

膵癌の神経浸潤と神経特異抗原および神経接着分子 (NCAM) との関連

岡山大学医学部第1外科 (主任: 折田薫三教授)

剣 持 雅 一

癌細胞の神経周囲浸潤は膵癌の予後規定因子として重要である。今回、膵癌の神経親和性の有無を検討する目的で抗神経特異蛋白および抗神経接着分子(NCAM)を用いて免疫組織学的検討を行った。(対象)教室における過去5年間の膵癌切除例42例中19例を対象とした。stageはII: 1例, III: 5例, IV13例, で膵内神経浸潤は ne_0 : 3例, ne_1 5例, ne_2 : 4例, ne_3 : 7例, であった。S-100蛋白, synaptophysin, substance-P, enkephalin, NSE, NCAM, chromograninの7種の抗体を用い免疫染色を行い, 陽性を1点としスコア化した。(成績)膵癌進行度と ne の間に相関は認められなかった。抗NSE, chromogranin抗体以外では癌細胞はさまざまな程度に染色された。各症例の染色スコアと神経浸潤度との間に相関を認めた。以上, 神経浸潤の強い膵癌細胞では, 多数の神経特異抗原を発現し, 神経接着分子で神経を認識し特異的に神経浸潤を起こす可能性が示唆された。

Key words: perineural invasion, neuro-endocrine differentiation, neural cell adhesion molecule

はじめに

癌細胞の神経周囲浸潤は膵癌の予後規定因子として重要である。神経周囲浸潤は, 癌細胞が神経周膜の内側を連続的に進展するため外科的治療において残存する可能性が高く, 局所再発の大きな要因と考えられている。膵癌に神経浸潤が多い理由として, 膵が自律神経組織に接しているという解剖学的特徴を主とする報告¹⁾が多いが, Jentzer²⁾のいう“neurotropism”つまり, 膵癌細胞が神経親和性を有し perineural space に沿って進展するという生物学的特性によるためという報告もある。

今回われわれは膵癌の神経親和性の有無を検討する目的で, 抗神経特異蛋白および抗神経接着分子を用いて免疫組織学的検討を行った。neuron specific enolase (NSE)³⁾, S-100³⁾, chromogranin³⁾, synaptophysin³⁾は神経内分泌細胞および腫瘍に特異的に発現する物質であり, substance-P, enkephalin は神経伝達物質である。Neural cell adhesion molecule (NCAM) は1977年, Edelman⁴⁾らが抽出に成功したポリペプチドで, 神経細胞間, および神経と筋とのシナプス形成に関与し, 細胞と細胞の間に分子結合を生じさせ, 細胞凝集を起

こす性質を有す。これらの物質に対する抗体を用いて, 膵癌細胞と神経との親和性を調べた。

対 象

1983年1月から1988年7月までの間に岡山大学第1外科で切除された膵癌42例中, 組織学的に神経浸潤の有無につき検索可能であった19例を対象とし, 膵癌取扱規約に準じて臨床病理学的に検討した。また, 島細胞癌, 膵腺房細胞癌は除いた。

方 法

新鮮凍結標本2例, ホルマリン固定標本19例をH.E.染色およびTable 1に示す7種の抗体を用い, 次のごとく avidin-biotinyl enzyme complex method (ABC法)による免疫組織染色を行った。新鮮凍結切片はアセトン固定, ホルマリン固定切片は脱パラの後, 0.3%過酸化水素化メタノールにて, 内因性ペルオキシダーゼを除去する。PBS洗浄後, 2次抗体と同一の正常動物血清を反応させる。次に, Table 1に示す1次抗体を室温1時間, 湿室中で反応させる。同様に湿室中でビオチン化2次抗体, avidin-biotinylated peroxidase complexを反応させた後, diaminobenzidine (DAB)にて発色し, ヘマトキシリンまたはメチルグリーンにて核染色を施行した。判定は, 200倍顕微鏡下で, 明かに染色性の認められるものを1, 全く認められないものを0とし, 各症例をスコア化した。

