

lymphatic basin と呼ばれる転移領域が推測できる場合が多い<sup>1)</sup>。

しかしながらセンチネルリンパ節理論の基本は、各個人固有のもっとも転移をきたしやすいリンパ節を同定することである。したがってセンチネルリンパ節の同定は個別化治療、とくにリンパ節郭清の個別化に有用である。早期癌では、センチネルリンパ節の転移の有無により郭清の省略化が可能になると思われる。

## II. EMR, ESD の適応と適応拡大

この項のポイント

- 現在の適応拡大は手術例の結果に基づく retrospective な解析結果である。

早期消化管癌では endoscopic mucosal resection (EMR) や endoscopic submucosal dissection (ESD) の進歩により、多くの粘膜癌症例では局所制御が可能となってきた。『食道癌診断・治療ガイドライン』による EMR の適応に関して、絶対的適応は食道癌のうち深達度が M1 あるいは M2 で周在性 2/3 以下と診断された症例とされている、深達度が M1 (EP) や M2 (LPM) に留まるものには、リンパ節転移や脈管侵襲はまれで、EMR によって多くの症例で根治が可能である。また、相対的適応として、壁深達度が粘膜筋板に達したものの、粘膜下層に浸潤するもの (200  $\mu$ m まで) ではリンパ節転移の可能性を認めるが、臨床的にリンパ節転移がない症例では粘膜切除が可能であり、相対的適応となる。また、粘膜切除が全周性になる病変でも相対的適応となる。と記載されている<sup>2)</sup>。したがって、適応拡大となるのは M3 (MM), SM1 の一部の症例と考えられる。

『胃癌治療ガイドライン』による EMR の適応の原則はリンパ節転移の可能性がほとんどな

く腫瘍が一括切除できる大きさと部位にあること、と記載されている。具体的な適応条件は 2 cm 以下の肉眼的粘膜癌 (cM) と診断される病変で、組織型が分化型 (pap, tub 1, tub 2)。肉眼型は問わないが、陥凹型では UL(-) に限る、となっている<sup>3)</sup>。臨床研究として行うべき適応がいわゆる適応拡大の範疇に入ってくると考えられる。すなわち、①分化型腺癌、M 癌、UL(-)、大きさを問わず、②分化型腺癌、M 癌、UL(+), 3 cm 以下、③分化型腺癌、SM1 癌、3 cm 以下、④未分化型腺癌、M 癌、UL(-), 2 cm 以下である<sup>4)</sup>。

これらの食道癌、胃癌の適応拡大の基準は、これまでの多数の手術例をもとにリンパ節転移の有無に関して、原発巣を解析することによって得られた結果に基づくものである。これらの検討から適応を拡大する場合には、いくつかの問題点がある。多くのこれらの検討は原発巣およびリンパ節転移巣も代表一切片で行われており、ある意味きわめて曖昧な検討である。実際、食道表在癌切除例で深切り追加切片を作製して深達度を再評価すると 15.5% の症例で深達度の変更がみられる<sup>5)</sup>。さらにリンパ節についても追加切片を作製し検討すると通常の HE 染色標本においても 10.5% に微小転移が発見される<sup>6)</sup>。TNM 分類の第 6 版ではすでに微小転移の項目が取り上げられており、次項で述べるこれらの微小転移の検討も是非必要である<sup>7)</sup>。また、リンパ節郭清が行われた手術例を基にした retrospective な解析であるために今後、リンパ節郭清を行わない場合には follow-up のありかたや再発への対処が重要な課題となる。

### III. センチネルリンパ節の微小転移

この項のポイント

- 早期癌に対する縮小治療には微小転移の診断が必須である。

前述したようにリンパ節の検索切片数を増やすとリンパ節微小転移が HE 染色によってもかなりの頻度で認められる。近年、免疫組織染色による分子生物学的方法および reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR 法) による遺伝子学的方法の進歩により、通常の組織標本では発見できないリンパ節微小転移巢の存在が明らかになってきた<sup>8),9)</sup>。EMR や ESD の対象となる病変は早期癌であるが、そのうち画像診断でリンパ節転移陽性例は除外される。したがって EMR や ESD 症例のリンパ節転移診断は、究極的には微小転移の有無をいかに正確に診断できるかということにある。

リンパ管侵襲はリンパ節転移を予測する重要な因子である。病理診断で転移陰性(pN 0)と診断された 80 例の胃癌で、微小転移とリンパ管侵襲について検討した<sup>10)</sup>。リンパ節微小転移はサイトケラチン(CK)染色と CEA-mRNA を用いた RT-PCR 法により調べられた。リンパ管侵襲は通常の組織標本に加え、D 2-40 を用いた免疫染色を行い解析した。CK 染色と RT-PCR で陽性になった症例は各々 9 例(11.3%)と 25 例(31.3%)であった。また、リンパ管侵襲は組織診断で 80 例中 9 例に陽性であったが、残る陰性 71 例中、D 2-40 染色で 11 例が陽性と判定された(図 1)。微小転移との関連をみると、微小転移陽性 25 例中 6 例のみが組織学的リンパ管侵襲陽性であった。一方、D 2-40 染色では 25 例中 16 例にリンパ管侵襲陽性と診断された(表)。この結果より、微小転移を含めたリンパ節転移を予測するとき、

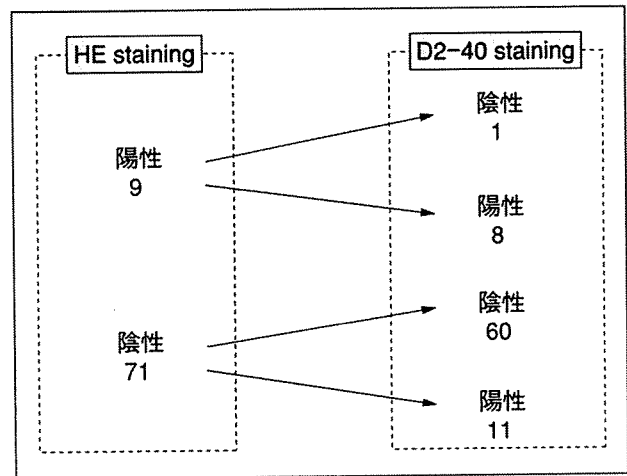


図 1 HE (hematoxylin and eosin) 染色と D 2-40 染色の比較

表 リンパ節微小転移とリンパ管侵襲

リンパ管侵襲	微小転移(%)		p-value
	陰性(n=55)	陽性(n=25)	
HE 染色			0.0150
陰性	52(73.2)	19(26.8)	
陽性	3(33.3)	6(66.7)	
D 2-40 染色			<0.0001
陰性	52(85.2)	9(14.8)	
陽性	3(15.8)	16(84.2)	

HE : Hematoxylin and eosin staining

EMR や ESD 症例の原発巣のリンパ管侵襲の評価には通常の組織診断のみならずリンパ管の特異的染色も是非必要と考えられる。

術前に深達度 T 1, T 2(cT 1, cT 2)と診断された胃癌 104 例について、センチネルリンパ節の同定と CK 抗体を用いた免疫染色による微小転移を含めたリンパ節転移について検討した<sup>11)</sup>。センチネルリンパ節の同定は初期の注入不適の 3 例を除き、cT 1 と cT 2 で各々 99% (78/79 例)と 95% (21/22 例)であった。リンパ節転移は通常の組織検査では cT 1 で 7 例に認められたが、すべてセンチネルリンパ節に含まれていた。また、cT 1 では CK 染色による微小転移が 8 例に認められたが、これらはすべて

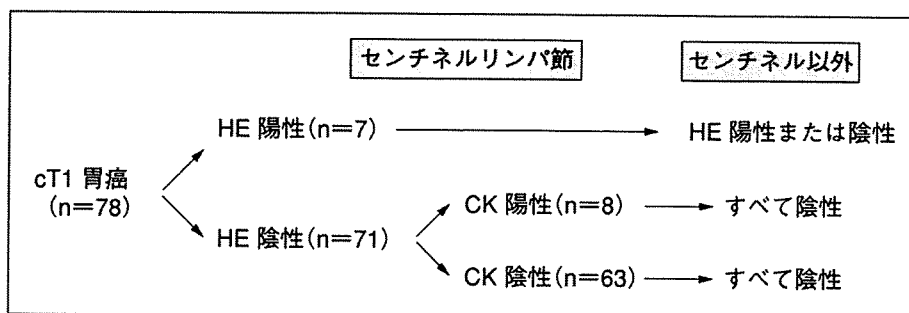


図2 センチネルリンパ節と微小転移  
HE : hematoxylin and eosin staining, CK : cytokeratin staining

