

大腸粘膜下層浸潤癌における簇出 (budding) の 組織学的評価

岡村 拓磨

新潟大学大学院医歯学総合研究科消化器・一般外科分野 (第一外科)

(指導: 若井俊文教授)

Histologic Evaluation of Tumor Budding in Colorectal Cancer Invading Submucosal Layer

Takuma OKAMURA

Division of Digestive and General Surgery, Niigata University

Graduate School of Medical and Dental Sciences

(Director: Prof. Toshifumi WAKAI)

要 旨

【緒言】大腸粘膜下層浸潤癌 (SM 癌) における粘膜下層の間質中に存在する癌の小胞巣である簇出はリンパ節転移危険因子であると報告されており, 内視鏡的粘膜切除後の病理診断で SM 癌かつ簇出高度陽性と診断された症例では追加切除が推奨されている。簇出の検出は, 通常の HE 染色では困難なことがあり, 免疫染色の施行により簇出の検出自体は容易になるが, 免疫染色による簇出評価の判定基準は確立されていない。本研究の目的は, HE 染色および免疫染色を用いて判定した簇出個数とリンパ節転移との関連を解析し, 免疫染色における簇出評価の判定基準を立案することである。

【方法】1981 年から 2008 年にリンパ節郭清を伴う外科切除が施行された大腸 SM 癌 310 例を対象とした。病理組織学的リンパ節転移は 31 例 (10%) に認められた。病変の浸潤最深部を含む連続切片を作製し, HE 染色および上皮性サイトケラチン CAM5.2 免疫染色を行った。簇出は, 癌発育先進部の間質中に存在する単個ないしは 5 個未満の癌胞巣を簇出と定義し, 簇出が最頻出する SM 浸潤部を選定し, 20 × 10 倍 1 視野当たりの簇出個数を算定した。染色別に ROC 曲線を作製し, リンパ節転移予測の正確度が最も高い簇出個数の閾値を決定した。

【結果】HE 染色, CAM5.2 免疫染色を用いて評価した簇出検出個数の平均 ± 標準誤差は, 各々 3.5 ± 0.2 , 8.4 ± 0.5 であり, CAM5.2 免疫染色を用いて評価した方が有意に簇出検出個数は増加した ($p < 0.001$)。リンパ節転移陰性であった 279 例における HE 染色, CAM5.2 免疫染色を用いて評価した簇出検出個数は各々 3.3 ± 0.2 , 8.1 ± 0.5 であったのに対し, リンパ節転移陽性であった 31 例では各々 5.7 ± 0.8 , 11.6 ± 1.5 であり, リンパ節転移の有無別で検討しても CAM5.2 免疫染色で検出される簇出個数は HE 染色と比較して有意に増加した (各々 $p < 0.001$)。ROC 曲線から簇出高度陽性と判定する簇出個数の閾値は HE 染色, CAM5.2 免疫染色で各々 5, 8 となり, リ

Reprint requests to: Takuma OKAMURA
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) 岡村 拓磨

リンパ節転移予測の正確度は各々 73.2%, 59.7% であり, HE 染色を用いて評価した簇出判定基準の方がリンパ節転移予測の正確度が高かった。

【結語】リンパ節転移予測の正確度を基盤とした大腸 SM 癌における簇出評価の判定基準は, HE 染色では 5 個以上, CAM5.2 免疫染色では 8 個以上の簇出検出個数をもって簇出高度陽性と定義できる。ただし, リンパ節転移予測の正確度は HE 染色を用いて簇出を検出した方が高い。

キーワード：大腸癌, 粘膜下層浸潤癌, 簇出, 上皮性サイトケラチン CAM5.2 免疫染色, リンパ節転移

緒 言

近年, 大腸粘膜内癌に対する治療法である内視鏡的粘膜切除術の普及に伴い, 内視鏡切除標本の病理診断で粘膜下層浸潤癌 (pSM 癌) と診断される症例が増加している。大腸 pSM 癌では予後不良因子であるリンパ節転移が約 10% の症例に認められるため¹⁾, pSM 癌の治療の原則はリンパ節郭清を伴う腸切除である²⁾。しかし, リンパ節転移リスクが極めて低い pSM 癌が存在することも事実であり, そのような症例に対して結果的には過剰治療となる追加切除を可及的に減じるために内視鏡切除後の追加治療の適応基準に関する研究が行われ, 所属リンパ節転移のリスク因子が報告されてきた^{3) - 20)}。その結果, 日本の大腸癌治療ガイドライン (2010 年度版) では, 組織学的検索で① SM 浸潤度 1000 μ m 以上の粘膜下層浸潤, ②脈管侵襲陽性, ③低分化腺癌/印環細胞癌/粘液癌, ④簇出高度陽性のうち一因子でも認められれば, 追加治療としてリンパ節郭清を伴う外科切除を考慮するとされている²⁾。

