

原 著

内視鏡的切除大腸粘膜下組織浸潤 (sm) 癌リンパ管侵襲検出における D2-40 免疫染色の有用性

横浜市立大学臓器病態治療医学¹⁾, 同 附属病院病理部²⁾, 横浜市立大学附属市民総合医療センター病理部³⁾,
同 消化病センター⁴⁾

和田 博雄¹⁾²⁾ 野沢 昭典³⁾ 大城 久²⁾
利野 靖¹⁾ 今田 敏夫⁴⁾ 稲山 嘉明²⁾

はじめに：内視鏡的切除された大腸粘膜下組織浸潤癌(以下，大腸 sm 癌と略記)につき，HE 染色と D2-40 免疫染色標本によるリンパ管侵襲検出の程度を比較し，リンパ管侵襲検出に関する同免疫染色の有用性を検討した。対象と方法：内視鏡的切除された大腸 sm 癌 30 例につき連続切片を作成し，HE 染色，D2-40 免疫染色を行った。結果：HE 標本でリンパ管侵襲は 2 例 2 病変，D2-40 免疫染色では 5 例 6 病変であった。両者で一致したのは 1 例 1 病変，乖離がみられたのは 5 例 6 病変で，4 例 5 病変が HE 標本で過小評価され，1 例 1 病変が HE 標本で過大評価された。前者 4 例は，組織との空隙が乏しい，腫瘍胞巣やリンパ管が小型である，などのため，HE 標本ではリンパ管侵襲と認識困難であったが，D2-40 免疫染色では認識容易であった。後者 1 例は，HE 標本でリンパ管とみなしたが，D2-40 免疫染色陰性であった。一方，同免疫染色では，腫瘍胞巣を一見取り囲むように非特異的に染まることもあり，リンパ管侵襲と誤認しないよう注意が必要であった。考察：D2-40 免疫染色は，内視鏡的切除術を受けた大腸 sm 癌におけるリンパ管侵襲の正確な評価に有用であると考えられた。

緒 言

大腸 sm 癌のリンパ節転移率は約 10%¹⁾²⁾であり，リンパ管侵襲はリンパ節転移と深く関連がある³⁾。そのため，大腸 sm 癌の内視鏡的切除後において，リンパ管侵襲は追加切除の適否を決めるうえで重要な因子といえる^{4)~6)}。

従来，リンパ管侵襲の有無は病理組織学的に HE 染色切片において腫瘍胞巣と脈管壁との間に空隙を形成することを特徴として評価されてきた。しかしながら，実際の HE 標本では脈管構造が不明瞭であったり，腫瘍胞巣と脈管との間の空隙が乏しかったりするなどのために，リンパ管侵襲を過小評価したり，逆にリンパ管侵襲と判断したものが実は組織解離であったなどのため，リンパ管侵襲を過大評価したりすることがあったと思わ

れる⁷⁾。

一方，大腸 sm 癌の内視鏡的切除標本において，リンパ管侵襲の有無を適切に評価することは，外科的追加切除の適否を決めるうえで因子の一つとなるので，臨床的にも重要と考えられている。

最近，ホルマリン固定パラフィン標本で利用可能なリンパ管内皮マーカーである D2-40 (分子量 4 万のシアロ糖蛋白)が市販され，外科病理診断へ応用され始め⁷⁾⁸⁾，実際，最近刊行された大腸癌取扱規約第 7 版においても，リンパ管侵襲の評価の 1 法として採用された⁴⁾。

今回，我々は内視鏡的切除された大腸 sm 癌において，HE 染色標本を用いて評価されたリンパ管侵襲の有無と，連続切片を用いて D2-40 免疫染色により評価した結果を比較し，内視鏡切除大腸 sm 癌リンパ管侵襲検出における D2-40 免疫染色の有用性について検討した。