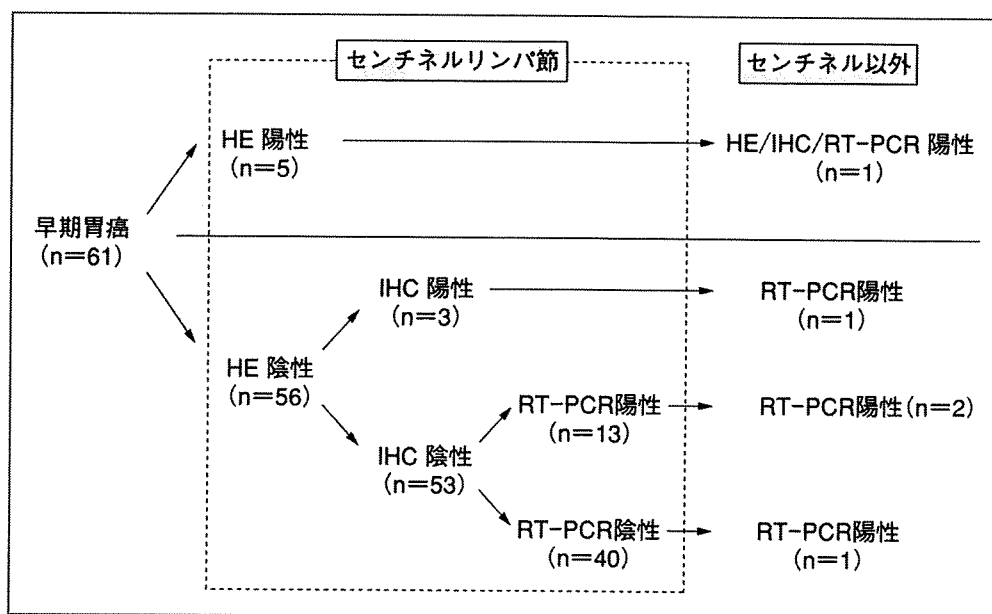


図3 早期胃癌のセンチネルリンパ節と微小転移  
HE : hematoxylin and eosin 染色, IHC : 免疫組織染色  
RT-PCR : reverse transcription-polymerase chain reaction

センチネルリンパ節に含まれていた(図2)。cT2では組織検査で12例に転移がみられ、6例はセンチネルリンパ節の転移であったが、残る6例はセンチネルリンパ節以外のリンパ節に転移がみられた。

さらにセンチネルリンパ節の微小転移をRT-PCR法を用いて検討した<sup>12)</sup>。cT1の53例とcT2の8例の計61例を対象として、摘出された1,410個のリンパ節についてCEA-mRNAを用いたRT-PCR法で微小転移を検討した。通常の組織診断およびCKによる免疫染色では5例(8.2%)と8例(13.1%)に転移

が認められた。転移がみられなかった53例のうち、RT-PCRでCEA-mRNA陽性例は14例に認められた。これら14例のうち、13例はセンチネルリンパ節への転移であり、1例のみがセンチネルリンパ節以外のリンパ節への転移であったが、この症例はcT2であった(図3)。組織学的転移陽性5例は、1例を除きsm以深であった。微小転移はM癌の33例中8例(24.2%)、SM癌の24例中7例(29.2%)、cT2の4例中2例(50%)にみられた。すべて陥凹型であり、未分化型は30.3%(10/33)、分化型は42.9%(12/28)であった。微小転移は第

1群リンパ節に11例、残る6例は第2群への転移であった。以上、RT-PCR法を用いた微小転移を含めた検討でも、cT1, cN0症例では正診率は100%であり、十分に臨床応用可能と考えられる。

#### IV. EMR, ESD とセンチネルリンパ節生検

この項のポイント

- EMR, ESDの適応拡大にはセンチネルリンパ節の転移診断が重要である。

早期の食道癌や胃癌に対し機能温存、臓器温存によるQOL保持の観点からEMRやESDを積極的に施行していく利点はあると考えられる。しかし、早期癌が対象であるために再発や癌死は避けなければならない。したがって、局所病変の治療のみに目を奪われて転移巣を見逃すことは慎むべきである。このような観点から、リンパ節転移診断をどのように前向きに行うかが一つの大きな課題である。

過去のデータの集積から得られるリンパ節転移に関する情報、術前にさまざまな画像による転移診断は必須であり、これらによりかなりの症例でリンパ節転移に関する転移予測が可能と考えられる。しかしながら、微小転移の診断までとなると、今までの転移予測では不十分である。明らかに転移を認めない早期癌はともかく、転移の可能性のある食道のM3-SM1癌や、胃癌で陥凹型や2cm以上、未分化型に適応拡大する場合には、確実なリンパ節転移診断が必要と考える。筆者らの報告を含め、センチネルリンパ節の概念はcT1, cN0症例では成立すると考えられるので、EMR, ESDの適応拡大を行う場合にはセンチネルリンパ節生検を併用するべきと考える。その際、微小転移に関しても未だ臨床的意義が明らかでない現状にお

いては、確実な診断を行うことが重要と考える。

今後、EMR, ESDの適応を拡大した治療を積極的に行う際にはリンパ節転移の確実な診断が不可欠である。術後経過観察で再発を見つけていくという不確定要素の高い危険性のある方法より、微小転移を含めた転移を確実に診断していく方法が重要であることは論を待たない。今後は、EMR, ESDと胸腔鏡や腹腔鏡下センチネルリンパ節生検による微小転移を含めた転移診断により、機能温存と根治性の両方が満足できる治療が成立すると考えられる。この方法により、早期の食道癌や胃癌に対するEMR, ESDの適応はさらに安全性をもって拡大すると思われる。

#### 文 献

- 1) 三輪晃一, 木南伸一, 寺田逸郎, 他: センチネルリンパ節生検による早期胃癌の縮小手術. 消化器外科 23; 1649-1656, 2000
- 2) 日本食道疾患研究会編: 食道癌診断・治療ガイドライン(2007年4月版). 金原出版, 東京, 2007
- 3) 日本胃癌学会編: 胃癌治療ガイドライン(第2版). 金原出版, 東京, 2004
- 4) 蓮池典明, 小野裕之, 乾 哲也, 他: 内視鏡的治療の適応と限界. 臨牀消化器内科 19; 852-857, 2004
- 5) 夏越祥次, 相良光久, 手塚善久, 他: 深切り切片による食道表在癌深達度の検討. 日消外会誌 28; 753-756, 1995
- 6) Natsugoe, S., Aikou, T., Shimada, M., et al.: Occult lymph node metastasis in gastric cancer with submucosal invasion. Surg. Today 24; 870-875, 1994
- 7) Sobin, L. H. and Wittekind, Ch.: TNM classification of malignant tumors. 6th(ed.). 10-12, Wiley-Liss, International Union Against Cancer(UICC), 2002
- 8) Natsugoe, S., Mueller, J., Stein, H. J., et al.: Micrometastasis and tumor cell microinvolvement of lymph nodes from esophageal squamous cell carcinoma. Cancer 83; 858-

866, 1998

- 9) Mori, M., Mimori, M., Ueo, H., et al. : Clinical significance of molecular detection of carcinoma cells in lymph nodes and peripheral blood by reverse transcription-polymerase chain reaction in patients with gastrointestinal or breast carcinomas. *J. Clin. Oncol.* 16 ; 128-132, 1998
- 10) Arigami, T., Natsugoe, S., Uenosono, Y., et al. : Lymphatic invasion using D2-40 monoclonal antibody and its relationship to lymph node micrometastasis in pN0 gastric cancer. *Br. J. Cancer* 93 ; 688-693, 2005
- 11) Uenosono, Y., Natsugoe, S., Ehi, K., 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
- 12) 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.* 243 ; 341-347, 2006

## Summary

### Clinical Application of Sentinel Node Biopsy for EMR or ESD

Shoji Natsugoe\*, Yoshikazu Uenosono\*, Takaaki Arigami\*, Yasushi Higashi\*, Takeo Arima\*, Katsuhiko Ehi\*, Tsutomu Kozono\*, Shigehiro Yanagita\*, Yawara Funasako\* and Takashi Aiko\*

Endoscopic mucosal resection (EMR) or endoscopic submucosal dissection (ESD) is a useful treatment from the viewpoint of preserving organs and their functionality. Lymph node metastasis is the most important factor in early gastrointestinal cancer, when deciding on EMR or ESD. The presence of lymph node micrometastasis can be determined by biological and molecular methods, in addition to overt metastasis detected by imaging means. Recently, the sentinel lymph node concept has been introduced for treatment of early gastrointestinal cancer. It is useful to provide less invasive treatment by examining lymph node micrometastasis after identification of sentinel node. In the near future, extension of indications for EMR or ESD may be established through the use of sentinel node biopsy based on the diagnosis of lymph node micrometastasis.

