原著

胃癌における免疫組織化学的染色を用いた 微小リンパ節転移検出に関する検討

帝京大学医学部外科
白 鳥 昌 利

Immunohistochemically Detected Micrometastases of Lymph Nodes in Patients with Gastric Cancer

Masatoshi SHIRATORI

Department of Surgery, Teikyo University School of Medicine

胃癌における微小リンパ節転移の臨床的意義を明らかにする目的で、縮小手術の対象となり得る深達度が漿膜に達しない胃癌158症例を対象とし、郭清リンパ節6,205個にHematoxylin and Eosin (HE) 染色と免疫組織化学的 (immunohistochemical; IHC) 染色を施行し、リンパ節転移を検討した。HE染色で転移を認めず、IHC染色で転移がみられる場合を微小転移陽性と定義した。その結果、HE染色で陰性108例中微小転移陽性は4例(3.7%)あり、HE染色陰性のリンパ節5,946個中34個(0.57%)に微小転移を認めた。本研究では、微小転移陽性例は少数で予後との有意な関連は見いだせなかったが、微小転移によって転移陽性リンパ節群が変化し、進行度も変化した症例が7例みられた。したがって、微小転移の検索は予後の予測や術後補助化学療法の適応決定に有用である可能性が示唆された。

索引用語: 胃癌 (gastric cancer), 免疫組織化学的染色 (immunohistochemical staining), 微小リンパ節転移 (lymph node micrometastasis)

はじめに

近年早期胃癌症例が増加し、内視鏡下粘膜切除術や縮小手術が広く施行されるようになり¹⁾, リンパ節転移の判定があらためて重視されるようになった。リンパ節転移の有無は、通常摘出リンパ節の最大断面切片のHE染色で判定してきたが、最大断面に達しない程度の転移巣では転移陰性と判断される可能性がある²⁾。一方、分子生物学的手法の進歩に伴い、免疫組織化学的 (immunohistochemical; IHC) 染色やreverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) 法による微小リンパ節転移の検索が胃癌のみならず各種の癌で施行されるようになり、微小転移検出の有用

性が報告されている³⁾⁴⁾。しかし、これまで微小リンパ節転移の臨床的意義に関して必ずしも一致した見解はなく、予後との関連も十分に評価されていない^{5)~7)}。そこで本研究では、胃癌における微小リンパ節転移の頻度とその臨床的意義を明らかにする目的で、胃癌郭清リンパ節の薄切切片を新たに作成してHematoxylin and Eosin (HE) 染色およびIHC染色を施行し、リンパ節転移の有無やその術後生存率との関連について検索した。

対象および方法

1985年1月1日から1990年12月31日までの帝京大学第2外科(旧)における胃癌症例中、縮小手術の対象となり得る深達度が漿膜面に達しない

193症例 (T1: 94例, T2: 99例) のうち, 5年以上の追跡調査が可能であった158例を対象とした。T1症例は89例, T2症例は69例で, 郭清リンパ節はT1症例で3,121個, T2症例で3,084個, 計6,205個であった。肉眼型分類は, O-IIa, O-IIb, 1を隆起型, O-IIC, O-III, 2, 3, 4を陥凹型とした。組織型分類は, 乳頭腺癌, 管状腺癌, 管状扁平癌を分化型, 低分化腺癌, 印環細胞癌, 粘液癌を未分化型とした。なお, 臨床病理学的事項は胃癌取り扱い規約第13版 (1999年6月)⁸⁾に従って記載した。

1. 病理組織標本の作製

パラフィン包埋固定で保存されていた郭清リンパ節をミクロトームで新たにその最大断面に近く3 μ m厚さに薄切し, 4枚の連続切片を作製した。それぞれ2枚にHE染色およびIHC染色を施行し, 病理組織学的検索を行った。

2. IHC染色

HE染色は常法に従い, IHC染色はavidin-biotinylated peroxidase complex (以下ABC) 法で施行した。IHC染色は一次抗体としてMonoclonal Mouse, Anti-human Cytokeratin, AE1/AE3 (DAKO社, Carpinteria, CA, USA), 二次抗体にビオチン化抗マウス抗体, 三次複合抗体にアビジン (DAKO社, Carpinteria, CA, USA) を用いた。100%キシレンで脱パラフィン化し, 100%エタノールにて親水化した。マイクロウェーブ法⁹⁾に基づき組織抗原性の賦活化を行った。その後一次抗体 (50倍希釈) を常温で一昼夜, ビオチン化二次抗体 (400倍希釈) を60分間, さらにABC complex (500倍希釈) を60分間反応させた。次にペルオキシダーゼ発色のためにDAB溶液 (3, 3'-ジアミノベンチジン・4HC 1ニチレイ製) に15分間反応させ, マイヤーヘマトキシリン液で核を染色して封入した。

