

大腸粘膜下層浸潤癌のリンパ節転移危険因子の検討

小林 裕彦^{1,2} 池上 雅博² 三戸部 慈実^{1,2}
浦島 充佳³

¹東京慈恵会医科大学内科学講座消化器・肝臓内科

²東京慈恵会医科大学病院病理部

³東京慈恵会医科大学臨床研究開発室

(受付 平成 21 年 2 月 27 日)

RISK FACTORS FOR LYMPH NODE METASTASIS OF COLORECTAL CARCINOMAS WITH SUBMUCOSAL INVASION

Hirohiko KOBAYASHI^{1,2}, Masahiro IKEGAMI², Jimi MITOBE^{1,2},
and Mitsuyoshi URASHIMA³

¹*Division of Gastroenterology and Hepatology, Department of Internal Medicine,
The Jikei University School of Medicine*

²*Department of Pathology, Clinical Service, The Jikei University School of Medicine*

³*Division of Clinical Research and Development, The Jikei University School of Medicine*

To clarify risk factors associated with lymph node metastasis in submucosal invasive (pSM) colorectal carcinoma, special stains were used to detect lymphatic and venous permeations. A total of 136 surgically resected pSM colorectal carcinoma were examined. The following items were analyzed as risk factors for lymph node metastasis: 1) macroscopic features; 2) the mode of growth (polypoid or nonpolypoid); 3) the degree of submucosal invasion (SM1 or SM2/3); 4) the depth of submucosal invasion ($<1,000 \mu\text{m}$ or $=1,000 \mu\text{m}$); 5) histological differentiation at the submucosal portion (well-differentiated/moderately differentiated, or poorly differentiated); 6) budding (+ or -); 7) lymphatic permeations (+ or -); and 8) venous permeations (+ or -). With regard to vessel permeations (items 7 and 8), hematoxylin and eosin staining was compared with the following special stains: D2-40 immunostain for lymphatic permeations; elastica Van Gieson stain for venous permeations involving relatively thick small arteries; and CD31 and CD34 stains for venous permeations involving arterioles and capillaries. Multivariate logistic analysis showed significant differences in lymphatic permeations and venous permeations assessed with special stains; odds ratios for the 2 factors were 14.8 (95% confidence interval, 1.4-158.2; $p=0.03$) and 7.5 (95% confidence interval, 1.2-48.1; $p=0.03$), respectively. No significant associations were seen with hematoxylin and eosin staining. Lymphatic and venous permeations accurately depicted with special stains are extremely useful risk factors for lymph node metastasis in pSM colorectal carcinoma.

(Tokyo Jikeikai Medical Journal 2009; 124: 113-26)

Key words: submucosal invasive colorectal cancer, lymph node metastasis, D2-40, CD31, CD34

I. 緒 言

大腸の上皮性腫瘍性病変を内視鏡的に切除し、その後の病理学的検索で pSM 癌であった場合、現時点で追加腸切除するか否かの決定については、組織学的な情報に頼らざるを得ないのが現状である^{1)~3)}。したがってその決定については、正確な組織所見をもって行うべきであり、正確なデータの集積によってその判定基準は決定されるべきである。従来の pSM 癌転移危険因子の検索は、主に hematoxylin-eosin (以下 HE) 染色を用いて解析されたものであり⁴⁾、特にリンパ管侵襲や毛細血管レベルの侵襲をはじめとする脈管侵襲の評価については、診断する病理医の主観にまかされていた部分が大きいのが実状である。

今回我々は、リンパ管内皮を染色するモノクローナル抗体の1つである D2-40 染色を用いてリンパ管侵襲を、elastica-Van-Gieson (以下 EVG)、CD31 染色、CD34 染色を用いて静脈侵襲を正確に評価し、他の転移危険因子と併せて、転移のみられた pSM 癌と転移のみられなかった pSM 癌とを比較検討し、大腸 pSM 癌のリンパ節転移危険因子について明らかにした。

II. 対象と方法

東京慈恵会医科大学病理学講座および病院病理部において、過去 20 年間に集積された外科的に切除された単発の大腸 pSM 癌のうち、肉眼および組織所見が相互に対応可能な 136 例 136 病変を用いた。なお家族性大腸腺腫症および進行癌合併例は対象からのぞいた。これらの病変の肉眼形態を観察後、3~5 mm 間隔で全割標本を作成し、パラフィン包埋後、4 μm にて薄切した。これらの薄切標本に HE 染色を行い、病変の最深部がでている標本を用い、連続切片を作成し、EGV 染色、さらに免疫染色として D2-40 (NICHIREI BIO, Japan)、CD31 (Dako, Denmark)、CD34 (Novocastra, UK)、desmin (Dako, Denmark)、CAM5.2 (BD BIO, USA) の各染色を行った。免疫染色法は、酵素抗体法 (i-VIEW DAB ユニバーサルキット) を用いた。

次に病変を顕微鏡下で polypoid growth type

(以下 PG) 病変と non polypoid growth type (以下 NPG) 病変とに分類した。PG 癌とは剖面形態が有茎性 (以下 Ip) や無茎性 (以下 Is) などの隆起性病変で代表され、腺腫あるいは癌の粘膜内での増殖により、辺縁正常粘膜より明らかに丈が高くなっているものと定義した。NPG 癌とは、表面型の癌で代表され、粘膜内病変の厚さが腫瘍辺縁正常粘膜とほぼ同等かむしろ薄いものと定義した⁵⁾。

肉眼型分類は大腸癌取扱い規約⁶⁾ にしたがって、それぞれについて陥凹を伴うものと伴わないものとに分類した。

SM 浸潤度分類は相対分類と絶対分類とを用いた。相対分類では顕微鏡下で各形態別に、粘膜下層を3等分し、粘膜側から SM1, 2, 3, と分類した^{7,8)}。その際粘膜筋板の同定には desmin 免疫染色標本を参考にした。特に Ip 型の病変では、Haggitt らの分類を参考に⁹⁾、粘膜内病変を有するポリープ部 SM 内までの浸潤を SM1、茎部までの浸潤を SM2、それ以深の浸潤を SM3 とした。また、大腸癌治療ガイドライン⁴⁾ に従って、SM 垂直浸潤長が 1,000 μm 未満とそれ以上とに分類した。

癌の組織学的な分化度については、大腸癌取扱い規約⁶⁾ に従い、高円柱状の上皮が明瞭な腺管を形成する高分化腺癌 (well differentiated tubular adenocarcinoma 以下 well)、篩状構造をとる中分化腺癌 (moderately differentiated tubular adenocarcinoma 以下 mod) に分類し、さらに腺管構造を示さない低分化腺癌 (poorly differentiated tubular adenocarcinoma 以下 por) に分類した。各々の病変の浸潤部で優位な組織型をもってその病変の組織型とした。

budding の有無については、腫瘍先進部を $\times 20$ の対物レンズで走査し、間質において5個未満の細胞からなる癌胞巣が浸潤、増生している領域があれば陽性とした^{10,11)}。

