

令和 2 年 5 月 26 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K10683

研究課題名(和文) 肺癌の浸潤に伴う自家蛍光変化のメカニズム解明と術式選択への応用

研究課題名(英文) Auto fluorescence findings of lung cancer specimens indicate invasiveness and prognosis

研究代表者

滝沢 宏光 (TAKIZAWA, Hiromitsu)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部(医学域)・准教授

研究者番号：90332816

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：蛍光顕微鏡(励起波長 470 ± 40 nm, 吸収波長 525 ± 50 nm)で肺組織を観察すると、その骨格構造である弾性線維網は緑色の明瞭かつ簡素化された視覚情報となる。肺腺癌の浸潤部では弾性線維網の乱れ、断裂、消失などの構造変化が起こっており、蛍光所見で浸潤所見ありと診断した症例には、胸膜浸潤、血管侵襲、リンパ管侵襲などの病理学的浸潤所見が認められ、無再発生存期間においては、浸潤なしと診断した症例と比較して予後不良であった。この蛍光所見は未染の凍結切片においても観察できるため、術中迅速診断への応用が可能であり、縮小手術の適応を含めた術式選択に役立てることができる可能性がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肺癌手術において、適切な切除範囲を決定することはとても重要である。近年、小型肺癌がよく発見されるようになったが、不用意に切除範囲を縮小すると、肺は温存できてもがん再発のリスクが高くなる。本研究では、術中に採取した肺癌組織を蛍光顕微鏡で観察することで、がんの浸潤程度や再発リスクを把握し、その結果を切除範囲に反映できるか検討した。蛍光顕微鏡で肺癌組織を観察すると、正常部や非浸潤部に認められる緑色の規則正しい網目構造が、浸潤部(悪性度が高い部分)では破壊されている様子が観察され、そのような浸潤部がある肺癌患者は術後再発リスクが高いことが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：Fluorescence microscopy (excitation wavelength 470 ± 40 nm, absorption wavelength 525 ± 50 nm) visualizes elastic fibers that are the skeletal structure of lung tissue as a green network. Structural changes in the elastic fiber network, such as disruption, rupture, and disappearance, are observed in the infiltrated areas of lung adenocarcinoma. When lung cancer tissues were diagnosed as invasive cancers using fluorescence microscopy, they included pathological infiltrates such as pleural, vascular, and lymphatic infiltrates. Such invasive cases had a higher risk of postoperative recurrence than cases diagnosed as non-invasive. Fluorescence findings can also be observed in unstained frozen sections, which can be applied for rapid intraoperative diagnosis and may help in the selection of surgical treatment for lung cancer.

研究分野：医歯薬学 呼吸器外科学

キーワード：肺癌 自家蛍光 胸膜浸潤 縮小手術

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

【早期肺癌に対する縮小手術の適応と術前術中診断の重要性】

近年、末梢小型肺癌に対する縮小手術(部分切除, 区域切除)の有効性が報告されるようになり, これらの妥当性, 葉切除に対する非劣性を検討する多施設共同研究が進行中である。縮小手術は画像診断に基づき, 非浸潤癌やリンパ節転移がないと判断された症例に適応されるが, 術後の病理診断でこれらの診断が覆ることがしばしばある。また, 胸膜浸潤も術前術中診断が困難な因子であり, 術後に胸膜浸潤が判明し, 病期が IA から IB に upstage することがある。縮小手術が標準手術に対して非劣性であるためには, 前述のような予後因子に対する術前術中診断精度を向上させることが重要である。

【自家蛍光観察で胸膜浸潤診断の正診率は向上する】

我々は術中胸膜浸潤診断に自家蛍光観察を用いることで, その正診率を向上させることができるのではないかと考え検討を重ねてきた。自家蛍光物質は気管支粘膜下層に豊富に存在することが知られており, そのことを利用した蛍光気管支鏡はすでに中心性早期肺癌発見のための重要なツールとなっている。我々は胸膜にも自家蛍光物質が存在することに注目し, 胸膜浸潤を来した症例では胸膜の自家蛍光が減弱することを確認した。呼吸器外科医 8 名を対象とした検討では, 自家蛍光を用いた胸膜浸潤診断は白色光のそれよりも感度, 特異度ともに有意に向上することを明らかにすることができた。

【肺癌剖面における自家蛍光】

胸膜の自家蛍光について研究を進める中で, 胸膜浸潤部位は緑色の自家蛍光が減弱し黒色調に見える一方で, 腫瘍剖面を自家蛍光内視鏡で観察すると, 腫瘍内部にも様々なパターンで自家蛍光を認める症例があることがわかってきた。自家蛍光内視鏡と同設定の蛍光顕微鏡を用いて未染色標本を観察すると, 正常肺では肺泡の骨格構造を成す弾性線維に一致した明瞭な自家蛍光を確認でき, 肺癌の非浸潤部では正常部と同様に規則正しい弾性線維網が確認できるのに対し, 浸潤部ではこの弾性線維網に肥厚, 断裂, 消失といった構造の乱れが確認された。

