞癌予防のための医療システムの確立を目指して，老人保健法の基本健康診査有所見者に対する2次精検を開始した。そのシステムは前述した通りであるが，このようなシステムが肝細胞癌の1.5次予防に有効であるか否かは今後さらに数年間にわたる検討が必要であり後日報告したいと考えている。今回はその第一段階である肝細胞癌のハイリスク群の設定について考察を加える。

HBV が肝細胞癌に関与していることは確実とされている[7)~9)]。HBV 関連マーカーと肝疾患との関係の検討については以前に深尾が報告[10)]したが，特に HBc 抗体陽性者の肝疾患有病率は陰性者に比べて有意に高率で，HBc 抗体の力価と有病率には正の相関がみられたことから，HBc 抗体が肝疾患のスクリーニングの際のハイリスク群設定の客観的指標となることが示唆されている。

今回のわれわれの検討で得られた HBs 抗原陽性率は同じく肝炎多発地区である島根県平田市Ⅰ地区の2.1～5.8%[11)]とほぼ同じであり，献血者における HBs 抗原陽性率が高い宮城県0町の5.7%[10)]ともほぼ同じであった。HBs 抗体陽性率は島根県平田市Ⅰ地区の25～37%[11)]とほぼ同じであり，宮城県0町の34.0%[10)]よりやや高い値であった。HBc 抗体についても年齢階級別にみると島根県平田市Ⅰ地区の50～73%[11)]，全体としてみると宮城県0町の49.8%[10)]とほぼ同じ値であった。以上のように，肝炎多発地域である宮城県A町での HBV 関連マーカー陽性率はこれまでの肝炎多発地区の報告とほぼ一致しており，A町の肝機能異常者の54.2%が HBV に暴露したことがあるといえる。

一方，肝細胞癌症例では HCV 抗体陽性率が肝硬変や慢性肝炎に比較して有意に高い[12)]ことが知られており，近年集検で測定した報告[13)~16)]がみられる。河村ら[15)]は献血者の HCV 抗体保有率が多い地域におい

て，基本健康診査でのGOT，GPT異常者のHCV抗体保有率を調べ，43.2～89.9%と報告している。われわれの調査でもA町全体では37.4%，特に陽性率が高いA地区では70.7%と高率であった。

われわれの検討では2次精検受検者中106例(68.4%)がHBs抗原，HBs抗体，HBc抗体，HCV抗体のうち一つ以上が陽性であった。49例（31.6%）では肝炎ウィルスマーカーの全てが陰性であったが，このうち25例では超音波検査で脂肪肝が認められた。基本診査から2次精査の対象者を拾い上げる際に，GOT，GPTとともにZTTも用いることにより脂肪肝の拾い上げを排除できないかを検討した。しかし，脂肪肝を拾い上げる率は低下するものの，同時にHBV関連マーカーおよびHCV抗体陽性者もかなりの割合で排除してしまうことになり問題である。また，ZTTは慢性化がある程度進まないと上昇せず，肝機能異常者を肝炎が進展する前に拾い上げて肝細胞癌への進展を防ぐ1.5次予防の観点からも，ZTTを用いることには問題があろう。同じくγ-GTPについても有用性は認められなかった。

以上より，基本診査の結果から肝細胞癌のハイリスク群を設定する場合には以下のような方法が良いと考えられる。すなわち，基本診査でのGOT，GPT異常者を拾い上げて，2次精検でHBs抗原，HBc抗体，HCV抗体を調べ，これらの陽性者を肝細胞癌のハイリスク群として設定する。さらに超音波検査を実施し，肝細胞癌の有無と脂肪肝の有無を確認する。肝炎ウィルスマーカーが陰性の脂肪肝は2次精検時に栄養指導と生活指導を実施して除外する。肝炎ウィルスマーカーが陰性で脂肪肝もない者は毎年基本診査を受診することを勧奨して除外する。このようにして設定したハイリスク群に対しては地元医療機関とその地域の基幹病院との連携のもとに治療や事後指導を実施していくことが必要であろう。なお，この場合の保健所と行政の役割は[1]，地域保健活動の企画や調整，一般住民に対する肝疾患についての啓蒙活動，基本健康診査の受診勧奨，基本診査後の事後処理などである。

ところで，HBV関連マーカー陽性率はA町の四つの地区で差がなかったが，高齢となるに従って陽性率が上昇していた。これに対してHCV抗体は四つの地区で有意差が認められたが，年齢階級別では40歳代で陽性率が有意に低率であり50歳以上では年齢階級による差はなかった。このことはHBVとHCVの感染経路が全く同一ではないことを示しているものと考えられる。C型肝炎については，輸血以外の感染経路の存在が示唆され[14),17),18)]ており，今回われわれは背景因子について聞き取り調査も実施したが，HCV抗体陽性率において既往歴と脂肪肝の有無で有意差がみられたのみであった。この点については今後更に対象数を増やすとともに対象年齢も広げて調査検討を重ね，輸血以外の感染経路が判明すれば，この地域における1次予防の可能性について模索していく必要があろう。

これまで肝癌検診体系の確立について種々の方法論が諸家によって報告されているが，現在のところ効率的で効果的な組織的に統一された検診方法が確立されるまでには至っていないのが現況である。小野ら[19)]はスクリーニング主体の検診では限界があり，肝癌の特殊性を考えると慢性肝疾患の早期治療と事後指導が重要であると述べている。われわれの成績[6)]でも集団検診としての肝癌の2次予防効果が充分に期待できるほど成果は得られていないことから，肝細胞癌発生を予防すべく1.5次予防対策を取り入れた検診システムをprospectiveに展開してみようと考えた。これを実現するためには，単に検診機関や専門的医療施設だけでの対応は難しく，実施にあたっては地域医療や保健所を含めた行政との連携による医療システムを確立して行うべきと考えた。肝細胞癌の場合にこのような医療システムの確立によってより有効性を高めることが可能であると予想されるが，今後更に検討を重ねて行きたい。

まとめ

肝炎多発地域である宮城県のA町において老人保健法の基本健康診査でGOT，GPTが異常を呈した症例で，GOT，GPT，HBs抗原，HBs抗体，HBc抗体，HCV抗体を調べるとともに，超音波検査を実施した。

その結果，肝細胞癌のハイリスク群を設定する場合には以下のような方法が良いと考えられた。老人保健法による基本健康診査でのGOT，GPT異常者を拾い上げて，2次精検でHBs抗原，HBc抗体，HCV抗体を調べ，これらの陽性者を肝細胞癌のハイリスク群とし，さらに2次精検で超音波検査を実施して肝細胞癌の有無を確認する。このようにして拾い上げたハイリスク群に対しては地元医師会員を主治医として紹介し，その地域の基幹病院との連携のもとに治療や事後指導を実施して肝細胞癌の1.5次予防を展開していくことが必要である。

本研究の一部は，平成4年度厚生省がん研究助成金「C型肝炎と肝細胞がんに関する研究」および第2回（平成3年度）「黒川利雄がん研究基金」の助成

を受けた。

文　献

1）小野寺博義他：腹部超音波スクリーニングによる肝胆膵疾患集検の適性化に関する検討（III）—肝細胞癌の拾い上げについて，日消集検誌：74，10，1987.

2）小野寺博義他：腹部超音波スクリーニングによる肝胆膵疾患集検の適性化に関する検討（IV）—効率的な集検のための対象選定について，日消集検誌：77，30，1987.

3）小野寺博義他：腹部超音波スクリーニングによる肝胆膵疾患集検の適性化に関する検討（VII）—集検発見肝細胞癌と病院発見肝細胞癌の比較，日消集検誌：85，40，1989.

4）岩沼保健所：平成3年度成人病予防のための保健指導体制の確立による健康づくりの推進，公衆衛生情報みやぎ：188，4，1992.

5）福本四郎他：集検発見肝癌とその予後，日消集検誌：85，71，1989.

6）小野寺博義他：腹部超音波スクリーニングによる肝胆膵疾患集検の適性化に関する検討（VIII）—肝細胞癌集検における臨床疫学的考察，日消集検誌：94，92，1992.

7）Poper, H., et al:Relation of the hepatitis B virus carrier state to hepatocellular carcinoma, Hepatology: 7，764，1987.

8）古澤浩司他：肝硬変と肝癌の疫学とその予防，医学のあゆみ：151，805，1989.

9）小林健一：肝癌における肝炎ウィルスの関与，医学のあゆみ：151，810，1989.

10）深尾彰他：地域集団におけるHBc抗体の臨床疫学的意義の検討，日消集検誌：69，87，1985.

11）清水一彦：ウィルス肝炎の疫学的研究，日消集検誌：61，81，1983.

12）小野寺博義他：肝細胞癌および慢性肝疾患におけるHCV抗体陽性率，臨牀と研究：68，1727，1991.

13）田中栄司他：長野県一山村の非A非B型肝炎多発地域における疫学調査特にHCV抗体陽性例について，肝臓：32，98，1991.

14）瀬戸口洋一他：地域住民検診と抗HCV抗体出現率，佐賀県地域，日本臨床：49，383，1991.

15）河村奨他：地域住民を対象とした肝癌high risk group検診の取り込み，日消集検誌：95，173，1992.

16）藤岡高弘他：肝機能集団検診におけるC型肝炎関連抗体測定についての検討，日消集検誌：96，17，1992.

17）藤沢洌：C型肝炎の流行，肝胆膵：20，25，1990.

18）荒巻琢己他：猿島肝炎について，肝臓病学の進歩：16，17，1990.

19）小野直美他：肝癌の2次予防における集団検診の効果　—集検発見肝癌の予後の検討より，日消集検誌：86，82，1990.

PTCD 前後における CA-50 と CA 19-9 の変動

小野寺博義　鵜飼克明　大方俊樹
鈴木　裕　本島　正　桑島一郎
中野　昇　氏家重紀　武田鐵太郎
庄司忠実

はじめに

CA-50 は Lindholm ら[1]によってヒト結腸直腸癌由来培養細胞（Colo-205）を免疫源として作製されたモノクローナル抗体 CA-50 が認識する糖鎖抗原であり，膵癌および胆道癌での陽性率が高い[2)-5)]。今回，われわれは閉塞性黄疸症例において，PTCD による黄疸改善前後に CA-50 を測定し，黄疸が CA-50 の値に与える影響について検討したので報告する。

Ⅰ．対象と方法

対象は1990年12月から1992年6月までに宮城県立がんセンターで経験した閉塞性黄疸20例である。その内訳は総胆管結石2例，総胆管癌9例，胆嚢癌1例，膵臓癌8例である。これらの症例で PTCD 前と PTCD 実施後黄疸が改善してからの2回にわたり CA-50（EIA 法，三井製薬工業）と CA19-9（EIA 法，セントコア社）を測定した。なお，CA19-9 を測定しえなかった3例と，血中 CA-50 のレベルが低く測定不能であった2例は一部の検討から除外した。

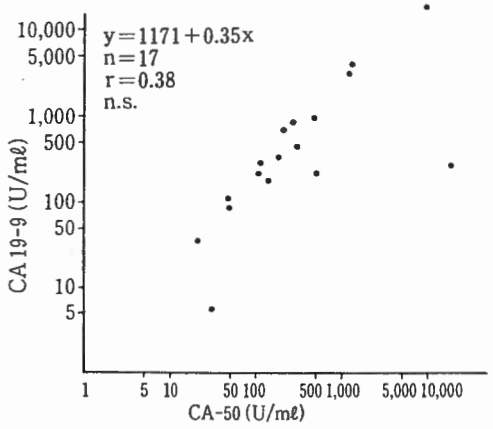


図 1　PTCD 前，黄疸時の CA-50 と CA19-9 の相関

宮城県立がんセンター内科

Ⅱ．結果

PTCD 前後の検査間隔は39.8±22.1日（平均値±標準偏差）であった。PTCD 前の総ビリルビン値は17.1±9.4mg/dℓ，黄疸改善後の総ビリルビンは3.0±2.2mg/dℓであった。PTCD 前の CA-50 と CA19-9 の相関を図1に示したが，r＝0.38 で有意の相関はみられなかった。しかし，PTCD 後（黄疸改善後）の CA-50 と CA19-9 との間には r＝0.97 で有意（p＜0.001）の相関がみられた（図2）。

PTCD 前に比べて PTCD 後に CA-50 の値が減少したのは16例で，減少率は63.3±30.0％であった。同じく PTCD 後に CA19-9 の値が減少したのは12例で，減少率は65.0±32.4％であった。両

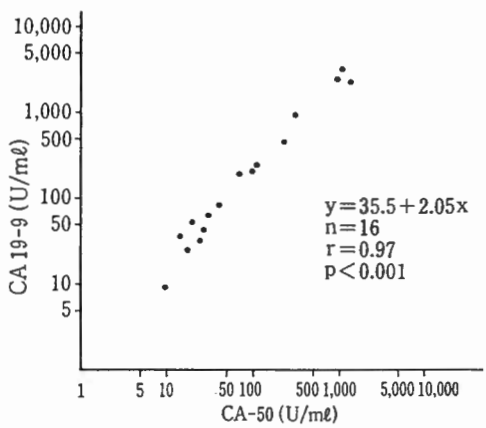


図 2　PTCD 後，黄疸が改善してからの CA-50 と CA19-9 の相関

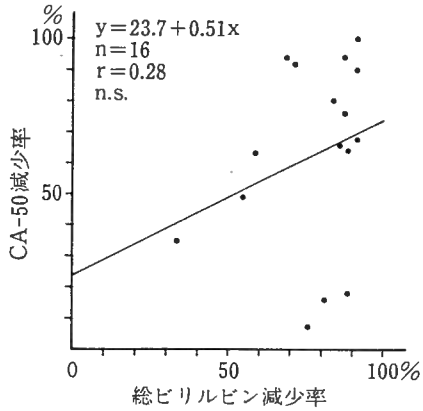


図 3　PTCD 前後における総ビリルビン値減少率と CA-50 減少率との相関

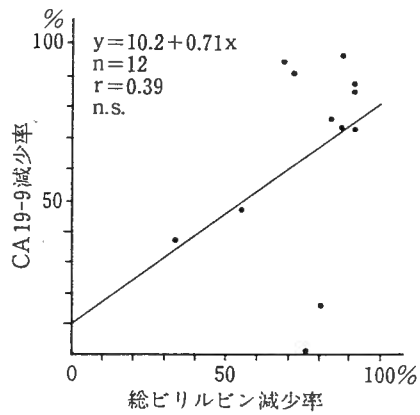


図 4　PTCD 前後における総ビリルビン値減少率と CA19-9 減少率との相関

表 1　PTCD実施前のCA50の診断精度

		癌 あり	癌 なし	合 計
CA 50	陽性	16	2	18
	陰性	2	0	2
合 計		18	2	20

感度 89%，特異度 0％
陽性反応適中度 89%，陰性反応適中度 0％
偽陽性率 100%，偽陰性率 11%

者の減少率の間に有意差はなかった。PTCD 前後における CA-50 減少率と総ビリルビン減少率の相関を図3に示したが，r＝0.28 で有意の相関はなかった。PTCD 前後における CA19-9 減少率と総ビリルビン減少率の相関を図4に示したが，r＝0.39 で有意の相関はなかった。なお，PTCD 後に CA-50 の値が上昇したのは2例，CA19-9 が上昇したのは3例であった。

表 2　PTCD実施前のCA19－9の診断精度

		癌 あり	癌 なし	合 計
CA19－9	陽性	13	2	15
	陰性	2	0	2
合 計		15	2	17

感度 87%，特異度 0％
陽性反応適中度 87%，陰性反応適中度 0％
偽陽性率 100%，偽陰性率 13%

表 3　PTCD後(黄疸改善後)のCA50の診断精度

		癌 あり	癌 なし	合 計
CA 50	陽性	10	0	10
	陰性	8	2	10
合 計		18	2	20

感度 56%，特異度 100%
陽性反応適中度 100%，陰性反応適中度 20%
偽陽性率 0％，偽陰性率 44%

表 4　PTCD後(黄疸改善後)のCA19－9の診断精度

		癌 あり	癌 なし	合 計
CA19－9	陽性	11	2	13
	陰性	4	0	4
合 計		15	2	17

感度 73%，特異度 0％
陽性反応適中度 85%，陰性反応適中度 0％
偽陽性率 100%，偽陰性率 27%

PTCD 前の CA-50 と CA19-9 の診断精度をそれぞれ表1と表2に示した。両者の診断精度に差はみられなかった。PTCD 後（黄疸改善後）の CA-50 と CA19-9 の診断精度をそれぞれ表3と表4に示した。CA-50 は特異度100%，陽性反応適中度100%，陰性反応適中度20%であり，CA19-9（それぞれ0％，85%，0％）より優れていた。

Ⅲ．考　　察

石井ら[2]の報告によれば，CA-50 は特に膵臓癌と胆道系癌での陽性率が75%，68%と高く，一方では膵炎と良性胆道疾患での陽性率が13%，9％と低率である。市原ら[4]の報告でも膵癌では62.7%，

胆道癌では71.4%であり CA19-9 の陽性率に匹敵するものであった。一方，閉塞性黄疸患者で CA19-9 や CA-50 の高値例が多いのはよく知られているが，これは胆管上皮に広く分布するこれらの抗原が胆汁中に分泌されずに血中に流入するためと考えられている[4]。

我々の検討では黄疸改善時には CA-50 と CA19-9 の間には，諸家の報告[4][5]と同じく有意の相関がみられたが，PTCD 前の黄疸がみられる時には有意の相関はみられなかった。原疾患が癌の場合には PTCD 後の測定までの間に癌の進行により CA-50 と CA19-9 の値が上昇する可能性が大きいが，それを考慮して計算することは困難であるため考慮しないで計算すると，PTCD 前後における減少率は CA-50 と CA19-9 の間に有意差はなく，両者の減少率と総ビリルビン減少率との間にも相関はみられなかった。すなわち，今回の結果からは黄疸が CA-50 と CA19-9 の値に与える影響に差があるとはいえなかった。

CA-50 と CA19-9 の大きな違いは黄疸改善後に CA-50 では偽陽性の症例がなくなったことである。偽陽性について渡辺ら[3]は CA-50 は胆石症や膵炎での偽陽性率が低いと報告している。石井ら[2]の報告では，膵炎と良性胆道疾患での陽性率は CA-50 が13%，10%，CA19-9 が19%，25%であり，良性胆道疾患では有意に偽陽性率が低いと報告している。我々の検討では症例数が20例，良性疾患はそのうち2例と少なく，症例数が増えれば偽陽性率も多少増加すると思われる。

閉塞性黄疸症例では通常黄疸が改善してから腫瘍マーカーを測定するが，胆道系良性疾患における偽陽性率が低いことについては，CA19-9 よりも CA-50 の方が優れている。

文　　献

1) Lindholm, L., Holmgren, J., Svennerholm, P. et al.: Monoclonal antibodies against gastrointestinal tumour-associated antigens isolated as monosialogangliosides. Int. Archs. Allergy Appl. Immunol., 71: 178-181, 1983.
2) 石井勝，阿部令彦，大倉久直ほか: CA-50 EIA キットの基礎的検討ならびに臨床的有用性．癌と化学療法，14: 2548-2555, 1987.
3) 渡辺弘之，小谷博子，里村吉威ほか: 各種消化器癌における血清 CA-50 測定の臨床的意義．医学のあゆみ，141: 861-862, 1987.
4) 市原透，中尾昭公，鈴木祐一ほか: 膵癌における CA-50, CA19-9, DUPAN 2(I)．膵臓，2: 13-23, 1987.
5) 澤武紀雄，竹森康弘，里村吉威ほか: 血清診断に用いられるがん性糖鎖抗原の有用性．癌と化学療法，15: PART-II，1091-1101, 1988.

現代医療 Vol.26(増Ⅰ)：873，1994.

肝硬変における凝固能異常に対するメシル酸ガベキサートの効果

小野寺 博義，鵜飼 克明，中野 昇，鈴木 裕
大方 俊樹，本島 正，桑島 一郎，武田 鐵太郎
庄司 忠實
宮城県立がんセンター 内科

はじめに

肝硬変では凝固因子の肝における産生能の低下，脾腫による血小板数の減少などにより時として高度な凝固能異常を合併する[1,2]．このような患者に対して，抗トロンビン作用および抗プラスミン作用を有するメシル酸ガベキサート（FOY）が凝固能異常の是正に有効であるとの報告[3]もみられる．今回われわれは，肝硬変患者に対してFOYを1,200mg/日と2,400mg/日を投与し，投与量と凝固能改善との関係について検討したので報告する．

対象と方法

宮城県立がんセンター内科に入院した肝細胞癌合併肝硬変患者10例と肝硬変患者1例で，プロトロンビン時間が50%以下であった11例を対象とした．このうち6例に対してはメシル酸ガベキサート（FOY，小野薬品）を1日1,200mg，5例には2,400mgを中心静脈より2週間投与した．凝固能はFOY投与前日と，投与終了直後に検討した．

投与前後の有意差の検定には，paired t-testを用い，危険率が5%以下の場合を有意差ありとした．

結果

プロトロンビン時間は2,400mg/日投与群では投与前の43.5±6.9%から投与後に53.1±7.9%と有意に（$p<0.05$）上昇したが，1,200mg/日投与群では投与前後での有意差はなかった（図1）．

ヘパプラスチンテスト（図2），アンチトロンビンIII（図3）は投与前後で両群ともに有意差はなかった．

フィブリノーゲンは2,400mg/日投与群では投与前の102.8±25.9mg/dℓから投与後に142.4±38.4mg/dℓと有意に（$p<0.05$）上昇したが，1,200mg/日投与群では投与後で有意差はなかった（図4）．

FDP（図5）は投与前後で両群とも有意差はなかった．しかし，FDP･Dダイマーは1,200mg/日投与群においては投与前の371.0±456.3ng/mℓから投与後に513.0±458.4ng/mℓと有意に（$p<0.05$）上昇したが，2,400mg/日投与群では投与前後で有意差はなかった（図6）．

α_2プラスミンインヒビター（図7），血小板数（図8）は投与前後で両群ともに有意差はなかった．

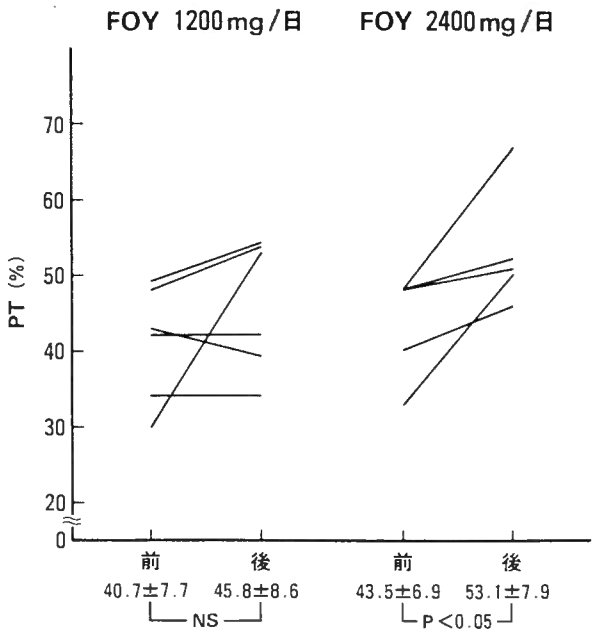


図 1. FOY 投与前後のプロトロンビン時間の変動

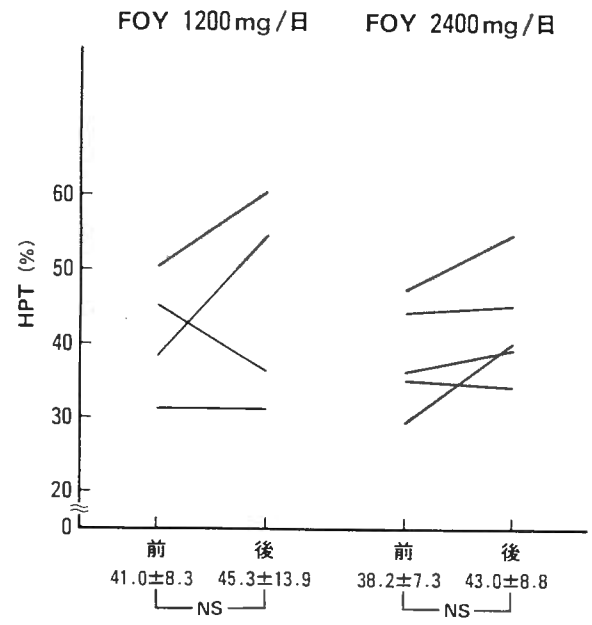


図 2. FOY 投与前後のヘパプラスチンテストの変動

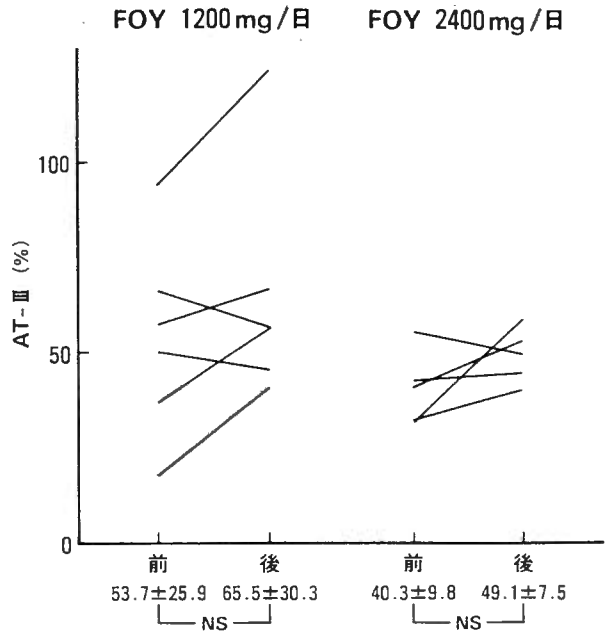


図 3. FOY 投与前後のアンチトロンビンIIIの変動

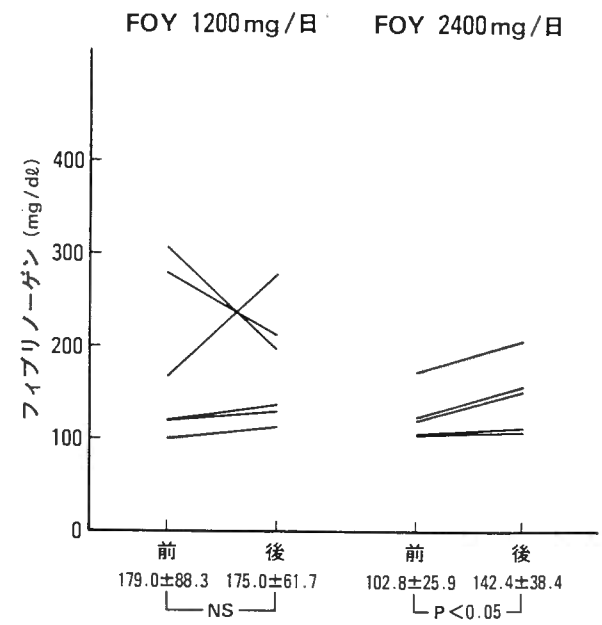


図 4. FOY 投与前後のフィブリノーゲンの変動

考　　察

肝硬変ではしばしば高度の凝固学的異常が出現[1,2]する．その成因としては肝機能低下による凝固因子の産生能低下，肝硬変そのものによる凝固と線溶の亢進などが考えられており，このような病態に対しては FOY などのプロテアーゼインヒビターの投与が有用である[2]．石崎ら[4]や金山ら[5]は肝硬変に伴う DIC に FOY が有効であったと報告している．福岡ら[3]は，肝硬変患者に FOY を投与することによりフィブリノーゲン寿命が著明に改善することから，FOY は肝硬変時の凝固能異常の是正に有効であると述べている．

