慶應義塾大学学術情報リポジトリ
Keio Associated Repository of Academic resouces

Title	乳癌骨転移におけるpamidronateの効果と酒石酸抵抗性酸性フォスファターゼの骨転移マーカーとしての有用性に関する研究
Sub Title	
Author	和田, 徳昭(Wada, Noriaki) 北島, 政樹(Kitajima, Masaki)
Publisher	慶應医学会
Publication year	2005
Jtitle	慶應医学 (Journal of the Keio Medical Society). Vol.82, No.4 (2005. 12) ,p.T297- T311
JaLC DOI	
Abstract	
Notes	学位論文
Genre	Journal Article
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=AN00069296-20051201-0297

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the KeiO Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

慶應医学・82(4)：T297～T311，2005

学位論文

乳癌骨転移におけるpamidronateの効果と酒石酸抵抗性酸性フォスファターゼの骨転移マーカーとしての有用性に関する研究

慶應義塾大学医学部外科学教室
（指導：北島政樹教授）
和田徳昭（わだ のりあき）

（平成16年3月17日受付）

Key Words：tartrate resistant acid phosphatase, breast cancer, bone metastasis, bone metabolic marker, bisphosphonate

乳癌は女性にとって最も罹患率の高い悪性腫瘍である．骨に転移する頻度が高く初再発の30%にみられ，癌死までに70%の患者に骨転移が発生するといわれる[1), 2)]．骨転移の成立，進展過程には破骨細胞がその主役を担うことが最近判明してきた．実験的には骨転移による骨破壊は腫瘍自体が直接関与するのではなく，腫瘍細胞が分泌するparathyroid hormone related peptide (PTHrP)[3)]により破骨細胞が活性化され，溶骨が促進される．それにより骨基質に豊富に蓄えられた腫瘍成長因子が放出され，さらに腫瘍細胞の増殖が進行する[4-6)]．ところで，ピロリン酸の類似物質であるbisphosphonate（BP）は強力に骨表面に結合し，骨吸収に伴い破骨細胞に取り込まれ，その働きを抑制するとされる．骨微小環境における活性化成長因子放出を抑えることで，腫瘍細胞と破骨細胞の悪循環を断ち切ることが可能であり[7)]，骨転移の治療に有効とされる．

臨床的に骨転移は，骨痛，病的骨折，脊髄圧迫など患者の生活の質に重大な問題を長期に引き起こすため，骨転移の早期診断と適切な治療効果の評価は重要である．通常骨転移発見には骨シンチグラフィがよく用いられ，高感度で1回の施行で全身が検査できるため骨転移の疑わしい部位の同定に威力を発揮する[8)]．しかしながら，特異度がやや低いことやフレア現象などのため[9), 10)]，しばしば，病変の評価に苦慮する．さらに，検査は煩雑で，被曝の問題などで経過観察中に頻回に繰り返すことはできない．単純エックス線検査は簡便であるが確定診断には問題が多い．CT，MRI[11)]などの画像検査は転移評価に有効ではあるが，高価でスクリーニングには向かない．

一方，別のアプローチとして，最近，種々の骨代謝に関する生化学マーカー[12)]が開発され，骨転移に対する臨床応用が進んでいる．マーカーの多くは骨吸収時に分解された骨基質タンパク質であるI型コラーゲンの代謝産物を血中，尿中で測定するものである．それとは別に，破骨細胞に局在する酵素[13-15)]で，破骨細胞の活性化と共に血中に放出される血清酒石酸抵抗性酸性フォスファターゼ（tartrate resistant acid phosphatase；TRACP）がある．総酸性フォスファターゼが骨転移患者で上昇することは以前からよく知られていたが，TRACPは総酸性フォスファターゼの酒石酸抵抗性分画[16), 17)]であり，血清TRACPの大部分は破骨細胞由来とされる．骨吸収は破骨細胞特有の機能であることから，直接破骨細胞の活性化や骨吸収の指標となり，理論上骨転移に対するマーカーとして期待される．

本論文は，Wada N, Ishii S, Ikeda T, Enomoto K, Kitajima M：Serum tartrate resistant acid phosphatase as a potential marker of bone metastasis from breast cancer. Anticancer Res 19：4515-4521, 1999の一部，Wada N, Fujisaki M, Ishii S, Ikeda T, Kitajima M：Evaluation of bone metabolic markers in breast cancer with bone metastasis. Breast Cancer 8：131-137, 2001の一部，Wada N, Ishii S, Ikeda T, Kitajima M：Inhibition of Bone Metastasis from Breast Cancer with Pamidronate Resulting in Reduction of Urinary Pyridinoline and Deoxypyridinoline in a Rat Model. Breast Cancer 11：282-287, 2004の一部を含む．

以上のように破骨細胞と腫瘍細胞の親密な関連や高感度な生化学マーカーの発展は，骨代謝の変化を捉え，骨転移の診断，治療に関する新しい方向性を示した．さらに我々は骨転移の治療だけでなくその予防の可能性と骨転移の発見や評価を画像診断だけに頼ってきた従来の方法を変える新しい戦略を必要としている．

本研究の目的は，BPの1つであるpamidronateによる骨転移制御の基礎的検討を行い，骨転移の状態と骨代謝マーカーとの関係を実験的，臨床的に明らかにすることである．まず，動物実験にて骨転移と破骨細胞の状態を観察し，pamidronateによる骨転移の予防・治療効果と骨代謝マーカーであるpyridinoline（Pyr），deoxypyridinoline（Dpyr）の関係を検討した．次に臨床研究として，乳癌患者における血清TRACPを中心に，現在利用可能で代表的な骨代謝マーカーである尿中Pyr，Dpyr，血中I型コラーゲンC端テロペプチド（ICTP），尿中I型コラーゲン架橋Nテロペプチド（NTx），総アルカリフォスファターゼ（ALP）を測定比較し，乳癌骨転移に対する骨代謝マーカーの有用性を評価した．

対象と方法

1．動物実験

1）動物

Charles River Japan Inc.より購入した42-45日齢のメス自然発生高血圧ラット（SHRラット）を用いた．体重は100-120 gの範囲であった．実験動物は慶應義塾大学医学部実験動物センター内で飼育し，実験は慶應義塾大学医学部動物実験ガイドラインを遵守し行われた．

2）細胞株

北海道大学病理学教室武市紀年博士より贈与を受けた，SHRラット自然発生乳癌細胞株であるc-SST-2を用いた．この細胞株はSHRラット皮下に接種すると局所に腫瘍を形成しリンパ節，肺，心，腎などに高率に転移を生じる[18]．この細胞株はエストロゲンレセプター，プロゲステロンレセプターはともに陰性である．

3）細胞培養

c-SST-2細胞は10%胎児ウシ血清を加えたEagle's minimal essential mediumを培養液とし，5%CO_2を含む37℃大気中の環境下で培養した．Passageと培養液の交換は週1回施行した．

4）骨転移の作成

SHRラットをpentobarbital sodium 50 mg/kgの腹腔内投与により麻酔後，左頸部に小切開を加え，左頸動脈を露出，切開し，ポリエチレンカテーテル（PE-10, Becton Dickinson）を挿入，胸部大動脈内に留置した．小開腹後，一時的に両側腎動脈をクランプし，腫瘍細胞の腎への流入を防ぐ準備をした．0.2 mlのHanks液に浮遊させた1×10^4個のc-SST-2細胞をカテーテルから約1分間かけて緩徐に注射し，0.8 mlの生理食塩水でフラッシュした．腎動脈のクランプを解除し，カテーテルを抜去後，左頸動脈を結紮した．

5）治療プロトコール（BP投与）

骨転移治療薬として，第二世代のBP剤であるpamidronateを用いた．動物は対照群（Control），前治療群（Pre-treatment group），後治療群（Post-treatment group）の3群とした．前治療群は腫瘍接種24時間前にpamidronate 10 mg/Kgを0.5 ml生理食塩水に溶解し下腹部に皮下投与した．後治療群は腫瘍接種7日後に同量の薬剤を投与し，対照群には生理食塩水を皮下投与した．腫瘍接種3週後に，12時間の絶食後，血液と尿検体を採取した．屠殺後，肉眼的に臓器転移を確認し，胸椎，腰椎を摘出した．

6）骨転移の評価

(1)組織準備

摘出した脊椎は10%ホルマリンにて1週間固定し，5.0%エチレンジアミン四酢酸にて4週間かけ脱灰した．脊椎は長軸の中心にて切断し，パラフィンに包埋，通常の方法にて薄切しヘマトキシリン・エオジン（HE）染色とTRACP染色を施行した．TRACP染色は改良された片山らの方法[19]を用いた．TRACP染色は1 mMのNaphthol AS-BI phosphate酢酸緩衝液と20 mg/mlのHexazonium pararosanilinに0.05 M酒石酸を加え，pHを5.0に調整した液を用い，37℃にて1-2時間インキュベーションした．その後，ヘマトキシリンにて核を染色した．このTRACP染色で胞体が赤染する多核細胞を破骨細胞とみなした．

(2)組織評価

HE染色の標本にて脊椎転移を顕微鏡的に観察し，1匹毎の胸腰椎転移数をカウントした．さらに，骨転移とTRACP染色で染められた破骨細胞の関係を観察した．

7）骨関連マーカーの測定

採取された血液は凝固後直ちに3000回転/分，10分間の遠心分離にて血清を採取し，検体測定まで−70℃にて凍結した．尿も同様の条件で保存した．尿中Pyr，DpyrはHPLCにて測定し，すべて尿中Cr値との比を使用した．血清，尿中カルシュウム値は通常の生化学検査にて行い，血清アルブミンが4.0 g/dl以下の時は以下の補正式を用いた：補正血清カルシュウム値＝測定カ

ルシュウム値（mg/dl）+4－血清アルブミン値（g/dl）.

