

論文目録

岐阜大学

報告番号	乙第1003号	氏名	白子隆志
主論文			
各種免疫組織染色所見から評価した胃癌の生物学的悪性度と予後に関する臨床的研究			
第1編	癌細胞内核DNA量とProliferating cell Nuclear Antigen標識率からの検討	1冊	
平成7年7月発行 岐阜大医紀 43(4) : 459~468			
第2編	腫瘍形態学的特徴および予後とlaminin, typeIV collagen, p53, nm23免疫組織染色所見との関連		
平成7年7月発行 岐阜大医紀 43(4) : 469~479			
参考論文			
1)	外科的疾患におけるハイカリック液を基本液とした高カロリー輸液300例の検討	1冊	
昭和62年5月発行 JJPEN. 9(5) : 719~726			
2)	腸管内に穿破した空腸壁在動脈瘤の1治験例	1冊	
平成元年10月発行 外科 51(10) : 1073~1075			
3)	妊娠・出産を契機に発症した先天性胆道拡張症の2例	1冊	
平成4年7月発行 総合臨床 41(7) : 2309~2312			
4)	血液透析患者に合併した腹部大動脈瘤切迫破裂の1手術例	1冊	
平成4年11月発行 日本臨床外科医学会誌 53(11) : 2668~2671			
5)	尿管遺残に発生した放線菌症の1例	1冊	
平成5年9月発行 日本臨床外科医学会誌 54(9) : 2390~2394			
6)	結腸全摘後7年目に腹腔内desmoidを発症したGardner症候群の1例	1冊	
平成6年3月発行 日本消化器外科医学会誌 27(3) : 806~810			
7)	術前画像診断が有用であった乳児回腸重複症の1例	1冊	
平成6年12月発行 日本臨床外科医学会誌 55(12) : 3094~3098			
8)	肋骨原発骨肉腫の1例	1冊	
平成7年3月発行 臨床外科 50(3) : 367~370			
9)	若年者原発性空腸癌の1例	1冊	
平成7年3月発行 日本臨床外科医学会誌 56(3) : 574~578			
10)	核DNA量とPCNA, laminin, p53, nm23 免疫組織染色からみた胃癌の臨床病理学的検討	1冊	
平成7年6月発行 癌と化学療法 22(Supplement II) : 118~123			

主論文

各種免疫組織染色所見から評価した胃癌の生物学的
悪性度と予後に関する臨床的研究

第1編 癌細胞内核DNA量とProliferating Cell Nuclear
Antigen 標識率からの検討
平成7年7月発行 岐阜大医紀 43(4): 459-468

第2編 腫瘍形態学的特徴および予後と laminin, type IV
collagen, p53, nm23 免疫組織染色所見との関連
平成7年7月発行 岐阜大医紀 43(4): 469-479

白子隆志

岐阜大学医学部外科学第2講座
(主任: 佐治重豊)

各種免疫組織染色所見から評価した
胃癌の生物学的悪性度と予後に関する臨床的研究 (I)

癌細胞内核 DNA 量と Proliferating Cell Nuclear Antigen 標識率からの検討

白 子 隆 志

岐阜大学医学部外科学第 2 講座 (主任 佐治重豊教授)

Immunohistochemical Study on Relationship
between Cytological Behavior and Prognosis in Gastric Cancer Patients. I
Special References on Quantity of Nuclear DNA Contents and Labeling Index
of Proliferating Cell Nuclear Antigen

Takashi SHIROKO

Second Department of Surgery, Gifu University School of Medicine
(Director : Prof. S. SAJI)

Reprinted from

ACTA SCHOLAE MEDICINALIS UNIVERSITATIS IN GIFU

Vol. 43 No.4 July 1995

各種免疫組織染色所見から評価した 胃癌の生物学的悪性度と予後に関する臨床的研究 (I)

癌細胞内核 DNA 量と Proliferating Cell Nuclear Antigen 標識率からの検討

白子隆志

岐阜大学医学部外科学第2講座 (主任 佐治重豊教授)

Immunohistochemical Study on Relationship
between Cytological Behavior and Prognosis in Gastric Cancer Patients. I
Special References on Quantity of Nuclear DNA Contents and Labeling Index
of Proliferating Cell Nuclear Antigen

Takashi SHIROKO

Second Department of Surgery, Gifu University School of Medicine
(Director: Prof. S. SAJI)

The quantity of nuclear DNA contents by Feulgen method and the expression of PCNA antigen by immunohistochemical stain were investigated using paraffin-embedded specimen, obtained from 135 gastric cancer patients who underwent gastrectomy over 3 years, starting from 1982, and were compared with clinicopathological findings and their prognoses.

Results: 1) In the distribution of nuclear DNA ploidy pattern (DNA-p) of 135 gastric cancer patients, 87 cases (64%) showed diploidy (DY) and 48 cases (36%) showed aneuploidy (AY). 2) In the clinicopathological findings, incidence of DY was significantly higher in the lower age, superficial (0) type of gross findings, signet-ring cell (sig) of histological type and mucosal layer (m) of invasion than those of AY. While incidence of AY was significantly higher in positive cases of n, ly, v and P factors. The survival curve of DY was significantly higher than that of AY. 3) The mean PCNA-LI of 135 patients was $44.1 \pm 21.0\%$, and it was significantly increased in 2, 3, 4-type of gross finding than 0-type and in ps(+) of serosal invasion than ps(-), while it decreased significantly in sig. of histological findings. Moreover, it was significantly increased in positive cases of n, ly, v and P factors. The survival curve of low PCNA-LI (under 45%, LS) was significantly higher than that of high PCNA-LI (over 45%, HS). 4) Depending on the categories of DNA-p (DY; AY) and PCNA-LI (HS; LS), 135 patients were divided into four subclass; they were 47 cases as group I (DY, LS), 40 as II (DY, HS), 14 as III (AY, LS) and 34 as IV (AY, HS). The tumor size of group I was significantly smaller than that of group II and IV. The frequency of sig. was increased in group I. In histological stages, stage I was significantly increased in group I + III, and stage IV in group IV. The survival curve of group I was significantly higher than that of other groups.

From the above results, it is suggested that the measurement of both nuclear DNA contents and PCNA labeling index are useful for evaluation of cytological behavior of gastric cancer patients.

Acta Sch Med Univ Gifu 43: 459-468 (1995)

Key words: gastric cancer, DNA ploidy pattern, PCNA-LI, surgical prognosis, cytological behavior

緒言

従来、癌の生物学的悪性度は主に肉眼像、組織像、浸潤増殖様式、転移形式などの形態学的な臨床病理学的所見から評価されてきたが、これらは癌細胞本来の生物学的特性の一部分を表現しているに過ぎない。一方、癌治療成績向上のためには手術療法、化学療法、放射線療法、

免疫療法、温熱療法などの各種治療法が単独あるいは集学的に用いられ、さらには遺伝子治療なども登場しつつある。しかし、期待した治療成績を得るためには、個々の症例で癌の生物学的悪性度を正確に把握し、治療計画を立てることが肝要で、これが縮小手術の適応や、患者の quality of life (以下 QOL と略す) 向上に寄与すると推察される。

ところで、癌の生物学的悪性度は細胞増殖能と綿密に関連しており、分子生物学の発展に伴い種々の細胞増殖因子の存在が明らかにされ、その単離精製、分子構造や作用機序の解明、レセプターの探求や遺伝子構造の究明が行われている。その中で、細胞内核DNA量やProliferating Cell Nuclear Antigen (以下PCNAと略す)標識率は、癌細胞の増殖能や細胞回転を解析する上で有用で¹⁾⁻³⁾、生物学的悪性度の評価が可能と考えられている。

胃癌を対象とした検討でも細胞内核DNA量⁴⁾⁻⁸⁾やPCNA標識率⁹⁾⁻¹⁰⁾から癌の悪性度を予知し治療方針に役立てようとする報告が散見される。そこで著者は、術後10年を経過し予後の判明している胃癌患者のパラフィン包埋固定標本を用い、原発巣のDNA ploidy patternを検索し、臨床病理学的所見と対比し予後との関連を推察した。また、抗PCNA抗体を用い免疫組織化学的染色から癌細胞のPCNA標識率を算出し、DNA ploidy patternおよび臨床病理学的所見との関連、および細胞増殖能と予後との関連を比較検討した。かくすることにより胃癌の生物

TABLE 1 Backgrounds of 135 gastric cancer patients and their clinico-pathological findings

characteristics		cases (135)
sex	male (female)	86 (49)
age (year)	~29	2
	30~39	15
	40~49	16
	50~59	39
	60~69	41
average (mean ± SD)	57.6 ± 12.2	
gross findings	0	61
	1	2
	2	34
	3	25
	4	10
5	3	
histologic type	pap	1
	tub ₁	32
	tub ₂	43
	por	38
	sig	21
histologic stage	I	69
	II	13
	III	31
	IV	20
	others	2

pap: papillary adenocarcinoma

tub₁: well differentiated adenocarcinoma

tub₂: moderately differentiated adenocarcinoma

por: poorly differentiated adenocarcinoma

sig: signet-ring cell carcinoma

学的悪性度を客観的に評価せんと試みたわけである。

研究対象と研究方法

1. 研究対象

対象は、1982年から1984年までの3年間に教室で経験した胃癌症例のうち術後10年以上を経過し、予後が判明している135例である。症例の内訳は、男性86例、女性49例。年齢分布は50歳代が39例、60歳代が41例で、平均57.6 ± 12.2歳であった。胃癌取扱い規約¹¹⁾による組織学的病期進行度は、stage Iが69例、IIが13例、IIIが31例、IVが20例、不明が2例で、組織型はpapillary adenocarcinoma (pap) が1例、well differentiated adenocarcinoma (tub₁) が32例、moderately differentiated adenocarcinoma (tub₂) が43例、poorly differentiated adenocarcinoma (por) が38例、signet ring cell carcinoma (sig) が21例である (TABLE 1)。

2. 研究方法

1) 癌細胞内核DNA量の測定法

a) 組織切片の作製法: 手術時採取した切除標本を10%ホルマリン固定後、エタノール脱水、パラフィン包埋された長期保存ブロックから10 μmの連続薄層切片を作製し、脱パラフィン後DNA測定用に供した。

b) Feulgen染色の方法¹²⁾: 各薄層切片を蒸留水で洗浄後1N-塩酸で60°C、7分間温浴し、冷1N-塩酸と蒸留水で漸次洗浄後Schiff試薬(MERCK社製)にて60分間染色した。次いで亜硫酸水にて2分間・3回洗浄後水洗し、脱水、透徹、封入した。

c) 核DNA量の測定法: 細胞変性、重なりが少ないFeulgen染色標本を選び、二波長方式顕微鏡分光測光¹³⁾にて測定した。すなわち、マルチ測光顕微鏡MMSP(オリンパス社製)を用い、545 nmおよび490 nmの二波長での分光を測光した。なお、細胞内核DNA量は1標本中100個の癌細胞を測定し、同一標本中の正常リンパ球20個の測定平均値をコントロール(diploid=2C)としてヒストグラムを作製した (FIG. 1)。

d) 核DNA量分布パターンの解析法: 是永らの分類¹⁴⁾に準じてI・II・III・IVの4型に分類し、I・II型をdiploidy、III・IV型をaneuploidyとして以下の検討に用いた (FIG. 2)。

2) PCNA免疫組織化学的染色の方法

a) 組織切片の作製と染色: DNA量測定に用いた上記パラフィン包埋ブロックから連続する4 μmの薄層切片を作製し、脱パラフィン・脱ケンロール後、3%過酸化水素水にて内因性ペルオキシダーゼ処理(30分)、マイタロウエーブ処理(5分)後、抗PCNAモノクローナル抗体(DAKO社製EPOS-PCNA, PC10)を滴下し、室温にて60分間反応させた。最後に0.05 M TRIS-HCl Buffer (pH 7.8)にて洗浄後、3,3'-diaminobenzidine・過酸化水素水反応液(以下DABと略す)で発色させ、ヘマトキシリンにて核染色後、脱水、透徹、封入した。

b) 染色の判定と評価法: 光学顕微鏡下(10×20倍)で

標本内3か所を写真撮影後、染色の強弱に関わらず細胞核が染色されたものを陽性と判定し、各部位で癌細胞500個中の陽性細胞数から陽性率 (Labeling Index, 以下LIと略す)を求め、3か所の平均陽性率で表示した (FIG. 2)。

3) 統計学的検討の解析法

得られた測定値は mean ± standard deviation (SD) で表し、結果の解析は2群間での連続数値変数における分析にはgeneralized Wilcoxon検定を、順位のないカテゴリ変数による分析にはχ²検定を用い、生存率はKaplan-Meier生命表にて算出した累積生存率で表示しLogrank testおよびgeneralized Wilcoxon testにて判定した。なお、危険率5%未満を統計学的有意差ありと

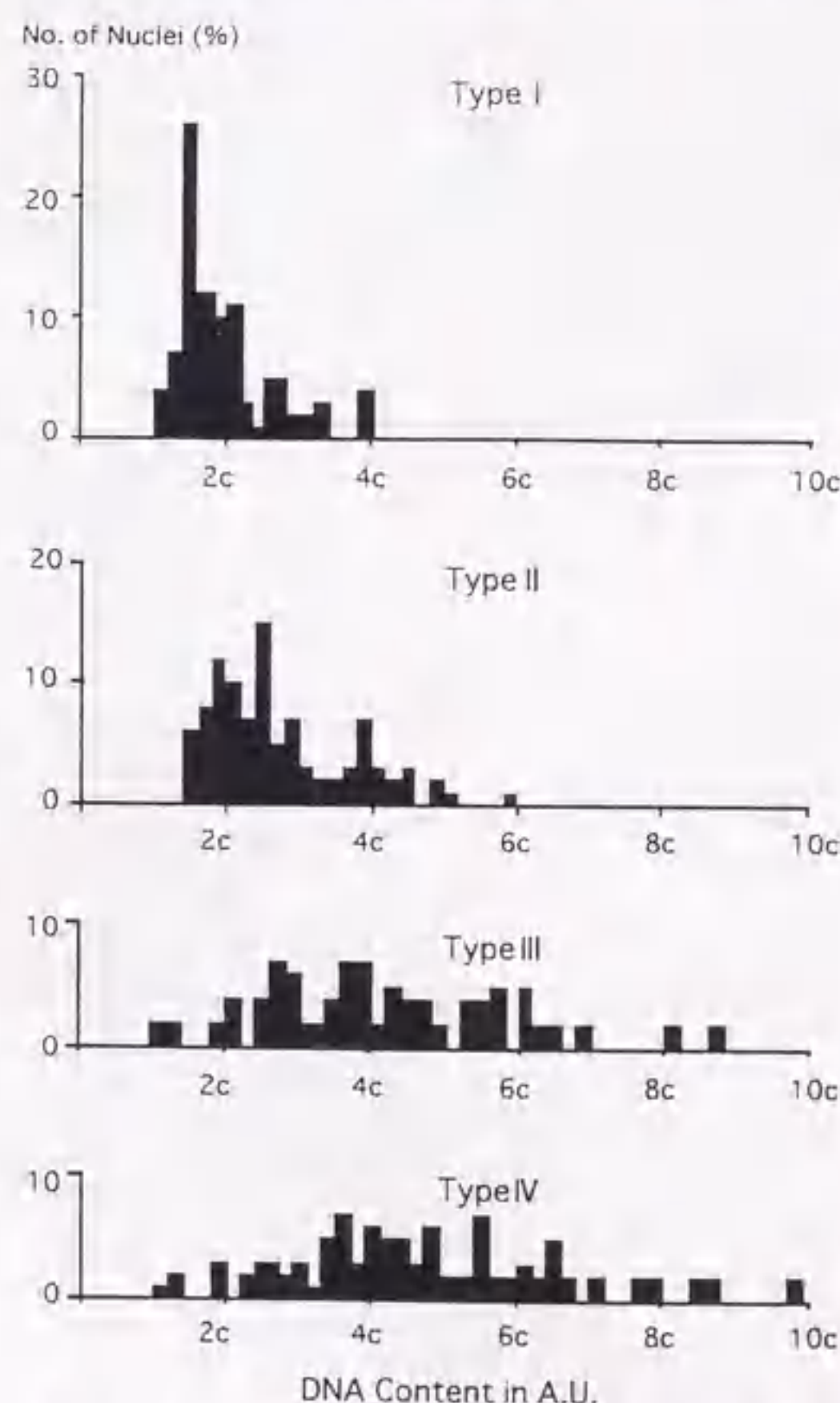


FIG. 1 Classification of nuclear DNA distribution pattern by Korenaga et al.¹⁴⁾

Type I: ≥ 90% of cells with < 4c with scattering of cells confined to < 6c.