脈管侵襲の評価は、リンパ管侵襲については D2-40 染色を施行し評価した (Fig. 1)。静脈侵襲については、小動脈レベルまでの比較的太い血管侵襲を EVG にて弾性線維を描出し評価した (Fig. 2)。また細動脈から毛細血管レベルの血管については、CD31 染色、CD34 染色にて評価を

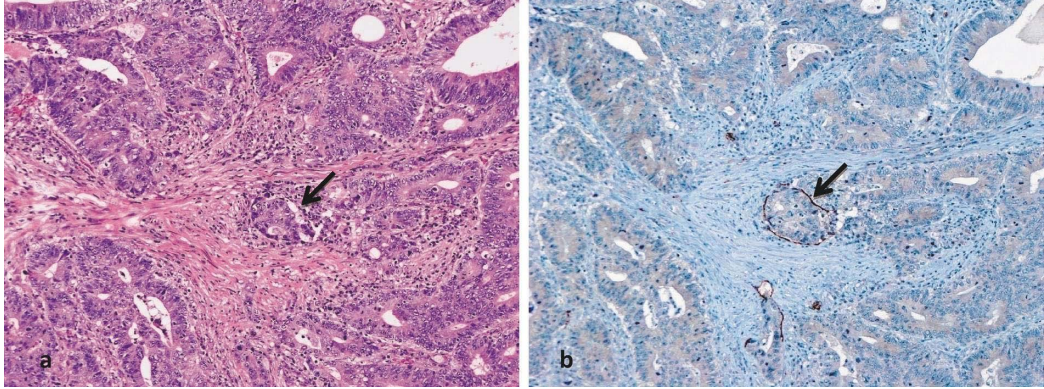


Fig. 1. Lymphatic permeations

- a) HE stain. Cancer invasion was seen in the submucosal layer. Lymphatic permeations could not be identified.
 b) D2-40 stain. Lymphatic permeations were identified, and cancer invasion in lymphatic permeation could be seen.

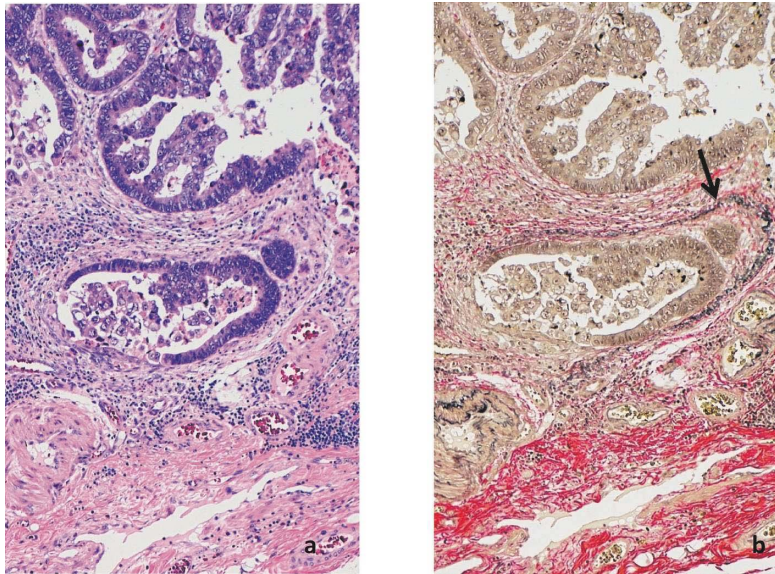


Fig. 2. Venous permeation by cancer cells

- a) HE stain. Cancer invasion was seen in the submucosal layer. Venous permeations could not be seen.
 b) EVG stain. Vascular elastic fibers (arrow) were identified, and cancer invasion was seen inside. Venous permeation was suspected.

行った (Fig. 3)。EVG 染色で評価される血管侵襲については静脈侵襲と表現するのが慣例である。一方 CD31 染色 CD34 染色で評価する血管侵襲については、本来ならば毛細血管侵襲と表現するべきであるが、両者とも血管に対する癌の侵襲と考えられることから、今回は EVG 染色上での評価と同様に静脈侵襲と表現した。したがって、EVG

染色上での評価と CD31 染色、CD34 染色上での評価で、どれか 1 つでも陽性となったものは静脈侵襲陽性と評価した。また、同一の脈管が D2-40 染色と CD31 染色 CD34 染色の複数の染色で陽性となった場合には、D2-40 染色で陽性ならばリンパ管侵襲とした。さらに D2-40 染色陰性かつ CD31 染色あるいは CD34 染色のどちらかで陽性

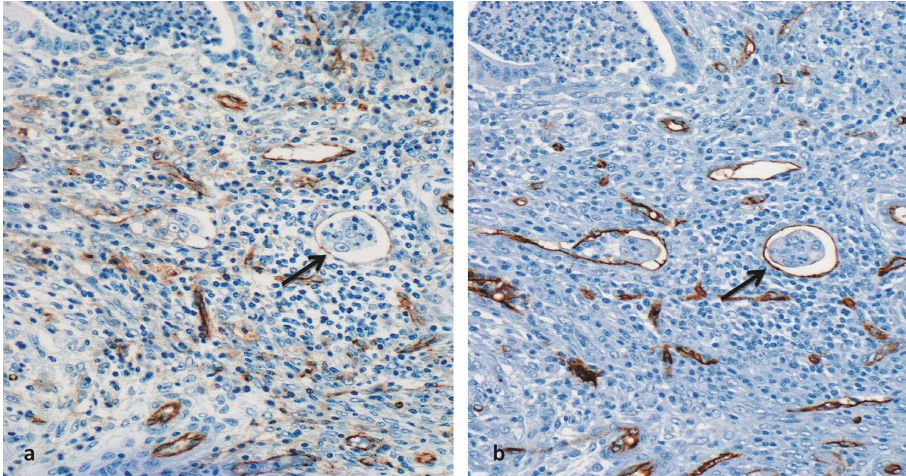


Fig. 3. Venous permeation at the capillary level

- a) CD31 stain identified capillaries, and cancer invasion was seen inside capillaries (arrow).
 b) CD34 stain identified capillaries, and cancer invasion was seen inside capillaries (arrow).

