

原 著

TRC 法による大腸癌術中腹腔洗浄液 CEA-mRNA 測定の意義

東京女子医科大学医学部外科学（第2）講座

ヒラノ セシモ アキヨシ カメオカ シンゴ
平野あづさ・瀬下 明良・亀岡 信悟

（受理 平成26年11月21日）

Carcinoembryonic Antigen mRNA Measurement by Using the Transcription-Reverse Transcription Concerted Method for Peritoneal Lavage Fluid Collected during Colorectal Cancer Surgery

Azusa HIRANO, Akiyoshi SESHIMO and Shingo KAMEOKA

Department of Surgery II, Tokyo Women's Medical University

We evaluated the cytology and measured the carcinoembryonic antigen (CEA) mRNA in peritoneal lavage fluid samples collected between 2006 and 2011, by using the transcription-reverse transcription concerted (TRC) method. Prewash samples were obtained from 80 primary colorectal cancer patients during laparotomy. Cytology and CEA mRNA of 14 colorectal cancer patients were examined twice, in prewash samples collected immediately after opening the peritoneal cavity and in postwash samples collected just before closing the abdomen. In patients positive for cytology or peritoneal dissemination in prewash samples, the incidence rate for detecting CEA mRNA by using TRC was 100%. TRC had a sensitivity of 100% and a specificity of 93.3%. There was a significant relationship between prewash CEA mRNA number and tumor site, invasive growth pattern, and liver metastasis. Detection of CEA mRNA in the postwash sample was associated with recurrence. Determination of CEA mRNA seemed to be more sensitive than cytology for the detection of cancer cells, and therefore, detecting CEA mRNA may be a useful method for predicting recurrence.

Key Words: peritoneal lavage fluid, recurrence, colorectal cancer, TRC, CEA mRNA

緒 言

大腸癌治癒切除後の初発再発部は肝（7.1%）、肺（4.8%）、局所（4.0%）とされ、腹膜播種はその他（3.8%）の中に分類され、その頻度は少ない¹⁾。腹膜播種の早期診断を目指して術中腹腔内洗浄細胞診が行われているが、その臨床的意義については現在コンセンサスが得られておらず、大腸癌取り扱い規約第8版²⁾でも、「洗浄細胞診で癌細胞を認めた場合の臨床的意義は現在不明であるので、その旨を記載するのにとどめる」とされている。しかし、大腸癌腹腔洗浄細胞診の臨床的意義について、松井ら³⁾が33文献を対象としたシステマティックレビューで、全再発、腹膜播種再発、局所再発の予測因子であると報告されている。

一方で、再発の指標として、癌胎児性抗原 (carcino-
noma embryonic antigen : CEA) 血中値は腫瘍量の

増減を反映することから、癌の診断、治療のモニターとして利用されている。近年では、消化器癌における腹水、腹腔洗浄液中の遊離癌細胞 (isolated tumor cells)、リンパ節中に散在する癌細胞をより鋭敏に検出するために、その遺伝子である CEA-mRNA を測定し、転移診断に役立てようとの試みが報告されている⁴⁾⁵⁾。その測定方法である TRC (transcription reverse transcription concerted reaction) 法は従来からの polymerase chain reaction (PCR) 法と比較し、より迅速で簡便な遺伝子増幅法で、PCR 法の約3分の1の時間で測定ができ術中診断に用いることも可能である。

今回、腹腔内洗浄細胞診とともに、TRC 法を用いた CEA-mRNA の測定を行い、その臨床的意義について検討した。

対象および方法

2006年12月～2011年3月に当科で行った初発の大腸癌開腹手術症例(473例)で、筆者が検体を採取した術中洗浄液の、細胞診およびTRC法によるCEA-mRNAを測定した結腸癌54例と直腸癌26例、合計80例について検討した(開腹時測定)。また直腸癌26例中14例で、病変切除再建後の骨盤内洗浄液についても検討した(直腸再建後測定)。

検討項目は、男女比、手術時病変部位、細胞診、深達度、組織型、浸潤増殖様式、リンパ管侵襲、静脈侵襲、リンパ節転移、肝転移、肉眼的腹膜播種、再発の有無とした。

臨床病理学的所見の記載は大腸癌取り扱い規約第8版²⁾に従って記載した。再発形式は身体所見、および画像診断検査にて判断した。

本稿において、細胞診陽性または肉眼的腹膜播種陽性を術中播種所見陽性と定義し、細胞診陰性かつ肉眼的腹膜播種陰性を術中播種所見陰性と定義して検討をおこなった。

TRC法によるCEA-mRNAの測定は次のように行った^{6)~9)}。

大腸癌手術時、開腹直後に腹腔内を生理食塩水100mlで洗浄し回収した。回収液のうち10mlをTRC法によるCEA-mRNA測定用、10mlを細胞診用とした。また、直腸癌の病変切除再建後の骨盤内洗浄液も同様に採取した。

