

大腸癌原発巣のラミニン染色と肝転移に関する研究

近畿大学第1外科

松田 泰次 赤埴 吉高 足立 俊之
肥田 仁一 森 亘平 安富 正幸

大腸癌原発巣192例と肝転移巣17例について、ラミニン(LN)の免疫組織学的研究を行いLNの局在性と癌の浸潤・転移との関係について検討した。大腸癌原発巣での腺管基底膜のLNの局在は、症例によっても、同一切片内でも均一ではなかった。そこで病巣を3層に分類し、3層のうち2層以上がLN染色(+)のものをLN陽性症例と判定基準を決定した。肝転移例原発巣ではLN陽性率は83.1%(59/71)と非肝転移例19.0%(23/121)に比べ有意に高率であり、しかも先進部で強いLN染色性を示すのが特徴であった。肝転移巣では、LNは94.1%と高率にしかも均一にみとめられた。肝転移巣がLN陽性で原発巣が陰性の症例では原発巣のLN(+)の部分の組織型が肝転移巣と類似していた。以上よりLN陽性のものほど肝転移をおこしやすく、LNは癌に付随する物質であって、壁内進展のバリアーと考えがたい。

Key words: immunohistology, laminin, colo-rectal cancer

I. はじめに

ラミニン(LN)はtype IV collagen (CIV) などとともに、基底膜の主要構成成分である。基底膜は形態学的に上皮組織と間質結合織の境界に位置することから、浸潤の最初のバリアーと考えられてきた。Liotta¹⁾は、癌細胞が間質結合織内に浸潤するためには、matrix degrading enzymeによる基底膜破壊が必要であるとし、この説をうけて、Forster²⁾、Burtin³⁾は免疫組織学的研究により、LN消失例ほど浸潤能、転移能が高いことを報告している。

一方、これら‘基底膜破壊説’と異なる報告も多くみられる。元来LNは接着能を持つ細胞外マトリックスで、培養細胞に加えることにより転移能が増強したこと⁴⁾、あるいはLNレセプターに拮抗阻害するLNフラグメントにより肝転移が抑制したこと⁵⁾が報告されている。さらに、数多くのヒト腫瘍細胞がLN、CIVを産生し、基底膜形成能を持つことが明らかになってきた^{6)~8)}。以上のことから、基底膜は癌の浸潤に対するバリアーで、この破壊が転移と一元的に因果関係にあるとする考え方には無理がある。

そこで、本研究ではLNの免疫組織学的研究を行い、大腸癌原発巣および肝転移巣におけるLNの局在性の相違を明らかにするとともに、LNの局在性と癌の浸潤、転移の関係を明らかにしようとした。

II. 対象および方法

最近9年間に教室で切除された大腸癌で、壁深達度が固有筋層以上(Dukes B, C)の192例を対象とした。うち肝転移例(異時性、同時性を含む)は71例である。肝転移巣17例についても検討を加えた。

切除材料は直ちに10%中性ホルマリンで48時間固定し、1個は病巣の中心を通る少なくとも3個の小片を採取し、パラフィン包埋ブロックを作成した。厚さ6 μ mの切片を作成しLN染色を行った。LN染色はavidin-biotin-peroxidase complex (ABC)法⁹⁾に準じて行った。方法をTable 1に示すが、重要ポイントをあげると、酵素処理は、0.02%CaCl₂および0.02%トリプシン(1:250, Difco社)の混合溶液(pH 7.8)を用いて、37 $^{\circ}$ C、40分間処理した。1次抗体はウサギ抗LN抗体(Chemicon社)(1:100 in PBS)を用いて37 $^{\circ}$ C、90分間インキュベートした。ABC法にはPeroxidase Rabbit IgGキット(Vector社)を使用した。その他、内因性ペルオキシダーゼ阻止のため、脱パラフィン後、0.3% H₂O₂加メタノールで30分間処理し、非特異的反応阻止の目的で、1次抗体で処理する前に10%正

