

## 早期乳癌における One-step Nucleic Acid Amplification(OSNA)法 によるセンチネルリンパ節転移診断の検討

溝尾 妙子\*, 枝園 忠彦, 伊藤麻衣子, 野上 智弘,  
岩本 高行, 元木 崇之, 平 成人, 松岡 順治,  
土井原博義

岡山大学病院 乳腺・内分泌外科

### Evaluation of a one-step nucleic acid amplification (OSNA) assay for sentinel lymph node metastases in early breast cancer

Taeko Mizoo\*, Tadahiko Shien, Maiko Ito, Tomohiro Nogami,  
Takayuki Iwamoto, Takayuki Motoki, Naruto Taira, Junji Matsuoka,  
Hiroyoshi Doihara

Department of Breast and Endocrinological Surgery, Okayama University Hospital, Okayama 700-8558, Japan

**Introduction:** The one-step nucleic acid amplification (OSNA) assay is a new method to detect sentinel lymph node (SLN) metastases using cytokeratin 19 (CK19) mRNA in early breast cancer. Here we retrospectively analyzed the advantages and disadvantages of the OSNA assay.

**Methods:** In a trial period, SLNs were divided into two sections, and we examined one side using the OSNA assay. The other side was examined by pathologists. After this period, we examined whole SLNs using only the OSNA assay. The patients with positive nodes by OSNA assay and/or pathology required axillary dissection.

**Results:** We examined 27 primary breast cancer patients (36 SLNs) during the trial period. The overall concordance rate between the OSNA assay and pathology results was 91%. In the later period, 157 patients (217 SLNs) were examined. The CK19-positive rate obtained by the OSNA assay was 16.5% (macrometastases OSNA (++) : 7.2%, micrometastases OSNA (+) : 9.2%). The non-SLN positive rate among the CK19-positive cases was 23%. The OSNA assay's false negative was one case in which the expression of CK-19 on the primary tumor and lymph node was not detected.

**Conclusions:** Our OSNA assay results were comparable to those obtained using a conventional pathological technique. Pathologists and laboratory technicians could save time and effort by using the OSNA assay when seeking the precise diagnosis during surgery.

キーワード：OSNA 法 (OSNA method), センチネルリンパ節 (sentinel lymph node), micrometastases, CK-19

### 緒 言

センチネルリンパ節生検 (sentinel lymph node biopsy : SNB) は、早期乳癌に対する腋窩リンパ節転移診断として現在では一般的な手技であり<sup>1)</sup>, ヘマトキシリン&エオジン (hematoxylin and eosin : HE) 染色で病理診断している施設がほとんどであるが, 9~45%には偽陰性がみられると報告されている<sup>2)</sup>。また, 迅速凍結病理診断を行う病理医には術中に早急な診断が求められ, さらに診断結果が直

接患者の術式決定に影響するため心理的負担も大きい。

One-step nucleic acid amplification (OSNA 法: シスメックス社) は, 転移リンパ節に発現量が高い cytokeratin 19 (CK19) を標的遺伝子とし, 可溶化から遺伝子増幅まで一行程で行い, 転移の有無を診断できる方法である。これまでにその妥当性についての検証が報告されており<sup>3)</sup>, 本邦でも2008年には保険適応となった。しかし, SLN すべてを OSNA 法で検査するか, 半割して OSNA 法と迅速病理検査で検査するかなど, 詳細な方法については明確になっておらず, まだ検討すべき点も残されている。

われわれは, これまでの病理診断からリンパ節 1 個全てを検索できる OSNA 法へ変更することによって, 病理診断における転移部位偏在や micrometastases による偽陰性を

平成25年7月11日受理

\*〒700-8558 岡山市北区鹿田町 2-5-1

電話: 086-235-7265 FAX: 086-235-7269

E-mail: taekomizoo@yahoo.co.jp

減少させることができる可能性があり、また、臨床検査技師や病理医の労力を軽減できることを期待して導入した。われわれは、OSNA法の精度と利便性を検証するために3ヵ月間の試験運用を経て2011年に導入し、試験運用および導入後の結果と現行法の結果を比較検討し、さらに検査技師や病理医にかかる労力や費やす時間の変化について報告する。

