

199. 共焦点内視鏡による消化管粘膜下腫瘍の生体内病理観察

大谷 友彦

東京慈恵会医科大学 内視鏡科

Key words : 共焦点レーザー顕微内視鏡, 胃粘膜下腫瘍

緒言

消化管粘膜下腫瘍 (submucosal tumor: SMT) には良性腫瘍と gastrointestinal stromal tumor (GIST) 等の臨床的悪性度の高い腫瘍が混在している。日本や欧州では、その悪性度を考慮して、病理組織学的に GIST と診断された場合は小病変であっても手術適応とされている¹⁾。しかしながら、多くの SMT は半球状を呈し、健常粘膜に被覆されているため形態的な組織型の鑑別は困難な上、掘削生検による組織採取率が極めて限定的であった。近年、endoscopic ultrasound-guided fine needle aspiration (EUS-FNA) が普及したことで SMT の組織採取率は 7-9 割程度まで改善したが²⁾、超音波内視鏡専用器は太く、先端硬性部が長いために SMT の局在部位によってはアプローチが不可能な場合もある。また、小病変では針穿刺が技術的に極めて困難であり、盲目的穿刺に伴う出血や、サンプリングエラーによる偽陰性など解決困難な課題も多く、より安全で信頼性の高い病理組織診断法の確立が急務である。

近年、共焦点レーザー顕微鏡を、軟性内視鏡に適合するよう小型細径化した共焦点レーザー顕微内視鏡 (confocal laser endomicroscopy) が開発され、本邦でも内視鏡の鉗子孔から挿入可能なプローブタイプ (probe-based CLE: pCLE) が薬事承認された。CLE の拡大倍率は 400-1000 倍であり、リアルタイムに生体内組織観察を可能とする新たな診断機器として注目され、既に胃癌やバレット腺癌、胆管腫瘍の診断において有用性が報告されている³⁾。これまで、我々は粘膜下層内に作成したトンネルを介して、内視鏡の消化管壁深部へのアプローチを可能にする技術 (submucosal endoscopy with mucosal safety flap valve: SEMF) を用いて、pCLE による筋層や筋間神経叢など、消化管壁深部の生体内組織観察に成功し、その実現可能性を報告してきた⁴⁾。

pCLE は小型かつ柔軟であるため、通常内視鏡でアプローチ可能な部位であれば、内視鏡の鉗子孔を介して全てを観察対象とすることができる。SEMF と組み合わせることで SMT の診断に際して EUS-FNA の施行が困難な局在や、小病変であっても顕微内視鏡観察が可能となると考えられた。今回の研究では、胃粘膜下腫瘍症例における切除検体を用いた *ex vivo* での検討、および、胃 SMT を有する患者において、SEMF によるアプローチ下での pCLE を用いた生体内組織観察を試みたため、その結果について報告する。

方法

対象・期間：2015 年 3 月～2016 年 3 月までに、当施設で、胃 SMT に対して胃部分切除が施行された 6 例において *ex vivo* での pCLE 観察を、また腫瘍径 20 mm 以上あり EUS-FNAB が施行困難な胃粘膜下腫瘍症例 3 例に対し臨床研究として、生体内 pCLE 観察を行った (表 1)。臨床試験においては、壁外発育型腫瘍は除外した。

方法：*Ex vivo* では、ホルマリン固定前の胃部分切除後検体を、クレシールバイオレット溶液に漬け込んで染色し、染色開始 5 分後から 20 分まで probe based CLE 観察を行った。pCLE に用いたのは、Maunakea technologies (フランス) が開発したレーザー光源装置 Cellvizio、および CLE プローブの Gastroflex である。臨床研究では、まずオリンパス社製の処置用内視鏡 (GIF-Q260J) を経口的に胃内に挿入し、SMT 周囲に生理食塩水の局注を行った。その後、内視鏡の粘膜下層切開剝離術に用いる Dual knife (オリンパスメディカルシステムズ社、日本) と高周波電源装置 VIO300D (ERBE 社、ドイツ) によって SMT に達する粘膜下トンネルを作成し、腫瘍を直視下に捉えた。蛍光色素としてフルオレセイン 500 mg (フルオレサイト®、アルコン、日本) を経静脈投与し、内視鏡の鉗子孔から pCLE プローブを挿入し、腫瘍に接触させて観察を行った。pCLE 後に、大型生検鉗子で腫瘍の組織採取を行った。全例で、

