

癌化学療法副作用発現に関する効果量を用いた予測モデルの構築と評価

内藤雅人

目次

略語一覧	1
緒言	4
第 I 章食道癌に対するドセタキセル・シスプラチン・フルオロウラシル併用療法における好 中球減少リスク因子に関する後方視的解析	
序論	6
患者背景と方法	8
結果	13
考察	22
第 II 章カベシタビン治療に伴う手足症候群発現においてヘモグロビン値が重要なリスク因 子である	
序論	32
患者背景と方法	33
結果	38
考察	44

要約	57
総括	59
参考文献	61
論文目録および参考論文.....	66
謝辞	67

略語一覽

5-FU	5-Fluorouracil
ACEI	Angiotensin converting enzyme inhibitor
ALT	Alanine transaminase
ARB	Angiotensin II receptor blocker
AST	Aspartate transaminase
AUC	Area under the ROC curve
Alb	Albumin
BMI	Body mass index
BSA	Body surface area
BUN	Blood urea nitrogen
Bev	Bevacizumab
CCB	Calcium channel blocker
CDDP	Cis-Diammine Dichloro Platinum (II)
CI	Confidence interval
CPA	Cyclophosphamide
CRP	C-reactive protein
CTCAE	Common terminology criteria for adverse events
Cape	Capecitabine
Cre	Creatinine
DOC	Docetaxel
DPD	Dihydropyrimidine dehydrogenase
FN	Febrile neutropenia

G-CSF	Granulocyte-colony stimulating factor
HFS	Hand-foot-syndrome
Hb	Haemoglobin
Her	Trastuzumab
Ht	Haematocrit
IDI	Integrated discrimination index
IQR	Interquartile range
K	Potassium
KM	Kaplan-Meier
Lapa	Lapatinib
MPA	Medroxyprogesterone acetate
NPV	Negative predictive value
NRI	Net reclassification index
OR	Odds ratio
PLT	Platelet
PPI	Proton-pump inhibitor
PPV	Positive predictive value
PTX	Paclitaxel
QOL	Quality of life
QR	Quantile regression
RBC	Red blood cell
RMST	Restricted mean survival time
ROC	Receiver operating characteristic
RR	Response Rate

SLR	Simple linear regression
Sen	Sensitivity
Spe	Specificity
Tau	Quantile Point
VB ₆	Vitamin B ₆
l-OHP	Oxaliplatin
mOS	median Overall Survival
<i>n</i>	Number
<i>r</i>	Pearson's correlation coefficient
γ-GTP	Gamma-glutamyl transpeptidase

緒言

日本では 2014 年には約 90 万人が癌に罹患し、約 40 万人が死亡している。このような状況のもと、2006 年からがん医療における人材レベル向上を目的とし、がん対策基本法が制定された。文部科学省は、2007 年から手術療法、放射線療法および化学療法などに携わるがん専門医療人を養成する大学の取組を支援することを目的とし、第 I 期がんプロフェッショナル養成基盤推進プラン(がんプロ)を策定した。2012 年以降、第 II 期計画が実施され、全国 15 のがんプロフェッショナル専門拠点が選定された。大阪薬科大学は第 II 期より大阪大学を拠点とするがんプロに参加している。私は大阪大学医学部附属病院薬剤部にて実地研修および癌化学療法の副作用発現に関する効果量を用いた予測モデルの構築と評価を行った。

癌化学療法時の副作用発現は、治療の中断や生活の質(Quality of Life; QOL)の低下を引き起こす要因である。一般的に癌化学療法による副作用の重篤度や発現時期は患者ごとに大きく異なり、正確に予測することが可能となれば、予防策を講じること等で適切な癌化学療法が施行できると考えられる。まず、発現時期が予測可能な代表的副作用として好中球減少が考えられる。抗癌薬による好中球減少の発現時期は、抗癌薬によりある程度予測可能であり、時間概念を考慮する必要は無い。一方、発現時期の予測が困難な副作用の代表として手足症候群が考えられる。抗癌薬により多少の前後はあるものの、治療早期から晩期まで様々な時期に発現するため、時間概念を考慮した解析が必要である。本研究では、第 I 章では、副作用の発現時期がある程度一定である臨床研究として、「食道癌に対するドセタキセル・シスプラチン・フルオロウラシル併用療法における好中球減少リスク因子に関する後方視的解析」を、第 II 章では、副作用の発現時期が予測困難な臨床研究として、「カペシタビン治療に伴う手足症候群発現においてヘモグロビン値が重要なリスク因子である」を実施した。

第 I 章

食道癌に対するドセタキセル・シスプラチン・フルオロウラシル併用療法における
好中球減少リスク因子に関する後方視的解析

序論

日本において、5-フルオロウラシル(5-Fluorouracil; 5-FU)およびシスプラチン(Cis-Diammine Dichloro Platinum (II); CDDP)併用療法(FP療法)は、進行食道癌の標準治療とされている。FP療法の生存期間中央値(median Overall Survival; mOS)は約6ヶ月、奏効率(Response Rate; RR)は約30%と報告されている[1,2]。欧州においても進行食道癌の標準治療とみなされており、mOSは約8ヶ月、RRは約35%と本邦と同程度の有効性が認められている[3]。しかしながら、統計学的に有意な延長および腫瘍縮小効果は得られていない。したがって、FP療法に種々の抗癌薬を併用することで抗腫瘍効果を高める試みが多数なされており、タキサン系の併用が有効であると報告されている[4-6]。Yamasakiらは、ドセタキセル(Docetaxel; DOC)、CDDPおよび5-FU併用療法(DCF療法)が、日本人における進行食道癌に対して高い抗腫瘍効果(RR=73%)があることを報告している[7]。しかしながら、約60%の患者にGrade IVの好中球減少が発症したことも併せて報告しており、DCF療法は非常に強い骨髄抑制を伴うことが示唆されている。他報においてもGrade IVの好中球減少が約50%に発症することが示されている[8-10]。また進行胃癌に対するDCF療法においては、Grade III/IVの好中球減少が約80%に発症したとも報告されている[11,12]。DCF療法は進行食道癌患者に対する効果的な治療法であると考えられるが、他の消化器癌に対する化学療法と比較しても骨髄抑制が極めて強いと考えられる[13-16]。Xiao-Longらは、胃癌に対するDCF療法と非タキサン系化学療法における毒性の違いを報告しており、DOCが好中球減少の大きな要因であると報告している[17]。また、DOC用量と好中球減少には関連があるとされているが、その他Grade IVの好中球減少に関連する要因は未だ分かっていない[18]。一般的に、固形癌患者において最低好中球数が1,000/ μ L以下の期間が長くなれば、約5%が感染症(敗血症または肺炎)にて死亡するとの報告もあり、好中球数をモニタリングすることは極めて重要である[19]。そこで本研究では、DCF療法を施行した進行食道癌に対する、Grade IV

の好中球減少の予測因子を調べることにした。

患者背景と方法

患者背景

2013年8月から2014年9月に大阪大学医学部附属病院に入院した進行食道癌患者73名を対象とした。7名の患者については詳細な経過データを取得することが難しかったため、66名を対象とした。患者背景はTable 1に示した。

本研究は、大阪大学医学部附属病院治験委員会の承認を受けて実施した(承認番号14392)。

Table 1; Baseline characteristics of oesophageal cancer patients ($n = 66$) treated with docetaxel (DOC), cisplatin (CDDP), and 5-FU (5-FU)

	Mean	95%CI	n
Age(years)	67	65-69	66
BMI (kg/m ²)	20.7	20.0-21.5	66
BSA (m ²)	1.62	1.58-1.67	66
Neutrophil (/μL)	4339	3871-4806	66
Monocyte (/μL)	442	396-487	66
RBC (×10 ⁶ /μL)	4.19	4.04-4.34	66
PLT (×10 ³ /μL)	256	239-273	66
Hb (g/dL)	13.5	13.1-13.9	66
Ht (%)	40.9	39.7-42.1	66
K (mEq/L)	4.3	4.2-4.4	66
BUN (mg/dL)	14.3	13.1-15.4	66
Cre (mg/dL)	0.78	0.74-0.82	66
AST (IU/L)	20	17-23	66
ALT (IU/L)	15	14-17	66
γGTP (IU/L)	34	28-41	65
Alb (g/dL)	3.9	3.8-4.0	66
CRP (mg/dL)	0.57	0.32-0.81	66
CDDP (mg/body)	108.9	105.0-112.9	66
DOC (mg/body)	111.0	107.3-114.8	66
5-FU (mg/body)	1111.3	1073.5-1149.0	66

	n	%
Sex		
Male	56	84.8
Female	10	15.2
Stage		
I	3	4.5
II	19	28.8
III	30	45.5
IV	14	21.2
Medication		
ACEI or ARB	12	18.2
CCB	18	27.3
PPI	18	27.3

Abbreviations: ACEI, angiotensin converting enzyme inhibitor; Alb, albumin; ALT, alanine transaminase; ARB, angiotensin II receptor blocker; AST, aspartate transaminase; BMI, body mass index; BSA, body surface area; BUN, blood urea nitrogen; CCB, calcium channel blocker; CI, confidence interval; Cre, creatinine; CRP, C-reactive protein; Hb, haemoglobin; Ht, haematocrit; K, potassium; *n*, number; PLT, platelet; PPI, proton-pump inhibitor; RBC, red blood cell; γ -GTP, gamma-glutamyl transpeptidase

治療スケジュール

DOC および CDDP(70mg/m²)を 2 時間、その後 5-FU(700mg/m²)を 5 日間持続投与された。悪心および嘔吐に対しては、ホスアプレピタント(150mg)、パロノセトロン(0.75mg)およびデキサメタゾン(6.6mg)を DCF 療法 30-45 分前に前投薬された。2-3 日目はデキサメタゾンのみ投与された。Grade IV の好中球減少を発症又は発症すると予測される場合には、顆粒球コロニー刺激因子(Granulocyte-colony stimulating factor;G-CSF)および抗菌薬が投与された。

統計解析

DCF 療法を受けた進行食道癌患者の医療記録を電子カルテより後方視的に調査した。DCF 療法施行前の年齢、体脂肪率(Body Mass Index;BMI)、体表面積(Body Surface Area; BSA)、各種生化学検査値および DOC、CDDP および 5-FU の用量を調査した。次いで好中球数の変化率(Δ Neu)を計算した。

$$\Delta \text{Neu} = \frac{(\text{pre neutrophil count} - \text{nadir neutrophil count})}{\text{pre neutrophil count}} \times 100$$

Grade IV の好中球減少は有害事象共通用語基準(Common Terminology Criteria for Adverse Events; CTCAE) version 4.0 によって定義した。

群間の比較には Welch t-test および Fisher's exact test を用いた。多重検定に対する補正はおこなわず、有意水準 5%($p < 0.05$)を用いて 2 群間の差を検定した。効果量は Hedges'g を用いて計算した[20]。

$$g = \frac{|M_1 - M_2| \times \sqrt{N_1 + N_2 - 2}}{\sqrt{(N_1 - 1) \times (S_1)^2 + (N_2 - 1) \times (S_2)^2}}$$

M_1 および M_2 は平均値、 S_1 および S_2 は標準偏差、 N_1 および N_2 は Grade II/III および Grade IV の好中球減少のサンプル数である。一般的に効果量は 0.5 で中、0.8 以上で大とされている。また、Hedges' g の信頼区間は以下のように計算した。

$$95\% \text{ CI} = g \pm 1.96 \times \sqrt{\frac{(N_1 + N_2 - 1)}{(N_1 + N_2 - 3)} \times \left(\frac{4}{N_1 + N_2}\right) \times \left(1 + \frac{g^2}{8}\right)}$$

カテゴリー変数に関しては、オッズ比(Odds ratio; OR)を効果量の代替とした。

多重ロジスティック回帰モデルにより、OR およびそれら 95%信頼区間(95% confidence interval; 95%CI)を求め、DCF 療法による Grade IV の好中球減少の予測因子を求めた。モデルには単変量解析にて $p < 0.05$ かつ効果量が中以上となったすべての変数を含めた。カテゴリー変数においては、OR の 95%CI が 1.0 を含んでいない場合、モデルに含めた。Grade IV の好中球減少を予測するためのカットオフ値の決定には、受信者動作特性(Receiver Operating Characteristic; ROC)曲線を描き、さらに ROC 曲線下面積(Area Under the ROC Curve; AUC)を計算した。求めた予測因子に対して、新しい予測因子が Grade IV の好中球減少の再分類能力を向上させるかどうかは、NRI(Net Reclassification Index; NRI)および IDI(Integrated Discrimination Index; IDI)を用いて検討した[21]。統計解析には、R-3.1.1 ソフトウェアを用いた。

結果

DCF療法において、49人(74.2%)がGrade IVの好中球減少を発症した(Grade III; 11例、Grade II; 6例)。Figure 1にDCF療法施行後15日間の好中球数推移を示した。Grade II/IIIおよびGrade IVの最低好中球数は、それぞれ886(95%CI : 708-1,065/ μ L)および282(95%CI : 252-313/ μ L)であった。 Δ Neu値はそれぞれ81.6(95%CI : 78.6-84.7)および92.0(95%CI : 90.9-93.3)であった。単変量解析の結果、年齢、血小板数、アラニトランスアミラーゼ(Alanine Transaminase; ALT)およびアルブミンは、Grade IVの好中球減少と有意に関連していた(Table 2)。また、プロトンポンプ阻害剤(Proton Pump Inhibitor;PPI)を内服していた患者群では、Grade IVの好中球減少が多かった(OR : 8.30, 95%CI : 1.10-376.37, $p < 0.05$)(Table 3)。効果量に関しては、年齢($g=0.62$)、好中球数($g=0.52$)、血小板数($g=1.26$)、ALT($g=0.53$)およびアルブミン($g=0.61$)は中程度以上であった(Figure 2)。好中球数の効果量は中にもかかわらず、統計学的な有意差はなかった。DOC、CDDPおよび5-FUの用量にも統計学的有意差は無く、効果量も小さかった。Grade IVの好中球減少を発症した患者全員がG-CSFの投与を受けており、これらのうち29人(59.2%)が予防的投与を受けていた。

