

## 膵癌の術後再発機序に関する臨床病理学のおよび 分子生物学的検討

横浜市立大学医学部外科学第2講座(主任: 嶋田紘教授)

三邊 大介

浸潤性膵管癌(膵癌)切除後の再発機序の解明を目的に、臨床病理学的検討ならびに分子生物学的検討を行った。まず、過去5年間の切除例25例を対象に、各再発形式に関する臨床病理学的各因子を多変量解析により検討した結果、肝転移に対しては原発巣の静脈侵襲が、局所腹膜再発に対してはリンパ管侵襲が有意な再発危険因子であった。次に、最近2年間の切除例13例で術中採取した肝、腹膜、骨髄組織中の癌細胞を検索した。PCR法により各組織からK-ras mutationの検出を試みた結果、肝組織では肝転移再発したv2以上の4例中v3の1例(25.0%)のみで検出された。腹膜組織では1y2以上の5例中4例(80.0%)に検出され、全例が腹膜再発した。骨髄組織ではv2かつ1y2以上の3例中2例(66.7%)に検出され、全例に遠隔転移再発を認めた。以上より、膵癌では脈管侵襲により形成された微小転移が術後再発の主な原因になっていると考えられた。

### はじめに

浸潤性膵管癌(以下、膵癌)に対して、近年、広範囲リンパ節郭清や血管合併切除を伴う拡大手術が行われるようになり、その切除率は確実に向上してきた。しかし、stage III以上の進行癌が全体の90%以上を占めるため治癒切除率はいまだ40%に満たない<sup>1)</sup>。さらに、組織学的治癒切除を行っても術後比較的早期かつ高率に再発をきたすため、予後は極めて不良である<sup>2)</sup>。早期発見が困難な現時点では有効な再発予防策が急務であり、そのためには再発機序の解明が望まれる。しかし、これまでの臨床病理学的検討では一致した見解が得られていない<sup>3)~7)</sup>。

最近、各種の消化器癌では、手術時に潜在する微小転移からの再発機序が考えられており、polymerase chain reaction(以下、PCR)法を用いて癌に特異的な遺伝子配列を検出するという、分子生物学的手法による微小転移の検索が試みられている。膵癌ではK-ras codon12のpoint mutation(以下、K-ras mutation)が特異的とされ、諸臓器における微小転移の検索に利用されている<sup>8)~13)</sup>。しかし、分子生物学的な微小転移と実際の再発との関係については、いまだ不十分な説明しかなくされている。

そこで本研究では、膵癌の臨床病理学的再発危険因子の解析と微小転移の分子生物学的検索を行い、実際の再発形式との関連性につき検討した。

### 対象と方法

1992年4月から1996年3月の5年間の膵癌切除例29例のうち、手術時に腹膜播種や遠隔転移を認めなかった25例の臨床病理学的諸因子より、各再発形式に対する危険因子を単変量および多変量解析を用いて検討した。

次に、1996年4月から1998年3月の2年間の切除例13例で、術中採取した肝組織、腹腔洗浄液、腹膜組織中のK-ras mutationの有無を調べ、これらに潜在する微量の癌細胞すなわち微小転移の検索を試みた。また、癌の術前よりの全身散布の有無を検討するために、骨髄組織中の癌細胞の検索を同様に行った。

膵癌の治療に関しては、腹腔動脈(celiac artery: 以下、CA)および上腸間膜動脈(superior mesenteric artery: 以下、SMA)周囲神経叢の亜全~全切除と大動脈周囲リンパ節を含めたD2郭清を伴う拡大切除を基本術式とし、門脈浸潤が疑われる症例に対しては門脈合併切除を行った。また、補助療法として、10~20 Gyの術中照射(intraoperative radiotherapy: 以下、IORT)と、術後に局所への40~50 Gyの体外照射(external beam radiotherapy: 以下、EBRT)、持続的肝動注療法(5FU1750mg/7days×4)および全身化学療法

(CDDP 75mg/m<sup>2</sup> + MMC10mg × 1day, etoposide 50 mg × 3days, UFT 400mg × 5days) を施行した。

術後再発の検索のため、腹部の造影 CT ないし MRI 検査および超音波検査を 1 ~ 2 か月ごとに定期的に行い経時の変化を確認した。特に局所再発は、CT 上臍床部や残臍断端部周囲の不規則に造影される不整形の腫瘤<sup>14)15)</sup>とされるが、術後の炎症性変化が併存したり再発巣が後腹膜をび漫性に浸潤する形態をとる場合は診断困難なことが少なくないため、腫瘤の増大に伴う血管や神経叢の変化<sup>16)17)</sup>なども注意深く観察した。臍床部のリンパ節再発もこのような後腹膜再発と鑑別困難なことが多いため局所再発に含んだ。腹膜再発も画像診断に加え、適時腹水細胞診を行い確認した。なお、前半の25例のうち5例については剖検により再発形式を再検討した。

#### 1. 肝転移および局所腹膜再発に対する臨床病理学的危険因子の検討

まず、再発形式を肝転移と局所腹膜再発の2つに分けて検討した。局所再発と腹膜再発は本来異なる再発であるが、今回は放射線治療や化学療法の効果により画像上判定しきれず最終的に腹膜再発に含まれてしまった局所再発症例も少なからず存在すると考え両者を一括した。再発に関与する因子としては、背景因子(年齢、性別)、臍癌取扱規規約第4版<sup>18)</sup>に従った病理学的諸因子、および治療因子(放射線療法、持続的肝動注療法、全身化学療法)をとりあげた。なお、血管合併切除を施行しなかった症例ではaやpvなどの病理学的所見が得られないため手術所見を代用した。また、放射線治療群はIORTとEBRTともに完遂した症例に限った。

