

INVITED REVIEW ARTICLE

肺癌診療のためのクライオバイオプシー

桐田圭輔¹・酒井徹也¹・内藤智之¹・
宇田川響¹・後藤功一¹

Cryobiopsy in Medical Practice Related to Lung Cancer

Keisuke Kirita¹; Tetsuya Sakai¹; Tomoyuki Naito¹;
Hibiki Udagawa¹; Koichi Goto¹

¹Department of Thoracic Oncology, National Cancer Center Hospital East, Japan.

ABSTRACT — Respiratory endoscopy is important for various aspects medical practice related to lung cancer, including the pathological diagnosis, the analysis of biomarkers, genetic panel tests using next generation sequencing, and the differential diagnosis of drug-induced lung disease and malignant airway stenosis. The importance of biopsy sample quality is increasing with progress of lung cancer therapies. Cryobiopsy is widely-used in the diagnosis of interstitial lung disease in Europe and the US, and it has been shown to be effective in the diagnosis of lung cancer because it can collect a large sample while causing little tissue damage. In this report, we review the usefulness and points from experience at our hospital and evidence to support the performance of cryobiopsy by medical professionals who provide lung cancer treatment.

(JLCC. 2020;60:2-9)

KEY WORDS — Cryobiopsy, Diagnosis of lung cancer, Genetic panel test, Drug-induced lung disorder, Guide-sheath method

Corresponding author: Keisuke Kirita.

要旨 — 肺癌診療における呼吸器内視鏡の意義は病理学的な確定診断のみならず、NGSを用いた遺伝子パネル検査などのバイオマーカー検索、薬剤性肺障害の鑑別診断、気道狭窄に対する治療目的など多岐にわたる。特に多様化する治療薬の進歩とともに検体検査の重要性はより増している。クライオバイオプシーは間質性肺疾患の診断において欧米では広く普及している手技であり、大型で挫滅の少ない検体が採取できることから肺癌診断で

も有効性が示されているが、国内での使用実績は少なく安全性の点で留意すべき事項も多い。本稿では当院での臨床試験による使用経験とエビデンスから、肺癌診療を行う多くの医療従事者へその有用性とポイントについて概説する。

索引用語 — クライオバイオプシー、肺癌診断、遺伝子パネル検査、薬剤性肺障害、ガイドシース法

はじめに

軟性気管支鏡を用いた経気道の生検は比較的低侵襲であり、肺癌の組織学的診断の first choice である。近年はガイドシース法やラジアル EBUS、仮想気管支ナビゲーションシステムなど様々な補助的デバイスの進歩により改善してきてはいるものの、末梢小型肺病変の診断率は 3 cm 以下で 70% 前後と報告され、十分ではない。¹ 診断

率が低い原因の 1 つとして、通常の生検鉗子を用いた気管支鏡下生検では得られる検体は約 2~5 mm² と総じて小さく、また生検時の圧力による挫滅が加わるために、適切な病理学的評価が困難な場合があることが挙げられる。

さらに、現在の肺癌診療においては病理学的診断のみでなく、driver oncogene を同定するためのコンパニオン検査が行われ、検査が行われる対象の多くは進行癌であ

¹ 国立がん研究センター東病院呼吸器内科。

論文責任者：桐田圭輔。

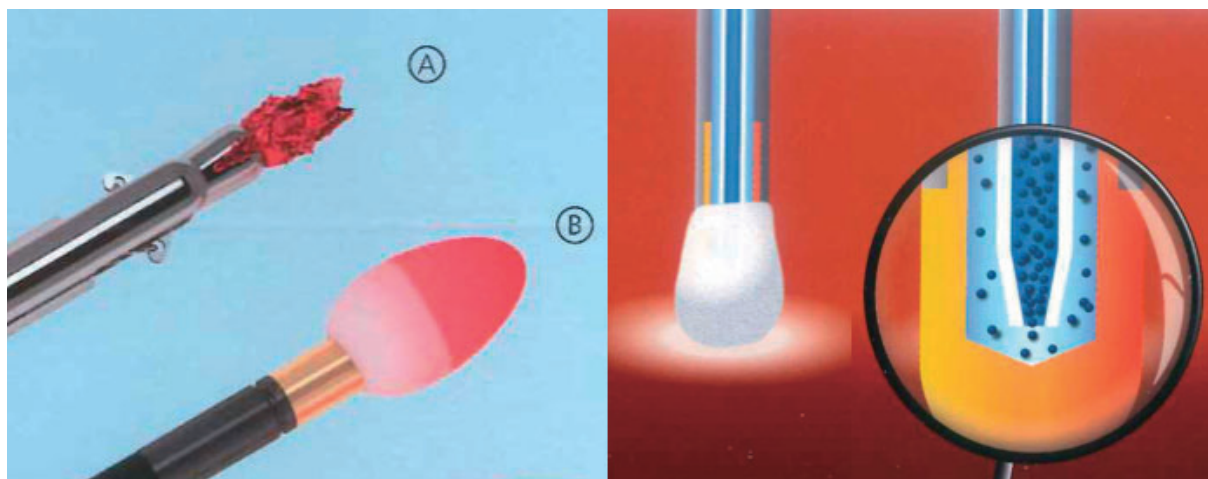


Figure 1. The principle of cryobiopsy. The metal tip is cooled to a temperature of approximately -60°C via the Joule-Thomson effect that is a change in temperature when expanded while maintaining a constant pressure on both sides through a porous wall.

