

- sentinel lymph node mapping in colorectal cancer and its impact on staging. *Ann Surg Oncol* 2000;7:120-124.
- 7 Kitagawa Y, Kitajima M: Gastrointestinal cancer and sentinel node navigation surgery. *J Surg Oncol* 2002;79:188-193.
 - 8 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;8:82S-85S.
 - 9 Aikou T, Higashi H, Natsugoe S, Hokita S, Baba M, Tako S: Can sentinel node navigation surgery reduce the extent of lymph node dissection in gastric cancer? *Ann Surg Oncol* 2001;8:90S-93S.
 - 10 Uenosono Y, Natsugoe S, Higashi H, Ehi K, Miyazono F, Ishigami S, Hokita S, Aikou T: Evaluation of colloid size for sentinel nodes detection using radioisotope in early gastric cancer. *Cancer Lett* 2003;200:19-24.
 - 11 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;92:886-889.
 - 12 Arigami T, Natsugoe S, Uenosono Y, Mataka Y, Ehi K, Higashi H, Arima H, Yanagida S, Ishigami S, Hokita S, Aikou T: 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.
 - 13 Matsushita M, Hajiro K, Suzuki T, Uchida K, Okano A, Ohana M, Maruo T, Konishi Y, Kusumi F, Matsubayashi Y, et al: Histopathological assessment of lymph node metastasis in patients with gastric cancer. *Hepatogastroenterology* 1995;42:861-866.
 - 14 Kwon SJ, Kim GS: Prognostic significance of lymph node metastasis in advanced carcinoma of the stomach. *Br J Surg* 1996;83:1600-1603.
 - 15 Takagane A, Terashima M, Abe K, Araya M, Irinoda T, Yonezawa H, Nakaya T, Inaba T, Oyama K, Fujiwara H, Saito K: Evaluation of the ratio of lymph node metastasis as a prognostic factor in patients with gastric cancer. *Gastric Cancer* 1999;2:122-128.
 - 16 Kunisaki C, Shimada H, Takahashi M, Okubo K, Moriwaki Y, Akiyama H, Nomura M: Prognostic factors in early gastric cancer. *Hepatogastroenterology* 2001;48:294-298.
 - 17 Nitti D, Marchet A, Olivieri M, Ambrosi A, Mencarelli R, Belluco C, Lise M: Ratio between metastatic and examined lymph nodes is an independent prognostic factor after D2 resection for gastric cancer: analysis of a large European monoinstitutional experience. *Ann Surg Oncol* 2003;10:1077-1085.
 - 18 Lo SS, Wu CW, Chen JH, Li AF, Hsieh MC, Shen KH, Lin HJ, Lui WY: Surgical results of early gastric cancer and proposing a treatment strategy. *Ann Surg Oncol* 2007;14:340-347.
 - 19 Bhandari S, Shim CS, Kim JH, Jung IS, Cho JY, Lee JS, Lee MS, Kim BS: Usefulness of three-dimensional, multidetector row CT (virtual gastroscopy and multiplanar reconstruction) in the evaluation of gastric cancer: a comparison with conventional endoscopy, EUS, and histopathology. *Gastrointest Endosc* 2004;59:619-626.
 - 20 Liao SR, Dai Y, Huo L, Yan K, Zhang L, Zhang H, Gao W, Chen MH: Transabdominal ultrasonography in preoperative staging of gastric cancer. *World J Gastroenterol* 2004;10:3399-3404.
 - 21 Chilosi M, Lestani M, Pedron S, Montagna L, Benedetti A, Pizzolo G, Menestrina F: A rapid immunostaining method for frozen sections. *Biotech Histochem* 1994;69:235-239.
 - 22 Matsumoto M, Natsugoe S, Ishigami S, Uenosono Y, Takao S, Aikou T: Rapid immunohistochemical detection of lymph node micrometastasis during operation for upper gastrointestinal carcinoma. *Br J Surg* 2003;90:563-566.
 - 23 Monig SP, Luebke T, Soheili A, Landsberg S, Dienes HP, Holscher AH, Baldus SE: Rapid immunohistochemical detection of tumor cells in gastric carcinoma. *Oncol Rep* 2006;16:1143-1147.
 - 24 Isozaki H, Okajima K, Fujii K: Histological evaluation of lymph node metastasis on serial sectioning in gastric cancer with radical lymphadenectomy. *Hepatogastroenterology* 1997;44:1133-1136.
 - 25 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;94:731-736.
 - 26 Yanagita S, Natsugoe S, Uenosono Y, Kozono T, Ehi K, Arigami T, Arima H, Ishigami S, Aikou T: Sentinel node micrometastases have high proliferative potential in gastric cancer. *J Surg Res* 2008;145:238-243.
 - 27 Kubota K, Nakanishi H, Hiki N, Shimizu N, Tsuji E, Yamaguchi H, Mafune K, Tange T, Tatsumatsu M, Kaminishi M: 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;105:136-143.
 - 28 Okada Y, Fujiwara Y, Yamamoto H, Sugita Y, Yasuda T, Doki Y, Tamura S, Yano M, Shiozaki H, Matsuura N, Monden M: Genetic detection of lymph node micrometastases in patients with gastric carcinoma by multiple-marker reverse transcriptase-polymerase chain reaction assay. *Cancer* 2001;92:2056-2064.
 - 29 Blumencranz P, Whitworth PW, Deck K, Rosenberg A, Reintgen D, Beitsch P, Chagpar A, Julian T, Saha S, Mamounas E, Giuliano A, Simmons R: Scientific Impact Recognition Award. Sentinel node staging for breast cancer: intraoperative molecular pathology overcomes conventional histologic sampling errors. *Am J Surg* 2007;194:426-432.
 - 30 Viale G, Dell'Orto P, Biasi MO, Stufano V, De Brito Lima LN, Paganelli G, Maisonneuve P, Vargo JM, Green G, Cao W, Swijter A, Mazzarol G: Comparative evaluation of an extensive histopathologic examination and a real-time reverse-transcription-polymerase chain reaction assay for mammaglobin and cytokeratin 19 on axillary sentinel lymph nodes of breast carcinoma patients. *Ann Surg* 2008;247:136-142.
 - 31 Use of GeneSearch breast lymph node assay to detect sentinel node metastases in early stage breast cancer. *Technol Eval Cent Asses Program Exec Summ* 2008;22:1-6.
 - 32 Matsumoto M, Natsugoe S, Ishigami S, Nakashima S, Nakajo A, Miyazono F, Hokita S, Takao S, Eizuru Y, Aikou T: Lymph node micrometastasis and lymphatic mapping determined by reverse transcriptase-polymerase chain reaction in pN0 gastric carcinoma. *Surgery* 2002;131:630-635.
 - 33 Noguchi S, Hiratsuka M, Furukawa H, Aihara T, Kasugai T, Tamura S, Imaoka S, Koyama H, Iwanaga T: 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;87:650-654.
 - 34 Gerhard M, Juhl H, Kalthoff H, Schreiber HW, Wagener C, Neumaier M: Specific detection of carcinoembryonic antigen-expressing tumor cells in bone marrow aspirates by polymerase chain reaction. *J Clin Oncol* 1994;12:725-729.
 - 35 Ishii T, Fujiwara Y, Ohnaka S, Hayashi T, Taniguchi H, Takiguchi S, Yasuda T, Yano M, Monden M: Rapid genetic diagnosis with the transcription-reverse transcription concerted reaction system for cancer micrometastasis. *Ann Surg Oncol* 2004;11:778-785.
 - 36 Tsujimoto M, Nakabayashi K, Yoshidome K, Kaneko T, Iwase T, Akiyama F, Kato Y, Tsuda H, Ueda S, Sato K, Tamaki Y, Noguchi S, Kataoka TR, Nakajima H, Komoike Y, Inaji H, Tsugawa K, Suzuki K, Nakamura S, Daitoh M, Otono Y, Matsuura N: One-step nucleic acid amplification for intraoperative detection of lymph node metastasis in breast cancer patients. *Clin Cancer Res* 2007;13:4807-4816.
 - 37 Hughes SJ, Xi L, Raja S, Gooding W, Cole DJ, Gillanders WE, Mikhitarian K, McCarty K, Silver S, Ching J, McMillan W, Luketich JD, Godfrey TE: A rapid, fully automated, molecular-based assay accurately analyzes sentinel lymph nodes for the presence of metastatic breast cancer. *Ann Surg* 2006;243:389-398.