各因子ごとの肝非転移率および局所腹膜非再発率をKaplan-Meier法により算出した。統計学的有意性はLog-rank法により検定した。次いで、各再発形式に対する各因子の寄与の程度をCox's proportional hazard modelを用いた多変量解析により検討した。なお、再発までの期間については、手術施行日を起算日とし転移確認日をもって非打ち切り例の終算日とした。変数の選択に際しては共線性の問題を避けるため、まず背景因子としての年齢や性別の影響を制御した病理学的因子間の偏相関を求め、相関が強い変数は臨床的に重要と思われる一方を選択した。危険率5%未満の場合を有意差ありとした。

#### II. 肝転移および腹膜再発に対する微小転移の検討 術前に患者側の了承を得たうえで、以下の通り微小

転移の検索を行った。手術時、開腹直前に胸骨から約5mlの骨髓組織を採取し、塗抹標本の作製とともにPCR法によるK-ras mutationの検出を行った。開腹直後に、腹腔内を1000mlの生食にて洗浄後、吸引回収分を1500rpmで2分間遠心し、従来の細胞診とPCR法によるK-ras mutationの検出を行った。また、癌細胞の術中散布の可能性についても検討するために、開腹直前にも同様の検討を行った。さらに、肝組織を肉眼的に転移を認めない肝縁付近の任意の1か所から、腹膜組織を肝鎌状間膜部、SMA根部の高さで左右鎖骨中線および正中の前腹壁、Winslow孔、Douglas窩の計6か所から約1cm角で採取し、HE染色による組織学的検索とともにK-ras mutationの検出を行った。PCR法は、検出感度10<sup>-4</sup>のmutant-allele-specific amplification(MASA)法<sup>19)</sup>により施行した。K-ras mutationが検出された検体には微小転移が存在するものと判断した。この微小転移の検索結果と実際の再発形式、ならびに多変量解析で得られた再発危険因子との関係について検討した。

### 結 果

#### 1. 肝転移および局所腹膜再発に対する臨床病理学的危険因子の検討

25例の内訳は男性19、女性6例、年齢47~82歳(平均65.0歳)、stage III3、IVa13、IVb9例であった。術式は臍頭十二指腸切除術8、幽門輪温存臍頭十二指腸切除術14、臍全摘術1、臍体尾部切除術2例で、11例に門脈合併切除術が行われていた。12例は非治療切除に終わっており、その原因はew(+)(10)、pw(+)(2)例であった。ew(+ )の部位はCAないしSMA周囲神経叢剥離断端9、門脈剥離断端1例であった。

##### 1. 肝転移再発

##### 1) 全例の肝非転移率

肝転移再発は13例(52.0%)に認められた。全体の肝非転移率は6か月79.2、12か月41.1、18か月30.8%であった。肝転移の出現時期は、6か月以内が5例、12か月以内が12例で、18か月以内に全例で肝転移再発がみられた。

##### 2) 各因子別の肝非転移率

病理学的因子ではv0-1がv2-3に比べ18か月までの肝非転移率が有意に低かった。背景因子、治療因子別による肝非転移率に有意差は認められなかった(Table 1)。

##### 3) 病理学的因子間の偏相関

aとplとcurability、組織型とch、組織型とnの間に

Table 1 Non-metastatic rate in liver of patients undergoing radical pancreatectomy for pancreatic cancer

Variable	Category	Number of patients	Non-metastatic rate( % )			median	p
			6 month	12 month	18 month		
Overall		25	79.2	41.1	30.8	11.3	
Age( yr. )	< 65	12	75.0	47.6	35.7	10.2	0.9084
	65	13	83.3	25.9	NR <sup>a</sup>	12.0	
sex	female	6	66.7	50.0	50.0	8.1	0.9402
	male	19	83.3	39.6	26.4	11.3	
location	ph	23	77.3	50.0	37.6	17.2	0.6033
	pbt	2	100.0	0.0	0.0	10.2	
ts	1	3	100.0	50.0	50.0	11.3	0.3533
	2 3	22	76.2	39.1	39.1	10.2	
s	0 1	19	77.7	32.9	16.5	11.3	0.1859
	2 3	6	83.3	66.7	66.7	NR <sup>a</sup>	
rp	0 1	13	76.9	57.0	38.0	17.2	0.3828
	2 3	12	81.8	19.9	19.9	10.2	
ch	0 1	10	90.0	38.9	38.9	12.0	0.3509
	2 3	15	71.4	45.4	22.7	8.3	
du	0 1	15	86.7	40.2	40.2	12.0	0.2963
	2 3	10	66.7	44.4	22.2	8.1	
pv	0 1	16	73.3	38.1	38.1	12.0	0.9913
	2 3	9	88.9	38.1	23.8	10.2	
a	0 1	20	79.0	49.4	37.0	12.0	0.0564
	2 3	5	80.0	0.0	0.0	8.1	
pl	-	9	87.5	65.6	43.8	17.2	0.1642
	+	16	75.0	33.3	33.3	8.3	
n	-	4	100.0	50.0	50.0	8.3	0.6743
	+	21	75.0	38.9	25.9	11.3	
Differentiation <sup>b</sup>	well	7	100.0	45.7	45.7	12.0	0.1586
	mod, por	18	70.6	40.4	20.2	10.2	
inf	$\beta$	6	83.3	66.7	33.3	17.2	0.5706
	$\gamma$	19	77.8	32.4	32.4	11.3	
ne	0 1	3	100.0	66.7	0.0	17.2	0.7575
	2 3	22	76.2	34.6	34.6	11.3	
ly	0 1	9	75.0	30.0	0.0	10.2	0.2060
	2 3	16	81.3	49.1	49.1	12.0	
v	0 1	12	100.0	71.6	53.7	NR <sup>a</sup>	0.0066
	2 3	13	61.5	0.0	0.0	8.3	
curability	A, B	13	83.3	60.8	45.6	17.2	0.0942
	C <sup>c</sup>	12	75.0	19.4	NR <sup>a</sup>	8.1	
RT <sup>d</sup>	+	13	84.6	46.4	46.4	10.2	0.7237
	-	12	72.7	38.2	19.1	12.0	
CT <sup>e</sup>	+	7	71.4	42.9	42.9	8.1	0.9204
	-	18	82.4	39.5	19.7	12.0	
HAI <sup>f</sup>	+	7	71.4	47.6	47.6	11.3	0.6017
	-	18	82.4	35.8	23.9	10.2	

