日消外会誌　27（10）：2268～2272，1994年

特集2

食道癌術後臓器ならびにリンパ節再発の術前予知

国立病院九州がんセンター消化器部外科[1]，大分医科大学第1外科[2]
斉藤　貴生[1]　筑波貴与根[2]　内野　眞也[2]　掛谷　和俊[2]
衛藤　　薫[2]　宮原　正樹[2]　小林　迪夫[2]　古澤元之助[1]

食道癌術後臓器ならびにリンパ節再発を術前に予知することを目的とし，癌遺伝子hst-1，核DNA量に従来の予後因子を加え，多変量解析によりこれら再発の危険因子を検討した．胸部食道癌根治切除77例を対象に，hst-1増幅，DNA ploidy，DNA index，heterogeneity（HG），従来の予後因子8項目の計12項目について，Cox比例ハザードモデルによる回帰分析を行った．その結果，臓器再発ではhst-1増幅，組織型，skip lesionが，リンパ節再発ではHG，skip lesionがそれぞれ独立した有意の再発危険因子であった．これらの因子の組み合わせで，臓器再発の頻度は，hst-1（＋）で，かつ，低分化型扁平上皮癌，未分化癌またはその他の組織型の場合に71％に達した．また，生検標本でのhst-1増幅およびHGの診断はほぼ可能であった．以上より，食道癌術後臓器再発については，hst-1増幅と組織型の組み合わせにより，その術前予知が可能と考えられた．

Key words: hst-1 amplification, DNA stemline heterogeneity and postoperative recurrence of esophageal cancer

はじめに

食道癌根治切除後の臓器再発およびリンパ節再発は予後を左右する主要な再発形式であり，これを術前に予知できれば再発形式に対応した適切な治療法の選択が可能になり有用と思われる．我々は癌関連遺伝子hst-1増幅が食道癌の臓器再発と，また，核のDNA量のstemline heterogereity（HG）がリンパ節再発と，それぞれ強い関連を示すことを報告してきたが[1)2)]，これらに従来の臨床理学的な予後因子を加えて，多変量解析により術後再発の危険因子について求め，さらに危険因子の組み合わせによる術後再発の術前予知の可能性について検討した．

方　法

大分医科大学第1外科で切除された胸部食道癌103例を対象とした．このうち77例が根治切除（$C_{1\sim3}$およびm_0）例であった．

再発の術前危険因子として，臨床病理学的因子では，性（男：女），年齢（連続量），部位（Iu：Im：E），X線長径（連続量），X線型（表在：腫瘤・鋸歯：らせん・ロート），他臓器浸潤（$A_{0\sim2}$：A_3），組織型（高・中分化型扁平上皮癌：低分化型扁平上皮癌・未分化癌・その他），skip lesion（無：有）の8項目，核DNA量ではploidy（Diploid：Aneuploid），DNA index（＜1.7：≧1.7），stemline HG（無：有）の3項目，癌遺伝子ではhst-1増幅（無：有）の1項目の計12項目を選んだ．

核DNA量の測定は，パラフィン包埋ブロック標本を用いて，Hedleyらの方法で裸核サスペンジョンを作成し，Flow cytometer（Becton Dickinson社製）で行った[1)]．各病変の全割ブロックすべてについて別々に測定した．一部では生検標本でも測定した．hst-1増幅の測定は，パラフィン包埋ブロックまたは新鮮凍結標本を用いて，Goetzの方法でDNAを抽出しDot blot hybridization法で行った[2)]．3倍以上を増幅（＋）と判定した．

単変量解析は，非連続量についてはKaplan-Meier法での無再発率解析，Log-RankおよびWilcoxon検定，連続量についてはMantel-Haenzel検定によった．多変量解析は，比例ハザードモデルによるCox回帰分析（SAS）によった．

＊第43回日消外会総会シンポ1（1）・再発，浸潤形式からみた消化器癌に対する治療の工夫―消化管
＜1994年7月6日受理＞別刷請求先：斉藤　貴生
〒815　福岡市南区野多目3－1－1　九州がんセンター消化器部外科

