日消外会誌　26（5）：1251～1255，1993年

大腸癌における epidermal growth factor receptor 発現についての免疫組織学的検討

神戸労災病院外科
島田　悦司　　裏川　公章　　植松　　清

切除大腸癌62例の新鮮凍結標本を用いて，epidermal growth factor receptor（EGFR と略）の発現の有無を免疫組織化学的に検索し，臨床病理学的諸因子との関連性を検討した．EGFR 陽性率は29/62（46.7%）であった．腫瘍の占居部位による差はなかったが，腫瘍径では右側結腸で陽性例が有意に大きかった．肉眼型，組織型では陽性率に差がなかったが，壁深達度では陽性例で si(ai)症例が有意に多く，また脈管侵襲は陽性例で v2，ly2以上が有意に多かった．しかしリンパ節転移では差がみられなかった．腹膜転移，肝転移および肺転移も陽性例に多く，したがって Dukes D 症例で陽性例が有意に多くみられた．以上より大腸癌における EGFR の発現は癌の進展，とくに血行性転移や局所浸潤などと関連している可能性が示唆された．

Key words: epidermal growth factor receptor, colorectal cancer, immunohistochemistry

I. はじめに

種々の腫瘍細胞や腫瘍組織で epidermal growth factor receptor（EGFR）の発現がみられ[1)~9)]，とくに食道癌[10)]，乳癌[11)]，胃癌[12)13)]，膀胱癌[14)]などでは EGFR の発現が予後と密接な関連を有し，腫瘍の生物学的悪性度の指標としての意義をもつことが報告されている．

しかし大腸癌における EGFR 発現についての研究はいまだ少なく[15)~18)]，その臨床病理学的な意義についても明らかではない．われわれは大腸癌の新鮮凍結標本について EGFR 発現の有無を免疫組織学的に検索し，EGFR 発現と臨床病理学的諸因子との関連を検討することにより，大腸癌における EGFR 発現の意義を明らかにすることを試みた．

II. 対象と方法

1991年4月より1992年6月の間に神戸労災病院外科で切除された大腸癌症例のうち62例（結腸癌40例，直腸癌22例）を対象とした．

切除後ただちに大腸癌組織の一部を採取し，免疫染色用として Tissue-Tek II ornithine carbomyl transferase compound に包埋し，−80℃で凍結保存した．新鮮凍結標本をクリオスタットで4μに薄切後風乾し，冷アセトンにて5分間固定した．Phosphate buffered saline（PBS）溶液にて洗浄したあと，10%正常ブタ血清と20分間反応させた．1次抗体として抗 EGFR モノクローナル抗体（Oncogene Science Inc）を用い，37℃で1時間反応させた．陰性対照には1次抗体にかえて PBS をもちいた．PBS にて洗浄後ペルオキシダーゼ標識抗マウス IgG 抗体（Tago Inc）で37℃，1時間反応させた．PBS で洗浄し，0.005%過酸化水素水加3-3ジアミノベンチジン（DAB）溶液と5分間反応させ発色させた．流水にて洗浄し，メチルグリーンにて核染色を行い，脱水後封入し鏡検した．

臨床病理学的項目は大腸癌取扱い規約[19)]にしたがった．統計学的検定は χ^2検定および t-検定を用い，度数5未満の場合は Fisher の直接確率計算法を用いて行い危険率5%未満を有意とした．

III. 結　果

大腸癌における EGFR の発現陽性所見は，癌細胞の細胞質および細胞膜に褐色顆粒状にみられた．細胞膜に強い染色性がみられた症例が多かったが，細胞膜のみが染色された症例はなかった（**Fig. 1**）．

大腸癌組織内での EGFR 陽性細胞の分布は，病巣全体に陽性所見を示す症例と部分的に陽性所見を示す症例があり，heterogenity がみられた．しかし部分的に陽性所見を示す症例でも，EGFR 陽性細胞は癌細胞全体の25%以上をしめていた．今回はこれらの症例を

＜1992年12月9日受理＞別刷請求先：島田　悦司
〒651　神戸市中央区籠池通4－1－23　神戸労災病院外科

Fig. 1 Positive immunostainig of EGFR is observed in colon cancer (×200).

