

## 早期胃癌における proliferating cell nuclear antigen 標識率の術前生検標本での検討

大阪市立大学医学部第1外科

前田 清 鄭 容錫 小野田尚佳 加藤 保之  
有本 裕一 新田 敦範 曾和 融生

早期胃癌患者82例を対象とし、増殖期細胞に特異的な抗 proliferating cell nuclear antigen(PCNA)モノクローナル抗体を用いて、術前の内視鏡検査でえられた癌病巣からの生検標本について PCNA 標識率をもとめ、胃癌の増殖能と壁深達度、リンパ節転移との関係について検討した。PCNA 標識率と壁深達度との関係では sm 癌では m 癌に比べ、有意に PCNA 標識率が高く、また、リンパ節転移陽性例では陰性例に比べて有意に標識率が高かった。PCNA 標識率が40%以上の6例いずれも sm 癌であり、全例にリンパ節転移が認められた。これに対し、標識率が30%以下の症例ではリンパ節転移はみられなかった。

以上より、術前の生検標本での PCNA 標識率は壁深達度、リンパ節転移の指標となりうることが示唆され、PCNA 標識率が30%以下の症例では縮小手術の可能性が示唆された。

**Key words:** proliferating cell nuclear antigen, early gastric cancer, lymph node metastasis, reduced radical gastrectomy

### はじめに

近年、診断技術の進歩につれ、早期胃癌症例が増加し、その治療成績はきわめて良好である<sup>1)</sup>。このため、早期胃癌に対して内視鏡的切除術をはじめとする縮小手術が行われる傾向にある<sup>1)2)</sup>が、縮小手術を施行する際にはリンパ節転移を術前に正確に診断することが不可欠である。

今回、われわれは早期胃癌を対象とし、術前の内視鏡下生検標本を用い、増殖期細胞に特異的な proliferating cell nuclear antigen (以下、PCNA と略記) に対するモノクローナル抗体を用いて免疫染色を行い、PCNA 標識率よりリンパ節転移の術前診断および縮小手術の適応について検討した。

### 対象と方法

当教室で切除された早期胃癌82例を対象とした。82症例の年齢は33歳から79歳まで平均57.9歳で、性別は男性57例、女性25例であった。

これらの症例の術前の内視鏡検査で癌病巣より採取された生検標本を10%ホルマリン固定の後、パラフィ

ン包埋し、4 $\mu$ m 切片を作製した。なお、生検は同一病巣内の heterogeneity を考慮し、1症例につき4箇所以上の異なる部位から採取した。また、ホルマリン固定時間は2時間以内とした。免疫組織化学染色は avidin-biotin peroxidase complex (ABC) 法を用いた (VECTOR 社製 Vectastain ABC Kit を使用)。1次抗体として抗 PCNA 抗体 (PC10; Novocastra Lab. Ltd.) を100倍希釈して用い、室温にて組織切片と1時間反応させた。次いでピオチン化抗マウス抗体と30分間、さらに ABC complex とも30分間室温にて反応させた。発色は diaminobenzidine を用いた。判定は癌細胞を500個以上検鏡し、陽性細胞を百分率で表し、PCNA 標識率とした。

臨床病理学的所見および用語は胃癌取扱い規約<sup>3)</sup>に従った。

また、粘膜下層癌 (以下、sm 癌と略記) の壁深達度をさらに3群に分け、深達度が sm 浅層にとどまるものを sm<sub>1</sub>、固有筋層近くまで達するものを sm<sub>2</sub> とし、これらの中間にあるものを sm<sub>3</sub> とした。

肉眼型は elevated type (I, IIa など)、depressed type (IIc, III, IIc+III, IIc+IIa など)、flat type (IIb) および complex type (IIa+IIc, IIa+III など) の4群

<1993年9月8日受理> 別刷請求先: 前田 清  
〒545 大阪市阿倍野区旭町1-5-7 大阪市立大学医学部第1外科

に分類し、また、腫瘍最大径を20mm以下、21~40mm、および41mm以上の3群に分け、比較検討した。

組織型は胃癌取り扱い規約<sup>4)</sup>での papillary adenocarcinoma, tubular adenocarcinoma を well differentiated adenocarcinoma とし、poorly differentiated adenocarcinoma, mucinous adenocarcinoma, signet ring cell carcinoma を poorly differentiated adenocarcinoma として分類した。