3. 転移の判定

すべてのHE染色およびIHC染色されたリンパ節を検索し, これらの染色性とリンパ節の構造により転移陽性か否かを診断した。さらに病理専門医に依頼して診断を確認した。HE染色でリンパ節に転移を認めず, IHC染色にて転移がみられる場合を微小転移陽性と定義した。

4. 術後の転帰

生存か否か, 再発の有無など術後の転帰は外来および入院病歴で検索した。またこれらによって明らかでない症例は直接電話あるいは文書によって確認した。再発例, 死亡例では, 臨床所見および画像診断を総合して再発様式を判断した。

5. 統計学的処理

2群間の有意差検定は χ^2 検定と累積 χ^2 検定で行った。5年生存率の算出はKaplan-Meier法で行い, 生存率における有意差検定はlog-rank testで行った。p<0.05を統計的に有意と判定した。

成 績

1. 微小リンパ節転移の状況

対象の158例中, HE染色陰性は108例, 陽性は50例であった。HE染色陰性症例中, IHC染色でリンパ節転移を認めた症例は4例で, 残りの104例はIHC染色でリンパ節転移は陰性であった。HE染色陽性症例はすべてIHC染色でもリンパ節転移陽性であった (Fig. 1)。郭清されたリンパ節数は6,205個で, HE染色陰性は5,946個, 陽性は259個であった。HE染色陰性リンパ節5,946個中, IHC染色でリンパ節転移を認めたリンパ節は34個 (0.57%) であった (Fig. 2)。なお, これらの34個のリンパ節を有する症例は22例であったが, うち18例はHE染色で転移陽性のリンパ節を有していたため, HE染色陰性, IHC染色陽性のリンパ節を有する症例, すなわち微小転移陽性症例は4例のみであった。なお, HE染色陽性症例の判定について, 今回の新たな検索による転移陽性の診断と過去の病理報告の診断とは全例一致していた。

2. リンパ節転移と臨床病理学的因子との関係

微小転移を含めてリンパ節転移を認めない症例 (HE(-)/IHC(-)症例) と, 微小転移を含めてリンパ節転移を認める症例 (HE(+)/IHC(+)) 症例) を比較すると (Table 1), 深達度が深いほど (p<0.001), 病期が進むほど (p<0.001), 転移陽性例が多く, また, 未分化型 (p<0.05), リンパ管侵襲陽性例 (p<0.001), 血管侵襲陽性例 (p<0.001) で転移陽性例が多くみられた。肉眼型とリンパ節転移に有意な関連は認めなかった。

3. 深達度別郭清リンパ節数と転移陽性率 (Table

Fig. 1 Patients with micrometastases detected by immunohistochemical staining. HE: Hematoxylin and Eosin staining, IHC: immunohistochemical staining

Fig. 2 Number of micrometastatic lymph nodes detected by immunohistochemical staining.

2)

郭清リンパ節数は6,205個で、深達度別の微小転移を含めたリンパ節転移陽性率は、M癌1.8% (1/55), SM癌23.5% (8/34), MP癌65.5% (19/29), SS癌65.0% (26/40) であった。

4. 微小リンパ節転移の転移形式

微小転移の形式は、転移陽性細胞がブドウの房状に集まったcluster cell type (Fig. 3) が29個 (18例) にみられ、転移陽性細胞が単独で存在するsingle cell type (Fig. 4) は5個 (4例) みられた。微小転移の22例はいずれもSS症例で、微小転移陽性リンパ節数は1個のみが17例、3個が2例、2個と4個と5個が各1例であった。

5. リンパ節転移と5年生存率

Table 1 Lymph node metastases detected by HE and immunohistochemical staining and clinicopathological characteristics in patients with gastric cancer