<2006 年 9 月 27 日受理>別刷請求先：和田 博雄
〒236-8566 横浜市金沢区福浦 3-9 横浜市立大学
附属病院病理部

Table 1 Results of Pathological findings

Case #	Primary site	HE				D2-40		Discrepancy
		Degree of differentiation	Depth (μm)	Margin	ly	ly	ly	
1	S	wel	6,000	+	0	1	↑	
2	S	mod	1,000	+	1	0	↓	
3	T	wel-mod	1,400	-	0	0		
4	S	wel	600	-	0	0		
5	D	wel	1,300	-	0	0		
6	S	wel (ca in ad)	500	+	0	1	↑	
7	S	wel	2,000	+	0	0		
8	S	wel	1,600	+	0	0		
9	S	wel	5,300	-	0	1	↑	
10	A	wel	500	-	0	0		
11	R	wel	2,800	NM	0	0		
12	S	wel	1,900	-	0	0		
13	S	wel	1,000	-	0	0		
14	T	wel (ca in ad)	1,600	-	0	0		
15	D	wel	400	-	0	0		
16	S	wel (ca in ad)	6,000	-	0	0		
17	S	mod	1,900	NM	0	1	↑	
18	S	wel	900	-	0	0		
19	S	wel	2,400	-	0	0		
20	R	wel-mod	1,000	-	0	0		
21	S	wel	600	NM	0	0		
22	S	wel	200	NM	0	0		
23	S	wel	2,100	-	0	0		
24	S	wel	1,800	-	0	0		
25	S	wel	600	-	0	0		
26	A	wel	400	-	0	0		
27	S	wel	2,800	NM	0	0		
28	S	wel	800	±	1	1	none	
29	S	wel-mod	1,900	NM	0	0		
30	S	mod	1,800	-	0	0		

Discrepancy ↑, upgraded when evaluated by D2-40 staining; Discrepancy ↓, downgraded when evaluated by D2-40 staining; S, sigmoid colon; T, transvers colon; D, descending colon; A, ascending colon; wel: well differentiated adenocarcinoma; mod, moderately differentiated adenocarcinoma; ca in ad, carcinoma in adenoma; NM, not measurable

対象と方法

1996年2月から2006年5月までの間に、当院で内視鏡的切除を行った大腸 sm 癌 30 例を対象とした。全例につき、ホルマリン固定パラフィン包埋された腫瘍組織より連続切片を作成し、HE 染色、D2-40 (×40, マイクロウエーブ, Signet, Dedham, MA, USA) を行い、リンパ管侵襲について評価を行った。適宜、弾性染色結果も評価した。まず、HE 標本においてリンパ管侵襲の有無お

よび程度 (ly0-3) を分類し、次に D2-40 免疫染色標本を用いて同様にリンパ管侵襲の有無および程度を分類した。D2-40 陽性部の評価については、内皮細胞が認識でき、あるいは、毛羽立ちがなく連続的で明瞭な管腔構造を呈することをもってリンパ管とみなした⁷⁾。3名 (HW, HO, YI) がおのおの独立してブラインド下に評価し、評価の一致しなかった部分については、議論のうえ意見を統一した。続いて HE 標本と D2-40 免疫染色の比較

Fig. 1 Histology of lymphatic invasion (arrow), which was not detected by HE-stained section (A), but was clearly demonstrated by D2-40 immunostaining (B). $\times 80$, respectively.

