

細胞核 DNA ヒストグラムからみた肝転移胃癌の検討

横浜市立大学第1外科

山本 裕司	天野 富薫	今田 敏夫	赤池 信
田村 聡	野口 芳一	青山 法夫	安部 雅夫
円谷 彰	利野 靖	松本 昭彦	

過去12年間に切除した肝転移胃癌症例13例と肝再発例8例の原発巣の核 DNA ヒストグラムから肝転移をきたす胃癌の特性を検討した。

DNA ploidy pattern は肝転移例は全例 aneuploid で、肝再発例は75%が aneuploid であった。Heterogeneity index score (HIS) は原発巣で、 78.62 ± 36.21 で正常粘膜の 31.07 ± 25.46 と比較して高値 ($p < 0.01$) であった。静脈侵襲陽性例の HIS は 90.31 ± 34.62 で、陰性例の 49.81 ± 18.71 と比較して高値であったが、静脈侵襲陽性例で肝再発の見られなかった症例と比較して差は見られなかった。また、肝転移例、肝再発例では髄様型・中間型増殖を示す症例が多い傾向がみられた。以上から、HIS の高い胃癌は静脈侵襲をきたしやすく、肝転移の risk factor となりえるが、転移形成には増殖様式も関与していることが示唆された。

Key words: liver metastasis of the gastric cancer, DNA ploidy pattern of the gastric cancer, heterogeneity index score of the gastric cancer

はじめに

近年、肝転移を伴う胃癌に対して積極的に原発巣ならびに肝転移巣の切除が行われるようになってきた。また、動注化学療法などの集学的治療法が開発され、その有効性が報告¹⁾²⁾されている。しかしながら、肝転移を伴う胃癌は開腹時すでに他の非治療因子を合併していることが多いことや、生物学的悪性度が高いなどにより、その治療成績はきわめて不良である。

一方、flow cytometry (FCM) による悪性腫瘍の細胞核 DNA 量の解析が多く試みられるようになり、腫瘍細胞の診断や悪性度を知る指標として細胞核 DNA 量が測定され、その有用性が報告されてきている^{3)~5)}。

そこで著者らは肝転移を伴う胃癌切除症例ならびに治療切除後、主再発が肝転移であった症例について retrospective に核 DNA 量 histogram および病理組織学的な面より検討を加え、その特性について興味ある知見を得たので報告する。

対象と方法

昭和51年から昭和62年までの12年間に教室で切除した胃癌症例は541例で治療切除329例、非治療切除112例

であった。治療切除例のうち主再発が肝転移であった症例（以下肝再発例）10例と、非治療切除例のうち開腹時肝転移の見られた症例（以下肝転移例）19例の計29例を対象とし（Table 1）、昭和51年から昭和53年までの3年間に胃切除を施行した stage 3, 4 治療切除例のうち10年以上経過し再発の認められていない症例（以下10生例）12例と比較検討した。

肝転移例19例のうち非治療因子が肝転移のみの症例は10例で、腹膜播種を伴っているもの5例、広範なリンパ節転移によるもの4例であった。

これら41例を病理組織学的に検討するとともに病巣

Table 1 Gastrectomy for gastric cancer with liver metastasis and recurrence in liver after curative gastrectomy

	Number of patients
Synchronous liver metastasis	19
Metachronous liver metastasis	10
Total	29

Synchronous liver metastasis :

liver metastasis at lapalotomy

Metachronous liver metastasis :

