

NIRS-M-168

辻井博彦・伴貞之 編

独立行政法人 放射線医学総合研究所 重粒子医科学センター・フロンティア研究センター

# テーラーメイド 放射線治療を目指して

株式会社 実業公報社



NIRS-M-167

辻井博彦・伴貞之 編

独立行政法人 放射線医学総合研究所 重粒子医科学センター・フロンティア研究センター

# テララーメイド 放射線治療を目指して

株式会社 実業公報社



# テララーメイド放射線治療を目指して

独立行政法人 放射線医学総合研究所  
第2回 重粒子医科学センター・第1回フロンティア研究センター  
合同シンポジウム

辻井博彦／伴貞之・編





## 序 文

最近の医学の進歩は目を見張るものがあるが、がん治療の分野も例外でない。なかでも放射線治療は最先端照射技術が次々と開発され、治療成績の向上とともに、これまでは適応外であった疾患も治療可能となっている。ちなみに、世界的にみて放射線療法を受けるがん患者は年々増加しており、わが国でその数は年間約11.8万人と見積もられ(JASTRO構造調査, 2003), 2015年には19万人になると推定されている。つまり、わが国でがん患者の4人に1人は一生のうちに一度は放射線療法を受けているということになる。欧米でこの割合はさらに高く、患者の2人に1人は放射線で治療されているという。最近では粒子線治療や、強度変調照射法あるいは定位的照射法などの高度照射技術の開発・普及により、がん病巣への放射線集中性が飛躍的に高まるとともに、種々の進行がんに対して放射線化学療法の有効性が示され、適応疾患はさらに広がっている。

一方、がんの放射線治療を分子レベルから追求しようとする研究も活発で、その裾野を着実に広げている。これは、個々のがん患者について、放射線に対する感受性を測定することにより治療法の個別化を計ろうというもので、実現するためには、個々の患者の放射線感受性を決定する遺伝子の発現状態を解明する必要がある。事前に、強度の放射線障害を来す恐れのある患者を除外し他の治療法に振り向けるか、あるいは放射線が効くと分かっているがんのみを選ぶことが出来れば、患者にとっては最適と思われる治療法を最短距離で選ぶことが出来る。まさにテーラーメイド治療が可能になるのである。

放医研では1994年以来、重粒子線(炭素線を使用)治療が行われている。今年で丸8年を経過したが、治療患者も約1,500人となり、従来法では制御困難であった疾患に対して良好な成績が得られている。一方、放医研ではこれと平行して、分子レベルでの放射線感受性の個人差検索と放射線応答解析が進められており、まさに、テーラーメイド治療法を開発するための理想的な環境で研究が進められていることになる。

本書は、テーラーメイド放射線治療の開発のため、臨床および基礎研究をどのように展開していくべきかという観点から企画されたシンポジウムをまとめたものである。この分野の専門家のお役にたてれば幸いである。

独立行政法人 放射線医学総合研究所  
重粒子医科学センター病院  
辻井 博彦





辻井 博彦・V

溝江 純悦・5  
宮本 忠昭・11  
加藤 博敏・17  
辻 比呂志・25  
鎌田 正・31  
山田 滋・35

藤澤 武彦・41  
宮崎 勝・47

簗原 伸一・55  
榮 武二・57  
西尾 禎治・59  
板野 明史・61  
山下 晴男・63  
福田 茂一・65

落合 淳志・71  
金井 達明・79  
古澤 佳也・85  
吉川 京燦・91

村田 啓・99  
岩川眞由美・105  
田村 和子・109  
畔柳 達雄・113

## 目 次

序 文

### 第 1 部

#### I. 重粒子線はこんな疾患に効く

1. 頭頸部
2. 肺
3. 肝臓
4. 前立腺
5. 悪性骨・軟部腫瘍
6. 消化器

#### II. 重粒子線治療に期待するもの

1. 肺癌の治療
2. 肝癌の治療

#### III. ランチョンセミナー

##### 「日本の粒子線治療施設」

1. 放医研-HIMAC
2. 筑波大学
3. 国立がんセンター東病院
4. 兵庫県立粒子線医療センター
5. 静岡がんセンターの陽子線治療施設
6. 若狭湾エネルギー研究センター

#### IV. 最先端を支える基礎および臨床研究

1. 生検組織を用いたがん放射線感受性予知の試み
2. 重粒子線の物理的線質について
3. 培養がん細胞における重粒子線照射の利点
4. PET-CTの有効性

#### V. 臨床研究における倫理的側面

1. 重粒子線治療のインフォームド・コンセント
2. 遺伝子解析とインフォームド・コンセント
3. 医療情報の公開と保護
4. 患者の権利



今井 高志・121

柳 剛・127

原田 良信・133

鈴木 紀夫・139

伴 貞幸・145

鎌谷 直之・153

矢守 隆夫・159

道川 祐市・163

三宅 正人・169

三枝公美子・175

太田 力・181

## 第 2 部

### I. 放射線感受性遺伝子プロジェクトの目的と意義

### II. 放射線感受性の個人差検索

1. 骨軟部腫瘍の炭素線治療における皮膚反応の解析
2. 細胞の放射線感受性解析—小核アッセイ法, コメットアッセイ法を中心として—
3. 放射線感受性とDNA損傷・修復
4. 放射線リスクの高い疾患—MDS—

### III. 遺伝統計学の論理と手法

### IV. 分子レベルでの放射線応答解析

1. 薬剤感受性データベースとバイオインフォマティクス
2. 放射線線量効果と細胞内情報伝達
3. トランスフェクションアレイ技術とその応用
4. 放射線感受性遺伝子検索：遺伝子発現解析からのアプローチ
5. がんにおけるゲノムDNAの多型および変異解析

---

第2回重粒子医科学センター・第1回フロンティア研究センターシンポジウム「テーラーメイド放射線治療を目指して」  
編集委員会／vi  
同シンポジウムプログラム／186



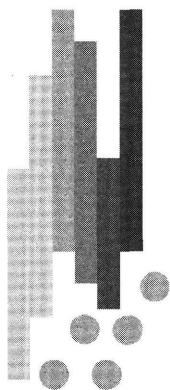
**放医研第2回重粒子医科学センター**  
**・第1回フロンティア研究センターシンポジウム**  
**「テーラーメイド放射線治療を目指して」**  
**編集委員会**

区分	氏名	所属及び職名
委員長	辻井 博彦	放射線医学総合研究所 重粒医科学センター病院長
委員	山田 滋	同病院 治療課第1治療室 医長
委員	山田 聡	放射線医学総合研究所 加速器物理工学部長
委員	遠藤 真広	同医学物理部長
委員	棚田 修二	同画像医学部長
委員	安藤 興一	同粒子線治療生物研究グループリーダー
委員	伴 貞幸	同フロンティア研究センター 主任研究員
委員	道川 祐市	同フロンティア研究センター 研究員

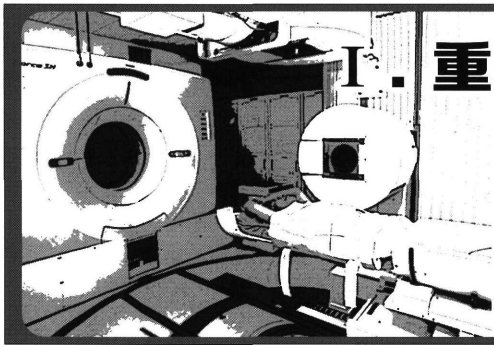
# 第 1 部

テーラーメイド医療を目指して





## I. 重粒子線はこんな疾患に効く



# I. 重粒子線はこんな疾患に効く

## 1. 頭頸部

溝江 純悦

放射線医学総合研究所 重粒子医科学センター病院

Head and Neck

Jun-etsu Mizoe

National Institute of Radiological Sciences

### 〈Abstract〉

Phase II clinical trial of carbon ion radiotherapy for head and neck cancer shows favorable results with high local control rate for non-squamous cell carcinoma, such as malignant melanoma, adenoid cystic carcinoma and adenocarcinoma. On the other hand, acute and late morbidity of the patients seems to be tolerable well.

Carbon ion radiotherapy is effective method for locally advanced, non-squamous cell carcinoma of the head and neck.

### 緒言

頭頸部領域の悪性腫瘍に対する治療においては、見る・聞く・話す・食べるなどの機能的要因および顔面の変形・傷跡などの審美的要因を可能な限り考慮(温存)する必要がある。外科切除は腫瘍治療の観点から第1に選択されるべき治療法であるが、腫瘍の場所やその大きさによってはX線治療が選択されることも多い。舌・口腔・喉頭では、その機能温存の観点からX線治療が行われ、その局所制御率や生存率も良好である。また、進行した上顎洞腫瘍や上咽頭腫瘍では、その審美的観点からX線治療が行われ、比較的満足すべき結果を得ている(表1)。

しかし、このような結果が得られる腫瘍は多く

が扁平上皮癌であり、腺様嚢胞癌や粘表皮癌などの非扁平上皮癌では、手術切除が可能な時はその5年生存率は良好なものの、手術が不能例に対す

表1 頭頸部腫瘍に対するX線治療

		局所制御率(%)	生存率(%)
舌	T1	90	85
	T2	80	70
	T3	70	55
口腔	T1	85~95	70~90
	T2	50~80	40~80
上咽頭			40~78
咽頭	T1	85~95	
	T2	75~90	
上顎洞		31~70	



表 2 唾液腺腫瘍

5年生存率(%)	
手術切除	
腺房細胞癌	82
粘表皮癌	71
腺様嚢胞癌	62
混合腫瘍	56
多形性腺癌	97
局所制御率(%)	
手術不能例(n>20)	
放射線単独	4~36
速中性子線	55~77

るX線治療ではその局所制御率は大幅に低下する(表2)。このような手術切除が不可能か、あるいは積極的に推奨されない主に非扁平上皮癌症例では、過去に速中性子線治療での実績があり、同じ高LET放射線である炭素イオン線治療の良好な適応疾患と考えられる。

## 対 象

頭頸部領域の悪性腫瘍に対する炭素イオン線の臨床試験は、1994年6月から18回/6週間および16回/4週間のPhase I/IIが開始され、1997年4月よりはPhase II臨床試験が行われている。Phase II臨床試験の対象は、組織学的に確認された頭頸部領域の悪性腫瘍で、原則としてN0M0症例である。治療線量は64.0 GyE/16回/4週間であるが、皮膚が広範に照射される時は57.6 GyEで照射が行われた。

## 結 果

2002年8月までに154例の治療が行なわれた。部位としては副鼻腔(44例)・鼻腔(38例)・上咽頭(14例)などであり、また、組織学的には悪性黒色腫(57例、図1)・腺様嚢胞癌(36例、図2)・腺癌(15例、図3)などである(表3)。2002年2月までに終了した148例の途中経過では良好な局所制御が得られており、主な対象が局所進行症例にもかかわらず、

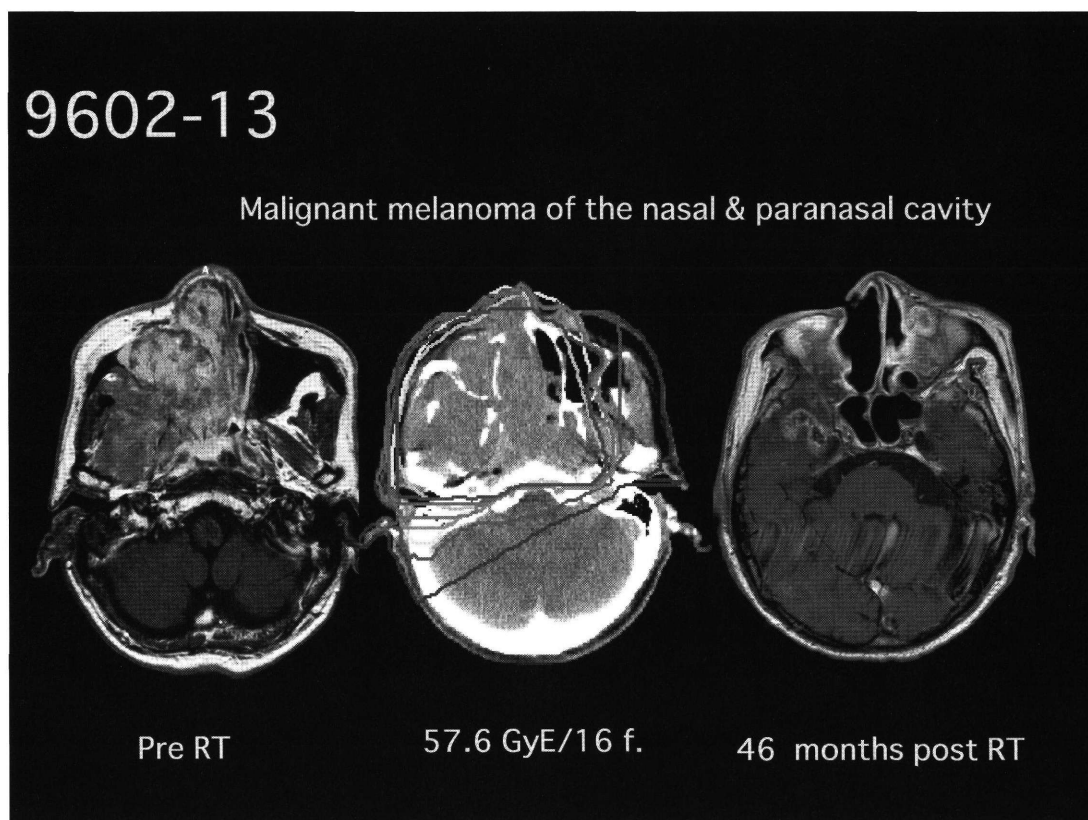


図 1

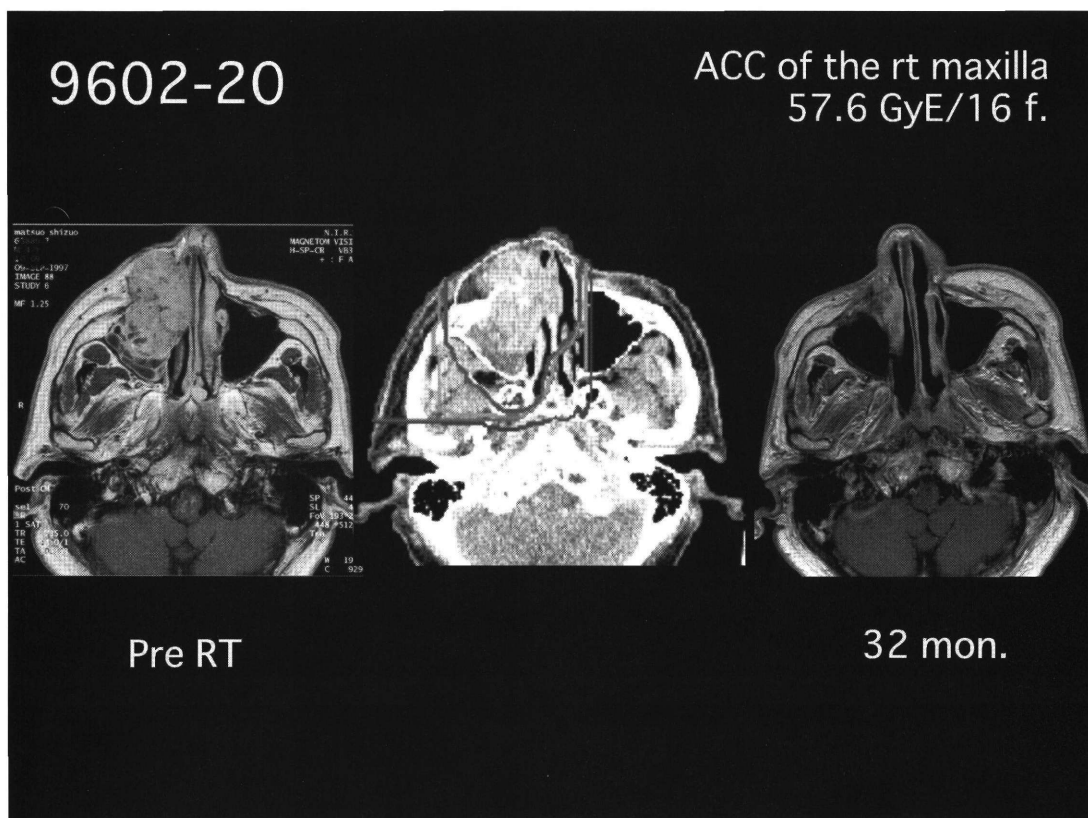


図 2

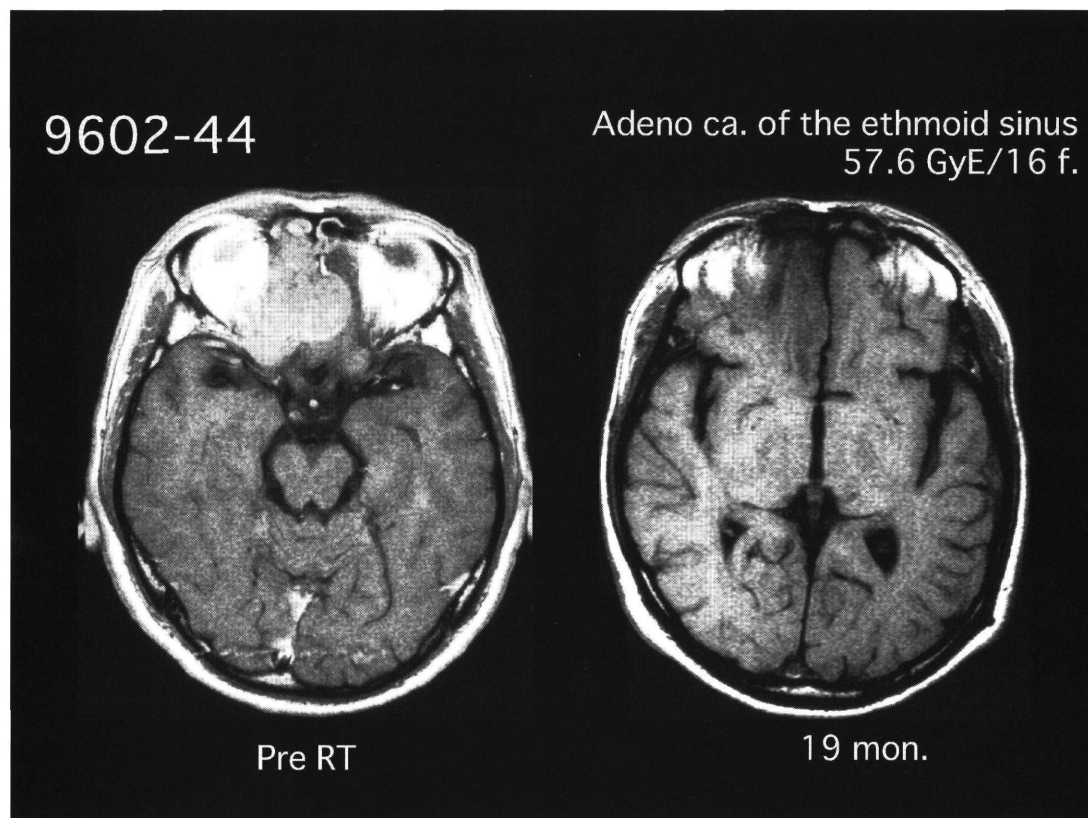


図 3



表 3

Histology/Site	ParaNasal Sinuses	Nasal Cavity	Pharynx	Orbita	Oral Cavity	Salivary Gland	Thyroid	Ears	Others	Total
Malignant Melanoma	15	32	2	4	4				57	
Adenoid Cystic Carcinoma	12	3	5	5	2	7			2	36
Adenocarcinoma	4	3	2	3	1	2				15
Papillary Adenocarcinoma	1						10			11
Squamous Cell Carcinoma	3		2		2			3		10
Osteosarcoma	3		1						2	6
Mucoepidermoid Carcinoma	1					2				3
Rhabdomyosarcoma	1		1						1	3
Others	4		1	1	3	1			3	13
Total	44	38	14	13	12	12	10	3	8	154

## LOCAL CONTROL

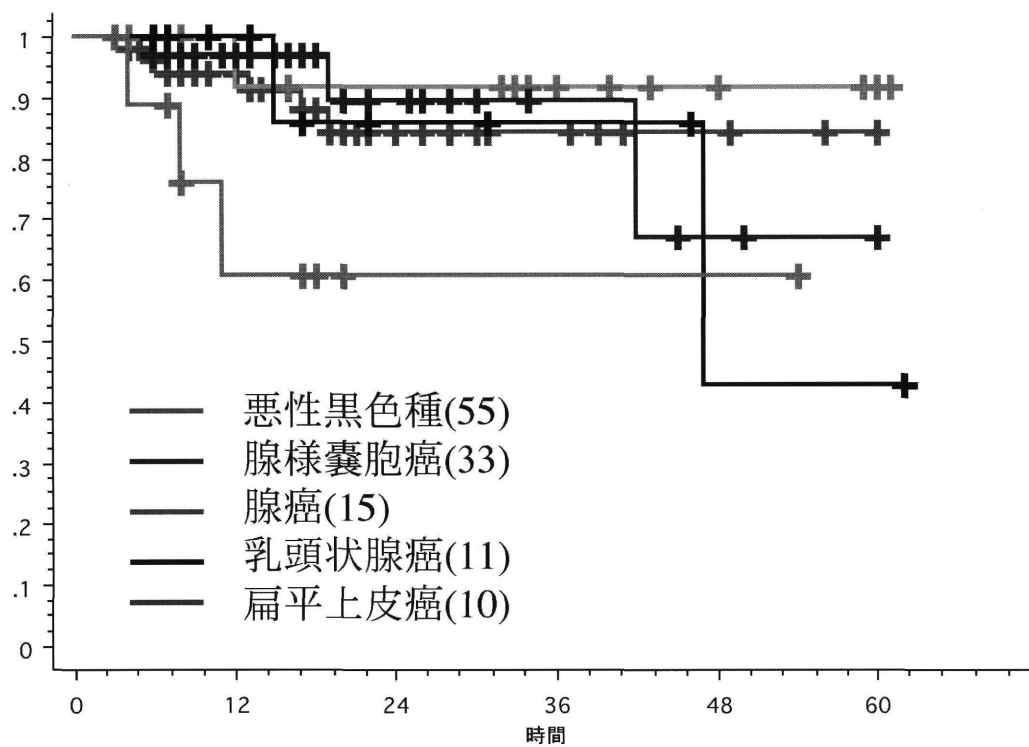
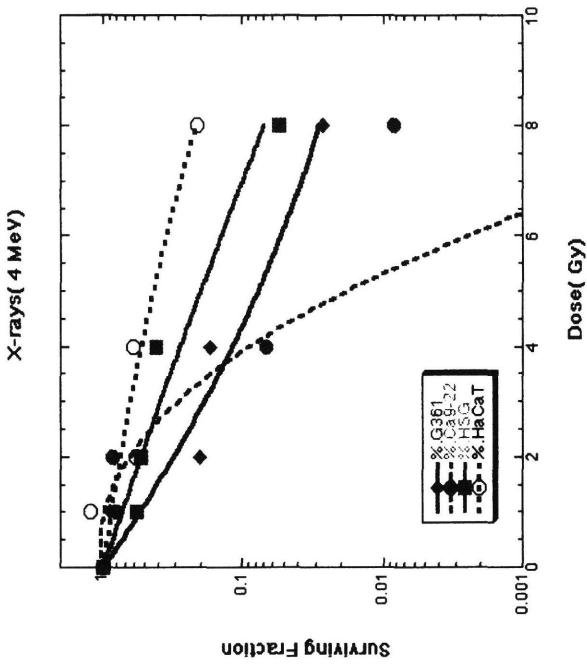


圖 4

I. 重粒子線はこんな疾患に効く



9

D0.1(SF4)				
X	Ca9-22>>	G361>	HSG>	HaCaT
C	(G361>)	(HSG>)	Ca9-22>	HaCaT
S	G361>	HSG>	Ca9-22>	HataT

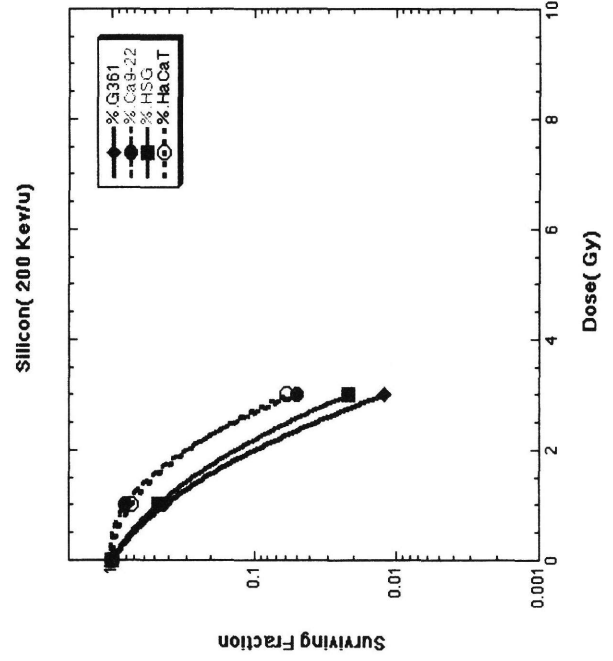
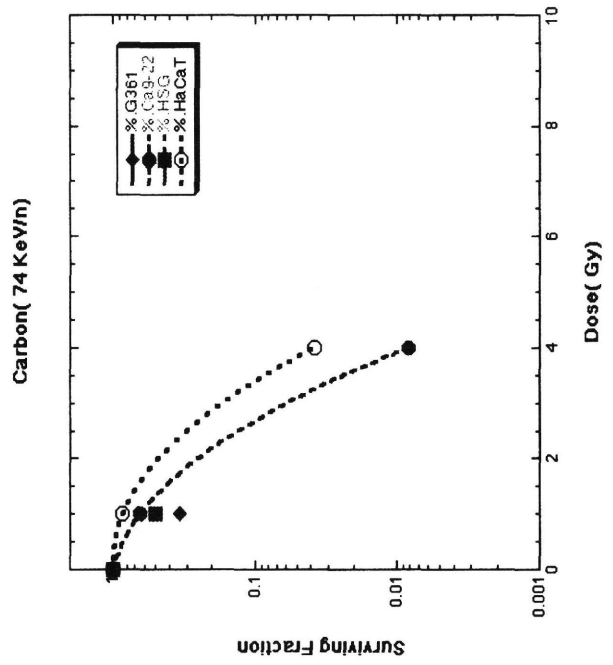


図 5



前例の5年局所制御率は74%と良好である。特に非扁平上皮癌では、5年局所制御率が悪性黒色腫(55例)で84%、腺様嚢胞癌(33例)で67%、腺癌(15例)で92%などである(図4)。これらの症例において見られた急性期反応は、約10%でgrade 3が見られたが、いずれも治療を中断するような重篤な反応はなかった。また、遅発反応も比較的軽微で、数例のgrade 2までが最高で、grade 3以上の重篤な反応は見られていない。

良好な局所制御に対し、148例の5年生存率は23%と低下している。腺様嚢胞癌は52%、腺癌は62%の5年生存率を示しているが、悪性黒色腫では15%と低下しており、その主因は遠隔転移の発生である。

## 考 察

高LET放射線が非扁平上皮癌に有効であることは、最近行った細胞照射実験でも明らかにされている。X線(4MeV)照射では、その感受性は扁平上皮癌(Ca9-22) > 悪性黒色腫(G361) > 腺癌(HSG)の順であるが、炭素イオン(74 KeV/n)及びシリコンイオン(200 KeV/n)では悪性黒色腫 > 腺癌 > 扁平上皮癌と非扁平上皮癌が感受性を示すようになる(図5)。高LET放射線は低LET放射線に比し、損傷からの回復が少なく、細胞の分裂周期に依存せず、酸素濃度にも影響されないことが生物学的特徴とされているが、特に非扁平上皮癌に有効であるという頭頸部領域の悪性腫瘍に対す

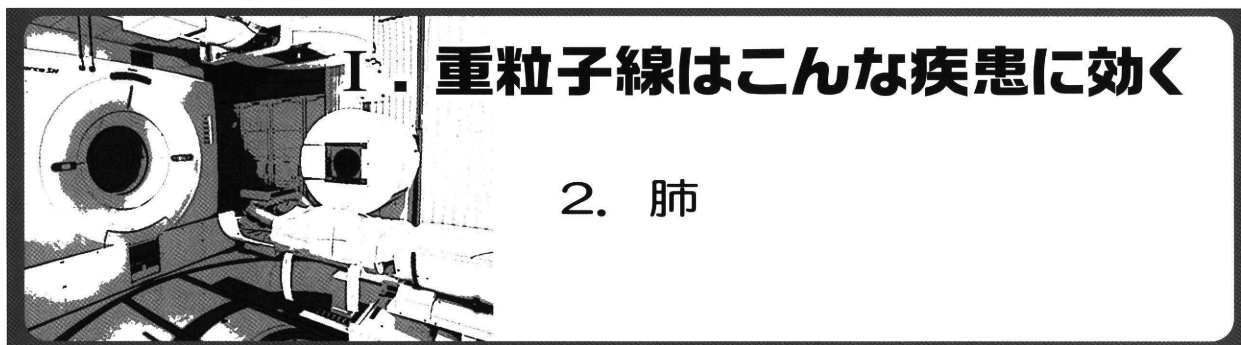
る臨床試験の結果は、別の説明を必要としているように思える。

炭素イオン線の高い生物効果は、腫瘍細胞だけではなく正常細胞にも作用する。速中性子線治療では、その線量分布から無視できない遅発傷害が発生している。これに対し炭素イオン線治療では、急性期および遅発反応は軽微であり、Bragg peakを持つ荷電粒子線としての特徴を十分に発揮している。

悪性黒色腫においては、良好な局所制御に対し、遠隔転移のために生存率が低下する。治療開始時にCT・MRでは認識不能な小さな転移の存在が原因と考えられる。これに対して、2001年4月より抗癌剤併用のプロトコールが開始されている。

## 結 論

1. 頭頸部領域の悪性腫瘍に対する炭素イオン線治療は、Phase II 臨床試験の途中経過では良好な局所制御率を示している。
2. 特に、X線・陽子線などの低LET放射線治療では制御が困難と予想される悪性黒色腫・腺癌・腺様嚢胞癌などの非扁平上皮癌で良好な成績を示しており、これらが炭素イオン線治療の良い適応症例と考えられる。
3. また、従来法では難治の大きな腫瘍に対しても、良好な治療成績と共に機能温存(審美的要因も含めた)も期待できる結果が示されている。



# I. 重粒子線はこんな疾患に効く

## 2. 肺

宮本忠昭／馬場雅行／菅原俊幸／山本直敬

西村英輝／小藤昌志／辻井博彦

放射線医学総合研究所 重粒子医科学センター病院

Heavy ion therapy for non-small cell lung cancer

Tadaaki Miyamoto/Masayuki Baba/Toshiyuki Sugawara/  
Naoyoshi Yamamoto/Hideki Nishimura/Masashi Koto/ Hirohiko Tsujii  
National Institute of Radiological Sciences

---

### 〈Abstract〉

---

Clinical trials and their results of carbon beam radiotherapy for stage I non-small cell lung cancer (NSCLC) were briefly described.

The local control rate, cause-specific and overall survival rate of 146 patients with clinical stage I NSCLC were 87.2%, 75.8% and 58.6%, respectively. Radiation pneumonia was not serious and a few (2.1%). In the phase II clinical study, the local control rate of 50 patients achieved 100% without radiation pneumonia, resulting in the 74.0% overall survival rate. Carbon beam therapy could be an alternative to surgery especially for the lung cancer patients with an advanced age and/or complications.

For the locally advanced lung cancer treated with carbon beams, the excellent local control as well as that of stage I NSCLC has been demonstrated and provided the hopeful prospects in the treatment of lung cancer.

---

#### はじめに

近年、急速な人口の老齢化とともに肺癌罹患率は増加している。1998年の死亡率は胃癌を抜き第1位になり、その対策は社会的な課題となってきた。肺癌の根治療法は手術であることに異論はない。しかし、高齢者にとって手術は常に最良の手段とはなり得ない。ここに、手術に劣らない治療成績

と優れたQOLを有する根治的放射線治療の登場が待たれている。これに応えられる新しい肺癌治療の手段として重粒子線治療の有用性が検討されている。

#### 病期 I 期非小細胞肺癌に対する重イオン治療

非小細胞肺癌に対して、臨床病期I期を“肺野



型”と“肺門型”肺癌に分け，“肺野型”肺癌として，“肺野末梢型”と“肺門近接型”に細分した。

(1) “肺野型”肺癌・病期Ⅰ期の治療経過と成果

1994年11月の開始から1999年2月まで2つのフェイズⅠ／Ⅱプロトコル(9303, 9701)を終了した。治療が終了してから2年以上経過した81名の手術非適応・肺野型肺癌の治療成績を概括する<sup>(2)(3)</sup>。重粒子線治療は標的として原発腫瘍のみを照射し，肺門・縦隔はリンパ節転移が出現した

時点で治療した。標的に対しては5 mm以上のマージンが設定され，照射方向は直交2門あるいは斜行4門を採用した(図1)。対象患者(9303)の第17例目より呼吸同期照射(呼吸照射)が導入された。

観察期間は最後の治療患者の照射が終了後，(9303)では30ヶ月，(9701)では24ヶ月が経過した。81名の症例の平均年齢は72(47～85)歳，男性60名と女性21名，組織型は腺癌45名，扁平上皮癌36名，大細胞癌1名であり，腫瘍サイズのT1は39名，T2は43名であった。手術非適応は60名(74%)，手

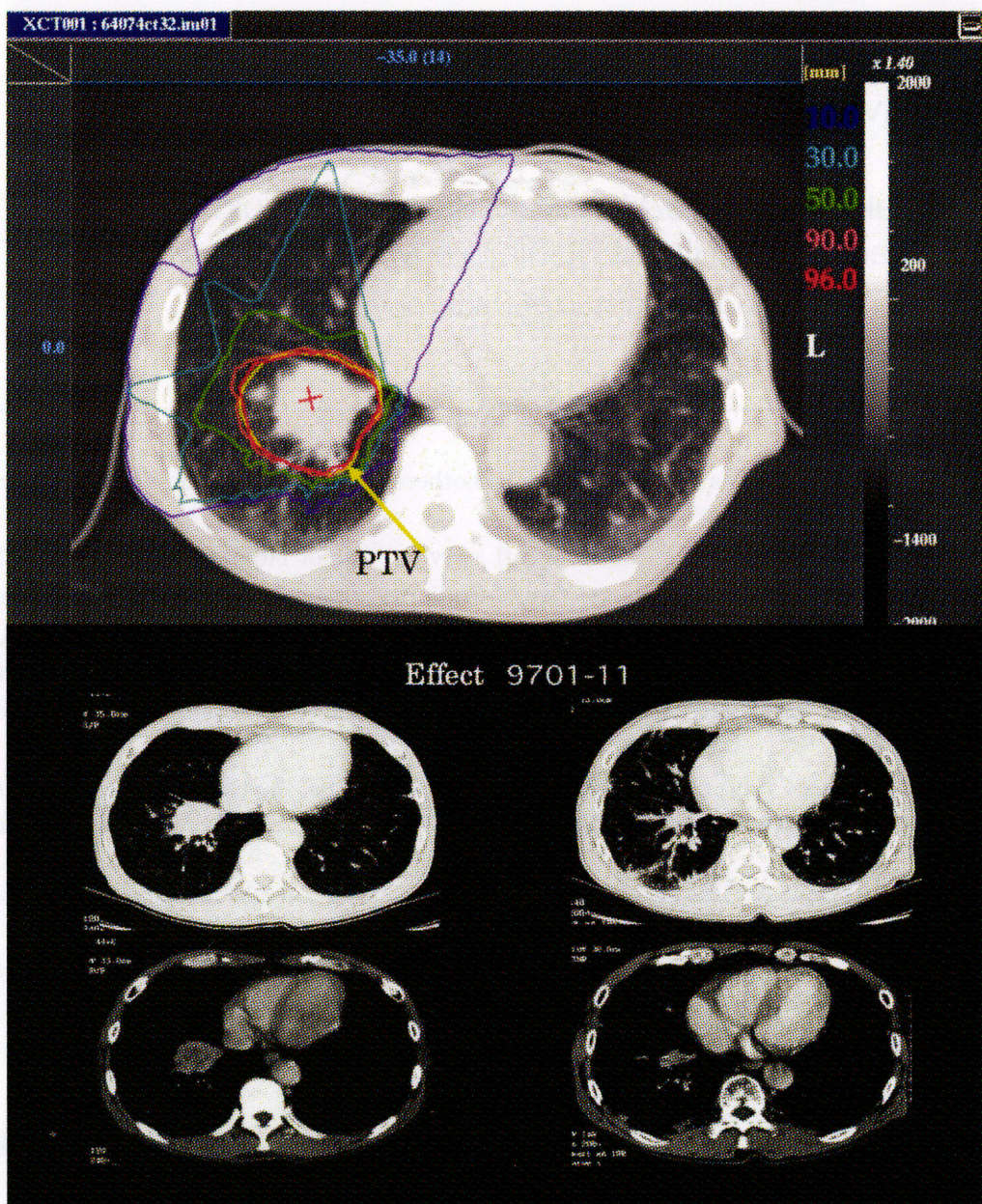


図1 照射時の線量分布と腫瘍反応



## I. 重粒子線はこんな疾患に効く

術拒否例は21名(26%)であった。手術非適応の理由の50名(83%)は肺機能低下であり、その内28名がCOPDによるものであった。9701プロトコルではT2例が多かったが、そのほかの背景因子に偏りはみられなかった。両プロトコルにおいて、適正線量を明らかにするため線量増加研究が行われた。線量別の有害反応の発生と腫瘍制御率の結果を説明する。18回/6週間の分割照射で治療された9303プロトコルでは47名の患者の48病巣が対象となり、開始総線量59.4GyEより皮膚および肺の安全性を確かめつつ、10%ずつ95.4GyEまで7段階の線量増量が行われた。95.4GyEレベルで3例中2例にグレードIIの肺反応(労作時呼吸困難、鎮咳剤使用など)が出現したので最大制限線量とした。腫瘍の局所再発は照射野内再発が29.1%(14/48)と辺縁再発が4.2%(2/48)となり、併せて33.3%(16/48)にみられた。腫瘍制御率(100%-再発率)を求めると、線量増加に比例して腫瘍制御率は上昇し、肺反応の最大制限線量より5%低い90GyEで95%以上の腫瘍制御を達成した。また、線量との関係で腫瘍因子をみると、扁平上皮癌と腺癌の間の腫瘍制御に相違はみられなかったが、T1とT2との間に有意差はみられないものの、腫瘍サイズが大きくなるにつれて腫瘍制御が低下する傾向がみられた。

一方、9回/3週間の分割照射で治療された9701プロトコルでは34名の患者が治療された。前プロトコルに比べて分割回数および照射期間が半減するのに伴い、約25%の有害反応の増強を見込んで、68.4GyEを開始線量に設定した。線量増加は、5%ずつアップして79.2GyEまで4段階の線量増加を行った。79.2GyEレベルで前プロトコルと同様に3例中2例にグレードIIの肺反応が出現したので最大制限線量とした。また、当線量より10%減の72GyEを適正腫瘍制御線量とした。原発腫瘍の再発は照射野内2.9%(1/34)、辺縁5.8%(2/34)で併せて8.8%(3/34)にみられた。腫瘍制御率は91.2%と前プロトコルに比べて著しく向上した。

この結果を踏まえ“肺野末梢型”肺癌を対象に線量分割を9回/3週間で、総線量を72GyEに固定して1999年の4月からフェイズII研究が始まった。この研究は、2000年12月に50名を治療して終了した。現在までにこのプロトコルの症例から原発

腫瘍の再発はみられていない。治療終了後41ヶ月のKaplan-Meier法によるoverall survivalは73%、cause-specific survivalは84.8%であり、最新の外科治療の成績と同等の結果となった。

### (2) “肺門部”肺癌に対する治療経過と成績

肺門部には大きな気管支があり、血管・リンパ管が集中する肺組織の中でも特別な解剖学的部位であり、放射線治療においても肺野領域と耐容線量が異なるとされている。“肺野型”肺癌を対象とした重粒子線治療においても、病期I期の中に肺門に近接して病巣を有する患者が入ることが予測されたため、腫瘍が気管支鏡にて直接に見える気管支に近接する症例を“肺門近接型”肺癌として“肺野末梢型”と区別して線量増加を行った。9303プロトコルでは47名の患者の内、“肺門近接型”肺癌は10例であった。当症例からの放射線肺臓炎の発症はなく、当有害事象に関しては“肺野型”肺癌を“肺野末梢型”と“肺門近接型”に分ける必要のないことが明らかにされた。

一方、この10症例の重粒子線による気管支反応を観察することにより、気管支反応のグレード表を作成することが可能となった(表1)。このスコア表でグレードIII以上の気管支の有害反応(難治性の潰瘍形成あるいは気管の完全閉塞)が79.6GyE以上で発症することがわかってきた。もしも、大きな肺外気管支にこのような傷害が発生した場合は生命維持に重大な支障となると思われる。したがって、肺外気管支に対して重粒子線治療による有害反応の線量規制をグレードII(浅い潰瘍あるいは気管支の部分狭窄)とし、これを最大制限線量として線量増加を行うことにより、“肺門部”肺癌の適正線量を明らかにするフェイズI/II研究を開始した。18回/6週間分割法において、気管支反応のグレードIIIの反応は79.2GyEから

Table.1 Radiation Morbidity Scoring System of Bronchus (NIRS).

正常気管支粘膜反応	
Grade 0	なし
Grade I	telangiectasia, 部分的な粘膜萎縮
Grade II	びらん, 苔, 軽度の狭窄
Grade III	潰瘍, 厚い苔, 重度の狭窄
Grade IV	壊死, 穿孔, 瘻孔, 閉鎖

Table.2 Overview of therapeutic results of stage I NSCLC by carbon beams.

	非小細胞癌 I	非小細胞癌 II	非小細胞癌 III	非小細胞癌 IV	I + II + III + IV
番号	9303	9701	9801	9802	9303/9701/ 9801/9802
フェイズ研究 施行期間	I / II 94/10-97/8(末梢型) 98/8(近接型)	I / II 97/9-99/2	I / II 98/10 -(01/8)	II 99/4 -00/12	
型(病期 I)	肺野	肺野末梢	肺門・肺門近接	肺野末梢	
分割法	18回/6週間	9回/3週間	9回/3週間	9回/3週間	
総線量 (GyE)	59.4/64.8/72.0/79.2/ 86.4/90.0/95.4	68.4/72.0/75.6/79.2	57.6/61.2/64.8	72	
登録数	48(終了)	35(終了)	15(#15)	51(終了)	149
解析対象者数	47	34	15	50	146
解析対象病巣数	48	34	15	51	148
肺反応 (≥grade III)	0:41, I:1, II:3, III:2 (4.20%)	0:30, I:1, II:2, III:1 (2.9%)	0:15 (0%)	0:49, I:0, II:1 (0%)	0:135, I:2, II:6, III:3 (2.10%)
遅発性 気管支反応	0:4, I:42, II:1	0:0, I:33 (評不:1)	0:2, I:13 0:1, I:10, II:3, III:0	0:0, I:48, II:2	0:6, I:136, II:3
局所制御率	66.7%(32/48)	91.1%(31/34)	100%(15/15)	100%(51/51)	87.2%(129/148)
粗生存率	41.3%(19/46*) [42.1]	50.0%(17/34) [48.9]	80.0%(12/15) [87.5]	74.0%(37/50) [72.4]	58.6%(85/145) [42.0]
cause specific 治療後期間	69.5%(32/46*) [61.2] (8年-4年)	61.7%(21/34) [61.8] (4年9月-3年6月)	93.3%(14/15) (3年6月-)	86.0%(43/50) [84.8] (3年5月-2年2月)	75.8%(110/145) [59.0] (8年-)
DLT	放射線肺臓炎	放射線肺臓炎	気管支粘膜反応	放射線肺臓炎	
最大制限線量:	95.4GyE(末梢型) 79.2GyE(近接型)	79.2GyE	72.0GyE		
推奨線量(≥90% 腫瘍制御線量)	86.4GyE				

\*追跡不能1名 [Kaplan-Meier method]

2002.09.04

### I. 重粒子線はこんな疾患に効く

90GyEの間に発生した。そこで、9回／3週間の分割照射で治療する9801プロトコルでは上記79.2GyEの25%減に相当する59.4GyEを開始線量と設定した。ちなみに18回／6週間分割法の79.2GyEにおける腫瘍制御率は83%，90GyEでのそれは100%であった。

肺門・肺門近接型に対する9回／3週間の分割照射(9801)は2000年の4月以降、すでに15例が治療され、この内13例が「肺門部」であり、6例が57.6GyEの線量で、9例が61.2GyEで治療された。すでに4例が3年を経過したが、気管支反応はすべてグレードⅡ以下の反応で潰瘍や気管支腔の完全閉塞などの重い有害事象は出現していない。また、この15例から局所再発はなく、100%の局所制御率である。手術、レーザー治療、気管支腔内照射の適応、あるいはこれらの治療に適応のない広く進展した「肺門部」肺癌に対して新しい治療法が加わったと考えられる<sup>(4)</sup>。

### (3)臨床病期Ⅰ期非小細胞肺癌に対する炭素線治療のまとめ

臨床病期Ⅰ期非小細胞肺癌に対する炭素線治療

は9303, 9701, 9801, 9802, の4つのプロトコルで146名(148病巣)を治療した。平均年齢は、73歳、男女は31, T1/T2は70/78, 腺癌扁平上皮癌／大細胞癌は78/69/1であった。表2にプロトコル別に対象、線量、分割法、施行期間、有害反応、抗腫瘍効果、局所制御率、生存率を纏めた。また、全ての症例の局所制御率、cause-specific survival及びoverall survivalを図2に示した。全体の局所制御率は87%であり、cause-specific survivalは59%, overall survivalは42%である。より新しい9801, 9802プロトコルにおける局所制御率は、100%であり、フェイズⅡ研究では現在までに原発の再発はなく、原病生存率は86%であり、また、グレードⅢの放射線肺臓炎も9801, 9802プロトコルでは発症していない。呼吸同期法の導入、照射法の改良および高度の肺線維症の除外などによるものである。非小細胞肺癌・臨床病期Ⅰ期に対する重粒子線治療は、手術適応、非適応に係わらず「肺門部」肺癌を含めて全ての病型の臨床病期Ⅰ期に対して対応が可能であり、安全かつ確実な根治療法であると思われる。

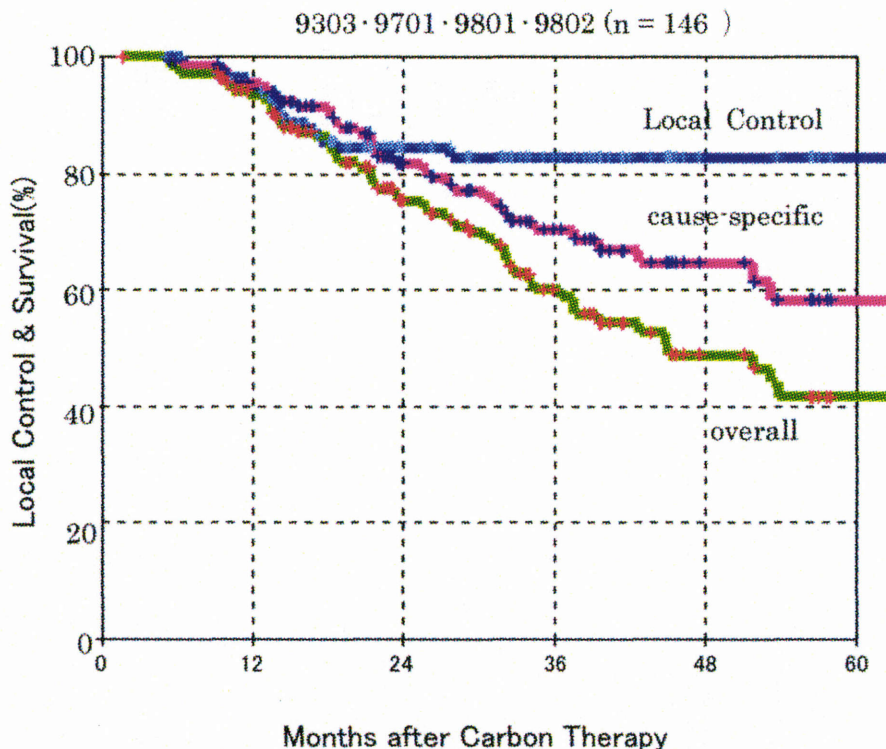


図2 病期Ⅰ期肺癌(146名)に対する局所制御, 原病生存率, 粗生存率



## おわりに

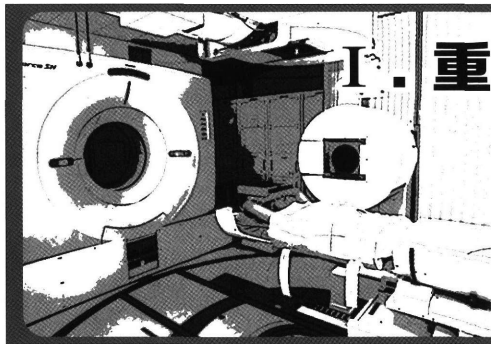
重粒子線による非小細胞肺癌・病期Ⅰ期肺癌の治療は、原発腫瘍に対する治療と肺門・リンパ節転移に対する対策と併せて根治療法として体系化されつつある。照射も4回／1週間と短縮されて治療時の患者さんの身体的、精神的負担もますます軽くなってきている。重篤な副作用はなく、外科治療に匹敵する成績が得られることが明らかになった現在、QOLやADLが問題となる高齢者肺癌(75歳以上)が具体的な適応と考えている。当治療法は、高度先進医療の申請中である。

病期Ⅰ期肺癌の重粒子線治療の最終目的は、

radiosurgery(1回照射法)の開発である。現在、新プロトコールとして狙上に乗っている。平成15年4月から開始する予定で鋭意準備を進めている。

## 参考文献

- 1)宮本忠昭:重粒子線による癌治療, 日本医事新報, 3635:125, 1993.
- 2)宮本忠昭, 山本直敬, 西村英輝, 辻井博彦, 山口豊:肺癌の重粒子線治療, 日本外科学会雑誌, 100:729-734, 1999.
- 3)山本直敬, 宮本忠昭, 小藤昌志, 西村英輝, 藤澤武彦:肺門型肺癌に対する重粒子線治療, 日本気管支学会誌, 23:712-720, 2001.



# I. 重粒子線はこんな疾患に効く

## 3. 肝 臓

肝癌の重粒子線治療—低侵襲・根治療法としての有用性について—  
「ひとに優しく、癌に強い最先端治療で手術に匹敵する治療成績を目指す」

加藤 博敏

放射線医学総合研究所 重粒子医科学センター病院

Carbon-Ion Radiotherapy for Hepatocellular Carcinoma  
—Clinical Efficacy as a Minimally Invasive and Radical Therapy—

Hirotooshi Kato

National Institute of Radiological Sciences

---

### 〈Abstract〉

---

Twenty-four and eighty-two patients with histologically documented hepatocellular carcinoma were enrolled onto the Liver Cancer Working Group for Heavy Ion Therapy's first and second clinical studies from June 1995 to February 1997, and from April 1997 to February 2001, respectively. No severe adverse effects and no treatment-related deaths have occurred up to now. We think that the results of these studies are satisfactory, considering the recurrent tumors, advanced stage of disease, large tumor size, and the high-grade hepatic disorder of liver cirrhosis.

---

#### はじめに

大半の肝細胞癌患者は肝硬変等の慢性肝疾患を有し、多中心性の発癌を高頻度に繰り返すため、治療法の持つ根治度および侵襲度が予後を大きく左右する。広い適応を持ち、かつ根治性と低侵襲性の両方を十分に兼ね備えた新しい治療法が待望されている現在、これらの性質を本来的に兼ね備えている放射線治療においては、コンピューターの急激な発展に伴い治療計画と照射技術が飛躍的に進歩しており、癌の低侵襲・根治療法としての

実力をいかに発揮できる時代となった。

#### I. 肝癌の臨床

##### 1. 肝癌の特徴と、肝癌の治療法が満たすべき必須条件

肝癌は、肝臓原発の原発性肝癌と、他臓器悪性腫瘍が肝臓に転移した転移性肝癌に大きく別けられる。原発性肝癌はさらに、肝細胞が癌化した肝細胞癌(95%を占める)と胆管上皮が癌化した胆管細胞癌(3%)に大別される。重粒子線治療の臨床試験は原発性肝癌の大半を占める肝細胞癌を対象と

しているのです、ここでは肝細胞癌の特徴について述べる。

肝細胞癌は胃、肺に次いで我が国の悪性新生物による死亡原因の第3位を占め、死亡実数は約3万4千人である。日本における肝細胞癌の特徴は、85%がC型肝炎ウイルス感染者、85%が肝硬変症を合併していることで、肝硬変からの発癌率は年率約7%で、毎年3万人に肝細胞癌が発生している。肝細胞癌発生の予備群であるC型肝炎ウイルス感染者は全国に200万人以上と推定されるため、今後も増加し続け、2010年には4万5千人と予想されている<sup>1)</sup>。肝細胞癌の85%は、それ自体が高度の肝障害である肝硬変に発生するため、癌を治すことだけにとらわれると、肝機能を低下させ、結果的に生命を脅かす危険を常に伴っている。肝硬変が肝細胞癌の発生母地であるということは、また、一旦治療が成功した場合でも、多くの患者さんは生涯に何度も発癌の機会にみまわれ、何度も治療を受けなければならないことを意味する。したがって、狙った腫瘍は必ず治せること(根治性)と、侵襲が低く、次の治療に耐え得る肝機能を温存できること(低侵襲性)が、肝細胞癌の治療法に課せられた必須条件となる。

## 2. 既存の治療法とその限界

### 2-1. 肝切除

肝細胞癌に対する既存の治療法には大きく分けて、肝切除(手術)、肝動脈塞栓療法(TAE)、経皮的局所療法(PEI, RFAなど)の3つがある。最も根治的な方法は肝切除で、肝機能が良好で腫瘍が小さく1個の場合は肝切除は最も良い治療法と言える。しかしながら、わが国において肝切除が可能だった患者さんは全体の28%で、その44%は肝障害が最も軽いグループ(慢性肝炎)だった<sup>2)</sup>。日本の肝細胞癌の85%は高度肝障害である肝硬変を合併していることを考えると、肝切除には自ずと限界があると言わざるを得ない<sup>3)</sup>。

### 2-2. 肝動脈塞栓療法(TAE)

肝硬変合併肝細胞癌に対する治療法の主流は肝動脈塞栓療法(TAE)であり、およそ半数の患者さんがTAEを受けている。手術よりは簡便で侵襲も低く、緩急を使い分けた治療が可能のため、一般病院での診療には欠かせない方法となっている。

しかしながら、いくつかの重要な臨床試験<sup>4),5)</sup>でTAEは生存期間に寄与しないとの結論が、また、TAE後の切除標本による組織学的検討<sup>6),7)</sup>では、完全に治せる力(根治性)に乏しいとの結論が出ている。したがって、初回治療で安易に行われるべき方法ではないと考えられる。一方、近年、高エネルギーX線(LINAC)治療との併用療法が良好な治療成績を上げたとの報告<sup>8),9)</sup>が散見されるようになったことから、この様なevidence basedな集学的治療の一環として明白な位置づけを行い、初回治療として行う場合は、完全に治すのだという明確な目的意識をもって行われるべきである。

### 2-3. 超音波映像下経皮的局所療法(PEI, RFAなど)

1980年代以降の超音波診断法の発展に伴い、肝癌にリアルタイムで細径針を刺入して行う超音波映像下経皮的局所療法が進歩し続けている。日本で発明され、1980年代以降世界中に広まったエタノール注入療法(PEI)や、近年盛んに行われているラジオ波熱凝固療法(RFA)などは、径3cm以下の腫瘍に対しては根治的で侵襲の低い治療法であることが分かってきた<sup>10),11)</sup>が、3cmを超える場合は治療効果に限界があるとされている。最近では、施行症例数の増加に伴い、激しい疼痛の問題や腹腔内出血等の重大な副作用についての報告もされるようになってきた。

以上より、本当の意味での低侵襲・根治療法が待望されている。特に、大きさ3cmを超える肝細胞癌に対しては、低侵襲・根治療法は存在しないと断言しても過言ではない。

## II. 肝癌に対する重粒子線治療の臨床試験

### 1. 経緯

肝細胞癌に対する炭素イオン線治療の第I/II相臨床試験は1995年6月より開始され1997年2月までに第一次プロトコールに従って5週間15回照射法により24例が治療された。この治療成績の分析から本疾患に対する炭素イオン線治療の安全性と有効性が確認されたため、欧米およびわが国において集積された速中性子線治療の知見と放医研における炭素イオン線に関する基礎実験により確認された「高LETの重イオン線照射では分割による影響が小さい」という事実に基づいて、短期少分

## 1. 重粒子線はこんな疾患に効く

割照射法に関する第Ⅰ/Ⅱ相臨床試験のプロトコール(第二次プロトコール)が作成された。これに従って、1997年4月より2001年2月までに82例が治療され、短期少分割照射法の安全性と有効性が確認されたため、2001年4月からは、4回・1週間で終了する治療法の第Ⅱ相臨床試験(第三次プロトコール)が行われている。

## 2. 臨床成績

### 【本研究発表の目的】

第一次および第二次プロトコールにより治療された全106例110病変の経過観察期間が一年を超過した今、この治療成績をまとめ、重粒子線治療の低侵襲・根治療法としての有用性を論じることを目的とした。

### 【対象】

第一次および第二次プロトコールの適応条件の主なものは、1.再発、残存腫瘍、もしくは、他治療の適応がない、2.肝障害度は、Child-Pughスコアが8点以下、3.消化管に接しない、4.PSが2以下であること、であった。これらを満たし、第一次プロトコールに従って、5週間15回照射法で治療された24例24病変と、第二次プロトコールに従って、3週間12回照射法で治療された33例34病変、2週間8回照射法で治療された22例24病変、1週間4回照射法で治療された27例28病変、の82例86病変、計106例110病変を対象とした。

### 【結果】

#### (1)腫瘍縮小率

腫瘍縮小率の経時的な推移を図1に示した。当院にて評価可能だった109病変の最大腫瘍縮小率は、 $72 \pm 25\%$ だった。WHO基準に基づいて判定したCR+PRの全体に対する割合(いわゆる奏効率)は、80% (87/109)だった。

#### (2)局所制御率

Kaplan-Meier法により算出した局所制御率は、第一次プロトコールで1年92%、2年以降81%、第二次プロトコールで1年94%、2年以降87%だった(図2)。

#### (3)肝有害反応

予後に関して重要な意味を持つ晩期肝有害反応を評価する目的で、治療開始後6ヶ月~12ヶ月におけるChild-Pughスコアの最も悪い値を用いて、治療前値からの変化を検討した。評価可能だった

91例中54%が無変化か改善、23%が1点の上昇だった。したがって、77%の症例においてChild-Pughスコアの上昇が1点以下だったことが判った(図3)。また、肝機能の低下が直接原因で1年以内に死亡した症例は1例もなかった。

#### (4)生存率

生命予後に関してCox比例ハザードモデルによる予後因子の解析を行った結果、「局所限局でない」こと、および、「初回治療でない」ことが担癌死に関する予後因子だった。すなわち、局所限局かつ初回治療であることが最も予後良好の因子であることが判った。このような症例を重粒子線治療の良い適応例と考え、Kaplan-Meier法により累積生存率を計算した(図4)。異時的に2病変の治療を行った6例に関しては、1回目の治療に関して生存期間を計算した。このため全対象数は104例となった。結果は、1年89.5%、2年70.4%、3年57.3%、4年53.9%だった。根治療法として確立している肝切除の治療成績(肝硬変合併例)<sup>2)</sup>の、それぞれ81.5%、70.1%、59.7%、50.1%と比較して、遜色のない治療成績であることが判った。

#### (5)症例提示

症例1:76歳女性、S1の8.5cm×7.2cmの腫瘍、病期はStageIVAの局所進行癌、肝機能はChild-Pughスコア6点、Grade Aと良好だった。5週間15回照射法により治療した。肝有害反応および再発を認めず、6.5年間生存中である。

症例2:71歳男性、S7の11.2cm×9.0cmの腫瘍、病期はStageIVAの局所進行癌でTAE後の再発、肝機能はChild-Pughスコア6点、Grade Aと良好だった。1週間4回照射法により治療した。肝有害反応および再発を認めず、2年間生存中である。

### 【結論】

重粒子線治療は、肝細胞癌に対して低侵襲かつ根治的な治療法であることが判った。

## 3. 今後の目標と見通し

現在、1週間・4回照射で終了する治療法の第Ⅱ相臨床試験が順調に行われており、近々終了の見通しである。その後、2回照射法の第Ⅰ/Ⅱ相臨床試験が行われる予定である。本研究の今後の目標は、近い将来、外来にて4回もしくは2回で治療を終了する方法を確立すること、および、肝



# 腫瘍縮小率

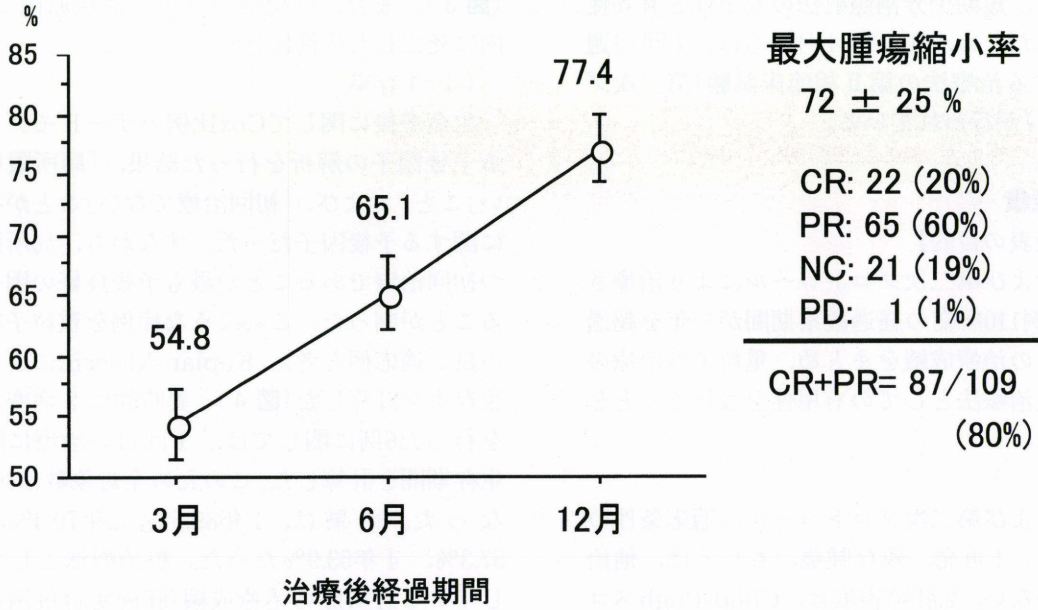


図1 腫瘍縮小率と奏効率(CR+PRの全体に対する割合)

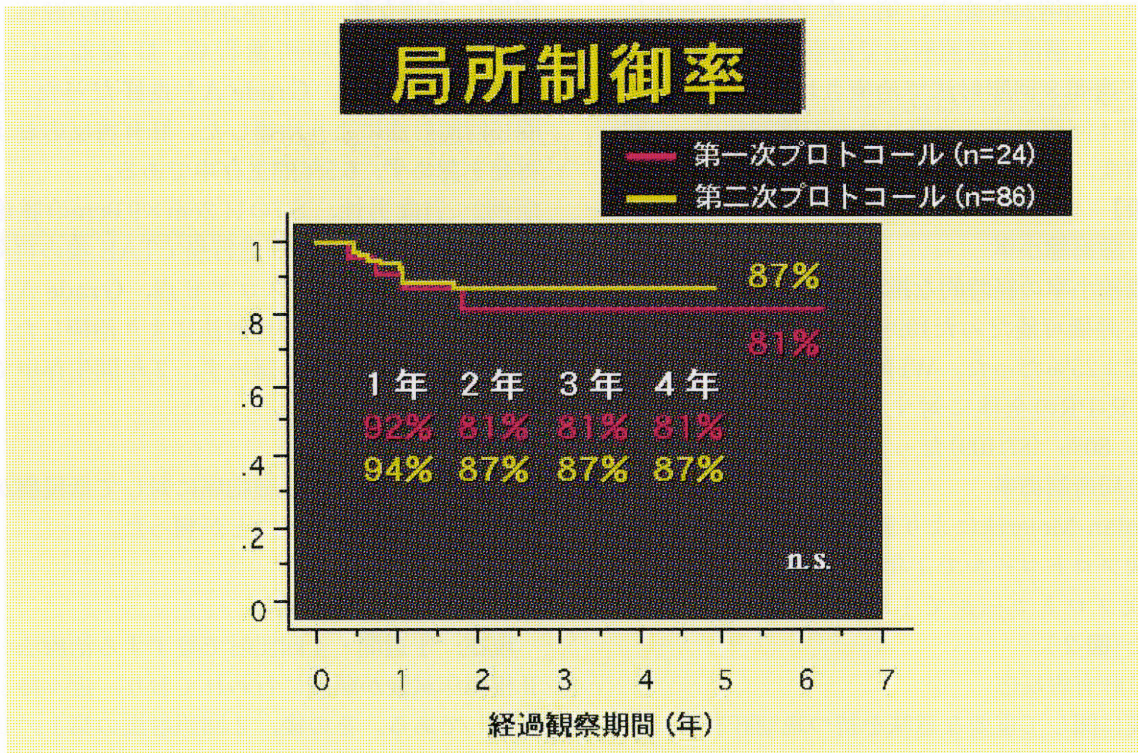


図2 局所制御率(第一次および第二次プロトコル)



