

平成 28 年 5 月 27 日現在

機関番号：16101
研究種目：基盤研究(C) (一般)
研究期間：2013～2015
課題番号：25462178
研究課題名(和文) 肺癌患者における術中胸膜浸潤の蛍光診断と胸膜下ルートを通るリンパ節転移の解明

研究課題名(英文) Autofluorescence diagnosis of visceral pleural invasion and demonstration of the subpleural pathway of lymph node metastasis in patients with non-small cell lung cancer.

研究代表者
滝沢 宏光 (TAKIZAWA, Hiromitsu)
徳島大学・大学病院・講師

研究者番号：90332816
交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：術中の胸膜浸潤診断に自家蛍光を用いることで正診率が向上することを示した。蛍光内視鏡所見とHE染色標本の蛍光顕微鏡所見は、胸膜浸潤部位において同様の所見を呈しており、肺癌の胸膜浸潤部における自家蛍光減弱は癌の浸潤性を反映している可能性を組織学的に示すことができた。胸膜の自家蛍光の変化にcollagen, fibronectinが関与している可能性がある。肺癌切除症例を対象とした後ろ向き検討では、リンパ節転移は胸膜浸潤症例で有意に多く、胸膜浸潤症例にスキップ転移も多いことが示された。術中に胸膜下に注入したICGの蛍光を観察することで、スキップ転移経路を可視化できる可能性も示すことができた。

研究成果の概要(英文)：We demonstrated that intraoperative autofluorescence findings of visceral pleura improved the diagnostic accuracy of visceral pleural invasion. The findings of visceral pleura using autofluorescence endoscopy and autofluorescence microscopy (hematoxylin and eosin stain specimen) were similar, and pathologic examination revealed that attenuation of autofluorescence at the visceral pleural invasion reflected the invasiveness of cancer. Collagen I and fibronectin were candidate proteins which were involved in the change of autofluorescence at the visceral pleura. In a retrospective study for resected lung cancer, there were significantly many cases with lymph node metastasis and skip metastasis within the cases with visceral pleural invasion. We could visualize subpleural lymphatic flow direct to N2 station which was seemed to be route of skip metastasis using indocyanine green fluorescence endoscopy.

研究分野：呼吸器外科学

キーワード：肺癌 胸膜浸潤 蛍光診断 5-ALA 自家蛍光

1. 研究開始当初の背景

予後不良因子である胸膜浸潤と積極的縮小切除の適応について

胸膜浸潤を伴う肺癌は予後不良であり、肺癌取扱い規約第7版からは、腫瘍径が3cm未満であっても胸膜浸潤があるとT2aとなり、病期IB以上に分類されることとなった。また、腫瘍が2cm以下であっても胸膜浸潤は予後不良因子と報告されている。胸膜浸潤が予後不良因子である理由としては、胸膜下に豊富に存在するリンパ管に浸潤した癌がリンパ節転移を起こすことが一因と考えられており、胸膜下のリンパ管は肺癌にしばしば認められるスキップ転移(肺内、肺門リンパ節転移を伴わない縦隔転移)の転移経路とも考えられている。

一方、近年小型末梢肺癌に対する積極的縮小手術(区域切除)の治療成績が、標準術式である葉切除と同等であるとの報告が相次ぎ、縮小手術の非劣勢を検証する第相試験(JCOG0802/WJOG4607L)が行われている。臨床試験において、積極的縮小手術の対象とするのは病期IA期患者に限定するのが適切と考えられるが、病期IB以上となる胸膜浸潤に関しては、術前画像診断による正診率は低く、術中の肉眼診断も術者の主観に基づく不確実なものであるため、適格・除外基準に含まれていない。

自家蛍光を用いた胸膜浸潤の客観的評価の可能性

肺癌領域において臨床利用されている蛍光診断法としては、気管支粘膜から発せられる自家蛍光の減弱を探索し、中心性早期肺癌の発見やその進展範囲の同定に繋げる蛍光気管支鏡検査が挙げられる。我々は、この自家蛍光が胸膜にも確認されることに着目し、末梢型肺癌に対する胸腔鏡下手術の際に自家蛍光の減弱を観察することで、胸膜浸潤を客観的に評価できる可能性について報告してきた。

2. 研究の目的

白色光と自家蛍光による術中胸膜浸潤診断の正診率を比較し、自家蛍光診断の有用性を証明する。また、胸膜の自家蛍光減弱が胸膜浸潤診断に有用である理由について組織学的に検討する。さらに、胸膜浸潤とスキップ転移を含むリンパ節転移の関連について検討し、胸膜下リンパ流がスキップ転移の転移経路であることを視覚化する方法を探る。

