

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20592206

研究課題名（和文）ピンホールコリメータを応用した微小転移リンパ節の分子イメージングシステムの開発

研究課題名（英文）Scintigraphic imaging system of micro-metastasis of lymph node with pinhole collimator

研究代表者

佐藤 強志 (SATO TSUYOSHI)

鹿児島大学・医歯学総合研究科・准教授

研究者番号：60098978

研究成果の概要（和文）：(1) 動物モデルでの扁平上皮癌腫瘍組織における放射性医薬品輸送蛋白発現の免疫組織学的染色による検討では、輸送蛋白の細胞膜上発現が顕著に観察され、放射性医薬品の取り込みと汲み出しとの相関が明らかであった。(2) ピンホールコリメータを用いたリンパ節模型のシンチ画像撮像では、臨床を想定した条件下ではピンホール径は5 mm 以上必要であり、小さな径では計数値の不足による雑音の影響が無視できなかった。また、10 mm のリンパ節サイズ模型における放射性医薬品の局在識別は5 mm が限界であった。

研究成果の概要（英文）：(1) Expression of transport proteins of nuclear agents on cell membrane was evaluated immunohistochemically by using animal models with squamous cell carcinoma. The expression of transport proteins was found distinctly on the tumor cell membrane and showed a clear correlation with the accumulation of nuclear agents in tumor cells. (2) Scintigraphic imaging of lymph node model was done with pinhole collimators of 5 mm and 7 mm in hole size and the spatial resolution was about 5 mm. This result showed a possibility that scintigraphic imaging with pinhole collimator could detect a micro metastasis in lymph nodes of over 10 mm in size.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度			
2007年度			
2008年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2009年度	800,000	240,000	1,040,000
2010年度	500,000	150,000	650,000
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・病態科学系歯学・歯科放射線学

キーワード：リンパ節、微小リンパ節転移、ピンホールコリメータ、シンチグラム、悪性腫瘍、ガンマカメラ

1. 研究開始当初の背景

(1) 臨床的背景：口腔癌の治療において転移リンパ節、とくに初期の転移リンパ節（微小転移リンパ節）の制御が予後を左右する重要な因子となる。当時はセンチネルリンパ節

の概念が口腔癌の治療にも導入されつつあった。しかし、口腔領域のリンパ流は複雑であるため、微小リンパ節の制御が困難で、多くの場合、予防的リンパ節廓清が実施されていたが、不必要な手術が含まれることも否め

なかった。この微小リンパ節に対しては、種々の画像検索法が応用されていたが、その多くはリンパ節のサイズを指標とした形態的診断であり、約1 cm が判定基準とされていた。しかし、0.5 mm～1 cm のリンパ節にもかなりの頻度で転移（微小転移）が発見されており、この0.5 mm～1 cm の微小転移リンパ節の制御が重要と考えられていた。

(2) 学術的背景：口腔癌の転移は血行性とリンパ行性であり、とくにリンパ行性転移（リンパ節転移）が治療において重要と考えられていた。癌組織は毛細リンパ管新生の促進因子を分泌、腫瘍周囲に毛細リンパ管を新生する。癌組織の一部が原発巣から遊離し、プロテアーゼ分泌により毛細リンパ管内に侵入し、リンパ流を介してリンパ節に到達、着床してリンパ節転移が成立すると考えられていた。一部の癌では原発巣の部位により最初に転移が成立するリンパ節（センチネルリンパ節）が解剖学的に決まっておき、乳癌の治療には早期から導入されていた。しかし、口腔領域のリンパ流は解剖学的に複雑であり、センチネルリンパ節が多数存在するとされていた。われわれはこれまでの研究で、放射性コロイドと標識アルブミンを用いた転移リンパ節の検索を実施し、正常リンパ節、炎症性リンパ節、転移性リンパ節について、リンパ流とリンパ節集積の違いを検討し、転移リンパ節の臨床的基準を独自に作成した。しかし、これらの平行型コリメータを使用したシンチ画像では空間分解能の不足から微小転移リンパ節の検出はほとんど不可能であった。

2. 研究の目的

我々のこれまでの研究で蓄積した資料をもとに、微小転移リンパ節における組織学的変化について、とくに放射性医薬品輸送蛋白発現に注目し、免疫染色法で検討する。次に、リンパ節を想定した放射性医薬品の局在をモデル化し、リンパ節シンチグラフィ撮像にピンホールコリメータを応用する事で空間分解能の向上を図り、微小転移リンパ節の画像化（可視化）を試みる。

3. 研究の方法

(1) 動物腫瘍モデルの作成：扁平上皮癌細胞（図-1、SCC-158、財団法人ヒューマンサイエンス振興財団）をラット（Fisher系、雄、7週齢）の後足大腿部に接種し、腫瘍径が1 cm 以上になった時点で安楽死させ、腫瘍組織を採取した（図-2）。

