原著

大腸癌の微小リンパ節転移の診断について —病理組織学的診断(HE染色, CK20免疫染色)と 分子生物学的診断(MASA法)の比較—

順天堂大学第1外科(大腸肛門外科)

根 上 直 樹 仙 石 博 信 中 野 誠
須 田 寸実人 田 中 真 伸 鎌 野 俊 紀

Diagnosis of the Metastases of Colon Cancer to Microlymphonodes —Comparison between Histopathological Diagnosis (HE staining, CK20 Immunostaining) and Molecular Biological Diagnosis (MASA Method)—

Naoki NEGAMI, Hironobu SENGOKU, Makoto NAKANO,
Sumito SUDA, Masanobu TANAKA and Toshiki KAMANO

First Department of Surgery (Coloproctology), Juntendo University, School of Medicine

大腸癌のリンパ節転移診断において、病理組織学的診断と分子生物学的診断の転移検出率にどの程度の差があるのか、手術症例36例、郭清リンパ節72個を対象として、肉眼的に転移なしと診断した郭清リンパ節のそれぞれ1個を2等分し、一方を病理組織学的診断(連続切片のHE染色とCK20免疫染色)に他方を分子生物学的診断(MASA法)に供して比較検討した。また、両診断法における1検体あたりのコストを算出した。両診断法の転移検出率に有意差はなかった。また、分子生物学的診断の方が有意にコストが高かった。診断結果不一致例3例のうち2例が分子生物学的診断ではstageが上昇した。より厳密なリンパ節転移診断には両診断法の結果を併せて評価することが望ましい。分子生物学的診断は、コスト・実用化の面で難点があるが、条件によっては病理組織学的診断より鋭敏であり、今後の発展が期待される。

索引用語: 大腸癌(colon cancer), 微小転移(micro metastasis), K-ras遺伝子(K-ras gene), MASA法(MASA method), サイトケラチン(cytokeratin)

緒 言

近年の分子生物学的手法の進歩は、通常の病理組織学的検討では同定できない癌の微小転移の検出を可能にした。それにともない、微小転移と予後との関連が指摘され始めている¹⁾²⁾。系統的なリンパ節郭清が施行され、病理組織学的にn(+)の診断で治癒切除と判定されたにもかかわらず、術後再発をきたす症例が少なからず存在する。このような症例では、切除の時点ですでに微量の癌細

胞が遠隔臓器や郭清されずに残ったリンパ節に存在していた可能性が考えられる。

今日までリンパ節転移診断は、病理組織学的診断のhematoxylin & eosin染色(以下: HE染色)による代表切片のみの鏡検で行われてきた。

しかし、リンパ節転移は大腸癌における重要な予後因子のひとつであり、微小リンパ節転移を免疫組織化学的検査法や分子生物学的手法により診断することは、より正確な病期判定、再発高危険群の予測、各種補助療法の適応の確立などにつな

がり, 重要な臨床的意義を持つと思われる³⁾⁴⁾。

これらの微小リンパ節転移の診断には, 形態学的な特徴を捉える免疫組織化学的検討⁵⁾⁶⁾を含む病理組織学的検査法か, polymerase chain reaction (以下: PCR) 法を用いて変異DNAやマーカー遺伝子を増幅して検出する分子生物学的手法が用いられている⁷⁾⁸⁾。しかし, 現時点では両診断法を一般に臨床応用している施設は多くない。

そこで, 今回われわれは大腸癌のリンパ節転移診断において, 病理組織学的診断と分子生物学的診断に, どの程度の差があるのか, それぞれの代表的検査法によるリンパ節転移検出率を算出し, 両診断法の診断結果を比較検討した。また, 両診断法のコストについても算出したので併せて報告する。

対象および方法

i 対象

1998年7月から1999年4月までの期間に教室で切除し, インフォームドコンセントの得られた大腸癌症例36例(男性23例, 女性13例, 平均66.7歳)を対象とした。

大腸癌の内訳は, 直腸癌12例, 右側結腸癌10例(横行結腸癌1例, 上行結腸癌6例, 盲腸癌3例), 左結腸癌14例(下行結腸癌3例, S状結腸癌11例), であった。郭清度はD2 26例, D3 10例で, 根治度

