

2. SNNSの歴史と進歩*

愛甲 孝 上之園芳一 夏越祥次**

【要旨】センチネルリンパ節(SN)の概念の導入は、最近の外科臨床に大きなインパクトを与えたブレイク・スルーの一つである。わが国においても、乳癌の治療ではSNの概念はすでに外科治療の方針を大きくかえた。また、消化器癌においてもすでにかえつつある。しかし、SNの概念の臨床応用にあたってはいくつかの問題点があるのも事実である。国内外において、SNNSがいかに進歩してきたか歴史的背景を知り、その進歩の過程での問題点の理論的検証をすすめることはきわめて重要である。癌治療の臨床の現場でのさらなる展開に期待したい。

はじめに

最近の外科学に関するブレイク・スルーの中で、もっとも大きく外科医にインパクトを与えたものの一つがセンチネルリンパ節(SN)の概念の導入である。すなわち、腫瘍から最初のリンパ流を受けるリンパ節に転移がなければ、その他のリンパ節にも転移は生じないとする仮説である。Mortonら¹⁾によって本概念が提唱されたとき、筆者はもっとも戸惑いを感じた者の一人である。リンパ流やリンパ管構築を研究対象の一つにし、それらのきわめて複雑な知見を垣間見た者として、またリンパ節転移の多様性について身をもって体

験した外科医として、当初はとて受け入れがたい概念であった。しかし、研究の延長線上でセンチネルノードナビゲーション手術(SNNS)の仕事すすめていく中で、予想に反して大部分の症例においてこの概念が成立することを認めざるをえなくなった者の一人でもある。

本概念が北島ら²⁾により本邦に導入されて以来のわれわれ消化器外科の臨床医にとって最大の関心事は、「センチネルリンパ節の概念は果たして癌の外科治療をかえるか否か?」という命題である。筆者の結論は、乳癌の治療においてはすでに外科治療の方針を大きくかえたといえよう。また、消化器癌においてもすでにかえつつあると答えたい。しかし、SNの概念の臨床応用にあたっては、基礎的理論の検証がなされないまま臨床的な展開が先行している状況にあることも事実である。今後、いくつかの問題点について理論的検証をすすめ、臨床の現場でのさらなる展開に期待したいものである。

キーワード：センチネルリンパ節，SNNS，消化器癌，リンパ節転移，微小転移

* The history and progress of the sentinel node navigation surgery

** T. Aikou(教授), Y. Uenosono, S. Natsugoe(准教授): 鹿児島大学大学院腫瘍制御学・消化器外科学。

本稿では、SNNSの歴史的背景について述べ、外科治療においてSN conceptがいかにブレイクスルーしてきたか、すなわちいかに進歩してきたかについて論述したい。併せて今後の展開を考察したい。

表1. SN conceptの意義

- ・ high-value diagnostic tool
- ・ increasing accuracy of diagnosis
- ・ real time results for the surgeon
- ・ LN staging based surgery
- ・ enabling personalized treatment

I. SNNSの歴史的展開

1. 国外での展開

筆者は当初このSN conceptに非常に戸惑いを感じた。しかし、研究の延長線上でSNNSの仕事すすめていく中で、予想に反して95%以上の症例においてこの概念が成立することを認めざるをえなくなってきた。また、サンタモニカで開催された第2回国際会議(2nd International Congress on the Sentinel Node in Diagnosis and Treatment of Cancer, 2000年12月)での、欧米の研究者との交流を通じてSNNSに21世紀の大きな潮流を筆者自身肌で感じた。その後の動向にも関心を寄せていたが、第3回(横浜)、第4回(サンタモニカ)、第5回(ローマ)と回数を重ねるにいたって、乳癌の臨床の現場においては不動の位置を占めつつある。また、第1回(2005年)、第2回(2007年)“Cancer Metastasis and Lympho-vascular System”のシンポジウムがサンフランシスコで開催され、消化器癌のセッションの企画運営を行ってきたが、欧米においても消化器癌への臨床応用の期待が高まっていることを実感している(表1)。

SN conceptの歴史的背景については、リンパ流やリンパ管の研究の発展の歴史とも密接な関連がある。リンパ管の存在が明らかにされて以来、1863年Virchowら³⁾により所属リンパ節の概念が免疫防御器官として提唱され、癌の転移との関連が指摘されるようになった。その後、癌のリンパ行性転移が癌の治療対象となり、根治性を求めた癌の外科治療の*en bloc* dissectionの概念が生まれ、Halstead理論とFisher理論の妥当性が論じられる時代を迎えた。

また一方では、癌の進展とリンパ管、リンパ節の関連性についての研究において、微小転移のあたりで最初に転移する、あるいはその可能性の高

いリンパ節が存在することを指摘したGray(1939年)⁴⁾の論文はSN conceptの原点でもある。Couldra⁵⁾は“Observation on a sentinel node in cancer of the parotid”の論文の中で、転移の生じやすい特定のリンパ節を術中に迅速診断して頸部を郭清するという概念を提唱した。さらにCabanas⁶⁾はSNの存在を陰茎癌でも指摘し、より具体的な郭清手技を提唱した。まさしくSNNSの幕開けであった。しかしその後、Weinberg(1951年)⁷⁾により色素を用いたリンパ節郭清の臨床応用が試みられているが、理論的根拠や同定手技の困難性もあり、広く臨床の現場で普及することにはなかった。

SNNSのブレイク・スルーとして、Mortonら¹⁾が皮膚癌においてSN conceptを導入し良好な成績を示したが、特筆すべき歴史的な報告であった。まさしく癌のリンパ節郭清の個別化の幕開けであったといえる。その後も、MortonらのグループによりSNNSの理論的根拠についての基礎的臨床的研究が精力的に行われた。また再現性をより高めるために、トレーサーとしてradioisotopeが用いられ、RI法や色素との併用方法の有用性が示された。同じく、John Wayne Caner InstituteのGiulianoら⁸⁾は、乳癌において多くの多施設共同大規模試験を行い検証し、SN生検の標準治療として認知されるにいった。これらの歴史的展開の背景には、Sherman(1953年)⁹⁾のSNを同定するためのradioisotopeの基礎的研究や、Selverstoneら¹⁰⁾によるSNナビゲーションで用いられるガンマプローブの基礎研究がある。また、SNの微小転移に関する検索法や診断に関する精力的な研究成果がSNNSの発展の基礎にあることは論をまたない。

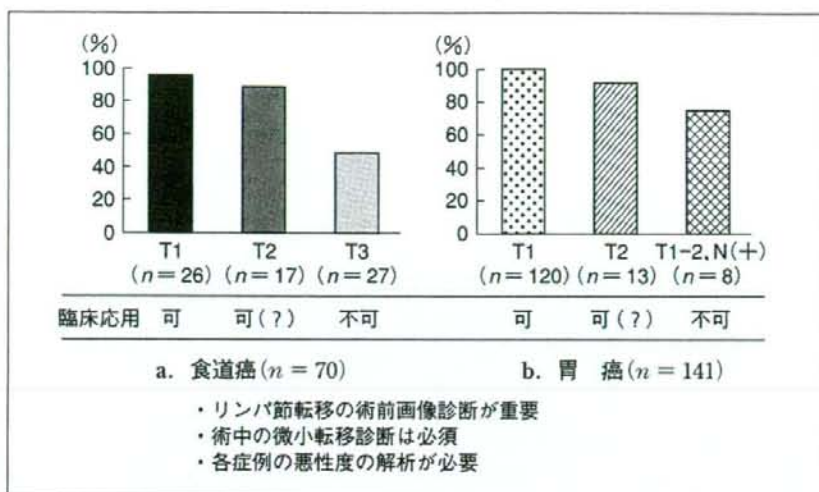


図1. SNとリンパ節転移診断¹⁶⁾

一方、1999年にアムステルダムで第1回 Sentinel Node 国際学会が開催された。第2回の国際会議は冒頭に述べたごとく、Mortonの地元カリフォルニアのサンタモニカで開催された。この会議から黒色腫、乳癌に加えて消化器癌のセッションも設けられ、大腸癌の成績について Bilchikら¹¹⁾、Sahaら¹²⁾の欧米からの発表がなされた。本邦からも筆者ら¹³⁻¹⁶⁾、慶應義塾大学^{17,20)}、金沢大学¹⁸⁾、大阪府立成人病センター¹⁹⁾などのグループから SN mappingの成果が発表された(図1)。これら胃癌をはじめとした消化器癌の領域では本邦での展開に熱い期待が寄せられた。この分野における北島らの大きな貢献が認められ、第3回の国際会議は慶應義塾大学の主催のもと日本で開催された。この会議での特徴は、腫瘍外科医、核医学者、病理医、基礎の免疫学者らが一堂に会して、SN conceptについてのテクノロジーとその臨床応用の可能性、理論的根拠など基礎・臨床の両面から活発な討議がなされた。この機運に乗り、International Sentinel Node Society (ISNS) が設立され、2年に1回の国際会議が開催されることとなった。同時に society の president に Morton が選出され、ISNSとしての最初の学術集会(第4回国際会議、2004年12月)は再びサンタモニカで開催された。その後、第5回 ISNSの学