*第36回日消外会総会シンポジウム・大腸癌の血行性転移
<1990年12月22日受理>別刷請求先: 松田 泰次
〒589 大阪狭山市大野東377-2 近畿大学医学部第1外科

Table 1 Technical procedures of immunohistochemical staining for lamimin (ABC method)

Formalin fixed, paraffin embedded sections
↓ (192 cases of colorectal cancer)
Deparaffinization
↓
Treatment with 0.3% H ₂ O ₂ in methanol
↓ (room temperature, 30 min)
Treatment with 0.02% trypsin (37°C, 40 min)
↓
Incubation with polyclonal anti-lamimin antibody diluted 1:100 in PBS
↓ (37°C, 90 min)
Incubation with biotinylated anti-rabbit IgG antibody diluted 1:200 in PBS
↓ (room temperature, 30 min)
Incubation with avidin-biotin peroxidase complex
↓ (room temperature, 30 min)
Incubation in 0.01% H ₂ O ₂ and 0.02% diaminobenzidine tetrahydrochloride in 0.05 M Tris buffer
↓
Nuclear staining

Fig. 1 The normal colo-rectal tissue. Linear staining is present at the basement membrane of the epithelium (→) and blood vessel (▶). (LN staining ×80)

常山羊血清により、37°C、20分間インキュベートした。対照試験には1次抗体に換えて非免疫血清（正常ウサギ IgG）を使用し、他の操作は同様に行った。

大腸癌の組織型、壁深達度などの病理組織学的所見の記載は「大腸癌取扱い規約」¹⁰⁾に従った。

統計学的処理は χ^2 検定により行い、 $p < 0.05$ の場合を有意差ありと判定した。

III. 結 果

1. 正常大腸癌におけるLNの局在

正常大腸組織では、LNは腺管上皮基底膜に明瞭に連続性に見られた。他に血管基底膜、筋肉組織基底膜にも認められた(**Fig. 1**)。したがって、癌組織におけるLN染色性は対照群と比較して判定したが、同時に同一切片内の正常腺管上皮基底膜および血管基底膜に、LNが明瞭に染色されていることを条件とした。

2. 大腸癌原発巣のLNの局在

1) LNの腫瘍内分布と染色性判定基準

大腸癌原発巣のLNの局在は、主に癌腺管上皮基底膜（基底部）と血管基底膜に認められた。血管基底膜は常に陽性であったが、腺管基底部のLN反応は症例により、あるいは同一切片内でも表層部と深部でしば

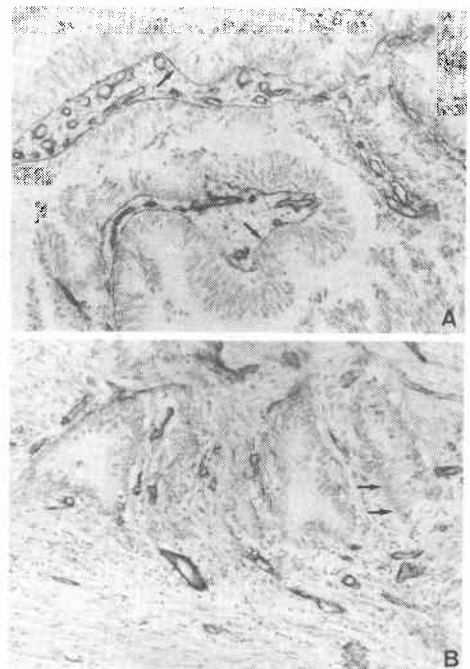
Fig. 2 Heterogeneity of LN staining in the primary lesion. A. In the mucosal and submucosal part, linear staining is present at the tumor-stromal border (→). B. In the part beyond the submucosal layer, LN staining isn't seen (→). (LN staining ×200)