るため、侵襲が少ない気管支鏡検体をはじめとする微小検体によって求められる。シングルプレックスのコンパニオン検査に加えて、2019年にはNGSを用いた遺伝子パネル検査がコンパニオン診断、ゲノムプロファイリングとして承認されたが、高額な検査で患者あたり1回しか保険上検査ができず、適切な治療薬を肺癌患者に届けるためには確実に気管支鏡検査で十分な検体を採取する必要がある。

これらの問題解消のために、我々は内視鏡的に既存のデバイスよりも大きく質の高い検体が採取可能なクライオバイオプシーに着目し、国内未承認時には国内でのエビデンス創設を目的とした臨床試験として、また承認後には肺癌診断に加えて薬剤性肺障害の診断にも広く使用し、有効性・安全性に関する検証を行っている。これまでの経験を踏まえて肺癌診療におけるクライオバイオプシーの役割について概説する。

クライオプローブについて

クライオプローブはERBE社によって製造・販売されている内視鏡用デバイスであり、海外、特に欧州においては間質性肺疾患や移植肺の病理学的診断において非常に高い診断率が報告され、広く用いられている。生検以外の目的として気道狭窄や気道異物、粘稠な喀痰や凝血塊の除去などにも有効とされており、たとえば悪性気道狭窄においてはしばしば高度の低酸素血症を伴い高濃度の酸素投与を必要とするが、クライオプローブは発火のリスクがなく比較的安全に使用可能である。

クライオプローブの内部は中空構造になっており、プローブ先端は金属で構成されている。内部に二酸化炭素

を循環させ、ジュール=トムソン効果(2つの空間の圧力を一定に保ちながら気体を膨張させることで温度変化が起きる)によってプローブ先端の金属が最低 -60°C 前後まで冷却される(Figure 1)。冷却されたプローブ先端部が接触することにより、周囲の組織が凍結される。凍結された組織はプローブ先端部と接着しているため、凍結部と非凍結部の境界部を物理的に引き離すことにより、凍結部を検体として採取することができる。

日本では2017年3月に医薬品医療機器総合機構(PMDA)より生検用の医療用機器として薬事承認され、販売後国内数十施設で広く臨床導入されている。

準備と基本手技

準備

軟性気管支鏡はBF-1TQ-290や1T-260(いずれもOlympus)などの処置用スコープを用いる。クライオ装置(ERBE CRYO®2)と、クライオプローブには径1.9 mm, 2.4 mmのものが販売されているが、生検を目的とした使用であれば1.9 mmで十分で、操作性も良い(Figure 2)。二酸化炭素ポンペを準備するが、プローブ内を循環するだけで多く消費されるものでないため頻回の補充は必要ない。基本的には経口挿管下に行いそのほか必要に応じて硬性気管支鏡、止血装置(APC, レーザーなど)、血管形成術用(PTA)バルーン、細径超音波プローブ、ガイドシースキットなどを準備する。

基本手技

①事前の準備

通常の気管支鏡検査と同様に事前準備として血算生化学及び線溶凝固能検査や血液感染症検査、胸部X線写



Figure 2. Cryobiopsy equipment (ERBE CRYO®2) and a cryoprobe.

Table 1. The Diagnostic Yield of Cryobiopsy in Patients with Malignancy

	Forceps	Cryoprobe	p-value
Overall			
Diagnostic	239 (85.1%)	268 (95.0%)	<0.001
Non-diagnostic	42 (14.9%)	14 (5.0%)	
Non-small cell carcinoma			
Diagnostic	172 (88.2%)	190 (94.5%)	0.025
Non-diagnostic	23 (11.8%)	11 (5.5%)	
Small cell carcinoma			
Diagnostic	52 (83.9%)	54 (96.4%)	0.024
Non-diagnostic	10 (16.1%)	2 (3.6%)	

Revised from reference 2.

