

審 査 の 結 果 の 要 旨

氏 名 久保田 啓介

本研究は胃癌根治手術症例の重要な予後規定因子であるリンパ節転移の判定に **real-time RT-PCR** 法の手法を導入し、その実用性・有用性、導入の意義を明らかにすることを目的に **H&E** 染色法・免疫組織染色法と比較検討したものであり、下記の結果を得ている。本論文中では、「微小転移」という用語は「**H&E** 染色法では検出されなかった微量の癌細胞・転移巣で、免疫組織染色法により初めて認識されたもの、あるいは **real-time RT-PCR** 法を用いた場合は **H&E** 染色法では癌細胞・転移巣の検出されなかったリンパ節において標的 mRNA が定量によって検出されたもの」として定義されており、改訂 TNM(2002)分類の Micrometastasis (MM : 径 2 mm 以下の転移)、Isolated tumor cells (ITCs : 径 0.2 mm 以下の転移で、癌組織への分化、間質との相互反応、脈管への浸潤像を伴わないもの) とは異なる意味で区別して用いられている。

1. **H&E** 染色で転移陽性と判定されたリンパ節は、すべて **AE1/AE3** による免疫組織染色法においても陽性と判定された。**H&E** 染色では癌細胞の転移を認めなかったリンパ節中の 11 個、3.6%が免疫組織染色法および連続切片の **H&E** 染色標本の確認により転移陽性と判定され、組織形態学的検討でこのうちの 2 個が MM、9 個が ITC と判定された。
2. **LightCycler** を用いた **real-time RT-PCR** 法は、基本的な分子生物学的手法

のみで可能な客観性・再現性のある方法であった。また、リンパ節の処理開始から結果の解析まで約 3 時間を要するのみの迅速な方法であった。

3. **real-time RT-PCR** 法の結果は、対照群（非癌症例リンパ節）では定量値はすべて 0 であった。微量でも標的 mRNA の検出されるリンパ節は「**real-time RT-PCR** 法陽性」とする判定基準を用いると、**H&E** 染色法による病理学的転移陽性リンパ節はすべて **real-time RT-PCR** 法でも陽性と判定された。また、**H&E** 染色法による病理学的転移陰性リンパ節中の 68 個、21.2%が **real-time RT-PCR** 法陽性であった。現時点ではこれらのリンパ節の全てが癌細胞・転移巣を検出しているものとは確証されないが、少なくとも一部は転移癌細胞を検出しているものと思われる。
4. 上記に関連して、今回の研究では深達度 M の全ての 4 症例において **real-time RT-PCR** 法陽性リンパ節が検出された。3 例は大きさ、組織型、潰瘍瘢痕などの因子により微小転移の存在する可能性があるものと思われる。しかし M 癌症例より検出された **real-time RT-PCR** 法の定量値は非常に低く、一部には偽陽性判定が含まれている可能性があり、将来的には対照リンパ節の蓄積により 0 以上のカットオフ値が設定される可能性もあり得る。
5. **real-time RT-PCR** 法は **H&E** 染色法、免疫組織染色法と比較して陽性リンパ節の検出能が高かったが、その一方で **H&E** 染色・免疫組織染色法にて癌細胞の存在が確認されるリンパ節において陰性と判定されるサンプルも存在した。**real-time RT-PCR** 法による mRNA の定量値は免疫組織染色強度と非常によく相関しており、上述の判定の相異が存在した原因は標的 mRNA の発現の低さが原因と考えられ、今後は高感度・高特異度を有する新規のマーカーを導入する必要があると考えられる。
6. 組織形態学的な MM、ITC の判定結果は、**real-time RT-PCR** 法の定量値の結果と相関を認めず、組織形態学的には ITC と判定されるリンパ節の中にも、

MM と同程度の癌細胞、極端な場合には **massive** な転移の含まれているものが存在することが示唆された。すなわち実地臨床上全症例・全てのリンパ節を全割して **H&E** 染色法・免疫組織染色法を行うことは不可能であることを考えると、リンパ節全体の癌細胞の転移状況を把握するためには **real-time RT-PCR** 法が必要であると考えられた。

以上、本論文は **real-time RT-PCR** 法を用いて胃癌リンパ節転移の検出を行い、**H&E** 染色法・免疫組織染色法と比較してその実用性・有用性を検討したものであり、単一あるいは限られた切片数の中で判定を行う **H&E** 染色法・免疫組織染色法には実務的に限界があり、**real-time RT-PCR** 法が必要であることを明らかにした。ただし現時点では **real-time RT-PCR** 法の陽性判定が、真に微小転移の存在を反映するか否かの確証は得られておらず、今後の課題である。当面は **real-time RT-PCR** 法の結果を参考にして、**H&E** 染色法・免疫組織染色法を併用しながらの微小転移診断を行うことが臨床上最も応用可能性が高いと考えられる。本研究は今後の胃癌のリンパ節転移の診断、治療法の決定に重要な貢献をなすと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。