

Figure 1. Cell growth inhibition of cholangiocellular carcinoma cell (CCC) lines after treatment with MK4. MK4 at the concentration range from 5 to 50 μM exerted dose-dependent cell growth inhibitory effects on each of the three types of CCC cell lines. Dose-dependent cell growth inhibitory effects on HL-60 leukemia cell lines were observed at the concentration range of MK4 from 2 to 20 μM .

CA, USA), they were reacted to horseradish peroxidase-conjugated goat anti-mouse IgG mAb, and visualization of immunoreactive proteins was carried out using an ECL kit (Amersham Biosciences Co.).

Assessment of morphological changes. After adding MK4 and incubation, cell solutions were prepared. Specimens were prepared using cytopsin 2 (Thermo Fisher Scientific Inc., Worcester, MA, USA) and the cell morphology was observed under May-Giemsa staining. Cells were classified into the following four types: 1) cells without significant morphological change, 2) polynuclear cells, 3) apoptotic cells, 4) autophagic cells, and were observed chronologically. Autophagic cells were defined as those with five or more vacuoles in the cytoplasm.

Electron microscopy. For TFK-1 cell line, two groups with and without the addition of 50 μM of MK4 were established and the cells were fixed for 1 h using a 3% glutaraldehyde plus 2% paraformaldehyde in 0.1 M cacodylate buffer (pH 7.3) solution. Then, the cells were post-fixed using the same buffer solution to which 1% OsO_4 was added. After embedding in gelatin, the cells were observed by electron microscopy.

Detection of acid vesicular organelles (AVOs). Vital staining was performed using acridine orange (Polysciences, Warrington, PA, USA) to confirm the presence of acid vesicular organelles (AVOs), characteristic of autophagy. For TFK-1 cell line, two groups, with and without the addition of 50 μM of MK4, were established and incubated for 96 h, the

cells were separated using a 0.25% trypsin and 0.02% EDTA solution. Acridine orange was dissolved in RPMI-1640 to reach a concentration of 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$. The cells were then cultured for 30 min in an atmosphere of 5% CO_2 air at 37°C and observed using a fluorescent microscope (25,26).

Statistical analysis. The data are shown as means \pm SD. Comparisons between two groups were assessed using the Student's t-test. A p-value of <0.05 was considered to indicate a statistically significant difference.

Results

Growth inhibitory effects of MK4 in cholangiocellular carcinoma (CCC) cell lines. MK4 at the concentration range from 5 to 50 μM exerted dose-dependent cell growth inhibitory effects on each of the three types of CCC cell lines (Fig. 1). Observed 50% inhibitory concentrations (IC_{50}) were 10.7, 10.6, and 7.3 μM for TFK-1, MEC, and HuCC-T1, respectively. In addition, dose-dependent cell growth inhibitory effects on HL-60 leukemia cell lines were observed at the concentration range of MK4 from 2 to 20 μM , with an IC_{50} of 6.8 μM .

Apoptosis induction. To confirm the effects of apoptosis on MK4-induced cell growth inhibition, the percentage of APO2.7 positive cells was measured by flow cytometry. In the cell lines TFK-1, MEC, and HuCC-T1, although the percentage of APO2.7 positive cells tended to slightly increase in the MK4-treated group, no statistically significant difference

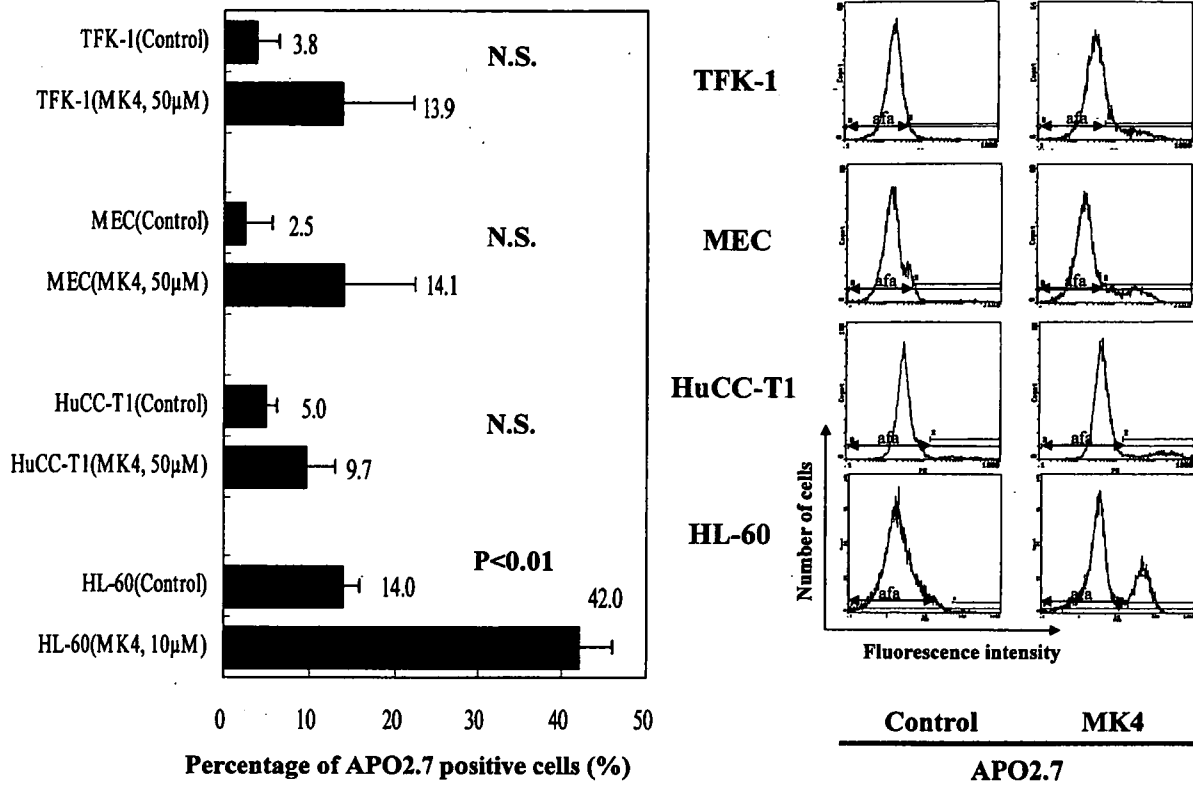


Figure 2. Assessment of apoptosis induction in response to MK4 in cholangiocellular carcinoma cell lines. For all CCC cell lines, the percentage of APO2.7 positive cells tended to slightly increase in the MK4-treated group, while no statistically significant difference was observed as compared with the control group. For HL-60 cell lines, on the contrary, a statistically significant increase in the percentage of APO2.7 positive cells was observed in the MK4-treated group (p<0.01).

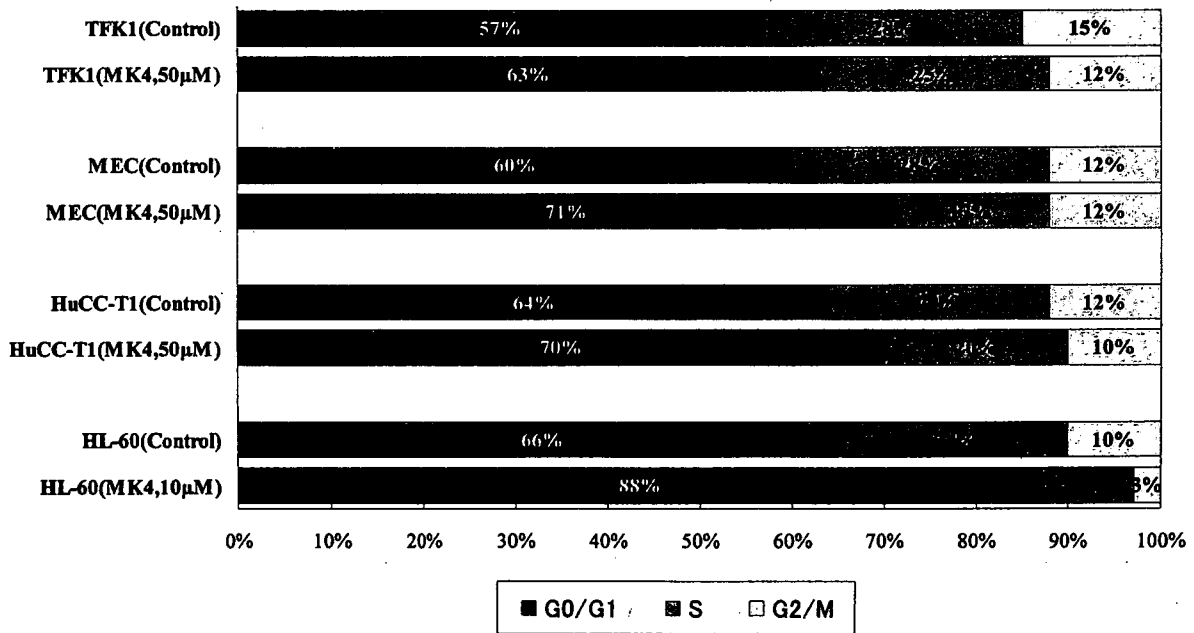


Figure 3. Cell cycle analysis after exposure to MK4 in cholangiocellular carcinoma cell lines. Among the cells that did not undergo cell death, the percentage of G0/G1-phase cells for HL-60 was 66% in the control group and 88% in the MK4-treated group, suggesting an obvious increase by MK4. On the other hand, the percentage of G0/G1-phase cells for TFK-1, MEC, and HuCC-T1 was 57, 60, and 64% in the control group and 63, 71, and 70% in the MK4-treated group, respectively. Although an increasing tendency was observed in each of the MK4-treated groups, the degree of cell cycle arrest was small.

was observed compared with the control group (Fig. 2). In the HL-60 cell lines, on the contrary, a statistically significant increase in the percentage of APO2.7 positive

cells was observed in the MK4-treated group (p<0.01). Thus, MK4-induced cell growth inhibitory effects were observed in CCC cell lines; however, the degree of apoptosis induction