また，FOY が抗凝固作用を発揮するには大量投

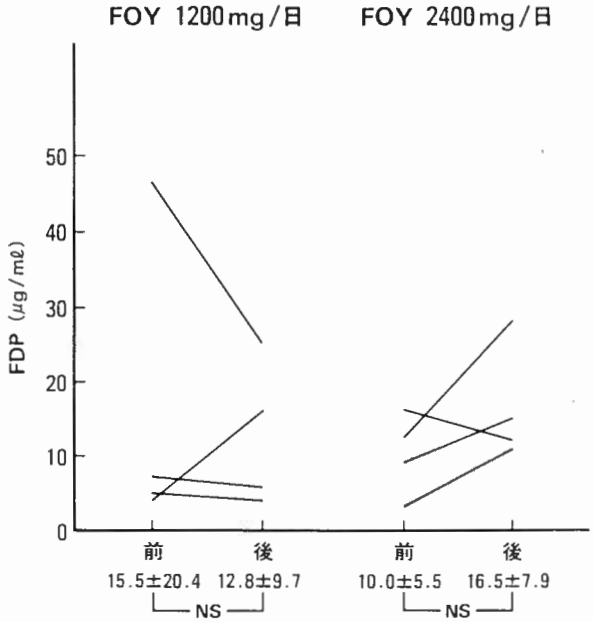


図 5. FOY 投与前後の FDP の変動

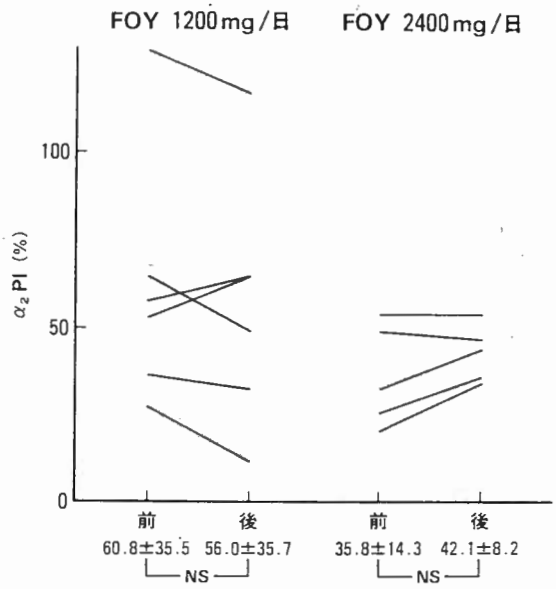


図 7. FOY 投与前後の α_2プラスミンインヒビターの変動

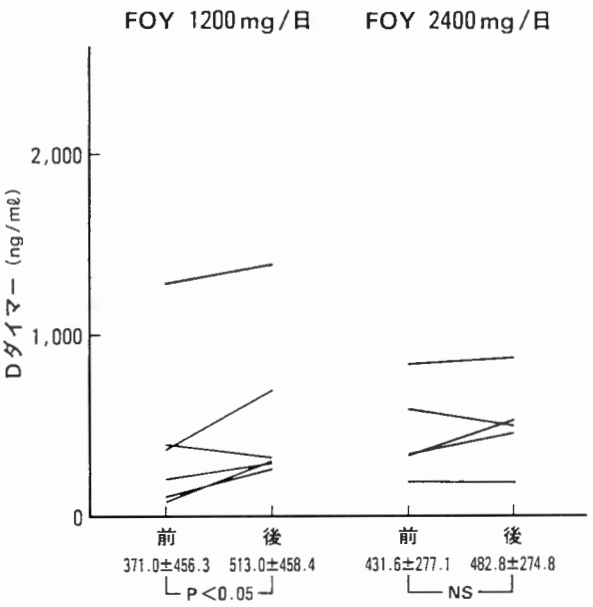


図 6. FOY 投与前後の FDP・D ダイマーの変動

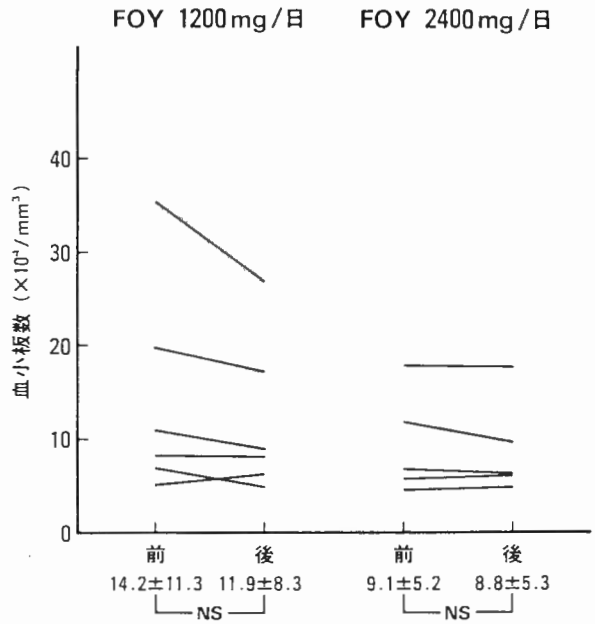


図 8. FOY 投与前後の血小板数の変動

与が必要である[6]とされ，1,000～2,000mg/日を5～10日間投与する必要があるとの報告[7,8]がある．福岡ら[3]は肝硬変患者に1,600～1,800mg/日を2週間，村上ら[9]はA型の重症急性肝炎に対して2,000mg/日を2週間投与することにより凝固能が改善されたと報告している．

われわれは1,200mg/日と2,400mg/日の2種類の投与量でFOYの効果を比較した．その結果，1,200mg/日投与群では凝固検査で有意の改善はみられず，むしろFDP・Dダイマーは投与後に有意に上昇していた．これに対して2,400mg/日投与群ではプロトロンビン時間，フィブリノーゲンにおいては全例で改善がみられ，統計学的にも有意であった．また有意差はなかったが，α_2プラスミ

ンインヒビターは1,200mg/日投与群では低下傾向にあるのに対し，2,400mg/日投与群では上昇傾向がみられた．血小板数も1,200mg/日投与群での低下が大きい傾向にあった．以上のように，今回のわれわれの検討の結果から肝硬変，肝細胞癌に合併した凝固能異常に対してはFOYの2,400mg/日のハイドースの投与が有効であると考えられた．

文　献

1) Tytgat, G., Collen, D., Vreker, R. *et al.* : Investigations on the fibrinolytic system in liver cirrhosis. Acta Hemat., **40** : 265-274, 1968.
2) 柏原紀文，佐藤俊一：“肝硬変：病態と対策”凝固線溶系．肝胆膵，**26**：249-255，1993.
3) 福岡賢一，松下文昭，鵜浦雅志 ほか：肝硬変における凝血学的異常に関する研究．肝臓，**27**：585-590，1986.
4) 石崎武志，沢村松彦，尾高和亮 ほか：著明な線溶能亢進を伴う血管内凝固症候群(DIC)を合併した肝硬変の一例．現代医療，**11**：531-536，1979.
5) 金山正明：DICに対するメシル酸ガベキサート(FOY)の治療効果．現代医療，**14**：1397-1401，1982.
6) 桜川信男，高橋　薫：メシル酸ガベキサート(FOY)の凝固線溶系阻害作用について．最新医学，**35**：2091-2099，1980.
7) 公文啓二，吉矢生人，島田康弘 ほか：DICに対するFOY療法．ICUとCCU，**3**：703-711，1979.
8) 千代孝夫，鹿浦陽祐，上村寛行 ほか：重症DIC症例に対するメシル酸ガベキサート(FOY)療法の臨床的検討．基礎と臨床，**15**：505-510，1981.
9) 村上昌彦，盛合　理，鈴木一幸 ほか：メシル酸ガベキサートが奏効した急性肝炎重症型の1例．現代医療，**23**(増VI)：3508-3512，1991.

衝撃波の生体に及ぼす影響：兎腎癌モデルによる検討

東北大学医学部泌尿器科

桑原正明・星　宣次・庵谷尚正・斉藤敏典・折笠精一

東北大流体科学研究所

高山和喜

Effects of Shock Waves on the Living Tissue: Studies in the Rabbit's Kidney-Tumor Model

Masa-aki KUWAHARA, Senji HOSHI, Naomasa IORITANI, Toshinori SAITO and Seiichi ORIKASA

Department of Urology, Tohoku University School of Medicine, Seiryo machi, Sendai 980, Japan

Kazuyoshi TAKAYAMA

Institute of Fluid Science, Tohoku University

Abstract

Recent experiments have shown that shock waves(SW) induce the cellular injury not only in normal living tissue, but also in cancer tissue. In cancer treatment, an inhibition of tumor infiltration to the surrounding tissue and of metastasis to the distant organ are critically important. The present experiments were performed for studying the effects of focused shock waves on the cancer tissue using a rabbit kidney-tumor model, with a special interest in its effects on the lung metastasis. Results suggested that SWs could induced cancer death without the lung metastasis, if SWs exactly hit. On the contrary, if SWs hit partly and incompletely, its might promote the lung metastasis, as long as using the present kidney-tumor experimental model.

1．はじめに

水中衝撃波(SW)が生体組織にフォーカシングされると程度の差こそあれ組織損傷が発生する．このことはSWを利用することで体外から生体内の特定部位の組織に損傷を与えることができることを意味する．こうしたことから私たちは固形癌の治療にSWを利用する研究を行ってきた[1-4]．ところで癌の治療では原発巣の治療に加えて癌の転移が問題になる．SWの癌組織への影響についてはこれまで多くの報告があるが、癌転移についての系統的な研究はなされていない．今回私たちはSWの移植腎癌に対する影響と共に、SW照射時の

癌転移について動物腎癌モデルをもちいて検討したので報告する.

2. 対象と方法

衝撃波発生装置: SWの発生にはpiezoceramic(膜型アプリケーター、焦点部最大圧力120 MPa,圧力半値領域2x2x20mm)をもちいた. アプリケータ内部には超音波画像診断用の超音波プローブ(3.75 MHz)が内蔵されており、SW照射対象部へのフォーカスの位置合わせはリアルタイム超音波イメージ下に行った. 実験模式図をFig.1に示す.

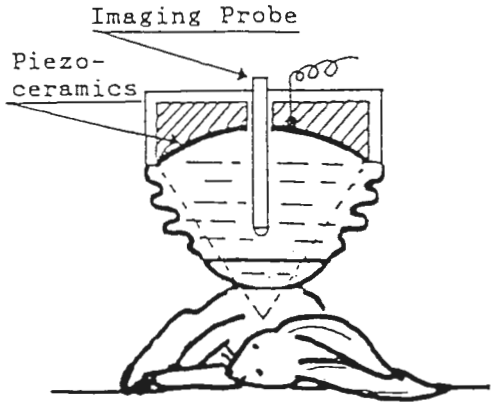


Figure 1. Expeimental setup. For SW generator, a piezoceramic SW generator with a water-bag applicator was used. Targeting an object to SW focus was performed by an ultrasound probe(3.75 MHz) inside the applicator. For exact targeting by ultrasound, a needle was placed below the tumor(1x1x2mm) which was inoculated into the kidney subcapsular space, because the tumor itself could not be detected by ultrasound. In SW application, the tumor was exposed to a total 2,000 shots, at 5 shots/sec, 120 MPa.

実験動物と腎腫瘍モデルの作製: 日本白兎大腿部に継代移植維持したVX2癌腫瘍から1x1x2 mm大の組織片を切り出し、これを日本白兎(雄、体重2.5-3.0kg, n=27)の左腎被膜下に移植した(腫瘍組織移植、TTI). この時、同時に超音波によるターゲットとするために手術用縫合針(長さ5mm、曲針)を腫瘍直下に埋め込んだ. これらの動物をSW非照射の対象群(C群,n=16)とSW照射の実験群(E群,n=11)に分けた. SWの照射は120 MPa, 5 shots/sec, total 2,000 shotsの1回照射とした. C群ではTTI腎を移植後2日(C1群, n=6),4日(C2群,n=5),7日(C3群,n=5)に摘出し、摘出腎の病理学的な検討を行った. E群では移植後2日に腎腫瘍部にSWを照射し、その直後にTTI腎を摘出(E1群,n=6)、あるいはSW照射後2日後(E2群、n=5)にTTI腎を摘出した. 両群ともTTI後21日に薬殺し、肺転移について肉眼的、組織学的に検討した(Table 1.).

TABLE 1. EXPERIMENTAL PROTOCOL

	Day 0	Day 2	Day 4	Day 7	Day 21
Control Group:					
Group 1 (n=6)	TTI	NX	-	-	Sacrificed
Group 2 (n=5)	TTI	-	NX	-	Sacrificed
Group 3 (n=5)	TTI	-	-	NX	Scrificed
Exprimental Group:					
Group 1 (n=6)	TTI	SW+NX	-	-	Sacrificed
Group 2 (n=5)	TTI	SW	NX	-	Sacrificed

TTI;tumor-tissue inoculation(a 2X1X1 mm of VX2 tumor-tissue was inoculated to the left renal subcapsular space.
NX;nephrectomy of the tumor-tissue inoculated kidney.
SW;exposure to shock waves.

3. 結果

腫瘍を移植した腎のSW照射実験時の超音波画像では腫瘍そのものは小さすぎて判別することはできなかったが、腫瘍下部に埋没した手術用縫合針は腎の横断像、縦断像とも良く描出され、摘出腎ではこの部をターゲテングすることで腫瘍への正確なSW照射が可能であることが判った. しかし腫瘍およびSWのfocusing regionが小さいため、腫瘍が照射される度合には多少のばらつきが認められた.

1) 衝撃波非照射群（対象群）における腎腫瘍と肺転移

コントロール群（C群1, 2, 3）の結果をまとめてTable 2に示す.

TABLE 2. CONTROL GROUP: KIDNEY TOMOR AND LUNG METASTASIS

Group	Animal	Kidney T. at Nx	Necrosis in Kidney Tumor	Lung Meta-stasis(day 21)
Group 1: (n=6) (Nx on day 2, sacrificed on day 21)	8577	+	-	-
	8580	+	++	-
	8581	+	++	-
	8621	+	-	-
	8622	+	-	-
	8624	+	-	-
Group 2 (n=5) (Nx on day 4, sacrificed on day 21)	8792	++	-	+
	8793	++	-	-
	8794	++	-	-
	8795	++	-	-
	8796	++	-	+
Group 3 (n=5) (Nx on day 7, sacrificed on day 21)	8953	+++	-	++
	8955	+++	-	++
	8956	+++	-	++
	8957	+++	-	++
	9014	+++	-	++

Nx;nephrectomy of the tumor-tissue inoculated kidney.

表に見るように移植腫瘍は2日、4日、7日と次第に増大した（表中、Kidney T. at Nx). 2日後の腫瘍部の組織像では腫瘍と正常腎組織との間には境界領域が認められた. 4日後ではNo.8792, 8796兎の腫瘍の一部に腎実質へ浸潤像が見られた. 7日後では全ての腎腫瘍に腎実質への浸潤像が認められ、No.8856, 8859兎の腫瘍内部には広範な出血壊死像が見られた. またC1群の2例には腫瘍内部に部分的な壊死巣が観察された. TTI後21日、薬殺時の肺を見ると、2日の腎摘群（C1群）では肺転移はなく、4日腎摘群（C2群）では2/5に、7日腎摘群（C3群）では7/7に肺転移が見られた. このことから、本実験モデルでは自然肺転移は2日以降に発生し、7日では全例に肺転移が成立することが明らかになった.

2) 衝撃波照射群（実験群）における腎腫瘍と肺転移

SW照射群（E群1, 2）の結果を次頁Table 3に示す.

TTI後2日にSW照射し、ただちにTTI腎を摘出したE1群では腫瘍部から腎実質に貫通する出血巣が認められ、周辺の腎実質にも出血巣が見られた. しかし

腫瘍内の壊死像は観察されなかった. No.8504, 8466兎では腫瘍部から腎実質への貫通性の出血が特に著明で、腫瘍組織は寸断され、顕微鏡的には腎実質内に腫瘍細胞が散布されている所見が認められた. TTI後21日、薬殺時の肺には4/6に肺転移が認められ、転移巣の数、大きさ共にNo.8504, 8466兎に著明であった. TTI後2日にSW照射し、その後2日後に腎摘したE2群では腎腫瘍内に壊死像が4/5に認められた. 特にNo.8922兎では腫瘍組織全体が壊死に陥っており、腫瘍は腎実質から剥離していた. TTI後21日、薬殺時の肺には2/5に肺転移が認められた.

TABLE 3. GROUPS EXPOSED TO SHOCK WAVES: KIDNEY TUMOR AND LUNG METASTASIS

Group	Animal	Kidney T. at Nx	Bleeding in T. and Kid.	Necrosis in K.T.	Lung Metastasis(day21)
Group 1 (n=6)	8502	+	+	-	+
(Nx on day 2,	8504	+	+++	-	+++
sacrificed	8374	+	+	-	-
on day 21)	8466	+	+++	-	+++
	8467	+	+	-	-
	8620	+	++	-	+
Group 2 (n=5)	8922	++	++	+++	-
(Nx on day 4,	8923	++	++	+	-
sacrrificed	8924	++	+++	-	-
on day 21)	8925	++	+++	+++	+
	8926	++	+++	++	+

Nx;nephrectomy of the tumor-tissue inoculated kidney.

4. 考察と結論

C1群では肺転移が見られなかったのに拘らず、E1群で4/6に肺転移が見られたことは、腎癌モデルではSW照射によって肺転移が促進される可能性が示唆された. E2群では2/5に肺転移が見られ、E1群と変わらなかった原因としは移植癌組織の状態の違いによると思われる. また、E2群の著明な腫瘍壊死像はSWの直接効果による細胞損傷の時間的な変化によると考えられる. 以上の結果からSWが腫瘍にまともに照射されれば腫瘍は壊死するものと思われ、壊死から逃れた一部の腫瘍細胞が損傷された血管系を介して転移するものと推察された. 私たちは動物膀胱癌モデルにおけるSW照射実験で、膀胱癌においては転移促進効果は見られなかったことを報告したが[3]、転移については各臓器の血管構築が関係しているものと思われた.

文献

1) Hezaber, J. et al: The effect of low energy shock waves on the implanted mouse mammary carcinoama cells. J.Urol., 139:303A, 1988.
2) Hoshi, S. et al: The effect of high energy underwater shock waves on the implantated urinary bladder cancer. J.Urol., 141:352A, 1989
3) Hoshi, S. et al: High energy underwater shock wave treatment on implanted urinay bladder cancer in rabbits. J.Urol., 146:439-443, 1991
4) Kuwahara, M. et al: Effect of focused shock waves on the kidney tumor: a new experimental model and its results. J.Urol., 147:227A, 1992.

衝撃波による結石破砕メカニズムに関する検討

(株)東芝研究開発センター　相田聡、藤本克彦、柴田真理子
(株)東芝中央病院外科　松本俊一
東北大学医学部泌尿器科　桑原正明
東北大学流体科学研究所　高山和喜

Experimental Studies on the Mechanisms of Stone Disintegration by Shock Waves

Satoshi AIDA, Katuhiko FUJIMOTO, Mariko SHIBATA, Syunichi MATUMOTO*
Masaaki KUWAHARA**, Kazuyoshi TAKAYAMA***

TOSHIBA R&D CENTER, KAWASAKI, JAPAN
* Dept. of Surgery, TOSHIBA Central Hospital
** Dept. of Urol., Tohoku Univ. School of Med., Sendai, Japan
*** Inst. of Fluid Science, Tohoku Univ., Sendai, Japan

Abstract

Extracorporeal shock wave lithotripsy has become widely accepted. However, the mechanisms of stone disintegration have not yet been clarified. Compression and tension generated at the boundary of different acoustic impedances, and high speed water flow localized at the shock wave focus are considered to be the main mechanisms. The dependence of stone disintegration on these factors according to the focal position and the type of stones was studied using human gallstones and model stones.

When the focus coincided with the front surface of a stone, fragmentation occurred at the front side with stone jumping. Compression and/or water flow seemed to play important roles. However, when the focus coincided with the back surface, the rear part of the stone mainly disintegrated (peeled off) without any movement. In this case, tension seemed to be the main factor. Gallstones having small acoustic impedances disintegrated well in the first situation. However, model stones, having a high acoustic impedance and hardness, showed better disintegration during the second situation.

1．はじめに

体外衝撃波による結石の破砕治療は保険も認められ、一般的に広く施行されるようになった。しかし、衝撃波で結石が破砕される機序（メカニズム）に関しては未だ理論が確立していない。我々は、嵌頓結石を模擬した実験から、従来から提唱されている「音響インピーダンス差による圧縮力及び後面反射による引っ張り力」[1)]や「キャビテーシ

ョン崩壊による二次衝撃波及びマイクロジェット」[2]とは異なる、「焦点部に限局した高速水流による水撃圧」の重要性を提案してきた[3)4)]。今回は、衝撃波の照射条件や結石の種類によるこれら要因の作用状況の違いを調べ、破砕機序を検討したので報告する。

2．実験装置・方法

衝撃波源は試作したピエゾタイプを用いた[3)]。これは24枚の大型ピエゾ素子を球面状に貼り合わせたもので、直径300 mm、曲率260 mmである。焦点は直径2 mm、長さ20 mmの紡錘形で、最大圧力は約100 MPa。また焦点とターゲットとの位置合わせは衝撃波源中央に取り付けられた超音波プローブにより得られる超音波断層像と、上記ピエゾ素子で送受信した反射超音波の強度及び伝搬時間により行った。

今回、破砕試料として、活性アルミナのモデル結石（直径6、12 mmの球）と、同一患者から摘出され、比較的サイズの揃ったヒト胆石を用いた。実測したそれぞれの音響・機械的な特性をTable 1 に示す。

Table 1　Acoustical and mechanical properties.

ヒト胆石（混合石）	モデル結石　（活性アルミナ製）
音速：1.88×10^5 cm/sec 密度：1.03 g/cm^3　（水浸状態） 音響インピーダンス： 1.95×10^5 g/cm^2/sec 平均ビッカース硬度： HV 4.73 主成分：コレステロール	音速：2.39×10^5 cm/sec 密度：1.83 g/cm^3　（水浸状態） 音響インピーダンス： 4.37×10^5 g/cm^2/sec 平均ビッカース硬度： HV 74.2 圧縮破壊強度：　≃1000 kg/cm^2

今回はFig.1に示す実験装置を用い、焦点の設定位置を結石表面から内部20 mmまで変化させて破砕状況を観察した。また、結石の破片が2 mm以下になるまでの照射数を計測した。

3．結果

焦点位置による結石の破砕状況の違いをFig.2に示す。焦点を衝撃波源から見て結石表面に合わせた場合、照射に同期して結石が跳ね上がり、しかも表面からキリで突いたように破砕されていった。しかし、焦点を結石表面から20 mm奥に設定した場合は、衝撃波照射に同期した結石の動きは見られず、主に後方が剥離する

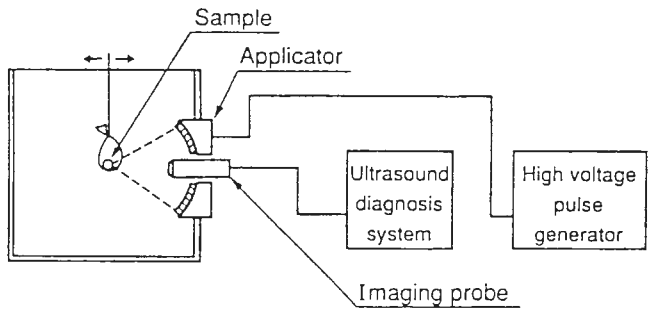


Fig.1 Schematic diagram of experimental apparatus.

様に破砕される状況が観察された。この傾向はヒト胆石でも同様であったが、焦点を奥にいれた場合でも、後面剥離は小量で、手前からの破砕が主であった。

次にモデル結石及び胆石の焦点位置と破砕力の関係をFig.3に示す。モデル結石では表面から深さ20mmまで大きな変化は無く、焦点位置が結石の後面にほぼ一致する-10 mmで破砕力が最大になった。これに対し胆石では、焦点位置が結石表面近傍で最大の破砕力を示し、奥に入るに従い破砕力は著しく低下し、照射数が増加した。特に-10 mmより奥では、硬度に勝るモデル結石より多くの照射数を必要とした。

4．考察

Fig.2に示した破砕状況から、焦点と結石の相対位置により破砕の主因が異なる事が示唆された。焦点を結石表面に一致させた場合は、結石に運動エネルギを与える「水撃圧」及び「圧縮力」が、焦点を奥にいれた場合は剥離破砕する「引っ張り力」が大きく作用していると推測される。さらに、焦点を奥に入れた場合、モデル結石では後面の剥離により破砕が良好に進行するのに対し、胆石では前面からの破壊が主であり破砕力が著しく低下する事から、結石側の特性の違いも大きく影響していると考えられる。

この原因を考察するため、結石内に発生している応力分布を、実測した音響インピーダンスを基に概算した(Fig.4)。ここで、結石入射時の屈折及び結石内の吸収などに

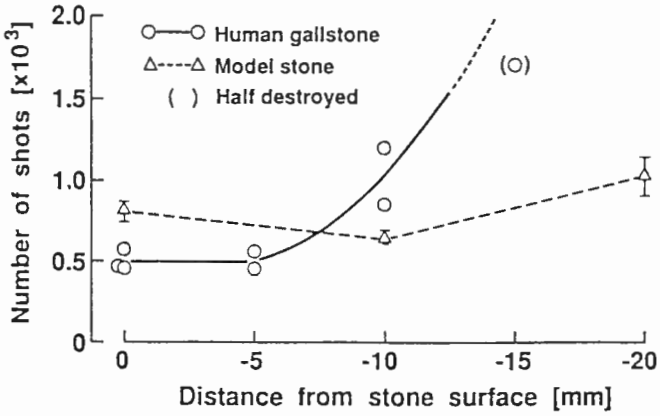


Fig.3 Number of shots required for stone disintegration.

