日消外会誌　27（12）：2523～2529，1994年

胃悪性リンパ腫の生物学的悪性度および予後因子としてのAgNORsの役割

大阪警察病院外科，同　病理*，国立呉病院外科**
長谷川順一　中尾　量保　仲原　正明　荻野　信夫
西田　俊朗　辻本　正彦*　濱路　政晴**

胃原発の非ホジキンリンパ腫（以下，NHL）31例を対象とし，nucleolar organizer regions-associated proteins（以下，AgNORs）を中心に，細胞学的悪性度と予後の関係を検討した．AgNORsは細胞周期中のS期分画の比率と正の相関が認められた（$p<0.01$）．予後因子として組織型，臨床病期，DNA ploidy，AgNORs，手術根治度，化学療法の有無につき単変量解析を行った結果，臨床病期，AgNORs，手術根治度の3因子に有意の差を得た（$p<0.01$）．次にこの3因子について多変量解析を行った結果，AgNORsが最重要予後因子となった（$p<0.05$）．また治癒切除の23例について，再発の有無でAgNORsを検討した結果，有再発症例（9.5±0.6）は無再発症例（5.4±1.5）に比べ高値であった（$p<0.01$）．以上よりAgNORsは胃NHLの生物学的悪性度を示す良い指標であり予後因子として有用と考えられた．

Key words：gastric non-Hodgkin's lymphoma，DNA analysis，nucleolar organizer regions-associated protein

はじめに

胃は扁桃と並んで節外性非ホジキンリンパ腫（以下，NHLと略記）の好発部位であるが[1)2)]，胃悪性腫瘍に占める割合は，本邦で1％[1)]，欧米で5％程度と[3)]，比較的まれな疾患であるため，これまでその予後因子などの評価は癌腫に準じ行われることが多かった．しかし，胃原発NHLは化学療法あるいは放射線療法に対する感受性が高く[4)]，また癌腫の術後再発の最も大きな因子である腹膜播種が少ない[5)]など，癌腫とは生物学的特性が異なるため，画一的に評価することには問題がある．このため近年，腫瘍の増殖能を反映する種々の指標を用いた解析が進められている．このうちAgNORs染色による核内の平均黒褐色顆粒数（以下，AgNORs countと略記）はパラフィン切片で検索可能な生物学的悪性度の指標として広く使用されている．

今回われわれは胃原発NHL手術例を対象に，AgNORs countを測定し，他の予後因子と比較することにより，AgNORs countが胃原発NHLの臨床的悪性度の指標となりうるかをretrospectiveに検討した．

＜1994年9月14日受理＞別刷請求先：長谷川順一
〒565　吹田市山田丘2－2　大阪大学医学部第1外科

対象および方法

（1）対象

対象は1975年から1992年の18年間に大阪警察病院および国立呉病院で手術を施行し，予後の明らかな胃原発NHL 31例で，いずれの症例も術前の化学療法は行っていなかった．性別は男性19例，女性12例で，年齢は31～74歳（平均57歳）であった．

病理組織学的検索は，その分類基準中に悪性度を加味し，低悪性度と高悪性型に2大別したKiel分類[6)]に従い分類した．対象症例の組織型は，低悪性型：19例（Lymphocytic：3例，Centrocytic：7例，Centroblastic/Centrocytic：9例），高悪性型：12例（Centroblastic：11例，Immunoblastic：1例）であった．

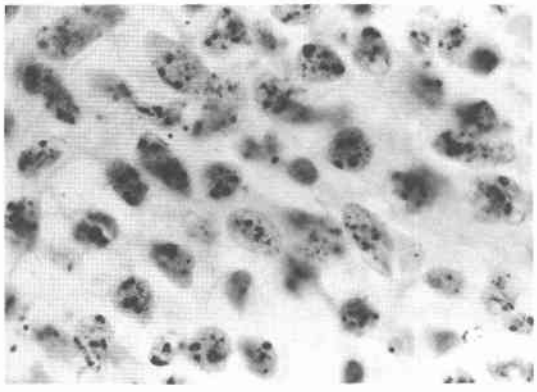
病期分類については，Naqviらの分類[7)]に従い分類し，I期14例，II期12例，III期4例，IV期1例であった．

（2）方法

パラフィン包埋ブロックから，顕微鏡下に病巣を確認後，同部位よりAgNORs染色用に3μm，flow cytometry用に50μmの切片を採取し測定に用いた．

AgNORs countの検索はCrockerらの染色法[8)]に

Fig. 1　AgNORs staining. Black dots in each nucleus are AgNORs.