術会議はローマで、第6回はシドニーで開催された。また、北島らの業績を顕彰することもあって、第7回は再度日本で開催されることが決定した。このように国際学術会議は盛会をきわめ、この分野の確実な発展が示されている。

2. 本邦での展開

手術を中心とした癌治療の変遷をみると、これまでの進歩の軌跡を四つの phaseに分けることができる²¹⁾。すなわち、pioneer phase, radical phase, rational phase, そして individualized phaseとして現在にいたる。すなわち、1950～1960年代は、腫瘍外科学の pioneer phaseに相当する。中心静脈栄養 (IVH) もない時代、外科手術をいかに安全に行うか、手術そのものが一発勝負の時代でもあった。また、感染予防の面でも術中厳しい手術手技が求められた。それゆえ先人の手術手技は、まさに芸術 (art) そのものであり、外科医の技を競う時代でもあった。腫瘍外科学の実践に多くの工夫がなされたのもこの時代であった。次の1970～1980年代は根治性を追求した radical phaseであり、壮絶な癌との闘いの時期でもあった。当時は、癌の多くが進行癌であり、今日のように有効な癌化学療法薬がない時代、原発巣はもとより積極的に合併切除を含めて拡大手術が試みられたのもこの時期であった。また一方

では、1980年代までのradical phaseは、手術が癌治療の唯一の手段であり、拡標準的リンパ節郭清がいろいろな癌で確立されつつあった時代でもあった。

その後の1990年代は、根治性追求にあまりにもシフトした癌の外科手術の在り方に反省が求められ、癌治療の合理性が盛んに議論されるようになった。すなわちrational phaseと呼ぶべき時代であった。そのrational phaseは、標準手術が確立された時代でもあり、根治性の維持はもとより、QOLの保持や癌の病態の解析から、どのような治療法が合理的であるかと議論された時代であった。また、画一的な癌治療が多様化し始めた時期でもあった。そして今、われわれに求められているものは癌治療の個別化であろう。癌治療の個別化に関する新しい知見が臨床の現場に大きなインパクトを与えている。すなわち、micro-metastasis, SN concept, endoscopic surgery, そして癌のbiological behaviorである。

この間、リンパ節郭清については、どの領域のリンパ節を郭清すべきか、多くの外科医の関心を集めた。1980年代にリンパ流およびリンパ管と癌の転移について多くの研究がすすめられていた。この時代に、われわれはリンパ指向性のRI(テクネシウム・レニウムコロイド)を経内視鏡的に癌の周囲に注入し、個々のリンパの流れを検索する方法をはじめて開発した²⁾。方法論は今日のSN mappingの手技とまったく同様であるが、当時われわれの関心は、外科的に切除する必要のある最終のリンパ節(terminal node)を検索することを目的にしたものであった。この時代のわれわれの研究成果は拡大手術の理論的根拠ともなった。当時の術中の写真を振り返ってみてみると、胃壁近くに青く染まったSNをみごとに確認できる(図2)。

SN conceptが本邦に紹介されたのは第100回の日本外科学会の記念大会であり、北島会長の会長講演は多くの外科医に感銘を与えた。その後、日本SNNS研究会が設立され、毎年会員数が増加してきており、表2に示すごとくテーマのもとで活発な討議がなされてきた。

II. SNNSの課題とその克服

SN conceptが実地臨床に標準的医療となるためには多くの課題があるが、それらの一つひとつが克服されつつある。臓器によりリンパ管の構築、リンパの流れは複雑に異なっており、同じ消化管でも臓器によってリンパ管のネットワークの存在部位や組織形態には大きな相違が認められる。また、乳腺や皮膚のごとく実質臓器でのSNナビゲーションの方法論が消化管などの他の管腔臓器にそのまま適応されるとはいえない。また、癌細胞自身によってSNの概念が異なることも容易に想像される。すなわち、組織型、分化度はもとより個々の癌細胞の悪性度によって、リンパ節転移をしやすい癌としにくい癌が存在することは臨床的に経験する。すべての癌がSNの概念に基づきリンパ節転移をきたすか否かは問題である。また、個々の癌細胞がSNをすり抜け、次のリンパ節にて転移が成立しないとの確証はない。いずれにしてもSNの概念は>95%の確率の問題であり、絶対的なものではない。そのことと手術侵襲、障害とのバランスのうえで、外科治療のあり方がSNの概念によってかわるか否かを考える必要がある。

一方、乳癌のごとく腫瘍からのリンパの流れの多くが腋窩へのある一定の方向性を示す臓器と、そうでない複雑なリンパの流れを呈する臓器があり、一概にSNを論ずることができない。また、複雑なリンパ管構築、相互の密なネットワークからすると真の意味での跳躍転移の存在も否定はできない。SNの概念はその跳躍転移を同定するものであるということはわかっているが、生物学的特性をもつ癌細胞を擬似のトレーサーで代用しうるかどうかが、基本的な疑問でもある。いずれにしても、この概念が乳癌や悪性黒色腫などの限られた臓器に通用する概念なのか、それとも消化器癌などにも応用しうる普遍的なものであるのか、まずは明らかにする必要がある。

SNの評価にあたっては、リンパ節転移の有無を微小転移を含めて正確に診断する必要がある。免疫組織化学や分子生物学的手法による微小転移

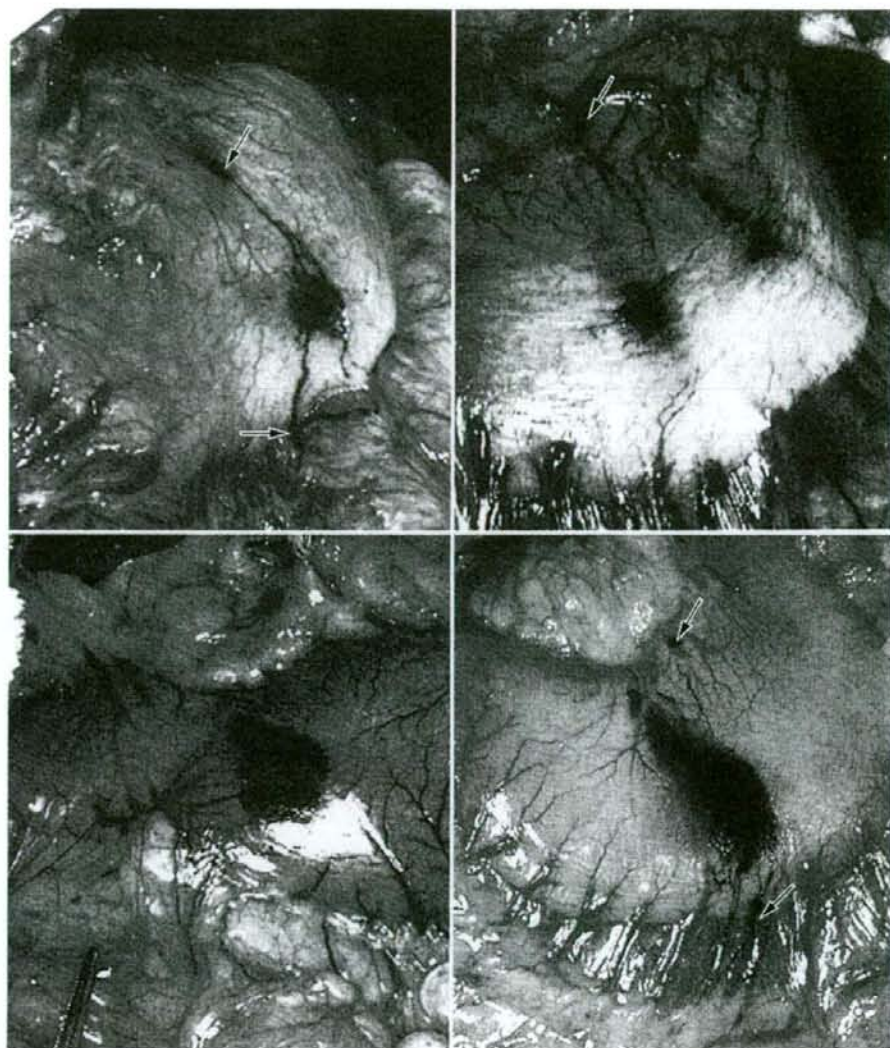


図2. 1960年代に行った色素法によるリンパ流の検索
矢印：SN

の存在は、SNNSを臨床応用するうえでもっとも重要な検討課題でもある。すなわち、SNを検出できても微小転移を術中に迅速かつ正確に診断できるか、その微小転移はどのような臨床的意義があるか、縮小手術にSNの概念を応用した場合に微小転移を取り残す危険性がないか、微小転移が存在したら郭清を追加すべきか、永久切片と迅速標本での所見に相違がみられたら追加治療をどうするかなど、多くの問題を含んでいる。事実、こ

れまでの学会でもこれらの問題に議論が集中している。現在、術中迅速診断に関しては、従来のHE診断に加え、スタンプ法、免疫組織細胞診、さらにはリアルタイムRT-PCR法なども開発されているが、病理学者の協力は不可欠であり、迅速標本における微小転移などを含めての時間労働は想像以上のものがある。欧米の臨床の現場でもどのように解決していくかが問題提起されているが、自動システムにより癌細胞を検出する

