

原 著

ss 大腸癌症例における CD34 免疫染色と弾性線維染色の 2 重染色による脈管侵襲検索の臨床病理学的意義

防衛医科大学校第 1 外科

佐藤 太一 神藤 英二 橋口陽二郎
上野 秀樹 望月 英隆

はじめに：特殊 2 重染色により静脈とリンパ管を識別し，2 重染色法により判定されたリンパ管侵襲（以下，ly と略記），静脈侵襲（以下，v と略記）の臨床的意義を検討した．方法：curA 手術が行われた ss 大腸癌初回手術 125 例を対象とし，代表的 1 切片に対し，CD34 免疫染色に弾性染色を加えた 2 重染色を施行．1 か所でもリンパ管侵襲，静脈侵襲を認めた場合を ly (+)，v (+)，まったく認めない場合を ly (-)，v (-) と定義し，2 重染色による分類および特殊染色の意義について検討した．結果：v はリンパ節転移との間に強い相関を認めた ($p=0.01$)．予後解析からは，ly (+) 群は ly (-) 群に比べ予後不良の傾向を認め (5 生率 88.9% vs 75.6%， $p=0.06$)，v (+) 群は v (-) 群に比べ予後不良の傾向を認めた (5 生率 90.0% vs 78.9%， $p=0.09$)．リンパ節転移有無，ly，v を共変量とした多変量解析ではリンパ節転移のみが独立した予後因子として選択された ($p=0.008$)．また，4 個以上の静脈侵襲所見の有無で検討したところ，静脈侵襲にはリンパ節転移有無とは独立性を有する臨床的意義が存在した．考察：予後因子としての意義は，侵襲所見の有無を基準とした場合，ly，v ともにリンパ節転移を凌駕しえないが，4 個以上の静脈侵襲所見はリンパ節転移の有無と同様に重要な臨床的意義を有すると考えられた．

緒 言

早期大腸癌の予後は比較的良好であるのに対し，進行癌のそれは不良で，その組織型，壁深達度，臓器転移の有無などが重要な予後規定因子といわれている．大腸癌取扱い規約¹⁾には病理診断項目として，これらの因子とともにリンパ管侵襲（以下，ly と略記），静脈侵襲（以下，v と略記）が記載されており，従来から病理医により判定され，臨床医も癌悪性度の指標としてこれを参考にしてきた．しかしながら，特に進行癌において脈管侵襲は単変量解析では予後因子となるものの，多変量解析で独立した予後因子として選択されるという論文は少ない (Table 1)^{2)~9)}．さらに，大腸癌の脈管侵襲の判定方法は，大腸癌取扱い規約に記載さ

れているものの，詳細は確立されておらず，脈管侵襲の判定および程度の違いが病理医間で生じやすい．その原因としては，一般的に切除材料での癌の ly，v の判定には Hematoxylin-Eosin (以下，HE と略記) 染色標本が使用されるが，リンパ管内皮細胞や静脈周囲弾性線維の同定が HE 染色標本では困難なことが多く，ly，v の判定および程度が病理医個々独自の基準により主観的になされていることにある^{10)~12)}．早期癌では消化管専門病理医であっても脈管侵襲陽性判定の一致率は 30% (ly) あるいは 50% (v) と極めて低率と報告されている¹²⁾．

脈管内皮の客観的な評価には，CD34，CD31，Ulex Europaeus agglutinin type I (UEA-1)，第 VIII 因子関連抗原などの抗体を用いた免疫組織化学的検索が有用である^{10)~20)}．しかしながら，脈管内皮の同定のみではリンパ管と静脈の判別は困難

<2006 年 3 月 22 日受理>別刷請求先：佐藤 太一
〒359-0042 所沢市並木 3-2 防衛医科大学校第 1
外科学教室

Table 1 Articles with reference to prognostic significance of vessel invasions of colorectal carcinoma