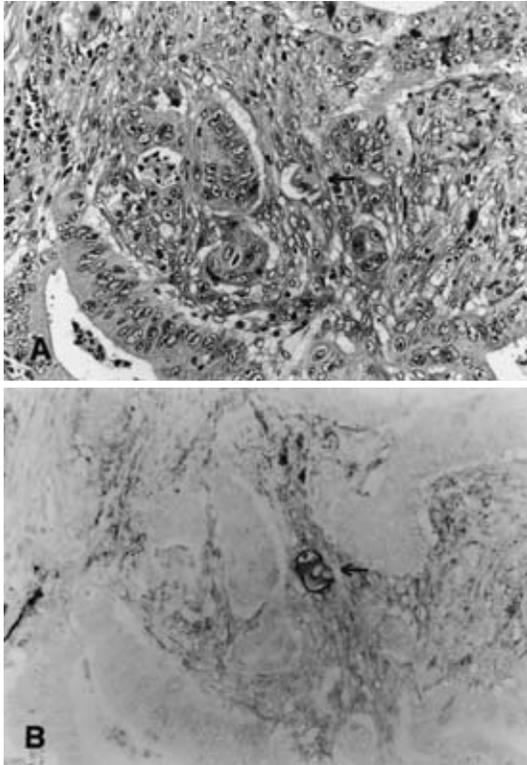
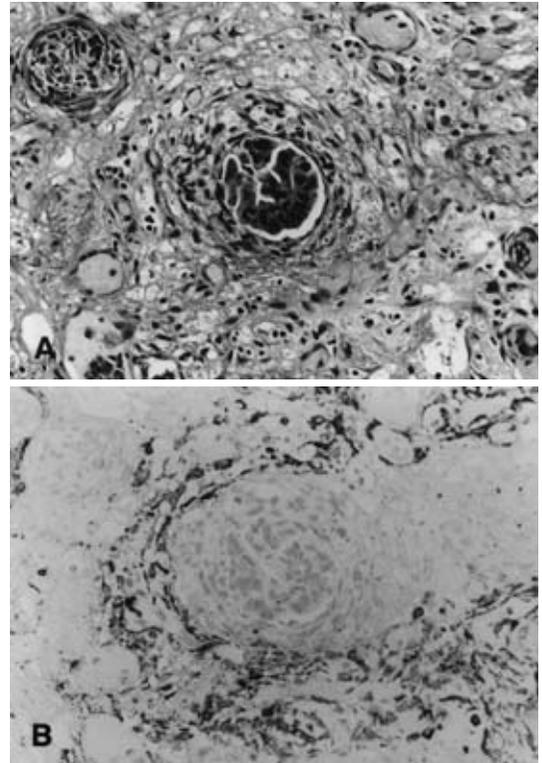


Fig. 2 Histology of the structure, where it was initially considered to be lymphatic invasion by HE-stained section (A), was proved to be D2-40 negative (B). Note nonspecific D2-40 immunoreaction in interstitial structures (B). $\times 80$, respectively.



分析を行った。なお、参考文献検索は、検索語として「D2-40」、「リンパ管侵襲」を用い、1983年～2006年まで、Pub Medならびに医学中央雑誌を用いて行った。

結 果

30例における内視鏡的切除部位は、上行結腸が2例、横行結腸が2例、下行結腸が2例、S状結腸が22例、直腸が2例であった (Table 1)。腫瘍分化度の内訳は、高分化腺癌が24例 (うち腺腫内癌が3例)、高分化～中分化腺癌が3例、中分化腺癌が3例であった。断端は陽性が5例、陰性が18例、評価困難なものが7例であった。

HE標本でリンパ管侵襲ありと判断したのは30例中、2例2病変 (症例2, 28) であった。D2-40染色標本でリンパ管侵襲ありと判断したのは30

例中、5例6病変 (症例1, 6, 9, 17, 28) であった。HE標本とD2-40染色標本でリンパ管侵襲について一致したのは30例中、1例1病変 (症例28) であった。HE標本とD2-40免疫染色で結果に乖離があったのは30例中5例6病変 (症例1, 2, 6, 9, 17) であった。4例5病変がHE標本で過小評価され (症例1, 6, 9, 17, Fig. 1)、1例1病変がHE標本で過大評価された (症例2, Fig. 2)。すなわち、Fig. 1ではHE標本でリンパ管と認識できなかった部位がD2-40免疫染色陽性で、最終的にリンパ管侵襲と考えられた。逆に、Fig. 2に示すようにHE染色でリンパ管と考えた部位がD2-40陰性であった部位もみられた。

結局、リンパ管侵襲はHE標本では30例中1

例 1 病変 (症例 28) が検出でき, D2-40 染色標本では 30 例中 5 例 6 病変 (症例 1, 6, 9, 17, 28) が検出できた. 検出の感度は, 有意差はないものの D2-40 染色標本のほうが高かった.

考 察

最近, リンパ管内皮マーカーである D2-40 が市販され, 乳癌, 大腸癌, 皮膚癌, 前立腺癌, 悪性黒色腫, 子宮頸癌, 子宮体癌, 胃癌などさまざまな腫瘍^{9)~11)}で外科病理診断へ応用されている.

今回, 我々は大腸 sm 癌に対し内視鏡的切除を施行した 30 例について, HE 標本, D2-40 免疫染色おのおのについて, リンパ管侵襲の評価の比較を行った.