TRC用に採取された洗浄腹水はRNeasy Mini Kit(QIAGEN社)を用いてRNAを抽出した。これにCEA-mRNAに対する反応試薬および酵素試薬としてTRCrtest CEA-m(東ソー株式会社)を加えTRCRリアルタイムモニターTRCRapid-160(東ソー株式会社)に投入し、約20分間の測定分析を行った。

陽性コントロール(1×10^4 コピー/5 μ l)の10重測定を行い、検量線より得られた測定値の平均は11,694コピー(最大値:16,669コピー、最小値:8,025コピー)であった¹⁰⁾。

CEA-mRNAコピー数のカットオフ値について、花田ら⁸⁾の報告より、CEA陽性株での希釈直線を確認した結果、下限値である測定感度は100.0コピー(細胞数5個)であったため、これに準じてカットオフ値を100コピーとし、100コピー以上をTRC陽性とした。

細胞診は、Papanicolaou分類にてclass分類を行い、classV以上を陽性とした。診断結果は、病理診

断科の細胞診診断報告書の記載を引用した。統計解析ソフトはJMP 11.0.0(SAS institute Japan株式会社)を使用し、単変量解析(χ^2 検定)および多変量解析(ロジスティック回帰分析)の結果を求めた。いずれもp値0.05以下を有意差ありと判定した。

本研究は東京女子医科大学倫理委員会の承認を得ている。

結 果

開腹時洗浄群80例の背景因子(Table 1)は、年齢中央値が66.5歳(34~94歳)で、性別は男性47例、女性33例であった。占拠部位は結腸癌が54例、直腸癌26例、壁深達度はSS以深が59例(73.8%)、組織型は高分化・中分化腺癌が70例(87.5%)、リンパ節転移陽性例が26例(32.5%)を占めていた。肉眼的腹膜転移陽性例は5例(6.3%)、肝転移陽性例は7例(8.6%)であった。また、結腸癌症例54例中2例は、病巣非切除例(試験開腹・人工肛門造設)であった。また、全例の平均追跡期間は42.4ヵ月であり、3年間の追跡率は88.8%であった。

1. 開腹時測定

1) 臨床病理学的因子との関連

80例中TRC陽性は10例(12.5%)であった(Table 1)。

TRCと臨床病理学的因子との間で単変量解析を行い、病変部位($p=0.0035$)、浸潤増殖様式($p=0.0230$)、肝転移の有無($p=0.0321$)との間に有意な関連性を認めた。

細胞診・肉眼的腹膜播種を除いた項目で多変量解析を行い病変部位($p=0.0216$)だけに有意な関連性を認めた。

2) TRCと細胞診・肉眼的腹膜播種の関連

細胞診陽性4例、肉眼的腹膜転移陽性5例はすべてTRC陽性であった(Table 1)。細胞診陽性症例は、すべて肉眼的腹膜播種陽性症例であった。細胞診と肉眼的腹膜播種転移は、いずれもTRC法と単変量解析で有意な関連性を認めた($p<0.0001$)(Table 1)。

TRC法と<方法>で定義した術中播種所見との関連を検討した(Table 2)。TRC法の術中播種所見に対する感度は100%、特異度93.3%であった。偽陰性は認めなかった。

3) 再発・臨床病理学的因子の検討

開腹時測定の再発について、手術施行時に遠隔転移陰性であった66例で検討した(Table 3)。術後再発を10例に認めた。再発の内訳は肺転移4例、肝転

Table 1 The characteristics of the colorectal cancer patients with positive or negative TRC findings

	Total n=80	TRC Positive n=10	TRC Negative n=70	Univariate p value	Multivariate p value
Gender					
Male	47	8	39	n.s	—
Female	33	2	31		
Tumor site					
Colon	54	10	44	0.0035	0.0216
Rectum	26	0	26		
Depth of invasion					
M ~ MP	20	1	19	n.s	—
SS ~	59	9	50		
unknown	1	0	1		
Histological grade					
tub1, 2 ²⁾	70	8	62	n.s	—
other	9	2	7		
unknown	1	0	1		
INF ²⁾					
a	14	1	13		
b	58	5	53	0.0230	0.2259
c	5	3	2		
unknown	3	1	2		
Lymphatic invasion					
0, 1	59	5	54		
2	14	2	12	n.s	—
3	5	2	3		
unknown	2	1	1		
Venous invasion					
0, 1	72	8	64		
2	3	0	3	n.s	—
3	3	1	2		
unknown	2	1	1		
Lymph node					
N0	52	5	47		
N0 ~ N3	26	4	22	n.s	—
NX	2	1	1		
Liver metastasis					
H0	73	7	66	0.0321	—
H1 ~ 3	7	3	4		
Cytology					
negative	76	6	70	<0.0001	—
positive	4	4	0		
Peritoneal dissemination					
negative	75	5	70	<0.0001	—
positive	5	5	0		

