

学 位 論 文 題 名

Tumor angiogenesis in human lung adenocarcinoma

(肺腺癌における腫瘍血管新生)

学位論文内容の要旨

原発性肺癌、特に末梢発生の原発性肺腺癌では、たとえ腫瘍径が小さくても遠隔転移を認めることが稀れでなく、病理学的病期I期でも手術後再発をきたすことがある。この場合手術時すでに血行性の微小転移が存在していると考えられる。しかしこのように転移している腫瘍と転移していない腫瘍にいかなる違いがあるかは充分には解明されていない。

一方、腫瘍細胞の血行性転移の側面より考えると、原発巣における増殖、血管新生、周辺結合組織への浸潤、血管内への侵入、特定の器官内での血管内皮細胞や血小板との接着、再び基底膜を貫通して血管外への脱出と浸潤、血管形成を含む微小環境の確立、増殖という長いプロセスが考えられている。このうち血管新生の増加は、腫瘍細胞が癌巣の基底膜を越えて間質内に侵入した際に、循環系に取り込まれる機会を増加させるものと考えられている。

しかし実際の組織標本上で血管新生の程度を定量的に検討した報告は非常に少ない。これまで悪性黒色腫、乳癌、前立腺癌の組織標本において、血管新生の程度を腫瘍組織中の微小血管数として定量化し、転移、予後との関連性を検討した報告があるが、それによると血行性転移のある群では腫瘍組織中により多くの微小血管数が存在することが報告されている。しかし肺癌に関してはI期非小細胞肺癌において同様の報告があるのみである。

そこで我々は、原発性肺腺癌における腫瘍の血管新生の程度、すなわち腫瘍組織中の微小血管数と、手術後の再発、すなわち血行性転移の関連性について検討し、さらに病理学的病期やリンパ節転移との関連性についても検討を加え報告する。

II 対象と方法

1975年から1986年までに北海道大学医学部付属病院第1内科に入院し、同院第2外科にて切除された原発性肺腺癌64例のうち標本中に腫瘍組織が充分含まれていることが確認された42症例（男性19例、女性23例 平均年齢58.5歳）を対象とした。病理学的病期はI期12例、II期4例、IIIA期21例、IIIB期2例および手術時に肺内転移が指摘されたIV期3例であった。材料は手術にて切除された原発巣を10%ホルマリン固定し、パラフィン包埋した標本を使用した。4 μ mの連続切片を作成し、1枚の切片で通常のヘマトキシリン・エオジン染色を行い、組織型を判定するとともに腫瘍組織が充分含まれていることを確認して、他の連続切片で免疫組織化学的染色を施行した。なお、1例に対し1枚の切片で検討した。1次抗体として、抗ヒト第VIII因子関連抗原ウサギポリクローナル抗体（Dako社）を用い血管内皮細胞を免疫組織化学的に染色した。発色は通常のビオチン・ストレプトアビジン法（SAB法）で行った。最初に低倍率（40倍または100倍）にて標本を観察し、腫瘍内間質部分の微小血管が最も多い部分、すなわち最も血管新生の著しい部分を探した。腫瘍内血管新生はheterogenousであったが、主に腫瘍の辺縁部に多く見られた。さらに200倍視野で観察した微小血管の断面数の最高値をもってその標本の微小血管数とした。なお、これらの観察は、転移の有無などその症例に関する情報が一切無い状態で行い、1枚の標本に対し2人の観察者が行った。統計学的検討は腫瘍径と再発の有無に関してはt検定を行い、リンパ節転移の有無と再発の有無に関しては χ^2 検定を行ったが、それ以外はWilcoxon-rank sum testによって行った。生存曲線はKaplan-Meier法

によって表わし、生存曲線の有意差検定にはlog rank testによって行った。5%以下の危険率をもって統計学的有意差ありと判定した。

III 結 果

1. 微小血管数と病理学的病期、リンパ節転移の関係

対象全42例の微小血管数は、平均 $66.8 \pm SD 54.4$ 、中央値60、最低値6、最高値362であった。病理学的病期およびそれぞれのTNM因子のそれぞれが増加するにつれて微小血管数が増加する傾向が見られたが、有意差は認められなかった。手術時のリンパ節転移の有無と微小血管数の検討では、N0症例の微小血管数 62.6 ± 35.1 に対し、N1症例の微小血管数は 51.7 ± 22.2 であり、N1症例の微小血管数はむしろN0症例の微小血管数より少なく、N2症例の微小血管数は 75.4 ± 75.3 であり、N0症例の微小血管数よりやや多かったが、有意差に至らなかった。

2. 微小血管数と再発、予後の関係

手術時および手術後再発をきたした群すなわち再発群25例と、手術後5年以上再発の徴候が無く、生存している非再発群11例を比較検討した。微小血管数は再発群 75.4 ± 65.3 、非再発群 42.6 ± 26.0 であり、再発群は非再発群に比べ、有意に微小血管数が多かった ($P=0.027$)。

