

論 文 要 旨

Utility of the GeneSearch Breast Lymph Node Assay for the Rapid Evaluation of Sentinel Nodes in Breast Cancer

乳癌のセンチネルリンパ節迅速診断における
GeneSearch BLN Assay の有用性に関する検討

船迫 和

【序論および目的】

乳癌では腋窩リンパ節転移がもっとも重要な予後因子のひとつであり、腋窩郭清が乳癌根治術の標準的な術式とされてきた。しかし、センチネルリンパ節生検により正確なリンパ節診断が可能となり、今日では病期診断のために一般的に行われるようになってきている。

センチネルリンパ節とは、主病変より最初にリンパの流れを受けるリンパ節であり、転移はこのリンパ節から最初に形成すると考えられ、センチネルリンパ節に転移が無ければ、それ以外のリンパ節には転移は無いとする仮説である。国際的にも多くのセンチネルリンパ節に関する臨床試験が行われ、乳癌においてはこの仮説が成立するとすることが証明され、臨床応用が行われている。

術中に転移診断が可能であれば、術後の患者のストレスや経済的な負担を軽減することが可能である。現在、術中リンパ節転移診断として HE 染色や捺印細胞診が行われているが、術後の診断と比較すると異同がみられることもある。この感度を改善するためには、リンパ節全体を評価することが必要である。近年、乳癌におけるセンチネルリンパ節の RT-PCR 診断を目的とした GeneSearch Breast Lymph Node (BLN) assay が欧米において紹介され、このキットを用いると術中に RT-PCR 法により約 40 分で転移診断を行うことが可能である。本研究では、BLN assay によるセンチネルリンパ節診断を HE 染色および免疫染色の結果と比較し、臨床応用の可能性について検討した。

【対象および方法】

2005 年 3 月から 2008 年 12 月までに、術前にインフォームドコンセントを行い、承諾の得られた乳癌切除 117 例を対象とした（鹿児島大学病院倫理委員会：承認番号 29）。全例が女性で、年齢は 23～90 才（平均：55.4）で、全例が術前未治療であった。

手術前日に 99m テクネシウムスズコロイドを 3mCi 腫瘍周囲の 3ヶ所に注入後、注入部のマッサージを 5 分間行い、2 時間後にリンフォシンチグラフィーを撮像した。術中は Navigator GPS を用いてセンチネルリンパ節を同定し、生検を行った。切除後は RI 活性のあるリンパ節の残存がない事を確認し、バックテーブルにてバックグラウンドの 10 倍以上の RI 取り込みがあるものをセンチネルリンパ節として評価した。

同定したセンチネルリンパ節は最大断面にて二分割し、半分は BLN assay 用に -80℃ にて凍結保存した。他方の半割を永久標本として保存し、HE 染色および抗サイトケラチン抗体 (AE1/AE3) を用いた免疫染色にて評価した。病理学的に検出された転移リンパ節は TNM 分類に従って Macrometastasis:MA (2mm<)、Micrometastasis:MI (2mm≥、0.2<)、Isolated tumor cell: ITC (0.2≥) に分類した。

BLN assayによるRT-PCRは、マンモグロピン(MG)とサイトケラチン(CK) 19をマーカーとしたBLN Test KitでSmartCycler systemを用いて行った。同時にInternal controlの確認も行い、MGもしくはCK19のどちらか一方が陽性であればBLN陽性と判断した。

【結果】

センチネルリンパ節は全例で同定され、計204個のリンパ節が摘出された(平均1.73個)。HE染色で26例31個(15.2%)の転移を認め、MA:23個(18例)、MI:5個(5例)、ITC:3個(3例)であった。HE染色にて陰性であった173個のセンチネルリンパ節のうち6個が免疫染色で新たに転移巣を認め、全てがITCであった。

