

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 28 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21591817

研究課題名（和文）肺癌において拡散強調画像は一体何を表しているのか？

研究課題名（英文）What does Diffusion-Weighted magnetic resonance Image for lung cancer reflect?

研究代表者

森 毅 (MORI TAKESHI)

熊本大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：60398196

研究成果の概要（和文）：極細径圧プローブを用いて、肺癌切除標本の腫瘍内圧を測定した。176例の肺癌の平均腫瘍内圧は 8.7 ± 6.3 mmHg (0-37) であった。腫瘍内圧は、1) 陽電子断層法における標準化最大集積値と相関を認めた ($r=0.398$)。2) 腫瘍サイズと相関を認めた ($r=0.326$)。3) リンパ節陽性肺癌は陰性より有意に腫瘍内圧が高かった ($p=0.005$)。4) 拡散強調画像における見かけの拡散係数とは相関を認めなかった ($r=0.114$)。

研究成果の概要（英文）：Measuring Intra-tumor pressure (ITP) was performed for 176 lung cancer patients. Mean ITP was 8.7 ± 6.3 mmHg (0-37). 1) ITP showed significant relationship with maximal standardized uptake value on PET ($r=0.398$) and tumor size ($r=0.326$). 2) Lung cancer with metastatic node showed higher ITP than that without metastatic node ($p=0.005$). ITP did not show relationship with apparent diffusion coefficient of MRI ($r=0.114$).

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	3,200,000	960,000	4,160,000
2010年度	300,000	90,000	390,000
2011年度	300,000	90,000	390,000
年度			
年度			
総計	3,800,000	1,140,000	4,940,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・胸部外科学

キーワード：肺癌、腫瘍内圧、陽電子断層法、拡散強調画像

1. 研究開始当初の背景

当教室では肺癌診断における核磁気共鳴拡散強調画像 (DWI) の有用性を検討するために、肺癌術前に FDG-PET と DWI の両方の検査を行い、両検査を比較検討してきた。現在まで明らかにしてきたことは、(1) 肺結節の良悪性鑑別において DWI は PDG-PET に比べ、感度は同等である上に、特異性が高い (Mori T, et al. J Thorac Oncol 2008)、(2) 肺癌リンパ節転移診断において DWI は FDG-PET に比べ、感度は同等である上に、特異性が高

い (Nomori H, et al. J Thorac Cardiovasc Surg. 2008) である。しかし現在までの問題点として、FDG-PET では癌に陽性になる機序は基礎的に解明されている一方、DWI では癌に陽性を示す機序がほとんど解明されておらず、臨床データが先走っている状態である。今回の研究の目的は DWI における癌組織の ADC 値が算出される機序を基礎的に解明することである。

①拡散強調画像 (DWI) と我々の示したこと
近年、がん治療に、FDG-PET 検査の重要性が増している。しかし、研究が進むにつれて FDG-PET の問題点が明らかとなってきた。それらは 1) 多額の資金を要するため、施設に限られ、地方の患者が容易に検査を受けることが出来ない。2) 被曝、3) 高分化腺癌、特に細気管支肺胞上皮癌を検出できない、4) 炎症性肺結節に陽性所見を示す、等である。そこで我々は、近年他臓器癌に対し応用されている核磁気共鳴装置 magnetic resonance imaging: MRI) の 1 つの撮像法である DWI を肺癌診断に応用し、その結果を FDG-PET と比較検討し、以下の結果を得てきた。(1) DWI は肺結節良悪性鑑別において、a) 高分化腺癌は FDG-PET と同様に検出できないものの、その感度は FDG-PET と同様であった (Mori T, et al. J Thorac Oncol 2008) (2) DWI は FDG-PET と比較して活動性炎症性肺結節を疑陽性とせず、このため、特異度が高い (Mori T, et al. J Thorac Oncol 2008)。c) 肺癌リンパ節転移診断では DWI が FDG-PET と比べ、感度に差はなかったものの、特異度が高かった (Nomori H, et al. J Thorac Cardiovasc Surg 2008)。以上のように DWI は FDG-PET の代替になる可能性を秘め、被曝、医療資源の問題をも解決する可能性を示した。

