

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2007～2008

課題番号：19790952

研究課題名（和文） マスピンを用いた腹水術中迅速細胞診断法の開発

研究課題名（英文） Development of intra operative peritoneal lavage cytology using maspin protein expression

研究代表者

秋山 有史（AKIYAMA YUJI）

岩手医科大学・医学部・研究員

研究者番号：10405798

研究成果の概要：進行胃癌の再発で腹膜播種の頻度は高く、その予後は不良である。手術中に腹膜再発の可能性を予測できれば、術中・術後の治療にきわめて有用な情報をもたらすことになる。術中の腹腔洗浄細胞診は腹水中の癌細胞を検出する有用な検査であるが、偽陰性も少なからず経験し、その検出率は満足できるものではない。本研究では、胃癌患者の腹腔洗浄細胞診材料において、がん細胞が表出している aberrant antigen である maspin を標的とした術中迅速診断法の開発とその自動化を行い、臨床応用の妥当性を検証した。蛍光抗体直接法による検査の自動化に成功した。胃癌 100 例での腹水材料の解析では、maspin 陽性と判定された症例は、stage IV の 3 例のみであった。3 例の陽性細胞カウント数は、29/1000, 16/1000, 8/1000 であった。原発巣と腹水中の腫瘍細胞に関する免疫染色動態は、良く相関していた ($p < 0.05$)。また細胞診の診断結果との比較では、感度は 67%、特異度は 99%、偽陰性率は 33%、偽陽性率 1% であった。偽陽性と判定された症例の免疫染色切片で細胞を特定した後、再度パパニコロ染色を行い、陽性細胞は腫瘍細胞であることが判明した。偽陰性と判定された症例での免疫染色は染色性不良であり、評価不可能であった。解析後、最長 2 年が経過し、腹水陽性症例は 3 例全てで癌性腹膜炎状態が生じた。陰性例では腹膜播種状を確認できていない。今後十分な follow-up の上、再発形式の検討から本検査の妥当性を検証する必要があるものの、本研究で開発した aberrant antigen を指標とした迅速診断法は胃癌治療の有用な検査手段となる可能性が示唆された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,700,000	0	1,700,000
2008 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	480,000	3,780,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・消化器外科学

キーワード：maspin, 細胞診, 胃癌, aberrant antigen, 腹膜播種

科学研究費補助金研究成果報告書

1. 研究開始当初の背景

進行胃癌の再発で腹膜播種の頻度は高く、その予後は不良である。手術中に腹膜再発の可能性を予測できれば、術中・術後の治療にきわめて有用な情報をもたらすことになる。術中の腹腔洗浄細胞診は腹水中の癌細胞を検出する有用な検査であるが、偽陰性も少なからず経験し、その検出率は満足できるものではない。

一方、近年の分子生物学的アプローチの進歩により、CEA (carcinoembryonic antigen), cytokeratin を標的とした RT-PCR (reverse transcriptase-polymerase chain reaction) 法による微量な癌細胞を検出する方法の有用性が報告されている。しかし、これらの方法は高感度であるものの、①個々の腫瘍細胞における発現量の違いが結果に影響する、②擬陽性例がある、③判定までに 1-2 時間程の時間を要する、などの欠点があり、実用性に問題があった。これらの欠点を解決し、腹腔洗浄液中の腫瘍細胞を正確に検出するためには、腫瘍細胞特異的な aberrant antigen を標的にした、迅速診断法の開発が必要である。

maspin は、乳癌の癌抑制遺伝子として単離され、膀胱癌や卵巣癌患者の正常上皮では発現が認められず、腫瘍の進展とともに maspin の陽性率が高くなり、まるで癌遺伝子のような振る舞いをすることが報告された。我々は、maspin が胃腸上皮化生粘膜 (100%) ならびに胃癌細胞 (90%) で aberrant antigen として発現していることを報告した。この maspin の発現を指標にすれば、直接法による蛍光抗体法を用いることで、簡便かつ迅速な術中微小転移の診断法が開発できる可能性がある。本研究課題は、maspin を標的分子とした新規術中微小転移診断法を開発する。