(2) 組織学的検討：組織は通法に従い10%中性ホルマリンにて固定後、パラフィン包埋、5 μm の薄切片を作り脱パラ後、抗原賦活化処理した。2%過酸化水素メタノール液に10分浸漬後、ABC法にて免疫組織化学染色を行

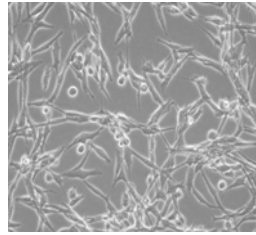


図-1



図-2



図-3



図-4

った。発色はDABにて行い、Mayerのヘマトキシリンで対比染色し顕微鏡的に観察した。放射性医薬品輸送蛋白のマーカとして、抗ヒトツジあるいはラットNa/K-ATPaseマウスモノクローナル抗体（図-5、バイオリアジェント社、コスモバイオ社）、抗ヒトP-糖蛋白マウスモノクローナル抗体（P-gp、図-6、ノボカストラ社）、抗ヒトグルコース輸送蛋白-1ウサギポリクローナル抗体、抗ヒトグルコース輸送蛋白-2ウサギポリクローナル抗体（Glut、図-7、ダコー社、サンタクルツテクノロジー社）、抗ヒトL型アミノ酸輸送蛋白-1ポリクローナル抗体（L-Amino-T、図-8、トランスジェニック社）を1次抗体として用いた。希釈倍率は50倍から200倍まで行った。これらの検討を動物モデルと患者の標本について実施した。組織所見は高分化、中等度分化、低分化の3段階に、染色発現はscore-0（5%未満の発現）、score-1（5%～49%の発現）、score-2（50%以上の発現）の3段階で評価し、両者を比較検討した。

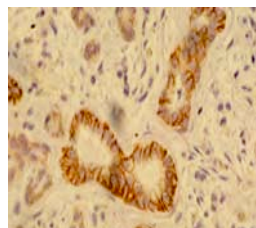


図-5 Na/K-ATPase

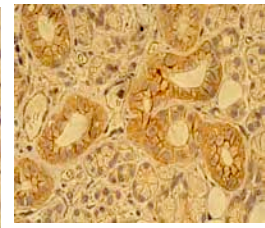


図-6 P-gp

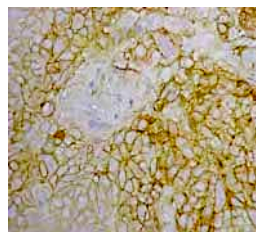


図-7 Glut

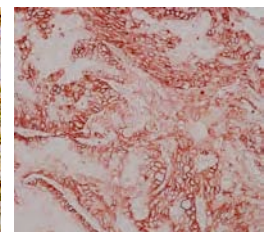


図-8 L-amino-t

(3) リンパ節シンチグラフィ撮像：従来の平行コリメータによる患者のリンパ節シンチグラフィを撮像し、評価基準を再評価した(図-9、図-10)。次に図-11、図-12に示すピンホールコリメータ(1mm、3mm、5mm、7mm)の4種類を作成し、図-4に示すガンマカメラで撮像した。転移リンパ節の模型は放射性医薬品のスポットの間隔を1mm～15mmまで作り、それぞれの分解能を線量(放射能量)、被写体とガンマカメラの距離、角度などを変化させて撮像した。