になった場合にのみ静脈侵襲として評価した。

以上大腸 pSM 癌のリンパ節転移危険因子として選出した項目をまとめると以下の 8 項目となる。

1. 陥凹の有無
2. 粘膜内増殖態度 (PG, NPG)
3. 浸潤度 (SM1, SM2/3)
 粘膜筋板の評価に desmin 免疫染色を施行
4. 浸潤実測値 (1,000 μm 未満, 1,000 μm 以上)
 粘膜筋板の評価に desmin 免疫染色を施行
5. 浸潤部組織型 (well/mod, por)
 浸潤部に優れた組織型
6. budding の有無 (+, -)
7. リンパ管侵襲 (+, -)
 D2-40 免疫染色を施行したものと HE 染色のみで評価したものとを比較
8. 静脈侵襲 (+, -)
 EVG 染色, CD31 染色, CD34 染色にて評価したものと, HE 染色のみで評価したものとを比較

これらの因子を用い, 大腸 pSM 癌を転移のある群と無い群に分けると共に, HE 染色にてリンパ管侵襲, 静脈侵襲を評価した群と, 特殊染色を用いてリンパ管侵襲, 静脈侵襲を評価した群に分け比較検討した。

統計学的な解析方法として, それぞれの因子と

リンパ節転移との関係についてはロジスティック解析により odds 比とその 95% 信頼区間, P 値を求めた。 P 値が 0.05 未満であった場合を有意差ありとした。次の 4 モデルを作製し検討した。HE 染色上の評価でリンパ管侵襲と静脈侵襲をそれぞれ独立した因子とした model 1, HE 染色上の評価でリンパ管侵襲と静脈侵襲とを脈管侵襲として 1 つにまとめた因子とした model 2, D2-40 染色を用いてリンパ管侵襲を, EVG 染色, CD31 染色, CD34 染色にて静脈侵襲を評価し, リンパ管侵襲と静脈侵襲をそれぞれ独立した因子とした model 3, D2-40 染色を用いてリンパ管侵襲を, EVG 染色, CD31 染色, CD34 染色にて静脈侵襲を評価し, リンパ管侵襲と静脈侵襲を脈管侵襲として 1 つの因子にまとめた model 4, 以上の 4 つのモデルについて, ロジスティックモデルを作成し, 多変量解析を行い各因子の独立した影響を評価した。

さらに, 今回用いた病変の中から, リンパ管侵襲が陽性であった 30 病変を無作為に選出し, 各々の病変で D2-40 染色にてリンパ管侵襲陽性となった部位を 1 カ所特定し, 同部位の CD31 染色, CD34 染色の染色態度と比較検討した。

III. 結 果

1. 症例の内訳 (Table 1)

リンパ節転移を来したものは、136 病変中 10 病変 (7.4%) であった (Table 2)。陥凹を認めたものは、84 病変 (61.8%) であった。粘膜内増殖態度については、PG 87 病変 (64.0%) NPG 49 病変 (36.0%) と PG が圧倒的に多くみられた。浸潤部組織型については、well/mod 127 (93.4%) por 9 (6.6%) と well/mod の分化型癌が多い結果であった。SM 浸潤度については、相対分類では、SM1 42 病変 (30.9%) SM2,3 94 病変 (69.1%)、浸潤実測値による絶対分類では、1,000 μm 未満が 19 病変 (14.0%)、1,000 μm 以上が、117 病変 (86.0%) と相対分類、絶対分類共に浸潤の深いものが多く認められた。budding については、陽性 84 病変 (61.8%)、陰性 52 病変 (38.2%) であった。

2. リンパ節転移症例について (Table 2)

リンパ節転移陽性例と転移陰性例を比較すると以下のものであった。肉眼型については、リンパ節転移陽性例で陥凹をみとめるものは、7 病変 (70%) であり、リンパ節転移陰性例での陥凹病変の頻度 61.1% よりわずかに多くみられた。粘膜内増殖態度については、リンパ節転移陽性例では PG 4 病変、NPG 6 病変と NPG が多くみられた。

病変の大きさについては、リンパ節転移陽性例の病変の平均径は、15.8 mm であり、転移陰性例の平均径 20.2 mm と比較して小さかった。浸潤部組織型については、リンパ節転移陽性例では well/mod 10 病変 por 0 病変と全て分化型癌であった。SM 浸潤度を相対分類でみると、転移陽性例では SM1 3 病変 (30.0%)、SM2,3 7 病変 (70.0%) であり、SM2,3 例が多くみられたが、転移陰性例での頻度 SM1 31.0% SM2,3 69.0% とほぼ同様であった。SM 浸潤実測値については、転移陰性例の平均 2,887 μm と比較して、リンパ節転移陽性例の平均は、4,010 μm と転移陽性例では浸潤の深い例が多くみられた。budding については、リンパ節転移陽性例では 7 例 (70.0%) に陽性であり、転移陰性例の陽性率 59.5% に比較して高率であった。リンパ管侵襲を D2-40 染色で判定したところ、陽性例は、8 病変 (80.0%) と転移陰性 pSM 癌の陽性率 37.3% に比較して極めて高率であった。静脈侵襲を EVG 染色、CD31 染色、CD34 染色で判定したものについては、転移陽性例 7 病変 (70.0%) に陽性となり転移陰性 pSM 癌の陽性率 35.7% と比較して極めて高率であった。また、転移陽性例においてリンパ管侵襲、静脈侵襲の両者もしくは一方が陽性の病変について特殊染色を施行し検索したところ陽性 10 病変 100% で、リンパ

Table 1. Comparison of pathological characteristics of colorectal carcinomas with submucosal invasion (total 136 lesions) materials

risk factor	the number of lesions (%)	
depression	+ 84 (61.8%)	- 52 (38.2%)
intramucosal growth (PG/NPG)	PG 87 (64.0%)	NPG 49 (36.0%)
histological type (well, mod/por)	well.mod 127 (93.4%)	por 9 (6.6%)
degree of submucosal invasion (SM1/SM2,3)	SM1 42 (30.9%)	SM2,3 94 (69.1%)
depth of submucosal invasion (1000 μm > / 1,000 μm \leq)	1,000 μm > 19 (14.0%)	1,000 μm \leq 117 (86.0%)
budding	+ 84 (61.8%)	- 52 (38.2%)

+ : positive - : negative

PG : polypoid growth type NPG : non polypoid growth type

well : well differentiated adenocarcinoma mod : moderate differentiated adenocarcinoma por : poorly differentiated adenocarcinoma