簇出とは, 癌の発育先進部から離れた間質中に存在する単個ないしは 5 個未満の癌細胞からなる小胞巣である²⁰⁾。癌の発育先進部は, 線維芽細胞の増生や炎症細胞浸潤に取り囲まれて多彩な組織所見を呈しており, 簇出を正確に検出することは必ずしも容易ではない。しかしながら, 上皮性サイトケラチンに対する CAM5.2 免疫染色を施行することにより, 間質中に存在する癌の小胞巣である簇出を検出することは, 比較的容易になる。大腸 SM 以深癌を対象とした検討で, 免疫染色を用

いると HE 染色より検出される簇出の個数が有意に増加したとする報告があり²¹⁾, HE 染色と CAM5.2 免疫染色では簇出高度陽性の判定に乖離がある可能性がある。

大腸 SM 癌の検討では, 上皮性サイトケラチンに対する免疫染色を用いて評価した簇出判定がリンパ節転移と関連するという報告がある^{22) 23)}。一方, 免疫染色を用いて評価した簇出判定は HE 染色での簇出判定よりリンパ節転移の予測に有用でないとする報告も認められる²⁴⁾。CAM5.2 免疫染色を用いて評価した簇出判定がリンパ節転移の予測に有用であるか否かの評価が定まっていない。本研究の目的は, HE 染色および CAM5.2 免疫染色を用いて判定した簇出個数とリンパ節転移との関連を解析し, CAM5.2 免疫染色における簇出評価の判定基準を立案することである。

材料と方法

1. 検討対象

1981 年から 2008 年に新潟大学医歯学総合病院および関連病院で, リンパ節郭清を伴う外科切除が施行された大腸 SM 癌 310 例を対象とした。家族性大腸線腫症, 炎症性腸疾患合併症例, 同時性重複癌症例は除外した。症例の年齢中央値は 69 歳 (範囲: 32 - 88 歳), 性別は男性 178 例, 女性 132 例であった。癌の発生部位は右側結腸 117 例, 左側結腸 104 例, 直腸 89 例であった。腫瘍径の中央値は 24mm (範囲: 5 - 100mm) であった。病理組織学的リンパ節転移は 31 例 (10%) に認められた。