2. 研究の目的

本研究課題では、胃癌患者の腹腔洗浄細胞診材料において、がん細胞が表出している aberrant antigen を標的とした術中迅速診断法の開発とその自動化を行い、臨床応用の妥当性を検証する。

3. 研究の方法

対象は、腹水洗浄細胞診サンプルおよび術

中迅速に提出されたリンパ節タッチ標本を解析した。胃癌250例、陰性コントロールとして胆石症100例を解析予定とした。胃癌症例に関してはリンパ節も解析対象とした。また細胞の陽性コントロールとして胃癌培養細胞株 (GCIY) を用いた。

方法は、冷メタノール固定したサンプルを、FITC標識抗maspin抗体 (BD Biosciences) で染色する。scanning cytometerで、有核細胞100-1000個を自動scanningし、陽性細胞比率を算出する。同一切片をパパニコロ染色し、検査士・病理医による細胞診検査と比較する。

同一症例の、組織切片および内視鏡材料を用いて免疫染色し、maspin発現を確認し腹水洗浄細胞診サンプルと原発巣との整合性を検討する。腹水洗浄細胞診サンプル中の細胞数に余裕があった場合にはRNAを抽出し、発表済みのreal-time PCR法でmRNAの発現を検討する。

独立性の検定には χ^2 検定を用いて原発巣との比較、および細胞診の結果との比較を行った。各々、感度、特異度について計算し、細胞診の診断結果を基にした、擬陽性、偽陰性を計算した。

4. 研究成果

(1) 固定方法、染色条件の検討

自動化システムの開発の前に、胃癌培養細胞株 GCIY を用いて、細胞の固定・染色条件を検討した。陰性コントロールにはボランテニアの末梢血から分離採取したリンパ球を用いた。

サンプルの固定には、maspin の陽性所見のみられる細胞膜および細胞質の両者を検出するためには、冷メタノール (4°C)、1 min による固定が良好であることが明らかとなった (図 1)。染色は5分間の抗体反応時間で、冷 PBS による洗浄3回で非特異的反応を除去できた。末梢血由来のマクロファージ等の細胞での、非特異的な反応は検出しなかった。

解析にかかる時間は、固定化から計測まで平均 43 分であった。この時間は細胞診の検査時間に比較して 2 倍強の時間を要した。

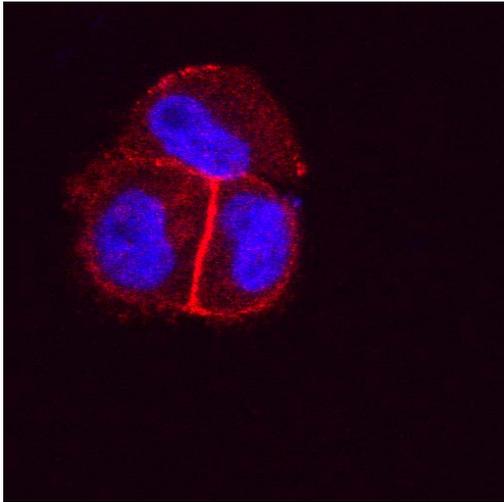


図1 胃癌培養細胞株 GCIY を用いた maspin 染色性の検討.

maspin の陽性所見を細胞膜および細胞質内にみる. 疑似カラー (赤) をつけてある.

(2) 腹水洗浄細胞診・リンパ節タッチ材料による解析

当所胃癌 250 例, 陰性コントロールとして胆石症 100 例を目標にしたが, サンプル量の十分採取できないものが多数存在し, 最終的に胃癌 100 例, 胆石症 50 例で解析した.

胃癌の病期は以下の表の通りである.

Stage	症例数
0	26
IA	14
IB	12
II	23
III	20
IV	5

細胞 100 個以上でカウントし, 3 個以上の陽性細胞がみられた症例を陽性と定義した. 進行癌が少ないこともあり, 解析結果で maspin 陽性と判定された症例は, stage IV の 3 例のみであった. 3 例のカウント数は, 29/1000, 16/1000, 8/1000 であった.