		HE(-)/IHC(-) n=104	HE(-)/IHC(+) n=4	HE(+)/IHC(+) n=50	p
Diameter of tumor (cm)		32±23	31±15	46±27	
Depth of tumor	M (n=55)	54	0	1	*p<0.001
	SM (n=34)	26	0	8	
	MP (n=29)	10	4	15	
	SS (n=40)	14	0	26	
Gross type	Elevated	29	0	14	N.S.
	Depressed	75	4	36	
Histological type	Differentiated	77	3	27	*p<0.05
	Undifferentiated	27	1	23	
Lymphatic invasion	ly(-)	80	2	3	*p<0.001
	ly(+)	24	2	47	
Venous invasion	v(-)	97	3	30	*p<0.001
	v(+)	7	1	20	
Stage	I A	80	0	0	*p<0.001
	I B	24	4	8	
	II	0	0	32	
	III A	0	0	6	
	IV	0	0	4	

*HE(-)/IHC(-) vs. HE(+)/IHC(+)

Table 2 Lymph node (LN) metastases detected by HE and immunohistochemical staining according to the depth of tumor invasion

Depth of tumor invasion	M	SM	MP	SS
Number of patients	55	34	29	40
Number of dissected LN	1849	1272	1275	1809
Average number of dissected LN	33.6	37.4	44	45.2
Number of metastatic LN	5	41	72	175
Number of patients with metastatic LN	1	8	19	26
Percentage of patients with metastatic LN	1.8(%)	23.5(%)	65.5(%)	65.0(%)

HE染色によるリンパ節転移陽性症例 (HE (+); n=50) の術後5年生存率は68.0%で、陰性症例 (HE(-); n=108) の81.6%に比較して有意に (p<0.05) 低かった (Fig. 5)。さらに、IHC染色による陽性例を含めたリンパ節転移陽性症例 (HE(-)/IHC(+), HE(+)/IHC(+); n=54) と陰性症例 (HE(-)/IHC(-); n=104) の比較でも、前者の5年生存率は66.7%で、後者の81.7%に比較して有意に (p<0.05) 低かった (Fig. 6)。IHC染色のみ陽性の微小転移症例と陰性症例の比較では、陽性例少数のため有意差は得られなかった。

6. 微小転移陽性症例と臨床病理学的因子との関係 (Table 3)

Fig.3 High-power photomicrograph of a gastric lymph node showing cluster cells of cytokeratin positive tumor cells.

Fig.4 High-power photomicrograph of a gastric lymph node showing a single, cytokeratin positive tumor cell.

微小転移陽性の22例について、臨床病理学的因子の詳細を検討した。微小転移が認められたことで胃癌取り扱い規約⁸⁾に定める転移陽性リンパ節群が変化したのは7例で、pN0からpN1へは4症例(症例3, 4, 5, 6), pN1からpN2へは3症例(症例8, 9, 14)であった。その結果、進行度の変化はpN0からpN1への4例はStage I BからIIへ, pN1からpN2への3例はIIからIIIAへ変化した。検索時点での死亡例は12例で、死因は、肺炎2例、老衰3例、食道癌1例、乳癌肝転移1例、胃癌再発例2例(腹膜再発, リンパ節再発各1例)、不明3例であった。微小転移のみ陽性の4例はいずれもMP癌で、全例死亡していた。しかし、胃癌死と考えられる症例はなく、死因は肺炎、老衰、

Fig.5 Survival curves of patients with and without metastatic lymph nodes by HE staining. The patients with negative lymph nodes metastases showed a better survival than the patients with metastatic lymph nodes.

Fig.6 Survival curves of patients with and without metastatic lymph nodes by HE and IHC staining. The patients with negative lymph nodes metastases showed a better survival than the patients with metastatic lymph nodes. IHC: immunohistochemical staining

食道癌、不明各1例であった。

考 察

縮小手術の対象となり得る深達度が漿膜面に達しない胃癌158例における6,205個の郭清リンパ節を対象に、新たにHE染色とIHC染色を施行してリンパ節転移の有無を検索した。HE染色では過去の病理検査報告と一致したが、IHC染色でHE染色陰性リンパ節5,946個中34個のリンパ節を微小転移陽性と診断した。

微小転移は通常の臨床病理学的方法では検出されない腫瘍からの転移と定義され⁴⁾、UICCのpTNM分類では、2mm以下のリンパ節転移とされている¹⁰⁾が、本研究ではHE染色陰性でIHC染色陽性を微小転移とした。この微小転移を検出する

Table 3 Clinicopathological characteristics and outcome of patients with lymph node micrometastases