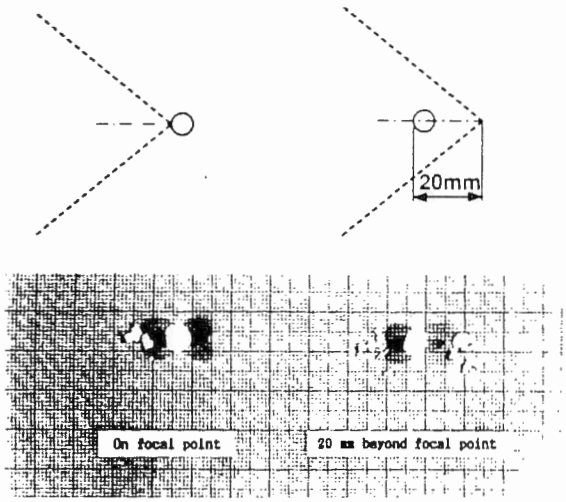


Fig.2 Fragmentation after 15 shock waves exposure depends on stone position. (Peak pressure ≃ 100 MPa)

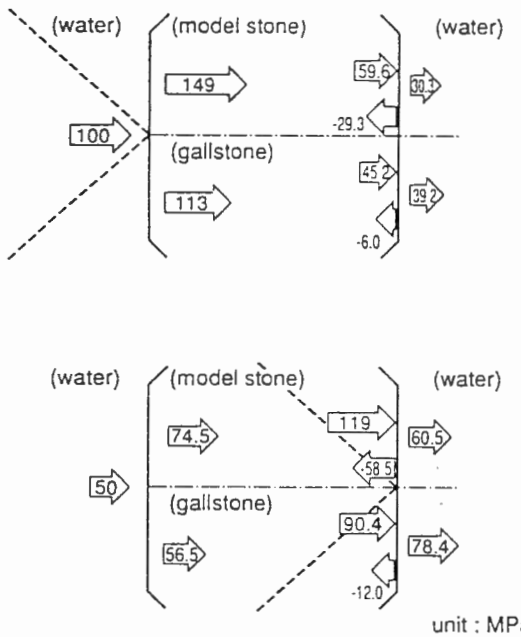


Fig.4 Reflection of shock wave in stone. (attenuation in stone : 0.8)

よる減衰分をモデル結石・胆石とも20%と仮定した。また水撃圧としての計算は行っていない。

モデル結石では音響インピーダンスが大きいため、前面の圧縮力・後面の引っ張り力とも胆石に比べ大きくなる事が判る。機械的に脆い材質であるモデル結石では引っ張り力が効果的に作用すると考えられ、焦点位置が後面に一致する点で破砕力が最大になると思われる。しかし、胆石では、後面での引っ張り力がモデル結石に比べ1/5程度と極めて小さくなる。また硬度的にも低いため、結石前面での水撃作用や圧縮力が効果的に働き、結石表面に焦点を一致させた場合が破砕力最大となると考えられる。

5. おわりに

同一の衝撃波源を用いても、焦点と結石との相対位置で破砕の状況すなわち破砕の主因が異なり、しかも結石の特性にも大きく依存する事が確認された。従って治療対象に合わせて最適な照射法を選べば治療効率を向上できる可能性がある。

今後、生体損傷の機序の解明を並行して進め、衝撃波条件の最適化を検討していく。

［参考文献］

1）Chaussy, C.(1982) Extracoporeal Shock Wave Lithotripsy - New Aspects in the Treatment of Kidney Stone Disease. Basel:Karger:8-

2）Coleman, A.J. et al. (1986) Acoustic Cavitation Generated by an Extracorporeal Shock Wave Lithotripter. Ultra. Med. Biol. 13:69-76

3）相田ら(1990) 嵌頓結石の破砕性に関する実験的検討. 平成2年度衝撃波シンポジウム講演論文集:91-94

4）Aida, S. et al.(submitted) Experimental Studies on the Destructibility of Impacted Stones. Proc. 18th Inter. Symp. Shock Waves

家兎膀胱癌に対する衝撃波と抗癌剤の併用療法

東北大医．泌　　＊星　宣次
折笠精一
鈴木謙一
桑原正明
東北大学流体研究所＊＊＊　高山和喜
東芝総研　　＊＊＊＊相田　聡

COMBINATION THERAPY OF SHOCK WAVES AND CHEMOTHERAPY FOR RABBIT'S BLADDER CANCER

Senji HOSHI＊, Seiichi ORIKASA＊, Ken-ichi SUZUKI＊, Masa-aki KUWAHARA＊, Kazuyoshi TAKAYAMA＊＊and Satoshi AIDA＊＊＊

Department of Urology＊, Tohoku University School of Medicine, 1-1 Seiryo-Machi, Aobaku, Sendai, 980, Japan

＊＊Institute of Fluid Science, Tohoku University, Sendai 980, Japan.

＊＊＊Institute of Research and Development Center, Toshiba Corp., Kawasaki 210, Japan

Abstract

We have examined the effects of a combination therapy of SW and chemotherapy.

Experimental animals were classified according to the treatment they recieved into the following 6 groups(n=43), chemotherapy followed by SW, chemotherapy-SW simultaneously, SW followed by chemotherapy, chemotherapy alone, SW alone and control without any treatment. The bladder tumors were pT0 in 2 cases treated by SW alone and in one case treated by SW followed by chemotherapy for 3 weeks, in 2 of cases treated by chemotherapy alone for 4 weeks and in 2 of cases treated by simultaneous treatment of SW and chemotherapy for 5-9 weeks. Lymphnode and lung metastases were observed 1 and 0 cases respectively of the 24 cases with combined therapy and 2 and 7 of 11 controls without any therapy, suggesting SW did not promote lung metastasis in this bladder tumor model.

1．はじめに

体内の結石破砕に利用されている水中衝撃波は、エネルギーを体外から目標物に集中することができ、焦点部の組織は障害されるが周囲の組織には障害をおこさない。この性質を利用した癌治療を目的に、これまで私たちは兎の膀胱癌に高エネルギー水中衝撃波(SW)による治療を試み以下の結果を得てきた。兎VX2 膀胱癌に対して SW 1回のみ2000発の照射で限局的な腫瘍壊死を認め2000～6000発の2 ～3 日間にわたる連続照射では著明な腫瘍の壊死像を認めた。腫瘍壊死の主な原因は腫瘍血管の破綻による循環障害である事が組織学的に証明された。また、8 ～10日のSWの連続照射では、腫瘍増殖抑制効果を認めた。SWとTHP-Adriamycin(THP) の併用では、それぞれの単独療法に比べ腫瘍壊死に関し相乗効果が認められた[3] 。そこで今回は、SWと種々の抗癌剤の併用療法の詳細ついて検討した。

2．対象及び方法

2.5 ～2.7Kg の雄日本白色家兎をペントバルビタール25mg/kg の静注にて麻酔した。兎の膀胱を露出し、前壁側より膀胱を切開し生理食塩水に溶解した5 $\times 10^6$ ～1 $\times 10^7$ 個のＶＸ２癌細胞浮遊液を両側尿管口を結ぶ線よりやや後側の膀胱粘膜下に移植し、臨床例に類似した膀胱癌を作製した。細胞を移植後約10日目に兎を麻酔し、経尿道的に4Fのfeedig tube を膀胱に挿入し、膀胱を空虚にしたのち20～30m l の生理食塩水にて膀胱を充満し膀胱腫瘍の存在を超音波で確認した。腫瘍の大きさはその最大断面積を計測し記載した。今回の実験開始時の腫瘍の大きさのは、平均値は85mm² であった。

衝撃波の発生装置として、24枚の大型扇形ピエゾ素子を半球面に張り付けたgeneratorを用いた。その直径は300mm で、中心から焦点までの距離は120mm である。なお中心部には、超音波診断装置(SSA-90A) 用の3.75MHz のセクター型超音波プローブが取り付けてある。膀胱癌に最大圧力100MPaで5shot/sec で10,000発のSWを照射した。

抗癌剤はTHP-Adriamycin(THP) 1mg/kg, methotrexate(MTX) 2mg/kg carboplatin(CBDCA)10mg/ke, THP 1mg/kg+CBDCA 10mg/kgを用いた。

SWと化学療法の治療スケジュールをTable 1 に示したが、治療は癌細胞移植後約10日目より1 回、計1 ～9 回行った。治療終了後１週間目に兎を屠殺し、摘出膀胱腫瘍を5mm 間隔のstep sectionにて検討した。さらに解剖時リンパ節、肝、肺転移の有無を検索した。無治療群の4 羽は18, 23, 33, 38日目にそれぞれ屠殺し、他の8 羽は移植後40日以内に死亡した。

Fig. 1 Protocol of SW and chemotherapy

Che. followed by SW(n=4)		Che.-SW simultaneously(n=11)	
	CASES		
THP	1	MTX	1
MTX	1	CBDCA	2
CBDCA	1	THP+CBDCA	8
THP+CBDCA	1		
SW followed by Che.(n=4)		Che. alone(n=8)	
THP	1	CBDCA	1
MTX	1	THP+ACBDCA	7
CBDCA	1		
THP+CBDCA	1		
SW alone(n=5)		No treat.(n=11)	

3．結果

SW単独群2 羽、SWを先行させCBDCA+THP を静注した群で3 回治療を行った1 羽、CBDCA+THP 静注のみを4 週行った2 羽、さらにSWとCBDCA+THP を5 回以上同時に行った2 羽でpT0 （癌細胞の完全消失）が得られた（table 2)。

Table 2 Evaluation of treatment(pTo by step sectioned bladder tumor specimen)

Treat. No of treat.	che.→SW (n=4)	SW+che. (n=11)	SW→che. (n=4)	che. alone (n=8)	SW alone (n=5)	no treat. (n=11)
1回	0/3	0/3	0/2	0/2	0/1	0/1
2	0/1	0/3	0/1	0/1	0/2	0/1
3		0/1	1/1	0/3	1/1	0/1
4				2/2	1/1	0/8
≧5		2/4				

治療効果を組織学的に検討すると、SWが照射されている部分は著明な出血壊死に陥っており、壊死に陥らなかった部分には出血が見られず SW が照射されていなかった事が伺われた。

転移に関する検討では、SWと化療の併用群と化療単独群には転移は見られなかったがSWのみの群5 羽では1 羽にリンパ節転移を認めたが肺転移は認めなかった。一方無治療群11羽ではリンパ節転移を2 羽に、肺転移7 羽にそれぞれ認めた（table 3)。

Table 3 Evaluation of metastasis

	Lymph node meta.	Lung meta.
sw+chemo.	0／19	0／19
SW alone	1／5	0／5
chemo. alone	0／8	0／8
no. treatment	2／11	7／11

合併症として、SW照射後に皮下血腫、血尿を認めたが、血尿は1 日以内に消失した。

4．まとめ

今回は腫瘍細胞移植後10日目より治療を開始したもので，治療開始時の腫瘍の大きさは

平均85mm² であり、前回のSWとTHP の併用の実験では移植後5 日目より治療開始したものであり、治療開始時の腫瘍の大きさの平均44mm² であった[3] 。腫瘍が大きくなればSWの治療効果も劣り、頻回多数のSWの照射が必要と考えられた。また治療効果の悪い例はSWが腫瘍にまんべんなく照射されていない事が伺われ、腫瘍に均等にSWを照射されるように、兎を乗せた台を自動的に回転させる台を東芝と共同で作製し実験中である。また、超音波のみでの標準には限界があることが考えられ、小児用膀胱鏡にて直接膀胱腫瘍を観察しながらSWの照射の実験を行っており、その結果についても報告する。 今回の結果でも、SWの照射は肺は転移を誘発しない可能性が強い。ＳW照射と所属リンパ節転移の有無については今後も症例を重ねて検討したい。

今後さらにSWと抗癌剤の最適な照射、投与スケジュール、さらにＳW照射と種々の抗癌剤の組み合わせによる治療効果を検討し、さらに他の腫瘍モデルについても検討をかさね、ＳWによる癌治療の臨床応用の可能性を追求する必要がある。

References

1)Hoshi, S., Orikasa, S., Kuwahara, M., Yoshikawa, K., Ohyama, C., Satoh, M., Kawamura, S. and Nose, M. The effect of high-energy underwater shock waves on implanted urinary bladder cancer in rabbits. Jpn. J. Cancer Res., 81, 317-319(1990).

2)Hoshi, S., Orikasa, S., Kuwahara, M., Suzuki, K., Yoshikawa, K., Saitoh, S., Ohyama, C., Satoh, M., Kawamura, S., Nose, M. High enerагy underwater shock wave treatment on implanted urinary bladder cancer in rabbits. J. Urol., 146, 439-443(1991).

3) Hoshi, S., Orikasa, S., Kuwahara, M., Suzuki, K., Shirai, S., Yoshikawa, K. and Nose, M. Shock wave and THP-adriamycin for treatment of rabbit's bladder cancer. Jap. J. Cancer Res. 82, 248-250(1992)

マウス膀胱癌(MBT-2)皮下移植腫瘍に対する高エネルギー水中衝撃波の効果

東北大医.泌尿器科　鈴木謙一
星　宣次
折笠精一
桑原正明
東北大学流体科学研究所　高山和喜
東芝総研　相田　聡

THE EFFECT OF HIGH ENERGY UNDERWATER SHOCK WAVE ON IMPLANTED SUBCUTANEOUS CARCINOMA (MBT-2) IN MICE

Ken-ichi SUZUKI[1)], Senji HOSHI, Seiichi ORIKASA, Masaaki KUWAHARA, Kazuyoshi TAKAYAMA[2)] and Satoshi AIDA[3)]

1) Department of Urology, Tohoku University School of Medicine, 1-1 Seiryo-Machi, Aobaku, Sendai 980, Japan

2) Institute of Fluid Science, Tohoku University, 2-1-1 Katahira, Aobaku, Sendai 980, Japan

3) Institute of Research and Development Center, Toshiba Corp., Kawasaki 210, Japan

Abstract

High energy underwater shock wave (SW) has been reported to kill tumor cells in suspension and to delay the growth of solid tumors exposed in vivo.

We previously reported that SW exposure on VX2 cancer implanted in the rabbit bladder induced tumor necrosis and decreased the tumor growth. SW induces vascular damage in the tumor, which may be the primary cause promoting the tumor necrosis. In the present experiments we have examined the effects of SW on the implanted subcutaneous carcinoma in mice, using a murine poorly differentiated transitional cell carcinoma line MBT-2. The subcutaneous tumor

implanted in the back of the mouse was exposed 2000-7000 shots of focused shock wave under ultrasound guidance. The SW exposed tumor had bleeding points not only on the tumor surface but also in the deep layer just after SW exposure, and the convex tumor was changed to concave tumor 2-3 days later.

1. はじめに

水中衝撃波は現在、尿路結石に対し治療の中心的存在となりつつあり、手術を必要としないその治療は多くの患者に福音を与えてきた。また高エネルギー水中衝撃波(SW)が腫瘍に壊死を生じさせ、増殖を抑制するとゆう報告もみられてきた。SWが癌治療に有効で臨床応用が可能なら、さらに多大な福音を医療にもたらすことになる。我々はこれまで家兎VX2膀胱癌にSWによる治療を試み以下の結果を得てきた。家兎VX2膀胱癌に対して、SWは1回のみ2000発の照射では限局的な腫瘍の壊死のみが認められたが、SWの2000～6000発の2～3日間にわたる連続照射では著明な腫瘍の壊死を認めた。SWを照射した腫瘍は腫瘍血管壁が破綻し、腫瘍壊死の主な原因は循環障害であることが推測された。また8～10日間の連続照射では腫瘍増殖抑制効果を認めた[1)~3)]。さらにSW照射により肺転移は促進されず、またSWとTHP-Adriamycin(THP)の併用で腫瘍壊死に関し相乗効果が認められ[3)]、著明な延命効果を認めた。

今回はマウスの未分化膀胱癌であるMBT-2の皮下移植腫瘍に対してSW照射を行い検討を加えたので報告する。

2.対象

1) 動物と腫瘍

使用したマウスはC3H/Heの雄または雌で、体重24g前後のものを用いた。使用した腫瘍は、マウスの皮下に継代移植しているFANFT(N-4-5-Nitro-2-Furyl-Thiazolyl Formamide)で、化学発癌させた未分化膀胱癌(MBT-2)[4)]を用いた。

2)皮下移植腫瘍の作製

皮下担癌C3H/Heマウスをエーテルにて全身麻酔し、アルコールにて十分消毒した後に腫瘍を摘出した。腫瘍中心部の壊死組織を取り除いた後にシャーレ内にて細片とし、細胞培養液RPMI(東北大学医学部組織培養室にて調製)に溶解した。RPMIにて3.5×10^6 cells/ml

に調製しC3H/Heマウスの背部皮下やや尾側よりに0.2 ml(7×10^5 cells)を注入した。腫瘍は約10日目には約5×4×3 mm前後の皮下腫瘍として認められるようになった。

3.方法

1)衝撃波発生装置

衝撃波の発生源にはpiezo-ceramicsを用いた。この装置には直径33cmの半球面に扇型凹面状の24枚のpiezo-ceramicsが緻密に貼られ、中心部には超音波診断装置(SSA-90A)用の3.75MHzのセクタ型超音波プローブが取り付けてある。中心部から焦点までの距離は120mmで、このpiezo-ceramicsに高電圧駆動回路から高電圧pulse波が印加されることにより衝撃波が発生する。発生した衝撃波は、アプリケーター内の脱気水、半球状のアプリケーター膜、生体と伝播し、照準部に収束する。焦点部における最大圧力1MPaで、5 shots/secにて照射した。

2)衝撃波の照射

腫瘍移植10日目以降で腫瘍径約約5×4×3 mm前後となったマウスを用いた。エーテルによる全身麻酔の後に皮下腫瘍周囲の毛を鋏と脱毛剤にて取り除き、板の上に腹臥位に固定した。ラップを腫瘍径と同じに切取り穴を開け、背部から当て押さえつけるようにして皮下腫瘍がラップの穴から突出するようにした。

超音波ガイド下に2000～7000 shots照射した。衝撃波の照射は、位置をずらし腫瘍に満遍無く当たるようにした。

4.結果と考察

SW 2000～5000発照射した直後に屠殺した腫瘍では、腫瘍の表層部のみならず、深層部にも出血を認めた。また、SW照射2～3日後には隆起性腫瘍に陥凹が認められ、中には陥凹部にfistulaを形成するものがみられた。なお組織学的効果については、現在検討中である。

Leeら[5]はマウス後肢皮下のMBT-2腫瘍に対し、Dornier lithotriptor (18kV, 100 shots/min)にて500～1500発照射し約2週間後に腫瘍重量をコントロールと比較することにより、衝撃波単独では腫瘍増殖を抑制する効果はなかったが、衝撃波とCisplatin (CDDP)

の併用は、CDDP単独よりも強い腫瘍増殖抑制効果を示したことを報告している。今回の我々の検討では、Leeらの実験とは条件が違うものの衝撃波単独で腫瘍内に出血を認め、また腫瘍に陥凹とfistulaを形成した。これは腫瘍壊死による二次的な変化と考えられ治療効果が推測され現在組織学的に検討中である。Gamarraら[6]はDornier社製の水中放電方式衝撃波を用いてハムスター背部に移植したメラノーマ腫瘍を1日頻回照射し、衝撃波単独にて腫瘍を根治し、また転移を誘発しなかったことを報告している。今後我々の実験においても頻回照射による検討、および抗癌剤との併用による検討を加えていく予定である。

文献

1) Hoshi, S., Orikasa, S., Kuwahara, M., Yoshikawa, K., Ohyama, C., Satoh, M., Kawamura, S., and Nose, M. The effect of high-energy underwater shock waves on implanted urinary bladder cancer in rabbits. Jpn. J. Cancer Res., 81, 317-319 (1990).

2) Hoshi, S., Orikasa, S., Kuwahara, M., Suzuki, K., Yoshikawa, K.,Saitoh, S., Ohyama, C., Satoh, M., Kawamura, S., and Nose,M. High energy underwater shock wave treatment on implanted urinary bladder cancer in rabbits. J. Urol., 146, 439-443 (1991).

3) Hoshi, S., Orikasa, S., Kuwahara, M., Suzuki, K.,Shirai, S., Yoshikawa, K. and Nose,M. Shock wave and THP-adriamycin for treatment of rabbit's bladder cancer. Jpn. J. Cancer Res., 82, 248-250 (1992).

4) Pan, J. S., Slocum, H. K., Rustum, T. M., Greco, W. R., Gaeta, J. F. and Huben, R. P. Inhibition of implantation of murine bladder tumor by thiotepa in cauterized bladder. J. Urol., 142, 1589-1593, 1989.

5) Lee, K., O'Donnell, R. W., Smith, P., and Cockett, A. T. K. High energy shock waves (HESW) enhance antitumor activity of cisplatin (DDP) in murine bladder cancer, MBT-2. J. Urol., 139, 326A, 1988.

6) Gamarra, F., Spelsberg, F., Dellian, M. and Goetz, A. E. Complete local tumor remission after therapy with extracorporeally applied high energy shock waves (HESW). Int. J. Cancer. in press.

ＶＸ２癌超微細構造への衝撃波の影響

東北大学　医学部　泌尿器科学教室

斎藤敏典、折笠精一、星宣次、桑原正明、鈴木謙一、庵谷尚正、田口勝行、白井修一

Ultrastructual Consequence of Shock Wave Exposure on VX2 Cancer

Toshinori SAITOH, Seiichi ORIKASA, Senji HOSHI, Masa-aki KUWAHARA,
Kenichi SUZUKI, Nomasa IORITANI, Katsuyuki TAGUCHI, and Shuuichi SHIRAI

Department of Urology,
Tohoku University School of Medicine
Seiryoumachi 1-1, AOBA-KU, Sendai 980, Japan

Abstract

This report clarified the ultrastructual consequence of the VX2 cancer cell after underwater shock wave exposure. The shock waves which we used were generated by the piezo-ceramics in the over head type applicator. After the VX2 cancer had been transplanted into a rabbit urinary bladder, the tumor was exposed to the shock waves(1000 shots, 100 MPa, 5 /sec.), according to the real time ultrasonic images. The changes in the cancer cell after the exposure were examined with a transmitted electron microscope and the isolated VX2 cancer cell with a deformed nucleus and destroyed organelles was observed. We thought, therefore, that underwater shock wave exposure had anti-cancer effect.

1.はじめに

当教室では従来より、生体に対する水中衝撃波の基礎的な研究を行なってきた。また、これまでの衝撃波シンポジウムにおいて、当教室の星らはＶＸ２移植膀胱癌への

衝撃波照射による抗腫瘍効果を報告してきた。この中で、衝撃波照射により腫瘍細胞が壊死に陥れられることを光学顕微鏡により観察で指摘してきた。今回我々は、透過型電子顕微鏡を用いてＶＸ２移植膀胱癌細胞における衝撃波照射による変化を観察したので報告する。

2.実験装置

衝撃波の発生源にはピエゾ素子を用いた。24枚のピエゾ素子を直径30cmの半球面に扇型凹面状に緻密に貼り、その中央部には超音波診断装置の探触子を設置した。高電圧駆動回路から高電圧パルス波をピエゾ素子に印加し、衝撃波を発生させた。実験で用いた衝撃波の最高圧力は約100MPaであった。さらに衝撃波発生装置の焦点方向前方には半球状の膜型アプリケーターが取り付けてあり、その内部には脱気水を満たしておいた。すなわち、ピエゾ素子より発生した衝撃波は、アプリケーター内の脱気水、アプリケーター膜、生体へと伝播し、焦点に収束することになる。

3.実験方法

実験には約3 Kgの日本家兎を用た。ペントバルビタール静脈麻酔下に膀胱を切開し、膀胱後壁に生理食塩水に溶解したＶＸ２癌細胞浮遊液を約 $1x10^7$個移植した。12日後、超音波断層装置により移植膀胱癌が生育していることを確認した後、衝撃波を照射した。この際、膀胱内に栄養チューブを経尿道的に挿入し、生理食塩水を約20ml膀胱内に注入し衝撃波を照射している。照射条件は約 100 MPa, 5 shots/sec.とし、1000回衝撃波を照射した。照射後直ちに膀胱を摘出し、腫瘍を2.5%グルタールアルデヒド（緩衝液：カコジル酸ナトリウム）内にて、約1 mm^3に細切、浸透固定した。オスミウム酸にて再固定後、段階アルコール系にて脱水、エポンに包埋した。50nmの超薄切片を作製し、ウラン鉛染色を行い、日本電子 JEM 100Cにて観察した。さらにコントロールとして衝撃波照射を行なわないＶＸ２移植膀胱癌担癌家兎を作製し、同様の方法で固定観察した。

4.結果

肉眼的には移植膀胱腫瘍は隆起してみられ、衝撃波照射後の腫瘍表面には点状の小さな出血が観察された。この部を標本とし、その超微細構造を観察した。腫瘍細胞の

間質には、出血と浮腫が認められ、細胞間隙は開大していた。腫瘍の組織構築は破壊されており、ＶＸ２細胞は１つ１つの細胞毎に遊離して観察された。細胞内では細胞膜と細胞小器官の著明な破壊が認められ、その細胞質内には多数の空胞を伴っていた。一部の空胞は均一な高い電子透過性の内容液を含んでおり、これは液体のようであった。障害の著しい細胞では核を含めて破壊されており、細胞変性に陥っていた。

5.考察

衝撃波照射後のＶＸ２移植膀胱癌では、組織間質の浮腫と遊離した腫瘍細胞の散在が観察された。これは細胞間接合の破綻を示している。1991年の本シンポジウムにおいて我々は、衝撃波照射後の腎尿細管細胞の変化について報告した。そこで衝撃波照射により、隣接する細胞同士の細胞間隙の開大と細胞の遊離がおこり、遊離した尿細管細胞が基底膜より離れ尿細管腔に脱落していくことを述べた。今回のＶＸ２移植膀胱癌においても、細胞間隙の開大と細胞の遊離が観察され、衝撃波照射は上皮細胞の細胞間接合に著しい影響を与えているものと考えられた。田中らはラットにN-butyl-N nitrosamine を飲料水として与えた膀胱癌担癌ラットを作製し、これにＢＣＧの膀胱内注入を行い、その超微細構造上の変化を報告している。いわゆる上皮細胞における細胞間接合は tight junction, desmosome, gap junctionの３つから構成されているが、このうちＢＣＧ注入後膀胱癌細胞では desmosomeの減少あるいは不明瞭化がみられ、細胞間隙の開大と遊離した腫瘍細胞が観察されたと報告している。ＢＣＧの膀胱内注入による抗腫瘍効果は広く知られているところである。衝撃波照射後のＶＸ２細胞でも、ＢＣＧ注入後の膀胱癌細胞と同様に、遊離した腫瘍細胞が認められたことは、衝撃波照射による抗腫瘍効果を示唆する重要な所見と思われた。当然、遊離した細胞では細胞同士の情報や物質の伝達は破綻しており、このために腫瘍細胞が変性に陥いることも類推された。

衝撃波照射により、均一な電子透過性の高い空胞が細胞内に形成されていた。この空胞は水解小体等の細胞内小器官が破壊され、酵素等が細胞質内に流出したことによるものと考えられた。これらの空胞も衝撃波照射後の腎尿細管細胞においても確認されており、ＶＸ２細胞でも衝撃波照射が細胞小器官に影響を与えているとものと思われた。

以上のことより、透過型電子顕微鏡による観察でも、衝撃波照射がＶＸ２移植膀胱

癌の細胞間接合の破壊と細胞変性を惹起することが示唆された。しかし、衝撃波照射が細胞間接合の破壊による細胞変性と、細胞小器官の破壊による変性のいずれを先に発生させているかについては、さらに詳細な検討が必要であると考えられた。

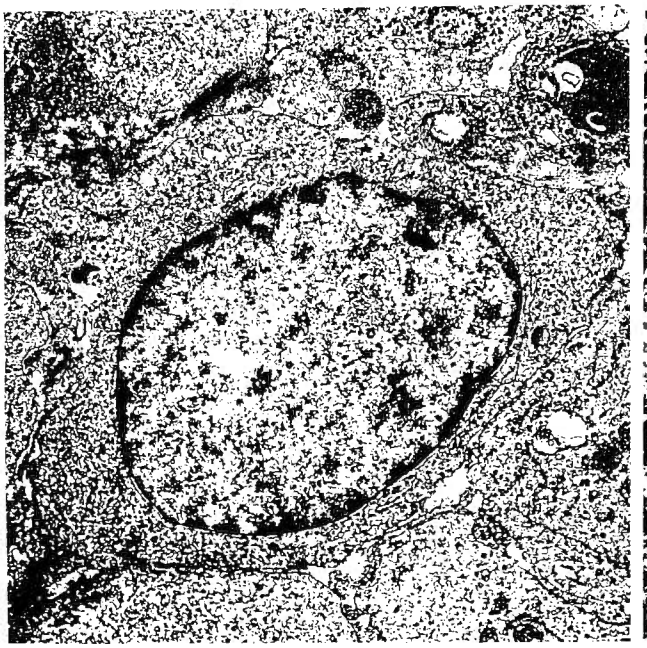


Fig. 1.
The VX2 cancer cell without the exposure(X6600).

