

---



---

 原 著
 

---



---

## 正常胆嚢におけるリンパ管の壁在分布

峠 弘 治

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（第一外科）  
 （指導：若井俊文教授）

### Distribution of Lymphatic Vessels in the Wall of the Normal Gallbladder

Koji TOGE

*Division of Digestive and General Surgery, Niigata University Graduate School of Medical and Dental Sciences  
 (Director: Prof. Toshifumi WAKAI)*

#### 要 旨

【目的】主病巣が漿膜下層または胆嚢床部筋層周囲の結合組織への浸潤に留まる胆嚢癌（pT2胆嚢癌）に関して、肝臓側に主病巣の少なくとも一部が存在する胆嚢癌（pT2b胆嚢癌）は、腹腔側にのみ主病巣が存在する胆嚢癌（pT2a胆嚢癌）よりもリンパ節転移頻度が高いことが知られている。われわれは、このpT2胆嚢癌の腫瘍局在によるリンパ節転移頻度の差は、正常胆嚢壁において肝臓側の方が腹腔側よりもリンパ管の密度が高いことに起因しているという仮説を立案し、本研究ではこの仮説を検証することを目的とした。

【対象と方法】大腸癌肝転移に対して肝切除術とともに胆嚢摘出術が施行された10例から得られた正常胆嚢標本を対象として、リンパ管内皮細胞を特異的に染色することのできるD2-40モノクローナル抗体を用いて免疫染色を実施した。本研究では、胆嚢壁の肝付着部を肝臓側胆嚢壁、それ以外の腹腔側の胆嚢壁を腹腔側胆嚢壁と定義した。各々の胆嚢標本（N=10）より、胆嚢底部から胆嚢の肝付着部を通り胆嚢管に至る長軸方向の切片（肝臓側胆嚢壁切片）と胆嚢の肝付着部を含まない胆嚢底部から頸部に至る長軸方向の切片（腹腔側胆嚢壁切片）を切り出した。リンパ管密度（lymphatic vessel density: LVD）を200倍率1視野あたりのリンパ管の個数（個/mm<sup>2</sup>）と定義し、各々の標本においてリンパ管の密生度が高い部位（hot spot）5か所で評価した。肝臓側および腹腔側胆嚢壁（N=10）において、各々5か所のhot spotにおけるLVDの平均値を算出し、これを個々の症例の肝臓側および腹腔側胆嚢壁のLVDとして統計学的解析を実施した。

Reprint requests to: Koji TOGE  
 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  
 新潟大学大学院医歯学総合研究科  
 消化器・一般外科学分野（第一外科）

峠 弘 治

【結果】肝臓側胆嚢壁におけるLVD(中央値22.7個/mm<sup>2</sup>, 範囲11.1~32.6個/mm<sup>2</sup>)は、腹腔側胆嚢壁におけるLVD(中央値6.2個/mm<sup>2</sup>, 範囲3.1~17.4個/mm<sup>2</sup>)と比較して有意に高かった(P=0.002, Wilcoxonの符号付き順位和検定). また, LVDの最大値(32.6個/mm<sup>2</sup>)は肝臓側胆嚢壁で記録された.

【結論】ヒトの正常胆嚢において, 肝臓側胆嚢壁には腹腔側胆嚢壁よりも多くのリンパ管が分布する. この事実は, 肝臓側に主病巣の少なくとも一部が存在するpT2b胆嚢癌では, 腹腔側にのみ主病巣が存在するpT2a胆嚢癌よりもリンパ節転移頻度が高いことを説明する明確な根拠の1つであると考えられる.

キーワード: 胆嚢, リンパ管, D2-40モノクローナル抗体, 胆嚢癌, リンパ節転移

## 緒 言

胆嚢癌において, 主病巣の局所進展度は重要な予後規定因子である<sup>1)-3)</sup>. 進行胆嚢癌に対する治療成績は概して不良であるが, 病理組織学的に主病巣が漿膜下層または胆嚢床部筋層周囲の結合組織への浸潤に留まる胆嚢癌(pT2胆嚢癌)は, 領域リンパ節郭清を含む根治手術を施行することで治癒が期待できる<sup>2)-10)</sup>. 胆嚢癌は, 主病巣の壁外進展に先行してリンパ行性進展をきたすことが多いことが知られており, 事実, 主病巣が胆嚢壁内に限局しているpT2胆嚢癌の約40%にリンパ節転移を認める<sup>7)9)13)-15)</sup>. pT2胆嚢癌における主たる胆嚢壁外への進展様式はリンパ行性であり<sup>5)9)11)</sup>, その根治手術を企図するうえで, リンパ節郭清は重要な要素となる<sup>2)6)-10)</sup>.

