

により強力な化学療法はできないであろうと判断したときには、Low Dose の CDDP を 5 mg/m^2 投与して、放射線治療を行っていました。

山本 それは同時照射を優先するのか、逐次照射にもっていくのかどちらですか。その場合も考えると、もしできるのであれば同時照射を先にしますか？

木浦 Stage IIIA、IIIB の高齢者のスタンダードはやはり放射線治療単独だと思っています。臨床試験として CDDP の Low Dose を週に一度クレアチニンクリアランスをみながら、 30 (mL/min) を下回ったら CDDP を止めるという条件で、生食 500 mL の中に CDDP を 5 mg/m^2 入れ同時放射線照射を行うという方法を報告しております。

山本 われわれは高齢者に対しては放射線治療のみです。年齢でサブセット解析した論文では、高齢者に関しては逐次的な併用でも化学療法を追加する効果は少ないと報告されています。それで今の JCOG の試験、「高齢者に対しての放射線療法 vs. Low Dose CBDCA+放射線療法」は、違和感なく参加できます。75 歳以上の方が来院して、今の対象であれば、放射線治療のみの治療を行っています。

木浦 やはり放射線治療単独がスタンダードですね。ただし、私たちの行った臨床試験は落ち穂拾いのようなもので、高齢者にも治療する以上はやはり何かの臨床試験に入ってもらおうというコンセプトで Low Dose を行っていました。

山本 それは重要ですね。高齢者で化学放射線療法ができる臨床試験を考えるのが重要だと思います。



坪井 正博 (つぼい まさひろ)

(東京医科大学病院 呼吸器・甲状腺外科)

- 1987 年 東京医科大学医学部医学科卒業
- 1991 年 東京医科大学医学部大学院修了
- 1991 年～ 国立がんセンター中央病院に外科レジデントとして勤務
- 1994 年～ 国立がんセンター中央病院に癌専門修練医として勤務
- 1996 年～ 東京医科大学外科学第一講座に臨床研究医として勤務
(財)会田病院に呼吸器外科医長として勤務
- 1997 年～ 東京医科大学外科学第一講座助手として勤務
- 2005 年～ 同上 講師、現在に至る。

■ 欧米での状況

木浦 欧米の場合、どのような状況なのでしょうか。

山本 米国では Low Dose の CBDCA+PTX+同時併用放射線療法が基本にあり、LAMP (Locally Advanced Multimodality Protocol) スタディ^{*3}では放射線の前に化学療法を加えるか後に化学療法を加えるか、というような比較試験を行っています。

*3) Locally Advanced Multimodality Protocol (LAMP)

Arm 1 (n=92). Paclitaxel 200 mg/m^2 and carboplatin area under the curve (AUC) 6 for two cycles, followed by daily thoracic radiation (TRT) of 63 Gy (sequential);

Arm 2 (n=74). Induction chemotherapy, followed by weekly paclitaxel 45 mg/m^2 and carboplatin AUC 2 with TRT for seven weeks (induction/concurrent);

Arm 3 (n=92). Concurrent chemoradiotherapy followed by paclitaxel 200 mg/m^2 and carboplatin AUC 6 for two cycles (concurrent/consolidation).

要するに CBDCA+PTX があり、それに放射線療法を追加するのが今の臨床試験から窺える米国の本流です。

しかし、それが決して順調だとは言えません。たとえば一昨年の ASCO では、CALGB から、インダクションの Full Dose 化学療法を行ってから Low Dose 化学放射線療法を行うのと、Low Dose 化学放射線療法だけの比較試験を行ったら、差がなかったのです。それで導入治療としての Full Dose 化学療法を入れなくてよいのではないかという結果でした。

それだけならよかったです。MST がインダクション群でも 13 カ月程度と過去の第 2 世代レジメンを用いた化学放射線療法の成績より悪かったのです。そのため、この近年米国のスタンダードとして進められてきた感のある、Low Dose CBDCA+TXL と胸部放射線との同時併用療法をこのまま推し進めていっていいのかどうか混沌としているのが、米国の現状だと思います。

木浦 SWOG (South Western Oncology Group) のガンダーラ (Gandara) 先生のデータはどうですか。

山本 クラシカルな化学放射線療法に地固め療法として DXT を加えて、非常によい結果が出ているのは大変興味深いです。

ただ、問題は頭の中で「本当に数コースの DXT を加えるだけでそんなに延びるのか」という気持がないわけでもありません。いま行われている比較試験 (HOG : Hoosier Oncology Group) の結果を私は非常に注目しています。

木浦 いま、進行中ですね。ガンダーラ先生のあのデータは米国の先生方はどのくらい信用しているのでしょうか。

坪井 それは私もわからないところです。SWOG グループはデータが一定していますが、他のグループでははっきりとはしていません。

これは私の個人的な感想ですが、地固め化学療法は、外科手術でいうと局所と全身の治療を行った後、つまり N2 で手術と化学療法を術前で行った後のアジュバントだと考えています。化学放射



線治療後の Full Dose の化学療法が実際には実施困難で、UFT のように単剤で行うことを考えられたのではないのでしょうか。確かに 2 剤以上を投与するよりはインパクトは落ちますが、アジュバントという意味で考えたら、そのぐらいの強さのほうは忍容可能で、実際に合併症も少なくてもいいと言われたら、外科医的な感覚でいうと、単剤でも生存期間延長へのインパクトは多少あるかと思われれます。

しかし、それは山本先生が言われるように比較試験をしないとわからないので、やはり臨床第 III 相での比較試験が重要であると思います。

木浦 私たちも第 III 相試験が重要なのはよくわかります。ただ私どものグループでも第 II 相試験のときは症例をほぼ登録してくれました。しかし、第 III 相試験では、第 II 相試験の症例集積速度から 200 症例を 2.5 年で計画したのですが、実際は 5 年もかかってしまいました。それは、比較試験ではグループの主治医に観念的なバイアスが入ってしまって、症例の登録がスムーズに行かなかったのです。第 III 相試験は難しいと強烈に感じました。単独グループで行うのはそろそろ限界だと思います。

した。ある先生から、「200例だと、統計学的なパワーが足りない、優位性があっても、有意差を出せないのではないか」と言われていましたが、2007年7月の最終解析で優位性が証明されると信じております。

坪井 どういう結果になるかわかりませんが、たとえ成績は上に行っても、有意差がないと科学的には採用できないということがあります。

木浦 米国では、そのような結果が出た場合「差がない。残念。」ですが、パワー不足で差が出せないというのは参加していただいた患者さんたちにとっても、残念なことです。日本でもWJTOGとか、JCOGのような多くの施設が参加した国家プロジェクトに期待しております。われわれも協力しなくてはいけないと思っています。

米国は潤沢な資金の基に研究ができる。私たちは大学の医局の先輩後輩だけで臨床試験を実施してきました。この試験には、直接的な税金の投入もありませんし、企業からの直接的な資金援助も受けていません。このたびの卒後研修制度により、関連施設と大学の医局との繋がりも希薄になりつつあります。このシステムもいつまで維持できるかわかりません。一大学を中心とする大規模試験の実実施遂行は非常に難しい時代が来ていると感じております。今後は、基幹エビデンスを作るためには全国的な国家プロジェクトとして、短期間にその成果を仕上げる必要性を痛感しております。

坪井 おっしゃるとおりです。木浦先生がおっしゃったように、エビデンスをつくるためには大きなサンプルサイズが要求されています。そのためには国を挙げて実施するという姿勢から実施可能なシステムを作っていかななくてはならないと思います。

木浦 それでは次にネオアジュバントについて坪井先生、お話いただけますか。

【ネオアジュバントについて】

坪井 ネオアジュバントについて術後化学療法に



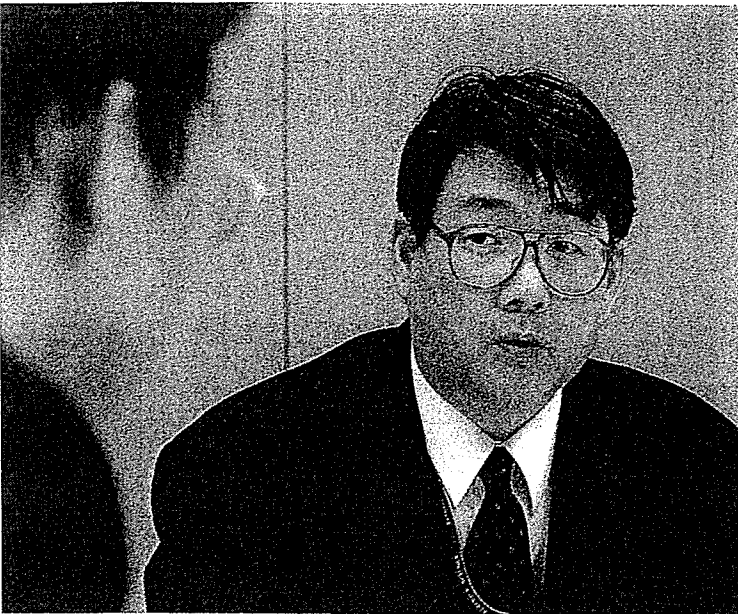
関しては今のところ有望なデータは見当たりません。M. D. アンダーソンやスペインの小規模なグループのデータを欧米では標準治療の礎としていますが、日本ではまだ探索的な領域でしかないと思います。

ただ、私は米国のインターグループトライアル (INT 0139) はスタンダードな化学放射線療法に手術を加える意義を問う試験ですので、私はネオアジュバントの話をするときはこの試験を引用して良いものかどうか躊躇しています。

木浦 インターグループトライアルは、治療関連で約8%も死亡しています。おそらく日本の外科の先生であればこんなことはないと思いますので、日本で実施されておれば現時点での成績は有意差が出ていると考えています。CDDP+VP-16という古い薬に同時放射線照射後に手術を加えることでも十分有意差が出たのではないかと思います。放射線化学療法の後ではやはり手術がしづらいのですか。