準じ，油浸レンズ（対物×100，接眼×10）にて，核内の陽性ドット数をランダムに100核計測し，1核あたりの平均AgNORsのドット数を求めた（**Fig. 1**）．AgNORs countのcut-off値は生存率の単変量解析においてχ^2値が最大となる値である8個を用いた．

核DNAの解析は，Schutte-Vindeloyらの方法[9)10)]に準じてトリプシンで裸核処理を行い，propidium iodideで染色，FACS-IV flow-cytometerおよびCell FITを用いヒストグラムを作成した．CV値8％以下を評価可能とし，DNA ploidyおよび細胞周期中のS期分画の比率（以下，SPFと略記）を算出した．単峰性のG0/1のみが認められるdiploidyに対し，多峰性ないし，異常ピークを示した症例をaneuploidyと判定した．得られたヒストグラムのG0/1ピークのCV値は，4.3±1.2（2.5～7.8％）であった．

生存率の解析方法は組織学的悪性度，臨床病期分類，AgNORs count，ploidy pattern，手術根治度，術後化学療法の有無の計6因子を単変量で解析し，予後因子となる可能性がある項目を選択し多変量解析を行った．単変量解析はlogrank test，多変量解析はCoxの比例ハザード法（SAS system，PROC PHGLM）を用いた．生存率曲線はKaplan-Meier法を用い求めた．有意差検定は危険率0.05以下を有意とした．

結　果

1．SPFとAgNORsとの関連性

胃NHL 31例のAgNORs countは2.5～11.1個（平均6.1個），ヒストグラムより算出したSPFは0.9～41.0％（平均17.6％）であった．この両者の比較を行ったところ相関係数0.8463（$p<0.01$）と明らかな正の相関が認められた（**Fig. 2**）．

Fig. 2　Correlation between AgNORs count and SPF. The AgNORs count revealed a good correlation with SPF measured by flow cytometry. The equation for the regression line was: $y=0.1634x+3.141$.

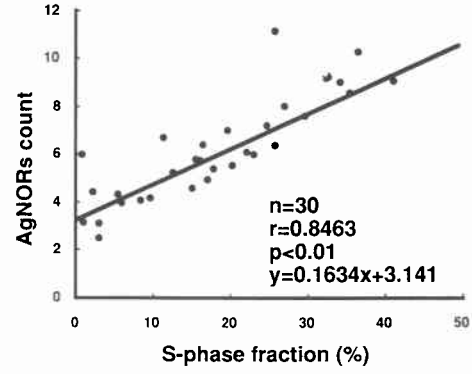
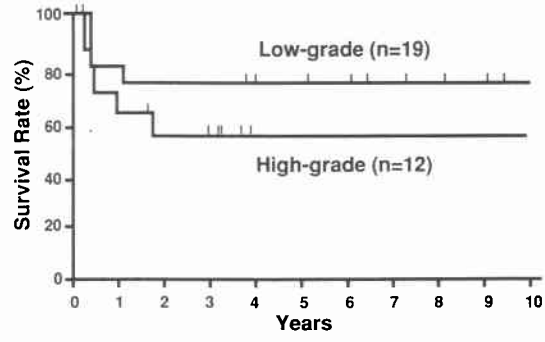


Fig. 3　Histologic type by Kiel classification and cumulative survival



2．単変量解析による予後解析

組織学的悪性度による比較では，3年生存率は低悪性型75.6％，高悪性型57.1％であり，高悪性型にもかかわらず10年以上の生存例も認められた（**Fig. 3**）．

臨床病期はIII期以上になるとその予後が極めて不良となり，3年生存率ではI期82.5％，II期75.0％に対しIII期以上は20.0％であった（$p<0.01$）（**Fig. 4**）．

