

OSNA (One-Step Nucleic Acid Amplification) 法の乳癌リンパ節転移術中迅速検査への応用

OSNA (One-Step Nucleic Acid Amplification) assay for intra-operative detection of lymph node metastasis in breast cancer

つじ もと まさ ひこ
辻 本 正 彦
Masahiko TSUJIMOTO

I. 乳癌治療とリンパ節転移

乳癌は近年増加の一途をたどり、女性の癌罹患率の第1位となっている。乳癌において、リンパ節転移の転移個数は、現在のところもっとも強力な予後予測因子とされている¹⁻⁴⁾。したがって、乳房腫瘍切除とともに、必ず腋窩リンパ節郭清が行われ、郭清されたリンパ節は組織学的検査に提出され、癌細胞転移の有無が判定されて、その結果に応じた治療指針がたてられている⁵⁾。近年マンモグラフィなどの画像診断の進歩により、小さな乳癌が多く発見されるようになり、郭清されたリンパ節に癌細胞転移を認めないリンパ節転移陰性乳癌 (pN0 乳癌) が手術症例全体の約7割を占めるようになった。腋窩リンパ節郭清は患肢のリンパ浮腫などの合併症を少なからず生じる。したがって、pN0 乳癌が主体となった現在では、多くの症例でリンパ節郭清を省略でき、術後の合併症を回避できる可能性が高いと考えられる。どの症例に対して腋窩リンパ節郭清を省略できるかを、術前ないし術中に適正に選別できる方法の出現が望まれていた。

II. センチネルリンパ節生検

「センチネル」とは英語で、戦争時に最前線で敵の襲来を最初に発見する「見張り役の歩兵」のことを意味している。センチネルリンパ節 (SLN) とは、癌細胞が原発巣から遊離して、最初に到達するリンパ節のことを示している⁶⁾ (図1)。SLN 生検とは、このリンパ節 (通常1から数個) を同定し、それを詳細に病理組織学的に検討する方法である。その結

果、SLN に転移がなければ、他のリンパ節には転移がないとして、追加のリンパ節郭清を省略し、転移が確認されれば、他のリンパ節にもすでに転移があり得るということで追加郭清を行う。この方法で、合併症の生じる恐れのある定型的なリンパ節郭清を省略することが可能となる。SLN 生検は最初に悪性黒色腫に適応となり⁷⁾、1993年 Krag らにより、はじめて乳癌に導入された⁸⁾。本邦では乳癌 SLN 生検の手技は現段階では保険収載されていない (近々保険収載される予定) が、実際は約6割の施設で安全に行われるようになっており (日本乳癌学会ホームページ参照)、乳癌患者のQOLの向上に貢献している。本方法では多くの場合、手術中に外科医がSLNを同定し、そのリンパ節を病理医が病理組織学的に術中迅速診断して、転移の有無を判定し、陽性であれば、続いて腋窩リンパ節郭清を行い、陰性であれば郭清を省略するものである。もし術中の病理組織学的判定が偽陰性の場合、つまり術中迅速診断では陰性の判定であったが、術後そのSLNを永久標本で確認した際に癌細胞が発見された場合、その患者さんは乳癌治療の最大の予後予測因子である

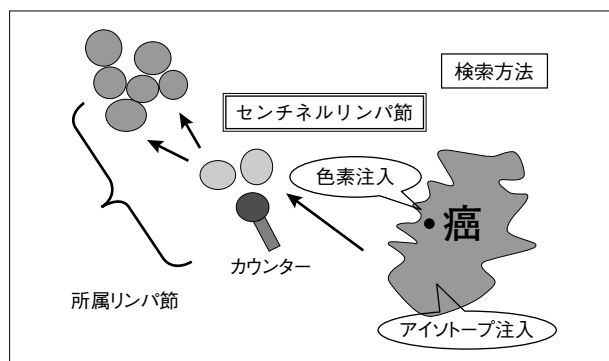


図1 センチネルリンパ節とその検索方法

転移陽性リンパ節個数を確認するというだけの目的で、再入院して腋窩リンパ節郭清手術を受けないといけないことになる。

Ⅲ. センチネルリンパ節転移検索方法の現状と問題点

外科医の仕事である SLN の同定に関しては、最近アイソトープと色素を併用し、その同定率の向上が図られ、約 95% の同定率といわれている⁹⁾。一方、病理医の仕事である術中の SLN の癌転移診断に関しては、正確な診断を術中の約 30 分程度の短時間で行う必要がある¹⁰⁾。しかし、通常の術中迅速診断で行われているリンパ節の最大割面 1 面のみを観察する転移診断法では、術後の永久標本と比較して、文献的な報告では約 2 割の偽陰性が生じるとされ、実際約 2 割の患者が再手術を受けることになる¹¹⁻¹³⁾ (表 1)。しかし、本邦ではさまざまな理由で、現在術中に最大 1 割面のみの検索を実施している施設が多い。また術後の検索に関しても、多数の切片を作成し、免疫染色も追加して詳細に検討する施設から、1 面しか観察しない施設までさまざまである。

そもそも、病理学的検索はリンパ節の全体を観察できず、図 2 に示すように観察する面によって、診断結果が異なるという形態学が持つ限界がある。2001 年にコンセンサス・ミーティングが開かれて、SLN 検索の一応のガイドラインは提示され、乳癌の規約に取り入れられている^{3, 14)}。しかし現在のところ世界的に見ても、SLN における病理組織学的な癌転移診断方法は標準化されておらず、その精度管理も行われていないのが現状といわざるをえない。