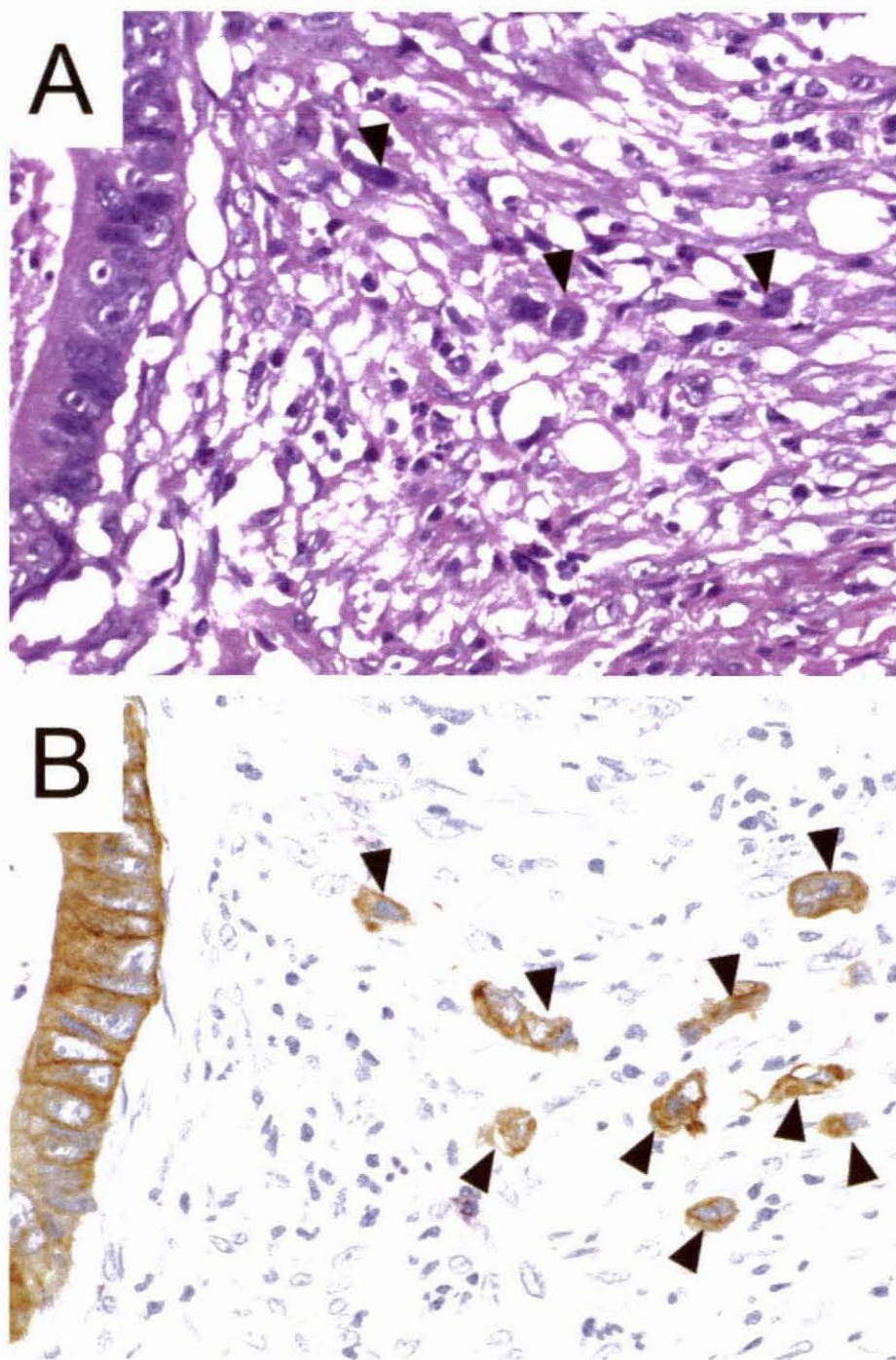


図1 粘膜下層の間質中に存在する癌の小胞巣である簇出
 (A) HE 染色標本. (B) CAM5.2 免疫染色標本. 矢頭は簇出を示す. 連続切片の
 同一領域の観察で, HE 染色では検出できない間質中に存在する癌の小胞巣であ
 る簇出を CAM5.2 免疫染色では検出できる.

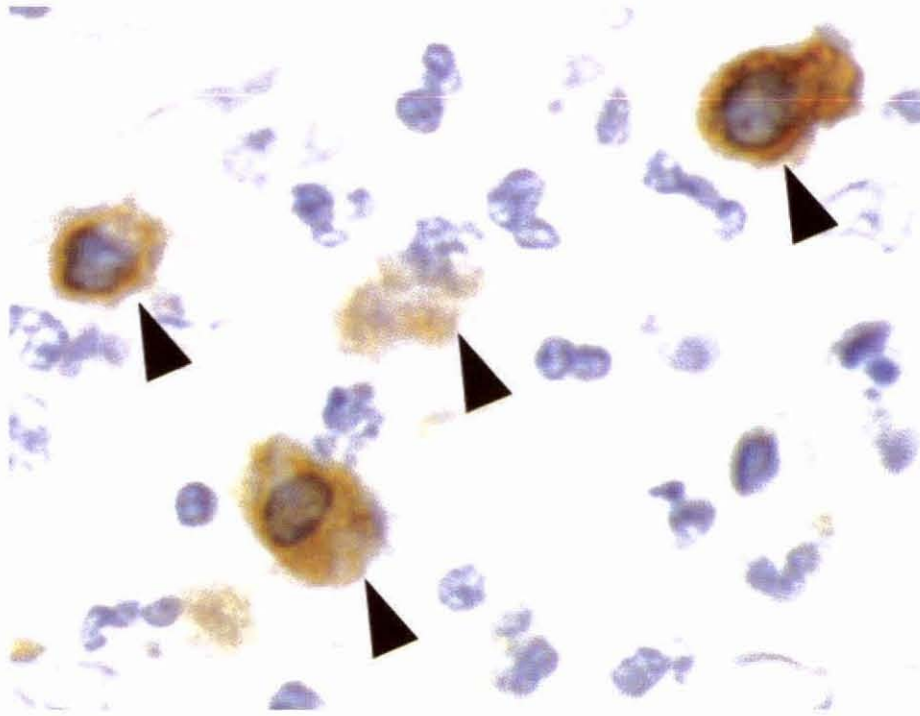


図2 CAM5.2免疫染色で染色される形質細胞

矢頭は形質細胞を示す。車軸様の核が細胞質内で偏在し、細胞質の境界がやや不鮮明な形質細胞の特徴を示している。CAM5.2免疫染色で染色される細胞で、形質細胞と認識される細胞は簇出から除外している。

