胃癌における漿膜下の微小血管形態と再発形式との検討

日本大学第1外科

西尾 知 天野 定雄 福澤 正洋

Relationship between Subserosal Microvessel Profile and Recurrent Types in Gastric Cancer

Satoshi NISHIO, Sadao AMANO and Masahiro FUKUZAWA

First Department of Surgery, Nihon University School of Medicine

胃癌の腹膜再発に関与する因子を予測する目的で腫瘍先進部におけるVEGF (vascular endothelial growth factor), u-PA (urokinase-type plasminogen activator) の免疫組織学的発現および腫瘍先進部漿膜下層の微小血管断面積率の面から、予後と再発形式について組織学的深達度mp, ss, seの胃癌組織111例を対象に比較検討を行った。深達度mp, ss, seにおいて癌性腹膜炎症例で微小血管断面積率が高く、深達度mp, ssにおいて微小血管断面積率が高い症例は有意に予後不良であった。VEGF, u-PAについては非再発群に比べなんらかの再発をきたした症例は染色率が高くなる傾向が見られたが、深達度および再発形式により一定しなかった。以上より胃癌原発巣漿膜下層における微小血管断面積率の測定は腹膜再発予測因子として、また予後因子として有用である可能性が示唆された。

索引用語：胃癌(gastric cancer)、微小血管断面積率(microvessel area rate)、腹膜再発(peritoneal recurrence)

はじめに

胃癌の再発形式として腹膜播種性転移は最も多く、一度再発するとその治療には難渋することが多い。近年の分子生物学の進歩により、血管透過性亢進作用をもつ血管新生因子が胃癌の進展に関与することが報告されている¹⁾。

血管新生の最初のステップとして血管の拡張がおこるが、内皮細胞は扁平で未熟であり、安定化が行われていないために血管の透過性が亢進していると考えられる。腫瘍の血管新生に関しても、その過程における血管の拡張、透過性の亢進と腹水産生の関連性が報告されている^{2)~5)}。

このような背景から胃癌術後の腹膜再発において、腫瘍の新生血管は血管透過性が亢進しており癌性腹水の産生と腹膜播種をきたす可能性が考え

られる。そこで初回手術時の胃癌先進部漿膜下層の微小血管の形態に着目して、一定面積における微小血管断面積率 (microvessel area rate略してMVAR) を算出して、予後と再発形式と比較検討を行った。また細胞外マトリックスの消化に重要なプロテアーゼである urokinase-type plasminogen activator (以下u-PA)⁶⁾⁷⁾や血管内皮細胞増殖因子である vascular endothelial growth factor (以下VEGF)⁸⁾の免疫組織学的発現と再発形式の関係についても合わせて検討した。

対 象

1974年1月から1995年12月までの間に当教室で治療手術を行い、術後5年間の経過が明らかな原発性進行胃癌111症例を対象とした。

男女比は男性74例、女性37例であり、年齢分布

A : VEGF (×200)

B : u-PA (×200)

Fig. 1 Immunohistochemical stainings with VEGF and u-PA in cancerous tissue.

The expression of VEGF (A) and u-PA (B) was shown by brownish staining in the cytoplasm of the cancer cells.

は22歳から83歳で、平均62.6歳であった。胃癌取り扱い規約第13版⁹⁾に従ったこれらの背景因子では深達度別ではmp症例21例、ss症例53例、se症例37例であり、stage分類ではstage I 14例、stage II 29例、stage III 36例、stage IV 32例であった。

非再発例（以下C群）は54例、再発例は57例で、細胞診で診断の確定した腹膜再発例（以下P群）は42例、その他の肝転移、肺転移、リンパ節転移の再発形式（以下R群）が15例であった。

方 法

1 免疫組織染色

腫瘍の先進部のパラフィン包埋標本より作成した4 μ mの連続切片を用いてstreptavidin-biotin complex (SAB) 法にて間接免疫酵素法を行った。脱パラフィン後、3% H_2O_2 加リン酸緩衝生理食塩水（以下PBS）にて内因性ペルオキシダーゼの不活性化を施行した。PBSにて洗浄後、10%ヤギまたはウサギ正常血清に室温にて30分漬け、非特異反応をブロックした。その後、一次抗体として抗VEGF polyclonal抗体（Santa-Cruz社）100

Fig. 2 Method of measuring MVAR

- a) Immunohistochemical staining with von Willebrand factor in cancerous tissue. The expression of the von Willebrand factor was shown by dark staining at microvessel ($\times 200$).
- b) The lumen of the minute blood vessel surrounded in vascular endothelial cells stained with von Willebrand factor was traced by the image analysis equipment.
- c) The field incorporated in the image analysis equipment was divided into lumen of the blood vessel and background part. Afterwards, MVAR was calculated. This measurement was carried out in the 5 visual fields of the hot spot, and the mean value was made to be MVAR.

