

15219

潰瘍性大腸炎における
癌・dysplasia のリスクに関する臨床的・病理学的検討

篠崎 大

目次

緒言	3
方法と結果	
I. 長期経過した潰瘍性大腸炎症例における癌・dysplasia 発生と臨床的因子との関連	6
目的	6
対象と方法	6
結果	10
小括	15
II. 潰瘍性大腸炎上皮における増殖細胞抗原の発現	16
背景と目的	16
対象と方法	16
結果	23
小括	45
考察	
1. 臨床的指標と腫瘍発生のリスクとの関連について	46
2. 増殖細胞抗原を用いた腫瘍発生リスクを予測する方法について	47
2-1. 基礎的検討	47
2-2. 潰瘍性大腸炎を母地とした癌・dysplasia の背景粘膜の異常	48
2-3. リスクの評価とサーベイランスへの応用	50
3. この研究における2つの方法の長所と短所について	51
まとめ	54
結論	55
文献	56

緒言

潰瘍性大腸炎は 1875 年、Sir William Wilks らによって初めて報告された炎症性腸疾患である。わが国でも近年患者数が増加し、厚生省難病統計によれば 5 万人を越え、稀な疾患であるという認識は以前より薄れつつある。その治療法としてはアミノサリチル酸（サラゾピリン、ペンタサ）とステロイドを中心とする薬物療法や白血球除去療法による血液浄化法などの保存的治療が中心になるが、これらの治療で十分な効果が上げられない場合、手術の適応となる。手術術式としては全大腸切除、回腸囊肛門吻合術が標準術式として行われ、永久的人工肛門は基本的には回避可能となった。このように、潰瘍性大腸炎の治療法はほぼ確立され、潰瘍性大腸炎患者がその疾病自体により死亡することは近年ほとんどなくなった。この経緯を反映し、欧米の population-based study でも潰瘍性大腸炎患者の生命予後はその背景人口と同等であることが示されている [1, 2]。

1925 年、Crohn と Rosenberg ら [3] が潰瘍性大腸炎と大腸癌の合併症例を初めて報告して以来、潰瘍性大腸炎に大腸癌が合併しやすいことはよく知られており、本邦報告例も既に 200 例を越えている [4]。潰瘍性大腸炎患者の死因を分析すると背景人口と比べ大腸癌による死亡率が 4.4 倍と高くなっているため [1, 5]、その早期発見・治療は患者の management 上重要な位置を占める。潰瘍性大腸炎自体により下血・下痢等の症状が発現するため、潰瘍性大腸炎に合併した大腸癌の発見は遅れる傾向にある。このためイレウスなどの症状が出現する頃には高度進行癌になっていることが多く、予後不良である。現在その対策として無症状の症例に大腸癌の早期発見のため定期的な全大腸内視鏡を行う、サーベイランス内視鏡が実施されている。サーベイラ

ンス内視鏡により発見された病変は、一般的に前癌病変である dysplasia や早期癌が多く [6] 予後良好である。しかし、長期経過した広範囲の患者に画一的に同じ頻度でサーベイランス内視鏡検査が施行されてきたため、癌や dysplasia の発見率が低く効率的でないとの指摘がある。その効率を向上させるためにはリスクの高い患者にはより高頻度に検査し、リスクの低い患者には検査の頻度を下げることが有用である。同じ潰瘍性大腸炎患者でもその活動性は個々の患者によって大きく異なり、例えば腸炎の活動性の高い患者に癌のリスクが高い可能性も考えられる。しかし、今まで潰瘍性大腸炎の臨床経過と合併する癌・dysplasia 発生との直接的な関連について十分な検討がなされていなかった。さらに潰瘍性大腸炎の治療には、通常サラゾピリンやステロイドなどの免疫抑制作用を持つ薬剤が使用される。これらの薬剤も癌・dysplasia の発生に関与している可能性がある。これらの癌・dysplasia の発生と関連し得る因子を明らかにして、サーベイランス内視鏡を高頻度に行うべき潰瘍性大腸炎の癌・dysplasia 合併ハイリスク症例を選別できるか明らかにすることを本研究の第一の目的とした。

次にサーベイランス内視鏡の問題点の一つとして、腸炎の存在が肉眼的にも組織学的にも腫瘍性病変の発見を困難にさせる [7] ことがあげられる。即ち、サーベイランス内視鏡による生検診断は炎症性異型と腫瘍性異型との鑑別が困難であることが指摘され、熟知した複数の病理医ですら同じ標本に対して異なる診断を下すことも稀ではない [8]。これに対して客観的に炎症性異型と腫瘍性異型を鑑別するための補助診断法が期待されている。

増殖細胞のマーカーとしては、DNA 量における S 期細胞分画、mitotic index、³H thymidine、5-bromo-2-prime-deoxyuridine、Ki-67、proliferating cell nuclear

antigen (PCNA)、DNA polymerase- α 、AgNOR などが知られている。Ki-67 抗原は G₀ 期を除く全ての増殖期の細胞に発現している増殖細胞のマーカーである [9, 10]。以前の抗体は凍結切片のみに使用可能であったが、クローニングから得られた MIB-1 抗原は抗原賦活化によりパラフィン切片でも染色可能になったため [11]、増殖細胞のマーカーとして一般的に広く用いられている。PCNA は 36 キロダルトンの核蛋白で、DNA polymerase- δ の補酵素であり、G₁ の後期から S 期に発現する。増殖細胞のマーカーとしてこの 2 者は特に高頻度に利用されている。通常の大腸上皮で細胞増殖が認められる部位は腺管下部 1/3 から 1/4 の細胞に限局している [12, 13]。ここで生じた細胞は腺底部から粘膜表面に移動し最終的には管腔内に脱落する。炎症性腸疾患では細胞回転が増加し [14, 15]、DNA 合成細胞の比率が上昇するため [9]、増殖帯が腺管下部から上部へと拡大が認められる [14-17]。これに対し大腸の腫瘍性上皮では基本的に全ての細胞が増殖するため、腺管の上部・下部に関わらず増殖細胞が分布している。この相違を利用し潰瘍性大腸炎の上皮で増殖細胞抗原の免疫染色を行い、増殖細胞の分布を検討することにより、潰瘍性大腸炎の大腸粘膜における腫瘍と非腫瘍との鑑別に有用な簡便な指標を設定し、増殖細胞抗原陽性細胞の分布が癌・dysplasia 発生のリスクと関連するかどうか明らかにすることを第二の目的とした。

I. 長期経過した潰瘍性大腸炎症例における

癌・dysplasia 発生と臨床的因子との関連

目的

癌・dysplasia のリスクの高い7年以上経過した全大腸炎型の潰瘍性大腸炎患者の中で、どのような臨床的因子を持つ患者が癌・dysplasia を発生しやすいハイリスク群かを明らかにする。

対象と方法

[癌・dysplasia を伴った患者（腫瘍群）]

1985年から1997年まで当科で経験した大腸癌を合併した潰瘍性大腸炎症例は15例であった。このうち1例は術後のため除外し、残りの14例の癌病変は形態学的に通常の大腸癌すなわち限局潰瘍型とは異なった形態、例えば平坦病変や絨毛状病変などの形態を示し、多発dysplasiaの併存などの所見が認められ潰瘍性大腸炎を母地とした大腸癌の特徴を満たしていた。

同時期に別の11例の潰瘍性大腸炎患者にdysplasiaが認められた。このうち、1例はUC-IIIが一回のみ平坦粘膜に認められたのみで再現性がなかったため、確実なdysplasiaでないと判断し除外した。また、8例は通常の大腸腺腫に見られるような有茎性または無茎性の隆起として認められたものであり、いずれも年齢が50歳以

上で1例を除き全例で罹病期間が7年未満であったため、通常の腺腫が潰瘍性大腸炎患者に偶然合併したと考え除外した。残りの2例を対象とした。

以上、癌症例14例と dysplasia 症例2例をあわせて腫瘍群とした。

[癌・dysplasia の認められなかった患者（対照群）]

1985年から1997年8月までに東京大学第一外科を受診した350例の潰瘍性大腸炎患者のうち、長期経過した全大腸炎型で、打ち切り時点とその2年前までとの間に内視鏡を行い癌・dysplasia がないことを確認できた61症例を対照群とした。350例のうち16例は大腸癌か dysplasia を合併しており、95例は既に腸切除を受けており、124例は左側大腸炎型か直腸炎型であった。また、35例については長期（発症後7年以上）経過を見ず、19例は内視鏡的に癌・dysplasia のないことが確認されなかったため除外症例となった。

[データ集積]

腫瘍群と対照群の患者について、臨床記録から retrospective に以下の情報を得た。

1. 家族歴：第1、2親等の血縁者に大腸癌があるか否かにより、陽性（+）または陰性（-）に分類した。
2. 打ち切り時年齢：腫瘍群は癌・dysplasiaの最初の診断時年齢とした。対照群は1997年8月時点の年齢か、もし患者が1997年8月に受診していなければ、最終外来通院時の年齢とした。罹病期間は打ち切り時年齢から発症年齢を引くことにより計算した。
3. 潰瘍性大腸炎の活動性は以下の因子により評価した。
 - a. 難治性：厚生省研究班の基準[18]によった。
 - b. 重症発作：過去に重症発作が認められるか否かを検討した。
 - c. 下痢期間：1日4回以上の下痢便であった期間のみ集計し検討した。
 - d. 1年間に3ヶ月以上炎症症状（下血、下痢、腹痛、発熱）の認められた年数。以下の3通りの病態から成る：
 - (1) 症状が持続したが、治療しなかった。
 - (2) 治療したにも関わらず症状が持続した。
 - (3) 治療に反応して症状が軽快したが比較的早期に再燃し、結果として1年間の合計で3ヶ月以上の有症状期間のあるもの。
 - e. 入院回数と総入院期間（月で表示）。
4. 薬物療法。投与量に関わらず、sulfapyridine と全身的 corticosteroids を使用した期間を記録した。対象患者にはその他の免疫抑制剤は投与されなかった。

[統計解析]

単因子解析には、数量データ、即ち発症年齢・打ち切り時年齢・罹病期間・入院回数・入院期間（月）・下痢期間（月）・下血期間（月）・年3ヶ月以上炎症の認められた年数・ステロイドとサラゾピリン使用期間（月）に対して Mann-Whitney U-test を、カテゴリーデータ（癌家族歴・性・難治・重症）に対しては χ^2 検定または Fisher の直接法を行った。多変量解析として潰瘍性大腸炎患者で癌・dysplasia の発生を予測する因子を Cox proportional hazards regression analysis にて検討した。この時、独立変数として表8の罹病期間・打ち切り時年齢以外のすべての因子を使用した。有意水準 $p < 0.05$ にて前向きおよび後ろ向き stepwise 法を行った。統計解析は統計ソフトとして stata version 6.0 (Stata Corp, Cokkege station, TX) を用いた。

