

原 著

進行胃癌に対する術前短期化学療法の有用性の検討 —アポトーシス誘導および細胞増殖能を指標として—

近畿大学医学部外科学教室

十川 佳史 今野 元博 塩崎 均 大柳 治正

はじめに：進行胃癌に対し，術前短期化学療法（short Neoadjuvant Chemotherapy：以下，s-NAC と略記）を施行し，原発巣ならびに転移リンパ節における効果を検討した。方法：進行胃癌 98 症例を対象とし，5-FU 単独投与群 20 例，5-FU+CDDP 併用投与群（以下，FC 群と略記）34 例，CDDP 単独投与群 15 例，化学療法未施行群 29 例に分類。各群の原発巣およびリンパ節を用いてアポトーシス誘導，細胞増殖能を検索した。また原発巣におけるアポトーシス関連遺伝子の発現も検索した。さらに抗サイトケラチン抗体を用いてリンパ節微小転移の有無を検索した。結果：FC 群で有意に原発巣および転移リンパ節にアポトーシスが誘導され，細胞増殖能が抑制された。p53 wild type, p21 および Bax 発現は FC 群で有意に陽性例が多かった。また FC 群では，HE 染色で確認されるリンパ節転移（以下，HE (+) と略記）は少なかったが，微小転移（以下，MM (+) と略記）は多かった。考察：進行胃癌に対する s-NAC として 5-FU と CDDP を併用投与すると 5-FU 単独投与，CDDP 単独投与に比べて，原発巣ならびにリンパ節の癌細胞により高度なアポトーシス誘導と細胞増殖能の抑制が起こり，HE (+) を MM (+) に縮小している可能性が推察された。

緒 言

近年，胃癌の治療成績は飛躍的に向上したが，これは検診の普及などにより早期胃癌の発見率が向上したことが大きく関与しており，進行胃癌の治療成績に関してはいまだ決して満足できるものではない¹⁾。また，集学的治療の一環として行われる術後補助化学療法にも，確実な延命効果を証明したエビデンスはない。

一方，進行胃癌術後の再発は腹膜播種・肝や肺など臓器への転移・リンパ節転移など多彩な形式で認められる。これらの再発巣は各種画像検査や術中所見では明らかにできない微小転移として術前より存在することが推測される。

そこで進行胃癌に対する手術成績の向上を図るために術前化学療法という概念が導入された。この術前化学療法の目的は，化学療法によりまず微

小転移のコントロールや原発腫瘍縮小を図ったあとに切除するという集学的治療法を行うことにある。また，根治切除が不可能な進行胃癌患者に対し，術前化学療法後に切除を施行し長期生存を得たとの報告もある^{2,3)}。そこで，我々は進行胃癌に対する術前短期化学療法（short Neoadjuvant Chemotherapy：以下，s-NAC と略記）の有効性を検索するために，抗癌剤の抗腫瘍効果を検討した。

対 象

1992 年から 2002 年までに近畿大学医学部附属病院外科にて，術前に各種画像診断で進行胃癌と診断され，かつ書面によるインフォームド・コンセントが得られた 98 症例を対象とした。症例選考にあたり 76 歳以上，重篤な併存疾患を有する症例，先行治療として他の治療を受けている症例，全身状態不良例（パフォーマンス・ステータス 3 以上）は除外した。臨床病理学的事項では各群とも年齢，性別，組織型，進達度，ステージに有意な差は認めなかった（Table 1）。

<2004 年 11 月 30 日受理>別刷請求先：今野 元博
〒589-8511 大阪狭山市大野東377-2 近畿大学医学部外科

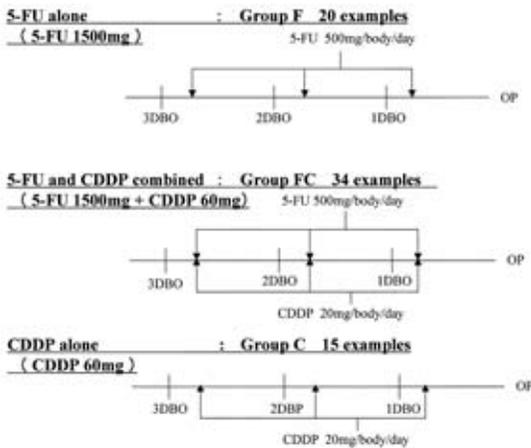
Table 1 Characteristics of 4 groups

	Sex	Age (mean ± SD)	Differentiation	Depth	Stage
Group F (5-FU alone)	Male 11	59.5 ± 10.4	well. 1	T2 14	IB 1
	Female 9		mod. 3	T3 5	II 5
Group FC (5-FU+CDDP combined)	Male 23	57.2 ± 12.3	por. 12	T4 1	III A 3
	Female 11		muc. 2		III B 2
Group C (CDDP alone)	Male 9	58.4 ± 9.5	sig. 1		IV 9
	Female 6		pap. 1		
Control group	Male 16	60.7 ± 8.7	well. 5	T1 8	IA 4
	Female 11		mod. 8	T2 14	IB 7
Group C (CDDP alone)	Male 9	58.4 ± 9.5	por. 17	T3 9	II 2
	Female 6		muc. 1	T4 3	III A 9
Control group	Male 16	60.7 ± 8.7	sig. 3		III B 1
	Female 13		pap. 1		IV 11
Control group	Male 16	60.7 ± 8.7	well. 4	T1 1	IA 1
	Female 13		mod. 5	T2 17	IB 4
Control group	Male 16	60.7 ± 8.7	por. 16	T3 11	II 5
	Female 13		muc. 3		III A 5
Control group	Male 16	60.7 ± 8.7	sig. 1		III B 1
	Female 13		pap. 1		IV 13

