

## 小膵癌(結節型)診断のアルゴリズム(III):画像検査,膵液K-ras遺伝子

著者	岡井 高, 山口 泰志, 渡辺 弘之, 澤武 紀雄
雑誌名	胆と膵 = The Biliary tract & pancreas
巻	19
号	1
ページ	55-60
発行年	1998-01-01
URL	<a href="http://hdl.handle.net/2297/40643">http://hdl.handle.net/2297/40643</a>

小膵癌 (ts<sub>1</sub>, 結節型) の診断をめざして小膵癌 (結節型) 診断のアルゴリズム (III)  
—画像検査, 膵液 K-ras 遺伝子\*—岡井 高<sup>1)</sup>・山口 泰志・渡辺 弘之・澤武 紀雄

要約: 1~2 cm の小膵癌は, EUS で尾側膵管の急激な拡張を伴う比較的境界明瞭な円形低エコー腫瘤として描出される場合が多い。上皮内癌など 1 cm 以下の場合には分枝の囊状拡張が唯一の所見となる可能性もあり, 主膵管および分枝の系統的スキャンが膵癌の早期発見につながると思われる。小膵癌と炎症性膵腫瘍との鑑別では, 尾側膵管の形状を加味して腫瘤の形態や内部エコーの性状を評価することが重要だが, 腫瘤が小さくなればなる程両者の鑑別は困難となる。診断能の向上を図るため膵液の遺伝子診断を組み合わせている。PCR-RFLP 法では, 全膵管癌の 81% (21/26) に K-ras コドン 12 の点突然変異が検出されたが, 慢性膵炎でも 9% (5/53) に検出された。しかし, HPA 法の開発により K-ras コドン 12 の簡便な定量的測定が可能となり癌特異性が向上した。膵液の遺伝子診断は, EUS にて検出された小腫瘍性病変や実質内の囊胞状変化の質的診断に有用であり, これら内視鏡を応用した一連の検査は, 膵癌の早期診断法として大いに期待される。

**Key words** : pancreatic cancer, endoscopic ultrasonography, pure pancreatic juice, K-ras mutation

## はじめに

今日, US, CT, ERCP, MRI などの画像診断法の開発普及により, 膵癌の診断能は目覚ましい進歩を遂げている<sup>1)</sup>。しかし, 予後の期待できるステージ I 膵癌となるといまだ少数であり, 手術例全体でも 6% を占めるにすぎない<sup>2)</sup>。一方, 超音波内視鏡検査 (EUS) は, 膵の最も鋭敏な画像診断法の一つに数えられており, 膵癌の早期診断法として大いに期待されている<sup>3~5)</sup>。しかし, 膵癌においては肝細胞癌のように明確な高危険群を設定できず, 本検査をどのような症例に絞って行なったらよいかについては一定の見解が得られていない。現状では, 本検査は拾い上げ診断というよりもむ

しろ精密検査として施行され, 患者の大半は他の画像診断や血液検査にて異常を指摘されていることが多い。また, 膵癌のごく初期の EUS 像についてはほとんど解明されておらず, 腫瘤が小さくなればなるほど炎症性腫瘍との鑑別も難しいのが現状である<sup>6)</sup>。

一方, 私共は, 膵癌は組織レベルで 90% 以上に K-ras コドン 12 の点突然変異が発現しているという Al-moguera らの報告<sup>7)</sup>に注目し, 経内視鏡的に採取した膵液に含まれる細胞成分を用いて K-ras 変異の検索を試みたところ, 膵癌患者では高頻度に K-ras 変異が検出されるという成績を得ている<sup>8~10)</sup>。また, 陽性例には腫瘍径 2 cm 以下の小膵癌例も含まれることより, 本法は小膵癌の早期診断にも応用できる新たな診断法として注目されている。

そこで, 本稿では, EUS による画像的評価に純膵液中の細胞成分を用いた分子生物学的評価を組み合わせ一連の内視鏡下の検査が, 小膵癌の診断にどのような臨床的意義を有しているかについて述べる。

