胃悪性リンパ腫の生物学的悪性度および 予後因子としての AgNORs の役割

大阪警察病院外科, 同 病理*, 国立呉病院外科**

長谷川順一 中尾 量保 仲原 正明 荻野 信夫
西田 俊朗 辻本 正彦* 濱路 政晴**

胃原発の非ホジキンリンパ腫 (以下, NHL) 31例を対象とし, nucleolar organizer regions-associated proteins (以下, AgNORs) を中心に, 細胞学的悪性度と予後の関係を検討した. AgNORs は細胞周期中の S 期分画の比率と正の相関が認められた ($p < 0.01$). 予後因子として組織型, 臨床病期, DNA ploidy, AgNORs, 手術根治度, 化学療法の有無につき単変量解析を行った結果, 臨床病期, AgNORs, 手術根治度の 3 因子に有意の差を得た ($p < 0.01$). 次にこの 3 因子について多変量解析を行った結果, AgNORs が最重要予後因子となった ($p < 0.05$). また治癒切除の 23 例について, 再発の有無で AgNORs を検討した結果, 有再発症例 (9.5 ± 0.6) は無再発症例 (5.4 ± 1.5) に比べ高値であった ($p < 0.01$). 以上より AgNORs は胃 NHL の生物学的悪性度を示す良い指標であり予後因子として有用と考えられた.

Key words: gastric non-Hodgkin's lymphoma, DNA analysis, nucleolar organizer regions-associated protein

はじめに

胃は扁桃と並んで節外性非ホジキンリンパ腫 (以下, NHL と略記) の好発部位であるが¹⁾²⁾, 胃悪性腫瘍に占める割合は, 本邦で 1%¹⁾, 欧米で 5% 程度と³⁾, 比較的低な疾患であるため, これまでその予後因子などの評価は癌腫に準じ行われることが多かった. しかし, 胃原発 NHL は化学療法あるいは放射線療法に対する感受性が高く⁴⁾, また癌腫の術後再発の最も大きな因子である腹膜播種が少ない⁵⁾など, 癌腫とは生物学的特性が異なるため, 画一的に評価することには問題がある. このため近年, 腫瘍の増殖能を反映する種々の指標を用いた解析が進められている. このうち AgNORs 染色による核内の平均黒褐色顆粒数 (以下, AgNORs count と略記) はパラフィン切片で検索可能な生物学的悪性度の指標として広く使用されている.

今回われわれは胃原発 NHL 手術例を対象に, AgNORs count を測定し, 他の予後因子と比較することにより, AgNORs count が胃原発 NHL の臨床的悪性度の指標となりうるかを retrospective に検討し

た.

対象および方法

(1) 対象

対象は 1975 年から 1992 年の 18 年間に大阪警察病院および国立呉病院で手術を施行し, 予後の明らかな胃原発 NHL 31 例で, いずれの症例も術前の化学療法は行っていなかった. 性別は男性 19 例, 女性 12 例で, 年齢は 31~74 歳 (平均 57 歳) であった.

病理組織学的検索は, その分類基準中に悪性度を加味し, 低悪性度と高悪性型に 2 大別した Kiel 分類⁶⁾に従い分類した. 対象症例の組織型は, 低悪性型: 19 例 (Lymphocytic: 3 例, Centrocytic: 7 例, Centroblastic/Centrocytic: 9 例), 高悪性型: 12 例 (Centroblastic: 11 例, Immunoblastic: 1 例) であった.

病期分類については, Naqvi らの分類⁷⁾に従い分類し, I 期 14 例, II 期 12 例, III 期 4 例, IV 期 1 例であった.

(2) 方法

パラフィン包埋ブロックから, 顕微鏡下に病巣を確認後, 同部位より AgNORs 染色用に $3\mu\text{m}$, flow cytometry 用に $50\mu\text{m}$ の切片を採取し測定に用いた.

AgNORs count の検索は Crocker らの染色法⁸⁾に

Fig. 1 AgNORs staining. Black dots in each nucleus are AgNORs.

