日消外会誌　33（4）：517～522，2000年

特集 2

術中骨盤腔洗浄液の RT-PCR 解析による直腸癌進行度評価の検討

大阪大学大学院医学系研究科病態制御外科学（第 2 外科），大阪大学医学部保健学科病態生体情報学講座分子病理学*

冨田　尚裕　　多田　正知　　関本　貢嗣　　大植　雅之
大西　　直　　森田　哲史　　池永　雅一　　三宅　泰裕
松浦　成昭*　　門田　守人

直腸癌手術では直腸剝離操作時の側方向脈管離断に伴う癌細胞漏出の可能性があり，側方リンパ節転移との関連等が推測されるが，その実際および臨床的意義は不明である．そこで近年単離された消化管上皮細胞特異的遺伝子マーカー GS04094を用いた RT-PCR 法にて骨盤腔遊離癌細胞を検出し，臨床病理学的因子との関連を検討した．直腸癌14例の開腹時（pre），直腸剝離操作終了時（post）の骨盤腔を生食100ml で洗浄，細胞診と共に RNA 抽出，GS04094の RT-PCR 解析を行った結果，陽性症例を 5 例（pre（＋），post（＋）：4例，pre（－），post（＋）：1例）認めた．RT-PCR 陽性と壁深達度，リンパ節転移，リンパ管侵襲（v），および pre（＋）においては腫瘍の局在（Ra）とに有意の相関を認めた．直腸癌の術中洗浄液を用いた GS04094の RT-PCR 解析により側方向への脈管離断による漏出癌細胞，また腹膜翻転部以上の癌においては漿膜表面への遊離癌細胞を高感度に検出できる可能性があり，直腸癌の進展度評価，術式決定における有用性が示唆された．

1．はじめに

進行直腸癌における側方リンパ節転移は術式の選択や予後評価との関連から重要であるが[1)～4)]，現在のところ，これを術前，術中に確実に診断あるいは予測する方法はない．一方，直腸癌の手術においては直腸剝離操作に伴って側方向への微小血管，リンパ管は離断される形となり，その際の癌細胞漏出の可能性が考えられるが，その実際および側方リンパ節転移との関連などの臨床的意義については不明である．そこで今回，我々はヒトゲノムプロジェクトの一環として作製されている3 'directed cDNA library[5)～7)]から単離した新たな消化管上皮細胞特異的遺伝子マーカー GS04094を用いた高感度の RT-PCR 法[8)]にて直腸癌手術中の骨盤腔への微量の遊離癌細胞を検出することを試み，臨床病理学的諸因子との関連について検討した[9)10)]．

2．対象と方法

まず最初に，GS04094を用いた RT-PCR 解析の感度検定を行った．当初，通常の RT-PCR を行っていたが，個々の大腸癌症例によって GS04094の発現レベルにはかなりの差があり，症例によっては必ずしも報告された1/105-1/106の検出感度が得られぬ場合があり，感度を上げるために nested RT-PCR を行うことにした．PCR に用いたプライマーおよび反応条件は，概ね文献 8 の通りであるが，以下に修正点を含めた概略を記す．

nested RT-PCR における1st round PCR には，upstream primer に NU-2，downstream primer に4094 u-rev を，2nd round PCR には NU-2と4094 U-rev をそれぞれ用いた．反応条件は，1, initial denature 95℃，4 min，2, amplification 20 cycles（denature 95℃，30 sec；annealing 56℃，40 sec；extention 72℃，40 sec），3, additional extention 72℃，5 min で，1st round，2nd round とも同様である[11)]．既知の上皮細胞マーカーであり，現在まで最もよく使用されている cytokeratin 20，CEA のプライマーを作製し，検体中に混在が予測されるリンパ節，腹膜，脂肪，皮膚などの組織の RNA をコントロールに用いた詳細な感度および特異性の検定を行った．次いで，癌細胞の腹腔への遊離の可能性が理論的に考えられない深達度 m，sm の早期大腸癌症例および消化器癌，子宮癌の癌性腹膜炎症例の腹水から抽出した RNA をコントロールとして用いた予備実験も行った．