<1990年7月10日受理>別刷請求先: 剣持 雅一
〒700 岡山市鹿田町2-5-1 岡山大学医学部第1外科

Table 1 Characterization of antibodies used ABC staining

	Reagent	Host	Dilution	Source	specificity
NSE	poly	rabbit	kit. dil.	BIO GENEX	neuron neuro-endocrine cell
Chromogranin	mono	mouse	kit. dil.	LIPSHAW	neuro-endocrine cell
S-100	mono	mouse	1:100	JIMRO	neuron muscle exocrine cell
Synaptophysin	mono	mouse	1:25	ICN	presynaptic-vesicle
Substance-P	poly	rabbit	kit. dil.	BIO GENEX	neuro-transmitter
Enkephalin	poly	rabbit	1:1000	CHEMICON	neuro-transmitter
NCAM	mono	rat	1:10	CHEMICON	neuron glial cell

Table 2 Clinico-pathological findings of 19 pancreatic carcinoma cases

Average age 58.8 years (35-77 years)
 Sex ♂ : ♀ = 12 : 7

Stage	0 case	tumor size	T ₁	0 case
I				
II	1		T ₂	6
III	5		T ₃	6
IV	13		T ₄	7

ne ₀	3
ne ₁	5
ne ₂	4
ne ₃	7

統計処理は Student's t-test, カイ 2 剩検定, 生存率の比較は Kaplan-Meier 法で累積生存率を求め Cox-Mantel 検定を用い有意差を検定した。

結 果

1. 臨床病理学的特徴：対象19例の内訳は男性12例, 女性7例, 平均年齢は58.8歳であった (Table 2). Stage分類は, Iが0例, IIが1例, IIIが5例, IVが13例で, 腫瘍の大きさは, T1症例はなく, T2: 6例, T3: 6例, T4: 7例であった。また, H.E.染色による検討では膵内神経浸潤は ne₀が3例, ne₁が5例, ne₂が4例, ne₃が7例と84%に神経浸潤陽性であった。

2. 膵癌の神経浸潤と臨床病理学的因子との関係：神経浸潤とその他の臨床病理学的因子との相関をカイ 2 剩検定を用い検討した。膵癌の進行度, 腫瘍の大きさと神経浸潤の間には相関は認められなかった。また, 静脈侵襲, リンパ管侵襲との間にも相関は認められなかった。組織分化度と神経浸潤との関係を見ると (Table 3), 高分化型癌と中分化型癌は全例が, ne₁以上であったのに対し, 低分化型癌の症例は, 1例を除く3例が ne₀であった。分化度の高いものに, 有意に神経浸潤陽性例が多いという結果であった (p<0.05)。

Table 3 Relationship between histological type and the grade of perineural invasion in pancreatic carcinoma

	well	mod.	poor
ne ₀	0	0	3
ne ₁	2	2	1
ne ₂	3	1	0
ne ₃	5	2	0

X² = 35.814
P < 0.05

Table 4 Results of neuro-endocrine markers and NCAM staining and clinicopathological findings of each cases

CASE NUMBER	NCAM	S-100	Synapt.	Sub-P	ENK	ne	H	Recurrence	Prognosis (months)
1	-	+	-	-	+	0	3	H	2 D
2	-	-	-	-	-	0	1	H	2 D
3	-	+	-	-	-	1	3	H L	3 D
4	-	-	-	-	-	0	0		3 D
5	-	-	-	-	-	3	0	H	6 D
6	-	-	-	-	-	1	1	H L	7 D
7	-	-	-	-	-	2	0	H L	11 D
8	-	+	-	-	-	2	0	L	15 D
9	+	+	+	+	-	3	0	H L	4 D
10	+	+	+	+	+	3	0		4.5 D
11	+	+	+	+	-	3	0		10 D
12	+	-	-	+	-	1	0	H L	15.5 D
13	+	+	+	+	-	2	0		15.5 D
14	+	+	+	+	+	2	0	L	18 D
15	+	+	+	+	+	3	0		21 D
16	+	+	+	+	+	3	0		24 A
17	+	+	+	+	+	1	0		25 A
18	+	+	-	-	-	1	0		38 A
19	+	+	+	+	+	3	0		U

