
原 著

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

橋 本 哲

新潟大学大学院医歯学総合研究科消化器内科学分野

(指導: 青柳 豊教授)

**Immunohistochemical Study on the Significance of Sprouting/Budding
as a Risk Factor for Lymph Node Metastasis in Submucosal
Invasive Colorectal Carcinoma**

Satoru HASHIMOTO

Division of Gastroenterology and Hepatology,

Niigata University Graduate School of Medical and Dental Sciences

(Director: Prof. Yutaka AOYAGI)

要 旨

大腸 sm 癌発育先進部の簇出 (sprouting/budding) のリンパ節転移危険因子としての意義については、研究者によって意見の一致がえられていない。このことは、通常の HE 染色標本のみでは、簇出、脈管侵襲、リンパ節転移の同定精度が必ずしも高くないことに起因している。本研究は、リンパ節郭清がなされた外科切除大腸 sm 癌 88 例を対象として、上皮性サイトケラチン CAM5.2 免疫染色で簇出を、同免疫染色および HE 標本でリンパ節転移を、Victoria blue 弾性線維染色で静脈侵襲を、リンパ管内皮細胞マーカー D2-40 免疫染色でリンパ管侵襲を、検索し、病変ごとの簇出平均個数・最大個数と、脈管侵襲、リンパ節転移との相関を検討した。リンパ管侵襲陽性例とリンパ節転移陽性例は、それぞれの陰性例に比べ、簇出平均個数、最大個数ともに有意に高値であった。また、最大個数として 11 個以上の簇出を認める症例はそれ未満に比べ、リンパ節転移陽性率が有意に高かった。これらのことから、大腸 sm 癌の簇出は、リンパ節転移危険因子としての意義があり、EMR 大腸 sm 癌の追加腸切除考慮条件のひとつになりうる可能性が示唆された。

キーワード : 大腸 sm 癌, 簇出, リンパ節転移, 脈管侵襲, 免疫染色

Reprint requests to: Satoru HASHIMOTO
Division of Gastroenterology and Hepatology
Niigata University Graduate School of Medical
and Dental Sciences
1 - 757 Asahimachi - dori,
Niigata 951 - 8510 Japan

別刷請求先 : ☎ 951 - 8510 新潟市旭町通り 1 - 757
新潟大学医歯学総合研究科消化器・肝臓内科分野
橋 本 哲

緒 言

大腸 sm 癌のリンパ節転移陽性率は約 10 % と報告されている^{1,2)}。近年、内視鏡的粘膜摘除術(EMR)の普及に伴い、大腸 sm 癌の EMR 例が増加しているが、摘除標本の病理学的検索によりリンパ節転移危険因子が認められた場合は、リンパ節郭清を含めた追加腸切除が必要となる。大腸癌取り扱い規約³⁾では、EMRsm 癌に、①明らかな脈管侵襲陽性、②低分化腺癌あるいは未分化癌、③断端近傍までの massive な癌浸潤の 1 項目以上が認められた場合、追加腸切除を推奨している。しかしこれらの基準を満たす症例のうち、リンパ節転移陽性例は 10 ~ 20 %⁴⁾ に過ぎないのが現状であり、リンパ節転移陽性例を更に絞り込むため、上記以外のリンパ節転移危険因子の確立が望まれている。

簇出は、今井⁵⁾により定義された癌の発育様式を表す用語であり、先進部で癌が平均して 2 ~ 3 個の幅に相当する細胞索で発育するもの、あるいは癌細胞が個々に遊離して発育するものを指し、これまで簇出と大腸 sm 癌のリンパ節転移および転移危険因子である脈管侵襲との関連が指摘されてきた^{6)~9)}。しかし一方で、簇出はリンパ節転移や脈管侵襲とは必ずしも相関しないという報告^{10)~12)}もあり、リンパ節転移危険因子としての評価は研究者により一致していない。その理由としては、第一に、今井の簇出の定義には組織学的な幅があり、どの程度の細胞数からなる癌細胞索(または癌胞巣)までを簇出とするかの判定基準が、研究者により一致していないこと、第二には、これまでの簇出に関する研究には HE 染色標本が用いられてきたが、少數個または個々の細胞に遊離した癌細胞の同定は同標本では必ずしも容易ではなく、従来の研究では簇出の有無や出現状態の正確な評価が行われていなかった可能性が挙げられる。前者に関しては、近年、簇出の判定を Ueno らの基準(癌発育先進部で、単個、または 5 個未満の構成細胞からなる癌胞巣を簇出とする)¹³⁾で、研究者間での統一をはかる方向にある¹⁴⁾。しかし後者については、未解決の問題とし

