

# 論文要旨

## Evaluation of Sentinel Node Concept in Gastric Cancer Based on Lymph Node Micrometastasis Determined by Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction

胃癌における RT-PCR を用いたリンパ節微小転移に基づく  
センチネルリンパ節コンセプトの検証

有上 貴明

### 【はじめに】

Sentinel Node (SN) Concept は、1992 年に Morton D.L. が提唱した概念であり、“腫瘍から最初のリンパ流を受けるリンパ節 (SN) が存在し、癌の微小転移はまずこのリンパ節より生じる”という仮説である。現在、本邦においては乳癌でその臨床応用が行われており、Sentinel Node Navigation Surgery (SNNS) による腋窩リンパ節郭清省略は標準的治療となっている。一方、消化器癌においても SNNS の臨床応用が広く検討され、その有用性が幾つか報告されているが、今後の臨床応用のためには分子生物学的手法を含めたリンパ節転移の正確な術中診断と術前診断に基づく適応の選択が重要である。近年、分子生物学、遺伝子学的手法により少数の癌細胞の検出が可能となってきた。今回、SN navigation を施行した胃癌症例において免疫染色および RT-PCR 法によるリンパ節の微小転移診断を行い、術前・術中診断に基づいて SN concept の検証を行った。

### 【対象と方法】

- 1) 対象;臨床研究として臨床研究倫理委員会の承認ののち、インフォームドコンセントの得られた 2003 年 2 月から 2004 年 8 月までの術前診断 cT1-T2 cN0 切除胃癌 61 症例を対象とした。総リンパ節郭清個数は 1410 個であり、平均リンパ節郭清個数は 23 個であった。
- 2) 方法;手術前日に放射線管理区域内において  $^{99m}\text{Tc}$ -Technetium-Tin コロイドを内視鏡下に腫瘍周囲の粘膜下層 4 カ所へ 0.5ml ずつ注入を行った。手術中は GPS Navigator (TYCO HEALTHCARE 社製) により検索を行い、バックグラウンドの 10 倍以上もしくは最高カウントの 10%以上あるものを Hot Node (HN)として同定を行った。術後も全ての摘出リンパ節を マッピングし、再度線量測定を行い、通常 Hematoxylin-Eosin (HE)染色と免疫染色である Cytokeratin 染色による転移診断に加え、Carcinoembryonic Antigen (CEA) mRNA の 発現を RT-PCR 法により測定し、評価した。

- 3) Cytokeratin 染色;抗サイトケラチン抗体 AE1/AE3 を用い、アルカリフォスファターゼ発色法にて行った。
- 4) RT-PCR 法;CEA をプライマーとして CEA mRNA の発現を LightCycler (Roche 社製) を用いて測定した。

#### 【結果】

- 1) 平均 HN 個数は 4.6 個であり、全例において同定された(同定率 100%)。
- 2) HE 染色におけるリンパ節転移は 61 例中 5 例(8.2%)に認められ、cytokeratin 染色では微小転移を含めたリンパ節転移陽性例は 8 例(13.1%)であった。また、RT-PCR 法では 22 例(36.1%)に陽性であった。
- 3) RT-PCR 法まで含めた転移診断では偽陰性例は 1 例であり(偽陰性率 2.5%)、正診率 98.4%であった。ただし、この偽陰性症例 1 例は術前 cT2 と診断した症例であった。
- 4) Cytokeratin 染色および RT-PCR 法でのみ陽性となった 17 症例(微小転移症例と定義)をみると全例、陥凹型のタイプであり、うち 11 例は 1 群リンパ節に存在したが、残る 6 例は 2 群リンパ節にのみ存在した。

#### 【考察】

SNNS は乳癌においては臨床応用されているが、胃癌においては未だ検証の段階である。しかし、今後 SNNS を臨床応用するにあたっては微小転移を含めたリンパ節転移の正確な診断と術前診断に基づく適応の選択が必要不可欠である。リンパ節微小転移については、近年の免疫組織化学的手法および分子生物学的手法のめざましい進歩により、高頻度に検出されるようになってきた。しかし、その一方でリンパ節微小転移の臨床的意義については現状では一定の見解が得られていない。それ故に、現時点においては臨床応用するにあたりリンパ節微小転移の存在を無視することは不可能である。

これまで胃癌 SNNS に関する論文は散見されるが、RT-PCR まで含めたリンパ節微小転移診断を考慮した臨床的検討は報告されていない。本研究では術前診断に基づき症例を選別し、全症例において免疫染色および RT-PCR によるリンパ節微小転移の検索を行ったが、術前 cT1N0 と診断した症例では正診率は 100%であり、SNNS を臨床応用するためには cT1N0 が適応と考えられた。今後、これらの手法による術中微小転移診断が確立し、早期胃癌において SNNS が臨床応用可能となれば、論理的かつ合理的なリンパ節郭清の個別化や縮小化が可能となり、さらには術後 QOL を考慮した腹腔鏡などの低侵襲手術を実現できるものと考えられる。