2. 原発巣の病理組織学的検索

切除標本を10%ホルマリンで固定後に原発巣を全割し、パラフィン包埋ブロックを作製後薄切片し、HE染色標本を作製した。二人の著者(T.O.とY.A.)により病理診断し、病変の浸潤最深部を含む代表切片を決定した。当該切片のブロックから再度3 μ mの連続切片を3枚作製し、それぞれHE染色、上皮性サイトケラチンCAM5.2免疫染色を施行し、残りはNegative controlに用いた。CAM5.2免疫染色には、上皮性サイトケラチン7, 8を認識するマウスモノクローナル抗体Anti-Cytokeratin (CAM5.2) (BECTON DICKINSON, CA, USA) を用いて行った。

簇出の診断は、リンパ節転移の有無、臨床情報

を秘匿して行った。Uenoらの定義に従い、簇出を、癌発育先進部の間質に認められる5個未満の細胞からなる癌細胞巣と定義した²⁰⁾(図1)。癌発育先進部を観察し、簇出最頻出である20 \times 10倍1視野を選択し、顕鏡して簇出数を算出した。いずれの染色でも、膿瘍内やその近傍、貯留粘液内やその破綻部にみられた遊離癌細胞は、簇出から除外した。HE染色では、明瞭な核小体とともに好塩基性で大きな核を有し、間質と細胞質の境界が明瞭な細胞を癌細胞と判定した。CAM5.2免疫染色では、細胞質が染色される細胞を染色陽性と判定し、CAM5.2免疫染色陽性細胞のなかで、明らかに形質細胞と判定できるもの(図2)を除外し、残りを癌細胞として判定した。

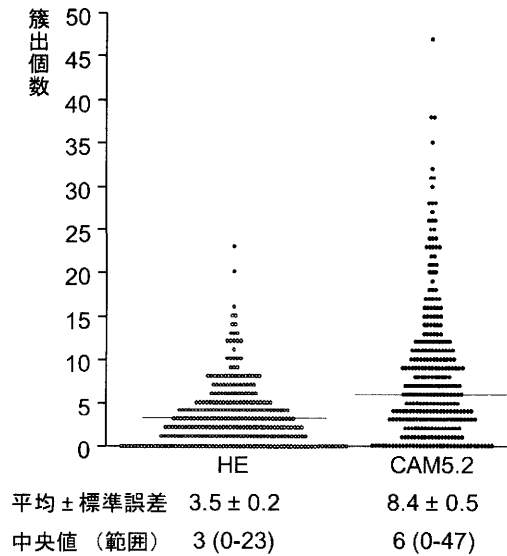


図3 簇出検出個数の比較

20 × 10倍1視野当たりの簇出検出個数の染色別データ分布図. barは中央値を示す. HE染色を用いて評価した簇出検出個数より, CAM5.2免疫染色を用いて評価した方が有意に簇出検出個数は増加した (p < 0.001).