て残されている。更に、脈管侵襲やリンパ節転移も、HE 標本のみによる判定では偽陰性がありうること¹⁵⁾も、簇出のリンパ節転移危険因子としての評価に統一的見解が得られないことの一因と考えられる。

本研究は、簇出の大腸 sm 癌リンパ節転移危険因子としての意義を明らかにするため、癌の簇出、脈管侵襲、リンパ節転移の免疫組織学的検索を行い、それらの相関を検討した。なお、簇出の英語名を今井は sprouting⁵⁾としたが、簇出と癌リンパ節転移との相関を検討した近年の研究では簇出を budding^{6,7,11)~13)}と呼称する傾向にあるため、本研究では両者を並記した。

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 sm 癌 88 例を対象とした。大腸 sm 以深浸潤癌重複例、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。症例の発生部位、肉眼型、組織学的特徴、リンパ節転移の有無、を表 1 に示した。

2. 原発巣の病理組織学的検索

sm 癌原発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 μm 切片 4 枚を作製し、それぞれ HE 染色、上皮性サイトケラチン CAM5.2 (Ecton Dickinson, USA) / リンパ管内皮細胞マーカー D2-40 (Signet, USA) の二重免疫染色、HE 染色/Victoria blue 弾性線維染色の二重染色、を行い、以下の病理組織所見を検索した。

1) 簇出(sprouting/budding)の判定と出現個数の評価

Ueno らの定義¹³⁾に従い、簇出を、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定義した。簇出の判定には CAM5.2/D2-40 二重免疫染色標本を用い、CAM5.2 陽性細胞を癌細胞とした(図 1)。癌発育先進部を 20 × 10 倍視野で検鏡して各視野ごとの簇出数を求め、症例ごとに 1 視野当たりの平均個

表1 検討対象の内訳

	n	%
計	88	
部 位		
盲 腸	6	7%
上 行 結 腸	10	11%
横 行 結 腸	7	8%
下 行 結 腸	3	3%
S 状 結 腸	20	23%
直 腸	42	48%
肉 眼 型		
II c + II a	10	11%
II a + II c	6	7%
II a	10	11%
I s	53	60%
I s + II c	1	2%
I p	8	9%
組 織 型		
well	51	70%
well + mod	17	19%
mod	9	10%
mod + poor	1	1%
sm浸潤度		
<1000 μm	8	9%
≥1000 μm	80	91%
リンパ管侵襲		
(-)	58	66%
(+)	30	34%
静脈侵襲		
(-)	63	72%
(+)	25	28%
リンパ節転移		
n(-)	59	67%
ITC(+)	15	17%
n(+)	14	16%

数と全視野中の最大個数とを算定した(図2). 膿瘍内やその近傍、貯留粘液内やその破綻部にみられた解離癌細胞は、簇出から除外した。

2) 脈管侵襲の判定

リンパ管侵襲は、HE標本とCAM5.2/D2-40二重免疫染色標本で、静脈侵襲はHE染色/Victoria blue弾性線維染色の二重染色標本で、判定を行った(図3-a). 対象88例のリンパ管侵襲陽性頻度は34%，静脈侵襲陽性頻度は28%であった(表1).

3. リンパ節転移の検索

リンパ節転移の検索は、郭清全リンパ節を対象として、HE染色標本と10μm厚切片3枚のCAM5.2免疫染色標本¹⁶⁾を用いて行った。HE染色で転移癌細胞の認識が可能なものをn(+), HE染色で転移陰性で、CAM5.2染色で転移癌細胞の

