

フランスでも Ponchon らが ENKI-2 という局注機能を有する ESD ナイフを開発し、臨床使用している²¹⁾。こちらの局注機能はハイブリットナイフ同様かなり強力であり、またシースの硬さやナイフ先端形状なども改良されており、さらに有望なナイフと期待される。

また、イギリスの Saunders らは、直腸癌の ESD に関してポートを挿入しそこからリトラクターを2本挿入しトラクションをかける ESD を報告している²²⁾。ビデオをみるとやや煩雑で、日本のエキスパートには必要ないように思えるが、robotic ESD が海外で普及する可能性もあり、海外で ESD を普及させるにはこのような工夫も必要かもしれない。このように、より安全、効率的な ESD ナイフが開発されており、欧米において大腸 ESD が普及する日は近い。

ESDの将来

将来的には、ESD をさらに発展させ、外科の自動縫合器のように切除と縫合が同時に可能な手技が開発されれば、現在の ESD のように巧みの技を必要とすることなく、全層切除となった場合でも問題なく、だれでも安全確実に早期大腸癌の治療が可能となるであろう。しかし、全層切除に関しては以前より開発や動物実験が行われているが、臨床応用へのハードルは高い。欧米では transanal endoscopic microsurgery (TEM) が直腸癌に対する minimum invasive surgery として普及している。TEM の利点のひとつは外科的縫合 (suture) が可能なため全層切除も施行できる点にある。それでも腺腫や Tis (粘膜内癌) に対して全層切除は侵襲的であり、粘膜下層までの切除が望ましいであろう。したがって、いかに簡便な切除手技が発達したとしても、ESD の粘膜と粘膜下層のみを切除するというコンセプトは今後も継承されるであろう。大腸 ESD が普及し、一人でも多くの患者が低侵襲性治療の恩恵を受けられることを切に願う。

謝辞：大腸 ESD 治療、データベースの集計にご協力いただいた以下の医師ならびに看護師、内視鏡技師に感謝申し上げます。チーフレジデント：山田真善、森源喜、関口正宇、レジデント：池澤伸明、岡本朋子、田中寛人、居軒和也、関口雅則、スタッフ：大竹陽介、阿部清一郎、坂本 琢、中島 健、海外研修医：Mathieu Pioche。

文献

- 1) Saito, Y. et al. : *Gastrointest. Endosc.*, **72** : 1217-1225, 2010.
- 2) Nakajima, T. et al. : *Surg. Endosc.*, **27** : 3262-3270, 2013.
- 3) 大腸 ESD 標準化検討部会(編著) : 大腸 ESD Guidebook (責任編集 : 田中信治). 日本メデイカルセンター, 2009.
- 4) 田中信治・他 : *Gastroenterological Endoscopy*, **56** : 1598-1617, 2014.
- 5) Uraoka, T. et al. : *Gut*, **55** : 1592-1597, 2006.
- 6) 斎藤 豊・他 : 胃と腸, **45** : 1001-1010 : 2010.
- 7) Saito, Y. et al. : *Dig. Endosc.*, **26**(Suppl. 1) : 52-61, 2014.
- 8) Matsuda, T. et al. : *Am. J. Gastroenterol.*, **103** : 2700-2706, 2008.
- 9) Fujii, T. et al. : *Endoscopy*, **33** : 1036-1041, 2001. (review)
- 10) Ono, A. et al. : *Gastrointest. Endosc.*, **57** : 583-587, 2003.
- 11) Mashimo, Y. et al. : *J. Gastroenterol. Hepatol.*, **23** : 218-221, 2008.
- 12) Saito, Y. et al. : *Gastrointest. Endosc.*, **65** : 537-542, 2007.
- 13) Kikuchi, T. et al. : *Surg. Endosc.*, **24** : 2231-2235, 2010.
- 14) Nonaka, S. et al. : *Surg. Endosc.*, **24** : 1638-1645, 2010.
- 15) Sakamoto, T. et al. : *Int. J. Colorectal. Dis.*, **27** : 1243-1244, 2012.
- 16) Saito, Y. et al. : *Gastrointest. Endosc.*, **62** : 297-301, 2005.
- 17) Oyama, T. : *Clin. Endosc.*, **45** : 375-378, 2012.
- 18) Sakamoto, N. et al. : *Gastrointest. Endosc.*, **69** : 1370-1374, 2009.
- 19) Okamoto, K. et al. : *Dig. Endosc.*, **24**(Suppl. 1) : 96-99, 2012.
- 20) Saito, Y. et al. : *Surg. Endosc.*, **24** : 343-352, 2010.
- 21) Ciocirlan M. et al. : *Endoscopy*, **46** : 139-143, 2014.
- 22) Saunders, B. P. et al. : *Gastroenterology*, **145** : 939-941, 2013.

* * *

【大腸】

大腸病変に対するスタンダードなアプローチ

山田真善 齋藤 豊 坂本 琢 中島 健 松田尚久
Masayoshi YAMADA Yuiaka SAITO Taku SAKAMOTO Takeshi NAKAJIMA Takahisa MATSUDA

key words: 大腸, ESD, アプローチ

はじめに

内視鏡的粘膜下層剝離術(ESD)の登場により, 従来の内視鏡的粘膜切除術(EMR)では分割切除となっていた, あるいは外科的切除を施行していた長径2cmを超える病変でも, 一括切除が可能となった¹⁾. 従来のEMRは, 病巣直下の粘膜下層に生理食塩水を局所注射し, 膨隆を確認後, スネアにて病変を切除する方法である(図1). この従来の方法とESDの大きな違いは, ①周囲切開を行うこと, ②粘膜下層を可視下に剝離すること, ③理論的には切除サイズに制限がないことである²⁾.

このESDにて一括切除された標本は, 詳細な病理組織学的検討を可能にする³⁾. 当院では2004年ごろから本格的に大腸ESDを導入し, これまで1,000例を超える症例を経験してきた^{4, 5)}. これまでの検討から, ESDはEMRおよび分割EMRと比較すると, 長い治療時間, 手技の困難性, 習得に時間がかかるなどの問題点を明らかにしてきた⁶⁾. しかし, さまざまなデバイスが開発され, また, ESD手技のストラテジーの確立もあり, 安全性や手技的困難性はESD導入当初と比べ飛躍的に改善した⁷⁾. したがって, 大腸ESDを始めるにあたっては, リンパ節転移の可能性と技術的にESDが可能な病変かどうかを事前に十分に検討することが必要である。

本稿では, この大腸ESDについて, 現在の当院におけるスタンダードなアプローチを解説する。

I. 当院におけるESDの適応

現在のところ, 保険収載されている大腸ESDの適応は, 2~5cmの腫瘍性病変である。また, 内視鏡治療はリンパ節転移の可能性のない病変に対して行うのが絶対条件である。大腸腫瘍におけるリンパ節転移の危険因子として, SM浸潤距離1,000 μ m以上, 脈管侵襲, 低分化腺癌成分, 簇出が明らかになっており, これらのなかで術前内視鏡診断にて予測ができるのはSM浸潤距離のみである⁸⁾. 近年, SM浸潤距離が1,000 μ m以上のSM高度浸潤癌であっても, 他のリンパ節転移に対する危険因子が陰性である場合は, リンパ節転移率が低いことから, SM高度浸潤癌に対する内視鏡治療の適応拡大に対する可能性が検討されている。しかし, 大腸SM癌の外科的切除後の生存率が極めて良いことや, ESD後長期予後データに関する検討が不十分であることから, 現時点における当院のESDの適応はSM軽度浸潤癌(<1,000 μ m)までの深達度と評価した病変, すなわち臨床分類(Clinical Classification)におけるnon-invasive patternを示す病変としている。

各肉眼型に対するESDの適応を表1に示す。臨床病理学的な適応に技術的な側面を加味して適応を考

a/b
c/d

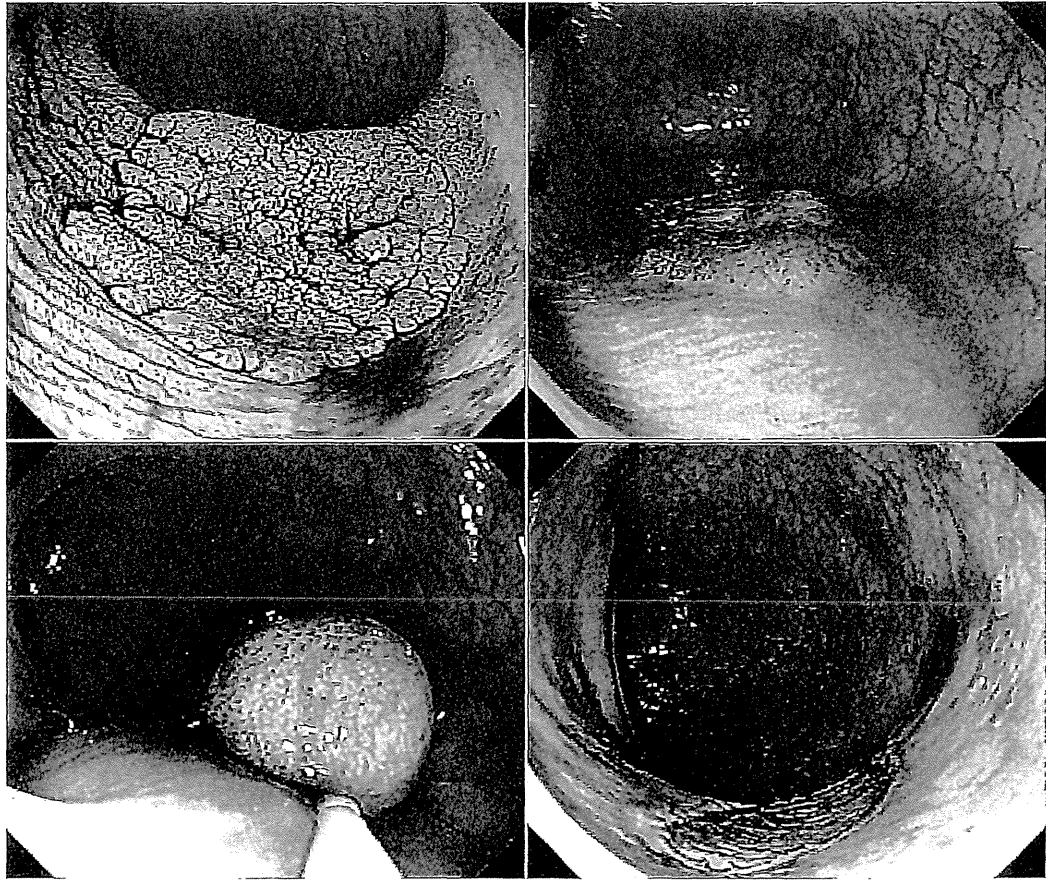


図1 内視鏡的粘膜切除術(EMR)

a. 直腸S状結腸部に2cm大の平坦隆起性病変を認める。b. 局所注射にて良好な粘膜下層の膨隆を作製する。c. スネアリング d. EMR後潰瘍

表1 国立がん研究センター中央病院における大腸ESDの適応

適応	腫瘍径(mm)			
	<10	10~20	20~30	>30
0-IIa, IIc, IIa+IIc (LST-NG)	EMR	EMR	ESD	ESD
0-Is+IIa (LST-G, 結節混在型)	EMR	EMR	EMR	ESD
0-Is (Villous)	EMR	EMR	EMR	ESD
遺残・再発病変	EMR	EMR/ESD	ESD	ESD
直腸カルチノイド腫瘍	EMR	ESD/Surgery	Surgery	Surgery

術前内視鏡診断にてnon-invasive patternと診断した病変
EMR: endoscopic mucosal resection, ESD: endoscopic submucosal dissection (文献4のTable1より抜粋, 訳して掲載)

える必要がある。臨床病理学的に多くの大腸癌は腺腫を介する発癌経路を有するとされており、2cm以上のすべての腫瘍にESDは必要ではないと考える。

当院にて内視鏡的・外科的に切除された800例を

超える一括切除が施行されたLSTの臨床病理学的検討に基づき、LSTに対する当院のESD適応基準は、非顆粒型LST(LST-NG)>2cm, 結節混在型LST(LST-G, nodular mixed type)>3cmとしている⁹⁾。

従来、顆粒均一型のLST-Gは腫瘍学的に分割切除で対応可能であり、腫瘍径が2~3cmの結節混在型LST-Gにおいては、粗大結節や陥凹部位などの癌やSM浸潤が疑われる部位を最初に大きくスネアリングすることにより、仮に残りの部位が分割切除となっても許容されるとしてきた。分割切除の際には癌を示すV型pit patternの部位を分断しないように注意することが肝要であるが、技術的側面から、最近ESDが安定化しており、これらの病変においても3cmを超える病変においては積極的な分割EMRよりもESDによる一括切除も選択肢となっている。

0-Is病変では、スネアのサイズおよび筋層の挙上によるnon-lifting signから2cm以上をESDの適応

a|b.