②DWI の原理とその悪性腫瘍への応用

DWI は水分子 (プロトン) の拡散 (0.05cm/sec) を表したもので、血液の流速 (5-150cm/sec) よりはるかにゆっくりしたものである。近年の核磁気共鳴装置の改良で、脳だけではなく、体軀にもその応用が可能となってきた。その拡散を表す値として“見かけの拡散係数” (apparent diffusion coefficient: ADC (mm²/sec)) が用いられる。この ADC を用いて、各腫瘍間の比較検討が可能である。水分子の拡散は細胞内小器官 (オルガネラ) や細胞内巨大分子に妨げられ、ADC は低下し、細胞内外水分子の割合でも ADC は変化する (Rowley HA. Neuroimag Clin N Am 1999, Wang J. Radiology 2001, Sumi M. AJR 2002)。悪性腫瘍では以下の要因から水の拡散が減少しており、ADC が低下している (Uhl M. Eur Radiol 2002, Sazafer A. Magn Reson Med 1995, Takahara T. Radiat Med 2004, Nasu K. Jpn J Clin Oncol 2004)。1) 細胞密度の増加、2) 核の巨大化および核細胞質比 (N/C 比) の上昇、3) 細胞外スペースの減少。DWI の悪性疾患への応用は中枢神経系 (Sugahara T. J Magn Reson Imaging 1999, を始めとして、頭頸部腫瘍 (Sumi M. AJR 2002, Abdel Razek AAK. Eur Radiol 2006)、乳癌 (Woodhams R. Magn Reson Med Sci 2005)、骨軟部腫瘍 (Baur A. Skeletal Radiol 2000,

Einaesdottir H. Eur Radiol 2004, Hayashida Y. Eur radiol 2006)、前立腺癌 (Reinsberg SA. AJR 2007)、直腸癌 (Dzik-Jurasz A. Lancet 2002) などに応用されている。肺癌に関しては少数例の報告しかなかったが、我々のグループが世界に先駆けてまとめた数 (140 結節) の報告を行った (Mori T. J Thorac Oncol 2008)。

③DWI および ADC は一体何を表しているか？
今までの論文を検討すると以下がその検索候補になると考えられる。

- 1) 細胞密度: 脳腫瘍に関する論文 (Sugahara T. J Magn Reson Imaging 1999, Murakami R. Radiology 2007) で示唆されるように、肺癌においても最も可能性が高いのではないかと考えられる。
- 2) 腫瘍細胞サイズ、核面積および N/C 比: 上記に次いで、影響を与えている可能性がある。
- 3) 微小血管密度 (microvessel density: MVD): DWI は水分子の拡散を示しているものの見かけ上のものであり、真の拡散を示している訳ではないと考えられる。血流も ADC に慣用している可能性がある。
- 4) 微小リンパ管密度 (lymphatic vessel density: LVD): 3) と同様の理由で検討する必要がある。
- 5) Ki-67 などをはじめとした腫瘍悪性度を示すマーカー: DWI は肺結節および肺癌リンパ節転移診断において、FDG-PET と同様の感度を示している (Mori T. J Thorac Oncol 2008, Nomori H. J Thorac Cardiovasc Surg 2008)。つまり、ADC が腫瘍の悪性度を示すマーカーと平行して変化している可能性がある。
- 6) 肝細胞癌、頭頸部がんなどで重要性が言われている腫瘍内圧: 腫瘍内圧は腫瘍細胞密度を代表する可能性がある。

また、FDG-PET における glucose transporter 1 (GLUT1) のような特異的なマーカーも検討中である。

2. 研究の目的

当初の研究の目的は DWI における肺癌組織の ADC 値と、癌の細胞密度、腫瘍細胞サイズ、核面積および N/C 比、微小血管密度、微小リンパ管密度、腫瘍内圧等と比較検討し、DWI が癌で陽性所見を示す機序を基礎的に解明することであった。

しかしながら、中間解析で、本研究の軸に据えていた腫瘍内圧と ADC の相関を見られないことが判明した一方、腫瘍内圧が臨床病理学的因子と相関し、腫瘍内圧測定の有用性が示唆され、腫瘍内圧を本研究の中心に据えた。