a : NR, not reached

b : Differentiation ; well, well differentiated mod, moderately differentiated  
por, poorly differentiated

c : curability C, ew( + ) or pw( + )

d : RT, radiation therapy( IORT and EBRT )

e : CT, chemotherapy

f : HAI, hepatic arterial injection

Table 2 Partial correlations between variables

	Location	ts	s	rp	ch	du	pv	a	pl	n	Differ-entiation	inf	ne	ly	v
ts	- 0.321														
s	- 0.228	0.159													
rp	- 0.291	- 0.310	- 0.214												
ch	0.385	0.202	- 0.424	- 0.117											
du	0.185	0.088	0.039	0.058	0.158										
pv	- 0.118	- 0.043	0.240	0.138	0.095	0.385									
a	0.157	0.147	- 0.233	0.301	0.360	- 0.055	0.179								
pl	0.140	0.170	0.111	0.132	- 0.231	- 0.110	- 0.122	0.455 *							
n	- 0.213	0.264	0.350	- 0.270	0.086	0.295	0.142	- 0.348	- 0.025	0.442 *					
Differentiation	0.129	0.388	- 0.055	0.087	0.646 *	0.117	0.109	0.132	- 0.125	0.265	0.284				
inf	- 0.150	- 0.274	0.234	0.341	- 0.092	- 0.079	0.133	0.111	0.084	0.062	- 0.005	0.389			
ne	- 0.138	- 0.330	0.228	0.344	- 0.386	- 0.050	- 0.003	- 0.163	- 0.040	0.011	- 0.148	0.196	- 0.066		
ly	- 0.003	0.139	0.297	- 0.076	- 0.134	- 0.004	- 0.148	0.209	0.064	0.011	- 0.106	0.271	0.030	0.142	
v	- 0.316	0.013	- 0.168	0.089	0.185	0.059	0.146	0.238	0.020	0.233	0.105	- 0.152	0.030	0.142	0.174
curability	0.076	0.321	- 0.330	0.286	0.279	- 0.037	- 0.146	0.639 *	0.470 *	- 0.266	0.105	- 0.152	0.030	0.142	0.369

\* two-tailed analysis, p < 0.05

互いに高い正の相関を認めた ( Table 2 ) .

4) Cox 's proportional hazard model による多変量解析

偏相関の結果を参考に, 肝転移再発への関与が予想される組織型, v, pv, a の病理学的 4 因子と, 治療因子としての肝動注療法, 全身化学療法を加えた計 6 因子について Cox 's proportional hazard model による多変量解析を行った. その結果, 肝転移再発に対しては v のみが独立した有意な危険因子であった ( Table 3 ). なお, 肝転移出現までの期間の平均は, v0 - 1 症例では 10.3 か月に対し, v2 - 3 症例では 6.1 か月と早期に出現する傾向にあった.

2. 局所腹膜再発

1) 全例の局所腹膜非再発率

局所再発は 18 例 ( 72.0% ) に, 腹膜再発は 12 例 ( 48.0% ) に認められたが, このうち 10 例に両者の重複がみられた. 両者をあわせると局所腹膜再発は 20 例 ( 80.0% ) となった. 全体の局所腹膜非再発率は 6 か月 70.8, 12 か月 20.8, 18 か月 16.7% であった. 再発出現時期は, 6 か月以内が 7 例, 12 か月以内が 19 例で, 18 か月以内に全例で局所腹膜再発がみられた.

2) 各因子別の局所腹膜非再発率

病理学的因子では 1y0 - 1 が 1y2 - 3 に比べ, a0 - 1 が a2 - 3 に比べて 18 か月までの局所腹膜非再発率が有意に低かった. 背景因子, 治療因子別による局所腹膜非再発率に有意差は認められなかった ( Table 4 ).

3) Cox 's proportional hazard model による多変量解析

先に求めた偏相関の結果を参考に, 局所腹膜再発への関与が予想される占居部位, 1y, s, rp, n, curability の病理学的 6 因子と, 治療因子としての放射線療法, 全身化学療法を選択した計 8 因子について Cox 's proportional hazard model による多変量解析を行った. その結果, 局所腹膜再発に対しては 1y のみが独立した有意な危険因子であった ( Table 5 ). なお, 局所腹膜再発までの期間の平均は, 1y0 - 1 症例では 9.8 か月に対し, 1y2 - 3 症例では 6.3 か月と早期に出現する傾向にあった.

II. 肝転移および腹膜再発に対する微小転移の検討

13 例の内訳は, 男性 9 例, 女性 4 例, 年齢 46 ~ 76 歳 ( 平均 61.3 歳 ). 術式は 臍全摘術 1, 臍頭十二指腸切除術 6, 幽門輪温存臍頭十二指腸切除術 5, 臍体尾部切除 1 例で, うち 8 例に門脈合併切除を施行した.