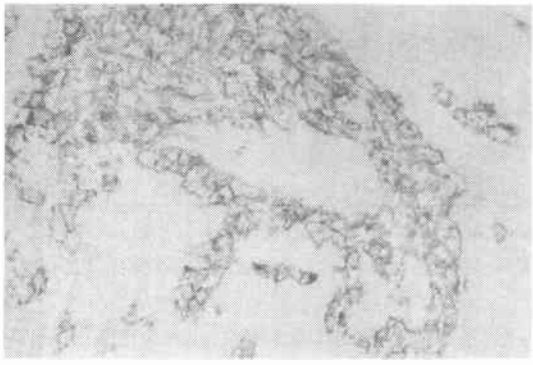

Table 1 EGFR expression and primary site of tumor

Primary site	No. of cases	EGFR(+) cases(%)	
Right colon	14	9(64.3)	NS
Left colon	26	13(50.0)	
Rectum	22	7(31.8)	
Total	62	29(46.8)	

Table 2 EGFR expression and macroscopic type of tumor

Macroscopic type	No. of cases	EGFR(+) cases(%)	
0	3	2(66.7)	NS
1	4	0(0.0)	
2	53	26(49.1)	
3	2	1(50.0)	

EGFR陽性例として検討した.

EGFR陽性所見は62例中29例（46.8%）にみられた（**Table 1**).

腫瘍の占居部位を右側結腸（盲腸，上行結腸，横行結腸右半），左側結腸(横行結腸左半，下行結腸，S状結腸),直腸に分類しEGFR陽性率を検討すると,右側結腸で9/14(64.3%)，左側結腸で13/26(50.0%)，直腸で7/22（31.8%）と直腸で陽性率が低かったが有意差はなかった（**Table 1**).

肉眼型ではEGFR陰性例,陽性例とも2型が多数を占め有意差はなかった（**Table 2**).

0型3例はEGFR陰性1例がdysplasia辺縁の小さなsm癌，陽性2例はIpで径3cm以下であった．それ以外の進行癌で腫瘍長径を部位別に検討したところ，右側結腸では陽性例の9.3cmに対し陰性例は5.6cmと有意に陽性例が大きかった($p<0.01$)．しかし左側結腸，直腸では差がなかった（**Table 3**).

Table 3 EGFR expression and tumor size (mean±SD)

Primary site	EGFR(−)	EGFR(+)	
Right colon	5.6±1.3	9.3±3.0	$p<0.01$
Left colon	5.2±2.0	5.3±1.5	NS
Rectum	5.3±2.1	5.5±1.9	NS

Table 4 EGFR expression and histologic type of carcinoma

Histologic type	No. of cases	EGFR(+) cases(%)	
Well	50	25(50.0)	NS
Moderate	8	2(25.0)	
Poorly	2	2(100)	
Signet	1	0(0.0)	
Mucinous	1	0(0.0)	

Table 5 EGFR expression and depth of tumor invasion

Depth of invasion	No. of cases	EGFR(+) cases(%)	
m, sm	3	2	
pm	5 (23)	1 (9(39.1))	
ss(a1)	15	6	
s (a2)	27	11(40.7)	p<0.05
si (a2)	12	9(75.0)	

組織型別のEGFR陽性率は陰性例,陽性例とも高分化型が多数をしめており差がなかった（**Table 4**).

壁深達度別のEGFR陽性率はss(a1)にとどまるものが9/23(39.1%)，s(a2)が11/27(40.7%)，si(a2)が9/12(75.0%)と，si(a2)で有意に高率であった($p<0.05$)（**Table 5**).

静脈侵襲ではEGFR陽性率がv0：4/12(33.3%)，v1：1/12（8.3%），v2：16/27（59.3%），v3：7/11(63.6%)で,v2以上がEGFR陽性例で有意に多かった（$p<0.01$）（**Table 6**).

リンパ管侵襲ではEGFR陽性率はly0：1/8(12.5%)，ly1：5/13(38.5%)，ly2：15/29(51.7%)，ly3：8/12（66.7%）でly2以上がEGFR陽性例で有意に多かった（$p<0.05$）（**Table 7**).