well. : well differentiated adenocarcinoma mod. : moderately differentiated adenocarcinoma por. : poorly differentiated adenocarcinoma muc. : mucinous adenocarcinoma sig. : signet-ring cell adenocarcinoma pap. : papillary adenocarcinoma

Fig. 1 Regimen of the short term neoadjuvant chemotherapy

DBO : days before operation



方 法

1) 術前化学療法のレジメン

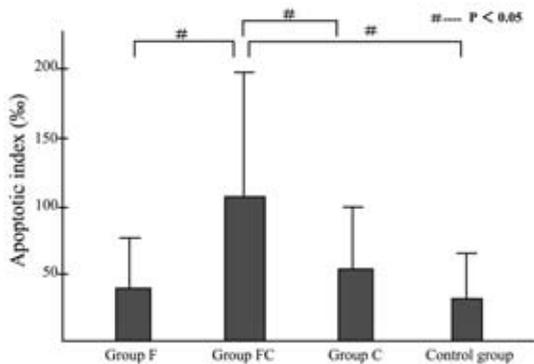
s-NAC のレジメンは 4 種類で、対象症例を封筒法により分類した。5-FU 単独使用群 (以下、F 群と略記) 20 例、5-FU + CDDP 併用群 (以下、FC 群と略記) 34 例、CDDP 単独使用群 (以下、C

群と略記) 15 例、また術前化学療法未施行の 29 例をコントロール群とした。調査研究期間を前期と後期に分け、前期として 1992 年から 1998 年の期間は F 群 20 例、FC 群 19 例、コントロール群 16 例を、後期として 1999 年から 2002 年の期間は FC 群 15 例、C 群 15 例、コントロール群 13 例に s-NAC を施行した。各群の薬剤投与方法および投与量は、術前でもあり安全域を考え Fig. 1 のように決定した。すなわち、F 群では術前 3 日間に 5-FU 500mg/body/day を 24 時間持続点滴投与、FC 群では術前 3 日間に 5-FU 500mg/body/day の 24 時間持続点滴投与にくわえ、CDDP 20mg/body/day を 30 分間点滴投与、C 群では術前 3 日間に CDDP 20mg/body/day を 30 分間点滴投与した。投与経路は末梢ないしは中心静脈からとした。5-FU の持続点滴は手術当日の 0 時までには総量 1,500mg が投与終了するように開始し、CDDP の 30 分間点滴静注は午前中に施行した。

また、病期に基づく系統的リンパ節郭清を全例に行った。臨床病理学的分類は胃癌取扱い規約第 13 版¹⁾に従った。

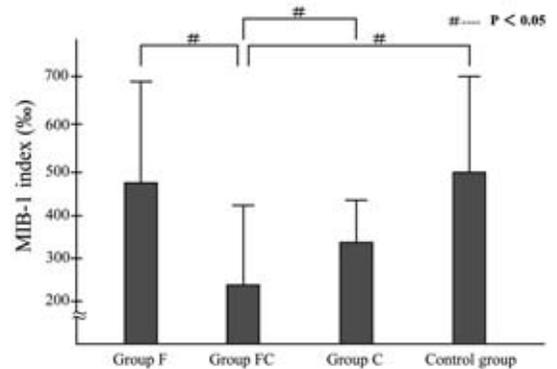
2) 染色方法

Fig. 2 The apoptosis manifestation on primary lesions



原発巣ならびにすべての郭清リンパ節のホルマリン固定・パラフィン包埋組織の4 μ m薄切切片に対して通常のhematoxylin and eosin(以下、HEと略記)染色に加え、細胞増殖能の指標として抗MIB-1抗体を、アポトーシス経路を推察する指標として抗p53, p21, Bax抗体を用いたENVISION法に基づく免疫組織化学染色を行った⁵⁾。検索リンパ節個数は総数3,298個(F群:613個, FC群:1,306個, C群:591個, コントロール群:788個)であった。脱パラフィン親水後, 0.01Mクエン酸緩衝液, pH6.0でmicrowaveにて5分間5回加熱処理を行い, 抗原を賦活化した⁶⁾。3%H₂O₂, 正常ヤギ血清で内因性peroxidaseと非特異的反応をブロックした後に, 抗MIB-1 monoclonal抗体(Immunotech, Marseilles, FRANCE)を用いた。p53はmutant typeとwild typeの両者を標識するDo-7 monoclonal抗体(DAKO, Copenhagen, Denmark)とp53 wild typeのみ認識するAb-5 monoclonal抗体(Oncogene, Massachusetts, USA)の2種類を用いた。p21はF-5 monoclonal抗体(Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Germany)を, Baxは抗Bax polyclonal抗体(DAKO, USA)を用いた。リンパ節内微小転移を検索するために抗サイトケラチン抗体AE1/AE3 monoclonal抗体(DAKO, USA)を用いて染色した。1次抗体の希釈倍数はMIB-1:×50, Do-7:×50, Ab-5:×25, F-5:×20, Bax:×25, サイトケラチン:×200