8）統計

すべての結果は平均値±標準偏差（mean±SD）で示した．二群間の比較は Fisher's test と Mann-Whitney U test を用い，p 値は 0.05 以下を有意差ありとした．

2．臨床研究

本研究の対象は乳房摘出術もしくは乳房温存手術を受け，組織学的に乳癌と診断した日本人女性 269 例（研究 1：113 例，研究 2：156 例）である．肝転移を除く重篤な肝機能障害や腎機能障害，また骨の代謝性疾患を有する患者は除外した．いずれの患者も BP 製剤の投与は受けていない．すべての患者はスクリーニングとして 99mTc-polyphosphate による骨シンチグラフィを受け，骨転移が疑われる時は，単純 X 線写真や MRI，CT などを施行し，慎重に経過観察し，骨転移の診断を確実なものとした．骨病変の検索だけでなく，理学的身体所見，胸部単純エックス線写真，腹部超音波検査を施行し，他部位の再発・転移の有無を確認した．すでに骨転移があり，治療中の患者の場合は，画像診断による骨病変の評価をおこない，乳癌取扱い規約[20]に基づき complete response（CR），partial response（PR），no change（NC），progressive disease（PD）に分類した．血液，尿検体は空腹時採血，早朝 2 番尿採取を原則とした．

検体採取は，術後決められた期間ではなく，外来定期検診時に説明と同意の得られた患者のみから行なった．得られたデータから個人が特定されることはなく，この研究だけに使用した．測定終了した検体の 2 次利用はなく，すみやかに廃棄した．

1）対象

(1)研究 1　TRACP と尿中 Pyr，Dpyr との比較

1995 年 1 月から 1996 年 1 月までに慶應義塾大学病院にて検体採取した乳癌患者 113 例を対象に，TRACP と尿中 Pyr，Dpyr，ALP を測定し骨代謝マーカーとしての有用性を比較検討した．また，同時期に同意の得られた 21-76 歳の健常女性 56 例から検体を採取し TRACP の健常対照群として使用した．

(2)研究 2　TRACP と血清 ICTP，尿中 NTx との比較

さらに 1997 年 7 月から 1999 年 3 月までに足利赤十字病院にて検体採取した乳癌患者 156 例を対象に，TRACP と血清 ICTP，尿中 NTx を測定し，臨床的有用性を検討した．

2）検体測定

採取した血液は凝固後直ちに 3000 回転/分の遠心分離を 10 分間施行後，測定した．当日測定できない場合は－70℃にて保存し，採取後 1 週間以内に測定した．採取された尿も同様に保存し測定した．

TRACP は Osawa ら[21]の方法にて改良された比色定量法にて自動分析装置（HITACHI 7150 もしくは OLYMPUS AU600）にて測定した．基質として Nitto Boseki から入手した基質 2,6-dichloro-4-acetiyl-phenilphoshate（DCAPP）を用いた．要約すると，0.1mM, pH5.4 ウシアルブミン加クエン酸ナトリウムに 26mM 酒石酸を加え緩衝液とした．基質 DCAPP は 6.0 mM，pH 3.0 に調整した．20μl の血清サンプルと 400 μl の緩衝液を混ぜ，100 μl の基剤を加えて測定を開始する．この DCAPP が酸性フォスファターゼにより加水分解され，その吸収光度増加速度を測定波長 340 nm で 40-240 秒測定し TRACP 活性を算出した．

過去の TRACP 測定方法[22, 23]では基質がそれぞれ違い，ビリルビンや溶血の影響を受けるなど，再現性や比較が難しいなどの問題点があったが，今回用いた基質 DCAPP は，前立腺 ACP に親和性が高く，水解生成物が直接高感度に検出できる改良された物質で,吸光度増加速度を生体色素の影響が少ない測定波長 340 nm にて自動分析装置で測定可能であり，従来[24, 25]より安定し測定も容易となった．

尿中 Pyr，Dpyr は高速液体クロマトグラフィー（HPLC）にて測定し，いずれも尿中 Cr 値との比（Pyr/Cr，Dpyr/Cr）を用いた．ICTP は Orion 社製の 2 抗体を用いた Radioimmunoassay 法にて測定し，尿中 NTx は持田製薬社製モノクロナール抗体を用いた ELISA 法にて測定した．ALP は各施設のルーチン検査キット（International 社もしく Yatoron 社製）を用いて測定した．

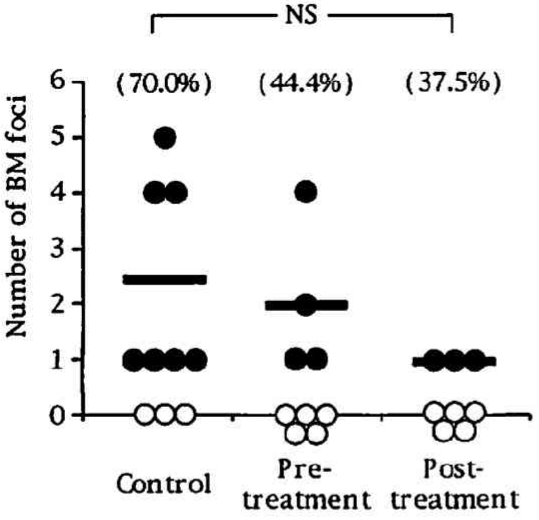
3）統計

すべての結果は平均±標準偏差（mean±SD）にて表示し，検定は 2 群間の比較は unpaired t test を，3 群間以上の比較は one-way analysis of variance（ANOVA）にて Sceffes F テスト，Kruskal-Wallis テストを用いた．感度特異度の検定は χ 二乗検定を用いた．p 値は 0.05 以下を有意差ありとした．

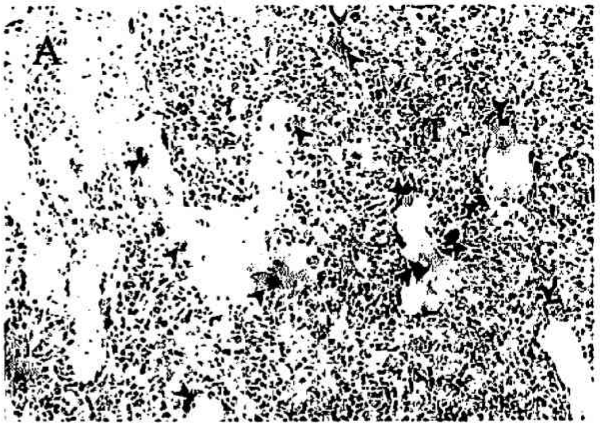
結　果

1．動物実験

第 1 図に各群の骨転移の数を示す．対照群の骨転移の発生率は 70.0%（7/10）であったが，前治療群，後治療群ではそれぞれ 44.4%（4/9），37.5%（3/8）であった．治療されたラットの転移の大部分は 1，2 カ所の小



第1図　腫瘍接種3週後の脊椎転移個数．括弧内は各群の骨転移発生率を示す．●は骨転移のあるラット，○は骨転移なしのラットを示す．グラフ内の横棒は骨転移を有するラットの平均骨転移数を示す．各群の平均転移個数±標準偏差は以下のとおり．対照群（Control：n＝10）；2.4±1.7個，前治療群（Pre-treatment group：n＝9）：2.0±1.2個，後治療群（Post-treatment group：n＝8）；1.0±0.0個．NS：有意差なし（Wada N et al：Breast Cancer 11：282-287, 2004の第1図を許可を得て転載）