【自家蛍光と肺癌の浸潤性について】

蛍光気管支鏡で観察される気管支の自家蛍光減弱は, 肺癌の浸潤による気管支粘膜下層の蛍光物質の減量が一因と考えられている。我々は胸膜の自家蛍光減弱について組織学的に検討し, 胸膜の蛍光減弱と胸膜浸潤およびリンパ管侵襲には有意な相関があることを明らかにした。すなわち浸潤性の強い肺癌は, 正常胸膜に存在する自家蛍光物質を減量させていると考えられる。肺癌の浸潤と自家蛍光についてはこれまでに研究されていない領域であり, 肺癌の浸潤に伴う正常肺組織および癌組織内の自家蛍光物質の変化を明らかにすることができれば, 自家蛍光は手術術式決定の際などの重要な情報となり得る。

2. 研究の目的

肺癌手術における術式決定(積極的縮小手術の適応)に, 術中検査として蛍光気管支鏡による組織診断が有用となるか, 既に切除された肺癌検体と患者情報を用いた研究を行う。肺腺癌は非浸潤癌→微小浸潤癌→浸潤癌と進行するため, その段階に応じた術式(部分切除→区域切除→葉切除)を選択できれば, 根治性を損なわずに機能温存できる可能性がある。肺腺癌の浸潤範囲は通常 HE 染色と Elastica Van Gieson (EVG) 染色によって病理学的に判断されるが, EVG 染色には通常 2 時間程度の時間がかかるため, 術中診断に有用ではない。自家蛍光顕微鏡を用いた肺腺癌の浸潤診断が可能かどうか, また自家蛍光顕微鏡で浸潤あり/なしの予後についても検討する。

3. 研究の方法

(1)従来の画像診断モダリティを用いた 3cm 以下のすりガラス陰影を伴う肺腺癌浸潤診断についての検討

2017 年に切除した 3cm 以下のすりガラス陰影を伴う肺癌 39 例 41 病変を対象とした。年齢 69 歳(45-84 歳), 男/女:16 例/23 例, 病変全体径 17mm(5-30mm), 充実成分径 7mm(0-28mm), 上皮内腺癌(AIS)/微小浸潤性腺癌(MIA)/浸潤性腺癌(ICA):15/21/5 病変であった。CT における病変全体径とその平均 CT 値, 充実成分径, PET/CT の SUVmax 値のデータを集積した。病理学的浸潤径は 3 名の病理医が HE 染色と弾性線維染色標本を用いて評価した。

(2)自家蛍光顕微鏡を用いた 3cm 以下のすりガラス陰影を伴う肺腺癌浸潤診断についての検討

2017 年に切除した 3cm 以下のすりガラス陰影を伴う肺癌 38 例 40 病変を対象とした(研究(1)と同様の対象)ホルマリン固定パラフィン包埋標本から 4um 厚の切片をスライドガラスに載せ, 染色せずに封入した。これを励起波長と検出波長をそれぞれ 375 - 440nm, および 450nm 以上に設定した蛍光顕微鏡で観察し, HE 染色および弾性線維染色標本と対比した。また, 蛍光顕微鏡で浸潤診断を行い, 最終病理診断との一致率も評価した。

(3)自家蛍光顕微鏡を用いた小型肺腺癌浸潤診断と予後予測についての検討

2012 年から 2016 年に解剖学的切除を行った 2cm 以下の肺腺癌 76 例を対象とした。年齢 66.2 歳(43-86), 男女比 50/26, 腫瘍径 15.6mm(8-20), 充実成分径 13.4mm(0-20), SUVmax 5.3(0-19.9), CEA 2.0mm(0.5-22.1)であった。ホルマリン固定パラフィン包埋標本から 4um 厚の未染切片を作成し, 励起波長 470±40 nm, 吸収波長 525±50 nm のフィルタを内蔵した自家蛍光(AF)顕微鏡で観察し, 弾性線維網の断裂所見(+)を AF 浸潤(+)と定義した。pl, v, ly のいずれかの浸潤所見を認めるものを病理学的浸潤(+)と定義した。

(4)肺癌凍結標本を用いた自家蛍光顕微鏡観察の検討

肺癌切除標本から凍結切片を作成し、未染色で封入し自家蛍光顕微鏡による画像データ取得を行った。同標本組織のホルマリン固定パラフィン包埋標本から4μm厚の未染切片を作成し、自家蛍光顕微鏡による画像データ取得を行い、凍結切片のものと比較した。