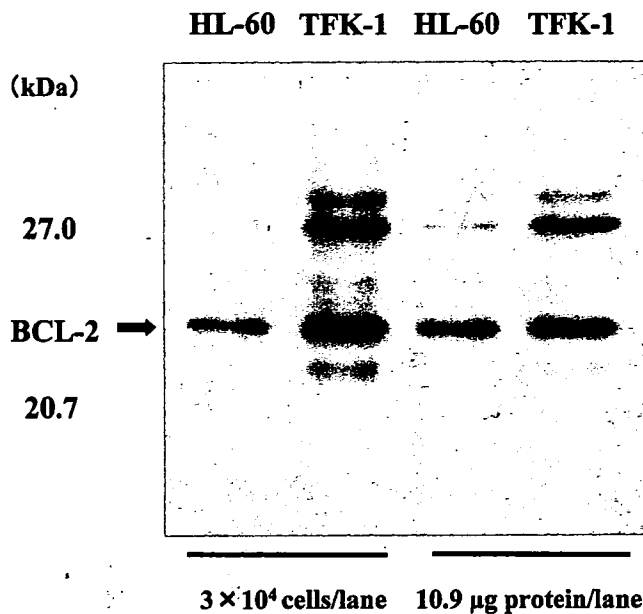


Figure 4. Comparison of Bcl-2 expression between TFK-1 and HL-60 cells. The expression level of Bcl-2 protein was compared between TFK-1 and HL-60 by immunoblotting with anti-Bcl-2 mAb. For standardization, two methods of measurement using equalized soluble protein content and cell counts were used. Both measurements showed a higher expression of Bcl-2 protein in TFK-1 than in HL-60.

was smaller than that observed in HL-60 leukemia cell lines. It was reported that overexpression of Bcl-2 prevents apoptosis from being induced in HL-60, but G1 arrest of the cell cycle was induced by MK4 (1). Therefore, we considered

that MK4-induced cell growth inhibition is attributable to the cytostatic action via cell cycle arrest.

Cell cycle analysis and expression level of Bcl-2. Among the cells that did not undergo cell death, the percentage of G0/G1-phase cells for HL-60 was 66% in the control group and 88% in the MK4-treated group, suggesting an obvious increase by MK4. On the other hand, the percentage of G0/G1-phase cells for TFK-1, MEC, and HuCC-T1 was 57, 60, and 64% in the control group and 63, 71, and 70% in the MK4-treated group, respectively. Although an increasing tendency was observed in each of the MK4-treated groups, the degree of cell cycle arrest was low (Fig. 3).

The expression level of Bcl-2 protein was compared between TFK-1 and HL-60. For standardization, two methods of measurement using equalized soluble protein content and cell counts were used. Both measurements showed a higher expression of Bcl-2 protein in TFK-1 than in HL-60 (Fig. 4).

Morphological appearance. Since we recognized that the effects of apoptosis and cell cycle arrest on MK4-induced cell growth inhibition were smaller than anticipated, we focused our attention on morphological differences. In HL-60 cells, the addition of MK4 resulted in typical apoptotic images including condensation of chromatin and nuclear fragmentation (apoptotic body). In TFK-1 cells, on the contrary, the addition of MK4 did not result in such apoptotic images, and a large number of cells containing vacuoles in their cytoplasm were observed, suggesting autophagy-induced cell death (12) (Fig. 5).

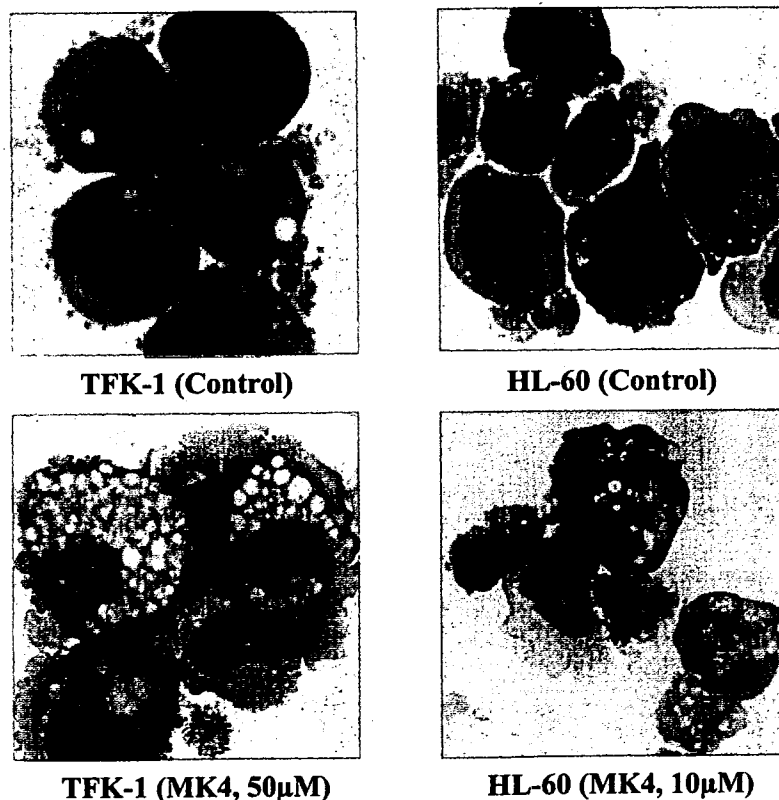


Figure 5. Comparison of morphologic changes between TFK-1 and HL-60 cells after treatment with MK4. In HL-60 cells, the addition of MK4 resulted in typical apoptotic images including condensation of chromatin and fragmentation of nucleus. In TFK-1 cells, on the contrary, the addition of MK4 resulted in autophagy images including a large number of cells containing vacuoles in their cytoplasm. May-Giemsa staining; original magnification, x1000.

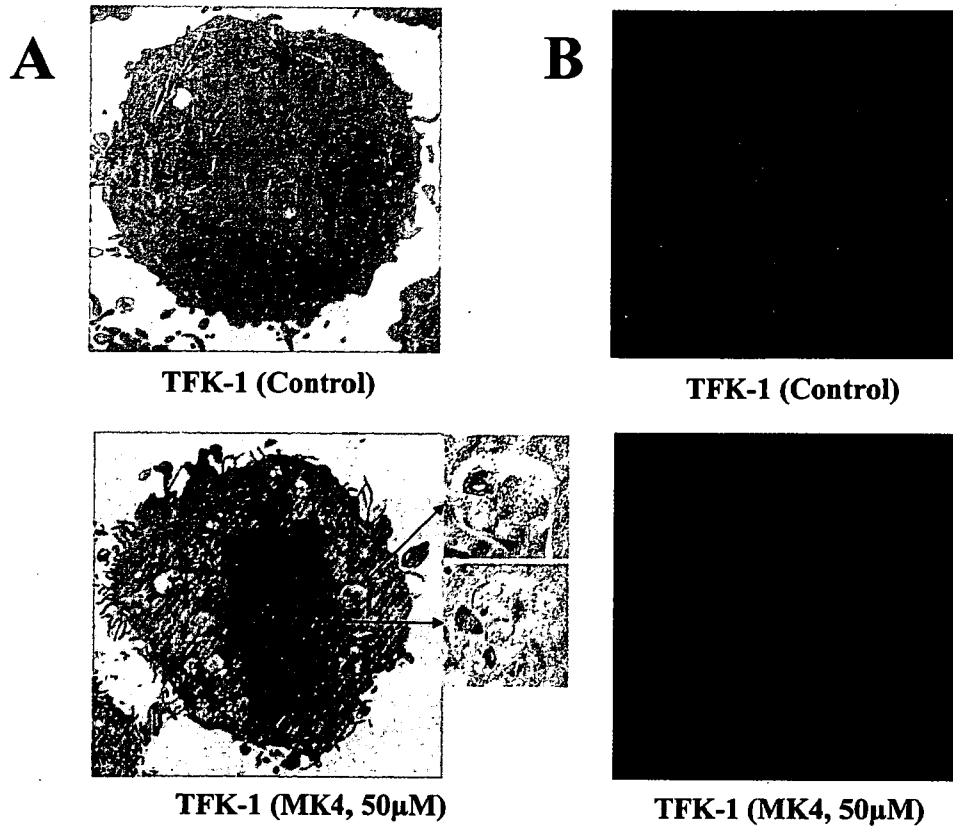


Figure 6. Induction of autophagy in response to MK4 in TFK-1 cells. (A) Electron microscopy showed a large number of cytoplasmic autophagosomes and autolysosomes in the MK4-treated group. (B) Fluorescence microscopy following acridine orange staining revealed an increase in the number of cytoplasmic acidic vesicular organelles (AVOs) characteristic of autophagy in the MK4-treated group.

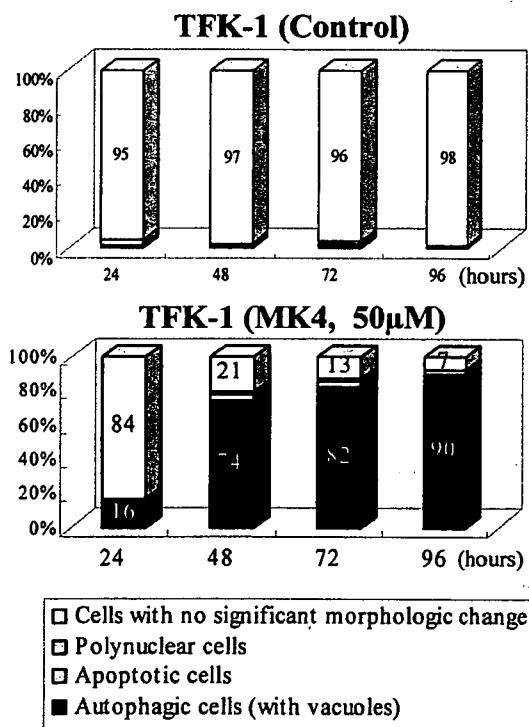


Figure 7. Chronological morphologic changes of TFK-1 cells during exposure to MK4. Morphological observation in the MK4-treated and control group showed that there were few cells forming vacuoles in the control group. In the MK4-treated group, on the contrary, the number of cells with vacuoles significantly increased at 48-h post culture. Moreover, the percentage of the cells increased with the duration of culture and cells with vacuolation accounted for ~90% of the cells at 96 h.