## 方 法

### 1. 対 象

cStage 0-II, cN0の乳癌患者（UICC TNM分類 第7版より）で、2009年11月～2010年2月まで試験運用期間の27例、2011年4月～2012年7月まで導入後の157症例を対象とした。

### 2. SNBの方法

SLNの同定は、インジゴカルミンによる色素法および<sup>99m</sup>Tc フチン酸によるRI法のtwo mappingで施行した。腫瘍径が大きくSLN転移が否定できない症例や、視触診でSLN転移が否定できない症例に対しては、青染や集積は認めないが腫大した周囲のリンパ節をサンプリングとして摘出し、永久病理検査を行った。

### 3. OSNA法

摘出したSLNは可溶化試薬（リノアーク：シスメックス社製）で可溶化、室温で遠心分離（10,000 g）され、その上清2  $\mu$ lを専用の遺伝子増幅検出装置（RD-100i：シスメックス社製）に入れ、reverse-transcription loop-mediated isothermal amplification（RT-LAMP）法で標的遺伝子のmRNAを増幅させる。標的遺伝子は転移リンパ節に発現量

が高いCK19を用い、カットオフ値はCK19コピー数により $2.5 \times 10^2$ copies/ $\mu$ l以下をOSNA（-）、 $2.5 \sim 5.0 \times 10^2$ copies/ $\mu$ lをOSNA（+）、 $5.0 \times 10^2$ copies/ $\mu$ l以上をOSNA（++）とした。UICC TNM分類 第7版に準拠し、OSNA（+）をmicrometastases、OSNA（++）をmacrometastasesとした。

### 4. SLN 転移診断

試験運用期間では、摘出したSLNを半割し、一方をOSNA法、他方を従来の術中迅速凍結病理（HE染色）で検査した（図1）。迅速病理検査またはOSNA法で転移陽性をリンパ節転移と判断し、腋窩郭清を追加した（Level I or II）。導入後は、摘出したSLNすべてをOSNA法で検査した。摘出された非センチネルリンパ節（non sentinel lymph node：non-SLN）は永久病理標本にし、最大断面1切片を用いてHE染色で転移の有無を検索した。OSNA陰性かつサンプリングリンパ節で転移陽性となった症例（偽陰性）については原発巣と転移リンパ節のCK19発現を免疫染色にて検討した。

### 5. OSNA法の結果報告方法

当院では結果報告によるミスを防ぐために、外科主治医が直接SLNの結果を確認している。OSNA法検査がすべて終了すると、検査担当者はOSNAの判定結果を電子入力する。そして外科主治医へ電話で測定終了が報告され、外科主治医は手術室内にある電子カルテのモニターに表示された判定結果を直接確認した。

