
原 著

大腸粘膜内癌のリンパ節 ITC (isolsted tumor cell) の 免疫組織学的検討

松 澤 岳 晃

新潟大学大学院医歯学総合研究科消化器・一般外科学分野

(指導：畠山勝義教授)

Immunohistochemical Study for Isolated Tumor Cell (ITC) of Lymph Node in Intramucosal Colorectal Carcinoma

Takeaki MATSUZAWA

Division of Digestive and General Surgery,

Niigata University Graduate School of Medical and Dental Sciences

(Director: Professor Katsuyoshi HATAKEYAMA)

要 旨

大腸粘膜内癌にはリンパ節転移例の報告はなく、大腸粘膜内癌にはリンパ節転移能がないと考えられてきた。しかし従来の大腸粘膜内癌リンパ節転移に関する検索は、HE 染色標本のみを元に行われたものであり、免疫組織学的に同定されるリンパ節微小転移 (isolated tumor cell: ITC) の有無については検討されていない。本研究は、リンパ節郭清を伴う外科切除が施行され、病変の全割切片による組織学的検索が行われた大腸粘膜内癌 36 例を対象に、上皮性サイトケラチン CAM5.2 免疫染色によりリンパ節 ITC を検索し、ITC と原発巣粘膜内癌の組織学的因子との関連を検討した。原発巣大腸粘膜内癌は全例が分化型 (高分化・中分化) 腺癌で、リンパ管侵襲・静脈侵襲、簇出のリンパ節転移リスク因子は陰性であり、対象とした 557 個のリンパ節全てに ITC は認められなかった。以上のことから、大腸粘膜内癌では免疫組織学的に同定される ITC すら存在せず、リンパ節転移能のない癌である可能性が高いことが再確認された。大腸粘膜内癌では、原発巣にリンパ節転移形成過程の第一段階である簇出形成がなく、そのことがリンパ節転移が生じない主要因として推定された。

キーワード：大腸粘膜内癌, ITC, リンパ節転移, 免疫染色, 簇出

Reprint requests to: Takeaki MATSUZAWA
Division of Digestive and General Surgery
Niigata University Graduate School of Medical
and Dental Sciences
1-757 Asahimachi - dori Chuo - ku,
Niigata 951-8510 Japan

別刷請求先：〒951-8510 新潟市中央区旭町通 1-757
新潟大学医歯学総合研究科消化器・一般外科学分野
松澤 岳 晃

緒 言

リンパ節転移は進行大腸癌の重要な予後規定因子の一つであり¹⁾²⁾, 固有筋層まで浸潤した癌(mp癌)の23%, 固有筋層を越えて浸潤した癌(ss/se/a1/a2癌)の43.9~63.0%にリンパ節転移が認められている³⁾. 従って進行大腸癌では, リンパ節郭清を伴う外科切除が治療の第一選択となる. 早期大腸癌でも, sm癌では約10%にリンパ節転移があり⁴⁾⁵⁾, 内視鏡的治療が行われたsm癌にリンパ節転移リスク因子(低分化腺癌・未分化腺癌, sm浸潤距離1000 μ m以上, 脈管侵襲陽性)がみられた場合は, 追加外科切除を考慮すること³⁾となっている. 一方, 粘膜内癌ではこれまでにリンパ節転移例の報告はなく, 経験的に, リンパ節郭清を伴わない内視鏡的治療で根治が期待されるとされている³⁾. しかし, 粘膜内にとどまる大腸癌には, 真にリンパ節転移能が欠如しているかどうかについては, 明らかにされていない.

従来, 癌のリンパ節転移はHE標本による病理組織学的検索によりなされてきた. しかし1990年代以降, 分子生物学的および免疫組織学的方法により, HE標本による検索で転移陰性とされたリンパ節にも微小癌巣が証明されるようになった⁶⁾. これらの微小癌転移巣は, occult metastasis⁷⁾⁸⁾またはmicrometastasis⁹⁾¹⁰⁾と呼ばれてきた. 大腸癌におけるmicrometastasis(またはoccult metastasis)は, 進行癌で21~76%¹¹⁾, sm癌で17.2%¹²⁾と報告されている. すなわち, 大腸癌はそれまで想定されていた以上に, 高いリンパ節転移能を有することが分かってきた. これらのことから, 経験的にリンパ節転移はきたさない, と考えられてきた大腸粘膜内癌にも, HE標本による検索では見逃されていたmicrometastasisが存在する可能性が考えられる. しかしこれまで, 大腸粘膜内癌を対象にmicrometastasisの有無を検討した研究は行われていない.

