日消外会誌　30（4）：838～845，1997年

p53，c-erbB-2，PCNA，CD44，nm23の免疫組織染色所見からみた大腸癌異時性肝転移高危険群の検索について

岐阜大学医学部第2外科
北村　文近　　佐治　重豊　　深田　代造　　宮　　喜一
国枝　克行　　杉山　保幸　　鷹尾　博司　　加藤　元久

大腸癌術後異時性肝転移予測の可能性を検索する目的で，治癒切除例で異時性肝転移33例（転移群），転移群と1：2で度数マッチングさせた非転移66例（対照群）を対象とし，p53，c-erbB-2，PCNA，CD44，nm23を免疫組織化学的に検討した．転移群は対照群に比べPCNA labeling index（LI）が有意に高く，CD44陽性例，nm23陰性例が有意に多かったが，p53，c-erbB-2は両群間に差を認めなかった．ROC曲線によるPCNA LIの異時性肝転移判別閾値は60であった．転移群の無再発期間はCD44陽性例で有意に短縮し，nm23陰性例で短い傾向を示した．転移群の累積生存曲線はCD44陽性例で予後不良となる傾向を示した．各因子の免疫組織所見より算出した異時性肝転移確率は，1項目ではPCNA LI(0.23)が，2項目ではPCNA LI＋nm23(0.62)が最も高かった．免疫組織染色によるPCNA LI，CD44，nm23の検索は大腸癌治癒切除後の異時性肝転移高危険群の判別に有用であると推察された．

Key words: metachronous liver metastasis of colorectal cancer, immunohistochemical stain, case control study, positive predictive value, receiver operating characteristic curve

はじめに

大腸癌は他の消化器癌に比べ比較的予後良好で，血行性転移，とくに肝転移に対しては転移巣に対する根治的切除や化学療法が一定の成果を上げている．しかし，いまだ最大の予後規定因子であり，とくに治癒切除後の異時性肝転移は，初回手術時すでに存在する微小転移巣の増大によるものと推察されており，術後補助療法の最大の標的臓器となる．それゆえ，予後向上のためには，この微小転移巣の存在，すなわち異時性肝転移高危険群を的確に判別する必要がある．

ところで，大腸癌の肝転移や予後の予測は従来，組織型，深達度，リンパ節転移，静脈侵襲などの病理組織学的因子から行われてきたが[1)~3)]，近年，発癌における遺伝子異常や，癌転移における分子機構が解明されるにしたがい，これら癌関連遺伝子や癌関連抗原の転移，予後への関与が検索されるようになった．このうち免疫組織化学的手法を用いた検索では，変異型p53タンパクの発現[4)]や，proliferating cell nuclear antigen（PCNA）の陽性細胞比率（labeling index，以下LI）が大腸癌の独立した予後因子と考えられている[5)]．また，転移関連因子としてc-erbB-2, CD44, nm23などが注目されているが，c-erbB-2は大腸癌のリンパ節転移との有意な関連が報告され[6)]，膜貫通型接着分子であるCD44は大腸癌同時性肝転移との関連が報告され[7)]，転移抑制遺伝子とされるnm23は，その発現減弱と大腸癌の進行度や遠隔転移との関連が報告されている[8)]．しかし異時性肝転移の予測すなわち肝転移の早期診断についてはいまだ十分な検索は少ない．

そこで，免疫組織化学的方法を用いて，大腸癌原発巣におけるp53，c-erbB-2，PCNA，CD44，nm23と異時性肝転移の関連を，臨床病理学的因子をマッチングさせたケースコントロールスタディにより解析し，異時性肝転移予測の可能性を検索した．

対象と方法

1．対象症例の内訳と肝転移の診断法

1982年1月から1990年12月までに手術した進行大腸癌症例のうち，予後が判明している症例で組織学的根治度[9)]がA（si，aiを除く）の276例中，術後に肝転移が発見された33例を異時性肝転移（以下，転移）群と

＜1996年11月13日受理＞別刷請求先：北村　文近
〒500　岐阜市司町40　岐阜大学第2外科

した．また，術後5年以上を経過した無再発生存例中，占居部位，組織型，壁深達度を転移群と1：2で度数マッチングさせた66例を非肝転移対照（以下，対照）群とした．なお，対照群の抽出に際し適格症例が多数存在した場合には無作為に抽出した．

再発，転移の診断は，術後1か月ごとの血清carcinoembryonic antigen（以下，CEA）値測定，3か月ごとおよび血清CEA値上昇時の腹部超音波検査，腹部computed tomography検査，胸部単純X線検査，1年ごとの胃，十二指腸および大腸内視鏡検査にて行った．