3. 研究の方法

(1)肺癌手術患者における自家蛍光を用いた術中胸膜蛍光診断

自家蛍光内視鏡による胸膜浸潤診断の有用性について、外科医8名を対象とした検証実験を行った。

2施設の呼吸器外科医8名を対象に、25問のテスト形式でデータを収集。白色光胸膜浸

潤診断は、白色光内視鏡動画および術前CT、組織型の情報から胸膜浸潤の有無を判断した。自家蛍光胸膜浸潤診断は、自家蛍光内視鏡動画から胸膜浸潤の有無を判断した。

症例は胸膜変化を認めた肺癌症例25例。平均年齢67歳(41-81歳)、男/女:12/13、平均腫瘍径26mm(12-46mm)、GGO無/有:13/12、腺癌/扁平上皮癌/その他:18/6/1、p10/1-2:19/6。病理学的胸膜浸潤有(p11≤)無(p10)に対する白色光および自家蛍光の感度、特異度、正診率を評価した。

(2)肺癌の胸膜浸潤部における顕微鏡的自家蛍光の変化と臨床病理学的因子との関連についての検討

術中自家蛍光観察を行った胸膜変化のある肺癌27症例のHE染色標本を用いた。術中自家蛍光内視鏡による自家蛍光減弱-/+:15/12、n-/+:25/2、p1-/+:22/5、ly-/+:22/5であった。蛍光顕微鏡の励起光波長と検出波長は、蛍光内視鏡にあわせて設定した。正常部と癌部それぞれ3カ所の胸膜の自家蛍光強度を画像解析ソフトで定量化した。また、collagen、collagen、fibronectinに対する免疫染色を行い、HE染色標本の自家蛍光強度と対比させることで、胸膜の自家蛍光減弱に関する物質について検討した。

(3)非小細胞肺癌における胸膜浸潤とskipリンパ節転移の検討

2008年1月から2014年12月に当院で施行した原発性肺癌手術症例のうち、縦隔リンパ節郭清を伴う区域切除以上の肺切除症例で胸膜浸潤が組織学的に評価されている332例を対象にリンパ節転移と組織学的胸膜浸潤を含む臨床病理学的因子について検討した。

332例の臨床背景は平均年齢68.1±8.2、男性/女性は209/123、組織型は腺癌230例(69.3%)、扁平上皮癌78例(23.5%)、その他24例(7.2%)でp10/1/2/3は235/57/18/22例。

(4)術中 ICG 蛍光を用いた胸膜下リンパ流の描出

術中に腫瘍近傍の胸膜下にICG2mlを注入し、ICG蛍光内視鏡システムを用いてリンパ流の観察を行い、センチネルリンパ節を同定した。

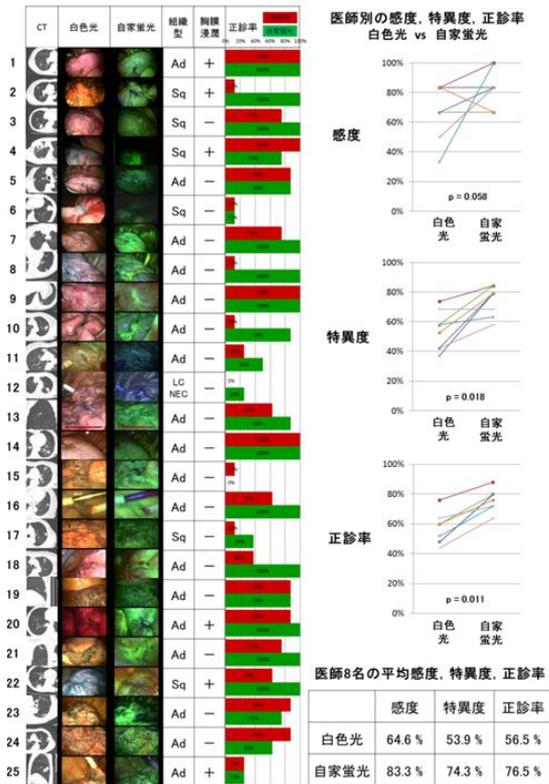
4. 研究成果

(1)肺癌手術患者における自家蛍光を用いた術中胸膜蛍光診断

白色光胸膜浸潤診断の感度は64.6%(33.3-83.3%)、特異度は53.9%(36.8-73.7%)、正診率は56.5%(44.0-76.0%)で、自家蛍光の感度は83.3%(66.7-100%)、特異度は74.3%(57.9-84.2%)、正診率は76.5%(64.0-88.0%)であった。

