

## 胆道系悪性腫瘍におけるリンパ節微小転移の臨床的意義

～ リンパ節微小転移の検出方法の確立と予後との関連について～

櫻井文明，木村 理

山形大学医学部器官機能統御学講座 消化器・一般外科学分野  
(平成15年3月7日受理)

### 要 旨

緒言 :消化器癌におけるリンパ節転移の診断は通常最大断面のHematoxylin and Eosin (HE)染色で行われるため、最大断面にまで至らないような転移病巣をもつリンパ節はリンパ節転移陰性と診断される。しかしリンパ節全体の切片を作成することは事実上不可能であり、リンパ節転移陰性と診断されたなかには微小な転移がある程度の頻度で含まれていることを認識する必要がある。消化器癌ではリンパ節転移陽性症例は陰性症例に比較し予後不良であるが、リンパ節微小転移陽性の臨床的意義は不明である。一方、胆管系悪性腫瘍においてもリンパ節転移は重要な予後規定因子であるが、この領域での微小転移に関する報告はこれまで2、3の報告を見るのみである。そこで本研究では胆管系悪性腫瘍におけるリンパ節微小転移の検出頻度並びに予後との相関を検討し、その臨床的意義を明らかにすることを試みた。

方法 :対象は肝門部胆管癌36例、漿膜下浸潤胆嚢癌24例、中下部胆管癌46例で、うち最大断面のHE染色でおこなわれた通常の病理組織検索で、リンパ節転移陰性と診断された症例のそれぞれ19例、15例、10例に対し連続切片の作成をおこなった。各切片レベルにつき2枚の切片を作成し、1枚をHE染色、あとの1枚を免疫組織化学染色を施行した。各切片レベルの間隔は40 $\mu$ mとした。1つのリンパ節につき平均17.1レベルでの観察を行った。免疫組織化学染色の1次抗体には抗サイトケラチン抗体を用いた。微小転移を来しやすい臨床病理的背景因子およびその予後を検討した。

結果 :微小転移の検出率はそれぞれ31.5%、20.0%、0.0%であった。微小転移を来しやすい臨床病理的背景に特徴はなかった。微小転移を来した症例は予後不良である傾向を示した。しかし微小転移を来さなかった症例との統計的有意差は認めなかった。

結論 :連続切片の作成と免疫染色によって検出された胆管系悪性腫瘍の微小転移の臨床的意義は明らかではなかったが、微小転移陽性症例は予後不良な傾向があり、今後大規模な研究が必要であると考えられた。

キーワード : 微小転移、免疫染色、連続切片、肝門部胆管癌、胆嚢癌

## 結 言

悪性腫瘍におけるリンパ節転移は、外科治療の際の郭清の対象であると同時に不良な予後を示す指標でもある。通常、リンパ節転移の病理組織学的診断は代表1切片の断面のHematoxylin and Eosin (HE) 染色で行われるが、最大断面に達しない程度の微小な転移巣を有するリンパ節は転移陰性と診断される。このことから追加切片を増やすこと、あるいは免疫組織化学染色(免疫染色)を用いることによって、微小転移巣が検出されることは容易に想像できることであり、またその存在が実際に確認されてきた<sup>1)3)</sup>。また近年、検出頻度の高いReverse transcriptase - polymerase chain reaction (RT-PCR) を用いることによって微小リンパ節転移巣の検出率が向上した<sup>4),5)</sup>。しかしこれらのいずれの方法も偽陽性・偽陰性の問題や手技の再現性などの問題を抱えており、また微小リンパ節転移の臨床的意義に関しても今だに議論がつづいている<sup>6)-8)</sup>。

一方、胆道系悪性腫瘍である肝門部胆管癌、胆嚢癌、中下部胆管癌においてもリンパ節転移は重要な予後不良因子である<sup>9)-11)</sup>。Ogura ら<sup>12)</sup>の集計による肝外胆管癌1001例の報告によれば、切除率は82.5%であるものの手術成績は満足のいくものではない。日本胆道学会による肝門部胆管癌の集計<sup>13)</sup>ではリンパ節転移のある症例の5年生存率は13.5%であり、転移のない症例の29%に比し有意に予後不良であった。しかしリンパ節転移陰性と診断された治癒切除症例の約70%はなんらかの形態で再発しており、その原因の解明が待たれている。胆嚢癌においては壁深達度が予後に大きく影響する<sup>14)-16)</sup>。癌の深達度が粘膜内、固有筋層内にとどまるものは単純な胆嚢摘出術のみで良好な予後が得られるが、漿膜外に進展する高度進行癌の長期予後は拡大手術をおこなってもほとんど期待できない。その中間に位置する漿膜下層に進展した胆

嚢癌(ss胆嚢癌)では予後が良好なものから極めて不良であるものまで千差万別である<sup>17)</sup>。その予後因子はリンパ節転移あるいは神経周囲浸潤であると報告されている<sup>18),19)</sup>。中下部胆管癌ではリンパ節転移の予後に与える影響は上記の2つの癌より明確ではない。深達度が粘膜、線維粘膜、漿膜下層、漿膜外、他臓器浸潤と浸潤するにつれ5年生存率はそれぞれ79.2%、75.8%、34.0%、33.3%、26.2%と不良となり、壁深達度が最大の予後不良因子であるとされている。

このようにリンパ節転移に関する予後規定因子としての重みについては各部位において若干の相違がある。そのため各臓器によるリンパ節転移の術後成績へのかかわりの違いが微小転移の臨床的意義の評価を複雑にしている。また胆道系悪性腫瘍における微小リンパ節転移に関しては胆嚢癌での2~3の報告をみるのみであり<sup>20)-22)</sup>、肝門部胆管癌と中下部胆管症における報告はない。

本研究では胆道系悪性腫瘍におけるリンパ節微小転移を検索し、その臨床的意義を明らかにすることを目的とした。

## 対象と方法

### 1. 肝門部胆管癌

1989-1999年に山形大学第1外科で行われた肝門部胆管癌切除症例のうち、術後2年以上経過を観察し得た36例を対象とした。対象の年齢は48歳から79歳、平均年齢は67.8歳、男性26例、女性10例であった。TNMによるstage分類<sup>23)</sup>では、stage 1が4例、stage 2が22例、stage 3が10例であった。切除症例の術式は、拡大右葉切除17例、拡大左葉切除5例、S1・S4・S5切除5例、左葉切除1例、右葉切除1例、尾状葉切除1例、その他の区域切除4例、胆管切除2例であった。組織学的治癒度は根治度Aが18例、根治度Bが18例であった。本研究では後述のように、組織学的に転移が認められなかった

微小転移の検出方法の確立と予後との関連について

19症例から摘出されたリンパ節228個の微小転移の検索をおこなった(表1, 2)。

表1. 肝門部胆管癌・漿膜下浸潤胆嚢癌・中下部胆管癌対象症例の臨床病理所見および手術術式

	Hilar bile duct carcinoma	pT2(ss)Gallbladder carcinoma	Mid and lower bile duct carcinoma
M/F	26/10	9/15	37/9
Age [ Ave. ]	48-79 [ 56.7 ]	50-82 [ 64.7 ]	48-82 [ 67.4 ]
TNM Stage			
	4	0	19
	22	15	25
	10	9	2
	0	0	0
Surgical Procedure			
Extended rt.hepatectomy	17	Extended cholecystectomy with bile duct resection	11
Extended lt.hepatectomy	5	Extended cholecystectomy without bile duct resection	8
Rt.hepatectomy with S1*	1	Simple cholecystectomy with bile duct resection	3
Lt.hepatectomy with S1*	1	Pancreato-duodenectomy	1
Segmentectomy(S1+S4+S5)**	5	simple cholecystectomy	1
Independent caudate lobectomy	1		
Other segmentectomy	4		
Bile duct resection alone	2		
Curability			
A	18	19	21
B	18	3	21
C	0	2	4
pNo/pN1	19/17	15/9	28/18