Type II: > 10% of cells with < 4c and/or < 10% of cells with ≥ 6c.

Type III: ≥ 10% and ≤ 20% of cells with ≥ 6c.

Type IV: ≥ 20% of cells with ≥ 6c.

diploidy: Type I and II

aneuploidy: Type III and IV

評価した。

研究結果

1. 細胞内核DNA量について

1) 核DNA分布パターン

対象135例の核DNA分布パターンはI型が15例、II型が72例、III型が13例、IV型が35例で、diploidy群が87例(64.4%)、aneuploidy群が48例(35.6%)と、II型でdiploidyとなる頻度が高かった。年齢ではdiploidy群がaneuploidy群に比べ有意(p<0.05)に低年齢であったが、性別には差はみられなかった (TABLE 2)。

2) 臨床病理学的所見との関連

癌の肉眼型で表在癌(0型)はdiploidy群が80.3%で、1-4型の48.6%に比べ有意(p<0.01)に高頻度であったが、腫瘍最大径との間には差はみられなかった。組織型では、sigはdiploidy群に有意(p<0.05)に多かったが、高分化癌と低分化癌の間には差はみられなかった。壁深さではdiploidy群にmが有意(p<0.01)に多くみられたが、予後の漿膜面因子(以下psと略す)からは両群間に差はみられなかった。組織学的リンパ節転移(n)とリンパ管侵襲(ly)はaneuploidy群に陽性例の出現頻度が有意(p<0.01)に高く、血管浸潤(v)と肉眼的腹膜播種(P)もaneuploidy群に陽性例の出現頻度が有意(p<0.05)に高かった。また、組織学的進行度では、aneuploidy群にstageの進行したものが多く有意の相関(p<0.01)がみられたが、肉眼的肝転移(H)には差を認めなかった (TABLE 3)。



FIG. 2 PCNA staining in normal and cancer area

TABLE 2 Summary of DNA ploidy pattern in gastric cancer

DNA ploidy	I (15)	II (72)	III (13)	IV (35)
ploidy pattern	diploid	87 (64.4%)	aneuploid	48 (35.6%)
sex	male/female	55 (32)	31 (17)	
age (year)*	mean ± SD	55.8 ± 12.5	60.9 ± 11.1	

*p<0.05

3) 予後との関連

生存曲線上10年生存率は diploidy 群が61.8%, aneuploidy 群が36.5%で、前者の予後が後者に比べ有意に良好であった (p<0.01, FIG. 3)。

2. 細胞内 PCNA 標識率について

1) PCNA 標識率

検索した135例のPCNA標識率(以下PCNA-LIと略す)の平均値は44.1±21.0 (mean±SD)%であった。年齢との関連で20歳および80歳以上を除く各年齢層と60歳代との間に有意差(30歳と50歳代はp<0.01, 40歳と70歳代は

TABLE 3 Correlation between clinico pathological findings and DNA ploidy pattern in gastric cancer

characteristics		diploidy	aneuploidy
size(cm)	mean±SD	5.26±4.02	6.58±3.84
macroscopic type**	0	49	12
	1	2	0
	2	16	18
	3	12	13
	4	6	4
	5	2	1
histologic type*	pap	0	1
	tub1	20	12
	tub2	27	16
	por	21	17
	sig	19	2
depth of invasion**	m	38	6
	sm	10	7
	pm	5	7
	ss	14	14
	se,si	20	13
	prognostic serosal factor	ps(-)	61
ps(+)		26	15
lymph node metastasis**	n(-)	55	18
	n(+)	30	29
v factor#	v(-)	84	43
	v(+)	2	5
ly factor###	ly(-)	44	12
	ly(+)	42	36
peritoneal dissemination*	P(-)	83	42
	P(+)	4	6
liver metastasis	H(-)	87	45
	H(+)	0	3
histologic stage**	I	52	17
	II	7	6
	III	20	11
	IV	7	13

: vascular invasion ## : lymphatic invasion *p<0.05 **p<0.01

p<0.05)を認めたが、性別では差がみられなかった(TABLE 4)。

2) 臨床病理学的所見との関連

肉眼型で腫瘤型(I型)を除く2~4型は50%以上で、表在型(0型)の33.9±20.3%に比べ有意の高値を示した(p<0.01)。組織型でsigは他の組織型に比べ有意(p<0.01)の低値を示したが、pap, tub1, tub2, porの各群間には差はみられなかった。壁深達度でPCNA-LIは深達度が進むほど高値を示し、ps についても ps(+)はps(-)に比べ有意の高値を示した(p<0.01)。また、n, ly, v およびPの各因子が陽性である群のPCNA-LIは、これらが陰性の群に比べ高値を示し、有意の相関が観察された(n, lyとPはp<0.01, vはp<0.05)。組織学的進行度では病期が進むほどPCNA-LIは有意の高値を示した(stage IとIII, IVおよびstage IIとIVがp<0.01, stage IIIとIVがp<0.05, TABLE 5)。

3) PCNA 高標識群の特徴

PCNA-LIの平均値(44.1±21.0%)からcut off値を45%とし、未満群をlow score(以下LSと略す)群、以上群をhigh score(以下HSと略す)群とし、その特徴を比較検討した。その結果、性別には差はみられなかったが、年齢でHS群はLS群に比べ有意に高齢者が多かつ

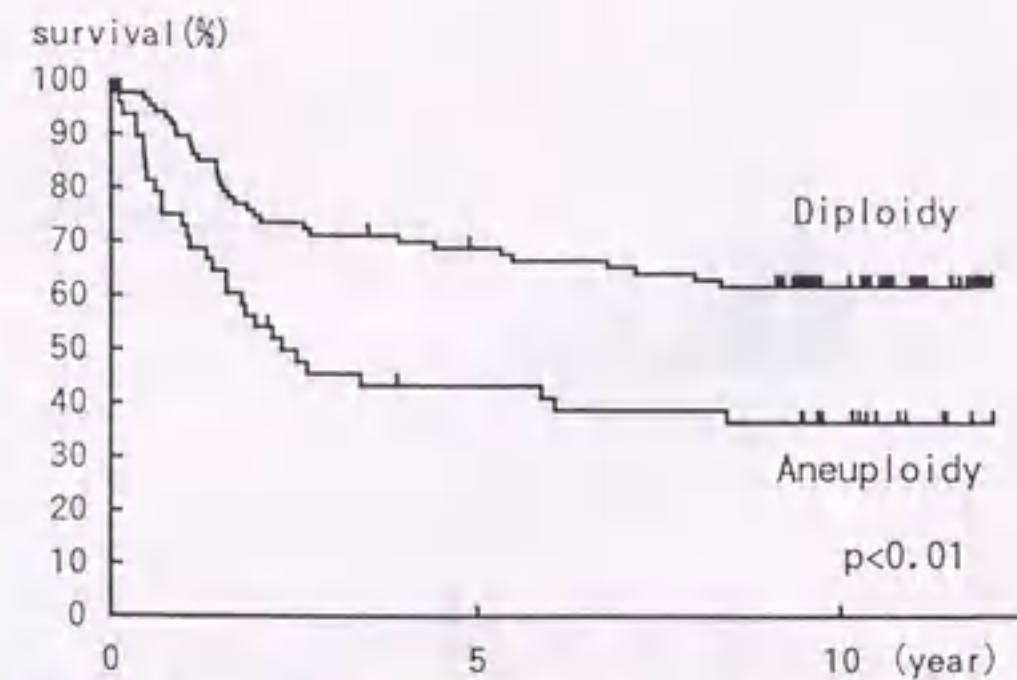


FIG. 3 Comparison of survival curves between DNA groups of diploidy and aneuploidy in 135 patients with gastrectomy

TABLE 4 Summary of average PCNA labeling index (LI) in gastric cancer

characteristics		cases	PCNA LI
sex	male	86	43.1±20.6
	female	49	45.9±22.1
age(year)	~29	2	40.0±24.5
	30~39*	15	32.7±20.7
	40~49**	16	40.4±26.2
	50~59*	39	39.6±18.6
	60~69	41	55.0±18.7
	70~79**	20	44.1±17.9
80~	2	29.7±36.7	

*p<0.01 **p<0.05

た(TABLE 6)。臨床病理組織学的所見では、腫瘍最大径はHS群が有意(p<0.01)に大きく、肉眼型はLS群に表在型が、HS群に中間型および浸潤型が多く、有意の相関がみられた(p<0.01)。組織型でsigがLS群に有意(p<0.01)に多かったが、pap, tub1, tub2, porの各群間で差はみられなかった。また、HSとなる頻度は壁深達度でss以上例に、psではps(+)例に(p<0.01)、n, ly, Pの各因子ではそれらの陽性例に多くみられ、有意の相関が観察された(n, lyとPはp<0.01, vはp<0.05)。組織学的進行度でも病期が進むほど有意にHS群が増加した(p<0.01, TABLE 7)。

TABLE 5 Correlation between clinico pathological findings and PCNA-LI in gastric cancer

characteristics		cases	PCNA-LI
gross findings	0	61	33.9±20.3
	1	2	62.2±8.7
	2*	34	53.0±18.2
	3*	25	51.9±15.8
	4**	10	51.5±23.4
	5	3	49.5±25.2
histologic type*	pap	1	46.1
	tub1	32	44.6±19.8
	tub2	43	46.3±19.6
	por	38	51.5±19.9
	sig	21	25.7±19.0
depth of invasion**	m	44	32.7±20.1
	sm	17	39.6±23.9
	pm	12	47.4±19.0
	ss	28	52.1±17.9
	se,si	33	53.9±17.1
	prognostic serosal factor	ps(-)	93
ps(+)		41	51.7±18.9
lymph node metastasis**	n(-)	73	38.9±21.1
	n(+)	59	50.5±19.5
v factor#	v(-)	127	43.9±20.5
	v(+)	7	52.5±19.9
ly factor###	ly(-)	56	37.0±20.5
	ly(+)	78	49.6±19.9
peritoneal dissemination*	P(-)	125	42.8±21.1
	P(+)	10	60.4±12.6
liver metastasis	H(-)	132	43.9±21.0
	H(+)	3	52.7±30.0
histologic stage**	I	69	38.2±21.3
	II	13	40.9±20.3
	III	31	49.8±18.2
	IV	20	60.3±13.7

: vascular invasion ## : lymphatic invasion *p<0.01 **p<0.05

TABLE 6 Significance of high PCNA-LI group (HS) in gastric cancer

characteristics	LS	HS	
sex	male(female)	41(20)	45(29)
age(year)*	mean±SD	54.6±12.6	60.1±11.4
size(cm)*	mean±SD	4.77±3.55	6.52±4.19

LS : LI<45% HS : LI≥45% *p<0.01

TABLE 7 Correlation between pathological findings and high PCNA-LI group(HS) in gastric cancer

characteristics	LS(<45%)	HS(≥45%)	
gross findings*	0	40	21
	1	0	2
	2	11	23
	3	6	19
	4	2	8
	5	2	1
histologic type**	pap	0	1
	tub1	15	17
	tub2	19	24
	por	11	27
	sig	16	5
depth of invasion*	m	30	14
	sm	9	8
	pm	4	8
	ss	10	18
	se,si	8	25
	prognostic serosal factor*	ps(-)	49
ps(+)		12	29
lymph node metastasis*	n(-)	41	32
	n(+)	19	40
v factor#	v(-)	57	70
	v(+)	3	4
ly factor##	ly(-)	34	22
	ly(+)	27	52
peritoneal dissemination**	P(-)	60	65
	P(+)	1	9
liver metastasis	H(-)	60	72
	H(+)	1	2
histologic stage*	I	40	29
	II	7	6
	III	11	20
	IV	2	18

: vascular invasion ## : lymphatic invasion *p<0.01 **p<0.05

4) 予後との関連

生存曲線で5年生存率はLS群が71.8%とHS群の40.1%に比べ、また10年生存率はLS群が66.7%とHS群の31.0%に比べ共にLS群の予後が有意に良好であった($p < 0.001$, FIG. 4)。

3. 癌細胞内核 DNA 量と PCNA 標識率との関連について

1) 両因子の相関性について

今回施行した胃癌135例の検索で、DNA ploidy pattern と PCNA-LI との間に有意($p < 0.01$)の相関がみられた(TABLE 8)。すなわち、aneuploidy 48例中 HS となる頻度は70.1%で、diploidy 87例中 LS となる頻度は54.0%であった。

2) 亜分類による検討

上記結果から、DNA ploidy pattern を diploidy と aneuploidy に、PCNA-LI を LS と HS に分け各群の組み合わせから I, II, III, IV群の4型に亜分類し、臨床病理学的所見と予後との関連を比較検討した。

a) 症例の内訳: I群は47例、II群は40例、III群は14例、IV群は34例に分類されたが、III群の頻度がやや少なかった。性別では各群間に差はみられなかったが、平均年齢はIV群が62.4±10.5歳とI群の53.7±12.8歳に比べ高齢でI-IV群間に有意差($p < 0.01$)がみられた(TABLE 9)。

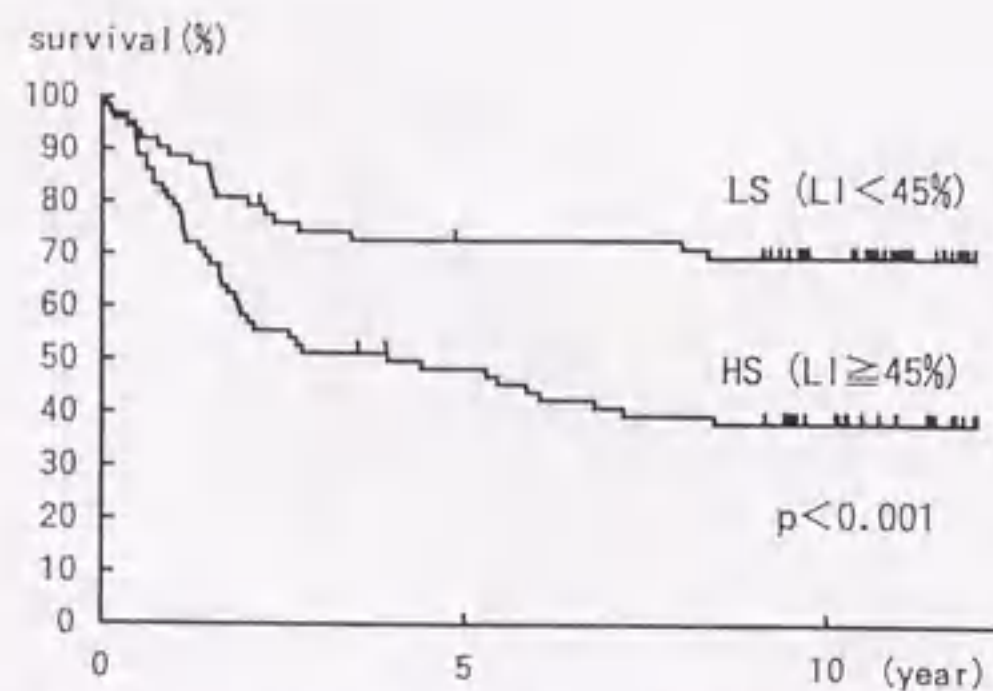


FIG. 4 Comparison of survival curves between PCNA-LI groups of high score ($\geq 45\%$) and low score ($< 45\%$) in 135 patients with gastrectomy