H, liver metastasis A, alive
L, Local recurrence D, died
U, unknown

3. 膵癌の神経浸潤と神経特異抗原との関係：神経特異抗原と神経浸潤との関連をみるため, 対象19例を7種の抗神経特異蛋白抗体を用い免疫組織染色を行った。抗 NSE 抗体, 抗 Chromogranin 抗体では膵癌細胞は染色されず, 正常ラウ細胞のみ染色された。ほかの5種の抗体では膵癌細胞が染色され (Fig. 1), それぞれの抗体による染色陽性を1, 陰性を0とし, 各症例を0から5で評価し, 神経浸潤度と比較した。Fig. 2のごとくすべての抗体で染色されなかった score 0では ne₀ 2例, ne₁, ne₂, ne₃に1例ずつ認め, score 1は ne₁, ne₂が1例ずつ, score 4, 5では全例, ne₂, ne₃の症例であった。平均染色 score は ne₃; 3.9点, ne₂; 2.5点, ne₁; 1.6点, ne₀; 0.7点と染色スコアと神経浸潤度間に相関を認めた (相関係数 r=0.607, p<0.01)。次に, Table 5に示す各抗原と神経浸潤度との関係を見ると, ne 陽性例の S-100出現率は69%, synaptophysin: 63%, substance-P: 56%, enkephalin: 31%, NCAM: 69%であり, 正診率は S-100が68%, synaptophysin: 63%, NCAM: 74%と神経浸