Table 1 Risk factors of postoperative lymph node recurrence (Univariate analysis)

	p values		
	Log-rank	generalized wilcoxon	Mantel-Haenzel
Sex	0.0883	0.0735	
Age			0.5165
Site	0.9539	0.9532	
X-ray length			0.1857
X-ray type	0.0531	0.1557	
Invasion to organs	0.7375	0.7922	
Histologic type	0.2946	0.2922	
skip lesion	0.0266	0.0318	
DNA ploidy	0.1876	0.1408	
DNA index	0.6114	0.7077	
DNA heterogeneity	0.0005	0.0041	
hst-1 amplification	0.4011	0.4010	

結　果

根治切除を行い解析可能な77例（臨床病理学的因子77例，hst-1増幅50例，核DNA量47例）を対象に，術後リンパ節再発の危険因子について単変量解析を行った（**Table 1**）．この結果から，術後リンパ節再発と関連があると思われる因子として，性，X線長径，X線型，skip lesion，DNA ploidy，HGの6項目を選び，これを多変量解析にentryした．

解析可能な47例について多変量解析を行った結果，これら6項目のうちHGとskip lesionが，術後リンパ節再発についての有意の独立した危険因子と判定された（**Table 2**）．中でもHGは最も重要な危険因子であった．

Fig. 1は，skip lesionおよびHGの術後リンパ節無再発率との関連を示したものである．skip lesion（＋）例は同（－）例に比べ，また，HG（＋）例は同（－）

Table 2 Risk factors of postoperative lymph node recurrence (Multivariate analysis)

Risk factors	β	p values	Risk ratio
DNA stemline heterogeneity	1.466306	0.0008	4.33(4.16—4.32)
Skip lesion	1.98117	0.0111	7.25(6.88—7.64)

Table 3 The rate of postoperative lymph node recurrence by combination of DNA heterogeneity and skip lesion

	Skip lesion	
	Absent	Present
DNA stemline heterogeneity		
Absent	5/25(20.0%)	3/6(50.0%)
Present	8/16(50.0%)	0/0(－)

Table 4 Risk factors of postoperative organ recurrence (Univariate analysis)

	p values		
	Log-Rank	generalized wilcoxon	Mantel-Haenzel
Sex	0.6507	0.9915	
Age			0.0790
Site	0.2263	0.1365	
X-ray length			0.1139
X-ray type	0.2048	0.2890	
Invasion to organs	0.6746	0.8525	
Histologic type	0.0614	0.1807	
skip lesion	0.0236	0.0264	
DNA ploidy	0.5520	0.3783	
DNA index	0.2412	0.2361	
DNA heterogeneity	0.0289	0.1032	
hst-1 amplification	0.0122	0.0068	

