

厚生労働科学研究委託費（医療技術実用化総合研究事業）  
委託業務成果報告書（業務項目）

試験の推進、ラジオ波焼灼療法後の病理診断

担当責任者 津田 均

防衛医科大学校 病態病理学講座 教授

担当責任者 吉田 正行

独立行政法人 国立がん研究センター中央病院 病理・臨床検査科 医員

研究要旨

早期乳がんに対するイメージガイド下ラジオ波熱焼灼療法の標準化に係る多施設共同試験（Radiofrequency ablation therapy for early breast cancer as local therapy: RAFAELO study）において、RFA 施行後約 6 か月後に腫瘍部分からの針生検を実施し、HE 所見と NADH-diaphorase 染色所見について検討を行った。先行の切除標本、および RFA 後非切除のプロトコール研究での針生検標本による組織学的効果判定基準が、本検討でも適応可能であり、HE と NADH-diaphorase 染色併用が有用と考えられた。

本検討では、放射線治療による乳管上皮の反応性異型が高頻度にみられることが明らかとなり、腫瘍の乳管内成分遺残との鑑別が問題となった。このような例は、本多施設共同研究における病理診断上のピットフォールになる可能性があり、今後の症例蓄積と詳細な検討を行っていく必要があると考えられた。

A. 研究目的

早期乳がんに対するイメージガイド下ラジオ波熱焼灼療法の標準化に係る多施設共同試験では、定期的フォローアップに用いられるコア生検標本の病理学的効果判定の役割が重要となる。先行研究としてこれまでに、RFA 施行直後の手術検体に対する病理学的検討と nicotinamide adenine dinucleotide (NADH)-diaphorase 染色の併用により、RFA 治療効果の病理学的判定が可能であることを示してきた。また、早期乳癌に対するラジオ波焼灼療法（RFA）後、非切除追跡の安全性、有効性を検証するプロトコール研究では、RFA 後3ヵ月ないし12ヵ月後の針生検

標本においても、同手法を用いて治療効果判定が安全に実施可能であることを示してきた。

本年度は、RAFAELO study に当院で登録された症例の針生検標本に対して病理学的効果の判定を行い、従前の判定基準を用いて安全に判定可能であるか検証を行った。また、非切除針生検を用いた評価による追跡の際に、病理診断上で陥り得るピットフォールについても検討した。

B. 研究方法

平成 25 年～26 年に RFA 施行後フォローアップ生検が行われた 23 症例を対象とした。これらの腫瘍は、超音波検査で腫瘍径

15mm 以下の限局型乳癌であり、全身麻酔下にセンチネルリンパ節生検(SLNB)を施行後、Cool-tip RF システムを用いて RFA を施行した。RFA 施行後放射線療法を施行し、放射線療法完了から3か月後、すなわち RFA 施行後約6か月後(5-7か月後)に超音波ガイド下吸引式コア針生検による RFA 術後評価を行った。

腫瘍中心部と辺縁部各々5本前後の生検標本(バコラ、マンモトーム)を採取し、各々の生検標本を全て OCT compound に埋め込みクライオスタットを用いて凍結切片の HE 染色標本と共に未染標本を作製し、後者は後日 NADH-diaphorase 染色に供した。NADH 染色は、切片を 0.8 mg/mL nitro blue tetrazolium、0.5 mg/mL 還元型 NADH (以上 Sigma)、0.05M Tris-HCl buffer (pH 7.4) 中で 37℃ 1 時間反応させ、NADH-diaphorase を発色させて 30 分室温でホルマリン固定し、2 分間水洗の後 NADH-diaphorase 活性を組織切片上で検討した。凍結切片作製後、すべての組織はホルマリン固定され、通常通り HE 染色に供された(戻し標本)。

HE レベルでの RFA 効果は、従前の手術標本および針生検標本での検討にて確立された基準を適用して判定された。上皮細胞の熱凝固変性像として、1. 細胞構造の融解、不明瞭化、2. 核クロマチン粗造化・濃縮、3. 細胞・核の線条化、間質の変化として、1. 線維構造消失、好酸性変性等の膠原線維の変化と 2. 線維芽細胞の熱変性像を判定した。これらの基準を適用し、病理医2名で生検標本 23例の病理学的治療効果評価を行った。

(倫理面への配慮)

研究計画は、施設内倫理委員会の承認を受けて行った。患者に対しては、研究内容を口頭と文書によって十分に説明したのち文書による同意を取得した。

### C. 研究結果

23名の患者年齢中央値は53歳、平均腫瘍径は10.6mmであった。RFA前の病理組織型は、浸潤性乳管癌17(硬癌14、乳頭腺管癌3)、非浸潤性乳管癌6であった。22例はホルモン受容体陽性・HER2陰性、1例はホルモン受容体陰性、HER2陽性であった。SLNBは、20例が陰性、3例が陽性であった。術後放射線療法は、全23例に実施された。

針生検では、腫瘍辺縁部平均6回、中央部で平均4回穿刺を施行した。全例で生存可能な腫瘍細胞の残存を認めなかった。凝固壊死による変性所見が強く腫瘍自体の組織構築の確認が困難であった1例を除き、22例では凝固壊死に陥った腫瘍組織が認められ、NADH染色あるいは戻し標本による評価が可能であった。また種々の程度に肉芽組織、線維性瘢痕組織が形成されていた。また液状変性が全例に認められた。

RAFAELO study 前の非切除プロトコール研究では、RFA後3か月の針生検で17例中2例(13%)において、乳管上皮の強い異型を認め、乳房の追加切除が実施され、最終的に反応性異型と判断された。本検討では、7例に乳管内の異型上皮が認められたが、術前の針生検標本との比較、異型上皮の分布の仕方、構造異型の程度、および以前の針生検での反応性異型像との比較を行い、最終的に反応性異型と判断した。いずれの症例も現在

まで再発を認めていない。

上述のように反応性異型と判断した症例について以下に記載する。

症例は50代で、左乳房の浸潤性乳管癌(硬癌、核グレード1)、RFA施行後5か月で、定期フォローアップのコア生検を受けた。辺縁部において、肉芽組織の混在した線維性間質内に異型細胞集団を複数個所に認めた。異型細胞周囲に筋上皮の介在が比較的明瞭であり、乳管内異型上皮であることの判断は容易であった。核腫大、核濃縮などがみられ、NADH-diaphorase 染色は陽性であり、viable な腫瘍の遺残あるいは反応性異型が鑑別の対象となった。乳管内癌とする異型細胞の均一性、あるいは高度の異型を有しておらず、反応性異型と判断された。