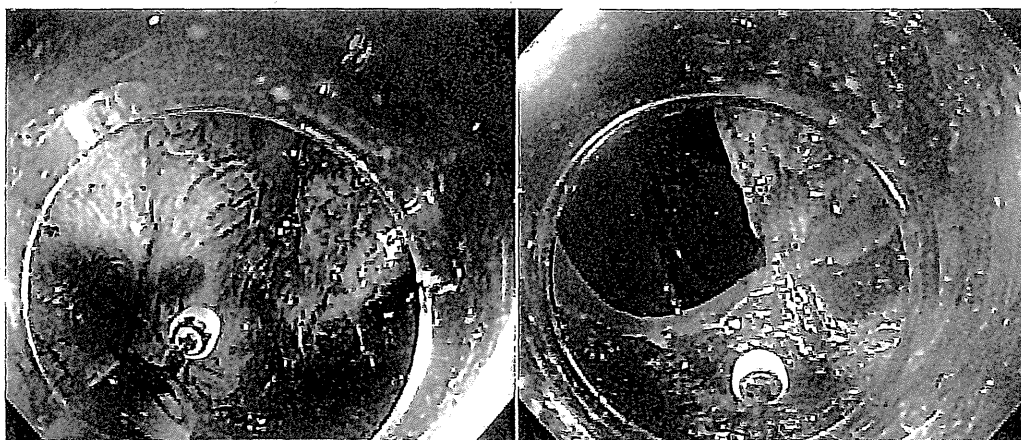


図2 鉗子口の違い

a. GIF-Q260J: 鉗子口が7時方向 b. PCF-Q260J: 鉗子口が6時方向

としている。再発病変は粘膜内病変のみを対象とし、non-lifting signのためEMRで対応が困難な病変をESDの適応としている。カルチノイドについては、1 cmまでのものは外来におけるESMR-Lで十分対応可能である^{10,11)}。

II. 前処理

偶発症時に便汁が治療の妨げにならないように、大腸ESDの前処置には通常の大腸内視鏡検査よりも多いムーベン[®]3lを最低容量としている。すなわち、穿孔時の便汁の腹腔内への流出や、出血時の視野の妨げなど、大腸ESDにおいては前処置が偶発症コントロールを左右すると言っても過言ではない。前日に入院後、患者は低残渣食を摂取し、就寝前にセンノシドを2錠、ESD当日の早朝から上記の内服を行っている。看護師が排便状況を確認し、ムーベン[®]3l内服終了後に十分な前処置の状態が得られた状況でESDを開始している。なお、既往の検査時の前処置の状況に応じて、必要であればESD前日から前処置薬内服(split-dose bowel prep)も適宜適応している。

III. 内視鏡システム

ESDには安定したスコープ操作が必須である。したがって、施行医は軸保持挿入法をマスターしておく必要がある。また、ESDは粘膜下層を視認しながら切除することが大切であり、時に出血のコント

ロールが必要となる。故に、当院ではスコープは操作性が良く(細径で先端硬性部が短い)、送水機能を有するPCF-Q260J(オリンパス社)を盲腸から下行結腸の病変に、GIF-Q260JをS状結腸から直腸までの病変に基本として用いている。この際、PCFとGIFでは鉗子口の位置がそれぞれ画面の6時方向と7時方向と異なること(図2)、また、ダウンアングルがPCF-Q260Jの190度に比べ、GIF-Q260Jは90度と角度が狭いことにも注意されたい。これらの機能的特徴を理解し、状況に応じたスコープを選択することが重要である。

高周波発生装置はERBE社のVIO300Dを、また、全例にCO₂送気を使用している。CO₂は安全性や有効性が確認されているだけでなく、穿孔時の偶発症の一つである腹部コンパートメント症候群による血栓塞栓症、不整脈や呼吸循環不全などの重篤な合併症を予防する目的もあるので重要である¹²⁾。

先端フードはESDの切開・剝離のすべての行程においてトラクションをかけるために必須である。さらに、壁の薄い大腸に対するESDにおいては、ブラインド操作により容易に穿孔する危険があり、粘膜下層への潜り込みによる視野確保は重要である。当院では、先端フードはshort-type ST hoodを使用している。これは従来のストレートタイプの先端フードよりも粘膜下層に潜り込みやすいことから、大腸に対するESDに適している。先端が狭くなっているため、スコープを挿入する前にデバイスの出し入れ

と、スコープの送水機能が正常に働くかを確認する必要がある。

IV. 局注液

粘膜下層の膨隆が長時間持続できるグリセオールとヒアルロン酸ナトリウム溶液(ムコアップ®)をサンドイッチ法で使用している。グリセオールにはインジゴカルミン液1%2mlとエピネフリン0.1%1mlを200mlに対して混ぜて、5mlのシリンジに入れて準備している。ムコアップ®は原液で2mlのシリンジに入れて準備している。実際には、まず上記にて作製したグリセオールを局注し、粘膜下層の膨隆を確認し、次にムコアップ®2mlを局注する。最後にグリセオールでフラッシュし、局注針の中に残存するムコアップ®を後押しする。ムコアップ®は大腸の固有筋層を容易に挙上させてしまうので、このような工夫が必要である。

V. デバイス

1. 周囲切開・剝離

当院では、送水機能を搭載したバイポーラ高周波ナイフであるjet-B knife(ゼオンメディカル社)とIT knife nano(オリンパス社)をメインデバイスとして使用している。

Jet-B knifeは、ナイフ先端のボールチップとシース先端の電極の間のみ電流が流れることから、モノポーラ高周波ナイフに比べ組織への凝固の影響が少ない。また、送水機能により局所注射の追加が可能である。

IT knife nanoは従来のIT knife 2よりも先端絶縁チップが小さく(1.7mm)、ブレード長が3.5mmと短くなった。これにより、スペースの狭い大腸ESDにおいても操作性・安全性が向上した。

2. 止血

当院では、バイポーラ止血鉗子であるHemoStat-Y(ペンタックス社)を使用している。安全対策として、バイポーラ止血鉗子を使用している。壁の薄い大腸に対するESDであるが故に、より安全をきたすために周囲組織への凝固の影響が少ないこれらのデバイスを使用している。

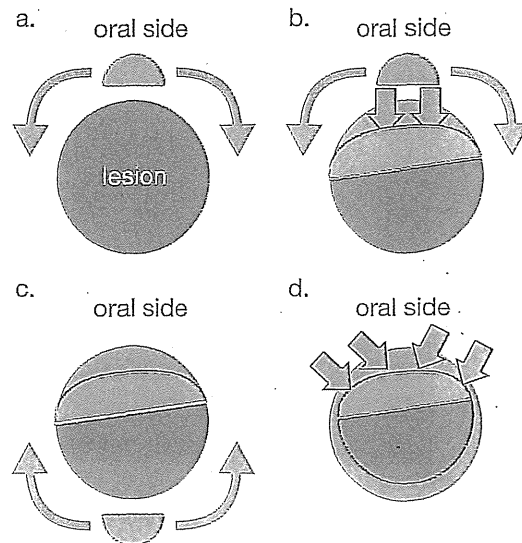


図3 国立がん研究センターにおける大腸ESDのスタンダード・アプローチ(模式図)

- 反転操作下にて口側に粘膜切開創を作製し、左右に切開創を拡げる。
- 粘膜下層剝離を随時加える。
- 約半周の粘膜切開および粘膜下層剝離を終えたところで、スコープを順方向操作に戻し、病変の肛門側に粘膜切開創を作製し、全周の粘膜切開およびトリミングを行う。
- 再度反転操作下にて粘膜下層剝離を完遂する。

VI. 当院におけるスタンダード・アプローチ

図3に当院におけるスタンダード・アプローチの模式図を示す。

- ESDを始める前に、患者の体位を適切な方向に変換する。適切な方向とは病変が重力の上側になる状態である(病変対側に腸液が溜まる状態)。これによりESD中に良好なトラクションをかけることが可能となる。空気量やESDの進行に伴い重力方向は変わるため、適宜患者の体位を変換する(図3a)。
- 良好な体位が得られると、次はスコープの反転操作を試みる。病変の局在によっても異なるが、当院ではスコープの安定性のため、可能な場合は反転操作により病変口側から粘膜切開を開始している。もちろん、エキスパートになると順方向の操作でもESDは完遂可能であるが、当院では大腸ESDを学びにくるレジデントや海外の医師が多く、教育のためにも反転操作にてESDを開始している。反転によりスコープはより安定し、

a	b	c
d	e	f
	g	h

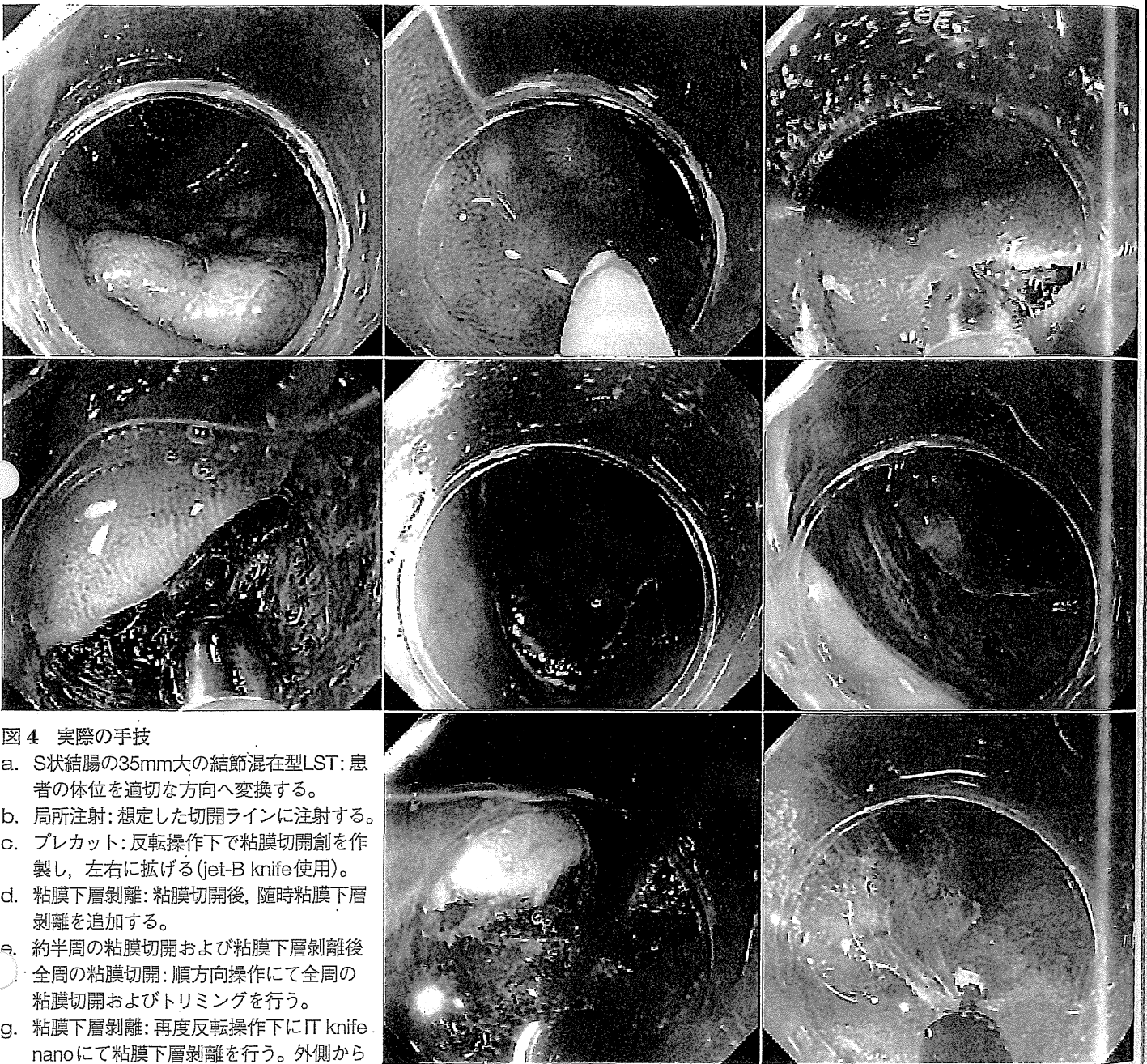


図4 実際の手技

- a. S状結腸の35mm大の結節混在型LST: 患者の体位を適切な方向へ変換する。
- b. 局所注射: 想定した切開ラインに注射する。
- c. プレカット: 反転操作下で粘膜切開創を製作し、左右に拡げる (jet-B knife使用)。
- d. 粘膜下層剥離: 粘膜切開後、随時粘膜下層剥離を追加する。
- e. 約半周の粘膜切開および粘膜下層剥離後
全周の粘膜切開: 順方向操作にて全周の粘膜切開およびトリミングを行う。
- g. 粘膜下層剥離: 再度反転操作下にIT knife nanoにて粘膜下層剥離を行う。外側から内側にIT knifeを動かす。
- h. ESD完遂