対象患者には、匿名で診療情報が研究及び教育に使用されることに関して、院内掲示とパンフレットの配布を行うことで包括的同意を得ている。

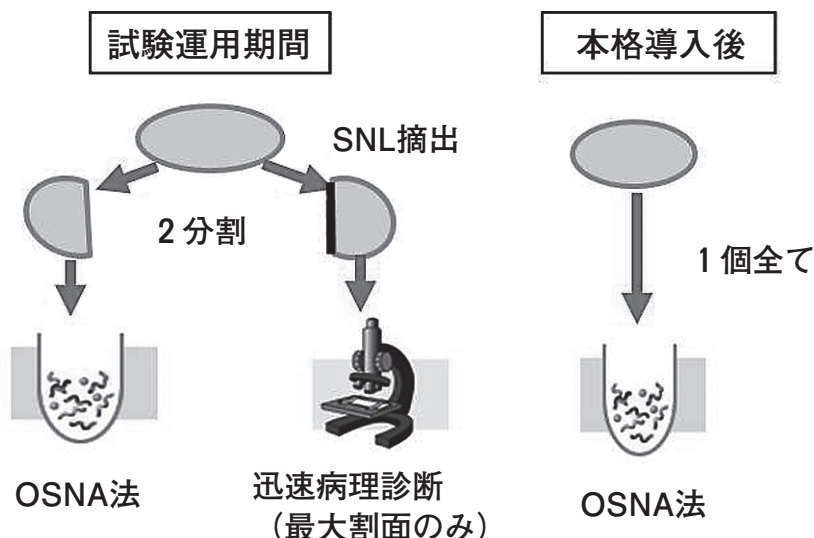


図1 試験運用期間、本格導入後のセンチネルリンパ節診断方法

## 結 果

試験運用期間では平均年齢59歳，平均腫瘍径±SDは15.0±12.52mmであった（表1）。OSNA 陽性は5リンパ節で陽性率13.8%，OSNA（+）4例，OSNA（++）1例であった。迅速凍結病理診断で転移陽性は2リンパ節で陽性率は5%であった。OSNA 陽性かつ迅速凍結病理検査で陰性であった3リンパ節はいずれも OSNA（+）であった。迅速病理診断陽性かつ OSNA 法陰性の症例は無く，全体一致率は91.6%であった（表2）。この期間，検査技師はトレーニングを受けることで OSNA 法の検査手技を修得したが，新たな仕事量の負担はみられなかった。また，凍結病理診断では検査技師と病理医少なくとも2名の人員が必要であったが，OSNA 法では検査技師1名で十分対応可能であった。導入後157症例，217リンパ節の平均年齢は54.9歳，

平均腫瘍径±SDは17.0±13.0mm，OSNA 陽性は30症例36リンパ節で OSNA 陽性率は16.5%，そのうち OSNA（++）は13症例16リンパ節（陽性率7.3%），OSNA（+）は17症例20リンパ節（陽性率9.2%）であった（表1）。

OSNA 陽性30症例のうち郭清した non-SLN 転移陽性は7例（23%：7/30）で，OSNA（++）では4例（30.7%：4/13），OSNA（+）3例（17.7%：3/17）であった（表3）。さらに，non-SLN の転移個数について検討し，OSNA（++）と OSNA（+）で non-SLN 転移陽性1～3個はいずれも2例，4個以上は2例と1例であった（表4）。

OSNA 陰性でサンプリングリンパ節に転移を認めた症例（偽陰性）は1例あり，乳癌原発巣とリンパ節について CK-19の免疫染色を行ったが，いずれも CK-19の発現を認めなかった（図2）。この CK-19無発現症例は，2個の SLNs を OSNA 法で検査し結果は陰性であったが，肉眼的に転移

表1 患者背景と OSNA 法結果

|            | 試験運用期間           | 本格導入後            |
|------------|------------------|------------------|
|            | n(%) / mean ± SD | n(%) / mean ± SD |
| 症例数        | 27               | 157              |
| リンパ節       | 36               | 217              |
| 平均年齢（歳）    | 59.07 ± 10.78    | 54.9 ± 13.7      |
| 平均腫瘍径（mm）  | 15.0 ± 12.52     | 17.2 ± 13.0      |
| 組織型        |                  |                  |
| 非浸潤癌       | 7 (26)           | 21 (13)          |
| 浸潤性乳管癌     | 17 (63)          | 126 (80)         |
| 特殊型        | 3 (11)           | 10 (7)           |
| ly*        |                  |                  |
| (－)        | 20 (77)          | 86 (56)          |
| (＋)        | 6 (23)           | 68 (44)          |
| 核グレード†     |                  |                  |
| 1          | 14 (78)          | 60 (47)          |
| 2          | 2 (11)           | 27 (21)          |
| 3          | 2 (11)           | 41 (32)          |
| ER         |                  |                  |
| 陰性         | 3 (11)           | 31 (20)          |
| 陽性         | 24 (89)          | 126 (80)         |
| HER2‡      |                  |                  |
| 陰性         | 19 (90)          | 119 (88)         |
| 陽性         | 2 (10)           | 17 (12)          |
| OSNA陽性リンパ節 | 5 (13.8) §       | 36 (16.5) §      |
| OSNA（++）   | 1 (2.7) §        | 16 (7.3) §       |
| OSNA（+）    | 4 (11.0) §       | 20 (9.2) §       |
| OSNA偽陰性    | 0 (0)            | 1 (0.6)          |