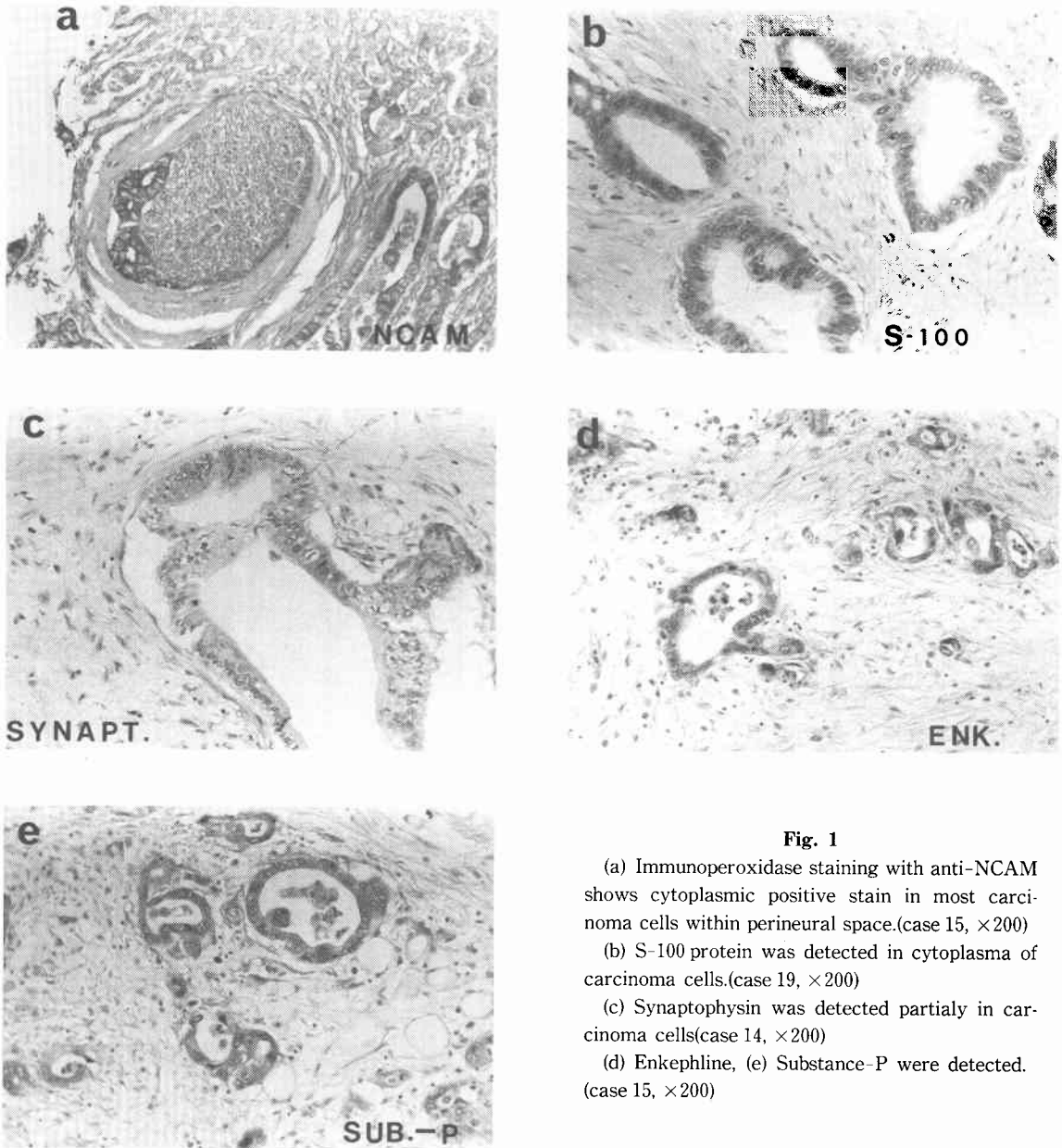


Fig. 1

(a) Immunoperoxidase staining with anti-NCAM shows cytoplasmic positive stain in most carcinoma cells within perineural space.(case 15, $\times 200$)

(b) S-100 protein was detected in cytoplasm of carcinoma cells.(case 19, $\times 200$)

(c) Synaptophysin was detected partially in carcinoma cells(case 14, $\times 200$)

(d) Enkephaline, (e) Substance-P were detected. (case 15, $\times 200$)

潤陽性と NCAM 発現との間に有意の相関を認めた ($p < 0.05$).

NCAM の発現を stage 別にみると, stage II では, NCAM 陽性症例は 1 例, 陰性例は 0 例, stage III においては陽性例 4 例, 陰性例 1 例, stage IV ではそれぞれ 6 例と 7 例であり, 膵癌の進行度と癌細胞の NCAM 発現との間には相関は認められなかった.

4. 肝転移および再発形式と膵癌細胞の NCAM 発

現との関係: 同時性および異時性肝転移と NCAM との関係を見ると (Table 6), NCAM 陰性 8 例中 6 例 (75%) に肝転移を認めたのに対し, NCAM 陽性 11 例中肝転移を認めたものは 2 例 (1.9%) で, NCAM 陰性例が有意に肝転移が多かった ($p < 0.05$). 局所再発と NCAM との関係は認められなかった.

5. NCAM 発現の有無と術後生存率との関係: Kaplan-Meier 法による累積生存率を NCAM 発現の

Table 5 Comparison of positive ratio with neuro-endocrine markers between neural invasion positive and negative

	S-100	Synapt.	Sub-P	ENK.	NCAM
ne (-)	1/3 (33%)	0/3 (0%)	0/3 (0%)	1/3 (33%)	0/3 (0%)
ne (+)	11/16 (69%)	10/16 (63%)	9/16 (56%)	5/16 (31%)	11/16 (69%)

Fig. 2 Correlation of staining score with perineural invasion

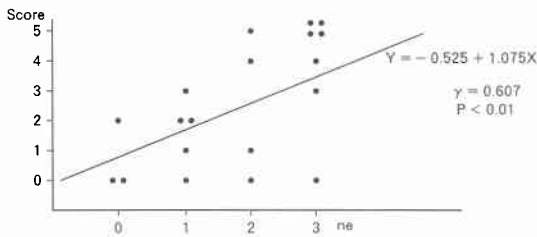
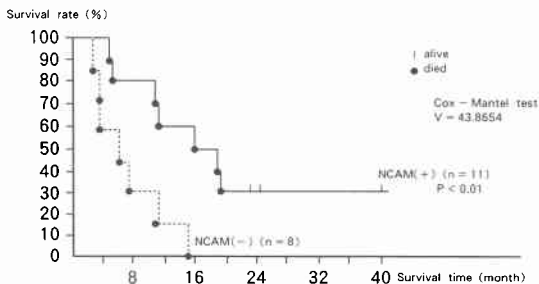


Table 6 Relationship between liver metastasis and NCAM stainings

	Liver Metastasis			total
	(+)	(-)	Unknown	
NCAM (+)	2	4	5	11
NCAM (-)	6	1	1	8
total	8	5	6	19

$\chi^2 = 6.146$
 $P < 0.05$

Fig. 3 Survival curves of pancreatic carcinoma cases in the view point of NCAM staining. NCAM positive cases were significantly higher survival rate than NCAM negative cases.