Ploidy pattern別の3年生存率はdiploidy 79.0％，aneuploidy 48.0％であり，それぞれの生存率に差を認めなかった（**Fig. 5**）．

AgNORs count 8個で2群に分類し，それぞれの予後を比較したところ，8個未満の群の3年生存率が79.2％であるのに対し，8個以上の群には生存例がなく，8個以上の群は有意に予後不良であった（$p<0.01$）（**Fig. 6**）．

Fig. 4 Clinical stage according to Naqvi classification

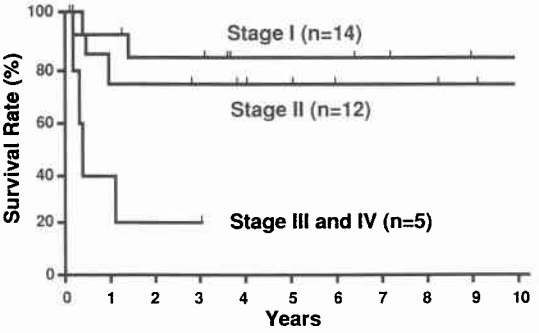


Fig. 5 DNA ploidy and cumulative survival

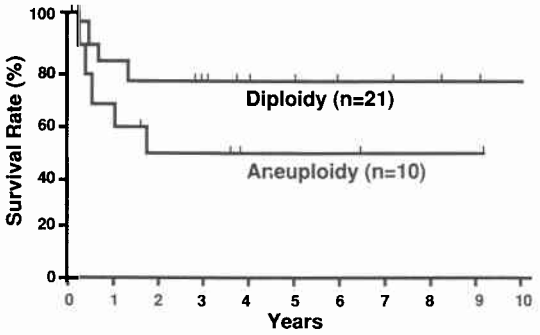


Fig. 6 AgNORs count and cumulative survival. The survival of patients with gastric non Hodgkin's lymphoma which AgNORs count was below 8, was significantly longer than that above 8.

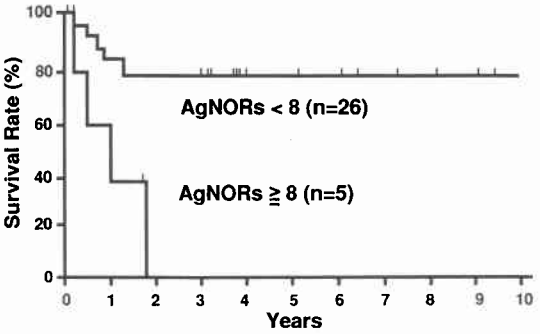


Fig. 7 Resectability and cumulative survival

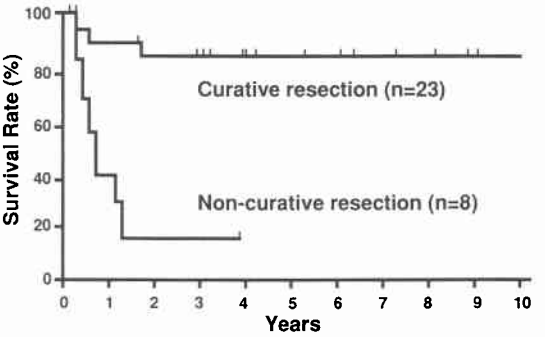


Fig. 8 Chemotherapy and cumulative survival

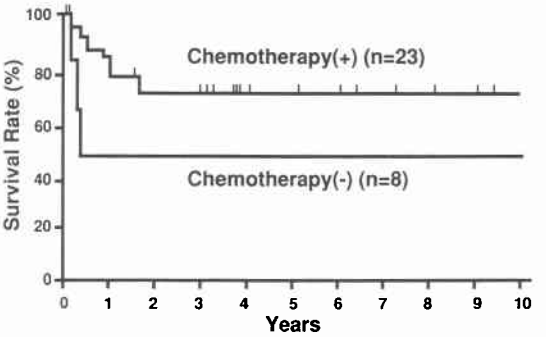


Table 1 Three-year survival rate and clinicopathological parameters

Factor		No. of patients	3-year survival (%)	Logrank test
Histologic type	Low-grade	19	76.5	0.36
	High-grade	12	57.1	
Clinical stage	I	14	82.5	
	II	12	75.0	<0.01
	≧III	5	20.0	
DNA ploidy	Diploidy	21	79.0	0.12
	Aneuploidy	10	48.0	
AgNORs count	<8	26	79.2	<0.01
	≧8	5	0	
Resectability	Curative	23	86.1	<0.01
	Noncurative	8	14.3	
Chemotherapy	(+)	23	73.7	0.16
	(−)	8	50.0	

