

潰瘍性大腸炎に随伴した dysplasia の

形態学的遺伝子学的解析

— 腫瘍との比較 —

櫻 井 圭 二

①

潰瘍性大腸炎に随伴した
dysplasiaの形態学的
遺伝子学的解析

—腺腫との比較—

松 田 圭 二

I 研究の背景と目的

UCを発生母地とする大腸癌は、1925年にCrohnとRosenberg¹⁾により第1例が報告された。以降、多数例が欧米から報告され、UCは大腸癌の発生母地として重視されている^{2)~4)}。このUC合併大腸癌は、UC発症後10年以上の長期経過例で、慢性持続する全大腸型UCに合併しやすい、といわれている^{4)~6)}。欧米流のUC合併大腸癌の組織診断基準は、粘膜下層(以下,sm)以深に浸潤した腫瘍を癌とし、粘膜内に限局する腫瘍をdysplasiaとしている(粘膜内腫瘍でも、低分化腺癌や粘膜固有層に浸潤した癌の存在は認めている)。UCでは粘膜内腫瘍性病変であるdysplasiaが高頻度(7.9~21.2%)に発生し^{4),7)~11)}、このdysplasiaは大腸癌の近傍や離れた部位にしばしばみられ^{6),8),12)~17)}、生検でdysplasia(特にHGD・high-grade dysplasia)を伴うUCは、しばしば切除材料で大腸癌を合併するといわれている^{6),8),16),18)~21)}。すなわち、dysplasiaは、他の部位に癌が存在することを示唆する有力な指標であると考えられている。しかし、dysplasia、特にlow-grade dysplasia(LGD)と非腫瘍性の再生性腺管の組織学的鑑別は往々にして困難であり、Riddell分類でもindefinite for dysplasiaとして判定を保留せざるを得ない病変が存在することを認めている⁴⁾。一方、UC大腸粘膜にも通常の大腸粘膜同様に腺腫が発生する、この腺腫は加齢とともに合併しやすく、切除部に異型性を認めない。しかし、有茎性の腺腫は診断に苦慮しないが、無茎性・扁平型・平坦型の腺腫の場合、dysplasiaとの鑑別が困難なことがある。腺腫であれば摘除のみで治療として十分であるが、dysplasiaであれば大腸全摘が必要となる。このように腺腫とdysplasiaでは組織発生の相違のみならず、治療面でも取り扱いが全く異なってくるのでその鑑別がきわめて重要である。

本研究では、臨床の場でUCにおける再生性腺管や腺腫とdysplasiaを鑑別するための方法を検討することを目的とした。すなわち、腺腫とdysplasiaのp53蛋白発現、K-rasおよびAPC変異、肉眼的特徴、年齢、pit patternを比較検討した。さらに、UC合併大腸腫瘍内の内分泌細胞とパネート細胞のp53蛋白発現と細胞増殖能、そしてUCに合併した大腸腫瘍の浸潤能と組織所見についての検討も行った。

II 材料と方法

材料

材料は、外科切除されたUC大腸7例にみられた大腸腫瘍27個(欧米でいう癌は5例中6個、dysplasiaは患者6例中21個)、内視鏡的切除されたUC患者10例の腺腫37個(組織学的には筆者らのいう腺腫と同じもの)と、外科切除された腫瘍非合併のUC大腸10例(活動期 active phase 4例、治癒進行期 resolving phase 4例、緩解期 remission phase 2例)、を対象とした。腫瘍非合併のUC大腸粘膜の対照として、炎症性腸疾患(IBD)を合併していない82症例の正常粘膜(大腸癌で外科手術された大腸材料で、癌から遠く離れた部位の組織学的にも正常な粘膜)を用いた。

腫瘍の組織診断基準

UCに合併する上皮性腫瘍の組織診断基準には、欧米で作成されたRiddellらのもの⁴⁾、本邦の厚生省のもの²²⁾、渡辺らのもの²³⁾²⁴⁾、の3つがある(表1)。

欧米のものは、前述したごとく、5mm以深に浸潤している腫瘍を癌とし、粘膜内に限局し、粘膜固有層への浸潤(この定義にも多くの意見がある)を欠く腫瘍をdysplasiaと表現している。さらに、dysplasiaを組織異型度によって、LGDとHGDに分け、前者に非UC例の腺腫と同様の病変を含み、前者と後者に本邦でいう粘膜内癌を含んでいる⁴⁾。

本邦では、粘膜内癌の存在を認めていることから、欧米のdysplasia判定基準をそのまま用いることを避け、本邦(厚生省特定疾患難治性炎症性腸管障害調査研究班)独自の組織学的判定基準を作成している²²⁾。その判定は、UC-I:炎症性変化、UC-II:炎症性か腫瘍性かの判定に迷う変化、このうち、UC-IIa;炎症性変化がより疑われるもの、UC-IIb;腫瘍性変化がより疑われるもの、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(粘膜内癌を含む)、に分類されている。

上述した2つの組織診断基準は主にH・E標本の所見から作成されたものである。一方、渡辺らは腫瘍の細胞異型度に注目して一般の大腸癌を低異型度癌と高異型度癌に分類し、その報告してきているが、同じ診断基準を用いることによりUCに合併した大腸上皮性病変を、組織学的に、(1)成熟～未熟上皮を含むUC、(2)腺腫、(3)低異型度癌、と(4)高異型度癌に分類している。即ち、RiddellらのいうLGDは腺腫と低異型度癌に細分類し、そのことを、HGDは高異型度癌に相当すると述べている。LGDと同一の組織が粘膜から粘膜下層に深へ連続的に浸潤した例があることも、LGDが癌であることを示唆する所見といえよう²⁵⁾。

本研究では渡辺らの診断基準を用いて組織診断を行った(表1)。すなわち、本論文で述べられるLGDは、RiddellらのいうLGDから腺腫を除いた狭義のLGDである。

方法

1)臨床病理学的特徴の検索

腫瘍合併UCのうち外科切除例では、腫瘍部を肉眼的に観察したのち、切除大腸全体を4mm幅で全割し、病変を割線入り肉眼カラー写真上にmappingした。腫瘍合併のうち4症例(dysplasia10病変、幼若再生上皮1病変、成熟再生上皮1病変)では、全大腸粘膜を実体顕微鏡(メチレンブルー染色下)にて詳細に観察・撮影し、工藤の分類²⁶⁾に従ってpit patternを分析した(図1)。

ホルマリン固定のバラフィンブロックすべてから、3μm厚の連続切片を5枚作成し以下の検討に供した。

2)免疫染色

2-a)p53免疫染色

p53蛋白発現の検討には抗p53蛋白モノクローナル抗体PAb1801(Oncogene Science, 200倍希釈)を用い、自然乾燥後、micro-wave処理²⁷⁾した薄切切片に、SAB法にて上述した2種の免疫染色を行った。陽性コントロールとして、常に強陽性に染色される大腸癌標本を用い

た。陰性コントロールとして正常組織の平滑筋細胞やリンパ濾胞の細胞を観察した。p53免疫染色結果は、以下の4つ、びまん性陽性・diffuse(+++)：陽性細胞が病変全体にびまん性にみられるもの(400倍視野で最低30%、ほとんどの場合70-80%以上)、集簇性陽性・nested(++)：病変の一部にp53陽性細胞が連続性に集合して、巣状集簇性に出現しているもの、散在性陽性・scattered(+)：散在性にみられるもの、陰性・negative(-)：陽性細胞が全くみられないもの、に分類した(図2)。p53蛋白過剰発現は、筆者らの今までの成績に従って、びまん性陽性または集簇性陽性のものとした^{23),28),29),30),31),32),33)}。

2-b)Ki-67免疫染色

増殖活性の検討には抗Ki-67モノクローナル抗体MIB-1(Immunotech, 50倍希釈)を用い、自然乾燥後、micro-wave処理²³⁾した薄切切片に、SAB法にて上述した2種の免疫染色を行った。Ki-67染色の陽性コントロールとして、大腸正常腺管の深層にある増殖帯内の細胞、およびリンパ濾胞の胚中心細胞を用いた。Ki-67免疫染色で、陽性コントロールが十分に染色されてない標本は、p53免疫染色の評価にも不適であるため、検討対象から除外した。正常大腸腺管では増殖帯の増殖細胞標識率は30%以上といわれている^{28),34)}。腺管全長が具現されている腺管を表層から底部へ50 μ mごとのcompartmentに分けて、各compartmentごとにKi-67 LI(labeling index)を測定し、そのLIが30%以上のcompartmentを合わせた部分を増殖帯とした。