他方, micrometastasis (occult metastasis)に関しては, 近年その用語と定義が変更された. 2002年のTNM分類第6版¹³⁾では, 従来micrometastasis (occult metastasis)とされてき

たものに対してisolated tumor cell (ITC)の用語を当て, “免疫組織学的(または分子生物学的手法)により同定される0.2mm未満の大きさの癌細胞または癌細胞集団”と規定している. 従って本研究では, 大腸粘膜内癌のリンパ節ITCの免疫組織学的検索を行い, そのリンパ節転移能の有無と原発巣の組織学的因子との関連について検討した.

材料と方法

1. 検討対象

所属リンパ節の郭清がなされた, 外科切除大腸粘膜内癌36例を検討対象とした. 郭清リンパ節個数は557個(1症例当たり平均15.5個)である. 粘膜内癌は病変全体の全割切片が作製されたものを対象とした. また, sm以深浸潤大腸癌合併例, 他臓器癌との重複例, 家族性大腸腺腫症, 炎症性腸疾患合併例, EMR後の追加腸切除症例, は対象から除外した.

2. 原発巣の病理組織学的検索

粘膜内癌巣は階段状に全割後, ホルマリン固定パラフィン包埋ブロックから4 μ m, HE染色切片を作製した. 癌巣が粘膜内に限局することを再確認し, 大腸癌取扱い規約¹⁴⁾に準じて, 癌の組織型, 腺腫併存の有無, 併存腺腫の組織型, リンパ管侵襲・静脈侵襲の有無を検索した. また, sm癌においてリンパ節転移リスク因子¹⁵⁾¹⁶⁾として注目されている簇出(budding)の有無を検索した. 簇出はUenoらの定義¹⁷⁾に従い, 癌発育先進部の間質に認められる単個の癌細胞あるいは5個未満の細胞からなる癌胞巣とした.

3. リンパ節転移の検索

郭清リンパ節は大腸癌取扱い規約¹⁴⁾に準じて第1群(腸管傍リンパ節), 第2群(中間リンパ節), 第3群(主リンパ節), 第4群(主リンパ節より中枢のリンパ節)に分類した. 全リンパ節に対して, HE染色標本と10 μ m厚切片3枚⁸⁾の免疫染色を行い, 癌細胞の有無を検索した. 免疫染色は,

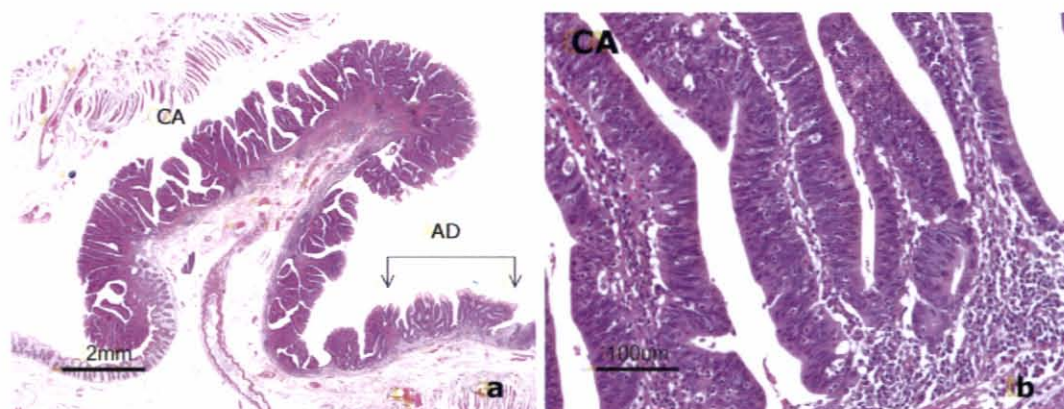


図 1

- a：粘膜内に限局する大腸癌（粘膜内癌）、腺腫成分の併存がみられる（図中 AD 部分）。
b：明瞭で大きな管状構造からなる高分化腺癌。

上皮性サイトケラチンに対するモノクローナル抗体 CAM5.2 (Becton-Dickinson, San Jose, CA) を用い、streptavidin-biotin immunoperoxidase (SAB) 法で行った⁸⁾。核染色にはヘマトキシリンを用いた。TNM 分類の定義¹³⁾に従い、HE 標本で癌転移陰性で、CAM5.2 免疫染色で同定される 0.2mm 未満の大きさの癌細胞または癌細胞集団を ITC (isolated tumor cell) とした。免疫染色の陽性コントロールとして、HE 染色でリンパ節転移陽性であった大腸進行癌 2 症例のリンパ節 16 個を用いた。