真、心電図検査を行っている。後述する出血のリスクを考慮すると、一般的な気管支検査の禁忌事項と同様に抗凝固・血小板薬の休薬が不可能な症例や、出血傾向を認める症例は不適格である。術者・介助者に加えて凍結した検体をプローブから離して検体処理する者も必要であり、最低3～4人の医師が必要である。

②凍結から検体処理まで

経口挿管チューブを留置し生検部位を決定したら、病変にプローブを接触させ凍結させるが、凍結時間と検体量の相関は5秒以上で大体プラトーに達するため、3秒程度から開始し、平均で5秒、長い場合で7秒程度の凍結を行っている。採取した検体はチャンネルを通らないの

で気管支プローブごと引き抜くが、出血の状況が評価できない時間が発生してしまうため注意が必要である。当院の経験では臨床試験でボスミンや冷生食の散布が必要となるような重度の出血は121例中1例のみで、それ以外は吸引で止血が可能であった。

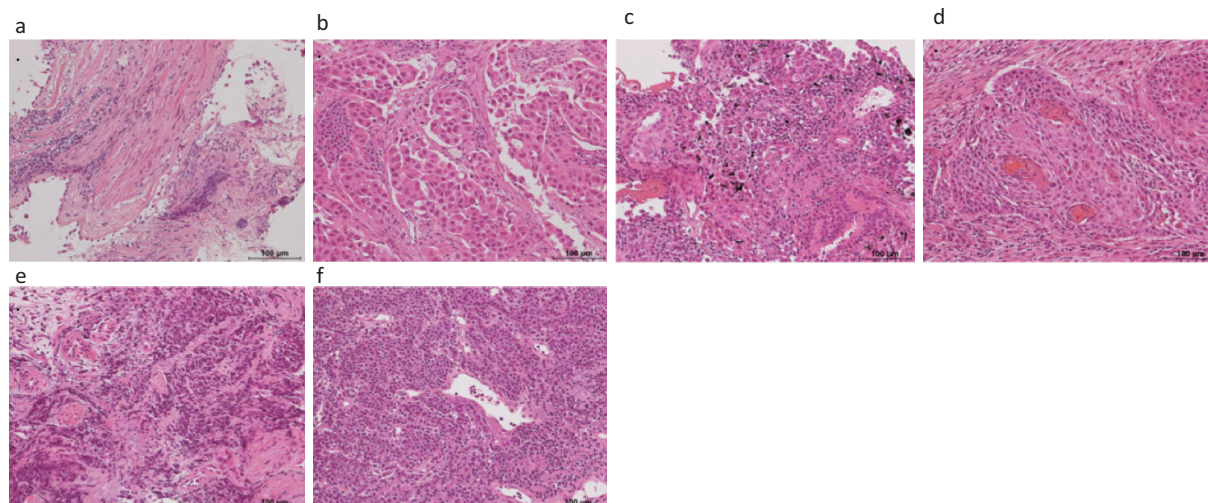
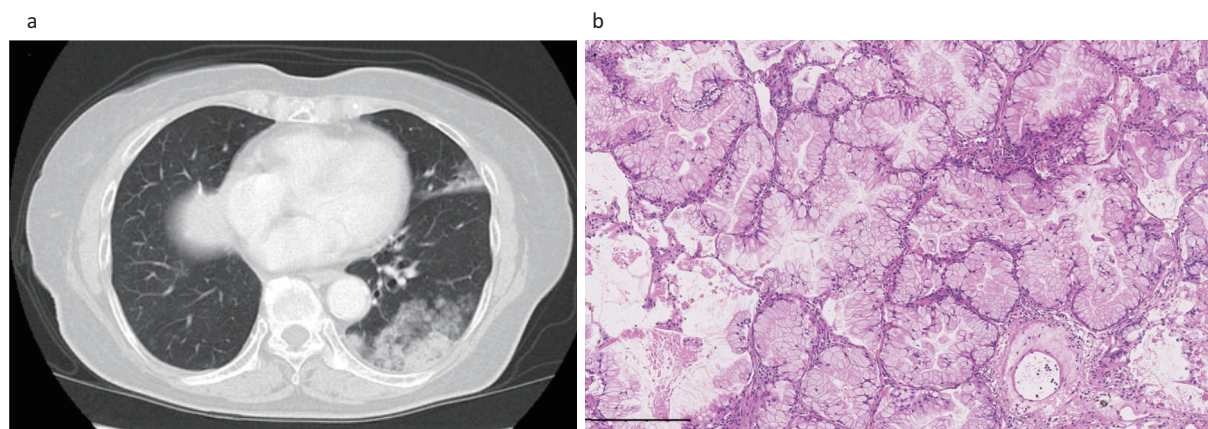
肺癌の病理診断・免疫染色における評価

Hetzel らの報告によると、肺癌疑いの症例計593例を対象とした気管支鏡下におけるクライオプローブによる生検と鉗子生検を比較した海外多施設共同研究において、診断率はクライオプローブ群が有意に良好であった(95.0% vs 85.1%, $p < 0.001$, Table 1).² 有害事象として

Table 2. The Bleeding Risk Associated with Cryobiopsy in Patients with Malignancy

Type of bleeding	Forceps	Cryoprobe	p-value
None	91 (30.6%)	59 (19.9%)	0.009
Mild (no intervention)	153 (51.5%)	183 (61.8%)	
Severe (at least one intervention)	53 (17.8%)	54 (18.2%)	

Revised from reference 2.