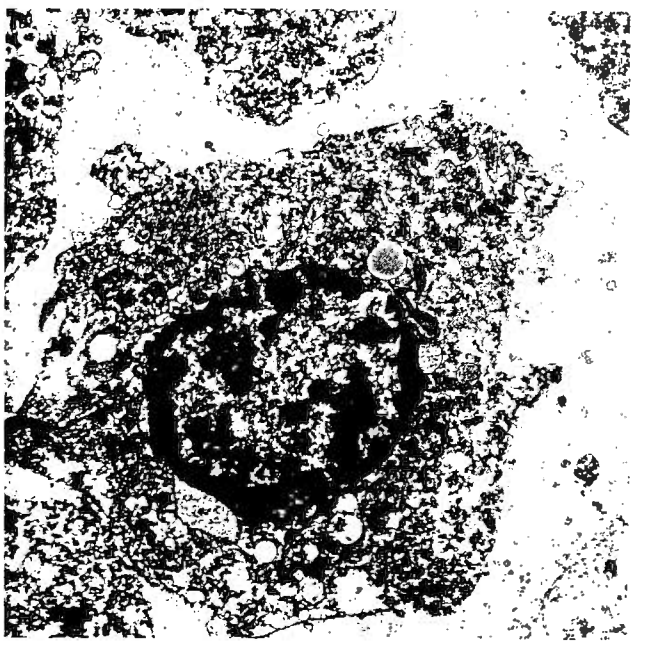


Fig. 2.
The changed VX2 cancer cell with a deformed nucleus and destroyed organelles after the exposure (X5200).

参考文献

1) Senji, H., Seiichi, O., Masa-aki, K., Kenichi, S., Kazuyuki, Y., Seiichi, S., Chikara, O., Makoto, S., Sadahumi, K..and Masato, N., :High Energy Underwater Shock Wave Treatment on Implamted Urinary Bladder Cancer in Rabbits. J.Urol., 146: 439, 1991.

2) 田中聡、工藤誠治、モーリック・アスラフ・ウッディン、工藤達也、古川利有、鈴木唯司: ＢＢＮ誘発ラットのＢＣＧおよびＡｄｒｉａｍｙｃｉｎ膀胱内注入療法による組織変化.日泌尿会誌.83:368.1992.

3) 斎藤敏典、折笠精一、庵谷尚正、神部廣一、桑原正明、田口勝行、白井修一、目時利林也、：衝撃波照射による腎組織損傷ー超微細構造からの観察ー.日泌尿会誌.83:23.1992.

水中衝撃波の変異原性の有無に関する検討

東北大学*　仙台市衛生研究所**
庵谷尚正*、折笠精一*、桑原正明*、田口勝行*、斎藤敏典*
玉川勝美**

Studies on Mutagenic Effect of Under Water Shock Waves

Naomasa IORITANI*, Seiichi ORIKASA*, Masaaki KUWAHARA*,
Katsuyuki TAGUCHI*, Toshinori SAITO*, Katsumi TAMAKAWA**

*Department of Urology, Tohoku University School of Medicine
Seiryo-cho 1-1, Aobaku, Sendai, 980, Japan
**Sendai Municipal Institute of Public Health
Oroshi-machi Higashi 2-5-10, Wakabayashiku, Sendai, 983, Japan

Abstract

The mutagenicity of under water shock wave was studied using Ames test. The shock wave source used in this study were two types of piezoceramic generators. Shock wave exposures ranging from 20 to 100 MPa and from 100 to 1000 shots were given to the suspension of tester strain (*Salmonella typhimurium* TA97, 98, 100, 102). The mutagenicity was estimated by the number of revertant colony. Shock wave exposure alone group showed no mutagenic effect. The group in which known mutagens were added to the suspension after shock wave exposure also showed no mutagenic effect. However, the group in which CDDP (cis-platinum) as a mutagenic agent was added in tester suspension before shock wave exposure showed elevation of mutagenicity.

1. はじめに

我々は収束水中衝撃波によって腎の小動脈の中膜筋層や尿細管上皮に細胞レベルの壊死あるいは細胞内小器官の破壊が生ずることを、これまで光顕、電顕所見から報告してきた。このような殺細胞効果の存在は、紫外線、放射線等と同様にＤＮＡ構造上の変化を惹起し、変異を生じさせる可能性を示唆している。 そこで今回は衝撃波の変異原性に関し（1）衝撃波単独で変異原性を有するか、（2）衝撃波照射が既存の変異原の作用を増強するかを明らかにすることを目的とした。

2.方法

変異原性試験に用いる*Salmonela typhimurium*の変異株は、発育にヒスチジンを必要とするが、この株に変異が生ずるとヒスチジン非要求性の野性株に復帰変異し、ヒスチジンを含まない培地上でコロニーを形成する。この現象を応用した Ames法は環境化学物質の変異原性検出に広く用いられている[1)]。今回は、試験菌浮遊液に衝撃波を照射して変異原性の有無を検討した。

2-1　衝撃波源　(Fig. 1)

菌体の容器の簡便さから、最初、ピエゾ型衝撃波源（1）を用いたが、低いピーク圧では変異原性が認められなかったため、次に高圧力の（2）を用いた。

衝撃波源（1）
直径125mm、曲率半径180mm　ピエゾ素子：1枚
焦点：4x4x37mm、ピーク圧：200bar固定、ピエゾ素子は水槽の底面に固定

衝撃波源（2）
直径300mm、曲率半径260mm　ピエゾ素子：24枚
焦点：1x1x19mm、ピーク圧：0-1000bar間で可変、水槽上方から懸架

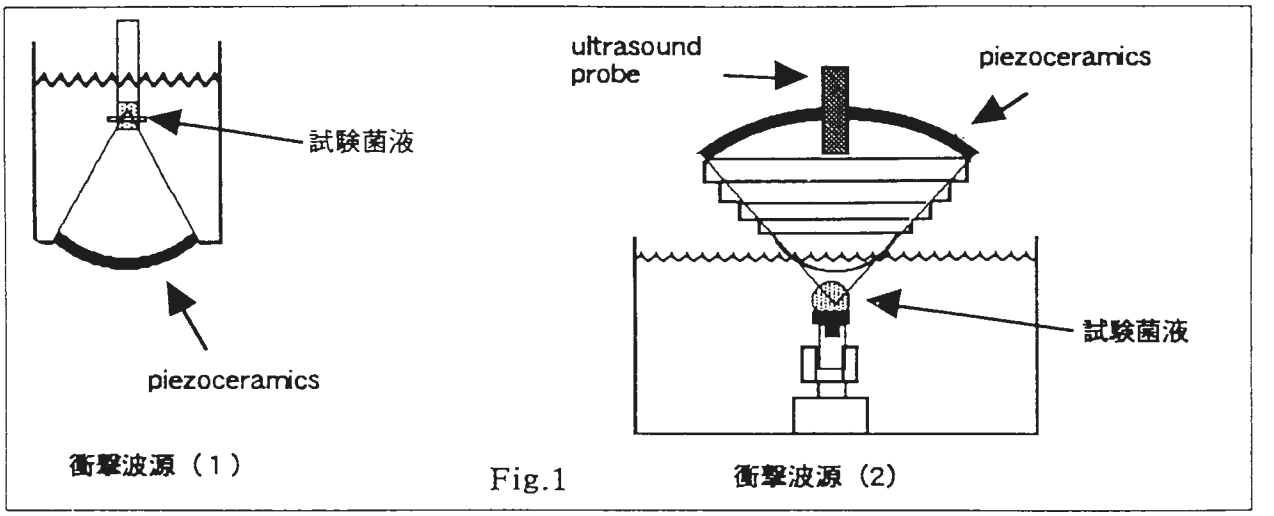


Fig.1

＜2＞　試験菌容器

1）衝撃波源（1）では断面の直径1.5cmのプラスチック製試験管の底面にラテックス膜を張り菌液を3mlを容れた。底面から衝撃波を照射し、液面高は約1.8mmで上面は空中に解放した。

2）衝撃波源（2）ではゴムキャップに一端が肓端のラテックスチューブをかぶせ、菌液2.5mlを注入し、気泡を吸引除去した。衝撃波は上面から照射した。

＜3＞　変異原性試験

変異原性試験として、Amesテスト（プレート法）を用いた。

試験菌種は*Salmonela typhimurium* TA97、TA98、TA100、TA102の4種類であり、それぞれ、TA97とTA98はフレームシフト型変異原検出用菌、TA100は塩基対置換型検出用菌、TA102は架橋型変異原および酸化型変異原検出用菌である。

変異原性試験はFig. 2の方法で施行した。

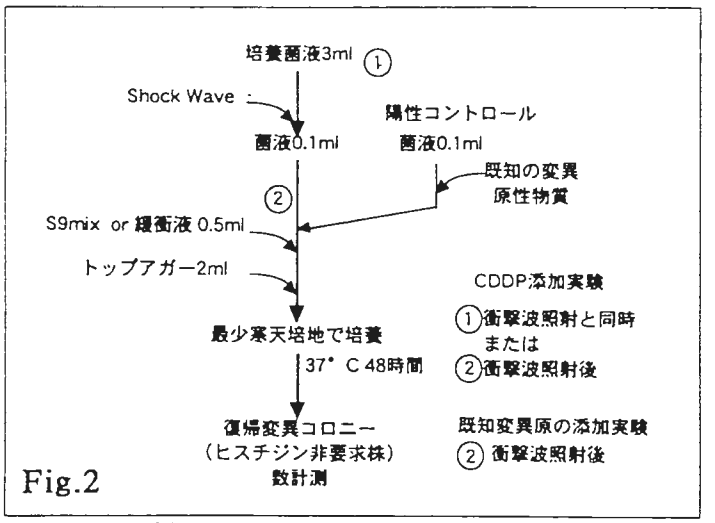


Fig.2

＜陽性コントロール＞

衝撃波を照射していない試験菌に、既知の変異原性物質として、ベンゾ(a)ピレン(B(a)P)、AF-2、2アミノアントラセン(2-AA)、マイトマイシンC(MMC)を添加し、復帰変異コロニーの出現を確認した。

＜生菌数の測定＞

衝撃波の試験菌に対する殺作用を見るため生菌数の測定を行った。

＜試験容器の変異原性について＞

試験株TA98および100を0、5、10、30分容器内に停滞させ、変異原性試験を行ったが、変異原性を認めなかった。

＜4＞　衝撃波照射条件

4-1　衝撃波単独の変異原性に関する実験

1）　衝撃波源（1）により20MPa、1shot/secに固定し、衝撃波数を0-1000で変化させ試験菌に照射した。TA98、100を用いた実験の一部では照射頻度を5shot/sec、あるいは衝撃波数を3000まで上昇させ影響を見た。

2）衝撃波源（2）により衝撃波数を300、 2shot/secとして、ピーク圧0、20、40、60、80、100MPaに変化させ照射した。

4-2　既知変異原の変異原性に対する衝撃波の影響（変異原の添加実験）

1）衝撃波照射後に既知の変異原を添加

20MPa、1shot/sec、300shot照射後の試験菌浮遊液にB(a)P、AF-2を作用させ、変異原性

の増強が認められるかを検討した。菌株はTA98を使用した。
2）衝撃波照射後にCDDPを添加
試験菌浮遊液(TA98)に20MPa、1shot/sec、300shot照射した後に、CDDPを各種の濃度で添加し、変異原性の増強が認められるか検討した。
3）CDDPを添加した菌体浮遊液に衝撃波を照射
試験菌浮遊液(TA97、102)にCDDPを各種の濃度で添加し、これに200bar、1shot/sec、300shot照射し変異原性の増強について検討した。

3. 結果

＜1＞ 衝撃波の試験菌に対する致死作用
今回の照射条件に於ては生菌数の減少を認めなかった。
＜2＞ 衝撃波単独による変異原性
20MPaの衝撃波源（1）では、1000回の衝撃波照射でも復帰変異コロニー数の増加を認めた試験菌株はなかった(Table1)。衝撃波源（2）でピーク圧を100MPaまで上昇させたが、復帰変異コロニー数の増加を認めた試験菌株はなかった(Table2)。
＜3＞ 衝撃波照射後の既知の変異源の添加よる影響
B(a)P、AF-2とも衝撃波照射菌に於ける復帰変異コロニー数はコントロールに対して増加を認めなかった(Table3)。衝撃波照射後にCDDPを添加しても同様の結果であった(Table4)。
＜4＞ CDDPを菌体浮遊液に添加し、同時に衝撃波を照射した影響 (Table5)
TA97(+S9mix)の衝撃波照射群において復帰変異コロニーの増加が認められ、衝撃波照射がCDDPの変異原性を増強する所見が得られた。

4. 考察

衝撃波による体内の結石破砕は非常に効果的であるが、結石を含む腎及び尿管が横隔膜上に存在するため呼吸による移動が避けられず、おおよそ腎結石の４５％、尿管結石の５５％が結石以外の組織に誤って収束する[2]。これら臓器の組織学的検討では、細胞内小器官の破壊や核の変性などが観察されており[3]、染色体やDNA損傷の可能性が考えられる。物理学的現象の面からも焦点領域に於て生ずるキャビテーションや高圧によって観察あるいは想定されるマイクロジェット[4]、高温、過酸化物質、pHの変化等の生体細胞のDNAに対する傷害性が予想される。今回の検討では衝撃波単独では変異原性は認められず、衝撃波を照射した後の菌体浮遊液に既知の変異原を添加しても変異原性の増強は認められなかった。しかし、菌体浮遊液に変異原性物質としてCDDPを添加し、同時に衝撃波も加えると変異原性の増強が認められた。この理由として衝撃波により細菌の外膜に穿孔が生じ、CDDPの細胞内濃度が上昇し易くなった可能性が考えられる。しかし、試験菌はもともと膜変異を有し高分子量物質も容易に細胞内に入ることができるとされていることから、CDDPおよび衝撃波がDNAに対し独立または相乗的に作用している可能性も否定できない。

5. 参考文献

1. 玉川勝美 他
2. Ioritani, N. et al., Jpan. J. Endourol. ESWL, 3, 179-186, 1990.
3. 斎藤敏典 他, 日泌尿会誌, 83, 23-32, 1992
4. Lush, P. A. et al., Proc. 18th intern. Sympo. Shock waves & Shock Tubes, 831-836, 1989.

Table 1 衝撃波数による影響
衝撃波源（1） （20MPa、1 shot/secに固定） 復帰変異コロニー数

衝撃波数	TA98		TA97		TA100		TA102	
	+S9mix	−S9mix	+S9mix	−S9mix	+S9mix	−S9mix	+S9mix	−S9mix
0	53	41	257	232	73	101	377	251
100	55	54	276	276	83	88	405	273
300	57	44	346	346	72	99	413	335
500	69	49	295	295	85	99	443	318
1000	49	55	279	279	83	90	434	297
陽性コントロール	B(a)P 497	AF-2 361	2-AA 1371	ICR191 850	B(a)P 507	AF-2 356	2-AA 748	ICR191 410

Table 2 ピーク圧による影響
衝撃波源（2） （300または900shots、2shot/secに固定） 復帰変異コロニー数

ピーク圧 (MPa)	衝撃波数	TA98		TA97		TA100		TA102	
		+S9mix	−S9mix	+S9mix	−S9mix	+S9mix	−S9mix	+S9mix	−S9mix
0	300	40	27	221	195	73	101	196	215
20		30	42	228	183	83	88	249	233
40		39	30	239	188	72	99	263	221
60		35	33	245	187	85	99	274	266
80		31	34	265	217	83	90	274	271
100		33	41	232	195	81	94	280	272
100	900	39	37	229	187	85	73	286	285
陽性コントロール		B(a)P 353	AF-2 371	2-AA 1132	ICR191 810	B(a)P 507	AF-2 356	2-AA 636	ICR191 355

Table 3 衝撃波照射後に既知の変異源を添加
衝撃波原（1） 20MPa、300shot、1shot/sec 復帰変異コロニー数

変異原 B(a)P (μg/plate)	試験菌 TA98 + S9mix	
	衝撃波照射菌	コントロール
0	54	53
1.25	136	129
2.5	264	234
5.0	423	412

変異原 AF-2 (μg/plate)	試験菌 TA98 − S9mix	
	衝撃波照射菌	コントロール
0	41	41
0.025	174	163
0.05	327	292
0.1	607	616

Table 4 衝撃波照射後にCDDP添加
衝撃波原（1） 20MPa、300shot、1shot/sec 復帰変異コロニー数

CDDP (μg/plate)	TA98 + S9mix		TA98 − S9mix	
	衝撃波照射菌	コントロール	衝撃波照射菌	コントロール
0	54	53	54	53
1.25	85	85	65	65
2.5	107	111	83	97
5.0	121	113	107	144
10.0	113	111	93	94

Table 5 CDDPを菌体浮遊液に添加し衝撃波を照射
衝撃波原（1） 20MPa、300shot、1shot/sec 復帰変異コロニー数

衝撃波	CDDP μg/plate	TA97		TA102	
		+ S9mix	−S9mix	+ S9mix	−S9mix
(+)	0.64	404	245	1195	1260
(−)	5.0	288	244	1165	1225

アニュラーアレイを用いた衝撃波焦点制御法の検討

東芝研究開発センター　石橋義治
東芝研究開発センター　相田　聡
東北大学泌尿器科　桑原正明
東北大学流体研　高山和喜

Electronic focusing of shock waves using an annular array

Yoshiharu ISHIBASHI, Satoshi AIDA, Masaaki KUWAHARA*, and Kazuyoshi TAKAYAMA**
Toshiba R & D Center, Kawasaki 210, Japan
*Department of Urology, Tohoku University School of Medicine, Sendai 980, Japan
**Shock Wave Research Center, Institute of Fluid Science, Tohoku University, Sendai 980, Japan

Abstract

A phased array system using an annular array has been developed for an extracorporeal shock wave lithotripter. The system has the following characteristics: a) generates pressure waves in water from 4 MPa (ultrasound) to 100 MPa (shock waves) at the focus; b) moves the focal position along the axis of the applicator (35 mm on both sides of the geometric focus); c) disintegrates stones at every focal position. The peak pressures decrease with increasing distance between the electronic focus and the geometric one. The pressure reduction rate for shock waves was smaller than that for ultrasound at every focal position because a 'time synchronized process' reduced the difference between the wave front released from an ideal spherical transducer and that from finite sized transducers with different phases. In this process, two shock waves emitted at different timings combine at the focus. The resulting shock wave is better formed with increasing wave pressure and with a shorter time interval between the two initial shock waves.

1．はじめに

体外衝撃波結石破砕術は生体内の結石に衝撃波を集束させて破砕する治療法であり、外科的な手術に比べて患者への侵襲度が極めて少ないことが特徴である(Chaussy 1982)。現行の治療では衝撃波源（アプリケータ）を機械的に移動させるか、患者を移動させて結石に焦点を合わせている。しかし、焦点位置を電子的に制御できれば装置の操作性が向上すると考えられる。そこで、超音波診断装置などに利用されているフェーズドアレイ技術を衝撃波焦点の移動に応用することを考え、強力超音波発生用アニュラーアレイアプリケータを試作し、深さ方向の衝撃波焦点移動の可能性について実験的に検討した。さらに、衝撃波の非線形性がフェーズドアレイを用いた焦点移動に対して与える影響について検討し、弱い水中衝撃波間の干渉に関して興味ある結果を得たので報告する。

2．実験装置及び方法

実験装置のブロック図をFig.1に示す。超音波及び衝撃波発生源として共振周波数500kHz、開口径300mm，曲率260mm，中心穴径（画像描出用超音波プローブ挿入

用）60㎜の6リングアニュラーアレイアプリケータを試作した。本アプリケータは駆動電圧を調整することにより、焦点ピーク圧力4～100MPaの超音波及び衝撃波を発生できる。目的の焦点位置を得るための各リングに与える遅延値は、設定焦点からリング重心までの距離を音速で除して求めた。圧力分布の測定は、アプリケータ中心軸上深さ方向及び方位方向について、超音波条件として焦点ピーク圧力4MPa、衝撃波条件として焦点ピーク圧力50MPa以上で、脱気水道水中で行った。ハイドロホンは、受圧面径0.5 ㎜のPVDFニードル型(IMOTEC社製)及びメンブレン型(東芝セラミックス社製)を用いた。さらに、φ6㎜の活性アルミナ製モデル結石を用いて、破砕片が2㎜以下になるまでの衝撃波照射数を計測し、破砕力を評価した。

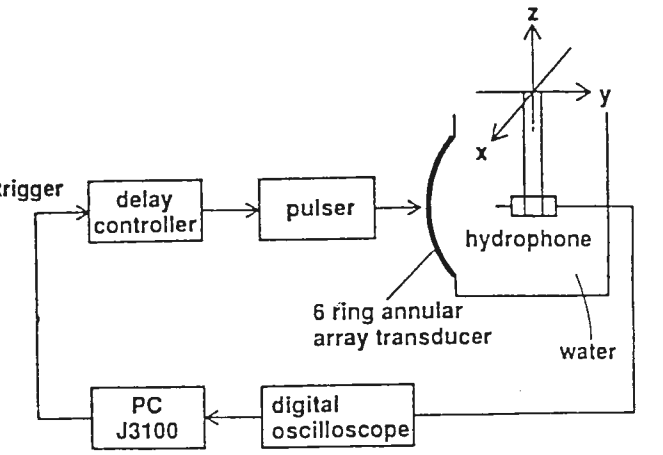


Fig.1 Schematic diagram of experimental apparatus.

3．結果及び考察

設定した焦点位置と実際のピーク圧力位置は、超音波及び衝撃波とも誤差±2㎜以内で一致していた。よって、目的の焦点位置を得るための各リングに与える遅延値の計算は、衝撃波でもその非線形性を考慮しないで実用上十分である。これは、集束超音波による衝撃波形成では焦点のごく近傍まで非線形現象が起こらないため、焦点位置のずれが大きくならないと考えられる。

Fig.2は焦点位置を深さ方向に移動した際のピーク圧力の変化を示す。値は幾何焦点位置におけるピーク圧力で規格化した。焦点位置を幾何焦点位置から移動させるほどピーク圧力は低下した。実際にモデル結石を用いて各焦点位置において破砕力を測定したら、Fig.3に示すようにピーク圧力の低下に対応して破砕に必要な衝撃波ショット数が増加した。

Fig.2に示す圧力低下はアニュラーリングを有限個に分割したことによる量子化誤差が主な原因と考えられる。この低下量は超音波の場合よりも衝撃波の方が少なくなった。例えば、焦点位置を±40㎜移動すると、ピーク圧力の低下は超音波では約40%であるのに対し，衝撃波では約30%にとどまっている。ここで、衝撃波の方が低下分が少ない原因を解明するために、位相差のある2つの衝撃波を焦点に向けて照射し、波形を観察した。結果をFig.4に示す。Fig.4(1)(a)において進み位相の衝撃波は遅延を与えずにアニュラーリングの

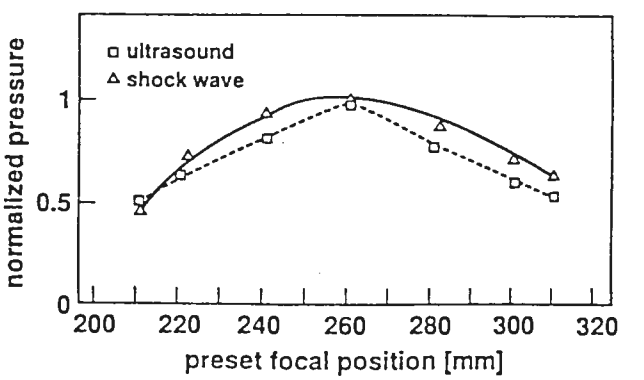


Fig.2 Peak pressures normalized with respect to those at geometric focus for ultrasound (□) and for shock waves(△).

内側3リングを駆動した場合、遅れ位相の衝撃波は遅延を0.3μs与えて外側3リングを駆動した場合の焦点波形をそれぞれ単独に実測し、オシロスコープ上に重ねて表示したものである。2波ともにピーク圧力は約50MPaである。(b)は(a)の遅延条件で全振動子を駆動した場合に焦点で観察された波形であり、1波のみの衝撃波が観察された。ここで、(b)の波頭の形成タイミングは(a)における進み位相の衝撃波とほぼ同じであるにもかかわらず、ピーク圧力(約70MPa)は(a)の進み位相の波のピーク圧力(約50MPa)よりも大きくなった。これはあたかも遅れ位相の波のエネルギが進み位相の波に吸収されてしまっ

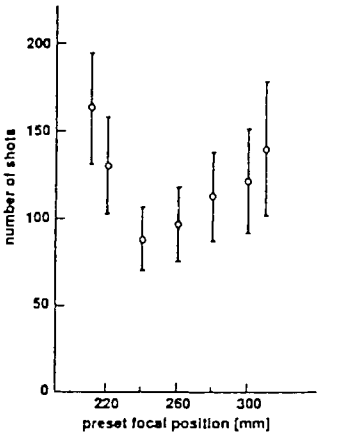


Fig.3 Number of shots required to disintegrate activated an alumina stone (6 mm) .