有無で比較すると (Fig. 3), NCAM 陽性症例の平均生存期間は12.5か月, それに対し, 陰性例のそれは5.4か月と NCAM 陽性例の予後が良好であった。

考 察

癌の神経浸潤は頭頸部⁹⁾, 乳腺, 前立腺⁷⁾などの癌について報告されており, リンパ管侵襲, 静脈侵襲とは全く異なる癌進展経路と考えられている。膵癌においても Miller⁸⁾らは73%, 長与ら⁹⁾は53.5%, 永川ら¹⁰⁾は100%, 大山ら¹¹⁾は92%に神経浸潤を認めたと報告しており, われわれの症例においても, 84%に神経浸潤を認め, 膵癌の癌進展経路として重要な経路と考えられた。

膵癌の予後を不良としているものに, 局所再発, 肝転移があり, 膵癌の局所再発の要因の1つとして神経浸潤の関与が考えられている。なぜ膵癌細胞が神経に沿って連続的に浸潤していくのかについては, Ernst¹²⁾は癌の神経浸潤を神経周囲リンパ管への浸潤として報告しており, perineural space とリンパ管との接合の可能性からリンパ管浸潤と考えられていたが, Hassen¹³⁾, Bock¹⁴⁾らは, perineural space にはリンパ管は存在せず, リンパ管浸潤と異なる進展経路だと報告している。われわれは膵管細胞が癌化する過程で, 同じ膵原基の導管上皮より発生したラ島細胞と同様に神経内分泌機能を発現し, 神経との間に親和性を獲得したのか, あるいは膵癌細胞の細胞膜に特異的な神経との接着レセプターが発現し, 神経浸潤を起こしやすくなったのではないかと仮定した。Papotti ら¹⁵⁾は乳癌細胞の中に神経内分泌機能を持った細胞を認め, synaptophysin の発現と神経内分泌機能の獲得との間に相関があったと報告している。また, DiSant'Agnese ら¹⁶⁾は神経浸潤が多いといわれている前立腺癌においても神経内分泌機能を有する癌細胞の存在を報告している。われわれの研究でも, 神経浸潤の63%に synaptophysin の発現を認め, S-100蛋白, enkephaline, substance-P などの神経特異蛋白の発現を認めていることより膵癌細胞が神経内分泌機能を有することが示唆された。

Rutishauser らによれば, NCAM は主に神経細胞間, 神経と筋肉とのシナプス形成など, 細胞認識と接着凝集に関係した分子と考えられており¹⁷⁾¹⁸⁾, NCAM に対する抗体により神経細胞の細胞間接着, 神経筋接合部の形成が阻害されたと報告している。膵癌細胞が, この NCAM を有していることより, 膵癌細胞同士が NCAM で結合すると同時に, 神経を認識し, これに近づき連続的に進展していく可能性を考えた。以上より, 分化度の高い膵癌のある種のもの, 神経内分泌機能を有するとともに, NCAM を発現して, 神経浸潤を起

こすものと考えられた。また、Linnemannら¹⁹⁾は、メラノーマ細胞の転移とNCAMとの関係を報告し、NCAMの減少した細胞に血行性転移が多かったと報告している。NCAMは細胞の接着に関連した糖蛋白であり、この糖蛋白の減少により癌細胞が遊離しやすくなり、肝転移が促進された可能性が示唆された。われわれの研究でも、NCAM陰性例に肝転移が多く、同様の結果となった。

対象症例が19例と少ないため、結論づけることはむずかしいが、膵癌細胞のNCAMの発現と、神経浸潤、肝転移との間の関連については今後ともさらに検討を要すると思われる。

稿を終えるに当たり、御指導、御校閲を賜りました恩師折田薫三教授に深甚なる謝意を捧げるとともに、直接御指導を頂きました合地 明博士ならびに第1外科教室諸兄に感謝の意を表します。