**Figure 3.** Biopsy specimens. **a)** Adenocarcinoma collected by forceps. **b)** Cryobiopsy. **c)** Squamous cell carcinoma collected by forceps. **d)** Cryobiopsy. **e)** Small cell carcinoma collected by forceps. **f)** Cryobiopsy.**Figure 4.** Invasive mucinous adenocarcinoma diagnosed by cryobiopsy. **a)** CT findings. **b)** The pathological examination revealed goblet-like or columnar tumor cells with mild atypia.

は、追加の止血処置（冷生食やアドレナリンの気管内散布）を要する重度の気管内出血の頻度は同程度であった（18.2% vs 17.8%, Table 2）. クライオプローブ群、鉗子群ともに、外科手術を要する症例はなく、致命的な有害事象も認めていない. 全周性に組織が採取されるため、通常の鉗子生検よりも、ラジアル EBUS で“adjacent to”症例で診断が良好であったとする報告もある.³ 当院で

行った臨床試験では悪性診断率は鉗子生検とはほぼ同等だったが、クライオバイオプシーは挫滅によるアーチファクトが少なく (Figure 3), 形態学的に腺癌/扁平上皮癌や小細胞癌の組織学的診断まで可能であった割合は鉗子生検より有意に高かった (86% vs 74%, $p < 0.01$). 粘液産生性腺癌や AAH などの通常の鉗子生検では診断が難しい組織型においても、診断に良好な組織検体が採取さ