TABLE 9 Distribution of 135 gastric cancer on subclassification by combination with DNA ploidy pattern and PCNA-LI

characteristics ^{a)}	group I	group II	group III	group IV
cases	47	40	14	34
sex				
male (female)	31 (16)	24 (16)	10 (4)	21 (13)
age (year)				
mean±SD	53.7±12.8 ^{a)}	58.2±11.9	57.5±12.1	62.4±10.5 ^{b)}

a) b) : $p < 0.01$

※) group I : DNA diploidy and PCNA-LI $< 45\%$ group III : DNA diploidy and PCNA-LI $\geq 45\%$
group II : DNA aneuploidy and PCNA-LI $< 45\%$ group IV : DNA aneuploidy and PCNA-LI $\geq 45\%$

b) 臨床病理学的所見と予後との関連: 腫瘍最大径は I 群 (4.48±3.73 cm) は II 群 (6.18±4.20 cm) および IV 群 (6.92±4.20 cm) に比べ有意に小さく ($p < 0.01$)、肉眼型で I 群は 0 型に、IV 群は 2, 3, 4 型に多く、I-IV 群間の比較で有意差がみられた ($p < 0.01$)。組織型で I 群は sig が多くなる傾向 ($p = 0.056$) がみられ、壁深達度で I 群に m, sm が、IV 群に pm 以上が有意に多かった ($p < 0.01$)。組織学的進行程度で I 群と III 群に stage I が、II 群に stage I・III が、IV 群に stage IV が多く、有意の相関 ($p < 0.01$) がみられた。また、ps では I-II 群間に有意差 ($p < 0.01$) が、n では I-III 群および I-IV 群間で有意差 ($p < 0.01$) が、ly では I 群と II・III・IV 群間で有意差 ($p < 0.01$) が、P では I-II 群および I-IV 群間で有意差 ($p < 0.05$) がみられたが、v および H 因子間では有意の関連は観察されなかった (TABLE 10)。

c) 予後との関連: 生存曲線上 I・II・III・IV 群の順に予後が不良であり、I 群と II・III・IV 群との間に有意差がみられた ($p < 0.01$, FIG. 5)。すなわち、DNA が diploidy で LS 症例の予後が最も良好で、aneuploidy でも LS 例の予後は比較的良好であった。

考 察

増殖相にある細胞は、 $G_1 \rightarrow S \rightarrow G_2 \rightarrow M$ という細胞周期を繰り返すことにより、分裂、増殖を行う。ヒトにおいては恒常的に増殖を行っている細胞は少数であり、その増殖は増殖因子ならびに細胞間の相互作用により厳密に制御されている。この増殖相の細胞に発現している物質を増殖細胞のマーカー (増殖関連抗原) として用いれば、生体中の少数の増殖細胞集団と癌細胞の検出が可能であろう。勿論、ヒト癌で腫瘍特異抗原が明らかとなれば悪性度の解明も飛躍的な発展が期待されるが、細胞融合法を用いた単抗体作製手技を駆使しても、癌関連抗原の存在は未だ定かではない。

TABLE 8 Relationship between DNA ploidy pattern and PCNA Labeling Index

PCNA-LI	diploidy(87)	aneuploidy(48)
LS(low score, $< 45\%$)	61 (70.1%)	14 (29.1%)
HS(high score, $\geq 45\%$)	26 (29.9%)	34 (70.9%)

TABLE 10 Correlation between clinico-pathological findings and subclassification according to combination of ploidy pattern and PCNA-LI (45%)

characteristics		group I (47)	group II (40)	group III (13)	group IV (32)
size (cm)	mean±SD	4.48±3.73 ^{a)}	6.18±4.20 ^{b)}	5.74±2.75	6.92±4.20 ^{c)}
gross findings	0	35	14	5	7
	1	0	2	0	0
	2	5	11	6	12
	3	4	8	2	11
	4	2	4	0	4
	5	1	1	0	
histologic type	pap	0	0	0	1
	tub1	10	10	5	7
	tub2	15	12	4	12
	por	8	13	3	14
	sig	14	5	2	0
depth of invasion*	m	29	10	2	4
	sm	6	4	3	4
	pm	2	3	2	5
	ss	5	9	5	9
	se,si	6	14	2	11
prognostic serosal factor	ps (-)	38 ^{d)}	23 ^{a)}	11	22
	ps (+)	9	17	3	12
lymph node metastasis	n (-)	33 ^{f)}	22 ^{e)}	8	10 ^{b)}
	n (+)	13	17	6	23
v factor#	v (-)	44	40	13	30
	v (+)	2	0	1	4
ly factor##*	ly (-)	30	14	4	8
	ly (+)	17	26	10	26
peritoneal dissemination**	P (-)	47	36	13	29
	P (+)	0	4	1	3
liver metastasis	H (-)	47	40	13	32
	H (+)	0	0	1	2
histologic stage*	I	32	20	8	9
	II	5	2	2	4
	III	8	12	3	8
	IV	1	6	1	12

: vascular invasion ## : lymphatic invasion

a)-b), a)-c), d)-e), f)-g), f)-h), * : $p < 0.01$ ** : $p < 0.05$

ところで、癌細胞の増殖能と悪性度との間に密接な関連が存在し、細胞増殖程度を客観的に定量化できれば臨床病理学的意義のみならず、予後推察上からもきわめて重要な情報を提供することになる。現在、細胞増殖能評価法として細胞内核 DNA 量⁴⁾⁶⁾、bromodeoxyuridine (BrdUrd) 標識率⁵⁾¹⁵⁾、Ki-67 抗原¹⁾、orunithine decarboxylase (ODC) 活性¹⁶⁾、Ag-NORs¹⁷⁾¹⁸⁾、PCNA 陽性細胞比率¹⁹⁾⁻²¹⁾などが試みられ、これらの組み合わせから悪性度が評価されている。

そこで、著者は術後10年以上を経過し予後の判明している胃癌症例を対象に、癌細胞内核 DNA 量を測定し ploidy

pattern を評価したうえで、同一連続薄層切片を用い PCNA 染色し互いに比較検討した。また、DNA ploidy pattern を diploidy と aneuploidy の 2 群に、PCNA-LI を LS と HS に分け各群の組み合わせから 4 型に亜分類し同様比較検討し、上記諸結果を得たわけである。以下これらにつき考察する。

細胞内核 DNA 量について

核 DNA 量の測定には従来から顕微分光測光法と flow cytometry 法が用いられてきたが、その選択は現時点でも議論の多いところである。すなわち、前者は隣接する切片で癌細胞が存在する部分を確認しながら対応する切

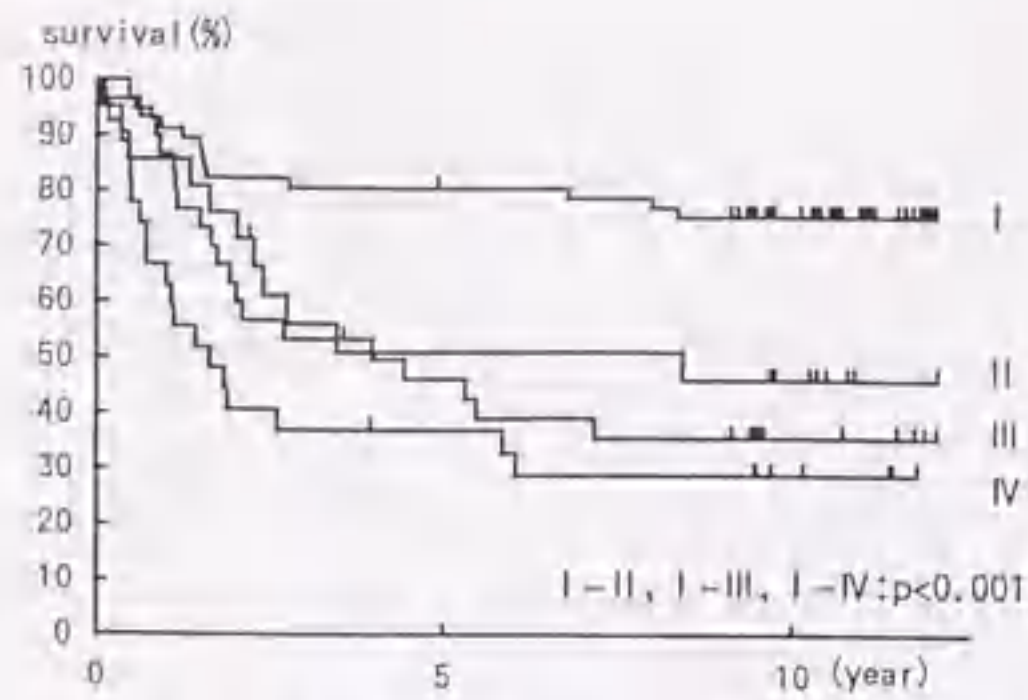


FIG. 5 Comparison of survival curves among subclass according to the combination of DNA ploidy pattern and PCNA LI in 135 patients with gastrectomy

片で個々に測光できるため、正常部分や細胞の増殖・壊死部分を除外できる利点があるが、一度に100~200個の測定が限度で客観性に乏しいという欠点が指摘されている。一方、後者は一度に1万個以上の癌細胞を同時に測定できるため客観性に優れているが、正常部分や細胞の増殖・壊死組織が混入する可能性と、測定に多量の検体を要するなどの欠点が存在する。したがって、研究目的に即した測定法の選択が肝要と考えられる。本研究で著者は、教室の近石⁴⁾、藤山²²⁾らの方法に準じて核DNA量を測定し、是永らの分類¹⁴⁾に準じてdiploidyとaneuploidyの二つに大別したが、各種免疫組織染色所見と対比する本研究においては一応的を得た測定法と考えている。

まず、組織学的進行程度との関連では、一般に病期進行に伴ってaneuploidyを示す頻度が増加すると報告されている²⁴⁾が、今回の検討でも同様の所見が観察された。一方、胃癌取り扱い規約¹⁾上の各因子では、aneuploidy群ではリンパ管侵襲、リンパ節転移が有意に高率であった。ploidy patternとの関連で、津嶋²³⁾は組織型、深達度、脈管侵襲、リンパ節転移などの因子との関連を否定しているが、木村⁹⁾は腹膜浸潤陽性、リンパ節転移陽性、静脈侵襲陽性、リンパ管侵襲陽性はaneuploidy群に有意に多く、米村⁸⁾もBorrmann 4型胃癌で静脈侵襲、リンパ管侵襲、腹膜播種での有意の関連を指摘しており、関連ありとする報告の方が多いためである。しかし、結果のばらつきは、検体採取時期の違い(生検材料か切除後標本か)や採取部位の違い(同一腫瘍内のheterogeneityの問題)²⁴⁾などがあり断言困難であるが、著者は、aneuploidy群では増殖能や転移能が共に高いとする考えを支持するものである。

予後との関係で、Korenaga²⁵⁾はlow ploidy群に比べhigh ploidy群で有意に不良と、また米村³⁰⁾、太山³⁷⁾もdiploidy群に比べaneuploidy群が有意に不良と報告している。教室の近石⁴⁾、藤山²²⁾らの検討でもhigh ploidy群の予後は有意に不良で、著者の検討でも同様の結果であり、予後との関連では一応のconsensusが得られてい

ると考えている。それ故、病期進行にともなってaneuploidy例の頻度が増加し、またaneuploidy例にリンパ節転移陽性例が多かった研究結果も了解可能で、DNA ploidy patternが癌悪性度を反映した予後規定因子となりうる可能性が示唆されたわけである。

細胞内PCNA標識率について

PCNAは、1978年Miyachi²⁷⁾によって全身性エリテマトーデス患者の自己抗体に反応する増殖細胞核抗原として見いだされ、その後Bravo²⁸⁾によって別途に見いだされていた増殖細胞核内に発現する36 kDの酸性物質cyclinと同一物質であることが判明した。また、PCNAはDNA polymerase δ の活性発現に必須なauxiliary proteinとしても知られている²⁹⁾。一方、DNA polymerase δ は、3、5-exonuclease活性を有する唯一の酵素であり、ヌクレオチドのミスペアを校正する作用を有している^{30,31)}。これらの発見によりPCNAは、DNAの適正な複製に必須な増殖期関連核蛋白の一つと考えられる。

近年、免疫組織学的染色法が進みPCNAの検索も迅速・簡便となり、増殖活性の指標として盛んに研究されている^{20,32)}が、問題点として染色濃度や陽性細胞比率が、標本の固定液や固定時間により差が生ずる可能性が指摘されてきた³³⁾。しかし、マイクロウェーブ処理法の登場により過去のホルマリン固定・パラフィン包埋ブロックでも安定した抗原性の回復と染色性が得られるようになった²⁸⁾。そこで著者もホルマリン固定・パラフィン包埋ブロックから作製した薄層切片を脱パラフィン後マイクロウェーブ処理し、DAKO EPOS PCNA (PC-10)の専用抗体を用い免疫組織染色法により検索したわけである。

ところで、PCNA活性は正常粘膜では増殖帯に一致してみられ、その細胞内局在は核内に顆粒状に認められる。腫瘍内での染色性は必ずしも一定ではなく、大きな腫瘍では壊死部や中心部潰瘍底で周辺部よりも低く、同一腫瘍内でのheterogeneityの問題が指摘されている。そこで著者は、3か所の腫瘍先進部から500個の癌細胞を選択して陽性細胞比率を求めたが、平均LIは44.1 \pm 21.0%であった。組織型別検討でsigで有意の低値を示したが、高ら²⁴⁾や山際³⁴⁾も同様所見を報告し、その理由として低分化腺癌の特殊型であるsigはPCNA陽性率の低いG₀期の特殊な分化を示す細胞系列に属するためと解釈している。一方、深達度別検討でPCNA LIは、深達度が進むほど高値を示しps(+)群はps(-)群に比べ有意の高値を示したが、前田³⁵⁾も内視鏡生検材料でsm癌はm癌に比べ有意の高値で、sm癌でもsm₁はsm₂に比べて高値であったと報告している。それ故、LIは先進部で高く増殖が盛んであることを意味し、腫瘍中心部は血流低下・壊死のため周辺部よりも低下していたと推察される。リンパ節転移に関してはn(+)群はn(-)群に比べ有意の高値を示し、米村⁹⁾と同様に癌細胞増殖能とリンパ節転移との関連が示唆された。この観点から前田³⁵⁾は術前生検材料でPCNA-LI値から早期癌例でのリンパ節転移の予後が可能とし、縮小手術への指標となる可能性を

示唆している。なお、stage別検討でも病期進行に伴いPCNA LIは有意に高値を示したが、壁深達度やリンパ節転移により高値を示すことから当然の結果と考えている。

予後との関連を著者はPCNA-LIの平均値からLS群とHS群に分けて検討したが、HS群の予後が有意に不良であった。PCNA免疫組織染色でホルマリン固定時間の問題などからretrospective studyがなく、予後との関連を文献的に考察できなかったが、米村⁹⁾は術前内視鏡生検材料での検討で高値群は予後不良と報告しており、今後更新の検索が必要である。

癌細胞内核DNA量とPCNA標識率との関連について

著者の検討で核DNA量がaneuploidy群ではPCNA-LIが有意の高値を示したが、今津²⁴⁾や米村⁹⁾も同様所見を報告している。さらに両群の組み合わせからI、II、III、IVの4群に垂分類し長期予後との関連を検討したが、当然ながらdiploidyでLS群(I群)の予後が最も良好で、aneuploidyでHS群(IV群)は不良であった。勿論、I群の背景因子にはps(-)、n(-)例がII群に比べ、またn(-)例がIV群に比べ有意に多かったが、se、siやn(+)例も相当程度含まれていた。なお、同様傾向はstage別検討でも観察されるので、癌細胞の増殖能を表現する上でDNA ploidy patternとPCNA-LI、およびその組み合わせによる総合評価は、胃癌の新しい予後規定因子として臨床応用できる可能性が示唆されたものと考えている。

結 語

1982年から3年間に手術した胃癌症例中、術後10年以上を経過し予後が判明している135例のパラフィン包埋ブロックからFeulgen法による癌細胞内核DNA量測定とPCNA免疫組織染色を施行し、臨床病理学的所見および予後との関連を検討し、以下の諸結果を得た。

A. 細胞内核DNA量の検索結果

1. 対象135例のDNA ploidy patternはdiploidy(DY)が87例(64%)、aneuploidy(AY)が48例(36%)であった。

2. 臨床病理学的所見との関連で、有意にDY群はAY群に比べ低年齢に、肉眼型では表在癌(0型)に、組織型別ではsigに、壁深達度ではm癌に多く認められた。また、AY群はn、ly、v、P因子陽性例で頻度が有意に高く、病期進行度でもstageの進行例に多く、有意の相関がみられた。

3. 生存曲線でAYはDYに比べ有意に不良であった。以上の所見より、核DNA量測定は胃癌の生物学的悪性度評価法として有用である可能性が示唆された。

B. 細胞内PCNA標識率の検索結果

1. 陽性細胞比率は、平均44.1 \pm 21.0%で、60歳代は20および80歳以上を除く各年齢層に比べ有意の高値を示した。

2. 臨床病理学的所見との関連で、PCNA-LI値は肉眼型で腫瘍型を除く2~4型が表在型より有意の高値を示し、

組織型ではsigが有意の低値を、壁深達度ではps(+)がps(-)に比べ有意の高値を示した。また、n、ly、vおよびPの陽性例で高値を示し、有意の相関がみられた。なお、病期進行度でも病期が進むほど有意の高値を示した。