\*S1; combined resection of the caudate lobe

\*\*S1, S4, S5; according to the classification of Cuinoud

表2. 検索リンパ節個数

	Hilar bile duct carcinoma	pT2(ss) Gallbladder carcinoma	Mid and lower bile duct carcinoma
Case (pN0)	19(19)	15(15)	10(28)
Number of LNs Lymphnodes	228	107	119
Number of sections /one node	17.7	20.7	12.7
Micrometastases /case(%)	6 (31.5%)	3 (20.0%)	0 (0%)
Micrometastases /node(%)	6 (2.6%)	3 (2.8%)	0 (0%)

## 2. 胆嚢癌

1985-2001年に山形大学第1外科で行われた装膜下浸潤(ss)胆嚢癌切除症例24例を対象とした。対象の年齢は50歳から82歳、平均年齢は64.7歳、男性9例、女性15例であった。TNMによるstage分類では、stage 2が15例、stage 3が9例であった。術式の内訳は肝床切除+胆嚢切除+胆管切除が11例、肝床切除+胆嚢切除で胆管切除を施行しなかったものが8例、肝床切除+胆嚢切除+臍頭十二指腸切除術が1例、肝床切除を行わずに胆嚢摘出+胆管切除を施行したものが3例、単純胆嚢摘出術のみが1例であった。組織学的治癒度は根治度Aが19例、根治度Bが3例、根治度Cが2例であった。組織学的に転移が認められなかった15症例の、摘出されたリンパ節107個に対し連続切片の作成と免疫染色法を用い微小転移の検索をおこなった(表1, 2)。

## 3. 中部胆管癌・下部胆管癌・広範囲胆管癌

1989-2001年に山形大学第1外科で行われた中部胆管癌21例、下部胆管癌22例、広範囲胆管癌3例、計46例の手術症例について検索した。2つ以上の領域に癌がまたがって存在した例は24例存在したが、それぞれ病変の主座をもとに分類した。下部胆管癌治癒切除症例44例を対象とした。対象の年齢は48歳から82歳、平均年齢は67.4歳、男性37例、女性9例であった。TNMによるstage分類では、stage 1が19例、stage 2が25例、stage 3が2例であった。術式の内訳は臍頭十二指腸切除術をおこなったものが38例、胆管切除を行なったものが8例であった。組織学的治癒度は根治度Aが21例、根治度Bが21例、根治度Cが4例であった。組織学的に転移が認められなかった10症例の、摘出されたリンパ節119個に対し連続切片の作成と免疫染色法を用い微小転移の検索をおこなった(表1, 2)。

## 4. 各部位の悪性腫瘍における臨床病理学的因子と通常組織学的リンパ節転移陽性症例との相関

リンパ節転移の予後への影響を他の臨床病理

組織学的因子と比較した。従来の方法で組織学的に転移が認められた33例(肝門部胆管癌17例、胆嚢癌9例、下部胆管癌18症例)の臨床病理学的所見を検討し、リンパ節転移と相関する因子の検討をおこなった。またリンパ節転移の予後への影響を他の臨床病理組織学的因子と多因子解析にて比較した。

## 5. 連続切片の作製

リンパ節転移の有無はリンパ節を最大断面で半割し、パラフィン包埋したブロックから薄切した1切片にHE染色をおこなった標本を用いて、10年以上の経験のある病理医が診断した。転移陰性と診断されたリンパ節に対し後述の方法で連続切片の作製と免疫染色をおこない微小転移の検索をおこなった。切片の厚さを4 $\mu\text{m}$ 、各切片の間隔を40 $\mu\text{m}$ とした。すなわち、各々の切片を4 $\mu\text{m}$ 間隔に薄切し、1つのレベルから最初の2枚を取り出し、1枚はHE染色用、1枚は免疫染色用とした。1つのリンパ節につき最大断面から0 $\mu\text{m}$ ~1440 $\mu\text{m}$ の範囲を検索した。つまり一つのリンパ節を4 $\mu\text{m}$ で50~360枚薄切し、そのうち上述のごとく10枚に1枚をHE染色、その隣接する1切片にサイトケラチン免疫染色を施し、残りの8枚は破棄した。標本を顕微鏡的に観察した(図1)。すなわち、一つのリンパ節について10~72枚の標本を検索した。結局リンパ節の観察枚数は、肝門部胆管癌ではHE染色標本、サイトケラチン標本をそれぞれリンパ節1個平均17.7枚、1例平均212.7枚ずつ、計4041個の観察をおこなった。また胆嚢癌ではそれぞれリンパ節1個平均20.7枚、1例平均147.9個ずつ、計2219個、下部胆管癌ではそれぞれリンパ節1個平均12.7枚、1例平均151.8個ずつ、計1518個ずつ観察した(表2)。

## 6. 免疫組織化学的染色の方法

通常免疫組織化学的手法に従った。4 $\mu\text{m}$ に薄切したパラフィン切片を脱パラフィンおよび親水化系列で処理したのち、0.1%トリプシン液にて抗原の賦活をおこなった。

## 微小転移の検出方法の確立と予後との関連について

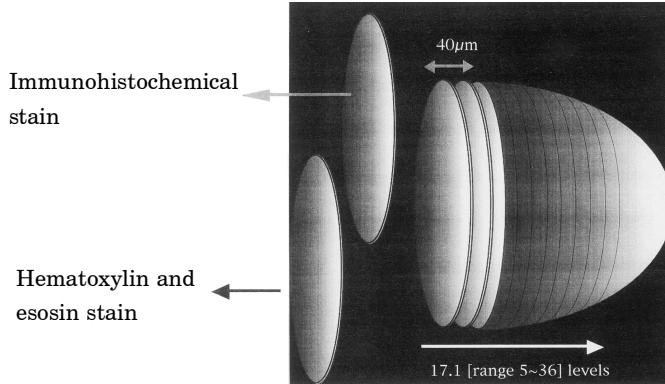


図 1 .

1. Each lymph node was serially sectioned at 40 µm intervals for multiple steps. Two sections was made at one section, one was for immunohistochemical staining to detect micro-metastases, and the other was used for hematoxylin and eosin staining to observe the morph of cyto keratin positive cells.
2. Sections were counted 17.1 pieces from each lymph node.
3. The thickness of each section was 4 µm.

0.3%過酸化水素水にて内因性ペルオキシダーゼを除去し、さらに脱脂粉乳で非特異的反応をブロックした。1次抗体には抗サイトケラチン抗体で、サトケラチン8、18を標識するマウスモノクローナル抗体複合体であるCAM5.2 (Becton Dickinson, San Jose, CA)をPBSと等倍に希釈して使用した<sup>24),25)</sup>。一晚4℃で反応させた後、2次抗体を反応させた。2次抗体にはスレプトアビディン - ビオチン複合体 (LSAB kit, DAKO, Kyoto)を用い、ペルオキシダーゼ法で標識した。発色基質はDAB tablet (武藤化薬、富山)を使用した。水洗後、メチルグリーンを使用し、核を染色し、脱水、透徹、封入した。

### 7. 微小リンパ節転移の観察と判定基準

免疫染色では上皮細胞を認識するサイトケラチンを標的とした。しかしサイトケラチンは正常な腺上皮細胞やマクロファージにも染色性があるため判定の際の偽陽性に注意した<sup>26)</sup>。すなわち免疫染色で観察されたサイトケラチン陽性細胞は、隣接するHE標本を用い細胞形態学的に観察し、それが正常に存在する細胞ではなく、癌細胞の転移であることを確認した。さらに転移巣の大きさと病巣と最大断面までの距離

を観察した。リンパ節微小転移は以下の基準で判定した。1)免疫染色にて検出された転移巣が隣接するHE標本あるいは免疫染色で細胞形態の観察が可能で、転移と診断できるもの。2)リンパ節の被膜内にあるもの。3)転移巣の大きさは規定しない。

### 8. 微小リンパ節転移をきたした症例の臨床病理学的特徴とその予後

微小転移をきたした症例の原発巣の組織型、脈管浸潤、神経周囲浸潤、深達度、50%生存期間、5年生存率、再発の有無、再発型式を検索し、微小転移のみられなかった症例との比較検討をおこなった。