Fig. 3 The MIB-1 manifestation on primary lesions



とした。いずれの1次抗体も4℃で一夜、反応させた。1次抗体反応後, DAKO社製peroxidase labeled polymer(ENVISION™)を室内にて60分間反応させ, 0.04%DABにて10~15分間発色させ(サイトケラチンは1分間), Hematoxylinにて核染後, 脱水, 透徹, 封入し, 光学顕微鏡にて検鏡した。

また, In situ apoptosis detection kit(TAKARA, Shiga, JAPAN)を用いたTUNEL法でアポトーシスを検出した⁷⁾。脱パラフィン後に蒸留水で洗浄した薄切切片に対して常温でProteinase K(10~20 μ g/ml)にて15分間処理した後にTdT enzyme(5 μ l)+labeling safe buffer(45 μ l)を37℃・60分間反応させ, 0.01Mリン酸緩衝液(以下, PBSと略記), pH7.2で5分間3回洗浄して反応を停止させた。次いでAnti-FITC HRP Conjugate(70 μ l)を37℃・30分間反応後, PBSで5分間3回洗浄して反応を停止した。発色は0.04%DABにて10~15分間行った後に核染し, 脱水, 透徹, 封入後光学顕微鏡にて観察した。

おのおのの標本は連続切片を用いて行い, また各工程間にはPBSによる十分な洗浄を行った。

3) 組織学的評価法

アポトーシスおよびMIB-1の評価は, 1標本あたり2~3か所の部位から光学顕微鏡200倍視野の画像をCCDカメラにてデジタル画像として取り込み, 癌細胞1,000個に対する陽性細胞の比率(%)をindexとし, それぞれをApoptotic index

Fig. 4 The expression of the apoptosis-associated gene on primary lesions

		#---- P < 0.05	
p53 Ab-5	Negative	Positive	
Group F	16	4 [#]	}#
Group FC	10	24 [#]	
Group C	13	2 [#]	
Control group	28	1 [#]	
p53 Do-7	Negative	Positive	
Group F	11	9	}#
Group FC	15	19	
Group C	8	7	
Control group	15	14	
p21	Negative	Positive	
Group F	15	5 [#]	}#
Group FC	8	26 [#]	
Group C	12	3 [#]	
Control group	28	1 [#]	
Bax	Negative	Positive	
Group F	9	11 [#]	}#
Group FC	6	28 [#]	
Group C	7	8 [#]	
Control group	20	9 [#]	

Fig. 5 The apoptosis manifestation on metastatic lymph nodes

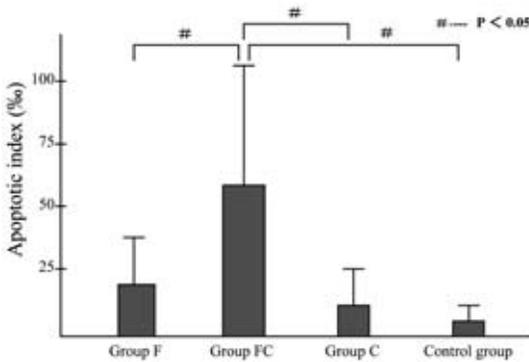
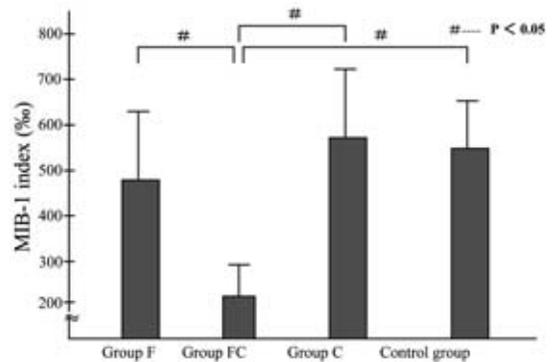


Fig. 6 The MIB-1 manifestation on metastatic lymph nodes



(以下、AI と略記), MIB-1 index(以下、MI と略記) とした⁸⁾.

p53 Do-7, p53 Ab-5, p21 および Bax は全体の癌細胞のうち発現陽性細胞が 20% 未満を陰性, 20% 以上を陽性として評価し, 各群における陰性症例数・陽性症例数により分割表を作成した.