認識が可能であったものをisolated tumor cell(ITC)¹⁷⁾(図4)とし、両者ともに転移癌細胞が認識できなかったものをn(-)とした。

n(+)例は16%(14/88), ITC(+)例は17%(15/88), n(-)例は67%(59/88)であった(表1)。

統計学的検討にはMann-Whitney's U-testとFisherの直接確率法を用い、p < 0.05を有意差ありとした。

結 果

1. 脈管侵襲と簇出との相関

リンパ管侵襲陽性例の簇出個数は陰性例に比べ、平均(3.4 ± 3.1 vs 0.95 ± 1.5), 最大(9.8 ± 6.6 vs 2.9 ± 3.6)とともに有意に高値であった(それぞれp < 0.001)(図5-A)。静脈侵襲も有意差はなかったものの、陽性例は陰性例に比べ、簇出平均個数、最大個数ともに高値であった(それぞれ2.7 ± 2.9 vs 1.4 ± 2.2と7.0 ± 6.0 vs 4.7 ± 5.7)(それぞれp = 0.05, p = 0.09)(図5-B)。

2. リンパ節転移と簇出との相関

ITC(+)およびn(+)症例の簇出個数はn(-)症例に比べ、平均(4.0 ± 3.5, 2.5 ± 3.0 vs 1.1 ± 1.5), 最大(9.1 ± 7.2, 7.6 ± 7.6 vs 3.8 ± 4.3)とともに有意に高値であった(すべてp ≤ 0.01)。ITC(+)とn(+)との間には、簇出平均個数、最大個数ともに有意差はなかった(図6-A)。

3. 簇出最大個数とリンパ節転移との関係

各症例を簇出最大個数別に①0個, ②1~5個, ③6~10個, ④11個以上の4群に分類し、4群間でリンパ節転移陽性率を比較した(図6-B)。①~③群の間には相互に有意差はなかったが、④群のリンパ節転移陽性率(ITC(+)およびn(+))は71%と他の3つの群に比べ、有意に高い値を示した。

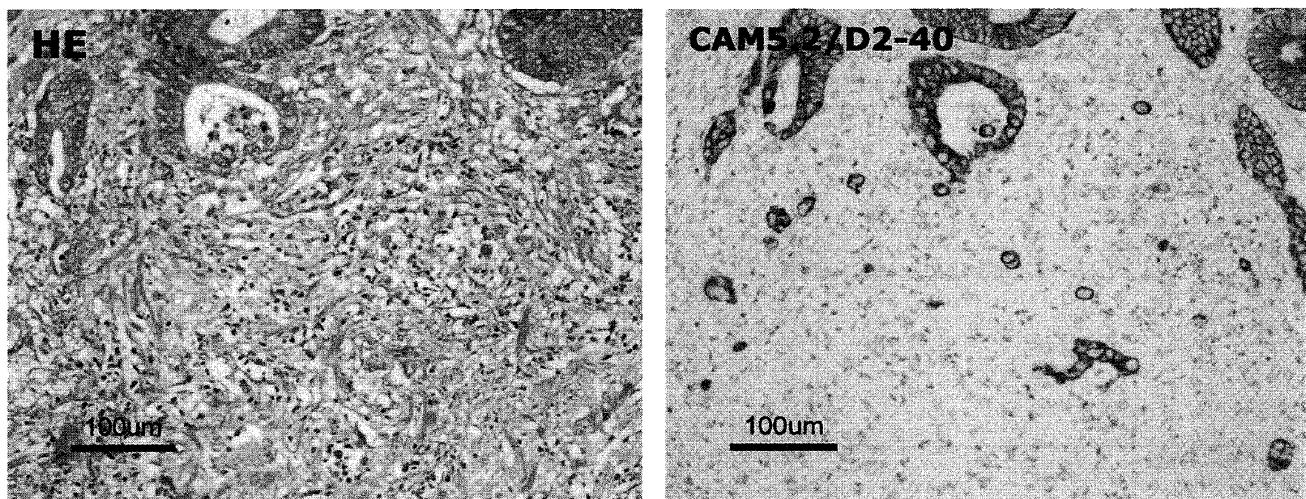


図1 HE染色標本とCAM5.2/D2-40二重免疫染色による簇出像

HE標本では簇出の正確な判定は容易ではないが、上皮性サイトケラチンCAM5.2染色では、癌細胞が明瞭に染色陽性となる。なお、図の領域内にはリンパ管は存在しないため、リンパ管内皮細胞マーカーD2-40陽性細胞はみられない。