デバイスが腸管壁と平行に動くため、ESDを始める初学者に反転操作は奨められる。

3. 大腸腫瘍は、通常、腫瘍と非腫瘍粘膜の境界が明らかであるため、当院では基本的に病変周囲のマーキングは行っていない。インジゴカルミン散布あるいはNBI観察において、境界を慎重に確認する。0-IIb型伸展を伴うなど境界が不明瞭な場合は、適宜周囲マーキングを行っている。

4. 反転操作下にjet-B knifeを用いて口側の粘膜切開から開始し(図3a)、左右に粘膜切開創を拡げる。その後、ある程度の粘膜下層剥離を行う(図3b)。約半周の粘膜切開・粘膜下層剥離が終了した後、順方向のスコープ操作にて肛門側の粘膜切開から全周切開、トリミングまで行う(図3c)。最後に、再度反転操作下にIT knife nanoを用いて粘膜下層剥離を完遂する(図3d)。

5. 実際の症例を図4に示す。切開ラインを決め、局注針を挿入し、前述のサンドイッチ法にて十分な粘膜下の膨隆を作製する(図4a, b)。局注は切開ラインに打つように心がける。十分な膨隆が得られたら、jet-B knifeを挿入し、粘膜切開を開始する(図4c)。当院における現在の切開時の高周波装置の設定は、Dry cut mode, Effect 3, 100Wである。Jet-B knifeのシースを粘膜に軽く押し当て、切開波にて少しずつ粘膜切開創を左右に拡げる。前述の通り、当院では最初の段階で全周切開は行っていない。

部分的な周囲切開の後、局所注射を適宜追加し、粘膜下層剝離を行う(図4d)。粘膜下層剝離時の高周波設定は、Swift coagulation mode, Effect 2, 50Wである。粘膜切開の後、粘膜下層の膨隆が保たれている間に粘膜下層剝離を行うのが望ましい。反転操作で粘膜下層剝離を行っている時、デバイスが筋層と平行に動くため、より安全である。

部分的な粘膜下層剝離の後、図4b～dを少しずつ繰り返し、粘膜切開創を水平方向に拡げていく。穿孔を予防するため、局所注射は適宜追加する。粘膜下層剝離の深度は粘膜下層の下1/3くらいが適切である。固有筋層を露出させない深さを保つように注意する。細い血管は上記のSwift coagulation mode,あるいはForced coagulation modeにてゆっくり切れば出血なく切れる。太い血管はあらかじめSoft coagulation modeで白くなるまで凝固し、その後Forced coagulation modeで切ると出血しない。

約半周の粘膜切開と粘膜下層剝離が終了後(図4e)、順方向にて肛門側も口側と同じ方法で粘膜切開とトリミングを行い、全周切開を完成させる(図4f)。

全周の粘膜切開が完成した後、再度反転操作にてIT knife nanoを挿入し、粘膜下層剝離を完遂させる(図4g, h)。IT knife nanoはjet-B knifeと同じ設定で使用しており、血管の視認できる部位では凝固波を、血管のない部位では切開波を使用する。IT knife nanoの操作では、基本的に視認できる粘膜下層の外側から内側にknifeを筋層と平行に動かしながら剝離していく。IT knife nanoは安全でかつ時間短縮につながるため有効である。

表2 国立がん研究センター中央病院における大腸ESDの治療成績

総症例数	1,104
平均年齢(歳)	65.9 ± 10
切除標本径(平均, mm) (中央値, mm)	38.6 ± 18.4 35
手技時間(平均, 分) (中央値, 分)	102.8 ± 73 85
一括切除率	91.2%
治癒切除率	86.1%
病変部位	
右側結腸(回腸・盲腸～横行)	517例(47%)
左側結腸(下行～直腸S状結腸部)	309例(28%)
直腸(上部・下部)・肛門管	278例(25%)
組織型	
腺腫	265例(24%)
癌	825例(75%)
T1a (SM1)	100例(9%)
T1b (SM2-)	113例(10%)
その他(カルチノイドなど)	13例(1%)
合併症	
穿孔率	2.6%
後出血率	1.8%

(2004～2014.5月)

Ⅶ. 当院のESD治療成績

表2に当院におけるESD治療成績を示す。これまでに1,000例を超す症例数を経験し、一括切除率は91%で治癒切除率は86%である。14%がSM高度浸潤癌(T1b),あるいは脈管侵襲陽性と診断され、追加外科切除を勧めている。手技時間は中央値で85分、平均値で103分、切除切片径の中央値は3.5 cmであった。

Ⅷ. 手技の工夫

ESDのエキスパートになるためには、良好なトラクションをかける方法を考えることが近道である。これまでに、上部消化管ではClip-band¹³⁾や糸付きクリップなどのトラクションメソッドが報告されている。大腸においては、RitsunoらのS-O clip¹⁴⁾やYamamotoらのClip flap¹⁵⁾が報告されている。これ

らのトラクションメソッドを使用すれば、粘膜下層を直視することがより容易となるため、特に大腸ESD初学者に対して有用であると考える。

おわりに

当院の日常臨床において施行している大腸ESDのスタンダード・アプローチについて解説した。当院におけるレジデントも含めた大腸ESDの施行医の増加に関わらず、解説した方法は良好な治療成績を納めていると言えるであろう。大腸ESDを安全かつ確実に導入するためには、この方法に加えてトラクションデバイスの併用が有用である。

文 献

1. Saito Y, Uraoka T, Yamaguchi Y et al: A prospective, multicenter study of 1,111 colorectal endoscopic submucosal dissections (with video). *Gastrointest Endosc* **72**:1217-1225, 2010
2. Saito Y, Yamada M, So E et al: Colorectal endoscopic submucosal dissection: Technical advantages compared to endoscopic mucosal resection and minimally invasive surgery. *Dig Endosc* **26**(Suppl 1):52-61, 2014
3. 山田真善, 九嶋亮治: 切除標本の取り扱いと病理標本. 山本博徳, 斎藤 豊(編): 大腸ESD, 151-159, 南江堂, 東京, 2013.
4. Saito Y, Otake Y, Sakamoto T et al: Indications for and technical aspects of colorectal endoscopic submucosal dissection. *Gut Liver* **7**:263-269, 2013
5. Saito Y, Sakamoto T, Nakajima T et al: Colorectal ESD: Current Indications and Latest Technical Advances. *Gastrointest Endosc Clin North Am* **24**:245-255, 2014
6. Saito Y, Fukuzawa M, Matsuda T et al: Clinical outcome of endoscopic submucosal dissection versus endoscopic mucosal resection of large colorectal tumors as determined by curative resection. *Surg Endosc* **24**:343-352, 2010
7. Nakajima T, Saito Y, Tanaka S et al: Current status of endoscopic resection strategy for large, early colorectal neoplasia in Japan. *Surg Endosc* **27**:3262-3270, 2013
8. 大腸癌研究会(編): 大腸癌治療ガイドライン. 金原出版, 東京, 2010
9. 斎藤 豊, 山田真善, 曾 絵里子ほか: LSTに対するESD治療の基本とピットフォール EMR/ESDの選択基準, 分割EMR許容の是非, 生検の是非. *INTESTINE* **18**:69-78, 2014
10. Ono A, Fujii T, Saito Y et al: Endoscopic submucosal resection of rectal carcinoid tumors with a ligation device. *Gastrointest Endosc* **57**:583-587, 2003
11. Mashimo Y, Matsuda T, Uraoka T et al: Endoscopic submucosal resection with a ligation device is an effective and safe treatment for carcinoid tumors in the lower rectum. *J Gastroenterol Hepatol* **23**:218-221, 2008
12. Saito Y, Uraoka T, Matsuda T et al: A pilot study to assess the safety and efficacy of carbon dioxide insufflation during colorectal endoscopic submucosal dissection with the patient under conscious sedation. *Gastrointest Endosc* **65**:537-542, 2007
13. Parra-Blanco A, Nicolas D, Arnau MR et al: Gastric endoscopic submucosal dissection assisted by a new traction method: the clip-band technique. A feasibility study in a porcine model (with video). *Gastrointest Endosc* **74**:1137-1141, 2011
14. Ritsuno H, Sakamoto N, Osada T et al: Prospective clinical trial of traction device-assisted endoscopic submucosal dissection of large superficial colorectal tumors using the S-O clip. *Surg Endosc*:2014
15. Yamamoto K, Hayashi S, Nakabori T et al: Endoscopic submucosal dissection using endoclips to assist in mucosal flap formation (novel technique: "clip flap method"). *Endoscopy* **44**(Suppl 2):E334-335, 2012

CO₂ 送気の導入

齋藤 豊

Yutaka SAITO

国立がん研究センター中央病院内視鏡科

key words: 炭酸ガス送気, 空気送気, ESD, 患者苦痛, 偶発症

炭酸ガス (CO₂) は空気と比較し腸管内での吸収が速やかで、通常の大腸内視鏡検査においても、患者苦痛度の軽減において、有用性・安全性はすでに欧米から報告されていた。さらに通常送気による大腸内視鏡検査では、検査終了後も、腹部膨満感や不快感が持続する 경우가あがるが、そのような検査後の腹部不快感の軽減にも有効である。

日本においても以前より一部で導入されていたが、内視鏡機器の改良、大腸内視鏡挿入手技の向上から、通常送気でも十分患者受容性の高い検査が可能となり、CO₂ 送気装置の導入の手間を考慮すると、普及には至らなかった。

内視鏡的粘膜下層剥離術 (ESD) は、消化管の大きな表面型腫瘍に対しても一括切除が可能である画期的な手

技であるが、長時間を要する場合があります。送気による患者苦痛が通常大腸内視鏡検査以上に問題となっていたり。

さらには、穿孔をきたした場合に、通常空気での送気では、皮下気腫や重篤な場合には縦隔気腫や気胸を誘発し、腹部コンパートメント症候群といった重篤な偶発症を引き起こす危険性が指摘されている。

欧米では直腸癌の低侵襲性治療に tansanal endoscopic microsurgery (TEM) が汎用されており、時に全層切除が施行されているが、重篤な偶発症はあまり問題となっていない。海外での国際会議でこの TEM の全層切除のビデオを見て、大腸 ESD に CO₂ 送気を導入することを思いついた。幸い国立がんセンター (当時) では、検診センターの大腸内視鏡検査に CO₂ 送気を YUTAKA 社製の Regulator を用いて使用していたために、比較