Fig. 1

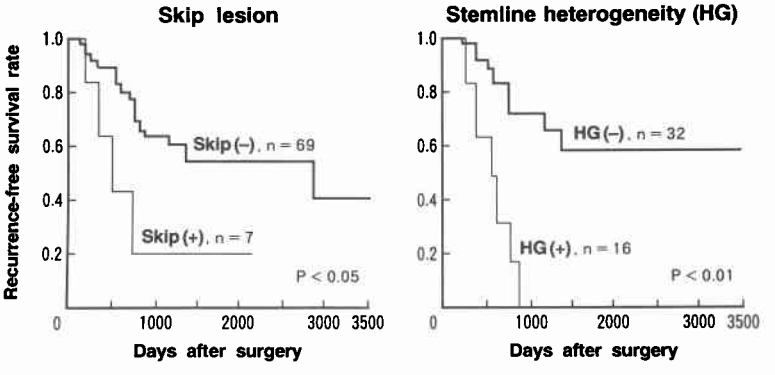

Fig. 2

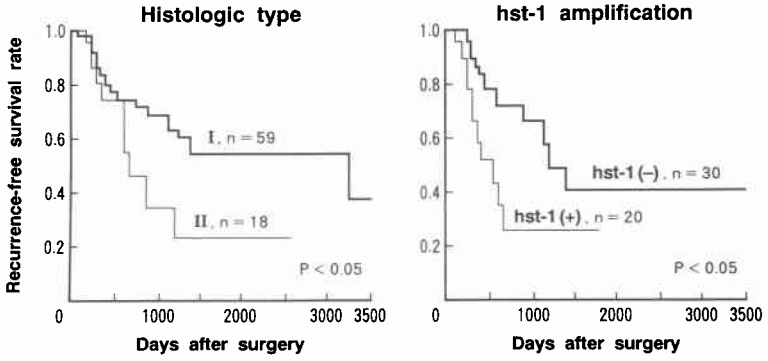

Table 5　Risk factors of postoperative organ recurrence (Multivariate analysis)

Risk factors	β	p values	Risk ratio
hst-1 amplification	1.064780	0.0068	2.90(2.80-3.00)
Histologic type*	1.094720	0.0323	2.99(2.88-3.11)
Skip lesion	1.518172	0.0437	4.56(4.37-4.76)

*Histologic type; well and moderately differentiated squamous cell carcinomas vs. poorly differentiated squamous cell carcinoma, undifferetiated carcinoma and others

Table 6　The rate of postoperative organ recurrence by combination of hst-1 amplification and histologic type

	Histologic type	
	Well and moderately differentiated SCC*	Poorly differentiated SCC,undifferentiated carcinoma and others
hst-1 amplification		
Absent	8/24(33.3%)	3/6(50.0%)
Present	6/13(46.2%)	5/7(71.4%)

*SCC; squamous cell carcinoma

例に比べ，いずれも無再発率が有意に低値であるのが認められる．

そこで，これら2因子を組み合わせた場合の術後リンパ節再発の頻度を求めた（**Table 3**）．HGまたはskip lesionのいずれか一方の因子が（＋）の場合の頻度は50%であったが，両因子とも（＋）の症例は今回の対象例には存在せず，この場合の頻度は不明であった．

次に，同じ症例を対象にして，術後臓器再発の危険因子を同様の方法で求めた．単変量解析の結果(**Table 4**)から，術後臓器再発に関連のあると思われる因子として，部位，X線長径，組織型，skip lesion，DNA index，HG，hst-1増幅の7項目を選び，これを多変量解析にentryした．

多変量解析により，hst-1増幅，組織型，skip lesionの3項目が，術後臓器再発の有意の独立した危険因子と判定され(**Table 5**)，中でもhst-1増幅が最も重要であった．

Fig. 2は，組織型およびhst-1増幅の術後臓器無再発率との関連を示したものである．組織型では，高・中分化型扁平上皮癌に比べ，低分化型扁平上皮癌・未分化癌・その他の組織型が，また，hst-1増幅では，増幅（－）に比べ同（＋）が，それぞれ無再発率が有意に低値となっている．

3項目のうち上位の2項目であるhst-1増幅と組織型を組み合わせた場合の術後臓器再発の頻度を求めると（**Table 6**），hst-1増幅（＋）で，低分化型扁平上皮癌・未分化癌・その他の組織型の場合には，術後臓器再発の頻度は71.4%と極めて高かった．

次に，38例を対象に各病変から一定の基準で2～5個の生検標本を採取し，核DNA量HGについての診断結果を生検標本と切除標本の間で比較すると，両者におけるHG診断の一致率は，生検標本数が2検体で66.7%，3～4検体で83.3%，5検体で100%であり，5検体以上採取すればHGの診断は生検でも可能であった．

また，27例を対象に，同一病変内の複数のブロックについてhst-1増幅を測定した結果，hst-1増幅のHGは認められなかった(データー省略)．そこで，さらに38例を対象に生検標本でhst-1を測定し，hst-1増幅についての診断結果を生検標本と切除標本の間で比較すると，両者におけるhst-1増幅の診断の一致率は78.7%であった．このうち，ホルマリン固定標本での一致率は75.8%，最近検討を始めた新鮮凍結標本でのそれは