まず, HE 標本と D2-40 免疫染色で結果が一致した症例では, 腫瘍胞巣は小さいが腫瘍胞巣に対してリンパ管が大きく, いわゆる浮島構造がはっきりしており⁷⁾, 脈管構造も明瞭で, HE 標本で容易に同定できた. D2-40 免疫染色でもリンパ管壁が明瞭に陽性となり, リンパ管侵襲と判断された.

次に, HE 標本で過小評価した 4 例は, いずれも周囲組織との解離が乏しい⁷⁾, リンパ管侵襲した腫瘍胞巣が小さい, リンパ管自体が極めて小さい, などの理由により, HE 標本ではリンパ管侵襲と認識できなかった (Fig. 1). このような場合においても, D2-40 免疫染色ではリンパ管侵襲が容易に確認でき, その有用性が確かめられた⁹⁾. あらためて鏡検しても, HE 標本では認識が難しく検出は困難と思われた.

HE 標本で過大評価した 1 例は, HE 標本では, リンパ管が大きく, 腫瘍胞巣との空隙があり, いわゆる浮島構造がはっきりしており, 脈管構造も明瞭でリンパ管侵襲と考えたが, この部分は D2-40 免疫染色では陰性でリンパ管ではないと判断された (Fig. 2). ちなみに, 弾性染色も陰性であり, 血管由来も否定的であった. ある頻度でこのような誤認がありうると思われた.

一方, D2-40 免疫染色でも過大評価の危険性がありうることを認識しなければならない. すなわち, D2-40 免疫染色では, Fig. 2B でも明らかなように, しばしば腫瘍間質が非特異的に染色され⁷⁾¹²⁾, 特に腫瘍胞巣を一見取り囲むようにみえる

ことがある⁷⁾. リンパ管侵襲と誤認しないために, 判定の際には組織学的な構造を総合的に判断する必要がある.

なお, 腫瘍の組織型によってリンパ管侵襲の検出の難易度が異なるかについて, 大腸癌において著者らが以前報告したが⁷⁾, 今回の症例では高分化型が多く, 十分な検討が不可能であった.

リンパ管侵襲とリンパ節転移とは深く関連があると考えられるが³⁾, 今回の研究ではリンパ節転移は 1 例に認めただけで, 症例数も少なく十分に考察することはできなかった. また, リンパ管侵襲と予後との関係についても, 症例を蓄積させたうえでのさらなる検討が必要であると考えられた.

また, 今回, H-E 標本におけるリンパ管侵襲陽性率は 6.7% (30 例中 2 例) と頻度が低かったが, 症例数が少ないことに加え, sm 浸潤度が軽度の症例が多いことも一因ではないかと思われた.

結論として, D2-40 免疫染色は, リンパ管以外の組織における非特異的陽性像がありうることを十分認識したうえで使用すれば, HE 染色標本単独でリンパ管侵襲を評価した場合よりも, 大腸癌におけるリンパ管侵襲検出の精度を高めると考えられる. 特に, 大腸癌の内視鏡的切除の際には, リンパ管侵襲の有無は, sm 浸潤の程度, 断端, 静脈侵襲の有無などととも, 追加切除の必要性を考える判断要素の一つとなるため, D2-40 免疫染色を日常の病理診断業務に取り入れることが必要であろう. 一方で, すべての標本に免疫染色を施行することは経済的な側面から現実的ではないので, 今回報告したような, HE 染色でリンパ管侵襲を過小評価しやすいパターンをよく理解し, 免疫染色に用いる標本を選択する際に役立てることも必要と思われた.

文 献

- 1) 武藤徹一郎, 西澤 護, 小平 進ほか: 大腸 sm 癌アンケート集計報告—sm 癌の転移リスクファクターを求めて—. 胃と腸 26: 911—918, 1991
- 2) 小平 進, 八尾恒良, 中村恭一ほか: sm 癌細分類からみた転移陽性大腸 sm 癌の実態. 胃と腸 29: 1137—1142, 1994
- 3) 浅井浩司, 五十嵐誠治, 松井孝至ほか: 大腸 sm