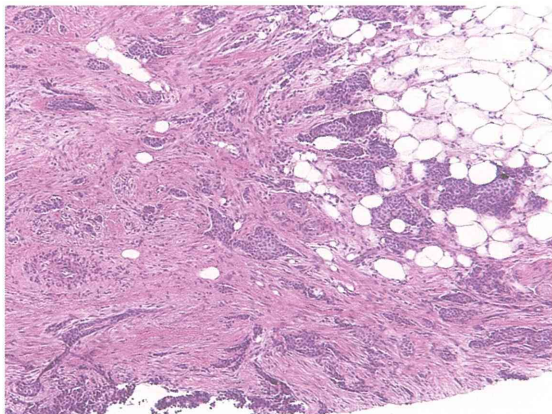


図1. 術前針生検標本 (HE)

線維性間質の増生を伴いながら脂肪組織まで浸潤する浸潤性乳管癌(硬癌)を認める。

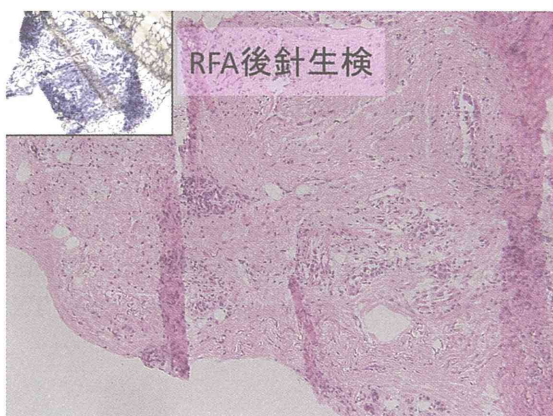


図2. RFA後針生検標本(凍結 HE および NADH 標本)

RFA5か月後の状態。線維性間質内の乳管ないし小葉内に異型上皮を認め、同部位はNADH陽性(枠内)を示すことから viable である。

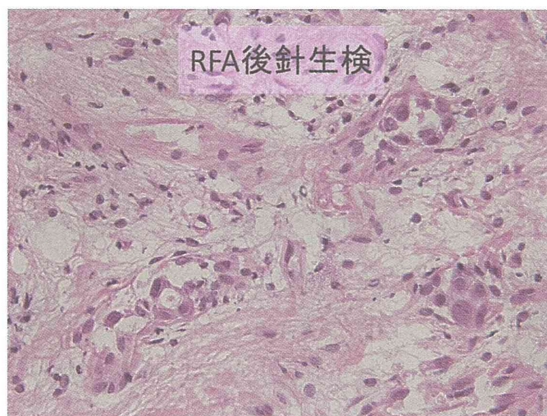


図3. RFA後針生検標本(凍結 HE、拡大) 異型細胞に核の大小不同がみられるが、核クロマチンの増量に乏しく、反応性異型の範疇である。

#### D. 考察

23名の検討では、従来の HE による判定基準と NADH 染色の判定は一致した。昨年度まで検討した RFA3 ヶ月後および1年後の中間の時期であり、壊死、肉芽組織形成、線維化という創傷治癒の経過を観察することとなった。

以前の検討で、RFA後12ヵ月では壊死した残存腫瘍がみられず癒痕化しており、NADH 染色の有用性が乏しかった。一方、RFA後3カ月の時点では、HE と NADH-diaphorase 染色の併用は腫瘍細胞の viability 評価に有用であった。6か月後を対象とした本検討では、壊死に陥った腫瘍組織

がほぼ全例で残存しており、NADH 染色による viability の評価が有用であった点において、3 ヶ月後の標本により近い組織像を示していたといえる。

乳管上皮の反応性異型が全体の 23 例中 7 例で認められ、治療効果判定に影響を及ぼし得ることが明らかとなった。RFA では熱焼灼による影響に加え、放射線療法による影響も加わる。放射線療法に伴う乳管上皮の異型は知られた事実ではあるものの、放射線治療後の経時的な変化については知見が極めて乏しい。診断上のピットフォールとなる可能性があることから、症例蓄積とより詳細な検討を重ねて正確な診断基準の確立を進めていきたい。また、これらの集積結果をアトラス化し公表することで、今後の研究・診療に役立てていけるものと考えている。

#### E. 結論

1. RFA 後非切除追跡 23 例につき、6 ヶ月後の生検標本の HE と NADH-diaphorase 染色による腫瘍遺残、腫瘍細胞の生存性の診断を行い、日常診療導入の際の追跡としてコア生検による評価法確立のための基礎データを蓄積した。
2. 病理診断学上、放射線療法による反応性異型か腫瘍の遺残かの判定が必要な場合があり、今後の症例蓄積による診断基準の確立が必要である。

#### F. 研究発表

1. 論文発表
1. Jimbo K, Tsuda H, Yoshida M, Miyagi-Maeshima A, Sasaki-Katsurada Y, Asaga S, Hojo T, Kitagawa Y, Kinoshita T. Mucinous breast carcinoma with a lobular

neoplasia component: a subset with aberrant expression of cell adhesion and polarity molecules and lack of neuroendocrine differentiation. *Pathol Int.* 64:217-23, 2014.

2. Katsurada Y, Yoshida M, Maeshima AM, Ikeda K, Shibata T, Kinoshita T, Matsubara O, Tsuda H. Wide local extension and higher proliferation indices are characteristic features of symptomatic lobular neoplasias (LNs) and LNs with early invasive component. *Histopathology*, 64:994-1003, 2014.

#### 2. 学会発表

1. 吉田正行：乳腺RFA病理判定の標準化. 第10回乳癌低侵襲治療研究会. 大阪, 平成26年7月 (基調講演) .
2. 新崎あや乃, 吉田正行, 麻賀創太, 岩本恵理子, 神谷有希子, 神保健二郎, 北條隆, 津田均, 木下貴之：ラジオ波焼灼療法 (radiofrequency ablation:RFA) 後非切除例の病理学的治療効果判定に有用性と問題点 (第2報). 第22回日本乳癌学会学術集会, 大阪, 平成26年7月 (ポスター発表)
3. 新崎あや乃, 吉田正行, 麻賀創太, 岩本恵理子, 神谷有希子, 神保健二郎, 北條隆, 津田均, 木下貴之：ラジオ波焼灼療法 (radiofrequency ablation:RFA) 後非切除例の病理学的治療効果判定に有用性と問題点. 第10回乳癌低侵襲治療研究会, 大阪, 平成26年7月 (口演)
4. Shigeru Imoto, Shinji Nagamine, Shunichi Ito, Hitoshi Tsuda, Masayuki Yoshida, Mitsuhiro Tozaki, Satoshi Morita, Takayuki Ueno. Phase II study on radiofrequency ablation in stage 0 and I breast cancer without extensive intraductal components. 37<sup>th</sup> San Antonio Breast Cancer Symposium, San Antonio, TX.