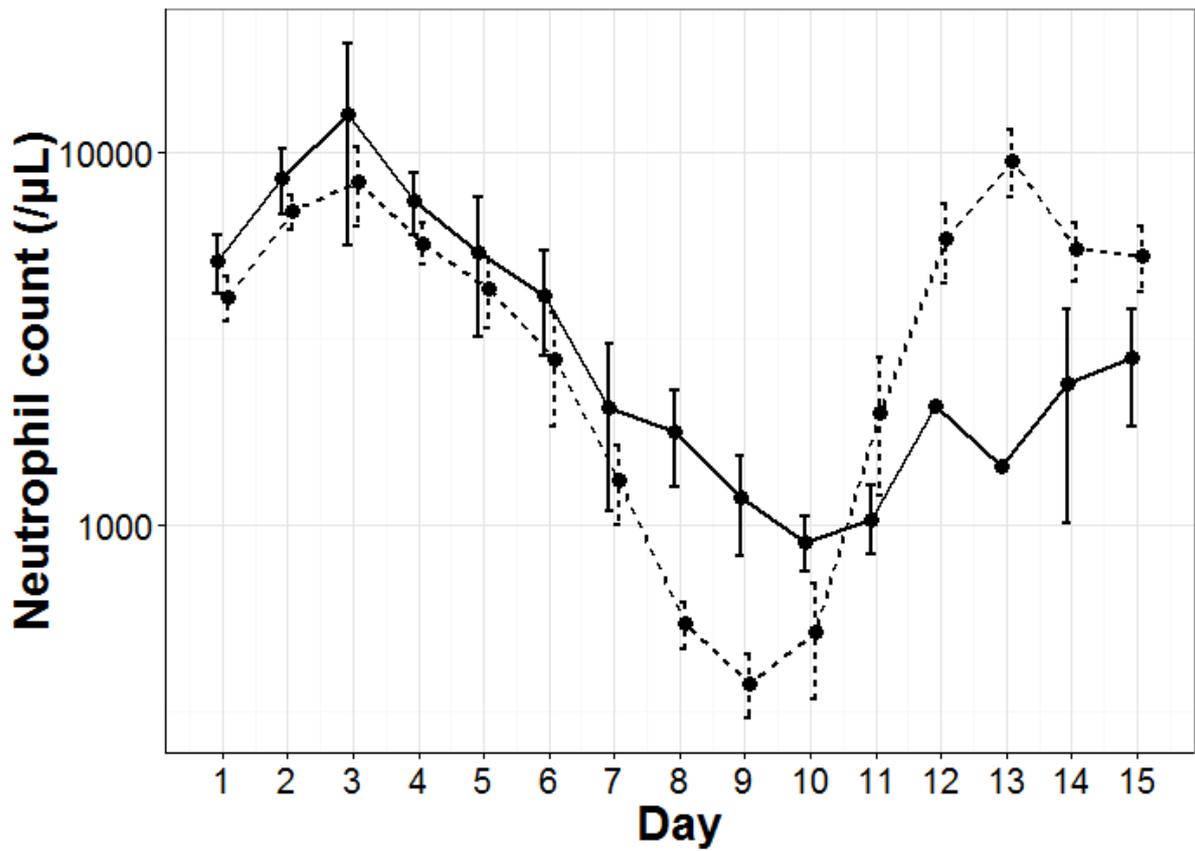


Figure 1; Neutrophil count-time profile (mean and 95 % confidence interval) after docetaxel, cisplatin, and 5-FU chemotherapy. Patients with Grade II/III and IV neutropenia are represented by the solid and dotted lines, respectively. Only the mean values are described due to the small sample sizes in Day 12 and Day 13 for patients with Grade II/III neutropenia.

Table 2; Univariate analysis (Welch t-test) of the risk factors for Grade IV neutropenia in oesophageal cancer patients ($n = 66$) treated with docetaxel (DOC), cisplatin (CDDP), and 5-FU (5-FU)

	GradeII/III			Grade IV			P-value
	Mean	95%CI	n	Mean	95%CI	n	
Age (years)	63	59-67	17	68	66-70	49	0.035*
BMI (kg/m ²)	21.2	19.6-22.9	17	20.6	19.7-21.5	49	0.45
BSA (m ²)	1.64	1.56-1.73	17	1.61	1.56-1.67	49	0.55
Neutrophil (/μL)	5089	4172-6007	17	4078	3535-4621	49	0.057
Monocyte (/μL)	437	368-506	17	443	386-501	49	0.89
RBC (×10 ⁶ /μL)	4.15	3.85-4.44	17	4.20	4.03-4.38	49	0.72
PLT (×10 ³ /μL)	312	281-344	17	236	219.1-253.5	49	<0.001*
Hb (g/dL)	13.3	12.4-14.2	17	13.6	13.1-14.1	49	0.57
Ht (%)	40.4	37.8-42.9	17	41.1	39.6-42.5	49	0.61
K (mEq/L)	4.3	4.1-4.5	17	4.3	4.2-4.4	49	0.78
BUN (mg/dL)	13.2	10.8-15.7	17	14.6	13.3-15.9	49	0.30
Cre (mg/dL)	0.75	0.69-0.81	17	0.79	0.74-0.84	49	0.24
AST (IU/L)	16	14-18	17	21	18-25	49	0.013*
ALT (IU/L)	13	11-15	17	16	14-18	49	0.030*
γGTP (IU/L)	41	21-62	17	32	27-37	48	0.38
Alb (g/dL)	3.7	3.5-3.9	17	3.9	3.8-4.1	49	0.038*
CRP (mg/dL)	0.90	0.21-1.59	17	0.45	0.21-0.69	49	0.21
CDDP (mg/body)	113.5	107.3-119.6	17	107.3	102.4-112.3	49	0.12
DOC (mg/body)	113.5	107.4-119.6	17	110.2	105.5-114.9	49	0.38
5-FU (mg/body)	1135.1	1073.8-1196.4	17	1103.0	1055.9-1150.1	49	0.39

* $p < 0.05$

Abbreviations: Alb, albumin; ALT, alanine transaminase; AST, aspartate transaminase; BMI, body mass index; BSA, body surface area; BUN, blood urea nitrogen; CI, confidence interval; Cre, creatinine; CRP, C-reactive protein; Hb, haemoglobin; Ht, haematocrit; K, potassium; n , number; PLT, platelet; RBC, red blood cell; γ-GTP, gamma-glutamyl transpeptidase

Table 3; Univariate analysis (Fisher's exact test) of the risk factors for Grade IV neutropenia in oesophageal cancer patients ($n = 66$) treated with docetaxel, cisplatin, and 5-FU

	Grade II/III		Grade IV		P-value	OR	95%CI
	n	%	n	%			
Sex							
Male	15	88.2	41	83.7	1.00	0.69	0.064-4.02
Female	2	11.8	8	16.3			
Stage							
I	1	5.9	2	4.1	0.18	-	-
II	2	11.8	17	34.7			
III	11	64.7	19	38.8			
IV	3	17.6	11	22.4			
Medication							
ACEI or ARB	2	11.8	10	20.4	0.72	1.91	0.34-19.91
CCB	5	29.4	13	26.5	1.00	0.87	0.23-3.77
PPI	1	5.9	17	34.7	0.027*	8.30	1.10-376.37

* $p < 0.05$

Abbreviations: ACEI, angiotensin converting enzyme inhibitor; ARB, angiotensin II receptor blocker; CCB, calcium channel blocker; CI, confidence interval; n , number; OR, odds ratio; PPI, proton-pump inhibitor

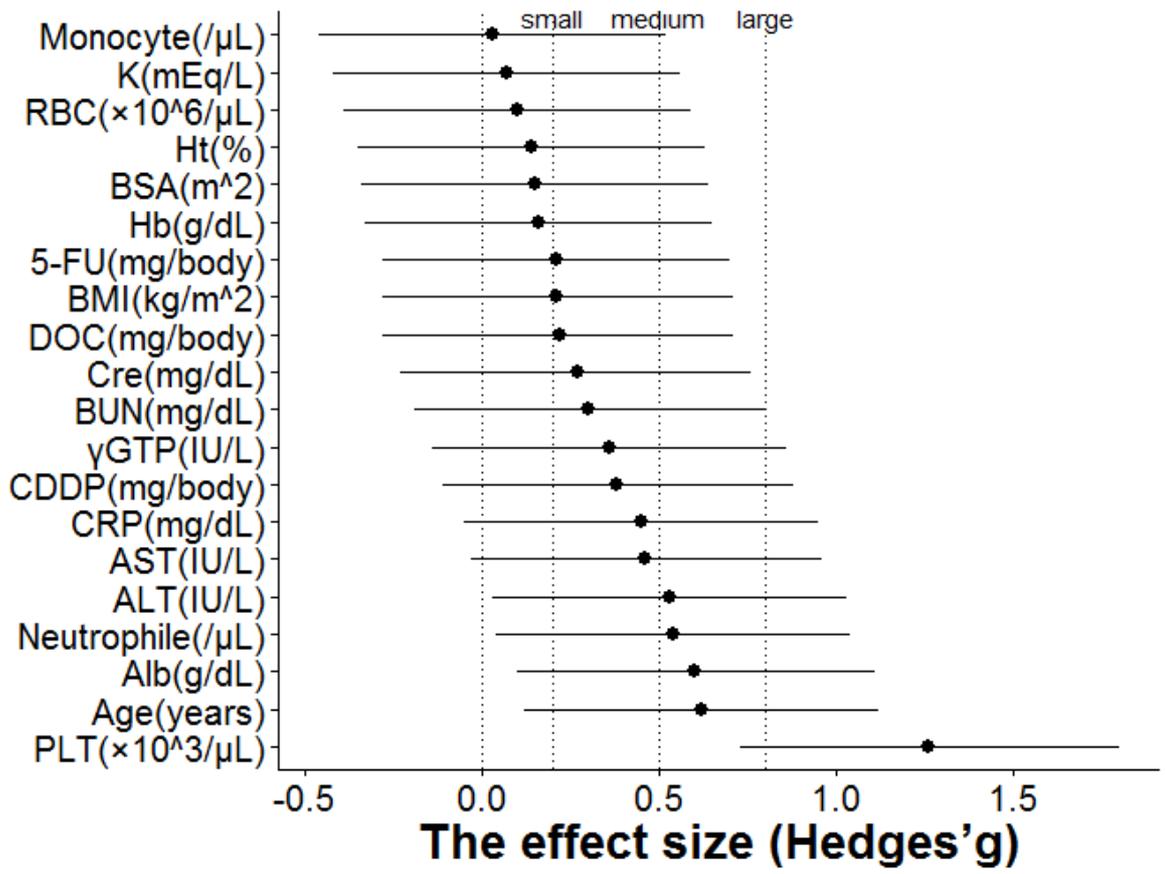


Figure 2; Effect size (Hedges' g) with 95 % confidence interval. Effect sizes were classified as either small (0.2), medium (0.5), or large (≥ 0.8)

Abbreviations: 5-FU, 5-FU; Alb, albumin; ALT, alanine transaminase; AST, aspartate transaminase; BMI, body mass index; BSA, body surface area; BUN, blood urea nitrogen; CDDP, cisplatin; Cre, creatinine; CRP, C-reactive protein; DOC, docetaxel; Hb, haemoglobin; Ht, haematocrit; K, potassium; PLT, platelet; RBC, red blood cell; γ -GTP, gamma-glutamyl transpeptidase

次いで多変数ロジスティック回帰分析を用いて、Grade IV の好中球減少の予測因子を検討した。その結果、血小板数($p<0.01$)、ALT($p<0.05$)、および PPI 内服($p<0.05$)は Grade IV の好中球減少と関連していた(Table 4)。ROC 解析の結果、血小板数の最適カットオフ値は $290 \times 10^3/\mu\text{L}$ であった(Basic model; AUC : 0.81, 95%CI : 0.70-0.93)(Table 5)。Basic model は、Grade IV の好中球減少を発症した 49 人の患者のうち 41 人を判別し(Sensitivity; Sen=83.7%)、発症の無かった 17 人の患者のうち 12 人を判別した(Specificity; Spe=70.6%)。ALT および PPI 内服を考慮すると、Sen および Spe はそれぞれ 75.5 および 88.2%であった(Updated model; AUC : 0.89, 95%CI : 0.81-0.97) (Table 5)。Updated model にて、Grade IV の好中球減少を発症した 8 人の患者が高リスク群に正しく再分類され、6 人の患者が低リスク群に不適切に再分類された。逆に、Grade II/III の好中球減少を発症した 9 人の患者が低リスク群に正しく再分類され、1 人の患者が高リスク群に不適切に再分類された(Table 6)。それらの NRI および IDI は、それぞれ 0.79(95%CI; 0.33-1.25, $p<0.001$)および 0.16(95%CI; 0.060-0.25, $p<0.01$)であった(Table 5)。

Table 4; Multivariate analysis of the risk factors for Grade IV neutropenia in oesophageal cancer patients ($n = 66$) treated with docetaxel, cisplatin, and 5-FU

	OR	95%CI	P-value
PLT ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	0.98	0.97-0.99	0.0052*
PPI	37.95	3.53-1660.64	0.015*
ALT (IU/L)	1.15	1.02-1.35	0.042*
Alb (g/dL)	4.09	0.69-27.10	0.12
Age (years)	1.07	0.98-1.19	0.14

* $p < 0.05$

Abbreviations: ALT, alanine transaminase; Alb, albumin; CI, confidence interval; OR, odds ratio; PLT, platelet; PPI, proton-pump inhibitor

Table 5; Discrimination and reclassification of the risk of Grade IV neutropenia in oesophageal cancer patients ($n = 66$) treated with docetaxel, cisplatin, and 5-FU

Model	Sen(%)	Spe(%)	Cut-off	ROCarea	IDI(95% CI)	P-value	NRI(95% CI)	P-value
PLT (Basic model)	83.7	70.6	290×10 ³ (/μL)	0.81 (0.70-0.93)		reference		
ALT	61.2	64.7	13.5 (IU/L)	0.65 (0.50-0.79)	-	-	-	-
PPI	34.7	94.1	-	0.64 (0.56-0.73)	-	-	-	-
ALT + PPI	71.4	76.5	-	0.76 (0.63-0.89)	-	-	-	-
PLT + ALT	81.6	64.7	-	0.82 (0.71-0.93)	0.026 (-0.013-0.066)	0.19	0.36 (-0.18-0.89)	0.19
PLT + PPI	71.4	88.2	-	0.87 (0.79-0.96)	0.10 (0.031-0.18)	0.0053*	0.58 (0.23-0.92)	0.0012*
PLT + PPI + ALT (Updated model)	75.5	88.2	-	0.89 (0.81-0.97)	0.16 (0.060-0.25)	0.0015*	0.79 (0.33-1.25)	< 0.0001*