Table 2 Distribution of laminin staining in colorectal cancer

Zone	Laminin							
	positive				negative			
pm+ss	+	+	+	-	-	-	+	-
pm+ss(a ₁)+s(a ₂)	+	+	-	+	-	+	-	-
	+	-	+	+	+	-	-	-
	61	33	8	4	0	8	97	12
	(74.4%)(15.9%)(9.8%)				(88.2%)(11.8%)			
	82/192(42.7%)				110/132(87.3%)			

Table 3 Relationship between laminin staining and liver metastasis

	Primary lesion		Liver metastatic lesion
	Without liver metastasis	With liver metastasis	
Laminin positive rate	23/121 (19.0%)	59/71 (83.1%)	16/17 (94.1%)

* p<0.01

Fig. 3 The deep zone of the primary lesion with liver metastasis. Linear staining is present around the glandular structure(→). (LN staining×200)

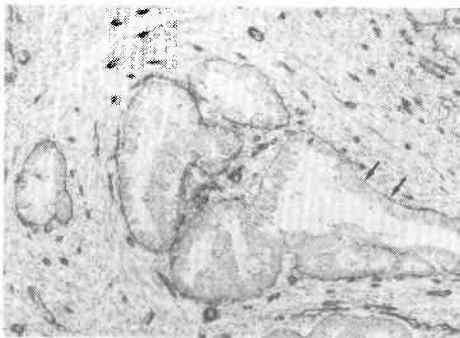


Fig. 4 The deepest part of the primary lesion. Linear staining is present around the glandular structure(→). A. one patient, B. another patient (LN staining×600)

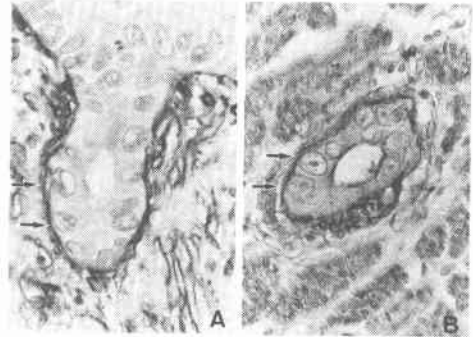
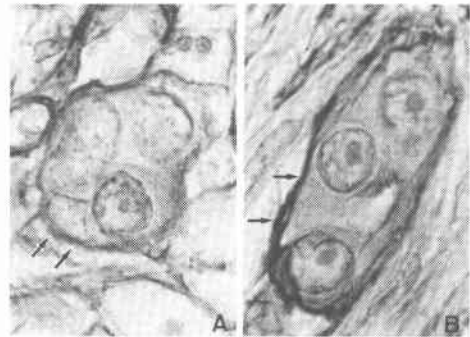


Fig. 5 The deepest part of the primary lesion. LN staining is present around the small nest of tumor cells (→), although the glandular structure is destroyed. A. one patient, B. another patient (LN staining×800)



みLN (+)であり、中間層、深層はLN (-)であった。すなわちLN染色性は粘膜下層と筋層を境界に変化する傾向があった。

2) 組織型および壁深達度とLN染色性

高分化腺癌のLN局在性はすでに述べたが低分化腺癌では癌細胞質内、癌細胞周囲、間質細胞のいずれにもLNは認められなかった。組織型別LN陽性率は、高分化腺癌40.2%、中分化腺癌44.0%、低分化腺癌で0%と高、中分化型でLN陽性率は高率となった(p<0.01)。

壁深達度とLN陽性率との関係は、pmで38.8%(14/36)、ss(a₁)43.3%(26/60)、s(a₂)45.2%(33/73)、si(ai)38.8%(8/23)であり、両者の間に相関は認められなかった。このことは対象症例がすべて