Hematoxylin & Eosin (HE) 染色標本における病理組織所見と pCLE 所見を比較した。その際の組織所見を核形状、細胞形状、組織構造の 3 要素に分け、pCLE 所見との一致率を検討した。さらに、画像解析ソフト (Image J) を用いて pCLE の 1 視野における組織型別の平均細胞数を比較した (図 1)。統計解析には、統計処理ソフト (R version, 3.2.4) を使用した。

表 1. 患者背景表

症例番号	方法	年齢	性別	局在部位	最終病理診断
1	Ex vivo	46	男性	前庭部	Schwannoma
2	Ex vivo	73	女性	体下部	GIST
3	Ex vivo	47	女性	体下部	Schwannoma
4	Ex vivo	67	女性	体上部	GIST
5	Ex vivo	71	男性	体上部	Schwannoma
6	Ex vivo	39	男性	体上部	GIST
7	In vivo	45	女性	前庭部	Leiomyoma
8	In vivo	31	男性	噴門部	Leiomyoma
9	In vivo	62	女性	胃角部	Leiomyoma

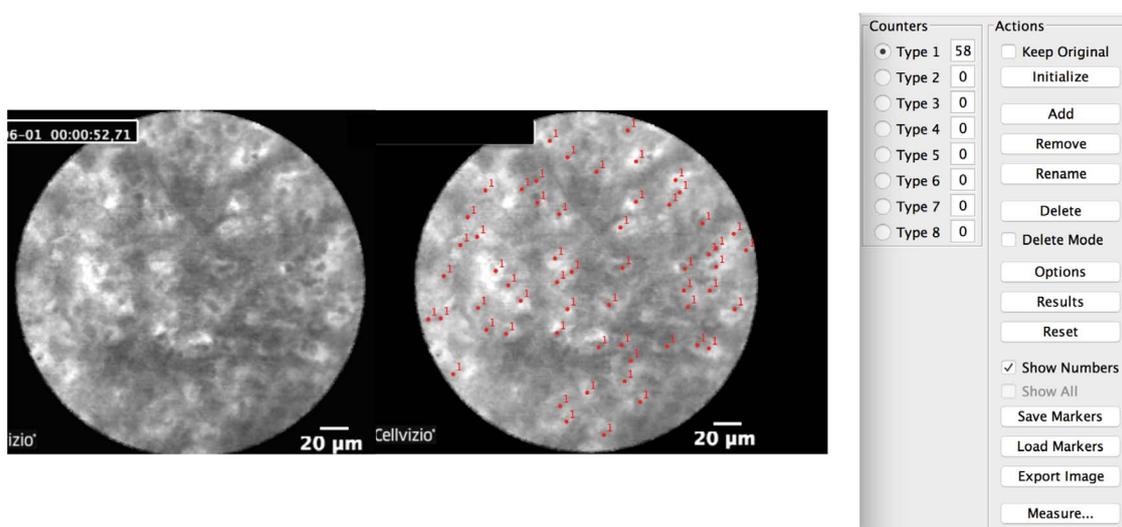


図 1. pCLE 1 視野あたりの細胞数カウント

pCLE において細胞質は蛍光色素により白く抜けて認められ、核は染色されないため黒く抜ける。IMAGE J を使用し pCLE 1 視野 (直径 250 μ m 円) 内の細胞数をカウントした。

