

胃癌における腹腔洗浄細胞診の精度向上の取り組み

Molecular Detection Approach to Improve the Accuracy of Peritoneal Washing Cytology for Gastric Cancer

會澤雅樹 藪崎裕 松木淳
番場竹生 中川悟

Masaki AIZAWA, Hiroshi YABUSAKI, Atsushi MATSUKI,
Takeo BAMBA and Satoru NAKAGAWA

要旨

局所進行胃癌に対する根治切除後の再発形式は腹膜播種が最も多い。病変から腹腔内に癌細胞が拡散して腹膜播種が形成されるため、腹腔洗浄細胞診陽性は各種の進行度分類において遠隔転移と定義される。細胞診はPapanicolaou染色下の形態診断で診断するが、日常診療では細胞診陰性であっても術後の腹膜播種再発を多く認めるのが現状である。細胞診の検出率の向上を目指し免疫染色やRT-PCRを併用する当院の取り組みを概説する。

はじめに

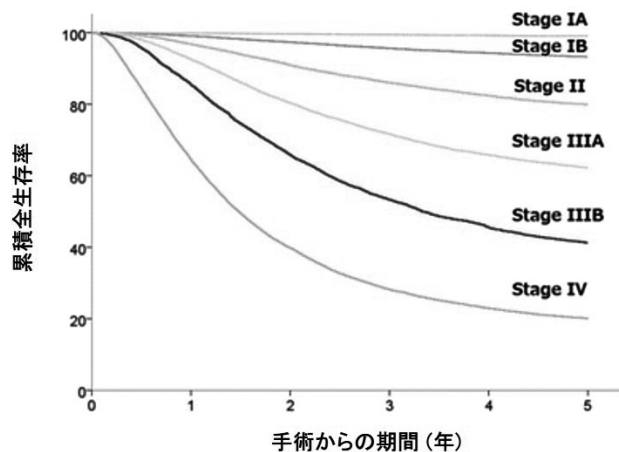
2001～2007年の全国胃癌登録症例の予後調査結果¹⁾におけるStage（胃癌取り扱い規約第13版）別の術後5年疾患特異的生存率（5Y-DSS）を図1に示す。系統的所属リンパ節郭清の定型化、術後補助化学療法の確立によりにより治療成績が向上し、Stage IA, IB, II胃癌の5Y-DSS中央値はそれぞれ99.0%, 93.2%, 79.9%である。一方、Stage IIIA, IIIB, IVの5Y-DSS中央値はそれぞれ62.2%, 41.2%, 20.1%で未だ改善が必要であり、術後再発症例数の集計結果（表1）では、pT3, pT4における腹膜播種再発が全再発の半数を占めている。胃癌治療ガイドライン第5版ではpStage II, III胃癌に対し根治手術後の補助化学療法として1年間のS1内服を行うことが推奨されていたが²⁾、近年にpStage IIIに対する術後S1+Docetaxel（DS）療法のS1単独療法に対する優位性がランダム化第III相試験によって示された³⁾。本試験における再発頻度の群間比較では、血行性転移とリンパ節転移の頻度はDS群で優位に低下していたが、腹膜播種は両群で最も多い再発形式であり、DS群の頻度は低下していたものの有意差は得られなかった。局所進行胃癌に対する

治療成績向上には、根治切除後の腹膜播種再発の防止が重要である。

I 腹腔洗浄細胞診について

胃癌術後の腹膜播種再発は、主病変から腹腔内に散布された遊離癌細胞の着床、増殖により発生すると考えられている。腹腔洗浄細胞診陽性（CY1）例の予後は不良で、主要なTNM分類（胃癌取り扱い規約, UICC, AJCC）においてCY1はM1と定義される。腹腔洗浄細胞診について、胃癌取り扱い規約には「cT1を除く癌手術の開腹直後に、腹水がある場合は腹水を、ない場合は生理食塩水を腹腔内に注入し、Douglas窩より洗浄液を採取して病理検査室に提出する。癌細胞を認める場合はCY1、疑陽性（suspicious）はCY0とする。原発巣切除として胃切除が行われた場合、CY1であれば遺残度はR1とする。」と明記されている。CY1はPapanicolaou染色によるClass分類のClass Vに相当し、Class V以外はCY0となる（図2）。近年は腹膜播種の存在診断を目的に行う審査腹腔鏡が普及しており、腹腔洗浄細胞診が同時に行われることが一般的である。迅速診断の所用時間は40分程度である。