recurrence in the liver after curative gastrectomy

<1990年1月10日受理> 別刷請求先：山本 裕司

〒232 横浜市南区浦舟町3-46 横浜市立大学第1

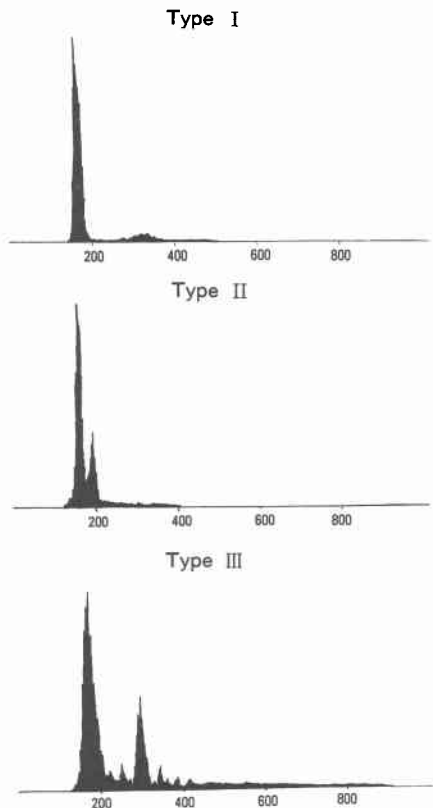
外科

採取部位を決定した。さらに、核 DNA 量の測定はパラフィン包埋組織から厚さ50 μ mの切片を作成した。脱パラフィン後癌巣部と正常粘膜部を採取し、トリブシン処理を行って nylon mesh で濾過し、単離細胞浮遊液を作成した。細胞数を 1×10^6 個に調整し、RNAase 処理後 Propidium iodide で DNA を染色し Cytofluorograf system 50H (Ortho 社製) にて細胞核 DNA 量を測定した。得られた正常粘膜のヒストグラムの G_{0+1} ピークの蛍光量を 1 とし、癌巣部の G_{0+1} ピークの蛍光量を DNA Index とし、DNA ploidy pattern を diploid (I 型) と aneuploid に分け、さらに aneuploid を low ploidy (II 型) と high ploidy (III 型) の 3 型に分類した (Fig. 1)。

I 型：単一の G_{0+1} peak を持つ diploid pattern を示すもの。

II 型：2 つ以上の peak を持ち、DNA Index < 1.3 のもの。

Fig. 1 DNA ploidy pattern. Type I: diploid, Type II: low ploidy aneuploid (D.I.<1.3), Type III: high ploidy aneuploid (D.I. \geq 1.3)



III 型：2 つ以上の peak を持ち、DNA Index \geq 1.3 のもの。

次にこれら histogram より得られた ploidy pattern を客観的指数として表すため、Tachibana ら⁹⁾の方法により heterogeneity index score (以下 HIS) を求めた。すなわち 1 番最初の peak の細胞を diploid 細胞 (2n) と仮定し、flow cytometer にて測定した全細胞集団の DNA の平均含量 (heterogeneity index, HI) を下式により求め HIS を計算した。

$$HI = \frac{1}{\text{全細胞数}} \cdot \sum_{i=1}^{1000} 2^i \times \frac{\text{channel 数 } x_{(i)} \times \text{細胞数 } N_{(i)}}{\text{最初の peak の channel 数}}$$

$$HIS = (HI \times 100) - 200$$

すなわち、HIS は 2n peak を逸脱する細胞集団の DNA 含量を示すことになり、diploid 以上の増加はこの値の増加を意味することになる。

なお、核 DNA 量を測定しえた症例は肝転移例 13 例、肝再発例 8 例、10 生例 9 例であった。また、肝転移例のうち転移巣も切除した症例は 6 例であった。なお、DNA histogram の検討には CV 値 8% 以下を検討対象とし、統計学的な検討は χ^2 検定および t 検定を用い危険率 0.05 以下を有意とした。

結果

1. 組織学的所見

1) 腫瘍占居部位の肉眼型

肝転移例・肝再発例・10 生例とも占居部位による差はなく肝転移例では A 領域 6 例 (31.6%)、M 6 例 (31.6%)、C 7 例 (36.8%) で、肝再発例では A 2 例 (20%)、M 4 例 (40%)、C 4 例 (40%) であった (Table 2)。

肉眼型では 2 型・3 型が多く、肝転移例の 18 例

Table 2 Location of primary lesions

	Location of primary lesion			Total
	A	B	C	
Synchronous liver metastasis	6 (31.6)	6 (31.6)	7 (36.8)	19 (100)
Metachronous liver metastasis	2 (20)	4 (40)	4 (40)	10 (100)
No recurrence	2 (16.7)	3 (25.0)	7 (58.3)	12 (100)

() : %

A : Lower portion of the stomach

B : Middle portion of the stomach

C : upper portion of the stomach

No recurrence : cases with no recurrence during more than ten years after gastrectomy

(94.7%), 肝再発例の10例(100%)が2型・3型であったが, 10生例の8例(75%)と比較して差は見られなかった (Table 2).