結果

[単因子分析] (表 1)

単因子分析では腫瘍群・対照群間で炎症の活動性を示す以下の4因子で有意差が認められた：3ヶ月以上の症状のあった年数 ($p=0.004$)、難治性 ($p=0.001$)、下血期間 ($p=0.022$)、下痢期間 ($p=0.004$)。平均発症年齢は腫瘍群の方が対照群より高かったが、有意差はなかった ($p=0.157$)。罹病期間は両群でほとんど差がなかった (平均で 15.0 年対、15.1 年)。全身的ステロイド投与期間は腫瘍群で長い傾向にあったが有意差には達しなかった ($p=0.148$)。

[多変量解析] (表 2)

有意な因子は2因子であった。下痢期間が1ヶ月長くなるごとに hazard ratio は 1.015 (95%CI: 1.007-1.023) となった。発症年齢は1歳増すごとに hazard ratio が 1.081 (95%CI: 1.028-1.138) であった。前向き法および後ろ向き法とも同じ結果が得られた。

表 1. 長期経過した潰瘍性大腸炎症例における癌・dysplasia 発生と臨床的因子との関連 (単因子分析)

	腫瘍群	対照群	P value
大腸癌家族歴 (陽性率%)	0.0	1.7	0.792 ^{a)}
性 (男性の割合%)	59.0	62.5	0.800 ^{b)}
発症年齢 ¹⁾	34.3 ± 3.6	28.4 ± 1.7	0.157 ^{c)}
年齢 ¹⁾	49.3 ± 2.9	43.5 ± 1.8	0.105 ^{c)}
罹病期間 (年)	15.0 ± 1.5	15.1 ± 0.7	0.962 ^{c)}
難治 (%)	31.3	3.3	0.001 ^{a)}
重症 (%)	12.5	3.3	0.189 ^{a)}
入院回数 ¹⁾	2.1 ± 0.8	1.1 ± 0.2	0.256 ^{c)}
入院期間 (月) ¹⁾	4.47 ± 1.9	2.12 ± 0.4	0.266 ^{c)}
下痢 (月) ¹⁾	71.1 ± 17.9	10.8 ± 2.0	0.004 ^{c)}
下血 (月) ¹⁾	74.5 ± 20.8	21.1 ± 3.0	0.022 ^{c)}
炎症 > 3 月 / 年 ¹⁾	7.9 ± 1.4	2.9 ± 0.4	0.004 ^{c)}
ステロイド (月) ¹⁾	41.4 ± 13.2	20.6 ± 3.7	0.148 ^{c)}
サラゾピリン (月) ¹⁾	121 ± 22	119 ± 9	0.920 ^{c)}

1) 平均 ± 標準誤差

a) Fisher's exact test

b) Pearson χ^2 test

c) t-test with unequal variances

表 2. 長期経過した潰瘍性大腸炎症例における癌・dysplasia 発生と臨床的因子との
関連 (多変量解析)

因子	Hazard ratio	95% 信頼区間	P value
下痢 (／月)	1.015	1.007-1.023	0.000
発症年齢 (／年)	1.081	1.028-1.138	0.003

[単因子分析に基づいたリスクファクター] (表 3)

単因子分析で腫瘍群・対照群間で有意差の見られた4因子のうち、下痢の期間が50ヶ月を越える症例で腫瘍群であったのは90%(9/10)、難治例では71%(5/7)であった。下血期間が75ヶ月を越えたものは50%(8/16)、年3ヶ月以上の症状期間が5年以上の症例では48%(12/25)の症例で癌・dysplasiaが認められた。これら4因子のうち1つ以上が陽性の症例では50%に腫瘍が認められ、腫瘍群16例中13例(81%)がこれに該当していた。該当しなかった3例はいずれも50歳以上の症例であった。

表 3. 長期経過した潰瘍性大腸炎症例における癌・dysplasia 発生のリスクファクター

因子	分類	腫瘍群の割合	P value
下痢	50 カ月以上	9/10 (90%)	<0.0001
	50 カ月未満	7/67 (10%)	
難治	あり	5/7 (71%)	0.0005
	なし	11/70 (16%)	
下血	75 カ月以上	8/16 (50%)	0.0025
	75 カ月未満	8/61 (13%)	
炎症>3 月/年	5 年以上	12/25 (48%)	<0.0001
	5 年未満	4/52 (8%)	
Risk	あり	13/26 (50%)	<0.0001
	なし	3/51 (6%)	

小括

炎症の活動性を示す下痢期間が癌・dysplasia 発生と最も相関しており、期間の長いほど癌・dysplasia の発生が多く見られた。また、総下痢期間が 50 カ月を越えるもの、総下血期間が 75 カ月を越えるもの、年 3 ヶ月以上の炎症があった年が 5 年以上のもの、難治例のいずれか 1 つ以上が認められた場合には、有意に高いリスクが認められた。

多変量解析では 2 つの有意な独立変数が得られ、下痢期間では 1 ヶ月長くなるごとに 1.015 倍、発症年齢では 1 歳高齢になるごとに 1.081 倍リスクの上昇が認められた。

II. 潰瘍性大腸炎上皮における増殖細胞抗原の発現

背景と目的

潰瘍性大腸炎における臨床的な癌・dysplasia のリスク解析で約 80%の腫瘍を持つ患者は該当したが、必ずしもこの条件に当てはまらない患者も存在した。このため、サーベイランスの際に得られる生検標本を用いてリスク評価をする検討を行った。すなわち、まず予備研究として(A)潰瘍性大腸炎上皮に増殖細胞抗原を免疫染色し、腫瘍と非腫瘍との鑑別に有用な抗原を選択する。その抗原について (B)腫瘍と非腫瘍との鑑別に簡便かつ最適な診断基準を設定する。これらを利用し(C)癌・dysplasia の検出前に増殖細胞抗原の分布異常があるかどうか明らかにする。

この検討に使用する異型度の分類は、厚生省研究班の基準[19]を用い UC-IV から UC-I の 4 段階とした。

UC-I	炎症性変化
UC-II	炎症性か腫瘍性か判定に迷う変化
UC-III	腫瘍性変化であるが、癌とは判定できないもの
UC-IV	癌

但し、UC-I に分類される組織のうち同時に得られた標本に癌・dysplasia (UC-III, IV)が見られた組織を「背景粘膜」として別に扱った。背景粘膜として計測に用いた標本は肉眼的な腫瘍性病変から 3 cm 以上離れた部位の組織のもののみとした。すなわち、UC-I は同時に得られた他の標本の異型度により以下のように分類された。

背景粘膜	UC-III, IV の認められた腸管で同時に採取された非腫瘍性粘膜
非腫瘍症例の UC-I	UC-I で同時に得られた標本に UC-III, UC-IV が認められなかったもの

対象と方法

[対象標本]

A. 腫瘍と非腫瘍を判別する上でより有用な抗原を選択するための検討

(Ki-67 と Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) との比較)

潰瘍性大腸炎患者に対する内視鏡検査で得られた同じ生検標本について Ki-67 抗原と PCNA を免疫染色し比較した。標本数は非腫瘍症例の UC-I が 37 検査 177 腺管、UC-III, IV があわせて 21 検査 78 腺管であった。

B. Ki-67 を用いた腺管単位における腫瘍と非腫瘍との鑑別基準設定のための検討

潰瘍性大腸炎患者のサーベイランス内視鏡により得られた生検標本。非腫瘍症例の UC-I が 31 例に対し 49 回の検査が行われ合計 339 腺管を計測対象とした。UC-III と UC-IV はそれぞれ 14 例に対する 21 検査における 71 腺管, 11 例に対する 13 検査における 46 腺管で計測可能であった。背景粘膜は 18 例での 34 検査における 217 腺管を対象とした。

C. 非腫瘍症例の UC-I における Ki-67 を用いた癌・dysplasia の予測に関する検討

非腫瘍症例で UC-I が得られた 31 例の経過を追い、経過観察期間（経過観察期間は該当する検査時点から、2000 年 7 月、最終来院日、大腸切除日のうちで最も早い時点までの年数）で癌・dysplasia (UC-III, IV) が認められたものは 4 例、認められなかったものは 27 例であった。次の 2 項目が後の癌・dysplasia のリスクになるかどうか検討した。

(1) LI-U が 0.3 を超える腺管の有無

(2) 腺管上部における Ki-67 標識率 (LI-U) の平均値

[染色]

ホルマリン固定パラフィン包埋標本を 4 μ m に薄切し、キシレンにて脱パラフィンし、95 $^{\circ}$ Cにて 15 分加熱し抗原を賦活化した。過酸化水素水を加えたメタノールで脱ペルオキシダーゼを行った。ウサギ正常血清 (ニチレイ) で常温 30 分処置後、50 倍希釈とした抗 Ki-67 抗体 (イムノテック) または 20 倍希釈の抗 proliferating cell nuclear antigen (PCNA) 抗体 (DAKO) を 4 $^{\circ}$ Cで一晩インキュベートした。2次抗体としてウサギ抗マウス抗体 (ニチレイ) で常温 20 分間反応させ、streptoavidin-biotin complex (ニチレイ) で 10 分間処置し、0.02% diaminobenzidine (Sigma) で発色させヘマトキシリンにて軽く核染色し包埋した。

[評価]

高倍(400倍)で観察し上皮細胞の核が褐色に染まっているものを標識されたものとした。可能な限り腺管が垂直に切片とされ、分岐の少ない腺管を無作為に選んだ。標本の偏りを防ぐため1検査あたり各異型度につき最大10腺管までを計測した。腺管を上部1/2と下部1/2とに等分し、上部1/2の全上皮細胞数に対するKi-67またはPCNA標識細胞の割合をLI-U (labeling index at upper half of crypt)として算出した(図1)。同様に腺管下部1/2についても標識細胞の割合をLI-L (labeling index at lower half of crypt)として求めた。腺管全層における標識率は、LI-W (labeling index of whole crypt)とした。即ち、