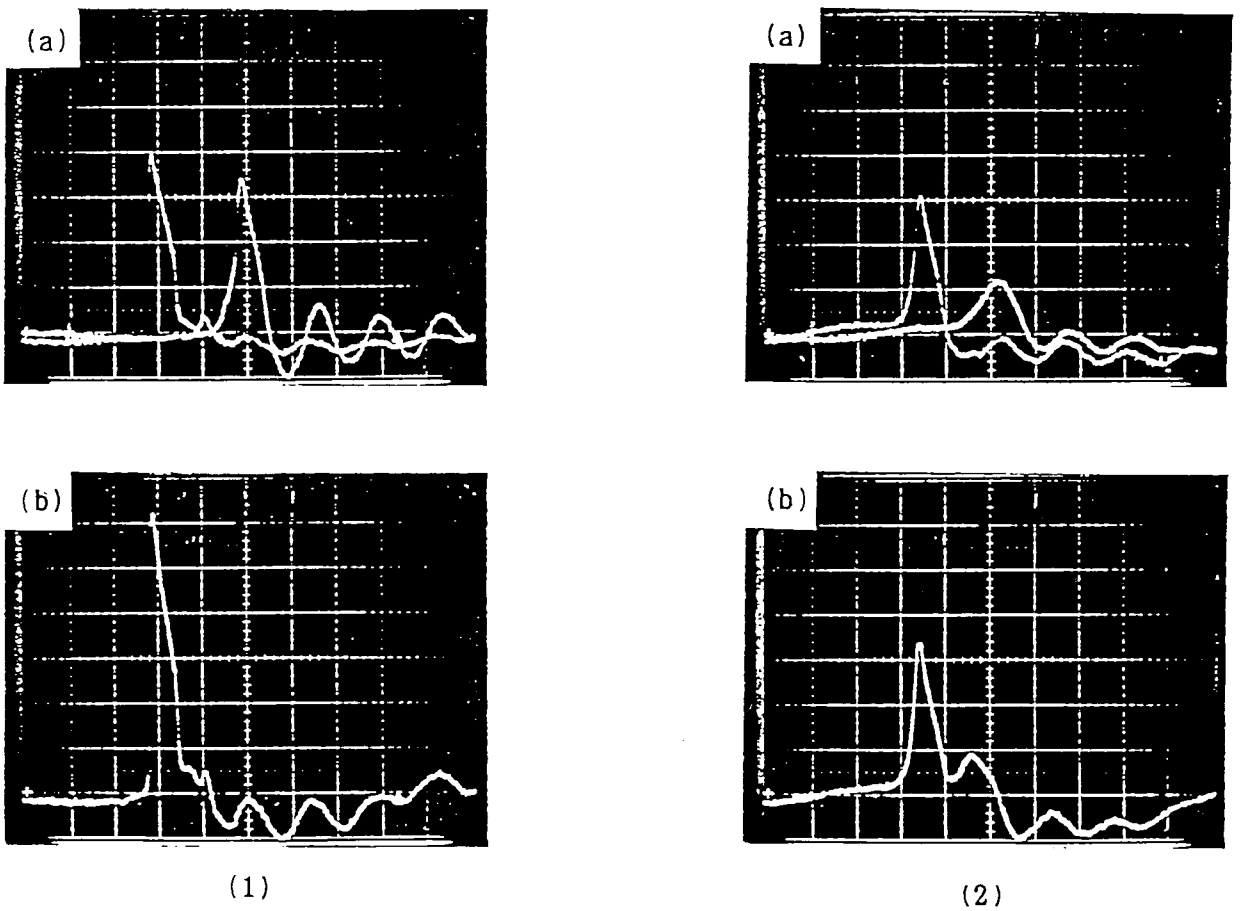


Fig.4 Time synchronized process.
[(1)200 ns/div, 500 mV(=11.8 MPa)/div, (2) 200 ns/div, 200 mV(=4.7 MPa)/div]
Left column: High voltage applied to the transducer. Right column: Low voltage applied to the transducer. Upper row: Two independent, superimposed waves are shown in each figure. The first wave was observed at the focus when the three inner rings of the transducer were in operation. The second waves was observed when the three remaining outer rings were in operation. (Decrease of the peak pressure of the second wave in both graphs was due to the directivity of the hydrophone.) Lower left: Only a single wave was observed at the focus even though two waves were emitted having different phases as in the upper left case. Eventually, the second wave seems to catch up and have its energy absorbed by the first wave. Lower right: Two peaks were observed with a reduced time interval between them compared to the upper right case.

たかのように見えるので、我々はこの現象を引き込み現象と名付けた。Fig.4(2)は(1)と同様な実験を振動子の駆動電圧を低くして行った結果である。(2)(a)は(1)(a)と同様、独立な2波を同一画面上に表示したものであり、ピーク圧力は約15MPaである。遅れ位相の波の圧力が低く見えるのはハイドロホンの指向性のためである。(a)の条件で2波を焦点へ向けて照射すると、(b)に示すような2つのピークを持つ波形が焦点で観察された。遅れ位相の波が進み位相の波に完全には引き込まれないが近づいている様子がわかる。このように、元になる2波のピーク圧力を変化すると、合成波の波形が変化した。その様子をグラフにしたのがFig.5である。図中、横軸は2波それぞれ単独で照射した場合の1波分のピーク圧力、縦軸は2波の干渉の結果得られた合成波のピーク圧力である。直線は合成波のピーク圧力が元の1波のピーク圧力と等しい線である。元の2波の駆動タイミングはずれているので重ね合わせの理が成り立てば合成波のピーク圧力は1波分に等しくなるはずである。よって、合成波のピーク圧力が直線よりも高くなっている場合は遅れ位相の波のエネルギの一部または全部が進み位相の波に吸収されたことを意味する。○印では合成波は完全な1波になっておりFig.4(1)に対応する。△印は合成波のピークが2つあってその間隔が元の2波の間隔よりも近づいている状態でありFig.4(2)に対応する。×印は元の2波の圧力が十分低く線形理論が成立する領域であり、合成波は元の2波の重ね合わせで記述できる。Fig.5から、2波のピーク圧力が大きいほど2波のエネルギがより有効に合成波の形成に寄与し、合成波のピーク圧力が高くなることがわかる。なお、元の2波のピーク圧力を一定にし2波間の時間差を変化させた場合は、2波間の時間差が短いほど合成波は完全な1波の衝撃波波形になり、かつピーク圧力が高くなった。

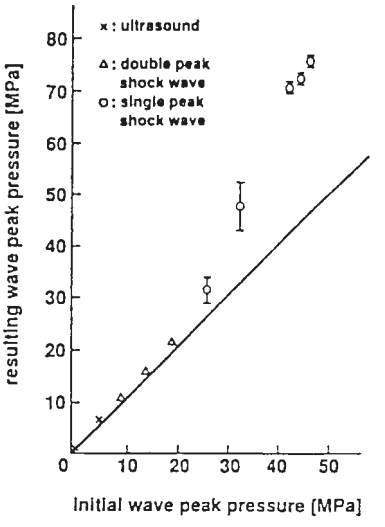


Fig.5 Pressure dependence of the time synchronized process.

このように、引き込み現象は衝撃波間の位相差を減少させて1波にしてしまう効果であり、そのため衝撃波の場合は量子化の不連続性が緩和されFig.2に示されるように焦点移動時の圧力低下が超音波よりも抑制されたと考えられる。

4．おわりに

引き込み現象は弱い水中衝撃波間の干渉の一種と考えられるが、今後は引き込み現象が起こるメカニズムについて解明していくとともに、生体内における衝撃波焦点移動を検討していく。

参考文献

Chaussy, Ch., Schmiedt, E., Jocham, D., Brendel, W., Frossmann, B. and Walther, V. (1982) First clinical experience with extracorporeally induced destruction of kidney stone by shock wave. J. Urol. 127:417-420

日泌尿会誌，84巻，6号，1993年：1007～1012

高エネルギー水中衝撃波による家兎VX2膀胱癌の治療
—衝撃波とTHP-ADM併用後のTHP-ADM組織内濃度について—

東北大学医学部泌尿器科教室（主任：折笠精一教授）
鈴木　謙一　　折笠　精一　　星　　宣次　　桑原　正明
吉川　和行　　大山　　力　　佐藤　　信　　川村　貞文

SHOCK WAVE THERAPY OF THE RABBIT VX2 BLADDER CANCER
—THP-ADM Concentration in the Tissue After Combination Therapy of THP-ADM and Shock Wave—

Ken-ichi Suzuki, Seiichi Orikasa, Senji Hoshi, Masaaki Kuwahara, Kazuyuki Yoshikawa, Chikara Ohyama, Makoto Satou and Sadahumi Kawamura
Department of Urology, Tohoku University School of Medicine
(Director: Prof. Seiichi Orikasa)

Tissue concentration of THP-ADM was analysed after the administration of THP-ADM with or without exposure of high energy underwater shock waves (SW) to rabbit bladder VX2 cancer.

THP-ADM was administered intra-venously (2 mg/kg) or into the urinary bladder (10 mg/body). After the administration of THP-ADM, SW was exposed (6,000～10,000 shots) to VX2 bladder cancer or normal bladder tissue. One hour later, THP-ADM tissue concentration was measured by high performance liquid chromatography method. In intra-venous group, THP-ADM concentration of cancer tissue was significantly lower ($p<0.02$) in SW group than that of non-SW group. In bladder instillation group, THP-ADM concentration of normal bladder tissue was significantly higher ($p<0.02$) in SW group than that of non-SW group and the average concentration of cancer tissue was higher about three times in SW group than that of non-SW group.

Key words: rabbit VX2 bladder cancer, high energy underwater shock wave, THP-ADM concentration

要旨：日本白色家兎の膀胱壁に兎VX2癌細胞を移植して実験的膀胱癌を作製し，高エネルギー水中衝撃波（SW）とTHP-ADMを併用した場合の組織内濃度を検討した．THP-ADMを静脈内投与（2mg/kg）あるいは膀胱内注入（10mg/body）した後，SWを照射した群（6,000～10,000発）と照射しない群に分けて正常膀胱組織と腫瘍組織のTHP-ADM組織内濃度を測定した．静脈内投与群においては，正常膀胱組織ではSW照射の有無による有意な差を認めなかったが，腫瘍組織ではSWを照射した群が有意（$p<0.02$）に低かった．膀胱内投与群においては，正常膀胱組織でSWを照射した群が有意（$p<0.02$）に高い値を示し，腫瘍組織ではSWを照射した群が平均値で約3倍近い高い値を示した．SWを照射しないコントロール群間の比較では，静注群と膀注群のいずれにおいても正常膀胱組織と腫瘍組織のTHP-ADM組織内濃度に有意差を認めなかった．

キーワード：家兎VX2膀胱癌，高エネルギー水中衝撃波，THP-ADM組織内濃度

緒　言

我々はこれまでに高エネルギー水中衝撃波（SW）を用いて，実験的家兎VX2膀胱癌の治療を試み，腫瘍血管の破綻と腫瘍の壊死が生じ，連日照射により腫瘍の

増殖抑制効果があることを報告してきた．さらにSW単独あるいはTHP-ADM静注療法単独に比べ，両者の併用により腫瘍壊死が著しく増加することを観察した．そこで両者の併用により効果が増強する機序と，最適な併用法を知る目的で，Pirarubicin(THP-ADM)とSWを併用した場合の腫瘍組織内濃度を測定した．

対　象

兎VX2癌細胞[1)2)]の継代と実験的VX2膀胱癌の作製は以下のようにして行った．

VX2癌細胞の継代：2.7kg前後の日本白兎家兎の雄の大腿部筋肉内にVX2癌細胞浮遊液$5\times10^7\sim1\times10^8$個/ml（溶媒として生理食塩水を用いた）を0.5～1.0mlを注入した．注入した癌細胞は2～3週で腫瘍径約2cm以上の腫瘍塊として触知出来るようになった．これを3週目以降に摘出し生理食塩水を溶媒として細片とし，ガーゼにてろ過した後に1,000rpmにて5min遠心して，癌細胞浮遊液を作製した．

実験的VX2膀胱癌の作製：2.7kg前後の日本白色家兎の雄にPentobarbital sodium（ネンブタール®）を25mg/kg静注して麻酔した後に開腹し，膀胱前壁を開けた．次いでVX2癌細胞浮遊液$6\times10^6\sim1\times10^7$個を膀胱後壁の粘膜下または膀胱筋層に移植して，実験的VX2膀胱癌を作製した．癌細胞は移植5日から7日後に超音波で描出される大きさの腫瘤を形成するので，移植7日目以降の兎を用いて以下の実験を行った．

方　法

衝撃波の発生：衝撃波の発生源にはpiezo-ceramicsを用いた．この装置には直径33cmの半球面に扇型凹面状の24枚のpiezo-ceramicsが緻密に貼られ，中央部には超音波診断装置のプローブが取り付けてある．半球面の曲率半径は26cmであり，このpiezo-ceramicsに高電圧駆動回路から高電圧pulse波が印加されることにより衝撃波が発生する．発生した衝撃波は，アプリケーター内の脱気水，半球状のアプリケーター膜，生体と伝播し，照準部に収束する．衝撃波の焦点部における最大圧力は100MPa，照射rateは5shots/secにて行った．焦点部における最高圧力領域の半値幅は1×1×20mmで，衝撃波対象組織の照準は超音波プローブにて行った．

1）静注群

1．コントロール群

THP-ADM 2mg/kgを静注し1時間後に屠殺して，正常膀胱組織（n=7），膀胱腫瘍（n=7）を摘出した．

2．SW群

超音波画像上膀胱容量が10ml前後の状態でTHP-ADM 2mg/kgを静注し，その直後からSWを6,000～10,000発を正常膀胱組織（n=4），膀胱腫瘍(n=4)にそれぞれ照射し，静注後1時間後に屠殺して摘出した．

2）膀注群

1．コントロール群

5Fr. 栄養チューブを外尿道口より膀胱内に挿入し，導尿して膀胱内を空虚にした後に，THP-ADM 10mg/bodyを滅菌蒸留水10mlで溶解して膀胱内へ注入し，1時間後に屠殺して正常膀胱組織（n=7），膀胱腫瘍（n=3）を摘出した．

2．SW群

5Fr. 栄養チューブを外尿道口より膀胱内に挿入し，導尿して膀胱内を空虚にした後に，THP-ADM 10mg/bodyを滅菌蒸留水10mlで溶解して膀胱内へ注入し，SWを6,000～10,000発正常膀胱組織（n=3），膀胱腫瘍（n=3）にそれぞれ照射し，膀注後1時間後に屠殺して摘出した．

組織摘出直後の標本は冷凍庫にて保管した．組織内THP-ADM濃度は，三楽（株）中央研究所生物評価研究室に依頼し高速液体クロマトグラフィー法（high performance liquid chromatography法<HPLC法>）にて測定した．つまり氷冷下に，採取した組織にammonium buffer（pH 9）5ml加えホモジネートし，0.5N-NaOHにてpH9に調製した．次に18mlのクロロホルム/メタノール（2/1）を加え，1分間攪拌した後に遠心分離し，有機層を分離した．水層はさらに12mlのクロロホルムを加え遠心分離し，有機層を再抽出した．有機層を合わせて蒸発乾固し，10mlのクロロホルム/メタノール(2/1)を加え溶解し，溶解後の1mlにinternal standardとして100ng/mlのダウノマイシン1mlを加え再び蒸発乾固した．残渣を0.2mlのアセトニトリル・水混合液に溶解し溶解液の50μlをHPLCのカラムに1.3ml/minのflow rateで展開した．励起波長470nm，検出波長550nmの蛍光にて検出し，internal standardに対するピーク面積の比から濃度を算出した．また有意差検定はt検定にて行った．

結　果

1）静注群

1．正常膀胱組織（図1）

コントロール群（n=7）のTHP-ADM組織内濃度は，3.18±2.88（mean±S.D.）μg/g，SW群（n=4）は3.37±3.15μg/gで，両者の組織内濃度の平均値に

図1　静注群における正常膀胱組織内 THP-ADM 濃度：静注のみの群(I.V)と衝撃波併用群(I.V＋SW)に有意差を認めない.

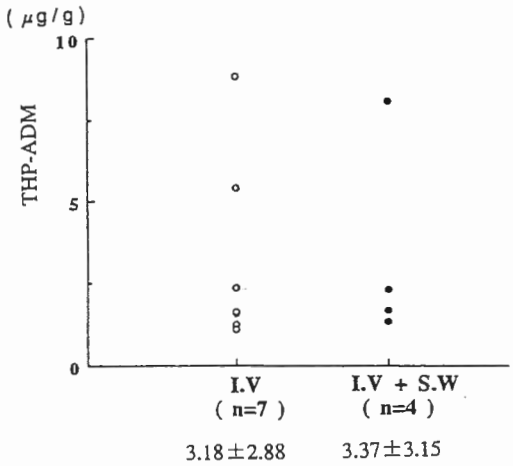
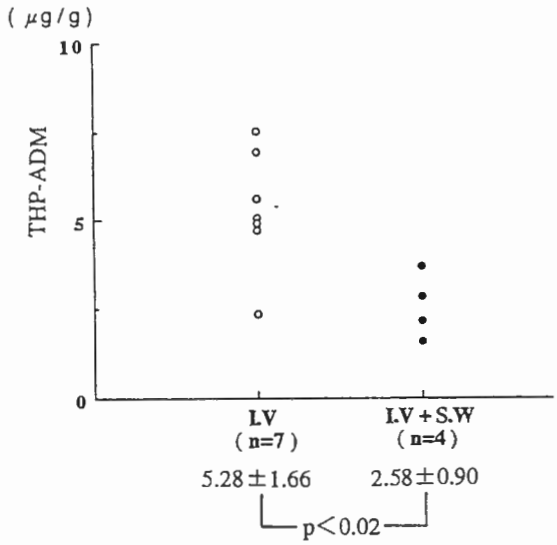


図2　静注群における膀胱腫瘍組織内 THP-ADM 濃度：衝撃波併用群（I.V＋SW）の方が静注のみの群（I.V）に比べ有意（p<0.02）に低い値を示した.



有意差を認めなかった.

2. 腫瘍組織（図2）

コントロール群（n=7）の THP-ADM 組織内濃度は，5.28±1.66（mean±S.D.）μg/g，SW 群（n=4）は，2.58±0.90μg/g であった．組織内濃度の平均値は，SW 群が p<0.02で有意に低かった.

2）膀注群

1. 正常膀胱組織（図3）

コントロール群（n=7）の THP-ADM 組織内濃度は，33.02±24.77（mean±S.D.）μg/g，SW 群（n=3)は，151.80±77.23μg/g であった．SW 群の組織内濃度が有意（p<0.02）に高かった.

図3　膀注群における正常膀胱組織内 THP-ADM 濃度：衝撃波併用群（B.I＋SW）が膀注のみの群（B.I）に比べ有意（p<0.02）に高い値を示した.

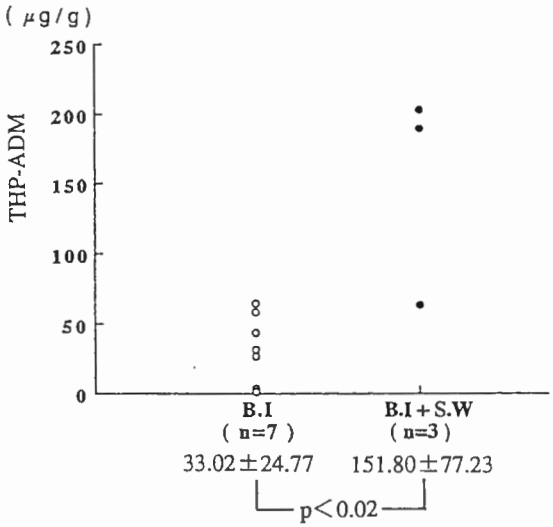
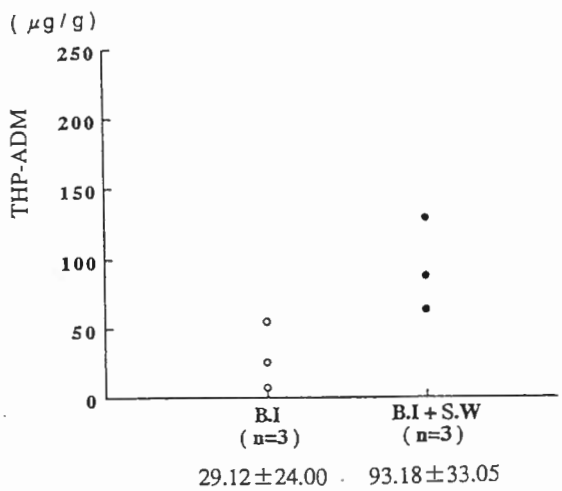


図4　膀注群における膀胱腫瘍組織内 THP-ADM 濃度：衝撃波併用群（B.I＋SW）が膀注のみの群（B.I)に比べ，平均値で約3倍高い値を示したが，有意差は認めなかった.



2. 腫瘍組織（図4）

コントロール群（n=3）は29.12±24.00（mean±S.D.)μg/g，SW 群(n=3)は93.18±33.05μg/g で，SW 群の方が高い値となったが有意な差を認めなかった.

3）正常膀胱組織と腫瘍組織の比較

静注群，膀注群のコントロール群において，正常膀胱組織と腫瘍組織とでは THP-ADM 組織内濃度に有意差を認めなかった.

考　察

高エネルギー水中衝撃波（SW）は，現在では尿路結石治療の主流となり，手術を必要としないその治療は多くの患者に福音を与えてきた．当初副作用があまり問題とされなかったSWによる結石治療も，血尿，腎被膜下血腫等が報告されるようになり[3]，SWの生体に与える影響が検討されてきた．黒須らは犬に衝撃波を照射し，衝撃波が生体に及ぼす影響の主たるものは臓器の出血であることを観察した[4]．庵谷らは犬生体腎に衝撃波を照射し，血腫と間質のび漫性出血を認め，それらの原因は弓状動脈，小葉間動脈の内弾性板の断裂，また動静脈短絡の形成が原因だろうと述べている[5]．斎藤らは家兎腎に衝撃波を照射し，特に近位尿細管細胞において空胞形成及び刷子縁とミトコンドリア等の細胞内小器官の破壊を観察し，衝撃波による障害は血流を介してのみ発生するのではなく，細胞に対する直接の作用が関与している可能性を示唆した[6]．水中衝撃波による組織障害の機序に関しては，膨張波によるキャビテーション現象，水撃作用（流れ）による剪断応力[7][8]，熱作用，free radical[9]などが作用していると考えられているが[10]，我々は，逆にこれらの作用が癌治療に応用できないかと考え，これまで検討を加えてきた．

今回用いたVX2癌が確立された経緯は，1935年にRousらがShope virusによる兎皮膚パピローマが癌化することを報告し[1]，それを1940年にKiddらが同種の兎への移植可癌として確立している[2]．その組織型はRousらはlike epidermoid carcinoma[1]，Kiddらはsquamous cell carcinoma[2]，Muckleらはanaplastic squamous cell carcinoma[11]と述べている．またNemotoらはVX2癌を兎膀胱壁に注入し悪性膀胱腫瘍モデルを確立し，詳細に検討している[12]．それによると，移植2週目には腫瘍は膀胱粘膜表面に突出し，膀胱筋層深くに浸潤し，移植3週目には膀胱外膜にまで達し，リンパ節転移および肺転移を認めるようになる．今回の実験においても，移植したVX2癌細胞は全て結節型腫瘍で腫瘍周囲に被膜を認めず浸潤傾向を示した．

星らは，今回の実験と同様の衝撃波発生装置にて以下の結果を報告してきた．つまり，1．家兎VX2膀胱癌にSWを2,000～6,000発1回照射あるいは2～3日間連日照射したところ，対照に比して著明な腫瘍の壊死と壊死部に白血球の浸潤を認めた．2．SWによる壊死部の腫瘍血管には線維の膨化や断裂が生じ，明らかな腫瘍血管の破綻が観察された．3．SW 6,000～8,000発の8～10日間連日照射では，対照に比し腫瘍の増殖抑制を認め，また経時的な胸部X-pの検討では肺転移を誘発しなかった[13][14]．4．THP-ADMを今回の検討と同様2mg/kg静注した後に，SWを10,000発照射したところSW単独，化学療法（THP-ADM静注）単独に比べ腫瘍部分の壊死が著しく認められた[15]．

今回の組織内濃度の検討では，静注群において正常膀胱組織では，静注単独群と静注にSWを併用した群に有意差を認めなかった．しかし腫瘍組織においては，静注単独群より静注にSWを併用した群で有意に低い値となった．この原因については，腫瘍組織では血管が豊富なため，SWによって損傷を受ける血管が多いためか，あるいは腫瘍血管が正常組織の血管よりも損傷を受け易く，THP-ADMが腫瘍全体に十分にゆきわたらなかった等の可能性が考えられた．しかし星らの報告では，THP-ADM静注にSWを併用した群ではTHP-ADM静注単独，SW単独に比べ著しい腫瘍の壊死を認めている．このことはSWとTHP-ADMを併用することにより，癌細胞のTHP-ADM取込みあるいは感受性の亢進，THP-ADM自体の性質の変化等の何らかの相乗効果を示し，腫瘍を壊死させていると考えられた．in vivoでSWと抗癌剤とを併用し組織内濃度を検討した報告は世界的にみても他になく，現在では推測の域を出ないが，抗腫瘍効果は単に腫瘍組織内の抗癌剤の濃度に依存するものではなく，放射線と抗癌剤の相乗効果が報告されているように[16]，SWと抗癌剤との相乗効果があり組織内濃度が低くてもより強い抗腫瘍効果があるのかもしれず，今後さらに検討が必要であると思われる．実際Leeらは，マウスで化学発癌させたtransitional cell carcinomaであるMBT-2を皮下に移植し，SW単独では腫瘍の増殖に影響を与えなかったが，SWとシスプラチン投与を併用したところ腫瘍増殖抑制をシスプラチン投与単独よりも認めたことを報告している[17]．

膀注群の正常膀胱組織では，膀注単独群より膀注にSWを併用した群で有意に高い値となった．腫瘍組織では，膀注単独群と膀注にSWを併用した群に有意差を認めなかったが，平均値では約3倍の組織内濃度を併用群で示した．このことから，SWは抗癌剤の組織への取込みを促進していると考えられ，膀注とSWの併用による抗腫瘍効果は膀注単独，SW単独よりも高くなるだろうと考えられた．龍治らは，培養細胞に衝撃波を照射するとアドリアマイシンの細胞内への透過性