American Joint Committee on Cancer (AJCC) 第8版のTNM分類において, pT2胆嚢癌は主病巣の局在によりpT2a(腹腔側)とpT2b(肝臓側)との2つのカテゴリーに亜分類された<sup>12)</sup>(図1A, 1B). 本改訂は, pT2b胆嚢癌の治療成績はpT2a胆嚢癌の治療成績よりも不良であるとするShindohら<sup>13)</sup>の報告に基づいている. その他にもpT2胆嚢癌における同様の治療成績が報告されている<sup>14)</sup>. このpT2胆嚢癌の腫瘍局在による治療成績の違いの要因の1つとして, pT2b胆嚢癌はpT2a胆嚢癌よりもリンパ節転移頻度が高いことがあげられる<sup>13)14)</sup>. しかしながら, pT2胆嚢癌において, なぜ腫瘍局在によりリンパ節転移頻度が異なるかについては未だ明確な根拠は示されていない.

われわれは, このpT2胆嚢癌の腫瘍局在によ

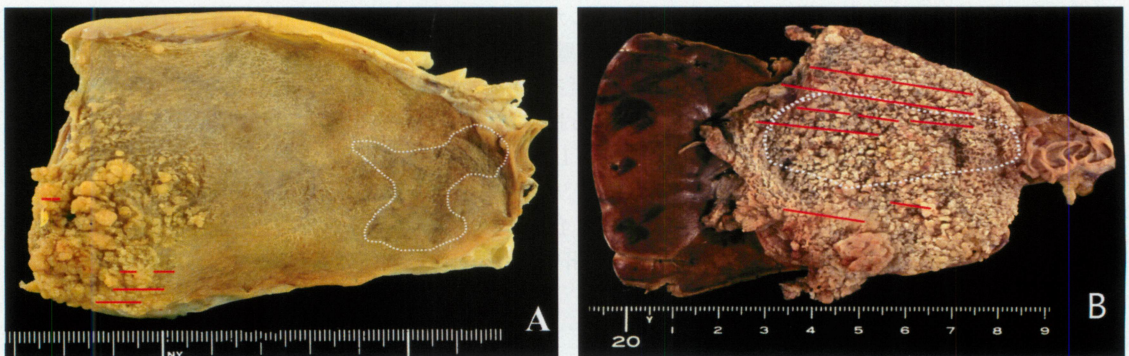


図1 pT2胆嚢癌における腫瘍局在に応じた分類<sup>12)</sup>

- A. pT2a(腹腔側)胆嚢癌. 腫瘍が遊離腹腔側の胆嚢壁にのみ浸潤していた.  
 B. pT2b(肝臓側)胆嚢癌. 腫瘍の少なくとも一部が胆嚢壁の肝臓附着部に浸潤していた.  
 赤線: 漿膜下層への浸潤部.  
 白点線で囲まれた部位: 胆嚢床部(肝臓附着部).

るリンパ節転移頻度の差は、正常胆嚢壁では肝臓側の方が腹腔側よりもリンパ管の密度が高いことに起因するという仮説をたてた。本研究の目的は、この仮説を検証し、pT2b胆嚢癌ではpT2a胆嚢癌よりもリンパ節転移頻度が高いことに関する根拠の1つを提示することである。

## 対象と方法

### 対象

2015年1月から2017年12月までの期間に、新潟大学医歯学総合病院で肝切除術が実施された大腸癌肝転移のうち、肝切除術とともに胆嚢摘出術が施行された10例を対象とした。いずれの症例においても、胆道系疾患や慢性肝疾患の既往歴は認められなかった。性別は、男性8例、女性2例であった。年齢の中央値は60.5歳（範囲34歳～65歳）であった。