肝組織における検討では, 10 例中 1 例 ( 10.0% ) のみ

Table 3 Estimate of relative risk of liver metastasis from multivariate Cox regression models

Variables		Assigned score	Relative risk	95% C.I. <sup>a</sup>		p
Differentiation <sup>b</sup>	well	0	1			
	mod, por	1	4.562	0.991	21.005	0.0514
a	0 1	0	1			
	2 3	1	2.021	0.465	8.789	0.3484
pv	0 1	0	1			
	2 3	1	0.543	0.144	2.054	0.3687
v	0 1	0	1			
	2 3	1	10.138	1.642	62.599	0.0126
CT <sup>c</sup>	-	0	1			
	+	1	0.979	0.237	4.050	0.9769
HAI <sup>d</sup>	-	0	1			
	+	1	2.002	0.393	10.188	0.4030

<sup>a</sup>: 95% C.I., 95% confidence interval

<sup>b</sup>: Differentiation; well, well differentiated mod, moderate differentiated por, poor differentiated

<sup>c</sup>: CT, chemotherapy

<sup>d</sup>: HAI, hepatic arterial injection

に K-ras mutation が検出された。また、原発巣で v2 以上の症例では、同時性肝転移と合併症死を除いた全例に肝転移再発を認めたと、この 1 例も v3 の症例であった。v2 以上の 4 例からみた K-ras mutation 検出率は 25.0% で、肝転移再発した 7 例からみると 14.3% であった。

腹腔洗浄細胞診は Class III 以上を陽性とする、13 例中 3 例 (23.1%) が開腹時と閉腹時ともに陽性であった。このうちの 2 例 (15.4%) に K-ras mutation を検出した。これらは全例原発巣で 1y2 以上の症例であった。腹膜組織における検討では、10 例中 5 例 (50.0%) に K-ras mutation を検出した。これには原発巣で 1y2 以上の 5 例のうち 4 例 (80.0%) が含まれていた。K-ras mutation が検出された腹膜の部位は、前腹壁 5 例、肝鎌状間膜部 2 例と、全例上腹部に位置していた。腹腔洗浄液および腹膜組織中の K-ras mutation 検出例は全例に腹膜再発を認め、腹膜再発した 7 例からそれぞれの検出率をみると 28.6% および 71.4% であった。閉腹時のみ腹腔洗浄細胞診陽性であった 1 例には腹膜再発を認めなかった。

骨髄組織における検討では、8 例中 2 例 (25.0%) に K-ras mutation を検出した。この 2 例は、原発巣で v2 以上かつ 1y2 以上の 4 例中合併症死を除く 3 例に含まれており、肝転移、局所、腹膜再発の他にも肺転移再発を認めたと (Table 6)。なお、病理組織学的検索では

すべての検体で癌細胞は証明されず、また各組織における K-ras mutation の変異型は全例で原発巣のそれと一致した。

### 考 察

膵癌は治癒切除がなされても局所再発や肝転移を中心とする術後再発が比較的早期かつ高率に出現するため、治療成績がいまだに不良である<sup>1,2)</sup>。したがって、治療成績向上のためには、術後再発の発生機序を明らかにし、それに応じた合理的な再発予防策をたてることが重要な課題である。

再発機序の解明のために、これまでも臨床病理学的諸因子における再発危険因子の検討は数多くなされているが、一致した見解は得られていない<sup>3)-5)</sup>。それは主に再発診断や解析法における問題によると思われる。

膵癌切除後の再発形式は、剖検による検討では、肝転移 66~79、局所再発 80~86、腹膜再発 36~53%<sup>20)-22)</sup>と報告されている。一方、画像を中心とした検討では、肝転移 40~58、局所再発 17~44、腹膜再発 37~47%<sup>23)-25)</sup>と報告されており、画像による診断能の低下がその後の解析を困難にする一因となっていると思われる。そのため今回は、各再発形式について画像診断を経時的かつ詳細に比較検討した結果、それぞれ剖検に近い肝転移 52.0、局所再発 72.0、腹膜再発 48.0% が確認された。

Table 4 Non-recurrent rate of local or peritoneum of patients undergoing radical pancreatectomy for pancreatic cancer

Variable	Category	Number of patients	Non-recurrent rate( % )			median	p
			6 month	12 month	18 month		
Overall		25	70.8	20.8	16.7	6.8	
Age( yr. )	< 65	12	83.3	33.3	NR <sup>a</sup>	7.5	0.2405
	65	13	58.3	8.3	8.3	6.3	
sex	female	6	50.0	0	0	5.2	0.0590
	male	19	77.8	27.8	22.2	7.1	
location	ph	23	68.2	18.2	13.6	8.2	0.1738
	pbt	2	100.0	50.0	NR <sup>a</sup>	12.0	
ts	1	3	66.7	33.3	33.3	7.1	0.6152
	2 3	22	71.4	19.1	NR <sup>a</sup>	6.8	
s	0 1	19	66.7	17.7	17.7	6.6	0.7055
	2 3	6	83.3	33.3	NR <sup>a</sup>	7.5	
rp	0 1	13	76.9	23.1	15.4	7.5	0.8996
	2 3	12	63.6	18.2	NR <sup>a</sup>	6.6	
ch	0 1	10	90.0	20.0	20.0	7.5	0.3670
	2 3	15	57.1	24.4	NR <sup>a</sup>	6.1	
du	0 1	15	73.3	26.7	20.0	7.1	0.3830
	2 3	10	66.7	11.1	NR	6.8	
pv	0 1	16	86.7	20.0	13.3	7.1	0.7736
	2 3	12	44.4	22.2	NR <sup>a</sup>	5.2	
a	0 1	20	79.0	26.3	21.1	12.0	0.0003
	2 3	5	40.0	0	0	8.1	
pl	-	9	62.5	25.0	NR <sup>a</sup>	6.8	0.9758
	+	16	75.0	18.8	18.8	6.6	
n	-	4	75.0	NR <sup>a</sup>	NR <sup>a</sup>	6.1	0.3811
	+	21	70.0	25.0	20.0	6.8	
Differentiation <sup>b</sup>	well	7	100.0	14.3	14.3	8.0	0.5055
	mod, por	18	58.8	23.5	NR <sup>a</sup>	6.3	
inf	$\beta$	6	83.3	16.7	NR <sup>a</sup>	8.0	0.7744
	$\gamma$	19	66.7	22.2	16.7	6.6	
ne	0 1	3	100.0	33.3	NR <sup>a</sup>	9.1	0.4427
	2 3	22	66.7	19.1	14.3	6.8	
ly	0 1	9	75.0	50.0	50.0	9.8	0.0082
	2 3	16	68.8	6.3	NR <sup>a</sup>	6.3	
v	0 1	12	81.8	27.3	18.2	8.0	0.4265
	2 3	13	61.5	15.4	NR <sup>a</sup>	6.3	
curability	A, B	13	75.0	33.3	25.0	7.5	0.2251
	C <sup>c</sup>	12	66.7	8.3	NR <sup>a</sup>	6.3	
RT <sup>d</sup>	+	13	61.5	23.1	NR <sup>a</sup>	6.3	0.6223
	-	12	81.8	18.2	18.2	7.5	
CT <sup>e</sup>	+	7	42.9	28.6	NR <sup>a</sup>	5.2	0.6012
	-	18	82.4	17.7	17.7	7.1	