一方、分子生物学的な検索方法は、病理組織学的

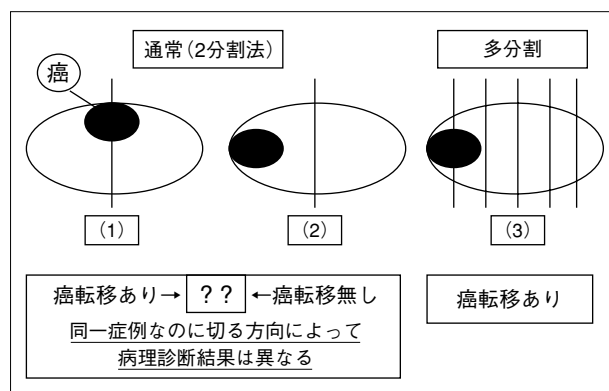


図 2 リンパ節の組織学的検索方法における矛盾

な検索よりもリンパ節全体を検索できるという点で優れている。RT-PCR (Reverse-Transcription Polymerase Chain Reaction) 法などの遺伝子検査法が試みられている^{15, 16)}。しかし RNA の抽出・精製には、時間を要する煩雑な操作や特別な実験環境、そして訓練された技師が必要であり、一般の検査室にて術中迅速検査に応用することは困難であるとされてきた。さらに、抽出・精製工程における RNA 回収率が一定しない点や、ゲノム DNA の増幅が避けられない点についても問題視されている。以上の理由から、SLN 生検では、術中に精度よく迅速、簡便に転移を検出できる新規の検査法の開発が望まれていた。

Ⅳ. 新規の癌リンパ節転移検査法 (OSNA 法)

われわれは、上記の課題を克服するため、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 OSNA 法 (One-Step Nucleic acid Amplification assay) を開発した¹⁷⁻¹⁹⁾。

1. OSNA 法の概要

OSNA 法は専用の可溶化試薬 (リノアーク) を用

表 1 乳癌 SLN 術中迅速診断の感度・特異度

First author	Year	Intraoperative technique	Definitive pathological examination	Metastases intraoperatively/ total no. patients	Metastases in permanent section/ total no. patients	Sensitivity (%)	Specificity (%)
Noguchi et al.	1996	FS; 1L	PS; 1L; H&E	65/243 (27%)	84/243 (35%)	77	100
Mayzler et al.	1999	FS; 1L	PS; 6L; H&E and IHC	6/28 (21%)	111/278 (40%)	55	100
Dixon et al.	1999	FS; 1L	PS; 3L; H&E	19/88 (22%)	26/88 (30%)	73	100
Kelly et al.	1999	FS; >1L	PS; 4L H&E; 2L IHC	9/19 (47%)	11/19 (58%)	82	100
Hill et al.	1999	FS; 1L	PS; 3L; H&E IHC	68/405 (17%)	78/405 (19%)	87	100
van Diest et al.	1999	FS; >1L	PS; 5L H&E; 5L IHC	21/54 (%)	23/54 (43%)	91	100
Tanis et al.	2001	FS; 1L	PS; 3L H&E; 1L IHC	71/265 (36%)	96/265 (36%)	74	99

FS, frozen section; L, level; PS, paraffin section; H&E, hematoxylin and eosin; IHC, immunohistochemical staining.

P. Tanis, et. al., Annals of Surgical Oncology. (2001) 8. 222-226.

いてリンパ節を可溶化し、遠心分離後の上清を測定サンプルとして用いることで、RNAの抽出・精製操作を行うことなくサンプル中の標的 mRNA を検出・定量できる。また、OSNA 法による測定においては専用の遺伝子増幅検出装置 (RD-100i) を用いて遺伝子増幅試薬 (リノアンプ BC) の分注が自動で行われるため、試薬調製などの手間を必要とせず、高い簡便性を有している。

OSNA 法はその遺伝子増幅原理として RT-LAMP 法 (Reverse-Transcription Loop-mediated Isothermal Amplification method) を採用している^{20~25)}。本法では遺伝子増幅反応が 65℃ の等温下で連続して進

むため、PCR (polymerase chain reaction) 等で必要とされるサーマルサイクラーのような特殊な機器を必要としない。また、6 種類の専用プライマーを用いるため、増幅効率が非常に高く、反応開始から検出までが約 16 分と迅速に完了する。さらに、サンプル中の標的 mRNA 量と検出時間との間には高い相関関係があり、キャリブレーションから作成された検量線を用いてサンプル中の標的 mRNA 量を定量することができる。この特徴を利用して、OSNA 法による乳癌のリンパ節転移診断では、標的 mRNA 量に応じてリンパ節転移を陰性 (-) / 陽性 (+, ++) に定性判定している¹⁷⁾。