しかしながら前述の通りCY0に相当するStage III



Stage (JGCA)	Number of patients	5-year OS rate (%)	5-year DSS rate (%)
IA	52,069	91.5	99.0
IB	17,454	83.6	93.2
II	13,805	70.6	79.9
IIIA	11,222	53.6	62.2
IIIB	5,910	34.8	41.2
IV	14,694	16.4	20.1

図1 全国胃癌登録症例予後調査 (2001~2007年) におけるStage 別の5年疾患特異的生存率 JGCA : 胃癌取り扱い規約第13版, OS : 全生存, DSS疾患特異的生存

表1 全国胃癌登録症例予後調査 (2001~2007年) における壁深達度 (pT), 再発形式別の再発症例数

再発形式	pT 1	pT 2	pT 3	pT 4	合計
腹膜播種	152	1,507	5,230	857	7,769
血行性転移	406	1,929	1,838	340	4,526
リンパ節転移	177	766	1,032	223	2,218
局所再発	126	520	627	101	1,378
再発部不明	119	475	846	199	1,641
合計	980	5,197	9,573	1,720	17,532

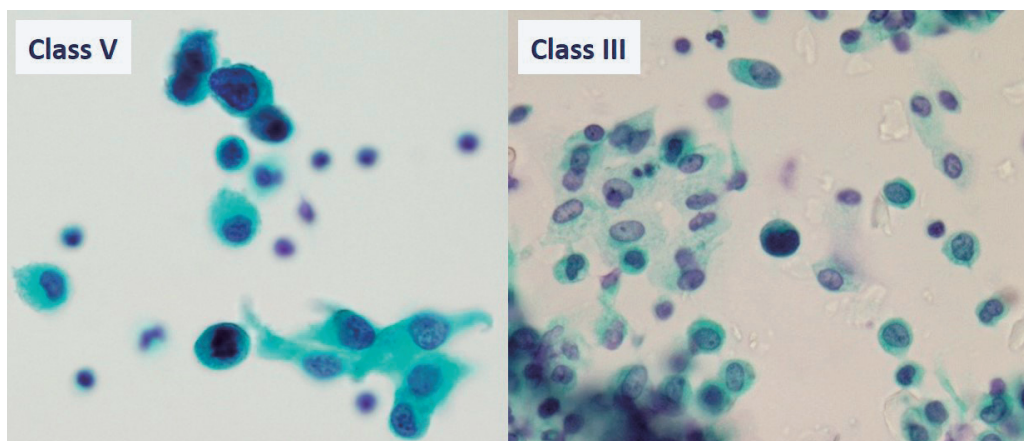


図2 Papanicolaou染色を用いた細胞診 左 : Class V (CY1), 右 : Class III (CY0)

胃癌のR0切除後再発の中で腹膜播種は最も多く、細胞診において遊離癌細胞を検知できていないことが課題である。当科ではDouglas窩と胃の近傍である左横隔膜下の2ヵ所で洗浄細胞診を行い、いずれかが陽性の場合にはCY1としている。

II 免疫染色について

抗体を用いて標本中の抗原を検出する組織化学的手法で、通常は二次抗体を用いた間接法が行われる。特異的的一次抗体を利用して抗原を検出し、一次抗体と同一宿主の標識二次抗体を結合させ、抗原の局在を顕微鏡下で観察することが可能である。臨床では組織検体の蛋白発現量の評価に用いることが多いが、細胞診においても施行可能である。ただし、一次、二次抗体それぞれに反応時間が必要であり、検査に時間を要する。

胃癌の腹腔洗浄細胞診においては腫瘍細胞と非腫

瘍細胞（腹膜中皮細胞や血球）との鑑別に有用である。Papanicolaou染色における疑陽性の細胞が腫瘍細胞に特有の抗原を発現する場合は、腫瘍細胞であることが特定し得る。腫瘍細胞マーカーとしてはCEAや上皮細胞構成蛋白が用いられる。胃癌細胞のCEA発現頻度は比較的 low、検出率を向上させるために抗CEA抗体と抗上皮細胞蛋白抗体の2種類を併用することが多い。

