

学 位 論 文 題 名

# Prognostic impact of para-aortic lymph node micrometastasis in patients with regional node-positive biliary cancer

(所属リンパ節転移陽性胆道癌症例における  
大動脈周囲リンパ節微小転移の意義)

## 学位論文内容の要旨

【背景と目的】 広範囲なリンパ節転移は、多くの癌において予後に影響する最も重要な因子のうちの 1 つである。胆道癌において、大動脈周囲リンパ節転移陽性症例は、肝転移、腹膜転移と同様に予後が悪く、UICC の TNM 分類においては遠隔転移とみなされている。大動脈周囲リンパ節転移陽性症例は根治手術の適応とならないが、術前の画像では診断が困難で、術中の迅速病理診断に頼らざるを得ない。免疫組織化学法により、従来の haematoxylin-eosin (HE) 染色で見落とされる微小リンパ節転移巣を確認することが可能となり、近年さまざまな癌において、微小リンパ節転移の臨床的意義が報告されている。しかし、胆道癌においては報告が少なく、大動脈周囲リンパ節の微小転移と予後の関連については報告がない。本研究の目的は、免疫組織化学法に基づき、胆道癌における大動脈周囲リンパ節の微小転移の発生率および予後との関連を明らかにすることである。

【対象と方法】 1998 年 6 月から 2007 年 6 月までに、北海道大学病院第二外科で大動脈周囲リンパ節の生検・郭清を伴う切除術を施行し、組織学的に所属リンパ節転移陽性、大動脈周囲リンパ節転移陰性であった 49 例（肝内胆管癌 8 例、肝外胆管癌 31 例、胆嚢癌 10 例）を対象とした。HE 染色で転移が認められなかった大動脈周囲リンパ節検体 546 個（症例当たり 1~46 個、中央値 8 個）に対し、5  $\mu$ m の切片を 8 枚作製し、1 枚目を HE 染色、2、5、8 枚目を CAM5.2 抗体を用いた免疫組織化学染色に供した。CAM5.2 抗体は Cytokeratin7 および 8 を認識する抗体で、腺癌の検出に有用である。TNM 分類に従い、大動脈周囲リンパ節微小転移は、0.2mm 以下の isolated tumour cells (ITCs) と 0.2mm 以上の micrometastases (MCMs) に分類した。統計は Fisher's exact probability test、Mann-Whitney U test を用い、生存分析は Kaplan-Meier 法、log rank test を用いた。

【結果】 所属リンパ節転移陽性、大動脈周囲リンパ節転移陰性であった 49 例は、所属リンパ節転移陰性、大動脈周囲リンパ節転移陰性であった 60 例に比べ、有意に術後生存率不良であった ( $P < 0.001$ )。対象の 49 例において、CAM5.2 免疫染色にて大動脈周囲リンパ節 546 個中 18 個 (3%)、49 例中 9 例 (18%) で微小転移が認められた（肝内胆管癌 2 例、肝外胆管癌 5 例、胆嚢癌 2 例）。微小転移の有無と、各種臨床病理学的因子との間に有意な関連は認めなかった。ITCs のみは 10 個、4 例に認められ、MCMs は 8 個、5 例に認められた。微小転移の大きさによらず個数のみで見ると、1 個が 3 例、2 個が 3 例、3 個が 3 例であった。

微小転移陽性群（9例）と陰性群（40例）では、術後生存率に統計学的有意差が認められず( $P=0.978$ )、無再発生存率においても有意差が認められなかった( $P=0.889$ )。一方、MCMs群5例（50%生存期間12ヶ月）はITCs群4例（50%生存期間48ヶ月）に比べて有意に術後生存率不良であった( $P=0.047$ )。微小転移の個数での検討では、術後生存率に有意差が認められなかった( $P=0.830$ )。対象49例における各種臨床病理学的因子の単変量解析では、顕微鏡的切除断端陽性症例の術後生存率が有意に不良であった( $P=0.001$ )。