* $p < 0.05$

Abbreviations: ALT, alanine transaminase; IDI, integrated discrimination index; NRI, net reclassification index; PLT, platelet; PPI, proton-pump inhibitor; ROC, receiver operating characteristic; Sen, sensitivity; Spe, specificity

Table 6; Reclassification of the risk of Grade IV neutropenia in oesophageal cancer patients ($n = 66$)

treated with docetaxel, cisplatin, and 5-FU

Number of subjects who did not developed Grade IV neutropenia				
	Updated model			
Basic Model	<0.25	$\leq 0.25-0.5 <$	$\leq 0.5-0.75 <$	≥ 0.75
<0.25	2	0	0	0
$\leq 0.25-0.5 <$	5	0	0	1
$\leq 0.5-0.75 <$	1	2	1	0
≥ 0.75	0	0	1	4

Number of subjects who developed Grade IV neutropenia				
	Updated model			
Basic Model	<0.25	$\leq 0.25-0.5 <$	$\leq 0.5-0.75 <$	≥ 0.75
<0.25	0	0	0	0
$\leq 0.25-0.5 <$	2	0	0	2
$\leq 0.5-0.75 <$	0	0	3	6
≥ 0.75	0	1	3	32

^aHatched columns: patients were reclassified into a higher risk group

^bLatticed columns: patients were reclassified into a lower risk group

^c0.25, 0.50, and 0.75 are event probabilities associated with the basic model

考察

Grade IV の好中球減少の事後確率に関して

本研究では、既報よりも Grade IV の好中球減少の発症割合が高かった[7-10]。そこで我々は、既報で報告されている Grade IV の好中球減少の発症割合を用い、Grade IV の好中球減少の事後確率をベイズ推定にて求めた。ベイズ推定は以下のように定義されている。

$$\pi(\theta|D) = k \times f(D|\theta) \times \pi(\theta)$$

$\pi(\theta|D)$ 、 $f(D|\theta)$ 、 $\pi(\theta)$ および k は、それぞれ Grade IV の好中球減少の事後確率、尤度、事前確率および定数を表している。既報および本研究から、 $\pi(\theta)$ は $\theta^{66}(1-\theta)^{51}$ 、 $f(D|\theta)$ は $\theta^{49}(1-\theta)^{17}$ となった[7-10]。その結果、事後確率は $\theta^{115}(1-\theta)^{68}$ となった。事後確率が最大となる θ は 0.63 であり、Updated model の陽性予測値(Positive Predictive Value;PPV)を求めたところ 0.92 となった。次いで Updated model の陽性尤度比を計算したところ 6.4 であった。Grade IV の好中球減少を発症した患者はそうでない患者よりも 6.4 倍陽性になりやすいことを示していた。

Grade IV の好中球減少と血小板数に関して

本研究では、Grade IV の好中球減少の最も重要な予測因子は DCF 療法前の血小板数であった。Kogo らは、進行食道癌患者において化学放射線療法前の血小板数が Grade IV の好中球減少と強く関連していることを報告している [22]。また、そのカットオフ値は $290 \times 10^3/\mu\text{L}$ であったと報告しており、本研究と同様の結果であった。一般的に、採血から得られる血小板数は産生、消費および老化(寿命)のバランスを反映していると考えられ、半減期は約 10 日と考えられている。仮に DCF 療法後の血小板数の減少が寿命を強く反映していると考えた場合、その減衰は対数直線にて近似できると考えられる。しかしながら、本研究にあてはめることは難しかった (Table 7)。したがって、血小板の減少は老化(寿命)だけでなく産生も強く反映していると考えられた。同様に、好中球数も種々の環境によって影響すると考えられている。例えば、ステロイドは循環プールと辺縁プールの好中球数を増加させ、辺縁プールから組織への好中球の遊走を阻害するとされている。DCF 療法ではデキサメタゾン を 3 日間投与しており、これにより好中球数の経時的変化を直接的に考察することが難しくなっている。したがって、DCF 療法治療中の血小板数や好中球数の推移を考察するよりも、DCF 療法開始前の血小板数が、半減期が比較的長いという観点から安定した骨髄機能の指標になると考えられた。

Table 7; Platelet half-life (Day 1–4) and log-linear changes in oesophageal cancer patients ($n = 66$) treated with docetaxel, cisplatin, and fluorouracil

	r^2	95 % CI	P-value	Half life (day)	95 % CI
GradeII/III	0.17	0.024-0.39	< 0.001*	8.90	5.57-22.20
Grade IV	0.13	0.043-0.25	< 0.001*	8.35	5.86-14.57

* $p < 0.05$

^aPearson's correlation coefficients were classified as low (0.04), intermediate (0.25), and high (≥ 0.64)

Abbreviations: CI, confidence interval; r , Pearson's correlation coefficient

次いで、血小板数と年齢の関係を詳細に検討した。Biino らは血小板数と年齢には相関があると報告し、Ishiguro らは血中トロンボポエチン濃度と年齢には関連があることを報告している[23,24]。これらの研究から、血小板数と年齢には何らかの関係があることが示唆された。しかしながら、本研究では血小板数と年齢の相関は小さく、効果量も小さかった。

Grade IV の好中球減少と PPI 内服に関して

血小板減少症は PPI の副作用として比較的よく臨床において経験する。しかし、本研究では、PPI 内服群と非内服群における患者背景に差はなかった。そこで我々は、PPI と DOC、CDDP および 5-FU の薬物間相互作用に焦点を当てた。PPI は CYP2C19 によって代謝されるため、CYP2C19 と相互作用する薬剤があればそれらの血中濃度が増加すると考えられる。しかしながら、DOC、CDDP および 5-FU のいずれも CYP2C19 が主要代謝経路であるとは報告されていない。

次いで、DOC、CDDP および 5-FU と ABC トランスポーターについて検討した。DOC は ABCC-10、CDDP は ABCC-1/2/5 および 5-FU は ABCC-5 と相互作用すると報告されている [25]。Pauli-Magnu らは、PPI が ABC トランスポーターの基質および阻害剤であることを報告している [26]。また、PPI は細胞膜にあるプロトンポンプを阻害することにより細胞周囲の酸性度を低下させる。その結果、弱塩基性である DOC の細胞内への取り込みが増加する可能性がある [27]。これらを考慮すると、PPI は DOC の排泄を遅延させることや細胞膜透過性を増加させる可能性がある。しかしながら、これが Grade IV の好中球減少と関連しているかどうかは本研究のみから断定することは難しい。

Grade IV の好中球減少と肝消失能に関して

ドラッグインフォメーションによると、DOC 投与後 48 時間の尿中未変化体排泄は少なく (<5%)、総クリアランスは 20.4L/hr/m² とされている。健常人の肝血流量を 1,500mL/min、本研究から得られた平均体表面積を用いて肝抽出率を計算したところ、0.35 となった。肝抽出率が小さいことから、DOC の代謝には肝消失能力が重要であることが考えられた。一般的に、ALT は肝消失能力の重要な指標とされており、肝消失能力に異常があると ALT は上昇する傾向にある。つまり、ALT が高ければ DOC の排泄が遅延することが十分に予想される。既報によれば、肝機能異常のある患者には DOC の減量が推奨されている [28,29]。同様に 5-FU は肝に多く存在するジヒドロピリミジンデヒドロゲナーゼ(Dihydropyrimidine Dehydrogenase; DPD)により分解される。それゆえ、DPD 活性が低い場合は 5-FU の毒性が強くと発症すると考えられる。しかしながら Ogura らは健常日本人において DPD 活性の欠損は 0.7%程度であると報告している [30]。また Fleming らは肝機能低下においても 5-FU は減量なく投与が可能であると報告している [31]。その為、5-FU は肝消失能による影響を受けにくいと考えられる。CDDP に関しては腎排泄であるため、肝機能には影響を受けないと考えられている。

本研究の限界について

本研究にはいくつかの問題点がある。第 1 に、血小板数および ALT の OR はそれぞれ 0.98 および 1.15 と非常に小さかった。これは、血小板数と ALT を連続変数として扱ったためである。本研究では、ALT が 10 増加した場合を考えると、Grade IV の好中球減少のリスクは約 4 倍高くなることを意味している。連続変数をカテゴリー変数に変換し、多変数ロジスティック解析を行なっている研究があるが、これは検出力を大幅に下げる可能性があるため不適切であると考えられるため実施しなかった。第 2 に、Grade II/III のサンプルサイズが少ないことである。そこで、サンプルサイズに依存しにくい効果量を用いて群間差を検討することとした。サンプルサイズに大きく影響を受ける p 値のみを報告するのではなく、実質的な差である効果量を報告することとした。しかしながら PPI の検討では、サンプルサイズがさらに少なく大きな問題があると考えられたため、事後解析にて必要サンプルサイズの再検討を行った。その結果、PPI 非内服群において 70% の Grade IV の好中球減少のリスク減少を見込む場合、各群 40 名にて検出力 80% で有意な差を得られることが示唆された。また、好中球数の効果量が中にもかかわらず統計学的な有意差が得られなかったため、同様に事後解析を行った。その結果、各群 55 名が必要であった。第 3 に、Grade IV の好中球減少の事後確率が最大となる θ をベイズ推定にて求めたが、重要なことは θ の信用区間である。実臨床では、サンプルサイズが小さいだけでなく、正常群に比べて疾患群のサンプルサイズがさらに小さくなる傾向にあり、このような状況下で算出した点推定値 θ を用いて予測モデルを評価することは難しい。また、臨床検査の有用性を考える際に重要なことは、疾患の罹患率である θ の分布を把握し、その結果として偽陽性および偽陰性の損失を考慮することである。そこで θ の信用区間、つまりは DCF 療法による Grade IV の好中球減少の罹患率の信用区間を求め PPV を計算することとした (Figure 3)。その結果、Updated model における PPV はおよそ 90% となり、実臨床において偽陽性は 10% 程度であると推察された。第

4に、本研究では発熱性好中球減少症(Febrile Neutropenia; FN)に関する考察が出来なかった。日本臨床腫瘍学会によると、FNは好中球数が500/ μ L以下かつ腋窩体温が37.5℃以上であると定義されている。本研究では、Grade IVの好中球減少を発症した患者全てがG-CSFの投与を受けており、一部は予防的な投与も受けていた。その結果、発熱時には好中球数が大きく増加している場合が多く、G-CSFによる発熱であるのか、FNによる発熱であるかの判定が難しかった。また、DCF療法に対する予防的G-CSF投与の是非も不明であり、本研究では好中球数のみに注目した解析を行った。第5に、Grade IVの好中球減少と予後の関係については倫理委員会からの許可を得ておらず実施することが出来なかった。既報によれば、好中球減少は予後に関与しているが、その重症度には関与していないとされており、Grade IVの好中球減少と予後には一般的には関係が無いと考えられている[32,33]。

本研究の結果、DCF療法によるGrade IVの好中球減少は、治療前の血小板数にて予測できることが示唆された。PPI内服の有無およびALTを考慮することで、Grade IVの好中球減少の予測能力が改善することも示唆された。化学療法において骨髄抑制は避けることができない副作用であり、Grade IVの好中球減少の発症リスクのある患者に対して適切なサポート治療をおこなうことが重要である。

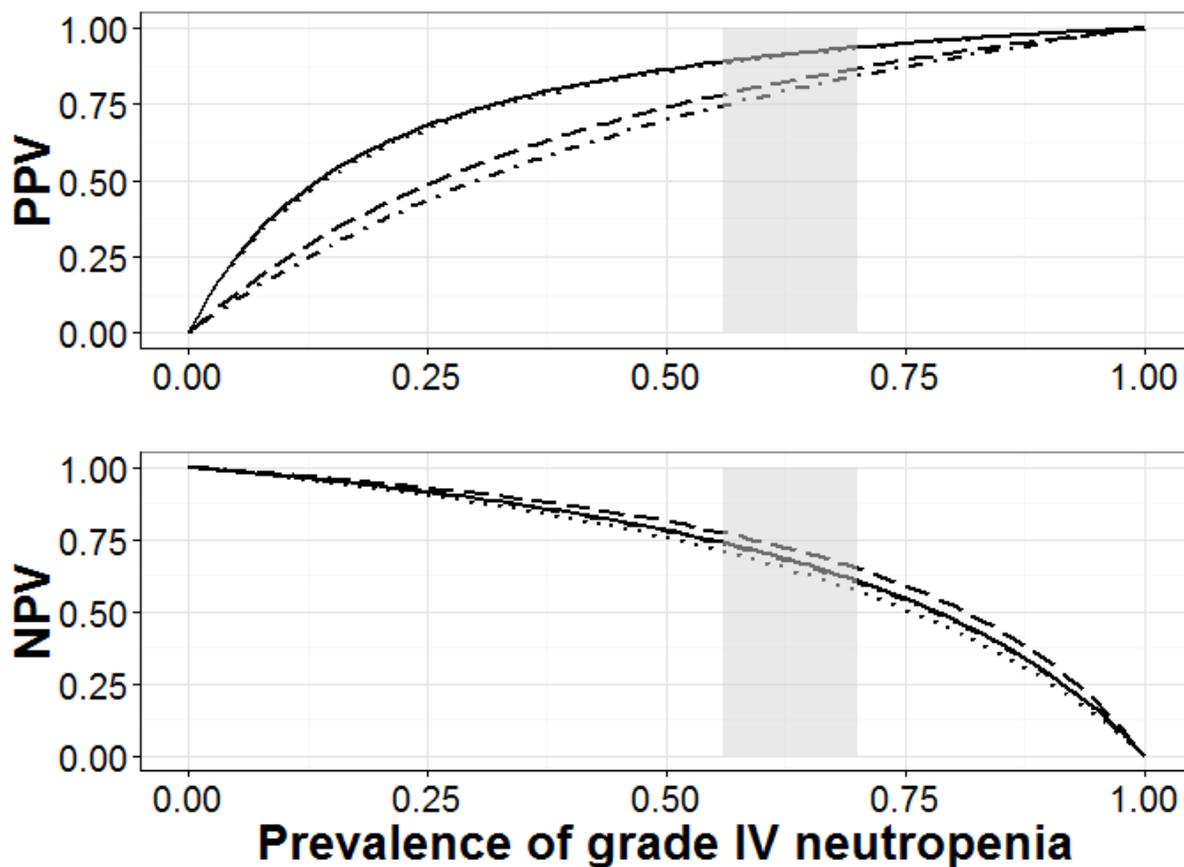


Figure 3; Predictive values of various models according to the prevalence of Grade IV neutropenia. The basic, updated, platelet and proton-pump inhibitor, and platelet and alanine transaminase models are represented by the long dashed, solid, dotted, and dot dashed lines, respectively. The grey shaded column represents the 95 % probability interval (0.56–0.70) using Bayesian inference