倍希釈, 抗u-PA monoclonal抗体 (American Diagnostic社) 100倍希釈, 抗von Willebrand因子 polyclonal抗体 (Dako社) 100倍希釈を用い, 4°C でover nightで反応させた。PBSにて洗浄後, VEGF, von Willebrand因子はbiotin化ヤギ抗ウサギIgG, u-PAはbiotin化ウサギ抗マウスIgG + IgA + IgMを室温で30分反応させ, 再度PBSにて洗浄しperoxidase-conjugate streptavidin (ニチレイ, ヒストファイン社) と反応させた。発色には H_2O_2 加 diaminobezidine を用いた。positive controlとして各実験毎に VEGF, u-PA, von

Willebrand因子染色が強陽性に認められる組織を同時染色した。またnegative controlとして10% ウサギ正常血清を1次抗体として用いた。

2 染色性の判定

VEGF, u-PAの染色性 (Fig. 1) の判定は光学顕微鏡下で, 癌先進部5視野を観察し, VEGF, u-PA染色陽性細胞を1,000個以上計測し, 平均して癌細胞の細胞質が10%以上染色されているものを陽性と判定した。また腫瘍先進部漿膜下層における微小血管断面積率の算出はvon Willebrand因子染色の切片について200倍の倍率で一定面積

(0.624mm²)について画像解析装置(日本アビオニクス社:TV image processor EXCEL)を用いた。まず組織切片上の面像を取り込み、染色された血管内皮細胞に囲まれた血管とそれ以外の組織を2値化して血管面積の総和を計測し、組織切片上において血管面積の占める割合を血管断面積率とした。この計測を5視野で行い平均値を求め微小血管断面積率(以下MVAR)とした(Fig. 2)。

MVAR, VEGF, u-PAの発現と臨床病理学的因子、特に再発形式を中心に検討した。2群間の検定にはStudent's t-testおよび χ^2 乗検定を用い、3群以上の検定には一元配置分散分析(1 way ANOVA)後多重比較(post hoc)としてBonferroni法を用いた。また累積生存率の算出にはKaplan-Meier法を用い、統計学的解析はlogrank法またはgeneralized Wilcoxon法を用いpが0.05以下のものを有意差ありと判定し、pが0.10以下を傾向ありと判定した。

成 績

1. 各深達度におけるMVARと臨床病理学的因子の検討

MVARは最小0.6%, 最大30.2%の間に分布しており、平均11.3±7.1%(mean±SD)であった。各深達度におけるMVARの値は深達度mp症例に

Fig. 3 Relations between the depth of invasion and MVAR in gastric cancer.

There was positive correlation between the depth of invasion and MVAR.

おいて平均5.8±4.1%であり、ss症例において平均11.2±6.9%, se症例では平均15.1±6.4%であり、それぞれ3群間で解析を行ったところ、深達度が進むにつれてMVARは有意に高値となった(mp-ss間: p<0.0001, mp-se間: p<0.0001, ss-se間: p<0.0019)(Fig. 3)。

2. 再発形式とMVARの検討

再発形式をC群, R群, P群の3群に分類し各深達度におけるMVARを比較した。深達度mp群において、C群では平均値4.6±3.3%, R群は5.7±3.2%, P群では平均値10.5±3.9%とC群よりP群は有意にMVARが高値となった(p=0.0003)(Fig. 4)。

深達度ss群においてC群(28例)では平均値7.0±4.1%, R群(5例)では12.5±4.2%, P群(20

Fig. 4 Relations between recurrent types of gastric cancer and MVAR in the cases with the depth of mp invasion.

In the cases of the peritoneal relapse (P group) in gastric cancer with tumor invasion to mp.

MVAR was significantly higher than non-recurrent cases (C group). MVAR of the P group tended to be higher than that of the other recurrent cases without peritoneal relapse (R group), whereas there was no statistical significance between these groups.

Fig. 5 Relations between recurrent types of gastric cancer and MVAR in the cases with the depth of ss invasion. In the cases of the peritoneal relapse (P group) with tumor invasion to ss, the microvessel area rate was significant higher than those of non-recurrent cases (C group) and other recurrent type cases (R group).