\* An Algorithm for the Evaluation of Patients with Suspected Pancreatic Cancer by Endoscopic Ultrasonography with K-ras Analysis of Pure Pancreatic Juice

1) 金沢大学がん研究所内科 (〒 921-8044 金沢市米泉 4-86)

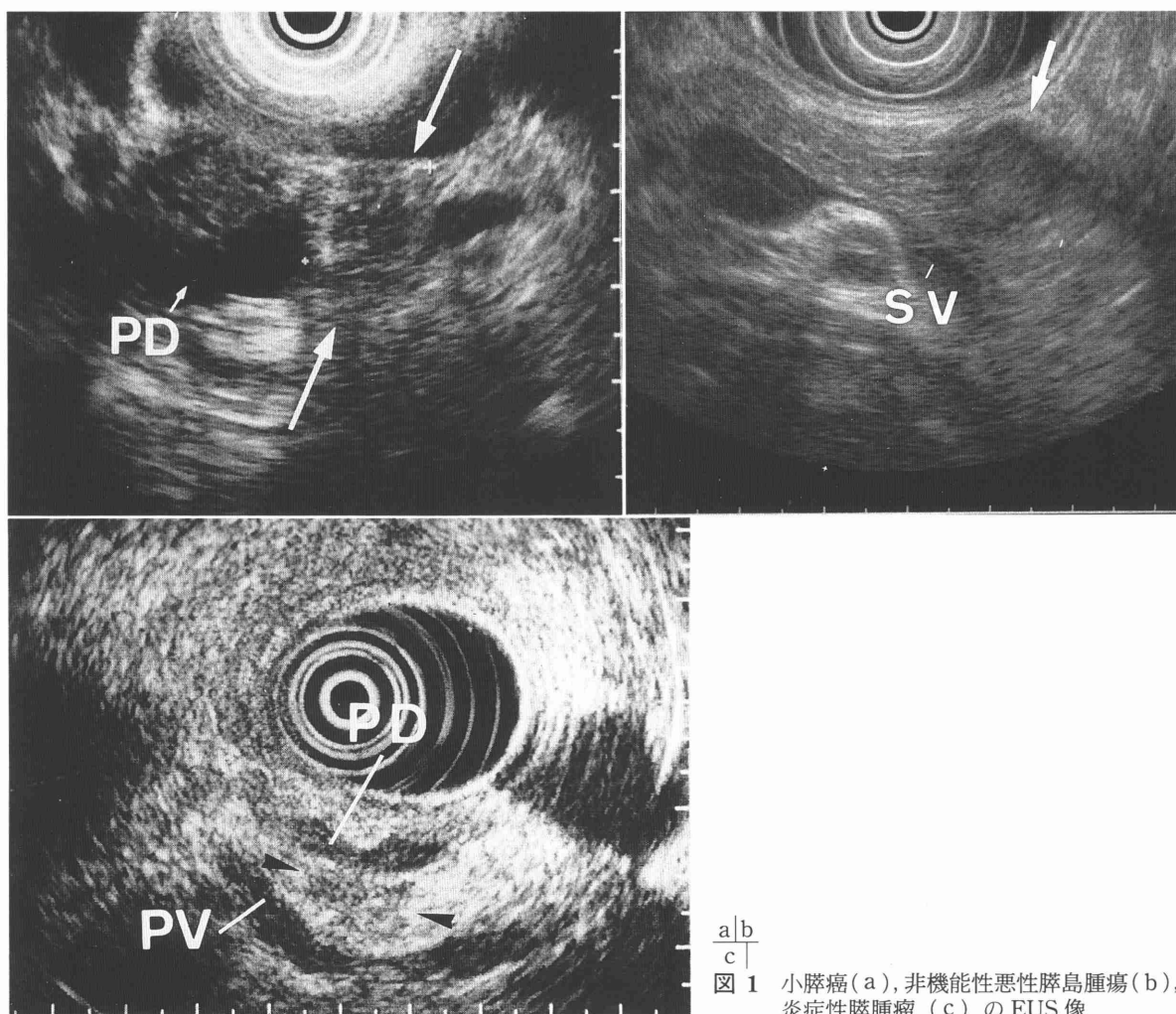


図 1 小膵癌 (a), 非機能性悪性膵島腫瘍 (b), 炎症性膵腫瘍 (c) の EUS 像

## I. EUS による膵癌の診断

筆者らは、ラジアルセクタ型 EUS により膵疾患の診断を行なっている。以前は、主として胃観察用のオリンパス社製 GF-UM2, UM-20 などを用いていたが、十二指腸下行脚への挿入が容易な十二指腸専用機 JF-UM200 (周波数, 7.5 MHz) を使用するようになってからは、膵の精密検査のみならずスクリーニング検査にも容易に対応できるようになった。スコープを十二指腸下行脚まで挿入して乳頭を観察した後、バルーンに脱気水を注入する。スコープをストレッチにしながらし進めて右の腎臓を越えると、膵鉤部が上腸間膜静脈に沿って描出されてくる。その後はスコープをゆっくりと引きながら膵頭部および膵頸部を観察する。この間、主膵管および総胆管の長軸断面層面が描出されるようにスコープの角度を上下左右に調節し、これら管腔壁の不整拡張の有無や膵実質像を観察する。膵体尾部は、スコープを胃内まで引き戻して、

胃体部より観察する。頭部と同様に、主膵管を頭側よりトレースし不整拡張の有無をチェックする。その後実質のエコーレベルの変化、特に限局性の異常エコー域の有無を深意深く観察する。7.5 MHz の器械では、主膵管内の小腫瘍や実質内の嚢胞状変化を詳細に描出することは困難である。これら膵の微小病変の検出には、12 MHz 程度の高周波プローブが必要であり、十二指腸専用機においても 7.5 MHz との切替が適宜可能な器械の開発が望まれる。