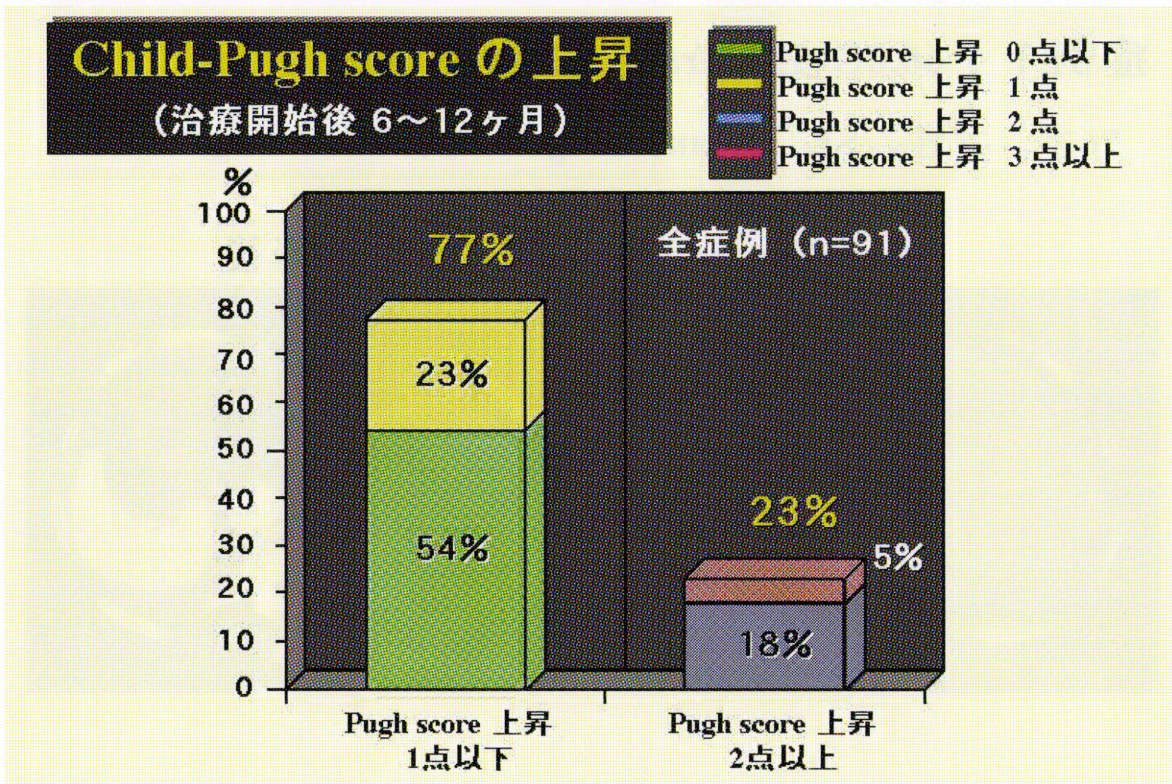


図3 治療開始後6?12ヶ月でのChild-Pugh scoreの上昇(最も悪い値を用いた検討)

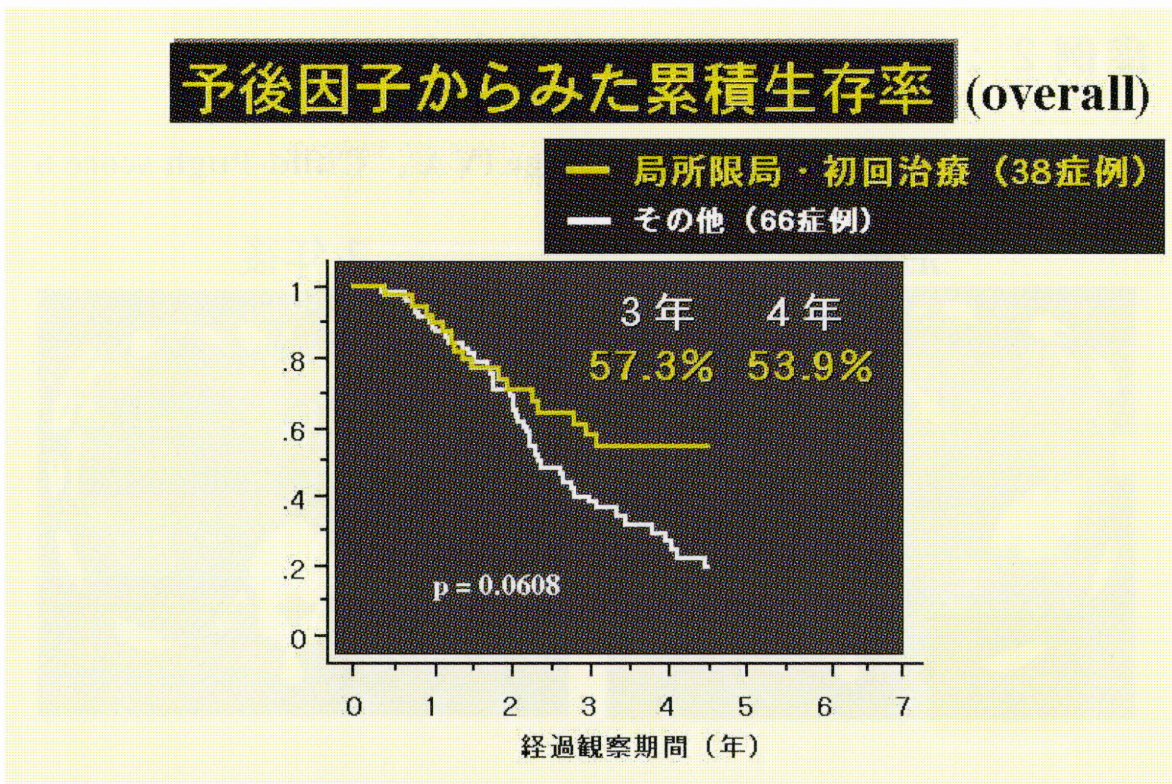


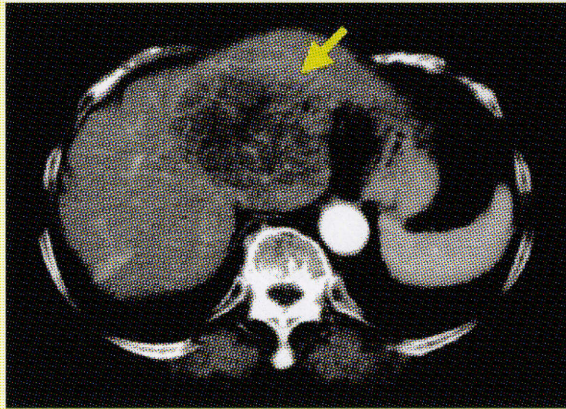
図4 予後因子からみた累積生存率：局所限局・初回治療例とその他の例の治療成績



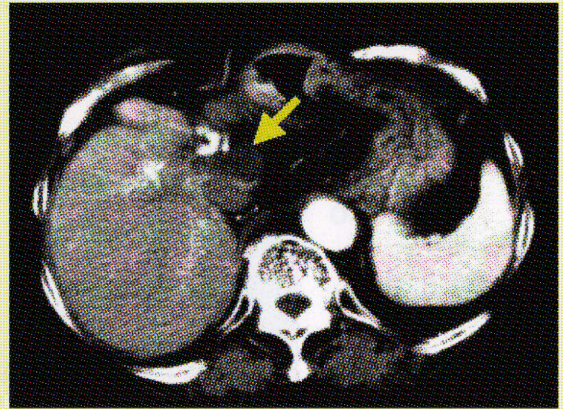
**症例 1 : 66.0GyE/15frs.、 6.5 年生存中**

76才、女性、S1、 8.5cm、 Stage IVA、 Child-Pugh score 6

治療前



1 年後

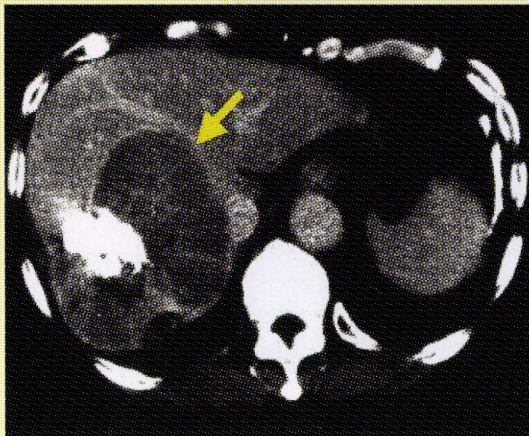


症例 1

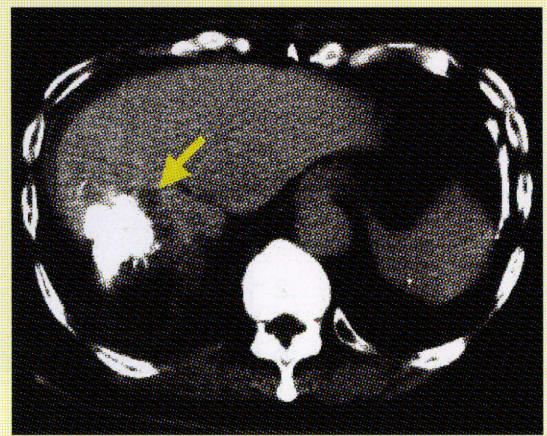
**症例 2 : 52.8GyE/4frs.、 2 年生存中**

71才、男性、S7、 11.2cm、 Stage IVA、 Child-Pugh score 6

治療前



1 年後



症例 2



## I. 重粒子線はこんな疾患に効く

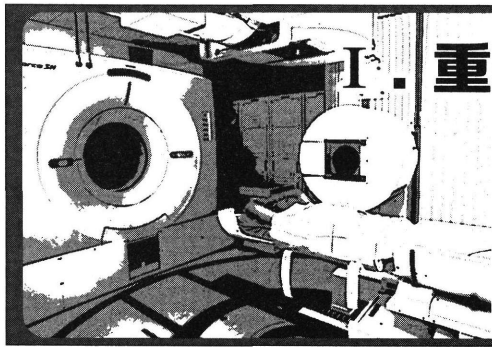
癌治療体系の中に本治療法を組み込むことである。

重粒子線治療の臨床試験は今のところ原発性肝癌の大半を占める肝細胞癌を対象として行われているが、ここで開発された診断および治療法、有害反応および治療効果の評価・判定方法等は、他の肝癌にも即応用可能であることから、近い将来、胆管細胞癌もしくは転移性肝癌を対象とした重粒子線治療の研究が行われる可能性は高い。

### 参考文献

- 1) 日本肝臓学会: 肝がん白書. 1999
- 2) 日本肝癌研究会: 第14回全国原発性肝癌追跡調査報告. 進行印刷出版, 2000
- 3) Afonso Ribeiro, David M. Nagorney, and Gregory J. Gores: Localized Hepatocellular Carcinoma: Therapeutic Options. *Current Gastroenterology Reports* 2:72-81, 2000
- 4) Group d'Etude et de traitement du carcinome hepatocellulaire: A comparison of lipiodol chemoembolization and conservative treatment for unresectable hepatocellular carcinoma. *N. Engl. J. Med.*, 13: 1256-1261, 1995
- 5) Bruix J, Llovet JM, Castells A, et al: Transarterial embolization versus symptomatic treatment in patients with advanced hepatocellular carcinoma: Results of a randomized, controlled trial in a single institution. *Hepatology* 27: 1578-1583, 1998
- 6) Higuchi T, Kikuchi M, Okazaki M. Hepatocellular carcinoma after transcatheter hepatic arterial embolization. *Cancer* 73: 2259-2267, 1994
- 7) Adachi E, Matsumata T, Nishizaki T, et al: Effects of preoperative transcatheter hepatic arterial chemoembolization for hepatocellular carcinoma. *Cancer* 72: 3593-3598, 1993
- 8) Cheng J C-H, Chuang VP, Cheng SH, et al: Local radiotherapy with or without transcatheter arterial chemoembolization for patients with unresectable hepatocellular carcinoma. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 47: 435-442, 2000
- 9) Guo W-J, Yu E-X: Evaluation of combined therapy with chemoembolization and irradiation for large hepatocellular carcinoma. *Br. J. Radiol.* 73: 1091-1097, 2000
- 10) Ohto M, Ebara M, Yoshikawa M, et al: Radiation therapy and percutaneous ethanol injection for the treatment of hepatocellular carcinoma, in Okuda K, Ishak KG (ed): *Neoplasm of the Liver*. Tokyo, Springer-Verlag, 1987, pp 335-341
- 11) Curley SA, Izzo F, Ellis LM, et al: Radiofrequency ablation of hepatocellular cancer in 110 patients with cirrhosis. *Ann. Surg.* 232: 381-391, 2000





# I. 重粒子線はこんな疾患に効く

## 4. 前立腺

辻 比呂志

放射線医学総合研究所 重粒子医科学センター病院

Heavy ion radiotherapy for prostate cancer

Hiroshi Tuji

National Institute of Radiological Sciences

---

---

### 〈Abstract〉

---

---

Clinical studies of carbon-ion radiotherapy (CIRT) for prostate cancer have been conducted at NIRS since 1995. From the results of two consecutive phase I/II studies, appropriate dose fractionation and irradiation techniques could be established. A phase II study is now being performed with fixed dose of 66.0Gy and patient stratification by three prognostic factors, clinical stage, initial serum PSA value and Gleason score. As of 2002.7, 170 patients were treated in these three clinical studies. As a result, incidences of rectal and genitourinary morbidities of CIRT were substantially lower than other radiotherapy, particularly with current dose and techniques. Disease-specific survival rate and relapse free rate after CIRT were also better than other radiotherapy, even in the patient subgroup of combined treatment with endocrine therapy. From these results, it can be concluded that the current method of CIRT is sufficiently safe and effective treatment option for prostate cancer. Clinical study should be continued in order to make these results more apparent.

#### I. これまでの臨床試験の経過 (Table 1)

前立腺癌に対する放射線治療では、X線による3次元原体照射や陽子線治療の結果から線量集中性の向上が重要であることが判明している。また過去の速中性子線治療の中で、高い局所効果の認められた疾患の一つであることから高LET放射線が有効な疾患の一つであることも明らかである。従って、高LET放射線であり、かつ線量集中性に優れた重粒子線(炭素イオン線)は、前立腺癌の治

療に非常に適していると考えられる。

放射線医学総合研究所(以下、放医研)では、前立腺癌の治療における炭素イオン線治療の有用性を調べるため、平成7年6月より臨床試験を開始した。初期には、前立腺癌に対する適切な炭素イオン線治療法を確立するため、第I/II相臨床試験を行った。最初はB2、C期の局所進行癌を対象として、炭素イオン線治療の安全性と有効性を調べる線量増加試験を行った。炭素イオン線の線量分布上の利点を生かすために、照射領域は前立腺お

Table 1. Clinical Studies of Carbon-ion Therapy for Prostate Cancer (1995.6.~)

Protocol	Study Design	Stage	Period	No. of Pts.
9402	Phase I / II Dose escalation	B2~C	95.6~97.12	35
9403	Phase I / II Dose escalation	A2~C	98.1~00.2	62
9404	Phase II	A2~C	00.4~ongoing	93

\*2 patients were dropped out for patient's refusal

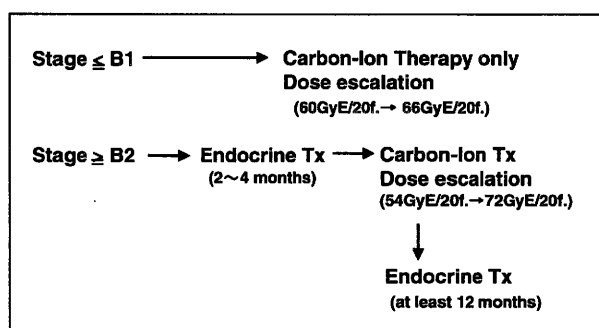


Fig.1 Treatment method in phase I/II clinical studies (1st and 2nd protocol) of C-lon RT for Prostate Cancer

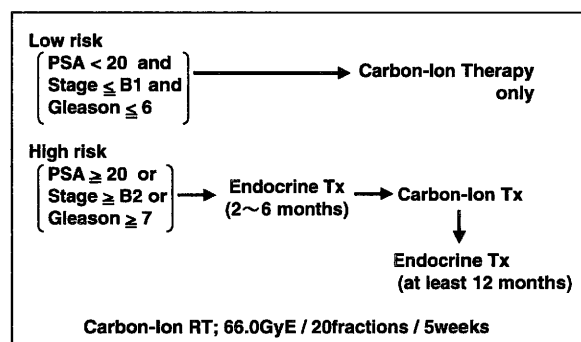


Fig.2 Treatment method in phase II clinical study (3rd protocol) of C-lon RT for Prostate Cancer

よび精のう腺のみとし、骨盤照射は行わなかった。そのため治療開始前に骨盤リンパ節廓清を行って、病理学的な病期診断を行うことを推奨するとともに、全例内分泌療法の併用を行った。この最初の臨床試験により、前立腺癌に対する炭素イオン線の適正線量が確定し、正常組織の有害反応を効果的に回避するための照射技術が確立できた。

2つめのプロトコルでは、適応をB1期以下にも拡大し、内分泌療法を併用しない炭素イオン線単独療法を実施するとともに、B2期以上の症例では最初のプロトコルで確立した線量、治療法の安全性の検証を行った(Fig.1)。その結果、C期以下のすべての前立腺癌に対する炭素イオン線治療法が確立した。

平成12年4月からは、それまでの試験によって確立された治療法を用いて、第II相臨床試験を開始した。この試験では、内分泌療法併用の基準について、治療前PSA(前立腺特異抗原)値、病理のGleason scoreといった病期以外の予後因子も考慮することにした(Fig.2)。すなわちB1期以下、PSA値20ng/ml未満、Gleason score6以下の3条件を満たす症例は炭素イオン線単独療法とし、それ以外の症例は内分泌療法併用治療を行うことと

した。この試験は現在の実施継続中であり、平成14年7月までに93症例がプロトコルに従った治療を受けた。

## II. 症例の内訳

3つの試験を通じて、平成7年6月から平成14年7月までに170症例が炭素イオン線治療を受けた。この内治療前に病期診断のための骨盤リンパ節廓清を受けた症例は27例であった。局所の進行度を示すT-分類病期別では、B1期以下に該当するT1b, T1c, T2a症例が合計58例、B2期以上に該当するT2b, T3症例が112例であった(Table 2)。治療前PSA値別では20ng/ml未満が94例、20以上が76例であった。

3つ目の試験では病理診断の判定基準の統一を図るためセントラルパソロジーを採用し、すべての症例の病理標本の診断を依頼している。データ解析に当たって、それ以前の症例についても病理標本を再収集し、可能な限りセントラルパソロジーによるレビューを行った。結果的に170例中156例で病理診断のレビューが可能であった(Table 3)。Gleason score別の内訳は、6以下が56例、7が60例、8以上が40例であった。

Table 2. Patient Characteristics (1) Clinical Stage & Pretreatment PSA

PSA (ng/ml)	T1d,c		T2a		T2b		T3		Total
	NO	pNO	NO	pNO	NO	pNO	NO	pNO	
<20	26	2	19	0	20	6	16	5	94
20-50	5	0	3	2	13*	3	14	5	45
50≤	0	0	1	0	3	2	23	2	31
Total	31	2	23	2	36*	11	53	12	170

\* including 2 patients with pN1 (solitary positive LN)

Table 3. Patient Characteristics (2) Clinical Stage & Gleason score (review)

Gleasonsum	T1b,c		T2a		T2b		T3		Total
	NO	pNO	NO	pNO	NO	pNO	NO	pNO	
≤6	14	1	13	0	10*	3	11	4	56
7	14	1	5	1	13	4	18	4	60
≥8	2	0	3	0	8*	3	20	4	40
Total	30	2	21	1	31*	10	49	12	156

\* including 2 patients with pN1 (solitary positive LN)

Pathological review was performed in 156 patients (91.8%)

### III. 結果

#### III-1. 正常組織有害反応

初期の線量増加試験において、計7例の直腸もしくは膀胱/尿道の3度遅発性有害反応を生じた。これらの症例に関して詳細な分析を行った結果、高度有害反応の危険因子としては①高線量(72.0GyE/20回分割)、②直腸への高線量および広範な照射容積(線量-容積ヒストグラム)、③糖尿病の合併などがあることが判明した。さらに④頻回の尿道カテーテル操作など物理的刺激の影響も考慮する必要があると考えられた。これを受けて、線量を66.0GyE/20回分割に固定し、直腸線量を低減を図るため治療途中で照射野を縮小するこ

ととした。さらに糖尿病合併例では約5%の線量低減を行い(63.0GyE/20回分割)、尿道カテーテル挿入回数も少なくした。その結果、2つ目の試験以降3度以上の高度有害反応は全く認められなくなった。

結果を他の放射線治療で報告されている有害反応発生率と比較した結果をTable 4に示す。初期の症例を含めても、従来の放射線治療よりは低い発生率であるが、さらに現行の治療法に限ると、X線の3次元原体照射、強度変調照射、さらに陽子線治療などの各種の最新放射線療法のものよりも低い発生率となる。特に直腸については2度の反応が1例で認められただけであり、直腸有害反応を効果的に回避する照射法が確立できたとと言える。

Table 4. Incidence of Gastrointestinal and Genitourinary Morbidity after Radiation Therapy

Morbidity Grade	Conventional RT	3DCRT	Proton	IMRT	C-ion	
					All pts.	Current*
Rectum						
≥2	9.4~43.1%	11.0%	2.1%	2.0%	7.1%	0.8%
3	1.4~12.3%	0.8%	—	0.5%	2.4%	0%
Urethra/Bladder						
≥2	—	7.0%	5.4%	10.0%	9.5%	3.8%
3	~16.0%	0.8%	—	0.5%	4.2%	0%

RT; Radiation Therapy, 3DCRT; Three Dimensional Conformal RT

\* Current Carbon RT is 66.0GyE/20fx with field shrinkage technique

Table 5. C-ion RT and various Phase studies of XRT with androgen withdrawal

Series	No. pts	stage	Hoemone	Dose(Gy)	LC	OS	BCC
EORTC	203	T1-4	(+)	70	97%	79%	81%
	198		(-)	70	77	62	43
RTOG8531	477	T1-3	(+)	65-70	84	75	53
	468		(-)	65-70	71	71	20
MD Anderson	174	C	(+)	70	94%	68	
	174		(-)	70	78	73	
Carbon	129	T1-3	(+)	54-72	98	88	84

LC: Local control OS: Overall survival BCC: Biochemical control at 5 years

膀胱/尿道の有害反応については、今後前立腺癌に対する放射線治療において、直腸に代わって最も重要な臓器となるものと考えられるが、炭素イオン線治療では、これについてもすでに2度の反応5%未満、3度の反応0%という非常に安全性の高い治療法を確立することができている。

### III-2. 抗腫瘍効果

170症例中前立腺癌による死亡例は4例のみで、7年原病生存率は94.0%という高値を得ている。これは初期の線量増加試験の症例を含んでいることを考慮すると、極めて良好な治療成績であると言える。PSA再上昇もしくは臨床的再発の有無で評価した非再発率は7年で87.2%であり、多くのC期症例を含んだ症例構成を考慮するとこれも非常に良い結果であると言える。

内分泌療法の併用が放射線療法の治療成績に寄与することについては、すでに数多くの報告がある。内分泌療法併用炭素イオン線治療の結果を、文献と比較してみると(Table 5)、特に生存率と生化学的非再発率において、他より良好な結果が得られている。局所制御についても現行の線量(66.0GyE)では、現時点で100%であり、炭素イオン線が安全性だけでなく、治療効果の点からも他の放射線治療を凌駕するものであることが示された。

### IV. まとめ

平成7年6月から平成14年7月までに炭素イオン線治療を施行した170症例についての結果を分析した。正常組織反応は、初期には3度の有害反応も観察されたが、治療法の改良、適正線量の決定などの対応策が確立してからは、高度の有害反

応は認められなくなった。抗腫瘍効果も、現行の治療では局所再発0%、全例での原病生存率も7年で94%と非常に良好であった。今後、さらに現行の試験を継続し、症例数の増加を図って、この事実をさらに明確にしていくとともに、予後因子別の成績を他治療の成績と比較して、特に炭素イオン線が有用となる症例群の抽出を行いたい。

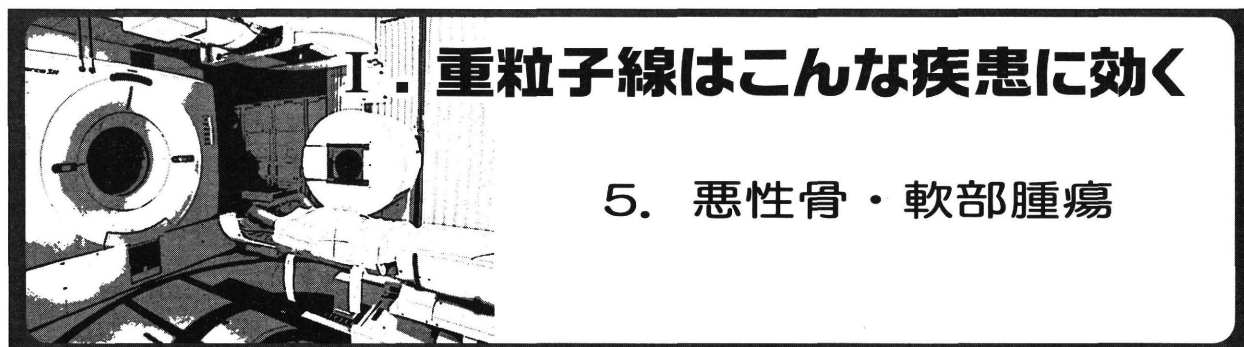
### V. 参考文献

- 1) 重粒子線がん治療臨床試験報告書 -1-, 1998
- 2) 前立腺癌取扱い規約(第2版), 1992
- 3) International Union Against Cancer (UICC): TNM Classification of Malignant Tumours, Fifth Edition. New York: Wiley-Liss, Inc., 1997, pp 170-173.
- 4) Gleason DF: Classification of prostatic carcinomas. *Cancer Chemother Rep* 50: 125-128, 1966.
- 5) American Society for Therapeutic Radiology and Oncology Consensus Panel: Consensus statement: Guidelines for PSA following radiation therapy. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 37: 1035-1041, 1997.
- 6) Shipley WU, Verhey LJ, and Munzenrider JE, et al: Advanced prostate cancer: The results of a randomized comparative trial of high dose irradiation boosting with conformal protons compared with conventional dose irradiation using photons alone. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 32: 3-12, 1995.
- 7) Bolla M, Gonzalez D, and Warde P, et al: Improved survival in patients with locally advanced prostate cancer treated with radiotherapy and goserelin. *N. Engl. J. Med.* 337: 295-



I. 重粒子線はこんな疾患に効く

- 300, 1997.
- 8) Roach MIII, Lu J, and Pilepich MV, et al: Predicting long-term survival, and the need for hormonal therapy: A meta-analysis of RTOG prostate cancer trials. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **47**: 617-627, 2000.
- 9) Vicini FA, Kini VR, Spencer W, et al: The role of androgen deprivation in the definitive management of clinically localized prostate cancer treated with radiation therapy. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **43**: 707-713, 1999.
- 10) Zelefsky MJ, Fuks Z, Hunt M, et al: High-dose intensity modulated radiation therapy for prostate cancer: Early toxicity and biochemical outcome in 772 patients. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **53**: 1111-1116, 2002.



# I. 重粒子線はこんな疾患に効く

## 5. 悪性骨・軟部腫瘍

鎌田 正

放射線医学総合研究所重粒子医科学センター病院

Bone and soft tissue tumors

Tadashi Kamada

National Institute of Radiological Sciences

---

### 〈Abstract〉

---

Unresectable bone and soft tissue tumors were treated with fixed 16-fractions-over-4-weeks phase-I/II and-II studies of carbon ion radiotherapy. Despite the fact that bone and soft tissue tumors are among the most radioresistant tumors, the two-year local control rates in 2 studies were 77 % and 90 %, and the three-year survival rate in the phase-I/II study was 49 %. Carbon ion radiotherapy seems to be a safe and effective modality in the management of bone and soft tissue sarcomas not eligible for surgical resection, providing good local control and offering a survival advantage without unacceptable morbidity.

---

#### 1. はじめに

骨や筋肉などから発生するがんは、悪性骨・軟部腫瘍とよばれる。この腫瘍は、発生が非常に少ないうえに、全身のどこにでも発生しうる。そのため、発見が遅れたり、正確な診断が難しく、良性のはれものとして不完全な治療を受けていることが少なくない。

このような骨・軟部腫瘍の治療として最も一般的なものは腫瘍切除であるが、近年、手術方法の進歩、MR、CT、PETなどの新しい画像診断、手術に化学療法や放射線療法を組み合わせる集学的治療の開発などにより、骨・軟部腫瘍の治療は、大きく進歩している。なかでも悪性の骨腫瘍の大

半を占める四肢に発生する骨肉腫では、化学療法との組み合わせにより、手や足を切断しない患肢温存手術が可能となっただけでなく、治療成績も1970年代には5年生存率で10～20%であったものが、最近では50～80%と著明に改善している。

同様に筋肉などにできる軟部腫瘍においても化学療法や放射線療法と組み合わせた形態や機能を保つ手術が行われ、その5年生存率は70%以上となっている。しかし、脊椎やその周辺、あるいは骨盤などに腫瘍ができた場合や、四肢でも進行した腫瘍、手術後に再発した腫瘍などでは、化学療法の効果が少なかったり、手術が困難であることが多い。また、大半の骨・軟部腫瘍は放射線に抵抗性であることが知られている。近年、大きく進

表1 炭素イオン線治療の適応となる骨軟部腫瘍の条件

**適格条件**

- 1) 骨・軟部原発の悪性腫瘍、あるいはそれに準ずる腫瘍で、病理診断がついている。
  - 2) 切除非適応(切除非適応とは、専門医が根治的手術不能と判断した症例、あるいは患者が切除を拒否した場合)。
  - 3) 原則として治療体積の最大径が15Cmを越えない。
  - 4) 計測可能な病変である。
  - 5) 原則として年齢は14歳以上で80歳以下である。
  - 6) PSは0-2 (KI 60以上)である。
  - 7) 6カ月以上生存の見込みがある。
  - 8) 他に重篤な合併疾患、活動性の重複癌がない。
  - 9) 本人に病名・病態の告知がなされており、かつ本人に同意能力がある。
- また、以下の場合には、参加することができません。

**不適格条件**

- 1) 当該照射部位に放射線治療の既往がある。但し、放射線誘発肉腫、炭素イオン線治療の既往症例についてはプロトコール運用委員会で検討判断する。\*1
- 2) 原発部位が、頭部あるいは上位頸椎(C1-C2)である。
- 3) 化学療法を実施中である、あるいは照射開始時点で終了後2週を経していない。
- 4) 照射領域に活動性で難治性の感染を有する。
- 5) 画像診断上、明らかな血管内腫瘍塞栓を認める。\*2
- 6) 生命の存続に重大な影響を及ぼす転移病巣を有する。
- 7) CT情報を用いての線量計算に影響のある人工物を有する。
- 8) 医学的、心理学的または他の要因により担当医師が不適当と考える。

歩している骨・軟部腫瘍の治療であるが、手術が難しいと判断された患者さんでは、有効な治療法が少ないというのが現状である。

一方、線量の集中性に加えて強い生物効果を持つ重イオン線は、放射線抵抗性の骨・軟部腫瘍に対しても優れた効果を発揮すると期待されている。

本稿では、放射線医学総合研究所(放医研)重粒子治療センターHIMAC(Heavy Ion Medical Accelerator in Chiba)における骨軟部腫瘍に対する重イオン線(炭素イオン線)治療の経験を述べる。

**2. 骨軟部腫瘍に対する重イオン線(炭素イオン線)治療**

**1) 対象および方法**

放医研における骨・軟部腫瘍に対する炭素イオン線治療は、まず1996年6月から2000年2月までの間に57名の64病変に対して炭素イオン線を用いた線量増加試験(第I/II相試験)を行った。その結果をもとに、2000年4月、線量固定の第II相試験が開始され、2002年8月までに60名の65病変を登録治療している。いずれの試験においても切除非適応と判断された骨軟部腫瘍患者が対象とされて

表2 症例のうちわけ(1996.4.-2002.8.)

患者数	: 117名(129 病巣)	
年齢	: 12~85 (ave. 50)	
男/女	: 73/44	
治療部位(129)	: 骨盤	92
	: 脊椎・傍脊椎	27
	: 四肢他	10
腫瘍の状況	: 前治療無し	48
	: 手術後再発(局所)	34
	: 化学療法後	35
	: 転移	10

いるが、その主な症例の選択基準を表1に示した。第II相試験においては、放射線により誘発された腫瘍についてもその対象に含めた一方、血管内腫瘍塞栓のある症例については適応外とした。これら117名(129病巣)のうちわけを表2に示した。年齢は12歳から85歳で平均50歳、男性73名、女性44名である。治療部位は、脊椎・傍脊椎部27部位、骨盤92部位、四肢他が10部位であった。化学療法あるいは切除などの前治療が行われていなかったものは48部位、切除後局所再発が34、化学療法後が35、原発巣治療後の転移巣に対するものが10で

I. 重粒子線はこんな疾患に効く

あった。いずれも4週間16回分割で総線量52.8GyEから73.6GyE(一回3.6~4.6GyE)が照射された。病理診断については、病理標本の中央診断を行い確定した。また試験参加者については、書面による説明と同意を行い同意を得た。

2) 第I/II相試験の結果(表3)

第I/II相試験の結果、73.6GyEで治療された17名中7名ではgrade3のRTOG早期反応が観察され、この時点で線量増加を中止した。これ以外にはgrade3より強い早期反応を認めなかった。以上からこの分割法における最大の投与可能線量として、皮膚が問題となる場合には70.4GyE、それ以外の場合には73.6GyEが明かとなった。また、全体の局所制御率は1年88%、3年73%であった。生存中央値は31カ月(2-60カ月)、1年および3年生存率はそれぞれ82%および46%であった。以上より、切除非適応の骨・軟部腫瘍において炭素イオン線治療が安全かつ有効な根治的治療となる可能性が示唆され、切除非適応の骨・軟部腫瘍を対象として炭素イオン線を用いた第II相臨床試験を行い、その有効性と安全性を明らかにすることが妥当と考えられた。

3) 第II相試験(表4)

症例登録を開始して28ヶ月を経過し、60名を登録、治療を終了し、順調な登録経過となっている。治療後6ヶ月以上経過した解析対象例は46例(+2)で10例で73.6GyE(1回4.6GyE)での治療が行われ、残り38例で70.4GyE(1回4.4GyE)での治療が行われた。現在までのところ、放射線誘発骨肉腫1例とユーイング肉腫1例で局所再発を認めたほか、遠隔再発(肺転移および腹腔内再発等)を11例で認めた。また腫瘍辺縁部での再発を骨肉腫2例、MFH2例で認め、2例では重粒子線での再治療を行った。有害反応としては、これまで皮膚において早期2例、遅発性5例のGrade3の有害反応を認めている。遅発性皮膚障害については、総線量に加えて1)腫瘍皮下浸潤、2)腫瘍体積、3)仙骨部、4)手術既往、5)化学療法追加、6)2門照射が、危険因子となる可能性が示唆されるが、70.4GyEを標準線量とするとともに可能な限り3門以上での照射を行うなど照射技術にも工夫を加え皮膚線量の低減がはかられた結果、回避可能となっている。

表3 第I/II相試験(線量増加)

●平成8年4月~平成12年2月登録終了
●登録:57症例64病変
●4週間16回照射 52.8→73.6GyEまで増加
●局所制御 約70% (3年)
●生存率 約40% (5年)
●最大投与線量:73.6GyEおよび70.4GyE(皮膚広範)

表4 第II相試験(線量固定)

●平成12年4月~平成14年11月登録中	
●登録:73症例77病変	
●primary endpoint 2年局所制御率	
●治療4週間16回照射	73.6GyE
	Or
	70.4GyE(皮膚広範)

3. まとめ

放医研では切除非適応の骨・軟部腫瘍を対象に1996年6月から2000年2月まで炭素イオン線治療を用いた線量増加試験を行ない57症例64病巣に16分割4週間で総線量52.8から73.6GyEまでの線量増加を行った。その結果、これまでのところ約70%局所制御率が得られている。また、副作用として病巣が体の表面に近く、広い範囲の皮膚に高い線量の照射が避けられなかった場合、線量の増加に伴いびらんや潰瘍など強い皮膚の炎症が10%前後の病巣で経験された。その他には強い副作用は認められなかった。

この試験の結果、線量を固定した第II相試験を継続中で、現在、90%以上の局所制御が得られるとともに照射法に工夫を加え、皮膚における強い副作用も回避可能となっている。

参考文献

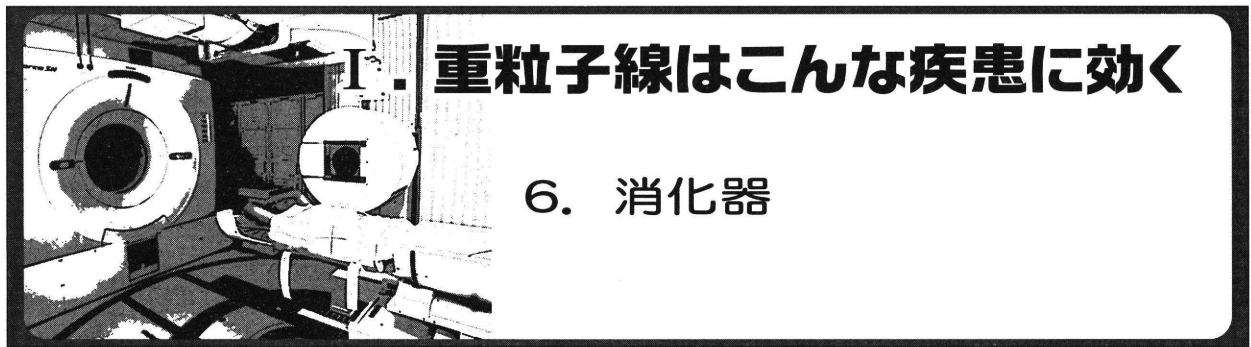
- 1) 鎌田 正 骨・軟部腫瘍の重粒子線治療の基礎と臨床. 先端医療シリーズ 8・整形外科 整形外科診断と治療の最先端 先端医療技術研究所 杉岡 洋一編285-291. 2000
- 2) 鎌田正 骨・軟部腫瘍の重粒子線(炭素イオン)線治療 骨・関節・靭帯13(8):943-946.2000
- 3) 鎌田正 放射線治療における画像診断-炭素イオン線治療の経験から 癌の臨床47(1):86-90.2001
- 4) 鎌田正 骨軟部腫瘍における炭素イオン線治療



医学のあゆみ196(11):801-802.2001

- 5) 鎌田 正 ここまでわかる画像－骨軟部腫瘍－  
放射線治療の効果判定. 整形・災害外科 45(8)  
843-849.2002
- 6) Tadashi Kamada, Hirohiko Tsujii, Hiroshi

Tsujii, et al. Efficacy and Safety of Carbon Ion  
Radiotherapy in Bone and Soft Tissue  
Sarcomas Journal of Clinical Oncology 20  
(22)4466-4471, 2002



# I. 重粒子線はこんな疾患に効く

## 6. 消化器

山田 滋／加藤博敏／鎌田 正／安田茂雄／辻井博彦  
放射線医学総合研究所 重粒子医科学センター病院

### HEAVY ION RADIOTHERAPY FOR GASTROINTESTINAL CANCER

Shigeru Yamada／Hirotohi Kato／Tadashi Kamada／  
Shigeo Yasuda／Hirohiko Tsujii

Research Center of Charged Particle Therapy Hospital, NIRS, National Institute of  
Radiological Sciences, 4-9-1 Anagawa, Inage, Chiba 263-8555, Japan

---

---

#### 〈Abstract〉

---

---

From June 1994 to July 2002, a total of 1297 patients were enrolled in clinical study with carbon ions at NIRS. Carbon ion therapy offers the potential advantages of improved dose localization and enhanced biological effect. Tumor sites includes head and neck, brain, lung, liver, prostate, uterine, bone and soft tissue and other locally advanced, unresectable tumors. Phase I/II and II studies are underway in each tumor with carbon ions. The results have shown that carbon ion therapy has potential ability to provide a sufficient dose to the tumor with acceptable morbidity in the surrounding normal tissues. Tumors that appear to respond favorably to carbon ions include locally advanced tumors or those with non-squamous histology such as adenocarcinoma.

This present discusses the experience in using carbon charged particles in treating 18 patients with pancreas carcinoma as preoperative radiation therapy and 10 patients with pelvic recurrence of rectal cancer at NIRS between 1999 and 2001. Our results clearly suggests the usefulness of heavy ion radiotherapy in the treatment of pancreas carcinoma and rectal cancer compared to conventional photon radiotherapy.

1994年に開始された重粒子線治療は2002年7月までに約1300人の患者を治療し、優れた線量分布と殺細胞効果の高い生物学的特性を示してきた。これらの実績より、最も頻度が高く従来放射線抵抗性であるとされていた消化器癌に応用するため、2000年より膵臓癌、さらに2001年より直腸癌に対

する第I/II相臨床試験が開始された。ここではこれらの臨床試験の概略について解説する。

#### 直腸癌術後再発の治療について

#### 直腸癌術後再発に対する治療の現状

直腸癌の骨盤内局所再発は近年、術式や手術操

作の改良により低下してきているが、現在でも手術後約10～40%に再発はみられている<sup>1)</sup>。この局所再発形式としては、吻合部および吻合部周辺の再発、骨盤内リンパ節再発、剥離面の再発、会陰縫合部再発などが含まれ、患者は違和感・疼痛をはじめとする種々の症状に悩まされることが多い。消化器癌のなかで、直腸癌は比較的限局的な発育をすることが知られている。再発症例も遠隔転移がなく局所再発のみの割合が多く、比較的長期間、再発巣を持ったまま生存するため、極めて管理に難渋するが、逆に局所を制御できれば十分な生命予後の延長を期待できると考えられる。

再発病巣に対する治療は現在外科的切除が第一選択であるが、切除不能なものが多い。しかし治療切除可能であれば、再切除後の5年生存率は30%前後、50%生存期間は25ヶ月前後と比較的良好である<sup>1)</sup>。治療切除を施行するためには十分なSurgical Marginをとる必要があり、骨盤内臓全摘術が適応となることが多い。しかし骨盤内臓全摘術では失う機能が多く、また創治療遷延、骨盤内感染などの術後合併症もしばしば認められ、とくに局所再発における骨盤内臓全摘術では一般的に手術時間10時間以上また出血量6000ml以上の大手術であることが多く、患者への侵襲がかなり大きく重篤な合併症や在院死も経験する。一方、直腸癌手術後再発における放射線治療の成績は決して良好とはいえ、Median Survivalで1年前後、3年生存率は10%以下という報告がほとんどであり、従来のX線照射では十分な治療効果を得ることができなかった<sup>2)</sup>。その理由として、1.直腸癌は分化度の比較的高い腺癌であることが多く、さらに腫瘍が大きく間質が多くさらに術後であることより血流が少なく腫瘍の低酸素分画が多いことより放射線感受性が低いこと、および2.周囲の消化管、膀胱など比較的耐容線量が低い重要臓器を照射野から外すことが困難なため、十分量の放射線を病巣に集中させることができなかったこと、などが考えられている。

### 重粒子線治療が期待される理由

炭素イオン線の場合は高LET (linear energy transfer) 放射線としてX線に比べて高い生物効果を呈する。重粒子線と同様の高LET放射線である中性子線<sup>3)</sup>および我々の重粒子線<sup>4,5)</sup>の臨床試験

の結果から、腺癌系に対しても有効性が示されていることより、同じ腺癌系である直腸癌に対しても有効な治療法と考えられる。また炭素イオン線では、通常の放射線に比べて標的領域に高い線量を集中できるため腸管・膀胱など周囲の正常組織への線量を低く抑えることができ、切除困難な腫瘍組織等に対して優れた治療効果が期待できる。したがって、重粒子線を直腸癌術後再発に応用し、再発病巣に線量を集中して照射を行えば、患者に過大な負担をかけることなく治療成績を向上させることができる可能性があると考えられた。

### 重粒子線治療プロトコールの概要

直腸癌切除後の骨盤内局所再発における炭素イオン線治療(4週間・16回照射)の第I/II相臨床試験を行い、正常組織反応および抗腫瘍効果を明らかにし、併せて直腸癌術後再発に対する炭素イオン線治療技術を開発、確立することを目的とする。対象は、原発性直腸癌切除後の骨盤内に限局する再発病変で、先行する大腸癌切除の組織学的手術根治度Aであり、かつ明らかな骨破壊像・膀胱浸潤を認めず、臨床的標的体積内に消化管が含まれない病変である。重粒子線としては炭素イオン線を用い、照射は67.2GyE/16回/4週間 (一回線量4.2GyE)から開始し、少なくとも5症例ずつに関して、照射効果と安全性を確認しながら原則として5%ずつの線量の増減を行うものとした。

現在、本試験は進行中であるため詳細は近々報告する予定であるが、臨床試験に先立ち重粒子線治療を行った直腸癌局所再発の患者を提示する。

### 症例

重粒子線にて治療した症例を示す(図1)。54歳男性、1992年に直腸癌にて腹会陰式直腸切断術が施行されている。その後1999年右水腎症と腫瘍マーカーの上昇(CEAが7.5ng/ml)が認められCT検査にて骨盤内右梨状筋前面に腫瘍が認められ、直腸癌術後リンパ節再発と診断される。炭素イオン線70.4GyE/16回を3門にて照射した。治療直後は画像上大きな変化はなかったが、治療3ヶ月後は腫瘍は縮小しenhanceされなくなり、3年後線維化を残すのみとなった。皮膚・消化管をはじめ現在までのところ副作用は認められていない。

重粒子線を直腸癌術後再発に対する治療に応用

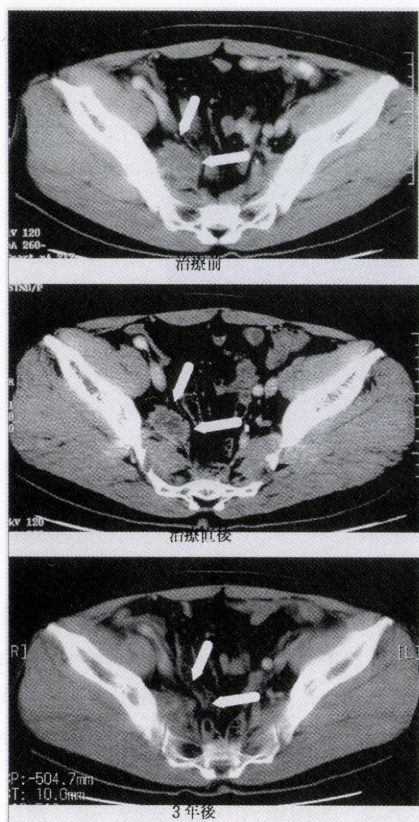


図1 CT像, 54才男性, 直腸癌再発

することにより、患者に過大な負担をかけることなく治療成績を向上させることができる可能性があると思われた。

### 膵臓癌の治療について

#### 膵臓癌に対する治療の現状

膵臓に対する治療は現在外科的切除が主流であるが、5年生存率は極めて低く、手術単独では十分な効果が期待できない。この原因は、後腹膜における微小癌遺残による局所再発が肝転移と並んで主なものと考えられている<sup>6)</sup>。後腹膜再発の対策として、放射線併用療法が施行されてきたが、従来のX線照射では十分な治療効果を得ることができなかった。その理由として、1.膵臓は低酸素分画が多い腺癌であり<sup>7)</sup>、通常の放射線に対して感受性が低いこと、および2.周囲の消化管、肝、腎、脊髄など比較的耐容線量が低い重要臓器と、消化管、胆管、残存膵の手術吻合部を照射野から外すことが困難なため、十分量の放射線を病巣に集中させることができなかったこと、などが考えられている。

#### 重粒子線治療が期待される理由

重粒子線臨床試験の結果より、重粒子線は①従来の放射線に抵抗性を示す腺癌や肉腫さらに低酸素細胞などに効果が高く、②ミリ単位で照射線量を制御可能な優れた線量分布が得られることより腸などの臓器を避けることが可能であることなどの特徴が示された。実際、重粒子線と同様の高LET放射線である中性子線の切除不能膵臓癌に対する治療臨床試験の結果から、優れた局所制御効果が示されたが、同時に消化管の障害が4分の1近くに認められ<sup>8)</sup>、線量分布の改善が望まれた。これより優れた線量分布を有する重粒子線は膵臓癌に対しても有効な治療法と考えられた。

#### 重粒子線治療プロトコールの概要

術後の局所再発を抑え治療成績を向上するため、2000年より膵臓に対する術前重粒子線治療の第I/II相試験が開始された。術前照射の利点は、①術後照射に比べて術後の回復に依存しないため治療期間を短縮し、治療完遂できる患者の割合を増加させる、②早期の治療は微小転移を抑制するうえでも有用である、③術前照射は照射された臓器を切除するため照射容積を考慮すると毒性が少ない、④組織学的治癒切除を増加する、⑤画像上切除不能膵臓癌を切除可能にする、などが挙げられる。目的は、術前重粒子線治療(4週間・16回照射)の正常組織反応および抗腫瘍効果を明らかにし、併せて膵臓癌に対する炭素イオン線治療技術を開発、確立することである。適格条件は、画像診断による臨床進行度が病期I～IVa(A2とA3は対象外)の膵臓原発の浸潤性膵管癌である。重粒子線としては炭素イオン線を用い、照射線量は44.8GyE/16Frから開始した。2002年2月までに10例エントリーし治療を行った。照射前臨床病期は全例IVa期であった。全例に手術が施行され、9例は切除術、1例にバイパス術が施行された。副作用については、消化管・骨髄・皮膚等にgrade3以上(NCI-CTC)の急性期障害は認められていない。現在施行されている術前放射線化学療法は、局所制御においては比較的良好な結果が認められるが、副作用として胃腸障害(吐気、嘔吐、脱水)が強く入院加療を必要とする患者が3分の1から2分の1と報告されている<sup>9)</sup>。本試験では現在までのところ治療期間中重篤な合併症は認められず、治療を休



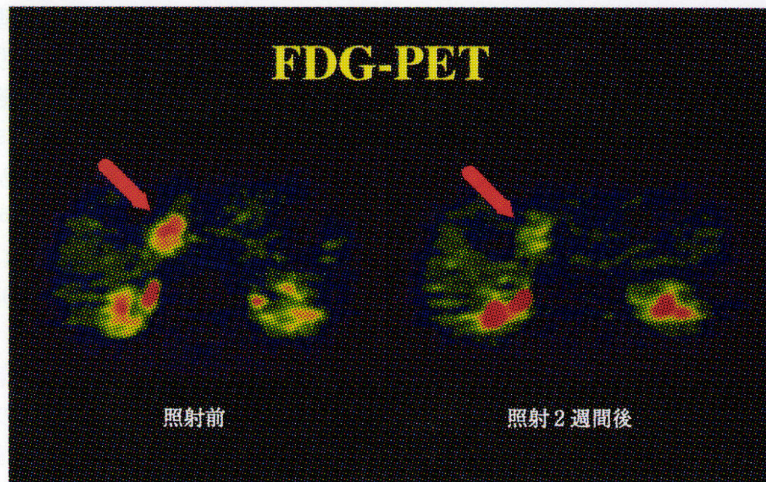


図2 PET像, 55歳男性, 膵頭部癌

止・中止した症例もなく安全に治療が施行できると考えられる。治療成績では、現在までのところ局所再発は1例も認められていない。

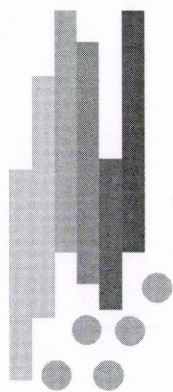
#### 症例

重粒子線にて治療した症例を示す。55歳男性。CTにて膵頭部に30mmの腫瘍を認めCTにて膵頭部癌の診断であった。炭素イオン線44.8GyE/16回を4門にて照射した。治療直後はCT画像上大きな変化はなかったが、FDG-PETでは集積が明らかに低下していた(図2)。また治療前には認められた胃潰瘍も治療後には癒痕化していた。

以上の結果より膵癌に対する術前重粒子線治療は安全に施行され、かつ効果の高い治療法として期待された。

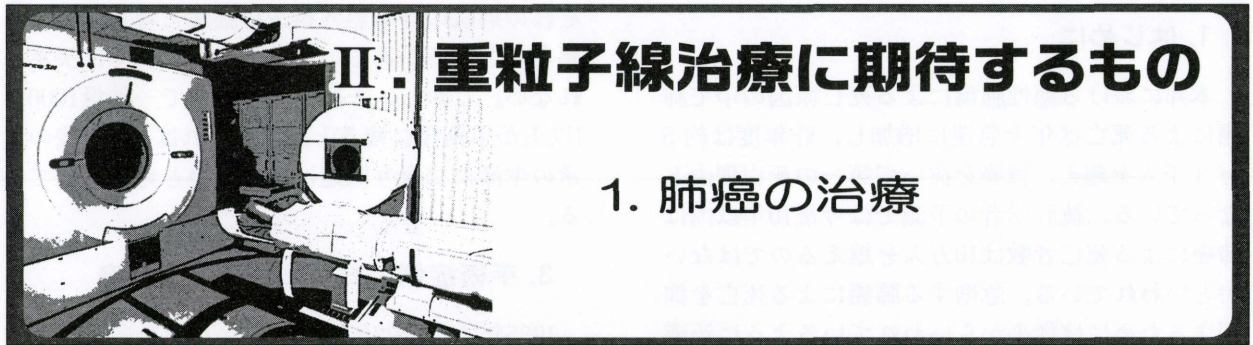
#### 参考文献

- 1) 加藤知行, 平井 孝, 荒井保明: 直腸癌局所再発の治療 消化器外科17:317-324, 1994
- 2) 中間昌博, 酒井 修, 菅原 正: 手術後再発直腸癌に対する放射線治療成績の検討 臨放 35: 1613-1618, 1990
- 3) Laramore G.E. :The use of neutrons in Cancer Therapy. *Seminars in Oncology* 24(6), 672-685, 1997
- 4) Tujii H., Morita S., Miyamoto T. et al : The current status and prospective of heavy-ion therapy. Proc. Of 6th international meeting on progress in radio-oncology ICRO/OGRO6, Italy, 709-721,1998
- 5) 辻井博彦, 森田新六, 宮本忠昭, 他 放医研における重イオン線治療の現状と将来, 重粒子線の基礎と臨床, 医療科学社, 6-17, 2000年
- 6) 羽生富士夫, 今泉俊秀: 消化器癌の術前・術中・術後照射 医学書院, 東京,131-138,1992
- 7) Koong A. C., Mehta V. K., Le Q. T., Fisher G. A., Terris D. J., Brown J. M., Bastidas A. J. And Vierra M. Pancreatic tumor show high levels of hypoxia. *Int. J. Radiation Oncology Biol. Phys.* 48: 919-922, 2000
- 8) Cohen L., Hendrickson F. R., Lennox A. J., Kroc T. K., Hatcher M. A., Bennett B. R. Pancreatic Cancer: Treatment with neutron irradiation alone and with chemotherapy. *Radiology* 200, 627-630, 1996
- 9) Hoffman J. P., Lipsitz S., Pisansky T. et al., Phase II trial of preoperative radiation therapy and chemotherapy for patients with localized, respectable adenocarcinoma of the pancreas. *J. Clin. Oncol.* 16 317-323, 1998



## II. 重粒子線治療に期待するもの





## Ⅱ. 重粒子線治療に期待するもの

### 1. 肺癌の治療

藤澤 武彦

千葉大学大学院 医学研究院 胸部外科学

Lung Cancer

Takehiko Fujisawa, M.D.

Professor and Chairman, Department of Thoracic Surgery, Graduate School of  
Medicine, Chiba University

---

#### 〈Abstract〉

---

Lung cancer is the leading cause of death among malignant tumors in Japan and statisticians predict that the death rate by lung cancer will increase twice or 2.5 times within 10 years. Early detection and early resection are the first task to decrease the death rate, and radiotherapy and chemotherapy should be improved. In this paper, the present status of syrgical treatment for lung cancer was summarized and the possibility of heavy ion therapy for lung cancer was discussed in comparison with surgical result.

Overall 5-year survival ratea in stages I,II,III and IV were 78%, 42% 29% and 16% respectively. The survival rate in stage I was correlated with tumor size and that in lung cancer of tumor size 2cm or less was about 90%. If lung canoor is found at early stage, lung cancer can be cured. Limitation of detection of lung cancer is 2.3mm in hilar aqusmous cell carcinoma by autofluoresceuce bronchoscopy and 5-10mm in peripheral adenocarcinoma by high resolution CT.

Less invasive surgery by video-assisted thoracoscopic surgery was applied to stage I lung cancer and the result was satisfactory. However, most lung cvancer patients are heavy smokers with underlying lung diseases including COPD and there are many patients not indicative for less invasive surgery.

Preliminary resulta of heavy ion therapy showed remarkable improvement compared with that with conventional radiation therapy. Three-year survival rate of stage I in Protocol 9802 is 80%, almost the same with that in surgical result, indicating the possibility becoming the established therapeutic modality in stage I lung cancers, in patients with marginal biological function for surgical treatment, in particular.

---

## 1. はじめに

本邦における悪性腫瘍による死亡原因の中で肺癌による死亡は年々急速に増加し、昨年度は約5万3千人を超え、胃癌を抜いて第一の死亡理由となっている。統計学者の予測では今後10年以内に肺癌による死亡者数は10万人を越えるのではないかとされている。急増する肺癌による死亡を抑制するためには従来からいられているように治療の最も基本である早期発見と早期手術の方法を確立することが極めて重要である。また放射線療法や化学療法の進歩もみられている。本講演では現時点における肺癌の診断と治療の現状と進歩につき述べ、外科療法の成績と重粒子線治療成績を対比し、重粒子線治療の可能性につき考察した。

## 2. 組織型と治療方針

肺癌の組織型は大きく腺癌、扁平上皮癌、大細胞癌、小細胞癌の四つに大別され、小細胞癌以外の3つはまとめて肺非小細胞癌と呼ばれ、小細胞癌とは治療方針が異なる。腺癌や大細胞癌は胸部X線写真やCTで発見される肺の末梢に多く発生し、扁平上皮癌や小細胞癌は心臓に近い肺門に多く発生する。小細胞癌では抗癌薬剤による化学療法が第一選択の治療であるが肺非小細胞癌では外科療法が第一選択の治療法となる。

肺非小細胞癌においてはⅠ期、Ⅱ期が手術の良い適応であり、Ⅲ期の一部にまで手術が行われる。その他のⅢ期およびⅣ期には通常手術は行われない。Ⅳ期でも肺内および脳への転移は原発の肺癌と転移の癌を手術するときがある。手術不能例に対しては放射線療法および化学療法がそれぞれ単独または複合して行われる。

小細胞癌では末梢発生のⅠ期には手術が第1選択の治療法となり、術後化学療法を追加する。その他には化学療法が第1選択の治療法となる。中枢発生のⅠ期およびⅡ期では化学療法後手術を行い、術後放射線療法・化学療法を追加する。Ⅲ期でも化学療法の効果が腫瘍の消失する「完全寛解」または「部分寛解」の場合は手術が行われる場合もある。化学療法の効果がみられない「不変」または腫瘍が増大したり、新しい病巣が出現した「増悪」には手術は行わない。Ⅳ期例には当然手術適応はない<sup>1)</sup>。

心肺機能による肺癌の手術を行うか否かはそれ

ぞれの病院の呼吸器外科医の経験と考え方により異なるところがあるので絶対的な数値では決定されない。しかし、一般的に肺活量で一秒量1000ml以上が手術後に残ると計算されれば、手術後の通常の生活には余り問題はないものと考えられている。

## 3. 手術症例における病期と生存率

1985年より1998年までに切除した全症例の5年生存率はⅠ期73% (Ⅰa 84%, Ⅰb 60.5%), Ⅱ期42% (Ⅱa 60.2%, Ⅱb 38.7%), Ⅲ期29%, Ⅳ期16%である。病期の進行と共に生存率が低下することが明らかである(図1)。またⅠ期でも腫瘍径が小さければ小さいほど5年生存率は良好となり、直径2cm以下のものの5年生存率は約90%と極めて良好であることから、早期に発見し、早期に切除することが大変重要である(図2)。Ⅲ、Ⅳ期例の5年生存率は不良である理由は遠隔転移再発が高頻度にみられることであることから、遠隔転移の抑制が極めて重要である。

## 4. 早期発見法

肺癌を発見するには胸部X線写真が代表的なものである。最近では新しい機器の開発とともに極めて小さな肺癌も検出可能となってきた。また喀痰細胞診も重喫煙者、血痰のでた者、石綿等の肺癌と関連性が考えられているものを扱っている職業についている者に早期肺癌の検出に有効である。

### 蛍光内視鏡(LIFE)検査

LIFEは微弱なヘリウム・カドミウム・レーザーを気管支鏡を通して気管支に照射すると正常気管支は緑色蛍光を発するのに対して、癌または前癌病変では暗赤色の蛍光を発し、その違いをモニター上に描出して診断するシステムである(図3)<sup>3)</sup>。喀痰細胞診で悪性または悪性を疑う細胞が認められた者はこの新しい検査であるLIFEの最も良い適応である。LIFEを用いることにより、通常の気管支鏡検査では診断が困難であった早期肺癌や前癌病変と考えられている異型扁平上皮化生が高頻度に検出されるようになってきた。早期肺癌の中でも最も早期の数mmの上皮内癌も検出できる時代となってきた。



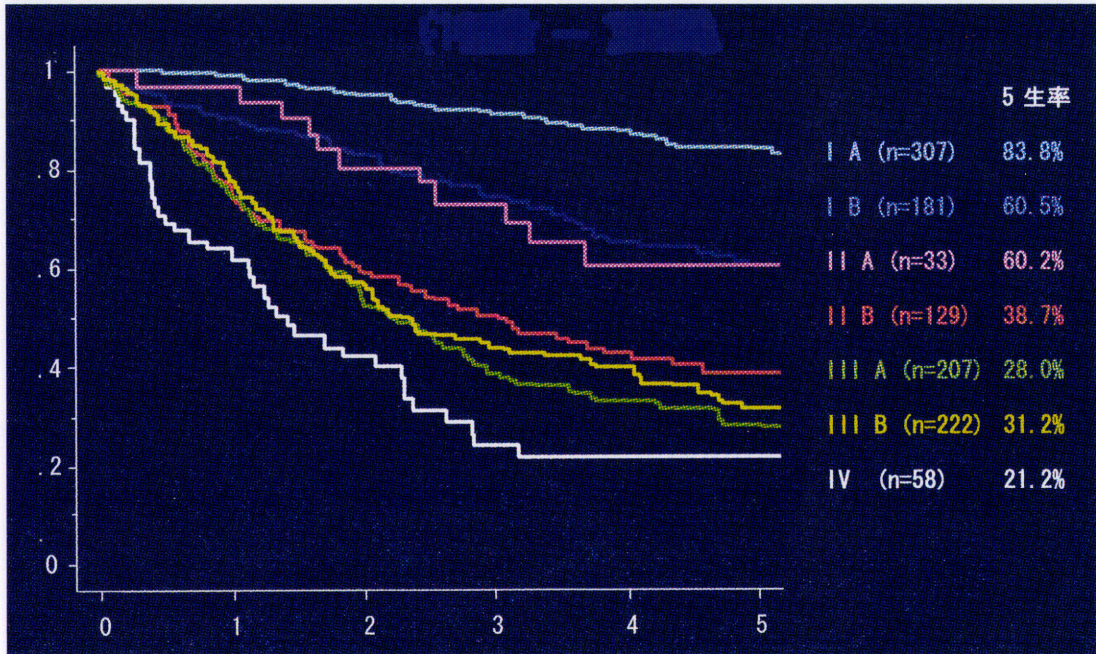


図1 肺癌切除例の病期別術後成績(1985-1998)

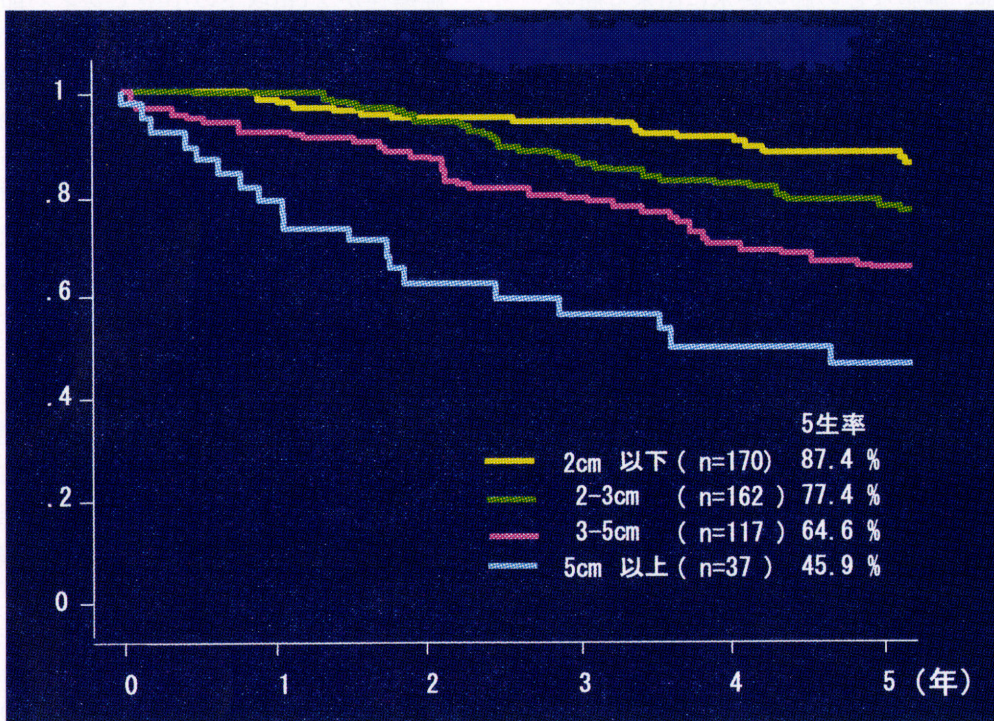


図2 腫瘍径によるI期肺癌の術後生存率(1985.1-1998.8)



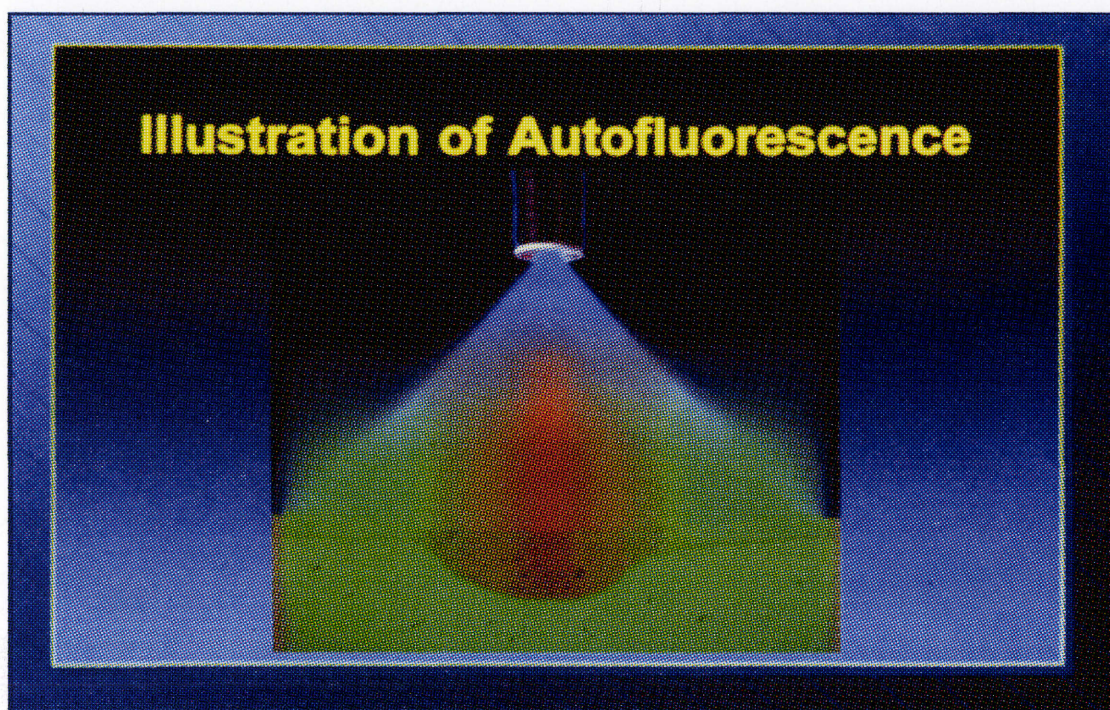


図3 蛍光内視鏡(LIFE)画像

### CT検査

肺の片縁部、肺胞などの肺の終末に出来る癌の検出に有用である。胸部X線写真では1 cm以下のものは検出が困難である場合がほとんどであるが、CTでは5 mmから10mmの肺癌の検出も可能となってきた。特に腺癌の発見に有用で、検診にも用いられ始めている。千葉県では結核予防会が中心となり車載型スパイラルCTを富浦町および長生村住民を対象に稼動しており高い肺癌の発見率が注目されている。

## 5. 手術法の変遷

### 肺葉切除および拡大切除

肺癌の確立された標準的術式は肺葉切除兼縦郭リンパ節郭清である。しかし、癌が胸壁、縦郭、横隔膜に浸潤したり、左右主気管支の近くに発生している場合には拡大切除が施行される。拡大切除術式としては肺全摘術、胸壁合併切除、横隔膜合併切除、左房合併切除、上大静脈または大動脈合併切除がある。従来は癌を完全に切除するという考えから切除する範囲を拡大する傾向にあったが、最近では小型肺癌の発見率が上昇するとともに切除範囲の縮小も検討され始めている<sup>2)</sup>。

### 縮小切除および低侵襲手術

腫瘍径が2 cm以下の小型でリンパ節転移がない場合には区域切除または部分切除が肺機能温存を目的に施行される時があるが、その適応については未だ確立していない。問題点は手術前でのリンパ節への転移がないことを証明する方法が不十分であることである。しかし、癌の発見が早期で小型になればなるほど切除する肺容量は少なくなり、肺機能を温存した縮小手術が可能となる。縮小手術は現時点における外科療法の最も熱い論議のある課題の1つである。

胸腔鏡下肺葉切除術は低侵襲術式として確立されつつあるが、IA期が適応であると考えている。部分切除または区域切除が小型肺癌の確立した術式となりうるかは結論できる時点には至っていないが、低肺機能例には試みられるべきである。

## 6. 重粒子線治療への期待

臨床病期I期肺非小細胞癌の外科療法後の5年生存率は約70から75%である。従来の放射線治療に比し重粒子線治療成績は格段に良好であることが証明されつつある。プロトコル9802では照射後3年半の経過観察ではあるが、生存率は約

## II. 重粒子線治療に期待するもの

80%とI期肺非小細胞癌切除術後の成績に近づきつつある。さらに、肺門部早期扁平上皮癌は重粒子線治療で治癒可能である。今後長期にわたる症例の追跡による局所再発、二次癌の発生、肺気管支障害等の問題が解決された時、外科療法と拮抗する治療法となりうる可能性を含んでいるものとする。

### 7. おわりに

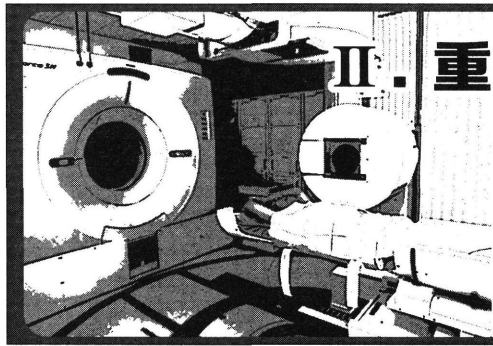
最近における医療工学分野の進歩には目覚ましいものがある。肺癌の診断にも著しい向上がみられている。肺の末梢の肺癌の診断については、従来2cm以下は小型の肺癌と定義され、1cmがその限界であるとされていたが、ヘリカルCTの導入により、その診断限界は現在5mmとなってきた。癌の存在する部位にもよるが、胸腔鏡下手術またはCTガイド下針生検により5-10mmの微

小な肺癌の診断も可能となってきた。一方、肺門部発生扁平上皮癌ではLIFEを用いることにより数mmの極めて微小な肺癌の診断も可能であり、これが現時点での診断限界であるといえる。肺癌の早期診断法は急速に進歩しており、侵襲の少ない治療法により根治も可能となり、重粒子線治療はその1つとして有用である。進行肺癌に対する集学的治療の中でも、重粒子線治療の果たす役割は極めて大きいものとする。

### 文献

- 1) 藤澤武彦、斎藤幸雄、馬場雅行、他：肺癌治療のプロトコール、臨床外科55:285-291,2003.
- 2) 飯笹俊彦、藤澤武彦：T因子からみた肺癌手術適応の再検討、日外会誌102:507-510,2001.
- 3) 藤澤武彦、渋谷 潔、星野英久、他、蛍光気管支鏡と気道の前癌病変、内科88:835-837,2001.





