

## 胃平滑筋原性腫瘍の臨床病理学的ならびにフローサイト メトリーによる DNA 量の検討

神戸大学医学部第1外科, \*同 医療技術短期大学部

船坂 真里 中村 毅 多淵 芳樹\* 多田 康之  
森下 透 河村 史朗 加藤 道男 斎藤 洋一

胃平滑筋原性腫瘍切除18例(筋腫8例・肉腫10例)について、臨床病理学的ならびに flow cytometry (FCM) により DNA パターンを検討した。肉腫の腫瘍径 $10.3 \pm 2.2$ cm は筋腫の $4.9 \pm 0.88$ cm より有意 ( $p < 0.01$ ) に大きく、肉腫の原疾患による死亡症例では腫瘍径と生存期間との間に負の相関  $Y = 23.3 - 0.35X$  ( $r = -0.907$ ,  $p < 0.01$ ) が認められた。肉腫の核分裂数(核分裂数/400倍率の100視野)  $49.3 \pm 23.3$  は筋腫の $2.6 \pm 1.1$  よりも有意に ( $p < 0.05$ ) 多かった。肉腫6例と筋腫5例のパラフィン包埋切片を用いての DNA の測定では、筋腫全例と1例の肉腫は diploid パターンを示し腫瘍死例はなかったが、5例の肉腫は aneuploid パターン(平均  $DI = 1.72$ ) を示し、このうち再発ないし再燃で4例が死亡した。以上の成績より、腫瘍径・核分裂数と FCM による DNA パターン解析は筋原性腫瘍の良悪性の判定や治療方針の決定ならびに予後の予測に有用であると考えられる。

**Key words:** gastric leiomyomatous tumor, mitosis, cellularity, nuclear DNA ploidy pattern, flow cytometry

### はじめに

平滑筋原性腫瘍は胃に発生する腫瘍の0.9~2.5%<sup>1)~4)</sup>を占めると報告されている比較的にまれな腫瘍である。しかし、良悪性の判定や悪性程度の診断は術中迅速組織診はもとより、永久標本を用いてもしばしば困難なことがあり<sup>5)~9)</sup>、外科的治療法の選択には難渋させられることが多い。転移や浸潤性増殖が認められない場合には、胃平滑筋原性腫瘍の良悪性の判定は一般に永久標本を用いて単位面積あたりの核分裂数や細胞密度などが利用されている<sup>1)3)5)6)10)11)</sup>。また一方、フローサイトメトリー(flow cytometry, FCM と略)による核DNAの解析が容易に行われるようになった近年、DNAパターンの解析は各種固形腫瘍の悪性程度や予後判定の指標としての有用性が高いとの報告が多数なされている<sup>12)~14)</sup>。

今回、著者らが経験した胃平滑筋原性腫瘍18例を対象として、臨床病理学的に検討すると同時にFCMによりDNAパターンを解析して、胃平滑筋原性腫瘍の良悪性や予後判定ならびに治療方針の指標になり得る

か否かを検討した。

### 対象と方法

最近教室で経験し、術後の永久標本で胃平滑筋原性腫瘍と診断された18例(肉腫10例・筋腫8例)を対象とした。腫瘍の発育形式はSkandalakisらの分類<sup>9)</sup>に準じて、胃内・壁内・胃外型に分類した。また腫瘍の臨床病理学的所見は胃癌取扱い規約<sup>15)</sup>に準じて記載した。

細胞密度と核分裂数の測定は $4\mu$ のホルマリン固定パラフィン包埋切片のHematoxylin Eosin染色標本を用いて、組織学的に検討した。すなわち細胞密度の測定は、接眼レンズに組み込んだ $1\text{mm}^2$ マイクロメッシュを用い、400倍率で5視野の細胞数を測定して、北岡らの方法<sup>11)</sup>に従い $4 \times 10^{-4}\text{mm}^2$ あたりの細胞数で表した。また400倍率で100視野(100 high power field, HPF と略)の核分裂像を測定・合計し、核分裂数とした。これらの細胞密度と核分裂数は複数(2~5)のブロックからの標本を用いて測定した。

肉腫7例・筋腫6例については、FCMによるDNAパターンを解析した。すなわちSchutteらの方法<sup>16)</sup>に従って、ホルマリン固定パラフィン包埋ブロックより $40\mu$ の切片を切出し脱パラフィン後、37°Cの0.025%ト

