

原 著

OSNA法によるセンチネルリンパ節生検診断と 腋窩郭清省略についての検討

藤本章博¹⁾, 太田郁子¹⁾, 茂垣雅俊¹⁾,
舩井秀宣¹⁾, 清水哲^{1, 2)}, 長堀薫¹⁾

¹⁾ 横須賀共済病院 外科

²⁾ 神奈川県立がんセンター 乳腺内分泌外科

要 旨：OSNA法は病理医不在でも簡便，正確，客観的にセンチネルリンパ節生検（SLNB）が可能である．しかしOSNA法での腋窩リンパ節郭清（ALND）省略のevidenceは少ない．当院のSLNB，ALND結果から，OSNA法での郭清省略について検討した．2012年1月～2016年11月にpT1-2，cN0乳癌でSLNBを施行した369例を対象とした．凍結切片法193例，OSNA法176例で行い，SLNB陽性例に全例ALNDを追加し，結果を比較検討した．凍結切片法13.5%，OSNA法23.3%で術中SLN陽性となり，OSNA法で微小転移検出率が高かった．SLNB陽性例でOSNA法の非センチネルリンパ節転移陽性率は，（1+）12.5%，（2+）50.0%で，（1+）が有意に低かった．これらの結果は既報告と同様の傾向で，（1+）ではALNDを省略できる可能性が示唆された．

Key words: OSNA (OSNA), センチネルリンパ節生検 (sentinel lymph node biopsy),
腋窩リンパ節郭清 (axillary lymph node dissection),
非センチネルリンパ節転移 (non-sentinel lymph node metastasis), 微小転移 (micrometastasis)

緒 言

OSNA (One-Step Nucleic Acid Amplification) 法は，センチネルリンパ節 (SLN) 中のCK (サイトケラチン) 19mRNAを特異的に増幅・検出し定量することにより，病理医が不在であっても簡便かつ迅速に，さらに客観的にSLN転移の有無を判定できる方法であり，従来の凍結切片法による術中迅速病理診断とは異なるSLN転移評価法として近年普及しつつある．現在本邦の乳癌診療ガイドラインでは，SLNに病理組織学的に転移巣が2mm以下である微小転移を認めた場合は，腋窩リンパ節郭清 (ALND) の省略が推奨されている．OSNA (1+) は微小転移に相当すると考えられているが，ALND省略に関しては，OSNA法でのevidenceは確立されていない．今回，当院における凍結切片法とOSNA法でのセンチネルリンパ節生検 (SLNB) 結果の比較検討をもとに，OSNA

法での郭清省略について検討した．

対象および方法

2012年1月から2016年11月までに，当院で術前にリンパ節転移陰性 (cN0) 乳癌と診断しSLNBを施行した症例で，術後にpT1あるいはpT2と診断された369例を対象とした．理学的所見と画像診断上明らかなリンパ節転移を認めない例をcN0と診断した．SLNの同定方法は，2016年以前はインジゴカルミンを用いた色素法単独で行い，2016年以降は^{99m}Tc-フチン酸を用いたRI法と色素法の併用法で行った．なお，SLN同定不能例は今回の検討から除外した．369例のうち，凍結切片法が193例，OSNA法が176例であり，2群間のSLNB結果を比較検討した．また，術中診断でSLN転移陽性と診断された症例には，全例にALNDを追加し，その結果をふまえてOSNA法で