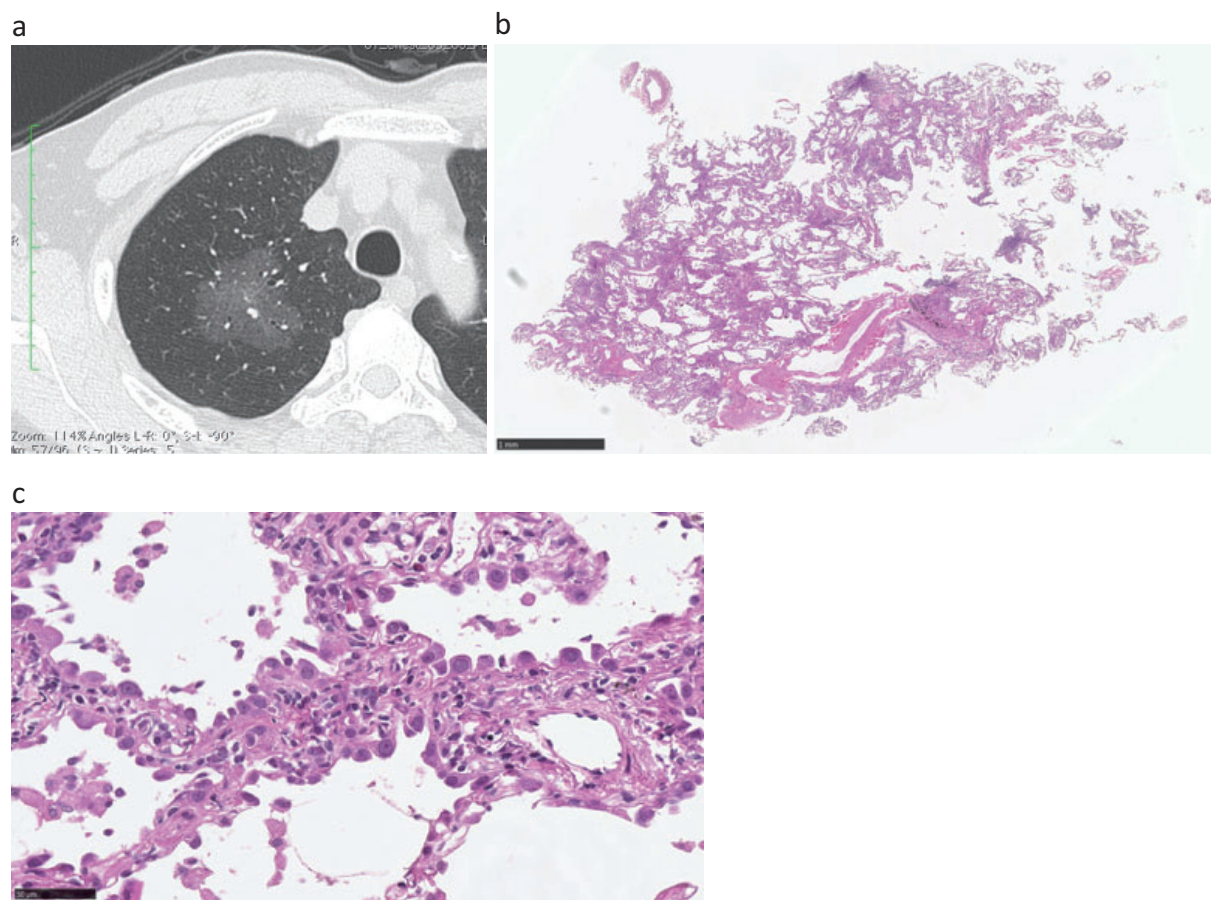


Figure 5. Atypical adenomatous hyperplasia diagnosed by cryobiopsy. **a)** CT findings. **b, c)** The pathological examination revealed type II alveolar epithelial cells with mild to moderate atypia growing along the alveolar walls. Gaps were observed between the cells.

れていた (Figure 4, 5)。また TTF-1 と p40 の免疫染色の評価は鉗子生検と同等の結果だったが、PD-L1 (22C3) 発現においては評価可能な細胞数が多いためか、クライオバイオプシーの方が陽性率でやや高い傾向を認めた。実臨床を含めると 200 例以上で同手技を行っているが、肺癌診断を目的とした生検で気胸発症の経験はない。

肺癌のバイオマーカー検査における有用性

海外の文献を含めてクライオバイオプシーのバイオマーカー検査における有用性について論じた報告は少ないが、大型で良質な検体が採取可能であることから、有用性が期待され、当院にて解析を行った。

当院の肺癌症例においてクライオバイオプシー検体と鉗子生検検体を比較すると、DNA、RNA の平均採取量 (μg) はいずれも約 3 倍 (DNA 量: 1.60 vs 0.58, $p=0.02$, RNA 量: 0.62 (0.05~10.1) vs 0.17 (0.00~0.37), $p<0.01$) と有意に高く、全エクソンシーケンスの解析成功割合は 90% vs 15%, RNA シーケンスの解析成功割合は

75% vs 10% と、クライオバイオプシーの方が良好であった。また AmoyDx® ROS1 Gene Fusions Detection Kit を用いた RT-PCR における解析成功割合は 83% で、ガイドシース下で用いられる鉗子の FB-233D 37%, FB-231D 70% と比較して有意に良好であった。

今後、より大規模な NGS を用いた遺伝子パネル検査に対する有用性のデータが出ることに期待したい。

薬剤性肺障害における有用性と安全性

薬剤性肺障害は抗悪性腫瘍薬、特に分子標的薬や免疫チェックポイント阻害薬では 2~5% と多く、また担癌患者では癌性リンパ管症や放射線肺臓炎、ニューモシスチス肺炎、肺泡出血などの鑑別も重要であり、肺癌診療を行う上で避けては通れない有害事象である。薬剤性肺障害を疑う場合は肺病理組織所見により、感染症や腫瘍性病変の除外、治療反応性・予後を予測しうる組織パターン認識や好酸球浸潤などの評価を行うために、組織学的な診断の重要性は高い。クライオバイオプシーの