準じ、油浸レンズ（対物×100、接眼×10）にて、核内の陽性ドット数をランダムに100核計測し、1核あたりの平均 AgNORs のドット数を求めた（**Fig. 1**）。AgNORs count の cut-off 値は生存率の単変量解析において χ^2 値が最大となる値である 8 個を用いた。

核 DNA の解析は、Schutte-Vindeloy らの方法⁹⁾¹⁰⁾に準じてトリプシンで裸核処理を行い、propidium iodide で染色、FACS-IV flow-cytometer および Cell FIT を用いヒストグラムを作成した。CV 値 8 % 以下を評価可能とし、DNA ploidy および細胞周期中の S 期分画の比率（以下、SPF と略記）を算出した。単峰性の G0/1 のみが認められる diploidy に対し、多峰性ないし、異常ピークを示した症例を aneuploidy と判定した。得られたヒストグラムの G0/1 ピークの CV 値は、 4.3 ± 1.2 (2.5~7.8%) であった。

生存率の解析方法は組織学的悪性度、臨床病期分類、AgNORs count, ploidy pattern, 手術根治度、術後化学療法の有無の計 6 因子を単変量で解析し、予後因子となる可能性がある項目を選択し多変量解析を行った。単変量解析は logrank test, 多変量解析は Cox の比例ハザード法 (SAS system, PROC PHGLM) を用いた。生存率曲線は Kaplan-Meier 法を用い求めた。有意差検定は危険率 0.05 以下を有意とした。

結 果

1. SPF と AgNORs との関連性

胃 NHL 31 例の AgNORs count は 2.5~11.1 個（平均 6.1 個）、ヒストグラムより算出した SPF は 0.9~41.0%（平均 17.6%）であった。この両者の比較を行ったところ相関係数 0.8463 ($p < 0.01$) と明らかな正の相関が認められた（**Fig. 2**）。

Fig. 2 Correlation between AgNORs count and SPF. The AgNORs count revealed a good correlation with SPF measured by flow cytometry. The equation for the regression line was: $y = 0.1634x + 3.141$.

Fig. 3 Histologic type by Kiel classification and cumulative survival

2. 単変量解析による予後解析

組織学的悪性度による比較では、3 年生存率は低悪性型 75.6%, 高悪性型 57.1% であり、高悪性型にもかかわらず 10 年以上の生存例も認められた（**Fig. 3**）。

臨床病期は III 期以上になるとその予後が極めて不良となり、3 年生存率では I 期 82.5%, II 期 75.0% に対し III 期以上は 20.0% であった ($p < 0.01$)（**Fig. 4**）。

Ploidy pattern 別の 3 年生存率は diploidy 79.0%, aneuploidy 48.0% であり、それぞれの生存率に差を認めなかった（**Fig. 5**）。

AgNORs count 8 個で 2 群に分類し、それぞれの予後と比較したところ、8 個未満の群の 3 年生存率が 79.2% であるのに対し、8 個以上の群には生存例がなく、8 個以上の群は有意に予後不良であった ($p < 0.01$)（**Fig. 6**）。

Fig. 4 Clinical stage according to Naqvi classification

Fig. 5 DNA ploidy and cumulative survival

Fig. 6 AgNORs count and cumulative survival. The survival of patients with gastric non Hodgkin's lymphoma which AgNORs count was below 8, was significantly longer than that above 8.

胃癌取扱い規約に準じ組織学的治癒切除群と非治癒切除群の比較を行ったところ、明らかに非治癒切除群の予後は不良となり、その3年生存率はそれぞれ86.1%, 14.3%であった ($p < 0.01$) (Fig. 7).

CHOP-bleomycin を主体とする術後化学療法施行

Fig. 7 Resectability and cumulative survival

Fig. 8 Chemotherapy and cumulative survival

Table 1 Three-year survival rate and clinicopathological parameters

Factor		No. of patients	3-year survival (%)	Logrank test
Histologic type	Low-grade	19	76.5	0.36
	High-grade	12	57.1	
Clinical stage	I	14	82.5	<0.01
	II	12	75.0	
	≥ III	5	20.0	
DNA ploidy	Diploidy	21	79.0	0.12
	Aneuploidy	10	48.0	
AgNORs count	< 8	26	79.2	<0.01
	≥ 8	5	0	
Resectability	Curative	23	86.1	<0.01
	Noncurative	8	14.3	
Chemotherapy	(+)	23	73.7	0.16
	(-)	8	50.0	

例、未施行例間では、3年生存率がそれぞれ73.7%, 50.0%でその予後に有意差は認められなかった (Fig. 8).