- 38 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;35:580-586.
- 39 Ajsaka H, Miwa K: Micrometastases in sentinel nodes of gastric cancer. *Br J Cancer* 2003;89:676-680.
- 40 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.
- 41 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;10:6912-6918.
- 42 Xu W, Zhang MW, Huang J, Wang X, Xu SF, Li Y, Wang SJ: Correlation between CK18 gene and gastric carcinoma micrometastasis. *World J Gastroenterol* 2005;11:6530-6534.
- 43 Sonoda H, Yamamoto K, Kushima R, Yamamoto H, Naitoh H, Okabe H, Tani T: 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;16:411-416.
- 44 Aihara T, Fujiwara Y, Miyake Y, Okami J, Okada Y, Iwao K, Sugita Y, Tomita N, Sakon M, Shiozaki H, Monden M: Mammaglobin B gene as a novel marker for lymph node micrometastasis in patients with abdominal cancers. *Cancer Lett* 2000;150:79-84.
- 45 Hardingham JE, Hewett PJ, Sage RE, Finch JL, Nuttall JD, Kotasek D, Dobrovic A: Molecular detection of blood-borne epithelial cells in colorectal cancer patients and in patients with benign bowel disease. *Int J Cancer* 2000;89:8-13.
- 46 Fujita S, Kudo N, Akasu T, Moriya Y: Detection of cytokeratin 19 and 20 mRNA in peripheral and mesenteric blood from colorectal cancer patients and their prognosis. *Int J Colorectal Dis* 2001;16:141-146.
- 47 Stathopoulou A, Vlachonikolis I, Mavroudis D, Perraki M, Kouroussis C, Apostolaki S, Malamos N, Kakolyris S, Kotsakis A, Xenidis N, Reppa D, Georgoulas V: Molecular detection of cytokeratin-19-positive cells in the peripheral blood of patients with operable breast cancer: evaluation of their prognostic significance. *J Clin Oncol* 2002;20:3404-3412.
- 48 Roa JC, Aretxabala X, Melo A, Faria G, Araya JC, Villaseca MA, Guzman P, Roa I: Detection of bone marrow micrometastases in patients with gallbladder cancer. *Rev Med Chil* 2004;132:1489-1498.
- 49 Ji XQ, Sato H, Tanaka H, Konishi Y, Fujimoto T, Takahashi O, Tanaka T: Real-time quantitative RT-PCR detection of disseminated endometrial tumor cells in peripheral blood and lymph nodes using the LightCycler System. *Gynecol Oncol* 2006;100:355-360.
- 50 Berois N, Varangot M, Aizen B, Estrugo R, Zarantonelli L, Fernandez P, Krygier G, Simonet F, Barrios E, Muse J, Osinaga E: Molecular detection of cancer cells in bone marrow and peripheral blood of patients with operable breast cancer. Comparison of CK19, MUC1 and CEA using RT-PCR. *Eur J Cancer* 2000;36:717-723.
- 51 Zhong XY, Kaul S, Thompson J, Eichler A, Bastert G: Evaluation of the reverse transcriptase/polymerase chain reaction for carcinoembryonic antigen for the detection of breast cancer dissemination in bone marrow and peripheral blood. *J Cancer Res Clin Oncol* 1999;125:669-674.
- 52 Mori M, Mimori K, Inoue H, Barnard GF, Tsuji K, Nanbara S, Ueo H, Akiyoshi T: Detection of cancer micrometastases in lymph nodes by reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Cancer Res* 1995;55:3417-3420.
- 53 Ruud P, Fodstad O, Hovig E: Identification of a novel cytokeratin 19 pseudogene that may interfere with reverse transcriptase-polymerase chain reaction assays used to detect micrometastatic tumor cells. *Int J Cancer* 1999;80:119-125.

Vascular Endothelial Growth Factor-C and -D Expression Correlates With Lymph Node Micrometastasis in pN0 Early Gastric Cancer

TAKAAKI ARIGAMI, MD, PhD,* SHOJI NATSUGOE, MD, PhD, YOSHIKAZU UENOSONO, MD, PhD, SHIGEHIRO YANAGITA, MD, PhD, KATSUHIKO EHI, MD, PhD, HIDEO ARIMA, MD, PhD, YUKO MATAKI, MD, PhD, AKIHIRO NAKAJO, MD, PhD, SUMIYA ISHIGAMI, MD, PhD, AND TAKASHI AIKOU, MD, PhD
Department of Surgical Oncology and Digestive Surgery, Field of Oncology, Course of Advanced Therapeutics, Kagoshima University Graduate School of Medical and Dental Sciences, Kagoshima, Japan

Background and Objectives: Vascular endothelial growth factors (VEGF)-C and -D play an important role in lymphangiogenesis, and the expressions of these factors are related to lymphatic invasion and lymph node metastasis in various malignant neoplasms. The present study investigates the expression of VEGF-C and -D in early gastric cancer and analyzes its relationship to lymph node micrometastasis determined by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR).

Methods: We examined 1,828 lymph nodes obtained from 80 patients with node-negative early gastric cancer. All dissected lymph nodes were examined by RT-PCR for CEA mRNA in addition to hematoxylin–eosin staining. The resected primary specimens were immunostained using anti-VEGF-C and -D polyclonal antibodies.

Results: The incidence of lymph node micrometastasis determined by RT-PCR was 23.8% (19/80). The high expression of VEGF-C and -D was found in 27.5% (22/80) and in 21.3% (17/80), respectively. The expression of VEGF-C and -D was closely related to lymph node micrometastasis ($P = 0.0390$ and 0.0213 , respectively).

Conclusions: We demonstrated a close relationship between micrometastasis and VEGF-C and -D expression of the primary tumor. Thus, levels of VEGF-C and -D expression might be useful for predicting micrometastasis in patients with early gastric cancer.

J. Surg. Oncol. 2009;99:148–153. © 2008 Wiley-Liss, Inc.

KEY WORDS: vascular endothelial growth factor (VEGF)-C; VEGF-D; lymph node micrometastasis; reverse transcription-polymerase chain reaction; gastric cancer

INTRODUCTION

Lymph node metastasis represents one of the most important prognostic factors for patients with gastric cancer [1–5]. Therefore, D2 lymph node dissection for gastric cancer has become established as a standard procedure [6]. The 5-year survival rates of postoperative patients with early mucosal and submucosal gastric cancer are 95–100% and 85–95%, respectively [7–9]. Early gastric cancer is frequently treated by endoscopic mucosal resection (EMR) without lymphadenectomy [10], yet routine hematoxylin–eosin (HE) staining has revealed lymph node metastasis in 2–20% of such patients [8,9,11–13].

Immunohistochemical and biological techniques are now sufficiently sensitive to detect very low numbers of cancer cells, and real-time reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) can identify lymph node micrometastasis in patients with gastrointestinal tract cancers [14,15]. Some authors have reported the clinical significance of lymph node micrometastasis determined by immunohistochemistry [8,16–18]. Accordingly, the control of lymph node metastasis, including micrometastasis, is the principal indicator for surgical treatment. However, to precisely diagnose pre-operative lymph node metastasis, especially micrometastasis, by imaging is difficult.

How lymph node metastasis arises from the primary tumor is obscure. Recent studies have demonstrated a principal role of molecules such as lymphatic endothelial markers in the mechanism of lymphogenous metastasis [19–21]. Vascular endothelial growth factor receptor (VEGFR)-3 is one of such molecular markers and its first lymphatic-specific endothelial ligand to be discovered was vascular endothelial growth factor (VEGF)-C [22,23]. Similarly,

VEGF-D is also a ligand for VEGFR-3 [24]. The expression of VEGF-C and -D in tumor cells is closely connected with lymphangiogenesis and closely correlates with lymphatic invasion and lymph node metastasis in gastrointestinal tract cancers, including gastric cancer [25–30]. However, little is understood about the relationship between VEGF-C and -D expression and lymph node micrometastasis (considered the initial stage of lymph node metastasis) in early gastric cancer.

The purpose of the present study was to investigate the presence of lymph node micrometastasis using RT-PCR in patients with node-negative (pN0) early gastric cancer. In addition, we analyzed relationships between clinicopathological findings including lymph node micrometastasis and VEGF-C and -D expression.