リブシン溶液中で24時間 incubate し、50 $\mu$ m のナイロンメッシュで濾過して単細胞浮遊液を作成した。さらに、これに Vindel $\phi$ v らの方法<sup>17)</sup>に準じて propidium iodide 染色を行って、50,000~60,000個の細胞の DNA 量を FACS-IV (Becton Dickinson 社製, USA) により測定した。DNA 指数が1.0~1.2の症例を diploid パターン、それ以外を aneuploid パターンと判定した。また coefficient of variation (CV と略) 値が10%以上の症例は判定不能として取り扱った。

なお、統計学的な差の検定は Student の t 検定および Fisher の補正を伴う Chi-Square 法で行った。

## 結 果

### 1. 臨床病理学的検討

腫瘍の主占居部位に関しては、筋腫は4例がCに・3例がMに・1例がAに、肉腫は6例がCに・4例がMに発生しており、肉腫と筋腫との間に発生部位に差は認められなかった。発育形式は Table 1 のとおり、肉腫では壁内型ではなく胃外型が7例・胃内型が3例であったのに対し、筋腫では胃内型6例・胃外型1例・壁内型1例と、肉腫症例では胃外型が多い傾向 ( $p < 0.1$ ) がみられた (Table 1)。腫瘍径は肉腫10.3 $\pm$ 2.2cm・筋腫4.9 $\pm$ 0.9cm と明らかな差 ( $p < 0.01$ ) が認められ (Table 1)、また胃外型を示す腫瘍径は12.6 $\pm$ 6.0cm とそれ以外の発育形成症例4.2 $\pm$ 1.7cm よりも有意に ( $p < 0.01$ ) 大きかった。核分裂数は、肉腫49.3 $\pm$ 23.3個/100HPF・筋腫2.6 $\pm$ 1.1個/100HPF と肉腫で有意 ( $p < 0.05$ ) に多かった。細胞密度は、肉腫19.5 $\pm$ 1.1個/ $4 \times 10^{-4}$ mm<sup>2</sup>・筋腫15.5 $\pm$ 2.7個/ $4 \times 10^{-4}$ mm<sup>2</sup> と有意な差は認められなかった (Table 2)。また核分裂数と細胞密度との間には関連性はみられなかった。

転移を有する症例と他臓器浸潤例は悪性腫瘍として手術が行われていたが、これらの所見を欠く症例は術中の迅速生検診断を参考にして術式が決定されていた

Table 1 Growth pattern and tumor size of leiomyomatous tumor in the stomach

Leiomyomatous tumor	No.	Growth pattern†			Size (cm) (mean $\pm$ SE)
		exo	intra	endo	
Sarcoma	10	7*	0	3	10.3 $\pm$ 2.2**
Myoma	8	1	1	6	4.9 $\pm$ 0.9

†The classification of Skandalakis et al: exo; exogastric, intra; intramural and endo; endogastric growth.

\* $P < 0.1$ , \*\* $P < 0.01$ .

Table 2 Mitosis and cellularity of leiomyomatous tumors in the stomach

Leiomyomatous tumor	No.	Mitosis† (mean $\pm$ SE)	Cellularity† (mean $\pm$ SE)
Sarcoma	10	49.9 $\pm$ 23.3*	19.5 $\pm$ 1.1
Myoma	8	2.6 $\pm$ 1.1	15.5 $\pm$ 2.2

†Number of cells with mitotic cell/100 HPF, and number of cells/ $4 \times 10^{-4}$ mm<sup>2</sup>. \* $P < 0.05$ .

(Table 3)。すなわち筋腫では、胃癌に合併した1例と生検から肉腫が疑われ径10cm と大きなA領域の1例を除いて胃部分切除ないし摘出術が行われていた。肉腫に対しては2例に胃部分切除が、8例に胃癌に準じたリンパ節郭清を伴う胃切除術が行われていた。これら8例のうち2例に腹膜転移 (大網および腹膜播種転移)・1例に肝転移・2例に1群のリンパ節転移が認められた。筋腫には再発例はなかったが、肉腫の10例中5例が再発ないし再燃で5年以内に死亡した。肉腫の再発・再燃例では腫瘍の大きさと生存期間には有意の負の相関 ( $r = -0.907$ ,  $p < 0.01$ ) が認められた (Fig. 1)。しかし、これら再発・再燃例の核分裂数はいずれも25個/100HPF 以上であり、核分裂数と生存期間の間には有意な相関は認められなかった。また細胞密度と核分裂数・生存期間および予後との間にも、関連性は認められなかった。