坪井 手術しづらいです。

木浦 放射線化学療法後の手術は外科医の腕次第ということですね。



坪井 手術は一種“アート”ですから外科医の腕にかかっていると思います。あとは術後回復も含めて安全に手術できるかどうかの判断が重要でしょう。右の肺全摘でも右肺が機能していなければ、いいと思うのですが、肺機能が十分にある人で、右肺全摘をしなければならない場合、導入化学放射線療法後の肺全摘は合併症も増えるし、生存期間も決して延長しないと私は感覚的に思っています。

木浦 左にがんができたなら幸運ということでしょうか？



坪井 そうですね。ただ、解剖学的に右肺に比べると左肺の方がⅢ期症例では肺全摘になりやすいという例はあるかと思えます。

木浦 私どもの実施している化学放射線療法後に手術を追加しますと、2~3割の患者で病理学的CRとなります。Full Doseの化学療法と同時放射線を加えることのみでも5年生存率が約30%になることから、この病理学的CR率は妥当な数字と私たちは思っています。

坪井 病理学的CRは非常に予後がよいです。これらの症例では5年生存率が50%は越えています。いわゆる局所進行肺がんは化学放射線療法を行った後、サルベージとしての手術が必要な症例があるのだらうと思います。ネオアジュバントはスタンダードとして不確定ということをお願いします。

木浦 適切な手術ができる外科医がいないと無理ということですね。

坪井 そうです。

■ 今後の展望

木浦 次に有望な薬剤の条件は何かあるでしょうか。

山本 化学放射線療法で有望な薬剤の条件は、放射線治療をと同時に併用しても、致死的な毒性の頻度を増強しないことが第一条件になります。

その上で、第二の条件としては非小細胞肺がんに対して効果が高いことです。ただ、非小細胞肺がんに対して効果が高くなくても、放射線増感効果が非常に強い、または、ほかの抗がん剤と併用すれば非常によく効くなどの場合もあるので、単剤で非小細胞肺がんの効果があることは必ずしも必須ではなのではないかと思っています。

坪井 毒性というのは放射線性の肺臓炎のことですか。それともほかのものもありますか。

山本 骨髄抑制はコントロールできるので気にしないです。今は主には放射線障害性の肺炎が一番大きな問題です。あとは食道炎ですね。

坪井 ただ、放射線性の肺臓炎は結構晩期で生じ

ます。もちろん早期に発症する人もいますが、晩期だと問題ですね。

木浦 1年未満の高度の放射線肺臓炎は少ないのですが、長期に追いかけると感染症で亡くられるケースもあります。やはり放射線を照射すると、かなりのダメージを肺に残して、普通の市中肺炎などで致命的になることがあり、注意が必要です。

今年の日本臨床腫瘍学会などでも発表しましたが、CDDP+DXT 療法併用放射線照射の5年生存率は約3割です。2年過ぎて亡くられる方は2次発がんや感染症で亡くなります。それは広い意味で放射線障害性の肺炎の後遺症とも言えるかもしれませんが、呼吸機能に余力がない方が存在すると考えられ注意が必要です。二次発がんは薬効の延長線上にある現象と考えられ、今後クリアしなくてはならない問題になるだろうと思います。

坪井 そういう副作用対策ができれば、新しい薬に期待するときに多少肺障害が残ったとしても問題ないとか、いろいろ今の薬でも Full Dose でいける薬がいいとかということが出てくると思うのですが。

木浦 間質性肺炎自体の本質的な治療薬はありません。

山本 新しい薬ではないですが、やはり DXT は有望な薬です。

たとえば私も近畿大学勤務中に、近畿大学を中心として Weekly の CDDP+DXT と胸部放射線の同時併用療法の第 I / II 相試験を行って、MST が 23 カ月という岡山大学のグループと全く同じ生存率が出ています。二つの独立した臨床試験グループで同じような薬を使って全く同じ成績が出ているということは、成績としては非常に有望ではないかと思っています。

あとは使い方が違いますが、ガンダーラ先生は地固め療法で、これも非常に有望なデータが出ていますので、化学放射線療法の分野で DXT は、有望な薬剤の一つだと思います。

ただ、同時照射で使うには、先生方も行われたように、PTX と同じく Full Dose でやるとかなり

厳しいですね。DXT も Full Dose の $60 \text{ mg/m}^2/3\text{wks}$ と同時照射するのは DXT にとっても厳しいので、ある程度、そこは考えて併用すべきだろうと思います。

もう一つはやはり今は EGFR の抗体が有望だと思います。

木浦 その前に、CDDP か CBDCA のどちらが有用かという、やはりわれわれのグループは CDDP だと思っていますが、いかがですか。

山本 CBDCA は非常にコンビニエントで、確かにそれは認めるのですが、進行がんにおいてはわずかですが CDDP の方がいいようです。化学放射



線療法が根治的に作用することを目的とするのであれば、CDDP との併用が有望かもしれません。この問題につきましては、前述しました WJTOG の第 III 相試験で、CBDCA を含むレジメンが入っておりますので、その結果を待ちたいと思います。その結果をみて、もし CBDCA の Low Dose が勝てば、それを選択することになると思います。

木浦 いま、CBDCA を実地臨床では使っています。利便性が高く外来でコントロールが可能です。外来で治療をしようと思ったら、CDDP では非常に難しいですが、根治を目指す治療を行うときは CDDP を使用いたします。

それから先ほど私どもの DXT の話が少し出たのですが、われわれのグループでは DXT のコース用量は d1、8、29、36 で $40/m^2$ を 4 回、計 $160/m^2$ 投与しています。欧米の方から分割していることと Full Dose ではないというご指摘を受けるのですが、この用量は少なくとも日本人では Full Dose に相当すると考えています。米国のネオアジュバントでは Full Dose の CDDP+DXT ($75 mg/m^2$) に放射線を併用していますが、おそらく DXT は分割すればそれ以上投与できる薬だろうと思います。

放射線化学療法における分子標的薬

木浦 放射線化学療法後の分子標的薬ゲフィチニブ (SWOG0023) は惨敗でしたが、cetuximab はどうですか。

山本 頭頸部領域で cetuximab+放射線と放射線照射のみとの比較試験で大きな差をもって cetuximab の併用が優っていました。EGFR の発現は胸部放射線治療の対象になる可能性が高い、扁平上皮がんで多いと言われております。ゲフィチニブでは、Mutation との関連が言われていますが、抗体であれば受容体の発現と関係すると思

ますので、放射線との併用は効果が期待できるものと思われます。

木浦 それと国内メーカーが導入するという pertuzumab もありますが、これも期待をもっているのかもしれませんが、ところで、放射線化学療法との併用でのゲフィチニブがネガティブなデータ (SWOG0023) をどう思われますか。

山本 これはゲフィチニブを化学放射線治療後 DXT を使用し、さらにその後にゲフィチニブを使用すると、生存期間に悪影響を与える可能性があるというデータでした。このデータを見てみますと、ゲフィチニブ投与で致死的な副作用が高頻度に発現しているわけではありませんので、この現象するのを説明するのはなかなか難しいです。ただ、動物試験でも、ゲフィチニブを中止した後に、急に腫瘍が大きくなる場合があるようですので、そのようなことが関係しているのかもしれませんが、ただし、DTX とゲフィチニブの併用自体には興味をもっております。

坪井 わたしも、DXT とゲフィチニブとの併用には興味があります。カリフォルニアのグループでは、DXT とゲフィチニブあるいは erlotinib の併用が行われているようです。実際、CBDCA や PTX、GEM との併用は行われていて、あまりいい成績ではなかったのですが、DXT とゲフィチニブとの併用はあまり報告はありません。使い方によっては効果の出る可能性は残されていると思います。

山本 ゲフィチニブには放射線の増感効果はあるので、胸部放射線と同時併用ということに関しては検討の余地はあります。

化学放射線療法の未来像

木浦 今後の放射線化学療法をお話いただくにあたって、まだ検証されねばならない新知見の部分、どういうところを確かめていきたいかを踏まえてコメントしていただきたいと思います。

まず、私の興味はネオアジュバントです。化学放射線療法後に手術をして、どれだけ治せるかに



一番興味があります。そのレジメンは今のところ、データは十分ではありませんが、CDDP+DXT 同時併用の 46 Gy まで行って、手術をして、もう一度化学療法をするというかなり強力な治療をして、どれだけ治せるか。うまくいけば 5 年生存率 60% ぐらいを目指してやりたい。それが一番の望みです。

ただ、病理学的 CR の 2-3 割ぐらいの人たちには手術は不要かもしれません。それが判別できる方法があればいいのですが、放射線化学療法後は PET でも CR の判別が難しいことが多いですね。

山本 術前の化学放射線療法につきましては、WJTOG でも CBDCA+DXT と胸部放射線療法の同時併用と、CBDCA+DXT の第Ⅲ相試験を行いました。症例集積が非常に悪く、途中で中止になりました。それを行うためには全日本だけではなくて、全世界でかなりいい外科医のいる施設で行わないとよい結果はでないと思います。