SM : submucosal invasive carcinoma

1,000 μm > : less than 1,000 μm 1,000 μm \leq : more than 1,000 μm

Table 2. Comparison with pathological characteristics of submucosal invasive carcinomas with and without lymphnode metastasis

	the number of lesions (%)			
	+		-	
lymphnode metastasis	n=10 (7.4%)		n=126 (92.6%)	
depression				
+	7 (70.0%)		77 (61.1%)	
-	3 (30.0%)		49 (38.9%)	
intramucosal growth				
PG	4 (40.0%)		83 (65.9%)	
NPG	6 (60.0%)		43 (34.1%)	
average Size	15.8 mm		20.2 mm	
histological type of the submucosal invasive resion	10 (100.0%)		117 (92.9%)	
well/mod	0 (0.0%)		9 (7.1%)	
poor				
degree of submucosal invasion				
SM1	3 (30.0%)		39 (31.0%)	
SM2,3	7 (70.0%)		87 (69.0%)	
depth of submucosal invasion				
1,000 μm >	0 (0.0%)		19 (15.1%)	
1,000 μm \leq	10 (100.0%)		107 (84.9%)	
	average depth: 4,010 μm		average depth: 2,887 μm	
budding				
+	7 (70.0%)		75 (59.5%)	
-	3 (30.0%)		51 (40.5%)	
lymphatic permeation	HE	D2-40	HE	D2-40
+	6 (60.0%)	8 (80.0%)	57 (45.2%)	47 (37.3%)
-	4 (40.0%)	2 (20.0%)	69 (54.8%)	79 (62.6%)
venous permeation	HE	EVG, CD31, CD34	HE	EVG, CD31, CD34
+	2 (20.0%)	7 (70.0%)	8 (6.3%)	45 (35.7%)
-	8 (80.0%)	3 (30.0%)	118 (93.7%)	81 (64.3%)
lymphatic and/or venous permeation	HE	special staining	HE	special staining
+	6 (60.0%)	10 (100.0%)	63 (50.0%)	67 (53.2%)
-	4 (40.0%)	0 (0.0%)	63 (50.0%)	59 (46.8%)

EVG: elastica-Van-Gieson stain HE: hematoxylin-eosin stain special staining: D2-40, EVG, CD31, CD34

節転移を来した病変全てで陽性であり、転移陰性病変の 53.2% と比較して極めて高率であった。

3. 統計学的検討 (Table 3, 4, 5, 6)

大腸 pSM 癌のリンパ節転移の危険因子として設定した各因子について統計学的に多変量解析を行い有意差のあるものを検索した。

HE 染色上で脈管侵襲を評価した model 1 (Table 3), model 2 (Table 4) では各因子とも有意差は認めなかった。特殊染色を施行し脈管侵襲を評価した model 3 (Table 5), ではリンパ節転移に関係する危険因子について有意な因子として取り込まれた変数はリンパ管侵襲, 静脈侵襲の 2 因子で, odds 比は, それぞれ 14.8 (95% 信頼区間: 1.4~158.2; P 値: 0.03) 7.5 (95% 信頼区間: 1.2~48.1; P 値: 0.03) であった。また model 4

(Table 6) では, リンパ節転移例は全例 ly, v の一方あるいは両方に陽性であり, ロジスティック解析を行わなかった。

4. 特殊染色を用いた標本における診断能について (Table 7)

特殊染色を用いた場合, リンパ節転移に対する感度は 100% (10/10), 特異度は 46.8% (59/126) であった。また陽性的中率は 13.0% (10/77) であり, 陰性的中率は 100% (59/59) であった。

5. HE 染色および D2-40 染色による脈管侵襲の評価差 (Table 8)

HE 染色でリンパ管侵襲ありと判定された病変は 63 病変 (46.3%), D2-40 染色でリンパ管侵襲ありと判定された病変は 55 病変 (40.4%) であった。HE 染色上でのリンパ管侵襲の評価は偽陽性とさ

Table 3 (model 1). Multivariate analysis of pathological factors associated with lymphnode metastasis (HE staining)

risk factor	odds ratio	<i>P</i> value	95% confidence interval	
depression (+/-)	1.5	0.67	0.2	8.7
intramucosal growth (NPG/PG)	0.4	0.16	0.08	1.5
degree of submucosal invasion (SM1/SM2,3)	0.3	0.25	0.05	2.6
depth of submucosal invasion (1,000 μm > / 1,000 μm \leq)	1.3	0.86	0.09	18.2
histological differentiation at the submucosal portion (well, mod/por)	3.6	0.22	0.5	27.7
budding (+/-)	4.7	0.18	0.5	45.3
lymphatic permeation (+/-)	1.2	0.80	0.3	6.0
venous permeation (+/-)	3.5	0.21	0.5	24.1

Table 4 (model 2). Multivariate analysis of pathological factors associated with lymphnode metastasis (HE staining)

risk factor	odds ratio	<i>P</i> value	95% confidence interval	
depression (+/-)	1.8	0.53	0.3	9.9
intramucosal growth (NPG/PG)	0.4	0.81	0.09	1.6
degree of submucosal invasion (SM1/SM2,3)	0.4	0.34	0.06	2.6
depth of submucosal invasion (1,000 μm > / 1,000 μm \leq)	1.3	0.87	0.09	17.9
histological differentiation at the submucosal portion (well, mod/por)	3.7	0.20	0.5	26.9
budding (+/-)	4.5	0.19	0.5	43.8
ly and/or v (+/-)	1.3	0.78	0.3	6.4

ly : lymphatic permeation v : venous permeation

Table 5 (model 3). Multivariate analysis of pathological factors associated with lymphnode metastasis (special staining)

risk factor	odds ratio	<i>P</i> value	95% confidence interval	
depression (+/-)	2.8	0.27	0.5	17.4
intramucosal growth (NPG/PG)	0.7	0.65	0.1	3.4
degree of submucosal invasion (SM1/SM2,3)	0.3	0.26	0.04	2.5
depth of submucosal invasion (1,000 μm > / 1,000 μm \leq)	0.4	0.56	0.02	7.7
histological differentiation at the submucosal portion (well, mod/por)	1.1	0.90	0.1	9.8
budding (+/-)	2.5	0.45	0.2	25.3
lymphatic permeation (+/-)	14.8	0.03	1.4	158.2
venous permeation (+/-)	7.5	0.03	1.2	48.0

Table 6 (model 4). Multivariate analysis of pathological factors associated with lymphnode metastasis (special staining)

risk factor	odds ratio	<i>P</i> value	95% confidence interval	
depression (+/-)	2.2	0.40	0.4	13.9
intramucosal growth (NPG/PG)	0.4	0.26	0.09	1.9
degree of submucosal invasion (SM1/SM2,3)	0.5	0.45	0.07	3.2
depth of submucosal invasion (1,000 μm > / 1,000 μm \leq)	0.5	0.67	0.03	9.7
histological differentiation at the submucosal portion (well, mod/poor)	3.6	0.20	0.05	25.3
Budding (+/-)	1.5	0.74	0.2	14.7
ly and/or v (+/-)	Considered as a dependent factor on lymphnode metastasis			