**Key words** : esophageal cancer, gastric cancer, sentinel node, endoscopic mucosal resection, endoscopic submucosal dissection

*\*Department of Surgical Oncology and Digestive Surgery, Kagoshima University Graduate School of Medical and Dental Science, 8-35-1 Sakuragaoka, Kagoshima-shi, Kagoshima 890-8520, Japan*



REVIEW

# Detection of micrometastases in sentinel node navigation surgery for gastric cancer

Shigehiro Yanagita\*, Shoji Natsugoe, Yoshikazu Uenosono, Takaaki Arigami, Hideo Arima, Tsutomu Kozono, Yawara Funasako, Katsuhiko Ehi, Akihiro Nakajo, Sumiya Ishigami, Takashi Aikou

Department of Surgical Oncology and Digestive Surgery, Field of Oncology, Course of Advanced Therapeutics, Kagoshima University Graduate School of Medical and Dental Sciences, 8-35-1 Sakuragaoka, Kagoshima 890-8520, Japan

**KEYWORDS**

Gastric cancer;  
Micrometastasis;  
Isolated tumor cell;  
Sentinel node;  
Genetic diagnosis

**Abstract**

Although lymph node metastasis is one of the important prognostic factors for patients with gastric cancer, the clinical significance of micrometastasis remains controversial. In the 6th edition of the TMN classification, micrometastases were classified as micrometastasis (MM) and isolated tumor cells (ITC) according to its greatest dimension. The accurate diagnosis of micrometastases is required when considering less invasive surgery, especially in early stage of gastric cancer. Since generating useful information about micrometastases by conventional RT-PCR is time-consuming, this procedure is not useful for rapid diagnosis during surgery. Recently some new methods of genetic diagnosis have reduced the amount of time required to obtain information about micrometastases in lymph nodes to 30–40 min. Such methodology can be clinically applied during less invasive surgery. The sentinel node (SN) concept has recently been applied to gastric cancer and SN navigation surgery (SNNS) is ideal for reduction of lymphadenectomy in patients with early gastric cancer. However, we should think about some conditions to establish SN concept for gastric cancer: the particle size of radioisotope, relationship between metastatic area and RI uptake, and the diagnosis of micrometastases by various method such as histological examination, immunostaining and RT-PCR. Here, we described the current status of MM and ITC in the lymph nodes and the SN concept in gastric cancer.

© 2008 Elsevier Ltd. All rights reserved.

**Contents**

Clinical significance of micrometastasis in gastric cancer .....	204
Sentinel node concept in gastric cancer .....	204
Selection of tracer for sentinel node detection .....	205

\* Corresponding author. Tel.: +81 99 275 5361; fax: +81 99 265 7426.  
E-mail address: [y0810@m.kufm.kagoshima-u.ac.jp](mailto:y0810@m.kufm.kagoshima-u.ac.jp) (S. Yanagita).

Ratios of metastatic areas and radioisotope uptake in sentinel nodes .....	206
SN mapping in patients with clinical T1 and N0 gastric cancer .....	206
Diagnosis of lymph node metastases including micrometastases .....	206
Selection of markers in genetic diagnosis using RT-PCR .....	207
Establishing marker cut-off values .....	207
Clinical application of the diagnosis of micrometastases .....	207
Conclusion and outlook .....	208
References .....	208

### Clinical significance of micrometastasis in gastric cancer

The advocated concept of "so-called micrometastasis" based on morphological or methodological findings is also referred to as micrometastasis, microcarcinosis, occult metastasis, latent metastasis, microinvolvement, microenvironment and isolated tumor cells (ITC). The term "ITC" has recently been introduced into the TNM classification [1]. These are individual tumor cells or small cell clusters that do not exceed 0.2 mm in the greatest dimension, which are usually detected by immunohistochemistry (IHC) or molecular methods, but may be verified by hematoxylin and eosin (HE) staining. They do not typically show evidence of metastatic activity (e.g., proliferation or stromal reaction) or penetrate vascular or lymphatic sinus walls. When ITC are located in lymph nodes or at distant sites, they should be classified as N0 or M0, respectively. The same applies to cases with findings suggestive of tumor cells or associated components detected by non-morphological techniques such as flow cytometry or DNA analysis.

The clinical significance of lymph node micrometastases in gastric cancer remains controversial. Some authors have reported a significant difference between the presence of micrometastases and prognosis in gastric cancer [2–9] whereas others have not [10–12] (Table 1). Nakajo et al. defined micrometastases as "tumor micrometastasis – cluster formation of tumor cells with stromal reaction and tumor cell microinvolvement – the presence of individual tumor cells without a change in stroma". They suggested that the immunohistochemical incidence of micrometastases in the lymph nodes of patients with gastric cancer is quite high and that such metastasis is associated with the prognosis of patients with pN0 [7]. Doekhie et al. defined MM and ITC according to the 6th edition of the TNM classification and found that the number of examined lymph nodes and the ratios (%) of positive MM and ITC in the lymph nodes are independent risk factors for locoregional and distant recurrent disease [2].

In contrast, Fukagawa et al. defined micrometastases as the presence of tumor cells detected by cytokeratin-specific IHC and not by ordinary HE staining. They concluded that the immunohistochemical presence of micrometastases in the regional lymph nodes does not affect the survival of gastric cancer patients [10]. Hong-Jo et al. defined micrometastases as individual epithelial cells or epithelial cell clusters detected immunohistochemically within the capsule of the lymph node either in

the sinus or in the lymphatic vessels and they concluded that IHC with an anticytokeratin antibody seems to be of little prognostic value in patients with submucosal gastric carcinoma [11].

Yokoyama et al. suggested that ITC in the regional lymph nodes regressed by removal of the primary tumor mainly via natural killer cell-mediated anti-tumor activity and that micrometastases in the lymph nodes could be effectively eliminated by the postoperative chemotherapy by animal model [13]. Yonemura et al. immunohistochemically evaluated ITC and found that they are highly proliferative and have the potential to induce established lymph node metastasis; the prognosis was significantly worse among patients with, than without ITC. They also suggested that highly proliferative ITC are destined to become clinical metastases [14]. We evaluated the proliferative activity of MM and ITC in the sentinel nodes with gastric cancer immunohistochemically using anti-Ki-67 antibody. Anti-Ki-67 antibody is frequently used to assess proliferative activity in tumor cells because the protein is usually detectable throughout the cell cycle except during the G0 phase [15]. It was found that 92% of MM, and 29% of ITC were Ki-67 positive and we considered that there was great importance in diagnosis of MM and ITC [16]. There were some problems regarding the difference of used antibody, identification between micrometastases and immune cells and estimation of micrometastases, especially in single cells. The clinical significance of micrometastases should be further studied in a large population of patients with the same disease stage.

### Sentinel node concept in gastric cancer

According to the sentinel node (SN) concept, SN is the first lymph node to receive lymphatic flow from the primary tumor and metastasis initially occurs at this site [17]. Thus, micrometastases are probably located in SNs as the first step of lymph node metastasis. SN navigation surgery (SNNS) has been clinically introduced for patients with breast cancer and malignant melanoma and it can also assess lymph node dissection areas [18–21]. The SN concept has recently been applied to cancers of the gastrointestinal tract [22–26]. Several authors have reported that the SN concept is applicable to patients with clinical T1 and N0 gastric cancers [27–30]. The incidence of patients with early gastric cancer is increasing in Japan thanks to early endoscopic discovery. Minimally invasive surgery based on SNNS might become an option if the SN concept could be applied to patients with early clinical T1 and N0 gastric