Abbreviations: NPV, negative predictive value; PPV, positive predictive value

第Ⅱ章

カペシタビン治療に伴う手足症候群発現においてヘモグロビン値が重要なリスク因子である

序論

第 I 章では DCF 療法と Grade IV の好中球減少に関して検討を行った。第 II 章では、DCF 療法においても用いられている 5-FU に注目した検討を行った。一般的に、5-FU は進行乳癌、胃癌、食道癌および大腸癌に使用されることが多い抗癌薬である。5-FU のプロドラッグであるゼローダ[®](Capecitabine; Cape)は、腫瘍選択的に 5-FU に代謝される抗癌薬である [34]。Cape は特に乳癌および胃癌で広く使用されており、進行乳癌に対する mOS は約 14 ヶ月、無増悪期間は約 6 カ月および RR は約 40%と報告されている [35]。進行胃癌においては、mOS は約 11 カ月である [36,37]。Cape は効果だけでなく内服抗癌薬という点から利便性が非常に高いが、手足症候群(Hand-Foot-Syndrome;HFS)が高頻度に発症し問題となっている。Cape を含む化学療法において、約 60%に HFS が発症し用量制限毒性となっている。HFS は QOL を著しく低下させることで、コンプライアンスの低下にも繋がっているとされる [38]。メタ解析の結果では、女性、高齢者および 5-FU 持続投与が HFS のリスク因子とされているが、他報ではそのようなリスク因子はないとも報告されており、明確な見解が得られていない [39,40]。我々が第 I 章で検討した DCF 療法においても、HFS が出現することは極めて少なく、5-FU の持続投与が HFS のリスク因子であることには疑問が残る。そこで本研究では、Cape を内服した患者において、HFS のリスク因子を調べることにした。

患者背景と方法

患者背景

2010年3月から2011年3月に大阪大学医学部附属病院にてCapeを内服した患者52名を対象とした。患者背景はTable 8に示した。

本研究は、大阪大学医学部附属病院治験委員会の承認を受けて実施した(承認番号15295)。

Table 8; Baseline characteristics of the patients

	Median	95 % CI	N
Age (years)	60	56-63	52
Hb (g/dL)	12.1	11.5-12.6	50
PLT ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	239	216-265	49
K (mEq/L)	4.3	4.0-4.5	34
BUN (mg/dL)	14	13-15	43
Cre (mg/dL)	0.63	0.60-0.71	49
AST (IU/L)	26	23-28	50
ALT (IU/L)	20	16-24	50
γ GTP (IU/L)	26	23-40	40
Cape (mg/body)	2400	2400-2400	52

Abbreviations: ALT, alanine transaminase; AST, aspartate transaminase; BUN, blood urea nitrogen; Cape, Capecitabine; CI, confidence interval; Cre, creatinine; Hb, haemoglobin; K, potassium; *n*, number; PLT, platelet; γ -GTP, gamma-glutamyl transpeptidase

Table 8; Baseline characteristics of the patients, continued

	n	%
Sex		
Male	44	15.4
Female	44	84.6
Tumor type		
Breast	39	75.0
Colon	12	23.1
Stomach	1	1.9
Premedications		
Vitamin B ₆	13	25.0
Moisturizing cream	6	11.5
Co-administered anticancer drug		
Bev	5	9.6
CDDP	1	1.9
CPA	1	1.9
DOC	5	9.6
Her	6	11.5
Lapa	3	5.8
l-OHP	5	9.6
MPA	1	1.9
PTX	1	1.9

Abbreviations: Bev, bevacizumab; CDDP, cisplatin; CPA, cyclophosphamide; DOC, docetaxel; Her, trastuzumab; Lapa, lapatinib; l-OHP, oxaliplatin; MPA, medroxyprogesterone acetate; PTX, paclitaxel; *n*, number

治療スケジュール

Cape1000-1250mg/m²を1日2回、2週間内服した患者を対象とした。HFSを発症又は発症すると予測される場合には、保湿剤、ステロイドおよび抗菌薬が適切に投与された。

統計解析

Capeを内服した患者の医療記録を電子カルテより後方視的に調査した。Cape内服前の年齢、各種生化学検査値、併用薬剤、癌種およびCapeの用量を調査した。HFSのグレードはCTCAEversion 4.0によって定義した。

サンプル数が小さく、群間でサンプル数が異なったこともあり、t-testなどのパラメトリック検定の正規分布仮定を大きく害する可能性があるため、群間の比較にはBrunner-Munzel test および Fisher's exact test を用いた。多重検定に対する補正はおこなわず、有意水準5% (p<0.05)を用いて2群間の差を検定した。効果量は以下を用いて計算した。

$$Effect\ size = \frac{median(M_2) - median(M_1)}{IQR(M_1) \times 0.7413}$$

IQR(Interquartile range)は四分位範囲である。一般的に効果量は0.5で中、0.8以上で大とされている。効果量の信頼区間はboot-strapping法により計算した。

カテゴリー変数に関しては、ORを効果量の代替とした。

COX 比例ハザードモデルにより、Cape内服後の期間を時間変数とし最初のHFS発症の予測因子を、単変量解析にてp<0.05かつ効果量が中以上となったすべての変数で調べた。カテゴリー変数においては、ORの95%CIが1.0を含んでいない場合モデルに含めた。統計解

析には、R-3.1.1 ソフトウェアを用いた。

結果

Cape 内服において、24 人(46.2%)が HFS を発症した(Grade III; 6 例、Grade II; 6 例、Grade I; 12 例)。単変量解析の結果、HFS を発症した患者はヘモグロビン(Haemoglobin; Hb)が高い傾向にあり、効果量も中以上であった(Table 9,10、Figure 4)。ROC 解析の結果、Hb による HFS の判定には 12mg/dL が最適なカットオフ値であった。Hb を考慮することで、HFS を実際に発症した 23 人(1 名は Cape 内服前の Hb 値が未測定)の患者のうち 18 人を判別し (Sen=78.3%)、発症の無かった 27 人(1 名は Cape 内服前の Hb 値が未測定)の患者のうち 18 人を判別した(Spe=66.7%)。COX 比例ハザード解析の結果、Hb が 12 以下の患者は HFS 発症までの期間が長くなる傾向にあった(115 vs 75 days, log-rank test; $p=0.30$, HR=1.42, 95%CI; 0.73-2.76, Figure 5, Basic model)。一方、Vitamin B₆(VB₆)内服が HFS 発症までの期間に与える影響は少なかった(104 vs 113 days, log-rank test; $p=0.69$, HR=1.17, 95%CI; 0.55-2.49, Figure 6)。

Table 9; Univariate analysis (Brunner-Munzel test) of the risk factors for developing Hand-Foot-Syndrome

	Without HFS			With HFS			P-value
	Median	95%CI	n	Median	95%CI	n	
Age (years)	60	56-63	28	60	54-68	24	0.86
Hb (g/dL)	11.0	10.6-12.1	27	12.7	12.3-13.2	23	<0.001*
PLT ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	250	222-327	26	222	211-262	23	0.16
K (mEq/L)	4.4	4.0-4.5	25	4.1	3.9-4.5	9	0.31
BUN (mg/dL)	14	11-15	25	14	13-15	18	0.95
Cre (mg/dL)	0.65	0.60-0.73	26	0.61	0.58-0.72	23	0.39
AST (IU/L)	26	23-33	27	23	20-30	23	0.77
ALT (IU/L)	20	16-24	27	21	13-29	23	0.59
γ GTP (IU/L)	29	24-59	20	26	19-44	20	0.44
Cape (mg/body)	2400	2400-3000	28	2400	2400-2400	24	0.94

* $p < 0.05$

Abbreviations: ALT, alanine transaminase; AST, aspartate transaminase; BUN, blood urea nitrogen; Cape, Capecitabine; CI, confidence interval; Cre, creatinine; Hb, haemoglobin; HFS, hand-foot-syndrome; K, potassium; n , number; PLT, platelet; γ -GTP, gamma-glutamyl transpeptidase

Table 10; Univariate analysis (Fisher's exact test) of the risk factors for developing Hand-Foot-Syndrome

	Without HFS	With HFS	P-value	OR	95%CI
	n	n			
Sex					
Male	7	1	0.06	7.42	0.84-359.54
Female	21	23			
Tumor type					
Breast	18	21	0.11	-	-
Colon	9	3			
Stomach	1	0			
Premedications					
Vitamin B ₆	7	6	1.00	1.00	0.24-4.33
Moisturizing cream	6	4	0.74	1.36	0.27-7.53
Co-administered anticancer drug					
Bev	5	0	0.072	-	-
CDDP	1	0			
CPA	0	1			
DOC	3	2			
Her	3	3			
Lapa	1	2			
l-OHP	5	0			
MPA	0	1			
PTX	1	0			

Abbreviations: Bev, bevacizumab; CDDP, cisplatin; CI, confidence interval; CPA, cyclophosphamide; DOC, docetaxel; Her, trastuzumab; HFS, hand-foot-syndrome; Lapa, lapatinib; l-OHP, oxaliplatin; MPA, medroxyprogesterone acetate; OR, odds ratio; PTX, paclitaxel; *n*, number

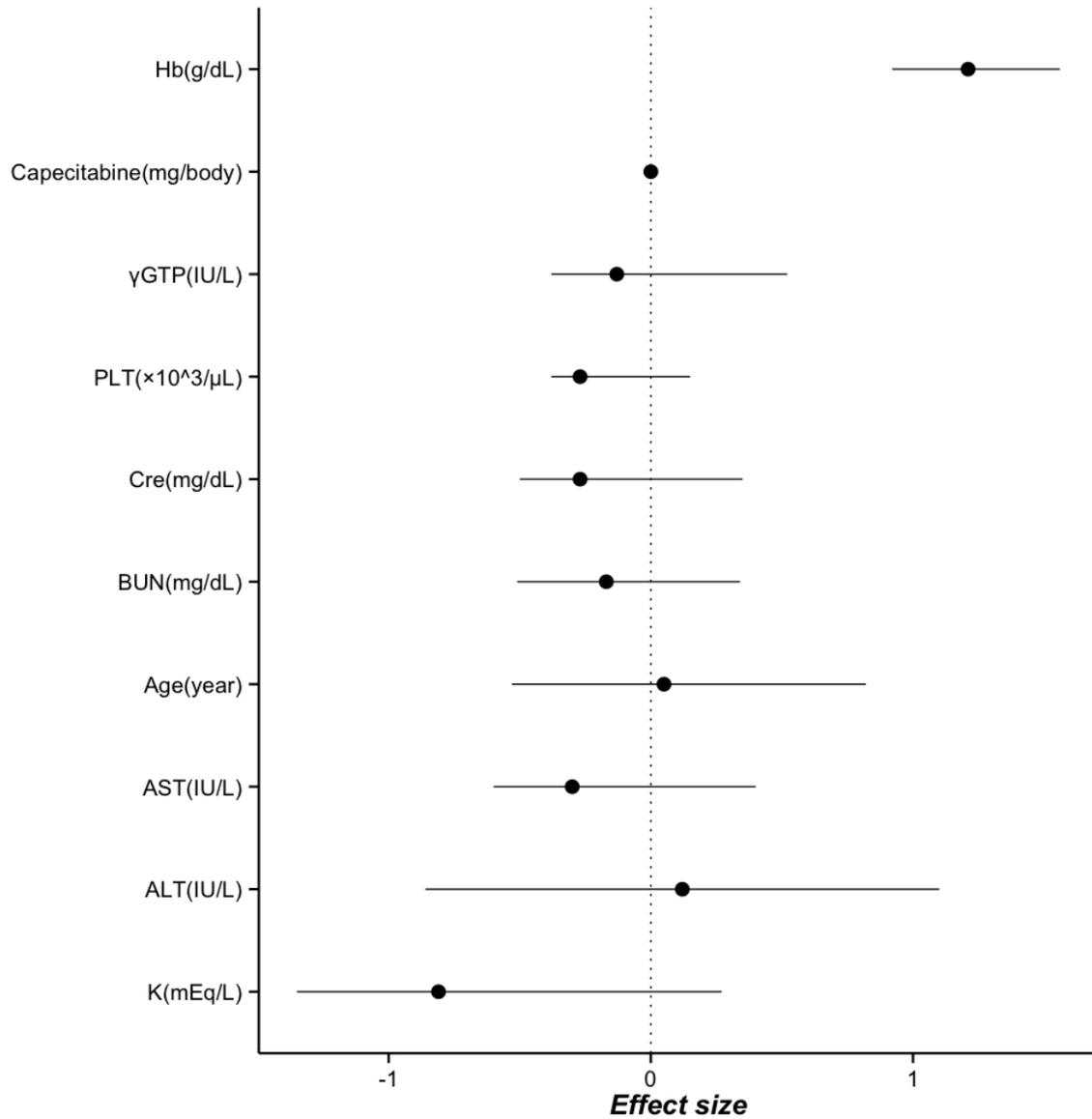


Figure 4; The effect size with 95 % confidence interval. The effect size was classified as small (0.2), medium (0.5) and large(≥ 0.8).

