

200720007B

厚生労働科学研究費補助金

第3次対がん総合戦略研究事業

肺腺癌の診断および悪性腫瘍度予測のためのAcetate-PETの臨床応用研究

平成18～19年度 総合研究報告書

主任研究者 野 守 裕 明

平成20(2008)年3月

総合研究報告書目次

目 次

I. 総括研究報告	
肺腺癌の診断および悪性腫瘍度予測のための Acetate-PETの臨床応用研究	1
野守 裕明	
II. 研究成果の刊行に関する一覧表	12
III. 研究成果の刊行物・印刷	13

厚生労働科学研究費補助金（第3次対がん総合戦略研究事業）  
（総合）研究報告書

肺腺癌の診断および悪性腫瘍度予測のためのAcetate-PETの臨床応用研究

主任研究者：野守 裕明・熊本大学医学部呼吸器外科教授

研究要旨

肺癌に対するPET診断としてfluorodeoxyglucose (FDG)が使用されているが、FDG-PETの弱点の一つは「高分化腺癌の約60%が陰性となる」ことである。理由は浸潤転移をしにくい高分化腺癌は代謝速度が遅いため糖の一種であるFDGを取り込みにくいからである。一方、<sup>11</sup>C-Acetateは脂肪代謝の研究に使用されていたトレーサーであるが、成長速度が遅くFDG陰性となる前立腺癌や高分化肝癌にAcetate-PETが陽性になることが報告されている。我々はpreliminary なデータとしてFDG-PETに陰性の高分化肺腺癌はAcetate-PETに陽性になることを以前見出した。本研究の目的は肺腺癌におけるAcetate-PETの有用性を検討することである。そのために肺腺癌の術前にAcetate-PETとFDG-PETを行い、両者の陽性率、悪性度増殖度との関係、リンパ節転移診断、EGFR遺伝子変異との関係を比較検討する。

分担研究者氏名・所属機関名及び所属機関における職名

高浪 巖・帝京大学医学部	教授
呉屋 朝幸・杏林大学	教授
小泉 潔・日本医科大学	教授
鈴木 隆・昭和大学医学部 藤が丘病院	教授
富吉 勝美・熊本大学医学部	教授

A. 研究目的

1. 肺腺癌の診断におけるAcetate-PETとFDG-PETの有用性を比較する。
2. 肺腺癌の組織型（肺胞上皮癌、高分化腺癌、中一低分化腺癌）におけるAcetate-PETとFDG-PETの有用性を比較する。
3. 肺腺癌のリンパ節転移診断におけるAcetate-PETとFDG-PETの有用性を比較する。
4. 肺腺癌の悪性度および増殖度の予測におけるAcetate-PETとFDG-PETの有用性を比較する。

5. 腺癌のEpidermal growth factor receptor (EGFR)変異をFDG-PETとAcetate-PETの両結果より予測できるか否かを検討する。
6. 腺癌の多段階発癌におけるEpidermal growth factor receptor (EGFR)変異の意義を検討する。
7. 肺腺癌以外の肺癌の診断におけるAcetate-PETの有用性を検討する。
8. 腺癌術後再発によりゲフィチニブを投与した症例において、原発巣におけるEGFR変異とゲフィチニブ奏功の関連性を検討する。

B. 研究方法

Acetate-PETの検査は各施設の倫理委員会で承諾された平成18年9月から開始された。平成19年12月末で症例登録を締め切った。研究期間中に腺癌197病変、非腺癌32病変（扁平上皮癌27病変、大細胞癌1病変、腺扁平上皮癌2病変、小細胞癌2病変）、良性肺結節57病変に対して術前にAcetate-PETとFDG-PETを行った。

1. 各施設においてAcetate-PETの検査に関して倫理委員会に諮り、平成18年8月には全施設で承認を得た。検査前には患者に十分にそのリスクと利点を説明し、承諾書に署名を頂いた。

2. 肺腺癌の術前にFDG-PETとAcetate-PETを施行し、その結果と病理組織学的所見を検討した。CTにて肺腺癌を疑われた症例、あるいは生検で腺癌と診断された症例で手術を行う症例に対して、術前にFDG-PETとAcetate-PETを施行した。東京地域では西台クリニックで行い、熊本地域では熊本日赤健康管理センターで行った。西台クリニックにはAcetate合成装置が既に設置されていたが、熊本日赤にはAcetate合成装置がなかったため同装置をリースしてAcetateを合成した。Acetate-PETとFDG-PETは同日に行い、Acetate-PET後にFDG-PETを行った。Acetate合成装置により<sup>11</sup>C-Acetateを合成し、125 μCi/kg投与し、10分後にPET画像の撮像を行った。Acetate-PET撮像30分後に<sup>18</sup>F-FDGを125 μCi/kg投与し45分後にPET画像を撮像した。
3. 腫瘍におけるAcetateおよびFDGの集積度の評価は施設間およびPET機器間の差を無くすため、病変の集積度と対側肺の集積度の比(CR: contrast ratio)で算出した。すなわち病変の集積度(SUV: standard uptake value)を「T」とし、その対側肺の集積度を「N」としてSUV-CR=T-N/T+N で評価した。
4. 腺癌197病変と良性肺結節57病変の鑑別におけるAcetate-PETとFDG-PETのROCカーブを描き、それぞれのカットオフ値を決定した。そのカットオフ値に基づくAcetate-PETとFDG-PETの感度と特異度を検討し、両検査の有意差をMcNemar testにて検定した。
5. 腺癌の組織型を肺胞上皮癌、高分化腺癌、中一低分化腺癌に分類し、それぞれの組織型におけるAcetate-PETとFDG-PETの陽性率を比較検討した。
6. 肺腺癌症例において病理診断にてN0の128例とN1あるいはN2の21例において、Acetate-PETとFDG-PETのリンパ節転移診断を比較検討した。
7. 組織学的に判定する腺癌の悪性度である病理病期、リンパ管浸潤、血管浸潤、胸膜浸潤とAcetate集積度およびFDG集積度の関係を調べ、それら組織学的悪性度の予測における両検査の有用性を検討した。対象症例は腺癌134例であり、病理病期(IA期: 116例 vs. IB期以上: 18例)、リンパ管浸潤(陽性: 23例 vs. 陰性: 111例)、血管浸潤(陽性: 23例 vs. 陰性: 111例)、胸膜浸潤(陽性: 16例 vs. 陰性: 118例)におけるAcetateおよびFDG集積度を検討した。
8. 研究開始前にFDG-PET単独が行われた症例においてFDG集積度と相関する腫瘍増殖度のマーカーを探索した。臨床病期Ia期と診断され手術された肺腺癌で1cm以上の症例71例において検討した。術前にFDG-PETを行い、FDGの集積度をSUV-CRで評価した。腫瘍増殖度のマーカーとしてKi-67(monoclonal mouse antibody MIB-1, 1:100 dilution), Cyclin D1(monoclonal mouse antibody DCS-1, 1:50 dilution), P53(monoclonal mouse antibody, D07, 1:400 dilution)の抗体DAKO社より購入して免疫染色を行った。Ki-67はMartinらの方法に従い、4視野以上で1000個以上の腫瘍細胞におけるKi-67陽性細胞を数え、Ki-67 indexとした。Cyclin D1とp53は陽性細胞数と染色度の両方の和より行った。すなわち陽性腫瘍細胞数は0, none; 1, <1/100; 2, <1/100-1/10; 3, 1/10-1/3; 4, 1/3-2/3; 5, >2/3で判定した。染色度は0, none; 1, weak; 2, intermediate; and 3, strongで判定した。その和であるAllred scoreを用いて判定した。
9. 平成18年度の研究結果では肺癌の腫瘍増殖度のマーカーと言われているKi-67(monoclonal mouse antibody MIB-1, 1:100 dilution), Cyclin D1(monoclonal mouse antibody DCS-1, 1:50 dilution), P53(monoclonal mouse antibody, D07, 1:400 dilution)の中では腫瘍内の脈管浸潤と最も相関したものはKi-67 indexであったので、同scoreとAcetateおよびFDG集積度との相関を検討した。Ki-67 indexはMartinらの方法に従い、4視野以上で1000個以上の腫瘍細胞におけるKi-67陽性細胞を数え、Ki-67 indexとした。
10. 腺癌のEGFR遺伝子変異は腺癌の中でも高分化腺癌に頻度が高い報告がある。一方、Acetate(+)とFDG(-)の腺癌は高分化腺癌の可能性が高い。そこでEGFR遺伝子変異をAcetate-PETおよびFDG-PETの結果から予測できるか否かを検討するために、腺癌でFDG(+)Acetate(+), FDG(+)Acetate(-), FDG(-)Acetate(+), FDG(-)Acetate(-)の間におけるEGFR遺伝子変異の頻度を検討した。
11. 腺癌の多段階発癌におけるEGFR遺伝子変異の意義を明らかにするために以下の研究を行った。腺癌の多段階発癌を表す症例は異型腺腫、肺胞上皮癌、腺癌の多発症例である。そこで異型腺腫、肺胞上皮癌、腺癌の多発症例におけるEGFR遺伝子変異を検討した。なおこれら腺癌組織型の分類は1999年WHO分類に従った。