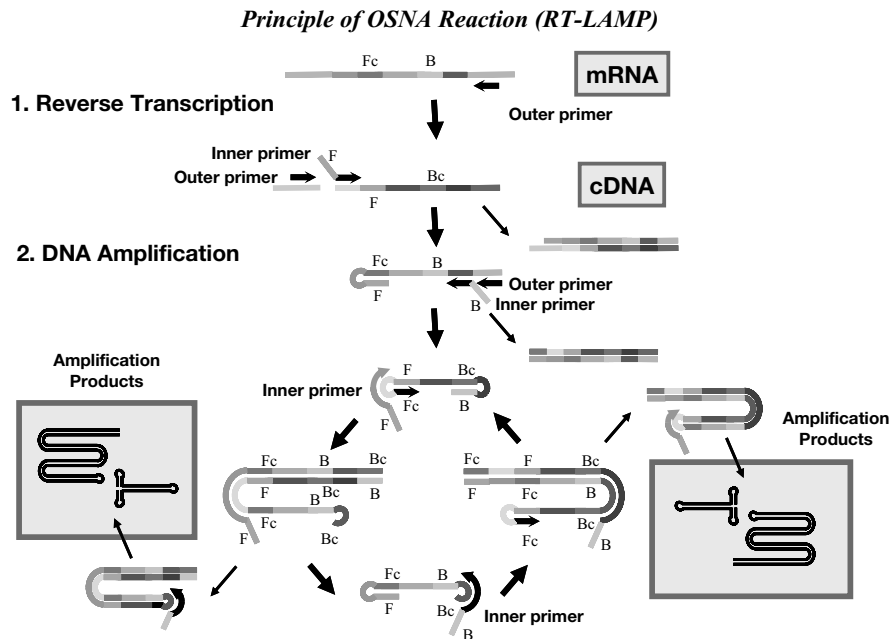


図3 RT-LAMP法の原理

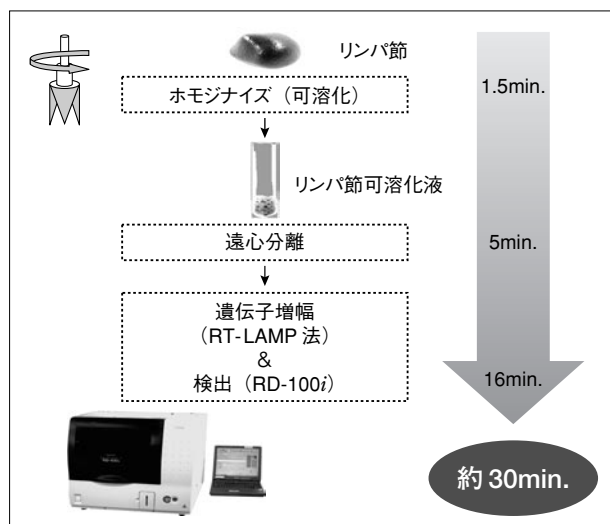


図4 OSNA法の概略

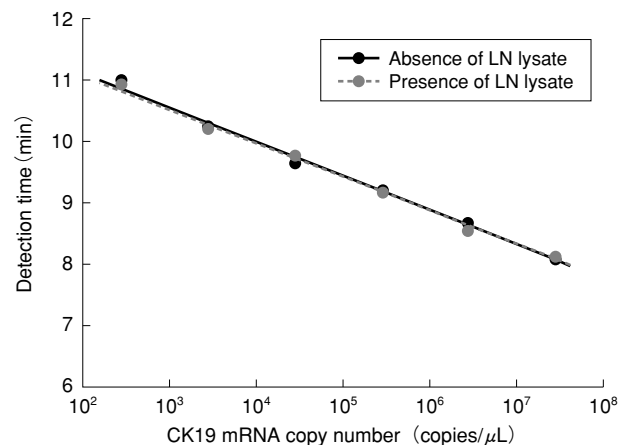


図5 OSNA法におけるCK19 mRNA検出時間の比較
—精製RNAのみおよびリンパ節可溶化液添加サンプル—

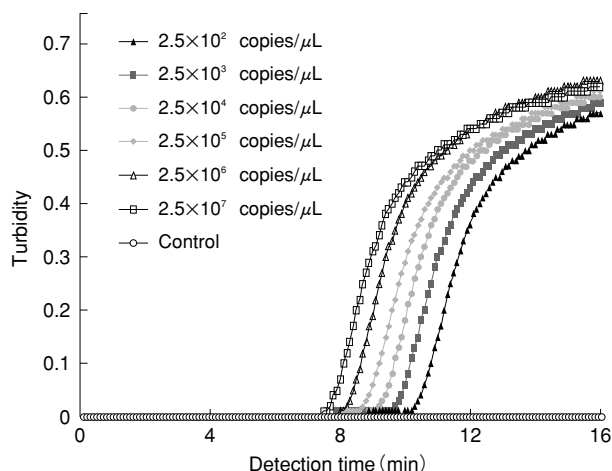


図6 RT-LAMP法の増幅曲線

上記の通り、OSNA法におけるマニュアル操作はリンパ節の可溶化操作のみであることから、リンパ節の可溶化後、RNAの抽出・精製および試薬調製など煩雑な操作を必要とする通常の遺伝子増幅法と比較し、OSNA法は実際の臨床現場での使用に適した迅速かつ簡便性に優れた検査法であるといえる(図3～6)。

2. 乳癌リンパ節転移検査法の構築

a. 標的 mRNA マーカーの選択

本法の開発の過程において、OSNA法に用いる mRNA マーカーとして、①転移陽性リンパ節中における発現量が高く、他方、転移陰性リンパ節中における発現量は低い mRNA、②乳癌患者の転移陽性リンパ節において広く発現しており、かつその発現量が組織型および個人によって大きく変動しない mRNA を検索し、有用性の高い遺伝子として CK19 (Cytokeratin 19, KRT19)、CEA (CEACAM5) などの 7 遺伝子が見出された¹⁷⁾。