Table 7. Diagnostic ability by special staining

	lymphnode metastasis +	lymphnode metastasis -	total
special staining +	10	67	77
special staining -	0	59	59
total	10	126	136

positive predictive value: 13.0% (10/77)

negative predictive value: 100% (59/59)

sensitivity: 100% (10/10)

specificity: 46.8% (59/126)

+: positive - : negative special staining: D2-40, EVG, CD31, CD34

Table 8. The difference between HE staining and special staining for lymphatic and venous permeation

lymphatic permeation		
	+ No. cases (%)	- No. cases (%)
HE	63 (46.3%)	73 (53.7%)
D2-40	55 (40.4%)	81 (59.6%)
venous permeation		
	+ No. cases (%)	- No. cases (%)
HE	10 (7.4%)	126 (92.6%)
EVG, CD34, CD31	52 (38.2%)	84 (61.8%)

+: positive - : negative

れるものが多かった (Fig. 4, 5). また HE 染色で静脈侵襲有りと判定された病変は 10 病変 (7.4%), 特殊染色で静脈侵襲有りと判定された病

変は 52 病変 (38.2%) であり, HE 染色での静脈侵襲の評価は偽陰性のものが多くみられた.

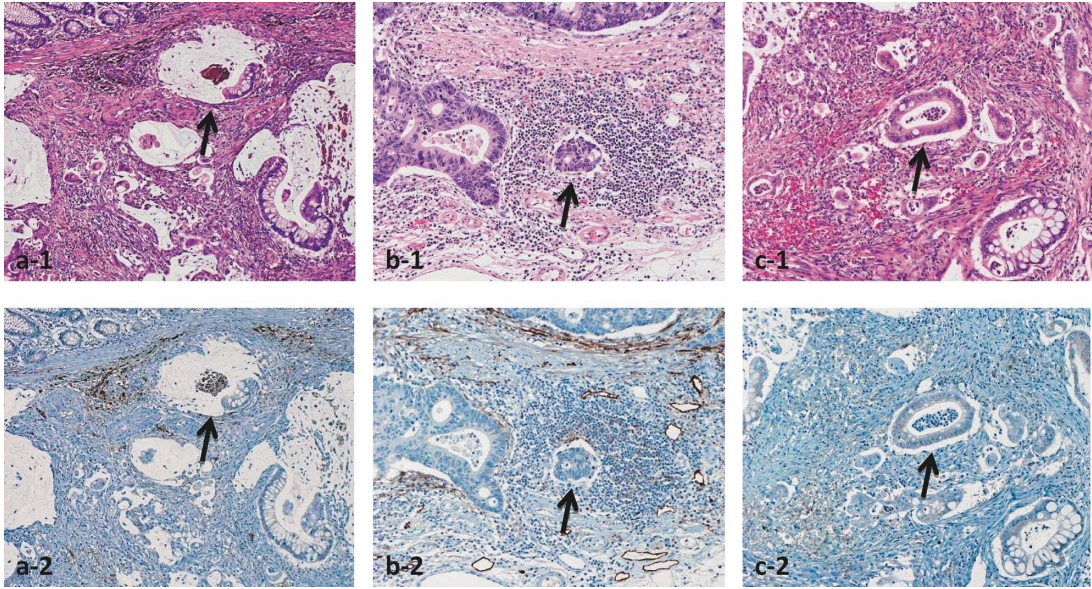


Fig. 4. Lymphatic permeations overestimated by HE stain (false-positive)

a-1, b-1 and c-1) HE stain indicating lymphatic permeations (arrow)

a-2, b-2 and c-2) D2-40 stain does not identify lymphatic permeations, confirming a false-positive (arrow)

a) Mucin in mucinous carcinoma can be mistaken for vessel invasion.

b and c) In the process of sample preparation, artificial discrepancies between cancer and stroma can be mistaken for venous permeations.

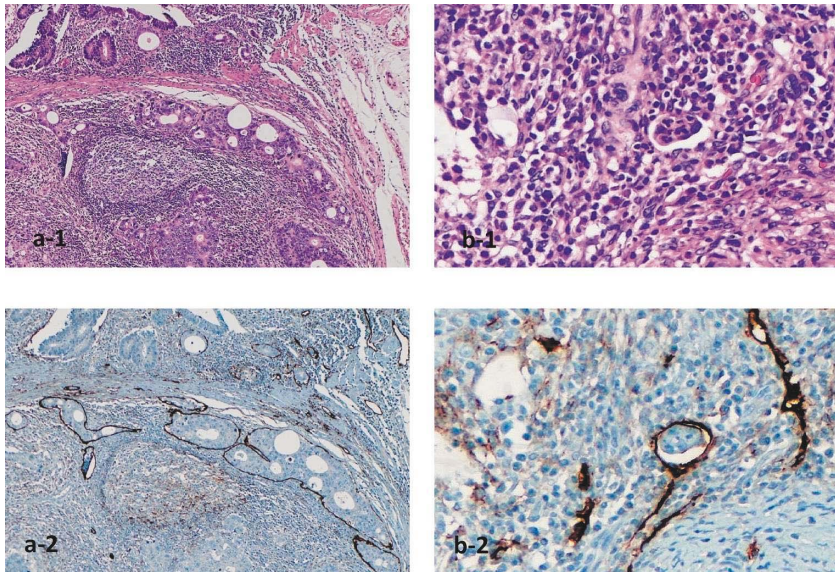


Fig. 5. Lymphatic permeations underestimated by HE stain (false-negative)

a-1) No gap is seen between cancer and stroma, and HE stain does not identify lymphatic permeations
a-2) D2-40 stain identifies lymphatic permeations, and lymphatic permeation is suspected.

b-1) A case in which lymphatic permeations (minute cancerous lesions) was missed.

b-2) D2-40 stain identifies lymphatic permeations, and lymphatic permeation is suspected.