- 癌のリンパ節転移高危険因子の検討. 日消外会誌 **36** : 1365—1369, 2003
- 4) 大腸癌研究会編 : 大腸癌取り扱い規約. 第7版. 金原出版, 東京, 2006, p30
 - 5) Sugihara K, Muto T, Morioka Y : Management of patients with invasive carcinoma removed by colonoscopic polypectomy. *Dis Colon Rectum* **32** : 829—834, 1989
 - 6) Kodaira S, Teramoto T, Ono S et al : Lymph node metastasis from carcinomas developing in pedunculated and semipedunculated colorectal adenomas. *Aust NZ J Surg* **51** : 429—433, 1981
 - 7) 稲山嘉明, 久保田香, 本野紀夫ほか : 大腸癌における D2-40 抗体によるリンパ管侵襲の検出. *診断病理* **22** : 6—12, 2005
 - 8) Kahn HJ, Bailey D, Marks A : Monoclonal antibody D2-40, a new marker of lymphatic endothelium, reacts with Kaposi's sarcoma and a subset of angiosarcomas. *Mod Pathol* **15** : 434—440, 2002
 - 9) Kahn HJ, Marks A : A new monoclonal antibody, D2-40, for detection of lymphatic invasion in primary tumors. *Lab Invest* **82** : 1255—1257, 2002
 - 10) Fogt F, Zimmerman RL, Ross HM et al : Identification of lymphatic vessels in malignant, adenomatous and normal colonic mucosa using the novel immunostain D2-40. *Oncol Rep* **11** : 47—50, 2004
 - 11) Arigami T, Natsugoe S, Uenosono Y et al : Lymphatic invasion using D2-40 monoclonal antibody and its relationship to lymph node micrometastasis in pN0 gastric cancer. *Br J Cancer* **93** : 688—693, 2005
 - 12) Kaiserling E : Immunohistochemical identification of lymph vessels with D2-40 in diagnostic pathology. *Pathologie* **25** : 362—374, 2004

Utility of D2-40 Immunohistochemistry for Detecting Lymphatic Invasion in Colonic Carcinoma with Submucosal Invasion Removed with Colonoscopy

Hiroo Wada¹⁾²⁾, Akinori Nozawa³⁾, Hisashi Oshiro²⁾,
Yasushi Rino¹⁾, Toshio Imada⁴⁾ and Yoshiaki Inayama²⁾
Systematic Approach and Surgical Practice for Organ Disorder¹⁾ and
Division of Anatomic and Surgical Pathology²⁾, Yokohama City University
Division of Pathology³⁾ and Department of Gastroenterological Center⁴⁾,
Yokohama City University Medical Center

Introduction : We evaluated the effectiveness of D2-40 immunohistochemistry for detecting lymphatic invasion, in colonic adenocarcinoma with submucosal invasion removed under colonoscopy. **Materials and Methods** : Subjects were 30 cases of invasive colonic adenocarcinoma removed endoscopically and proven to have submucosal invasion. Serial paraffin sections were stained with hematoxylin-eosin (HE) or immunostained with D2-40, and the degree of lymphatic invasion was evaluated based on staining. **Results** : The number of lymphatic invasions was 2 lesions in 2 cases or 6 lesions in 5 cases by HE-stained or D2-40-immunostained sections. One lesion was detected by both HE and D2-40 antibody. The discrepancy in the degree of lymphatic invasion evaluated by HE or D2-40 was noted in 6 lesions in 5 cases. Underestimation in HE-stain-based evaluation compared to that in D2-40 was seen in 5 lesions among 4 cases. These were caused by obscure separation artifact, characteristic of lymphatic invasion, and the small size of lymphatic invasion. Overevaluation in HE-stained sections was noted in one lesion in 1 case, where D2-40 was unstained. Nonspecific D2-40 staining was often observed in tumor parenchyma, including structures just around the edge of tumor cell nests : this should not be confused with true lymphatic invasion. **Conclusions** : D2-40 is useful for accurately evaluating lymphatic invasion in colonic cancer with submucosal invasion undergoing colonoscopic resection.

Key words : colonic cancer, lymphatic invasion, D2-40

[Jpn J Gastroenterol Surg 40 : 247—252, 2007]

Reprint requests : Hiroo Wada Division of Anatomic and Surgical Pathology, Yokohama City University Hospital
3-9 Fukuura, Kanazawa-ku, Yokohama, 236-8566 JAPAN

Accepted : September 27, 2006