2-c)免疫染色結果の評価

p53とKi-67陽性細胞は、濃度の強弱にかかわらず、核が茶色に染まっているものを陽性とした。染色濃度が非常にうすくて陽・陰性の判定が困難な色調のものは、陰性とした。

そこで、まず、対照82症例の正常大腸粘膜および手術された腫瘍非合併UC10例の粘膜を用いて、p53陽性細胞の出現状況を分析した。すなわち、p53陽性腺管の頻度、単一腺管内における陽性細胞の数と単一腺管の増殖帯内におけるp53陽性細胞出現率、腺管内でのp53陽性細胞出現部位を検討した。非腫瘍組織では、Ki-67 LIは増殖帯の中のKi-67陽性細胞出現率として計算し、この増殖帯に対応する部分でp53 LI(labeling index)を測定した(10症例、43腺管)。一方、腫瘍組織では、p53染色結果が散在性陽性の場合(今回の対象では腺腫とLGDのみ)、増殖帯内でp53 LI、Ki-67 LIを測定した(23病変、27腺管)。p53染色結果が巣状集簇性陽性の場合(今回の対象では2個の腺腫内に、それぞれ1腺管がこの所見を呈した)、増殖帯でp53 LIとKi-67 LIを測定した(2病変、2腺管)。p53染色結果がびまん性陽性の場合、粘膜内癌であれば腺管全長のp53 LIとKi-67 LIを、浸潤癌であればat randomに複数箇所を選択し、p53 LIとKi-67 LIを測定した(20病変、150腺管)(各症例で250個~320個の癌細胞中における陽性細胞率)^{28),35),36)}。

3)K-ras変異の分析

K-ras(コドン12)の点突然変異は、nested PCR-RFLP法によって分析した^{27),38)}。その対象材料は脱バラ・親水後の腫瘍組織を顕微鏡下でneedleにて摘出した。同一病変内にLGDとHGDが混在する場合、それらを取り分けて遺伝子分析した。これら材料を100 μ lのHMW(10mM Tris-HCl, 150mM NaCl, 10mM EDTA, pH8.0)

にて、20分100°Cで温めた。それに、300 μ lの消化促進溶液(100 μ g/mlのproteinase Kと0.1%のSDS)を混合し、48°Cで一晩置いた。さらに、フェノールクロロホルムとエタノールで精製した。うち、2 μ lのDNA溶液を、nested-PCRのtemplate溶液として使用した。PCR増幅は、Ohshimaらの方法に従った。各実験で、(a)DNAを含まないもの(negative control)と、(b)正常ヒト胎盤DNA(positive control)を、同時に使用した。PCR産物は、1 μ l Mval(タカラ、京都、日本)で37°C、6時間反応させた後、エチチウムブロマイド入り4% NuSieve アガロースゲル(FMC Voproducts, Rockland, ME)にて電気泳動した。Wild-typeのPCR産物は切断され、86-base pairの破片のバンドが写したされた。コドン12に遺伝子変異のあるPCR産物は、切断されずに106-base pairの破片となった。このPCR-RFLP法は、感度が20倍であった³⁷⁾。

4) APC変異の分析

APC遺伝子は、大阪大学医学部附属バイオメディカル教育研究センター臨床遺伝子研究部・西庄教授らの方法で分析された³⁹⁾。PCR-mediated RNase Protection AnalysisにてExon 15にあるMCR(mutation cluster region)部のみを分析した³⁹⁾。K-ras分析時と同様に対象材料は脱バラ・親水後の腫瘍組織を顕微鏡下でneedleにて摘出した。DNAを精製したのち、あらかじめデザインしたoligonucleotide primerを用いて、PCRを40サイクル行った後、産物をRNase protection analysisにて変異の有無を検討した。

5) UC合併大腸腫瘍内の内分泌細胞とパネート細胞のp53蛋白発現

UC合併大腸腫瘍に好発しやすい腫瘍性分化細胞、すなわち、内分泌細胞とパネート細胞がp53蛋白を発現するか否か、増殖能を有するか否かを検討した。本論文で内分泌細胞として取り扱ったものはクロモグラニン陽性細胞である。同細胞の確認には抗クロモグラニンA(CGA)ポリクローナル抗体SP1(INC)の2000倍希釈液で免疫組織染色を行った。パネート細胞の確認はHE染色標本で行った。内分泌細胞のp53蛋白発現と増殖能を検討するために、p53とCGA、およびKi-67とCGAの2組の二重免疫染色を行った。パネート細胞のp53蛋白発現と増殖能の検討には、3連続切片のうち、1枚目をp53染色(パネート顆粒がみえやすくなるように、うすくエオシン染色をかぶせた)、2枚目をHE染色、3枚目をKi-67染色し(p53同様、うすくエオシン染色をかぶせた)、HE標本でパネート細胞を同定し、同一細胞がp53染色やKi-67染色に陽性か否かを観察した。CGA陽性顆粒やパネート細胞顆粒が細胞質に確認されても、同部位に細胞核が見当たらない場合、または、細胞境界が不鮮明な細胞内に核が2個みられて、それら顆粒がどちらの細胞内に存在するのかが判定困難な場合、これら細胞を研究の対象細胞から除外した。

核形態(面積・周囲長・長径・短径)を、画像解析装置EM-II(Risc社)を用いて計測した。

6) UCに合併した大腸腫瘍の浸潤能

大腸癌の浸潤能について検討するために、渡辺らの基準に従ってLGDを粘膜内低異型度癌、HGDを粘膜内高異型度癌として外科切除UC合併癌27病変を用いて、細胞異型度別に、(1)sm浸潤頻度、(2)sm浸潤能、(3)粘膜筋板の厚さ(顕微鏡下で測定)、(4)脈管侵襲頻度、(5)p53 LIおよびKi-67 LI(at random)に腫瘍内で領域を選び、1領域あたり250~350個の腫瘍

細胞を計測した。高異型度癌で65領域，低異型度癌で36領域)，(6)分化細胞出現頻度を検討した。

脈管侵襲を判定するために，CD31(血管・リンパ管の内皮細胞を染色する)，Victoria blueとH・Eの二重染色(弾性線維染色で静脈侵襲を判定する)，S-100蛋白染色(癌の神経浸潤を判定)およびCAM5.2染色(ケラチン染色で上皮細胞のマーカー。脈管内や深部浸潤部の癌細胞を正確に判定するため)を行った。

統計処理

p53陽性症例の出現頻度の分析は，Fisher法に従った。p53 LI，Ki-67 LI，p53 LI/Ki-67 LI比は，unpaired t-testにて行った。p<0.05を有意差ありとした。

III 結果

1. UC合併粘膜内腫瘍の肉眼的特徴・年齢・pit pattern・細胞増殖能

1-1)肉眼型

Dysplasiaの肉眼型は、I型が2病変(10%)、IIa型が7病変(33%)、IIb型が12病変(57%)であった。腺腫との鑑別上特に問題になるLGDに限れば、I型はなく、IIa型が3病変(20%)、IIb型が12病変(80%)とIIb型が圧倒的に多かった。一方、UC合併腺腫は、I型が7病変(19%)、IIa型が28病変(76%)、IIb型が2病変(5%)であった。UC合併腺腫の肉眼型は、通常の腺腫(10mm以下ではI型22%、IIa型73%、IIb型5%)と近似していた。

1-2)大きさ

大きさは、dysplasiaが 22.7 ± 18.9 mm(5~85)、腺腫が 5.0 ± 7.4 mm(1.5~50)と差がみられた($p < 0.01$)。

1-3)年齢

Dysplasia合併症例が 43.5 ± 16.7 歳($n=7$)、腺腫合併症例が 59.5 ± 12.9 歳($n=10$)と、dysplasia合併症例の方が若かった($p < 0.05$)。また、腺腫合併症例は、通常の腺腫患者(57.7~57.9歳)と近似していた。

