

16-6 がん診療を標準化するための病理診断基準の確立に関する研究

主任研究者 札幌医科大学医学部 長 谷 川 匡

研究成果の要旨

GIST の病理診断を下す際に免疫染色パネルを用いること、子宮頸部の良悪性判定の難しい腺型病変では病理医間で統一した基準で診断することで高い診断一致率が得られることが判明した。一方、診断が難解な唾液腺腫瘍のコンサルテーション症例では病理医間の診断一致率は低かった。組織標本を利用した軟部腫瘍の FISH 解析の結果、小円形細胞腫瘍群では EWS 遺伝子変異の検出率は 90%と高感度であった。その他の腫瘍には EWS の異常はなく、FISH 解析の特異度は 100%であった。乳癌のセンチネルリンパ節の推奨される 2mm 間隔のリンパ節切り出しにて、通常の検索法(非割、二分割)で見落とされる転移の 55%~73%を検出することが可能と推定された。濾胞性リンパ腫においては、正確な遺伝子型、表現型、grade を知ることが、正確な診断や治療法の開発に必要であると考えられた。細胞増殖関連抗原 Ki-67 標識率の実数値による観察者間変動は非常に大きいものの、5%未満、5%から 10%、10%以上と実用的な区分で見た場合の一致率は高いことから、診断に関する Ki-67 標識率の信頼性はあるものと思われた。これまでに実施された多施設共同研究における病理除外割合および標本回収割合を調査し、病理組織診断基準や分類スキームが未成熟な腫瘍では著しく病理除外割合が高いこと、同一組織型を対象としていても研究単位で病理除外割合と標本回収割合が異なることを示した。

研究者名および所属施設

研究者名	所属施設および職名	分担研究課題
長 谷 川 匡	* ¹ 国立がんセンター研究所 室長 札幌医科大学医学部 教授	悪性腫瘍の病理診断基準の確立
津 田 均	防衛医科大学校 助教授	乳がん、婦人科腫瘍の病理診断基準の確立と遺伝子解析の標準化
大 島 孝 一	* ¹ 福岡大学医学部 助教授 久留米大学医学部 教授	悪性リンパ腫の病理診断基準の確立と遺伝子解析の標準化
佐 野 壽 昭	徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部 教授	内分泌腫瘍の診断基準の確立と免疫染色の標準化
松 野 吉 宏	国立がんセンター中央病院 医長	臨床試験における病理診断のあり方に関する研究
森 永 正 二 郎	北里研究所病院 部長	診断標準化のための基盤整備に関する研究

* 1 : 平成16年4月1日～平成17年3月31日

総合研究報告

- 1 研究目的
がんの治療選択に関わる病理診断精度を全国規模で標準化するために、各施設で診断に従事する病理医の診断基準を統一化する必要がある。また、免疫染色や遺伝子

解析が積極的にがん診療に導入されている領域もあるが、その検査法や評価法の標準化は達成されていない。さらに、頻度が低い腫瘍の場合は病理診断を拠点化し、専門病理医による診断を迅速に供給できる体制が望まれる。本研究班では、1) 軟部腫瘍、乳癌、婦人科腫瘍、悪性リンパ腫、内分泌腫瘍など各種臓器がんの専門病理医による病理診断基準の確立と一般病理医への教育普及、2) 免疫染色や遺伝子解析など治療関連形質解析の標準化、3) 診断支援体制の整備を目的として研究を行う。その際、関連する臨床研究グループと連携して研究を進める。

2 研究方法

1) GIST の病理診断基準の確立

GIST とその他の紡錘形細胞腫瘍を鑑別できる病理診断基準を確立するために、GIST とその他の紡錘形細胞腫瘍 80 例の HE 標本と KIT、CD34、desmin、SMA、S-100、Ki-67/MIB-1 免疫染色標本のみを異なる施設の専門病理医 7 名が個別に鏡検し、オリジナル診断との一致率を検討した。さらに、KIT が陰性もしくは弱陽性の GIST 30 例の臨床病理学的特徴を検討し、ホルマリン固定・パラフィン切片から DNA を抽出し、c-kit 遺伝子 exon 9、11、13、17 および PDGFR α 遺伝子 exon 12、18 を同定するプライマーを用意し、PCR 反応産物からダイレクトシークエンス法によって遺伝子変異を検索した。