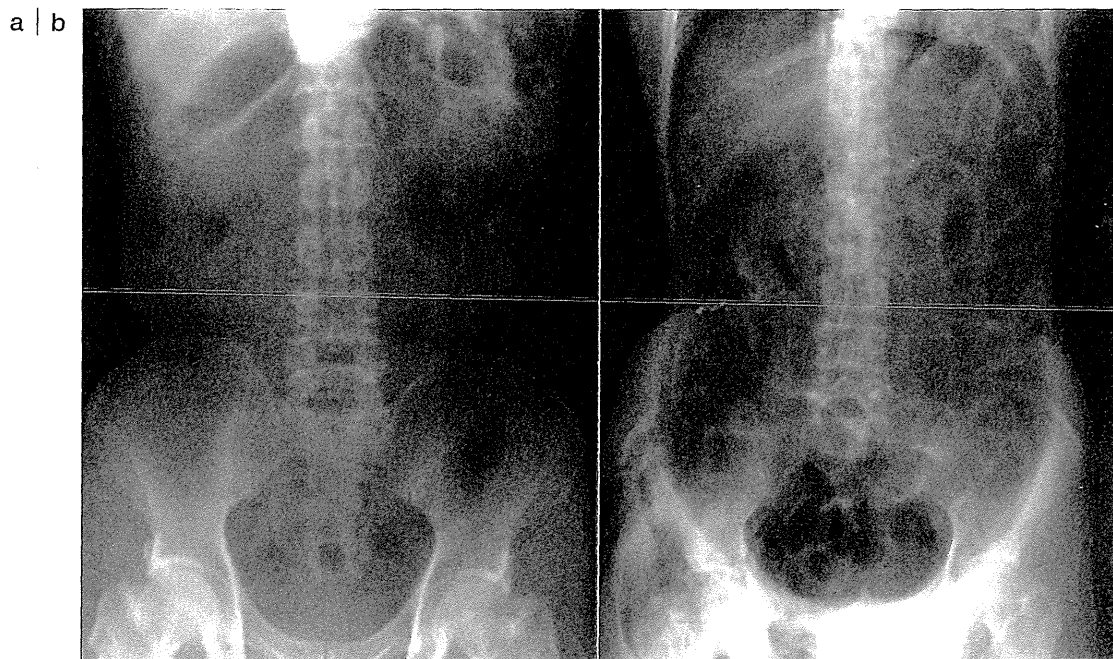


図 腹部 X 線写真の比較 (大腸 EMR/ESD 穿孔例)
a. CO₂ 送気 b. 空気送気

的容易に導入が可能であった²⁻⁴⁾。

実際、穿孔が起きた際の術直後のX線写真では、腹腔内 free air の差は歴然であり(図)、腹部コンパートメント症候群の予防にもつながると期待される。その後、大腸のみでなく食道ESDにおいてもCO₂送気を導入したが、当初、CO₂ retention の危険性を指摘されたが、そのようなことは杞憂であった⁵⁾。

また、空気による送気では禁忌であるが、CO₂を使用していることで、water jet に加え、送気による切除検体に対するトラクションも適宜使用しており、粘膜下層への潜り込みが容易となっている。

現在では、全消化管のESDにCO₂送気は必須であり、またERCPやバルーン内視鏡などの侵襲的手技にはなくてはならない存在である。

文献

1. Saito Y, Uraoka T, Matsuda T et al: Endoscopic treatment of large superficial colorectal tumors: a case series of 200 endoscopic submucosal dissections (with video). *Gastrointest Endosc* **66**(5): 966-973, 2007
2. Saito Y, Uraoka T, Matsuda T et al: A pilot study to assess safety and efficacy of carbon dioxide insufflation during colorectal endoscopic submucosal dissection under conscious sedation. *Gastrointest Endosc* **65**(3): 537-542, 2007
3. 斎藤 豊, 菊地 剛, 福澤誠克ほか: 進化するESD 大腸ESDにおける炭酸ガス送気のメリット. *消化器内視鏡* **19**(5): 694-699, 2007
4. Kikuchi T, Fu KI, Saito Y et al: Transcutaneous monitoring of partial pressure of carbon dioxide during endoscopic submucosal dissection of early colorectal neoplasia with carbon dioxide insufflation: a prospective study. *Surg Endosc* **24**(9): 2231-2235, 2010
5. Nonaka S, Saito Y, Takisawa H et al: Safety of carbon dioxide insufflation for upper gastrointestinal tract endoscopic treatment of patients under deep sedation. *Surg Endosc* **24**(7): 1638-1645, 2010

違法コピーに注意!!

そのコピーは大丈夫ですか?

現代社会において、コピー(複写)はなくてはならないものになっていますが、その手軽さゆえに違法コピーが後を絶ちません。あなたが日常的に行っているコピーは大丈夫ですか? 著作権法に定められた例外、つまり、個人または家庭内等で使うために自らコピーする場合や図書館において調査研究等のため一部分をコピーする場合(著作権法第30, 31条等)のごく限られた範囲以外のコピーは、すべて著作権者の許諾を得なければ違法となります。企業や研究施設等で職務上利用するコピーはすべて許諾が必要となりますので、ご注意ください。

違法コピーは健全な創作活動、出版活動の障害となり、ひいては文化・学術の発展を阻害する大きな要因となります。今一度、著作権についてお考えください。

許諾の手続きは簡単です!

医学や関連領域の出版物の多くは、(社)出版者著作権管理機構 **JCOPY** に複写権の管理・運営が委託されています。複写される場合は事前に **JCOPY** に連絡し許諾を得てください。

JCOPY (社)出版者著作権管理機構

TEL03-3513-6969 FAX03-3513-6979 info@jcopy.or.jp



一般社団法人

日本医書出版協会

不正なコピーは

許さない!

Q&A サイト「それは違法かも。」

「これって違法?」著作権に関するよくある質問にわかりやすくお答えしています。

<http://www.ihokamo.net/>

情報受付窓口「不正コピー情報ポスト」

不正コピーなど、明らかに違法なものを見つけたら、こちらまで情報をお寄せください。

<https://www2.accsjp.or.jp/piracy/>
フリーダイヤル 0120-765-175



社団法人 コンピュータソフトウェア著作権協会
<http://www2.accsjp.or.jp/>

I. 限局性病変・単発病変 ■隆起性病変
 A. 上皮の変化を伴うもの

LST-G, LST-NG
 Laterally spreading tumor-granular type and laterally spreading tumor-non-granular type

池澤伸明, 齋藤 豊, 松田尚久
 Nobuaki IKEZAWA, Yutaka SAITO, Takahisa MATSUDA

key words : 側方発育型腫瘍, laterally spreading tumor (LST)

疾患の概要

側方発育型大腸腫瘍 (laterally spreading tumor : LST) は1993年, 工藤らによって提唱された概念で10 mm以上の『上方向発育に比較して側方向への発育傾向が極端に強い丈の低い隆起性病変』と定義されている¹⁾。この概念は発育形態分類であり, 肉眼形態分類であるパリ内視鏡分類および大腸癌取扱い規約とは異なる分類法である。しかしながら, LSTという用語は腫瘍の臨床病理学的特徴をよく反映しており, また病変の特徴がイメージしやすいため, 現在では世界で幅広く認知されている。LSTは, 石川らによって顆粒集簇様病変²⁾と初めに定義された表面顆粒結節状の顆粒型 (granular type : LST-G) と, 表面平滑な非顆粒型 (non-granular type : LST-NG) に分類され, さらにLST-Gは, 顆粒均一型 (homogeneous type) と顆粒の中に粗大結節を伴う結節混在型 (nodular mixed type) に, LST-NGは平坦隆起型 (flat elevated type) と明らかな陥凹局面ではなく, 全周の追えない不完全な陥凹を有する偽陥凹型 (pseudo depressed type) に細分類される。それぞれの好発部位は, 顆粒型が直腸・盲腸・近位上行結腸, 非顆粒型は右半結腸とされる。LSTを細分類することは, 腫瘍の質的診断・悪性度評価・治療法選択を行ううえで非常に有用である。

内視鏡所見の読み方

LSTは大きさに比して丈が低い故, 通常のポリープ病変と比べ発見困難である。結節型の場合は, その結節部において存在診断は容易であることが多いが, そのほかにおいては正常粘膜との高低差がほとんどないため, 認識困難なこと, 大腸粘膜の血管透見消失像に注意することにより, その存在診断が可能となる。存在診断後も範囲が不明瞭なことも多く, インジゴカルミン散布がその存在および範囲診断に非常に有用である。

LST-G (homogeneous type) は0-II a型の病変で (図1a), 均一な顆粒よりなり, 主にIII L型・IV型 pitを示し, 30 mmを超える大きな病変であっても, SM浸潤をきたすことは少ない。一方, LST-G (mixed type) は0-I s+ II a型の病変 (図1b) で, 結節部でSM浸潤をきたしていることが多く, 特に結節部の pitの観察に注意を払う必要がある。LST-NGの内視鏡所見の特徴として, 花卉状や偽足様

(pseudo podiac appearance) といったはみ出し所見が特徴的である。LST-NG (pseudo depressed type) は, 0-II c型および0-II a+ II c型の病変 (図1c) で, 20 mm程度の病変であってもSM浸潤をきたしていることが多い。また, multifocalにSM浸潤をすることが多いため, 表面の pit patternのみではSM浸潤を診断しきれないことも少なくない。LST-NG (flat elevated type) は0-II a型の病変 (図1d) で, III L型・IV型 pitからなることが多いが, 大きさに伴いSM浸潤率も増加する。また, 実臨床では肉眼分類の亜分類に迷うLST病変もしばしば経験される (図2)。鑑別疾患と内視鏡的鑑別点

・ Sessile Serrated Adenoma/Polyp (SSA/P)

LSTの多くはその特徴的な形態のため, 他の腫瘍性病変と鑑別困難なことは少ないが, SSA/P (図3) は形態的にLSTと類似しており, 時に鑑別が必要となる。しかしながら, SSA/Pは褪色調・表面に多量の粘液を伴う, NBIで微細血管がほとんど視認できない, II型 pitなどの特徴を有し, これらの所見から鑑別は可能である。

・ DALMs (dysplasia associated lesions or masses)

潰瘍性大腸炎 (UC) に発生するDALMsのなかには内視鏡像として, LST様の形態を示すものも存在し, 時に鑑別が必要である。UC患者でこのような隆起性病変を認めた際は, 内視鏡切除または生検を施行し, 病理結果に基づいた治療方針決定が重要となる。