抗サイトケラチン抗体を用いたリンパ節微小転移の評価は, 光学顕微鏡で観察し通常の HE 染色で転移が確認されるものを HE (+), サイトケラチン染色でのみ転移が確認されるものを MM (+) とした. その際, いわゆる tumor cell microinvolvement や狭義の micrometastasis などの分類は用いなかった⁹⁾.

リンパ節内癌細胞面積の評価は, 抗サイトケラ

チン抗体による免疫組織化学染色を施したプレパラート上に肉眼で確認しうる 1mm 以上の癌細胞塊の長径と短径を計測し, 楕円形の面積に換算して算出した.

4) 統計学的解析

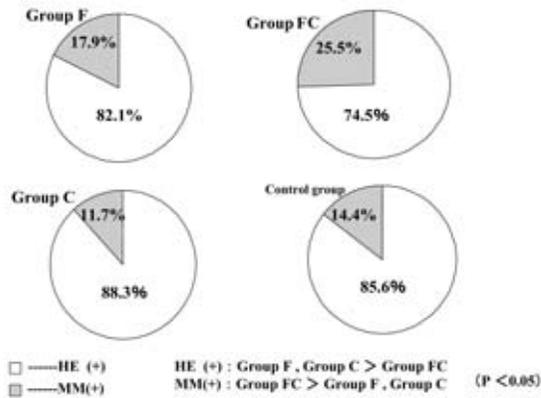
AI, MI および癌細胞面積の検定には Mann-Whitney's U test を用いた. 分割表を作成した p53 Do-7, p53 Ab-5, p21, Bax および微小転移の検定には χ^2 乗検定を用いた. いずれも, 危険率 5% 未満を持って有意と判定した.

成 績

s-NAC を施行した全症例において, 手術の延期を要する有害事象の発現は認められなかった.

s-NAC 後の原発巣における増殖能の比較では,

Fig. 7 A ratio of HE (+) and MM (+) on metastatic lymph nodes



AI は F 群 : 38.0 ± 39.2 , FC 群 : 103.5 ± 77.4 , C 群 : 61.0 ± 41.2 , コントロール群 : 7.0 ± 7.1 であり, MI は F 群 : 484.0 ± 210.5 , FC 群 : 268.6 ± 167.0 , C 群 : 343.3 ± 108.7 , コントロール群 : 530.9 ± 201.2 であり, FC 群は他群に比べて AI は有意に低値で, MI は有意に高値であった ($P < 0.05$) (Fig. 2, 3).

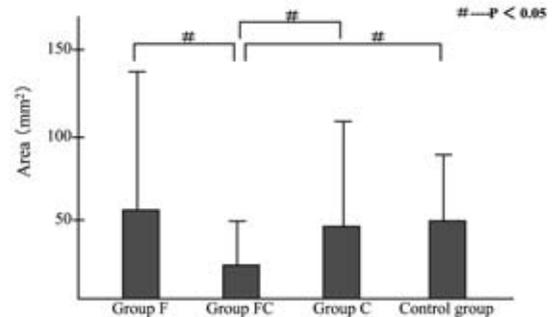
アポトーシス関連遺伝子である p53 Ab-5, p21, Bax においては, FC 群でのみ他群と比較して有意に陽性例が多く観察された ($P < 0.05$) (Fig. 4).

転移リンパ節における増殖能の比較では, AI は F 群 : 17.9 ± 15.8 , FC 群 : 57.0 ± 50.9 , C 群 : 10.6 ± 8.6 , コントロール群 : 5.1 ± 4.4 であり, MI は F 群 : 479.0 ± 161.7 , FC 群 : 210.2 ± 79.7 , C 群 : 540.0 ± 219.6 , コントロール群 : 530.2 ± 153.7 であり, FC 群は他群に比して AI は有意に低値で, MI は有意に高値であった ($P < 0.05$) (Fig. 5, 6).

転移リンパ節個数では, F 群の HE (+) は 188 個, MM (+) は 41 個, FC 群の HE (+) は 322 個, MM (+) は 109 個, C 群の HE (+) は 188 個, MM (+) は 25 個, コントロール群の HE (+) は 288 個, MM (+) は 49 個であり, FC 群でのみ HE (+) の占める比率は 74.5% と有意に低く, MM (+) の占める比率は 25.5% と有意に高かった ($P < 0.05$) (Fig. 7).

また, リンパ節中の転移癌細胞面積 (mm^2) は F 群 : 53.8 ± 82.7 , FC 群 : 25.2 ± 33.5 , C 群 : $37.8 \pm$

Fig. 8 Area occupied with cancer in metastatic lymph nodes



57.6, コントロール群 : 40.3 ± 44.2 であり, FC 群で有意に小さかった ($P < 0.05$) (Fig. 8).