### 9. 微小リンパ節転移の分布

微小転移を認めた切片の最大断面からの距離を検討した。また微小転移が観察されたリンパ節を、JSBS (Japanese Society of Biliary Surgery)によるリンパ節分類<sup>27)</sup>に従って、微小転移の分布を観察した。

### 10. リンパ節の大きさの測定

検索したリンパ節はすべて大きさを測定した。大きさは最大断面の最大径で評価した。通常の最大断面のHE染色転移陽性であったリン

リンパ節、転移陰性であったリンパ節のうち微小転移をきたしたリンパ節、転移陰性であったリンパ節のうち微小転移を認めなかったリンパ節のそれぞれの最大径を測定し、大きさの比較をおこなった。

11. リンパ節転移と病理組織学的因子との相関  
各部位の悪性腫瘍においてリンパ節転移と臨床病理学的因子との相関を検討した。

12. 統計処理

リンパ節転移の予後不良因子としての影響の程度は、各因子をCox regression modelを用い比較し、危険率5%以下を有意差ありと判定した。微小転移の認められた症例と認めなかった症例の生存曲線の比較はKaplan Meier法でおこなった。有意差検定はlog rank検定でおこない、危険率5%以下を有意差ありと判定した。リンパ節転移の有無でのリンパ節の大きさの比較は、t検定でおこなった。リンパ節転移と他の臨床病理組織学的因子の相関は、Fisher検定を用い、危険率5%以下を有意差ありと判定し

た。

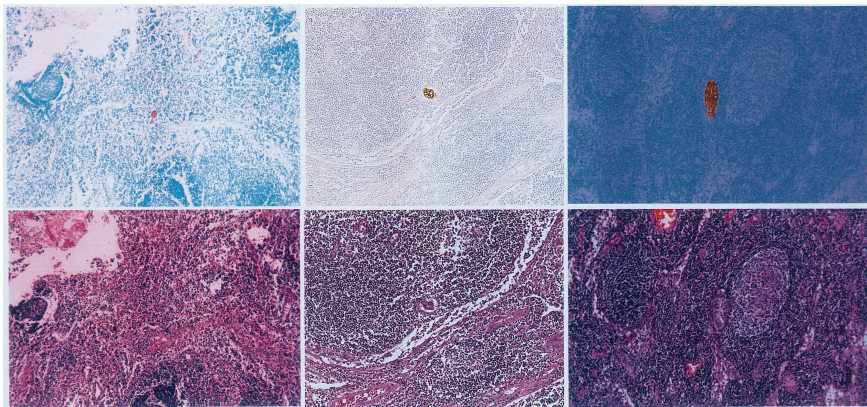
結 果

1. 肝門部胆管癌

通常の検索方法でリンパ節転移の認められた症例の5年生存率は19.4%と不良であり、転移陰性例の52.1%と比較し有意に予後不良であった。他の臨床病理学的因子と比較してもリンパ節転移は最大の予後不良因子であった(表3)。

リンパ節微小転移の検索の結果、通常の組織学的検索方法でリンパ節転移陰性と判定された19症例から抽出された228個のリンパ節のうち、6例(31.5%)、6個(2.6%)に微小転移を認めた。微小転移の認められたリンパ節を表4に示した。すなわち微小転移は肝十二指腸間膜内のリンパ節である12a1に2例、12b1に3例、12c1に1例、肝十二指腸間膜外の8pに1例認め

た。転移巣の大きさは25~640μmであった。全



a	c	e
b	d	f

図2.

a,b : Immunohistochemical detection for micrometastasis with monoclonal antibody cocktail CAM5.2 in case 1. hematoxylin and eosin staining reveals its morph was malignancy.

c,d : case 3.

e,f : case 7.

微小転移の検出方法の確立と予後との関連について

表3．肝門部胆管癌における予後規定因子

Category	Variables	P-value	Hazard ratio	95% Confidential Interval
Lymph node	+/-	0.017	3.76	1.27-11.15
Gender	Male/Female	0.058	3.65	0.95-13.87
Age	Under 69/Over 70	0.104	0.36	0.10-1.23
Histological type	Pap,Well diff./Other	0.595	1.32	0.70-38.26
Perineural invasion	+/-	0.647	1.29	0.42-3.98
Surgical margin	+/-	0.704	0.82	0.29-2.26

表4．微小転移巣のリンパ節内における分布

		LN station number*	Figure	Distribution ( $\mu\text{m}$ )#	Nest Size ( $\mu\text{m}$ )
Hilar bile duct-					
carcinoma	case 1	12b1**	cluster	280	25
	case 2	12a1**	cluster	280	30
	case 3	12**	cluster	320	80
	case 4	12b1**	cluster	200	640
	case 5	12b1**	cluster	40	110
	case 6	8p***	cluster	1400	60
pT2(ss) Gallbladder					
carcinoma	case 7	12c**	cluster	0	100
	case 8	12c**	cluster	40	80
	case 9	12b**	cluster	200	30
Mid and lower-					
bile duct carcinoma					

\*According to JSBS (Japanese Society of Biliary Systems) Classification of Biliary Tract Carcinoma (First English Edition)

\*\*pericholedocal lymph node

\*\*\*post hepatic artery lymph node

length from the section of maximum diameter

例細胞集塊 (cluster)<sup>8)</sup>を形成しており、単細胞 (single cell)では検出はされなかった。最大剖面からの転移巣の距離は、280  $\mu\text{m}$ 、280  $\mu\text{m}$ 、320  $\mu\text{m}$ 、200  $\mu\text{m}$ 、40  $\mu\text{m}$ 、1400  $\mu\text{m}$ であった (表4)。6個の微小転移のうち3個の転移巣は、HE染色による近接切片の観察では確認できず、免疫染色でのみ検出が可能であった。これらは形態学的に癌細胞であると確認した。それ以外の3個の転移巣は非常に小さいもので

あったが、注意深く観察すれば連続切片の作製とHE染色のみで癌細胞と確認できるものであった。

リンパ節微小転移の認められた症例を認められない症例の病理組織学的に比較検討したが、原発巣の組織型、脈管浸潤などに特徴的な所見はなかった。また6例の分化度は中分化5例、未分化1例であり、深達度は線維筋層 (pT1b)が1例、漿膜下層 (pT2)が4例、漿膜に

露出するもの (pT3) が 1 例であった。神経周囲浸潤は陽性が 5 例、陰性が 1 例であった (表 5)。リンパ節微小転移巢のみられた 3 症例は、術後再発をきたした。再発形式は胆管断端再発が 1 例、腹膜播種 1 例、大動脈周囲リンパ節転移 1 例であった。6 症例の 50% 生存期間は 13 カ月、5 年生存率は 31.2% であった。これは通常の組織学的検索で転移陽性と診断された 17 例の治療成績 (5 年生存率、19.7%) との差を認めなかった。微小転移を認めないリンパ節転移陰性 13 症例の 5 年生存率 57.5% との比較して予後不良な傾向があったが統計的有意差はなかった (図 3)。

2. 漿膜下層浸潤胆嚢癌 (ss胆嚢癌)

通常の検索方法でリンパ節転移が認められた症例の 5 年生存率は 12.0% と不良であり、転移陰性例の 81.5% と比較して有意に予後不良であった。他の臨床病理学的因子と比較してリンパ節転移は占拠部位 (胆嚢頸部を含むか否) と組織学的切離断端陽性と同等に予後不良因子となっていた (表 6)。

微小リンパ節転移の検索の結果、通常の組織学的検索方法でリンパ節転移陰性と判定された 15 症例から摘出された 107 個のリンパ節のうち、3 例 (20.0%)、3 個 (2.8%) に微小転移を認めた。転移巢が 1 群リンパ節、すなわち肝十二指腸間膜内にとどまる症例が 3 例のうち 2 例が 12c への転移であり、残りの 1 例も 12b 1 への転移であり、pN0 症例においては肝十二指腸間膜外の 2 群リンパ節に跳躍したリンパ節微小転移を認めなかった。転移巢の大きさは 30、80、1000 μm であった。全例細胞集塊 (cluster) を形成しており、単細胞 (single cell) での検出は認めなかった。最大断面からの転移巢の距離は、0 μm、40 μm、200 μm であった (表 4)。