LI-U : 腺管上部 1/2 における、標識された上皮細胞数 / 全上皮細胞数

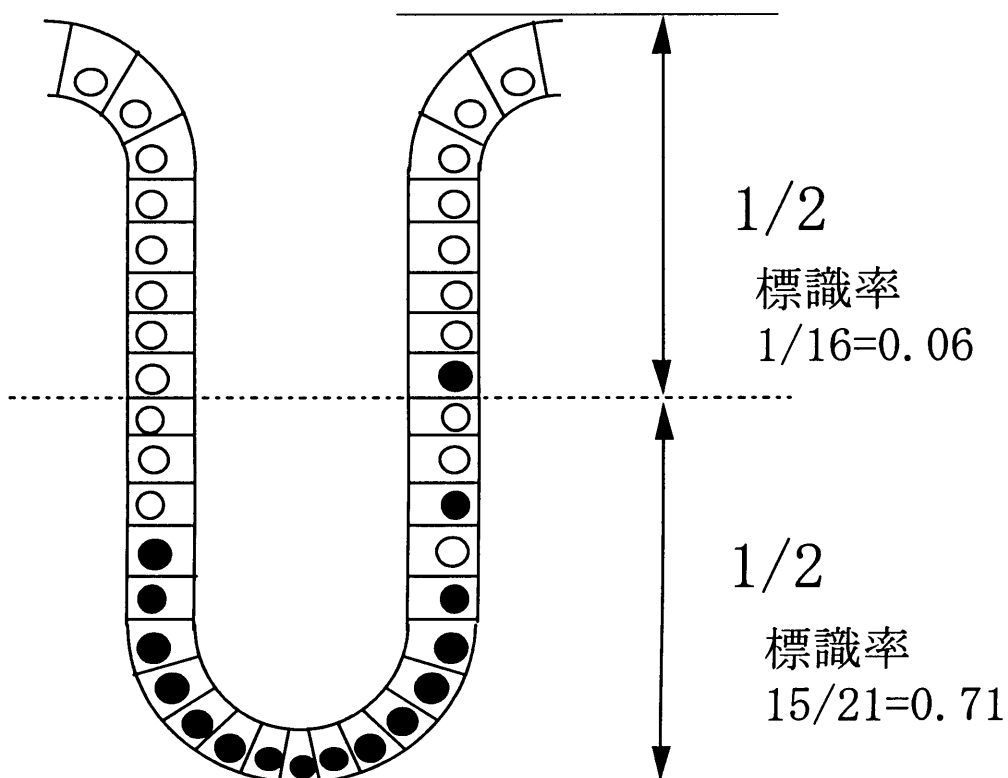
LI-L : 腺管下部 1/2 における、標識された上皮細胞数 / 全上皮細胞数

LI-W : 腺管全層における標識された上皮細胞数 / 全上皮細胞数

[統計]

データは「平均 ± 標準誤差」で表示し、3群間以上の群間比較は analysis of variance (ANOVA)で、2群間の比較は t 検定で解析した。カテゴリーデータは 2 × 2 型の場合は Fisher の直接法で、その他は χ^2 検定で解析した。p < 0.05 を有意とした。

図 1. 標識率計算法(例)



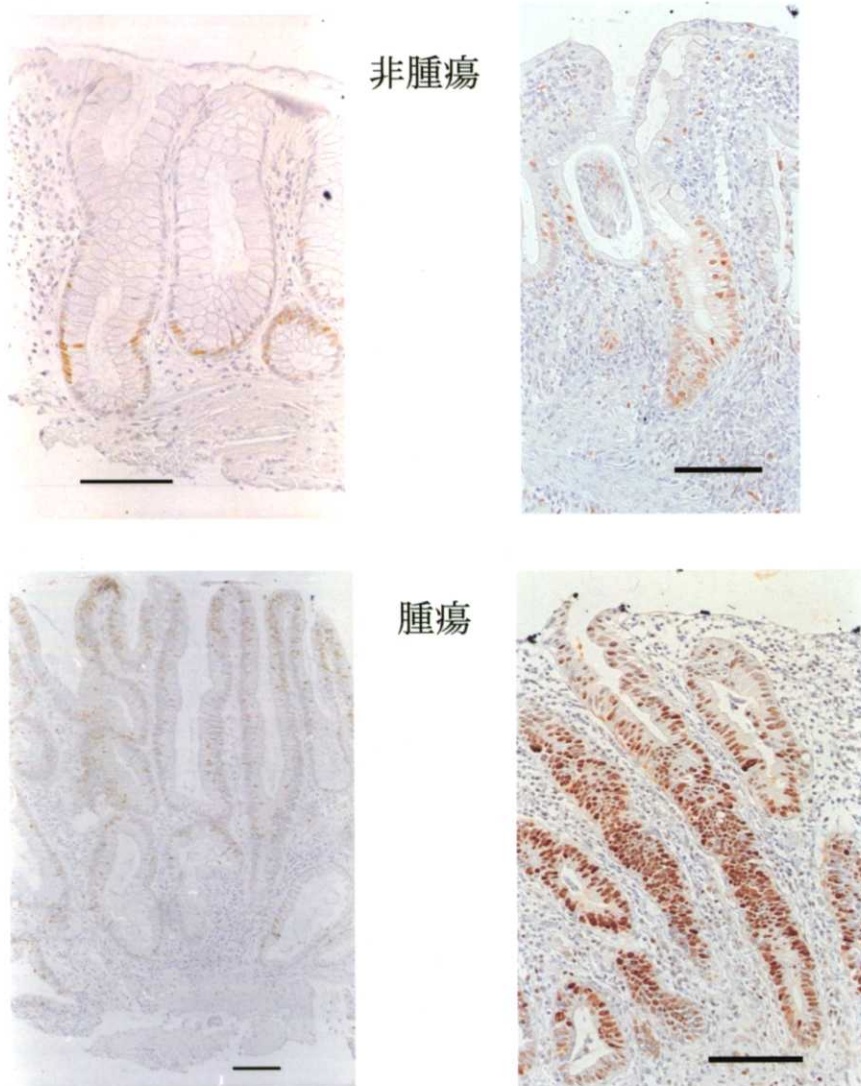
結果

A. 腫瘍と非腫瘍を判別する上でより有用な抗原を選択するための検討 (Ki-67 と PCNA との比較) (図 2)

非腫瘍症例の UC-I において Ki-67 染色では LI-W, U, L がそれぞれ 0.191 ± 0.008 , 0.051 ± 0.005 , 0.293 ± 0.012 , PCNA 染色ではそれぞれ 0.314 ± 0.012 , 0.180 ± 0.011 , 0.400 ± 0.016 となっていた。UC-III, IV においては Ki-67 染色では LI-W, U, L がそれぞれ 0.437 ± 0.017 , 0.450 ± 0.020 , 0.412 ± 0.021 , PCNA 染色ではそれぞれ、 0.484 ± 0.033 , 0.471 ± 0.034 , 0.489 ± 0.035 となっており、染色・評価法に関わらず UC-III, IV における値は非腫瘍症例の UC-I の値より高値を示した。

LI-W, U, L における腫瘍と非腫瘍との平均値の差の標準誤差に対する平均値の差を統計学的に示す指標である t 値で見ると、Ki-67 染色においてそれぞれ 14.6, 26.4, 5.1、PCNA 染色において 5.9, 10.3, 2.6 となり、Ki-67 染色において LI-W, U, L いずれも腫瘍と非腫瘍との標準誤差に対する平均値の差が大きいため、両者の鑑別により有用であると考えられた。この結果を受けて、以降の検討では増殖因子抗原として Ki-67 染色を採用した。

図2. Ki-67染色とproliferating cell nuclear antigen染色との比較



(a) Ki-67染色

(b) Proliferating cell nuclear antigen染色

いずれの染色でも標識された細胞は、非腫瘍では腺底部を中心に、腫瘍では全層性に分布した。(黒線=0.1mm)

B. Ki-67 を用いた腺管単位における腫瘍と非腫瘍との鑑別基準設定のための検討

(1) Ki-67 免疫染色を用いた腫瘍・非腫瘍における増殖細胞分布の検討

(i) 症例背景

症例の背景因子として性別、年齢、罹病期間を検討したが、有意な差はなかった (表 4)。

(ii) Ki-67 染色結果

非腫瘍症例の UC-I では染色された細胞は主として腺管の下部に分布したが (図 3)、UC-III, IV では腺管下部と同様に腺管上部でも染色細胞が多数認められた (図 4、5)。

(iii) 各異型度における腺管内部位別の Ki-67 標識率の検討

腺管単位で検討すると (表 5)、非腫瘍粘膜である非腫瘍症例の UC-I (n=339) においては LI-L (0.330 ± 0.011) が LI-U (0.056 ± 0.004) より有意に高かった ($p < 0.0001$) が、腫瘍性病変である UC-III (n=71) では両者の差がなく (0.451 ± 0.024 vs. 0.418 ± 0.024)、UC-IV (n=38) では逆に LI-U の方が有意に高かった (0.503 ± 0.027 vs. 0.446 ± 0.029 ; $p < 0.05$)。

表 4. Ki-67 染色の背景因子

	男性の割合	年齢 (歳)	罹病期間 (年)
非腫瘍症例の UC-I (n=31)	61.3%	45.5 ± 2.6	14.2 ± 0.7
UC-III (n=14)	57.1%	50.5 ± 3.8	14.0 ± 1.4
UC-IV (n=11)	54.5%	43.7 ± 3.6	15.0 ± 1.7
背景粘膜 (n=18)	52.9%	50.1 ± 2.2	14.9 ± 0.9
P value	0.9152	0.4232	0.8610

図3. UC-IでのKi-67免疫染色



(a) ヘマトキシリンエオジン染色
(黒線=0.1mm)