表2. 日本SNNS研究会のこれまでの主題

第1回(1999年)	① 乳癌に対する Sentinel Node Biopsy の手技と成績 ② 消化器癌における Sentinel Node Navigation Surgery 導入の可能性
第2回(2000年)	① Sentinel Node Navigation Surgery の実際 ② 消化器癌における Sentinel Node Navigation Surgery の成績及び問題点 ③ リンパ節における微小転移 ④ 乳癌における Sentinel Node Biopsy による腋窩リンパ節郭清の省略
第3回(2001年)	① Standard Procedure と Standard Criteria の確立に向けて
第4回(2002年)	① センチネルリンパ節検索のための新技術・乳癌の Sentinel Node Navigation Surgery のもたらす功罪 ② 乳癌および消化器癌におけるセンチネルリンパ節生検のガイドライン
第5回(2003年)	① Sentinel Node Navigation Surgery の臨床応用に向けて
第6回(2004年)	① 消化器癌における SNNS の功罪
第7回(2005年)	① 人にやさしい外科医療を目指して
第8回(2006年)	① SNNS のエビデンスと展望
第9回(2007年)	① SNNS の現状と未来

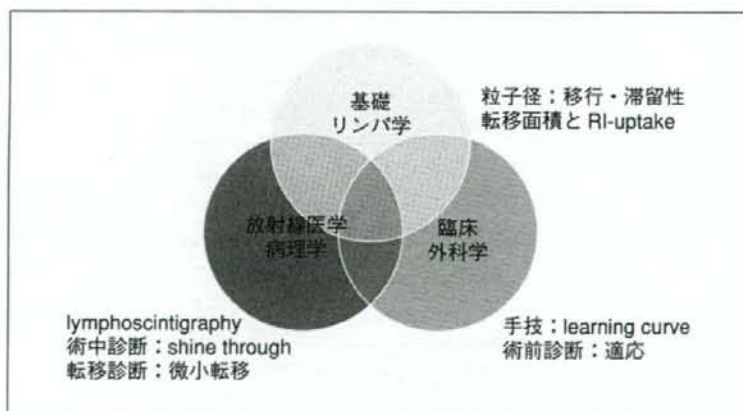


図3. SN 確立の条件

CellSearch (Veridex 社) などが臨床応用される日もそれほど遠い先ではないと思われる。SN 生検の敏感度が95%であったとしても、患者自身にとっては all or none の絶対の問題でもある。単

に確率だけで治療のあり方を変えることがあってはならないことも論をまたない。

SN の検出にあたっては色素やアイソトープなどが用いられるが、トレーサーの種類、投与部位、

投与量など、各臓器別に方法論を確立する必要がある。また、色素法かRI法かについてもその検証は十分にされていない。色素法とRI法でのSNが必ずしも一致しない症例を経験しており、この点をどのように解釈するかが問題の一つである。現時点ではRIで十分であると考えるが、併用がベストであるということには異論はない。しかし、施設の問題やSNとしてのRIのcut-off値の問題もあり、癌治療のあり方をどの臓器でもかえるほどのインパクトがあるかは疑問である。さらに、本法を行うにあたってはlearning curveの問題もあり、臓器に応じたlearning phaseが必要である。これら方法論の解決いかんによっては、そのメリットはきわめて大であり、SNNSを応用することによりある種の癌においては将来的に外科治療のあり方がかわるであろう。まずは現在、本邦においてすすめられている胃癌に対するSNNSの二つのprospective randomized control studyの結果がまたれる。

III. 今後の展望

今後の解決すべきさらなる課題として、標準手技の確立、SNのcriteriaの確立、術中微小転移診断の確立、消化器癌におけるSN conceptについてのエビデンスの確立があげられる。すなわち、今後、消化器外科においても、SNNSが腫瘍外科の分野において一つの潮流となることと思われる。しかし、新たな潮流が本物の流れになるには、科学的根拠を明確に示すとともに、基礎リンパ学、放射線医学、病理学ならびに臨床外科学の治験を駆使して標準的方法論を明確にすることが不可欠である(図3)。

いずれにしても、これからの癌治療の個別化の戦略としては、癌の広がり、stagingの正確な把握と、患者のバックグラウンド、activityに加えて、癌の生物学的悪性度のもとに判断すべきであり、標準的治療もしくは癌治療の個別化がすすめられるであろう。

おわりに

SNNSについて歴史的展開と種々の命題を論述

したが、これら諸問題が解決されたうえで、SNの概念が広く臨床展開されることを期待したい。いずれにしても、センチネルリンパ節の概念はリンパ節転移の有無を検索するうえできわめて高い診断手技であり、乳癌においては癌の外科治療のあり方をかえたが、消化器癌においてもかえるほどのインパクトがある。事実、臨床医にとって、リアルタイムにリンパ節転移状況を把握できる点は最大の魅力である。ひいては癌の個別化治療を確約してくれるツールであることに疑問の余地はない。関係者のさらなる尽力に期待したい。

◆ ◆ ◆ 文献 ◆ ◆ ◆

- 1) Morton DL, Wen DR, Wong JH et al: Technical details of intraoperative lymphatic mapping for early stage melanoma. Arch Surg 27:392-399, 1992
- 2) 日本外科学会(編):第100回日本外科学会学術総会抄録,100号記念,日本外科学会,東京,2000
- 3) Virchow R: Cellularpathologie in ihrer Begründung auf physiologische und pathologische Gewebelehre. Verlag von August Hirschwald, Berlin, 1858(翻訳,朝日出版社,東京,1988)
- 4) Gray JH: The relation of lymphatic vessels to the spread of cancer. Br J Surg 26:464-495, 1939
- 5) Coult EA, Winship T, Philbin PH et al: Observation on a "sentinel node" in cancer of the parotid. Cancer 13:77-78, 1960
- 6) Cabanas RM: An approach for the treatment of penile carcinoma. Cancer 39:456-466, 1977
- 7) Weinberg JA: Identification of regional lymph nodes in the treatment of bronchiogenic carcinoma. J Thor Durg 22:517-526, 1951
- 8) Giuliano AE, Kigran DM, Guenther JM et al: Technical details of intraoperative lymphatic mapping and sentinel lymphadenectomy for breast cancer. Ann Surg 220:391-401, 1994
- 9) Sherman AI: Lymph node concentration of radioactive colloidal gold following intestinal injection. Cancer 6:1238-1240, 1953
- 10) Selverstone B: The clinical use of radioactive

- phosphorus in the surgery of brain tumor. *Ann Surg* 136 : 643-651, 1949
- 11) Bilchick A, Giuliano A, Essner R et al : Universal application of intraoperative mapping and sentinel lymphadenectomy in solid neoplasms. *Cancer J* 4 : 351-358, 1998
 - 12) Saha S, Wiese D, Badin J et al : Technical details of sentinel node mapping in colorectal cancer and its impact on staging. *Ann Surg Oncol* 7 : 82-84, 2000
 - 13) Aikou T, Higashi H, Natsugoe S et al : Can sentinel node navigation surgery reduce the extent of lymph node dissection in gastric cancer ? *Ann Surg Oncol* 8 [9 Suppl] : 90-93, 2001
 - 14) Uenosono Y, Natsugoe S, Aikou T et al : Evaluation of colloid size for sentinel node detection using radioisotope in early gastric cancer. *Cancer Lett* 200 : 19-24, 2003
 - 15) Higashi H, Natsugoe S, Aikou T et al : Particle size of tin and phytate colloid in sentinel node identification. *J Surg Res* 121 : 1-4, 2004
 - 16) Uenosono Y, Natsugoe S, Aikou T et al : Detection of sentinel nodes and micrometastases using radioisotope navigation and immunohistochemistry in patients with gastric cancer. *Br J Surg* 92 : 886-889, 2005
 - 17) Kitagawa Y, Fujii H, Mukai M et al : Radio-guided sentinel node detection for gastric cancer. *Br J Surg* 89 : 1-6, 2002
 - 18) 三輪晃一 : Sentinel node conceptと癌治療への応用. *日外会誌* 101 : 307-310, 2000
 - 19) Hiratsuka M, Miyashiro I, Ishikawa O et al : Application of sentinel node biopsy to gastric cancer surgery. *Surgery* 129 : 335-340, 2001
 - 20) Kitagawa Y, Kitajima M : Gastrointestinal cancer and sentinel node navigation surgery. *J Surg Oncol* 79 : 188-193, 2002
 - 21) 西 満正, 愛甲 孝 : 消化管のリンパ流と癌の転移. *リンパ学* 7 : 1-8, 1984
 - 22) 愛甲 孝 : 経胃内視鏡的 RI-Lymphography. *リンパ学* 5 : 195-198, 1982