MATERIALS AND METHODS

Patients

We enrolled 80 patients (58 men and 22 women; age range 41–84 years; average 64 years) who were diagnosed with pN0 early gastric

*Correspondence to: Takaaki Arigami, MD, PhD, 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. Fax: +81-99-265-7426. E-mail: arigami@m.kufm.kagoshima-u.ac.jp

Received 20 August 2008; Accepted 26 November 2008

DOI 10.1002/jso.21228

Published online 30 December 2008 in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com).

cancer (mucosal and submucosal tumors) by routine HE staining. All patients underwent curative gastrectomy with lymphadenectomy at the Department of Surgical Oncology and Digestive Surgery, Kagoshima University Hospital, between February 2003 and March 2005. None of the patients had received radiation therapy or chemotherapy before undergoing distal (n = 50), proximal (n = 6), total (n = 11), or partial (n = 13) gastrectomy. Based on the Japanese classification of gastric carcinoma [31], 21, 7, and 52 patients underwent D1, D2, and modified D2 (removal of all perigastric and other nodes along the left gastric, common hepatic and celiac arteries) lymphadenectomy, respectively. Fourteen, 44, and 22 tumors were located in the upper, middle, and lower thirds of the stomach, respectively. Fifty-two and 28 patients had mucosal and submucosal tumors, respectively, that were histopathologically classified as differentiated (n = 39; papillary, well and moderately differentiated tubular adenocarcinomas) and undifferentiated (n = 41; poorly differentiated adenocarcinoma, mucinous adenocarcinoma, and signet-ring cell carcinoma) types. All patients provided written informed consent to participate in all procedures associated with the study in accordance with our institutional guidelines.

Lymph Nodes

We examined 1,828 lymph nodes from 80 patients with pN0 early gastric cancer. The mean number of dissected lymph nodes was 23 (range 2–57). Positive controls comprised 21 lymph nodes from 10 patients with advanced gastric cancer and histologically evident metastasis. Negative controls comprised 30 lymph nodes from 14 patients without cancer (gall bladder stone, n = 6; gastric adenoma, n = 4; gastric ulcer, n = 3; Crohn's disease, n = 1). The lymph nodes were cut into two blocks at the plane of the largest dimension. Half of each lymph node was suspended in 1 ml of Isogen (Nippon Gene, Toyama, Japan) and immediately stored at –80°C. The other half was fixed in 10% formaldehyde, embedded in paraffin, cut into 3 µm sections and stained with HE.

Immunohistochemical Staining and Evaluation

The resected primary tumors were immunostained using polyclonal antibodies against VEGF-C and -D. Specimens of primary tumors were also fixed in 10% formalin, embedded in paraffin, sectioned, and then deparaffinized on slides with xylene and rehydrated with a graded series of ethanol. Endogenous peroxidase was blocked by immersing the slides in methanol containing 3% hydrogen peroxide for 30 min. After three 5-min washes with phosphate-buffered saline (PBS), non-specific binding was blocked at room temperature for 30 min with 1% bovine serum albumin in PBS. The sections were autoclaved in citrate buffer (0.01 mol/L, pH 6.0) at 120°C for 15 min to activate the antigen and incubated at 4°C overnight with anti-VEGF-C and -D polyclonal antibodies (Santa Cruz Laboratory, Santa Cruz, CA) diluted 1:100 in PBS. After three 5-min washes in PBS, the reactions for VEGF-C and -D were developed using avidin–biotin complex immunoperoxidase (ABC method; VECTASTAIN ABC kit, Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA) [32] and visualized using diaminobenzidine tetrahydrochloride. Negative controls were performed in all cases by omitting the first antibody.

Two independent investigators (T.A. and S.N.), who were blinded to the clinicopathological data of the patients, evaluated the immunoreaction of VEGF-C and -D. The presence of VEGF-C and -D immunoreactivity in over 10% of the cancer cells was defined as the high expression [26,29]. The expression of VEGF-C and -D was evaluated in 10 fields each containing 100 cells using high-power (200×) microscopy.

Cell Lines

MKN-45, an adenocarcinoma cell line that produces carcinoembryonic antigen (CEA) derived from a gastric cancer, was cultured in RPMI 1640 (Nissui Pharmaceutical Co., Ltd., Tokyo, Japan) supplemented with 10% fetal calf serum (Mitsubishi Kasei, Tokyo, Japan) and 100 U/ml each of penicillin and streptomycin.

Real-Time RT-PCR

Thawed lymph nodes were homogenized using FastPrep (Qbiogene, Inc., Carlsbad, CA) and then total RNA extracted according to the manufacturer's instructions was dissolved in 20 µl of water treated with diethylpyrocarbonate. The concentration, purity, and amount of total RNA were determined by measuring absorption at 260 and 280 nm using a GeneQuant pro UV/Vis Spectrophotometer (Amersham Pharmacia Biotech, Cambridge, England). To avoid contamination with genomic DNA, 0.5 µg of total RNA was digested at 37°C for 15 min with 1 U of DNase-I (Invitrogen, Life Technologies, Foster City, CA), which was then inactivated by heating with 1 µl of 25 mM ethylenediamine tetra-acetic acid (EDTA) at 65°C for 15 min. Complementary DNA (cDNA) was synthesized using the Advantage™ RT-for PCR Kit (Clontech Lab., Inc., Palo Alto, CA) according to the manufacturer's protocol and then stored at –20°C. A CEA-specific oligonucleotide primer was designed based on that described by Gerhard et al. [33]: sense, 5'-TGTCGGCATCATGATTGG-3'; anti-sense, 5'-GCAAATGCTTTAAGGAAGAA GC-3'. The donor and acceptor probe sequences for CEA identification were 5'-CCTGAAATGAAGAACTACACCAGGGC-fluorescein and 5'-LC-Red640-GCTATATCAGAGCAACCCCAACCAGC-phosphorylation, respectively. Amplification of CEA by PCR using a quantitative fluorescence LightCycler™ (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) proceeded in a 20 µl reaction mixture containing 2 µl of LightCycler™ FastStart DNA Master Hybridization Probes (Roche Diagnostics), 3.0 mM MgCl₂, 0.5 µM sense and anti-sense primers, 0.4 µM fluorescent probe, 0.2 µM LC-Red probe, and 5 µl of undiluted template cDNA in LightCycler™ capillaries (Roche Diagnostics). Before amplification, 0.32 µl of anti-Taq DNA polymerase antibody (TaqStart™ antibody, Clontech Lab., Inc.) was added to the reaction mixture, which was then incubated at room temperature for 5 min to avoid primer prolongation. The amplification profile consisted of denaturation for one cycle at 95°C for 10 min followed by 35 cycles of 95°C for 10 sec, 60°C for 15 sec, and 72°C for 5 sec. Real-time PCR was monitored by measuring fluorescent signals at the end of the annealing phase for each cycle. We quantified and confirmed the integrity of the RNA by comparison with the results of real-time RT-PCR of the amplified glyceraldehyde-3-phosphatase dehydrogenase (GAPDH) housekeeping gene. The sense and anti-sense primers for GAPDH were 5'-TGAACGGGAAGCTCACTGG-3' and 5'-TCCACCACCTGTTGCTGTA-3', respectively. The donor and acceptor probes for GAPDH were 5'-TCAACAGCGACACCCACTCCT-3'-fluorescein and 5'-LC-Red640-CACCTTTGACGCTGGGGCT-3'-phosphorylation, respectively. The GAPDH gene was amplified in 20 µl of the reaction mixture described above in a LightCycler™ capillary (Roche Diagnostics). The amplification profile consisted of one denaturation cycle at 95°C for 10 min followed by 45 cycles of 95°C for 15 sec, 60°C for 15 sec, and 72°C for 12 sec. All primers and probes were synthesized and purified by reverse-phase high-performance liquid chromatography and the Nihon Gene Research Laboratories (Sendai, Japan) established the optimal reagent concentrations and PCR cycling conditions. Each RT-PCR reaction included positive controls synthesized from MKN-45 cells and negative controls from RNA-negative samples. Quantification data were analyzed using the LightCycler™ software (Roche Diagnostics).

We tested the sensitivity of the RT-PCR assay by spiking a series of 10-fold dilutions of MKN-45 cells (10^6 – 10^0) into 1×10^7 peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from a healthy volunteer who did not express CEA mRNA. Total RNA extracted as described above was assayed by real-time RT-PCR. These results were used as external standards for analyses of quantification data. Levels of CEA mRNA were assessed using the LightCycler™ from the crossing point, marking the cycle when fluorescence of a sample increased above the background to give the maximal slope by log-linear amplification. Relative CEA mRNA levels of samples were calculated with reference to standard curves generated from plots of crossing points versus the initial number of MKN-45 cells.

Statistical Analysis

StatView statistical software version 5.5 (SAS Institute, Inc., Cary, NC) performed all statistical calculations. Data were statistically compared using chi-square and Fisher's exact tests. A *P*-value of <0.05 was considered statistically significant.

RESULTS

Sensitivity of RT-PCR in Cell Dilution Study and CEA mRNA Level in Control Samples

We detected CEA mRNA in as little as 10^1 tumor cells/ 10^7 PBMCs in MKN-45 cancer cell lines. The mean CEA mRNA levels corrected for GAPDH mRNA levels (CEA mRNA/GAPDH mRNA $\times 10^5$) in histologically evident metastatic (positive controls) and benign (negative controls) lymph nodes were 5.9×10^4 (range 4.9×10^0 – 9.1×10^5) and 0.0, respectively. Based on these results, samples with corrected CEA mRNA levels of >0.0 were classified as positive.