さらに、これら 7 遺伝子に関して、定量的 RT-PCR 法により遺伝子発現量の評価を用いて、転移陽性リンパ節中における発現量が最も高く、かつ転移陰性リンパ節において発現量が低かった遺伝子は CK19 であり、最も優れた mRNA マーカーであることが明らかになった¹⁷⁾(図7)。以上の検索結果から、OSNA 法による乳癌リンパ節転移検査では CK19 mRNA をマーカーとして用いることとした。

b. カットオフ値の設定

乳癌リンパ節転移の病理組織検査は UICC (Unio Internationale Contra Cancrum) 第 6 版の TNM (Tumor-node-metastasis) 分類に従い、観察面における転移巣の最大径に基づいて、マクロ転移(転移巣最大径 > 2mm)、ミクロ転移(2mm ≥ 転移巣最大径 > 0.2mm) および ITC (遊離癌細胞: 転移巣最大径 < 0.2mm) に分類されている。通常、マクロ転移、ミクロ転移は転移陽性、ITC は転移陰性と判定される^{26, 27)}。

OSNA 法では、以下に示す基礎研究データに基づき、病理組織検査における転移陽性(マクロ転移、ミクロ転移)と陰性を区別し、加えてマクロ転移を推定できるカットオフ値(CK19 mRNA コピー数)を設定した¹⁷⁾。

(i) 転移陽性と陰性を区別するカットオフ値

転移陽性と陰性との間のカットオフ値は、転移陽性と陰性とを分離できると同時に、偽陽性を避けることができる点を考慮し、以下のプロトコルを用いてカットオフ値を設定した。凍結リンパ節を 4 分割してその 1 ブロックから各々 1mm のスライス 3 枚を作製し、それぞれ a、b、c とした。これらのブロックの i、ii、iii および iv 断面をヘマトキシリン&エオジン染色(HE)と抗 CK19 抗体による免疫染色(CK19-

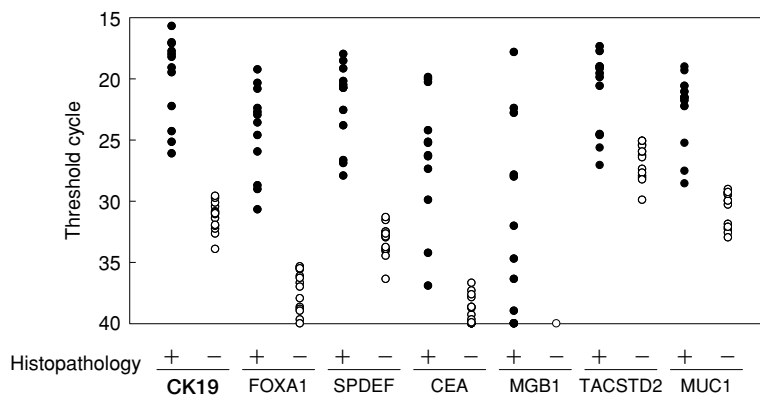


図7 癌転移陽性/陰性リンパ節における各種 mRNA マーカーの発現量比較

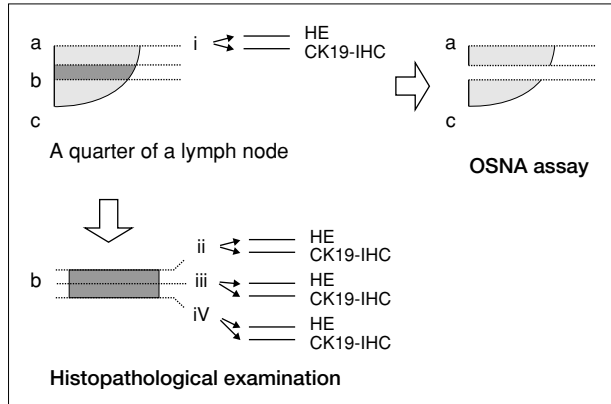


図8 転移陽性/陰性のカットオフ値設定のためのサンプル調整方法

IHC)にて転移の有無を確認し、HEもしくはCK19-IHC陽性となったリンパ節を転移陽性とした。一方、HE陰性かつCK19-IHC陰性となったリンパ節を転移陰性と定義した。ブロックa、cはOSNA法にてCK19 mRNAのコピー数を測定した(図8)。

まず、転移陰性リンパ節におけるCK19 mRNAの発現量を推定するために、通常の病理組織学的診断で腋窩リンパ節転移がないとされたpN0患者(11症例)由来の転移陰性リンパ節42個を取得し、これを用いて転移陰性リンパ節におけるCK19 mRNA発現量の上限值として $0.95 \times 10^2 \text{ copies}/\mu\text{L}$ の値を得た。

次に、通常の病理組織学的診断で腋窩リンパ節転移が認められた、pN1-3患者(19症例)から採取された転移陽性リンパ節22個を用いて、転移陽性リンパ節におけるCK19 mRNA発現量の分布を調査した結果から、その平均値-2SDとして $6.3 \times 10^2 \text{ copies}/\mu\text{L}$ を得た。

これらの結果から、転移陽性と陰性との間のカットオフ値として、両者の対数上の中央値である $2.5 \times 10^2 \text{ copies}/\mu\text{L}$ に設定した。

さらに、pN1-3患者由来の転移陰性リンパ節42個を用いて、同様にCK19 mRNAの発現量の分布を検討した結果、1例を除いたすべてのサンプルで $2.5 \times 10^2 \text{ copies}/\mu\text{L}$ 以下の値を示すことが確認された¹⁷⁾(図9)。