2 個以下のカウント数の症例は細胞形態計測でも, 核の大きさが陽性症例の 1/2 以下と小さく死滅細胞の非特異的な反応と考えられた.

リンパ節のタッチ材料における検討は, 迅速診断の行われた 18 例についてのみ解析された. 陽性例は認められなかった.

陰性コントロールの胆石症例では陽性例は検出できなかった.

(3) 原発巣の免疫染色との比較

胃癌原発巣における maspin 陽性例は 100 例中 75 例 (75%) であった. 腹水細胞診で maspin 陽性と認められた 3 例は全て陽性であった. Stage IV の 5 例のうち 2 例は陰性で

あった.

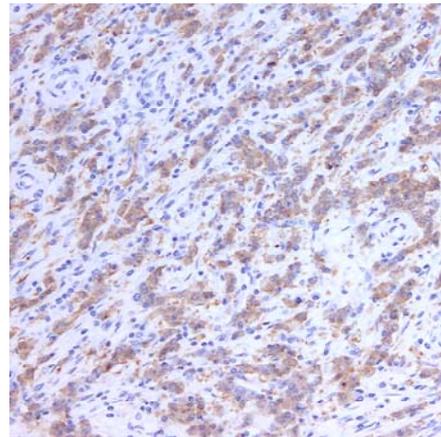


図2 原発巣の免疫染色像.

Stage	maspin immunoreactivity			
	Primary site		Peritoneal lavage	
	陽性	陰性	陽性	陰性
0 (26)	20	6	0	0
IA (14)	9	5	0	0
IB (12)	8	4	0	0
II (23)	17	6	0	0
III (20)	15	5	0	0
IV (5)	3	2	3	2

(4) 細胞診の診断結果との比較

細胞診の診断結果との相関を検討した.

感度は 67%, 特異度は 99%, 偽陰性率は 33%, 偽陽性率 1% であった.

maspin	細胞診	
	陽性	陰性
	陽性	2
陰性	1	91

偽陽性と判定された症例の免疫染色切片で細胞を特定した後, 再度パパニコロ染色を行い, 検討を行った. 再解析により陽性細胞は腫瘍細胞であることが明らかとなった.

(5) PCR 法による定量解析

Real-time quantitative PCR 法を用いて maspin mRNA 定量解析を行った. 陰性例に比較して陽性例は平均 8 倍の発現を示していた.

(6) 患者の生命予後, 臨床病理学的事項との相関

解析後, 最長二年が経過した. 腹水陽性症例は, 3 例中 2 例が死亡し残りの一例は, 現在がん腹膜炎状態である. 陰性例で腹膜播種状, 十分な follow-up を行い再発形式の検討から本検査の妥当性を検証する必要がある.

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 1件)

Sugitachi A, Otsuka K, Fujisawa K, Itabashi T, Akiyama Y, Sasaki A, Ikeda K, Yoshida Y, Takamori Y, Kurozumi S, Mori T, Wakabayashi G. A novel anticancer drug delivery system -DAC-70/CDDP. Gan To Kagaku Ryoho. 34(12):2159-61. 2007

〔学会発表〕(計 2件)

秋山有史, 高金明典, 早川善郎, 入野田崇, 加藤久仁之, 目黒英二, 小林慎. 当科における直腸癌に対する腹腔鏡補助下低位前方切除術の現状と問題点. 第 109 回日本外科学会. 2009. 4.1 福岡

秋山有史, 大塚幸喜, 板橋哲也, 藤澤健太郎, 若林剛. 胃・大腸重複癌に対して腹腔鏡補助下同時切除を施行した 1 例. 第 21 回日本内視鏡外科学会. 2008. 9.2 横浜

6. 研究組織

(1)研究代表者

秋山 有史 (AKIYAMA YUJI)
岩手医科大学・医学部・研究員
研究者番号：10405798

(3)連携研究者

前沢 千早 (MAESAWA CHIHAYA)
岩手医科大学・医学部・教授
研究者番号：10326647