

平成22年5月27日現在

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2007～2009

課題番号：19500424

研究課題名（和文）

次世代超音波造影剤を用いた悪性腫瘍のセンチネルリンパ節同定法の研究

研究課題名（英文）

Study of sentinel node detection method using contrast-enhanced ultrasonography with second generation of ultrasound contrast agent in malignant tumor

研究代表者

尾本 きよか (OMOTO KIYOKA)

自治医科大学・医学部・准教授

研究者番号：90306118

研究成果の概要（和文）：

新たな乳癌のセンチネルリンパ節同定法として第2世代超音波造影剤ソナゾイドを用いた造影超音波法の研究を行った。当施設で100人以上の乳癌患者を対象に、ソナゾイド2mlを乳輪下に投与し、腋窩部をリニア型探触子で観察した結果、5分以内に高エコーに造影されたセンチネルリンパ節が80%以上の症例で同定できた。他の同定法との比較や摘出されたリンパ節の病理学的検討から本法の臨床的有用性が証明された。

研究成果の概要（英文）：

This study aimed to evaluate the usefulness of sentinel lymph node (SLN) detection in breast cancer using contrast-enhanced ultrasonography with Sonazoid. More than 100 breast cancer patients were examined in our hospital. After 2 ml of Sonazoid was injected subareolarly, the axillary area was observed transdermally using ultrasonography with linear transducer. A contrast-enhanced SLN was seen within 5 min, and its detection rate was more than 80%. Moreover the SLN detection rate was compared with that of other methods and resected SLNs were evaluated pathologically. It is suggested that our new method is clinically useful for sentinel node identification.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2008年度	800,000	240,000	1,040,000
2009年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：人間医工学・医用システム

キーワード：第2世代超音波造影剤、ソナゾイド、センチネルリンパ節、乳癌、超音波造影法

## 1. 研究開始当初の背景

### ①センチネルリンパ節(見張りリンパ節)

#### 同定の意義

- ・あらかじめセンチネルリンパ節(癌が最初に転移するリンパ節)を同定し、そのリンパ節に転移がないことがわかれば、余計な所属リンパ節全体の郭清をしなくて済み、術式を決定する際にもこのセンチネルリンパ節は重要な役割を担う。
- ・近年乳癌手術の際に論じられることが多いのは、この同定法により腋窩リンパ節郭清を省略できる症例が格段に増加し、重篤な合併症(上肢の浮腫、しびれ、機能障害)を回避し、QOLの向上に寄与してきたからである。今や乳癌手術の腋窩リンパ節郭清を省略するかどうかを決める重要な検査の一つとして欠かすことはできない。

#### センチネルリンパ節の概念図



### ②センチネルリンパ節同定に関する研究の国内外の動向・位置づけ

- ・現在国内外において、センチネルリンパ節の同定法はガンマプローブ法が主として行なわれている。これは客観的で精度の高い方法ではあるが、使用する装置、機器が高額であること、判定に数時間以上の長時間を要すること、そして最大の欠点は放射線(アイソトープ)を扱わなければならない利用できる場所、医療機関に限られることである。

### ③本研究の着想に至った経緯およびこれまでの研究成果

- ・ガンマプローブ法によるセンチネルリンパ節同定法の問題点を解決し、簡便に検査でき小規模の病院施設でも普及するような同定法の開発を目指し、われわれは研究してきた。
- ・そしてわれわれは世界に先駆けて、超音波造影剤としてアルブミンを用いることによりセンチネルリンパ節が同定できる「超音波造影法による同定法」を動物実験にて報告し、平成15年度～17年度の科学研究費補助金(基盤研究B)「超音波造影法による乳癌のセンチネル(見張り)リンパ節同定法の研究」により、ヒト乳癌患者においてもアルブミンを用いた超音波造影法によるセンチネルリンパ節同定法が有用であったことを国内外で発表し、報告し

てきた。

Sentinel node detection in breast cancer using ultrasonography contrast-enhanced with 25% albumin-Initial clinical experience. Kiyoka Omoto, Yasuo Hozumi, Yawara Omoto, Nobuyuki Taniguchi, Kouichi Itoh, Yasutomo Fujii, Hirobumi Mizunuma, Hideo Nagai

: J Clinical Ultrasound 34 : 317-326,2006.