有意差検定は t-検定を用いた。

### 結 果

82例中粘膜内癌(以下、m癌と略す)は32例、sm癌は50例で、さらにsm癌のうち、sm<sub>1</sub>は19例、sm<sub>2</sub> 15例、sm<sub>3</sub> 16例であった。

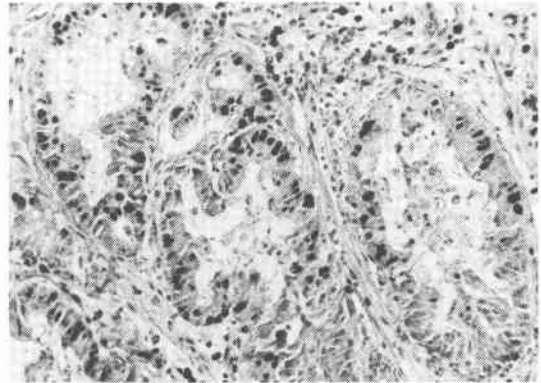
肉眼型では depressed type が52例と最も多く、ついで complex type 15例、elevated type 13例、flat type 2例の順であった。腫瘍最大径別には20mm以下31例、21~40mm 35例、41mm以上16例であった(**Table 1**)。リンパ節転移はm癌1例(3.1%)、sm癌9例(18.0%)の計10例にみられ、さらにsm癌のうち、sm<sub>1</sub>、sm<sub>2</sub>症例ではリンパ節転移はわずか1例(2.9%)にすぎなかったが、sm<sub>3</sub>症例では8例(50%)にみられた。

**Table 1** Characteristics on cases studied

Depth of invasion	
m	32
sm	50
sm1	19
sm2	15
sm3	16
Macroscopic type	
elevated type	13
depressed type	52
flat type	2
complex type	15
Histologic Type*	
well	46
poorly	36
Location	
C	9
M	39
A	34
Tumor size	
~41mm	16
21~40mm	35
20mm~	31

\*well; well differentiated adenocarcinoma  
poorly; poorly differentiated adenocarcinoma

**Fig. 1** PC 10 immunostaining in early gastric cancer ( $\times 400$ ). PCNA staining was confined to the nuclei of tumor cells, while cytoplasm and cell membrane remained unstained.



PCNA免疫染色は核のみが染色され、細胞質、細胞膜は染色されなかった(**Fig. 1**)。早期胃癌全体のPCNA標識率は6~68%の範囲で、平均(Mean $\pm$ SD)22.1 $\pm$ 13.5%であった。壁深達度別にはm癌32例でのPCNA標識率は平均14.0 $\pm$ 7.9%にすぎなかった。一方、sm癌50例では平均PCNA標識率27.3 $\pm$ 13.9%であり、sm癌ではm癌に比較して有意に( $p < 0.01$ )PCNA標識率が高値を示した(**Table 2**)。さらにsm深達度別にPCNA標識率をみるとsm<sub>1</sub>、sm<sub>2</sub>症例の平均PCNA標識率はおのおの21.8 $\pm$ 9.3%、22.9 $\pm$ 8.5%であったが、sm<sub>3</sub>例では37.9 $\pm$ 16.8%であり、sm<sub>3</sub>症例はsm<sub>1</sub>、sm<sub>2</sub>の症例に比べてPCNA標識率は有意に( $p < 0.01$ )高率であった(**Fig. 2**)。

リンパ節転移とPCNA標識率との関係についてみるとリンパ節転移が陽性であった10例のPCNA標識率は平均44.2 $\pm$ 18.5%であった。これに対し、リンパ節転移陰性72例では平均19.6 $\pm$ 9.4%であり、リンパ節転移例において有意に高値を示した( $p < 0.005$ )。

また、リンパ管侵襲陰性例では平均PCNA標識率は20.9 $\pm$ 14.0%であったが、リンパ管侵襲陽性例では26.9 $\pm$ 10.0%であり、リンパ管侵襲陽性症例のほうが陰性例よりも標識率は高かったが、有意差はなかった。静脈侵襲に関しても同様で、静脈侵襲陽性例のほうが陰性例に比べてPCNA標識率が高い傾向がみられたが、有意差はみられなかった。