\*術前化学療法 cCR 症例は除く

†術前化学療法施行症例，非浸潤癌症例は除く

‡非浸潤癌症例は除く

§（ ）内は OSNA 陽性率

表2 試験運用期間の迅速病理診断と OSNA 法の比較

| OSNA 法判定 | 迅速凍結病理検査 |    | 合計 |
|----------|----------|----|----|
|          | 陰性       | 陽性 |    |
| （－）      | 31       | 0  | 31 |
| （＋）      | 3        | 1  | 4  |
| （++）     | 0        | 1  | 1  |
| 合計       | 34       | 2  | 36 |

OSNA 判定：（－）陰性，（＋）micrometastases，（++）macrometastases

OSNA 陽性率：13.8% 迅速凍結病理陽性率：5%  
全体一致率：91.6%

表3 OSNA 陽性例の非センチネルリンパ節転移頻度

| OSNA 法 | 症例数 | non-SLN*転移症例（%） |
|--------|-----|-----------------|
| 陽性全例   | 30  | 7 (23%)         |
| (++)   | 13  | 4 (30.7%)       |
| (+)    | 17  | 3 (17.7%)       |

\*non-sentinel lymph node

OSNA 法判定：（＋）micrometastases，（++）macrometastases

表4 非センチネルリンパ節転移の個数と pNstage

| OSNA 判定 | non-SLN 転移個数に対する症例数 (pStage) |         |        |
|---------|------------------------------|---------|--------|
|         | 0                            | 1～3     | 4～     |
| （++）    | 9 (N1a)                      | 2 (N1a) | 2 (N2) |
| （+）     | 14 (N1mi)                    | 2 (N1a) | 1 (N2) |
| 計       | 10                           | 4       | 3      |

N1mi 14例（46.6%），N1a 12例（40.0%），N2 4例（13.4%）

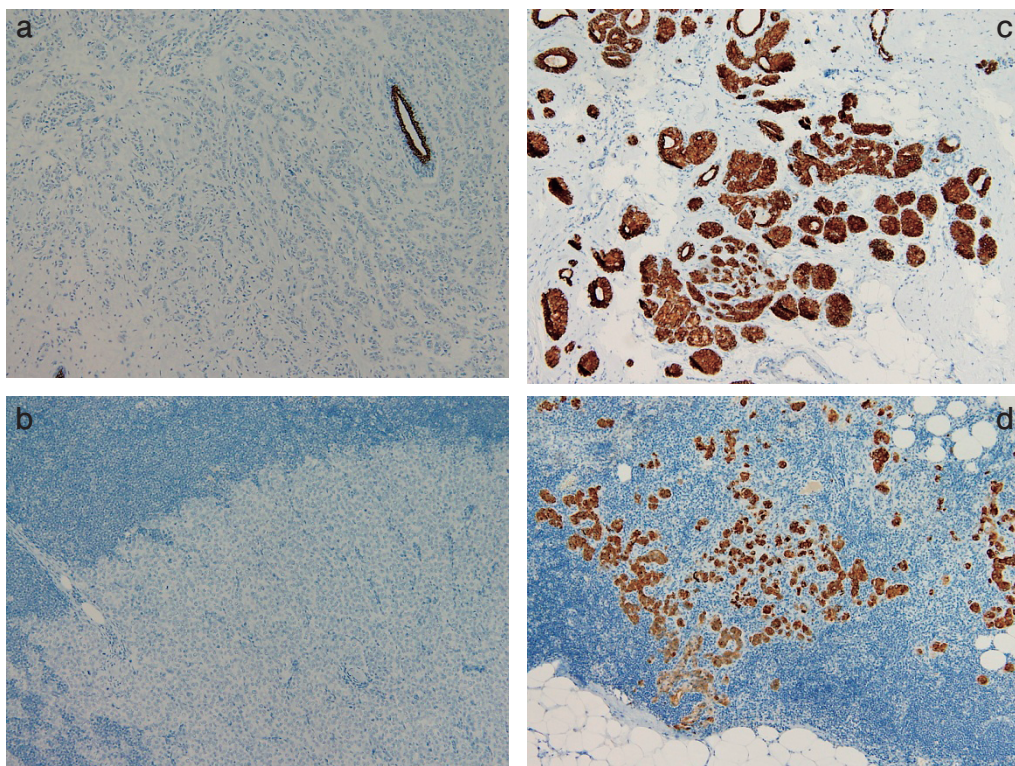


図2 CK-19無発現乳癌の病理所見

a, b : CK-19無発現乳癌 (a : 原発巣, b : 転移リンパ節) (CK-19免疫染色×100). c, d : CK-19陽性例 (c : 原発巣, d : 転移リンパ節) (CK-19免疫染色×100).