なお、本論文の一部は第48回日本癌学会総会、第90回日本外科学会総会にて発表した。

文 献

- 1) 植松繁人, 尾形佳郎: 膵癌の切除後生存率を決める諸因子—神経浸潤. 日臨 44: 1766—1769, 1986
- 2) Jentzer A: Neurotropisme des cellules cancerueuses Clinique et therapeutique des cancers neurotropes. Am J Cancer 16: 37—37, 1932
- 3) 中島 孝: 神経組織抗原の免疫組織化学. 病理と臨 6: 134—140, 1988
- 4) Gould VE, Wiedenmann LI, Schwachheimer K et al: Synaptophysin expression in neuroendocrine neoplasms as determined by immunocytochemistry. Am J Pathol 126: 243—257, 1987
- 5) Edelman GM: Cell adhesion molecule. Science 219: 450—457, 1983
- 6) Ballantyne AJ, McCarten AB, Ibanez ML: The extension of cancer of the head and neck through peripheral nerves. Am J Surg 106: 751—767, 1963
- 7) Rodin AE, Larson DL, Roberts DK: Nature of the perineural space invaded by prostatic carcinoma. Cancer 20: 1772—1779, 1967
- 8) Miller JR, Baggenstoss AH, Comfort MW: Carcinoma of the pancreas, Effect of histological type and grade of malignancy on its behavior. Cancer 3: 233—241, 1951
- 9) 長与健夫, 村上信之, 松岡幸彦: 胆嚢癌, 胆管癌及び膵管癌の局所神経侵襲について. 癌の臨 22: 1406—1409, 1976
- 10) 永川宅和, 東野義信, 宮崎逸夫: 膵, 胆道系癌の神経周囲浸潤について. 胆と膵 5: 1031—1033, 1984
- 11) 大山廉平: 膵癌切除例の臨床病理学的研究—臨床病理学的にみた予後左右因子及びリンパ節転移の検討. 日外会誌 85: 820—834, 1984
- 12) Ernst P: Uber das Wachstum und die Verbreitung Bostariger Geshwulste insbesondere des Krebses in den Lymph-Bahnen der Nerven. Beitr Pathol Anat (Suppl): 7: 29—51, 1905
- 13) Hassen MO, Makesem J: The prostatic perineural space and its relation to tumor spread. Am J Surg Pathol 4: 143—148, 1980
- 14) Bock P, Hanak H: Die verteilung exogener peroxydase im endoneuralraum. Histchemie 25: 361—371, 1971
- 15) Papotti M, Macri L: Correlative study on Neuro-Endocrine differentiation and presence of somatostatin receptors in beast carcinomas. Int J Cancer 43: 365—369, 1989
- 16) Di Sant' Agnese PA, De Mesy Jensen KL: Neuron-endocrine differenciation in prostatic carcinoma. Human Pathol 18: 849—856, 1987
- 17) 村松 喬: 免疫グロブリンファミリーに属する接着レセプターの機能. 細胞工学 18: 489—496, 1989
- 18) Acheson A, Rutishauser U: Neural cell adhesion molecule regulates cell contact-mediated changes in choline acetyltransferase activity of embryonic chick sympathetic neurons. J Cell Biol 106: 479—486, 1988
- 19) Linnemann D, Avraham RAZ, Bock E: Differential expression of cell adhesion molecules in variants of K 1735 melanoma cells differing in metastatic capacity. Int J Cancer 43: 709—712, 1989

**Relationship Between Perineural Invasion and Expression of
Neuro-endocrine Markers and Neural Cell Adhesion
Molecule in Human Pancreatic Carcinoma**

Masaichi Kenmotsu

First Department of Surgery, Okayama University Medical School

Perineural invasion is one of the significant prognostic factors of pancreatic carcinoma. To clarify the relationship between the expression of neuro-endocrine (NE) markers and perineural invasion in human pancreatic carcinoma, tissue specimens from a series of 19 patients who were operated between January 1983 and August 1989 in our department were stained immunohistochemically with specific NE markers (i.e., NSE, Synaptophysin, Chromogranin, S-100 protein, Substance-P, Enkephaline) and with neural cell adhesion molecule (NCAM) MoAb. The staining method was immunoperoxidase staining with avidin-biotinylated peroxidase complexes. There were no carcinoma cells stained by NSE or Chromogranin in any specimens. Any specimens from 11 cases were positively stained by NCAM MoAb and at least one of 4 NE markers. On the other hand, 8 patients were negative for all of them. Specimens from 16 patients (84%) revealed perineural invasion when stained with hematoxylin and eosin. Perineural invasion of pancreatic carcinoma was significantly related to the expression of NCAM and 4 NE markers ($p < 0.01$). In particular, the expression rate was increased in carcinoma cells which invaded the perineural space. NCAM-positive patients showed much less a liver metastasis and had a better prognosis than NCAM negative patients. Our results indicate that NE differentiation may occur in some pancreatic carcinoma cells and especially that NCAM may be involved in perineural invasion through its neural affinity. Pancreatic carcinoma cells which express NCMA may have neural affinity.

Reprint requests: Masaichi Kenmotsu First Department of Surgery, Okayama University School of Medicine
2-5-1 Shikata-cho, Okayama City, 700 JAPAN