12. EGFR変異の検出はPNA-LNA Clamping法で行い、三菱化学Bio-Chemical Lab, Inc. に外注した。全員の患者から術前にインフォームドコンセントを行い、切除標本の遺伝子変異の検索を行う了承を得た。今回検討を行ったサンプルは1cm以下のGGO病変がほとんどで、1薄切切片あたりの癌細胞の個数が少ないため、正常細胞の混入が多くても高感度に変異を検出できる本方法を用いた。[12, 13] 切除標本のホルマリン固定、パラフィン包埋ブロックを5 $\mu$ mに薄切し、5枚の切片において腫瘍部分を目視にて切り出した。サンプルは200 $\mu$ lのlysis buffer (10mM Tris-HCl pH8.0, 1mM EDTA, 0.5% SDS) と40 $\mu$ gのグリコーゲン、2 $\mu$ lのproteinase K (20mg/ml) とともに56度で一晩incubateした。DNAはphenol-chloroform抽出し20 $\mu$ l TE (10mM Tris-HCl pH8.0, 1mMEDTA)で溶解した。全てのPCR反応は25mmol/L TAPS (PH9.3)を含んだBasic mixture (50mmol/L KCL, 2mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 1mmol/L 2-mercaptoethanol, 200 $\mu$ l/L each of deoxynucleotide triphosphate, and 1.25 units of Takara Ex Taq HS (Takara Bio, Shiga, Japan))にて行った。Conventional PCRにおいては、PCR primer (200nmol/L each)をbasic mixtureに加えた。Peptide nucleic acid-locked nucleic acid (PNA-LNA) PCR clampにはPCR primer (200nmol/L, each)と、fluorogenic probe (100nmol/L each), PNA clamp primer (5 $\mu$ mol/L)がbasic mixtureに加えられた。PCR反応とreal time amplificationはSmart CyclerII (Cepheid, Sunnyvale, CA)を用いて行った。PCRサイクルは95 $^{\circ}$ C30秒ののち、95 $^{\circ}$ C3秒、62度(exon 18, 19)か56度(exon 21)で30秒を45サイクル。PNA-LNA PCR ClampのためのNested PCRは同様の条件でinner primerと1/10(6乗)の第一PCR反応液を加えて行った。DNAの抽出、PNA-LNA Clamping法による変異の検出についてはMitsubishi Kagaku Bio-chemical Laboratories, Inc.にて行った。数値DATAの比較は2-tailed Student t-testにて有意差検定を行った。3群間の比較は、Bonferroni testを行った。カテゴリーDATAの比較はFisher's exact testを用いた。P<0.05を有意と判定した。
13. 非腺癌32例におけるAcetate-PETとFDG-PETの感度と特異度を比較検討した。
14. 腺癌術後再発によりゲフィチニブを投与した症例において、原発巣におけるEGFR変異とゲフィチニブ奏功の関連性を検討した。非小細胞肺癌患者組織40検体(36人の患者からの検体)のEGFR遺伝子変異解析、k-RASコドン12変異解析、EGFR蛋白の免疫染色が終了した。AKT, リン酸化AKT, リン酸化EGFRの解析は継続中である。①EGFR遺伝子変異解析：東京済生会中央病院にて切除された36名の患者から得られたホルマリン固定パラフィン包埋非小細胞肺癌切除組織40検体より、5 $\mu$ m薄切標本を5-10枚作成し、三菱化学BCL株式会社にてDNA抽出およびPNA-LNA PCR Clamping法<sup>1)</sup>によるEGFR遺伝子変異解析(exon19, 21)を依頼した。②K-RASコドン12遺伝子変異解析：①にて得られたDNAを用いて同じく三菱化学BCL株式会社に依頼して、enriched PCR法<sup>2)</sup>による遺伝子変異解析を行った。③①にて作成した薄切標本の連続切片を作製し、EGFRに対するマウスモノクローナル抗体によりABC法を用いた免疫組織化学染色を施行した。具体的には、キシレンにて切片を脱パラフィン後、抗原賦活目的にて、切片をProtease Iにて処理し、Santa CRUZ BIOTECHNOLOGY社のmouse ABC Staining System(sc-2017)を用いて、ABC法による染色を行った。一次抗体にはZYMED Laboratories社のマウスモノクローナル抗体(clone:31G7)を200倍希釈にて使用した。染色性の判定は3段階法を用い、染色の局在(核か細胞質・細胞膜か両方か)と染色の強さ(無しか弱いか強いか)を少なくとも2人の観察者にて行った。遺伝子変異の有無や蛋白発現の有無とゲフィチニブによる治療効果との関連性については、カイ2乗検定を用いて、有意性を判定した。
15. Acetateが腫瘍に集積する機序は未だ解明されていないが、正常細胞では細胞膜における脂質代謝に関連していることが現在までの報告で明らかにされている。すなわち細胞内に取り込まれた酢酸はアセチルCoAに変換され、その多くは中性脂肪酸の合成に使用されると考えられる。合成された中性脂肪酸は細胞膜の構成成分の一つであるホスファチジルコリンの合成に使用される。この合成のKey enzymeの一つとしてコリンキナーゼがある腫瘍ではこのコリンキナーゼの活性または発現量が増加しており細胞膜におけるホスファチジルコリンの合成が亢進し、酢酸の取り込みが増加している可能性が考えられる。そこで免疫染色によりコリンキナーゼおよびホスファチジルコリンの抗体を用いて免疫染色で腫瘍内のそれらの存在とAcetateの集積度の関連を調べ、腫瘍におけるAcetate取り込み亢進の機序を解明する。

### (倫理面への配慮)

Acetate-PETは既に国内のいくつかの施設で行われている検査であり、安全性の高い検査である。各施設において倫理委員会を通して同検査の承認を得た。またEGFR変異の診断においても別件として倫理委員会の承認を得た。ヘルシンキ宣言、厚生省臨床研究の倫理指針試験に関係するすべての研究者はヘルシンキ宣言(2000改訂版)を遵守して試験を実施した。同意の取得にあたっては試験担当医師は対象となる患者に対し、試験の内容、副作用や有害事象などについて別紙説明書、同意書を用いて十分説明した上で、試験への参加について、患者本人の自由意思による同意を文書で得た。この際患者に対して質問の機会、また参加の判断をするのに十分な時間を与えた(同意書の署名を説明の翌日以降にするなどの配慮を行う)。同意文書は試験担当医師および患者が一部ずつ保管した。プライバシーの保護に関しては登録時には原則として、参加施設から登録番号が主任研究者の事務局に伝えられた。登録番号と症例の氏名、ID番号、生年月日などの対照表は院内に厳重に保管した。以後の外部のデータマネジメントにはこの登録番号を用いた。

### C. 研究結果

各施設の倫理委員会で承認が得られたのが平成18年8月であり、同年9月からAcetate-PETの検査が開始された。平成19年12月末までに腺癌197病変、非腺癌病変、良性肺結節57病変が登録された。現段階で得られた結果の概要は以下の点である。

1. 腺癌と良性結節鑑別のためのAcetateとFDG集積度のカットオフ値：腺癌と良性結節の鑑別のためのAcetateおよびFDGの集積度(SUV-contrast ratio)のカットオフ値はAcetate-PETでは0.14、FDG-PETでは0.2であった。
2. 腺癌診断のためのAcetate-PETおよびFDG-PETの感度と特異度：そのカットオフ値では腺癌197病変においてはAcetate-PETの真陽性は137病変、偽陰性は60病変であり、FDG-PETの真陽性は100病変、偽陰性は97病変であった。Acetate-PETの感度は0.70、FDG-PETの感度は0.51であり、McNemar testではAcetate-PETはFDG-PETより有意に高い感度を有した( $p < 0.001$ )。また同カットオフ値では良性肺結節57病変においてはAcetate-PETの真陰性は39病変、偽陽性は18病変であり、FDG-PETの真陰性は45病変、偽陽性は12病変であった。Acetate-PETの特異度は0.68、FDG-PETの特異度は0.79であり、両者間には有意差はなかったが( $p = 0.07$ )、FDG-PETの方が特異度がやや高かった。同カットオフ値では腺癌197病変と良性肺結節57病変を合わせた254病変においてはAcetate-PETの診断が正しかった病変は176病変、正しくなかった病変は78病変であり、FDG-PETの診断が正しかった病変は145病変、正しくなかった病変は109病変であり、Acetate-PETはFDG-PETより有意に高い正診率を認めた(McNemar test:  $p < 0.001$ )。