**Table 1** Clinical immunohistochemical investigation of micrometastases with gastric cancer

Author	Patient	Definition	Significance
Doekhie et al. [2]	40 With disease recurrence 41 Without disease recurrence	6th Edition of TNM classification	Yes Disease recurrence
Morgagni et al. [3]	300 With pN0 early gastric cancer	Single or small clusters of cancer cells identified only by IHC staining	No
Yasuda et al. [4]	64 With histologically node-negative gastric cancer (T2, T3)	Single or small clusters of cancer cells identified only by IHC staining	Yes Survival
Lee et al. [5]	46 With early gastric cancer 107 With advanced gastric cancer	Single or small clusters of cancer cells identified only by IHC staining	Yes Survival
Cai et al. [6]	162 With early gastric cancer	Tumor cells detected only by cytokeratin immunostaining	Yes Survival
Nakajo et al. [7]	67 Diagnosed as pN0 by routine histological examination	Tumor micrometastasis: cluster formation of tumor cells with stromal reaction Tumor cell microinvolvement: presence of individual tumor cells without a change in the stroma	Yes Survival
Harrison et al. [8]	25 Patients with T1-4N0M0 gastric and gastroesophageal junction adenocarcinoma	Immunohistochemical detected lymph node micrometastasis with histologic node negative	Yes Survival
Maehara et al. [9]	34 Patients with node-negative early gastric cancer who died of a recurrence	Cytokeratin-positive cells in lymph nodes of patients with node-negative early gastric cancer	Yes Survival
Fukagawa et al. [10]	107 Patients with pT2N0M0	The presence of tumor cells detected only by cytokeratin immunostaining (1) Single cell type and (2) Cluster type	No
Choi et al. [11]	88 With submucosal gastric cancer with D2 lymph node dissection	Any tumor cells, single or in groups, detected by cytokeratin IHC and missed in HE staining	No
Morgagni et al. [12]	139 With early gastric cancer diagnosed as pN0	Defined as single or small clusters of neoplastic cells identifiable only by IHC staining	No

cancer. When patients preoperatively staged as T1 and N0, do not show any evidence of micrometastases in SNs during surgery, reduction of gastrectomy such as preserving gastrectomy, segmental resection, wedge resection and limited proximal gastrectomy is possible. Similarly, SN biopsy and basin dissection of lymph nodes might also reduce the extent of lymphadenectomy. A key factor in SNNS is the accurate diagnosis of micrometastases during surgery.

### Selection of tracer for sentinel node detection

Several authors have described SN mapping in gastric cancer. However, the SNs were detected by radioisotope (RI)-labeled colloid guided, dye-guided and both RI and dye guided methods. The most popular RI tracer is  $^{99m}\text{Tc}$ -Technetium ( $^{99m}\text{Tc}$ ) in forms such as  $^{99m}\text{Tc}$ -tin colloid,  $^{99m}\text{Tc}$ -sulfur colloid,  $^{99m}\text{Tc}$ -serum albumin and  $^{99m}\text{Tc}$ -phytate [31–34]. The accuracy rate of dye method in SN mapping using patent blue is 98% [29]. Indocyanine green (ICG) can also detect SN [35,36] and infrared electronic endoscopy with ICG staining can easily detect SN [37]. Furthermore, the accuracy rate of SN detection is improved by using both RI and dye tracers [30,38]. However, in the dye method, the visceral fat and the time elapsed after injection of dye may

affect the detection of SN. Therefore, we regard the RI method as important.

Several questions are associated with the RI method of SN detection. Which RI tracers are suitable for SN detection? Which particle sizes of colloid easily move to lymph nodes and remain in the SNs? How many SNs are proper in SNNS? Colloid particle size might be an important factor in determining how certain tracers move from injection sites to lymph nodes via lymphatics [39]. We investigated the relationship between colloid particle size and the detection rate of SN in early gastric cancer. In this study,  $^{99m}\text{Tc}$ -tin colloid was used because the particle size can be changed easily by varying the ratio between the isotonic sodium chloride and the tin solution [40]. We preoperatively injected three size of  $^{99m}\text{Tc}$ -tin colloid (50, 100 and 500 nm) into the submucosa of the stomach under endoscopic control. The uptake of RI and total RI-uptake in SNs was highest when using particles of 100 nm and at least one lymph node metastasis (including micrometastases) was included in such SNs. Our results indicated that colloid particles of 100 nm were suitable for detection of SNs in early gastric cancer. Although small (50 nm) and large (500 nm) particle sizes were not proper for detection of SNs in gastric cancer, the optimal colloid size might vary among organs [26].



## Ratios of metastatic areas and radioisotope uptake in sentinel nodes

SNs are identified by RI or dye uptake during surgery. However, even if macroscopically overt nodal metastases are found during operation, RI or dye is not always contained in such nodes. Miwa et al. reported that false negative results were found in 4 of 211 patients with early-stage gastric cancer using the dye method. All four patients with a false negative finding had a large clinical node [29]. Martin et al. reported that the highest RI count (in SNs) was not predictive of nodal metastasis in breast cancer [41]. The problem arises due to the relationship between RI count and lymphatic flow or nodal metastasis. We investigated whether the RI count reflects the ratio of metastatic areas of sentinel nodes in gastric cancer, with the aim of decreasing false negative rates in the radioisotopic identification of SNs. The mean ratio of the metastatic area was significantly higher in RI (-) ( $68.3 \pm 20.5\%$ ) than in RI (+) ( $15.1 \pm 20.8\%$ ;  $p < 0.0001$ ). Therefore, the presence of lymph node metastases without RI uptake should be considered, particularly for lymph nodes with a metastatic area of  $>60\%$  [42]. A diagnosis of lymph node metastasis should be confirmed using both preoperative imaging and SN detection.

## SN mapping in patients with clinical T1 and N0 gastric cancer

SN mapping by the RI method has been performed in patients with clinical T1 and N0 gastric cancer since 2000. Lymph node metastases are examined by conventional HE and IHC using cytokeratin antibody as described [26,28,43]. At the present time we have enrolled 139 patients with clinical T1 and N0 gastric cancer in our institute. On the day prior to surgery, about 3 mCi of  $^{99m}\text{Tc}$ -tin colloid was injected endoscopically into the submucosa at four sites around the tumor using a 23-G needle. Lymph node mapping was performed after surgery. RI uptake in all dissected lymph nodes was measured after surgery using Navigator GPS™ (Tyco Healthcare, Tokyo, Japan) [26–28,42,43]. 'Hot' nodes were defined as individual lymph nodes with a signal ten times greater than the background level, and these were considered to be SNs. All dissected lymph nodes were examined by HE staining and IHC. The average number of SN was 4.3 per patient and the detection rate of SN was 97.8% (136/139). Lymph node metastases were detected in 8% of patients (11/136) and the sensitivity of detecting lymph node metastases in SN was 100%. In patients without nodal metastases by HE staining, lymph nodes metastases were detected by IHC in 10.4% (13/125) of 125 patients. In the patients with nodal metastases detected by both HE staining and IHC, 23 patients had lymph node metastasis in SNs and one patient was false negative case because the patient had lymph node metastasis in non-SNs only. Thus, the sensitivity and accuracy rate of detecting lymph node metastases, including micrometastases, in SN mapping was 95.8% (23/24) and 99.3% (135/136), respectively.

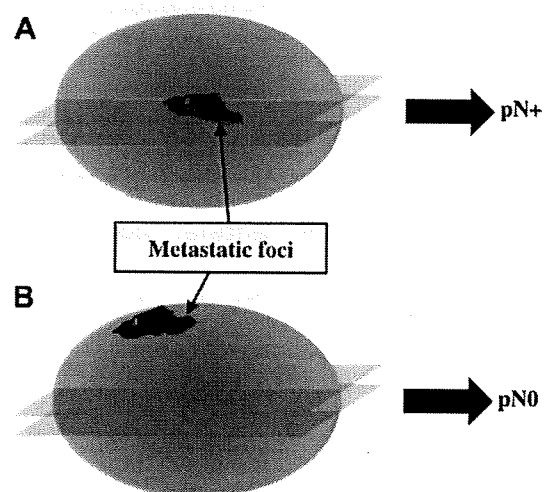
The 10.4% incidence of lymph node metastases that we detected by IHC alone was high, even in patients with pathological N0 in this series. According to the results of SN mapping, both conventional HE and IHC staining should be

performed when considering reducing the extent of lymphadenectomy based on the SN concept.

## Diagnosis of lymph node metastases including micrometastases

In SNNS, there is a problem regarding the diagnosis of lymph node metastases including micrometastases. As mentioned above, not all metastases are detected by routine histological examination. As lymph node metastasis is one of the most important prognostic factors in gastric cancer [9,44], accurate diagnosis of lymph node metastasis before and during surgery is indispensable for SNNS. Although lymph nodes are three-dimensional structures, histological and IHC investigations are usually performed on planar slices. Metastatic foci located in the center of lymph nodes result in a correct positive identification, but when they are not located in the hilus of the lymph node, the results are deemed negative (Fig. 1). Serial sectioning of lymph nodes for HE staining results in a more accurate evaluation of the extent of lymph nodes metastases [45], but this procedure is clinically laborious and expensive. A comprehensive diagnostic method is required for the accurate diagnosis of lymph node metastases, especially for detecting micrometastases.