- ・われわれは、超音波造影剤としてアルブミンを使用した臨床研究で、良好な結果が得られ論文にて報告したが、ヒトの血清を使用していることから感染症の問題があり、その使用はかなり制限される可能性があった。そこで今回この研究を申請するに至った。

## 2. 研究の目的

- ・現在乳癌におけるセンチネルリンパ節同定法の主流とされている核医学的手法や色素法に替わるべく、次世代超音波造影剤を用いた造影超音波画像によるセンチネルリンパ節同定法の臨床的有用性を検証することを本研究の目的とする。
- ・現在海外で使用が認められている第2世代超音波造影剤にはオプチゾンやデフィニティがあるが、日本ではまだ認可されていないため使用制限がある。そこで、日本で近日発売が予定されている次世代超音波造影剤(ソナゾイド)などを中心にその有用性を研究する予定である。
- ・これまでのセンチネルリンパ節同定に関する臨床研究は、多くが乳癌であるが、他の悪性腫瘍(皮膚メラノーマ、甲状腺癌、耳下腺癌など)に対しても対象を広げ、その有用性を研究していく予定である。

## 3. 研究の方法

(1) 平成19年度は、乳癌患者を対象に、第2世代超音波造影剤ソナゾイドを用いた造影超音波法にて最初の臨床研究を行った。本法を検証するために、乳癌のセンチネルリンパ節同定法としてすでに行われている他の方法(核医学的手法、色素法)も併用して施行することとした。

具体的には、同一患者において本研究のソナゾイドによる超音波造影法だけでなく、ガンマプローブを使用した核医学的手法やパテントブルーを用いた色素法の三者を併用して検討した。まず手術の数時間前に<sup>99m</sup>Tcで標識したフチン酸を腫瘍直上に皮下注射しておき、全身麻酔後にソナゾ

イド 2ml を 3 症例は腫瘍直上に、3 症例は乳輪下に注射しマッサージ後、腋窩部などを観察した。センチネルリンパ節生検の数分前に 1%パテントブルー溶液を乳輪下に投与した。超音波診断装置は GE 社製 LOGIQ 7 で、リニア型探触子 (model 7L, 7.5-10MHz) を用いて、Coded Phase Inversion Imaging による造影超音波画像で観察した。

(2) 平成 20 年度は、乳癌患者での臨床研究を積み重ね、国内を中心にその研究成果を発表した。具体的検討項目として、①ソナゾイドの投与部位、②ソナゾイドの投与量、③超音波装置画面の設定などについて研究を進めた。

基本的には前年度と同一の方法で施行し、その結果を国内にて発表すると同時に、課題解決のための情報収集を精力的に行う。

(3) 平成 21 年度は、さらに乳癌における症例を積み重ね、乳癌患者 100 人以上を目標とする。方法に関しては、前年までの検討から次のように統一した方法で施行した。ソナゾイドの投与量は 2ml で、投与部位は乳輪下に注射しマッサージ後、腋窩部などを観察する。使用する探触子は電子リニア型で、メカニカルインデックスは 0.2 以下に設定した。また造影されたセンチネルリンパ節を摘出し、その病理学的結果と比較することにより、その有用性を検証し、有害事象の有無に関する安全性の評価も行う。

これらの成果を国内だけでなく国際学会にて発表し、また超音波医学で世界的に最も権威のある英文誌 *Ultrasound in Medicine and Biology* (UMB) に投稿する。

#### 4. 研究成果

(1) 平成 19 年度は、乳癌患者 20 人を対象に、第 2 世代超音波造影剤ソナゾイドを用いた造影超音波法にて最初の臨床研究を行った。その結果 20 例中 14 症例においてセンチネルリンパ節が同定できた。7 割の症例にはリンパ節が明瞭に造影され、センチネルリンパ節として確認できたが、その他の症例においては同定できなかった原因についての検討が必要であり、次年度以降の課題とした。