Autophagy induction of TFK-1 cells in response to MK4. To confirm the evidence of autophagosome and autolysosome formation characteristic of autophagy, the following observation was performed. Electron microscopy showed a large amount of cytoplasmic autophagosomes and autolysosomes in the MK4-treated group (Fig. 6A). In the MK4-treated group, fluorescence microscopy following acridine orange staining revealed an increase in the number of cytoplasmic acidic vesicular organelles (AVOs) characteristic of autophagy (Fig. 6B) (24-26). Moreover, chronological morphological observation in the MK4-treated and the control group showed that few cells formed vacuoles in the control group. In the MK4-treated group, on the contrary, the number of cells with vacuoles significantly increased at 48-h post culture. Moreover, the percentage of the cells increased with the duration of culture, and ~90% of the cells showed vacuolation at 96 h (Fig. 7).

Discussion

We set out to determine whether VK2 has antitumor effects through the induction of autophagy on cholangiocellular carcinoma (CCC) cells. Although *in vitro* and *in vivo* antitumor effects of VK2 have been documented previously (1-8), details of the mechanisms of the effects remain unclear. Bouzazhah *et al* described that VK2 may increase the expression of *jun* and *c-myc*, leading to apoptosis induction and that it may also increase prothrombin and other VK2-dependent proteins, resulting in growth inhibition of hepatocellular carcinoma

(5). In the study of the effects of VK2 using MDS-KZ cell lines derived from MDS patients, Nishimaki *et al* reported that the addition of VK2 led to decreased Bcl-2 expression and increased BAX expression, which caused depolarization of mitochondria membrane potential, release of cytochrome c, and activation of caspase-3, and thereby inducing cell death via apoptosis. They also reported that the addition of a caspase inhibitor, ZVAD, suppressed apoptosis induced by VK2. These results led to the speculation that mitochondria is a target organ for apoptosis by VK2 (27). Moreover, Miyazawa *et al* reported that examination of the effects of VK2 in an HL-60 leukemia cell line overexpressing Bcl-2 as a result of bcl-2 gene transfection (leukemia HL-60-bcl-2) showed the suppression of apoptosis in HL-60-bcl-2 cells due to the stabilization of mitochondrial membrane, while also showing an increase of G0/G1 phase and monocytic differentiation inducibility (1). These results suggest that the antitumor effects of VK2 are caused mainly by apoptosis induction and cell cycle arrest.

The present study demonstrates that the addition of VK2 resulted in dose-dependent cell growth inhibitory effects on all three CCC cell lines (Fig. 1). The IC₅₀ for the three types of CCC cells ranged from 5 to 20 μ M, which was slightly higher than the IC₅₀ of 5 to 10 μ M for leukemia cell lines. When compared with the IC₅₀ for the same type of solid tumor, gastric cancer and lung cancer cell lines, of 20 to 60 μ M (4) and 10 to 50 μ M (2,3), respectively, the IC₅₀ for CCC cell lines tended to be lower. In addition, previous studies reported that the IC₅₀ for HCC cell lines ranged from 100 to 200 μ M and that certain HCC cell lines have only <50% growth inhibition rate (5,28). Based on these reports, it was considered that CCC cells were more sensitive to the antitumor effects of VK2 than hepatocellular carcinoma (HCC) cells.

In the present study, the apoptosis induction effect of VK2 on CCC cells was assessed using APO2.7. Although the percentage of APO2.7-positive cells tended to slightly increase (9-15%) in each of the MK4-treated CCC cells, the apoptosis induction effect of VK2 in CCC cells was relatively small, compared with the rates of ~50% for leukemia cell lines (1), 20 to 40% for gastric cancer cell lines (4), and 30-40% for lung cancer cell lines (2,3). A possible reason for this smaller effect is that Bcl-2 expression is higher in CCC cells (TFK-1) than in HL-60 (Fig. 4). Regarding the cell cycle, although the percentage of G0/G1-phase cells tended to increase in the VK2-treated (50 μ M) group with a rate of 63.2% as compared with 57.4% for the TFK-1 control group, the percentage of G0/G1-phase cells was lower than that in HL-60 (Fig. 3). Furthermore, in a previous study from our group among four types of gastric cancer cell lines, all had >70% G0/G1-phase cells and two had \geq 80% G0/G1-phase cells (4). Although the *in vitro* antitumor effects of VK2 on CCC cells, as described above, were equal to those on known solid cancer cell lines, the effects of apoptosis induction and cell cycle arrest were confirmed to be smaller.

The morphologic changes observed by May-Giemsa staining was a large number of cells containing vacuoles in their cytoplasm in TFK-1 of the VK2-treated group. Since this change was rarely or never observed in the control group, it was considered due to the effects of VK2 (Fig. 5). In addition, the increased number of AVOs observed with acridine orange

staining and the increased number of autophagosomes observed by electron microscopy demonstrated that autophagy had been induced in the VK2-treated CCC cells (Fig. 6). Cytoplasmic vacuolation became obvious at 48 h after the addition of VK2 and accounted for ~90% of the TFK-1 cultured cells at 96 h (Fig. 7).

Autophagy increases with stimulation by starvation and is a biological phenomenon that occurs as a cytoprotective reaction for cells to survive (13,14). Apoptosis is considered to be type I programmed cell death (PCD), while autophagy is considered to be type II PCD (12). Morphologically, apoptosis involves nuclear changes such as fragmentation and condensation, while autophagy is characterized by few nuclear changes and increased cytoplasmic autophagic vesicles, which is highly consistent with the altered nuclear morphology observed in the VK2-treated TFK-1 (12). This suggested that the antitumor effects of VK2 result from autophagic cell death, not from apoptosis and cell cycle death. There have been reports on autophagy-related cell death in certain types of tumor cell lines including breast cancer cell lines (17) and malignant glioma cell lines (29,30).

It was reported that new alkylating agents, temozolomide (TMZ) and arsenic trioxide (As₂O₃), induce autophagy in malignant glioma cell lines (30) and that histone deacetylase inhibitors, sodium butyrates and suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA), induce autophagy in Bcl-XL overexpressing HeLa cells (31). The addition of etoposide can induce autophagy even in Bax/Bak-double knock-out murine embryonic fibroblasts (MEF), and inhibiting this autophagy pathway by siRNA or 3-methyladenine results in suppressed cytotoxic effects of etoposide, indicating that this autophagy represents autophagic cell death and is an essential process to induce cell death (32). Thus, when autophagy occurs in association with cell death, it is controversial whether autophagy itself causes autophagic cell death or protective autophagy is induced in order to prevent cell death. Also in the present study, non-apoptotic cell death and autophagy in CCC cells induced by VK2 were observed. Whether the autophagy observed in this study is cytoprotective or contributory to cell death induction from a biological aspect remains to be established in future studies.

Although the IC₅₀ for CCC cells was higher than that for leukemia cells, it was considered to be equal to or lower than that for hepatocellular carcinoma, which is the same type of solid tumor and the chemoprevention effects of VK2 have been confirmed. In addition, because of hepatic metabolism, VK2 has higher tissue concentrations in the liver than in other organs, and after being metabolized by the liver, it is excreted in bile. It has been confirmed that after a single administration of VK2 to rats, 79.0% of VK2 is excreted into bile (33). In dogs administered with ¹⁴C-menatetrenone, it is known that its radioactive concentration in bile remains extremely high for long periods in comparison to other organs and the maximum biliary level is 51.2 times the blood level (34,35). Although there have been no reports on the investigation of tissue concentrations, since VK2 levels in cholangiocellular carcinoma tissue are expected to be higher than in the tissue of solid tumors other than hepatobiliary tumors, clinical applications of VK2 are anticipated in this disease entity.

Acknowledgements

This study was supported by the 'Third-Term Comprehensive Control Research for Cancer' conducted by the Ministry of Health, Labor and Welfare of Japan. We are indebted to Professor J. Patrick Barron of the International Medical Communication Center of Tokyo Medical University, and would like to thank Ms. Ayako Hirota and Ms. Minako Suzuki for their expert technical assistance.