例)は $15.9 \pm 7.3\%$ であった。P群はC群に比べ高値 ($p=0.0001$) となり、P群はまたR群に比べ有意に高値であった ($p=0.0069$) (Fig. 5)。深達度se群においてC群では平均値 $11.5 \pm 6.2\%$ 、R群は $15.8 \pm 3.9\%$ 、P群は $17.1 \pm 6.7\%$ であった。P群はC群にくらべて有意にMVARが高値となった ($p=0.0107$) (Fig. 6)。

3. 累積生存率の検討

MVARの平均値12%を境界とし12%以上をMVAR高値群 (62例)、それ未満をMVAR低値群 (49例) の2群に分類し、mp, ss, seの各群において術後累積生存率を比較してみると、mp, ssの深達度において高値群は低値群に比べて有意に術後累積生存率が不良であったが (Fig. 7, 8), se群では高値群は術後累積生存率が不良の傾向があったが有意ではなかった (Fig. 9)。

4. VEGFの染色性と再発形式との検討

各深達度別にVEGFの染色性と再発形式を検討した。VEGFの免疫組織学的発現率はmp, ss, seの深達度別では各々43%, 43%, 57%で有意差は

Fig. 6 Relations between recurrent types of gastric cancer and MVAR in the cases with the depth of se invasion.

In the cases of the peritoneal relapse (P group) with tumor invasion to se, MVAR was significantly higher than non-recurrent cases (C group).

MVAR of the P group tended to be higher than that of the other recurrent type cases (R group), whereas there was no statistical significance between these groups.

なかった。再発形式とVEGF発現との検討では深達度mpにおけるVEGF発現率はC群21%, R群50%, P群40%で、C群とP群の間に有意差を認めた ($p=0.024$)。深達度ssにおいてC群36%, R群40%, P群55%であり、P群はC群より有意に発現率が高く ($p=0.034$)、深達度seではC群45%, R群71%, P群58%であり各群間に有意差は認めなかった (Fig. 10)。

5. u-PAの染色性と再発形式の検討

各深達度別にu-PAの染色性と再発形式を検討した。u-PAの免疫組織学的発現率はmp, ss, seの各深達度別では各々34%, 34%, 59%で有意差はなかった。再発形式とu-PA発現との検討では深達度mpにおいてC群7%, R群50%, P群40%で有意差はなかった。深達度ssにおいてC群14%, R群40%, P群60%でありP群はC群より有意に発現率が高かった ($p=0.0013$)。深達度seではC群54%, R群57%, P群63%であり、非再発例にくらべて再

Fig. 7 Survival rate for MVAR in the cases with tumor invasion to mp.

The patients were divided into two groups: high MVAR ($\geq 12\%$) and low MVAR ($< 12\%$).

Survival rate was significantly worse in the patients with high MVAR than those with low MVAR. The probability value was calculated by Generalized Wilcoxon test.

Fig. 9 Survival rate for MVAR in the cases with tumor invasion to se.

The patients were divided into two groups: high MVAR ($\geq 12\%$) and low MVAR ($< 12\%$).

there was no significance between survival rate in the patients with high MVAR and those with low MVAR. The probability value was calculated by Generalized Wilcoxon test.

Fig. 8 Survival rate for MVAR in the cases with tumor invasion to ss.

The patients were divided into two groups: high MVAR ($\geq 12\%$) and low MVAR ($< 12\%$).

Survival rate was significantly worse in the patients with high MVAR than those with low MVAR. The probability value was calculated by Generalized Wilcoxon test.

発例では発現率が高くなる傾向があったが各深達度により一定しなかった (Fig. 11).

6. 癌性腹水出現までの期間とMVARの検討

深達度ssにおいて癌性腹水出現までの期間が1

年未満の早期再発群と1年以上の晩期再発群の2群に分け、それぞれのMVARについて検討した。早期再群は $21.0 \pm 6.6\%$ 、晩期再発群で $14.5 \pm 5.5\%$ と早期再発群はMVARが有意に高値であった ($p=0.0217$) (Fig. 12)。MVAR21%をこえる場合、1年以内の早期に癌性腹膜炎型再発をきたすものと推察された。

考 察

MVARを測定する意義は、血管新生の観察にあると考えられる。癌の進展に必要な形質は運動性の亢進と細胞外マトリックス¹⁰⁾の分解である。細胞外マトリックスを分解する蛋白分解酵素が転移、進展に際して癌細胞から分泌される。また分解された間質内へ成長した血管新生が成熟するためには内皮細胞の増殖、平滑筋や周細胞による被覆安定化が必要といわれている。この過程では、血管の形態が変化し透過性が亢進しているものと仮定し、漿膜下の血管の形態に着目して検討した。

既報¹¹⁾では胃癌原発巣腫瘍先進部の漿膜下層でのMVARと腹膜再発との関連性を検討した。その結果、MVARは腹膜再発と関連性が認められ、深達度とも強い相関があった。今回は更に各深達度

Fig. 10 The relations between patterns of recurrence and the expression rate of VEGF according to the depth of tumor invasion.

Fig. 11 The relations between patterns of recurrence and the expression rate of u-PA according to the depth of tumor invasion.

Fig. 12 The relations between MVAR and the period till peritoneal relapse in the cases with tumor invasion to ss.

In the early peritoneal relapse group which recurred within 1 year after operation, MVAR tended to be significantly higher than that of the late peritoneal relapse group which recurred over 1 year.