### 1. 小膵癌の EUS 像 (腫瘍の性状)

筆者らの施設で切除された腫瘍径 1~2 cm の小膵癌 8 例は、諸家の報告<sup>3-5)</sup>と同様、全例低エコーの類円形ないし楕円形の腫瘍として描出された。周囲膵実質との境界は概して明瞭だが、等エコー部分が辺縁に存在するとその部分で不明瞭となる。辺縁不整も一部のみ不整を入れると全例が不整である (図 1 a)。腫瘍径 1 cm 以下のより小さな膵癌の経験はないが、いわゆる上皮内癌では、膵実質に拡張した分枝膵管や嚢胞の検出される頻度が比較的高いといわれており<sup>11,12)</sup>、低エ

コーの腫瘍のみならず、分枝膵管の限局性拡張や実質内の嚢胞状変化にも注目することが重要と思われる。また、膵内分泌腫瘍は、教科書的には均一な円形低エコー腫瘍として描出されるといわれているが<sup>3)</sup>、図1bに示したように、2 cm 前後になると中心に高エコー域が出現したり辺縁の凹凸が出現したりすることがあり、膵管癌との鑑別は必ずしも容易ではない。

## 2. 大きな膵癌のEUS像

腫瘍径が3 cmを越すと、辺縁の凹凸が強くなり、不整形を呈するものが多くなる。内部エコーは、低エコーに等ないし高エコーが混在して不均一になり、エコーレベルも上昇する。周囲との境界は不明瞭となり、隣接する血管壁に不整浸潤する像もみられる。しかし、腫瘍形成性膵炎でも同様の腫瘍像を呈することがあり、尾側膵の性状、特に尾側膵管の拡張や膵実質の萎縮の有無を確認することが両者の鑑別に重要である。ただし、EUSに他の画像診断の所見を加味しても、膵癌と腫瘍形成性膵炎との鑑別に難渋する場合が依然としてみられる。