表1 患者背景

	凍結切片法 (n=193)	OSNA法 (n=176)	P value
平均年齢 (歳)	62.3 ± 12.8	63.0 ± 11.8	0.53
年齢			0.97
60歳未満	72 (37.3%)	66 (37.5%)	
60歳以上	121 (62.7%)	110 (62.5%)	
月経状況			0.81
閉経前	47 (24.4%)	41 (23.3%)	
閉経後	146 (75.6%)	135 (76.7%)	
摘出SLN個数 (個)	3.0 ± 1.2	2.0 ± 1.0	<0.01
病理学的腫瘍サイズ			0.26
T1	104 (53.9%)	105 (59.7%)	
T2	89 (46.1%)	71 (40.3%)	
病理組織型			0.88
浸潤性乳管癌	167 (86.5%)	152 (86.4%)	
浸潤性小葉癌	7 (3.6%)	5 (2.8%)	
特殊型	19 (9.8%)	19 (10.8%)	
核グレード			0.42
1	124 (64.2%)	125 (71.0%)	
2	28 (14.5%)	22 (12.5%)	
3	40 (20.7%)	27 (15.3%)	
不明	1 (0.5%)	2 (1.1%)	
サブタイプ			0.82
Luminal	163 (84.5%)	141 (80.1%)	
Luminal/HER2	9 (4.7%)	9 (5.1%)	
HER2	6 (3.1%)	8 (4.5%)	
Triple negative	14 (7.3%)	16 (9.1%)	
分類不能	1 (0.5%)	2 (1.1%)	

の郭清省略に関して検討した。

エストロゲンレセプター (ER), プロゲステロンレセプター (PR) は, 免疫組織学的染色を行い, 1%以上を陽性とした。human epidermal growth factor receptor type 2 (HER2) に関しては, 免疫組織学的染色を行い, 乳癌取扱い規約に従って (3+) を陽性とした。(2+) は, 原則として fluorescence in situ hybridization (FISH) に提出し, HER2/centromeric probe for chromosome 17 (CEP17) ratio 2.0以上を陽性とした。

2012年1月~2014年10月の期間ではSLN診断を凍結切片法による術中迅速診断で行った。最大断面の1切片を用いた診断を原則とし, 病理医の判断で断面を追加された症例も存在した。また, 術後に同断面を用いて永久標本を作製し, ヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色を行い最終的な転移の有無の検索を行った。2014年11月~2016年11月の期間ではOSNA法による転移診断を行った。OSNA法にはSysmex社のRD100iを用いてSLN全体を検体として転移評価を行い, SLNの病理組織学的検索は行わなかった。OSNA法ではCK19mRNAコピー数を算出し, あらかじめ設定されたカットオフ値に従いリンパ節転移の有無を判定した。250コピー/μL未満を陰性, 250

コピー/μL以上を陽性とした。陽性はさらに250以上5000コピー/μL未満をOSNA (1+), 5000コピー/μL以上をOSNA (2+) と分類した。このカットオフ値の判定は, OSNA法と永久標本3断面の病理組織診断との一致率判定試験において, 92.9%と良好な一致率が得られている¹⁾。統計学的解析は, 群間比較には χ^2 検定, t検定を用い, $p < 0.05$ を有意差ありとした。

結 果

凍結切片法193例, OSNA法176例の患者背景を示す(表1)。平均年齢, 月経状況, 病理組織学的腫瘍サイズ, 病理組織型, 核グレード, サブタイプに関して両群間に有意差はみられなかった。摘出SLN個数は凍結切片法で平均3.0個, OSNA法で平均2.0個と凍結切片法で多かった。

次に, SLN診断結果を示す(表2)。SLN転移陽性率は, 凍結切片法では13.5%であるのに対し, OSNA法では23.3%と, OSNA法で有意に転移陽性率が高かった。その内訳は, 凍結切片法では微小転移が1.0%, 病理組織学的に2mmより大きい転移巣であるマクロ転移が12.4%であったのに対し, OSNA法ではOSNA (1+) が9.1%, OSNA (2+) が12.5%, (+I) が1.7%と, OSNA法で微小転移の割合が大きく増加していた。なお, 凍結切片法による術中迅速診断ではSLN転移陰性であったが, 術後永久標本の診断で面が変わり isolated tumor cells (ITC) と診断された例が1例, 微小転移陽性と診断された例が3例あり, 術後にSLN転移診断が変更された例が合計4例あった。