しば差異がみられた(Fig. 2)。そこで、腫瘍をTable 2に示すように3層に分け、周辺の正常組織の粘膜、粘膜下層に一致した部分を表層とし、筋層に一致した部分から癌先進部までを2等分し、中間層、深層と分類した。各層別のLN染色性は50%以上に反応が認められる場合にLN(+)と判定した。症例としてのLN染色性の判定は、3層のうち2層以上がLN(+)のものをLN陽性例とし、2層以上がLN(-)の場合にLN陰性例とした。この判定基準によるLN陽性率は42.7%である。LN陽性例の74.4%はすべての層でLN(+)であった。一方LN陰性例の88.2%は表層の

Fig. 6 Tumor cells invading blood vessels. LN staining is present around the small nest of tumor cells (\rightarrow). Basement membrane of the blood vessel is also stained strongly (\blacktriangleright). A. one patient, B. another patient (LN staining \times 600)

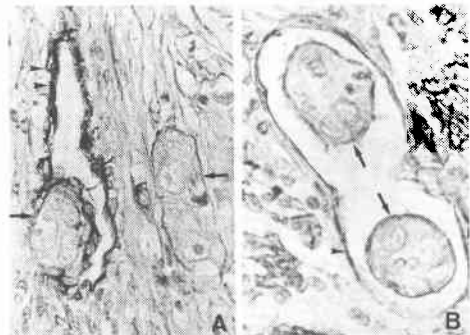
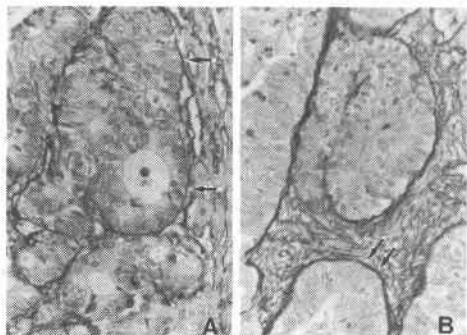


Fig. 7 The liver metastatic lesion. LN staining is present around the granular structure (\rightarrow). A. Tumor nest adjacent to hepatic cells, B. Tumor nest surrounded by the connective tissue (LN staining \times 400)



pm 以上であり、LN 染色の不均一性が粘膜下層と筋層を境界にして認められることから導びかれる。

3. 肝転移と LN 染色性の関係

1) 肝転移症例原発巣の LN 局在性

肝転移例原発巣の LN 陽性率は83.1% (59/71) であった (Table 3)。LN は表層、中間層のみならず深層にも認められた (Fig. 3)。さらに先進部でも強い反応がみられたことが特徴である。Fig. 4 は先進部の腺管構造が保たれた症例である。主病巣から離れた部位の小腺管にも腺管基底部に連続性に LN を認める。肝転移例の分化型腺癌ではこのタイプが最も多かった。しかし分化型腺癌でも先進部で腺管構造を示さないもの

もある。こういった症例でも、先進部で数個の癌細胞塊あるいは single cell に近い形で、間質内に浸潤している癌細胞の周囲に LN 染色を認めた (Fig. 5)。Fig. 6 は先進部で細静脈を侵襲している癌細胞で、細胞周囲に LN の局在を認めた。

2) 肝転移巣における癌 LN の局在

肝転移巣における癌腺管基底部の LN 陽性率は 94.1% と高率であった。肝転移巣では、原発巣と異なり組織型も LN 染色性もほぼ均一であり、LN は標本全野にわたり癌腺管基底部に強陽性を示すものがほとんどであった。増殖先端部では類洞内に癌細胞が脈管侵襲のごとく存在することもあるが、肝細胞を置換性に浸潤していることも多い (Fig. 7a)。腫瘍中心部で、腺管周囲が間質結合織でおおわれている部位でも、LN の局在はかわらなかった (Fig. 7b)。

