

## 消化器癌患者の周術期における単球の表面抗原 HLA-DR, CD11b と血中サイトカイン IL-6, IL-8の変動に関する研究

山梨医科大学第1外科

中瀬 一 河野 浩二 関川 敬義  
飯塚 秀彦 松本 由朗

消化器癌患者の周術期における免疫能の変動を、単球表面抗原と血清サイトカインをパラメーターとして検討した。胃癌群 (23例), 食道癌群 (右開胸開腹術, 8例), 膵癌群 (膵頭十二指腸切除術, 7例), 大腸癌群 (10例) を対象に、術前および術後 1, 3, 5, 7, 14日目の末梢血単球表面抗原 HLA-DR, および CD11b の mean fluorescence intensity (MFI) をフローサイトメトリーにて、また血清 IL-6, IL-8, IFN- $\gamma$  値を ELISA 法によって測定した。食道癌群の CD11b 発現は、他群に比べ術後低下したまま回復せず、IL-8値は術前より全経過を通じて高値を示した。膵癌群では CD11b 発現は術後一時的に上昇したが、術後14日目に食道癌群と同様に低値を示した。食道癌や膵癌に対する侵襲の大きな手術においては、単球の接着に関与する CD11b の発現低下が認められ、高サイトカイン血症の病態において、単球機能の変化が大きく関与していると思われた。

**Key words:** immunosuppressive state of cancer patients, surgical stress, monocyte surface antigen, expression of CD11b on monocytes, serum IL-8 level

### I. はじめに

血中の単球と組織内マクロファージは、その特有用な貪食作用によって病原物質を処理し、その情報を他の免疫系細胞に伝達するとともに、サイトカインを産生することにより免疫系を賦活している。

すなわち、感染源や腫瘍局所において、単球の表面抗原のうちの CD11b が、血管内皮との接着に関与して、単球が血管外へ遊走するが、それに引き続く単球のマクロファージ化にも深く関与する<sup>1)~3)</sup>。また同じく HLA-DR は、major histocompatibility complex (MHC) class II pathway によって、認識した抗原を主に CD4 (+) T 細胞へ提示し、細胞性免疫に関与しているとされている<sup>1)~3)</sup>。そして周術期には免疫能が低下することは広く知られているが、特に感染症を併存する症例では、単球の HLA-DR, CD11b はともにその発現が低下することが報告されている<sup>4)5)</sup>。

一方、単球由来のサイトカインには interleukin (IL)-1, IL-3 など多くが知られているが<sup>6)</sup>、特に IL-8 は単球との関係が深く、炎症期に高値を示すが、その他

に、数種の癌細胞からも産生されることが明らかになっている<sup>7)~10)</sup>。また IL-6 は単球の他に、好中球、肝細胞などからも産生され、手術をはじめ炎症期に高値を示す<sup>10)~12)</sup>。そしてマクロファージからの産生も炎症期には重要であり、癌細胞からの IL-6 の産生量は IL-8 ほど高値を示さない<sup>10)~12)</sup>。

そこで、われわれは消化器癌患者の周術期における単球機能の変動を検索するために、術後 1~2 週間の変動が知られている<sup>4)</sup>単球の表面抗原 HLA-DR, CD11b と turn-over が短い単球と極めて密接な関係にある血中サイトカイン (IL-6, IL-8, IFN- $\gamma$ ) 値の変動を指標として、本研究を行った。

### II. 対象症例および方法

#### (1) 対象症例

1995年7月から1996年4月まで、当科において施行した、胃癌に対する胃切除術23例 (64.4 $\pm$ 10.5歳, 男性18例, 女性5例, Stage Ia 9例, Stage Ib 4例, Stage II 2例, Stage IIIa 1例, Stage IIIb 1例, Stage IVb 6例), 食道癌に対する右開胸開腹食道切除術8例 (63.9 $\pm$ 8.1歳, 男性7例, 女性1例, Stage I 2例, Stage II 2例, Stage IV 4例), 膵癌に対する膵頭十二指腸切除術7例 (63.0 $\pm$ 12.1歳, 男性6例, 女性1

例, Stage I 1 例, Stage III 2 例, Stage IVb 4 例), 大腸癌に対する大腸切除術10例(58.7±5.1歳, 男性 5 例, 女性 5 例, Stage 0 1 例 Stage I 3 例, Stage II 3 例, Stage IIIa 3 例) を対象とした. 手術時間では胃癌は食道癌, 膵癌より, 大腸癌は他の 3 群より有意に短かった ( $p < 0.03$ ). 出血量では膵癌が他の 3 群より有意に多かった ( $p < 0.03$ ) (Table 1). なお, 胃癌, 食道癌, 膵癌および大腸癌の病期分類はそれぞれ, 日本の取扱い規約に従った<sup>13)~16)</sup>. また全例, 術前術後に感染症などの合併症を認めなかった.