胃癌取扱い規約に準じ組織学的治癒切除群と非治癒切除群の比較を行ったところ，明らかに非治癒切除群の予後は不良となり，その3年生存率はそれぞれ86.1%，14.3%であった（$p<0.01$）（**Fig. 7**）.

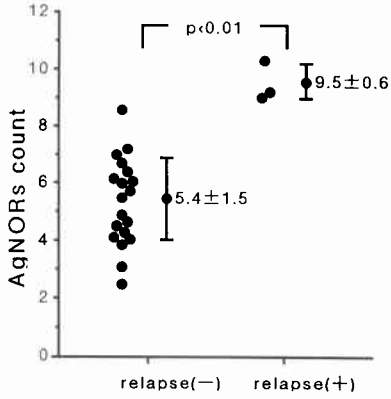
CHOP-bleomycin を主体とする術後化学療法施行例，未施行例間では，3年生存率がそれぞれ73.7%，50.0%でその予後に有意差は認められなかった（**Fig. 8**）.

以上単変量解析による検討で，AgNORs count，臨床病期，手術根治度の3因子が予後因子となる可能性が示唆された（**Table 1**）.

Table 2 Major prognostic factor for gastric non-Hodgkin's lymphoma by multivariate analysis using Cox's proportional harzard model

Factor	Beta	Chi-sguare	P
AgNORs count	2.5377	12.651	0.0118
Clinical stage	1.4192	4.134	0.0755
Resectability	1.4043	4.078	0.1560

Fig. 9 Comparison of AgNORs count and relapse after curative resection. Median censoring time: relapse (−) 92 months, relapse (+) 8 months.



3．多変量解析による予後解析

単変量解析で予後因子としての可能性がもたれた3因子を説明変数，術後生存期間を目的変数としてCoxの比例ハザード法により解析を行った結果，AgNORs countが有意な予後因子と判定された（**Table 2**）．

4．治癒切除例の術後再発とAgNORs

組織学的に治癒切除しえた23例におけるAgNORsと術後再発の有無(有再発例：3例，無再発例：20例)を比較検討した．AgNORsは，有再発が9.5±0.6個，無再発が5.4±1.5個で，有再発症例が有意に高値であり（$p<0.01$），治癒切除しえた症例であってもAgNORsが高値を示した症例は再発する可能性が高いことが判明した（**Fig. 9**）．

考　察

胃原発NHLは節外性NHLの特徴として，全身化する前に比較的長期間局所に限局する傾向があり[11]，癌に比べて腹膜播種が少ないこともあって[5]，外科的治療や放射線などの局所療法の対象となることが多い疾患である．その予後を左右する因子に，腫瘍要因として組織型，腫瘍径，リンパ節転移の有無，臨床病期などが，治療要因として手術根治度，化学療法の有無，放射線療法などが報告されているが[3)12)~22)]，手術根治度以外は，その予後因子としての有用性の評価は，報告により異なり，統一した見解は得られていない．

今回われわれはnucleolar organizer regions関連蛋白を解析し，これまで報告されてきた他の予後因子と比較することにより，腫瘍の生物学的悪性度および予後との関係を検討した．

NHLの組織型に関しては種々の分類が認められ，国際的にはWorking formulation for clinical usage（以下，WFと略記）分類[2]，Kiel分類[6]，本邦ではLymphoma Study Group（以下，LSGと略記）分類[24]などが提唱されている．消化管原発NHLにおいては組織分類上，diffuse large cellが中程度悪性型に入るWF分類およびLSG分類よりもcentroblastic typeまたはimmunoblastic typeとして高悪性型に入るKiel分類における悪性度評価がより予後に関与すると報告されているため[21]，今回われわれはKiel分類に基づき2群に分け，比較検討した．しかしながら明らかな差を認めず，組織型学的な悪性度評価に加え他の補助的指標の必要性が考えられた(Fig. 3，Table 1)．