The 80 patients colorectal cancer were divided into 2 groups: positive TRC and negative TRC, and logistic regression was performed

tub1: Well differentiated adenocarcinoma²⁾

tub2: Moderately differentiated adenocarcinoma²⁾

INF: invasive growth pattern²⁾

移 3 例, 腹腔内リンパ節転移 2 例, 肝転移・腹膜播種再発 1 例であった。

リンパ節転移陽性が単変量解析 ($p=0.0272$), 多変量解析 ($p=0.0194$) とともに, 有意な関連性を認めた (Table 3). TRC 陽性で再発は 4 例中 1 例 (25%) に

認め, TRC 陰性で 62 例中 9 例 (14.5%) に認めた. TRC 陽性で再発が多い傾向を認めた. また細胞診は, 再発例のすべてで陰性であった。

2. 直腸切除後測定

直腸癌症例で病変切除再建後の骨盤内洗浄液を回

Table 2 Relationship between cytology or peritoneal dissemination and the results obtained by using the transcription-reverse transcription concerted (TRC) method

Total n = 80	Peritoneal washing cytology or Peritoneal dissemination	
	Positive n = 5	Both negative n = 75
TRC positive n = 10	5	5
TRC negative n = 70	0	70

TRC sensitivity, 100% (5/5); TRC specificity, 93.3% (70/75).

収した 14 例について検討した (Table 4). 14 例全例が細胞診陰性かつ、遠隔転移陰性の症例であった。14 例中 TRC 陽性が 5 例, TRC 陰性が 9 例であった。TRC 陽性例で、壁深達度が深く、リンパ管侵襲・静脈管侵襲・リンパ節転移が陽性となる頻度が多かったが、症例が少なく統計学的検討は行えなかった。3 例の再発を認めたが、再発例はすべて TRC 陽性であり、TRC 陰性に再発を認めなかった。再発の内訳は肝転移 1 例, 肝転移・腹膜播種 1 例, 腹腔内リンパ節 1 例であった。

Table 3 Risk factors for recurrence among 66 colorectal cancer patients

	Total n = 66	Recurrence positive n = 10	Recurrence negative n = 56	Univariate p value	Multivariate p value
Gender					
Male	39	5	34	n.s	—
Female	27	5	22		
Tumor site					
Colon	40	4	36	n.s	—
Rectum	26	6	20		
Cytology					
negative	66	10	56	n.s	—
positive	0	0	0		
Depth of invasion					
M ~ MP	20	1	19	n.s	—
SS ~	46	9	37		
Histological grade					
tub1, 2	60	9	51	n.s	—
other	6	1	5		
INF					
a	14	0	14		
b	49	9	40	n.s	n.s
c	2	0	2		
unknown	1	1	0		
Lymphatic invasion					
0, 1	54	7	47	n.s	—
2	11	3	8		
3	1	0	1		
Venous invasion					
0, 1	63	10	53	n.s	—
2	2	0	2		
3	1	0	1		
Lymph node					
N0	47	4	43	0.0272	0.0194
N1 ~ 3	19	6	13		
TRC					
negative	62	9	53	n.s	—
positive	4	1	3		

Logistic regression was performed with data from 66 colorectal cancer patients divided into 2 groups: recurrence-positive and recurrence-negative groups.

tub1: Well-differentiated adenocarcinoma²⁾.

tub2: Moderately differentiated adenocarcinoma²⁾.

INF: Invasive growth pattern²⁾.

Table 4 The characteristics of the rectal cancer patients with positive or negative postwashes TRC

	Total n = 14	postwashes TRC Positive n = 5	postwashes TRC Negative n = 9
Gender			
Male	9	2	7
Female	5	3	2
Depth of invasion			
M ~ MP	4	0	4
SS ~	10	5	5
Histological grade			
tub1, 2	12	4	8
other	2	1 (muc)	1 (pap)
INF			
a	1	0	1
b	13	5	8
c	0	0	0
Lymphatic invasion			
negative	2	0	2
positive	12	5	7
Venous invasion			
negative	10	3	7
positive	4	2	2
Lymph node			
negative	9	2	7
positive	5	3	2
Recurrence			
negative	11	2	9
positive	3	3	0

postwashes TRC: post rectal reconstruction TRC.

tub1: Well differentiated adenocarcinoma²⁾.

tub2: Moderately differentiated adenocarcinoma²⁾.

muc: Mucinous adenocarcinoma²⁾.

pap: Papillary adenocarcinoma²⁾.