References

- Miyazawa K, Yaguchi M, Funato K, Gotoh A, Kawanishi Y, Nishizawa Y, Yuo A and Ohyashiki K: Apoptosis/differentiation-inducing effects of vitamin K2 on HL-60 cells: dichotomous nature of vitamin K2 in leukemia cells. *Leukemia* 15: 1111-1117, 2001.
- Yokoyama T, Miyazawa K, Yoshida T and Ohyashiki K: Combination of vitamin K2 plus imatinib mesylate enhances induction of apoptosis in small cell lung cancer cell lines: *Int J Oncol* 26: 33-40, 2005.
- Yoshida T, Miyazawa K, Kasuga I, Yokoyama T, Minemura K, Ustumi K, Aoshima M and Ohyashiki K: Apoptosis induction of vitamin K2 in lung carcinoma cell lines: the possibility of vitamin K2 therapy for lung cancer. *Int J Oncol* 23: 627-632, 2003.
- Tokita H, Tsuchida A, Miyazawa K, Ohyashiki K, Katayanagi S, Sudo H, Enomoto M, Takagi Y and Aoki T: Vitamin K2-induced antitumor effects via cell-cycle arrest and apoptosis in gastric cancer cell lines. *Int J Mol Med* 17: 235-243, 2006.
- Bouzahzah B, Nishikawa Y, Simon D and Carr BI: Growth control and gene expression in a new hepatocellular carcinoma cell line, Hep40: inhibitory actions of vitamin K. *J Cell Physiol* 165: 459-467, 1995.
- Miyazawa K, Nishimaki J, Ohyashiki K, Enomoto S, Kuriya S, Fukuda R, Hotta T, Teramura M, Mizoguchi H, Uchiyama T and Omine M: Vitamin K2 therapy for myelodysplastic syndromes (MDS) and post-MDS acute myeloid leukemia: information through a questionnaire survey of multi-center pilot studies in Japan. *Leukemia* 14: 1156-1157, 2000.
- Yaguchi M, Miyazawa K, Otawa M, Ito Y, Kawanishi Y and Toyama K: Vitamin K2 therapy for a patient with myelodysplastic syndrome. *Leukemia* 13: 144-145, 1999.
- Mizuta T, Ozaki I, Eguchi Y, Yasutake T, Kawazoe S, Fujimoto K and Yamamoto K: The effect of menatetrenone, a vitamin K2 analog, on disease recurrence and survival in patients with hepatocellular carcinoma after curative treatment: a pilot study. *Cancer* 106: 867-872, 2006.
- Wu FY, Liao WC and Chang HM: Comparison of antitumor activity of vitamins K1, K2 and K3 on human tumor cells by two (MTT and SRB) cell viability assays. *Life Sci* 52: 1797-1804, 1993.
- Parekh HK, Mansuri-Torshizi H, Srivastava TS and Chitnis MP: Circumvention of adriamycin resistance: effect of 2-methyl-1, 4-naphthoquinone (vitamin K3) on drug cytotoxicity in sensitive and MDR P388 leukemia cells. *Cancer Lett* 61: 147-156, 1992.
- Orimo H, Shiraki M, Tomita A, Morii H, Fujita T and Ohata M: Effects of menatetrenone on the bone and calcium metabolism in osteoporosis: a double-blind placebo-controlled study. *J Bone Miner Metab* 16: 106-112, 1998.
- Kondo Y, Kanzawa T, Sawaya R and Kondo S: The role of autophagy in cancer development and response to therapy. *Nat Rev Cancer* 5: 726-734, 2005.
- Kuma A, Hatano M, Matsui M, Yamamoto A, Nakaya H, Yoshimori T, Ohsumi Y, Tokuhisa T and Mizushima N: The role of autophagy during the early neonatal starvation period. *Nature* 432: 1032-1036, 2004.
- Tsukada M and Ohsumi Y: Isolation and characterization of autophagy-defective mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett* 333: 169-174, 1993.
- Qu X, Yu J, Bhagat G, Furuya N, Hibshoosh H, Troxel A, Rosen J, Eskelinen EL, Mizushima N, Ohsumi Y, Cattoretti G and Levine B: Promotion of tumorigenesis by heterozygous disruption of the beclin 1 autophagy gene. *J Clin Invest* 112: 1809-1820, 2003.
- Yue Z, Jin S, Yang C, Levine AJ and Heintz N: Beclin 1, an autophagy gene essential for early embryonic development, is a haploinsufficient tumor suppressor. *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 15077-15082, 2003.
- Scarlati F, Bauvy C, Ventruti A, Sala G, Cluzeaud F, Vandewalle A, Ghidoni R and Codogno P: Ceramide-mediated macroautophagy involves inhibition of protein kinase B and up-regulation of beclin 1. *J Biol Chem* 279: 18384-18391, 2004.
- Yu L, Alva A, Su H, Dutt P, Freundt E, Welsh S, Baehrecke EH and Lenardo MJ: Regulation of an ATG7-beclin 1 program of autophagic cell death by caspase-8. *Science* 304: 1500-1502, 2004.
- Yaguchi M, Miyazawa K, Otawa M, Katagiri T, Nishimaki J, Uchida Y, Iwase O, Gotoh A, Kawanishi Y and Toyama K: Vitamin K2 selectively induces apoptosis of blastic cells in myelodysplastic syndrome: flow cytometric detection of apoptotic cells using APO2.7 monoclonal antibody. *Leukemia* 12: 1392-1397, 1998.
- Tsuchida A, Nagae I, Saitoh H, Ikeda T, Tanabe Y, Takahashi S, Aoki T and Itoi T: *Clin Gastroenterol* 21: 705-709, 2006.
- Saijyo S, Kudo T, Suzuki M, Katayose Y, Shinoda M, Muto T, Fukuhara K, Suzuki T and Matsuno S: Establishment of a new extrahepatic bile duct carcinoma cell line, TFK-1. *Tohoku J Exp Med* 177: 61-71, 1995.
- Yoshida K, Tomizawa H, Ota T, Nagashima T, Kikuchi H, Watanabe H, Hashizaki K and Yonaha A: Establishment and characterization of human cholangiocarcinoma, MEC, producing carbohydrate antigen 19-9. *Hum Cell* 3: 346-351, 1990.
- Miyagiwa M, Ichida T, Tokiwa T, Sato J and Sasaki H: A new human cholangiocellular carcinoma cell line (HuCC-T1) producing carbohydrate antigen 19-9 in serum-free medium. *In Vitro Cell Dev Biol* 25: 503-510, 1989.
- Paglin S, Hollister T, Delohery T, Hackett N, McMahlil M, Sphicas E, Domingo D and Yahalom J: A novel response of cancer cells to radiation involves autophagy and formation of acidic vesicles. *Cancer Res* 61: 439-444, 2001.
- Traganos F and Darzynkiewicz Z: Lysosomal proton pump activity: supravital cell staining with acridine orange differentiates leukocyte subpopulations. *Methods Cell Biol* 41: 185-194, 1994.
- Stankiewicz M, Jonas W, Hadas E, Cabaj W and Douch PG: Supravital staining of eosinophils. *Int J Parasitol* 26: 445-446, 1996.
- Nishimaki J, Miyazawa K, Yaguchi M, Katagiri T, Kawanishi Y, Toyama K, Ohyashiki K, Hashimoto S, Nakaya K and Takiguchi T: Vitamin K2 induces apoptosis of novel cell line established from a patient with myelodysplastic syndrome in blastic transformation. *Leukemia* 13: 1399-1405, 1999.
- Wang Z, Wang M, Finn F and Carr BI: The growth inhibitory effects of vitamins K and their actions on gene expression. *Hepatology* 22: 876-882, 1995.
- Kanzawa T, Kondo Y, Ito H, Kondo S and Germano I: Induction of autophagic cell death in malignant glioma cells by arsenic trioxide. *Cancer Res* 63: 2103-2108, 2003.
- Kanzawa T, Germano IM, Komata T, Ito H, Kondo Y and Kondo S: Role of autophagy in temozolomide-induced cytotoxicity for malignant glioma cells. *Cell Death Differ* 11: 448-457, 2004.
- Shao Y, Gao Z, Marks PA and Jiang X: Apoptotic and autophagic cell death induced by histone deacetylase inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 18030-18035, 2004.
- Shimizu S, Kanaseki T, Mizushima N, Arakawa-Kobayashi S, Mizuta T, Thompson CB and Tsujimoto Y: Role of Bcl-2 family proteins in a non-apoptotic programmed cell death dependent on autophagy genes. *Nat Cell Biol* 6: 1221-1228, 2004.
- Sano Y, Tadano K, Kaneko K, Kikuchi K and Yuzuriha T: Metabolic fate of menatetrenone in rats - absorption, distribution, metabolism and excretion after a single oral administration. *Jpn Pharmacol Ther* 23: 2659-2667, 1995.
- Sano Y, Tadano K, Kikuchi K, Kaneko K, Yuzuriha T, Kimura T and Murayama Y: Metabolic fate of menaquinone-4 in dogs (I): Absorption, distribution, metabolism and excretion after a single oral administration. *Drug Metab Pharmacokinet* 12: 48-57, 1997.
- Sano Y, Tadano K, Kikuchi K, Kaneko K, Yuzuriha T, Kimura T and Murayama Y: Metabolic fate of menaquinone-4 in dogs (II): Absorption, distribution, metabolism and excretion after a single oral administration. *Drug Metab Pharmacokinet* 12: 58-67, 1997.

尾側臍切除における切離方法と臍液瘻の検討

東京医科大学外科学第3講座

永川裕一 土田明彦 小澤隆
粕谷和彦 斉藤準 池田隆久
青木利明 青木達哉

日本外科系連合学会誌 第32巻4号

平成19年8月30日発行 別刷

原著

尾側膵切除における切離方法と膵液瘻の検討

東京医科大学外科学第3講座

永川 裕一 土田 明彦 小澤 隆
粕谷 和彦 斉藤 準 池田 隆久
青木 利明 青木 達哉

Relationship between Resection Method and Pancreatic Fistula after Distal Pancreatectomy

Yuichi NAGAKAWA, Akihiko TSUCHIDA, Takashi OZAWA,
Kazuhiko KASUYA, Hitoshi SAITO, Takahisa IKEDA,
Toshiaki AOKI and Tatsuya AOKI

Third Department of Surgery, Tokyo Medical University

目的：尾側膵切除症例において切離方法別による膵液瘻発生率と発生要因を解析し、その防止策を検討した。
方法：尾側膵切除が施行された56例を対象とした。膵切離法はメス・電気メス（従来法）、ハーモニックスカルペル（HS）、自動縫合器が用いられ、各膵切離法において膵液瘻発生率およびその臨床・病理組織学的要因に関する検討を行った。結果：膵液瘻発生は従来法群（21.7%）、HS群（23.8%）と比較し自動縫合器群（16.7%）が最も少なかった。術後在院期間も自動縫合器群が有意に良好であった。膵断端の病理組織像において、HS群では膵組織に線維化を伴った症例では膵液瘻発生がなかった。自動縫合器群では、良性腫瘍や膵断端の線維化を伴わない正常膵で有意に膵液瘻発生が少なく、一方、膵断端が厚い症例では有意に発生率が高かった。考察：膵液瘻発生防止のため、切離方法は、膵炎の有無、膵断端の厚さによって使い分けが必要であると思われた。

索引用語：尾側膵切除 (distal pancreatectomy), 膵液瘻 (pancreatic fistula), 自動縫合器 (auto suture stapler),
ハーモニックスカルペル (Harmonic Scalpel), 術後合併症 (postoperative complication)

はじめに

尾側膵切除は膵頭十二指腸切除と比較し術後死亡率は低い¹⁾²⁾、術後合併症の発生率は22%~47%³⁾⁴⁾と高い。中でも膵液瘻の発生は、約5~30%と高頻度であり^{2)4)~7)}、しかも一旦膵液瘻が発生すると術後在院期間を長期に延長させる原因となる。現在までに膵液瘻防止策として、様々な膵切離方法が試みられており、従来からのメス、電気メスの他に、ハーモニックスカルペル(HS)^{8)~10)}、自動縫合器による膵切離が報告されてい