結 果

対象とした大腸粘膜内癌は、結腸癌 25 例、直腸癌 11 例で、肉眼型は I 型が 12 例 (33.3%)、II a 型が 8 例 (22.3%)、結節集簇様病変が 16 例 (44.4%) であり、大きさは平均 45.1 ± 28.9 mm であった。組織型は全例分化型（高分化または中分化）腺癌で（図 1）、32 例 (88.9%) は腺腫を併存していた。リンパ管侵襲・静脈侵襲、簇出はいずれも陰性であった（表 1）。

検索リンパ節 557 個には、HE 染色標本、CAM

5.2 免疫染色標本いずれも癌転移巣は認められなかった（表 2）。これらのリンパ節では、CAM5.2 免疫染色で陽性とされる細網細胞⁸⁾は陽性に染色されていた（図 2-a）。また、陽性コントロールリンパ節でも、HE 染色で同定可能な転移巣の癌細胞集団、およびその周囲の単個または数個の癌細胞集団の細胞質が強陽性を示していた。

考 察

癌のリンパ節転移巣形成までには、①原発巣癌塊からの癌細胞の遊離・離脱、②間質浸潤、③脈管内（リンパ管内）浸潤、④脈管内の移動、⑤脈管（リンパ管またはリンパ管類洞）からリンパ節への脱出、⑥リンパ節への浸潤と再増殖、の過程が存在する¹⁸⁾。これらの中で、⑤脈管からリンパ節への脱出、の段階では癌細胞は単個または数個の細胞集団としてリンパ節辺縁洞内に留まっており、HE 染色ではその同定が容易ではない。こうした段階の癌転移を有するリンパ節の多くは、これまでの病理組織学的検索では転移陰性とされてきた。しかし、近年の分子生物学的および免疫組織学的方法により、こうした癌細胞の同定が可能

表1 対象例大腸粘膜内癌の臨床病理学的事項

発生部位	
結腸	25
直腸	11
肉眼型	
Ip, Isp	5
Is	7
IIa	5
IIa+IIc	3
結節集簇様病変	16
大きさ(平均±標準偏差)	45.1±28.9 mm
組織型	
高分化	29
中分化	7
低分化	0
腺腫併存	
絨毛管状腺腫併存	13
管状腺腫併存	19
腺腫併存なし	4
リンパ管侵襲	
陰性	36
陽性	0
静脈侵襲	
陰性	36
陽性	0
簇出	
陰性	36
陽性	0

となり⁶⁾、大腸癌でもそれまで考えられていた以上に高頻度に癌細胞のリンパ節転移が存在することが分かってきた¹¹⁾¹²⁾。分子生物学的方法や免疫組織学的方法で同定される癌のリンパ節微小転移巣は、従来は micrometastasis⁷⁾⁸⁾ または occult metastasis⁹⁾¹⁰⁾、近年の TNM 分類¹³⁾ では ITC (isolated tumor cell) と呼ばれている。その臨床

的意義(癌の再発や予後との関連)については必ずしも統一の見解は得られていないが¹¹⁾、こうした癌の微小転移巣が HE 染色でも認識可能なリンパ節癌転移巣の初期段階であることは確かであり、逆に ITC すら存在しない段階の癌にはリンパ節転移能がないか、極めて低い、ことが推定される。