図-9

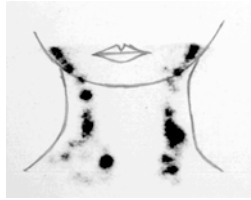


図-10

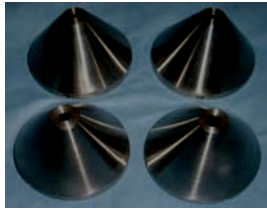


図-11



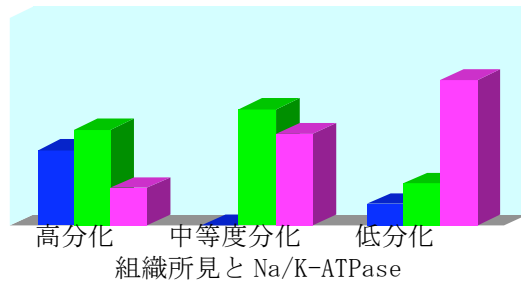
図-12

4. 研究成果

(1) 放射性医薬品輸送蛋白発現：

① Na/K-ATPase の発現

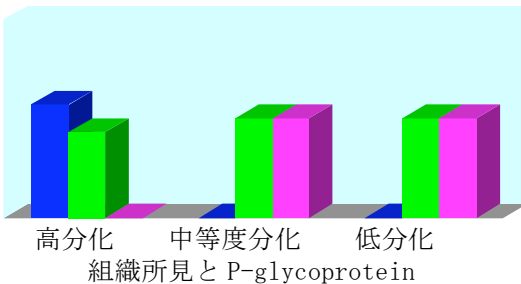
青：Score-0 緑：Score-1 紫：Score-2



組織の分化度に相関してNa/K-ATPaseの腫瘍細胞膜での発現は強くなり、放射性医薬品の腫瘍内への取り込みに大きく関与していることが示された。

② P-糖蛋白の発現

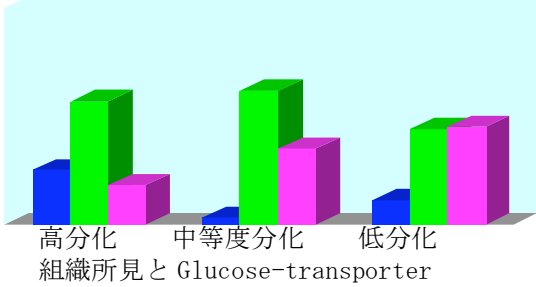
青：Score-0 緑：Score-1 紫：Score-2



P-糖蛋白の発現は高分化の腫瘍細胞ではほとんど認められなかった。それに反して、中等度分化と低分化の腫瘍細胞では発現は著明であり、差はみられなかった。この輸送蛋白は薬剤耐性に関係しており、核医学検査では放射性医薬品のくみ出しに関係すると考えられている。

③ グルコース輸送蛋白の発現

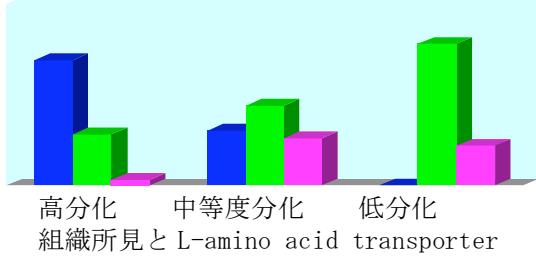
青：sore-0 緑：score-1 紫：sore-2



グルコース輸送蛋白の発現は腫瘍組織の分化度と明らかな相関を示した。

④ L-amino acid 輸送蛋白の発現

青：sore-0 緑：score-1 紫：sore-2



L-amino acid 輸送蛋白の相関は他の輸送蛋白ほど明らかではなかったが、有意な相関を示した。

(2) 臨床でのリンパ節シンチグラフィ

① 正常なリンパ節

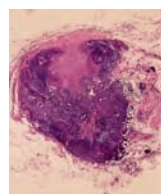
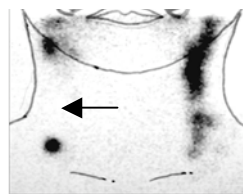
門部、洞部は明らかである。



② 転移リンパ節

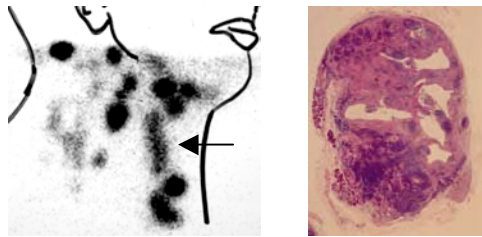
(欠損像)

リンパ節への放射性医薬品の集積が欠損している部位に一致して、組織像では正常なリンパ節組織が腫瘍組織に置換されている。



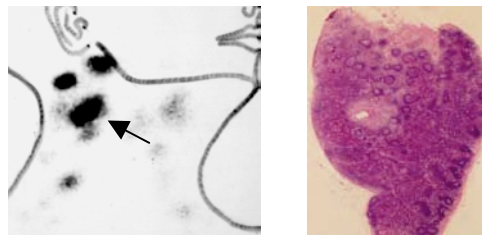
(数珠状像)

正常リンパ節組織の一部が主要組織に置換されている。



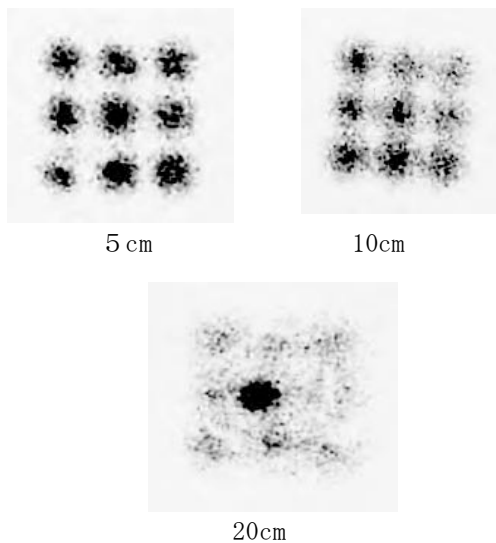
(腫大像)