リンパ節微小転移の認められた症例を認められない症例と病理組織学的に比較検討したが、原発巢の組織型、脈管浸潤などに特徴的所見はなかった。神経周囲浸潤が認められた症例は 1 例であった (表 5)。微小リンパ節転移巢のみられた 3 例中 1 症例のみ、術後再発をきたした。再発形式は肝転移であった。また 3 例の分

表 5 微小リンパ節転移症例における臨床病理所見

		Histopathologic Grade	Lymphatic Invasion	Venous Invasion	Perineural Invasion	Depth of Tumor	Outcome	Follow up (months)
Hilar bile duct carcinoma								
	case 1	mod*	+	-	-	pT2	dead	8
	case 2	mod	-	-	+	pT1b	alive	9
	case 3	por**	+	+	+	pT2	dead	15
	case 4	mod	-	-	+	pT3	alive	18
	case 5	mod	+	-	+	pT2	dead	24
	case 6	mod	+	-	+	pT2	alive	76
pT2(ss) Gallbladder carcinoma								
	case 7	pap***	+	-	-	pT2	alive	56
	case 8	mod	-	-	+	pT2	alive	16
	case 9	pap	+	+	-	pT2	dead	24
Mid and lower-bile duct carcinoma								

\* mod; moderately differentiated type

\*\* por; poorly differentiated type

\*\*\* pap; papillary differentiated type



微小転移の検出方法の確立と予後との関連について

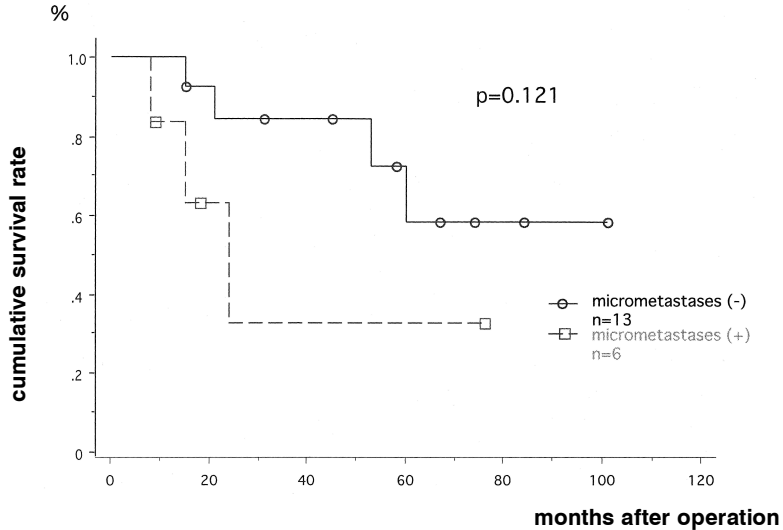


図3 . Cumulative survival rate for pN0 patients hilar cholangio-carcinoma with and without Lymph node micrometastases.

表6 . 漿膜下浸潤胆嚢癌における予後規定因子

Category	Variables	P-value	Hazard ratio	95% Confidential Interval
Location	Including neck/Not	0.013	56.90	2.36-1371.7
Surgical margin	+/-	0.017	42.58	1.93-938.5
Lymph node	+/-	0.040	0.36	1.03-534.5
Histological type	Pap,Well diff./Other	0.196	0.92	0.002-3.42
Gender	Male/Female	0.201	0.14	0.007-2.83
Age	Under 69/Over 70	0.682	1.85	0.09-35.6

化度は高分化型2例、中分化型1例であった。神経周囲浸潤は陰性が2例、陽性が1例であった。3症例の50%生存期間は24カ月、5年生存率は50.2%であった。微小転移を認めたリンパ節転移陰性群との比較では不良である傾向はあるものの統計学的有意差は認めなかった(図4)。

3. 中下部胆管癌

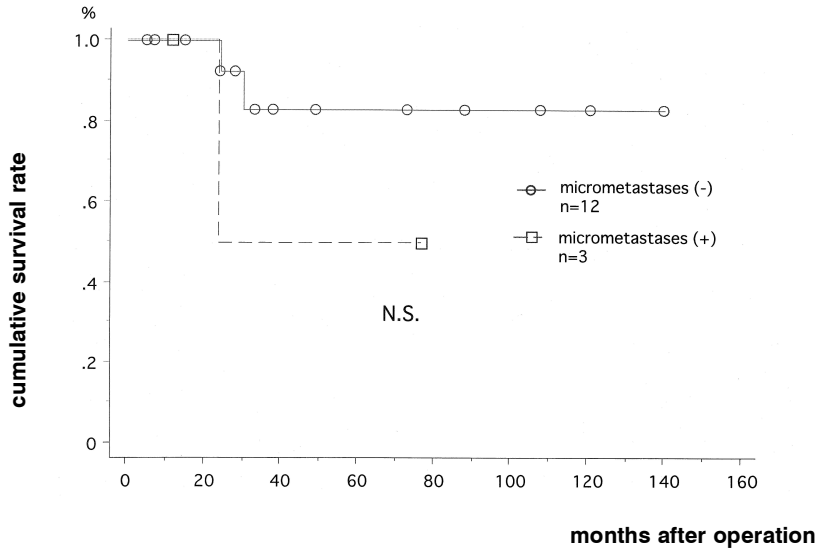
通常の検索方法でリンパ節転移の認められた症例の5年生存率は29.4%であり、転移陰性例の45.4%との差は認めなかった。他の臨床病理学的因子を検討すると深達度と組織型が予後不良因子であり、リンパ節転移の臨床的意義は低

いと考えられた。リンパ節転移陰性と診断はされた28症例のうち10例のリンパ節微小転移を検索したが検出された症例はなかった(図5)。

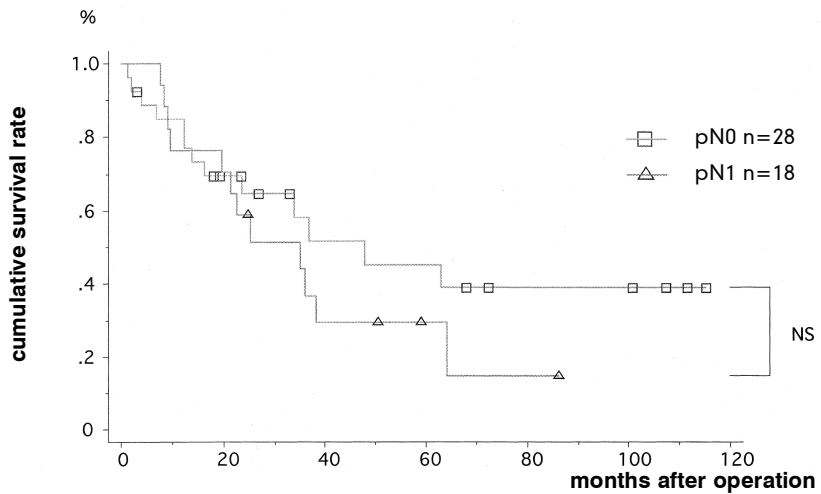
4. 各部位の悪性腫瘍における臨床病理学的因子と通常の組織学的リンパ節転移陽性症例との相関

肝門部胆管癌では通常の組織学的リンパ節転移陽性症例と相関がみられたのは神経周囲浸潤、壁深達度、リンパ管浸潤であった。また胆嚢癌では占拠部位(胆嚢頸部を含むか否)と神経周囲浸潤リンパ管浸潤、静脈浸潤、組織型であった。中下部胆管癌では占拠部位(広範か否か)とリンパ管浸潤であった(表7, 8, 9)。

櫻井, 木村



☒ 4 . Cumulative survival rate for pN0 patients pT2 gallbladder carcinoma with and without lymph node micrometastases.