Author	Year	Number of patients	Subject	Prognostic significance	
				Univariate analysis	Multivariate analysis
Shirouzu ⁹⁾	1992	501	without limits	No reference	ly : N.S., v : N.S.
Nakamori ⁸⁾	1994	101	curA, B	ly : p = 0.12, v : p = 0.08	ly : p = 0.44, v : p = 0.24
Bognel ⁷⁾	1995	339	curA, B	vascular invasion : p < 0.001	vascular invasion : N.S.
Yamaguchi ⁶⁾	1996	215	without limits	No reference	ly : p = 0.73, v : p = 0.86
Takebayashi ⁵⁾	1996	166	curA, B	ly : p < 0.001, v : p < 0.001	ly : p = 0.26, v : p = 0.23
Lanza ⁴⁾	1998	118	T3M0, T4M0	v : p = 0.002	V : p = 0.054
Nakagoe ³⁾	2000	927	T1, T2, T3, T4	No reference	ly : N.S., v : N.S.
Bouzourene ²⁾	2003	104	T3, T4	vascular invasion : p = 0.01	vascular invasion : N.S.

※ N.S. : not significant

である。Elastica-Van-Gieson (以下, EVG と略記) 染色は弾性線維を染色するもので, 静脈侵襲の同定法として古くより用いられてきたが, 免疫染色および Elastica 染色を同一スライド上で施行する 2 重染色という技法を用いて, とくにリンパ管について脈管侵襲の有無をより客観的に判定したうえで, 他の臨床病理学的因子や予後との関係を検討した研究は, PubMed で「Colorectal cancer」, 「Vascular invasion」をキーワードとして 1983 から 2004 年まで, また医学中央雑誌で 1987 から 2004 年まで「大腸癌」, 「脈管侵襲」について検索したところ, 皆無である。

そこで今回, 我々は CD34 の免疫染色および Elastica 染色を同一スライド上で施行する 2 重染色法を行い, 静脈とリンパ管を識別した。次に, 2 重染色法により判定された ly, v と他の臨床病理学的因子との関係, および予後因子としての意義を検討した。

なお, 論文中的組織型, 部位, 脈管侵襲などの用語は大腸癌取扱い規約¹⁾に基づいた。

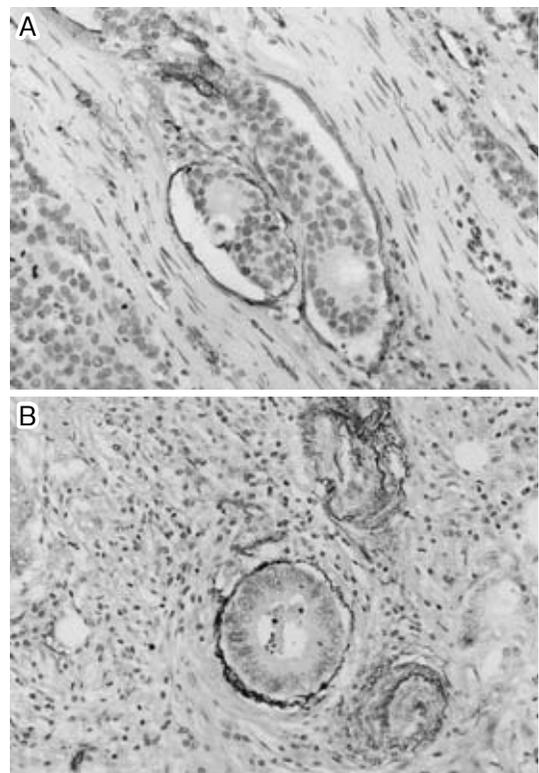
対象と方法

1. 対象

1989 年から 1993 年に防衛医科大学校病院第 1 外科で初回手術が行われた大腸癌症例で, 根治度 A に分類された 125 症例を検討した。脈管侵襲の予後因子としての意義について検討するため, TNM 分類での T 因子を固定する方針とし, 当科で最も症例数の多かった漿膜下層浸潤 (以下, ss と略記) の症例を対象とした。

カルテおよび病理報告書の記載より年齢, 性別,

Fig. 1 A : Characteristic appearance of lymphatic invasion on a slide with double stain : Lymphatic vessels have CD34 immunopositive endothelial cells. B : Characteristic appearance of venous invasion on a slide with double stain : Venous vessels have round elastic lamina stained by elastica stain.