3. 生存曲線上、HS群はLS群に比べ有意に予後不良であった。

以上の所見から、PCNAは細胞の増殖能の判定に有用であると考えられた。

C. 核DNA量とPCNA標識率との関連

核DNA量をDYとAYに、PCNA-LIを45%以上(HS群)と未満(LS群)に分け、4型に垂分類した。その結果、

1. DNA ploidy patternとPCNA-LIとの間に有意の相関がみられた。

2. 垂分類では、I群(DY、LS)が47例、II群(DY、HS)が40例、III群(AY、LS)が14例、IV群(AY、HS)が34例で、年齢でIV群がI群に比べ有意に高齢であった。

3. 病理所見では、腫瘍径はI群に比べII群およびIV群が大きく、肉眼型はI群に0型が多く、IV群に2、3、4型が多くみられ、I-IV群間で有意差がみられた。組織型はI群にsigが多い傾向が、壁深達度はI群にm、smが、IV群にpm以上に有意に多かった。病期進行度はI群とIII群にstage Iが、II群にstage I・IIIが、IV群にstage IVが多く、有意の相関がみられた。

4. リンパ節転移はI-IIIおよびI-IV群間の比較で、lyはIとII・III・IV群間の比較で、PはI-IIおよびI-IV群間の比較でそれぞれ有意差がみられた。

5. 生存曲線上、I・II・III・IV群の順に予後不良で、I群とII・III・IV群間の間に有意差がみられた。

以上の結果、癌細胞内核DNA量測定とPCNA染色の組み合わせは腫瘍増殖能の見地から、胃癌における生物学的悪性度の評価法として有用で、臨床応用の可能性が示唆された。

文 献

- 1) 佐々木典典, 村上知之, 小野貞英, 菅井有: フローサイトメトリーによるDNAヒストグラムと免疫染色による増殖細胞抗原陽性率との比較—その臨床的意義—. 病理と臨 9, 894-901 (1991)
- 2) 玉井克之: DNA複製装置と増殖関連抗原. 病理と臨 9, 855-861 (1991)
- 3) 横田淳: ヒト癌における癌遺伝子と癌抑制遺伝子の異常. Mol Med 31, 4-11 (1994)
- 4) 近石登庸雄: 胃癌の組織学的悪性度と治療効果予測法としての細胞内核DNA量測定の意義に関する臨床的研究. 岐阜大医紀 40, 135-166 (1992)
- 5) 大山繁和, 米村豊, 宮崎逸夫: Anti-BrdU monoclonal antibodyを用いたFlow cytometryによる胃癌の細胞動態の解析. 日外会誌 90, 1848-1854 (1989)
- 6) 木村寛伸, 米村豊, 岩佐和典, 大山繁和, 小坂建夫, 三輪英一, 宮崎逸夫: Flow cytometryによる進行胃癌のDNA ploidy patternと予後. 日外会誌 92,

- 288-292 (1991)
- 7) 橋爪立雄, 山浦武彦, 福田敬宏, 杉原志朗, 中島孝, 長町幸雄: sm胃癌における核DNA量とリンパ節転移についての検討. 日外会誌 **92**, 397-400 (1991)
 - 8) 北村正次, 荒井邦佳, 宮下 薫: 漿膜下浸潤胃癌 (ss胃癌) の臨床病理学的検討および予後規定因子としてのDNA ploidy pattern. 日消外会誌 **25**, 2103-2109 (1992)
 - 9) 米村 豊, 山口明夫, 加治正英, 伏田幸夫, 津川浩一郎, ルイス・フォンセカ, 宮崎逸夫: 胃癌におけるProliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA) 標識率と悪性度. 日外会誌 **93**, 661 (1992)
 - 10) 前田 清, 鄭 容錫, 小野田尚佳, 加藤保之, 有本裕一, 新田敦範, 曾和融生: 早期胃癌におけるProliferating Cell Nuclear Antigen 標識率の術前生検標本での検討. 日消外会誌 **26**, 2740-2744 (1993)
 - 11) 胃癌研究会編: 胃癌取り扱い規約, 11版. 東京, 金原出版, 1985. 146p
 - 12) 杉山繁雄: 核酸染色 4. フォイルゲン反応. Med Technol **5**, 1018-1019 (1977)
 - 13) Leuchtenberger C, Leuchtenberger R, Davis AM: A microspectrophotometric study of deoxyribonucleic acid (DNA) content in cell of normal and malignant human tissues. Am J Pathol **30**, 65-85 (1954)
 - 14) 是永大輔, 原口 勝, 辻谷俊一, 岡村 建, 玉田隆一郎, 杉町圭蔵, 井口 潔: 細胞核DNA量分析による胃癌のリンパ節転移に関する研究. 癌の臨 **32**, 45-49 (1986)
 - 15) 星野孝夫: がんの悪性度診断 BrdU (bromodeoxyuridine)-脳腫瘍への応用-. 病理と臨 **9**, 862-867 (1991)
 - 16) 星野 豊, 寺西 寧, 寺島信也, 伊藤藤男, 今野 明, 井上 仁, 元木良一: 胃癌におけるオルニチン脱炭酸酵素活性と増殖細胞核抗原の意義. 日外会誌 **95**, 743-752 (1994)
 - 17) 笹野公伸, 宮崎修吉, 伊達文子, 佐藤郁郎: がんの悪性度診断 AgNORs-病理組織診断への応用-. 病理と臨 **9**, 890-893 (1991)
 - 18) 津屋 洋: 大腸癌の生物学的悪性度と予後の関連に関する臨床的研究 (II) Nucleolar organizer regionsからの検討. 岐阜大医紀 **42**, 379-288 (1994)
 - 19) 松野吉宏, 向井 清: がんの悪性度診断 増殖細胞核関連抗原 (PCNA). 病理と臨 **9**, 879-878 (1991)
 - 20) 鈴木孝夫, 岸本浩次, 家泉桂一, 岩沢篤郎, 中野 浩, 磯山恵一, 今井 満, 中川信廣, 近藤峰子, 光谷俊幸: 増殖細胞核抗原 (PCNA) の基礎的検討. 臨検 **36**, 81-84 (1992)
 - 21) 高 長, 中西功夫: 増殖細胞核抗原 (PCNA) 免疫染色による胃癌細胞増殖能の検討. 金沢大十全医会誌 **100**, 974-980 (1991)
 - 22) 藤山 徹: 胃癌術前血清 CEA 値と組織 CEA 局在様式からみた予後と, CEA 陽性癌細胞の核DNA量からみた生物学的悪性度に関する検討. 岐阜大医紀 **39**, 598-631 (1991)
 - 23) 津嶋秀史: BrdU 標識率を用いた胃癌細胞動態の臨床的研究-DNA ploidy pattern, EGF との関連性-. 日外会誌 **94**, 41-49 (1993)
 - 24) 今津浩喜, 船曳孝彦, 落合正宏, 丸山善久, 中村耕治, 福井博志, 亀井克彦, 山口 久, 長谷川 茂, 新井一史, 森 紀久朗, 笠原正男: 進行胃癌の原発巣及び同転移リンパ節におけるDNA ploidy pattern, proliferation index およびProliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA) の検討. 日臨外医会誌 **54**, 2962-2969 (1993)
 - 25) Korenaga D, Okumura T, Saito A, Baba H, Sugimachi K: DNA ploidy is closely linked to tumor invasion, lymphnode metastasis, and prognosis in clinical gastric cancer. Cancer **62**, 309-613 (1988)
 - 26) 米村 豊, 杉山和夫, 鎌田 徹, 藤村 隆, 山口明夫, 三輪晃一, 宮崎逸夫: Borrmann 4型胃癌のDNA ploidy pattern. 日外会誌 **90**, 681-685 (1989)
 - 27) Miyachi K, Fritzler MJ, Tan EM: Autoantibodies to nuclear antigen in proliferating cells. J Immunol **121**, 2228-2234 (1978)
 - 28) Bravo R, Celis JE: A search for differential polypeptide synthesis throughout the cell cycle of HeLa cells. J Cell Biol **84**, 795-802 (1980)
 - 29) Bravo R, Frank R, Blindell PA, MacDonald-Bravo H: Cyclin/PCNA is the auxiliary protein of polymerase δ . Nature **326**, 515-517 (1987)
 - 30) Lee MWY, Toomy NL: Human placental DNA polymerase δ : Identification of a 170-kilodalton polypeptide by activity staining and immunoblotting. Biochem **26**, 1076-1085 (1987)
 - 31) Kunkel TA, Sabatino RD, Bambara RA: Exonucleolytic proof reading by calf thymus DNA polymerase δ . Proc Natl Acad Sci USA **84**, 4865 (1987)
 - 32) Robbins BA, de la Vega D, Ogata K, Tan EM, Nakamura RM: Immunohistochemical detection of proliferating cell nuclear antigen in solid human malignancies. Arch Pathol Lab Med **111**, 841-845 (1987)
 - 33) 中野 浩, 生田目公夫, 仲吉昭夫, 熊田 馨: Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA) 発現率による胃癌増殖活性の評価-その基礎的検討と臨床応用について-. 日外会誌 **94**, 580-592 (1993)
 - 34) 山際裕史, 大西信行, 大西長久, 西井宗男: 胃の上皮性病変とPCNA染色所見. 癌の臨 **39**, 651-656 (1993)

各種免疫組織染色所見から評価した
胃癌の生物学的悪性度と予後に関する臨床的研究 (II)

腫瘍形態学的特徴および予後と laminin, type IV collagen,
p53, nm23 免疫組織染色所見との関連

白 子 隆 志

岐阜大学医学部外科学第 2 講座 (主任 佐治重豊教授)

Immunohistochemical Study on Relationship
between Cytological Behavior and Prognosis in Gastric Cancer Patients. II

Special References on Relationship
between the Findings of Morphology and Immunohistochemical Stain
of laminin, type IV collagen, p53 and nm23

Takashi SHIROKO

Second Department of Surgery, Gifu University School of Medicine
(Director : Prof. S. SAJI)

Reprinted from
ACTA SCHOLAE MEDICINALIS UNIVERSITATIS IN GIFU
Vol. 43 No.4 July 1995

各種免疫組織染色所見から評価した 胃癌の生物学的悪性度と予後に関する臨床的研究 (II)

腫瘍形態学的特徴および予後と laminin, type IV collagen,
p53, nm23 免疫組織染色所見との関連

白子隆志

岐阜大学医学部外科学第2講座 (主任 佐治重豊教授)

Immunohistochemical Study on Relationship
between Cytological Behavior and Prognosis in Gastric Cancer Patients. II

Special References on Relationship
between the Findings of Morphology and Immunohistochemical Stain
of laminin, type IV collagen, p53 and nm23

Takashi SHIROKO

Second Department of Surgery, Gifu University School of Medicine
(Director: Prof. S. SAJI)

The findings of laminin, type IV collagen, p53 and nm23 by immunohistochemical stain were investigated using paraffin-embedded specimen, obtained from 135 gastric cancer patients over 3 years starting from 1982 and were compared with clinico-pathological findings and their prognoses.

Results: 1) Tumor diameter of type 4 and 1 was significantly larger than that of type 0. It was significantly predominant that histological por was in type 4, tub1 was in type 2 and 3, ps(-) was in type 0, and ps(+) was in type 3 and 4. 2) It was significantly predominant that the ps(-) was in tub1, tub2 and sig, while ps(+) was in por. The survival curve was significantly lower in type 4 than type of 0, 2 and 3, in tumor diameter larger than 6 cm and in ps(+) cases. 3) The frequency of positive laminin stain was significantly higher in type 0 than other types, in tumor size under 6 cm and in ps(+) cases. The survival curve of laminin negative cases was significantly lower than that of positive cases. 4) The frequency of negative type IV collagen stain was significantly higher in type 1, 2, 3 than type 0, in diameter larger than 6 cm and in ps(-). The survival curve in negative cases was slightly lower than that in positive cases. 5) There was no significant correlation on expression of p53 stain among gross finding, tumor diameter and depth of invasion. The survival curve in positive p53 cases was slightly lower than in negative cases. 6) The frequency of positive nm23 stain was significantly higher in type 0 than that type 3 and 4, in ps(-) than ps(+). The survival curve of nm23 negative cases was significantly lower than that of positive cases.

From above results, it is suggested that investigation of laminin, type IV collagen, p53 and nm23 by immunohistochemical stain is useful for new parameter as evaluation of cytological behavior of gastric cancer in addition to conventional clinico-pathological findings.

Acta Sch Med Univ Gifu 43:469-479 (1995)

Key words: gastric cancer, laminin, type IV collagen, p53, nm23, immunohistochemical stain, cytological behavior

緒 言

分子生物学的見地から胃癌の生物学的悪性度を評価する目的で、術後10年を経過し予後の判明している胃切除例のパラフィン包埋固定標本を用い、原発巣のDNA ploidy pattern と PCNA 標識率を検索し、臨床病理学的所見との対比から細胞増殖能と予後との関連を検討し研究 I¹⁾に

報告した。そこで今回、腫瘍の形態学的特徴と laminin²⁾, type IV collagen³⁾, p53⁴⁾, nm23⁵⁾ との関連を免疫組織学的に検索し、臨床病理学的所見と予後との関連を同様に比較検討した。かくすることにより、胃癌細胞の生物学的悪性度を多因子から客観的に評価せんと試みたわけである。

研究対象と研究方法

1. 研究対象

対象は既報の研究¹⁾と同様、1982年から3年間に手術した胃癌症例のうち術後10年以上を経過し予後が判明している135例で、手術時採取した切除標本のホルマリン固定パラフィン包埋ブロックを用い以下の検討を行った。

2. 研究方法

1) 病理組織学的所見の検索法

胃癌取扱い規約⁶⁾に従って、肉眼形態、組織型、組織学的深達度、予後的漿膜面因子、リンパ節転移程度、リンパ管および脈管侵襲程度、組織学的病期進行度、腫瘍の最大径などから臨床病理学的特徴を評価し予後との関連

を比較検討した。

2) laminin の染色法²⁾

パラフィン包埋ブロックから4 μ mの薄層切片を作製し、脱パラフィン・脱キシロール後0.01NのHClでペプシン処理(37 $^{\circ}$ C, 30分)し、0.3%過酸化水素水加メタノールにて内因性ペルオキシダーゼ処理(30分)後、抗 laminin ポリクローナル抗体(CHEMICON社製 AB949)を滴下し、4 $^{\circ}$ Cで15時間反応させた。次いでABC法、3 \cdot 3-diaminobenzidine \cdot 過酸化水素水反応液(以下DABと略す)で発色させ、ヘマトキシリンにて核染色した(FIG. 1-a, b)。判定は光学顕微鏡下で観察し、癌腺管基底膜の50%以上に染色が認められるものを陽性、50%未満を陰性とした。