1-4)pit pattern

4例のうち、9個のdysplasiaがあった。そのpit patternを検討した。実体顕微鏡によるdysplasia表面のpit patternは4病変(44%)が楕円~長楕円形、2病変(22%)が樹枝状、3病変(33%)が乳頭状突起の集簇からなるものであった。これは、通常の腺管腺腫や腺管絨毛腺腫にみられるものと同様のpit patternであった(図3)。

1-5)細胞増殖能

Ki-67 LIはHGDで $71.6 \pm 15.2\%$ ($n=5$)、LGDで $44.5 \pm 15.1\%$ ($n=15$)、腺腫で $53.9 \pm 9.1\%$ ($n=37$)であった(HGDvsLGD: $p < 0.01$, HGDvs腺腫: $p < 0.01$, LGDvs腺腫:有意差なし)。

2. 免疫染色結果

2-1)腫瘍非合併例のUC粘膜におけるp53発現、Ki-67陽性細胞およびUCの病期との関係

p53陽性細胞を有する腺管の平均出現率は、UCの活動期で $16.9 \pm 9.5\%$ 、治癒進行期で $3.0 \pm 1.4\%$ 、緩解期で $0.5 \pm 0.2\%$ と減少し、前二者は緩解期UCや対照群に比べて高い出現率を示した(表3)。

また、腺管あたりのp53陽性細胞数は緩解期UCや対照群では、陽性細胞が1個(98%)または2個だけしかみられなかった(図4)。治癒進行期UCでも陽性細胞が1腺管当たり1~2個が79%で、5個以下が93%で、1腺管でのみ12個みられた。これに対し、活動期UCでは、陽性細胞1~2個が24%で、5個以下が44%、12個以下が84%となり、最大21個が1腺管にみられた(図4)。これらの場合のp53陽性細胞の染色様式は、一般に薄い褐色で、散在性に出現し、対照群ばかりでなく活動期UCでもすべて増殖帯の中に限局していた。21個のp53陽性細胞がみられた活動期UCでも、これら細胞が連続して5つ以上の細胞集団を形成することはなかった。すなわち、p53染色結果はUC粘膜や正常大腸粘膜では陰性が散在性で、p53

蛋白過剰発現はみられなかった(表4, 図5).

p53 LIは活動期UCで有意に高く(図6), Ki-67 LIは緩解期UCに比べ, 活動期UCと治癒進行期UCで有意に高かった(図7). p53 LI/Ki-67 LI比も活動期UCでのみ有意に高かった(図8). 増殖帯の長さは, 対照群に比べ, 活動期UCと治癒進行期UCで有意に延長していた(表5). しかし, 緩解期UCと対照群の間では, 増殖帯の長さに違いはみられなかった. また, 腺管長における増殖帯長の比では, 活動期, 治癒進行期はいずれも対照群および緩解期に比し有意に高かった(表5).

2-2) UCに合併した大腸腫瘍のp53蛋白発現

対象病変は, Riddellらの基準⁹⁾に沿って, 抽出されたものである. これら病変のp53染色結果をみると, びまん性陽性が浸潤癌で100%(6/6), HGDで100%(6/6), LGDで73%(11/15)にみられた(表6, 図9~14). p53染色結果が散在性陽性であったLGDの4病変は, H・E標本上, びまん性陽性例のLGD病変と同様の組織所見を示した(図15).

一方, 筆者らが腺腫と判定した病変では, p53蛋白過剰発現は5%(2/37)で, そのp53染色結果は巣状集簇性陽性(2病変とも1腺管で)であった(表6, 図16). この巣状集簇性陽性の組織像は, H・E標本上, p53陰性部やp53散在性陽性部の組織像と同様であった.

3. UCに合併した大腸腫瘍のK-ras遺伝子異常

K-ras変異はLGDの8病変中1病変(最大径50mm)にのみ認められ, HGDで0/5, 浸潤癌では0/7であった. UC合併大腸癌・dysplasiaでは5%(1/20)であった(図17). これに対し, UCに合併した腺腫ではK-ras変異が20%(4/20)にみられ, その頻度は5mm以下で15%(2/13), 5<x<10mmで20%(1/5), 10mm以上で50%(1/2)となった. K-ras変異の有無とKi-67 LIや増殖帯の位置(全層型か表層型か)の間に相関はなかった.

4. UCに合併した大腸腫瘍のAPC遺伝子異常

APC遺伝子変異は, UC合併浸潤癌で33%(2/6), HGDで50%(1/2), LGDで43%(3/7), 腺腫で56%(4/7)であった(表7). 病変間でAPC遺伝子の変異率に差はない傾向にあった. また, 諸家の報告とほぼ同様の結果であった.

5. UC合併大腸腫瘍内の内分泌細胞とパネート細胞のp53蛋白発現と細胞増殖能

5-1) 対象とした内分泌細胞とパネート細胞が腫瘍性であることの再確認

内分泌細胞ないしパネート細胞は, p53がびまん性陽性を示した癌6病変, HGD5病変とLGD9病変の粘膜内に主にみられた. これら分化細胞は, (1)p53陽性細胞に取り囲まれていたこと(図18), (2)未分化なp53陽性細胞と核形態的計測値に差がなく(表8), (3)UC部非腫瘍腺管内の分化細胞と比較して数が圧倒的に多く(図19), (4)腺管の下1/3だけでなく, 中1/3から上1/3にも多くみられた(図20).

p53染色結果が散在性のLGD2病変にみられた内分泌細胞とパネート細胞は, 組織学的にp53びまん性陽性例のそれら分化細胞と酷似していた.

5-2) 腫瘍性内分泌細胞と腫瘍性パネート細胞のp53とKi-67陽性率

CGA陽性の腫瘍細胞は540個のすべてでp53染色陰性であったが、Ki-67染色ではわずか5.1%が陽性であった(表9)。

一方、癌とHGDではパネート細胞がなく、LGDでみられたパネート細胞はすべて、p53とKi-67染色に陰性であった(表10)。

5-3) 腫瘍性未分化細胞のp53・Ki-67陽性率

びまん性p53陽性の腫瘍内でも、内分泌細胞やパネート細胞ばかりでなく、一部の粘液細胞もp53染色が陰性であった。そこで、p53がびまん性に陽性の腫瘍内にある未分化細胞(内分泌細胞・パネート細胞・粘液細胞を除いた細胞を未分化細胞と定義する)がどの程度のp53 LIおよびKi-67 LIを示すかを検討した。p53 LIは、sm浸潤癌の粘膜部で92.8%、sm浸潤部で97.5%、HGDで93.8%、LGDで93.1%であり、ほぼそれぞれに対応する部位でのKi-67 LIは、それぞれで、64.9%、37.1%、67.5%、67.9%であった(表11)。これらの値は、内分泌細胞およびパネート細胞のp53 LIやKi-67 LIと比較すると、有意に高い値を示していた(いずれも $p < 0.01$)。

6. UCに合併した大腸腫瘍の浸潤能と組織所見

6-1) 浸潤能

低異型度癌(渡辺分類)のみから成る15病変(すべて分化型癌)はすべて粘膜内癌であった。これに対し、高・低異型度癌が混在した癌9病変のうち、3病変がsm以深へ浸潤していた(図21)。3病変のうち、1病変では低異型度と高異型度の両方の分化型癌が浸潤していた。残りの2例のうち、1例では粘膜内にある高異型度分化型癌のみが浸潤し、他の1例では粘膜内の低異型度分化型癌と高異型度印環細胞のうち後者のみが浸潤していた。粘膜内部分の癌が高異型度癌(分化型癌が1例、印環細胞癌が2例)から成る3例では、この高異型度癌部分が浸潤していた。すなわち、低異型度癌部分が主にsm以深へ浸潤したものはなく、すべて高異型度癌が主に浸潤していた(表12)。

次に、癌の異型度と大きさの関係をみた(図22)。一般に高異型度癌は大きい傾向にあった。

深部浸潤した高異型度癌は、低異型度癌に比べて、粘膜内病変が小さいときからsm以深へ浸潤しやすく、その浸潤量(面積)が多いかどうかを検討した。このため、粘膜内癌部分の面積と深部浸潤部の面積比を比較した。その面積比は低異型度癌で小さく、逆に高異型度癌で大きかった(表13)。すなわち高異型度癌は、低異型度癌に比べて、粘膜内病変が小さい段階でsm以深へ浸潤していた。