2) 深達度とリンパ節転移

深達度では肝転移例・肝再発例・10生例とも ps (+) 症例が多く, 肝転移例16例 (84.2%), 肝再発例6例 (60%) であった (Table 4).

リンパ節転移は肝転移例・肝再発例とも n (+) 症例が多く, 29例中26例 (89.7%) に見られた (Table 5). 10生例においても同様に12例中11例 (91.7%) が n (+) 症例であった. また, 肝転移例では n_{3,4} 症例が多い傾向が見られた.

3) 組織型と間質量

肝転移例では pap, tub1, tub2 の分化型腺癌 8例

(42.1%), por, muc の未分化型腺癌11例 (57.9%) と差はみられなかった. 一方, 肝再発例では分化型腺癌は7例 (70%) と多い傾向がみられたが, 10生例の8例 (75%) と比較して差はみられなかった (Table 6a).

また, 間質量では肝転移例の硬性型の占める割合は10生例と比較して少なく (p<0.05), 髓様型, 中間型が15例 (78.9%) と多い傾向がみられた. 肝再発例でも同様な傾向がみられ, 髓様型・中間型が8例 (80%) を占めていた (Table 6b).

4) 脈管侵襲

細胞核 DNA 量を測定しえた30例について脈管侵襲を検討した.

リンパ管侵襲陽性は肝転移例・肝再発例とも高率にみられ, 肝転移例では12例 (92.3%), 肝再発例では7例 (87.5%) と10生例の5例 (55.6%) と比較して高い傾向がみられた (Table 7a).

静脈侵襲陽性は肝転移例9例 (69.2%), 肝再発例5例 (62.5%) で, 10生例の3例 (33.3%) と比較して高い傾向が見られた (Table 7b).

2. 細胞核 DNA ヒストグラム

1) 原発巣と肝転移巣の細胞核 DNA ploidy pattern

肝転移例では I 型はなく, II 型9例, III 型4例と全例 aneuploidy pattern を示した. 肝再発例では I 型2例, II 型3例, III 型3例であったが, 10生例では I 型4例, II 型3例, III 型2例と I 型の出現頻度は高率

Table 3 Classification of gross findings

	Borrmann's classification					Total
	1	2	3	4	5	
Synchronous liver metastasis	1 (5.3)	9 (47.4)	9 (47.4)	0	0	19 (100)
Metachronous liver metastasis	0	3 (30)	7 (70)	0	0	10 (100)
No recurrence	0	3 (25.0)	6 (50.0)	1 (8.3)	2 (16.7)	12 (100)

(): %

Table 4 Histological depth of invasion

	Prognostic serosal invasion		Total
	ps(-)	ps(+)	
Synchronous liver metastasis	3 (15.8)	16 (84.2)	19 (100)
Metachronous liver metastasis	4 (40)	6 (60)	10 (100)
No recurrence	2 (16.7)	10 (83.3)	12 (100)

(): %

Table 5 Lymph node metastasis

	Lymph node metastasis				Total
	n(-)	n ₁	n ₂	n _{3,4}	
Synchronous liver metastasis	1 (5.3)	2 (10.5)	9 (47.4)	7 (36.8)	19 (100)
Metachronous liver metastasis	2 (20)	5 (50)	3 (30)	0	10 (100)
No recurrence	1 (8.3)	5 (41.7)	5 (41.7)	1 (8.3)	12 (100)

(): %

Table 6 Microscopic findings

a) Histogical type

	Histological type			Total
	pap	tub1, tub2	por, muc	
Synchronous liver metastasis	1 (5.3)	7 (36.8)	11 (27.9)	19 (100)
Metachronous liver metastasis	3 (30)	4 (40)	3 (30)	10 (100)
No recurrence	2 (16.7)	6 (50.0)	4 (33.3)	12 (100)