Lymph Node Micrometastasis and Clinicopathological Factors

Lymph node micrometastasis was identified in 19 of 80 patients (23.8%), in 43 of 1,828 nodes (2.4%), in 15 of 74 patients without

TABLE I. Relationship Between Lymph Node Micrometastasis and Clinicopathological Factors in 80 Patients With pN0 Early Gastric Cancer

| Variable | Micrometastasis (%) | | <i>P</i> -value |
|-------------------------|---------------------|-------------------|-----------------|
| | Negative (n = 61) | Positive (n = 19) | |
| Gender | | | |
| Male | 47 (81.0) | 11 (19.0) | 0.1412 |
| Female | 14 (63.6) | 8 (36.4) | |
| Tumor location | | | |
| Upper | 12 (85.7) | 2 (14.3) | 0.6045 |
| Middle | 32 (72.7) | 12 (27.3) | |
| Lower | 17 (77.3) | 5 (22.7) | |
| Histological type | | | |
| Differentiated | 32 (82.1) | 7 (17.9) | 0.2970 |
| Undifferentiated | 29 (70.7) | 12 (29.3) | |
| Depth of tumor invasion | | | |
| Mucosal invasion | 41 (78.8) | 11 (21.2) | 0.5828 |
| Submucosal invasion | 20 (71.4) | 8 (28.6) | |
| Lymphatic invasion | | | |
| Negative | 59 (79.7) | 15 (20.3) | 0.0261 |
| Positive | 2 (33.3) | 4 (66.7) | |
| Venous invasion | | | |
| Negative | 59 (76.6) | 18 (23.4) | 0.5620 |
| Positive | 2 (66.7) | 1 (33.3) | |

(20.3%), and in 4 of 6 patients with (66.7%) lymphatic invasion by RT-PCR. The incidence of lymph node micrometastasis was significantly higher in patients with, than without lymphatic invasion (*P* = 0.0261; Table I). However, gender, tumor location, histological type, depth of tumor invasion, and venous invasion did not significantly differ.

Expression of VEGF-C and -D

The expression of VEGF-C and -D was found in the cytoplasm of cancer cells. The high expression of VEGF-C and -D was present in 22 (27.5%; Fig. 1A,B) and in 17 (21.3%; Fig. 1C,D), respectively, of the 80 patients.

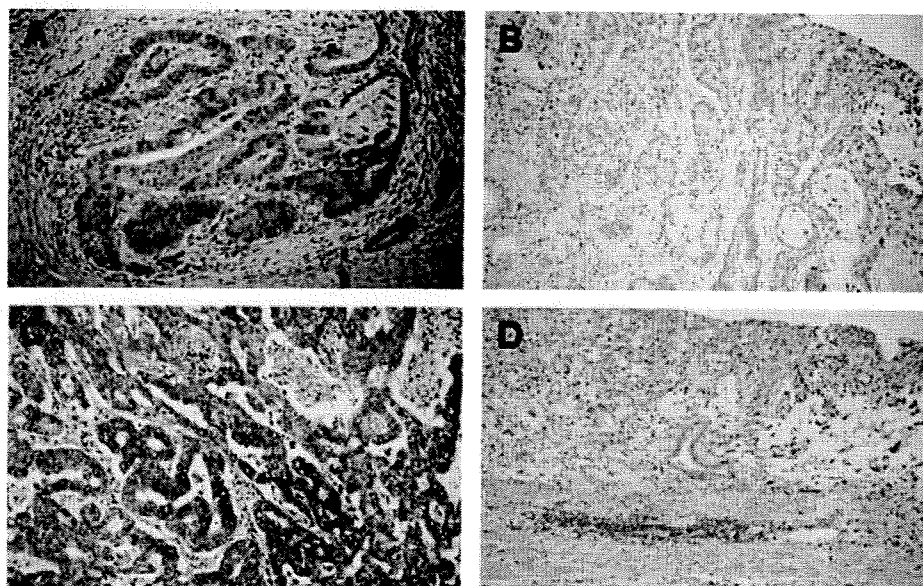


Fig. 1. Expression of VEGF-C and -D in cytoplasm of cells from early gastric cancer. A,B: High and low levels of VEGF-C expression, respectively. C,D: High and low levels of VEGF-D expression, respectively (magnification, 200 \times).

TABLE II. Relationship Between VEGF-C and -D Expression and Clinicopathological Factors in 80 Patients With pN0 Early Gastric Cancer

| Variable | VEGF-C expression (%) | | P-value | VEGF-D expression (%) | | P-value |
|----------------------------|-----------------------|---------------|---------|-----------------------|---------------|---------|
| | Low (n = 58) | High (n = 22) | | Low (n = 63) | High (n = 17) | |
| Gender | | | | | | |
| Male | 43 (74.1) | 15 (25.9) | 0.5877 | 48 (82.8) | 10 (17.2) | 0.2199 |
| Female | 15 (68.2) | 7 (31.8) | | 15 (68.2) | 7 (31.8) | |
| Tumor location | | | | | | |
| Upper | 12 (85.7) | 2 (14.3) | 0.4667 | 14 (100.0) | 0 (0.0) | 0.0705 |
| Middle | 31 (70.5) | 13 (29.5) | | 34 (77.3) | 10 (22.7) | |
| Lower | 15 (68.2) | 7 (31.8) | | 15 (68.2) | 7 (31.8) | |
| Histological type | | | | | | |
| Differentiated | 27 (69.2) | 12 (30.8) | 0.6191 | 31 (79.5) | 8 (20.5) | >0.9999 |
| Undifferentiated | 31 (75.6) | 10 (24.3) | | 32 (78.0) | 9 (22.0) | |
| Depth of tumor invasion | | | | | | |
| Mucosal invasion | 41 (78.8) | 11 (21.2) | 0.1155 | 42 (80.8) | 10 (19.2) | 0.5759 |
| Submucosal invasion | 17 (60.7) | 11 (39.3) | | 21 (75.0) | 7 (25.0) | |
| Lymphatic invasion | | | | | | |
| Negative | 58 (78.4) | 16 (21.6) | 0.0002 | 61 (82.4) | 13 (17.6) | 0.0168 |
| Positive | 0 (0.0) | 6 (100.0) | | 2 (33.3) | 4 (66.7) | |
| Venous invasion | | | | | | |
| Negative | 57 (74.0) | 20 (26.0) | 0.1818 | 61 (79.2) | 16 (20.8) | 0.5167 |
| Positive | 1 (33.3) | 2 (66.7) | | 2 (66.7) | 1 (33.3) | |
| Lymph node micrometastasis | | | | | | |
| Negative | 48 (78.7) | 13 (21.3) | 0.0390 | 52 (85.2) | 9 (14.8) | 0.0213 |
| Positive | 10 (52.6) | 9 (47.4) | | 11 (57.9) | 8 (42.1) | |

VEGF-C and -D Expression and Clinicopathological Factors

The patients with high levels of VEGF-C and -D had a significantly higher incidence of lymphatic invasion ($P=0.0002$ and 0.0168 , respectively) and lymph node micrometastasis ($P=0.0390$ and 0.0213 , respectively), compared with those with low levels of VEGF-C and -D (Table II). However, the expression levels of VEGF-C or -D did not correlate with any other clinicopathological factors (Table II).

Lymph Node Micrometastasis and Combined Analysis of EGF-C and -D Expression

The correlation between VEGF-C and -D expression was significant ($P=0.0001$; Table III), although these expressions were discrepant in 11 patients. Based on the expression profiles of VEGF-C and -D, all patients were divided into groups (Table IV) expressing high levels of both VEGF-C and -D (high group), low levels of both VEGF-C and -D (low group), and of either VEGF-C or -D (intermediate group). According to this combined analysis, the high group had a significantly higher incidence of lymph node micrometastasis compared with the low group ($P=0.0135$).