次に対象例を微小血管数から4群に分けて検討した。すなわち微小血管数30までをA群、31-60までをB群、61-90までをC群、91以上をD群とすると、手術時および手術後の再発率はA群33.3%、B群50.0%、C群73.3%、D群80.0%となり、微小血管数が増加するにつれて再発率が増加する傾向にあった。

この4群の生存曲線の検討では、微小血管数が多い群ほど予後は悪い傾向にあったが、有意差は認められなかった。

IV 考 案

固形腫瘍は2-3 mm³程度の大きさになるまでは自動的に増殖するが、さらに増殖を続けるためには、その内部に栄養血管の存在が必須となる。固形腫瘍は血管新生促進因子を分泌して近隣の生体血管を腫瘍組織の方へ誘導し、毛細血管の新生を促して内部に豊富な血管網を形成する。

今回我々は、肺腺癌における血管新生を手術標本を対象として、血管内皮細胞を免疫組織化学的に染色することにより検討した。その結果、組織標本中の微小血管の少ない腫瘍、すなわち血管新生が少ない腫瘍は再発率が少なく、血管新生が多い腫瘍は再発率が高いことが示された。手術後再発を認めた症例は手術時すでに血行性の微小転移が存在していたと考えられることから、血管新生が多い腫瘍は血行性転移が生じやすいことが、組織標本上で示されたことになる。この結果は、これまでの乳癌、前立腺癌、I期非小細胞肺癌の報告と一致するものである。

血行性転移には細胞外マトリックス分解酵素、接着分子、生体内の免疫機構などの他の因子が関連していることが知られている。しかし今回の我々の結果は、肺腺癌の手術標本において血管新生の程度を検討することにより再発や予後を推測することが可能であること、さらに術後の追加治療を要する患者を選択することが可能であることを示したものと考えられる。

V 結 語

肺腺癌において、腫瘍の血管新生は血行性転移の重要な因子であることが組織標本上で示された。さらに血管新生の程度は新たな予後推定因子になりうる可能性が示唆された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 川 上 義 和
副 査 教 授 加 藤 紘 之
副 査 教 授 内 野 純 一

学 位 論 文 題 名

Tumor angiogenesis in human lung adenocarcinoma

(肺腺癌における腫瘍血管新生)

目的：原発性肺腺癌においては手術後再発をきたすことが多く、この場合手術時すでに血行性の微小転移が存在していると考えられる。しかしこのように転移している腫瘍と転移していない腫瘍にいかなる違いがあるかは充分には解明されていない。一方血管新生の増加は、腫瘍細胞が癌胞巢の基底膜を越えて間質内に侵入した際に、循環系に取り込まれる機会を増加させるものと考えられている。しかし実際の組織標本上で血管新生の程度を定量的に検討した報告は非常に少ない。本論文は、原発性肺腺癌における腫瘍の血管新生の程度、すなわち腫瘍組織中の微小血管数と、血行性転移の関連性について検討したものである。

対象、方法：原発性肺腺癌42例を対象とし、手術にて切除された原発巣のホルマリン固定パラフィン包埋病理組織標本を用いた。抗ヒト第VIII因子関連抗原ウサギポリクローナル抗体(Dako社)を用い血管内皮細胞を免疫組織化学的に染色し、腫瘍内間質部分の200倍視野で観察した微小血管の断面数の最高値をもってその標本の微小血管数とした。

結果：対象全42例の微小血管数は、平均 $66.8 \pm SD 54.4$ 、中央値60、最低値6、最高値362であった。手術時肺内転移を認めた群および手術後再発をきたした群、すなわち転移、再発群25例は、手術後5年以上再発の徴候が無く、生存している非再発群11例に比べ、有意に微小血管数が多かった($p=0.027$)。また微小血管数が増加するにつれて再発率が増加し、予後は悪い傾向にあったが、有意差は認められなかった。なお手術時のリンパ節転移の有無と微小血管数の間には、明らかな関連性は

認められなかった。

結論：肺腺癌において、腫瘍の血管新生は血行性転移の重要な因子であることが組織標本上で示された。さらに肺腺癌において、血管新生の程度は新たな予後因子になりうるものと考えられた。

口答発表にあたり、加藤教授より再発群の定義および病理学的病期との関連について、内野教授より腫瘍細胞の血管侵襲との関連および血管の形態学的な性質について、小山教授より他の血行性転移関連因子との関連について、阿部（和）教授より腫瘍血管の検討法についてそれぞれ質問があった。申請者は概ね妥当に答えたと思う。

また、加藤教授、内野教授より個別に審査を受け、合格との御返事をいただいている。

これまでに原発性肺腺癌の組織標本を使って微小血管数と血行性転移の関連を直接証明した報告はなく、血管新生が血行性転移の重要な因子であること、および血管新生の程度は新たな予後因子になりうることを示したことは意義あるものと考えられ、よって本論文は博士（医学）に相当するものと認めた。