占居部位, 組織型, 遠隔転移, リンパ節転移を引用した。

性別は男性 69 例, 女性 56 例, 年齢は 29 歳から

Table 2 Clinicopathological features of cancers, classified by novel classification according to the double staining

	ly (-)	ly (+)	P value	v (-)	v (+)	P value
Age						
≥ 60	46	24		36	34	
< 60	39	16	0.54	29	26	0.89
Sex						
Male	44	25		34	35	
Female	41	15	0.26	31	25	0.50
Histological differentiation						
well/moderately	81	37		63	55	
poorly/mucinous	4	3	0.68	2	5	0.26
Lymph node metastasis						
Negative	51	20		44	27	
Positive	34	20	0.29	21	33	0.01

85歳で平均61.0歳、占居部位は盲腸11例、上行結腸15例、横行結腸10例、下行結腸5例、S状結腸40例、直腸44例であった。組織型は高分化腺癌(wel)が29例、中分化腺癌(mod)が89例、低分化腺癌(por)が5例、粘液癌(muc)が2例であった。

2. 特殊2重染色法

腫瘍組織の最深部を含む代表的1切片(ホルマリン固定後パラフィン切片)を4μmに薄切、抗CD34モノクローナル抗体(Dako社、クローン:QBEnd10、免疫動物:マウス)を用いた内皮細胞の免疫染色の後に、レゾルシンフクシン液(武藤化学)を用いたElastica染色を追加した。特殊染色の手順は以下の通りである。キシレンで脱パラフィン後、97℃のクエン酸bufferに45分浸した。抗CD34モノクローナル抗体を50倍希釈し、1次抗体とし、4℃ overnight。2次抗体はEnvision System anti-mouse and rabbitを使用(DAKO社)し、室温2時間放置。その後、発色反応を行った。次に、レゾルシンフクシン液(武藤化学)に20分浸し²¹⁾、その後ヘマトキシリンで核を薄く染めて脱水封入した。

3. 脈管侵襲の判定

リンパ管、静脈はともに内皮細胞を有するが、弾性線維からなる弾性板は静脈のみに認められる。CD34免疫染色により内皮細胞を識別することが可能で、Elastica染色により弾性線維を染色することが可能である。

それゆえ、CD34免疫染色にて脈管内腔を裏打ちする内皮細胞が染色され、Elastica染色により周囲に弾性線維が認められない脈管に癌が浸潤している場合、リンパ管侵襲陽性とし(Fig. 1A)、Elastica染色により管腔周囲を取り巻く弾性線維が確認できる脈管に癌が浸潤している場合、静脈侵襲陽性とした(Fig. 1B)。脈管侵襲の判定は著者の中の1名が判定した。1か所でもリンパ管侵襲、静脈侵襲を認めた場合をly(+), v(+)とし、まったく認めない場合をly(-), v(-)とした。

4. 統計学的解析方法

有意差検定は2×2χ²二乗検定(Fisherの直接確率試験)を用い、5%以下を有意差ありとした。脈管侵襲の予後(生存期間)に及ぼす影響はKaplan-Meier法から累積生存率を算出し、log-rank検定を用いて評価した。多変量解析はCoxの比例ハザードモデル(ステップワイズ減少法)を用いて評価した。

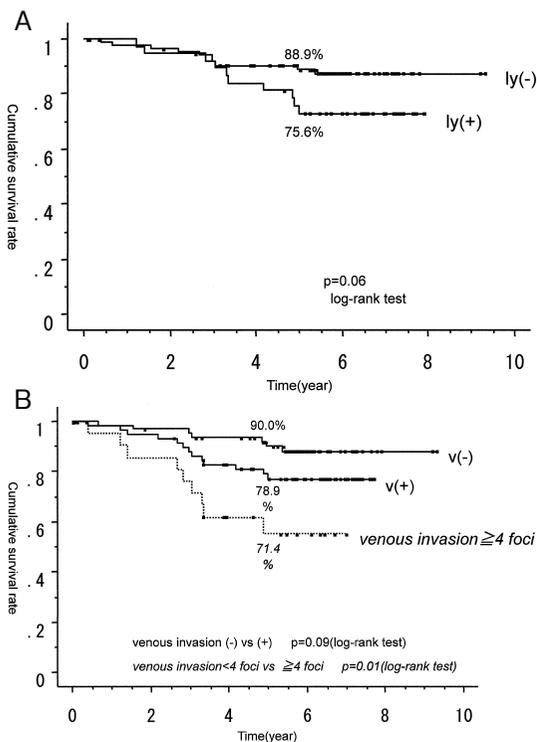
結 果

1. 臨床病理学的因子との相関

全125例中ly(+)群は40例、ly(-)群は85例、v(+)群は60例、v(-)群は65例であった。ly(+)とly(-)群との比較において、Table 2に挙げる他の臨床病理学的因子との間に有意差は認められなかった。