## II. 重粒子線治療に期待するもの

### 2. 肝癌の治療

宮崎 勝

千葉大学大学院 医学研究院 臓器制御外科学

## Treatment for Hepatocellular Carcinoma

Masaru Miyazaki, M.D./Professor & Chairman

Department of General Surgery Graduate School of Medicine Chiba University

---

### 〈Abstract〉

---

Cancer treatments for hepatocellular carcinoma(HCC) have been developed in a multi-modalities such surgical resection, ethanol injection, TAE, TAI, microwave and radiofrequency therapies. These multi-modality of cancer treatments have been selected and performed in a different stage and situation of the same patient. In some cases, these modalities have been combined together. However, surgical resection at present occupies the first line of cancer treatments for HCC in most countries. Most patients who underwent surgical resection have recurrent lesions in the remnant liver after surgical resection. These recurrent patients have seldom received repeated hepatectomy due to reduced hepatic functionasl reserve. Now, other interventional treatments except surgery have been applied to these patients and have brought about some beneficial effect on the patients outcome. Heavy particle radiotherapy is expected to have strongly powerful local control effect on HCC. However, it might be an useful therapeutic modality for HCC in considering the combination treatment with surgery.

---

#### 1. 肝癌の治療現況

肝癌の死亡数は本邦においては年間3万人を越えて未だ増加の一途である。肝癌の発生原因は本邦ではその大半がウイルス性肝炎によっている事は周知の事実であり、したがってウイルス排除のターゲットの面から肝癌予防治療の進歩も見られてきている。しかし現場臨床ではいまだ多くの肝癌患者さんを目の当たりに診察する訳でありその治療法の向上も臨床診療上、重要な課題である。

肝癌治療においては外科切除のみならず多くの非手術的なインターベンショナルな手段が確立されてきておりPEITやラジオ波治療などがその代表格として局所療法の代表である外科手術療法の成績に迫ろうとしている。一方従来からある肝動脈化学塞栓療法や肝動脈内制がん剤動注療法は再発例、多発例、肝機能不良例などを中心としてその役割を果たしてきている。肝癌患者さんの病期によっていろいろな治療法を選択していけるような現状であるが、その選択基準はいまだ施設や医師



によって必ずしも一定していない。またその治療成績は10年前に比べて向上してきたものの国民の目から見てまだまだ満足しえるというところには来ていないといえよう。表1に日本肝癌研究会がまとめた全国の肝癌例に対してどのような治療法が選択されたかが示されているが、外科手術が34%、TAEとTAIが45%、59%と最も多い。最近ではこれにラジオ波療法が急速にその数を増してきているものと推察されうる。原発性肝癌に対しての外科切除率はHCC29%、CCC55%となっている(表2)。HCCに選択された外科切除術式は表3にあるようにさまざまであるが最も多いのが部分切除である。最近ではこれに適応を厳密して小さなかつ腫瘍数の少ない肝癌に対する肝移植療法が試みられて来ており、その成績が今後注目される場所である。図1に全国集計のHCCの外科切除成績が示してあるが5年生存率52%、10年生存率27%となっている。治療法別また肝癌の数、大きさ、臨床病期別の細かな生存率を表4に示してあるが、腫瘍数の少ないものでは明らかに手術成績が他を凌駕している事がわかる。また腫瘍径別のデータでも外科切除成績の優位性が良く示されている。しかしながら肝の予備力不足のため外科切除をなしえない臨床病期の高い症例においては他の治療選択を選択せざるを得ないわけであるがその成績は決して満足行くものではないことが良く判る。ここが重粒子線治療などの放射線治療が最も期待される領域と言えよう。

Table.1 Therapeutic Modalities for HCC

**Liver Cancer Study Group of Japan Survey and Follow-up Study of Primary Liver Cancer in Japan**

1.	surgical resection	34%
2.	TAE	45%
3.	L-TAI	59%
4.	ethanol injection	19%
5.	radiation	1%

*Acta Hepatol Jpn. 1997; 38: 317-330*

Table.2 Surgical Resection for Primary Liver Cancer

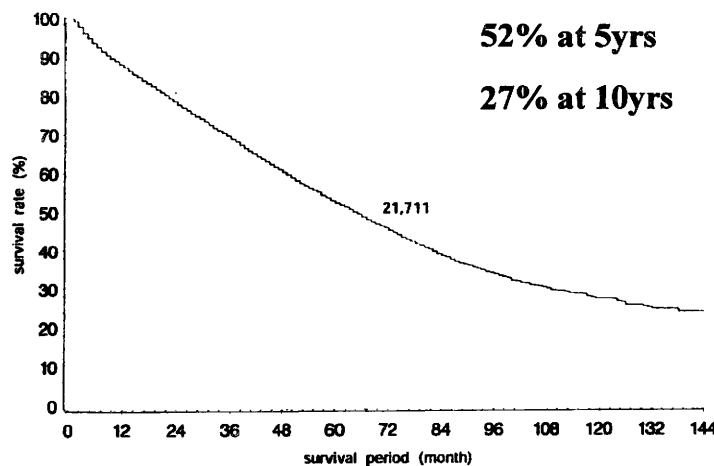
	n	%
HCC:	5217/17885	29.2
CCC:	342/626	54.6
Cystoadenocarcinoma:	21/30	70.0
Mixed type	65/101	64.4
Hepatoblastoma	21/24	87.5
Sarcoma	6/12	50.0

*Liver Cancer Study Group of Japan 1998-1999*

Table.3 Operative Procedures of Hepatectomy for Hcc

	n	%
Extended lobectomy	318	6
Hemihepatectomy	726	15
Segmentectomy	1137	24
Subsegmentectomy	894	19
Partial resection	1716	36
Liver transplant	0	0
Total	4791	100

*Liver Cancer Study Group of Japan 1998-1999*



肝細胞癌 肝切除 一全症例一

Fig.1

Table.4 5-Years Survival Rates of Hcc

	HTX	PEI	TAE	MW
total	52% (21711)	49% (5736)	21% (17821)	57% (828)
1 nodule	58% (15453)	53% (3846)	28% (6936)	67% (602)
2 nodule	45% (3304)	46% (1079)	22% (3424)	69% (109)
3 nodule<	29% (2557)	40% (450)	15% (1906)	
2 cm<	67% (4213)	54-67% (3379)		
2-5 cm	53% (11282)	27-43% (2082)		
5-10 cm	41% (3918)	27% (135)		
10 cm<	32% (1715)	----		
CS I	57% (13020)	60% (2809)	31% (10126)	76% (414)
CS II	46% (6006)	42% (1959)	19% (8001)	24% (291)
CS III	34% (741)	23% (573)	6% (2596)	43% (60)

Liver Cancer Study of Japan 1998-1999

## 2. 進行肝臓における外科治療の進歩

門脈内腫瘍栓や肝静脈および下大静脈内にまで腫瘍栓の及んだ進行肝臓に対しては手術による切除以外期待しえる方法がないのが現状であり我々は可能な限り積極的外科切除を選択してきた。その結果図2に示すような腫瘍栓を伴った巨大肝臓に対して全身血行より局所を遊離して安全に外科切除を施行するTotalVascularExclusion法<sup>1),2)</sup>を確立させてきた。腫瘍栓の進展レベルをMRIなど

の画像検査により術前的確に把握することで安全な手術プランニングを立てて肝病変と腫瘍栓をともに一塊として切除する事により根治性を向上させることが可能となった(図3)。その生存率を見ると門脈本幹内まで腫瘍栓の及んだVp3症例では切除後5年生存率は10%であり下大静脈まで腫瘍栓の及んだVv3症例では27%(図4)と他の非手術療法による従来成績に比べて著明な成績の向上が得られてきている<sup>3)</sup>。

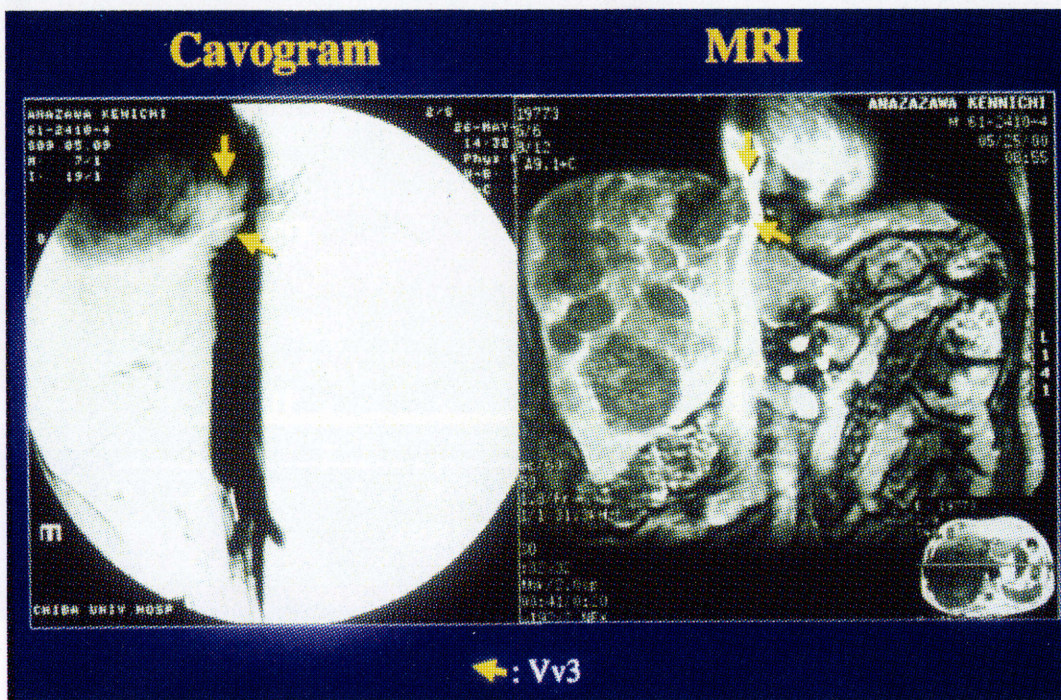


Fig.2



# THVE

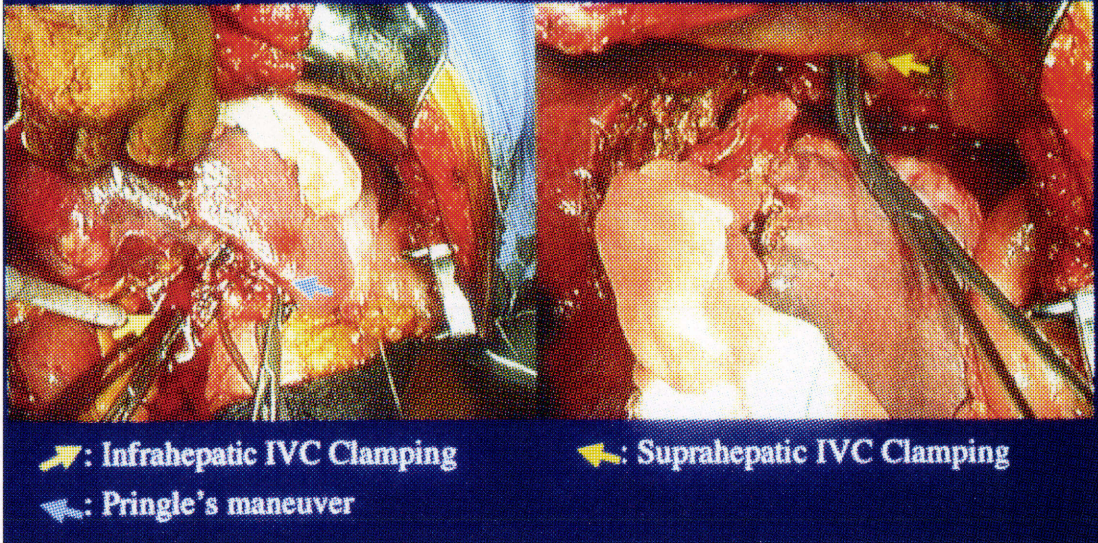


Fig.3

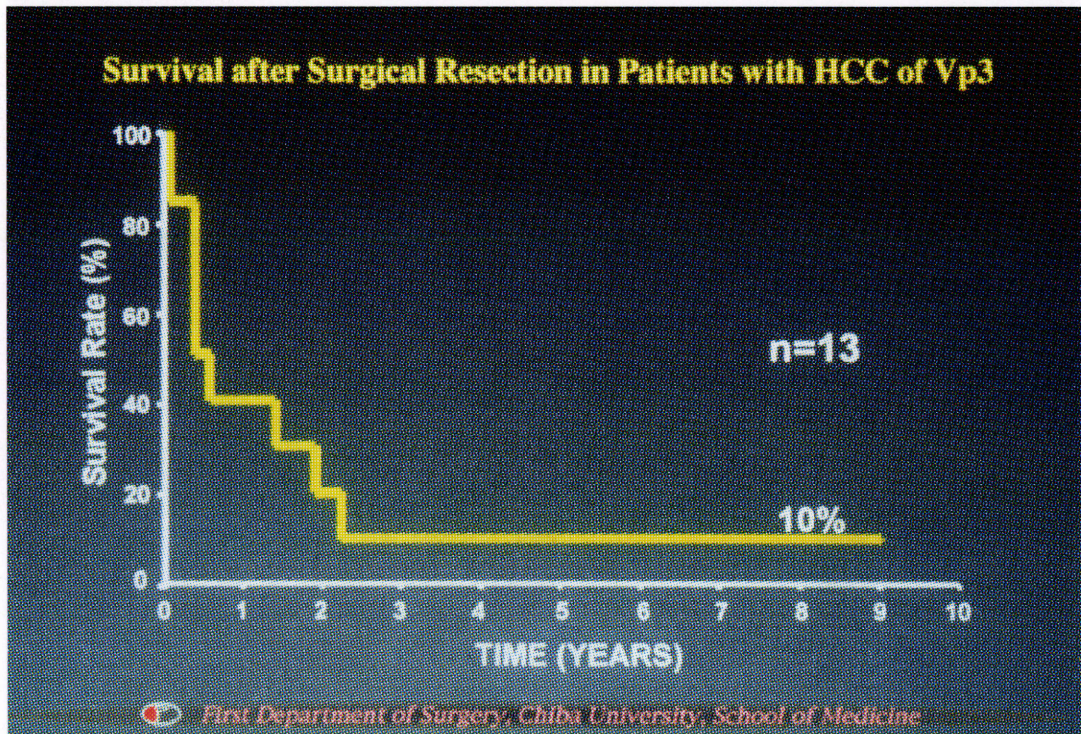


Fig.4



### 3. 外科から見た重粒子線治療に求められるもの

外科治療が現在主体である肝癌治療の成績から見て重粒子線治療に求められるもの、期待されるものとしては表5に示すような3つの方向性が挙げられる。その第一は多発性の肝癌において主腫瘍が3cmを越えたような比較的大きい場合で他の区域にも小病変の肝癌(2cm以下)が併存するような症例である。肝機能が許せる範囲で大きな腫瘍の切除は十分可能であるが小病変の切除の安全性に問題がある場合には小病変に対しての重粒子線治療による根治性の確保が可能であれば外科切除+重粒子線治療の極めて良い適応になる症例は多いものと予想される。従来このような症例は最初から外科切除がきざめられてきており、併用療法による効果が大変に期待されるであろう。第二に外科切除の施行後にしばしば見られる残存肝における新たな肝癌あるいは再発肝癌に対する治療である。最近では肝機能が許せば二度のみならず三度でも肝切除を安全に施行できる外科手技の安定が得られている。しかし再発肝癌において再切除が可能となる症例の率は決して高くないのが現状であろう。そのような症例において重粒子線治療がその局所制御効果を期待して適応されるのであれば肝癌患者さんの生存率は一層向上していくことになる。第三には先程提示したような血管内腫瘍栓を併存した進行肝癌において一次的に切除可能例なら手術療法を行うことでよい訳であるが、やはり臨床病期の進んだ例では切除は難しい事が多い。そのような場合に先進部の腫瘍栓を中心として重粒子線治療を行いdown-stagingを図りその後外科切除を行う戦略を立てることができる。多くの血管内腫瘍栓例ではその腫瘍栓の進展範囲が外科切除範囲を大きく拡大して規定してしまう事が多い。そのような例では腫瘍栓の先進部を縮小させることが可能となればそれにより選択されるべき術式が大きく縮小出来得ることになり外科切除適応の拡大、強いては進行肝癌の成績向上に寄与していくことが強く期待されよう。また肝癌の外科切除療法を選択するうえで、その病変の主座がどこにあるのかが放射線治療でもそうであるように、極めて大きな影響を持っている。特に図5にあるような肝の深部特

Table.5 Heavy particle Radiotherapy & Surgery for HCC

1. radiotherapy for residual tumor in the remnant liver following surgical resection for main tumor
2. radiotherapy for intrahepatic recurrence after surgical resection
3. preoperative radiotherapy for tumor thrombus of the portal vein and the hepatic vein

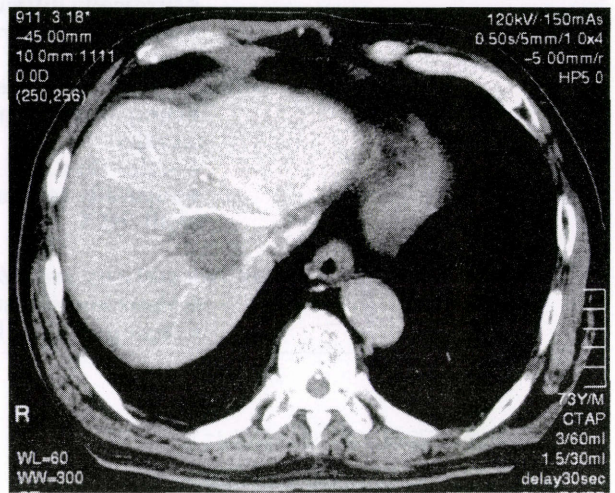


Fig.5 Centrally located tumor, especially closed to the main hepatic vein and the main portal tract

に尾状葉を中心とした領域に小肝癌が存在した場合多くの外科医は手術を躊躇しがちである。欧米ではこのような症例には積極的に肝移植を適応として行う方針の外科医が多いのが現状である。手術手技の卓越した肝臓外科医であればこのような外科切除でも十分な安全性を確保して切除を行っているが、必ずしも一般的とはいえない。このような肝深部に主座を持つ例、肝静脈に接した例などの局所因子を持つ小さな肝癌も重粒子治療の極めてよい適応例とも考えられる。いずれにせよ重粒子線治療の局所制御効果が十分高められた上での展望であるが、その効果に期待するものは非常に大きいものがあると言えよう。

### 4. まとめ

最後に重粒子線治療に求められるものとして表6にその結論をまとめておいたように、low invasiveness, satisfactory anti-cancer effect, low cost and easy availabilityといった点がこの

Table.6

---

---

## CONCLUSION

### Expected Roles of Heavy Particle Radiotherapy for HCC from the Point of Surgical Approach

**1. low invasiveness,  
especially to liver function for long period**

- ◆ severe liver dysfunction (Child C)
- ◆ other operative high risk factor (DM, old age, steroid etc)
- ◆ surgically difficult to be resected
- ◆ intolerable for resection due to limited liver volume

**2. satisfactory anti-cancer effect**

- ◆ comparable to microwave and radiofrequency therapy
- ◆ better than PEI and TAE
- ◆ hopefully comparable to surgical resection for small HCC

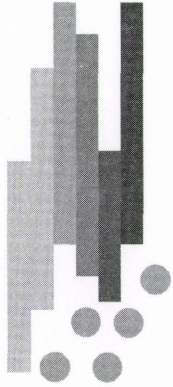
**3. low cost and easy availability**

- ◆ short hospital stay
  - ◆ high quality of life after discharge
- 

治療法の広い臨床応用への普及には不可欠の要因であると言えよう。このまだ始まったばかりの重粒子線療法に期待するところは大きく、この治療法の確立に携わっておられる方々の今後より一層のご努力による成果を待ちたいところである。

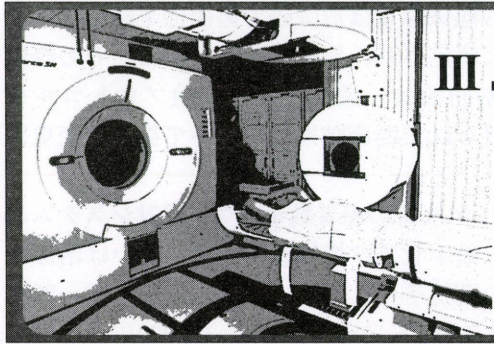
#### 文献

- 1) Miyazaki M, et al. Aggressive surgical resection for hepatic metastases involving the inferior vena cava. Am J Surg 1999; 177: 294-198
- 2) Miyazaki M, et al. An approach to intrapericardial inferior vena cava through the abdominal cavity, without median sternotomy, for total hepatic vascular exclusion. hepatogastroenterol 2001; 48: 1443-1446
- 3) Kashima Y, et al. Effective hepatic artery chemoembolization for advanced hepatocellular carcinoma with extensive tumour thrombus through the hepatic vein. J Gastroenterol Hepatol 1999; 14: 922-927



### Ⅲ. ランチオンセミナー 「日本の粒子線治療施設」





### Ⅲ. ランチョンセミナー 「日本の粒子線治療施設」

#### 1. 放医研—HIMAC

蓑原 伸一

放射線医学総合研究所 重粒子医科学センター 加速器物理工学部

#### Current status of HIMAC treatment system

Shinichi Minohara

National Institute of Radiological Sciences

---

#### 〈Abstract〉

---

Clinical research of carbon-ion radiotherapy at HIMAC was started at June 1994, and a total of about 1300 patients were treated until the end of August 2002. The number of patients per year has been gradually increasing, and about 280 patients are treated at this year. Major types of treated tumors were lung cancer, head and neck tumor, prostate carcinoma and hepatocellular carcinoma.

HIMAC (重粒子線がん治療装置)は国の対がん10ヶ年総合戦略の1つとして建設され、1994年6月から炭素線による治療が開始された。2002年8月までの治療患者総数は1297名、現在年間240名を越える患者数をこなしながら、装置としてはルーチン的な運用状態にある。HIMACの加速器は、イオン源(3台)+前段直線加速器1コース+主加速器2コース(上下2段のシンクロトロン)+ビーム輸送系で構成される。ビームは3治療室の他、生物照射室、物理汎用照射室、中エネルギービーム照射室に供給できる。3治療室のうちA室は垂直照射ポート、C室は水平照射ポート、B室は垂直・水平の両ポートを持つ。治療に使用しているのは炭素線(290,350,400MeV/u)であるが、実験用としては他に、He, N, O, Ne, Si, Ar, Feのビームが最大エネルギー800MeV/uで利用できる。通常月曜の昼間を週例点検日として、加速器は月曜夕方から土曜夕方(或いは日曜)まで連続運転され

ている。そのうち火曜から金曜の日中(8:30~17:30頃)を患者治療時間帯とし、それ以外の時間は装置の試験や共同実験用に各種のビームを供給している。また毎年3月と8月にそれぞれ1ヶ月程度休止して装置の改善や新機能の追加、及び定期点検を行っている。過去8年間に装置側のトラブルで治療照射が完全に休止した日はわずか数日であり、この手の大型加速器装置としては極めて安定に運転されており、これを背景にルーチン的な治療が実施可能となっている。

Fig.1にHIMACでの治療部位毎の分布を示す。現在HIMACで行われている“臨床試験研究”は、治療法が「安全であるか、効果があるか」などの点を確認すること、また、従来の治療法と比較して「この治療法が有効であるか、有効な疾患は何か」を見いだすことを目的とした試験研究であり、治療そのものの患者の費用負担は無い。なお現在高度先進医療へ向けた手続きが進められつつある。



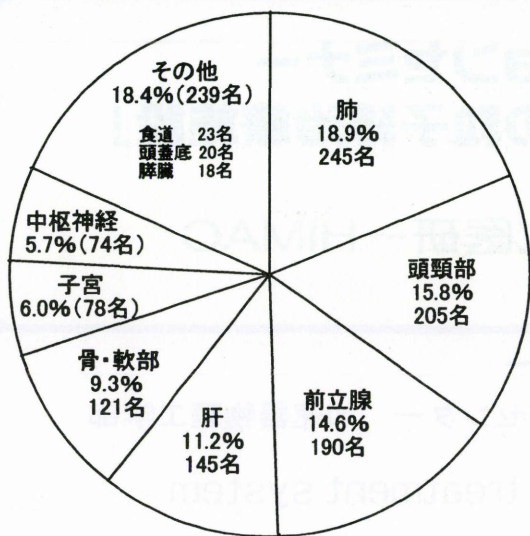


Fig.1 Types of tumors treated at HIMAC. A total of 1297 patients treated until the end of August 2002.

HIMACの場合、炭素線に対するHSG細胞の生存率曲線から生物学的効果が一定となるようなSOBP物理線量分布が作られた。さらのその物理線量から臨床的な効果がどの程度期待できるか、

すなわち臨床線量は放医研での中性子線治療の経験を元に決定され、治療が開始された。その後線量や分割回数は、厳密な臨床試験プロトコルに沿って得られた臨床結果に基づいて徐々に変更されてきている。

Fig.2に年度毎の患者数を示す。照射システムの安定化・効率化及び操作性の改善、或いは治療スタッフの習熟等によって、患者数は毎年10~20%づつ増えてきた。特に1999年から2000年にかけて、専用のシミュレーション室運用・ビーム強度のアップ・照射制御系の大幅な更新がなされ、これらがルーチン的にスムーズに運用されるようになった2001年には約20%の増加があった。また最近は臨床結果に応じて分割回数が減少し、特に肺がん・肝がんでは4回/1週の照射プロトコルもある。このような治療期間の短縮も、年間治療患者数の増加の要因になっている。一方患者数増加に伴い、装置側のトラブルで治療ビームの供給が停止すると、短時間であっても治療スケジュールへの影響が大きい。安定した治療システム運用のための定期的な点検やQA試験がますます重要になりつつある。

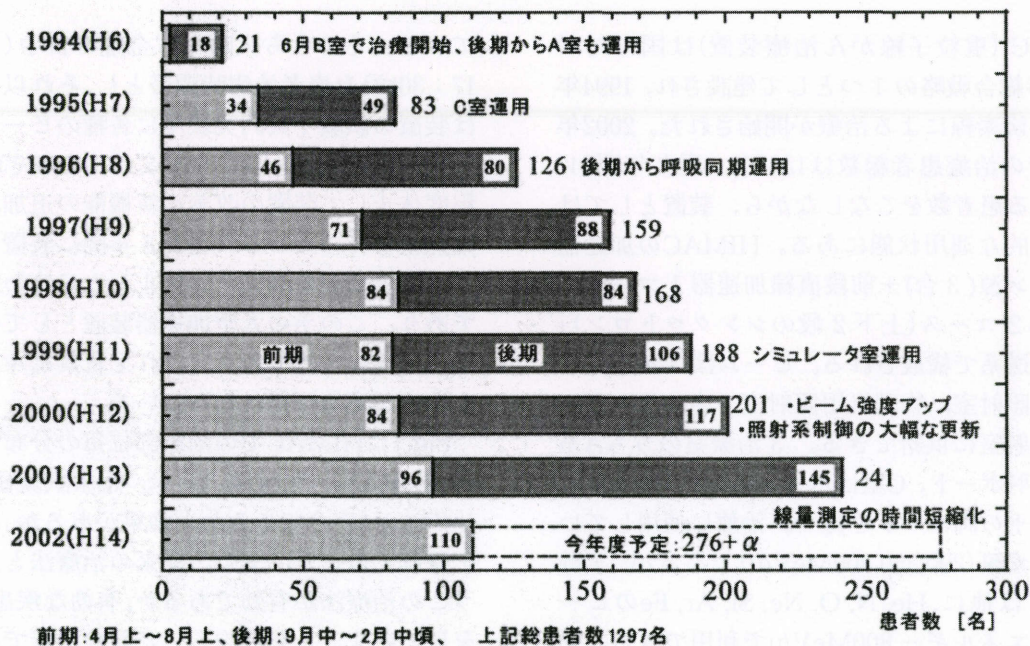
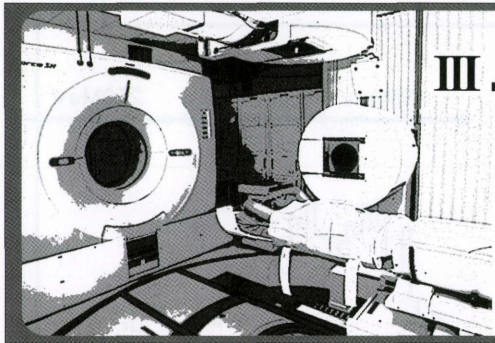


Fig.2 The number of patients each year



### Ⅲ. ランチョンセミナー 「日本の粒子線治療施設」

#### 2. 筑波大学

榮 武二

筑波大学陽子線医学利用研究センター：治療施設の現状

Present Status of Facility for Proton Therapy in Tsukuba Univ.

Takeji Sakae  
PMRC, Tsukuba

---

#### 〈Abstract〉

---

Cancer treatments in the new facility was started at Sep., 2001. Several improvements in the system have been made for the daily treatments. We can make 4 or 5 treatments in one hour by radiation dose rate of about 2Gy/min with two rotating gantries.

---

#### Ⅰ. はじめに

筑波大学では約1年の休止の後、新施設での治療を2001年9月に開始した。システムの一時的な障害・故障等の件数は多いが、治療のための稼働は順調に行われており、年間の治療患者数は旧施設での実績の2～3倍が可能となっている。故障による長期の運転停止は発生していない。メンテナンスによる停止は、この1年で1週間規模のものを2回行った。その他のメンテナンスと短期の故障対応は主に夜間あるいは休日に行い、原則として病院と同等の運用時間が実現されている。

#### Ⅱ. 改良点

装置の設計上の問題点と治験開始当初に発生した種々の問題点の多くは、改修あるいは改良によりほぼ解決されている。以下主なものを箇条書きにする。

(1) 加速器設計パラメータ変更による電流増強

- (2) 治療計画システムの基本計算ルーチンのバグ補修
- (3) 呼吸同期装置の高効率化
- (4) 呼吸同期運転方式変更による高効率化
- (5) ガントリー角1度おきの電磁石パラメータを設定できる仕組みの実現
- (6) IPによる迅速測定装置の実用化
- (7) 呼吸同期CTの開発
- (8) 治療計画線量分布計算の高速化
- (9) 磁石電源切替，設定時間の短縮
- (10) 漏水対策

#### Ⅲ. 運転状況

ビームエネルギーは、標準測定にかかる時間を短縮するため、155, 200, 250MeVの3種を使用している。ビーム電流について、制御方式を改良することにより電流増強時に発生する先漏れ現象が呼吸同期から外れない仕組みが実現されており、数%の先漏れを容認して調整を行っている。治療



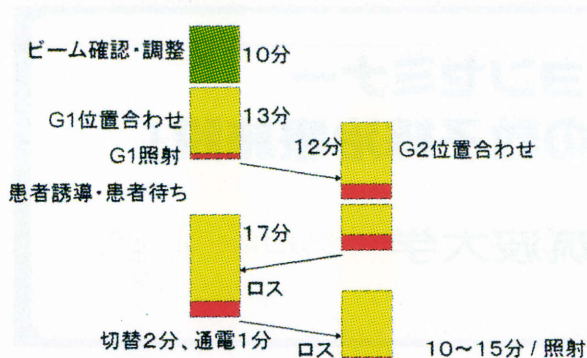


図1 Flow Diagram of the Treatments by two rooms

時の作業効率を高めるために、上流のコリメータ交換が不要となるよう照射野サイズの制限(150mm)を行っている。また、使用条件内ではリッジフィルターのエネルギー毎の最適化の効果が大きくないことから、この交換作業を省略している。心配されていた二重散乱体に対する軸ずれの影響に対しては、平坦度約2%のずれに対応するインターロックを設けており問題は発生していない。

図1は、照射室2室を使用して治療を行う場合の作業の進行の例である。ビームの設定再現性が良好であるため、ビーム確認作業は一連の作業の最初に行うのみである。患者待ちのロスが大きくなければ1照射あたり10分から15分を必要とする。現状の手順を参考にして、平均分割回数16、平均門数3、照射あたりの時間15分、装置故障率5%、患者待ちのロス15%、新患測定時間1門あたり1時間、治療計画変更15%の仮定をすると、1日8時間の運転で年間の治療可能患者数は170名程度と予測される。この場合、新患測定時間等のため、治療照射時間は1日に約4時間となる。図2は、新施設で約1年間に治療計画された406例の照射の水等価深度の頻度分布である。3つのエネルギーの使用範囲を矢印で示した。同例のガントリー角

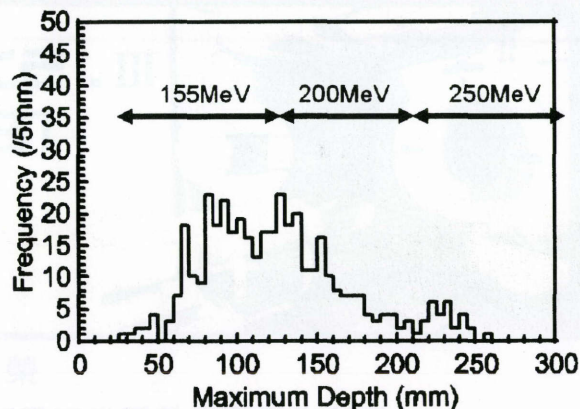
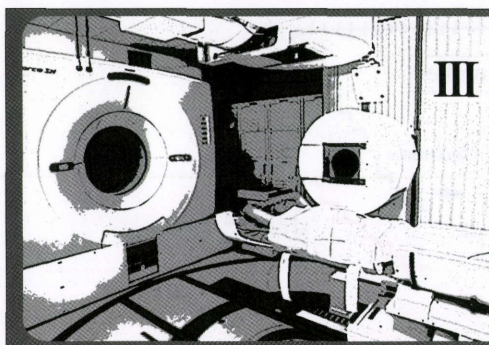


図2 Distribution of Maximum Depth in plannings

度の使用頻度分布では、 $-180$ 度、 $-90$ 度、 $0$ 度、 $90$ 度のどれかを使う場合が全体の64%であった。一時的な障害と故障により治療に影響が出た時間の割合は、運転時間に対して過去3ヶ月の平均で5.8%であった。

#### IV. 課題

残されている短期的課題の主なものとして、治療計画における線量分布計算の精度確認、線量分布測定の実定器依存に関する考え方の整理、ボラス底厚管理等の人的ミス導入箇所の再検討、ノンコプラナ照射の実現、加速器の機器別故障頻度の分析、電流変動要因の解明、ビーム位置のスピル内変動要因の解明などが挙げられる。陽子線治療のシステムが医療装置として使いやすく、信頼できる物になるには、装置の障害・故障内容がすぐに把握できる仕組みの実現、修理が容易で迅速にできる仕組みの実現、標準測定・患者測定を短時間で装置の開発、ボラスの最適化が可能な治療計画の開発が必要であり、できるだけ早急にこれらを検討していかなければならない。



### Ⅲ. ランチョンセミナー 「日本の粒子線治療施設」

#### 3. 国立がんセンター東病院

西尾 禎治

国立がんセンター東病院 放射線部

National Cancer Center Hospital East

Teiji Nishio

National Cancer Center Hospital East

---

#### 〈Abstract〉

---

In 1997, the proton- treatment facility that has the therapeutic AVF cyclotron accelerator (C235) is constructed at National Cancer Center Hospital East. The facility has 3-irradiation ports (rooms) that are 2-rotating gantry ports and 1-horizontal fixed port. The C235 can accelerate proton to 235MeV with the beam intensity of 300nA.

The proton beam therapy began at the end of November 1998. It has been curing 160 patients by the present. The patient number by each site of head and neck, liver, lung, prostate and other are 70, 30, 32, 27 and 1 patients, respectively. Also, the proton therapy system at our hospital got an approval as medical equipment from the Japanese government in April 2001. And the proton therapy at our hospital was approved as a high advanced medical technology from the Japanese government in July 2001. The treatment expenses are 2883,000 yen uniformly.

---

#### I. 概要

国立がんセンター東病院では、1997年5月に病院設置型の陽子線治療施設を完成させ、翌年の1998年11月末から臨床利用を開始している。2002年11月の時点で、160名の患者について陽子線治療を行っており、部位ごとの治療実績人数は、頭頸部70名、肝臓部30名、肺部32名、前立腺部27名、その他1名となっている(Fig.1参照)。国立がんセンター東病院の陽子線治療装置は、2001年4月に医療用具、7月に高度先進医療の認可を受けている。現在、高度先進医療適応患者数は76名であり、

治療費用は一律2,883,000円である。

陽子線治療装置は、加速器、ビーム輸送系、3つの治療ポートで構成される。3つの照射ポートは、2つの回転ガントリーポート(通称G1, G2ポート)、1つの水平固定ポート(G3ポート)から形成される。加速器として医療専用小型常伝導AVFサイクロトロン(C235)を利用しており、陽子核を235MeVまで加速(エネルギーは固定)し300nAの強度でビームを供給することが出来る。照射野形成方法は、陽子線を含む重荷電粒子線治療施設としては数少ない、ワブラー法と2重散乱体法の両方を有している。



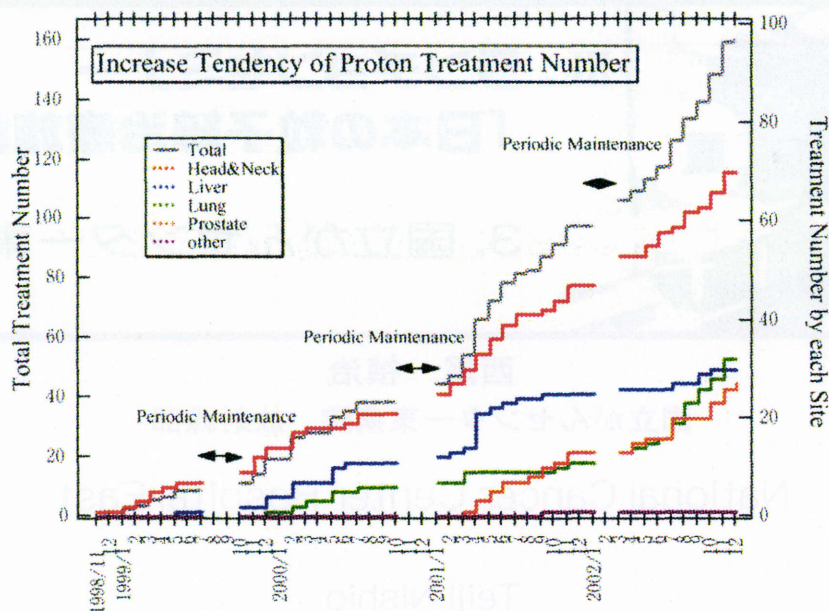


Fig.1: The number of proton treatment patient by each site is shown.

Table.1: A summary of physical data for proton treatment of 160 patients by a treatment site.

	patient number	plan number	gate number	non-coplanar gate number	gate number /plan number	target volume [ml]	target size [mm φ]	target thickness [mm-wcl.]	range [mm-wcl.]	energy [MeV]
Head&Neck	70	83	177	31	2.1	159.4	108.9	76.5	114.6	125.1
Liver	30	35	69	0	2.0	190.6	109.0	77.0	130.5	134.8
Lung	32	35	76	1	2.2	130.2	99.5	54.6	113.8	124.5
Prostate	27	27	54	0	2.0	128.9	99.1	77.4	226.4	185.2
other	1	1	1	0	1.0	77.4	137.8	37.1	108.7	121.3
total	160	181	377	32	mean	154.8	105.7	72.2	133.4	136.5

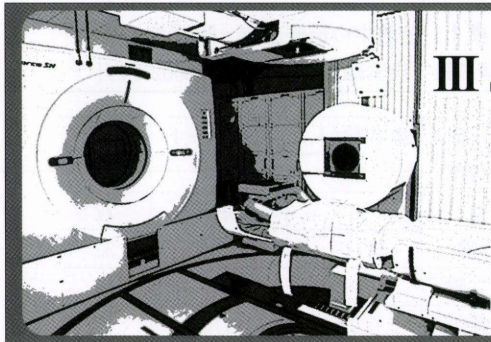
	min. range [mm-wcl.]	min. energy [MeV]	max. range [mm-wcl.]	max. energy [MeV]	min. target thickness [mm-wcl.]	max. target thickness [mm-wcl.]	min. target size [mm φ]	max. target size [mm φ]
Head&Neck	47.5	75.3	219.5	181.9	31.2	115.5	44.7	170.2
Liver	73.7	96.9	174.6	159.4	44.9	147.7	63.3	168.0
Lung	62.2	87.9	205.8	175.3	28.2	155.1	64.8	170.4
Prostate	202.8	173.8	250.6	196.4	67.1	101.3	79.8	125.1
other	108.7	121.3	108.7	121.3	37.1	37.1	137.8	137.8

## II. 陽子線治療実績－頭頸部

国立がんセンター東病院で陽子線治療を行った患者160名中、頭頸部患者は70名と多く、全体の44%を占めている。頭頸部はnon-coplanar照射を含めた3門照射が24%、2門照射が65%、1門照

射が11%であった。頭頸部の治療総門数177門の内non-coplanar照射は31門であり、全体の18%を占めている。Non-coplanar照射は、眼球(水晶体)、視神経、延髄への照射線量を抑えるために利用され、照射方向は左右斜め下前方(330, 30度近傍)からが多い。





### Ⅲ. ランチョンセミナー 「日本の粒子線治療施設」

#### 4. 兵庫県立粒子線医療センター

板野 明史

兵庫県立粒子線医療センター

Hyogo Ion Beam Medical Center

Akifumi Itano

Hyogo Ion Beam Medical Center, Kouto, Shingu, Ibo-gun, Hyogo.

---

#### 〈Abstract〉

---

Hyogo prefecture government has constructed a medical accelerator facility PATRO ( Particle Accelerator for Therapy, Radiology and Oncology ) for hadrontherapy at Hyogo Ion Beam Medical Center (HIBMC). It consists of injector, synchrotron, high-energy beam transport system and patient irradiation system. 70-230MeV proton and 70-320MeV/u carbon beams are used for the treatment. Two horizontal, one vertical and one 45-degree oblique beam ports and two proton gantry ports are provided. Synchrotron beam test and official examination for radiation safety were successfully finished in 2000. Clinical trials with proton beam ( May-November 2001, 30 patients) and with carbon beam (January-July 2002, 30 patients) were successfully finished. Patient treatment is expected to start next April(2003).

兵庫県立粒子線医療センター (Hyogo Ion Beam Medical Center, HIBMC) の粒子線がん治療装置は、陽子線、炭素線を用いてがんの放射線治療を行うもので、イオン源、ライナック(線型加速器)、シンクロトロン(円形加速器)、高エネルギービーム輸送ライン及び治療照射装置からなる大規模な複合加速器装置です[1]。この装置には、PATROと言う愛称がついています。これは英語のParticle Accelerator for Therapy, Radiology and Oncologyの頭文字から採ったもので「放射線腫瘍学的治療のための粒子線加速器」の意味です。patro-とは、ラテン語pater(父)を表す接頭語であり、英語にもpatron(守護聖人)、patriarch(創始

者)、patriot(愛国者)、patrician(古代の貴族)等の派生語があります。

装置建設プロジェクトは、1995年の基本設計から始まりました。1999年の装置搬入・据付・調整、2000年のビーム調整、照射系機器の調整、動物・細胞照射実験、2001年の照射系ソフトウェアの改善と、治療のための準備を進めて行きました。

粒子線がん治療装置PATROの医療用具としての厚生労働省への製造承認申請のために臨床試験(治験)を、まず陽子線について2001年5月から11月にかけて、ついで炭素線について2002年1月から7月にかけて実施しました。陽子線、炭素線についてそれぞれ30名の患者さん、計60名の患者さ



んの治療照射を無事終了することが出来ました。表に患者さんの照射対象部位毎の統計と、治療に使われた門(ポート)数の集計を示します。たとえば頭頸部の場合、縦横(HとV)の2門照射を行い、治療期間の途中で腫瘍の縮小に応じて再治療計画を行い小さな照射野で再度2門照射を行った場合、1患者当り4門とカウントされます。A,B,C,G1,G2の5照射室に6門が有りますが、そのすべてを有効に使いこなしています。これは、現場の技師、メーカー技術者達の頑張りの現れです。

治験照射期間中には毎日患者さんの照射に先立って、要求されるビームエネルギー毎にすべての照射ポートにビームを導入して確認を行いました。陽子線の場合は、回転ガントリーの回転角毎にもビーム確認を行うために確認数が多くなります。治験の第1段階にあたる陽子線治験の場合には、加速器の運転員は運転日には毎朝5時に出勤してビーム調整を開始しました。8時過ぎにはすべてのビーム調整・確認を終えて、9時から治療チームにビームを渡します。治療側でも線量校正、照射野確認をすべてのポート、エネルギーにわたって行いました。治験の第2段階にあたる炭素線治験の場合には、運転員は朝の7時に出勤してビーム調整を開始しました。ビームと線量測定は、ほとんど無調整、無補正で毎日再現することが1年以上にわたった治験中のデータにより統計的・実証的に明らかになりました。装置性能の安定性・再現性が確認されたことにより、病院開設後多数の患者さんを受け入れても、ビーム調整・校正手続きを合理化することにより技術的には十分に対応可能であることが実証されました。

図1に入射器系ECRイオン源のクライストロンや、線型加速器(RFQ, DTL, DBC)の4極真空管フィラメント通電時間による装置のこれまでの累積運転時間を示します。1999年12月からは入射器系の、2000年3月からはシンクロトロンビーム調整が開始され、9月の放射線発生施設検査合格の後には照射室周りのビームによる調整が急

表1 治験中の治療部位・照射ポート  
陽子線・炭素線 2001年5月-2002年7月

患者部位	患者数(人)	照射ポート	門数
頭頸部	23	AOC	8
肺	8	BHC	77
肝臓	11	BVC	32
前立腺	16	CHC	24
骨軟部	2	G1C	49
		G2C	8

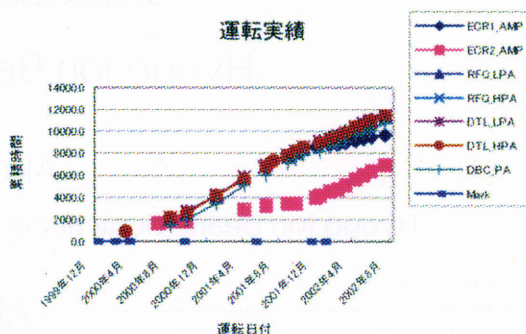


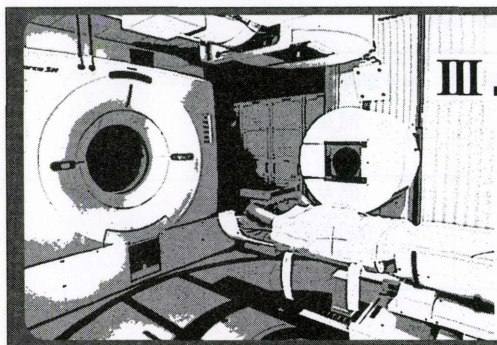
図1 装置の運転時間

ピッチで進み、2001年5月からの陽子線治験開始、2002年1月からの炭素線治験開始と、順調に運転を続けたことが見て取れます。炭素線治験開始とともに炭素線に割り当てられたECR2イオン源の運転も順調に進んだことが見て取れます。

調整期間中の初期故障、治験期間中の若干のトラブルや制御ソフトの手直しはあったものの、毎日の患者照射スケジュールを順調にこなして1日たりとも中断、順延することはありませんでした。治療装置としてのビームの安定性、再現性を十分に証明することが出来ました。2003年4月からは、陽子線による一般治療を開始する予定です。

- 1) 「兵庫県加速器の運転開始」, 板野明史, 第1回重粒子医学科学センターシンポジウム, 粒子線治療の基礎展開, NIRS-M-156, pp.6-9, Nov., 2001.





### Ⅲ. ランチョンセミナー 「日本の粒子線治療施設」

#### 5. 静岡がんセンターの陽子線 治療施設

山下 晴男

静岡がんセンター陽子線治療科

## Proton Treatment Facility at Shizuoka Cancer Center

Haruo Yamashita

Proton Treatment Department, Shizuoka Cancer Center

---

### (Abstract)

---

Proton radiation therapy was added to a master plan of Shizuoka Cancer Center (SCC) in 1997 and founded in 1998. Proton treatment system was mainly constructed from accelerator system (Linac system and Synchrotron) and irradiation system. The facility has three ports, which were two gantry ports and one horizontal port, and aims to irradiate 400 persons per a year. Currently, It have been examined the performance and safety by combination of various systems. A treatment start schedules in 2003.

#### I. はじめに

静岡県は、がんセンターの建設計画を進める上で、高齢化社会が迫っている中でがん患者の視点を重視したがん治療の実践を基本方針に据えた。陽子線治療法は、患者のQOL (Quality of life) を維持する点で、他の治療法に比べて優れており、本センターの方針に適合したがん治療法であることから、陽子線治療を本センターの特徴として積極的に導入した。また、本がんセンターでは、陽子線治療の他にも、病院情報システム (HIS) / 放射線情報システム (RIS / PACS) の完全電子化、緩和医療、チーム医療など患者を中心にした先進的な医療概念・技術を積極的に採用している。

#### II. 陽子線治療システム

陽子線加速器は、シンクロトロン方式 (入射器はイオン源とRFQが1対型の直線加速器 (3MeV)、主加速器はシンクロトロン (周長: 約20m)) を採用し、そのエネルギー範囲は70~235MeV、最大線量率を2Gy/分以上に設定し、さらに呼吸同期照射にも対応できる性能を持つように設計した。加速器制御システムは、照射システムからの指令に対して、加速器が自動運転できるように設計されている。

照射システムの装置設計に際しては、兵庫県の粒子線医療センターの設計経緯を踏まえ、可能な限り仕様の共通化を図ることで、照射装置の安定性・安全性や装置設計費の削減に努めた。照射装



Table. 1 Specification of irradiation system.

項目	回転ガントリ照射室(2室)	水平照射室(1室)
照射野形成法	ワブラー法	同左
ブラッグピーク拡大法	リッジフィルタ法	同左
飛程調節法	レンジシフト法	同左
最大照射野	20cm φ	10cm φ
呼吸同期照射法	あり	なし

置の基本仕様を表1に示す。特に、陽子線の拡大ビーム生成法は、ビーム利用効率を犠牲にしても、治療照射中の陽子線を安定に供給することを最優先に位置付け、ワブラー法(軽度のビーム軸が発生した場合に再調整なしで照射を続行できる利点がある)を採用した。

陽子線治療の治療計画は、陽子線治療専用のCTシミュレータ装置で撮影したCT画像を陽子線治療専用の治療計画システムに取り込み、輪郭入力、線量計算、計画評価などの一連の作業を実施する。また、治療部位によっては、MRI画像やPET画像などの補助画像を通じて精度の高い輪郭入力が可能である。なお、治療計画を通じて決定されたアイソセンタは、上記のCTシミュレータ装置へ送信し、治療開始時の基準画像を撮影する。毎回の治療時には、この基準画像と1mm程度の精度で一致するように患者位置決めを実施する。

最後に、本センターでは、放射線治療、陽子線治療、小線源治療に対して、治療情報(照射録、依頼情報、実績情報、課金情報、治療計画画像など)の共通管理を目的とした放射線治療情報システム

を導入し、陽子線治療が他の診療部門と一体となる情報管理が可能な部門システムを構築した。

### Ⅲ. 陽子線治療施設の進捗状況

陽子線治療施設の進捗状況を以下に示す。1996年(平成8)に陽子線治療の導入を決定すると共に、陽子線治療施設の基本計画書を作成した。1997年(平成9)に陽子線治療装置の設計候補者を選定し、1998年(平成10)から1999年(平成11)前半に陽子線治療装置の詳細設計を実施した。治療装置の製作は1999年(平成11)後半から着手し、2001(平成13)には現地への装置搬入と機器の据付調整を完了した。現在、陽子線加速器のビーム試験、並びに照射装置を中心とした各種試験を実施している最中である。図1に陽子線加速器と回転ガントリ照射室の外観を示す。今後、生物試験、安全確認試験などの総合試験を経て、2003年(平成16)4月以降から陽子線治療の臨床使用を開始する予定である。なお、臨床使用に向けた治療体制(治療プロトコル、各種委員会の制定、治療費の算定など)の確立が今後の課題である。

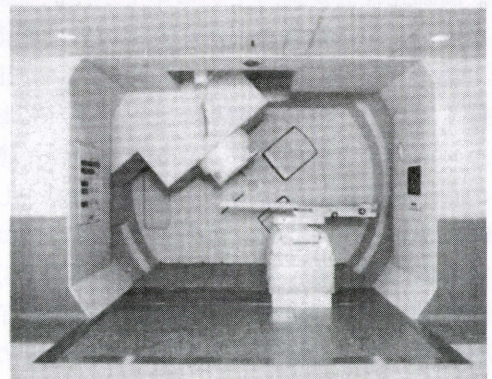
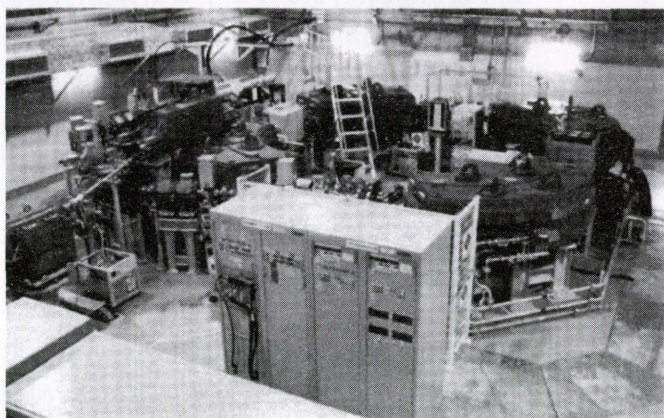
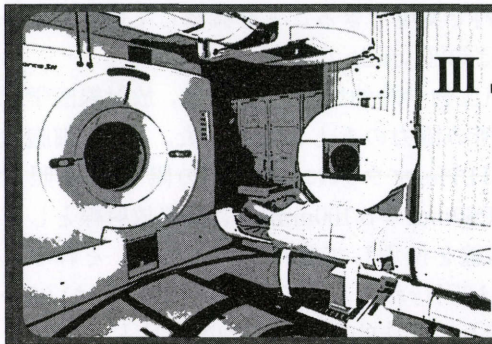


Fig. 1 Proton synchrotron (left) and Gantry irradiation room (right).





### Ⅲ. ランチョンセミナー 「日本の粒子線治療施設」

#### 6. 若狭湾エネルギー研究センター

福田茂一／久米恭／鍵谷豪／横濱則也／丸山市郎／山本和高  
(財)若狭湾エネルギー研究センター 粒子線医療研究室

## Present Status of Proton Cancer Therapy Project at WERC (Wakasa Wan Energy Research Center)

S. Fukuda, K. Kume, G. Kagiya, N. Yokohama,  
I. Maruyama, K. Yamamoto

Medical Division, Wakasa Wan Energy Research Center

---

### (Abstract)

---

Wakasa Wan Energy Research Center (WERC) is a foundation authorized by MITI (The Ministry of International Trade and Industry) and STA (The Science and Technology Agency) in 1994. The overall aims of WERC are to contribute to the creation of active local communities and to promote the development of science and technology. Since November 1998 WERC has administered and managed the institute built in Tsuruga City by Fukui Prefecture. In the radiation section the accelerator complex names as W-MAST (Wakasa Wan Multipurpose Accelerator with Synchrotron and Tandem) was installed for the multipurpose research as physical science, engineering, biotechnology, and medical science. Especially, the medical application of accelerators, such as proton cancer therapy is one of the important fields to be intensively researched, which makes a direct contribution to the regional community. The proton cancer therapy system including the irradiation system and the planning and database system was installed in August 2001. They were examined to check their performance and safety in the off-line situation and the on-line situation using proton beams. Since June 2002, we have started to perform the clinical trials as the safety proof examination suggested by the government.

---

#### 1. 緒言

(財)若狭湾エネルギー研究センター（以下、財団という）では、エネルギーに関する研究開発を推進し、地域産業への波及等により活力ある地域社

会の形成を図り、科学技術の振興、我が国経済の健全な発展・国際社会への貢献に寄与することを目指している。具体的には、福井県が敦賀市長谷地区に整備し平成10年11月に開所した福井県若狭湾エネルギー研究センター（以下、研究センター

という)の管理・運営を行い、研究開発、交流、研修の3つの事業を推進している。その中でも財団では陽子線を用いたがん治療研究を加速器を応用した重要な研究と位置付けている。平成12年8月には加速器W-MAST(Wakasa Wan Multipurpose Accelerator with Synchrotron and Tandem)の運用を開始した。平成13年8月には陽子線がん治療研究装置がメーカから福井県に納品され、財団による陽子線がん治療研究装置の性能試験の後、平成14年6月に臨床試験(治験)を開始している。前立腺がんの患者2名の治療が終了し、引き続き4名の治療が治験として予定されている。

## 2. 加速器システムと陽子線がん治療装置

センターの放射線研究棟は地上1階、地下1階の施設で、地上部分には加速器制御室、放射線管理室、実験室等がある。また、地下部分には負イオン源、タンデム型加速器、シンクロトン加速器、低エネルギー輸送系、高エネルギー輸送系からなる加速器システムW-MASTが整備されている。平成13年の8月末には、照射野形成装置、ビームライン、治療計画、データベース、患者位置決めCT等を含む陽子線がん治療研究システムがメーカから福井県に納品された。ビームラインは、固定垂直、水平ビームラインそれぞれ1本で、アイソセンターを共有している。照射野形成はウォブラーと散乱体の組み合わせることにより行い、照射野の広さは100mmφである。また、X線CTの診断ベッドと治療用ベッドを共通化することにより、がん腫瘍の位置決め精度の向上を図ることができる。照射室内に配置したX線CTは位置決めだけでなく、治療計画用画像を撮影することも可能であり、別棟にある治療計画室の治療計画装置にネットワークで結ばれている。

## 3. 陽子線がん治療研究装置の検証

財団では、臨床研究システムの納品後、基本性能確認のために治療計画システムに基づく照射野形成試験、患者ボラス、コリメータの製作、データベースの運用、位置決め精度の検証、生物学的効果比の測定などを行い、さらに加速器を含めたシステムの長期安定運転についての調査を行った。

照射野形成では、SOBP(拡大ブラッグピーク)幅30~60mm、直径100mmφの照射野を平坦度

2.5%以内で実現できることを確認している。ビーム強度は約2Gy/minである。

RBE(生物学的効果比)の測定は、放射線医学総合研究所の協力のもとに実施した。HSG細胞およびC3H/Heマウスに180MeVの陽子線を照射(SOBP60mm×φ100mm)し、基準放射線として4MV X線を使用して生存率を求めた。それぞれの測定は3回行われた。SOBP中心でRBEは1.08~1.11となり、臨床的な生物学的効果比として1.1を採用することとした。

CT治療共通ベッドシステムによる位置決め精度の測定をファントムを用いて実施した。用いたファントムはアクリル製の一辺20cmの立方体で中心から3軸方向にワイヤーが張ってある。このファントムの中心をCTで位置決めし、共通ベッドを治療ポートに輸送し、X線透視によってファントム中心のアイソセンターからのずれを測定した。1mm以下の精度でCTのアイソセンターと治療ポートのアイソセンターが一致することが確かめられている。

治療計画システムはHitachi 3D Proton Treatment Planning Plan version 1.6が採用されている。この治療計画は、既存の陽子線の治療計画がX線治療計画上に陽子線線量分布計算モジュールを実装しているのとは異なり、最初から陽子線がん治療計画として設計され構築されている。計算時間は70ccの腫瘍に対して一門あたり約1分である(計算ボックスサイズは1mm<sup>3</sup>)。陽子線がん治療に必要なほとんどの機能は実装されているが、実装が必ずしも洗練されておらず使い勝手に難がある。現在、メーカに対して改良を要請している。

システムの長期安定試験では、線量測定システム、シーケンサ回路の放射線による誤動作が確認された。これらのシステムを低線量域に移設するなどの対策が行われている。

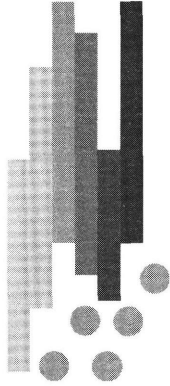
## 4. 臨床試験(治験)

平成14年度6月から、装置の安全性を確かめることを目的とした治験をメーカから委託され開始している。現在2人の患者の治療が終了している。治療部位は前立腺で、1回線量2.5GyE、分割回数はそれぞれ27回、28回、週4回照射、総照射線量67.5、70.0GyEである。分割照射毎に、陽子線照射前の

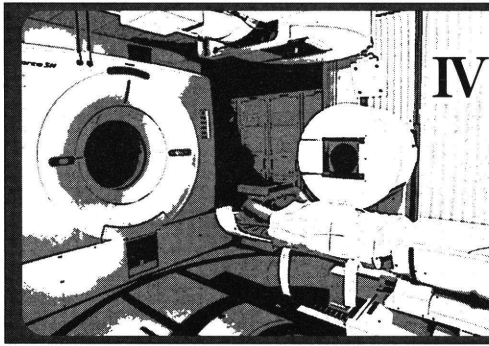


位置決めCT撮影に加えて治療後の患者のCT撮影を行った。これらのデータを用いて、現在CTによ

Ⅲ. ランチョンセミナー「日本の粒子線治療施設」  
る位置決め精度に関する解析を行っている。平成15年には引き続き4人の治療が予定されている。



## **IV. 最先端医療を支える基礎及び 臨床研究**



## IV. 最先端医療を支える 基礎および臨床研究

### 1. 生検組織を用いたがん放射線 感受性予知の試み

落合 淳志

国立がんセンター研究所支所 臨床腫瘍病理部

## A Prediction of cancer radio-sensitivity using a biopsy sample before treatment

Atsushi Ochiai

Pathology Division, National Cancer Center Research Institute East

---

### 〈Abstract〉

---

In order to elucidate a predictive factor for radiosensitivity using a biopsy sample before treatment, biopsy samples obtained from 31 cases of early laryngeal cancer, 58 cases of hypopharyngeal cancer were immunohistochemically stained by various antibodies which have been reported to be a significant predictive factor for radiosensitivity. Among 8 factors, microvessel density (MVD) has proven to be an important predictive factor for radiosensitivity of laryngeal and hypopharyngeal cancers. Image analysis about tumor microvessels was performed and showed that total perimeter of microvessels per tumor area was the best predictive factor for early laryngeal cancer. We further confirmed whether can the MVD in esophageal cancer predict the chemoradiosensitivity. MVD has also found to be an important predictive factor for chemoradiosensitivity of advanced esophageal cancer. In order to select the way of treatment of the patients, the expression of various predictive factors reported previously were performed both Stage II and III esophageal cancers by both surgical treatment and chemoradiotherapy. The cancer with N(+), EGFR(+), Cyclin D1 (+), High MVD showed better prognosis when treated by surgically and the patients with N(-), EGFR(-), Cyclin D1 (-), low MVD revealed good when treated by chemoradiotherapy. These results indicate that the combination of predictive factors could select the better treatment for the esophageal cancer patients.