100%（4例）であった．

考　察

遠隔成績の向上を目的として，3領域郭清を始めとする拡大手術や集学的治療が行われてきたが，食道癌の5年生存率は20～30%にとどまっている[3)4)]．食道癌の治療成績が不良である最大の理由は，術後再発や再燃が多いことにある．根治手術後の再発形式を臓器，リンパ節，局所，吻合部，その他の再発に分けると，臓器およびリンパ節再発が極立って多い[5)]．大分医科大学第1外科の症例でも，臓器再発が36%，リンパ節再発が29%と高頻度に認められている．

食道癌の治療成績を向上させ，また，その治療を合理的に行うためには，癌の生物学的特性を治療前に診断し，その特性に応じた治療を行うことが重要と考えられる．このような観点から，本研究では，根治切除後の臓器およびリンパ節再発の術前予知の可能性について検討を行った．

近年，癌の発生や進展・転移は多重の遺伝子異常に基づくことが明らかにされつつあるが，食道癌でもhst-1とint-2の同時増幅が28～52%にみられ，その予後や臓器再発と密接に関連することが報告された[6)~8)]．我々もhst-1の高度増幅が食道癌術後臓器再発と関連のあることを報告した[2)]．他方，核DNA量，特にAneuploidやS期分画(SPF)が種々の癌の予後や再発と関連のあることが明らかにされており[9)]，食道癌でもいくつかの報告がされている[10)~13)]．我々も，Aneuploidがリンパ節転移と関連があることを明らかにし[14)]，ついで，stemline HGが術後リンパ節再発と極めて関連の強いことを報告した[1)]．このように，hst-1増幅と核DNA量のHGは，それぞれ食道癌の術後臓器再発とリンパ節再発に密接に関連する新しい因子である．

今回，hst-1増幅と核DNA量のHGに，従来の予後因子をまじえ，食道癌術後再発に関連のある術前因子を多変量解析でしらべたところ，臓器再発についてはhst-1増幅，組織型，skip lesionの3項目が有意に関連のある独立した因子であり，中でもhst-1増幅が最も重要であることが明らかとなった．また，リンパ節再発については，HG，skip lesionが有意に関連のある独立した因子であり，HGが最も重要であった．これは，hst-1増幅およびHGが，これまで知られた予後因子をまじえても，それぞれ臓器再発およびリンパ節再発と最も関連の深い術前の再発危険因子であることを示している．

再発と関連のある因子の組み合わせで再発の頻度を求めると，臓器再発の場合には，hst-1増幅（＋）で組織型が高・中分化型扁平上皮癌以外の時の再発率は71.4%に達し，この組み合わせは臓器再発の予知に有用と考えられた．ただ，リンパ節再発については，関連のある2因子とも（＋）の例が存在せず，この組み合わせは予知の指標として実用性がなかった．

再発を術前に予知するためには，生検組織標本を用いてHGとhst-1増幅を診断することが必要になるが，HGについては一定の基準で5カ所から標本を生検採取することにより，また，hst-1については新鮮標本を生検することによって，診断がほぼ可能と考えられた．

以上の結果から，少なくとも術後臓器再発の術前予知は可能と考えられるが，今後，これらの因子を用いてのprospective studyが必要であろう．さらに，臓器再発が予知される例には，術前・後を通じての積極的化学療法導入など効率的治療が計られるべきである．