IV. 考 察

LN の免疫組織学的研究は現在までのところ検索方法も確立されておらず、十分解明されているとはいえない。従来の研究結果によると、Burtin ら²⁾は蛍光抗体法、Forster ら²⁾は酵素抗体法を用いて、大腸癌の全症例で先進部の LN が完全消失し、LN 陰性例ほど浸潤能、転移能が高いことを報告している。しかし、本研究結果はこれらの報告と大きく異なっていた。すなわち、先進部での LN の完全消失は全例にみられず、しかも、この先進部陽性例が肝転移例に多くみられたことである。しかも、肝転移例では先進部の癌の腺管構造が維持されているものが多く、その周囲に LN が強陽性にみられた。さらに間質内に浸潤した癌細胞塊あるいは静脈を侵襲した癌細胞塊にも、周囲を取り囲むように LN の局在を認めた。

この相違の原因として、1つは染色方法、もう1つは判定方法があげられる。まず、染色方法に関して、著者らも Forster ら²⁾と同様にホルマリン固定切片を用いた。ホルマリン固定切片は酵素処理を十分に行うことが必要である。著者らは0.02%トリプシン溶液中に、37°C、40分間処理したが、これが最適条件と考える。ところで、LN に限らず免疫組織学的研究では固定法などの不良により染色されにくい標本がある。しかし、LN 染色では適正な標本ならば、必ず正常腺管および血管基底膜が染色される特徴があるので^{2,3)}、これらが染色されない場合は除外した。このことは非常に重要である。次に判定法について述べる。著者らは Forster ら²⁾と同様、原発巣内での基底膜 LN 染色性が均質でないことに注目した。LN 染色の不均質性は主と

して腸管垂直方向で見られ、しかも、多くは粘膜下層と筋層に一致した部位で変化していた。このことは Burtin³⁾、Forster²⁾も言及している。とすれば、彼らのように LN 染色性の判定を層を無視して腫瘍全体に占める割合で決定した場合には、壁深達度のすすんだ症例では、当然腫瘍全体に対して表層の占める割合が減少するため LN 陽性部の占める割合が低くなり、LN 陰性例と判定される。つまり、彼らの主張する『LN 陰性例ほど予後不良』という結論に達することは当然である。そこで、著者らはこの不合理性を除去するため、先進部の反応性を重視して、前述した判定規準をもうけた。

ところで、従来の報告では肝転移との関係について述べながら、肝転移巢の LN 局在性についての記載は少ない^{11)~14)}。本研究では、肝転移巢の LN の局在はほぼ均一であり、陽性率は94.1%と高率であった。転移巢で LN 陽性となったことに関しては、標的臓器の特殊性に影響された結果ではないかという議論がある。山鹿¹⁵⁾は、転移性肝癌では癌細胞は基本的には非癌部類洞内を浸潤性に増殖することから、癌腺管が類洞壁に被覆されているのではないかと報告している。著者らの観察では、先端部の増殖様式は必ずしも類洞型だけではないこと、中心部の間質結合織で覆われた部分でも腺管基底部分が LN 染色されていることから、すべての腺管が類洞壁に覆われながら膨張性増殖するとは考えられない。また、転移巢が LN 陽性で原発巣が陰性の場合でも、原発巣は LN 陰性部分と陽性部分があり、陰性部分が優勢なために LN 陰性と判定したが、原発巣の LN 陽性部分の組織型は肝転移巢と類似していた。これらの研究結果から、LN 陽性のものほど肝転移を起こしやすく、原発巣の LN 染色性が不均一な場合には、LN 陽性癌細胞が転移を形成すると推察される。

一方、従来の生化学的研究¹¹⁾⁶⁾¹⁷⁾では、転移形成の第1段階として LN、CIV を破壊することが必要であり、CIV 分解能が高いものほど転移能が高いとされてきた。はたして癌の進展、転移に基底膜浸潤(破壊)が必要不可欠であるのか。高分化腺癌は基底膜を温存しながら壁内を進展する。もしも、壁内進展に基底膜浸潤が不可欠ならば、基底膜を温存する高分化腺癌は壁内進展できないことになる。高分化腺癌でも先進部で基底膜浸潤がおこって壁内進展すると仮定するならば、基底膜浸潤部のみが先駆して、基底膜温存された癌腺管を誘導することになり、不合理である。また、