### 緒言

およそ100年以上前のレントゲンによるX線の発見以来、X線は医学において診断・治療の療法の面において重要な役割を担ってきた。がんに対

する放射線治療はX線発見後1年目にすでに行われていることが記載されている。放射線によるがん細胞の障害機構はこれまで長い年月基礎的に検討され、その機構として放射線によるDNA障害ならびにがん細胞におけるDNA修復能、アポトーシ



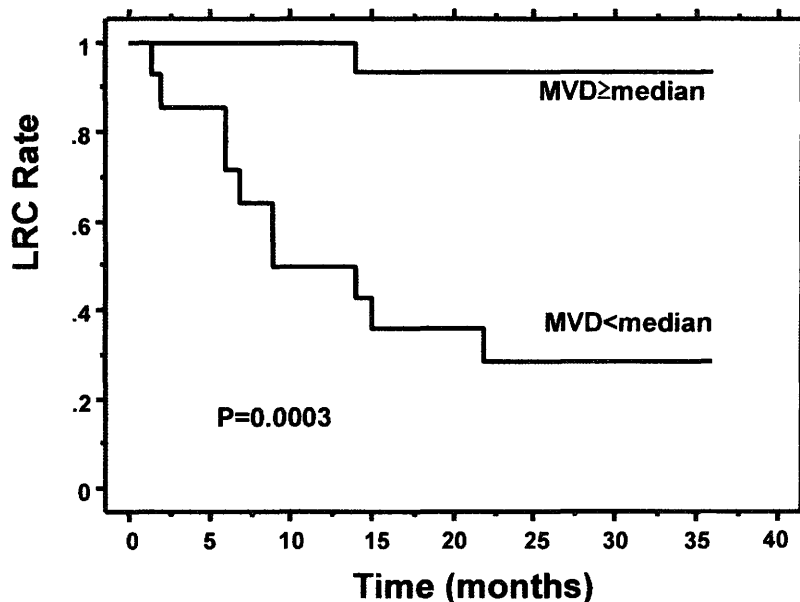


図1 Correlation between MVD and radiosensitivity

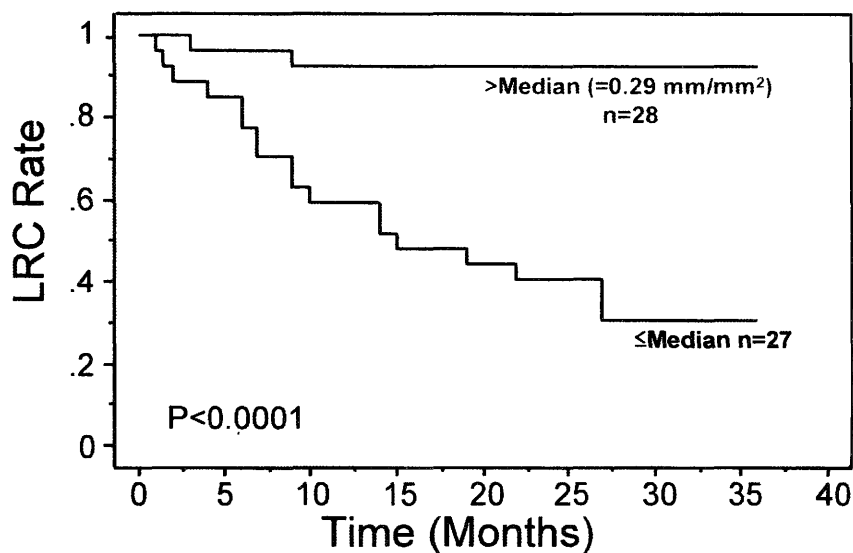


図2 Correlation between TP/TA ratio and radiosensitivity

ス抵抗性さらに増殖性の違いが重要であることが知られている。放射線によるDNA障害には放射線が直接DNA障害を引き起こすとともにラジカルを産生し間接的にDNA障害を引き起こす機構が存在するが、一般の放射線においては後者の機構によるDNA障害が重要であることがこれまで報告されている。ラジカル産生には組織内の酸素濃度が重要であり、がん組織内の酸素濃度の変化が放射線治療の感受性に関わる可能性はこれまで多

く報告されてきている。しかし、正常組織と同様にがん組織の酸素も血管を介して供給されるが、がんの形態像と生物学的環境を考えると、多くのがん組織は正常に比し不完全な血管を形成し酸素・栄養とも乏しい状況であると考えられる。

一方、生検組織はがんの確定診断に用いられ、現在のがん患者の治療を進めるに当たり必須である。しかし、生検組織は採取される量が少なく、また臓器によってはその採取される部位が限定さ

表1 早期喉頭がん臨床病理学的因子と放射線感受性

A.I.	Radioresistant	Radiosensitive	HR	p value*
>median vs <median	6	11	1.14	
Bax (-vs+)	5	9	(0.35-3.73)	0.835
Bcl-2 (<29% vs >30%)	9	11	2.83	
EGF-R (<9% vs >10%)	2	9	(0.61-13.14)	0.184
P53 (<9% vs >10%)	5	15	0.39	
Ki-67 (<39% vs >40%)	6	7	(0.12-1.28)	0.119
MVD (<31% vs >32%)	5	13	0.58	
	6	10	(0.18-1.91)	0.371
	6	10	1.06	
	5	10	(0.32-3.49)	0.920
	7	19	3.34	
	4	1	(0.97-11.5)	0.056
	10	5	16.43	
	1	15	(2.09-128.94)	0.008

\*Fischer's exact test HR: hazard ratio

Table 2 生検組織を用いた画像解析結果と放射線感受性

	MVD(vessels/field)	TP/TA ratio(mm/mm <sup>2</sup> )	Hypoxic ratio(%)
Radiosensitive	48.14(18-109)	0.48(0.07-1.40)	25.75(0.36-86.39)
Radioresistant	29.32(11-60)	0.21(0.05-1.03)	44.13(12.30-85.01)
Total	41.64(11-109)	0.38(0.05-1.40)	32.10(0.35-85.01)

れていることより、以下に掲げる問題が出てくる。1)がん組織の特徴であるがん組織内の組織像の多様性を考えると、生検組織ががん組織の組織学的特徴を代表しているかどうかの問題が存在する。また同時に、がん組織の形態像だけでなく、がん細胞の生物像を代表する部位が採取されている可能性が少ないと考えられる。2)生検組織の試料量が少ないため、組織学的な判定だけでなく遺伝子検索を含めて技術的に困難である。3)採取生検組織内の腫瘍細胞量または非がん組織量に偏りが出やすいと考えられる。4)採取後の取り扱い上の問題だけでなく、採取者により、採取された試料の内容が異なる可能性が強い。等々多くの問題を含

んでいると考えられる。しかし、これまで実際に生検組織を用いた放射線感受性など悪性度予知を検討された研究は少ない。

生検組織を用いた放射線治療感受性の予知を目的として、I)放射線治療が行われた早期喉頭がんおよび下咽頭がん症例における放射線感受性に相関する分子発現の検索、II)生検組織を用い、放射線化学療法が施行された食道がん症例を用いて治療前生検組織により放射線感受性を検討し、がん細胞の放射線感受性に関わる組織学的因子を検討すると同時に、同じ分子発現を用い手術材料における発現を検討し、手術および放射線化学療法の層別化の可能性について検討した。そしてIII)

表3 多変量解析

	MVD	Ki-67 LI	p53
Category	>40 vs. ≤40	≤64 vs. 64<	- vs. +
Hazard ratio	1.790	1.618	1.463
p value	0.026	0.122	0.211
95% CI*	1.070-2.993	0.880-2.974	0.807-2.652

\*; confidence interval

表4 Relative risks of CRT against OP on survival

Category	n	Relative Risk*	95%CI	P value	
N stage	0	51	1.01	0.38-2.71	0.98
	1	44	0.81	0.35-1.87	0.62
p53	(-)	34	0.77	0.33-1.80	0.55
	(+)	61	0.96	0.48-1.94	0.91
Ki-67	≤63	34	0.77	0.31-1.93	0.58
	>64	61	0.94	0.48-1.85	0.85
EGFR	(-)	44	1.26	0.62-2.57	0.53
	(+)	51	0.66	0.30-1.47	0.31
Cyclin D1	(-)	31	3.25	0.68-15.5	0.14
	(+)	64	0.62	0.30-1.30	0.21
MVD	≤49	56	1.35	0.51-3.55	0.55
	>50	39	0.54	0.22-1.31	0.17
VEGF	(-)	51	1.04	0.43-2.50	0.94
	(+)	44	0.77	0.33-1.79	0.54

\*; When relative risk > 1, OP has better survival than CRT

DNAチップを用いた放射線感受性分子の検索を行った。

## 実験と結果

### 1. 生検組織を用いた頭頸部がん(早期喉頭がんならびに下咽頭がん)の放射線感受性予知の検討

国立がんセンター東病院において放射線治療をなされた早期喉頭がん31症例の治療前生検組織を用い1)腫瘍組織内酸素濃度に関わると考えられる微小血管数, 2)腫瘍細胞抵抗性としてp53, Bax, Bcl-2の発現とTunnel法によるapoptotic indexさらに3)腫瘍増殖性の指標としてMIB1およびEGF受容体発現, そして4)臨床病理学的所見と放射線治療に対する感受性を比較検討した。放射線感受性は無再発20症例と再発または残存腫瘍を認めた11症例に分類した。早期喉頭がんにおける放射線感受性は年齢, 性別, 腫瘍局在部位および組織型などの臨床病理学的所見の何れも相関を示さな

かった。またp53, Bax, Bcl-2およびEGF受容体の発現やapoptotic indexも放射線感受性とは相関を示さなかった。MIB-1 indexはp=0.056と増殖が高い腫瘍に放射線感受性がある傾向を認めた。放射線感受性と最も強い相関を認めた因子は腫瘍血管数であり(p=0.008), Kaplan-Meier analysis法を用いた腫瘍無再発生存率でも有意(P<0.0003)に血管新生数の高い症例で放射線感受性が存在することが示された。これらの結果を確認するため, 早期喉頭がんと同様な検討を放射線治療の行われた下咽頭がん38症例の生検組織を用いて検討した。治療後再発した14症例と無再発24症例を用いてこれまで下咽頭がんの放射線感受性因子または予後因子と報告のあった8分子の発現(Ki67, Bcl-2, Bax, p53, Cyclin D1, CDC25, VEGF, MVD)を免疫組織化学的染色により検討した。

Cox proportional hazard analysisによる単変量解析では早期喉頭がんと同様に臨床病理学的因子のいずれも放射線感受性とは相関を示さなかつ



たが、微小血管の密度のみが有意な差 ( $p < 0.042$ ) を持って放射線感受性と相関していることが示された。以上の結果は、生検組織を用いた腫瘍血管の測定により放射線感受性を予知することが可能であることが示された。しかし、組織内微小血管密度の測定は観察者の主観が入り観察者間の一致が乏しい可能性があり個々の患者治療に対応する診断情報とするには情報の定量化が必要と考えられた。このため、生検内に含まれる腫瘍組織全体を画像解析装置にかけて血管に関わる様々な分子を定量化し客観的に血管密度を検索することを試みた。

#### 画像解析法を用いた放射線感受性予知法の確立

画像解析に用いた症例は国立がんセンター東病院で1992年から1997年に放射線治療が行われたT1,T2の喉頭がん55症例である。このうち36症例が無再発であり19症例が再発または腫瘍残存を認め放射線治療抵抗性と判断された。これら症例の治療前生検組織をCD31抗体を用いて微小血管を染色しKarl Zeiss社製KS300Image analyzerを用いて腫瘍内微小血管の画像解析を行った。画像解析としてはがん組織単位面積あたりの微小血管数 (MVD), 単位腫瘍面積あたりの血管周囲径 (TP/TA ratio), そして微小血管から150um離れた部位を低酸素下状態であると定義し、腫瘍面積あたり低酸素化腫瘍面積比 (Hypoxic ratio) として測定し、実際の放射線感受性と比較検討した。画像解析結果と放射線感受性の比較結果を表に示す。何れもMVDの高い腫瘍、腫瘍面積あたりに対する血管周囲径 (TP/TA ratio) の高い腫瘍は放射線感受性が高く、またHypoxic ratioの高い腫瘍は感受性が乏しいことが示された。Kaplan-Meier Analysisによると、何れも局所コントロールと有意な相関を示したが、なかでもTP/TA ratioが最もつよい相関を示した。これらの結果より、頭頸部腫瘍の放射線感受性は腫瘍内微小血管数と相関すること、また腫瘍内微小血管密度の測定は放射線感受性予知に有効である可能性と、その画像解析によりより客観的に放射線感受性を予知することが可能になるのではないかと考えられた。また、頭頸部がんの放射線感受性はがん細胞自身の有する増殖・分化そしてアポトーシスに関わる分子発現よりは組織の微小環境である酸素濃

度が最も重要な役割を果たしている可能性が示された。

#### 2. 生検組織を用いた食道がん放射線化学療法および手術療法選択の可能性

近年、我が国においても食道がん治療には手術療法だけでなく放射線化学療法が行われるようになり、その治療後の臨床経過は手術療法と比べて遜色がないことが報告されるようになってきた。治療前の生検組織を用いて放射線感受性の有無または手術療法抵抗性分子を検索することが可能ならばより適切な治療法を選択することが可能になると考えられる。そこで、放射線化学療法を第一選択として行われた101症例を用いて免疫組織化学的にp53蛋白、Tunnel法によるAI、細胞増殖因子としてEGF受容体、VEGF、Cyclin D1、MIB-1、微小血管密度MVD、さらに薬剤耐性分子の発現としてTS、DPD、GST-piの免疫染色を行った。用いた症例の患者特性はT2/T3/T4:11/58/32であり、ステージの高い症例が多く認められた。組織学的には2例のadenosquamous carcinoma症例以外は扁平上皮癌であった。検索結果では放射線化学療法の感受性と臨床病理所見の相関は全く認められなかった。生検組織を用いた分子発現では頭頸部がんと同様に血管新生数の高い症例に放射線化学療法感受性を認めた。 ( $p < 0.024$ ) p53蛋白発現では陽性症例において感受性が低い傾向が ( $p = 0.088$ ) またMIB-1 labeling indexの高い症例において放射線化学療法が効く傾向を認めた。 ( $p = 0.095$ ) この3種類の分子発現に関し多変量解析を行ったところ、MVDのみが有意な独立した予後因子であることが示された。 ( $p = 0.026$ ) 以上の結果より、食道がんの放射線化学療法においても生検組織における血管新生数の評価は治療法感受性を予知する因子として重要であることが示された。

放射線化学療法と手術治療をなされた患者の治療法選択のための予知因子を明らかにする目的で、放射線化学療法を行われたステージ2および3の51症例と同時期に手術された44症例の治療前生検組織を用いて免疫組織化学的にp53蛋白、Tunnel法によるAI、細胞増殖因子としてEGF受容体、VEGF、Cyclin D1、MIB-1、微小血管密度MVDを測定し、治療法選択のために必要な分子の選択

を行った。臨床病理学的には両治療の間には差を認めないが、患者年齢が放射線化学療法群では高年齢であった。生存曲線によると両治療の間には放射線化学療法群(5年生存率47%)手術治療群(5年生存率50%)と全く差がなかった。手術治療群と放射線化学療法群の生存率に関して相対危険度を比較検討したところ、有意な差はないものの単変量解析ではN stageでリンパ節転移の無い症例は手術治療により1.64倍の危険率で放射線治療より生存が高いことが示され、cyclin D1発現の無い症例、MVDの低い症例はそれぞれ3.86倍と1.82倍の危険率で手術治療が放射線化学療法に比べて予後がよいことが示された。また、多変量解析によっても、何れも有意差はないものの、N stage, EGFR発現, Cyclin D1発現, MVDの4項目は何れも手術療法と放射線化学療法の間で予後に関して逆相関を示した。これらの結果より、N(+), EGFR(+), Cyclin D1(+), High MVD群では放射線化学療法がまたN(-), EGFR(-), Cyclin D1(-), low MVD群では手術療法が予後良好と考えられ、これらの分子発現の組み合わせにより手術、または放射線化学療法の治療法選択のために基準を作成することが出来る可能性が示された。

### 3. 生検組織を用いた放射線化学療法の食道がん発現プロファイルの検討

近年の分子生物学的手法の進展により、生検組織などの微小切片より遺伝子を抽出し同時に多数の遺伝子発現が検索できるようになってきた。同一症例から生検組織を2個以上採取し一方では病理組織診断を行うとともに同一症例の生検組織における網羅的遺伝子発現解析を行った。用いたDNAチップはAffimetrix社製12626遺伝子チップを使い、生検組織からのmRNA増幅は国立がんセンター研究所分子腫瘍部佐々木博巳博士らの開発したTALPAT法を用いた。同一症例において遺伝子解析が2個以上の生検組織から可能であった症例については遺伝子発現の違いがあるかを比較検討した。

長期生存群14症例と早期死亡群11症例の網羅的遺伝子発現検索によりこれらの症例間には異なる遺伝子発現パターンが存在することが明らかになった。その中で、食道がん放射線化学療法の効

果と相関する178個の遺伝子を抽出した。その発現分子の一部を示すと、長期生存例においては免疫に関わる分子発現が数多く発現していることが示された。また、組織学的に放射線化学療法と最も相関を示した微小血管については微小血管内皮の産生するVEGFの受容体の発現の高い症例では放射線化学療法に感受性があることが示された。一方、早期死亡群1症例では薬剤耐性遺伝子群、アポトーシス抑制遺伝子群そして浸潤・転移に関わるプロテアーゼ群などの発現が有意に高いことが明らかになった。

### 考 察

生検組織を用いた早期喉頭がんにおける放射線感受性は組織学的には組織内微小血管の画像解析によりかなり精度良く分類できる可能性が示された。これは早期喉頭がんの大きさは5ミリ程度の小型であることにより組織学的なheterogeneityが少ないことが重要な因子である可能性が示された。実際、潰瘍をともなう浸潤がんでは採取組織内の血管内密度はHot spotにより測定した血管内密度と異なり必ずしも放射線感受性と強く相関しないと考えられた。これらの結果より小型がんについては生検組織を用いた治療法選択のための診断技術の開発の可能性を示すことが出来ると考えられる。しかし、一方、比較的大型腫瘍においては組織学的heterogeneityが強いことより、生検組織を用いた検討には今後十分な条件の検討を行う必要があると考えられる。

食道がんの放射線化学療法は我が国では始まったばかりであり十分な臨床情報は集まっていないが、これまでの検討では手術療法とほぼ同じ生存率を示すと考えられる。同じ生存率を示す治療法が2種類存在することは生検組織を用いてその治療法を選択することにより生存率を上げることには貢献できると考えられる。今回の検討では放射線化学療法群には臨床的N(+), EGFR(+), Cyclin D1(+), High MVD群の予後がよく、また手術療法群には臨床的N(-), EGFR(-), Cyclin D1(-), low MVD群が予後良好と考えられた。現在、これらの分子発現の組み合わせにより手術、または放射線化学療法の治療法選択のために基準を作成を試みている。

生検組織を用いた遺伝子発現検索においては依

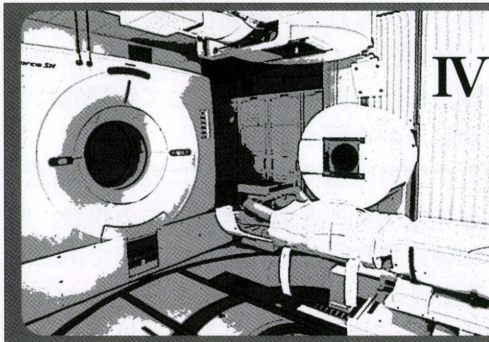
#### IV. 最先端医療を支える基礎および臨床研究

然技術的な改良と症例の積み重ねが必要と考えられるが、がん細胞とがん周囲間質組織細胞の発現する遺伝子情報を有効に利用することにより、治療法選択のための新たな手段が登場したと考えられる。生検組織を用いた遺伝子検索は手術材料を用いた遺伝子発現検索結果と必ずしも相関しないが、これは生検組織を用いた遺伝子発現検索の結果はより生体内で起こっている遺伝子発現を示しているものと考えられる。今後、症例の積み重ねを行い、生検組織を用いた遺伝子発現検索情報の

臨床への応用について検討していくべきだと考えられる。

我々は今後生検組織を用いて画像解析、遺伝子発現解析を同時に行い、放射線治療と手術療法の2種類の異なった治療手段に対しより適切な症例の選択が可能になるよう検討を進めていきたいと思う。21世紀に行われる医療の目標の一つである tailor-made medicine は生検組織から得られる情報をいかに解析し、利用するかが重要な点になると思われる。





## IV. 最先端医療を支える 基礎および臨床研究

### 2. 重粒子線の物理的線質について —テーラーメイド放射線治療を目指して—

金井 達明

放射線医学総合研究所 重粒子医科学センター 医学物理部

Radiation therapy made to order from viewpoint of  
physics side

Tatsuaki Kanai

National Institute of Radiological Sciences

---

#### 〈Abstract〉

---

Eight-year experiences of a heavy-ion radiotherapy have given us fruitful knowledge about responses of tumor to carbon beams. In order to develop more advanced therapy based on prediction of radio-sensitivity of individual patients, we have to analyze present therapeutic results. From physical point of view, the radiation therapy, made to order, will be executable if we know how to irradiate tumors in the each patient. LET of the therapeutic beam used in NIRS is not so large in view point of OER. However, in carbon therapy, we observe high biological effect in the therapy. Individual optimum therapeutic schedule, irradiation dose to each region of the body are found in the course of dose escalation study. It is very important to analyze the results of the carbon therapy for the individually optimized therapy.

---

#### 緒言

放医研における重粒子線治療は8年を越え、多大な成果を上げている。従来の治療、特に放射線治療は、治療成績などのデータをもとにした平均的な腫瘍に対する感受性をもとに治療を行ってきた。この統計的な手法は全体としての治療成績を向上させるのに非常に有効である。予め患者の放射線感受性がわからない現状では、治療を行ってからの結果でしか患者各々の正常組織・腫瘍の感受性の大小はわからない。この感受性が予めわかり、患者個々に最適の治療が行われれば治療成績

はさらによくなることは間違いない。このような試みに、重粒子線治療における物理的に考えられることを整理して考察してみようと思う。しかし、このような試みに物理的なサイドでは現状で答えがあるわけではないので議論が散漫になってしまうが、これからの発展の一助になれば幸いと思うので間違いを恐れず議論する。

#### 積層照射法による個別化した拡大Bragg ピークの提供

重粒子線治療が始まった当初は、重粒子線の治療はなるべくシンプルに考え、個々の患者および



腫瘍の種別に対する個別化はできない状況であった。腫瘍の重粒子に対する反応は多くの細胞でばらばらであり全く予想できないものであった。この状況で耳下腺癌の細胞(HSG細胞)の生残率曲線を腫瘍全体の代表格として治療の全体像を描いていった。拡大Braggピークの設計はHSG細胞の生残率曲線をもとに行われたが<sup>1)</sup>、他の腫瘍細胞に対しては異なる反応を示すと考えられていた。しかし、いろいろな細胞での拡大Braggピークの確認実験では、そこそこ一様な反応が得られまずは治療に適用することがOKになった。その後で、鈴木ら<sup>2)</sup>は、さまざまな腫瘍細胞で炭素線に対するRBEはほぼ一定であることを示し、拡大Braggピークの設計で一つの細胞(HSG細胞)を用いて一様殺傷するように設計すれば他の腫瘍細胞に対してもそこそこ一様に殺傷されることを実験的に示した。以上の事実は、様々の種類のがん細胞に対して、RBEや拡大Braggピークの形を変える必要がないことを示しており、様々の患者に共通の線量や拡大Braggピークを使用しても第0次近似としては有効であることを示している。すなわち、現在放医研で使われている固定的な照射方法(Passive Method)は重粒子線治療に対して有効であることがわかった。

テラレーメイド放射線治療とは、このような第0次近似からさらに治療を高度化させた次の段階

にあるものと考えられる。最初に、粒子線治療において、生物学的にこのような高度なテラレーメイド放射線治療が可能になったとして物理的に対応できるかどうか検証する。

患者固有の放射線感受性が事前に判明すれば、治療線量を加減することができる。この場合、照射線量の制御は物理的には当然対応可能である。しかし、治療線量レベルが変わると一般にはRBEが変わりしかもその変化の大きさは拡大Braggピークの中で異なる。例として図1に線量を変化させた場合の計算上の臨床線量の変化を示す。特に拡大Braggピークの最深部で線量が増大するとRBEが相対的に落ちて来て臨床線量は見かけ上少なくなってくる。また、細胞の感受性が異なり、拡大Braggピークの形がかわってくることも考えられる。図2に、HSG細胞に対する生物線量分布と同じ設計の拡大Braggピークに対するV79細胞の生物線量分布を示す。これらの図からわかるように、線量域、細胞種が異なると詳細に見ると拡大Braggピークの形が変わってきて同じ設計のBraggピークでは拡大Braggピークでの細胞生残率は一様ではなくなってくる。これらのことは、実際には未だ確かめられていないことであるがそのような可能性は十分考えられる。治療前にこのような患者ごとの線量域、照射に対する反応が十分わかっている場合、個々の患者に対して最適な

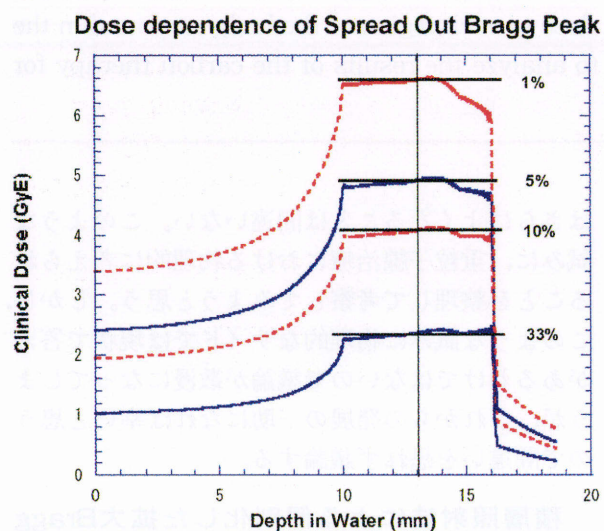


Fig.1 Biological dose distributions of carbon beam. Using a ridge filter, which is used in the present therapy, biological doses are calculated for various levels of irradiation doses.

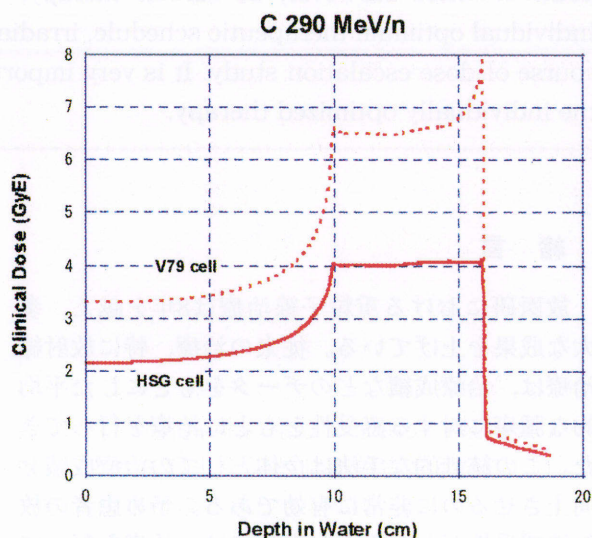


Fig.2 Spread out Bragg peak, which is designed using the responses of HSG cells, Dashed curve shows responses of V79 Chinese hamster cells for the designed spread-out Bragg peak.



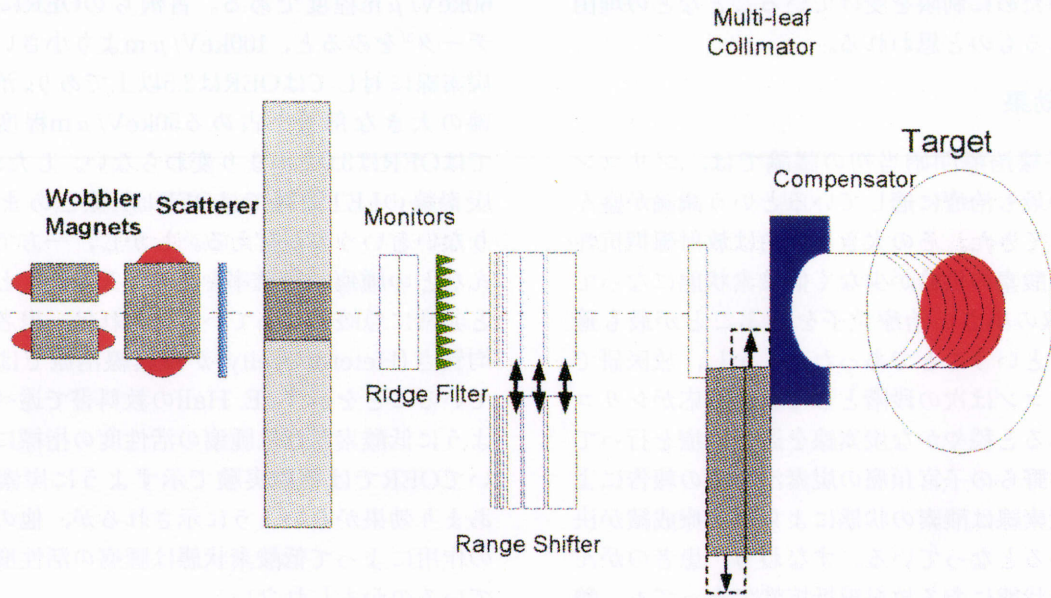


Fig 3 Schematic layout of irradiation system showing conformal irradiation using stacking layer method.

拡大Braggピークを提供することが必要になる。  
 治療の照射系としての対応を考えると、現在のPassiveな治療照射方法から脱却していく必要がある。現在の方法では、たくさんの種類の照射を予め用意することは不可能に近い。Activeな照射を行い、固定的なリッジ・フィルターなどを使用しない方法で照射を行えば、患者ごとのパラエティーに富む照射に対応可能になる。積層照射、スポット走査法はこのような要求に対応可能な照射法と言える。図3に積層照射法の原理図を示す。積層照射法では、数mmに拡大したBraggピークを時間的に重ねていくことで拡大Braggピークを形成する。したがって、重ね合わせの比率は患者毎に最適化することは原理的に可能である。

### 重粒子線治療の個別化

放射線による腫瘍増殖制御の失敗を改善するための物理サイドからの努力は1)線量を患部に集中する治療を達成すること。2)重粒子線などの高LET放射線を使用して放射線抵抗性の高い腫瘍に対しても腫瘍増殖抑制効果を上げること。の2点である。1)と2)の効果を狙った重粒子線治療はそのねらいどおりの成果を上げている。重粒子線治療は基本的に患者個々の反応の違いを無くす方向に働き、そのことが現在の治療法で大きな成果を挙げていると考えることができる。

一方、今回のテーマであるテーラーメイド治療は、予め患者の感受性などを予見し患者に最適の放射線治療を施そうというものである。ある意味では、これは重粒子線治療が患者の放射線抵抗性の細胞をも一様に殺傷することを目的とした治療とはベクトルが反対方向であるように思われる。

重粒子線治療特に放医研で行われている炭素線治療でも個別化が進んでいる。部位別の分割スケジュール、部位別の治療線量の一覧表を表1に示す。これからわかるように、分割スケジュールや処方線量は部位毎に異なっている。異なっている原因は様々あるが、統一的な解釈はなされていない。線量が異なるのは、目標とする治療のレベルが部位によって異なり、避けられない正常組織へ

表1 放医研で行われている炭素線治療の処方線量とスケジュール

部位	GyE	回/週
頭頸部	57.6~64	16/4
頭蓋底	48~57.6	16/4
肺V(肺野末梢型)	72	9/3
肺II	54~59.6	12/3
	48~52.8	8/2
	48	4/1
前立腺II	60~66	20/5
骨・軟部II	70.4~73.6	16/4



の線量のために制限を受けていることなどの理由が含まれるものと思われる。

### 酸素効果

重粒子線治療開始当初の議論では、シリコンビームが最も治療に適しているという議論が盛んに行われてきた。その大きな理由は放射線抵抗性のがんは酸素の供給が少なく低酸素状態になっていてOERの小さい治療粒子を選ぶことが最も適当であるということであった。しかし、放医研では、シリコンは次の段階としてまず反応がシリコンに比べると穏やかな炭素線を選び治療を行ってきた。中野らの子宮頸癌の炭素治療線の報告によると、炭素線は酸素の状態によらず治療成績が決まっているとなっている。すなわち、患者のがんが低酸素状態にある放射線抵抗性であっても、酸素が十分にあり放射線感受性が高いと予想される場合にも炭素線で治癒することができるということを意味している。局所制御と再発のデータから酸素濃度の因子は関係がない。すなわち、重イオン治療では、酸素があろうがなかろうが一様にclonogen cellを不活性化することができるということを示している。

放医研で使用している炭素線のLETは拡大Braggピーク内で図4に示すような値になっている。腫瘍に照射する大部分の領域ではLETは40-

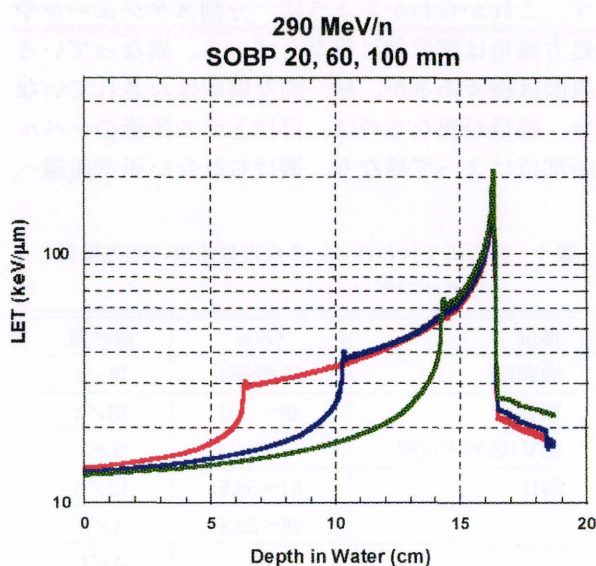


Fig.4 Dose averaged LET of the therapeutic carbon beams.

60keV/μm程度である。古沢らのOERに関するデータ<sup>3)</sup>をみると、100keV/μmより小さいLETの炭素線に対してはOERは2.5以上であり、治療炭素線の大きな部分を占める50keV/μm程度のLETではOERは3.0とあまり変わらない。したがって、炭素線のLET領域ではOERはX線とあまり変わらないという事が言える。しかし、一方では肺がんなどの腫瘍制御確率をみるとX線などと比べると非常に急峻になっている。これは、患者間の不均質さ (Heterogeneity) が炭素線治療では消失していることを示す。E. Hallの教科書で述べているように低酸素状態は腫瘍の活性度の指標になっていてOERでは細胞実験で示すように炭素線ではあまり効果がないように示されるが、他の何らかの作用によって低酸素状態は腫瘍の活性度が落ちているのかもしれない。

### まとめ

- 患者毎の最適化したテーラーメイド治療は積層照射の技術を使用すればある程度可能である。
- 治療炭素線はそんなに高LETの放射線ではない。したがって、細胞実験から見られるOER酸素効果は大きくない。しかし、現実の治療においては、酸素効果と同じような減少が観測されている。細胞レベルでの常識は実際の治療結果と矛盾するののかについては結論がついていない。
- 重粒子線治療でも個別化が進んでいる。線量増加研究を重ねた結果、部位により、スケジュール、治療処方線量が異なる。これらの、治療現場に即した結果の解析がテーラーメイド治療という新しい技術にも重要ではないか。

### 参考文献

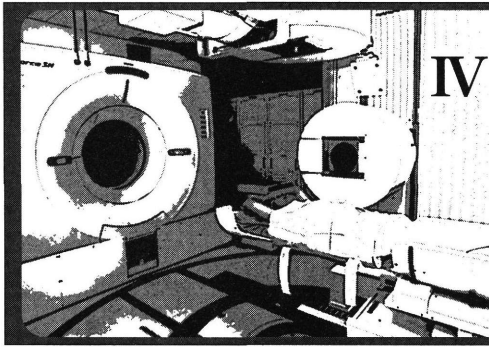
- 1) T. Kanai, M. Endo, S. Minohara, N. Miyahara, H. Koyama-Ito, H. Tomura, N. Matsufuji, Y. Futami, A. Fukumura, T. Hiraoka, Y. Furusawa, K. Ando, M. Suzuki, F. Soga and K. Kawachi: Biophysical Characteristics of HIMAC Clinical Irradiation System for Heavy-ion Radiation Therapy. *Int. J. Radiation Oncology Biol. Phys.* 44, 201-210, (1999).
- 2) M. Suzuki, Y. Kase, H. Yamaguchi, T. Kanai, and K. Ando; Relative biological effectiveness for cell-killing effect on various human cell

lines irradiated with heavy-ion medical accelerator in Chiba (HIMAC) carbon-ion beam. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **48**, 241-250, 2000.

- 3) Y. Furusawa, K. Fukutsu, M. Aoki, H. Itsukaichi, K. Eguchi-Kasai, H. Ohara, F.

#### IV. 最先端医療を支える基礎および臨床研究

Yatagai, T. Kanai, K. Ando, Inactivation of Aerobic and Hypoxic Cells from Three Different Cell Lines by Accelerated  $^3\text{He}$ -,  $^{12}\text{C}$ - and  $^{20}\text{Ne}$ -Ion Beams. *Radial Res.* **154**, 485-496 (2000).



## IV. 最先端医療を支える 基礎および臨床研究

### 3. 培養がん細胞における重粒子線照射の利点

古澤 佳也

放射線医学総合研究所 重粒子医科学センター 粒子線治療生物研究グループ

## Advantages for the Use of Heavy-ion Irradiation on Cancer Cells at Radiotherapy

Yoshiya Furusawa

National Institute of Radiological Sciences

---

### 〈Abstract〉

---

Accelerated heavy-ion beams have unique radiobiological characteristics. The beam has a sharp peak of energy deposit in a body, such called as Bragg peak. To apply this beam for cancer therapy, the peak is spread-out by some way to get an uniform irradiation field, such as SOBP (spread-out Bragg peak). Linear energy transfer (LET) of heavy-ion beams changes with depth in body, and this change modifies the relative radiobiological effectiveness (RBE), oxygen enhancement ratio (OER), efficiency of recover from cell damage by the radiation, and so on. These higher LET radiation in target tumor region in the SOBP shows higher RBE, lower OER, and small repair efficiencies. In contrast, the LET at entrance and along the path of the beam at the upper stream of the SOBP, such as skin or other normal tissues, the LET values are lower than in the SOBP gives lower RBE and larger repair efficiency. In addition smaller OER in the SOBP gives much uniform radiobiological efficiencies to cells even in a hypoxic region in the cancer tissue. Those biological characteristics that depends on the LET values are different by the end points of biological responses interested. Those complicated responses may make difficult to understand overall radiobiological responses or treatment plan for heavy-ion radiotherapy. However they must gives a lot of advantages in heavy-ion radiotherapy.

---

### 1. 緒言

放射線医学総合研究所に1994年、医療用として世界初の重粒子線がん治療装置(HIMAC: Heavy Ion Medical Accelerator in Chiba)が完

成して<sup>1)</sup>臨床試行が始まった<sup>2)</sup>。これに先駆け、アメリカのLBLで1976年から1992年にかけて最初の重粒子線を用いた治療が行われ<sup>3)</sup>、ドイツでは少し遅れてGSIが1998年より治療を開始した<sup>4)</sup>。重粒子線のうち炭素線などの重い粒子に比較してより



生物効果の解析しやすい陽子線による治療は、より一般的になりつつあり世界各地に建設・計画が進められていて、国外に稼働中のものが15施設、計画中のものが8施設以上ある。国内では放医研で1986年より陽子線を用いた眼の癌治療が行われており、最近では国立がんセンター東病院(2000～)と兵庫県立粒子線治療センター(2001～、炭素線は2002～)、若狭エネルギー研究センター(2002～)や筑波大学陽子線医学利用研究センター(2001～)で治療が開始され、静岡県立がんセンター(2003～)でも治療が開始される予定である。粒子線による治療が行われる背景には、今後増加が予想されるにも関わらず従来の方法では治療が困難ないわゆる難治癌に対する新しい治療法への強い期待があり、これは粒子線のもつ空間的な線量分

布の良さと強い生物学的効果という二つの特徴に負うところが大きい。

LBLでは治療開始に先立って重粒子線を治療に用いるために必要な多くの生物学的実験<sup>5)</sup>が行われ、HIMACにおいても前臨床試験<sup>1)</sup>が行われて数多くの重粒子線に関する生物学的知識が得られている。しかし粒子線による生物効果は十分解明されているとは言い難く、教科書的にみてもごく一部の研究結果が粒子線の一般的性質のごとく扱われていていっそうの研究が望まれる。この重粒子線治療の基礎を明らかにするため、放医研ではHIMACの共同利用が行われ、治療・物理・生物の分野で多くの研究者が参加して広範な領域で研究が進められている。

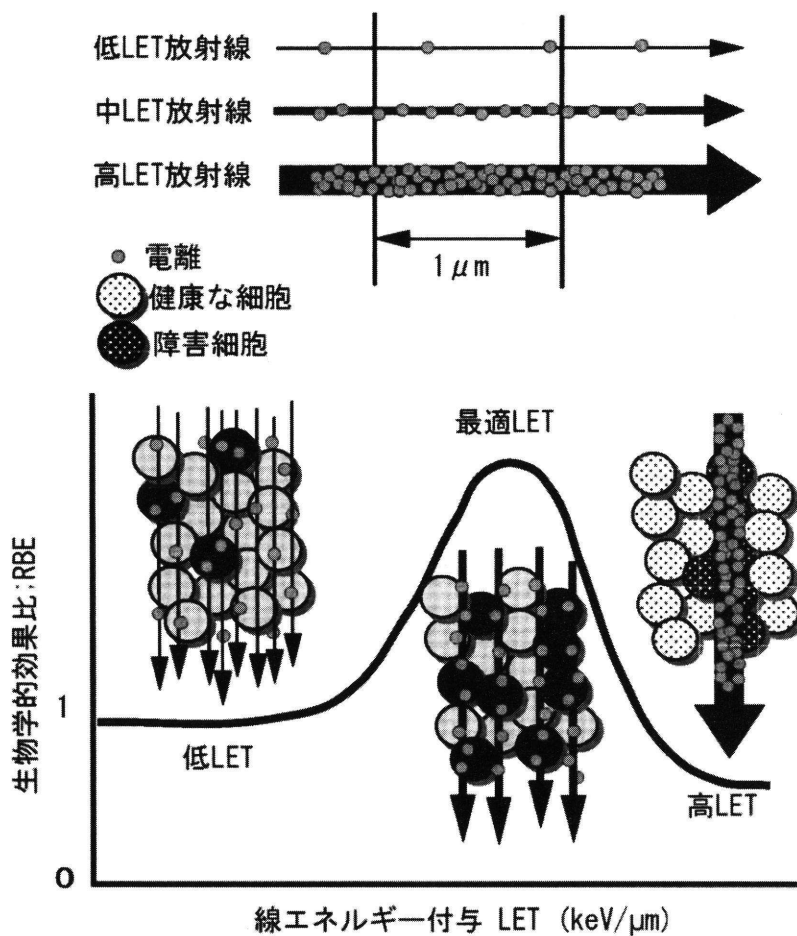


図1 LETの概念と生物学的効果比。

上；放射線の線エネルギー付与(LET)は水中を放射線が1ミクロン進んだときに与えられるエネルギー量。同じ線量を与える時、低LET放射線は広範囲にまばらな電離を引き起こし、高LET放射線は限局的な高密度の電離を引き起こす。下；健康な細胞に2つの電離が起こると障害が生じると仮定した場合の障害細胞の分布。電離の密度と細胞の大きさが一定の関係となったとき効率的に障害を引き起こす。

## 2. 重粒子線の特徴

### 2.1 線エネルギー付与(LET)

X線やガンマ線あるいは非荷電の中性子線などが人体に入射したときには、一般に皮膚直下の浅い部分でエネルギー付与の強度が最大となり、深部に行くにつれて指数関数的に減衰する。これに対し陽子線や重粒子線などの荷電粒子線では身体の表面付近では相互作用が小さく、ビームの進行とともにエネルギー(速度)を失って徐々に線量付与が大きくなり、停止寸前の飛程終端部でブラッグピークを形成して大きなエネルギーを身体に与える。荷電粒子線が生体内に照射されると飛跡に沿ってそのエネルギーを周囲の物質に与え、生体高分子、特にDNAの切断をおこすことが放射線の生物学的効果の初期事象と考えられている。この時、飛跡に沿って単位長さあたりに与えるエネルギーを線エネルギー付与(LET: linear energy transfer; [keV/ $\mu$ m])と呼び(図1)、これを放射線の「線質」を示すパラメーターとしている。重粒子線は従来の放射線に比べるとこの値が大きく(数十～数千keV/ $\mu$ m)高LET放射線と呼ばれ、X線(～2keV/ $\mu$ m)やガンマ線(～0.2keV/ $\mu$ m)は低LET放射線と呼ばれている。

### 2.2 生物学的効果比(RBE)

こういった線質の異なる放射線の生物効果を示す指標として生物学的効果比(RBE: relative biological effectiveness)が用いられている。RBEは同じ生物効果を生じさせるのに必要な放射線の物理量を、基準X線(水中でのLETが3keV/ $\mu$ m, 線量率0.1Gy/min; ICRPによる)との比で表したものであり、たとえば細胞の生存率を10%にするための線量比などとして表される。

$$RBE = \frac{\text{基準放射線で必要な線量}}{\text{試験放射線で必要な線量}}$$

高LET放射線では一般にこのRBEが高い、すなわちより少ない物理線量で同じ効果を生じせしめる<sup>6,7)</sup>。RBEは生物効果の着眼点、例えば細胞の致死・突然変異・染色体異常など、あるいは組織や細胞の種類等によっても異なる。RBEはLETとともに大きくなり、培養細胞の致死を指標にすると100-200keV/ $\mu$ mあたりで極大値をとり、その後は再び減少して1,000keV/ $\mu$ m付近では再び1と

なって、さらに高いLET領域ではX線より低く(<1)なる。放射線生物学の領域では、こういったLET領域をオーバーキル(殺し過ぎ)領域と呼ぶ。これは線量ベースの考え方で、一つの細胞を殺すにはある一定のエネルギー付与で十分であって、それ以上ではエネルギーの無駄使いとなり効果には結びつかないという考え方である。一方、量子数を基盤として考えると高LETでは、同じ線量であっても低LETに比べて粒子数が少ないので、粒子線でヒットされない多くの細胞が残る(作用断面積の飽和)と考えられる(図1)。またDNA上のごく限られた部分の変化による点突然変異や、小さな分子が関与する現象、たとえばDNA分子の単鎖切断やアミノ酸の失活などに着目した場合には、RBEは極大を持たずLETに従って単調に減少する。このようにLETや着目する生物効果あるいは臓器組織の違いによってRBEが異なるため、単純に物理線量の測定だけでは生物効果を推定することができない。

### 2.3 酸素増感比(OER)

さらに高LET放射線では酸素の存在による効果の修飾が小さいことも知られている。放射線の効果は標的(おもにDNA)となった分子が直接放射線のエネルギーを受けて、物理的・化学的変化を引き起こす直接効果と、標的分子以外の周辺分子(おもに水)がエネルギーを吸収してラジカル種(OH $\cdot$ , H $\cdot$ , e $_{aq}^{-}$ 等)を生成し、このラジカル種が標的分子にたどり着いてこれに変化を及ぼす間接作用とに分けられる。この間接効果は化学的作用であるので、周囲の化学的環境によって修飾を受けやすい。放射線によって生成した水酸化ラジカルがDNA分子に化学変化をおこして初期損傷が生成されると、この損傷部位に酸素分子が結合し、修復可能なDNAの初期損傷を固定化して修復不可能な損傷にすると考えられている。このため酸素の有無で生物効果の大きさが異なり低LET放射線に対しては、細胞が常酸素下(20%, 150mmHg)にある場合に比べて無酸素下(例えば窒素下)では同じ効果を得るために約3倍の放射線量が必要となる。低LET放射線による放射線治療を受けた場合、癌組織中で低酸素状態にあった癌細胞は酸素効果が期待できないため効果が小さく、治療後の再発の原因の一つではないかと考え

られている。この酸素効果は間接作用に起因するものであって、直接作用が優位となる高LET放射線では無くなると考えられている。事実、OERはLETが20-30keV/ $\mu$ m以下では3であるが、さらにLETが上昇するとこれに伴って減少し50keV/ $\mu$ mで約2、数百keV/ $\mu$ m付近ではほぼ1となる<sup>6)</sup>。このため重粒子線による治療で十分高いLETの放射線が利用できれば酸素効果に基づく放射線効果の修飾が起らず、癌組織中の細胞の均一な増殖抑制が期待できる。癌組織中の酸素分圧の分布などがよくわからないことから、現在の放医研での重粒子線治療の治療計画に於いては酸素効果の寄与は考慮されていない。しかし、この治療ビームは線量加重LETが約50keV/ $\mu$ mなので、低酸素分画にある細胞に対しては1.5倍(=3/2)の酸素による効果が存在する可能性が示唆される。

#### 2.4 損傷の修復

第三の高LET放射線の特徴として、損傷の修復が起こりにくいことが挙げられる。放射線によってできる損傷は、細胞自身では修復できない致死損傷(LD; Lethal damage)と、致死的でない状態

までもどる回復性損傷に分けられる。回復性損傷はさらに亜致死損傷(SLD; sublethal damage)と潜在的致死損傷(PLD: potentially lethal damage)にわけることが出来、それぞれの損傷からの回復(または、損傷の修復)を亜致死損傷回復(SLDR)、潜在的致死損傷回復(PLDR)と呼ぶ。ここで修復(repair)とは分子レベルでDNA損傷が直される現象を示し、回復(recover)とは細胞または組織・個体レベルでの機能が治される現象を言う。

PLDは放射線照射後の細胞周辺の環境条件(低栄養、低pH、低酸素、接触増殖阻害など)によって細胞の生存率が上昇し、あるいは損傷が固定(一部の抗がん剤、不等張塩処理、カフェインなどによる)されて生存率が下降する現象として捉えられる。生存率曲線の変化の特徴として、PLDRにより高線量領域の直線部分の傾きが変化するが、この直線部分の0Gyへの外挿値(標的数)は変化しない。

SLDは発見者の名にちなんでElkind回復とも呼ばれ、分割照射に対する回復である。一回目の照射と二回目の照射の間に時間をおくことによっ

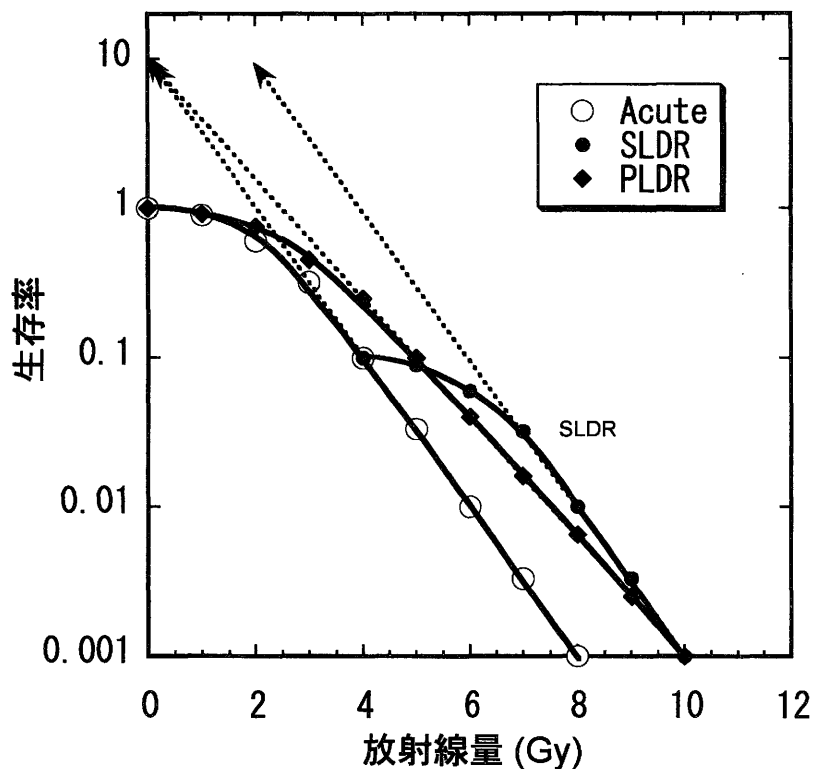


図2 SLDRとPLDRの生存率曲線の違い



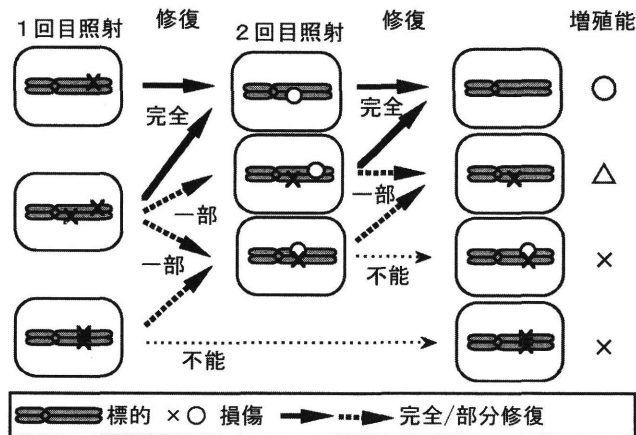


図3 分割照射による細胞(染色体)の損傷と修復。  
 単独の姉妹染色体分体の損傷は修復されやすく、同位染色体分体切断が起こると修復は困難。一回目(X)と二回目(O)の照射による損傷の相互作用で同位染色体分体切断となることもある。高LET放射線では同位染色体分体切断が起こりやすい。

て、二回分の線量を一度に照射した場合に比べて生存率が上昇する現象であり、放射線治療に於いては分割照射が一般に行われるので臨床的に重要である。生存率曲線の変化の特徴は、PLDRと異なり直線部分の傾きは変化しないで、二回目の放射線に対する生存率曲線の「肩」の回復(外挿値の増加)として捉えられる。図3に示すように、一回目の照射で染色体切断が起こっても次の照射までに修復されると無傷の状態に戻る。ここに二回目の照射で別の切断が起こったとしても再び修復が起こると結果的に無傷となって増殖能を示す(上)。結果的にひとつの染色体切断が残ると、引き続き細胞分裂で切断染色体を受け継いだ娘細胞は致命的となり健康な染色体を受け継いだ娘細胞は増殖可能であるかもしれない。一回目の照射で複数の切断が起こった場合でも完全修復の可能性はあるが、特に、向かい合う姉妹染色体の切断(同位染色体切断)が起こると誤修復が起こりやすく完全修復が困難な場合が多い(下)。このような同位染色体切断は低LET放射線では確率的に発生頻度が低い、高LET放射線では電離密度がトラックの周辺に非常に高いため、姉妹染色体の切断を同時に起こしやすい<sup>8)</sup>ので、修復が困難となることが予想される。

## 2.5 物理的線量分布

荷電粒子線はブラッグピークと呼ばれる独特の

線量分布を持ち、これを適当に拡げて拡大ブラッグピークを得て治療に供している。詳細は別項(金井ほか)に譲るが、ブラッグピークの中での線量分布と共に、LETの分布が非常に重要な因子となる。簡単には、以上述べたように大きなRBE、小さいOER、低い修復能などが高LET放射線の生物に対する特徴であるが、照射時に癌組織の手前にある皮膚その他の正常組織の被曝は、癌組織より小さい線量でかつ低LET成分での照射となるため、単に物理的な線量分布以上に大きな治療効果比が得られることになる。

## 3. 結語

重粒子線は上に述べたようにRBE, OER, 修復能などがLETによって変化し、他の特有な反応性の違いも観察されている。これらの複雑なコンビネーションから従来の放射線による知識と物理的計算からだけでは推定できない複雑な生物効果が発現する。しかし、重粒子線の生物効果の解析は加速度的に進んでいるので、巧く重粒子線を用いることによって従来は治療が困難であった癌の治療にさらに新しい展開をもたらすことが期待される。

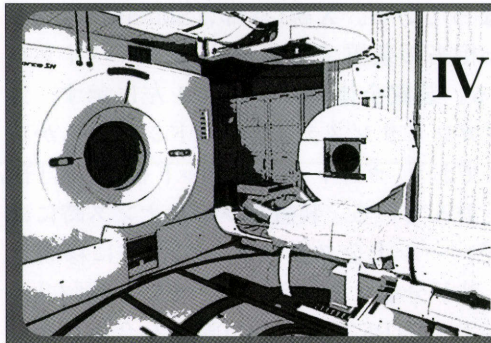
## 参考文献

- 1) 山田聰編(1995)重粒子線がん治療装置(HIMAC)-その施設と前臨床試行-, *Ionics* 235: 1-154

- 2) Tsujii H *et al.* (1994) *NIRS-M-103*, National Institute of Radiological Sciences, Chiba, pp. 212-8.
- 3) Castro J. R. *et al.* (1988) *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, 14: 711-720.
- 4) Krft G. *et al.* (1999) *Radiat. Environ. Biophysics* 38: 229-37.
- 5) Blakeley E. A. *et al.* (1984) In; *Adv. Radiat. Biol.*, Vol.11, pp.295-389, Academic Press, New York.
- 6) Furusawa Y. *et al.* (2000a) *Radiat. Res.* 154, 485-96
- 7) Furusawa Y. *et al.* (2000b) In: *Exp. Future. Res. Strat. Space Radiat. Sci.*, pp. 104-9, Iryokagaku-sha Co, Tokyo.
- 8) Kawata *et al.* (2001) *Radiat. Res.*, 156: 598-602.

#### その他参考となる文献

- 9) 日本放射線技術学会 監修 (2002), 放射線生物学. オーム社出版局. 東京
- 10) 菅原 監修 (2002), 放射線基礎医学. 金芳堂. 東京.
- 11) シャーフ (1998), 医生物学用加速機総論. 医療科学社. 東京.



## IV. 最先端医療を支える 基礎および臨床研究

### 4. PET-CTの有効性

吉川 京燦

放射線医学総合研究所 重粒子医科学センター病院

The Usefulness of the Combined PET-CT scanner.

Kyosan Yoshikawa

Clinical Diagnosis Section, Research Center Hospital for Charged Particle Therapy,  
National Institute of Radiological Sciences.

---

#### (Abstract)

---

Recently, combined PET-CT scanners that simultaneously reveal both anatomical and metabolic images within the body have been developed. The Siemens Biograph was the first PET-CT used in Japan and was installed at NIRS at the end of March 2002. The Biograph system integrates Siemens PET (HR+) and spiral CT (SOMATOM Emotion Duo) technologies with a multimodality computer platform. The CT data obtained with PET-CT is also used for attenuation corrections of the PET images. The advantages of PET-CT for clinical use are i) much shorter study time for each patient, ii) easy and precise alignment of the patient's lesion within the PET field of view, iii) an increase in PET image quality due to the CT attenuation correction system which gives a higher spatial resolution and produces much less noise in the attenuation correction data, and iv) an improvement in diagnostic accuracy provided by both functional and anatomic imaging. The Japanese government has not yet approved the marketing of PET-CT. We are continuing to investigate its usefulness. We expect that PET-CT will be a major diagnostic tool for oncology imaging in the near future.