一方、v(+)群はv(-)群に比べリンパ節転移(55.0% vs 32.3%, p=0.01)が有意に高率に認められた(Table 2)。

Fig. 2 A : Disease specific survival curves of ly (+)/ly (-) groups, defined by novel classification (Kaplan-Meier Method) : A survival of ly (+) group was worse than that of ly (-) group ($p = 0.06$, log-rank test). B : Disease specific survival curves of v (+)/v (-) groups and the group that venous invasion was 4 foci or more, defined by novel classification (Kaplan-Meier Method) : A survival of v (+) group was worse than that of v (-) group ($p = 0.09$, log-rank test), and a survival of the group that venous invasion was 4 foci or more was statistically worse than that was less than 4 foci ($p = 0.01$, log-rank test).



2. 予後因子としての意義

ly に関しては ly (+) 群は ly (-) 群に比べ予後不良の傾向を認めた (5 年生存率 ly (-) 群 88.9% vs ly (+) 群 75.6%, $p = 0.06$) (Fig. 2A). v に関しては v (+) 群は v (-) 群に比べ予後不良の傾向を認めた (5 年生存率 v (-) 群 90.0% vs 78.9%, $p = 0.09$) (Fig. 2B).

次に、リンパ節転移有無, ly, v を共変量とした Cox の比例ハザードモデル (ステップワイズ減少法) による多変量解析を行った (Table 3). リンパ

節転移のみが独立した予後因子として選択された (リンパ節転移: HR3.6, $p = 0.008$).

一方、複数の静脈侵襲所見について検討を行ったところ、4 個以上の静脈侵襲所見を有する群は、有しない群と比べて有意に予後不良であった ($p = 0.01$) (Fig. 2B). リンパ節転移有無, ly, 4 個以上の静脈侵襲の有無を共変量とした Cox の比例ハザードモデル (ステップワイズ減少法) による多変量解析では、リンパ節転移, 4 個以上の静脈侵襲所見が独立した予後因子として選択された (リンパ節転移: HR3.0, $p = 0.03$, 4 個以上の静脈侵襲所見: HR4.4, $p = 0.001$) (Table 4).

考 察

大腸癌取扱い規約¹⁾には病理診断項目として脈管侵襲が定められているが、その判定は一般に難しいとされる。その理由は、ly の判定に関してはリンパ管内皮細胞の同定が困難なことも多く^{10)~12)}、v の判定に関しても、HE 染色で内腔がほとんど確認できない虚脱した脈管は同定が困難であるからである。大腸 sm 癌を対象とした検討では、HE 染色標本による判定に比べ、特殊染色標本を併用した ly, v の陽性率はそれぞれ 18.8% から 21.4% (有意差なし)、12.0% から 23.9% ($p = 0.027$) に増加したという報告や²⁰⁾、進行癌において HE 染色での癌の静脈侵襲陽性率は 25% であるのに対し、EVG 染色を併用すると陽性率は 87% になるという報告もある²²⁾。また、半数の消化管専門病理医が脈管侵襲の判定にリンパ節転移の有無を考慮するという調査結果も報告されている¹²⁾。

今回の検討においては、2 重染色により判定された ly および v ともに、単変量解析において予後因子となる傾向を認めたが、多変量解析ではリンパ節転移のみが独立した予後因子となった。単変量解析および多変量解析で ly が予後因子とならない論文も見受けられるが⁸⁾、本研究結果からも、免疫染色や Elastica 染色を加え精密に判定しようとも、陽陰性を基準とした場合 ly や v は予後因子としてリンパ節転移を凌駕しえない因子であると考えられる。ただし、本法により侵襲個数に関する客観的情報が得られ、4 個以上の静脈侵襲所見にはリンパ節転移とは独立性を有する臨床的意義

Table 3 Multivariate analysis of survival, using novel classification

Factors	HR	95%CI	P value
Lymph node metastasis (Positive vs Negative)	3.6	1.399–9.524	0.008