Owing to progress in genetic detection, micrometastases in lymph nodes have been identified in patients in whom histological examinations indicated absent nodal involvement [46,47]. We investigated lymph node micrometastases determined by real-time reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). The relationship between micrometastases and lymphatic invasion, evaluated by IHC using a specific marker for the lymphatic vessels (D2-40) was analyzed [48]. We examined 1862 lymph nodes obtained from 80 patients with node-negative gastric cancer. All dissected lymph nodes were examined by RT-PCR in addition to HE staining and IHC. The resected primary specimens were immunostained using the D2-40 monoclonal antibody, and the presence or absence of lymphatic invasion was compared



**Figure 1** The metastatic foci in (A) are diagnosed accurately, but in (B) diagnosed inaccurately. Histological examination of lymph node metastasis is not always accurate because of the distribution of metastatic foci in the lymph node.

with that determined by HE staining. The incidence of lymph node micrometastases determined by IHC and by RT-PCR was 11.3% (9/80) and 31.3% (25/80), respectively. Although routine HE staining revealed lymphatic invasion in 11.3% (9/80) of patients, D2-40 staining uncovered new invasion in 23.8% (19/80) of patients. Lymph node micrometastases were more frequent among patients with pT2, than with pT1 tumors ( $P = 0.0042$ ). In the diagnosis of HE and D2-40 staining, the incidence of lymph node micrometastases was significantly higher in patients with lymphatic invasion than in those without lymphatic invasion ( $P = 0.0150$  and  $P < 0.0001$ , respectively). Lymph node micrometastases correlated more closely with D2-40, than with HE staining. We concluded that the incidence of both micrometastases and lymphatic invasion was high and that they correlated even in pN0 gastric cancer. The presence of micrometastases should be considered when planning less invasive treatment strategies. From the results of this study we conclude that although RT-PCR is non-morphological diagnostic method, an RT-PCR positive lymph node indeed may indicate the presence of nodal metastases.

RT-PCR can detect micrometastases in the lymph node more sensitively than HE and IHC. A few investigators have examined micrometastases of SN in gastric cancer using RT-PCR. In our institute, we examined the applicability of the SN concept to 61 patients with gastric cancer who were preoperatively diagnosed with clinical T1–T2 and N0 (cN0) based on lymph node micrometastases determined by IHC and RT-PCR. During surgery, RI uptake in the lymph node was measured using Navigator GPS™. All dissected lymph nodes were examined by RT-PCR in addition to HE and IHC. Sentinel nodes were identified in all patients (100%). The incidences of metastasis determined by HE and IHC were 8.2% (5/61) and 13.1% (8/61), respectively. Micrometastases undetectable by IHC were identified in 14 patients (23.0%) by RT-PCR. Only one patient had micrometastases detectable by RT-PCR in lymph nodes other than SN, but this patient had a cT2 tumor. In patients with cT1 and cN0 tumors, the false negative and accuracy rates were 0% and 100%, respectively. We concluded that although the incidence of micrometastases detected by RT-PCR was quite high, SN navigation identified such metastasis in all patients except one. Thus, the SN concept was applicable to patients with cT1 and cN0 gastric cancer, even when micrometastases were detectable by RT-PCR [28].

### Selection of markers in genetic diagnosis using RT-PCR

Several RT-PCR markers can detect micrometastases (Table 2), and carcinoembryonic antigen (CEA) is very popular. However, Honda et al. reported that 21.7% of differentiated tumors, 34.7% of undifferentiated tumors with a tubular component and 69.7% of pure undifferentiated tumors all express high levels of CEA [49]. Since gastric cancer comprises various histological types, markers other than CEA might be required to detect micrometastases by RT-PCR. Cytokeratin-19 (CK19) is a candidate for detecting micrometastases in lymph nodes [50], but a CK19 pseudogene can be associated with false positive findings [51]. Hoon et al. [52] suggested that a PCR assay with multiple markers

is more reliable and sensitive than a single-marker assay for detecting melanoma cells in the blood of patients. Similarly, Okada et al. [53] suggested that the multiple-marker RT-PCR assays are useful for detecting micrometastases in regional LNs among patients with gastric carcinoma. As with immunohistochemical methods, these markers are not cancer cell-specific. The problems associated with RT-PCR methods are multiple: marker selection, contamination of normal epithelial cells, presence of pseudogenes, and amplification of suitable settings.

### Establishing marker cut-off values

Metastatic and benign nodes without cancer cells should be compared to establish cut-off values of markers. Kubota et al. compared cut-off values assessed as CEA and CK20 expression between histologically proven nodal metastasis and benign nodes obtained from patients without cancer. Their results indicated that duplex quantitative real-time RT-PCR using CEA and CK20 primers is the most sensitive method of detecting micrometastases and useful for evaluating the prognostic significance of lymph node micrometastasis in patients with gastric cancer [46]. Osaka et al. established cut-off values by evaluating CEA and CK20 expression in primary gastric cancer tumors, metastatic lymph nodes, histologically benign lymph nodes, normal blood from healthy volunteers, and in the cancer cell lines, MKN-45, OCUM-2M, and OCUM-2M-D3. The sensitivity of detecting primary tumors was 93.1% for CEA, 86.2% for CK20 and 96.6% for either CEA or CK20. These values for detecting nodal metastasis were 100%, 76.9% and 100%, respectively, and all cell lines were positive for both CEA and CK20 [47]. These results indicated that the sensitivity was improved by measuring the expression of both markers rather than that of either alone.

After cut-off values for multiple markers are established by evaluating the expression of each marker individually in benign lymph nodes, multiplex assays might improve both the sensitivity and specificity of detecting nodal metastasis.

The discovery of a cancer-specific primer will eventually lead to only a single assay being sufficient to detect micrometastases in lymph nodes.

### Clinical application of the diagnosis of micrometastases

The presence of micrometastases in lymph nodes of gastric cancer has been confirmed by various methods. The concept of micrometastases should be applied not only to the prediction of prognosis and adjustment of staging migration but also to actual clinical practice. Intraoperative detection of micrometastases in lymph nodes is useful for determining the extent of lymphadenectomy. Conventional RT-PCR requires several steps and thus can generate information after 2–3 h. Thus, a more rapid procedure is required to obtain valuable results during surgery.

The new RT-PCR-based system, the GeneSearch BLN Assay (Veridex, LLC, Warren, NJ) has been developed for clinical applications. This system also generates results within about 30 min. Compared with histological staining, the GeneSearch BLN Assay detected 98% of metastases

**Table 2** Diagnosis of lymph node metastasis with gastric cancer by genetic methods

Author	Source of lymph nodes	Method	Marker
Noguchi et al. [50]	100 From 12 gastric cancer patients	RT-PCR	CK-19
Aihara et al. [65]	37 From 2 gastric cancer patients	RT-PCR	Mammaglobin B
Okada et al. [53]	435 Nodes from 28 gastric cancer patients	RT-PCR	CEA, CK-20, MAGE-2
Matsumoto et al. [64]	312 From 50 gastric cancer patients with node-negative gastric cancer	RT-PCR	CEA
Kubota et al. [46]	392 From 21 gastric cancer patients	RT-PCR	CEA, CK-20
Ajisaka and Miwa [59]	213 From 35 gastric cancer patients with SN mapping	RT-PCR	CEA, CK-18, hTRT, MUC-1
Sonoda et al. [60]	305 From 28 gastric cancer patients	RT-PCR	MUC-2, CEA
Osaka et al. [47]	345 From 57 gastric cancer patients with SN mapping	RT-PCR	CEA, CK-20
Xu et al. [61]	298 From 35 gastric cancer patients	RT-PCR	CK-18
Sonoda et al. [62]	310 Lymph nodes from 33 patients with pN0 early gastric cancer	RT-PCR	MUC-2, TFF1
Arigami et al. [28]	1410 Lymph nodes from 61 gastric cancer patients with SN mapping	RT-PCR	CEA
Horibe et al. [63]	92 Lymph nodes from 9 gastric cancer patients	RT-LAMP	CK-19

RT-PCR, reverse transcriptase-polymerase chain reaction; RT-LAMP, reverse transcription loop-mediated isothermal amplification.

>2 mm and 88% of metastases >0.2 mm during surgery using CK19 and mammaglobin as markers [54].

Improvements to the RT-PCR procedure such as the transcription-reverse transcription concerted reaction (TRC) [55] have resulted in results being generated within 1 h. The quantitation, sensitivity, and reproducibility of TRC and conventional RT-PCR were similar when CEA expression was evaluated in a gastric cancer cell line and in metastatic lymph nodes of gastric cancer [56].

The one-step nucleic acid amplification (OSNA) assay is characterized by mRNA quantitation, high specificity, the absence of genomic DNA amplification and requires only about 21 min to complete. This method using Cytokeratin-19 (CK19) generated similar results to histological staining in 98.2% of lymph nodes in breast cancer patients [57]. The fully automated, multiplex quantitative RT-PCR system, GeneXpert (Cepheid, Sunnyvale, CA) is useful and requires <30 min to complete. The sensitivity and specificity of this system using two markers was 94% and 100%, respectively, compared with histological staining of lymph nodes from patients with breast cancer [58].