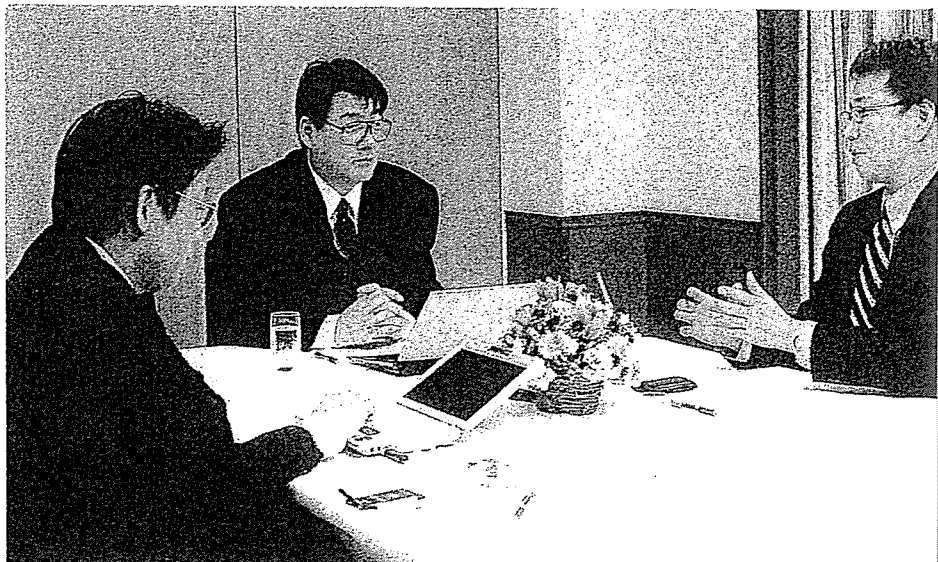
化学放射線療法に関する臨床試験のコンセプトとして、現時点で実現可能な試験は三つだと思います。

一つは化学療法のレジメンを統一し、放射線のやり方を考えていく。放射線照射の方法としては、3D コンフォーマル照射で照射野を絞って radiation Dose を上げていくというのが、まず一つの方策です。

もう一つは化学療法をさらに変える。その中で一番興味があるのは、やはり分子標的薬剤との併用です。

三つ目は先ほどから言っている化学放射線治療後の地固め化学療法です。これは、現在行われている HOG LUN 01-24 で有意な結果ができれば、すぐに一般応用できますので、一番臨床に近い方法かもしれません。

坪井 私の関心は、どの薬が放射線に効果と安全



性の面からが一番組み合わせが良いかということ、それによってネオアジュバントというか、手術も加わる集学的治療にどのくらいインパクトがあるかということを検証することです。また、N2-Ⅲ期については、術後の化学放射線療法をもう一回私は再評価してもいいと思っています。欧米でも N2 に対して化学放射線療法をするのに逐次照射や同時照射の比較試験を行うというデザインを聞いたことがあります。

木浦 Ⅰ期、Ⅱ期と思って取ったら N2 だったという症例ですね。

坪井 そうです。アジュバント化学療法は有用であるという結果は出てきているので N2-Ⅲ期や残存腫瘍を対象に、局所効果増強を狙って放射線治療を加える意義を検証してもおもしろいと思っています。

■ おわりに

木浦 本日は、日本にとどまらず、欧米のデータも含めて広くレビューをしていただき、今後の肺がん治療にとっても役立つ有意義なお話をお聞きすることができました。お忙しい中、どうもありがとうございました。先生方の益々のご活躍をお祈り致します。

Adjuvant and Neoadjuvant Chemotherapy

2 肺癌

坪井正博 (東京医科大学大学病院呼吸器・甲状腺外科講師)

加藤治文 (東京医科大学大学病院呼吸器・甲状腺外科教授)

P o i n t

術後補助化学療法

- 病理病期 I B-III A期非小細胞肺癌完全切除例に対する術後補助化学療法は5年生存率で8～15%の予後改善をもたらすことが複数の大規模臨床試験で明らかになった。
- わが国においては術後病期 I B期NSCLC・完全切除例に対してUFTによる術後化学療法を行うことは標準的治療と位置付けられる。
- 腫瘍径2cm以上の I A期に対するUFT、腫瘍径4cm以上の I B期に対するカルボプラチン、パクリタキセル併用療法(プラチナ製剤を含む併用療法)については、個々の症例でその適応を検討されるべきである。
- 病理病期 II～III A期非小細胞肺癌に対するシスプラチンを含む2剤併用療法は、手術単独治療に比し5年生存率で約5%の上乗せ効果があり、約20%の死亡リスク減少効果を期待できることが示された。

術前化学療法

- I B-III A期の一部の局所限局型非小細胞肺癌に対しては、現時点で術前化学療法が手術単独治療に比して生存の延長に寄与する傾向、可能性は示されているものの、それが標準治療として行うよう推奨するだけの根拠に乏しい。

非小細胞肺癌の切除全例の5年生存率は、おおむね53～40% (38.1%)で、欧米では“early stages”と認識されている臨床病期 I B/II期非小細胞肺癌でさえ切除後5年生存率は60%程度にとどまり、満足できる成績とは言い難い(表1)¹⁾。また、2cm以下の小型肺癌であっても約20%の症例にリンパ節転移を認める。一方、治癒切除後の再発形式は圧倒的に遠隔転移である。したがって、

局所治療である外科切除の成績向上のためには、「全身療法である化学療法」との併用が臨床現場の重要なテーマであることは論を待たない。その手段として術後補助化学療法 (adjuvant chemotherapy) があり、術前導入化学療法 (neoadjuvant chemotherapy) の考え方がある。現状では、大局的に standard なものと言えば“adjuvant chemotherapy”であり、standard になり得るもの

病期	TNM分類	術後5年生存率 (%)	
		臨床病期	病理病期
I A	T1N0M0	72.1	79.5
I B	T2N0M0	49.9	60.1
II A	T1N1M0	48.7	59.9
II B	T2N1M0	40.6	42.2
	T3N0M0		
III A	T3N1M0	35.8	29.8
	TanyN2M0		
III B	TanyN3M0	28.0	19.3
	T4NanyM0		
IV	TanyNanyM1	20.8	20.0

表1 非小細胞肺癌の病期分類と術後生存率(文献1から引用)

と云えば“neoadjuvant chemotherapy”である。前者はここ数年間に公表された大規模臨床試験によって10数年来の課題に終止符を打って「標準的治療」として受け入れられるようになってきた。ただし、サブ解析から病期別にはまだcontroversialな部分もあり、その評価に注意が必要である。一方、後者は大規模臨床試験と言えるサンプルサイズの試験が少なく、その効果については十分に証明されたとは言えない。しかしながら、最近公表されたmeta-analysisからは少なくとも手術単独の治療戦略に対する上乘せ効果が期待される結果が示されており、将来的に「標準治療」になりえる可能性がある。本稿では、非小細胞肺癌に対する術後補助化学療法、そして術前化学療法の現状をreviewする。

術後補助化学療法

非小細胞肺癌に対する術後補助化学療法の試みは1960年代より行われ、当初は高い抗腫瘍効果をもつ化学療法剤がなかったことに加え、十分に整備、計画された大規模な臨床試験が行われていな

かったことなどから芳しい結果は得られていなかった。EBM (evidence based medicine) の観点からは臨床試験においてのみ術後補助化学療法の実施を推奨され、実地医療では術後化学療法を行うだけの明確な根拠がないとされていた²⁻⁴⁾。しかし、2003年のフランスを中心としたInternational Adjuvant Lung Cancer Trial Collaborative Group (IALT)⁵⁾と日本のJapan Lung Cancer Research Group (JLCRG)⁶⁾の発表以来、Cancer and Leukemia Group B (CALGB) のCALGB9633⁷⁾、NCI-CanadaのJBR10⁸⁾、スペインを中心としたグループ; Adjuvant Navelbine International Trial Association; ANITA試験⁹⁾と相次いでpositive dataが発表された(表2)。これらの結果から、術後補助化学療法は局所限局型非小細胞肺癌の標準的治療の一躍を担う戦略として世の中に認知されて、種々の肺癌治療に関するガイドラインに反映されている。加えて、ヨーロッパを中心としたグループによるLung Adjuvant Cisplatin Evaluation (LACE)¹⁰⁾から、シスプラチンを使った術後補助化学療法の効果についての複数の試験結果(ALPI、IALT、BLT、JBR10、ANITA)のメタアナリシス

	IALT	JBR.10	CALGB	JLCRG	ANITA
薬剤	CDDP-based	VNR/CDDP	Paclitaxel/CBDCA	UFT	VNR/CDDP
症例数	1,897	459	344	999	831
結果	Positive	Positive	Positive	Positive	Positive
p-value	0.03	0.011	0.028	0.035	0.013
ハザード比	0.86	0.69	0.62	0.709	0.79
5年生存率の差	4.1%	15%	12% (4年)	3%	8.6%

表2 早期非小細胞肺癌に対する術後化学療法臨床試験結果まとめ (2003~2006)

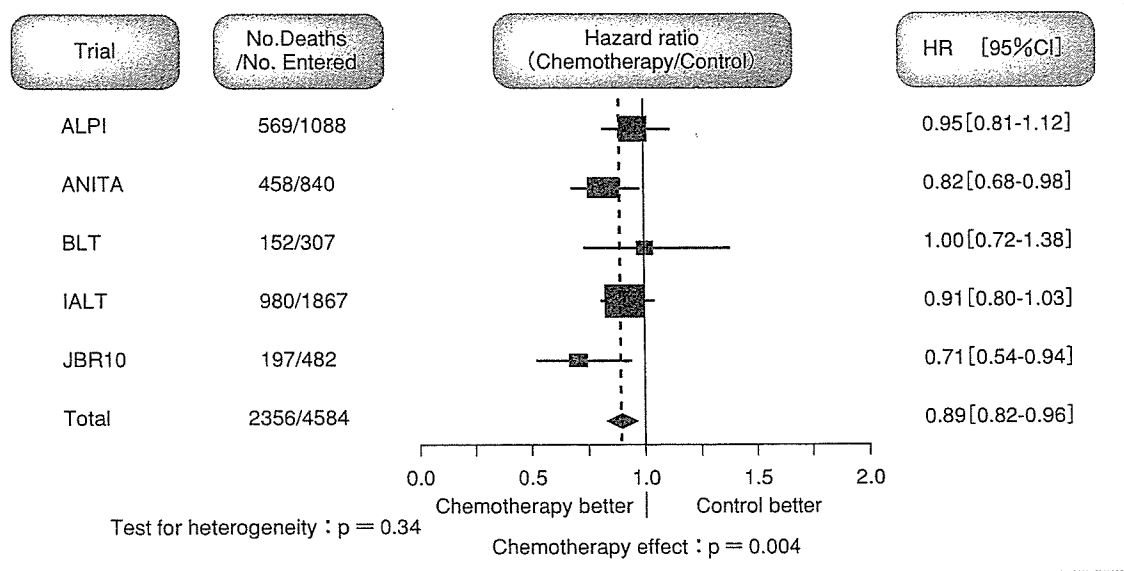


図1 LACE meta-analysis — overall survival — (文献10より引用)