考 察

近年, 検診の普及などにより胃癌の治療成績は飛躍的に向上したが, これは早期胃癌の発見率が高まったことによるところが大きい. 進行胃癌における外科治療には限界があり, 進行胃癌の予後を改善するための試みが多く行われてきた. 特に, 術後補助化学療法については広く検討が行われている. しかしながら, メタアナリシスの結果, 術後補助化学療法の有用性を示す報告も散見されるが¹⁰⁾¹¹⁾, 手術単独を対照群とし, 比較的多数の症例を用いて検討された無作為化比較試験において, 無治療群より有意な生存期間の延長が認められているレジメンはない^{12)~14)}. したがって, 進行胃癌の根治度 A および B の手術例における標準療法は無治療 (手術単独) であり, 手術成績を向上させるための方法の開発が望まれる.

一方, 術前化学療法とは, 化学療法によってまず腫瘍縮小を図り, ついで遺残した原発巣や転移巣を切除する集学的治療である. その利点として, 1) 癌細胞の活動性を下げ, 手術操作による癌細胞の散布転移を抑制する. 2) 癌組織の破壊や局在化をはかる. 3) リンパ管を荒廃させリンパ行性の転移を抑制する. 4) 微小遠隔転移巣に対する早期治療となる. 5) 切除標本の病理組織学的検討により抗癌剤の癌に対する感受性を推察できる, などが挙げられる. また, 根治切除不能胃癌症例に術前化学療法を行い, その後に切除した症例に長期生

存の報告²³⁾もあることから、我々は術前化学療法に着目した。しかし、術前化学療法の最も大きな欠点は、①手術施行時期が遅れる。②抗癌剤不応例には治療中に癌の増大が起こる可能性がある。③抗癌剤による副作用により耐術能を低下させる可能性がある。④術後に影響が及んで手術前に予測できなかったトラブルに見舞われる。⑤入院期間が延長して医療費の加算を生むことである³⁾。これらの欠点を回避するために術前化学療法の程度を軽度にするほど副作用は少なくすむが、効果が期待できず、術前化学療法を行う意義が失われる。そこで、我々はこの術前化学療法の利点と欠点を踏まえて術直前の短期間に限定して化学療法を行うことにした。

胃癌の化学療法で最も一般的に行われてきたのはFU系抗癌剤を主体としたものであり、中でもbiochemical modulationを応用した5-fluorouracil(以下、5-FUと略記)+cis-diamminedichloroplatinum(以下、CDDPと略記)併用療法は切除不能進行・再発胃癌に対し、30%以上の奏効率があると報告されている¹¹⁾¹⁵⁾¹⁶⁾。さらに、5-FU+CDDP併用療法は、アドリアマイシンやエトポシドなどの細胞毒性の高い薬剤による化学療法と変わらない奏効率や、副作用の低さを考慮すると優れていると考えられているので¹⁾、今回の検討で使用する薬剤を5-FUおよびCDDPとした。また、我々は5-FUは時間依存性が強くCDDPは濃度依存性が強いこと²⁾に着目し、5-FUは24時間持続点滴とし、CDDPは30分間点滴静注の併用投与とした¹⁷⁾。

5-FUはチミジル酸合成阻害剤で、細胞内のdTTPとdGTPの減少とdATPの増加をきたすために2本鎖DNAの切断をもたらシアポトーシスを誘導するという機序が考えられ、血中半減期は約10分から20分とされている¹⁸⁾。一方、CDDPは2つの塩基間でinterstrandおよびinterstrand crosslinkを形成してDNAの結合を阻害する薬剤であり¹⁹⁾、CDDPの血中動態は投与直後に最高血中濃度を示し、その後 α 相、 β 相の2層性に減衰するといわれている。半減期は α 層で10分から14分、 β 相で41時間から81時間であるが、これら半減期は投与量により変化し、低濃度のCDDP

でもG2期ブロックを経て48時間以上経過後、つまり投与後3日以降にアポトーシスを誘導する¹⁹⁾。これらのことより、FP療法3日目から免疫組織化学染色を用いて、抗腫瘍効果を推察することが可能であると考え、術前化学療法の期間を3日間に設定した。

また、CDDPによる5-FUのbiochemical modulationは以下の機構で発揮されると考えられている。すなわち、CDDPの投与によってまず腫瘍細胞内へのメチオニン供給が阻害され、細胞内メチオニンの欠乏状態がじゃっ起される。これに引き続いて細胞内でメチオニン合成が誘導され、同時に5-methyltetrahydrofolate (5-CH₃FH₄)からtetrahydrofolate (FH₄)、さらには5, 10-methylenetetrahydrofolate (5, 10-CH₂FH₄)への生成が高まる。5, 10-CH₂FH₄は5-FUの代謝産物である5-fluoro-2'-deoxyuridine-5'-monophosphate (FdUMP)と5-FUの標的酵素であるthymidilate synthase(以下、TSと略記)とともに三重結合体を形成する物質であり、その増加は三重結合体の形成率上昇と安定化をもたらす。以上の過程の結果、TS阻害とDNA合成阻害が上昇し、5-FUのもつ抗腫瘍効果が増強されると考えられている¹⁶⁾。これら作用機序の観点からも、5-FUとCDDPを併用することによりアポトーシスが誘導されやすいといえる。