別に背景をそろえて再検討したところ, mpではC群とP群の間に有意差があり, ssではC群とP群, R群とP群の間に有意差があり, seではC群とP群の間に有意差があった。これらの成績は基本的にP群が他の2群と比べMVARが大きいことを示しており, 再発形式の指標になることを示している。またこれらの結果はse群の様に明らかに腹膜再発の危険が高い群ではなく, ss群のように治癒の可能性が高い群において再発形式を予測できるという特徴を示していた。mp群ではR群において症例数が少なかったため統計では有意差がでなかったがss群と同様の傾向であると考えられる。

累積生存率についてもMVARはmp, ssにおいて予後因子として有用であり腹膜再発が直接予後に結びつくことを示している。一方se群では腫瘍組織が明らかに腹腔内に露出しているため臨床的なMVARの意義は低くなっていると考えられた。今回, 再発形式とu-PAやVEGFの発現との関連性についての検討を行った結果では, mp群は有意差が

なく、ss群ではu-PAとVEGFの発現でいずれもC群とP群の間に有意差があり、se群ではVEGFの発現でC群とP群の間に有意差があった。しかしいずれの深達度においてもR群とP群の間に有意差のある因子はなく、腹膜再発の予想にはMVARがこれらの因子より優れていることが示唆された。

現在、腹膜再発の予測因子として術中腹腔洗浄細胞診が幅広く行われているが¹²⁾、細胞診の判定は陽性、陰性の2種であり再発までの期間 (disease free interval) を検討しているものは少ない。深達度ssにおけるP群において1年未満の早期再発群と1年以上の晩期再発群に分けて検討したところ、早期再発群においてMVARが有意に高値となることが判明した。すなわちこの結果はMVARが再発形式を予測し、加えて再発時期も予測できることを示唆するものと考えられた。今回の成績から今後の課題として迅速凍結病理検査の手法をもちいて手術終了までに漿膜下層のMVARを測定し、腹膜再発のハイリスク群(特にss群)と判定された症例では温熱水還流化学療法などの集学的治療の適応を決める良い方法となるのではないかと考えている。今後、術中細胞診の成績とあわせて検討を重ねていきたい。

結 語

進行胃癌の漿膜下層の微小血管断面積率は胃癌の腹膜再発の予測因子となる可能性が示唆された。

参考文献

- 1) 荒谷宗充, 阿部 薫, 寺島雅典: 胃癌における腫瘍血管新生に関する検討. 岩手医誌49: 405-416, 1997
- 2) Janice AN, Michelle SM, Elizabeth MM, et al: Pathogenesis of Ascites Tumor Growth: Fibrinogen Influx and Fibrin Accumulation in Tissues Lining the Peritoneal Cavity. Cancer Res 55: 369-375, 1995
- 3) Janice AN, Elizabeth MM, Kemp TH, et al: Pathogenesis of Ascites Tumor Growth: Vascular Permeability Factor, Vascular Hyperpermeability, and Ascites Fluid Accumulation. Cancer Res 55: 360-368, 1995
- 4) Janice AN, Ellen SM, Kemp TH, et al: Pathogenesis of Ascites Tumor Growth: Angiogenesis, Vascular Remodeling, and Stroma Formation in the Peritoneal Lining. Cancer Res 55: 360-368, 1995
- 5) Peter Carmeliet: Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. NATURE MEDICINE vol 6 April 2000
- 6) Cho JY, Chung HC, Noh SH, et al: High Level of urokinase-type plasminogen activator is a New Prognostic Marker in Patients with Gastric Carcinoma. Cancer 79: 878-883, 1997
- 7) 富松聡一, 市倉 隆, 玉熊正悦: ss胃癌における urokinase-type plasminogen activator と type 1 plasminogen activator inhibitor の発現—肝再発予測としての有用性. 日消外会誌28: 1662-1672, 1995
- 8) Maeda K, Yong-suk Chung, Ogawa Y, et al: Prognostic Value of Vascular Endothelial Growth Factor Expression in Gastric Carcinoma. CANCER 77: 858-868, 1996
- 9) 胃癌研究会編: 胃癌取扱規約. 改訂第12版, 金原出版, 東京, 1993
- 10) Lance A Liotta, C N Rao, Sanford H Barsky: Tumor Invasion and the Extracellular Matrix. Laboratory Investigation 49: 636-649, 1983
- 11) 西尾 知, 天野定雄, 桜井健一他: 胃癌における癌性腹水再発予測因子に関する免疫組織学的検討—血管密度, 血管断面積率, VEGFについて(第一報). Biotherapy12: 1149-1156, 1998
- 12) 中島聡總, 及川隆司, 大橋一郎他: 進行胃癌における術中腹腔細胞診の臨床的意義. 癌の臨23: 27-34, 1977