が高まることを報告しているが[18]，今回の実験結果と一致する．先に述べた斎藤らは，SW照射による細胞に対する直接の作用の関与の可能性を示唆しているが，腫瘍細胞膜に対する何らかの影響も十分に考えられ，細胞膜を介しあるいは細胞膜を破壊し，その結果腫瘍細胞内に取り込まれるTHP-ADM濃度が高くなった可能性がある．また横田らは，CDDPに比してADM，THP-ADMといったanthracyclin系の抗癌剤は，接触面積が移行量に大きく関係するのではないかと述べている[19]．今回の実験からこのことは，SW照射が腫瘍表面に亀裂を生じさせ，あるいは腫瘍細胞と腫瘍細胞間との細胞結合を破壊し，細胞間にTHP-ADMが入り込みやすくなり，THP-ADMと腫瘍細胞との接触面積を増加させた可能性が考えられる．実際斎藤らは，SWを照射したVX2膀胱癌を透過型電子顕微鏡にて観察し，腫瘍細胞間の離開を観察しており[20]興味深い．

単に静注あるいは膀注した場合，正常膀胱組織と腫瘍組織のTHP-ADM組織内濃度に有意差を認めなかった．横田らは，表在性膀胱癌に対しTHP-ADMを膀注した場合，正常膀胱粘膜よりも癌組織において高い組織内濃度であったこと，しかし非乳頭状腫瘍は乳頭状腫瘍よりも有意に低い組織内濃度を示し，正常膀胱粘膜に近い値を示したことを報告している[19]．今回用いた家兎VX2膀胱癌は，全て結節状の腫瘍となるため膀注群において正常膀胱組織と腫瘍組織のTHP-ADM組織内濃度に有意差を認めなかったものと考えられた．静注群においても，正常膀胱組織と腫瘍組織のTHP-ADMの組織内濃度に有意差を認めなかったが，文献的にはTHP-ADM静注による組織内濃度の検討はほとんど報告がない．

今回のTHP-ADMの組織内濃度に関する検討では，腫瘍組織に対しては膀胱内注入にSWを併用する治療が最も高い濃度を示した．期待した静注群では，SW併用によりむしろ組織内濃度は低くなった．しかし，今までの報告を考慮するとSWと抗癌剤併用による何らかの相乗効果も考えられ，今後SWによる薬剤透過性あるいは感受性の変化および薬剤の投与方法につき検討が必要である．

結　語

1．兎正常膀胱組織と実験的兎VX2膀胱癌に対し，高エネルギー水中衝撃波とTHP-ADMを併用して，THP-ADMの組織内濃度を検討した．

2．静注群における腫瘍組織では，SWを照射した群が照射しない群に比べ有意にTHP-ADMの組織内濃度が低くなった．

3．膀注群における正常膀胱組織では，SWを照射した群が照射しない群に比べ有意にTHP-ADMの組織内濃度が高くなった．

4．膀注群における腫瘍組織では，SWを照射した群が照射しない群に比べ，有意差は認めなかったが平均値で3倍近い組織内濃度を示した．

5．静注群，膀注群のコントロール群間の比較では，正常膀胱組織と腫瘍組織のTHP-ADM組織内濃度に有意差を認めなかった．

尚，本研究の一部は，文部省科学研究費補助金試験研究B（課題番号04557071）の援助を受けた．

最後に，本研究に協力をいただいた泌尿器科教室の高橋勝治技官，高橋とし子技官に感謝致します．

文　献

1) Rous, P. and Beard, J.W.; The progression to carcinoma of virus-induced rabbit papillomas (Shope). J. Exp. Med., 62, 523—548, 1935.
2) Kidd, J.G. and Rous, P.: A transplantable rabbit carcinoma originating in a virus-induced papilloma and containing the virus in masked or altered form. J. Exp. Med., 71, 813—838, 1940.
3) Rubin, J., Peter, A., Pollack, H., Banner, M., Coleman, B., Mintz, M. and Van Arsdalen, K.: Kidney changes after extra-corporeal shock wave lithotripsy, CT evaluation. Radiology, 162, 21—24, 1987.
4) 黒須清一，竜谷尚正，神部広一，景山鎮一，桑原正明，丹羽　隆，高山和喜：爆薬を用いた体外腎結石破砕．水中衝撃波の生体に及ぼす影響．日泌尿会誌，78，1252—1259，1987.
5) Ioritani, N., Kuwahara, M., Kambe, K., Taguchi, K., Saitoh, T., Shirai, S. and Orikasa, S.: Renal tissue damage induced by focused shock waves. Am. Inst. Phys. Conf., Proc., 208, 185—190, 1989.
6) 斎藤敏典，折笠精一，竜谷尚正，神部広一，桑原正明，田口勝行，白井修一，目時利林也：衝撃波照射による腎組織損傷—超微細構造からの観察—．日泌尿会誌，23—32，1992.
7) Kambe, K., Kuwahara, M., Orikasa, S. and Takayama, K.: Mechanism of fragmentation of urinary stones by under water shock wave. Urol. Int., 43, 275—281, 1988.
8) Kuwahara, M., Iorintani, N., Kambe, K., Taguchi, K., Saitoh, T., Igarashi, M., Shirai, S. and Orikasa, S.: Acoustic cavitation bubbles in the kidney induced by focused shock waves in

extracorporeal shock wave lithotripsy (ESWL). Am. Inst. Phys. Conf. Proc., 208, 173—178, 1989.
9) Morgan, T.R., Laudone, V.P., Heston, W.D.W., Zeitz, L. and Fair, W.R.: Free radical production by high energy shock waves—Comparison with ionizing irradiation. J. Urol., 139, 186—189, 1988.
10) 折笠精一：体外衝撃波砕石術と水中衝撃波の生体に及ぼす影響. 日泌尿会誌, 82, 1027—1044, 1991.
11) Muckle, D.S. and Dickson, J.A.; The selective inhibitory effect of hyperthermia on the metabolism and growth of malignant cells. Br. J. Cancer, 25, 771—778, 1971.
12) Nemoto, R., Mori, H., Iwata, K., Kato, T. and Harada, M.: A model of malignant urinary bladder tumor in rabbits. Tohoku J. Exp. Med., 134, 257—263, 1981.
13) Hoshi, S., Orikasa, S., Kuwahara, M., Yoshikawa, K., Ohyma, C., Satoh, M., Kawamura, S. and Nose, M.: The effect of high-energy underwater shock waves on implanted urinary bladder cancer in rabbits. Jpn. J. Cancer Res., 81, 317—319, 1990.
14) Hoshi, S., Orikasa, S., Kuwahara, M., Suzuki, K., Yoshikawa, K., Saitoh, S., Ohyma, C., Satoh, M., Kawamura, S. and Nose, M.: High energy underwater shock wave treatment on implanted urinary bladder cancer in rabbits. J. Urol., 146, 439—443, 1991.
15) Hoshi, S., Orikasa, S., Kuwahara, M., Suzuki, K., Shirai, S., Yoshikawa, K. and Nose, M.: Shock wave and THP-Adriamycin for treatment of rabbit's bladder cancer. Jpn. J. Cancer Res., 83, 248—250, 1992.
16) Welden, T.E., Kursh, E., Novak, L.J. and Persky, L.: Combination radiotherapy and chemotherapy in murine bladder cancer. Urology, 14, 47—52, 1979.
17) Lee, K., Smith, P. and Cockett, A.T.K.: Influence of high-energy shock waves and cisplatin on antitumor effect in murine bladder cancer. Urology, 36, 440—444, 1990.
18) 龍治　修, 伊藤文夫, 中村倫之助, 中沢速和, 東間紘：衝撃波による細胞障害の検討. 第4回日本EE総会抄録集, p. 86, 1990.
19) 横田欣也, 秋山昌範, 住吉義光：表在性膀胱癌に対するPirarubicin膀胱内注入療法における血中および腫瘍組織内濃度に関する検討. 西日泌尿, 53, 533—537, 1991.
20) 斎藤敏典, 折笠精一, 星　宣次, 桑原正明, 鈴木謙一, 庵谷尚正, 田口勝行, 白井修一：VX2癌微細構造への衝撃波の影響. 平成4年度衝撃波シンポジウム講演論文集, p. 635—638, 1993.

（1993年　3月1日受理, 特別掲載）

2．兎腎癌モデルにおける桃核承気湯の肺転移抑制効果についての検討

宮城がんセンター泌尿器科　桑原　正明
東北大学泌尿器科　高橋　とし子

はじめに

これから述べることは，今日のタイトル名である漢方研究会という会議に，あるいはふさわしくない内容かもしれないが，漢方方剤を使ったということで発表させていただきたいと思う。今回発表する内容は，癌の転移に漢方剤が効くかどうかという極めて単純で，きわめて明解なテーゼである。

今回選んだ桃核承気湯という薬は，思いつきでやったのではなく，実はこれをやろうと思ったバックグラウンドがある。昨年の11月頃だったと思うが，NHK，あるいは衛星放送で，漢方方剤，すなわちこの桃核承気湯が癌の転移を抑制する[1]というニュースが世界中に流れた。これは非常な反響を呼び，日本では全部がみているわけでもないし，それほど関心を集めたわけではないが，むしろ外国の方で関心を持たれて，アメリカで漢方方剤の制癌効果について研究されている方が特に興味を示したわけである。

私どもは以前から腎癌の自然転移モデルを作りたいと思って研究を進めていた。何とかモデルができるというところまでこぎつけた頃にそういうニュースがあったので，まず漢方方剤の効果について検討してみたわけである。

腎癌の肺転移モデルというのは，いろいろ実験的には試みられているが，最適モデルというものは，残念ながら今のところはないといってもいいと思われる。癌学会とか，泌尿器科領域であると腎癌，膀胱癌の研究者の間で行われている肺転移モデルは，浮遊癌細胞を直接静脈内に注射するという方法である。そうすると，癌細胞は循環系に乗って肺に転移するわけであるが，そういうモデルで検討しているのが現状である。　このモデルは静脈内に直接腫瘍細胞を入れるため，自然転移というには当たらないモデルである。

Ⅰ．方法と結果

今回私どもは日本シロウサギを用い，腫瘍細胞としては，ウサギに代々植え継がれているVX2[2]という腫瘍細胞を用いた。このVX2腫瘍細胞というのは，現在，pathologicalにはanaplastic carcinomaということになっている。腎がoriginではないので，その点に問題はあるが，非常に転移しやすいという特徴がある。

最初我々はVX2腫瘍浮遊細胞をウサギの腎被膜下に注射していたが，被膜下に注意して浮遊細胞を注射しても，やはり静脈注射と同じような結果になってしまうというデータが出た。これでは使いものにならないので，何とか自然転移に近いものを作ろうということで，その次にはVX2の腫瘍塊の一部を1㎜×2㎜ぐらい取ってきて，それを腎被膜下に植えてみた。少し離れた場所で腎被膜を切開して，そこからそっと腫瘍を腎被膜下に置いてくる方法である。

腫瘍塊を植えた直後に動物を脊殺して，移植がどういう状態にあるかを病理組織学的に検討してみると，腎被膜下で正常の腎実質と腫瘍の間はきれいに境されており，少なくともartificalに腎実質を損傷しているという所見はなく，このことから植えた直後に腫瘍塊がばらばらになって血中に入るという所見はないという結果であった。

表1にcontrol groupの実験プロトコールを示す。また，実験群のプロトコールを表2に示す。まずグループ1，2，3と分けた。腫瘍の移植をここではtumor tissue inoculation(TTI)と記す。day 0にそれぞれtumor tissue inoculationをして，これには11羽，10羽，5羽，それぞれ使った。グループ1では，tumor tissue inoculationをして，day 2に植えた腎臓をnephrectomyした。この後，動物は単腎で生きてきているわけである。そしてday 21にsacrificeした。グループ2はtumor tissue inoculationしてday 4にnephrectomyして21日にsacrificeした。グ

表1．experimental protocol—control group—

	day 0	day 2	day 4	day 7	day 21
control group :					
group 1 (n=11)	TTI	NX	—	—	sacrificed
group 2 (n=10)	TTI	—	NX	—	sacrificed
group 3 (n=5)	TTI	—	—	NX	scrificed

TTI ; tumor-tissue inoculation (a 2×1×1mm of VX2 tumor-tissue was inoculated to the left renal subcapsular space.
NX ; nephrectomy of the tumor-tissue inoculated kidney.

表2．experimental protocol—tumura No. 61—

	day -1 0 1 2 3 4 --------7--------21			
roup 1 (n=5)	TTI	-	NX	sacrificed
TM.61(p.o) 375mg/day	+ + + + + +	+ + + + + + + + + + + + + + + + + +		

TTI ; tumor-tissue inoculation (a 2×1×1mm of VX2 tumor-tissue was inoculated to the left renal subcapsular space.
NX ; nephrectomy of the tumor-tissue inoculated kidney.
TM ; Tsumura No. 61. p.o. ; peroral administration (ad lib drinking of a water solution).

ループ3はday 0にtumor tissue inoculationしてday 7にnephrectomyして21日にsacrificeした。こういうプロトコールを組んで，sacrificeした時点で肺の転移がどうなっているかということをみてみたわけである。

話が前後するが，まず移植腫瘍の腎被膜下における自然発育状態を検討すると，day 2になって腫瘍は増大してくる。day 4だと更に大きくなって，day 7になると，5mm前後の大きさになる。このVX2という腫瘍は非常にcentral necrosisを作りやすい腫瘍で，その特徴が良く表れている。当初は移植腫瘍塊全体にtumor cellがあったと思われるが，day 2の標本でみると腎実質と組織液が接している部分に限って腫瘍細胞が増殖してくる。腫瘍の中心部はnecrosisになってくる。Day 7になると腫瘍は増大するものの中心部は液体を満たすような状態でcentral necrosisになってきた。こうした変化がこの腫瘍の自然経過なわけである。

コントロール群の肺転移の結果を表3左に示す。まず

表3．lung metastasis on day 21

	control group	Tsumura No.61 group
group 1 (Nx on day 2)	0/11(0%)	—
group 2 (Nx on day 4)	2/10(20%)	—
group 3 (Nx on day 7)	5/5 (100%)	5/5(100%)

NX ; nephrectomy of the tumor-tissue inoculated kidney.

day 2でnephrectomyし，21日でsacrificeしたグループ1の肺転移をみると，11羽のうち1羽も転移は見られなかった。これは肉眼的にみられないということに加えて，肺の2切片のスライスを作ってミクロで検討したのであるが，それでも転移は認められなかった。TTI 4日後にnephrectomyしたグループ2では10羽のうち2羽に転移がみられた。

ただ，腫瘍の付きの悪いものには肺転移は出現せず，付きのいいものに出ているということが多少問題になる。これはどういうことかというと，腎被膜下に植えた腫瘍のサイズが転移を起こす起こさないというのに関係している可能性を示している。この点については定量的に分析していないので，詳しいことはまだわからないが，そういう可能性があるということである。

Day 7でnephrectomyしたグループ3では全例に転移が起こっていた。少なくともこのモデルでみる限り，2日後にnephrectomyしたものでは肺転移は出ない，7日目では全例に出る。4日目だと20%ぐらいということになる。こうしたことから，植えて少なくとも2日目までは自然肺転移は起こらず，肺転移を起こすのは3日以降であろうという結論になったわけである。

それで本題に入るわけだが，ここで前の桃核承気湯が肺転移を抑制するというリポート[1]を参考にして，漢方方剤の投与法および投与量をきめた。そのリポートでは桃核承気湯を水に溶かして自然摂取させている。その量を参考にして実験群に与えてみた。

実際にはtumor tissue inoculationする前の日から，市販のツムラ桃核承気湯を経口摂取375mg/dayで投与した。これは飲水量をチェックして，だいたいこのぐらい飲むということから方剤の濃度を決め，実験前日からsacrificeするまで継続して飲ませた。実験群ではday 0で

tumor tissue inoculationをして，day 7でnephrectomyした。Controlの場合にはday 7では転移が100％起こるのがわかっているので，もしday 7で腎摘した実験群で転移が起こる個数が少ないとか，あるいは起こらないということになれば，このモデルにおいては桃核承気湯が転移に対して抑制的に作用するといえると思われる。

実験群の結果は表3右に示す。5羽しか実験しなかったのであるが，100％転移が起こっていた。これだけの実験で桃核承気湯が全く影響がないかどうか，転移を阻止するような作用があるかないかということを断言するのは非常にリスクがあると思うが，少なくとも桃核承気湯がドラマティックに癌の転移を抑制するという結果は得られなかった。

質疑応答

座長　ありがとうございました。それでは質問をお願いいたします。

羽鳥(整形外科)　幾つか教えていただきたいと思います。というのは，私もちょっと骨肉腫の肺転移モデルを作って，先生と同じような方法で評価しようかと思っているところですが，それで幾つか教えていただきたいのです。まず，肺転移のモデル法で，先生の場合は特に腎癌の肺転移をみようということで大分ご苦労なさったようですが，被膜下に植える時に1㎜で植えるというのは，聞き逃したのかもしれませんが，切って植えているのですか，それとも注射器などで入れるのですか。

桑原　ちょっと触れたのですが，実はこれにはコツがありまして，これをやるのに半年ぐらいかかったのです。そう簡単に教えたくないような感じで(笑)，後で教えます。注射するのはだめなのです。ピンセットで入れるだけでも，腎実質層を傷つけてしまいまして，ある道具を使うです。

羽鳥　トロッカーみたいなものですか。

桑原　まあそんなものです(笑)。

羽鳥　それから飲料水について，マウスの場合，やるのはどうしようかと思って，経口でチューブでやろうかと思っていますが，実際は今の状態を考えるとなかなか毎日やるのは大変で，飲料水というのはいい方法かと思いますが，その場合1つ躊躇するのは，controlと漢方薬入りの時に，ウサギが飲む量を少し控えてしまうとか，そういう傾向はないのでしょうか。

桑原　最初の1日ぐらいは多少飲み方が少ないです。でも，やはり背に腹は替えられなくて飲むようです。実は予備実験として5日間ぐらい毎日飲む量をチェックしました。多少飲み方も個別差があります。でも，数を増やせばだいたい平均されてきますので，1週間の平均をとって，だいたいこのくらい飲むということを押さえてからやりました。でも，厳密にいうと経口摂取の場合には，栄養チューブといいますか，チューブでやっているのがオーソドックスですが，とてもそこまで臨床をやりながらできません。これで勘弁してもらうしかありません。多少の誤差はあっても，そう大きな狂いはないと思います。

羽鳥　その時は，飲料水を事前によくチェックしておくということですね。

桑原　そうです。事前に5日前ぐらいはどのぐらい飲むかということをチェックする必要があります。

羽鳥　あと，肺転移が一番難しいところだと思われる評価方法ですが，実際マウスなどの場合では多発転移を作ってくるらしいです。今回のウサギもそういうようですが，果たして多発の転移の像が見られた時に，抑制があったかないかというのをみる時，いろいろ難しいと思います。一つには肺の重量を測るとか，先生がやっていらっしゃるような肺の表面の，大変でしょうが，転移の数を全部数えるとか，それでも中の方の転移の状態はわからないわけで，その辺，先生のご意見，どういう形にしたら，あった，なかったではなくて，実際の肺転移のvolumeはどうだったとかいうところまでいった時の，一番scientificな肺転移の評価法でご意見あったら教えてください。

桑原　肺転移の定量というのは実は非常に難しい問題で，はっきりしたオーソドックスな方法というのはまだないと思います。ただ，ラットとかマウス，ああいう小動物に関しては，ルーペでも何でもいいのですが，だいたい肉眼的で，表面の数を数えてそれを定量しているというのが一般的です。

羽鳥　結節中ですね。

桑原　表面のです。私もこの実験をやるまで知らなかったのですが，驚いたことに，そういうやり方を行っている人は，切片を作ってはみていないのです。肉眼的に教えているだけです。私も驚いて，そんなのでいいですか，中を切ったときのものと表面の数というのはちゃんと合うのか，要するにコーリレートするというデータがあるのですかということを聞いたのですが，そういう

データはないけれども，traditionalにそういうことで評価しているというのが現状だし，それで欧米の論文などもアクセプトされるということでした。ただ，ラビットとかドッグになると，正直のところわかりません。少なくとも先生がおやりになっているマウスでしたら，ルーペで表面の転移巣の数を数えるだけで定量的に評価しているのが現状ですし，それ以外の方法は今のところないのではないかと思います。

羽鳥　あと，漢方薬の投与法ですが，投与の前の1日目からお使いになったかと思いますが，薬のメカニズムは私はよくわかりませんが，一番効果的だと思える，そうなると予防投与になってしまうと思いますが，もう少し前からやっていたらどうだったのかとか，その後でやったらどうだとか，実際に肺転移が成立してからではだめなわけで，先生の方法だと肺転移が成立する前に漢方薬の効果が出ているのではないかと思うのですが，例えばどの辺までやるかとか，先生は21日間としたわけですが，どうして21日間としたかとか，その辺をちょっと——。

桑原　前の日からやったのは，先ほどいいましたように，最初に普通の水から味が変わると飲み方が変わってきます。それで1日おいたということと，少なくとも予防効果も含めて，トータルでとにかく肺転移が抑えられるという結果が出ればと思ったので，こういう組み方をしました。それから21日でみたということは，ウサギはあと1週間でだいたい死にます。21日で転移が評価できると考えたからです。もっと早くですと，おそらくmicroscopic levelになってしまって，一つ一つコロニーと考えて——そういう考えはいいのかどうかわかりませんが，そういうことで勘定するのは難しいと思います。

羽鳥　今回桃核承気湯を使ったのは，文献的にもどういう機序で肺転移抑制効果とかがあるのでしょうか。というのは，他の文献によっては十全大補湯とか，小柴胡湯などの方が免疫力という点では結構effectiveなのではないかというデータもあるかと思います。

桑原　今までの漢方剤が癌に効くというのは，西洋医学的に，どこかに作用して単独で効くというリポートよりも，免疫力を上げるとか，間接的にそれに効くというリポートが大部分だと思います。ただ，なぜこの桃核承気湯を選んだかということについては，最初に述べましたように，なぜ効くかということよりも，とにかく効くというデータが世界中に出回りまして，非常にショッキングなリポートが発表されたことによります。これがどう効くかというのは，前の演題で発表がありました福士先生がおやりになったような形で攻める必要があると思います。トータルとして効かなかったので，私はそれ以上やるファイトをなくしてしまったのが本音です。先生がおっしゃるように，なぜ今回のような投与法にしたかということについては問題が残っていると思います。例えばtumor tissueを植える1ヵ月前から飲ませたらどうだとか，いろいろな詰めはあると思いますが，私もそんなに長生きできませんから，勘弁してください。

座長　時間ですが，ちょっと聞きたいのですが，量は本当によかったのかということです。どのぐらいですか。

桑原　ウサギが2,500 g ぐらいですから，先の発表ではマウスに1 g/ℓで自由摂取させたというデータです。これはウサギの1日摂水量を300 mℓとすると，1.25 g/ℓぐらいになると思います。

座長　我々の実験でも，もっと多くないと効果が出てきません。

桑原　このリポートは，それで効果が出たというリポートです。

座長　もう少し増やしてみるといいと思います。

桑原　そう思います。

座長　どうも興味ある報告をありがとうございました。

文献

1) 武藤　博，石橋正彦，広島健三，他：Luis肺癌の肺転移に及ぼす桃核承気湯の効果．肺癌 32：701，1992
2) Kidd JG, Rous PA：Transplantable rabbit carcinoma originating in a virus-indused papilloma and containing the virus in masked or altered form. J Exp Med 71：813-838，1940

テーマ　痛み―日常臨床に役立つQ&A―

Q 癌性疼痛管理に内科医はどのように参加できますか？

A 山室　誠[1)]
日下　潔[2)]
1) 宮城県立がんセンター麻酔科
2) NTT東北病院麻酔科

結論から言えば，癌性疼痛の治療は内科医を含めて癌の治療を行うすべての医者にとっては必要欠くべからざる医療技術の1つである．特にWHO方式の治療法は，内科医の最も得意とする経口投与を主体とした疼痛治療法であるが，本邦では十分に普及しているとは言えない．その理由としてWHOの治療指針によって最小限の副作用で期待した鎮痛を得るには，相応の知識と習熟も大切だが，それ以上に薬剤の効果と副作用を詳細に観察して，その結果を頻回にフィード・バックさせる必要があるからである．逆にこの点が上手くできれば，極めて有効な鎮痛法と言える．それは，欧米では常勤医のいない看護婦のみのホスピスでも本法による疼痛治療が普及していることからも推察できる．しかし，一人で多くの患者の主治医である内科医にとって鎮痛薬投与後の細やかな観察と配慮が不可欠となると，ただでさえ多忙な内科医には負担となるだけである．

筆者は手術室の麻酔業務を維持しながら，ペインクリニック医としても（少数ではあるが癌患者の主治医として），神経ブロック療法にオピオイドを併用してきて，最近ようやくコツらしきものを理解できたように思われるので以下に述べる．

■疼痛治療から見たWHO方式の利点■

1) 段階的な鎮痛薬の使用法

オピオイドを投与するにあたって医者は，ソムリエが酒と顧客に対するように，オピオイドに対する知識と患者への配慮が必要である．なぜならオピオイドの効果はお酒に似て，個人差が大きいのはもちろん，同じ患者でも体調によっても効果や副作用が異なるからである．

顧客が初めての飲酒で快く酔うために，ソムリエは弱いお酒から始めて，様子を観察しながら徐々に強いお酒を勧めるだろう．同時に食事の方法や飲用の速度など細やかな指導も必要となる．

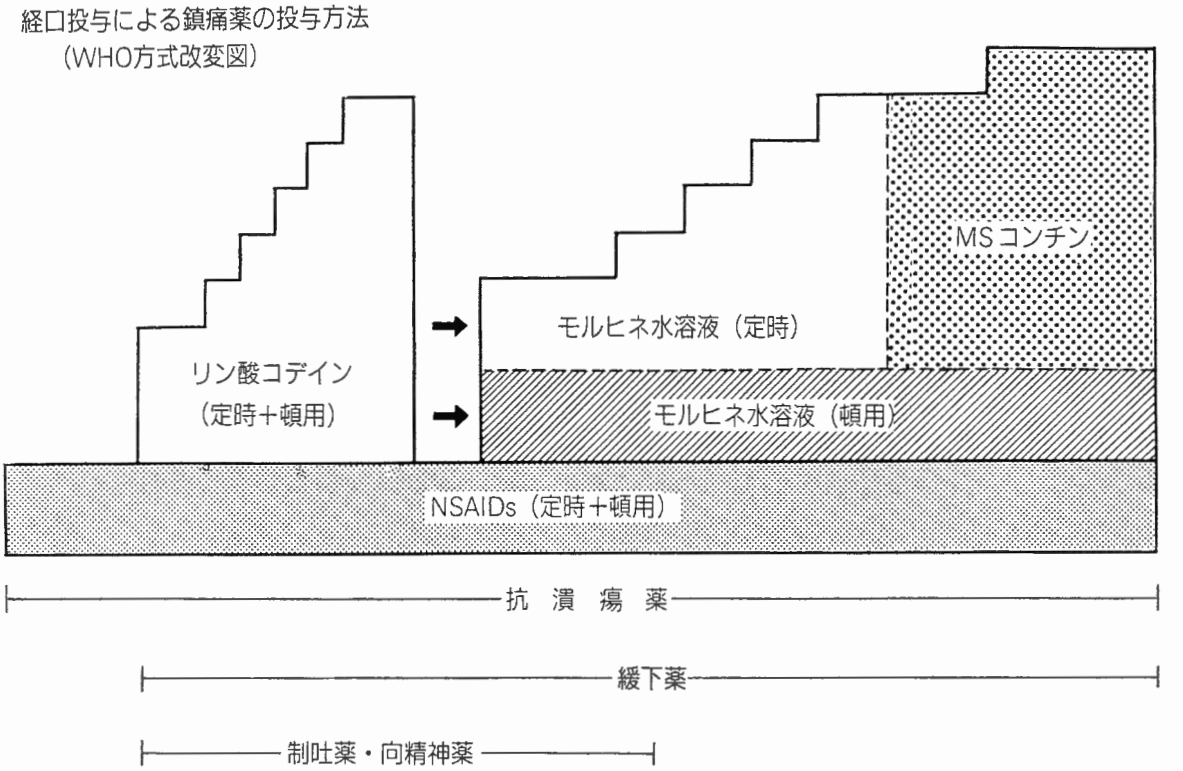
同じようにオピオイドの使用に慣れるまでは，医者もリン酸コデインから開始してモルヒネ水溶液（粉末）に移行し，鎮痛効果と副作用を注意深く観察しながら至適量を決めてから，MSコンチンに移行させると言う段階的投与方法を厳守すべきである．

☞麻薬拮抗性鎮痛薬は原則として使用しない．

いずれモルヒネ投与に移行せざるを得ない癌性疼痛には，鎮痛効果やモルヒネとの効力比が個人によって異なる薬剤を使用するのは混乱の基である．

2) 定時的な鎮痛薬の投与

鎮痛に必要な血中濃度を一定に維持する



†① 間歇的投与のNSAIDsを定時投与＋疼痛時頓用投与とする.
② NSAIDsに加えてリン酸コデインを投与し，至適量まで増量する（<300 mg/日）.
③ リン酸コデインの1/6量のモルヒネ水溶液（粉末）に切り替え，至適量まで増量する．至適量が決まった後，MSコンチンに移行する.
MSコンチン移行後も，頓用投与は吸収の早いモルヒネ水溶液を用い，使用回数に応じて定時投与量を増やす.
④ 抗副作用薬は，鎮痛薬開始時から併用（消失する症状に対しての薬剤は中止）.