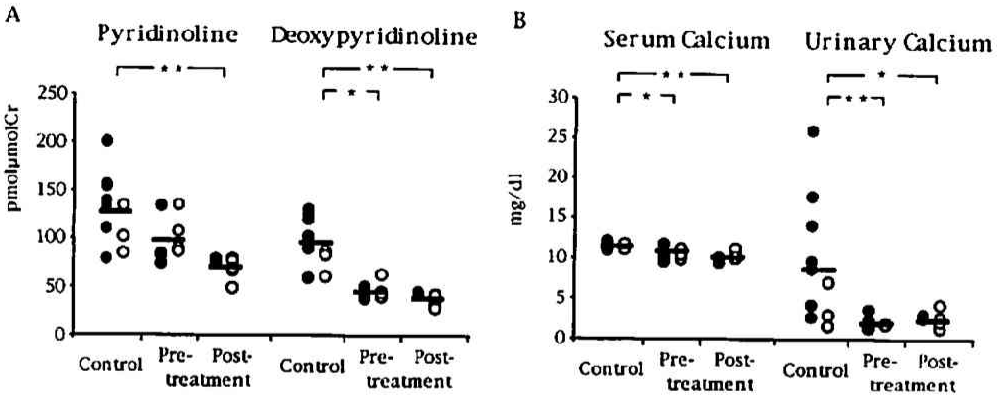


第2図　対照群の脊椎骨転移病理組織像
（A）腫瘍細胞（T）は破骨細胞（矢印）の増殖を伴って溶骨をおこす．（TRACP染色，×100）（B）骨髄内から骨破壊を伴い椎体外の軟部組織（S）に浸潤する腫瘍（T）．赤染する破骨細胞は浸潤する腫瘍に混じって椎体外でも認められる．（TRACP染色，×40）（Wada N et al：Breast Cancer 11：282-287, 2004の第2図を許可を得て転載）

転移巣であったが，対照群では4カ所以上の骨転移を認めるラットもいた．

第2図A，Bに脊椎中の骨転移顕微鏡写真を示す．TRACP染色で胞体が赤染する多核細胞が破骨細胞である．これにより破骨細胞と骨転移の特別な関係が明らかとなった．対照群での骨転移は微小骨髄転移から骨破壊まで多彩な像がみられた．骨髄内皮細胞に沿って破骨細胞が観察されたが，骨髄転移巣周囲と取り囲まれた島状の骨梁周囲にも多数の破骨細胞が存在し，活発に骨吸収を思わせる吸収窩を形成していた（第2図A）．骨髄中の転移巣は他の正常骨髄細胞を圧排するように発育しているが，破骨細胞は転移巣内にも観察された．骨破壊を伴い骨髄内から骨周囲軟部組織へ広がった浸潤転移巣内にも破骨細胞は認められた（第2図B）．しかし，骨に密接する軟部組織転移巣内には破骨細胞は存在せず，外側からの骨破壊像は決して認めなかった．一方，治療群には骨破壊をもたらす転移はなく，対照群にくらべて小さな転移巣であり，破骨細胞数もより少なかった．

骨転移と各群のPyr，Dpyrと血清，尿中カルシュウムの関連を示すため骨転移有無別にプロットしたのが第3図である．まず骨転移の有無に関係なく各郡全体の平均値を比較してみると，治療群の平均Pyr値はいずれも対照群より低く，特に後治療と対照群では有意な差を認めた．平均Dpyr値も治療群で有意に低値を示した．平均尿中，血清補正カルシュウム値も同様であり，対照群との間に有意差を認めた．さらに骨転移の有無別に検討すると対照群において，骨転移を有するラットの平均Pyr，Dpyr値は，転移がないラットと比較してやや高い傾向にあるものの，有意差はなかった．これらの値は対照群から前治療，後治療になるにつれて順に低くなっていった．すべての治療群のPyr，Dpyr値は骨転移の状態に関係なく同じレベルであった．尿中，血清補正カ



第3図 (A) 骨転移有無別尿中 Pyr, Dpyr 値. 骨転移の有無によらず pamidronate 投与により Pyr, Dpyr の平均値は低下した. (B) 骨転移有無別血中 Ca, 尿中 Ca 値. 転移を有する対照群の中には非常に高い尿中 Ca を示すものがあるが, 治療群にはない. ●は骨転移のあるラット, ○は骨転移なしのラットを示す. グラフ内の横棒は各郡全体の平均値を示す. 対照群 (Control : n=10), 前治療群 (Pre-treatment group : n=9), 後治療群 (Post-treatment group : n=8). *p<0.05, **p<0.01. (Wada N et al : Breast Cancer 11 : 282-287, 2004 の第3図を許可を得て転載)

ルシュウム値は骨転移の有無で有意差を認めなかった. しかし尿中カルシュウムでは骨転移を有する対照群の一部が非常に高値を示したが, 治療群では認めなかった.

2. 臨床研究

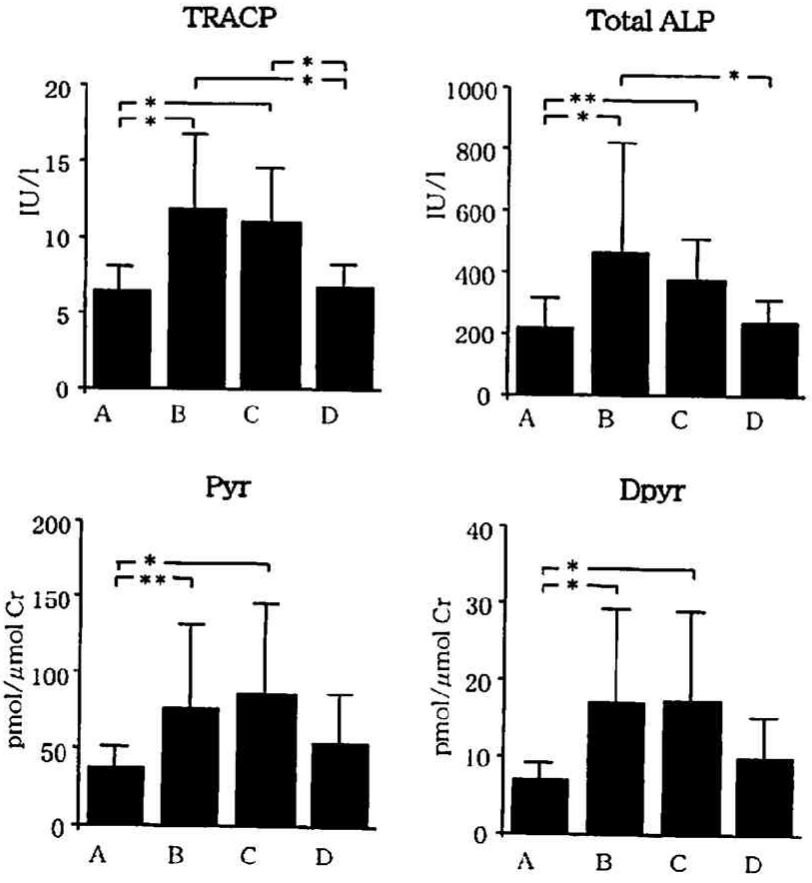
1) 研究1

症例全体の平均年齢は 54.5±11.8 歳, 閉経前 40 例, 閉経後 73 例であった. この症例を骨転移の有無に従い以下の4グループに分類した. Group A (n=61) は健存群, Group B (n=20) は骨単独転移群, Group C (n=15) は骨+他臓器転移を有する群, Group D (n=17) は骨以外の転移群である. 第4図は各骨代謝マーカーと骨転移の有無の関係を示している. いずれの群間にも平均年齢に差はない. すべてのマーカーにおいて, 骨転移を含む Group B と Group C の平均値は健存群 Group A に比べ有意に上昇していた. 特に Group D と Group B もしくは Group C の間に有意差を認めたのは TRACP だけであり, Pyr, Dpyr には認められなかった. 第5図では年齢別健常女性における TRACP の変化をみたもので, TRACP は加齢と共に上昇する傾向を示し, 閉経前女性の平均値 (5.7±1.3 IU/l) は閉経後女性 (6.6±1.2 IU/l) に比べ有意 ($p<0.02$) に低い値を示した. このことから TRACP の正常上限値を mean+2SD に設定すると, 閉経前後でそれぞれ 8.3 IU/l と 9.0 IU/l 以下を正常値と定義できた. これをカットオフ値に設定し, 実際の骨転移の有無を示したのが第1表である. これより TRACP の骨転移マーカーとしての特異度, 感度, 正診率はそれぞれ 91.0%, 65.7%, 83.2%であった.