リンパ節には腫瘍組織はみられず、正常リンパ節の過形成が観察される。

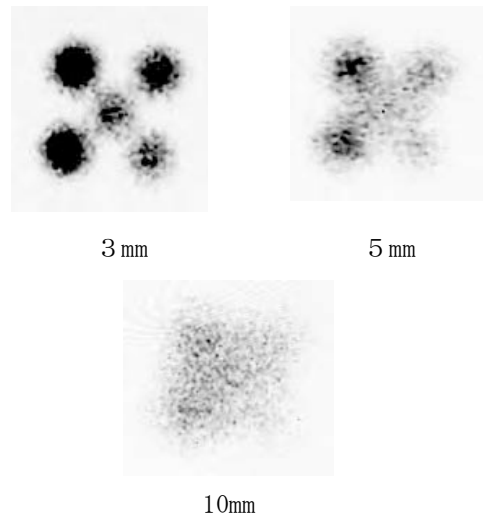


(3) ピンホールコリメータを使用したリンパ節 (模型) シンチグラフィ

1 cm の間隔で基盤目状に 9 個の放射性医薬品スポット状に配列したリンパ節模型の被写体をピンホールと被写体の距離を 5 cm、10cm、20cm 距離で撮影した。ピンホールは 5 mm と 7 mm を使用した。放射性医薬品の放射エネルギーは臨床に準じて使用した。画像では、10cm の距離までは各放射性医薬品のスポットを識別する事が可能であったが、20cm では個々のスポットの識別が不可能であった。このことは臨床の撮影ではその撮像面積の関係から頸部全体を 1 回の撮像で観察する事が無理である事を意味する。



次に放射性医薬品のスポットの間隔を 5 mm にした被写体の撮像ではピンホールコリメータと被写体の距離を 5 cm の時は個々のスポットの識別が可能であったが、それ以上の距離ではボケ像となり識別できなかった。このことは今回の検討での最適条件での分解能の限界は 5 mm であることを示していた。すなわち、リンパ節内の放射性医薬品の局在の分解能には 1 cm 以上のリンパ節である事が必要となる。しかしながら、通常の画像検査において 1 cm 以上の大きさは転移リンパ節と認識されるため、今回の検討結果である 5 mm は臨床的には不十分な分解能であり、さらなる向上が必要となる。



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 1 件)

① Sato T, Morita Y, Kawabata Y, Majima H, Sugihara K. Making the best use of our previous results as a clue for interpreting kinetics of scintigraphic agents. JSDR, 査読あり、2011 (受理、掲載予定) .

[学会発表] (計 6 件)

① 川畑義裕, 佐藤強志, 馬嶋秀行. 上顎に発生した骨形成性粘表皮癌の画像所見、第 15 回臨床画像大会、2010 年 9 月 3 日、鹿児島県鹿児島市.

② Sato T, Kawabata Y., Majima H . Scintigraphy for oral malignant lesions, 88th International Association of Dental Research, July 14, 2010, Barcelona, Spain.

③ 川畑義裕, 佐藤強志, 馬嶋秀行. 全身疾患に伴う顎関節骨変化の画像所見の検討、第

51 回日本歯科放射線学会総会、2010 年 4 月 23 日、神奈川県横浜市。

④ 川畑義裕、佐藤強志、馬嶋秀行。SAPHO 関連性骨髄炎と細菌性骨髄炎における下顎骨骨変化の画像所見、第 14 回臨床画像大会、2009 年 10 月 24 日、北海道札幌市。

⑤ Sato T.、Kawabata Y.、Majima H.。Interpretation of SUV of FDG-PET in oral malignant tumors. 17th ICDMFR, July 2, 2009, Amsterdam, Netherlands.

⑥ Sato T.、Kawabata Y.、Majima H.。Subclassification of Warthin tumor by Tc-99m-Sialoscintigraphy. The 7th ACOMFR, November 21, 2008, Nara, Japan.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐藤 強志 (SATO TSUYOSHI)
鹿児島大学・医歯学総合研究科・准教授
研究者番号：60098978

(2) 研究分担者

川畑 義裕 (KAWABATA YOSHIHIRO)
鹿児島大学・医学部・歯学部附属病院・助教
研究者番号：70274842

野添 悦郎 (NOZOE ETSURO)
鹿児島大学・医歯学総合研究科・准教授
研究者番号：40208351

松根 彰志 (MATSUNE SHOJI)
鹿児島大学・医歯学総合研究科・准教授
研究者番号：00253899

川島 清美 (KAWASHIMA KIYOMI)
鹿児島大学・医学部・歯学部附属病院・講師
研究者番号：40145511

馬嶋 秀行 (MAJIMA HIDEYUKI)

鹿児島大学・医歯学総合研究科・教授
研究者番号：60165701

(3) 連携研究者

上村 亮三 (KAMIMURA RYOZO)
鹿児島大学・医歯学総合研究科・准教授
研究者番号：30253884