る^{11)~14)}。しかしながら、膵液瘻発生率は報告によって異なり、未だ最善の切離方法が確立されていない。

膵頭十二指腸切除における膵液瘻発生においては、切離膵の線維化や、主膵管の拡張の有無がその発生率に大きく関わっていると報告されている¹⁵⁾¹⁶⁾。尾側膵切除においても何らかの影響が予測されるが、現在まで関連性を検討した報告は少なく、またそれぞれの膵切離法における関連性を検討した報告はない。

今回われわれは、尾側膵切除においていかなる

要因が膵液瘻発生に関与しているかを患者背景と膵断端の病理組織学的因子の両面から解析し、発生要因を検討した。また切離方法別による膵液瘻発生率とその発生要因との関連性を解析しその防止策を検討した。

対象および方法

1995年1月から2006年5月まで、当院にて尾側膵切除が施行された56例を対象とした。年齢は13歳～77歳(平均57.5±14.6歳)、男性24例、女性32例(男女比1:1.3)、疾患別の内訳は浸潤性膵管癌14例、内分泌腫瘍またはsolid-pseudopapillary tumor (SPT) 9例、膵管内乳頭粘液性腫瘍(IPMN) 13例、粘液性嚢胞腫瘍(MCN)または漿液性嚢胞腫瘍(SCN) 16例、胃癌3例、慢性膵炎1例であった。当院における膵切離方法は1999年5月以前ではメス、電気メスで行い、それ以降は、ハーモニクスカルペル(HS)による切離に変更した。2004年9月以降では自動縫合器による膵切離を基本としている。

メス、電気メスによって膵切離した従来法は23例で、切離方法は膵切離予定線頭側を、ネラトンをういクランプ後、メスにて一気に膵切離し、膵断端からの出血に対しては電気メスにて止血した。また止血困難部位は5-0プローリンでZ縫合し止血した。HSによる膵切離は21例で、HSの出力レベル3に設定した。主膵管周囲以外をすべてHSで切離し、主膵管は周囲膵組織を含め、メスにて切開した。従来法、HSともに、主膵管は牽引しモスキート鉗子で把持後、非吸収性モノフィラメント糸で二重結紮した。膵断端は4-0プローリンで6-8針マットレス縫合した。自動縫合器は12症例に行い、縫合器はTL-60(6例)、Endo-GIA(6例)を用いた。膵切離面の追加縫合は通常行わず、断端からの出血を認めた場合のみ出血部位を5-0プローリンにてステープル間に追加縫合し止血した。ドレーンは膵断端左下方から膵断端面に、またWinslow孔経由から膵断端面近傍に、どちらか一本もしくは両方にペンローズドレーンを留置した。またドレーン挿入時、ペンローズ内にアトムチューブを留置し、術後定期的にドレーン排液を採取しアミラーゼの測定を行った。

膵液瘻の定義は、術後7日目以降のドレーンからの排液アミラーゼ値が1万U/L以上とした。膵液瘻発生要因の検索として、患者背景(年齢、男女比、悪性の有無、疾患)との関連を調べ、各膵切離別にも解析した。さらに膵切離面の病理組織学的因子と膵液瘻発生との関連性として、切除断端の線維化の有無、主膵管の太さ(膵断端主膵管径)、膵切離線(門脈直上または右側、門脈左側)、膵の大きさ(膵断端実質の横径)を計測し、膵液瘻発生要因を膵切離方法別に検討した。

統計学的解析はStatView 4.5を用い、 χ^2 検定を行った。P<0.05を統計学的有意差ありとした。

結 果

1. 膵液瘻の発生と在院期間

膵液瘻は56例中12例(21.4%)に発生した。膵液瘻を伴った患者の術後在院期間は59.6日±16.6で膵液瘻のない患者の29.7日±14.0と比較し有意に在院期間が長かった(p<0.01)。

2. 患者背景と膵液瘻発生との関連

患者背景において、膵液瘻発生は高齢者に少なく、良性腫瘍に多かった。また疾患別ではIPMNに最も多くみられたが胃癌や慢性膵炎では認めなかった。統計学的には膵液瘻発生と関連する因子はなかった(Table 1)。

3. 膵切離方法と膵液瘻発生との関連

自動縫合器による膵切離の膵液瘻発生率は16.7%(TL-60:1/6例, Endo-GIA:1/6例)で、従来法やHSによる膵切離法と比較し少なく、また腹腔内感染の合併も少なかった。術後在院期間では有意に自動縫合器群で短かった(P<0.05)(Table 2)。

4. 膵切離方法と病理組織学的因子および膵液瘻発生との関連

膵断端の病理組織学的因子との比較では、全体では膵液瘻発生と膵線維化の有無や主膵管の太さとの関連は認めなかった。膵切離線においては門脈直上または右側で切離した症例に膵液瘻発生がやや多く、膵断端の短径が大きい症例にやや多かった。しかし統計学的に膵液瘻発生と有意に関連する因子はなかった(Table 3)。膵の切離方法別にみると、HS群では、膵断端組織に線維化を伴っ

Table 1 Relationship between patient characteristics and pancreatic fistula

	Pancreatic fistula
Age (year)	
≥70y	2/17 (6.7 %)
< 70y	10/39 (32.1 %)
Gender	
Female	6/32 (18.8 %)
Male	6/24 (25.0 %)
Malignancy	
Malignant	4/30 (13.3 %)
Benign	8/26 (30.8 %)
Pathology	
Invasive ductal carcinoma	1/14 (7.1 %)
IPMNs	5/13 (38.5 %)
MCN or SCN	4/16 (25.0 %)
Endocrine neoplasm or Solid-pseudopapillary tumor	2/ 9 (22.2 %)
Gastric cancer	0/3 (0 %)
Chronic pancreatitis	0/1 (0 %)

Table 2 Relationship between resected methods of closure and pancreatic fistula

Resected methods	Pancreatic fistula	Intra-abdominal infection	Length of hospitalization (days)
Conventional	5/23 (21.7 %)	2/23 (8.7%)	39.8 ± 19.7
Harmonic scalpel	5/21 (23.8 %)	3/21 (9.5 %)	43.2 ± 20.3
Stapler	2/12 (16.7 %)	0/12 (0 %)	24.8 ± 13.8

* Statistically significant difference (p < 0.05)

た症例では膵液瘻発生がなかった。自動吻合器群では、膵断端の線維化を伴わない正常膵で有意に膵液瘻発生が少なく (p<0.05), 一方, 膵断端が厚い症例では有意に発生率が高かった (p<0.05) (Table 4)。

考 察

尾側膵切除における膵液瘻発生率は、当科では21.4%であったが、他の報告をみると、5%から30%と幅広い^{2)~7)}。この原因の一つとして、施設によって膵液瘻の定義が異なっており⁴⁾、膵液瘻発生率を施設ごとで比較する妨げとなっている。今後は、膵液瘻の共通の定義を作ることが必要である。

尾側膵切除における膵液瘻発生要因に関して現

Table 3 Relationship between pathological factors and pancreatic fistula

	Pancreatic fistula
Pancreatic stump	
Normal	10/48 (20.8 %)
Fibrotic	2/ 8 (25.0 %)
Main pancreatic duct	
< 2mm	9/43 (20.9 %)
≥2mm	3/13 (23.1 %)
Location	
Right side of portal vein or position of portal vein	8/29 (27.6 %)
Left side of portal vein	4/27 (14.8 %)
Size of pancreatic stump	
< 1.5cm	7/38 (18.4 %)
≥1.5cm	5/18 (27.8 %)

Table 4 Relationship between resected methods, pathological factors, and pancreatic fistula

	Pancreatic fistula		
	Conventional	Harmonic scalpel	Stapler
Malignancy			
Malignant	3/11 (27.3 %)	1/11 (9.1 %)	0/ 8 (0 %)
Benign	2/12 (16.7 %)	4/10 (40.0 %)	2/ 4 (50.0 %)
Pancreatic stump			
Normal	4/20 (20.0 %)	5/17 (29.4 %)	1/11 (9.1%)
Fibrotic	1/ 3 (33.3 %)	0/ 4 (0 %)	1/ 1 (100 %)
Main pancreatic duct			
< 2mm	3/17 (17.6 %)	4/16 (25.0 %)	2/10 (20.0 %)
≥2mm	2/ 6 (33.3 %)	1/ 5 (20.0 %)	0/ 2 (0 %)
Location			
Right side of portal vein or position of portal vein	3/ 13 (23.1 %)	4/14 (28.6 %)	1/ 2 (50.0 %)
Left side of portal vein	2/ 10 (20.0 %)	1/ 7 (14.3 %)	1/10 (10.0 %)
Size of pancreatic stump			
< 1.5cm	4/16 (25.0 %)	3/13 (23.1 %)	0/ 9 (0 %)
≥1.5cm	1/ 7 (14.3 %)	2/ 8 (25.0 %)	2/ 3 (66.7 %)

* Statistically significant difference (p < 0.05)

在までいくつか報告がなされている。Sledzianowskiら⁶⁾は患者背景と膵液瘻の関係を検討し、肥満が唯一の膵液瘻発生要因だったと報告している。Fahyら⁴⁾は51例の尾側膵切除において、患者背景と膵液瘻の発生に明らかな関連因子はなかったと報告している。われわれの検討でも、膵液瘻発生と患者背景因子との間に統計学的に明らかな関連性があるものはなかった。また膵頭十二指腸切除において、硬化膵と比較して正常膵では膵液の産生が多いため膵液瘻が多いと報告されてお

り¹⁵⁾¹⁶⁾、尾側膵切除においても同様の結果が予測されたが、今後の検討では線維化を伴った膵組織でも膵液瘻発生率は高かった。これより尾側膵切除では正常膵と同様、硬化膵においても膵液瘻発生に注意が必要と考える。