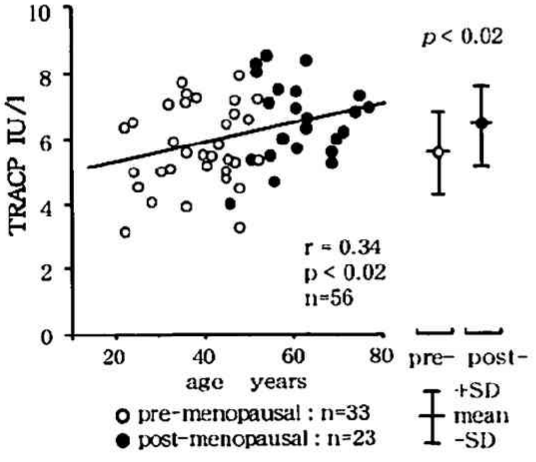
骨転移を有する患者は全て検体採取時, 様々な治療を既に受けていた. この時点で骨転移に対する治療効果を乳癌取扱い規約[20]に基づいて評価し non-responder 群 (PD) と stable-responder 群 (NC, PR, CR) に分類した. すべての骨代謝マーカーの平均値は non-responder 群で stable-responder 群に比べ有意に上昇していた.

non-responder 群を骨シンチグラムのホットスポットの数に応じて分類し, マーカーとの関係を調べた (第6図). いずれのマーカーも stable-responder 群は健存群と同じレベルであるが, ホットスポットの数が増加するに従い, 値も上昇していった. TRACP だけが 5-9 カ所のホットスポットでも有意な上昇を認めたが, 他のマーカーは 10 カ所以上ホットスポットがないと健存群と有意な差を認めなかった.

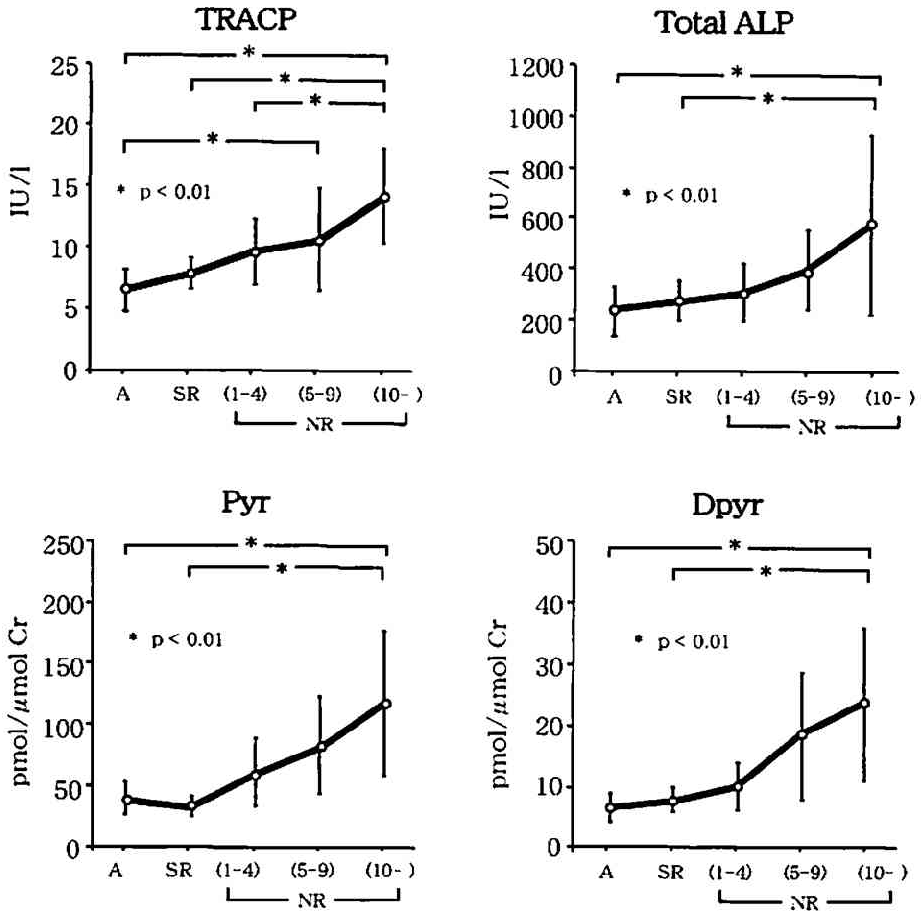
骨転移を有する症例で経時的 (2-12 ヶ月間) に観察し2回 TRACP を測定できたのは 16 症例で, その差を第7図にプロットした. この間に病状が悪化した群 (n=10) は安定していた群 (n=6) に比べ有意 ($p<0.05$) に大きな正の差を認めた. すなわち病勢の悪化にともない上昇する傾向にあった.



第4図　研究1　転移部位別骨代謝マーカーの比較
各群間の平均年齢に差はない．骨転移を有する群の平均値は健存群と比べいずれも有意な上昇を認めた．骨転移群と骨以外の転移群との間に有意差を認めたのはTRACPだけであった．Group A（n＝61 51.8±11.2歳）：健存群，Group B（n＝20 55.8±9.9歳）：骨単独転移群，Group C（n＝15 58.8±13.6歳）：骨＋他臓器転移群，Group D（n＝17 58.6±12.6歳）：骨以外の転移群．*p＜0.01，**p＜0.05．（Wada N et al：Anticancer Res 19：4515-4521，1999の第1図を許可を得て転載）



第5図　研究1　健常人におけるTRACP値と年齢との関係，閉経状況別平均値の比較
健常人においては，年齢が上昇するにつれTRACP値も徐々に増加し有意な相関を認めた．閉経前女性のTRACP平均値（5.7±1.3 IU/l）は閉経後女性の平均値（6.6±1.2 IU/l）と比べ有意に低かった．（Wada N et al：Anticancer Res 19：4515-4521，1999の第2図を許可を得て転載）

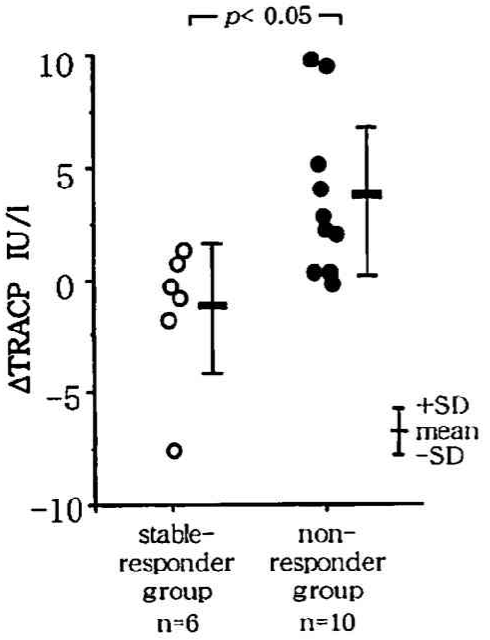


第6図　研究1　骨転移治療効果別，転移程度とマーカーとの関係
骨転移治療後，骨転移病巣を non-responder 群（NR）と stable-responder 群（SR）に分類し，NR 群はさらに程度別に細分した．図中の NR 群の括弧内の数値は骨シンチグラムのホットスポット数を示す．A は第1図と同じく健存群を意味する．骨転移治療効果のあった SR 群のマーカーの平均値は健存群と同レベルであるが，NR 群ではホットスポット数の増加に応じて各マーカーの平均値も上昇した．TRACP のみが，ホットスポット（5-10）でも健存群に比べ有意な上昇を示した．（Wada N et al：Anticancer Res 19：4515-4521，1999 の第3図を許可を得て転載，一部改変）

第1表　研究1　TRACP 値による骨転移の判定

		骨転移		
		あり (Group B, C)	なし (Group A, D)	計
TRACP	上限以上	23	7	30
	範囲内	12	71	83
	計	35	78	113

特異度：91.0%，感度：65.7%，正診率 83.2%，Fisher's exact probability test；$p<0.001$ 健常人の mean＋2SD を正常上限値と定め，閉経前後で正常値を変えた．（Wada N et al：Anticancer Res 19：4515-4521，1999 の第2表を許可を得て転載）



第7図　研究1　TRACP病勢別経時的変化
骨転移を有する症例で経時的（2-12ヶ月間）に観察し2回TRACPを測定できたのは16症例で，その差をプロットした．この間に病状が悪化した群（n＝10）は安定していた群（n＝6）に比べ有意（p<0.05）に大きな正の差を認めた．（Wada N et al：Anticancer Res 19：4515-4521，1999の第4図を許可を得て転載）

2）研究2

症例全体の平均年齢は55.3±12.5歳，閉経前64例，閉経後71例，不明21例であった．この症例を骨転移の有無に従い，健存群（n＝114），骨転移群（n＝23），骨以外の転移群（n＝19）と分類した．