BLN assayでは、204個のセンチネルリンパ節の全てがInternal control陽性であり、40個(32例)が陽性と診断された。MGとCK19がともに陽性であったのは17個(42.5%)で、CK19のみ陽性は16個、MGのみ陽性は7個であった。HE染色で陽性となったセンチネルリンパ節のBLN assayによる感度は83.9%(26/31)であり、免疫染色のみで陽性であった6個中4個(66.7%)はBLN assay陽性であった。BLN assayの陽性率はHE染色および免疫染色の結果に相関を認めた($p < 0.001$)。HE染色、免疫染色で共に組織学的に転移を認めずBLN assay陽性であったセンチネルリンパ節は10個(10例)存在した。10例中9例はinvasive ductal carcinomaであり、3例は主病変において組織学的にリンパ管侵襲を認めた。HE染色、免疫染色およびBLN assayが陽性であったセンチネルリンパ節47個を全て転移陽性と考えると、それぞれの検出法による検出感度はHE染色:66.0%、免疫染色:78.7%、BLN assay:85.1%であった。また、BLN assayの検出率をTMN分類により評価すると、MA:95.7%、MI:60.0%、ITC:55.6%であった。

【結論及び考察】

過去に報告されている凍結迅速HE診断の感度(44-74%)や捺印細胞診よりBLN assayの感度は良好であった。現在の病理学的迅速診断と併せてBLN assayの精密な診断により、再手術の防止と予後の改善にもつながると考えられる。

BLN assayの結果が特に微小転移巣で不良な原因は、BLN assayで診断しているのが半分のみであり、組織学的に診断している切片とは別の検体を見ていることが原因と考えられる。BLN assayで評価しなかった側の半量にのみ転移が存在した可能性が残る。この点からリンパ節の診断には全量的な評価が必要であると思われる。

組織学的転移陰性でBLN assay陽性であった10例の主病変は浸潤癌やリンパ管侵襲陽性など転移の可能性を有する症例であった。また、組織学的診断は最大断面の数切片だけを評価しているにすぎないことから考えると、BLN assay陽性は偽陽性ではなく、組織学的に転移が検出が不可能であったと考えられる。

最近ではSNの新しい評価法としてOSNA法(one-step Nucleic Acid Amplification)があり、このシステムではCK19のみをマーカーとして用いている。BLN assayは偽陰性を減らすためにCK19とMGのダブルマーカーを用いており、同時にInternal controlの確認も出来る点で利点大きい。また、本研究でのCK19での単独での感度は73%であったが、MGと併せてダブルマーカーにすることで81.1%に感度は上昇した。本研究の結果から、センチネルリンパ節の術中迅速診断では、CK19とMGのダブルマーカーを用いたBLN assayによるRT-PCR法の診断は有用であり、今まで以上に正確なセンチネルリンパ節ナビゲーション手術が可能になると考えられた。

論文審査の要旨

報告番号	総研第141号		学位申請者	船迫 和
審査委員	主査	谷本 昭英	学位	博士 (医学)
	副査	米澤 傑	副査	堂地 勉
	副査	高尾 尊身	副査	橋口 照人

Utility of the GeneSearch Breast Lymph Node Assay for the Rapid Evaluation of Sentinel Nodes in Breast Cancer

乳癌のセンチネルリンパ節迅速診断における GeneSearch BLN Assay の有用性に関する検討

乳癌では腋窩リンパ節転移が重要な予後因子の一つであり、腋窩リンパ節郭清が標準術式とされてきた。近年、センチネルリンパ節 (SLN) 理論が乳癌で導入されている。SLN とは、主病巣より最初にリンパ流を受けるリンパ節であり、転移は先ず SLN に起こるという理論である。SLN が転移陰性の場合、他のリンパ節にも転移はないとする仮説である。国際的に多くの SLN に関する臨床試験が行われ、乳癌では SLN 理論が成立するとする事が実証され、臨床応用が広く行われている。しかし、乳癌手術で安全な腋窩リンパ節郭清の省略には、迅速かつ正確な SLN の転移診断が必要である。今回、申請者らは mammaglobin (MG) と cytokeratin (CK) 19 のダブルマーカーを用いた RT-PCR 診断法である GeneSearch Breast Lymph Node (BLN) assay による SLN 診断を、hematoxylin and eosin (HE) 染色および抗サイトケラチン抗体 (AE1/AE3) を用いた免疫染色の結果と比較し、臨床応用の可能性について検討した。

