

胃癌原発巣の血管新生からみた再発形式の予測

—第VIII因子関連抗原染色を用いて—

大阪市立大学医学部第1外科

前田 清 鄭 容錫 高塚 聡 小川 佳成
澤田 鉄二 小野田尚佳 加藤 保之 有本 裕一
新田 敦範 曾和 融生

胃癌患者124例を対象とし、血管内皮細胞に特異的な factor VIII related antigen に対するモノクローナル抗体を用いて免疫組織化学染色を行い、切除標本での新生血管の分布パターンを検討した。胃癌原発巣における新生血管の分布は腫瘍内増生型と間質型に大別された。臨床病理学的諸因子別には腫瘍内増生型では間質型に比べて有意に静脈侵襲陽性例、肝転移例が多かった。予後との関係については腫瘍内増生型では間質型に比べ、有意差はないものの予後不良の傾向を示した。また、再発形式については腫瘍内増生型では間質型に比べて有意に ($p < 0.01$) 肝転移再発が高率で、一方、間質型では有意差はないものの腹膜再発が高頻度に認められた。以上、今回の検討では腫瘍内増生型は血行性転移と関連し、胃癌組織での新生血管の分布パターンを検討することは再発形式の予測に有用であることが示唆された。

Key words: angiogenesis, factor VIII related antigen, gastric cancer, recurrence

はじめに

胃癌において術後再発の high risk 症例を選択し、再発部位を的確に予測することは胃癌の治療成績の向上に重要である。一方、古くより癌の発育、増殖には血管新生が必要であり、血管新生の密度は癌の悪性度とも深い関係があるとされている¹⁾²⁾。

今回、われわれは血管内皮細胞に特異的に存在する第VIII因子関連抗原 (factor VIII related antigen: 以下、F VIII-RAg と略記)^{3)~5)} に対するモノクローナル抗体を用いて胃癌原発巣における血管新生と臨床病理学的諸因子および術後再発との関係について免疫組織化学的に検討した。

対象と方法

1986, 1987年に当教室で切除された胃癌患者124例を対象とした。

これらの症例より摘出した標本はホルマリン固定後、癌部を含めて平均4~5か所より組織を取り出し、パラフィン包埋を行った。各パラフィンブロックより4 μ m切片を作製し、avidin-biotin peroxidase com-

plex (ABC) 法にて免疫組織化学染色を行った (VECTOR 社製 Vectastain ABC Kit を使用)。1次抗体として抗 FVIII-RAg モノクローナル抗体 (F8/86; Dakopatts) を100倍希釈して用い、室温にて組織切片と2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。判定は光学顕微鏡的に行い、内皮細胞が褐色に染色された capillaries と venules を微小血管と同定した。

臨床病理学的所見および用語は胃癌取扱規約⁶⁾に従い、組織型は低分化腺癌のうち、癌胞巣が髄様性、充実性に増殖し、間質成分の乏しいものを por 1、間質成分が比較的多く、小癌胞巣がびまん性浸潤をしめすものを por 2として分類した。

有意差検定は χ^2 検定を用い、治療後の予後については Kaplan-Meier 法にて生存率を算出し、一般化 Wilcoxon 法にて検定した。今回の検討では $p < 0.05$ を有意差ありとした。