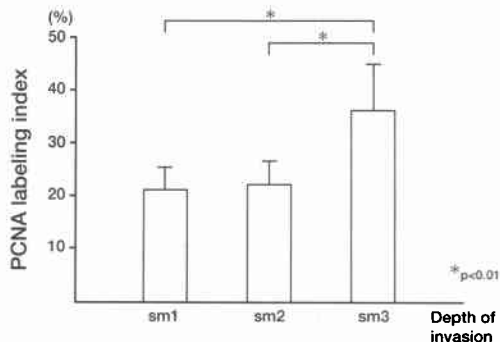
肉眼型別にはelevated typeおよびcomplex typeの症例が他の群よりも有意に高いPCNA標識率を呈した( $p < 0.05$ )。

**Table 2** Correlation between PCNA labeling index and clinicopathological factors

Variable	PCNA labeling index	P value
Depth of invasion		
m	14.0±7.9	<0.01
sm	27.3±13.9	
Lymph node metastasis		
negative	19.0±9.4	<0.005
positive	44.2±18.5	
Invasion into lymph vessels		
negative	20.9±14.0	NS
positive	26.9±10.0	
Invasion into the veins		
negative	20.4±13.3	NS
positive	32.6±10.3	
Macroscopic type		
elevated type	31.2±18.0*	
depressed type	17.6±9.7	
flat type	22.5	
complex type	29.5±15.8*	
Histologic type		
well	24.2±12.9	NS
poorly	21.3±13.8	
Location		
C	26.8±7.8	NS
M	19.1±11.8	
A	23.6±13.5	
Tumor size		
41mm~	32.1±17.5**	
21~40mm	21.1±11.9	
~20mm	18.9±10.4	

\* ; Significantly higher (p&lt;0.05) than depressed type

\*\* ; Significantly higher (p&lt;0.05) than other types

**Fig. 2** PCNA labeling index in cases with sub-mucosal involvement**Table 3** Depth of invasion and lymph node metastasis according to the PCNA labeling index

PCNA labeling index	Depth of invasion	Lymph node metastasis	
		positive	negative
40%~	m	—	—
	sm1	—	—
	sm2	—	—
	sm3	6	—
30.0~39.9%	m	1	1
	sm1	1	4
	sm2	—	4
	sm3	2	3
~30.0	m	—	30
	sm1	—	14
	sm2	—	11
	sm3	—	5

組織型別にみると高分化型癌のほうが低分化型に比べて高い標識率を示す傾向がみられたが、有意差はなかった。

部位別にはC, M, A いずれの領域間にも差は認められなかった。

腫瘍径別に比較すると平均 PCNA 標識率は20mm以下の群では18.9±10.4, 21~40mmの群では21.1±11.9であるのに対し、41mm以上の症例では32.1±17.5と他の2群に比べて有意に高値であった。

ついで、PCNA 標識率が40%以上を高増殖能群、30.0~39.9%を中増殖能群、30%未満を低増殖能群として検討すると高増殖能群6例はいずれも深達度がsm<sub>3</sub>であり、さらに、全例にリンパ節転移がみられた。中増殖能群16例ではm癌は2例(12.5%)のみで、sm<sub>1</sub>5例(31.2%), sm<sub>2</sub>4例(25%), sm<sub>3</sub>5例(31.2%)であった。また、リンパ節転移は4例(25%)に認められた。これに対し、低増殖能群60例ではm癌が50%(30/60)を占め、リンパ節転移はすべて陰性であった(**Table 3**)。

### 考 察

近年、早期胃癌患者の治療成績、予後は非常に良好であり、また、quality of lifeの点からも早期胃癌の治療として内視鏡治療をはじめとする縮小手術が提唱されている<sup>1)~3)5)</sup>。

縮小手術の適応については臨床病理学的諸因子別に検討した報告が多数みられるが、伊藤ら<sup>1)</sup>は早期胃癌のうち、腫瘍径3cm以下、低分化型、深達度mの条件をすべて満たす症例ではリンパ節転移がみられず、縮

小手術可能であると報告している。また、上田ら<sup>4)</sup>は縮小手術の適応として癌巣内潰瘍を伴わないIIa, IIb, IIc型をあげている。一方、鈴木ら<sup>2)</sup>は早期癌においてもsm癌ではm癌に比較してリンパ節転移率も高く予後不良であり、R<sub>2</sub>郭清を標準術式とするべきであると述べている。当教室の早期胃癌395例の検討でもm癌ではリンパ節転移率1.7%にすぎないが、sm癌では22.3%の症例にリンパ節転移がみられている<sup>3)</sup>。