6-2) 粘膜筋板の厚さ・脈管浸潤能

粘膜内癌がsm浸潤する際に、バリアーとなるのが粘膜筋板である。そこで、低異型度癌と高異型度癌とで、癌部の粘膜筋板の厚さを比較した。厚さは、前者で $348 \pm 163 \mu\text{m}$ (9症例)、後者で $316 \pm 110 \mu\text{m}$ (5症例)となり、両者間で有意差はなかった。癌合併例のUC部分の粘膜筋板の厚さ($336 \pm 142 \mu\text{m}$)は、非IBDのそれ $55 \pm 33 \mu\text{m}$ (10症例)に比べ有意に肥厚

していた。

sm以深へ浸潤した癌のうち、ly(+)は、低異型度癌(分化型癌)で0/1、高異型度癌で4/6(分化型癌のみでは1/3)、v(+)は、それぞれ、0/1と4/6(分化型癌のみでは1/3)、腹膜播種は、それぞれ、0/1と1/6(陽性の1例は印環細胞癌)で、これら陽性所見はすべて高異型度癌にのみ認められた。しかし、低異型度癌の1例はsmで神経浸潤を示した(図12)。

6-3)p53 LIおよびKi-67 LI

p53がびまん性陽性例のp53 LIは、低異型度癌の粘膜内部で $82.3 \pm 8.9\%$ (11症例, 36領域; at randomに腫瘍内で領域を選び、1領域あたり250~350個の腫瘍細胞を計測した)であり、高異型度癌の粘膜内部で $86.3 \pm 8.4\%$ (6症例, 25領域)、sm以深の浸潤部で $88.9 \pm 7.6\%$ (6症例, 40領域)で、それぞれの間で有意差はなかった(図23)。Ki-67 LIは低異型度癌の粘膜内で $44.5 \pm 15.1\%$ (p53 LI測定領域に対応する領域)、高異型度癌の粘膜内で $58.7 \pm 10.8\%$ (同)、を示し、後者で有意に高値を示した($p < 0.001$)。しかし、同じ高異型度癌でも、Ki-67 LIは粘膜内癌部分で $58.7 \pm 10.8\%$ (同)、sm以深部で $41.2 \pm 15.9\%$ (同)となり、前者で有意に高値であった($p < 0.001$)(図23)。

6-4)分化細胞出現頻度

分化細胞の一つであるパネート細胞の陽性腺管出現頻度は、低異型度癌で 22.4% (109/486)、高異型度癌で 1.4% (2/139)であった($p < 0.01$)。クロモグラニン陽性内分泌細胞の陽性腺管出現頻度は、低異型度癌で 69.4% (288/415)、高異型度癌で 43.8% (39/89)であった。

IV 考察

UCに発生する粘膜内腫瘍には、dysplasiaと腺腫がある。DysplasiaはUC大腸粘膜の他の部位に癌が存在することを示唆する有力な指標であると考えられており、dysplasiaであれば大腸全摘が必要となる。腺腫は通常の大腸粘膜に発生するものと同様で、加齢とともに合併しやすく、摘除のみで治療として十分である。このように腺腫とdysplasiaでは組織発生の相違のみならず、治療面でも取り扱いが全く異なるのでその鑑別がきわめて重要である。しかし、dysplasiaと腺腫の鑑別は、無基性病変・扁平隆起・平坦病変などの場合では、肉眼的にも組織学的にも判定が困難である。Pit patternに関して、dysplasiaのpit patternは腺管腺腫や腺管絨毛腺腫と似ており、pit patternからはdysplasiaと腺腫との鑑別は困難であった。

今回の成績から、渡辺の分類に従って診断したUCに合併する「腺腫」は年齢、肉眼形態や通常の組織所見ばかりでなく、p53免疫染色によるp53染色結果やK-ras変異の頻度も、通常の腺腫と極めて近似していた。逆にdysplasiaはUC合併腺腫と年齢・肉眼型・大きさ・p53染色結果・K-ras変異頻度で異なっていた。従って、UCに合併する腺腫は通常の「腺腫」として、dysplasiaと別に取り扱われるべきである。本研究結果から、UCにおけるdysplasiaと腺腫の間には大きさや肉眼型に差はあるものの、鑑別に最も有用な指標はp53免疫染色であり、過剰発現陽性のうち、びまん性に染まるものはdysplasiaであり、巣状集簇性に染まるものは腺腫と考えられた。しかし、p53過剰発現(-)の場合には、dysplasiaと腺腫の鑑別が難しく、他の指標を見出すことが必要であろう。

UCに合併する大腸癌の遺伝子異常についてはいくつかの報告がある。Burmer⁴⁰⁾は、p53のLOH(loss of heterozygosity)が癌85%(22/26)、HGD 63%(25/40)、LGD 33%(7/21)、dysplasia不明 9%(5/57)、dysplasia陰性 6%(1/18)にみられたと報告し、UCでは癌発生の極く初期にp53のLOHが生じていると結論づけている。Yin⁴¹⁾は、p53変異が癌94.7%(18/19)、dysplasia 66.7%(8/12)にみられたことから、UCではp53変異が癌発生の初期から起こる一般的な変化と述べている。Brentnall⁴²⁾は、p53のLOHが癌83%(5/6)、dysplasia 44%(11/25)、dysplasia不明 0%(0/9)、dysplasia陰性 0%(0/1)にみられ、p53変異が、それぞれ、83%(5/6)、48%(23/48)、3%(1/34)、29%(5/17)に認められたことから、p53変異はLOHの前に起こり、UCでの癌発生前に働くと述べている。

p53免疫染色では、Taylor⁴³⁾が癌52%(11/21)、HGD 45%(5/11)、LGD 11%(1/9)に陽性、Harpuz⁴⁴⁾は癌61%(34/56)、HGD 83%(10/12)、LGD 50%(11/20)に、Ilyas⁴⁵⁾は癌100%(3/3)、HGD 67%(4/6)、LGD 40%(2/5)に陽性であったと報告している。今回の成績ではp53過剰発現が癌で100%(6/6)、HGDで100%(6/6)、LGDで73%(11/15)、と高率であった(表14)。以上の成績を総合すると、UCの腫瘍化には初期からp53異常が高率に働いていると推定される。

K-ras変異は、UC合併大腸癌やdysplasiaでは、非UCのそれらに比べて、一般に低い傾向にある(表15)^{46)~52)}。今回の成績でも、LGDの1例(大きさ50mm)にのみK-ras変異がみられ、UC合併癌全体では5%(1/20)であった。一方、UC合併の腺腫ではK-ras変異が20%(4/20)にみられ、その大きさ別では5mm以下で15%(2/13)、5<x<10mmで20%(1/5)、10mm以上で50%(1/2)となり、これは非UC例腺腫のK-ras変異率(5mm以下で3%(1/38)、5<x<10mmで

16%(6/37), 10mm以上で30%(8/27)⁶⁰⁾に近似していた。以上の成績から、UCに合併する癌やdysplasiaの発生にはK-ras変異の関与がほとんどなく、UC合併腺腫の発生にはK-ras変異が関与すると考えられる。

APC変異に関しては、Tarminら⁵³⁾がUC合併の癌とdysplasiaでAPC変異6%(2/33)であるのに対し、炎症性腸疾患を合併しない大腸癌では74%(17/23)であったと報告しており、Kernら⁵⁴⁾はUC合併の癌とdysplasiaで11%(1/9)のAPC変異を報告している(表7)。両報告とも、UC合併腫瘍のAPC変異率が炎症性腸疾患を合併しない腺腫のそれ(41~63%)や大腸癌のそれ(33~60%)^{55)~57)}に比べて低いことから、UC合併癌はadenoma-carcinoma sequenceではなく、dysplasia-carcinoma sequenceで発生する、と考察している。