(ii) マクロ転移とミクロ転移のカットオフ値

マクロ転移とミクロ転移とを区別するカットオフ値は、マクロ転移に相当する転移巣(2mm角)中のCK19 mRNA発現量から設定することを試みた。

乳癌患者9症例(Ductal carcinoma 8症例、Lobu-

lar carcinoma 1症例)から採取した9個の凍結保存された転移陽性リンパ節を用いて $10 \mu\text{m}$ の連続切片を作製し、CK19-IHCによりCK19陽性領域を確認した。これらの切片に隣接する切片をOSNA法に供し、転移巣2mm角中のCK19 mRNAコピー数を算出した。その結果、上限値 $1.4 \times 10^2 \text{ copies}/\mu\text{L}$ から下限値 $4.7 \times 10^3 \text{ copies}/\mu\text{L}$ までの分布を得た(表2)。以上の結果から、下限値に近い $5.0 \times 10^3 \text{ copies}/\mu\text{L}$ をマクロ転移とミクロ転移とのカットオフ値として設定した¹⁷⁾。

V. 多施設臨床試験の概要

上記の基礎研究により示された、乳癌リンパ節転移の検出におけるカットオフ値(表3)の妥当性を確認するため、2005年10月～2006年5月の間、9施設(表4)において臨床研究を実施した²⁸⁾。

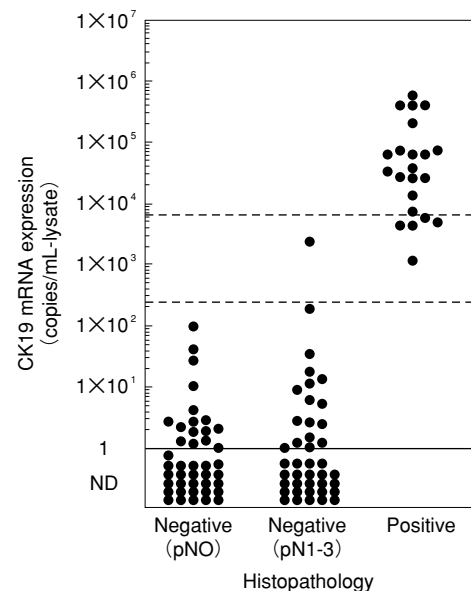


図9 癌転移陽性/陰性リンパ節のCKmRNAコピー数分布

表2 CK19 mRNA発現量の基礎的検討結果

Case	Histopathology	CK19 mRNA (copies/ μL)
1	Ductal carcinoma	2.3×10^4
2	Ductal carcinoma	1.1×10^4
3	Ductal carcinoma	4.7×10^3
4	Ductal carcinoma	5.0×10^4
5	Ductal carcinoma	1.0×10^4
6	Lobular carcinoma	1.4×10^5
7	Ductal carcinoma	2.0×10^4
8	Ductal carcinoma	6.7×10^4
9	Ductal carcinoma	2.4×10^4
Average		3.0×10^4

リンパ節転移診断の基準法となる病理組織検査と OSNA 法等の遺伝子検査法とは特性が異なるため、これらを同一の試料で実施検討することは難しい。そのため、本臨床研究では病理組織検査と OSNA 法の検査部位の違いによる結果の乖離をできるだけ避けるために、試験 1, 2 共に、各施設で採取されたリンパ節を 1 または 2mm の厚さに 4 分割し、隣り合わない 2 ブロックを OSNA 法に、残りの 2 ブロックは病理組織検査に付した。なお、リンパ節の 4 分割には、リンパ節専用カッター（ティッシュカッター：シスメックス社製）を使用した（図 10）。通常、未固定のリンパ節を被膜ごと等分することは困難であるが、このカッターの使用により、リンパ節を安全かつ簡便に一度に 4 分割することができる。刃の間隔は 1mm と 2mm の 2 種類があり、その選択はリンパ節の短径に応じて決めた。この病理組織学的判定は 3 施設の第 3 者病理医が 3 者合意の上で行う

表 3 TNM 分類と OSNA 判定

リンパ節における腫瘍サイズ	OSNA 判定
1. Macro-Metastasis > 2.0mm	++ 5.0 × 10 ³ (copy/μl)
2. Micro-Metastasis 0.2-2.0mm	+
3. Isolated Tumor Cells < 0.2mm	2.5 × 10 ² (copy/μl) - & ND

表 4 臨床研究実施施設

臨床性能試験実施施設	① 大阪大学医学部附属病院 ② 大阪府立成人病センター ③ 防衛医科大学校 ④ 大阪警察病院 ⑤ 癌研究会 癌研有明病院 ⑥ 聖路加国際病院 ⑦ 国立病院機構 大阪医療センター
病理標本検査施設	⑦ 国立病院機構 大阪医療センター ⑧ 大阪市立大学大学院医学研究科 ⑨ 大阪船員保険病院

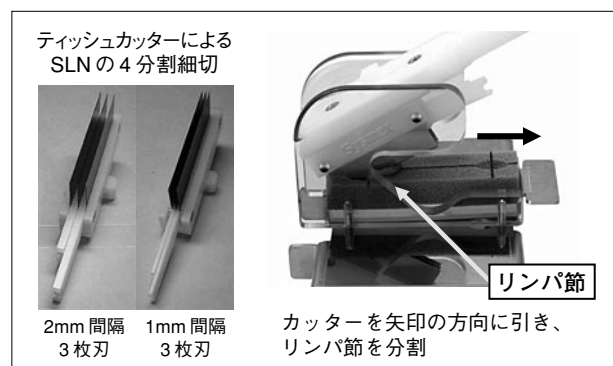


図 10 ティッシュカッター（シスメックス社製）によるリンパ節 4 分割細切法

事とした²⁸⁾。

本臨床性能試験においては、試験 1 をもって、まず OSNA 法が偽陽性を生じないことを確認し、その結果を前提として、試験 2 において OSNA 法の病理組織検査に対する同等性を確認した。

