

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 13 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591936

研究課題名(和文)食道表在癌に対するセンチネルリンパ節ナビゲーションシステムの構築

研究課題名(英文)Development of sentinel lymph node navigation system for superficial esophageal cancer

研究代表者

川上 行奎 (KAWAKAMI, Yukikiyo)

徳島大学・大学病院・特任講師

研究者番号：00596249

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：1.食道癌細胞株YES-2を用いマウス親和性株を樹立、SCIDマウス下部食道粘膜下に細胞懸濁液を注入、同所移植Xenograftモデルを作成した。転移モデルは作成できたが、モデルの時間軸設定は難しいことが判明した。2.学内IRB承認後、接合部を含む食道癌41例にCTリンパ管造影を行い全例にSLNを同定できた。描出されたSLNを色素法で同定、採取し郭清を追加、SLNは細切、郭清リンパ節は1切片で組織検査を行い、同定率、正診度を比較した。全例でSLNは正しく同定され、SLNのみに微小癌が検出された。検出できなかったのは癌で占拠された転移リンパ節で、CTLGによる転移予測は可能であった。

研究成果の概要(英文)：This study evaluated the feasibility of sentinel lymph (SLN) node navigation using computed tomographic lymphography (CTLG) to treat superficial esophageal cancer. Forty-one patients clinically diagnosed with superficial esophageal cancer were enrolled after a written informed consent. After endoscopic submucosal injection of iopamidol around the primary lesion with a sclerotherapy needle, three-dimensional multidetector CT image was made to identify SLNs with their lymphatic routes. Fluorescence imaging was obtained by infrared ray electronic endoscopy after peri-tumor injection of ICG solution intraoperatively. Thoracoscope-assisted radical esophagectomy with lymphadenectomy was performed to confirm an accuracy of navigation. Lymphatic vessels and SLNs were identified preoperatively using CTLG and ICG fluorescence imaging in all cases. Lymph node metastases were found in 7 cases, including 5 micro metastases. The bulky metastatic tumor was diagnosed with CTLG by negative enhancement.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・消化器外科学

キーワード：食道癌 表在癌 リンパ節転移 センチネルリンパ節 バイオイメージング

## 1. 研究開始当初の背景

食道癌は世界でも比較的罹患頻度の高い癌であり(男性の癌死亡率第6位)、高齢社会である。

わが国では今後も増加が予測される癌腫である。食道は後縦隔内に存在し、発達したリンパ網を介して縦隔内から頸部、腹部にまで広範囲にリンパ節転移を起こすため、その根治手術は3領域にわたる広範囲なリンパ節郭清が必要であり、その手術侵襲は大きく、術後合併症を高率に発症する。食道癌の発生が脳血管や代謝障害を有する高齢者に多いことと相まって、手術に起因する死亡も少なくない。

内視鏡技術の進歩により食道の表在癌が発見される機会が増えてきた。リンパ節転移のない表在癌(深達度Ep、M1、M2)では内視鏡的粘膜切除術で根治的治療が可能であるが、超音波内視鏡でも深達度診断の正診率は70%前後であり、多くの表在癌は進行癌と同様に侵襲の過大なリンパ節郭清を伴う開胸開腹手術か放射線化学療法が選択されているのが現状である。それは術前画像診断による正確なリンパ節転移予測ができないためである。

近年、センチネルリンパ節(SLN)、すなわち癌腫が最初に転移するリンパ節の転移の有無を判定し、転移がない場合はリンパ節郭清を省略するというSLN生検の試みが検討され、乳癌ではすでに臨床応用されている。SLN同定法には米国で開発された放射性同位元素を用いる。

“ガンマプローブ法”(ラジオアイソトープ:RI法)青色色素を用いる色素法がある。放射性物質に関する使用規制のあるわが国ではRI法は普及せず、より不確実な色素法が多く施設で採用されつつあるが、色素法による同定はリンパ節の炭粉沈着のある食道癌では難しく、術前にSLNを正しく同定することはできない。ガンマプローブ法は術前のガンマシンチグラムでもリンパ管の描出ができるが、癌腫周囲のリンパ節が描出できない(shine through現象)などの問題点があり、高価な検出装置や核種が必要である。また、リンパ管の走行が一方方向ではなく多方向

に存在すること、跳躍転移の存在(リンパ路が描出されない従来法では本当に跳躍しているのかどうか不明である)などから食道癌に対するSLN同定法は未だ確立されたものがない。

申請者らはRIを用いることなく、わが国で一番普及しているCT scanを用いたSLN同定法であるCT lymphography(CTLG)を開発し(Radiology 230: 543-552, 2004, Surgery 135: 258-265, 2004)、乳癌の実臨床に活用している。本法は術前に行う遠隔転移診断時に短時間で行え、水溶性造影剤を用いたSLN同定法である。本法はCT上でSLNの正確な場所と個数、その形態を、それに向かうリンパ管と周囲の解剖学的な位置関係とともに描出できる画期的な方法である。

## 2. 研究の目的

食道はリンパ網が発達しており、表在癌でも高頻度にリンパ節転移を起こす。しかし、食道のリンパ網の解剖は不明な部分が多く、これに関する研究は少ない。本研究の目的は以下の2点である。