☒ 5 . Cumulative survival rate for mid-and-lower bile duct carcinoma patients according to nodal status.

微小転移の検出方法の確立と予後との関連について

表 7 . 肝門部胆管癌におけるリンパ節転移と臨床病理所見との相関

	pN0 (n=19)	pN1 (n=17)	Fisher's exact test
Age (average)	66.3	68	
< 70	13	8	NS
70	6	9	
Gender			
Male	12	4	NS
Female	7	13	
Bithmuth Classification			
or	3	5	NS
or	16	11	
Major Hepatectomy			
Yes	13	12	NS
No	6	5	
Histopathologic grade			
Papillary or Well			
Differentiated	7	8	NS
Others	12	9	
Depth of Tumor Invasion			
~ pT1	5	0	p=0.03
pT2 ~	14	17	
Perineural Invasion			
Present	10	14	NS
Absent	9	3	
Microscopic Invasion of the Lymphatic System			
Present	10	22	p<0.01
Absent	9	0	
Microscopic Invasion of the Venous System			
Present	2	9	NS
Absent	17	9	

表 8 . 漿膜下浸潤胆嚢癌におけるリンパ節転移と臨床病理所見との相関

	pN0 (n=15)	pN1 (n=9)	Fisher's exact test
Age (average)	66.9	69.3	NS
< 70	12	6	
70	3	3	
Gender			
Male	12	6	NS
Female	3	3	
Location			
Include neck	3	6	p=0.03
Not	12	3	
Tumor size			
<3cm	4	3	NS
3cm	11	6	
Histopathologic grade			
Papillary or Well Differentiated	10	1	P<0.001
Others	5	8	
Perineural Invasion			
Present	2	6	P<0.01
Absent	13	3	
Microscopic Invasion of the Lymphatic System			
Present	3	6	P<0.03
Absent	12	3	
Microscopic Invasion of the Venous System			
Present	1	5	P<0.01
Absent	14	4	

微小転移の検出方法の確立と予後との関連について

表 9 . 中下部胆管癌におけるリンパ節転移と臨床病理所見との相関

	pN0 (n=28)	pN1 (n=18)	Fisher's exact test
Age (average)	66.8	70.9	NS
< 70	18	10	
70	10	8	
Gender			
Male	22	14	NS
Female	6	4	
Location*			
Diffuse	3	9	p<0.01
Not	25	9	
Histopathologic grade			
Papillary or Well Differentiated	14	7	NS
others	14	11	
Depth			
~ pT1	4	2	NS
pT2 ~	24	16	
Perineural Invasion			
Present	24	16	NS
Absent	4	2	
Microscopic Invasion of the Lymphatic System			
Present	14	15	p<0.05
Absent	14	3	
Microscopic Invasion of the Venous System			
Present	5	5	NS
Absent	23	13	

\*tumor spread to common hepatic duct

5. リンパ節の大きさ

リンパ節の最大径を計測した結果、通常の大断面のHE染色で転移陽性であったリンパ節の最大径の平均は12.1 (±5.5)mm で、転移陰性であったリンパ節のうち微小転移を認めなかったリンパ節の最大径の平均は6.8 (±4.4) mm と比較し、有意に小さかった ( p < 0.05 )。

微小転移をきたしたリンパ節の最大径の平均は13.4 (±5.5)mm でやはり、微小転移を認めなかった転移陰性リンパ節より有意に大きい傾向にあった ( p < 0.05 ) (図 6)。

考 察

癌の手術におけるリンパ節郭清の意義についてはいまだ不明の点も多く、外科学において注目を浴びている課題の一つである。しかしとくに本邦ではリンパ節郭清は癌の根治性を得る為に不可欠な操作であり今日の手術成績の向上に貢献してきたと考えられる。また切除されたリンパ節を詳細に解析することで、手術における至適な郭清範囲の決定、治療の選択、あるいは患者の予後の推定などに有用な情報を提供して

きた。しかし根治切除症例、リンパ節転移陰性症例のなかにも再発症例がみられることも事実である。

通常リンパ節転移の病理組織診断は1切片の断面のHE染色でしかおこなわれないが、追加切片を増やすことで、転移陰性と診断されたリンパ節のなかに微小な転移巣がある程度の頻度で見つかることが知られていた。リンパ節の微小転移の検索の取り組みのはじまりは古く、Saphir ら<sup>29)</sup> は1948年にリンパ節の連続切片作成後にHE染色することで30症例中10例 ( 33% ) に新たな潜在転移を発見したことを報告した。しかし、追加切片の作製に費やす膨大な労力のわりには微小転移の予後因子としての価値が定まっていないことなどの理由から、広く定着することはなかった。

1980年代からはHE染色に比較して微小リンパ節転移を検出するうえで感度の高い免疫組織化学的染色が用いられるようになった。これは上皮特異的抗原や腫瘍抗原を選択的に染色するものであるが、この方法では1万~10万個の単核細胞のなかから1個の腫瘍細胞を発見することが可能といわれている。しかし検索方法が標

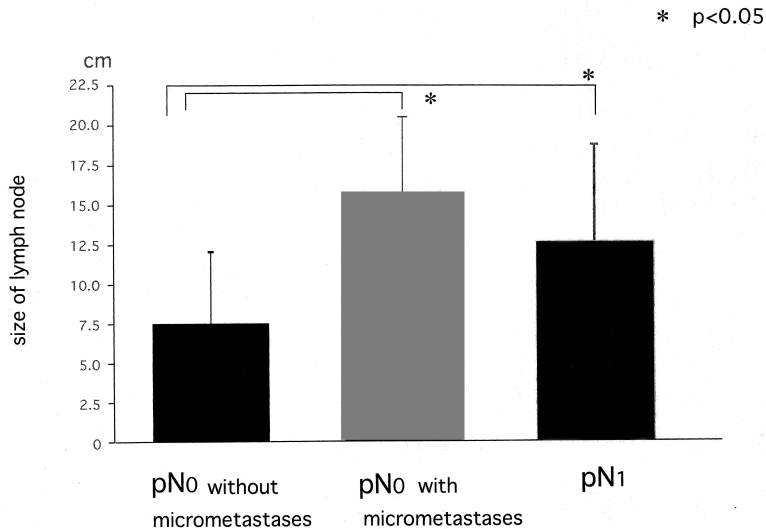


図 6 . measurement of size of lymph node  
 転移陰性リンパ節は転移陽性リンパ節、微小転移陽性リンパ節に比較して最大径が小さい。

準化しなかったこと、形質細胞などの正常細胞の“混入”、低分化細胞における偽陰性などの問題があり、免疫組織化学染色法もまた臨床応用はされていない。

1990年代からおこなわれたReverse transcriptase-polymerase chainreaction (RT-PCR)を用いた検索<sup>45)</sup>でさらに検出頻度は向上したが、免疫組織化学染色法と同様に偽陽性、偽陰性の問題を抱えている。さらにこれらの方法で検出された微小転移の臨床的意義に関しては今だに議論が続いている。たとえ微小転移の検出率があがるが、臨床的な意義が明らかで無い限り、検索することに価値があるかは不明である。したがって一般的にコンセンサスの得られる方法で臨床的な意義を解明することが急務であると考えられる。

微小転移の臨床的意義に統一した見解がないことに関して以下のような原因が考えられている。第一の理由として研究者によって検索方法が異なることである。現在のところ微小転移の検出には免疫染色とPCRが用いられるが、同じ免疫染色をとっても1次抗体の種類、作製する切片数などが異なり、検出率に差が生じる。一般に作製する切片数が多い程、検出率が高くなる傾向がある(表10)。