結 果

病理組織検査の結果、腫瘍の内訳は *Ex vivo* 6 例のうち神経鞘腫が 3 例、GIST が 3 例であった。臨床において生体内 pCLE を行った 3 例では、全て平滑筋腫であった (図 2)。

pCLE 所見と HE 標本所見における、3 要素 (核形状、細胞形状、組織構造) の組織型別一致率は、神経鞘腫では平均 77.8 %、GIST では平均 100 %、平滑筋腫では平均 44.4 % であった。GIST と神経鞘腫を合わせた群と平滑筋腫では所見の一致率に有意差を認めた (88.9 % vs. 44.4 %, $p = 0.036$) (図 3)。さらに、pCLE 1 視野における平均細胞数は GIST と神経鞘腫を合わせた群では 55.2 ± 15.2 cell/field、平滑筋腫では蛍光色素により染色されない筋線維の間にわずかに細胞を同定できたのみ (17.3 ± 3.2 cells/field) であり両者間には有意な差を認めた ($p = 0.024$) (図 4)。

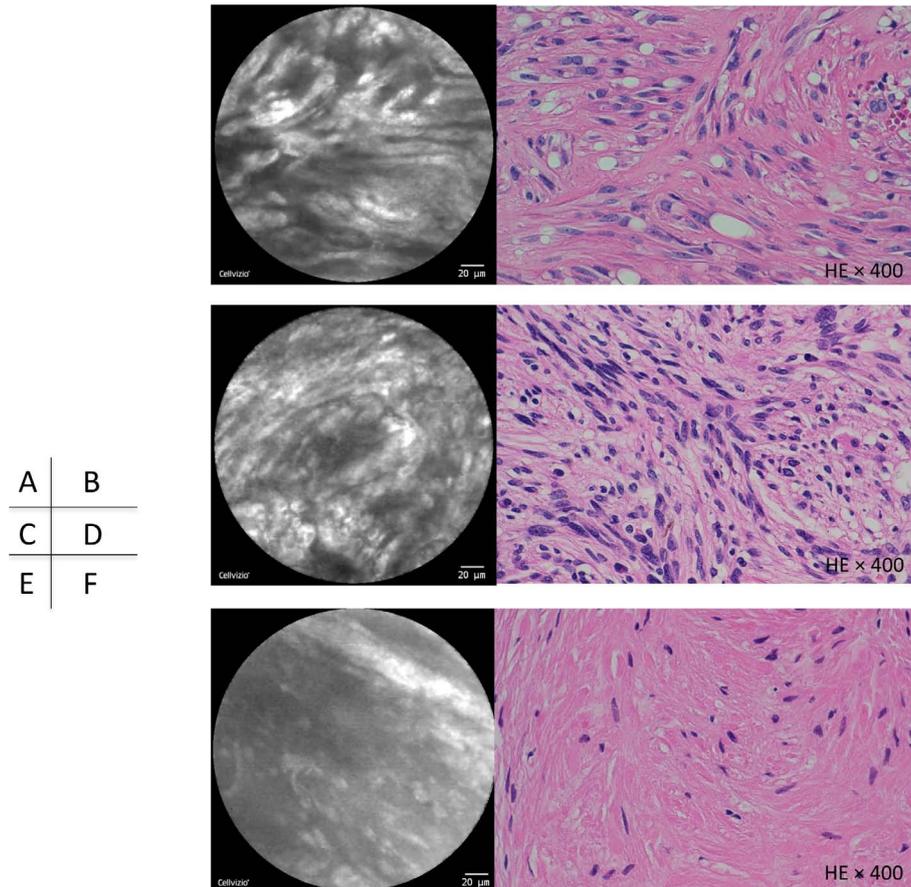


図 2. pCLE 画像と HE 染色標本所見

A、B : GIST

C、D : Schwannoma

E、F : Leiomyoma

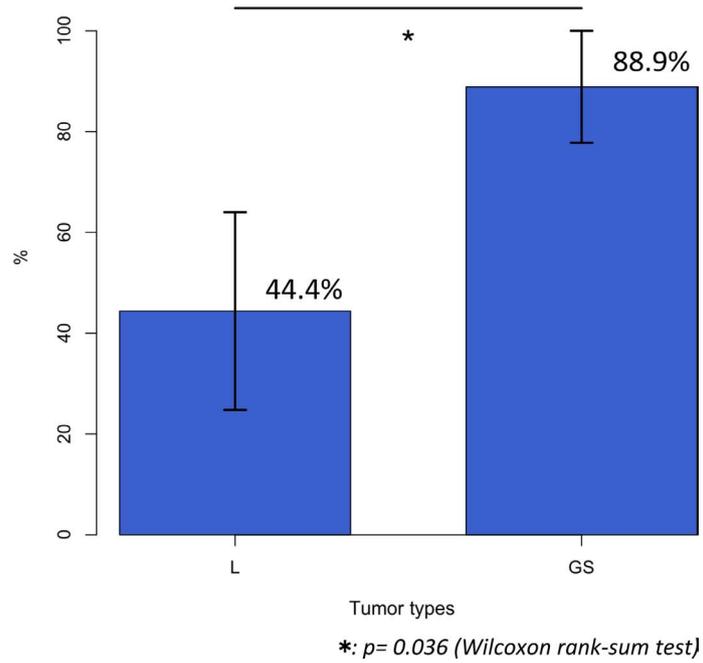


図3. pCLE と HE 染色標本の所見一致率
 L : 平滑筋腫 (leiomyoma)
 GS : GIST/Schwannoma

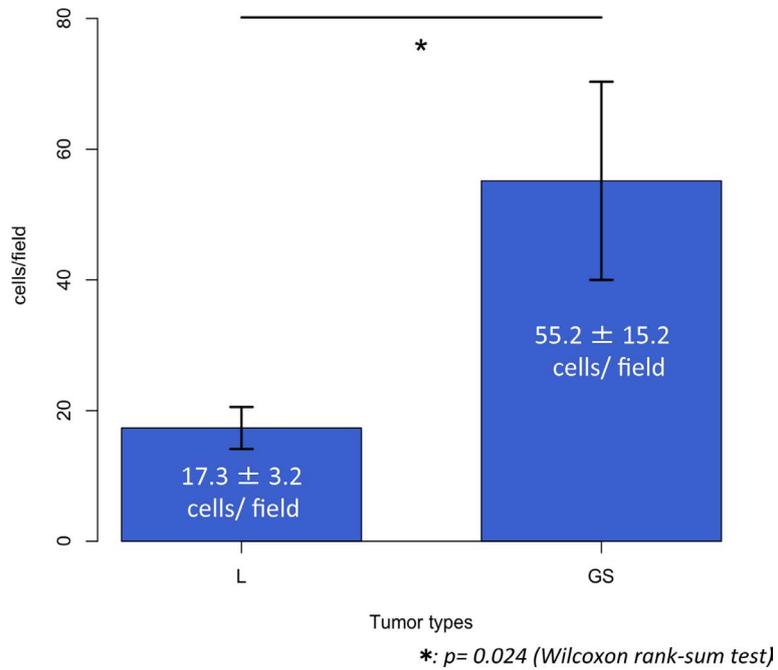


図4. pCLE 1 視野あたりの細胞数の比較
 L : 平滑筋腫 (leiomyoma)
 GS : GIST/Schwannoma

考 察

SMT の病理組織診断においては、組織型によらず spindle cell と呼ばれる紡錘形細胞が多く認められるため、通常は HE 染色に加え、S-100、c-kit、CD-34 などの特殊免疫染色を行う。平滑筋腫に関しては、腫瘍の大部分を筋線維に占められ、細胞密度の低さが特徴とされているため、多くの場合は HE 染色のみで GIST や神経鞘腫などの細胞成分が豊富な腫瘍と鑑別が可能である⁵⁾。平滑筋腫は悪性転化が極めて稀であるため、大型であっても多くの場合で手術は不要であり、pCLE により鑑別できれば、その意義は大きいと考えられる。