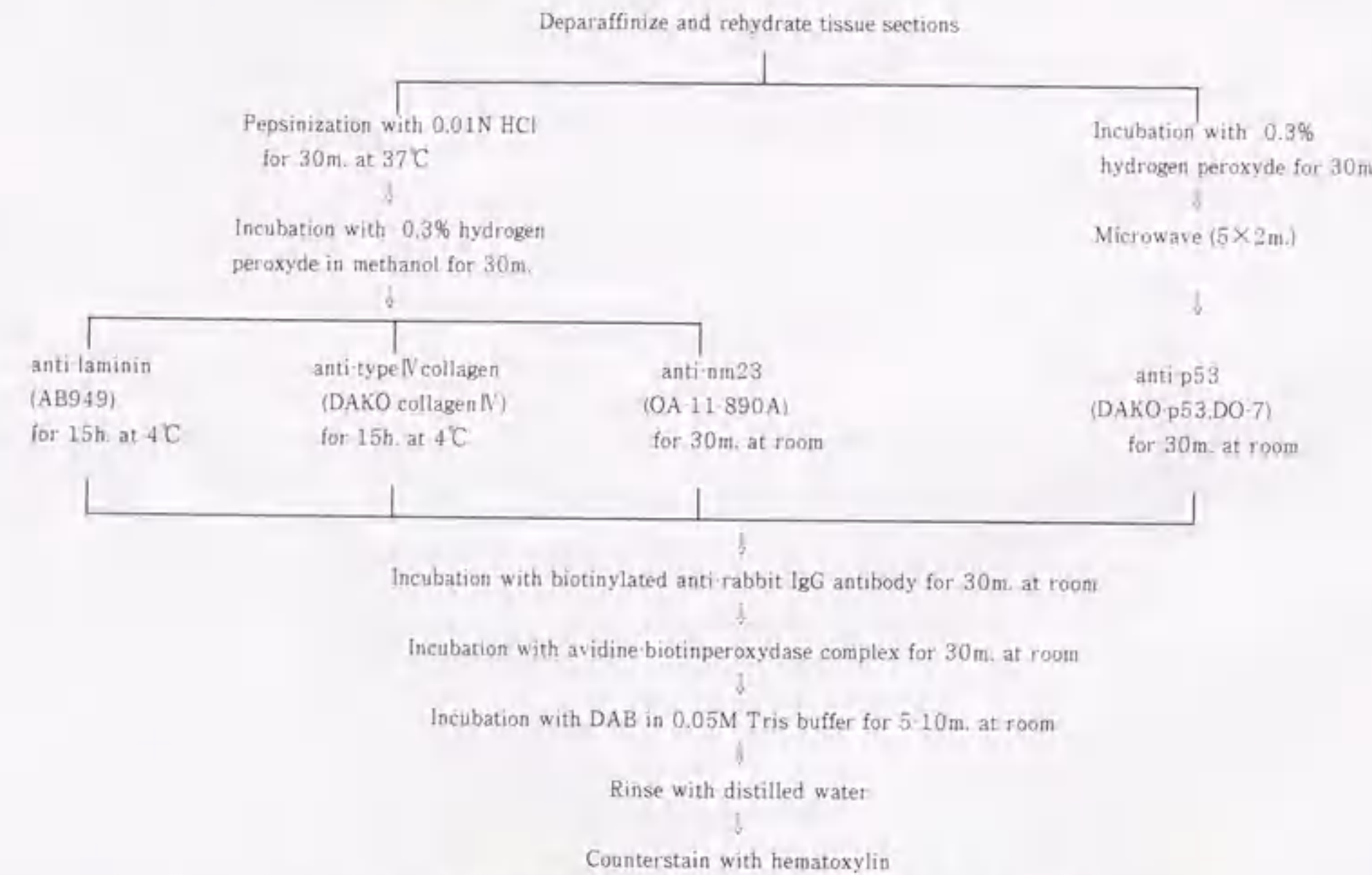


FIG. 1-a Procedures of various immunohistochemical stain

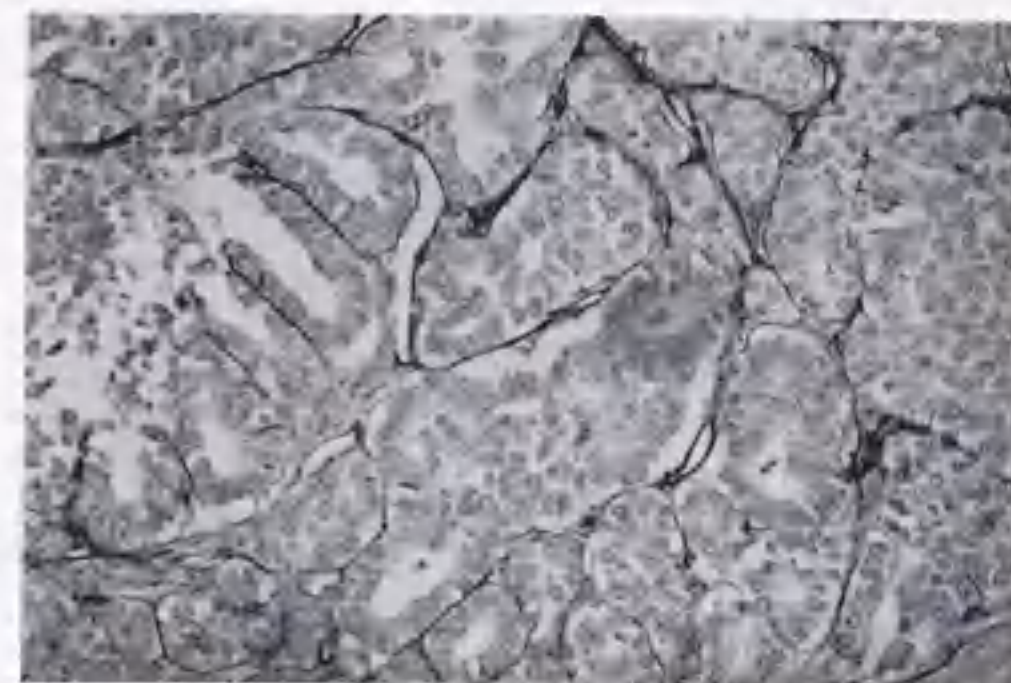


FIG. 1-b laminin stain in the adenocarcinoma of the stomach. Linear staining is present along the cancer-stroma border.

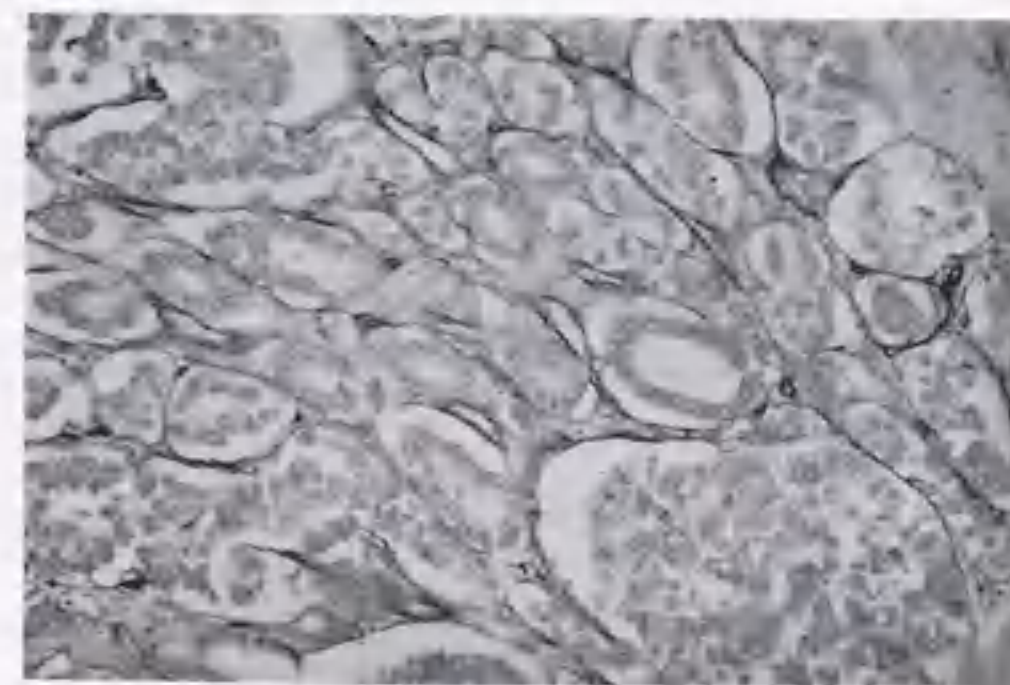


FIG. 1-c type IV collagen stain in the adenocarcinoma of the stomach. Linear staining is present along the cancer-stroma border.

3) type IV collagen の染色法³⁾

上記方法で内因性ペルオキシダーゼ処理後、抗 type IV collagen モノクローナル抗体(DAKO-COLLAGEN IV)を滴下し4 $^{\circ}$ Cで15時間反応させABC法、DABで発色後、ヘマトキシリンで核染色した(FIG. 1-a, c)。判定は顕鏡下で癌腺管基底膜の50%以上が染色されるものを陽性、50%未満を陰性とした。

4) p53 の染色法⁴⁾

上記方法で内因性ペルオキシダーゼ処理後マイクロウェーブ処理し抗 p53 モノクローナル抗体(DAKO-p53, DO-7)を滴下後、室温で30分間反応させABC法、DABで発色後、ヘマトキシリンで核染色した(FIG. 1-a, d)。判定は顕鏡下で全体の約30%以上の癌細胞核内に染色が認められるものを陽性、30%未満を陰性とした。

5) nm23 の染色法⁵⁾

上記内因性ペルオキシダーゼ処理標本を、抗 nm23 ポリクローナル抗体(Cambridge Research Biochemicals製抗ヒト nm23 (H1, H2) OA-11-890A)を滴下し室温にて30分間反応させABC法、DABで発色後、ヘマトキシリンで核染色した(FIG. 1-a, e)。判定は顕鏡下に観察後中山らの方法⁵⁾に準じて5段階に分類し、3, 4を陽性、0, 1, 2を陰性とした。

6) 統計学的検討の解析法

得られた測定値は mean \pm standard deviation (SD) で表示し、結果の解析で2群間の連続数値変数における分析は unpaired *t* 検定を、順位のないカテゴリー変数による分析は χ^2 検定を用い、生存率は Kaplan-Meier 生命表にて算出した累積生存率で表示し、Logrank test および generalized Wilcoxon test にて判定した。なお、危険率 5%未満を統計学的有意差ありと評価した。

研究結果

1. 胃癌の病理組織学的所見の特徴

1) 肉眼形態との関連

性別では4型に女性が多く、年齢では2型に高齢者が多く、0と4型との間に有意差 ($p < 0.01$) がみられた。

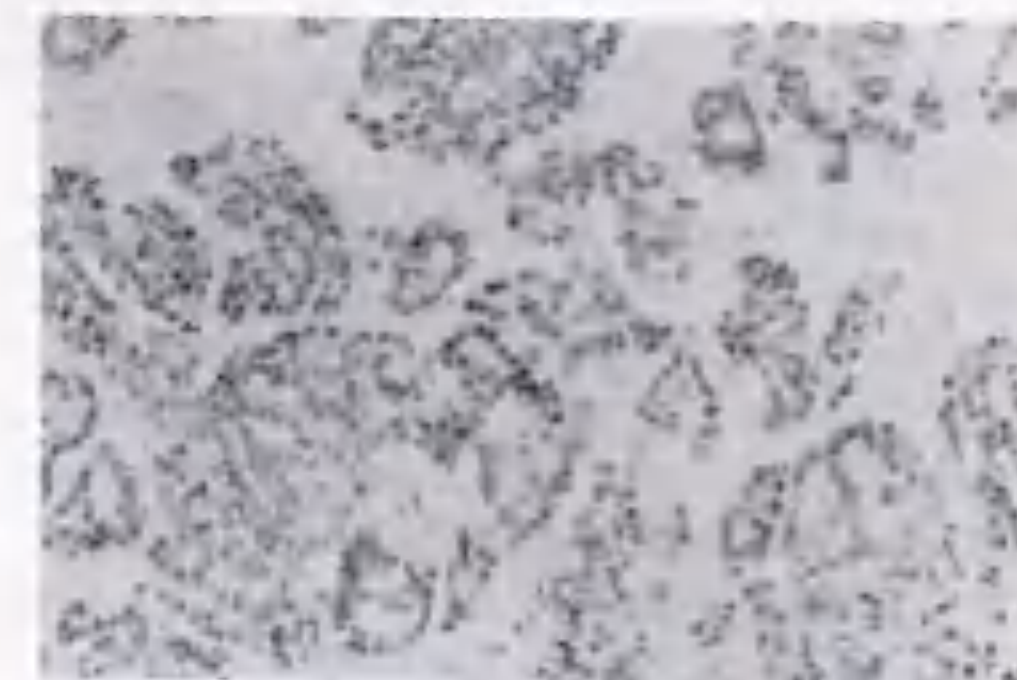


FIG. 1-d p53 stain in the adenocarcinoma of the stomach. Positive staining of nuclei in carcinoma cells

腫瘍最大径では4型、1型の順に大きく0型との間に有意差 ($p < 0.01$) がみられた。組織型では、4型は低分化型腺癌 (por と sig) のみで、2および3型は分化型腺癌が多くみられ、有意 ($p < 0.01$) の相関が観察された。しかし、0型には差を認めなかった。組織学的深達度で予後的漿膜面因子 (PS) では0型に ps(-) が、3と4型に ps(+) 例が有意 ($p < 0.001$) に多くみられた。リンパ節転移は0が10%であったが、3, 4型ではほとんどの例で転移がみられ有意差 ($p < 0.001$) が観察された。脈管侵襲も同様所見で、組織学的病期進行度は病期進行に伴って3型、4型の比率が有意 ($p < 0.001$) に増加した (TABLE 1)。

2) 腫瘍の最大径との関連

腫瘍の最大径は性別、年齢に著差なく、組織型で por は tub₁ および tub₂ に比べ有意 ($p < 0.01$) に大きく、深達度で ps(+) は ps(-) に比べ有意 ($p < 0.001$) に大きかった。また、リンパ節転移とリンパ管侵襲では、n(+) は n(-) に比べ、ly(+) は ly(-) に比べて、P(+) は P(-) に比べ共に有意 ($p < 0.001$) に大きかった。また、病期進行に伴い有意 ($p < 0.001$) に増加したが、静脈侵襲に関しては差はみられなかった (TABLE 2)。

3) 予後的漿膜面因子との関連

性別、年齢に著差なく、組織型で tub₁, tub₂, sig は ps(-) が、por は ps(+) の頻度が有意に高かった ($p < 0.05$)。n, ly, v および P 因子は陽性群に ps(+) の頻度が有意に高かった ($p < 0.001$)。また、病期進行に伴い ps(+) の頻度が有意 ($p < 0.001$) に増加した (TABLE 3)。

4) 予後との関連

a) 肉眼型: 平均生存期間は0型が10.4年、1型が11.5年、2型が5.2年、3型が6.2年、4型が1.4年で、0型は1~4型に比べ有意に予後良好で、4型は0, 2, 3型に比べ有意に不良であった ($p < 0.001$, FIG. 2)。

b) 腫瘍最大径: 最大径を6.0 cm で2群に分けると、平均生存期間は、未満群が8.7年で以上群の5.6年に比べ有意に不良であった ($p < 0.01$, FIG. 3)。

c) 予後的漿膜面因子: 平均生存期間は、ps(+) 群が

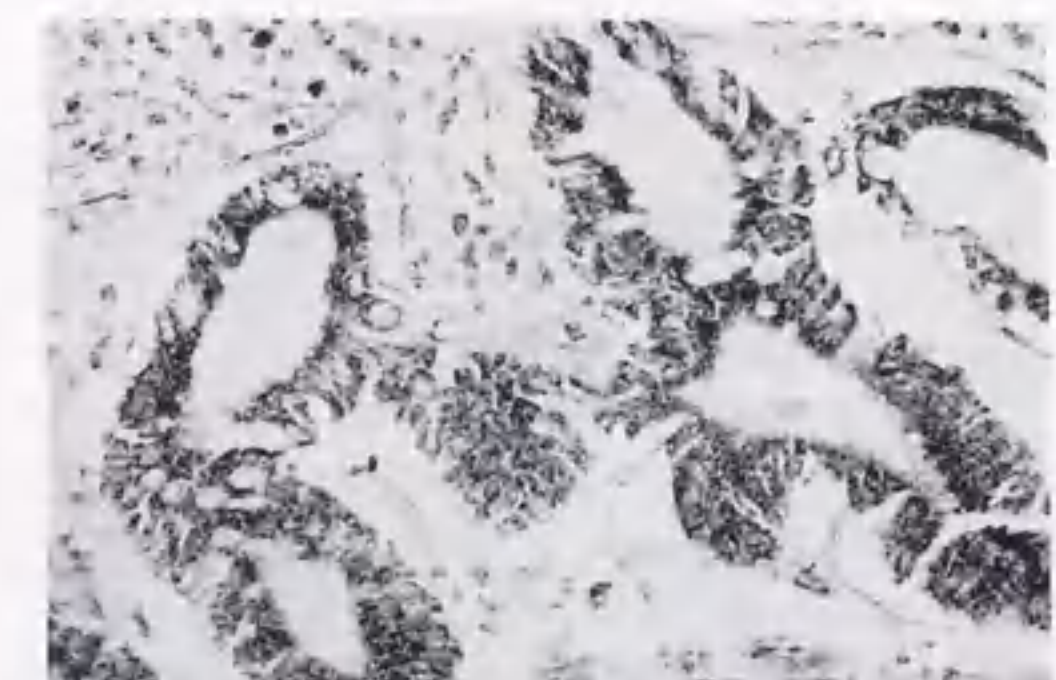


FIG. 1-e nm23 stain in the adenocarcinoma of the stomach. Positive staining of nuclei in carcinoma cells