以上より、腺癌の診断においてAcetate-PETはFDG-PETより有意に優れていることが判明した。

3. 腺癌の各組織型におけるAcetateとFDG-PETの陽性率：腺癌を肺胞上皮癌57病変、高分化腺癌89病変、中一低分化腺癌51病変に分類し、それぞれの組織型におけるAcetate-PETとFDG-PETの結果は以下の如くであった。肺胞上皮癌57病変中FDG-PET陰性は49病変(86%)で、そのうち21病変(43%)がAcetate(+)であった。高分化腺癌89病変中FDG(-)は43病変(48%)で、そのうち24病変(56%)がAcetate(+)であった。中一低分化腺癌51病変中FDG(-)は5病変(10%)で、そのうち4病変(80%)がAcetate(+)であった。すなわち肺胞上皮癌や高分化腺癌においてはFDG(-)であることが多く、そのFDG(-)の肺胞上皮癌や高分化腺癌の約50%がAcetate(+)となり、Acetate-PETの有用性は腺癌の中でも肺胞上皮癌や高分化腺癌で認められた。
4. リンパ節転移診断：病理病期はN0が163例、N1が9例、N2が15例であった。FDG-PETはN0の163例中155例(95%)、N1の9例中1例(11%)、N2の15例中6例(40%)を正確に診断できた。Acetate-PETはN0の163例中155例(95%)、N1の9例中2例(22%)、N2の15例中5例(33%)を診断できた。両PET間にリンパ節転移診断の有意差はなかった。(-)と判断し、両者間に有意差はなかった。
5. 腺癌の組織学的悪性度とAcetateおよびFDG集積度の関係：病理病期IA期とIB期以上におけるFDG集積度(SUV-contrast ratio)はそれぞれ0.24と0.41であり、IB期以上のFDG集積度はIA期より有意に高かった( $p = 0.007$ )。一方、病理病期IA期とIB期以上におけるAcetate集積度(SUV-contrast ratio)はそれぞれ0.18と0.26であり、有意差は無かった( $p = 0.51$ )。リンパ管浸潤(+)と(-)におけるFDG集積度(contrast ratio)はそれぞれ0.49と0.22であり、リンパ管浸潤(+)は(-)より有意にFDG集積度が高かった( $p < 0.001$ )。一方リンパ管浸潤(+)と(-)におけるAcetate集積度(contrast ratio)はそれぞれ0.24と0.20であり、有意差はなかった( $p = 0.12$ )。血管浸潤(+)と(-)におけるFDG集積度はそれぞれ0.50と0.22であり、血管浸潤(+)は(-)より有意にFDG集積度が高かった( $p < 0.001$ )。一方、血管浸潤(+)と(-)におけるAcetate集積度はそれぞれ0.24と0.20であり、有意差はなかった( $p = 0.13$ )。胸膜浸潤(+)と(-)におけるFDG集積度はそれぞれ0.43と0.24であり、胸膜浸潤(+)は(-)より有意にFDG集積度が高かった( $p = 0.013$ )。一方、胸膜浸潤(+)と(-)におけるAcetate集積度はそれぞれ0.24と0.20であり有意差はなかった( $p = 0.25$ )。以上より、腺癌の病理病期IA期の予測にはFDG-PETもAcetate-PETも有用である。しかし腺癌の組織学的悪性度の予測においてFDG-PETは有用であるが、Acetate-PETの有用性は無いことが判明した。

6. 悪性腫瘍度の種々のマーカーとFDG集積度の相関性の検討：以前にFDG-PET単独を施行された臨床病期Ia期肺腺癌の71例において、FDGの集積度(SUV-CR)が肺腺癌の増殖度の指標であるKi-67, PCNA, Cyclin-D1の染色度と関連するかを検討した。病理病期では59例がIa期であり、その他12例はリンパ節転移等が認められ病理病期ではIb期であった。病理病期Ia期とIb期の間でKi-67, Cyclin D1, p-53のscoreを比較した。Ki-67indexではIa期では平均 $9.4 \pm 12.0$ でIb期以上では $18.0 \pm 11.0$ であり、有意にIa期の方がIb期以上よりKi-67 indexが低かった( $P=0.012$ )。Cyclin D1では病理病期Ia期とIb期でそれぞれ $3.9 \pm 1.7$ と $4.1 \pm 1.8$ で有意差が無かった。P53では病理病期Ia期とIb期でそれぞれ $2.6 \pm 2.6$ と $3.3 \pm 3.6$ で有意差が無かった。SUV-CRと相関性が認められたものはKi-67 indexのみであり、有意な相関が認められた( $r=0.42, P=0.0004$ )。そのため今後、本研究においてはKi-67 indexを腺癌の悪性腫瘍度の指標として検討することとした。
7. Ki-67 indexとFDG集積度の相関性の検討：Ki-67 indexはMartinらの方法に従い、4視野以上で1000個以上の腫瘍細胞におけるKi-67陽性細胞を数え、Ki-67 indexとした。FDG集積度(SUV-contrast ratio)とKi-67 indexとの相関係数は0.468であり、明らかな相関が認められたが、Acetate集積度とKi-67 indexとの相関係数は0.327であり軽度の相関が認められたが、FDG集積度との相関係数より低値であった。
8. 非腺癌におけるAcetate-PETの意義：非腺癌32病変と良性結節57病変において非腺癌描出のためのROCカーブ上の集積度のカットオフ値はAcetateでは0.33、FDGでは0.26であった。そのカットオフ値によると非腺癌のFDG(+)は31病変(97%)、Acetate(+)は26病変(81%)であり、両者間に有意差はなかった。
9. Acetate-PETとFDG-PETの結果とEGFR遺伝子変異の関連性：腺癌77病変においてEGFR遺伝子変異を検討した結果、43病変(56%)が変異(+)であった。PETの結果との関係においては、EGFR遺伝子変異(+)症例はFDG(+)Acetate(+)では24/43病変(53%)、FDG(+)Acetate(-)では3/6病変(50%)、FDG(-)Acetate(+)では9/13病変(69%)、FDG(-)Acetate(-)では7/16 ((43%)であり、各パターンにおいてEGFR遺伝子の変異率に差はなかった。
10. 異型腺腫、肺胞上皮癌、高分化腺癌の多発症例におけるEGFR変異：異型腺腫、肺胞上皮癌、高分化腺癌の多発症例27例における切除標本97病変のうち、各症例における組織学的に悪性度の最も高い病変と2番目に高い病変の2病変を選んだ。例えば腺癌、肺胞上皮癌、異型腺腫の3病変を有した症例であれば、腺癌と肺胞上皮癌を選んだ。その結果26症例48病変(異型腺腫10病変、肺胞上皮癌28病変、腺癌10病変)のEGFR遺伝子検索が可能であった。全体の変異率は25病変(52%)であり、高分化腺癌、肺胞上皮癌、異型腺腫の変異率はそれぞれ80%, 57%, 10%であった。高分化腺癌の変異率はその他(肺胞上皮癌と異型腺腫)と比較して有意に高率( $p=0.04$ )であった。そのため腺癌の多段階発癌において腺癌が浸潤性を有する過程においてEGFR遺伝子変異は密接に関連することが示唆された。また2病変を検討できた22症例においては2病変のEGFR遺伝子変異型が同じであった症例は2症例(9%)のみであり、15例(68%)は異なった型の変異、残りの5例は一病変がEGFR遺伝子変異(+)で他の病変が変異(-)であった。すなわち腺癌多発症例において各々の腺癌の発癌機序は異なることが示唆された。
11. 腺癌家系におけるEGFR遺伝子変異：EGFR遺伝子変異を検討した症例のなかに、肺癌の多発家系(父親と兄に肺腺癌発生)の肺腺癌の多発の70歳女性がいた。その腺癌のEGFR遺伝子変異をdirect sequence法(SRL社に外注)により検討した結果、通常見られるexon 21のL858R, L861Qの遺伝子変異以外に、通常には見られないexon 21のV843Iの変異が見られた。そこでその肺組織および白血球におけるEGFR遺伝子変異をdirect sequence法により検出した結果、同様のexon 21のV843Iの変異が認められた。そこで院内倫理委員会の承認を得て承諾書を頂き、患者の兄弟3名の白血球のEGFR遺伝子変異を検出した結果、兄弟3名中2名に同様のEGFR exon 21のV843Iの変異が認められた。このことよりこの家系においてはEGFR exon 21 V843Iの変異が肺癌の家族内発生およびこの患者の腺癌多発に関与していることが示唆された。この症例をきっかけに肺癌家系を有する腺癌症例10例と腺癌多発症例の10例のEGFR遺伝子変異をdirect sequence法で調べたが、このような特殊な遺伝子変異は認められなかった。
12. EGFR変異とゲフィチニブ有効性の関連性の検討：EGFR変異とゲフィチニブの有効性を検討するために外科的に切除した肺腺癌症例で術後再発をしてゲフィチニブを内服した36例について、原発巣におけるEGFR変異とイレッサ有効性の相関を検討した。

その結果、EGFR変異は47%に認められ、術後再発非小細胞肺癌におけるゲフィチニブの奏功と有意な相関が認められた。患者36人はすべて非小細胞肺癌手術後に再発をきたし、ゲフィチニブによる治療を受けた患者である。年齢は中央値で61.5歳(34歳~84歳)、喫煙歴は非喫煙者12人、喫煙者24人であった。手術時の切除肺癌の組織型は、腺癌31例(84%)、扁平上皮癌3例(8%)、大細胞癌1例(3%)、その他2例(6%)であった。その他の組織型は2例とも腺扁平上皮癌であった。①遺伝子変異解析：36例中解析可能であったものは34例であった。解析可能であった34例中16例(47%)にEGFR遺伝子変異を認めた。検出された遺伝子変異は3種類であり、エクソン19の欠失変異2種類(E746-A750 del、L747-S751 del)とエクソン21の1塩基置換変異(L858R)であった。それぞれの変異頻度は、E746-A750 delが10例(29.4%)、L747-S751 delが2例(5.9%)、L858Rが4例(11.8%)であり、従来の報告よりエクソン19の欠失変異の頻度が高く、エクソン21の1塩基置換変異の頻度が低かった。遺伝子変異の有無とゲフィチニブによる抗腫瘍効果(CR/PR対SD/PD)との関連性を、カイ2乗検定にて調べると、有意に遺伝子変異が存在するほうが抗腫瘍効果を示す確率が高いことが示された(p<0.01)。DNAが抽出され、解析可能であった34例においてはK-RASコドン12の変異を1例も検出できなかった。

