

当院における 乳癌センチネルリンパ節転移診断 OSNA 法の使用経験

荒木 剛^{*1}, 足立 絵里加^{*1}, 上垣 真由子^{*1},
吉田 さおり^{*1}, 長崎 雅幸^{*1}, 柴田 宏^{*1}, 石川 典由^{*2},
荒木 亜寿香^{*2}, 原田 祐治^{*3}, 板倉 正幸^{*4}, 丸山 理留敬^{*2}

*1 島根大学医学部附属病院検査部；島根県出雲市塩冶町 89-1 (〒 693-8501)

*2 島根大学医学部医学科器官病理学

*3 島根大学医学部附属病院病理部

*4 島根大学医学部附属病院乳腺外科

要 旨

乳癌センチネルリンパ節転移検索法である One Step Nucleic acid Amplification (OSNA) 法は、乳癌センチネルリンパ節転移の有無を遺伝子増幅法により検出する方法で、リンパ節の可溶化から遺伝子増幅までを一工程で行うことができる。乳癌においてセンチネルリンパ節への転移の有無を知ることは、不必要な腋窩リンパ節郭清によるリンパ浮腫や神経障害などの合併症を減らすことにつながる。

今回、乳癌手術中に提出されたセンチネルリンパ節 108 個 (37 症例) について OSNA 法と病理組織学的診断結果との比較を行った。一致率は、術中迅速組織診 94.4%、永久標本組織診 93.5%と良好な結果が得られた。また、感度・特異度においても良好であった。不一致は 8 検体認めたが、転移部位の局在による不一致が否定できないことを考慮すると OSNA 法と病理組織学的診断は極めて高い一致率を示すと考えられる。この比較により OSNA 法の臨床的運用は有用であることが確認された。

キーワード OSNA 法, 乳癌センチネルリンパ節

はじめに

センチネルリンパ節は、リンパ管に入った癌細胞が最初に到達するリンパ節と考えられている。乳癌においてセンチネルリンパ節への転移の有無を知ることは、不必要な腋窩リンパ節郭清によるリンパ浮腫や神経障害などの合併症を減らすことにつながる。そのセンチネルリンパ節癌転移の検索方法の 1 つに OSNA 法がある。

OSNA 法は遺伝子増幅法を用い Cytokeratin19 (CK19) mRNA を検出する方法で、リンパ節の可溶化から遺伝子増幅まで一工程で行うことができる検査法である (図 1, 2)。当院で 2009 年 10 月より OSNA 法を導入したので、従来の病理組織学的診断方法との比較や使用経験について報告する。

OSNA 法の使用機器・試薬

1. 遺伝子増幅検出装置：RD-100i (シスメックス社)
2. 試薬：リンパ節可溶化試薬 (製品名：リノアーク, シスメックス社)
遺伝子増幅試薬 (製品名：リノアンプ BC, シスメックス社)