(4,584例)では、中間観察期間が5.1年で5年生存率にみる術後化学療法の上乗せ効果は5.3%、全体のハザード比が0.89であり、統計学的にその有用性が示された(図1)。

ただし、病期によっては化学療法のリスクがベネフィットを上回る可能性が示唆され、今後の検討の余地を残している(表3)。JBR10⁸⁾やANITA⁹⁾などのシスプラチンを使った他の臨床試験個々のサブ解析では、I B期で術後化学療法が生存の延長に

寄与することが示されなかった。LACEの検討では、I A期についてはハザード比が1.41であり明らかに効果がないことが示され(図2)、I B期についてはその効果はボーダーラインともいえるべきもので、標準治療として推奨するにはインパクトが弱いとまとめられた¹⁰⁾。さらに、I B期非小細胞肺癌完全切除例のみを対象としたCALGB9633試験では、初回の中間解析(中間観察期間34ヵ月)で無再発生存(Disease Free Survival; DFS)と全生存

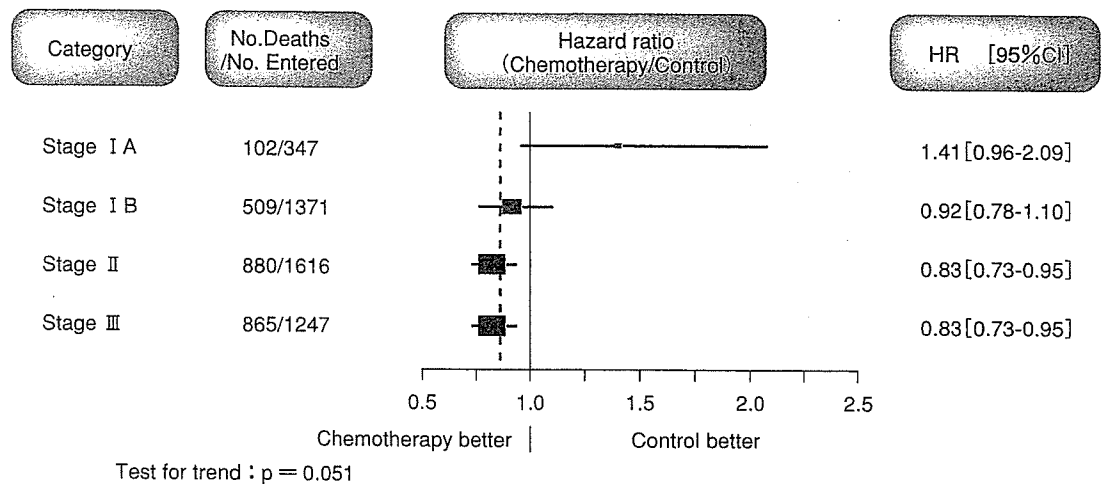


図2 LACE meta-analysis —術後化学療法の病期別効果— (文献10より引用)

	ALPI	IALT	JBR.10	CALGB	JLCRG	ANITA
Case No.	1,088	1,897	459	344	999	831
p-stage I	Non	Non	Non	Non? marginal	Positive (T2)	Non
p-stage II	Positive	Non	Positive			Positive
p-stage III A	Non	Positive				Positive

表3 早期NSCLCに対する術後化学療法—病期別にみた治療適応— (2003～2006)

ハザード比10% (任意境界) の改善を「positive」とした。

(Overall Survival ; OS) ともに統計学的有意差をもって改善したことが示されていたが、その後の中間解析 (中間観察期間57ヵ月) では、DFSの比較では有意差が認められた (化学療法群 : 89ヵ月 vs 手術単独群 : 52ヵ月) もの、OSでは有意差は認められず (化学療法群 : 95ヵ月 vs 手術単独群 : 78ヵ月)、主催したCALGBのグループはこの試験結果を「術後化学療法の有用性を証明できなかった (= negative study だった)」と報告した。ただし、術後補助化学療法の効果は、I B期でも特に、腫瘍が4cmよりも大きな患者の場合に有効であることを後解析により示している。一方、わが国で

行われた術後病期I期肺腺癌を対象とした経口フッ化ピリミジン製剤：テガフル・ウラシル配合剤 (UFT) による術後補助療法群と手術単独群の比較試験では、I期全体で補助療法群の5年生存率87.9%に対して手術単独群のそれは84.9%で、術後補助化学療法群の生存が有意に優れていた。特に、I B期症例では術後補助療法が5年生存率で11.4%の上乗せ効果があり、癌死のリスクを52%減じることが明らかになった⁶⁾。また、このことはUFTによる術後補助化学療法と経過観察を比較した6つの無作為試験 (症例数 : 2,003例) のメタアナリシス¹¹⁾、そして2000年以降発表された5つの

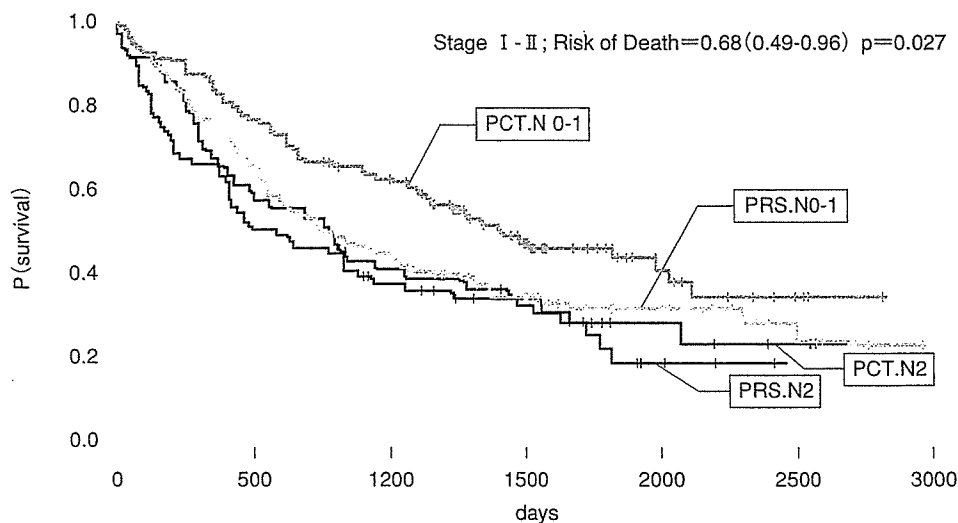


図3 FLOG studyの全生存—リンパ節転移によるサブ解析—
(Depierre A, et al. J Clin Oncol 2002; 24:7-53. より引用) (文献13より引用)

臨床第Ⅲ相試験の抄録ベースのメタアナリシスでもその有用性が証明された¹²⁾。これらの結果を総合すると、わが国においては術後病期 I B 期 NSCLC・完全切除例に対してUFTによる術後化学療法を行うことは標準的治療と位置付けられる。腫瘍径2cm以上のI A期に対するUFT、腫瘍径4cm以上のI B期に対するカルボプラチン、パクリタキセル併用療法(プラチナ製剤を含む併用療法)については、個々の症例でその適応を検討されるべきである。

上述のように、病理病期 I B-Ⅲ A 期非小細胞肺癌完全切除例に対する術後補助化学療法は5年生存率で8~15%の予後改善をもたらすことが複数の大規模臨床試験で明らかになった。多くの国々、治療グループではこれらの病期において術後化学療法が標準治療戦略に組み込まれてきている。わが国でも肺癌診療ガイドラインは推奨グレードが「C」から「B」にアップ・グレードされ、術後化学療法を行うことを推奨している。したがって、一般臨床

においては、個々の症例で毒性の問題も加味してこれらの結果を情報公開すべきである状況にある。化学療法のレジメンについては、EBMの観点から、I B期ではUFT、Ⅱ-Ⅲ A期ではプラチナベース併用化学療法、すなわち90年代に登場した第3世代の抗癌剤とプラチナ製剤との2剤併用療法が勧められよう。ただし、わが国におけるプラチナベース併用化学療法の補助療法としての投与量、投与スケジュール、治療開始時期など安全性が十分に証明されているとは言い難いので、実地医療では特に注意を払う必要がある。今後は、切除標本から生物学的(遺伝学的)情報を容易に得ることができることから、病期に加えて個々の特性に応じた治療レジメンの選択を考えていく方向性もあるであろう。

術前化学療法

I B-II期といった比較的早期の非小細胞肺癌症例に対する術前化学療法については、フランスの

stage	上乗せ率(%)
I A	4
I B	6
II A	7
II B	7
III A	6~7
III B	3~5

表4 局所限局NSCLCにおける術前化学療法病期別ベネフィット(文献16より引用)

