

平成25年度（第18回）  
弘前大学医学部学術賞  
奨励賞受賞論文

TANAKA H, TONE K, HAYASHI A, MORIMOTO T, TAIMA K, TANAKA Y, NAKAGAWA H, TAKANASHI S, OKUMURA K, KUROSE A. Clinical application of immunocytochemical detection of ALK rearrangement on cytology slides for detection or screening of lung adenocarcinoma. *Lung Cancer*. 2013 Jun; 80(3): 289-92. Epub 2013 Mar 21.

## ALK 転座を有する肺癌の検出，擦過細胞診標本を用いた免疫細胞化学染色の有用性

弘前大学医学部附属病院 循環器内科・呼吸器内科・腎臓内科  
弘前大学大学院医学研究科 病理診断学講座  
田 中 寿 志

### 【背景・目的】

肺癌は癌死亡原因の一位を占めその有効な治療法の確立が重要な課題である。近年，非小細胞肺癌において標的分子をターゲットとする個別化治療が本格化してきた。2007年 EML4-ALK (echinoderm microtubule associated protein-like 4 anaplastic lymphoma kinase, ALK) 遺伝子転座を有する肺癌 (ALK 肺癌) が報告され，ALK 肺癌に ALK 阻害剤であるクリゾチニブが劇的な効果を示すことが臨床試験により明らかにされた。2012年より本邦でもクリゾチニブが臨床現場で使用可能となり ALK 肺癌の検出が必須となった。その検出法として，ALK 融合遺伝子を検出する蛍光in situハイブリダイゼーション (FISH) 法，reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) 法，ALK 融合遺伝子産物である ALK 蛋白を検出する免疫組織化学 (IHC) 法がある。これらの中で IHC 法は最も簡便でありスクリーニングとして有用であることが組織切片において報告されている。しかしながら肺癌の確定診断のための気管支内視鏡検査では腫瘍組織の採取が困難な場合が少なくなく，同時に行われる擦過細胞診のみで腫瘍細胞が得られることも多い。そこで今回，細胞診標本を用いた免疫細胞化学 (ICC) 法と，同じ症例の組織切片を用いた IHC 法の結果を比較し，ALK 肺癌検出のための ICC 法の有用性を検討した。

### 【方法】

細胞診および組織診で腺癌の診断が得られた18例を対象とした。対象患者は男性11例，女性7例，年齢は中央値61歳 (39～85歳) であり，喫煙者11例，非喫煙者7例であった。

免疫染色は抗 ALK 抗体として抗5A4抗体を使用し，高感度法である Envision FLEX Mini-kit により検出した。IHC 法はホルマリン固定パラフィン包埋組織を用いた。ICC 法は擦過細胞診検体をパパニコロウ染色して腫瘍細胞を確認した後，同細胞診標本の脱色を行いICC法を施行した。染色スコアは陰性，弱陽性，強陽性の3段階で評価し，弱陽性，強陽性を陽性と判断した。ALK 融合遺伝子の確認は FISH 法，または RT-PCR 法で行い，免疫染色の結果と比較した。

### 【結果】

IHC 法と ICC 法の染色結果を Table 1 に示す。IHC 法陽性は18例中7例であり染色スコアは弱陽性が

Table 1 IHC 法と ICC 法における ALK 免疫染色の結果

|       |                 | IHC            |                 | Total  |
|-------|-----------------|----------------|-----------------|--------|
|       |                 | Positive (n=7) | Negative (n=11) | (n=18) |
| ICC   | Positive (n=6)  | 6              | 0               | 6      |
|       | Negative (n=12) | 1              | 11              | 12     |
| Total |                 | 7              | 11              | 18     |

(Lung Cancer. 2013;80:289-92を改変).

感度6/7 (85.7%), 特異度11/11 (100%), 陽性的中率6/6 (100%), 陰性的中率11/12 (91.6%), 一致率17/18 (94.4%).

Table 2 IHC 法陽性の 7 症例と ICC 法, FISH 法, RT-PCR 法の検討

| Case            | 1        | 2      | 3      | 4      | 5      | 6      | 7      |
|-----------------|----------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| Sex             | M        | M      | F      | M      | F      | M      | F      |
| Age             | 70       | 65     | 63     | 52     | 45     | 39     | 79     |
| Smoking history | +        | +      | -      | +      | -      | +      | -      |
| IHC             | weak     | strong | strong | strong | strong | strong | strong |
| ICC             | negative | strong | strong | strong | strong | strong | strong |
| FISH            | -        | +      | ND     | ID     | +      | ID     | ID     |
| RT-PCR          | ND       | ND     | ND     | ND     | ND     | +      | ND     |

(Lung Cancer. 2013;80:289-92を改変).

NE, Not done. ID, Indeterminate.