続いて, 両群のSLN転移陽性例において, ALNDの結果をもとに, センチネルリンパ節以外の腋窩リンパ節 (non-SLN) 転移の頻度に関して比較検討した(表3)。なお, 凍結切片法において術後に転移陽性と診断が変更された4例に対しては, ALNDが行われていないため, この検討からは除外した。SLN転移陽性例におけるnon-SLN転移陽性率は, 凍結切片法で42.3%に対し, OSNA法では31.7%と, 統計学的有意差は認めないが, 凍結切片法で高い傾向にあった。両群の内訳では, 凍結切片法で微小転移の2例はともにnon-SLN転移を認めず, マクロ転移の45.8%でnon-SLN転移陽性であった。また, OSNA法に関しては, OSNA (1+) で12.5%, OSNA (2+) で50.0%がnon-SLN転移陽性であった。なお, OSNA (+I) ではnon-SLN転移陽性例はなかった。OSNA法でのSLN転移陽性例における, non-SLN転移陽性率の比較では(表4), OSNA (1+) の症例はOSNA (2+) と比較してnon-SLN転移陽性率が有意に低かった ($p = 0.02$)。

表 2 SLN 診断結果

	凍結切片法 (n=193)		OSNA 法 (n=176)	P value
SLN 転移陽性率	26 (13.5%)		41 (23.3%)	0.01
・微小転移	2 (1.0%)	・ OSNA (1+)	16 (9.1%)	
・マクロ転移	24 (12.4%)	・ OSNA (2+)	22 (12.5%)	
		・ OSNA (+I)	3 (1.7%)	
SLN 転移陰性率	167 (86.5%)		135 (76.7%)	
・ITC	1 (0.5%)			
・永久標本で転移陽性	3 (1.6%)			
・腫瘍細胞なし	163 (84.5%)			

表 3 SLN 転移陽性例における non-SLN 転移陽性率

	凍結切片法 non-SLN 転移陽性例 /ALND 例 (%)		OSNA 法 non-SLN 転移陽性例 /ALND 例 (%)	P value
全体	11/26 (42.3%)	全体	13/41 (31.7%)	0.38
・微小転移	0/2 (0.0%)	・ OSNA (1+)	2/16 (12.5%)	
・マクロ転移	11/24 (45.8%)	・ OSNA (2+)	11/22 (50.0%)	
		・ OSNA (+I)	0/3 (0.0%)	

表 4 OSNA 法での SLN 転移陽性例における non-SLN 転移陽性率

	non-SLN 転移陽性例 /ALND 例 (%)		non-SLN 転移陽性例 /ALND 例 (%)	P value
OSNA (1+)	2/16 (12.5%)	OSNA (2+)	11/22 (50.0%)	0.02

考 察

SLNB は臨床的 N0 早期乳癌に対する標準治療として確立しており、比較的多くの施設でガイドラインの記載に基づき 2 mm 厚で施行されているが、それでもガイドラインでは「病理学的検索方法については、標準的な検索法はいまだ定められていない²⁾」とされている。従来の方法である凍結切片法による術中迅速診断では病理医による診断が必須だが、偽陰性率は 5～52%との報告³⁾があり、精度管理が困難という問題がある。一方 OSNA 法は、病理医が不在でも施行可能であり客観的な評価法としてその有用性が認知されており、既にガイドラインの推奨グレード A に記載されている。OSNA 法は、SLN 中の CK19mRNA を特異的に増幅・検出し定量することで転移を判定する分子生物学的手法である。OSNA 法に用いる CK19mRNA は、乳癌転移陽性リンパ節中における発

現量が高く、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マーカーとして見いだされた⁴⁾。OSNA 法と従来の病理組織学的診断とを比較した報告では、その一致率は 92.9% と良好な成績が得られている¹⁾。CK19mRNA コピー数のカットオフ値の設定により、病理組織学検査における微小転移、マクロ転移の判別が可能で、それぞれ OSNA (1+), OSNA (2+) であらわされる。また、OSNA (+I) (inhibition) は、転移陽性だが、抑制物質により OSNA 法の結果と希釈サンプルの結果に乖離が生じたため、(1+), (2+) が判別不能な比較的可疑な状態である。OSNA (+I) の予後や病理組織学的特徴に関する報告はなく、今後の検討を要する。