当院ではCEA抗体、上皮細胞抗原の一つであるMoc-31抗体を用いた免疫染色（図3）を行っている。当院を含む国内のいくつかの癌専門施設では既にCY判定に免疫染色を併用する総合診断を日常臨床業務で運用しており、当院の診断フローチャートを図4に示す。迅速診断によるCY判定を行い、後日の免疫染色結果より、CY0症例のうちCEAまたはMoc-31の陽性細胞が形態上異型細胞と断定し得る場合は細胞診陽性としている。

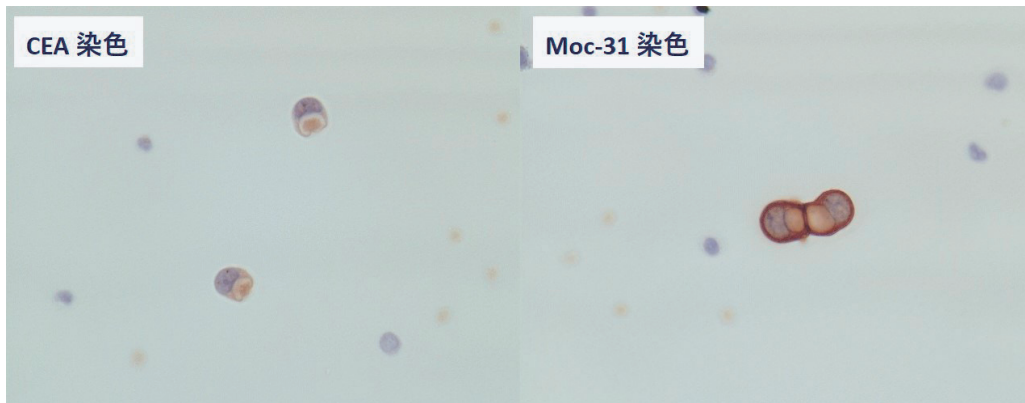


図3 免疫染色陽性の腫瘍細胞 左：CEA染色，右：Moc-31染色

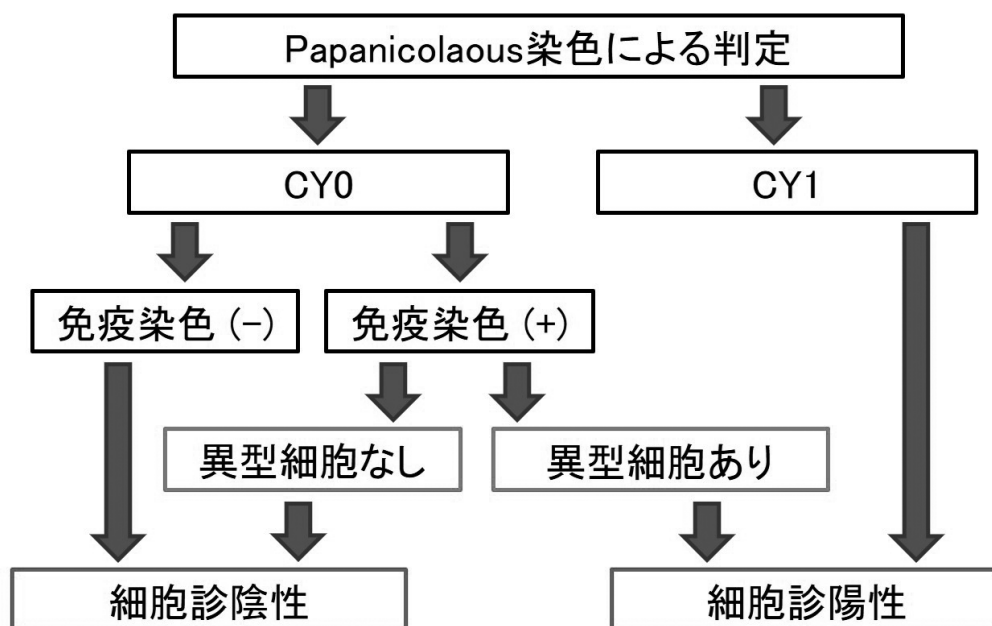


図4 Papanicolaou染色によるCY判定に免疫染色を併用する総合診断

Ⅲ Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) 法について

RNAサンプルを鋳型として逆転写酵素 (reverse transcription) を用いて相補的DNAを合成し、プライマーを用いて特定の塩基配列のDNAを人工的に増幅して検出する方法である。標的蛋白をコードする腫瘍細胞内のmRNAを数コピーの量から検出可能である。比較的短時間での診断が可能で、用途は異なるが現在流行中のCOVID-19ウイルスの検出に用いられ診断の第一線を担っている。