(2) 単球表面抗原の測定

ヘパリン加静脈血15ml を術前日, 術後 1 日目, 3 日目, 5 日目, 7 日目, 14 日目に採血し, 採血後直ちに同量の PBS(ニッスイ)で 2 倍に希釈, 10ml の Ficoll-Paque (Pharmacia) 上に重層し, 20°C, 1,500回転で 30分間遠心分離, 単核球層を得た. 単核球を 3 回洗浄の後, 10%FCS 加 RPMI1640 (ニッスイ) にて  $5 \times 10^5$  / ml の細胞浮遊液を作製した. このうち  $1 \times 10^5$  個の単核球を抗 HLA-DR FITC 標識抗体 (BECTON DICKINSON) 5 $\mu$ l と Leu15 PE 標識抗体 (CD11b, BECTON DICKINSON) 5 $\mu$ l を同時に加え十分攪拌し, 4°C, 遮光で 30分間静置の後, FACS 用 PBS 1ml を加え 4°C, 1,500回転で 5 分間の遠心分離を 2 回施行し, FACS 用 PBS 1ml を加え速やかに FACScan で測定した.

単球の同定は FACScan 上 FSC と SSC とにより行い<sup>5)</sup>, 単球上に発現している CD11b および HLA-DR の mean fluorescence intensity (MFI) を測定した.

(3) 血中サイトカイン値の測定

単球同様術前日, 術後 1 日目, 3 日目, 5 日目, 7 日目, 14 日目に末梢血5ml を採血し, 4°C, 3,000回転で 10分間遠心分離の後, 上清を採取し, 速やかに -80°C で凍結保存し IL-6, IL-8 および IFN- $\gamma$  の ELISA キット (トーレフジバイオニクス) にて測定した. 測定限

界は IL-6 は 25pg/ml, IL-8 は 12.5pg/ml, IFN- $\gamma$  は 1.0 IU/ml であった.

有意差検定は Welch's t-test を用い, 危険率 5% 以下を有意差ありとした.

III. 結 果

(1) 末梢血単球数の周術期の変動

単球数の推移は, 食道癌を除いて, いずれの群も術後第 1 日目に軽度上昇する傾向を認めたが, いずれも術前値との間に有意差は認めなかった (Fig. 1). また術後第 14 日目までは各時点における単球数は, 各群間で有意差は認めなかった.

(2) 単球表面抗原 CD11b の MFI の変動

CD11b の MFI は 4 群とも術後第 1 日目に低下を示すが, その後胃癌, 大腸癌で漸増した (Fig. 2). この術後第 1 日目の CD11b の MFI の低下は, 各群の術前値との比較で, 大腸癌群にのみ有意差を認めた. 食道癌は術後第 1 日目の低下が, 第 14 日目まで回復することなく低値を示し, 第 14 日目では胃癌, 大腸癌の値に

Fig. 1 Changes of peripheral blood monocytes counts in each group

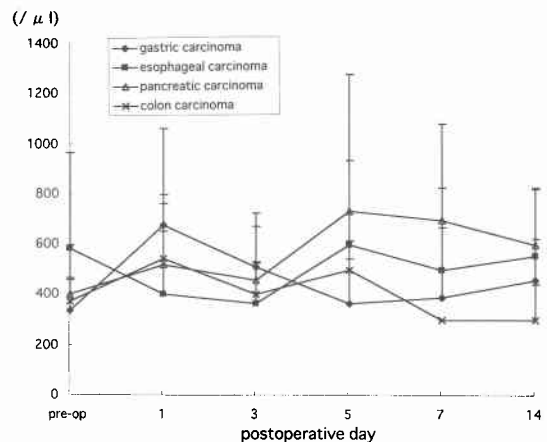


Table 1 Surgical reviews of each group

Groups	No. of Cases	Age(years) (Mean ± SD)	Duration of Operation (min.) (Mean ± SD)	Blood Loss(ml) (Mean ± SD)
Gastric carcinoma	23	64.4 ± 10.5	342 ± 88*a	652 ± 450
Esophageal carcinoma	8	63.9 ± 8.1	566 ± 143	601 ± 147
Pancreatic carcinoma	7	63.0 ± 12.1	686 ± 54	2,168 ± 895*c
Colon carcinoma	10	58.7 ± 5.1	250 ± 190*b	522 ± 673