Abbreviations: ALT, alanine transaminase; AST, aspartate transaminase; BUN, blood urea nitrogen; Cape, Capecitabine; Cre, creatinine; Hb, haemoglobin; K, potassium; PLT, platelet; γ -GTP, gamma-glutamyl transpeptidase

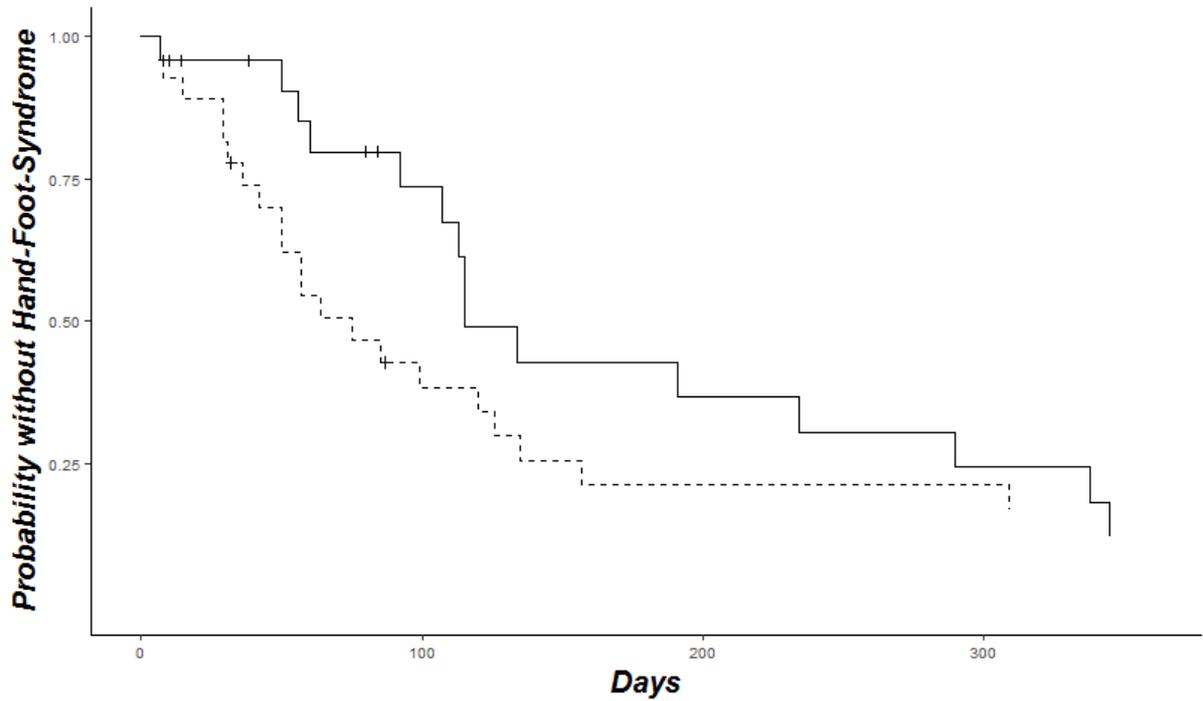


Figure 5; Kaplan-Maier curves showing the proportion of patients developing Hand-Foot-Syndrome with hemoglobin values of 12 or below (solid line) and high hemoglobin values (>12; dotted line) during the 365 days (log-rank test, $p=0.30$, $HR=1.42$, $95\%CI=0.73-2.76$). Plus symbols indicate censoring.

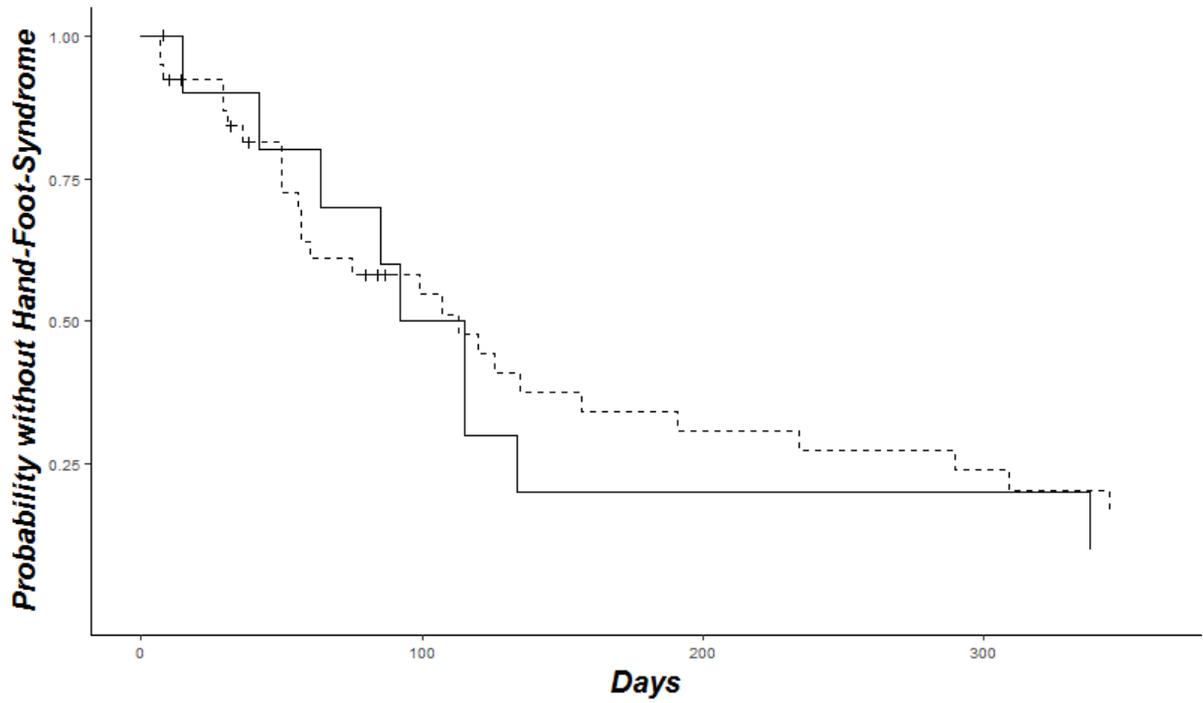


Figure 6; Kaplan-Maier curves showing the proportion of patients developing Hand-Foot-Syndrome with (solid line) or without (dotted line) taking Vitamin B₆ during the 365 days (log-rank test, $p=0.69$, $HR=1.17$, $95\%CI=0.55-2.49$). Plus symbols indicate censoring.

考察

本研究では、HFS の発症に Hb が関与する結果となった。Hb が少ないほど HFS の発症が遅れる傾向があったが、COX 解析の結果からは統計学的有意差を得ることができなかった。これは比例ハザード性の仮定を満たしていないことが原因であった($p < 0.027$)。そこで、比例ハザード性の仮定を必要としない解析を用いることとし、2 群間の Kaplan-Meier (KM) 曲線下面積 (Restricted Mean Survival Time; RMST) を直接比較することとした [41-43]。その結果、Cape 内服後 60 日から 230 日において、Hb が少ないほど HFS の発症が遅れる結果となった (RMST 比 = 1.18-1.46, $p < 0.05$, Figure 7)。

これまでに HFS と Hb の関連性は報告されていないが、Hb が少ないほど皮膚血流量が減少すること、高齢になると皮膚血流量が減少することが報告されている [44,45]。しかしながらそれら報告はサンプルサイズが小さく、その相関は弱かった ($p < 0.01$, $r^2 = 0.09$)。また、Levy らは年齢と HFS には関係があると報告しているが、我々の検討では年齢と HFS に関連はなかった (log-rank test; $p = 0.36$, HR = 0.99, 95% CI: 0.95-1.01) [46]。そこで本研究では、Hb と年齢の相関関係を詳細に検討することとした。最小二乗法を用いた線形回帰 (Simple Linear Regression; SLR) の検討では、Hb と年齢には相関関係を見出すことはできなかったが ($p = 0.060$, $r^2 = 0.052$)、分位点回帰 (Quantile Regression; QR) を用いた検討では Hb と年齢には何らかの相関関係があることが示唆された (Figure 8) [47]。SLR と 50% QR の傾きが等しいことから、ある任意の年齢における Hb の分布は正規分布に近いと考えられた (Table 11)。また、高齢になればなるほど回帰幅が小さく、若年者では回帰幅が大きかった。これは、若年者では体格差が大きいことや生理の影響があると考えられる。一般的に高齢者では体格差が小さくなることや閉経を迎えることを考えると、高齢になればなるほど回帰幅は小さくなると考えられる。種々の QR を検討したところ、30% QR が HFS の発症を分類できる割合が高かった (Table 11)。

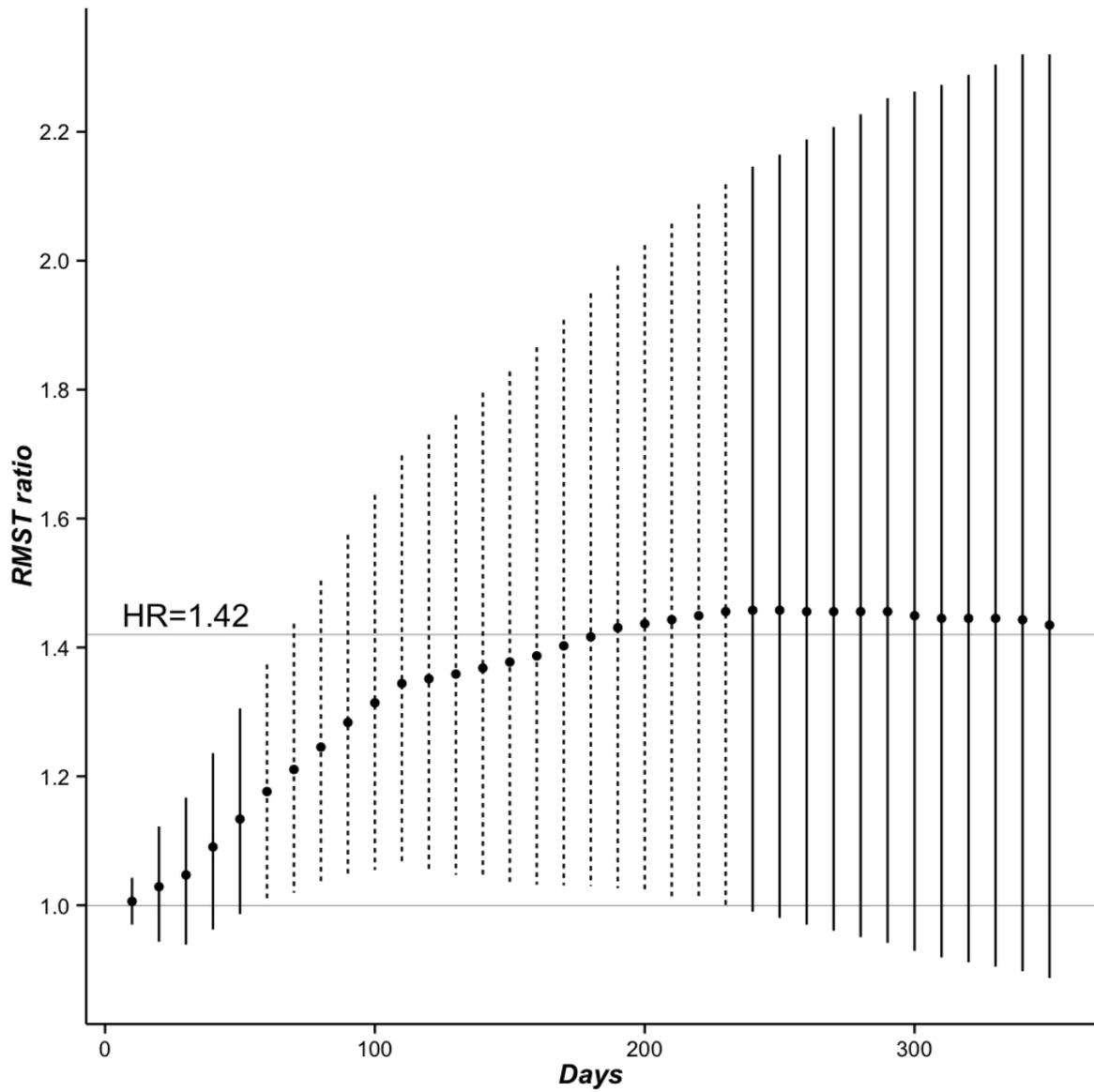


Figure 7; The RMST ratio of patients with hemoglobin values of 12 or below and high hemoglobin values.

The ranges display 95 % confidence interval; dotted lines indicate significance ($P < 0.05$).

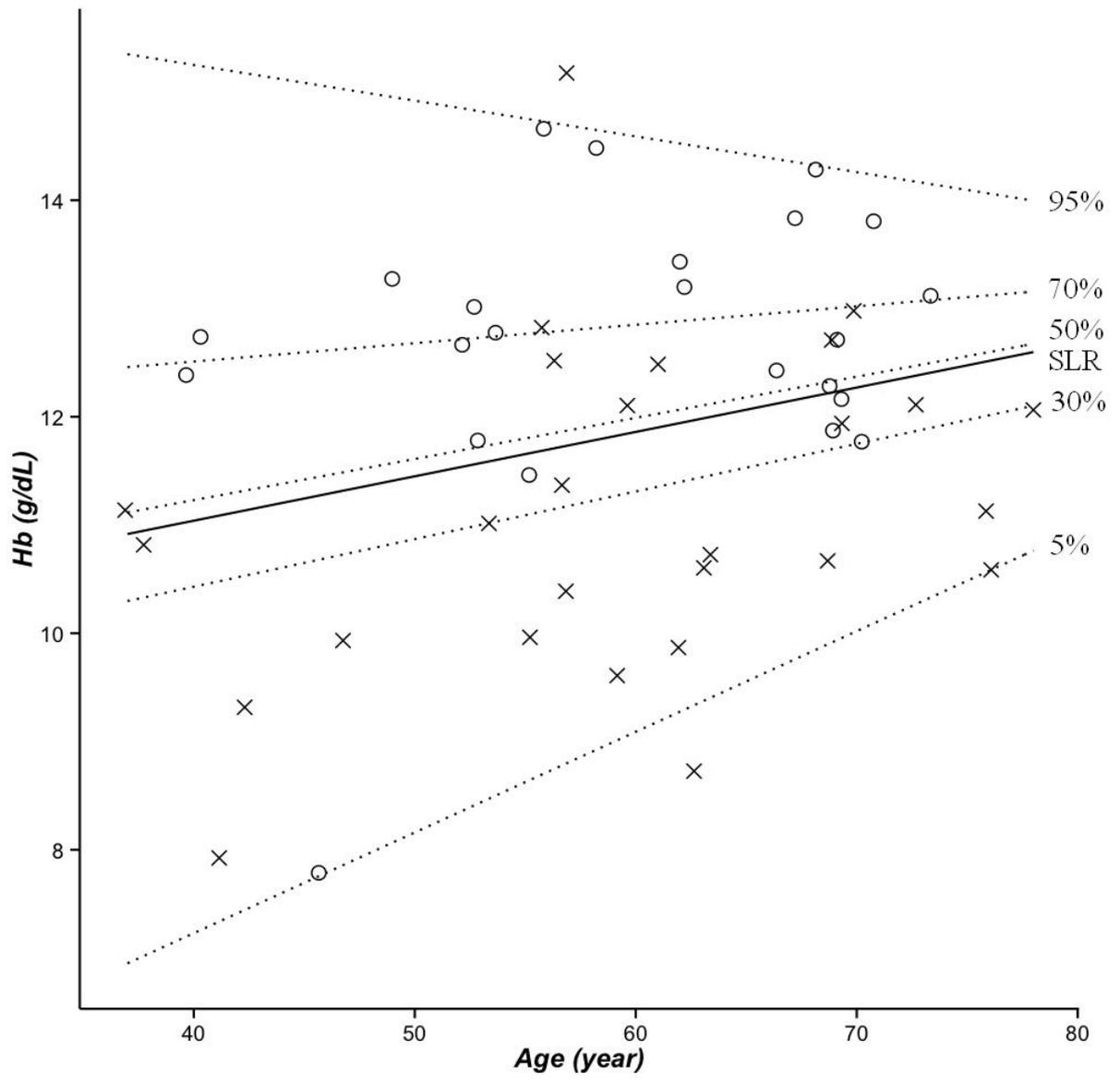


Figure 8; Distribution of age and hemoglobin values according to quantile regression analysis.

