様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９、Ｚ－１９　（共通）

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

平成 ２８ 年　 ６ 月　 １ 日現在

機関番号：１４４０１
研究種目：基盤研究(C)（一般）
研究期間：2013～2015
課題番号：２５４６２０５５

研究課題名（和文）ＯＳＮＡ法を用いた直腸癌側方リンパ節郭清省略への応用

研究課題名（英文）Prediction of lateral lymph node metastasis by inspection of the para-rectal lymph nodes using the one-step nucleic acid amplification (OSNA) assay in the lower rectal cancer

研究代表者
畑　泰司（Hata, Taishi）

大阪大学・医学（系）研究科（研究院）・助教

研究者番号：７０６４４９１２

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　3,900,000円

研究成果の概要（和文）：両側側方リンパ節郭清を施行した下部直腸癌26症例について、傍直腸リンパ節のOSNA診断と病理学的側方リンパ節転移の関連性を検討し、OSNA法で傍直腸リンパ節転移が陰性の場合、病理学的にみても側方リンパ節転移がみられないかどうかを明らかとすることを目的とした。術前化学療法は26症例中23例で施行された。傍直腸リンパ節のOSNA診断能は正診率85%、感度80%、特異度86%、陰性的中度95%と良好な成績であった。多数の術前化学療法施行症例があったが、傍直腸リンパ節のOSNA診断によって側方リンパ節転移を予測でき予防的側方郭清を省略可能な症例の選択が可能であると考えられた。

研究成果の概要（英文）：We have investigated 26 cases with lower rectal cancer who received lateral lymph node dissection. Twenty-three cases were treated with pre-operative chemotherapy. The diagnostic performance of OSNA assay of para-rectal lymph nodes to the lateral lymph node metastasis was as follows.; Correct diagnosis 85%, Sensitivity 80%, Specificity 86%, Negative predictive value 95%. Although most cases had preoperative chemotherapy, negative prediction of the lateral lymph node metastasis was still highly achieved by OSNA assay (95%) when targeted to para-rectal lymph nodes. The present study suggests a possibility that intra-operative evaluation of para-rectal lymph nodes by OSNA assay may be useful to judge the necessity of lateral lymph node dissection. A large scale conformation study would be essential.

研究分野：消化器外科

キーワード：直腸癌　OSNA法　側方郭清　術中迅速検査

１．研究開始当初の背景

直腸のリンパ流は上方向に加え、側方向への流れがあるために、直腸癌に対する手術においては側方リンパ節への転移を考慮にいれなければならない。術前の画像診断で側方リンパ節転移が疑われる症例に対する側方リンパ節廓清は施行すべきであるが、明らかな側方リンパ節転移を認めていない症例に対する予防的側方リンパ節廓清の意義に関しては議論の余地がある。本邦の大腸癌ガイドラインにおける直腸癌の側方リンパ節郭清の適応は、腫瘍下縁が腹膜反転部より肛門側にあり、かつ固有筋層を越え浸潤している症例とされているが、この基準で側方リンパ節廓清を施行した症例における側方リンパ節転移率は約 20%と報告されている [1]。また、側方リンパ節転移率を大腸癌研究会のデータ（大腸癌治療ガイドライン医師用 2010 金原出版）をもとに深達度で分けてみると、筋層（mp）までと筋層を越え外膜に達する場合(ss/a1)とでは、それぞれの側方リンパ節転移は 9.2%と 12.2%であり、その差はわずかに 3%である。更に外膜に達しているか否かを術前に正確に診断する事は MRI をもってしても容易ではない。このことは現在推奨されている固有筋層を越え浸潤している症例に限定した適応条件は、妥当とは言えず、側方の予防郭清を行う事の難しさを表している。さらには側方リンパ節郭清は自律神経温存術を施行したとしても、術後排尿障害や性機能障害といった合併症が少なからず認められ、患者の QOL が損なわれる可能性がある。したがって必要のない側方郭清を回避する方法を見出すことは患者さんにとっても切実な問題となる。今後の課題として、予防的側方リンパ節郭清の省略が可能と考えられる症例を選択する基準を明確にしていく必要がある。