These novel technologies seem productive for diagnosing micrometastases, since such metastases can be detected during surgery and the accuracy rates seem at least as high as those of HE or IHC staining of frozen sections.

## Conclusion and outlook

The presence of micrometastases in lymph nodes might be related to recurrence and prognosis in patients with gastric cancer. The clinical significance of micrometastases should be surveyed in a large patient population with the same disease stage who undergo the same types of surgery. Recent progress in RT-PCR technology means that about 30–40 min is required to determine micrometastases status. Since this is a relatively short time in which to reach an intraoperative diagnosis of micrometastases in lymph

nodes, the extent of lymphadenectomy could be individualized based on such findings.

SNNS is an ideal method of reducing the extent of lymphadenectomy. The SN concept is applicable to patients at the early stages of cancer, including gastric cancer. The following conditions should be satisfied to establish the SN concept in gastric cancer. The absence of overt metastasis should be confirmed by preoperative imaging, because RI uptake is undetectable in massive metastases in SN. Suitable RI particles should be selected because the RI count and the numbers of SN differ according to particle size. The accurate diagnosis of micrometastases is essential for SN navigation surgery in gastric cancer, because of the presence of micrometastases among the patients without pathological nodal metastasis. SN navigation surgery, based on the rapid diagnosis of micrometastases, using new RT-PCR technology might soon change the concept of lymph node dissection in early gastric cancer.

## References

- [1] Sobin LH, Wittekind C. TNM classification of malignant tumours. In: IUA Cancer, editor. 6th ed. International Union Against Cancer; 2002.
- [2] Doekhie FS, Mesker WE, van Krieken JH, Kok NF, Hartgrink HH, Kranenbarg EK, et al. Clinical relevance of occult tumor cells in lymph nodes from gastric cancer patients. *Am J Surg Pathol* 2005;29:1135–44.
- [3] Morgagni P, Saragoni L, Scarpi E, Zattini PS, Zaccaroni A, Morgagni D, et al. Lymph node micrometastases in early gastric cancer and their impact on prognosis. *World J Surg* 2003;27:558–61.
- [4] Yasuda K, Adachi Y, Shiraishi N, Inomata M, Takeuchi H, Kitano S. Prognostic effect of lymph node micrometastasis in patients with histologically node-negative gastric cancer. *Ann Surg Oncol* 2002;9:771–4.
- [5] Lee E, Chae Y, Kim I, Choi J, Yeom BLEong AS. Prognostic relevance of immunohistochemically detected lymph node

- micrometastasis in patients with gastric carcinoma. *Cancer* 2002;94:2867–73.
- [6] Cai J, Ikeguchi M, Tsujitani S, Maeta M, Liu JKaibara N. Significant correlation between micrometastasis in the lymph nodes and reduced expression of E-cadherin in early gastric cancer. *Gastric Cancer* 2001;4:66–74.
- [7] Nakajo A, Natsugoe S, Ishigami S, Matsumoto M, Nakashima S, Hokita S, et al. Detection and prediction of micrometastasis in the lymph nodes of patients with pN0 gastric cancer. *Ann Surg Oncol* 2001;8:158–62.
- [8] Harrison LE, Choe JK, Goldstein M, Meridian A, Kim SH, Clarke K. Prognostic significance of immunohistochemical micrometastases in node negative gastric cancer patients. *J Surg Oncol* 2000;73:153–7.
- [9] Maehara Y, Oshiro T, Endo K, Baba H, Oda S, Ichiyoshi Y, et al. Clinical significance of occult micrometastasis lymph nodes from patients with early gastric cancer who died of recurrence. *Surgery* 1996;119:397–402.
- [10] Fukagawa T, Sasako M, Mann GB, Sano T, Katai H, Maruyama K, et al. Immunohistochemically detected micrometastases of the lymph nodes in patients with gastric carcinoma. *Cancer* 2001;92:753–60.
- [11] Choi HJ, Kim YK, Kim YH, Kim SS, Hong SH. Occurrence and prognostic implications of micrometastases in lymph nodes from patients with submucosal gastric carcinoma. *Ann Surg Oncol* 2002;9:13–9.
- [12] Morgagni P, Saragoni L, Folli S, Gaudio M, Scarpi E, Bazzocchi F, et al. Lymph node micrometastases in patients with early gastric cancer: experience with 139 patients. *Ann Surg Oncol* 2001;8:170–4.
- [13] Yokoyama H, Nakanishi H, Kadera Y, Ikehara Y, Ohashi N, Ito Y, et al. Biological significance of isolated tumor cells and micrometastasis in lymph nodes evaluated using a green fluorescent protein-tagged human gastric cancer cell line. *Clin Cancer Res* 2006;12:361–8.
- [14] Yonemura Y, Endo Y, Hayashi I, Kawamura T, Yun HY, Bandou E. Proliferative activity of micrometastases in the lymph nodes of patients with gastric cancer. *Br J Surg* 2007;94:731–6.
- [15] Gerdes J, Lemke H, Baisch H, Wacker HH, Schwab U, Stein H. Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67. *J Immunol* 1984;133:1710–5.
- [16] Yanagita S, Natsugoe S, Uenosono Y, Kozono T, Ehi K, Arigami T, et al. Sentinel node micrometastases have high proliferative potential in gastric cancer. *J Surg Res* 2007.
- [17] Morton DL, Wen DR, Wong JH, Economou JS, Cagle LA, Storm FK, et al. Technical details of intraoperative lymphatic mapping for early stage melanoma. *Arch Surg* 1992;127:392–9.
- [18] Giuliano AE, Kirgan DM, Guenther JM, Morton DL. Lymphatic mapping and sentinel lymphadenectomy for breast cancer. *Ann Surg* 1994;220:391–8 [discussion 398–401].
- [19] Veronesi U, Paganelli G, Galimberti V, Viale G, Zurrida S, Bedoni M, et al. Sentinel-node biopsy to avoid axillary dissection in breast cancer with clinically negative lymph-nodes. *Lancet* 1997;349:1864–7.
- [20] Krag D, Weaver D, Ashikaga T, Moffat F, Klimberg VS, Shriver C, et al. The sentinel node in breast cancer – a multicenter validation study. *N Engl J Med* 1998;339:941–6.
- [21] Edwards MJ, Martin KD, McMasters KM. Lymphatic mapping and sentinel lymph node biopsy in the staging of melanoma. *Surg Oncol* 1998;7:51–7.
- [22] Saha S, Wiese D, Badin J, Beutler T, Nora D, Ganatra BK, et al. Technical details of sentinel lymph node mapping in colorectal cancer and its impact on staging. *Ann Surg Oncol* 2000;7:120–4.
- [23] Kitagawa Y, Kitajima M. Gastrointestinal cancer and sentinel node navigation surgery. *J Surg Oncol* 2002;79:188–93.
- [24] Bilchik AJ, Saha S, Tsioulis GJ, Wood TF, Morton DL. Aberrant drainage and missed micrometastases: the value of lymphatic mapping and focused analysis of sentinel lymph nodes in gastrointestinal neoplasms. *Ann Surg Oncol* 2001;8:825–55.
- [25] Aikou T, Higashi H, Natsugoe S, Hokita S, Baba M, Takao S. Can sentinel node navigation surgery reduce the extent of lymph node dissection in gastric cancer? *Ann Surg Oncol* 2001;8:905–35.
- [26] Uenosono Y, Natsugoe S, Higashi H, Ehi K, Miyazono F, Ishigami S, et al. Evaluation of colloid size for sentinel nodes detection using radioisotope in early gastric cancer. *Cancer Lett* 2003;200:19–24.
- [27] Uenosono Y, Natsugoe S, Ehi K, Arigami T, Hokita S, Aikou T. Detection of sentinel nodes and micrometastases using radioisotope navigation and immunohistochemistry in patients with gastric cancer. *Br J Surg* 2005;92:886–9.
- [28] Arigami T, Natsugoe S, Uenosono Y, Mataka Y, Ehi K, Higashi H, 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;243:341–7.
- [29] 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;90:178–82.
- [30] Lee JH, Ryu KW, Kim CG, Kim SK, Lee JS, Kook MC, et al. Sentinel node biopsy using dye and isotope double tracers in early gastric cancer. *Ann Surg Oncol* 2006;13:1168–74.
- [31] Wilhelm AJ, Mijnhout GS, Franssen EJ. Radiopharmaceuticals in sentinel lymph-node detection – an overview. *Eur J Nucl Med* 1999;26:536–42.
- [32] Tsopelas C. Particle size analysis of (99m)Tc-labeled and unlabeled antimony trisulfide and rhenium sulfide colloids intended for lymphoscintigraphic application. *J Nucl Med* 2001;42:460–6.
- [33] Davis MA, Jones AG, Trindade H. A rapid and accurate method for sizing radiocolloids. *J Nucl Med* 1974;15:923–8.
- [34] Warbick A, Ege GN, Henkelman RM, Maier G, Lyster DM. An evaluation of radiocolloid sizing techniques. *J Nucl Med* 1977;18:827–34.
- [35] Ichikura T, Morita D, Uchida T, Okura E, Majima T, Ogawa T, et al. Sentinel node concept in gastric carcinoma. *World J Surg* 2002;26:318–22.
- [36] Hiratsuka M, Miyashiro I, Ishikawa O, Furukawa H, Motomura K, Ohigashi H, et al. Application of sentinel node biopsy to gastric cancer surgery. *Surgery* 2001;129:335–40.
- [37] Nimura H, Narimiya N, Mitsumori N, Yamazaki Y, Yanaga K, Urashima M. Infrared ray electronic endoscopy combined with indocyanine green injection for detection of sentinel nodes of patients with gastric cancer. *Br J Surg* 2004;91:575–9.
- [38] Hayashi H, Ochiai T, Mori M, Karube T, Suzuki T, Gunji Y, et al. Sentinel lymph node mapping for gastric cancer using a dual procedure with dye- and gamma probe-guided techniques. *J Am Coll Surg* 2003;196:68–74.
- [39] Bergqvist L, Strand SE, Persson BR. Particle sizing and biokinetics of interstitial lymphoscintigraphic agents. *Semin Nucl Med* 1983;13:9–19.
- [40] Higashi H, Natsugoe S, Uenosono Y, Ehi K, Arigami T, Nakabeppu Y, et al. Particle size of tin and phytate colloid in sentinel node identification. *J Surg Res* 2004;121:1–4.
- [41] Martin RC, Fey J, Yeung H, Borgen PI, Cody III HS. Highest isotope count does not predict sentinel node positivity in all breast cancer patients. *Ann Surg Oncol* 2001;8:592–7.
- [42] Arima H, Natsugoe S, Uenosono Y, Arigami T, Ehi K, Yanagita S, et al. Area of nodal metastasis and radioisotope uptake in sentinel nodes of upper gastrointestinal cancer. *J Surg Res* 2006;135:250–4.
- [43] Arigami T, Natsugoe S, Uenosono Y, Arima H, Mataka Y, Ehi K, et al. Lymphatic invasion using D2-40 monoclonal antibody

