

学内グラント 報告書

平成24年度 学内グラント終了時報告書

食道扁平上皮癌の拡大，超拡大内視鏡観察と分子生物学との関連

研究代表者 熊谷 洋一（総合医療センター 消化管・一般外科）

緒 言

食道領域の拡大内視鏡観察は1) 約100倍程度での微細血管形態の検討と2) 400-1000倍での細胞の観察に大きく分けられる。100倍での観察では，正常重層扁平上皮で観察される終末毛細血管である上皮乳頭内ループ状毛細血管（Intra-papillary capillary loop (IPCL)）が，癌の深達度により特徴的に変化することが報告された。すなわち，M1，M2癌のIPCLは健常部に比較して拡張と延長が観察され，M3癌（粘膜筋板浸潤）以深では，腫瘍表層に錯綜する新生血管が観察されるようになる（図1）。拡大内視鏡観察による血管形態の変化は現在食道癌深達度診断の重要なツールとなっているがこの変化は食道癌の発癌初期の血管新生そのものを観察するものである。我々はこの点に注目し，組織像と血管新生因子との相関を文献的に考察し報告してきた。

また，我々はオリンパスメディカルシステムズとの共同研究により細胞形態の観察が可能なEndocytoscopy system（以下ECS）を開発した。現在までに，プローブタイプ（XEC300F：450倍，XEC120U：1125倍），2眼式一体型（Y0001：450倍），連続拡大（Y0002：380倍）と3種類のプロトタイプがオリンパス社により開発されている。プローブタイプ，2眼式一体型では主に食道癌症例で検討を行った。食道癌部で正常部と比較して著明な核密度の上昇と核異型（核の大小不同，色素での染色性の不同，N/C比の上昇）が観察された（図2）。病理医は，1125倍のECS観察で84%の症例で生検省略可能と診断した。現在の連続拡大ECSは，スコープの細径化がはかられスクリーニング内視鏡として使用可能となった。

方 法

血管新生の研究には2005年1月から2012年8月の間に埼玉医科大学総合医療センター消化管・一般外科，消化器・肝臓内科を受診し食道を切除された症例（手術，内視鏡治療），内視鏡検査中に生検病理診断を

行った症例を対象とした。正常食道9例，食道炎10例，Low grade intraepithelial neoplasia (LGIN) 7病変，M1食道癌12病変，M2 7病変，M3 7病変，SM1 5病変，SM2 3病変，SM3 12病変をCD105抗体を用い免疫染色を行いMicrovessel densityを測定した。CD105抗体はabcam社 ab66947を40倍に希釈し，ニチレイを用いAC121度15分，EDTA buffer pH8.0抗体反応時間15分で行った。病理医1名，外科医1名が同一視屋を鏡見し，それぞれ微細血管数を計測した。低倍率でCD105陽性血管の密な部分を特定し200倍，400倍で血管数を計測した。非腫瘍（正常，食道炎），境界病変（LGIN），M1，M2癌，M3以深癌の4群にわけて検討した。

生体内細胞観察にはオリンパス社試作のECSであるGIF-Y0002（380倍）を使用した。これに内視鏡本体内蔵のデジタルズーム機能を用い約600倍で観察を行った。対象は2012年5月より2012年10月まで埼玉医科大学総合医療センター消化管・一般外科にて内視鏡検査を受けた22例（食道癌9例，食道炎12例（GERD：7例，放射線性食道炎：5例），正常1例）を対象とした。細胞の観察には生体内染色生体染色が必要であり，2%トルイジンブルーを使用し5 ml程を散布し観察した。1名の内視鏡医がECS観察を行い，ECS画像をType 0：ヨードで染色される。核密度の多寡は問わない。Type1：ヨードで不染もしくは淡染，ECSでは正常細胞（N/C比低く核異型なし），Type2：ヨードで不染もしくは淡染，ECSで核密度は高いが核異型がない。Type3：ヨード不染であり，ECSで核密度が高く核異型ありに分類した。内視鏡医はECS画像をタイプ分類し，1名の病理医に通常内視鏡像をブラインドとしECS画像のみで“良悪性”が判定可能かコンサルトした。