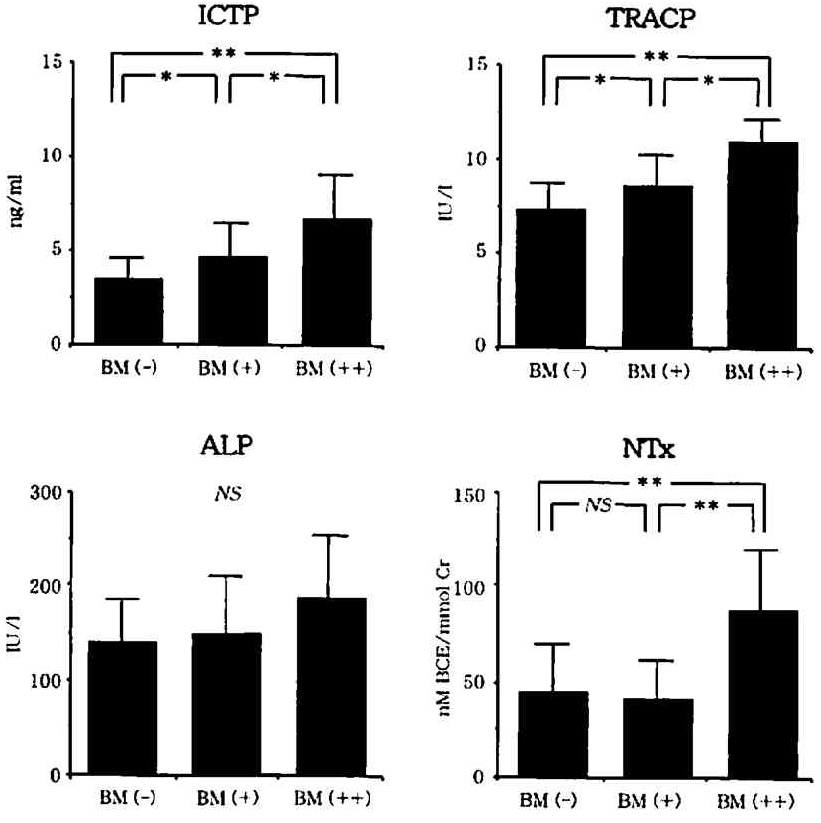
第2表は，骨代謝マーカーと骨転移の有無の関係を示す．骨転移群のICTPとTRACPは健存群に比べ有意（p<0.01）に上昇していた．同様に骨以外の転移群との比較でも有意（p<0.05）に上昇しておりこれらのマーカーは骨転移で特異的に上昇していた．ALPとNTxはいずれの群間にも有意な差を認めなかった．

第3表に骨転移患者の特徴を表し，第8図に骨代謝マーカーと骨転移の程度との関係を示した．骨転移群は骨シンチグラムのホットスポットの数に応じ2つのサブグループに分けた．第3表中の骨転移程度＋と＋＋は第8図のBM（＋）とBM（＋＋）にそれぞれ一致する．BM（＋）は1-3カ所のホットスポットを認める群で，BM（＋＋）は4カ所以上認める群である．骨シンチグラムの画像上，胸椎面積の3倍までをBM（＋）とみなした．BM（−）は健存群を示す．第8図でICTPとTRACPはBM（＋＋）群だけでなくBM（＋）でさえBM（−）と比べ有意（p<0.05）に上昇していた．またBM（＋＋）はBM（＋）と比べても有意（p<0.05）な上昇を認めた．これらのマーカーは明らかに骨転移の程度と関連していた．NTxにおいてはBM（＋＋）とBM（−）間に有意差（p<0.05）を認めたが，BM（＋）とBM

第2表　研究2　骨転移の有無と骨代謝マーカーの関係

	健存群 (n＝114)	骨転移群 (n＝23)	骨以外の転移群 (n＝19)
検体採取時年齢（歳）	56.7±11.8	63.2±13.1	55.9±13.9
ICTP (ng/ml)	3.5±1.2*	5.4±2.2**	4.1±1.9'
TRACP (IU/l)	7.3±1.4*	9.4±1.9**	8.0±1.6'
ALP (IU/l)	139.7±43.3	156.7±59.9	135.5±54.2
NTx/Cr (nM BCE/mmol Cr)	45.3±24.7	59.7±34.2	42.5±22.6

*p<0.01，'p<0.05，他の群間は有意差なし　　平均±標準偏差
（Wada N et al：Breast Cancer 8：131-137，2001の第2表を許可を得て転載）

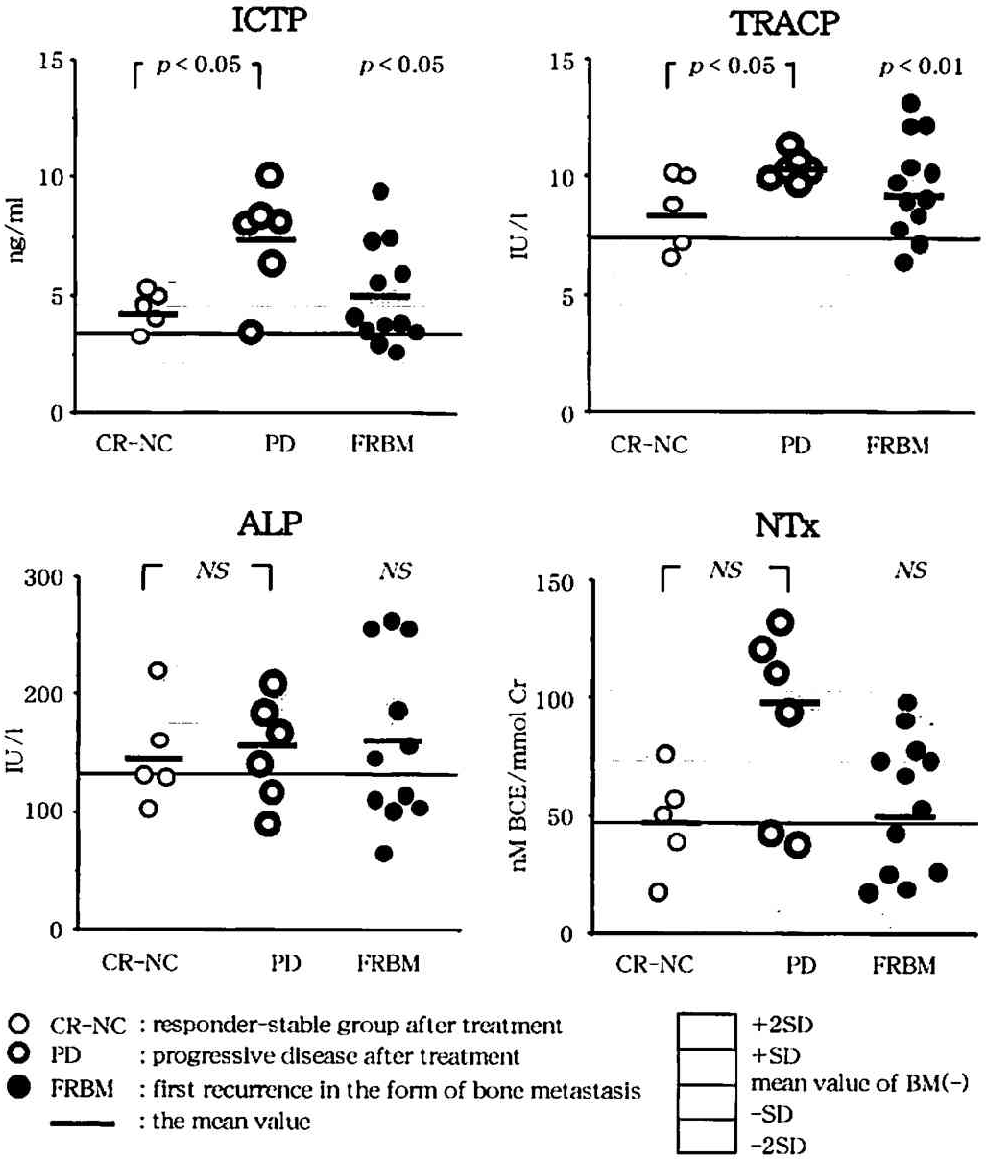


第8図　研究2　骨代謝マーカーと骨転移程度との関係
ICTP と TRACP は BM（＋＋）群だけでなく BM（＋）でも BM（－）と比べ有意（$p<0.05$）に上昇していた．また BM（＋＋）は BM（＋）と比べても有意（$p<0.05$）な上昇を認めた．これらのマーカーは明らかに骨転移の程度と関連していた．NTx においては BM（＋＋）と BM（－）間に有意差（$p<0.05$）を認めたが，BM（＋）と BM（－）間には有意差を認めなかった．BM（－）：健存群，BM（＋）：ホットスポット 1-3 カ所，BM（＋＋）：ホットスポット 4 カ所以上，BM（＋）と BM（＋＋）は第3表の骨転移程度の＋と＋＋にそれぞれ一致する．詳細は本文参照．（Wada N et al：Breast Cancer 8：131-137, 2001 の第1図を許可を得て転載）