No	Age	Gender	Depth of invasion	Histology	HE(+)/IHC(+)	HE(-)/IHC(+)	Number of LN with micrometastases	N-number	Outcome	Duration of survival
1	66	F	SM	signet	No.7 (19/36)	No.7 (1/36)	1	N2	S	7y
2	69	F	MP	tub1,tub2	No.6 (5/5)	No.1(1/2)	1	N2	S	12y6m
3	59	M	MP	adenosquas		No.3(1/3)	1	N0→N1	D	3y11m
4	74	M	MP	tub		No.4sd (1/10)	1	N0→N1	D	9y
5	53	F	MP	tub2>tub1		No.4d 1/9	1	N0→N1	D	3y6m
6	62	M	MP	por>tub1		No.5(1/3)	1	N0→N1	D	9y4m
7	44	F	MP	poor sig	No.1(1/5),4d (4/6), 4sb(1/8)	No.4sb (1/8)	1	N1	S	10y1m
8	52	M	MP	mucocell sig	No.3(1/6)	No.7(1/3)	1	N1→N2	D	5y6m
9	78	M	MP	pap tub	No.3 (1/16)	No.1 (2/8), 6 (2/2)	4	N1→N2	D	3y11m
10	41	M	MP	tub1	No.3 (2/14), 8(2/5)	No.4d (1/7)	1	N2	D	1y6m
11	76	M	SS	tub2 pap	No.3 3/6, 4d 1/8, 5 1/1, 6 3/5	No.7(1/6)	1	N2	D	1y1m
12	36	F	SS	por,sig	No.1 (4/7), 4d (1/8)	No.4d (1/8) *Si	1	N1	S	17y11m
13	51	M	SS	tub	No.4d (1/17)	No.4d (1/17)	1	N1	S	6y6m
14	62	M	SS	mucocell	No.6(1/4)	No.8(1/5)	1	N1→N2	S	8y8m
15	73	F	SS	microtubular	No.3(1/6)	No.3(1/6)	1	N1	S	1y4m
16	47	M	SS	sig	No.3(1/8), 4d (1/4)	No.4d (1/4) *Si	1	N1	D	4y3m
17	58	F	SS	mucinous	No.3 (5/16)	No.2 (1/2), 3 (4/16)	5	N1	D	13y3m
18	70	M	SS	pap	No.3(2/9), 4sa (3/5), 4d (2/5), 10 (1/5)	No.3 (1/9)*Si, 11(1/8)	2	N3	S	6y8m
19	66	M	SS	poor	No.3(1/5), 4d(1/5), 5 (1/5), 6 (1/12)	No.6 (1/12)	1	N1	D	2y1m
20	63	F	SS	sig	No.3 (1/9), 4sb (7/16), 4d (5/7)	No.1(1/2), 6 (2/5) *Si	3	N1	S	6y2m
21	50	F	SS	tub2	No.3 2/3, 4sa 2/8, 5 2/3, 8 1/1	No.1(1/2), 3 (1/3), 4d(1/6)	3	N2	D	10m
22	65	M	SS	poor	No.3(1/3)	No.3(1/3)	1	N1	S	11y4m

*Si : single cell

S: survived
D: dead

方法として、免疫組織化学染色法^{4)10)~13)}や癌組織に発現性の高いRNAを標的とするRT-PCR法がある³⁾⁴⁾。RT-PCR法は検出感度が免疫染色に比較して高く、より客観的で、原理的にリンパ節全体で判定出来る利点がある³⁾⁴⁾が、偽陽性の問題⁷⁾や日常臨床応用の面で課題が残されている。そこで本研究では、より実用的と考えられる免疫組織化学的染色を用いた。一次抗体としては扁平上皮癌の染色性に優れているとされるAE1/AE3¹¹⁾¹³⁾や、腺癌の染色性に優れているとされるCAM5.2¹¹⁾¹³⁾が多く用いられ、両者とも胃癌微小リンパ節転移の検出に関して多くの知見が報告されている^{14)~25)}。いずれが微小転移の検索に適しているかは現段階では断定できないが、著者らはこれまでに胃癌においてしばしば用いられてきたことから前者を選択した。

病理組織学的なリンパ節転移検索の一般的な問題点として、切片の割面に認められる転移のみで判定している点が挙げられる。連続切片で検索すれば転移率は上昇する²⁾が、研究としては実施できても日常臨床では不可能と言わざるを得ない。IHC染色による微小転移の報告でも、大部分は最大割面のみの染色で判定している^{14)~16)19)~21)23)27)}。しかし、本研究と同じように2~3枚の切片を用