肝転移の診断は，12例は画像所見で，21例は再開腹時の転移巣切除による病理組織学的所見で判定した．転移時期の判定は画像上確認可能となった時期とした．なお，身体所見または画像所見で，腹腔内腫瘤，腹水貯留，局所再発，遠隔転移巣などの肝以外の転移，再発が判明した症例，また血清CEA値が上昇したが転移，再発所見が確認できなかった症例は対象から除外した．既往歴および術後経過観察中に重複癌を認めた症例はなかった．

2．免疫組織染色の方法と判定法

切除標本のホルマリン固定パラフィン包埋ブロックより4μmの薄切連続切片を作製し脱パラフィン後，p53，c-erbB-2，CD44，nm23はavidine-biotinylated peroxidase complex（以下，ABC）法で染色し，PCNAはenhanced polymer one-step staining（以下，EPOS）法で染色した（**Table 1**）．すなわち前者は0.3% H_2O_2加メタノールにて30分間内因性ペルオキシダーゼを不活化後，1%正常ウマ血清（p53，CD44）またはヤギ血清（c-erbB-2，nm23）を添加した1次抗体を4℃にて12時間（p53，c-erbB-2，CD44）または室温にて30分間（nm23）反応させ，ビオチン化2次抗体を30分間，ABC試薬（Vector，USA）を30分間反応させた．次いでdiaminobenzidine tetrahydrochlorideで発色させhematoxylinで核染色後，封入，検鏡した．後者は前者同様に内因性ペルオキシダーゼを不活化し1%正常ウマ血清にて30分間非特異的反応をブロック後，EPOS抗体を室温にて60分間反応させ，発色，核染色後，封入，検鏡した．なお陽性対照はいずれも既知の陽性標本を用い[10]，陰性対照はABC法では各1次抗体を，EPOS法ではEPOS抗体を除いて染色した標本を用いた．

Table 1 Primary antibodies used for immunohistochemical stain

Primary antibody	Clone	Source	Working dilution
p53	DO-7	DAKO, Denmark	1：100
c-erbB-2	polyclonal	DAKO, Denmark	1：200
PCNA	PC10	DAKO, Denmark	—
CD44	DF1485	DAKO, Denmark	1：80
nm23	polyclonal	*	1：1,000

*：kindly provided by Prof. Tahara, Hiroshima Univ.

判定は，p53は癌細胞の核が集簇的に染色されたものを陽性とし，少数の核が散在的に染色されたものは陰性とした．c-erbB-2とCD44は細胞膜が染色されたものを陽性とし，nm23は細胞質が正常粘膜細胞以上に濃染されたものを陽性，正常粘膜細胞より染色性の低いものを陰性とした．PCNAは核が染色されたものを陽性とし，腫瘍最深部における癌細胞500個中の陽性細胞数をPCNA LIとし，百分率で表示した．なお，判定はいずれも光学顕微鏡高倍率視野（×400）で行った．

PCNA LIはreceiver operating characteristic（ROC）曲線[11]を描記し，左上隅に最も近いPCNA LI値をcut-off値とした．

3．陽性予測値の算定法と統計学的検討法

両群の各因子の検査陽性率より，単独および組み合わせによる検査陽性予測値[12]すなわち検査陽性時の異時性肝転移確率を算定した．検査前確率は本研究期間における異時性肝転移発生率とした．

数値はmean±standard deviation（SD）で示し，検定はStudent's t-testを用いた．背景因子の差の検定にはMann-Whitney's U-testを用い，出現率の差の検定にはchi-square testを，少数例の検討ではFisher's exact probability methodを用いた．累積生存率はKaplan-Meier法にて算出し，logrank testを用いた．いずれも$p<0.05$を有意とした．

また，臨床病理学的用語は大腸癌取扱い規約[9]に従った．

結　果

1．背景因子の検討

転移群の占居部位は結腸が17例，直腸が16例，組織型は高分化型が16例，中分化型が15例，低分化型が2例，壁深達度はmp，ss・a_1，se・a_2がそれぞれ6例，21例，6例で，いずれも対照群は1：2で度数マッチングさせた．非マッチング背景因子では，転移群は対照群に比べ，組織学的stage III b，リンパ節転移n_2以上の症例が若干多くみられたが，これらを含め，いずれも両群間に有意差を認めなかった（**Table 2**）．