- and its relationship to lymph node micrometastasis in pN0 gastric cancer. *Br J Cancer* 2005;93:688–93.
- [44] Natsugoe S, Aikou T, Shimada M, Yoshinaka H, Takao S, Shimazu H, et al. Occult lymph node metastasis in gastric cancer with submucosal invasion. *Surg Today* 1994;24:870–5.
- [45] Isozaki H, Okajima K, Fujii K. Histological evaluation of lymph node metastasis on serial sectioning in gastric cancer with radical lymphadenectomy. *Hepatogastroenterology* 1997;44:1133–6.
- [46] Kubota K, Nakanishi H, Hiki N, Shimizu N, Tsuji E, Yamaguchi H, et al. Quantitative detection of micrometastases in the lymph nodes of gastric cancer patients with real-time RT-PCR: a comparative study with immunohistochemistry. *Int J Cancer* 2003;105:136–43.
- [47] 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* 2004;10:6912–8.
- [48] Kahn HJ, Bailey D, Marks A. Monoclonal antibody D2-40, a new marker of lymphatic endothelium, reacts with Kaposi's sarcoma and a subset of angiosarcomas. *Mod Pathol* 2002;15:434–40.
- [49] Honda T, Tamura G, Endoh Y, Nishizuka S, Kawata S, Motoyama T. Expression of tumor suppressor and tumor-related proteins in differentiated carcinoma, undifferentiated carcinoma with tubular component and pure undifferentiated carcinoma of the stomach. *Jpn J Clin Oncol* 2005;35:580–6.
- [50] Noguchi S, Hiratsuka M, Furukawa H, Aihara T, Kasugai T, Tamura S, et al. Detection of gastric cancer micrometastases in lymph nodes by amplification of keratin 19 mRNA with reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Jpn J Cancer Res* 1996;87:650–4.
- [51] Ruud P, Fodstad O, Hovig E. Identification of a novel cyto-keratin 19 pseudogene that may interfere with reverse transcriptase-polymerase chain reaction assays used to detect micrometastatic tumor cells. *Int J Cancer* 1999;80:119–25.
- [52] Hoon DS, Wang Y, Dale PS, Conrad AJ, Schmid P, Garrison D, et al. Detection of occult melanoma cells in blood with a multiple-marker polymerase chain reaction assay. *J Clin Oncol* 1995;13:2109–16.
- [53] Okada Y, Fujiwara Y, Yamamoto H, Sugita Y, Yasuda T, Doki Y, et al. Genetic detection of lymph node micrometastases in patients with gastric carcinoma by multiple-marker reverse transcriptase-polymerase chain reaction assay. *Cancer* 2001;92:2056–64.
- [54] Blumencranz P, Whitworth PW, Deck K, Rosenberg A, Reintgen D, Beitsch P, et al. Scientific Impact Recognition Award. Sentinel node staging for breast cancer: intraoperative molecular pathology overcomes conventional histologic sampling errors. *Am J Surg* 2007;194:426–32.
- [55] Ishiguro T, Saitoh J, Horie R, Hayashi T, Ishizuka T, Tsuchiya S, et al. Intercalation activating fluorescence DNA probe and its application to homogeneous quantification of a target sequence by isothermal sequence amplification in a closed vessel. *Anal Biochem* 2003;314:77–86.
- [56] Ishii T, Fujiwara Y, Ohnaka S, Hayashi T, Taniguchi H, Takiguchi S, et al. Rapid genetic diagnosis with the transcription-reverse transcription concerted reaction system for cancer micrometastasis. *Ann Surg Oncol* 2004;11:778–85.
- [57] Tsujimoto M, Nakabayashi K, Yoshidome K, Kaneko T, Iwase T, Akiyama F, et al. One-step nucleic acid amplification for intraoperative detection of lymph node metastasis in breast cancer patients. *Clin Cancer Res* 2007;13:4807–16.
- [58] Hughes SJ, Xi L, Raja S, Gooding W, Cole DJ, Gillanders WE, et al. A rapid, fully automated, molecular-based assay accurately analyzes sentinel lymph nodes for the presence of metastatic breast cancer. *Ann Surg* 2006;243:389–98.
- [59] Ajisaka H, Miwa K. Micrometastases in sentinel nodes of gastric cancer. *Br J Cancer* 2003;89:676–80.
- [60] Sonoda H, Yamamoto K, Kushima R, Okabe H, Tani T. Detection of lymph node micrometastasis in gastric cancer by MUC2 RT-PCR: usefulness in pT1 cases. *J Surg Oncol* 2004;88:63–70.
- [61] Xu W, Zhang MW, Huang J, Wang X, Xu SF, Li Y, et al. Correlation between CK18 gene and gastric carcinoma micrometastasis. *World J Gastroenterol* 2005;11:6530–4.
- [62] Sonoda H, Yamamoto K, Kushima R, Yamamoto H, Naitoh H, Okabe H, et al. Detection of lymph node micrometastasis in pN0 early gastric cancer: efficacy of duplex RT-PCR with MUC2 and TFF1 in mucosal cancer. *Oncol Rep* 2006;16:411–6.
- [63] Horibe D, Ochiai T, Shimada H, Tomonaga T, Nomura F, Gun M, et al. Rapid detection of metastasis of gastric cancer using reverse transcription loop-mediated isothermal amplification. *Int J Cancer* 2007;120:1063–9.
- [64] Matsumoto M, Natsugoe S, Ishigami S, Nakashima S, Nakajo A, Miyazono F, et al. Lymph node micrometastasis and lymphatic mapping determined by reverse transcriptase-polymerase chain reaction in pN0 gastric carcinoma. *Surgery* 2002;131:630–5.
- [65] Aihara T, Fujiwara Y, Miyake Y, Okami J, Okada Y, Iwao K, et al. Mammaglobin B gene as a novel marker for lymph node micrometastasis in patients with abdominal cancers. *Cancer Lett* 2000;150(1):79–84.