脈管侵襲の差が壁深達度によるものでないことを明

Table 6 EGFR expression and vascular invasion

Vasculor invasion	No. of cases	EGFR(+) cases(%)	
v0	12	4(33.3)	p<0.01
v1	12	2(16.7)	
v2	27	16(59.3)	
v3	11	7(63.6)	

Table 7 EGFR expression and lymphatic invasion

Lymphatic invasion	No. of cases	EGFR(+) cases(%)	
ly0	8	1(12.5)	p<0.05
ly1	13	5(38.5)	
ly2	29	15(51.7)	
ly3	12	8(66.7)	

Table 8 EGFR expression and vascular invasion in pm-s (a2) cases

Vascular invasion	EGFR(−) n=29	EGFR(+) n=18	
v0, v1	16/29(55.2)	2/18(11.1)	p<0.01
v2, v3	13/29(44.8)	16/18(88.9)	

(%)

らかにするために，EGFR 陽性例で有意に多かった si (ai) や m，sm 症例を除く47例（陰性29例，陽性18例）で検討した．静脈侵襲は，EGFR 陰性例では v0，v1：16/29 (55.2%)，v2，v3：13/29 (44.8%) であったが陽性例では v0，v1：2/18 (11.1%)，v2，v3：16/18 (88.9%) で陽性例は v2以上が多かった ($p<0.01$) (**Table 8**)．またリンパ管侵襲は，EGFR 陰性例で ly0，ly1：12/29(41.4%)，ly2，ly3：17/29(58.6%)であったが，陽性例では ly0，ly1：2/18(11.1%)，ly2，ly3：16/18 (88.9%) で陽性例は ly2以上が多かった ($p<0.05$) (**Table 9**)．

組織学的リンパ節転移では両者間に差はみられなかった (**Table 10**)．

腹膜転移の有無では，P (−) が24/59 (40.0%)，P (+) が5/6 (80.3%)，肝転移の有無では H (−) が25/56 (44.6%)，H (+) が4/6 (66.7%)，肺転移の有無では転移(−)が27/60(45.0%)，転移(+)が2/2(100%) と EGFR 陽性例でいずれも高率であったが，各因子単独では有意差はなかった．そこで肝転移，肺転移を血行性転移として EGFR との関連を検討すると，有意ではないが陽性例で転移が多い傾向にあった (**Table 11**)．

Table 9 EGFR expression and lymphatic invasion in pm-s (a2) cases

Lymphatic invasion	EGFR(−) n=29	EGFR(+) n=18	
ly0, ly1	12/29(41.4)	2/18(11.1)	p<0.05
ly2, ly3	17/29(58.6)	16/18(88.9)	

(%)

Table 10 EGFR expression and lymphnode maetastasis

Lymphnode metastasis	No. of cases	EGFR(+) cases(%)	
n(−)	34	15(44.1)	NS
n1(+)	13	7(53.8)	
n2(+)	9	3(33.3)	
n3(+)	6	4(66.7)	

Table 11 EGFR expression and distant metastasis

	No. of cases	EGFR(+) cases(%)	
Peritoneal dissemination			
None	56	24(42.9)	NS
Present	6	5(83.3)	
Liver metastasis			
None	56	25(44.6)	NS
Present	6	4(66.7)	
Lung metastasis			
None	60	27(45.0)	NS
Present	2	2(100)	
Hematogenous metastasis			
None	54	23(42.6)	p<0.1
Present	8	6(75.0)	

Dukes による臨床病期分類では，A が1/6(16.7%)，B が12/26 (46.2%)，C が6/17 (35.3%)，D が10/13 (76.9%) と D で EGFR 陽性率が有意に高率であった (**Table 12**)．

IV. 考　察

EGF や Transforming growth factor α (TGFα) は腫瘍の増殖に関与する重要な因子であり，その受容体である EGFR はヒト腫瘍において種々の程度の発現がみられることが示されている[1)~9)20)]．この EGFR の発現も腫瘍の増殖・進展に関与することが考えられるが，食道癌[10)]，乳癌[11)]，胃癌[12)13)]および膀胱癌[14)]など

Table 12 EGFR expression and Dukes' stage

Dukes' stage	No. of cases	EGFR(+) cases(%)	
A	6	1(16.7)	
B	26	12(46.2)	
C	17	6(35.3)	$p<0.05$
D	13	10(76.9)	

では，EGFR発現が予後規定因子としての意義をもち，生物学的悪性度の指標となることが報告されている．

しかし大腸癌におけるEGFR発現に関する報告はいまだ少なく[7)8)12)15)~18)]，さらに臨床病理学的諸因子との関連について検討したもの[12)15)~18)]は散見されるにすぎないことから今回の検討を行った．

大腸癌におけるEGFRの発現は，細胞質および細胞膜に陽性とされ[8)12)15)]，自験例でも同様であった．また同一腫瘍組織内での発現様式については北上ら[8)]竹村ら[15)]は表面部，先進部などで差がみられなかったとしている．われわれは新鮮凍結標本を対象としたため，この点について明らかにできなかったが，今後検討を行いたいと考えている．