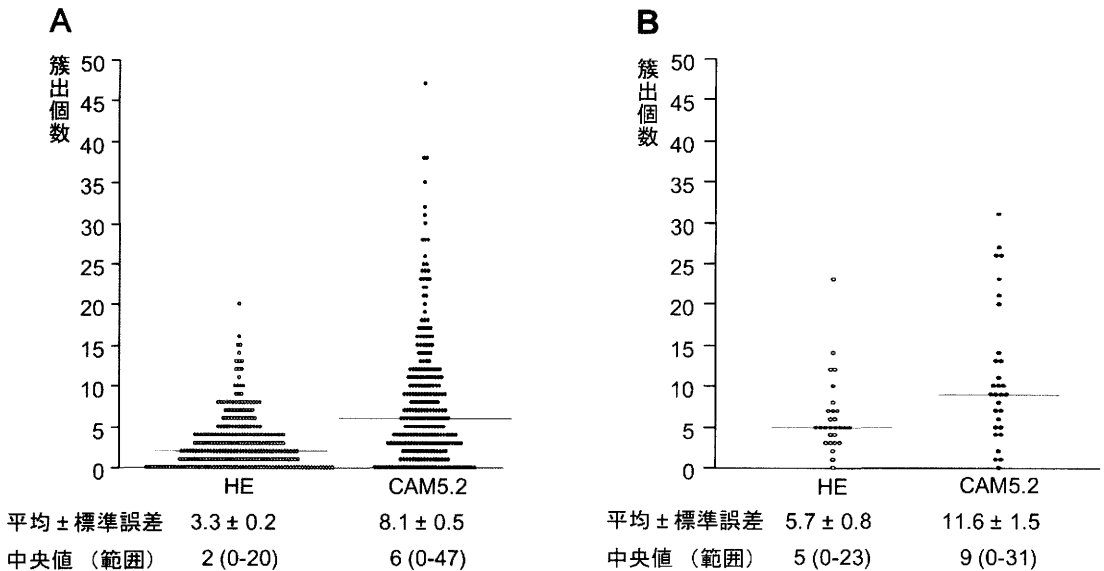


図4 リンパ節転移有無別の簇出検出個数の比較

(A) リンパ節転移陰性例における簇出検出個数の染色別データ分布図. (B) リンパ節転移陽性例における簇出検出個数の染色別データ分布図. barは中央値を示す. リンパ節転移陽性例, 陰性例とも CAM5.2免疫染色を用いて評価した簇出検出個数は, HE染色を用いて評価した簇出検出個数より有意に増加した (各々 p < 0.001). HE染色を用いて評価した簇出検出個数, CAM5.2免疫染色を用いて評価した簇出検出個数は, ともにリンパ節転移陰性例に比べリンパ節転移陽性例では有意に簇出検出個数が増加した (各々 p < 0.001).

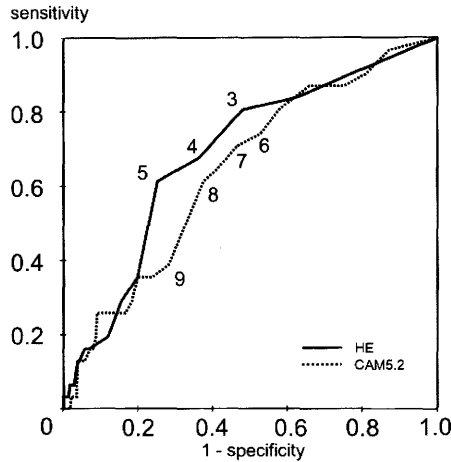


図5 リンパ節転移を基盤とした染色別の簇出検出個数のROC曲線

ROC曲線から簇出高度陽性と判定する簇出個数の閾値はHE染色, CAM5.2免疫染色で各々5, 8と算定される. リンパ節転移予測の正確度は, HE染色を用いて簇出を検出したほうが高い.

3. リンパ節転移との関連の検討

各染色で, 簇出個数とリンパ節転移の関係から Receiver Operating Characteristic (ROC) 曲線を作製し, Youden Index を用いてリンパ節転移予測の正確度が最も高い簇出個数の閾値を決定した.

統計学的検討は, PASW statistics 17 (SPSS Japan Inc., Tokyo, Japan) を使用し, Mann - Whitney U 検定および Fisher の直接確率法を用いて, $p < 0.05$ を有意差ありと定義した.

結 果

1. 簇出検出個数の比較

HE染色を用いて評価した簇出検出個数の平均±標準誤差は 3.5 ± 0.2 であった. 一方, CAM5.2免疫染色を用いて評価した簇出検出個数の平均±標準誤差は 8.4 ± 0.5 であり, CAM5.2免疫染色を用いて評価した方が有意に簇出検出個数は増加した ($p < 0.001$; 図3). リンパ節転移陰性であった279例におけるHE染色で評価した簇出検出個数の平均±標準誤差は 3.3 ± 0.2 であった. 一方, CAM5.2免疫染色を用いて評価した簇出検

出個数の平均±標準誤差は 8.1 ± 0.5 であり, CAM5.2免疫染色を用いて評価した方が, 有意に簇出検出個数は増加した ($p < 0.001$; 図4A). リンパ節転移陽性であった31例におけるHE染色で評価した簇出検出個数の平均±標準誤差は 5.7 ± 0.8 であった. 一方, CAM5.2免疫染色を用いて評価した簇出検出個数の平均±標準誤差は 11.6 ± 1.5 であり, CAM5.2免疫染色を用いて評価した方が, 有意に簇出検出個数は増加した ($p < 0.001$; 図4B).

2. 染色別の簇出高度陽性判定とリンパ節転移との関連

染色別に簇出検出個数を比較すると, 両染色ともリンパ節転移陰性例に比べリンパ節転移陽性例では有意に簇出検出個数が増加した (各々 $p < 0.001$; 図4). ROC曲線を用いた Youden Index の算出から, HE染色における簇出高度陽性と判定する簇出個数の閾値は5個と算定された (図5). 同様の方法でCAM5.2免疫染色における簇出高度陽性と判定する簇出個数の閾値は8個と算定された (図5).