A 30例, B 2例, C 4例であった。大腸癌取り扱い規約による進行度分類ではstage I 4例, stage II 12例, stage IIIa 8例, stage IIIb 7例, stage IV 5例であった。

ii 方法

大腸癌切除時に, 「肉眼的に転移なし」と診断した郭清リンパ節(各症例2個ずつで, 1群と郭清度に準じた2~3群の計72個)を無作為に選出した。それぞれのリンパ節1個を2等分し, 一方を病理組織学的診断に, 他方を分子生物学的診断に供した (Fig. 1)。

1. 病理組織学的診断

各検体を最大径5 mm以下に分割し, ホルマリン固定後にパラフィン包埋したものを標本として使用した。

佐々木らの方法⁵⁾⁶⁾に従い, 各標本の連続切片を厚さ10 μ mで5枚ずつ作製後, 第1枚目と第5枚目の切片にHE染色を施行した。さらに, 第2から4枚目の切片には抗サイトケラチン20免疫染色 (Cytokeratin 20, Ks 20.8 DAKO社, 以下: CK20) を施行した⁹⁾¹⁰⁾。

HE染色かCK20免疫染色の, どちらか一方でも転移を認めた場合は, 病理組織学的に「転移あり」と判定した。なお, 検査方法自体による偽陽性, 偽陰性の可能性を低くするために, 原発巣についてもCK20の染色性を確認した。

Fig. 1 Shema of diagnosis methods and point mutation of K-ras gene codon 12.

MTO primer used for measurement

		Reactive base (codon 12)
wild	ACTTGTGGTAGTTGGAGCTGG	GGT
mutant		
1st		
set1	ACTTGTGGTAGTTGGAGCTC	CGT
	ACTTGTGGTAGTTGGAGCTT	TGT
	ACTTGTGGTAGTTGGAGCTA	AGT
2nd		
set2	CTTGTGGTAGTTGGAGCTGC	GCT
	CTTGTGGTAGTTGGAGCTGT	GTT
	CTTGTGGTAGTTGGAGCTGA	GAT

Fig. 2 MTO primer used for measurement.

2. 分子生物学的診断

点突然変異の解析としてはmutant allele specific amplification法（以下：MASA法）⁷⁾¹¹⁾¹²⁾を用いた。標的遺伝子はK-ras遺伝子のコドン12とし、コドン12の3個の塩基のなかでもアミノ酸置換をおこす、最初の2塩基(1st, 2nd)の変異を対象とした（Fig. 1）。

測定に使用したmutation trapped oligonucleotideプライマー（以下MTOプライマー）はFig. 2に示したとおりである。以下測定操作の概要を記す。検体から抽出したDNA 100ngと、wild, set1, set2のそれぞれのMTOプライマーをPCRにかけ、そのPCR productを電気泳動して判定した。増幅されたDNAの確認はアガロース電気泳動を行い、ゲル上でエチレンブロマイドに染色されるバンドを、wild, positive controlのバンドと比較して50コピー相当以上を転移と判定した。

なお、検査方法自体による偽陽性、偽陰性の可能性を低くするために、原発巣についてもK-rasコドン12の変異の有無を、同様にMASA法で確認した。

3. 病理組織学的診断と分子生物学的診断に必要な経費

両診断法それぞれの1検体あたりのコストを算出した。なお、両診断法を施行し得る設備は完備されているものとし、技術料を含む人件費や光熱費は加算していない。

なお、統計学的解析には χ^2 検定を用い、 $p < 0.05$ を有意差ありとした。

成 績

i リンパ節転移検出率の比較

Table 1 Comparison of diagnoses of its metastasis to lymphonodes Histopathological metastases (HE・CK 20) VS. Molecular biological metastases (MASA method)

	The metastases to lymphonodes	
	The number of positive nodes (%)	Positive cases (%)
	n = 72	n = 36
HE・CK20	4 nodes (5.6%)	4 cases (11.1%)
MASA	5 nodes (6.9%)	5 cases (13.9%)

「肉眼的に転移なし」と診断したリンパ節72個のうち、HE染色で4個（5.5%）、CK20免疫染色で2個（2.8%）のリンパ節に転移を認めた。CK20免疫染色で陽性となった2個はいずれもHE染色でも陽性であったため、病理組織学的診断としては4個（5.5%）の転移を確認した。なお、HE染色で陽性を示した4例中2例ではCK20免疫染色が陰性であったが、その2例はリンパ節と同様に、原発巣のCK20免疫染色も陰性であった。一方、MASA法では5個（6.9%）のリンパ節に転移を確認した。