Dec.9-12, 2014

G. 知的財産権の出願・登録状況  
(予定を含む。)

1. 特許取得  
なし
2. 実用新案登録  
なし
3. その他  
なし

早期乳癌へのラジオ波焼灼療法の有効性の検証と標準化に向けた研究

担当責任者 和田 徳昭

独立行政法人 国立がん研究センター東病院 乳腺外科 乳腺外科長代行

研究要旨

1.5cm までの早期乳癌に対して、ラジオ波熱焼灼療法(RFA)の施行し、最終温度と関連する因子を検討した。最終温度は、初期インピーダンスと有意な負の相関、US による長径×短径値と有意な正の相関があった。さらにインピーダンスと US による腫瘍の大きさは強い負の相関を認めた。

本治療の原理は、電極針を病変に穿刺しラジオ波により発生するジュール熱で凝固壊死させることであるため、最終温度の十分な上昇が不可欠である。最終温度上昇が不十分な症例にどう対処してゆくか今後の課題である。

A. 研究目的

ラジオ波熱焼灼療法（RFA）は早期乳癌に対して低侵襲で整容性にすぐれた局所治療法として検証されてきた。RFA後病変の切除を行い、病理学的な効果判定の結果から、外科切除に匹敵する根治的効果が得られることが確認され、実行可能であると判断できた。前回まで腫瘍径1cmまでの早期乳癌に対してRFA後非切除試験を行い安全性・有効性の評価が行われてきた。現在は平成25年の新しい先進医療制度のもとで、腫瘍径1.5cmまでの乳癌を対象にRFAを施行し非切除経過観察による手技の確立と効果・安全性の評価が行われている。

症例の蓄積により、種々の問題点が判明してきた。その1つが低い最終温度症例の存在である。RFA治療法の原理は、穿刺針からジュール熱を発生し組織温度を上げることで蛋白変性を起こし腫瘍組織を死滅させる方法である。十分な腫瘍内の温度上昇が治療成功の鍵となるが、今回最終温度の上昇が低い症例を経験した。症例提示とそこから最終温度に

関連する要因を自験例から検討したので報告する。

B. 研究方法

対象は、2010年10月から2014年12月までに当院でRFA施行した連続16例を解析の対象とした。前治療のない組織学的に確認された浸潤癌もしくは非浸潤癌で、病変は1個で超音波（US）検査、マンモグラフィさらにMRI検査にていずれも長径が1.5cm 以下、広範な乳管内進展がなく、転移を思わせるリンパ節がなく、遠隔転移を認めない症例である。

方法として、センチネルリンパ節生検などの腋窩治療の後、USガイド下に電極針を穿刺し、ラジオ波の通電を開始する。徐々に出力を増加させるが、インピーダンスの上昇とジェネレーターによる自働出力の中断（ロールオフ）にて、凝固が完成されたと判断しRFAを終了する。通電終了後、穿刺針に環流する冷却水を止め、穿刺針先端の温度が安定したことを確認し記録する。1cm引き抜き、さらにその部位の温度も記録する。患部温度が70 度以上になっていな

い場合は通電を再開する。

(倫理面への配慮)

被験者の安全性確保については、対象選択条件、研究中止変更規則を厳密に設定しており、試験参加による不利益は最小化されている。また、ヘルシンキ宣言に従い、IRBにより承認され、患者本人に対し、研究内容を文書と口頭にて十分に説明した後、本人の直接署名による同意文書を取得した。

### C. 研究結果

16 症例の術前患者背景を示す。年齢中央値 62 歳[44-77 歳]、閉経前 3 例、閉経後 13 例であった。平均肥満度  $23.4 \pm 4.7 \text{kg/m}^2$ 、触診画像の総合判定による平均腫瘍長径(cT)  $0.9 \pm 0.3 \text{cm}$ 、平均 US 腫瘍長径(US-T)  $0.9 \pm 0.2 \text{cm}$ 、平均 US による長径×短径値 (US 腫瘍面積)  $0.7 \pm 0.3 \text{cm}^2$ 、cT 分類として 0-0.5cm 1 例、0.6-1.0cm 9 例、1.1-1.5cm 5 例であった。針生検による組織型で 1 例は非浸潤性乳管癌で、残り 15 例は浸潤癌であった。全例ホルモン受容体陽性、HER2 陰性であった。エコーガイド下に全症例穿刺可能であった。穿刺直後の初期インピーダンス中央値は  $212 \Omega$  [120-325  $\Omega$ ]であった。焼灼時間中央値 7 分[3-13 分]、セッション数は 1 回のみ 13 例、2 回 1 例、3 回 1 例であった。最終温度の中央値  $83.5$  度 [61-99 度]であり、温度が低かった症例をあげると 72 度が 2 例、1 例は 61 度であった。この最終温度上昇が不十分な症例を提示する。

#### 症例

患者年齢 63 歳、2014 年マンモグラフィ検診にて左乳房にカテゴリー3 の腫瘍陰影を指摘された。初診時乳房腫瘍は非触知で、乳房 US 検査にて左 12 時に  $5 \times 4 \text{mm}$  の低エコー腫瘍を認めた。マンモグラフィ 0.8cm、MRI 0.7cm の早期から造影される腫瘍陰影を認め

た。乳管内進展を認めず、画像でも腋窩リンパ節に腫脹はない。針生検にて浸潤性乳管癌、ER、PgR 共に陽性、HER2 陰性、Ki-67 3% であった。総合的判定で腫瘍サイズは 0.8cm とした。

RFAは、全身麻酔下におこなった。型通りのセンチネルリンパ節生検を施行後、ニードルサイズ3cmのcool-tipを使用し、エコーガイド下に腫瘍の中心を穿刺、通電開始初期インピーダンスが $325 \Omega$ と高値であった。1回目5分40秒でブレイクしたが、最終温度59度と低いため、追加でさらに2セッション施行しいずれも3分であった。最高最終温度が $61^\circ\text{C}$ で終了した。特に術中術後の有害事象なく終了できた。術後50Gy+ブースト10Gyの乳房照射とレトロゾール投与開始している。

最終温度が治療として重要となることからこれと相関する因子を全16症例で調べた。初期インピーダンス： $y = -0.095x + 104.7$ 、 $R^2$ (寄与率)=0.355、 $p = 0.015$ 、US-T： $y = 19.199x + 66.71$ 、 $R^2 = 0.148$ 、 $p = 0.142$ 、US腫瘍面積： $y = 17.505x + 1.55$ 、 $R^2 = 0.264$ 、 $p = 0.041$ 、肥満度： $y = -1.06x + 108.4$ 、 $R^2 = 0.239$ 、 $p = 0.055$ 、ラジオ波焼灼時間： $y = 1.503x + 73.11$ 、 $R^2 = 0.134$ 、 $p = 0.163$ となり最終温度は初期インピーダンスと有意な負の相関、US腫瘍面積と有意な正の相関があった。さらにインピーダンスとUS-Tの相関は $y = -0.002x + 1.399$ 、 $R^2 = 0.535$ 、 $p = 0.001$ と有意な負の相関を認めた。