1)未だ解明されていない食道粘膜下から縦隔内、頸部、腹部に至るリンパ網の解剖を解明する。

2)食道癌センチネルリンパ節を正確に同定する方法を開発、PETCTやCT以上の精度で術前転移診断が可能かを検証、従来にない新しい低侵襲治療を考案し、実用化する。

申請者らが開発したCTLGは従来のラジオアイソトープや色素を用いない、水溶性造影剤を用いたセンチネルリンパ節の同定法であり、乳癌では国内外の多くの施設ですでに臨床応用されている。この方法を用いるとリンパ網の発達した食道の縦隔内リンパネットワークの描出も可能であることを動物実験で証明し、食道表在癌においてその正確性を確認し、臨床応用している(Radiology 237: 952-60, 2005, Surgery 139: 224-235, 2006)。

申請者らはこの方法を用いて、乳癌においてリンパ節転移の術前診断や従来法では難しいと思われていた術前化学療法後のセンチネルリンパ節同定や治療効果判定も可能

なことを証明した (J Med Invest 54: 1-18, 2007)。

術中の SLN 同定には ICG (イソシアニングリーン) を 1mL 粘膜下に注入し、術中に腫瘍近傍の肺実質に ICG を注入し、ICG が波長 845nm の発光ダイオードからの励起光によって発光する特性を利用し、内視鏡装置を開発 (オリンパス社製)、使用し、本法により術中に SLN を同定、採取する。

**縦隔リンパ節転移モデルの作成** 食道癌動物実験モデルとして皮下移植モデル、腹膜播種、尾静脈からの移植による肺転移モデル、また、腹部食道への同所移植モデルを作ること成功している。食道癌縦隔転移が作れる同所移植モデルは生存率が不良であったが、腹膜播種モデルの継代培養によりマウス親和性のあるモデルを作成することができた。

縦隔リンパ節転移モデルの SLN が発生するまでとそれ以降の Time course を確立し、SLN 転移発生に関するメカニズムを解明したい。網羅的 cDNA array により、遺伝子的な変化も検討したい。臨床例の蓄積により、正確な SLN ナビゲーションシステムを構築し、縦隔から頸部、腹部に至るリンパネットワークの解剖を解明したい。内視鏡による蛍光観察装置の改良により、縦隔鏡を用いた SLN 生検を実現し、臨床応用したい。

### 3. 研究の方法

#### (1) 動物実験

##### SCID マウスを用いた食道癌同所移植 Xenograft モデルの作成

ヒト食道癌細胞株 (YES-2) を用いて食道癌 in vivo モデルを作製する。移植する細胞株は YES-2 をもとに継代培養を行い、マウス親和性株を樹立することにより、長期生存が可能同所移植モデルを作成する。SCID マウスを用い麻酔下に開腹し、下部食道粘膜下に細胞懸濁液を注入する。同所移植モデルを生育し、定期的 (1 週間、2 週間、3 週間の時点で) に犠牲死し、縦隔リンパ節転移発生、遠隔転移発生時期を計測して Time course を作成する。

Time course の検討から腫瘍径 2mm 以下の微小転移が発生する時期も解明する。

#### センチネルリンパ節の免疫学的機能に関する研究

癌が最初に到達したリンパ節 (センチネルリンパ節) とその周囲のリンパ節を採取し、組織学的構造、サイトカインの測定、免疫組織学的手法による転移細胞集塊を取り巻くリンパ組織と SLN を取り巻く周囲リンパ節の機能を解明する。

#### (2) 臨床研究

##### センチネルリンパ節同定に関する従来法との比較試験

学内 IRB にて比較臨床試験を承認後、食道癌患者に十分なインフォームドコンセントを行い、内視鏡下にイオパミドール 0.5ml ずつ腫瘍周囲の粘膜下に圧をかけて注入し CT リンパ管造影検査を行う。縦隔内リンパ管とともに SLN の部位と個数を同定する。手術時には <sup>99m</sup>Tc フチン酸と青色色素を腫瘍周囲の粘膜下に注入し、CT 上に描出された SLN とともに色素法、ガンマプローブ法で同定した SLN を摘出し、組織検査を行い、それぞれの同定法による SLN 同定率、正診度を比較する。色素法は ICG (イソシアニングリーン) の注入し、オリンパス社製蛍光認識 CCD カメラを用いて SLN の同定を行う。

##### 転移リンパ節に対する集積のメカニズム解明

転移リンパ節についてはとくにその組織学的構造と同定率について詳細に検討し、非転移リンパ節も含めた免疫学的機能を免疫組織化学および組織中サイトカイン測定により解明する。

##### 精度の高い SLN の術中同定法の確立

術前に SLN の数と個数の同定ができていても術中、検索に難渋することが多く、SLN 生検の問題点となっている。この問題を解決すべく申請者らはオリンパス社製 CCD カメラに一体化させた内視鏡赤色光センサーを用いて臨床試験を行い、それぞれの試験結果を数値化し客観的にそれぞれの方法を評価し、簡便で精度の高い SLN 同定法を構築する。