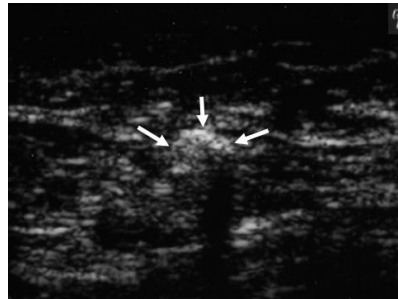
(2) 平成 20 年度は、乳癌患者での臨床研究を積み重ね、国内を中心にその研究成果を発表した。具体的検討項目として、①ソナゾイドの投与部位、②ソナゾイドの投与量、③超音波装置画面の設定などについて

研究を進めた。

①第 21 回日本乳癌甲状腺超音波診断会議 (2008 年 9 月;大阪)において、日本(世界)で初めて動画を用いて本研究の概要を発表 (演題:ソナゾイドを用いた造影超音波法による乳癌センチネルリンパ節同定法の研究)し、大いに反響を呼んだ。

【方法】6 人の乳癌患者を対象に、同一患者においてソナゾイドによる超音波造影法、 $\gamma$ プローブを使用した核医学的手法、パテントブルーを用いた色素法の三者を併用して検討した。

【結果】ソナゾイドを腫瘍直上に注入した 3 症例および乳輪下に注入した 3 症例とも、注入約 3~5 分後には造影されたリンパ管やリンパ節 (超音波写真:矢印)が観察された。切開後それぞれの症例において染色されたリンパ節や $\gamma$ プローブに反応するリンパ節が確認されたが、それらは造影されたリンパ節と概ね一致していた。



②第 10 回国際造影超音波シンポジウム (2008 年 12 月;東京)にて、前年度に行った乳癌患者 20 人について、摘出したリンパ節を病理学的に分析し、ソナゾイドの投与経路や超音波装置の最適な設定条件について検討した結果 (Title: Novel method of sentinel node (SLN) detection using contrast-enhanced ultrasonography with Sonazoid in breast cancer: Initial clinical experience) を発表した。超音波造影剤に関する国際学会に参加して、当分野における世界で唯一の臨床研究であることが確認でき、外国からの多くの参加者にも関心をもって聴いて頂いた。

#### 【MATERIALS AND METHODS】

Twenty breast cancer patients were examined. The sentinel lymph node biopsy (SLNB) was performed by three different techniques, that were the CEUS-guided,  $\gamma$ -probe-guided and dye-guided methods, in every case on the same day as the operation for breast cancer. We evaluated the SLNs detected by each method, to determine if the same ones

were identified or not. After the SLNs were resected, pathological examination was done.

#### 【RESULTS】

In all 20 cases, SLNs were identified in 14 cases by the CEUS-guided method, 15 cases by the dye-guided method, and 20 cases by the  $\gamma$ -probe-guided method. The number of CE-SLNs was 1-2 (average 1.1), and it took 2-20 (average 5.3) minutes to detect each of them.

**～Clinical RESULTS～**

- Comparison with  $\gamma$ -probe-guided and dye-guided method
- #1. CE-SLNs in all 14 cases are corresponding to R-SLNs
- #2. CE-SLNs in 12 of 14 cases are corresponding to D-SLNs

**～Pathologic RESULTS～**

- SLN meta (+) : 5/20 cases (by permanent section)
- ↳ micro-meta (+) : 2/5 cases

CE-SLNs corresponded grossly to SLNs detected by the  $\gamma$ -probe-guided and dye-guided methods. The pathological results revealed five cases of SLN metastasis amongst all the 20 cases. Twelve cases of 15 without SLN metastasis were identified by the CEUS-guided method, while two cases of 5 with SLN metastasis were identified by our method.