### 胆嚢の解剖

胆道癌取扱い規約第6版<sup>16)</sup>に準拠して、胆嚢を胆嚢底部の頂点から胆嚢管移行部までの長軸を直角に三等分し、底部、体部、頸部の3領域に分類した。また、組織学的な胆嚢壁各層の名称を粘膜層、固有筋層、漿膜下層、漿膜と表記した<sup>16)</sup>。

### 肝臓側・腹腔側胆嚢壁の定義

AJCC第8版<sup>12)</sup>では、pT2胆嚢癌を、腫瘍が遊離漿膜側のみに局在するpT2a胆嚢癌と、腫瘍の少なくとも一部が胆嚢の肝付着部に局在するpT2b胆嚢癌とに亜分類している。この定義に基づき、本研究では、胆嚢壁の肝付着部を肝臓側胆嚢壁、それ以外の腹腔側の胆嚢壁を腹腔側胆嚢壁と定義した。

### 胆嚢標本の取扱い

すべての胆嚢標本(N=10)において、肉眼所見上、大腸癌肝転移巣の直接浸潤が認められないこと、粘膜病変や胆嚢結石が存在しないことを確認した。胆嚢標本を10%中性緩衝ホルマリンにて固定した。固定後、胆嚢底部から胆嚢の肝付

着部を通り胆嚢管に至る長軸方向の切片(肝臓側胆嚢壁切片)を各々の標本から切り出し、パラフィンに包埋した。ヘマトキシリン・エオジン染色を行い、いずれの切片においても組織学的に異常所見を認めないことを確認した。続いて、各々の胆嚢標本から、胆嚢の肝付着部を含まない胆嚢底部から頸部に至る長軸方向の切片(腹腔側胆嚢壁切片)を切り出し、同様に包埋、染色し、組織学的に異常所見を認めないことを確認した。

### リンパ管の評価方法

これまでの研究報告に基づいて、リンパ管密度(lymphatic vessel density:LVD)を200倍率1視野あたりのリンパ管の個数(個/mm<sup>2</sup>)と定義し、リンパ管の密生度が高い部位(hot spot)で評価することとした<sup>17)</sup>。

### 免疫組織化学

パラフィン包埋した肝臓側および腹腔側胆嚢壁切片ブロックから、3μmの厚さで3枚ずつ薄切切片を作製した。そのうち、1枚はヘマトキシリン・エオジン染色に、1枚はD2-40モノクローナル抗体を用いた免疫組織化学染色に、残りの1枚はネガティブコントロールに用いた。

免疫組織化学染色は標識酵素ポリマー法で行った。薄切した各々の切片を脱パラフィン処理した後、pH6.0の10mmol/Lのクエン酸バッファーを緩衝液としてマイクロウェーブ照射(500W)を3分間、7サイクル施行して、抗原を賦活化した。内因性ペルオキシダーゼをブロッキングし、D2-40モノクローナル抗体(200倍希釈, Signet Laboratories, Inc., Dedham, MA)を室温で1時間反応させた(一次抗体反応)。次いで、ヒストファイン シンプルステイン MAX-PO (MULTI) キット(ニチレイバイオサイエンス[株], 東京, 日本)を用いて室温で30分間、二次抗体反応を行った。ジアミノベンジンを用いて抗体を発色し、背景をヘマトキシリンで染色した。ネガティブコントロールに対しては、一次抗体反応を除いた同様の操作を施行した。

### リンパ管の解析

D2-40モノクローナル抗体で染色した肝臓側および腹腔側胆嚢壁の顕微鏡画像をコンピュータ(Pannoramic Scan II; 3DHISTECH, Ltd., Budapest, Hungary)に取り込んだ。バーチャルスライドシステム(CaseViewer; 3DHISTEC, Ltd., Budapest, Hungary)を用いてhot spotにおけるLVDを評価した。まず、各々の切片において、20倍率での観察下に合計5か所のhot spotを決定した。個々のhot spotで染色されたリンパ管をトレースし、200倍率1視野におけるリンパ管数を記録した。

### 統計解析

肝臓側および腹腔側胆嚢壁において、各々5か

所のhot spotにおけるLVDの平均値を算出し、これらを個々の症例の肝臓側および腹腔側胆嚢壁のLVDとした。

Wilcoxonの符号付き順位和検定を用いて、肝臓側胆嚢壁と腹腔側胆嚢壁とでLVDを比較した。統計解析ソフトはIBM SPSS Statistic 24 software(日本IBM [株], 東京, 日本)を用いた。両側P値を用い、 $P < 0.05$ を統計学的に有意であると判定した。