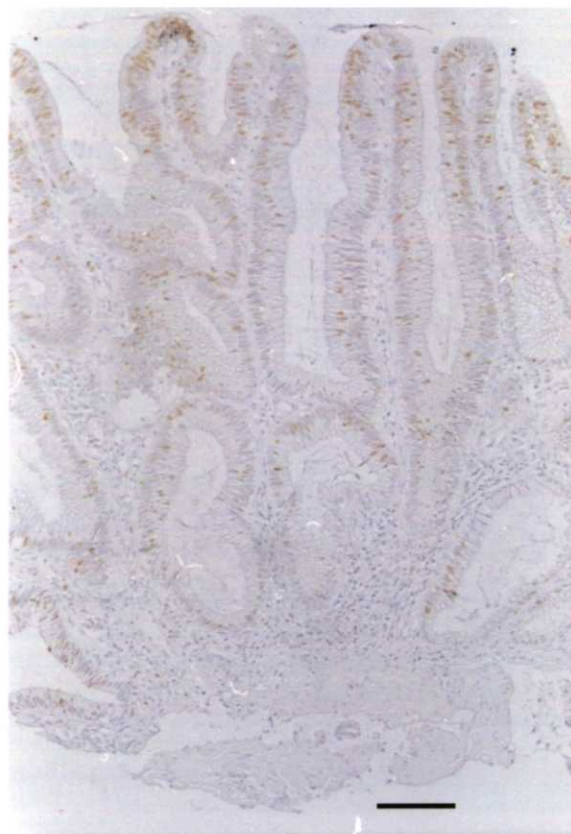


(b) Ki-67免疫染色
標識細胞はほとんど腺管下部1/2に
限局して認められる。

図4. UC-IIIでのKi-67免疫染色

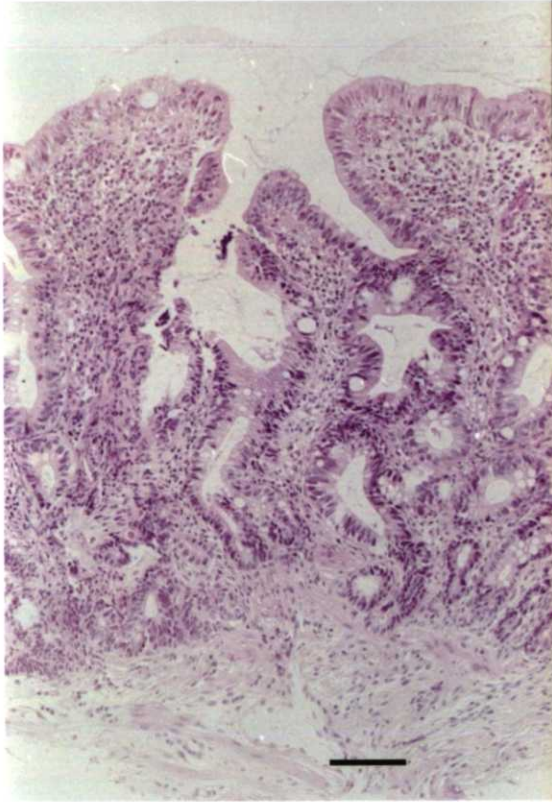


(a) ヘマトキシリンエオジン染色
(黒線=0.1mm)

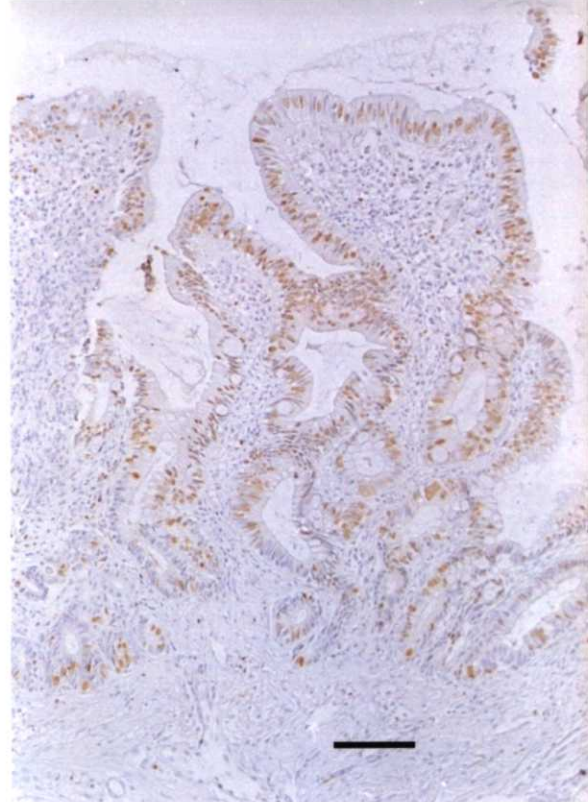


(b) Ki-67免疫染色
標識細胞は腺管上部・下部で
ほぼ同程度の比率で認められる。

図5. UC-IVでのKi-67免疫染色



(a) ヘマトキシリンエオジン染色
(黒線=0.1mm)



(b) Ki-67免疫染色標識細胞は
腺管上部・下部で同程度に高率に認められる。

表 5. 異型度別の Ki-67 標識率

分類	LI-W	LI-U	LI-L	p(LI-U vs. LI-L)
非腫瘍症例の UC-I (n=339)	0.216 ± 0.007	0.056 ± 0.004	0.335 ± 0.011	<0.0001
UC-III (n=71)	0.442 ± 0.019	0.418 ± 0.024	0.441 ± 0.024	0.25
UC-IV (n=46)	0.477 ± 0.025	0.503 ± 0.027	0.394 ± 0.027	<0.05
背景粘膜 (n=217)	0.268 ± 0.008	0.139 ± 0.009	0.370 ± 0.012	<0.0001
P value	<0.0001	<0.0001	<0.0001	

LI-W: p<0.0001: 非腫瘍症例の UC-I, 背景粘膜 vs. 非腫瘍症例の UC-III, IV ;
非腫瘍症例の UC-I vs. 背景粘膜

LI-U: 4 群間すべてに p<0.001 で有意差あり。

LI-L: p<0.0001: 非腫瘍症例の UC-I vs. UC-III

p<0.001 : 非腫瘍症例の UC-I vs. UC-IV, UC-III vs. 背景粘膜

p<0.01 : UC-IV vs. 背景粘膜

p<0.05 : 非腫瘍症例の UC-I vs. 背景粘膜

(iv) 全層および腺管内部位別の異型度別比較

LI-U は非腫瘍症例の UC-I で 0.056 ± 0.004 、UC-III で 0.418 ± 0.024 、UC-IV で 0.503 ± 0.027 となっており腫瘍性粘膜が炎症性粘膜より有意に高値を示した (表 5)。LI-W, LI-L も同様に非腫瘍症例の UC-I が UC-III, IV より有意に低値であったが、絶対値の差は LI-U より少なかった。

(2) 腫瘍と非腫瘍の鑑別に適した基準値設定

(i) LI-T, LI-U, LI-L の比較 (図 6)

判別基準値を変化させ sensitivity、specificity で比較すると、LI-U の曲線が LI-W, L に比して sensitivity=1, specificity=1 の点に近いことから、腫瘍と非腫瘍との鑑別に最も有用と考えられた。

(ii) LI-U における基準値の設定 (表 6)

判別基準値を 0.05 単位で変化させ、統計学的指標であるファイで比較すると、LI-U が 0.3 の時、腫瘍と非腫瘍との相違を示すファイが 0.852 と最大となった。このため両者の判別には LI-U を 0.3 とするのが最適な基準値と考えられた。

図6. LI-W, LI-U, LI-L における分別係数を変化させたときの
sensitivity, specificity の変化

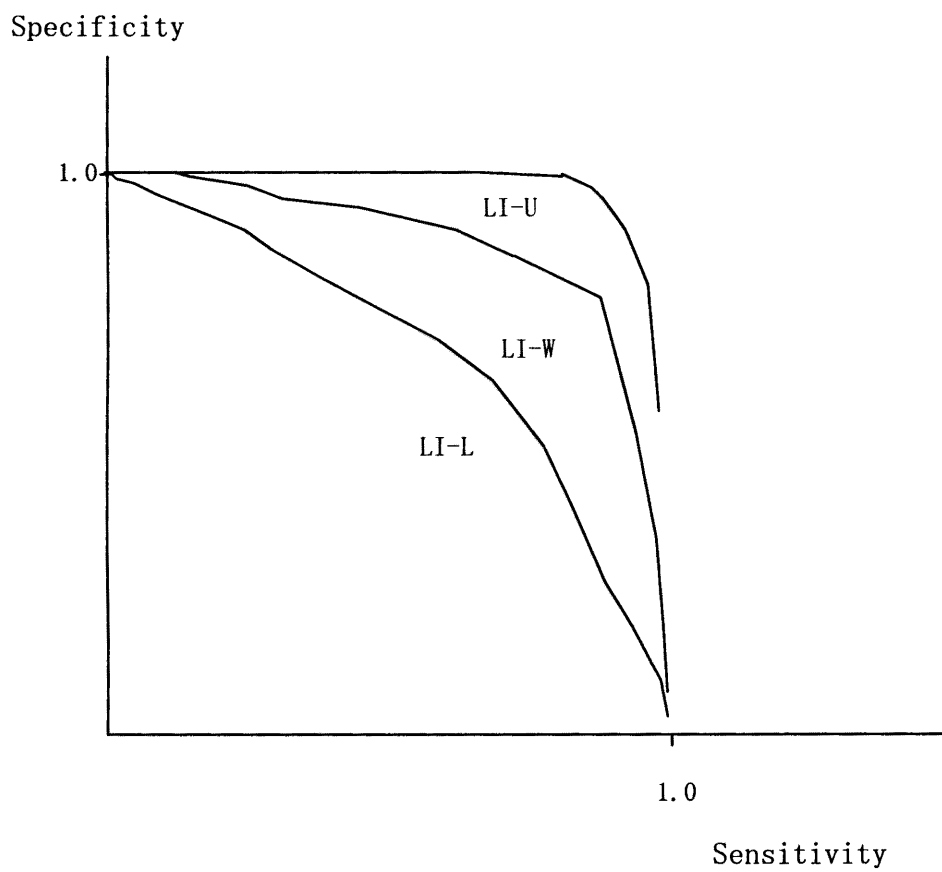


表 6. LI-U の基準値を変化させた時の腫瘍と非腫瘍の鑑別

LI-U 基準値	Sensitivity	Specificity	PPV*	ファイ
0.05	0.9909090	0.5752212	0.4308300	0.491
0.1	0.9727272	0.7935103	0.6045197	0.674
0.15	0.9363636	0.8938053	0.7410071	0.772
0.2	0.8909090	0.9469026	0.8448275	0.823
0.25	0.8727272	0.9675516	0.8971962	0.848
0.3	0.8181818	0.9882005	0.9574468	0.852
0.35	0.6727272	0.9970501	0.9866666	0.772
0.4	0.5636363	1	1	0.703
0.45	0.4727272	1	1	0.635

*: positive predictive value

(3) 腫瘍と非腫瘍における増殖細胞分布が異常を示す腺管の割合 (表 7)

非腫瘍症例の UC-I では LI-U が 0.3 を越える腺管は 4 症例に各 1 腺管、合計 4 腺管のみに認められ全腺管の 1.2%しかないのに対して、UC-III で 76.1%、UC-IV で 92.1%と腫瘍性変化では大多数の腺管で 0.3 を越えていた。逆に LI-U が 0.3 を越えた 135 腺管の中では非腫瘍症例の UC-I が 4 腺管(3.0%)しかないのに対して腫瘍性と考えられる UC-III, IV が 89 腺管(65.9%)と約 2/3 を占めた。したがって、UC-I と UC-III, UC-IV を鑑別する基準値として LI-U=0.3 は有用な指標と考えられた。