13. 免疫組織学的解析：遺伝子解析に用いた癌組織標本より、連続切片を作成し、EGFR蛋白を検出する目的で、免疫染色を施行した。36例全例において、免疫染色が可能であった。全くEGFRを発現していないものを陰性と表記し、癌細胞が非常に強く発現しているものを強発現と表記した。癌細胞がEGFR蛋白を発現しているが、その発現が明らかに弱いということ、2人の評価者がそろって判定したものは弱発現と表記した。陰性は染色性なし、強発現・弱発現をあわせて染色性ありと判定した。36例中22例(61%)にてEGFRの染色性を認めたが、すべて細胞質・細胞膜の発現であり、核での蛋白発現は認めなかった。蛋白染色性の有無とゲフィチニブによる抗腫瘍効果(CR/PR対SD/PD)との関連性を、カイ2乗検定にて調べたが、有意な関係は示されなかった。
14. コリンキナーゼおよびホスファチジルコリンの抗体を用いた免疫染色では、コリンキナーゼおよびホスファチジルコリンのコントロールとなり得る腫瘍組織あるいは正常組織が見出せなかったため、この研究は研究期間内にはできなかった。今後、さらにこの研究に関しては続行する予定である。

## D 考察

### ①Acetate-PETおよびFDG-PETの腺癌の診断能の比較

腺癌の描出においてAcetate-PETはFDG-PETより優れていることが判明した。さらに腺癌の中でもFDG(-)の肺胞上皮癌と高分化腺癌の約50%がAcetate(+)となることが判明した。FDG(-)の腺癌にAcetate(+)となる理由として考えられるのは以下の如くである。Acetateの代謝経路は細胞内において一方ではTCAサイクルに入り糖代謝に利用されるが、もう一方では脂質代謝に利用され細胞膜の合成に利用されることが報告されている。そのため肺胞上皮癌や高分化腺癌においてFDG(-)Acetate(+)となる理由はおそらく肺胞上皮癌や高分化腺癌は増殖速度が遅いので糖代謝が低くFDG(-)となるが、細胞膜の合成は盛んに行われているため、Acetate(+)になることが考えられる。但し肺胞上皮癌および高分化腺癌においてもAcetate(-)の症例が存在し、その原因としては①Acetate(+)の症例に比べてさらに脂質代謝あるいはそれに伴う細胞膜合成が低いこと、②細胞自体に集積はあるがGGOのCT画像で代表されるように腫瘍細胞の密度が極めて低いためにPETカメラに写らない事が考えられる。

### ②腺癌のリンパ節転移診断：

同診断において、Acetate-PETとFDG-PETの間に差はなかった。Acetate-PETはFDG-PETより腺癌の描出に優れているので、当初は転移の診断においてもAcetate-PETの方がFDG-PETより優れている可能性を想定したが、両者はリンパ節転移診断において同等であった。理由は以下のことが考えられる。リンパ節転移する腺癌細胞は浸潤転移能が高く糖代謝も高いので、そのような腺癌細胞の転移巣はFDG-PETで描出できるので、Acetate-PETとの差が無かったことが考えられる。

### ③腺癌の組織学的悪性度とAcetate-PETの関連性：

腺癌の組織学的悪性度の指標である病理病期、腫瘍内リンパ管浸潤、血管浸潤、胸膜浸潤においてFDG集積度は関連があることが報告されている。また腫瘍増殖度のマーカーであるKi-67 indexとFDG集積度も関連があることが報告されている。しかし本研究の結果ではAcetate集積度は病理病期とは関連したが、その他の組織学的悪性度およびKi-67 indexとの関連がなかった。理由は以下のことが考えられる。糖代謝は腫瘍細胞の増殖浸潤度と関連するが、脂質代謝による細胞膜合成は腫瘍の増殖浸潤度と関連が無いことが考えられる。そのため糖代謝と脂質代謝の両方を描出するAcetateの集積度は増殖浸潤度と相関しないことが考えられる。



以上の結果をふまえ、多発GGO症例の治療方針について以上の内容を提案する。①1cm以下のpure GGO結節に関してはAAHもしくはpure BACの可能性が高く、CTによって定期的にfollow upを行う。短期間に増大するものや内部に高吸収域を伴ってきた場合は切除を行う。②多発結節のうち内部に高吸収域を伴うものは浸潤性の高分化腺癌を含有する可能性を考え、切除する。同側のGGOに関しては可能な限り同時に切除を目指す。対側の病変に関しては1cm以下、pure GGOであればfollow upとする。③多発GGOの症例において浸潤癌が多発し、肺機能その他の理由によって完全切除が不能である場合はEGFR遺伝子変異陽性の可能性が高く、チロシンキナーゼインヒビターの適応が考慮される。但し多発の肺胞上皮癌に対してはそれほどEGFR遺伝子変異の可能性はそれほど高くないので、同薬剤の効果はあまり期待できない。結論として、今回の我々の研究により多発GGO症例の腫瘍の悪性度とEGFR遺伝子変異との間には密接な関連性が存在した。EGFR遺伝子変異は多発GGOの発生には関与しておらず、多発GGO症例における各個の結節の悪性度上昇に関与していることが示唆された。更なる研究により、多発GGO症例に対する治療のガイドラインの設定と、肺内にGGO病変が多発する遺伝的、環境的背景の解明が望まれる。

#### ⑤EGFR遺伝子変異とAcetate-PETの関連性：

本研究の結果ではその関連性はなかった。そして肺胞上皮癌は前述した如く高分化腺癌よりEGFR遺伝子変異を有する確率が低いことが研究中に判明した。一方、肺胞上皮癌は腫瘍細胞の密度が低いのでAcetate(-)になることが多い傾向があることも研究中に判明した。そのため、仮説としてAcetate(+)の腺癌はAcetate(-)の腺癌より高分化腺癌である可能性が高いので、EGFR遺伝子変異を有する可能性があり、そうであればチロシンキナーゼインヒビターの効果を予測できるのではないかと考えた。しかし研究結果としてAcetate(+)と(-)の間にEGFR遺伝子の変異率は差がなかった。PETは代謝を見るには優れた機器であるので、今後他の方法を用いて分子標的治療薬の効果を予測できるトレーサーの開発が望まれる。

⑥肺癌家系におけるEGFR遺伝子変異：肺癌の多発した一家系においてEGFR遺伝子変異を正常組織においても有する症例があったが、他の肺癌多発の10症例の正常肺組織の遺伝子変異を調べても変異はなかった。肺癌の家族発生症例を時折経験するが、肺癌の発癌機序を解明する上にも家族発生における多方面からの研究が望まれる。

#### ⑦非腺癌におけるAcetate-PETの意義：

腺癌においてはAcetate-PETはFDG-PETより優れていることが判明したが、非腺癌症例においてはAcetateとFDGの間に差はなかった。非腺癌においては既にFDG-PETの陽性率が高く、Acetate-PETの意義は少ないと言える。

⑧従来の報告通り、ゲフィチニブの奏功とEGFR変異には深い関連が認められた。次年度はゲフィチニブの奏功率と相関のあるEGFR変異をFDG-PETとAcetate-PETの結果より予測できるか否かを検討する。すなわち我々の今回出したpreliminaryなデータとして肺胞上皮癌より浸潤性のある高分化腺癌でEGFR変異が明らかに多くなることが認められた。また別のpreliminaryなデータとして、肺胞上皮癌では多くの場合FDG(-) Acetate(-)であり、高分化腺癌ではFDG(-) Acetate(+)の事が多い傾向が認められている。そのためFDGおよびAcetateの結果より肺胞上皮癌と高分化腺癌の鑑別を行い、ひいてはEGFR変異、ゲフィチニブの有効性を予測できる可能性を検討する。肺腺癌症例においてFDG-PETとAcetate-PETよりEGFR変異を予測できれば、ゲフィチニブ投与適応決定のために組織生検をする必要がなくなる可能性がある。

#### 今後の研究で期待される研究成果

1. Acetate-PETはFDG-PETより腺癌を高率に診断できる。その有用性は特に肺胞上皮癌や高分化腺癌のように悪性度の低い腺癌において高く認められた。そのため今後、他の固形腫瘍においても悪性度の低い癌における診断としてAcetate-PETは期待できる。
2. 今回使用したAcetateは<sup>11</sup>Cで標識したが、同アイソトープは半減期が20分と短いため、腫瘍細胞内に充分に取り込まれていない可能性がある。そこで我々は現在、<sup>18</sup>Fで標識したAcetateを合成精製している。<sup>18</sup>F-Acetateは半減期が2時間であるので、<sup>11</sup>C-Acetateより投与後長時間してからPET撮像できる。そのため<sup>18</sup>F-Acetateは<sup>11</sup>C-Acetateより腫瘍の陽性率が高くなる可能性がある。今後、<sup>18</sup>F-Acetateを合成精製して、担癌マウスにおけるPET撮像を行い、<sup>11</sup>C-Acetateと比較することを計画している。<sup>18</sup>F-Acetateの有用性が認められれば、将来デリバリーも可能となり、一般応用できる可能性がある。
3. Acetateが腫瘍に集積する機序を研究期間において解明することはできなかったが、Acetateが正常細胞では細胞膜における脂質代謝に関連していることが現在までの報告で明らかにされている。すなわち細胞内に取り込まれた酢酸はアセチルCoAに変換され、その多くは中性脂肪酸の合成に使用されると考えられる。合成された中性脂肪酸は細胞膜の構成成分の一つであるホスファチジルコリンの合成に使用される。この合成のKey enzymeの一つとしてコリンキナーゼがある腫瘍ではこのコリンキナーゼの活性または発現量が増加しており細胞膜におけるホスファチジルコリンの合成が亢進し、酢酸の取り込みが増加している可能性が考えられる。そこで免疫染色によりコリンキナーゼおよびホスファチジルコリンの抗体を用いて免疫染色で腫瘍内のそれらの存在とAcetateの集積度の関連を調べ、腫瘍におけるAcetate取り込み亢進の機序を解明する。今後、Acetateの腫瘍における集積の機序を解明する研究を続け、腫瘍診断および悪性度診断におけるAcetate-PETの有用性を明らかにする予定である。