Table 2 Patients' characteristics of the group of metachronous liver matastasis and control, matched for tumor location, depth of invasion, and histological typing

	Metachronous (n=33)	Control (n=66)	P-value
histological stage			
I	1	6	
II	6	14	0.1770
III a	12	26	
III b	14	20	
lymph node metastasis			
n_0	7	20	
n_1	12	26	0.1105
n_2	9	19	
n_3	5	1	
lymphatic invasion			
ly_0	5	13	
ly_1	13	21	0.8200
ly_2	7	19	
ly_3	8	13	
venous invasion			
v_0	18	42	
v_1	12	15	0.5137
v_2	1	9	
v_3	2	0	

2. 免疫組織染色性の検索結果

両群間の比較で，PCNA LI 値は転移群が61.5±10.7と対照群の54.9±11.5に比べ有意に高値を（p=0.0070），CD44陽性率は転移群が66.7%と対照群の33.3%に比べ有意に高値を（p=0.0033）示し，nm23陽性率は転移群が45.5%と対照群の71.2%に比べ有意に低値を示した(p=0.0227)．一方，p53，c-erbB-2は両群間で有意差はみられなかった（**Table 3**）．

3. PCNA LI cut-off 値の検索結果

ROC 曲線の左上隅に最も近い LI 値は60であった（**Fig. 1**）．この cut-off 値を用いた PCNA LI 高値例の頻度は転移群で有意に高く（p=0.0018），以下の検討では PCNA　LI≧60を高値群，<60を低値群とした（**Table 3**）．

4. 病理組織学的因子との関連

転移群と対照群を合わせた全例での組織学的病期との関連では，nm23陰性群では病期が有意に高く（p=0.0209），PCNA LI 高値群では病期が高くなる傾向を示したが(p=0.0681)，p53，c-erbB-2，CD44では有意の関連はみられなかった．また，リンパ節転移程度との関連では，nm23陰性群でリンパ節転移程度が有意に高く(p=0.0141)，PCNA LI 高値群ではリンパ節程度が高い傾向を示したが（p=0.0662），他はいずれも有意の関連はみられなかった(**Table 4**)．なお，組織型，壁深達度，リンパ管侵襲，静脈侵襲のいずれの項目とも免疫組織染色性との間には有意の関連はみられなかった．

5. 無再発期間，累積生存率との関連

転移群における平均無再発期間（disease free interval；以下，DFI）は24.1±16.6(6～56)か月で，69.7%(23/33)の症例が24か月以内であった(**Fig. 2**)．CD44

Fig. 1 Receiver operating characteristic (ROC) curve of PCNA LI as predictor for metachronous liver metastases on curatively resected colorectal cancer
*: the closest plot to the upper left-hand corner of the frame

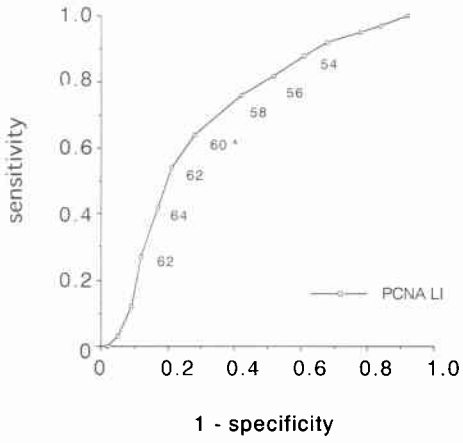

Table 3 A comparison on positive rates of p53, c-erbB2, CD44, and nm23, and PCNA labeling index evaluated by immunohistochemical stain between matachronous group and controls

	Metachronous %(n=33)	Control %(n=66)	P-value
p53	57.6(19)	47.0(31)	0.4331
c-erbB-2	45.5(15)	28.8(19)	0.1544
PCNA LI	61.5±10.7*	54.9±11.5*	0.0070
CD44	66.7(22)	33.3(22)	0.0033
nm23	45.5(15)	71.2(47)	0.0227
PCNA LI≧60	63.6(21)	28.8(19)	0.0018