(): %

b) The amount of interstitial connective tissue

	Stroma			Total
	medullary	intermediate	scirrhous	
Synchronous liver metastasis	6 (31.6)	9 ^a (47.4)	4 ^b (21.1)	19 (100)
Metachronous liver metastasis	7 (70)	1 (10)	2 (20)	10 (100)
No recurrence	4 (33.3)	1 ^a (8.3)	7 ^b (58.3)	12 (100)

(): %

a, b : p<0.05

Table 7 Lymphatic invasion (a) and vascular invasion (b)

a) Lymphatic invasion

Liver metastasis	ly(-)	ly(+)	Total
Synchronous	1	12	13
Metachronous	1	7	8
No recurrence	4	5	9

b) Vascular invasion

Liver metastasis	v(-)	v(+)	Total
Synchronous	4	9	13
Metachronous	3	5	8
No recurrence	6	3	9

ly(-) : lymphatic invasion negative, ly(+) : positive
v(-) : vascular invasion negative, v(+) : positive

Table 8 Nuclear DNA ploidy pattern of primary gastric cancer (a) and metastatic liver lesion (b)

a)

Liver metastasis	DNA ploidy pattern			Total
	I	II	III	
Synchronous	0*	9	4	13
Metachronous	2	3	3	8
No recurrence	4*	3	2	9

* : p<0.05

b)

		Metastatic liver lesion		
	DNA ploidy pattern	I	II	III
Primary lesion	I	0	0	0
	II	0	3	1
	III	0	0	2

(p<0.05) であった (Table 8a).

また、原発巣・肝転移巣の ploidy pattern を比較すると、6 例中 5 例は ploidy pattern が一致し、1 例は原発巣 II 型、肝転移巣 III 型であった (Table 8b).

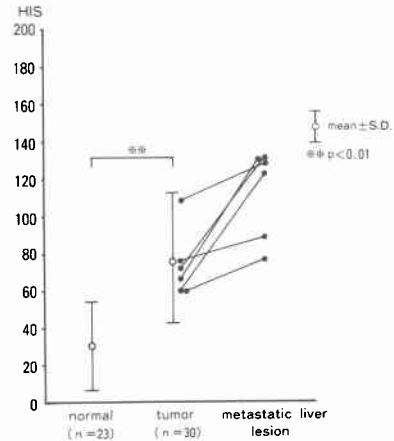
2) 各組織の HIS

正常粘膜の HIS は 31.07±25.46、腫瘍組織では 78.62±36.21 と腫瘍組織で有意に高値であった (p<0.01)。また、肝転移巣も切除した 6 例について、原発巣と肝転移巣の HIS を比較するとおのおの 74.58±18.53、115.07±24.22 と肝転移巣で高値 (p<0.01) を示した (Fig. 2)。

3. 組織学的所見と細胞核 DNA 量

1) 脈管侵襲と HIS

Fig. 2 Mean HIS of normal tissue, tumor, and metastatic liver lesion : The mean HIS of gastric cancer is higher than that of normal tissue. And the mean HIS of metastatic liver lesion is higher than that of primary lesion.



リンパ管侵襲陽性例の HIS は 76.83±36.89 (n=24) で、陰性例の 56.48±20.84 (n=6) と比較して高値を示す傾向がみられたが、リンパ管侵襲陰性例が少数のためか有意な差はみられなかった (Table 9a).

静脈侵襲陽性例の HIS は 90.31±34.62 (n=17) で陰性例の 49.81±18.71 (n=13) と比較して高値 (p<0.01) であったが、静脈侵襲陽性例に限っては、肝転移例、肝再発例、10 生例との間に差はみられなかった (Table 9b).

2) 間質量と HIS

各 DNA ploidy pattern の HIS は I 型 57.56±19.02 (n=6)、II 型 63.06±26.19 (n=15)、III 型 99.05±43.36 (n=9) と I 型 II 型 III 型となるに当たって HIS は高値となる傾向がみられた。また、肝転移・肝再発例の v(+) 例 14 例のうち髄様型は 7 例、中間型 6 例、硬性型 1 例であったのに対し、10 生例においては v(+) の 3 例は全例硬性型であった (Fig. 3).