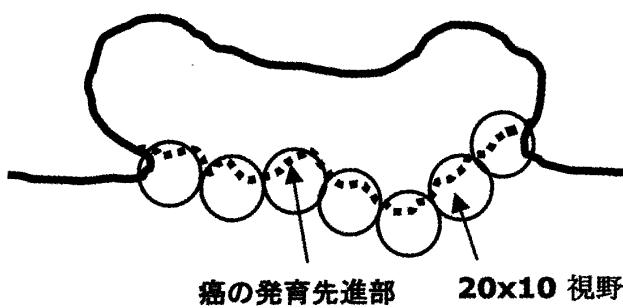


図2
癌の発育先進部を20×10倍視野領域ごとに
検鏡し、各視野ごとの簇出個数を求めた。

考 察

癌のリンパ節転移成立までにはいくつかの段階があり、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、の過程を経てはじめて転移巣が形成される¹⁸⁾。簇出は、リンパ節転移形成の①②の段階

であり、癌細胞が脈管内（リンパ管内）浸潤を来るための必要条件であるといえる。しかし、癌の発育先進部は、線維芽細胞の増生や種々の程度の炎症細胞浸潤に取り囲まれており、こうした多彩な組織所見を呈する間質内に存在する、単個の遊離癌細胞または少数個の細胞からなる癌巣、すなわち簇出を、HE染色標本で正確に認識することは必ずしも容易ではない。

これまでの、大腸sm癌の簇出と脈管侵襲、リンパ節転移との相関に関する研究は、吉川ら¹²⁾のものを除き、HE染色標本のみで簇出を判定しており、その有無や程度が、正確には評価されていない可能性が否定できない。本研究と同様に、上皮性サイトケラチン免疫染色を用いて簇出の検討を行った吉川ら¹²⁾も、免疫染色による簇出検出率はHE標本のそれに比べより高率であると述べており、従来のHE標本による検索では、簇出が過小評価されてきた可能性がある。また、これまでの研究では脈管侵襲やリンパ節転移もHE標本のみで評価されることが多く、その検出能についても問題がある。HE標本のみでは正確な脈管侵襲の判定には限界があり¹⁵⁾、更に大腸sm癌でもHE標本では認識できない癌の微小リンパ節転

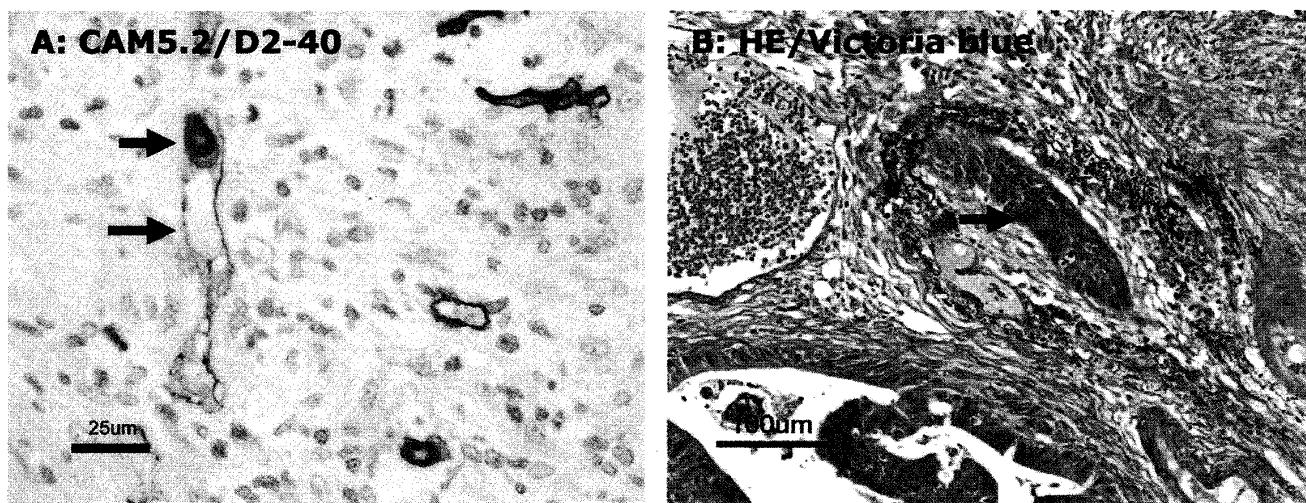


図3 CAM5.2/D2-40二重染色（A）と、HE/Victoria blue二重染色（B）
A：リンパ管内皮細胞が赤色に（赤矢印）、癌細胞が茶色に染色されている。遊離した単個の癌細胞の
リンパ管侵襲（黒矢印）が明瞭に判定される。
B：Victoria blue染色で青色に染色された弾性線維の存在から、癌の静脈侵襲（矢印）が明瞭に判定
される。