DISCUSSION

Immunohistochemical and biological techniques have become sufficiently sensitive to detect a few occult cancer cells such as lymph

TABLE III. Relationship Between Expression Level of VEGF-C and -D

| VEGF-C expression | VEGF-D expression (%) | | P-value |
|-------------------|-----------------------|---------------|---------|
| | Low (n = 63) | High (n = 17) | |
| Low (n = 58) | 55 (68.8) | 3 (3.8) | <0.0001 |
| High (n = 22) | 8 (10.0) | 14 (17.5) | |

node micrometastasis. Among these methods, RT-PCR is the most sensitive [14,15]. Mori et al. [14] detected CEA mRNA expression in 47 of 87 lymph nodes from patients diagnosed with node-negative malignant neoplasms and showed by RT-PCR that the rate of node-positivity was 66% among patients with gastrointestinal or breast carcinomas, compared with 26% among the same group of patients determined by a histological analysis. Here, we examined all dissected lymph nodes by RT-PCR in addition to HE staining and identified lymph node micrometastasis in 23.8% of patients with pN0 early gastric cancer. This result indicates that lymph node micrometastasis is extant at a high incidence during the early stage of gastric cancer.

Although the clinical significance of lymph node micrometastasis in gastric cancer remains controversial [18], some authors have reported that lymph node micrometastasis is a prognostic factor [8,16-18]. The immunohistochemical study of Cai et al. [8] showed that patients with submucosal gastric cancer and micrometastasis had a significantly worse prognosis than those without micrometastasis (82% vs. 100%), and that lymph node micrometastasis was closely associated with tumor size, macroscopic type, lymphatic invasion, and depth of submucosal invasion. Their study differed from the present investigation in terms of patients and methodology. We examined lymph node micrometastasis in both mucosal and submucosal types of cancer using

TABLE IV. Relationship Between Lymph Node Micrometastasis and VEGF-C and -D Expression Profile

| Profile of VEGF-C and -D expression | Micrometastasis (%) | | P-value |
|-------------------------------------|---------------------|-------------------|---------|
| | Negative (n = 61) | Positive (n = 19) | |
| Low (n = 55) | 46 (83.6) | 9 (16.4) | 0.0135 |
| Intermediate (n = 11) | 8 (72.7) | 3 (27.3) | |
| High (n = 14) | 7 (50.0) | 7 (50.0) | |

Low, low level of both VEGF-C and -D expression; intermediate, high level of either VEGF-C or -D expression; high, high level of both VEGF-C and -D expression.

RT-PCR. We found that lymph node micrometastasis was related only to lymphatic invasion and not to other clinicopathological factors including tumor size, macroscopic type, and depth of tumor invasion. However, 15 of 74 patients (20.3%) without lymphatic invasion had lymph node micrometastasis. Thus, we examined VEGF-C and -D expression to clarify the mechanism of initial nodal metastasis.

The VEGF family members VEGF-C and -D are associated with the lymphatic spread of cancer cells [25–30]. VEGFR-3, which is the receptor for VEGF-C and -D, is specifically expressed in cells of the lymphatic endothelium [22–24]. Since these signals promote the multiplication, migration, and luminal formation of lymphatic vessels, VEGF-C and -D expression induces lymphangiogenesis. Yonemura et al. [25] reported that VEGF-C expression is closely related to lymph node metastasis, lymphatic invasion, venous invasion, and tumor infiltration in gastric cancer. They also reported that the prognosis of patients was significantly poorer in the presence of high, than low levels of VEGF-C expression and that VEGF-C tissue status is an independent prognostic factor according to multivariate analysis [25]. On the other hand, little is known about VEGF-D expression in patients with gastric cancer. Ishikawa et al. [28] reported that the expression of VEGF-D is significantly correlated with histological type, tumor depth, lymphatic invasion, and lymph node metastasis in early gastric cancer. We found that high levels of VEGF-C and -D expression were significantly correlated with lymphatic invasion and lymph node micrometastasis. These results suggested that VEGF-C and -D expression could predict lymph node micrometastasis. We also found that lymph node micrometastasis more closely correlated with the expression of both VEGF-C and -D compared with that of either alone.

EMR has recently been applied to treat early gastric cancer [10]. When planning such therapy, the presence or absence of lymph node micrometastasis is an important issue. From the results of this study, to examine VEGF-C and -D expression in resected specimens of EMR could offer useful information regarding lymph node micrometastasis. Meticulous follow-up or sentinel node sampling under laparoscopy should be considered for patients with high levels of VEGF-C and -D expression.

In conclusion, we demonstrated that lymph node micrometastasis detected by RT-PCR, which was the initial stage of lymph node metastasis, was closely associated with lymphatic invasion and with VEGF-C and -D expression by the primary tumor. The presence of micrometastasis is an important factor when less invasive strategies such as EMR or reduction of lymphadenectomy are under consideration for patients with early gastric cancer, and could be indicated by the levels of VEGF-C and -D expressed by the primary tumor.

REFERENCES

- Matsushita M, Hajiro K, Suzuki T, et al.: Histopathological assessment of lymph node metastasis in patients with gastric cancer. *Hepatogastroenterology* 1995;42:861–866.
- Kwon SJ, Kim GS: Prognostic significance of lymph node metastasis in advanced carcinoma of the stomach. *Br J Surg* 1996; 83:1600–1603.
- Takagane A, Terashima M, Abe K, et al.: Evaluation of the ratio of lymph node metastasis as a prognostic factor in patients with gastric cancer. *Gastric Cancer* 1999;2:122–128.
- Kunisaki C, Shimada H, Takahashi M, et al.: Prognostic factors in early gastric cancer. *Hepatogastroenterology* 2001;48:294–298.
- Nitti D, Marchet A, Olivieri M, et al.: Ratio between metastatic and examined lymph nodes is an independent prognostic factor after D2 resection for gastric cancer: Analysis of a large European monoinstitutional experience. *Ann Surg Oncol* 2003;10:1077–1085.
- Maehara Y, Okuyama T, Moriguchi S, et al.: Prophylactic lymph node dissection in patients with advanced gastric cancer promotes increased survival time. *Cancer* 1992;15:392–395.
- Maehara Y, Orita H, Okuyama T, et al.: Predictors of lymph node metastasis in early gastric cancer. *Br J Surg* 1992;79:245–247.
- Cai J, Ikeguchi M, Maeta M, et al.: Micrometastasis in lymph nodes and microinvasion of the muscularis propria in primary lesions of submucosal gastric cancer. *Surgery* 2000;127:32–39.
- Kim DY, Joo JK, Ryu SY, et al.: Factors related to lymph node metastasis and surgical strategy used to treat early gastric carcinoma. *World J Gastroenterol* 2004;10:737–740.
- Takekoshi T, Baba Y, Ota H, et al.: Endoscopic resection of early gastric carcinoma: Results of a retrospective analysis of 308 cases. *Endoscopy* 1994;26:352–358.
- Yamao T, Shirao K, Ono H, et al.: Risk factors for lymph node metastasis from intramucosal gastric carcinoma. *Cancer* 1996;77: 602–606.
- Tsujitani S, Oka S, Saito H, et al.: Less invasive surgery for early gastric cancer based on the low probability of lymph node metastasis. *Surgery* 1999;125:148–154.
- Folli S, Morgagni P, Roviello F, et al.: Risk factors for lymph node metastases and their prognostic significance in early gastric cancer (EGC) for the Italian Research Group for Gastric Cancer (IRGGC). *Jpn J Clin Oncol* 2001;31:495–499.
- Mori M, Mimori K, Inoue H, et al.: Detection of cancer micrometastases in lymph nodes by reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Cancer Res* 1995;55:3417–3420.
- 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.
- Siewert JR, Kestlmeier R, Busch R, et al.: Benefits of D2 lymph node dissection for patients with gastric cancer and pN0 and pN1 lymph node metastases. *Br J Surg* 1996;83:1144–1147.
- Maehara Y, Oshiro T, Endo K, et al.: Clinical significance of occult micrometastasis lymph nodes from patients with early gastric cancer who died of recurrence. *Surgery* 1996;119:397–402.
- Ishida K, Katsuyama T, Sugiyama A, et al.: Immunohistochemical evaluation of lymph node micrometastases from gastric carcinomas. *Cancer* 1997;79:1069–1076.
- Breiteneder-Geleff S, Soleiman A, Kowalski H, et al.: Angiosarcomas express mixed endothelial phenotypes of blood and lymphatic capillaries: Podoplanin as a specific marker for lymphatic endothelium. *Am J Pathol* 1999;154:385–394.
- Banerji S, Ni J, Wang SX, et al.: LYVE-1, a new homologue of the CD44 glycoprotein, is a lymph-specific receptor for hyaluronan. *J Cell Biol* 1999;144:789–801.
- Wigle JT, Oliver G: Prox1 function is required for the development of the murine lymphatic system. *Cell* 1999;98:769–778.
- Joukov V, Pajusola K, Kaipainen A, et al.: A novel vascular endothelial growth factor, VEGF-C, is a ligand for the Flt4 (VEGFR-3) and KDR (VEGFR-2) receptor tyrosine kinases. *EMBO J* 1996;15:290–298.
- Jeltsch M, Kaipainen A, Joukov V, et al.: Hyperplasia of lymphatic vessels in VEGF-C transgenic mice. *Science (Washington, DC)* 1997;276:1423–1425.
- Achen MG, Jeltsch M, Kukk E, et al.: Vascular endothelial growth factor D (VEGF-D) is a ligand for the tyrosine kinases VEGF receptor 2 (Flk1) and VEGF receptor 3 (Flt4). *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:548–553.
- Yonemura Y, Endo Y, Fujita H, et al.: Role of vascular endothelial growth factor C expression in the development of lymph node metastasis in gastric cancer. *Clin Cancer Res* 1999;5:1823–1829.
- Kabashima A, Maehara Y, Kakeji Y, et al.: Overexpression of vascular endothelial growth factor C is related to lymphogenous metastasis in early gastric carcinoma. *Oncology* 2001;60:146–150.
- Amioka T, Kitadai Y, Tanaka S, et al.: Vascular endothelial growth factor-C expression predicts lymph node metastasis of human gastric carcinomas invading the submucosa. *Eur J Cancer* 2002;38:1413–1419.
- Ishikawa M, Kitayama J, Kazama S, et al.: Expression of vascular endothelial growth factor C and D (VEGF-C and -D) is an