a : NR, not reached

b : Differentiation ; well, well differentiated mod, moderately differentiated  
por, poorly differentiated

c : curability C, ew( + ) or pw( + )

d : RT, radiation therapy( IORT and EBRT )

e : CT, chemotherapy

Table 5 Estimate of relative risk of local or peritoneal recurrence from multivariate Cox regression models

Variables		Assigned score	Relative risk	95% C.I. <sup>a</sup>		p
Location	Pbt	0	1			
	Ph	1	6.926	0.482	99.490	0.1546
ly	0	1	1			
	2	3	6.434	1.653	25.036	0.0072
s	0	1	1			
	2	3	0.689	0.090	5.300	0.7025
rp	0	1	1			
	2	3	1.603	0.320	8.043	0.5662
n	-	0				
	+	1	0.712	0.175	2.898	0.6355
curability	A, B	0	1			
	C <sup>b</sup>	1	1.410	0.402	4.946	0.5919
CT <sup>c</sup>	-	0	1			
	+	1	1.144	0.272	4.807	0.8544
RT <sup>d</sup>	-	0	1			
	+	1	0.964	0.222	4.179	0.9610

<sup>a</sup> : 95% C.I., 95% confidence interval

<sup>b</sup> : curability C, ew( + ) or pw( + )

<sup>c</sup> : CT, chemotherapy

<sup>d</sup> : RT, radiotherapy

Table 6 Summary of clinicopathological findings and K-ras mutations in 13 patients with pancreatic cancer

patient no.	Age/Sex	pathological findings		K-ras mutation						pattern of recurrence				Survival interval ( mo )	Outcome
				ly	v	main tumor	liver	BM <sup>a</sup>	peritoneal lavage ( cytology )		peritoneum	liver	local		
		before <sup>b</sup>	after <sup>c</sup>												
1	61/M	2	2	+	N/D <sup>d</sup>	+	+( III )	+( III )	+	+ <sup>e</sup>	+	+	Lung	15.3	dead
2	76/M	2	2	+	-	-	-( II )	-( I )	+	-	-	-	-	3.9	dead <sup>f</sup>
3	58/M	2	3	+	-	-	-( I )	-( I )	+	+	+	+	Lung	9.5	dead
4	46/F	1	1	+	-	-	-( I )	-( I )	-	+	+	+	-	20.2	dead
5	73/F	1	0	+	-	-	-( II )	-( II )	+	+	+	+	-	6.6	dead
6	68/M	0	0	+	-	-	-( I )	-( I )	-	+	-	-	Spleen	20.2	dead
7	48/M	1	2	+	-	-	-( II )	-( II )	-	+	+	-	-	9.7	dead
8	56/F	3	0	+	N/D <sup>d</sup>	N/D <sup>d</sup>	-( I )	-( II )	N/D <sup>d</sup>	-	+	-	-	19.0	dead
9	61/M	0	3	+	N/D <sup>d</sup>	N/D <sup>d</sup>	-( I )	-( I )	N/D <sup>d</sup>	+	-	-	-	12.2	dead
10	71/M	0	0	+	-	N/D <sup>d</sup>	-( I )	-( I )	-	-	+	+	-	12.0	dead
11	66/F	2	1	+	-	N/D <sup>d</sup>	-( III )	-( III )	-	-	+	+	-	19.1	alive
12	57/M	3	3	+	+	+	+( V )	+( IV )	+	+	+	+	Lung	16.4	alive
13	56/M	0	1	+	-	N/D <sup>d</sup>	-( I )	-( III )	N/D <sup>d</sup>	-	+	-	-	20.1	alive

<sup>a</sup> : BM, bone marrow

<sup>d</sup> : N/D, not done

<sup>b</sup> : before, before pancreatectomy

<sup>e</sup> : simultaneous metastasis

<sup>c</sup> : after, after pancreatectomy

<sup>f</sup> : died of postoperative complications

また、多数の因子が互いに複雑に影響し合う膵癌では、単変量解析のみの検討<sup>3)-6)</sup>ではどの因子が各再発形式の発現においてより重要なかが判然としない。

