

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 28 日現在

機関番号：32203  
 研究種目：若手研究(B)  
 研究期間：2010 ～ 2011  
 課題番号：22791327  
 研究課題名（和文） 肺腺癌における核グレードを応用した細胞診断の可能性  
 研究課題名（英文） Nuclear Morphometry for Cytologic Diagnosis  
 in Adenocarcinoma of the Lung  
 研究代表者  
 中里 宜正 (NAKAZATO YOSHIMASA)  
 獨協医科大学・医学部・准教授  
 研究者番号：10372921

研究成果の概要（和文）：細胞診断にて肺腺癌 110 例の平均腫瘍細胞の核面積は  $119.1\mu\text{m}^2 (\pm 64.4)$  で、wild type: mutant type=89:21 例で、核面積は、wild type: mutant type= $125.3\mu\text{m}^2 (\pm 69.5)$ :  $92.5\mu\text{m}^2 (\pm 19.6)$  で、 $p < 0.05$  であった。陰性症例 67 例のうち胸水を除いた 36 例の平均核面積は  $67.1\mu\text{m}^2 (\pm 17.8)$  で、 $p < 0.05$  であった。細胞診断陽性と陰性の核面積での ROC 曲線では、 $\text{AUC}=0.915$ ,  $95\% \text{CI}=0.873-0.958$  で感度 80%, 特異度 86%にて平均核面積  $81.0\mu\text{m}^2$  が cut-off 値となることが判明した。今回の研究結果から、Morphometry を応用し、少ない検体でも細胞診を併用することにより良悪の鑑別は感度 80%で可能と考える。

研究成果の概要（英文）：The nuclear area of tumor cells ( $119.1\mu\text{m}^2 \pm 64.4$ ) in adenocarcinoma of the lung was significantly larger than that of normal cells ( $67.1\mu\text{m}^2 \pm 17.8$ ) ( $P < 0.05$ ). The ROC curve analysis showed that an NA cut-off level of  $81.0\mu\text{m}^2$  had a sensitivity of 80% and specificity of 86% to detect malignant strictures. The nuclear area of tumor cells in EGFR mutant type ( $92.5\mu\text{m}^2 \pm 19.6$ ) was significantly smaller than that of tumor cells in EGFR wild type ( $125.3\mu\text{m}^2 \pm 69.5$ ) ( $P < 0.05$ ).

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2011 年度	400,000	120,000	520,000
年度			
年度			
年度			
総計	1,800,000	540,000	2,340,000

研究分野：医歯薬学  
 科研費の分科・細目：外科系臨床医学・胸部外科学  
 キーワード：呼吸器外科学

1. 研究開始当初の背景

肺癌取り扱い規約改訂第 6 版，細胞診の項

目に「陽性あるいは疑陽性と判定された場合，肺がん細胞型分類表に基づき，その細胞型を

把握し、細胞診断名あるいは疑われる病変について記述する」とある。診断の可能性を追求することが要求され、細胞診での診断は組織診断の補助的役割から一つの体系化がされた診断部門へと発展しつつある。2003年に文部科学省の「オーダーメイド医療実現化プロジェクト」が発足し、医療分野ではヒト組織の重要性が急速に高まってきた。オーダーメイド医療とは、個人の遺伝子情報を元になされる診断・治療のことで、パーソナライズド医療ともいう。それゆえ患者個人の診断情報の収集に関してはより非侵襲的な検査、より安全性の高い検査が要求されるようになってきた。しかしながら、医療従事者、特に診断部門では悲鳴を挙げざる得ないのが現状である。検体の縮小により情報収集が免疫染色にたよらざる得なくなってきたのである。また組織検体は追加情報を得ることができるが、細胞診検体はそうはいかず、その場でのサイトスクリーナーによる判断が重要なことも少なくないのが現状である。我々はこれまでに、核グレードによる悪性度分類を使用した小型肺腺癌症例での組織診断における臨床応用を目指し、これまでにMorphometryを応用し、ROC曲線から悪性度分類における基準値の定量化に成功しCancerに2010年に報告している。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、Morphometryを応用し、少ない検体でも細胞診を併用することにより良悪の鑑別と悪性度判定を可能にすることである。病理学の世界もついにデジタル化されるべく発展したバーチャルスライドシステムを組み合わせた悪性度判定を細胞診断に応用させることを考案する。しかしながら、従来だとその妥当性を検証するすべは同時に行った生検検体の組織診断との正当性

が通説である。しかしながら、これでは組織診断ありきという概念は覆せないと思われる。それゆえ我々は多発肺腺癌と原発性肺癌肺内転移の鑑別困難症例における遺伝子変異解析による補助診断について研究中である。病理組織学的に原発及び転移の鑑別が困難である多発肺癌に対して、EGFR, p53, k-rasの遺伝子多型の解析を行うことによりその遺伝子多型の相同または相違により補助的な診断の是非について検討中であるが、その可能性については2008年にJTOで報告済みである。これらの技術を細胞診検体に応用することにより、細胞診のみで悪性度判定を行うことを目的とする。