### 結 果

10例いずれの胆嚢においても、D2-40モノクローナル抗体で染色されたリンパ管は、主として漿膜下層で観察された(図2A, 2B)。個々の症

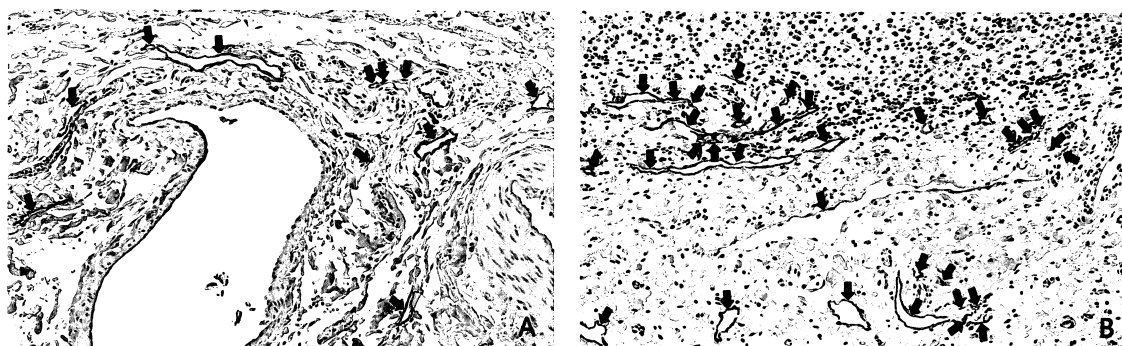


図2 ヒト正常胆嚢における壁局在別のD2-40モノクローナル抗体陽性のリンパ管  
腹腔側胆嚢壁(A)と比較して、肝臓側胆嚢壁(B)には多くのリンパ管(矢印)が分布していた。

表1 正常胆嚢10例における壁局在別のリンパ管密度(LVD)

症例 no.	年齢(歳)	性別	腹腔側胆嚢壁 LVD(個/mm <sup>2</sup> )	肝臓側胆嚢壁 LVD(個/mm <sup>2</sup> )
1	57	男	7.6	14.7
2	59	男	3.6	15.6
3	63	男	3.6	17.0
4	47	男	3.1	31.2
5	65	男	9.8	25.9
6	34	女	17.4	30.8
7	63	男	4.9	11.1
8	65	女	8.0	32.6
9	62	男	3.1	21.0
10	50	男	8.5	24.5

LVD, lymphatic vessel density, リンパ管密度。

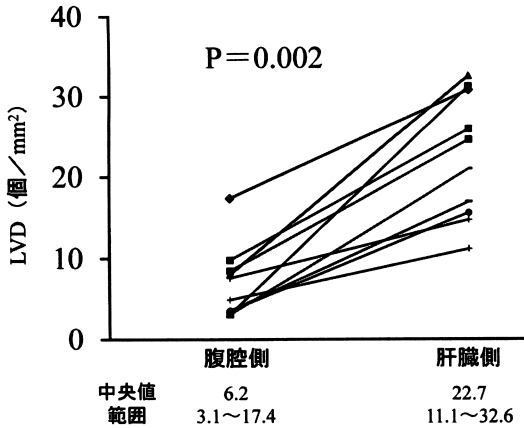


図3 ヒト正常胆嚢における壁局在別のリンパ管密度の比較  
LVD: lymphatic vessel density, リンパ管密度.

例における腹腔側および肝臓側胆嚢壁のLVDを表1に示した。腹腔側胆嚢壁におけるLVD(中央値6.2個/mm<sup>2</sup>, 範囲3.1~17.4個/mm<sup>2</sup>)と比較して, 肝臓側胆嚢壁におけるLVD(中央値22.7個/mm<sup>2</sup>, 範囲11.1~32.6個/mm<sup>2</sup>)は, 統計学的に有意に高かった(P=0.002, Wilcoxonの符号付き順位検定)(図3)。また, LVDの最大値(32.6個/mm<sup>2</sup>)は, 肝臓側胆嚢壁で観察された。