特集：センチネルノードナビゲーション手術(SNNS)の進歩と展望

Ⅱ. 各論

2. 消化器癌

a) 食道癌

青木達哉 高木 融 逢坂由昭

星野澄人 篠原玄夫 吉村真奈 土田明彦

臨床雑誌「外科」第70巻 第4号 [2008年4月] 別冊

南 江 堂

2. 消化器癌

a) 食道癌*

青木達哉
星野澄人高木 融
篠原玄夫逢坂由昭
吉村真奈

土田明彦**

〔要旨〕食道癌は頸部から腹部まで3領域に広範にリンパ節転移しやすく跳躍転移も多く、また手術侵襲も大きい。近年、乳癌などではセンチネルリンパ節理論を応用した縮小手術が行われている。食道癌においてセンチネルリンパ節理論はRI法でcT1N0、腫瘍径5cm以内と症例を限定すれば成立する可能性が示唆された。今後、センチネルリンパ節理論を応用した個別化治療により、食道癌治療後のQOL改善が期待される。

はじめに

わが国では、胸部進行食道癌のリンパ節郭清は1980年中ごろよりそれまで主流であった胸部・腹部の2領域リンパ節郭清から頸部・胸部・腹部の3領域リンパ節郭清が行われ、予後の向上が得られるようになり標準術式とされている^{1,2)}。手術の侵襲などによる合併症は術中・術後管理の進歩により少なくなったが、難渋する症例も依然として存在する。近年、食道表在癌は診断および技術の進歩により、精度の高い進行度診断ができるようになり、内視鏡的粘膜切除術の適応の拡大が行われている。しかし、手術においては進行度に応じた術式が選択されていない。乳癌³⁾や悪性黒色腫⁴⁾においてはセンチネルリンパ節(SN)生検が

行われ、SNに転移のない症例にはリンパ節郭清を省略する縮小手術が行われている。侵襲が大きく、郭清範囲の広い食道癌にこのSN理論を応用した縮小手術の妥当性が立証できれば、侵襲の軽減と根治性を両立させ、標準的治療から個別化治療に発展することができる。

本稿では、食道癌におけるSN理論の検証と臨床応用について概説する。

I. 食道癌のリンパ節転移

第44回食道疾患研究会のアンケート調査⁵⁾によれば占居部位別のリンパ節転移は胸部上部食道(Ut)では頸部から上縦隔に多いが、腹部にも10%の頻度でみられた。胸部中部食道(Mt)では頸部、縦隔、腹部にわたる広範囲にみられた。胸部下部食道(Lt)では中下縦隔から腹部に多くみられたが頸部にも数%みられた。癌の占居部位によりある程度リンパ節転移の多い部位は推察することはできるが、跳躍転移も多く、症例ごとに正確に診断することは困難である。

キーワード：食道癌、センチネルリンパ節、縮小手術

* Sentinel node navigation for esophageal cancer

** T. Aoki(教授), Y. Takagi(講師), Y. Osaka(講師), S. Hoshino, M. Shinohara(第三外科), M. Yoshimura(講師)(放射線医学), A. Tsuchida(准教授)(第三外科); 東京医科大学。

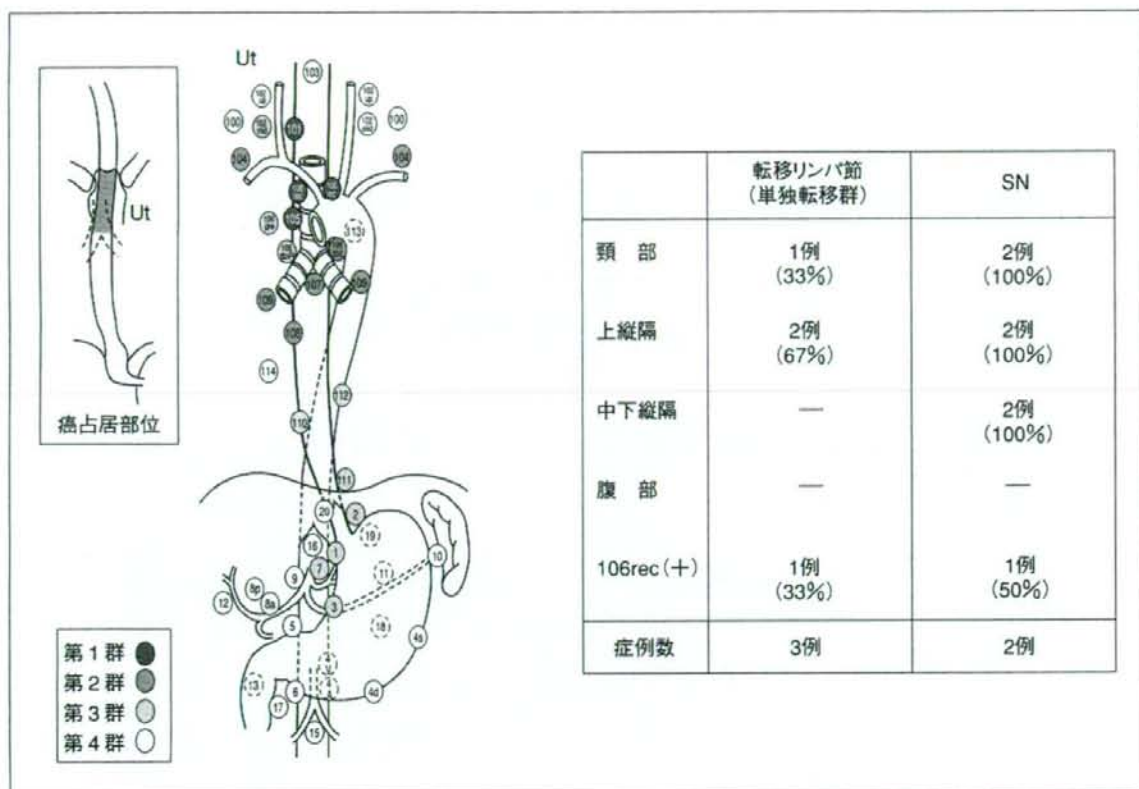


図1. 転移リンパ節, SNの分布(Ut)

II. リンパ節転移1個症例の検討

胸部食道癌314例中, 右開胸で切除されたリンパ節転移が1個の51例(16.2%)を対象にした。転移リンパ節を占居部位別に頸部, 上縦隔, 中下縦隔, 腹部に分け分布を検討すると, 転移1個のみの症例は上縦隔と腹部に多い結果であった。これは梶山ら⁶⁾の報告と同様な結果であった。占居部位別にみると, Utでは頸部と上縦隔に多く(図1), Mtでは上縦隔と腹部に多かったがすべての領域に認められ(図2), Ltでも上縦隔と腹部に多く認められたが頸部にも認められ予測は困難であった(図3)。

もし, SN理論が成立するならば, 転移1個症例のその転移リンパ節はSNのはずである。この結果からは, SNはどの部位にも存在しえることが示唆された。

III. 食道癌におけるSN同定方法

1. トレーサーの選択

SNを同定する方法はisosulfan blue, indocyanine greenを用いる色素法とradioisotope(RI)法がある。粒子径の小さい色素は注入直後よりリンパ管に流入するため視認できるという利点がある。しかし, 食道癌の手術では頸, 胸, 腹部と手術部位が3領域となり, さらに食道を剥離授動することにより正常なリンパ流が破壊され, 色素が漏れて同定困難になったり, 色素のリンパ節滞留時間が短いために視認できなくなり不向きである。一方, RI法では半減期が6時間と比較的短い^{99m}Tcで標識したスズコロイドカフチン酸が用いられている。RI法は色素法に比べて滞留時間が長く, 深部のリンパ節同定にも有用である。また, 術前にリンパシンチグラフィによりSNの位置が