### D. 考察

RFAの治療効果は、穿刺針からのジュール熱発生による蛋白凝固変性に依存する。理想的には穿刺針からの熱が腫瘍の全ての範囲に均一に伝わるもことであり、腫瘍壊死には少なくとも約45度の組織温度上昇が必要とされている。本試験のプロトコールでは安全

生を考慮して70度を超えることが目標とされているが、通電時間の規定はなくジェネレーターによるインピーダンスをモニターし自働でロールオフとなり出力を調整する。

今回RFA後の最終温度が61度であった症例を経験し、温度が低い要因を検討した。本症例に特徴的なところは、腫瘍径が8mmと非常に小さく、初期インピーダンスが325Ωと高値を示したことである。全16症例を対象として、初期インピーダンス、US-T、US腫瘍面積、肥満度、ラジオ波焼灼時間と最終温度との相関関係を検討した。このうち初期インピーダンスとUS腫瘍面積が最終温度と有意な相関を示した。これは穿刺直後の初期インピーダンスが高い、もしくはUS腫瘍面積が小さいほど最終温度が低くなることを意味する。一方、US-Tと最終温度の関係は $R^2=0.147$ のため明らかな相関ありとは言えなかったが、興味深いことに、インピーダンスとUS-TもしくはUS腫瘍面積の間にはいずれも強い有意な負の相関を認めた。つまりUS-Tが小さいとインピーダンスが増大することになる。

最終温度を予測することは困難であるが、初期インピーダンス値、US腫瘍面積が有用である可能性がある。腫瘍径が小さい腫瘍ほどRFAの良い適応であるが、インピーダンスが高く、温度上昇不足になる可能性も考えられる。しっかりと焼灼し最終温度の上昇を保つための工夫、例えば出力の上昇をゆっくり行うなどのアルゴリズムの調節などで対応可能か今後の課題と思われた。

## E. 結論

1.5cmまでの早期乳癌に対するRFAにおいて、最終温度は初期インピーダンスと負の、US-Tは正のいずれも有意な相関を示した。最終温度上昇が不十分な症例にどう対処してゆくか今後の課題である。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Komoike Y, Wada N, et al. Japan Breast Cancer Society clinical practice guideline for surgical treatment of breast cancer. *Breast Cancer*. 22(1):37-48, 2015.
2. Matsubara N, Wada N, et al. Survival outcome and reduction rate of Ki-67 between pre- and post-neoadjuvant chemotherapy in breast cancer patients with non-pCR. *Breast Cancer Res Treat*. 147(1):95-102, 2014.
3. Shibayama O, Wada N, et al. Association between adjuvant regional radiotherapy and cognitive function in breast cancer patients treated with conservation therapy. *Cancer Med*. 3(3):702-9, 2014.
4. Oba MS, Wada N, et al. Observational Study of Axilla Treatment for Breast Cancer Patients with 1-3 Positive Micrometastases or Macrometastases in Sentinel Lymph Nodes. *Jpn J Clin Oncol*. 44(9):876-9, 2014.
5. Matsubara N, Wada N, et al. Different prognostic significance of Ki-67 change between pre- and post-neoadjuvant chemotherapy in various subtypes of breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 137(1):203-12, 2013.

### 2. 学会発表

1. Wada N, et al. Different prognostic impact according to residual tumor status after neoadjuvant chemotherapy in breast cancer subtypes. 9th European Breast Cancer Conference, Mar 2014, Glasgow, UK
2. 康 裕紀子, 和田 徳昭, 他. PgR 値を考慮したホルモン受容体陽性 HER2 陰性乳癌に対する術前化学療法の影響. 第 114 回 外科学会定期学術集会, 平成 26 年 4 月, 京都.
3. 木下 貴之, 和田 徳昭, 他. 乳癌局所治療における新展開 先進医療制度に承認された新しい乳がん局所療法としてのラジオ波熱焼灼療法(RFA)多施設共同研究. 第



- 114 回外科学会定期学術集会, 平成 26 年 4 月 3 日, 京都.
4. 和田 徳昭, 他. 乳癌センチネルリンパ節生検施行例の予後 転移径別 8 年間の長期成績. 第 114 回外科学会定期学術集会, 平成 26 年 4 月, 京都
  5. 米山 公康, 和田 徳昭, 他. 術前化学療法 (NAC) 非施行 Triple-negative breast cancer(TNBC)の予後. 第 114 回外科学会定期学術集会, 平成 26 年 4 月, 京都.
  6. Kinoshita T, Wada N, et al. A multi-center prospective study of image-guided radiofrequency ablation for small breast carcinomas. 50th Annual Meeting of American Society of Clinical Oncology, Jun 2014, Chicago, USA.
  7. 岩田 良子, 和田 徳昭, 他. 造影デジタルマンモグラフィにおける浸潤性乳管癌の病変長径の検討. 第 22 回日本乳癌学会学術総会, 平成 26 年 7 月, 大阪.
  8. 岡田 淑, 和田 徳昭, 他. 温存乳房内再発は遠隔転移に影響を与えるのか. 第 22 回日本乳癌学会学術総会, 平成 26 年 7 月, 大阪.
  9. 和田 徳昭, 他. センチネルリンパ節転移陰性症例の腋窩再発. 第 22 回日本乳癌学会学術総会, 平成 26 年 7 月, 大阪.
  10. 内藤 陽一, 和田 徳昭, 他. 国立がん研究センター東病院における遺伝診療科/家族性腫瘍外来開設と問題点の提起. 第 22 回日本乳癌学会学術総会, 平成 26 年 7 月, 大阪.
  11. 佐々木 政興, 和田 徳昭, 他. Luminal タイプ乳癌における予後因子としての組織グレードの意義. 第 22 回日本乳癌学会学術総会, 平成 26 年 7 月, 大阪.
  12. 康 裕紀子, 和田 徳昭, 他. 乳癌局所領域再発症例に対する外科的切除の意義. 第 22 回日本乳癌学会学術総会, 平成 26 年 7 月, 大阪.
  13. 櫻庭 実, 和田 徳昭, 他. 当院における DIEP 皮弁による乳房再建の成績. 第 22 回日本乳癌学会学術総会, 平成 26 年 7 月, 大阪.
  14. 米山 公康, 和田 徳昭, 他. 乳癌腋窩リンパ節転移 4 個以上症例に対する Postmastectomy radiation therapy(PMRT)の短期治療成績. 第 22 回日本乳癌学会学術総会, 平成 26 年 7 月, 大阪.
  15. 米山 公康, 和田 徳昭, 他. 術前薬物療法後 pN0 乳癌症例に対する乳房切除術後放射線療法の治療成績. 第 52 回日本癌治療学会学術集会, 平成 26 年 8 月, 横浜.
  16. 康 裕紀子, 和田 徳昭, 他. 乳癌局所領域再発症例に対する外科的切除の意義. 第 52 回日本癌治療学会学術集会, 平成 26 年 8 月, 横浜.
  17. 和田 徳昭, 他. 乳癌術前化学療法後の Ki67 値は予後予測に有用な因子である. 第 52 回日本癌治療学会学術集会, 平成 26 年 8 月, 横浜.
  18. 米山 公康, 和田 徳昭, 他. 高齢者 (80 歳以上) 乳癌切除症例の治療内容と予後. 第 76 回日本臨床外科学会総会, 平成 26 年 11 月 30 日, 郡山.
- G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)
1. 特許取得  
なし
  2. 実用新案登録  
なし
  3. その他  
なし

