

Title	Detection of Occult Tumor Cells in Lymph Nodes from Non-Small Cell Lung Cancer Patients Using Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction for Carcinoembryonic Antigen mRNA with the Evaluation of its Sensitivity
Author(s)	前田, 純
Citation	大阪大学, 2006, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/46172">https://hdl.handle.net/11094/46172</a>
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">＜a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"&gt;</a> 大阪大学の博士論文について <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">&lt;/a&gt;</a> をご参照ください。

***Osaka University Knowledge Archive : OUKA***

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

氏名	まえ だ じゅん 前 田 純
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学位記番号	第 20163 号
学位授与年月日	平成 18 年 3 月 24 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当 医学系研究科未来医療開発専攻
学位論文名	Detection of Occult Tumor Cells in Lymph Nodes from Non-Small Cell Lung Cancer Patients Using Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction for Carcinoembryonic Antigen mRNA with the Evaluation of its Sensitivity (RT-PCR 法を用いた非小細胞肺癌症例におけるリンパ節内潜在腫瘍細胞の検出)
論文審査委員	(主査) 教 授 福 澤 正 洋 (副査) 教 授 川 瀬 一 郎 教 授 青 笹 克 之

### 論 文 内 容 の 要 旨

#### 【目的】

1998 年以降肺がんは部位別癌死亡率 1 位となり年間死者数は 5 万 5 千人以上である。肺がんの 5 年生存率は各施設の報告でも、リンパ節転移を伴わない 1 期で 70 から 90%、1 群リンパ節のみに転移を認める 2 期で 50 から 60% となっている。これらのほとんどが 2 群リンパ節郭清をとまう根治術が施行されていると考えた場合、従来の病理学的検索法では検出し得ない潜在腫瘍細胞が、リンパ節を含めた全身に手術時既に存在し、術後病理病期が過小評価されている可能性があり、これらを検出しより正確な病期判定を行うことは術後補助療法の選択、ひいては予後改善を図るためにも必要であると考えられる。

本研究では分子生物学的手法 (定量 RT-PCR 法を用いた CEA mRNA の検出) を用いることで、従来のリンパ節最大断面を H-E 染色にて鏡検する手技 (H-E 法) では不可能であったリンパ節内潜在腫瘍細胞の検出、およびその検出感度を検討した。

#### 【方法】

- 1) 培養細胞における細胞数毎の CEA mRNA 検出感度の検討 (連続希釈法)  
A549 (ヒト肺腺癌培養細胞) 2.5 個、25 個、250 個、2500 個から抽出した RNA を用いて定量 RT-PCR 法により各細胞数における CEA mRNA コピー数を測定した。
- 2) 癌部面積と CEA mRNA コピー数に関する検討 (連続切片法)  
凍結転移リンパ節を用いて 4 枚 1 組の連続切片を作成し、1 枚目と 4 枚目を H-E 染色し目視にて癌部の面積を測定、2、3 枚目から RNA を抽出し定量 RT-PCR 法により CEA mRNA コピー数を測定した。
- 3) 肺癌臨床検体 (原発巣) における CEA mRNA の検出  
当院でのリンパ節郭清を伴う肺葉切除術を施行した 28 症例の原発巣より RNA を抽出し定量 RT-PCR 法により

CEA mRNA コピー数を測定した。

4) 肺癌臨床検体（所属リンパ節）における CEA mRNA の検出

28 症例 224 個の郭清したリンパ節のうち H-E 法により転移陽性と診断された 13 個および陰性と診断された 211 個より RNA を抽出し定量 RT-PCR 法により CEA mRNA コピー数を測定した。

【成績】

- 1) 細胞数 2500 個、250 個、25 個からはそれぞれ 1250、180、18 コピー検出された。細胞数 2.5 個から抽出した RNA からは CEA mRNA を検出し得なかった。結果として定量 RT-PCR 法による肺癌細胞の検出限界として、細胞数は 25 個、CEA mRNA として 18 コピー以上であると考えられた。
- 2) 目視にて癌細胞を認めない切片から CEA mRNA は検出されなかった。また癌部面積と定量 PCR 法による CEA mRNA コピー数は相関した。
- 3) 原発巣は組織型、進行度にかかわらず 28 例中 28 例（100%）で CEA mRNA が検出された。
- 4) H-E 法陽性リンパ節 13 個中 13 個〔6 例中 6 例〕で CEA mRNA が検出され、偽陰性は認めなかった。H-E 法陰性リンパ節 211 個中 159 個で CEA mRNA は検出されず 52 個〔28 例中 21 例〕で CEA mRNA の検出（潜在腫瘍細胞陽性）がみられた。従来の H-E 法による pN0 の 22 症例中 14 例（64%）において潜在腫瘍細胞の存在が示唆された。

【総括】

- 1) 肺癌培養細胞における定量 RT-PCR 法の検出限界は細胞数 25 個、CEA mRNA 18 コピーであった。
- 2) 肺癌転移リンパ節における定量 RT-PCR 法による CEA mRNA の検出とリンパ節内潜在腫瘍細胞（癌部面積）は相関した。
- 3) 定量 RT-PCR 法では原発巣、および HE（+）のリンパ節はすべて陽性であり偽陰性を認めなかった。さらに H-E 法では検出できない潜在腫瘍細胞を認めるリンパ節を 52/211 個（25%）検出した。
- 4) pN0 症例 22 例のうち 14 例（64%）において摘出リンパ節中に潜在腫瘍細胞が検出された。

論文審査の結果の要旨

現在、肺癌は部位別癌死亡率 1 位となり予後の改善は急務である。根治的手術が施行された病期 1、2 期においても 5 年生存率は 80 から 40% であり、これらの症例には手術時にすでにリンパ節を含めた全身に腫瘍細胞が存在し術後病期が過小評価されていると考えられている。正確な病期の把握は術後補助療法をふくめた予後改善の手段を模索する上でも必要である。

筆者らが行ったのは現状の HE 法では転移診断が困難なリンパ節内潜在所要細胞検出を目的として CEA mRNA をターゲットとした RT-PCR 法を用いた報告である。肺がん培養細胞を用いた連続希釈法、転移リンパ節を用いた連続切片法でこの方法の検出感度を同定し、その結果を踏まえて 28 症例の臨床検体（原発巣 28 個、摘出リンパ節 224 個）に対して RT-PCR 法を行った。結果は偽陰性はなく、HE 法では転移陰性であった 25% のリンパ節において潜在腫瘍細胞の存在を確認した。肺癌症例において RT-PCR 法による潜在腫瘍細胞検索の報告はほとんど無く、また同法に対する微細な感度測定を行った報告はこれまで見られない。これらより、この論文は学位の授与に値すると考えられる。