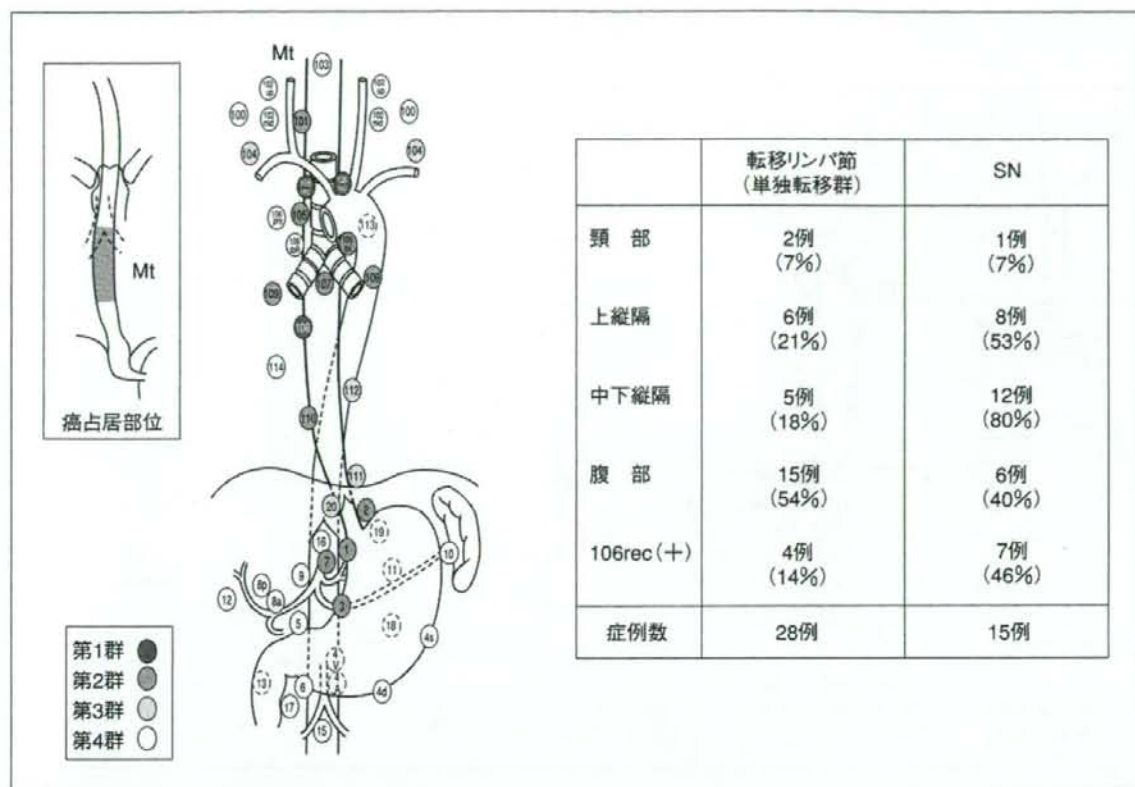


図2. 転移リンパ節, SNの分布(Mt)

ある程度確認できるという利点からも、現時点では食道癌においてはRI法が有用と考えている。

2. RIの注入法と注入量

RIは診療用放射性同位元素使用室で取扱わなければならない。トレーサーは術前日、内視鏡下に23G食道静脈瘤穿刺針を用いて粘膜下層に0.5mlずつ4カ所、腫瘍を取り囲むように注入している。投与量は、手術時のアイソトープの活性を0.3mCiとするためには^{99m}Tcの半減期が6時間であるので同日12時間前1.2mCi, 18時間前2.4mCi, 24時間前4.8mCiのトレーサーの注入が必要となる⁷⁾。

3. センチネルリンパ節同定基準

多くの施設では10秒間の積算カウントがバックグラウンドの10倍以上をSNとしている⁸⁾。このバックグラウンドの10倍とは抽象的でわかりにくい、バックグラウンドのカウントを1として10

秒間の積算カウントが10count/10秒以上になっているのが現状である。SNの多くは100count/10秒以上になるので同定に難渋することは少ない。主病巣周囲では注入部位からの強い散乱線などの影響があるため、必ず*ex vivo*でカウントを確認する必要がある。

4. SNの同定法

RI法の利点として、術前にリンパシンチグラフィによりSNの部位をある程度特定できることがあげられるが、トレーサー局注部位周囲は放射活性が高いため(shine through現象)SNを描出することが困難な症例もある。そのためにいろいろな画像処理をすることにより、トレーサー局注部位周囲のSNも描出できるようになってきている。

手術中はリンパシンチグラフィを参考に丹念に検索する必要がある。SNは、リンパ節内に流入

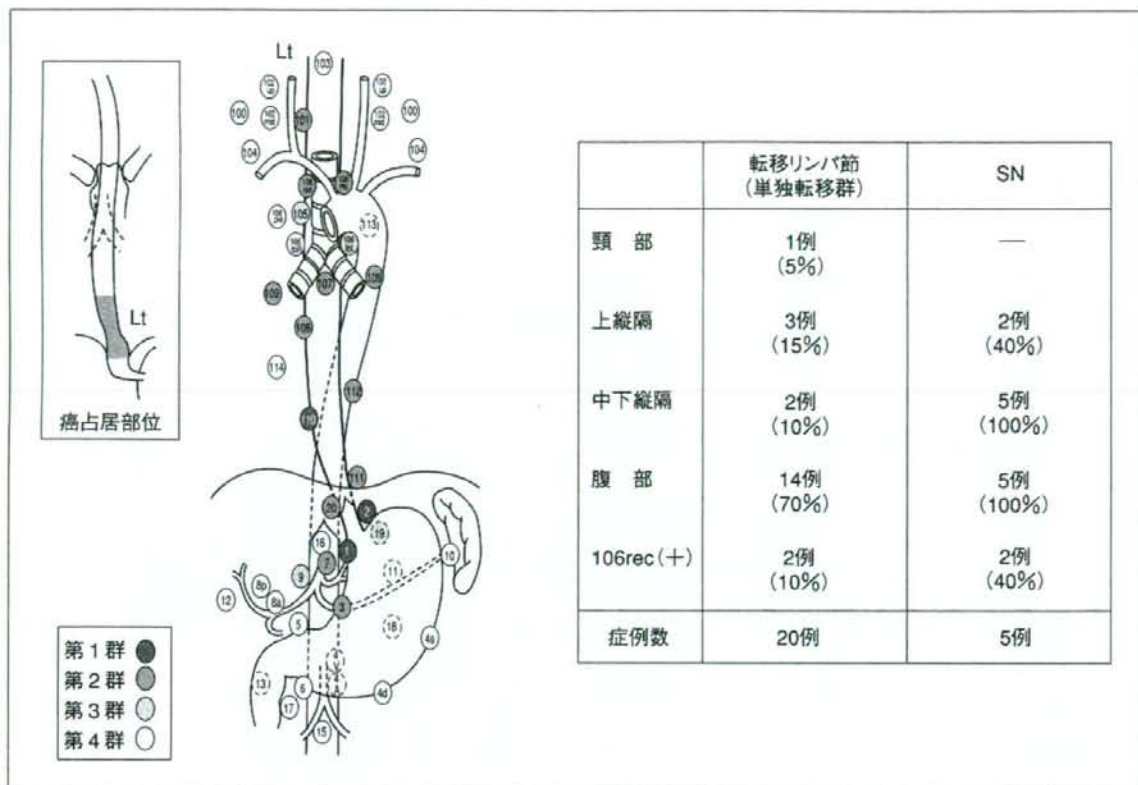


図3. 転移リンパ節, SNの分布(Lt)

したトレーサーから放出される γ 線を検出するガンマプローブで検索し同定される。トレーサー局注部位周囲は放射活性が高いため、この部位を避ける方向からのガンマプローブの操作が重要となる。また、より正確に同定するためにガンマプローブの先端にコリメータを装着したり⁹⁾、局注部位を鉛板で遮蔽しshine through現象を減少させる工夫をしている。

IV. SN同定の成績

適応は比較的リンパ節転移の少ないcT1N0にしている。SNの同定率は95.7%(22/23例)、転移陽性検出率は75%(6/8例)、リンパ節転移正診率は91%(20/22例)であった。偽陰性2例は5cm以上の表層拡大型であり、腫瘍径5cm以下のリンパ節転移正診率は100%(20/20例)であった。腫瘍径5cm以上では、粘膜下層に0.5mlずつ4カ

所の注入では局注したトレーサーが腫瘍全体に及ばず、適応外と考えられた。SNの個数は平均5.3個で、リンパシンチグラフィによるSNは平均1.4個であった。

術中のSN個数とリンパシンチグラフィによるSNの個数に乖離がみられたのは、主病巣周囲では強い散乱線によりリンパ節への集積が隠されてしまうためと考えられた。また、リンパシンチグラフィのプレーン像では、SNの正確な位置を確認することは困難でありSPECT画像を追加したりCTなど他のモダリティとfusionさせることにより、より解剖学的に正確にSNを描出できるように検討中である。

食道癌におけるSNの分布を検討してみると、頸部には3例(14%)、上縦隔12例(55%)、中下縦隔19例(86%)、腹部11例(50%)にみられた。占居部位別にみると、Utでは頸部、上縦隔、中

下縦隔に認められたが腹部には認めなかった(図1)。Mtでは上縦隔と中下縦隔に多かったが、すべての領域に認められた(図2)。Ltでも中下縦隔と腹部に多く認められたが、頸部には認められなかった(図3)。

リンパ節106recがSNであったのは10例(45%)で、頸部にSNが同定できた3例中2例は106recにSNを認めなかった。SN理論からは、106recリンパ節を頸部郭清の指標にするのは危険であると推察された。食道癌取り扱い規約によるNカテゴリーにおける検討では、SNが1群のみに分布する症例は2例(9%)にすぎなかった。また、跳躍転移といわれる症例が5例(23%)あり、跳躍転移の中にはSNがたまたま2群以遠に存在した症例が含まれる可能性が示唆された。

今回の検討では適応症例をcT1N0、腫瘍径5cm以下に限定すればSN理論が成立する可能性が示唆された。

V. 臨床応用と今後の課題

食道癌では胃癌のように腫瘍の局所切除はむずかしい。Mtで頸部郭清の必要のない症例やLtで頸部郭清の必要な症例の見極めに有用と考える。また、思わぬ部位にSNが存在したり、郭清後の取り残しのリンパ節の検索にも有用である。さらに適応拡大されている内視鏡的粘膜切除術/内視鏡的粘膜下層剥離術(EMR/ESD)の追加治療の決定においての一つの手段になりうると考える。