図1 WHO癌性疼痛治療法改変図

ことがWHO方式の利点であるから，疼痛の有無に関係なく鎮痛薬が投与されなければならない．従来の「疼痛時に使用するのが鎮痛薬」と言う固定概念が医療者にもあるが，患者への服薬指導でも痛みの有無に関係なく定時服用することを理解・実行させるのが最も難しい.

3) 作用機序の異なる鎮痛薬の併用

発痛物質の合成阻害による鎮痛作用を持つNSAIDsと中枢神経系の受容器に作用して鎮痛をもたらすオピオイドとの併用により，相加的ときには相乗的な鎮痛効果が期待できる．そして，この鎮痛効果の増幅が副作用の減少に直結する.

これらの利点を基にWHO方式を改変すると図1のようになると考えられる.

■疼痛治療の実施方法■

(1) 癌性疼痛と考えられたら，まず鎮痛を優先して検査は鎮痛後に行う.

(2) 基本（定時）投与と頓用投与を指標として至適投与量を決定する（図1）.

リン酸コデイン150 mg/日（粉末）あるいはモルヒネ30 mg/日（水溶液あるいは粉末）を初回定時投与量（表1）として4時間毎に，痛みの有無にかかわらず，定時に1日量の

表 1　オピオイドの初回処方例（定時投与分）

薬剤名		1回量	1日量
麻薬	リン酸コデイン（10倍散）	250 mg	1,500 mg
	モルヒネ（原末 or 水溶液）	5 mg	30 mg
① アセトアミノフェン		300 mg	1,800 mg
② ドンペリドン（10 mg/g）		500 mg	3,000 mg
③ カ マ		250 mg	1,500 mg
計		1,300 mg	7,800 mg

†1 リン酸コデイン，モルヒネ粉末処方時には，①～③も混ぜて1包にする．
モルヒネ水溶液では，モルヒネとは別に①～③を1包にして処方する．
†2 ドンペリドン（制吐薬）は，2週間後に中止を検討．
カマ（緩下剤）は排便状態により増・減量あるいは他の緩下剤を追加．

1/6量を投与する（就寝前は2回分，1日量の1/3量を投与）．さらに疼痛時頓用投与の薬剤として，定時投与1回量のオピオイド（＝1日量の1/6）を1回投与量として3回分とNSAIDsの坐薬3回分を別に処方して与えておく．そして疼痛発現時には（投与間隔は2時間以上）オピオイドとNSAIDsの坐薬を交互に用いる．

3日間の定時投与量と頓用投与量の平均量を，次回の定時投与量とする（副作用が強い場合には投与回数・方法は変えずに，次回投与量を3/4に減少させる）．

(3)　投与経路は症例により，時期により自由に選択・変更する．

経口投与から開始するのが一般的で，かつ最も良いと考えられている．しかし痛みの強さ・症例の状態ならびに副作用・鎮痛効果に応じて，持続皮下注入・静注あるいは硬膜外腔投与など最も良い投与経路を選択すべきである．

(4)　副作用対策は予防的に行い，発現した副作用に対しては可能な限り対症的に行いオピオイドの減量は最終的な手段とする．

オピオイドの投与と同時に，最も発生しやすい吐き気・便秘に対する薬剤とNSAIDsの胃粘膜障害に対するH_2-ブロッカーを投与する（図1，表1）．

吐き気・眠気・軽度の混乱などはオピオイドに慣れる（2週間前後）と消失するので，状態をみて対症薬剤を減量・中止する．便秘はオピオイドを用いる限り続くので，必ず定期的な排便を維持できるように緩下剤を増量・継続させる．

(5)　患者・看護婦による鎮痛効果と副作用のチェックを参考に，投与量・方法を修正専用のチェック用紙を用意して，疼痛・睡眠・食欲・気分などとともに吐き気・排便などの状態を患者および看護婦に別個に記入させる．投与開始（増量）から安定するまでの期間は，可能なら1時間毎に（安定後も6～8時間毎）チェックし，これらの用紙の結果を基に鎮痛薬や対症薬の投与を（カンファランスにて），適時にかつ細やかに修正（titration）する．

☞多忙な内科医にとって最も難しい仕事だが，痛みを持つ患者自身の実感とそれに付き合う看護婦の観察というフィードバックなしに疼痛治療は不可能である．したがって患者の意見の掌握とそのために看護婦の協力を得られる体制を作ることが鍵となる（欧

米では看護婦のみのホスピスでも鎮痛医療が成功している).

(6) ペインクリニックへの相談・依頼

局在性の痛み（他に痛みがあっても，特に痛みが強い部位がある場合も含む）では，リン酸コデインでコントロールが難しくなってきた時期が望ましい．それ以外の痛みでは，モルヒネ 50 mg/日を超えても鎮痛不十分な場合にはペインクリニックへ相談して欲しい．

いる時に、拠り所としてきたもの、あるいはもっとも気にかけていた多くのものが、終末期になり死を意識するようになると無価値になってしまい、それまでは無価値あるいはマイナスとさえ思われるような事柄が、逆に人生ではかけがえのない大切なことに変換する（Paradox in terminal stage）という実体験と考えられる。

したがって、「終末期のパラドックス」なる価値観の逆転を身をもって体験した患者自身が、ターミナル・ケアのスタッフとして直接関わることがもっとも良いのかもしれないが（一部のホスピスではがん患者の講演会なども試みられている）、現状では、患者の著書や遺族の話から間接的に知るだけである。

感覚の受容から発想の転換へ

『死の瞬間』を書いたキュブラー・ロスは、疑惑から受容に至るがん患者の心理過程と全く同じ経過を、目が見える人が失明する時にも体験すると報告している。そこで、宮城県立盲学校の鍼灸科の先生にターミナル・ケアへの参加を依頼した。なぜなら、がん患者と同じ貴重な心理体験を持ち、しかも東洋医学の担い手としてもターミナル・ケアに関与できる人材として、盲人の鍼灸師が最適任者と考えたからである。

がん患者の重苦しい痛みやしびれ感などに対する鍼灸の治療効果は、国立がんセンターの麻酔科から報告されているが、盲学校の先生の治療はそれを上回るように思われた。その理由のほとんどは、彼らの熱意と技術によると考えられるが、患者さんたちが私や看護婦には話さなかった大事な話をするなど、盲学校の先生を歓迎し、彼らに心を開いてくれたのも事実である。

武田鉄矢氏の『贈る言葉』の中に「人は悲しみが多い程、人にはやさしく出来る」とあるが、患者さんが盲学校の先生に感じたのは、悲しみを経たやさしさだったように思える。しかも、この「悲しみ」は、山上の垂訓にある「悲しんでいるものは幸いである」という逆説的な悲しさと通ずるものではなかろうか？

「終末期のパラドックス」を、この「悲しみを経たやさしさ」を基にして「ターミナル・ケアのパラドックス」として医療に組み込むことが、患者のQOLを高めることに繋がるのではないだろうか？

私は、がん性疼痛の治療技術が発展・普及して痛みが軽減すれば、がん患者の終末期はもっと改善されると信じていた。しかし、終末期医療における疼痛の治療にも発想の転換が必要だった。緩和ケア病棟・在宅医療など体制上の改善とともに、患者のQOLの向上を掲げるなら、身体障害者に終末期医療の有資格者としてスタッフに加わってもらうことが、ターミナル・ケアの必要条件となると考えている。

（やまむろ・まこと／宮城県立がんセンター麻酔科）

終末期がん患者の疼痛治療とQOL

山室　誠

疼痛治療の発展と実情

ペインクリニック医として二〇年前からがん性疼痛の治療を行って来たが、近年神経ブロック療法に、WHOのがん性疼痛治療法を併用することによって、治療成績は著しく向上した。

しかし終末期（死亡約三～四週間前）に限定すると、十分な除痛が得られている症例は、残念ながら四〇％以下とかなり少ないのが実情である。

一方、必ずしも鎮痛医療の専門家とはいえない医師によって行われているホスピス・緩和ケア病棟、あるいは在宅治療の患者は、終末期でも痛みが少なく、痛みの治療成績も良い（これらの患者は、Total pain careすなわち身体的な痛みの治療のみならず、精神的・社会的そして場合によっては宗教的なケアも受けている）。

医療技術の尺度

このような結果については多くの考え方があると思われるが、私は以下のように判断している。死を間近に控えた終末期の患者の痛みには、「がん性疼痛の管理」に基づく治療では（技術的にはいかに優れた方法であっても）歯が立たないのではないだろうか？　逆に鎮痛医療技術としては必ずしも高度ではなくとも、「がん患者の持つ痛みの治療」を基盤とする医療では、高い除痛効果を示すと考えられる。

痛みの治療方法という単純な技術論においても、より高度な先進医療ではなく、いわば手作り医療の方が有効であるという具合に、終末期の医療には発想の転換が必要となる。

Paradox in terminal stage

「仙台ターミナル・ケアを考える会」の集まりで、家族（遺族）、ときにはがん患者自身の話を聞く機会が多いが、彼らは異口同音に「どんな偉い先生の貴重な話よりも、同じ想いをした仲間の一言の方がはるかに心に浸透する」と言う。ここで言う同じ想いとは、同病相哀れむという単純なものではなく、価値観の逆転を経験することのようである。

それは、健康で普通の社会で生きて

シンポジウム

癌疼痛治療の諸問題の解決に向けて

地域における「ターミナル・ケアの会」の現況と将来

山室 誠* 日下 潔*

癌終末期の在り方は単に医療の問題ではないという考え方から，宗教家・福祉関係者および一般市民など非医療従事者を含めたターミナル・ケアの集りがある．全国的な組織として死の臨床研究会・医療と宗教を考える会・生と死のセミナーなどがある．それとは別に各地域でもターミナル・ケアの会が設立されている．

仙台では，著者が一杯飲みながらミッションスクールの校長を兼任している牧師に癌性疼痛について愚痴のようにして話したことが契機になり，クチコミにもかかわらず34名が集まって1988年8月23日に「ターミナル・ケアの会」の発起人会が開かれた．その後癌終末期の現状を学ぶ目的で医師あるいは看護婦を講師とする勉強会やシンポジウムを経て1989年1月に設立総会が開かれ，51名の参加者で「仙台ターミナル・ケアを考える会」として正式にスタートした．会の構成メンバーは医療関係者ばかりでなく宗教家・教育者・法律家・会社員・主婦など多岐にわたっている．

当面はターミナル・ケアの現況を学びながら，会としての具体的な行動を決めていくことにしたが，1991年6月に年数回の単発的な会合では活動不十分ということで会員を医療・家族・宗教・社会福祉の四つの部門に分け，各部門が毎月第1土曜日に仙台青年文化センターにて「生と死のセミナー」と題する研修会を定期的に開催するとともに，機関誌も(B4両面刷り一現在5号)定期的に発行することにした．そして本年9月に，①ホスピスの建設のための募金活動，②ターミナル・ケア現場の要請への対応，③講演会・部門研究会の開催，の三つを活動方針として掲げた．さらにこれまで年3,000円の会費のみで，会運営の事務的な仕事などはすべてボランティア活動で運営されていたが，年1万円会費で賛助会員を募り各方面に働きかけ，経済的基盤を固めることにした．

これまで行なわれた公開シンポジウム・講演会・研修会の内容を表1に示す．シンポジウムや講演会の出席者は80〜100名，研修会は30名前後である．しかし出席者のほとんどが看護婦で，肝腎の医師の参加が少ないことを憂慮して，副会長の当院院長が教授であった外科学教室の同窓会や医学部の同窓会ならびに市・県の医師会に依頼して生涯教育カリキュラムの指定を受けて，わざわざ医師向けセミナーと銘打って医師会館にて中川米造先生（滋賀医科大学教授）を招いて講演会を行なった(1990.9/7)．しかし医師の出席は26/150名だった．

本年9月12日に行なわれたシンポジウムと

*NTT東北病院麻酔科

表1

公開シンポジーム

89' 4/22	末期癌患者の看護－I	看護婦5名
6/27	末期癌患者の看護－II	患者家族・看護婦・医師
90'11/28	ターミナル・ケアと宗教	菅洞宗住職・天理教教会長・キリスト教牧師
92' 9/12	ターミナル・ケアを考える	医師・MSW・患者

講演会

90' 9/7	癌治療の進歩	NTT東北病院院長	葛西森夫
	治療としてのInfomed Consent	滋賀医科大学教授	中川米造
	（東北大学医学同窓会共催、仙台市・宮城県医師会後援）		
91' 6/29	癌の痛みの治療	埼玉がんセンター院長	武田文和
	（塩野義製薬と協賛）		
9/17	ホスピスについて	淀川キリスト教病院副院長	柏木哲夫
	（仙台癌治療研究会共催）		
11/16	看護婦によるターミナル・ケア	岩手看護短期大学教授	斉田トキ子
92' 1/17	精神的ケアと宗教的ケア	宮城教育大学教授・精神科医	宮腰　孝
		浄土宗・住職	樋口孝信
9/12	末期癌患者の苦痛は救える	国立がんセンター中央病院麻酔科部長	平賀一陽

研修会

88'10/25：「癌性疼痛の治療」、「病名と予後告知を受けた胃癌末期患者の看護」
89'11/28：「ヨーロッパのホスピス事情」
91' 6/1 ：第24回ペインクリニック学会公開講座を録音テープで
7/6 ：「家族の立場からのターミナル・ケアの経験について」
8/3 ：「ターミナル・ケアと宗教」－読書研修会
10/5 ：「若者と語ろう、生と死について」
3/7 ：1991.9/17、柏木先生講演ビデオ
92' 4/4 ：「ターミナル・ケアを経験した家族を囲んで」
5/30：「わたしの死生観」
7/4 ：「東海大学事件における尊厳死について」

講演会には，本会開始以来最高の356名の参加者があったが，医師はわずか23名であった．それでも本会への出席を契機にモルヒネを購入した医師から投与法についての問い合わせがあったり，看護婦の強い要請でモルヒネの投与が行なわれるようになったという報告もあり，微力ながらも医師に対する癌性疼痛治療の啓蒙に寄与していると考えられる．また患者家族あるいは患者から，医療に対する批判や希望などを直接聞けるのは医療従事者にとっては有意義との意見もあり，間接的には臨床の現場にも影響を与えているとは思われる．さらに本会の役員に経済界や主婦の集会などでの講演依頼があり，デーケン先生の言われる「死の準備教育」には尽力していると思われる．

しかし会の主力メンバーである看護婦からは，研修会や講演会ばかりで具体的な行動がなく，臨床現場の実情や要請とは解離しているという不満が多く，現状のままでは会の存在意義自体が問われることになる．

これまでの臨床に直結した具体的な行動としては，会のメンバーを通じて病院の紹介あるいは転院した患者が5名（疼痛管理不十分な患者3名が当科に紹介入院），逆に退院後の診療を依頼したのが4名（当科からは2名）であった．患者家族からの悩みを訴える電話は多かったが，医療相談など専門的な知識を必要とした手紙あるいは電話での応対は6名であった．また

表2

「医療と宗教を考える会」の活動

1. いのちの山彦電話
   全国のボランティアによるスタッフが、癌終末期患者や家族の苦悩、不満、愚痴の聞き役（専門的なアドバイスはしない）として電話で応対する
2. 山鳩の手紙
   医師・看護婦・宗教家等の専門スタッフが癌終末期の患者や家族と手紙を通じて悩み・苦しみ・悲しみを分かち合い、励まし合いながら、質問に答える。
3. 生・死・超越のためのワークショップ
4. 福祉関連施設など運営研究会
   医療者と宗教家の協力による施設などの運営の研究会
5. ホームナーシング支援互助会
   住み慣れた地域で愛する家族ともに過ごせるように、有償・無償のボランティアによる援助を行なう。

1回／月：月例勉強会、1－2回／年：全国規模のシンポジーム
機関誌「医療と宗教」の発行

宗教家の派遣要請が3例，遺言の件で弁護士の派遣が1例であった．

本会と同様の趣旨をもち，しかも歴史も古く規模も大きい「医療と宗教を教える会」では表2のように五つの具体的な活動を行なっている．第1は「いのちの山彦電話」といわれる「ターミナル・ケア110番」的な組織で，ボランティアによる電話受け付けである．仙台の会の事務局は医療機械店内に置いているが，実際に多数の患者家族から悩みの聞き役を求めて電話がかかっている．応対は医療機械店の主婦(会員)が行なっているが，対応しきれず組織化するようにという強い希望がある．秋田のターミナル・ケアの会は一人のカトリックの牧師のターミナル・ケアに関する電話相談からスタートしたことを考えれば，ぜひとも実現させたい活動の一つである．次に手紙によって専門家の意見を聞いたり相談を行なう部門として「山鳩の手紙」がある．これは今日からでも実現可能な活動だが，実際には手紙での相談はごく少数で，電話による悩みごと相談システムを土台として初めて有効に機能する活動と思われる．このほかターミナル・ケアの臨床に直結する実際的な行動としてワーク・ショップやボランティアの派遣，在宅医療への看護婦の派遣などが行なわれている．

仙台の会で現在検討中の案としては，Hospice minded care を行なっている病院で，入浴が癌患者に非常に喜ばれるのだが，多くの看護婦が必要で十分にできないという臨床現場の悩みに対して，福祉あるいは教育関係の学生を単位習得も兼ねてボランティアとして定期的かつ組織的な派遣の可能性についてである．さらに家族部門の会合を本会の定例会とは別に1回/月，家族集会のような形で開催して，同じ苦労を経験した互助会的な存在にすることがあげられている．

しかし，疼痛からの開放がなければ看護婦の

献身的なケアやボランティアの活動あるいは家族の会も十分な効果をあげることはできない．

したがって何よりも重要な課題は一人でも多くの医師がターミナル・ケアに関心をもち，癌性疼痛の治療だけは十分に行なえるようにすることである．そのためには実際に患者・家族の心底からの訴えを聞くのが最も近道と考えられるので，あらゆる機会を利用して，医師の参加を促す努力をすべきと考えられる．

これらの活動を通じて，一般病院での Hospice minded care そして開業医による在宅医療システムが普及してくれるのが望ましいが，実際にはかなりむずかしい．やはり終末期医療の現状を打開するには，仙台に一ヵ所でも良いから実践の場としてホスピス的治療を行なう病棟あるいは病院の建設が不可欠と考えられる．なぜなら知識としてだけではなく，このような病院（病棟）において実際に研修を行ない，あるいはボランティア活動を経験することによって，この会の会員が各病院あるいは地域におけるターミナル・ケアの担い手あるいは支援要員として成長することが期待されるからである．

これらのことを成し遂げるには会独自に地道な努力をすることも必要だが，まず地元の医師会と連携を図り，各病院に存在するターミナル・ケア研究会と協力体制を組み，そのうえでホスピス病棟（病院）建設のための資金の調達や経済・政界などへ働きかける必要があると考えられる．

さらに地域的な活動を続ける一方で，各地に存在する同様な会との連合組織の設立や既存の全国的組織の一支部としての活動も考慮すべきではないだろうか．

いずれにせよ，講演会と研修会しか行なわなかった「仙台ターミナル・ケアを考える会」であっても，これを4年間継続することによってわずかではあるが臨床の現場に直接関係する具体的な行動が出てきた．さらに知識の吸収だけでは飽き足らず，実際的な行動への欲求が会員のなかに自然に発生したことは，各地域のターミナル・ケアの会の活動は一見乾いた砂に水をかけるような努力ではあっても，将来的には癌終末期医療の改善に大きな希望を抱かせるものがあると思われる．

著者連絡先　山室　誠
〒981-12　名取市愛島塩手野田山 47-1
宮城県立がんセンター麻酔科

J. Jpn. Soc. Clin. Cytol. 32(6)：1037～1041, Nov., 1993

症　例

膵ラ島腫瘍4例の細胞所見

宮城県立がんセンター
大沼眞喜子　小野寺博義　武田鐵太郎　小室　邦子
村田　孝次　中村　克宏　松田　堯

悪性2例を含む4症例の膵ラ島腫瘍について割面擦過塗抹像を検討し，良・悪性および産生ホルモンにより細胞像に違いがあるか否かについて考察した．

症例1では，細胞は均一散在性，一部ロゼット様配列を示し，核は円ないし類円形，核長径平均8.77±1.07 μmであった．クロマチンは顆粒状，核小体は概して小さいものが1個認められた．細胞質に富み，核は偏在性であった．

症例2は，症例1と同様の細胞像だが，核長径は10.26±1.53 μmとやや大型の傾向があり，20 μmの大型核もみられた．

症例3は，細胞は散在性から集塊状で，核は類円形ないし紡錘形であり，核長径平均は9.89±2.00 μmであった．クロマチンは増量し，核小体は1～2個認められた．集塊形成細胞の細胞質はライトグリーンに淡染しているが，散在性のものは裸核状であった．

症例4は，症例3と同様の細胞像を呈したが，核長径10.63±2.33 μmとやや大きい傾向にあった．

今回のわれわれの検討の結果からは，細胞像のみでは良・悪性の鑑別は困難であった．また，産生ホルモンの違いによる細胞像の差も明瞭ではなかった．

Key words：Pancreas——Cytology——Islet cell tumor

I. はじめに

画像診断の発達により，膵ラ島腫瘍についても容易に診断ができるようになった．超音波映像下穿刺細胞診も実施されてはいるが，その細胞像に関する報告は少ない．一般に膵ラ島腫瘍では，腫瘍細胞の異型性，多形性も少ないとされている．われわれは4例の膵ラ島腫瘍を経験し，その摘出標本の擦過塗抹細胞像について検討したので報告する．

II. 症　例

検討した4症例の細胞像を表1に示した．以下，各症例について述べる．

症例1：49歳，女性．心窩部不快感を主訴として近医受診．Borrmann IV型の胃癌と診断され，治療のため当院を紹介された．入院後の胃内視鏡検査では，胃体上部から中部にかけて表面凹凸不整な隆起がみられ胃粘膜下腫瘍が疑われた．ERCPで主膵管の断裂が認められ，血管造影で背膵動脈と大膵動脈の領域に腫瘍血管と腫瘍濃染がみられた．また，肝右葉にも腫瘍

Cytology of islet cell tumor
Makiko ONUMA, C.T., C.M.I.A.C., Hiroyoshi ONODERA, M.D., Tetsutaro TAKEDA, M.D., F.I.A.C., Kuniko KOMURO, C.T., I.A.C., Takatsugi MURATA, C.T., I.A.C., Katsuhiro NAKAMURA, M.D., Takashi MATSUDA, M.D.
Miyagi Cancer Center
論文別刷請求先：〒981-12 宮城県名取市愛島塩手字野田山47の1　宮城県立がんセンター　大沼眞喜子
平成5年5月19日受付
平成5年9月3日受理

表 1

		症例 1	症例 2	症例 3	症例 4
年　齢		49 歳	71 歳	55 歳	78 歳
性　別		♀	♀	♀	♀
産生ホルモン		ガストリン	インスリン	なし	ソマトスタチン
良・悪性		悪性	良性	悪性	良性
細胞像	出現状態	ロゼット様配列	ロゼット様配列	散在～集塊	散在～集塊
	核　形	円形	円形	紡錘形	紡錘形
	核長径平均*	8.77±1.07	10.26±1.53	9.89±2.00	10.63±2.33
	核短径平均*	7.47±1.03	8.01±1.07	6.67±1.34	7.33±1.41
	クロマチン	顆粒状	顆粒状	顆粒状	顆粒状
	核小体	1 個	1 個	1～2 個	1～2 個
組織像		腺腔形成	腺腔形成～索状	胞巣状～索状	胞巣状