文　献

1) Kaketani K, Saito T, Kuwahara A et al: DNA stemline heterogeneity in esophageal cancer accurately identified by flow cytometric analysis. Cancer **72**：3564—3570, 1993
2) Chikuba K, Saito T, Uchino S et al: Association of hst-1 gene amplification with poor postoperative prognosis of esophageal carcinoma. Edited by Nabeya K, Hanaoka T, Nogami H. Recent advance in diseases of the esophagus. Springer-Verlag, Tokyo, 1993, p441—443
3) Isono K, Sato H, Nakayama K et al: Results of nationwide study on the three-field lymph node disection of esophageal cancer. Oncology **48**：411—420, 1991
4) Kato H, Watanabe H, Tachimori Y et al: Evaluation of neck lymph node dissection for thoracic esophageal carcinoma. Ann Thoracic Surg **51**：931—951, 1991
5) Sugimachi K, Inokuchi H, Kuwano H et al: Patterns of recurrence after curative resection for carcinoma of the thoracic part of the esophagus. Surg Gynecol Obstet **157**：537—540, 1983
6) Tsuda T, Tahara E, Kajiyama G et al: High incidence of coamplification of hst-1 and int-2 genes in human esophageal carcinomas. Cancer Res **49**：5505—5508, 1989
7) Kitagawa Y, Ueda M, Ando N et al: Significance of int-2/hst-1 coamplificaton as a prognostic factor in patients with esophageal squamous carcinomas. Cancer Res **51**：

1504—1508, 1991
8) Wagata T, Ishizaki K, Imamura M et al: Deletion of 17p and amplification of the int-2 gene in esophageal carcinoma. Cancer Res 51: 2113—2117, 1991
9) Merkel DE, McGuire WL: Ploidy, proliferative activity and prognosis. DNA flow cytometry of solid tumors. Cancer 65: 1194—1205, 1990
10) Sugimachi K, Matsuoka H, Ohno S et al: Multivariate approach for assessing the prognosis of clinical esophageal carcinoma. Br J Surg 75: 1115—1118, 1988
11) Ruol A, Segalin A, Panozzo M et al: Flow cytometric analysis of squamous cell carcinoma of the esophagus. Cancer 65: 1185—1188, 1990
12) Boettger T, Stoerkel S, Stoeckle M et al: DNA image cytometry. A prognostic tool in squamous cell carcinoma of the esophagus? Cancer 67: 2290—2294, 1991
13) Doki Y, Shiozaki H, Tahara H et al: Prognostic value of DNA Ploidy in squamous cell carcinoma of the esophagus analyzed with improved flow cytometric measurement. Cancer 72: 1814—1818, 1993
14) Kaketani K, Saito T, Kobayashi M: Flow cytometric analysis of nuclea DNA content in esophageal cancer. Aneuploidy as an index for highly malignant potential. Cancer 64: 887—891, 1989

Prediction of Postoperative Organ and Lymph Node Recurrences in Esophageal cancer

Takao Saito[1], Kiyone Chikuba[2], Sinya Uchino[2], Kazutoshi Kaketani[2], Kaoru Etoh[2]
Masaki Miyahara[2], Michio Kobayashi[2] and Motonosuke Furusawa[1]
[1]Department of Gastroenterological Surgery, National Kyushu Cancer Center
[2]First Department of Surgery, Oita Medical University

In an attempt to preoperatively predict organ and lymph node recurrence after radical resection of esophageal cancer, risk factors associated with these recurrences were studied. Twelve factors consisting of hst-1 amplification, DNA ploidy, DNA index, stemline heterogeneity (HG) and 8 known clinicopathological prognostic factors were analyzed in 77 patients with thoracic esophageal cancer using univariate and Cox's multivariate analyses. Amplification of hst-1, histology and skip lesion were statistically significant as independent risk factors for organ recurrence, while HG and skip lesion were factors for lymph node recurrence. By analyzing combinations of these factors, the incidence of organ recurrence was found to be 71% when hst-1 amplification was positive and the histology was a poorly differentiated squamous cell carcinoma, an undifferentiated carcinoma or other histologic types. Amplification of hst-1 and HG were accurately measured in biopsy specimens from most patients. Thus, as far as organ recurrence is concerned, a combination of two risk factors, hst-1 amplification and histology, may be preoperatively predictive of this recurrence following radical resection of esophageal cancer.

Reprint requests: Takao Saito Department of Gastroenterological Surgery, National Kyushu Cancer Center
3-1-1 Natame, Minamiku, Fukuoka, 815 JAPAN