# 論文審査の要旨

報告番号	医研 第 6 2 5 号	氏名	有 上 貴 明
審査委員	主 査	中 川 昌 之	
	副 査	吉 田 浩 己	松 山 隆 美

## Evaluation of Sentinel Node Concept in Gastric Cancer Based on Lymph Node Micrometastasis Determined by Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction

(胃癌におけるRT-PCRを用いたリンパ節微小転移に基づく

センチネルリンパ節コンセプトの検証)

早期胃癌に対する外科治療は、根治性を重視した拡大リンパ節郭清から癌の進行度に応じた低侵襲な縮小手術・個別化治療が行われるようになってきた。また、胃癌における早期胃癌症例も急速に増加してきている。このような背景の中でSentinel Node (SN) Conceptの理論が胃癌をはじめとする消化器癌においても臨床応用として検討されるようになってきた。この概念は“腫瘍から最初のリンパ流を受けるリンパ節 (SN) が存在し、癌の転移はまずこのリンパ節より生じる”という仮説である。これまで学位申請者らの教室ではSNに効率よく取り込まれる至適粒子径などの基礎的研究を行ってきたが、今後の臨床応用のためには分子生物学的手法を含めたリンパ節転移の正確な診断が重要である。すなわちリンパ節微小転移の存在診断であり、その臨床的意義に一定の見解が得られていないのが現状である。近年、分子生物学、遺伝子学的手法により少数の癌細胞の検出が可能となってきているが、今回学位申請者らはSN Mappingを施行した術前診断cT1-T2 N0切除胃癌61例において抗サイトケラチン抗体による免疫染色およびCEAをプライマーに用いたRT-PCR法によるリンパ節の微小転移診断を行い、術前診断に基づいてSN conceptの検証を行った。

その結果、本研究で以下の興味ある知見が明らかにされた。

1. 平均 HN 個数は 4.6 個であり、全例において同定された (同定率 100%)。
2. HE 染色におけるリンパ節転移は 61 例中 5 例 (8.2%) に認められ、cytokeratin 染色では微小転移を含めたリンパ節転移陽性例は 8 例 (13.1%) であった。また、RT-PCR 法では 22 例 (36.1%) に陽性であった。
3. RT-PCR 法まで含めた転移診断では偽陰性例は 1 例であり (偽陰性率 2.5%)、正診率 98.4% であった。ただし、この偽陰性症例 1 例は術前 cT2 と診断した症例であった。
4. Cytokeratin 染色および RT-PCR 法でのみ陽性となった 17 症例 (微小転移症例と定義) では全例、陥凹型のタイプであり、うち 11 例は 1 群リンパ節にも存在したが、残る 6 例は 2 群リンパ節にも転移が存在した。

本研究の今後の展開としては、SN Concept が消化器癌においても臨床応用可能となれば、合理的手術はさらに普遍化されるものと思われる。すなわち、微小転移を考慮した内視鏡的治療の適応拡大、腹腔鏡下手術および開腹手術における郭清範囲の縮小化・機能温存手術といった個別化治療が可能になるとと思われる。

本研究は、術前診断に基づき症例を選別し、リンパ節微小転移を考慮した結果として術前 cT1N0 の症例を現時点での Sentinel Node Navigation Surgery (SNNS) の適応とした。また、免疫染色および RT-PCR をリンパ節微小転移検索として用いることで転移を正確に検出可能であることを証明し、SNNS の臨床応用の際のこれらの手法の重要性を示している。今後、これらの手法による術中微小転移診断の早急な確立が望まれる。これまで RT-PCR まで含めたリンパ節微小転移診断を考慮しての臨床的検討は報告されておらず、極めて興味深い研究である。よって本研究は学位論文として十分な価値を有するものと判定した。

# 最終試験の結果の要旨

報告番号	医研 第625号	氏名	有上貴明
審査委員	主査	中川昌之	
	副査	吉田浩己	松山隆美

主査および副査の3名は、平成18年6月27日、学位請求者 有上貴明 君に面接し、学位請求論文の内容について説明を求めると共に、関連事項について試問を行った。具体的には、以下の様な質疑応答がなされ、いずれについても満足すべき回答を得ることができた。