#### E. 結論

本研究の最大の目的である「腺癌の診断と悪性腫瘍度予測における Acetate-PET の有用性の検討」は①Acetate-PET は FDG-PET より腺癌の診断能が高い、②Acetate-PET では腺癌の悪性度を予測できない、という結果を得ることができ研究の目的は十分に果たした。

#### F. 健康危険情報

Acetate-PETの検査により合併症や危険性はなかった。AcetateはFDGに比べて半減期が1/6であるので、被曝はまったく問題がない。他の施設におけるAcetateをはじめとするいくつかのトレーサーを用いたPET検査でも合併症及び危険性は報告されていない。

## G. 論文発表

1. Nomori H, et al. Omission of mediastinal lymph node dissection in lung cancer. *Ann Thorac Cardiovasc Surg.* 2006; 12:83-8
2. Ohtsuka T, Nomori H, et al. FDG-PET imaging for lymph node staging and pathologic tumor response after neoadjuvant treatment of non-small cell lung cancer. *Ann Thorac Cardiovasc Surg.* 2006; 12:89-94.
3. Watanabe K, Nomori H, et al. F-18 fluorodeoxyglucose positron emission tomography can predict pathological tumor stage and proliferative activity determined by Ki-67 in clinical stage IA lung adenocarcinomas. *Jpn J Clin Oncol.* 2006; 36:403-9.
4. Ohtsuka T, Nomori H, et al. Prognostic significance of 18-F fluorodeoxyglucose uptake on positron emission tomography in patients with pathologic stage lung adenocarcinoma. *Cancer* 2006; 107:2468-73.
5. Ebihara A, Nomori H, et al. Characteristics of advantages of positron emission tomography over computed tomography for N-staging in lung cancer patients. *Jpn J Clin Oncol.* 2006; 36:694-8.
6. Kaji M, Nomori H, et al. 11C-acetate and 18F fluorodeoxyglucose positron emission tomography of pulmonary adenocarcinoma. *Ann Thorac Surg* 2007; 83:312-4.
7. Takanami I. Lymphatic microvessel density using D2-40 is associated with nodal metastasis in non-small cell lung cancer. *Oncol Rep.* 2006; 15:437-42.
8. Okamoto J, Koizumi K, et al. Dissimilarity in gene expression profiles of lung adenocarcinoma in Japanese men and women. *Genet Med* 2006; 3: 223-35.
9. Ohtsuka K, Goya T, et al. Abnormalities of epidermal growth factor receptor in lung squamous cell carcinomas, adenocarcinomas, and large cell carcinomas. *Cancer* 2007; 109:741-50.
10. Ohnishi H, Goya T. A simple and sensitive method for detecting major mutations within tyrosine kinase domain of epidermal growth factor receptor gene in non-small cell lung carcinoma. *Diagn Mol Pathol* 2006; 15:101-8.
11. Nomori H, Ikeda K, Mori T, Kobayashi H, Iwatani K, Kawanaka K, Shiraishi S, Kobayashi T. Sentinel node navigation segmentectomy for c-T1N0M0 non-small cell lung cancer. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 2007; 133:780-5.
12. Kobayashi S, Sakashita N, Okuma T, Nomori H, et al. Class A scavenger receptor (CD204) attenuates hyperoxia-induced lung injury by reducing oxidative stress. *J Pathol* 2007; 212:38-46.
13. Mori T, Nomori H, et al. Microscopic-sized "microthymoma" in patients with myasthenia gravis. *Chest* 2007; 131:847-9.
14. Mori T, Nomori H, et al. Three cases of multiple thymoma with a review of the literature. *Jpn J Clin Oncol.* 2007; 37:146-9.
15. Ikeda K, Nomori H, et al. Successful steroid treatment for fibrosing mediastinitis and sclerosing cervicitis. *Ann Thorac Surg* 2007; 83:1199-201.
16. Ikeda K, Nomori H, et al. Impalpable pulmonary nodules with ground-glass opacity: Success for making pathologic sections with preoperative marking by lipiodol. *Chest* 2007; 131:502-6.
17. Mori T, Nomori H, et al. The distribution of parenchyma, follicles, and lymphocyte subsets in thymus of patients with myasthenia gravis, with special reference to remission after thymectomy. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2007; 133:364-8.
18. Yoshioka M, Mori T, Nomori H. The efficacy of epidural analgesia after video-assisted thoracoscopic surgery: a randomized controlled study. *Ann Thorac Cardiovasc Surg* 2006; 12:313-8.
19. Iwatani K, Kubota I, Nomori H, et al. *Sparganum mansoni* parasitic infection in the lung showing a nodule. *Pathol Int* 2006; 56: 674-7.
20. Ohtsuka T, Nomori H, et al. Obstructive subglottic granuloma after removal of a mini tracheostomy tube. *Ann Thorac Cardiovasc Surg* 2006; 12:265-6.
21. Watanabe K, Nomori H, et al. Usefulness and complications of computed tomography-guided lipiodol marking for fluoroscopy-assisted thoracoscopic resection of small pulmonary nodules: experience with 174 nodules. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2006; 132:320-4.
22. Ohtsuka T, Nomori H, et al. Isolated unilateral absence of a pulmonary artery treated by pneumonectomy in an adult: report of a case. *Surg Today* 2006; 36:525-7.
23. Mori T, Yoshioka M, Nomori H, et al. Kissinger pleural metastases from metastatic osteosarcoma of the lung. *Ann Thorac Cardiovasc Surg* 2006; 12:129-32.
24. Ohtsuka T, Nomori H, Watanabe K, Naruke T, Suemasu K, Kosaka N, Uno K. Positive imaging of thymoma by 11C-acetate positron emission tomography. *Ann Thorac Surg.* 2006 Mar;81:1132-4.

25. Takanami I. Endoscopic drainage of an infected giant bulla. *Interactive Cardiovascular and Thoracic Surgery* 2006; 5:794-795.
26. Ohtsuka K, Ohnishi H, Goya T, et al. Clinical-pathological and biological significance of tyrosine kinase domain gene mutations and overexpression of epidermal growth factor receptor for lung adenocarcinoma. *J Thorac Oncol* 2006; 1:787-95.
27. Ikeda K, Nomori H, Mori T, et al. Size of metastatic and nonmetastatic mediastinal lymph nodes in non-small cell lung cancer. *J Thorac Oncol* 2006; 1:949-52.
28. Ikeda K, Awai K, Mori T, Kawanaka K, Yamashita Y, Nomori H. Differential diagnosis of ground-glass opacity nodules: CT number analysis by three-dimensional computerized quantification. *Chest* 2007; 132:984-90.
29. Mori T, Nomori H, Yoshioka M, et al. Treatment of a fractured ultraflex stent causing tracheal Stenosis. *Ann Thorac Cardiovasc Surg* 2007; 13:195-7.
30. Nomori H, et al. Sentinel node identification in clinical stage Ia non-small cell lung cancer by a combined single photon emission tomography. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2007; 134:182-7.
31. Ikeda K, Nomori H, Mori T, et al. Novel germ line mutation, EGFR V843I in a patient with multiple lung adenocarcinomas and family members with lung cancer. *Ann Thorac Surg*, 2008 (in press).
32. Ikeda K, Awai K, Mori T, Kawanaka K, Yamashita Y, Nomori H. Differential diagnosis of ground-glass opacity nodules: CT number analysis by three-dimensional computerized quantification. *Chest*, Reply to Editors. 2008 (in press)
33. Ikeda K, Nomori H, Ohba Y, et al. EGFR mutations in multicentric lung adenocarcinomas and atypical adenomatous hyperplasias. *J Thorac Oncol* 2008, (in press).
34. Nomori H, Mori T, Ikeda K, et al. Diffusion-Weighted Magnetic Resonance Imaging Can Be Used in Place of Positron Emission Tomography for N-Staging of Non-Small Cell Lung Cancer with Fewer False-Positive Results. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 2008, (in press).
35. Mori T, Nomori H, Ikeda K, et al. Diffusion-Weighted Magnetic Resonance Imaging for diagnosing malignant pulmonary nodules/masses: Comparison with Positron Emission Tomography. *J Thorac Oncol* 2008, (in press).
36. Yoshioka M, Nomori H, Mori T, et al. Extrapleural Pneumonectomy via Lower Door Open Thoracotomy with Reconstruction of Diaphragm and Pericardium by Reversed Latissimus Dorsi Muscle Flap and Fascia Lata Graft for Mesothelioma. *Surg Today* 2008 (in press).
37. Yoshioka M, Nomori H, Mori T, et al. A case of pleuritis carcinomatosa in which preoperative FDG-PET CT showed positive uptake. *Jap J Chest Surg*. 2008 (in press).
38. Nomori H, Ikeda K, Mori T, Kobayashi H, Iwataani K, Kawanaka K, Shiraishi S, Kobayashi T. Sentinel node navigation segmentectomy for c-T1N0M0 non-small cell lung cancer. *J Thorac Cardiovasc Surg*, Reply to the Editors. 2008 (in press).