グループの試験のサブセット解析からその有用性が示唆され(図3)¹³⁾、米国をはじめ、世界中でこれらの病期に対する術前化学療法の意義を問う試験が、手術単独をコントロール群として行われていた。しかし、スペインのNATCHトライアルを除く多くの比較試験が、症例集積不良と標準治療(コントロール治療群)の変更から中止された。SWOG9900(BLOT or knot)では、I B~III A(T3N1)期非小細胞肺癌例を対象にカルボプラチン+パクリタキセルの化学療法を術前に3コース行う群と行わない群(手術単独)との大規模な比較試験を行った¹⁴⁾。この試験は先述のような経緯から目標症例数600例の設定であったが、症例集積約5年で354例(うち不適格例19例)登録されて中止に至った。観察期間中央値は31ヵ月で、生存期間中央値; MSTは化学療法群で47ヵ月、手術単独群では40ヵ月で、両群間の生存期間に統計学的な有意差はない(p=0.32)ものの、先のフランスのグループ同様に化学療法群で生存期間の延長傾向を認めた。スカンジナビアの試験は、SWOG9900とほぼ同様の薬剤、デザインで行われ、6年間で90例(目標症例数; 280例)を集積し中止された。結果は、MSTが化学療法群で34.4ヵ月、手術単独群では22.5ヵ月で、両群間の生存期間に差は認められなかった¹⁵⁾。これらの試験は症例集積が不良なために中止となり、統計学的な正しい結論を導き出すことはできない。

最近90年代後半以降に公表された術前化学療法に関する論文あるいは発表抄録ベースのメタナリシスが公表された。この論文では、I~III期NSCLCを対象とした7つの臨床試験を集積してoverallのhazard ratioが0.82(95%CI; 0.69-0.97)であり、術前化学療法が統計学的に有意に生存延長に寄与することが示された(表4)¹⁶⁾。しかし、このメタナリシスのデータはそのまま鵜呑みにはできない。それぞれの試験の対象病期が1997年のTNM分類改訂前後で混在している。またJCOG9209のデータについては、実際の試験結果から手術単独群と術前化学療法群の生存曲線が全く重なっていたにもかかわらず、ハザード比の中央値は大きく左にシフトしており、あたかも術前化学療法が優勢にみてとれる結果として解釈されており再検討の余地を残している。さらには、このメタナリシスに用いられた多くの試験が試験デザインの変更などにより途中中止されたものであったり、コントロール群の成績が実地臨床に比し極端に悪いと思われる小規模試験であったりしている点から、必ずしもqualityの高い試験のメタナリシスとは言えず、その結論の過大評価は禁物である。なお、このメタナリシスを行ったMRC Clinical Trials Unitは、さらにこれらの研究の各症例の生データを集積してmeta-analysisを行い、近々論文発表する予定であり、その結果の解釈が待たれる。

いずれにしても、I B-III A期の一部の局所限局型非小細胞肺癌に対しては、現時点で術前化学療法が手術単独治療に比して生存の延長に寄与する傾向、可能性は示されているものの、それが標準治療として行うよう推奨するだけの根拠に乏しい。術前治療は依然「実験的治療」という認識のもとに今後臨床試験ベースでの検討を進めていくべきである。

おわりに

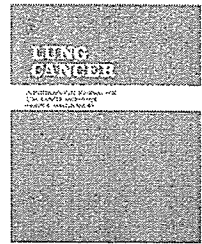
術後補助療法のエビデンスが高まるなか、術前

治療はどうなるのか？ 欧米では、術後補助化学療法標準化を受けて、術後 vs 術前の比較、あるいは術後補助療法の強化を念頭にカルボプラチン+パクリタキセルの標準的2剤併用レジメンにアバスチン (bevacizumab) のような新規薬剤を加えるか否かの比較が検討されている。前者については、先述したスペインのNATCHトライアルやフランスのIFCT0002試験が間もなく症例集積を終わろうとしており、その報告が待たれる。わが国では、各地で安全性確認を目的とした小規模の臨床試験

が行われている一方で、欧米で有用性が示されたプラチナ2剤併用療法とテガフル・ウラシル配合剤 (UFT) の大規模比較試験が行われている、あるいはその準備が進行している。今後は、これらの大規模試験を完遂させることも重要であるが、日本で開発された新規薬剤を組み入れた大規模試験、あるいは臨床検体や切除標本をもとにした個別化医療への先駆けとなるようなデザインの大規模臨床試験の実施が魅力的でもある。今後の動向に期待したい。

文 献

- 1) Goya T, Asamura H, Yoshimura H, et al. Prognosis of 6644 resected non-small cell lung cancers in Japan: a Japanese lung cancer registry study. *Lung Cancer* 2005; 50: 227-34.
- 2) Chemotherapy in non-small cell lung cancer: a meta-analysis using updated data on individual patients from 52 randomised clinical trials. Non-small Cell Lung Cancer Collaborative Group. *BMJ* 1995; 311: 899-909.
- 3) Keller SM, Adak S, Wagner H, et al. A randomized trial of postoperative adjuvant therapy in patients with completely resected stage II or III A non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med* 2000; 343: 1217-22.
- 4) Scagliotti GV, Fossati R, Torri V, et al. Randomized study of adjuvant chemotherapy for completely resected stage I, II, or III A non-small-cell Lung cancer. *J Natl Cancer Inst* 2003; 95: 1453-61.
- 5) The International Adjuvant Lung Cancer Trial Collaborative Group. Cisplatin-based adjuvant chemotherapy in patients with completely resected non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med* 2004; 350: 351-60.
- 6) Kato H, Ichinose Y, Ohta M, et al. A randomized trial of adjuvant chemotherapy with uracil-tegafur for adenocarcinoma of the lung. *N Engl J Med* 2004; 350: 1713-21.
- 7) Strauss GM, Hernden J, Maddaus MA, et al. Randomized Clinical Trial of adjuvant chemotherapy with paclitaxel and carboplatin following resection in Stage I b Non-Small Cell Lung Cancer (NSCLC): Report of cancer and leukemia group B (CALGB) protocol 9633. *J Clin Oncol* 2004; 22: 621.
- 8) Winton TL, Livingstan R, Johnson D, et al. A prospective randomized trial of adjuvant vinorelbine (VNR) and cisplatin (CIS) in completely resected stage I b and II non small cell lung cancer (NSCLC) Intergroup JBR 10. *N Engl J Med* 2005; 352: 2589-97.
- 9) Douillard JY, Rosell R, Lena MD, et al. Adjuvant vinorelbine plus cisplatin versus observation in patients with completely resected stage I B-III A non-small-cell lung cancer (Adjuvant Navelbine International Trialist Association [ANITA]): a randomized controlled trial. *Lancet Oncology*, Published online August 16, 2006 (<http://oncology.thelancet.com>) DOI:10.1016/S1473-2045(06)70804-X, *J Clin Oncol* 2005; 23: #7013.
- 10) Pignon JP, Tribodet H, Scagliotti GV, et al. Lung Adjuvant Cisplatin Evaluation (LACE): a pooled analysis of 5 randomized trials including 4584 patients. *J Clin Oncol* 2006; 24: #7008 (366s).
- 11) Hamada C, Ohta M, Wada H, et al. Survival benefit of oral UFT for adjuvant chemotherapy after complete resected non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 2004; 22: 617.
- 12) Hotta K, Matsuo K, Ueoka H, et al. Role of adjuvant chemotherapy in patients with resected non-small-cell lung cancer: reappraisal with a meta-analysis of randomized controlled trials. *J Clin Oncol* 2004; 22: 3860-7.
- 13) Depierre A, Milleron B, Moro D, et al. Preoperative chemotherapy followed by surgery compared with primary surgery in resectable stage I (except T1N0), II, and III A non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 2002; 20: 247-53.
- 14) Pisters K, Vallieres E, Bunn P, et al. SWOG9900; Phase III trial of surgery alone or surgery plus preoperative paclitaxel/carboplatin chemotherapy in early stage NSCLC: Preliminary Results. *J Clin Oncol* 2005; 23: #7012.
- 15) Sorensen J, Riska H, Ravn J, et al. Scandinavian phase III trial of neoadjuvant chemotherapy in NSCLC stages I B-III A/T3. *J Clin Oncol* 2005; 23: #7146.
- 16) Burdett S, Stewart LA, Ryzdzewska L. A systematic review and meta-analysis of the literature: Chemotherapy and surgery versus surgery alone in non-small cell lung cancer. *J Thorac Oncol* 2006; 1: 611-21.



Detection of occult tumor cells in lymph nodes from non-small cell lung cancer patients using reverse transcription-polymerase chain reaction for carcinoembryonic antigen mRNA with the evaluation of its sensitivity

Jun Maeda^a, Masayoshi Inoue^{a,*}, Meinoshin Okumura^a, Mitsunori Ohta^a, Masato Minami^a, Hiroyuki Shiono^a, Yasushi Shintani^a, Hikaru Matsuda^a, Nariaki Matsuura^b

^a Division of General Thoracic Surgery, Department of Surgery (E1), Osaka University Graduate School of Medicine, 2-2 Yamadaoka, Suita, Osaka 565-0871 Japan

^b Department of Molecular Pathology, School of Allied Health Science, Osaka University Faculty of Medicine, Suita, Osaka, Japan

Received 29 August 2005; received in revised form 30 November 2005; accepted 5 December 2005

KEYWORDS

Micrometastasis;
Real-time
quantitative reverse
transcription-
polymerase chain
reaction;
Carcinoembryonic
antigen;
Occult tumor cell;
Lung cancer

Summary We evaluated the usefulness of a real-time quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) method for detecting occult tumor cells in histologically malignant-negative lymph nodes resected from patients with non-small cell lung cancer. First, we examined the relationship between tumor cell number and carcinoembryonic antigen (CEA) mRNA copy number using a PCR method with a cancer cell line (A549) in a serial dilution study. Next, we evaluated the relationship between nodal metastatic area size and CEA mRNA copy number using lymph nodes with histologically proven metastasis in a serial slice study. On the basis of those results, we performed RT-PCR analyses with 28 primary tumors and 211 lymph nodes from 28 patients who underwent a lobectomy with systematic node dissection. Our results in the serial dilution study showed that the detectable limitation by quantitative RT-PCR was 25–100 neoplastic cells and 20–100 CEA mRNA copy numbers. In the serial slice study, we found a correlation between CEA mRNA copy number and nodal metastatic area. In the clinical samples, amplification of CEA mRNA was obtained with all 28 primary tumors and 13 of the lymph nodes with metastasis shown by hematoxylin–eosin staining. Furthermore, 52 (25%) of 211 histologically negative lymph nodes and the specimens from 14 (64%) of the 22 pN0 patients revealed a significant level of CEA mRNA. These results indicate that micrometastases, which