- ① 胃癌においてLymphoscintigraphyはどのように生かされているのか？  
→胃癌においては腫瘍近傍にHot Nodeが検出されることが多い。ただし、2群リンパ節などの比較的腫瘍から遠いリンパ節にも認められることがあり、その際には術前のLymphoscintigraphyにて描出されることもある。術前にHot Nodeを把握することは手術の際のリンパ節郭清の指標となり、有用であると考えている。
- ② これまで学位申請者らの教室ではNested RT-PCRを行ってきたが、今回の本研究においてはReal-time RT-PCRが行われているのはなぜか？  
→これまで当教室にて行ってきたNested RT-PCRでは結果がでるまでに6時間前後の時間を要してきた。術中診断として用いるには時間的な制約があるため、本研究においてはLightCyclerが導入されたこともあり、約2時間で結果がでるハイブリダイゼーションプローブ法によるReal-time RT-PCR法を採用した。
- ③ リンパ節の転移診断に関し、最大割面でのCytokeratin染色を行っているが、多切片での検討は必要ないのか？  
→今回の本研究では、多切片での検討は行っていないが、文献的には多切片でのCytokeratin染色を行うことによりその陽性頻度は増加するとの報告もある。
- ④ RT-PCR陽性のものは、全て本当に癌細胞であるのか？  
→本研究のRT-PCRではプライマーとしてCEAのみを使用した。CEAは上皮系のマーカー（上皮特異抗原）であり、胃癌にも高頻度に発現しているとされている。文献的にはRT-PCRのリンパ節転移診断において偽陽性の報告もあり、必ずしも否定はできない。よって偽陽性を少しでも減らす手法としてPCRのサイクル数を含めたCut off値の設定等が重要であると考えている。また、その他の手段としてmultiple marker (Cytokeratin19など) によるRT-PCR の導入も重要であると考えている。
- ⑤ コロイドのサイズは乳癌の場合と異なるのか？  
→我々は乳癌においてもSNNSを行っているが、コロイドのサイズは今回の本研究で用いた100nmを使用し、良好な臨床結果を得ている。
- ⑥ 具体的にはRIの注入は、どこに行っているのか？  
→腫瘍周囲の粘膜下層に4箇所行っている。
- ⑦ 乳癌の場合はSentinel Nodeが1個とか少ないと思うのだが、胃癌ではどうか？  
→平均3個であった。乳癌は発生学的にリンパ流は腋窩への1方向であることから少ないものと考えられる。一方、胃癌ではリンパ流が複雑であることが知られており、その結果と考えられる。
- ⑧ 乳癌の場合はSentinel Node が少なく、多切片でのリンパ節転移診断が可能と思われるが、胃癌の場合はどうか？  
→胃癌の場合は乳癌と比較するとSentinel Nodeの個数が多いため臨床的には時間と手間がかかると思われる。ただ、多切片での検索を何スライスまで行えば妥当であるのかエビデンスがないのが現状であり、現時点ではRT-PCRを併用することが転移診断能を向上させるものと考えている。
- ⑨ 偽陰性症例の1例について、どのように考えているか？  
→偽陰性症例は術前cT2N0と診断した症例であり、適応とならないと考える。

- ⑩ 免疫染色およびRT-PCR陽性であったリンパ節微小転移症例の予後についてどう考えるか？  
→本研究のリンパ節微小転移症例については現時点では予後に差は認められてはいない。文献的にも微小転移の臨床的意義については一定の見解が得られていないことから現時点では無視できないものと考えている。
- ⑪ 注入するTc-Tinコロイドはその都度、作成しているのか？  
→手術前日にRI室にてその都度、100nmに調合している。
- ⑫ どうして肉眼型の陥凹型のものに微小転移が多いのか？  
→一般に胃癌では形態学的に隆起型に比較し、陥凹型が多い。また同じサイズでも隆起型は陥凹型に比較し、深達度が浅い傾向にあることが知られており、これらのことが関与していると考えている。
- ⑬ 数例において微小転移が2群リンパ節に認められているが、それはなぜか？  
→胃癌においては1群リンパ節を介さない2群リンパ節への転移が10%程度に認められるとの報告があり、これが跳躍転移 (Skip metastasis) と呼ばれている。Mappingの結果ではSNが2群リンパ節にも存在することから、2群リンパ節に直接流入するリンパ流も存在するものと考えている。
- ⑭ 術前cT1N0症例がSNNSの適応となり、cT2N0症例が適応とならない理由はなぜか？  
→術前のリンパ節転移診断を含めた画像診断には限界があり、術前cT2N0と診断した症例でも最終的にはリンパ節転移を伴った進行癌が含まれる可能性が高い。このような症例ではmassiveなリンパ節転移等によりリンパ流が複雑となり、Tc-Tinコロイドが効率よく取り込まれないことを基礎的研究にて確認している。また、注入部位におけるTc-Tinコロイドが腫瘍最深部でのリンパ流を完全にカバーできない可能性も考えられ、現時点では適応外であると考えている。
- ⑮ RT-PCRで検出される程の少ない癌細胞が臨床的に転移となり得るのかどうか？  
→他の文献では無免疫状態のマウスにおいて免疫染色陽性のリンパ節から転移が形成されたとの報告はあるが、免疫を持つ実際の人間においてこれらの数少ない癌細胞が着床・増殖し、転移となっていくのかどうかは今後の検討課題であると考えている。
- ⑯ 本研究では放射性同位元素としてTcを用いているが、それはなぜか？  
→Tcの半減期は6時間と他の放射性同位元素に比較し、短い。そのため患者さんの被曝量を最小限に抑えられることからTcを使用している。

以上の結果から、3名の審査委員は本人が大学院博士課程修了者としての学力と識見を具備しているものと判断し、博士(医学)の学位を与えるに足る資格を有するものと認定した。