＊第54回日消外会総会シンポ 4・消化器癌転移能の分子生物学的側面（消化管）

<1999年12月22日受理＞別刷請求先：冨田　尚裕

〒660-8511　尼崎市稲葉荘3―1―69　関西労災病院外科

Fig. 1　Sensitivity and specificity of epithelial cell gene markers on RT-PCR analyses.
The markers used in RT-PCR analyses are shown on the left. RNA samples used are shown in the bottom. 10^0～10^{-6}：colon cancer RNA diluted　×10^0～×10^6, respectively, with normal lymph node RNA. S：skin. F：fat（adipose tissue）. P：peritoneum. For GS04094, the sensitivity is 10^{-5}, and for CK−20 or CEA, the sensitivity is 10^{-6}, 10^{-5}, respectively. S and P RNA samples for CK−20 and P RNA sample for CEA give positive bands.

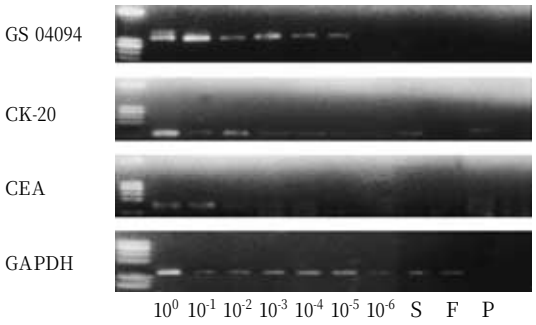
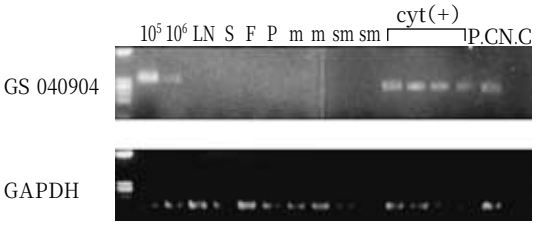


Fig. 2　Preliminary experiment of GS04094 RT-PCR on peritoneal lavage samples of cancer patients.
Template RNA used in RT-PCR analyses are the followings. 10^5, 10^6：colon cancer RNA diluted ×10^5 or ×10^6, respectively, with normal lymph node RNA. LN：normal lymph node. S：skin. F：fat（adipose tissue）. P：peritoneum. m, sm：colon cancer with invasion to mucosal layer or submucosal layer, respectively. cyt（＋）：gastrointestinal or gynecological cancers with peritoneal dissemination（cytology positive）. P. C：positive control（colon cancer）. N. C：negative control（distilled water）. GAPDH（glyceraldehyde－3－phosphate dehydrogenase）RNA are used to rule out the possibility of RNA degradation in each reaction.



本実験であるが，低位前方切除術あるいは腹会陰式直腸切断術を施行した直腸癌手術症例14例を対象とした．まず開腹時のダグラス窩（pre）および直腸剝離操作終了時（post）の骨盤腔を生理食塩水100ml にて洗浄した後，洗浄液を全量回収し，半分を細胞診に提出，半分を遠心分離にて細胞成分を採取し凍結保存後，ISOGEN 法にて RNA を抽出した．その後，予備実験にて確立した至適条件にて GS04094の RT-PCR を行い，直腸癌症例の術中洗浄液中の癌細胞の検出を試み，臨床病理学的諸因子との関連の有無を検討した．

3．結　　果

感度検定および，既知の上皮細胞マーカーである cytokeratin 20，carcinoembryonic antigen（CEA）との比較検討を行ったのが **Fig. 1**である．感度検定の希釈系列は大腸癌の total RNA をサンプル中に混在する可能性のあるリンパ節の total RNA で段階希釈したものを用いている．腹腔，骨盤腔の洗浄液中に混在してくる可能性のあるものとしては，リンパ球以外に皮膚，脂肪，腹膜などが考えられるので，これらの RNA をコントロールとして全く発現が検出されないことを PCR 反応の絶対条件とした．**Fig. 1**に示すごとく，GS 04094では1/10^5の検出感度が得られ，同条件でコントロールの組織には全くバンドが検出されない．これに対して，cytokeratin 20では皮膚と腹膜で，CEA では腹膜に発現が検出され，今回の RT-PCR 解析には適していないと考えられた．