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

該当無し。

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の 編集者名	書 籍 名	出版社名	出版地	出版年	ページ
該当無し							

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
該当無し					

# Omission of Mediastinal Lymph Node Dissection in Lung Cancer: Its Techniques and Diagnostic Procedures

Hiroaki Nomori, MD, PhD, Kazunori Iwatani, MD, Hironori Kobayashi, MD, Atsushi Mori, MD, and Shouichi Yoshioka, MD

To reduce or omit a mediastinal lymph node dissection in the patients with clinical stage I non-small cell lung cancer (NSCLC), several authors examined the prevalence of metastatic sites of lymph nodes. Because lymphatic drainage usually heads for the upper mediastinum in upper lobe cancer and for the lower mediastinum in lower lobe cancer, upper and lower mediastinal lymph node dissection could be reduced in lung cancers of lower lobe and upper lobe.

By using sentinel node (SN) navigation surgery, it is possible to omit mediastinal lymph node dissection. Radiological findings are also useful to determine reduction of mediastinal lymph node dissection. In clinical stage Ia adenocarcinomas that show ground glass opacity (GGO) findings on computed tomography (CT) or negative for fluorodeoxyglucose accumulation on positron emission tomography (PET), mediastinal lymph node dissection can be omitted, because these types of adenocarcinomas rarely metastasize to the lymph nodes. By using these procedures, mediastinal lymph node dissection can be reduced or omitted with little risk of local recurrence. (*Ann Thorac Cardiovasc Surg* 2006; 12: 83–8)

**Key words:** lung cancer, lymph node dissection, sentinel node, positron emission tomography, computed tomography

## Introduction

Mediastinal lymph node dissection is a procedure used to secure complete local control of non-small cell lung cancer (NSCLC), with subsequent improvement in survival as well as nodal staging.<sup>1-5)</sup> However, how many patients with clinical stage I will be advantaged by mediastinal lymph node dissection? It has been stated that 20-25% of patients with clinical stage I disease have mediastinal lymph node metastases<sup>1-5)</sup> and that 20-25% of them

may be cured by mediastinal lymph node dissection.<sup>6)</sup> Hence, only 5% of patients with clinical stage I disease may benefit from mediastinal lymph node dissection.

To minimize damage caused by mediastinal node dissection in patients with clinical stage I NSCLC, several authors examined the characteristics of lymphatic drainage, as well as the incidence of lymph node metastasis. This was undertaken with respect to the location of the primary tumor and it indicated the possibility of reduction in dissection of mediastinal lymph nodal stations. In 1960, Cahan reported that the upper mediastinal lymph nodes should be dissected for patients with upper lobe cancer and the lower mediastinal lymph nodes should be dissected for those with lower or middle lobe cancer.<sup>7)</sup> Recently, the concept of Cahan has been revisited, and some authors have omitted dissection of lower and upper mediastinal lymph node stations in upper and lower lobectomy.<sup>8-11)</sup>

To expand the possibility of reduction of mediastinal

---

*From Department of Thoracic Surgery, Graduate School of Medicine and Pharmaceutical Sciences, Kumamoto University, Kumamoto, Japan*

Received October 31, 2005; accepted for publication November 23, 2005.

Address reprint requests to Hiroaki Nomori, MD, PhD: Department of Thoracic Surgery, Graduate School of Medical and Pharmaceutical Sciences, Kumamoto University, 1-1-1 Honjo, Kumamoto 860-8556, Japan.

**Table 1. Lymph node nomenclature**

Station	Name
Superior mediastinal	
1	Highest mediastinal <sup>a</sup>
2	Paratracheal <sup>a</sup>
3	Pretracheal <sup>a</sup>
4	Tracheobronchial <sup>a</sup>
Aortic	
5	Botallo <sup>a</sup>
6	Para-aortic <sup>a</sup>
Inferior mediastinal	
7	Subcarinal <sup>a</sup>
8	Paraesophageal <sup>a</sup>
9	Pulmonary ligament <sup>a</sup>
Hilar	
10	Hilar <sup>b</sup>
11	Interlobar <sup>b</sup>
12	Lobar <sup>b</sup>
Intrapulmonary	
13	Segmental <sup>b</sup>
14	Subsegmental <sup>b</sup>

<sup>a</sup>, N2 node; <sup>b</sup>, N1 node.

lymph node dissection, the availability of intraoperative sentinel lymph node (SN) biopsy has been examined, using radio-isotope mapping.<sup>12-17)</sup>

Here, we examine reduction of lymph node dissection of clinical T1N0M0 lung cancer via literature review.

### Reduction of Mediastinal Lymph Node Dissection by the Localization of Lung Cancer

In 1999, Naruke et al. examined the incidence of lymph node metastasis in each lobe from the data of 1,815 patients with T1 NSCLC who had major lung resection with mediastinal lymph node dissection.<sup>8)</sup> Table 1 shows the lymph node nomenclature used in the original lymph node map for lung cancer reported by Naruke et al.<sup>4)</sup> They reported that, while the frequencies of metastases of hilar lymph nodes (#10-13) were almost same in each lobe, those of each mediastinal lymph node stations were dependent on the lobe; i.e. the usual metastatic sites of mediastinal lymph node in each lobe were as follows: right upper lobe, #3 –12.3% (80/648) and/or #4–8% (52/648); right middle lobe, #3 or #7–16.4% (13/79); right lower lobe, #7–13.7% (13/79); left upper lobe, #5–12.3% (60/489); and left lower lobe, #7–11.9% (26/219). As based on these data, they concluded that, while hilar lymph nodes were usually SNs in lung cancer, the following mediastinal lymph nodes could be SNs: #3 and/or #4 in right

**Table 2. Residual mediastinal lymph node metastasis in T1 patients with negative mediastinal lymph nodes (Naruke T et al., *Eur J Cardiothorac Surg* 1999; 16: S17–24)<sup>8)</sup>**

Lobe	Mediastinal SNs	Residual metastasis (%)
RUL	#3 and/or #4	2/249 (0.8)
RML	#3 and/or #7	0/38 (0)
RLL	#7	5/147 (3.4)
LUL	#5 and/or #6	3/186 (1.6)
LLL	#7	3/75 (4.0)

SN, sentinel node; RUL, right upper lobe; RML, right middle lobe; RLL, right lower lobe; LUL, left upper lobe; LLL, left lower lobe.

upper lobe, #3 and/or #7 in right middle lobe, #7 in right lower lobe, #5 and/or #6 in left upper lobe, and #7 in left lower lobe. Therefore, they described that, in clinical T1N0M0 lung cancer, if the hilar lymph nodes and those mediastinal SNs were negative of metastasis by intraoperative pathological diagnosis, complete mediastinal lymph node dissection could be omitted with little risk of residual metastasis (Table 2). The other authors also reported similar results, i.e. (1) if the hilar and upper mediastinal lymph nodes were negative for metastasis in the upper lobe NSCLC, the lymph node dissection for lower mediastinum could be omitted; and (2) if the hilar and lower mediastinal lymph nodes were negative in the lower lobe NSCLC, the lymph node dissection for upper mediastinum could be omitted.<sup>9,18)</sup> However, Asamura et al. described that #7 could be a SN in the left lingual lobe NSCLC.<sup>9)</sup> Consequently, several institutions have already initiated selective mediastinal lymph node dissection for clinical T1N0M0 lung cancer.

### Omission of Mediastinal Lymph Node Dissection by Sentinel Node Navigation Surgery

To reduce the scope of mediastinal lymph node dissection beyond selective lymph node dissection, SN navigation surgery has been performed.<sup>12,13,19,20)</sup> In 2000, Liptay et al. reported the SN identification by using radio-isotope with an 82% identification rate.<sup>12)</sup> However, the previous reports using a radioisotope<sup>12-17)</sup> were based on the data of ex vivo counting, i.e. evaluation of the radioactivity of the dissected lymph nodes; that is not practical in SN navigation surgery. Although ex vivo counting is more accurate than in vivo counting, SN identification before lymph node dissection by in vivo counting is necessary for SN navigation surgery.