1 例, 強陽性が 6 例であった. ICC 法陽性は 6 例であり染色スコアは全例が強陽性であった. IHC 法で弱陽性の 1 例は ICC 法では陰性であり, IHC 法強陽性 6 例は ICC 法強陽性 6 例と一致した. IHC 法に対する ICC 法の免疫染色結果は, 感度6/7(85.7%), 特異度11/11(100%), 陽性的中率6/6(100%), 陰性的中率11/12(91.6%) であり, 一致率17/18(94.4%) であった. IHC 法陽性の 7 例の結果と FISH 法, RT-PCR 法の結果を Table 2 に示す. FISH 法は IHC 法陽性の 7 例のうち 6 例で施行できたが, IHC 法, ICC 法いずれも強陽性であった 1 例は薄切後に腫瘍細胞が消失したため施行できなかった. FISH 法を施行した 6 例では ALK 融合遺伝子陽性 2 例, 陰性 1 例, 判定不能 3 例であった. FISH 法で判定不能であった 3 例はいずれもホルマリン固定時間が 48 時間以上であり, そのうち 1 例では擦過細胞診検体で RT-PCR 法による ALK 融合遺伝子が陽性であった. ICC 法が陰性, IHC 法が弱陽性であった 1 例は FISH 法陰性, 残りの IHC 法と ICC 法が両方強陽性であった 2 例はいずれも FISH 法陽性であった. IHC 法と ICC 法がともに陰性であった 11 例中 4 例で FISH 法を施行したがいずれも陰性であった.

### 【考察】

ALK 肺癌は非小細胞肺癌の 5 から 9 % を占め, クリゾチニブが著効することからその検出は肺癌の治療上極めて重要である. ALK 肺癌を臨床情報のみで選別することは不可能であり, 有用な検査が必要である. IHC 法は簡便かつ安価であり一般の病院病理部門でも施行可能である. 従来の IHC 法では ALK 蛋白の検出は困難とされていたが, 高感度検出法を用いることにより FISH 法の結果と高い一致率が報告されている. 今回の検討では高感度検出法と 5A4 抗体を用いることで, パパニコロウ染色後の擦過細胞診標本を利用した ICC 法による ALK 蛋白検出が可能であり, さらに IHC 法と高い一致率を示すことが明かとなった. 両者が一致しなかった 1 例は ICC 法陰性, IHC 法弱陽性であり, FISH 法では陰性で ALK 融合遺伝子は検出されなかった. 免疫染色による ALK 蛋白の検出において IHC 法が弱陽性例では FISH 法と結果が一致しないとする報告もなされており, 染色スコアが弱陽性例は注意を要するが, 本検討での 1 例は ICC 法が IHC 法よりも正確な結果を示した. 染色スコア強陽性と判断した例については IHC 法と ICC 法の結果がすべて一致していた. これらのことから ALK 肺癌の検出における ICC 法の有

用性が示された。

本検討では IHC 法あるいは ICC 法陽性例で FISH 法での ALK 融合遺伝子を確認できなかった例が多い。その原因は薄切による腫瘍細胞の消失が 1 例、判定不能が 3 例であった。後者の検体はいずれも 48 時間以上ホルマリン固定がなされており、過固定による影響が考えられ、固定時間には注意が必要である。

#### 【結語】

ICC 法による ALK 蛋白の同定は IHC 法と高い一致率を示し、ALK 肺癌検出の有用な手段であることが明かとなった。肺癌における個別化治療は今後ますます必要性が高まるが、肺癌の確定診断では腫瘍組織が採取できず細胞診検体でのみ腫瘍細胞を認めることも多い。よって通常の細胞診標本で肺癌の診断を行った後の標本を用いた ICC 法による ALK 肺癌の検出は臨床において極めて重要である。

#### 【参考文献】

- 1) Soda M, Choi YL, Enomoto M, Takada S, Yamashita Y, Ishikawa S, et al. Identification of the transforming EML4-ALK fusion gene in non-small-cell lung cancer. *Nature* 2007;448:561-6.
- 2) Kwak EL, Bang YJ, Camidge DR, Shaw AT, Solomon B, Maki RG, et al. Anaplastic lymphoma kinase inhibition in non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med* 2010;363:1693-703.
- 3) Takeuchi K, Choi YL, Togashi Y, Soda M, Hatano S, Inamura K, et al. KIF5B-ALK, a novel fusion oncokinase identified by an immunohistochemistry-based diagnostic system for ALK-positive lung cancer. *Clin Cancer Res* 2009;15: 3143-9.
- 4) Yi ES, Boland JM, Maleszewski JJ, Roden AC, Oliveira AM, Aubry MC, et al. Correlation of IHC and FISH for ALK gene rearrangement in non-small cell lung carcinoma: IHC score algorithm for FISH. *J Thorac Oncol* 2011;6:459-65.
- 5) Park HS, Lee JK, Kim DW, Kulig K, Kim TM, Lee SH, et al. Immunohistochemical screening for anaplastic lymphoma kinase (ALK) rearrangement in advanced non-small cell lung cancer patients. *Lung Cancer* 2012;77:288-92.