膵液瘻発生予防のため、現在まで様々な工夫が報告がなされている。従来のメス、電気メスによる方法では、分枝膵管からの膵液の漏出による膵液瘻の発生がおこると考え、CUSAにより分枝膵管を露出して結紮し、膵液瘻の発生が減少したとの報告や⁷⁾¹⁷⁾、fibrinを膵管内に注入し分枝膵管を閉鎖して、膵液瘻を軽減させたとの報告¹⁸⁾、分枝膵管をHSなどの超音波凝固切開装置にてシーリングすることで、膵液瘻発生予防に有効であったとの報告がある^{8)~10)}。しかしながら超音波凝固切開装置による膵断端処理法では膵液瘻発生減少に寄与しなかったとの報告もいくつかみられる⁷⁾¹⁹⁾。当科でもHSによる超音波凝固切開装置を用いた方法と従来のメス、電メスによる従来法と比較した膵液瘻発生率に差はなかった。HSの特徴として、凝固効果と切開効果は出力、組織にかかる緊張、ブレードの把持力、組織の種類によって異なるとされ²⁰⁾、組織に強い緊張で切離すると、凝固効果より切開効果が強くなり、分枝膵管がシーリングされる前に切離される可能性がある。この技術的な問題が膵液瘻発生率の差になっている可能性が考えられる。一方、今回の検討で、膵断端の病理組織像と比較したところ、HSによる膵切離は膵実質の線維化を伴う症例では膵液瘻の発生はなかった。これより線維化を伴う膵においてはHSにおける分枝膵管のシーリング効果がより有効であると考えられた。

自動縫合器による膵切離は、1979年にPachterら¹¹⁾が初めて12例の膵切離に使用し、その有用性を報告して以来、さまざまな施設で使用され、膵液瘻発生率の減少が報告されている¹³⁾¹⁴⁾。縫合器は従来TAやTLなど2例のステープルが使われていたが、近年腹腔鏡下尾側膵切除では3列の自動縫合器(Endo-GIA, Endo-Cutter)が用いられている。Takeuchiら¹³⁾は10症例にEndo-GIAを使用し、従来法と比較し有意に膵液瘻の発生が抑えられたとしている。当科ではTL-60とEndo-GIA

を使用しており、ともに膵液瘻発生率は16.7%と他の方法と比べ比較的良好な成績であった。また、術後在院期間も他の膵切離方法と比較し有意に短縮していたほか、手技自体も簡単であることから手術時間の短縮ができ膵切離に有用な方法と思われる。しかしながら、自動縫合器は消化管の縫合切離を目的として開発されたもので、厚さ数ミリの組織を対象としており、膵組織の厚さは通常1~2cmあるため自動縫合器を閉じる際に膵実質の裂傷を起こすことが指摘されている¹²⁾。今回の検討においても、膵実質が厚く線維化がある症例に膵液瘻が発生したことから、膵実質の厚い症例や線維化がある症例では、その適応を慎重にすべきである。今後は厚い膵組織でも安全に切離できる、膵切離用の自動縫合器の開発が待たれる。

結 語

尾側膵切除では、依然として膵液瘻が一定の割合で発生しており、これを予防するために、膵炎の有無、膵断端の厚さによって、従来法、HS、自動縫合器を使い分けることが必要と考えられた。

参考文献

- 1) Balcom JH, Rattner DW, Warshaw AL, et al : Ten years' experience with 733 pancreatic resections : changing indications, older patients, and decreasing length of hospitalization. Arch Surg 136 : 391-398, 2001
- 2) Lillemoe KD, Kaushal S, Cameron JL, et al : Distal pancreatectomy : indications and outcomes in 235 patients. Ann Surg 229 : 693-698, 1999
- 3) Aldridge MC, Williamson RC : Distal pancreatectomy with and without splenectomy. Br J Surg 78 : 976-979, 1991
- 4) Fahy B, Frey C, Hung S, et al : Morbidity, mortality, and technical factors of distal pancreatectomy. Am J Surg 183 : 237-241, 2002
- 5) Sheehan MK, Beck K, Creech S, et al : Distal pancreatectomy : does the method of closure influence fistula formation? Am Surg 68 : 264-267, 2002
- 6) Sledzianowski JF, Duffas JP, Muscari F, et

- al: Risk factors for mortality and intra-abdominal morbidity after distal pancreatectomy. *Surgery* 137: 180-185, 2005
- 7) 浅井浩司, 炭山嘉伸, 渡邊 学他: 膵切除方法別にみた術後膵液瘻発生に関する検討. *日外科系連合会誌*30: 590-595, 2005
- 8) Okabayashi T, Kobayashi M, Sugimoto T, et al: Postoperative pancreatic fistula following distal pancreatectomy for pancreatic neoplasm; can pancreatic fistula be prevented? *Hepatogastroenterology* 51: 1838-1841, 2004
- 9) Takao S, Shinchi H, Maemura K, et al: Ultrasonically activated scalpel is an effective tool for cutting the pancreas in biliary-pancreatic surgery: experimental and clinical studies. *J Hepato-Bilia-Pancr Surg* 7: 58-62, 2000
- 10) Sugo H, Mikami Y, Matsumoto F, et al: Comparison of ultrasonically activated scalpel versus conventional division for the pancreas in distal pancreatectomy. *J Hepato-Bilia-Pancr Surg* 8: 349-352, 2001
- 11) Pachter HL, Pennington R, Chassin J, et al: Simplified distal pancreatectomy with the Auto Suture stapler: preliminary clinical observations. *Surgery* 85: 166-170, 1979
- 12) 吉田和彦, 藤岡秀一, 三澤健之他: 膵切除法 自動縫合器を用いた膵切除. *外科*64: 639-642, 2002
- 13) Takeuchi K, Tsuzuki Y, Ando T, et al: Distal pancreatectomy: is staple closure beneficial? *ANZ J Surg* 73: 922-925, 2003
- 14) Lansing PB, Browder IW, Harkness SO, et al: Staple closure of the pancreas. *Am Surg* 49: 214-217, 1983
- 15) Sato N, Yamaguchi K, Chijiwa K, et al: Risk analysis of pancreatic fistula after pancreatic head resection. *Arch Surg* 133: 1094-1098, 1988
- 16) Hamanaka Y, Nishihara K, Hamasaki T, et al: Pancreatic juice output after pancreatoduodenectomy in relation to pancreatic consistency, duct size, and leakage. *Surgery* 119: 281-287, 1996
- 17) Suzuki Y, Fujino Y, Tanioka Y, et al: Randomized clinical trial of ultrasonic dissector or conventional division in distal pancreatectomy for non-fibrotic pancreas. *Br J Surg* 86: 608-611, 1999
- 18) Suc B, Msika S, Fingerhut A, et al: Temporary fibrin glue occlusion of the main pancreatic duct in the prevention of intra-abdominal complications after pancreatic resection: prospective randomized trial. *Ann Surg* 237: 57-65, 2003
- 19) 栗田信浩, 田代征記: 尾側膵切除における断端処理 尾側膵切除における断端処理のピットフォール. *外科*64: 643-646, 2002
- 20) 椎葉健一, 石井誠一, 溝井賢幸他: 超音波凝固切開装置 (ハーモニック・スカルペル) とLigaSureTMの特徴と使い方. *外科治療*89: 34-41, 2003

特集 センチネルリンパ節理論の消化器癌への応用

2

センチネルリンパ節の同定

(1) RI 法

高木 融* 星野 澄人* 片柳 創*
須藤日出男* 逢坂 由昭* 篠原 玄夫*
吉村 真奈** 土田 明彦* 青木 達哉*

Key words : センチネルリンパ節, RI 法, スズコロイド, フチン酸

要旨

センチネルリンパ節同定の RI (radioisotope) 法は半減期 6 時間と短い^{99m}Tc を使用し安全であるが、放射性同位元素使用室で使用しなければならない。トレーサーはスズコロイドとフチン酸が用いられている。センチネルリンパ節の同定は主病巣周囲には shine through 現象の影響が強く、これを避ける方向からのプローブの操作とコリメーターが必要となる。診断基準は一般的には「バックグラウンドの 10 倍以上」が使われている。リンパシンチグラフィは食道癌では有用であるが胃癌ではあまり行われず、消化器領域では使用することの少ない RI の特性や安全性を理解して施行しなければならない。

節郭清を省略する sentinel node navigation surgery (SNNS) が悪性黒色腫や乳癌で行われている。本邦でもすでに臨床応用されおり、侵襲の軽減がはかられている。一方、消化器癌では本邦を中心に食道癌、胃癌、大腸癌などで研究が進められている。とくに、胃癌では 2 種類の多施設共同研究が進行中である。消化器癌で SNNS ができれば、リンパ節に転移のない症例を個別に診断でき臓器の温存が可能となるため、QOL の向上に有用であるのはいままでもない。本稿では、とくに RI (radioisotope) 法による SN の同定法について、自験例を含めた最近の知見と今後の展望について概説する。

はじめに

センチネルリンパ節 (sentinel lymph node ; SN) とは、癌からのリンパ流を最初に受けるリンパ節で、癌の転移はこの SN から始まるというのがセンチネルコンセプトである。欧米では、SN に転移がなければ予防的リンパ

なお、日本核医学会では RI 法が安全に行われるよう「センチネルリンパ節の核医学的検出法ガイドライン」を作成している¹⁾。RI 法による SN 同定はこれに準じて施行する必要がある。放射性薬剤は^{99m}Tc 製剤で、投与場所は診療用放射性同位元素使用室でなければならない。

*東京医科大学外科学第三講座 **同 放射線医学
(〒160-0023 東京都新宿区西新宿 6-7-1)

I. 放射性薬剤と安全性

この項のポイント

- ^{99m}Tc は半減期 6 時間と短い。

^{99m}Tc は半減期 6 時間と短く、10 半減期の 60 時間後には放射線はほとんど検出されなくなる。腫瘍親和性のある ^{67}Ga は、SN を同定するには使用できない。安全性は、1 手術当り執刀医の被曝は平均 $6.7 \mu\text{Sv}$ であり、年間 100 例の手術を施行したとしても一般公衆の線量限度の年 1 mSv を超えることはなく、有害な影響を及ぼすことは考えられない²⁾。

II. トレーサーの種類

この項のポイント

- SN を同定するための理想的なトレーサーは、リンパ節への移行がよく、遠位のリンパ節に流出しないことである。
- 本邦では、スズコロイドかフチン酸が用いられている。

SN を同定するための理想的なトレーサーは、リンパ節への移行がよく、SN に取り込まれたら長く留まり遠位のリンパ節に流出しないことであるが、SN を同定するための専用のトレーサーはない。

欧米では nanocolloid や sulfur colloid が使用されているが、本邦では使用できずスズコロイド(粒子径 400~1,000 nm)かフチン酸(粒子径 200~400 nm)が用いられている。レニウムコロイドを使用している施設もあるが、未承認放射性医薬品であるため個人輸入しなければならない。