NHLの病期分類はAnn Arbor分類[25]が一般的に用いられている．しかし，この分類は，節性NHLを中心として考えられた分類であり腫瘍深達度，リンパ節転移の程度などが考慮されておらず，胃原発例にそのまま適用するには問題がある[14)17]．今回これら腫瘍深達度およびリンパ節転移の有無を考慮したNaqviらの分類[7]に基づき臨床病期を評価した．Naqviらの原著によると，胃原発例の5年生存率はI期64%，II期42.1%，III期17.4%，IV期12.5%と病期が進むにつれて予後不良であることが示されている．一方，術後化学療法および放射線療法の併用により完全寛解が得られた症例では，高悪性型の組織型を示し，かつ病期分類II期以上の進行例であっても5年生存率が79%と高く，進行例といえども予後は必ずしも悪くないとする報告[18]も認められる．われわれの症例の3年生存率は，I期82.5%，II期75.0%，III期以上20.0%とNaqviらの報告同様進行度が進むにつれて生存率は低下し，単変量解析においても予後因子としての可能性が示唆された．

AgNORsは1986年にPlotonら[26]により，非常に簡便な改良鍍銀法を用い通常の病理組織標本でもnucleolar organizer regions関連蛋白を検索することが可能となって以来，臨床研究が進められてきた．悪性

腫瘍におけるAgNORs数の増加には種々の要因が推定されているが[27]，最大の要因は増殖分画の増加である．AgNORsは静止期にある細胞では核小体に一致した1個のドットとして認められ，増殖期には核小体の核内分散に伴って増加する．こうしたcell cycleとAgNORsとの関係は，PHA刺激人リンパ球で確かめられている[28]．特にNHLではその増殖性に対応したAgNORs数の増加が見られ，SPFやKi-67陽性細胞数とよく相関することが報告されている[29)30]．本研究でも，パラフィン切片が適用可能な核DNA量解析とAgNORsを同時に検討した結果，胃NHL症例においてもSPFとAgNORsはよく相関し，増殖能を反映することが確認された．核DNA量および腫瘍増殖能と予後との関係は，主に節性NHLに関するものは認められるが[31]，胃NHLに関してはDNA量に関するもののみで[32]，腫瘍増殖能からの予後解析の報告は認められない．したがって本研究では，外科的疾患と考えられる胃NHLにもこれら生物学的悪性度の評価が予後因子として有効か否かを検討した．この際，腫瘍増殖能を反映する指標は，お互いよく相関することが確かめられたため，多変量解析を行う際，予後因子としての重みが相殺される可能性が高いという理由により，測定方法が容易なAgNORs countのみを説明変数として用いた．その結果，AgNORs countは腫瘍要因（組織学的悪性度，臨床病期分類，核DNA量，AgNORs）および治療要因（手術根治度，化学療法の有無）中最も予後を反映する因子であることが判明した．さらに治癒切除群においても術後有再発症例は無再発症例に比べAgNORs countが高値であり，治癒切除後といえども摘出腫瘍のAgNORs countが高い症例は，術後の徹底した補助療法および長期にわたる経過観察が必要であると考えられた．

治療要因のうち手術根治度が，重要な予後因子であることは一致した意見である[12)16)18)22]．われわれの検討でも，治癒切除群の3年生存率が86.1%であるのに比べ，非治癒切除群は14.3%と予後不良であった．しかし非治癒切除術後頻回の化学療法の結果，4年を経過した現在も病変の再燃なく外来にて経過観察中の症例が認められること，および多変量解析の結果手術根治度に有意差が認められなかったことより，非治癒切除症例への集学的治療の可能性および重要性が再認識された．