**～Clinical RESULTS～**

- Comparison with  $\gamma$ -probe-guided and dye-guided method
- #1. CE-SLNs in all 14 cases are corresponding to R-SLNs
- #2. CE-SLNs in 12 of 14 cases are corresponding to D-SLNs

**～Pathologic RESULTS～**

- SLN meta (+) : 5/20 cases (by permanent section)
- ↳ micro-meta (+) : 2/5 cases

(3) 平成21年度は、さらに乳癌における症例を積み重ね、多数の乳癌患者を対象に、第2世代超音波造影剤ソナゾイドを用いた造影超音波法にて臨床研究を行った。当初70%程度の同定率であったが、投与部位や装置の設定を調整することにより80%以上へと改善し、その結果を国内外の学会に発表し、その成果に対する新規性・独創性から雑誌(映像情報メディカル41(5); 552-555; 2009、インナービジョン24(6); 82-84; 2009)からの原稿依頼があり寄稿した。

シドニーで開催された超音波医学で最

も大きな世界学会である第12回WFUMBにおいてその業績が評価され“Certificate of Merit”を受賞した。また本研究の初期経験を詳細に分析・検討した成果をWorld Federation for Ultrasound in Medicine & Biology (Ultrasound Med Biol)に投稿し、世界で初めて乳癌におけるソナゾイドを用いた造影超音波画像によるセンチネルリンパ節同定法が臨床的に有用であることが証明された。

①2009年7月に第17回日本乳癌学会学術総会(東京)にて、さらに症例を積み重ね乳癌患者66人を対象に検討した。ソナゾイドの投与部位は乳輪下で、投与量は2ml、超音波装置のメカニカルインデックス値は0.2以下に設定して検討した。その結果当初より同定率が85%と大幅に改善し、その結果(演題:造影超音波画像による乳癌センチネルリンパ節同定法の研究)を発表した。

【対象】乳癌患者66人で、内訳は硬癌28例、乳頭腺管癌13例、充実腺管癌4例、DCIS6例、浸潤性小葉癌4例、髄様癌2例、粘液癌2例、その他7例。腫瘍径は6～33mm。

【方法】手術直前の全身麻酔下で、2mlのソナゾイドを乳輪下に注入しマッサージした後、腋窩部体表にリニア型探触子をあてて観察し、造影されたリンパ管やリンパ節(CE-SLN)を検索した。さらに同定されたCE-SLNは摘出後ホルマリン固定し、病理学的に転移の有無を調べた。また色素法と核医学的手法による同定法も並行して行った。

【結果】本法により56症例(同定率85%)でCE-SLNが確認できた。またCE-SLNの個数は1～3(平均1.2)個で、多くは5分以内に同定できた。

**【 結 果 】**

- #1. CEUS-guided method (Sonazoid®)による同定
  - 1) 同定症例数: 56/66 症例 (同定率85%)
  - 2) 同定された個数: 1-3 (平均1.2)
  - 3) 同定に要した時間: 2-23min (平均3.8)
  - 4) 同定したSLNの大きさ: 6-33mm
  - 5) 皮膚からの深さ: 5-27mm
- #2. 本法で同定された56症例中、55症例はdye-guided methodにより、53症例は $\gamma$ -probe-guided methodにより同定されたSLNと一致した。
- #3. SLNに転移陽性は10症例あり、そのうち本法で同定できたのは7症例であった。

Saitama Medical Center, Jichi Medical University

②2009年8-9月には12th World Congress of the World Federation for Ultrasound in Medicine and Biology (シドニー)で、これまで蓄積した乳癌患者111症例の結果(Title: Sentinel lymph node identification method using contrast-enhanced ultrasonography with Sonazoid™

in breast cancer)を公表した。

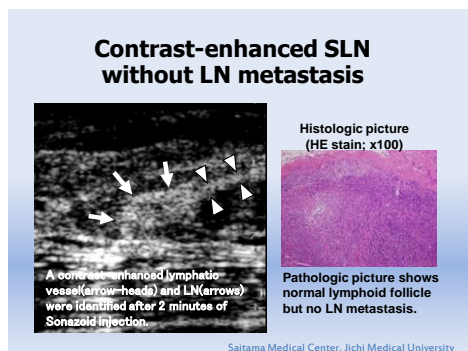
なおこの発表は、Australasian Society for Ultrasound of Medicine より大いに評価され“Certificate of Merit”として特別表彰された。