1. 試験 1

病理組織学的陰性リンパ節の判定は、リンパ節ブロック b、d をホルマリン固定もしくはパラフィン包埋後、0.2mm 間隔で連続的に階段切片を作製し、HE 染色、CK19 抗体による免疫染色（CK19-IHC）を行い、転移の有無を確認した²⁸⁾（図 11）。

2. 試験 2

OSNA 法による転移有無の判定結果を、現行の術後に行われている永久標本 3 割面を用いる病理組織検査（以下、現行法）の判定結果と比較した。また、OSNA 法と現行法で不一致となったリンパ節については、その原因を検討した。

更に、現行法でマクロ転移（転移巣 2mm 以上）と判定されるリンパ節に対して、OSNA 法で陽性または（++）と判定される検出率、および OSNA 法が（++）と判定されたリンパ節に対して現行法がマクロ転移である的中率も併せて確認した²⁸⁾（図 12）。

3. 臨床試験結果（表 5）

1) 試験 1 OSNA 法の特異度（陰性一致率）

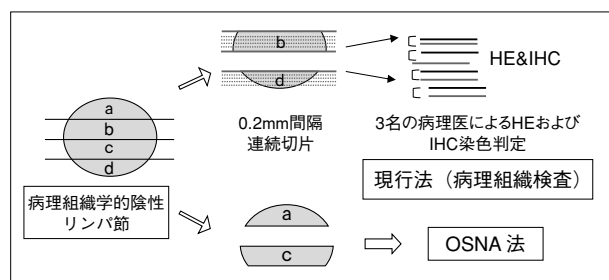


図 11 多施設共同臨床性能試験 試験 1 の方法

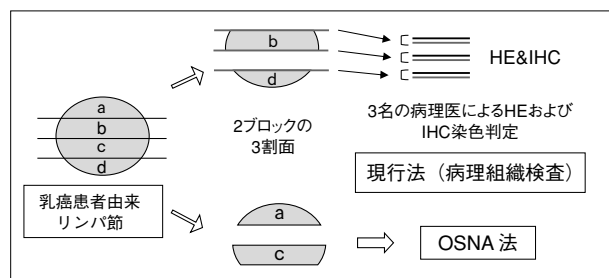


図 12 多施設共同臨床性能試験 試験 2 の方法

124 リンパ節を解析対象とした。病理組織学的陰性は、104 リンパ節であり、その内 11 リンパ節では ITC が観察された。OSNA 法は、病理組織学的陰性 104 リンパ節の内、101 リンパ節を陰性と判定した。その結果、OSNA 法の病理組織学的陰性リンパ節に対する特異度（陰性一致率）は、97.1%（95%信頼区間 0.918～0.994）となり、OSNA 法が高い特異度を有することが確認された²⁸⁾（表 6）。両法の解離はリンパ節ブロックにおける転移巣の局在によるものと考えられた。このことから、病理組織学的陰性リンパ節における OSNA 法陰性判定の特異性は極めて高いと考えられた。

2) 試験 2 OSNA 法と現行法との一致率

対象の 164 症例、450 リンパ節のうち、OSNA 法および現行法の両法で陽性と判定されたのは 70 リンパ節であり、両法にて陰性と判定されたのは 348 リンパ節であった。その結果、OSNA 法と現行法の一一致率は、92.9%（信頼区間 0.901～0.951）となり、OSNA 法は現行法と良好な一致率を示した（表 7）。不一致例が存在したが、詳細な追加検討結果から、原因の多くはリンパ節ブロックにおける転移巣の局在によるものと考えられた²⁸⁾。

また、OSNA 法（++）のマクロ転移検出率は

表 5 解析した症例数（試験 1, 試験 2）

	解析対象数	
	試験 1	試験 2
症例数	34	164
リンパ節数 (SLN数)	124 (12)	450 (105)

表 6 試験 1 の結果

N=124		病理組織検査	
		陽性	陰性
OSNA法	陽性	(++) 16	0
	(+)	3	3
	陰性 (ITCまたはND)	1	101

特異度（陰性一致率）：97.1% 95%信頼区間：0.918～0.994

表 7 試験 2 の結果

N=450		現行法		
		陽 性		陰性
		マクロ転移	ミクロ転移	
OSNA法	陽性	(++) 54	2	0
		(+) 10	4	22
	陰性	4	6	348

一致率：92.9% 信頼区間：0.901～0.951

94.1%であり、マクロ転移適中率は 96.4%であった。このように、マクロ転移検出率およびマクロ転移適中率は良好な結果を示した²⁸⁾。

4. 多施設共同臨床試験のまとめ

1) OSNA 法の特異度（陰性一致率）は、97.1%（信頼区間 0.918～0.994）と良好な結果であった。このことから、OSNA 法が偽陽性を生じる可能性が極めて低いことが確認された。

2) OSNA 法と現行法の一一致率は、92.2%（信頼区間 0.901～0.951）であり、OSNA 法は術後に行う永久標本 3 割面を用いた病理組織検査の性能とほぼ同等であることが示された。

3) マクロ転移に対する OSNA 法の検出率は 94.1%、適中率は 96.4%であり、良好な結果であった。

VI. 認可と保険収載

上記の多施設共同臨床研究の結果から、厚生労働省への許認可申請が行われ、2008 年 6 月遺伝子増幅試薬リノアンプ BC が臨床検査試薬として認可され、OSNA 法は乳癌におけるリンパ節転移診断法として、2008 年 11 月に保険収載された。保険点数は 2000 点である。