このような場合、再発期間や観察期間内の打ち切り例を考慮した多変量解析を用いて各因子の寄与の程度を同時に比較検討する必要があるが、多変量解析による

検討は少ない<sup>7)</sup>。そこで今回 臨床病理学的諸因子より各再発形式に対する危険因子を、単変量解析と Cox's proportional hazard model による多変量解析を用いて検討した。その結果、肝転移再発では *v* が、局所腹膜再発では *1y* が独立した危険因子であることが判明した。また、*v* や *1y* と腫瘍径、局所における癌遺残の有無と各再発形式の間に相関は認められなかった。特に、*v2* 以上や *1y2* 以上の症例では、肝転移や局所腹膜再発が術後早期に出現した。すなわち、膵癌の術後再発は脈管侵襲という癌の生物学的特性によって規定され、手術時にはすでに癌が微小転移あるいは微小浸潤などの形で広く進展していることが推測された。

最近膵癌では、PCR 法を用いた K-ras mutation の検索によって、手術時すでに諸臓器において微小転移が高率に潜在することが指摘されている<sup>8)-13)</sup>。これに準じた今回の検討でも、肝、腹膜、骨髄に微小転移が存在すると考えられた。しかし、このような微小転移の分子生物学的検索法は高感度であるがゆえに、contamination の可能性や検出された癌細胞が viable であることの証明が困難であるなど、再現性の問題がつねに存在している。Aihara ら<sup>26)</sup>も膵癌と胃癌の症例において、false positive の原因を厳密に排除した上で末梢血と門脈血中の cytokeratin 19 mRNA の検出を試みた結果、検出率は他の報告と異なり予想外に低かったと報告している。したがって、分子生物学的な微小転移に関しては、その検出率よりも実際の再発をどう説明するかについて検討しなければ臨床的意義は乏しいと思われるが、これまでの報告ではあまり論じられていない。そこで今回は微小転移と各再発形式の関係、さらに多変量解析で得られた再発危険因子との関連性についても検討した。

肝組織における検討では、手術時に潜在する肝微小転移が実際の肝転移再発の原因になっていると考えられたが、その検出率からは高い肝転移再発率を説明することはできなかった。一方、Inoue ら<sup>8)</sup>の検討では、肝組織の採取方法や PCR 法が今回とは若干異なるものの、76.5%もの高率に肝微小転移が検出されている。この報告では実際の肝転移再発との関係については検討されていないため、false positive の可能性も否定できず単純には比較できないが、今回採取した肝組織の部位や個数あるいはその量では、全肝の正常細胞に対する癌細胞の個数が検出限界以下となってしまう可能性が考えられた。むしろ、肝微小転移が *v3* の症例で検出されたことから、原発巣での静脈侵襲が高度にな

るに従い多数の肝微小転移巣が形成されていくのではないかと考えた。

腹腔洗浄液における検討では、腹膜再発例でみても開腹時、閉腹時ともに癌細胞の検出率は低かった。これは諸家<sup>8) 27)</sup>の検討でも同様で、肉眼的に腹膜転移を認めない膵癌では腹腔洗浄液中の癌細胞の検出率は低い。しかし、実際に腹膜組織について検討してみると、腹膜再発例の多くに腹膜微小転移が検出され、手術時に潜在する腹膜微小転移が腹膜再発の主な原因になっていると考えられた。そこでこれらの結果の違いから、膵癌では癌細胞の腹腔内散布が腹膜転移の原因となることは術前術中を問わず少ないのではないかと思われた。米村<sup>28)</sup>は胃癌の腹膜転移経路について、癌細胞が腹膜中皮の間隙へ接着する以外に、大網や腹膜における腹水や異物などの吸収装置である乳班や stomata から侵入した癌細胞が腹膜下リンパ管内で増殖するという一種のリンパ系転移経路を明らかにしている。今回、腹膜微小転移の多くが *1y2* 以上の症例で検出されたことは、このリンパ系転移経路が腹膜転移に深く関与していることを示唆するものと思われた。すなわち膵癌では、まず腹膜下リンパ管への微小転移が成立しリンパ流が遮断され、乳班や stomata から逆行性に癌細胞が腹腔内へ遊離していくことで腹膜転移が顕在化していくのではないかと考えられた。ところで、今回は局所再発に関する微小転移の検索は行っていないが、Tamagawa ら<sup>10)</sup>はリンパ節および膵外神経叢における微小転移を検索し、特に膵床部リンパ節における微小転移が局所再発を反映していたと報告している。また、森<sup>29)</sup>は膵癌の SMA 周囲への進展経路として、膵外神経叢への連続性進展以外にも神経叢の外側を通るリンパ行性進展が存在することを明かにし、菅原<sup>30)</sup>はリンパ管侵襲の著しいものほど膵外神経叢浸潤が高度になっていたと述べている。したがって、膵外神経叢浸潤は膵癌の特徴であり局所における癌遺残の原因になりやすいが、積極的な神経叢切除による治癒切除後の局所再発に関してはリンパ行性進展が深く関与していることが推測された。このように、局所再発と腹膜再発はともに原発巣における高度なリンパ管侵襲によって形成された微小浸潤や微小転移から成立している可能性が考えられた。

骨髄組織における検討では、膵癌の骨転移が比較的まれなことから考えれば高頻度に微小転移が検出され、検出例ではその後全身的な転移再発が認められた。骨髄微小転移の検索はこれまでも免疫組織学的手法



によって膵癌を含む各種の消化器癌で数多く行われており、骨髄微小転移の有無と再発・予後に相関がみられている<sup>31)~34)</sup>。また、その再発機序については、骨髄が癌細胞の貯蔵庫となり全身散布を引き起こすためと理解されている<sup>33)~35)</sup>。今回の分子生物学的検索もこれを支持する結果であり、骨髄微小転移の検索は膵癌の全身散布の可能性を予測し、治療戦略を立てるうえで有用と思われた。また、今回の切除標本との比較検討から、原発巣での高度な脈管侵襲がみられた場合は骨髄微小転移の存在を念頭に置く必要があると考えられた。一方、K-ras mutationをマーカーにした末梢血中癌細胞の検索による同様の検討もなされているが、癌細胞の検出結果と再発・予後との相関はみられておらず<sup>11)~13)</sup>、再発機序の説明も十分ではない。これは、原発巣からの癌細胞の遊離が常に起こっているとは考えにくく、また、検出された癌細胞が遠隔臓器への生着能を必ずしも有するとは限らないためではないかと思われる、現時点ではその臨床上的有用性は不明である。