対象検体

当院乳腺外科にて術中迅速診断標本として提出されたセンチネルリンパ節 108 個 (37 症例) を用いた。

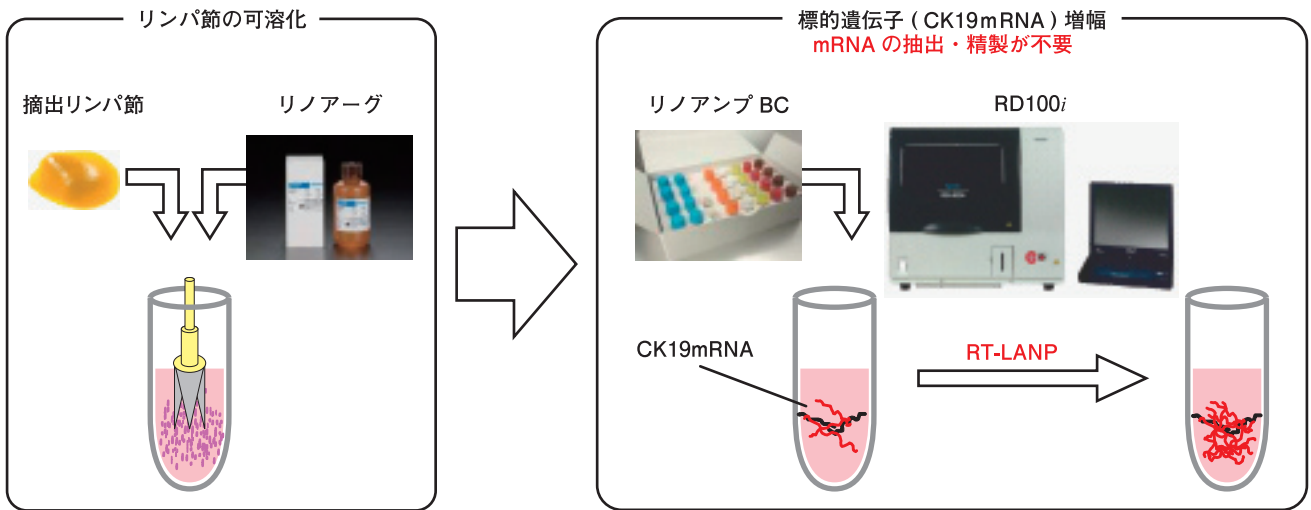


図 1. OSNA 法の工程

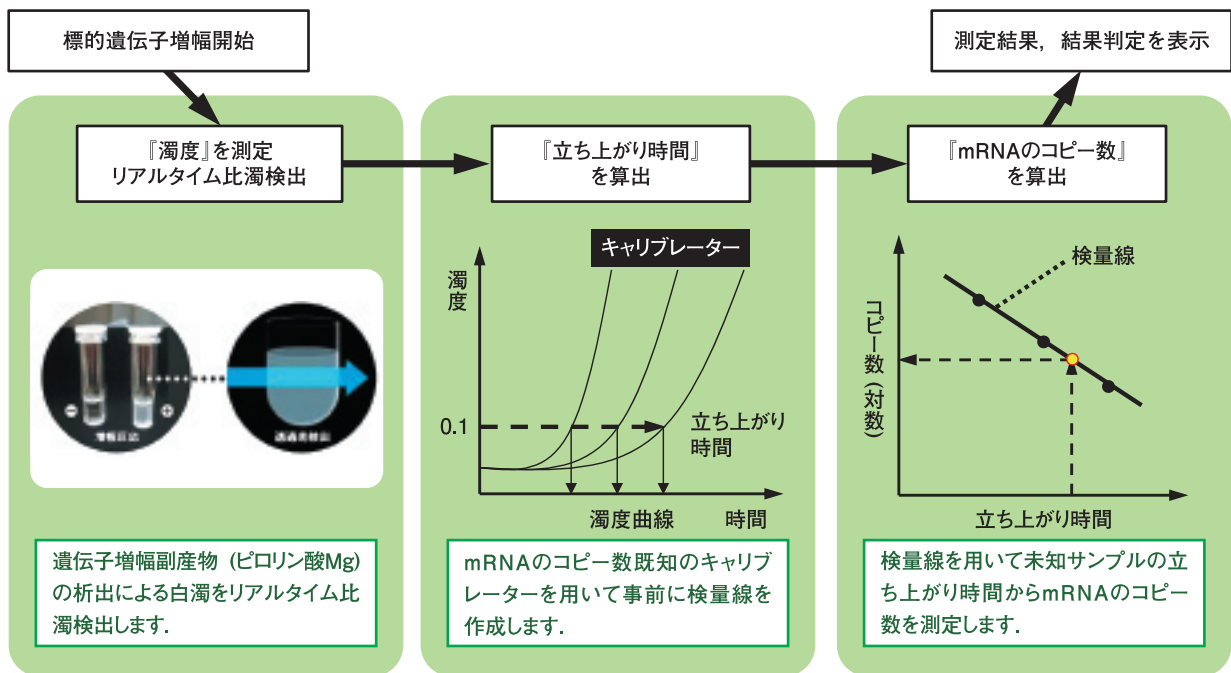


図 2. RD-100i による遺伝子増幅の検出法

比較方法

1. 乳癌手術中検体

センチネルリンパ節を長軸方向で3分割し、中央部で従来の術中迅速標本を作成し、残りをOSNA法にて測定した(図3)。

2. 術中迅速標本検体

ホルマリンで再固定し、200 μ m 間隔 (isolated tumor cells (ITC) をなるべく見落とさない間隔) で連続的に1対の標本を薄切、HE染色と Cytokeratin19

免疫染色 (CK19-IHC) を行い、癌転移の有無を確認し、病理組織学的診断結果と OSNA 法を比較した。

3. OSNA 法と病理組織学的転移の判定基準

OSNA 法の判定は、CK19mRNA 濃度が 5.0×10^3 copies/ μ L 以上を 2 + 陽性、 $2.5 \times 10^2 \sim 5.0 \times 10^3$ copies/ μ L を 1 + 陽性、および 2.5×10^2 未満を陰性とする。病理組織学的診断による転移の有無は、2mm 以上を macro meta, 0.2 ~ 2mm 未満を micro meta, および 0.2mm 未満を ITC とした(図4)。