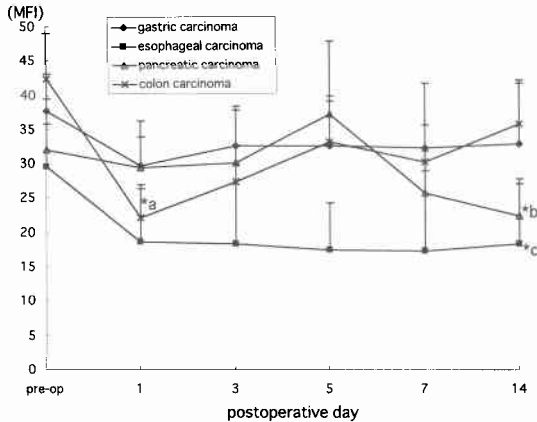
\*a:  $p < 0.03$  vs other 3 groups.

\*b:  $p < 0.03$  vs other 3 groups.

\*c:  $p < 0.03$  vs other 3 groups.

**Fig. 2** Perioperative changes of CD11b expression on monocytes

\*a:  $p < 0.02$  vs preoperative day. \*b:  $p < 0.05$  vs patients with gastric carcinoma. \*c:  $p < 0.03$  vs patients with gastric carcinoma and colon carcinoma.



比べ有意に低値を示した。膵癌では術後第1日目の値から次第に回復し、術前値よりも術後第5日目には高値を示したが、その後急激に低値をとり、第14日目には胃癌よりも有意に低値を示した。大腸癌では術後第1日目の有意な低下の後、第14日目まで漸増したが術前値を越えなかった。すなわち、食道癌、膵癌群では、CD11bの術後第1日目の低値が遷延化していると想われた。

### (3) 単球表面抗原 HLA-DR の MFI の変動

HLA-DR の MFI は胃癌、膵癌、大腸癌群では術後第1日目にいったん低下するが、第3日目以降再び上昇した (Fig. 3)。特に膵癌は第7日目には第1日目よりも有意に高値となった。食道癌は術後第1日目から漸増し、胃癌に比べ有意に高値を示して経過し、第7日目までこの傾向を認めたが、第14日目には低下した。しかし第14日目の値は、胃癌、膵癌より有意に高値であった。

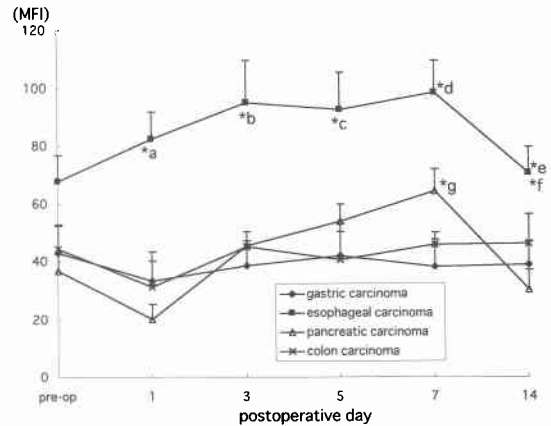
### (4) 血清 IL-6 値の変動

IL-6は胃癌では術後第1日目からほぼ漸増を続け、第14日目には有意に術前値より高値を示した。食道癌は第14日目まで大きな変動は認めなかった。大腸癌は術後第5日目まで漸増したが、その後低下し第14日まで漸減を示した。膵癌は第1日目に著増したが、第3日目には低下し、以後大きな変動を示さなかった (Fig. 4)。

### (5) 血清 IL-8 値の変動

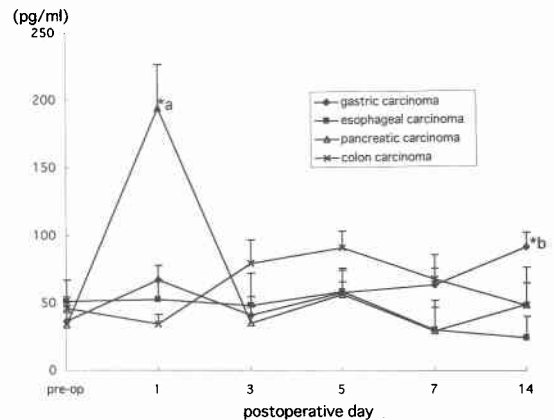
**Fig. 3** Perioperative changes of HLA-DR expression on monocytes

\*a, \*b, \*c, \*d, \*e:  $p < 0.02$  vs patients with gastric carcinoma. \*f:  $p < 0.01$  vs patients with pancreatic carcinoma. \*g:  $p < 0.01$  vs POD 1.