化学療法に関してはCHOP療法，CHOP-bleomycin療法などの多剤併用療法が行われ，その有効性が報告されている[19)20)33]．われわれも術後補助化学療法としてCHOP-bleomycin療法を主に行ってきたが，その生存率に差を認めなかった．これは今回の検討がretrospectiveなもので，結果的に化学療法を行わなかった症例が，全例AgNORs count 8個未満の腫瘍増殖能が低い症例ばかりであったためと考えられる．一方，AgNORs countが8個以上の5例に対しては，全例に術後化学療法を行っていたにもかかわらず2年以上の生存例は認めず，腫瘍増殖能の高い症例に対しては化学療法の回数および量を増やすなど，術後補助療法に工夫が必要と考えられた．

以上，胃NHLは腫瘍増殖能を加味した組織学的悪性度診断が必要であり，その指標としてAgNORs countは有用である．また胃NHLは治癒切除群といえどもAgNORs countの高い症例は，長期にわたるより厳重な経過観察と術後化学療法の複数回施行などの工夫が必要である．

文　献

1) 毛利　昇，島峰徹郎：筋外性non-Hodgkinリンパ腫．日臨　41：145—153，1983
2) Freemann C, Berg JW, Cutler SJ: Occurrence and prognosis of extranodal lymphomas. Cancer 29：252—260，1972
3) Shimm DS, Dosoretz DE, Anderson T et al: Primary gastric lymphoma. An analysis with emphasis on prognostic factors and radiation therapy. Cancer 52：2044—2048，1983
4) 木下　平，福富隆志，笹子三津留ほか：図説，臨床癌シリーズNo.17白血病・リンパ腫・メジカルビュー社，東京，1987, p176—179
5) 高木國夫：消化管の悪性リンパ腫．内科　60：1258—1265，1987
6) Lennert K, Mohri N: Histopathology and diagnosis of non-Hodgkin's lymphomas. Edited by Lennert K. Handbuch der speziellen pathologischen Anatomie und Histologie. I/3. Lymph nodes Part B. Malignant lymphomas other than Hodgkin's diease. Hisktology. Cytology. Ultrastructure. Immunology. Springer-Verlag, New York, Heidelberg, Berlin, 1978, p111—469
7) Naqvi MS, Burrow L, Kark AE: Lymphoma of the gastrointestinal tract: Prognostic guides based on 162 cases. Ann Surg 170：221—231，1969
8) Schutte B, Reynder MJ, Bosman FT et al: Flow cytometric determination of DNA ploidy level in nuclei isolated from paraffin-embedded