以上単変量解析による検討で、AgNORs count, 臨床病期, 手術根治度の3因子が予後因子となる可能性が示唆された (Table 1).

Table 2 Major prognostic factor for gastric non-Hodgkin's lymphoma by multivariate analysis using Cox's proportional hazard model

Factor	Beta	Chi-square	P
AgNORs count	2.5377	12.651	0.0118
Clinical stage	1.4192	4.134	0.0755
Resectability	1.4043	4.078	0.1560

Fig. 9 Comparison of AgNORs count and relapse after curative resection. Median censoring time: relapse (−) 92 months, relapse (+) 8 months.

3. 多変量解析による予後解析

単変量解析で予後因子としての可能性がもたれた 3 因子を説明変数、術後生存期間を目的変数として Cox の比例ハザード法により解析を行った結果、AgNORs count が有意な予後因子と判定された (Table 2)。

4. 治癒切除例の術後再発と AgNORs

組織学的に治癒切除しえた 23 例における AgNORs と術後再発の有無 (有再発例: 3 例, 無再発例: 20 例) を比較検討した。AgNORs は, 有再発が 9.5 ± 0.6 個, 無再発が 5.4 ± 1.5 個で, 有再発症例が有意に高値であり ($p < 0.01$), 治癒切除しえた症例であっても AgNORs が高値を示した症例は再発する可能性が高いことが判明した (Fig. 9)。

考 察

胃原発 NHL は節外性 NHL の特徴として, 全身化する前に比較的長期間局所に限局する傾向があり¹¹⁾, 癌に比べて腹膜播種が少ないこともあって⁵⁾, 外科的治療や放射線などの局所療法の対象となることが多い疾患である。その予後を左右する因子に, 腫瘍要因として組織型, 腫瘍径, リンパ節転移の有無, 臨床病期

などが, 治療要因として手術根治度, 化学療法の有無, 放射線療法などが報告されている^{3,12)~22)}, 手術根治度以外は, その予後因子としての有用性の評価は, 報告により異なり, 統一した見解は得られていない。

今回われわれは nucleolar organizer regions 関連蛋白を解析し, これまで報告されてきた他の予後因子と比較することにより, 腫瘍の生物学的悪性度および予後との関係を検討した。

NHL の組織型に関しては種々の分類が認められ, 国際的には Working formulation for clinical usage (以下, WF と略記) 分類²⁾, Kiel 分類⁶⁾, 本邦では Lymphoma Study Group (以下, LSG と略記) 分類²⁴⁾などが提唱されている。消化管原発 NHL においては組織分類上, diffuse large cell が中程度悪性型に入る WF 分類および LSG 分類よりも centroblastic type または immunoblastic type として高悪性型に入る Kiel 分類における悪性度評価がより予後に関与すると報告されているため²¹⁾, 今回われわれは Kiel 分類に基づき 2 群に分け, 比較検討した。しかしながら明らかな差を認めず, 組織型学的な悪性度評価に加え他の補助的指標の必要性が考えられた (Fig. 3, Table 1)。

NHL の病期分類は Ann Arbor 分類²⁵⁾が一般的に用いられている。しかし, この分類は, 節性 NHL を中心として考えられた分類であり腫瘍深達度, リンパ節転移の程度などが考慮されておらず, 胃原発例にそのまま適用するには問題がある¹⁴⁾¹⁷⁾。今回これら腫瘍深達度およびリンパ節転移の有無を考慮した Naqvi らの分類⁷⁾に基づき臨床病期を評価した。Naqvi らの原著によると, 胃原発例の 5 年生存率は I 期 64%, II 期 42.1%, III 期 17.4%, IV 期 12.5% と病期が進むにつれて予後不良であることが示されている。一方, 術後化学療法および放射線療法の併用により完全寛解が得られた症例では, 高悪性型の組織型を示し, かつ病期分類 II 期以上の進行例であっても 5 年生存率が 79% と高く, 進行例といえども予後は必ずしも悪くないとする報告¹⁸⁾も認められる。われわれの症例の 3 年生存率は, I 期 82.5%, II 期 75.0%, III 期以上 20.0% と Naqvi らの報告同様進行度が進むにつれて生存率は低下し, 単変量解析においても予後因子としての可能性が示唆された。