**Fig. 4** Perioperative changes of serum IL-6 levels

\*a:  $p < 0.03$  vs preoperative day. \*b:  $p < 0.03$  vs preoperative day.

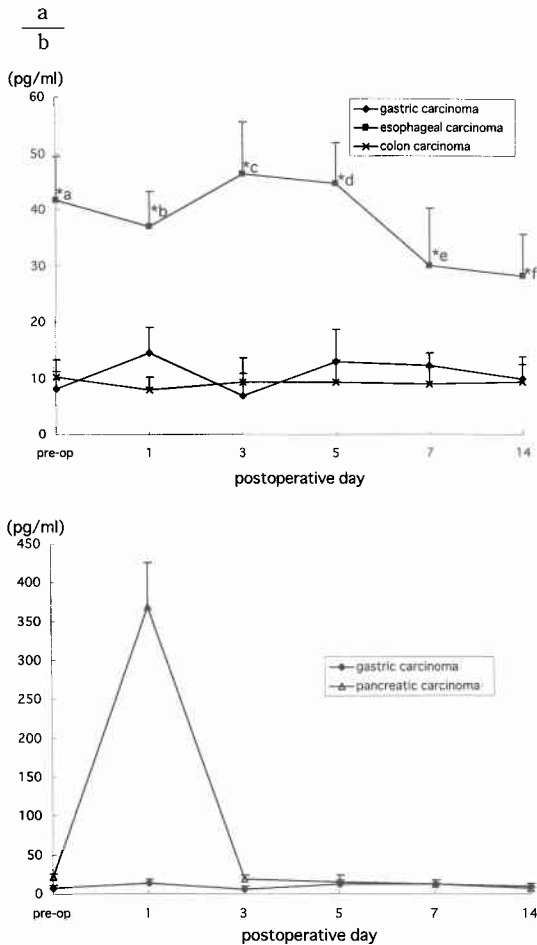


IL-8の値は胃癌、大腸癌では大きな変動を示さずに経過した。食道癌の術前値は、他の3群に比べ有意に高値を示し、術後第1日目は膵癌を除く2群に、第3日目以後は他のすべての群に比べて有意に高値を示して推移した (Fig. 5a)。一方、膵癌は術後第1日目には異常高値を示したが、第3日目以降は胃癌、大腸癌と同様に低値のまま経過した (Fig. 5b)。すなわち、食道癌群において IL-8高値が術後長期間持続した。

### (6) 血清 IFN- $\gamma$ 値の変動

胃癌、大腸癌では、IFN- $\gamma$ は術後大きな変動を示さ

**Fig. 5** Perioperative changes of serum IL-8 levels  
 \*a:  $p < 0.05$  vs other 3 groups. \*b:  $p < 0.05$  vs other groups excepted for patients with pancreatic carcinoma. \*c, \*d, \*e, \*f:  $p < 0.05$  vs other 3 groups.



ず、また全群測定限界以下であった。

#### IV. 考 察

手術、外傷後などや担癌状態において宿主の免疫能の抑制状態<sup>17)~23)</sup>を示す主たる原因として、組織損傷や出血に伴う末梢血中の免疫担当細胞の消費と、それによって生ずる当該細胞の機能の低下, suppressor T細胞の活性化<sup>21)</sup>, コルチゾールの血中濃度の上昇, 血清中の免疫抑制因子の出現, などが報告されている<sup>20)</sup>。本研究でわれわれは、周術期における免疫能の変動として単球に着目し、検討した。

##### (1) 単球表面抗原の変動

##### (a) CD11bの変動

CD11bは外傷の場合、受傷後3時間まではその発現は認めないものの、受傷6時間後には強い発現が認められたとする報告がある<sup>24)</sup>。またCD11bは、血中の単球由来のサイトカインの濃度および臓器障害の程度に応じて、発現するとする報告もある<sup>24)25)</sup>。