表 7. 異型度別の LI-U>0.3 を示す腺管数の割合

異型度	LI-U>0.3 を示す腺管数の割合
非腫瘍症例の UC-I	1.2% (4/339)
UC-III	76.1% (54/71)
UC-IV	92.1% (35/38)
背景粘膜	15.7% (34/217)

p<0.0001: 非腫瘍症例の UC-I vs. 背景粘膜, UC-III, UC-IV
 背景粘膜 vs. UC-III, UC-IV

p<0.05 : UC-III vs. UC-IV

(4) 背景粘膜における増殖細胞分布

(i) 背景因子 (表 4)

年齢、性、罹病期間で各群に有意差はなかった。

(ii) 全層および腺管内部位別の Ki-67 標識率 (図 7)

癌・dysplasia の背景粘膜における LI-U は 0.139 ± 0.009 と非腫瘍症例の UC-I を示す粘膜 (0.056 ± 0.004) より有意に高く、UC-III (0.418 ± 0.024), UC-IV (0.503 ± 0.027) より有意に低かった (表 5)。これに伴って LI-U > 0.3 を示す「異常」腺管は背景粘膜で 15.7% と非腫瘍症例の UC-I よりも有意に高い比率で認められた (表 7)。したがって、背景粘膜ではヘマトキシリンエオジン染色上異常を示さなくとも増殖細胞の分布異常が認められた。

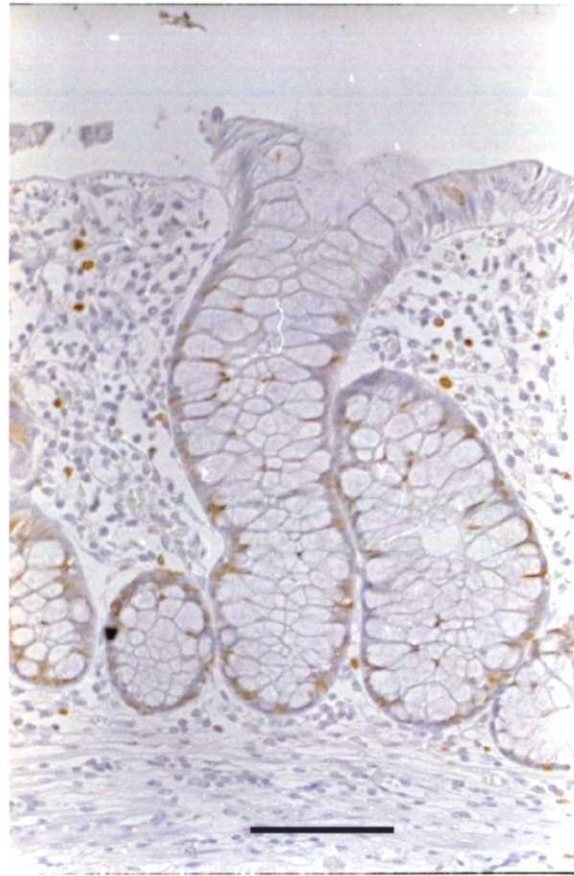
図7. 癌・dysplasiaの背景粘膜でのKi-67免疫染色



(a) ヘマトキシリンエオジン染色

UC-Iと診断される。

(黒線=0.1mm)



(b) Ki-67免疫染色

標識細胞は腺管上部にまで認められ、増殖帯が拡大している。

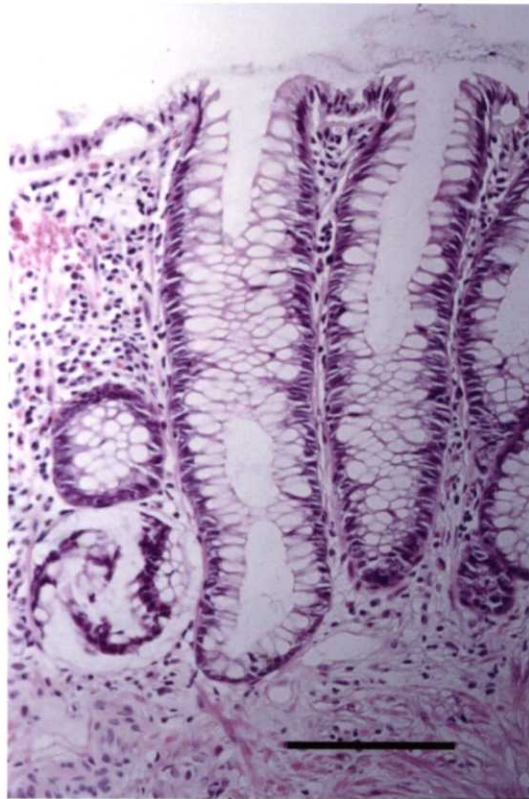
C. 非腫瘍症例の UC-I における Ki-67 を用いた癌・dysplasia の予測に関する検討

(1) LI-U が 0.3 を超える腺管のあることが癌・dysplasia のリスクになるか (図 8)

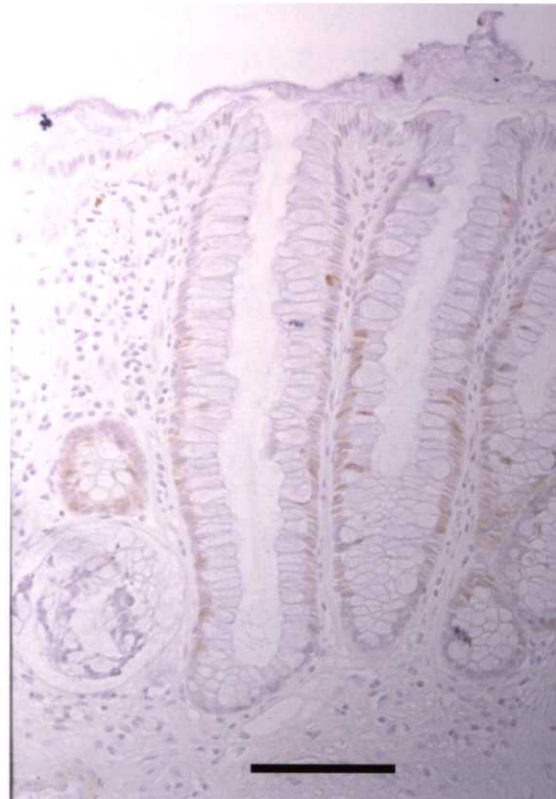
まず背景因子を検討すると、年齢は UC-I が 0.3 を越える症例で 39.6 ± 4.1 歳、0.3 以下の症例で 45.9 ± 2.9 歳 ($p=0.424$)、罹病期間は前者で 15.9 ± 2.8 年、後者で 13.4 ± 0.6 年 ($p=0.173$) と有意差がなかった。男性の比率は前者で 75% (3/4)、後者で 59% (16/27) ($p=1.0$)、経過観察期間は前者で 9.6 ± 1.4 年、後者で 6.8 ± 0.7 年 ($p=0.171$)、検査数は前者で 1.5 ± 0.3 、後者で 1.6 ± 0.2 ($p=0.860$) といずれも有意差がなかった。

LI-U が 0.3 を超える腺管が認められた 4 例のうち 2 例で後に腫瘍が発生した。1 例は 1 年後 UC-IV が認められ手術を行い m 癌であった。他の 1 例は平坦粘膜に 1 年後 UC-III が認められたが、再検で UC-I であったためサーベイランスを繰り返し、7 年後に UC-IV が認められた。手術標本では sm 癌であった。他の 2 例はそれぞれ 2、9 年経過し、サーベイランス内視鏡を継続的に行っているものの癌・dysplasia は認められていない。一方、すべての腺管で LI-U が 0.3 以下であった 27 症例では 2 症例で後に腫瘍が発生し、LI-U が 0.3 を越える腺管のある症例で腫瘍発生頻度が高かったが有意差には至らなかった ($p=0.0704$)。

図8. 腺管上部のKi-67標識率が0.3を越える非腫瘍上皮での follow-up study



(a) ヘマトキシリンエオジン染色



(b) Ki-67染色

UC-Iと診断される。
この症例は7年後にsm癌が認められた。

標識細胞は腺管上部まで多数認められる。
(黒線=0.1mm)

(2) 平均 LI-U が高値であることが癌・dysplasia のリスクになるか

平均 LI-U は腫瘍発生例で 0.102 ± 0.024 、腫瘍非発生例で 0.055 ± 0.006 ($p=0.179$) と腫瘍発生例が有意に高い値を示した。平均 LI-U の基準値を 0.01 単位で変化させると平均 LI-U=0.05 でファイが 0.337 と最大を示した (表 8)。そこで平均 LI-U が 0.05 を基準値としてこの基準値が将来の癌・dysplasia の予測に有用かどうか検討した。

まず背景因子では、年齢は平均 LI-U>0.05 を示す症例で 45.4 ± 3.4 歳、それ以外の症例で 44.7 ± 4.2 歳 ($p=0.897$)、罹病期間は前者で 14.2 ± 0.9 年、後者で 13.0 ± 0.7 年 ($p=0.315$) と有意差がなかった。男性の比率は前者で 61% (11/18)、後者で 62% (8/13) ($p=1.0$)、経過観察期間は前者で 7.7 ± 0.9 年、後者で 6.4 ± 1.0 年 ($p=0.357$)、検査数は前者で 1.4 ± 0.1 、後者で 1.8 ± 0.4 ($p=0.195$) といずれも有意差がなかった。

平均 LI-U が 0.05 を越えた症例では 18 症例中 4 例 (22%) で後に腫瘍を発生し、0.05 以下の症例では 13 例中 1 例も癌・dysplasia が検出されなかったが (表 9)、両者の差は統計学的な有意差には至らなかった ($p=0.12$)。

表 8. 平均 LI-U の基準値を変化させた時の癌・dysplasia の発生

平均 LI-U 基準値	Sensitivity	Specificity	PPV*	ファイ	P value**
0.01	1	0.037	0.133	0.07	1
0.02	1	0.111	0.143	0.126	1
0.03	1	0.185	0.154	0.169	1
0.04	1	0.444	0.211	0.306	0.1389
0.05	1	0.481	0.222	0.327	0.1200
0.06	0.75	0.63	0.231	0.258	0.2836
0.07	0.5	0.741	0.222	0.178	0.5595
0.08	0.5	0.778	0.25	0.213	0.2683
0.09	0.5	0.852	0.333	0.299	0.1594
0.10	0.25	0.889	0.25	0.139	0.4422
0.11	0.25	0.889	0.25	0.139	0.4422
0.12	0.25	0.889	0.25	0.139	0.4422
0.13	0.25	0.926	0.333	0.199	0.3493
0.14	0.25	0.926	0.333	0.199	0.3493
0.15	0.25	0.926	0.333	0.199	0.3493
0.16	0.25	0.963	0.5	0.291	0.2452
0.17	0.25	0.963	0.5	0.291	0.2452