以上のことから、UCの癌発生に関与する遺伝子変異は図24のように考えることができよう。第1の経路として、UC粘膜を母地としてp53異常ないしp53とAPC異常でLGDが発生し、それがHGDへprogressionし(別の遺伝子異常が起こっている可能性もある)、増殖能が増し(Ki-67 LI増加)、浸潤癌へと進展する(さらに別の遺伝子異常が起こっている可能性あり)経路である。症例の発生頻度からみると、これがUC合併癌の主経路と考えられる(図24)。第2の癌発生経路は、p53とAPC異常でHGDが発生するものである(7%)。今回の検討では、2病変とも大きく、浸潤癌(20mmのsm癌、45mmのss癌)であったことから、初期にLGDが存在していた(すなわち、第1の経路)可能性もあろう。この経路は非UC例のde novo癌でも報告されている⁵⁸⁾。第3の経路は、非UC型癌と同様に、adenoma-carcinoma sequenceと同様の遺伝子異常^{56),59)}、すなわち、APC変異、次いでK-ras変異、そしてp53変異、で癌が発生するものである(7%、図24)。この経路で発生する癌は前二者で発生した癌に比べ、臨床的に発見しやすく、浸潤癌へ移行する時間は長いと推定される。症例が少なく、経路と遺伝子変異結果が相反する箇所もあるが、今後のデータ蓄積が待たれる。

UCに合併する癌とdysplasiaが通常の癌と同等、あるいはそれ以上にp53過剰発現率が高い理由について2点考えられる。1つはUCにおいて癌に至るpathwayが通常型と異なっておりK-rasを経ないでp53が早期から異常をきたすルートを進んでいること、そしてもう1つはdysplasiaがp53異常の点ですでに癌と同等であること、が推測される。非腫瘍粘膜で炎症が高度なほどp53陽性細胞がより多く出現していたが、いずれもp53過剰発現ではなく散在性に出現しており、p53 LI/Ki-67 LI比も100%を超える(p53 LI/Ki-67 LI \geq 100%がp53蛋白過剰発現の特徴²⁸⁾)をことはなかった。すなわちこれは炎症によって増殖が増えたことへの抑制として、wild-typeのp53蛋白が発現したものと考えられた³²⁾。炎症でp53蛋白が高頻度に出現することとUC合併癌やdysplasiaでp53蛋白過剰発現率が高いことに相関性は見い出せなかった。今後症例が集積されることでより明らかになるものと思われる。

Daniel⁶⁰⁾は、大腸の腺腫や腺癌に多数のパネート細胞がみられたと報告した(特に絨毛腺腫で82%、粘液癌で100%)。Lewin⁶¹⁾も、大腸の機能・発達異常では数は変わらないが、炎症および腫瘍性疾患でパネート細胞が増加することを報告した。波辺^{62),63)}は、銀還元細胞が胃腺腫の42.6%、胃癌の12.4%に認められること、銀還元細胞とパネート細胞の出現率は正比例すること、癌浸潤部にも銀還元細胞が認められること、腫瘍性分化細胞は未熟癌細胞の分化により生じてくることを報告した。このように、腫瘍病変でも内分泌細胞およびパネート細胞は出現する。

今回我々はUC合併腫瘍で、Ki-67LIがCGA陽性細胞で5.1%、パネート細胞で0%であると報告した。これは、胃内分泌細胞癌内のCGA陽性細胞がKi-67陽性率2.5%以下⁶⁴⁾、胃癌CGA陽性細胞がPCNA陽性率1%未満⁶⁵⁾との成績と近似している。Barbareschiら⁶⁶⁾は、肺のカルチノイドと小細胞癌を比較検討し、CGA陽性の神経内分泌細胞数が少ない小細胞癌では、PCNAやKi-67標識率が高かったことから、細胞増殖能が増大していることを報告している。しかし、この報告ではCGA陽性細胞自体が増殖しているかどうかを検討していない。今回の結果から、腫瘍内でも、CGA細胞やパネート細胞への分化は細胞増殖能の消失に強く関連すると考えられた。

さらに我々は、今回、p53変異によると推定される、p53蛋白びまん性発現のUC合併腫瘍細胞でもCGA陽性内分泌細胞やパネート細胞へ分化すると、p53染色がすべての細胞で陰性になることを報告した。Barbareschiら⁶⁶⁾は、肺の内分泌細胞腫瘍のうち、CGA陽性細胞が多いカルチノイドではp53蛋白発現はなく、それが少ない小細胞癌ではp53蛋白発現が83%に認められることを報告した。しかし、彼らは、CGA陽性内分泌細胞自体がp53免疫染色で陽性が否かを明らかにしておらず、CGA陽性内分泌細胞とp53蛋白発現との直接の相関を述べるには至っていない。Nishikuraら⁶⁴⁾は、p53蛋白過剰発現の胃内分泌細胞癌で、CGA陽性細胞のp53陽性率が1.9%以下であったと、報告している。

大腸ではびまん性のp53蛋白発現は癌に特徴的所見であることから、びまん性p53陽性腫瘍の細胞は、p53遺伝子変異に由来したもの⁶⁷⁾と考えられる。このようなp53変異細胞に属すると考えられるCGA陽性内分泌細胞やパネート細胞がp53蛋白発現を失う理由として、1)m-RNAへの転写が抑制されていること、2)蛋白が蓄積されなくなったこと、などが考えられよう。このような変化は、びまん性p53陽性扁平上皮癌の角化層や角質層部でもみられる⁶⁸⁾。またびまん性p53陽性腫瘍でも、粘液産生が高度で細胞異型が低下した部ではp53陽性核が著減する。この変化がどのような機序で起こるのかを今後明らかにする必要がある。

V まとめ

本研究でUCに合併する大腸腫瘍性病変を分子・形態病理学の立場から検討し明らかになったことをまとめる。

- (1) Dysplasia 21病変中、隆起を呈したのが9病変(42.9%)、平坦型が12病変(57.1%)であった。平坦型は、すべてLGDに相当し、HGDはなかった。色調は、24病変中19病変(79.2%)で褐色～黄褐色であった。実体顕微鏡による病変表面のpit patternは4病変(44.4%)が楕円～長楕円形、2病変(22.2%)が樹枝状、3病変が乳頭状突起の集簇からなるものであった。Ki-67 LIはHGDで $71.6 \pm 15.2\%$ (n=5)、LGDで $44.5 \pm 15.1\%$ (n=15)、腺腫で $53.9 \pm 9.1\%$ (n=37)であった(HGDvsLGD:p<0.01, HGDvs腺腫:p<0.01, LGDvs腺腫:有意差なし)。
- (2) 非腫瘍合併例において、p53染色結果はUC非腫瘍粘膜や正常大腸粘膜では陰性が散在性で、p53蛋白過剰発現はみられなかった。UC腫瘍病変のp53染色結果をみると、p53蛋白過剰発現が浸潤癌で100%(6/6)、HGDで100%(6/6)、LGDで73%(11/15)にみられ、い

ずれもびまん性陽性であった。一方、腺腫ではp53蛋白過剰発現は5%(2/37)で、いずれも巣状集簇性陽性であった。

(3)K-ras変異は低異型度癌で13%(1/8)、高異型度癌で0%(0/12)であり、UC合併大腸癌全体では5%(1/20)であった。これに対し、UCに合併した腺腫ではK-ras変異が20%(4/20)にみられた。

(4)APC遺伝子変異は、UC合併浸潤癌で33%(2/6)、HGDで50%(1/2)、LGDで43%(3/7)、腺腫で56%(4/7)で、病変間でAPC遺伝子の変異率に差はない傾向にあった。

(5)UC合併腫瘍にみられたCGA陽性腫瘍細胞は540個のすべてでp53染色陰性であったが、Ki-67染色ではわずか5.1%が陽性であった。腫瘍性バネート細胞はすべて、p53とKi-67染色に陰性であった。