OSNA 法のデメリットとして、迅速診断をする前に予め検量線作成を要するため技師の負担となる、OSNA 法の判定はリンパ節 1 つで約 30 分を要するため、リンパ節が

提出されてから報告までに要する時間が従来法よりも長くなる, 一度に検査可能なリンパ節の個数は4個までのため, 検体数が多い場合はさらに2倍の時間がかかる可能性があることなどが挙げられる。また, CK19陰性乳癌あるいは低発現乳癌ではOSNA法の反応が適切に進まない可能性がある。そのような場合など, 得られたデータに信頼性がないと判断した際に, 従来の迅速病理診断と異なり再検が困難という欠点もある。さらに, コスト面では機器 (RD100i) 購入の初期費用以外にも, 試薬等の消耗品のため1日1件のSLNBで約14,000円~19,000円/症例, 1日2件のSLNBで約10,000円~15,000円/症例のランニングコストを要すると試算できる。OSNA法では, 標本切片作成が不要なので病理医および技師の人工費が削減されるとはいえ, 従来法と比較してかなり高額であり, 現状ではすべての施設で導入するのは困難と考えられる。前述したOSNA法の利点・欠点をよく理解した上で, その施設に最も適した迅速診断法を選択していくことが求められる。

さて, SLN転移陽性症例に関しては, ALND後の上腕浮腫等の有害事象を考慮し, 近年は郭清省略に関する議論が活発に行われている。ACOSOG 0011試験⁵⁾では, T1-T2, cN0の乳房温存手術例において, SLN転移陽性であってもALNDを省略できる可能性が示唆された。また, IBCSG 23-01試験⁶⁾では, T1-T2, cN0でSLNに微小転移を有する患者において, ALNDを省略しても生存率・腋窩リンパ節再発率に影響しないことが示された。他に, AMAROS試験⁷⁾では, SLN転移陽性症例で, 腋窩照射とALNDの局所制御効果は同等であることが示された。ただし, これら郭清省略に関する大規模臨床試験のSLN評価はすべて従来の病理組織診断を基に行われており, OSNA法の結果によりALNDを省略した症例の長期予後は未だ報告されていないのが現状である。

前述のようにOSNA (1+)は微小転移に相当すると考えられているが, OSNA (1+)でのALND省略に関するエビデンスは確立されていない。そのため, 当院ではOSNA法を導入した2014年11月から2016年11月までは, OSNA法陽性となった症例については, 全例でALNDを施行する方針としていた。なお, 当院ではOSNA法導入以降の2016年8月よりSLN同定を色素法とRI法の併用法で行うようになり, 色素法単独で施行していた際は比較的多くのSLNを提出する傾向にあったため, 摘出SLN個数に2群間で有意差が出た可能性がある。

SLN転移陽性率は, Osakoら⁸⁾は凍結切片法で17.6%, OSNA法で22.8%であったと報告している。また, 久保田⁹⁾らは凍結切片法で13.3%, OSNA法で17.5%であったと報告している。いずれもOSNA法で高い陽性率が得られており, その理由はOSNA法の高い微小転移検出率のためと考えられている。SLN全体を検体として転移評