いた検討¹⁷⁾²⁸⁾²⁹⁾、Ishidaら²²⁾による3 μ mの連続切片を用いた検討があり、Ishidaら²²⁾の微小転移陽性率は9.1%と最も高率である。このようにIHE染色でも連続切片による検索が理想であるが、実際の臨床応用は労力と時間の点から困難である。

こうした背景から本研究ではHE染色とIHC染色各2枚の切片で判定し、HE染色で転移陰性とされた5,946個のリンパ節中34個(0.57%)に微小転移を認めた。本研究と同じように一次抗体としてAE1/AE3を用いた場合の微小リンパ節転移陽性率は1.5~6.3%^{14)~17)}、CAM5.2を用いた場合の陽性率は2.6~9.1%^{21)~23)25)}と共に高い値が報告されている。本研究で陽性率が低かった原因として、抗原賦活化の方法、染色過程、発色の方法など手技的な違い¹²⁾の他、HE染色の判定自体に施設間の差がある可能性が考えられる。

本研究で対象とした158症例中、微小リンパ節転移により7例でリンパ節転移度が変化した。内訳はpN0からpN1へが4例、pN1からpN2へが3例で、進行度も各IBからIIへ、IIからIIIAへと変化した。定型手術後の5年生存率は、進行度IB、II、IIIAではそれぞれ87.0%、68.3%、50.1%と報告されており³⁰⁾、このような微小転移の検索で、進行度

の判定をより正確なものとする事は、予後の予測や術後補助化学療法の適応を決定するうえで非常に意義があると思われる。

予後について、これまで微小転移陽性例では不良とされている^{14)15)17)~21)23)24)}一方、T1症例や早期胃癌症例では微小転移と予後とは関連しない¹⁶⁾²⁶⁾²⁸⁾とする報告もみられ、完全に一致した見解はない。本研究では微小転移陽性例は4例のみで、直接この点を検証することはできなかったが、これまでの報告では微小転移と予後は関連するとしたものが多く、微小転移は予後に影響を与える可能性が高いと考えられる。

おわりに

本研究では微小転移陽性例が少数で予後との有意関連を見いだせなかったが、微小転移によって転移陽性リンパ節群が変化し、進行度も変化した症例がみられた。したがって、微小転移の検索は予後の予測や術後補助化学療法の適応決定に有用である可能性が示唆された。今後はさらに免疫組織化学的染色法の精度を向上させる工夫と、RT-PCR法を含め、より一般的に実施できる分子生物学的手法の開発が期待される。

謝 辞

本研究にご協力いただいた当外科教室の皆様と研究室の熊谷晴美女史、田村純子女史に感謝申し上げます。また、ご指導を頂いた病院病理部の今村哲夫教授、外科学教室飯沼久恵講師、および沖永功太客員教授・名誉教授に感謝申し上げます。

参考文献

- 1) Miwa K, Miyazaki I, Sahara H, et al: Rationale for extensive lymphadenectomy in early gastric carcinoma. *Br J Cancer* 82: 1518-1524, 1995
- 2) Isozaki H, Okajima K, Fujii K: Histological evaluation of lymph node metastasis on serial sectioning in gastric cancer with radical lymphadenectomy. *Hepato-Gastroenterol* 44: 1133-1136, 1997
- 3) Mori M, Mimori K, Inoue H, et al: Detection of cancer micrometastases in lymph nodes by reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Cancer Res* 55: 3417-3420, 1995
- 4) 山本浩文, 三宅泰裕, 能浦真吾他: 消化器癌の微小リンパ節転移の検出と臨床的意義. *癌と化療* 28: 776-783, 2001
- 5) Okada Y, Fujiwara Y, Yamamoto H: Genetic detection of lymph node metastases in patients with gastric carcinoma by multiple-maker reverse transcriptase-polymerase chain reaction assay. *Cancer* 92: 2056-2064, 2001
- 6) Matsumoto M, Natsugoe S, Ishigami S, et al: Lymph node micrometastasis and lymphatic mapping determined by reverse transcriptase-polymerase chain reaction in pN0 gastric carcinoma. *Surgery* 131: 630-635, 2002
- 7) Kubota K, Nakanishi H, Hiki N, et al: Quantitative detection of micrometastases in the lymph nodes of gastric cancer patients with real-time RT-PCR: A comparative study with immunohistochemistry. *Int J Cancer* 105: 136-143, 2003
- 8) 日本胃癌学会編: 胃癌取り扱い規約. 13版, 金原出版, 東京, 1999
- 9) Shi SR, Key ME, Kalra KL: 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
- 10) 三森功士, 増田隆明, 森山紀之他: 微小転移の臨床的意義 1. 微量癌細胞検出の臨床的意義. *外科* 66: 497-501, 2004
- 11) 辻谷俊一, 貝原信明: 胃癌治療の最近の進歩と今後の問題点 2. 胃癌における微小転移の分子生物学診断とその臨床的意義. *日外会誌* 102: 741-744, 2001
- 12) 夏越祥次, 東 泰志, 松本正隆他: リンパ節転移. *外科* 63: 786-791, 2001
- 13) 土岐祐一郎: サイトケラチン免疫染色による診断. *日臨* 61: 242-246, 2003
- 14) Kikuchi Y, Tsuchiya A, Ando Y, et al: Immunohistochemical detection of lymph node microinvolvement in node-negative cancer. *Gastric Cancer* 2: 173-178, 1999