各症例で提出した2個のリンパ節は、いずれの方法でも、2個とも転移陽性を認めた例は1例もみられなかった。したがって、転移リンパ節は各症例に1対1で対応することになり、検索した36例中、病理組織学的診断では4例（11.1%）が転移陽性であり、分子生物学的診断では5例（13.9%）が転移陽性を示した（Table 1）。

ii 両診断法におけるリンパ節転移の統計学的解析

Table 2 Diagnostic discrepant cases of its metastases to lymphonodes Histopathological metastases (HE・CK 20) VS. Molecular biological metastases (MASA method)

MASA	Positive	Negative
HE・CK20		
Positive		1 case(2.8%)
Negative	2 cases(5.6%)

Fig.3 Case 1. Histopathological diagnosis: Continuous sections stained by HE showed no metastasis to lymphonodes (HE ×40).

病理組織学的診断と分子生物学的診断のリンパ節転移検出率に有意差はみられなかった。

iii リンパ節転移診断の不一致率

「肉眼的に転移なし」と診断したリンパ節を検索した36例のうち, MASA法では陰性であったが, 病理組織学的診断で転移を認めた例は1例(2.8%)であった。また, それとは反対に, 病理組織学的診断では陰性であったが, MASA法で転移を認めた例は2例(5.6%)であった。したがって, 診断が不一致となった例は, 両者を合わせて3例(8.3%)であった (Table 2)。

病理組織学的診断と分子生物学的診断が一致しなかった例を呈示する。

症例1: 74歳, 男性。右側結腸癌(上行結腸癌,

Fig.4 Case 1. Immunohistological diagnosis: Continuous sections stained by CK20 showed no metastasis to lymphonodes (CK 20 ×40).

Fig.5 Case 1. The mutation of K-ras codon 12 1st letter was found.

lane 1: Size Marker pUC19/Mspl.
lane 2: Positive Control 1 (5×10⁵).
lane 3: Positive Control 2 (5×10²).
lane 4: Positive Control 3 (5×10¹).
lane 5: Healthy Control 1.
lane 6: Healthy Control 2.
lane 7: Healthy Control 3.
lane 8: Case 1.

2型, 高分化腺癌)で, 211番のリンパ節を検索したところ, HE染色, CK20免疫染色ともに陰性であったが(Fig. 3, 4), MASA法では陽性を示した(wild陽性1st letter陽性2nd letter陰性) (Fig. 5)。

症例2: 80歳, 男性。右側結腸癌(横行結腸癌, 2型, 中分化腺癌)で, 221番のリンパ節を検索したところ, HE染色, CK20免疫染色ともに陰性であったが, MASA法では陽性を示した(wild陽性1st letter陽性2nd letter陰性)。

症例3: 60歳, 男性。左側結腸癌(S状結腸癌,

Fig.6 Case 3. Histopathological diagnosis: The continuous sections stained by HE showed metastasis to lymphonodes (HE ×40).

Fig.7 Case 3. Immunohistological diagnosis: Continuous sections stained by CK 20 Showed metastasis to lymphonodes (CK 20 ×40).

2型、中分化腺癌)で、肝臓と肺に遠隔転移を認めていた。253番のリンパ節を検索したところ、HE染色、CK20免疫染色ともに陽性であったが(Fig. 6, 7)、MASA法では陰性を示した(wild陽性1st letter陰性2nd letter陰性)(Fig. 8)。この例は、原発巣にもK-rasコドン12に変異のないことをMASA法で確認した。

iv 診断結果不一致によるstageへの影響

診断結果不一致例の進行度を、分子生物学的診断に基づいて、従来のstage分類で再評価すると、症例1はstageIIからstageIIIaに、症例2はstageIからstageIIIaへとstageが上昇した。なお、症例3は遠隔転移を認めていたため、stageに変化はなかった(Table 3)。

v 両診断法のコスト比較 (1検体あたり)

K-RAS CODON12 MASA法 1ST LETTER

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17

Fig.8 Case 3. No mutation was found in K-ras codon 12 1st, and 2nd letter (The photo shows the result of 1st letter).

lane 1: Size Marker pUC19/Mspl.

lane 2: Positive Control 1 (5×10^5).

lane 3: Positive Control 2 (5×10^2).

lane 4: Positive Control 3 (5×10^1).

lane 5: Healthy Control 1.

lane 6: Healthy Control 2.

lane 7: Healthy Control 3.

lane 8: Case 3.