【考察】 対象49例のうち9例で、大動脈周囲リンパ節の微小転移が認められ、そのうち4例にITCsのみが、5例にMCMsが見出された。微小転移の検出率は、検索する切片の枚数に関連している可能性がある。Nouraらは、大腸癌のリンパ節において、4 $\mu$ mの切片1枚の検索では3.8%であった微小転移検出率が、5枚検索することで11.8%に増加したと報告している。Sasakiらは、大腸癌のリンパ節において、3 $\mu$ mの切片を13枚検索すると、9枚（27 $\mu$ m分）の検索で微小転移の検出率が一定となるため、30 $\mu$ m分の検索で十分かもしれないと示唆している。本研究では、5 $\mu$ mの切片を10 $\mu$ m間隔で3枚検索することで、1枚のみの検索では2.2%だった微小転移検出率が、3枚検索することで3.3%まで増加した。しかし、さらに検索枚数を増やせば、微小転移の検出数は増える可能性がある。

胆道癌の大動脈周囲リンパ節における微小転移については、Sasakiらが胆嚢癌において4例、Taniguchiらが肝門部胆管癌において1例、Tajimaらが胆嚢癌において1例認められたと報告しているが、いずれも予後との関連については検討されていなかった。本研究では、大動脈周囲リンパ節微小転移の有無で術後生存率に有意差は認められなかったが、対象とした所属リンパ節転移陽性症例においては、すでに重大な予後不良因子を有しているため、大動脈周囲リンパ節微小転移の影響はわずかであった可能性が考えられる。微小転移の大きさで分類した場合、MCMs群はITCs群よりも有意に術後生存率が不良であった。ITCsが転移の初期の状態であったために、大動脈周囲リンパ節の郭清が術後生存率を改善したのかもしれない。あるいは、ITCsには生物学的活動性がなく自然消滅してしまうのかもしれない、そうであるならば、大動脈周囲リンパ節郭清の意義はないことになる。この点については更なる研究が必要である。

さまざまな癌腫において、免疫組織化学的に検出されたリンパ節微小転移と予後との関連について報告されているが、リンパ節微小転移が予後規定因子になっているかは一定の見解が得られていない。これまでの検討では検索する切片の枚数、検出方法もさまざまである。加えて、元来、微小転移は免疫染色によってのみ認められる転移巣と定義されていたが、近年はUICCに従い、転移巣の大きさによってITCsとMCMsに分類するようになってきている。各臓器癌におけるリンパ節微小転移の臨床的意義を明らかにし、予後改善に生かすためには、こうした定義や検索法の標準化が望まれる。

# 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 福 田 諭

副 査 教 授 櫻 木 範 明

副 査 教 授 松 野 吉 宏

副 査 教 授 近 藤 哲

## 学 位 論 文 題 名

### Prognostic impact of para-aortic lymph node micrometastasis in patients with regional node-positive biliary cancer

(所属リンパ節転移陽性胆道癌症例における  
大動脈周囲リンパ節微小転移の意義)

免疫組織化学法により、従来の haematoxylin-eosin (HE)染色で見落とされる微小リンパ節転移巣を確認することが可能となり、近年さまざまな癌において、微小リンパ節転移の臨床的意義が報告されている。しかし、胆道癌においては報告が少なく、大動脈周囲リンパ節の微小転移と予後の関連については報告がない。本研究の目的は、免疫組織化学法に基づき、胆道癌における大動脈周囲リンパ節の微小転移の発生率および予後との関連を明らかにすることである。

対象は、北海道大学病院第二外科で大動脈周囲リンパ節の生検・郭清を伴う切除術を施行し、組織学的に所属リンパ節転移陽性、大動脈周囲リンパ節転移陰性であった 49 例とした。HE 染色で転移が認められなかった大動脈周囲リンパ節検体 546 個に対し、5 $\mu$ m の切片を 8 枚作製し、1 枚目を HE 染色、2、5、8 枚目を CAM5.2 抗体を用いた免疫組織化学染色に供した。CAM5.2 抗体は Cytokeratin7 および 8 を認識する抗体で、腺癌の検出に有用である。TNM 分類に従い、大動脈周囲リンパ節微小転移は、0.2mm 以下の isolated tumour cells (ITCs)と 0.2mm 以上の micrometastases (MCMs)に分類した。統計は Fisher's exact probability test、Mann-Whitney U test を用い、生存分析は Kaplan-Meier 法、log rank test を用いた。

