

昭和医学会誌 第71巻 第1号 [64-70頁, 2011]

# 原著 食道扁平上皮内腫瘍および表在型癌における 毛細血管の動向

一内視鏡的所見を反映し得る病理組織学的因子の検索一

昭和大学医学部第一病理学教室

伊達 博三 大池 信之 齊藤 光次  
松尾 海 落合 康雄 野垣 航二  
保母 貴宏 高野 祐一 諸星 利男

昭和大学病院病理診断科

伊達 由子

昭和大学横浜市北部病院病理診断科

浜谷 茂治

昭和大学医学部公衆衛生学教室

小風 暁

昭和大学医学部外科学教室 (消化器・一般外科学部門)

村上 雅彦

**要約:** 材料内視鏡的技術の進歩に伴い、食道癌初期段階、すなわち上皮内腫瘍や表在型癌を含むいわゆる食道表層性腫瘍性病変 (SNLsE) の診断治療ならびに、適切な治療が可能となった。特に拡大・特殊光観察 (NBI) は表在血管構造を視認することが可能であるという理由でその有効性が注目されている。そこで著者らは、SNLsE における毛細血管の動向について病理組織学的、および生物計測学的観察をすることにより NBI システムの有効性を検討することとした。外科的に切除された SNLsE、計 16 例より 52 病変を抽出し材料とした。HE 染色の他、血管内皮マーカーである CD31 抗体を利用して免疫染色を施行、標本を作製し光学顕微鏡的観察を行った。食道癌取扱い規約に準じて非腫瘍性および腫瘍性病変を組織学的異型度とその深達度から、7 群 (G0 ~ G6) に分類した。次いでその各々の病変部位につき、上皮厚 (表面 ~ 上皮最深部までの距離)、血管径および最浅血管位置 (表面 ~ 最浅血管までの距離) について、光学顕微鏡下、マイクロメーターを利用し実測しその計測平均値を求め比較検討した。上皮厚計測値は、統計学的に組織学的異型度・深達度が増すにつれ有意に増大する傾向を示した ( $P$  for trend  $< 0.0001$ )。血管径に関し、上皮内病巣の異型度と浸潤病巣の深達度増加に従い、血管径平均値は増大し、正の関連性を認めた ( $P$  for trend  $< 0.0001$ )。最浅血管は、上皮内病巣の異型度増加にともない、より浅い (表面に近い) 位置を示し、浸潤病巣においても、深達度が粘膜下浅層にとどまる群までは、順に浅くなる傾向が見られたが、統計学的に有意差は認められなかった。SNLsE においては、上皮厚と毛細血管の血管径は、組織異型度と深達度に従い増大する傾向にあった。これらの結果は、NBI を用いた深達度診断における血管構造の変化像に矛盾しないものであった。以上より、毛細血管の動向は上皮の変化に伴った変化であり、内視鏡的所見に浅在微小血管を観察することは、SNLsE の診断治療に有効であることが示唆された。

**キーワード:** 食道扁平上皮内腫瘍, 表在型食道癌, 血管径, 組織形態計測

近年、食道を含む消化管に対する内視鏡的・外科的技術が進歩し、食道腫瘍を早期に診断し治療することが可能となった<sup>1)</sup>。とりわけ、内視鏡的技術に関しては、拡大や特殊光観察が汎用されるようになり、従来、診断が困難であった微小病変の拾い上げや腫瘍組織異型度・深達度の推定がなされている<sup>2)</sup>。内視鏡・特殊光観察として、narrow-band imaging : NBI システム<sup>3)</sup> が登場したことで、腫瘍の組織異型度や深達度とともに変化する、毛細血管の動向に衆目が集まっている。

著者らはここで、食道扁平上皮内腫瘍および表在型癌を総合し、食道表層性腫瘍性病変 (superficial neoplastic lesions of esophagus : SNLsE) と定義する。まず、SNLsE に関して、毛細血管の動向に着目し、内視鏡的所見に影響を及ぼし得る組織学的因子を推測した。そして、これら因子の形態を計測学的に定量化し、組織異型度や深達度の変化とどのように関連するか、検索することを目的とした。