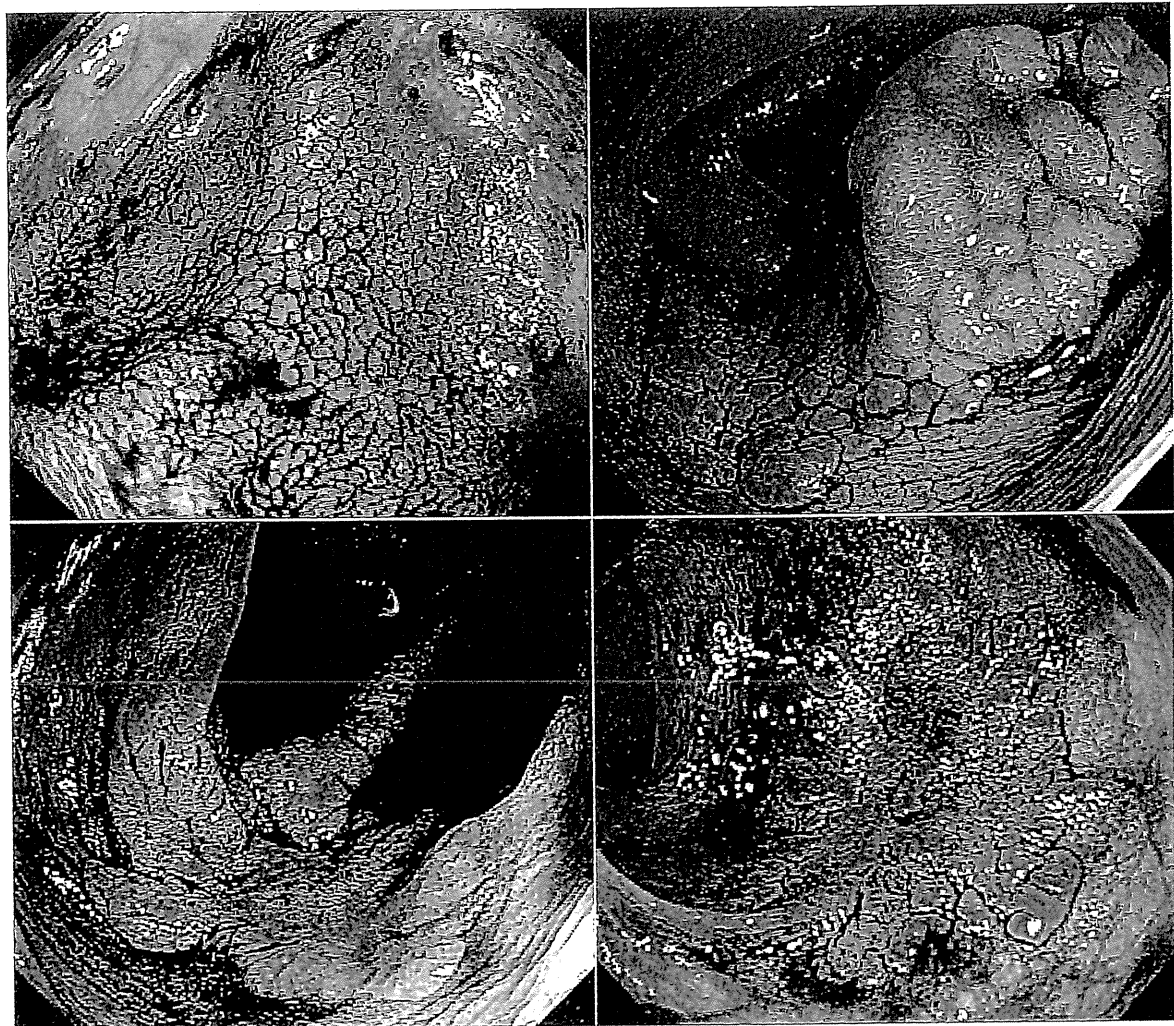
治療方針

LSTは大きさの割には深達度が浅く, 内視鏡治療のよい適応になる病変が多い。EMRは20 mm程度までの病変では可能なことが多いが, それ以上の病変では分割EMRにならざるを得ないことが多い。特に顆粒均一型, 30 mmを超える大きなものでもSM癌はほとんどないため分割EMRでもよいとされる。偽陥凹型に関しては, 20 mm以上でSM浸潤率が高い, またmultifocalにSM浸潤をきたすため内視鏡的に浸潤部位を予想できない, さらに, 線維化のためnon-lifting sign陽性を示すことが多い, といった理由により, 20 mm程度からESDの良い適応と考えられる。

結節混在型においては, 結節部を一括切除できればよいとの考えもあるが, 30 mmを超えるとSM浸潤の可能性が高くなり, また偽陥凹型と同様にmultifocalに浸潤をきたすことも多くなるため, 30 mm以上の結節混在型に対しては, 一括切除が望ましいと思われる³⁾。

文献

1. 工藤進英：早期大腸癌—平坦・陥凹型へのアプローチ。25-55, 医学書院, 東京, 1993
2. 石川 勉：顆粒集簇を主体とした大腸隆起性病変。胃と腸 21 : 1373-1380, 1986
3. 齋藤 豊：治療法選択からみた側方発育型大腸腫瘍 (LST) の分類と意義。胃と腸 45 (6) : 1001-1010, 2010



a	b
c	d

図1

- a. 0-II a型, LST-G (homogeneous type): ほぼ均一な顆粒結節よりなる平坦隆起性病変
- b. 0-I s+ II a型, LST-G (nodular mixed type): 顆粒状隆起に丈の高い結節成分を伴う平坦隆起性病変
- c. 0-II a+ II c型, LST-NG (pseudo-depressed type): ひだのひきつれを伴う平坦隆起性病変。病変内に局面として追えない陥凹を認める。
- d. 0-II a型, LST-NG (flat elevated type): 陥凹を伴わない非顆粒型平坦隆起性病変。LST-NGに特徴的な偽足様所見 (pseudo podiac appearance) を認める。



図2 0-II a型, LST-G/NG混在型
病変左側は顆粒を伴わない非顆粒型, 病変右側は顆粒型の形態を示す平坦隆起性病変

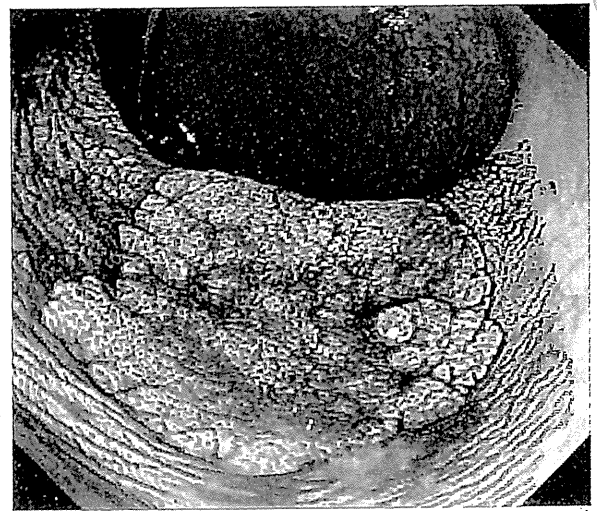


図3 SSA/P
一見顆粒均一型のようにみえるが, 多量の粘液を伴い, NBI観察では血管がほとんど視認できず, II型pitを認めることから鑑別可能である。

Photoimmunotherapy Targeting Prostate-Specific Membrane Antigen: Are Antibody Fragments as Effective as Antibodies?

Rira Watanabe¹, Hirofumi Hanaoka¹, Kazuhide Sato¹, Tadanobu Nagaya¹, Toshiko Harada¹, Makoto Mitsunaga¹, Insook Kim², Chang H. Paik³, Anna M. Wu⁴, Peter L. Choyke¹, and Hisataka Kobayashi¹

¹Molecular Imaging Program, Center for Cancer Research, National Cancer Institute, National Institutes of Health, Bethesda, Maryland; ²Applied/Developmental Research Directorate, Leidos Biomedical Research Inc., Frederick National Laboratory, Frederick, Maryland; ³Nuclear Medicine Department, Radiology and Imaging Science, Warren Grant Magnuson Clinical Center, National Institutes of Health, Bethesda, Maryland; and ⁴Department of Molecular and Medical Pharmacology, David Geffen School of Medicine at UCLA, Los Angeles, California

Photoimmunotherapy is a highly cell-selective cancer therapy based on an armed antibody conjugate with a phthalocyanine-based photosensitizer, IR700. Photoimmunotherapy induces rapid and highly specific necrosis in targeted cancer cells after exposure to near-infrared (NIR) light. Cells not expressing the antigen are not affected. To date, photoimmunotherapy has been demonstrated only with full antibody-IR700 conjugates. In this study, small and bivalent antibody fragments, including anti-prostate-specific membrane antigen (PSMA) diabody (Db) and minibody (Mb), were compared with intact IgG for their effectiveness as photoimmunotherapy agents. **Methods:** Radioiodinated antibody and antibody fragments with ¹²⁵I were used to determine the timing of maximum binding of each anti-PSMA antibody fragment on the cell surface in vivo in mice bearing either PSMA-positive or -negative PC3 tumors. Then therapeutic efficacy of photoimmunotherapy was examined by exposing mice to NIR light at 2 time points based on the time of maximum cell surface binding at 6 h after injection for Db-IR700 and 24 h after injection for Mb-IR700 and IgG-IR700 as well as 24 h after the peak uptake times. **Results:** Photoimmunotherapy with the same molar concentration of PSMA-Db-IR700, PSMA-Mb-IR700, and PSMA-IgG-IR700 conjugate showed similar therapeutic effects in vitro and in vivo on PSMA-positive PC3 tumor xenografts in cytotoxicity and survival curves ($P > 0.05$). **Conclusion:** The use of PSMA-Db-IR700 conjugate results in the shortest time interval between injection and NIR exposure without compromising therapeutic effects of photoimmunotherapy.

Key Words: photoimmunotherapy; prostate specific membrane antigen; monoclonal antibody; diabody; minibody; pharmacokinetics

J Nucl Med 2015; 56:140–144
DOI: 10.2967/jnumed.114.149526

Antibody-based cancer therapies, including therapeutic monoclonal antibodies, antibody-drug conjugates, antibody-toxin conjugates (immunotoxin), and radioimmunoconjugates, have been

Received Oct. 3, 2014; revision accepted Nov. 7, 2014.

For correspondence or reprints contact: Hisataka Kobayashi, Molecular Imaging Program, Center for Cancer Research, National Cancer Institute, National Institutes of Health, Building 10, Rm. B3B69, MSC1088, Bethesda, MD 20892-1088.

E-mail: Kobayash@mail.nih.gov

Published online Dec. 11, 2014.

COPYRIGHT © 2015 by the Society of Nuclear Medicine and Molecular Imaging, Inc.

a mainstay of molecularly targeted therapy (1). The antibodies used in these conjugates typically demonstrate great affinity for the target; however, there are some well-known limitations to the use of whole antibodies. Therapeutic antibodies do not initially permeate across the cell membrane, and thus they induce cytotoxicity at the cell surface, typically invoking antibody-dependent cellular cytotoxicity or complement-dependent cytotoxicity (1). Antibody-drug conjugates or immunotoxins can release their therapeutic payload after binding and internalization (2,3). Radioimmunoconjugates carry therapeutic radioisotopes that lead to radiation-induced cell death without internalization (4). These approaches have been successful in treating cancers; however, hepatic, renal, and bone marrow exposure often results in dose-limiting toxicities.

Photoimmunotherapy represents yet another way of harnessing antibodies to direct therapy. In photoimmunotherapy, an antibody is conjugated to a phthalocyanine-based photosensitizer, IR700, and when the conjugate binds the target cell and is exposed to near-infrared (NIR) light, it results in rapid and highly specific target cell death (5). Unlike other immunoconjugates, photoimmunotherapy can limit off-target side effects by 2 safety check points: it requires the conjugate to be docked at the cell surface and it requires the presence of light to activate. Because the conjugate is only effective after binding to target molecules on the cellular membrane, there are few off-target side effects and further safety can be achieved by limiting the region of exposure to NIR light. However, full antibodies, because of their relatively large size, do not penetrate evenly into tumor parenchyma, limiting the extent of therapy. Thus, genetically engineered small and bivalent antibody fragments, which are considerably smaller, might also bind more quickly and stably to the antigen yet improve the intratumoral distribution of the conjugate (6). Therefore, in this study, a small and bivalent anti-prostate-specific membrane antigen (PSMA) diabody (Db) and minibody (Mb) conjugated to IR700 were compared with an IgG-IR700 conjugate in a PSMA-positive tumor model. The timing of maximum binding to PSMA on the cell surface was determined for each antibody type, and therapeutic efficacy of photoimmunotherapy with the 3 agents was compared.

MATERIALS AND METHODS

Reagents

HuJ591, a humanized PSMA-specific monoclonal antibody (IgG), was developed at Weill Cornell Medical College and kindly provided by Prof. Neil H. Bander. Anti-PSMA-Mb and anti-PSMA-cys-Db were kindly supplied by ImaginAb Inc. IRdye 700-DX (IR700) NHS

ester was purchased from LI-COR Biosciences. All other chemicals were of reagent grade.

Synthesis of IR700-Conjugated IgG, Mb, and Db

IgG (1.0 mg, 6.2 nmol), Mb (0.5 mg, 6.3 nmol), or Db (0.5 mg, 10 nmol) was incubated with IR700 (molar ratio, 1:5) in 0.1 M Na_2HPO_4 (pH 8.6) at room temperature for 30 min, followed by purification with a size-exclusion Sephadex G-25 M column (PD-10; GE Healthcare). The concentration of IR700 was calculated by measuring the absorption with a UV-Visible Value System (model 8453; Agilent Technologies) to confirm the number of fluorophore molecules conjugated to IgG, Mb, or Db. The number of IR700 per IgG, Mb, or Db was 2–4 (7).

Radioiodination of IgG, Mb, and Db

^{125}I -PSMA-IgG, -Mb, and -Db were prepared using the IODO-GEN (Pierce) procedure. Briefly, 100 μg of each protein (PSMA-IgG, Mb, or Db) were added to each IODO-GEN-coated vial and iodinated with 37 MBq of ^{125}I -Na, which was neutralized to pH 7.2 with the addition of 0.5 M phosphate buffer at room temperature. After 5 min of reaction, each ^{125}I -radiolabeled product was purified with a PD-10 size-exclusion column. The specific activities of the radiolabeled IgG, Mb, and Db were 207.2 MBq (5.6 mCi)/mg for PSMA-IgG, 251.6 MBq (6.8 mCi)/mg for PSMA-Mb, and 347.8 (9.4 mCi)/mg for PSMA-Db. The radiochemical purity of radiolabeled products was validated with size-exclusion high-performance liquid chromatography equipped with a TSK SWxl G3000 column (TosoHaas), an ultraviolet monitor, and an online radiodetector (Bioscan). The high-performance liquid chromatography was eluted with 0.067 M phosphate-buffered saline (PBS) with 100 mM KCl at a flow rate of 1 mL/min.