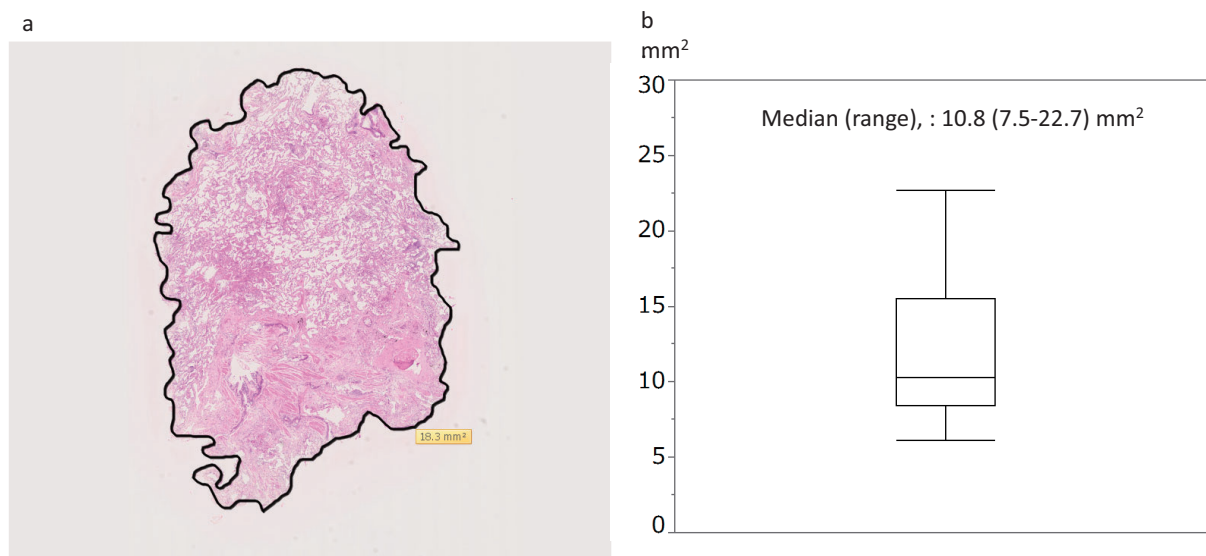


Figure 6. Cryobiopsy samples obtained during chemotherapy from patients with diffuse lung disorder. **a)** A representative sample. **b)** The median size was 10.8 mm² (range 7.5-22.7 mm²).

間質性肺疾患の診断においては、ランダム化比較試験で有用性、安全性が報告されており、⁴ メタアナリシスの結果からも有効性が示唆される。⁵ 薬剤性肺障害の診断においても間質性肺炎と同様に組織学的診断の有用性を期待し、検証を行った。

当院において化学療法施行中に発生したびまん性肺浸潤影に対してクライオバイオプシーを行った13例では、検体のサイズは中央値10.8 mm²と大きく (Figure 6)、薬剤性肺障害9例のほかに1例は既存の間質性肺疾患の増悪、2例は癌の転移もしくはリンパ管症、1例は感染性肺炎と診断された。1例で止血処置を要する出血を認めた以外は重篤な有害事象は認めず、比較的安全に施行可能であった。一部では組織学的にステロイド反応性の予測可能と思われる病理所見を認め、化学療法施行中の患者における薬剤性肺障害の鑑別や組織学的な診断には一定の有用性が示唆された。

当院では気胸の経験はないものの、間質性肺炎における気胸の発生割合が5~33%と報告されていることから、注意が必要である。⁶

胸腔鏡下クライオバイオプシー

胸腔鏡検査は原因不明の胸水貯留や胸膜肥厚の病理診断において非常に安全で有効な検査だが、局所麻酔下に非鎮静下で行える検査であることから、胸水貯留を認めドレーナージを要するような肺癌患者においては組織採取方法の大きな選択肢の1つである。胸水セルブロック検体による免疫染色では検査が推奨されない場合があること、胸水では変異アレル頻度が低くNGSを用いた遺伝

子パネル検査では正確な診断が得られない可能性があることから、当院ではsemi rigidの局所麻酔下胸腔鏡検査に積極的にクライオバイオプシーを行っている。特に、悪性胸膜中皮腫との鑑別が必要な場合では胸膜表層のみの生検では診断に至らないことも多く、クライオバイオプシーを併用して行っている。熟練者が行えば重篤な出血のリスクは非常に低いが、胸壁から大きな検体を採取する場合には疼痛を伴うため、通常より念入りに局所麻酔薬の散布を行うこと、また気管支鏡より体温の影響を受けやすいので凍結時間を長めに設定することが重要である。

海外の前向き観察研究の結果では、胸水貯留を認める92例において胸水セルブロック、非切開胸膜生検、胸腔鏡下鉗子生検の診断率はそれぞれ34.8%、27.2%、91.3%だったのに対してクライオバイオプシーでは98.9%で、検体のサイズも鉗子生検と比較して有意に大きく (9.4 ± 4.9 mm vs 4.2 ± 2.3 mm, $p < 0.0001$)、免疫染色も多くで可能であった (98.9% vs 87.0%, Table 3).⁷ また本邦では、Nakai らによると局所麻酔下胸腔鏡検査が施行された悪性胸膜中皮腫疑い5例で通常の鉗子生検では診断が十分出なかった4例において、クライオバイオプシーでは診断に至ったことが報告されている。⁸