(cases)
*：mean±SD

Table 4 Summary on positive cases of immunohistochemical stain according to histological stage and lymph node metastasis in overall cases

	p53	c-erbB-2	PCNA LI≧60	CD44	nm23
histological stage					
I (n= 7)	4(3)	3(4)	2(5)	4(3)	6(1)
II (n=20)	11(9)	7(13)	5(15)	9(11)	14(6)
III a (n=38)	18(20)	11(27)	16(22)	13(25)	26(12)
III b (n=34)	17(17)	13(21)	17(17)	18(16)	16(18)
P-value	0.7004	0.8854	0.0681	0.6390	0.0209
lymph node metastasis					
n_0 (n=27)	15(12)	10(17)	7(20)	13(14)	20(7)
n_1 (n=38)	18(20)	11(27)	16(22)	13(25)	26(12)
n_2 (n=28)	15(13)	12(16)	14(14)	15(13)	15(13)
n_3 (n= 6)	2(4)	1(5)	3(3)	3(3)	1(5)
P-value	0.6186	0.9876	0.0662	0.6112	0.0141

(negative cases)

Fig. 2 Case distribution of disease free interval on metachronous cases

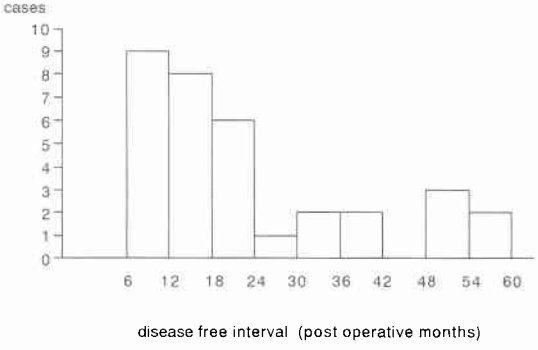

Fig. 3 A comparison of cumulative survival curves between CD44-positive and negative cases of metachronous group

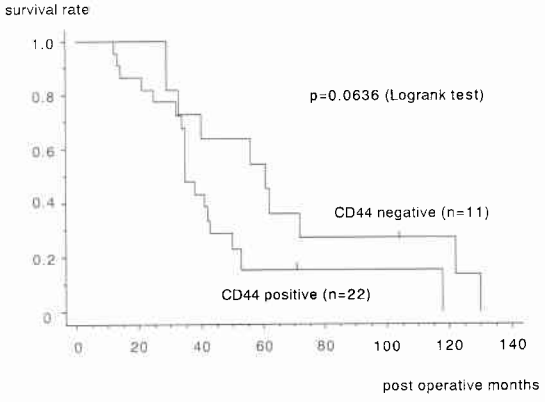

Table 5 A comparison of disease free intervals between immunohistochemical stain positive and negative cases on metachronous group

	Disease free interval (mean±SD, months)		
	Positive	Negative	P-value
p53	21.1±14.4	26.7±17.6	0.3176
c-erbB-2	25.5±16.8	21.8±15.3	0.5137
PCNA LI*	23.2±16.9	23.8±14.4	0.9192
CD44	18.7±10.9	32.9±20.1	0.0128
nm23	27.9±18.1	18.1±10.9	0.0737

*: positive; PCNA LI≧60, negative; PCNA LI<60

陽性群はDFIが有意に短縮し(p=0.0128), nm23陰性群ではDFIが短くなる傾向を示した(p=0.0737). しかし, p53, c-erbB-2, PCNA LIはいずれもDFIとの間に有意の関連はみられなかった (**Table 5**).

累積生存率との関連では, CD44陽性例は陰性例に比べ予後不良となる傾向 (p=0.0636) を示したが (**Fig. 3**), p53 (p=0.7065), c-erbB-2 (p=0.6170), PCNA LI (p=0.5574), nm23 (p=0.3730) はいずれも有意の関連はみられなかった.

6. 検査陽性予測値の算定

免疫組織染色率で有意差が認められたPCNA LI, CD44, nm23を用い, PCNA LI高値, CD44陽性, nm23陰性を検査陽性とした場合の検査陽性予測値を算定した. 1項目では, PCNA LIが0.23と最高で, 以下, CD44, nm23の順であった. 2項目ではPCNA LIとnm23の組み合わせが0.62と最高値を示した, 3項目では0.62と2項目の最高値と同値であった (**Table 6**).