2) 小円形細胞腫瘍の FISH 法による遺伝子解析

病理形態学的な鑑別が難しい EWS 変異（転座）が共通するユーイング肉腫およびその他の小円形細胞腫瘍の病理診断のために、EWSR1 プローブを用いて 16 例のユーイング肉腫、6 例の線維形成性小円形細胞腫瘍、6 例の淡明細胞肉腫および各 3 例ずつの胞巣型横紋筋肉腫、低分化滑膜肉腫、神経芽腫のホルマリン固定パラフィン組織切片で間期核を対象とした FISH 解析を行った。

3) 乳癌のセンチネルリンパ節 (SN) 生検の術中病理診断法標準化に向けた研究

RI 法にて SN 生検が行われた T1~T2 (3cm 以下) N0 乳癌 121 例を対象に、ルーチン病理診断にて転移陰性とされたセンチネルリンパ節 (SN) 及び非 SN 腋窩リンパ節の組織ブロックの全割連続切片検索を行い、潜伏転移率（真の転移率）を算出した。また、より細かなリンパ節切り出し法で真の転移の何%を検出可能かにつきシミュレーションを行った。44 例に SN 生検のみ、77 例に SN 生検と非 SN 郭清が行われた。SN は原則非割ないし二分劃にて、非 SN は原則非割にて検索され、109 例で SN 転移陰性、74 例で非 SN 転移陰性とルーチン診断された。これらの

リンパ節の組織ブロックから組織がなくなる迄 100 μ m 毎連続切片を作製し、HE 染色とサイトケラチン (AE1/AE3) による免疫染色を施行した。

4) 婦人科腫瘍の病理診断基準の確立

予後不良でかつ病理診断が困難な子宮頸部悪性腺腫 (MDA) と、臨床的に良性の経過をとる分葉状頸管腺過形成 (LEGH) との正確な鑑別診断基準確立を目標に、主に明らかな腺癌成分の有無と浸潤の有無の 2 点から診断基準を定めた上で、7 名の専門医が独自に鏡検し、診断一致率を検討した。

5) 濾胞性リンパ腫における BCL2-IGH 融合シグナル及び BCL6 遺伝子変異の出現率と bcl-2、bcl-6、CD10 の発現の検討

147 例の濾胞性リンパ腫症例を用いて遺伝子型、表現型、grade との関連を検索するために bcl-2、bcl-6、CD10 の免疫染色を行い、119 例については bcl-2 および bcl-6 の FISH 解析を行った。

6) 細胞増殖関連抗原 Ki-67 免疫染色の標準化

Ki-67 標識率は腫瘍の診断、良性・悪性の鑑別、悪性度や予後の推定などの目的で現在広く用いられている。この Ki-67 抗原標識率の手技ならびに評価方法の標準化の一環として、染色手技の現状把握のために全国 33 病理施設にアンケート調査を実施し回答を得た。Ki-67 標識率の観察者変動の現状を把握し、それを最小限に止めるための算出法の標準化を確立すべく検討した。診断あるいは組織亜型分類に必要なあるいは参考になると言われている腫瘍性病変 20 例の HE 染色標本と Ki-67 抗原染色標本対象に、12 名の病理専門医の協力を得て、Ki-67 標識率の観察者間・観察者内変動の方法を検討した。

7) 臨床試験における病理診断のあり方に関する研究

診断拠点化推進に重点をおくべき腫瘍種類を明らかにするための基礎データとして、多施設共同研究における症例登録適格基準に関する施設病理診断と中央病理診断の乖離の指標である病理除外割合 pathology exclusion rate (PER)、および中央診断のための標本回収に関わる問題点を検討する資料として標本回収割合 specimen availability rate (SAR) の現状調査を行った。日本国内で行われたいくつかの多施設共同研究の結果から、SAR および PER を算出した。

8) 診断標準化のための基盤整備に関する研究

標準化された適切な診断を迅速に提供する病理診断コンサルテーションシステムを構築するため、唾液腺腫瘍をモデルとして基礎的な検討を行った。過去のコンサルテーション症例 100 例につき、唾液腺腫瘍専門病理医 4

名によって顕微鏡デジタル写真のみによる診断(以下、写真診断)とその後のプレパラート鏡検による診断(以下、鏡検診断)を比較した。

3 研究成果

1) GIST の病理診断基準の確立

オリジナル診断に対する GIST とその他の紡錘形細胞腫瘍の病理診断の再現性は κ 検定で 0.97 と高かった。ポリクローナル抗体を用いた KIT 免疫染色の判定では、観察者間 ($\kappa=0.86$) だけでなく異なった施設間 ($\kappa=0.85$) でも再現性が高かった。MIB-1 標識率の再現性は高かったが ($\kappa=0.77$)、観察者の経験の差や GIST における Ki-67 抗原の不均等分布が判定不一致の原因と考えられた。さらに、KIT が陰性/弱陽性の GIST とみなしうる症例で myxoid epithelioid type には PDGFR α 遺伝子変異が 90% と高率で、その半数にグリベック感受性のある遺伝子変異が含まれていた。