結 果

CD105免疫染色

正常食道粘膜ではCD105陽性血管はほぼ認めず，食道炎，LGIN，M1M2食道癌では粘膜固有層，上皮

乳頭内にCD105陽性血管をみとめた。粘膜筋板以深に浸潤した癌では癌胞巣を取り囲むように間質内にCD105陽性血管を多数認めた。表1に200倍, 400倍にての各群でのMicrovessel densityを示す。CD105陽性血管のMicrovessel densityは非腫瘍において200倍にて中央値1.0, 400倍においても1.0であった。境界病変では7.0, 3.0, M1, M2癌では19.0, 7.0, M3以深癌

では20.0, 10.0であり悪性度, 深達度が進行するに伴い有意に増加していた。

生体内細胞観察

正常食道粘膜では表層から2-3層までの舟形の扁平上皮細胞が敷石状に整然と配列し, 淡染する細胞質と濃染する核が描出される。描出される核は色素による染色性, 形状は均一でありN/C比は低かった。

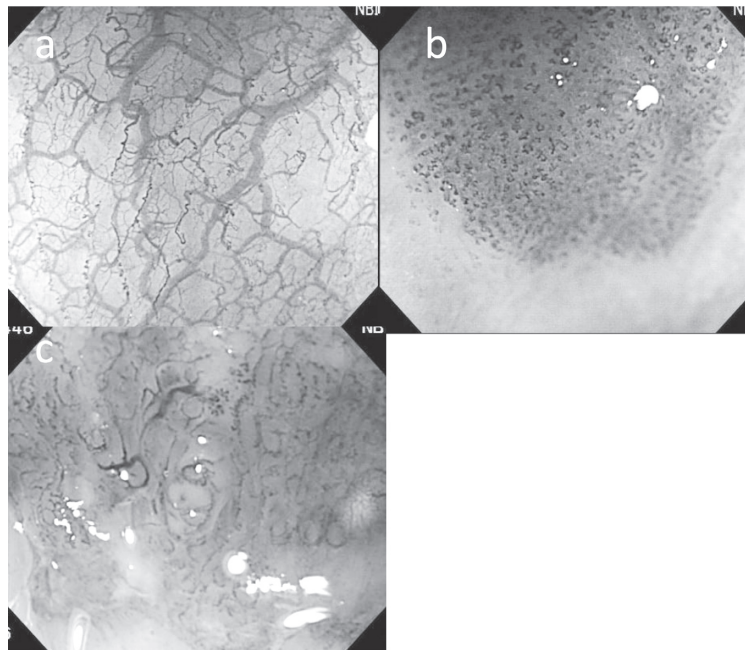


図 1-1. 100倍拡大内視鏡による食道の観察. a: 正常食道粘膜. 樹枝血管網とIPCLが観察される. b: M2食道癌. 正常のIPCLと比較し拡張したIPCL様血管の増生を認める. c: SM食道癌. IPCL様血管は消失し新生血管で置換されている。

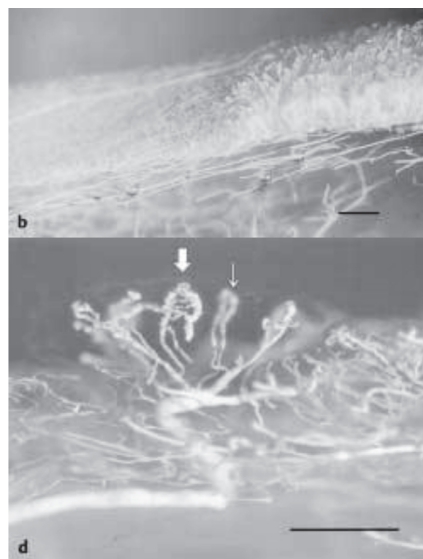


図 1-2. MICROFIL注入後の食道癌の血管像. 上: M2癌(断面像). 下: M3癌(断面像)太い矢印が新生血管。

食道癌症例では全例で正常食道粘膜と比べ核密度の上昇が確認された。核の形状，色素での染色性は不同であり核異型が観察された(図3)。食道癌では内視鏡医は，Type3：88.9% (8/9)，Type2-3：11.1% (1/9)と判定し，感度100%であった。良性病変の検討ではType1もしくは2と診断したものが12/13(特異度92.3%)であった。病理医の判定では，食道癌では9/9(感度100%)で悪性と判定し，良性病変の9/13(特異度69.2%)をECS画像より良性と診断した。