* Corresponding author. Tel.: +81 6 6879 3152; fax: +81 6 6879 3164.
E-mail address: masa@surg1.med.osaka-u.ac.jp (M. Inoue).

are not detectable with conventional examinations, can be detected by the present method of RT-PCR for CEA mRNA in a proportion of patients with resected pN0 non-small cell lung cancer. © 2006 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Lung cancer has been the leading cause of death by malignancy in Japan since 1998 and over 55,000 patients have died in recent years. In the United States, lung cancer is also the most common cause of death and 163,510 deaths, more than those caused by breast, colorectal, and prostate cancers combined, are expected in 2005 [1]. Despite improvements in diagnostic and therapeutic methods, the overall 5-year survival rate of patients with lung cancer is estimated to be approximately 15%. One-third of patients treated with a complete resection and node dissection are reported to have experienced recurrence and have a 5-year survival rate of 57–71%, even in p-stage I, the so-called “early stage” [2]. According to results over the past decade in our institute, locoregional failure was found in 24% of cases of p-stage I lung cancer with postoperative recurrence (unpublished data). These results suggest the possible presence of occult tumor cells in the lymph nodes and elsewhere at the time of surgery. Conventional histopathological diagnosis for node involvement relies on the detection of malignant cells in several sections taken from the central part of the node; therefore, the presence of a small number of cancer cells could be misdiagnosed as no metastasis in some samples.

Several studies have been conducted to detect micrometastases in lung cancer specimens and immunohistochemistry has been shown to be a powerful detection method. An abnormal expression of cytokeratin or p53 has been reported to show micrometastases in lymph nodes, which is important because patients with positive expression in the nodes show poorer outcomes as compared to those with negative expression [3,4]. However, another study revealed that the detection of nodal micrometastases by immunohistochemical analysis had no clinical impact on survival, due to instances of false positive staining [5].

Another technique used to detect occult tumor cells in lymph nodes is a molecular method using a reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) assay. The RT-PCR assay for carcinoembryonic antigen (CEA) mRNA has been widely used to detect micrometastases in resected lymph nodes from patients with esophageal, gastric, and colorectal carcinomas [6–8], and each of those reports noted the superiority of RT-PCR to predict patient survival as compared to immunohistochemical analyses. However, the efficacy and accuracy of such RT-PCR techniques to survey nodal micrometastases in patients with lung cancer remain unknown; the Cancer and Leukemia Group B trial 9761 is the only study that has shown the advantages of quantitative RT-PCR using CEA mRNA [9]. In the present study, to clarify the usefulness of real-time quantitative RT-PCR for CEA mRNA as a tool to detect occult tumor cells in lymph nodes resected from patients with non-small cell lung cancer, we evaluated sensitivity in detail. Our RT-PCR method was able to detect CEA mRNA both *in vitro* and clinically and also indicated the possible presence of occult tumor cells in pathologically negative lymph nodes.

2. Materials and methods

2.1. Patients

Fresh surgical primary tumor and lymph node specimens were collected from 28 consecutive patients who underwent a lobectomy with systematic hilar and mediastinal node dissection between July 2001 and May 2004 at Osaka University Hospital. Patient characteristics are shown in Table 1. None received induction chemotherapy or radiation therapy before the operation. The present study was performed with institutional review board approval and written informed consent was preoperatively obtained from all of the patients. Histopathological diagnosis for all dissected lymph nodes was made with hematoxylin–eosin (H–E) staining of sections from the central portion of formalin-fixed, paraffin-embedded lymph nodes by the Pathology Division of Osaka University Hospital.

2.2. Surgical specimens

Each lymph node was cut in half immediately after resection in the operation room with a 14G needle under sterile conditions to prevent RNA cross-contamination. One half was snap-frozen within 10 min in liquid nitrogen and stored at -80°C until molecular analysis. The other half was fixed with 10% buffered formalin and embedded in paraffin for routine H–E staining. Each primary tumor was also incised in the operation room and stored at -80°C for RNA extraction.

2.3. Detection sensitivity of real-time quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction assay for CEA mRNA using a human pulmonary adenocarcinoma cell line (serial dilution study)

A human pulmonary adenocarcinoma cell line (A549) was obtained from the Japanese Cancer Research Resources Bank

Table 1 Patient characteristics

Age	40–83 years old (average: 65 years)	
Sex	Male	18
	Female	10
Histology	Adenocarcinoma	21
	Squamous cell carcinoma	5
	Adenosquamous cell carcinoma	2
p-stage	I (N0)	20
	IIA (N1)	2
	IIB (T3N0)	1
	IIIA (N2)	4
	IIIB (T4N0)	1

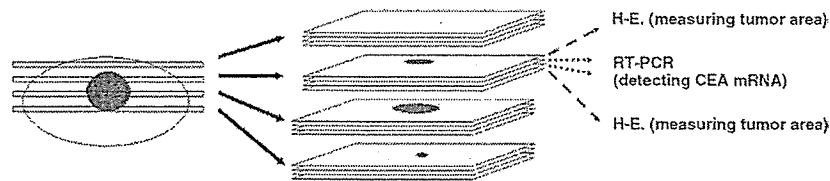


Fig. 1 Schematic representation of the serial section study using a metastatic node to evaluate the relationship between metastatic area size and the copy numbers by reverse transcription-polymerase chain reaction assay.

and cultured in Dulbecco's modified Eagle's Medium (DMEM; Nihon-seiyaku, Tokyo, Japan) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS; Dainippon Pharmaceutical Co., Tokyo, Japan), 50 units/ml of penicillin, and 50 μ g/ml of streptomycin (Life Technologies, Inc., Frederick, MD) in a humidified atmosphere of 5% CO₂. The cultured A549 cells were quantitated with a hemocytometer and diluted to each test concentration (2.5, 25, 250, and 2500 cells/well) for evaluation of the sensitivity of RT-PCR for CEA mRNA in vitro.

2.4. Serial slice examination of metastatic lymph nodes (serial slice study)

Frozen lymph nodes embedded in Tissue-TekTM compound (SAKURA, Tokyo, Japan) were analyzed in serial sections to evaluate the relationship between the size of the metastatic area and the mRNA copy number using real-time quantitative RT-PCR (Fig. 1). One metastatic node was sliced into several parts as shown in Fig. 1. The first and final sections of each part, 10 μ m in size, were stained with H-E for microscopic examination and the total area occupied by cancer cells was measured. Total RNA was then extracted from the second and third 10- μ m sections of each part and subjected to real-time quantitative RT-PCR to evaluate the sensitivity of CEA mRNA clinically.

2.5. RNA extraction

Total RNA was isolated from the lymph node and tumor specimens (each 30 mg) using a standard spin column-based RNeasy Mini Kit (Qiagen, Tokyo, Japan) with RNase-free DNase used according to the manufacturer's protocol. The total amount of RNA was quantitated by OD₂₆₀ measurements using spectrophotometry and then diluted with RNase-free water to a concentration of 300 ng/ μ l. Purity was ascertained with an OD₂₆₀/OD₂₈₀ ratio of greater than 1.8.

2.6. Real-time quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction assay for CEA mRNA

Quantification of relative mRNA abundance was carried out using a real-time fluorescence detection method with TaqMan chemistry. Emissions from the released reporter dye were monitored with an ABI Prism 7700 Sequence Detection System (Perkin-Elmer, Wellesley, MA). The following oligonucleotides were used for a real-time quantitative RT-PCR: forward CEA primer, 5'-AGACAATCACAGTCTCTGCGGA-3'; reverse CEA primer, 5'-ATCCTTGTCCTCCAC- GGGTT-3';

CEA probe, 5'-FAM-GCCCAAGCCCTCCATCTCCAGCAACAACCTC-TAMRA-3'.

Amplification by PCR was performed using a 96-well optical tray and caps in a final reaction volume of 50 μ l, including 2 μ l (600 ng) of RNA. The reaction mixture consisted of 300 nM of each primer, 200 nM of the probe, and TaqMan One-Step RT-PCR Master Mix Reagents (Roche, Basel, Swiss), according to the manufacturer's protocol. The RT-PCR cycle parameters were as follows: 48 °C for 30 min and 95 °C for 10 min, followed by 40 cycles of 95 °C for 15 s and 60 °C for 1 min. Each RT-PCR assay was performed in triplicate with added standard CEA mRNA of 20, 2 \times 10², 2 \times 10³, 2 \times 10⁴, 2 \times 10⁵, 2 \times 10⁶, and 2 \times 10⁷ copies. The expression levels of CEA mRNA were quantified from a standard curve by inserting the standard CEA mRNA threshold. Standard CEA mRNA was synthesized using a Riboprobe in vitro Transcription System (Promega, Madison, WI), then cloned into pBluescript (Stratagene, LaJolla, CA). As an internal control, β -actin was concurrently amplified with CEA by the RT-PCR assay used in this study (data not shown).

3. Results

3.1. Sensitivity of real-time quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction assay for CEA mRNA (serial dilution study)

We first attempted to establish the sensitivity of a real-time quantitative RT-PCR technique using a known quantity of synthesized standard CEA mRNA. Standard curves (correlation coefficient = 0.999) were obtained from serially diluted cloned CEA mRNA (Fig. 2a). Fig. 2b shows the number of CEA mRNA copies amplified from the different numbers of A549 cells in the present experiment. The number of copies from 2500 cells and 250 cells were 1250 and 180, respectively, while tests with 25 and 2.5 cells resulted in poor amplification. These findings indicate that the limitations for detecting lung cancer cells and extracted CEA mRNA copies by the present real-time quantitative RT-PCR method were 25–100 cells and 20–100 copies, respectively.