当院ではCEA mRNAの塩基配列を認識する複数のプライマーを用いたSemi-nested PCRを行って腹腔洗浄細胞診のサンプル中のCEA発現細胞を検出し、腫瘍細胞の存在診断の参照としている。

Ⅳ CY判定に免疫染色, RT-PCR法を併用する有効性について

当院症例における後方視的検討の結果を以下に示す。対象は2010~2013年の腹腔洗浄細胞診を施行した手術症例とし、術前化学療法施行例は除外した。背景と腫瘍関連因子、手術所見について表2に示す。当科では腹腔洗浄細胞診の適応をcT3 (SS) 以

深としており、腫瘍肉眼型Type 3/4, pT4がそれぞれ半数を占めている。CY判定, 免疫染色併用, RT-PCR法併用における細胞診の陽性率はそれぞれ, 19.5%, 25.3%, 32.8%であった (表3)。R0またはR1切除となった222例の生存曲線を図5に示す。CY0 (N=210), CY1 (N=12) 症例の3年全生存率 (3Y-OS) はそれぞれ78.0%, 30.7%で有意差 ($p<0.001$) を認めた。CY0かつ免疫染色陽性例 (N=12) の3Y-OSは60.6%で、免疫染色陰性例と比較して有意に ($p=0.016$) 予後不良であった。CY0かつRT-PCR陽性 (N=27) 例の3Y-OSは48.8%でRT-PCR陰性例と比較し有意に ($p<0.001$) 予後不良であった。CY0症例 (N=210) の予後因子について多変量解析を行ったところ、免疫染色陽性は独立した予後規定因子ではなかった (表4) が、RT-PCR陽性は独立した予後規定因子であった (表5)。

各群の再発を集計したところ (表6), CY1の再発症例は8例でそのうち7例が腹膜播種であった。CY0かつ免疫染色陽性例の再発, 腹膜播種再発はそれぞれ4例, 3例で、CY0かつRT-PCR陽性例の再発, 腹膜播種再発はそれぞれ10例, 6例であった。免疫染色, RT-PCR法の併用によってCY0症例の中から腹膜播種再発高リスク症例が選別し得ることが示唆された。RT-PCR法は免疫染色よりも感度が高

表2 当院症例の検討における患者背景と腫瘍関連因子

背景・腫瘍関連因子		症例数
性別	男性/女性	210/83
年齢 (歳)	中央値 (範囲)	69 (27-91)
肉眼的腫瘍型	Type 0 / 1, 2 / 3, 4	34/99/160
組織型	分化型/未分化型	163/130
pT	1 / 2 / 3 / 4	45/50/44/154
pN	0 / 1 / 2 / 3 / x	99/56/49/82/7
M	0 / 1	243/50
肝転移 H	0 / 1	282/11
腹膜播種 P	0 / 1	260/33
手術術式	幽門側胃切除/胃全摘/非切除	163/113/17
腫瘍の遺残 R	0 / 1 / 2	210/12/71

表3 CY判定, CY+免疫染色, CY+PCRにおける細胞診陽性率

細胞診判定	Papanicolaou染色 (CY)	Papanicolaou染色 + 免疫染色	Papanicolaou染色 + 定性PCR
陰性	236	219	197
陽性 (CYに対しての増減)	57 (0)	74 (+17)	96 (+39)
陽性率 (CYに対しての増減)	19.5 (0)	25.3 (+5.8)	32.8 (+13.3)