腹腔洗浄液，腹水を用いたコントロール実験が **Fig. 2**である．GS04094の RT-PCR において，大腸の m 癌，sm 癌の早期癌症例の腹腔洗浄液ではバンドは検出されないが，癌性腹膜炎症例の腹水においては 4 例全例にバンドが検出されている．

実際の直腸癌手術症例を対象とした実験において，まず直腸癌14例の洗浄液細胞診の結果は pre，post とも全例陰性であった．RT-PCR 後の PCR 産物の電気泳動の代表例を **Fig. 3**に示している．RNA 抽出に関しては，GAPDH の RT-PCR にて全例でその精製が確認された．GS04094の RT-PCR の結果，陽性症例を 5 例（pre（＋），post（＋）：4例，pre（－），post（＋）：1例）認めた．pre（＋）の 4 例はいずれも腫瘍の局在が腹膜翻転部より口側（Ra，Rs）にかかる症例で深達度は se（a2）～ss（a1）高度であった．sm～ss（a1）軽度の10例はすべて pre（－）であった．また，post（＋）のものが 5 例あったが，うち Ra の ss 癌 1 例が post のみで（＋）であり，直腸剝離による癌細胞の漏出の可能性が示唆された．側方郭清を行った Rb 癌 4 例では pre，post とも（－）であったが，側方リンパ節転移は認めなかった．GS04094の RT-PCR 解析の結果と臨床病理

Fig. 3 Representative figure of GS04094 RT-PCR analyses on pelvic lavage samples of rectal cancer patients.
Case No. are shown on the top. pre, post：RNA extracted from the pelvic lavage sample obtained before manipulation of rectum, or after complete mobilization of rectum, respectively. n-LN：normal lymph node. n.c：negative control (distilled water).

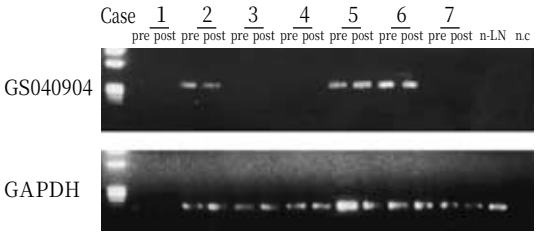


Table 1 Summary of the results of RT-PCR analyses

	pre	post
tumor location		
Rs	1/4(25%)	1/4(25%)
Ra	1/3(33%)	2/3(67%)
Rab	2/3(67%)	2/3(67%)
Rb	0/4(0%)	0/4(0%)
Dukes' stage		
A	0/4(0%)	0/4(0%)
B	1/4(25%)	1/4(25%)
C	3/6(50%)	4/6(67%)
depth of invasion		
sm～mp	0/5(0%)	0/5(0%)
ss(a)～	4/9(44%)	5/9(56%)
lymphnode metastasis(n)		
－	1/8(13%)	1/8(13%)
＋	3/6(50%)	4/6(67%)
lymphatic invasion(ly)		
－	0/5(0%)	0/5(0%)
＋	4/9(44%)	5/9(56%)
venous invasions(v)		
－	3/13(23%)	4/13(31%)
＋	1/1(100%)	1/1(100%)

Rs：rectosigmoid, Ra：upper rectum, Rb：lower rectum, sm：submucasal layer, mp：proper muscle layer, ss：subserosal layer, a：adventitia. The difference in depth of invasion(sm～mp vs. ss (a)～), lymph node metastasis(n(－)vs. n(＋))and lymphtic invasion(ly(－)vs. ly(＋))are statistically significant($p<0.05$).

学的諸因子との関連を **Table 1**にまとめた[12]．まだ解析された症例数は少ないが，深達度，リンパ節転移，リンパ管侵襲および pre(＋)においては腫瘍の局在との間に有意の相関を認めた．