本研究では連続切片の作製と免疫染色の検索を組み合わせることにより、より正確な微小転移の検出に留意した。この検出方法による利点はまず偽陽性を除外できることが挙げられる。本研究ではMoriら<sup>26)</sup>などが指摘するような形質細胞やマクロファージなどの正常細胞による疑陽性で診断に苦慮したことはなかった。また胆道系悪性腫瘍においては、神経周囲浸潤が高率に認められており、本研究でも微小なリンパ節周囲の神経周囲浸潤が免疫染色で検出されることがあったが、その局在を知ることによって微小リンパ節転移の診断からは除外することができた。このことは微小転移の局在を同定できない、PCR法による検出方法に比較して免疫組織化学的染色法における1つの利点である。

反対に免疫組織化学的染色法の欠点としては、膨大な数の連続切片の検体を観察する必要があることが挙げられる。本研究でも作製した1枚目の切片に微小転移が確認されたのは1例のみであった。したがって十分な検出率を得るにはさらに労力を費やす必要がある。この点に関してはPCRによる検索方法が、半割したリンパ節全体を網羅して1回の検出行程で検索できる点で有利である。本研究ではこのような免疫染色の欠点を、合計454個のリンパ節に対し平均17.1枚の連続切片の作製を組み合わせることで補った。PCRに関してもマーカーの選定、疑陽性の判定、カットオフ値の決定、設備や試薬、PCR方法の多様性など問題点があり、各施設で独自に方法論が生まれている。

リンパ節微小転移に臨床的意義が定まらない第二の理由として症例数の問題が挙げられる。これまでの報告では単一施設での検討が多いため必然的に症例数が限られる。わずかな差でしかあらわれないような場合、有意差がないとしか判定できない。大規模な検討をおこなった報告では1990年に乳癌921例を対象にした検討があったが、微小転移を認めた83例は予後不良であったと報告されている<sup>46)</sup>。

第三の理由としてリンパ節微小転移の定義が統一されていないことがある。微小転移の定義は研究者によって異っている。リンパ節微小転移の定義に関するものではHuvos<sup>47)</sup>がHE染色で2mm間隔の連続切片を観察し、1切片のみに2mm未満の転移巣が認められた場合をmicrometastasesと定義している。AJCC(American Joint Committee on Cancer)<sup>48)</sup>では乳癌の項目にかぎり最大径が0.2mm~2.0mmの転移巣をmicrometastasisと定義した。しかし本研究では従来の検索法との相違に重点をおき、前述のような基準で微小転移と判定した。つまり微小転移の生物学的態度をあきらかにするよりもこの微小転移の検索方法と従来の検索方法がどれだけ差がでるかに重点をおいたものである。この考えはPelkey<sup>49)</sup>らが提示

表10 大腸癌における免疫組織学的検索による微小リンパ節転移の検出頻度

Author	Year	No. of Patients	Organs	Modality	Marker	Node sectioning [ number of sections ]	Patients " positive " on IHC	Effect of " positivity " on prognosis
O`Brien[ 30 ]	1981	10	colon ca.	IHC	anti-CEA	single	0.0%	n/a
Makin[ 31 ]	1989	10	colon ca.	IHC	CAM5.2	single	10.0%	ND*
Davidson[ 32 ]	1990	28	colon ca.	IHC	anti-CEA	single	2.0%	n/a
Liefel[ 33 ]	1991	27	colon ca.	IHC	CAM5.2	single	25.9%	"Adverse"
Cutait[ 34 ]	1991	46	colon ca.	IHC	anti-CEA, AE1/AE3	single	26.0%	ND
Nicholson[ 35 ]	1994	33	colon ca.	IHC	CAM5.2	single	0.0%	n/a
Greeson[ 36 ]	1994	17	colon ca.	IHC	CAM5.2	single	28.0%	"Adverse"
Oberg[ 37 ]	1998	147	colon ca.	IHC	CAM5.2	single	32.0%	ND
Isaka[ 38 ]	1999	42	colon ca.	IHC	CAM5.2	single	21.4%	"Adverse"
Haboub[ 39 ]	1992	25	colon ca.	IHC	CAM5.2	multiple	32.0%	n/a
Jeffers[ 40 ]	1994	77	colon ca.	IHC	AE1/AE3	multiple[ 3 ]	25.0%	ND
Cote[ 41 ]	1996	16	colon ca.	IHC	AE1/AE3, CAM5.2,CC49	multiple	25.0%	n/a
Adel[ 42 ]	1996	100	colon ca.	IHC	CAM5.2	multiple	39.0%	ND
Brol[ 43 ]	1997	32	colon ca.	IHC	AE1/AE3, BerEP4	multiple	19.0%	ND
Hitchcock[ 44 ]	1999	173	colon ca.	IHC	AE1/AE3, CAM5.2	multiple	16.0%	n/a
Sasaki[ 51 ]	1997	19	colon ca.	IHC	CAM5.2	multiple[ 10 ]	25% of node	"Adverse"

IHC ; immunohistochemistry, n/a ; not assessed ND ; no deference  
 "Adverse" ; adverse prognosis n/a ; not assessed CEA ; carcinoembryonic antigen,  
 CAM5.2 ; anticytokeratin antibody(Becton Dickinson,CA)  
 BerEP4 ; epithelial membrane antigen  
 AE1/AE3 ; anticytokeratin antibody(Boehringer-Mannheim,IN)  
 CC49 ; monoclonal antibody against tumor associated glycoprotein-72

した微小リンパ節転移の定義と同じ考えに基づくものである。

第四の理由には、臓器の違いによりリンパ節転移の予後規定因子としての程度に差があることが挙げられる。本研究ではまず通常の病理組織検査で診断される転移陽性リンパ節の術後の成績を検討し、リンパ節転移の予後への影響を

他の臨床病理組織学的因子と多因子解析にて比較した。その結果リンパ節転移が予後規定因子として考えられたのは肝門部胆管癌と胆嚢癌のみであり、中下部胆管癌に関しては予後規定因子としての影響は前述の癌に比較して低いものであった。つまり同じ胆道系悪性腫瘍でも、中下部胆管癌ではそのリンパ節転移の臨床的意味



の重みについては若干の相違があると考えられた。

多数の連続切片の作製にもかかわらず、リンパ節全体の切片を調べることは事実上不可能である。しかし観察切片数をふやすことで検出率が向上することも事実である。表10のごとく、切片数の多い研究では検出率が高い傾向がある。しかし多数の連続切片の作成は費用と労力がかかるため、その臨床的特徴があればその症例に対し重点的に微小リンパ節転移の検索をおこなうことで費用対効果比の向上が期待できる。そこで本研究では微小転移を来しやすい臨床病理学的背景を検討した。しかし肝門部胆管癌では漿膜下以深の深達度であること、神経周囲浸潤が認められる症例が多いこと以外は特徴的な所見はなかった。Nakajoら<sup>50)</sup>もリンパ節転移陰性胃癌67例の免疫組織学的な微小転移の検索において20.9%に微小転移を検出したがその臨床病理像(組織型、腫瘍径、血管侵襲、リンパ管侵襲)には相関がみられなかったとしている。そこで本研究では通常検索方法で診断されたリンパ節転移陽性症例の臨床病理的背景を検討した。その結果、肝門部胆管癌で相関がみられたのは神経周囲浸潤、壁深達度、リンパ管浸潤、胆嚢癌では占拠部位(胆嚢頸部を含むか否)とリンパ管浸潤と組織型。中下部胆管癌では占拠部位(広範か否か)と神経周囲浸潤であった。したがって臨床病理学的因子からは上記の因子が陽性であるリンパ節については従来のリンパ節転移の診断が陰性であっても微小転移が検出される可能性も高いものと考えられる。

さらに個々のリンパ節の大きさからの検討では微小転移陽性リンパ節は転移陰性リンパ節に比較して大きい傾向があるといえる。またSasakiら<sup>51)</sup>は27 $\mu$ mまでの検索範囲で検出率はプラトーに達したと述べており、本研究でも多数の連続切片のうち微小転移の確認された切片は、8/9個(88.9%)の微小転移が最大割面から320mm以内の切片で検出されていることから、

