

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 25 年 6 月 1 日現在

機関番号：33303

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22591471

研究課題名(和文) 新しいリンパ節転移診断技術の開発ー抗体標識ナノビーズを用いた迅速転移診断

研究課題名(英文) The development of a novel technique for a rapid diagnosis of nodal metastasis using nanocrystal beads labeled anti-cytokeratine antibody.

研究代表者

木南 伸一 (KINAMI SHINICHI)

金沢医科大学・医学部・准教授

研究者番号：00397184

研究成果の概要(和文)：

胃癌センチネルリンパ節生検を普及させることを目的に、術中迅速リンパ節転移診断法の開発に取り組んだ。抗サイトケラチン抗体標識ナノビーズを用いた迅速ホールマウント免疫染色をリンパ節に施し、マイクロ X-CT にて転移巣画像化を試みた。しかしマイクロ CT には術中迅速診断に耐えうる短時間では質の高い画像が得られないという問題点が、迅速ホールマウント免疫染色にはビーズの wash out が難しく SN 比の高い画像が得られないという問題点があり、よい結果は得られなかった。

研究成果の概要(英文)：

We investigated a novel technique for a rapid diagnosis of nodal metastasis to achieve the prevalence of the sentinel node mapping for early gastric cancer. We tried to visualize metastatic foci in lymph nodes with 3-dimensionary using the Micro X-CT equipment after the rapid immunohistological whole-mount staining using nanocrystal beads labeled anti-cytokeratine antibody. Regrettably, we failed to obtain any good results because of difficulty in setting of Micro X-CT and finding the low signal/noise regimen of whole-mount immunostaining.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2011 年度	800,000	240,000	1,040,000
2012 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

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 胃十二指腸外科学

キーワード：センチネルリンパ節 微小転移

1. 研究開始当初の背景

センチネルリンパ節とは、癌巣から最初にリンパ流を受けるリンパ節と定義される。こ

れはすなわち、癌の転移が最初に成立するリンパ節に他ならない。センチネルリンパ節概念の臨床応用として、センチネルリンパ節を手術中に同定・生検し、転移陰性の場合にリ

リンパ節郭清を省略する試みが各臓器癌で行われている。リンパ節郭清の省略は、癌手術に伴う様々な機能障害の軽減に繋がり有用性が高い。胃癌のリンパ節郭清が省略可能なら胃切除は局所切除もしくは横断切除に留める事ができる。

しかし胃癌センチネルリンパ節生検を臨床応用し郭清省略の指標とするには、リンパ節転移の診断精度の問題が残っている。再郭清の余地のない胃癌では、センチネルリンパ節の転移の有無は術中短時間で正確に判定せねばならない。現状では凍結切片を用いた術中迅速病理検索に頼るしかないが、この方法では一定の割合で生じる偽陰性が避けられない。また郭清リンパ節を連続切片で詳細に検討すると、しばしば凍結切片外の部分に微小な転移が潜在しているのが発見される。よってセンチネルリンパ節の転移判定は微小転移をも鋭敏に検出するものでなければならない。

迅速病理診断の偽陰性発生をカバーし、微小転移も鋭敏に検出する方法として、研究開始当時には術中迅速免疫組織化学的染色法や RT-PCR を用いた遺伝子診断が試みられていた。しかし前者でもすべての微小転移の検出は難しく、後者は偽陰性の克服や感度の設定などいまだ研究段階の域を出ない上に、組織学的検証が不可能になるという致命的欠陥を有する。その現状は現在でも同じである。現在はこの2法に加え、RT-LAMPによる微小転移診断が胃癌でも模索されているが、この新法も問題点は RT-PCR と同等なため、普及には至っていない。

早期胃癌患者の術後障害を軽減するには、組織学的に検証可能で微小転移をも反映する、術中迅速病理検索を上回るような、偽陰性の少ない簡便な迅速判定法の確立は急務であるが、研究開始当時も、現在でも、状況は変わっていない。

2. 研究の目的

胃癌センチネルリンパ節生検の臨床応用を普及させることを目的に、後日の病理学的診断が可能で、かつ微小転移まで鋭敏に検出する、術中迅速リンパ節転移診断法を新規開発する。

3. 研究の方法

当初は、抗サイトケラチン抗体標識ナノビーズを用いた迅速ホールマウント免疫染色をリンパ節に施し、マイクロ X-CT にて転移巣を画像化する研究を行う予定であった。

研究は次の段階を経て行う予定であった。

実験 A: ラットリンパ節転移モデルを用いて、抗サイトケラチン抗体標識ナノビーズに

よる迅速ホールマウント免疫染色法を確立し、ならびにマイクロ X-CT の条件設定を行う。

実験 B: 迅速ホールマウント免疫染色による腫瘍量定量の精度を、分子生物学的に評価する。

実験 C: ヒト臨床の進行癌手術材料から得られた郭清リンパ節を用い、迅速ホールマウント免疫染色による微小転移の迅速診断が可能か検討する。

研究途中で、マイクロ CT による微小転移巣可視化が困難であることが判明したため、実験計画は、蛍光検出カメラシステムを用いた多切片断面での転移巣検出へ、さらには Tissue Rinsed Liquid Base Cytology (TRLBC 法) を併用した迅速転移診断法へと変更された。現在でも継続中である。

4. 研究成果

(1) マイクロ CT を用いた転移診断

研究代表者は以前、術中迅速免疫組織化学的染色法の改良法として、抗サイトケラチン抗体標識ナノクリスタルビーズを用いた術中迅速蛍光免疫・HE 2 重染色法を開発、報告した (Ojima T, Kinami S, et al. Sentinel node 2008, Sydney)。研究開始時には、それをさらに推し進めた形での、リンパ節にホールマウント免疫染色を施して微小転移巣を検出する診断法が可能かの研究に着手した。ナノクリスタルビーズを抗サイトケラチン抗体で標識する。この標識ビーズを用いてリンパ節にホールマウント迅速免疫染色を施し、マイクロ CT を用いて転移巣を 3 次元的に可視化することをゴールに置いた。