以上、静脈やリンパ管への高度な侵襲をきたす膵癌では、治癒切除がなされても肝、局所、腹膜あるいは遠隔臓器への微小転移がすでに成立し、これが術後再発の主な原因になっていると考えられた。また、このことが、膵癌全国登録調査報告<sup>1)</sup>においてもv2以上あるいは1y2以上の症例の1年生存率が50%に満たず、静脈、リンパ管侵襲が予後不良因子となっている理由ではないかと思われた。もちろん、脈管侵襲が軽微な場合でも最終的に同様の転移再発をきたすことは少なくない。しかしこの場合は、その発現時期がやや遅いことや、局所において非治癒切除となった症例が少なからず含まれていたことなどから、局所遺残癌からの局所再発と二次的な転移が主に起こっているのではないかと推測された。

今回の結果は膵癌の手術治療を否定するものではなく、むしろ、後腹膜組織の一括郭清を伴った拡大切除による局所コントロールと、微小転移の存在を念頭に置いた術後早期よりの補助療法の重要性を示すものであると考えている。すなわち、明かなCA、SMA周囲神経叢浸潤陽性所見などの、非治癒切除が見込まれる症例の手術適応はないが、治癒切除可能と判断される症例では術後QOLの許す限り拡大切除を行うべきである。さらにDemeureら<sup>36)</sup>が微小転移の段階での補助療法の有用性を述べているように、術後は原発巣の脈管侵襲の程度から予想される微小転移に対して合理的な補助療法を追加することが重要と思われる。ただ、現

時点での補助療法による再発予防効果は不十分であるため、今後の新しい補助療法の開発に期待したい。

稿を終えるにあたり、御指導と御校閲を賜りました嶋田紘教授に深甚なる誠意を表します。また、終始御指導頂きました横浜市立大学医学部第2外科学教室市川靖史助手、簾田康一郎助手、瀧本 篤助手ならびに、御協力を頂きました膵胆道グループの諸兄に深謝致します。

## 文 献

- 膵癌登録委員会報告：膵癌全国登録調査報告（1998年度症例の要約）。膵臓 15：179-211, 2000
- 大橋 修, 山本正博, 斉藤洋一：膵癌治療の成績統計的推移。日外会誌 98：588-591, 1997
- 川端章弘, 上野富雄, 鶴見征志ほか：膵癌の病理組織と予後 リンパ節転移, 神経叢浸潤を中心に。癌と化療 19：2325-2332, 1992
- 金子哲也, 中尾昭公, 原田明生ほか：膵癌拡大手術後の再発形式の検討 術中照射による影響も含めて。日消外会誌 26：2423-2428, 1993
- 小野山裕彦, 山本正博, 長谷川恭久ほか：肉眼的進行度などからみた再発様式 膵頭部癌。肝胆膵 31：515-521, 1995
- 関 誠, 加藤 洋, 久保起与子ほか：肉眼的進行度などからみた再発様式進行度からみた膵体・尾部癌の再発様式。肝胆膵 31：523-530, 1995
- 菊地安徳, 山内英生, 柿崎健二：膵癌の肝転移 核DNA解析と癌組織間質質量からみた検討。膵臓 12：273-284, 1997
- Inoue S, Nakao A, Kasai Y et al : Detection of hepatic micrometastasis in pancreatic adenocarcinoma patients by two-stage polymerase chain reaction/restriction fragment length polymorphism analysis. Jpn J Cancer Res 86 : 626-630, 1995
- Rall CJN, Rivera JA, Centeno BA et al : Peritoneal exfoliative cytology and Ki-ras mutational analysis in patients with pancreatic adenocarcinoma. Cancer Lett 97 : 203-211, 1995
- Tamagawa E, Ueda M, Takahashi S et al : Pancreatic lymph nodal and plexus micrometastases detected by enriched polymerase chain reaction and nonradioisotopic single-strand conformation polymorphism analysis : A new predictive factor for recurrent pancreatic carcinoma. Clin Cancer Res 3 : 2143-2149, 1997
- Nomoto S, Nakao A, Ando N et al : Clinical application of K-ras oncogene mutations in pancreatic carcinoma : detection of micrometastasis. Semin Surg Oncol 15 : 40-46, 1998
- Yamada T, Nakamori S, Ohzato H et al : Detection of K-ras gene mutations in plasma DNA of patients with pancreatic adenocarcinoma : Correla-