検索にあたっては最大割面近辺の検索が効率的であると考えられる(図7)。

胆管系悪性腫瘍の場合にはとくに同一施設での検討には限りがあるのでリンパ節微小転移の臨床的意義は大規模な研究によって確認される必要がある。とくに胆管系悪性腫瘍での検討は少なく早急な解明が必要である(表11)。一方他臓器での検討のなかには微小転移の臨床的意義をみいだしている報告もあり、これまでの診断・治療体系におおきな影響を与える可能性が高く今後の展開が注目される。

## 結 語

多数の連続切片の作製と免疫染色を併用した結果、リンパ節微小転移の診断率が向上した。微小転移をもつ症例の予後は、通常の方法で診断されるリンパ節転移の症例と転移陰性例との間でみられるような有意な差は見出せなかった。リンパ節微小転移の検出は各々の施設で独自の検出方法で検討しているのが現状である。リンパ節微小転移を来した症例は予後不良な傾向があるため、その臨床的意義を明らかにするために今後大規模な調査が必要と思われる。検出方法の統一、診断基準の確立、効率的な検出方法の模索などの課題の解決が急務である。

この稿をおえるにあたり、直接御指導、御校閲を賜りました山形大学第1外科、木村理教授に深甚なる謝意を捧げます。またご指導、ご協力いただきました第一外科、布施明助教授、医局員一同、標本作製に多大なご協力をいただきました黒沼正子技官・武田淳子技能補佐員に感謝いたします。また助言を賜りました第2病理、本山悟教授、田村元助教授、公衆衛生学、高橋英樹助教授に厚く御礼申し上げます。

本研究の一部は科学研究費補助金(平成12~13年)の援助を受けて行なわれた。

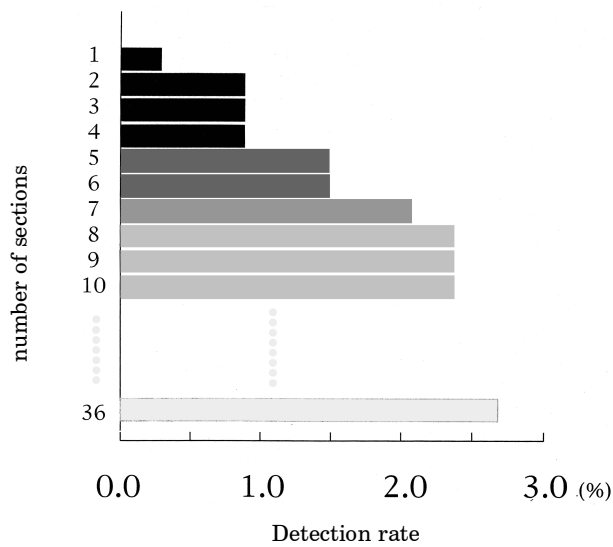


図7 . 薄切枚数と微小転移検出頻度  
最大断面から8枚目以上の切片を検索しても検出率は向上しなくなる。

表11 . 胆管系悪性腫瘍における微小リンパ節転移と予後との相関

Author	Year	No. of Patients	Organs	Modality	Marker	Patients " positive " on IHC	Effect of " positivity " on prognosis
Yokoyama[ 20 ]	1999	17	GBC	IHC	CAM5.2	29.4%	ND
Nagakura[ 21 ]	2001	27	GBC	IHC	CAM5.2	25.9%	"Adverse"
Okami[ 22 ]	2002	8	CCC,BDC,GBC	PCR	mammaglobin B CEA	25.0%	n/a

CCC ; intrahepatic cholangiocarcinoma, BDC ; bile duct cancer, GBC ; gallbladder cancer, IHC ; immunohistochemistry, n/a ; not assessed ND ; no difference "Adverse" ; adverse prognosis

文 献

- 1 . Ueno H, et al.: Clinicopathological study of intrapelvic cancer spread to the iliac area in lower rectal adenocarcinoma by serial sectioning. Br J Surg 1999; 86: 1532-1535
- 2 . Ambrosch P: Detection of nodal micrometastases in head and neck cancer by serial sectioning and immunostaining. Oncology 1996; 10: 1221-1229
- 3 . Sloane JP, et al.: The use of antisera to epithelial membrane antigen in detecting micrometastases in histological sections. Br J Cancer 1980; 42:392-398
- 4 . Hamakawa H, et al.: Genetic diagnosis of micrometastasis based on SCC antigen mRNA in cervical lymph nodes of head and neck

微小転移の検出方法の確立と予後との関連について

- cancer. *Clin Exp Metastasis* 1999;17: 593-599
- 5 . Sloane JP :Molecules and micrometastases. *Lancet* 1995; 345: 1255-1256
- 6 . Hermanek P : Classification of isolated tumor cell and micrometastasis. *Cancer*1999; 86: 2668-2673
- 7 . Ghossein R A,Bhattacharya S,Rosai J: Molecular detection of micrometastases and circulating tumor cells in solid tumors.*Clin Cancer Res*1999; 5:1950-1960
- 8 . Nakamura T, et al.: Clinical implications of lymph node micrometastasis in patients with histologically node negative (pN0) esophageal carcinoma. *J Surg Oncol* 2002; 79: 224-229
- 9 . Nimura Y, et al.: Aggressive preoperative management and extended surgery for hilar cholangiocarcinoma: Nagoya experience. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 2000; 7: 155-162
- 10 . Tsukada K, et al.: Lymph node spread from carcinoma of the gallbladder. *Cancer* 1997; 80: 661-667
- 11 . Kurosaki I, Hatakeyama K, Tsukada K: Long-term survival of patients with biliary tract cancers with lymph node involvement. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 1999; 6: 399-400
- 12 . Ogura Y, et al.: Radical operations for carcinoma of the gallbladder: present status in Japan. *World J Surg*1991; 15: 337-343
- 13 . 永川宅和 , 萱原正都 : 胆道癌治療成績からみた胆道癌治療の実態 . *胆道* 2000 ; 14 : 23-28 .
- 14 . Tsukada K, et al.: Outcome of radical surgery for carcinoma of the gallbladder according to the TNM stage. *Surgery* 1996; 120: 816-821
- 15 . Muratore A, Polastri R, Capussotti L, Radical surgery for gallbladder cancer: current options. *Eur J Surg Oncol* 2000; 26: 438-443
- 16 . Wakai T, et al.: Early gallbladder carcinoma does not warrant radical resection. *Br J Surg* 2001; 88: 675-678
- 17 . Orth K, Beger HG: Gallbladder carcinoma and surgical treatment. *Langenbecks Arch Surg* 2000; 385: 501-508
- 18 . Yamamoto M, et al.: Surgical results of operations for carcinoma of the gallbladder. *Hepatogastroenterology* 1999; 46: 1552-1556
- 19 . Yamaguchi K, et al.: Retrospective analysis of 70 operations for gallbladder carcinoma. *Br J Surg* 1997; 84: 200-204
- 20 . Yokoyama N, Shirai Y, Hatakeyama K: Immunohistochemical detection of lymph node micrometastases from gallbladder carcinoma using monoclonal anti-cytokeratin antibody. *Cancer* 1999; 85: 1465-1469
- 21 . Nagakura S, et al.:Clinical significance of lymph node micrometastasis in gallbladder carcinoma. *Surgery* 2001; 129: 704-713
- 22 . Okami J, et al.: Genetic detection for micrometastasis in lymph node of biliary tract carcinoma. *Clin Cancer Res* 2000; 6: 2326-2332
- 23 . Sobin LH, Wittekind Ch, eds.: TNM classification of Malignant Tumors. 6th ed. In: International Union Against Cancer.New York; Wiley-Liss, 2002: 81-83
- 24 . Sloane JP, Ormerod MG, Neville AM: Potential pathological application of immunocytochemical methods to the detection of micrometastases. *Cancer Res* 1980; 40: 3079-3082
- 25 . Galea MH, et al.: Occult regional lymph node metastases from breast carcinoma: immunohistological detection with antibodies CAM 5.2 and NCRC-11. *J Pathol* 1991; 165: 221-227
- 26 . Mori M, et al.: Detection of cancer micrometastases in lymph nodes by reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Cancer Res* 1995; 55: 3417-3420
- 27 . Nagakawa T, ed.: Classification of Biliary Tract Carcinoma. 1st ed. In: Japanese Society of Biliary Surgery(JSBS). Totyo; Kanehara & Co., Ltd., 2001: 7-10
- 28 . Natsugoe S, et al.: Occult lymph node metastasis in gastric cancer with submucosal invasion. *Surg Today* 1994; 24: 870-875.
- 29 . Saphir O, Amromin G: Obscure axillary lymph metastasis in carcinoma of the breast.