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

## I. 総論

### 2. SNNSの歴史と進歩

愛甲 孝 上之園芳一 夏越祥次

臨床雑誌「外科」第70巻 第4号〔2008年4月〕別冊

南江堂

## 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<sup>1)</sup>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<sup>2)</sup>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。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

<ul style="list-style-type: none"> <li>・ high-value diagnostic tool</li> <li>・ increasing accuracy of diagnosis</li> <li>・ real time results for the surgeon</li> <li>・ LN staging based surgery</li> <li>・ enabling personalized treatment</li> </ul>
--

## 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<sup>3)</sup>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、微小転移の私たちで最初に転移する、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)<sup>4)</sup>の論文はSN conceptの原点でもある。Couldら<sup>5)</sup>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Cabanas<sup>6)</sup>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)<sup>7)</sup>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はなかった。

SNNSのブレイク・スルーとして、Mortonら<sup>8)</sup>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 Cancer InstituteのGiulianoら<sup>9)</sup>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)<sup>9)</sup>のSNを同定するためのradioisotopeの基礎的研究や、Selverstoneら<sup>10)</sup>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。



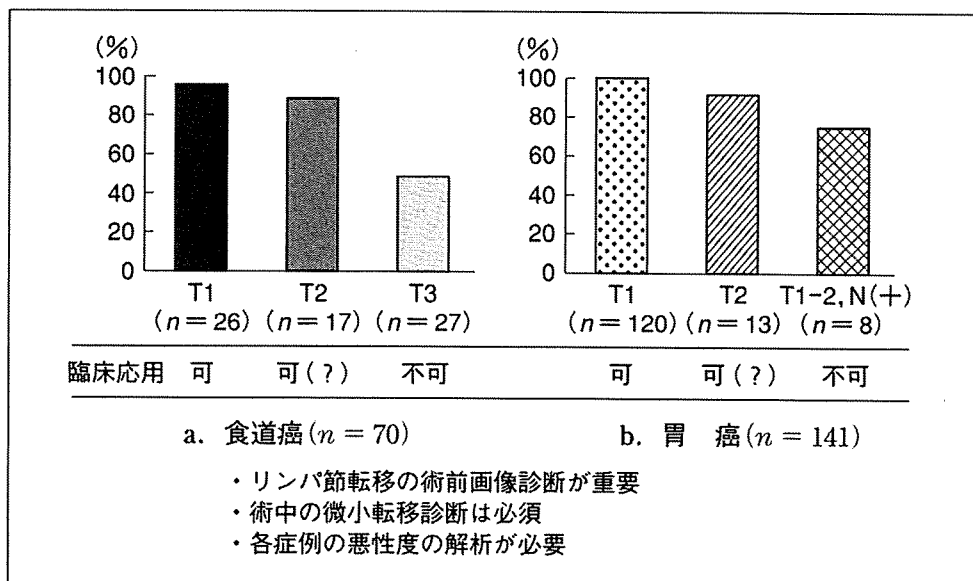


図1. SNとリンパ節転移診断<sup>16)</sup>

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<sup>11)</sup>、Saha ら<sup>12)</sup>の欧米からの発表がなされた。本邦からも筆者ら<sup>13-16)</sup>、慶應義塾大学<sup>17,20)</sup>、金沢大学<sup>18)</sup>、大阪府立成人病センター<sup>19)</sup>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る。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<sup>21)</sup>。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<sup>29)</sup>。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

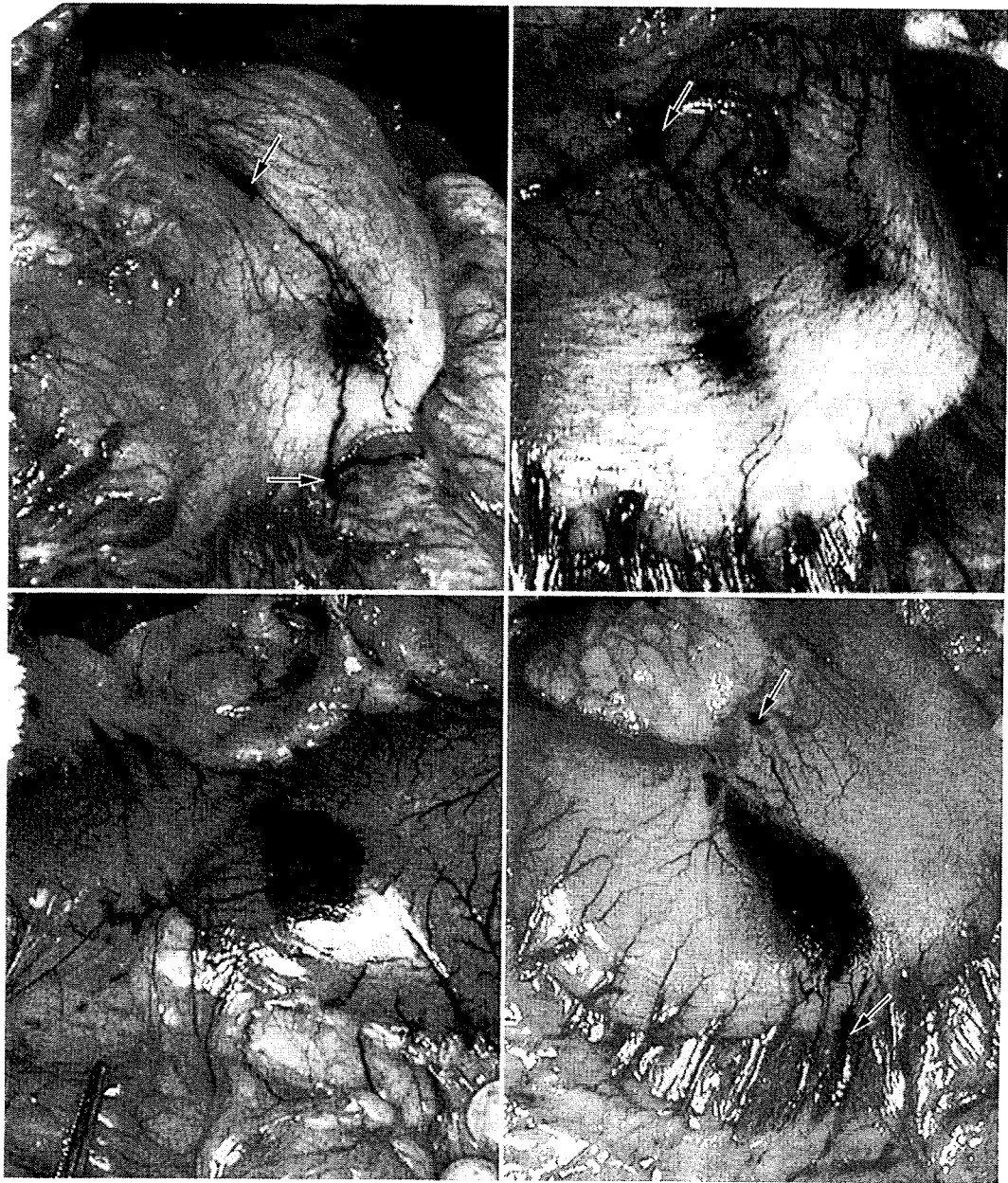


図2. 1960年代に行った色素法によるリンパ流の検索  
矢印：SN

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

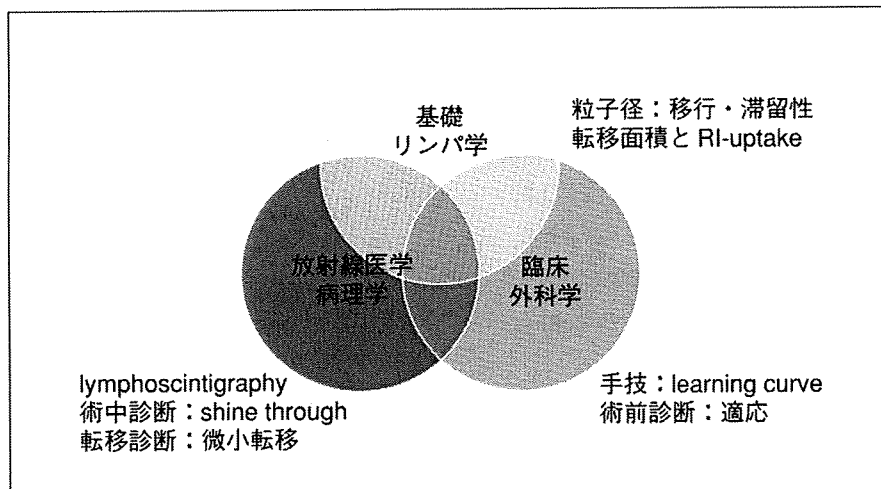


図3. SN 確立の条件

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、