Cell Culture

A PSMA-transfected PC3 cell line, PSMA-positive (PC3pip) cells, and a control blank vector transfected PC3 cell line, PSMA-negative (PC3flu) cells, were used for PSMA-targeting studies. Both cells were established at the Cleveland Clinic Foundation and kindly provided by Prof. Warren Heston. All cell lines were grown in RPMI 1640 medium (Life Technologies) containing 10% fetal bovine serum (Life Technologies) and 1% Pen-Strep (Life Technologies). All cell cultures were maintained in 5% carbon dioxide at 37°C in a humidified incubator.

Fluorescence Microscopy Studies

PSMA-positive or -negative cells (1×10^4) were plated on a covered glass-bottomed culture well and incubated overnight. Then IgG-IR700, Mb-IR700, or Db-IR700 was added to the medium at 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, and the cells were incubated for 5 h at 37°C in a humidified incubator or for 1 h on ice. Cells were washed once with PBS, and fluorescence microscopy was performed using an Olympus BX61 microscope (Olympus America, Inc.) equipped with the following filters: excitation wavelength, 590–650 nm; emission wavelength, 665–740 nm. Transmitted light differential interference contrast images were also acquired before and after the fluorescence imaging.

In Vitro Photoimmunotherapy

Cells were seeded into 35-mm cell culture dishes and incubated overnight. Medium was replaced with phenol red-free culture medium containing IgG-IR700 (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$), Mb-IR700 (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$), or Db-IR700 (3 $\mu\text{g}/\text{mL}$) that was the same molar concentration at 70 nM. After incubation for 5 h at 37°C, phenol red-free culture medium was added. Then cells were irradiated with a red light-emitting diode, which emits light at a 670- to 710-nm wavelength (L690-66-60; Marubeni America Co.), and a power density of 25 mW/cm^2 as measured with optical power meter (PM 100; Thorlabs). All in vitro experiments were repeated at least 3 times.

Phototoxicity Assay

Cytotoxic effects of photoimmunotherapy with IgG-IR700, Mb-IR700, or Db-IR700 were determined with a flow cytometric LIVE/DEAD Fixable Green Dead Cell Stain Kit (Life Technologies), which can detect compromised cell membranes. Cells were trypsinized after treatment and washed with PBS. Green fluorescent reactive dye was added in the cell suspension and incubated at room temperature for 30 min, followed by analysis on a flow cytometer (FACS Calibur; BD Biosciences).

Animal Tumor Model

All procedures were performed in compliance with the *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* (8), National Research Council, and approved by the local Animal Care and Use Committee. Six- to 8-wk-old female homozygote athymic nude mice were purchased from Charles River (NCI-Frederick). During the procedure, mice were anesthetized with isoflurane. PSMA-positive or -negative cells (2×10^6 /mouse, suspended in PBS) were injected subcutaneously in the dorsum of the mice.

Biodistribution Study

PSMA-positive and -negative tumor-bearing mice were divided into 3–4 groups ($n = 3$ –5) with approximately equal distributions of tumor sizes on the day of study, 5 d after inoculation of the cells. ^{125}I -IgG, -Mb, or -Db (37 kBq/1.0 $\mu\text{g}/200 \mu\text{L}$ in PBS per mouse) was injected via the tail vein. The biodistribution of ^{125}I -IgG, -Mb, or -Db was determined at 6 h and 1, 2, and 3 d after injection; at 1 and 6 h and 1 and 3 d after injection; or at 1, 6, and 24 h after injection, respectively, based on their reported biologic clearance rate. Organs of interest were excised and weighed, and the radioactivity counts were determined with a γ counter (Wizard 2480; PerkinElmer) using the injected dose as a standard. Data were calculated as the percentage injected dose per gram of tissue.

In Vivo Photoimmunotherapy

PSMA-positive tumor-bearing mice were allocated on the basis of the tumor volume 3 d after inoculation of the cells to each of 3 groups of 9–10 animals per group for the following treatments: no treatment control; the same mole dose (670 pmol) of agent (100 μg of IgG-IR700, 50 μg of Mb-IR700, or 30 μg of Db-IR700) intravenously (27 pmol/kg), no NIR light exposure; and the same mole dose of agent intravenously, NIR light administered at 50 J/cm^2 on day 1 and 100 J/cm^2 on day 2 after injection of IgG-IR700 and Mb-IR700, or at 50 J/cm^2 at 6 h and 100 J/cm^2 on day 1 after injection of Db-IR700. To determine tumor volume, the greatest longitudinal diameter (length) and the greatest transverse diameter (width) were measured with an external caliper. Tumor volumes based on caliper measurements were calculated using tumor volume = length \times (width) $^2 \times 0.5$. Mice were observed daily, and tumor volumes were measured 3 times a week until the tumor volume had reached more than 500 mm^3 , at which time mice had to be euthanized with carbon dioxide.

Statistical Analysis

Quantitative data were expressed as mean \pm SEM from a minimum of 3 experiments. The Dunnett test was used for multiple comparisons of tumor volumes. The cumulative probability of survival was estimated in each group with the Kaplan–Meier survival curve analysis, and the results were compared using the log-rank test. A P value of less than 0.05 was considered statistically significant.

RESULTS

Target-Specific, Dose-Dependent NIR Light-Induced Necrotic Cell Death in Response to Photoimmunotherapy

Fluorescence microscopy was performed to confirm target-specific localization of each conjugate. IR700 was mainly localized to the cell

membrane after 1 h of coincubation on ice and to the lysosomes of PSMA-positive cells at room temperature. When these cells were observed during continuous NIR light exposure, almost immediate swelling, budding, and rupture of the lysosome were observed, leading to irreversible cell death (Fig. 1). PSMA-positive and PSMA-negative cells were coincubated to confirm cell-specific killing. IgG-IR700, Mb-IR700, and Db-IR700 did not localize to PSMA-negative cells, which were not killed by exposure to NIR light (Fig. 1).

To confirm that rapid phototoxic cell death had occurred, we used the LIVE/DEAD assay (Life Technologies), which can detect early cell membrane damage. Death of PSMA-positive cells by photoimmunotherapy with IgG-IR700, Mb-IR700, or Db-IR700

increased in a dose-dependent manner with the intensity of NIR light. No cell death was observed in the absence of IgG-IR700 or Mb-IR700 or in the absence of light, whereas considerable cell death was observed with either unlabeled Db or Db-IR700 without NIR irradiation (Fig. 2A). Cell death by photoimmunotherapy with those IR700 conjugates or unlabeled agents was not observed in PSMA-negative cells (Fig. 2B).

Biodistribution of ^{125}I -IgG, -Mb, or -Db

Results of in vivo biodistribution studies of ^{125}I -IgG, ^{125}I -Mb, and ^{125}I -Db were expressed as percentage injected dose per gram (Supplemental Fig. 1 [supplemental materials are available at <http://jnm.snmjournals.org>]) and as ratios to blood (Fig. 3, left), as a subtraction of PSMA-negative tumor values from PSMA-positive tumor values (Fig. 3, center), and as ratios of PSMA-negative tumor to PSMA-positive tumor (Fig. 3, right). The highest activity was observed in the spleen, kidney, and PSMA-positive tumors. Compared with IgG, Db distributed to the kidney immediately after injection. High radioactivity in the stomach at 6 h after injection suggests rapid catabolism. Clearance of Mb was also much faster than IgG; however, there was no evidence of rapid catabolism.

The peak difference of percentage injected dose per gram between PSMA-positive and -negative tumors was at 1 d after injection for IgG and Mb but was 6 h for Db (Fig. 3, center).

Tumor Growth Inhibition in Response to Photoimmunotherapy

PSMA-positive tumors were treated with photoimmunotherapy using 2 exposures to NIR light at 50 J/cm^2 on the peak time of tumor uptake as shown by biodistribution and at 100 J/cm^2 1 d later. In the case of IgG-IR700 or Mb-IR700, the first light exposure took place at 24 h and the second at 48 h after injection whereas for Db-IR700 the first light exposure took place at 6 h and the second at 24 h after injection.

Tumor growth was significantly inhibited in the photoimmunotherapy treatment groups with IgG-IR700, Mb-IR700, or Db-IR700, and significantly prolonged survival was observed in photoimmunotherapy treatment groups with IgG-IR700 or Mb-IR700 (Fig. 4). No significant therapeutic effect was observed in the group of each agent only, without NIR irradiation (Fig. 4), or in mice with NIR irradiation only, without injection of agent (Supplemental Fig. 2). No significant difference on survival was detected between different agents ($P > 0.05$).

DISCUSSION

Photoimmunotherapy is a highly selective method of killing cancer cells that depends on exposure to NIR light. Typically a full IgG monoclonal antibody is conjugated with the phthalocyanine dye IR700. Approximately 24 h after the injection, when the immunoconjugate is bound to the appropriate cell surface targets, exposure to NIR activates the photosensitizer and selectively kills the cells to which the antibody is bound (5,9-11). Although whole IgGs have the advantage of high input function due to prolonged clearance time from the circulation, antibody fragments such as Dbs and Mbs have theoretic advantages based on their better penetration into tumor, resulting in homogeneous microdistribution. Therefore, this study was conducted to compare the efficacy of photoimmunotherapy using a full antibody and antibody fragments. To determine the optimal binding kinetics of antibody fragments to the PSMA expressed on the cell membrane, we used ^{125}I -labeled

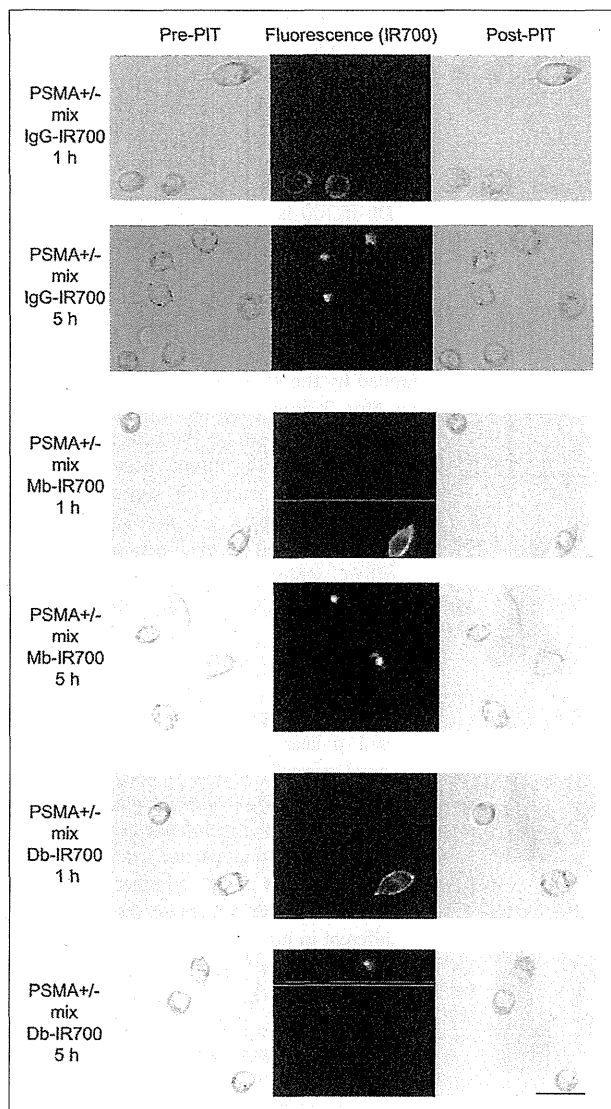


FIGURE 1. Differential interference contrast and fluorescence microscopy of photoimmunotherapy-treated mix of PC3pip (PSMA-positive) and flu (PSMA-negative) cells. Cells were incubated with anti-PSMA antibodies (IgG-IR700), Mbs (Mb-IR700), or Dbs (Db-IR700) at $10 \mu\text{g/mL}$. Just after fluorescence imaging, only PSMA-positive cells demonstrate necrotic cell death (cell budding/rupture). Scale bar = $50 \mu\text{m}$. PIT = photoimmunotherapy.

