日消外会誌　28（3）：627～632，1995年

原　著

細胞動態からみた残胃粘膜増殖活性に関する検討

大阪市立大学第1外科

鄭　容錫　前田　清　小野田尚佳　中西　一夫
西村　重彦　繁澤　晃　久保　俊彰　佐藤　成
小川　正文　加藤　保之　吉川　和彦　曽和　融生

幽門側胃切除後の残胃粘膜の細胞動態を増殖活性の面より，64例を対象に部位別，術式別および経時的変化について検討した．部位別では吻合部が大彎部に比べて proliferating cell nuclear antigen 標識率および Ornithine Decarboxylase 活性が有意に高値を示した．術式別では BI 群で部位別に差がみられなかったのに対して，BII 群では S 期細胞率，PCNA 標識率および ODC 活性が大彎部に比べて吻合部で有意の高値を示した．吻合部のみについてみると BII 群が BI 群よりも有意の PCNA 標識率および ODC 活性の高値を示した．吻合部について術後経過期間でみると，5年未満群と比較して5年以上群で BII 群が PCNA 標識率と ODC 活性の有意の高値を示したのに対して BI 群では逆に5年以上群で低値傾向がみられた．術式別に5年以上群でみるといずれのパラメーターも BI 群に比べて有意に BII 群が高値を示した．以上，残胃粘膜の細胞増殖活性は吻合部で高く，その傾向は BII 群の長期経過例でより著明で，その発癌リスクの高さを示唆するものと考えられた．

Key words: gastric remnant mucosa, cell proliferation, Proliferating Cell Nuclear Antigen, Ornithine Decarboxylase

はじめに

胃癌の診断技術の進歩に伴う早期癌症例の増加により，その長期予後は近年著しく改善されてきた．一方で平均寿命の延長などにより胃手術後の残胃という非生理的条件が長期に及ぶことによって生じる種々の問題点，とくに残胃癌発生との関係が従来にも増して今後注目されるところである．従来より残胃粘膜についてはこのような観点より手術術式別に，内視鏡所見[1]，組織学的所見[2)~4)]および疫学的[5)~7)]にも解析がなされ，また動物実験からも種々検討が加えられている[8)~13)]．それらのなかで残胃粘膜とくに吻合部粘膜の変化が残胃癌発生との関係より指摘されてきたがその細胞動態については報告が少なくまた経時的な変化についても興味深いところである．一方，近年前癌病変や癌の悪性度について細胞増殖活性を評価するパラメーターが種々報告されている．

そこで今回，胃切除後の残胃粘膜の細胞動態をその増殖活性の面より，細胞周期，proliferating cell nuclear antigen（以下，PCNA），ornithine decarboxylase（以下，ODC）活性を中心に指標に術式別，経時的変化について検討した．

＜1994年11月9日受理＞別刷請求先：鄭　容錫
〒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

対象と方法

対象：胃癌で根治術がなされた幽門側胃切除後の患者64例を対象とした．性別は男性43例，女性21例．平均年齢は60.7歳（36～79歳）であった．消化管再建法は Billroth I 法（以下，BI 群）が30例，Billroth II 法（以下，BII 群）は34例で全例 Braun 吻合は設置されていない．術後経過期間の中央値は4年（1～36年：平均4.2年）であった．

内視鏡検査時に残胃吻合部（吻合部）および非断端大彎部（大彎部）の粘膜組織を採取し，以下の測定に用いた．

DNA 量と細胞周期：細胞を単離後，脱 RNA，propidium iodide により核染色し，flow cytemetry（FACScan，Beckton-Dickinson 社）により4,000～20,000個の細胞核 DNA 量を測定した．DNA ヒストグラムを作成し，DNA ploidy および細胞周期を検討した．細胞周期は sum of broadened rectoangles model により各期細胞の百分率を求めた．

免疫組織学的検討：上記と同様の生検材料の10%ホルマリン固定パラフィン包埋切片を作成し，PCNA陽性細胞の検討を行った．ホルマリン固定時間は2時間以内とした．免疫組織染色は抗PCNAモノクローナル抗体PC10（100倍希釈 Novocastro Lab Ltd）を1次抗体として用い，室温にて1時間反応させた．その後はstreptoavidine-biotin法にて反応させ，発色はdiaminobenzidineを用いた．核染色にはメチルグリーンを使用した．判定は腺管上皮細胞を粘膜全層にわたり500個以上を検鏡し，陽性細胞を百分率で表し，PCNA標識率（labeling index：LI）とした．