また、癌細胞に対するs-NACの効果を判定する指標として、癌細胞の増殖能とアポトーシスという側面からアプローチを試みた。多くの抗癌剤による癌細胞破壊はアポトーシスの形で行われると考えられており、現在アポトーシスの誘導またはアポトーシスの抑制遺伝子、抑制蛋白が癌治療の標的になるのではないかと期待されている。しかしながら、アポトーシスに関するほとんどの研究はin vitroで行われたものであり、臨床的にアポトーシスの誘導を証明したものはわずかにすぎない^{19)~21)}。

以上の文献的考察のもとに我々は、薬剤の効果を明らかにするためにF群とFC群とC群ならびにコントロール群の4群に分けて比較検討した。

s-NAC 施行後の胃癌原発巣において、FC 群は他群と比較して有意に AI は高値で、MI は低値であった。このことより、FC 群においては他群に比べて有意に原発巣胃癌細胞にアポトーシスが誘導され、細胞増殖能が抑制されたといえる。

その作用機序を推察するために、胃癌における s-NAC のアポトーシス誘導機序を p53 およびその関連遺伝子により検討した。癌抑制遺伝子として発見された p53 は、その遺伝子産物 p53 蛋白の転写因子としての性質が明らかとなり、その primary-response gene として p21, Bax などが判明した。両者とも p53 に由来するアポトーシスの重要な因子であると報告されている²²⁾²³⁾。

われわれは p53 の免疫化学染色に際し、p53 wild type と p53 mutant type の両者に対する抗体である p53 Do-7²⁴⁾ と、一般的に免疫組織化学的検討では検出されないとされる p53 wild type に特異的に反応する p53 Ab-5²⁵⁾²⁶⁾ を用いて検討した。

また、p21 は Vogelstein や Harper らにより発見された p53 wild type 依存的に発現誘導される分子量約 21kD の遺伝子である。転写因子として活性を持つ p53 wild type の発現は p21 遺伝子の発現を亢進するとされ、合成された p21 はサイクリン-Cdk 複合体形成を阻害し、細胞周期の G1 期から S 期への移行を障害する (G1 arrest) と考えられている²²⁾。

一方、1993 年に Oltvai らにより発見された Bax 遺伝子発現により出現する Bax 蛋白は Bcl-2 および Bcl-XL と結合しアポトーシス抑制活性を阻害するとともに、Bax が細胞を直接アポトーシスに導くとされている²³⁾。

我々の検討では、p53 Ab-5 すなわち p53 wild type の発現は、FC 群においてのみ他群より有意に多く認められたが、p53 Do-7 すなわち p53 mutant type の発現は各群間で有意差を認めなかった。したがって、化学療法によるアポトーシスの誘導には mutant type を上回る p53 wild type の過剰発現が重要であると考えられた。また、p21 の発現も、FC 群においてのみ他群より有意に多く認められたことより、p21 の発現は p53 wild

type の発現とより密接な関連があり G1 arrest を強く支持していると推察された。さらに、Bax 蛋白の発現も、FC 群においてのみ他群より有意に多く認められたことより、Bax 蛋白の過剰発現はアポトーシスの誘導に強く関与していることが推察された。

一方、早期胃癌やリンパ節転移のない症例でも再発をきたす可能性はあるが、これはリンパ節の代表一切片による組織検査では発見できない微小転移が一因ではないかと考えられている。最近の免疫組織化学染色方法や分子生物学的診断の急速な進歩に伴い、リンパ節内の微小転移が比較的高頻度に存在しうることが報告されてきている。リンパ節微小転移の臨床的意義の有無に関しては、リンパ節微小転移陽性例の予後が陰性例に比べ不良とする報告も多い^{9)27)~29)}。

我々の検討では、癌転移リンパ節全体に占める MM (+) の割合は他群と比べて FC 群で有意に多く、HE (+) の割合は FC 群で有意に少なかった。この変化は抗癌剤により生じたと考えられたが、さらにそれを証明するためにリンパ節内転移癌細胞の体積を面積に置き換え測定した。その結果、癌細胞面積は他群と比べて FC 群で有意に小さかった。また、リンパ節内転移癌細胞の増殖能は FC 群では他群に比べて、AI は有意に高値で、MI は低値であった。

これらの結果から、FC 群では s-NAC の作用によりリンパ節中癌細胞に増殖能の抑制とアポトーシスの誘導が生じ、本来なら HE 染色で確認されるリンパ節転移を微小転移に縮小している可能性が推察された。胃癌原発巣の摘出標本、摘出リンパ節におけるこれらの結果は、FC 群における s-NAC の有用性を示唆している。

以上より、原発巣ならびに転移リンパ節両者における効果を考慮すると、s-NAC に関しては F 群、C 群、コントロール群よりも FC 群がアポトーシスならびに細胞増殖能の観点から、最も有効であると考えられた。また、この s-NAC におけるアポトーシスは p53 wild type の過剰発現により誘導される p21 および Bax の発現を介しており、細胞周期の G1 arrest 期での傷害に関与しているこ