PET検査は治療前の悪性度診断、癌の浸潤範囲や転移病巣の検出などによる臨床病期の診断、治療中・治療直後の癌治療に対する反応性(治療効果)の判定・評価、治療後の予後予測や再発診断など、癌診断について精度の高い情報が提供されることとして癌臨床への応用が広がっている。放医研では重粒子線加速器(HIMAC)を使った癌治療の臨床試験が施行されているが、炭素イオン線の病巣への線量集中性が高いという特徴は必然的にそれ

に見合う治療領域設定の高精度化が要求され、それを支える高度な診断精度が求められている。これに対し最新のCT・MRI技術を駆使するとともに、PET診断から得られる機能情報の活用が行われている。しかし、癌浸潤範囲の正確な診断という観点では、PET画像のみでは生体臓器や組織の正確な位置情報が得にくいという欠点がある。一方、X線CT装置は生体の解剖学的な詳細情報を正確に描出でき、医療分野において広く利用されて



いるが、PETのような代謝機能に関する解析能は備わっていない。このPET装置とX線CT装置との互いの欠点を補い、両者の優れた特徴を利用した新しい癌診断法が切望されている。

近年、PET装置とX線CT装置を合体し、患者が同一ベッド上で移動することなく両検査を受けることを可能とするCT付PET装置(PET-CT)が開発された。この装置の利用は、生体の代謝機能過程(PET)と解剖学的詳細構造(X線CT)を同時にかつ明瞭に描出し、両情報の正確な重ね合わせ表示(fusion imaging)を可能にするなど、癌診断の精度を飛躍的に向上させるものと期待される。平成14年3月末に日本で第1号機となるPET-CT装置が放医研に導入され研究が開始された。

### PET-CT装置の構成と特徴

放医研に設置されているPET-CTは米国SIEMENS社製のBiographで、全身PET装置とX線CT装置を合体し機能的に融合させた装置である。本装置のPET部は同社のECAT EXACT HR+を改良した装置で基本的性能はECAT EXACT HR+と同じであるが、2次元収集のためのセプタは無く3次元収集専用となっている。また内部線源を持たず、吸収補正データはX線CT情報を使う

仕様となっている。X線CT部はSomatom Emotion Duo相当の装置で2列検出器のスパイラルCTである。装置全体の外観を図1左に示す。大まかにはガントリシステムとベッドシステムから構成されており、ガントリ部はベッド側からCT部、PET部と並んでいる。装置のメンテナンス時にはPET部がレール上をスライドして後方に移動してガントリが分離するようになっている(図右)。

PET-CTは(1)PETとX線CT装置を合体させ、(2)同一寝台に寝たままPETとX線CT検査を施行でき、(3)機能画像と解剖学的画像の同時収集と重ね合わせ表示(fusion image)が可能な装置である。その特徴はi)PET検査所要時間の短縮、ii)容易で正確なPET検査部位の設定、iii)X線CTを用いた吸収補正による画質向上の可能性、iv)容易かつ精巧なPET画像とCT画像の重ね合わせ表示(fusion imaging)が可能などである。その結果、画質の向上と体のどこの位置にPET集積があるか正確な診断が可能となり、従来のPET診断の精度をより向上させると期待される。また、患者検査負担の軽減、患者スループットの向上などが図れる。以下、それぞれの特徴に関して概説する。

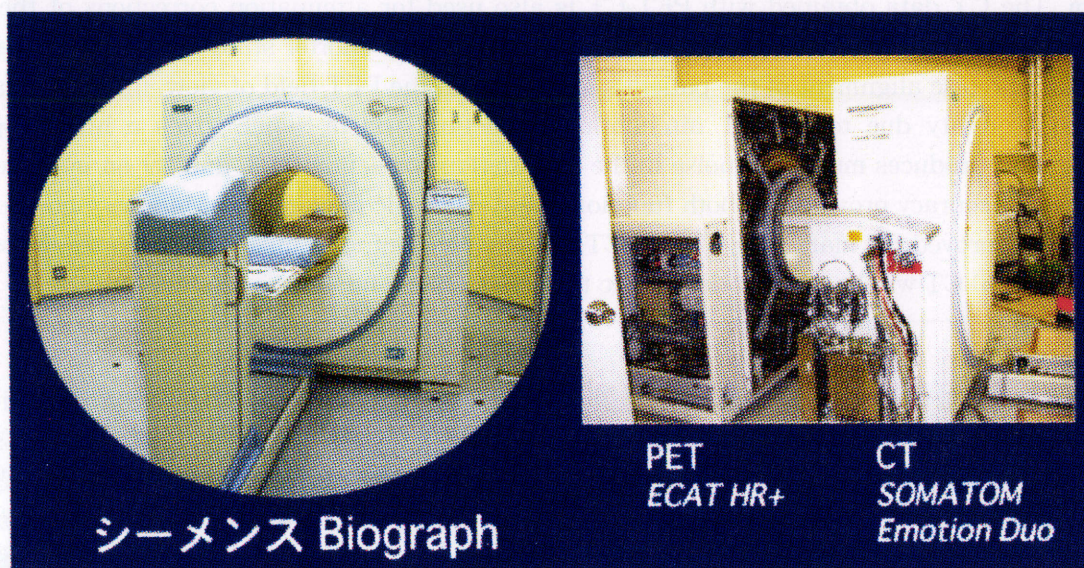


図1 PET-CT装置の構成

図左は装置全体の外観。ガントリシステムとベッドシステムから構成されている。装置のメンテナンス時にはPET部がレール上をスライドして後方に移動してガントリが分離するようになっている(図右)。



## i) PET検査所要時間の短縮

通常のPET検査ではPET本体に装備された線源を用いて吸収補正のための測定(transmission scan)を行う。この吸収補正は体内から導出するガンマ線が体に吸収され減弱するのを補正し定量性に優れた画像を得るために行われる。通常このtransmission scanには数十分(我々の施設では10~20分)を要する。一方、PET-CTではこの吸収補正のためのデータとしてX線CTデータを用いて吸収補正を行うのだが、X線CT検査は非常に短時間で終了する。我々の装置では通常8~16秒で目的の検査範囲のX線CTを施行している。従ってこの差の分、検査時間が短縮する。また、X線CTは体内にポジトロン製剤が注射されていても影響を受けないので、注射後任意の時に検査可能であるのも利点の一つである。検査薬剤と検査方法によっては数十分~1時間ぐらゐの時間短縮の可能性が有る。

## ii) 容易で正確なPET検査部位の設定

我々の施設ではX線CTを施行するという点を考慮し、現在のところ一度のPET-CT検査では約15~30cm弱領域の局所に限った検査を施行している。従来のPETではこのような局所、たとえば膵臓などを検査する場合、rect linear scanと呼ばれる簡易画像を作成して検査部位を決定していたが、簡易画像のため画質も悪くPETの検査部位を設定するのはなかなか困難な場合があった。また、この操作のために10分前後の余分な時間が必要であった。しかし、PET-CTではX線CTによるtopographyが容易に得られるため、これを利用して検査部位の設定が容易で正確かつ短時間に行える。

## iii) X線CTを用いた吸収補正による画質向上の可能性

i)で述べた吸収補正のためのデータとしてX線CT画像を基にしてデータ( $\mu$ 値のマップ)がPET-CTでは利用されるが、この基になるX線CT画像は従来の外部線源を用いたtransmissionデータに比べると非常にノイズが少なくS/N比の高い画像である。そのため最終的に処理されて得られるPET画像もよりアーチファクトの少ない画質のよい画像となることが期待され、診断精度

が向上する可能性がある。

## iv) 容易かつ精巧なPET画像とCT画像の重ね合わせ表示(fusion imaging)が可能

同一寝台上に寝たままで、X線CTとPETの撮像が行えるため簡単な画像処理によって容易に両者の重ね合わせ表示(fusion image)を得ることが出来る。胸部や腹部では一端検査台から起きあがると体内臓器の相対位置が変化してしまい、別々の時期に撮ったX線CT画像とPET画像は必ずしも正確に重ね合わせることはできない。特に腹部では腸管の動き(重力による移動、ガスの移動などによる)や肝臓などの柔らかな臓器の位置移動の影響は大きい。一方PET-CTではこの点、検査寝台上に寝たまま短時間に両検査を施行するため良好なfusion imageが得られる。

## PET-CTの臨床例

## 症例1：卵巣癌術後多発再発症例(図2)

図2は卵巣癌術後の転移に対して数回の摘出術および化学療法を繰り返している症例のPET-CT検査結果である。腫瘍マーカーが上昇してきたため再発病巣の精査目的にFDGを投与してPET-CTを施行した。PET-CTでは検査部位のX線CT画像とPET画像およびその両者の重ね合わせ画像(fusion image)が得られる。図2右上方のPET画像では腹腔内に多発するFDG集積を認め播種巣に対する集積と考えられた。一方、図2左上方のX線CT画像ではPET画像と対比すると播種巣を示唆する軟部陰影が疑われたがCT画像単独のみからは病巣の存在を断定するのはなかなか困難である。ところがPET画像とX線CT画像の重ね合わせ画像(図2左下方)では、PETの高集積とX線CTの軟部陰影がきちんと一致して表示され容易に播種病巣の診断が可能である。このようにPET-CTによって、癌の代謝情報と解剖学的情報を同時に画像化でき、診断能の向上が期待される。

## 症例2：直腸癌術後再発症例(図3)

46歳、男性。直腸癌に対してlow anterior resection施行後、局所再発し切除術を施行された。その後、再度局所再発し重粒子線照射が施行された。さらにその後の経過観察中にCEA再上昇し再発疑いにてPET施行。PET検査はFDGを投与して通常のPETとPET-CTが同時に施行された。通常



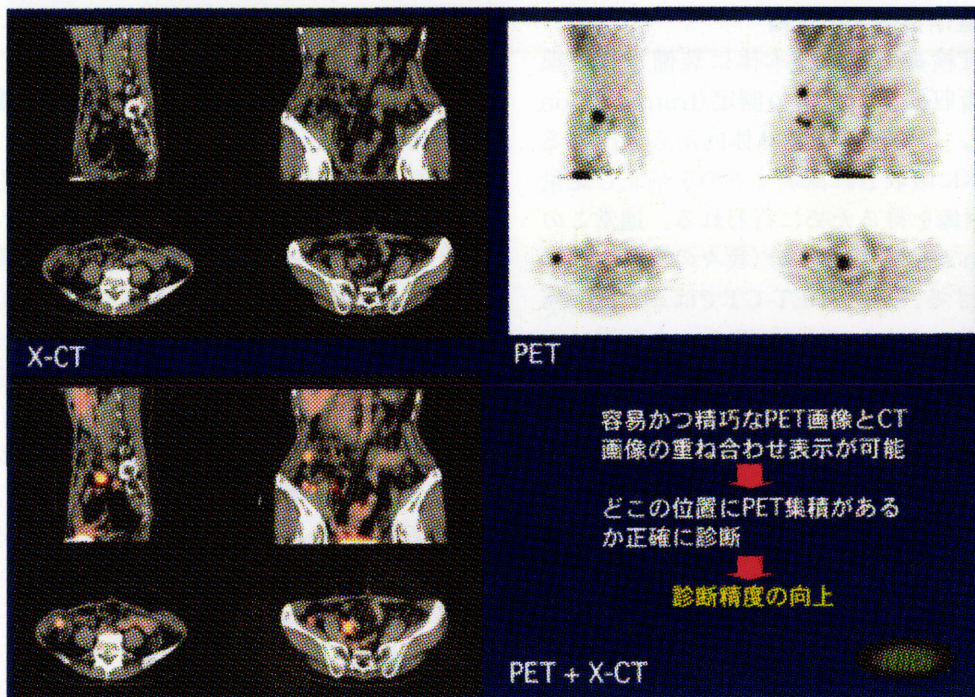


図2 症例1：卵巣癌術後多発再発症例  
 卵巣癌術後で再発精査目的にFDGを投与してPET-CTを施行。図右上方のPET画像では腹腔内に多発する播種巣にFDG集積を認める。図左上方のX線CT画像単独では病巣の存在を断定するのはなかなか困難である。図左下方のPETとX線CTの重ね合わせ画像では、PETの高集積とX線CTの軟部陰影がきちんと一致して表示され容易に播種病巣の診断が可能である。

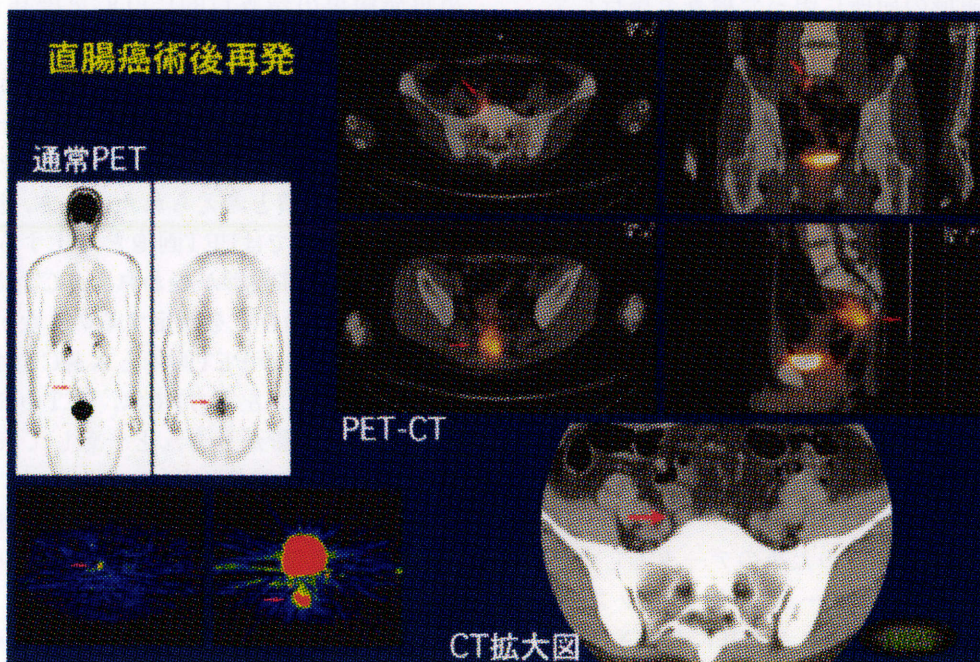


図3 症例2：直腸癌術後再発症例  
 46歳、男性。直腸癌術後再発で重粒子照射後で、CEA再上昇しFDG-PET施行。通常PETとPET-CTが同時に施行された。通常PETでは仙骨前面の局所再発が示唆された(図左下画像)。また、仙椎前方に小さな高集積が指摘され、リンパ節転移あるいは尿管内のRI(生理的)との鑑別が問題となった。PET-CT fusion画像(図右画像)では仙椎右前方の小集積は小結節への集積と判明し(図右下拡大像)手術によってリンパ節転移が確認された。小集積の診断にPET-CTが有効であった症例である。



PETでは仙骨前面で膀胱背側に腫瘤状集積亢進を認め局所再発が示唆された(図3左下画像)。また、膀胱背側、最上レベルの仙椎前方に小さな高集積が指摘され、リンパ節転移あるいは、尿管としてはやや内側に偏位してはいるが手術歴もあることから尿管内のRI(生理的)との鑑別が問題となった。同時に施行したPET-CT(図3右画像)では仙骨前面腫瘍部への高集積と、仙椎右前方の小結節への集積が認められた。後者はfusion画像にて明らかに尿管とは異なった部位で、仙椎前方の小結節への集積と判明した(図3右下拡大像)。本症例はその後の手術により局所再発とリンパ節転移が確認された。小集積の診断にPET-CTが有効であった症例である。

#### 症例3：肺癌症例(図4)

左S2腺癌。胸部ではX線CT撮像時とPET撮像時の呼吸の違いによる影響の問題がある。通常X線CTは吸気で呼吸を止めて撮像するがPETは安静呼吸状態で一定の時間をかけて撮像する。このため両者の呼吸位相の違いによる胸郭と内部臓器の相対的位置が異なりfusion画像に大きな誤差を生じる。この問題の解決には、究極にはX線CTと

PET撮像時に共に呼吸同期を実行するのが解決策と思われる。しかし簡易的にはX線CTを呼気安静状態で息止めて撮像し、PETは安静呼吸下で撮像する事によってできるだけ呼吸位相の違いを吸収するように工夫することで良好なfusion画像が得られる。本症例は呼吸の影響が大きい胸部で上記呼吸法にて撮像した例で、PETとX線CTが良く一致している。

#### 症例4：肝細胞癌症例(図5)

54歳、男性。肝細胞癌にて重粒子照射前にFDG-PET精査を施行。吸収補正にX線CTを用いる事により、PET画像が向上する可能性を示している症例。通常PETでは外部線源( $\gamma$ 線)を用いてtransmission画像を得るがそのノイズが最終的なPET画像に影響を与える。しかしPET-CTではX線CT画像を利用するためノイズの影響の少ない吸収補正が可能である。本症例では肝S2-3に結節状腫瘍(HCC)が存在するが、通常PETでは同部への集積は判然としない(図5左上部画像)。一方同時に施行したPET-CTでは明瞭な集積が認められた。X線CTを用いた吸収補正による画質の向上の寄与が大きいと考えられる。

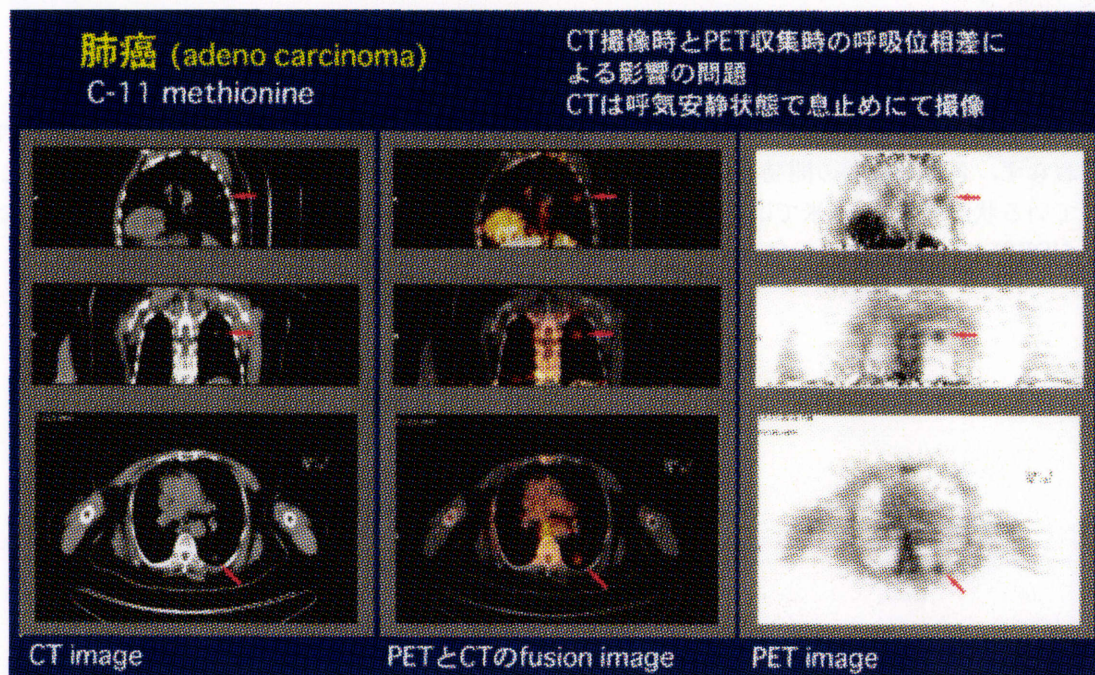


図4 症例3：肺癌症例

左S2腺癌。X線CTを呼気安静状態で息止めて撮像し、PETは安静呼吸下で撮像。本症例は呼吸の影響が大きい胸部で上記呼吸法にて撮像した例で、PETとX線CTが良く一致している。



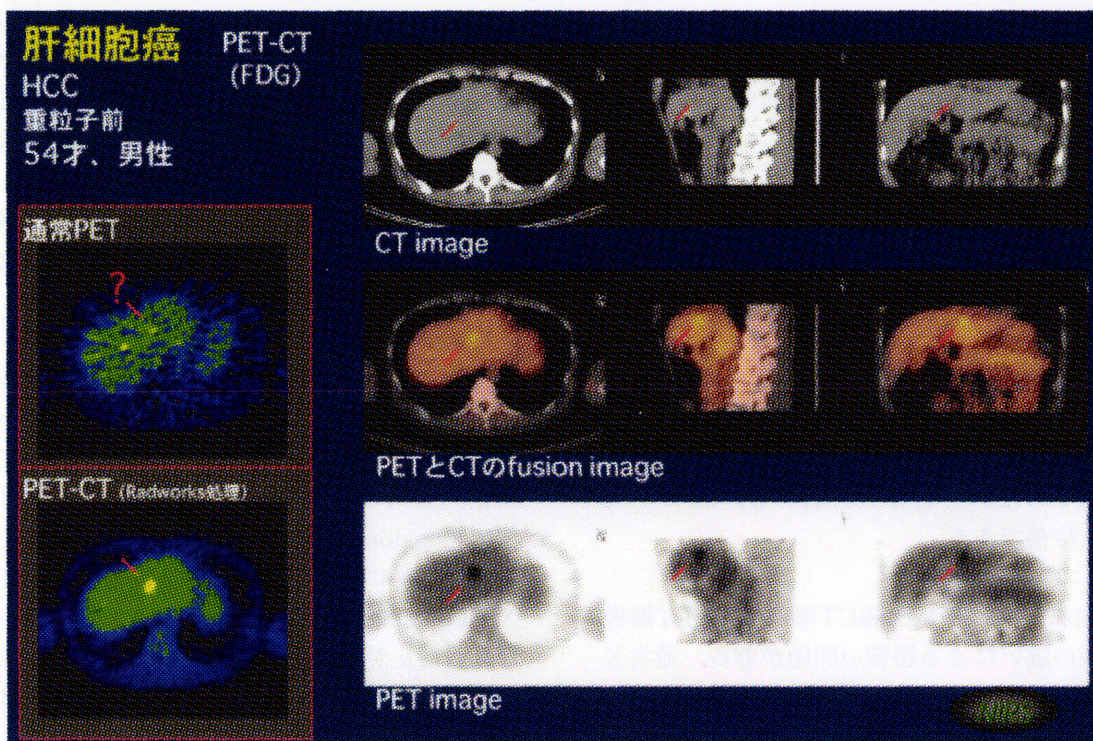
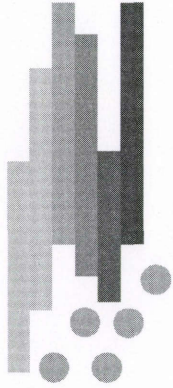


図5 症例4：肝細胞癌症例  
 54歳，男性。肝細胞癌でFDG-PET精査を施行。肝S2-3に結節状腫瘍(HCC)が存在するが，通常PETでは同部への集積は判然としない(図左上部画像)。一方，同時に施行したPET-CTでは明瞭な集積が認められた(図左下および図右側画像)。X線CTを用いた吸収補正による画質の向上の寄与が大きいと考えられる。

### まとめ

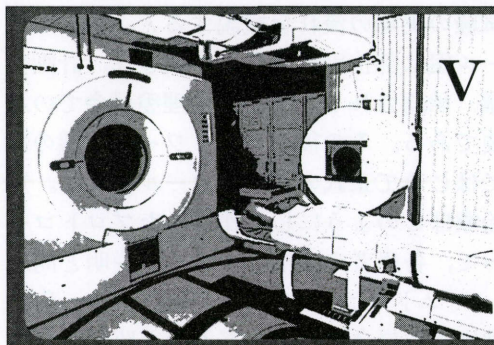
PET-CTはまだ日本においては医療用具の認可は下りておらず，各社が機器の開発および申請準備を進めている状況である。欧米では既に100数十台におよぶPET-CTが稼働あるいはその準備中で

ある。現在放医研ではPET-CTの臨床診断上の有用性を評価する目的で試験研究が行われているが，近い将来医療用具の認可が下りた暁にはPET-CTは腫瘍PETの主要なモダリティーとなることが予想され，癌診療の臨床に大きな貢献を果たすと期待される。



## V. 臨床研究における倫理的側面





## V. 臨床研究における 倫理的側面

### 1. 重粒子線治療のインフォームド・ コンセント

村田 啓

放射線医学総合研究所 重粒子医科学センター病院

Ethical Aspect of the Clinical Research : Informed Consent in  
The Clinical Research for Heavy Ion Radiotherapy of Cancer.

Hajime Murata

National Institute of Radiological Sciences

---

#### 〈Abstract〉

---

The research center for heavy ion therapy of cancer was decided to be built in 1984 as a part of the national 10-year anticancer campaign, and construction of Heavy Ion Medical Accelerator in Chiba (HIMAC) was completed at the National Institute of Radiological Sciences in 1993. The HIMAC is the first heavy ion accelerator for only medical use in the world, and the clinical research of cancer radiotherapy was begun in 1994 using carbon ion generated by HIMAC.

The purposes of the clinical research are to evaluate the safety and usefulness of carbon ion for cancer treatment, and to establish carbon ion therapy as a new and valuable tool for cancer therapy. Therefore, to obtain exact data in ethical aspect as well as scientific aspect of the clinical research, many special committees have been organized like as the committees of protocol planning for each organ, clinical study groups for each organ, evaluating committee of clinical data, and the ethical committee.

Each clinical research is performed according to the research protocol of each organ, in which study purpose, rationale, patient condition, end-point of the study, adverse reaction are described. The document of informed consent (IC) contains study purpose, patient condition, method, predicted effect and demerit, protection of privacy, etc.. IC to each patient is done precisely by the doctor, and the freely-given IC of the patient is obtained. After the IC was completed, judgement of propriety for carbon ion therapy is done by the ethical committee for IC of each patient.

Since 1994 carbon ion therapy has been performed over 1300 patients with cancer in various organs, and its safety and usefulness for cancer treatment has been clarified gradually.

The carbon ion therapy is thought to be a new and promising tool for cancer treatment near future.

---

## I 緒言

國の対がん10ヶ年総合戦略の一環として、1993年に放射線医学総合研究所(放医研)に医療用としては世界初の重粒子線加速装置(Heavy Ion Medical Accelerator in Chiba, HIMAC)が建設され、翌年から炭素イオン線によるがん治療の臨床研究(臨床試験)が開始されて現在に至っている。この臨床試験の目的は、炭素イオン線治療の安全性と有効性を実証して、これをがんの新しい治療法として確立することにある。本臨床試験は、倫理性と科学性を確保したデータを得るべくきっちりとした推進体制を組んで実施されているが、ここではその倫理的側面を中心に述べる。

## II 重粒子線治療臨床試験の概要

まず臨床試験の推進体制を示す。多数の外部専門家から成る多くの委員会が組織されているが、最上位の審議機関としてネットワーク会議があり、その下に、試験計画書(プロトコル)を作成する計画部会とその部位別分科会、成績を審査する評価部会、治療をバックアップする部位別臨床研究班、および2つの倫理委員会、の計25の委員会がある(図1)。

臨床試験の実際の流れを概説すると、新しいプロトコル案は部位別分科会で作成され、計画部会で審議、承認される。同時に倫理委員会での承認が必要である。その後、ネットワーク会議の承認を経てはじめて正式のプロトコルとなる。重粒子線治療はこのようにして作られたプロトコルに則って、各患者の適格性の確認と説明と同意(インフォームド・コンセント)の取得の後、症例毎に倫理審査委員会の承認を経たのち照射が行われる。治療成績は評価部会の審議を経てネットワーク会議で承認された後に公表される。

これまでに37のプロトコルが立ち上がり実施されたが、いくつかが役目を果して終了し、現在19が進行中である。すべての部位でI/II相試験からスタートし、今いくつかII相試験に進んでいる(図2)。頭頸部を例にとると、まず全組織を対象にした6週間、18回照射の線量増加I/II相試験のプロトコルの結果を受けて、4週16回のプロトコルの中で確認された安全性と適正線量を基にして、現在II相試験が続いている。またこれまでに得られた成果を基に、悪性黒色腫を対象にしたII相試験と骨軟部を対象にしたI/II相試験が新たにスタートしている。

このようなプロトコルに則った治療は最初の

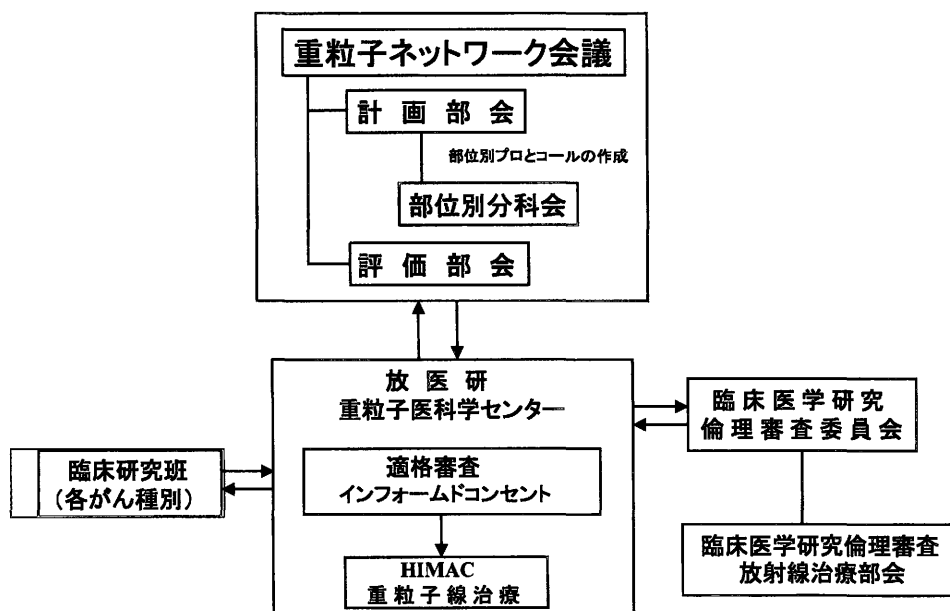


図1 重粒子線がん治療臨床試験推進組織図



V. 臨床研究における倫理的側面

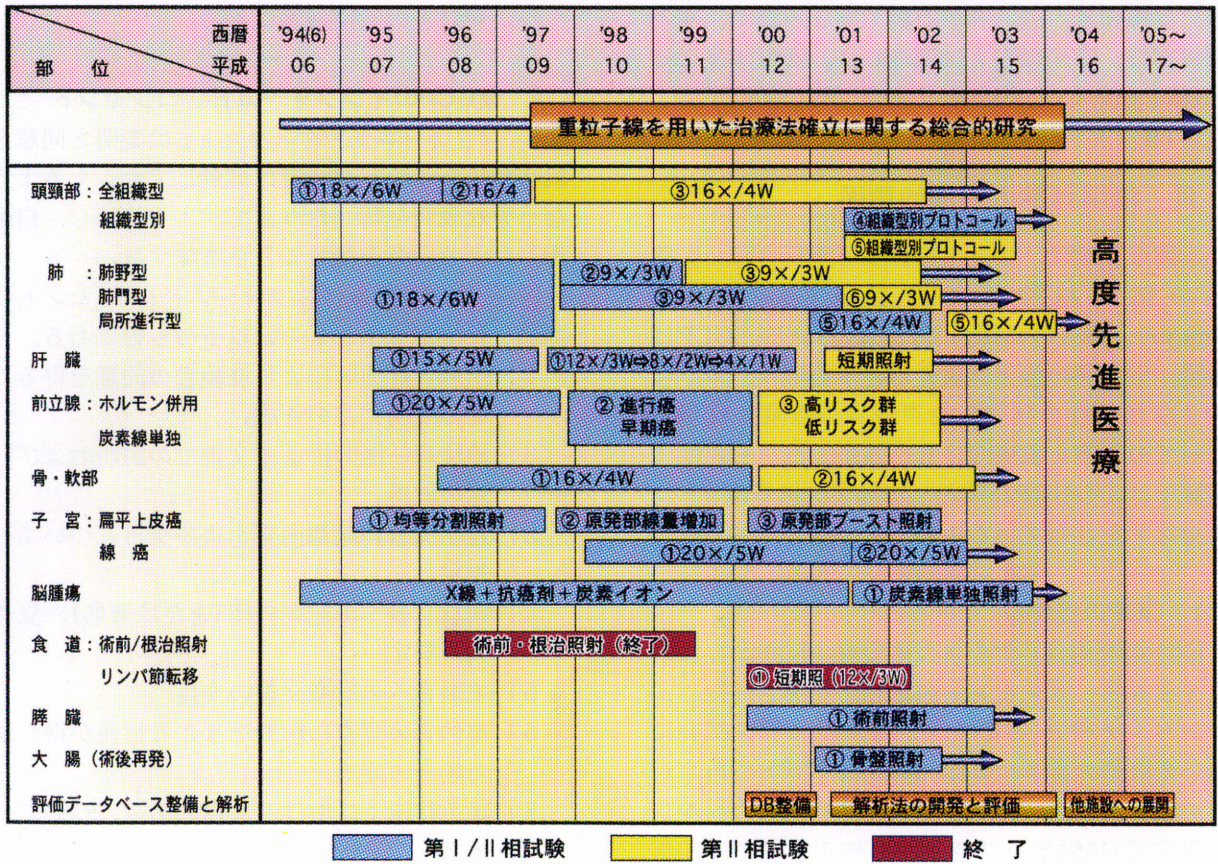


図 2

表 1 放医研における炭素イオン線治療患者数(6/1994-8/2002)

部位	1994	1995	1996	1997	1998	1999	2000	2001	2002	合計
頭頸部	9	10	19	31	22	38	29	39	10	207
脳	6	8	10	6	9	7	15	10	3	74
頭蓋底	-	-	-	6	4	2	2	4	2	20
肺	6	11	27	17	28	33	45	51	27	245
肝臓	-	12	13	19	25	17	22	28	9	145
前立腺	-	9	18	10	30	30	31	44	18	190
子宮	-	9	13	11	10	11	13	5	6	78
骨・軟部組織	-	-	9	13	19	18	25	23	14	121
食道	-	-	1	16	4	-	2	-	-	23
膵臓(術前照射)	-	-	-	-	-	-	3	7	8	18
直腸(再発)	-	-	-	-	-	-	-	10	5	15
涙腺	-	-	-	-	-	-	-	-	2	2
眼(悪性黒色腫)	-	-	-	-	-	-	-	8	3	11
総合	-	24	16	30	17	32	14	12	3	148
合計	21	83	126	159	168	188	201	241	110	1,297



年には頭頸部、脳、肺の21例で始まったが、年々照射部位、症例数ともに増加して、2001年度には241例を照射し、2002年8月までに約1300例が終了した(表1)。

### Ⅲ 臨床試験の倫理的側面

本臨床試験は、1998年に日本で施行された医薬品の臨床試験の実施基準(Good Clinical Practice, GCP)に則って行われている。GCPは本来、医薬品の臨床試験における倫理性、科学性および信頼性を確保したデータの収集作成にあたっての基準と位置づけられるが、重粒子線臨床試験ではこのGCPに準拠してインフォームド・コンセントを行っているのです、まずGCPにふれる。

#### 1 GCPの歴史

GCPの歴史は、ナチス人体実験の反省からインフォームド・コンセントの概念が提唱されたニュルンベルグ綱領(1946年)と、第18回世界医師会において医学の進歩には臨床研究は不可欠であるがその際の倫理面への配慮の重要性を謳ったヘルシンキ宣言(1964年、以後4回の修正を経て2000年に5回目の修正が行われた)にさかのぼる。その後、1980年代の米国でのGCP関連諸規則の施行、1990年の日本の旧GCP施行などを経て、1996年日米EU医薬品規制調和国際会議で欧米との間でのGCPの調和を図ることになり、これを基に日本の新GCPが1998年に施行された。その大きな目的の

一つが被験者の人権擁護にある。

#### 2 新GCPのインフォームド・コンセント

「インフォームド・コンセント」は説明と同意と訳されているが、被験者に理解してもらえるような十分な説明を行ったうえで、よく相談し、自由意志による同意を得ることを意味する。

新GCPにおけるインフォームド・コンセントに関連した規定の主なものは以下のものである。

- 1) 治験責任医師による被験者の同意を得るための説明文書の作成。
- 2) 治験責任医師による文書での説明および同意の取得。
- 3) 説明文書の記載内容および交付についての規定。
- 4) 同意文書への記名捺印(または署名)、立会人の規定。
- 5) 被験者への同意文書の交付。
- 6) 被験者の意志に影響を与える情報が得られた場合の規定。
- 7) 緊急状況下における救命的治験についての規定。

#### 3 放医研の倫理審査体制

放医研には倫理審査に関わる4つの委員会がある(図3)。

このうち、臨床医学研究倫理審査委員会と放射線治療部会が本臨床試験のための委員会である。

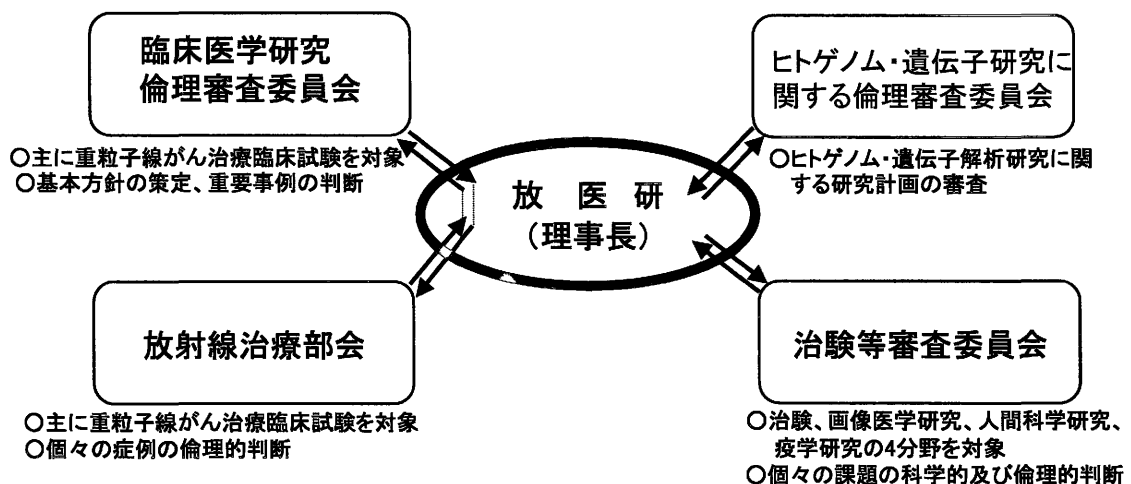


図3 放射線医学総合研究所における医学的研究等の倫理審査体制

表2 インフォームド・コンセント

<ul style="list-style-type: none"> <li>・炭素イオン線治療の効果、副作用を見るための臨床試験であること</li> <li>・本臨床試験の根拠、意義、必要性、目的など</li> <li>・本試験治療の方法と試験デザイン</li> <li>・予測される効果（利益）</li> <li>・予測される副作用（有害反応、危険性、治療関連死を含む）</li> <li>・替わり得る治療方法の有無、治療内容と予測される利益、危険性</li> <li>・試験に関わる費用</li> <li>・試験への参加は患者の自由であり、同意後もいつでもこれを撤回できること</li> <li>・研究の成果が発表される場合、モニタリングを実施する場合にも患者の人権、プライバシーは保護されること</li> <li>・質問の自由</li> <li>・健康被害が発生した場合における放医研関係者の連絡先</li> <li>・健康被害が発生した場合に必要な治療が行われる旨</li> <li>・健康被害の補償に関する事項</li> <li>・患者が守るべき事項（治療後の診療など）</li> </ul>
--

これら2委員会は親子の関係にあり、前者は当臨床試験の倫理面に関する基本方針の策定や重要事例の判断を担当し、後者は個々の症例の倫理的審査にあたる。今では年間250例以上の症例を個々に審査する放射線治療部会は年に約40回開催されている。

これら以外に、ヒトゲノム・遺伝子研究のための倫理委員会と、その他のヒトを対象とした研究を担当する委員会(治験等審査委員会)がある。

新GCPでは、審査委員会の構成について、医学・薬学・歯学などの医療関係以外の委員、および当該機関と利害関係のない外部委員の参加を義務づけている。放医研の臨床医学研究倫理審査委員会は医療関係者3名、それ以外の学識経験者・有識者3名、弁護士1名の7名で構成され、これは全て外部の方をお願いしている。また、放射線治療部会は医療関係者4名、学識経験者・有識者9名から成り、このうち6名は所外の方々である。

#### 4 重粒子線治療のインフォームド・コンセント

本臨床試験の中で同意を得るために用いられる説明文書は対象部位およびプロトコル毎に作られていて、内容にそれぞれ特徴があるものの、

GCP基準にそって表に示すような項目が網羅されている(表2)。各プロトコルの構成は、プロトコル内の全ての被験者に共通した部分と、個々の被験者に固有の部分からなっている。共通部分では、臨床試験そのものについての説明、当該部位のがんに対する重粒子線治療のこれまでの成績などを細かく解説し、また固有な部分では、がんと診断された経緯およびその診断法、病名と進行度、重粒子線以外の方法による治療の可能性およびそれらの有効度と危険性などが述べられている。またこれらの他に、個々の被験者に対する重粒子線の照射方法、予測される副作用、などが詳しく記載されていて、全体で10ページ前後となっている。

被験者への説明は、この説明文書を基にして、可能な限り家族の立ち会いのもとに複数回行い、他日同意書に署名捺印してもらう方式をとっている。

#### IV おわりに

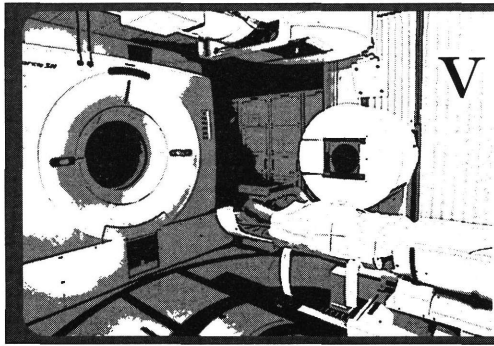
以上のように、重粒子線臨床試験では、倫理面から見ても十分に信頼できるデータの収集に心掛けている。

本臨床試験の最大の目的は、重粒子線治療をがんの新しい放射線治療法として確立することであるが、この春に高度先進医療の承認申請に漕ぎ着けることができた。ご協力頂いた関係各位にお礼申し上げるとともに、早い時期に医療として認知されることを期待する。

#### 参考文献

- 1) ヘルシンキ宣言, 2000年修正版(日本医師会訳)
- 2) 医薬品の臨床試験の実施の基準, 厚生省令, 1997, 3, 27
- 3) 新GCPとインフォームド・コンセント, 瀧村佳代, 重粒子線治療の基礎と臨床, P-131, 辻井博彦編, 医療科学社





## V. 臨床研究における 倫理的側面

### 2. 遺伝子解析とインフォームド・コンセント

岩川 眞由美

放射線医学総合研究所 フロンティア研究センター

## Human Genome and Genetic Sequencing Research and Informed Consent

Mayumi Iwakawa

RadGenomics Project Frontier Research Center  
National Institute of Radiological Sciences

---

### 〈Abstract〉

---

On March 29, 2001, the Ethical Guidelines for Human Genome and Genetic Sequencing Research were established. They have intended to serve as ethical guidelines for all human genome and genetic sequencing research practice, for the purpose of upholding respect for human dignity and rights and enforcing use of proper methods in the pursuit of human genome and genetic sequencing research, with the understanding and cooperation of the public.

The RadGenomics Project has prepared a research protocol and informed consent document that follow these ethical guidelines. We have endeavored to protect the privacy of individual information, and have established a procedure for examination of research practices by an ethics committee. Here we report our procedure in order to offer this concept to the patients.

ヒトゲノム・遺伝子解析研究は、「個人」を対象にした研究に大きく依存し、また、解析研究過程で得られた情報が、その取り扱いによっては、倫理的・法的・社会的問題を招く危険性を持つ。研究者は、これら諸問題に留意しながら、かつ社会の理解を得て、研究を実行しなければならない。よって、最も重要視されるのは提供者の権利であるため、重要な項目は、当然ICとなる。今回発表内容の大項目は、まず、一般的なICの歴史的背景、次いで、ヒトゲノム・遺伝子解析研究の特殊性、そしてプロジェクト独自のIC、最後に研究者の立

場と国民側の視点についてである。

#### 1 ICの歴史的背景

紀元前ヒポクラテスに始まる近代までの医師の規範は、ヒポクラテスの誓詞にある「現在の症状や予後について、特に経過が悪い時は、何も告げてはいけない。事実を告げると患者は死に追いやられる。」という、「患者に知らせないことの良否は医師が判断する」ことを基調としていた。しかし、この規範は、第二次世界大戦を機に大きな転換を迎える。1946年、ナチスが行った戦争犯罪に対する

判決文であるニュールンベルグ綱領の中で、「医学実験の実施には、被験者に対する明確な説明と自発的な同意が絶対条件である」という新たな概念が生まれた。1964年第18回世界医師会総会ではこれを受け、ヘルシンキ宣言「ICは医療側の義務であり、被験者個人の利益は、科学や社会の利益より優先する」が発せられた。現在、医療現場で行われるICはこの歴史のほぼ延長線上にある。しかし、21世紀に入り医療現場に展開するヒトゲノム・遺伝子解析研究は、これに加えて更に解決すべき問題がある。

## 2 ゲノム・遺伝子解析研究の特殊性

21世紀、生命科学は新しい時代、すなわち31億の文字の解読・ゲノム解析ドラフト結果発表という衝撃的なスタートをきった。21世紀のゲノム解析を足がかりに、生活習慣病など、多遺伝子が関与する複雑な病態の解明、そしてその早期発見・予防医学発展の可能性が生まれた。発現形質と遺伝形質の詳細な対応により、多くの疾患の遺伝的背景を明らかにすることが可能となり、現在不明とされている病態の解明が進行している。この網羅的な遺伝形質の解析の対象として、DNAの多型解析、特に一塩基多型(SNP, スニップ, スニップス)がある。SNPとは、single nucleotide polymorphismの略であり、個人間における1遺伝暗号(1塩基)の違いを意味する。スニップは数百塩基対から1000塩基対に一つの割合で存在すし、全ゲノム中には300万から1000万のスニップがあると予想されており、high throughputがキーワードである21世紀生物研究の主役となっている。遺伝子情報の特殊性は、個人情報としての医療情報とやや異なり、個人の未来の発病をも予言する未来のダイアリーであると共に、祖先に遡ることが可能な過去のダイアリーでもある。また、この遺伝子情報は社会的、道徳的不公正を生む情報としてのリスクをあわせ持つ。更に、患者さんや国民がその情報を理解するためには、外的因子、遺伝学的因子の区別や、統計学的理論の理解など、社会全体における理解も未だ不十分といった背景があり、問題を内包している。

## 3 Radgenomics ProjectにおけるIC

2001年、新しい21世紀の幕開けにタイミングを

合わせたごとく、放射線医学総合研究所に新しいプロジェクト、放射線感受性遺伝子研究プロジェクトRadGenomics(ラドジェノミクス)Projectが開始された。プロジェクトは、放射線感受性を規定するヒト遺伝子群を網羅的に解析し、臨床上の放射線に対する反応(副作用)とゲノム中に存在するSNPの相関関係を明らかにすることを目的としている。

プロジェクト遂行にあたり、最も重要なことは、ゲノム研究を倫理的に注意深く行うことの必要性を痛感することである。ヒトゲノム・遺伝子解析研究は、「個人」を対象にした研究に大きく依存し、また、研究の過程で得られた遺伝情報が、その試料提供者やその家族の遺伝的素因を明らかにする可能性があり、その取り扱いによっては、倫理的、法的、社会的問題を招く危険性を持つ。昨年3月末、倫理指針として発表された倫理指針をプロジェクトは遵守し、嚴重な個人情報管理及び匿名化を行った上で、研究を行っている。主な留意点は、以下の如くである。

1. 平易な内容であること:IC文書中の用語はわかりやすい言葉に置き換えることが最も重要である。難しい言葉で試料提供者を困惑させ、研究の目的を粉飾することは許されない。プロジェクトでは、図や漫画を多用した説明補助資料とICの内容に沿ったビデオを作製し、理解しやすいように努めた。
2. 試料採取の方法:試料提供者が、心配するのはどのように自分から試料が採取されるのかである。プロジェクトでは、採血、及び手術・生検の際一部標本が提供されるので、採血は普通の方法で行われること、標本採取は医療行為、すなわち腫瘍摘出あるいは検査の一環として行われることを明記した。
3. 研究結果の開示:プロジェクトの目的である遺伝子多型解析は、試料提供と同時に解析を行うが、解析研究結果がそのまま各試料提供者の医療に反映される可能性はほとんどない。また遺伝子解析により、重大な疾患が発見され、治療可能となり試料提供者に利益となる場合もあるかもしれないが、その可能性はきわめて低い。逆に不利な遺伝子情報が得られる可能性がある。更に、個人の遺伝子情報により不当な差別を受けることが現実にある。

## V. 臨床研究における倫理的側面

一方、提供者の人権としての知る権利、知らない権利を保証することは大切なことである。プロジェクトでは、最初の1年間は、提供者に解析結果を知りたいかどうかを確認し、研究期間が終了した時点で可能な限り開示する方針であったが、現在は開示しない方針に変更した。現在、他研究および世界的風潮において、基礎研究は、結果を開示しない方針が主流である。

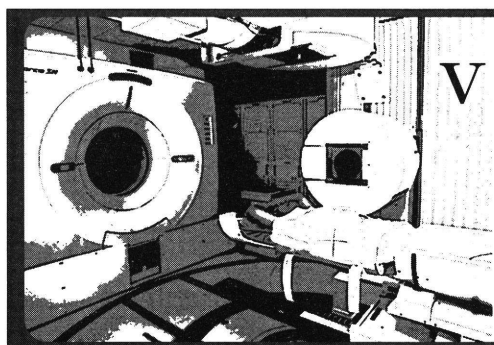
### 4 研究者の立場と国民側の視点

以上、留意点の多いゲノム・遺伝子解析研究にあたる研究者には、当然、学問・思想の自由がある。1995年、科学技術基本法はわが国の経済社会

の発展と国民福祉の向上にこそ、科学技術を利用することを説き、1999年 世界科学会議も、科学の進歩にある方向性を求めている。すなわち、社会の求める科学のあり方が、平和、福祉に集約されつつある。よって、自由であるはずの研究者、特にゲノム・遺伝子解析研究にあたる研究者であっても、この社会からの制約の中にあり、高い倫理性(抽象的であるが)が求められている。また、国民側の意識も重要である。研究者は可能な限り、多様な価値観を持つ国民の重要な決定(自己決定)に関わる、正しく豊富な基礎情報を提供することが、責務であろう。

以上、遺伝子研究におけるICについて報告した。





## V. 臨床研究における 倫理的側面

### 3. 医療情報の公開と保護

田村 和子

共同通信社客員論説委員

The protection and opening of medical information

Kazuko Tamura

Kyodo News

---

---

#### 〈Abstract〉

---

---

Recently in Japan, it becomes more ordinary that a doctor exchanges the informed consent letters with his patient about medical treatment. But it seems to be not so good condition by reason for doctor's poor technique of communication and patient's poor basic medical knowledge. It is necessary to introduce to brush up communicational technique and broad medical knowledge into doctor's training course. On the other hand we are surrounded by a flood of medical information on mass media or internet, we cannot access to necessary information about our own disease or treatment. So I hope public medical center or special hospital should have a more kindly homepage system that shows to many standard medical information to educate the public.

The informed consent letters of NIRS clinical trials on cancer treatment by HIMAC are very strict and good designed. The committee of clinical ethics is open every week and inspect every patient's medical condition and document of informed consent precisely. It is so difficult to take informed consent of HIMAC treatment that a patient declared no other treatment is good for his cancer by first hospital strongly expects to HIMAC overcome it. I suppose it should be more careful informing patient in the case of serious side effect such as loss of sight go on long after radiation treatment of HIMAC.

HIMAC brings new era of cancer treatment. Patients who desire to take this treatment will be increase. It is necessary to select and give priority to the patient to use HIMAC. So NIRS will be asked for more open and fair management in clinical use including informed consent.

In the post genome age researchers are beginning to search main genome that occur serious disease or sensitivity to radiation. Clinical genome analysis will be introduced soon. It requires careful manner to researcher or doctor to protect privacy on genomic information. I think personally public ethical guideline of genome researcher is necessary.

---

## 1. インフォームドコンセント(IC)の現状と問題

近年、医療現場でのインフォームドコンセント(IC・説明と同意)が、日本でもようやく普及しつつある。しかし、医師が患者に最善の治療法や投薬法を説明し、患者はそれをよく理解し、納得して選択し同意する、という筋道はそう容易ではないようだ。医師が患者に告げたいこと、知って欲しいことと、患者が知りたいことがすれ違うからだ。その原因は基礎知識の量の差と、医師のコミュニケーション技術の不足によるところが多い。

乳がんと診断されておろおろする患者の前で、手早くさまざまな治療法を説明して患者に選択を迫る専門医。開け放った診察室に患者を次々に詰め込んで能率本位に診断結果を告げる大病院の外来など、医療側の患者への無配慮も散見される。日本の医療には長年のパターンリズムが残存していて、医療現場ではあまりにも医師の裁量が大きい。医師が医療サービスの最前線に立つという認識を持たなければ、患者との信頼感に満ちた、良いICは得られないと思う。患者の側も日ごろ自分の健康や病気に対する無自覚、一般的な医学知識の欠如の溝を埋める努力が要る。医師の説明が良く理解できないまま、質問もしない。一方で医師が処方してくれた薬を勝手に途中で止める患者を数多く見かける。

日本の医療が良くなるためには、ICは医師が患者にいかに親切に医療の説明をするかではなく、医師と患者が協力して病気を治すための手続きとして重視されなければならない。医師がコミュニケーション技術のみがき、専門の知識だけでなく患者の啓発に必要な広い知識を持つように、今後医学教育や卒後教育をしてほしい。

## 2. 医療情報のはんらんと不足

最近新聞、雑誌、テレビが競って医療、健康のページや番組を増やし、様々な情報を提供している。氾濫といってもいいほどだ。ところが、短絡的な話題や情報が多くて、ひとたび自分が病気を疑って、詳しい知識、基本的な治療法、最先端の医療技術や薬、専門の病院などについて知ろうとすると、満足な情報を得るのはなかなか難しい。インターネット情報は取捨選択が難しいし、権威ある病院や医療機関の一般向けのHPは十分な

い。一般向けの情報を充実させている国立がんセンターのHPと専門的な放医研の重粒子医学センターのHPでは、一般のアクセスしやすさにまだ大きな格差がある。権威のある機関の分かりやすい医療情報の提供がもっと増えることが望ましい。

私は過去、医学記者として多くの相談を受けてきたが、その多くはがんなど重い病気を疑われた人が、セカンドオピニオンを聞く機会を持ちたいというものだった。これも、実際には医師を信頼していないように思われて、なかなかむずかしい。何とか制度化できないものだろうか。

## 3. 私のIC体験

患者は診断結果を告げられただけで動転し、後の説明を良く聞いていないことが多い。がんといってもどのくらい悪いといわれたかを聞いてみると、良く覚えていない人が多い。ちょうど10年前、私は、偶然見つけた脳動脈瘤のクリップ手術を受けた。そのとき若い先生に説明を受け、ICの文書に署名した経験がある。脳の開頭手術では百例に三例くらいは予想外な展開になる。盲腸の手術ならそういうことは十萬例に一例だがといわれ、最悪の場合、半身麻痺、手足のしびれ、歩行障害も起こりうると説明された。大変なショックで頭の中では、老いた母の世話をどうしようとか、遺書を用意しなければとか、後は本当に上の空で聞いていた。医療側は十分な説明をするつもりで、様々な場面を想定しているが、患者は自分のことしか頭にない。だから、こういう手術などでは基本的な説明文書が用意されていたほうが良いなと思った。説明を受け、冷静にそれを読んでから同意の文書を交わしたい。大抵の患者が同じような体験をしていると思う。ここにも医療情報の開示の問題がある。

## 4. 重粒子医科学センターのIC

私は放医研重粒子医科学センターの倫理委員会治療部会の審議に参加させていただき、臨床試験としての厳格な制度と、患者さんへのICにかかわる詳しい対応が、毎週一例一例外外部者を含む治療部会で審査されていることに敬服した。非常によく説明された詳しい文書も患者に渡されるが、その書き方にも倫理委の目が行き届く。それでも私のような素人には、局所制御率と生存率の違いな

ど詳しい説明がないと理解が難しい。一番気になったのは、照射後1年とか1年半経ってから、失明とか聴覚障害とか、排尿障害といった重い晩発副作用が起こりうる場合のICだった。患者ごとに重い障害が起こる確率やその対処法、がん再発の兆候、二次がんの発生率など、一生を見通した説明が十分なされていることが望ましい。

特に重粒子線の治療では、多くの患者が他の医療機関で、他の治療法では効果が期待できないと説明されてくるので、この治療に掛ける期待は過剰なほど大きいと思う。したがって、個々のICでは、病気の進行度をよく認識させ、がんをやっつけた後で起こる機能障害のような重い晩発副作用とその対処法について特によく説明し、後で絶望しないようにする必要があると思う。

これまで一般に、がんの放射線治療には大きな誤解が世の中に存在する。手術が出来ない進行がんが放射線治療が選択された結果、その効果が不当に低く評価されてきた。しかし、重粒子線治療は本当ががんを選択的にやっつけて、患者を元気にする。新しい放射線治療の時代がきたのだ。今後、高度先進医療として認定されれば、今まで以上に多くの患者が治療を希望するようになる。患者の経済的負担も増えるし、患者の選択や優先度を付ける必要が出てくることも予想される。ICを含めてより一層公正透明な運営が求められよう。

### 5. 遺伝子分析などのICについて

ヒトゲノムが解読され、多くの病気の原因遺伝子が研究されている。放射線によるがん治療では放射線の感受性が、人により、がんにより大きく違うことが知られており、その遺伝的な根拠を知るために患者の遺伝子分析が必要になってくる。遺伝子分析のICは非常に重要で医療側の慎重さが求められる。

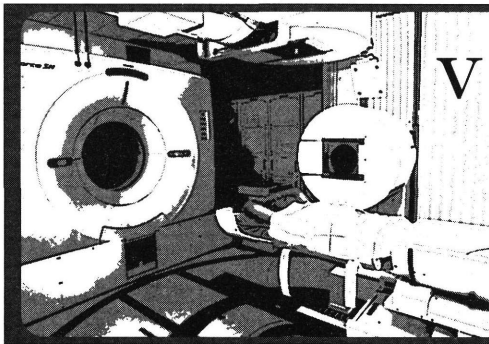
日本では、遺伝病や遺伝的障害に関して偏見が強いので、特に個人の遺伝情報の保護管理について、検査する側、利用する医療機関、研究者などに慎重さが求められる。直接患者に接する医師のICが重要になる。第一に自分の遺伝子分析を承諾するか、拒否するか自由がなければならない。結果に関しても患者のプライバシー保護の原則が必要だ。

また、患者である市民は医学研究に協力して遺伝子分析を承諾し、あるいはES細胞作りのためには、不要になった受精卵を提供することが求められている。その結果が、創薬などにつながっても、何の情報も見返りも得られない。そういう無償の奉仕にこたえる真しな態度が研究者や検査者に求められる。倫理綱領も必要だと思う。私は個人的には、大きな利益があがる創薬につながった場合は、難病対策などへ一定の寄付行為を義務付けるような制度があってもいいと思っている。

### 6. 健康の自己管理を

これまでの医療制度では、患者はお金を出して検査を受けても、その結果は医師だけが判断して患者に見せないといった管理の仕方だった。最近では疾病の多くが生活習慣病であり、患者に健康の自己管理が求められ、検査結果が渡され、医師の生活指導が行われるようになってきた。しかし、自分の検査結果をよく理解している人は少ないようだ。私たち一般市民が正しい健康への関心を持ち、人に管理してもらうのではなく、自分で生活習慣を変え、健康を維持する努力が必要だ。医療制度の改革の中で、Evidence Based Medicineが推進され、その原則的な医療情報が公開されて、一般市民の健康管理、病気の予防への知識が多くなることを期待したい。





## V. 臨床研究における 倫理的側面

### 4. 患者の権利

畔柳 達雄  
弁護士

Patients' rights

Tatsuo Kuroyanagi  
Advocate

---

#### 〈Abstract〉

---

This paper discusses the implementation of human rights' protection for subjects who undergo investigational treatment, placing particular emphasis on the issue of liability for unexpected physical impairment, including death, in patients or non-patients who take part in such investigations. An outline is presented of the historical development of the international guidelines proposed to date for studies involving human subjects, such as the Declaration of Helsinki, CIOMS guidelines, and ICH-GCP guidelines for clinical trials of new drugs. This paper advocates that those responsible for the investigation is ethically and legally obliged to compensate patients and non-patients for unexpected impairments that may occur as a result of their participation in such investigations.

---

#### 1 実験的治療

放医研で実施中の重粒子線によるがん治療は、現在までのところ、実験的な治療であり研究である。実験・研究の対象・被験者は患者である。実験・研究が「ヒト」である患者を対象とすることから、その結果は「ヒト」の生命・身体に大きな影響をもたらす。影響は常にプラスばかりとは限らない。ときには予期に反して、被験者の死・重篤な後遺障害をもたらすことがある。それだけに研究関係者は慎重のうえに慎重を期して研究を進めることが求められている。

#### 2 ヘルシンキ宣言

「『ヒト』を対象とする医学研究」については、現在国際的な医師の倫理規範が存在し、多くの先進国の研究者はこの規範に従っている。世界医師会が1964年6月総会で採択した「Declaration of Helsinki(ヘルシンキ宣言)」である。この宣言はその後の科学技術の進展—変化を反映して1975年東京で最初の大改訂、2000年10月エディンバラで再度の大改訂を経て現在に至っている。

#### 3 ニュルンベルク綱領

ヘルシンキ宣言の淵源は1947年の「Code of

Nuremberg (1947)」にあるといわれる。ニュルンベルクはヒトラーの率いるナチス・ドイツにとって象徴的な街である。アメリカを中心とする連合国軍は、唯一破壊を免れたニュルンベルク市裁判所庁舎を利用して、ナチ首謀者などに対する国際戦争犯罪人法廷を開いた。この裁判ではBuchenwald強制収容所で729人の被収容者に対してチフス菌を接種する人体実験を行い154人を死亡させたRose教授らの医師が裁かれた。その裁判の際に判断基準として示されたのがニュルンベルク綱領である。同綱領は人体実験を行う場合に、道徳的、倫理的、法的に医師が守るべき基本原則として10項目を定めている。その冒頭で「『1 被験者の自発的同意は絶対的・本質的なものである。』そのためは、被験者が法的な同意能力を有し、強制されない自由な状況下で、実験目的を理解し十分な知識と理解のもとに同意・承諾することが必要である。被験者に対して、実験の性質、期間、目的、実験方法、手段、予期しうるすべての利益・不利益、実験による個体への影響などを予め知らせるべきである。」と述べて、今日いわれる「患者・被験者の自己決定権」と「informed consent」の内容を高らかにうたいあげている。

#### 4 ヘルシンキ宣言の改訂

当初のヘルシンキ宣言の骨格をなしたのは、明らかにニュルンベルク綱領である。同宣言はヒトを対象とする実験・研究を患者・被験者に利益のあるものと無いものとに分けて、いずれの場合にも被験者に実験目的をきちんと説明し、本人の自由意思に基づく同意・承諾を得て初めて実施できると定めている。患者・被験者に同意能力がない場合には、法律上の代理人・保護者による同意・承諾が必要であるとする。また被験者は何時でも実験から離脱する自由を有し、有害な実験は中止しなければならないことを明記している。その後1975年の東京総会で、もう一つの重要な基本原則が付け加えられた。実験に先立ち実験計画書(プロトコル)を作成、独立の倫理委員会に提出して科学的・倫理的側面から審査を受けることを必要としたことである。2000年のエディンバラ改訂では、患者・被験者からの同意・承諾条項が全部で9ヶ条に増えたこと、倫理委員会の権限が強化されたこと、被験者のプライバシー(個人情報)の保護の

条文が付け加えられたことなど、被験者・患者の権利保護が一層強化されている。

#### 5 ICH-GCP指針の成立

1996年5月、日米欧三極の国々の国際会議で医薬品開発のため共通の法整備を行う合意が成立し、新薬開発の国際基準として「ICH-GCP指針」が策定された。この指針は医薬品臨床試験の際に、ヘルシンキ宣言を遵守することを義務づけている。会議の当事国である日本は直ちに薬事法を改正し、平成9年3月27日「医薬品の臨床試験の実施の基準に関する省令」(「省令GCP」ともいう。)を公布、4月1日から施行した。省令GCPはICH-GCPに従い、被験者の健康被害に対する治療・補償条項を治験契約書、同意説明文書などに明記すべきとしており、この責任は旧GCP以来、事実上の無過失責任、結果責任であると解されている。

#### 6 CIOMS指針

1993年The Council for International Organizations of Medical Sciences (CIOMS)は、WHOと共同して「International Ethical Guidelines for Biomedical Research Involving Human Subjects(ヒトを対象とする医生物学的研究の国際的倫理指針)」を策定発表している。この指針は新薬開発に特化されることなく、ヒトを対象とするすべての実験的研究に適用されるよう設計されており、ヘルシンキ宣言の補充的な役割を果たしている。発展途上国を念頭に置く指針とされるが、現在の日本でも十分に通用するものである。この指針には「Compensation of Research Subjects for Accidental Injury」という項目があり、「Guideline 13 Right of subjects to compensation」の定めがある。

#### 7 改訂CIOMS指針19

CIOMSはヘルシンキ宣言のエディンバラ改訂などを受けて、2002年秋、大幅に内容を改めた指針を発表した。旧13項は「Guideline 19」に移され、「Right of injured subjects to treatment and compensation」の題名下に次のように定めている。「Investigators should ensure that research subjects who suffer injury as a result of their participation are entitled to free medical

## V. 臨床研究における倫理的側面

treatment for such injury and to such financial or other assistance as would compensate them equitably for any resultant impairment, disability or handicap. In the case of death as a result of their participation, their dependants are entitled to compensation. Subjects must not be asked to waive the right to compensation. (研究者は参加の結果、障害を被った研究被験者が受けた障害に対して自由に医療を受けることおよび結果として生じた損傷、廃失およびハンディキャップに対して公平に填補する経済的またはそのほかの援助を受ける権利を有することを保障しなければならない。参加の結果死亡した場合には

相続人は補償を受ける権利がある。被験者に保障の権利の放棄を求めてはならない。)

## 8 結び

「ヒトを対象とする医学的研究」に携わる研究者は、被験者に利益のない研究の場合(たとえば健常人に対する1相試験)は勿論、被験者の利益が期待される臨床研究であっても医薬品などの開発、適用拡大のごとく企業利益の追求と結局は関連する場合には被験者が当然上記諸権利を有することを確認するとともに、それ以外の場合でも医療者として被験者の健康回復に尽くすべき責務があることを忘れてはならない。



# 第 2 部

テーラーメイド医療を目指して



# I. 放射線感受性遺伝子プロジェクトの 目的と意義

# I. 放射線感受性遺伝子プロジェクトの目的と意義

今井 高志

放射線医学総合研究所 フロンティア研究センター 放射線感受性遺伝子プロジェクト

## The RadGenomics Project

— Prediction for radio-susceptibility of individuals with genetic predisposition —

Takashi Imai

National Institute of Radiological Sciences

---

---

### 〈Abstract〉

---

---

The ultimate goal of our project, named RadGenomics, is to elucidate the heterogeneity of the response to ionizing radiation arising from genetic variation among individuals, for the purpose of developing personalized radiation therapy regimens for cancer patients. Cancer patients exhibit patient-to-patient variability in normal tissue reactions after radiotherapy. Several observations support the hypothesis that the radiosensitivity of normal tissue is influenced by genetic factors.

The rapid progression of human genome sequencing and the recent development of new technologies in molecular biology are providing new opportunities for elucidating the genetic basis of individual differences in susceptibility to radiation exposure. The development of a sufficiently robust, predictive assay enabling individual dose adjustment would improve the outcome of radiation therapy in patients.

Our strategy for identification of DNA polymorphisms that contribute to the individual radiosensitivity is as follows. First, we have been categorizing DNA samples obtained from cancer patients, who have been kindly introduced to us through many collaborators, according to their clinical characteristics including the method and effect of treatment and side effects as scored by toxicity criteria, and also the result of an in vitro radiosensitivity assay, e.g., the micronuclei assay of their lymphocytes. Second, we have identified candidate genes for genotyping mainly by using our custom-designed oligonucleotide array with RNA samples, in which the probes were obtained from more than 40 cancer and 3 fibroblast cell lines whose radiosensitivity level was quite heterogeneous.

We have also been studying the modification of proteins after irradiation of cells which may be caused by mainly phosphorylation or dephosphorylation, using mass spectrometry. Genes encoding the modified proteins and/or other proteins with which they interact such as specific protein kinases and phosphatases are also strong candidates for genotyping. Finally, the DNA polymorphisms of



these candidate genes in the patients who show heterogeneity in their response to radiation therapy have been analyzed.

We believe that the results of our project will greatly contribute to the establishment of personalized radiotherapy.