Table 3 Influence of different diagnostic results on the stage

Cases	stage	
	HE・CK20	MASA
1 74 y.o. male Type2 ascending colon cancer well differentiated adeno carcinoma	II	IIIa
2 80 y.o. male Type2 transverse colon cancer moderately differentiated adeno carcinoma	I	IIIa
3 60 y.o. male Type2 sigmoid colon cancer moderately differentiated adeno carcinoma, positivity for its metastases to the liver and lung	IV	IV

病理組織学的診断では免疫染色がやや高価なため、1検体あたりのコストは約2,500円であった。分子生物学的診断では需要の少ない特異なプライマーを必要とするため、1検体あたりのコストは約12,000円であった。単純計算でも分子生物学的診断の方が約5倍近く経費がかかり、有意にコストが高かった。

考 察

日常の臨床において、病理組織学的診断でn(一)であっても、術後再発をきたす症例が実際に

存在する。そのような症例の遠隔臓器やリンパ節には、手術の時点ですでに微量の癌細胞が着床もしくは転移していたと推測される¹³⁾¹⁴⁾。そこで、このような潜在、微小転移を診断することができれば、従来よりさらに厳密な予後評価と適切な治療が可能になると期待されている。実際、さまざまな診断法が開発され、実用化に向け試行されている¹⁾²⁾。

形態学的な特徴を捉える診断法としては、連続切片作製後の鏡検による病理組織学的方法と免疫組織学的方法がある⁹⁾¹⁰⁾。一方、分子生物学的手法を用いる診断法としては、変異DNAをPCRにより増幅して検出する方法や、マーカー遺伝子の遺伝子転写物(以下mRNA)から鋳型DNAを合成しPCRで増幅するreverse transcriptase-polymerase chain reaction(以下RT-PCR)法などがある⁸⁾¹³⁾。

今回、形態学的(病理・免疫組織学的)診断法の感度をあげるために、上皮細胞のマーカーであるCK20を用いて免疫染色を施行した。CK20は理論上、1個の癌細胞がリンパ節内にあるだけでも同定可能であり、下部消化管癌の原発巣および転移巣に95%以上の確率で診断されると報告されている⁹⁾¹⁰⁾。また、分子生物学的診断法としては変異DNAをPCRにより増幅するMASA法を選択した。純粋に感度のみを比較するとRT-PCR法に劣るが、実験操作過程で生物学的にmRNAより安定しているDNAを扱うからである。MASA法でも理論上、約1万個の正常細胞中に潜んでいる1個の腫瘍細胞を診断することができるとされている⁷⁾¹¹⁾¹²⁾。

以上のような理由から、潜在、微小転移を含めたリンパ節転移の診断に十分な感度であると判断し、病理組織学的診断(HE・CK20)と分子生物学的診断(MASA法)の結果を比較検討した。

実際今回の検討で、「肉眼的に転移なし」と診断されたリンパ節であっても、病理組織学的診断では4例(11.1%)が転移陽性となり、分子生物学的診断では5例(13.9%)が転移陽性となった。また、分子生物学的診断(MASA法)では陰性であったが、病理組織学的診断で転移を認めた例が1例(2.8%)、病理組織学的診断では陰性であっ

たが、分子生物学的診断(MASA法)で転移を認めた例が2例(5.6%)存在した。

両検査法の検出率に有意差はなく、むしろ診断結果が不一致となる症例が存在した。その理由は、病理組織学的診断で捉えきれなかったリンパ節転移が分子生物学的診断によって検出され、逆に分子生物学的診断の欠点のために検出されなかったリンパ節転移が病理組織学的診断によって捉えられていたからであろう。

つまり、両診断法がお互いの欠点を相補し合った結果であると推測された。

お互いの欠点とはそれぞれ下記のとうりである。すなわち、病理・免疫組織化学的診断法は形態学的特徴を捉えるという診断法であるがゆえに、疑陽性の確率が低いという利点をもつ反面、偽陰性(見逃し)をなくすには膨大な数の連続切片を作製しなければならないという欠点がある。