術中迅速診断のあり方については、現時点で一定の合意は得られていない。現在の最大割面1切片のHE染色のみで転移の有無を決定するには不安が残る。さらに、サイトケラチン抗体などを用いた免疫組織染色やRT-PCR法などによる微小転移の検索までの必要性の有無など迅速診断の精度の向上は、臨床応用に向けてデータの集積が必要である。

現在使用されているトレーサーはSNを同定す

るために開発された製剤ではない。SNをより特異的に同定できるような特殊なトレーサーの開発が望まれる。

おわりに

SN理論が成立することにより、個別の必要に応じたテーラーメイドの治療が可能になり食道癌の治療後のQOLは改善されると思われる。

◆ ◆ ◆ 文 献 ◆ ◆ ◆

- 1) Isono K, Sato H, Nakayama K: Results of a nation wide study on the three-field lymph node dissection of esophageal cancer. *Oncology* 48: 411-420, 1991
- 2) Akiyama H, Tsurumaru M, Udagawa H et al: Systemic lymph node dissection for esophageal cancer-effective or not? *Dis Esophagus* 7: 2-12, 1994
- 3) Morton DL, Wen DR, Wong JH et al: Technical details of intraoperative lymphatic mapping for early stage melanoma. *Arch Surg* 127: 392-399, 1992
- 4) Borgestein PJ, Meijer S, Pijpers R: Intradermal blue dye to identify sentinel lymph-node in breast cancer. *Lancet* 349: 1668-1669, 1997
- 5) 児玉正智, 掛川輝夫: 食道表在癌の治療—第49回食道癌疾患研究会, 食道表在癌アンケート集計報告. *日外会誌* 97: 683-689, 1996
- 6) 梶山美明, 鶴丸昌彦: 食道癌の治療—右開胸手術. *日外会誌* 103: 343-347, 2002
- 7) 高木 融, 逢坂由昭, 伊藤一茂ほか: センチネルリンパ節同定におけるRI至適投与量の検討. *日消外会誌* 34: 1371, 2001
- 8) 高木 融, 土田明彦, 青木達哉ほか: センチネルリンパ節の同定とnavigation surgery(NS) センチネルリンパ節同定の現状. *日臨* 61 [増刊]: 321-325, 2003
- 9) 立花慎吾, 高木 融, 青木達哉ほか: 腹腔鏡用gamma probeの特性—コリメータの有効性について. *日外科系連会誌* 28: 724-729, 2003

Research

Open Access

Detection of sentinel and non-sentinel lymph node micrometastases by complete serial sectioning and immunohistochemical analysis for gastric cancer

Kaname Ishii*, Shinichi Kinami, Kenichiro Funaki, Hideto Fujita, Itasu Ninomiya, Sachio Fushida, Takashi Fujimura, Genichi Nishimura and Masato Kayahara

Address: Department of Gastroenterologic Surgery, Kanazawa University Hospital, 13-1 Takara-machi, Kanazawa 920-8641, Ishikawa, Japan

Email: Kaname Ishii* - k.ishii@med.kurobe.toyama.jp; Shinichi Kinami - kinami@surg2.m.kanazawa-u.ac.jp; Kenichiro Funaki - funa4788@yahoo.co.jp; Hideto Fujita - hfuji@surg2.m.kanazawa-u.ac.jp; Itasu Ninomiya - nino@surg2.m.kanazawa-u.ac.jp; Sachio Fushida - fushida@surg2.m.kanazawa-u.ac.jp; Takashi Fujimura - tfuji@surg2.m.kanazawa-u.ac.jp; Genichi Nishimura - genichi@surg2.m.kanazawa-u.ac.jp; Masato Kayahara - masatok@surg2.m.kanazawa-u.ac.jp

* Corresponding author

Published: 30 May 2008

Received: 26 April 2008

Journal of Experimental & Clinical Cancer Research 2008, **27**:7 doi:10.1186/1756-9966-27-7

Accepted: 30 May 2008

This article is available from: <http://www.jeccr.com/content/27/1/7>

© 2008 Ishii et al; licensee BioMed Central Ltd.

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/2.0>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Abstract

Background: We investigated the presence and distribution of the sentinel and the non-sentinel node micrometastases using complete serial sectioning and immunohistochemical staining (IHC), to inspect whether lymph node micrometastases spread to the sentinel lymph nodes first.

Methods: A total of 35 patients, who underwent gastrectomy with a sentinel lymph node biopsy for gastric cancer, were enrolled in this study. Total of 1028 lymph nodes of 35 patients having gastric cancer without metastasis of lymph node by permanent section with hematoxylin and eosin staining (H&E) were selected. There were 252 sentinel nodes and the other 776 were non-sentinel nodes. All nodes were sectioned serially and stained alternately with H&E and IHC. Lymph node micrometastases was defined as proving to be positive first either the IHC or the complete serial sectioning.

Results: Micrometastases were detected in 4 (11%) of the 35 patients, 6 (0.58%) of 1028 nodes. Of these 4 patients, 3 had micrometastases exclusively in sentinel nodes, and the other had micrometastasis in both sentinel and non-sentinel nodes. There was no patient who had the micrometastases only in non-sentinel nodes.

Conclusion: These results support the concept that lymph node micrometastasis of gastric cancer spreads first to sentinel nodes.

Background

The prognosis of patients with gastric cancer is influenced primarily by the presence of lymph node metastases.

Lymph node metastases in gastric cancer patients with submucosal invasion occur in 15 to 20% of patients; therefore, a lymph node dissection may be unnecessary

for the remaining 80 to 85% of patients [1]. An accurate and reliable indicator to predict the absence of lymph node metastases would eliminate many unnecessary lymphadenectomies [1]. Therefore, a preoperative and accurate diagnosis of lymph node metastases remains important [2-4]. A sentinel node biopsy for gastric cancer is an intraoperative diagnostic method to detect lymph node metastases [5-7]. In 1992, Morton et al. [8] introduced the technique of intraoperative dye injection at the site of melanoma to identify the "sentinel" node, which is the first node that the afferent lymphatics enter from the tumor site. Miwa et al. [7,9] employed this type of dye mapping technique to identify the sentinel nodes of gastric cancer, and reported a high positive predictive value and accuracy for the sentinel node biopsy of early gastric cancer. On the other hand, the presence of a micrometastasis in a lymph node is a serious issue for the clinical application of sentinel node biopsy for early gastric cancer. Lymph node micrometastases have been found in patients determined to be node-negative by routine histological examination. Previous investigators have reported that lymph node micrometastases could be detected using step sectioning, immunohistochemical staining and the reverse transcriptase-polymerase chain reaction [10-12]. However, there have been a few reports about the distribution of micrometastases in both the sentinel and non-sentinel nodes in node-negative gastric cancer patients by routine histologic examination [13-15].

In this study, we retrospectively investigated the presence and distribution of sentinel and non-sentinel node micrometastases using complete serial sectioning and immunohistochemical staining. These techniques are the most accurate methods to detect micrometastases in nodes so that we could determine whether lymph node micrometastases had spread to the sentinel lymph nodes first.

Methods

A sentinel lymph node (SLNs) biopsy for gastric cancer was performed on 243 patients at the Department of Gastroenterologic Surgery, Kanazawa University Hospital from 1993 to 2002. Before the sentinel node biopsy was performed, written informed consent was obtained in accordance with the ethical standards of the Committee on Human Experimentation of Kanazawa University Hospital. Of these patients, we enrolled 35 who had a cancer that had invaded to the submucosa or muscularis propria and had no lymph node metastasis by routine histologic examination for this study. None of the patients had received preoperative chemotherapy or radiotherapy. Based on the Japanese Classification of Gastric Carcinoma, all 35 patients underwent a sentinel node biopsy followed by conventional lymphadenectomy for back-up dissection [16]. A total of 1028 lymph nodes were

removed from the 35 patients. Of these, 252 lymph nodes were SLNs and the other 776 were non-SLNs. All 252 SLNs were negative for metastases both on intraoperative frozen-section examination and permanent section with hematoxylin and eosin staining (H&E). The other 776 nodes were negative for metastases on histological examination by H&E of multiple step sectioning at 0.2 cm intervals. The clinicopathologic data were evaluated according to the Japanese Classification of Gastric Cancer [16]. The patients' characteristics are listed in Table 1. For detecting the SLNs, we used intraoperative endoscopic lymphatic mapping (IELM), which consisted of an intraoperative injection of 0.2 ml of 2% patent blue into the submucosal layer at four sites around the gastric carcinoma through a gastroscope [9]. The dye immediately appeared at the serosal surface and stained the lymphatic vessels and nodes [5,9]. In this study, the SLN was defined as the lymph node that stained blue 20 minutes after the injection. The lymphatic basins were defined as the area containing the stained lymphatic vessels, and which were able to be divided into five categories according to the directions of the arteries surrounded the stomach, as follows: the left gastric artery area, the right gastric artery area, the right gastroepiploic artery area, the right gastroepiploic artery area and the posterior gastric artery area. The excised SLNs were sent for frozen-section examination. The lymph nodes stained with H&E on representative sections were cut along the plane with the largest diameter that included the node hilus, and examined intraoperatively for metastases.