## 研究方法

### 1. 材料

材料は、2008年～2009年の2年間に、昭和大学病院で外科的に切除されたSNLsEのうち、術前放射線・化学療法を施行されていない16例である。全ての材料に関して、患者からinformed consentを得た。

### 2. 方法

#### 1) 組織学的観察

材料を10%ホルマリンで24時間固定し、腫瘍部を網羅し、3mm幅で短冊状に切り出した。それらの切片をパラフィン包埋後、3 $\mu$ mに薄切してHE (hematoxylin and eosin) 染色標本を作製し、光学顕微鏡で観察した。

非腫瘍部および腫瘍部病巣に関し、組織異型度と深達度から、食道癌取扱い規約<sup>4)</sup>を加味して群別した (grade 0～grade 6 : G0～G6)。

#### 2) 免疫組織化学的方法

HE染色標本に連続する3 $\mu$ mの切片を用い、血管内皮マーカーとして、CD31免疫染色を行った。免疫染色に関しては、抗CD31抗体 (JC70A, monoclonal antibody, Dako Denmark, Glostrup, Denmark) を一次抗体とし、希釈倍率50倍、反応時間12時間で、抗マウスIgGビオチン化抗体を二

次抗体に用い、Labelled Streptavidin Biotin法で染色した。

#### 3) 組織形態計測法

毛細血管の動向を念頭に、内視鏡的所見を反映し得る組織学的因子を推測した。そして、光学顕微鏡とマイクロメーターのみを用いて計測可能な上皮厚 (epithelial thickness : ET)、血管径 (vessel caliber : VC) および最浅血管位置 (position of most shallow vessel : PMSV) の3因子を選択した。各因子とも、組織標本上、1mm幅の範囲内で計測することとした。

ET (表面～上皮最深部までの距離) に関して、HE染色標本上、病巣表面～上皮突起先端、もしくは浸潤先進部までの距離をマイクロメーターで実測した。

VCに関して、CD31免疫染色標本上、病巣表面～300 $\mu$ m以内<sup>3)</sup>に存在し、管腔構造を確認出来る血管の短径を実測した。

PMSV (表面～最浅血管までの距離) に関して、VCと同様、CD31免疫染色標本上、表面～最も浅い位置にある血管までの距離を実測した。

#### 4) 非腫瘍部および腫瘍部病巣に関する群別と計測値の比較

上記7群間で各組織学的因子の計測平均値を比較し、組織異型度・深達度と各測定項目について、トレンド検定をSASのGLM Procedureを用いて分析し、 $p < 0.05$ を有意とした。

## 結果

### 1. 形態計測を行った病巣数および血管数 (Table 1)

腫瘍部を組織学的に観察し、表面から腸管長軸方向に対し垂直な切片を選択し、計測に適した52病変を抽出し得た。全ての症例について最低2か所 (2～4か所) を用いた。腫瘍背景から、同じく計測に適し、炎症性変化に乏しい14か所を選び、対照 (非腫瘍部) とした。

腫瘍部で計測し得た血管の総数は152、非腫瘍部のそれは41であった。

### 2. 非腫瘍部および腫瘍部病変に関する群別の実際

組織学的観察でなし得た、非腫瘍部および腫瘍部病変に関する群別の実際は、以下の通りである。

Table 1 Number of lesions and vessels of each group

	G0	G1	G2	G3	G4	G5	G6	Total neoplastic lesion (G1 ~ G6)
lesion	14	3	17	17	5	2	8	52
vessel	41	8	49	50	15	6	24	152

Table 2 Mean value of each histological factors \*

	G0	G1	G2	G3	G4	G5	G6	p for trend
ET	285.7 ± 76.7	343.3 ± 66.0	322.4 ± 86.1	689.4 ± 230.0	1460.0 ± 716.2	725.0 ± 95.0	2450.0 ± 1415.4	p < 0.0001
VC	9.9 ± 2.5	10.9 ± 2.1	12.5 ± 3.2	16.1 ± 5.2	22.0 ± 6.8	22.5 ± 3.8	24.4 ± 8.9	p < 0.0001
PMSV	143.8 ± 52.7	74.2 ± 27.6	40.7 ± 64.5	37.2 ± 24.8	23.8 ± 19.6	8.8 ± 39.1	35.3 ± 30.9	p = 0.257