2) 小円形細胞腫瘍の FISH 法による遺伝子解析

FISH 解析の結果、小円形細胞腫瘍群では EWS 遺伝子変異の検出率は 90% と高感度であった。その他の腫瘍には EWS の異常はなく、FISH 解析の特異度は 100% であった。この FISH 解析の利点として EWS 遺伝子変異を共通するユーイング肉腫、線維形成性小円形細胞腫瘍および淡明細胞肉腫の診断上価値が高いことが判明した。

3) 乳癌のセンチネルリンパ節 (SN) 生検の術中病理診断法標準化に向けた研究

SN を 1 mm, 2 mm, 3 mm 間隔で切り出して病理検索に供したと仮定すると、ITC を除いた潜伏転移例のうち 11.6 例 (68%)、9.3 例 (55%)、8.4 例 (49%) が検出されると見積もられた。しばしば推奨される 2mm 間隔のリンパ節切り出しにて、通常の検索法 (非割、二分割) で見落とされる転移 (ITC を除く) の 55%~73% を検出することが可能と推定された。

4) 婦人科腫瘍の病理診断基準の確立

LEGH、上皮内腺癌を伴った LEGH、MDA、分化型粘液腺癌の 4 カテゴリーの観察者間診断一致レベルはかなりの一致 ($\kappa=0.62$) で、浸潤のない予後良好な病変群 (LEGH と上皮内腺癌を伴った LEGH) と浸潤があり予後不良な病変群 (MDA と分化型粘液腺癌) の 2 カテゴリーに分けると、観察者間診断一致レベルはほとんど完全な一致 ($\kappa=0.93$) となった。

5) 濾胞性リンパ腫における BCL2-IGH 融合シグナル及び BCL6 遺伝子変異の出現率と bcl-2、bcl-6、CD10 の発現の検討

濾胞性リンパ腫を bcl-2 転座陽性例および陰性例に分けたところ、bcl-2 転座陽性例は CD10 陽性、bcl-2 陽性、low-grade といった典型的性質を示すことが多いことが分かった。bcl-2 転座陰性例には、bcl-2 増幅、bcl-6 転座といった異常が含まれていた。また bcl-2 転座陰性例は CD10、bcl-2 が陰性のことが多く、high-grade な傾向があることが分かった。

6) 細胞増殖関連抗原 Ki-67 免疫染色の標準化

アンケート調査の結果、反応時間、賦活化の熱処理方法、薄切後染色までの切り置き期間等に施設間で格差のある実態が明らかにされた。12 名の病理医が日常的に行っていた Ki-67 標識率を算出する方法として最も多かったのは、中等度以上の染色性を陽性と判断し、陽性細胞の多い場所にて 100 から 500 個の腫瘍細胞を 40 倍の対物レンズを用いて観察する方法であった。Ki-67 標識率の実数値による観察者間変動は非常に大きかったが、Ki-67 標識率を 5%未滿、5%から 10%、10%以上に区分して Ki-67 標識率の一致性みると、1 回目と 2 回目の一致率は平均 78.33%、 κ 値は 0.664 で一致性が認められた。

7) 臨床試験における病理診断のあり方に関する研究

悪性リンパ腫研究では研究ごとにばらつきがみられ、PER が 10%を上回るものもあった。独立疾患単位としての診断基準が浸透不十分な肺大細胞神経内分泌癌 (LCNEC) および近似腫瘍群において PER が著しく高かった。治験では調査した 3 件中 2 件で SAR が 100% と良好であるのに対し、公的研究費による共同研究では 70%台から高くても 92.9% と不良であった。

8) 診断標準化のための基盤整備に関する研究

全員の診断が一致したのは写真診断で 51%、鏡検診断では 42% ときわめて低いことが明らかとなり、今後再現性の高い診断基準の作成が必要と考えられた。

4 倫理面への配慮

本研究は後ろ向き研究であり、診療目的で得られた標本のみを用いるものであり患者に新たに検体を採取するなど損傷・傷害が及ばない。診断、評価、解析、発表に際しての患者個人情報には完全にマスクされている。さらに各施設の倫理審査委員会で審査を受けている。