tissue. Cytometry 6：26—30, 1985
9) Vindelov LL, Christensen IL, Nissen NI: A detergenttrypsin method for the preparation of nuclei for flow cytometric DNA analysis. Cytometry 3：323—327, 1983
10) Crocker J: Nucleolar organizer regions in lymphomas. J Pathol 51：111—118, 1987
11) Isaacson PG, Spencer J: Malignant lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue. Histopathology 11：445—462, 1987
12) 北野良博, 梅北信孝, 松峯敬夫ほか：消化管悪性リンパ腫の治療成績. 日臨外医会誌 51：1661—1667, 1990
13) Lewin KJ, Ranchod M, Dorfman RF: Lymphomas of the gastro-intestinal tract. A study of 117 cases presenting with gastro-intestinal disease. Cancer 42：693—707, 1978
14) Weingard DN, Decosse JJ, Sherlock P et al: Primary gastro-intestinal lymphoma —A 30—year review—. Cancer 49：1258—1265, 1982
15) Filippa DA, Decosse JJ, Lieberman PH et al: Primary lymphomas of the gastro-intestinal tract. Analysis of prognostic factors with emphasis on histological type. Am J Surg Pathol 7：363—372, 1983
16) Rosen CB, Heerden JA, Martin JK et al: Is an aggressive surgical approach to the patient with gastric lymphoma warranted? Ann Surg 205：634—640, 1987
17) Brooks JJ, Enterline HT: Primary gastric lymphomas. A clinico-pathologic study of 58 cases with long-term follow-up and literature review. Cancer 51：701—711, 1983
18) Stewart WP, Harris M, Wagstaff J et al: A prospective study of the treatment of high-grade histology non-Hodgkin's lymphoma involving the gastro-intestinal tract. Eur J Cancer Clin Oncol 21：1195—1200, 1985
19) Maor MH, Maddux B, Osborne BM et al: Stages IE and IIE non-Hodgkin's lymphomas of the stomach. Comparison of treatment modalities. Cancer 54：2330—2337, 1984
20) Jones RE, Willis S, Innes DJ et al: Primary gastric and management. Am J Surg 155：118—123, 1988
21) Aozasa K, Ueda T, Kurata A et al: Prognostic value of histologic and clinical factors in 56 patients with gastro-intestinal lymphomas. Cancer 61：309—315, 1988
22) Dragosics B, Bauer P, Radaszkiewicz T: Primary gstrointestinal non-Hodgin's lymphomas. Cancer 55：1060—1073, 1985
23) The non-Hodgkin's lymphoma pathologic classification project: National Cancer Institute sponsored study of classifications of non-Hodgkin's lymphomas: Summary and description of a Working Formulation for clinical usage. Cancer 49：2112—2135, 1982
24) 須知泰山：非ホジキンリンパ腫の新病理組織分類. 小島 瑞, 飯島宗一, 花岡正男ほか編. 新分類による悪性リンパ腫アトラス. 文光堂, 東京, 1981, p27—40
25) Carbone PP, Kaplan HS, Masshoff K et al: Report of the committee on Hodgkin's disease staging classification. Cancer Res 31: 1860—1861, 1971
26) Ploton D, Menager M, Jeannesson P et al: Improvement in the staining and in the visualization of the argyrophilic proteins of the nucleolar organizer region at the optical level. Histochem J 18：5—14, 1986
27) Underwood JCE, Giri DD: Nucleolar organizer regions as diagnostic discriminants of malignancy (Editorial). J Pathol 155：95—96, 1988
28) Field DH, Fitzgerald PH, Sin FYT: Nucleolar silver-staining patterns related to cell cycle phase and cell generation of PHA-stimulated human lymphocytes. Cytobios 41：23—33, 1984
29) Crocker J, Macartney JC, Smith PJ: Correlation between DNA flow cytometric and nucleolar organizer region data in Non-Hodgkin's lymphomas. J Pathol 154：151—156, 1988
30) Hall PA, Crocker J, Watts A et al: A comparison of nucleolar organizer region staining and Ki-67 immunostaining jin non-Hodgkin's lymphoma. Histopathology 12：373—381, 1988
31) Macartney JC, Camplejohn RC: DNA flow cytometry of non-Hodgkin's lymphomas. Eur J Cancer 26：635—637, 1990
32) Joensuu H, Soderstrom K, Klemi PJ et al: Nuclear DNA content and its prognostic value in lymphoma of the stomach. Cancer 60：3042—3048, 1987
33) Miller TP, Jones SE: Initial chemothrapy for clinically localized lymphomas of unfavorable histology. Blood 26：412—418, 1983

AgNORs as Prognostic Factor of Gastric Non-Hodgkin's Lymphoma

Junichi Hasegawa, Kazuyasu Nakao, Masaaki Nakahara, Nobuo Ogino, Toshirou Nishida, Masahiro Tsujimoto* and Masayasu Hamaji**
Department of Surgery and Pathology*, Osaka Police Hospital, Departments of Surgery, National Kure Hospital**

The utility of nucleolar organizer regions-associated proteins (AgNORs) for estimating proliferative activity and prognosis of gastric non-Hodgkin's lymphomas (NHL) was examine. Formalin-fixed and paraffin-embedded sections of 31 patients with gastric NHL were used. AgNORs count was taken as a mean dot number of 100 nuclei. The AgNORs count revealed a good correlation with S-phase fraction measured by flow cytometry ($p<0.01$). Several histologic and clinical factors including AgNORs count were evaluated as prognostic factors by single variant analysis, and it was proved that Naqvi classification, AgNORs count and resectability were significant prognostic factors ($p<0.01$). Among these factors, Cox's multivariate analysis indicated that AgNORs count was a most important prognostic factor ($p<0.05$). In patients with curative surgery, AgNORs count of relapsed cases after operation were higher than that of not relapsed cases ($p<0.01$). These results suggest that AgNORs count reflects proliferative activity and is useful as a prognostic index of gastric NHL.

Reprint requests: Junichi Hasegawa First Department of Surgery, Osaka University Medical School 2-2 Yamadaoka, Suita, 565 JAPAN