なお, 背景因子でリンパ節転移程度に若干の差がみられたので, n_{0-1}症例について検討すると, 症例数は少

Table 6　A comparison of immunohistochemical stain positive predictive values for metachronous liver metastasis among PCNA LI≧60, positive CD44 and negative nm23

	Groups		P-value	Sn	Sp	PV-pos
	M	C				
PCNA LI≧60	21	19	0.0018	0.64	0.71	0.23
CD44 (+)	22	22	0.0033	0.67	0.67	0.22
nm23 (−)	18	19	0.0228	0.55	0.71	0.21
and						
PCNA, nm23	12	2	0.0001	0.36	0.97	0.62
CD44, nm23	12	4	0.0003	0.36	0.94	0.45
PCNA, CD44	15	9	0.0008	0.45	0.86	0.30
PCNA, CD44, nm23	8	1	0.0006	0.24	0.98	0.62

incidence 33/276=0.12
M: metachronous, C: control, Sn: sensitivity, Sp: specificity, PV-pos: positive predictive value

Table 7　A comparison of immunohistochemical stain positive predictive values for metachronous liver metastasis among PCNA LI≧60, positive CD44 and negative nm23 on n_{0-1} cases

	Groups		P-value	Sn	Sp	PV-pos
	M	C				
nm23 (−)	10	9	0.0180	0.53	0.80	0.21
CD44 (+)	13	13	0.0068	0.68	0.72	0.19
PCNA LI≧60	10	12	0.0769	0.53	0.74	0.17
and						
CD44, nm23	7	2	0.0017	0.37	0.96	0.48
PCNA, nm23	6	2	0.0060	0.32	0.96	0.44
PCNA, CD44	9	7	0.0091	0.47	0.85	0.24
PCNA, CD44, nm23	5	0	0.0014	0.26	1.00	1.00

incidence 19/206=0.09
M: metachronous, C: control, Sn: sensitivity, Sp: specificity, PV-pos: positive predictive value

ないが転移確率は1項目でnm23が0.21と最高で，2項目ではCD44とnm23の組み合わせが0.48と最も高く，3項目では，対照群に該当症例がなく転移確率1.00となった（**Table 7**）．

考　察

大腸癌治癒切除後の異時性肝転移は，初回手術時すでに存在した微小転移巣の増大によるもの，転移陽性遺残リンパ節からの2次的転移，術中腫瘍揉み出し操作に起因した癌細胞の門脈内散布による可能性などが推察されるが，後2者は，教室の樫塚ら[13]によるCEA slope analysisによる検討および術中腫瘍揉み出し操作の実験的検討により，その可能性は予想以上に少ないと報告されている．したがって異時性肝転移は大部分が潜在的同時性肝転移と推察され，著者らは占居部位，組織型，壁深達度を度数マッチングさせた対照群との比較において，原発巣の免疫組織化学的検索から異時性肝転移予測の可能性を検討した．

本研究では，マッチングさせなかった静脈侵襲程度は，転移群と対照群の間で有意差はみられなかった．静脈侵襲と同時性肝転移との関連を示唆する報告は多いが[3)14)]，異時性肝転移との関連を検討した報告は少ない．教室の樫塚らは325例の検討で，同時性と異時性では静脈侵襲に有意差が認められたが，異時性肝転移群と非転移群との間に差は認められなかったと報告している[13]．本研究は大腸癌取扱い規約に従い，腫瘍中心部最大割面でのHematoxylin-Eosin染色所見である

が，弾性線維染色を用いた腫瘍全割連続切片での検討においても，mp以深部に静脈侵襲を認めた症例では転移との関連が認められなかったとする報告や[2]，静脈侵襲率は異時性肝転移例で有意に高かったが大腸癌取扱い規約に基づく静脈侵襲程度との関連は認められなかったとする報告がなされており[15]，著者らの結果と一致する．したがって大腸癌取扱い規約に基づく静脈侵襲は異時性肝転移予測の指標とはなりがたいと考えている．

大腸癌異時性肝転移予測の指標として今回p53，c-erbB-2，PCNA LI，CD44，nm23の5項目について検討したところ，対照群との間に有意差がみられたのはPCNA LI，CD44，nm23の3項目であった．以下に各因子の特徴と異時性肝転移における検索意義を考察する．

PCNAはG_1後期からS期前半に存在する細胞増殖期関連核タンパクで[16]，大腸癌で予後との関連が報告されている[5]．今回の検討では，転移群のLI値は61.5±10.7と対照群の54.9±11.5に比べ有意の高値を示した．諸家の報告および本研究から，LI値が高いほど悪性度が高いと推察されるが，そのcut-off値は平均値や中間値を用いた報告が多い．著者らは各LI値における異時性肝転移の感度と特異度からROC曲線を用いて解析しcut-off値を60と判定した．その結果，60以上の高値例は有意に転移群に多く，組織学的病期やリンパ節転移程度も高い傾向を示した．また，このLI値60は大腸癌のDukes分類やDNA ploidyを有意に判別するcut-off値と同一値で[17]，著者らの正当性が支持されたものと考えている．なお，PCNAの抗原性は固定方法により変化するため，bromodeoxy uridineによる細胞増殖活性と最も相関するエタノール1日固定法が推奨されている[18]．著者らは大腸癌取扱い規約に基づき20%ホルマリンで3日間固定した標本を用いたが，PC10抗体を用いたEPOS法では安定した染色性を示し，LI値も諸家の報告と比べ著差はみられず，進行大腸癌症例ではホルマリン固定で十分検討しうると考えている．