### 考 察

pT2胆嚢癌において, 腫瘍局在は予後因子として次第に認識されるようになってきた<sup>13)-15)18)</sup>。主病巣が肝臓側に局在するpT2胆嚢癌は, 腹腔側に局在するpT2胆嚢癌よりも予後不良であるという報告を踏まえ, 新しいAJCC第8版では, pT2胆嚢癌は腫瘍局在に応じてpT2a(腹腔側に腫瘍が局在)とT2b(肝臓側に腫瘍が局在)とに亜分類された<sup>12)</sup>。最近の2編の報告では, pT2b胆嚢癌はpT2a胆嚢癌と比較して, リンパ節転移の頻度が高いこと報告されている<sup>13)14)</sup>。しかしながら, pT2胆嚢癌の主たる壁外への進展様式はリンパ行性であるにもかかわらず<sup>5)9)11)</sup>, なぜリンパ節転移頻度が腫瘍局在によって異なるかに関

しては明らかになっていない。本研究では, ヒト正常胆嚢において, LVDは肝臓側胆嚢壁のほうが腹腔側胆嚢壁と比較して統計学的に有意に高いことを明らかにした。この結果は胆嚢壁においてリンパ管が腹腔側よりも肝臓側に多く存在することを意味しており, 肝臓側胆嚢壁は腹腔側胆嚢壁よりも癌細胞がリンパ管に浸潤しやすい環境であることを示唆している。このことは, pT2b胆嚢癌がpT2a胆嚢癌と比較して領域リンパ節転移をきたしやすいことを示す明確な根拠の1つであると考えられる。

D2-40モノクローナル抗体は, リンパ管内皮細胞に対して非常に特異性の強い抗体の1つであり, 血管内皮細胞とは反応しない。われわれは以前に, ヒト正常胆嚢壁において, 漿膜下層にはそれよりも浅層(粘膜層, 固有筋層)と比較して多くのリンパ管が存在することを, D2-40モノクローナル抗体を用いた免疫組織化学染色の結果に基づいて報告した<sup>17)</sup>。本研究においても, D2-40モノクローナル抗体で染色されたリンパ管は正常胆嚢壁の主として漿膜下層に存在していた。この事実は, pT2以上の進行胆嚢癌における高いリンパ節転移陽性率を説明する明確な根拠の1つであると考えられる。

本研究では, 後方視的研究であること, 検索した標本数が少ないこと, 胆嚢標本が大腸癌肝転移症例より採取されたことなどが研究の限界としてあげられる。しかしながら, 本研究は, われわれが検索した限り, ヒト正常胆嚢においてリンパ管が腹腔側胆嚢壁よりも肝臓側胆嚢壁に多く分布することを明らかにした初めての研究である。

### 結 論

ヒトの正常胆嚢において, 腹腔側胆嚢壁と比較して肝臓側胆嚢壁には多くのリンパ管が分布する。この事実は, 腹腔側にのみ主病巣が存在するpT2a胆嚢癌よりも, 肝臓側に主病巣の少なくとも一部が存在するpT2b胆嚢癌は, リンパ節転移頻度が高いことを説明する明確な根拠の1つであると考えられる。