4. 肝再発例における生存期間

肝再発例における術後生存期間は HIS の高い症例ほど生存期間は短い傾向がみられた (Fig. 4).

考 察

肝転移を伴う胃癌は進行した症例が多く、また、多くの場合、他の非治癒切除因子を合併していることもあり、その治療成績はきわめて不良である。しかしながら、近年、積極的に原発巣ならびに肝転移巣の切除が施行され、長期生存例も報告されている^{7)~10)}。また、

Table 9 The correlation between HIS and lymphatic invasion (a), and between HIS and vascular invasion (b)

a)

	Synchronous liver metastasis	Metachronous liver metastasis	No recurrence	Total
ly(-)	35.46 (n= 1)	81.62 (n= 1)	55.45±19.09 (n= 4)	56.48±20.84 (n= 6)
ly(+)	84.73±45.67 (n=12)	68.95±28.28 (n= 7)	68.89±22.72 (n= 5)	76.83±36.89 (n=24)

b)

	Synchronous liver metastasis	Metachronous liver metastasis	No recurrence	Total
v(-)	39.93±18.65 (n= 4) **	55.77±22.82 (n= 3)	53.41±17.56 (n= 6) *	49.81±18.71 (n=13) **
v(+)	99.16±42.47 (n= 9)	79.39±26.70 (n= 5)	81.93±13.97 (n= 3)	90.31±34.62 (n=17)

* : p<0.05
** : p<0.01

Fig. 3 HIS and microscopic findings : Gastric cancers with vascular invasion showed higher HIS values than without vascular invasion. Thirteen of 14 metastatic gastric cancers with vascular invasion were medullary or intermediate type cancers.

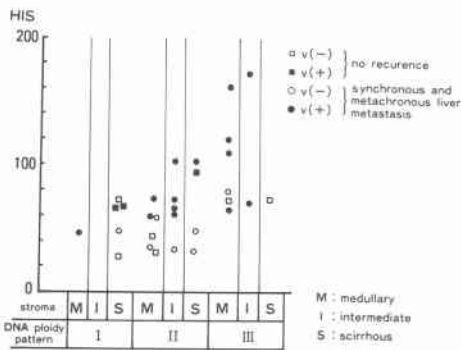
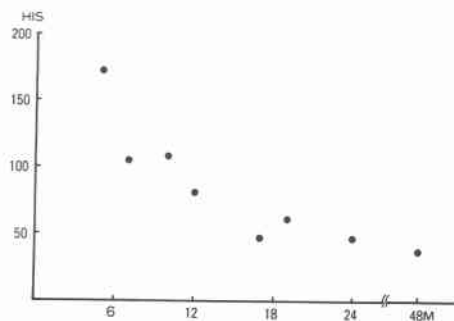


Fig. 4 Postoperative survival time of patients with metachronous liver metastasis: Patients with higher HIS gastric cancer had shorter survival times after gastrectomy.



動注化学療法などの集学的治療法の有効性も報告されてきている¹²⁾。しかし、胃癌治癒切除後の肝再発例も決してまれではなく、術後早期からの肝転移に対する対策が必要となってくる。そこで、肝転移胃切除症例および治癒切除後再発が肝転移であった症例を対象に病理組織学的ならびに細胞核 DNA 量の面から、肝転移をきたしやすい胃癌の特徴を検討した。

肝転移を伴った胃癌は、開腹時すでに進行した症例が多く、米村ら¹¹⁾は他の非治癒因子合併例は約88%と高率であったと報告している。今回の対象症例は胃切

除を行った症例ではあるが他の非治癒因子合併例は47.4%とやはり高率であった。

肉眼型では1型・2型の限局型が多いとされている¹²⁾。自験例では2型・3型の潰瘍形成胃癌が多い傾向がみられたが、10生例と比較して有意な差はなかった。

組織型では、乳頭状腺癌あるいは分化型腺癌に肝転移の頻度が高い⁷⁾¹²⁾¹³⁾とされているが、木村ら¹⁴⁾は低分化腺癌でも髄様型増殖を示す症例は肝転移をきたしやすいと報告している。自験例でも同様に組織型による差は見られなかったが、間質量との関係では肝転移例・肝再発例の髄様型・中間型は23例(79%)にみられ、10生例の5例(41.7%)と比較して高率(p<0.05)であり、髄様型・中間型増殖を示す症例は肝転移をき