ODC活性：ODC活性の測定は大谷ら[14]の方法に準じて行った．生検材料を細切後超音波粉砕し，超遠心後の上清に14-C-ornithineを加え，ODCの作用によって遊離した14-Cを液体シンチレーションカウンターにより測定した．ODC活性はpmol CO_2/hour/mg proteinで表した．

統計学的検討：有意差の検定はt検定を用い，危険率5%未満をもって有意差ありと判定した．

成　績

DNA ploidyとS期細胞率：DNAヒストグラムの解析では平均DNA index は1.00で，64例全例がdiploid patternを示し，aneuploid pattern症例は認めなかった．残胃の部位別平均S期細胞率の検討では，吻合部：19.0±9.2%，大彎部：17.3±10.7%で差は認めなかったが，再建法別ではBI群吻合部：17.9±8.5%，大彎部：17.7±9.0%に対してBII群ではそれぞれ21.0±9.6%，17.0±10.0%と吻合部で有意にS期細胞率が高かった（**Fig. 1**）．

PCNA標識率：部位別では吻合部：29.2±13.0%，大彎部：17.3±8.3%で有意に吻合部で高く，再建法別でもBI群の部位別では差がみられなかった（吻合部：25.9±8.1%，大彎部：17.7±8.9%）のに対して，BII群では有意に吻合部でのPCNA標識率（吻合部：34.1±13.8%，大彎部：17.4±7.5%）が高く，吻合部についてみるとBI群に比べて有意にBII群が高値を示した（**Fig. 2**）．

ODC活性：部位別のODC活性は全症例（吻合部：398.5±235.2，大彎部：144.0±75.5），BI群（吻合部：281.5±154.8，大彎部：146.9±70.5）およびBII群（吻合部：501.3±155.6，大彎部：155.6±92.2）において吻合部が有意に高値を示し，また再建法でもBII群がBI群よりも有意に高値を示した（**Fig. 3**）．

経時的推移：3つのパラメーターについて，吻合部での細胞増殖活性を経時的に再建法別に検討した（**Fig. 4**）．術後5年目まで各パラメーターとも再建法別には差はみられないが，5年目以後ではBII群はい

Fig. 1　S phase cell population in gastric remnant mucosa. A : stomal area, C : greater curvature

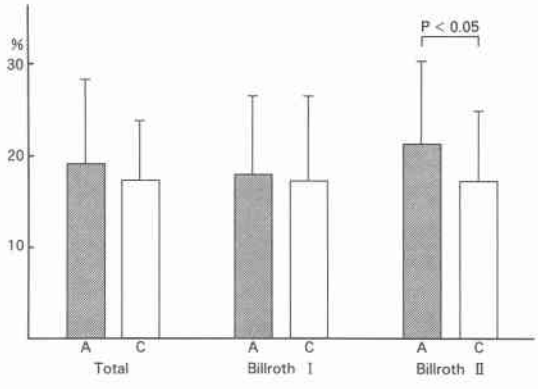


Fig. 2　PCNA labeling index in gastric remnant mucosa.

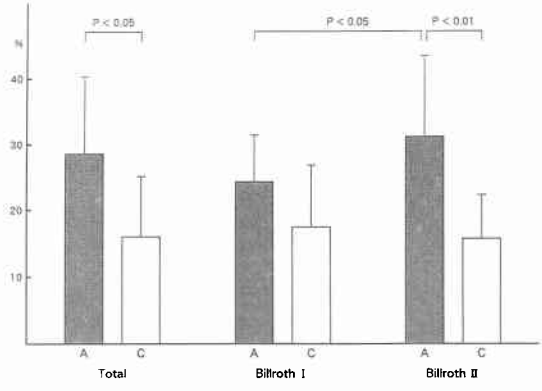


Fig. 3　ODC activities in gastric remnant mucosa.