我々は、これまでの報告から病理学的直腸間膜内リンパ節転移が側方リンパ節転移のリスク因子である [2]ということに注目し、微小転移も含めた精度の高い方法で腸間膜リンパ節転移がない事を証明すれば、側方リンパ節への転移はほとんどなく、術後の病理検査でなく術中に微小転移を診断することができれば側方リンパ節郭清を回避する判断材料となりうるのではないかと考えた。

一方、近年乳癌のセンチネルリンパ節転移の術中迅速検査に OSNA 法が用いられており、その簡便性と感度の高さが報告されている。OSNA 法はリンパ節を専用の試薬（リノアンプ BC）で可溶化するだけで通常の PCR 等で必要とされる核酸の抽出・精製を必要とせずに、癌細胞由来サイトケラチン 19 を増幅して検出する方法である(Tsujimoto M et al. Clin Cancer Res 2007)。また測定時間は約 30 分で完了し、術中の診断にも十分に適用可能となっている（図１）[3]。教室の山本浩文らは大腸癌のリンパ節転移を OSNA 法にて検索すると、OSNA 法は 2mm スライスの病理学的診断における転移検出力と同等の診断能であった報告している [4]。また近年、進行直腸癌に対して術前化学療法を行う症例も増えつつあり、そうした症例におけるリンパ節の転移検索において OSNA 法が機能するかどうかはまだ分かっていないという現状にある。

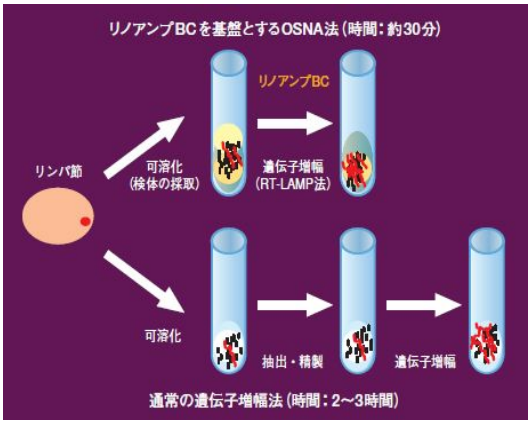

図１　OSNA 法

２．研究の目的

本研究では OSNA 法を用いて直腸間膜内リンパ節の転移ステータスを調べ、それと病理学的側方リンパ節転移ステータスとの関係性を調査する。OSNA 法の結果により側方リンパ節転移を予測できるかどうかを明確にし、実臨床において予防的側方リンパ節廓清を省略可能な症例を術中 OSNA 診断にて同定できるかどうかについて明らかにする。また、副次項目として傍直腸リンパ節の微小転移を CEAmRNA の RT-PCR によって調べ、それと OSNA 法との関連や側方リンパ節転移との関係性についても明確にする。

３．研究の方法

臨床的に側方リンパ節郭清が必要と考えられた症例(腫瘍下縁が腹膜反転部より肛門側にあり、かつ固有筋層を越え浸潤している)を前向きに本研究に登録し、術中に標本が摘出された時点で傍直腸リンパ節 (LN#251)を検索する。同リンパ節を可能な限り半割し一方は従来の病理学的検査を行う。他方をさらに半割し、OSNA 法による転移検索と CEAmRNA 微小転移検索を行う。OSNA 法の結果に関わらず両側側方リンパ節廓清を施行し、側方リンパ節(LLN)における病理組織検査の結果と照らし合わせる（図２）。