The remaining frozen tissues were thawed, and the tissues and non-SLNs were routinely cut at 0.2 cm intervals. Subsequently, the multiple sectioned lymph nodes and

Table 1: Patients characteristics

Median age (range)	62 (37-85)
Sex	
Male	23
Female	12
Depth of invasion	
SM	24
MP	11
Histological type	
Differentiated *	18
Undifferentiated **	17
Lymphatics invasion	
Negative	16
positive	19
Vascular invasion	
Negative	30
positive	5

SM, submucosa; MP, muscularis propria

*The differentiated type: papillary, well and moderately differentiated tubular adenocarcinomas

**The undifferentiated type: poorly differentiated adenocarcinoma, mucinous adenocarcinoma and signet-ring cell carcinoma.

resected specimens were fixed in 10% formalin, processed through graded ethanol, and embedded in paraffin for permanent sections. The lymph nodes were stained with H&E and were examined by two pathologists.

In this study, all resected lymph nodes were sectioned serially at 25- μ m intervals of 4- μ m thickness in addition and either alternately stained with H&E and immunohistochemical staining (IHC) using an anti-cytokeratin antibody. The ENVISION technique was used (DAKO, Carpinteria, CA) for IHC and we used the monoclonal anti-human cytokeratin 8/18 antibody (Santa Cruz Biotechnology, California, USA) [17-19]. All main tumor specimens from 35 patients were subjected to cytokeratin staining and were used as a positive control. A lymph node micrometastasis was defined as a node negative for metastasis by our routine histologic examination, but positive by either the IHC or the complete serial sectioning methods.

Results

The total number of sections examined was 24,094. Of these, 5986 were SLNs and 18,108 were non-SLNs. Of the 35 patients, 4 (11%) had micrometastases. A micrometastasis was found in 6 of 1028 nodes (0.6%) and 60 sections (0.3%) of 24,094 (Figs. 1, 2). Of these 6 nodes involving a micrometastasis, 4 were SLNs and the other 2 were non-SLNs in the lymphatic basin. No micrometastases were detected outside the basin (Table 2). The details of the distribution pattern, location and size of the micrometastases are shown in Tables 3, 4 and 5. Of the 4 patients who had a lymph node micrometastasis, 3 patients had micrometastases exclusively in the SLNs. The other patient had a micrometastasis in both the SLN and non-SLNs in the lymphatic basin. No patient had a micrometastasis only in non-SLNs. No patient has yet suffered a recurrence or has died as of December, 2007.

Discussion

Miwa et al. introduced the concept of sentinel node biopsy for gastric cancer [7]. The clinical use of the sentinel node biopsy to determine the surgical approach for

gastric cancer requires the verification of this concept at the level of lymph node micrometastases. In this study, we investigated the presence and distribution of lymph node micrometastases in patients with gastric cancer who had a sentinel node biopsy. Recently, the presence of lymph node micrometastases undetectable by routine histological examination has been reported in breast, lung, esophagus, stomach, colon and gallbladder cancers. It has been reported that a lymph node micrometastasis was a poor prognostic indicator in breast, lung, and colon cancers [20-22]. A few authors have reported that a lymph node micrometastasis was a poor prognostic factor in gastric cancer patients [23,24]. Thus, the importance of the detecting a lymph node micrometastasis has been emphasized for various neoplastic diseases.

A variety of methods to detect lymph node micrometastases exist, including IHC and polymerase chain reaction assays. Matsumoto et al. demonstrated that the reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) is more sensitive than IHC for the detection of micrometastases [2]. However, Yamamoto et al. [25] suggested that positive results with a molecular assay such as RT-PCR may not be indicative of the presence of viable tumor cells, but rather the presence of tumor DNA and thus, may be associated with a greatly increased false positive rate despite the higher sensitivity of the molecular assay. On the other hand, it has been reported that the serially sectioning increased the identification of tumor cells in the peripheral sinuses of lymph nodes [26]. It is thought that serial sectioning with IHC is the most accurate method for the detection of lymph node micrometastases. Therefore, we subjected the entire specimen to serial sectioning and IHC. The antibody used for IHC was a monoclonal anti-human cytokeratin 8/18 antibody which is more sensitive, specific, simple, accurate, and economic than other antibodies for IHC.

Tumor deposits within lymph nodes were classified and staged according to the revised guidelines set by the International Union Against Cancer (UICC) 6th Edition. According to this classification system, metastases less

Table 2: Number and location of lymph nodes with micrometastasis

Location of nodes	Number of nodes	
	with micrometastasis	without micrometastasis
SLNs	4	248
non-SLNs in lymphatic basin	2	653
non-SLNs out of basin	0	121
All nodes	6	1022

SLNs, sentinel lymph nodes

Table 3: Distribution pattern of lymph node micrometastasis

Distribution pattern of micrometastasis	Number of cases	
	Routine histological examination	complete serial sectioning and IHC
SLNs (-), non-SLNs (-)	35	31
SLNs (+), non-SLNs (-)	0	3
SLNs (+), non-SLNs (+)	0	1
SLNs (-), non-SLNs (+)	0	0

SLNs, sentinel lymph nodes; IHC, immunohistochemical staining

than 0.2 cm were considered micrometastases (MMs), and isolated tumor cells (ITCs) were single tumor cells or small clusters of cells that measured no greater than 0.2 mm and were usually detected by IHC or molecular methods, but may be verified with H&E. ITCs do not typically show evidence of metastatic activity by proliferation, induction of a stromal reaction, or penetration of vascular or lymphatic sinus wall invasion [27,28]. Nakajo et al. [23] and Siewert et al. [29] reported that lymph node involvement is classified into cluster formation or single cell forms, according to the results of IHC for cytokeratin. Their results suggested that single cells cannot proliferate in lymph nodes because they were already killed by local and general immunocytes. A cluster of cells with a stromal reaction may easily proliferate and therefore have metastatic potential. In our department, resected lymph nodes are routinely cut at 0.2 cm intervals and the lymph nodes are examined for metastases. So, in this study, the definition of lymph node micrometastasis differed from the UICC classification. For this study it was defined as a node, negative for metastasis by our routine histological examination of sections cut at 0.2 cm intervals, but positive by complete serial sectioning with H&E and IHC. In addition, all single cell types and small cluster types without a stromal reaction by cytokeratin positive staining were not recognized as cancer cells in the next H&E stained slide. Thus, we excluded all single cells and small clusters without a stromal reaction, which are classified as ITCs in the UICC classification system, from the positive lymph node micrometastasis group [27,28].

We excluded the gastric cancer patients whose tumors had invaded to the mucosa in this study because doing complete serial sectioning and immunohistochemical staining was a lot of work; in addition, the rate of a lymph node micrometastasis was low. Accordingly we enrolled 35 who had a gastric cancer that had invaded to the submucosa or muscularis propria and had no evidence of a lymph node metastasis by histologic examination for this study.

In this study, we observed a lymph node micrometastasis in 4 patients (11%) with a gastric cancer that had invaded to the submucosa or muscularis propria. In gastric cancer, Isozaki et al. [30] and Natsugoe et al. [31] reported that lymph node micrometastases were identified in 10 to 30% of specimens by step-sectioning or IHC. Our results were the most accurate of all the past studies and proved the actual circumstances of lymph node micrometastasis of gastric cancers that had invaded to the submucosa or muscularis propria.

In this study, we examined the lymph node micrometastases of SLNs and non-SLNs. We found lymph node micrometastases in the SLNs of 4 patients. One patient also had a micrometastasis in a non-SLN of the lymphatic basin, though no micrometastases of non-SLNs were identified outside the basin. Furthermore, no patient had a lymph node micrometastasis only in a non-SLN. Our results revealed that the patients who didn't have a lymph node micrometastasis in the SLNs also didn't have a micrometastasis in the non-SLNs. These results may support the concept that lymph node micrometastases spread

Table 4: Location of lymph node micrometastasis

case	Location of tumor	Stained lymphatic basins	Number of SLNs	Number of micrometastasis	Station of micrometastasis of SLNs	Station of micrometastasis of non-SLNs
1	M, Less	Left GA	8	1	No.3 LN	-
2	M, Post.	Left GA Right GEA	5	1	No.3 LN	-
3	M, Ant.	Left GA	2	1	No.3 LN	-
4	M, Less	Left GA Right GEA	10	3	No.3 LN	No.3 LN

SLNs, sentinel lymph nodes; M, Middle third of the stomach; Less, lesser curvature; Post., posterior wall; Ant. anterior wall; GA, gastric artery; GEA, gastroepiploic artery; No.3 LN, LN along the lesser curvature

Table 5: Site and size of lymph node micrometastasis

case	Type of lymph node	Site in lymph node	Size of micrometastasis(mm)
1	SLN	peripheral sinus	1.2
2	SLN	peripheral sinus	0.3
3	SLN	peripheral sinus	0.2
4	SLN	peripheral sinus	0.6
	non-SLN	peripheral sinus	1.0
	non-SLN	peripheral sinus	1.0

SLN, sentinel lymph node

first to the SLNs, then to the non-SLNs in the lymphatic basin and finally to non-SLNs outside the basin. Therefore, based upon this concept, it is sufficient to examine only the SLNs to determine whether or not there are lymph node micrometastases in patients with gastric cancer.