INF: invasive growth pattern²⁾.

考 察

大腸癌治癒切除後の腹膜再発の頻度は少なく、平井ら¹¹⁾の報告によれば、大腸癌治癒切除術後の累積5年の腹膜再発率は1.7%と報告されている。Haraら¹²⁾は大腸癌の腹膜播種再発率が低い原因は、腹腔内に遊離する大腸癌細胞が少ないためではなく、大腸癌細胞が胃癌細胞と比較し、腹膜上に生着する能力が低いためである可能性を報告している。

大腸癌取り扱い規約第8版²⁾でも腹水細胞診で癌細胞を認めた場合はCylとするが、病期診断には反映させないと記載され、腹腔洗浄細胞診での臨床的意義は、現時点では未定である。しかし、前掲のシステマティックレビュー³⁾では大腸癌腹腔洗浄細胞診は全再発、腹膜播種再発、局所再発の予測因子であると結論し、またHommaら¹³⁾も大腸癌治癒切除例771例を対象とした検討で、腹腔洗浄細胞診は全

再発の予測因子であると報告している。そこで本研究では、腹腔洗浄細胞診よりも少数の癌細胞を検出できる方法として、TRC法を用いた腹腔洗浄液のCEA-mRNA測定を行い、その意義を検討した。

まず細胞診と開腹時測定TRC法の陽性率を比較すると、自検例では細胞診の陽性率が5.0%、TRC陽性率が12.5%であり、諸家の報告による細胞診陽性率平均5.1%³⁾、Hayamaら¹⁴⁾の報告による大腸癌腹腔洗浄液のTRC陽性率の19.9%と大きく矛盾しない結果であり、いずれもTRC陽性の頻度が高かった。自検例では細胞診陽性症例はすべてTRC陽性であり、術中播種所見に対する感度は100%で偽陰性は認めなかった。また、癌細胞の有無を術中に機械的に判定できれば、病理の迅速診断や細胞診のための人的資源を必要とせず、臨床的にはきわめて有用となると考えられる。

開腹時測定TRC法と病理的所見の関係では、TRC陽性の10例はすべて結腸症例であった。これは、腹膜反転部より肛門側の直腸癌では腹腔内に病巣が露出しないため、腹腔内への癌細胞の遊離が少ないことが一因と考えられた。TRC陽性10例中9例が漿膜浸潤(SS)以上の深達度であり、これまでの腹腔洗浄細胞診の報告と同様である¹²⁾。漿膜浸潤(SS)症例でTRC陽性となる機序について、西ら¹⁵⁾は漿膜面に露出した部分を組織学的に確認することが困難であり、実際にはどこかで漿膜に露出しながら組織標本上漿膜浸潤(SS)と診断される場合や、漿膜直下に達した癌細胞が漿膜をすり抜けて腹腔内に遊離している可能性を指摘している。また、転移リンパ節から脂肪細胞に癌が侵入し腹膜播種を生じる可能性が、胃癌で提示されており¹⁶⁾、大腸癌でもリンパ節転移が多いものに細胞診陽性が多いとされている¹⁷⁾。今回は浸潤増殖様式、肝転移の有無でも有意な差を認め、TRC法による腹腔洗浄液CEA-mRNA測定は、深達度だけでなく、癌の様々な進行度が反映される可能性が考えられた。開腹時測定TRC法の再発への影響では、今回の遠隔転移陰性66例の検討において、開腹時測定TRC陽性(1/4 25%)は陰性(9/62 14.5%)より再発が多いが、腹膜播種再発、全再発ともに有意差は認められなかった。また細胞診は、再発例のすべてで陰性であった。

次に直腸再建後測定TRC法についてであるが、TRC陽性となった5例は、開腹時測定では細胞診・TRC陰性であり、手術操作により腫瘍周囲の剝離面より癌細胞が散布されたと考えられる。この5例中、

3例に再発を認めたが、細胞診はすべて陰性であった。直腸再建後測定 TRC 法は、全体の症例数が14例と少なく、統計学的検討は困難であったが、TRC陽性群での再発率が60% (3/5)、TRC陰性群での再発率が0%であり、直腸再建後 TRC陽性が、癌細胞の遺残を反映し、直腸癌の再発の予測因子となりうる可能性が示された。