が疑われたため術中に腋窩郭清を追加した。最終永久病理では10個のリンパ節転移を認め、病理学的特徴は、硬癌、腫瘍径16mm, ly2, v0 ER50%以上, PgR50%以上, HER2陰性, 核 Grade 1 Ki67 5.1であった。

所要時間については、リンパ節摘出後から結果報告までの平均±SDは $38.9 \pm 1.12$ 分で、摘出リンパ節1個では $34.9 \pm 1.18$ 分、2個では $46.4 \pm 1.88$ 分、3～4個では $55.0 \pm 0$ 分であった。

## 考 察

センチネルリンパ節の迅速病理診断は、感度57～74%、特異度99～100%、精度83～90%<sup>4)</sup>、OSNA法の感度は75.0～98.1%、特異度91.7～98.4%、精度91.8～96.3%であり<sup>5)</sup>、OSNA法の感度は従来の迅速病理診断より高いとされている。Osakoら<sup>6)</sup>は、OSNA法では特にmicrometastasesの検出に有効と報告している(迅速病理診断で4.5%, vs OSNA法8.7%)。われわれの試験運用期間での検討でも、迅速凍結病理検査で転移陰性であってもOSNA法で転移陽性の3リンパ節は全てOSNA(+)であり、micrometastasesの検出に有効であったことが示唆された。

SLN転移陽性例でnon-SLN転移陽性率は、従来の迅速

病理診断では30～50%<sup>7,8)</sup>、micrometastasesの場合はnon-SLN転移陽性率13.8～27.0%と報告されている<sup>9)</sup>。OSNA法では、OSNA(++)のnon-SLN転移陽性率34～54%、OSNA(+)のnon-SLN転移陽性率10～22%と報告されており、われわれの検討でもOSNA(++)でnon-SLN転移陽性率30.7%、OSNA(+)では17.7%であり、これまでの報告と同様の結果であった。SLN micrometastasesであった症例のnon-SLN転移陽性の個数については、Cortesiら<sup>10)</sup>が、non-SLN転移0個は80.3%、2個11.3%、3個4.9%、4個以上1.4%であり、4個以上の症例もみられると報告しているが、われわれの検討でもOSNA(+)でnon-SLN転移4個以上の症例が1例(5%)含まれていた。OSNA法によるnon-SLN転移陽性率、転移個数は、従来の迅速病理診断とほぼ同等と考えられた。

SLN転移陽性症例に対する腋窩郭清の意義については議論されており、ACOSOG Z0011試験<sup>11)</sup>、IBCSG 23-01試験<sup>12)</sup>の報告では、SNL転移陽性症例の腋窩郭清群と非郭清群の間で、局所再発率、無病生存期間(disease free survival : DFS)、全生存期間(overall survival : OS)に差が無かったと報告され、SLN転移陽性症例の腋窩郭清の省略について考慮される流れである。これまで報告されている、SLN

転移陽性例の腋窩郭清有無で予後を比較した検討は，迅速病理検査（HE 染色）によるデータである．迅速病理検査と OSNA 法の診断における同等性は確認されているが，迅速病理検査で SLN 転移陽性例の予後と OSNA 法転移陽性症例の予後が同等かについてはまだ検証されていない．今後は OSNA 法で転移陽性と診断された症例に対する局所再発，DFS，OS についての検討も必要と考えられる．また OSNA 法は定量的にコピー数を測定することができ，そのコピー数と予後との関連を検討することも有用と考える．

迅速病理診断の偽陰性率は前述の通り 9～45%で，これは転移部位偏在や micrometastases が原因と考えられている<sup>2)</sup>．一方 OSNA 法の偽陰性率は 0～21%とされているが<sup>13)</sup>，これらの研究では複数に分割した同一 SLN について，いくつかの切片を病理検査で，残りの切片を OSNA 法で診断するため，転移部位が病理検査側に偏るために偽陰性が生じることがほとんどである．したがって，1 個すべて OSNA 法で検査すれば偽陰性はさらに軽減できると考えられる．