結 果

124症例の年齢は33歳から78歳まで平均58.2歳で、性別は男性90例、女性34例であった。124例中治癒切除されたのは92例、非治癒切除例は32例であった。

<1994年6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

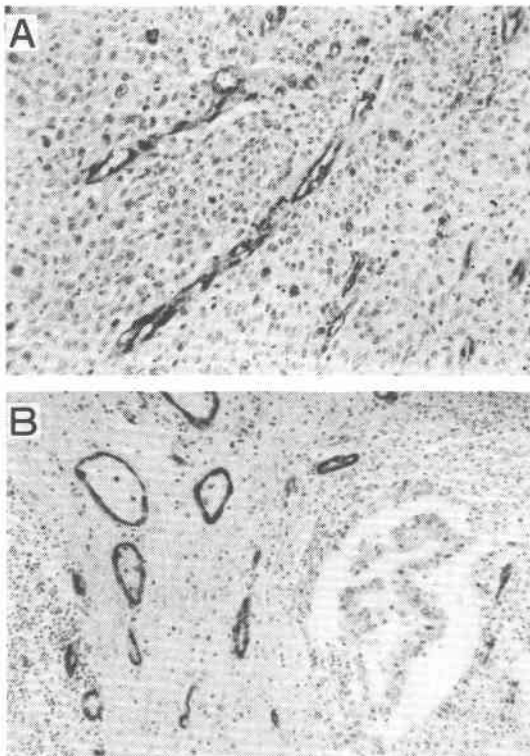
F VIII-RAg の免疫染色は血管内皮細胞のみが染色され、血管の同定は容易であった。癌巣およびその周囲の間質では非癌部に比べて血管分布は密であったが、癌巣周囲の多くの血管は癌の増殖により圧排され、内腔が狭小化していた。血管の分布密度は症例間で大きな差がみられ、また、同一腫瘍内においても heterogeneity がみられ、密な分布をしめす部位と粗な分布をしめす部位が認められた。

癌巣における血管新生の分布パターンには血管が主に腫瘍中心部に認められ、癌細胞に隣接して多数存在するタイプと癌細胞から離れた腫瘍辺縁部の間質に散在性に存在するタイプの2通りに大別された。前者が優位に認められるものを腫瘍内増生型 (intratumoral type)、後者が優位なものを間質型 (stromal type) とした (Fig. 1A, 1B)。124例中腫瘍内増生型は39例 (31.5%)、間質型は85例 (68.5%) であった。血管密度については両群間に差は認められなかった。

今回の検討では腫瘍内増生型と間質型の2群にわけ

Fig. 1 Immunohistochemical staining for F VIII-RAg in gastric cancer ($\times 200$).

A: intratumoral type, B: stromal type



て臨床病理学的諸因子、予後との関係について比較検討した。

組織型との関係では腫瘍内増生型は por 1が、間質型は por 2が多い傾向がみられたが、有意差は認められなかった。肉眼型、壁深達度、リンパ節転移、リンパ管侵襲についても両群間に明らかな差はみられなかった。静脈侵襲については間質型では静脈侵襲陽性例が49.4% (42/85) にみられたのに対し、腫瘍内増生型では71.8% (29/39) を占め、間質型よりも静脈侵襲が有意に ($p < 0.05$) 高率に認められた (Table 1)。

組織学的進行程度別にも腫瘍内増生型では stage I 20.5%, stage IV が46.1%であるのに対し、間質型では stage I 32.9%, stage IV 24.7%と腫瘍内増生型の

Table 1 Correlation between distribution of the microvessel and the clinicopathological factors

Variable	Distribution of the microvessels		p value
	intratumoral type (n=39)	stromal type (n=85)	
Histologic type			
pap	6(17.1)	9(10.6)	NS
tub 1	4(10.3)	12(14.1)	
tub 2	6(17.1)	13(15.3)	
por 1	12(30.8)	18(21.2)	
por 2	8(20.5)	30(35.3)	
sig	2(5.1)	1(1.2)	
muc	1(2.6)	2(2.4)	
Macroscopic type			
0	11(28.1)	35(41.2)	NS
1	4(10.3)	3(3.5)	
2	2(5.1)	8(9.4)	
3	18(46.2)	33(38.8)	
4	4(10.3)	4(4.7)	
5	0(0)	2(2.4)	
Depth of invasion			
m, sm	6(15.4)	24(28.3)	NS
pm, ss	10(25.7)	21(24.8)	
se, sei	23(58.9)	40(47.2)	
Lymph node metastasis			
negative	12(30.8)	35(41.1)	NS
positive	27(69.2)	50(48.9)	
Lymphatic involvement			
negative	14(35.9)	28(32.9)	NS
positive	25(64.1)	57(67.1)	
Venous involvement type			
negative	11(28.2)	43(50.6)	<0.05
positive	28(71.8)	42(49.4)	

Fig. 2 Correlation between distribution of the microvessels and histologic stage.