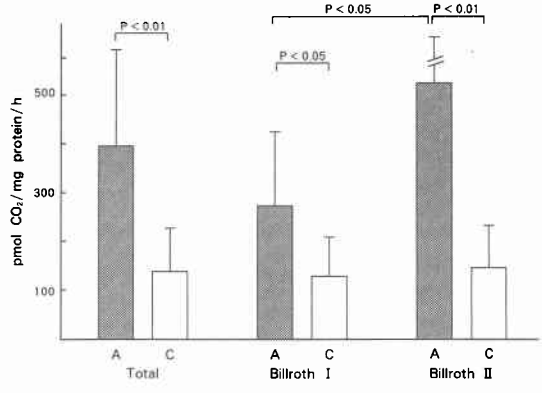
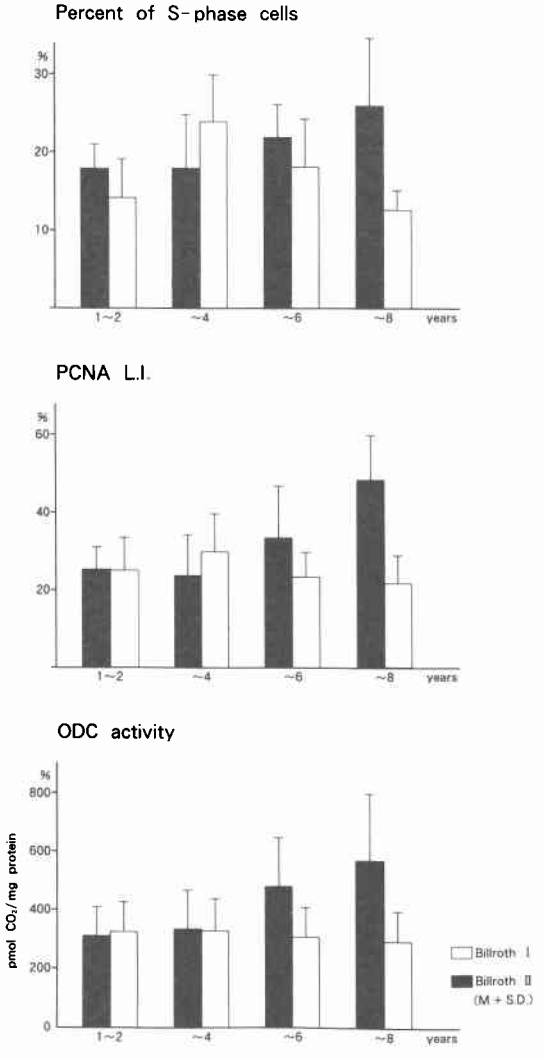


Fig. 4 Changes of cell proliferation kinetics in stomal mucosa after operation.



ずれも高値傾向がみられたのに対してBI群ではほとんど変化が認められなかった．そこで術後5年以上の症例について術式別にみるといずれのパラメーターもBI群に比べて有意にBII群が高値を示した．BII群の術後5年未満群と以上群との比較では5年以上群にS期細胞率の高値傾向，PCNA標識率とODC活性では有意の高値が認められた．一方，BI群では，5年未満群と5年以上群との間にはいずれのパラメーターも有意差は認められなかった．大彎部粘膜については術式別にも経過期間別にも有意の差は認められなかった(**Table 1**)．

考　察

胃切除後の残胃は手術的操作に加えて，種々の因子つまり胆汁を含む十二指腸液の逆流[8)~13)]，胃内pHの上昇[11)15)]，細菌叢の変化[16)]，消化管ホルモンの変化などによる非生理的に環境下におかれる．これらのfactorが残胃癌の発生に関与していることは動物実験からも示唆されているところであるが[8)~13)]，臨床例については明らかな証明はなされていない．このような観点より胃切除後の残胃粘膜については従来より，内視鏡的検討[1)]，組織学的検討[2)~4)]および最近では細胞増殖活性[17)18)]の面より多面的な検討がなされている．我々も術後の定期的内視鏡検査で吻合部粘膜の発赤，糜爛所見が再建法別にBillroth-II法に多くみられることを報告してきたが，その組織像は腺腔の拡張，腺管迂曲所見を示し[19)20)]，他の報告においても腺の嚢胞状拡張，再生異型，固有胃腺の萎縮など[2)4)]の過形成胃炎の所見がB-II法の吻合部粘膜でより強くみられている．これらの組織学的変化が実際に残胃の発癌と結びつくのかはいまだ明らかにされていないが，近年，gastritis cystica polyposaと合併する吻合部の早期癌症例が多数報告されるようになり，これらの変化が発癌と密接に関係する可能性が示唆されてきている．