早期乳がんに対するイメージガイド下ラジオ波熱焼灼療法の標準化に係る多施設共同試験  
---RFA 後の生検組織における遺残がん細胞の viability に関する免疫組織学的検討---

担当責任者 土井原 博義

岡山大学病院 乳腺・内分泌外科 教授

研究要旨

早期乳癌に対する RFA によって腫瘍が完全焼灼できたかどうかの判断は、ヘマトキシレン・エオジン（HE）染色のみでは困難で NADH 染色が行われることが多いが、この標本作成には凍結切片が必要である。そこでホルマリン固定標本でも可能かどうかについて、anti-ssDNA Ab である F7-26（ALX-804-192-L001, ENZO）, MAB3868（CHEMICON）, Anti-Single Stranded DNA Rabbit IgG Affinity Purify（IBL）および抗ミトコンドリア抗体について検討した。

また、染色強度、染色範囲、再現性など判定において種々の問題が予想されるので、画一的な診断方法、手技について併せて検討する予定である。

A. 研究目的

RFA 施行後の生検組織における細胞の viability を評価し、有効な染色方法について検討する。

2005 年 7 月に承認されている。個人名で登録はせず、院内で設定した番号で登録しているため個人を特定することは不可能で個人情報も漏洩することは無い。

B. 研究方法

現在 RFA により十分に腫瘍が焼灼できたかどうかの判断は、NADH 染色を行い、癌細胞の生死をみるのが標準である。しかしこの標本作成には凍結切片を必要とすることから、HE 染色用の切片とともに多数の針生検標本が必要である。NADH 染色の代替えとして、ホルマリン固定のパラフィンブロックからでも染色可能な抗ミトコンドリア抗体による染色について検討した。さらに 4 種類の anti-ssDNA Ab を用いて、RFA 後の癌細胞の viability について検討する。

C. 研究結果

RFA 施行後の生検組織における細胞の viability を評価：プロトコールに従い、RFA 施行後、さらに放射線照射終了後 3 カ月目の時点でマンモトームエリートにて生検を行った。登録された 7 例中 2 例に NADH 染色にて遺残が疑われたので、その 2 例についてパラフィンブロックより抗 ssDNA 抗体および抗ミトコンドリア抗体を用いて再評価した。

第 1 例目は、58 歳女性、腫瘍径 0.8cm、triple negative, n1 症例で H.E. 染色では浸潤巣の遺残がみられ、NADH 染色でも陽性であった。抗ミトコンドリア抗体による染色では陰性で、遺残がん細胞はみられなかった。

（倫理面への配慮）

早期乳がんに対する RFA の実施および整容性の評価に関しては、院内の倫理委員会

第2例目は65歳女性で、luminal A, n0症例でH.E.染色では乳管内癌巣の遺残があり、NADH染色でも陽性であった。抗ミトコンドリア抗体による染色でも同様に陽性所見を呈したが、染色強度は弱かった。抗ssDNA抗体による染色では有意な所見は得られなかった。

#### D. 考察

RFAによる焼灼巣の中心は凝固壊死になり、その周囲は類壊死でその外側が非がん部と考えられる。焼灼早期(1~3週間)は変性有核細胞が主体であるので、針生検標本でのH.E.診断は熟練した病理医の診断が要求されるが、細胞の呼吸補酵素をみるNADH染色では、ある程度客観的に評価が可能である。ただ、NADH染色には凍結切片が必要であり、HE染色も行うとすれば針生検にて多数切片を採取する必要がある。

そこでホルマリン固定パラフィンブロックより染色が可能であれば多くの切片は必要なく、またviableと考えられる切片のみの染色で良好な結果が得られると考える。ssDNA (F7-26) (ENZO), ssDNA (IBL), ssDNA(CHEMICON)はapoptosisとnecrosisの判別が可能で、TUNNEL染色より良好とされている。また、early apoptosis (on going necrosis)にも陽性となるのが特徴である。また抗ミトコンドリア抗体は、呼吸酵素をみることでviable cellの判定が可能と考えられている。

今回H.E.染色にて遺残が確認された2例について、パラフィンブロックにて種々の免疫染色を行った。その結果、1例はNADHと抗ミトコンドリア抗体の陽性反応は一致したが、もう1例は不一致であった。一致例

の染色性も陽性コントロールである肝細胞の染色性に比し、微弱であった。また、抗ssDNA抗体による染色は不良で有用な結果が得られなかった。抗ssDNA抗体は、apoptosisをみる抗体であり、necrosisの判定には有用でない可能性が高い。

今後は、抗ミトコンドリア抗体を中心に凍結切片によるNADH染色との整合性について症例を重ねて調べる予定である。

#### E. 結論

早期乳癌に対するRFAが一般化するため、凍結切片によるNADH染色が必須となると、RFAを施行できる施設が限られてくる。次善の策として、NADH染色に匹敵する染色法を見つけることは、本治療法が一般化するために重要である。

今後症例を重ね、最適な抗体をみつけるとともに、陽性細胞の判断基準の作成を行いたいと考えている。

#### F. 研究発表

1. 論文発表
1. Nogami T, Doihara H, et al. Expression of ALDH1 in axillary lymph node metastases is a prognostic factor of poor clinical outcome in breast cancer patients with 1-3 lymph node metastases. *Breast Cancer*. 2014;21(1):58-65.
2. Shien T, Doihara H. Resection of the primary tumor in stage IV breast cancer. *World J Clin Oncol*. 2014;5:82-85.
3. Itoh M, Doihara H, et al. Estrogen receptor (ER) mRNA expression and molecular subtype distribution in ER-negative/progesterone receptor-positive breast cancers. *Cancer Res Treat*. 2014;