*: Positive predictive value

** : P value は Fisher の直接法により計算した。

表9. 腺管上部における平均 Ki-67 標識率と癌・dysplasia の発生

平均 LI-U	腫瘍発生例	腫瘍非発生例
0-0.05	0	13
0.05-0.1	3 (21%)	11
0.1-0.15	0	1
0.15-0.2	1 (33%)	2

(3) 平均LI-Uによるリスク評価とLI-Uが0.3を超える腺管の有無によるリスク評価法と間の関連 (表10)

LI-Uが0.3以上を示した標本を持つ4例とも平均LI-Uが0.05以上を示した。すなわち、平均LI-Uによるリスク評価の方がリスク陽性者をより多く拾い上げる点では優れていた。

(4) Ki-67 免疫染色における危険因子と臨床的危険因子との関連 (表11, 12)

Ki-67 染色と臨床因子ともに検討した症例は15例のみであり、癌・dysplasiaを合併したものは4例であった。この4例のうち、臨床因子によるリスク陽性例が3例、陰性例が1例あった。この1例は平均LI-Uが0.05を越えていたが、LI-Uが0.3を越える腺管はなかった。したがって、「平均LI-Uが0.05以上」の基準を用いれば、臨床的リスク陽性者を拾い上げることが可能であった。

表 10. 平均 LI-U によるリスク評価と LI-U が 0.3 を越える腺管の有無によるリスク評価との関係

	LI-U>0.3 腺管あり	なし
平均 LI-U > 0.05	4 (2)	14 (2)
平均 LI-U ≤ 0.05	0 (0)	13 (0)

()内は腫瘍発生例

表 1 1. 平均 LI-U によるリスクと臨床経過によるリスクとの関係

	臨床症状によるリスク		
	あり	なし	評価不能
平均 LI-U > 0.05	6 (3)	5 (1)	9 (0)
平均 LI-U ≤ 0.05	0 (0)	4 (0)	7 (0)

()内は腫瘍発生例

表 1 2. LI-U が 0.3 を越える腺管の有無によるリスクと臨床経過によるリスクとの関係

	臨床症状によるリスク		
	あり	なし	評価不能
LI-U>0.3 腺管あり	3 (2)	1 (0)	0 (0)
なし	3 (1)	8 (1)	16 (0)

()内は腫瘍発生例

小括

(1) 潰瘍性大腸炎での腫瘍と非腫瘍の鑑別において、Ki-67 染色は PCNA 染色より有用であった。

(2) 潰瘍性大腸炎における Ki-67 染色で腫瘍と非腫瘍との差が最も大きくなる基準値は LI-U=0.3 であり、非腫瘍では 99%以上で LI-U が 0.3 以下を示したのに対し、腫瘍では 80%以上で LI-U が 0.3 を越え、両者の鑑別に有効であることが示唆された。

(3) 癌・dysplasia の背景粘膜では ヘマトキシリンエオジン染色上異型が認められなくとも、これらを合併しない症例より増殖細胞の比率が高く、LI-U が 0.3 を越える腺管が増加していた。

(4) ヘマトキシリンエオジン染色上異型が認められなくとも、1 腺管でも LI-U が 0.3 以上を示した症例の 50%と、平均 LI-U が 0.05 以上であった症例の 22%では、後に大腸癌か dysplasia を合併した。

(5) 平均 LI-U が 0.05 以上の基準値は症状によるリスク非該当者で癌・dysplasia 例の拾い上げが可能であった。

考察

1. 臨床的指標と腫瘍発生のリスクとの関連について

本研究において臨床的指標を検討した結果、下痢等の有症状期間が長い潰瘍性大腸炎症例に大腸腫瘍の発生するリスクが高いことが示された。例えば、下痢が50カ月認められる症例は全く認められない症例より2.11倍(=1.015⁵⁰)倍のリスクがあると計算される。このような、臨床症状の多変量解析を利用したリスクの解析は今まで見当たらず、今回の検討が初めてと思われる。Levinらは潰瘍性大腸炎において炎症自体が腫瘍を促進させる因子と考える報告しており[20]、今回の結果はこの仮説を支持するものであった。このことは慢性持続型が大腸癌のハイリスクであるとする傾向[21]と一致している。しかし、Pinczowskiらは、潰瘍性大腸炎の活動性を年当たりの悪化回数・診察回数・検査回数などで評価し、活動性が高いことは癌の発生に抑制的であるとしている[22]。潰瘍性大腸炎における腫瘍と活動性との関連を示すデータは他に少なく、今後の検討が待たれる。

今回の検討結果はすぐに臨床的な患者取り扱い検討に応用できる。即ち、表3に挙げられている因子の一つ以上が陽性的の場合、ハイリスク症例としてより積極的にサーベイランスを行うことが勧められるが、もし、どの因子にも当てはまらなければ、サーベイランスの間隔を延ばしうる。現在のサーベイランスプログラムが1-3年毎に内視鏡を行っている[22-28]ことを考えると、表3内の1因子以上陽性的の患者には少なくとも年1回の検査が勧められる。また、1日4回以上の下痢が通算50カ月を越える場合には、今回の検討で90%の高率で大腸腫瘍が生じているため、定期

的なサーベイランスが続けられない症例では、予防的な腸切除が勧めた方がよい場合もあろう。一方、今回の検討結果の臨床応用には一定の限界が残った。表3のリスクファクター陽性患者は13/16=約81%の症例で一致しているが、残りの約20%はリスク陰性となってしまう。本研究での対象患者は外科施設であるため手術目的の患者も含まれており、リスク陰性症例は実際はこれよりも多いと予想される。したがってリスク評価を向上させるため方法を組み合わせる必要がある

2. 増殖細胞抗原を用いた腫瘍発生リスクを予測する方法について

2-1. 基礎的検討

本研究では増殖因子関連抗原として Ki-67 と PCNA とを比較した。両者ともホルマリン固定、パラフィン包埋切片によく染色されるとされ、³Hチミジンのように放射性物質の取り扱いを要したり、5-bromo-2-prime-deoxyuridine のように組織を得る際の処理が不要であるためである。既に、Kullmann ら[29]が報告しているように、今回の検討では Ki-67 染色と PCNA 染色では大きな相違は認められなかった。しかし、同一標本で両者を比較した時、Ki-67 染色の方が両群の平均値の差を統計学的に表す t 値が LI-W, U, L いずれの指標においても大きかった。即ち、PCNA に比して Ki-67 で評価を行った場合、測定値の標準誤差に対する平均値の差が大きくなるため、両者の鑑別がより容易になる。更に、PCNA は G₁ の後期から S 期に発現するが半減期が 20 時間と長いため[30, 31]、必ずしも染色されることとその細胞が増殖期にあることが対応していない可能性がある。一方、Ki-67 では G₀ 以外の全増殖期に抗原性を持ち、

proline-glutamine-serine-threonine 基質が多く含まれるため分解されやすい[32] ので染色された細胞が増殖期にあると考えやすい。このため、Ki-67 をこれ以降の検討で使用することとした。

次に、異型度別の Ki-67 標識率の差を利用して非腫瘍粘膜(非腫瘍症例の UC-I)と腫瘍性粘膜(UC-III, IV)との鑑別に利用できるか否かを検討した。まず、指標の選択では簡便に計測可能な LI-W, LI-U, LI-L の中では LI-U が最も有用と考えられた。さらに、LI-U の基準値では 0.3 が最も有用であることが示された。LI-U が 0.3 を越える腺管の比率を両者で比較すると、非腫瘍組織 (UC-I) では陽性腺管がごく少数 (1.2%) であるのに対し、UC-III, IV ではそれぞれ 76.0%, 92.1%と陽性腺管が大多数を占めた。したがって、多くが LI-U が 0.3 を越える腺管で構成されている病変は腫瘍性であるといえる。

LI-U が 0.3 を越える非腫瘍症例の UC-I の経過観察例を見ると、4 例のうち 2 例が短期間に癌・dysplasia を合併しているためこの 2 例は検査の時点ですでに腫瘍を合併していた可能性も否定できない。この 2 例を除くと非腫瘍症例の UC-I で LI-U が 0.3 を越えるものは 0.6%しかない。したがって、LI-U が 0.3 を越える腺管はそれ自体が腫瘍性変化の初期段階と考えるべきかどうかは不明であるが、少なくとも異型腺管の存在と強い関連があることを示唆している。

2-2. 潰瘍性大腸炎を母地とした癌・dysplasia の背景粘膜の異常

癌や dysplasia の背景粘膜では、ヘマトキシリンエオジン染色では異型が認められないにも関わらず LI-U が上昇していた。したがって組織上で明らかな癌・

dysplasia よりも広い範囲で LI-U の異常が拡がっていることになる。このことは今回マーカーとした Ki-67 染色のみに認められる現象ではない。Agawa ら [33] は PAT/KOH/PAS 染色により mosaic pattern を示す組織が、癌・dysplasia の背景粘膜では 14/20 (70%) と多かったのに対し、これらを背景に持たない粘膜では 2/11 (18%) しか認められないと報告した。また、Suzuki らは組織切片による顕微蛍光測光法で DNA 量を検討し [34]、diploid + polyploid pattern が癌・dysplasia の背景粘膜では 4/11 (36%)、通常の大腸炎粘膜では 3/53 (6%)、6c を越す細胞の割合が前者で 2.5%、後者で 0.7% といずれも背景粘膜でより癌・dysplasia に近い値を示した。今回の検討では、新たに Ki-67 染色細胞の分布拡大が示されており、細胞増殖の異常が背景粘膜の異常の一端を担っている事が初めて直接的に示された。このような背景粘膜の異常は大腸炎を母地とした大腸癌が高頻度 (約 30%) に多発性が認められる [4] ことと関連し、潰瘍性大腸炎における癌化のプロセスに関わっていると考えられる。