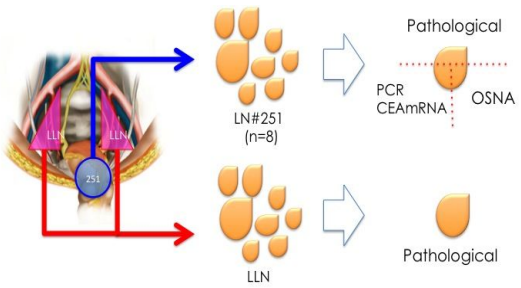

図２　方法の概要

４．研究成果

2014 年 4 月から 2016 年 3 月までに 26 症例を本研究にエントリーし検討した。患者背景は男性 17 例、女性 9 例。年齢中央値が 67 歳 (49-80)であった。腫瘍占拠部位は Ra:2 例、Rb:24 例であった。治療前深達度は cT3/cT4 が 23 例/3 例であった。治療前画像診断で直腸間膜内リンパ節転移が認められた症例は 12 例であり、側方リンパ節転移が疑われた症例は 5 例であった。26 例中 23 例に術前化学療法が施行されており奏功率は 65%であった。術前化学療法によって術前にリンパ節転移陽性と診断された症例で、陰転化した症例は 11 例中 6 例であった。最終病理診断で側方リンパ節転移は 5 症例に認められた。術前化学療法の組織学的効果判定は Grade1 が 15 例、Grade2 が 5 例、Grade3 が 3 例であった。病理学的側方リンパ節転移が見られた症例は全例、病理学的直腸間膜内リンパ節を認めており有意に相関がみられた (p<0.0001)。側方リンパ節転移に対する傍直腸リンパ節の OSNA 診断において 1 例が、側方陽性で、OSNA 陰性症例を認めた、陰性的中率は 95% (18/19)であった。診断能をまとめると正診率 85%、感度 80%、特異度 86%、陰性的中度 95%であった。側方リンパ節郭清の省略可能症例を同定する目的設定に対して、陰性的中度 95%は良好な結果であると考えられた。

表１ 傍直腸リンパ節の OSNA 診断と病理学的側方リンパ節転移

N=26		HE Lateral LNs		
		Positive	Negative	Total
OSNA LN#251	Positive	4	3	7
	Negative	1	18	19
	Total	5	21	26

副次項目として直腸間膜内リンパ節の CEAmRNA による転移検索を行った。病理学的にも ONSA 法においても陰性と診断されたが CEAmRNA にて直腸間膜内リンパ節転移陽性と診断された症例を 2 例に認めたが、これらの症例において側方リンパ節転移は陰性であり、原発巣からの初期進展を示しているものと考えられた。
本研究の意義として、昨今、進行直腸癌に対して治療成績の向上を目的として術前化学療法が臨床試験として行われているが、OSNA 法は概ね、抗癌剤治療を行った患者さんでもほとんどの例で転移測定が可能であることが示唆された。
一方、本研究の限界として、直腸間膜内リンパ節を３分割し、OSNA に与した容量が全体の４分の１に留まったことで、偽陰性となっている可能性は考慮する必要がある。

以上より、術前化学療法が多数行われていても、OSNA 法を用いた傍直腸リンパ節転移検索は側方リンパ節転移を高精度に予測することが可能であり、側方リンパ節郭清省略症例同定のための術中迅速診断法として有用であると考えられた。

〈引用文献〉

1) 大腸癌治療ガイドライン 医師用 2014 年版，大腸癌研究会編，金原出版，東京 2014
2) Sugihara K, Kobayashi H, Kato T, Mori T, Mochizuki H, Kameoka S, Shirouzu K, Muto T. Dis Colon Rectum. 2006, 1663-72
3) Feldman S, Krishnamurthy S, Gillanders W, Gittelman M, Beitsch PD, Young PR, Streck CJ, Whitworth PW, Levine EA, Boolbol S, Han LK, Hermann R, Hoon DS, Giuliano AE, Meric-Bernstam F. Cancer. 2011, 2599-607
4) Yamamoto H, Sekimoto M, Oya M, Yamamoto N, Konishi F, Sasaki J, Yamada S, Taniyama K, Tominaga H, Tsujimoto M, Akamatsu H, Yanagisawa A, Sakakura C, Kato Y, Matsuura N. Ann Surg Oncol. 2011, 1891-8

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）

６．研究組織

(1)研究代表者
畑泰司(HATA, Taishi)
大阪大学・医学系研究科・助教
研究者番号：70644912

(2)研究分担者
山本浩文（YAMAMOTO, Hirofumi）
大阪大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号：30022184

(3)連携研究者
（　　）

研究者番号：