##### 器機の開発

動物実験により安全性が証明された器機を実際の手術に応用し、術野の明瞭さ、操作性、同定精度を確認、改良し、描出力を改良、

新規技術の開発をめざす。

#### 4. 研究成果

##### (1) 動物実験：SCID マウスを用いた食道同所移植 Xenograft モデルの作成

ヒト食道癌細胞株(YES-2)を用いてマウス親和性株を樹立し、食道癌 in vivo モデルを作製した。SCID マウスを用い麻酔下に開腹し、下部食道粘膜下に細胞懸濁液を注入、長期生存が可能な同所移植モデルを作成できた。同所移植モデルの作成は生着にばらつきが多く、リンパ節転移モデルは作成できたが、リンパ節転移モデルの時間軸設定は非常に難しいことが判明した。しかし、食道癌同所移植モデルが作成できれば、食道癌リンパ節転移のメカニズム研究は格段に進むだけでなく、患者個別の抗癌剤感受性試験も可能になることから研究を継続中である。

##### (2) 臨床研究

センチネルリンパ節同定に関する臨床試験を学内 IRB にて臨床試験を承認後、食道胃接合部癌を含む食道癌患者 41 例に書面によるインフォームドコンセントを行い、内視鏡下にイオパミドール 0.5ml ずつ腫瘍周囲の粘膜下に圧をかけて注入し CT リンパ管造影検査を行った。縦隔内リンパ管とともに SLN の部位と個数を同定できた。手術時に色素を腫瘍周囲の粘膜下に注入し、CT 上に描出されたセンチネルリンパ節(SLN)とともに色素法で同定した SLN を摘出した。色素法は ICG(イソシアニングリーン)を注入し、オリンパス社製蛍光認識 CCD カメラを用いて SLN の同定を行った。SLN をサンプリングし、さらに通常のリンパ節郭清を追加した後、ホルマリン固定し、採取した SLN は細切、他の郭清リンパ節は 1 切片で組織検査を行い、それぞれの同定法による SLN 同定率、正診度を比較した。ほぼ全例で SLN は正しく同定されており、SLN のみに微小癌が検出されたことからその精度が確かめられた。両同定法とも検出できなかったのは癌で占拠された転移リンパ節であり、CTLG でこのリンパ節転移が予測可能であった。この結果を国際雑誌に投稿し、すでに掲載済みである。本研究に関しては日本外科学会をはじめ多くの国際学会でも発表し、日本医事新報社から「センチネルリンパ

節生検 手技・エビデンス・ピットフォール」を出版した。センチネルリンパ節とその周囲リンパ節の機能に関する、免疫組織化学、遺伝学的検討はセンチネルリンパ節のみの転移症例、微小転移のみを有する症例を抽出して行う予定である。

#### 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)

Yuasa Y, Seike J, Yoshida T, Takechi H, Yamai H, Yamamoto Y, Furukita Y, Goto M, Minato T, Nishino T, Inoue S, Fujiwara S, Tangoku A. Sentinel lymph node biopsy using intraoperative indocyanine green fluorescence imaging navigated with preoperative CT lymphography for superficial esophageal cancer. *Annals of Surgical Oncology*. 査読有, 19 巻(2), 2012, 486-493

Tangoku A, Yamamoto Y, Furukita Y, Goto M, Morimoto M. The new era of staging as a key for an appropriate treatment for esophageal cancer. *Ann Thorac Cardiovasc Surg*. 査読有, 18 巻(3), 2012, 190-199

Takizawa H, Kondo K, Toba H, Kajiura K, Abdellah Hamed Khalil Ali, Sakiyama S, Tangoku A. Computed tomography lymphography by transbronchial injection of iopamidol to identify sentinel nodes in preoperative patients with non-small cell lung cancer: A pilot study. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 査読有, 144 巻(1), 2012, 94-99

[学会発表](計2件)

Akira Tangoku, 3D-CT navigation surgery for superficial esophageal cancer, International Surgical Week 2013, 2013 年 8 月 25 日-28 日, Helsinki Exhibition and Convention Center (Finland)

Akira Tangoku, SLN biopsy using intraoperative ICG fluorescence imaging navigation with preoperative CT lymphography for superficial esophageal cancer, 13rd World Congress of the International Society for Diseases of the Esophagus, 2012 年 10 月 15 日-17 日, Venice Lido Congress Center (Italy)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

川上 行奎 (KAWAKAMI, Yukikiyo)

徳島大学・大学病院・特任講師

研究者番号：00596249

### (2) 研究分担者

丹黒 章 (TANGOKU, Akira)

徳島大学・大学院AI&IT研究部・

教授

研究者番号：10197593

古北 由仁 (FURUKITA, Yoshihito)

徳島大学・大学病院・助教

研究者番号：20563810

吉田 卓弘 (YOSHIDA, Takahiro)

徳島大学・大学病院・助教

研究者番号：00380105

山本 洋太 (YAMAMOTO, Yota)

徳島大学・大学病院・助教

研究者番号：50522273

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：