そこで著者らの研究の結果を分析すると、胃癌、大腸癌では、術後第1日目にCD11bは最低値を示したが、その後漸増または横ばいの値で推移した。これらは手術侵襲の程度から、術直後の一時的な単球機能の変動を示したものと思われる。また食道癌の術前値をみると、有意差はないものの胃癌、大腸癌より低値を示しており、これは術前からCD11b発現抑制の状態にあったとも考えられる。すなわち、これは後述するサイトカイン値の変動と考え併せると、食道癌にとって合目的な免疫抑制状態を作り出した可能性も考えられた。さらに、食道癌手術では、CD11bの値が周術期には低下したままで、術前値までに回復しなかった。これは開腹術に加え、開胸術という大きな手術侵襲の加重による持続的な免疫能の低下状態と、回復の遅延を示唆していると考えられた。膵癌に対する膵頭十二指腸切除術も術後第14日目には、CD11b値は食道癌に近い値を示し、手術侵襲の規模を反映しているものと考えられた。このように感染症を伴わない担癌生体における周術期のCD11b値の発現低下は、流血中の単球の局所への集積が抑制されていることを示唆し、感染の準備状態にあるとも考えられた。

##### (b) HLA-DRの変動

単球表面抗原の1つであるHLA-DRの発現は、B細胞、マクロファージ、活性化T細胞といった免疫関連の細胞でコントロールされている<sup>26)27)</sup>。また、その発現は外科手術後の感染症の重篤化の目安にもなる<sup>28)</sup>。このようなHLA-DR発現の低下は、単球の幼若化によるHLA-DR陽性単球数の減少に基づくものではなく<sup>4)29)</sup>、細胞レベルの現象であるとの報告がある<sup>29)</sup>。しかし術後のHLA-DR発現の低下の機序についてはいまだ明らかではなく、複数の経路によるものとする考え方が有力である<sup>29)</sup>。著者らの成績では、単球上のHLA-DR発現には食道癌を除く3群において特徴的な変動は認めなかった。その理由は、これらの対象症例の周術期に、感染が全く認められなかったためと思われる。しかし食道癌では、むしろ他の3群より単球上のHLA-DR発現が高値で推移しているが、HLA-DRの発現がその抗原量の多寡にも関連していると考えれば、手術により腫瘍を除去した結果、単球に対する抑

制がとれたとも考えられるが、推測の域を出ておらず、その理由については今後の検討を要する課題と考える。

## (2) 血清サイトカイン値の変動

担癌状態は炎症の側面も有するが<sup>10)</sup>、炎症性サイトカインには主に単球—マクロファージ系細胞から産生されるIL-1, TNF, IL-6, IL-8などがある<sup>12)</sup>。そしてヒト癌細胞株において、この炎症性サイトカインであるIL-6やIL-8の発現が、その起源となる組織とはほぼ無関係に、しかも大量に産生するものも少なくないという報告がある<sup>10)11)</sup>。

一方、癌細胞がIL-10, TGF- $\beta$ などの抑制性サイトカインも産生している場合があり、癌細胞が生体のサイトカイン産生機構を抑制する可能性を示唆しており、抑制性サイトカインの産生が担癌生体の免疫能低下と関係していることも考えられている<sup>10)</sup>。

### (a) IL-8値

著者らの研究結果では膀胱癌において、術後第1日目には著明な高値を示したが、これは手術侵襲を反映したと思われる。これに対して食道癌では、IL-8の高値が周術期に持続的に推移した。この理由は手術侵襲に伴うIL-8産生が、食道癌では周術期を通して持続していると考えられた。また食道癌では術前のIL-8の値も、他群より高値を示しており、食道癌の担癌状態という要因も関係していることが示唆された。このことからIL-8は、単球から産生され、サイトカインネットワークの上流に位置しているため、担癌状態や、その他の免疫抑制との関連において検討すべきであると考えられた。

### (b) IL-6値

IL-6は、IL-8同様に手術の侵襲度に応じてその上昇度は大きく、しかもピークに達する時間が速いと言われている<sup>30)</sup>。著者らの結果は、IL-6の変動が手術侵襲度を反映していると考えられ、膀胱癌で術後第1日目に高値を示し、その後速やかに術前値に近い値に低下して推移した。また、食道癌以外の群では術前値と変わらぬIL-6は推移したが、食道癌でIL-6の値が大きな変動を示さなかった理由は不明である。さらに、今回のサイトカイン値の検討では血清中のサイトカイン値を測定しており、単球からの産生能を直接測定したわけではないので、この点は今後の検討課題であると考えられる。