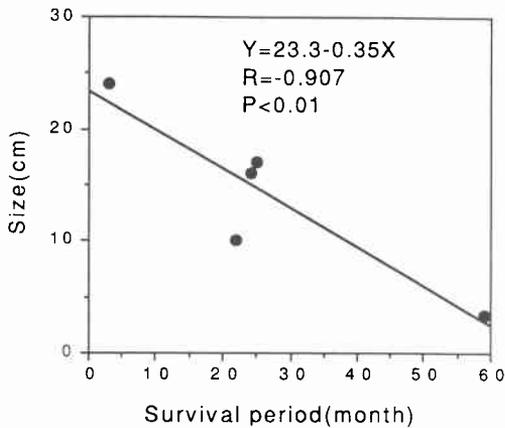
### 2. FCM による検討

FCM により DNA 量を測定した13例のうち、切除より15年以上を経過していた筋腫および肉腫それぞれ1例は CV 値が10%を越えたため除外し、肉腫6例・筋腫5例を対象として DNA 量を測定した。Fig. 2 に代表的な DNA パターンを示したが、肉腫では5例が aneuploid パターンを、1例のみが diploid パターンを示した。これら6例の肉腫における DNA 指数の平均は1.72 (1.3~2.05) であった。なお diploid パターンを示した肉腫の核分裂数は1個/100HPF であり、細胞密度は25個/ $4 \times 10^{-4}$ mm<sup>2</sup> であった。Aneuploid パターンを示した肉腫のうち再発・再燃による死亡例は4例あったが、このうち3例は aneuploid peak が著明に高いのが特徴的であった。また5例の筋腫は全例 diploid パターンを示した (Fig. 2)。

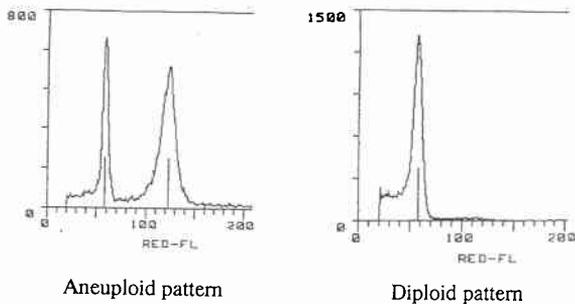
## 考 察

胃平滑筋原性腫瘍の良悪性の判定は転移や他臓器浸潤があれば容易であるが、これらの所見を欠く場合は形態学的所見のみでは困難で、一般に術後の永久標本

**Fig. 1** Correlation between tumor size and survival period in 5 patients died of leiomyosarcoma



**Fig. 2** Typical DNA ploidy patterns of leiomyomatous tumors in the stomach



を用いて核分裂数や細胞密度などがその判定に利用されている<sup>1)3)~7)9)~11)18)19)</sup>。このために、術中においても適切な治療法の選択に困難を感じる場合が少なくはない。今回自験例を対象として術前・術中に胃平滑筋原性腫瘍の良悪性や悪性程度の判定が可能か否かを、retrospectiveに検討するとともに、術前・術中の治療方針決定に利用しうる因子について検討を加えた。

今回の検討においては、肉腫の径は筋腫よりも有意に大きく、胃外型は筋腫よりも肉腫に有意に多く、肉腫のなかでは再発・再燃による死亡例は生存期間と腫瘍径が負の相関を示した。この結果は、腫瘍径が大きな胃外型平滑筋原性腫瘍は悪性度が高い肉腫である可能性が高いことを示唆している。一般に、平滑筋肉腫の転移は肝転移が最も多く次いで腹膜転移であり、リンパ節転移は比較的少ないと報告されている<sup>1)4)9)11)</sup>。最近、笹子ら<sup>4)</sup>は肉腫の大きさとリンパ節転移との間には強い関連があり、5cm以下の肉腫のリンパ節転移

は2.0%にすぎなかったが、5cm以上では14.4%であったと報告している。自験例でも径16.0と7.5cmの2例の肉腫にリンパ節転移が認められた。したがって、核分裂数などの他の客観的な情報がない場合には、腫瘍径と発育形態は転移および浸潤性増殖とともに術前・術中に知りうる術式選択の重要な指標となると考えられる。