価を行うOSNA法では, 断面を用いて病理学的検索を行う従来法よりも微小転移検出率が高いと考えられる。術後の永久標本作成に関しては, 当院は一般市中病院であり, 病理医数や標本作成に携わる技師数もごく限られたものであるという制約があったため, リンパ節の断面は最大断面の1切片を用いた評価を原則としていた。OSNA法と従来法を正確に比較するためには2mm間隔以下の詳細な検索が不可欠で, 最大断面の1切片のみの観察では不十分であり, この点に関しては本研究の限界と考えられる。ただし, 仮に切片を2mm間隔として詳細な検討を行っても, 2mm未満のリンパ節転移は見落とされる可能性がある。今回の検討でもOSNA法でのSLN転移陽性率は, 凍結切片法と比較して9.8%高く, 有意に転移陽性率が高い結果となった。既報告よりもOSNA法の転移陽性率の上昇がやや大きかった理由としては, 当院ではもともと凍結切片法での微小転移診断の割合が低かったことも一因と考えられる。

SLN転移陽性時のnon-SLN転移陽性率についての検討では, OSNA法全体ではTamakiら¹⁰⁾は, 22.2%, 久保田ら⁹⁾は33.7%であったと報告しており, 今回の検討でも31.7%と概ね一致した。OSNA法の内訳に関して, Tamakiら¹⁰⁾は, OSNA (1+)で17.6%, OSNA (2+)で44.0%, 久保田ら⁹⁾はOSNA (1+)で11.1%, OSNA (2+)で33.3%と報告している。今回の自施設での検討でもOSNA (1+)で12.5%, OSNA (2+)で50.0%がnon-SLN転移陽性であり, 同様の傾向を示した。

従来法で微小転移陽性の場合, 10~15%でnon-SLNに転移を認めた¹¹⁾ことが報告されており, IBCSG 23-01試験⁶⁾でもALND群の13%にnon-SLN転移を認めたとの報告もあり¹²⁾, その割合は一定ではない。OSNA法は微小転移検出率が高いため, OSNA (1+)としてnon-SLN転移陰性症例を, より多く発見できると考えられ, OSNA (1+)のnon-SLN転移陽性率はこれよりも低い傾向となることが予想される。今回当院でのOSNA (1+)におけるnon-SLN転移陽性率12.5%は, これらの既報告を考慮しても妥当であり, ALNDを省略できる可能性が示唆された。さらに, 近年はOSNA法においてCK19mRNAコピー数と腋窩リンパ節転移との関連が指摘されており¹³⁾, CK19mRNAコピー数 (総数) が予後に影響するとも報告されている¹⁴⁾。このことから, ALND省略の基準として, OSNA (1+), (2+)以外のカットオフ値を考慮せねばならないと考えられる。このように, ALND自体の必要性が論議されている現状において, SLNBはALND省略の基準のみならず, 予後予測法としてより大きな役割を担っていくと考えられる。治療方針選択のため, 今後はOSNA法を用いた新たな予後予測法の開発が待たれる。

おわりに

当院の OSNA 法を用いた術中迅速診断結果は、既報告とほぼ同様の傾向を示した。OSNA 法は病理医不在でも施行可能で、客観的な診断が得られるという利点がある。OSNA 法は既報告同様に微小転移検出率が高く、OSNA (1+) では non-SLN 転移陽性率が低いいため、OSNA (1+) で ALND が省略できる可能性が示唆された。