そのため本研究では、細胞成分の豊富な GIST と神経鞘腫 (G/S 群) を合わせた群と、平滑筋腫群 (L 群) における pCLE 所見の比較検討を行った。まず、pCLE 所見と HE 標本所見における、3 要素 (核形状、細胞形状、組織構造) の組織型別一致率は、G/S 群において有意に高率であった。筋線維が主体の平滑筋腫は蛍光色素を取り込みやすい細胞質に乏しいが、細胞成分が豊富なため蛍光色素を取り込みやすい G/S 群においては pCLE 画像にコントラストが付き、分解能が上回った結果と考えられる。このことから、GIST 及び神経鞘腫における pCLE では、より HE 染色標本に近い所見が得られる可能性が示唆された。さらに、pCLE 1 視野あたりの平均細胞数に関しても、G/S 群は L 群よりも有意に多い結果となった。平滑筋腫の筋線維主体の構成に加え、HE 染色標本で認められる細胞密度の低さが反映されたものと考えられ、pCLE においても、細胞数の差が GIST や神経鞘腫との鑑別の一助となる可能性が示唆された。

本研究により、胃粘膜下腫瘍の診断において、pCLE が HE 染色標本に匹敵する診断能を有する可能性が示唆された。現時点では、特に平滑筋腫におけるコントラストの低さや画像のブレが大きく、pCLE 単独での診断は困難である。今後は、観察法や染色法の改良を続け、pCLE による SMT の生体内組織診断の確立を目指す。

共同研究者

本研究の共同研究者は東京慈恵会医科大学内視鏡科の榎俊介、小林雅邦、および、炭山和毅である。

文 献

- 1) ESMO/European Sarcoma Network Working Group. Gastrointestinal stromal tumours: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol.* 2014 Sep;25 Suppl 3:iii21-6. doi: 10.1093/annonc/mdu255. PMID: 25210085.
- 2) Nishida T, Kawai N, Yamaguchi S, Nishida Y. Submucosal tumors: comprehensive guide for the diagnosis and therapy of gastrointestinal submucosal tumors. *Dig Endosc.* 2013 Sep;25(5):479-89. doi: 10.1111/den.12149. Epub 2013 Jul 31. PMID: 23902569.