#### 【Materials and Methods】

We examined 111 patients with breast cancer. Under general anesthesia in operation room, 2 ml of Sonazoid™, ultrasound contrast agent, was injected subareolarly. After massage of the injection site, the axillary area was observed transdermally using coded phase inversion harmonic ultrasonography with mechanical indices of 0.15 to 0.19. When contrast-enhanced LNs were seen, they were defined as CE-SLN. Two other SLN detection methods, the  $\gamma$ -probe-guided and dye-guided methods, were performed together. We evaluated the SLNs detected by each method and calculated the SLN detection rate. After the SLNs were resected, pathological examinations were done.

#### 【Results】

CE-SLNs were successfully identified in 91(82%) of 111 patients by our CEUS-guided method. The number of CE-SLN was 1-3 (average 1.1), and it took 2-23 (average 3.8) minutes to detect. The pathological results revealed 27 cases of SLN metastasis amongst all the 111 cases. Seventy six cases of 84 without SLN metastasis were identified, while 17 cases of 27 with SLN metastasis were identified by our method.



## RESULTS

#### CEUS-guided method using Sonazoid™

- 1) detected cases: 91/111 cases (total detection rate: 82%)
- 2) number of SLN: 1-3 (mean1.2)
- 3) time required: 2-23min (mean3.8)
- 4) size of SLN: 6-33mm (mean15.2)
- 5) depth from skin: 5-27mm (mean12.8)

Saitama Medical Center, Jichi Medical University

## DISCUSSION

- In 76 cases of 84 without LN metastasis and 17 cases of 27 with LN metastasis, CE-SLNs were identified.
- Contrast-enhanced lymphatic vessels and SLNs were observed within 5 minutes after subareolar injection.
- No side effects by the subareolar Sonazoid™ injection
- Limitation in present study as follows ;
  - #. Age, physique, location and depth of the LN
  - #. The transducer may be inadequate for detailed observation, so that a transducer with a higher frequency may be needed.
  - #. A lymphatic vessel may be compressed by a transducer, which may interrupt lymphatic flow.
  - #. Some improvements are needed, especially in metastatic cases

Saitama Medical Center, Jichi Medical University

③本研究の初期に経験した乳癌の20症例について、核医学的手法、色素法と比較し、病理学的考察を加えて分析・検討した結果を2009年World Federation for Ultrasound in Medicine & Biology (Ultrasound Med Biol)に投稿し、掲載された。その後、内外を問わず多くの方より本法に対する研究参加の依頼や内容に関する問い合わせがあり、本法は世界的に注目されている研究であることを確信した。

Sentinel node detection method using contrast-enhanced ultrasonography with Sonazoid in breast cancer: Preliminary clinical study. Omoto K, Matsunaga H, Take N, Hozumi Y, Takehara M, Omoto Y, Shiozawa M, Mizunuma H, Harashima H, Taniguchi N and Kawano M. Ultrasound Med Biol 2009; 35(8), 1249-1256

【Abstract】 This study aimed to evaluate the usefulness of sentinel lymph node (SLN) detection in breast cancer using contrast-enhanced ultrasonography (CEUS) with subareolar Sonazoid injection. The subjects were 20 breast cancer patients. General anesthesia was induced and 2 mL of Sonazoid was injected subareolarly. After massage of the injection site, the axillary area was observed transdermally using coded phase inversion harmonic ultrasonography with mechanical indices of 0.15 to 0.19. When contrast-enhanced lymph nodes (LNs) were seen, they were defined as CE-SLN. Two other SLN detection methods, the  $\gamma$  probe-guided and dye-guided methods, were performed together. We evaluated the SLNs detected by each method to determine if they corresponded with each other and calculated the SLN detection rate. After the SLNs were resected, pathologic examinations were done. The SLN