4. 考　察

癌の治療方針の決定に際しては，癌の進行度すなわちその浸潤・転移の範囲を的確に診断することが重要である．外科領域においては，その診断は術前の種々の画像検査や内視鏡検査および生検によって総合的に判定され，手術術式を含めた治療方針が立てられ，手術時における所見を参考にして実際の手術が施行される．最終的な進行度の決定は手術で得られた摘出標本の病理組織学的検査によってなされ，予後評価や術後の補助療法の選択に利用される．しかしながら，手術時における術式の選択においては，最終の病理組織報告を待たず術前および手術中に得られた情報のみから癌の進展範囲を決定あるいは予測をせねばならず，ここに外科医のジレンマがある．進行直腸癌の術後の予後規定因子としては，肝転移とともに局所再発が重要である．我々の施設における直腸癌切除全症例（治癒切除，非治癒切除を含む）中の局所再発率は13%でそのほとんどは側方リンパ範転移を主体とした骨盤底再発である[13]．側方のリンパ節転移に対する側方リンパ節郭清に関しては，理論上の意義は認められるものの自律神経の損傷による QOL の低下との兼ね合いもあり，その妥当性に関してはいまだに結論が出ていないのが現状である[1)～4)11)]．しかしながら，明らかに側方リンパ節郭清が有用であったと考えられる症例が存在するのは臨床的な事実であり，問題は側方リンパ節郭清が有用である症例をいかに絞り込むかにある．現在，我々の施設では下部直腸（Rb）に腫瘍の占居部位があり，深達度が a1以深，もしくは術前・術中にリンパ節転移が認められた症例を側方郭清の適応としているが，現実的には甚だあいまいな基準である．そこで，我々は直腸癌手術中の骨盤腔遊離癌細胞の検出からの側方リンパ節転移予測の可能性を考え，今回の研究を行った．

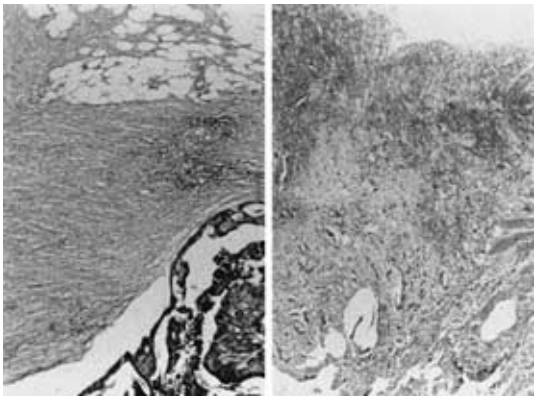
癌の手術におけるリンパ節郭清は通常 en bloc と称される方法で行われ，リンパ節にいたるリンパ管，血管等を含む組織が腫瘍と一括に切除される．直腸癌においても上直腸動脈に沿ういわゆる上方向の郭清は en bloc になされるが，側方の郭清は通常，直腸の剝離あるいは切除の終了後であり，側方リンパ節に至る側方向の脈管は必ずいったん離断される形となる．したがって，側方リンパ節転移の高危険群においては，直腸剝離操作時にそれらの脈管から癌細胞が遊離することが予想されるが，それを高感度に検出することがで

きれば側方リンパ節転移の指標として臨床上有用となる可能性がある．

一方，近年 PCR の手法を利用して体液やリンパ節中に存在する微量の癌細胞を検出し，癌の早期発見や進行度評価，治療方針の選択などに応用する試みが多く報告されている[14)~19)]．当初，p53，K-ras などの癌関連遺伝子変異をマーカーとして応用した報告が多かったが[20)21)]，この方法では原発巣における遺伝子変異が前もって確認されていることが必要で，また原発巣にその遺伝子変異が認められない症例に関しては応用できないという欠点があり，臨床応用上は不利である．それに対して，癌細胞あるいは上皮細胞に特異的に発現する遺伝子の転写産物を RT-PCR を用いて検出する方法は，原則としてすべての症例に適用可能であることから実地臨床の応用への期待が持たれている．現在まで CEA，cytokeratin 19，20，MUC1など種々の遺伝子が上皮細胞特異的な発現を示すものとして広く用いられ，大腸癌においてもリンパ節，血液，便などさまざまな組織からの微量な癌細胞の検出の試みが報告されてきた[21)~30)]．しかしながら，厳密な意味での上皮細胞特異的発現を示す遺伝子は現在のところ皆無であり，前述の種々の遺伝子も非常に微量な発現をリンパ球あるいは間葉系細胞において有している．すなわち微量な癌細胞を検出しようとして PCR の検出感度を上げるに従って偽陽性の結果が生じる可能性が高くなり，これは臨床応用の際に大きな問題となる．そこで，さらに特異性の高い新しい遺伝子マーカーが必要となるが，我々はヒトゲノムプロジェクトの一環として作製されている3′directed cDNA library を用いた組織特異的遺伝子マーカーの単離に注目してきた[8)~10)]．今回使用した遺伝子マーカー GS04094は homology search の結果，chloride ion channel をコードする遺伝子であることがわかっているが[8)]，cytokeratin や CEA よりも上皮細胞特異性が高く，本研究のような体腔液中の微量な癌細胞検出のマーカーとしてはより有用性が高いと考えられた．直腸癌の術中骨盤腔洗浄液を用いた本研究においても，GS04094の RT-PCR 解析により高感度に，また特異的に微量な大腸癌細胞の検出が可能であることが示された．