胃の平滑筋原性腫瘍の核分裂数と細胞密度は癌腫における細胞分裂指数やDNA標識指数<sup>20)~23)</sup>と同様、同一腫瘍内においても大きな偏りがあることが指摘されており<sup>5)6)</sup>、測定部位や測定方法によって測定値に差が生じるところに1つの欠陥がある。この欠陥を最小限にとどめて1腫瘍におけるより客観的な測定値を得るため、今回の検討では腫瘍の複数切片における核分裂数と細胞密度を測定した。核分裂数は一般にStout<sup>10)</sup>に準じて高倍率で10ないし50視野中に観察される核分裂数として表現されることが多い<sup>5)6)19)24)25)</sup>が、今回の検討では100視野の核分裂数を測定した。著者らの検討では、核分裂数が25個/100HPF以上を示す肉腫の予後は不良であった。この成績は核分裂数が5ないし10個/50HPF以上の腫瘍をhigh mitotic rateと定義し、予後不良であると報告しているLee<sup>6)7)</sup>、Appelmannら<sup>5)</sup>の結果と近似した成績であった。筋原性腫瘍の細胞密度に関しては、北岡ら<sup>11)</sup>、角谷ら<sup>25)</sup>は細胞密度と予後の間に関連があると報告しているが、今回の検討では核分裂数との間および筋腫と肉腫の間にも有意な差はみられず、さらに肉腫の予後との間にも関連性は認められなかった。核分裂数は切除時の腫瘍の増殖状態を直接反映していると考えられる<sup>18)19)</sup>が、細胞密度は単位面積当りの細胞数を表している値であり、必ずしも腫瘍の増殖とは関連はないと思われる。一般に、腫瘍の増殖速度は腫瘍の悪性度と強く関連していると考えられており<sup>20)21)</sup>、この腫瘍における一般的な現象が今回の測定結果として得られたものと考えられる。いずれにしても、著者らの検討結果からは転移や浸潤が認められない筋原性腫瘍の良悪性の診断には、細胞密度よりも核分裂数を測定する方が有用であると考えられる。

ホルマリン固定後のパラフィン包埋組織を用いてのFCMによるDNA量の測定が最近可能となったことから、腫瘍のretrospectiveなDNA量の測定が容易かつ迅速に行えるようになった。このため、種々な腫瘍においてDNA量との関連が種々な観点より検討され、腫瘍の悪性程度や予後判定の指標としての有用性

が多数報告されている<sup>12)~14)</sup>。Tsushima ら<sup>26)</sup>は、117例の胃原発の平滑筋原性腫瘍の DNA パターンを解析し、筋腫の87%が diploid パターンであったが、肉腫では32%が tetraploid~polyploid パターンであり、23%が aneuploid パターンを示し、これらの ploidy パターンを示す症例の予後は不良であったと報告している。また Kiyabu ら<sup>27)</sup>も同様に消化管原発の平滑筋腫瘍41例の DNA パターンを測定し、核分裂数が10/10HPF以上の high grade malignancy の肉腫の71%に aneuploidy が認められたと述べている。著者らの検討では、全例の筋腫と1例の肉腫が diploid を示し再発ないし再燃例は認めなかったが、5例の肉腫は aneuploid を示していた。このうち特に高い aneuploid ピークを示す3例は腫瘍死していた。したがって、FCM 上このような ploidy パターンを示す腫瘍は悪性度が高い肉腫と考えられる。最近では、新鮮標本を用いた FCM による DNA 量の測定は短時間に行い得るようになったことから、筋原性腫瘍の悪性程度の術中迅速診断法として有用であると思われる。