AgNORs は 1986 年に Ploton ら²⁶⁾により, 非常に簡便な改良鍍銀法を用い通常の病理組織標本でも nucleolar organizer regions 関連蛋白を検索することが可能となつて以来, 臨床研究が進められてきた。悪性

腫瘍における AgNORs 数の増加には種々の要因が推定されているが²⁷⁾、最大の要因は増殖分画の増加である。AgNORs は静止期にある細胞では核小体に一致した1個のドットとして認められ、増殖期には核小体の核内分散に伴って増加する。こうした cell cycle と AgNORs との関係は、PHA 刺激人リンパ球で確かめられている²⁸⁾。特に NHL ではその増殖性に対応した AgNORs 数の増加が見られ、SPF や Ki-67陽性細胞数とよく相関することが報告されている²⁹⁾³⁰⁾。本研究でも、パラフィン切片が適用可能な核 DNA 量解析と AgNORs を同時に検討した結果、胃 NHL 症例においても SPF と AgNORs はよく相関し、増殖能を反映することが確認された。核 DNA 量および腫瘍増殖能と予後との関係は、主に節性 NHL に関するものは認められるが³¹⁾、胃 NHL に関しては DNA 量に関するもののみで³²⁾、腫瘍増殖能からの予後解析の報告は認められない。したがって本研究では、外科的疾患と考えられる胃 NHL にもこれら生物学的悪性度の評価が予後因子として有効か否かを検討した。この際、腫瘍増殖能を反映する指標は、お互いよく相関することが確かめられたため、多変量解析を行う際、予後因子としての重みが相殺される可能性が高いという理由により、測定方法が容易な AgNORs count のみを説明変数として用いた。その結果、AgNORs count は腫瘍要因(組織学的悪性度、臨床病期分類、核 DNA 量、AgNORs) および治療要因(手術根治度、化学療法の有無)中最も予後を反映する因子であることが判明した。さらに治癒切除群においても術後再発症例は無再発症例に比べ AgNORs count が高値であり、治癒切除後といえども摘出腫瘍の AgNORs count が高い症例は、術後の徹底した補助療法および長期にわたる経過観察が必要であると考えられた。

治療要因のうち手術根治度が、重要な予後因子であることは一致した意見である¹²⁾¹⁶⁾¹⁸⁾²²⁾。われわれの検討でも、治癒切除群の3年生存率が86.1%であるのに比べ、非治癒切除群は14.3%と予後不良であった。しかし非治癒切除術後頻回の化学療法の結果、4年を経過した現在も病変の再燃なく外来にて経過観察中の症例が認められること、および多変量解析の結果手術根治度に有意差が認められなかったことより、非治癒切除症例への集学的治療の可能性および重要性が再認識された。

化学療法に関しては CHOP 療法、CHOP-bleomycin 療法などの多剤併用療法が行われ、その有効性が報告

されている¹⁹⁾²⁰⁾³³⁾。われわれも術後補助化学療法として CHOP-bleomycin 療法を主に行ってきたが、その生存率に差を認めなかった。これは今回の検討が retrospective なもので、結果的に化学療法を行わなかった症例が、全例 AgNORs count 8 個未満の腫瘍増殖能が低い症例ばかりであったためと考えられる。一方、AgNORs count が8個以上の5例に対しては、全例に術後化学療法を行っていたにもかかわらず2年以上の生存例は認めず、腫瘍増殖能の高い症例に対しては化学療法の回数および量を増やすなど、術後補助療法に工夫が必要と考えられた。

以上、胃 NHL は腫瘍増殖能を加味した組織学的悪性度診断が必要であり、その指標として AgNORs count は有用である。また胃 NHL は治癒切除群といえども AgNORs count の高い症例は、長期にわたるより厳重な経過観察と術後化学療法の複数回施行などの工夫が必要である。