今回，対象とした骨盤腔洗浄液サンプルの内，開腹時のサンプル（pre）は最初，コントロールの意味で採取したものである．すなわち，pre（－），post（＋）となった場合に，直腸剥離操作により骨盤腔内に上皮細胞（癌細胞）が逸脱してきたと考えられるからである．しかしながら，実際の結果では14例中 4 例で pre（＋）となった．4 例はいずれも腹膜翻転部より口側に腫瘍占居部を有する深達度 ss 以深の症例である．また，**Fig. 4**に示すごとく，同じ ss 癌でも（－）症例（A）と（＋）症例（B）では漿膜下の癌の浸潤様式に差が認められた．すなわち，（－）症例では，漿膜表面と癌の先進部には比較的距離があり，また，癌の浸潤様式も膨張性で境界明瞭なのに対し，（＋）症例はいわゆる浸潤性増殖で境界も不明瞭である傾向が認められた．これは丁度，胃癌取扱い規約による胃癌の INFα，γに対応する違いである[31)]．以上から，いまだ推測の域を出ないが，pre（＋）の ss 癌症例においては漿膜表面に何らかの機序で癌細胞が漏出しているのではないかと考えられる．腹腔の内面を被う腹膜中皮細胞間には stomata と呼ばれる間隙がありリンパ管との交通があることが知られており，また，大網表面にも milky spot

Fig. 4　The representative histology of GS04094-RT-PCR-positive or negative upper rectal carcinoma with invasion to subserosal layer.
A．Case 3, upper rectal cancer（Ra）, depth：subserosal layer（ss）, lymph node metastasis：negative（no）, lymphatic invasion：severe（ly3）, venous invasion：negative（v0）There is a distance between the serosal surface and the invasion front of cancer and the margin of the cancer nest is very clear. B. Case 5, upper rectal cancer（Rs）, depth：subserosal layer（ss）, lymph node metastasis：positive（n1）, lymphatic invasion：moderate（ly2）, venous invasion：negative（v0）The invasion front of cancer is very close to the serosal surface and the scattering of the cancer cells can be seen just beneath the serosal surface. For the detail of classification, please see Ref. 12.



と呼ばれるリンパ組織が存在することなどから[32]，漿膜下の微小リンパ管を通じて漿膜表面に癌細胞が遊離する可能性は十分考えられるであろう．ただ，大腸のss癌における腹膜播種性転移の頻度は非常に低率であることから，これらの漏出癌細胞は着床して播種性転移を生じることなく，腹腔内のマクロファージなどに貪食されるのではないかと推測される．これは胃癌と大腸癌の播種性転移の頻度の差を考える時，非常に興味深い知見である．

腫瘍占居部位がRaにかかり同部の深達度がss以深のものではpreで（＋）となる症例があるので，当初目的とした側方リンパ節転移との関連の検索はRbに限局する症例が主な対象となることになる．まだ症例数が少なく結論は得られないが，現在のところ，RT-PCRの結果と側方リンパ節転移の有無との間に矛盾は認められず，本解析を用いた転移予測の可能性についてさらに症例を増やして検討中である．

今回検討に用いたRT-PCR解析において常に留意せねばならぬのは，陽性結果が必ずしも癌細胞の存在の絶対的な証拠とはなりえないことである．偽陽性を生じる不確定因子の存在も想定され，結果の判定には注意せねばならないが，個々の症例の詳細な病理組織学的検討とともに転移，再発などを含めた予後との比較検討が臨床上重要であると考えられる．