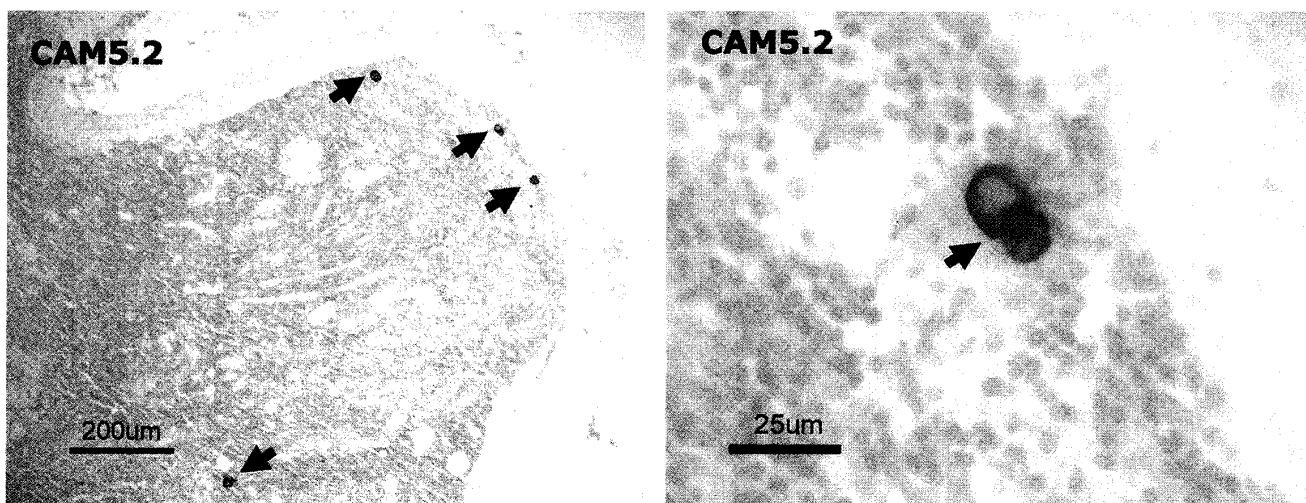


図4 CAM5.2染色により同定されるリンパ節のITC (isolated tumor cells) (矢印)
同染色では、通常のHE標本では同定困難な、単個または少数個の胞巣からなる癌細胞のリンパ節
転移の認識が可能である。

移巣 (isolated tumor cell)¹⁷⁾ が存在する¹⁵⁾。

本研究は、癌の簇出とリンパ節転移の同定に上皮性サイトケラチン CAM5.2 免疫染色を、静脈侵襲の同定に静脈弹性板を染色する Victoria blue 弹

性線維染色を、リンパ管侵襲の同定にリンパ管内皮細胞マーカーである D2-40 染色を用いることで、従来の報告に比べより精度の高い検討を行うことができたと考えられる。その結果、リンパ節