- Cancer 1948; 14: 1266-1271
- 30 . O'Brien MJ, Zamcheck N, Burke B, Kirkham SE, Saravis CA, Gottlieb LS: Immunocytochemical localization of carcinoembryonic antigen in benign and malignant colorectal tissues. Assessment of diagnostic value: *Am J Clin Pathol* 1981; 75: 283-290
- 31 . Makin CA, Bobrow LG, Nicholls RJ: Can immunohistology improve detection of lymph node metastases in large bowel cancer ? *Dis ColonRectum*1989; 32: 99-102
- 32 . Davidson BR, Sams VR, Styles J, Deane C, Boulos PB: Detection of occult nodal metastases in patients with colorectal carcinoma. *Cancer*1990; 65: 967-970
- 33 . Liefers GJ, Cleton-Jansen AM, van de Velde CJ, Hermans J, van Krieken JH, Cornelisse C J, Tollenaar RA: Micrometastases and survival in stage II colorectal cancer. *N Engl J Med* 1998; 339: 223-228
- 34 . Cutait R, Alves VA, Lopes LC, Cutait DE, Borges JL, Singer J, da Silva H, Goffi FS: Restaging of colorectal cancer based on the identification of lymph node micrometastases through immunoperoxidase staining of CEA and cytokeratins. *Dis Colon Rectum* 1991; 34: 917-920
- 35 . Nicholson AG, Marks CG, Cook MG: Effect on lymph node status of triple levelling and immunohistochemistry with CAM 5.2 on node negative colorectal carcinomas. *Gut* 1994; 35: 1447-1448
- 36 . Greenson JK, Isenhardt CE, Rice R, Mojzisek C, Houchens D, Martin Jr EW: Identification of occult micrometastases in pericolic lymph nodes of Dukes' B colorectal cancer patients using monoclonal antibodies against cytokeratin and CC49. Correlation with long-term survival. *Cancer*1994; 73: 563-569
- 37 . Oberg A, Stenling R, Tavelin B, Lindmark G: Are lymph node micrometastases of any clinical significance in Dukes Stages A and B colorectal cancer ? *Dis Colon Rectum*1998; 41: 1244-1249
- 38 . Isaka N, Nozue M, Doy M, Fukao K: Prognostic significance of perirectal lymph node micrometastases in Dukes' B rectal carcinoma: an immunohistochemical study by CAM5.2 . *Clin Cancer Res*1999; 5: 2065-2068
- 39 . Haboubi NY, Clark P, Kaftan SM, Schofield PF: The importance of combining xylene clearance and immunohistochemistry in the accurate staging of colorectal carcinoma. *JR Soc Med*1992; 85: 386-388
- 40 . Jeffers MD, O'Dowd GM, Mulcahy H, Stagg M, O'Donoghue DP, Toner M: The prognostic significance of immunohistochemically detected lymph node micrometastases in colorectal carcinoma. *J Pathol* 1994; 172: 183-187
- 41 . Cote RJ, Houchens DP, Hitchcock CL, Saad AD, Nines R , Greenson JK, Schneebaum S, Arnold MW, Martin Jr. EW: Intraoperative detection of occult colon cancer micrometastases using 125 I-radiolabeled monoclonal antibody CC49. *Cancer* 1996; 7: 613-620
- 42 . Adell G, Boeryd B, Franlund B, Sjudahl R, Hakansson L: Occurrence and prognostic importance of micrometastases in regional lymph nodes in Dukes' B colorectal carcinoma: an immunohistochemical study. *Eur J Surg* 1996; 162: 637-642
- 43 . Broll R, Schauer V, Schimmelpenning H, Strik M, Woltmann A, Best R, Bruch HP, Duchrow M: Prognostic relevance of occult tumor cells in lymph nodes of colorectal carcinomas: an immunohistochemical study. *Dis Colon Rectum* 1997; 40: 1465-1471
- 44 . Hitchcock CL, Sampsel J, Young DC, Martin, Jr EW, Arnold MW: Limitations with light microscopy in the detection of colorectal cancer cells. *Dis Colon Rectum* 1999; 42: 1046-1052
- 45 . Deguchi T, Doi T, Ehara H, Ito S, Takahashi Y, Nishino Y, Fujihiro S, et al.: Detection of micrometastatic prostate cancer cells in lymph nodes by reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Cancer Res* 1993; 53: 5350-5354

微小転移の検出方法の確立と予後との関連について

- 46 . Neville AM, Price KN, Gelber RD, Goldhirsch A: Axillary node micro-metastases and breast cancer. *Lancet* 1991; 337: 1110
- 47 . Huvos AG, Hutter RV, Berg JW : Significance of axillary macrometastases and micro-metastases in mammary cancer. *Ann Surg* 1971; 173: 44-46
- 48 . Frederick LG, David LP, Irvin DF, April GF, Charles MB, Daniel GH, Monica M, eds.: AJCC Cancer staging handbook 6th ed. In: American Joint Committee on Cancer. New York Berlin Heidelberg; Springer-Verlag, 2002: 260-263
- 49 . Pelkey TJ, Frierson HF, Jr., Bruns DE: Molecular and immunological detection of circulating tumor cells and micrometastases from solid tumors. *Clin Chem* 1996; 42: 1369-1381
- 50 . Nakajo A, Natsugoe S, Ishigami S, Matsumoto M, Nakashima S, Hokita S, Baba M, Takao S, Aikou T: Detection and prediction of micrometastasis in the lymph nodes of patients with pN0 gastric cancer. *Ann Surg Oncol* 2001; 8: 158-162
- 51 . Sasaki M, Watanabe H, Jass JR, Ajioka Y, Kobayashi M, Hatakeyama K: Immunoperoxidase staining for cytokeratins 8 and 18 is very sensitive for detection of occult node metastasis of colorectal cancer: a comparison with genetic analysis of K-ras. *Histopathology* 1998; 32: 199-208

## Detection of the Micrometastasis and Its Prognostic Significance in Malignant Tumors of the Hepatobiliary Systems

**Fumiaki Sakurai, Wataru Kimura**

*The First Department of Surgery, Yamagata University School of Medicine, Yamagata, Japan*

### **ABSTRACT**

**Background :** Most commonly, the status of regional lymph node was examined by only one section in maximum diameter pathologically. Therefore, the minute metastatic lesion was result in node negative. The most important disease-related prognostic factor in primary cancer of the digestive system is the status of regional lymph nodes. Recently, there are many reports about micro-metastases in various malignant tumors of the digestive systems. But it's prognostic significance remains to be clarified.

**Methods :** The lymph nodes obtained from 19 node-negative patients in hilar bile duct cancer, 15 node-negative patients in pT2 gallbladder cancer, and 10 node-negative patients in mid-and-lower bile duct cancer were sectioned at multi-level, and stained immuno-histochemically for detecting micrometastases. And then the associations between micrometastases and other clinico-pathological variables and prognosis were assessed.

**Results :** Micrometastases were present in 6 cases (31.5%) in hilar bile duct cancer, 3 cases (20.0%) in pT2 gallbladder cancer, and no case in mid-and-lower bile duct cancer. The presence of micro-metastases was unrelated to any clinicopathological factors, and they were not independent factors statically.

**Conclusions :** The presence of the micrometastases detected by serial sectioning and immunohistochemistry did not have significant prognostic value in primary cancer of the hepatobiliary system, a larger series would be found to dissolve this problem certainly.

**Key words :** micrometastases, serial section, immunohistochemistry, hilar bile duct carcinoma, gallbladder carcinoma