しかし，CK-19が無発現のために OSNA 法で偽陰性となる可能性もあり，当院でも 1 例経験した．Tamaki ら<sup>3)</sup>は，100転移リンパ節中 2 例に，snook ら<sup>14)</sup>は 78転移リンパ節中 1 例に，vilardell ら<sup>15)</sup>は 97転移リンパ節中 1 例に認めたと報告している．これらの結果より，約 1～2%では CK-19 無発現により OSNA 法で偽陰性となる可能性がある．今回われわれが経験した症例は，術中では OSNA 法で陰性であったが肉眼的に転移疑われたため腋窩郭清を追加し，結果的に non-SLN に 10 個の転移を認めた．肉眼的に SLN 転移を確認できる症例は術中に対応可能だが，潜在的に偽陰性と判断されている症例も存在する可能性も推測される．

このように，CK-19無発現乳癌による OSNA 偽陰性は，症例数は少ないが臨床上的問題である．術前に CK-19発現の有無を確認できれば偽陰性を回避できるが，腫瘍内で CK-19発現は一部に限局する症例もあり，針生検では検出できない可能性もある<sup>16)</sup>．また，CK-19タンパク発現を認めないが mRNA の増幅のみ認め，OSNA 法では陽性となる症例もある<sup>17,18)</sup>．これらの現状を踏まえて，今後の課題として，乳癌組織の CK-19の発現状況と OSNA 法の判定結果を検討していく必要があり，乳癌組織で CK-19発現陰性であれば OSNA 法と従来の迅速病理診断を併用するといった方法も考えられる．

遺伝子増幅検出装置（RD-100i）で CK-19増幅にかかる時間は 16 分とされている．OSNA 法は 4 個までは一度に検査することが可能であるが，ホモジナイズは 1 個ずつしか行えず，個数が多い場合は時間がかかるようである．今回の検討では，OSNA 法の報告までの所要時間は迅速病理診

断と比較して差は見られなかったが，検査技師が関わるのは専用検出器に入れるまでの操作であり，人的労力を要する時間は短縮できると考える．検査手技も比較的容易で検査技師が 1 人でも行えることから，人員の効率化に繋がることが期待できる．当院では病理医 2～3 人で全科の標本を診断しており非常に業務負担が大きかったが，今回 OSNA 法を導入することで，病理医の労力や心理的負担を大幅に軽減することができたと考える．

## 結 語

当院で行った OSNA 法はこれまでに報告された結果と同等であった．SLN 転移陽性症例に対する腋窩郭清省略の可能性や予後への影響については現在議論されているところであり，今後は OSNA 法で診断されたリンパ節転移陽性例の予後への影響を検討する必要があると考える．OSNA 法の導入により，検査技師や病理医の労力や費やす時間を大幅に減少できることが示唆された．

## 文 献

- 1) Krag DN, Anderson SJ, Julian TB, Brown AM, Harlow SP, Costantino JP, Ashikaga T, Weaver DL, Mamounas EP, Jalovec LM : Sentinel-lymph-node resection compared with conventional axillary-lymph-node dissection in clinically node-negative patients with breast cancer : overall survival findings from the NSABP B-32 randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol* (2010) 11, 927-933.
- 2) Cserni G, Amendoeira I, Apostolikas N, Bellocq JP, Bianchi S, Bussolati G, Boecker W, Borisch B, Connolly CE, Decker T, Dervan P, Drijkoningen M, et al. : Pathological work-up of sentinel lymph nodes in breast cancer. Review of current data to be considered for the formulation of guidelines. *Eur J Cancer* (2003) 39, 1654-1667.
- 3) Tamaki Y, Akiyama F, Iwase T, Kaneko T, Tsuda H, Sato K, Ueda S, Mano M, Masuda N, Takeda M, Tsujimoto M, Yoshidome K, 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* (2009) 15, 2879-2884.
- 4) Layfield DM, Agrawal A, Roche H, Cutress RI : Intraoperative assessment of sentinel lymph nodes in breast cancer. *Br J Surg* (2011) 98, 4-17.
- 5) Tamaki Y : One-step nucleic acid amplification assay (OSNA) for sentinel lymph node biopsy. *Breast cancer* (2012) [Epub ahead of print].
- 6) Osako T, Iwase T, Kimura K, Yamashita K, Horii R, Yanagisawa A, Akiyama F : Intraoperative molecular assay for sentinel lymph node metastases in early stage breast cancer : a comparative analysis between one-step nucleic acid amplification whole node assay and routine frozen section histology. *Cancer*