\* $\mu\text{m}$  (mean value  $\pm$  S.D)

Epithelial thickness: ET, Vessel caliber: VC, Position of most shallow vessel: PMSV

G0を非腫瘍部とし、G1は腫瘍細胞が上皮内にとどまり、上皮深層側1/2の範囲内で高密度な細胞増殖をみるもの。G2は同じく上皮内腫瘍で、高密度な細胞増殖が上皮全層にわたってみられるもの。G3、G4、およびG5は、それぞれ、腫瘍細胞の浸潤が、粘膜固有層、粘膜筋板および粘膜下層浅層1/3までにとどまるもの。G6は粘膜下層内で、浅層1/3を越え、深層浸潤を示すものである。

### 3. 各組織学的因子に関する計測値の比較 (Table 2)

ETに関し、G1とG2、G4とG5の計測値は逆転しており、必ずしも組織異型度や深達度に随伴した変化を示さなかった。しかし、統計学的にETは、異型度・深達度の増加にともない、延長する傾向にあった (P for trend < 0.0001)。

VCに関し、その計測値は、上皮内病巣の異型度と浸潤病巣の深達度に従い、順次、増大した。統計学的にも、VCは、異型度・深達度の増加にともない、増大する傾向にあった (P for trend < 0.0001)。

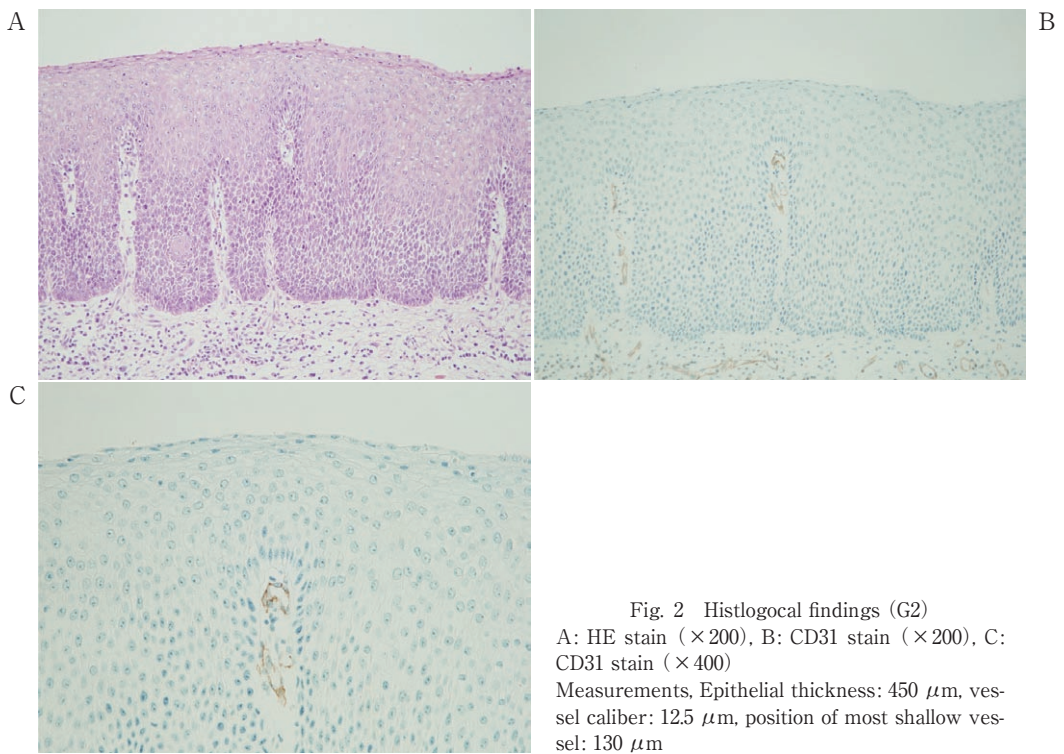
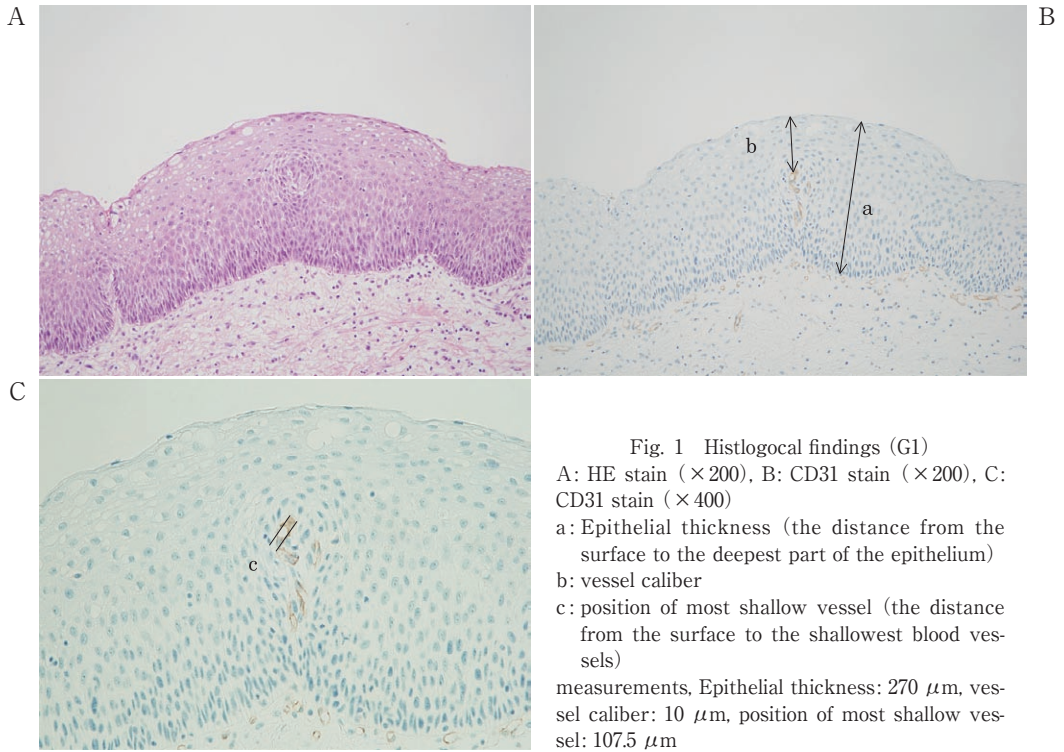