VII. OSNA 法運用の実際と OSNA 法実地運用結果

当院では 2008 年 11 月保険収載された時点から、乳癌 SLN 術中迅速診断に OSNA 法を適応している。

OSNA 法導入後の推奨される実際的な SLN 検索にはいくつかの方法が考えられる。1) 1 番目は、従来法との併用で、リンパ節の最大中心割面部分を 1mm 幅で切り取り、凍結切片を作成して迅速組織診断を行い、他のすべてを OSNA 法に供する方法。2) 同様にサンプリングし、1mm 幅で切り取った部分は、迅速診断は行わずに永久標本で観察し、術中は OSNA 法のみを施行する方法。3) リンパ節を細切して捺印標本を作成し、迅速捺印細胞診を行い、細切されたリンパ節すべてを OSNA 法に供する方法。3)、4) の場合、組織標本用の検体はない。

当院では、従来はリンパ節を 1～2mm 幅で 4 分

割細切し、そのすべてを術中迅速組織診断 (HE 染色、CK 免疫染色) を行い、術後 100 ミクロンおきに階段切片を作成して、HE 染色、CK 免疫染色を各々行って、センチネルリンパ節転移の最終診断としていた。

OSNA 法導入後は、当院では術中迅速捺印細胞診を併用する、3) の方法で行っている。その理由は、OSNA 法の利点を最大限に生かし、できるだけ多くのリンパ節組織を OSNA 法で検索することにより、正確な癌細胞リンパ節の転移量が明らかになることが期待されるからである。図 13 に示すような方法で、実際の診断を行った。

2008 年 11 月より 2009 年 6 月までに当院外科で施行された乳癌 SN 生検 58 症例 114 リンパ節 (SN は 1 症例 1 から 4 リンパ節) を対象とした。

結果として、114 個中、OSNA 法の判定は、2+ が 5 個、1+ が 13 個、- が 96 個であった。CY との一致は 103 個に認められた (一致率 90.4%)。OSNA (+) CY (-) は 10 個 (いずれも OSNA 判定 1+)、OSNA (-) CY (+) は 1 個であった (表 8)。サンプル調整開始から結果報告までの時間は、1 症例は平均 42 分 (測定リンパ節 1 個の場合は 34 分、4 個の場合は 53 分) であった。

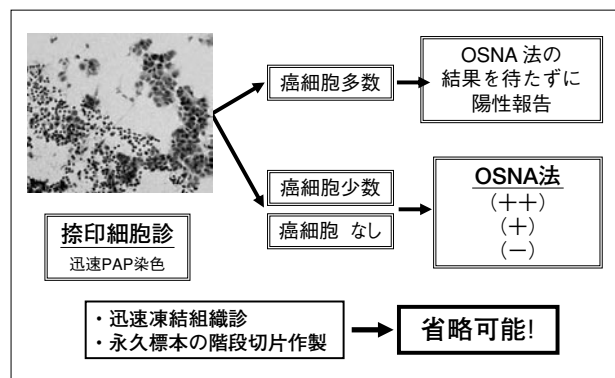


図 13 当院における捺印細胞診を併用した OSNA 法

表 8 センチネルリンパ節生検における CY・OSNA の一致率

CY: 捺印細胞診 2008.11-2009.6 OSNA法の適応症例*; 58例 114LN

	2+	1+	-	
CY (+)	5	3	1	9
CY (-)	0	10	95	105
	5	13	96	114

*肉眼的に剖面で転移陽性と考えられた症例は OSNA法の適応外 CYのみ施行、すべて CY陽性であった。

一致率 90.4%

OSNA 法と捺印細胞診の一致率は良好で、CY のみでは見逃されていたミクロ転移 10 個を陽性と診断して術中偽陰性による再手術を回避し、逆に CY の結果のみでは過剰郭清されていた 1 症例を郭清回避することができた。OSNA 法は SN の術中迅速診断と術後の病理学的診断が一挙に約 40 分という短時間で終了し、SLN における癌転移診断の正確な定量的評価、術中・術後病理診断の迅速化、業務の省力化に貢献しており、当院では安全に施行されている。

VIII. 結 語

OSNA 法の精度は、確定診断法として用いられる術後の病理組織学的検査法と同等の判定精度を有しており、マクロ転移を高い精度で判定できる。

遺伝子増幅検出装置 RD-100i を用いることにより、術中に最終的な判定結果を得ることができる迅速性を有し、また、訓練を受けた検査技師が実施可能な操作の簡便性を有する。

OSNA 法は、術中迅速病理診断および、その後の詳細な病理学的検索に代わる客観的なリンパ節転移診断法として、乳癌のリンパ節転移診断と治療の標準化に寄与する、臨床的に有用な検査法であると考えられる。(図 14)

IX. OSNA 法の今後

OSNA 法は、術中迅速病理診断および、その後の詳細な病理学的検索に代わる客観的なリンパ節転移診断法として、乳癌のリンパ節転移診断と治療の標



図 14 OSNA (One-Step Nucleic acid Amplification) 法の特徴

準化に寄与する、臨床的に画期的に有用な検査法である。CK19は他の多くの癌腫において高率に発現されているマーカーである。大腸癌、胃癌、頭頸部癌などのリンパ節の術中癌転移検索などにも有効であろう。また術中腹腔洗浄細胞診なども別のマーカーをOSNA法に適應することで、現行の細胞診より、さらに客観的で、定量的な報告が迅速に行える可能性があると考えられる。