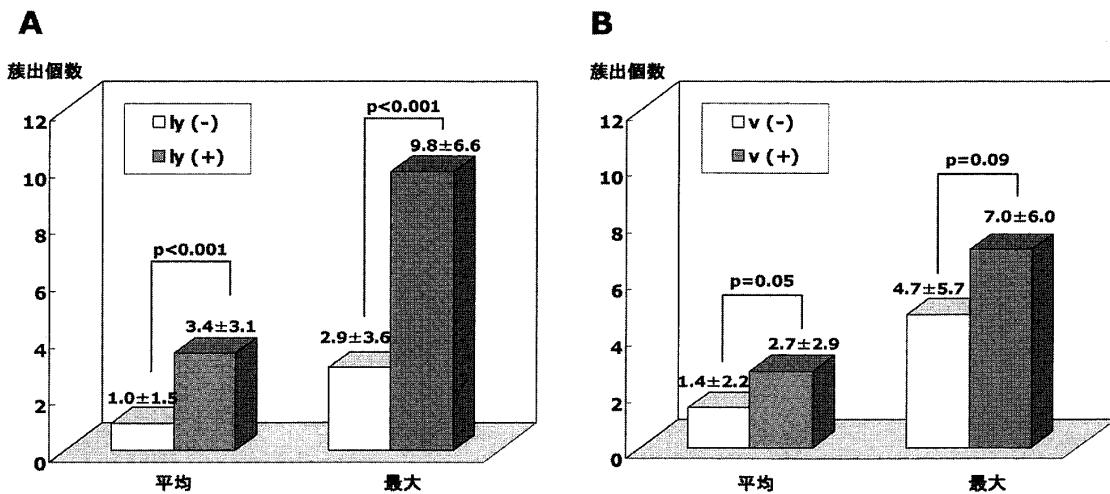


図 5

A : リンパ管侵襲陽性例 (ly (+)) と陰性例 (ly (-)) の簇出平均個数、最大個数の比較.
B : 静脈侵襲陽性例 (v (+)) と陰性例 (v (-)) の簇出平均個数、最大個数の比較.

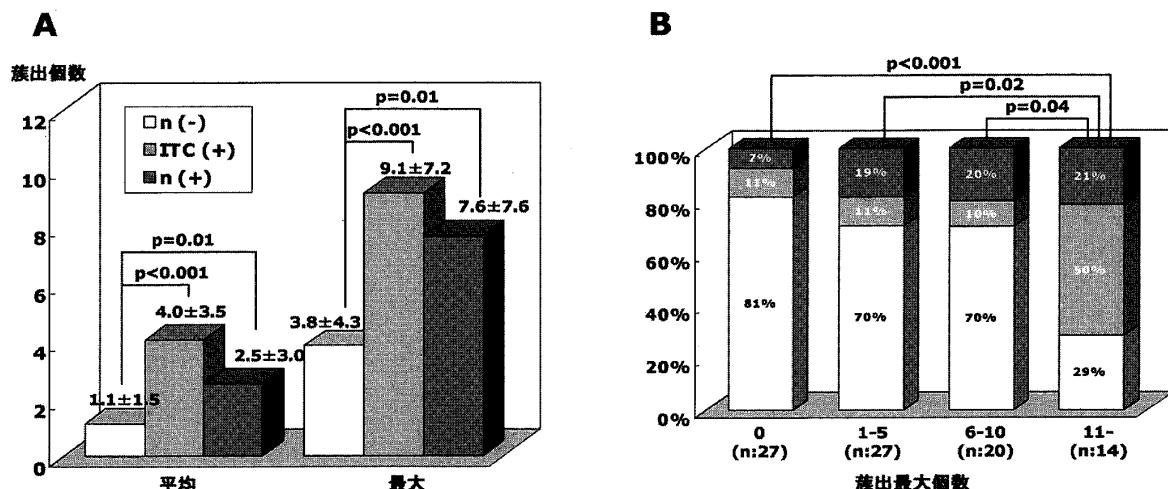


図 6

A : n (-) 例, ITC (+) および n (+) 例の簇出平均個数、最大個数の比較.
B : 簇出最大個数群とリンパ節転移との関係. 白: n (-), 灰色: ITC (+), 黒: n (+).

転移および脈管浸潤（リンパ管侵襲）陽性例は陰性例に比べ、簇出平均・最大個数とも有意に高値であり、また簇出最大個数とリンパ節転移との関係では、11個以上の簇出を認める症例はそれ未満に比べITCも含めたリンパ節転移陽性率が有意

に高いことから、簇出は大腸sm癌のリンパ節転移危険因子としての意義があると考えられた。

現在、EMR大腸sm癌では、①明かな脈管侵襲陽性、②低分化腺癌あるいは未分化癌、③断端近傍までのmassiveな癌浸潤、のいずれかが認めら

れた場合は、リンパ節転移の危険性を考慮して、リンパ節郭清を含めた追加腸切除が推奨されている³⁾。原発巣における簇出も、リンパ節転移危険因子の一つとして、追加腸切除を考慮する上で、有用な病理組織所見になりうると期待されるが、簇出を上記 3 所見と等価値の追加腸切除考慮条件とするか、もしくは上記と組み合わせて用いるかについては、検討の余地が残されている。また、本研究はサイトケラチン免疫染色により簇出を同定したが、日常ルーチンの病理組織診断で EMRsm 癌の全てに同染色を施行することは実用的ではない。本研究結果を病理組織診断に反映させ、EMR 大腸 sm 癌のより適切な治療方針の決定に寄与するためには、免疫染色標本と HE 標本での簇出現頻度、個数の対応関係の分析を行うことも、今後の検討課題と考えられた。