detection rate of the CEUS-guided method, the dye-guided method and the  $\gamma$  probe-guided method were 70%, 75% and 100%, respectively. There was no statistically significant difference in these rates between the CEUS-guided and dye-guided methods but the CEUS-guided method showed a significantly lower rate than the  $\gamma$  probe-guided method, and dye-guided method also showed a significantly lower rate than the  $\gamma$  probe-guided method. The number of CE-SLNs was 1 or 2 (average 1.1) and each took 2 to 20 (average 5.3) min to detect. The CE-SLNs corresponded grossly with SLNs detected by the  $\gamma$  probe-guided and dye-guided methods. The pathologic results indicated no metastasis from the resected SLNs in 15 of 20 cases. However, the CEUS-guided method detected 12 cases of these 15 and CE-SLNs were detected in two of the remaining five metastasis cases. In summary, in breast cancer patients, after subareolar injection of Sonazoid, contrast-enhanced LNs were observed in real time with ultrasonography. In an initial clinical study of 20 cases, the detection rate of the CEUS-guided method was less than that of the  $\gamma$  probe-guided method. It is suggested that the CEUS-guided method using Sonazoid may, with some improvements, be a useful new modality for sentinel node identification.

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計3件)

1. Omoto K, Matsunaga H, Take N, Hozumi Y, Takehara M, Omoto Y, Shiozawa M, Mizunuma H, Harashi-ma H, Taniguchi N and Kawano M: Sentinel node detection method using contrast-enhanced ultrasonography with Sonazoid in breast cancer: Preliminary clinical study. *Ultrasound Med Biol* 査読有 35:1249-1256, 2009
2. 尾本きよか: ソナゾイドを用いた造影超音波画像による乳癌のセンチネルリンパ節同定法. *映像情報メディカル* 41(5):552-555, 2009
3. 尾本きよか: ソナゾイド乳輪下注入による造影超音波画像を用いたセンチネルリンパ節の新たな同定法. *インナービジョ*

ン 24(6):82-84, 2009

[学会発表] (計4件)

1. Kiyoka Omoto, Natsuki Take, Hiro-aki Matsunaga, Nobuyuki Taniguchi, Yasuo Hozumi, Megumi Takehara, Yawara Omoto, Mikihiko Kawano: Sentinel lymph node identification method using contrast-enhanced ultrasonography with Sonazoid™ in breast cancer. 12th World Congress of the World Federation for Ultrasound in Medicine and Biology. 28 August - 3 September 2009. Sydney, Australia
2. 尾本きよか、河野幹彦、松永宏明、竹夏樹、谷口信行、穂積康夫、竹原めぐみ、尾本和、水沼洋文: 造影超音波画像による乳癌センチネルリンパ節同定法の研究. 第17回日本乳癌学会学術総会. 2009年7月4日. ホテル日航東京(台場)
3. Kiyoka Omoto, Hiroaki Matsunaga, Natsuki Take, Yasuo Hozumi, Megumi Takehara, Yawara Omoto, Hirobumi Mizunuma, Nobuyuki Taniguchi, Mikihiko Kawano: Novel method of sentinel node detection using contrast-enhanced ultrasonography with Sonazoid in breast cancer: Initial clinical experience. 第10回国際造影超音波シンポジウム. 2008年12月13~14日. 東京医科大学病院(東京・新宿)
4. 尾本きよか、河野幹彦、松永宏明、竹夏樹、谷口信行、穂積康夫、竹原めぐみ、尾本和、水沼洋文: ソナゾイドを用いた造影超音波法による乳癌センチネルリンパ節同定法の研究. 第21回日本乳癌甲狀腺超音波診断会議. 2008年9月14~15日. 大阪国際会議場

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

[その他]

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

尾本 きよか (OMOTO KIYOKA)  
自治医科大学・医学部・准教授  
研究者番号：90306118

(2) 研究分担者

谷口 信行 (TANIGUCHI NOBUYUKI)  
自治医科大学・医学部・教授  
研究者番号：10245053  
穂積 康夫 (HOZUMI YASUO)  
自治医科大学・医学部・准教授  
研究者番号：50260831

(3) 連携研究者

なし