## ゲノムサイエンスの進展

放射線治療は外科手術、化学療法と並んで有効ながんの治療法であり、治療効果だけでなく高齢者に見られる体力低下の問題や治療後のQOL (quality of life)を考えれば、そのアドバンテージは大きい。現在、ゲノムサイエンスが世界的規模で急速に進展しており、ヒトゲノムの約30億対の塩基配列は予想外に多様性に富んでいること、この塩基配列の多様性が、顔のかたち、背の高さなどの外見だけでなく、性格やお酒の強さ、あるいは花粉症のような特定の病気に対するかかりやすさなど、これまで「体質」という漠然とした言葉で表現されてきた多くの事柄を決めていることが明らかになりつつある。

## 急速に進む遺伝解析

まず最初に、個人間のDNA配列の比較がどのようにして可能になってきたかを最初に示す。生物学における種とは、古典的には形態的な違いによって分類されるが、同じ形態を持つ種であってもひとつひとつはよく見ると互いに異なっていて、その形質は親から子へと受け継がれている。このことはもう紀元前4000年の古代バビロニアの石版にウマのたてがみの形を例として記されている。したがって6000年前には人類はこの個体差と遺伝について知っていたに違いないが、このことが科学的に解析されたのは近代になってからである。遺伝因子の伝わり方が科学的に示されたのは、1865年のMendelによる遺伝因子の独立・分離の法則が最初である。残念なことにその意義は当時の人々には理解されなかったが、1900年にこの法則がCorrens, de Vries, Tschermakにより独立に再発見されるや遺伝の解析は急速に進んだ。

## ヒトゲノムの全容明らかに

1902年にはGarrodによりヒトの代謝酵素の欠陥が親から子に遺伝することが示され「生化学的

機能に個人差がある」ことが報告されている。これらの現象が分子として捉えられ、解析されるのは20世紀も半ば1944年に遺伝子の本体がDNAであることがAvery, MacLead, McCartyによって示され、DNAの構造、複製のメカニズムが1953年にWatson, Crickにより二重らせんモデルとして説明されたことから始まる。

その後このDNAを切り張りして大量のコピーを作る組換えDNA実験技術がBoyer, Cohen, Bergによって開発され、さらにSanger, MaxamとGilbertが塩基配列を解読する方法を独自に開発した。そしてヒトの設計図であるゲノムの全塩基配列を決めようとするヒトゲノムプロジェクトが始まった。1987年には旧科学技術庁が塩基配列決定システムの開発を開始し、またアメリカではDOE (エネルギー省)がLos Alamos, Lawrence Livermore国立研究所などでゲノム解析を開始し、続いてNIHがゲノム解析センターを設立した。このプロジェクトはデータの迅速な公開と材料の共有を原則として、世界的なコンソーシアムを形成して行われ、ついに2001年の春にドラフトシーケンスが公表されヒトゲノムの全容がほぼ明らかになった。

ヒトゲノム解析の目的の一つは疾患に関わる遺伝子を明らかにすることであり、その成果はゲノムの全シーケンスがわかる前から得られてきた。即ち、ヒト染色体の最初の遺伝地図(ヒト24本の染色体のどこにどんなマーカーが載っているかを示すもの)が報告されてから地図の精度の向上と、さらに物理的地図やDNAコンティグの構築によって、単一遺伝子病の原因遺伝子の同定が加速的に進んだ。2000年には約1200の疾病の原因遺伝子が同定されている。

## 期待されるゲノム研究の臨床応用

しかしながら、この方法では、高血圧とか糖尿病など複数の遺伝子が関わる病気やいわゆる体質を解明することは難しい。90年代後半から21世紀

にかけてゲノムの構造が分かってくると、個々の遺伝子ではなくゲノム全体を見て、即ち全遺伝子配列を個人間で比較する、あるいは他の種とゲノムと比較する、といったことで病気、体質に関わる遺伝子群を同定することが可能になってきた。ヒト個人個人の間では、当初の予想よりはるかに塩基配列が違っていることが分かってきて、現在では200-500塩基対の一つ、即ち全体では数百万カ所も異なる部位があることが報告されている。この違いを「多型」あるいは特に一つの塩基で多型がある場合「SNP: single nucleotide polymorphism」と言う。

今後のゲノム研究で重要なことはこれらの多型の中から機能上意味のある、例えばアミノ酸置換を起こすことによってタンパク質の活性が変化するようなDNA配列の違いを知ることである。21世紀の少なくとも前半は細胞、臓器、個体レベルにおいて遺伝的多様性がどのように表現型(タンパク質の活性)を調節しているかを明らかにすることがメインテーマになるだろう。このゲノム研究の臨床への応用は、DNA検査による個人別の遺

## I. 放射線感受性遺伝子プロジェクトの目的と意義

伝的危険因子のプロファイリングであり、多くの薬剤応答性に関わるハプロタイプが明らかにされるであろう。放射線治療の効率化を推進したい我々にとっては、放射線感受性に関わる遺伝子のハプロタイプが重要になると考えている。

### 放射線感受性遺伝子プロジェクトの意義

我々はこのような背景を元に、放射線治療上問題となるような重篤な副作用が生じる患者さんを放射線治療前に予測することを目指して、放射線感受性遺伝子プロジェクトを2001年4月から開始した。

Fig. 1に示したようにこれまでの放射線治療においては、希にはあるが放射線に非常に高感受性の人が存在し、またこの高感受性の人を簡単に見分けることができないために、治療線量を安全な値に下げざるを得なかった。しかしながら、もしこれら高感受性の人をDNA配列の解析から予測することができれば、この人たちにはその感受性に合った治療計画を立てることができるとい

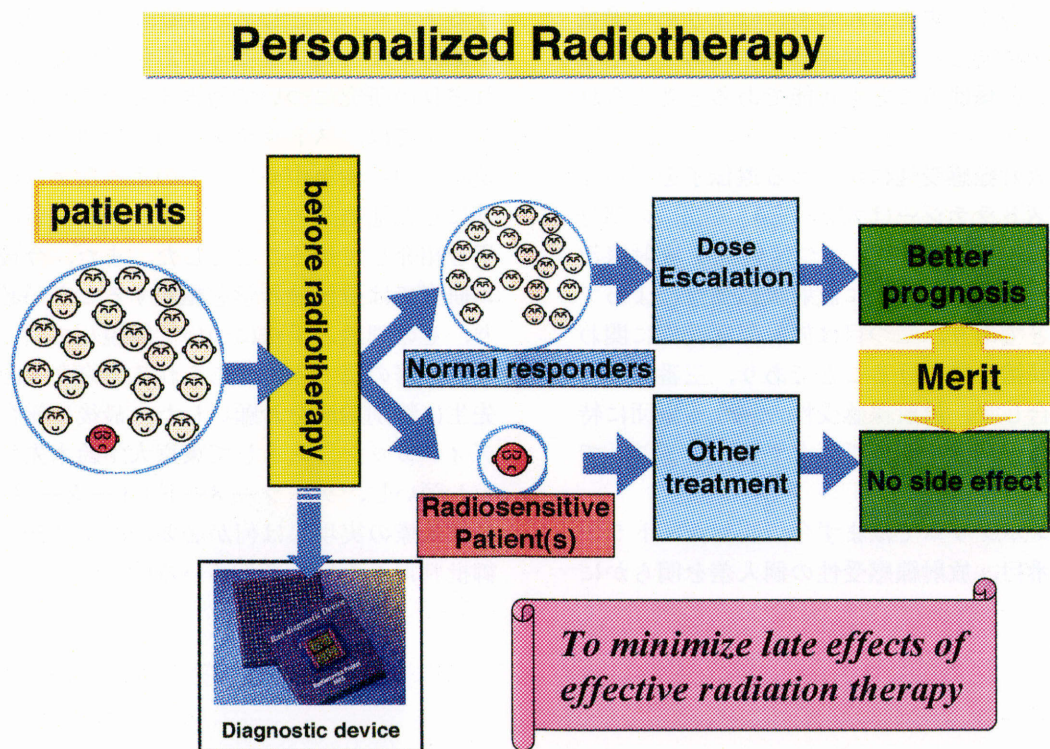


Fig.1 Personalized Radiotherapy



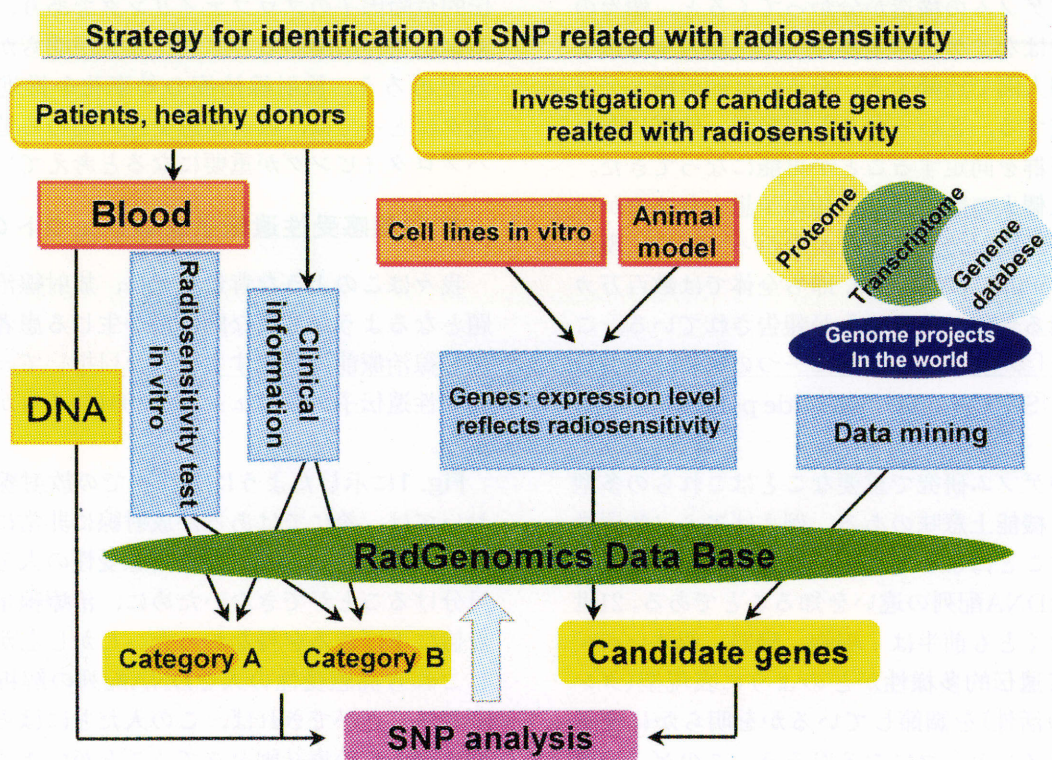


Fig.2 Strategy for identification of SNP related with radiosensitivity

考えられる多くの患者さんたちにはより高い線量での治療が可能となり、治療効果を高めまた治療期間の短縮に繋げることも可能であると考えられる。

我々の放射線感受性にかかわる遺伝子を同定するための戦略は大きく分けて3つの部分から成っている (Fig. 2)。一つは集団を放射線治療の臨床情報などを中心に放射線感受性によって分けることであり、二つ目は放射線感受性に関わる遺伝子候補を見つけることであり、三番目にそれらを統合して、放射線感受性の異なる集団に特異的な遺伝子型を相関解析により見つけることである。

このシンポジウムではまず今説明した戦略の一番目、放射線感受性の個人差を明らかに

するアプローチとして、1)臨床の場合、2)in vitroでの細胞を使ったアッセイ、3)疫学の観点から、それぞれの研究について報告する。また午後のセッションでは、戦略の二番目にあたる候補遺伝子の検索を中心に、このようなゲノム情報を基にした他施設のプロジェクから最新の研究成果を紹介して頂くこととした。また、今後のゲノム研究では遺伝統計学を駆使することが必須であり、その理論と手法について解説して頂くために、この分野の第一人者である東京女子医大鎌谷先生に特別講演をお願いした。最後に総合パネルディスカッションとして東京大学鈴木先生に司会をお願いし、テーラーメイド(オーダーメイド)放射線治療の実現には何が必要か、十二分に議論し御批判頂きたいと考えている。





## **II. 放射線感受性の個人差検索**

---

## Ⅱ. 放射線感受性の個人差検索

### 1 骨軟部腫瘍の炭素線治療における皮膚反応の解析

柳 剛／辻井博彦／宮本忠昭／溝江純悦／鎌田 正／  
辻比呂志／小藤昌志  
放射線医学総合研究所 重粒子医科学センター病院

#### Skin reaction analysis of bone and soft tissue sarcoma in carbon ion radiotherapy

Takeshi Yanagi／Hirohiko Tujii／Tadaaki Miyamoto／Junetsu Mizoe／  
Tadashi Kamada／Hiroshi Tuji／Masashi Koto  
National Institute of Radiological Sciences

---

#### 〈Abstract〉

---

〈Purpose〉 To evaluate the possible factors related to radiation induced reactions such as 1) the skin reactions for patients with bone and soft tissue sarcoma treated by carbon ion radiotherapy and 2) the pulmonary reactions with lung cancer treated by carbon ions.

〈Materials and Methods〉 The clinical skin reactions of 35 lesions for acute reactions and 27 for late were evaluated using RTOG scoring system. DVHs were calculated to all of these cases. We evaluated the relationship between the DVH and the skin reactions. We also evaluated some other factors for skin reactions including the age, sex, use of chemotherapy, target volume, target dose, and the site of tumor. In the same way, we analyzed the relationship between the DVH and the pulmonary reactions of 46 patients with Stage I NSCLC treated with carbon ions.

〈Results〉 Acute skin reaction of more than grade 3 was 8 lesions and late was 10. In DVH analysis some cases could not be explained well. In pulmonary analysis, the actuarial development of Grade 2 or greater pneumonitis was 5 patients at three months. There was no definite tendency in pulmonary DVHs by Grade. The irradiated volume of the lung in carbon ion radiotherapy was too small for using V20 methods of photon radiotherapy.

〈Conclusions〉 Though DVH analysis was useful to predict the radiation induced reactions, it could not be the complete predictor to all the cases. The development of molecular biology is expected.

---

## 緒 言

1994年、切除不能骨軟部腫瘍に対する炭素イオン線治療の臨床試験が開始され、その局所制御率は3年で約70%と非常に高いことが示された<sup>1)</sup>。一方、これらの骨軟部腫瘍は皮膚に非常に近いところにあるものが多く、この臨床試験においても何名かの患者に強い皮膚反応が出現した。もしも、皮膚をはじめとする正常組織の放射線感受性を規定する因子を選びだすことができれば、これらの反応を事前に予知することが可能となり、これら避けることによってより最適な治療を行うことができる。そこで我々は、Dose Volume Histogram (線量体積ヒストグラム、以下DVH)と呼ばれる照射線量と照射体積との関連を示す因子をとりあげた。この因子と臨床的な皮膚反応との関連を解析することにより、皮膚反応を事前に予測できないか検討する。また、肺における肺炎の発症についても、このDVHによる解析を試みたので報告する。

## 対 象

皮膚反応の解析については、1996年6月から2000年2月までに炭素イオン線治療を施行された切除不能骨軟部腫瘍のうち、体位変換によるDVHの再計算を要さなかった43例中、皮膚への腫瘍の直接浸潤がなく、適切に皮膚の評価を行うこ

とが可能であった早期反応35部位、遅発性反応27部位(ただし、遅発性反応の解析には、局所再発例および1年半以内の死亡例を除いた)を対象とした。患者の内訳は、男性23例、女性12例、年齢は15歳から85歳、部位は骨盤22例、脊椎近傍が12例、四肢が1例、標的体積は49mlから714ml、標的線量は52.8GyEから73.6GyEであった。

肺炎の発症の解析については、1994年から1998年にかけて炭素イオン線治療を施行されたStage I期の非小細胞性肺癌46例。患者の内訳は、男性33例、女性13例、年齢は49歳から82歳、照射門数は2門:29例、3門:2例、4門:15例、呼吸同期あり:29例、なし:17例、標的体積は4.8mlから290.0ml、標的線量は59.4GyEから95.4GyEであった。

## 方 法

皮膚反応の評価は、早期反応、遅発性反応とも、RTOG scoring system(表1)を用いて4人の放射線科医が合議して決定した。検討項目は性別、年齢(70歳以上、未満)、照射前化療の有無、照射後化療の有無、部位(仙骨、仙骨以外)標的体積(平均体積745ml以上、未満)、標的線量(70.4GyE以上、未満)およびDVHである。DVHとは、横軸に照射線量を、縦軸に照射体積をとってグラフ化したものであり、今回はこれを積算した積算DVHを利用

表1 RTOG Acute/Late Radiation Morbidity Scoring System (Skin)

Acute		
Grade 0 No change over baseline	Grade I Follicular, faint or dull erythema, epilation, dry desquamation, decreased sweating	Graded II Tender or bright erythema, patchy moist desquamation, moderate edema
	Grade III Confluent, moist desquamation other than skin folds, pitting edema	Grade IV Ulceration, hemorrhage, necrosis
Late		
Grade 0 None	Grade I Slight atrophy pigmentation change some hair loss	Graded II Patchy atrophy, moderate telangiectasia total hair loss
	Grade III Marked atrophy, gross telangiectasia	Grade IV Ulceration



した。これらの検討項目について単変量解析および多変量解析を行った。単変量解析についてはFisherの直接法による分析を、多変量解析についてはロジスティック回帰分析を行った。

肺炎の発症についても同様に、早期反応、遅発性反応についてRTOG scoring systemを利用した評価を行った。また、性別、年齢、全身状態、肺機能(FEV%, VC%), 肺手術や肺疾患の既往、総線量、門数、標的体積、呼吸同期の有無について検討した。

**結 果**

皮膚反応の結果は、早期反応についてはGrade 0+1/2/3+4 : 12/15/8例、遅発性反応については : 13/4/10例であった。全患者のDVHの結果を図1に示す。図の右上に相当する高線量/高体積の領域にGrade 3や4が存在し、左下の低線量/低体積の領域にGrade 0や1が存在している。さらにGrade毎の平均値をとってみると、早期反応、遅発性反応とも高線量の領域でGrade毎の違いが見られ、臨床的皮膚反応とDVHによる解析との間に

関連を認めた。また、早期反応と遅発性反応との間に強い相関が認められた。

また、遅発性反応Grade 0あるいは1を示した症例13例のうち、その平均値より算出した1S.D.(68%が存在すると予測される領域)よりはずれる症例が3例存在し、そのうち2S.D.(96%が存在すると予測される領域)からはずれている症例が1例存在した(図2-Case 1)。また、早期反応と遅発性反応とは強く相関していたが、早期反応と遅発性反応のGradeが2つ以上ずれた症例(早期反応Grade 2:遅発性反応Grade 4)が1例存在した。これら2症例について次に症例提示する。

**症例1.**

43歳の男性で坐骨の骨肉腫。標的体積は1284ml、標的線量は73.6GyEであった。DVHについては、高線量が多く、体積に照射されておりグラフの右上に位置しているが、実際の皮膚反応は早期反応、遅発性反応ともにGrade 1であった。DVHから予想する反応よりもかなり軽症である。単変量解析で有意差のあった標的線量も73.6GyEと最高線量

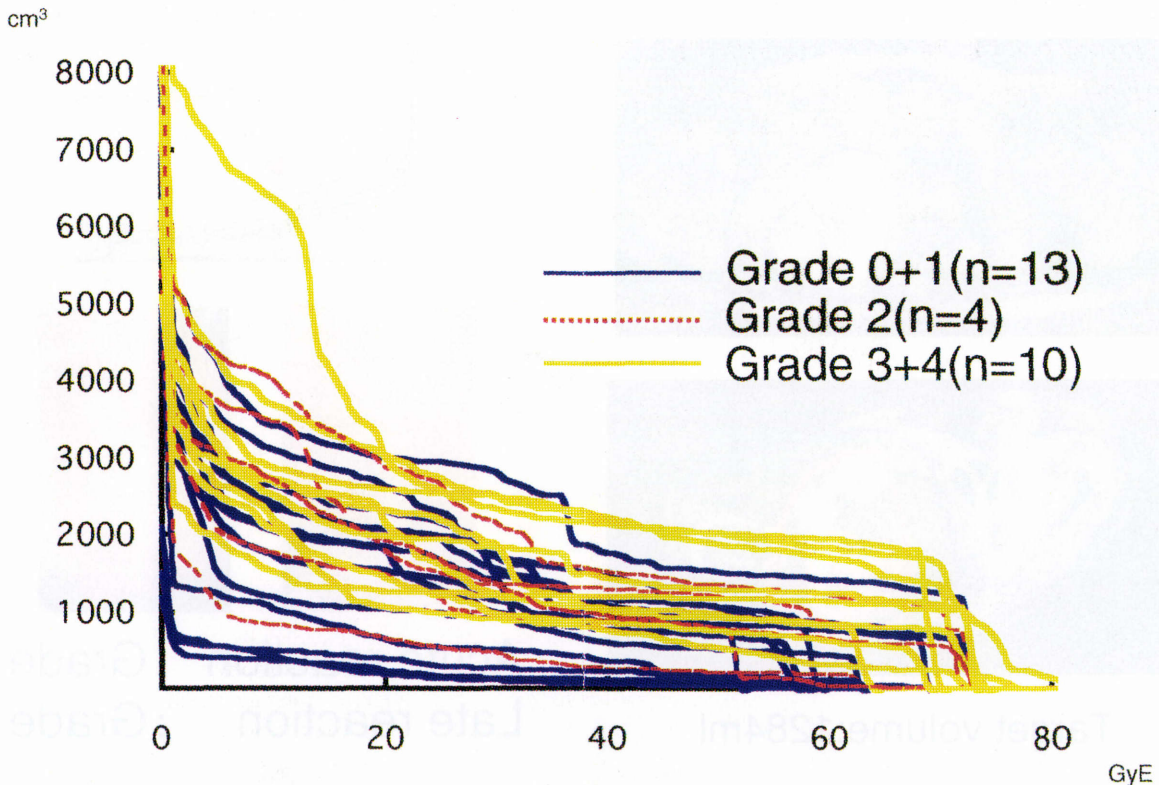


Fig.1 Dose volume histograms of all patients are shown. Histograms for grade 3,4 of late reactions (yellow lines) tend to exist in the upper part of the graph.



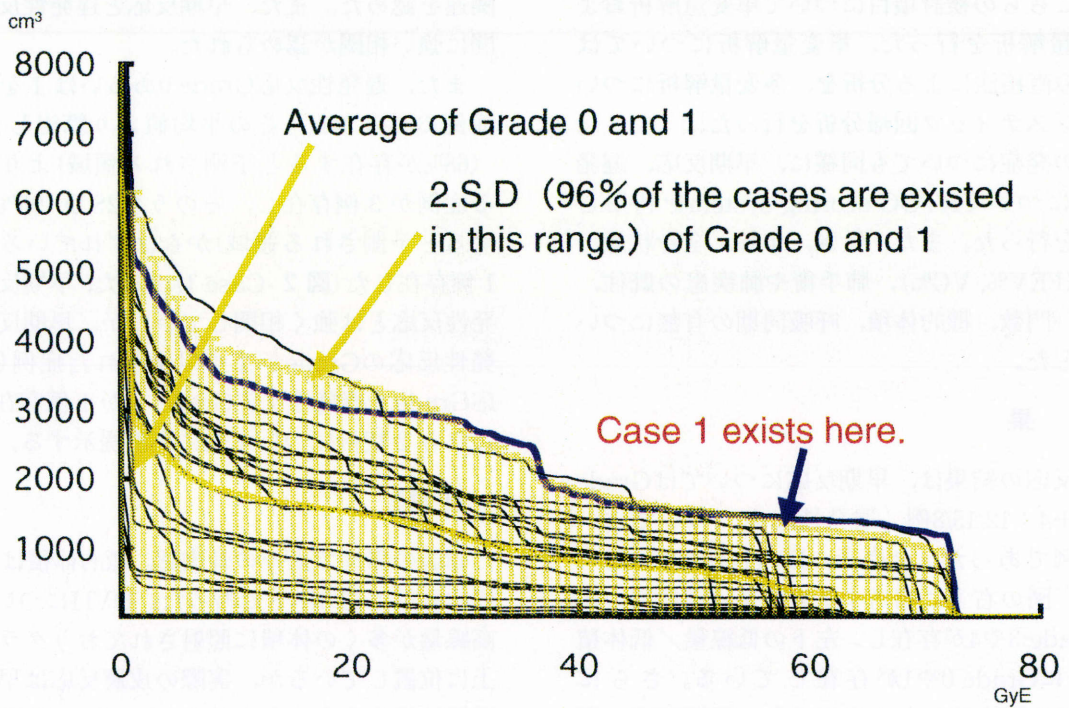
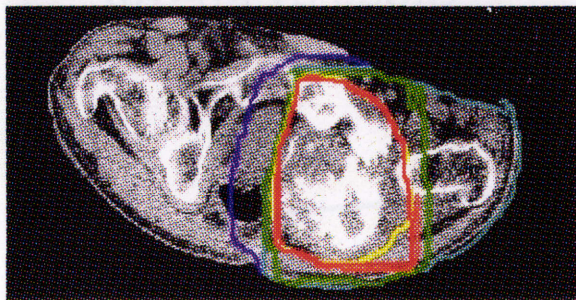
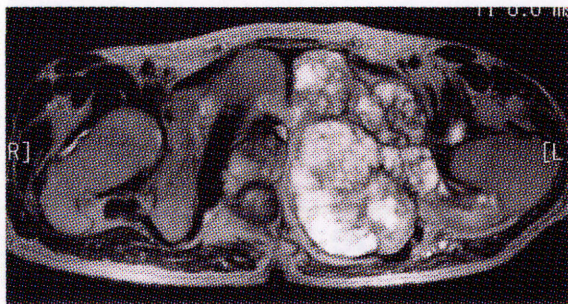
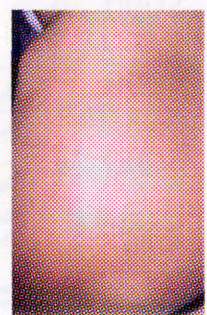
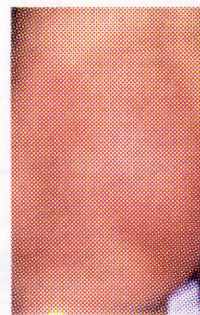
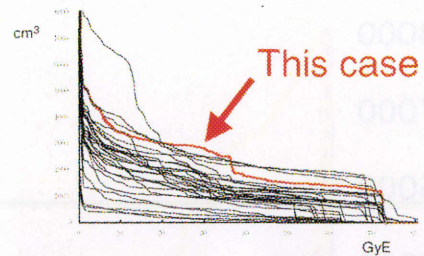


Fig.2 This particular case located out of the range of 2 S.D.



Target volume:1284ml



Acute reaction : Grade 1  
Late reaction : Grade 1

Fig.3 This case is 43 year-old male of osteosarcoma in ischiatic bone. The skin reaction was less severer than expected.

が投与されている。我々の検討項目では予想が難しく、内的因子等の他の因子の関与が疑われた。

### 症例2.

55歳の男性で腸骨の骨肉腫。標的体積は1665ml、標的線量は70.4GyEであった。DVH上、高線量が多くの体積に照射されており、グラフの右上に位置している。遅発性反応は予想通り強い皮膚反応(Grade 4)であったが、早期反応は予想に反して軽症(Grade 2)であった。標的線量も多く、内的因子等の他の因子の関与が疑われた。

肺反応についての結果は、早期反応についてはGrade0/1/2/3:40/1/3/2例、遅発性反応についてはGrade0/1/2/3:10/35/1/0例であった。全症例のDVHをとってみると、X線での肺炎発症の目安である $V_{20}$ (20Gy以上が照射される体積)はすべての患者で25%以下となっていた。また、Grade 3を示した症例よりもグラフ上右側に、Grade 0や1や2を呈した症例が存在した。また、早期反応としての肺炎がGrade 2, 3であった5症例と、Grade 0であった症例のうち比較的照射体積が大きかった5症例について、その他の背景因子を比較してみると、年齢、性別、全身状態、%FEV、%VC、標的線量、標的体積では違いを認めず、肺の手術の既往や肺線維症、対向2門の使用が反応の強い群でやや多く、呼吸同期の使用が反応の弱い群で多かった。

### 考 察

従来から放射線治療に使用されてきたX線は、ビルドアップと呼ばれる特徴をもち、結果的に皮膚線量を軽減させることに役立っているが、皮膚線量の正確な評価がときとして困難である。重粒子線にはこのビルドアップがないため、X線と比較すると皮膚の線量をずっと正確に評価できる。また、重粒子線治療時の皮膚線量を知るにあたっては、生物学的効果を考慮する必要があるため、実測した値よりも計算により予測値を算出する方が、現実の皮膚反応に合致する。こうした背景により今回は、DVHを利用して皮膚線量を算出し、臨床的な評価との関連を調べた。皮膚反応に、皮膚の表面線量だけではなく体積を利用したのは、皮膚反応には皮下組織への変化が関連すると考え

ためである。これらのDVHによる検討で、早期皮膚反応、遅発性皮膚反応ともに特に高線量付近において、Grade毎にグラフが別れる傾向が認められた。DVHに対する統計学的解析を行うためのDVHを代表させる点としては、仙骨に70.4GyE以上照射された症例だけを選びだし、Grade毎の差が最も表れるとみられた“68GyE以上照射される体積が300ml以上”という点を選択した。この点は、単変量解析において早期反応、遅発性反応ともに有意差を認めた。そのほかにも、単変量解析で有意差を認めた因子としては、部位(仙骨)がある。これは、仙骨付近では褥創ができやすいことと共通する要因があると思われる。おそらく仰臥位での物理的圧迫や血流が不十分になりやすいことなどに関連すると推測される。標的線量については70.4GyE以上で単変量解析で有意差を認めた。これ以下の線量で局所制御可能な腫瘍であれば、皮膚反応はかなり軽減すると思われる。また、これらの因子はいずれも多変量解析では有意差を認めなかった。

ところでDVHをはじめとするこれらの因子が皮膚反応に関連することが明らかになったが、これらの因子では説明がむずかしい症例が存在した。症例1に提示したごとく、標的線量やDVHからはかなり強い皮膚反応が予想されたものの、実際にはGrade 1と比較的軽度であった。原因としては個人が本来もっている放射線感受性に関する内的因子が関与している可能性があり、さらなる検索が必要とされる。

早期反応と遅発性反応の関連については、最近consequential late effectとよばれる概念が認知されつつある<sup>2)</sup>。これは、遅発性反応を起こす因子には本来その組織がもつ因子以外に、早期反応に関連した動向を示す因子が存在しているとする考え方である。つまり、早期反応が強ければこの遅発性反応も強くでると考えてよい。我々の検討でもほとんどの症例で早期反応と遅発性反応とがほぼ同じGradeを示した。このことは、consequential late effectを支持すると考えられる。ただ1症例だけが、早期反応がGrade 2、遅発性反応がGrade 4と2つずれて評価された。この症例では早期反応が予想に反して軽症であった。この原因についても、個人が本来持っている放射線感受性に関する内的因子が関与している可能性がある。



肺の反応については、Grahamらによれば一般のX線治療においては肺炎を避けるために、20Gyをこえる肺の体積( $V_{20}$ )が全肺の体積の25%を超えないという目安が用いられている<sup>3)</sup>。今回の検討では、すべての症例でこの値を満たしており、この値を用いて肺炎の予想をすることは難しい状況であった。また、DVHについても必ずしもGradeの高い群で高線量が高体積に照射されているとは限らず、DVHのグラフ上の位置による予想も難しい状況であった。そこで、他の検討項目として患者因子や治療因子の検討を行ったが、反応が強い群では過去の手術の既往、間質肺炎、対向2門照射などがやや多く、反応の弱い群では呼吸同期が使用された割合が高かった程度で、明らかな傾向は見られなかった。肺の反応においても、分子生物学的検討でより明瞭な傾向が明らかになる可能性がある。

#### まとめ

骨軟部腫瘍および肺癌における重粒子線治療後の皮膚および肺の反応について、DVHを用いてこれらを予知できないか検討した。

皮膚反応についてはある程度反応を予測することが可能と考えられたが、すべての症例を説明することは難しかった。肺炎については、炭素イオン線では照射される体積が非常に小さく、DVHによる予測が難しかった。今回考察した因子以外にも、さらに別な因子の関与が考えられる。これについての分子生物学的な検討に期待したい。

#### 参考文献

- 1) Tadashi Kamada, Hirohiko Tsujii, Hiroshi Tsuji et al. Efficacy and Safety of Carbon Ion Radiotherapy in Bone and Soft Tissue Sarcomas. *Journal of Clinical Oncology*; 20, 4466-4471, 2002
- 2) Wolfgang Doerr, Jolyon H.Hendry. Consequential late effects in normal tissues. *Radiotherapy and Oncology*; 61, 223-231, 2001
- 3) Mary V. Graham et al. Clinical dose-volume histogram analysis for pneumonitis after 3D treatment for non-small cell lung cancer (NSCLC). *Int. J. Radiation Oncology Biol. Phys.*; 45, 323-329, 1999

## II. 放射線感受性の個人差検索

### 2 細胞の放射線感受性解析—小核アッセイ法、 コメットアッセイ法を中心として—

原田 良信

放射線医学総合研究所 フロンティア研究センター

Yoshinobu Harada

National Institute of Radiological Sciences

---

#### 〈Abstract〉

---

The aim of RadGenomics project is discovering comprehensively the genetic polymorphisms relating with the side effects after radiotherapy treatment. It is necessary to divide the human group into two or more subgroups by the difference of radiosensitivity in order to discover such genetic polymorphisms. In this study, *in vitro* studies were carried out on breast cancer patients and normal individuals to divide them into subgroups. We detected putative hypersensitive subgroups by using two *in vitro* assay systems, the micronucleus test and the comet assay. The genetic polymorphisms which are specific for these radiation hypersensitive subgroups must be good genetic markers to predict radiosensitive individuals. We expect that the other genetic polymorphisms can be discovered by the *in vitro* studies with more various conditions.

---

#### I. 背景

2001年2月、国際ゲノムプロジェクトと米国のベンチャー企業からヒトゲノムドラフトシーケンスが発表され、2003年中にはほぼ完全なヒトゲノムシーケンスが発表されると言われている。この偉業は医学・生物学史上最も重要な出来事のひとつであり、ゲノムサイエンスからの知見が21世紀の医療を大きく変えていくことは疑いのないところであろう。

ヒトのゲノムは約30億個対の塩基(一般にA, T, G, Cで表現される4つの文字)によって構成され

ている。ヒトである限り、その並び方はほとんど同じであるが1000塩基にひとつほどの割合で別の塩基(文字)に置き換わっている部分がある。これを一塩基多型、SNP(single nucleotide polymorphism)と言う。SNPの多くはヒトの生存には大きく影響しないものの、遺伝子の働きを少しだけ変化させ、個人間の違いを規定していると考えられる。すなわち顔立ちや背の高さ、お酒の強さや花粉症の罹り易さなど、これまで「体質」という漠然とした言葉で表現されてきた多くの事柄を決めていると考えられる。放射線に対する感受性も個人毎に異なっているが、これにもSNPなどのゲノム



上の違いが関与していると思われる。放射線感受性遺伝子プロジェクトでは、放射線治療に対する反応(副作用や治療効果など)とゲノムの違いの相関関係を網羅的に発見する研究を行っている。理想的にはヒトの全ての遺伝子におけるSNPなどの遺伝的多型と患者さんの副作用の発生を比較すれば良いと考えられる。しかしながら、現在の技術レベルでは膨大なコストを必要とし、現実的ではない。よって実際の研究では3万個から4万個あると言われる遺伝子の中から放射線感受性に係わる遺伝子を絞り込む必要がある。これについては本報文集の別章に譲るとして、本章ではヒト集団のグループ化と細胞の放射線感受性解析について解説する。

## II. 診療情報による患者集団のグループ化

古典遺伝学の父であるメンデルは、エンドウ豆の丈の高さが高いものと低いもの、あるいは豆の表面にシワがあるものとないものなど、対称的な外見上の「違い」を見出し、それらが次世代にどの様に表れるか観察することで遺伝の法則を発見した。このような違いを見つけられる眼力が偉大な発見につながったのであるが、遺伝学では「違っているもの」を比べることが重要である。本プロジェクトでは多くのがん患者さん、健常者の方にご協力いただいているが、放射線感受性と遺伝子の関係を遺伝学的(ゲノムサイエンス的)に解析するに

は、これらのヒト集団から「違い」を見出し、集団を分ける必要がある。

がん患者については副作用の有無など、診療情報によって集団を分類することが出来る。本プロジェクトでは平成14年11月現在で480名以上のがん患者さんに登録していただいているが、その半数以上が乳がん患者である。これは意図的に乳がん患者を集めた結果であるが、その理由は乳がんの放射線治療はその方法が確立しており、治療施設や患者間での照射線量の差異が比較的少ないからである。これは照射線量の差による副作用の違いを低く押さえることができ、科学的な解析を行う上で重要である。また乳がん患者における副作用はしばしば皮膚に観察され、医師のRTOG (Radiation Therapy Oncology Group) による副作用のスコアリングが安定的に行われると考えられる。さらに乳がん患者が重要である理由は、乳がん発症に浸透力の弱い放射線感受性遺伝子群が関与している可能性が指摘されていることにある(Scott *et al.*, 1994)。これは乳がん患者集団中には他の集団に比べて放射線感受性に係わる遺伝的変異を持った患者が多く存在することを意味しており、より効率的に放射線感受性に係わる遺伝子やその変異を発見することが期待できる。

本プロジェクトに登録された乳がん患者における線量分布は46-50Gyに集中しており、これ以上またはこれに満たない照射線量の患者は少数で

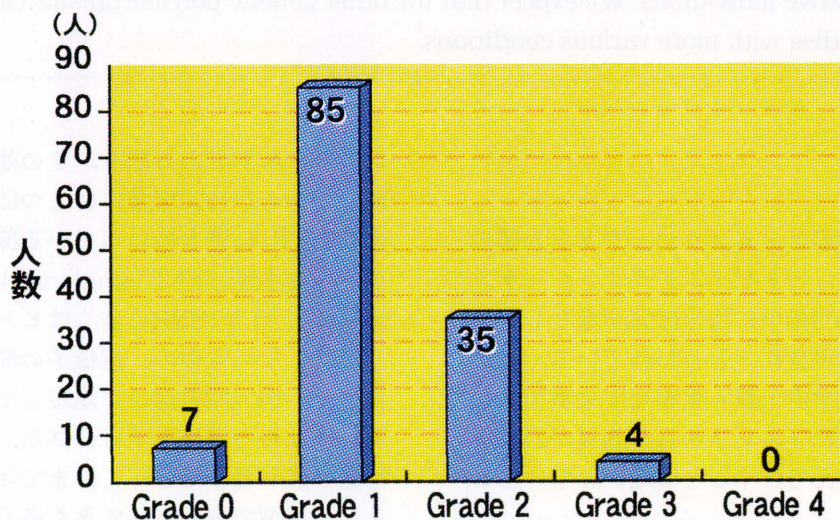


図1 乳がん患者における皮膚障害の発生頻度分布。各GradeはRTOG (Radiation Therapy Oncology Group) による分類。棒グラフ中の数字は患者数を示す。



あった。図1は皮膚障害の発生頻度分布を示したものであるが、Grade 1が最も多いもののGrade 0, Grade 2あるいはGrade 3の患者もある頻度で観察された。言い換えれば乳がん患者における皮膚障害の発症は、患者集団をグループ化する上での指標となりうる。実際、Grade 2と3をひとつのグループとしてまとめ、全体を3群に分けた場合、グループ間で遺伝子多型の頻度に有意な差が観察されており、これは放射線感受性に係わる遺伝子多型の候補であると思われる。

### III. *in vitro*放射線感受性解析の意義

現在の放射線治療は、照射技術が向上していることに加え、副作用発生頻度が低い照射線量、すなわち安全域での照射が行われており、Grade 3以上の重篤な副作用が発生することは少ない。副作用の発生は、放射線照射後に細胞レベル、臓器レベルあるいは個体レベルで様々な反応が起こった結果であり、そのメカニズムは極めて複雑であると想像される。診療情報からの集団のグループ化は、これらの反応の総和としての結果を反映するものであり、重要な意味を持つが、その複雑さが解析を困難にする場合も考えられる。また診断上は同じであっても、そこに至る過程やメカニズムが異なる場合や、外的因子によって副作用が発生あるいは悪化した場合もある想像され、十分な患者数が確保できない場合は間違った結果を出す可能性がある。

歴史ある放射線生物学は様々な*in vitro*の放射線感受性解析方法を開発してきた。これらは診療情報のように複雑な反応系の全体を反映するものではないにせよ、その一部を反映あるいは代弁することができると思われる。また一部しか反映しない、すなわち比較的シンプルな反応系のみを見ることは、正確な実験データを出すことにもつながるであろう。がん患者においても診療情報からではなく、*in vitro*の実験によって新たなグループ化を行うことが可能である。さらには、がん患者には副作用を含めた診療情報があるが、一般健常人はそもそも放射線治療を受けていないのであるから、健常人の集団をグループ化し、放射線感受性に係わる遺伝子多型を発見するには、*in vitro*の放射線感受性解析を行うしか方法がない。

現在までに様々な*in vitro*の放射線感受性解析方

法が開発されてきたが、低線量照射においても放射線感受性を鋭敏にとらえることができ、少量の血液を使ってハイスループットな実験系を確立できることから、現在本プロジェクトでは*in vitro*の放射線感受性解析法に小核アッセイ法、コメットアッセイ法を採用している。

### IV. 小核アッセイ法による放射線感受性解析

小核アッセイ法(micronucleus test)はSchmid (1975)によって開発された放射線感受性解析法のひとつである。二重鎖切断によって切り離された染色体が細胞分裂時に小さな核として観察される現象を利用した方法で、染色体レベルでの放射線感受性を計測する方法として確立されている。我々はこの方法を用いて乳がん患者と一般健常人の白血球における小核の発生頻度を計測した。自然発生による乳がん患者の小核発生頻度は、一般健常人のそれに比べ有意に高値であった(data not shown)。図2にはX線誘発による小核発生頻度を示した。この場合も乳がん患者の小核発生頻度は一般健常人のそれに比べ有意に高値であった。これらの結果は前述した乳がん発症に浸透力の弱い放射線感受性遺伝子群が関与している可能性(Scott *et al.*, 1994)を裏付けるデータとして興味が持たれる。更に興味深いのは、図2の赤枠内にプロットされた群である。乳がん患者および一般健常人の中には、他に比べ特に高値を示すサブグループが存在しており、少なくとも小核アッセイ法を用いた場合には放射線高感受性群ととらえることができる。今後これらのサブグループに特異的で共通な遺伝子多型や放射線治療における有害事象との関係を解析する予定である。

### V. コメットアッセイによる放射線感受性解析

コメットアッセイはOstling and Johanson (1984)によって報告された方法で、別名Single-cell gel electrophoresis (SCGE)と呼ばれる。細胞核DNAの1本鎖切断、2本鎖切断、酸化ダメージ、アルカリ脆弱部位などを高感度で検出できる方法で、比較的安価にしかも少量の細胞で実験が可能であるなどの特徴を有する。細胞をアガロー

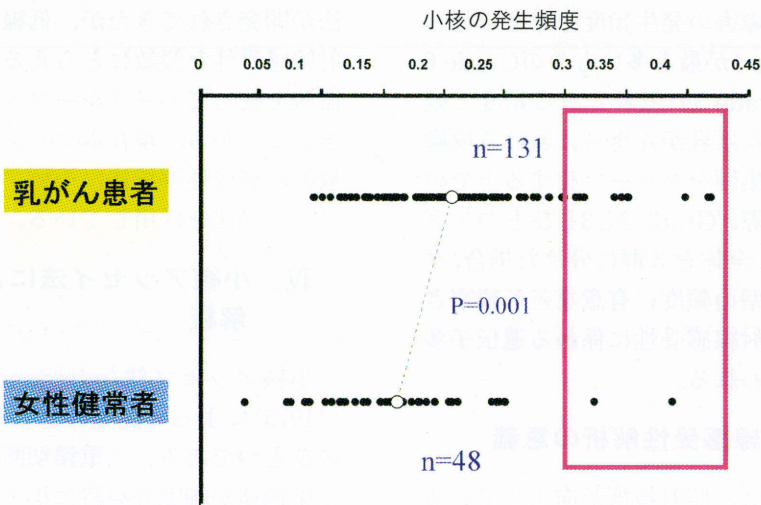


図2 X線誘発による小核の発生頻度。各血液サンプル毎に1000個の二核細胞に観察し、観察された小核の数を計測し頻度計算を行った。頻度が高いほど放射線感受性が高い。赤枠内は小核発生頻度が0.3以上を示す。○は平均値で乳がん患者と女性健常者間で有意な差がある。

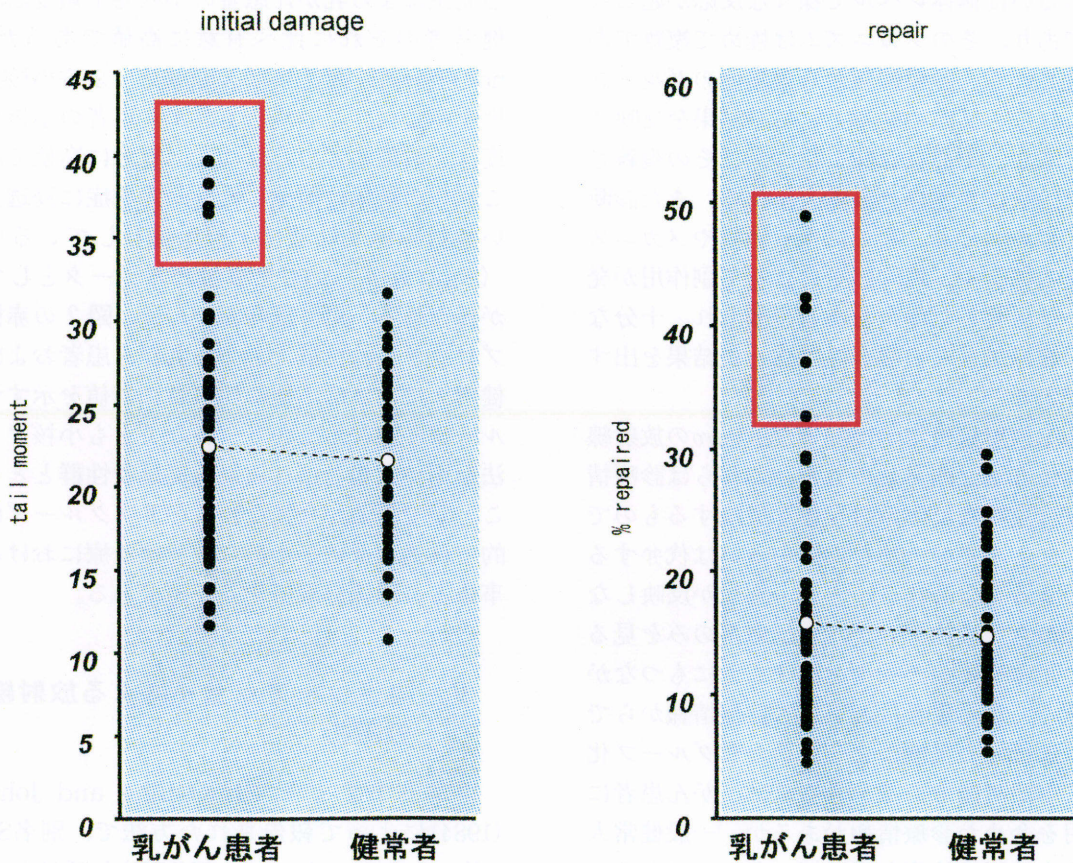


図3 コメットアッセイによる放射線感受性解析の結果。コメットアッセイはアルカリ法による。(a)8Gy照射、0分後の初期傷害をテールモーメント値によってプロットした。この値が高いほど放射線感受性が高い。赤枠内はテールモーメント値35以上を示す。(b)37°C、30分間修復後のテールモーメント値を0分時のテールモーメントに対する百分率(%)で示す。この値が高いほど放射線感受性が高い。赤枠内は30%以上のものを示す。○は平均値であるが乳がん患者と健常者間で有意な差は観察されなかった。

## II. 放射線感受性の個人差検索

スゲルと混和後、スライドガラス上に展開し、それを電気泳動法により処理することにより、核から流れ出たDNAを定量し、DNAのダメージを測定する方法である。我々はコメットアッセイ法を用いて乳がん患者と健常女性における白血球の放射線感受性解析を行った(図3)。DNAの初期傷害(initial damage)および修復時(repair)のテールモーメント値によって比較したところ、その平均値は初期傷害、修復時共に両群で有意な差は観察されなかった。しかしながら小核アッセイ法においても観察されたように、他に比べ特に高値を示すサブグループが乳がん患者群内において観察された。これらのサブグループはコメットアッセイ法を用いた場合には放射線高感受性と判別することができ、小核アッセイ同様、今後このサブグループに特異的で共通な遺伝子多型などを解析する予定である。

## VI. まとめ

本研究ではin vitroのアッセイ系を用いて、乳がん患者あるいは一般健常人のグループ化を試み、

2つの方法で放射線高感受性であると推定されるサブグループを検出した。これらの方法では白血球を用いており、放射線障害が発生する臓器とは異なるが、少なくとも放射線の細胞への影響を見ているのであり、このグループ化から発見された遺伝子多型は、放射線感受性を予測するものとなりうる可能性が高い。今後さらに様々な条件における感受性解析を行い、それによるグループ化から新たな遺伝子多型が発見できるものと期待している。

## 参考文献

- Ostling, O and Johanson, K.L, Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 123:291-298, 1984
- Schmid, W., The micronucleus test. *Mutat. Res.* 31 (1):9-15, 1975
- Scott, D., Spreadborough, A., Levine, E., Roberts, S.A., Genetic predisposition in breast cancer. *Lancet.* 19;344 (8934):1444, 1994



## II. 放射線感受性の個人差検索

### 3 放射線感受性とDNA損傷・修復

鈴木 紀夫

東京大学医学研究科

#### DNA damage repair and radiosensitivity

Norio Suzuki

Graduate School of Medicine, University of Tokyo

---

---

#### 〈Abstract〉

---

---

Tailored treatment is not new in radiotherapy; it has been the major subject for the last 20-30 years. Radiation responses and RBE (relative biological effectiveness) depend on assay systems, endpoints, type of tissues and tumors, radiation quality, dose rate, dose fractionation, physiological and environmental factors etc, Latent times to develop damages also differ among tissues and endpoints depending on doses and radiation quality. Recent progress in clarification of radiation induced cell death, especially of apoptotic cell death, is quite important for understanding radiosensitivity of tumor cure process as well as of tumorigenesis. Apoptotic cell death as well as dormant cells had been unaccounted and missed into a part of reproductive cell death.

Another area of major progress has been made in clarifying repair mechanisms of radiation damage, i.e., non-homologous end joining (NHEJ) and homologous recombinational repair (HRR). New approaches and developments such as cDNA or protein micro arrays and so called informatics in addition to basic molecular biological analysis are expected to aid identifying molecules and their roles in signal transduction pathways, which are multi-factorial and interactive each other being involved in radiation responses,

---

#### 1 まえがき

オーダーメイド医療と言うことばを最近よく耳にするようになり気になることがふたつある。英米語でまったく通じない外国語擬きのカタカナ日本語(和製英語)が正確さを旨とする科学・医学の専門分野まで侵入していることである。英語とし

てはtailored medicine(tailor-made, custommade), individualized medicine。そもそも<標準化と個別化・最適化>は放射線治療分野の中心課題として20年以上前から制がんシンポジウム等でよくとりあげられてきた。

放射線は分子・細胞・組織のレベルでどれだけ吸収されたか正確に推定することができるゆえに、

線量と放射線応答の大小との関係すなわち感受性は古くから放射線医生物学研究の課題であった。多くの研究の蓄積があり、放射線治療の分野では predictive assay として各患者と腫瘍に最適な線源や照射法の個別選択のための医生物学研究が続けられてきた。しかし、未だ実用に耐える方法は確立しておらず分子生物学的展開への期待は大きい。

## 2 放射線感受性の多様性

培養細胞を用いた研究から放射線感受性の指標としてコロニー形成法による細胞死(増殖死, reproductive cell death)や色素排除能による細胞死(間期死, interphase cell death, apoptotic cell death), 染色体異常, さらに, 照射後の細胞における各種の生化学的解析, DNA鎖切断の各種方法による解析, 突然変異の解析など多くの研究の結果, 放射線作用・効果(RBE; relative biological effectiveness)は放射線の種類(線質), 線量率, どの大きさの線量で比べるか, 細胞環境の酸素濃度・温度などに依存することがわかった。さらに, これらの重要な生物作用の多くがDNA損傷, 特に修復されずに残った二重鎖切断や間違った再結合, に起因すると考えられるようになった。

一方, 個体や組織となると構成細胞も複雑多様である。障害発現の時間により急性あるいは早発性(数ヶ月以内), 後発性(半年~数年), 晩発性(数年以上)の正常組織障害があり, 個体死は線量に依存して死の主因となる各種臓器障害をそれぞれ特有の時間経過で発現する。発ガンのようにがんの種類により発現に5年から20~30年かかる障害もある。

腫瘍治療では5年生存率や局所治療率等が用いられる。腫瘍の放射線分割治療法が確立した1960年代以降その生物学的メカニズムの解明研究が盛んに行われた。腫瘍の細胞動態や正常組織応答の解析により放射線感受性に重要な因子として tumor doubling time, labeling index, cell cycle time, growth fraction, cell loss factor, hypoxic cell fraction等の概念が確立, 分割照射により正常組織を防護・再生しながら腫瘍細胞を制御できる生物学メカニズムとして, 4R's すなわち repair, reoxygenation, repopulation, ressortment の重

要性が提唱された。LQ model により腫瘍と組織幹細胞の生存曲線の違いの解明がすすみ, 分割照射による治療効果(TG; Therapeutic gain, 正常組織障害を少なく再生を促しながら腫瘍細胞を制御できるメカニズム)が生物学的に説明されるようになった。さらに, 近年では, apoptotic cell death (放射線生物学的には interphase cell death)の発ガンおよび治療メカニズムにおける重要性が認識されるようになった。

以上の細胞生物作用や組織障害・再生の分子的メカニズムの解明は目下急速に進行中でありその展開は大変興味深く時を忘れさせる。

## 3 DNA 損傷の修復メカニズムの最近の進展

細胞死や発ガンといった電離放射線生物作用の多くがDNA損傷, 特に修復されずに残った二重鎖切断あるいはその誤修復に起因するとする考えが注目されてきた。二重鎖切断修復メカニズムの最近の進歩には目をみはるものがある。各種変異株, 遺伝病由来の細胞株やDT40の組み換え効率のたかさを利用して作られた transgenic 変異株を利用して, 相同組み換え修復(HRR; homologous recombinational repair)と非同末端結合修復(NHEJ; non-homologous end joining)の解明が進展した。相同組み換え修復には Mre11-Rad50-NBS1 complex や Rad 51, XRCC2, XRCC3, Rad 52, Rad 54等を中心に, その上流のシグナル伝達に ATM, ヒストン H2AX, BRCA1, BRCA2等の関与が考えられている。HRRは細胞周期のS期以降, 特にS期後半での放射線抵抗性に重要な役割をしていると考えられる。SLDR (sub-lethal damage repair, Elkind-Sutton type recovery)において中心的役割を果たしている可能性も提唱されている。一方, NHEJには DNA-PKcs-Ku70, Ku80, XRCC4, LIG4 (DNA Ligase IV) 等が関与しており, 修復の誤りを伴いやすいが細胞周期全般に働いている点で重要と考えられてきた。PLDR (potentially lethal damage repair)における中心的な役割も提唱されてきた。更に, 興味深いことは, これら両修復システムが, その修復プロセスにおいて, また上流のシグナル伝達においても, 互いに補完または影響を及ぼしあっていることが判明しつつある。

#### 4 DNA 損傷の修復と細胞死放射線感受性

DNA損傷は正しく修復されなければ染色体異常や突然変異さらに細胞死につながる、あるいは、相関すると一般に考えられているが、DNA損傷修復の異常や染色体異常、突然変異から細胞死に至るメカニズムは未解明な部分が多い。必ずしも修復の異常すなわち細胞死(の増感)とはかぎらない。たとえばBLM(Bloom DNA helicase)の異常の場合、sister chromatid exchangeの頻度は亢進しているが細胞死は亢進していない。コロニー形成能、すなわち、培養細胞および臓器実質細胞のin situコロニー形成法で測定される細胞死(増殖死, reproductive cell death, clonogenic cell death)はDNA損傷修復の異常や染色体異常・突然変異に起因する細胞死に加え、色素排除能、Tunel法、Annexin V陽性等として定量される細胞死(間期死, interphase cell death, apoptotic cell death)、さらに生きているが分裂・増殖していない細胞を包含すると考えられる。この包括性ゆえに従来、in vitro, in situのコロニー形成能を中心に(幹)細胞生存率が論じられて来た。しかし、感受性やそのメカニズム解明のために、増殖死生存率の中に混在して計測されていたapoptotic cell deathとclonogenic cell deathを区別することにより、シグナル伝達経路、修復・細胞死のメカニズム解明が進展すると考えられる。放射線照射後の細胞死におけるapoptotic cell deathの役割は以前考えられていたよりはるかに重要であることが、近年明らかになりつつある。腫瘍生成の原因として組織を構成する細胞の生成と消失のプロセスの破綻という視点からは、apoptotic cell deathのメカニズムの欠陥例が次々と集積しつつあり、照射後の多くの腫瘍組織でapoptotic cell deathが限局的にしかみられないことは理にかなっている。照射後のapoptotic cell deathについてはTP53(p53)経路、JNK/SAPK経路を中心に研究が進展しているが、シグナル伝達経路とそのプロセスに関与する未解明分子の同定とメカニズムの解明が急務である。

AT(ataxia telangiectasia)は臨床症状として放射線高感受性であることが初期からよく知られていたが、遺伝子ATMがクローニングされ、今の位置づけはTP53(p53)、Chk1、Chk2、NBS1、

H2AX、BRCA1、BRCA2、c-Abl等のリン酸化酵素という仮説が有力視されている。放射線生物学分野ではatmが変異し、あるいはwortmanninなどでATM機能が抑制されるとDNA損傷の修復が不十分となり細胞死が亢進すると考える研究者が多いようである。しかし、反対に、ATMがapoptotic cell deathに必要な場合もいくつか報告されている。ATMやTP53(p53)が細胞死に重要と考えられる実験系の場合にはp53の変異により、その機能が損なわれると細胞死が起こりにくくなり、細胞周期制御も機能せず、増殖が進むという考えがある。TP53の役割・機能は細胞死、修復、細胞周期、血管生成増殖等多様であり、現在、TP53のリン酸化、アセチル化の部位等modificationの違いにより多様な機能を説明しようとする研究が盛んである。したがって、今でもatmの異常で放射線高感受性(細胞死および組織障害、発ガンについて)になるメカニズムはよく解明されていない。

DNA-PKはM059J細胞やscid mouseを放射線高感受性に行っている原因でいずれもDNA-Pkcsの異常によるDNA二重鎖切断の修復異常とされているが細胞死に至るメカニズムはATM、p53の場合と同様、未解明である。DNA-PKはXRCC4、LIG4と共にNHEJに関与すると考えられているがDNA-PKの真の基質と機能は十分解明されていない。DNA-PKを阻害することにより細胞死が亢進する場合もあるが逆にapoptoticな細胞死にDNA-PKを必要とする場合もある。HRR系NHEJ系は互いに影響補完している可能性も論じられている。一方、DNA-PKの臨床への実用化研究については、Ku70,80 subunitsの量、DNA-PK活性あるいは機能と放射線感受性との関係を調べDNA-PKの役割を解明しようとする研究も試みられている。DNA-PK活性は、serine-threonine kinaseとして合成ペプチドを基質にリン酸化能で定量する(図1)が、各種培養細胞(表1)、ヒト手術材料等を調べた我々自身の結果も含め、DNA-PK活性と細胞の放射線感受性が相関する場合の報告としない場合の報告がそれぞれいくつかある。従って現状の情報と理解のレベルではpredictive assayのような利用、すなわち臨床的に個別の患者・腫瘍の治療法や線源の選択には、未完成で使えず研究段階である。



## DNA-PK activity assay

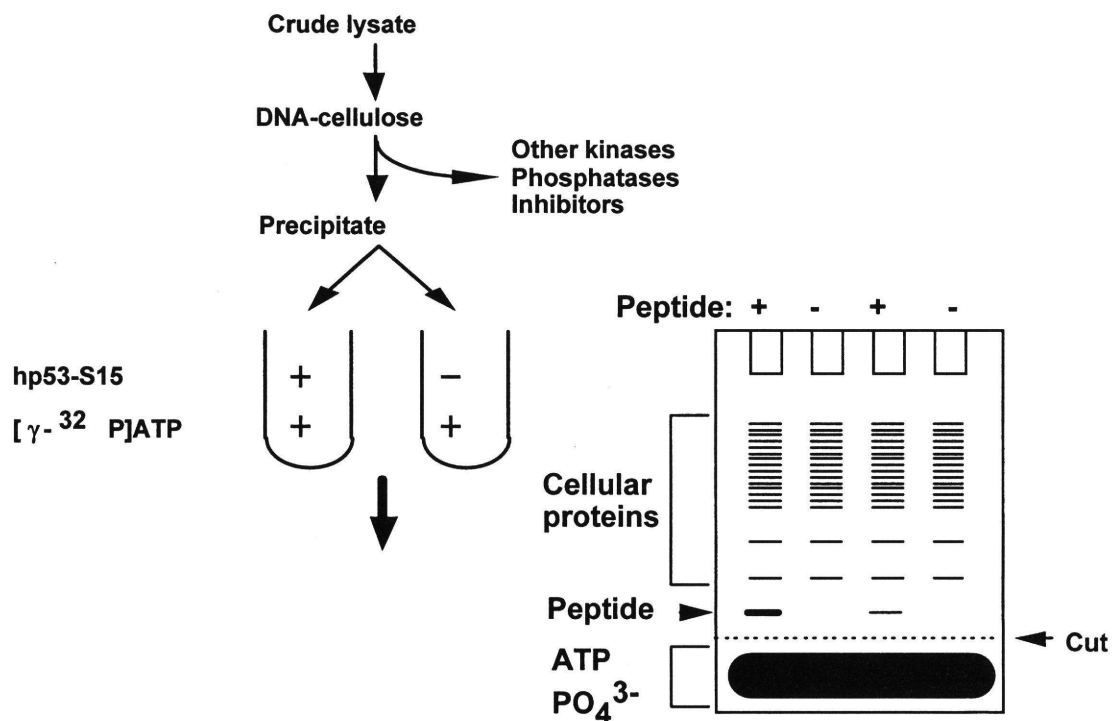


Fig 1

Tab. DNA-PK activity of human and rodent cells

Cells	Origin	Substrate peptide	DNA-PK activity <sup>a)</sup> (pmol min <sup>-1</sup> mg <sup>-1</sup> )
FSA1233	Mouse fibro sarcoma	hp53 -S15 <sup>b)</sup>	4.9 ± 1.5
		mp53 -S18 <sup>c)</sup>	6.9 ± 1.8
FM3A	Mouse mammary carcinoma	hp53 -S15	7.0 ± 0.2
V79	Chinese hamster fibro blast	hp53 -S15	6.9 ± 3.7
XR-V15B	(Ku86-d efficient clone from V79)	hp53 -S15	0.81 ± 0.33
CHO-K1	Chinese hamster ovary	hp53 -S15	6.7 ± 2.7
xrs5	(Ku86-d efficient clone from CHO -K1)	hp53 -S15	0.23 ± 0.09
MOLT-4	Human T-cel leukemia	hp53 -S15	218 ± 62
U937	Human monoblastic leukemia	hp53 -S15	93 ± 25
MKN45	Human gastric cancer	hp53 -S15	170 ± 50
		mp53 -S18	150 ± 18
A7	Human glioma	hp53 -S15	44 ± 9

a) Activity of unheated cells. Determined from repeated experiments (n=2 to 38) and represented as mean ± standard deviation (SD).

b) Sequence e: EPPLSQEAFADLWKK. The phosphorylation site, serine 15, is underlined. Threonine 18 and serine 20 in human p53 were changed to alanine and an extralysine was appended to C terminal.

c) Sequenc e: ELPLSQEAFAGLWKK. The phosphorylation site, serine 18, is underlined. Threonine 21 amd serine 23 in mouse p53 were changed to alanine and an extralysine was append to C terminal.

## 5 まとめ

組織障害や腫瘍治癒における放射線照射後応答に関連する近年の研究の進展は著しい。放射線感受性(細胞死)とDNAをはじめとする分子の損傷の修復メカニズム,特にDNA二重鎖切断修復メカニズムについて,相同組み換え修復(HRR; homologous recombinational repair)と非相同末端結合修復(NHEJ; non-homologous end joining)の解明が進んでいる。照射後のシグナル伝達経路・細胞死のメカニズム解明は急速に進むことが期待される。組織障害や腫瘍治癒に関連する放射線照射後の細胞死において,apoptotic cell deathはコロニー形成能という指標(clonogenicまたはreproductive cell death)の中に含まれるものとして従来あまり重視されなかったが,両者を区別することにより解明が急速に進んでいる。腫瘍生成においても治癒・細胞死においても,apoptotic cell deathの役割は以前考えられていたよりはるかに重要で基本的であることが明らかになりつつある。照射後のシグナル伝達経路はTP53(p53)経路, JNK/SAPK経路を中心に研究が展開しているが,そのプロセスに関与する分子の同定とメカニズムの解明が急務である。従来からの分子生物学的方法と並行して,本シンポジウムで取り上げられているマイクロアレイのようなシステムティックな方法・インフォマティクスといった新たなアプローチの進展が大きく貢献するであろうことへの

期待は大きい。関係式の両辺に未知変数が多く,しかも互いに独立でないことが分かりつつあるというのが現状であり,方程式を解くまでには時間がかかりそうであるが,予想以上に進展が加速し急速になるかもしれないという期待もある。

## 6 謝辞ほか

DNA-PK, ATM, JNK/SAPK, 放射線誘導アポトーシスについては教室の細井義夫,松本義久,榎本敦,森田明典らとの共同研究の結果および同じ分野の多くの研究者の研究成果を踏まえたものである。特に本発表討論のために,DT40のHRRに関して貴重な資料やご教示をいただきました,京都大学,内海博司,武田俊一,放医研,古沢佳也,の各博士に感謝いたします。以上,いずれも引用文献を省略してしまいましたが,諸先生のお考えと小生の私見が違っていたり,あるいは,誤っていましたら,どうか,お許しいただきたい。また,ご教示頂ければ幸いです。なお,放射線医生物学に直接身を置いてこられなかった方々には同分野の多くの研究結果の集積を要約したものとして,以下の著書が参考としてお役に立つかとおもいます。

E. J. Hall,「Radiobiology for the radiologist」, 5<sup>th</sup> ed., 2000

Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia, PA

## II. 放射線感受性の個人差検索

### 4 放射線リスクの高い疾患—MDS

伴 貞幸<sup>1)</sup>／須藤仁美<sup>1)</sup>／三枝公美子<sup>1)</sup>／相良雅史<sup>1)</sup>／今井高志<sup>1)</sup>／  
田中英夫<sup>2)</sup>／木村昭郎<sup>2)</sup>／蔵本 憲<sup>3)</sup>／小田健司<sup>4)</sup>  
放医研・フロンティア研究センター<sup>1)</sup>／広島大学・原医研・血液内科<sup>2)</sup>／  
米国国立衛生研究所・血液部門<sup>3)</sup>／広島市民病院・内科<sup>4)</sup>

#### **MDS - A disease with high radiation-risk-**

**Sadayuki Ban<sup>1)</sup>/Hitomi Sudo<sup>1)</sup>/Kumiko Saegusa<sup>1)</sup>/  
Masashi Sagara<sup>1)</sup>/Takashi Imai<sup>1)</sup>/Hideo Tanaka<sup>2)</sup>/  
Akio Kimura<sup>2)</sup>/Ken Kuramoto<sup>3)</sup>/Kenji Oda<sup>4)</sup>**

Frontier Research Center, National Institute of Radiological Sciences, Chiba<sup>1)</sup>  
Department of Hematology and Oncology, Research Institute for Radiation Biology and  
Medicine, Hiroshima University, Hiroshima<sup>2)</sup>/Hematology Branch, US-NIH<sup>3)</sup>/Department of  
Internal Medicine, Hiroshima City Hospital, Hiroshima<sup>4)</sup>

---

#### **〈Abstract〉**

---

A preliminary epidemiological study demonstrated that myelodysplastic syndrome (MDS) has an excess relative risk per sievert of 13 in atomic bomb survivors. MDS is the only other radiogenic blood disease apart from leukemia. Clinically, MDS involves dysplastic hematopoiesis and an increased risk of leukemic transformation. Because it is uncertain whether MDS pathogenesis affects lymphoid progenitor cells as well as myeloid progenitor cells, we investigated the micronucleus (MN) frequency in peripheral T lymphocytes of twenty-three atomic bomb survivors with MDS and five normal individuals. The spontaneous- and X-ray-induced-MN frequencies were significantly higher in MDS patients than in normal individuals. Interestingly, radiation sensitivity increased along with the severity of MDS clinical subtypes. Because many of the patients in this study had not been exposed to chemo- or radiation-therapy, their unusual radiosensitivities may be related to their chromosomal or genomic instability. To explain the cause of unusual radiosensitivity, we measured the expression levels of four nucleotide excision repair (NER) genes (ERCC1, ERCC3, ERCC5 and XPC) in peripheral blood mononuclear cells using a RT-PCR method. The ERCC5 gene was expressed at reduced levels in only one of 10 patients with mild symptom. Reduction of NER genes was expressed in four of 11 patients with severe symptom. Immortalized lymphoid cell lines were



established from B-lymphocytes infected with Epstein-Barr virus in vitro. The abrogation of radiation-induced-G2/M arrest was observed in some of MDS-B lymphoid cell lines, but not in the normal B lymphoid cell lines. Our data suggest that the control of chromosomal stability is impaired in pluripotent stem cells of MDS patients, and that DNA repair defects and loss of G2/M arrest may be involved in the pathophysiology of disease progression.