*：平均値±標準偏差（μm）

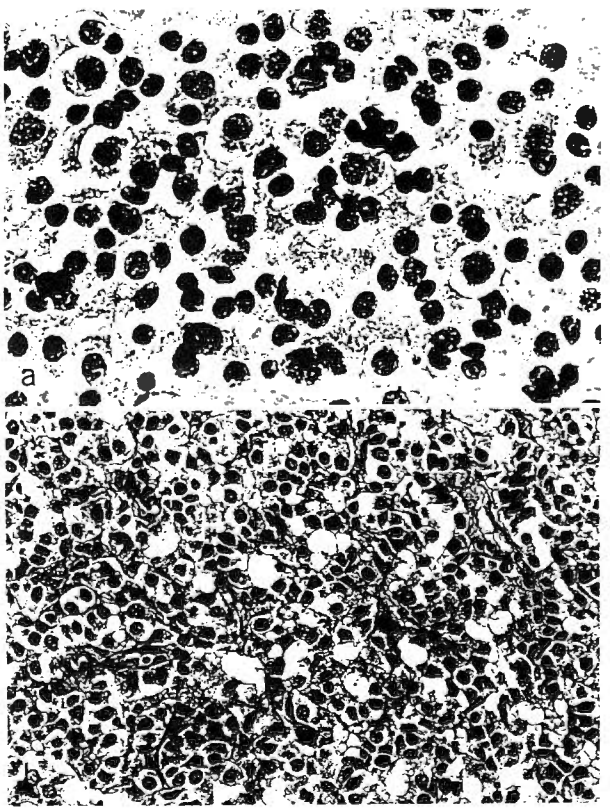


写真 1　a：細胞は均一で，ロゼット様配列もみられる（症例 1，Pap. 染色，対物 40 倍）
b：腺腔形成型（症例 1，H-E 染色，対物 20 倍）

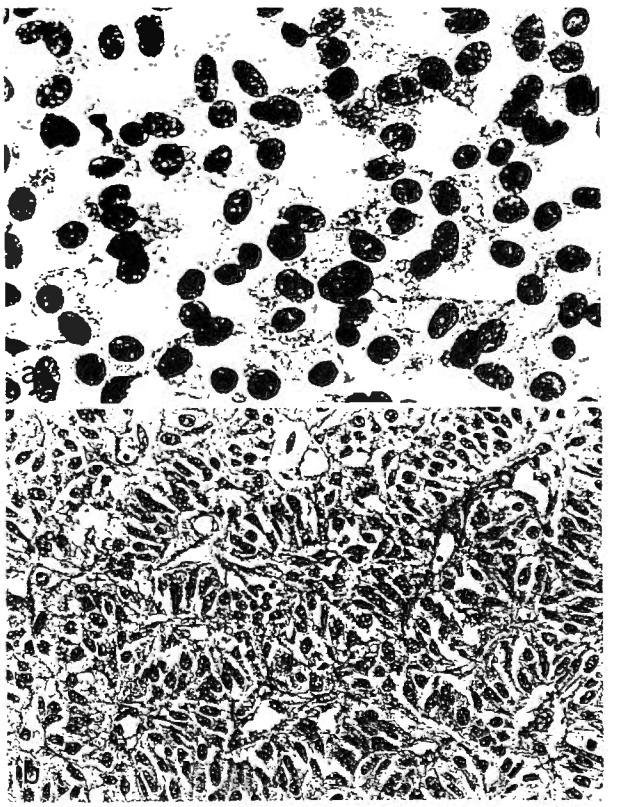


写真 2　a：ロゼット様配列を示し，一部に大型核もみられた（症例 2，Pap. 染色，対物 40 倍）
b：腺腔形成～索状型（症例 2，H-E 染色，対物 20 倍）

血管と腫瘍濃染が認められた．血中ガストリンが 700 pg/ml と高値で，臨床的には肝転移を伴う悪性膵ラ島腫瘍（Zollinger-Ellison syndrome）と考えられた．手術の結果，腫瘍は膵体尾部に位置し，周囲臓器への浸潤および肝転移がみとめられた．摘出標本の擦過塗抹細胞像（写真 1 a）では，細胞は均一で散在性，一部にロゼット様配列がみられた．核は小型で円形ないし類円形で，その核長径は 8.77±1.07 μm（平均値±標準偏差）で，核短径は 7.47±1.03 μm であった．クロマチンは顆粒状，核小体は概して小さいものが 1 個認められた．細胞質に富み，核は偏在性であった．病理組織所見（写真 1 b）では腺腔形成型の

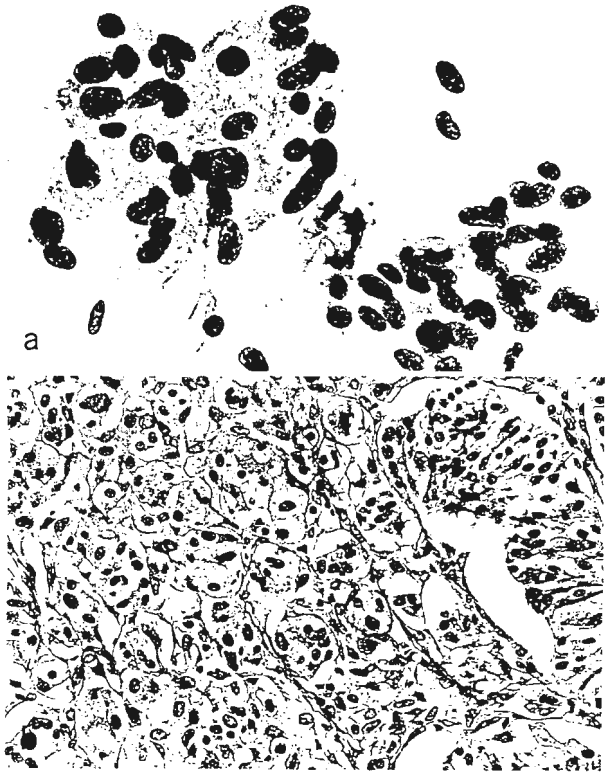


写真3　a：類円形～紡錘形核がみられる（症例3，Pap. 染色，対物40倍）
b：胞巣～索状型（症例3，H-E染色，対物20倍）

膵ラ島腫瘍であった．

症例2：71歳，男性．心窩部痛を主訴として来院．CTで膵体尾部に腫瘍が認められたため入院した．ERCPで主膵管は体部で断裂．血管造影にて膵体部に腫瘍血管と腫瘍濃染が認められた．血中インスリンが49.0 μU/m*l*と高値であった．インスリノーマと診断し，膵体尾部切除術を施行した．腫瘍は5×5×4 cmであった．摘出標本の擦過塗抹細胞像（写真2 a）は症例1とほぼ同じであり，核長径は10.26±1.53 μm，核短径は8.01±1.07 μmであった．また，20 μm程度の大型核もわずかにみられた．病理組織所見（写真2 b）では索状ないし腺腔形成型の膵ラ島腫瘍であった．また，congo red染色により，アミロイド沈着はみられなかった．

症例3：55歳，女性．蕁麻疹で近医受診したが，右上腹部に圧痛があったために超音波検査実施．膵頭部に直径5 cmの腫瘤を認めたために当院紹介となった．血管造影で膵頭部に腫瘍血管と腫瘍濃染がみられ，膵ラ島腫瘍と診断し，手術を実施した．手術で5×4×4 cmの腫瘍が摘出された．割面の擦過塗抹細

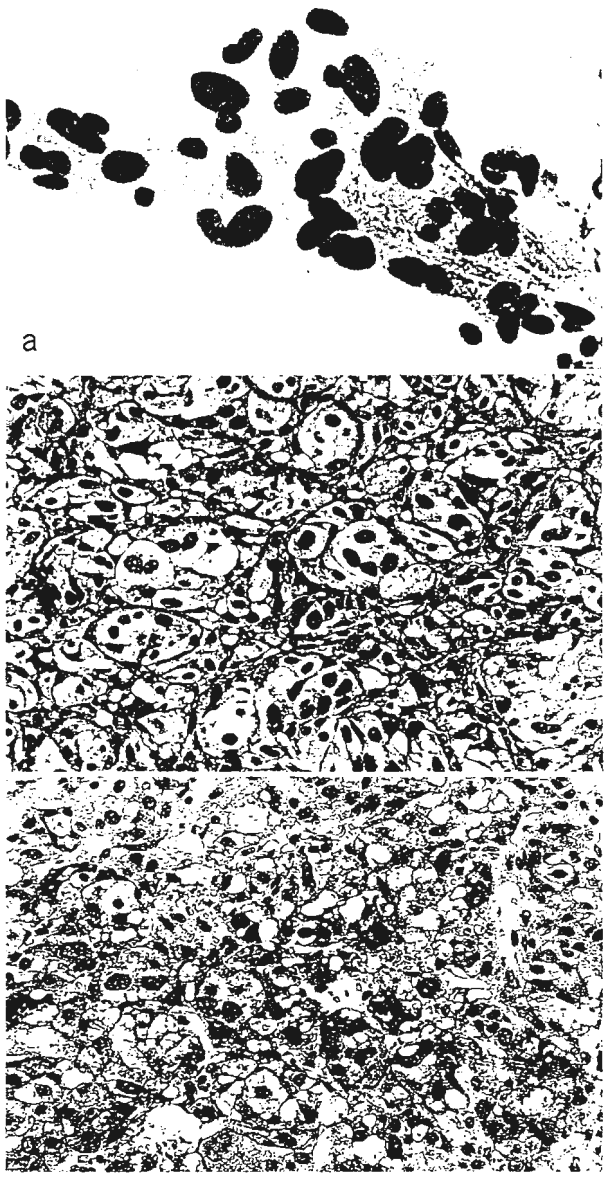


写真4　a：紡錘形核で，大小不同みられる（症例4，Pap. 染色，対物40倍）
b：胞巣型（症例4，H-E染色，対物20倍）
c：胞体内に陽性物質がみられる（症例4，ソマトスタチン免疫染色，対物20倍）

胞像（写真3 a）では，細胞は散在性から集塊状で，核は小型で類円形ないし紡錘形を呈し，核長径は9.89±2.00 μm，核短径は6.67±1.34 μmであった．小さな核小体が1～2個認められた．集塊形成細胞の細胞質はライトグリーンに淡染しているが，散在性のものは裸核状のものが多かった．病理組織所見（写真3 b）では，索状から胞巣状の膵ラ島腫瘍であり，血管内浸潤もみられ悪性と考えた．酵素抗体法ではpancreatic polypeptideが一部強陽性を示した．

症例4：78歳，女性．食欲不振，上腹部不快感を主訴として来院．超音波検査・CTにて膵頭部に直径2 cmの腫瘤を認め，血管造影にて膵頭部に腫瘍濃染がみられた．血中ソマトスタチンが16 pg/m*l*と高値であった．膵ラ島腫瘍と診断し，手術を実施した．2×2 cmの腫瘍が摘出され，割面の擦過塗抹細胞像（写真4 a）は，症例3とほぼ同じであった．核長径は10.63±2.33 μm，核短径は7.33±1.41 μmで，症例1と2に比較して核の大小不同が著明で，クロマチン増量もみられた．病理組織所見（写真4 b）では胞巣型の膵ラ島腫瘍であり，酵素抗体法でソマトスタチンとpancreatic polypeptideが一部強陽性，グルカゴン弱陽性であった（写真4 c）．

III. 考　　察

特異な症状が出現する機能性膵ラ島腫瘍，たとえばインスリノーマなどは比較的小さな時期に質的診断も可能である．一方，超音波検査などの画像診断の発達により，特異な症状を呈さない非機能性膵ラ島腫瘍も容易に存在診断が可能となった．非機能性腫瘍であってもcontrast enhancementを実施したCTスキャンで濃染した場合や，血管造影にて腫瘍濃染が認められた場合には膵ラ島腫瘍との診断は可能である．しかし，なかには画像診断で腺癌との鑑別が困難なこともあり，そのような症例で超音波映像下穿刺細胞診が有用であった症例も報告[1]されている．

腹部腫瘍に対する超音波映像下穿刺細胞診は確立された診断手技ではあるが，腹膜播種がしばしば報告[2]されている．特に膵は肝臓と異なり実質部分が薄いため播種の報告[3]が多く，われわれは膵腫瘍の穿刺は実施していない．しかし，竹中ら[1]は超音波映像下穿刺細胞診を実施し，膵ラ島腫瘍では円形核を有する一様な細胞が平面的集団または散在性に出現したと報告している．一方，三村ら[4]は腫瘍が膵頭部膵管に隣接して発生したためERCP時採取した膵液の細胞診で診断できたと報告している．

このように，症例によっては細胞診が膵腫瘍の鑑別に重要な役割を果たす場合もあると考えられる．Bell[5]は膵ラ島腫瘍の穿刺細胞診所見について，小さな円形または多角形の細胞で，円形ないし楕円形の核を有し，小型核小体がみられる，全体としてモノトーンな細胞であるとしている．Hsiuら[6]も同様な報告をしている．三枝ら[7]はインスリノーマ6例の細胞像について，腫瘍細胞は小型の卵円形ないし多角形で大小不同が少なく，なかにはロゼット様配列を示すものもあると報告している．また，悪性のインスリノーマでは散在傾向がみられたが，細胞異型は良性のものより少なく，細胞像のみでは良悪性の鑑別は困難であったとしている．ソマトスタチノーマでは紡錘形の核が主体で細胞異型が大きいとの報告[8]がある．また，工藤ら[9]はグルカゴノーマでは，円形ないし類円形の核を有する小型細胞が散在性あるいはシート状，一部ロゼット様にみられたと報告している．しかし，産生されるホルモンの違いによる細胞像の特徴，機能性・非機能性の違いによる細胞像の相違などについては報告例が少なく明確ではない．また，膵ラ島腫瘍の良性・悪性の鑑別は腫瘍細胞が血管内に浸潤しているか否か，あるいは臨床的な転移の有無によりなされており，この点と細胞の異型性との関連なども明確ではない．向井[10]は病理組織学的に組織構築から1）充実胞巣型，2）リボン型，3）ロゼットあるいは腺腔形成型の3型に分け，H-E染色による組織像からは，その腫瘍の機能的な性格を推定することはむずかしく，また，個々の症例において組織型のみから悪性度を判定するのは多くの場合不可能であると報告している．本論文の症例も産生ホルモンが異なるが，症例1と2は同じ細胞所見であり，症例3と4も同じであった．一方，症例1と3は臨床上悪性であった．すなわち，産生ホルモンによる細胞像の特徴，良性・悪性による細胞像の違いは見い出せなかった．しかし，従来の報告と同じようにインスリノーマは小型円形核主体で細胞異型が少なく，ソマトスタチノーマでは紡錘形核が主体で細胞異型が大きい傾向にあると思われた．今後，超音波映像下穿刺細胞診を実施する機会も多くなると思われ，症例を重ねて細胞像からみた産生ホルモンの推定や良性悪性の鑑別についてさらに検討し，確立する必要があろう．

Summary

We describe the cytologic features of touch smears in four histologically confirmed islet cell tumor cases.

In case 1, the smears contained uniform tumor cells in isolated, loose aggregates and occasional rosette like arrangements. The cells had eccentrically located round-to-oval nuclei with granular chromatin and a single small nucleolus. The mean maximal diameter of nuclei was 8.77±

1.07 μm. The cytoplasm was moderate in amount.

In case 2, the tumor cells were similar to those of case 1. The mean maximal diameter of nuclei was 10.26±1.53 μm.

In case 3, the smears contained isolated tumor cells and cohesive clusters of tumor cells. The cells had oval-to-spindle like hyerchromatic nuclei with one-to-two small nucleoli. The mean maximal diameter of nuclei was 9.89±2.00 μm. Although the cytoplasm of tumor cells which composed cohesive clusters was moderate in amount and stained light green, the isolated tumor cells had little cytoplasm.

In case 4, the tumor cells were similar to those of case 3. The mean maximal diameter of nuclei was 10.26±2.33 μm.

In our cases, the cytologic features did not reveal the malignancy of the tumor or hormone production.

文　献

1) 竹中明美・他：膵島細胞腫の超音波映像下穿刺吸引細胞診の検討，日臨細胞誌，30：904，1991.
2) Hiroyoshi Onodera, et al.：Cutaneous seeding of hepatocellular carcinoma after fine-needle aspiration biopsy, J Ultrasound Med, 6：273～275, 1987.
3) Rashleigh-Beicher, HJC, Russell, RCG, Lees, WR：Cutaneous seeding of pancreatic carcinoma by fine-needle aspiration biopsy, Br J Radiol, 59：182～186, 1986.
4) 三村明弘・他：膵液細胞診にてIslet cell tumorを考えたislet cell carcinomaの1例，日臨細胞誌，30：905，1991.
5) Bell, D.A.：Cytologic features of islet-cell tumors, Acta Cytol, 31：485～492, 1987.
6) Hsiu, J.G., et al.：Malignant islet-cell tumor of the pancreas diagnosed by fine needle aspiration biopsy, Acta Cytol, 29：576～579, 1985.
7) 三枝　圭・他：インスリノーマの細胞像とその病理組織学的背景—6症例の検討—，日臨細胞誌，29：457～462，1990.
8) 上野紀子・他：悪性ラ島腫瘍の1例，日臨細胞誌，28：279，1989.
9) 工藤浩史・他：Glucagnomaの1例，日臨細胞誌，28：80～84，1989.
10) 向井　清：膵内分泌腫瘍，胆と膵，9：1529～1540，1988.

職　員　名　簿

職　員　名　簿

平成６年３月31日現在

職名	氏名
総長	涌井　昭
【総務局】	
総務局長	吉田協一
総務局次長	佐々木勝典
【総務室】	
総務室長	鎌田幸男
総務室長補佐兼総務係長	村上利信
主査	坂本節子
主事	佐藤みゆき
〃	鈴木幸正
技師（運）	高橋正志
経理係主事	西條昇平
〃	太田匡美
〃	堀喜昭
【医事室】	
医事室長	高橋貞義
医事室長補佐兼医事係長	小野友和
主事	佐藤圭子
技師（庁務）	引地清次
〃	今野正男
非常勤嘱託	引地てる子
技術主幹栄養指導係長事務取扱	鹿又みゑ
技術主幹	遊佐ひでよ
技術主査	升田佳子

職名	氏名
【企画情報室】	
企画情報室長（兼）	佐々木勝典
企画情報室長補佐兼企画情報係長	相原正義
主査	吉岡宗子
主事	石川一利
非常勤嘱託	長谷川洋子
【病院】	
院長	庄司忠實
副院長	吉田弘一
〃	浅川洋
【医療局】	
医療局長	武田鐵太郎
医療部長	粉川嗣敏
〃	中野昇
〃	松田堯
〃	高橋通宏
〃	大内清昭
〃	桑原正明
〃	齋藤博之
〃	小田和浩一
主任医長	富澤信夫
〃	鈴木裕
〃	大方俊樹
〃	小野寺博義
〃	本島正
〃	小犬丸貞裕
〃	小池加保兒
〃	岡部健
〃	中村雍志

職名	氏名
主任医長	菅原　暢
〃	小野日出麿
〃	村上　享
〃	片倉隆一
〃	西條　茂
〃	山室　誠
〃	佐藤　智
医長	桑島一郎
〃	鵜飼克明
〃	菱沼民生
技師	萱場佳郎
〃	高橋　功
〃	岩渕　悟
〃	富永　剛
〃	藤谷恒明
〃	田子悟史
〃	鈴木洋一
〃	大井聖幸
〃	中嶋美佳
〃	日向野修一
〃	杉山公利
臨床工学技士	齋藤美香
【臨床検査技術部】	
臨床検査技術部長兼臨床検査科長	白井克彦
技術主査	小室邦子
〃	佐藤裕美子
〃	清野妙子
〃	長谷とみよ
〃	大沼真喜子
〃	近野寿美枝
技師	郷右近順子
〃	齋藤玲子
〃	氏家恭子

職名	氏名
技師	村田孝次
〃	石川和浩
〃	阿部美和
〃	植木美幸
〃	岡本優子
技師（試）	山田千代子
【診療放射線技術部】	
診療放射線技術部長	早川博文
診療放射線科長	千葉俊雄
技術主査	島倉満男
〃	荒　ふみ子
〃	本田悦雄
〃	今野千香子
技師	渡辺信二
〃	渡辺ヒサ子
〃	金子美和子
〃	小山　洋
〃	熊谷祐子
【薬剤部】	
薬剤部長	石川隆秀
薬剤科長	荘司良子
技術主査	鈴木幹子
〃	高村千津子
技師	小坂卓哉
〃	斉藤恵美
〃	鈴木ちえみ
【看護部】	
総看護婦長	瀬川幸子
主任看護婦長	高橋美佐子
外来1	
看護婦長	冨田きよ子

職名	氏名
技術主査	曽我ふく子
技師	阿部京子
〃	及川恵子
〃	大友美佐子
〃	平山淳子
〃	今野テツ子
〃	布田基子
〃	岡崎節子
外来2	
看護婦長	今野とし子
技術主査	鈴木ミツ子
〃	鈴木やす子
技師	星和佳子
〃	二階堂せい子
〃	玉井喜代子
〃	森下榮子
〃	伊藤孝子
手術室	
看護婦長	高橋勝子
技術主査	河東田ヤス子
〃	小山田美千代
技師	大槻正弘
〃	阿部文恵
〃	村上則子
〃	菅野俊彦
〃	大槻尚子
〃	及川真紀
〃	赤間由佳
〃	阿部泰子
〃	片岡こと

職名	氏名
3階東病棟	
技術主査	芦名容子
〃	相澤ミヨ
技師	高橋玲子
〃	石原和枝
〃	鈴木由美子
〃	佐藤るみ子
〃	木村枝利子
〃	丸山知子
〃	鈴木ひろ江
〃	相原智子
〃	大場政子
〃	齋藤二恵
〃	三上由郁
〃	大村悦子
〃	高橋温子
〃	佐々木律子
〃	佐藤真由美
〃	山内宗子
〃	今野陽子
3階西病棟	
看護婦長	平岡玲子
技術主査	星しげ子
〃	石川和子
技師	三浦由美子
〃	遠藤由紀子
〃	佐藤頼子
〃	南條あけみ
〃	阿部宏子
〃	柴田修子
〃	千葉るり子
〃	高橋さとみ
〃	小寺美由紀
〃	小原美智

職名	氏名
技師	三瓶智美
〃	金田幸
〃	木戸浦由美
〃	今野英子
〃	高橋節子
〃	佐藤とし子
4階東病棟	
看護婦長	太田きみ子
技術主査	目黒裕子
技師	安藤順子
〃	吉田藤子
〃	齋藤弘子
〃	小原喜美子
〃	佐藤真由美
〃	菅原美幸
〃	小野由美子
〃	伊藤浩子
〃	庄司聖子
〃	原田一美
〃	星久美子
〃	宮前久美
〃	高橋美和
〃	佐藤香織
〃	後藤夕子
〃	大友かづえ
〃	三浦祐子
〃	長田歳子
4階西病棟	
看護婦長	足沢孝子
技術主査	船迫好子
技師	鈴木久美子
〃	後藤けい子
〃	星久美

職名	氏名
技師	金子浩美
〃	菊地裕希子
〃	浅野かおり
〃	佐藤千賀
〃	高山玲子
〃	守明美
〃	大場美代子
〃	須藤洋子
〃	氏家由希子
〃	清水いくみ
〃	引地美紀
〃	秋山由紀
〃	今野たけ子
〃	高子よし子
5階東病棟	
看護婦長	菊池かづ子
技術主査	高橋幸子
技師	森暁美
〃	齋藤たか子
〃	渋谷幸江
〃	岩倉成美
〃	森亮子
〃	菊地宏子
〃	本名小穂里
〃	鈴木有里
〃	鈴木里枝
〃	横山和子
〃	菅原浩江
〃	星美穂
〃	齋藤泰子
〃	丸子恵美
〃	桝田香代子
〃	千葉幸子
〃	伊藤睦子

職名	氏名
技師	高橋和子
5階西病棟	
看護婦長	兼平礼子
技術主査	片田光子
技師	井上なみ江
〃	三浦哲子
〃	松本智代
〃	荒木ひろえ
〃	星真紀子
〃	伊藤弘美
〃	飯塚美江
〃	武藤千代美
〃	熊谷佳奈
〃	津久井淳子
〃	千葉美加
〃	森谷恭子
〃	佐々木香織
〃	千葉かほる
〃	可沼峰子
〃	佐藤よし子
〃	佐藤多津子
〃	菊地まさ子
HCU	
看護婦長	庄司咲子
技術主査	我妻和子
技師	関野七枝
〃	加藤ひろみ
〃	塙ゆかり

職名	氏名
技師	高子利美
〃	熊谷有希恵
〃	氏家佳奈子
〃	木島祐子
〃	熊谷直美
〃	菊地義弘
〃	下館薫
〃	相沢トヨ
〃	折居陽子
研究所	
研究所長（兼）	涌井昭
【免疫学部】	
免疫学部長	海老名卓三郎
技師	小鎌直子
【病理学部】	
病理学部長	立野紘雄
研究員	佐藤郁郎
【薬物療法学部】	
薬物療法学部長	氏家重紀
技師	菊池寛昭
〃	伊藤友美
【生化学部】	
生化学部長	宮城妙子
研究員	和田正

転退職者

	職名	氏名	異動年月日
退職者	技師	菅原実穂	5．4．30
	〃	佐藤智加	5．6．30
	医長	田沼正司	5．7．31
	技師	佐藤仙子	5．9．30
	〃	遠藤洋子	5．12．31
	〃	真壁宏枝	〃
	院長	庄司忠實	6．3．31
	医療部長	斉藤博之	〃
	総務室長	鎌田幸男	〃
	技師	三上由郁	〃

	職名	氏名	異動年月日
転出者	事務局長	大久雅之	5．4．1
	主査	畠山勝子	〃
	〃	田畑登茂子	〃
	技術主査	我妻代志子	〃
	〃	浅野友子	〃
	技師	中沢順子	〃
	〃	本田智子	〃
	〃	内海昌子	〃
	〃（調理）	佐藤光昭	5．6．1
	〃（〃）	阿部道	〃
	〃（〃）	布田基八郎	〃
	医療部長	町田哲太	5．8．1
	主任看護婦長	渡辺ミッエ	5．11．1
	看護婦長	高野久子	6．1．1

編　集　後　記

平成５年度宮城県立がんセンター年報をお届けします。成人病センターからがんセンターに移行してからの第１号になります。本年報の形態については全国のがんセンターおよび成人病センターの年報を参考に論議を重ねた結果、従来の宮城県立成人病センター年報から一部、形態を変更しました。その大きな要因は診療科の増設と研究所の新設にあります。

県民に質の高い医療をサービスするためには最新の医療設備に加えて医療関係者も常に向上心を持ち、自らのレベルを高める努力が必要です。診療科の増設と研究所の新設はこうした学問的な向上心もサポートする大きな力になるはずです。

人はやがて年をとり、いずれ老人になります。21世紀の県民の健康を担う若い人材を今から育てる努力とこうした人材を迎え入れる医療環境の充実も必要でしょう。こうした努力によってこの年報の内容が、今後一層、充実してゆくことを願ってやみません。　（桑　原）

平成５年度年報　編集委員

桑　原　正　明　（医　療　局）・委員長
海老名　卓三郎　（研　究　所）・副委員長
石　川　　潔　（薬　剤　部）
大　内　清　昭　（医　療　局）
鹿　又　み　ゑ　（栄養指導室）
白　井　克　彦　（臨床検査部）
鈴　木　　裕　（医　療　局）
高　橋　貞　義　（医　事　室）
足　沢　孝　子　（看　護　部）
千　葉　俊　雄　（診療放射線部）
佐々木　勝　典　（総　務　局）
古　川　光　男　（企画情報室）
吉　岡　宗　子　（企画情報室）

宮城県立がんセンター年報

第　1　号

平成6年10月発行

発　行　〒981－12

宮城県名取市愛島塩手字野田山47－1

宮城県立がんセンター

ＴＥＬ　022（384）3151

編集者　宮城県立がんセンター年報編集委員会

印刷所　田端印刷株式会社