本研究では転移群のCD44陽性率は66.7%と対照群の33.3%に比べ有意に高値を示し，転移群におけるCD44陽性例のDFIは有意に短縮し，予後不良であった．リンパ節転移や組織学的病期との間に有意の関連はみられなかったが，IchikawaもCD44陽性例は同時性肝転移例や術後再発例が有意に多かったが，リンパ節転移との間には関連がなかったと報告しており[7]，著者らの結果と一致する．CD44はstandard form (CD44s) とvariant isoform (CD44v) が存在し，CD44vの発現は癌の進展と関連すると報告されている[19]．著者らはCD44sのみを検索したが，CD44vとの同時発現例では細胞外に高分子複合体を形成し抗原性が高まると報告されており[20]，また挿入配列の部位によってはCD44v自体がCD44s抗体に反応する可能性も推察される．したがってCD44sの免疫組織化学的発現例にCD44vの発現例も含まれる可能性が十分考えられ，CD44sの免疫組織化学的検討は有用であると考えている．

nm23は転移能の低い細胞株で高発現し，高転移株に遺伝子導入すると転移能が低下することから癌転移抑制遺伝子と理解されている[8]．著者らは正常粘膜に比べ低染色性を示す場合を陰性と判断したが，異時性肝転移例では有意の染色性低下を示し，nm23陰性例で組織学的病期やリンパ節転移率が有意に高く，DFIも短縮する傾向がみられた．この結果は，nm23が血行性転移やリンパ節転移に対しても抑制遺伝子として関与する可能性を示唆しているが，腺腫から進行癌まで一貫して発現が認められたとする報告もあり[21]，必ずしも癌に抑制的に作用するわけではなく，進展程度により作用機序が異なる可能性が推察される．

ところで，p53とc-erbB-2は今回の検討では異時性肝転移の予測指標とはならず，組織学的病期，リンパ節転移，DFI，あるいは転移群における予後との間にも有意の関連はみられなかった．p53と癌の予後との関連は，症例数が多いほど有意とする報告の比率が高く[4]，予後因子としては確立している．一方，肝転移との関連は著者らの結果同様に，認められないとする報告が多く[22][23]，有意関連を主張する報告でも異時性肝転移との関連は確認されていない[24]．したがって，p53の免疫組織化学的発現は癌の進展には関与するが，異時性肝転移予測指標としては有用性は低いと考えている．

c-erbB-2も肝転移との有意な関連を認めないとする報告[25]がある一方，異時性肝転移例では非転移例に比べ有意に陽性率が高いとする報告がみられる[26]．後者は早期癌を含み，非転移例での陽性率が4.4%と自験例および他の報告例と比べ著しく低く，背景因子の差が関与している可能性が推察される．

一般にケースコントロールスタディでは，群間に有意差が存在することが比較項目の有用性を示す．本研究ではPCNA LI，CD44，nm23が対照群に比べ有意差

を示し，有用な検査項目と推察されるが，有意差が肝転移の可能性をどの程度予測できるのかは不明で，検査結果の臨床的評価には至らない．一方，検査法の有用性を判断する指標として感度，特異度が挙げられるが，これは疾病（正常）における検査陽性（陰性）比率を示すため，検査陽性時における判断基準としては妥当性が少ない．これに対し，検査陽性予測値は感度，特異度，検査前確率を用いて検査陽性時の疾病確率を求めるもので[12]，著者らは各検査陽性時の異時性肝転移確率として算出した．その結果，1項目ではPCNA LIが最も優れており，2項目ともに陽性の場合，PCNA LIとnm23の組み合わせが異時性肝転移確率0.62と最も高値を示した．しかし，3項目では2項目の最高値と同等で，異時性肝転移予測の観点からはこれら3項目すべてを検索する必要性は少ないと推察された．一方，リンパ節転移程度の低いn_{0-1}症例で同様に検討すると，1項目ではnm23，2項目ではCD44とnm23の組み合わせが最も高値を示し，全体例での結果と異なった．この理由として，n_{0-1}症例ではPCNA LIのcut-off値60における感度が低く，群間差も有意でないことから，n_{0-1}症例ではcut-off値が異なる可能性が推察されるが，少数例の検討であり，今後症例を蓄積し多変量解析を用いた検討が必要であろう．