実験 A の動物実験に着手する前に、マイクロ CT の解像度でどの程度までの転移巣の可視化が可能か、およそその目処を立てるべく、ヒトリンパ節の立体画像化を試みた。胃癌患者手術材料から得られたヒト胃癌転移リンパ節と正常リンパ節を用い、マイクロ CT でリンパ節をスキャンし 3D 構築した。マイクロ CT は東芝 IT コントロールシステム社で開発中であった超高分解能のマイクロ CT 装置を使用した。理論的には $4\mu\text{m}$ 程度の分解能を持つように X 線強度・テーブル移動速度・試料検出器距離が設定された装置である。

しかし実際に測定画像化を試みると、幾つもの問題に直面した。隣接する物体間で X 線の吸収率に差がないと CT での画像化は困難である。リンパ節の内部構造はリンパ球からなる皮質・髄質と、支持組織である被柱、さらに辺縁洞・類洞・さらに被膜や出入するリンパ管からなるが、これらが概ね同じ X 線吸収率を示し、得られた画像はほぼ無構造なものであった。転移リンパ節も同様の画像で、リンパ節と転移巣は分離できなかった。リン

パ節内の構造がある程度画像化できないのでは、ホールマウント染色の SN 比が高くない場合に診断精度が担保できなくなる。今一つの問題は、画像処理に要する時間である。高解像度の 3D 画像を得るには、スキャン時間も画像処理時間も数時間を要し、術中迅速診断に用いる程度の短時間では質の高い画像が得られないものと結論せざるを得なかった。この 2 点は、X 線の条件と 3D 構築の解像度の条件を様々に変更して検証したが、クリアする見通しは立たなかった。

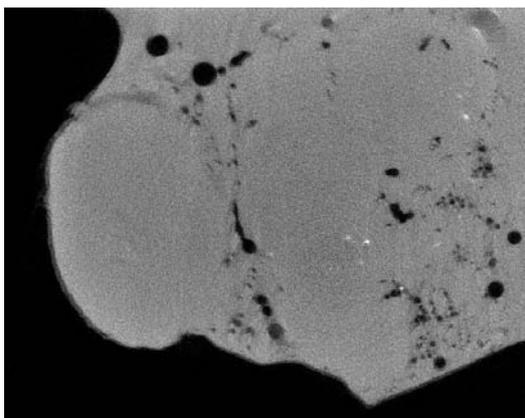


図 1 マイクロ CT で得られたリンパ節転移巢の画像 転移巢の分離が得られない

この時点で、研究は計画変更を余儀なくされた。マイクロ CT での画像化を行う前に、転移巢の光学的検出から開始することに方針転換した。ラットリンパ節転移モデルからは大きな実験材料が得られず光学的検出にはやや不向きである。また実験 A・B はマイクロ CT での転移巢検出が条件である以上、実験動物を使用することは倫理的に問題がある。一方で教室は外科であり、手術材料をコンスタントに入手できるため、まずは癌患者から得られた転移リンパ節を使用して、抗体標識ビーズを用いたホールマウント染色の方法確立を優先させることにした。

(2) ホールマウント免疫染色

抗サイトケラチン抗体標識ナノビーズによるヒトリンパ節の転移巢のホールマウント免疫染色による染色技術の確立を研究した。ナノビーズに抗体を標識する方法は既報通りに行った。ビーズの蛍光検出には、マクロズーム蛍光実体顕微鏡がベストであるが、代替として蛍光検出カメラシステムの設定を一部変更して使用した。

まずはそのままホールマウント染色を試みたが、リンパ節被膜に手を加えない状態でのビーズの浸透には問題があり、リンパ節を 2mm 程度の間隔で多切片にする必要性が明らかとなった。多切片にし、振盪を加えるとビーズは深部まで到達したが、今度は転移巢に

結合しなかったビーズの wash out が問題となった。ビデオカメラシステムの解像度や励起光の光量の調節も試みたが、ノイズも強く、micrometastasis 程度の転移巢の検出には目処が付いたが、それを下回るサイズの転移巢の検出は困難であった。術中迅速凍結切片の診断精度を上回る簡便な方法が確立する可能性は低く、ホールマウント染色での微小転移検出は断念した。



図 2 ホールマウント免疫染色によるリンパ節転移の画像化 大きな転移巢は検出できた。しかし小さな転移巢の検出は SN 比が悪く困難であった。

(3) TRLBC の応用

再度の方向転換を余儀なくされた研究であるが、目的はリンパ節微小転移巢の術中迅速診断であり、現在は TRLBC 法を試みている。

TRLBC 法は、一部施設で乳癌のセンチネルリンパ節の術中迅速転移診断に用いられている新しい方法である。リンパ節の多切片を作成、これを保存液に浸し振盪、剥離した細胞を含んだ細胞浮遊液の迅速細胞診を行い転移診断とする方法である。従来の捺印細胞診と大きく異なり、極めて高い転移検出感度と正診率が特徴である。

現在教室では、TRLBC 法が消化器癌のリンパ節転移でも同様の高い転移検出感度を示すか、また特異度を改善することができるかを検証すべく、抗体標識ビーズを用いた迅速免疫染色を併用する方法の開発に着手した。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] なし
[学会論文] なし

[その他]
ホームページ等 なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

木南 伸一 (KINAMI SHINICHI)

金沢医科大学・医学部・准教授

研究者番号：00397184