研究の後期では、肺癌における腫瘍内圧と臨床病理学的因子との相関性を検討することで、腫瘍内圧測定の意義を明らかにすることに目的を変更した。

3. 研究の方法

以下に示す研究計画・方法は、臨床材料を用いる部分に関して、平成18年4月20日に「肺癌におけるPET検査およびMRI検査の有効性の検討」として熊本大学大学院医学薬学研究部等倫理委員会にて承認を受けている。

(1)DWI、肺癌手術および臨床材料を用いた研究について

(対象)

以下の3点に全て合致し、除外基準に該当しない症例を対象とする。

1) 気管支鏡やCT下肺生検等で肺癌と組織学的な確定診断が行われており、外科的切除の対象となる患者に対して行う。成年に達していれば性別・症状は問わない。未成年は対象外とする。

2) すりガラス陰影のみ (pure Ground Glass Opacity: pure GGO) で構成される高分化腺癌および1cm未満の結節影は本研究より除外する (予備実験で両者はDWIで検出できないことが判明している)。

3) 当病院の倫理委員会で承認された本研究の同意書に従って、文書および口頭での説明を行い (担当: 森)、患者の自由意志による本研究への参加の同意を得た症例。

患者に対する説明事項は下記のとおりである。

- ① 研究の目的および方法
- ② 予期される効果及び合併症
- ③ 当該疾患に対する他の治療法の有無及びその内容
- ④ 患者が研究への参加に同意しない場合であっても不利益は受けないこと
- ⑤ 患者が研究への参加に同意した場合でも随時これを撤回できること
- ⑥ その他患者の人権の保護に関して必要な事項

除外基準

同側多発肺癌

肺癌と同側で既往歴 (開胸術等) がある症例。

重篤な腎機能不全・肝機能不全・心機能不全がある症例。

その他、担当医師が不相当と判断した症例。(担当: 森)

① (DWI 情報の集積) 手術前に、DWI は熊本中央病院 放射線科 (協力者: 片平和博) もしくは当院で行う。ともに、Phillips 社製核磁気共鳴装置 (MRI)、Gyrosan Intera Achieva Nova Dual を用いて検査を行う。本研究の条件設定は完了している。

② (切除標本を対象にした研究)

(標本収集) 熊本大学医学附属病院手術室で肺癌根治術を行なう (担当: 森)。研究参加前に患者より文書および口頭で同意を得た上で、手術標本より癌病巣と正常部分より一部分を取り出し、これを免疫染色用およびDNA抽出として採取し、deep freezerに保存する。通常の病理学的検索は残りの標本をホルマリン処理、パラフィン包埋したものに対して行なう。

(ヘマトキシリン・エオジン (HE) 標本) パラフィン包埋固定 HE 標本を用いて肺腺癌の分化度、脈管侵襲 (免疫染色の有無も考慮する)、リンパ節転移等の通常の病理因子を調べる。2cm 以下の場合には Noguchi 分類も検討する。

(担当: 森) 尚、病理学的評価には当院病理部猪山賢一准教授にご指導いただくことのできる。

(腫瘍細胞密度) HE 標本を $\times 100$ で観察し、一定面積 (650×850 micrometer) の region of interest (ROI) を作成し、数箇所腫瘍細胞個数を測定し、この平均を求める。更に、この値と ADC 値との相関を検討する。

(腫瘍細胞サイズ測定) 3と同様に一定面積を選択し、当科で保有する顕微鏡自動計測装置を用いて、HE 標本を腫瘍細胞の大きさを計測する。これらの値と ADC 値との相関を検討する。

(核面積と N/C 比) 4と同様に、核面積および N/C 比を測定し、この値と ADC 値との相関を検討する。

(免疫染色) 連続凍結切片を作成し、以下の免疫染色を行う。パラフィン包埋の組織を使用することを基本にするが、不可能な抗体もしくは不安定な抗体の場合は新鮮凍結標本を用いる。可能であれば、顕微鏡自動測定装置を用い、定量性が向上することに留意する。