Table 4 Multivariate analysis of survival, using novel classification according to the number of venous invasions as variables

Factors	HR	95%CI	P value
Lymph node metastasis (Positive vs Negative)	3.0	1.120–7.813	0.03
Venous invasion (< 4 foci vs ≥ 4 foci)	4.4	1.795–10.87	0.001

が存在することが明らかとなった。

今回、CD34 免疫染色と Elastica 染色を重ねる 2 重染色を行い、脈管侵襲を判定した。同一切片上で 2 重染色をすることで、CD34 陽性の脈管について、弾性線維陽性の静脈と陰性のリンパ管に分類が可能であった。しかしながら、CD34 免疫染色では血管とリンパ管の内皮細胞の両者とも陽性を示すため、弾性線維に乏しい細静脈～毛細血管とリンパ管の区別は本法を用いても困難である¹³⁾¹⁹⁾。リンパ管と毛細血管を鑑別する方法として、墨汁・硝酸銀をおおのこの脈管に取り込ませて鑑別する方法（加墨汁硝酸銀水局所動脈注入法）や、電子顕微鏡検査がある。また、5'-nucleotidase (5'-Nase) 活性がリンパ管で高く、血管で陰性であること、alkaline phosphatase (ALPase) 活性がリンパ管で低く血管で高いことを利用して染め分ける酵素 2 重染色法²³⁾も報告されているが、いずれの方法も手間がかかり、特殊な酵素および抗体が必要であることから、通常の診断業務には適さない¹⁹⁾。近年開発された D2-40 はリンパ管内皮に特異的に染色性を有し、この臨床的意義についての検討が必要と考えられる。

文 献

- 1) 大腸癌研究会編：大腸癌取扱い規約。第 6 版。金原出版、東京、1998
- 2) Bouzourene H, Bosman FT, Matter M et al : Predictive factors in locally advanced rectal cancer treated with preoperative hyperfractionated and accelerated radiotherapy. *Hum Pathol* **34** : 541–548, 2003
- 3) Nakagoe T, Sawai T, Tsuji T et al : Carcinoma of the splenic flexure : multivariate analysis of pre-

dictive factors for clinicopathological characteristics and outcome after surgery. *J Gastroenterol* **35** : 528–535, 2000

- 4) Lanza G, Matteuzzi M, Gafa R et al : Chromosome 18q allelic loss and prognosis in stage II and III colon cancer. *Int J Cancer* **79** : 390–395, 1998
- 5) Takebayashi Y, Akiyama S, Yamada K et al : Angiogenesis as an unfavorable prognostic factor in human colorectal carcinoma. *Cancer* **78** : 226–231, 1996
- 6) Yamaguchi A, Urano T, Goi T et al : Expression of a CD44 variant containing exons 8 to 10 is a useful independent factor for the prediction of prognosis in colorectal cancer patients. *J Clin Oncol* **14** : 1122–1127, 1996
- 7) Bognel C, Rekeciewicz C, Mankarios H et al : Prognostic value of neural invasion in rectal carcinoma : a multivariate analysis on 339 patients with curative resection. *Eur J Cancer* **31** : 894–898, 1995
- 8) Nakamori S, Watanabe H, Kameyama M et al : Expression of autocrine motility factor receptor in colorectal cancer as a predictor for disease recurrence. *Cancer* **74** : 1855–1862, 1994
- 9) Shirouzu K, Isomoto H, Morodomi T et al : Clinicopathologic study of perineural invasion in rectal cancer. *Kurume Med J* **39** : 41–49, 1992
- 10) 味岡洋一, 渡辺英伸, 西倉 健ほか：早期大腸癌の病理組織診断上の問題点。 *臨消内科* **18** : 343–352, 2003
- 11) 池上雅博, 劉 鉄成, 山下伸子ほか：大腸 sm 癌における転移と脈管侵襲との関係および脈管侵襲の病理組織診断上の問題点。 *早期大腸癌* **5** : 449–457, 2001
- 12) 大倉康男, 池上雅博, 鶴田 修：大腸 sm 癌における脈管侵襲の判定—病理医間で判定に違いはないのか？ *早期大腸癌* **5** : 486–500, 2001
- 13) 三富弘之, 籾林妙子, 五十嵐正広ほか：大腸の脈管構造と大腸癌の脈管侵襲の判定方法—特殊染色の有用性も含めて。 *早期大腸癌* **5** : 441–447, 2001