VI 結語

UCに合併するdysplasiaと腺腫の鑑別が肉眼像や組織像で困難な時は、p53免疫染色が客観的なマーカーとして有用である、と考えられた。

文献

- 1) Crohn BB, Rosenberg H. Sigmoidoscopic picture of chronic ulcerative colitis. *Am J Med Sci* 170:220-228,1925.
- 2) Goldgraber MB, Kirsner JB. Carcinoma of the colon in ulcerative colitis. *Cancer* 17:657-665,1964.
- 3) Katzka I, Brody RS, Morris E, Katz S. Assessment of colorectal cancer risk in patients with ulcerative colitis: experience from a private practice. *Gastroenterology* 85:22-29,1983.
- 4) Riddell RH, Goldman H, Ransoloff DF, Appelman HD, Fenoglio CM, Haggitt RC, Ahren C, Correa P, Hamilton SR, Morson BC, Sommers SC, Yardley JH. Dysplasia in inflammatory bowel disease: Standardized classification with provisional clinical applications. *Hum Pathol* 14:931-938,1983.
- 5) Derroede GJ, Taylor WF, Sauer WG. Cancer risk and life expectancy of children with ulcerative colitis. *N Engl J Med* 285:17-21,1971.
- 6) Morson BC, Pang SC. Rectal biopsy as an aid to cancer control in ulcerative colitis. *Gut* 8:423-434,1962.
- 7) Nugent FW, Haggitt RC. Long-term follow-up, including cancer surveillance, for patients with ulcerative colitis. *Clin Gastroenterol* 9:459-468,1980.
- 8) Fuson JA, Farmer RG, Hawk WA, Sullivan BH. Endoscopic surveillance for cancer in chronic ulcerative colitis. *Am J Gastroenterol* 73:120-126,1980.
- 9) Granqvist S, Gabrielsson N, Sundelin P, Thorgeirsson T. Precancerous lesions in the mucosa in ulcerative colitis. *Scand J Gastroenterol* 15:289-296,1980.
- 10) Dickinson RJ, Dixon FM, Axon ATR. Colonoscopy and the detection of dysplasia in patients with longstanding ulcerative colitis. *Lancet* 2:620-622,1980.
- 11) Waye JD, Braunfeld S, Geller S. Dysplasia and ulcerative colitis: a colonoscopy study. *Gastroenterology* 82:1208(Abstr.),1982.
- 12) Hulten L, Kewenter J, Ahren C. Precancer and carcinoma in chronic ulcerative colitis: a histopathological and clinical investigation. *Scand J Gastroenterol* 7:663-669,1972.
- 13) Cook MG, Goligher JC. Carcinoma and epithelial dysplasia complicating ulcerative colitis. *Gastroenterology* 68:1127-1136,1975.
- 14) Fenoglio CM, Pascal RR. Adenomatous epithelium, intraepithelial anaplasia, and invasive carcinoma in ulcerative colitis. *Am J Dig Dis* 18:558-562,1973.
- 15) Gewertz BL, Dent TL, Appelman HD. Implications of precancerous rectal biopsy in patients with inflammatory bowel disease. *Arch Surg* 111:326-329,1976.
- 16) Nugent FW, Haggitt RC, Colcher H, Kutteruf GC. Malignant potential of chronic ulcerative colitis: preliminary report. *Gastroenterology* 76:1-5,1979.
- 17) Yardley JH, Keren DE. "Precancer" lesions in ulcerative colitis: a retrospective study of rectal biopsy and colectomy specimens. *Cancer* 34:835-844,1974.
- 18) Lennard-Jones JE, Morson BC, Ritchie JK, Shove DC, Williams CB. Cancer in colitis: Assessment of the individual risk by clinical and histological criteria. *Gastroenterology* 73:1280-1289,1977.
- 19) Blackstone MO, Riddell RH, Rogers BH, Levin B. Dysplasia-associated lesion or mass(DALM) detected by colonoscopy in long-standing ulcerative colitis: an indication for colectomy. *Gastroenterology* 80:366-374,1981.
- 20) Dobbins WO III. Current status of the precancer lesion in ulcerative colitis. *Gastroenterology* 73:1431-1433,1977.
- 21) Myrvold HE, Koek NG, Ahren C. Rectal biopsy and precancer in ulcerative colitis. *Gut* 15:301-304,1974.

- 22)厚生省特定疾患難治性炎症性腸管障害調査研究班：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-。日本大腸肛門病会誌 47：547-551, 1994。
- 23)渡辺英伸, 味岡洋一, 山口正康, 野田裕, 本間照, 本山悌一。大腸腺腫と癌の関係—私の組織診断基準。胃と腸 24：253-259, 1989。
- 24)渡辺英伸, 味岡洋一。大腸良悪性境界病変の病理。病理と臨床 6：1280-1292, 1988。
- 25)松田圭二, 渡辺英伸, 味岡洋一。潰瘍性大腸炎と大腸癌。Molecular Medicine 32：1158-1168, 1995。
- 26)工藤進英。早期大腸癌—平坦陥凹型へのアプローチ。医学書院, 1993。
- 27)Shi SR, Key ME, Kalra KL。Antigen retrieval in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues: An enhancement method for immunohistochemical staining based on microwave oven heating of tissue sections. J Histochem Cytochem 39:741-748,1991。
- 28)渡辺英伸, 味岡洋一, 小林正明, 人見次郎, 本山悌一。早期大腸癌と分子生物学。胃と腸 29(増刊)：171-180,1994。
- 29)Matsuda K, Watanabe H, Ajioka Y, Kobayashi M, Saito H, Sasaki M, Yasuda K, Kuwabara A, Nishikura K, Muto T. A case of ulcerative colitis with p53 overexpression preceding overt histological abnormalities of the epithelium. J Gastroenterol 31:860-867,1996。
- 30)Oohashi Y, Watanabe H, Ajioka Y, Hatakeyama K. p53 immunostaining distinguishes malignant from benign lesions of the gall-bladder. Pathology International 45：58-65,1995。
- 31)渡辺英伸, 中川悟, 遠藤泰志, 西倉健, 味岡洋一。食道扁平上皮の上皮内癌と異形成の組織診断。胃と腸(増刊) 30：407-416, 1995。
- 32)Matsuda K, Watanabe H, Jass JR, Ajioka Y, Kobayashi M, Saito H, Sasaki M, Yasuda K, Kuwabara A. Frequency of p53-positive cells in differing histological phases of ulcerative colitis. Acta Medica et Biologica 43:197-203,1995。
- 33)味岡洋一, 渡辺英伸, 小林正明, 松田圭二, 太田玉紀, 齊藤英俊, 佐々木正貴。潰瘍性大腸炎に合併する大腸癌・dysplasiaの肉眼・実体顕微鏡と生検組織診断。胃と腸 30：629-642, 1995。
- 34)本間照。抗DNA polymerase α モノクローナル抗体を用いた大腸上皮細胞の増殖に関する研究-特に大腸腺腫の生長に関して-。新潟医学会雑誌 106：89-97, 1992
- 35)松田圭二, 渡辺英伸。潰瘍性大腸炎の癌化—免疫組織化学の立場から—。医学のあゆみ。178：622-629, 1996
- 36)松田圭二, 渡辺英伸, 太田玉紀, 味岡洋一。潰瘍性大腸炎に随伴する癌およびdysplasia内の腫瘍性内分泌細胞とパネート細胞ではp53異常蛋白発現と細胞増殖能が消失・著減する。日消誌 92：1922-1928, 1995。
- 37)Kobayashi M, Watanabe H, Ajioka Y, Honma T, Asakura H. Effect of K-ras mutation on morphogenesis of colorectal adenomas and early cancers; relationship to distribution of proliferating cells. Hum Pathol 27:1043-1049,1996。
- 38)Ohshima S, Shimizu Y, Takahama M. Detection of c-K-ras gene mutation in paraffin sections of adenocarcinoma and atypical bronchioloalveolar cell hyperplasia of human lung. Virchows Arch 424:129-134,1994。
- 39)Kurahashi H, Takami K, Oue T, Kusafuka T, Okada A, Tawa A, Okada S, Nishisho I. Biallelic inactivation of the APC gene in hepatoblastoma. Cancer Res 55:5007-5011,1995。