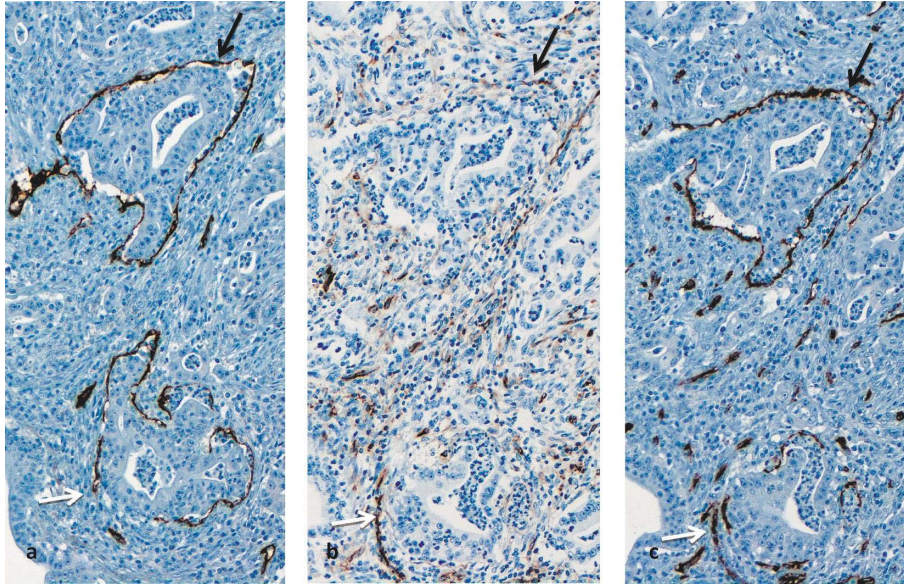


Fig. 6. CD31 and CD34 staining of D2-40-positive vessels (black arrow, white arrow)

- a) D2-40 stain (positive)
- b) CD31 stain (positive)
- c) CD34 stain (positive)

The same vessel may react to multiple antibodies. In such cases, the first priority is D2-40 stain. In other words, positive D2-40 indicates lymphatic permeations, and negative D2-40 and positive CD31 or CD34 indicates venous permeations.

Table 9. Relationship between D2-40, CD31 and CD34 staining

immunohisto-chemistry	D2-40	CD31	CD34
No. cases (%)	30(100%)	2(6.7%)	16(53.3%)
			(n=30)

6. D2-40 染色で陽性となった脈管に対する CD31 染色, CD34 染色の染色態度 (Table 9)

今回 D2-40 染色でリンパ管侵襲の認められた病変から無作為に選んだ 30 病変のうち D2-40 染色にてリンパ管侵襲陽性部位を 1 カ所特定し、同一部位での CD31 染色, CD34 染色の染色態度をみたところ, CD34 染色で 16 カ所 (53.3%), CD31 染色で 2 カ所 (6.7%) に陽性であり, 同一の脈管で複数の抗体に陽性となることが判明した (Fig. 6).

IV. 考 察

今回我々は, 大腸 pSM 癌のリンパ節転移の危険因子を明らかにするため, 特にリンパ管侵襲を D2-40 染色, 毛細血管侵襲を CD31 染色, CD34 染色を用いて同定し, 検討を行った。

D2-40 は開発当初その抗原が不明であったが, 後にその抗原が podoplanin であることが判明した。Podoplanin は, I 型膜貫通蛋白で細胞表面上の 0-linked sialoglycoprotein (MW: 36-45 kD) であるとされている。正常組織上では肺胞上皮, リンパ管内皮細胞, 胎盤, 線維芽細胞, 末梢神経などに発現を認め, 腫瘍では, 精巣胚細胞性腫瘍, 中皮腫などで陽性となることが知られている。従って脈管の鑑別を行うに当たってはリンパ管内皮マーカーとして有効な抗体とされている¹²⁾⁻¹⁴⁾。一方, 今回毛細血管マーカーとして CD31, CD34 を採用した。CD31 は免疫グロブリンスーパーファミリーに属する分子量 140 kDa の単鎖細胞膜糖蛋白で血小板に存在する細胞膜接着因子

PECAM-1 と同一とされている。正常では造血前駆細胞、血小板、マクロファージ、血管内皮細胞に発現がみとめられる¹⁵⁾⁻¹⁷⁾。CD34 は単鎖細胞膜貫通型シアル化糖蛋白で分子量 110 kDa、造血前駆細胞、血管内皮細胞に分布するとされている¹⁶⁾⁻¹⁸⁾。CD31, CD34 共に血管内皮細胞に発現するとされているが、同定している抗原が何であるか未だに不明である。従って、今回の検討で、D2-40 染色と CD31 染色、CD34 染色にて脈管を評価する場合に、複数の抗体で脈管が陽性となった場合は、D2-40 染色の評価を優先し、D2-40 染色陽性の場合にリンパ管侵襲陽性とした。一方、D2-40 染色陰性で、CD31 染色および CD34 染色のうち両方あるいは一方が陽性の場合にのみ静脈侵襲陽性としてあつかった。

従来、病理組織学的な脈管侵襲の評価は HE 染色上か、あるいは HE 染色とせいぜい弾性染色（今回用いた EVG あるいは HE-Victoria blue 二重染色）を行って評価していた。弾性線維染色を用いると、内弾性板を有している小動脈あるいは小静脈レベルまでの太い血管侵襲の評価は客観的に成しうるが、毛細血管レベルの侵襲については全く評価が不可能であった。また、たとえ HE 染色で毛細血管レベルでの侵襲を疑う所見を認めた場合でもリンパ管か毛細血管かの鑑別が不可能であったため、それは血管侵襲としてではなく、リンパ管侵襲として扱われてきたのが実状である。したがって特に pSM 癌のような比較的浸潤初期の病変においては、これまで静脈侵襲の陽性率は低く、リンパ節転移の危険因子としてとりあげられてくることはなかった¹⁹⁾²⁰⁾。また毛細血管侵襲を含めてリンパ管侵襲として扱われてきた所見は、診断する病理医の主観が入る余地が大きく、客観的な所見として評価されたものとは言い難いのが実状であった。

従来脈管侵襲を評価する際に、病理医の主観の入る余地が大きい最大の理由として、組織標本を作製する際の脱水、脱脂過程における癌細胞とそれを取り囲む間質との間の収縮率の差により出現する、いわゆる浮島構造（癌細胞巣と間質との間の空隙）があげられる。この評価の仕方が、各病理医によりまちまちであることが、大きな問題である。稲山ら²¹⁾によると、リンパ管侵襲が HE 染