文 献

- 1) Tamaki Y, Akiyama F, Iwase T, et al: Molecular detection of lymph node metastases in breast cancer patients: results of a multicenter trial using the one-step nucleic acid amplification assay. *Clin Cancer Res*, **15**: 879 – 2884, 2009.
- 2) 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① 治療編2015年版, 275–276, 金原出版, 2015.
- 3) Hughes SJ, Xi L, Raja S, et al: A rapid, fully automated, molecular-based assay accurately analyzes sentinel lymph nodes for the presence of metastatic breast cancer. *Ann Surg*, **43**: 389–398, 2006.
- 4) Tsujimoto M, Nakabayashi K, Yoshidomi K, 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.
- 5) Giuliano AE, Hunt KK, Ballman KV, et al: Axillary dissection vs no axillary dissection in women with invasive breast cancer and sentinel node metastasis: a randomized clinical trial. *JAMA*, **305**: 569–575, 2011.
- 6) Galimberti V, Cole BF, Zurrada S, et al: Axillary dissection versus no axillary dissection in patients with sentinel-node micrometastases (IBCSG 23-01) : a phase 3 randomised controlled trial. *Lancet Oncol*, **14**: 297–305, 2013.
- 7) Donker M, van Tienhoven G, Straver ME, et al: Radiotherapy or surgery of the axilla after a positive sentinel node in breast cancer (EORTC 10981-22023 AMAROS) : a randomised, multicentre, open-label, phase 3 non-inferiority trial. *Lancet Oncol*, **15**: 1303–1310, 2014.
- 8) Osako M, Iwase T, Kimura K, et al: Intraoperative molecular assay for sentinel lymph node metastases in early stage breast cancer. *Cancer*, **117**: 4365 – 4374, 2011.
- 9) 久保田博文, 早野史子, 古賀 淳, 他：センチネルリンパ節の術中診断における one-step nucleic acid amplification 法 (OSNA) 法の経験. *乳癌の臨床*, **27** (3): 327–331, 2012.
- 10) Tamaki Y, Sato N, Homma K, et al: Routine clinical use of the one-step nucleic acid amplification assay for detection of sentinel lymph node metastases in breast cancer patients: results of a multicenter study in Japan. *Cancer*, **14**: 3477–3483, 2012.
- 11) Cserni G, Gregori D, Merletti F, et al: Metaanalysis of non sentinel node metastases associated with micrometastatic sentinel lymph nodes in breast cancer. *Br J Surg*, **91**: 1245–1252, 2004.
- 12) McCready D, Yong W, Ng A, et al: Influence of the new AJCC breast cancer staging system on sentinel lymph node positivity and false-negative rates. *J Natl Cancer Inst*, **96**: 873–875, 2004.
- 13) Peg V, Espinosa-Bravo M, Vicites B, et al: Intraoperative molecular analysis of total tumor load in sentinel lymph node: a new predictor of axillary status in early breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat*, **139**: 87 – 93, 2013.
- 14) Peg V, Sansano I, Vicites B, et al: Role of total tumor load of sentinel lymph node on survival in early breast cancer patients. *The Breast*, **33**: 8 – 13, 2017.

Abstract

ONE-STEP NUCLEIC ACID AMPLIFICATION ASSAY FOR DIAGNOSIS OF
SENTINEL LYMPH NODE METASTASES AND OMISSION OF
AXILLARY LYMPH NODE DISSECTION

Akihiro FUJIMOTO¹⁾, Ikuko OTA¹⁾, Masatoshi MOGAKI¹⁾,
Hidenobu MASUI¹⁾, Satoru SHIMIZU^{1, 2)}, Kaoru NAGAHORI¹⁾

¹⁾ *Department of Surgery, Yokosuka Kyosai Hospital*

²⁾ *Department of Breast and Endocrine Surgery, Kanagawa Cancer Center*

A one-step nucleic acid amplification (OSNA) assay makes it possible to diagnose sentinel lymph node biopsy (SLNB) specimens when there is no pathologist available. However, there is little evidence for omission of axillary lymph node dissection (ALND) using an OSNA assay. The purpose of this study was to compare the results between conventional histopathologic examination and OSNA assay, and to evaluate the criteria for ALND when using an OSNA assay. Between 2012 and November 2016, 369 breast cancer patients (pT1-T2 cN0) who underwent SLNB were enrolled and assigned to OSNA assay (n=176) or conventional histopathologic examination (n=193). ALND was performed in all SLNB-positive cases. It was found that the OSNA assay detected SLN metastases at a higher rate than histopathologic examination, especially micrometastases. In the OSNA assay group of SLNB-positive cases, the rate of non-SLN metastases (12.5%) in the OSNA (1+) group was significantly lower than the rate of non-SLN metastases (50.0%) in the OSNA (2+) group. This suggests that ALND can be omitted in OSNA (1+) cases.