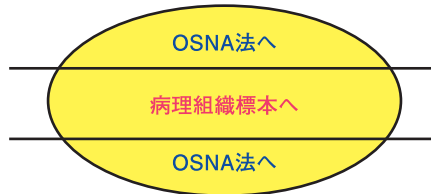


図3. リンパ節の分割の仕方

CK19mRNA 濃度 (copies/ μ L)	OSNA による測定結果	OSNA の判定
$5.0 \times 10^3 <$	++	陽性
$2.5 \times 10^2 \sim 5.0 \times 10^3$	+	
$2.5 \times 10^2 >$	-	陰性

組織診での meta (転移) の種類

- macro meta : 2mm 以上
- micro meta : 0.2mm ~ 2mm 未満
- ITC (isolated tumor cells) : 0.2mm 以下

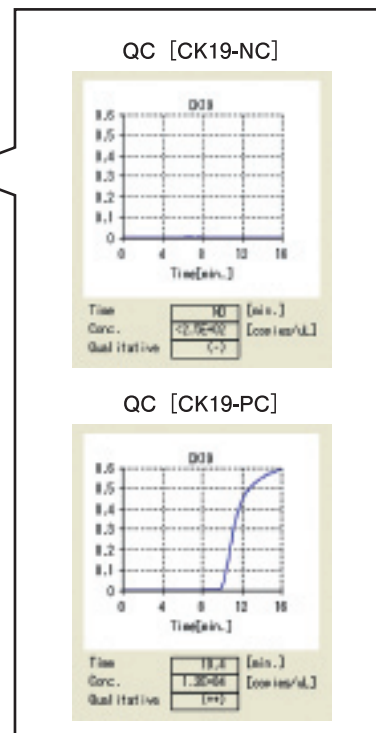


図4. OSNA 法判定結果

結果

1. OSNA 法と術中迅速組織診、および永久標本組織診の比較

OSNA 法と術中迅速組織診の一致率は 94.4%であり、OSNA 法の感度は 100%、特異度は 93.8%であった(表 1)。OSNA 法と永久標本組織診の一致率は 93.5%であり、感度は 85.7%、特異度は 94.6%であった(表 2)。従来の組織診で macro meta と判定した検体では、OSNA 法にて 100%の割合で陽性と判定された。

2. 不一致例

8 検体の不一致が存在した(表 3)。不一致検体 1, 3, 4, 5 において、腋窩リンパ節郭清が行われたが郭清後のリンパ節に腫瘍の転移は認めなかった。

3. 検査に要する時間の比較

結果報告までの時間は、術中迅速組織診は平均 28.5 分、OSNA 法は平均 59.8 分(平均センチネルリンパ節数 3.1 個)で、最大でも OSNA 法は報告まで 70 分であった(表 4)。

表 1. OSNA 法と術中迅速組織診

N=108 (37 症例)		術中迅速組織診				no LN	一致率：94.4% 感度：100% 特異度：93.8%
		陽性		陰性			
OSNA 法	陽性 (++)	9	1				
	陽性 (+)	1			5	1	
	陰性 (-)			2	84	5	

表 2. OSNA 法と永久標本組織診

N=108 (37 症例)		術中迅速組織診				no LN	一致率：93.5% 感度：85.7% 特異度：94.6%
		陽性		陰性			
OSNA 法	陽性 (++)	9	1				
	陽性 (+)	1	1		4	1	
	陰性 (-)			2	84	5	

表 3. 不一致検体

検体	OSNA 結果	術中迅速組織診	永久標本組織診
1	(-)	no meta	meta
2	(-)	no meta	meta
3	(+)	no meta	no meta
4	(+)	no meta	no meta
5	(+)	no meta	no meta
6	(+)	no meta	no meta
7	(+)	no meta	meta
8	(+)	no LN	no LN

表 4. センチネルリンパ節の結果報告時間

	平均時間
術中迅速組織診	28.5 分 (13 ~ 40 分)
OSNA 法	59.8 分 (43 ~ 70 分)

※平均センチネルリンパ節数 3.1 個

考 察

センチネルリンパ節への腫瘍転移の有無は、術中迅速組織診や術中迅速細胞診により判断されてきたが、より精度を高めるため Cytokeratin などによる術中迅速免疫染色を用いることも行われてきた。