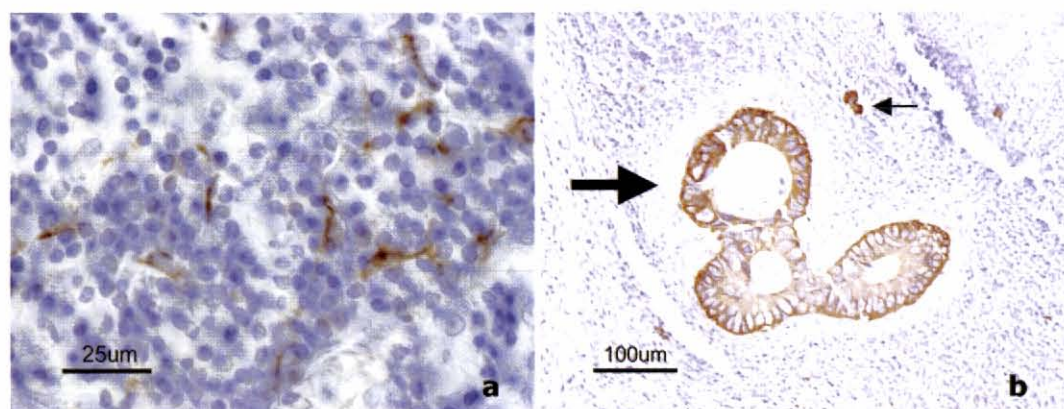


図 2

- a：粘膜内癌の郭清リンパ節の CAM5.2 免疫染色。リンパ節細網細胞の紡錘形細胞質が陽性。
b：陽性コントロールリンパ節の CAM5.2 免疫染色。HE 染色でも同定可能な癌転移巣（大矢印）およびその周囲の単個の癌細胞（小矢印）の細胞質が強陽性を示す。

表 2 大腸粘膜内癌のリンパ節転移

リンパ節の合計	ITC 陽性	群別のリンパ節数			
		n1	n2	n3	n4
557	0	262	235	27	33
(15.5)		(7.3)	(6.5)	(0.8)	(0.9)

() 平均リンパ節個数

これまでに、粘膜内に限局する大腸癌のリンパ節転移報告例はなく、経験的に大腸粘膜内癌にはリンパ節転移能はないと考えられてきた。しかし、従来の粘膜内癌のリンパ節転移に関する検索は HE 染色標本を元に行われたものであり、ITC についての研究は行われていない。従って、大腸粘膜内癌にも HE 染色で認識可能なリンパ節転移巣形成の初期段階が存在するかどうかについては明らかではない。本研究で対象とした大腸粘膜内癌 36 例でみる限りは、大腸粘膜内癌には ITC すら存在せず、粘膜内に限局する段階の大腸癌にはリンパ節転移能がない可能性が高いことが再確認さ

れた。本研究では、上皮性サイトケラチン CAM5.2 に対して陽性となることが知られているリンパ節細網細胞⁸⁾や、HE 染色で同定可能な陽性コントロールの癌リンパ節転移巣およびその周囲の微小癌巣が CAM5.2 免疫染色陽性であった。このことから、粘膜内癌リンパ節の免疫染色結果が、染色手技などによる偽陰性の可能性はないと考えられる。

本研究で対象とした大腸粘膜内癌は全例が分化型（高分化・中分化）腺癌であり、大腸 sm 癌でリンパ節転移リスク因子とされている、リンパ管侵襲・静脈侵襲³⁾、簇出¹⁵⁾¹⁶⁾はいずれもが陰性

であった。これら因子の中で、簇出は癌のリンパ節転移巣形成の第一段階である「①原発癌巣塊からの癌細胞の遊離・離脱」に対応する組織所見である。大腸粘膜内癌ではリンパ節転移が生じないことの主要因は、簇出形成の欠如によりその後の転移巣形成過程が成立しないためと推定される。大腸粘膜内癌で簇出が形成されない理由は不明であるが、進行大腸癌を対象としたこれまでの研究では、簇出と癌の浸潤・転移に関連する糖鎖抗原である Sialyl Le^x の発現¹⁹⁾ や、matrix metallo-proteinases (MMP) family 中の matrilysin (MMP-7) の発現²⁰⁾ との相関が報告されている。大腸粘膜内癌におけるこれら蛋白発現の解析を行うことが、今後の検討課題と考えられた。

謝 辞

稿を終えるにあたり、御指導を賜りました新潟大学大学院医歯学総合研究科消化器・一般外科学分野、畠山勝義教授、同分子・診断病理学分野、味岡洋一教授に深謝いたします。また、標本作製・免疫染色の技術指導を頂きました分子・診断病理学分野の職員（山口尚之、佐藤彩子、小林和恵）の皆様に深謝いたします。