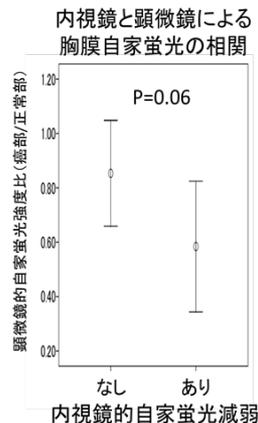
胸膜浸潤診断に自家蛍光内視鏡を用いる

ことで診断能は向上することが示された。



(2) 肺癌の胸膜浸潤部における顕微鏡的自家蛍光の変化と臨床病理学的因子との関連についての検討

蛍光内視鏡で癌部の胸膜に自家蛍光減弱を認めた症例においては、蛍光顕微鏡でも自家蛍光減弱を認める傾向があった(p=0.06)。pI+の症例は pI- に比べ有意に蛍光強度比が低く(0.47 vs 0.81, p=0.05), pI+ または Iy+ の症例では, pI, Iy いずれも-の症例に比べ有意に蛍光強度比が低かった(0.47 vs 0.88, p=0.007)。collagen, fibronectin は正常胸膜には認められ, 自家蛍光減弱部位に一致して発現が低下していた。



肺癌の胸膜浸潤部における自家蛍光減弱は癌の浸潤性を反映している可能性があり, 蛍光内視鏡による胸膜浸潤診断が有用であることを示唆する結果であった。また自家蛍光減弱に関与する物質は collagen, fibronectin である可能性が示唆された。

■ 単変量解析

臨床病理学的因子	n	自家蛍光強度比	p value*	
年齢	<65	11	0.67 ± 0.45	NS
	65≤	16	0.78 ± 0.33	
性別	男性	14	0.59 ± 0.26	0.05
	女性	13	0.88 ± 0.44	
組織型	腺癌	21	0.81 ± 0.39	0.06
	非腺癌	6	0.47 ± 0.22	
リンパ節転移 (n)	(-)	25	0.73 ± 0.39	NS
	(+)	2	0.84 ± 0.16	
胸膜浸潤 (pI)	(-)	22	0.81 ± 0.37	0.05
	(+)	5	0.47 ± 0.30	
リンパ管侵襲 (Iy)	(-)	22	0.77 ± 0.39	NS
	(+)	5	0.57 ± 0.32	
pI or Iy	(-)	19	0.88 ± 0.36	0.007
	(+)	9	0.47 ± 0.29	

* Student t test

■ 多変量解析

臨床病理学的因子	n	自家蛍光強度比	p value*	
性別	男性	14	0.59 ± 0.26	0.517
	女性	13	0.88 ± 0.44	
組織型	腺癌	21	0.81 ± 0.39	0.112
	非腺癌	6	0.47 ± 0.22	
pI or Iy	(-)	19	0.88 ± 0.36	0.009
	(+)	9	0.47 ± 0.29	

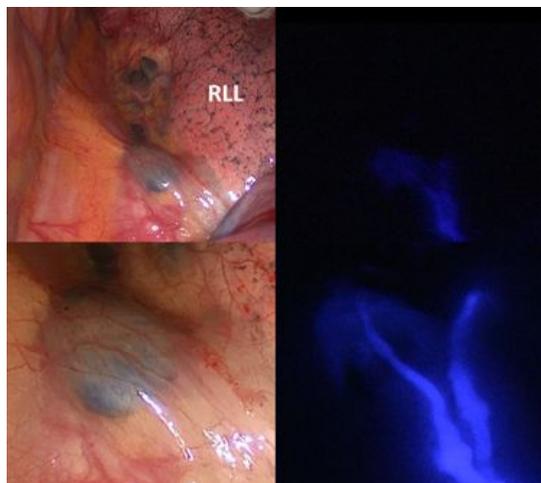
* 重回帰分析

(3) 非小細胞肺癌における胸膜浸潤と skip リンパ節転移の検討

リンパ節転移は胸膜浸潤症例で有意に多かった(11.1% vs 33.0%; p<0.001)。スキップ転移は14例に認め, うち pI0 症例は4例(28.6%), pI1 以上症例で10例(71.4%)であった。また, 組織学的に非腺癌でスキップ転移が多い傾向を認めた(p=0.06)。腫瘍の部位別では右上葉で#2R, #4R, #3p, 右中葉で#2R, #4R, #7, 右下葉で#7, #4R, 左上葉で#4, #5, #6, 左下葉で#7, #9 にスキップ転移を認めた。

(4) 術中 ICG 蛍光を用いた胸膜下リンパ流の描出

胸膜下に注入された ICG は蛍光内視鏡システムで明瞭に描出され, 胸膜下のリンパ流も ICG 蛍光で確認できることがわかった。センチネルリンパ節として摘出した2群リンパ節に転移を認め, 1群リンパ節に転移を認めない skip 転移症例も認めた。



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4件)