スズコロイドは、過テクネチウム酸ナトリウム溶液と塩化スズ溶液の混合比を変えることにより粒子径を変えることができるが、この調整は容易ではなく、どの施設でも簡単にできるものではない³⁾。Sudo ら⁴⁾や Kitagawa ら⁵⁾は胃

癌でスズコロイドを使用し、良好な結果を得ている。

フチン酸は投与後にカルシウムと反応してコロイドを形成する。投与直後は粒子径が小さいため SN に速やかに移行しやすく、SN に到達するころには時間とともに大きな粒子径に生長するためにリンパ節内に留まりやすいという特徴をもっている⁶⁾。

III. 注入法と注入量

この項のポイント

- RI は、診療用放射性同位元素使用室で投与しなければならない。
- 10 例くらいの learning curve があるので、初めは内視鏡医と注入医を固定したほうが良い。

RI は、ガイドラインに定められているように診療用放射性同位元素使用室で投与しなければならない。術前に、内視鏡を用い 0.5 ml ずつ 4 カ所の計 2 ml を粘膜下層に、腫瘍を取り囲むように局注している。当初は、測定時 0.5 mCi になるように投与量を決定していたが⁷⁾、現在では測定時の RI の線量を 0.3 mCi としているので、6 時間前 0.6 mCi 、24 時間前 4.8 mCi となる。

手術の当日に注入すると腸管内に空気が入り手術の邪魔になるために、前日投与が望ましい。粘膜下にはゆっくり注入しないと漏れる量が増えてリンパ節に移行する割合(% ID)が減少するので、注意が必要である。われわれの施設でも初めの 10 例では SN の平均個数は 3.4 個、最高 % ID は $0.053\% \text{ ID}$ 、次の 10 例では 4.4 個、 $0.114\% \text{ ID}$ 、次の 10 例では 5.5 個、 $0.254\% \text{ ID}$ 、次の 10 例では 5.3 個、 $0.292\% \text{ ID}$ と、少なくとも 10 例くらいの learning curve があるので、初めは内視鏡医と注入医を固定したほうがよいと思われる。

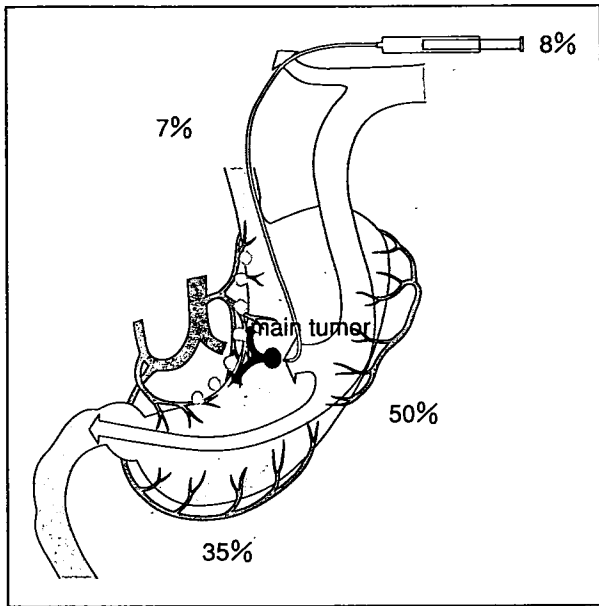


図1 実際の RI の流れ

投与した RI は注射筒と穿刺針に 15% 残り、また、35% が注入時の漏れで実際に主病巣には 50% しか局注されていなかった。

IV. 実際の RI の流れ

この項のポイント

- 投与した RI は、主病巣には全投与量の $50.1 \pm 17.9\%$ 残存しており、残り $33.9 \pm 15.8\%$ がリンパ節への移行と注入時の漏れであった。

われわれは、RI 投与時に使用した注射筒と穿刺針をキュリーメーターで測定し、また、摘出胃を術後にガンマカメラで測定し実際の RI の流れを検討した。RI は全投与量のうち、注射筒に $8.9 \pm 3.0\%$ 、穿刺針に $7.1 \pm 4.8\%$ 残存しており、実際の投与量は $84 \pm 4.0\%$ になっていた。また、主病巣には全投与量の $50.1 \pm 17.9\%$ 残存しており、残り $33.9 \pm 15.8\%$ がリンパ節への移行と注入時の漏れであった(図 1)。SN の多くは 0.02% ID 以上で、ガンマプローブでは 50 count/10 sec 以上であった。

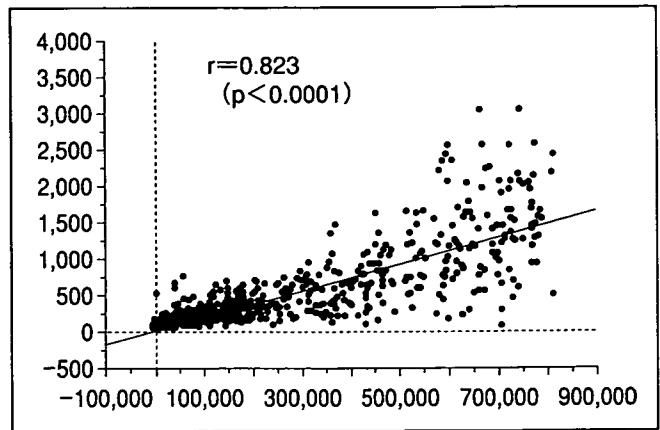


図2 摘出リンパ節のガンマプローブとウェル型シンチレーションカウンターの関係

V. ガンマプローブの精度

この項のポイント

- 既知の濃度の RI 線源を、ガンマプローブとウェル型シンチレーションカウンターで測定すると相関がみられた。
- 摘出リンパ節では、いろいろな方向からガンマプローブで測定しなければならない。

既知の濃度の RI 線源をガンマプローブとウェル型シンチレーションカウンターで測定すると相関がみられ、また、ガンマプローブでカウントできる範囲は 0.5 ml 溶液中に $1 \times 10^{-1} \sim 1 \mu\text{Ci}$ の線量がなければならない。次に、実際に摘出リンパ節で同様に検討すると、ガンマプローブでカウントできたリンパ節は 20～4,800 count/10 sec の 955 個であった。ウェル型シンチレーションカウンターでは 4,000～820,515 count/10 sec で両者の間に強い相関がみられた(図 2)⁸⁾。摘出リンパ節では RI がリンパ節全体に均一に流入することはないため、いろいろな方向からガンマプローブで測定しなければならない。

VI. SN の同定

この項のポイント

- RI の注入部位は、いろいろな方向からガンマプローブを操作し検出しなければならない。

術中 SN を診断する検出器は NAVIGATOR GPS (Tyco Health care Japan) (図 3), neo 2000 (千代田テクノル), C-Track などがある。RI の注入部位は高い radioactivity を有することから、これを避けるためにいろいろな方向からガンマプローブを操作し検出しなければならない。shine through 現象の影響を少なくするために、コリメーターや鉛板を使用し側方線量を遮蔽することが重要である (図 4)。



図 3 NAVIGATOR GPS
コントロールユニットと
プローブ。



図 4 プローブとコリメーターと鉛板
上段は鏡視下用プローブ、下段は通常ブ
ローブ。キャップは指向性を高めるコリ
メーターと遮蔽用鉛板。

SN を摘出したら必ず *ex vivo* で再度カウントし、SN であることを確認しなければならない。

VII. SN の診断

この項のポイント

- もっとも一般的な診断基準は「10 count/10 sec 以上」である。

診断基準は一定のものはないが、もっとも一般的なのは「バックグラウンドの 10 倍以上、つまり 10 count/10 sec 以上」である。他に、「最高カウントの 1/10 まで」や「カウントできたすべて」などがある。われわれの施設では、注入量のリンパ節への移行率である %ID を指標に 0.02%ID 以上を SN の診断基準にしていたが、測定手技が煩雑なために現在では 10 count/10 sec 以上にしている^{4),9)~11)}。

VIII. リンパシンチグラフィ

この項のポイント

- 食道癌では、主病巣から離れた部位に SN が存在することがあり、リンパシンチグラフィが有用である。
- 主病巣近傍の SN は、shine through 現象により描出できないこともある。

食道癌では跳躍転移はまれではなく、主病巣から離れた部位に SN が存在することがあり、リンパシンチグラフィが有用である。ガンマプローブで検出された SN の平均は 5.3 個であるが、シンチグラフィで SN が描出された症例は 81% (17/21 例) にすぎず、hot spot の平均は 1.2 個 (1~4 個) であった。これは、とくに主病巣近傍の SN は shine through 現象により描出できないこともあるため個数に乖離がみられると考えられ、撮影条件や画像処理など検討が進められている。胃癌では shine through 現

象のためリンパシンチグラフィはほとんど行われていない。

IX. SN 同定の成績

この項のポイント

- 食道癌ではSNは3領域のどの領域にも、また連続しない2領域にもみられた。
- 胃癌ではSNはどの部位にもみられた。

食道癌：適応をT1aN0にしている。同定率は95.5%(21/22例)、SNの個数は平均5.3個(1~17個)、転移陽性検出率は75%(6/8例)、正診率は90.5%(19/21例)であった。ガンマプローブのカウントは31~4,700 count/10 secであった。

胃癌：適応をT1/T2N0にしている。同定率は100%(203/203例)、SNの個数は平均4.7個(1~16個)、転移陽性検出率は91.7%(33/36例)、正診率は98.5%(202/205例)であった。ガンマプローブのカウントは20~4,800 count/10 secであった。

食道癌ではSNは3領域のどの領域にもみられ、また連続しない2領域にもみられた。胃癌でもSNはどの部位にもみられ、癌取扱い規約の第1群リンパ節にのみSNを認める症例は58%にすぎなかった。占居部位別にSNの分布予測はある程度可能であるが、正確にSNを同定するためには個々に検索しなければならない。