色上偽陰性となる具体的所見として、① 癌細胞巣とリンパ管壁との空隙、いわゆる浮島構造の空隙がごくわずかで不明瞭な場合、② リンパ球集簇における見落とし、すなわちリンパ球が集簇し、リンパ装置様にみられる部位に腫瘍が浸潤した場合、③ 脈管構造が不明瞭、リンパ管の構造自体がはっきりしないため HE 標本では同定困難な場合、④ 人工的乖離との区別、つまり HE 標本では癌細胞巣とリンパ管壁との空隙である浮島構造が著明であり人工的空隙と判断されたが、D2-40 染色でリンパ管と認識される場合などをあげている。今回の我々のデータからはリンパ管侵襲については HE 染色上では、むしろ陽性とりすぎる傾向、すなわち偽陽性が多く、リンパ管侵襲を過大に評価する傾向を認めた。この為に特殊染色における陽性的中率が低くなったと考えられた。静脈侵襲については、所見上はリンパ管侵襲とほぼ同様の問題点があげられると考えられるが、今回の我々の検討からは、HE 染色上での評価と比較して、偽陰性が多くみられた。すなわち太い血管では、癌浸潤に伴う desmoplastic reaction により、EVG 染色をしなければ同定できないものや、CD31 染色、CD34 染色では、HE 染色では見逃してしまうような微小な浸潤像が多くみられた。

さらに静脈侵襲で問題となるのは、従来毛細血管内に癌がみとめられた場合に、それをリンパ管侵襲としていたことがあげられる。このように従来の方法では、リンパ管侵襲と毛細血管侵襲を客観的にとらえることはできず、従ってそこから導きだされた、大腸 pSM 癌の転移危険因子についても正確な評価とは言い難いと考えられる。

以上のような点をふまえて今回我々は、リンパ管を D2-40 染色、小静脈レベルまでの太い血管を EVG 染色、毛細血管を CD31 染色、CD34 染色で同定し、脈管侵襲について現時点で可能な限り正確な評価を行い、それを基に大腸 pSM 癌のリンパ節転移危険因子について多変量解析を用い検討した。その結果 HE 染色でリンパ管侵襲、静脈侵襲を評価した場合には、我々があげたいずれの因子も危険因子として、ロジスティックモデルに取り込まれなかった。リンパ管侵襲と静脈侵襲の両者あるいはいずれか一方が陽性である場合を脈管侵襲陽性とした場合にも同様に、ロジスティック

モデルには取り込まれなかった。一方、リンパ管侵襲および静脈侵襲を特殊染色を用いて評価した場合には、リンパ管侵襲と静脈侵襲がロジスティックモデルに取り込まれ、各々の odd 比が 14.8 7.5 であった。これは、リンパ管侵襲がないものと比べてあるものは 14.8 倍、静脈侵襲のないものと比べてあるものは 7.5 倍転移の危険が高いことを示している。その他の因子は、ロジスティックモデルには取り込まれなかった。またリンパ管侵襲と静脈侵襲を合わせて脈管侵襲とした場合には、リンパ節転移例は全例が何らかの脈管侵襲が陽性であり、脈管侵襲とリンパ節転移とは、極めて高い相関を示した。すなわち今回の我々の検討結果からは、大腸 pSM 癌のリンパ節転移危険因子として、リンパ管侵襲、静脈侵襲があげられた。

癌がリンパ節転移あるいは遠隔転移を来すにはリンパ管、静脈などの脈管を中心とする経路を必ず介する必要があると考えられ、今回の結果は極めて受け入れやすい結果と考えられる。リンパ節転移と静脈侵襲は一見無関係のようにも考えられるが、リンパ節内にも毛細血管が存在していることを考えると静脈を介したリンパ節転移の可能性も考えられる。

大腸 pSM 癌のリンパ節転移危険因子として従来一般的には以下のように報告されている。富樫ら²²⁾は、リンパ節転移の危険因子における統計学的検討の結果、先進部の組織型、脈管侵襲の各因子で有意差を認めたと報告している。喜多嶋ら²³⁾は、大腸 sm 癌をリンパ節転移陽性群と転移陰性群に分類し各臨床病理学的因子について統計学的に比較検討した結果、SM 浸潤距離、粘膜下層での癌分化度、リンパ管侵襲、静脈侵襲、簇出で有意差を認め、さらに有茎型、非有茎型について検討すると、有茎型では、リンパ管侵襲と、粘膜下層癌分化度に有意差を認め、非有茎型では、浸潤距離、リンパ管侵襲、静脈侵襲、簇出の各因子で有意差を認めたと報告している。多くの施設で脈管侵襲の他に SM 浸潤距離、浸潤部の budding、粘膜下層癌分化度などの複数の所見が転移危険因子としてあげられている^{24)–26)}。

我々のデータからみると SM 浸潤距離では、SM 癌全体でも SM2/3 の割合が 69.1% と比較的高く、リンパ節転移陽性群でも SM2/3 の割合が、

100% であったため、ロジスティックモデルには取り込まれなかったものと考えられる。一方 budding は SM 癌全体の頻度は 84/136 (61.8%) でありリンパ節転移陽性群では 9/10 (90%) でみられた。budding においては、リンパ節転移陽性群での陽性率は極めて高いものの、リンパ節転移のないものの群においても比較的高率であり、多変量解析において有意差がでなかったものと考えられる。浸潤部組織型では、SM 癌全体では well/mod の割合は 93.4%。リンパ節転移のある群では 100% が well/mod であり、これもリンパ節転移のない群でも高率であり、有意差が出なかったものと考えられる。

前述したようにリンパ節および遠隔転移と直接的に関係するのは脈管侵襲と考えられ、SM 浸潤度、budding、浸潤部組織型などはいずれも間接的な関係でしかないと考えられる。従ってリンパ管侵襲、静脈侵襲の所見を正確に特殊染色で拾い上げることができれば、これらは極めて有力な転移危険因子となると考えられた。実際に我々のデータでは、特殊染色を用いて正確に脈管侵襲の評価を行った場合のリンパ節転移に対する陰性的中率は、100% であり、脈管侵襲が陰性であった場合には、極めて信頼度の高い指標となりうると考えられた。

特殊染色を施行し、正確なリンパ管および静脈侵襲のデータを出すことにより、大腸 pSM 癌の手術適応を絞り込むことが出来ると考えられた。今回我々の検討した 136 例中 77 例 (56.6%) は、静脈侵襲、およびリンパ管侵襲の一方ないしは両方を認め、136 例中 59 例 (43.4%) は、静脈侵襲、リンパ管侵襲ともに認めなかった。従って、静脈侵襲、リンパ管侵襲ともに認めなかった 59 例 (43.4%) は内視鏡的切除のみでも適当であったのではないかと考えられた。

今回我々の行った検索の問題点として、症例数が少ないことがあげられる。今後症例数をさらに加えた大規模な検索が望まれるとともに、その検索結果をもとに大腸 pSM 癌の内視鏡切除適応基準を決めるべきと考えられる。