従来より高分化なものほど肝転移を、低分化ほど腹膜播種を起こしやすいという事実があるが^{18~20)}、基底膜浸潤の強いものは低分化型になることから、彼らの論理では低分化なものほど肝転移を起こしやすいことになり矛盾する。

最近、基底膜破壊が転移の第1段階として必要であるという考え方に反論する生化学的研究が多くみられる。Sas²¹⁾は培養細胞に³H ラベルした CIV を加えた実験で、低転移細胞株の方がより高度の CIV 分解能を示したこと、Irimura²²⁾は大腸癌組織と正常粘膜の間には、CIVase 活性に差がなかったことを報告している。また吉野²³⁾は CIVase 活性はリンパ節転移と相関したとしているが、肝転移との相関は認めていない。Schor²⁴⁾は癌細胞が CIVase 活性を有することなく、コラーゲンゲル中を遊走することが可能であり、必ずしも CIV がバリアーとは考えられないとしている。さらに、最近 yorc sac tumor⁶⁾、adenoid cystic carcinoma⁶⁾、胃癌細胞⁷⁾、basal cell carcinoma⁸⁾など数多くのヒト腫瘍細胞が LN、CIV を産生し、基底膜を形成する能力を持つことが報告されている。

以上の文献の考察、および本研究において、肝転移例での癌先進部での腺管構造の維持、さらに数個の細胞塊および single cell 周囲に LN を認めたことから、高分化腺癌が腺管構造を維持して壁内進展する浸潤過程では、基底膜の破壊、基底膜構成成分の消失は必要でなく、しかも、LN は癌に付随する特質であって、バリアーというよりは接着能を持った機能的な物質であると考えている。

文 献

- 1) Liotta LA: Tumor invasion and metastasis—Role of the extracellular matrix. *Cancer Res* 46: 1—7, 1986
- 2) Forster SJ, Talbot IC, Claiton DG et al: Tumor basement membrane laminin in adenocarcinoma of rectum: An immunohistochemical study of biological and clinical significance. *Int J Cancer* 37: 813—817, 1986
- 3) Burtin P, Chavanel G, Foidart JM et al: Antigens of the basement membrane and the peritumoral stroma in human colonic adenocarcinomas: An immunofluorescence study. *Int J Cancer* 30: 13—20, 1982
- 4) Terranova VP, Williams JE, Liotta LA et al: Modulation of the metastatic activity of melanoma cells by laminin and fibronectin. *Science* 226: 982—985, 1984
- 5) McCarthy JB, Scubit AP, Palm SL et al: Metastasis inhibition of different tumor types by purified laminin fragments and a heparin-