## 3. 小膵癌における腫瘍と主膵管との関連

切除された腫瘍径1~2 cmの小膵癌8例で、腫瘍と主膵管、特に尾側膵管との関連について検討した。鉤部癌の1例を除く7例で腫瘍部の尾側膵管に拡張が認められた。そして、7例中6例は、腫瘍部尾側の膵管が単純性あるいは数珠状に拡張し、断端は腫瘍に向かってペン先状または楔状となり、凹凸不整を示した。また、残る1例は、屈曲蛇行を示すのみで、拡張は軽度であった。前述のように、上皮内癌では分枝レベルの膵管に流出障害が生じ、膵管分枝の限局性拡張さらに嚢状拡張をきたす可能性があり、微小癌の発見につなげるためには実質内の嚢胞状変化にも注意を払う必要があると思われる。

## 4. 炎症性膵腫瘍との鑑別診断

炎症性膵腫瘍17例のEUS施行理由は、USないしはCTで主膵管の拡張を指摘されたものが5例、SOLないしは限局性腫大を指摘されたものが4例、ERCPで主膵管の壁不整を指摘されたものが3例、膵酵素あるいは腫瘍マーカーの高値を指摘されたものが4例、そして、腹痛の精査目的のものが1例である。USないしはCTでSOLないしは限局性腫大を指摘された4例は、いわゆる腫瘍形成性膵炎であり、EUSでも大きな腫瘍像として描出されたが、残り13例は、EUSにて初めて腫瘍が描出された。これら腫瘍の大きさは30 mmから6 mmで、膵野に存在していたものが6例、主膵管にまたがって存在していたものが7例である。膵野型の6例はいずれも円形ないしはやや角ばった不

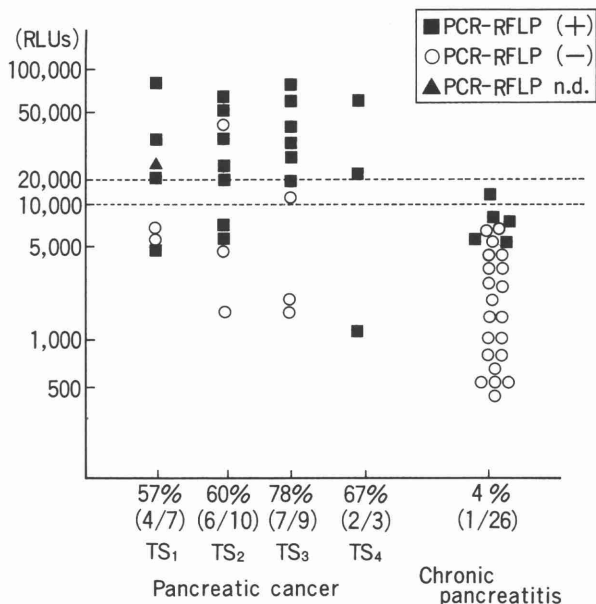


図2 HPA法による膵癌および慢性膵炎患者膵液におけるK-rasコドン12点突然変異(腫瘍径別の検討)

整形を呈しており、点ないし斑状の高エコースポットを有する比較的均一な低エコー域として描出された(図1c)。また、主膵管にまたがるものは類円形を呈していたが、小膵癌程境界は明瞭ではなく、エコーレベルもさほど低下していなかった。また、尾側膵管や分枝の拡張を伴うものは1例も経験されなかった。前項でも述べたごとく、尾側膵管の拡張の有無が膵癌との鑑別上かなり重用である。しかし、腫瘍径1 cm以下では、腫瘍像および主膵管との位置関係などを総合的に評価しても膵癌との鑑別に苦慮する場合が多かった。

## II. 膵液中K-rasコドン12点突然変異の検出

膵液採取は通常EUSやERCPとは別の日に行ない、十二指腸内視鏡下に主乳頭にカテーテルを挿入し、セクレパンを負荷して5分ごと4分画に分けて採取している。第Iか第II分画の沈渣よりDNAを抽出し、各種遺伝子分析に用いている。