胃平滑筋原性腫瘍の手術術式の選択に関しては、術前に良悪の診断のつけ難いことやリンパ節転移の頻度の報告の差などから議論が多いところである。肉腫のリンパ節転移は一般に低率であると報告もされている<sup>11)9)11)</sup>。しかし、リンパ節転移の頻度は確実にリンパ節郭清が施行されればその頻度は増える可能性も否定はできない。Evans<sup>19)</sup>は再発例の予後は極めて不良であり、再発の一因として不十分な腫瘍の切除とリンパ節郭清を挙げている。また Lee<sup>6)7)</sup>は平滑筋腫が再発を繰り返すうちに悪性化の可能性を示唆し、消化管の平滑筋肉腫の治療方針として、1) 組織学的な良悪の判定は永久標本を用いても困難であること、2) リンパ節転移の可能性が否定できないこと、3) 合併症の頻度は wedge resection にくらべてほとんど変わらないことから、腸間膜を含めた広範囲な切除を提唱している。一方、笹子は<sup>4)</sup>は原則として、5cm 以下の筋原性腫瘍は腫瘍周辺のリンパ節の sampling による迅速診断を行い転移がなければ局所切除を、5cm 以上の腫瘍では R<sub>1</sub> の郭清を伴う胃切除を行う方針を取っていると述べている。しかし、おのずと術中診断には限界があり、内視鏡的あるいは経皮経腹的生検<sup>28)29)</sup>や FCM などで術前に可能な限り良悪性の診断や悪性程度を把握した後に筋原性腫瘍の術式を決定することが肝要であろうと思われる。すなわち、腫瘍の術前生検で平滑筋原性腫瘍と判明し、かつ核分裂数が25個/100HPF 以

上または aneuploid 症例、あるいは術中に他臓器浸潤・腹膜転移・リンパ節転移陽性例や FCM による aneuploid 症例に対しては進行胃癌と同様な R<sub>2-3</sub> を伴う胃切除術を、これ以外の症例に対しては腫瘍縁より 1cm 以上の正常胃壁全層を含む局所切除を行うのが妥当であろうと考えられる。しかし、後者の場合胃の平滑筋原性腫瘍は C・M に好発する<sup>1)~4)11)24)</sup> ために、腫瘍の局所切除によって逆流性食道炎や噴門部狭窄などの機能障害を生じる可能性もある。腫瘍の局所切除による噴門部の機能障害をきたす可能性が高い場合には、噴門側胃切除ないし胃全摘術が行わざるをえないもの<sup>4)</sup>と考えられる。このような場合には、リンパ節郭清の有無によって手術侵襲はそれ程変わらないので、R<sub>1</sub> 程度のリンパ節郭清を行うのが妥当であろうと思われる。

#### 文 献

- 1) 佐野量造, 広田映五, 下田忠和ほか: 胃平滑筋肉腫の病理. 胃と腸 5: 47-58, 1970
- 2) 高木国夫, 山本英昭: 胃腸管平滑筋肉腫. 消外 5: 1507-1513, 1982
- 3) 竹内仁司, 小長英二, 渡辺哲也ほか: 胃および小腸平滑筋肉腫症例の臨床病理学的検討. 日臨外医会誌 48: 314-319, 1987
- 4) 笹子三津留, 木下 平, 丸山圭一ほか: 胃平滑筋肉腫 51 切除例からみた切除術式の検討. 日消外会誌 22: 2212-2216, 1989
- 5) Appelman HD: Smooth muscle tumors of the gastrointestinal tract. Am J Surg Pathol 10: 83-99, 1986
- 6) Lee YN; Leiomyosarcoma of the gastrointestinal tract. Cancer Treat Rev 10: 91-101, 1983
- 7) Lee YN; Leiomyosarcoma of the gastrointestinal tract. J Surg Oncol 15: 319-321, 1980
- 8) Skandalakis JE, Gray SW, Shepard D: Smooth muscle tumors of the stomach. Int Abst Surg 110: 209-226, 1960
- 9) Lindsay PC, Ordenez n, Raaf JH: Gastric leiomyosarcoma. J Surg Oncol 18: 399-421, 1981
- 10) Stout AP: Bizarre smooth muscle tumors of the stomach. Cancer 15: 400-409, 1962
- 11) 北岡久三, 岡林謙蔵, 木下 平ほか: 胃平滑筋肉腫の予後因子と手術法. 癌の臨 29: 811-816, 1983
- 12) Coon JS, Landay AL, Weinstein RS: Biology of disease. Laboratory Invest 57: 453-479, 1987
- 13) Hanson CA: Application of flow cytometry in diagnostic pathology. Am J Clin Pathol 91: S27-S31, 1989