4. 研究成果

(1)従来の画像診断モダリティを用いた3cm以下のすりガラス陰影を伴う肺腺癌浸潤診断についての検討

CTにおける充実成分径と病理学的浸潤径には中等度の相関($r=0.34$)を認めた。病変全体径はAIS/MIA+ICA: $13.7 \pm 6.9\text{mm}/19.2 \pm 6.4\text{mm}$ ($p=0.01$)で平均CT値はAIS/MIA+ICA: $-531 \pm 156\text{HU}/-349 \pm 148\text{HU}$ ($p=0.001$)、充実成分径はAIS/MIA+ICA: $2.7 \pm 3.8\text{mm}/11.1 \pm 6.6\text{mm}$ ($p < 0.001$)で、SUVmaxはAIS/MIA+ICA: $1.07 \pm 0.69/2.07 \pm 1.03$ ($p=0.006$)であった。しかし、充実成分を有する病変(31病変)において、ICA診断に対する充実成分径5mm以上の陽性的中率は18%と低く、CTおよびPET/CTの定量データにおいて、ICAの診断に有用なカットオフ値は見出せなかった。

(2)自家蛍光顕微鏡を用いた3cm以下のすりガラス陰影を伴う肺腺癌浸潤診断についての検討

蛍光顕微鏡で観察すると、弾性線維染色標本で観察される弾性線維に一致した強い自家蛍光が観察された。AISにおける保たれた弾性線維網や、浸潤部における弾性線維網の断裂なども鮮明に観察することができた。弾性線維構造に注目した自家蛍光顕微鏡による診断と、最終病理診断との一致率77.5%であった。

(3)自家蛍光顕微鏡を用いた小型肺腺癌浸潤診断と予後予測についての検討

病理学的浸潤と関連する因子は、単変量解析では年齢($p=0.03$)、充実成分径($p=0.01$)、SUVmax($p=0.002$)、CEA($p=0.02$)、AF浸潤($p < 0.001$)であり、多変量解析ではAF浸潤($p=0.03$)であった。術後5年無再発生存率はAF浸潤(-)94.1%に対し、AF浸潤(+)67.6%($p=0.03$)であった。

(4)肺癌凍結標本を用いた自家蛍光顕微鏡観察の検討

未染色の凍結標本切片において、弾性線維に一致した自家蛍光が観察され、浸潤部における弾性線維網の断裂なども鮮明に観察することができた。これらの所見は未染色のホルマリン固定パラフィン包埋標本切片を観察したものと同様の所見であり、迅速診断でも十分応用できる品質であることが確認できた。

まとめ

自家蛍光顕微鏡により、肺組織内の弾性線維構造は明瞭かつ簡素化された視覚情報となり、肺腺癌の浸潤診断および術式選択に役立つ可能性が示唆された。肺腺癌における弾性線維構造の自家蛍光パターンには、WHO分類の各組織型別に特徴も認められるため、次のステップとして自家蛍光パターンを機械学習アルゴリズムに学習データとしてインプットし、浸潤予測モデルを構築することを目的とした研究を既に開始している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Takizawa H, Kondo K, Kawakita N, Tsuboi M, Toba H, Kajiura K, Kawakami Y, Sakiyama S, Tangoku A, Morishita A, Nakagawa Y, Hirose T.	4. 巻 53
2. 論文標題 Autofluorescence for the diagnosis of visceral pleural invasion in non-small-cell lung cancer.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Eur J Cardiothorac Surg	6. 最初と最後の頁 987-992
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） doi: 10.1093/ejcts/ezx419	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hiromitsu Takizawa, Kazuya Kondo, Naoya Kawakita, Mitsuhiro Tsuboi, Hiroaki Toba, Koichiro Kajiura, Yukikiyo Kawakami, Shoji Sakiyama, Akira Tangoku, Atsushi Morishita, Yasushi Nakagawa, Toshiyuki Hirose	4. 巻 53
2. 論文標題 Autofluorescence for the diagnosis of visceral pleural invasion in non-small-cell lung cancer.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Eur J Cardiothorac Surg	6. 最初と最後の頁 987-992
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） doi: 10.1093/ejcts/ezx419	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 滝沢 宏光、竹原 恵美、宮本 直輝、高嶋 美佳、松本 大資、河北 直也、坪井 光弘、鳥羽 博明、吉田 光輝、川上 行奎、近藤 和也、丹黒 章
2. 発表標題 蛍光顕微鏡を用いた肺腺癌浸潤診断についての検討
3. 学会等名 第60回日本肺癌学会学術集会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	近藤 和也 (KONDO Kazuya) (10263815)	徳島大学・大学院医歯薬学研究部(医学系)・教授 (16101)	
研究分担者	梶浦 耕一郎 (KAJIURA Koichiro) (60596253)	徳島大学・大学院医歯薬学研究部(医学系)・助教 (16101)	
研究分担者	坪井 光弘 (TSUBOI Mitsuhiro) (10711872)	徳島大学・病院・助教 (16101)	
研究分担者	澤田 徹 (SAWADA Toru) (60522258)	徳島大学・大学病院・医員 (16101)	