### 1. 膵癌における検出

#### 1) 定性的測定法

当初K-rasコドン12, 13, 61領域のそれぞれに対応する6種のallele specific oligonucleotide (ASO)プローブを用いてドットプロットハイブリダイゼーションを行なった。膵癌20例中11例(55%)にK-rasコドン12の点突然変異が認められたが、粘液産生膵腫瘍で組織学的には腺腫であった2例ならびに慢性膵炎

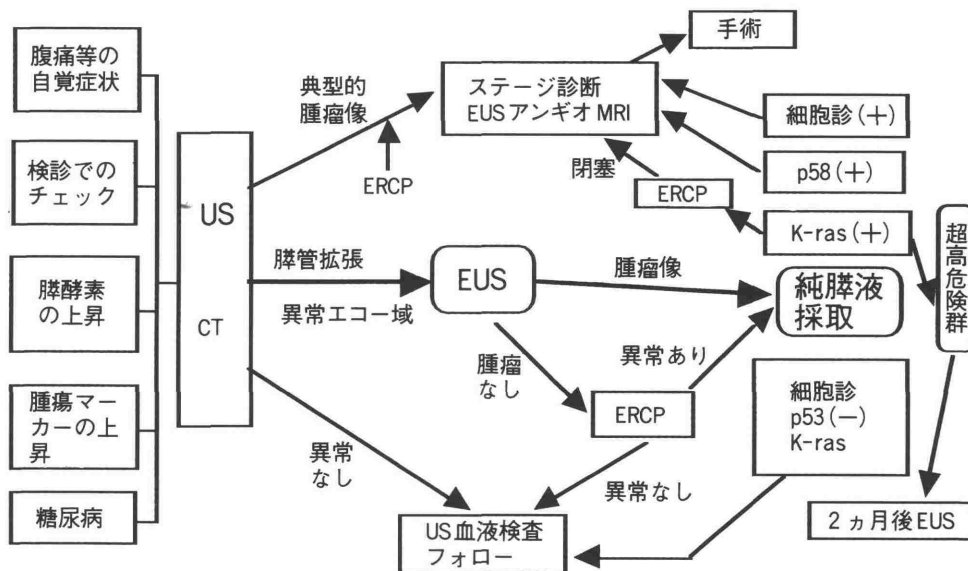


図 3 EUS と膵液遺伝子診断を組み合わせた膵癌診断体系

18例には検出されなかった<sup>8)</sup>。コドン 13, 61 については、膵癌、慢性膵炎ともに検出されなかった。このように膵癌の *K-ras* 変異はコドン 12 がホットスポットであることが確認され、膵癌に特異的であるように思われた。しかし、ASO プローブ法の検出感度は、変異 DNA が少なくとも 5% 以上に存在しなければならないとされ、より高感度の検出法の開発を試みた。

そこで、Levi らにより考案された *K-ras* コドン 12 の点突然変異検出用に設定されたプライマーを用いて PCR-RFLP 法を行なった。*K-ras* コドン 12 の正常型 DNA は BstNI により 106 bp と 29 bp の大きさに切断されるが、膵液中より抽出した DNA 中に増幅された変異型 DNA が存在すれば、BstNI に切断されず 135 bp のバンドが残存することにより識別される。本法により膵液中の *K-ras* コドン 12 の点突然変異を検索すると、膵癌 29 例中 37 例 (78%) に、粘液産生膵腫瘍 4 例中 2 例に陽性であった<sup>9)</sup>。

膵液中 *K-ras* コドン 12 の変異と膵癌の占拠部位との関係を見ると、頭部癌 74% (17/23)、体部癌 86% (6/7)、尾部癌 86% (6/7) であり、占拠部位による差はみられていない。腫瘍径との関係では、TS1 67% (4/6)、TS2 82% (9/11)、TS3 73% (8/11)、TS4 89% (8/9) であり、未だ小膵癌における成績が十分集積されていないが、腫瘍径との関連性はみられていない。10 例において膵液の細胞診との比較が可能であった。細胞診では 20% (2/10) が陽性と判定されたのみであったが、*K-ras* 変異は 80% (8/10) に検出され、細胞診より優れた成績が得られている。しかし、筆者らの用いている PCR-RFLP 法は、変異 DNA が 0.2~0.5% の比率