- 15) Nakajo A, Natsugoe S, Ishigami S, et al: Detection and prediction of metastasis in the lymph nodes of patients with pN0 gastric cancer. *Ann Surg Oncol* 8: 158-162, 2001
- 16) Fukagawa T, Sasako M, Bruce G, et al: Immunohistochemically detected micrometastases of the lymph nodes in patients with gastric carcinoma. *Cancer* 92: 753-759, 2001
- 17) Matsumoto M, Natsugoe S, Ishigami S, et al: Rapid immunohistochemical detection of lymph node micrometastasis during operation for upper gastrointestinal carcinoma. *Br J Surg* 90: 5636-5666, 2001
- 18) Lee E, Chae YK, Kim I, et al: Prognostic relevance of immunohistochemically detected lymph node micrometastasis in patients with gastric carcinoma. *Cancer* 94: 2867-2873, 2002
- 19) Ishigami S, Natsugoe S, Tokuda K, et al: Clinical impact of micrometastasis of the lymph node in gastric cancer. *Am Surg* 69: 573-577, 2003
- 20) Higashi H, Natsugoe S, Ishigami S, et al: Distribution of lymph node metastasis including micrometastasis in gastric cancer with submucosal invasion. *World J Surg* 27: 455-459, 2003
- 21) Maehara Y, Oshiro T, Endo K, et al: Clinical significance of occult micrometastasis in lymph nodes from patients with early gastric cancer who died of recurrence. *Surgery* 119: 397-402, 1996
- 22) Ishida K, Katsuyama T, Sugiyama A, et al: Immunohistochemical evaluation of lymph node micrometastases from gastric carcinomas. *Cancer* 79: 1069-1076, 1997
- 23) Cai J, Ikeguchi M, Maeta M, et al: Micrometastasis in lymph nodes and microinvasion of the muscularis propria in primary lesions of submucosal gastric cancer. *Surgery* 127: 32-40, 2000
- 24) Harrison LE, Choe JK, Goldestein M, et al: Prognostic significance immunohistochemical micrometastasis in node negative gastric cancer patients. *J Surg Oncol* 73: 153-157, 2000
- 25) 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
- 26) Choi HJ, Kim Y-K, Kim Y-H, et al: Occurrence and prognostic implications of micrometastases in lymph nodes from patients with submucosal gastric carcinoma. *Ann Surg Oncol* 9: 13-19, 2002
- 27) Yun HY, Bandou E, Kawamura T, et al: Influence of micrometastasis on N stage in gastric cancer and clinical application. *J Exp Clin Cancer Res* 24: 531-539, 2005
- 28) Morgagni P, Saragoni L, Scarpi E, et al: Lymph node micrometastasis in early gastric cancer and their impact on prognosis. *World J Surg* 27: 559-561, 2003
- 29) Moenig SP, Luebke T, Soheili A, et al: Rapid immunohistochemical detection of tumor cells in gastric carcinoma. *Oncol Rep* 16: 1143-1147, 2006
- 30) 日本胃癌学会編: 胃癌治療ガイドライン. 第2版, 金原出版, 東京, 2004, p30