所属リンパ節転移陽性、大動脈周囲リンパ節転移陰性であった 49 例は、所属リンパ節転移陰性、大動脈周囲リンパ節転移陰性であった 60 例に比べ、有意に術後生存率不良であった( $P < 0.001$ )。対象の 49 例において、CAM5.2 免疫染色にて大動脈周囲リンパ節 546 個中 18 個(3%)、49 例中 9 例(18%)で微小転移が認められた(肝内胆管癌 2 例、肝外胆管癌 5 例、胆嚢癌 2 例)。微小転移の有無と、各種臨床病理学的因子との間に有意な関連は認めなかった。ITCs のみは 10 個、4 例に認められ、MCMs は 8 個、5 例に認められた。微小転移の大きさによらず個数のみでみると、1 個が 3 例、2 個が 3 例、3 個が 3 例であった。

微小転移陽性群 (9 例) と陰性群 (40 例) では、術後生存率に統計学的有意差が認められず( $P = 0.978$ )、無再発生存率においても有意差が認められなかった( $P = 0.889$ )。一方、MCMs 群 5 例は ITCs 群 4 例に比べて有意に術後生存率不良であった( $P = 0.047$ )。微小転移の個数での検討では、術後生存率に有意差が認められなかった( $P = 0.830$ )。対象 49 例にお

ける各種臨床病理学的因子の単変量解析では、組織学的切除断端陽性症例の術後生存率が有意に不良であった( $P=0.001$ )。

微小転移の検出率は、検索する切片の枚数に依存している可能性がある。Nouraらは、大腸癌のリンパ節において、 $4\mu\text{m}$ の切片1枚の検索では3.8%であった微小転移検出率が、5枚検索することで11.8%に増加したと報告している。Sasakiらは、大腸癌のリンパ節において、 $3\mu\text{m}$ の切片を13枚検索すると、9枚( $27\mu\text{m}$ 分)の検索で微小転移の検出率が一定となるため、 $30\mu\text{m}$ 分の検索で十分かもしれないと示唆している。本研究では、 $5\mu\text{m}$ の切片を $10\mu\text{m}$ 間隔で3枚検索することで、1枚のみの検索では2.2%だった微小転移検出率が、3枚検索することで3.3%まで増加した。しかし、さらに検索枚数を増やせば、微小転移の検出数は増える可能性がある。

本研究では、大動脈周囲リンパ節微小転移の有無で術後生存率に有意差は認められなかったが、対象群は所属リンパ節転移陽性という予後不良因子を有し、大動脈周囲リンパ節微小転移の影響はわずかであった可能性がある。また大動脈周囲リンパ節微小転移の郭清が術後生存率を改善した可能性、あるいは微小転移の自然消滅の可能性も考えられ、大動脈周囲リンパ節郭清の意義については更なる研究が必要である。

口頭発表に続き、副査櫻木範明教授より CAM5.2 抗体の良性病変への反応性についてと RT-PCR 法での検討について、副査松野吉宏教授より微小転移検索の今後の臨床応用についてと ITCs 群と MCMs 群の差について、主査福田 諭教授より切片作製はどこまで追求すべきかについてと大動脈周囲リンパ節郭清の現状について、最後に副査近藤 哲教授より大動脈周囲リンパ節郭清と術中迅速病理診断の今後の必要性についての質問があった。

いずれの質問に対しても申請者はその主旨をよく理解し、自らの研究内容と文献的考察を混じえて適切に回答した。

審査員一同はこれらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ申請者が博士(医学)の学位を受けるのに十分な資格を有すると判定した。