（－）間には有意差を認めなかった．

骨転移を有する群は検体を採取する時点で，骨転移が初めて発見され骨転移に対する治療がなされていない症例と既に治療を受けている症例などさまざまであった．そこで，骨転移に対して治療を受けていた患者 11 名を検体採取時点での治療効果別に 2 つのサブグループに分類した．一つは骨転移に対する効果が PD（n＝5）で，もう一つは CR-NC（n＝6）のサブグループである．また第3表，第9図の First recurrence in the form of BM（FRBM）：骨初再発転移症例とは骨転移群の中で，未治療初再発骨単独転移か，もしくは他の転移部位の治療中に骨転移が初めて見つかったサブグループ（n＝12）とする．第9図に骨代謝マーカーと骨転移に対する治療効果の関係を示す．ICTP と TRACP は PD 群と CR-NC 群間で有意な差（$p<0.05$）を認めた．健存群の範囲をグラフ中の斜線の領域（mean±2SD）で示してあるが，この平均値と CR-NC 群にはいずれのマーカーも差を認めなかった．第9図には直接示していないが PD 群においては，ALP 以外の各マーカーの平均値は健存群に比べ有意（$p<0.01$）に上昇していた．

さらに同じ第9図中で骨初再発転移症例（FRBM）の ICTP と TRACP 値は，健存群と比べ有意（ICTP：$p<0.05$, TRACP：$p<0.01$）に上昇していたが，ALP, NTx は差を認めなかった．



第9図　研究2　骨転移治療効果とマーカーの関係，および骨初再発転移群と健存群との比較
検体測定時，骨転移治療の評価でPD群とCR-NC群のサブグループに分類した．ICTPとTRACPは両群間で有意な差（p<0.05）を認めた．健存群の範囲をグラフ中の斜線の領域で示してあるが，この平均値とNC-CR群にはいずれのマーカーも差を認めなかった．PD群においては，ALP以外の各マーカーの平均値は健存群にくらべ有意（p<0.01）に上昇していた．また，骨初再発転移群（FRBM）のICTPとTRACP値は，健存群と比べ有意（ICTP：p<0.05，TRACP：p<0.01）に上昇していた．（Wada N et al：Breast Cancer 8：131-137，2001の第2図を許可を得て転載，一部改変）

第3表　研究2　骨転移群患者の特徴

番号	検体採取時年齢	骨転移程度	骨転移部位	骨以外転移部位	検体採取時治療内容
1	79	+	胸椎	-	内分泌
2*	87	+	胸椎	-	-
3	64	++	多発転移	-	内分泌
4	44	+	胸椎	-	化学内分泌
5	54	+	胸椎	-	化学内分泌
6*	54	+	胸椎	-	化学内分泌
7*	47	+	胸骨	-	-
8*	60	+	腰椎	-	化学内分泌
9*	76	++	多発転移	-	-
10*	67	++	頚椎，胸骨	リンパ節	-
11	68	++	多発転移	肺，リンパ節	化学
12	67	+	胸骨	肺，皮膚	化学内分泌
13*	48	++	多発転移	リンパ節	-
14	78	+	胸骨	リンパ節	化学内分泌
15	61	+	腰椎	リンパ節	化学
16	56	++	多発転移	肺，リンパ節	内分泌
17	71	++	腰椎，胸骨	-	化学内分泌
18	69	++	多発転移	皮膚	-
19*	77	+	胸骨	-	-
20*	51	+	胸骨	-	化学
21*	57	+	骨盤，頭蓋骨	-	-
22*	81	+	頭蓋骨	肺	-
23*	38	+	頭蓋骨	肺，肝	化学内分泌

*First recurrence in the form of BM (FRBM)：骨初再発転移症例．
初めて骨転移再発が確認された症例で，骨単独初再発例と骨以外の再発部位治療中に新たに骨転移が出現した例を含む．骨転移の程度の定義は本文参照．（Wada N et al：Breast Cancer 8：131-137, 2001 の第3表を許可を得て転載）

考　察

骨転移と BP の関係について今まで多数の論文があり，基礎的検討にて BP によって骨転移が抑制されることが示されている[26]．しかし，*in vivo* において BP 治療下における骨転移の状態と骨代謝マーカーの関連はまだ十分に検討されていない．

本研究では，まず動物実験として乳癌骨転移モデルを用いて，骨転移，骨代謝マーカー（Pyr，Dpyr），破骨細胞の強力な抑制剤である pamidronate の治療効果の関係を調べた．背景として，極めて硬い骨の吸収，破壊は腫瘍細胞自身では不可能で，破骨細胞がその役割を担っていることがある．骨転移の成立には，腫瘍細胞が骨髄に到達しそこで増殖する必要がある．癌の増殖因子として作用する transforming growth factor-β や insulin-like growth factor などは骨基質自体に豊富に蓄えられ，生理的な骨のリモデリングの一環として放出される．また，骨転移をおこしやすい乳癌などの特定の癌は PTHrP，transforming growth factor-α，prostaglandin などの分泌により破骨細胞を増殖，活性化させ，骨基質の吸収が増加，それによりさらに腫瘍増殖因子が放出されるという悪循環がおこり，癌増殖の場を広げ骨破壊に至ると考えられている[27-29]．よって効果的な治療・予防として BP を用いた破骨細胞の抑制が考えられる．

本実験では pamidronate 投与時期を，腫瘍接種前の前治療：完全予防投与と骨髄に生着した直後の後治療：臨床的な補助療法を想定し設定した．BP は骨に長期にとどまり，徐々に骨代謝に伴い放出される[30]ため，単回投与で実験期間中は治療効果を十分持続すると考えられた．Wingen ら[31]の実験も BP の前治療は後治療より優れていることを示し，最近の研究では BP は腫瘍細胞と骨表面の特性を変化させ，癌細胞が骨表面に接着するの

を阻止することが示されており[32),33)]，当初，前治療としての pamidronate 予防投与が骨転移制御に最も効果的であろうと予想していた．結果は骨転移の発生率は対照群，前治療群，後治療群はそれぞれ 70.0%，44.4%，37.5%であり，後治療の骨転移の程度が対照群と比べ有意差はないが，最も低かった．治療されたラットには癌細胞による骨破壊は全くみられなかった．pamidronate は前，後治療でほぼ同等であり，確実に骨破壊が進展するのを阻止することが示された．

病理組織像では対照群の転移巣内には骨髄腔だけに限らず，骨破壊により浸潤した椎体外に広がる転移巣内にも破骨細胞が多数存在することが観察された．しかしこの骨転移モデルにおいては椎体に隣接する軟部組織転移がどんなに大きくても，椎体外から骨髄腔内へ腫瘍の浸潤はみられなかった．そこには破骨細胞が存在しないためと思われ，破骨細胞は骨破壊に重要な役割を担っていると考えられた．

骨代謝マーカーと骨転移，pamidronate の治療効果の関係であるが，第3図から，pamidronate の使用は対照群に比べ骨転移の有無に関係なく Pyr，Dpyr 全体の平均値を有意に引き下げた．また第3図 A は骨転移の有無別に Pyr，Dpyr の個々の値もプロットしており，対照群の中では骨転移のある群で若干 Pyr，Dpyr の平均値が高い傾向にあったものの，有意差を認めなかった．この理由は，骨破壊を伴う進行した骨転移の数が，腫瘍接種後3週ではまだ少なかったためと思われる．Tamura ら[34),35)]は同じモデルを用いて，骨破壊を伴う骨転移群のみ Pyr，Dpyr の増加がみられ，骨転移スコアと密接に関連することを示している．また，治療群の中でも骨転移の有無にかかわらず平均値に全く差を認めなかったが，いずれも対照群より値が低いことに注目すべきであり，pamidronate 使用により破骨細胞機能が抑制され骨転移の発生，骨破壊に至らなかったためと思われる．

本実験は pamidronate が骨転移の発生と骨転移による骨破壊を明らかに抑制し，Pyr，Dpyr の値は低下した[36)]．これらの測定は骨転移の治療の良い示標となり，Pamidronate によって Pyr，Dpyr の値を低く保つことは，骨転移の発生と進展を抑制することにつながるかもしれない．

動物実験の結果から，骨転移には破骨細胞が関与しており，破骨細胞に局在する TRACP は活性化の示標となる可能性があることが示された．生理的に破骨細胞の活動が活発となるのは，子供では成長時の骨のリモデリング[37)]，閉経後では骨密度の低下時であり[38)]，この時期に血清 TRACP の増加が報告されている．今回は研究1にて56人の健康女性ボランティアから TRACP の正常範囲を求めた．第5図で TRACP は加齢と共に上昇する傾向にあり，閉経前後において平均値に有意な差を認めた[39)]．よって，閉経状況により cut off を設定することで，より正確に骨転移の状態が判定できるようになり，特異度は 91.0%と，他の報告[40),41)]よりも優れていた．しかし，TRACP の感度は 65.7%であり，一般的な骨シンチグラフィの感度と比べてまだ十分とはいえなかった．