近年，組織学的変化を細胞増殖活性より検討することが報告されている．細胞増殖活性のパラメーターは幾種類も報告されており，それぞれが特徴を有している．細胞のDNA量より，また細胞周期を応用したBrdU，Ki67，PCNAや近年ではpolyamine合成の律速酵素で細胞増殖時に高値を示すODC活性などが挙げられる．今回の検討にはDNAヒストグラム，細胞周期のG1～S期の細胞核に発現するPCNAおよびODCについて残胃粘膜の増殖活性を検討した．これらのパラメーターを用いた検討の多くは，悪性疾患を材料として悪性度の評価として応用されており，多くの報告は悪性度と相関するというものである[21)]．今回はこれらのパラメーターを細胞増殖活性の評価に用いた．

その結果，DNA ploidy patternでは明らかな差がみられなかったが，S期細胞率，PCNAおよびODC活性では残胃粘膜の吻合部が，再建法ではB-II法が有意に高い成績を示した．これはB-II法吻合部での高い細胞増殖活性を示すものと思われた．吻合部粘膜についてはthymidineの取り込み[17)]やBrdU[18)]を用いた検討がなされており，それらによるとB-II法吻合部のcell proliferationの亢進が指摘され，carcinogenesisの

Table 1 Cell proliferation kinetics in stomal area and greater curvature of gastric remnant

1. stomal area

operation	duration	S phase cell(%)	PCNA L.I.(%)	ODC
B-I	<5years	19.0±9.4	26.8±8.3	332.5±92.6
	>5years	16.0±6.0*	23.3±15.0*	303.7±87.3*
B-II	<5years	19.7±10.4	**24.1±9.7	**328.5±113.5
	>5years	25.0±8.7*	**37.8±13.0*	**535.2±168.5*

*B-I VS B-II : $p<0.05$
**<5years VS >5years : $p<0.05$

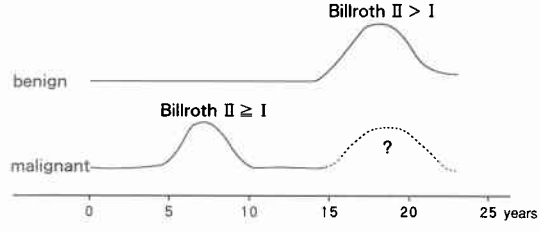
2. Greater curvature

operation	duration	S phase cell(%)	PCNA L.I.(%)	ODC
B-I	<5years	19.2±10.5	20.0±11.9	168.2±99.1
	>5years	15.0±5.9	15.0±16.1	150.3±90.7
B-II	<5years	17.4±10.8	13.7±4.8	134.3±55.7
	>5years	16.7±12.2	16.3±7.0	160.6±51.2

promoteを示唆している．残胃粘膜のDNA量の解析の報告はほとんどみられないが，福沢ら[22]は吻合部の比較的高い(34.8%) aneuploidyの出現を認めている．今回の検討ではaneuploidy例は認めなかったが，これは術後の経過観察期間などが影響している可能性も考えられる．B-II法の残胃吻合部における細胞増殖活性の亢進の事実は今回の多数のパラメーターの検討からもほぼ確認され，従来の組織学的変化との関係も示唆されるところである．細胞増殖活性の亢進が残胃の発癌と単純に結びつくかは現時点では明確には証明されていない．しかし，胆汁，十二指腸液逆流実験モデルでの高い胃癌発生率や，臨床例でB-II法術後の高い吻合部における残胃癌発生率の報告が多数みられる[23)~26)]ことより，これらのことはB-II群の吻合部粘膜における増殖活性の亢進と何らかの関係があるとおもわれた．今回パラメーターのひとつとして用いたODCについては，近年Anvinenら[27]はODCが発癌のinitiatorおよびpromotorとしての作用を有し，腫瘍化の過程に深く関与していることを明らかにしており，ODC遺伝子はproto-oncogeneの一つとして考えるべきものであるとしている．B-IIにおける残胃吻合部粘膜のODC活性の亢進はこのような基礎的背景，その発癌リスクの高さを示唆するものの一つとして考慮されるものと思われる．