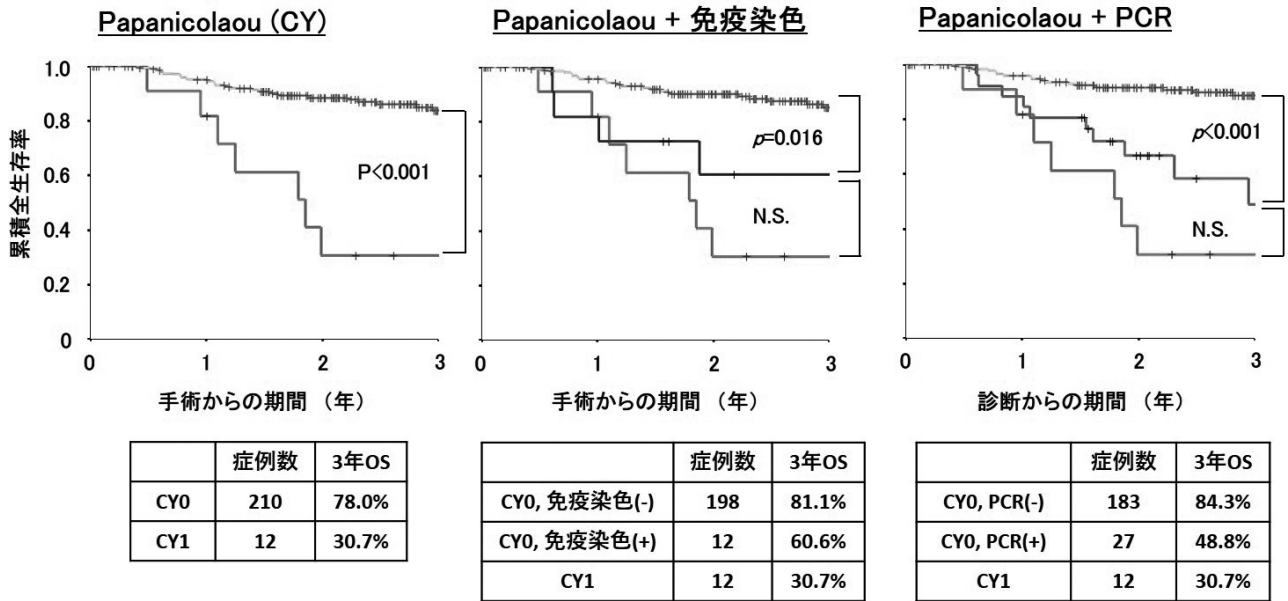


図5 CY判定, CY+免疫染色, CY+PCRにおける細胞診判定と全生存曲線 OS: 全生存

表4 CY0症例(210例)における多変量生存解析, 腹腔洗浄細胞診の免疫染色を共変量に含む

共変量	症例数	HR	(95% CI)	有意差
pT4	82	2.942	(1.028 - 8.422)	$p=0.04$
pN2-3	65	2.583	(1.089 - 6.129)	$p=0.03$
肉眼型 Type 4	10	2.377	(0.850 - 6.644)	$p=0.09$
腹腔洗浄細胞診 免疫染色 (+)	12	2.637	(0.956 - 7.275)	$p=0.06$

表5 CY0症例(210例)における多変量生存解析, 腹腔洗浄細胞診のPCRを共変量に含む

共変量	症例数	HR	(95% CI)	有意差
pT4	82	2.761	(0.971 - 7.853)	$p=0.05$
pN2-3	65	2.605	(1.105 - 6.139)	$p=0.03$
肉眼型 Type 4	10	1.914	(0.699 - 5.246)	$p=0.21$
腹腔洗浄細胞診 PCR (+)	27	3.130	(1.436 - 6.823)	$p=0.004$

表6 CY判定, CY+免疫染色, CY+PCRにおける細胞診と再発 3 Y-RFS: 3年無再発生存率

細胞診判定	症例数	3 Y-RFS	再発数	腹膜播種再発数 (%)
CY0	210	81.7%	31	12 (5.7)
CY0, 免疫染色 (-)	198	83.4%	27	9 (4.5)
CY0, 免疫染色 (+)	12	53.0%	4	3 (25.0)
CY0, PCR (-)	183	85.7%	21	6 (3.3)
CY0, PCR (+)	27	50.0%	10	6 (22.2)
CY1	12	18.2%	8	7 (58.3)