再発への影響について、室野ら¹⁸⁾は大腸癌腹腔洗浄細胞診に対する12文献で、症例数の結果への影響を報告している。それによると対象が100例以上の8文献では5文献で細胞診陽性が予後不良因子であり、100例未満の4文献では予後不良因子ではないとされていた。やはり予後の検討ではある程度以上の症例数が必要であることを指摘している。今回、開腹時測定 TRC法は再発の危険因子とならなかったが、Hayamaら¹⁴⁾は161例の検討で、TRC陽性は腹膜再発および予後不良因子であると報告している。

今回の検討では、TRC法の予後因子としての可能性が示唆され、今後より多くの症例での検討が必要と考えられた。

結 論

TRC法は、従来の細胞診より、実際の診断で有効性が高い可能性があり、また同時に、全再発の予測因子としての有用性も示唆された。

謝 辞

稿を終えるにあたり統計処理についてご指導していただいた、総合研究所研究部清水悟先生、病理診断科の皆様、TRC測定にご協力いただいた中央検査部遺伝子関連検査室の皆様に深く感謝いたします。

この研究において、開示すべき利益相反状態はない。

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) 「大腸癌取り扱い規約 第8版」(大腸癌研究会編), 金原出版, 東京 (2013)
- 3) 松井孝至, 北村東介, 小澤平太ほか: システマックレビューによる大腸癌腹膜播種洗浄細胞診の臨床的意義の検討. 日本大腸肛門病学会誌 **65**: 197-203, 2012
- 4) 藤原義則, 宮田博志, 瀧口修司: 術中迅速リンパ節転移診断法の新展開. 臨外 **59** (5): 593-599, 2004
- 5) 藤原義則, 瀧口修司, 宮田博志ほか: 腹膜転移の分子生物学的診断. 臨消内科 **20** (2): 219-226, 2005
- 6) 保川 清: TRC反応によるRNA増幅とリアルタイム検出. 医のあゆみ **206** (8): 479-483, 2003
- 7) 韓 龍海: 腹腔内遊離微量癌細胞検出のための2種の高感度検出法における所要時間の比較検討. 京府医大誌 **116** (3): 163-175, 2007
- 8) 花田浩之, 藤原義之, 相場逸郎ほか: TRC法を用いた腹腔洗浄液遺伝子診断の胃癌腹膜播種再発予測における有用性の検討. 臨病理 **55**: 1002-1007, 2007
- 9) Nishizawa M, Sesimo A, Miyake K et al: Usefulness of the TRC method in the peritoneal washing cytology for gastric cancer. Hepatogastroenterology **61**: 20-24, 2014
- 10) 「CEAmRNA 測定試薬 TRCRtest CEA-m (第2版)」(東ソー株式会社編)(2006)
- 11) 平井 孝, 加藤知行, 金光幸秀: 大腸癌腹膜播種性転移の治療とその成績. 外科 **66**: 921-925, 2004
- 12) Hara M, Nakanishi H, Jun Q et al: Comparative analysis of intraperitoneal minimal free cancer cells between colorectal and gastric cancer patients using quantitative RT-PCR: possible reason for rare peritoneal recurrence in colorectal cancer. Clin Exp Metastasis **24**: 179-189, 2007
- 13) Homma Y, Hamano T, Akazawa Y et al: Positive peritoneal washing cytology is a potential risk factor for the recurrence of curatively resected colorectal cancer. Surgery today published on line 14: DOI: 10.1007/s00595-013-0689-z11, 2013
- 14) Hayama T, Iinuma H, Watanabe T et al: Rapid genetic diagnosis system for peritoneal recurrence and survival in colorectal cancer patients. Oncol Red **18**: 779-784, 2007
- 15) 西 満正, 大山 満, 中島聰總ほか: 癌性腹膜炎(播種)の発生病理. 外科 **35**: 385-390, 1973
- 16) 辻 恭嗣, 国枝克行, 須原貴志ほか: 胃癌の腹膜播種性転移に及ぼす転移陽性リンパ節の影響, 腹腔洗浄細胞診による検討. 日消外会誌 **30**: 2140-2145, 1997
- 17) 藤井正一, 池 秀之, 大田貢由ほか: 大腸癌の術中腹腔洗浄細胞診の有用性. 横浜医 **59**: 33-39, 2008
- 18) 室野浩司, 須並英二, 渡邊聡明: 大腸癌における腹腔洗浄細胞診の意義. 臨外 **68**: 1032-1035, 2013