- important risk factor for lymphatic metastasis in undifferentiated early gastric carcinoma. *Jpn J Clin Oncol* 2003;33:21–27.
29. Kawakami M, Furuhashi T, Kimura Y, et al.: Quantification of vascular endothelial growth factor-C and its receptor-3 messenger RNA with real-time quantitative polymerase chain reaction as a predictor of lymph node metastasis in human colorectal cancer. *Surgery* 2003;133:300–308.
 30. Onogawa S, Kitadai Y, Tanaka S, et al.: Expression of VEGF-C and VEGF-D at the invasive edge correlates with lymph node metastasis and prognosis of patients with colorectal carcinoma. *Cancer Sci* 2004;95:32–39.
 31. Japanese Gastric Cancer Association: Japanese Classification of Gastric Carcinoma, 2nd English Edition. *Gastric Cancer* 1998; 1:10–24.
 32. Hsu SM, Raine L, Fanger H: Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: A comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. *J Histochem Cytochem* 1981;29:577–580.
 33. Gerhard M, Juhl H, Kalthoff H, et al.: Specific detection of carcinoembryonic antigen-expressing tumor cells in bone marrow aspirates by polymerase chain reaction. *J Clin Oncol* 1994;12: 725–729.

2

センチネルリンパ節の同定

(1) RI 法

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

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

要 旨

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

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

はじめに

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

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

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

I. 放射性薬剤と安全性

この項のポイント

- ^{99m}Tc は半減期 6 時間と短い。

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

II. トレーサーの種類

この項のポイント

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

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

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

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

癌でスズコロイドを使用し、良好な結果を得ている。

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

III. 注入法と注入量

この項のポイント

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

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

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

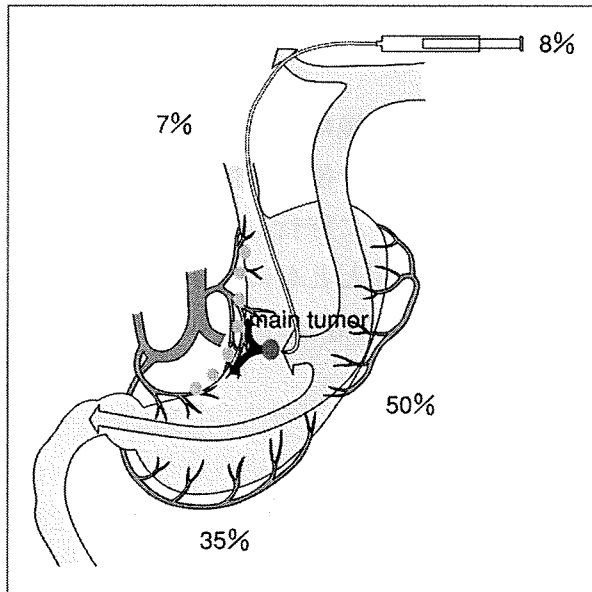


図1 実際のRIの流れ

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

IV. 実際のRIの流れ

この項のポイント

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

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

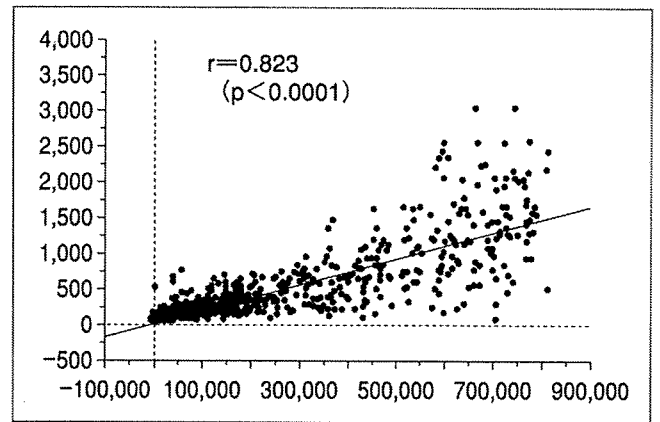


図2 摘出リンパ節のガンマプローブとウェル型シンチレーションカウンターの関係

V. ガンマプローブの精度

この項のポイント

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

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

VI. SN の同定

この項のポイント

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

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



図3 NAVIGATOR GPS
コントロールユニットと
プローブ。

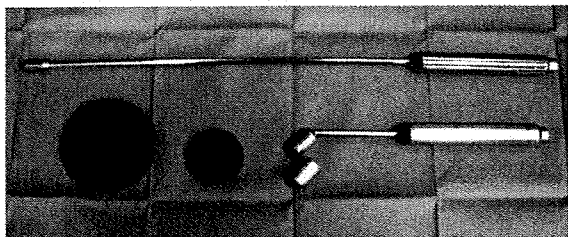


図4 プローブとコリメーターと鉛板
上段は鏡視下用プローブ、下段は通常
プローブ。キャップは指向性を高めるコ
リメーターと遮蔽用鉛板。

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

VII. SN の診断

この項のポイント

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

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

VIII. リンパシンチグラフィ

この項のポイント

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

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

象のためリンパシンチグラフィはほとんど行われていない。

IX. SN 同定の成績

この項のポイント

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

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

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

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

X. 今後の展望

この項のポイント

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

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

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

文 献

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

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

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

Summary

RI Method for Sentinel Lymph Node Detection

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

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

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

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

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

2 センチネルリンパ節の同定

(2) 色素法

藤村 隆* 木南 伸一* 伏田 幸夫*
萱原 正都* 太田 哲生* 三輪 晃一**

Key words : 色素法によるセンチネルリンパ節検索, 消化器癌, リンファズリン, パテントブルー, インドシアニングリーン

要旨

sentinel node mapping に使用される色素には, リンファズリン, パテントブルー, インドシアニングリーン(ICG)などがある。色素法は, 色素が比較的安価で特別な施設が不要であること, 染色されたリンパ節やリンパ管を肉眼的に捕らえることができることから, 広く行われている。しかし, 色素の注入方法や, 染色リンパ節の探索方法など, こまかなテクニックの習得に時間を有し, learning curve には30例くらい必要である。

色素法は消化器癌では胃癌や大腸癌を中心に行われており, 同定率は90%以上, 正診率は85%以上とされる。しかし縮小手術に応用するためには, さらなる同定率, 正診率の向上が必要で, ICGの観察方法の工夫や, 新しい蛍光色素の開発などが行われている。

はじめに

この項のポイント

- 色素法は安価で, 肉眼で観察できるため簡単に施行できるが, こまかな技術に関しては熟練を要する。

肉眼的になかなか認識できないリンパ系を色素で染め出すというアイデア自体は, 死体を用いたものでは20世紀初頭からみられるが, 生体のリンパ系を染色したのは1950年, Weinbergら¹⁾が pontamine sky blue 6 BX を使用して胃癌患者を対象に行ったのが嚆矢である。その後, 微粒子活性炭なども用いられてきたが, 消化管における sentinel node mapping として色素法が確立されたのは1990年台に入ってからのことである。

sentinel node mapping にはトレーサーの種類により, 色素法と radioisotope(RI)法とが知られている。色素法は, 色素が比較的安価で容易に手に入るため施行しやすく, その最大の特長は, 染色されたリンパ節やリンパ管を肉眼的に捕らえることができることである(表)。しかし, 厚い脂肪組織内の場合, 染色されたリンパ節を探し出すために脂肪組織内を剝離しなければならなかったり, 色素が比較的短時間に