滝沢宏光、坪井光弘、梶浦耕一郎、鳥羽博明、中川靖士、川上行奎、吉田光輝、先山正二、近藤和也、森下敦司、河北直也、広瀬敏幸

肺癌の術中胸膜浸潤診断の正確性についての検討,日本呼吸器外科学会誌,査読有,29, 2015,576-581

Hiromitsu Takizawa, Shoji Sakiyama, Mitsuhiro Tsuboi, Akira Tangoku
Demonstration of the skip metastasis pathway for N2 non-small cell lung cancer. J Thorac Cardiovasc Surg, 査読有,147, 2014, e50-52, doi:10.1016/j.jtcvs.2013.12.058

滝沢宏光

肺癌におけるセンチネルノード同定,胸部外科,査読無,67(8),2014,753-757

滝沢宏光

肺癌における sentinel node navigation surgery,外科,査読無,76(4),2014,371-376

[学会発表](計8件)

滝沢宏光、近藤和也、乾友浩、高杉遥、松本大資、河北直也、西野豪志、坪井光弘、梶浦耕一郎、鳥羽博明、川上行奎、吉田光輝、先山正二、丹黒章

胸膜の自家蛍光減弱は肺癌の浸潤性を反映する

第56回日本肺癌学会学術集会,2015年11月26日-28日,パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)

Hiromitsu Takizawa, Kazuya Kondo, Mitsuhiro Tsuboi, Koichiro Kajiura, Tamaki Otani, Hiroaki Toba, Yukikiyo Kawakami, Shoji Sakiyama, Akira Tangoku
Computed Tomography Lymphography by Transbronchial Injection of Iopamidol for Preoperative Non-Small Cell Lung Cancer Patients

16th World Conference on Lung Cancer,2015年9月6日-9日,Denver,Colorado(USA)

Mitsuhiro Tsuboi, Hiromitsu Takizawa, Daisuke Matsumoto, Naoya Kawakita, Koichiro Kajiura, Hiroaki Toba, Yukikiyo Kawakami, Shoji Sakiyama, Kazuya Kondo, Akira Tangoku

The Correlation between Visceral Pleural Invasion in T1a Non-Small Lung Cancer and Lymph Node Metastasis

16th World Conference on Lung Cancer,

2015年9月6日-9日,Denver,Colorado(USA)

滝沢宏光、住友弘幸、坂本晋一、西野豪志、坪井光弘、梶浦耕一郎、鳥羽博明、中川靖士、川上行奎、吉田光輝、先山正二、丹黒章、近藤和也、森下敦司、河北直也、広瀬敏幸

自家蛍光内視鏡による胸膜浸潤診断能の検証
第55回日本肺癌学会学術集会,2014年11月14日-16日,国立京都国際会館(京都府・京都市)

滝沢宏光、近藤和也、梶浦耕一郎、森下敦司、西野豪志、坪井光弘、鳥羽博明、中川靖士、吉田光輝、川上行奎、先山正二、丹黒章

胸膜の自家蛍光を用いた胸膜浸潤の術中診断
第31回日本呼吸器外科学会総会,2014年5月29日-30日,ホテル日航東京(東京都・港区)

森下敦司、滝沢宏光、近藤和也、西野豪志、坪井光弘、梶浦耕一郎、鳥羽博明、中川靖士、吉田光輝、川上行奎、丹黒章、河北直也、広瀬敏幸、住友正幸

胸膜浸潤の術中評価はどの程度正確か

第31回日本呼吸器外科学会総会,2014年5月29日-30日,ホテル日航東京(東京都・港区)

滝沢宏光、近藤和也、梶浦耕一郎、坪井光弘、森下敦司、鳥羽博明、中川靖士、吉田光輝、川上行奎、先山正二、丹黒章

自家蛍光観察による胸膜浸潤の術中診断精度向上にむけた取り組み

第37回日本呼吸器内視鏡学会学術集会,2014年4月14日-15日,国立京都国際会館(京都府・京都市)

滝沢宏光、近藤和也、梶浦耕一郎、坪井光弘、鳥羽博明、中川靖士、吉田光輝、川上行奎、先山正二、丹黒章

肺癌区域切除におけるリンパ節転移と胸膜浸潤の術中診断精度向上に向けた取り組み

第114回日本外科学会定期学術集会,2014年4月3日-5日,国立京都国際会館,グランドプリンスホテル京都(京都府・京都市)

6. 研究組織

(1)研究代表者

滝沢 宏光 (TAKIZAWA, Hiromitsu)

徳島大学・病院・講師

研究者番号: 90332816

(2)研究分担者

近藤 和也 (KONDO, Kazuya)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部・教授

研究者番号: 10263815

先山 正二 (SAKIYAMA, Shoji)
徳島大学・大学院医歯薬学研究部・准教授
研究者番号： 60291986

梶浦耕一郎 (KAJIURA, Koichiro)
徳島大学・大学院医歯薬学研究部・助教
研究者番号： 60596253