1) MVD測定に関しては抗CD31抗体

(pan-endothelial cell測定)、抗CD105抗体 (Proliferation-Related Endothelial Cell測定)、抗CD34抗体+抗alpha smooth muscle action (alpha-SMA) 抗体 (immature and mature vessel測定) で免疫染色を行なう。

2) LVD測定に関しては抗podoplanin抗体 (D2-40, lymphatic vessel測定) で免疫染色を行う。

3) 腫瘍悪性度判定に関しては抗ki-67抗体

(MIB-1)、抗p53抗体、抗Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA) 抗体等の免疫染色を行い、腫瘍悪性度を調べる。

(腫瘍内圧測定)

1) 予備実験：熊本大学大学院医学薬学研究部等倫理委員会で承認を得た後、患者に文書による説明行い、同意を得られた患者に対して行う。切除肺を用いて Millar 社の極細径圧プローブである Ultra-Miniature Mikro-Tip Pressure Transducer Catheters (SPR1000)を用いて、腫瘍内圧を調べる。23G 留置針を P23XL-1 および持続注入器に接続し、肺に針を穿刺し、内圧を測定する。基準点は腫瘍の中心部分とする。

2) 手術中および切除肺での内圧測定：患者に文書による説明行い、同意を得られた患者に対して腫瘍内圧測定を行う。手術中の内圧の基準点は虚脱肺における腫瘍の中心部とする。切除前（体内）および切除後（体外）で計測を行い、その両者の値の相関性を吟味する。もし、強い相関があれば、医療安全を考慮し、体外計測を選択する。

3) もし、体内計測を選択した際は、手術中の実験になるため、20 例程蓄積された時点で中間解析を行い、この研究の続行の異議があるか否かを検討する。

4) 腫瘍内圧と ADC との相関の有無を検討する。

③腫瘍内圧と ADC の間に相関性がないことが明らかになった後は、腫瘍内圧の研究にシフトした。

1) 切除肺を用いて、肺癌の腫瘍内圧測定を継続して行った。

2) 腫瘍内圧と TNM 分類、病理因子（組織型、分化度、p1, v, ly, pm, PLC）、MIB1 index, microvessel density, EGFR mutation と腫瘍内圧の相関性を検討する。統計ソフトの使用および生物統計専門家との議論を行い、統計学的に解析を行なう。

4. 研究成果

①腫瘍内圧測定法の確立

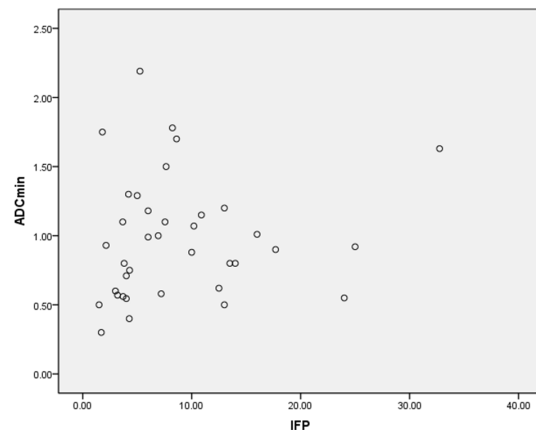
当学臨床研究・医療技術倫理委員会の許可を得た後、研究を開始した。既に、多くの論文で使用されている Millar 社の極細径圧プローブである Ultra-Miniature Mikro-Tip Pressure Transducer Catheters (SPR1000) を、腫瘍内圧測定に用いた。23 ゲージ注射針に先端を内装し（この際、先端が注射針から出ないようにする。）、腫瘍中心部まで注射針先端を進める。圧プローブの先端の位置を変えないようにして、注射針を手前に引く。この状態で、腫瘍内圧を測定した。この際、腫瘍から比較的離れた位置を把持する必要があった。3 回計測を行い、この平均値を測定値とした。

②腫瘍内圧測定から得られた結果

当学臨床研究・医療技術倫理委員会の許可を得た後、2009 年 9 月より 2012 年 4 月までに当科で手術を行った肺癌のうち、176 例に対し腫瘍内圧が測定可能であった。基本的に、測定対象は充実性のものとした。但し、すりガラス影を呈する病変でも、切除肺内で秀隆が明瞭に触知でき、腫瘍内圧が測定可能と判断された肺癌は、測定の対象とした。また、使用するプローブが臨床使用を目的としておらず、体内計測は 1 例も施行しなかった。