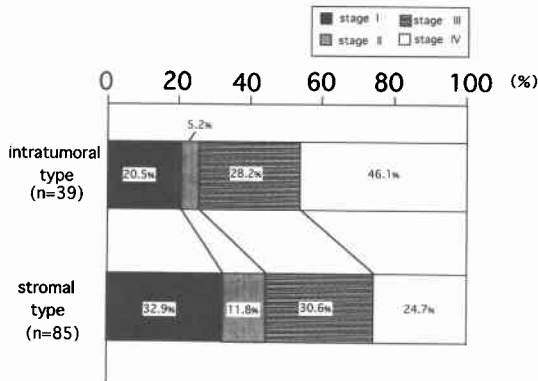


Fig. 3 Correlation between distribution of the microvessels and liver metastasis.

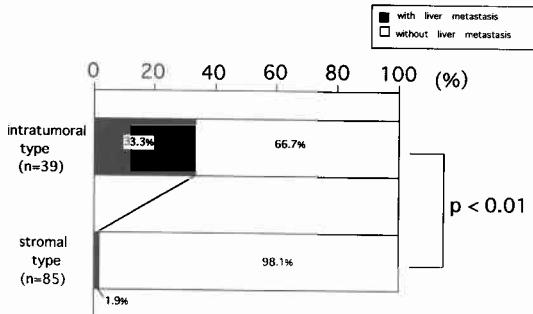


Fig. 4 Correlation between distribution of the microvessels and the peritoneal metastasis.

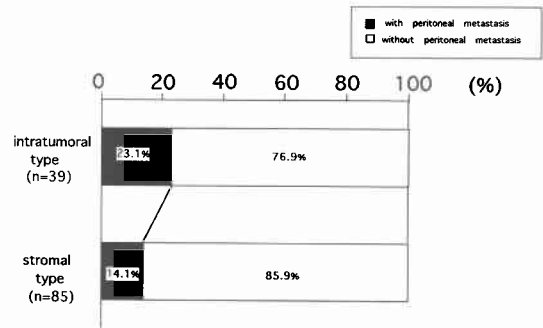


Fig. 5 Survival rate after curative resection.

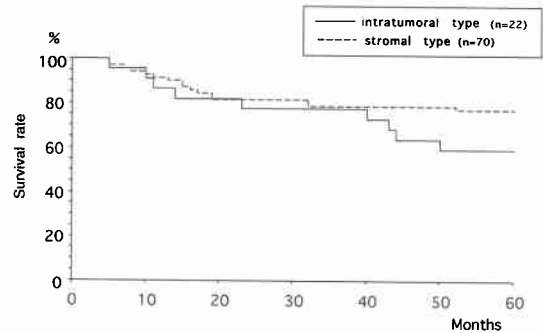


Table 2 Correlation between the distribution of the microvessel and the recurrence

Distribution of the microvessels	Recurrent cases	Recurrent site
intratumoral type (n=22)	9 (40.7%)	liver 6 (66.7%)
		peritoneum 2 (22.2%)
		lymph node 1 (11.1%)
stromal type (n=70)	17 (21.5%)	peritoneum 13 (76.7%)
		liver 1 (5.9%)
		lymph node 1 (5.9%)
		other 2 (11.5%)

* $p < 0.01$

ほうが進行例が多く、間質型には早期癌が多かったが、有意差はなかった (Fig. 2, n.s). stage I, II の占める割合も両群間に差はみられなかった。

手術時、肝転移は14例、腹膜転移は21例に認められたが、これら遠隔転移と新生血管分布パターンとの関係では間質型では肝転移はわずか1例 (1.9%) のみ認められたが、腫瘍内増生型では肝転移が13例 (33.3%) にみられ、間質型に比べて肝転移が有意に ($p < 0.001$) 高頻度に認められた (Fig. 3). 腹膜転移の有無別には両群間に有意差は認めなかった (Fig. 4, n.s).