一方、分子生物学的診断法は、変異DNAやマーカー遺伝子を、検体の一部からではなく、全体から抽出するので、偽陰性(見逃し)の確率が低いという利点をもつ。しかし、原発・転移巣に検出可能な変異DNAや定量化できるマーカー遺伝子が存在しない場合は診断できないという欠点がある。

今回のMASA法では、K-rasのコドン12の変異のない癌は検出できない。K-ras遺伝子の点突然変異は大腸癌全体の50~60%にしか認められず¹⁵⁾、コドン12の変異はさらにその約80%にしか認められない。また、de novo癌においてはその発生段階でK-rasの変異を介さないといわれている¹⁶⁾。さらに、MASA法では転移能やviabilityの問題も残されている。viableな癌細胞を検出できるとされるRT-PCR法も、検体中に標的とするマーカー遺伝子が正常組織より有意に存在しなければ診断できない。分子生物学的診断法は上述のような理論・技術的な課題のみならず、コスト的にも問題がある。実際、今回の検討でも免疫染色を加えた病理組織学的診断法の約5倍ものコストがかかることが判明し、分子生物学的検査法が広く普及し、需要と供給のバランスが取れない限りコストの低下は困難なように思われる。医療費削減が叫ばれている今日、現段階ではコスト面からも

臨床応用上まだ問題を抱えている診断法と言えるのではないだろうか。

コストの問題は別として、前述のような利点・欠点があるために、診断結果不一致例の存在は両診断法がお互いの欠点をそれぞれの利点で相補し合った結果であると推測されるに至った。このことから、現段階においては、両検査法の診断結果を併せて評価することが、より厳密なリンパ節転移診断となる可能性が示唆された。

潜在・微小転移の検出が可能な両診断法はともにその利点である鋭敏さに注目が集まっている反面、viabilityや転移能まで、確認できなければ検出する意味がないと欠点を指摘する論文も報告されている¹⁷⁾。これらの方法では、増殖能を持たない遊離癌細胞や、免疫担当細胞に貪食された癌細胞のDNA断片など、死んでいる癌細胞を潜在、微小転移として検出してしまう可能性が指摘されている¹⁷⁾。しかし、検出されたすべての癌細胞が転移能のない死にゆく癌細胞とは考えにくく、転移能をもつ生きた癌細胞の存在を推測するひとつの材料であることにまちがいはないと思われる。

Viabilityや転移能の問題を解決するために、形態学的な特徴を捉える病理・免疫組織学的診断法では、癌細胞の周囲に間質反応を伴うことを確認し転移能の有無を判定する方法が提唱されはじめた¹⁸⁾。また、分子生物学的診断法では、mRNAが分解されやすいことを利用して、viable cellの存在が証明できるとするRT-PCR法などが開発されている⁸⁾。

このviabilityや転移能の問題に関しては今後の検討課題として、現時点での分子生物学的診断を従来のstage分類で再評価すると、病理組織学的診断よりstageの上昇する症例が存在した。現在のところ、stageの上昇する2例はともに再発の兆候をみない。

しかし、文献的にはすでに、微小転移に対する分子生物学的診断や病理（免疫）組織化学的診断とその予後（再発）に高い相関が認められたとする報告が散見される³⁾⁶⁾、また、分子生物学的診断においては、CK20 RT-PCRの方がMASA法より鋭敏であるとの報告もある¹⁹⁾。さらなる症例の追加検討と、微小転移陽性例の追跡予後調査により、

病理組織学的診断と分子生物学的診断の感度・特異度による精度の比較が今後の検討課題である。

また、潜在・微小転移の検索がより盛んに行われるようになった場合、より多くの症例のstage上昇が予想され、潜在・微小転移の予後を反映し、かつ、従来のstage分類との整合性をもった新しいstage分類が必要になってくるのではないだろうか。