異時性肝転移群のDFIは6～56か月間に分布し，70%の症例は24か月以内であった．したがって異時性肝転移を念頭においた場合，少なくとも2年間は厳重な経過観察が必要である．一方，異時性肝転移の治療は，腫瘍量の少ないミクロレベルの時期すなわち術後6か月以内に行うのが効果的であると推察されるが，異時性肝転移の予防的治療である経門脈的補助化学療法は，randomized trialによる検討において有効性に議論を残している[27)28)]．今回の検討では，進行大腸癌治癒切除例で異時性肝転移は12%であった．この場合肝転移に対する予防的治療は88%が不適格例と推察されるので，異時性肝転移高危険群の検索なしに予防的治療を行えば不適格例が多数含まれることになり，先の臨床治験で有効性が立証できなかった可能性がある．また，患者のquality of lifeの向上や医療経済学的見地からも補助化学療法適応例の判定が求められている．これらの点において，本研究で用いた免疫組織化学的手法は手技的にも比較的簡単であり，臨床応用可能な検査法として有用性が高いと考えている．

稿を終えるにあたり，nm23抗体を御供与いただきました広島大学医学部第1病理学教室田原榮一教授に深謝いたします．

文　献

1) Phillips RKS, Hittinger R, Blesovsky L et al: Large bowel cancer: surgical pathology and its relationship to survival. Br J Surg 71：604—610, 1984
2) 小西文雄：大腸癌の静脈浸潤に関する臨床病理学的研究．日消病会誌　80：1599—1609, 1983
3) 小棚木均，永沢　治，丹羽　誠ほか：数量化による直腸癌の血行性転移と局所再発の予知の可能性．日外会誌　89：1022—1027, 1988
4) Dowell SP, Hall PA: The p53 tumour suppressor gene and tumour prognosis: Is there a relationship? J Pathol 177：221—224, 1995
5) Al-Sheneber IF, Shibata HR, Sampalis J et al: Prognostic significance of proliferating cell nuclear antigen expression in colorectal cancer. Cancer 71：1954—1959, 1993
6) Saeki T, Salomon DS, Johnson GR et al: Associasion of epidermal growth factor-related peptides and type I receptor tyrosine kinase receptors with prognosis of human colorectal carcinomas. Jpn J Clin Oncol 25：240—249, 1995
7) Ichikawa W: Positive relationship between expression of CD44 and hepatic metastases in colorectal cancer. Pathobiology 62：172—179, 1994
8) Ayhan A, Yasui W, Yokozaki H et al: Reduced expression of nm23 protein is associated with advanced tumor stage and distant metastases in human colorectal carcinomas. Virchows Archiv B Cell Pathol 63：213—218, 1993
9) 大腸癌研究会編．大腸癌取扱い規約．第5版．金原出版，東京，1994
10) 白子隆志：各種免疫組織染色所見から評価した胃癌の生物学的悪性度と予後に関する臨床的研究．岐阜大医紀　43：469—479, 1995
11) Knottnerus JA, Leffers P: The influence of referral patterns on the characteristic of dignostic tests. J Clin Epidemiol 45：1143—1154, 1992
12) Vecchio TJ: Predictive value of a single diagnostic test in unselected populations. N Engl J Med 274：1171—1173, 1966
13) 樫塚登美男，佐治重豊，宮　喜一ほか：大腸癌の異時性肝転移に関する臨床的・実験的研究．岐阜大医紀　42：455—475, 1994
14) Tsuchiya A, Ando Y, Kikuchi Y et al: Venous invasion as a prognostic factor in colorectal cancer. Surg Today 25：950—953, 1995
15) 斉藤善広，大内明夫，後藤慎二ほか：静脈侵襲よりみた大腸癌の血行性転移の特性．日外会誌　93：133—138, 1992
16) Bravo R, Frank R, Blundell PA et al: Cyclin/PCNA is the auxiliary protein of DNA