## 緒 言

原爆生存者における予備調査によると、骨髓異形成症候群(MDS)における1シーベルト当たりの過剰相対リスク(ERR<sub>15v</sub>)は13という値が得られている<sup>1)</sup>。ちなみに再生不良性貧血のERR<sub>15v</sub>は0であった<sup>1)</sup>。すなわち、MDSは白血病を除いて唯一の放射線に関連する血液疾患であると考えられる<sup>2)</sup>。MDSの病原論的変異は骨髓系幹細胞にある証拠は多く出されているが、リンパ球系幹細胞にもあるのかどうかははっきりしていない<sup>3)</sup>。

本研究では放射線誘発染色体不安定性がMDS患者の多能性幹細胞に起きているのではないかと、そして、その染色体不安定性およびDNA修復欠損がMDSの進展に関与しているのではないかと、言う仮説を立てた。染色体不安定性は自然小核頻度で、放射線感受性はX線誘発小核頻度で、塩基対除去修復(NER)遺伝子の発現レベルはRT-PCR法で、細胞周期チェックポイントはフローサイトメーターで調べて幾つかの実験結果を得たので報告する。

## 材料と方法

血液サンプル: 5人の正常人と23人のMDS患者からインフォームドコンセントを得て数mLの末梢血を得た。MDS患者の内訳は男性16人、女性7人で、1人を除いて全員が被爆者である。MDSの血液像から、11人のRA、1人のRARS、5人のRAEB、6人のRAEB-Tに分類された。B細胞株の樹立のためには、正常人とMDS患者から新たに末梢血を得ている。

X線照射: 220 kVp, 8mA, 1Gy/分の条件で照射した。

小核アッセイ: 方法は既に報告してあるので<sup>4,5)</sup>、簡単に述べる。全血を20%胎牛血清とPHAを含むRPMI1640培養液中で培養した。42時間後にサイトカラシンB(最終濃度3 μg/ml)を添加後、更に24

時間培養を続ける。カルノア固定液(メタノール:酢酸=3:1)で固定し、2%ギムザ液で染色後、顕微鏡下で二核細胞中の小核数を数えた。

RNA抽出: Ficol-Paque遠心法で血液から単核細胞を分離し、Trizol (GIBCO BRL, Grand Island, NY, USA; catalogue no. 15596-018)でRNAを抽出した。RNAにDNaseの処理は行わなかった。

RT-PCR: 4種のNER遺伝子を増幅するためのプライマーのデザインはChengらの報告<sup>6)</sup>にしたがった。RNAのモニターはβ-アクチンを用いた。β-アクチンのmRNAの増幅には5'CAACA CCTTCTACAATGAG3'と5'GGTCTCAAACA TGATCTG3'のプライマーを用いた。RNAとプライマーをmRNA Selective PCR Kit Ver.1.1. (Takara, Japan; catalogue no. RR025A)に混合して、42°Cで30分間の処理後、85°C1分、47°C30秒、72°C30秒の25回のPCRを行った。mRNA Selective PCR Kit Ver.1.1にはdGTPの類似体dITPを含んでいるので、アニーリング温度が低く設定でき、そのためにRNAサンプル中に混在するDNAの増幅は抑えられる<sup>7)</sup>。RT-PCR産物は8%アクリルアミドゲルの電気泳動で分離した。

Bリンパ球細胞株の樹立: Ficol - Paque遠心法により、ヘパリン処理した末梢血から単核細胞を分離した。PBS(-)で2回洗浄後に遠心して細胞を集めた。1×10<sup>3</sup>細胞を1mlのEpstein-Barrウイルス(EBV)を含む培養液に懸濁して、37°Cで二時間の振とう培養(1分あたり50ストローク)を行なった。20% FCSと0.75 μg/mlのサイクロスポリンAを含むRPMI1640培養液の2mlを添加し、1mlずつ24穴培養プレートに分注した。5% CO<sub>2</sub>, 37°Cの条件下で2-4週間後に増殖してくる細胞を回収した。

細胞周期の解析: 6GyのX線を照射後、4, 8, 12, 16, 20, 24, 36, 48時間目に細胞を回収し、70-75%エタノールで固定した。Rnase A(1mg/ml PBS)処理後、Propidium Iodine (PI)で核を染色

した。各細胞当たりのDNA量をフローサイトメーターで比較した。

結 果

1人につき1000個の二核細胞中の自然小核数を調べた。対照群5人での平均値は $27.6 \pm 8.8$  (S.D.)であった。対照群に比べてMDS患者のほうにたくさんの小核が観られ、その数は、RA, RARS, RAEB, RAEB-Tの順にMDSの病態が進展するにしたがって増加した。特に、RAEBおよびRAEB-T群での小核数の増加は対照群に比べて統計的に有意であった<sup>9,10</sup>。

MDS患者の末梢血の放射線感受性を検討することを目的に、末梢血に0, 0.5, 1.0, 2.0GyのX線を照射後の小核数を数えた。自然小核頻度には大きな個人差があるので、被照射サンプルの小核頻度から0 Gyでの小核頻度を差し引いた値、即ち、X線誘発頻度を個人の放射線感受性として比較した。すべての血液サンプルの線量-反応関係において、線量依存性の上昇が観られた。しかし、同じ線量の放射線を照射されても、対照群に比べてMDS患者群では小核数が有意に多かった。しかも、放射線感受性はMDS病態の進展にしたがって高くなっていった<sup>9,10</sup>。

MDSの放射線高感受性を考えるために、DNA修復遺伝子の発現レベルをRT-PCR法で調べた。2名のMDS患者からは十分量の血液を得られなかったためにRNA抽出を行わなかった。現在までに非常にたくさんのDNA修復遺伝子が確認されているが、本研究ではまずERCC1, ERCC3, ERCC5, XPCについて調べた。RNA量は $\beta$ -アクチンでモニターした。RT-PCRの結果をMDSのサブセット毎にまとめると、10名のRAおよびRARS患者群の中でたった1名にERCC5の発現低下が見られたのに対して、11名のRAEBおよびRAEB-T患者群では4名に複数の遺伝子の発現低下が観察された<sup>9,10</sup>。

健康人由来Bリンパ球細胞にEpstein-Barrウイルス(EBV)が感染して最初に発現するEBV遺伝子はEBNA-2とEBNA-LPである。このうち、EBNA-LPタンパク質がp53タンパク質およびRBタンパク質と結合することによってそれらの癌抑制遺伝子産物の働きを阻害することが、EBVによるBリンパ球細胞の永久増殖化に必須であると考えられている。図1(a)は、健康人由来Bリンパ芽球細胞に6Gy照射した場合の各細胞周期における細胞の割合を示す。p53タンパク質が不活性化されているために、所謂G1期停止が観られな

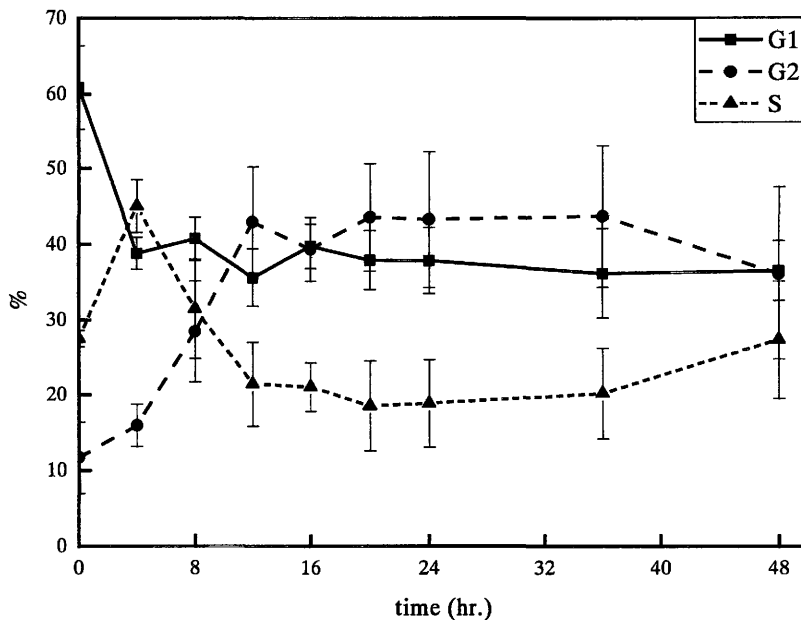


図1 EBVで株化樹立させたBリンパ芽球細胞に6GyのX線を照射し、各細胞周期における細胞の割合を経時的にフローサイトメトリーで測定した結果。  
(a) 5人の正常健康人から樹立したBリンパ芽球細胞での平均

い。しかし、G2/M期停止はp53タンパク質に非依存的であるために、G2/M期停止が明瞭に観察された。放射線照射されたMDS-Bリンパ芽球細胞では、健常人由来細胞とよく似た反応を示すB細胞株も見られるが(図1(b))、G2/M期での停止が完全でなく、M期をすり抜けた細胞の一部がG1期に進行するためにG1期細胞の減少が非常に少ないB細胞株も見られた(図1(c))。

## 考 察

細胞分裂の際に、染色体あるいは染色体断片が娘核に取り込まれないで細胞質に残される場合がある。このとき、それらは細胞質中で小核を形成する。小核は一回の細胞分裂を経た細胞に観察されるので、分裂した細胞と未分裂の細胞とを区別する目的で、細胞をサイトカラシンBで処理

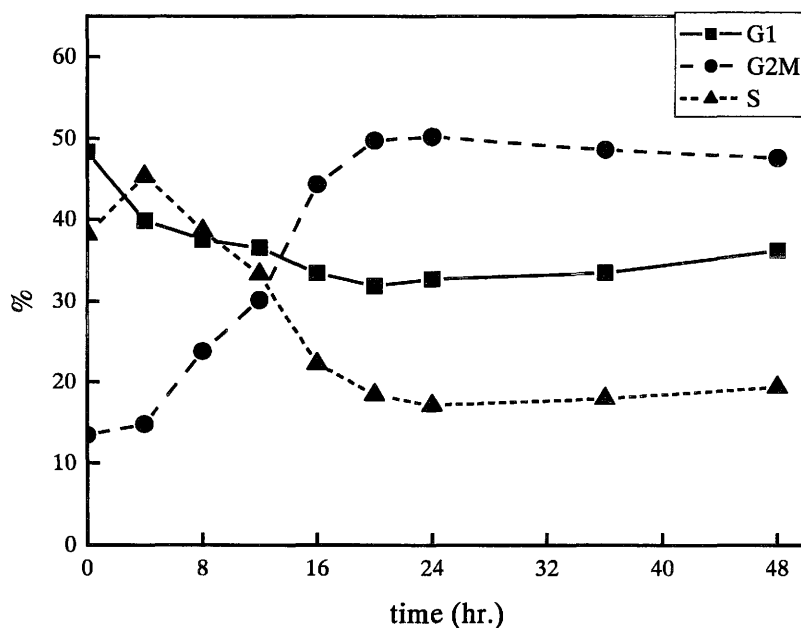


図 1 (b) MDS患者(0908)由来Bリンパ芽球細胞

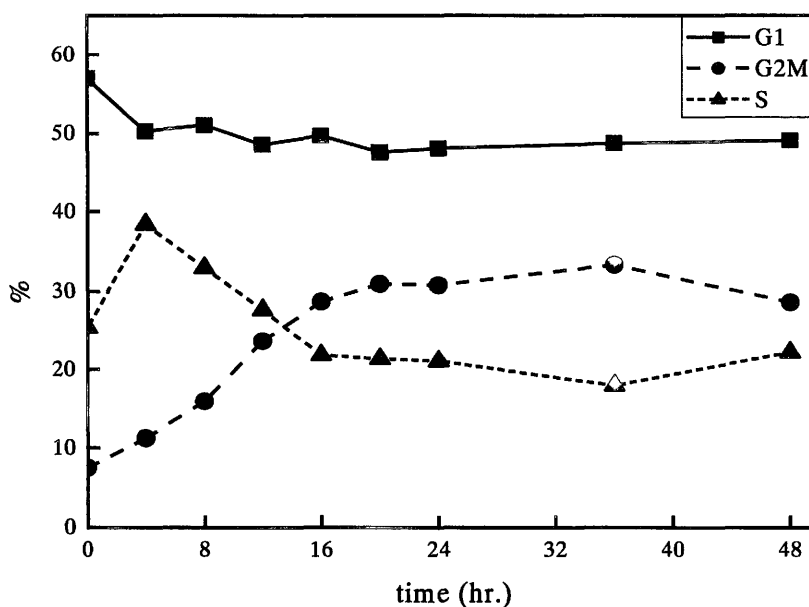


図 1 (c) MDS患者(1125)由来Bリンパ芽球細胞



した。この薬物は、核の分裂は止めないが、細胞質の分裂を阻害する働きを持つ。したがって、サイトカラシンB処理後に出現する二核細胞を分裂細胞として、これらの二核細胞中の小核頻度を求めた。自然に出現する小核形成の機構は染色体分配の不均等によると考えられている。染色体の不均等分配による染色体の消失あるいは獲得は、癌細胞に特異的な染色体不安定性の指標である異数性を引き起こす。言い換えれば、自然小核頻度を求めることは、染色体不安定性を評価する上で技術的に最も簡単な方法の一つであると考えられている<sup>9)</sup>。最初に、MDS患者から得られた末梢血液中の自然小核頻度を比較した。正常人の末梢血T細胞よりもMDS患者の末梢血T細胞で自然小核頻度が高かった<sup>10)</sup>。末梢血細胞での染色体不安定性が個人の癌感受性を評価する上で有用であるかどうかは大きな問題である。前癌病変ORLsは口腔内あるいは口腔咽頭部にできる白斑症または赤色肥厚症のことであり、口腔癌に進展するリスクの高い疾患である。Wuら<sup>11)</sup>は、ORLs患者から得られた末梢血リンパ球細胞に染色体不安定性の高いことを観察した。即ち、特定の前癌病変の染色体不安定性を評価する上で、末梢血リンパ球細胞は有用な材料であることが示唆された。

放射線は非常に効率良く小核を誘発する。その誘発頻度は放射線線量に依存して増加し、ヒト放射線感受性を評価する上で非常に有効な方法であることが認められている<sup>4)</sup>。MDS患者は放射線感受性が高く、その程度はMDS症状と関連していた<sup>10)</sup>。MDSの高感受性の原因はまずDNA修復遺伝子の発現異常に求められる。現在までに非常にたくさんのDNA修復遺伝子が同定されているが、電離放射線誘発損傷の修復に特異的に関わる遺伝子はまだ同定されていないように思われる。それで、我々の研究室でRT-PCRの条件が既に整っていた複数のNER遺伝子の発現レベルを調べた。わずか4種のNER遺伝子を調べただけなのに、臨床症状の軽い患者グループよりも、重いグループにより頻繁に発現レベルの低下が観察された<sup>10)</sup>。MDSの臨床症状は多段階で進行すると説明されている<sup>8)</sup>。我々の得た放射線感受性およびNER遺伝子の発現に関する結果はMDSの多段階説に一致している。まだ例数が少ないものの、G2/M停止の欠損しているMDS-Bリンパ芽球細胞株が

あった。G2/M停止欠損の大きさはMDS患者の症状に依存していることが考えられるので、今後更に例数を増やして、MDSの重篤度とG2/M停止喪失の大きさとの関係を調べる予定である。G2/M停止の喪失は染色体不安定性を誘導し<sup>11)</sup>、さらには放射線感受性を高めることも示唆されている<sup>12)</sup>。我々の結果は、DNA修復遺伝子の発現低下およびG2/Mチェックポイントに関与する遺伝子の欠損がMDSの重篤度あるいは放射線高感受性の原因の一つであることを示唆する。

以上のデータを踏まえて、今後は、MDS患者の多能性造血幹細胞における遺伝子発現をマイクロアレイ技術で調べることによって、MDS発生に関わる遺伝子群を同定する計画をしている。さらには、自然発生MDSに関わる遺伝子群と比較することにより、原爆放射線誘発性の染色体不安定性あるいは遺伝的不安定性の原因を探ることを計画している。こういった研究は、原爆被爆者間のMDSのERRが高い理由を明らかにし、ひいてはMDSに対する治療方法を考える上でも極めて有用な情報を与えるものと思われる。

## 結 論

正常人の末梢血T細胞よりもMDSを発症した原爆被爆者の末梢血T細胞で自然小核頻度が高かったこと、および株化されたMDS由来Bリンパ球細胞においてG2/Mチェックポイントの低下がみられることから、原爆放射線が多能性造血幹細胞に染色体不安定性を誘発したことがMDS発症の一原因であることが示唆される。更に、MDS患者が放射線高感受性であること、MDS患者にDNA修復遺伝子の発現低下が観られること、およびG2/Mチェックポイントが減少していることから、DNA修復あるいは細胞周期制御に関与する遺伝子(群)の欠損がMDS病態の進展に関与していると思われる。

## 参考文献

- 1) Kimura A., Oda K. *et al*: Strong radiation effect for myelodysplastic syndrome (MDS) among atomic survivors. *Int. J. Hematology* 72 (Suppl.), 110, 2000.
- 2) 蔵本 憲, 木村昭郎, 伴 貞幸: 骨髄異形成症候群 - 放射線リスクの高い血液疾患。放射線生物研

- 究 37, 115 - 133, 2002.
- 3) Koeffler H.P: Myelodysplastic syndrome (Preleukemia), *Seminars in Hematology* 23: 284-299, 1986.
  - 4) Ban S, Cologne J.B. *et al*: Radiosensitivity of atomic bomb survivors as determined with a micronucleus assay. *Radiation Research* 134: 170-178, 1993.
  - 5) Ban S., Shinohara T. *et al*: Chromosomal instability in BRCA1- or BRCA2-defective human cancer cells detected by spontaneous micronucleus assay. *Mutation Research* 474:15-23, 2001.
  - 6) Cheng L., Guan Y. *et al*: Expression in normal human tissues of five nucleotide excision repair genes measured simultaneously by multiplex reverse transcription-polymerase chain reaction. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention* 8: 801-807, 1999.
  - 7) Auer T, Sninsky J.J. *et al*: Selective amplification of RNA utilizing the nucleotide analog dITP and *Thermus thermophilus* DNA polymerase. *Nucleic Acids Research* 24: 5021-5025, 1996.
  - 8) Raskind WH, Tirumali N *et al*: Evidence for a multistep pathogenesis of a myelodysplastic syndrome. *Blood* 63: 1318-1323, 1984.
  - 9) Ban S., Kuramoto K. *et al*: Radiosensitivity and Expression of Nucleotide Excision Repair Genes in Peripheral Blood Mononuclear Cells of Myelodysplastic Syndrome Patients. In 'Radiation and Homeostasis' ICS1236, pp67-69, (Eds. T. Sugahara, O. Nikaido, O. Niwa), Elsevier Science, The Netherlands, 2002.
  - 10) Kuramoto K., Ban S. *et al*: Chromosomal instability and radiosensitivity in myelodysplastic syndrome cells. *Leukemia* 16: 2253-2258, 2002.
  - 11) Wu X., Lippman S.M., *et al*: Chromosome instability in lymphocytes: a potential indicator of predisposition to oral premalignant lesions. *Cancer Res.* 62, 2813-2818, 2002.
  - 12) Ethemann V., Eifert B., *et al*: Flow cytometric DNA analysis and chromosomal aberrations in malignant glioblastomas. *Cancer Letters* 138, 101-106, 1999.
  - 13) Bache M., Pigorsch S., *et al*: Loss of G2/M arrest correlates with radiosensitization in two human sarcoma cell lines with mutant p53. *Int. J. Cancer* 96, 110-117, 2001.



### Ⅲ. 遺伝統計学の論理と手法



### Ⅲ. 遺伝統計学の論理と手法

鎌谷 直之

東京女子医科大学膠原病リウマチ痛風センター  
大学院先端生命医科学系専攻遺伝子医学分野

Logics and methods for statistical genetics

Naoyuki Kamatani

Tokyo Women's Medical University

---

#### 〈Abstract〉

---

There are various methods used to identify loci responsible for a trait. A trait is a set of phenotypes associated with a locus in question. Those can be related to the diseases and the outcomes of the drug therapy. Those methods are based on different logics in statistical genetics. Different methods are suited for different types of materials. For the linkage analysis in which materials from families are used, both parametric and nonparametric linkage methods are used. For the materials from separate subjects, methods based on the linkage disequilibrium are used. One of the major differences between the linkage analysis and the linkage disequilibrium analysis is that, in the former, the positive region is wide, while in the latter, it is considerably narrow. We have developed computer programs for the analysis of linkage disequilibrium. In the program named ldsupport, the algorithm to infer haplotype frequencies in the population as well as the diplotype configuration for each subject was implemented. On the other hand, ldpooled infers haplotype frequencies on pooled DNA samples. Both programs infer haplotypes very accurately when SNPs are in strong linkage disequilibria and both of them are of considerable frequencies. The programs to infer haplotypes have been useful for various purposes. For example, the haplotypes explained more efficiently the outcomes of the drug treatment of rheumatoid arthritis.

---

#### 1 どのような遺伝統計学的手法を選ぶか

遺伝統計学手法にもいろいろあり、対象とすべき遺伝的形質の種類も異なるし、必要なサンプルの種類も異なる。以下に、主な解析の手法とそれ

に適したサンプル、結果の特徴などについて概説する。表 1 に各種遺伝統計学的手法の特徴を示した。

いわゆる狭義の遺伝病とは、一座位が関係する疾患で、しかも浸透率が高い疾患である。Mendel

表1 種々の連鎖解析, 連鎖不平衡を利用した解析

解析の方法	適する対象集団	集団の構造化による問題	陽性領域
パラメトリック連鎖解析 <sup>1</sup>	少数大家系	最小	広い
ノンパラメトリック連鎖解析 <sup>1</sup>	多数小家系	小	広い
TDT, S-TDT	多数小家系	小	狭い
連鎖不平衡解析 <sup>2</sup>	多数の患者と対象者	中	狭い
関連解析	多数の患者と対象者	大	狭い
家系内関連解析	多数の患者と家族	小	狭い

<sup>1</sup>狭義の連鎖解析 <sup>2</sup>ハプロタイプ解析を含む

型遺伝病という範疇の疾患である。このような疾患の座位を見つけるために最適の手法がパラメトリック連鎖解析である。しかし、Mendel型以外の疾患、例えば二つ以上の座位が関係している複雑な形質の場合はこの手法では分析が困難である。そのような形質の座位を推定するための手法がノンパラメトリック解析である。ノンパラメトリック解析の代表は罹患同胞対解析である。

パラメトリック連鎖解析とノンパラメトリック連鎖解析の違いは、検定、推定にMendel型遺伝形式を仮定するか否かである。Mendel型遺伝形式を仮定した上で検定、推定を行う手法をパラメトリック連鎖解析、仮定しないで行う手法をノンパラメトリック連鎖解析という。Mendel型遺伝形式を仮定するとは、それぞれの遺伝子型の浸透率を与えるということである。以上の二つの手法が狭い意味での連鎖解析である。

連鎖解析以外の手法はほとんどすべて連鎖不平衡を利用した解析法である(原因突然変異について検定を行う場合は連鎖不平衡を利用したものではない)。それらの手法には関連解析, 連鎖不平衡解析, TDT (transmission disequilibrium test) などがある。

## 2 連鎖解析

連鎖解析には、パラメトリック連鎖解析とノンパラメトリック連鎖解析がある。今回は、紙面の関係で連鎖解析についての記述は省略した。次の文献を参照してほしい<sup>1)</sup>。

## 3 Linkage disequilibrium (連鎖不平衡)

連鎖不平衡の概念は遺伝統計学で最も大切な概念の一つである。連鎖と連鎖不平衡とはどう違うのか、など、正確に理解する必要がある。連鎖の

概念は、Mendelの独立の法則の例外であることは前述した。そして、独立とは純粹に確率的な概念であることを述べた。真の連鎖不平衡は連鎖を前提とした概念である。しかし、連鎖が無くても統計的に複数座位のアレルが個人へ分布する場合の非独立性があれば連鎖不平衡と呼ぶこともある。後者は要するに、集団の構造化などの場合である。連鎖不平衡も、このように、連鎖と同様、確率的な概念である。

複数の連鎖する座位があると、それぞれの座位に一人の個人について、一つの遺伝子型が存在する。そして家系情報が十分に得られれば個人のディプロタイプ形(二つのハプロタイプの組み合わせ)が確定できる。個人のハプロタイプとは、それぞれの座位のアレルを由来親ごとにまとめたリストである。

連鎖不平衡とは、集団におけるハプロタイプの分布に関する概念である。ディプロタイプ形は二つのハプロタイプの組み合わせなので、集団には個体数の二倍のハプロタイプが存在する。このハプロタイプが連鎖する $n$ 個の座位についての情報であるとする。あるハプロタイプ $H_i$ の座位 $j$ におけるアレルのアレル頻度を $p_{ij}$ とすると、ハプロタイプ $H_i$ の集団における頻度が $\Pi_j p_{ij}$ のとき連鎖平衡にあるという。即ち、ハプロタイプ頻度がアレル頻度の積で表されるとき(即ち独立のとき)、連鎖平衡という。連鎖平衡にない状態を連鎖不平衡という。

もし、集団が十分に大きく、すべての突然変異の起きた後に十分な時間がたち、しかもアレル頻度に変化が無ければ連鎖平衡が達成されているであろうと予想される。しかし、実際には集団は十分に大きくなく、十分な時間はたっていない、しかもアレル頻度には変化がある。また近い過去に二

つの連鎖平衡が達成された集団が混合したなら、混合集団には強い連鎖不平衡があると予想される。一般に、近い遺伝的距離の中では世界のほとんどの集団で強い連鎖不平衡が存在する。距離が離れた多型であるほど連鎖不平衡の程度は低い。新しい突然変異に関係したハプロタイプほど強い連鎖不平衡があると予想され、集団の有効な大きさが大きいほど弱い連鎖不平衡があると予想される。

連鎖不平衡の存在は、遺伝統計学のための多くの手法を提供する。中でも、common-disease common-variant common-originという予測が正しければ(即ち、ありふれた疾患の原因の変異が共通祖先突然変異に由来するものであれば)、疾患の変異と周囲の変異に強い連鎖不平衡が存在し、連鎖不平衡を利用して疾患関連部位を探し出すことができる(連鎖不平衡解析による疾患遺伝子発見)。

#### 4 ハプロタイプ推定LDSUPPORTとプールされたハプロタイプ推定LDPOOLEDのアルゴリズム

次のような一つの実験を考える。連鎖するL個の座位について、可能なハプロタイプすべて(SNP座位であれば $2^L$ 個)の頻度を非決定論的に決める。この頻度を $\Theta = (\theta_1, \dots, \theta_M)$ とする。ただし、Mは可能なハプロタイプの数で、 $\theta_i$ はi番目のハプロタイプの頻度とする( $\sum_{i=1}^M \theta_i = 1$ )。 $\Theta$ に従ってn人の個体にハプロタイプを二つずつ非決定論的に配布する。それぞれの個体は順番付きのハプロタイプを二つ与えられる(これを順列ディプロタイプ形ということにする)。 $d_i$ をi番目の個人に与えられた順列ディプロタイプ形とし、 $D = (d_1, d_2, \dots, d_n)$ とする。

このような実験の一つの結果は $(\Theta, D)$ によって表され、一つの結果はL個のすべての座位について、すべての個体の遺伝子型を決定する。実際にはすべての個体の遺伝子型はDのみによって決まる。

標本空間は非可算無限である。 $\Theta$ の条件下で $d_1, d_2, \dots, d_n$ は互いに独立である。即ち、 $P(D | \Theta) = \prod_{i=1}^n P(d_i | \Theta)$ 。

Hardy-Weinberg平衡を仮定するので、 $d_i$ を構成するハプロタイプがj番目とk番目であるとすると、 $P(d_i | \Theta) = \theta_j \theta_k$

すべての個体についての観察された遺伝子型を $G = (g_1, \dots, g_n)$ とする。ここで、 $g_k$ はk番目の個人のL個の座位についての遺伝子型の全体で $g_k = (g_{k1}, \dots, g_{kL})$ とする。ただし、 $g_{kL}$ はk番目の個人のj座位の遺伝子型(順列ではなく組み合わせ)とする。

尤度関数は、単に標本空間 $\Omega$ の要素である結果 $(\Theta, D)$ のうち、Gと合致するものの集合の $\Theta$ のもとの条件付確率であり、

$$L(\Theta) = P(G | \Theta) = P(g_1, g_2, \dots | \Theta) = \prod_{k=1}^n P(g_k | \Theta) \quad (1)$$

$P(g_k | \Theta)$ は出来事 $d_k$ のうち、単に $g_k$ に合致するものの集合 $(d_k \cap g_k)$ の確率であり、

$$P(g_k | \Theta) = \sum_{Q_k \in (i,j)} \theta_i \theta_j \quad (2)$$

ただし、 $Q_k$ は $g_k$ に合致する $d_k$ を構成するハプロタイプの番号の順列の集合である。

即ち、尤度関数は、

$$L(\Theta) = \prod_{k=1}^n \sum_{Q_k \in (i,j)} \theta_i \theta_j \quad (3)$$

これを $\Theta$ の上で最大化すればよい。

EMアルゴリズムによりこれを最大化し、最尤推定値 $\hat{\Theta}$ のもとの $d_k$ の確率分布 $P(d_k | \hat{\Theta})$ を求めるプログラムがLDSUPPORTである<sup>2)</sup>。

ここで、 $\Theta$ の最尤推定量 $\hat{\Theta} = (\hat{\theta}_1, \dots, \hat{\theta}_n)$ は次の等式を満足する。

$$\hat{\theta}_i = E(n_i | G, \hat{\Theta}) / 2n$$

ただし、 $n_i$ は特定のDのもとのi番目のハプロタイプの数である。従って、上式はGに合致するすべてのDの上で平均したi番目のハプロタイプ数の期待値である。

これは最尤推定値の内部無矛盾性を表現したものであり、これにより以下のEMアルゴリズムの繰り返し過程が生まれる。

すべての $i (i=1, 2, \dots, M)$ について、 $\theta_i^{t+1} = E(n_i | G, \Theta^t) / 2n$ 。

ただし、 $\theta^t$ はt回目のステップでのハプロタイプ頻度のベクトル、 $\theta^{t+1}$ はt+1回目のステップでのi番目のハプロタイプの頻度である。

これを繰り返し、 $\Theta^t$ が収束したところで中止する。また、最尤推定量 $\hat{\Theta}$ のもとの $d_k$ の事後確率 $P(d_k | \hat{\Theta})$ を計算する。

ハプロタイプ推定の問題を詳細に検討すると、プール問題に還元できる。一人の個人は二つのハ



プロタイプを持ち、その二つが混合していて情報が劣化している。そのような不完全な情報から完全情報を推定する、という問題がハプロタイプ推定問題の本質である。これを一般化すると次のような問題になる。

多くのハプロタイプが、それぞれ $2m$ 個のハプロタイプを含む多くの小集団に混合されている。そのため、それぞれの混合されたプール単位で劣化された情報が観察される。そのように、不完全になった情報から完全情報を推定する。このように、一般のハプロタイプ推定問題を拡張したプログラムがldpooledである<sup>3)</sup>。通常ハプロタイプ推定問題は、このように拡張された $2m$ 個のハプロタイププールからの推定の問題の中で単に $m=1$ の特殊な場合である。

即ち、ldpooledで最大化される尤度関数は、

$$L(\Theta) = \prod_{k=1}^n \sum_{Q_{kj} \in R_k} \prod_{i \in Q_{kj}} \theta_i \quad (4)$$

ただし、 $R_k$ は $k$ 番目のプールのデータに合致するすべてのハプロタイプの順列の集合、 $Q_{kj}$ は $R_k$ の $j$ 番目の要素であるハプロタイプの順列、 $Q_{kj}$ は $Q_{kj}$ の因子であるハプロタイプの番号の集合である。

ハプロタイプ推定に関してはいくつかのアルゴリズムが発表されている。特に、分子進化のcoalescenceモデルを用いて $P(\Theta)$ を計算し、Gibbs samplerを用いてMCMCを動かすPHASEアルゴリズム<sup>4)</sup>、同様のGibbs samplerを用いる

PLアルゴリズム<sup>5)</sup>などが興味深い。

#### 参考文献

- 1) 鎌谷直之編 ポストゲノム時代の遺伝統計学 羊土社, 2001
- 2) Kitamura Y., Moriguchi M., Kaneko H., Morisaki H., Morisaki T., Toyama K., Kamatani N (2002) Determination of probability distribution of diplotype configuration (diplotype distribution) for each subject from genotypic data using the EM algorithm, *Am. Hum. Genet.*, **66**, 183-193, 2002
- 3) Ito T., Chiku S., Inoue E., Tomita M., Morisaki T., Morisaki H., Kamatani N. Estimation of haplotype frequencies, linkage disequilibrium measures and combination of haplotype copie in each pool using pooled DNA data. *Am. J. Hum. Genet.*, **72**, 384-398, 2003.
- 4) Stephens M., Smith N. J., Donnelly P. A new statistical method for haplotype reconstruction from population data. *Am. J. Hum. Genet.*, **68**, 978-989, 2001
- 5) Niu T., Qin Z. S., Xu X., Liu JS. Bayesian haplotype inference for multiple linked single-nucleotid polymorphisms. *Am. J. Hum. Genet.*, **70**, 157-169, 2002

## **IV. 分子レベルでの放射線応答解析**

---

## IV. 分子レベルでの放射線応答解析

### 1. 薬剤感受性データベースとバイオインフォマティクス

矢守 隆夫

(財)癌研究会 癌化学療法センター分子薬理部

#### Drug Sensitivity Database and Bioinformatics

Takao Yamori

Japan Cancer Research Center

---

#### 〈Abstract〉

---

Cancer chemotherapy is expected to play more important roles in overcoming cancer. There are two important aspects to realize innovative cancer chemotherapy. One is to develop more effective new anticancer drugs. Another is to develop personalized medicine. We have been doing drug discovery by using a human cancer cell lines panel. In addition, we have been studying gene expression profiles of human cancer cell lines that closely relate to chemosensitivity. We established a panel of 39 cancer cell lines of various human cancers, and developed a database of their chemosensitivities. Each drug was profiled in terms of its fingerprint that is a differential activity pattern against 39 cell lines. We observed significant correlation between a drug fingerprint and its mode of action. Based on this nature, the 39 cell lines panel system turned out to be a powerful tool to predict modes of action of new compounds. We have been using it for drug discovery. Recently, we have found by the system a novel DNA minor groove binder MS-247, which had inhibitory activities against topoisomerases I and II and potent in vivo antitumor activity against various human cancer xenografts (*Cancer Res.* **59**: 4042-9, 1999). We also discovered a potent novel telomerase inhibitor FJ5002 by mining our database with the COMPARE algorithm followed by experimental validation (*Cancer Res.* **59**: 4004-11, 1999). We have recently established another 45 cell lines panel including stomach-, liver- and breast cancers, and again observed the correlation between a drug fingerprint and its mode of action. We have combined all the chemosensitivity data and compared 73 cell lines for the chemosensitivity to 65 anticancer drugs. Various chemosensitivity patterns appeared among the 73 cell lines. However, cluster analysis of the cell lines by chemosensitivity revealed that they were clustered into several groups. These results may indicate that our cell lines panel can be a good model to study personalized chemotherapy. We have currently started to investigate gene expression profiles of the cell lines by using DNA micro arrays and protein chips in order to find gene expression



profiles determining cellular chemosensitivity and to find new targets of anti cancer drug (Cancer Res. 62: 1139-1147, 2002). Our integrated database including chemosensitivities and gene expression profiles of a panel of various human cancer cell lines will provide a basis for drug discovery and tailor-made therapy.

がん克服へ向け抗がん剤をベースとしたがん化学療法への期待は大きい。よりすぐれたがん化学療法の実現のために、有効な新規抗がん剤の開発とオーダーメイド化学療法の開発は二つの重要な課題である。われわれは、多数のがん細胞株を集めてがん細胞パネルを樹立し、がん細胞パネルを用いた新規抗がん剤探索研究を行っている。さらに、オーダーメイド化学療法をめざし、がん細胞パネルをモデルとした抗がん剤感受性予測法の開発研究を進めている。

### 1. がん細胞パネルによる抗がん剤探索研究

多数のがん細胞株による薬剤感受性試験とインフォーマティクスとを組み合わせることにより、新規抗がん剤の有力な探索評価系(がん細胞パネル法)が構築できることが米国国立がん研究所およびわれわれの研究でわかってきた<sup>1,2)</sup>。がん細胞パネル法は、がん細胞がもつ個性を利用して斬新

な作用メカニズムをもつ有望物質を効率よく見つけ出せる画期的方法である。われわれは、39系のヒト培養がん細胞株を集め、その薬剤感受性を一括して調べデータベース化することで、一つの薬剤によって細胞が50%増殖阻害を受ける濃度(GI50)はがん細胞株ごとに個性があること、そして、GI50をパネル全体で眺めるとその薬剤に固有のパターン(Fingerprint)となることを示した(Fig.1)。

薬剤のFingerprintを比較するため、われわれは、Paulらの方法<sup>3)</sup>に基づきCOMPAREプログラムを開発した(Fig.2)。抗がん剤など300種類以上の標準物質のFingerprintをデータベース化しCOMPAREプログラムを用いて相互に比較した結果、“薬剤のFingerprintによる分類は作用機作による分類と良く一致する”という重要な法則が明らかとなった。これまで本法を活用し、トポイソメラーゼIおよびIIを阻害し強力な抗がん効果

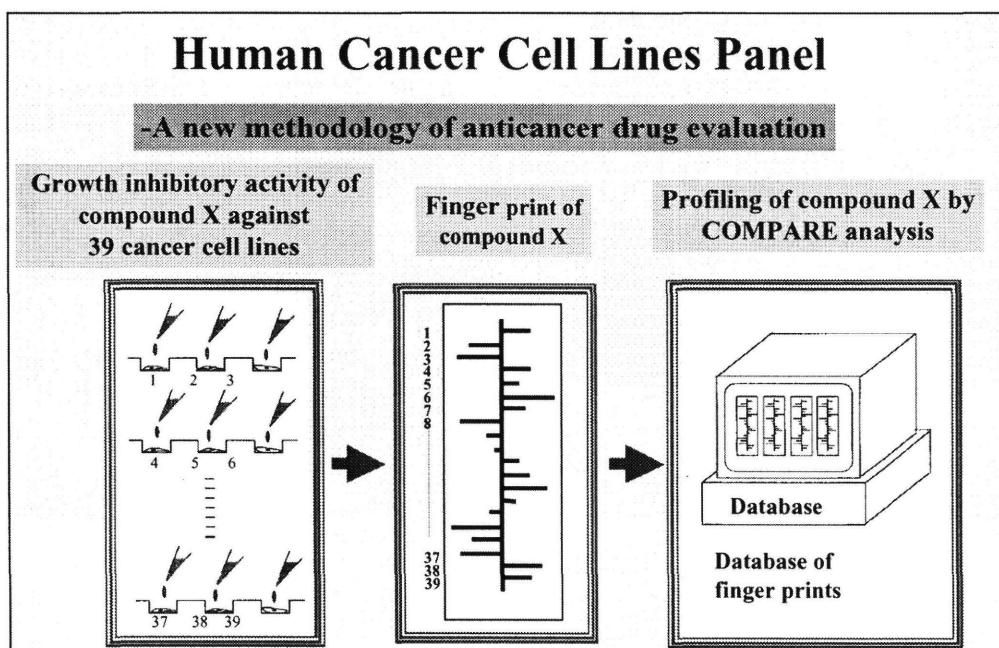


Fig. 1

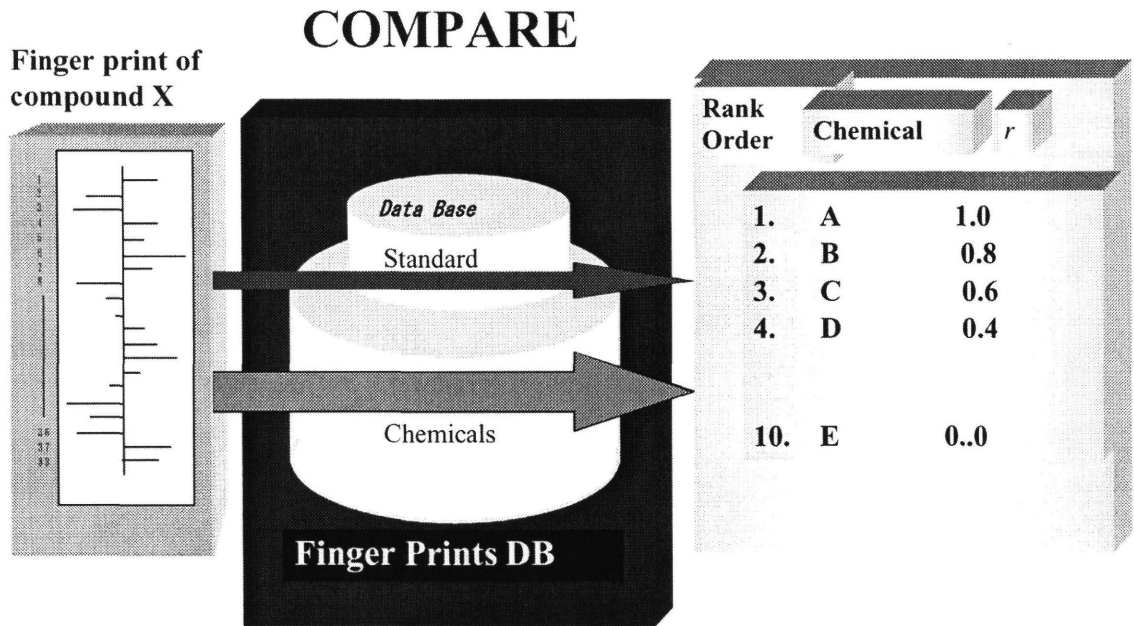


Fig. 2

を發揮する新規物質MS-247<sup>2)</sup>や新規テロメラゼ阻害物質FJ5002<sup>4)</sup>を見出した。

### 2. 抗がん剤の分子薬理研究

オーダーメイドの化学療法の実現には、個々のがんの抗がん剤感受性をいかに予測するかが重要な課題である (Fig.3)。抗がん剤感受性には薬の直接のターゲットだけでなく種々の遺伝子産物が関わっていると考えられる (Fig.4)。われわれは、抗がん剤感受性マーカーとなる遺伝子群を抽出するため、ヒトがん細胞株をモデルに、抗がん剤感受性と遺伝子発現を調べ両者の関連性を解析している。胃がん、肺がん、大腸がん、肝がん、乳がんなど種々のがん細胞株73系の各々について抗がん剤 (約70種類) に対する感受性試験を行い、GI50を調べた結果、がん細胞株の感受性プロフィールには明らかに個性があることが確認された。同時に感受性プロフィールの類似性によるがん細胞株のグループ化が可能であることも示された。一方、これらの細胞株における遺伝子発現プロフィールを発現アレーによって調べた。感受性と遺伝子発現を統合データベース化したのち、データマイニング法により抗がん剤感受性と関連があると考えられる遺伝子群を抽出した (Fig.5)。これらの遺伝子は、抗がん剤感受性マーカーとしてがん細胞の抗がん

### A Problem in Cancer Chemotherapy

Who is the responder?

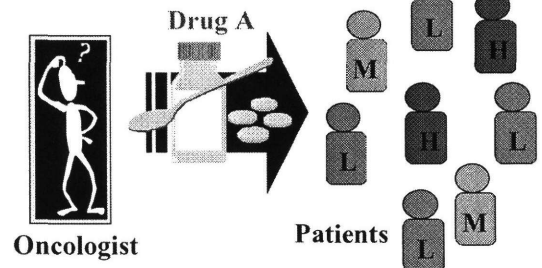


Fig. 3

### Molecular Pharmacology of Anticancer Drugs

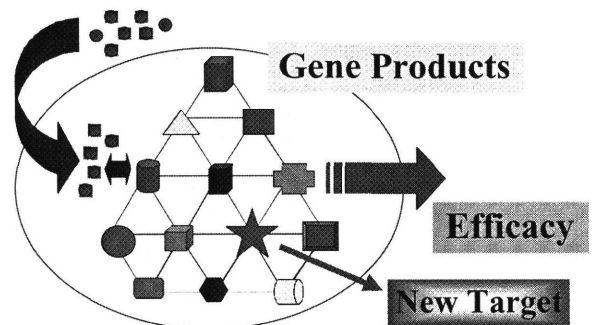


Fig. 4

## 統合データベース化とバイオインフォマティクス

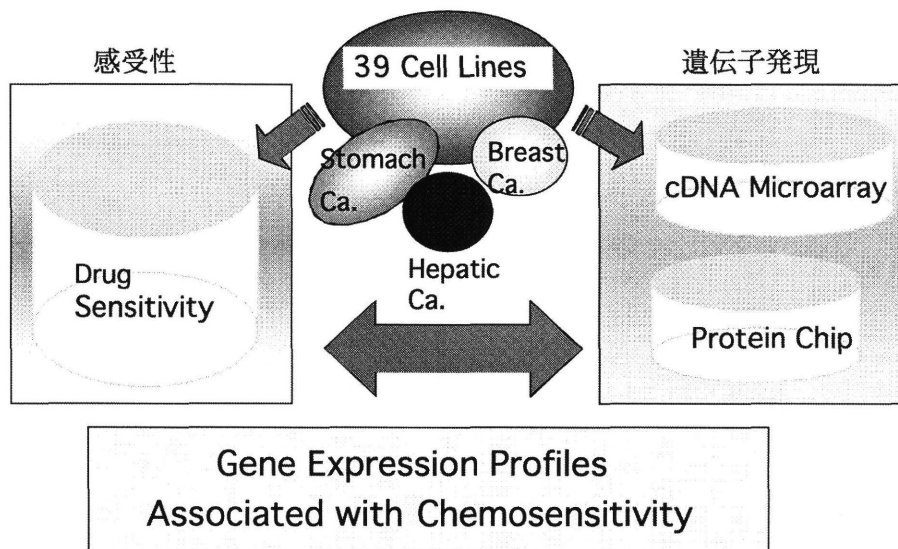


Fig. 5

剤感受性予測に使える可能性がある<sup>5)</sup>。また、このような解析を通じて新たな創薬ターゲットの見つかる可能性も考えられる。

### 参考文献

- 1) Monks, A., Scudiero, D., Skehan, P., Shoemaker, R., Paull, K., Vistica, D., Hose, C., Langley, J., Cronise, P., Vaigro-Wolff, A., Gray-Goodrich, M., Campbell, H., Mayo, J., and Boyd, M. Feasibility of a high-flux anticancer drug screen using a diverse panel of cultured human tumor cell lines. *J. Natl. Cancer Inst.* **83**: 757-66, 1991.
- 2) Yamori, T., Matsunaga, A., Sato, S., Yamazaki, K., Komi, A., Ishizu, K., Mita, I., Edatsugi, H., Matsuba, Y., Takezawa, K., Nakanishi, O., Kohno, H., Nakajima, Y., Komatsu, H., Andoh, T., and Tsuruo, T. Potent antitumor activity of MS-247, a novel DNA minor groove binder, evaluated by an in vitro and in vivo human cancer cell line panel, *Cancer Res.* **59**: 4042-9, 1999.
- 3) Paull, K. D., Shoemaker, R. H., Hodes, L., Monks, A., Scudiero, D. A., Rubinstein, L., Plowman, J., and Boyd, M. R. Display and analysis of patterns of differential activity of drugs against human tumor cell lines: development of mean graph and COMPARE algorithm. *J. Natl. Cancer Inst.*, **81**: 1088-92, 1989.
- 4) Naasani, I., Seimiya, H., Yamori, T., and Tsuruo, T. FJ5002 : a potent telomerase inhibitor identified by exploiting the disease-oriented screening program with COMPARE analysis. *Cancer Res.* **59**: 4004-4011, 1999.
- 5) Dan, S., Tsunoda, T., Kitahara, O., Yanagawa, R., Zembutsu, H., Katagiri, T., Yamazaki, K., Nakamura, Y., and Yamori, T. An integrated database of chemosensitivity to 55 anticancer drugs and gene expression profiles of 39 human cancer cell lines., *Cancer Research.* **62**: 1139-1147, 2002.



## IV. 分子レベルでの放射線応答解析

### 2. 放射線線量効果と細胞内情報伝達

道川 祐市

放射線医学総合研究所 フロンティア研究センター 放射線感受性遺伝子プロジェクト

#### Signal transduction underlying ionizing radiation dose effects on cell growth

Yuichi Michikawa

National Institute of Radiological Sciences

---

#### 〈Abstract〉

---

Phosphorylation / dephosphorylation is commonly utilized in the irradiated cells to transmit intracellular information, such as that monitoring the severity of lesions, effectiveness of repair of damages, and fate of cells. Thus, the radiation dose effects on the flow of information through these intracellular networks should reveal the mechanisms underlying the cellular radiosensitivity, which needs to be monitored before performing radiation therapy on cancer patients. Antibodies that specifically recognize phosphorylated state of amino acids can be utilized to detect phosphorylation / dephosphorylation networks. It will be necessary to identify the antigenic proteins of the anti-phosphorylated amino acid antibody for further understanding. Mass spectrometry, which can determine the amino acid sequence of small peptide, will be important for this purpose. The radiation sensitivity measured by the flow of intracellular information will have general applications as a biomarker reflecting the state of homeostasis of cells in patients affected by various diseases or healthy aging individuals.

#### I. 緒言

細胞は自己の状態を常にモニターし、異常が感知されると速やかに修復活動を行い恒常性を維持することが明らかにされてきている<sup>1)</sup>。放射線を照射された細胞内でも、受けたダメージを感知しその後の修復活動を開始するための指令を送る機構が働く<sup>2)</sup>。現在の技術では検出することができ

ないような異常でも細胞は感知し対応しているものと考えられる。また、修復の遂行具合に応じてそのまま完全な回復を目指すのか、不完全であっても生き残ることを選択するのか、あきらめて死を選ぶのかなどの最終的な運命の決定に伴う情報のやり取りも行われる。従って、放射線を照射された細胞の中で飛び交う情報を何らかの方法で解読することができれば、ダメージそのものを

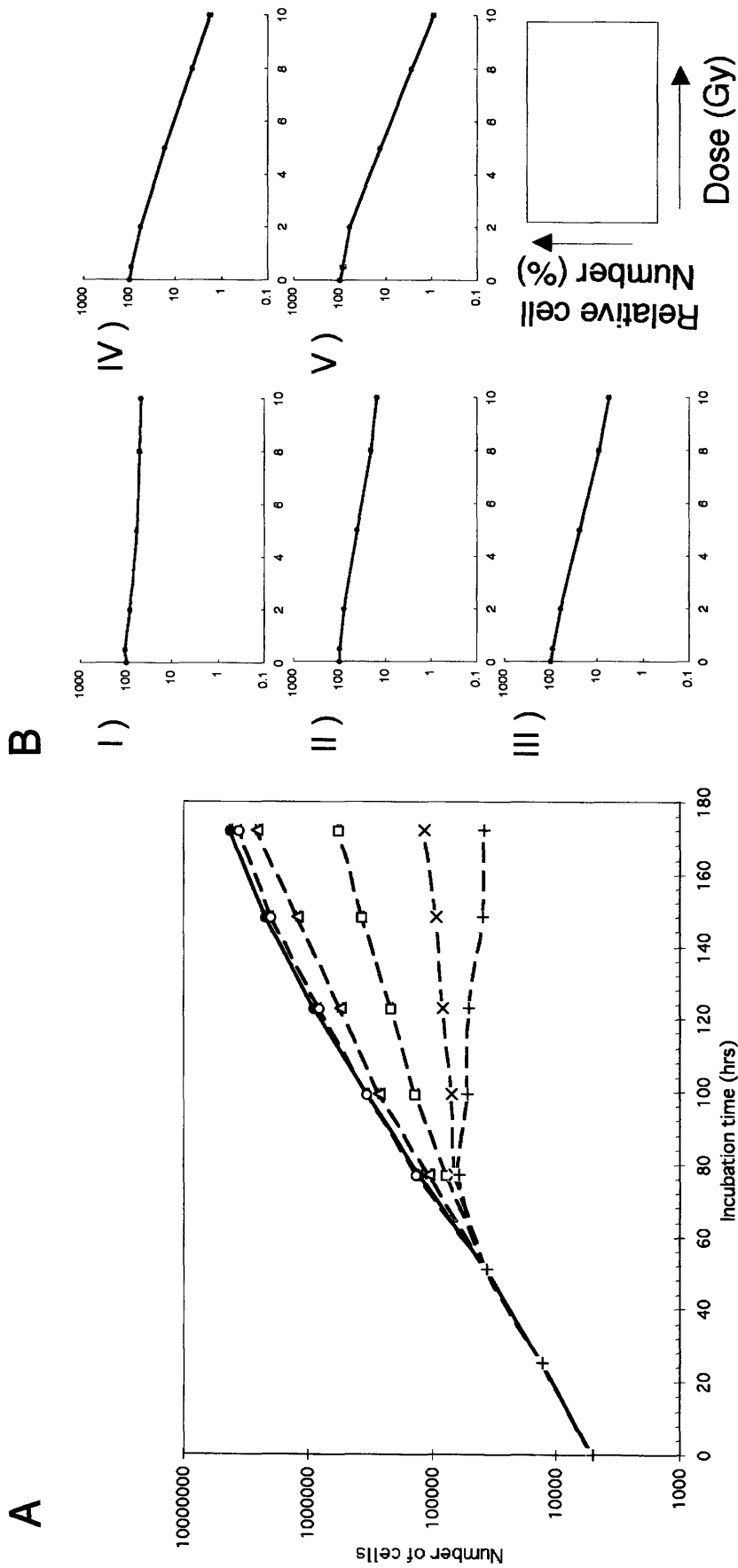


Fig.1 Change of HeLaS3 growth property after X ray exposure.

A. Growth curve.

●: No irradiation, ○: 0.5Gy, △: 1Gy, □: 2Gy, ×: 5Gy, +: 10Gy

B. Dose effect on the number of surviving cells at each time point.

I): Day 1, II): Day 2, III): Day 3, IV): Day 4, V): Day 5

人為的に検出することができなくてもその細胞が置かれている状況を把握することが可能になると考えられる。DqやD10という放射線感受性の指標となる線量を照射した場合、情報を読み取ることによってその細胞の放射線感受性の原因となる因子を明らかにする可能性も出てくる。

## II. 実験

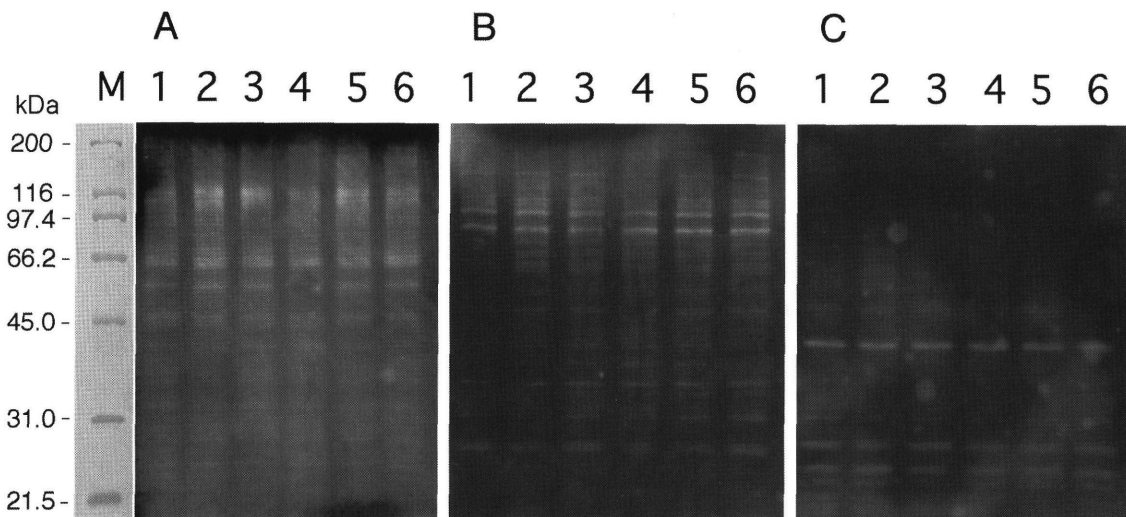
### 1. 細胞レベルでの放射線線量効果

まずHeLaS3をモデル細胞として用い、放射線照射後の細胞レベルでの挙動変化を経時的に検出するために5日後までの増殖曲線を作成した。放射線はX線を用い、0, 0.5, 2, 5, 8, 10Gyの線量をそれぞれ播種2日後の対数増殖期への移行が確認されたHeLaS3に照射した。図1Aは横軸に時間、縦軸に細胞数をプロットしたグラフであるが、HeLaS3では照射線量に応じた増殖能の低下が照射1日後から検出され、また減少した増殖速度は5日後までの観察期間では回復が見られることはなかった。増殖速度ではなく細胞数そのものの減少が見られたのは10Gyを照射した時のみであったが、この線量でも照射1日後の時点では細胞数は増加しており2日後以降に緩やかな減少

傾向に転換することが観察された。図1Bは各計測日における照射線量と残存細胞数の関係をプロットしたものであるが、照射後徐々に2Gy以上の線量における両者の反比例関係が構築されることがわかる。

### 2. 放射線応答に伴う情報伝達

放射線を照射された細胞内で伝達される情報は、遺伝子の転写制御情報やタンパク質活性制御情報、代謝反応制御情報等多岐にわたり、多くの場合情報の担い手はタンパク質である<sup>3)</sup>。タンパク質は情報の送り手であり、かつ伝達媒体と受け手でもある可能性を持つ。従って、細胞内情報の解読のためには個々のタンパク質の挙動を追うだけでは不十分で、全体的なネットワークとしての動きを捉える必要がある。細胞内で伝達される情報として利用されるものの中で特に研究されているのはタンパク質のリン酸化である。情報を担うタンパク質の多くは一時的なリン酸化により局所的な構造変化を起こし、活性型に変換したり他のタンパク質により認識されるようになることが知られている。近年リン酸化されているタンパク質を特異的に認識する抗体が作製され<sup>4)</sup>、多くの研究者が



**Fig.2** Western blot detection of phosphorylated proteins.

HeLaS3 cells were exposed to 10 Gy X ray then incubated for 10 min, 30 min, 1h, 3h or 5h, respectively, before protein extraction. 10  $\mu$ g of each protein extracts were loaded onto 8% SDS-PAGE. After electrophoresis, proteins on the gel were transferred to a PVDF membrane. Anti-phosphotyrosine antibody (A), anti-phosphothreonine antibody (B) or anti-phosphoserine antibody (C) was used as a 1<sup>st</sup> antibody. HRP-conjugated anti-rabbit IgG antibody was used as a 2<sup>nd</sup> antibody and detection was done by ECL plus system.



利用できるように市販されている。この抗体を用いることにより放射線照射後の細胞内での情報の動きを明らかにすることにした。図2はHeLaS3に10GyのX線を照射後10分、30分、1時間、3時間そして5時間培養後にタンパク質を抽出し、3種類の抗リン酸化アミノ酸認識抗体でそれぞれ検出したパターンである。個々の抗体ごとに様々な分子量のタンパク質の経時的なリン酸化/脱リン酸化が観察される。

### 3. 質量分析計を用いたリン酸化タンパク質の解析

前述の抗体を用いたリン酸化タンパク質検出法では、全体的な動きを観察することは可能であるが検出された個々のタンパク質が何であるかを同定することはできない。また同じタンパク質でも線量や照射後培養時間の違いによってリン酸化を受けるアミノ酸が異なっている場合、そのリン酸化アミノ酸の違いを検出することは難しい。細胞内情報伝達を理解するためには検出された抗原タンパク質のリン酸化されているアミノ酸を含む周辺配列を詳細に解析する方法が必要である。

現在市販されているイオントラップ型もしくは四重極-飛行時間ハイブリッド型質量分析計を用

いると分子量1000Da-2000Da程度のペプチドのアミノ酸配列を決定するために利用することが可能である<sup>5)</sup>。ここで問題となるのはアミノ酸配列を決定するための質量分析計内でのペプチド部分断片化反応時におけるリン酸が付加された側鎖の安定性である<sup>6)</sup>。通常アミノ酸配列を決定するためには側鎖の結合はペプチド結合よりも安定であることが必須である。図3にリン酸化アミノ酸の開裂パターンを示すが、セリンとスレオニンにリン酸が付加されている場合、ペプチド結合の開裂の前にリン酸が外れてしまう。そのため同一ペプチド内にリン酸化されるアミノ酸が複数存在するとリン酸が付加されていたアミノ酸を決定することは難しい。リン酸がチロシンに付加されている場合は、チロシンの芳香環がリン酸結合を安定化するため通常の側鎖と同様に挙動し配列決定をすることが可能となる<sup>7)</sup>。実際にチロシンにリン酸が付加されている合成ペプチドの部分断片化を四重極-飛行時間ハイブリッド型質量分析計を用いて行って見たところ、リン酸結合の安定性とペプチド結合の開裂に伴うリン酸化チロシンインモニウムイオン(m/z216.04)の生成が確認された(図4)。

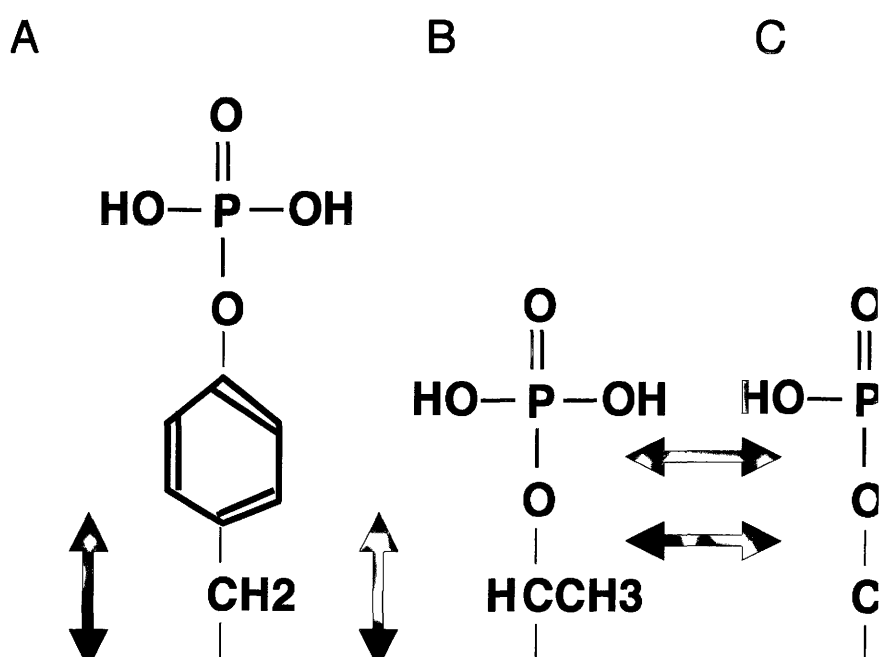


Fig.3 Collision-induced fragmentation patterns of phosphorylated amino acids.  
 $\leftrightarrow$ : Chemical bonds cleaved by collision energy.



### Ⅲ. 考察

本研究ではまずHeLaS3の細胞増殖能に及ぼす放射線照射の影響が検出される時間的要素が明らかになった。10GyのX線を照射した時に細胞数の増加傾向から減少傾向への転換は1日後から2日後の間に見られ、その後緩やかな減少傾向が5日目まで継続されることが観察された。この線量では放射線によりダメージを受けた細胞はすぐに死に始めるわけではなく、また死が訪れる時間も一定ではないことが推測される。照射後4日以降では2Gy以上の線量において残存細胞数との間に反比例関係が見られることも明らかとなった。このことはダメージを受けて死ぬ細胞の割合と分裂して増加する細胞の比率が照射線量を関数とする特定の方程式により導かれる事を意味している。今回はHeLaS3をモデル細胞として使用したが、その他の細胞ではどのようになるのか興味を持たれる。放射線線量効果の現れる時間的要素が明らかになることで、細胞内での分子の動きを捉えるにはどの線量の放射線を照射していつ観察すればよいのかを検討することが可能となる。分子の挙動を網羅的に解析するには、照射する放射線線量とその後の培養時間も網羅的に必要であろう。

放射線応答を分子レベルで観察するには、細胞内情報伝達に利用されているタンパク質のリン酸化を網羅的に検出することが重要である。そのためには抗体の利用が有効であることが本研究により示された。リン酸化されるアミノ酸として盛んに研究されているのはセリン、スレオニンそしてチロシンであり、それぞれのリン酸化状態を特異的に認識する抗体が市販されている。チロシンリン酸の場合は抗体が認識している抗原を質量分析計を利用して同定することが可能であり、今後は最終的に質量分析計に導入するためのリン酸化タンパク質もしくはリン酸化ペプチドの効率よい精製方法の確立が必要となる。

放射線を照射された細胞の中で伝達される情報を読み取ることは、その細胞が置かれている状況を把握することを可能にすると考えられる。細胞の放射線感受性のような複雑な特性も、情報の流れを解析することによって明らかにできるようになるであろう。

### 参考文献

- 1) Desai B.N., Myers B.R. and Schreiber S.T. "FKBP12-rapamycin-associated protein associates with mitochondria and senses osmotic stress via mitochondrial dysfunction." *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* (2002) **99**, 4319-4324
- 2) Szumiel I. "Monitoring and signaling of radiation-induced damage in mammalian cells." *Radiation Research* (1998) **150**, S92-S101
- 3) Schmidt-Ullrich R.K., Dent P., Grant S. et al. "Signal transduction and cellular radiation responses." *Radiation Research* (2000) **153**, 245-257
- 4) Pang D.T., Sharma B.R. and Shafer J.A. "Purification of the catalytically active phosphorylated form of insulin receptor kinase by affinity chromatography with o-phosphotyrosyl-binding antibodies." *Archives of Biochemistry and Biophysics* (1985) **242**, 176-186
- 5) Staudenmann W. and James P. "Interpreting peptide tandem mass-spectrometry fragmentation spectra." *Proteome Research: Mass Spectrometry*; James P. Ed; Springer-Verlag, (2001) 143-166
- 6) Moyer S.C., Cotter R.J. and Woods A.S. "Fragmentation of phosphopeptides by atmospheric pressure MALDI and ESI/ion trap mass spectrometry" *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* (2002) **13**, 274-283
- 7) Pandey A., Podtelejnikov A.V., Blagoev B. et al. "Analysis of receptor signaling pathways by mass spectrometry: identification of Vav-2 as a substrate of the epidermal and platelet-derived growth factor receptors." *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* (2000) **97**, 179-184



## IV. 分子レベルでの放射線応答解析

### 3. トランスフェクションアレイ技術とその応用

三宅正人／吉川智啓／内村英一郎

(独)産総研 ティッシュエンジニアリング研究センター

#### Transfection Array technology and the application for post-genetic research

Masato Miyake/Tomohiro Yoshikawa/Eiichiro Uchimura

Tissue Engineering Research Center, National Institute of advanced Science and Technology

---

#### 〈Abstract〉

---

The development of a novel high throughput genetic screening method based on mammalian phenotype markers will provide a powerful approach in functional genomics and proteomics. We have developed a transfection array system that places DNA and cells onto a glass slide in a sequence dependent spacial distribution allowing localized transfection and screening to take place on the same slide. A high density transfection array allowed the functional screening of a red fluorescent protein expression vector from 10,000 different plasmid samples on a 7.5 cm×2.5 cm glass slide plate. By using a transfection array system optimized for HeLa cell line, antiproliferative 20-residue peptides were screened based on the phenotypic changes in the HeLa cells. A designed synthetic peptide was selected from the library and showed growth inhibition activity in HeLa cells. Our results demonstrated that the transfection array system miniaturizes and speeds up genetic screening system. The transfection array system provides a powerful high throughput genetic screening system in mammalian cells for functional genomics and proteomics applications.