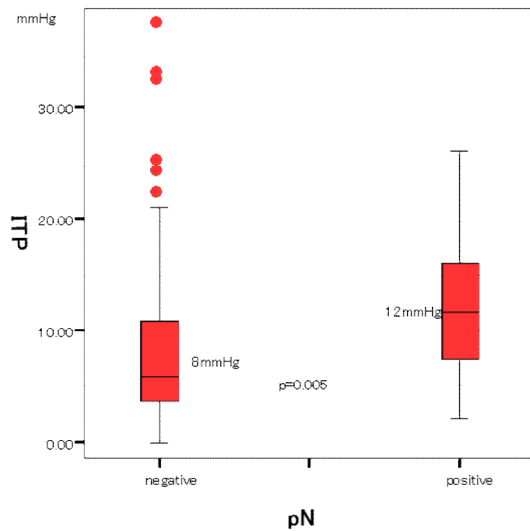
176 例の臨床背景であるが、平均年齢 70.0 ± 9.0 歳 (39-78)。男性 110 例、女性 66 例であった。CT 上の平均腫瘍サイズは 2.7 ± 1.4 cm (0.8-7.9) であった。CT 上の腫瘍の性状は mixed GGO 49 例、solid 127 例であった。FDG-PET より算出された平均 SUVmax は 4.7 ± 3.4 (0.3-17) であった。ADCmin (ADC の最小値) は $1.02 \pm 0.47 \times 10^{-3}$ mm²/sec であった。組織型は腺癌 118 例、扁平上皮癌 38 例、腺扁平上皮癌 9 例、およびその他であった。平均腫瘍内圧は 8.7 ± 6.3 mmHg (0-37.2) であった。

腫瘍内圧と ADC の相関 ($r=0.114$) は見られなかったため、後半の研究では、腫瘍内圧と臨床病理学的因子との相関を検討した。

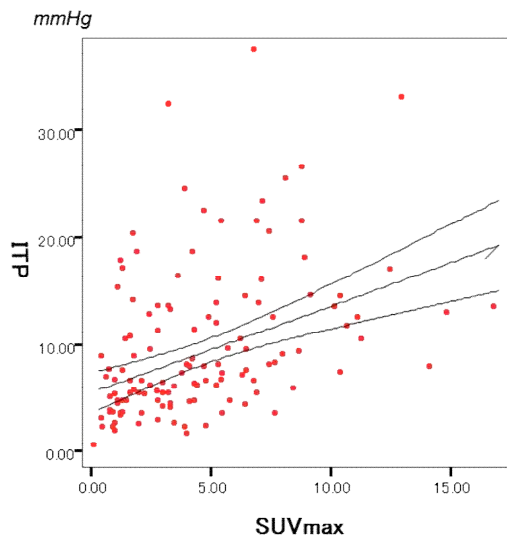


腫瘍内圧と臨床諸因子の関連を検討した。組織型、脈管侵襲の有無、腫瘍分化度、EGFR mutation の有無、MIB1 index, micro-vessel density その違いでは、腫瘍内圧の違いは認めなかった。

リンパ節転移陽性肺癌 (12 ± 6.2 mmHg) は、陰性より (8 ± 6.6 mmHg) より有意に腫瘍内圧が高かった ($p=0.005$)。



腫瘍サイズ ($r=0.326$)、SUVmax との間に相関が見られた ($r=0.398$, $p<0.0001$)。



③考察

拡散強調画像における拡散の状況を定量的に表す値が、ADC である。脳腫瘍において、細胞密度と相関することが報告されている (Hayashida Y, et al. AJNR 2006)。細胞密度を凌駕する可能性のある測定河本して、肝細胞癌や頭頸部癌で、予後因子として報告されている腫瘍内圧を候補として選んだ。腫瘍内圧は ADC との相関は見られなかったが、肺癌の腫瘍内圧法の確立および幾つかの臨床病理学諸因子 (リンパ節転移の有無、SUVmax) との相関する知見が得られた。