放射線性食道炎の1例は内視鏡医，病理医ともに悪性を示唆した。また病理医はほかに放射線性食道炎2例，GradeDのGERD1例を悪性と診断した。

考 察

食道の100倍での拡大内視鏡観察はその微細血管網

に着目し，組織学的悪性度や癌の深達度と血管形態が良く相関することが示されてきた。しかし，現在の拡大内視鏡観察は深達度診断にのみ使用されており，腫瘍の発育進展や発癌早期の血管新生の観点から議論されることはなかった。今回我々はCD105抗体を用い免疫染色することで腫瘍血管の血管密度を計測した。Endoglin/CD105は上皮細胞増殖の最も信用できるマーカーであり腫瘍血管で強発現することが知られている。

これまで，正常食道で観察されるIPCLに注目しM1，M2癌で観察される表層の微細血管は既存のIPCLが拡張し延長したものであると考えられてきた。しかし，詳細に拡大内視鏡観察を行うと食道癌部ではIPCLの密度が増えている。上皮乳頭は正常食道の既存の構造であるからIPCLの密度が増えるのであれば，

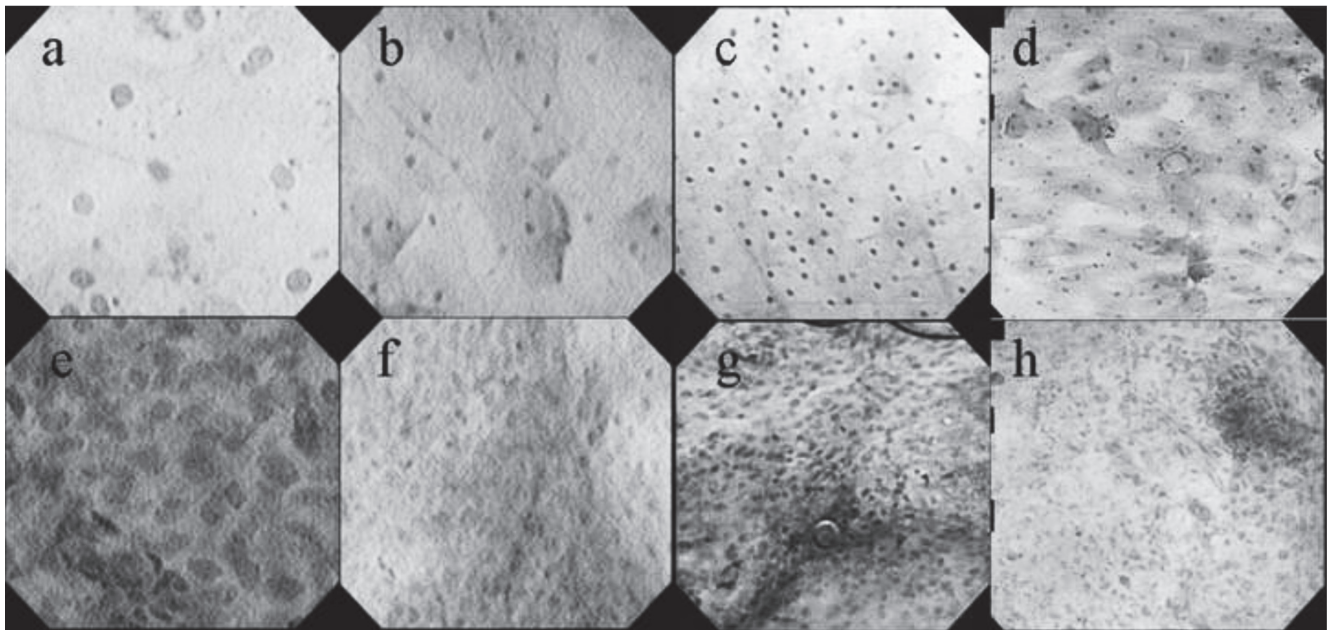


図2. 生体内での正常食道，食道癌のECS像。a～d：正常食道粘膜，e～h：食道癌。a，e：XEC120U(1125倍)，b，f：XEC300F(450倍)，c，g：Y0001(450倍)，d，h：Y0002(380倍)。