以上のように縮小手術における問題点として壁深達度、リンパ節転移の術前診断があげられる。早期胃癌の壁深達度診断については鈴木ら<sup>6)</sup>は術前内視鏡所見から、また、柳井ら<sup>7)</sup>は超音波内視鏡所見から深達度診断を行い、その正診率はおのおの77.3%、79%であったと報告しているが、一般に術前に正確に深達度、リンパ節転移の有無を予測することは困難である。

近年、癌の悪性度の判定に細胞増殖活性の測定が有用であるとされ<sup>3,8)~12)</sup>、曾和ら<sup>3)</sup>、石川ら<sup>8)</sup>は核DNA量測定、大山ら<sup>9)</sup>はBrdU labelingを用いて早期胃癌の縮小手術の適応について検討している。

PCNAはDNA合成に重要な役割をもつDNA polymerase  $\delta$ の補助蛋白であり、G1後期からS期の細胞核内に特異的に発現するとされ<sup>13)</sup>、また、BrdU<sup>9)</sup>、Ki-67<sup>14)</sup>などとは異なり、ホルマリン固定標本でも検出されるため、PCNA染色は簡便な増殖期細胞の同定法として臨床応用が期待されている。しかし、PCNAは長時間ホルマリン固定されると失活するとされ<sup>13)</sup>、Yonemuraら<sup>15)</sup>も胃癌において摘出標本でPCNA染色を行った場合には半数以上の症例では全くPCNAの発現はみられなかったが、ホルマリン固定時間の短い内視鏡下生検標本を用いた場合には全例に発現がみられたと報告している。われわれも切除標本を用いてPCNA染色を施行したが、ホルマリン固定時間が3~10日と一定でないためか、症例によりPCNAの染色性に「ばらつき」が生じ、臨床病理学的な進行度とは関連しなかった。このため、今回われわれは内視鏡下生検材料を用い、ホルマリン固定時間を2時間以内とした。

各種癌の悪性度とPCNA標識率との関係について多数の報告がみられる<sup>15)~18)</sup>が、Robbinsら<sup>16)</sup>は正常組織と各種組織でのPCNAの発現状態を比較検討し、PCNAの発現率は悪性度の指標となりうると報告している。Yonemuraら<sup>15)</sup>は胃癌においてPCNA標識率は腫瘍径6cm以上、リンパ節転移陽性例で高値を示し、PCNA標識率が40%以上の群では予後不良であっ

たと報告している。

今回、われわれは細胞増殖活性の指標としてPCNAを用い、早期胃癌症例について術前の内視鏡下生検標本を免疫組織化学的に検討した結果、リンパ節転移陽性例は陰性例に比べてPCNA標識率は有意に高く、また、sm癌はm癌に比べてPCNA標識率は有意に高率であった。鈴木ら<sup>6)</sup>や胡ら<sup>19)</sup>はsm<sub>3</sub>症例ではsm<sub>1</sub>、sm<sub>2</sub>の症例よりもリンパ節転移率が高く、縮小手術に際してm癌とsm癌の鑑別のみならず、sm<sub>3</sub>症例とsm<sub>1</sub>、sm<sub>2</sub>症例の鑑別が重要であると報告している。われわれの検討でもsm<sub>3</sub>の症例ではsm<sub>1</sub>、sm<sub>2</sub>の症例に比べてリンパ節転移、PCNA標識率ともに有意に高値であり、術前の内視鏡下生検標本でのPCNA標識率は壁深達度、リンパ節転移の予知因子となりうることが示唆された。

PCNA標識率が40%以上の高増殖能群では6例いづれも深達度はsm<sub>3</sub>であり、さらに全例にリンパ節転移がみられた。これに対し、PCNA標識率30%以下の症例では50%がm癌であり、リンパ節転移はみられなかった。以上より早期胃癌でPCNA標識率が40%以上の症例は縮小手術の適応はないが、30%以下の症例では縮小手術の可能性が示唆された。

PCNA標識率の有用性については今後さらに症例を増やして検討していく必要があるが、今回の検討は術前に得られた生検標本を用いた成績であり、PCNA標識率はリンパ節転移の予知因子として、また、早期胃癌の縮小手術の適応決定において興味ある結果と思われた。