次に，症例全体を骨転移の有無で分類しマーカーの平均値を比較した．平均年齢に有意差はない．研究1，2のそれぞれ第4図，第2表から，TRACP は骨転移を含む群で特異的に上昇し，骨以外の転移では健存群に比べ変化はなかった．同様に Pyr，Dpyr，ICTP も骨転移を含む群で有意な上昇を認めたが，NTx は有意な差を認めず，骨転移の検索マーカーとしては劣っていた．

研究1の骨転移を有する症例はすべて治療されており，第6図から治療に反応した症例は健存例と同レベルで，いずれのマーカーの上昇も認めていない．骨転移増悪症例はその転移個数が増加するにつれてマーカーも上昇しているが，TRACP は他マーカーより少ない骨転移数でも有意な上昇がみられ，より鋭敏であった．また同様に研究2でも第9図から骨転移を治療し安定している症例のマーカーは健存群と同程度に低いレベルであり，増悪群は有意に上昇していた．また第8図での骨転移症例（BM＋，BM＋＋）は研究1第6図と違い，治療の有無が様々で，その反応も不均一な集団である．それでも BM（＋＋）では全マーカーで有意に上昇し，TRACP，ICTP は BM（＋）でも健存群と有意な差を認めた．

研究2において，骨病変には未治療の骨初再発転移例 FRBM（第9図）では血清 ICTP と TRACP は健存群より有意に高かった．初再発骨転移例の大半が，TRACP ではばらつきが少なく健存群の平均値以上を示したことは重要であり，スクリーニングとしての骨転移診断とさらに骨転移の程度も予想できる可能性が示唆された．さらに CR-NC 群と PD 群を選別する治療効果判定では，他のマーカーは値のばらつきが目立つ中，病変の増悪に対して TRACP は最も値のばらつきが少なく，骨病変の病勢を反映し治療効果判定により有用であると思われた[42)]．研究1の第7図では少数例であるが，TRACP を経時的に2回測定し，その差を治療効果別にプロットしたもので，治療に反応しなかった群の差は正に大きく開いており，経過観察にも有用である可能性が示唆された．研究2では TRACP と同じく ICTP の有

用性[43), 44)]も高かったが，NTx はそれに比べ劣っていた．一方で，NTx が骨転移を有する患者にとって最も predictive な生化学マーカーであるとする報告もある[45-47)]．最近では破骨細胞特異性を高めた血清 TRACP 5b が測定可能となり，優れた骨吸収マーカーであることが示されている[48), 49)]．

乳癌の好発年齢はちょうど閉経前後に及ぶため，骨のモニタリングを行う場合，エストロゲン欠乏による閉経後骨粗鬆症という生理的な骨量の減少をマーカーが反映し，また治療としてのホルモン療法による影響をうけるなど，骨代謝マーカーの値は骨全体の病変の総和を反映したものであることを常に考慮しなければならない．スクリーニングとして骨代謝マーカーの上昇を認めても，臨床症状がない限り場所の特定は困難であり，この点において骨シンチグラフィはまだ重要な役割を担うであろう．しかし，骨代謝マーカーは存在診断やすでに骨転移を有する乳癌患者のモニタリングにとって繰り返し測定ができ，低侵襲，低コストで利便性の高いものであることから，骨転移の臨床評価の戦略として考慮すべき手段であると思われた．さらに，BP は臨床では悪性腫瘍に伴う高カルシュウム血症の治療だけではなく，既に骨転移に対する直接的な治療や骨転移予防として BP 製剤が使用されてきている[50), 51)]．破骨細胞の抑制により骨代謝マーカーの低下，中でも TRACP が破骨細胞の機能を反映するため有用であることが示された．これらのことから骨転移早期発見，治療効果判定だけでなく，治療としての BP 使用時のモニターなど，今後 TRACP 測定は様々に応用されていくことが考えられた．

総　括

動物実験にて骨転移と破骨細胞の状態を観察し，pamidronate による骨転移の予防・治療効果と Pyr，Dpyr の関係を検討した．さらに臨床研究では乳癌患者にて各種骨代謝マーカーを測定，TRACP を Pyr，Dpyr，ICTP，NTx と比較することで骨転移の診断，治療効果判定に対する有用性を検討した．

1．動物実験において Pamidronate 投与は骨転移発生を抑制し，骨破壊への進展を阻止した．治療により Pyr，Dpyr 全体の平均値は低下し，骨吸収が抑制された．
2．病理組織検査で，対照群の骨転移巣内には多数の破骨細胞が認められ積極的に骨吸収を行っている様子が観察された．
3．臨床研究にて健常人において TRACP 値は閉経前に比べ閉経後で有意に上昇し，閉経状況に応じて正常値の設定が必要であった．これにより骨転移診断の特異度，感度，正診率はそれぞれ 91.0%，65.7%，83.2%であった．
4．TRACP は骨転移を有する群で有意に高値をとり，骨転移の程度に応じて上昇していった．特に骨シンチグラムでホットスポット数が他のマーカーより少なくても，健存群と比べ有意に上昇した．骨転移治療が無効であった群は有意に高く，骨病変の病勢を反映し変動することで治療効果判定や経過観察にもに有用であると思われた．
5．初再発骨転移例のほとんどの TRACP 値が健存群の平均値以上を示したことは重要であり，スクリーニングとしての骨転移診断が可能で，さらにその程度も予想できる可能性が示唆された．

以上により，動物実験にて pamidronate は骨転移を抑制し Pyr，Dpyr 値を下げた．臨床的に TRACP は他の骨代謝マーカーと同等かそれ以上に有用性があり，破骨細胞の活性を直接反映するユニークな性質であることから他と違った乳癌骨転移マーカーとして有望であることが示唆された．

稿を終えるにあたり，御指導，御高閲を賜りました慶應義塾大学外科学教室北島政樹教授に深甚なる謝意を表します．また，本研究の遂行にあたり，直接御指導，御高閲いただきました外科学教室池田正助教授と川崎市立川崎病院外科石井誠一郎博士に深謝いたします．実験助手であった安藤靖子女史に深謝いたします．御指導いただいた榎本耕治助教授（現　国際医療福祉大学教授）に深謝いたします．

本論文の一部は，平成7年度文部省科学研究費補助金により行われた．

本論文の要旨は第6，10回日本乳癌学会総会，第36，37回日本癌治療学会総会，第96回日本外科学会総会，21st American Association for Cancer Research, 18th, 19th, 22nd San Antonio Breast Cancer Symposium, 3rd European Breast Cancer Conference において発表した．

文　献

1) Coleman RE, Rubens RD：The clinical course of bone metastases from breast cancer. Br J Cancer 55：61-66, 1987
2) Nielsen OS, Munro AJ, Tannock IF：Bone metastases：pathophysiology and management policy. J Clin