- tion with clinicopathological features. *Clin Cancer Res* 4 : 1527-1532, 1998
- 13) Castells A, Puig P, Mora J et al : K-ras mutations in DNA extracted from the plasma of patients with pancreatic carcinoma : diagnostic utility and prognostic significance. *J Clin Oncol* 17 : 578-584, 1999
- 14) Heiken JP, Balfe DM, Picus D et al : Radical pancreatotomy : postoperative evaluation by CT. *Radiology* 153 : 211-215, 1984
- 15) Coombs RJ, Zeiss J, Howard JM et al : Ct of the abdomen after the Whipple procedure : value in depicting postoperative anatomy, surgical complications, and tumor recurrence. *Am J Roentgenol* 154 : 1011-1014, 1990
- 16) Lepanto L, Gianfelice D, Dery R et al : Postoperative changes, complications and recurrent disease after Whipple's operation : CT features. *Am J Roentgenol* 163 : 841-846, 1994
- 17) Bluemke DA, Fishman EK, Kuhlman J : CT evaluation following Wipple procedure : potential pitfalls in interpretation. *J Comput Assist Tomogr* 16 : 704-708, 1992
- 18) 日本膵臓学会編 : 膵癌取扱い規約 .第4版 .金原出版, 東京, 1993
- 19) 林 尚子, 江上 寛, 高野 定ほか : MASA 法による変異遺伝子の検出とその臨床応用 . *日消外会誌* 30 : 897-900, 1997
- 20) 尾崎秀男, 北條慶一, 加藤抱一ほか : 膵癌の集学的治療 . *消外* 3 : 84-90, 1985
- 21) Kayahara M, Nagakawa T, Ueno K et al : An evaluation of radical resection for pancreatic cancer based on the mode of recurrence as determined by autopsy and diagnostic imaging. *Cancer* 72 : 2118-2123, 1993
- 22) Westerdahl J, Andren-Sandberg A, Ihse I : Recurrence of exocrine pancreatic cancer-local or hepatic? *Hepatogastroenterology* 40 : 384-387, 1993
- 23) Griffin JF, Smalley SR, Jewell W et al : Patterns of failure after curative resection of pancreatic carcinoma. *Cancer* 66 : 56-61, 1990
- 24) 中尾昭公, 高木 弘 : 膵頭部癌 膵広範切除 .リンパ節郭清 . *肝胆膵* 31 : 591-597, 1995
- 25) 井上一知, 細谷 亮, 小切匡史ほか : 膵癌術後再発の問題点とその対策 . *外科治療* 76 : 927-934, 1997
- 26) Aihara T, Noguchi S, Ishikawa O et al : Detection of pancreatic and gastric cancer cells in peripheral and portal blood by amplification of keratin 19mRNA with reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Int J Cancer* 72 : 408-411, 1997
- 27) Merchant NB, Conlon KC, Saigo P et al : Positive peritoneal cytology predict unresectability of pancreatic adenocarcinoma. *J Am Coll Surg* 188 : 421-426, 1999
- 28) 米村 豊 : 腹膜播種 . へるす出版, 東京, 1996, p 1-134
- 29) 森 和宏 : 上腸間膜動脈周囲の三次元構造の研究 膵癌における上腸間膜動脈周囲神経叢を温存したリンパ節完全郭清の可能性について . *十全医会誌* 101 : 406-415, 1992
- 30) 萱原正都 : 膵癌進展様式の臨床病理学的ならびに実験的研究 とくに膵外神経叢内神経浸潤について . *日消外会誌* 21 : 1363-1372, 1988
- 31) Lindemann F, Schlimok G, Dirschedl P et al : Prognostic significance of micrometastatic tumor cells in bone marrow of colorectal cancer patients. *Lncet* 340 : 685-689, 1992
- 32) Heiss MM, Allgayer H, Gruetzner KU et al : Individual development and uPA-receptor expression of disseminated tumour cells in bone marrow : a reference to early systemic disease in solid cancer. *Nat Med* 1 : 1035-1039, 1995
- 33) Thorban S, Roder JD, Siewert JR et al : Detection of micrometastasis in bone marrow of pancreatic cancer patients. *Ann Oncol* 10 : 111-113, 1999
- 34) Gerald CO, Kevin C, Fiona OB et al : Micrometastasis in bone marrow of patient undergoing "curative" surgery for gastrointestinal cancer. *Gastroenterology* 109 : 1535-1540, 1995
- 35) Brugger W, Bross KJ, Glatt M et al : Mobilization of tumor cells and hemopoietic progenitor cells into peripheral blood of patient with solid tumors. *Blood* 83 : 636-640, 1994
- 36) Demeure MJ, Doffek KM, Komorowski RA et al : Molecular metastases in stage I pancreatic cancer : Improved survival with adjuvant chemoradiation. *Surgery* 124 : 663-669, 1998

Clinicopathological and Molecular Studies for the Mechanism of Recurrence  
after Resection of Pancreatic Cancer

Daisuke Minabe

The Second Department of Surgery, Yokohama City University, School of Medicine  
( Director : Prof. Hiroshi Shimada )

We clarified the mechanism of recurrence after pancreatic cancer resection through clinicopathological and molecular studies were attempted. The clinicopathological profiles of 25 patients who undergoing pancreatectomy for pancreatic cancer were evaluated, using multivariate analysis. A significant prognostic factor for liver metastasis was venous invasion ( v factor ) in the main tumor, and that for both local recurrence and peritoneal metastasis was lymph vessel invasion ( 1y factor ) . The polymerase chain reaction ( PCR ) targeting the mutant K-ras gene was applied to detect cancer cells in tissue specimens from liver, peritoneum, and marrow during surgery from 13 patients with pancreatic cancer. In only 1 ( 25. 0% ) patient with v3 among the 4 patients with more than v2 who developed postoperative liver metastasis, the mutant K-ras gene was detected in liver tissue specimen. In 4 of 5 ( 80. 0% ) patients with more than 1y2, the mutant K-ras gene was detected in peritoneal tissue specimens, and all developed peritoneal recurrence. In 2 of the 4 ( 50. 0% ) with more than v2 and 1y2, the mutant K-ras gene was detected in bone marrow tissue, and all suffered distant metastasis. In conclusion, the recurrence after pancreatic cancer resection is mainly caused by micrometastasis rapidly formed by venous or lymph vessel invasion.

Key words : pancreatic cancer, recurrence, micrometastasis, mutant K-ras gene, vessel invasion

[ Jpn J Gastroenterol Surg 34 : 1702 - 1712, 2001 ]

Reprint requests : Daisuke Minabe The Second Department of Surgery, Yokohama City University, School  
of Medicine  
3-9 Fukuura, Kanazawa-ku, Yokohama, 236-0004 JAPAN

---