この背景粘膜を含む増殖細胞の分布異常が既知の大腸癌の遺伝子変異と関連している可能性について考察が必要である。現在、大腸癌の発生は遺伝子変異の結果と考えられており [35]、大きく分類すると 2 通りの経路が想定されている。一方は adenoma-carcinoma sequence として K-ras, p53, APC, DCC の変異が生じ、他方は microsatellite instability (MSI) が発癌の主要因子となる。癌・dysplasia における陽性率は、K-ras で文献 [36-43] の合計症例の 18%、APC [41, 43-45] で 21% と少ないため潰瘍性大腸炎における大腸癌には関係が薄い。p53 は遺伝子解析で文献 [40, 44-47] 合計症例の 48%、免疫染色 [44-47, 49] で 64% が陽性になり、潰瘍性大腸炎の癌化に関わっている可能性がある。MSI に関する報告は少ないが、Umetani らは浸潤

癌で 50%、high grade dysplasia で 53%、low grade dysplasia で 50%が MSI 陽性を示していたと報告しており [43]、これも潰瘍性大腸炎背景粘膜の異常の原因である可能性がある。しかも、Brentnall ら [49] は潰瘍性大腸炎の非腫瘍粘膜で MSI 陽性が 60%と報告しており、MSI の変化が組織学的な腫瘍化の前段階で生じることを示唆している。今後、増殖細胞の分布異常のある粘膜において p53 の異常と MSI が認められるかどうか検討する必要がある。

2-3. リスクの評価とサーベイランスへの応用

まず、非腫瘍症例の UC-I で LI-U が 0.3 を越えた腺管を持つ 4 症例のうち 2 例 (50%) でその後に癌が認められた。症例数が少ないので断定は困難だが、この指標が異常を示す場合、サーベイランスを行う上で特に重点的に観察する必要がある。同様に、平均 LI-U が高値を示した症例に高頻度で後の癌・dysplasia を合併したことから、重点的なサーベイランスの対象とすべきである。

次に潰瘍性大腸炎に伴う腫瘍性病変は通常の大腸の腫瘍性病変と異なり平坦な形態をとることが多いため [50, 51] 内視鏡診断が困難な事がある。この時たとえ腫瘍自体を生検出来なくともその背景粘膜の「異常」を検知出来れば診断能が向上することが期待される。一方、今回の検討で明らかになったように、癌・dysplasia の背景粘膜では 15.7%で LI-U が 0.3 を超えていた。これを「異常」とし、1 個の生検材料に LI-U が測定可能となる腺管が 1 個あったと仮定すると、ランダムに 10 個の非腫瘍粘膜の生検を行い、癌・dysplasia が他の部位に存在した時に 1 個でも「異常」を示す生検が得られる可能性は $1-(1-0.157)^{10}$ =約 82%となる。したがってサーベイラン

スに Ki-67 染色を併用することにより、通常のヘマトキシリンエオジン染色では検出できない異常を発見し効率化し得ることが示唆された。

3. この研究におけるハイリスク選択法の長所と短所について

臨床経過によりハイリスクグループを選別する際、腸管の慢性炎症を客観的に評価することは難しい。症状は毎日でも評価することは可能だが、基本的には主観的なものであり、患者間の比較に必ずしも好ましいとはいえない。潰瘍性大腸炎の主要症状の下痢・下血を例にとると、下痢は炎症がなくとも起こり得るし、下血は無視できない割合で潰瘍性大腸炎患者が痔核を持っていることを考えると、炎症のみの症状とは判断しづらい場合がある。注腸・内視鏡などの画像検査は客観的に状態を表しうるが、患者の肉体的・精神的負担と共に費用・時間がかかるため簡単には実施出来ない。また、検査自体またはその前処置により潰瘍性大腸炎の病勢を悪化させる可能性を考えるとあまり頻繁には行えない。また、何らかの理由で発症と診断の間隔が長い場合には、その間の評価が出来ない。血算や血液生化学などの臨床検査は毎日の評価が困難であること、潰瘍性大腸炎では手術にならないような程度の炎症では炎症反応が上昇することは比較的少なく、更にステロイドの使用により白血球数の増多や CRP の見かけの上の正常化が起こりうるため、血液データが炎症程度と平行に動くとは限らず信頼性は高くない。したがって現在のところ慢性炎症の理想的な評価法はないが、患者に負担を強くない形で評価するため、本研究では症状の解析を中心に検討を行った。

もう一つの問題点として、検討で用いられた因子は炎症の重症度よりも持続

性に関連している点がある。例えば、下痢の回数や下血の量を検討していない。しかし、入院回数や入院期間はより重症な状態を表していると考えられるが、これらは単変量・多変量解析ともに腫瘍の発生との関連が見られなかった。したがって、炎症の重症度よりも持続性の方がより腫瘍の進展と関連していると考えられる。

今回の検討において、より多くのリスク陽性者を選別する意味では1腺管でも0.3以上である腺管の有無より、平均LI-Uが0.05を越えるかどうかの基準値のほうが優れていた。この点は、LI-Uが0.3を越える腺管の分布がfocalであるために、そしてそれを内視鏡的に発見することが困難であるため、局所的な増殖細胞分布の異常よりも全体的な異常をより捉えやすいことを示唆している。しかし、平均LI-Uが0.05を越えた症例が18/31=58%もいたことを考えると、この基準がサーベイランスの効率化にどれほど有用かは症例数を更に増加させて検討する必要がある。この事実は臨床的なリスク評価と組み合わせた時も同様である。例えば、臨床症状によるリスク陽性または平均LI-Uが0.05以上であることをリスク陽性と仮定すると、リスク陽性者11例のうち癌・dysplasiaの認められた症例は4例(36%)であり、臨床症状のみでリスクを評価すると3/6=50%で腫瘍が認められた。したがって2つのリスク評価法を組み合わせた場合、すべての癌・dysplasiaの認められた症例をカバーするものの反対にpositive predictive valueは低下する。このため前述した増殖と関連する遺伝子の異常なども検討し、更に効率を高めるべきであろう。

Ki-67染色により増殖細胞の比率を検討する方法の欠点の一つは、orientationのよい標本でなければ診断が困難な点である。Ki-67染色のためのみならず、生検標本のヘマトキシリンエオジン染色での正しい評価のためにもこのような注意が重要である。しかし、今回の結果から多少orientationが悪くとも表層近くに

Ki-67 染色陽性細胞が多ければ腫瘍性との疑いを持てるかもしれない。第2の欠点は retrospective study である点である。特に、非腫瘍と診断された上皮の LI-U が高値（平均値で 0.05 以上, 1 腺管で 0.3 以上）を示した場合の予後を調べ、Ki-67 免疫染色が臨床的に有用かどうか更に多くの症例で prospective に検討する必要がある。

まとめ

1. 潰瘍性大腸炎患者の臨床症状の経過の解析から、総下痢期間が 50 カ月を越えるもの、総下血期間が 75 カ月を越えるもの、年 3 ヶ月以上の炎症があった年が 5 年以上のもの、難治例のいずれか 1 つ以上が認められた場合には、有意に高い癌・dysplasia のリスクが認められた。

多変量解析では 2 つの有意な独立変数が得られ、下痢期間では 1 ヶ月長くなるごとに 1.015 倍、発症年齢では 1 歳高齢になるごとに 1.081 倍リスクの上昇が認められた。

2. 潰瘍性大腸炎の生検標本での増殖因子抗原の免疫染色による腫瘍と非腫瘍の鑑別では、Ki-67 染色における LI-U=0.3 が最適であり、非腫瘍では約 99%で LI-U が 0.3 以下を示したのに対し、腫瘍では 80%以上で LI-U が 0.3 を越え、両者の鑑別に有効であることが示唆された。

3. ヘマトキシリンエオジン染色上異型が認められなくとも、癌・dysplasia を同時に持つ非腫瘍粘膜(背景粘膜)ではこれらを合併しない非腫瘍粘膜より増殖細胞の比率が高く (LI-U で 0.139 vs. 0.056)、LI-U が 0.3 を越える腺管が増加していた (15.7% vs. 1.2%)。

4. ヘマトキシリンエオジン染色上異型が認められなくとも、1 腺管でも LI-U が 0.3 以上を示した症例の 50%と、平均 LI-U が 0.05 以上であった症例の 22%では、後に大腸癌か dysplasia を合併した。

5. 症状によるリスク非該当者でも「平均 LI-U が 0.05 以上」を満たす症例があり、この基準値が症状によるリスクの見逃しを防ぐ可能性があった。

結論

1. 下痢期間の長い症例など臨床的な炎症症状の持続する症例に癌・dysplasia のリスクが高かった。

2. ヘマトキシリンエオジン染色上で非腫瘍と考えられても、腺管上部における増殖細胞 (Ki-67 陽性細胞) の比率が高い場合には後の癌・dysplasia 発生率が高かった。

3. 症状によるリスク選別法と Ki-67 染色によるリスク選別法を組み合わせると更に有用な癌・dysplasia の好発生状態の指標となる可能性があった。

文献

1. Ekbon A, Helmick CG, Zack M, Holmberg L, Adami H. Survival and causes of death in patients with inflammatory bowel disease: A population-based study. *Gastroenterology* 1992; 103: 954-960.
2. Karlen P, Lofberg R, Brostrom O, Leijonmarck CE, Hellers G, Persson PG. Increased risk of cancer in ulcerative colitis: A population-based study. *Am J Gastroenterol* 1999; 94: 1047-1052.
3. Crohn BB, Rosenberg H. The sigmoidoscopy picture of chronic ulcerative colitis (non-specific). *Am J Med Sci* 1925; 170: 220-228.
4. 齊藤修治、長嶺弘太郎、小松茂治、藤井義郎、田中邦哉、金村栄秀、松尾恵五、石山暁、小尾芳郎、鬼頭文彦、福島恒男、佐野仁勇、中村宣生、篠崎 大. 潰瘍性大腸炎に合併した大腸癌の5例ならびに本邦報告203例の集計. *日消誌* 1998; 95: 539-546.
5. Ekbon A, Helmick C, Zack M, Adami H. Ulcerative colitis and colorectal cancer. *N Engl J Med* 1990; 323: 1228-1233.
6. 篠崎 大, 武藤徹一郎, 鈴木公孝, 樋口芳樹, 齊藤幸夫, 沢田俊夫: 潰瘍性大腸炎サーベイランスの精度の問題. どのような問題があり、どのような対処をすべきか. *胃と腸* 1995; 30: 643-651.
7. 篠崎 大, 松田圭二, 横山 正, 鈴木公孝, 渡辺聡明, 正木忠彦, 武藤徹一郎. サーベイランスの実際. 日比紀文 (編). *炎症性腸疾患ハンドブック*. 真興交易, 東京. 1999. 221 - 229.
8. Riddell RH, Goldman H, Ransohoff DF, Appleman HD, Fenoglio CM, Haggitt RC, Ahren C, Correa P, Hamilton SR, Morson BC. Dysplasia in inflammatory bowel disease: standardized classification with provisional clinical applications. *Hum Pathol* 1983; 14: 931-968.
9. Gerdes J, Li L, Schlueter C, Duchrow M, Wohlenberg C, Gerlach C, Stahmer I, Kloth S, Brandt E, Flad HD. Immunobiochemical and molecular biologic characterization of the cell proliferation associated nuclear antigen that is defined by monoclonal antibody Ki-67. *Am J Pathol* 1991; 138: 867-873.
10. Gerdes J, Lemke H, Baisch H, Wachter H-H, Schwab U, Stein H. Cell cycle analysis of cell proliferation associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67. *J Immunol* 1984; 133: 1710-1715.