私の所属する教室では、SUVmax が肺腺癌の悪性度と相関すること (Ohtuska T, et al. Cancer 2006)、拡散強調画像は肺結節の両悪性鑑別には有効であるが (Mori T, et al. J Thorac Oncol 2008)、悪性度は相関しないこと (Ohba y, et al. J Thorac Cardiovasc Surg

2009) を示してきた。私の研究では、腫瘍内圧は、SUVmax に相関し、リンパ節転移を有する肺癌で有意に高い値を示したが、ADC とは相関を示さなかった。このことは、腫瘍内圧が、PET と同様に、腫瘍悪性度との関連性を持つ可能性があることが考えられる。

本研究は、播種の危険性を避けるため、切除標本を用いて、体外で腫瘍内圧を測定した。このため、切除前の腫瘍内圧は測定できていない。頭頸部癌では、放射線治療の効果判定に、腫瘍内圧測定は有用な方法とされており (Brizel et al, Radiother Oncol 1999; Birner et al, Cancer Res 2000; Koukourakis et al, Clin Cancer Res 2001; Bachtiry et al, Clin Cancer Res 2003; Nordmark and Overgaard, Acta Oncol 2004)、肺癌においても、放射線治療もしくは血管新生阻害因子を使用した治療 (Willett CG, et al. J Clin Oncol, 2009) に、腫瘍内圧測定が有用な可能性がある。このため、今後は、1) CT ガイド生検と同じアプローチで、2) 開胸時、3) 肺虚脱時、4) および切除後に、腫瘍内圧を測定し、その相関性を調べる必要があると考える。

④結語

腫瘍内圧は、拡散強調画像における ADC とは相関を示さなかった。

腫瘍内圧は腫瘍サイズおよび SUVmax との相関が認められた。リンパ節陽性肺癌は、陰性肺癌と比して、有意に腫瘍内圧が高かった。

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 2 件)

① Ohba Y, Nomori H, Mori T, Shiraishi K, Namimoto T, Katahira K. Diffusion-weighted magnetic resonance for pulmonary nodeuls: 1.5T vs 3 Tesla, Asian Cardiovascular and Thoracic Annals, 査読有, 19, 2011, 108-14.

② Ohba Y, Nomori H, Mori T, Ikeda K, Shibata H, Kobayashi H, Shiraishi K, Katahira K. Is diffusion-weighted magnetic resonance imaging superior to positron emission tomography with fluorodeoxyglucose F 18 in imaging non-small cell lung cancer?, Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery, 査読有, 138, 2009, 439-45.

[学会発表] (計 2 件)

① 森 毅、大場康臣、千場隆、本岡大和、吉本健太郎、池田公英、白石健治、鈴木実. 肺癌に対する腫瘍内圧測定とその意義. 第 64

回日本胸部外科学会総会, 2011.10.10. 名古屋国際会議場 (愛知) .

② Mori T, Ohba Y, Semba T, Motooka Y, Yoshimoto K, Ikeda K, Shiraishi K, Suzuki M. Intratumoral pressure of lung cancer correlates Fluorodeoxy-glucose Positron Emission tomography. 6th meeting of Asian Thoracic Surgical Club, 2011.9.12. Westin Chosun Hotel (Busan, Korea)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

森 毅 (MORI TAKESHI)

熊本大学・医学部附属病院・講師

研究者番号: 60398196

(2) 研究分担者

なし ()

研究者番号:

(3) 連携研究者

なし ()

研究者番号:

(4) 研究協力者

鈴木 実 (SUZUKI MAKOTO)

熊本大学・生命科学研究部・教授

研究者番号: 81312940

大場 康臣 (OHBA YASUOMI)

熊本大学・生命科学研究部・助教

研究者番号: 50622601

吉本 健太郎 (YOSHIMOTO KENTARO)

熊本大学・生命科学研究部・助教

研究者番号: 60613429

谷口 裕子 (TANIGUCHI HIROKO)

熊本大学・生命科学研究部・技術補佐員 (臨床検査技師)