In 2002, we reported the SN identification data in 46



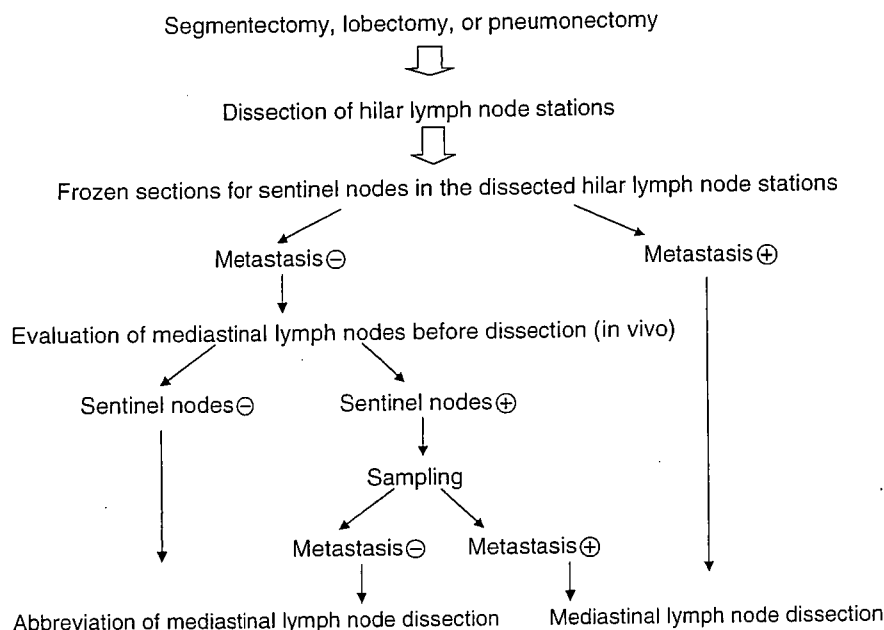


Fig. 1. The algorithm for omission of mediastinal lymph node dissection by using sentinel lymph node identification. The peak of the histogram is at the low CT number.

patients with clinical stages I-III NSCLC, with the following results: (1) there were no false negative SNs identified by ex vivo counting for patients with N1 or N2 disease, and (2) although the SN identification with in vivo counting was not available in hilar lymph node stations due to shine-through from the tumor radio-activity, it might be available for the mediastinum because there was less effect of radio-activity from the primary tumor.<sup>11)</sup> In 2004, we reported the results of in vivo identification of SN for 104 patients with clinical stage I NSCLC;<sup>20)</sup> results were as follows: (1) SNs could be identified in 84 patients (81%); (2) SNs were identified at the hilum by ex vivo counting in 78 of the 84 patients (93%) and at the mediastinum by in vivo counting in 40 patients (48%). While the in vivo counting of the mediastinum showed some false positive (over diagnosis) for SN identification, it missed (false negative) the mediastinal SNs only in 4 of the 84 patients (5%). From these results, we concluded that mediastinal lymph node dissection could be omitted by the algorithm in Fig. 1. First, patients with clinical stage I peripheral type NSCLC can be candidates for sentinel navigation surgery. To identify SNs in the hilar lymph node stations, segmentectomy or greater resection is necessary. Because the in vivo counting is not available for hilar lymph node stations, their SN identification is conducted by ex vivo counting after separating from the resected lung. The hilar SNs are examined in

intraoperative frozen sections. If the frozen section of hilar SNs showed metastases, a mediastinal lymph node dissection should be performed because of the high possibility of N2 disease. If it did not show metastasis, the mediastinal SNs are identified before lymph node dissection by in vivo counting. If there were no SNs in the mediastinum by in vivo counting, a mediastinal lymph node dissection can be omitted. If the in vivo counting of the mediastinum showed SNs, they are sampled for frozen sections. If a frozen section of mediastinal SNs did not show metastasis, the sampling is adequate and a mediastinal lymph node dissection can be omitted. If the frozen section showed metastasis, the mediastinal lymph node dissection should be performed. The study showed that N2 disease was shown in 9 of 84 (11%) patients who were diagnosed as N0 in computed tomography (CT) scan and that overlooking the mediastinal SNs by in vivo counting was shown in 4 of 84 patients (5%), resulting in the risk of leaving metastatic lymph nodes in the mediastinum to be 0.55% (11%×5%). We believe that this is an acceptable risk in the reduction of mediastinal lymph node dissection in the patients with stage I NSCLC.

### Omission of Mediastinal Lymph Node Dissection for Stage I Squamous Cell Carcinoma

A skip metastasis, i.e. metastasis to the mediastinal lymph

**Table 3. Correlation between pathological tumor stage and histogram pattern in clinical T1N0M0 lung adenocarcinomas**

Tumor stage	Histogram pattern			Total
	One peak (low)	One peak (high)	Two peaks	
T1N0M0	18	34	27	80
T1N1M0	0	4	0	4
T2N1M0	0	3	0	3
T1N2M0	0	7	1	7
T2N2M0	0	1	0	1
T3N2M0	0	1	0	1
T4N0M0	0	3	0	3
T4N1M0	0	1	0	1
Total	18	54	28	100

node without hilar lymph node metastasis, is one of the difficulties for omission of mediastinal lymph node dissection. The skip metastasis is usually encountered in adenocarcinomas. It has been reported that approximately 25% of adenocarcinomas with N2 or N3 disease are skip metastases.<sup>21)</sup> However, the skip metastasis has been reported to rarely occur in T1 squamous cell carcinomas. Sakurai et al. reported that, while 19 of 70 patients (25%) with squamous cell carcinoma less than 3 cm had lymph node metastasis, none of them had skip metastases.<sup>22)</sup> Besides, Asamura et al. reported that lymph node metastasis was seen in only one of 16 patients (6%) with squamous cell carcinoma less than 2 cm.<sup>21)</sup> From their reports, it could be stated: (1) mediastinal lymph node dissection could be omitted in squamous cell carcinomas less than 3 cm, if the intraoperative frozen section of hilar lymph nodes had no metastasis; and (2) mediastinal lymph node dissection could be omitted for patients with squamous cell carcinoma less than 2 cm.

### Omission of Lymph Node Dissection from the CT Findings of Primary Tumor

Because lung adenocarcinomas showing ground glass opacity (GGO) by CT are usually pathological N0 disease,<sup>23-31)</sup> they are good candidates for omission of mediastinal lymph node dissection. By using the CT number histogram, we examined lymph node metastasis in GGO or solid lesions in 100 patients with clinical T1N0M0 adenocarcinomas. According to the CT number histograms, 18 patients had one peak at a low CT number (pure GGO), 54 had one peak at a high CT number (solid), and the remaining 28 had two peaks at both low and high CT numbers (mixed GGO) (Table 3).

Pathological TNM showed that all (100%) of the 18 adenocarcinomas with one peak at a low CT number were T1N0M0, and 27 of the 28 (96%) ones with two peaks were T1N0M0. While 34 of the 54 (63%) adenocarcinomas with one peak at a high CT number were pathological T1N0M0, but the remaining 20 (37%) had lymph node metastasis. Lymph node dissection could be omitted for adenocarcinomas with pure GGO and probably ones with mixed GGO, which were defined from CT number histograms.

### Omission of Lymph Node Dissection from the Findings of Positron Emission Tomography (PET)

According to the meta-analysis by Dwamena et al., <sup>18</sup>F-fluorodeoxyglucose positron emission tomography (FDG-PET) has higher sensitivity and specificity than CT.<sup>32)</sup> However, PET cannot detect small or micro-metastasis because of lower limits of spatial resolution of a PET camera. We previously reported the size of metastatic foci yielding false negative lymph node staging with PET in patients with lung cancer.<sup>33)</sup> From the results of 564 lymph node stations in 80 patients with peripheral type lung cancer, the sizes of metastatic foci within lymph nodes that showed false-negative (n=8) and true-positive (n=28) with PET ranged from 0.5 to 9 mm (3±1 mm) and from 4 to 18 mm (10±3 mm), respectively (p<0.001) (Fig. 2). None of the metastatic foci smaller than 4 mm could be detected with PET scanning. Therefore, lymph node dissection cannot be omitted for patients who are diagnosed N0 disease by PET scanning.

It has been reported that low grade lung cancers, such as carcinoid, mucoepidermoid carcinomas, and bronchioloalveolar carcinomas, usually show false-negative by PET

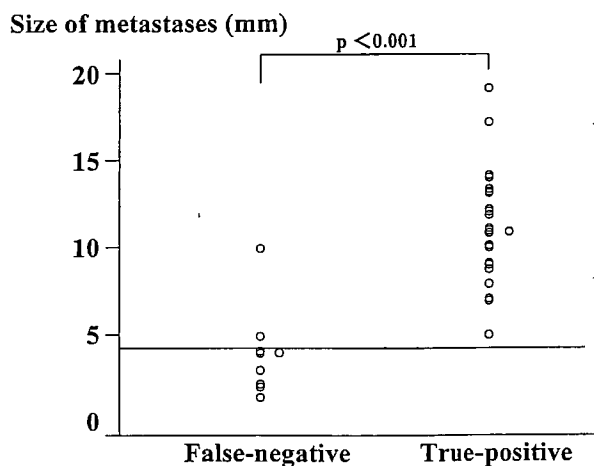


Fig. 2. The distribution of sizes of metastatic true-positive and false-negative lymph nodes with PET scan.

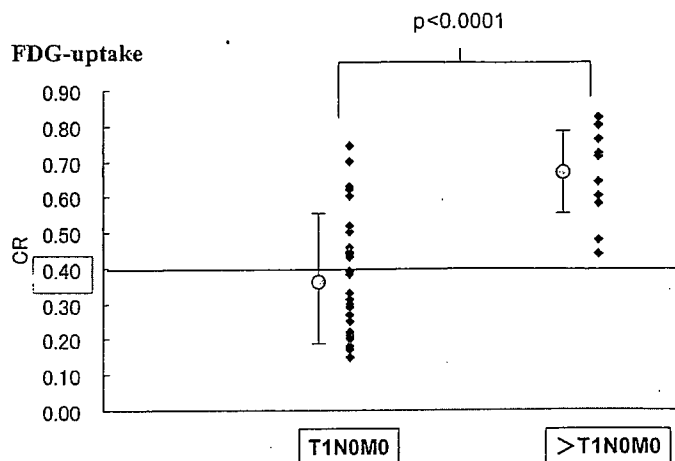


Fig. 3. The distribution of FDG-uptake of pathological T1N0M0 and more advanced stages than T1N0M0 in clinical T1N0M0 adenocarcinomas.