TABLE 1 Summary of 135 gastric cancer patients on gross findings and their clinico-pathological findings

characteristics		0	1	2	3	4	5
sex	male(female)	42(19)	1(1)	21(13)	17(8)	4(6)	1(2)
age(year)	mean±SD	55.2±12.9 ^{a)}	60.5±7.8	64.3±8.0 ^{b)}	56.7±11.3	49.1±13.1 ^{c)}	65.3±15.2
size(cm)	mean±SD	3.5±2.7 ^{d)}	8.5±2.1 ^{e)}	6.5±2.7 ^{f)}	6.9±3.7 ^{g)}	13.4±4.3 ^{h)}	5.0±2.2
histologic type ^{***}	pap	0	0	0	1	0	0
	tub1	16	1	9	5	0	1
	tub2	17	1	15	9	0	1
	por	12	0	9	8	8	0
	sig	16	0	1	2	2	0
depth of invasion*	m	43	0	0	1	0	0
	sm	16	0	0	0	0	1
	pm	0	0	8	4	0	0
	ss	0	2	16	8	1	1
	se,si	2	0	9	12	9	1
prognostic serosal factor*	ps(-)	59	2	20	11	0	1
	ps(+)	2	0	13	14	10	2
lymph node metastasis*	n(-)	54	0	14	4	0	1
	n(+)	6	2	20	20	10	2
v factor [#] **	v(-)	60	2	30	25	8	2
	v(+)	0	0	4	0	2	1
ly factor ^{##} *	ly(-)	49	1	3	3	0	0
	ly(+)	11	1	31	22	10	3
peritoneal dissemination*	P(-)	61	2	30	24	5	3
	P(+)	0	0	4	1	5	0
liver metastasis	H(-)	61	2	33	23	10	3
	H(+)	0	0	1	2	0	0
histologic stage*	I	53	0	11	4	0	1
	II	3	1	5	2	1	1
	III	3	1	11	12	3	1
	IV	1	0	6	7	6	0

***: p<0.05

**a)-b), b)-c), d)-e)~h): p<0.01

*: p<0.001

pap: papillary adenocarcinoma

tub1: well differentiated adenocarcinoma

tub2: moderately differentiated adenocarcinoma

por: poorly differentiated adenocarcinoma

sig: signet ring cell carcinoma

: vascular invasion

: lymphatic invasion

4.4年と ps(-) 群の8.8年に比べ有意に不良であった (p<0.001, FIG. 4)。

2. laminin染色所見と病理組織学的所見および予後の関連

1) 病理組織学的所見との関連

肉眼型で0型のlaminin陽性群は75%であったが、1~4型では14%と低値で有意の相関がみられた (p<0.01)。また、腫瘍最大径との関連でlaminin陰性群は7.12±4.08 cmと陽性群の3.83±2.98 cmに比べて有意に大きく (p<0.001)、予後の漿膜面因子との関連では ps(-) 群に陽性例が、ps(+) 群に陰性例が多く、両群間に有意の相関がみられた (p<0.001, TABLE 4)。

2) 予後との関連

生存曲線上、陰性群は陽性群に比べ有意に予後不良であった (p<0.001, FIG. 5)。

3. type IV collagenと病理組織学的所見および予後の関連

1) 病理組織学的所見との関連

肉眼型で0型はtype IV collagenの陽性群が75%で、1~4型は32%で、その分布に有意の相関がみられた (p<0.01)。また、腫瘍最大径はtype IV collagenの陰性群 (6.52±4.03 cm) が陽性群 (5.03±3.86 cm) に比べ有意に大きかった (p<0.05)。予後の漿膜面因子との関連では ps(-) 群にtype IV collagenの陽性例が、ps(+) 群に陰性例が多く、両群間に有意の相関がみられた (p<0.05, TABLE 5)。

TABLE 2 Correlation between clinico-pathological findings and tumor size

characteristics		size(mean±SD,sm)
sex	male	6.48±4.16
	female	5.30±3.86
age(year)	<60	5.53±4.27
	60≤	5.91±3.60
gross findings	0 ^{a)}	3.49±2.70
	1 ^{b)}	8.50±2.12
	a)-b)~e), b)-c)~e) : p<0.001	2 ^{c)} 6.54±2.65
	3 ^{d)}	6.92±3.69
	4 ^{e)}	13.35±4.30
histologic type	pap	3.5
	tub1 ^{f)}	4.65±2.70
	tub2 ^{g)}	5.00±2.75
	por ^{h)}	7.57±5.32
	sig	5.64±4.22
depth of invasion	m ¹⁾	3.22±2.60
	sm ²⁾	3.98±2.79
	pm ³⁾	4.68±2.11
	ss ⁴⁾	6.96±2.16
	1), 2)-4), 5): p<0.01 3)-4), 5): p<0.05	se,si ⁵⁾
prognostic serosal factor*	ps(-)	4.41±2.90
	ps(+)	8.51±4.53
lymph node* metastasis	n(-)	3.73±2.64
	n(+)	8.14±4.13
v factor#	v(-)	5.69±4.0
	v(+)	7.19±3.71
ly factor##*	ly(-)	3.49±2.63
	ly(+)	7.29±4.00
peritoneal dissemination*	P(-)	5.30±3.64
	P(+)	11.1±4.55
liver metastasis	H(-)	5.71±4.04
	H(+)	6.00±2.29
histologic stage	I	3.66±2.68
	II	6.49±2.70
	III	8.09±3.98
	IV	8.16±4.68

*p<0.001

2) 予後との関連

生存曲線上、陰性群は陽性群に比べて予後不良であったが、有意差はみられなかった (FIG. 6)。

4. p53染色所見と病理組織学的所見および予後の関連

1) 病理組織学的所見との関連

肉眼型との関連でp53の染色陽性頻度に差がなく、腫瘍最大径との関連で陰性群が5.56±4.05 cmと陽性群の6.10±3.89 cmに比べ若干低値であったが有意差はみられな

TABLE 3 Correlation between clinico-pathological findings and depth of invasion

characteristics		ps(-)	ps(+)	
sex	male(female)	61(32)	24(17)	
age(year)	mean±SD	58.1±12.4	56.1±11.7	
size(cm)*	mean±SD	4.41±2.90	8.51±4.53	
histologic type ^{***}	pap	1	0	
	tub1	28	4	
	tub2	31	12	
	por	17	20	
	sig	16	5	
gross findings*	0	59	2	
	1	2	0	
	2	20	13	
	3	11	14	
	4	0	10	
lymph node metastasis*	n(-)	69	4	
	n(+)	23	35	
	v factor**	v(-)	91	35
		v(+)	1	6
	ly factor*	ly(-)	55	1
ly(+)		37	40	
peritoneal dissemination*	P(-)	92	33	
	P(+)	1	8	
liver metastasis	H(-)	90	40	
	H(+)	2	1	
histologic stage*	I	69	0	
	II	7	6	
	III	9	22	
	IV	7	13	

***: p<0.05, **: p<0.01, *: p<0.001

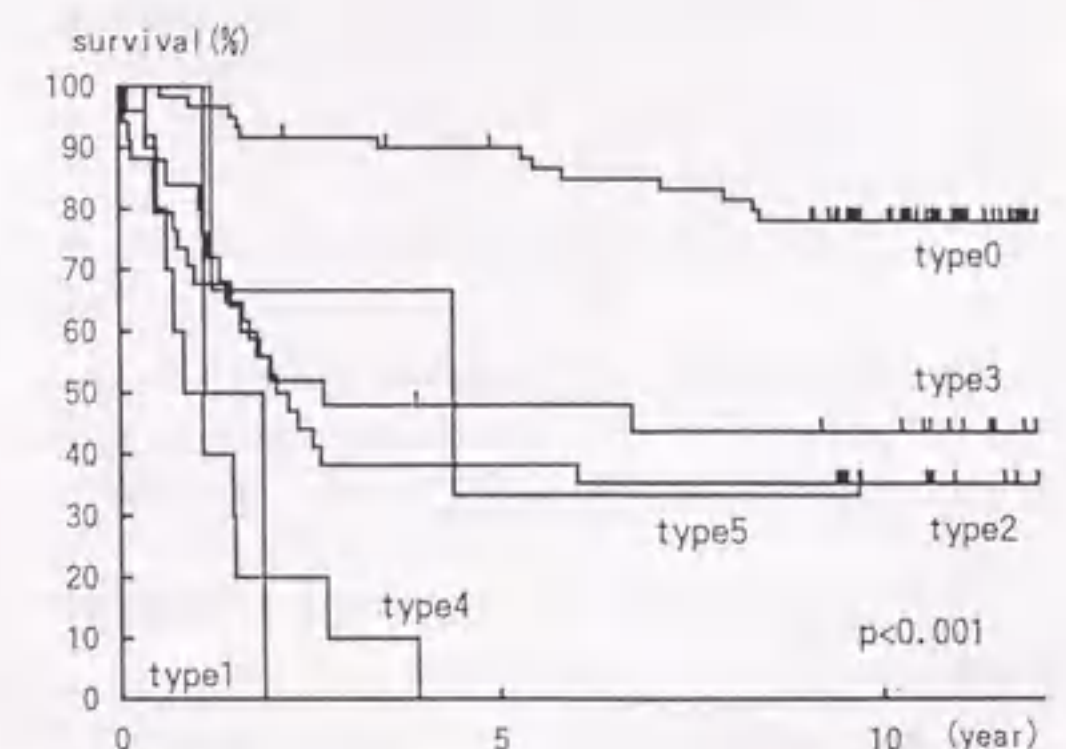


FIG. 2 Comparison of survival curves among gross findings of cancer in 135 patients with gastrectomy

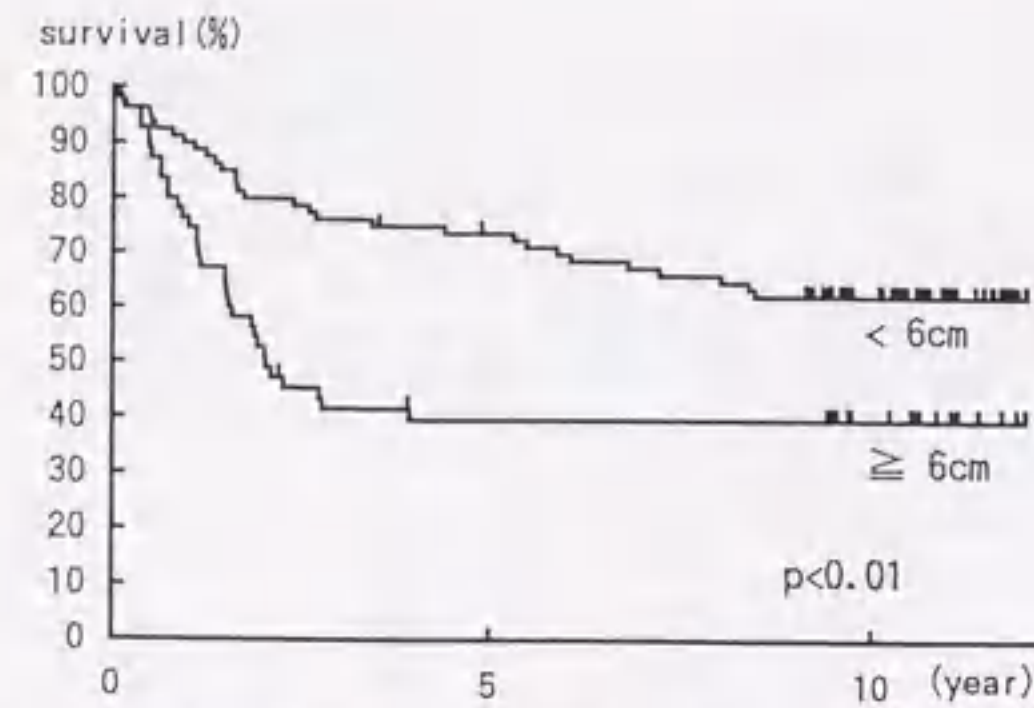


FIG. 3 Comparison of survival curves between <6.0 cm and ≥ 6.0 cm in tumor diameter

TABLE 4 Correlation between laminin and histopathological findings in gastric cancer

	laminin	negative		positive			
		gross findings**	size(cm)*	ps factor*	gross findings**	size(cm)*	ps factor*
0	15	46	7.12 \pm 4.08	3.83 \pm 2.98	0	15	46
1	2	0			1	2	0
2	28	6			2	28	6
3	21	4			3	21	4
4	10	0			4	10	0
5	2	1			5	2	1
mean \pm SD			7.12 \pm 4.08	3.83 \pm 2.98	ps(-)	41	52
ps factor*	ps(-)	36			ps(+)	36	5

*p < 0.001 **p < 0.01

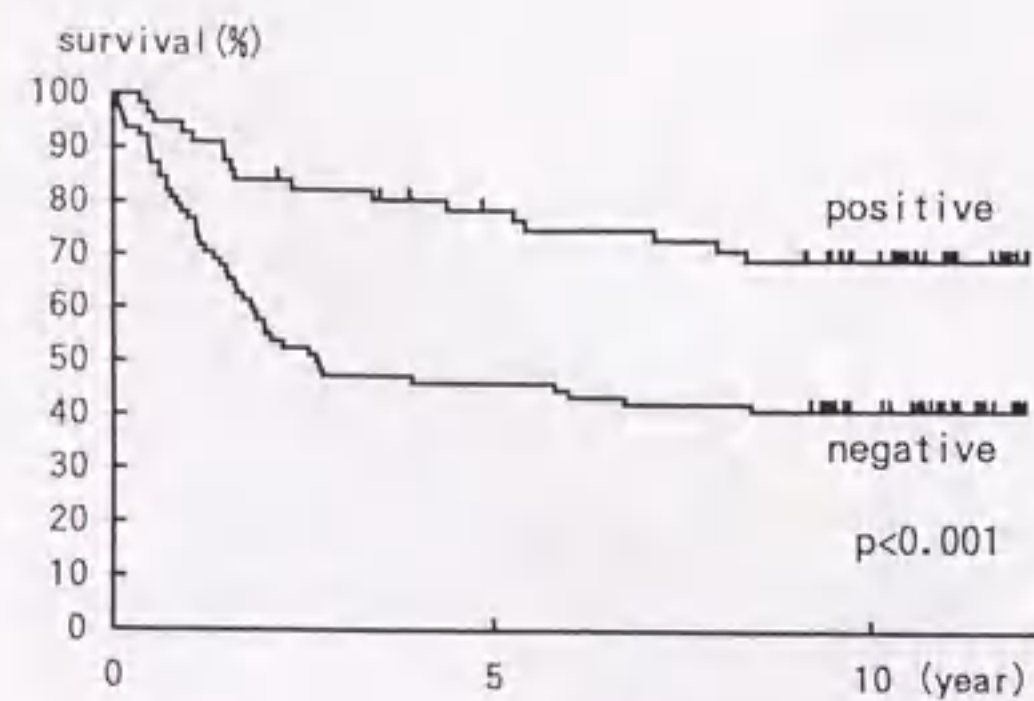


FIG. 5 Comparison of survival curves between groups of laminin positive and laminin negative in 135 patients with gastrectomy

った。また、予後的漿膜面因子との関連でも陽性頻度に差はみられなかった (TABLE 6)。

2) 予後との関連

生存曲線上、陽性群は陰性群に比べて予後不良であったが、有意差は認められなかった (FIG. 7)。

5. nm23染色所見と病理組織学的所見および予後との関連

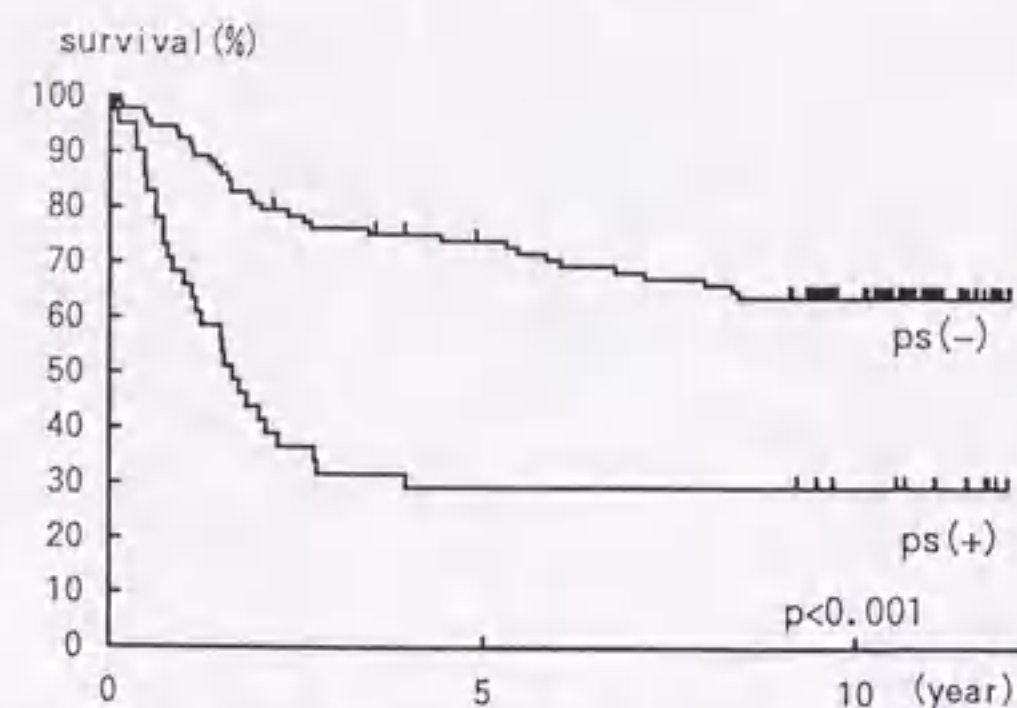


FIG. 4 Survival curves between ps(+) and ps(-) in depth of invasion

TABLE 5 Correlation between type IV collagen and histopathological findings in gastric cancer

	type IV collagen		negative		positive		
	gross findings**	size(cm)*	ps factor*	gross findings**	size(cm)*	ps factor*	
0	15	46	6.52 \pm 4.03	5.03 \pm 3.86	0	15	46
1	1	1			1	1	1
2	24	10			2	24	10
3	18	7			3	18	7
4	5	5			4	5	5
5	0	3			5	0	3
mean \pm SD			6.52 \pm 4.03	5.03 \pm 3.86	ps(-)	37	56
ps factor*	ps(-)	25			ps(+)	25	16