く、より多くの再発症例を抽出できているが、腹膜以外の再発症例が少なからず含まれており、必ずしも腹腔内遊離癌細胞を検出した結果ではなかった可能性が示唆された。

V 臨床運用の現状について

免疫染色、RT-PCR併用の特性について図6に示す。免疫染色では特異性が担保し得るが、感度が低く、診断に数日を要するため迅速診断には不適である⁴⁾。RT-PCR法は感度が高く迅速診断が可能だが、分子発現の細胞特異性が評価できず偽陽性が問題となる⁵⁾。近年に定量RT-PCRを併用する手法が報告された⁶⁾が、判定のCut off値が確立されていない。当院では、Papanicolaou染色によるCY判定と免疫染色を併用する総合診断(図4)を通常診断として運用し、定性RT-PCRと定量RT-PCR(2013年以降)の結果を報告書に記載し参考情報としている。

	長 所	短 所
免疫染色	<ul style="list-style-type: none"> ● 分子発現の局在を評価可能 	<ul style="list-style-type: none"> ● 診断まで2日間程度要する ● 染色不良症例が存在する ● CEA染色の感度が低い
RT-PCR	<ul style="list-style-type: none"> ● 感度が高い ● 診断時間短縮が可能 (迅速診断で併用が可能) 	<ul style="list-style-type: none"> ● 偽陽性 ● 発現部位を評価できない

図6 免疫染色とPCRを併用した場合の長所と短所

VI 展望と課題

今後は当院の定量RT-PCRの施行症例の蓄積を待って、腹膜播種再発予測に最適なCut off値を評価する予定である。定量によりRT-PCR法の特異性を改良できれば、より感度が高く迅速な補助診断となり得る。

現在のガイドライン治療においては術後腹膜播種

再発高リスク症例に対する治療オプションがないため、一律に全身化学療法レジメンを用いた補助化学療法を行わざるを得ない。胃癌の腹膜進展に特化した治療法として腹腔内注入を併用する化学療法レジメンが期待されるが、先進医療制度下でのランダム化第III相試験⁷⁾では全身化学療法に対する優位性が証明されず、抗腫瘍薬の腹腔内注入は未だ保険未収載となっている。

診断精度の向上とともに高リスク症例に対する治療の開発が今後の課題である。

参考文献

- 1) Katai H, Ishikawa T, Akazawa K, et al: Five-year survival analysis of surgically resected gastric cancer cases in Japan: a retrospective analysis of more than 100,000 patients from the nationwide registry of the Japanese Gastric Cancer Association (2001-2007). *Gastric Cancer*. 21 (1): 144-154. 2018.
- 2) 日本胃癌学会: 胃癌治療ガイドライン2018年1月改訂第5版. P32 E補助化学療法. 金原出版. 2018.
- 3) Yoshida K, Kodera Y, Kochi M, et al: Addition of docetaxel to oral fluoropyrimidine improves efficacy in patients with Stage III gastric cancer: Interim analysis of JACCRO GC-07, a randomized controlled trial. *J Clin Oncol*. 37 (15): 1296-1304. 2019.
- 4) Benevolo M, Mottolise M, Cosimelli M, et al: Diagnostic and prognostic value of peritoneal immunocytology in gastric cancer. *J Clin Oncol*. 16 (10): 3406-3411. 1998.
- 5) Virgilio E, Giamieri E, Rosaria M, et al: Gastric cancer cell in peritoneal lavage fluid: a systematic review comparing cytological with molecular detection for diagnosis of peritoneal metastases and prediction of peritoneal recurrences. *Anticancer Res*. 38 (3): 1255-1262. 2018.
- 6) Nakanishi K, Kanda M, Umeda S, et al: The level of SYT13 and CEA mRNAs in peritoneal lavages predict the peritoneal recurrence of gastric cancer. *Gastric Cancer*. 22 (6): 1143-1152. 2019.
- 7) Ishigami H, Fujiwara Y, Fukushima R, et al: Phase III trial comparing intraperitoneal and intravenous paclitaxel plus S-1 versus cisplatin plus S-1 in patients with gastric cancer with peritoneal metastasis: PHOENIX-GC trial. *J Clin Oncol*. 36 (19): 1922-1929. 2018.