術中迅速組織診と永久標本組織診における診断結果の一致率は 79% との報告¹⁾ や、術中迅速細胞診と併用することにより 96.3% になるとの報告²⁾ がある。しかし、その精度は標本作製における手技や、病理診断経験によって左右される可能性があり、結果のバラツキが存在することを考慮しなければならない。

今回筆者は、手技・経験のバラツキが少なくなると考えられる分子生物学的診断法の OSNA 法を導入した。

OSNA 法は、検討結果に示すように術中迅速組織診や永久標本組織診による結果と比べても、一致率・感度・特異度とも良好で、センチネルリンパ節転移の有無を調べる検査法として有用であると思われる。多施設共同研究による報告においても、良好な結果が得られている³⁾。また、この手技による判定結果が出る時間は 3～4 個提出時の測定においても 50～70 分と、測定者による差はほとんどなく、操作も簡便であった。

OSNA 法のみでの診断を行う場合には、提出されたリンパ節の全てを使用して検査するため、その結果を最終診断とせざるをえない。従来、病理検査においては癌そのものの転移像を観察、診断していたため、リンパ節すべてを OSNA 法に使用することは、目での確認なく診断をするという抵抗感が一般的にある。筆者らも OSNA 法導入前にセンチネルリンパ節として提出された検体にリンパ節は無く、異所性乳腺組織が含まれている症例を経験している。この例は上皮成分を含むため OSNA 法のみで診断すれば陽性と判定され、腋窩リンパ節郭清の対照になるものである。8 検体の不一致があったが、リンパ節内における転移部位の局在による不一致が否定できないこと(図5)を考慮すると、OSNA 法は従来の組織診と極めて高い一致率を示すと思われた。また、OSNA 法導入後においては、センチネルリンパ節が組織診で確認できず、OSNA 法も陰性であった症例で、腋窩リンパ節郭清を行い転移が確認された症例も存在した。

このように、従来通りの病理組織学的診断を併用すれば誤判定は避けられる場合もあるが、OSNA 法の最大の利点は、リンパ節への転移が小さく、病理組織診では標本上現れない可能性がある時に、最も効力が発揮されることにあると考える。OSNA 法に

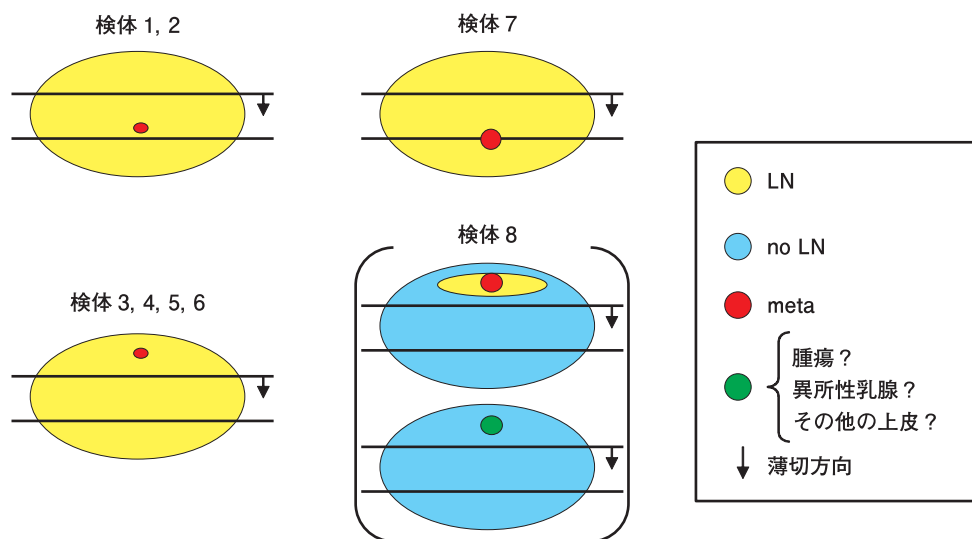


図5. 不一致検体リンパ節予想図

よるリンパ節転移の診断は、2mm 間隔で検索した場合の病理学的診断と同等との報告³⁾もあり、診断精度の優れた検査法であることが窺える。

他に考慮する点として、測定検体数やCK19 陰性症例などがある。

RD-100i における OSNA 法の測定検体数については、1 回に 4 検体と限りがある。センチネルリンパ節数は必ずしも 1 個ではなく数個以上認められ、平均 2.3 個あるとの報告もある⁴⁾。当院でも測定限界数以上にセンチネルリンパ節を提出された時に、OSNA 法による測定に用いた以外のリンパ節において、術中迅速組織診で転移を認めた症例を経験したため、今後はある程度の個数でも量的許容範囲 (500 ~ 600mg) を超えない程度に一緒に測定する方法も考える必要がある。