*p < 0.05 **p < 0.01

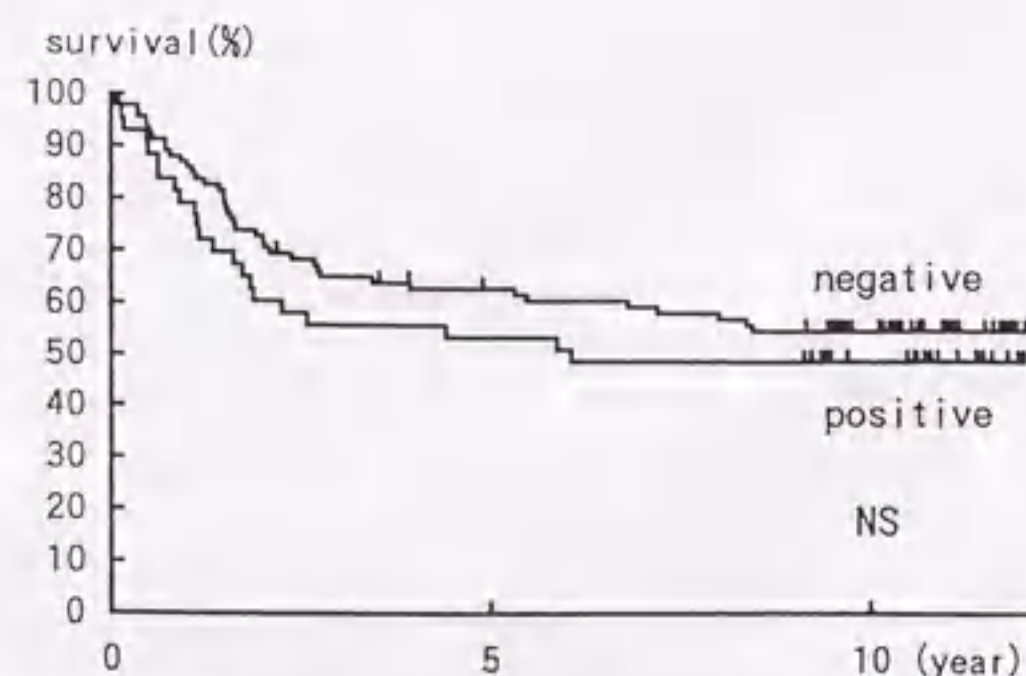


FIG. 6 Comparison of survival curves between groups of type IV collagen positive and type IV collagen negative in 135 patients with gastrectomy

1) 病理組織学的所見との関連

肉眼型との関連で0型に陽性群が、3・4型に陰性群が多く、両群間で有意の相関がみられた (p < 0.01)。また、腫瘍最大径は陰性群が陽性群に比べ有意に大きく (2, 3と4間は p < 0.05, 1と2~4間は p < 0.001)、予後的漿膜面因子で ps(-) 群に陽性例が、ps(+) 群に陰性例が有

意に多くみられた (p < 0.001, TABLE 7)。

2) 予後との関連

生存曲線上、陰性群は陽性群に比べて有意に予後不良であった (p < 0.01, FIG. 8)。

考 察

胃癌は胃粘膜に発生し、胃壁に沿って広がるとともに胃壁深部に向かって三次元的に発育する。その様式は膨張性あるいは浸潤性増殖で表現されているが、形態上は胃の内腔に向かって発育する腫瘤型、壊死崩壊して潰瘍を形成する潰瘍型或いは胃壁に沿って浸潤性に発育して胃壁の硬化を起こす瀰漫浸潤型に大別される。胃癌の悪性度は古来これらの肉眼形態から予測され、一般には腫瘤型は予後良好で、瀰漫浸潤型は不良と考えられてきた⁷⁾⁸⁾。その後、癌細胞の発育進展様式が病理組織学的に種々検索されてきたが、近年分子生物学的手法の導入により腫瘍側要因と宿主側要因から癌細胞の生物学的悪性度が評価されるようになった。その中で、岡島ら⁹⁾は胃癌の先進部における collagenase の動態や、発育進展における腫瘍側と宿主側因子の有用性を指摘し、この方面の研究が急増した。そこで著者も、最近注目されている宿主側要因

TABLE 6 Correlation between p53 and histopathological findings in gastric cancer

	p53	negative		positive			
		gross findings	size(cm)*	ps factor*	gross findings	size(cm)*	ps factor*
0	48	13	5.56 \pm 4.05	6.10 \pm 3.89	0	48	13
1	1	1			1	1	1
2	22	12			2	22	12
3	13	12			3	13	12
4	7	3			4	7	3
5	1	2			5	1	2
mean \pm SD			5.56 \pm 4.05	6.10 \pm 3.89	ps(-)	64	29
ps factor*	ps(-)	27			ps(+)	27	14

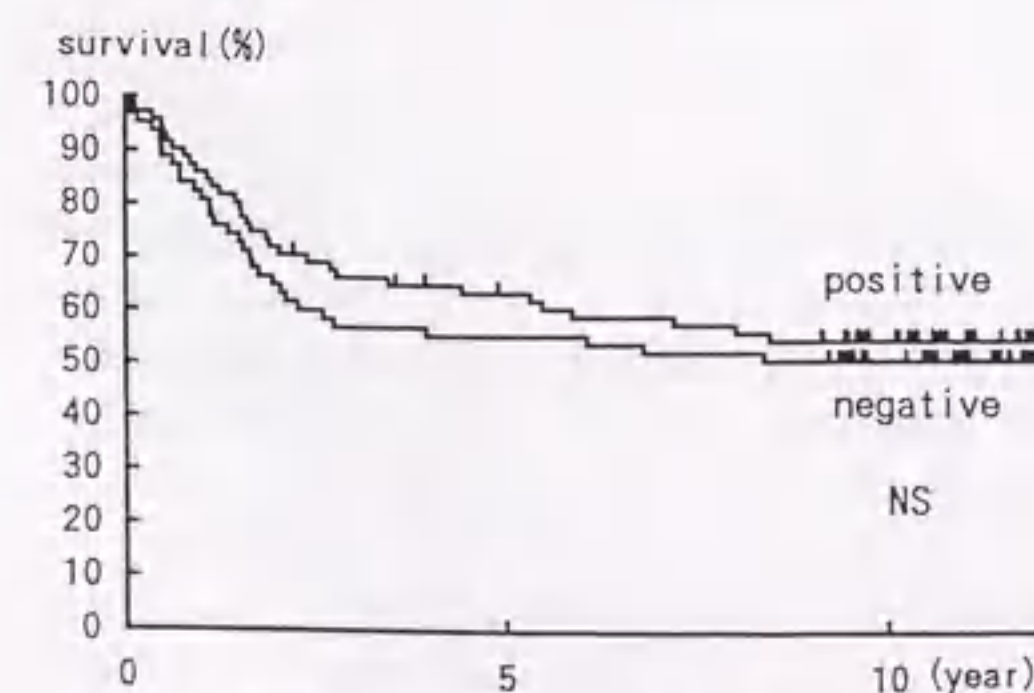


FIG. 7 Comparison of survival curves between groups of p53 positive and p53 negative in 135 patients with gastrectomy

として laminin, type IV collagen を、腫瘍側要因として p53, nm23 などの癌関連遺伝子をそれぞれ免疫組織学的染色により検索し、従来の肉眼型、最大腫瘍径、組織学的深達度などの臨床病理学的所見や予後との関連で比較検討し、上記諸結果を得たわけである。以下、これらにつき順次考察を加える。

胃癌の肉眼的腫瘍形態と予後との関連について

手術予後は当然ながら早期癌 (0型) は他の肉眼型に比べ良好で、進行癌で浸潤性増殖を示す4型胃癌が不良であったが、この結果は他の多くの報告¹⁰⁾¹¹⁾と同様である。腫瘍の最大径と肉眼分類に関して西ら⁷⁾は、5年生存率は3および4型胃癌では腫瘍径が大きいほど予後不良で、0および2型胃癌は腫瘍径との間に関連をみなかったと報告し、中村⁸⁾は腫瘍径4cm以下で漿膜浸潤のない場合、分化型癌は肝転移再発が予後規定因子となり未分化癌のそれよりも不良で、4cm以上群で漿膜浸潤がある場合、未分化型癌は腹膜播種再発が予後規定因子となるため、分化型癌のそれよりも不良となると述べている。しかし、一般には全国登録の遠隔成績¹¹⁾でも腫瘍径が大きいほど予後不良で、著者の検討でも腫瘍径が大きい症例に4型が多く、かつ予後も不良であった。壁深達度との関連で

TABLE 7 Correlation between nm23 and histopathological findings in gastric cancer

	nm23	negative		positive			
		gross findings*	size(cm)*	ps factor*	gross findings*	size(cm)*	ps factor*
0	16	45	7.30 \pm 4.70	4.68 \pm 3.01	0	16	45
1	0	2			1	0	2
2	11	23			2	11	23
3	14	11			3	14	11
4	10	0			4	10	0
5	2	1			5	2	1
mean \pm SD			7.30 \pm 4.70	4.68 \pm 3.01	ps(-)	26	67
ps factor*	ps(-)	27			ps(+)	27	14

*p < 0.001

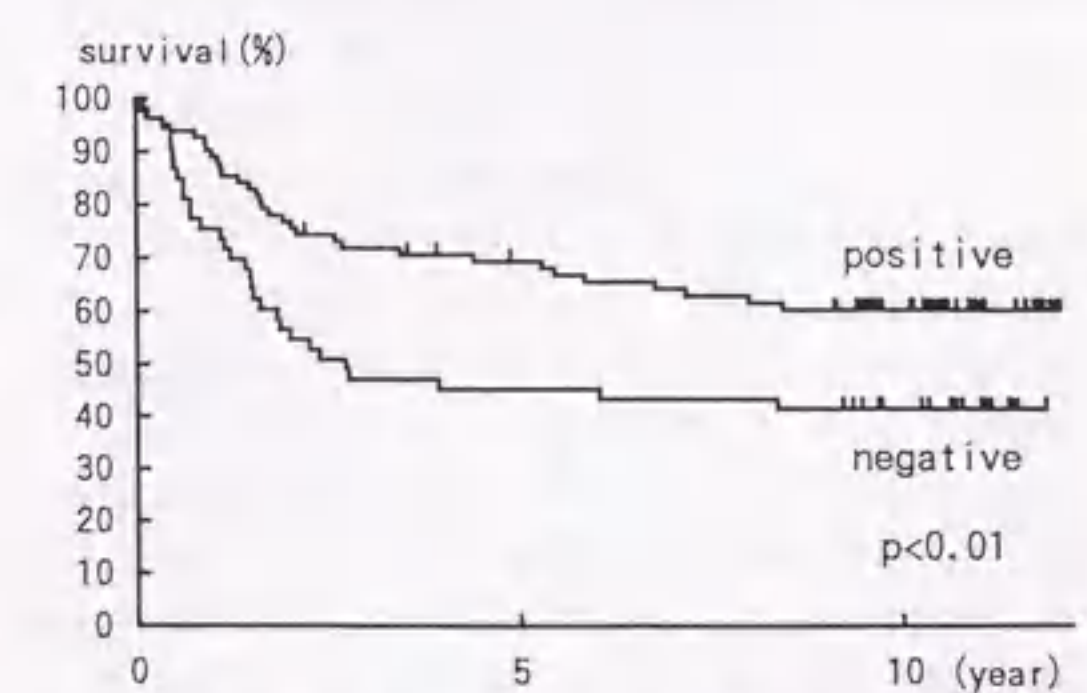


FIG. 8 Comparison of survival curves between groups of nm23 positive and nm23 negative in 135 patients with gastrectomy

は全例登録の5年生存率は、ps(-)例が84.3%、ps(+)例が29.5%で予後との相関がみられ¹¹⁾、著者の検索結果もほぼ同様の所見であった。従って、臨床病理組織学的所見に関しては、従来の報告との間に著差はみられなかった。

laminin 染色所見について

laminin は分子量82万ダルトンの糖蛋白で、fibronectin, proteoglycan, entactin, type IV collagen などとともに、基底膜構成成分の一つである。最近、乳癌¹²⁾、肺癌¹³⁾、胃癌¹⁴⁾、大腸癌¹⁵⁾などで癌組織基底膜に laminin 活性が認められる症例で肺や肝転移再発が高率にみられることから注目されている。著者は今回、腫瘍増大に伴う周囲組織への圧迫・破壊過程で膜管基底膜の変化を laminin 染色から評価したわけであるが、肉眼型で陽性率は0型が75%、1~4型が14%で、有意の相関がみられた。腫瘍最大径との関連では、陰性群(7.12±4.08 cm)が陽性群(3.83±2.98 cm)に比べ有意に大きかった。また、壁深達度との関連では予後の漿膜面因子ps(-)群に陽性例が、ps(+)群に陰性例が多く有意の相関がみられた。坂口¹⁶⁾は深達度と laminin 陽性率との関連を否定する立場を取っているが、迎¹⁴⁾は早期癌に陽性率が高かったとしており著者の結果と趣を一つにしている。なお、著者の検討では粘膜下に浸潤した癌細胞が粘膜筋板を破壊すると粘膜筋板の laminin の染色性が低下する所見を観察したが、これは癌が粘膜筋板を浸潤する際に癌から laminin を分解するようなプロテアーゼが分泌される可能性を推察している。

laminin 陽性率と予後との関連に言及した報告は少ないが、Nakamuraら¹⁸⁾は胃癌腺管基底膜の laminin 染色パターンと組織分化度がよく相関し、陰性例は陽性例に比べ5年生存率が低いと報告している。著者の検討結果もほぼ同様所見であったが、これは laminin 染色陰性例は陽性例に比べ浸潤度が強く、リンパ節転移陽性となる頻度が高くなるためと考えられている。

type IV collagen との関連について

type IV collagen は laminin と同様、上皮成分と間質成分の異なる compartment を二分する基底膜の主要成分で、しばしば腫瘍腺管で基底膜の不連続性や欠損が観察されている。この type IV collagen の欠損が癌細胞の浸潤・転移能の獲得に関連した現象として注目されている訳である¹⁹⁾。著者は、type IV collagen を腫瘍増大に伴う周囲組織の反応パラメーターとして捉え、細胞外マトリックスとしての局在を免疫組織学的に観察し比較検討した。その結果、肉眼型との関連で、陽性群は0型で75%、1~4型で32%と早期癌に陽性例が多かった。腫瘍最大径との関連では、陰性群(6.52±4.03 cm)が陽性群(5.03±3.86 cm)に比べ若干大きかったが、組織型の sig では両群間に差を認めなかった。この理由として、sig は粘膜内にある早期のうちから基底膜を形成することなく増大するためと考えられている。深達度との関連では、ps(-)群に陽性率が、ps(+)群に陰性群が多く有意の

相関がみられた。青柳ら¹⁴⁾は、胃癌低分化癌において ps(+)群に陰性群が多く、浸潤度の低いものが陽性となる頻度が高いと報告している。

予後との関連で、Nakamuraら¹⁸⁾は胃癌の type IV collagen と laminin 染色で、癌腺管基底膜の染色パターンと組織分化度がよく相関し、陰性群は陽性群に比べ5年生存率が低かったと報告しているが、著者の今回の検討では両群間に著差はみられなかった。