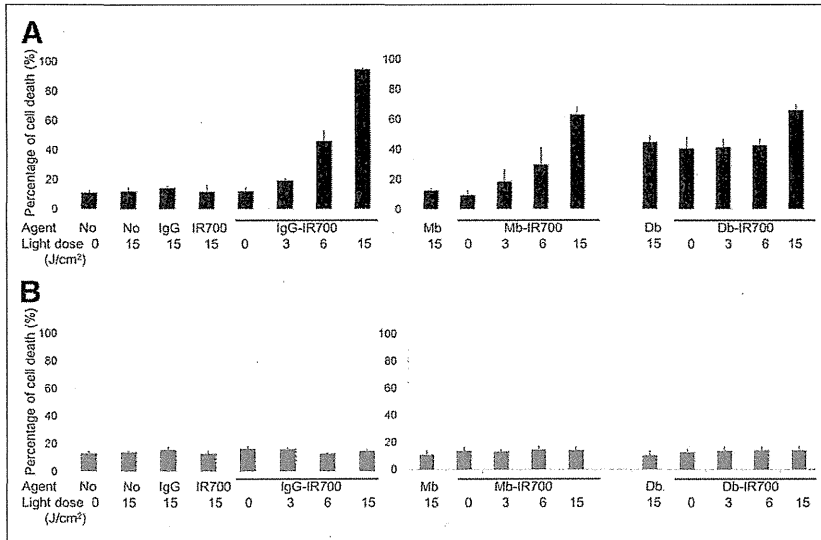


FIGURE 2. Target-specific cell death in response to IgG-, Mb-, or Db-IR700-mediated photoimmunotherapy in PSMA-positive (A) or -negative (B) cells. Target-specific cell death in response to photoimmunotherapy was dose-dependent to intensity of irradiation. Data are mean \pm SEM ($n \geq 3$).

antibody fragments in mice bearing both PSMA-positive and PSMA-negative PC3 tumors. Because radiiodine detaches from the cell when radiolabeled fragments are internalized, we could detect the surface-bound fraction of antibody fragments by comparing

photoimmunotherapy were similar in all 3 groups. The higher input function due to longer clearance time of the larger fragments was likely balanced by the improved microdistribution of the smaller fragments. This 2-time irradiation regimen is considered to improve the efficacy of agent delivery into the tumor, because the first treatment kills tumor cells especially near the vessels, inducing a post-photoimmunotherapy superenhanced permeability and retention effect, which enhances delivery of any macromolecules subsequently administered into the tumor bed (9,11). Therefore, we assessed biodistribution of all agents and adopted the first time point as the peak tumor uptake of ^{125}I and the second as 1 d later when macromolecular intratumoral microdistribution was optimal because of the photoimmunotherapy-induced superenhanced permeability and retention effect (11). The treatment regimen and irradiation timing for Mb and Db might be further optimized in the clinical setting because the clearance is different in humans, compared with mice.

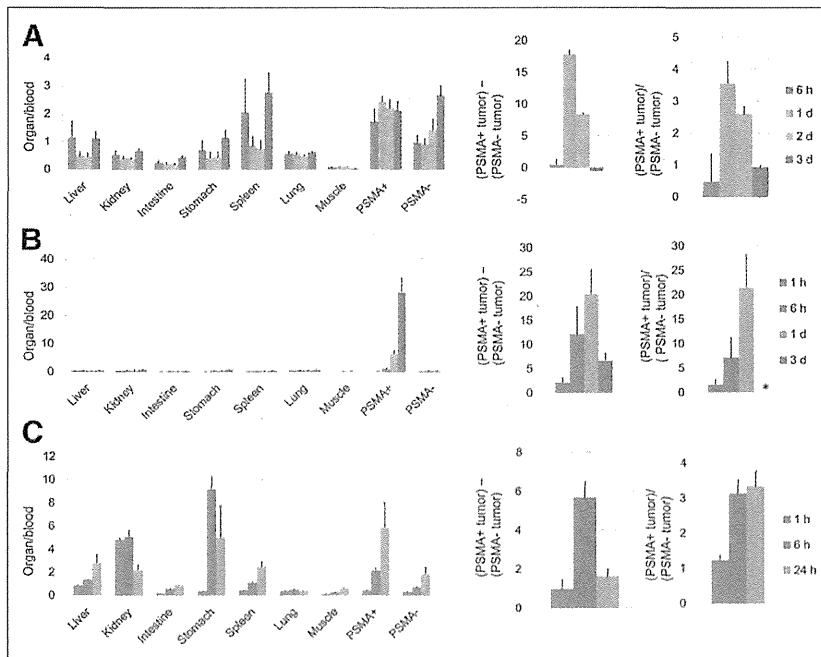


FIGURE 3. Analysis of in vivo biodistribution of radioactivity after injection of ^{125}I -PSMA-IgG (A), Mb (B), or Db (C) into mice bearing PSMA positive (PSMA+) and negative (PSMA-) tumors. Each value was calculated using percentage injected dose per gram of tissue (Supplemental Fig. 1) for each animal and represented as mean \pm SEM ($n = 3-5$): ratios of each organ and tumor to blood (left), subtraction of PSMA-negative tumor from PSMA-positive tumor (center), and ratios of PSMA-positive tumor to PSMA-negative tumor (right). * = value cannot be calculated because some denominators are 0.

PSMA-positive tumor with PSMA-negative controls (12). Although PSMA is internalized rapidly, IR700 bound to cell membrane and photoimmunotherapy effects were similarly confirmed at both 1 and 5 h after coincubation with agents regardless of different internalized amounts of IR700. In addition, the biodistribution data shown in Figure 3 indicated that the optimal binding time for PSMA-targeted molecules based on Db, Mb, and IgG was at 6, 24, and 24 h after injection, respectively. Therefore, for Db-IR700 conjugates NIR exposure in PSMA-positive PC3 tumor-bearing mice was performed at 6 and 24 h, whereas Mb-IR700 and IgG-IR700 conjugates required NIR exposure at 24 and 48 h after injection in the same model. Although all conjugates produced comparable cell killing with photoimmunotherapy, the early treatments with Db-IR700 is a comparative advantage for this antibody fragment. Despite different accumulation doses of the 3 conjugates, growth suppression effects induced by photoimmunotherapy were similar in all 3 groups. The higher input function due to longer clearance time of the larger fragments was likely balanced by the improved microdistribution of the smaller fragments. This 2-time irradiation regimen is considered to improve the efficacy of agent delivery into the tumor, because the first treatment kills tumor cells especially near the vessels, inducing a post-photoimmunotherapy superenhanced permeability and retention effect, which enhances delivery of any macromolecules subsequently administered into the tumor bed (9,11). Therefore, we assessed biodistribution of all agents and adopted the first time point as the peak tumor uptake of ^{125}I and the second as 1 d later when macromolecular intratumoral microdistribution was optimal because of the photoimmunotherapy-induced superenhanced permeability and retention effect (11). The treatment regimen and irradiation timing for Mb and Db might be further optimized in the clinical setting because the clearance is different in humans, compared with mice.

As shown in Figure 1, target-specific necrotic cell death was similar in all 3 groups at 1 and 5 h after incubation. The Db-IR700 conjugate showed greater selective cytotoxicity to PSMA-positive cells than PSMA-negative cells even without exposure of NIR light at 5 h after incubation as shown in Figure 2. However, in vivo cytotoxicity of Db-IR700 conjugate by itself was not observed, and cell killing was seen only with NIR exposure. We assessed cytotoxicity of Db and Db-IR700 and found that both had dose-related cytotoxicity and the

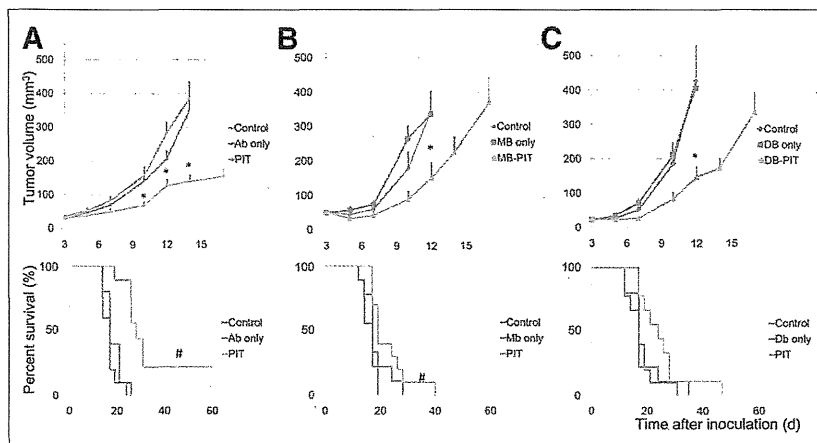


FIGURE 4. Tumor volume and survival curves of PSMA-positive tumor-bearing mice. Mice were randomized to 1 of 3 groups at 3 d after tumor cell injection ($n = 9-10$). IgG-IR700 (A), Mb-IR700 (B), or Db-IR700 (C) was injected, and photoimmunotherapy was performed at 1 and 2 d after injection for IgG-IR700 or Mb-IR700 and at 6 h and 1 d after injection of Db-IR700. Mice were observed until tumor volume reached more than 500 mm³, at which time mice had to be euthanized. * $P < 0.05$ vs. control, Dunnett multiple-comparison test. # $P < 0.05$ vs. control, log-rank test. Ab = antibody.

LD50 (the lethal dose for 50% [cell] death) was approximately 1–3 $\mu\text{g/mL}$ (data not shown), at which level Db saturated cell surface PSMA molecules. However, considering the rapid *in vivo* clearance of Db, the actual concentration of Db-IR700 in tumor cells *in vivo* is likely to be far lower than this level. Therefore, all cytotoxicity that was shown *in vivo* required activation by NIR light exposure.

Inaccessibility of light to deep organs is a limitation of photoimmunotherapy even with NIR light; however, many tumors such as prostate cancer recurrences or regional lymph nodes would be amenable to photoimmunotherapy using laparoscopic probes. Although a light-emitting diode was used in this study, laser light also can be used and is more effective. Laser can be applied to endoscopy; therefore, photoimmunotherapy might be effective for treatment of disseminated tumor cells or tiny recurrences after surgery.

CONCLUSION

We demonstrate that equally effective photoimmunotherapy can be obtained with both full antibodies and antibody fragments. Because the pharmacokinetics of smaller fragments (e.g., Dbs) are faster, photoimmunotherapy can be initiated at a shorter time interval after smaller fragment injection than with larger fragments and intact antibodies, and this feature may have advantages in clinical translation of photoimmunotherapy. Therefore, the use of Db-IR700 conjugate can minimize the time interval between injection and NIR exposure without compromising the therapeutic effects of photoimmunotherapy despite inferior accumulation of the agent.

DISCLOSURE

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. Therefore, and solely to indicate this fact, this article is hereby marked “advertisement” in accordance with 18 USC section 1734. This research was supported by

the Intramural Research Program of the National Institutes of Health, National Cancer Institute, Center for Cancer Research. This project has been funded in whole or in part with federal funds from the National Cancer Institute, National Institutes of Health, under Contract No. HHSN261200800001E. The content of this publication does not necessarily reflect the views or policies of the Department of Health and Human Services, nor does mention of trade names, commercial products, or organizations imply endorsement by the U.S. Anna M. Wu is a shareholder and consultant to ImaginAb, Inc. The Regents of the University of California have licensed intellectual property to ImaginAb and have taken equity as part of the licensing transaction. No other potential conflict of interest relevant to this article was reported.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Drs. Derek Bartlett, Christian P. Behrenbruch, and Jean Gudas at ImaginAb Inc. for their technical and administrative assistances.