○ : with Hand-Foot-Syndrome

× : without Hand-Foot-Syndrome

Table 11; Quantile regression analysis between age and hemoglobin values

	SLR	Quantile regression analysis				
		Tau=5%	Tau=30%	Tau=50%	Tau=70%	Tau=95%
Intercept	9.40	3.51	8.67	9.71	11.83	16.57
Age (years)	0.041	0.093	0.044	0.038	0.017	-0.033
HFS (%)	79.17	66.67	93.75	76.00	64.86	51.02

Abbreviations: HFS, hand-foot-syndrome, SLR; simple linear regression

次いで、QR が HFS をうまく判別できるのかどうか F 値を用いて検討した。F 値は Precision および Recall の調和平均である。Precision は PPV、Recall は Sen と同等である。一般的に、不均等なデータに対しては ROC 解析よりも F 値が有効とされており、不均等データが生じやすい医療データに適しているとされる。Precision、Recall および F 値は以下を用いて計算した。

$$Precision = \frac{True\ Positive}{(True\ Positive + False\ Positive)}$$

$$Recall = \frac{True\ Positive}{(True\ Positive + False\ Negative)}$$

$$F\text{-measure} = \frac{1}{\frac{\alpha}{Precision} + \frac{(1 - \alpha)}{Recall}} \quad (0 \leq \alpha \leq 1)$$

さらに、boot-strapping 法、hold-out 法および double cross validation 法にて F 値が最も大きくなる分位点(Quantile Point; Tau)を求め、その Tau が最も汎化能力が高い Tau とした[48]。その結果、Tau=0.4 の F 値($\alpha=0.5$)が大きく、HFS の発症を予測する能力が高かった(Figure 9,10)。一般的に hold-out 法は過剰推定する機会が多いとされており、本研究でもその傾向がみられた(Figure 10)。次いで Precision および Recall の重み(α)を適宜変化させ、同様に解析を行った(Figure 11)。Tau が 0.55 の場合、種々の α に対して安定した F 値であった。得られた Tau を元に、改めて COX 解析および KM 曲線下面積を比較した(Figure 12,13)。モデル評価の結果、HFS の発症において Hb だけでなく年齢を考慮することが重要であった(Tau = 0.55 model, log-rank test, p = 0.023, HR = 2.17, 95 % CI = 1.11-4.12)。

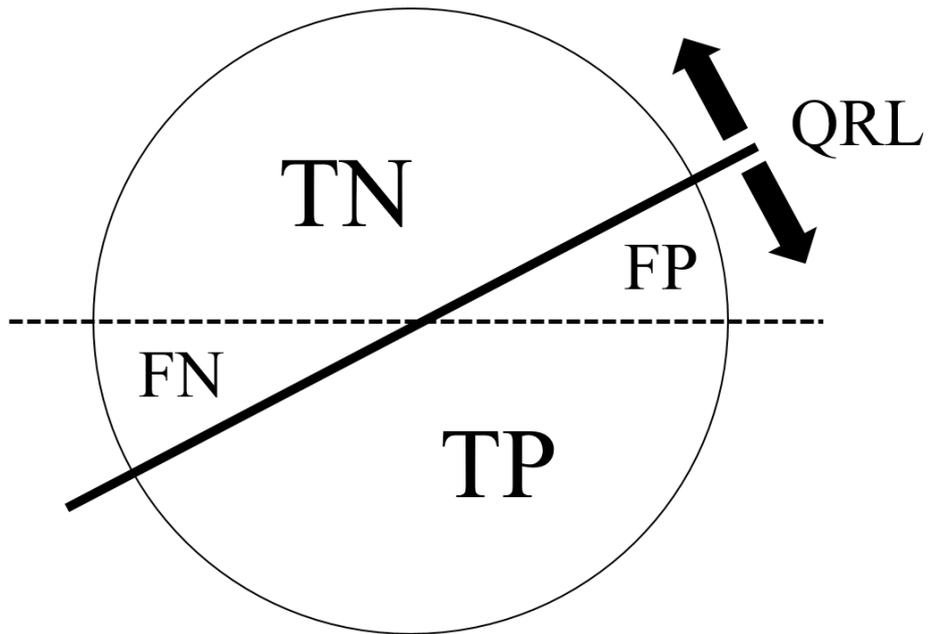


Figure 9; Combining two actual and two predicted labels produces four outcomes.

Abbreviations: QRL; quantile regression line, TP; true positive, TN; true negative, FP; false positive, FN; false negative

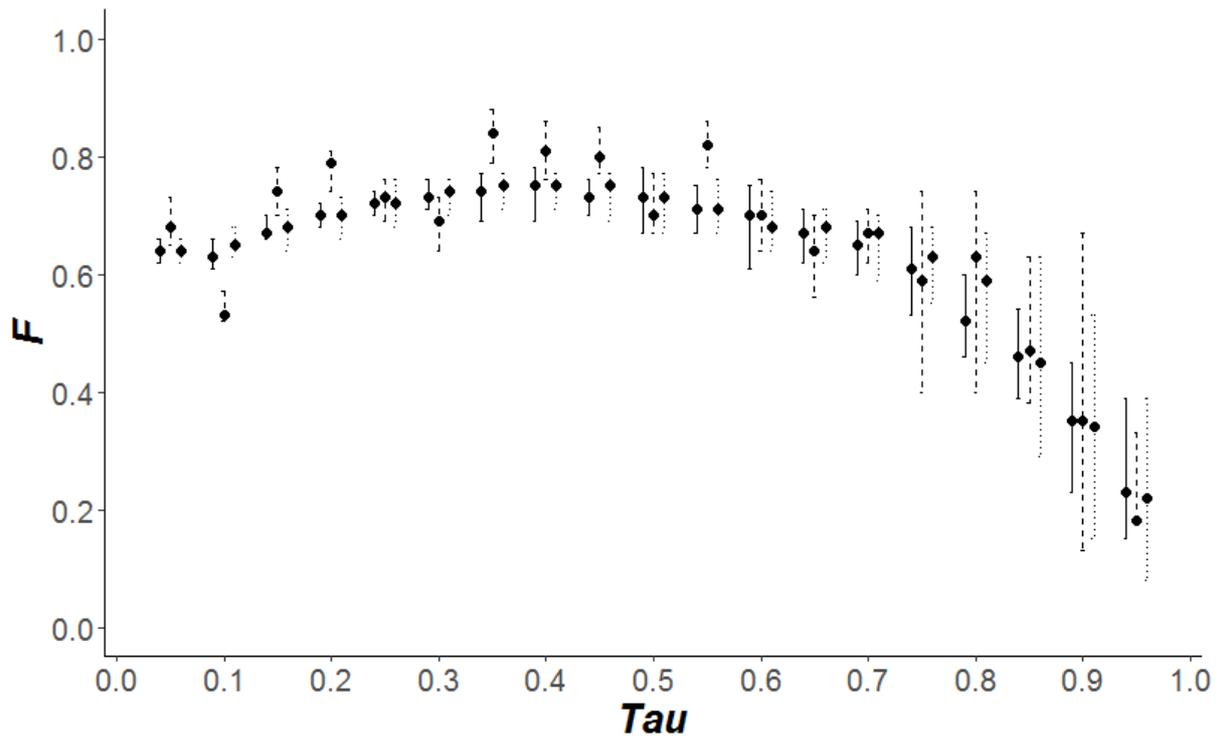


Figure 10; F-measure ($\alpha = 0.5$) - Tau profile (median and 80 % confidence interval).

Abbreviations: Tau; quantile points, Solid line; double cross validation, Dashed line; hold out validation, Dotted line; bootstrapping validation

The F-measure describe the balance between the precision and the recall. Precision is equivalent to positive predictive value and recall is equivalent to sensitivity.

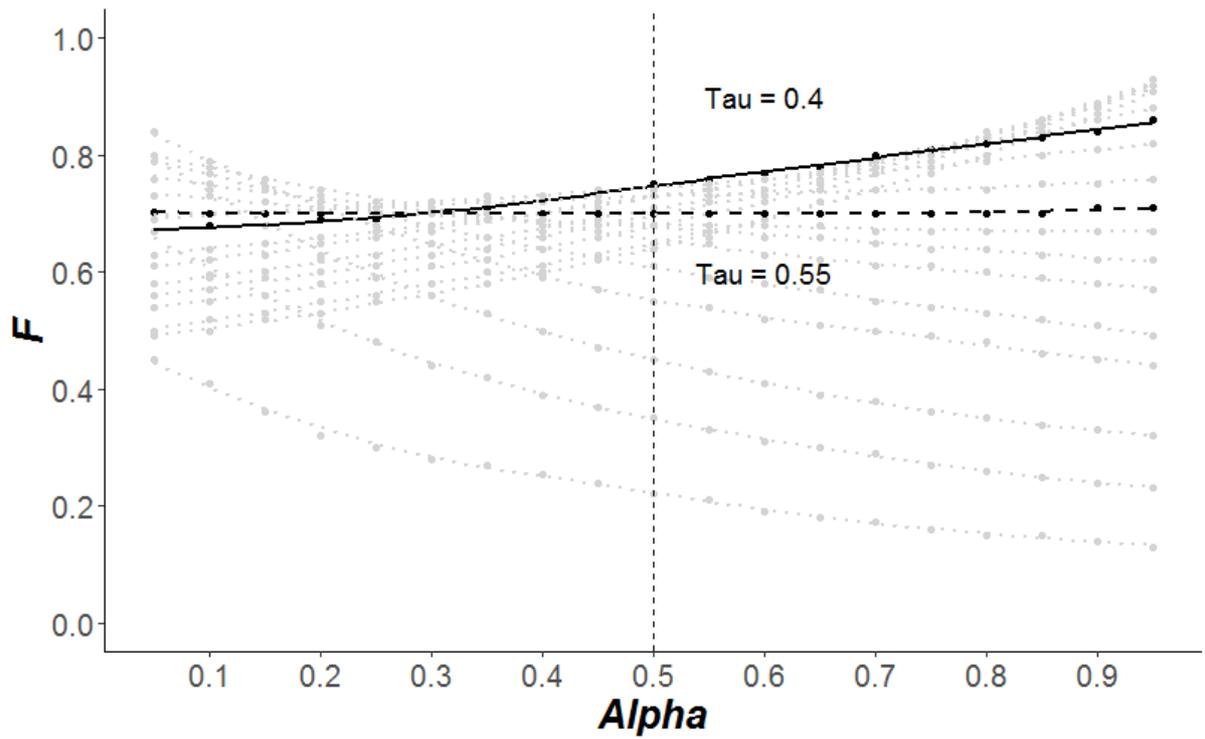


Figure 11; F-measure – Alpha profile.

Abbreviations: Tau; quantile points, Solid line; Tau = 0.4, Dashed line; Tau = 0.55, Dotted line; Others ($0.05 \leq \text{Tau} \leq 0.95$)

The F-measure describe the balance between the precision and the recall. The precision is equivalent to positive predictive value and the recall is equivalent to sensitivity

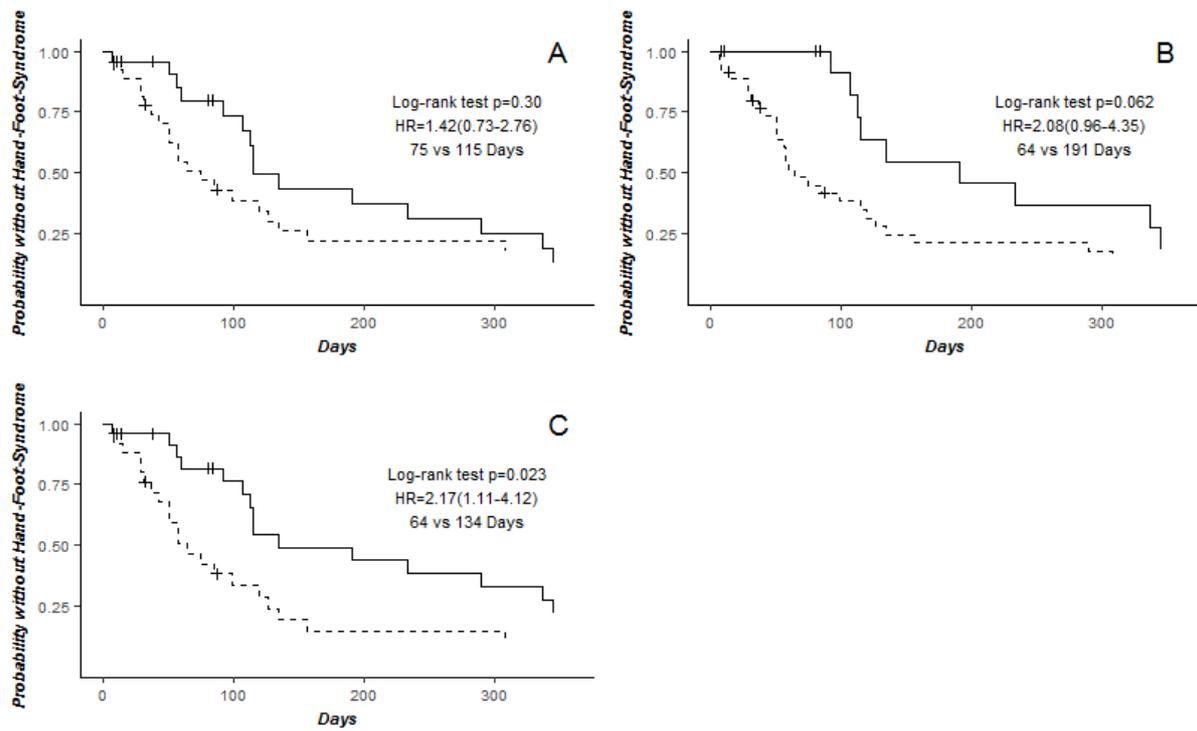


Figure 12; Kaplan-Maier curves showing the proportion of patients developing Hand-Foot-Syndrome during the 365 days. The Cox proportional hazard assumption of A and B was not satisfied.