初回胃病変によって胃切除後より残胃癌発生までの期間が異なることは，従来の諸家の報告よりほぼ明らかにされている．これらをまとめてみると初回良性群では術後15～20年以上にpeakがみられるのに対して，悪性群では数年～10年までにみられる[28)~30)]．経過期間，発生部位や再建法からみても，初回良性群では再建法（B-II）法が深く関わっていることが推測される．一方，悪性群では時間的にみると遺残癌や異時性多発癌によるリスクが大きいと思われる[28)]．しかし，悪性群については胃癌根治術後の長期生存例が増加するとともに，良性群のpeakに一致するsecond peakが予想される(**Fig. 5**)．今回の経時的検討においても術後5年以後は5年未満に比較して有意に高い吻合部粘膜の増殖活性がB-II法群に認められた．今回の観察期間は比較的短く，残胃癌発生との関係を証明するためには，今後長期の観察を検討する必要があるが，先述のODCのproto-oncogeneの性格などを考慮すれば増殖活性の亢進状態が長期持続することと残胃癌発生とは密接に関係するものと考えられる．したがって，初回悪性群では良性群とは異なり，2つのpeakを有することを考慮し，術後のfollow upは長期間行う必

Fig. 5 The intervals between first operation (benign or malignant) and the onset of gastric remnant cancer.



要がある．また，吻合部粘膜の増殖活性亢進のrisk factor(吻合部，B-II法，術後長期間)を考慮し，胃切除後の再建法を工夫する必要がある．

文　献

1) 曽和融生，中西一夫，鄭　容錫ほか：内視鏡的生検標本からみた残胃粘膜の検討．外科治療　64：807—811，1991
2) 森本俊雄：十二指腸潰瘍に対する胃切除術後長期経過例における残胃の生理学的ならびに組織学的研究．日消外会誌　21：2703—2711，1988
3) Sowa M, Chung YS, Fujimoto Y et al: A histologic study of endoscopic biopsies of the gastric remnant mucosa following subtotal gastrectomy, with special reference to changes of the stomal mucosa. Dig Endosc 2：169—175, 1990
4) 近藤　健，菊池　学，横山　功：残胃吻合部粘膜の生検組織所見からみた残胃癌の発生．癌の臨 33：651—660，1987
5) 近藤　健，山内晶司，佐々木隆一郎ほか：残胃癌の統計的および臨床病理学的研究—B-II法残胃の癌発生リスクについて—．日消外会誌　24：2105—2112，1991
6) Toftgaard C: Gastric cancer after peptic ulcer surgery. Ann Surg 210：159—164, 1989
7) Caygill CP, Hill MJ, Kirkham JS et al: Mortality from gastric cancer following gastric surgery for peptic ulcer. Lancet 1：929—931, 1986
8) Nishidoi H, Koga S, Kaibara N: Possible role of duodenogastric reflux on the development of remnant gastric carcinoma induced by N-Methyl-N′-N-nitrosoguanidine in rats. J Natl Cancer Inst 72：1431—1435, 1984
9) 藤村　隆：十二指腸液胃逆流によるラット胃発癌—胆汁，膵液の分離逆流モデルによる検討—．日外会誌　92：933—939，1991
10) Kondo K, Suzuki H, Nagayo T: The influence of gastro-jejunal anastomosis on gastric carcinogenesis in rats. Jpn J Cancer Res 75：362—369, 1984
11) 三輪晃一，佐々木正，高島茂樹ほか：胃良性疾患手術後胃癌の発生．手術　24：1071—1080，1975
12) 堀川佳朗：N-Methyl-N′-nitro-N-nitrosoguanidine投与による再建術式別ラット残胃癌の発生．日消外会誌　26：1211—1221，1993
13) 佐野千秋，神代龍之介，井口　潔ほか：胃切除術式の残胃癌発生プロモーションに及ぼす影響に関する実験的研究．日消外会誌　17：2130—2136，1984
14) Otani S, Kuramoto A, Matsui I et al: Induction of ornithine decarboxylase in gunea pig lymphocytes by the divalentacation ionophore A23187. Eur J Biochem 125：35—40, 1984
15) Helsinger N, Hillestad L: Cancer development in the gastric stump after partial gastrectomy for ulcer. Ann Surg 143：173—179, 1956
16) Domellof L, Eriksson S, Janunger KG: Carcinoma and possible precancerous change of the gastric stump after Billroth II resection. Gastroenterology 73：462—468, 1977
17) Offenhaus GTA, De Stadt JU, Tytgat GNJ et al: Cell proliferation kinetics in the gastric remnant. Eur J Cancer Clin Oncol 21：73—79, 1985
18) Ohyama S, Yonemura Y, Miwa K et al: Proliferation assay of human gastric remnant by bromodeoxyuridine and flow cytometry. Gastroenterology 103：789—793, 1992
19) 曽和融生，鄭　容錫，芳野裕明ほか：残胃初発癌に関する考察—とくに自験18例と胃切除後残胃粘膜生検所見ならびに細胞核DNA測定成績を中心として—．外科治療　57：128—133，1987
20) Sowa M, Chung YS, Fujimoto Y et al: A histologic study of endoscopic biopsies of the gastric remnant mucosa to changes of the stomal mucosa. Dig Endosc 2：169—175, 1990
21) Maeda K, Chung YS, Onoda N et al: Proliferating cell nuclear antigen labeling index of preopertive biopsy specimens in gastric carcinoma with special reference to prognosis. Cancer 73：528—533, 1994
22) 福沢邦康，野口芳一，野村勝俊ほか：核DNA量解析からみた残胃吻合部粘膜の特異性—残胃癌発生母地に関する検討—．日外会誌　93：336，1992
23) 安名　主，萩原迪彦，山浦芳徳ほか：残胃癌の4例と最近10年間本邦報告例の統計的考察．臨外 39：99—104，1984
24) 小坂建夫，鎌田　徹，藤村　隆ほか：残胃癌29例の検討—癌占拠部位からみた残胃癌の発生増殖因子の推察—．日外会誌　91：340—347，1990
25) 岡島邦雄，山田真一，磯崎博司ほか：残胃癌の検討—進行度因子の検討と予後—．消外　8：61—67，1985
26) Hirano M, Niimoto M, Toge T et al: A cohort study on second malignancies in gastrectomized patients with gastric cancer. II. Second malignancies in the gastricj remnant. Jpn J Surg 16：344—350, 1986
27) Auvinen M, Passinen A, Anderson LC et al: Ornithine decarboxylase activity is critical for cell transformation. Nature 360：355—358, 1992
28) 西土井英昭，石黒　稔，工藤浩史ほか：初回病変からみた残胃癌症例の検討．日消外会誌　25：2898—2902，1992
29) 藤本三喜夫，内田直里，道後正勝ほか：残胃の癌症例の検討—とくに同時性多発胃癌との関連について—．日臨外医会誌　52：979—984，1991
30) Sowa M, Onoda N, Nakanishi I et al: Early stage carcinoma of the gastric remnant in Japan. Anticancer Res 13：1835—1838, 1993

