

## 学位請求論文の内容の要旨

論文提出者氏名	病態制御科学領域呼吸病態内科学教育研究分野 氏名 田中 寿志
<p>(論文題目)</p> <p>Clinical application of immunocytochemical detection of ALK rearrangement on cytology slides for detection or screening of lung adenocarcinoma</p> <p>(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)</p>	
<p>(内容の要旨)</p> <p>【背景・目的】</p> <p>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。</p> <p>【方法】</p> <p>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。</p> <p>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 Envsion 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。</p> <p>【結果】</p> <p>IHC 法陽性は 18 例中 7 例であり染色スコアは弱陽性が 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。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</p>	

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。