A; Basic model (log-rank test, $p = 0.30$, HR = 1.42, 95 % CI = 0.73-2.76).

B; Tau = 0.4 model (log-rank test, $p = 0.062$, HR = 2.08, 95 % CI = 0.96-4.35).

C; Tau = 0.55 model (log-rank test, $p = 0.023$, HR = 2.17, 95 % CI = 1.11-4.12).

Plus symbols indicate censoring.

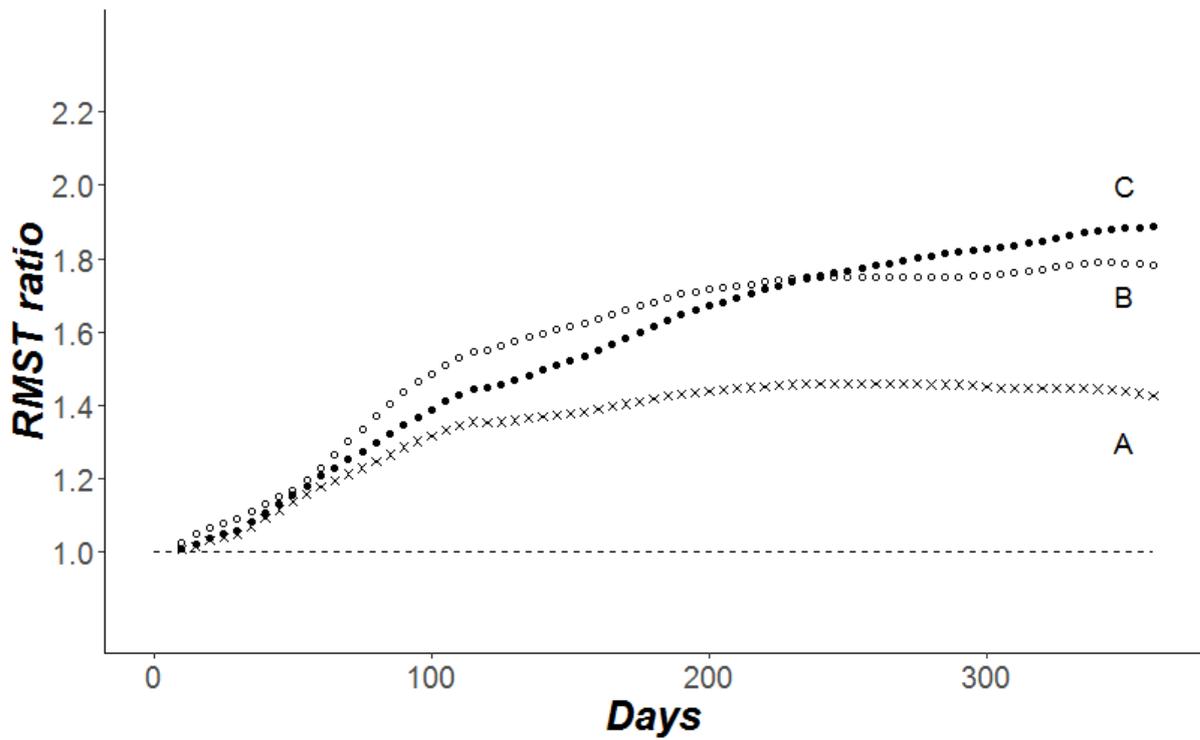


Figure 13; The RMST ratio of patients developing Hand-Foot-Syndrome during the 365 days.

A; Basic model (The Cox proportional hazard assumption was not satisfied).

B; Tau = 0.4 model (The Cox proportional hazard assumption was not satisfied).

C; Tau = 0.55 model (The Cox proportional hazard assumption was satisfied).

HFS を引き起こす代表的抗癌薬には、ドキシソルビシン、シタラビンおよびスニチニブなどが知られている[49,50]。Molpus や Mangili らは、リポソーム化ドキシソルビシン投与中には手足を冷やすことが HFS の発症予防に重要であると報告しているが、サンプルサイズが小さいことが問題であった[51,52]。そこで我々は、Mangili らのデータから検出力を計算した。検出力が小さいと効果を検出できず、効果がある場合も効果がないと誤って結論付けることになる。計算の結果、検出力は 0.76 となり手足を冷やすことが HFS の発症を予防する可能性が高いことが推察された。またニコチンパッチやセレコキシブが HFS の発症を減少させるとの報告もある[53,54]。ニコチンによる直接的血管収縮作用、セレコキシブによる Prostaglandin I₂ 低下に伴う血管拡張の阻害を考慮すると、末梢血管を収縮させることが HFS の予防に重要である可能性がある。VB₆ 内服が HFS に対して無効であった結果も併せて考えると、末梢血管の血流と HFS には関連があると考えられる[55]。

本研究にはいくつかの問題点がある。まず第 1 に、サンプルサイズが小さいことである。これは第 I 章と同様に、効果量を合わせて報告し、サンプルサイズによる影響を可能な限り小さくした。一方 Lewis らは、サンプルサイズが小さいことで効果量を過大評価する可能性を指摘しているため、信頼区間の報告は徹底する必要があると考えられる[56]。第 2 に、ROC 解析の結果、Hb の最適カットオフ値は 12mg/dL であった。しかしながら、第 I 章同様にカットオフ値そのものが重要ではないため、種々の HFS の事前確率を用い NPV を求めた (Table 12)。今日までに HFS に対する予防薬は存在していないことを考慮すれば、第 II 章では PPV というよりはむしろ NPV が重要な意味を持つと考えられる。その結果、Tau = 0.4 model における NPV はおおよそ 90% となり、実臨床において偽陰性は 10% 程度であると推察された。第 3 に、本研究では Cape の詳細な累積投与量を得ることが出来なかった。一般的に累積投与量が多くなればなるほど、HFS の発症リスクが高まるとされている[57,58]。第 4 に、Cape 内服中の日常生活強度(皮膚への物理的刺激、熱刺激、光刺激)に関する情報を得ることが出

来なかった。皮膚刺激の増強が HFS の原因になることが考えられており、この観点からステロイドの長期塗布は不適切であるとされている。第 5 に、Precision および Recall の重み付けに関する考察が不十分である。重み付けに関して明確なルールはなく、実臨床に合わせて適宜重みを変化させる必要がある。

本研究の結果、Cape による HFS の発症には Hb が予測因子となることが示唆された。また、RMST 比は年齢を考慮することで大きくなったことから、Hb と年齢を考慮することが HFS 発症を予測する上で極めて重要であると考えられた。

Table 12; Predictive values of hemoglobin and patients age according to the prevalence of Hand-Foot-Syndrome.

Prevalence of HFS	Basic model		Tau = 0.4 model		Tau = 0.55 model	
	PPV	NPV	PPV	NPV	PPV	NPV
50 %	75.8	70.3	66.6	92.3	75.8	77.3
60 %	82.4	61.2	74.9	88.9	82.4	69.4

Abbreviations: Hb, hemoglobin; HFS, hand-foot-syndrome; NPV, negative predictive value; PPV, positive predictive value

要約

第 I 章では、食道癌に対する DCF 療法における好中球減少予測因子に関する検討を行った。DCF 療法では、Grade IV の好中球減少が 50% 以上に発現したとの報告があるが、Grade IV の好中球減少をマネジメントすることは感染症リスクの観点から重要である。しかしながら、これまで Grade IV の好中球減少に強く関連する予測因子に関して明確な見解は得られていない。本章では、仮説検定に加え、効果量、モデル評価およびベイズ推定を用いて、Grade IV の好中球減少の予測因子を検討した。その結果、効果量およびそれら信頼区間は「真に差が無いのか」それとも「サンプルサイズが小さいために有意な差が出ないのか」を判断するために有用であった。またモデル評価に関しては「求めた予測モデルがどれだけうまく Grade IV の好中球減少を分類できるか」を検討するために有効であった。種々の検討の結果、Grade IV の好中球減少の予測因子として、化学療法開始前の血小板数、肝機能検査の一つである ALT 値および PPI 内服の有無が有用であることが示唆された。その陽性予測値は 92% と高く、DCF 療法における Grade IV の好中球減少予測に十分利用可能である。

第 II 章では、発現時期の予測が困難な、Cape 療法における HFS に関する予測因子について検討を行った。Cape は乳癌、大腸癌、胃癌等に使用されているフッ化ピリミジン系抗癌薬であるが、代表的な副作用に HFS があり、Cape 治療に伴い約 50% に発現するとされている。しかし、HFS の発現時期および予測因子に関しては明確な見解は得られていない。そこで、HFS 発現における時間依存リスク因子の存在を探るため、COX 比例ハザードモデルを用いてリスク因子を検討した。一般的に COX 比例ハザードモデルは時間や打ち切りを考慮する解析に用いられる方法であるが、比例ハザード性(瞬間イベント発現率が一定)を仮定するという大きな制約の下で解析を行なう必要がある。しかしながら近年、IPASS および ICON-7 試験など、比例ハザード性を仮定できない結果が報告されるようになってきている [59-60]。そこで、比例ハザード性の仮定を必須としない解析手法である RMST を用いて検討した。その結果、Cape 内服後 60-230 日までは、化学療法開始前の Hb 値が HFS 発現に対して有意に相関することが示唆された。ハザード比が一定でないことに注

目すると、任意区間においてのみ HFS 発現にヘモグロビン値が関与している結果となり、リスク因子が観察期間中に変化することが推察された。またモデル評価では、年齢と Hb 値の相関関係を分位点回帰により考察し、それぞれの分位点における HFS の分類能力である F 値(Precision および Recall の調和平均)を求めた。さらに double cross validation にて F 値が最も大きくなるモデルを、汎化能力の高いモデルと評価した。こうした一連の解析により、年齢を合わせて考慮することでモデルの予測能力が高くなる可能性があること、さらに医療上の戦略を加味すること等により一層有用な予測結果が得られることが示された。これらの結果から、HFS に対するマネジメントは画一的であるべきではなく、様々な条件に応じて適宜変化させることで、より適切な医療上の対応に繋げることが可能であることが示唆された。

総括

これまでに仮説検定を用いた「The effect of aprepitant and dexamethasone combination on paclitaxel-induced hypersensitivity reaction」を我々は報告した。しかしながら、American Statistical Association は p 値の解釈を以下の様に提案し、仮説検定を過度に過信することに警鐘を鳴らしている。

I: P-values can indicate how incompatible the data are with a specified statistical model.

II: P-values do not measure the probability that the studied hypothesis is true, or the probability that the data were produced by random chance alone.

III: Scientific conclusions and business or policy decisions should not be based only on whether a *p*-value passes a specific threshold.

IV: Proper inference requires full reporting and transparency.

V: A *p*-value, or statistical significance, does not measure the size of an effect or the importance of a result.

VI: By itself, a *p*-value does not provide a good measure of evidence regarding a model or hypothesis.

本研究では American Statistical Association の示した効果量を有効に活用した。一般的に、T 統計量はサンプルサイズおよび効果量から計算される。

$$T \text{ statistic} = \text{Sample size} \times \text{Effect size}$$

帰無仮説において大きな T 統計量を得る最も単純な方法は、サンプルサイズを大きくすることである。しかしながらサンプルサイズを大きくした場合、効果の大きさが小さくとも有意な差を間違えて得ることになる。一方、T 統計量が小さくとも効果の大きさが小さいとは限らない。そこで p 値のみを検討するのではなく、効果量も併せて検討することが重要であると考えた。

統計解析(回帰や分類)を行うにあたり、予め何らかの仮説を立て、モデルを設定し、次いで臨床研究で得られたデータを用いてモデルを再構築していくのが一般的である。しかしながらこの過程には大きな問題が存在する。得られたデータからモデルを再構築した場合、得られたデータに対するモデルの適合度は非常に高くなる(オーバーフィッティング)が、未知のデータに対するモデルの予測能力が高いとは限らない。つまり、統計解析(p 値や効果量)からはモデルを十分に説明することは可能であっても、モデルの予測能力を評価することは不可能である。そこで本研究では、統計解析に加えてモデル評価も併せて検討することが必要であると考えた。NRI や IDI は統計モデルの再分類能力を評価する場合に有用であり、doublecross validation はモデルの予測能力を評価する場合に有用であった。このような理由から、臨床研究において p 値、効果量およびモデル評価を併せて検討することが重要であると考えられた。

以上、癌化学療法による副作用の重篤度や発現時期に関しては、効果量を用いたモデルの構築によって、癌化学療法前の各種検査値に基づく予測精度が向上することが示された。また、副作用発現の予測性能評価には double cross validation が有効であった。本研究で得られた知見を基にモデル構築と評価を行うことによって、比較的小さなサンプルサイズの臨床情報からであっても、薬物治療の有効性や安全性の患者個別化予測が可能になることが示された。