## 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・一般外科学分野の若井俊文教授、坂田純講師に深謝いたします。

## 参考文献

- 1) Cubertafond P, Gainant A and Cucchiario G: Surgical treatment of 724 carcinomas of the gallbladder. Results of the French Surgical Association. *Ann Surg* 219: 275-280, 1994.
- 2) Bartlett DL, Fong Y, Fortner JG, Brennan MF and Blumgart LH: Long-term results after resection for gallbladder cancer. Implications for staging and management. *Ann Surg* 224: 639-646, 1996.
- 3) Duffy A, Capanu M, Abou-Alfa GK, Huitzil D, Jarnagin W, Fong Y, D'Angelica M, Dematteo RP, Blumgart LH and O'Reilly EM: Gallbladder cancer (GBC): 10-year experience at Memorial Sloan-Kettering Cancer Centre (MSKCC). *J Surg Oncol* 98: 485-489, 2008.
- 4) Glenn F and Hays DM: The scope of radical surgery in the treatment of malignant tumors of the extrahepatic biliary tract. *Surg Gynecol Obstet* 99: 529-541, 1954.
- 5) Wakai T, Shirai Y, Yokoyama N, Ajioka Y, Watanabe H and Hatakeyama K: Depth of subserosal invasion predicts long-term survival after resection in patients with T2 gallbladder carcinoma. *Ann Surg Oncol* 10: 447-454, 2003.
- 6) Coburn NG, Cleary SP, Tan JC and Law CH: Surgery for gallbladder cancer: a population-based analysis. *J Am Coll Surg* 207: 371-382, 2008.
- 7) Jensen EH, Abraham A, Jarosek S, Habermann EB, Al-Refaie WB, Vickers SA, Virnig BA and Tuttle TM: Lymph node evaluation is associated with improved survival after surgery for early stage gallbladder cancer. *Surgery* 146: 706-711, 2009.
- 9) Downing SR, Cadogan KA, Ortega G, Oyetunji TA, Siram SM, Chang DC, Ahuja N, Leffall LD Jr and Frederick WA: Early-stage gallbladder cancer in the Surveillance, Epidemiology, and End Results database: effect of extended surgical resection. *Arch Surg* 146: 734-738, 2011.
- 10) Shirai Y, Sakata J, Wakai T, Ohashi T and Hatakeyama K: "Extended" radical cholecystectomy for gallbladder cancer: long-term outcomes, indications and limitations. *World J Gastroenterol* 18: 4736-4743, 2012.
- 10) Goetze TO and Paolucci V: The prognostic impact of positive lymph nodes in stages T1 to T3 incidental gallbladder carcinoma: results of the German Registry. *Surg Endosc* 26: 1382-1389, 2012.
- 11) Fahim RB, McDonald JR, Richards JC and Ferris DO: Carcinoma of the gallbladder: a study of its modes of spread. *Ann Surg* 156: 114-124, 1962.
- 12) Zhu AX, Pawlik TM, Kooby DA, Schefyete TE and Vauthey JN: Gallbladder, Amin MB, Edge SB, Greene FL, Schilsky RL, Gaspar LE, Washington MK, Sullivan DC, Brookland RK, Brierley JD, Balch CM, Compton CC, Hess KR, Gershenwald JE, Jessup JM, Byrd DR, Winchester DP, Madera M, Asare EA(eds) *AJCC Cancer Staging Manual*. 8th ed, Springer, New York, pp303-309, 2017.
- 13) Shindoh J, de Aretxabala X, Aloia TA, Roa JC, Roa I, Zimmitti G, Javle M, Conrad C, Maru DM, Aoki T, Vigano L, Ribero D, Kokudo N, Capussotti L and Vauthey JN: Tumor location is a strong predictor of tumor progression and survival in T2 gallbladder cancer: an international multicenter study. *Ann Surg* 261: 733-739, 2015.
- 14) Lee H, Choi DW, Park JY, Youn S, Kwon W, Heo JS, Choi SH and Jang KT: Surgical strategy for T2 gallbladder cancer according to tumor location. *Ann Surg Oncol* 22: 2779-2786, 2015.
- 15) Lee W, Jeong CY, Jang JY, Kim YH, Roh YH, Kim KW, Kang SH, Yoon MH, Seo HI, Yun SP, Park JI, Jung BH, Shin DH, Choi YI, Moon HH, Chu CW, Ryu JH, Yang K, Park YM and Hong

- SC: Do hepatic-sided tumors require more extensive resection than peritoneal-sided tumors in patients with T2 gallbladder cancer? Results of a retrospective multicenter study. *Surgery* 162: 515-524, 2017.
- 16) 日本肝胆膵外科学会 編：臨床・病理 胆道癌 取扱い規約，第6版，金原出版，東京，pp21-27, 2013.
- 17) Nagahashi M, Shirai Y, Wakai T, Sakata J, Ajioka Y and Hatakeyama K: Perimuscular connective tissue contains more and larger lymphatic vessels than the shallower layers in human gallbladders. *World J Gastroenterol* 13: 4480-4483, 2007.
- 18) Park TJ, Ahn KS, Kim YH, Kim TS, Hong JH and Kang KJ: The optimal surgical approach for T2 gallbladder carcinoma: evaluating the role of surgical extent according to the tumor location. *Ann Surg Treat Res* 94: 135-141, 2018.
- (平成31年1月11日受付)
-