PMSVに関し、その計測値は、上皮内病巣の異型度増強にともない、より小さく (表面に近く) なった。浸潤病巣に関しても、深達が粘膜下層浅層にとどまる群 (G5) までは、順に小さくなった。しかし、統計学的に有意な傾向は認められなかった。(Fig. 1~4は、計測を施行した腫瘍部病巣の代表組織像である。)

## 考 察

内視鏡技術の進歩により、食道扁平上皮内腫瘍や表在型癌が発育する際、腫瘍に随伴する毛細血管がどのような動向を示すか、明らかになりつつある<sup>5-7)</sup>。

Kumagaiら<sup>8)</sup>は、表在型食道癌の浸潤度が増すにつれ、(超拡大)内視鏡的に表面から観察し得る毛細血管は、拡張・延長し、やがて不整な腫瘍血管に置換される傾向にあることを示している。その際、組織標本における毛細血管の口径 (VC) は、順次、増大することを検証している。著者らの検索でも、表在型食道癌など (SNLsE) の組織異型度と深達度に従い、毛細血管の口径は、順次、増大し、統計学的にも有意な傾向を認めた。著者らはさらに、毛細血管の動向に関し、内視鏡的所見を反映し得る因子として、腫瘍表面から最も浅い位置にある血管までの距離 (PMSV) を計測した。異型度や深達度が増すにつれ、最浅血管は、より表面に近付くと予想し、計測値を統計学的に解析した。G5における病巣数が少ないこともあり、有意な結果は得られなかったものの、G0~G4においてPMSVは、順に小さくなり、異型度・深達度に従い減少する可能性が考えられた。毛細血管の動向に先立ち、変化の予想される、腫瘍上皮厚 (ET) についても検索した。ETの、数値自体は、組織異型度・深達度に必ずしも随伴しなかったが、統計学的には、異型