参考文献

1. Hayashi K, Ando N, Watanabe H, et al (2001) Phase II evaluation of protracted infusion of cisplatin and 5-FU in advanced squamous cell carcinoma of the esophagus: a Japan Esophageal Oncology Group (JEOG) Trial (JCOG9407). *Jpn J Clin Oncol* 31: 419–423
2. Iizuka T, Kakegawa T, Ide H, et al (1992) Phase II evaluation of cisplatin and 5-FU in advanced squamous cell carcinoma of the esophagus: a Japanese Esophageal Oncology Group Trial. *Jpn J Clin Oncol* 22: 172–176
3. Bleiberg H, Conroy T, Paillot B, et al (1997) Randomised phase II study of cisplatin and 5-FU (5-FU) versus cisplatin alone in advanced squamous cell oesophageal cancer. *Eur J Cancer* 33: 1216–1220
4. Gisselbrecht C, Calvo F, Mignot L, et al (1983) Fluorouracil (F), Adriamycin (A), and cisplatin (P) (FAP): combination chemotherapy of advanced esophageal carcinoma. *Cancer* 52: 974–977
5. Webb A, Cunningham D, Scarffe JH, et al (1997) Randomized trial comparing epirubicin, cisplatin, and fluorouracil versus fluorouracil, doxorubicin, and methotrexate in advanced esophagogastric cancer. *J Clin Oncol* 15: 261–267
6. Ilson DH, Ajani J, Bhalla K, et al (1998) Phase II trial of paclitaxel, fluorouracil, and cisplatin in patients with advanced carcinoma of the esophagus. *J Clin Oncol* 16: 1826–1834
7. Yamasaki M, Miyata H, Tanaka K, et al (2011) Multicenter phase I/II study of docetaxel, cisplatin and fluorouracil combination chemotherapy in patients with advanced or recurrent squamous cell carcinoma of the esophagus. *Oncology* 80: 307–313
8. Hara H, Tahara M, Daiko H, et al (2013) Phase II feasibility study of preoperative chemotherapy with docetaxel, cisplatin, and fluorouracil for esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer Sci* 104: 1455–1460
9. Yokota T, Hatooka S, Ura T, et al (2011) Docetaxel plus 5-FU and cisplatin (DCF) induction chemotherapy for locally advanced borderline-resectable T4 esophageal cancer. *Anticancer Res* 31: 3535–3541
10. Tamura S, Imano M, Takiuchi H, et al (2012) Phase II study of docetaxel, cisplatin and 5-FU (DCF) for metastatic esophageal cancer (OGSG 0403). *Anticancer Res* 32: 1403–1408

11. Roth AD, Fazio N, Stupp R, et al (2007) Docetaxel, cisplatin, and fluorouracil; docetaxel and cisplatin; and epirubicin, cisplatin, and fluorouracil as systemic treatment for advanced gastric carcinoma: a randomized phase II trial of the Swiss Group for Clinical Cancer Research. *J Clin Oncol* 25: 3217–3223
12. Van Cutsem E, Moiseyenko VM, Tjulandin S, et al (2006) Phase III study of docetaxel and cisplatin plus fluorouracil compared with cisplatin and fluorouracil as first-line therapy for advanced gastric cancer: a report of the V325 Study Group. *J Clin Oncol* 24: 4991–4997
13. Mahaseth H, Brucher E, Kauh J, et al (2013) Modified FOLFIRINOX regimen with improved safety and maintained efficacy in pancreatic adenocarcinoma. *Pancreas* 42: 1311–1315
14. Jo JC, Lee JL, Ryu MH, et al (2007) Docetaxel monotherapy as a second-line treatment after failure of fluoropyrimidine and platinum in advanced gastric cancer: experience of 154 patients with prognostic factor analysis. *Jpn J Clin Oncol* 37: 936–941
15. Tournigand C, André T, Achille E, et al (2004) FOLFIRI followed by FOLFOX6 or the reverse sequence in advanced colorectal cancer: a randomized GERCOR study. *J Clin Oncol* 22: 229–237
16. Okusaka T, Nakachi K, Fukutomi A, et al (2010) Gemcitabine alone or in combination with cisplatin in patients with biliary tract cancer: a comparative multicentre study in Japan. *Br J Cancer* 103: 469–474
17. Chen XL, Chen XZ, Yang C, et al (2013) Docetaxel, cisplatin and fluorouracil (DCF) regimen compared with non-taxane-containing palliative chemotherapy for gastric carcinoma: a systematic review and meta-analysis. *PLoS One* 8: e60320
18. Harvey V, Mouridsen H, Semiglazov V, et al (2006) Phase III trial comparing three doses of docetaxel for second-line treatment of advanced breast cancer. *J Clin Oncol* 24: 4963–4970
19. Inagaki J, Rodriguez V, Bodey GP (1974) Causes of death in cancer patients. *Cancer* 33:568–573
20. Nakagawa S, Cuthill IC (2007) Effect size, confidence interval and statistical significance: a practical guide for biologists. *Biol Rev Camb Philos Soc* 82: 591–605
21. Pencina MJ, D'Agostino RB Sr, Steyerberg EW (2011) Extensions of net reclassification improvement calculations to measure usefulness of new biomarkers. *Stat Med* 30: 11–21
22. Kogo M, Watahiki M, Sunaga T, et al (2011) Analysis of the risk factors for myelosuppression after chemoradiotherapy involving 5-FU and platinum for patients with esophageal cancer. *Hepatogastroenterology* 58: 802–808
23. Biino G, Santimone I, Minelli C, et al (2013) Age- and sex-related variations in platelet count in Italy: a proposal of reference ranges based on 40987 subjects' data. *PLoS One* 8: e54289

24. Ishiguro A, Nakahata T, Matsubara K, et al (1999) Age-related changes in thrombopoietin in children: reference interval for serum thrombopoietin levels. *Br J Haematol* 106: 884–888
25. Wang YJ, Zhang YK, Kathawala RJ, et al (2014) Repositioning of tyrosine kinase inhibitors as antagonists of ATP-binding cassette transporters in anticancer drug resistance. *Cancers (Basel)* 6: 1925–1952
26. Pauli-Magnus C, Rekersbrink S, Klotz U, et al (2001) Interaction of omeprazole, lansoprazole and pantoprazole with P-glycoprotein. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 364: 551–557
27. De Milito A, Fais S (2005) Proton pump inhibitors may reduce tumour resistance. *Expert Opin Pharmacother* 6: 1049–1054
28. Burris HA (1996) Optimal use of docetaxel (Taxotere): maximizing its potential. *Anticancer drugs* 7 Suppl 2: 25–28
29. Bruno R, Hille D, Riva A, et al (1998) Population pharmacokinetics/pharmacodynamics of docetaxel in phase II studies in patients with cancer. *J Clin Oncol* 16: 187–196
30. Ogura K, Ohnuma T, Minamide Y, et al (2005) Dihydropyrimidine dehydrogenase activity in 150 healthy Japanese volunteers and identification of novel mutations. *Clin Cancer Res* 11: 5104–5111
31. Fleming GF, Schilsky RL, Schumm LP, et al (2003) Phase I and pharmacokinetic study of 24-hour infusion 5-FU and leucovorin in patients with organ dysfunction. *Ann Oncol* 14: 1142–1147
32. Innominato PF, Giacchitti S, Smaaland R, et al (2011) Chemotherapy-induced neutropenia association with survival in metastatic colorectal cancer (MCC): Schedule dependency. *J Clin Oncol* 29(4): 454-454
33. Maio DM, Gridelli C, Gallo C, et al (2005) Chemotherapy-induced neutropenia and treatment efficacy in advanced non-small-cell lung cancer: a pooled analysis of three randomised trials. *Lancet Oncol* 6(9): 669-677
34. Longley D.B, Harkin D.P, Johnston P.G. (2003) 5-FU : mechanisms of action and clinical strategies. *Nat Rev Cancer* 3(5): 330–338
35. O’Shaughnessy J, Miles D, Vukelja S, et al (2002) Superior survival with capecitabine plus docetaxel combination therapy in anthracycline-pretreated patients with advanced breast cancer: phase III trial results. *J Clin Oncol* 20(12): 2812-2823

36. Bang YJ, Van Cutsem E, Feyereyslova A, et al (2010) Trastuzumab in combination with chemotherapy versus chemotherapy alone for treatment of HER2-positive advanced gastric or gastro-oesophageal junction cancer (ToGA): a phase 3, open-label, randomised controlled trial. *Lancet* 376(9742): 687-697
37. Kang YK, Kang WK, Shin DB, et al (2009) Capecitabine/cisplatin versus 5-fluorouracil/cisplatin as first-line therapy in patients with advanced gastric cancer: a randomised phase III noninferiority trial. *Ann Oncol* 20(4): 666-673
38. Clark A.S, Vahdat L.T (2004) Chemotherapy-induced palmar-plantar erythrodysesthesia syndrome : etiology and emerging therapies. *Support Care Cancer* 1(4): 213–218
39. Lévy E, Piedbois P, Buyse M, et al (1998) Toxicity of fluorouracil in patients with advanced colorectal cancer: effect of administration schedule and prognostic factors. *J Clin Oncol* 16(11): 3537–3541
40. Comandone A, Bretti S, La Grotta G, et al (1993) Palmar-plantar erythrodysestasia associated with 5-FU. *Anticancer Res* 13(5C): 1781-1783
41. Uno H, Claggett B, Tian L, et al (2014) Moving beyond the hazard ratio in quantifying the between-group difference in survival analysis. *J Clin Oncol* 32(22): 2380-2385
42. Uno H (2015) Comparing two survival curves using the restricted mean survival time. Dana-Farber Cancer Institute
43. Royston P, Parmar M. K (2013) Restricted mean survival time : an alternative to the hazard ratio for the design and analysis of randomized trials with a time-to-event outcome. *BMC Medical Research Methodology* 13: 152-166
44. Tsuchida Y, Fukuda O, Kamata S (1991) The correlation of skin blood flow with age, total cholesterol, hematocrit, blood pressure, and hemoglobin. *Plast Reconstr Surg* 88(5): 844–850
45. Tsuchida Y, Fukuda O, Kamata S (1995) The effect of anemia on skin blood flow in human. *J Dermatol Sci* 9(2): 117–122
46. Lévy E, Piedbois P, Buyse M, et al (1998) Toxicity of fluorouracil in patients with advanced colorectal cancer: effect of administration schedule and prognostic factors. *J Clin Oncol* 16(11): 3537–3541
47. Lingxin H, Daniel Q. Naiman (2007) Quantile regression.
48. Refaeilzadeh P, Tang L, Liu H (2009) Cross-Validation. *Encyclopedia of Database Systems*. 532-538
49. Morio K, Mizuki M, Sozu T, et al (2014) Risk factors for cytarabine-induced cutaneous toxicity in patients with haematological malignancies. *Chemotherapy* 60(3): 168-173

50. Park SJ, Lee JL, Park I, et al (2012) Comparative efficacy of sunitinib versus sorafenib as first-line treatment for patients with metastatic renal cell carcinoma. *Chemotherapy* 58(6): 468-474
51. Molpus K.L, Anderson L.B, Crag C.L, et al (2004) The effect of regional cooling on toxicity associated with intravenous infusion of pegylated liposomal doxorubicin in recurrent ovarian carcinoma. *Gynecol Oncol* 93(2): 513-516
52. Mangili G, Petrone M, Gentile C, et al (2008) Prevention strategies in palmar-plantar erythrodysesthesia onset: the role of regional cooling. *Gynecologic Oncol* 108(2): 332-335
53. Kingsley E.C (1994) 5-FU dermatitis prophylaxis with a nicotine patch. *Ann Intern Med* 120(9): 813
54. Zhang R.X, Wu X.J, Wan D.S, et al (2012) Celecoxib can prevent capecitabine-related hand-foot syndrome in stage II and III colorectal cancer patients : result of a single-center, prospective randomized phase III trial. *Ann Oncol* 23(5): 1348-1353
55. Kang Y.K, Lee S.S, Yoon D.H, et al (2010) Pyridoxine is not effective to prevent hand-foot syndrome associated with capecitabine therapy: results of a randomized, double-blind, placebo-controlled study. *J Clin Oncol* 28(24): 3824-3829
56. Halsey L.G, Curran-Everett D, Vowler S.L, et al (2015) The fickle P value generates irreproducible results. *Nat Methods* 12(3): 179-185
57. Lipworth A.D, Robert C, Zhu A.X (2009) Hand-foot syndrome (hand-foot skin reaction, palmar-plantar erythrodysesthesia) : focus on sorafenib and sunitinib. *Oncology* 77(5): 257-271
58. Hueso L, Sanmartín O, Nagore E, et al (2008) Chemotherapy-induced acral erythema : a clinical and histopathologic study of 44 cases. *Actas dermosifiliográficas* 99(4): 281-290
59. Mok TS, Wu YL, Thongprasert S, et al (2009) Gefitinib or carboplatin-paclitaxel in pulmonary adenocarcinoma. *N Engl J Med* 361(10): 947-957
60. Perren TJ, Swart AM, Ledermann JA, et al (2011) A phase 3 trial of bevacizumab in ovarian cancer. *N Engl J Med* 365(26): 2484-2496

論文目録

I: Retrospective analysis of the risk factors for Grade IV neutropenia in oesophageal cancer patients treated with a docetaxel, cisplatin, and 5-FU regimen.

Masahito Naito, Tomoya Yamamoto, Chikao Shimamoto, Yoshihiro Miwa

Chemotherapy (2017) 62(4), 215-224

II: Hemoglobin value is the most important factor in the development of hand-foot-syndrome under the capecitabine regimen.

Masahito Naito, Tomoya Yamamoto, Shinsuke Hara, Chikao Shimamoto, Yoshihiro Miwa

Chemotherapy (2016) 62(1), 23-29

参考論文

I: The effect of aprepitant and dexamethasone combination on paclitaxel-induced hypersensitivity reaction.

Tomoya Yamamoto, Masahito Naito, Shinsuke Hara, Toshihiro Kudo, Yoshihiro Miwa

Eur J Gynaecol Oncol (2016) 37(6), 833-836

謝辞

本研究を遂行するとともに本稿をまとめるにあたり、終始懇切なるご指導ご鞭撻を賜りました、島本 史夫 教授(大阪薬科大学薬物治療学Ⅱ研究室)に深甚なる謝意と敬意を表します。

本研究の遂行に際し、直接ご指導を賜りました、山本 智也助教授(大阪大学医学部附属病院薬剤部、大阪大学大学院医学系研究科保健学専攻)および三輪 芳弘准教授(大阪大学医学部附属病院薬剤部)に深く感謝致します。

また、日常の議論を通じ多くの知識や示唆を頂きました、松村 人志 教授(大阪薬科大学薬物治療学研究室)、中村 敏明 教授(臨床薬学教育研究センター)および中村 任 教授(臨床薬学教育研究センター)に感謝の意を表します。

また、本研究を進めるにあたって、種々のお力添えを頂戴しました、Charlotte Mekis (Interac Co. Ltd., Japan)、Robert Boardman (Interac Co. Ltd., Japan)および Thomas Halsted (SR Life Science Instrumentation Unit, RIKEN SPring-8 Center, Japan)に心より感謝の意を表します。