polymerase-δ. Nature 326：515—517, 1987
17) Lazaris AC, Davaris P, Nakopoulou L et al: Correlation between immunohistochemical expression of proliferating cell nuclear antigen and flow cytometry parameters in colorectal neoplasia. Dis Colon Rectum 37：1083—1089, 1994
18) 中野 浩, 生田目公夫, 仲吉昭夫ほか：Proliferating cell nuclear antigen (PCNA)発現率による胃癌増殖活性の評価—その基礎的検討と臨床応用について—. 日外会誌 94：580—591, 1993
19) Wielenga VJM, Heider KH, Offerhaus GJA et al: Expression of CD44 variant proteins in human colorectal cancer is related to tumor progression. Cancer Res 53：4754—4756, 1993
20) Sleeman J, Moll J, Sherman L et al: The role of CD44 splice variants in human metastatic cancer. Cell adhesion and human disease. Wiley, Chichester, 1995, p142—156
21) Haut M, Steeg PS, Willson JKV et al: Induction of nm23 gene expression in human colonic neoplasms and equal expression in colon tumors of high and low metastatic potential. J Natl Cancer Inst 83：712—716, 1991
22) Yamaguchi A, Kurosaka Y, Fushida S et al: Expression of p53 protein in colorectal cancer and its relationship to short-term prognosis. Cancer 70：2778—2784, 1992
23) Tomoda H, Kakeji Y: Immunohistochemical analysis of p53 in colorectal cancer regarding clinicopathological correlation and prognostic significance. J Surg Oncol 58：125—128, 1995
24) Maruyama K, Tanaka T, Baba S et al: p53 Accumulation in colorectal cancer with hepatic metastasis. Jpn J Cancer Res87：368—376, 1996
25) 吉田典行, 金沢匡司, 水沼 廣ほか：Prostaglandins, c-erbB-2 および ploidy よりみた大腸癌肝転移能の検討. 日消外会誌 28：673—678, 1995
26) 大森一吉, 内野純一, 近藤征文ほか：大腸癌における肝転移再発の予知—原発巣の病理組織学的所見, c-erbB-2 蛋白発現および腫瘍核 DNA 量からの検討—. 日消外会誌 24：2963—2969, 1991
27) Wereldsma JCJ, Bruggink EDM, Meijer WS et al: Adjuvant portal liver infusion in colorectal cancer with 5-fluorouracil/heparin versus urokinase versus control. Cancer 65：425—432, 1990
28) The colorectal cancer chemotherapy study group of Japan: Five-year results of a randomized controlled trial of adjuvant chemotherapy for curatively resected colorectal carcinoma. Jpn J Clin Oncol 25：91—103, 1995

Predicion of Metachronous Liver Metastasis on Curatively Resected Colorectal Cancer by Immunohistochemical Staining of p53, c-erbB-2, PCNA, CD44, and nm23

Fumichika Kitamura, Shigetoyo Saji, Daizo Fukada, Kiichi Miya, Katsuyuki Kunieda, Yasuyuki Sugiyama, Hiroshi Takao and Motohisa Katoh
Second Department of Surgery, Gifu University, School of Medicine

For the purpose of prediction of metachronous liver metastasis on curatively resected colorectal cancer, immunohistochemical expression of p53, c-erbB-2, CD44, nm23 and proliferating cell nuclear antigen labeling index (PCNA LI) was compared between 33 cases with metachronous liver metastasis (metachronous group) and 66 cases without liver metastasis (control group). Control group was frequency (1：2) matched with metachronous group for tumor location, depth of invasion, and histological typing. PCNA LI ($p=0.0070$), CD44 positive late ($p=0.0033$) and nm23 negative late ($p=0.0227$) of metachronous group were significantly higher than those of control group. Receiver operating characteristic (ROC) curve of PCNA LI indicated that the most compatible cut off value for liver metastasis was 60. On the other hand, expression of p53 or c-erbB-2 showed no correlations with metastasis. On metachronous group, CD44 positive cases had significantly shorter disease free intervals (DFI) than negative cases ($p=0.0128$), and nm23 negative cases had relatively shorter DFI than positive cases ($p=0.0737$). Cumulative survival of CD44 positive cases was relatively lower ($p=0.0636$) than that of negative cases. PCNA LI≧60 cases had the highest positive predictive value (PV-pos) on one test (0.23), and PCNA LI≧60 and nm23 negative cases showed the highest one on two tests (0.62) for liver metastasis. From above results it is suggested that immunohistochemical expression of CD44, nm23 and PCNA LI is useful for prediction of metachronous liver metastasis on curatively resected colorectal cancer.

Reprint requests: Fumichika Kitamura Second Department of Surgery, Gifu University, School of Medicine
40 Tsukasamachi, Gifu, 500 JAPAN