でも検出されるといわれているが、慢性膵炎でも 9% (5/53) に陽性である。さらに、enriched PCR-SSCP 法、two-step enriched-nested PCR 法、MASA 法など検出能の高い方法によると慢性膵炎における偽陽性率はかなり高く、特に MASA 法では変異 DNA が 0.01~0.001% に含有していても検出できるといわれており、慢性膵炎での偽陽性率は 40~50% にも達する。膵管内乳頭腺腫でも *K-ras* 変異が高率にみられるのに加え、慢性膵炎の一部にみられる粘液過形成上皮に *K-ras* 変異が高率にみられることから、Yanagisawa らは、mucous cell hyperplasia-adenoma-carcinoma sequence の概念を提唱している<sup>13)</sup>。これらのことより、慢性膵炎の膵液中にみられる *K-ras* 変異はこのような過形成上皮が混入したことによると考えられ、*K-ras* 変異の癌特異性が大きな問題になっている。

## 2) 定量的測定法

筆者らは、*K-ras* コドン 12 に対応したプローブにアクリジンエステルを標識し、膵液より抽出した DNA の PCR 産物と反応させ、生じる化学発光値より *K-ras* 変異の有無を定量的に測定できるハイブリダイゼーションプロテクションアッセイ (HPA) 法を新たに開発した<sup>10)</sup>。前述したように感度の高い定性的な方法では慢性膵炎でも *K-ras* 変異はかなり検出されるが、本法のような定量的方法では、適切なカットオフ値を設定することにより癌特異性の高い診断法として用いることが可能である。また、本法により変異した塩基配列の種類も判別可能である。図 2 は、腫瘍の大きさ別に膵癌患者の *K-ras* コドン 12 変異の有無を

みたものであるが、膵癌では TS1 でも 57% が陽性を示したのに対し、慢性膵炎患者では、体尾部にまたがる腫瘤形成性膵炎の 1 例がカットオフ値を少し越えたのみであった。

## 2. 炎症性膵腫瘍における膵液中 K-ras コドン 12 点突然変異の検出

17 例の炎症性膵腫瘍患者で、PCR-RFLP 法を用いて K-ras 変異を検索した。15 例は陰性と判定されたが、膵野型の 1 例と腫瘤形成性膵炎の 1 例では変異陽性と判定された。後者については手術がなされたが癌の合併はなかった。前者は、膵癌の超高危険群として 1 年間 EUS の厳重なフォローを行なっているが、腫瘤の増大はみられていない。

### III. EUS と膵液の遺伝子診断を組み合わせた一連の内視鏡下の検査の膵癌早期診断における意義

図 3 に、EUS と膵液の遺伝子診断を用いた膵癌診断手順の実際を示す。腹痛などの自覚症状、検診でのチェック、糖尿病の悪化などがあった場合、膵癌の可能性を考慮し、膵胆道系酵素や腫瘍マーカーの血液検査と、US または CT による一次スクリーニングを施行する。この時点で膵癌と診断されれば、手術適応を決めるため血管造影や EUS を行なう。この際 EUS は、主として門脈浸潤やリンパ節転移などの進展度診断に用いる。一方、膵に明らかな腫瘍像はないが膵管拡張や小嚢胞などの異常所見が認められた場合には、二次検査として最初に EUS を行なう。EUS は操作に熟練を要するものの、腫瘍性病変の検出能には優れており、外来検査として安全に行ないうる利点がある。これに対し、膵管系を描出する ERCP は、膵疾患の診断法として確立された検査法ではあるが、より侵襲的で、その所見は腫瘍性病変の診断に対しては非特異的である。