その結果、本研究で以下の知見が明らかとされた。

- 1) SLN は対象 117 例の全例で同定され、計 204 個の SLN (平均 1.73 個) が摘出された。HE 染色では 26 例、31 個 (15.2%) の SLN に転移を認めた。HE 染色で陰性であった 173 個の SLN のうち、免疫染色で 6 個に新たに転移が認められた。
- 2) BLN assay では 117 例中 32 例 (27.4%)、リンパ節個数では 40 個 (19.6%) が転移陽性と診断された。MG と CK19 の両方陽性は 17 個、CK19 のみ陽性は 16 個、MG のみ陽性は 7 個であった。
- 3) BLM assay と HE 染色および免疫染色の結果を比較した。HE 染色で転移陽性 31 個中 26 個 (83.9%) が BLM assay で陽性であった。また、免疫染色で陽性であった 6 個中 4 個 (66.7%) が BLN assay で陽性であった。一方、HE および免疫染色で両方とも陰性で、BLN assay のみ陽性であった SLN は 10 個 (10 例) であった。
- 4) HE 染色、免疫染色および BLN assay のいずれかが陽性であった SLN は計 47 個であった。それぞれの検出法による感度は HE 染色 : 66.0% (31/47)、免疫染色 : 78.7% (37/47)、BLN assay : 85.1% (40/47) であった。また、リンパ節転移の大きさから BLN assay の検出率を評価すると、macrometastasis は 95.7% (22/23)、micrometastasis は 60.0% (3/5)、isolated tumor cells は 55.6% (5/9) であった。

以上の結果から、乳癌手術の SLN の転移診断では、HE 染色および免疫染色に加え、BLN assay による診断は有用であり、安全かつ正確な手術が可能になることを示した点で非常に興味深い。よって本研究は学位論文として十分な価値を有するものと判定した。

最終試験の結果の要旨

報告番号	総研第141号		学位申請者	船迫 和
審査委員	主査	谷本 昭英	学位	博士(医学)
	副査	米澤 傑	副査	堂地 勉
	副査	高尾 尊身	副査	橋口 照人

主査および副査の5名は、平成23年8月1日、学位申請者 船迫 和 君に面接し、学位申請論文の内容について説明を求めると共に、関連事項について試問を行った。具体的には、以下のような質疑応答がなされ、いずれについても満足すべき回答を得ることができた。

質問1) センチネルリンパ節(sentinel lymph node: SLN)陰性で腋窩郭清を省略した症例で再発の報告があるか。

(回答) 本邦での多施設共同研究の結果でも1%未満ではあるが、腋窩郭清省略症例でのリンパ節再発が存在している。その原因として注入部位やSNLの同定方法などの手技的な問題やリンパ節転移診断の問題が指摘されている。

質問2) Radioisotope (RI)法でのSLNの同定方法に関して、2時間後のシンチ撮影が最も良いか。

(回答) 当科ではSLNの同定にRI法を選択してきた。その理由のひとつとして、色素法では手技的に安定性が無く、視覚に頼る点で偽陰性の原因となりうる。当科で使用している^{99m}Tc-Tinコロイドは安定性があり、シンチグラフィでの同定、γプローブによる同定ともに容易かつ確実に行えると考えられる。当科ではデータ集積のためにRI注入後のlymphoscintigraphyの撮像を行ってきた。^{99m}Tc-Tinコロイドは色素と異なりリンパ節に留まるため、RIの十分なリンパ節への移行という点からは、少なくとも2時間以降の撮影が妥当であると考えられる。

質問3) SLNが2個あった場合、これらは近くにあるのか、あるいは離れているのか。

(回答) 乳腺の場合、同一の領域内にSLNが存在することがほとんどであるが、稀に胸骨傍リンパ節や鎖骨上リンパ節など通常郭清を行わない領域に存在することもある。

質問4) SLNのRIカウントのcut off値があるのか。

(回答) 本研究ではナビゲーターを用いてバックグラウンドの10倍以上の放射能活性を持つリンパ節をSLNと同定し、検討した。

質問5) SLNのみに転移があった症例(10例)に対して追加切片の病理組織診断で再確認したか。GeneSearch Breast Lymph Node (BLM) assayでfalse positiveはあるのか。

(回答) BLM assayのみ陽性だった症例の半割リンパ節を全割しての確認は行っていない。全割すれば転移が確認される可能性はある。BLM assayで遺伝子マーカーとして用いているcytokeratin (CK19)については以前よりpseudogeneが指摘されている。しかし、mammaglobin (MG)とのダブルマーカーを用いることでcut off値を低く設定しているため、BLM assayでのfalse positiveの可能性は低いと考えられる。