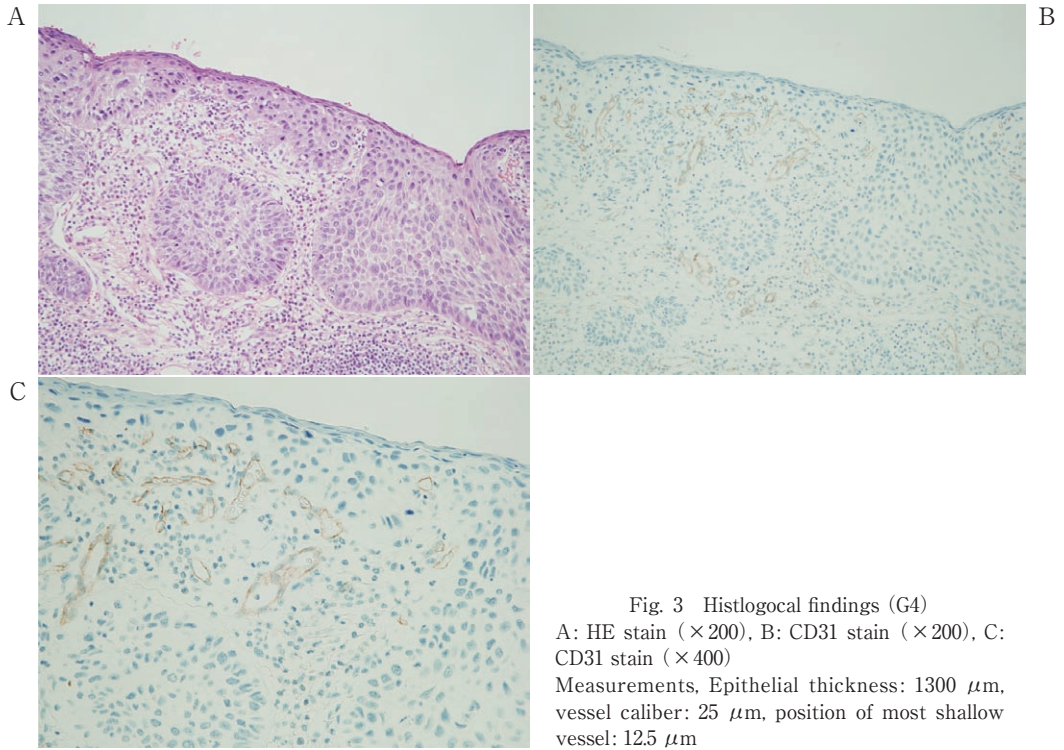


Fig. 3 Histological findings (G4)  
A: HE stain ( $\times 200$ ), B: CD31 stain ( $\times 200$ ), C:  
CD31 stain ( $\times 400$ )  
Measurements, Epithelial thickness:  $1300 \mu\text{m}$ ,  
vessel caliber:  $25 \mu\text{m}$ , position of most shallow  
vessel:  $12.5 \mu\text{m}$