3.2. Relationship between nodal metastatic area and CEA mRNA copy number by real-time quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction assay (serial slice study)

The area occupied by neoplastic cells and the CEA mRNA copy number detected by real-time quantitative RT-PCR were examined in serial sections histologically diagnosed as metastasis-positive. As shown in Fig. 3, the CEA mRNA

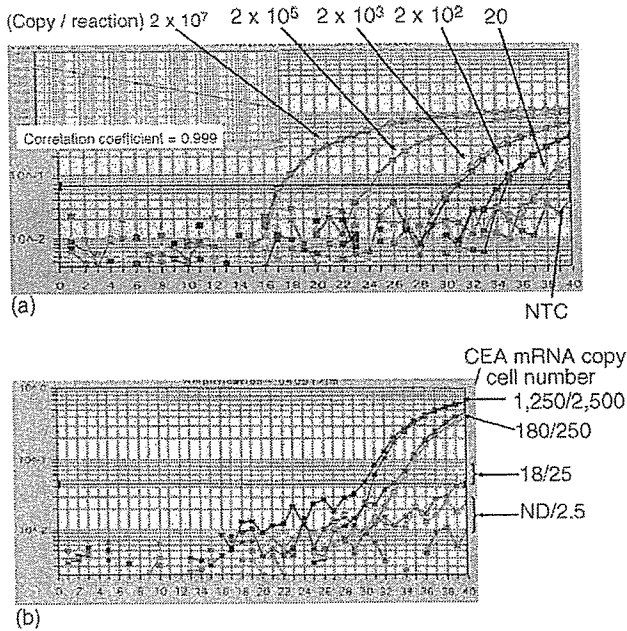


Fig. 2 Results of serial dilution study: (a) sensitivity of a quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction assay using a known number of synthesized standard CEA mRNA copies and (b) number of CEA mRNA copies amplified from various numbers of A549 cells. The limitations to detect lung cancer cells and extracted CEA mRNA copies were 25–100 cells and 20–100 copies, respectively. NTC: not template control; ND: not detectable.

copy number was correlated with the total area occupied by tumor cells. A neoplastic area of 0.5 mm², that is 5 × 10⁶ μm³, was detected with RT-PCR for CEA mRNA. The slices without tumor cells, two of the seven sections outside of the metastatic area, showed no amplification of CEA mRNA (Fig. 3).

3.3. Detection of occult tumor cells in lymph nodes from patients with non-small cell lung cancer using real-time quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction assay for CEA mRNA

We performed quantitative RT-PCR analysis of primary tumor and lymph node specimens from 28 patients. Fig. 4a shows

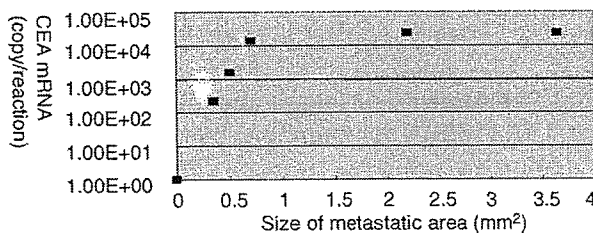


Fig. 3 Results of serial section study using a metastatic lymph node showing a correlation between CEA mRNA copy number and size of tumor cell area. The slices without tumor cell area showed no amplification of CEA mRNA.

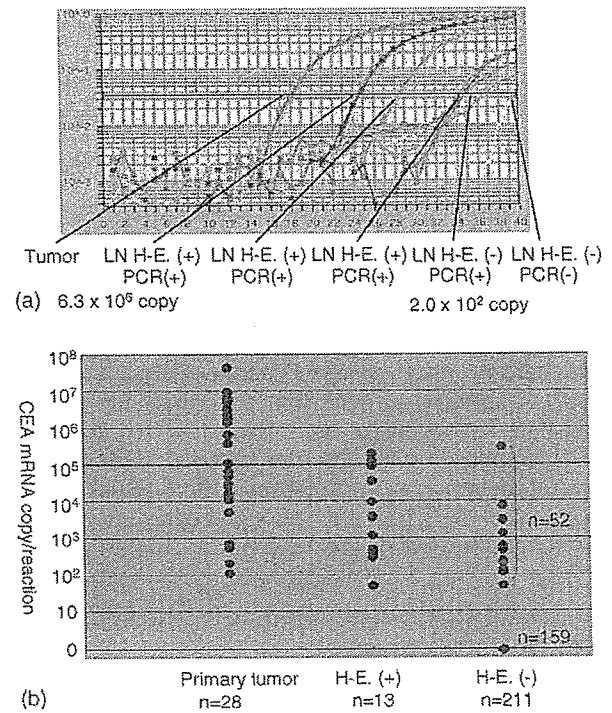


Fig. 4 (a) Representative reverse transcription-polymerase chain reaction assay results showing CEA mRNA amplification plots for samples from a patient with non-small cell lung cancer. Histologically metastatic nodes revealed clear amplification with fewer polymerase chain reaction cycles as compared to histologically malignant-negative lymph nodes. (b) Copy number/reaction ratio for CEA mRNA from primary tumors and histopathological metastatic or non-metastatic lymph nodes from all patients. There were 52 (25%) histologically malignant-negative nodes that revealed positive amplification, suggesting the presence of occult tumor cells.

representative RT-PCR amplification plots of specimens from a patient with non-small cell lung cancer. Histologically metastatic lymph nodes revealed clear amplification with fewer PCR cycles as compared to histologically malignant-negative nodes. The level of amplification of metastatic nodes varied, although they consistently showed significantly lower levels than the primary tumor specimens.

Overall, CEA mRNA was detected in all 28 primary tumors and all 13 lymph nodes shown to be metastasis-positive by H-E staining. Of the 211 histologically malignant-negative lymph nodes, 52 (25%) were positive for CEA mRNA. Fig. 4b shows the copy number/reaction ratio for CEA mRNA in primary tumors and histologically metastatic or non-metastatic lymph nodes from all of the patients. There were 35 CEA mRNA-positive, but histologically malignant-negative, lymph nodes among the specimens from 14 (64%) of the 22 histologically proven N0 patients: one positive node from each of five patients, two positive nodes from each of six patients, three positive nodes from each of one patients, five positive nodes from one patient, and 10 positive nodes from one patient. The prevalence of CEA mRNA-positive lymph nodes in histologically N0 patients is summarized in Table 2. Occult tumor cells were detected in both hilar and mediastinal nodes. Stage alterations, as predicted by molecular diagnosis using real-time quantitative RT-PCR, are shown in

Table 2 Prevalence of CEA mRNA-positive lymph nodes according to location of the primary lesion in patients without metastatic nodes using conventional histopathology methods

Station no.	RUL	LUL	RMLL	LLL
1	1/1		0/1	
2	2/3		0/3	
3	2/7		0/3	
4	2/6		1/3	1/4
5		1/4		0/4
6				0/6
7	4/7	0/1	3/6	2/9
8	0/1		0/1	
9		0/1		1/2
10	1/5	0/1		0/2
11	2/7	0/3	0/1	1/3
12	6/10	2/5	1/4	2/6

Station no.: Lymph node station according to Naruke's numbering system [25]; RUL, right upper lobe; LUL, left upper lobe; RMLL, right middle-lower lobe; LLL, left lower lobe. The number of CEA mRNA-positive lymph nodes/the number of dissected lymph nodes.

Table 3 Stage alteration by real-time quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction assay for CEA mRNA

p-stage		m-stage	
I (N0)	20	I (N0)	8
II (N1)			3
IIIA (N2)			9
IIB (T3N0)	1	IIIA (T3N1)	1
IIIB (T4N0)	1	IIIB (T4N2)	1

p-stage: pathological staging using conventional microscopic examination with hematoxylin-eosin staining. m-stage: molecular staging using real-time quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction method for CEA mRNA.

Table 3. Thirteen patients (59%) showed a possibility of up-staging.

As a control, CEA mRNA was not detected in mediastinal lymph nodes obtained from three patients with a thymoma.

4. Discussion

In the present study, we first evaluated the sensitivity of molecular detection for nodal metastases using a cancer cell line and serial sections of metastatic nodes. To establish negative controls, we demonstrated that the slices without tumor cells in the serial slice study and lymph nodes obtained from thymoma patients showed no amplification of CEA mRNA. Those results revealed a correlation between the number of tumor cells and the level of detection using a quantitative RT-PCR assay for CEA mRNA, which indicated the reliability of our technique. On the basis of those findings, we applied our molecular diagnosis method to clinical samples from patients with non-small cell lung cancer. The CEA mRNA was detected by RT-PCR in all primary tumors and all histologically positive lymph nodes, regardless of clinical

staging and histological type, as well as in 25% of the histologically malignant-negative lymph nodes. Thus, there were no false negative results in the clinical setting. In addition, we discovered CEA mRNA in histologically malignant-negative nodes from 64% of the pN0 patients. These results are similar to those reported in the Cancer and Leukemia Group B Trial 9761, which showed a 57% up-staging rate [9]. Recently, the effectiveness of postoperative adjuvant chemotherapy has been reported in completely resected non-small cell cancer cases [10,11]. Thus, molecular diagnosis of node involvement might be useful for selecting suitable candidates from among pN0 patients to receive postoperative treatment.