表1 染色別の簇出個数とリンパ節転移との関連

評価項目	簇出個数の 閾値	リンパ節転移		オッズ比 (95%信頼区間)	p	感度 (%)	特異度 (%)	正確度 (%)
		陰性	陽性					
HE	< 5	208	12	1.000				
	≥ 5	71	19	4.638 (2.145-10.031)	< 0.001	61.3	74.6	73.2
CAM5.2	< 8	165	11	1.000				
	≥ 8	114	20	2.632 (1.214-5.703)	0.010	64.5	59.1	59.7

表2 大腸 SM 癌の簇出評価に免疫染色を用いた過去の報告

著者	免疫染色を用いた簇出評価の リンパ節転移予測の有用性に関する見解	簇出評価に用いた染色方法	簇出陽性と判定した基準
Kazama ら ²¹⁾	簇出評価に免疫染色は有用である	免疫染色のみで評価	癌の発育先進部に簇出を1個以上認めるものを陽性
Ishikawa ら ²²⁾	簇出評価に免疫染色は有用である	HE染色と免疫染色を併用して評価	400倍1視野に5個以上の簇出を認めるものを陽性
Suzuki ら ²³⁾	HE染色で評価した簇出判定が、免疫染色で評価した簇出判定よりリンパ節転移と関連する	HE染色と免疫染色の各々で評価	200倍1視野に10個以上の簇出を認めるものを陽性

HE染色を用いて評価した簇出高度陽性(簇出個数5個以上)におけるリンパ節転移のオッズ比は4.638倍であり、CAM5.2染色を用いて評価した簇出高度陽性(簇出個数8個以上)におけるリンパ節転移のオッズ比は2.632倍であった(表1)。HE染色およびCAM5.2免疫染色でのリンパ節転移予測の正確度は各々73.2%、59.7%であり、HE染色を用いて評価した簇出判定基準の方がリンパ節転移予測の正確度が高かった(表1)。

考 察

簇出は、元来、癌の発育様式を表現する用語であり、癌発育先進部において、①平均して2~3個の幅に相当する細胞索で発育するもの、②癌細胞が個々に遊離して発育するもの、と定義されて

いたが²⁵⁾、大腸SM癌のリンパ節転移リスク因子としては、後者の「癌細胞の遊離発育」が重要であり、大腸癌治療ガイドラインでは後者のみを簇出と定義している²⁾。HE染色における簇出の評価では、Grade 2/3(簇出検出個数5個以上)のリンパ節転移率はGrade 1(簇出検出個数5個未満)よりも有意に高率であり、Grade 2/3は独立したリンパ節転移の予測因子であることが大腸癌研究会の多施設共同研究から明らかになっている²⁶⁾。一方、大腸SM癌の簇出の評価に上皮性サイトケラチンを使用した報告は過去に3編存在するが²²⁾⁻²⁴⁾、免疫染色を用いた簇出判定のリンパ節転移の予測因子としての有用性に関する見解は定まっていない。いずれの報告²²⁾⁻²⁴⁾も離散連続変数である簇出検出個数を恣意的な閾値により簇出陽性または陰性にカテゴリー化して評価し

ているという統計学上の問題点があった (表 2)。我々は、離散連続変数である簇出検出個数を、リンパ節転移予測の正確度を基盤とした ROC 曲線を作製し、Youden Index を用いて簇出個数の閾値を決定することにより、免疫染色における簇出評価の判定基準を初めて立案した。

HE 染色、CAM5.2 染色を用いた簇出検出個数は、CAM5.2 免疫染色を用いた方が有意に増加した (図 3)。過去の研究でも本研究と同様に、免疫染色を用いて評価することにより簇出検出個数は有意に増加することが示されていた²¹⁾。HE 染色では、単個から少数個の癌細胞を、幼弱な線維芽細胞の増生や、種々の炎症細胞浸潤に取り囲まれた癌の発育先進部の間質中で検出することは、時に困難である。一方、CAM5.2 免疫染色は上皮性サイトケラチンに対する染色であり、CAM5.2 免疫染色を用いることで間質中に存在する癌胞巣である簇出を検出することは容易になり、簇出検出個数が増加すると考えられる。ただし、CAM5.2 免疫染色は形質細胞も染色するため²⁷⁾、簇出を評価する際には CAM5.2 免疫染色陽性細胞から形質細胞を除外する必要がある。