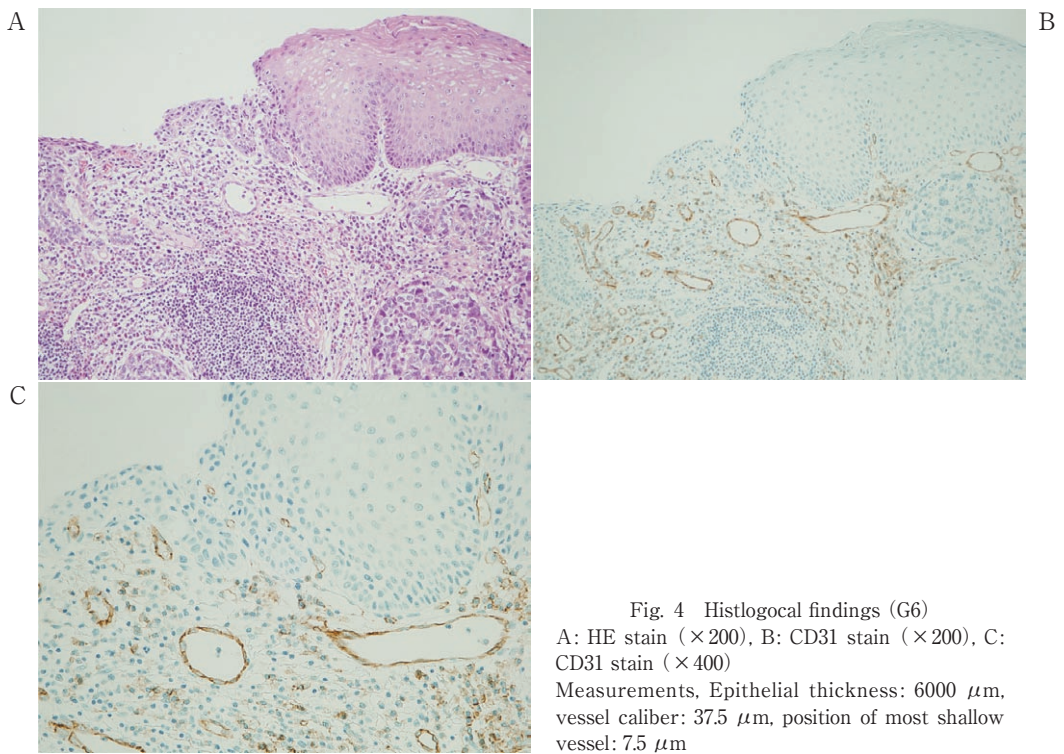


Fig. 4 Histological findings (G6)  
A: HE stain ( $\times 200$ ), B: CD31 stain ( $\times 200$ ), C:  
CD31 stain ( $\times 400$ )  
Measurements, Epithelial thickness:  $6000 \mu\text{m}$ ,  
vessel caliber:  $37.5 \mu\text{m}$ , position of most shallow  
vessel:  $7.5 \mu\text{m}$

度・深達度が増すにつれ有意に増大する傾向を示した。

井上ら<sup>9)</sup>は、内視鏡・拡大および特種光 (NBI) 観察で、食道扁平上皮内腫瘍や表在型癌の表面に視認し得る毛細血管 (intrapapillary capillary loop : IPCL) が、異型度・深達度とともに変化する様子をパターン分類している。この分類によれば、IPCL は、腫瘍の組織異型度や深達度に相関し、拡張や蛇行、口径不同などの変化を示すこととなる。腫瘍の発育・進展に伴う毛細血管の動向に関し、著者らが組織学的に検索し得た結果は、内視鏡的な IPCL 分類にも矛盾しないものと考えられる。

腫瘍の血管新生という話題に関連し、食道扁平上皮癌における微小血管密度と、腫瘍の悪性度や予後との関係について、報告がなされている<sup>10,11)</sup>。毛細血管の動向は、血管新生とは異なる概念と思われるが、著者らも、引き続き毛細血管の動向に着目し、血管径と予後などとの関係について検索を進めたい。

結論として、SNLsE においては、上皮厚と毛細血管の血管径は、組織異型度と深達度に従い増大する傾向にあった。これらの結果は、拡大内視鏡や NBI を用いた深達度診断における血管構造の変化像に矛盾しないものであった。以上より、毛細血管の動向は上皮の変化に伴った変化であり、内視鏡的所見である発赤程度や血管様構造の拡張として、内視鏡的所見を反映し得ることが示唆された。