*金沢大学大学院がん局所制御学
(〒920-8641 石川県金沢市宝町13-1)

**独立行政法人労働省健康福祉機構富山労災病院

表 色素法と RI 法の長所と短所

| | 長 所 | 短 所 |
|------|---|---|
| 色素法 | <ul style="list-style-type: none"> ・安価，設備不要 ・簡単な手技 ・視覚的(肉眼でリンパ管，リンパ流域も観察可能) | <ul style="list-style-type: none"> ・アレルギー ・短い滞留時間 ・熟練が必要 ・視覚的(アントラコーシス，脂肪が厚い例で問題) |
| RI 法 | <ul style="list-style-type: none"> ・術前 lymphography 可能 ・長い滞留時間 ・客観的・定量的 ・非視覚的(胸腔・骨盤腔内で有利) | <ul style="list-style-type: none"> ・放射線被曝 ・高価，設備必要 ・Shine-through effect ・非視覚的(gamma probe が必要) |

流れ出してしまうため，その前に同定しなければならぬなど，技術的な熟練を要することを念頭におかなければならない。

色素法は視覚的に捕らえやすいことから，乳癌，悪性黒色腫など表在性の悪性腫瘍をはじめとして，消化器癌では胃や結腸の癌によく用いられている。一方，食道癌や直腸癌ではリンパ系全体を見渡せないことから，RI 法のほうが有利であり，アントラコーシスの多い肺癌，食道癌など胸腔内の悪性腫瘍の場合は色素法では不確実である。

I. トレーサーとしての条件と染色の機序

この項のポイント

- ・色素はコロイド輸送によりリンパ管へ移行するが，サイズが大きすぎると sentinel node がすべて染色されず，小さすぎるとすべてのリンパ節が染色されてしまうことになる。

色素などトレーサーは，コロイド輸送によりリンパ管に取り込まれる。その機序には，粒子がそのまま毛細リンパ管壁を通過する extracellular transport と，組織間隙で食細胞に貪食された後にリンパ管に移行する intracellular transport とがある²⁾。コロイド注入後，数時間から 1 日目までの輸送は，ほとんど extracel-

lular transport によるとされることから，癌細胞の転移と必ずしも同じ動態を反映していないことを銘記しなければならない。

sentinel node mapping を行う際に必要なトレーサーの条件としては，リンパ系に取り込まれた後，確実に sentinel node にたどりつき，できるかぎりそこにとどまることが理想的といえよう。移行性が低すぎるとなかなかリンパ節が染色されず，すべての sentinel node が染め出されない危険性があり，逆に高すぎると sentinel node を含めて，より高次のリンパ節まで染色されてしまうことになり，術中に迅速組織診を行うためのリンパ節を選ぶことは事実上，不可能となってしまう。

リンパ管への移行性を決定する因子としては，分散媒の種類，分散相の濃度，およびコロイド粒子の直径・表面の物性・荷電・形状・変形能などがあげられているが，なかでもコロイドの直径は重要で，取り込み量と粒子径は反比例するとされる²⁾。RI トレーサーの検討からは 200 から 400 nm のサイズが前述の条件を満たしているようであるが，それでも完全なものはないのが現状である。色素自体のサイズは 50 nm 未満のレベルと考えられており，理論的には高次リンパ節まで流れてしまうはずである。以前，リンパ系を観察するために使用されてい

た微粒子活性炭 CH 44 は約 20 nm と小さく、胃に注入すると大動脈周囲リンパ節まで染まることが知られている³⁾。しかし現在、色素法による mapping が可能であるのは、色素が血清中のタンパク質と結合してサイズが大きくなるためであろうと考えられている。

II. 使用される色素

この項のポイント

- 青色色素としてリンファズリン、パテントブルー、緑色色素としてインドシアニンググリーンがある。前者はより色識別性が高く、後者はより滞留性が高いのが特徴である。

色素法では、リンファズリン(Lymphazurin, isosulfan blue), パテントブルー(patent blue V, sulfan blue), インドシアニンググリーン(indocyanine green; ICG), メチレンブルー, ピオクタニン, インジゴカルミンが使用されてきたが、現在はおもに前三者が用いられている。一般に、リンファズリン, パテントブルーを青色色素, ICG を緑色色素と呼称しているが、それぞれの色素について紹介する。

1. 青色色素

リンファズリンはパテントブルーの isomer であり、基本的には同じ化学的性質を有している。一般にリンファズリンは1%のものが、パテントブルーは2%のものが用いられている。リンファズリン(US Surgical Corp., Norwalk, CT, USA)は欧米では認可されており、各種の癌の sentinel node mapping に使用されている。しかしわが国では認可されていないため、倫理委員会から許可を受けなければならない。またパテントブルーは和光純薬から試薬として販売されているが、医薬品としては認可されていないため、同様に倫理委員会から認可を受けることが必須である。

青色は黄色の補色になるため、黄色い脂肪組織に埋もれた組織内で青く染め出されるリンパ節やリンパ管は非常に識別しやすい。しかし、なぜ青色色素が sentinel node に留まりやすいのかははっきりとは判明していない。最近、松本ら⁴⁾はリンファズリンを血清処理することにより、体内での粒子径のシミュレーションを行っている。それによると、リンファズリンの粒子径は血清処理する前にはほとんど 50 nm 以下であったが、処理後には3分の2が 50 から 100 nm へと増大したと報告されている。

二つの青色色素は、1.1~2.7%と比較的高頻度にアレルギー反応を起こすことが知られており、そのなかには、じんましん、低血圧、低酸素血症やアナフィラキシーショックまで含まれている^{5),6)}。しかし当科では1993年よりパテントブルー、2004年からリンファズリンも用いて mapping を 200 例以上に行ってきたが、1例もアナフィラキシーショックを経験していない。Raut ら⁵⁾は、リンファズリンによる mapping を行う際にグルココルチコイド、ジフェンヒドラミン、ファモチジンによる予防を行った結果、アナフィラキシーショックの発生率に差はなかったものの、重症度が低下したと報告している。

2. 緑色色素

ICG は本邦では肝機能検査用試薬(ジアグノグリーン, 第一製薬)として認可されている薬剤であるため、広く使用されている。また副作用の頻度が低いことも使用しやすい理由と思われる。薬剤添付文書によれば、副作用発生率は0.17%(36例/21,278例)で、おもな副作用はショック症状0.02%、悪心・嘔気0.08%、血管痛0.04%、発熱・熱感0.02%等となっている。ICG は体内に投与されると速やかにタンパク質と結合するとされており⁷⁾、そのため粒子径

が大きくなり sentinel node 内に留まりやすくなることから、それより高次のリンパ節に広がりにくいと考えられている。

しかし、緑色素は青色に比べて、黄色に対するコントラストが悪いため同定率が低くなるのが懸念されている。このため高濃度で使用したり、赤外線観察などにより、同定率を上げる工夫がなされている。Nimura ら⁸⁾は、ICG による mapping を通常光と赤外線観察下に行って比較したところ、転移リンパ節の感度において赤外線観察のほうが優れていたことを報告した。詳細は別稿で述べられているので、そちらを参照していただきたい。さらに最近になり、蛍光ダイオードを励起して ICG の蛍光を観察する方法が開発された⁹⁾。本法では蛍光を発するリンパ節がきわめて鮮明に写し出されるのが特徴であり、また蛍光が 48 時間以降も維持されていたことから、かなり長時間留まるものと考えられる。

Ⅲ. 色素法の成績

この項のポイント

- 胃癌では、粘膜側アプローチと漿膜側アプローチとがあるが成績に差はなく、同定率は 95%前後で、正診率は 85~100%である。
- 結腸癌では、漿膜側アプローチが中心で、成績は同定率 90%以上、正診率 80%以上と報告されている。

現在、色素法による mapping が行われている消化器癌として、胃癌、大腸癌などがあるが、これらの癌について色素法による成績を中心に概説する。

sentinel node mapping は非常に繊細な手技であり、慎重に取り組むことが肝要である。染色されたリンパ節を探し出す外科医のみならず、トレーサーを注入する内視鏡医や迅速病理診断を行う病理医にも、手技の熟練が必要であ

る。とくに色素の場合、短時間で高次のリンパ節に流れ出ることもあるため、迅速かつ十分に調べつくす技術が必要であり、また内視鏡医も確実に粘膜下層に注入することが必要で、色素が漏れると術野が汚染されるのみならず、染色リンパ節の判定は不可能になってしまう。このため、手技が安定するまでメンバーを固定することが重要であり、一般的には learning curve は 30 例くらいとされている¹⁰⁾。