---

#### 1. 緒言

創薬ターゲットの同定プロセスにおける主たるボトルネックは遺伝子や蛋白質機能のバリデーションである (Fig.1)。遺伝子や蛋白質の検出に関わる分子生物学的解析はDNAマイクロアレイやプロテインチップ等の新技術によって、大規模か

つ高速化された。しかし、遺伝子や蛋白質の機能を解析するために有用な、細胞表現型を指標とした遺伝子のファンクショナルスクリーニング等の高速化は検出技術に比べて遅れており、それが創薬ターゲットの同定速度を律しているといえる。

ヒトの蛋白質のうち創薬ターゲットに利用されているものはわずかに444種類である。遺伝子や蛋

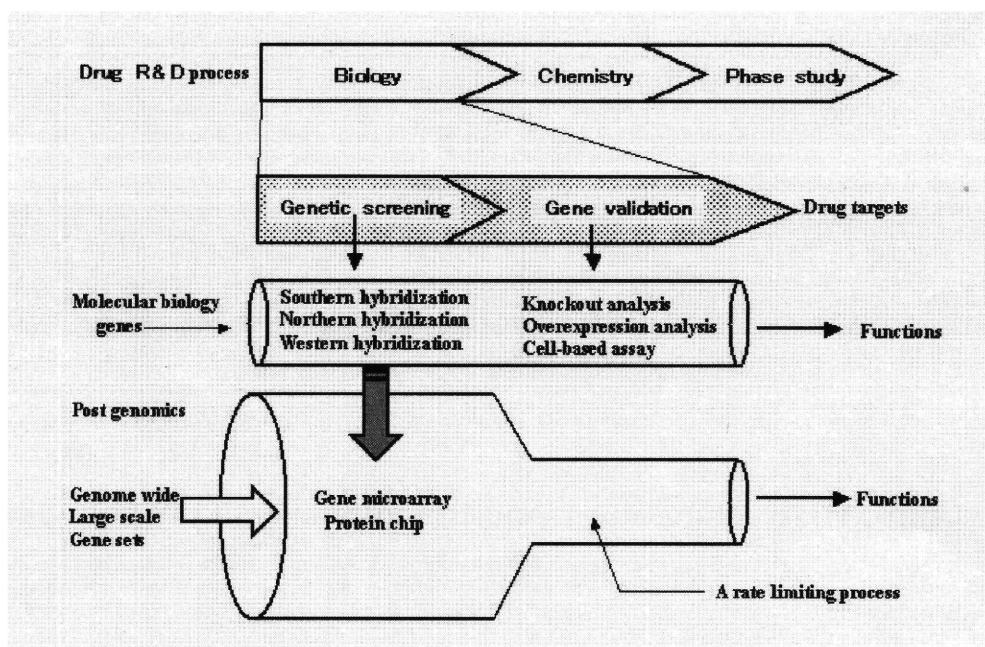


Fig.1 Technologies used for a drug target screening in the process of a drug discovery.

白質のバリデーションを高速化することで、十萬種類を超えると考えられているヒトcDNAから、組織の再生や難病の治療に役立つ遺伝子、細胞の増殖・分化を制御する遺伝子が多数、迅速に発見されることが期待される。本研究では、細胞表現型を指標とする遺伝子機能バリデーションをチップ化する技術として、開発された「トランスフェクションアレイ」とその応用について概説する。

## 2. トランスフェクションアレイ技術

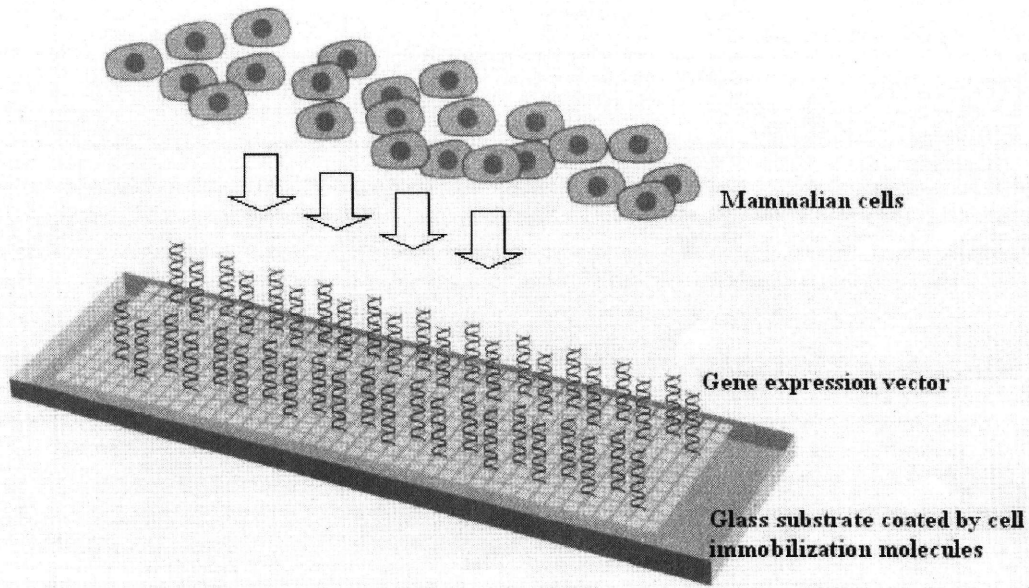
トランスフェクションのアレイ化に関する報告は、2001年にホワイトヘッド研究所のZiauddinとSabatiniによつてはじめてなされた<sup>1)</sup>。しかし、その後、あまり進展が見えないまま現在に至っている。ここでは、トランスフェクション用基板の設計原理と、それを利用したアレイ開発の現状について述べる。

### 2-1 固相系トランスフェクション

最近、プラスミドDNAを固着させることにより作られたアレイ基板表面に細胞を付着・培養することによって大規模な数のトランスフェクションを同時に行う方法<sup>1)</sup>が開発されているが、応用できる細胞に制限があるなど実用性に問題があった<sup>2)</sup>。著者らは細胞付着性材料を利用することで

汎用性の高い独自のトランスフェクション用アレイ基板 (Fig.2) の開発に成功した。このアレイ基板を用いた遺伝子導入にはリン酸カルシウム法、リポフェクション等の従来法とは異なる特性が見られたため、「固相系トランスフェクション」として、従来法との比較を行った。

固相系トランスフェクションは、従来法に比べて、特に遺伝子導入が困難な細胞における導入遺伝子の発現効率が高いという特徴がある。例えば、ヒト間葉系幹細胞にEGFP発現ベクターを固相系と従来法(最適化されたリポフェクション法)で導入した場合、従来法より40倍も高いEGFPの発現が固相系の場合に確認された。一般に、DNA顆粒の表面電荷はやや正電荷によっているのがよいと言われている。例えばリポフェクションでは脂質の正電荷とDNAの負電荷の比(P/N比)が2から3になる条件で、多くの動物細胞のトランスフェクション効率が最大になることが経験的に知られている。P/Nを低くすると遺伝子発現効率が下がるのは、DNAの核移行頻度が下がるためと考えられている。逆にP/N比を上げると、DNAの核移行頻度は向上するが、同時にDNA顆粒が細胞の膜構造を破壊する作用が強くなり、死細胞を増加させることにもなる<sup>3)</sup>。トランスフェクションの最適条件は、細胞株ごとにDNA顆粒の核移行頻度と細



**Fig.2** A design of solid-phase transfection. The gene expression vectors are slowly diffused and are incorporated into the mammalian cells attached on the substrate.

胞毒性のバランスによって決まることになる。固相系トランスフェクションでは、核移行を促進する著しく正電荷側に偏ったP/N比のDNA顆粒を利用できる点で従来法と異なる。例えば、ヒト間葉系幹細胞の固相系トランスフェクションに用いるDNA顆粒調製条件を最適化した結果、P/N比は10であり、従来法における最適条件のP/N比=3から著しく正電荷側に偏っていた。従来法においてP/N比=10のDNA顆粒を用いると細胞生存率が60%まで低下してしまうのに対し、固相系トランスフェクションでは細胞生存率は90%と高いままを維持していた。この傾向は調べた複数の細胞株で共通していた。固相系トランスフェクションに見られる高い遺伝子発現効率は、核移行に有効なDNA顆粒を用いても細胞が基板上で生存し続けられることに起因しているのかもしれない。こうした特性はゼラチン・DNAを用いたマイクロアレイ・トランスフェクション<sup>1)</sup>では確認されないので興味深い。

## 2-2 トランスフェクションアレイシステム

DNAマイクロアレイやプロテインチップを用いた解析から生み出されるデータは膨大であり、その一つ一つの遺伝子や蛋白質の機能の評価に費やされる時間との間にギャップが発生している。

固相系トランスフェクションをアレイ化することによって実現したトランスフェクションアレイを用いることにより一度に多数のcDNAやRNAi（おそらくは抗体等の蛋白質も）を細胞に導入し、細胞表現型を指標にして遺伝子機能の評価が一括して可能になると期待される（Fig.3）。基板上でアレイ化された遺伝子発現細胞には、二次的に薬物や放射線、紫外線などの刺激を与えることも可能である。細胞表現型のアッセイには従来から細胞生物学的手法として用いられてきた免疫染色法や細胞形態観察、また、カルシウムイメージングなどの生物物理的手法も組み合わせることができる。

標準サイズ(2.5cm×7.5cm)のスライドガラス基板上に約1万種類のDNAと荷電ポリマーの複合体を固着させることができる。この基板上で細胞を培養すると、導入した遺伝子が過剰発現した細胞のアレイができる。一例としてFig.4にはEGFP発現ベクターを固着した基板上でHEK293細胞を2日間培養した結果観察されたEGFP過剰発現細胞のアレイとそれができるまでのプロセスを図式化した。現状では、HEK293細胞、HeLa細胞、NIH3T3細胞、HepG2細胞、ヒト間葉系幹細胞についてトランスフェクションアレイによる大規模遺伝子導入が可能になった。その他の細胞についても基板とDNA顆粒調製条件の最適化により、遺



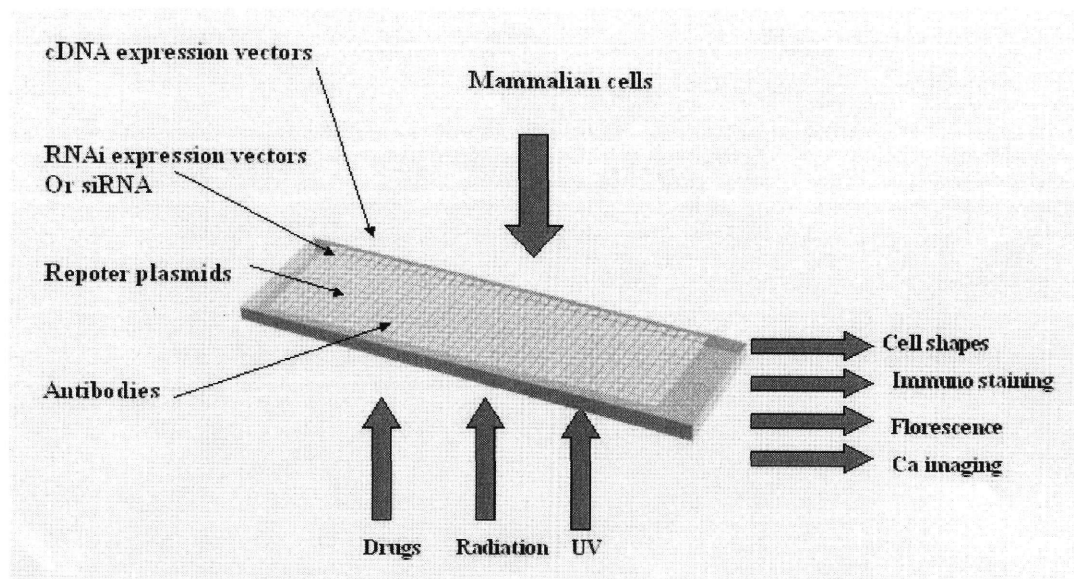


Fig.3 A variety of large-scale gene validation based on the transfection array system.

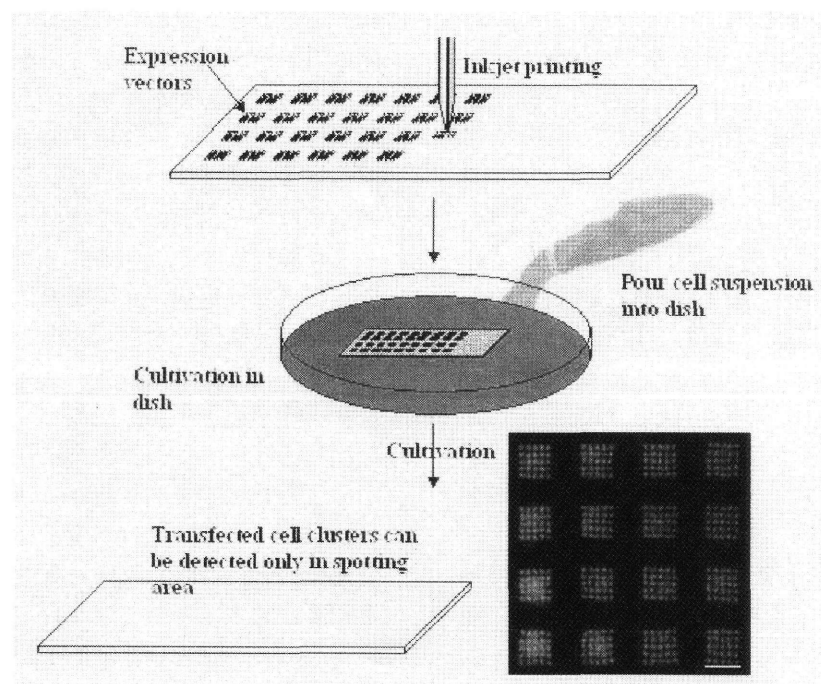


Fig.4 A transfection array experiment. Localized transfection of EGFP expression vector printed on the array substrate was demonstrated by using HEK293 cell line.

伝子導入が可能になると考えている。当該技術は将来的に初代培養細胞などを含む実用細胞表現型を指標にした遺伝子機能探索の大規模化、ミニチュア化、高速化に資することを期待している。

### 3. トランスフェクションアレイの応用

#### 3-1 細胞増殖抑制ペプチドのスクリーニング

トランスフェクションアレイは細胞表現型を指標にした遺伝子機能探索に応用することが可能に

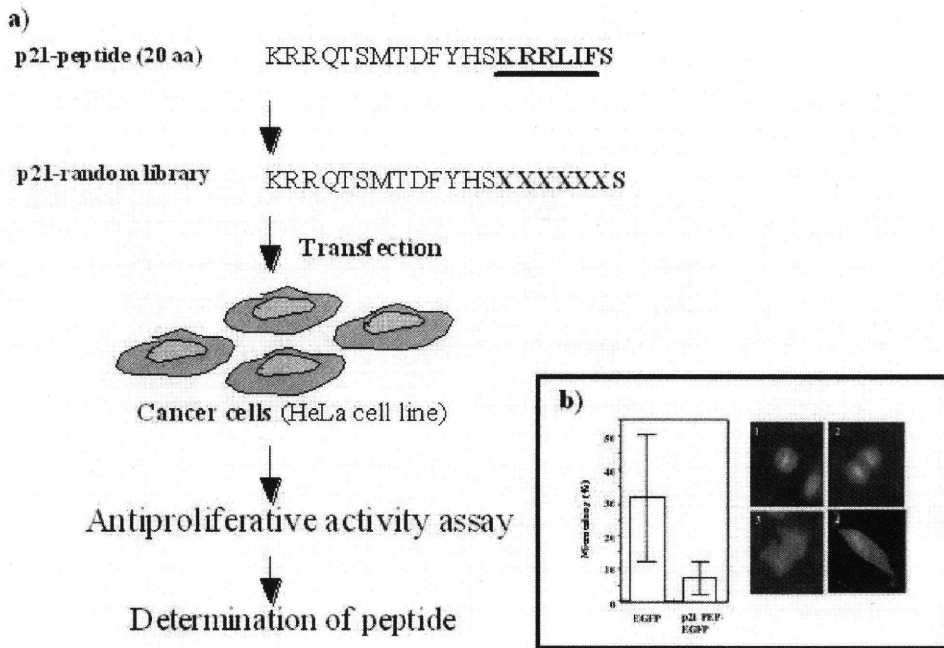


Fig.5 A strategy of screening of antiproliferative peptides in human cells. a) The screening procedure and, b) antiproliferative activity assay on the transfection array.

なりつつある。HeLa細胞に最適化されたトランスフェクションアレイシステムを用いて、20残基からなる細胞増殖阻害ペプチド遺伝子のスクリーニングを行うことによって、トランスフェクションアレイの実用化に関する検討を行った。具体的には、G1チェックポイント蛋白質p21CIP/WAFのカルボキシルドメインの20残基配列<sup>4)</sup>のうち、サイクリン蛋白質との相互作用に必須なカルボキシル側6残基領域をランダム化したペプチド遺伝子ライブラリからHeLa細胞の増殖を阻害する効果のあるペプチド遺伝子をトランスフェクションアレイ上でスクリーニングした。Fig.5にはスクリーニングフローを示した。

スクリーニングはHeLa細胞トランスフェクションアレイをヨウ化プロピジウムによってDNA染色処理した後、細胞分裂の頻度を比較することによって行った(Fig.5.b)。ペプチド遺伝子はEGFP遺伝子のアミノ基末端にインフレームで連結し、CMVプロモーターによって強制発現させた。ポジティブコントロールとして、EGFP-p21カルボキシル末端ペプチド融合蛋白質を発現させたトランスフェクタントにおける分裂過程細胞の頻度はネガティブコントロールとしてEGFPのみ

を発現させた場合より低下していることがトランスフェクションアレイ上で確認できた。同様の指標により、約1000種類のペプチド遺伝子を含むランダムライブラリからスクリーニングを行った結果、3つのペプチドが新たにHeLa細胞の増殖を抑制できることが明らかになった。選択されたこれらのペプチドの増殖抑制効果は化学合成されたペプチドを培地中に添加した場合においても得られ、その活性はFACS解析やHeLa細胞の増殖曲線から定量的に確認された。以上の実験結果は、トランスフェクションアレイは細胞表現型を指標とした遺伝子スクリーニングに応用できることを示している。

### 3-2 トランスフェクションアレイの新しい応用展開

本技術は遺伝子間の相互作用連関、いわゆる遺伝子間相互作用ネットワークの解析にも応用できると考えられる。情報科学の分野では、遺伝子間相互作用ネットワークを遺伝子発現等の時系列データの相関解析によって生物の複雑なシステムをin silico(コンピューター上)でシミュレーションする試みが行われている<sup>5)</sup>。完成すれば、細胞

と遺伝子機能の関係を理解するための強力な解析ツールになりうる。現状では、大規模な遺伝子発現時系列データを実験的に取得することが困難であるため、in silicoシミュレーションは仮想的事実の解析という域を抜け出していない。遺伝子発現の時系列データを取得するためのレポーター遺伝子等を網羅的に細胞に導入することはトランスフェクションアレイ技術を用いることにより容易に行える。これによって、生きた細胞の遺伝子間相互作用ネットワークを解析することが近い将来可能となると考えている。

#### 参考文献

- 1) J. Ziauddin and D. M. Sabatini (2001), *Nature* 411, 107.
- 2) R. Z. Wu *et al.* (2002), *TRENDS in Cell Biol.* 12, 485.
- 3) T. Bieber *et al.* (2002), *J. Controlled Release* 82, 441.
- 4) K. L. Ball *et al.* (1997), *Curr. Biol.* 7, 71.
- 5) 岡本正宏 (2001), 蛋白質・核酸・酵素 46, 2515.



## IV. 分子レベルでの放射線応答解析

### 4. 放射線感受性遺伝子検索：遺伝子発現解析からのアプローチ

三枝 公美子

放射線医学総合研究所 フロンティア研究センター 放射線感受性遺伝子プロジェクト

#### Characterization of genes in response to irradiation by gene-expression profiling

Kumiko Saegusa

Frontier Research Center, National Institute of Radiological Sciences, Chiba

---

#### 〈Abstract〉

---

To predict unusual response to clinical radiations, identifying molecular markers and understanding the variation in radio sensitivity at a molecular level are required. Microarray technology can be used for simultaneously detecting expression of thousands of genes in different cell types in a single hybridization experiment. Microarray technology has also proved to be a powerful tool for comparing gene expression in normal and disease states and/or for analyzing the response of cells exposed to drugs or unknown physiological conditions. We have studied gene expression profiles of two normal fibroblast cell lines and 31 cancer cell lines with different radio sensitivities using an oligonucleotide microarray before/after exposure to ionizing radiation. We compared gene expression profiles of 8 cell lines whose radio sensitivities were quite different. The two-dimensional cluster analysis indicated that the radio-resistant cell lines such as Becker, KNS60, T98G and A549, were clearly separated from the radiosensitive ones. The genes classified by this analysis may be useful to predict radio-resistant cells that were clarified by D10 value. As a result, we selected approximately 85 genes to related of radiation sensitivity. Moreover, we tried SNP typing, identification of their allelic variants in human population, development of an effective procedure for quantity of individual radiation-sensitivity, and analysis of interrelationship between the genetic heterogeneity and susceptibility to irradiation.

---

#### 緒言

放射線治療は外科手術，化学療法と共に優れたがん治療法であり，特に高齢化社会となった現在

ではその重要性は増している。しかしながら同じ病理組織型のがんであっても，放射線治療効果に大きな差が観られたり，また腫瘍を取り囲む正常組織での障害(副作用)に個人差が観られる場合が

ある。そこで、腫瘍における放射線治療の効果、正常組織における放射線感受性を治療前に調べることができれば、より個人に適したオーダーメイド治療法を採用することができる。一方ヒト・ゲノムの全塩基配列が明らかになるに従い予想以上に高い頻度で多型があることが解ってきた。そこで私共は臨床上的放射線に依る治療効果や副作用とゲノムにおける多型との相関関係を明らかにし、個人間で異なる放射線感受性を予測する診断デバイスの開発を目指している。

研究協力機関からインフォームドコンセントが得られた放射線治療対象者の試料(血液・腫瘍)および診療情報の提供を受け、放射線障害の指標NCI/CTC(common toxicity criteria)によりグループ化を行っている。一部の血液試料においては小核アッセイ法によりT-リンパ球の放射線感受性を調べ、その程度によりグループ化した。一方、コロニー形成法に依る線量-生存率が互いに異なるがん由来細胞株約40種類を用いて14K-または22K-カスタムオリゴアレイによる放射線照射前後の遺伝子発現パターンを解析しておりその結果、放射線高・低感受性を分ける遺伝子群を放射線応答関連遺伝子として抽出を行った。現在、これら放射線応答遺伝子を中心に多型情報を収集し、放射線障害や小核アッセイ法などによる放射線感受性が異なる集団との相関解析を行っている。

## 実験および方法

### 血液試料

インフォームドコンセントが得られた健常人ボランティア122名および乳癌放射線治療対象者218名を対象とした。

放射線治療対象者については皮膚障害分類RTGO(Grade estimation by Radiation Oncology Group)による分類を行った。健常人ボランティアおよび放射線治療対象乳癌患者の一部については小核アッセイ<sup>1,2)</sup>を行い放射線誘発小核出現頻度(MN値)による分類を行った。

### 培養細胞株の放射線感受性試験

67種類の培養癌細胞および正常細胞株用いてX線照射(220kV, フィルター 0.5mm Al 0.5mm Cu, 0.85Gy/min)後コロニー形成法にてX線感受性を調べた。多標的説に基づく近似式から各細胞

の線量-生存率曲線を描き、線量-生存率曲線の指標である $D_{10}$ 、 $D_0$ 値を求めた<sup>3,4)</sup>。

### マイクロアレイ解析

解析に使用したカスタムオリゴアレイ(Agilent社)には公共データベースより独自に抽出した19,862ユニークIDのスポットを配置した。

感受性試験を行った培養細胞株のうちの33細胞株を用いた。X線非照射細胞および2GyのX線照射後1時間、3時間後にtotalRNAを抽出した。アレイ解析の対照にはヒト11種類の正常組織から抽出したRNAを混合し用いた。対照RNAをCy-3、サンプルRNAをCy-5にてラベル化を行った。カスタムオリゴアレイは17時間のハイブリダイゼーション後、洗浄、スキャンを行った。各スポット発現比を基に遺伝子発現プロファイルを作成した。解析にはResolver(Rosetta社)を用いた。

### 遺伝子多型解析

一塩基多型(single-nucleotide polymorphism; SNP)解析はDNAポリメラーゼが塩基伸長するとき生じるピロリン酸をルシフェラーゼ発光に変換して伸長反応をリアルタイムで検出し、発光の強度とパターンからSNPを含む周辺配列を自動決定するPyrosequencing(住商バイオサイエンス)、およびSNPに応じて長さの異なる断片を飛行時間型質量分析し、質量と遺伝子型の対応を解析するシステムであるMass ARRAY(SEQENOM, 日立製作所)の2種類のシステムを用いて行った。

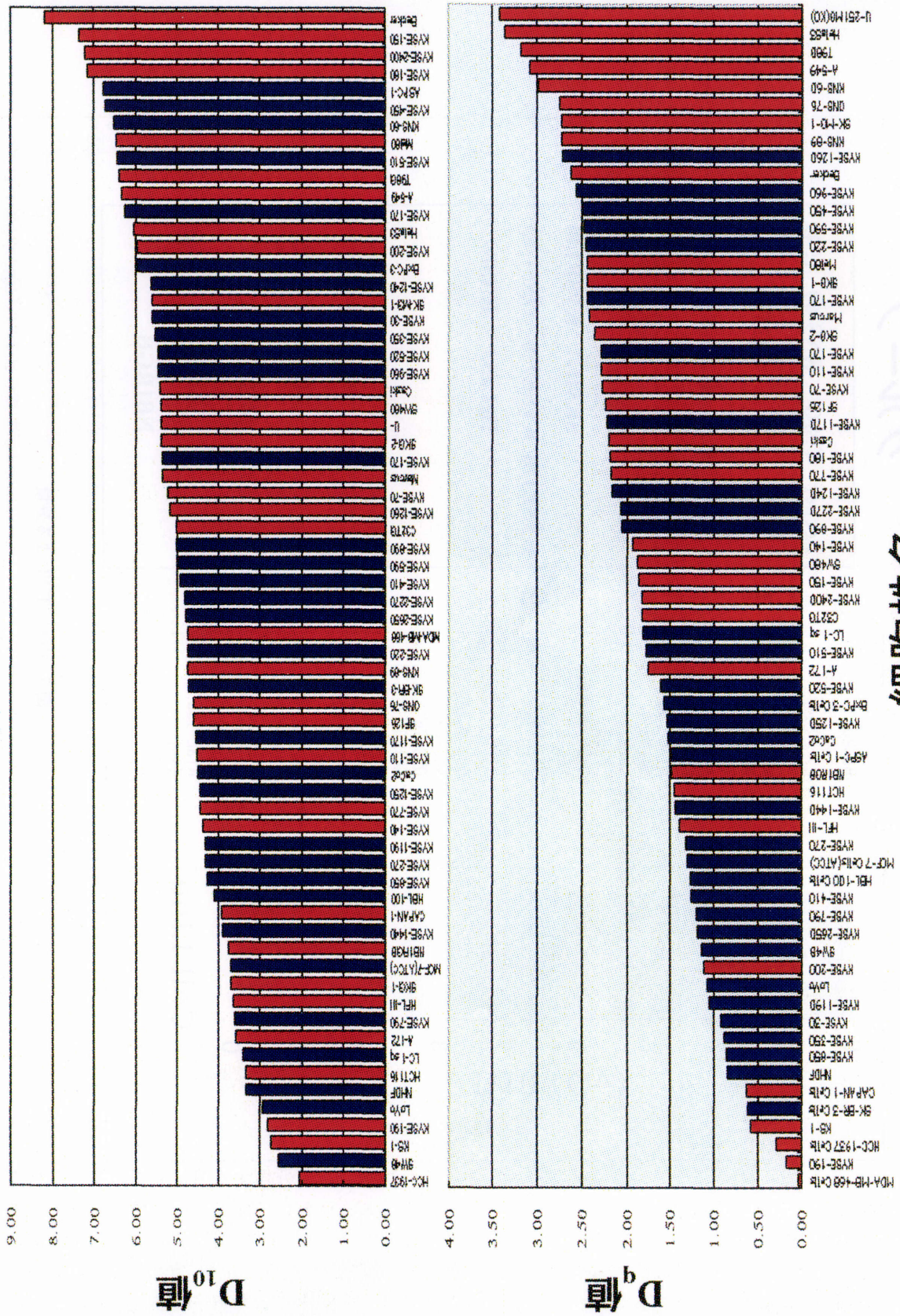
## 結果

培養癌培養細胞株67種類の放射線感受性を調べるために、コロニー形成法にて線量-生存曲線を求めた。放射線感受性の指標として細胞の生存率を10%下げるのに必要な線量 $D_{10}$ 値と、細胞の放射線損傷から回復できる能力の程度を示す $D_0$ を求めた(図1)。

放射線感受性を分類する遺伝子群の検索を行うためにマイクロアレイにて遺伝子発現プロファイルリングを作成した。最初に $D_{10}$ 値の高い細胞と低い細胞から4種類を選択しその遺伝子発現パターンを比較した。2Dクラスター解析はagglomerative法を用い、発現比3倍以上の条件で行った。その



IV. 分子レベルでの放射線応答解析



細胞株名

図1 67種類の細胞株における感受性試験結果



# グループ

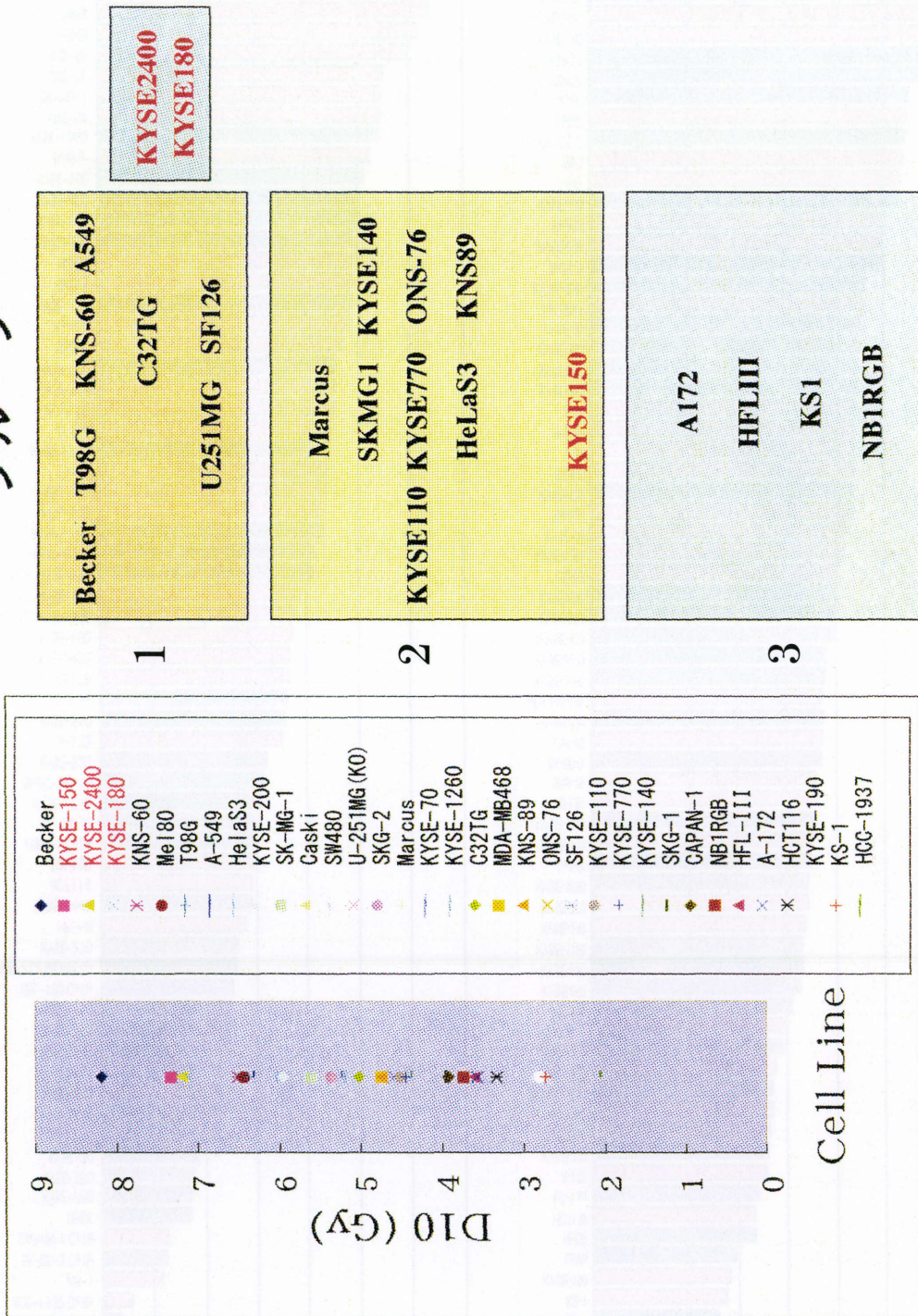


図 2 ROAST™による分類

#### IV. 分子レベルでの放射線応答解析

結果、12000種類の遺伝子中85種類の遺伝子にてD<sub>10</sub>値の高いまたは低い細胞をグループ化出来た。次にこの85遺伝子を用いて前解析に用いた以外の細胞での発現パターンがD<sub>10</sub>値の高い細胞群と低い細胞群のどちらに分類されるかの検討を行いさらに、細胞間における遺伝子発現パターンの類似性の解析をROAST (Rosetta社)にて行い遺伝子発現パターンの近い順に3グループに分類した。この結果は各々の放射線感受性の指標の一つであるD<sub>10</sub>値による分類と良く一致していた(図2)。

これら遺伝子発現解析により選択した85遺伝子とこれら遺伝子の上流または下流遺伝子についても注目し、放射線感受性関連遺伝子として多型解析の候補遺伝子とした。

多型解析を行うためには遺伝子のSNP部位の情報を効率良く収集する必要がある。遺伝子のSNP情報をデータベースより効率良く検索し、情報の収集を行うために、ゲノムビューアー (World fusion社)をカスタマイズし独自のデータベース構築を行っている。

多型解析は340人(乳癌放射線療法対象患者218人、一般健常人122人)を対象として42遺伝子につ

いてケースコントロールスタディーを行った。多型解析に用いるサンプルは、218人の乳癌放射線療法対象患者では皮膚障害分類RTOGにより、Grade 0, 14人, Grade 1, 84人, Grade 2以上40人および経過観察中, 80人, MN値による分類によりMN値0.1未満, 2人, 0.1以上0.3未満, 114人, 0.3以上, 13人, 未測定89人, 122人の一般健常人についてはMN値0.1未満, 8人, 0.1以上0.3未満, 43人, 0.3以上, 10人, 未測定61人にグループ化を行った。SNPとの相関解析は $\chi^2$ 乗検定により行った。その結果、ヒト19番染色体q13.2-13.3領域の遺伝子No.541のSNP部位(アレルG/A)においてRTOG Grade 2以上では一般健常人と比較しGアレルを持つ頻度がP値0.0175, またヒト6番染色体q16.1-16.3領域の遺伝子No.3540のSNP部位(アレルT/C)においてRTOG Grade 0と一般健常人とを比較し、Tアレルを持つ頻度がp値0.0159, ヒト11番染色体q23.3領域の遺伝子No.7454のSNP部位(アレルG/A)において乳癌放射線療法対象患者MN値0.3以上ではAアレルを持つ頻度がP値0.0387であり、有意に高いことが示された(表1)。

#### 考 察

遺伝子発現解析の結果、発現パターンの類似性によりグループ化により3グループに分類することが可能であった。各々の放射線感受性の指標の一つであるD<sub>10</sub>値による分類と良く一致していたことからこの分類に用いた85遺伝子は細胞がX線に暴露された時の生存率に関わる遺伝子である可能性が高いことが示唆された。しかし、D<sub>10</sub>値の高い2種類の細胞は同一グループに属する1部の細胞の発現パターンと類似性示し、他の細胞とは類似性が低い結果であった(図2)。これは、今回の解析で選択された85遺伝子だけでは説明がつかない細胞株も存在し、適切に分類する他の遺伝子群があることを示唆している。また、この85遺伝子の分類をThe gene Oncology Consortium; Amigoデータベースにて機能面で分類することを試みた。特定のパスウェイに関わるモノではなく、細胞制御、DNA修復、アポトーシスやシグナル伝達など多彩に渡っていた。

遺伝子多型と有害事象の分類または*in vitro*感受性試験による分類との相関解析により放射線感受性に関わる遺伝子座位は染色体6, 11, 19番長腕に

表1 SNP解析結果

SNPNo.	Breast Cancer	Healthy Control	$\chi^2$
<b>541</b>	<b>Grade 2, 3*</b>		<b>(p value)</b>
<b>allele</b>	<b>n = 76</b>	<b>n = 244</b>	
<b>G</b>	<b>40</b>	<b>91</b>	<b>5.6373</b>
	<b>(52.6 %)</b>	<b>(37.3 %)</b>	<b>(0.0175)</b>
<b>A</b>	<b>36</b>	<b>153</b>	
	<b>(47.4 %)</b>	<b>(62.7 %)</b>	

SNPNo.	Breast Cancer	Breast Cancer	$\chi^2$
<b>3540</b>	<b>Grade 0*</b>	<b>Grade 1 - 3*</b>	<b>(p value)</b>
<b>allele</b>	<b>n = 28</b>	<b>n = 194</b>	
<b>T</b>	<b>23</b>	<b>109</b>	<b>5.805</b>
	<b>(82.1 %)</b>	<b>(56.2 %)</b>	<b>(0.0159)</b>
<b>C</b>	<b>5</b>	<b>85</b>	
	<b>(17.9 %)</b>	<b>(43.8 %)</b>	

\*Grade estimated by Radiation Therapy Oncology Group (RTOG)

SNPNo.	Healthy Control	Healthy Control	$\chi^2$
<b>7475</b>	<b>0.3&lt;=MN#</b>	<b>MN&lt;0.3</b>	<b>(p value)</b>
<b>allele</b>	<b>n = 26</b>	<b>n = 232</b>	
<b>C</b>	<b>14</b>	<b>174</b>	<b>4.276</b>
	<b>(53.8 %)</b>	<b>(75.0%)</b>	<b>(0.0387)</b>
<b>G</b>	<b>12</b>	<b>58</b>	
	<b>(46.2 %)</b>	<b>(25.0 %)</b>	

#MN induced by 2Gy of X-ray irradiation

存在することが強く示唆された。

#### 参考文献

- 1) Ban S, J.B. Cologne J. B. *et al*: Radiosensitivity of atomic bomb survivors as determined with a micronucleus assay. *Radiation Research* **134**: 170-178, 1993.
- 2) Ban S, Shinohara T. *et al*: Chromosomal instability in BRCA1- or BRCA2-defective human cancer cells detected by spontaneous micronucleus assay. *Mutation Research* **474**: 15-23, 2001.
- 3) Suzuki M, Kase Y, Yamaguchi H, et al. Relative biological effectiveness for cell-killing effect on various human cell lines irradiated with heavy-ion medical accelerator in Chiba (HIMAC) carbon-ion beams. *Int. J. Radiation Oncology Biol. Phys*, 2000; **48**: 241-250
- 4) Suzuki M, Kase Y, Kanai T, and Ando K. Correlation between cell killing and residual chromatin breaks measured by PCC in six human cell lines irradiated with different radiation types. *Int. J. Radiat. Biol*, 2000; **76**: 1189-1196



## IV. 分子レベルでの放射線応答解析

### 5. がんにおけるゲノムDNAの多型および変異解析

太田 力

国立がんセンター研究所

## Polymorphism and Mutation Analysis of Genomic DNA on Cancer

Tsutomu Ohta

National Cancer Center Research Institute

---

### 〈Abstract〉

---

DNA repair is a universal process in living cells that maintains the structural integrity of chromosomal DNA molecules in face of damage. A deficiency in DNA damage repair is associated with an increased cancer risk by increasing a mutation frequency of cancer-related genes. Variation in DNA repair capacity may be genetically determined. Therefore, we searched single-nucleotide polymorphisms (SNPs) in major DNA repair genes. This led to the finding of 600 SNPs and mutations including many novel SNPs in Japanese population. Case-control studies to explore the contribution of the SNPs in DNA repair genes to the risk of lung cancer revealed that five SNPs are associated with lung carcinogenesis. One of these SNPs is found in RAD54L gene, which is involved in double-strand DNA repair. We analyzed and reported activities of Rad54L protein with SNP and mutations.

#### 疾病ゲノムセンターにおける研究

我々は「遺伝子解析によるがん対策・創薬推進事業」において、肺がん、浸潤性膀胱がん、胃がん、大腸がん、食道がん、乳がん、白血病等の症例について、生殖細胞系列のゲノム解析を行い、既知又は新規に本研究で見出すSNP(一塩基多型: single nucleotide polymorphism)等の多型と、診療情報、すなわちがん罹患等の臨床病理学的指標との相関について解析を行っている。それぞれのがんに関連する遺伝子とその多型、及びそれらの機能を解明し、新しい診断・治療法の開発や、個々

人に最適の治療法を選択するために役立てる事を最終目的としている。提供を受けた個人識別情報を含む試料や、診療録等から収集する診療情報等の個人情報、**「指針」に定める個人識別情報管理者が責任を持って連結可能匿名化し、遺伝子解析担当研究者に提供される。個人識別情報管理者は匿名化などの個人識別情報の管理を、他のコンピューターと切り離された専用のコンピューターを用いミレニアム・ゲノム・プロジェクトにおける個人情報・遺伝子解析情報を安全に管理するために特に開発された「遺伝子解析による疾病対策・創薬推進事業研究管理基本システム」**を使用して

取り行った。個人識別情報はコンピューターの外部記憶装置に保管して厳重に保管している。また、説明文書・同意文書により同意を得て提供された末梢血からDNAを抽出、遺伝子解析に用いた。一部の末梢血試料についてはリンパ球を分離してEBウイルス等で形質転換して増やし、核酸抽出に当てた。これらのDNA試料に対して、がんに関連すると考えられる遺伝子や、従来の研究ではがんとの関係が明らかでなかった遺伝子を含め約400の候補遺伝子を絞り込んだ。現段階では、およそ300の候補遺伝子に関してSNPs等の遺伝子多型解析を行っている。

### 今回の発表内容における背景と目的

上記研究の中から、現在我々が進めているがん患者に偏ったDNA修復因子の多型・変異検索の結果について報告させて頂く。酸化ストレス、複製

エラー、紫外線、放射線等によるDNA障害は、DNA複製やRNA転写を阻害し、あるいはアポトーシスを誘発し細胞死をもたらすとともに、未知の機構により突然変異を誘発する。突然変異は遺伝情報の不安定化ひいてはがん化、老化、遺伝病などの発症の原因になっていることが知られている。最近、塩基除去修復、ヌクレオチド除去修復、ミスマッチ修復などの除去修復遺伝子 (Fig.1A) の変異および発現低下とがん発症との関わりが示され遺伝子診断等に应用されつつある。しかし、その解析はすべての除去修復因子を解析しているわけではなく、ごく一部の遺伝子を解析しているに過ぎない。さらに、除去修復機構と同様にDNA障害の修復に重要な役割が知られている二本鎖DNA切断修復機構 (Fig.1A) とがん発症との関わりについては不明な点が多い。最近、二本鎖DNA切断修復蛋白質の一つである出芽酵母

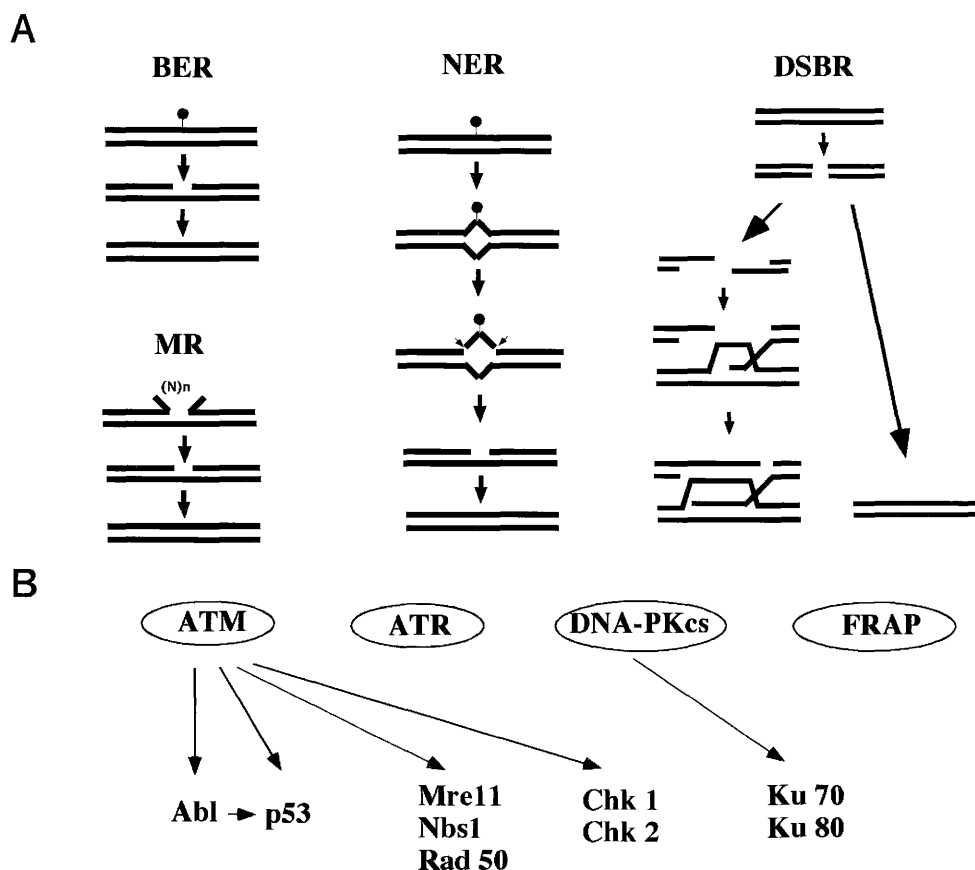


Fig.1 Candidate Genes for SNPs Analysis in DNA Repair Systems

(A)Repair systems. BER; base excision repair, MR; mismatch repair, NER; nucleotide excision repair, DSBR; double strand break repair.

(B)PI-kinase pathways. Arrow indicates kinase substrates.

#### IV. 分子レベルでの放射線応答解析

Xrs2のヒトホモログ(Nbs1)がナイミンヘン症候群(高発がん)の原因遺伝子であることが示され、二本鎖DNA切断修復機構の研究ががんの研究へと発展していく可能性がでてきた。そこで、ゲノムの解読が完了に向かいつつある今、ゲノムの塩基配列を用いて網羅的にがん患者における除去修復や二本鎖DNA切断修復に関わる蛋白質の遺伝子多型や変異を解析し、がん発症との関わりを解明することを目的とした。この除去修復や二本鎖DNA切断修復のがん発症への関与の解明は、新たな癌発症機構の解明につながると共に、それらの遺伝子群を用いたがんの早期診断・予防あるいは治療につながる事が考えられる。

#### 多型・変異検索の方法と結果

まず、説明文書・同意文書により同意を得た健康者約20人およびがん患者さん約100人から提供された末梢血からゲノムDNAを精製した。このDNAを用いて、約150のDNA修復遺伝子および制御因子(Fig.1)の全てのエクソン領域とイントロン-エクソン境界領域の塩基配列の解読を試みた。

このダイレクトシーケンスによって見つかった多型や変異が解読エラーでないことを確かめるため、さらに、タイピング法を用いて検定を行った。その結果、一塩基の変異をともなった多型(一塩基多型:SNP)を多数検出した。この中にはアミノ酸に変化を与えるSNPsが約600個存在した。このアミノ酸に変化を与えるSNPsの中から20箇所を選び出し(Table.1)、肺がん患者数百名を用いたアソシエーション解析を行った。その結果、肺がんの易罹患性と相関する可能性のあるSNPsを数個同定することができた(Sakiyama T et al. 投稿中)。

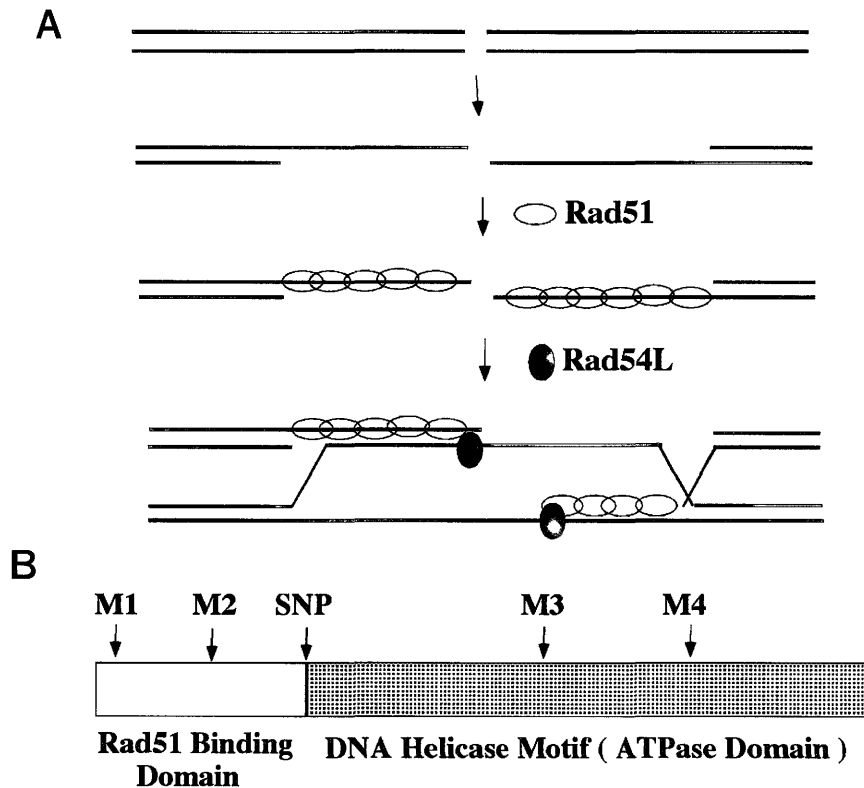
#### 遺伝子多型・変異による蛋白質活性への影響の検定

Fig.2Aに肺がんの易罹患性と相関する可能性のあるSNPsの一つとして見つかったRAD54L遺伝子の作用経路を示した。RAD54L遺伝子はFig.1で示した二本鎖DNA切断修復経路の中の組換え修復経路で働くことが知られている。組換え修復経路は主に大腸菌ではRECA遺伝子が担っている。

Table.1 Candidate SNPs in DNA Repair Systems

Repair Systems	Genes	SNPs	Amino Acid
DSBR (dsDNA Break)	BRCA2	A→C	N→
	RAD54L3	G→A	R→
	RAD54L	A→G	K→
	WRN	C→T	T→
	WRN	T→C	C→
BER (Base Excision)	XRCC3	C→T	T→
	OGGL	C→G	S→
	POLH	A→G	K→
	XRCC1	C→T	R→
	XRCC1	G→A	R→
MR (Mismatch)	XRCC1	G→A	R→
	MLH1	A→G	I→
	MSH2	C→T	T→
	MSH3	A→G	T→
NER (Nucleotide Excision)	MSH6	G→A	G→
	ERCC5	C→G	H→
	ERCC6	G→A	G→
	XPC	A→C	K→
	XPD	G→A	D→
	XPD	A→C	K→





**Fig.2** Pathway and Structure of RAD54L Gene

(A)Double strand repair pathway. Rad54L protein helps strand invasion of Rad51 protein.

(B)Structure of Rad54L. Rad54L has Rad51 binding domain and ATPase domain. M: mutation. SNP: single nucleotide polymorphism.

真核生物ではRECA遺伝子のホモログであるRAD51遺伝子が知られているが、その活性はRecA蛋白質に比べ非常に弱い。最近の解析からRad54L蛋白質はRad51蛋白質と直接結合し、Rad51蛋白質の活性を高める活性があることが知られ、Fig.3Aに示されるようなステップで働くことが示唆されている。Fig.3BにRad54L蛋白質の一次構造と多型部位および、他のがんで検出した変異や既に報告のある変異部位を示した。Rad51蛋白質と直接結合するRad54L蛋白質のN末端領域に二つの変異部位が存在し、SNP部位もその近傍に存在している。そこで、N末端領域にアミノ酸置換したRad54L変異蛋白質がRad51蛋白質と直接結合できるか酵母Two-Hybrid法を用いて解析した。その結果、Rad54LSNP蛋白質は野生型と同様な活性を示したが、Rad54L変異蛋白質の一つM2がRad51蛋白質との結合活性が低下していることが分かった(Fig.3A)。Rad54L蛋白質の中央からC末端領域はATPase活性をもつ蛋白質に良く保存されている領域があり、実際、Rad54L

蛋白質はATPase活性をもつことが知られている。この領域にはSNP部位および二つの変異部位が存在している(Fig.2B)。そこで、この領域にアミノ酸置換したRad54L変異蛋白質を昆虫細胞で大量発現させ、精製後、ATPase活性を測定した。その結果、Rad54LSNP蛋白質は野生型の約半分の活性を示した。また、Rad54L変異蛋白質の一つM3はATPase活性はほとんど検出できなかった。次に、細胞中でこれらの変異がRAD54L遺伝子の働きにどう影響するのか検討を行った。京都大学の武田先生が作成されたトリRAD54L遺伝子欠失細胞(トリRAD54LKO-DT40細胞)は放射線に対して感受性を示すことが知られていた。そこで、我々はヒトRAD54L遺伝子をトリRAD54LKO細胞で安定的に発現する細胞を樹立し、この細胞の放射線に対する感受性を測定してみたところ、ヒトRAD54L遺伝子はトリDT40細胞で機能することがわかった。この放射線感受性の回復を指標に変異RAD54L遺伝子の活性を調べてみた。in vitroでのATPase活性が約半分に低下していた

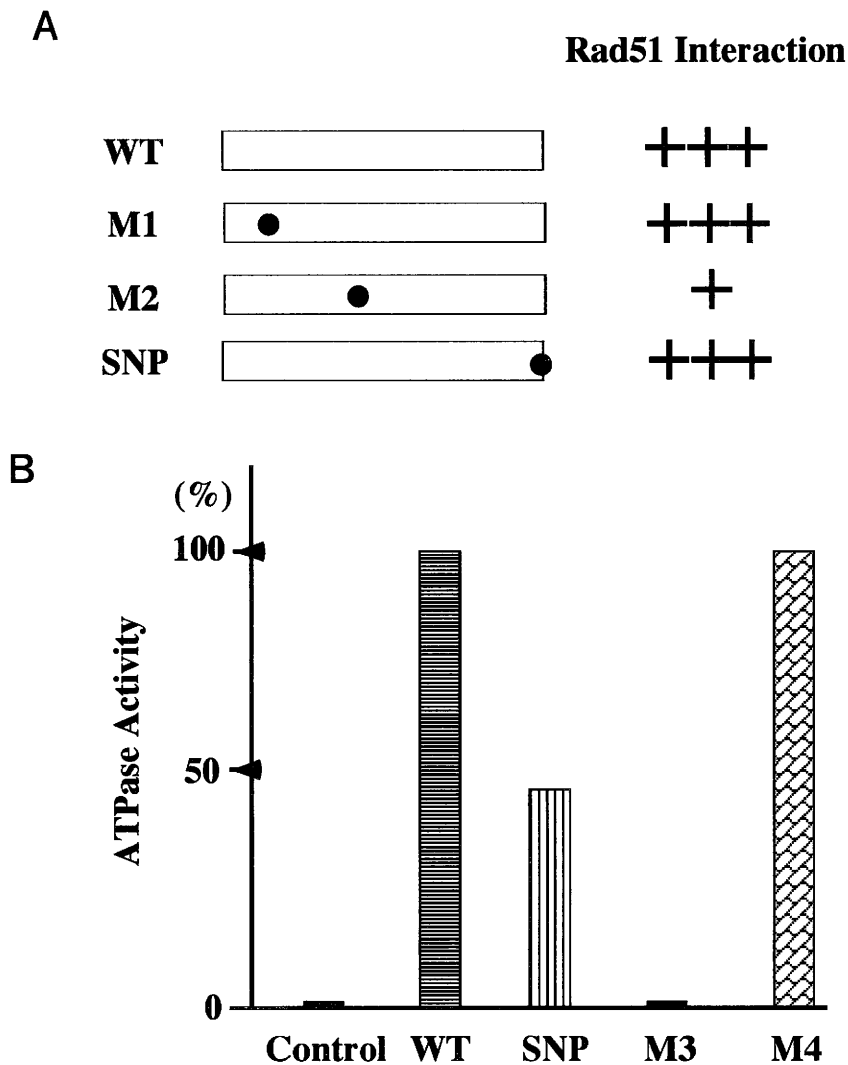


Fig.3 Activities of Rad54L Protein with SNP and Mutations

(A) Two hybrid assay. N-terminal domain of Rad54L protein binds to Rad51 protein. WT; wild type, M1; mutant 1, M2; mutant 2, SNP; SNP.

(B) ATPase activities of Rad54L. Rad54L has ATPase activity in vitro, Control: BSA.

Rad54LSNP遺伝子は、放射線感受性の回復能は野生型とはほぼ同じであった。従って、トリDT40細胞を用いた機能回復テストでは多型をもつRAD54L遺伝子の機能変化は検出できなかった。しかし、in vitroでのATPase活性がほとんど検出できなかったrad54LM3変異遺伝子は、放射線感受性の回復能は全くみられず、ほとんど機能していないことが分かった。

#### 考察

今回、我々はDNA修復遺伝子のSNPsを多数見出すことに成功した。その中の幾つかは、肺が

んの易罹患性と関連のあることがわかった。また、がん患者に偏りが見つかったDNA修復遺伝子の多型や変異の中に機能低下を示すものがみつき、DNA修復能低下とがん発症の関連が示唆された。今後、DNA修復機構のがん発症への関与の解明が進めば、新たながん発症機構の解明につながると共に、DNA修復系遺伝子群を用いたがんの早期診断あるいは予防の一つになることが期待される。さらに、DNA修復系遺伝子群は抗がん剤や放射線等の治療効果と密接に関与することが知られているので、DNA修復系遺伝子群の多型解析は、がん治療の選択の一つの目安になることも期待される。

# NIRS 放医研シンポジウム

第2回重粒子医科学センター・第1回フロンティア研究センター  
合同シンポジウム

## 「オーダーメイド放射線治療を目指して」

主 催：独立行政法人 放射線医学総合研究所  
後 援：日本放射線腫瘍学会，日本医学放射線学会，  
日本放射線影響学会，日本医学物理学会，  
日本核医学会，日本保健物理学会  
日 時：平成14年11月28日(木)・29日(金)  
場 所：放医研 講堂

第1日目 平成14年11月28日(木)

時 間	セッション及び演題	座長及び演者
9:00- 9:05	実行委員長挨拶	辻井博彦(放医研)
9:05- 9:10	開会挨拶	佐々木康人(放医研)
9:10-10:30	I. 重粒子線はこんな疾患に効く	座長：辻井博彦(放医研)
9:10- 9:20	1. 頭頸部	溝江純悦(放医研)
9:20- 9:30	2. 肺	宮本忠昭(放医研)
9:30- 9:40	3. 肝臓	加藤博敏(放医研)
	(討論10分)	
9:50-10:00	4. 前立腺	辻 比呂志(放医研)
10:00-10:10	5. 骨軟部	鎌田 正(放医研)
10:10-10:20	6. 消化器	山田 滋(放医研)
	(討論10分)	
10:30-11:45	II. 重粒子線治療に期待するもの	座長：森田皓三(愛知県がんセン ター名誉院長)
10:35-11:10	1. (特別講演)肺癌の治療	藤澤武彦(千葉大)
11:10-11:45	2. (特別講演)肝癌の治療	宮崎 勝(千葉大)
	(休憩15分) (昼食)	
12:00-13:20	III. ランチョンセミナー 「日本の粒子線治療施設」	座長：伊藤 彬(癌研)
12:00-12:10	1. 放医研	箕原伸一
12:10-12:20	2. 筑波大学	榮 武二
12:20-12:30	3. 国立がんセンター東病院	西尾禎治
12:30-12:40	4. 兵庫県立粒子線治療センター	板野明史
12:40-12:50	5. 静岡県立がんセンター	山下晴男
12:50-13:00	6. 若狭湾エネルギー研究センター	福田茂一
	(討論20分) (休憩10分)	
13:30-15:05	IV. 最先端を支える基礎および臨床研究	座長：棚田修二(放医研)
13:30-14:05	1. (特別講演)生検組織を用いたがん放射線感受性予知の試み	落合淳志(国立がんセンター)
14:05-14:20	2. 重粒子線の物理的線質について	金井達明(放医研)
14:20-14:35	3. 培養がん細胞における重粒子線照射の利点	古澤佳也(放医研)
14:35-14:50	4. 診断 PET-CTの有効性	吉川京燦(放医研)
	(討論15分) (休憩10分)	



第1日目 11月28日(木)続き

時 間	セッション及び演題	座長及び演者
15:15-16:35 15:15-15:30 15:30-15:45 15:45-16:05 16:05-16:25	<b>V. 臨床研究における倫理的側面</b> 1. 重粒子線治療のIC 2. 遺伝子解析とIC 3. 医療情報の公開と保護 4. 患者の権利  (討論10分) (休憩10分)	座長：伊東久夫(千葉大) 村田 啓(放医研) 岩川真由美(放医研) 田村和子(共同通信) 畔柳達雄(兼子・岩松法律事務所)
16:45-17:45	<b>VI. 特別講演</b> “ハンバーガー 1個から世界が見える”	座長：辻井博彦(放医研) 藤原和博(杉並区教育委員会参与)
18:00-	<b>懇親会 重粒子治療推進棟1階 食堂</b>	挨拶：小澤俊彦(放医研)

第2日目 11月29日(金)

時 間	セッション及び演題	座長及び演者
9:00- 9:10	<b>I. 放射線感受性遺伝子プロジェクトの目的と意義</b>	今井高志(放医研)
9:10-11:00	<b>II. 放射線感受性の個人差検索</b>	座長：安藤興一(放医研) 原田良信(放医研)
9:10- 9:30	1. 骨軟部腫瘍の炭素イオン線治療における皮膚反応の解析	柳 剛(放医研)
9:30- 9:50	2. 細胞の放射線感受性解析-小核アッセイ法, コメットアッセイ法を中心として-	原田良信(放医研)
9:50-10:20	3. 放射線感受性とDNA損傷・修復 (休憩20分)	鈴木紀夫(東大)
10:40-11:00	4. 放射線リスクの高い疾患 -MDS-	伴 貞幸(放医研)
11:00-12:00	<b>III. (特別講演)遺伝統計学の論理と手法</b>  (昼食)	座長：今井高志 鎌谷直之(東京女子医科大)
13:30-16:45	<b>IV. 分子レベルでの放射線応答解析</b>	座長：矢守隆夫(癌研) 岩川真由美(放医研) 油谷浩幸(東大)
13:30-14:00	1. 発現プロファイル解析と疾病研究	矢守隆夫(癌研)
14:00-14:30	2. 薬剤感受性データベースとバイオインフォーマティクス	道川祐市(放医研)
14:30-15:00	3. 放射線線量効果と細胞内情報伝達	三宅正人(産総研)
15:00-15:30	4. トランスフェクションアレイ技術とその応用 (休憩15分)	
15:45-16:15	5. 放射線感受性遺伝子検索：遺伝子発現解析からのアプローチ	三枝公美子(放医研)
16:15-16:45	6. がんにおけるゲノムDNAの多型および変異解析	太田 力(がんセンター)
16:50-17:20	<b>V. 総合討論</b>	座長：鈴木紀夫 森田皓三, 三宅正人, 鎌谷直之, 矢守隆夫, 太田 力, 他
17:20-17:30	閉会の辞	村田 啓(放医研)

テーラーメイド放射線治療を目指して

独立行政法人 放射線医学総合研究所  
第2回重粒子医科学センター・第1回フロンティア研究センター  
合同シンポジウム

---

2003年6月30日発行

編著 辻井博彦／伴貞之

発行人 林 光 生

発行所 株式会社 実業公報社

〒120-0073 東京都千代田区九段北1-7-8

電話 東京(03)3265-0951 Fax.(03)3265-0952

振替口座 00110-6-32466

---

©2003 独立行政法人 放射線医学総合研究所  
禁無断転載・複製

Printed in Japan

ISBN4-88038-043-1