- 143(2):403-409.
4. Nogami T, Doihara H, et al. The discordance between primary breast cancer lesions and pulmonary metastatic lesions in expression of aldehyde dehydrogenase 1-positive cancer cells. *Breast Cancer*. 2014;21(6):698-702.
  5. 溝尾 妙子, 土井原 博義, 他. 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. *岡山医学会雑誌*. 2014;126:25-30.
  6. 土井原 博義. 乳がん検診の現状. *岡山県医師会報*. 2014;1385:34-36.
  7. 枝園 忠彦, 土井原 博義:外科療法 進行・再発病変の手術. 症例から学ぶ最新治療ストラテジー (分担), 166-168, メディカルレビュー社, 東京, 2014.
  8. 土井原 博義. 挙児希望その他の患者ニーズ, 乳癌薬物療法ケースファイル (分担), 43-53, 南江堂, 東京, 2014
  9. 鳩野 みなみ, 土井原 博義, 他. 側頸部嚢胞性腫瘍として発見された異所性腺腫様甲状腺腫の1例. *日本臨床外科学会誌*, 2014;75(11):2971-2975.
2. 学会発表
1. 土井原 博義:骨転移に対する治療戦略～乳腺外科医の立場から～, *岡山骨転移フォーラム*, 岡山, 2014
  2. 土井原 博義:再発乳癌に対する化学内分泌併用療法の基礎的検討, *日本乳腺疾患研究会*, 熊本, 2014
  3. 土井原 博義:乳癌治療のABC「HER2陽性乳癌の治療戦略」, 第9回中国・四国 臨床腫瘍研究会セミナー, 岡山, 2014
  4. 土井原 博義: SELECT BC discussion, SELECT BC 結果報告会, 東京, 2014
  5. 土井原 博義:乳がんの克服をめざして, *岡山対がんシンポジウム 2014*, 岡山, 2014
  6. 土井原 博義:乳がん検診の現状-受診率向上に向けて-. 乳がん検診講習会, 岡山, 2014
  7. 土井原 博義:乳がん手術療法の集学的マネージメント, 総合がんセンターボード, 岡山, 2014
  8. 土井原 博義:早期乳がんに対する: RFA:症例提示, 臨床試験初期の問題点. 早期乳癌への RFA の有効性の検証と標準化に向けた多施設共同研究 平成26年度班会議, 東京, 2014
  9. 土井原 博義:乳がん検診の現状と対策, 鳥取県度乳がん検診従事者講習会, 鳥取, 2014
  10. 土井原 博義:チームで行う乳癌医療の現状, 第10回四国 BC 研究会, 徳島, 2014
  11. 土井原 博義:最近の乳がんの診断と治療, 国民健康保険診療報酬審査委員会講演会, 岡山, 2014
  12. 土井原 博義, 平 成人, 枝園忠彦, 野上智弘, 溝尾妙子:チーム医療で行う乳房再建術の向上を目指して, 第76回日本臨床外科学会総会パネルディスカッション, 福島, 2014
  13. 土井原 博義:ピア・サポーター活動に必要な医療知識, 第3回ピア・サポーター養成研修会, 岡山, 2014
  14. 土井原 博義:進行再発乳癌における内分泌療法の治療戦略, 埼玉乳癌内分泌療法講演会, 埼玉, 2014
  15. Shien T, Ito M, Tsuyumu Y, Nakatsuka M, Hatono M, Mizoo T, Iwamoto T, Nogami T, Motoki T, Matsuoka J, Taira N, Doihara H: Active counseling about influence against reproductive function by adjuvant systemic therapy and fertility preservation by breast oncologist and gynecologist for reproductive age women with cancer in Japan. 9th European Breast Cancer Conference, Glasgow, 2014

16. Doihara H. Symposium on Breast Cancer Screening . 42Myanmar Health Research Congress, Yangon ,2014
17. 平 成人, 野村長久, 高橋三奈, 高嶋成輝, 小笠原豊, 大住省三, 吉富誠二, 清藤佐知子, 松岡欣也, 高畠大典, 枝園忠彦, 石部洋一, 川崎賢祐, 秋山一郎, 斉藤誠, 原文堅, 溝尾妙子, 溝田友里, 山本精一郎, 土井原 博義: 乳癌診断後のライフスタイルと予後に関する多施設共同前向き観察研究: 瀬戸内乳がんコホート研究. 第 22 回日本乳癌学会学術総会, 大阪, 2014
18. 平 成人, 枝園忠彦, 鳩野みなみ, 溝尾妙子, 野上智弘, 岩本高行, 元木崇之, 松岡順治, 土井原 博義: 当院における家族性乳がん相談外来の現状報告. 山陽乳癌研究会, 岡山, 2014
19. 枝園忠彦, 露無祐子, 鳩野みなみ, 伊藤麻衣子, 三好雄一郎, 野上智弘, 岩本高行, 元木崇之, 平 成人, 松岡順治, 土井原 博義: 乳癌術後薬物療法を受ける患者に対するカウンセリングと妊孕性温存～大学での試みから地域ネットワーク発足へ. 日本乳癌学会学術総会, 大阪, 2014
20. 枝園忠彦, 土井原 博義, 卜部登紀子, 安部優子, 原 暁生, 三好雄一郎, 溝尾妙子, 野上智弘, 平成人, 三好新一郎: HER2 陽性 Stage IV 乳がんに対する治療戦略～良好な経過をたどっている 2 例の報告. 中四国外科学会, 松江, 2014
21. 卜部登紀子, 土井原 博義, 枝園忠彦, 安部優子, 溝尾妙子, 野上智弘, 平成人, 三好新一郎: 非反回下喉頭神経を伴ったバセドウ症例の検討. 中四国外科学会, 松江, 2014
22. Shien T, Ohsumi S, Hara F, Ikeda M, Ohtani S, Taira N, Ogasawara Y, Kiyoto S, Matsuoka K, Hikino H, Funakoshi T, Funakoshi M, Doihara H : NPO 法人瀬戸内乳癌事業包括的試験機構による地域で行う臨床試験の現状. 第 12 回日本臨床腫瘍学会学術集会, 福岡, 2014
23. 卜部登紀子, 溝尾妙子, 安部優子, 野上智弘, 岩本高行, 元木崇之, 枝園忠彦, 平成人, 松岡順治, 土井原 博義, 稲垣兼一, 大塚文男: 甲状腺片葉欠損に発症した原発性副甲状腺機能亢進症の 1 例. 第 77 回岡山内分泌同好会, 岡山, 2014
24. 野上智弘, 鳩野みなみ, 溝尾妙子, 岩本高行, 枝園忠彦, 元木崇之, 平 成人, 土井原 博義: 甲状腺悪性腫瘍に対し気管合併切除を施行した 4 例. 第 42 回中国四国甲状腺外科研究会, 高松, 2014
25. 野上智弘, 鳩野みなみ, 西山慶子, 溝尾妙子, 岩本高行, 枝園忠彦, 元木崇之, 平 成人, 松岡順治, 土井原 博義: 良性の術前診断にて手術を施行した甲状腺腫瘍の検討. 第 114 回日本外科学会定期学術集会, 京都, 2014
26. 野上智弘, 安部優子, 片山裕子, 西山慶子, 溝尾妙子, 雑賀美帆, 渡部聡子, 岩本高行, 枝園忠彦, 元木崇之, 平 成人, 木股敬裕, 松岡順治, 土井原 博義: 一次乳房再建術が術後補助療法へ及ぼす影響に関する検討. 第 114 回会日本乳癌学会中国四国地方会, 広島, 2014
27. 溝尾妙子, 鳩野みなみ, 伊藤麻衣子, 岩本高行, 野上智弘, 元木崇之, 枝園忠彦, 平成人, 松岡順治, 土井原 博義: PET-CT による術前化学療法の効果判定の検討. 第 20 回日本乳癌疾患研究会, 熊本, 2014
28. 溝尾妙子, 枝園忠彦, 鳩野みなみ, 伊藤麻衣子, 岩本高行, 野上智弘, 元木崇之, 平成人, 松岡順治, 土井原 博義: Triple negative 乳癌の画像所見と術前化学療法の効果についての検討. 第 23 回日本乳癌画像研究会, 高松, 2014
29. 溝尾妙子, 枝園忠彦, 鳩野みなみ, 伊藤麻衣子, 岩本高行, 野上智弘, 元木崇之, 平成人, 松岡順治, 土井原 博義: 画像所見による術前化学療法の治療効果予