表1. CD105抗体を用いたMicrovessel density (MV)

	n	X200		X400	
		MV(Median(range))	P	MV(Median(range))	P
非腫瘍	22	1.0 (0-15)		1.0 (0-6)	
境界病変	7	7.0 (0-16)	0.05	3.0 (0-9)	0.04
M1M2癌	19	13.0(3-19)	0.03	7.0 (2-13)	0.02
M3以深癌	27	20.0(4-65)	<0.01	10.0(3-33)	<0.01

それは正常食道のIPCLが変化したものの他に新たな血管が誘導されていると考えなくてはならない. Kubotaらは, CD105抗体で正常食道, 細胞異型のないヨード不染帯(≡食道炎), low grade intraepithelial neoplasia (LGIN), high grade intraepithelial neoplasia (HGIN)を染色し, 特に上皮乳頭内に存在する微細血管についてmicrovessel density (MVD)を計測した. それによると, CD105陽性血管(腫瘍血管)は食道炎から出現しており, LGIN, HGINと異型度が増すにつれCD105陽性血管のMVDは上昇するとしている. 今回の我々の検討でも同様に食道癌の拡大内視鏡で観察される上皮乳頭内に存在する多くの微細血管は既存のIPCLの変化したものだけではなくCD105陽性の新たに誘導された血管が存在することが判明した. この各深達度におけるCD105陽性血管のプロファイルは未だ報告はない. 我々は文献的考察より「食道癌の多段階血管新生」という概念を提唱してきた. すなわち, 血管新生のスイッチは前癌病変もしくは炎症の段階でONになっており, 粘膜癌までは程度の差はあれおおむね同様の炎症性の血管新生因子で血管が誘導されている. 粘膜下層に癌が浸潤して初めてVEGFを中心とする血管新生因子が誘導され, 新生血管(いわゆる腫瘍血管)が出現する. よってこの段階にも第2のスイッチがあると思われる.

今回の検討はCD105抗体のみの検討であるが, 腫瘍の悪性度深達度がますますつれてCD105陽性血管(腫瘍血管)は有意に増加することが判明した. 今後さらに

第Ⅷ因子陽性血管との関係, また各種血管新生因子発現との関係を免疫染色にて検討していくことで前癌病変, 発癌早期の血管新生のプロファイルを作成し我々の提唱する概念の裏付け作業を行う予定である.

ECSによる生体内細胞観察の目的は生検組織診断の省略である. 我々は研究協力者の田久保らと生体内でのECS画像を検討し, 第1世代ECSである1125倍での食道癌症例の観察で84%の症例でECS画像のみで生検組織診断を省略できるとの結論に達した. このECS観察は表層1~2層の細胞の情報しか得られないために従来の病理組織学とは全く異なる新しい組織学を構築する必要がある.

連続拡大ECSでは380倍と従来モデルより低倍率ではあるが細径化され, 簡便に超拡大が行えるようになりスクリーニングに使用可能で非癌病変の観察にも使用できる. 今回の検討では内視鏡医による癌, 非癌の判別能はSensitivity: 100%, Specificity: 92.3%と良好であったが, 通常内視鏡観察所見をblindにした病理医の判定ではsensitivity: 100%, specificity: 69.2%であり食道炎, LGINの約1/3を悪性と判定していた(表2, 3). 非癌病変であっても著明な核密度の上昇を示す症例が存在し, 核異型の診断が必須となる. 現在の380倍ECSではデジタルズーム機能を用い600倍まで拡大しても画質の問題から核密度の情報は良好に得られるが核異型の情報が少ないためと判断される. 核異型を診断できる倍率の設定と機器の改良が今後の課題である.