- 40)Burmer GC, Rabinovitch PS, Haggitt RC, Crispin DA, Brentnall TA, Kolli VR, Stevens AC, Rubin CE. Neoplastic progression in ulcerative colitis: Histology, DNA content, and loss of a p53 allele. *Gastroenterology* 103:1602-1610,1992.
- 41)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* 104:1633-1639,1993.
- 42)Brentnall TA, Crispin DA, Rabinovitch PS, Haggitt RC, Rubin CE, Stevens AC, Burmer GC. Mutations in the p53 gene: An early marker of neoplastic progression in ulcerative colitis. *Gastroenterology* 107:369-378,1994.
- 43)Taylor HW, Boyle M, Smith SC, Bustin S, Williams NS. Expression of p53 in colorectal cancer and dysplasia complicating ulcerative colitis. *Br J Surg* 80:442-444, 1993.
- 44)Harpaz N, Peck AL, Yin J, Fiel I, Hontanosas M, Tong TR, Laurin JN, Abraham JM, Greenwald BD, Meltzer SJ. p53 protein expression in ulcerative colitis-associated colorectal dysplasia and carcinoma. *Hum Pathol* 25:1069-1074,1994.
- 45)Ilyas M, Talbot IC. p53 expression in ulcerative colitis: a longitudinal study. *Gut* 37:802-804,1995.
- 46)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* 99:416-420,1990.
- 47)津田倫樹. 潰瘍性大腸炎の癌化例におけるras系遺伝子点突然変異とp21蛋白質発現の検討. *日本大腸肛門病学会誌* 47:315-323, 1994.
- 48)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* 144:767-775,1994.
- 49)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*. 50:3627-3630,1990.
- 50)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* 64:174-178,1991.
- 51)Chen J, Compton C, Cheng E, Fromowitz F, Viola MV. c-Ki-ras mutations in dysplastic fields and cancers in ulcerative colitis. *Gastroenterology* 102:1983-1987,1992.
- 52)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* 108:383-392,1995.
- 53)Tärmin 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* 55:2035-2038,1995.
- 54)Kern SE, Redston M, Seymour AB, Caldas C, Powell SM, Kornacki S, Kinzler KW. Molecular genetic profiles of colitis-associated neoplasms.
- 55)Miyaki M, Konishi M, Kikuchi-Yanoshita R, Enomoto M, Igari T, Tanaka K, Muraoka M, Takahashi H, Amada Y, Fukayama M, Maeda Y, Iwama T, Mishima Y, Mori T, Koike M. Characteristics of somatic mutation of the adenomatous polyposis coli gene in colorectal tumors. *Cancer Res* 54:3011-3020,1994.
- 56)Powell SM, Zilz N, Beazer-Barclay Y, Bryan TM, Hamilton SR, Thibodeau SN, Vogelstein B, Kinzler KW. APC mutations occur early during colorectal tumorigenesis. *Nature* 359:235-237,1992.

- 57) Ichii S, Takeda S, Horii A, Nakatsuru S, Miyoshi Y, Emi M, Fujiwara Y, Koyama K, Furuyama J, Utsunomiya J. Detailed analysis of genetic alterations in colorectal tumors from patients with and without familial adenomatous polyposis(FAP). *Oncogene* 8:2399-2405,1993.
- 58) 中村恭一. 大腸癌の構造, 医学書院, 東京, 1989.
- 59) Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton SR, Kern SE, Preisinger AC, Leppert M, Nakamura Y, White R, Smits AMM, Bos JL. Genetic alterations during colorectal-tumor development. *N Engl J Med* 319:525-532,1988.
- 60) Daniel AS. Paneth cell metaplasia in disease of the colon and rectum. *Arch Pathol* 97 : 343-347,1974.
- 61) Lewin K. The Paneth cell in disease. *Gut* 10 : 804-811,1969.
- 62) Watanabe H. Argentaffin cells in adenoma of the stomach. *Cancer* 30 : 1267-1274, 1972.
- 63) 渡辺英伸. 非癌胃粘膜, 胃腺腫および胃癌内の嗜銀細胞. *癌の臨床* 20 : 519-534, 1974.
- 65) Ooi A, Hayashi H, Katsuda S. Gastric carcinoma cells with endocrine differentiation show no evidence of proliferation. *Hum Pathol* 23 : 736-741,1992.
- 66) Barbareschi M, Girlando S, Mauri FA, Arrigoni G, Laurino L, Dalla Palma P, Doglioni C. Tumour suppressor gene products, proliferation, and differentiation markers in lung neuroendocrine neoplasms. *J Pathol* 166 : 343-350,1992.
- 67) Rodrigues NR, Rowan A, Smith MFE, Kerr IB, Bodmer WF, Gannon JV, Lane DP. p53 mutations in colorectal cancer. *Proc natl Acad Sci USA* 87 : 7555-7559,1990.
- 68) 渡辺英伸, 中川悟, 遠藤泰志, 西倉健, 味岡洋一. 食道扁平上皮の上皮内癌と異形成の組織診断. *胃と腸* 30 : 407-416,1995.







分類	シェーマ	腺口形態の特徴	腺口1個の 大きさ(mm)
I		円形(正常 pit)	0.07 ± 0.02
II		星芒状・乳頭型	0.09 ± 0.02
III _s		正常 pit より小型の 管状・類円形	0.03 ± 0.01
III _L		正常 pit より大型の 管状・類円形	0.22 ± 0.09
IV		溝紋型・樹枝状・脳 回転状	0.93 ± 0.32
V		不整・無構造(pit 構 造の消失)	—

図 1 pit pattern (腺口形態) 分類

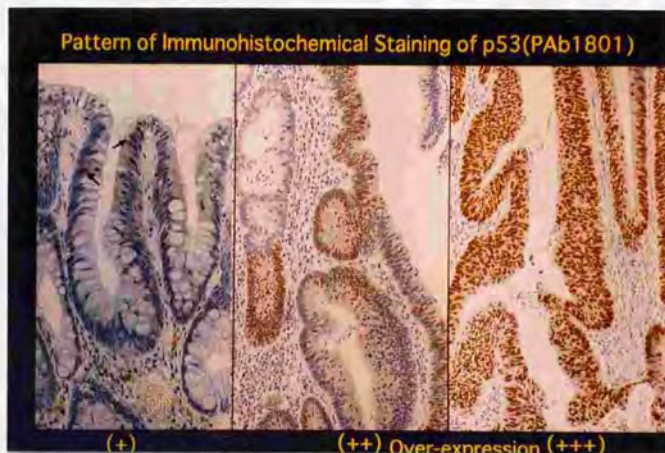


図2

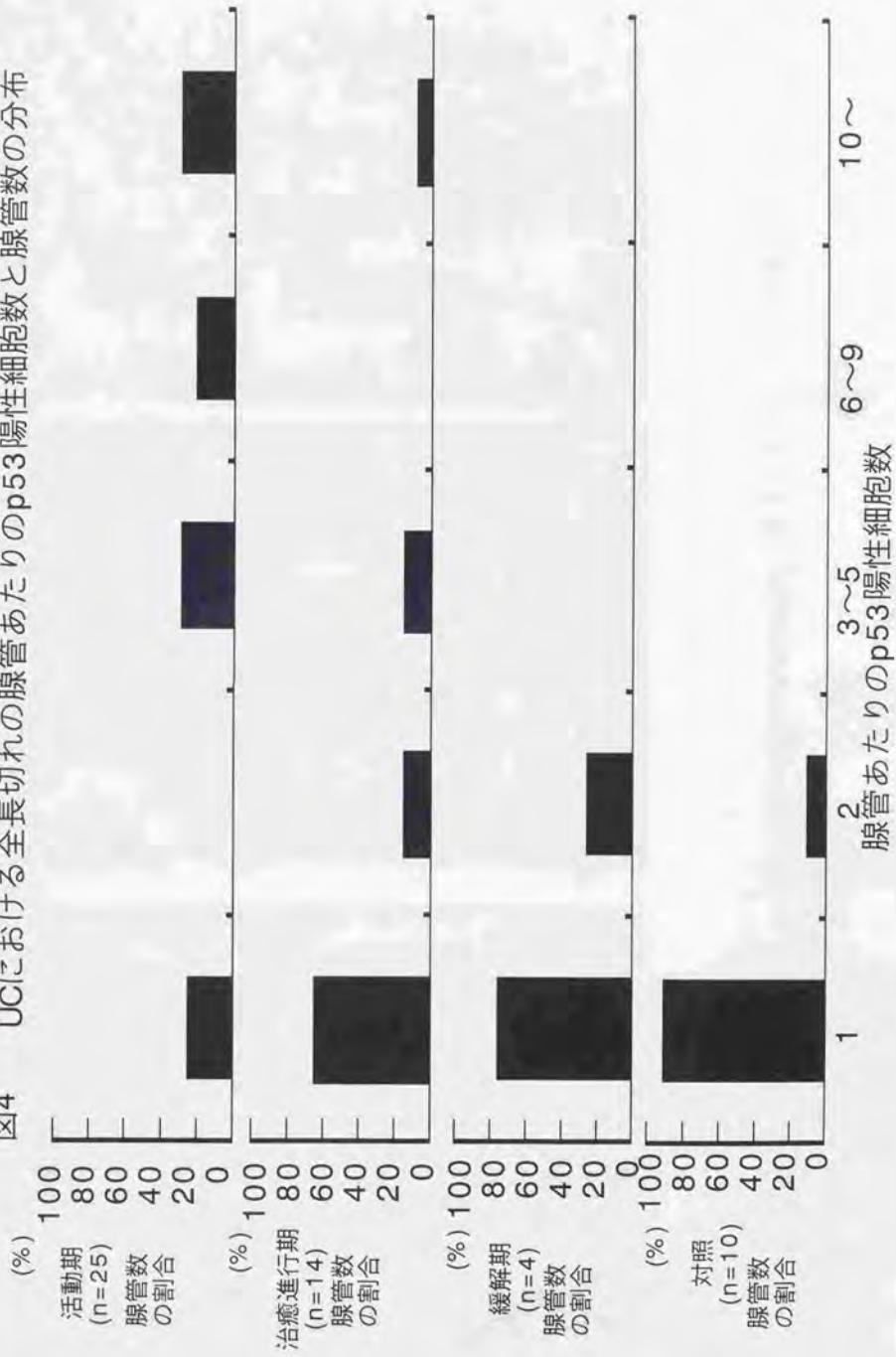
p53免疫染色による蛋白発現パターン．左が散在性(scattered)(黒矢印：陽性細胞)，中央が巣状集簇性(nested)，右がびまん性(diffuse)．中央と右が蛋白過剰発現陽性．