なお，本研究の要旨は，90th Annual Meeting of American Association for Cancer Research（1999年，Philaderphia），第54回日本消化器外科学会総会(1999年，名古屋)，第10回日本消化器癌発生学会(1999年，熊本)にて発表した．

文　献

1）Okubo K, Hori N, Matoba R et al：A novel system for large-scale sequencing of cDNA by PCR amplification. DNA Seq **2**：137―144, 1991
2）Okubo K, Hori N, Matoba R et al：Large scale cDNA sequencing for analysis of quantitative and qualitative aspects of gene expression. Nat Genet **2**：173―179, 1992
3）Ohkubo K, Yoshii J, Yokouchi H et al：An expression profile of active genes in human colonic mucosa. DNA Res **1**：37―45, 1994
4）Rich T, Gundreson LL, Low R et al：Patterns of recurrence of rectal cancer after potentially curative surgery. Cancer **52**：1317―1329, 1983
5）Pilipshen SJ, Heilweil M, Quan SHQ et al：Pattern of pelvic recurrence following definitive reactions of rectal cancer. Cancer **53**：1354―1362, 1984
6）Hojo K, Sawada T, Moriya Y：An analysis of survival and voiding, sexual function after wide iliopelvic lymphadenectomy in patients with carcinoma of the rectum, compared with comventional lymphadenectomy. Dis Colon Rectum **32**：128―133, 1989
7）Moriya Y, Hojo K, Sawada T et al：Significance of lateral node dissection for advanced rectal carcinoma at or below the peritoneal reflection. Dis Colon Rectum **32**：307―315, 1989
8）Ohnishi T, Tomita N, Miyoshi Y et al：Identification of a novel gene marker specific for epithelial cells by utilizing a 3′-directed cDNA library. Cancer Res **58**：2440―2444, 1998
9）冨田尚裕，大西　直，加納寿之ほか：3′directed cDNA libraryを用いた組織特異的遺伝子マーカーの検索と消化器癌の転移診断への応用．消癌の発生と進展　**9**：39―42, 1997
10）冨田尚裕，大西　直，多田正知ほか：大腸癌の新しい遺伝子マーカー．日本大腸肛門病会誌　**51**：1125―1131, 1998
11）Hida J, Yasutomi M, Fujimoto K et al：Does lateral lymph node dissection improve survival in rectal carcinoma? Examination of node metastases by the clearing method. J Am Coll Surg **184**：475―480, 1997
12）Japanese Society for Cancer of the Colon and Rectum：Japanese Classification of Colorectal Carcinoma. 1st English edition. Kanehara & Co., Ltd., Tokyo, 1997
13）多田政知ら：(私言)
14）冨田尚裕，門田卓士，小林哲郎ほか：外科におけるPCR（Polymerase Chain Reaction）臨床応用．外科　**57**：101―111, 1995
15）冨田尚裕，門田卓士，大西　直ほか：臓器癌における遺伝子診断―大腸癌．癌の臨　**42**：1615―1624, 1996
16）冨田尚裕，門田卓士，関本貢嗣ほか：大腸癌―診断と治療の進歩，4．分子病理学的観点からみた問題点と展望．日外会誌　**98**：366―372, 1997
17）Raj GV, Moreno JG, Gomella LG：Utilization of polymerase chain reaction technology in the detection of solid tumors. Cancer **82**：1419―1442, 1998
18）McLeod HL, Murray GI：Tomor markers of prognosis in colorectal cancer. Br J Cancer **79**：191―203, 1999
19）Sidransky D, Tokino T, Hamilton SR et al：Identification of ras oncogene mutations in the stool of patients with curable colorectal tumors. Science **256**：102―105, 1992
20）Hayashi N, Yanagisawa A, Kato Y et al：Genetic diagnosis of lymph-node metastasis in colorectal cancer. Lancet **345**：1257―1259, 1995
21）Gerhard M, Juhl H, Kalthoff H et al：Specific detection of carcinoembryonoic antigen expressing