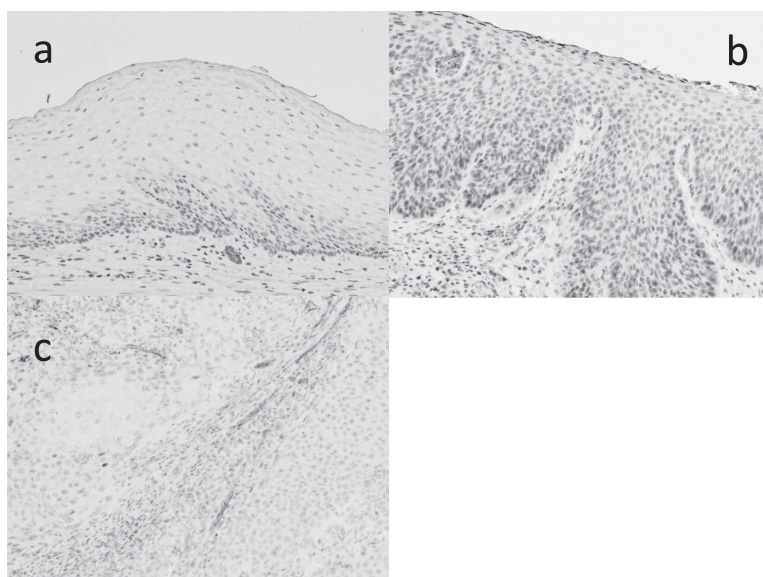


図3. CD105抗体での免疫染色像(x200). a: 正常食道粘膜. CD105陽性血管は認めない. b: M2食道癌. 上皮乳頭内にCD105陽性血管が侵入している. c: SM食道癌. 癌間質に腫瘍胞巣を取り巻くようにCD105陽性血管が分布している.

表 2. x600 GIF-Y0002を用いた食道病変のECS診断(内視鏡医診断)

Type classification	Normal	Esophagitis	SCC	Total
Type 0				0
Type 1	1	4		5
Type 2		7		7
Type 2 or 3			1	1
Type 3		1	8	9
Total	1	12	9	

SCC: squamous cell carcinoma

Sensitivity: 100%, Specificity: 92.3%

表 3. x600 GIF-Y0002を用いた食道病変のECS診断(病理医診断)

ECS diagnosis	Normal	Esophagitis	SCC	Total
Non-neoplastic	1	8		9
Neoplastic		4	9	13
Total	1	12	9	22

SCC: squamous cell carcinoma

Sensitivity: 100%, Specificity: 69.2%

分担執筆

- 1) 熊谷洋一, 川田研郎, 山崎繁, 飯田道夫, 河野辰幸, 田久保海誉. 田久保海誉, 大橋健一編. 第4部臨床との連携 新しい技術について－Endocytoscopy system (in vivo 内視鏡病理診断)の可能性－. 腫瘍病理鑑別診断アトラス食道癌, 東京: 文光堂; 2012. p. 190-7.

原著

- 1) Kumagai Y, Kawada K, Yamazaki S, Iida M, Odajima H, Ochiai T, Kawano T, Takubo K. Current status and limitations of the newly developed endocytoscope GIF-Y0002 with reference to its diagnostic performance for common esophageal lesions. J Dig Dis 2012;13:393-400.
- 2) 熊谷洋一, 戸井雅和, 石畝亨, 川田研郎, 石田秀行, 河野辰幸. 【食道癌の発育進展－初期浸潤の病態と診断】血管新生の見地からみた食道癌の発育進展. 胃と腸 2012;47:1428-34.
- 3) 熊谷洋一, 戸井雅和, 川田研郎, 河野辰幸. 表在食道癌の血管新生: 拡大内視鏡観察と分子生物学との関連. 日本消化器内視鏡学会雑誌 2012;54:2062-72.

学会発表

- 1) 熊谷洋一, 川田研郎, 石田秀行, 河野辰幸, 田久保海誉. エンドサイトスコープシステム開発の経緯と現状, 第83回日本消化器内視鏡学会総会, 2012年5月14日, 東京, ビデオシンポ
- 2) 熊谷洋一, 川田研郎, 芳賀紀裕, 石畝亨, 石橋敬一郎, 隈元謙介, 山崎繁, 石田秀行, 河野辰幸, 田久保海誉. エンドサイトスコープシステム (GIF-Y0002) による食道病変の観察, 第66回日本食道学会総会, 2012年6月21日, 長野
- 3) 熊谷洋一, 戸井雅和, 石畝亨, 芳賀紀裕, 隈元謙介, 石橋敬一郎, 桑原公亀, 大澤智徳, 岡田典倫, 石田秀行. 食道癌発癌早期の多段階血管新生 (拡大内視鏡と分子生物学との関連), 第67回日本消化器外科学会総会, 2012年7月20日, 富山
- 4) 熊谷洋一, 川田研郎, 石畝亨, 芳賀紀裕, 石橋敬一郎, 馬場裕之, 隈元謙介, 河野辰幸, 田久保海誉. デジタルズーム機能を用いたエンドサイトスコープシステム (GIF-Y0002) による食道病変の観察, 第85回日本消化器内視鏡学会総会, 2013年5月10日, 京都