測の検討. 第 22 回日本乳癌学会, 大阪,  
2014

30. 溝尾妙子, 安部優子, 岩本高行, 野上智  
弘, 元木崇之, 枝園忠彦, 平成人, 松岡  
順治, 土井原 博義: OSNA 法による  
センチネルリンパ節転移陽性例の検討.  
第 11 回日本乳癌学会中国四国地方会,  
広島, 2014

G. 知的財産権の出願・登録状況

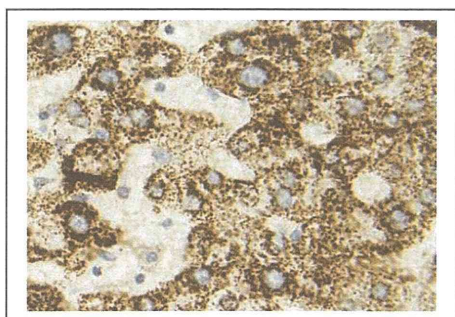
(予定を含む。)

1. 特許取得  
なし

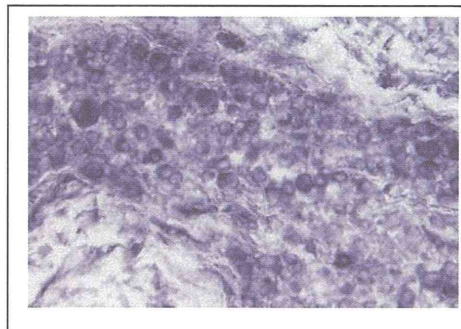
2. 実用新案登録  
なし

3. その他  
なし

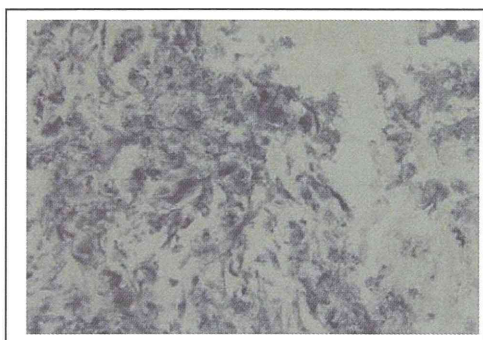
陽性コントロール：肝細胞



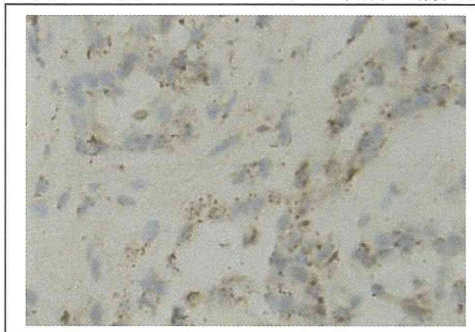
症例 2：NADH 染色（陽性）



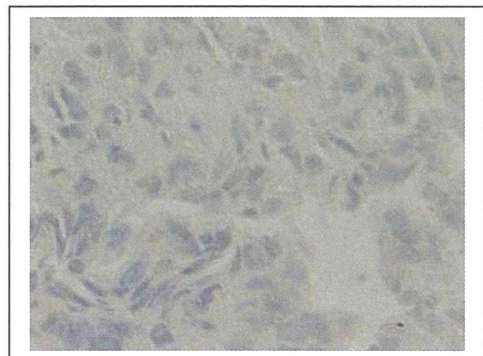
症例 1：NADH染色（陽性）



症例 2：抗ミトコンドリア抗体（陽性）



症例 1：抗ミトコンドリア抗体（陰性）



試験の推進、ラジオ波焼灼療法の指導、実施

担当責任者 高橋 将人

独立行政法人国立病院機構北海道がんセンター 乳腺外科 統括診療部長

研究要旨

乳房温存術は、早期乳癌に対する標準的な術式であるが、さらに整容性を高めるためにラジオ波熱焼灼療法が期待されている。今後標準的な治療法として確立するためには、全国の多施設での実施方法の確立が要求される。

北海道がんセンターでは、過去に施行したラジオ波熱凝固療法の単施設での臨床研究の成果を生かし、多施設共同研究の分担研究者として、治療の有効性と安全性を検証する予定である。

A. 研究目的

ラジオ波熱凝固療法の標準化の確立のために、北海道がんセンターでの施行に対する問題点を探索する。

B. 研究方法

1.5cm以下の限局した乳癌に対して、先進医療 B でラジオ波熱凝固療法の臨床研究を開始する。放射線終了後3ヶ月後にMRIを中心とした画像評価および画像ガイドした吸引組織生検を行い、癌が完全に焼灼されていることを確認する。

（倫理面への配慮）

本研究は、北海道がんセンターの倫理委員会で審議し、安全性や効果などで参加した患者が倫理面で考慮されていることを確認している。また、本法は、現時点で標準的な方法でないことを十分に説明し、文書で本臨床試験への参加の同意を得た患者にのみ施行する。

C. 研究結果

研究分担者が2010年3月まで在籍していた北海道大学で、早期乳癌に対してラジオ波熱凝固療法を行った22名の患者の画像診断および術後の病理所見、再発の有無などをまとめた。