ついで治癒切除92例の予後について Kaplan-Meier 法にて検討すると腫瘍内増生型では5年生存率59.1% (13/22), 間質型では75.7% (53/70) と腫瘍内増生型のほうが予後不良の傾向を示したが、有意差はなかった (Fig. 5, n.s). しかし、再発形式との関係では腫瘍内増生型では肝転移再発が66.7% (6/9), 腹膜再発が22.2% (2/9) であるのに対し、間質型では腹膜再発が

76.7% (13/17) を占め、肝転移再発は1例 (5.9%) にすぎなかった。腫瘍内増生型では間質型に比べて有意に ($p < 0.01$) 肝転移再発が高率で、一方、間質型では有意差はないものの腹膜再発が高頻度に認められた (Table 2).

考 察

一般に癌組織には多くの微小血管が存在し、癌の増殖、発育には血管新生が必要とされている¹⁾²⁾。また、

近年では癌細胞から分泌される増殖因子により血管新生が誘導され、血管新生は癌の悪性度、増殖能と深い関係があるとされている^{7)~9)}。

従来、腫瘍内の血管同定には Victoria Blue などの弾性染色が施行されていたが、この方法では毛細血管や細静脈のような弾性線維を持たない血管は同定できなかった¹⁰⁾¹¹⁾。一方、F VIII-RAg は血管内皮細胞内で合成され、内皮細胞に局在する高分子蛋白である^{3)~5)}。この抗原に対するモノクローナル抗体を用いた免疫染色では血管内皮が直接染色され、血管の同定を正確に、かつ容易に行うことができ、とくに毛細血管や細静脈のような微小血管での染色性がすぐれているとされている^{3)~5)}。

近年、胃癌の治療成績は手術手技や診断技術の進歩にともない、著しく向上している。しかし、遠隔臓器への血行性転移をきたした症例や腹膜転移例ではその予後はきわめて不良で、胃癌患者の死因の約50%は腹膜転移が、約25%は肝転移が占めている¹²⁾。したがって肝転移、腹膜転移の high risk 症例を的確に選択することは治療成績の向上につながると思われる。

今回われわれは F VIII-RAg に対するモノクローナル抗体を用いて免疫染色を行い、胃癌原発巣における新生血管の分布と再発形式、遠隔転移との関係について検討した。胃癌患者の予後、とくに再発形式と血管新生との関連についての報告は現在までみられないが、今回の検討では腫瘍内増生型では肝転移再発が有意に高頻度に認められ、一方、間質型では有意差はないものの腹膜再発が高率にみられた。遠隔転移との関係については腫瘍内増生型では肝転移が有意に高率に認められたが、腹膜転移については血管新生の分布様式との間に明らかな相関関係はみられなかった。一般に肝転移胃癌の特徴として肉眼形態では Borrmann 1, 2の限局型が、組織型としては高分化型が多いとされているが¹³⁾、曾和ら¹⁴⁾、木村ら¹⁵⁾は肉眼型、組織型を問わず、髄様性増殖を示すタイプに肝転移陽性例が多かったと報告している。今回の検討では腫瘍内増生型では間質型に比べて髄様性増殖をしめす por 1が多く認められたが、有意差はなかった。その他の組織型の分布についても両群間に差はみられないにもかかわらず、腫瘍内増生型では肝転移、肝転移再発が高率に認められた。

以上より従来の形態学的な検討だけでなく胃原発巣の血管新生の分布パターンの検討も肝転移の high risk 症例を選択するうえで有用であることが示唆さ

れた。多くの新生血管が癌細胞に隣接している腫瘍内増生型では癌細胞が血管内に流入しやすく血行性転移をおこしやすいと考えられ、今回の成績でも腫瘍内増生型と血行性転移との間に強い相関が認められた。

腹膜転移については Borrmann 3, 4の浸潤型および低分化型に多いとされている¹⁶⁾。新生血管の分布パターンと腹膜再発、腹膜転移との間には明らかな相関関係は認められなかったが、間質型では腹膜再発が高率に認められた。間質型に腹膜再発が多い理由については不明であるが、このような症例では腹膜再発に留意した経過観察が必要であると思われる。

以上、今回の検討では F VIII-RAg に対するモノクローナル抗体を用いた免疫組織化学染色法は微小血管の同定するうえできわめて簡便であり、癌組織での新生血管の分布パターンを検討することは再発部位の予測に有用であることが示唆された。