結 語

本研究は、大腸 sm 癌の簇出、脈管侵襲、リンパ節転移の免疫組織学的検索を行い、簇出は脈管侵襲・リンパ節転移と相關していること、リンパ節転移危険因子としての意義があること、を明らかにした。簇出は、EMR 大腸 sm 癌の追加腸切除を考慮する上で、有用な病理組織因子の一つになると期待される。

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・肝臓内科分野、青柳豊教授、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。

尚、本研究の一部は第 62 回大腸癌研究会にて発表した（2005 年、東京）。

文 献

- 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、岩下明徳： 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.
- 大腸癌研究会編：大腸癌取り扱い規約. 第 6 版, 金原出版, 東京, 1998.
- Masaki T, Mori T and Matsuoka H: Colonoscopic treatment of colon cancers. Surg Oncol Clin North Am 10: 693 - 708, 2001.
- 今井 環：人体癌腫発育状況の形態学的考察. 福岡医誌 45: 72 - 102, 1954.
- 林田啓介、磯本浩晴、白水和雄、諸富立寿、黒肱 敏彦、曹 光男、緒方 裕、福永淳治、梶原賢一郎、小畠敏生、山下裕一、山内 肥、掛川暉夫；大腸 sm 癌の検討ーとくに脈管侵襲と簇出についてー. 大腸肛門誌 40: 119 - 126, 1987.
- Hase K, Shatney CH, Johnson D, Trollope M and Vierra M: Prognostic value of tumor "budding" in patients with colorectal cancer. Dis Colon Rectum 37: 514 - 515, 1993.
- 岡部 聰：大腸 sm 癌の転移のリスクファクターに関する検討. 大腸肛門誌 47: 564 - 575, 1994.
- Shimomura T, Ishiguro S, Konishi H, Wakabayashi N, Mitsufuji S, Kasugai T, Manou M and Kodama T: New indication for endoscopic treatment of colorectal carcinoma with submucosal invasion. J Gastroenterol Hepatol 19: 48 - 55, 2004.
- 小林正明、渡辺英伸、前尾征吾、味岡洋一、吉田光宏、斎藤英俊、人見次郎、須田武保：大腸 sm 癌の新しい sm 浸潤度分類からみた組織異型度・発育先進部簇出像と脈管侵襲・リンパ節転移との相関. 胃と腸 29: 1151 - 1160, 1994.
- 池上雅博、小山友己、小林裕彦、杉坂宏明、羽野 寛：大腸 sm 癌の病理組織学的評価の問題点；とくに粘膜筋板の判定・評価及びリンパ管・静脈侵襲の評価について. 消化器外科 25: 1691 - 1699, 2002.
- 吉川智道、佐々木一晃、高坂 一、大野 敬、仲川尚明、有村佳昭、平田公一：大腸 sm 癌におけるリンパ節転移危険因子に関する検討ー特に先進部癌細胞の MMP-7 発現について. 大腸肛門誌 56: 385 - 391, 2003.

- 13) 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.
- 14) 第62回大腸癌研究会抄録集. 主題I 癌先進部組織形態は大腸癌の予後因子となりうるか? 第62回大腸癌研究会 東京, 2005.
- 15) 味岡洋一, 横山純二, 渡辺英伸: 大腸 sm 癌のリンパ節微小転移 (lymph node micrometastasis) と脈管侵襲. 早期大腸癌 5: 471 - 477, 2001.
- 16) Sasaki M, Watanabe H, Jass JR, Ajioka Y, Kobayashi M and Hatakeyama K: Immunoperoxidase staining for cytokeratins 8 and 18 is very sensitive for detection of occult node metastasis of colorectal cancer: a comparison with genetic analysis of K-ras. *Histopathology* 32: 199 - 208, 1998.
- 17) American Joint Committee on Cancer. AJCC cancer staging manual. 6th ed, New York, Springer, 2002.
- 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 蕉編, 癌と遺伝子 機能から診断・治療まで. 初版, 共立出版社, 東京, pp1664 - 1668, 1999.
- 19) 諸富立寿: 進行直腸癌における臨床病理学的研究—術前生検材料からみたリンパ節転移程度の予測—. 日外会誌 89: 352 - 364, 1988.

(平成17年12月28日受付)