また、その後2011年11月より北海道がんセンターにてラジオ波熱凝固療法の開始が認められた。4名の患者につきラジオ波熱凝固療法を行った。一年後の生検結果まで終了し、癌の遺残も無く、再発も認めていない。

これらの成果を踏まえて、先進医療での多施設共同研究が開始された。

当院では、この共同試験に2014年1月に1例目の登録を開始し、合計8名の患者にラジオ波熱凝固療法を施行した。1例に関して放射線治療後の生検にて癌の残存を完全に否定できなかったため、焼灼部の切除を施行したが、悪性所見は認められなかった。

現在までに有害事象は認めず、局所再発も認めていない。



#### D. 考察

安全性と治療有効性について注意深い観察をしていく必要がある。

#### E. 結論

先進医療下でラジオ波熱凝固療法の研究システムが確立された。自施設で画像診断、病理診断について検証し、他施設の結果をあわせて問題点を検証する。

#### F. 研究発表

1. 論文発表  
なし

2. 学会発表  
なし

#### G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

1. 特許取得  
なし

2. 実用新案登録  
なし

3. その他  
なし

試験の推進、ラジオ波焼灼療法の指導、実施

担当責任者 大谷 彰一郎

広島市立広島市民病院 乳腺外科 乳腺外科部長

研究要旨

現在、早期乳癌症例に対して、非切除を前提としたラジオ波熱焼灼療法（以下 RFA）を行い、5年温存乳房内無再発生存割合を Primary endpoint としてその有効性を検証し、早期乳癌に対する標準治療としての位置づけを目指した RAFAELO 試験が行われている。

当科も当試験に参加させていただき、現在までに 15 症例登録出来たので症例報告を行う。

A. 研究目的

近年の乳癌検診受診率の向上にともなう検診発見早期乳癌患者の増加と、それに対応した局所治療の低侵襲化および簡便化は、乳癌治療の大きな課題である。このような背景で「早期乳癌への RFA の安全性および有効性の評価」に関する多施設共同研究は、平成 20 年 3 月 31 日臨床的な使用確認試験として実施が認められ、同 4 月より第 3 項先進医療（以下高度医療）として臨床試験を遂行することが認められた。平成 19 年度～21 年度厚生労働科学研究費補助金 医療技術実用化総合研究事業「早期乳癌への RFA の安全性および有効性の評価」に関する多施設共同研究では、RFA の標準的手技および病理判定法の確立とともに、早期乳癌局所治療におけるその安全性と有効性および適応症例の確立という成果を得た。この結果をもとに引き続き高度医療として、早期乳癌に対して非切除 RFA にて、有効性と安全性を評価する Phase II 試験を多施設共同研究として開始した。これは、RFA 後、厳密に計画された画像診断や針生検により経過観察を行い、中期的有効性と

安全性および本治療の特徴である整容性評価を実施することを目的とするとともに、RFA 後の適切な画像診断や病理診断法を開発し標準化していくことを目的としたものである。

RFA は、電極針を病変部に穿刺し、ラジオ波電流を通電することによって腫瘍部位を焼灼する方法で行われるため、乳房への傷は、最小限の穿刺部位にとどめることができるという利点があり、本研究により早期乳癌への RFA の有効性が認められれば、現行の治療法にともなう「患者の苦痛」を取り除くことが可能となり、大幅な QOL 改善が期待できる。手術手技としても「乳房温存術」に「非切除」という新たな選択肢をもたらさうと期待される。そこで、早期乳癌症例に対して非切除を前提としたラジオ波熱焼灼療法を行い、5年温存乳房内無再発生存割合を Primary endpoint としてその有効性を検証し、早期乳癌に対する標準治療としての位置づけを目指した RAFAELO 試験に症例を登録していくことになった。

## B. 研究方法

方法は、術前針生検にて確定診断がなされた早期乳癌（TMN 分類上の T1 1.5cm 以下）患者に対して、説明同意文書にて同意を取得後、全身麻酔下に手術室で RFA を行う。イメージ（US）ガイド下に体表面から乳房内病変に対してラジオ波電極針を穿刺し、病変にラジオ波による焼灼を行う。腫瘍縁から 1cm マージンを目標として、ニードルポジションを設定する。焼灼中は、超音波画像にてマイクロバブル（焼灼変性部位）の範囲を確認し、クールチップシステムにて焼灼温度もモニタリングし、十分かつ安全な焼灼効果エリアを確保することとする。この際、手技中の合併症に有無を記録する。完全な焼灼確認後、乳房温存療法と同様に術後乳房照射（50 / 60Gy）を実施し術後補助内分泌療法を開始する。RFA 後、3 ヶ月、6 ヶ月および 12 ヶ月後に、超音波検査（US）や CT、MRI による画像診断評価、およびマンモトーム生検、または針生検を実施し病理診断評価を実施し、RFA の安全性および有効性を検証する。なお、採取された検体は、H&E 染色と特殊染色法（NADH 染色）を用いた病理診断による RFA 効果判定にて、腫瘍の viability を判定することとする。

### （倫理面への配慮）

被験者の安全性確保については、対象選択条件、研究治療の中止、変更基準を厳密に設定しており、試験参加による不利益は最小化される。また、ヘルシンキ宣言、ICH-GCP 等の国際的倫理原則に従い、IRB の承認を義務化し、インフォームド・コンセントの実施および個人情報保護法の遵守を徹底する。

## C. 研究結果

2014 年 4 月から 2015 年 2 月までに 10 症例登録した。試験開始より合計 15 症例登録できた。このうち、5 症例においては放射線治療 3 か月後の乳房 MRI、組織診を行った。全例、乳房 MRI でも完全焼灼と診断された。組織診においては HE 染色だけでは、完全焼灼（死）を診断できない症例もあり、ssDNA 染色にて RFA による完全焼灼を証明しえた。5 症例全例の病理学的完全焼灼を証明できた。

## D. 考察

まだ全例の術後の断端評価と不完全焼灼の検出を目的とした組織診ならびに画像評価は検討できていないが、5 症例では有効な結果を提示できた。RFA 自体の安全性は、当科が報告した症例と同じく安全であった（Ohtani S, The Breast 2011）。また短期的ではあるが、整容性も良好で、皆様、満足しておられた。症例経験を重ねてデータを排出していきたい。

## E. 結論

RAFAELO 試験に現在までに 15 症例登録出来た。全例、RFA は安全に施行可能であった。また短期的ではあるが、整容性も良好であった。5 症例においては、放射線治療終了 3 か月後時点での癌の完全焼灼を画像的にも組織学的にも確認できた。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

なし

### 2. 学会発表

なし

G. 知的財産権の出願・登録状況  
(予定を含む。)

1. 特許取得  
なし

2. 実用新案登録  
なし

3. その他  
なし