文 献

- 1) 毛利 昇, 島峰徹郎: 筋外性 non-Hodgkin リンパ腫. 日臨 41: 145—153, 1983
- 2) Freemann C, Berg JW, Cutler SJ: Occurrence and prognosis of extranodal lymphomas. Cancer 29: 252—260, 1972
- 3) Shimm DS, Dosoretz DE, Anderson T et al: Primary gastric lymphoma. An analysis with emphasis on prognostic factors and radiation therapy. Cancer 52: 2044—2048, 1983
- 4) 木下 平, 福富隆志, 笹子三津留ほか: 図説, 臨床癌シリーズ No.17白血病・リンパ腫・メジカルビュー社, 東京, 1987, p176—179
- 5) 高木國夫: 消化管の悪性リンパ腫. 内科 60: 1258—1265, 1987
- 6) Lennert K, Mohri N: Histopathology and diagnosis of non-Hodgkin's lymphomas. Edited by Lennert K. Handbuch der speziellen pathologischen Anatomie und Histologie. I/3. Lymph nodes Part B. Malignant lymphomas other than Hodgkin's disease. Histochemistry. Cytology. Ultrastructure. Immunology. Springer-Verlag, New York, Heidelberg, Berlin, 1978, p111—469
- 7) Naqvi MS, Burrow L, Kark AE: Lymphoma of the gastrointestinal tract: Prognostic guides based on 162 cases. Ann Surg 170: 221—231, 1969
- 8) Schutte B, Reynder MJ, Bosman FT et al: Flow cytometric determination of DNA ploidy level in nuclei isolated from paraffin-embedded