ところで、type IV collagen は type IV collagenase によって特異的に分解され、その活性値は癌隣接部非癌部胃粘膜、癌先進部に高いとされている。さらに type IV collagenase の分泌が laminin の存在下において増加するとの考え²⁰⁾もあり、両者は腫瘍細胞間および腫瘍細胞と間質との interaction で重要な役割を演じていると推測される。この観点において、laminin と type IV collagen の検索は意義深いものと考えている。

p53 染色所見について

p53 遺伝子は第17染色体短腕上にある癌抑制遺伝子で、生物活性として転写制御²⁰⁾・DNA複製障害²¹⁾などがあり、細胞増殖に関わる様々な遺伝子を直接・間接的に制御することにより細胞増殖を制御していると考えられている。正常 p53 遺伝子は第17染色体短腕の欠損、対立遺伝子の点突然変異により不活性化される²²⁾。胃癌原発巣における p53 変異の頻度は0~53%で²³⁾²⁴⁾、この変異が p53 の正常機能を狂わせていると推察されている。最近、p53 の特異抗体を用いた免疫組織学的染色による検討が増加したが、本抗体は p53 蛋白の野生型とも変異型とも反応する。免疫染色では正常粘膜や腸上皮化生粘膜には p53 活性はみられないが、野生型 p53 の半減期が非常に短く、量がわずかであるのに対し、変異型は heat shock protein (Hsc70) との結合により半減期が延長するため、免疫染色において活性を示すものは変異型と考えられている²⁵⁾。

ところで、p53 免疫染色は発癌初期の微小な病変や過去のホルマリン固定・パラフィン包埋材料でも異常を検出できる利点があり汎用されている。著者もホルマリン固定・パラフィン包埋手術材料から薄切し DAKO p53 抗体を用いて、ABC 法で免疫組織学的染色を施行した。通常、ホルマリン・パラフィン包埋手術材料では p53 活性が失活され染色性が低下すると考えられているが²⁶⁾、脱パラフィン後マイタロウエープ処理にて p53 活性を試活性化させることが可能で、著者も本法により良好な染色性を得ることができた。

まず、肉眼型との関連では早期癌と進行癌の間に染色性に著差がみられなかった。米村ら²²⁾も肉眼型に関して差を認めなかったとしているが、大野²¹⁾は4型と2および3型との間に有意差がみられたと報告している。一方、腫瘍最大径との関連で陰性群(5.56±4.05 cm)と陽性群(6.10±3.89 cm)の間に著差を認めなかった。この点に関して米村ら²²⁾は6 cm で、大野²¹⁾は5 cm で2群に分けて検討しているが同様に有意の相関をみていない。壁深達度との関連で予後の漿膜面因子別に検討すると、p53 染色

陽性頻度には著差がみられなかったが、深達度が浅い早期癌ほど p53 染色陽性となる頻度が高いとする大野²¹⁾の報告と同様の結果を著者も得ている。

p53 の予後との関連で、陽性群は陰性群に比べ不良であったが有意差はみられなかった。これに対し、米村ら²⁷⁾は治癒切除群において陽性群の予後が不良であり、p53 染色が予後予測のパラメーターになると報告している。この理由として、米村ら²⁷⁾および大野²¹⁾は PCNA LI の高値および DNA で aneuploidy 発現頻度の増加との関係から、p53 が核異型度の高い未分化で悪性度の高い症例に多く観察されることより、腫瘍増殖に関与していると推察している。しかし、著者の検討では、p53 と研究 I¹⁾での PCNA LI との対比で有意の相関をみたが、腫瘍形態および予後には有意の相関がみられなかった。今回の検索で差がみられたのは p53 とリンパ節転移程度との関連であり、変異 p53 の発現は発癌時の細胞増殖に関与するが、癌化した後はリンパ節転移などの遠隔転移に関連して、胃癌の悪性度を規定しているものと推察される。

nm23 染色所見について

nm23 遺伝子は、転移能の高い癌細胞にトランスフェクトすると転移能が低下すると報告され²⁸⁾、転移抑制遺伝子として注目されている。現在 H 1 と H 2 の二つの nm23 遺伝子が分離され、NDP (nucleotide diphosphate) キナーゼ A と B とをそれぞれコードしている²⁹⁾。乳癌で nm23 の発現低下例にリンパ節転移の頻度が高く、発現の高い例は低い例に比べ有意に予後良好であったと報告されている³⁰⁾³¹⁾。胃癌では原発巣の80%以上が組織型に関係なく正常粘膜より高い発現を示すが、転移巣、特に肝転移巣では原発巣に比べ発現が著しく低下している³⁾。著者も胃癌の病理組織学的形態や予後と nm23 免疫組織学的染色所見との関連を種々検索した結果、肉眼型では0型に陽性群が、3・4型に陰性群が多くみられ、有意の相関を認めた。腫瘍最大径との関連では、nm23 発現陰性群は陽性群に比べ有意に大きく、深達度では ps(-)群に陽性群が、ps(+)群に陰性群が多くみられ有意の相関が観察された。Hirayamaら³¹⁾は乳癌症例で nm23 の染色性と臨床病理学的所見との間に有意の相関がみられなかったと報告しているが、乳癌では胃癌と異なった態度を示すのかも知れない。

予後との関連では乳癌³⁰⁾³¹⁾で nm23 陽性群は陰性群に比べ再発が少なく、予後も良好であったと報告されており、著者の検討結果と同様所見であったが、肺癌³²⁾では逆の結果が報告されている。すなわち、nm23 陽性群は AgNOR や BrdU Index が高値を示し、陰性群に比べ増殖活性が高いと指摘している。以上のごとく、nm23 染色所見と臨床病理学的所見との関連でいまだ意見の一致はみられないが、これは nm23 が発見されてから日が浅く、構造・機能・特徴などが未解明であること、対象臓器により結果が異なる可能性、使用抗体の差、アイソフォームの性格の問題³³⁾などが考えられ、今後の積み重ねによる研究により解決される日も近いと期待される。

結 語

1982年から3年間に手術した胃癌症例中、術後10年以上を経過し予後が判明している135例の切除標本のパラフィン包埋ブロックを用い、laminin, type IV collagen, p53, nm23 の免疫組織学的染色を施行し、臨床病理学的所見と予後との関連を比較検討し、以下の諸結果を得た。

1. 臨床病理組織学的所見

1) 肉眼型：腫瘍最大径は4型、1型の順に大きく0型との間に有意差がみられた。組織型は4型で低分化型腺癌が、2・3型で分化型腺癌が多くみられ、有意の相関がみられた。組織学的深達度で0型に ps(-) が、3と4型に ps(+) 例が有意に多かった。n, ly, v および stage は高度なほど3・4型の比率が有意に高かった。

2) 腫瘍最大径：組織型で por が大きく、tub1 および tub2 と比べ有意差がみられた。ps, n, ly, P の各因子では陽性群が陰性群に比べ有意に大きく、stage 進行例ほど有意に大きかった。

3) 深達度：組織型で tub1, tub2, sig で ps(-) が、por で ps(+) の頻度が高かった。n, ly, v, P では陽性群に ps(+) の頻度が有意に高かった。

2. 病理学的所見と予後との関連

肉眼型で4型は0・2・3型と比べ、腫瘍最大径で6.0 cm 以上群は未満群に比べ、深達度で ps(+) 群は、ps(-) 群に比べ共に有意に予後不良であった。

3. laminin 染色所見との関連

肉眼型で0型は1~4型に比べ陽性群が有意に多く、腫瘍最大径は陰性群が陽性群に比べ有意に大きく、ps(+) 群は ps(-) 群に比べ陰性群が有意に多く、陰性群の予後は陽性群に比べ有意に不良であった。

4. type IV collagen 染色所見との関連

肉眼型で0型は1~4型に比べ陽性群が有意に多く、腫瘍最大径で陰性群は陽性群に比べ有意に大きく、ps(+) 群は ps(-) 群に比べ陰性群が有意に多く、陰性群の予後は陽性群に比べ若干不良であった。

5. p53 染色所見との関連

肉眼型、腫瘍最大径、壁深達度で陰性群と陽性群との間に著差を認めなかった。また、予後は陽性群が陰性群に比べ若干不良であった。

6. nm23 染色所見との関連

肉眼型で0型は3・4型に比べ陽性例が有意に多く、腫瘍最大径で陰性例は陽性例に比べ有意に大きく、ps(-) 群に陽性例が、ps(+) 群に陰性例が多くみられ有意の相関が観察された。また、陰性群は陽性群に比べ有意に予後不良であった。

以上の結果、胃癌の生物学的悪性度評価法として、従来の臨床病理組織学的所見に加え、laminin, type IV collagen, p53 および nm23 の免疫組織学的染色所見は新しい診断基準として臨床応用できる可能性が示唆された。

文 献

- 1) 白子隆志: 各種免疫組織染色所見から評価した胃癌の生物学的悪性度と予後に関する臨床的研究 (I) 癌細胞内核 DNA 量と Proliferating Cell Nuclear Antigen 標識率からの検討. 岐阜大医紀 **43**, 459-468 (1995)
- 2) 坂口隆啓: 胃原発巣および転移巣における laminin の免疫組織学的研究. 近畿大医誌 **14**, 537-551 (1989)
- 3) Kendall C, Sanderson P, Cope J, Talbot I: Follicular thyroid tumors: a study of laminin and type IV collagen in basement membrane and endothelium. J Clin Pathol **38**, 1100-1105 (1985)
- 4) 大野博之: ヒト胃癌組織における癌抑制遺伝子 p53 の発現に関する免疫組織学的検討. 東医大誌 **51**, 153-163 (1993)
- 5) Nakayama H, Yasui W, Yokozaki H, Tahara E: Reduced expression of nm23 is associated with metastasis of human gastric carcinomas. Jpn J Cancer Res **84**, 184-190 (1993)
- 6) 胃癌研究会編: 胃癌取り扱い規約, 11版. 東京, 金原出版, 1985. 146p
- 7) 西 満正, 七沢 武, 関 正威, 広瀬益雄, 中島聡総, 池田靖洋, 山崎善弥, 山野辺孝雄, 木下 巖, 菱田泰治, 中川安房, 佐藤順泰, 久野敬二郎, 山田 肅, 高木国夫, 深見敦夫: 胃癌の5年生存率とくに進行癌について. 胃と腸 **4**, 1087-1100 (1969)
- 8) 中村恭一: 胃癌の構造, 1版. 東京, 医学書院, 1987. 45-49p
- 9) 岡島邦雄: 胃癌・大腸癌の発育進展—教室15年の歩み—. 日消外会誌 **27**, 725-734 (1994)
- 10) 大森幸夫, 本田一郎: 最新消化器外科シリーズ2, 胃癌 (I) 1B 進行胃癌, 阿部令彦, 出月康夫, 小澤和恵, 榎原宣, 1版. 東京, 金原出版, 1989. 15-25p
- 11) 三輪 潔: 最新消化器外科シリーズ2, 胃癌 (I) 8 遠隔成績, 阿部令彦, 出月康夫, 小澤和恵, 榎原宣, 1版. 東京, 金原出版, 1989. 155-154p
- 12) Barsky SH, Siegel G, Jannotta F, Liotta LA: Loss off basement membrane components by invasive tumors but not by their benign counterparts. Lab Invest **49**, 140-148 (1983)
- 13) 久吉隆郎: 肺扁平上皮癌における Ia (DR) 抗原・fibronectin・IV型 collagen・laminin の局在と予後との関連. 日外会誌 **94**, 1209-1217 (1993)
- 14) 迎 徹: 胃癌組織における fibronectin, laminin の免疫組織学的検討. J Jpn Soc Ther **25**, 2468-2476 (1990)
- 15) 松田泰次: 大腸癌の免疫組織学的検討からみた癌の浸潤・転移におけるラミニンの役割. 医のあゆみ **141**, 194 (1987)
- 16) Nakamura K, Mori M, Enjoji M: Distribution of basement membrane antigens in clinical gastric adenocarcinoma: an immunohistochemical study. J Clin Pathol **40**, 1418-1423 (1987)
- 17) 大谷明夫, 名倉 宏: ヒト癌と間質—人体病理学からのアプローチ—. Biother **7**, 1635-1641 (1993)
- 18) 青柳慶史朗, 橋本 謙, 孝富士喜久生, 田中裕穂, 児玉一成, 矢野正二郎, 太田準二, 丸岩昌文, 武田仁良, 掛川暉夫: 胃底分化腺癌における laminin および type IV collagen の局在に関する検討. 癌の臨 **38**, 652-656 (1992)
- 19) 窪地 淳: 組織内IV型コラゲナーゼ活性値測定法の確立とそれによる胃・肺癌組織内同酵素活性に関する研究—I型コラゲナーゼ活性および病理組織学的所見と対比して—. 日外会誌 **91**, 174-183 (1990)
- 20) Raycroft L, Wu HY, Lozano G: Transcriptional activation by wild-type but not transforming mutants of the p53 anti-oncogene. Science **249**, 1049-1050 (1990)
- 21) Jenkins JR, Chmakov P, Adison C, Sturzbecher H-W, Wade-Evans A: Two distinct region of murine p53 primary amino acid sequence are implicated in stable complex formation with simian virus 40T antigen. J Virol **62**, 3039-3906 (1988)
- 22) 米村 豊, 伏田幸夫, 津川浩一郎, 二宮 致, 加治正英, 宮崎逸夫: 胃癌における p53 遺伝子異常. 外科診療 **35**, 7-20 (1993)
- 23) Seruca R, David L, Holm JM, Nesland JM, Frangan BM, Castedo S, Sobrinho-Simoes M, Borresen A-L: p53 mutation in gastric carcinomas. Br J Cancer **65**, 708-710 (1992)
- 24) Tamura G, Kihana T, Nomura K, Terada M, Sugimura T, Hirohashi S: Detection of frequent p53 gene mutation in primary gastric cancer by cell sorting and polymerase chain reaction single-strand conformation polymorphism analysis. Cancer Res **51**, 3056-3058 (1991)
- 25) Finlay CA, Hind PW, Tan T-H, Elyahu D, Oren M, Levine J: Activating mutation for transformation by p53 produce a gene product that forme an hsc70-p53 complex with an alterd half-life. Mol Cell Biol **7**, 531-539 (1988)
- 26) 米村 豊, 伏田幸夫, 津川浩一郎, 二宮 致, 加治正英, 宮崎逸夫: 胃癌における p53 遺伝子異常. Oncologia **26**, 417-425 (1993)
- 27) 米村 豊, 伏田幸夫, 津川浩一郎, 山口明夫, 宮崎逸夫, 珠玖 洋, 浦野 健: 胃癌における p53 の発現と予後. 日外会誌 **93**, 662 (1992)
- 28) Steeg PS, Bevilqua G, Kopper L, Thorgerirsson UP, Talmadge JE, Liotta LA, Sobel ME: Evidence for a nobel gene associated with low tumor metastatic potential. J Natl Cancer Inst **80**, 200-204 (1988)
- 29) Stahl JA, Leone A, Rosengard AM, Porter L, King CR, Steeg PS: Identification of a second human nm23 gene. nm23-H2. Cancer Res **51**, 445-449 (1991)
- 30) Hennessy C, Henry JA, May FEB, Westly BR, Angus B, Lennard TWJ: Expression of the antimetastatic gene nm23 in human breast cancer: An association with good prognosis. J Natl Cancer Inst **83**, 281-285 (1991)
- 31) Hirayama R, Sawai S, Takagi Y, Mishima Y, Kimura N, Shimada N, Esaki Y, Kurashima C, Utsuyama M, Hirokawa K: Positive relationship between expression of anti-metastatic factor (nm23 gene product or nucleoside diphosphate kinase) and good prognosis in human breast cancer. J Natl Cancer Inst **83**, 1249-1250 (1991)
- 32) 中森正二, 石川 治, 大東弘明, 佐々木 洋, 古川 洋, 今岡真義, 岩永 剛, 木村成道: 転移抑制遺伝子 NDP キナーゼ/nm23 遺伝子産物発現からみた肺腫瘍の生物学的悪性度. 胆と膵 **14**, 517-522 (1993)
- 33) 木村成道: 日本癌学会シンポジウム・癌転移の分子機構とその制御—転移関連遺伝子と悪性化—Nm23/NDP キナーゼと癌転移. 癌と化療 **20**, 332-337 (1993)