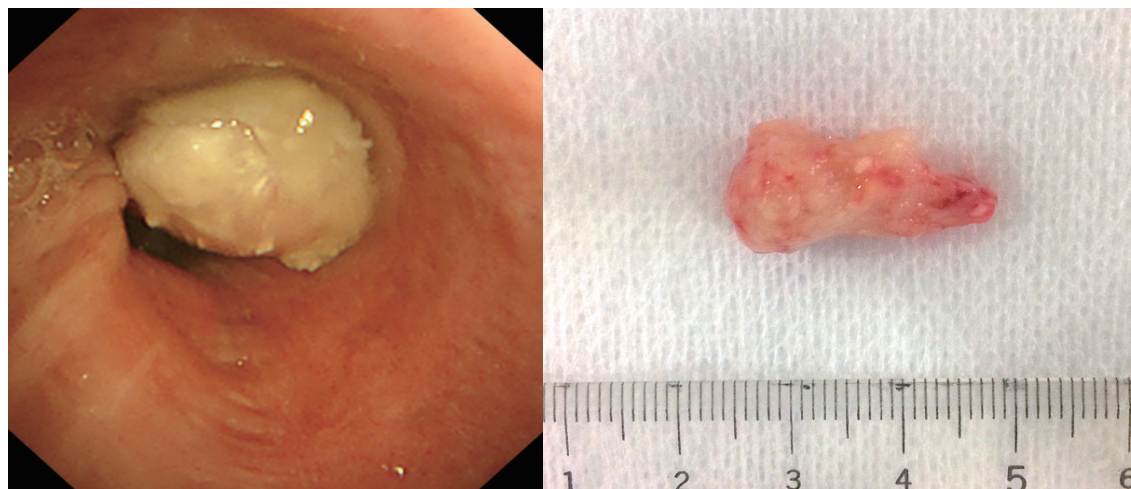
クライオバイオプシーのポイント

クライオバイオプシーの導入を検討している、または導入済の施設はここ1年で非常に多くなっているが、本邦では承認後まだ日が浅く、今後それぞれの経験蓄積の元に学会議や学会誌にて情報の発信・共有が必要であ

Table 3. The Diagnostic Yield of Pleuroscopic Biopsy and Other Techniques

N = 51	Close pleural biopsy	Forceps biopsy	Cryobiopsy	Cytology cell block
Diagnostic yield	25 (27.2%)	84 (91.3%)	91 (98.9%)	32 (34.8%)
For IHC staining	12 (13.0%)	80 (87.0%)	91 (98.9%)	12 (13.0%)
Size, mm	1.9 ± 1.0	4.2 ± 2.3	9.4 ± 4.9	-

Revised from reference 7.

**Figure 7.** Cryobiopsy samples from lesions occupying the left main bronchus.

る。安全に、利点を最大限に生かしてクライオプローブを使用させていただくために、当院のこれまでの経験から実際のポイントについて解説する。

直視下生検

通常の鉗子では生検が難しい接線方向のような病変でも、1/4周性程度でもプローブが接触していれば十分な量の生検が可能である。露出病変からの出血が致命的になることはほとんどないが、止血用デバイスを準備することが望ましい。気道内に腫瘤を形成している病変で腫瘍減量まで期待する場合などは、腫瘍の中心にプローブを差し込んで凍結することでより大きく病変を除去することが可能である (Figure 7)。ただし、予想外に大きい検体が採取されてしまった場合、挿管チューブ内を通らないことや、気管支閉塞解除により末梢に貯留した膿が中枢気道に流出することがあり、注意する。

末梢肺病変の透視下生検

可能であれば病変に細径超音波プローブを挿入し、周囲の血管の評価を行う。血管が近い部位での生検は避けることが重要で、特に比較的中枢の露出していない病変では血管の損傷による出血の程度は露出病変よりも高度であり、致命的になりうる。PTA 用バルーンを口側に留置することで安全に検体を採取する試みがなされているが、比較的高額であるため、実臨床で全例に使用するこ

とは難しいかもしれない。

凍結後、気管支鏡ごと瞬間的に引きちぎるような衝撃を与え凍結部位を気管支から物理的に引き離すが、この操作にはコツがあり一定の熟練が必要である。気管支ファイバー先端から露出するプローブの長さを通常の鉗子生検などと比べて少し長めに出した方が、衝撃を与えやすく、凍結により気管支鏡を傷めてしまうことも少ない。この動作がうまくいかないと「根掛かり」のようになるが、その場合には無理に引き剥がそうとせず、一旦解凍したのちに再度手技を行う。

ガイドシースを留置することで通常のブラシ擦過、鉗子生検も同様に行い、圧迫止血後にクライオバイオプシーすることができるが、同一部位で生検を繰り返すと出血により質の高い検体が採取できなくなってしまうので、通常の鉗子生検を数回繰り返したのちにクライオバイオプシーを行う場合には生検部位を数 mm ずらすことが重要である。1.9 mm のプローブであれば太径ガイドシース (K-203, K-204; Olympus) は通過するが、使用とともにプローブの捻れが生じてしまい挿入が困難となり、無理に挿入してプローブが根本で曲がってしまうと故障の原因となるため併用はお勧めしない。2019 年に Olympus 社が販売開始したガイドシースキット 2 の太径ガイドシースや大口徑の気管支鏡用ガイドシース (ブ

ロンコガイドシース (SG シリーズ), SG-27092, 町田製作所)ではクライオプローブを挿入しても抵抗が少なく, こちらを使用している. 採取した検体は当然ガイドシース内を通過しないため, ガイドシースごと体外に引き抜く.