乳癌の中には CK19 陰性症例が、2.2% 存在するとの報告⁵⁾がある。そのためセンチネルリンパ節においても転移乳癌が CK19 陰性の症例があるものと考えられ、生検材料などで CK19-IHC の確認をし、OSNA 法を実施することが必要である。

結果報告までの時間は、OSNA 法が術中迅速組織診断より約 2 倍を要していた。通常 OSNA 法では 1 検体の測定時間は約 16 分で、4 検体+コントロールを測定しても約 30 ~ 40 分で報告できる。今回は、リンパ節の 3 分割や周囲の脂肪を除く作業が加わっていたため多くの時間を要したと思われる。一方、OSNA 法の結果判定は CK19mRNA 濃度測定による客観的な数値で表現されるため、組織診断のような熟練が不要な点も重要な利点と考えられる。

今後は、OSNA 法の利点に重点を置き、病理組織診断に用いる検体を小さくして比較することも必要と考える。

まとめ

OSNA 法は病理組織診断同様、精度の優れた検査法であり臨床的にも有用であることが証明された。しかし、提出リンパ節をすべて用いて検査を行えば、その結果は最終診断となるため、使用に当たっては OSNA 法単独で行うかあるいは組織診断と併用するかなどについて臨床側と十分協議して行うことが望まれる。

本論文の要旨は第 43 回中国四国医学検査学会 (2010 年 11 月) において発表した。

参考文献

- 1) 佐藤一彦, 平出星夫, 望月英隆. 特集 リンパ節の癌転移病態と至適郭清: 2. リンパ節の癌転移病態: センチネルリンパ節と転移限局例の考察. 日本外科学会雑誌. 2001; 102 (6): 445-448
- 2) 南雲サチコ 他. 乳癌におけるセンチネルリンパ節生検: (2) 細胞診断. 病理と臨床. 2004; 22 (5): 455-459
- 3) 松浦成昭, 伊藤絵望子. 分子病理診断と個別化治療: リンパ節転移の分子病理診断. 医学のあゆみ. 2009; 229 (10): 1019-1024
- 4) 黒住昌史. 乳癌におけるセンチネルリンパ節生検: (1) 病理診断. 病理と臨床. 2004; 22 (5): 448-454
- 5) Masahiko T et al. One-step Nucleic Acid Amplification for Intraoperative Detection of Lymph Node Metastasis in Breast Cancer Patients. Clin Cancer Res. 2007; 13 (16): 4807-4816

Experience of Using OSNA for Diagnosis of Sentinel Lymph Node Metastasis in Breast Cancer

Tsuyoshi ARAKI^{*1}, Erika ADACHI^{*1}, Mayuko UEGAKI^{*1}, Saori YOSHIDA^{*1},
Masayuki NAGASAKI^{*1}, Hiroshi SHIBATA^{*1}, Noriyuki ISHIKAWA^{*2}, Asuka ARAKI^{*2},
Yuhji HARADA^{*3}, Masayuki ITAKURA^{*4} and Riruke MARUYAMA^{*2}

*1 Central Clinical Laboratory, Shimane University Hospital, 89-1, Enya-cho, Izumo, Shimane 693-8501

*2 Department of Organ Pathology, Shimane University Faculty of Medicine

*3 Department of Pathology, Shimane University Hospital

*4 Surgical Oncology, Shimane University Hospital

SUMMARY

One Step Nucleic Acid Amplification (OSNA) is a method to detect sentinel lymph node (SLN) metastasis in breast cancer by using gene amplification. OSNA involves the homogenization of the lymph node and subsequent gene amplification at one step. Metastasis in SLN is considered a major factor in deciding the need for axillary lymph node dissection and eventually affects patients' Quality Of Life (QOL).

In this study, we compared the results of OSNA and histopathological diagnosis using 108 sentinel lymph node from 37 patients obtained during surgery for the breast cancer. The results showed very good concordance rate as 94.4% in intraoperative rapid histological diagnosis and as 93.5% in histopathological diagnosis of permanent preparation. Sensitivity and specificity were also excellent. Although there were discrepancies in 8 samples, it is believed that OSNA shows extremely high concordance rate with histopathological diagnosis considering undeniable possibility of discrepancy by site localization of metastasis. These results indicate that OSNA is useful in clinical applications.

Key Words OSNA Assay, Sentinel Lymph Node Metastasis in Breast Cancer