## 文 献

- 1) 伊藤英人, 市倉 隆, 玉熊正悦: 早期胃癌に対する合理的リンパ節郭清—早期胃癌のリンパ節郭清—早期胃癌のリンパ節転移陽性例および再発例の検討. 日臨外医会誌 52: 2566—2572, 1991
- 2) 鈴木博孝, 喜多村陽一, 笹川 剛ほか: 早期胃癌に対するリンパ節郭清の合理化に関する検討. 外科治療 64: 311—320, 1991
- 3) 曾和融生, 芳野裕明, 加藤保之ほか: 早期癌の予後に関する考察—とくに肉眼形態核DNA測定成績について—. 外科治療55: 810—814, 1986
- 4) 胃癌研究会編: 胃癌取扱い規約. 第11版, 金原出版, 東京, 1985
- 5) 上田 博, 磨伊正義, 萩野知己: 早期胃癌のリンパ節転移からみた合理的手術. 日臨外医会誌 48: 1969—1976, 1987
- 6) 鈴木 茂, 光永 篤, 笹川 剛ほか: 早期胃癌の深達度を規察する内視鏡所見. 消内視鏡 4:

- 1305—1313, 1992
- 7) 柳井秀雄, 多田正弘, 野口隆義ほか: 早期胃癌深達度診断と超音波内視鏡所見. 消内視鏡 4: 1315—1319, 1992
- 8) 石川 啓, 平野達雄, 田川 泰ほか: 第3群リンパ節転移陽性早期胃癌の検討(核 DNA 量からみたリンパ節転移について). 日消外会誌 22: 2223—2229, 1989
- 9) 大山繁和, 米村 豊, 鎌田 徹ほか: 早期胃癌におけるリンパ節転移の指標としての細胞増殖活性 in vitro BrdU labeling の臨床応用. 日外会誌 91: 359—359, 1990
- 10) 木村寛伸, 米村 豊, 岩佐和典ほか: 進行胃癌における DNA ploidy の予後規定因子としての意義. フローサイトメトリー 9: 37—41, 1989
- 11) 米村 豊, 杉山和夫, 鎌田 徹ほか: DNA ploidy pattern, 増殖能からみた胃癌の悪性度. 日外会誌 89: 1175, 1987
- 12) 大山繁和, 米村 豊, 伏田幸夫ほか: Flow-cytometry を用いた胃癌の細胞増殖能の検討. 医のあゆみ 148: 367—368, 1989
- 13) 鈴木幸一, 加藤良平, 川生 明: 抗 PCNA モノクローナル抗体による増殖期細胞の同一ホルマリン固定パラフィン包埋切片を用いた免疫組織化学的検討. 医のあゆみ 157: 655—656, 1991
- 14) Gerdes J, Schwab U, Lemke H et al: Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a nuclear antigen associated with cell proliferation. Int J Cancer 31: 13—20, 1983
- 15) Yonemura Y, Kimura H, Fushida S et al: Analysis of proliferative activity using anti-proliferative cell nuclear antigen antibody in gastric cancer tissue specimens obtained by endoscopic biopsy. Cancer 71: 2448—2453, 1993

### Proliferating Cell Nuclear Antigen Labeling Index in Early Gastric Cancer Using Preoperative Biopsy Specimens

Kiyoshi Maeda, Yong-Suk Chung, Naoyushi Onoda, Yasuyuki Kato, Yuichi Arimoto, Atsunori Nitta and Micho Sowa

First Department of Surgery, Osaka City University Medical School

The expression of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) was investigated by immunohistochemical study in 82 early gastric cancer patients to estimate the correlation between the proliferation kinetics and the depth of invasion, or the lymph node metastasis. PCNA labeling index in cases with submucosal invasion (sm cancer) was significantly higher than in cases with mucosal invasion (m cancer). Also, in patients with lymph node metastasis, labeling index was significantly higher than in those without lymph node metastasis. Therefore, the PCNA labeling index may be useful as a parameter of depth of invasion and lymph node metastasis. Furthermore, six sm cancer patient with lymph node metastasis had high PCNA labeling index ( $\geq 40\%$ ), and there was no lymph node metastasis in cases with low PCNA labeling index ( $< 30\%$ ). As a result of this study, we conclude that reduced radical gastrectomy can be applied for patients with low PCNA labeling index.

**Reprint requests:** Kiyoshi Maeda First Department of Surgery, Osaka City University Medical School  
1-5-7 Asahimachi, Abeno-ku, Osaka, 545 JAPAN