クライオプローブは通常の鉗子と比較して硬く, また処置用スコープを用いているため, B⁶や肺尖部の病変では到達が難しい場合がよくある. Imabayashiらはクライオプローブの剛性を利用し, 気管支鏡の先端からクライオプローブを出した状態で気管支壁に押し当て, クセを作ることによって角度のきつい病変に挿入しやすくする“bending method”について報告しており, 参考にされたい.⁹

通常の鉗子生検と同様, 下葉の末梢の病変の場合には呼吸性に変動してしまい採取が難しい. 前もって透視下に呼吸時に病変に接するように調整すれば, 凍結を開始するとプローブと組織は接着するため, それ以降呼吸性変動は問題とはならない.

今後の展望

肺癌の遺伝子パネル検査に対するクライオバイオプシーの大規模な有効性の検証, また経口挿管チューブや止血バルーンなどの補助的デバイスの改良・開発に期待したい. また 1.1 mm のミニクライオプローブについて動物実験で有効性が検証され, crush artifact は少なく組織量は従来のクライオプローブより小さいが鉗子生検よりも大きいことが報告されている.¹⁰ 2.6 mm のガイドシース内をプローブが通過することにより気管支鏡の引き抜きが不要なため, より簡便で安全なより多くの検体を採取することが可能となるかもしれない.

最後に

クライオプローブは大型で挫滅の少ない組織検体の採取が可能であり, 今後の肺癌診療において大きな役割を担うものと考えられるが, 一方で大きな病変を採取することは気道出血や気胸のリスクを増強させる可能性があり, 安全に, 確実に採取するためには施設での導入前に十分なトレーニングを積む必要がある. 販売輸入元, もしくは学会主導のハンズオンセミナーでもクライオバイオプシーは広く取り入れられているほか, 導入施設への見学などを行い準備されることをお勧めしたい.

本論文内容に関連する著者の利益相反: なし

REFERENCES

1. Ali MS, Trick W, Mba BI, Mohananeey D, Sethi J, Musani AI. Radial endobronchial ultrasound for the diagnosis of peripheral pulmonary lesions: A systematic review and meta-analysis. *Respirology*. 2017;22:443-453.
2. Hetzel J, Eberhardt R, Herth FJ, Petermann C, Reichle G, Freitag L, et al. Cryobiopsy increases the diagnostic yield of endobronchial biopsy: a multicentre trial. *Eur Respir J*. 2012;39:685-690.
3. Kho SS, Chan SK, Yong MC, Tie ST. Performance of transbronchial cryobiopsy in eccentrically and adjacently orientated radial endobronchial ultrasound lesions. *ERJ Open Res*. 2019;5.
4. Pajares V, Puzo C, Castillo D, Lerma E, Montero MA, Ramos-Barbón D, et al. Diagnostic yield of transbronchial cryobiopsy in interstitial lung disease: a randomized trial. *Respirology*. 2014;19:900-906.
5. Gangnanah O, Guo SL, Chiniah M, Li YS. Efficacy and safety of cryobiopsy versus forceps biopsy for interstitial lung diseases and lung tumours: A systematic review and meta-analysis. *Respirology*. 2016;21:834-841.
6. Raparia K, Aisner DL, Allen TC, Beasley MB, Borczuk A, Cagle PT, et al. Transbronchial Lung Cryobiopsy for Interstitial Lung Disease Diagnosis: A Perspective From Members of the Pulmonary Pathology Society. *Arch Pathol Lab Med*. 2016;140:1281-1284.
7. Chen CH, Cheng WC, Wu BR, Chen CY, Chen WC, Liao WC, et al. Feasibility and Safety of Pleuroscopic Cryobiopsy of the Pleura: A Prospective Study. *Can Respir J*. 2018;2018:6746470.
8. Nakai T, Matsumoto Y, Sasada S, Tanaka M, Tsuchida T, Ohe Y, et al. Cryobiopsy during flex-rigid pleuroscopy: an emerging alternative biopsy method in malignant pleural mesothelioma. A comparative study of pathology. *Jpn J Clin Oncol*. 2019;49:559-566.
9. Imabayashi T, Uchino J, Yoshimura A, Chihara Y, Tamiya N, Kaneko Y, et al. Safety and Usefulness of Cryobiopsy and Stamp Cytology for the Diagnosis of Peripheral Pulmonary Lesions. *Cancers*. 2019;11.
10. Franke KJ, Linzenbold W, Nuessle D, Enderle M, Boesmueller H, Nilius G, et al. A New Tool for Transbronchial Cryobiopsies in the Lung: An Experimental Feasibility ex vivo Study. *Respiration*. 2016;91:228-234.