以上より、食道癌や膀胱癌のように侵襲度の大きな手術の周術期には、単球表面抗原のうち、血管内皮への接着に関与するCD11bの発現の低下が認められた。こ

れはすでに報告されているHLA-DRの発現の低下とともに、さらにCD11bの低下も単球機能の変動に関与していることが示唆され、周術期には多因子の関与による単球機能の変動が認められた。著者らの研究対象は感染症を伴わない症例であったが、手術侵襲の大きな手術の術後免疫能の低下は、重篤な感染症による合併症の発症に繋がることを示唆している。さらに食道癌では他の癌の手術症例に比べ、術前からIL-8の高値が特徴的であったが、単球の免疫能、特にCD11bの発現の低下と関連して検討すべき課題と考える。

本論文の要旨は第17回癌免疫外科研究会(滋賀)、第97回日本外科学会(京都)で報告した。なお、本研究は文部省科学研究費一般研究07671376の助成をうけた。

## 文 献

- 1) Meerschaert J, Furie MB: The adhesion molecules used by monocytes for migration across endothelium include CD11a/CD18, CD11b/CD18, and VLA-4 on monocytes and ICAM-1, VCAM-1, and other ligands on endothelium. *J Immunol* 154: 4099—4112, 1995
- 2) Issekutz AC, Chuluyan HE, Lopes N: CD11/CD18-independent transendothelial migration of human polymorphonuclear leukocytes and monocytes: involvement of distinct and unique mechanisms. *J Leukoc Biol* 57: 553—561, 1995
- 3) Connall TP, Zhang J, Vaziri ND et al: Radiodetoxified endotoxin-induced tolerance alters monocyte but not neutrophil CD11b and CD18 expression in response to lipopolysaccharide. *Arch Surg* 129: 1153—1158, 1994
- 4) Kono K, Sekikawa T, Matsumoto Y: Influence of surgical stress on monocytes and complications of infection in patients with esophageal cancer—monocyte HLA-DR antigen expression and respiratory burst capacity. *J Surg Res* 58: 275—280, 1995
- 5) Cheadle WG, Hershman MJ, Wellhausen SR et al: HLA-DR antigen expression on peripheral blood monocytes correlated with surgical infection. *Am J Surg* 161: 639—645, 1991
- 6) Spittler A, Winkler S, Gotzinger P et al: Influence of glutamine on the phenotype and function of human monocytes. *Blood* 86: 1564—1569, 1995
- 7) Liebler JM, Kunkel SL, Burdick MD et al: Production of IL-8 and monocyte chemoattractant-1 by peripheral blood monocytes. *J Immunol* 152: 241—249, 1994
- 8) Ember JA, Sanderson SD, Hugli TE et al:

- Induction of interleukin-8 synthesis for monocytes by human C5a anaphylatoxin. *Am J Pathol* 144 : 393-403, 1994
- 9) Marsh CB, Gadek JE, Kindt GC et al: Monocyte Fc  $\gamma$  receptor cross-linking induces IL-8 production. *J Immunol* 155 : 3161-3167, 1995
  - 10) 箕田誠司, 小川道雄: 癌の病態とサイトカイン. *消外* 16 : 1951-1957, 1993
  - 11) Sakamoto K, Masuda T, Mita S et al: Interleukin 8 is constitutively and commonly produced by various human carcinoma cell lines. *Int J Clin Lab Res* 22 : 216-219, 1992
  - 12) 若林 剛, 市東昌也, 白杉 望ほか: サイトカインネットワークと多臓器不全. *救急医* 18 : 275-278, 1994
  - 13) 胃癌研究会編: 胃癌取扱い規約. 第12版. 金原出版, 東京, 1993
  - 14) 食道疾患研究会編: 臨床・病理食道癌取扱い規約. 第8版. 金原出版, 東京, 1992
  - 15) 日本痔臓学会編: 痔癌取扱い規約. 第4版. 金原出版, 東京, 1993
  - 16) 大腸癌研究会編: 大腸癌取扱い規約. 改訂第5版. 金原出版, 東京, 1994
  - 17) Monjan AA, Collector MI: Stress induced modulation of the immune response. *Science* 196 : 307-308, 1977
  - 18) Constantin MB, Menzoian JO, Nimberg RB: Association of a circulating immunosuppressive polypeptide with operative and accidental trauma. *Ann Surg* 185 : 73-79, 1977
  - 19) Faist E, Kupper TS, Baker CC et al: Depression of cellular immunity after major injury. *Arch Surg* 121 : 1000-1005, 1986
  - 20) 上尾裕昭: 免疫系の反応. *救急医* 17 : 927-931, 1993
  - 21) 隅田英典, 片岡 誠, 桑原義之ほか: Three color flow cytometry を用いた消化器癌患者の末梢血リンパ球サブセットの検討. *日消外会誌* 29 : 1643-1651, 1996
  - 22) Dent RG, Cole P: In vitro monocyte maturation in squamous carcinoma of the lung. *Br J Cancer* 43 : 486-495, 1981
  - 23) Farinas MC, Valverde RV, Zarrabeitia MT et al: Contribution of monocytes to the decreased lymphoproliferative responses to phytohemagglutinin in lung cancer. *Cancer* 68 : 1279-1284, 1991
  - 24) 西田昌道, 二味 寛, 前川和彦: ショックと細胞接着因子. *外科治療* 75 : 401-408, 1996
  - 25) Limb GA, Hamblin AS, Wolstencroft RA et al: Rapid cytokine up-regulation of integrins, complement receptor 1 and HLA-DR on monocytes but not on lymphocytes. *Immunology* 77 : 88-94, 1992
  - 26) Cheadle WG: The human leukocyte antigen and their relationship to infection. *Am J Surg* 165 : 75-81, 1993
  - 27) 倉岡節夫, 鷲尾正彦, DiZerega GS: 多核白血球による術後活性化マクロファージの機能調節. *日外会誌* 93 : 363-368, 1992
  - 28) Cheadle W, Wilson M, Hershman M et al: Comparison of trauma assessment scores and their use in prediction of infection and death. *Ann Surg* 209 : 541-546, 1989
  - 29) Wakefield CH, Carey PD, Foulds S et al: Changes in major histocompatibility complex class II expression in monocytes and Tcells of patients developing infection after surgery. *Br J Surg* 80 : 205-209, 1993
  - 30) 江上 寛, 荒川博文, 酒本喜与志ほか: 手術侵襲とサイトカイン. *外科治療* 65 : 149-155, 1991

**Perioperative Changes in Expression of Surface Antigen HLA-DR and CD11b and Serum Cytokine IL-6 and IL-8 Levels in Patients with Cancer of the Digestive Organs**

Hajime Nakase, Koji Kono, Takayoshi Sekikawa, Hidehiko Iizuka and Yoshiro Matsumoto  
The First Department of Surgery, Yamanashi Medical University

We studied the immunosuppressive state of patients with cancer of the digestive organs in the perioperative period by determining expression of surface antigen HLA-DR and CD11b on monocytes and serum cytokine IL-6 and IL-8 levels. Peripheral blood samples of 48 patients who received gastrectomy for gastric cancer (n=23), esophagectomy (transthoracic and abdominal approach) for esophageal cancer (n=8), pancreatoduodenectomy for pancreatic cancer (n=7) and colectomy for colon cancer, were examined on the preoperative day and the 1st, 3rd, 5th, 7th and 14th postoperative day. The mean fluorescence intensity of surface antigen HLA-DR and CD11b expressed on monocytes was determined by flowcytometry and serum cytokines were assayed by ELISA. In patients with esophageal cancer, the expression of CD11b on monocytes was at lower levels in the postoperative course compared to that of the other groups, and the levels of serum IL-8 remained higher than those of the other groups in the perioperative course. In pancreatic cancer patients, the level of expression of CD11b was elevated on the 1st day after surgery, but on the 14th day it dropped to a level lower as well as that of patients with esophageal cancer. Major surgical stress for esophageal or pancreatic cancer induced decreased expression of CD11b on monocytes, which is thought to be related to monocyte adhesion. This phenotypic change of monocyte was suggested to be associated with hypercytokinemia caused by surgical stress.

**Reprint requests:** Hajime Nakase The First Department of Surgery, Yamanashi Medical University  
1110 Shimokato, Tamaho, Nakakomagun, Yamanashi, 409-3821 JAPAN

---