It is still unclear whether a lymph node micrometastasis is a prognostic factor in gastric cancer. However, a lymph node micrometastasis was found in gastric cancer patients who had no evidence of a lymph node metastasis by routine staining. This result suggests that we should cautiously reduce the extent of lymph node dissections. The intraoperative absence of a SLN micrometastasis suggests that the extent of lymph node dissection may be safely reduced, because it is unlikely for non-SLNs to have micrometastases without a SLN micrometastasis. In the case of breast cancer, the need for the intraoperative diagnosis of lymph node micrometastases is not essential, because additional dissection of the axillary lymph nodes can be performed easily. However, the subsequent dissec-

tion of lymph nodes is difficult in gastric cancer; therefore, the intraoperative diagnosis of lymph node micrometastases is crucial. We believed that when a lymph node micrometastasis was present, we should perform a lymph node dissection at the present. Our study utilized the most accurate methods, but we could not obtain the results rapidly enough for an intraoperative diagnosis. Therefore, we need to establish an accurate method for rapid intraoperative identification. Matsumoto et al. claimed that intraoperative rapid immunostaining was a simple and useful technique for detecting lymph node micrometastases [32]. An ultra-rapid RT-PCR system, which can complete the detection of cancer cells within approximately 70 minutes, has been developed. In the near future, these methods will be applied to detect lymph node micrometastases in SLNs during surgery [33].

Conclusion

We have demonstrated the ability to detect lymph node micrometastases by subjecting the entire specimen to complete serial sectioning and IHC for node-negative gastric cancer patients who have had a sentinel node biopsy. These results support the concept that lymph node micrometastases spreads first to the SLNs. In addition, the intraoperative and rapid diagnosis of lymph node micrometastases in SLNs may help guide the appropriate lymph node dissection in gastric cancer patients. Therefore, a rapid and accurate intraoperative diagnosis of lymph node micrometastases in SLNs will be necessary and should be the focus of future studies.

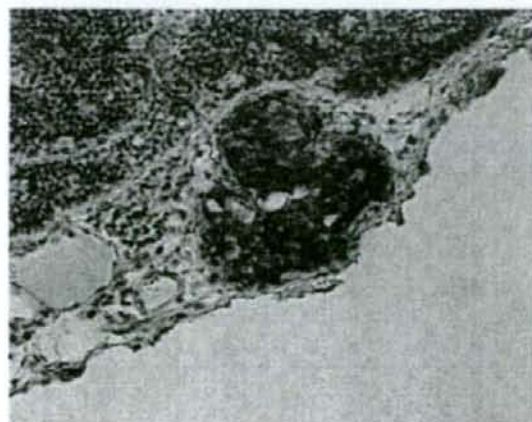


Figure 1
Lymph node micrometastasis as detected by immunohistochemical staining with a cytokeratin antibody. ($\times 400$).



Figure 2

No cancer cells were identified in this section by routine histologic examination. (hematoxylin & eosin staining, $\times 40$). (b) Lymph node micrometastasis in the representative section by the entire serial sectioning method. (Immunohistochemical staining, $\times 40$). (c) Micrometastasis lymph node in the representative section by the entire serial sectioning method. (Immunohistochemical staining, $\times 400$)

Acknowledgements

The authors are grateful to Professor Tetsuo Ohta in Kanazawa University for this study. And we also thanks to pre-professor Koichi Miwa.

References

- Higashi H, Natsugoe S, Ishigami S, et al: Distribution of lymph node metastasis including micrometastasis in gastric cancer with submucosal invasion. *World J Surg* 2003, **27**:455-459.
- Matsumoto M, Natsugoe S, Ishigami S, et al: Lymph node micrometastasis and lymphatic mapping determined by reverse transcriptase-polymerase chain reaction in pN0 gastric carcinoma. *Surgery* 2002, **131**:630-635.
- Morgagni P, Saragoni L, Folli S, et al: Lymph node micrometastases in patients with early gastric cancer: experience with 139 patients. *Ann Surg Oncol* 2001, **8**:170-174.
- Morgagni P, Saragoni L, Scarpi E, et al: Lymph node micrometastases in early gastric cancer and their impact on prognosis. *World J Surg* 2003, **27**:558-561.
- Hiratsuka M, Miyashiro I, Ishikawa O, et al: Application of sentinel node biopsy to gastric cancer surgery. *Surgery* 2001, **129**:335-340.
- Kitagawa Y, Fujii H, Mukai M, Kubota T, Otani Y, Kitajima M: Radio-guided sentinel node detection for gastric cancer. *Br J Surg* 2002, **89**:604-608.
- Miwa K, Kinami S, Taniguchi K, Fushida S, Fujimura T, Nonomura A: Mapping sentinel nodes in patients with early-stage gastric carcinoma. *Br J Surg* 2003, **90**:178-182.
- Morton DL, Wen DR, Wong JH, et al: Technical details of intraoperative lymphatic mapping for early stage melanoma. *Arch Surg* 1992, **127**:392-399.
- Miwa K: [Endoscopic lymphatic mapping: ELM]. *Igaku no Ayumi* 1994, **11**:940-941. (in Japanese)
- Ajisaka H, Miwa K: Micrometastases in sentinel nodes of gastric cancer. *Br J Cancer* 2003, **89**:676-680.
- Veronesi U, Zurrada S, Mazzarol G, Viale G: Extensive frozen section examination of axillary sentinel nodes to determine selective axillary dissection. *World J Surg* 2001, **25**:806-808.
- Viale G, Maiorano E, Mazzarol G, et al: Histologic detection and clinical implications of micrometastases in axillary sentinel lymph nodes for patients with breast carcinoma. *Cancer* 2001, **92**:1378-1384.
- Arigami T, Natsugoe S, Uenosono Y, et al: Evaluation of sentinel node concept in gastric cancer based on lymph node micrometastasis determined by reverse transcription-polymerase chain reaction. *Ann Surg* 2006, **243**:341-347.
- Miyake K, Seshimo A, Kameoka S: Assessment of lymph node micrometastasis in early gastric cancer in relation to sentinel nodes. *Gastric Cancer* 2006, **9**:197-202.
- Osaka H, Yashiro M, Sawada T, Katsuragi K, Hirakawa K: Is a lymph node detected by the dye-guided method a true sentinel node in gastric cancer? *Clin Cancer Res* 2006, **10**(20):6912-6918.
- Japanese Research Society for Gastric Cancer: Japanese Classification of Gastric Carcinoma Kanehara, Tokyo; 1999.
- Cartun RW: Immunohistochemistry of infectious disease. *J Histotechnology* 1995, **18**:195-202.
- Sabatini E, Bisgaard K, Ascani S, et al: A new immunohistochemical method for diagnostics and research. Critical comparison with the APAAP, ChemMate™, CSA, LABC, and SABC techniques. *J Clin Pathol* 1998, **51**:506-511.
- Sasaki M, Watanabe H, Jass JR, Ajioka Y, Kobayashi M, Hatakeyama K: Immunoperoxidase staining for cytokeratins 8 and 18 is very sensitive for detection of occult node metastasis of colorectal cancer: a comparison with genetic analysis of K-ras. *Hepatology* 1998, **32**(3):199-208.
- Passlick B, Izbicki JR, Kubuschok B, et al: Immunohistochemical assessment of individual tumor cells in lymph nodes of patients with non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 1994, **12**:1827-1832.
- Sasaki M, Watanabe H, Jass JR, et al: Occult lymph node metastases detected by cytokeratin immunohistochemistry predict recurrence in "node-negative" colorectal cancer. *J Gastroenterol* 1997, **32**:758-764.
- Trojani M, de Mascarel I, Bonichon F, Coindre JM, Delsol G: Micrometastases to axillary lymph nodes from carcinoma of breast: detection by immunohistochemistry and prognostic significance. *Br J Cancer* 1987, **55**:303-306.
- Nakajo A, Natsugoe S, Ishigami S, et al: Detection and prediction of micrometastasis in the lymph nodes of patients with pN0 gastric cancer. *Ann Surg Oncol* 2001, **8**:158-162.
- Ishigami S, Natsugoe S, Tokuda K, et al: Clinical impact of micrometastasis of the lymph node in gastric cancer. *Am Surg* 2002, **69**:573-577.
- Yamamoto N, Kato Y, Yanagisawa A, Ohta H, Takahashi T, Kitagawa T: Predictive value of genetic diagnosis for cancer micrometastasis: histologic and experimental appraisal. *Cancer* 1997, **80**:1393-1398.
- Liu LH, Siziopikou KP, Gabram S, McClatchey KD: Evaluation of axillary sentinel lymph node biopsy by immunohistochemistry and multilevel sectioning in patients with breast carcinoma. *Arch Pathol Lab Med* 2000, **124**:1670-1673.
- Hermanek P, Hutter RV, Sobin LH, Wittekind C: International Union Against Cancer. Classification of isolated tumor cells and micrometastasis. *Cancer* 1999, **86**:2668-2673.