- tissue. *Cytometry* 6 : 26—30, 1985
- 9) Vindelov LL, Christensen IL, Nissen NI: A detergenttrypsin method for the preparation of nuclei for flow cytometric DNA analysis. *Cytometry* 3 : 323—327, 1983
 - 10) Crocker J: Nucleolar organizer regions in lymphomas. *J Pathol* 51 : 111—118, 1987
 - 11) Isaacson PG, Spencer J: Malignant lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue. *Histopathology* 11 : 445—462, 1987
 - 12) 北野良博, 梅北信孝, 松峯敬夫ほか: 消化管悪性リンパ腫の治療成績. *日臨外医会誌* 51 : 1661—1667, 1990
 - 13) Lewin KJ, Ranchod M, Dorfman RF: Lymphomas of the gastro-intestinal tract. A study of 117 cases presenting with gastro-intestinal disease. *Cancer* 42 : 693—707, 1978
 - 14) Weingard DN, Decosse JJ, Sherlock P et al: Primary gastro-intestinal lymphoma —A 30—year review—. *Cancer* 49 : 1258—1265, 1982
 - 15) Filippa DA, Decosse JJ, Lieberman PH et al: Primary lymphomas of the gastro-intestinal tract. Analysis of prognostic factors with emphasis on histological type. *Am J Surg Pathol* 7 : 363—372, 1983
 - 16) Rosen CB, Heerden JA, Martin JK et al: Is an aggressive surgical approach to the patient with gastric lymphoma warranted? *Ann Surg* 205 : 634—640, 1987
 - 17) Brooks JJ, Enterline HT: Primary gastric lymphomas. A clinico-pathologic study of 58 cases with long-term follow-up and literature review. *Cancer* 51 : 701—711, 1983
 - 18) Stewart WP, Harris M, Wagstaff J et al: A prospective study of the treatment of high-grade histology non-Hodgkin's lymphoma involving the gastro-intestinal tract. *Eur J Cancer Clin Oncol* 21 : 1195—1200, 1985
 - 19) Maor MH, Maddux B, Osborne BM et al: Stages IE and IIE non-Hodgkin's lymphomas of the stomach. Comparison of treatment modalities. *Cancer* 54 : 2330—2337, 1984
 - 20) Jones RE, Willis S, Innes DJ et al: Primary gastric and management. *Am J Surg* 155 : 118—123, 1988
 - 21) Aozasa K, Ueda T, Kurata A et al: Prognostic value of histologic and clinical factors in 56 patients with gastro-intestinal lymphomas. *Cancer* 61 : 309—315, 1988
 - 22) Dragosics B, Bauer P, Radaszkiewicz T: Primary gastrointestinal non-Hodgkin's lymphomas. *Cancer* 55 : 1060—1073, 1985
 - 23) The non-Hodgkin's lymphoma pathologic classification project: National Cancer Institute sponsored study of classifications of non-Hodgkin's lymphomas: Summary and description of a Working Formulation for clinical usage. *Cancer* 49 : 2112—2135, 1982
 - 24) 須知泰山: 非ホジキンリンパ腫の新病理組織分類. 小島 瑞, 飯島宗一, 花岡正男ほか編. 新分類による悪性リンパ腫アトラス. 文光堂, 東京, 1981, p27—40
 - 25) Carbone PP, Kaplan HS, Maschhoff K et al: Report of the committee on Hodgkin's disease staging classification. *Cancer Res* 31 : 1860—1861, 1971
 - 26) Ploton D, Menager M, Jeannesson P et al: Improvement in the staining and in the visualization of the argyrophilic proteins of the nucleolar organizer region at the optical level. *Histochem J* 18 : 5—14, 1986
 - 27) Underwood JCE, Giri DD: Nucleolar organizer regions as diagnostic discriminants of malignancy (Editorial). *J Pathol* 155 : 95—96, 1988
 - 28) Field DH, Fitzgerald PH, Sin FYT: Nucleolar silver-staining patterns related to cell cycle phase and cell generation of PHA-stimulated human lymphocytes. *Cytobios* 41 : 23—33, 1984
 - 29) Crocker J, Macartney JC, Smith PJ: Correlation between DNA flow cytometric and nucleolar organizer region data in Non-Hodgkin's lymphomas. *J Pathol* 154 : 151—156, 1988
 - 30) Hall PA, Crocker J, Watts A et al: A comparison of nucleolar organizer region staining and Ki-67 immunostaining in non-Hodgkin's lymphoma. *Histopathology* 12 : 373—381, 1988
 - 31) Macartney JC, Camplejohn RC: DNA flow cytometry of non-Hodgkin's lymphomas. *Eur J Cancer* 26 : 635—637, 1990
 - 32) Joensuu H, Soderstrom K, Klemi PJ et al: Nuclear DNA content and its prognostic value in lymphoma of the stomach. *Cancer* 60 : 3042—3048, 1987
 - 33) Miller TP, Jones SE: Initial chemotherapy for clinically localized lymphomas of unfavorable histology. *Blood* 26 : 412—418, 1983

AgNORs as Prognostic Factor of Gastric Non-Hodgkin's Lymphoma

Junichi Hasegawa, Kazuyasu Nakao, Masaaki Nakahara, Nobuo Ogino, Toshiro Nishida,
Masahiro Tsujimoto* and Masayasu Hamaji**

Department of Surgery and Pathology*, Osaka Police Hospital, Departments of Surgery,
National Kure Hospital**

The utility of nucleolar organizer regions-associated proteins (AgNORs) for estimating proliferative activity and prognosis of gastric non-Hodgkin's lymphomas (NHL) was examined. Formalin-fixed and paraffin-embedded sections of 31 patients with gastric NHL were used. AgNORs count was taken as a mean dot number of 100 nuclei. The AgNORs count revealed a good correlation with S-phase fraction measured by flow cytometry ($p < 0.01$). Several histologic and clinical factors including AgNORs count were evaluated as prognostic factors by single variant analysis, and it was proved that Naqvi classification, AgNORs count and resectability were significant prognostic factors ($p < 0.01$). Among these factors, Cox's multivariate analysis indicated that AgNORs count was a most important prognostic factor ($p < 0.05$). In patients with curative surgery, AgNORs count of relapsed cases after operation were higher than that of not relapsed cases ($p < 0.01$). These results suggest that AgNORs count reflects proliferative activity and is useful as a prognostic index of gastric NHL.

Reprint requests: Junichi Hasegawa First Department of Surgery, Osaka University Medical School
2-2 Yamadaoka, Suita, 565 JAPAN