Oncol 9 : 509-524, 1991
3) Powell GJ, Southby J, Danks JA, Stillwell RG, Hayman JA, Henderson MA, Bennett RC, Martin TJ : Localization of parathyroid hormone-related protein in breast cancer metastases : increased incidence in bone compared with other sites. Cancer Res 51 : 3059-3061, 1991
4) Boyde A, Maconnachie E, Reid SA, Delling G, Mundy GR : review of methods, potential and applications. Scan Electron Microsc 1 : 537-1554, 1986s
5) Taube T, Elomaa I, Blomqvist C, Beneton MN, Kanis JA : Histomorphometric evidence for osteoclast-mediated bone resorption in metastatic breast cancer. Bone 15 : 161-166, 1994
6) Hiraga T, Nakajima T, Ozawa H : Bone resorption induced by a metastatic human melanoma cell line. Bone 16 : 349-356, 1995
7) Mundy GR, Yoneda T : Facilitation and suppression of bone metastasis. Clin Orthop : 34-44, 1995
8) Krasnow AZ, Hellman RS, Timins ME, Collier BD, Anderson T, Isitman AT : Diagnostic bone scanning in oncology. Semin Nucl Med 27 : 107-141, 1997
9) Vogel CL, Schoenfelder J, Shemano I, Hayes DF, Gams RA : Worsening bone scan in the evaluation of antitumor response during hormonal therapy of breast cancer. J Clin Oncol 13 : 1123-1128, 1995
10) Pollen JJ, Witztum KF, Ashburn WL : The flare phenomenon on radionuclide bone scan in metastatic prostate cancer. AJR Am J Roentgenol 142 : 773-776, 1984
11) Algra PR, Bloem JL, Tissing H, Falke TH, Arndt JW, Verboom LJ : Detection of vertebral metastases : comparison between MR imaging and bone scintigraphy. Radiographics 11 : 219-232, 1991
12) Calvo MS, Eyre DR, Gundberg CM : Molecular basis and clinical application of biological markers of bone turnover. Endocr Rev 17 : 333-368, 1996
13) Eggert FM : Stable acid phosphatase : II. Effects of pH and inhibitors. Histochemistry 66 : 319-329, 1980
14) Minkin C : Bone acid phosphatase : tartrate-resistant acid phosphatase as a marker of osteoclast function. Calcif Tissue Int 34 : 285-290, 1982
15) Stepan JJ, Zichova M, Lachmanova J, Pacovsky V : Plasma tartrate resistant acid phosphatase : a marker for osteoclastic bone resorption. Acta Univ Carol 32 : 345-353, 1986
16) Yam LT : Clinical significance of the human acid phosphatases : a review. Am J Med 56 : 604-616, 1974
17) Tavassoli M, Rizo M, Yam LT : Elevation of serum acid phosphatase in cancers with bone metastasis. Cancer 45 : 2400-2403, 1980
18) Yuhki N, Hamada J, Kuzumaki N, Takeichi N, Kobayashi H : Metastatic ability and expression of c-fos oncogene in cell clones of a spontaneous rat mammary tumor. Jpn J Cancer Res 77 : 9-12, 1986
19) Katayama I, Yang JP : Reassessment of a cytochemical test for differential diagnosis of leukemic reticuloendotheliosis. Am J Clin Pathol 68 : 268-272, 1977
20) The Japanese breast cancer society : General rules for clinical and pathological rcording of breast cancer, 13th edition, Tokyo, Kanehara shuppan, 1998
21) Osawa S, Iida S, Yonemitsu H, Kuroiwa K, Katayama K, Nagasawa T : Prostatic acid phosphatase assay with self-indicating substrate 2,6-dichloro-4-acetylphenyl phosphate. Clin Chem 41 : 200-203, 1995
22) Stepan JJ, Silinkova-Malkova E, Havranek T, Formankova J, Zichova M, Lachmanova J, Strakova M, Broulik P, Pacovsky V : Relationship of plasma tartrate resistant acid phosphatase to the bone isoenzyme of serum alkaline phosphatase in hyperparathyroidism. Clin Chim Acta 133 : 189-200, 1983
23) Lam KW, Li CY, Yam LT, Desnick RJ : Comparison of the tartrate-resistant acid phosphatase in Gaucher's disease and leukemic reticuloendotheliosis. Clin Biochem 14 : 177-181, 1981
24) Lau KH, Onishi T, Wergedal JE, Singer FR, Baylink DJ : Characterization and assay of tartrate-resistant acid phosphatase activity in serum : potential use to assess bone resorption. Clin Chem 33 : 458-462, 1987
25) Scarnecchia L, Minisola S, Pacitti MT, Carnevale V, Romagnoli E, Rosso R, Mazzuoli GF : Clinical usefulness of serum tartrate-resistant acid phosphatase activity determination to evaluate bone turnover. Scand J Clin Lab Invest 51 : 517-524, 1991
26) Hall DG, Stoica G : Effect of the bisphosphonate risedronate on bone metastases in a rat mammary adenocarcinoma model system. J Bone Miner Res 9 : 221-230, 1994
27) Yin JJ, Selander K, Chirgwin JM, Dallas M, Grubbs BG, Wieser R, Massague J, Mundy GR, Guise TA : TGF-beta signaling blockade inhibits PTHrP secretion by breast cancer cells and bone metastases development. J Clin Invest 103 : 197-206, 1999
28) Yoneda T : Cellular and molecular mechanisms of breast and prostate cancer metastasis to bone. Eur J Cancer 34 : 240-245, 1998
29) Mundy GR, Yoneda T : Facilitation and suppression of bone metastasis. Clin Orthop : 34-44, 1995
30) Kasting GB, Francis MD : Retention of etidronate in human, dog, and rat. J Bone Miner Res 7 : 513-522, 1992
31) Wingen F, Eichmann T, Manegold C, Krempien B : Effects of new bisphosphonic acids on tumor-induced bone destruction in the rat. J Cancer Res Clin Oncol 111 : 35-41,1986
32) van der Pluijm G, Vloedgraven H, van Beek E, van der Wee-Pals L, Lowik C, Papapoulos S : Bisphosph

onates inhibit the adhesion of breast cancer cells to bone matrices *in vitro*. J Clin Invest 98 : 698-705, 1996

33) Boissier S, Magnetto S, Frappart L, Cuzin B, Ebetino FH, Delmas PD, Clezardin P : Bisphosphonates inhibit prostate and breast carcinoma cell adhesion to unmineralized and mineralized bone extracellular matrices. Cancer Res 57 : 3890-3894, 1997

34) Tamura H, Ishii S, Ikeda T, Enomoto T, Imai Y, Kitajima M : A novel animal model for bone metastasis of breast cancer. Proc Am Assoc Cancer Res 34 : 97, 1993

35) Tamura H, Ishii S, Ikeda T, Enomoto K, Kitajima M : The relationship between urinary pyridinoline, deoxypyridinoline and bone metastasis in a rat breast cancer model. Breast Cancer 6 : 23-28, 1999

36) Wada N, Ishii S, Ikeda T, Kitajima M : Inhibition of bone metastasis from breast cancer with pamidronate resulting in reduction of urinary pyridinoline and deoxypyridinoline in a rat model. Breast Cancer 11 : 282-287, 2004

37) Chen J, Yam LT, Janckila AJ, Li CY, Lam WK : Significance of "high" acid phosphatase activity in the serum of normal children. Clin Chem 25 : 719-722, 1979

38) de la Piedra C, Torres R, Rapado A, Diaz Curiel M, Castro N : Serum tartrate-resistant acid phosphatase and bone mineral content in postmenopausal osteoporosis. Calcif Tissue Int 45 : 58-60, 1989

39) Wada N, Ishii S, Ikeda T, Enomoto K, Kitajima M : Serum tartrate resistant acid phosphatase as a potential marker of bone metastasis from breast cancer. Anticancer Res 19 : 4515-4521, 1999

40) Desoize B, Veiler V, Pourny C, Comoe L, Jardillier J C : Isoenzymes of alkaline and acid phosphatases as bones metastasis marker in breast cancer patients. Anticancer Res 9 : 1105-1109, 1989

41) Nguyen M, Bonneterre J, Hecquet B, Desoize B, Demaille A : Plasma acid and alkaline phosphatase in patients with breast cancer. Anticancer Res 11 : 831-833, 1991

42) Wada N, Fujisaki M, Ishii S, Ikeda T, Kitajima M : Evaluation of bone metabolic markers in breast cancer with bone metastasis. Breast Cancer 8 : 131-137, 2001

43) Koizumi M, Takahasi S, Ogata E : Bone metabolic markers in bone metastasis of breast cancer. Int J Clin Oncol 4 : 331-337, 1999

44) Shimozuma K, Sonoo H, Fukunaga M, Ichihara K, Aoyama T, Tanaka K : Biochemical markers of bone turnover in breast cancer patients with bone metastases : a preliminary report. Jpn J Clin Oncol 29 : 16-22, 1999

45) Demers LM, Costa L, Chinchilli VM, Gaydos L, Curley E, Lipton A : Biochemical markers of bone turnover in patients with metastatic bone disease. Clin Chem 41 : 1489-1494, 1995

46) Costa L, Demers LM, Gouveia-Oliveira A, Schaller J, Costa EB, de Moura MC, Lipton A : Prospective evaluation of the peptide-bound collagen type I cross-links N-telopeptide and C-telopeptide in predicting bone metastases status. J Clin Oncol 20 : 850-856, 2002

47) Brown JE, Thomson CS, Ellis SP, Gutcher SA, Purohit OP, Coleman RE : Bone resorption predicts for skeletal complications in metastatic bone disease. Br J Cancer 89 : 2031-2037, 2003

48) Capeller B, Caffier H, Sutterlin MW, Diell J : Evaluation of tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) 5b as serum marker of bone metastases in human breast cancer. Anticancer Res 23 : 1011-1015, 2003

49) Koizumi M, Takahashi S, Ogata E : Comparison of serum bone resorption markers in the diagnosis of skeletal metastasis. Anticancer Res 23 : 4095-4099, 2003

50) Lipton A, Theriault RL, Hortobagyi GN, Simeone J, Knight RD, Mellars K, Reitsma DJ, Heffernan M, Seaman JJ : Pamidronate prevents skeletal complications and is effective palliative treatment in women with breast carcinoma and osteolytic bone metastases : long term follow-up of two randomized, placebo-controlled trials. Cancer 88 : 1082-1090, 2000

51) Diel IJ, Solomayer EF, Costa SD, Gollan C, Goerner R, Wallwiener D, Kaufmann M, Bastert G : Reduction in new metastases in breast cancer with adjuvant clodronate treatment. N Engl J Med 339 : 357-363, 1998