たしやすいと思われた。

DNA量 ploidy pattern では、肝転移をきたす症例は aneuploidy pattern を示す症例が多く¹¹⁾¹⁵⁾、肝転移巣の ploidy pattern は原発巣と同一の ploidy pattern を示す症例が多い¹⁶⁾が、一致しない場合でも、肝転移巣において、high ploidy cell の出現頻度が高くなる¹¹⁾¹⁶⁾とされている。自験例でも6例中5例にDNA ploidy pattern が一致しており、1例は原発巣II型、肝転移巣III型と転移巣においてhigh ploidy化した症例であった。

今回著者らは、DNA ploidy pattern をより客観的に表現する方法として heterogeneity index score (HIS)⁹⁾を求め検討した。HISは最初の明らかな peak (2n)を示す細胞集団以外の細胞の平均DNA含量を示すことになり、S期、G₂+M期、および4n以上の細胞が全て含まれることになる。すなわち、S期細胞の増加、high ploidy cell の増加および tetraploidy pattern を示す症例においてこの値は増加すると考えられる。Tachibana ら⁹⁾は膀胱腫瘍においてHISが腫瘍の悪性度に準じてよく相関し、腫瘍の分化の程度を表現する指標となりうると報告した。今回の著者らの検討では癌細胞のHISは胃の正常粘膜と比較して有意に高値であり(p<0.01)、DNA ploidy pattern で diploid pattern を示した症例でもHISは高値であったことから癌細胞集団の中にはDNA ploidy pattern では解析し難い high ploidy cell が存在することを示唆するものと思われた。

一方、癌細胞核DNA量は悪性度をよく反映するとされ、high ploidy cell の出現率が高い症例では脈管侵襲陽性率が高く、肝転移・リンパ節転移をきたしやすく、予後不良である¹¹⁾¹⁷⁾とされている。自験例でも同様に静脈侵襲陽性例でHISは陰性例と比較して有意に高値(p<0.01)であった。しかし、静脈侵襲陽性例においては肝転移例、肝再発例および10生例との間に有意の差は見られなかった。こうした結果からHISの高い症例では増殖活性が高く静脈侵襲を来しやすいが、肝臓への着床・転移形成は異なった因子によるものと思われた。その1つの因子として北岡ら¹⁸⁾は細胞相互の接合の緊密さをあげ、さらに木村ら¹⁴⁾は髄様型増殖パターンを指摘している。自験例でも、10生例の静脈侵襲陽性であった3例は高いHISを示したがすべて硬性型増殖であったのに対し、肝転移例・肝再発例では14例中13例が髄様型・中間型増殖を示したことから、転移形成には増殖様式が関与していることが示唆され

た。

また、肝再発例において原発巣のHISの高い症例ほど予後は不良であったことから、原発巣のHISは肝転移形成後の転移巣の増殖活性の1つの指標となりうることを示唆された。