リンパ節転移予測の正確度を基盤とした ROC 曲線を作製し、Youden Index を用いて簇出検出個数の閾値を決定した。HE 染色における簇出検出個数の閾値は、大腸癌研究会の多施設共同研究²⁶⁾でリンパ節転移予測の有用性が検討され明らかとなった閾値 (簇出検出個数 5 個) と同じ結果であり、HE 染色における簇出評価の判定基準の有用性を再確認できた。CAM5.2 免疫染色における簇出高度陽性と判定する簇出個数の閾値は、簇出検出個数 8 個と算定された。ただし、リンパ節転移との関連では HE 染色を用いて評価した簇出判定基準の方が、リンパ節転移予測の正確度が高かった。CAM5.2 免疫染色で簇出高度陽性と判定される症例で、リンパ節転移を有する頻度が低くない、すなわち検査の偽陽性が多いことが問題点である。CAM5.2 免疫染色は細胞骨格を認識しているため、免疫応答によりすでに生物学的活性を失っている癌細胞の細胞骨格も簇出として検出している可能性が考えられる。CAM5.2 免疫染色で検出

される間質中の癌細胞の中で増殖能を有する細胞、アポトーシスに陥っている細胞がどの程度存在するか検討することが、今後の課題である。

本研究では外科切除された大腸 SM 癌を対象としているため、本来対象とすべき内視鏡切除された大腸 SM 癌と検討対象が異なっているという制限がある。すなわち、内視鏡切除は粘膜内癌の切除を目的としているため、臨床的に粘膜内癌と診断されたもののみを対象とし、あきらかな粘膜下層浸潤癌は内視鏡治療前に対象から除外される。今回は多数例を検討するために、リンパ節郭清を伴う外科切除された大腸 SM 癌を対象とした。今後の課題として、内視鏡切除後に病理診断で癌の粘膜下層浸潤が認められ、追加治療として外科切除された症例を集積して、検討することが必要であろう。

リンパ節転移予測の正確度を基盤とした大腸 SM 癌における簇出評価の判定基準は、簇出が最頻出する SM 浸潤部を選定後、20×10 倍 1 視野当たりの簇出を算出し、HE 染色では 5 個以上、CAM5.2 染色では 8 個以上の簇出検出個数をもって簇出高度陽性と定義できる。ただし、リンパ節転移予測の正確度は HE 染色を用いて簇出を検出した方が高い。

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病院研究科消化器・一般外科分野、若井俊文教授、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、本研究に関して助言・協力を頂きました技官 (山口尚之、佐藤彩子、小林和恵) をはじめ教室の皆様にも深謝いたします。

文 献

- 1) Wilcox GM, Anderson PB and Colacchio TA: Early invasive carcinoma in colonic polyps: A review of the literature with emphasis on the assessment of the risk of metastasis. *Cancer* 57: 160-171, 1986.
- 2) 大腸癌研究会一編：大腸癌治療ガイドライン。