とが考えられた。

さらに、生命予後に関して Kaplan-Meier 法を用いて検討したが、各群間に有意差は認めなかった。これは検討した抗癌剤の種類、投与期間、投与方法では生命予後にまで影響を与えないとも考えられるが、今回の術後補助化学療法のレジメンは各群において統一されておらず、単純な予後の比較は不適当であるとも考えられる。今後は術後補助化学療法のレジメンを各群別に統一し、さらに症例数を増やし、生命予後を比較検討すべきであると考えられた。

また最近、Irinotecan hydrochloride (CPT-11)、Novel oral dihydropyrimidine dehydrogenase inhibitory fluoropyrimidines (TS-1)、Docetaxel hydrate (TXT)、Paclitaxel (PTX) などの抗癌剤が登場し、さまざまな種類・方法の化学療法が多施設で検討されている。今後これらの新薬を用いたレジメンにより、進行胃癌治療成績のさらなる向上が期待される。

稿を終えるに臨み、御指導頂きました加藤道男博士に深謝すると共に、御協力頂きました本学外科学教室の諸兄に感謝の意を表します。

なお、本論文の要旨は第 102, 103, 104 日本外科学会 (2002 年 4 月京都, 2003 年 6 月札幌, 2004 年 4 月大阪), 第 75, 76 回日本胃癌学会 (2003 年 2 月東京, 2004 年 3 月鳥根), 第 41 回日本癌治療学会 (2002 年 11 月札幌), 第 58 回日本消化器外科学会 (2004 年 7 月東京) にて発表した。

文 献

- Ohtsu A, Shimada Y, Shirao K et al : Randomized phase III trial of fluorouracil alone versus fluorouracil plus cisplatin versus uracil and tegafur plus mitomycin in patients with unresectable, advanced gastric cancer. : The Japan Clinical Oncology Group Study (JCOG9205) . J Clin Oncol **21** : 54—59, 2003
- Nakajima T, Ota K, Ishihara S et al : Combined intensive chemotherapy and radical surgery for incurable gastric cancer. Ann Surg Oncol **4** : 203—208, 1997
- Yonemura Y, Sawa T, Kinoshita K et al : Neoadjuvant chemotherapy for high-grade advanced gastric cancer. World J Surg **17** : 256—262, 1993
- Japanese Gastric Cancer Association : Japanese classification of gastric carcinoma. 13th ed. Kanehara, Tokyo, 1998
- Sabattini E, Bisgard K, Ascani S et al : The EnVision™+ system : a new immunohistochemical method for diagnostics and research. Critical comparison with the APAAP, ChemMate™, CSA, LABC, and SABC techniques. J Clin Pathol **51** : 506—511, 1998
- Shan-Rong S, Key ME, Kalra KL et al : Antigen retrieval in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues : an enhancement method for immunohistochemical staining based on microwave oven heating of tissue sections. J Histochem Cytochem **39** : 741—748, 1991
- Gavrieli Y, Sherman Y, Ben-Sasson SA : Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. J Cell Biol **119** : 483—501, 1992
- Yamasaki F, Tokunaga O, Sugimori H : Apoptotic index in ovarian carcinoma : correlation with clinicopathologic factors and prognosis. Gynecol Oncol **66** : 439—448, 1997
- Nakajo A, Natsugoe S, Ishigami S et al : Detection and prediction of micrometastasis in the lymph nodes of patients with pN0 gastric cancer. Ann Surg Oncol **8** : 158—162, 2001
- Earle CC, Maroun JA : Adjuvant chemotherapy after curative resection for gastric cancer in non-Asian patients : Revisiting a meta-analysis of randomised trials. Eur J Cancer **35** : 1059—1064, 1999
- Nakajima T, Ohta K, Ohyama S et al : Meta-analysis of adjuvant chemotherapy trials for gastric cancer at the Cancer Institute Hospital, Tokyo. Edited by Nakajima T, Yamaguchi T. Multimodality therapy for gastric cancer. Springer-Verlag, Tokyo, 1999, p27—31
- Sano T, Sasako M, Katai H et al : Randomized controlled trials on adjuvant therapy for gastric cancer. Edited by Nakajima T, Yamaguchi T. Multimodality therapy for gastric cancer. Springer-Verlag, Tokyo, 1999, p7—16
- Douglass Jr HO, Nava HR, Smith JL et al : Multimodality therapy for completely resected (R0) gastric cancer (Excluding Japanese trials) . Springer-Verlag, Tokyo, 1999, p17—26
- Krook JE, O'Connell MJ, Wieand HS et al : A prospective, randomized evaluation of intensive-course 5-Fluorouracil plus doxorubicin as surgical adjuvant chemotherapy for resected gastric cancer. Cancer **67** : 2454—2458, 1991
- Kim NK, Park YS, Heo DS et al : A phase III randomized study of 5-fluorouracil and cisplatin versus 5-fluorouracil, doxorubicin, and mitomycin C versus 5-fluorouracil alone in the treatment of advanced gastric cancer. Cancer **71** : 3813—3818, 1993
- Shirasaka T, Shimamoto Y, Ohshimo H et al : Metabolic basis of the synergistic antitumor activities of 5-fluorouracil and cisplatin in rodent tumor models in vivo. Cancer Chemother Pharmacol **32** : 167—172, 1993
- Ohtsu A, Yoshida S, Saito D et al : An early phase II study of 5-Fluorouracil combined with cisplatin as a second line chemotherapy against metastatic gastric cancer. Jpn J Clin Oncol **21** : 120—124, 1991
- Yoshioka A, Tanaka S, Hiraoka O et al : Deoxyribonucleoside triphosphate imbalance. 5-fluorodeoxyuridine-induced DNA double strand breaks in