## 文 献

- 1) Endo M and Kawano T: Detection and classification of early squamous cell esophageal cancer. *Dis Esophagus* 10 : 155-158, 1997.
- 2) Yoshida T, Inoue H, Usui S, *et al*: Narrow-band imaging system with magnifying endoscopy for superficial esophageal lesions. *Gastrointest Endosc* 59 : 288-295, 2004.
- 3) Gono K, Yamazaki K, Doguchi N, *et al*: Endoscopic observation of tissue by narrowband illumination. *Opt Rev* 10 : 211-215, 2003.
- 4) 日本食道学会編：臨床・病理食道癌取り扱い規約、第10版補訂版、金原出版、東京都、2008。
- 5) Inoue H, Honda T, Yoshida T, *et al*: Ultra-high magnification endoscopy of the normal esophageal mucosa. *Dig Endosc* 8 : 134-138, 1996.
- 6) Inoue H, Honda T, Nagai K, *et al*: Ultra-high magnification endoscopic observation of carcinoma in situ. *Dig Endosc* 9 : 16-18, 1997.
- 7) Kumagai Y, Toi M and Inoue H: Dynamism of tumour vasculature in the early phase of cancer progression: outcomes from oesophageal cancer research. *Lancet Oncol* 3 : 604-610, 2002.
- 8) Kumagai Y, Inoue H, Nagai K, *et al*: Magnifying endoscopy, stereoscopic microscopy, and the microvascular architecture of superficial esophageal carcinoma. *Endoscopy* 34 : 369-375, 2002.
- 9) 井上晴洋：NBI拡大内視鏡とIPCLパターン分類。食道疾患の内視鏡診断と治療、pp. 14-36、医学書院、東京、2009。
- 10) Porschen R, Classen S, Piontek M, *et al*: Vascularization of carcinomas of the esophagus and its correlation with tumor proliferation. *Cancer Res* 54 : 587-591, 1994.
- 11) Sarbia M, Bittinger F, Porschen R, *et al*: Tumor vascularization and prognosis in squamous cell carcinomas of the esophagus. *Anticancer Res* 16 : 2117-2122, 1996.



HISTOLOGICAL AND MORPHOMETRICAL INQUEST INTO  
ESOPHAGEAL INTRAEPITHELIAL NEOPLASIA AND  
SUPERFICIAL ESOPHAGEAL CANCER

—Search for the histopathological factors reflecting endoscopic features—

Hiromi DATE, Nobuyuki OHIKE, Koji SAITO,  
Kai MATSUO, Yasuo OCHIAI, Koji NOGAKI,  
Takahiro HOBO, Yuichi TAKANO and Toshio MOROHOSHI  
First Department of Pathology, Showa University School of Medicine

Yuko DATE

Department of Pathology, Showa University Hospital

Shigeharu HAMATANI

Department of Pathology, Showa University Northern Yokohama Hospital

Akatsuki KOKAZE

Department of Public Health, Showa University School of Medicine

Masahiko MURAKAMI

Department of Gastroenterological and General Surgery, Showa University School of Medicine

**Abstract** — According to recent, advances in endoscopic technology, including magnification and image-enhanced endoscopy, it is possible to view the surface vascular structures in esophageal squamous cell tumors and early stage esophageal cancers, so called superficial neoplastic lesions of the esophagus (SNLsE), including intraepithelial neoplasms and superficial carcinomas. The authors therefore focused on characteristic findings in capillaries in SNLsE, and considered the possible histological factors that may reflect the endoscopic findings. Using surgically resected SNLsE obtained from a total of 16 cases, the authors quantitated the metrics of the form of these factors and looked for a relationship between histological grade and invasion depth. The non-tumor components and tumor lesion components were classified into seven groups (G0–G6) on the basis of histological grade and invasion depth. Epithelial thickness, vessel caliber, and the position of most shallow vessel were measured under an optical microscope using a micrometer and the mean values were calculated; the mean of those measurements and the histological factors were compared. Epithelial thickness measurements showed a statistically significant tendency to increase. Regarding vessel caliber, the mean diameter increased and showed a positive relationship as grade of intraepithelial lesions, and invasion depth of invasive lesions increased. In SNLsE, epithelial thickness and vessel caliber of the capillaries tended to increase with histological grade and invasion depth. These results were consistent with the change in the images of vascular structures obtained using NBI for the diagnosis of invasion depth. The above suggests that the trend in the capillaries is associated with changes in the epithelium, and the degree of endoscopic findings of rubefaction and extension of vascular-like structures may reflect endoscopic findings.

**Key words:** Esophageal intraepithelial neoplasia, superficial esophageal cancer, vessel caliber, histomorphometry

〔受付：1月5日，受理：1月27日，2011〕