文 献

- Fielding LP, Phillips RK, Fry JS and Hittinger R: Prediction of outcome after curative resection for large bowel cancer. *Lancet* 2: 904-907, 1986.
- 大腸癌研究会全国登録委員会: n 別生存率, 全国大腸癌登録調査報告, 第 1, 2, 3, 4, 6 号, 大腸癌研究会, 1986, 1987, 1988, 1989, 1990.
- 大腸癌研究会編. 大腸癌治療ガイドライン, 医師用 2005 年版, II. 治療法の種類と治療方針の解説. 金原出版, 2005.
- Coverlizza S, Risio M, Ferrari A, Fenoglio-Preiser CM and Rossini FP: Colorectal adenomas containing invasive carcinoma. Pathologic assessment of lymph node metastatic potential. *Cancer* 64: 1937-1947, 1989.
- 小平 進, 八尾恒良, 中村恭一, 渡辺英伸, 丸山雅一, 牛尾恭輔, 下田忠和, 岩下明德: sm 癌細分類からみた転移陽性大腸 sm 癌の実態. *胃と腸* 29: 1137-1142, 1994.
- Pelkey TJ, Frierson HF and Bruns DE: Molecular and immunological detection of circulating tumor cells and micrometastasis from solid tumors. *Clin Chem* 42: 1369-1381, 1996.
- Greenson JK, Isenhardt CE, Rice R, Mojzisek C, Houchens D and Martin EW Jr.: Identification of occult micrometastases in pericolic lymph node of Dukes B colorectal cancer patients using monoclonal antibodies against cytokeratin and CC49. Correlation with long-term survival. *Cancer* 73: 563-569, 1994.
- Sasaki M, Watanabe H, Jass JR, Ajioka Y, Kobayashi M and Hatakeyama K: Occult lymph node metastases detected by cytokeratin immunohistochemistry predict recurrence in "node-negative" colorectal cancer. *J Gastroenterol* 32: 758-764, 1997.
- Yasuda K, Adachi Y, Shiraishi N, Yamaguchi K, Hirabayashi Y and Kitano S: Pattern of lymph node micrometastases and prognosis of patients with colorectal cancer. *Ann Surg Oncol* 8: 300-304, 2001.
- Palma RT, Waisberg J, Bromberg SH, Simao AB and Godoy AC: Micrometastasis in regional lymph nodes of extirpated colorectal carcinoma: immunohistochemical study using anti-cytokeratin antibodies AE1/AE3. *Colorectal Dis* 5: 164-168, 2003.
- 味岡洋一: リンパ節微小転移 (lymph node micrometastasis) と脈管侵襲. *消化器病セミナー* 86, へるす出版, p71-80, 2002.
- Yokoyama J, Ajioka Y, Watanabe H and Asakura H: Lymph node metastasis and micrometastasis of submucosal invasive colorectal carcinoma: An indicator of the curative potential of endoscopic treatment. *Acta Med Biol* 50: 1-8, 2002.
- Sobin LH and Wittekind Ch (eds): "TNM classification of malignant tumours." 6th ed. New York: Wiley-Liss; 2002.
- 大腸癌研究会編. 大腸癌取り扱い規約 (第 7 版), 金原出版, 東京, 2006.
- 林田啓介, 磯本浩晴, 白水雄, 諸富立寿, 黒脇敏彦, 曹 光男, 緒方 裕, 福永淳治, 梶原賢一郎, 小島敏生, 山下裕一, 山内 胖, 掛川暉夫:

- 大腸 sm 癌の検討 — とくに脈管侵襲と簇出について —. 大腸肛門誌 40: 119-126, 1987.
- 16) 橋本 哲：簇出 (sprouting/budding) の大腸 sm 癌リンパ節転移危険因子としての意義に関する免疫組織学的検討. 新潟医学会誌 120: 569-576, 2006.
 - 17) Ueno H, Mochizuki H, Hashiguchi Y, Shimazaki H, Aida S, Hase K, Matsukuma S, Kanai T, Kurihara H, Ozawa K, Yoshimura K and Bekku S: Risk factors for an adverse outcome in early invasive colorectal carcinoma. Gastroenterology 127: 385-394, 2004.
 - 18) 清水元治：癌の浸潤・転移と細胞接着 概説, 山本 雅, 土田信夫, 中村裕輔, 藤永 蕙編 癌と遺伝子 機能から診断・治療まで. 初版, 共立出版株式会社, 東京, 1664-1668, 1999.
 - 19) Ono M, Sakamoto M, Ino Y, Moriya Y, Sugihara K, Muto T and Hirohashi S: Cancer cell morphology at the invasive front and expression of cell adhesion-related carbohydrate in the primary lesion of patients with colorectal carcinoma with liver metastasis. Cancer 78: 1179-1186, 1996.
 - 20) Masaki T, Matsuoka H, Sugiyama M, Abe N, Sakamoto A and Atomi Y: Matrilysin (MMP-7) as a significant determinant of malignant potential of early invasive colorectal carcinomas. Br J Cancer 18: 1317-1321, 2001.
- (平成 20 年 1 月 7 日受付)