## 3. 研究の方法

気管支鏡下及びCTガイド下肺生検、胸水穿刺にて得られた細胞診標本(エタノール固定)を肺癌取り扱い規約改訂第6版に準じて判定する。我々は、迅速診断を行っており、得られた検体はすぐに迅速パパニコロウ染色し検体量及び標的病変から採取されているかについて判断し、陽性で主に腺癌、もしくは偽陰性と診断された標本を対象とし、鉗子又は針洗浄液QIAGEN QIAamp<sup>®</sup> DNA Micro Kit (50)を用いて検体からDNAを抽出し、SmartAmp<sup>®</sup>EGFR Mutation Detection Test Kit (DNAFORM)を用いて、リアルタイムPCR装置(BIO-RAD・CFD3120, Mini Opticon)を用いて、等温増幅反応させた。診断が済んだ標本はNanoZoomer<sup>®</sup> Digital Pathology system(Hamamatsu Photonics K.K.)によりデジタル化し核の面積を測定する。一つのプレパラートから異形細胞を最低50個以上は大きいものから測定する。各症例ごとに核面積の平均値を算出しその数値を症例の核面積とする。陽性で肺腺癌と診断された症例と陰性症例でROC曲線を描き、カットオフ値を

定める。

細胞診断及び Morphometry により定量化した良悪鑑別の基準に従い群分けした悪性症例群での EGFR 遺伝子多型の症例分布を核面積とともに解析する。

#### 4. 研究成果

2010年10月21日から2012年4月26日までで、気管支鏡検査184例、CTガイド下針生検59例、胸水穿刺76例の319例が行われ、気管支鏡検査では陽性：陰性：擬陽性=123:34:27例、CTガイド下針生検は陽性：陰性：擬陽性=50:2:7例、胸水穿刺は陽性：陰性：擬陽性=33:31:12例と、全体では、陽性：陰性：擬陽性=206:67:46例であった。擬陽性率は14.4%と1割を超えた。陽性および擬陽性症例のうち、133例にSMAP法を施行した。擬陽性は6例含まれており、すべてwild typeであった。また133例中、細胞診断でadenocarcinomaが100例のうち27例がmutant type、NSCLC30例のうち1例がmutant type、SCCが2例(wild type)、SCLCが1例(wild type)であった。細胞診で腺癌と診断された100例のうち組織診断も腺癌であったものは81例で、19例の詳細は非腫瘍11例、扁平上皮癌2例、非小細胞癌5例(転移を2例含む)であった。81例中、mutant type23/81(28.4%)、男性5/39(12.8%)、女性18/42(42.9%)で、喫煙者で、mutant typeは男性4/36、女性0/10、非喫煙者でmutant typeは男性0/1、女性18/32(56%)であった。

EGFR 変異解析に関して、SMAP 法と他法 (PNA-LNA PCR-Clamp 法または PCR-Invader 法) を同一検体で行った 34 例で、結果が同様であったのは、変異陽性 8 例、変異陰性 24 例で、偽陰性が 2 例あった。感度 92%、特異度 100%で、腫瘍量が少量の検体であったため検体を分けるときの不均等配分が、その原因

と考えている。

変異解析を行った症例のうち、胸水症例および明らかな非腺癌の 23 例を除いた 110 例で、平均腫瘍細胞の核面積は  $119.1\mu\text{m}^2 (\pm 64.4)$  で、wild type: mutant type=89:21 例で、核面積は、wild type: mutant type= $125.3\mu\text{m}^2 (\pm 69.5)$ :  $92.5\mu\text{m}^2 (\pm 19.6)$  で、 $p < 0.05$  であった。陰性症例 67 例のうち胸水を除いた 36 例の平均核面積は  $67.1\mu\text{m}^2 (\pm 17.8)$  で、 $p < 0.05$  であった。

細胞診断陽性と陰性の核面積での ROC 曲線では、 $\text{AUC}=0.915$ 、 $95\% \text{CI}=0.873-0.958$  で感度 80%、特異度 86%にて平均核面積  $81.0\mu\text{m}^2$  が cut-off 値となることが判明した。

今回の研究結果から、Morphometry を応用し、少ない検体でも細胞診を併用することにより良悪の鑑別は感度 80%で可能と考える。また、EGFR 変異を有する肺癌は、腫瘍細胞が小さい傾向があり、核面積が小さく、良悪の鑑別が困難な症例などには、積極的に行った方が良い検査であると考えられる。なかでも低分化なものは核面積がかなり大きく、なかには  $1000\mu\text{m}^2$  を超えるような異型核まで含まれ、wild type 群には、低分化な腺癌が多く含まれていた。また胸水症例では陰性コントロールが中皮細胞となるため、除外しなければならず、陰性症例が極端に少ない症例群での検討となったが、陰性症例を過去の気管支鏡検査からランダムに抽出した 50 例との比較でも、 $80.5\mu\text{m}^2$  が cut-off 値となり、大きな差がないことは確認した。

#### 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 0 件)

〔学会発表〕（計 4 件）

①Smart Amp 法を用いた微量細胞検体における EGFR 遺伝子変異解析/2011/第 58 回日本臨床検査医学会, 岡山, 2011 年 11 月 18 日.

②SMAP 法を用いた気管支鏡下肺生検時の微量細胞検体における EGFR 遺伝子変異解析/2011/第 34 回日本呼吸器内視鏡学会, 浜松, 2011 年 6 月 16 日～17 日

③SMAP 法を用いた微量細胞検体における遺伝子変異解析/2011/第 52 回日本臨床細胞学会春期大会, 福岡, 2011 年 5 月 20 日～22 日

④迅速細胞診を併用した EGFR 遺伝子変異検出解析/2010/第 48 回日本癌治療学会学術集会, 京都, 2010 年 10 月 28 日～30 日

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況（計 0 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

中里 宜正 (NAKAZATO YOSHIMASA)

獨協医科大学・医学部・准教授

研究者番号：10372921