REFERENCES

1. Waldmann TA, Morris JC. Development of antibodies and chimeric molecules for cancer immunotherapy. *Adv Immunol.* 2006;90:83–131.
2. Alley SC, Okeley NM, Senter PD. Antibody–drug conjugates: targeted drug delivery for cancer. *Curr Opin Chem Biol.* 2010;14:529–537.
3. Pastan I, Hassan R, Fitzgerald DJ, Kreitman RJ. Immunotoxin therapy of cancer. *Nat Rev Cancer.* 2006;6:559–565.
4. Sharkey RM, Goldenberg DM. Cancer radioimmunotherapy. *Immunotherapy.* 2011;3:349–370.
5. Mitsunaga M, Ogawa M, Kosaka N, Rosenblum LT, Choyke PL, Kobayashi H. Cancer cell-selective *in vivo* near infrared photoimmunotherapy targeting specific membrane molecules. *Nat Med.* 2011;17:1685–1691.
6. Wu AM, Senter PD. Arming antibodies: prospects and challenges for immunoconjugates. *Nat Biotechnol.* 2005;23:1137–1146.
7. Sano K, Mitsunaga M, Nakajima T, Choyke PL, Kobayashi H. *In vivo* breast cancer characterization imaging using two monoclonal antibodies activatably labeled with near infrared fluorophores. *Breast Cancer Res.* 2012;14:R61.
8. *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals.* Washington, DC: National Academy Press; 1996.
9. Mitsunaga M, Nakajima T, Sano K, Choyke PL, Kobayashi H. Near-infrared theranostic photoimmunotherapy (PIT): repeated exposure of light enhances the effect of immunoconjugate. *Bioconjug Chem.* 2012;23:604–609.
10. Nakajima T, Sano K, Choyke PL, Kobayashi H. Improving the efficacy of Photoimmunotherapy (PIT) using a cocktail of antibody conjugates in a multiple antigen tumor model. *Theranostics.* 2013;3:357–365.
11. Sano K, Nakajima T, Choyke PL, Kobayashi H. Markedly enhanced permeability and retention effects induced by photo-immunotherapy of tumors. *ACS Nano.* 2013;7:717–724.
12. Kobayashi H, Kao CH, Kreitman RJ, et al. Pharmacokinetics of ¹¹¹In- and ¹²⁵I-labeled antiTac single-chain Fv recombinant immunotoxin. *J Nucl Med.* 2000;41:755–762.



The Journal of
NUCLEAR MEDICINE

Photoimmunotherapy Targeting Prostate-Specific Membrane Antigen: Are Antibody Fragments as Effective as Antibodies?

Rira Watanabe, Hirofumi Hanaoka, Kazuhide Sato, Tadanobu Nagaya, Toshiko Harada, Makoto Mitsunaga, Insook Kim, Chang H. Paik, Anna M. Wu, Peter L. Choyke and Hisataka Kobayashi

J Nucl Med. 2015;56:140-144.

Published online: December 11, 2014.

Doi: 10.2967/jnumed.114.149526

This article and updated information are available at:
<http://jnm.snmjournals.org/content/56/1/140>

Information about reproducing figures, tables, or other portions of this article can be found online at:
<http://jnm.snmjournals.org/site/misc/permission.xhtml>

Information about subscriptions to JNM can be found at:
<http://jnm.snmjournals.org/site/subscriptions/online.xhtml>

The Journal of Nuclear Medicine is published monthly.
SNMMI | Society of Nuclear Medicine and Molecular Imaging
1850 Samuel Morse Drive, Reston, VA 20190.
(Print ISSN: 0161-5505, Online ISSN: 2159-662X)

© Copyright 2015 SNMMI; all rights reserved.

The logo for the Society of Nuclear Medicine and Molecular Imaging (SNMMI) features the letters 'SNMMI' in a stylized, blocky font, with 'SNM' stacked above 'MI'. To the right of the logo, the full name of the society is written in a smaller, sans-serif font.

SOCIETY OF
NUCLEAR MEDICINE
AND MOLECULAR IMAGING

A Pilot Study of Fluorescent Imaging of Colorectal Tumors Using a γ -Glutamyl-Transpeptidase-Activatable Fluorescent Probe

Chiko Sato^{a,e} Seiichiro Abe^a Yutaka Saito^a Eriko So Tsuruki^a
Hiroyuki Takamaru^a Makomo Makazu^{a,e} Yoshinori Sato^a Hayato Sasaki^a
Hirohito Tanaka^a Nobuaki Ikezawa^a Masayoshi Yamada^a Taku Sakamoto^a
Takeshi Nakajima^a Takahisa Matsuda^a Ryoji Kushima^b Mako Kamiya^c
Shin Maeda^f Yasuteru Urano^{c,d}

^aEndoscopy Division and ^bPathology Division, National Cancer Center Hospital, ^cLaboratory of Chemical Biology and Molecular Imaging, Graduate School of Medicine, The University of Tokyo, and ^dBasic Research Program, Japan Science and Technology Agency (JST), Tokyo, ^eGastroenterological Center, Yokohama City University Medical Center, and ^fDepartment of Gastroenterology, Yokohama City University Graduate School of Medicine, Yokohama, Japan

© S. Karger AG, Basel
PROOF Copy
for personal
use only

ANY DISTRIBUTION OF THIS
ARTICLE WITHOUT WRITTEN
CONSENT FROM S. KARGER
AG, BASEL IS A VIOLATION
OF THE COPYRIGHT.

Key Words

Activatable fluorescent probe · Colorectal tumor · Fluorescent imaging · γ -Glutamyl hydroxymethyl rhodamine green · γ -Glutamyl-transpeptidase

Abstract

Backgrounds/Aim: Colorectal laterally spreading tumors (LSTs) are sometimes difficult to visualize even with image-enhanced endoscopy. γ -Glutamyl-transpeptidase (GGT) is a cell surface-associated enzyme that is overexpressed in various types of human cancers. Furthermore, GGT expression is higher in colorectal cancer cells than in normal colorectal mucosa. γ -Glutamyl hydroxymethyl rhodamine green (gGlu-HMRG), an activatable fluorescent probe, is nonfluorescent under a neutral pH and normal cellular environment; however, it turns highly fluorescent upon reaction with GGT. We evaluated ex vivo fluorescent imaging of colorectal LSTs using this GGT-activatable fluorescent

probe. **Methods:** Between March 2013 and March 2014, 30 endoscopically resected colorectal LSTs were prospectively included in this study. Each was analyzed by first taking a baseline image before spraying, then spraying with gGlu-HMRG onto the freshly resected specimen, and finally taking fluorescent images 15 min after spraying with a dedicated imaging machine. **Results:** Of the LSTs, 67% rapidly showed positive fluorescent activity. These activities were shown in adenoma (54%) and carcinoma in adenoma (76%), and in LST-granular type (80%) and LST-nongranular type (40%). **Conclusion:** Topically spraying gGlu-HMRG enabled rapid and selective fluorescent imaging of colorectal tumors owing to the upregulated GGT activity in cancer cells.

© 2015 S. Karger AG, Basel

KARGER 125

© 2015 S. Karger AG, Basel
0012-2823/15/0911-0070\$39.50/0

E-Mail karger@karger.com
www.karger.com/dig

Yasuteru Urano, PhD
Laboratory of Chemical Biology and Molecular Imaging
Graduate School of Medicine, The University of Tokyo
7-3-1 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-0033 (Japan)
E-Mail uranokun@m.u-tokyo.ac.jp

Seiichiro Abe, MD
Endoscopy Division
National Cancer Center Hospital
5-1-1 Tsukiji, Chuo-ku, Tokyo 104-0045 (Japan)
E-Mail seabe@ncc.go.jp

Introduction

Currently, screening colonoscopy is widely accepted as the gold standard for colorectal cancer detection [1–3]. Indeed, early detection of polyps and their subsequent endoscopic removal are the best ways to reduce colorectal cancer mortality [1–3]. Various image-enhanced endoscopy techniques, such as chromoendoscopy [4, 5], narrow-band imaging [6, 7], autofluorescence imaging [8] and confocal laser endomicroscopy [9], have improved the detection and characterization of colorectal neoplasms. However, laterally spreading tumors (LSTs) are still difficult to detect with such modalities [10–14]. LST-nongranular type (LST-NG) is particularly difficult to visualize even with a large tumor size, which has a higher potential risk of lymph node metastasis and should be treated by endoscopic submucosal dissection (ESD) [14–16].

Optical fluorescence molecular imaging has been investigated for optically guided surgery and endoscopy [17]. γ -Glutamyl-transpeptidase (GGT) is a cell surface-associated (or -bound) enzyme involved in cellular glutathione homeostasis, and is considered to play a role in tumor progression, invasion and drug resistance [18]. GGT is poorly expressed in normal tissue, but overexpressed in vivo on the cell surface membrane of various cancer cells, such as cervical and ovarian cancers [19–21].

Urano et al. [22] developed an enzymatically activatable fluorescent probe, γ -glutamyl hydroxymethyl rhodamine green (gGlu-HMRG) in vivo, which originated from the fluorophore rhodamine green that became fluorescent after cleavage of a GGT-specific sequence. gGlu-HMRG is nonfluorescent under neutral pH and a normal cellular environment with low GGT activity. When gGlu-HMRG reacts with GGT on the surface of a cancer cell, gGlu-HMRG is promptly hydrolyzed and transformed into HMRG, showing strong fluorescence, and permeates the plasma membrane and accumulates in the lysosomes of cancer cells. Furthermore, topically spraying gGlu-HMRG could provide immediate and specific enhancement of the cells overexpressing GGT [22, 23]. Therefore, this activatable fluorescent probe may be a new modality for cancer-selective fluorescent imaging. However, only limited data from mice models have been reported [22–24]. We assumed that gGlu-HMRG might be applied to the visualization of a superficial colon neoplasm with high GGT activity, leading us to conduct this pilot study [25]. The study aimed to evaluate ex vivo fluorescent imaging of colorectal tumors using the GGT-activatable fluorescent probe.

Materials and Methods

Lesion Inclusion Criteria

Between March 2013 and March 2014, a total of 30 endoscopically resected LSTs at the National Cancer Center Hospital in Tokyo, Japan, were prospectively included in this study. Clinical macroscopic type was divided into LST-granular type (LST-G) and LST-NG. LST-G is defined by the presence of aggregates of even or uneven nodules on the surface, and LST-NG has a smooth surface lacking granular formations [26, 27]. The right-side colon was defined as including the lesions located in the cecum, ascending colon and transverse colon. The left-side colon was defined as a descending colon and sigmoid colon.

Imaging Method of Fluorescent Imaging

We used a handheld fluorescent imaging machine (Discovery; INDEC Inc., Santa Clara, Calif., USA) which could provide the still images under white light and 450–490 nm of blue excitation light (fig. 1a). The freshly resected specimens were quickly fixed on a black board and baseline images were obtained before spraying gGlu-HMRG by blue light and white light with the Discovery machine. Then, 1,000 μ l of gGlu-HMRG in a concentration of either 50 or 500 μ M were topically sprayed onto the resected specimen. We first used gGlu-HMRG in a concentration of 500 μ M based on previous reports, and then modified this to 50 μ M [22–24]. After spraying, fluorescent images were subsequently taken every 30 s for 15 min.

Assessment of Fluorescent Image with gGlu-HMRG

The fluorescent images were evaluated by three endoscopists. The fluorescent activity was determined to be positive when the lesion was illuminated after spraying gGlu-HMRG compared with the baseline image, even if the illumination was partial or heterogeneous. The activity was determined to be negative if the illumination showed no difference from that of the baseline image.

Histopathological Assessment

After fluorescent imaging all resected specimens were fixed in 10% buffered formalin and cut into 2-mm slices. These specimens were embedded in paraffin, cut into 3- μ m sections, stained with hematoxylin and eosin, and microscopically examined for histopathological diagnosis. Experienced gastrointestinal pathologists assessed the macroscopic and histological type, tumor size, depth of invasion, lymphovascular invasion and resected margin according to the Japanese Classification of Colorectal Carcinoma [28]. The pathological findings were evaluated with the nonneoplastic, adenomatous or cancerous area, and the distribution of the adenoma and/or cancer was shown on the mapping. We evaluated the consistency between the illuminated area in the fluorescent image and the tumor extension in the pathological mapping.

Results

Clinicopathological Features

The mean age was 68 ± 7 years and the study included 15 male and 15 female patients. The mean tumor size was 39 ± 13 mm, 20 were LST-G and 10 were LST-NG macroscopic type. Thirteen lesions were diagnosed as adenoma and 17 were diagnosed as carcinoma in adenoma (table 1).