そして、腫瘍が小さく画像的に質的診断が困難な場合には、内視鏡下に採取した純膵液を用いて、K-ras などの遺伝子診断を行なう。最近私共は、膵液中の p53 のエクソン 5~8 における変異の有無を分析したところ、膵癌の 42% (11/26) に変異のみられることを確認している<sup>14)</sup>。良性膵疾患では、p53 変異はまったくみられておらず、また、K-ras 変異陰性例にも p53 変異陽性例を認めていることから、膵液中の K-ras に p53 を加えて検討することにより、膵癌の遺伝子診断能はよりいっそう高まるものと予想している。

## おわりに

小膵癌の発見のためには、上腹部痛を訴える患者に対して膵の血液検査のほか丁寧な US スクリーニングを行ない、膵管の拡張などのわずかな異常をも見逃さないことが重要である。また、EUS を積極的に施行し、小腫瘍性病変や実質内の嚢胞状変化の発見に努め、これら所見がみられた場合には、さらに、純膵液の細胞診や遺伝子診断を追加する。これら内視鏡下の一連の検査により、膵癌の早期診断能はいっそう高まるものと期待される。

## 参考文献

- 1) MacCarty RL, Ward EM, Charboneau W, et al. : Imaging of the pancreas. The pancreas, biology, pathobiology and diseases, (Go VL), 2nd ed., 1103-1135, Raven Press, New York, 1993.
- 2) 日本膵臓学会膵癌登録委員会 : 全国膵癌登録調査報告, 1992 年度症例.
- 3) Rösch T, Classen M : Pancreatic carcinoma. Gastroenterologic Endosonography, (Rosch T, Classen M), 1st ed. 114, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 1992.
- 4) Yasuda K, Mukai H, Nakajima M : Endoscopic ultrasonography diagnosis of pancreatic cancer. Gastrointest Endosc Clin North Am 5 : : 699-712, 1995.
- 5) 古川 剛, 大橋計彦, 内藤靖夫, ほか : 早期膵癌の臨床的検討, 小膵癌と上皮内癌の比較を中心に. 膵臓 11 : 368-377, 1996.
- 6) 渡辺弘之, 山口泰志, 里村吉威, ほか : 小膵癌診断における膵液中腫瘍マーカーの測定と K-ras 点突然変異の検索. 消化器内視鏡 7 : 1137-1146, 1995.
- 7) Almoguera C, Shibata D, Forrester K, et al. : Most human carcinomas of the exocrine pancreas contain c-K-ras genes. Cell 53 : 549-554, 1988.
- 8) Watanabe H, Sawabu N, Ohta H, et al. : Identification of K-ras oncogene mutation in the pancreatic juice of patients with ductal pancreatic cancer. Jpn J Cancer Res 84 : 961-965, 1993.
- 9) Watanabe H, Sawabu N, Songur Y, et al. : Detection of K-ras point mutation at codon 12 in pure pancreatic juice for the diagnosis of pancreatic cancer by PCR-RFLP analysis. Pancreas 12 : 18-24, 1996.
- 10) Watanabe H, Miyagi C, Yamaguchi Y, et al. : Detection of K-ras mutations at codon 12 in pancreatic juice for the diagnosis of pancreatic cancer by hybridization protection assay for the determination of the types of point mutations. Jpn J Cancer

Res **67** : 466-474, 1996.

- 11) Nakaizumi A, Tatsuta M, Uehara H, et al. : Effectiveness of the cytologic examination of pure pancreatic juice in the diagnosis of early neoplasia of the pancreas. *Cancer* **76** : 750-757, 1995.
- 12) 佐藤一弘, 有山 襄, 須山正文, ほか : 膵上皮内癌の診断, ERCP と ERCP の応用手技による診断を中心に. *消化器科* **21** : 7-16, 1995.
- 13) Yanagisawa A, Ohtake K, Ohashi K, et al. : Frequent *c-K-ras* oncogene activation in mucous cell hyperplasia of pancreas suffering from chronic inflammation. *Cancer Res* **53** : 953-956, 1993.
- 14) 山口泰志, 渡辺弘之, Songür Y, ほか : 膵癌患者膵液中 p53 癌抑制遺伝子の検討. *腫瘍マーカー研究会誌* **10** : 123-124, 1995.

\* \* \*