結 語

大腸癌のリンパ節転移診断において、病理組織学的診断と分子生物学的診断の転移検出率に有意差はなく、むしろ診断結果不一致例が存在した。

この結果から現時点においては、より厳密なリンパ節転移診断をくだすには両診断法の限界と欠点を補うべく、両診断法の結果を併せて評価することが望ましい。また、分子生物学的診断はいまだコストが高く、現時点では臨床応用・実用化の面において、難点がある。しかし、遺伝子変異が術前に同定されているという条件下に限っては、大腸癌のリンパ節転移の検出において分子生物学的診断が病理組織学的診断より鋭敏である可能性があり、今後の発展が期待される。

なお、本論文の要旨は第55回日本消化器外科学会総会（宮崎）にて発表した。

謝 辞

稿を終えるにあたり、ご指導、ご協力を賜りました大腸肛門外科の諸兄に深謝致します。

参考文献

- 1) 小川道雄：癌の潜在・微小転移の検索—現状と今後の課題—。Surg Fronti 8：5-7, 2001
- 2) 愛甲 孝，中条哲浩，松本正隆他：リンパ節微小転移の検出。Surg Fronti 8：40-45, 2001
- 3) 中村祐輔，須貝幸子：がんの遺伝子診断。遺伝子医 1：41-44, 1997
- 4) Hayashi Naoko, Ito Isao, Yanagisawa Akio, et al：Genetic diagnosis of lymph-node metastasis in colorectal cancer. Lancet 345：1257-1259, 1995
- 5) Sasaki Masataka, Watanabe Hidenobu, Jass

- JR, et al: Immunoperoxidase stainig for cyto-keratins 8 and 18 is very sensitive for detection of occult node metastasis of colorectal cancer. *Histopathology* 32: 199-208, 1998
- 6) 小向慎太郎, 西巻 正, 渡邊英伸他: 微小リンパ節転移の免疫組織学的検出法. *Surg Fronti* 8: 8-12, 2001
 - 7) 林 尚子, 江上 寛, 高野 定他: MASA法による変異遺伝子の検出とその臨床応用. *日消外会誌* 30: 89-92, 1997
 - 8) 前原喜彦, 古賀 聡, 織田信弥他: 分子生物学的手法を用いた微量癌細胞の検出法—RT-PCRを用いるアプローチ—. *Surg Fronti* 8: 17-22, 2001
 - 9) Roland Moll, Andrea Lowe, Jurgen Laufer, et al: Cytokeratin 20 in Human Carcinomas. *Am J Pathol* 140: 427-447, 1992
 - 10) 栗原世津子, 當間由子, 深瀬知之他: 皮膚転移巣から見出されたS状結腸癌—CK 20免疫染色による検討—. *皮の臨* 42: 489-492, 2000
 - 11) 服部隆志, 福地邦彦, 五味邦英他: K-rasを用いた大腸癌の遺伝子スクリーニング法の検討. *日本大腸肛門病会誌* 50: 33-40, 1997
 - 12) Takeda Satoshi, Ichii Shigetoshi, Nakamura Yusuke: Detection of K-ras Mutation in Sputum by Mutant-Allele-Specific Amplification (MASA). *Human mutation* 2: 112-117, 1993
 - 13) 藤原義之, 矢野雅彦, 塩崎 均他: リアルタイム定量的PCR法による術中迅速遺伝子診断. *Surg Fronti* 8: 34-39, 2001
 - 14) 林 尚子, 小川道雄: 変異DNAを標的とした分子生物学的検出法. *Surg Fronti* 8: 13-16, 2001
 - 15) 黒瀬圭輔, 江見 充, 中村祐輔: 多段階発癌. *遺伝子医* 1: 36-40, 1997
 - 16) 中森正二, 門田守人: 大腸癌治療における微小転移遺伝子診断の現状と問題点. *PRACTICAL ONCOLOGY* 13: 2-4, 2000
 - 17) Paul Hermanek: Disseminated Tumor Cells versus Micrometastasis: Definitions and Problems. *ANTICANCER RESEARCH* 19: 2771-2774, 1999
 - 18) Natsugoe S, Mueller J, Stein HJ, et al: Micrometastasis and tumor cell microinvolvement of lymphnodes from esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer* 83: 858-866, 1998
 - 19) Kankatsu Yun, Arend EHM, Jeremy Gunn, et al: Keratin 20 is a specific marker of submicroscopic lymph node metastases in colorectal cancer: validation by K-RAS mutations. *J Pathol* 191: 21-26, 2000