大腸癌におけるEGFR発現の頻度は，Koretzら[16)]は49.3%，Steeleら[17)]は46.6%と報告しており，自験例の46.7%とほぼ同様であった．部位別にみると右側結腸癌にくらべて直腸癌ではEGFR発現の頻度が低率で，Koretzら[16)]も同様の傾向を指摘している．また腫瘍径に関しても右側結腸でEGFR陽性例は陰性例より有意に大きく，左側結腸や直腸では差がなかった．右側結腸癌は左側，直腸に比較して腫瘍径は大きいとされている[21)]が，自験例におけるEGFR陰性例の腫瘍径は部位による差がなかった．EGFRの陽性率が右側結腸で高く，しかも陽性例の腫瘍径が右側結腸では有意に大きいことから，右側結腸癌の発育や増殖にEGFRが関与している可能性が考えられた．

EGFRの発現と大腸癌の組織型との関連ではBradelyら[7)]は13例の大腸癌のcell lineでのEGFRの発現の検討から組織型との関連を指摘しているが，大腸癌組織レベルでの検討ではわれわれと同様に組織型による差がないとするものがほとんどである[8)12)15)16)]．自験例にもみられたように，大腸癌では低分化型の症例が少ないため組織型による比較が困難な面もあるが，組織型との関連は少ないものと思われる．

深達度について竹村ら[15)]はm，smに陽性例はなくpm以上とで差がみられたとしている．しかし自験例ではm，smの症例が3例と少なかったにもかかわらず，陽性例がmで1例，smで1例存在しており，早期症例に関しては症例を重ねてさらに検討する必要があろう．pm以上の進行例ではsi(ai)でEGFR陽性例が有意に高率であり，陰性例に比較してEGFR陽性大腸癌の浸潤能が高いことが示唆された．

脈管侵襲についてKlutfingerら[18)]はEGFR陽性例で脈管侵襲が多くみられたとし，自験例でも静脈侵襲，リンパ管侵襲ともにEGFR陽性例では高度例が多くみられた．大腸癌では壁深達度と脈管侵襲の程度が[22)23)]相関するとされているため，陽性例で有意に多かったsi症例と，m～sm症例を除いて脈管侵襲の検討を行ったが，EGFR陽性例で高度侵襲例が多く，深達度によらないことが示された．しかも肝転移例は6例中4例，肺転移例は2例ともEGFR陽性例であり，静脈侵襲の結果とあわせてEGFR発現と血行性転移との関連が示唆された．

一方リンパ節転移について，竹村ら[15)]はEGFR発現とリンパ節転移との関連はなかったとしている．自験例ではEGFR陽性例にリンパ管侵襲高度例が多くみられたが，リンパ節転移との関連はなく，静脈侵襲と肝，肺転移との関係と比較してちがいがみられた．したがって今後転移経路によりEGFR発現の意義が異なることを明確にするうえで，脈管内に侵襲した癌細胞や，肝転移巣あるいはリンパ節転移巣でのEGFRの発現を検索していくことが重要と思われた．

EGFR発現と臨床病期との関連では，病期による差がないとする報告もあるが[12)15)16)]，Steeleら[17)]はDukes Cで，Klutfingerら[18)]はDukes C，Dで陽性率が高いとしている．自験例ではDukes D症例で陽性例が多くみられ，EGFR発現と遠隔転移との関連が示唆された．

今回の検討では，術後観察期間が最長でも1年6か月であるため予後との関連は明らかにできなかった．しかし以上の結果より，大腸癌においてもEGFRの発現が癌の発育・増殖だけではなく他臓器への浸潤や血行性転移とも関連している可能性が示され，EGFR発現の有無が大腸癌においても生物学的悪性度の指標となりうることが示唆された．今後さらに症例を重ね予後との関連も明らかにしていきたいと考えている．