- 3) Canto MI, Anandasabapathy S, Brugge W, Falk GW, Dunbar KB, Zhang Z, Woods K, Almario JA, Schell U, Goldblum J, Maitra A, Montgomery E, Kiesslich R; Confocal Endomicroscopy for Barrett's Esophagus or Confocal Endomicroscopy for Barrett's Esophagus (CEBE) Trial Group. In vivo endomicroscopy improves detection of Barrett's esophagus-related neoplasia: a multicenter international randomized controlled trial (with video). *Gastrointest Endosc.* 2014 Feb;79(2):211-21. doi: 10.1016/j.gie.2013.09.020. Epub 2013 Nov 9. PMID: 24219822.
- 4) Ohya TR, Sumiyama K, Takahashi-Fujigasaki J, Dobashi A, Saito S, Tajiri H. In vivo histologic imaging of the muscularis propria and myenteric neurons with probe-based confocal laser endomicroscopy in porcine models (with videos). *Gastrointest Endosc.* 2012 Feb;75(2):405-10. doi: 10.1016/j.gie.2011.09.045. PMID: 22248608.
- 5) 廣田 誠一, 梶本 仙子. 【消化管の病理 I-上部消化管-】 消化管非上皮性腫瘍の病理診断. *病理と臨床* 2011 . 09;29(9):978-984.