質問6) 進行乳癌は減少しているのか。

(回答) 検診の普及により早期乳癌の割合が増え、進行乳癌の割合が減っている。

質問 7) 2008 年乳癌診療ガイドラインと本研究の違いがあるのか。

(回答) ガイドラインは全国多施設の多数例での、hematoxylin and eosin (HE)染色による診断を用いたデータをもとに検討されている。現実的には発表中に述べたように病理学的診断での偽陰性が存在しうるため、再手術や術後再発例がある。安全性を高めるうえでも、正確な SLN 転移診断が必要と考えられ、RT-PCR 法による全量的な評価法について検討した点がガイドラインと本研究の違いである。

質問 8) SLN 転移陽性症例に術前化学療法 (NAC)を行い、郭清を省略することが可能なのか。

(回答) 現在、全国規模の SLN 転移例に対する NAC 後の腋窩郭清省略に関する trial が進行中である。

質問 9) 子宮頸癌・体癌にセンチネルは臨床応用できるのか。

(回答) 婦人科領域についても以前よりセンチネルの臨床応用に関する報告は散見されるが、未だ一般化されていない。子宮頸癌・体癌についても臨床応用の可能性はあると思われる。

質問 10) 病理診断 (術中診断) のために中央切片だけを残し、残りの検体を PCR で診断してはどうか。

(回答) すでに当科で中央 1 mm 幅の病理検体を残したほぼ全量での BLN assay 診断の検討を行っている。現時点の結果では、半割の評価に比べると高い診断率が得られ、micrometastasis レベルであれば 100%の検出率である。また、両 side の診断結果を比べると約 4 割に異同を認め、転移巣の偏在の可能性を示唆するものとする。

質問 11) CK 抗体の中で AE1/AE3 と CK19 の違いは何か。

(回答) AE1/AE3 は CK1-8, 10, 14, 15, 16, 19 を含む pancytkeratin の抗体であるが、本研究の BLN assay の遺伝子マーカーは CK19 のみを用いている。そのことから免疫染色の結果と PCR の CK の結果が乖離した可能性はある。

質問 12) 乳癌のリンパ行性転移の機序はどの様に説明されているのか。

(回答) 乳腺内は比較的リンパ流が豊富であること、皮膚に近い部位に腫瘍が存在した場合、皮下の豊富なリンパ流を介して転移をきたしやすいという機序が推測される。

質問 13) 乳癌はリンパ行性転移を誘導する因子を分泌しているのか。

(回答) 我々はこれまでの研究で、リンパ節転移の初期状態では抗腫瘍的な免疫環境にあるが、転移を形成し始めると免疫が低下するということを確認している。また、ケモカイン等の腫瘍関連物質の SLN における発現も報告されている。

質問 14) 論文中的方法の部分で、SLN 同定に関して、RI 注入を行った 3 名が明記してある理由は何か。

(回答) ガイドラインにもあるように、SLN の同定には手技慣れ期間 (learning curve) があり、20 例以上の経験が最低でも必要といわれている。本論文ではこの手技を習熟した 3 名が行ったということをも明記した。

質問 15) 凍結切片を用いた術中診断、あるいは最終病理診断は病理医が行っているのか。

(回答) HE 診断結果は凍結切片、永久標本ともに病理医が診断した報告書の結果を用いた。

質問 16) OSNA 法が行われているが、BLN assay は今後普及するのか。

(回答) スライドで示したように OSNA 法にも問題があることが最近指摘されている。本研究の結果から見ると、微小転移の感度の点では BLN assay が優れていると思われる。しかし、OSNA 法を用いている施設が多いのが現状である。

質問 17) OSNA 法では SLN のコピー数で次の転移リンパ節を予測可能とする報告があるが、BLM assay ではどうか。

(回答) 乳癌は比較的 heterogeneity が少ないことから、コピー数によって転移の量的評価ができる可能性が報告されている。2 次リンパ節への転移の可能性が SLN の腫瘍量によって予測可能であれば、BLN assay でも同様な定量的評価による予測が可能である。

以上の結果から、5 名の審査委員は申請者が大学院博士課程修了者としての学力・識見を有しているものと認め、博士 (医学) の学位を与えるに足る資格を有するものと認定した。