Optical detection of metastases using histological methods, including immunohistochemistry (IHC), can indicate the presence of actual tumor cells; however, it needs a considerable number of slices and much more effort to detect micrometastasis. Regarding the use of IHC to detect micrometastases, cytokeratin, p53, and Ber-Ep-4 antibodies were tested in previous studies [12-14]. Immunohistochemistry using the cytokeratin antibody, especially the cocktail antibody of AE1/3, was reported to be useful for predicting patient prognosis [3,4,12], while other studies found that IHC was not able to serve as a prognostic predictor [5,13]. Ber-EP-4 was also used as an antibody with IHC to detect micrometastases because its presence may be a poor prognostic factor [14]. On the other hand, molecular biological methods cannot reveal actual tumor cells, though PCR analyses have a high sensitivity to detect small numbers. When using a highly sensitive molecular technique such as RT-PCR, the possibility of false positive results should be considered, although other studies have shown the advantages of molecular methods as compared to IHC [5]. For esophageal and breast carcinomas, a combination analysis with IHC and RT-PCR is recommended to avoid false negative results [15,16]. We considered that our results correlating amplification of CEA mRNA to the number of cancer cells without false positive detection indicate the reliability and availability of the present real-time quantitative RT-PCR method as a tool for detecting nodal micrometastases.

We previously used quantitative RT-PCR methods to detect occult tumor cells using cytokeratin-19 (CK19), as well as vascular endothelial growth factor-C (VEGF-C) concurrently with CEA, because they are markers related to nodal metastasis [17-22]. Detection of CK19 mRNA by RT-PCR was shown to be non-specific [17,18], while another study found that detection of CK19 using a nested PCR technique with agarose gel and RNA extracted from nodes cut in half was correlated to the risk of rapid recurrence [19]. In our preliminary experiment using a quantitative RT-PCR method with a limited quantity (30mg) of lymph node sample and extracted RNA (600ng), CK19 mRNA showed non-specific amplification in most samples, regardless of conventional histopathological findings (data not shown). These results suggest that a very specific PCR method, such as a nested technique, and a larger sample amount may be required for the accurate detection of CK19 mRNA in lymph nodes. Furthermore, because VEGF-C has been reported to be a useful molecule for predicting the presence of lymph node metastasis [20-22], we also attempted to detect VEGF-C mRNA in tumor samples. However, the detection rate was less than 50% in primary tumors (data

not shown), which led us to conclude that VEGF-C is not a suitable marker for detection of lymph node metastases.

The CEA mRNA was detected by real-time quantitative RT-PCR in lymph nodes from 14 (64%) of the present patients without metastatic nodes using conventional histopathology with H-E staining. None of those patients, who are being followed at the time of this writing, have shown evidence of local or distant recurrence. Such detection of occult cancer cells in pN0 lymph nodes using RT-PCR was previously reported for colorectal cancer [23] and molecular detection of micrometastases has been recently applied to cases with preoperative nodal staging using endoscopic ultrasound-guided needle aspiration in patients with lung cancer [24]. However, it is still unclear whether such micrometastasis causes locoregional recurrence during the clinical course or contributes to patient outcome. Additional long-term survival analyses with larger samples are necessary to clarify the clinical impact of detection of micrometastases with a molecular technique.

References

- [1] Jemal A, Murray T, Ward E, Samuels A, Tiwari RC, Ghafoor A, et al. Cancer statistics, 2005. *CA Cancer J Clin* 2005;55:10–30.
- [2] Smythe WR, American College of Chest Physicians. Treatment of Stage I non-small cell lung carcinoma. *Chest* 2003;123:181–7.
- [3] Gu CD, Osaki T, Oyama T, Inoue M, Kodate M, Dobashi K, et al. Detection of micrometastatic tumor cells in pN0 lymph nodes of patients with completely resected non-small cell lung cancer: impact on recurrence and survival. *Ann Surg* 2002;235:133–9.
- [4] Wu J, Ohta Y, Minato H, Tsunozuka Y, Oda M, Watanabe Y, et al. Nodal occult metastasis in patients with peripheral lung adenocarcinoma of 2.0 cm or less in diameter. *Ann Thorac Surg* 2001;71:1772–7.
- [5] Hashimoto T, Kobayashi Y, Ishikawa Y, Tsuchiya S, Okumura S, Nakagawa K, et al. Prognostic value of genetically diagnosed lymph node micrometastasis in non-small cell lung carcinoma cases. *Cancer Res* 2000;60:6472–8.
- [6] Kijima F, Natsugoe S, Takao S, Aridome K, Baba M, Yoshifumi M, et al. Detection and clinical significance of lymph node micrometastasis determined by reverse transcription-polymerase chain reaction in patients with esophageal carcinoma. *Oncology* 2000;58:38–44.
- [7] Kubota K, Nakanishi H, Hiki N, Shimizu N, Tsuji E, Yamaguchi H, et al. Quantitative detection of micrometastases in the lymph nodes of gastric cancer patients with real-time RT-PCR: a comparative study with immunohistochemistry. *Int J Cancer* 2003;105:136–43.
- [8] Noura S, Yamamoto H, Ohnishi T, Masuda N, Matsumoto T, Takayama O, et al. Comparative detection of lymph node micrometastases of stage II colorectal cancer by reverse transcriptase polymerase chain reaction and immunohistochemistry. *J Clin Oncol* 2002;20:4232–41.
- [9] D'Conha J, Corfits AL, Herndon 2nd JE, Kern JA, Kohman LJ, Patterson GA, et al. Molecular staging of lung cancer: real-time polymerase chain reaction estimation of lymph node micrometastatic tumor cell burden in stage I non-small cell lung cancer—preliminary results of Cancer and Leukemia Group B Trial 9761. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2002;123:484–91.
- [10] Arriagada R, Bergman B, Dunant A, Le Chevalier T, Pignon JP, Vansteenkiste J, International Adjuvant Lung Cancer Trial Collaborative Group. Cisplatin-based adjuvant chemotherapy in patients with completely resected non-small-cell lung cancer. *N Eng J Med* 2004;350:351–60.
- [11] Kato H, Ichinose Y, Ohta M, Hata E, Tsubota N, Tada H, et al., Ohta M, Japan Lung Cancer Research Group on Post surgical Adjuvant Chemotherapy. A randomized trial of adjuvant chemotherapy with uracil–tegafur for adenocarcinoma of the lung. *N Eng J Med* 2004;350:1713–21.
- [12] Osaki T, Oyama T, Gu CD, Yamashita T, So T, Takenoyama M, et al. Prognostic impact of micrometastatic tumor cells in the lymph nodes and bone marrow of patients with completely resected stage I non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 2002;20:2930–6.
- [13] Goldstein NS, Mani A, Chmielewski G, Welsh R, Pursel S. Immunohistochemically detected micrometastases in peribronchial and mediastinal lymph nodes from patients with T1, N0, M0 pulmonary adenocarcinomas. *Am J Surg Pathol* 2000;24:274–9.
- [14] Izbicki JR, Passlick B, Hosch SB, Kubuschock B, Schneider C, Busch C, et al. Mode of spread in the early phase of lymphatic metastasis in non-small-cell lung cancer: significance of nodal micrometastasis. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1996;112:623–30.
- [15] Nagatani S, Shimada Y, Li Z, Kaganoi J, Kan T, Maeda M, et al. Validation of intra-operative detection of paratracheal lymph node metastasis using real-time RT-PCR targeting esophageal squamous cell carcinoma. *Jpn J Clin Oncol* 2003;33:549–55.
- [16] Ishida M, Kitamura K, Kinoshita J, Sasaki M, Kuwahara H, Sugimachi K. Detection of micrometastasis in the sentinel lymph nodes in breast cancer. *Surgery* 2002;131(1 (Suppl.)):S211–6.
- [17] Benlloch S, Galbis J, Alenda C, Peiró E, Rodriguez-Paniagua J, Sanchez-Paya J, et al. P-649 Role of CEA, PLUNC and CK19 mRNA expression in lymph nodes from resected stage I non-small cell lung cancer (NSCLC) patients as markers of occult micrometastasis: a pilot study. *Lung Cancer* 2005;49(2 (Suppl.)):S289.
- [18] Krismann M, Todt B, Schroder J, Gareis D, Muller KM, Seeber S, et al. Low specificity of cytokeratin 19 reverse transcriptase-polymerase chain reaction analyses for detection of hematogenous lung cancer dissemination. *J Clin Oncol* 1995;13:2769–75.
- [19] Le Pimpec-Barthes F, Danel C, Lacave R, Ricci S, Bry X, Lancelin F, et al. Association of CK19 mRNA detection of occult cancer cells in mediastinal lymph nodes in non-small cell lung carcinoma and high risk of early recurrence. *Eur J Cancer* 2005;41:306–12.
- [20] Niki T, Iba S, Tokunou M, Yamada T, Matsuno Y, Hirohashi S. Expression of vascular endothelial growth factors A, B, C, and D and their relationships to lymph node status in lung adenocarcinoma. *Clin Cancer Res* 2000;6:2431–9.
- [21] Tamura M, Ohta Y. Serum vascular endothelial growth factor-C level in patients with primary non-small cell lung carcinoma: a possible diagnostic tool for lymph node metastasis. *Cancer* 2003;98:1217–22.
- [22] Ohta Y, Endo Y, Tanaka M, Shimizu J, Oda M, Hayashi Y, et al. Significance of vascular endothelial growth factor messenger RNA expression in primary lung cancer. *Clin Cancer Res* 1996;2:1411–6.
- [23] Futamura M, Takagi Y, Koumura H, Kida H, Tanemura H, Shimokawa K, et al. Spread of colorectal cancer micrometastases in regional lymph nodes by reverse transcriptase-polymerase chain reactions for carcinoembryonic antigen and cytokeratin 20. *J Surg Oncol* 1998;68:34–40.
- [24] Wallace MB, Block MI, Gillanders W, Ravenel J, Hoffman BJ, Reed CE, et al. Accurate molecular detection of non-small cell lung cancer metastases in mediastinal lymph nodes sampled by endoscopic ultrasound-guided needle aspiration. *Chest* 2005;127:430–7.
- [25] Naruke T, Suemasu K, Ishikawa S. Lymph node mapping and curability at various level of metastasis in resected lung cancer. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1978;76:832–9.