- (2011) 117, 4365-4374.
- 7) Viale G, Maiorano E, Pruneri G, Mastropasqua MG, Valentini S, Galimberti V, Zurrida S, Maisonneuve P, Paganelli G, Mazzarol G : Predicting the risk for additional axillary metastases in patients with breast carcinoma and positive sentinel lymph node biopsy. *Ann Surg* (2005) 241, 319-325.
  - 8) Rahusen FD, Torrenge H, van Diest PJ, Pijpers R, van der Wall E, Licht J, Meijer S : Predictive factors for metastatic involvement of nonsentinel nodes in patients with breast cancer. *Arch Surg* (2001) 136, 1059-1063.
  - 9) Travagli JP, Atallah D, Mathieu MC, Rochard F, Camatte S, Lumbroso J, Garbay JR, Rouzier R : Sentinel lymphadenectomy without systematic axillary dissection in breast cancer patients : predictors of non-sentinel lymph node metastasis. *Eur J Surg Oncol* (2003) 29, 403-406.
  - 10) Cortesi L, Proietto M, Cirilli C, Tazzioli G, Andreotti A, Federico M : Prognosis and treatment of micrometastatic breast cancer sentinel lymph node : A population-based study. *J Surg Oncol* (2012) 106, 399-405.
  - 11) Giuliano AE, Hunt KK, Ballman KV, Beitsch PD, Whitworth PW, Blumencranz PW, Leitch AM, Saha S, McCall LM, Morrow M : Axillary dissection vs no axillary dissection in women with invasive breast cancer and sentinel node metastasis : a randomized clinical trial. *JAMA* (2011) 305, 569-575.
  - 12) Glehner A, Wockel A, Gartlehner G, Thaler K, Strobelberger M, Griebler U, Kreienberg R : Sentinel lymph node dissection only versus complete axillary lymph node dissection in early invasive breast cancer : A systematic review and meta-analysis. *Eur J Cancer* (2013) 49, 812-825.
  - 13) Cserni G : Intraoperative analysis of sentinel lymph nodes in breast cancer by one-step nucleic acid amplification. *J Clin Pathol* (2012) 65, 193-199.
  - 14) Snook KL, Layer GT, Jackson PA, de Vries CS, Shousha S, Sinnott HD, Nigar E, Singhal H, Chia Y, Cunnick G, Kissin MW : Multicentre evaluation of intraoperative molecular analysis of sentinel lymph nodes in breast carcinoma. *Br J Surg* (2011) 98, 527-535.
  - 15) Vilardell F, Novell A, Martin J, Santacana M, Velasco A, Diez-Castro MJ, Cuevas D, Panades MJ, Gonzalez S, Llombart A, Iglesias E, Matias-Guiu X : Importance of assessing CK19 immunostaining in core biopsies in patients subjected to sentinel node study by OSNA. *Virchows Arch* (2012) 460, 569-575.
  - 16) Alvarenga CA, Paravidino PI, Alvarenga M, Dufloth R, Gomes M, Zeferino LC, Schmitt F : Expression of CK19 in invasive breast carcinomas of special histological types : implications for the use of one-step nucleic acid amplification. *J Clin Pathol* (2011) 64, 493-497.
  - 17) Tsujimoto M, Nakabayashi K, Yoshidome K, Kaneko T, Iwase T, Akiyama F, Kato Y, Tsuda H, Ueda S, Sato K : One-step nucleic acid amplification for intraoperative detection of lymph node metastasis in breast cancer patients. *Clin Cancer Res* (2007) 13, 4807-4816.
  - 18) Schem C, Maass N, Bauerschlag DO, Carstensen MH, Loning T, Roder C, Batic O, Jonat W, Tiemann KC : One-step nucleic acid amplification-a molecular method for the detection of lymph node metastases in breast cancer patients : results of the German study group. *Virchows Arch* (2009) 454, 203-210.