X. 今後の展望

この項のポイント

- 食道癌では、RI法が主流となる。
- 胃癌では、RI・色素併用法がよい。

食道癌では3領域を同時に検索することは不可能なため、RI法が主流となると思われる。胃癌では2, 3mmの小さいSNに転移陽性の

こともあり、shine through現象や肥満で脂肪が多いと診断が困難な症例がある。一方、色素法単独でも良好な結果が得られているが、リンパ節の染色性、肥満で脂肪が多い症例では診断が難しいこともある。胃癌では視認性に優れ、トレーサーの停滞と客観性のあるRI・色素併用法がよいと思われる。

文 献

- 1) 日本核医学会：センチネルリンパ節の核医学的検出法ガイドライン。核医学 36；1033-1034, 1999
- 2) 横山邦彦：放射線被曝と安全性。北島政樹、久保敦司編：Sentinel Node Navigation—癌治療への新しい展開。75-80, 金原出版, 東京, 2002
- 3) Uenosono, Y., Natsugoe, S., Higashi, H., et al.: Evaluation of colloid size for sentinel nodes detection using radioisotope in early gastric cancer. *Cancer Lett.* 200；19-24, 2003
- 4) Sudo, H., Takagi, Y., Aoki, T., et al.: Establishment of the sentinel lymph node concept in early gastric cancer. *JJCS* 28；200-206, 2003
- 5) Kitagawa, Y., Ohgami, M., Fujii, H., et al.: Sentinel node mapping in gastrointestinal cancer: Radio-guided method and dye method. *Gastroenterol. Surg.* 23；1611-1615, 2000
- 6) 中村佳代子：センチネルリンパ節の核医学的検出に用いる放射性医薬品。北島政樹、久保敦司編：Sentinel Node Navigation—癌治療への新しい展開。43-51, 金原出版, 東京, 2002
- 7) 高木 融, 逢坂由明, 伊藤一成, 他：センチネルリンパ節同定法におけるRI至適投与量の検討。日消外会誌 34；1371, 2001
- 8) Harada, Y., Takagi, Y., Aoki, T., et al.: In vitro and vivo analysis of radio-guided lymph node detection for gastric cancer. *JJCS* 28；45-50, 2003
- 9) Kitagawa, Y., Fujii, H., Mukai, M., et al.: Intraoperative lymphatic mapping and sentinel lymph node sampling in esophageal and gastric cancer. *Surg. Oncol. Clin. N. Am.* 11；293-304, 2002
- 10) 草別智行, 末益公人, 菅又徳孝, 他：新しい乳癌の手術—Sentinel node(SN) biopsyを用いたり

ンパ節転移陰性乳癌縮小術. 日外科系連会誌
26; 163-166, 2001

- 11) McMasters, K. M., Reintgen, D. S., Ross, M. I., et al.: Sentinel lymph node biopsy for melanoma: How many radioactive node should be removed? Ann. Surg. Oncol. 8; 592-597, 2001

Summary

RI Method for Sentinel Lymph Node Detection

Yu Takagi*, Sumito Hoshino*,
So Katayanagi*, Hideo Sudo*,
Yoshiaki Osaka*, Motoo Shinohara*,
Mana Yoshimura**, Akihiko Tsuchida*
and Tatsuya Aoki*

^{99m}Tc, which has short half-life of six hours, is safely used for the detection of sentinel lymph node (SN) with

the radioisotope (RI) method. However, it must be used in an isolated RI room. ^{99m}Tc-tin colloid or ^{99m}Tc-phytate are used as tracers. Technically, a collimator and accurate aiming of gamma probes are required because of strong a "shine-through" phenomenon in the main lesion. Concerning diagnostic criteria, SN radioactivity is considered to be 10 times that of background levels. Lymphatic scintigraphy is useful for esophageal cancer treatment, but it is not frequently performed for gastric cancer. SN detection in the gastrointestinal region should be performed with an understanding of the characteristics and safety measures necessary for RI.

Key words : sentinel lymph node, radioisotope method, ^{99m}Tc-tin colloid, ^{99m}Tc-phytate

*Third Department of Surgery, **Radiology, Tokyo Medical University, 6-7-1 Nishishinjuku, Shinjuku-ku, Tokyo 160-0023, Japan

本書を読めば、現在の colitic cancer のすべてがわかるように企画 2006年5月刊

colitic cancer

— 診断と治療の現況

編集：渡邊 聡明 / 味岡 洋一 / 五十嵐正広 / 田中 信治

「colitic cancer」は全国的にも症例はまだ少なく、あらゆる事項について、ディスカッションの多い分野である。本書では、多数の施設から症例を提供いただき、これ1冊読めば「colitic cancer」の現況がわかるよう企画した。B5判 約270頁 定価 (本体16,000円+税)

主な内容

緒言 - UCの専門家に告ぐ

I. 疫学的総論

II. 病理学的総論

III. 画像診断

IV. サーベイランス法

1. サーベイランス-本邦と欧米の比較
2. ステップバイオブシー
3. ターゲットバイオブシー

V. 遺伝子学的話題

1. 潰瘍性大腸炎における遺伝子異常
2. 臨床応用

VI. 治療法

1. dysplasiaの扱い
2. dysplasiaに対する外科治療

VII. colitic cancer

サーベイランスと症例の実態

1. サーベイランスの実態

2. 症例の実態

症 例 (34症例呈示)

急速に進行した例/経過が迫った例/外科手術後の発生病例/診断困難例/内視鏡治療後に手術を要した例/見逃し例/その他/UC以外の炎症性腸疾患に合併した癌



日本メディカルセンター

ホームページアドレス : <http://www.nmck.co.jp>

〒101-0051 東京都千代田区神田神保町1-64 ☎03(3291)3901(代) FAX03(3291)3904

TS-1/CDDP の術前化学療法により
組織学的効果判定 Grade 3が得られた 4 型胃癌の 1 例

東京医科大学外科学第 3 講座, 同 病理学診断部*

須田 健 高木 融 片柳 創 星野 澄人
芹沢 博美* 土田 明彦 青木 達哉

A CASE OF FAR ADVANCED GASTRIC CANCER OF TYPE 4 TREATED
WITH TS-1/CDDP RESULTING IN CHEMOTHERAPY EFFICACY OF GRADE 3

Takeshi SUDA, Yu TAKAGI, So KATAYANAGI, Sumito HOSHINO,
Hiromi SERIZAWA*, Akihiko TSUCHIDA and Tatsuya AOKI
Third Department of Surgery and Department of Diagnostic Pathology*, Tokyo Medical University

日本臨床外科学会雑誌 第68巻 5号 別刷

(平成19年 5月25日発行)

症 例

TS-1/CDDP の術前化学療法により 組織学的効果判定 Grade 3が得られた 4 型胃癌の 1 例

東京医科大学外科学第 3 講座, 同 病理学診断部*

須田 健 高木 融 片柳 創 星野 澄人
芹沢 博美* 土田 明彦 青木 達哉

69歳, 男性. 検診にて胃壁硬化を指摘されて来院. 上部消化管内視鏡検査で胃体上部から前庭部に粘膜不整と壁伸展不良を認め, 生検診断は低分化腺癌であった. 上部消化管造影検査でも胃体部の壁硬化を確認した. 腹部 CT 検査では膵臓への浸潤が疑われ, CA72-4は36U/ml であった. 進行 4 型胃癌で膵臓への浸潤も疑われたため, TS-1/CDDP 療法 (TS-1: 120mg/body 3 週投与 2 週休薬, CDDP: 90mg/body day 8 の 5 週 1 コース) を先行して施行した. 2 コース後の内視鏡検査では胃壁の伸展は改善し, 胃体部小彎に癒痕を認めたが生検で癌細胞は検出されなかった. 腹部 CT 検査で膵臓への浸潤は明らかでなく, CA72-4は正常化した. 患者の希望により, 胃全摘術, D2郭清を施行した. 組織学的に摘出胃, リンパ節に癌細胞を認めず, 化学療法の組織学的効果判定は Grade 3であった. TS-1/CDDP 療法が著効した 1 例を報告した. 本法は進行 4 型胃癌に期待される化学療法と思われた.

索引用語: 胃癌, TS-1/CDDP, 組織学的効果判定 Grade 3

はじめに

近年, 切除困難な進行胃癌に対して TS-1 単独あるいは併用による化学療法が行われ, 著効例も報告されている. しかし, 薬物治療の組織学的効果判定¹⁾の Grade 3 を得た症例は稀である. 今回われわれは進行 4 型胃癌に TS-1/CDDP 療法を施行し, 組織学的効果 Grade 3 を確認したので報告する.

症 例

症例: 69歳, 男性.

家族歴: 父親が胃癌.

既往歴: 12歳時に虫垂切除術.

現病歴: 検診の上部消化管造影検査で胃体部の伸展不良を指摘され, 精査のため当院消化器内科を受診した. 上部消化管内視鏡検査で胃体上部から前庭部にかけて全周性に胃粘膜の不整像を認め, 生検結果は低分化腺癌であった. 胃癌と診断され, 加療目的で入院した.

入院時所見: 体表リンパ節を触れず, 下腹部に手術痕を認めたが, 平坦, 軟, 肝脾その他の腫瘍も触知せず, 腹水は認めなかった.

入院時検査所見: 血液および生化学検査に異常を認めなかった. 腫瘍マーカーは CA72-4 が 36.0U/ml (4.0 U/ml 以下) と高値であった.

上部消化管内視鏡および造影検査: 内視鏡では胃体上部から前庭部にかけて粘膜不整と胃壁の伸展不良を認め, 4 型胃癌が疑われた. 粘膜不整部からの生検結果は低分化腺癌であった (図 1 a). 造影検査では体上部から前庭部にかけて胃壁の硬化像, 伸展不良が認められた (図 2 a).

腹部造影 CT 検査: 小彎から後壁を中心に壁の肥厚を認め, 後壁で膵臓への直接浸潤が疑われた. 小彎側ではリンパ節の腫大を認めたが, 腹膜播種を疑う所見は認めなかった (図 3 a).

以上から cT4(panc) N1 H0 P0 CYx M0 c Stage III b の 4 型胃癌と診断した. この時点においては手術根治性が低いと判断し, 手術に先行した TS-1/CDDP 併用療法^{2,3)}を施行した.

化学療法は, TS-1は120mg/body (day 1~21),

2007年 2月13日受付 2007年 3月 8日採用

<所属施設住所>

〒160-0023 東京都新宿区西新宿 6-7-1