Analysis of Cell Proliferation Kinetics in Gastric Remnant Mucosa

Yong-Suk Chung, Kiyoshi Maeda, Naoyoshi Onoda, Itsuo Nakanishi,
Shigehiko Nishimura, Akira Shigesawa, Toshiaki Kubo,
Sei Sato, Masafumi Ogawa, Yasuyuki Kato,
Kazuhiko Yoshikawa and Michio Sowa
First Department of Surgery, Osaka City University Medical School

The cell kinetics of epithelium in the gastric remnant were studied using several parameters including S phase cell population, PCNA labeling index and ODC activity in terms of portion, operative procedure (Billroth I or II) and duration after operation in 64 patients. PCNA LI and ODC activity in the stomal mucosa were significantly higher than in the greater curvature. This difference was especially pronounced in the group with the B-II procedure. Significantly higher PCNA LI and ODC activity of the stomal mucosa was recognized in the group with the B-II procedure than in that with the B-I procedure. PCNA LI and ODC activity of the stomal mucosa in B-II were significantly higher 5 or more years after surgery than less than 5 years after surgery, however those with B-I showed a contrasting tendency. Parameters in the group with a duration of 5 or more years with the B-II procedure showed significantly higher levels than the group with the B-I procedure. The present study showed that the cell kinetics of stomal mucosa in the gastric remnant were high, especially in the group with a duration of 5 or more years after surgery with the B-II procedure, sugesting that stomal mucosa in the gastric remnant reconstructed with the B-II procedure may have a high risk of promoting carcinogenesis.

Reprint requests: Yong-Suk Chung First Department of Surgery, Osaka City University
1-5-7 Asahimachi, Abeno-ku, Osaka City, 545 JAPAN