本論文の要旨は第34回日本消化器外科学会総会(平成元年7月13日)において発表した。

文 献

- 1) 奥山和明, 磯野可一, 佐藤裕俊: 手術適応とその限界. 4. 消化器癌の肝転移に対する手術適応と持続動注療法の効果. 日臨外医会誌 43: 349-353, 1982
- 2) 井上和則, 田淵芳樹, 斉藤洋一: 肝転移をともなう胃癌に対する治療法の選択. 消外 9: 325-332, 1984
- 3) Friendlander ML, Hendly DW, Taylor IW: Clinical and biological significance of aneuploidy in human tumors. J Clin Pathol 37: 961-974, 1984
- 4) Kokal WA, Duda RB, Azumi N et al: Tumor DNA content in primary metastatic colorectal carcinoma. Arch Surg 121: 1434-1439, 1986
- 5) Armitage NC, Robins RA, Evance DF et al: The influence of tumor cell DNA abnormalities on survival in colorectal cancer. Br J Surg 72: 828-830, 1985
- 6) Tachibana M, Addozio JC, Chiao JW et al: Heterogeneity index score (HIS): New computerized method for classification of human bladder carcinomas using flow-cytometry. Urology 26: 355-361, 1985
- 7) 太田博俊, 高木国夫: 肝転移胃癌の検討. 消外 4: 999-1004, 1981
- 8) 中西昌美, 佐野秀一, 葛西洋一: 肝転移を伴う胃癌の病態と手術適応. 消外 7: 1529-1533, 1984
- 9) 黒田芳隆, 辻 政彦, 喜多一郎ほか: 肝転移を伴う胃癌に対する治療法の選択とその治療成績. 日臨外医会誌 47: 9-15, 1986
- 10) 小坂健夫, 菅原正都, 山口明夫ほか: 胃癌肝転移長期生存例の1例. 癌の臨 33: 221-216, 1987
- 11) 米村 豊, 宮崎逸夫: 肝転移を伴う進行胃癌の治療. 消外 9: 1737-1747, 1986
- 12) 西 満正, 田村竜男: 肝転移胃癌の臨床的研究. 癌の臨 8: 433-442, 1962
- 13) 橋本 謙, 掛川暉夫, 武田仁良ほか: 肝転移を有する胃癌に対する臨床的検討. 日消外会誌 19: 752-756, 1986
- 14) 木村 修, 万木英一, 岡本恒之ほか: 肝転移・肝再発のみられた胃癌の病理組織学的特徴, とくに髄様型低分化腺癌について. 癌の臨 30: 131-137,

- 1984
- 15) 西村昌憲, 曾和融生, 鄭 容錫ほか: 癌細胞核 DNA ヒストグラムからみた胃癌リンパ節および肝転移巣の検討. 日消外会誌 22: 913-918, 1989
- 16) 古田雄一, 小堀鷗一郎, 森岡恭彦ほか: ヒト胃癌原発巣と転移巣の癌細胞核 DNA 量についての比較検討. 癌の臨 33: 1777-1782, 1987
- 17) 芳野裕明, 曾和融生, 蔡 榮若ほか: 核 DNA 蛍光測定による胃癌の検討. 日消病会誌 83: 1960-1967, 1986
- 18) 北岡久三, 舛井恵一, 広田映五: 細胞間結合様式と転移-胃癌の門脈血行性転移-. 癌の臨 18: 534-537, 1972

A Study of Nuclear DNA Histograms in Gastric Cancer with Liver Metastasis

Yuji Yamamoto, Tomishige Amano, Toshio Imada, Makaoto, Akaike, Satoshi Tamura,
Yoshikazu Noguchi, Norio Aoyama, Masao Abe, Akira Tsuburaya,
Yasushi Rino and Akihiko Matsumoto

First Department of Surgery, Yokohama City University School of Medicine

Nuclear DNA histograms of 21 gastric cancers with synchronous or metachronous liver metastasis were analyzed to investigate the characteristics of gastric cancer with liver metastasis. All of the gastric cancers with synchronous liver metastasis were aneuploid and 75% of those with metachronous liver metastasis were also aneuploid. The mean heterogeneity index score (HIS) of the cancers was 78.62 ± 36.21 , a higher value than that of normal tissue ($p < 0.01$). The mean HIS of cancers with vascular invasion was higher than that of those without vascular invasion ($p < 0.01$), but there was no correlation between a high HIS and liver metastasis. Microscopic examination revealed that the incidence of the medullary or intermediate type of carcinoma was more frequent in patients with liver metastasis. It is suggested that high HIS gastric cancer can be a risk factor of liver metastasis because of its high incidence of vascular invasion, and that the amount of interstitial connective tissue can be also connected with liver metastasis.

Reprint requests: Yuji Yamamoto First Department of Surgery, Yokohama City University School of Medicine
3-46 Urafune-cho, Minami-ku, Yokohama, 232 JAPAN