- 14) 池上雅博, 小山友己, 小林裕彦ほか: 大腸表面型腫瘍の診断と治療. 消外 25: 1691—1699, 2002
- 15) 望月能成, 平井 孝, 加藤知行ほか: 大腸 sm 癌におけるリンパ節転移危険因子としての腫瘍先進部病理組織所見の意義. 日臨外会誌 59: 629—635, 1998
- 16) 阿曾弘一, 高橋俊毅, 五十嵐正広: 大腸癌と脈管侵襲. 日臨 39: 162—167, 1981
- 17) Muller S, Chesner IM, Egan MJ et al: Significance of venous and lymphatic invasion in malignant polyps of the colon and rectum. Gut 30: 1385—1391, 1989
- 18) Ikarashi T: Immunohistochemical identification of lymphovascular invasion with antibodies against endothelium-specific antigens—von Willebrand's factor (vWF, factor VIII), CD31, and CD34—. 新潟厚生連医誌 9: 13—17, 1999
- 19) 池上雅博, 江藤哲哉, 安田武史ほか: 大腸癌におけるリンパ管および静脈侵襲の見方と判定方法. 早期大腸癌 4: 203—208, 2000
- 20) 味岡洋一, 横山淳二, 渡辺英伸: 大腸 sm 癌のリンパ節微小転移 (lymph node micrometastasis) と脈管侵襲. 早期大腸癌 5: 471—477, 2001
- 21) 館林妙子, 山下和也, 篠田 宏: レゾルシン・フクシン染色液の特性と重染色法の検討. 神奈川臨衛検技師会誌 34: 195—201, 1999
- 22) 小西文雄, 望月孝規, 五関謹秀ほか: 大腸癌の静脈侵襲の病理組織学的検索方法について (規準化のための一試案). 日本大腸肛門病会誌 33: 69, 1980
- 23) 三浦真弘, 豊田弘之, 加藤征治: 大腸壁内リンパ管の微細分布とリンパ流—組織化学・電顕的考察. 早期大腸癌 5: 423—432, 2001

Prognostic Significance of Lymphatic and Venous Invasions in pT3 Colorectal Carcinoma, Quantified with a Double Staining Combining CD34 Immunostaining and Elastica Staining

Taichi Sato, Eiji Shinto, Yojiro Hashiguchi,

Hideki Ueno and Hidetaka Mochizuki

Department of Surgery I, National Defense Medical College

Purpose : We clarified the prognostic significance of lymphatic and venous invasion judged by slides with double staining combining CD34 immunostaining and elastica staining. **Methods** : Subjects were 125 patients with pT3 colorectal carcinoma who underwent curative surgery between 1989 and 1993. Each representative pathological section including the deepest area of tumor penetration was stained with elastica staining after immunostaining for CD34. Cancer was classified based on the number of lymphatic invasions per section (ly (-), 0; ly (+), 1 or more) and on venous invasions (v (-), 0; v (+), 1 or more). We then looked at the relationship between invasion grade and patient prognosis. **Results** : Microscopically, we clearly identified lymph vessels with immunostained endothelium and venous vessels with round elastic fibers on slides with double staining. V (+) was strongly associated with lymph node metastasis ($p=0.01$). Univariate analysis showed that the ly (-) group (5-year survival of 88.9%) and v (-) group (90.0%) showed more favorable survival than the ly (+) group (75.6%, $p=0.06$) and v (+) group (78.9%, $p=0.09$). Lymph node metastasis (HR 3.6, $p=0.008$) was found by multivariate analysis to be independent prognostic factors, but not ly (+) and v (+). **Conclusions** : To diagnose the grade of vessel invasion objectively, additional staining was useful. Lymphatic and venous invasion were not found to be independent prognostic factors in patients with pT3 colorectal carcinoma.

Key words : colorectal carcinoma, lymphatic invasion, venous invasion, CD34 immunostaining, elastica staining

[Jpn J Gastroenterol Surg 39: 1571—1576, 2006]

Reprint requests : Taichi Sato Department of Surgery I, National Defense Medical College
3-2 Namiki, Tokorozawa, 359-0042 JAPAN

Accepted : March 22, 2006