文 献

- 1) Samejima N, Yamazaki K: A study on the vascular proliferation in tissues around the tumor in breast cancer. *Jpn J Surg* 18: 235-242, 1988
- 2) 前田隆志: マイクロ波サーモグラフィによる乳腺疾患の診断—各因子別にみた補助診断法としての検討—. *日外会誌* 91: 622-630, 1990
- 3) Weudner N, Semple JP, Welch WR et al: Tumor angiogenesis and metastasis—correlation in invasive breast carcinoma. *N Engl J Med* 324: 1-8, 1991
- 4) 斉藤 修, 笠原健弘, 三田村美紀子: 第八因子関連抗原の病理診断への応用とその問題点. *臨検* 28: 1011-1018, 1984
- 5) 坂江清弘, 八木幸夫, 佐藤栄一: 血管性腫瘍における第VIII因子関連抗原の免疫組織科学的検討. *癌の臨* 28: 1038-1042, 1982
- 6) 胃癌研究会編: 胃癌取扱い規約. 第11版. 金原出版, 東京, 1985
- 7) 豊田淑江, 森田育男, 室田誠逸: 血管新生研究最新の進歩. *血管内皮* 2: 449-455, 1992
- 8) 佐藤靖史: 増殖因子と血管新生. *血管内皮* 2: 485-490, 1992
- 9) 滝川正春, 鈴木不二男: ポリアミンの血管誘導作用. *血管内皮* 2: 496-502, 1992
- 10) 加藤孝男, 木村恒人, 村木 博ほか: 第VIII因子関連抗原染色を用いた乳癌の血管侵襲と病理学的因子との関係についての検討. *日臨外医会誌* 51: 1397-1403, 1990
- 11) 加藤孝男, 木村恒人, 村木 博ほか: 第VIII因子関連抗原染色を用いた乳癌の血管新生についての検討. *J Jpn Soc Cancer Ther* 27: 1819-1828, 1992

- 12) 中島聡総, 木村 巖, 中川安芳ほか: 胃癌の非治癒切除症例の予後. 癌の臨 20: 317-323, 1974
- 13) 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
- 14) 曾和融生, 加藤保之, 芳野裕明ほか: 肝転移胃癌の検討—とくに髄様型低分化腺癌と核DNAとの関連について. 日消外会誌 21: 32-37, 1988
- 15) 木村 修, 万木英一, 岡本恒之: 肝転移, 肝再発のみられた胃癌の病理組織科学的特徴—とくに髄様型低分化腺癌について. 癌の臨 30: 131-137, 1984
- 16) 西 満正, 大山 満, 中島聡総ほか: 癌性腹膜炎(播腫)の発生病理. 外科 35: 385-390, 1973

**Tumor Angiogenesis in Gastric Carcinoma as an Indicator of Recurrence
—Using Monoclonal Antibody Against Factor VII Related Antigen—**

Kiyoshi Maeda, Yong-Suk Chung, Satoshi Takatsuka, Yoshinari Ogawa, Tetsuji Sawada,
Naoyoshi Onoda, Yasuyuki Kato, Yuichi Arimoto,
Atsunori Nitta and Michio Sowa
First Department of Surgery, Osaka City University Medical School

The expression of factor VIII related antigen (FVIII-RAg) was investigated by immunohistochemical study of 124 gastric cancer patients to determine the correlation between the tumor's angiogenesis and the clinicopathological factors and the prognosis. The distribution of the microvessels was divided into the intratumoral type and the stromal type. Involvement of veins and liver metastasis were more often observed in patients with the intratumoral type. Patients with the intratumoral type tended to have a worse prognosis than patients with the stromal type. According to the site of recurrence, liver metastasis was significantly ($p < 0.01$) more common in patients with the intratumoral type than those with the stromal type. Otherwise, patients with the stromal type tended to have the recurrence in the peritoneum. As a result of this study, we conclude that the intratumoral type is associated with blood-borne metastasis and that examination of the distribution of microvessels may be useful as a predictor of the site of recurrence.

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