- mouse FM3A cells and the mechanism of cell death. *J Biol Chem* **262** : 8235—8241, 1987
- 19) Barry MA, Behnke CA, Eastman A : Activation of programmed cell death (apoptosis) by cisplatin, other anticancer drugs, toxins and hyperthermia. *Biochem Pharmacol* **40** : 2353—2362, 1990
 - 20) Okamoto-Kubo S, Nishio K, Heike Y et al : Apoptosis induced by etoposide in small-cell lung cancer cell lines. *Cancer Chemother Pharmacol* **33** : 385—390, 1994
 - 21) Hickman JA : Apoptosis induced by anticancer drugs. *Cancer Metast Rev* **11** : 121—139, 1992
 - 22) Harper JW, Adami GR, Wei N et al : The p21 cdk-interacting protein cip-1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases. *Cell* **75** : 805—816, 1993
 - 23) Schmitt E, Steyaert A, Cimoli G et al : Bax- α promotes apoptosis induced by cancer chemotherapy and accelerates the activation of caspase 3-like cysteine proteases in p53 double mutant B lymphoma Namalwa cells. *Cell Death Differ* **5** : 506—516, 1998
 - 24) Vojtesek B, Bartek J, Midgley CA et al : Immunohistochemical analysis of the human nuclear phosphoprotein p53. *J Immunol Methods* **151** : 237—244, 1992
 - 25) Lane DP : p53, guardian of the genome. *Nature* **358** : 15—16, 1992
 - 26) Finlay CA, Hinds PW, Tan TH et al : Activating mutations for transformation by p53 produce a gene product that forms an hsc70-p53 complex with an altered half-life. *Mol Cell Biol* **8** : 531—539, 1988
 - 27) Yasuda K, Adachi Y, Shiraishi N et al : Prognostic effect of lymph node micrometastasis in patients with histologically node-negative gastric cancer. *Ann Surg Oncol* **9** : 771—774, 2002
 - 28) Lee E, Chae K, Kim I et al : Prognostic relevance of immunohistochemically detected lymph node micrometastasis in patients with gastric carcinoma. *Cancer* **94** : 2867—2873, 2002
 - 29) Cai J, Ikeguchi M, Maeta M et al : Clinicopathological value of immunohistochemical detection of occult involvement in pT3N0 gastric cancer. *Gastric Cancer* **2** : 95—100, 1999

Examination of Utility of Short-termed Neoadjuvant Chemotherapy for Advanced Gastric Cancer : Study from Viewpoints of Apoptosis Induction and Cell Growth

Yoshifumi Sogo, Motohiro Imano, Hitoshi Shiozaki and Harumasa Ooyanagi
Department of Surgery, Kinki University School of Medicine

Purpose : We reviewed the effect of short-term neoadjuvant chemotherapy (s-NAC) in resected primary gastric lesions and metastatic lymph node postoperatively in patients with advanced gastric cancer. **Materials and methods** : We preoperatively classified 98 patients with advanced gastric cancer into 4 groups, i.e., 5-FU administration alone for 20 (group F), CDDP administration alone for 15 (group C), and both 5-FU and CDDP for 34 (group FC). Nothing was administered to 29 serving as the control group. s-NAC was conducted 3 days preoperatively. We studied apoptosis induction, cell growth in primary lesions and metastatic lymph nodes for each group, and expression of the apoptosis-associated gene on primary lesions. We also studied micrometastasis using an anticytokeratin antibody in lymph nodes. **Results** : Group FC showed apoptosis and restrained cell growth in primary gastric lesions and metastatic lymph nodes, with changes significantly higher than in other groups. p53 wild type, p21, and Bax expression were observed significantly highly positively in group FC. Significantly increased micrometastasis in lymph nodes was detected in group FC although fewer metastases were recognized in HE staining. **Conclusions** : s-NAC in advanced gastric cancer reduced lymph node metastasis recognized in HE staining to micrometastasis by extensively inducing apoptosis and depressing cell growth more in group FC than in groups F and C.

Key words : advanced gastric cancer, neoadjuvant chemotherapy, apoptosis, micrometastasis, FP therapy
[*Jpn J Gastroenterol Surg* **38** : 385—393, 2005]

Reprint requests : Motohiro Imano Department of Surgery, Kinki University School of Medicine
377-2 Ono-Higashi, Osaka-Sayama, 589-8511 JAPAN

Accepted : November 30, 2004