V. 結 語

1. リンパ管侵襲および静脈侵襲を正確に評価するためには、D2-40 染色, EVG 染色, CD31 染色, CD34 染色などの特殊染色が必要と考えられる。リンパ管侵襲の評価では、HE 染色での評価に比べて過大評価が防げる。静脈侵襲の評価では、小静脈までの大きい血管は EVG 染色で、毛細血管レベルでは CD31 染色, CD34 染色を用いての評価することで、HE 染色のみで判定したときの過小評価を防ぐことができる。

2. 多変量解析の結果大腸 pSM 癌のリンパ節転移危険因子として有効な因子は、D2-40 染色, EVG 染色, CD31 染色, CD34 染色の特殊染色を行った上でのリンパ管侵襲と静脈侵襲であった。

文 献

- 1) 味岡洋一, 渡邊英伸, 横山純二, 西倉 健, 向井玄, 馬場洋一郎. 腫瘍局所遺残の判定, sm 癌におけるリンパ節転移(微小転移を含む)の評価について. 消化器外科 2002; 25: 1683-90.
- 2) 福光賞真, 白水和雄, 緒方 裕, 荒木靖三. 直腸癌のリンパ節転移: リンパ節転移危険因子と非危険因子. 消化器科 2003; 37: 115-20.
- 3) 東野晃治, 飯石浩康, 竜田正晴, 井上拓也, 木津崇, 三好里佳 ほか. 大腸 SM 癌の内視鏡摘除後の follow up. 胃と腸 2007; 42: 1477-82.
- 4) 大腸癌研究編. 大腸癌ガイドライン. 医師用 2005 年度版. 東京: 金原出版; 2005.
- 5) Ikegami M. A pathological study on colorectal cancer: from de novo carcinoma to advanced carcinoma. Acta Pathol Jpn 1987; 37: 21-37.
- 6) 大腸癌研究会 編. 大腸癌取り扱い規約. 7 版. 東京: 金原出版; 2006.
- 7) 工藤進英, 曾我 淳, 下田 聡, 山本睦生, 小山真, 武藤輝一. 大腸 sm 癌の sm 浸潤の分析と治療方針: sm 浸潤度分類について. 胃と腸 1894; 19: 1349-56.
- 8) 一之瀬方紀子, 池上雅博, 松島雅人, 鈴木博昭, 牛込新一郎. 大腸 sm 癌におけるリンパ節・肝転移の危険因子に関する臨床病理学的検討. Gastroenterol Endosc 1999; 41: 1163-74.
- 9) Haggitt RC, Glotzbach RE, Scoffer EE, Wruble LD. Prognostic factors in colorectal carcinomas arising in adenomas: implications for

lesions removed by endoscopic polypectomy. Gastroenterology 1985; 89: 328-36.

- 10) 今井 環. 人体癌発育状況の形態学的考察. 福岡医誌 1954; 45: 72-102.
- 11) Ueno H, Mochizuki H, Hashiguchi Y, Shimazaki H, Aida S, Hase K, et al. Risk factors for adverse outcome in early invasive colorectal carcinoma. Gastroenterology 2004; 127: 385-94.
- 12) Kaiserling E. Immunohistochemical identification of lymph vessels with D2-40 in diagnostic pathology. Pathology 2004; 25: 362-74.
- 13) Marks A, Sutherland DR, Bailel D, Iglesias J, Law J, Lei M, et al. Characterization and distribution of an oncofetal antigen (M2A antigen) expressed on testicular germ cell tumours. Br J Cancer 1999; 80: 569-78.
- 14) 畑中 豊, 谷 洋一. リンパ管の免疫組織化学的解析: 病理研究および診断で利用可能なマーカー. 細胞 2005; 37: 200-3.
- 15) Albelda SM, Muller WA, Buck CA, Newman PJ. Molecular and Cellular Properties of PECAM-1 (end-CAM/CD31): A Novel vascular cell-cell adhesion molecule. J Cell Biol 1991; 114(5): 1059-68.
- 16) Alessandri G, Girelli M, Taccaagni G, Colombo A, Nicosia R, Caruso A, et al. Human vasculogenesis ex vivo: embryonic aorta as a tool for isolation of endothelial cell progenitors. Lab Invest 2001; 81: 875-85.
- 17) 宮井須万子, 井上正久, 秋田昌彦, 安部友美, 瀬津弘順. 婦人科腫瘍における基礎研究: 子宮頸部扁平上皮癌, 前癌病変における複数の血管マーカーを用いた血管新生の免疫組織化学的研究. 日婦腫瘍会誌 2006; 24: 137-44.
- 18) Asahara T, Masuda H, Takahashi T, Pastore C, Silver M, Kearne M, et al. Bone marrow origin of endothelial cells responsible for postnatal vasculogenesis in physiological neovascularization. Circ Res 1999; 85: 221-8.
- 19) 池上雅博, 江藤哲哉, 安田武史, 鷹橋 浩, 山下伸子, 中山順今. sm 浸潤の病理学的評価と問題点. 大腸癌におけるリンパ管および静脈侵襲の見方と判定方法. 早期大腸癌 2000; 4: 203-8.
- 20) 池上雅博, 劉 鉄成, 山下伸子, 羽野 寛. 大腸 sm 癌における転移と脈管侵襲との関係および脈管侵襲の病理組織診断上の問題点. 早期大腸癌 2001; 5: 449-57.
- 21) 稲山嘉明, 久保田香, 本野紀夫, 佐川弘美, 嶋田紘. 大腸癌における D2-40 抗体によるリンパ管侵

- 襲の検出：HE 標本を用いた評価との比較。診断病理 2005；22：6-12.
- 22) 富樫一智，深達度のうえからの限界。武藤徹一郎，多田正大 編。大腸 sm 癌。内視鏡診断と治療。東京：日本メディカルセンター；1999. p. 84-9.
- 23) 喜多嶋和晃，藤盛孝博，藤井茂彦，熊本俊秀，渡辺英伸，武藤徹一郎 ほか。病理組織学的因子からみた大腸 sm 癌のリンパ節転移危険因子—大腸癌研究会 sm 癌取り扱いプロジェクト研究委員会の解析から。胃と腸 2004；39：1329-37.
- 24) 浅井浩司，五十嵐誠治，松井孝司，堀口 潤，固武健二郎。大腸 sm 癌のリンパ節転移高危険因子の検討。日消外会誌 2003；36：1365-9.
- 25) 橋本 哲，青柳 豊。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。新潟医会誌 2006；120：569-76.
- 26) 渡邊 清，吉松和彦，石橋敬一郎，横溝 肇，吉田淳仁，勝部隆男 ほか。大腸粘膜下層癌 (sm 癌) のリンパ節転移危険因子に関する検討。東女医大誌 2007；76：254-7.