文 献

- 1) 日本乳癌学会編 科学的根拠に基づく乳癌診療ガイドライン2外科療法 2005年版. 金原出版 2005; 33-35
- 2) Lyman GH, et al.: American Society of Clinical Oncology guideline recommendations for sentinel lymph node biopsy in early-stage breast cancer. *Journal of Clinical Oncology* **23** : 7703-7720, 2005.
- 3) 日本乳癌学会編 臨床・病理 乳癌取扱い規約【第16版】金原出版 2008
- 4) Sabel MS, et al.: Accuracy of sentinel node biopsy in predicting nodal status in patients with breast carcinoma. *Journal of Surgical Oncology* **77** : 243-246, 2001.
- 5) Goldhirsch A, et al.: Progress and promise : highlights of the International expert consensus on the primary therapy of early breast cancer 2007, *Ann Oncol* **18** : 1133-1144, 2007.
- 6) Morrow M.: Management of the axillary nodes. *Breast Cancer* **6** : 1-12, 1999.
- 7) Morton, D.L., Wen, D.R., Wong, J.H. et al.: Technical details of intraoperative lymphatic mapping for early stage melanoma. *Arch Surg* **27** : 392-399, 1992.
- 8) Krag DN, Weaver OJ, Alex JC, et al.: Surgical resection and radiolocalization of the sentinel node in breast cancer using a gamma probe. *Surg Oncol* **2** : 335-340, 1993.
- 9) Kim T, Giuliano AE, Lyman GH.: Lymphatic mapping and sentinel lymph node biopsy in early-stage breast carcinoma. *Cancer*, **106** : 4-16, 2006.
- 10) 元村和由ら：センチネルリンパ節生検の手技と臨床応用 日本臨床 2007；65巻増刊号6 乳癌：185～192
- 11) European Working Group for Breast Screening Pathology : Pathological work-up of sentinel lymph nodes in breast cancer. Review of current data to be considered for the formulation of guidelines. *Eur J Cancer* **39** : 1654-1667, 2003.
- 12) Van Diest PJ, et al.: Reliability of intraoperative frozen section and imprint cytological investigation of sentinel lymph nodes in breast cancer. *Histopathology* **35** : 14-18, 1999.
- 13) Cserni G, Amendoeira I, Apostolikas N, et al.: Discrepancies in current practice of pathological evaluation of sentinel lymph nodes in breast. Results of a questionnaire based survey by the European Working Group for Breast Screening Pathology. *J Clin Pathol*, **57** : 695-701, 2004.
- 14) Schwartz GF, Giuliano AE, Veronesi U, et al.: Proceedings of consensus conference on the role of sentinel lymph node biopsy in carcinoma of the breast, April 19-22, 2001, Philadelphia, Pennsylvania. *Cancer***94** : 2542-2551, 2002.
- 15) Hughes SJ, et al.: A rapid, fully automated, molecular-based assay accurately analyzes sentinel lymph nodes for the presence of metastatic breast cancer. *Ann Surg* **243** : 389-398, 2006.
- 16) Sakaguchi M, et al.: Clinical relevance of reverse transcriptase-polymerase chain reaction for the detection of axillary lymph node metastases in breast cancer. *Ann Surg Oncol* **10** : 117-125, 2003.
- 17) Tsujimoto M, et al.: One-step nucleic acid amplification for Intraoperative Detection of Lymph Node Metastasis in Breast Cancer Patients. *Clinical Cancer Research* **13** : 4807-4816, 2007.
- 18) Mike V, et al.: Intra-operative rapid diagnostic method based on CK19mRNA expression for the detection of lymph node metastases in breast cancer. *International Journal of Cancer* **122** : 2562-2567, 2008.
- 19) Masatoshi Y. et al.: One Step Nucleic acid Amplification (OSNA) 法による直接遺伝子増幅. *Bioindustry* **22** : 79-82, 2005.
- 20) Notomi T, et al.: Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Research* **28** : E63, 2000.
- 21) Parida MM, et al.: Development and Evaluation of Reverse Transcription-Loop-Mediated Isothermal Amplification Assay for Rapid and Real-time Detection of Japanese Encephalitis Virus. *Journal of Clinical Microbiology* **44** : 4172-4178, 2006.
- 22) Nagamine K, et al.: Accelerated reaction by loop-mediated isothermal amplification using loop primers. *Molecular Cellular Probes* **16** : 223-229, 2002.
- 23) Ushikubo H.: Principle of LAMP method -A simple and rapid gene amplification method-. *Virus* **54** : 107-12, 2004.
- 24) Mori Y, et al.: Real-time turbidimetry of LAMP reaction for quantifying template DNA. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* **59** : 145-57, 2004.
- 25) Mori Y, et al.: Detection of Loop-mediated Isothermal Amplification Reaction by Turbidity Derived from Magnesium Pyrophosphate Formation. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **189** : 150-154, 2001.
- 26) American Joint Committee on Cancer. *AJCC Cancer Staging Manual Sixth edition*, Springer 223-240, 2002.
- 27) Gusterson BA.: The new TNM classification and micro-metastases. *Breast* **12** : 387-390, 2003.
- 28) Tamaki Y, et al.: Molecular Detection of Lymph Node Metastases in Breast Cancer Patients : Results of a Multi-center Trial Using the One-Step Nucleic Acid Amplification Assay. *Clin cancer Res* **15** : 2879-2884, 2009.