- 2010年版, 金原出版, 東京, pp40-44, 2010.
- 3) Colacchio TA, Forde KA and Scantlebury VP: Endoscopic polypectomy: inadequate treatment for invasive colorectal carcinoma. *Ann Surg* 194: 704 - 707, 1981.
 - 4) Lipper S, Kahn LB and Ackerman LV: The significance of microscopic invasive cancer in endoscopically removed polyps of the large bowel. A clinicopathologic study of 51 cases. *Cancer* 52: 1691 - 1699, 1983.
 - 5) Haggitt RC, Glotzbach RE, Soffer EE and Wruble LD: Prognostic factors in colorectal carcinomas arising in adenomas: implications for lesions removed by endoscopic polypectomy. *Gastroenterology* 89: 328 - 336, 1985.
 - 6) Cranley JP, Petras RE, Carey WD, Paradis K and Sivak MV: When is endoscopic polypectomy adequate therapy for colonic polyps containing invasive carcinoma? *Gastroenterology* 91: 419 - 427, 1986.
 - 7) Richards WO, Webb WA, Morris SJ, Davis RC, McDaniel L, Jones L and Littauer S: Patient management after endoscopic removal of the cancerous colon adenoma. *Ann Surg* 205: 665 - 672, 1987.
 - 8) 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.
 - 9) Kyzer S, Begin LR, Gordon PH and Mitmaker B: The care of patients with colorectal polyps that contain invasive adenocarcinoma. Endoscopic polypectomy or colectomy? *Cancer* 70: 2044 - 2050, 1992.
 - 10) Minamoto T, Mai M, Ogino T, Sawaguchi K, Ohta T, Fujimoto T and Takahashi Y: Early invasive colorectal carcinomas metastatic to the lymph node with attention to their nonpolypoid development. *Am J Gastroenterol* 88: 1035 - 1039, 1993.
 - 11) Kikuchi R, Takano M, Takagi K, Fujimoto N, Nozaki R, Fujiyoshi T and Uchida Y: Management of early invasive colorectal cancer. Risk of recurrence and clinical guidelines. *Dis Colon Rectum* 38: 1286 - 1295, 1995.
 - 12) Hase K, Shatney CH, Mochizuki H, Johnson DL, Tamakuma S, Vierra M and Trollope M: Long - term results of curative resection of "minimally invasive" colorectal cancer. *Dis Colon Rectum* 38: 19 - 26, 1995.
 - 13) Cooper HS, Deppisch LM, Gourley WK, Kahn EI, Lev R, Manley PN, Pascal RR, Qizilbash AH, Rickert RR, Silverman JF and Wirman JA: Endoscopically removed malignant colorectal polyps: clinicopathologic correlations. *Gastroenterology* 108: 1657 - 1665, 1995.
 - 14) Volk EE, Goldblum JR, Petras RE, Carey WD and Fazio VW: Management and outcome of patients with invasive carcinoma arising in colorectal polyps. *Gastroenterology* 109: 1801 - 1807, 1995.
 - 15) Whitlow C, Gathright JB, Jr., Hebert SJ, Beck DE, Opelka FG, Timmcke AE and Hicks TC: Long - term survival after treatment of malignant colonic polyps. *Dis Colon Rectum* 40: 929 - 934, 1997.
 - 16) Netzer P, Forster C, Biral R, Ruchti C, Neuweiler J, Stauffer E, Schonegg R, Maurer C, Husler J, Halter F and Schmassmann A: Risk factor assessment of endoscopically removed malignant colorectal polyps. *Gut* 43: 669 - 674, 1998.
 - 17) Goldstein NS and Hart J: Histologic features associated with lymph node metastasis in stage T1 and superficial T2 rectal adenocarcinomas in abdominoperineal resection specimens. Identifying a subset of patients for whom treatment with adjuvant therapy or completion abdominoperineal resection should be considered after local excision. *Am J Clin Pathol* 111: 51 - 58, 1999.
 - 18) Masaki T, Matsuoka H, Sugiyama M, Abe N, Goto A, Sakamoto A and Atomi Y: Matrilysin (MMP-7) as a significant determinant of malignant potential of early invasive colorectal carcinomas. *Br J Cancer* 84: 1317 - 1321, 2001.
 - 19) Okuyama T, Oya M and Ishikawa H: Budding as a risk factor for lymph node metastasis in pT1 or pT2 well - differentiated colorectal adenocarcino-

- ma. *Dis Colon Rectum* 45: 628 - 634, 2002.
- 20) 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.
- 21) Ohtsuki K, Koyama F, Tamura T, Enomoto Y, Fujii H, Mukogawa T, Nakagawa T, Uchimoto K, Nakamura S, Nonomura A and Nakajima Y: Prognostic value of immunohistochemical analysis of tumor budding in colorectal carcinoma. *Anticancer Res* 28: 1831 - 1836, 2008.
- 22) Kazama S, Watanabe T, Ajioka Y, Kanazawa T and Nagawa H: Tumour budding at the deepest invasive margin correlates with lymph node metastasis in submucosal colorectal cancer detected by anticytokeratin antibody CAM5.2. *Br J Cancer* 94: 293 - 298, 2006.
- 23) Ishikawa Y, Akishima - Fukasawa Y, Ito K, Akasaka Y, Yokoo T and Ishii T: Histopathologic determinants of regional lymph node metastasis in early colorectal cancer. *Cancer* 112: 924 - 933, 2008.
- 24) Suzuki A, Togashi K, Nokubi M, Koinuma K, Miyakura Y, Horie H, Lefor AT and Yasuda Y: Evaluation of venous invasion by Elastica van Gieson stain and tumor budding predicts local and distant metastases in patients with T1 stage colorectal cancer. *Am J Surg Pathol* 33: 1601 - 1607, 2009.
- 25) 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.
- 26) 河内 洋, 小池盛雄：大腸癌における簇出診断の意義 (2) 大腸癌研究会簇出検討プロジェクトの結果, 武藤徹一郎 (監), 杉原健一, 多田正大, 藤盛孝博, 五十嵐正広 (編) 大腸疾患 NOW2007. 日本メディカルセンター, 東京, pp87 - 92, 2007.
- 27) 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.

(平成 25 年 2 月 26 日受付)