- binding fragment of fibronectin. *J Natl Cancer Inst* 80 : 108-116, 1988
- 6) Barsky SH, Layfield L, Varki L et al: Two human tumors with high basement membrane-producing potential. *Cancer* 61 : 1798-1806, 1988
 - 7) Sobue M, Takeuchi J, Tsukidate K et al: Accumulation of basement membrane components in interface between gastric tumor cells and fibroblasts in vitro. *Br J Cancer* 54 : 699-704, 1986
 - 8) Stamp GW, Quaba A, Brithwaite A et al: Basal cell carcinoma xenograft in nude mice: Studies on epithelial differentiation and stromal relationships. *J Pathol* 156 : 213-225, 1988
 - 9) Hsu SM, Ralne L, Fanger H: The use of antiavidin antibody and avidin-biotin-peroxidase technique. *Am J Pathol* 75 : 816-821, 1981
 - 10) 大腸癌研究会: 臨床・病理, 大腸癌取扱い規約, 第4版, 金原出版, 東京, 1985
 - 11) 松田泰次: 大腸癌の免疫組織学的検討からみた癌の浸潤, 転移におけるラミニンの役割, 医のあゆみ 141 : 194, 1987
 - 12) 松田泰次, 坂口隆啓, 肥田仁一ほか: 胃癌における laminin の免疫組織学的検討, 組織型および転移と laminin との関連, 日消外会誌 22 : 2778-2783, 1989
 - 13) 下川邦泰, 稲田 潔: 免疫組織化学の進歩とその応用, 大腸癌の肝転移に関する研究, 臨病理 38 : 115-123, 1990
 - 14) 迎 徹: 胃癌組織における Fibronectin, Laminin の免疫組織学的検討, *J Jpn Soc Cancer Ther* 25 : 2468-2476, 1990
 - 15) 山鹿博史: 転移性肝癌の病理形態学的研究, 癌の臨 33 : 1437-1445, 1987
 - 16) Kalebic T, Garbis S, Glaser B et al: Basement membrane collagen: Degradation by migrating endothelial cells. *Science* 221 : 281-283, 1983
 - 17) Wirl G, Frick J: Collagenase: A marker enzyme in human bladder cancer? *Urol Res* 7 : 103-108, 1979
 - 18) 西 満正, 田村達男, 高月英夫: 肝転移胃癌の臨床病理学的研究, とくに肝転移成立の条件因子について, 癌の臨 8 : 759-767, 1962
 - 19) 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
 - 20) 安富正幸, 丸山次郎, 松田泰次ほか: 転移性肝癌の治療と予後, 外科 45 : 137-142, 1983
 - 21) Sas DF, McCarthy JB, Furcht LT: Clearing and release of basement membrane proteins from substrates by metastatic tumor cell variants. *Cancer Res* 46 : 3082-3089, 1986
 - 22) Irimura T, Yamori T, Bennet SC et al: The relationship of collagenolytic activity to stage of human colo-rectal carcinoma. *Int J Cancer* 40 : 24-31, 1987
 - 23) 吉野肇一, 岡崎 勲, 松山重雄ほか: 胃癌の進展, 間質とくにコラーゲンからみて, *Oncologia* 22 : 27-34, 1989
 - 24) Schor SL: Cell proliferation and migration on collagen substrate in vitro. *J Cell Sci* 41 : 159-175, 1980

Immunohistochemical Studies on Laminin in Basement Membrane of Colo-rectal Cancer

Taiji Matsuda, Yoshitaka Akabane, Toshiyuki Adachi, Jinichi Hida,
Kohei Mori and Masayuki Yasutomi
First Department of Surgery, Kinki University School of Medicine

In 192 patients with colorectal cancer and 17 with liver metastatic lesions, immunohistological study (ABC method) of laminin (LN) was made to clarify the relation of localization of LN and invasion or metastasis of the cancer. LN was commonly localized on epithelial basement membrane of normal colonic tissue in all cases, but unevenly stained over the primary lesion of colorectal cancer. Therefore, the foci were divided into 3 layers: superficial, intermediate and deep layers. Positive cases were defined as those with positive LN staining in all or 2 of 3 layers. The positive staining was found in 83.3% of primary lesion with liver metastasis with significant difference from the rate of 19.0% in those without liver metastasis ($p < 0.01$). The cases with liver metastasis were characterized by remarkable LN staining at the deepest part of invasive lesion, which frequently maintained glandular structure. LN staining was also found around the small nests invading stroma or veins. In liver metastatic lesions, LN was almost uniformly stained at the basal part of glandular structure in 94.1% of the cases. From the above results, cases with positive LN staining frequently develop liver metastasis, and LN is concomitant with cancer and unbelievable to be a barrier to intramural invasion.

Reprint requests: Taiji Matsuda First Department of Surgery, Kinki University School of Medicine
377-2 Ono-Higashi, Osaka-Sayama, 589 JAPAN