

しまだ よしふみ

氏名	島田 能史
学位	博士 (医学)
学位記番号	新大院博(医)第1199号
学位授与の日付	平成20年3月24日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
博士論文名	Multiple-sectioning study to establish a standardized immunohistochemical method for detecting isolated tumor cells in lymph nodes of patients with colorectal cancer (大腸癌リンパ節 Isolated tumor cell の標準的な免疫組織学的検出方法を確立するための連続切片による検討)
論文審査委員	主査 教授 青柳 豊 副査 教授 畠山 勝義 副査 教授 味岡 洋一

#### 博士論文の要旨

##### [背景]

第6版 TNM 分類では、リンパ節における 0.2 mm 未満の単個もしくは複数の癌細胞集塊からなる癌病変を Isolated tumor cell (ITC) と定義している。しかし、その標準的な検出方法については言及していない。ITC に関するこれまでの研究では ITC の検出方法、つまり標本切片の1枚の厚さ・枚数・使用抗体などは、個々の研究者により様々であり、それが ITC の臨床的意義が定まらない原因の一つであると考えられる。

##### [目的]

様々な標本切片の厚さと2種類の抗サイトケラチンモノクローナル抗体 (CAM5.2 および AE1/AE3) を用いて ITC 検出率を比較し、ITC の標準的な免疫組織学的検出方法を確立する。

##### [対象・方法]

Hematoxylin and eosin (HE) 標本によりリンパ節転移陽性とされ、Stage III と診断された大腸癌 29 例のリンパ節のうち、HE 標本で転移が検出されなかった 149 個のリンパ節を対象とした。それぞれのリンパ節について、12 枚のリンパ節連続切片を作成した。切片の厚さは、1 枚目から 8 枚目までを 4  $\mu\text{m}$ 、9 枚目から 12 枚目までを 10  $\mu\text{m}$  とした。染色は、1 枚目と 8 枚目を HE 染色、2 枚目から 6 枚目と 9 枚目から 11 枚目までを CAM5.2 染色、7 枚目と 12 枚目を AE1/AE3 染色とした。ITC の定義は第 6 版 TNM 分類に従い、0.2 mm 未満の単個もしくは複数の癌細胞集塊からなる癌病変とした。CAM5.2 および AE1/AE3 免疫染色標本から ITC を検出し、様々な累積切片の厚さによる ITC 累積検出率の比較と使用抗体による ITC 検出率の比較を行った。前者の比較を CAM5.2 染色の 4  $\mu\text{m}$  切片 1 枚から 5 枚 (累積切片の厚さが 4、8、12、16、20  $\mu\text{m}$ )、および 10  $\mu\text{m}$  切片 1 枚から 3 枚 (累積切片の厚さが 10、20、30  $\mu\text{m}$ ) で行った。また、後者の比較を CAM5.2 と AE1/AE3 染色で行い、4  $\mu\text{m}$  切片 1 枚と 10  $\mu\text{m}$  切片 1 枚とでそれぞれ ITC 検出率を比較した。統計解析はカイ二乗検定を用いて行い、 $P < 0.05$  の場合に有意差ありとした。統計ソフトは SPSS (version 11.5J, SPSS Japan Inc., Tokyo, Japan) を用いた。

[結果]

ITC は主にリンパ節内における辺縁洞および髄洞に存在し、癌細胞としての形態学的特徴を有していた。免疫染色により癌細胞の他、細網細胞、形質細胞、マクロファージが染色されたが、これらはそれぞれの染色態度および形態学的特徴から癌細胞と区別することができた。

それぞれの累積切片の厚さでの ITC 累積検出率を比較した。4  $\mu\text{m}$  切片で CAM5.2 による ITC 累積検出率は累積切片の厚さが 4、8、12、16、20  $\mu\text{m}$  でそれぞれ 33.6、37.6、43.0、48.3、48.3% であった。10  $\mu\text{m}$  切片で CAM5.2 による ITC 累積検出率は累積切片の厚さが 10、20、30  $\mu\text{m}$  でそれぞれ 39.6、47.0、47.7% であった。すべての組み合わせで ITC 累積検出率を比較すると、累積切片の厚さが 4  $\mu\text{m}$  と 16  $\mu\text{m}$ 、4  $\mu\text{m}$  と 20  $\mu\text{m}$ 、4  $\mu\text{m}$  と 30  $\mu\text{m}$  の組み合わせで ITC 累積検出率に有意差が認められ、累積切片の厚さが 8  $\mu\text{m}$  以上ではどの組み合わせでも有意差はみられなかった。

CAM5.2 と AE1/AE3 染色での ITC 検出率を比較した。4  $\mu\text{m}$  切片 1 枚で CAM5.2 による ITC 検出率は 33.6 から 41.6%、AE1/AE3 による ITC 検出率は 37.6% であり、有意差はなかった。また、10  $\mu\text{m}$  切片 1 枚で CAM5.2 による ITC 検出率は 37.6 から 40.3%、AE1/AE3 による ITC 検出率は 33.6% であり、有意差はなかった。

[結論]

ITC 検出のために CAM5.2 および AE1/AE3 が使用され、各リンパ節の累積切片の厚さが 8  $\mu\text{m}$  以上の場合には、ITC 検出率に有意差はない。これらの方法は、ITC 診断のために費やす労力からみて実際の病理診断において実行可能な方法であると考えられる。また、これらの方法により検出された ITC のデータは相互比較や合算することが可能であり、これらの検出方法による多施設共同研究から ITC の臨床的意義が明らかになるものと期待される。

(論文審査の要旨)

本研究においては大腸癌における Isolated tumor cell (ITC) の標準的な免疫組織学的検出方法を確立することを目的とした。

HE 標本によりリンパ節転移陽性とされ、Stage III と診断された大腸癌 29 例のリンパ節のうち、HE 標本で転移が検出されなかった 149 個のリンパ節を対象とした。それぞれのリンパ節について、12 枚の連続切片を作成した。切片の厚さは、1 から 8 枚目までを 4  $\mu\text{m}$ 、9 から 12 枚目までを 10  $\mu\text{m}$  とした。染色は、1 枚目と 8 枚目を HE 染色、2 から 6 枚目と 9 から 11 枚目までを CAM5.2 染色、7 枚目と 12 枚目を AE1/AE3 染色とした。

4  $\mu\text{m}$  切片で CAM5.2 による ITC 累積検出率は累積切片の厚さが 4, 8, 12, 16, 20  $\mu\text{m}$  でそれぞれ 34, 38, 43, 48, 48%であった。10  $\mu\text{m}$  切片では累積切片の厚さが 10, 20, 30  $\mu\text{m}$  でそれぞれ 40, 47, 48%であった。これらの ITC 累積検出率を比較すると、累積切片の厚さが 4  $\mu\text{m}$  と 16  $\mu\text{m}$ 、4  $\mu\text{m}$  と 20  $\mu\text{m}$ 、4  $\mu\text{m}$  と 30  $\mu\text{m}$  の組み合わせで検出率に有意差が認められ、厚さが 8  $\mu\text{m}$  以上ではどの組み合わせでも有意差はみられなかった。CAM5.2 と AE1/AE3 染色での ITC 検出率に有意差はなかった。以上、本研究は ITC 検出のために CAM5.2 および AE1/AE3 を用い、各リンパ節の累積切片の厚さが 8  $\mu\text{m}$  以上の場合には、ITC 検出率に有意差が無いことを明らかにしたものであり、この点に学位論文としての価値を認める。