11. Gerdes J, Becker MHG, Key G, Cattoretta G. Immunohistological detection of tumour growth fraction (Ki-67 antigen) in formalin-fixed and routinely processed tissues. *J Pathol* 1992; 168: 85-87.
12. Maskens AP, Deschner EE. Tritiated thymidine incorporation into epithelial cells of normal appearing colorectal mucosa in cancer patients. *J Natl Cancer Inst* 1977; 58: 1221-1224.
13. Potten CS, Kellett M, Rew DA, Roberts SA. Proliferation in human gastrointestinal epithelium using bromodeoxyuridine in vivo: data for different sites, proximity to a tumour, and polyposis coli. *Gut* 1992; 33: 525-529.
14. Bleiberg H, Mainguet P, Galand P, Chretien J, Dupont-Mairesse N. Cell renewal in the human rectum. In vitro autoradiographic study on active ulcerative colitis. *Gastroenterology* 1970; 58: 851-855.
15. Eastwood GL, Trier JS. Epithelial cell renewal in cultured rectal biopsies in ulcerative colitis. *Gastroenterology* 1973; 64: 383-390.
16. Tonelli F, Bianchini F, Kodovici M, Valanzano R, Caderni G, Dolara P. Mucosal cell proliferation of the rectal stump in ulcerative colitis patients after ileorectal anastomosis. *Dis Colon Rectum* 1991; 34: 385-390.
17. Biasco G, Lipkin M, Minarini A, Higgins P, Miglioli M, Barbara L. Proliferative and antigenic properties of rectal cell in patients with chronic ulcerative colitis. *Cancer Res* 1984; 44: 5450-5454.
18. 井上幹男. 内科分科会報告. 厚生省特定疾患 難治性炎症性腸管障害調査研究班 昭和61年度研究報告書 1987. 27-30.
19. 武藤徹一郎、若狭治毅、喜納勇、渡辺英伸、名倉宏、小西文雄. 潰瘍性大腸炎に出現する異型上皮の病理組織学的判定基準—surveillance colonoscopy への応用を目的とした新判定基準の提案— 日本大腸肛門病学会雑誌 1994; 47: 547-551.
20. Levin B. Ulcerative colitis and colon cancer: biology and surveillance. *J Cell Biochem Suppl.* 1992; 16G, 47-50.
21. Edwards FC, Truelove SC. The course and prognosis of ulcerative colitis. *Gut* 1964; 5: 1-64.
22. Pinczowski D, Ekbon A, Baron J, Yuen J, Adami HO. Risk factors for colorectal cancer in patients with ulcerative colitis: a case-control study. *Gastroenterology* 1994; 107: 117-120.

23. Levin B, Lennard-Jones J, Riddell RH, Sachar D, Winawer SJ, the WHO Collaborating Centre for the Prevention of Colorectal Cancer. Surveillance of patients with chronic ulcerative colitis. *Bull World Health Organization* 1991; 69: 121-126.
24. Lennard-Jones JE, Melville DM, Morson BC, Ritchie JK, Williams CB. Precancer and cancer in extensive ulcerative colitis: findings among 401 patients over 22 years. *Gut* 1990; 31: 800-806.
25. Lynch DAF, Lobo AJ, Sobala GM, Dixon MF, Axon AT. Failure of colonoscopic surveillance in ulcerative colitis. *Gut* 1993; 34: 1075-1080.
26. Rosenstock E, Farmer RG, Petras R, Sivak MJ, Rankin GB, Sullivan BH. Surveillance for colonic carcinoma in ulcerative colitis. *Gastroenterology* 1985; 89: 1342-1346.
27. Nugent FW, Haggitt RC, Gilpin PA. Cancer surveillance in ulcerative colitis. *Gastroenterology* 1991; 100: 1241-1248.
28. Lashner BA, Kane SV, Hanauer SB. Colon cancer surveillance in chronic ulcerative colitis: historical cohort study. *Am J Gastroenterol* 1990; 85: 1083-1087.
29. Kullmann F, Fadaie M, Gross V, Knuchel R, Bocker T, Steinbach P, Scholmerich J, Ruschoff J. Expression of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) and Ki-67 in dysplasia in inflammatory bowel disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 1996; 8: 371-379.
30. Bravo R, Macdonald-Bravo H. Existence of two populations of cyclin/PCNA during the cell cycle: associated with DNA replication sites. *J Cell Biol* 1987; 105:1549-1554
31. Morris GF, Mathews MB. Regulation of proliferating cell nuclear antigen during cell cycle. *J Biol Chem* 1989; 264: 13856-13864.
32. Rogers S, Wells R, Rechsteiner M. Amino acid sequences common to rapidly degraded proteins: the PEST hypothesis. *Science* 1986; 234: 364-367.
33. Agawa S, Muto T, Morioka Y. Mucin abnormality of colonic mucosa in ulcerative colitis associated with carcinoma and/or dysplasia. *Dis Colon Rectum* 1988; 31: 387-389.
34. Suzuki K, Muto T, Masaki T, Morioka Y. Microspectrophotometric DNA analysis in ulcerative colitis with special reference to its application in diagnosis of carcinoma and dysplasia. *Gut* 1990; 31: 1266-1270.
35. Vogelstein B, Kinzler KW. p53 function and dysfunction. *Cell* 1992; 70:523-526.
36. Burmer GC, Levine DS, Kulander BG, Haggitt RC, Rubin CE, Rabinovitch PS. c-Ki-ras mutations in chronic ulcerative colitis and sporadic colon carcinoma. *Gastroenterology* 1990;99:416-420.

37. Meltzer SJ, Mane SM, Wood PK, Resau JH, Newkirk C, Terzakis JA, Korelitz BI, Weinstein WM, Needleman SW. Activation of c-Ki-ras in human gastrointestinal dysplasias determined by direct sequencing of polymerase chain reaction products. *Cancer Res* 1990;50:3627-3630.
38. Bell SM, Kelly SA, Hoyle JA, Lewis FA, Taylor GR, Thompson H, Dixon MF, Quirke P. c-Ki-ras gene mutations in dysplasia and carcinomas complicating ulcerative colitis. *Br J Cancer* 1991;64:174-178.
39. Chen J, Compton C, Cheng E, Fromowitz F, Viola MV. c-Ki-ras mutations in dysplastic fields and cancers in ulcerative colitis. *Gastroenterology* 1992;102:1983-1987.
40. Chaubert P, Benhattar J, Saraga E, Costa J. K-ras mutations and p53 alterations in neoplastic and nonneoplastic lesions associated with longstanding ulcerative colitis. *Am J Pathol* 1994;144:767-775.
41. Redston MS, Papadopoulos N, Caldas C, Kinzler KW, Kern SE. Common occurrence of APC and K-ras gene mutations in the spectrum of colitis-associated neoplasias. *Gastroenterology* 1995;108:383-392.
42. Tsuda T, Mochizuki M, Wakasa H. Detection of c-ras gene mutation and expression of p21 protein in dysplasias and carcinomas complicating ulcerative colitis. *J Gastroenterol* 1995;8:30-32.
43. Umetani N, Sasaki S, Watanabe T, Shinozaki M, Matsuda K, Ishigami H, Ueda E, Muto T. Genetic alterations in ulcerative colitis-associated neoplasia focusing on APC, K-ras gene and microsatellite instability. *Jpn J Cancer Res* 1999;90:1081-1087.
44. Greenwald BD, Harpaz N, Yin J, Huang Y, Tong Y, Brown VL, McDaniel T, Newkirk C, Resau JH, Meltzer SJ. Loss of heterozygosity affecting the p53, Rb, and mcc/apc tumor suppressor gene loci in dysplastic and cancerous ulcerative colitis. *Cancer Res* 1992;52:741-745.
45. Tarmin L, Yin J, Harpaz N, Kozam M, Noordzij J, Antonio LB, Jiang HY, Chan O, Cymes K, Meltzer SJ. Adenomatous polyposis coli gene mutations in ulcerative colitis-associated dysplasias and cancers versus sporadic colon neoplasms. *Cancer Res* 1995;55:2035-2038.
46. Yin J, Harpaz N, Tong Y, Huang Y, Laurin J, Greenwald BD, Hontanosas M, Newkirk C, Meltzer SJ. p53 point mutations in dysplastic and cancerous ulcerative colitis lesions. *Gastroenterology* 1993;104:1633-1639.
47. Kern SE, Redston M, Seymour AB, Caldas C, Powell SM, Kornacki S, Kinzler KW. Molecular genetic profiles of colitis-associated neoplasms. *Gastroenterology* 1994;107:420-428.

48. Ajioka Y, Watanabe H, Matsuda K. Over-expression of p53 protein in neoplastic changes in ulcerative colitis: immunohistochemical study. *J Gastroenterol* 1995;8:33-35.
49. Brentnall TA, Crispin DA, Bronner MP, Cherian SP, Hueffed M, Rabinovitch PS, Rubin CE, Haggitt RC, Boland CR. Microsatellite instability in nonneoplastic mucosa from patients with chronic ulcerative colitis. *Cancer Res* 1996;56:1237-1240.
50. Butt JH, Konishi F, Moson BC, Lennard-Jones JE, Ritchie JK. Macroscopic lesions in dysplasia and carcinoma complicating ulcerative colitis. *Dig Dis Sci* 1983; 28: 18-26.
51. 篠崎 大, 沢田俊夫, 斉藤幸夫, 樋口芳樹, 鈴木公孝, 鮫島伸一, 武藤徹一郎, 松村健三: 潰瘍性大腸炎合併大腸癌の2例. 特に肉眼形態と表面パターンについて. *胃と腸* 1995; 30: 671-676.