- 14) Merkel DE, McGuire WL: Ploidy, proliferative activity and prognosis. *Cancer* 65 : 1194-1205, 1990
- 15) 胃癌研究会編：胃癌取扱い規約改訂第11版。金原出版，東京，1985
- 16) Schutte B, Reynders MMJ, Bosman FT: Flow cytometric determination of DNA ploidy level in nuclei isolated from paraffin-embedded tissue. *Cytometry* 6 : 26-30, 1985
- 17) Vindeløv LL, Christensen IJ, Nissen NI: A detergent-trypsin method for the preparation of nuclei for flow cytometric DNA analysis. *Cytometry* 3 : 323-327, 1983
- 18) 木村臣一，木村秀幸，北村元男ほか：腸管平滑筋腫瘍の臨床病理学的検討。日消外会誌 24 : 1002-1007, 1991
- 19) Evans HL: Smooth muscle tumors of the gastrointestinal tract. *Cancer* 56 : 2242-2250, 1985
- 20) Tabuchi Y, Inoue K, Takiguchi Y et al: Mitotic activity of human gastric cancer cells under stathkinetic effect of vincristine sulfate. *Jpn J Cancer Res (Gann)* 71 : 84-93, 1980
- 21) 多淵芳樹，南 正樹，中村 毅ほか：胃癌と大腸癌の癌細胞分裂能に関する研究。日消外会誌 16 : 2060-2066, 1983
- 22) 井上和則：Autoradiographyによるヒト胃癌細胞の核酸合成能に関する研究。日外宝 51 : 315-335, 1982
- 23) 菊山成博：Bromodeoxyuridineおよび免疫組織化学的手法を用いたヒト癌細胞の基礎的，臨床的研究。日外会誌 90 : 355-363, 1989
- 24) Shiu MH, Farr GH, Papachristou DN et al: Myocarcoma of the stomach. *Cancer* 49 : 177-187, 1982
- 25) 角谷直孝，米村 豊，大山繁和ほか：消化管平滑筋性悪性腫瘍の臨床病理学的検討。日外会誌 90 : 1873-1878, 1989
- 26) Tsushima K, Rainwater LM, Goellner JR, et al: Leiomyosarcoma and benign smooth muscle tumors of the stomach. *Mayo Clin Proc* 62 : 275-280, 1987
- 27) Kiyabu MT, Bishop PC, Parker JW et al: Smooth muscle tumors of the gastrointestinal tract. *Am J Surg Pathol* 12 : 954-960, 1988
- 28) 弓前順子，峯 徹哉，大沢 仁ほか：3年半の経過観察後術前に確定診断しえた胃平滑筋肉腫の1例。Prog Dig Endosc 25 : 243-245, 1984
- 29) Graham SM, Ballantyne GH, Modlin IM: Gastric epithelioid leiomyosarcoma. *Am J Gastroenterol* 82 : 82-85, 1987

### Clinicopathological and Nuclear DNA Analyses of Gastric Leiomyomatous Tumors

Masato Funasaka, Takeshi Nakamura, Yoshiki Tabuchi\*, Yasuyuki Tada, Toru Morishita,  
Shiro Kawamura, Michio Kato and Yoichi Saito

First Department of Surgery, Kobe University School of Medicine and School of Allied  
Medical Sciences\*, Kobe University

Ten leiomyosarcomas and 8 leiomyomas of the stomach were examined clinicopathologically, and the nuclear DNA patterns in 6 of the myosarcomas and 5 of the myomas were analyzed by flow cytometry (FCM) using paraffin-embedded tissues. The average size (103 cm) of the myosarcomas was significantly ( $p < 0.01$ ) larger than that (4.9 cm) of the myomas, and there was a negative correlation ( $Y = 23.3 - 0.35X$ ,  $r = -0.907$ ,  $p < 0.01$ ) between tumor size and survival period among 5 patients died of the disease. The average number of mitoses was also significantly ( $p < 0.05$ ) higher in the myosarcomas (49.3/100 HPF) than the myomas (2.6/100 HPF). All the myomas and 1 of the myosarcomas showed a diploid pattern, and none of these patients died of the disease. Five myosarcomas showed an aneuploid pattern (mean  $DI = 1.72$ ), and 3 of patients died of the disease. These data indicate that tumor size, number of mitoses and analysis of DNA patterns by FCM are valuable for determining the grade of malignancy and therapeutic method, and predicting prognosis for patients with leiomyomatous tumors of the stomach.

**Reprint requests:** Masato Funasaka First Department of Surgery, Kobe University School of Medicine  
7-5-2 Kusunoki-cho Chuo-ku, Kobe, 650 JAPAN