1. 胃 癌

胃癌についてはわが国からの報告が多く、最近では韓国からの成績も増えてきている。これまでの報告を見てみると、色素法の同定率は 95%前後で RI 法と差がなく、正診率は 85~100%で RI 法の 90~100%と差がないか若干劣るようである。また両者を併用した dual tracer 法での成績では、正診率はさらによくすることが知られている。われわれは基本的には mapping は色素法のみで十分と考えているが、厚い脂肪組織により染色リンパ節が判別不能の場合や、腹腔鏡下手術において視野が不十分であったり、長時間の操作により色素が流出してしまった場合では、RI 法との併用が必要であると思われる。Kitagawa ら¹¹⁾は、RI 法は sentinel node の取り残しを避けることができること、色素法はリンパ流を観察できる点で相補的であることから、dual tracer 法を推奨している。

消化管における sentinel node mapping の方法には注入部位別に二つあり、内視鏡を用いて腫瘍周囲の粘膜下に色素を注入する粘膜側アプローチと、直視下に病巣に一致するところの漿膜下に注入する漿膜側アプローチがある。胃癌においては、sentinel node concept を応用して郭清の縮小を目指している対象は早期胃癌、すなわち浸潤が粘膜下層までの癌であるこ

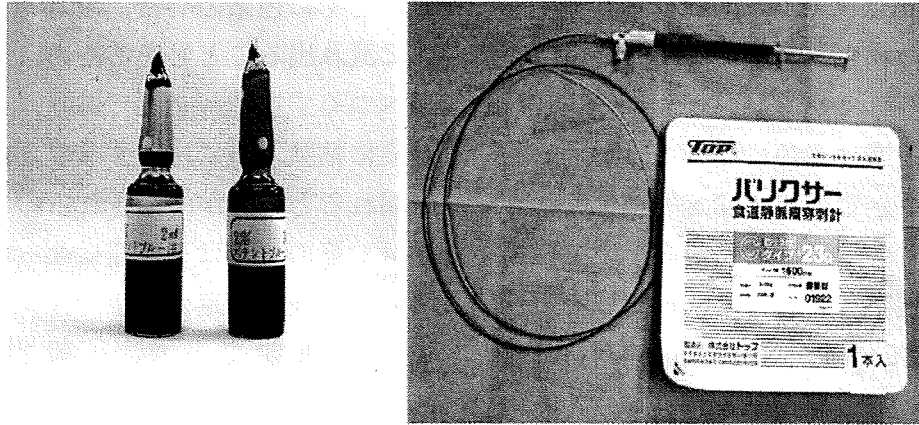


図1 色素と穿刺針

当科では倫理委員会の承認の下、patent blue Vを院内で2%に調整して使用している。穿刺針は静脈瘤治療用のものを用いるのがベストであるが、なければ汎用されている注入針でもかまわない。この穿刺針に2% patent blue Vを詰めた皮内用1 mm注射筒を取り付ける。

とから、理論的には色素を粘膜下層に注入すべき(粘膜側アプローチ)であろうと考えられている。しかし臨床成績の報告を見てみると、両者に差はないようである¹²⁾。

1) 粘膜側アプローチ

われわれは1993年に、術中内視鏡的リンパ系描出法(intraoperative endoscopic lymphatic mapping; IELM)を開発し、sentinel node conceptを検討してきた¹³⁾。術前に癌が陰性であることを確認してclippingされている腫瘍周囲の4カ所の部位に、2%パテントブルーを0.2 mlずつ注入する(図1)。patent blueを確実に粘膜下層に注入することが重要であるため、内視鏡用注入針の長さや穿刺角度に注意を払わなければならない。また抜針時に注入した液が胃内に漏れないようにするため、胃内の空気量を調節したり、注入直後穿刺針をholdしておくなど、いくつかの工夫が必要である。

注入直後より漿膜側に色素斑が染め出され、順次、リンパ管やリンパ節が青く染色されてくる。注入後15分後までに染色されたリンパ節を青染リンパ節(blue node)として、このblue

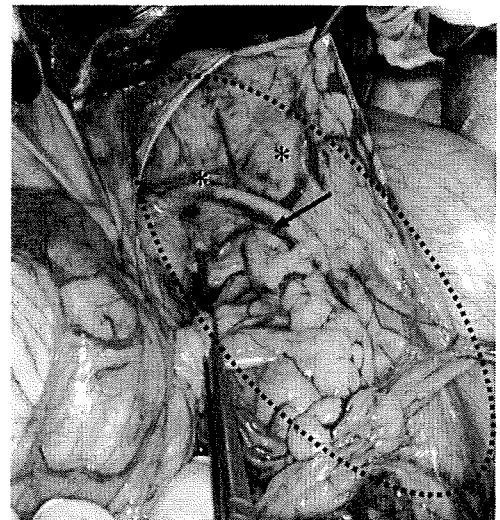


図2 blue node と lymphatic basin

patent blue Vにより青く染色されるリンパ節を青染リンパ節(blue node)と呼んでいる。色素法では同時にリンパ管も染色されることが多い。青く染まったリンパ節、リンパ管を含む流域をリンパ流域(lymphatic basin)と呼んでいる(リンパ流域に関しては「用語解説」を参照)。

*: 青染リンパ節(blue node)

←: 青染リンパ管(blue lymphatics)

----: リンパ流域(lymphatic basin)

nodeがsentinel nodeであるかどうかを検討した(図2)。すなわちvalidation studyとして、D2の定型手術を行った126例を対象にIELMを行い、blue nodeと、郭清後の術後病理検査による全リンパ節とにおける転移診断能を比較した。IELMは119例(94%)に成功し、1例当りのblue node個数の中央値は6個であった。感度86%(31/36)、特異度100%(83/83)、正診率96%(114/119)であった。5例がfalse negativeであったが、いずれも肉眼的転移例で術中に容易に判定されるものであり、少なくとも肉眼的リンパ節転移のない症例ではsentinel node conceptの成立することが証明された¹⁴⁾。

一方、Ichikuraら¹⁵⁾はICGを用いて、粘膜側アプローチによる検討を行っている。その結果、mappingは62例すべてに成功し、感度87%、特異度100%であったとしている。興味深いことに、ICGを0.63%の濃度で2mlずつ4カ所に注入した場合と、1.25%の濃度で1mlずつ8カ所に注入した場合を比較すると、green nodeの数は前者が8.6個に対して後者が4.5個と有意差が認められており、tracerの注入総液量が染色リンパ節個数に影響を与えることを示唆している。さらにIshizakiら¹⁶⁾はリンファズリンを用いて、同様な検討を行っ

ている。mapping成功率は97.0%(98/101)で、感度は85.7%(18/21)であったが、初期の症例を除くといずれも100%になったとして、手技の熟練の必要性を強調している。

Sentinel Node Navigation Surgery研究会では、色素法およびRI併用法による粘膜側アプローチの合理性について、多施設共同臨床試験の下に検討を行っている。本試験により、これまで単施設からの成績で示されるにすぎなかったsentinel node conceptがevidenceとして確立されることが期待されている。

2) 漿膜側アプローチ

漿膜側アプローチでは、内視鏡の施行および施行医を必要としないため、時間的・人間的に制約を受ける施設でも行える利点がある。

Hiratsukaら¹⁷⁾はICGを使用して、漿膜側アプローチの検討を行っている。すなわちICG 25mgを蒸留水5mlに溶解して、26ゲージ針にて原発巣周囲の4カ所の漿膜下層に注入する。病巣の確認は、触診(クリップ併用)、胃切開にて行うが、それでも困難な場合は内視鏡を用いる。その結果、mappingは74例中73例に成功し、green nodeの数は平均2.6個、感度90%(ただしT1では100%)、特異度100%と報告している。

現在、このICGによる漿膜側アプローチ法

用語解説

◆リンパ流域(lymphatic basin)とリンパ流域郭清(lymphatic basin dissection)

パテントブルーにより青く染色されるリンパ節(blue node)やリンパ管を含む流域をリンパ流域(lymphatic basin)と呼んでいる。これまでのリンパ節転移陽性症例の検討から、blue nodeに転移のある場合にはすでに半数以上の症例でblue node以外にも転移のあることが判明している。しかし早期癌の場合は別のリンパ節転移は、転移のあったblue nodeが属するリンパ流域内の非

染色リンパ節に認められている。

術中のリンパ節転移診断が100%ではない以上、もしblue nodeにおける転移を術中に見逃すと、別のリンパ節転移が郭清されずに残ってしまう。そこでblue nodeのみを拾い上げて調べるのではなく、リンパ流域のみを選択的に郭清するリンパ流域郭清(lymphatic basin dissection)を行えば、万一、blue nodeに転移があったとしても根治性は保たれると考えられる。