FDG,  $^{18}\text{F}$ -fluorodeoxyglucose; CR, contrast ratio.

scanning. We examined the correlation between lymph node metastasis and FDG-uptake in primary tumors, finding that FDG-uptake in primary tumor could predict lymph node metastasis in lung adenocarcinomas with clinical T1N0M0.<sup>34-36</sup> FDG-uptake was evaluated by contrast ratio (CR) comparing with the FDG-uptake of contralateral lung. The correlation between the CR of the primary tumor and pathological stage in 52 lung adenocarcinomas with clinical T1N0M0 showed that, while all of the tumors with CR less than 0.4 were pathological T1N0M0, all of the tumors advanced more than T1N0M0 (n=11) showed CR higher than 0.4 (Fig. 3). Therefore, we concluded that lymph node dissection or mediastinoscopy could be omitted for adenocarcinomas with clinical T1N0M0 showing CR less than 0.4 on PET scanning.

While the standard operation for lung cancer is lobectomy and mediastinal lymph node dissection, we consider that mediastinal lymph node dissection may be omitted with use of techniques described.

## References

1. Seely JM, Mayo JR, Miller RR, Muller NL. T1 lung cancer: prevalence of mediastinal nodal metastases and diagnostic accuracy of CT. *Radiology* 1993; **186**: 129-32.
2. Heavey LR, Glazer GM, Gross BH, Francis IR, Orringer MB. The role of CT in staging radiographic T1N0M0 lung cancer. *AJR Am J Roentgenol* 1986; **146**: 285-90.
3. Conces DJ Jr, Klink JF, Tarver RD, Moak GD. T1N0M0 lung cancer: evaluation with CT. *Radiology* 1989; **170** (3 Pt 1): 643-6.
4. Naruke T, Suemasu K, Ishikawa S. Lymph node mapping and curability at various levels of metastasis in resected lung cancer. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1978; **76**: 832-9.
5. Naruke T, Goya T, Tsuchiya R, Suemasu K. The importance of surgery to non-small cell carcinoma of lung with mediastinal lymph node metastasis. *Ann Thorac Surg* 1988; **46**: 603-10.
6. Mountain CF. Revisions in the international system for staging lung cancer. *Chest* 1997; **111**: 1710-7.
7. Cahan WG. Radical lobectomy. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1960; **39**: 555-72.
8. Naruke T, Tsuchiya R, Kondo H, Nakayama H, Asamura H. Lymph node sampling in lung cancer: how should it be done? *Eur J Cardiothorac Surg* 1999; **16** (Suppl 1): S17-24.
9. Asamura H, Nakayama H, Kondo H, Tsuchiya R, Naruke T. Lobe-specific extent of systematic lymph node dissection for non-small cell lung carcinomas according to a retrospective study of metastasis and prognosis. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1999; **117**: 1102-11.
10. Okada M, Tsubota N, Yoshimura M, Miyamoto Y, Matsuoka H. Prognosis of completely resected pN2 non-small cell lung carcinomas: what is the significant node that affects survival? *J Thorac Cardiovasc Surg* 1999; **118**: 270-5.
11. Graham AN, Chan KJ, Pastorino U, Goldstraw P. Systematic nodal dissection in the intrathoracic staging of patients with non-small cell lung cancer. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1999; **117**: 246-51.
12. Liptay MJ, Masters GA, Winchester DJ, et al. Intraoperative radioisotope sentinel lymph node mapping in non-small cell lung cancer. *Ann Thorac Surg* 2000; **70**:

- 384-90.
13. Liptay MJ, Grondin SC, Fry WA, et al. Intraoperative sentinel lymph node mapping in non-small-cell lung cancer improves detection of micrometastases. *J Clin Oncol* 2002; **20**: 1984-8.
  14. Nomori H, Horio H, Naruke T, Orikasa H, Yamazaki K, Suemasu K. Use of technetium-99m tin colloid for sentinel lymph node identification in non-small cell lung cancer. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2002; **124**: 486-92.
  15. Schmidt FE, Woltering EA, Webb WR, Garcia OM, Cohen JE, Rozans MH. Sentinel nodal assessment in patients with carcinoma of the lung. *Ann Thorac Surg* 2002; **74**: 870-4.
  16. Melfi FM, Chella A, Menconi GF, et al. Intraoperative radioguided sentinel lymph node biopsy in non-small cell lung cancer. *Eur J Cardiothorac Surg* 2003; **23**: 214-20.
  17. Sugi K, Kaneda Y, Sudoh M, Sakano H, Hamano K. Effect of radioisotope sentinel node mapping in patients with cT1 N0 M0 lung cancer. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2003; **126**: 568-73.
  18. Okada M, Tsubota N, Yoshimura M, Miyamoto Y. Proposal for reasonable mediastinal lymphadenectomy in bronchogenic carcinomas: role of subcarinal nodes in selective dissection. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1998; **116**: 949-53.
  19. Little AG, DeHoyos A, Kirgan DM, Arcomano TR, Murray KD. Intraoperative lymphatic mapping for non-small cell lung cancer: the sentinel node technique. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1999; **117**: 220-4.
  20. Nomori H, Watanabe K, Ohtsuka T, Naruke T, Suemasu K. In vivo identification of sentinel lymph nodes for clinical stage I non-small cell lung cancer for abbreviation of mediastinal lymph node dissection. *Lung Cancer* 2004; **46**: 49-55.
  21. Asamura H, Nakayama H, Kondo H, Tsuchiya R, Shimosato Y, Naruke T. Lymph node involvement, recurrence, and prognosis in resected small peripheral non-small-cell lung carcinomas: are these carcinomas candidates for video-assisted lobectomy? *J Thorac Cardiovasc Surg* 1996; **111**: 1125-34.
  22. Sakurai H, Asamura H, Watanabe S, Suzuki K, Tsuchiya R. Clinicopathologic features of peripheral squamous cell carcinoma of the lung. *Ann Thorac Surg* 2004; **78**: 222-7.
  23. Kuriyama K, Seto M, Kasugai T, et al. Ground-glass opacity on thin-section CT: value in differentiating subtypes of adenocarcinoma of the lung. *AJR Am J Roentgenol* 1999; **173**: 465-9.
  24. Kim EA, Johkoh T, Lee KS, et al. Quantification of ground-glass opacity on high-resolution CT of small peripheral adenocarcinoma of the lung: pathologic and prognostic implications. *AJR Am J Roentgenol* 2001; **177**: 1417-22.
  25. Kodama K, Higashiyama M, Yokouchi H, et al. Prognostic value of ground-glass opacity found in small lung adenocarcinoma on high-resolution CT scanning. *Lung Cancer* 2001; **33**: 17-25.
  26. Aoki T, Tomoda Y, Watanabe H, et al. Peripheral lung adenocarcinoma: correlation of thin-section CT findings with histologic prognostic factors and survival. *Radiology* 2001; **220**: 803-9.
  27. Kondo T, Yamada K, Noda K, Nakayama H, Kameda Y. Radiologic-prognostic correlation in patients with small pulmonary adenocarcinomas. *Lung Cancer* 2002; **36**: 49-57.
  28. Nomori H, Ohtsuka T, Naruke T, Suemasu K. Histogram analysis of computed tomography numbers of clinical T1 N0 M0 lung adenocarcinoma, with special reference to lymph node metastasis and tumor invasiveness. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2003; **126**: 1584-9.
  29. Nomori H, Ohtsuka T, Naruke T, Suemasu K. Differentiating between atypical adenomatous hyperplasia and bronchioloalveolar carcinoma using the computed tomography number histogram. *Ann Thorac Surg* 2003; **76**: 867-71.
  30. Matsuguma H, Nakahara R, Anraku M, et al. Objective definition and measurement method of ground-glass opacity for planning limited resection in patients with clinical stage IA adenocarcinoma of the lung. *Eur J Cardiothorac Surg* 2004; **25**: 1102-6.
  31. Nakata M, Sawada S, Yamashita M, et al. Objective radiologic analysis of ground-glass opacity aimed at curative limited resection for small peripheral non-small cell lung cancer. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2005; **129**: 1226-31.
  32. Dwamena BA, Sonnad SS, Angobaldo JO, Wahl RL. Metastases from non-small cell lung cancer: mediastinal staging in the 1990s—meta-analytic comparison of PET and CT. *Radiology* 1999; **213**: 530-6.
  33. Nomori H, Watanabe K, Ohtsuka T, Naruke T, Suemasu K, Uno K. The size of metastatic foci and lymph node staging yielding false-negative and false-positive lymph node staging with positron emission tomography in patients with lung cancer. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2004; **127**: 1087-92.
  34. Nomori H, Watanabe K, Ohtsuka T, et al. Fluorine 18-tagged fluorodeoxyglucose positron emission tomographic scanning to predict lymph node metastasis, invasiveness, or both, in clinical T1 N0 M0 lung adenocarcinoma. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2004; **128**: 396-401.
  35. Watanabe K, Nomori H, Ohtsuka T, Naruke T, Uno K. False negative cases of F-18 fluorodeoxyglucose-positron emission tomography (FDG-PET) imaging in small lung cancer less than 3 cm in size. *Nihon Kokyuki Gakkai Zasshi* 2004; **42**: 787-93. (in Jpse.)
  36. Watanabe K, Nomori H, Ohtsuka T, et al. [F-18] Fluorodeoxyglucose positron emission tomography can predict pathological tumor stage and proliferative activity determined by Ki-67 in clinical stage IA lung adenocarcinomas. *Lung Cancer* 2006. (in press)