tumor cells in bone marrow aspirates by polymerase chain reaction. J Clin Oncol **12**：725—729, 1994
22) Mori M, Mimori K, Inoue H et al：Detection of cancer micrometastases in lymph nodes by reverse transcriptase-polymerase chain reaction. Cancer Res **55**：3417—3420, 1995
23) Mori M, Mimori K, Ueo H et al：Molecular detection of circulating solid carcinoma cells in the peritoneal blood：The concept of early systemic disease. Int J Cancer **68**：739—743, 1996
24) Yoshida K, Sugino T, Bolodeoku J et al：Detection of exfoliated carcinoma cells in colonic luminal washings by identification of deranged patterns of expression of the CD44 gene. J Clin Pathol **49**：300—305, 1996
25) Gunn J, McCall JL, Yun K et al：Detection of micrometastases in colorectal cancer patients by *K 19* and *K 20* reverse-transcription polymerase chain reaction. Lab Invest **75**：611—616, 1996
26) Gotley DC, Reeder JA, Fawcett J et al：The deleted in colon cancer（DCC）gene is consistently expressed in colorectal cancers and metastases. Oncogene **13**：787—795, 1996
27) Gotley DC, Fawcett J, Reeder JA et al：Alternatively spliced variants of the cell adhesion molecule CD44 and Tumour progression in colorectal cancer. Br J Cancer **74**：342—351, 1996
28) Yoshida K, Sugino T, Goodison S et al：Detection of telomerase activity in exfoliated cancer cells in colonic luminal washings and its related clinical implications. Br J Cancer **75**：548—553, 1997
29) Jonas S, Windeatt S, O-Boateng A et al：Identification of carcinoembryonic antigen producing cells circulating in the bllod of patients with colorectal carcinoma by reverse transcriptase polymerase chain reaction. Gut **39**：717—721, 1996
30) Weitz J, Kienle P, Lacroix J et al：Dissemination of tumor cells in patients undergoing surgery for colorectal cancer. Clin Cancer Res **4**：343—348, 1998
31) 日本胃癌学会編：胃癌取扱い規約. 第13版. 金原出版，東京，1999
32) Hall JC, Heel KA, Papadimitriou JM et al：The pathobiology of peritonitis. Gastroenterology **114**：185—196, 1998

Molecular Staging of Rectal Cancer Using RT-PCR Analysis on Intraoperative Pelvic Lavage Samples

Naohiro Tomita, Masatomo Tada, Mitsugu Sekimoto, Masayuki Ohue,
Tadashi Ohnishi, Tetsushi Morita, Masakazu Ikenaga,
Yasuhiro Miyake, Nariaki Matsuura*
and Morito Monden

Department of Surgery II, Osaka University Medical School
*Department of Pathology, School of Allied Health Sciences, Faculty of Medicine, Osaka University

In the operation for advanced rectal cancer, some cancer cells may possibly emigrate from lateral blood- or lymph-vessels during mobilization of the rectum. This could be related to lateral lymphnode metastasis or local recurrence, although its detail is quitely unknown. In order to clarify this point, we tried to detect cancer cells in pelvic lavage fluid during rectal surgery by RT-PCR analysis using a new epithelial cell-specific gene marker, GS04094 (Cancer Res., 58, 2440-2444, 1998). During the operation for rectal cancer, pelvic lavage with 100 ml saline was performed before rectal manipulation (pre) and after complete mobilization of rectum (post), and each sample was then examined by cytologic and RT-PCR analyses. Among 14 cases of rectal cancer, 5 cases were shown to be positive by RT-PCR analysis indicating the possible presence of cancer cells. These included 4 cases with pre（+）and post（+）, and 1 case with pre（−）and post（+）. A correlation was demonstrated between RT-PCR positive diagnosis and depth of tumor invasion, lymph node metastasis, lymphatic invasion, or tumor location（only for pre（+）cases）. These preliminary results suggest that the emigration of cancer cells by breakdown of lateral vessels or the leakage of cancer cells to the serosal surface could be detected with high sensitivity using RT-PCR analyses of GS04094 on pelvic lavage samples during operations for rectal cancer. This indicates that RT-PCR analyses may be useful for tumor staging and/or the determination of therapeutic procedures.

Key words：colorectal cancer, RT-PCR, molecular staging

〔Jpn J Gastroenterol Surg 33：517—522, 2000〕

Reprint requests：Naohiro Tomita　Department of Surgery, Kansai Rosai Hospital, 3—1—69 Inaba-so, Amagasaki-city, 660-8511 JAPAN