文　献

1) 渋谷正史：EGF受容体遺伝子と細胞の増殖・癌化．実験医 8：673—680，1990

2) Gusterson B, Cowley G, Smith JA et al: Cellular localization of human epidermal growth factor receptor. Cell Biol Int Rep 8: 649—658, 1984
3) Yamamoto T, Kamata N, Kawano H et al: High incidence of amplification of the epidermal growth factor gene in human squamous carcinoma cell lines. Cancer Res 46: 414—416, 1986
4) Ozawa S, Ueda M, Ando N et al: Epidermal growth factor receptors in cancer tissues of esophagus, lung, pancreas, colorectum, breast and stomach. Jpn J Cancer Res 79: 1207—1210, 1988
5) Sakai K, Mori S, Kawamoto T et al: Expression of epidermal growth factor receptors on normal human gastric mucosa and gastric carcinoma. J Natl Cancer Inst 77: 477—483, 1986
6) 加藤道男, 吉川恵三, 島田悦司ほか：ヒト胃癌における epidermal growth factor receptor と transforming growth factor α 産生に関する免疫組織化学的検討. 日消外会誌 25: 195—202, 1992
7) Bradeley SJ, Garfinkle G, Walker E et al: Increased expression of epidermal growth factor receptor on human colonic carcinoma cells. Arch Surg 121: 1241—1247, 1986
8) 北上慈子, 板橋正幸, 広田映五ほか：ヒト大腸癌・胃癌における癌遺伝子関連産物の免疫組織化学的検索. 癌の臨 32: 1950—1958, 1986
9) Ito M, Yoshida K, Kyo E et al: Expression of several growth factors and their receptor genes in human colon carcinoma. Virchows Arch [B] 59: 173—178, 1990
10) Ozawa S, Ueda M, Ando N et al: Prognostic significance of epidermal growth factor receptor in esophageal squamous cell carcinomas. Cancer 63: 2169—2173, 1989
11) Sainsbury JRC, Needham GK, Malcolm A et al: Epidermal growth factor receptor status as predictor of early reccurrence and death from breast cancer. Lancet 1: 1398—1402, 1987
12) Yasui W, Hiromichi S, Hata J et al: Expression of epidermal growth factor receptor in human gastric and colonic carcinomas. Cancer Res 48: 137—141, 1988
13) Sugiyama K, Yonemura Y, Miyazaki I: Immunohistochemical study of epidermal growth factor and epidermal growth factor receptor in gastric carcinoma. Cancer 63: 1557—1561, 1989
14) Neal DE, Marsh C, Bennet MK et al: Epidermal growth factor receptors in human bladder cancer. Lancet 1: 366—368, 1985
15) 竹村清一, 小原 剛, 岡野重幸ほか：大腸癌における Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) の免疫組織化学的検討. 日消病会誌 88: 1177—1183, 1991
16) Koretz K, Sclag P, Moller P: Expression of epidermal growth factor receptor in normal colorectal mucosa, adenoma, and carcinoma. Virchows Arch [A] 416: 343—349, 1990
17) Steele RJC, Kelly P, Ellul B et al: Epidermal growth factor receptor expression in colorectal cancer. Br J Cancer 61: 325—326, 1990
18) Klutfinger AM, Robinson BW, Quenville RJ et al: Correlation of epidermal growth factor receptor and c-erbB2 oncogene product to known prognostic indicators of colorectal cancer. Surg Oncol 1: 97—105, 1992
19) 大腸癌研究会編：大腸癌取扱い規約. 改訂第4版. 金原出版, 東京, 1985
20) Sporn MB, Roberts AB: Autocrine growth factors and cancer. Nature 307: 403—406, 1985
21) 及川隆司, 工藤正純, 後藤洋一ほか：右側結腸癌の臨床病理学的検討. 消外 10: 999—1004, 1987
22) 白水和雄, 磯本浩晴, 梶原賢一郎ほか：大腸癌の静脈侵襲に関する臨床病理学的研究. 日外会誌 91: 373—385, 1990
23) 白水和雄, 磯本浩晴, 諸富立寿ほか：大腸癌のリンパ管侵襲, Prospective study による予後因子としての評価について. 日外会誌 92: 1686—1683, 1991

Immunohistochemical Study of Epidermal Growth Factor Receptor in Colorectal Cancer

Etsuji Shimada, Tomoaki Urakawa and Kiyoshi Uematsu
Department of Surgery, Kobe Rosai Hospital

Expression of Epidermal growth factor receptors (EGFRs) was examined immunohistochemically in a total of 62 freshly frozen specimens of colorectal cancer, and correlations between their expression and clinicopathological variables were analyzed. The rate of positive immunostaining among the total of 62 cases was 46.7%. A significantly higher rate of expression was found in larger sized tumors of the right colon, those exhibiting extraserosal spreading, venous invasion, lymphatic invasion and in the most advanced stage (Dukes D). These results suggest that EGFR may serve as a biological marker of the degree of malignant potential of colorectal cancer.

Reprint requests: Etsuji Shimada Department of Surgery, Kobe Rosai Hospital
4-1-23 Kagoikedori, Chuo-ku, Kobe, 651 JAPAN