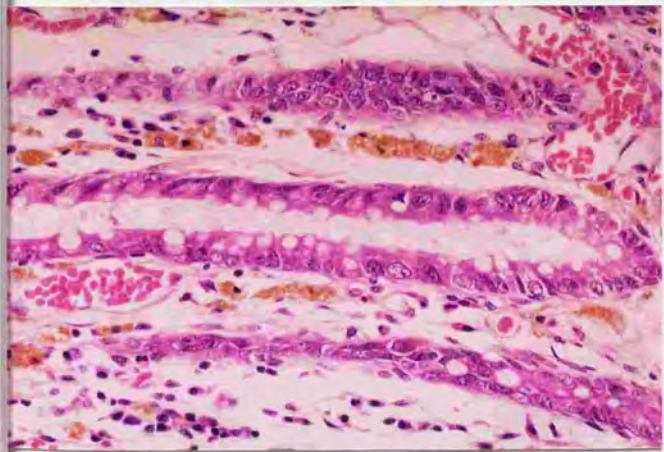


図3

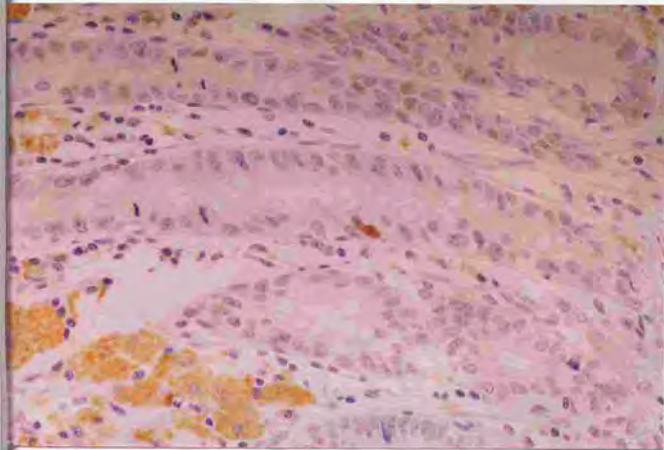
低異型度癌(渡辺らの分類), またはlow-grade dysplasia(Riddellらの分類). 実
体顕微鏡像では, 乳頭状(白線の右側), 樹枝状・長楕円形(白線中央部)を示
している. (NI-7032-34).

図4 UCにおける全長切れの腺管あたりのp53陽性細胞数と腺管数の分布

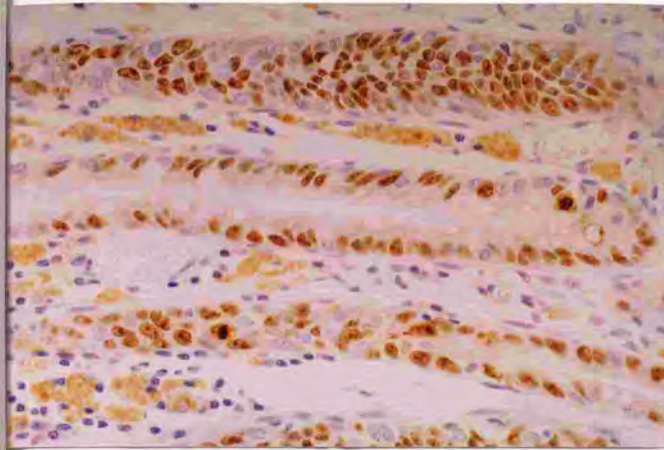




a



b



c

図5

UC非腫瘍粘膜部(治療進行期). p53陽性細胞が増殖帯内に散在性に存在している(a:H・E染色,x100, b:p53免疫染色,x100, c:Ki-67免疫染色,x100).

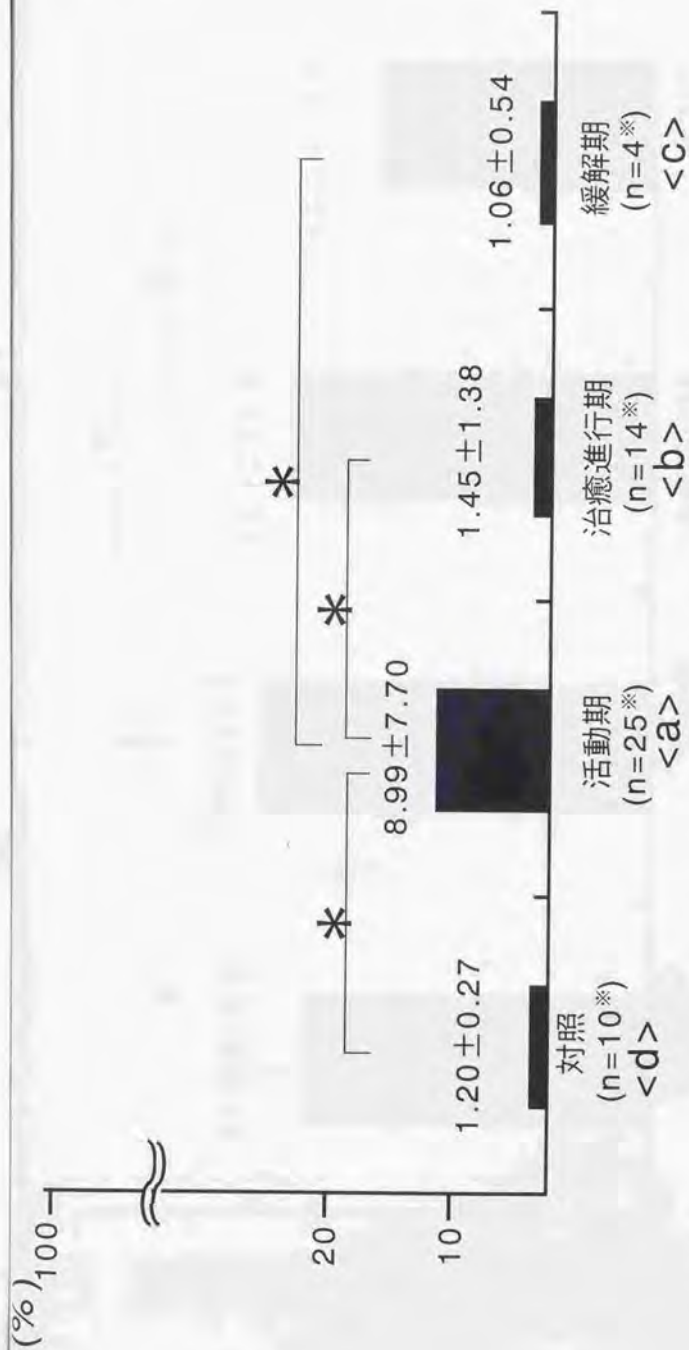


図 6 UCの非腫瘍腺管の増殖帯におけるp53 labeling index

※ 垂直切れの腺管数

※ :p<0.01

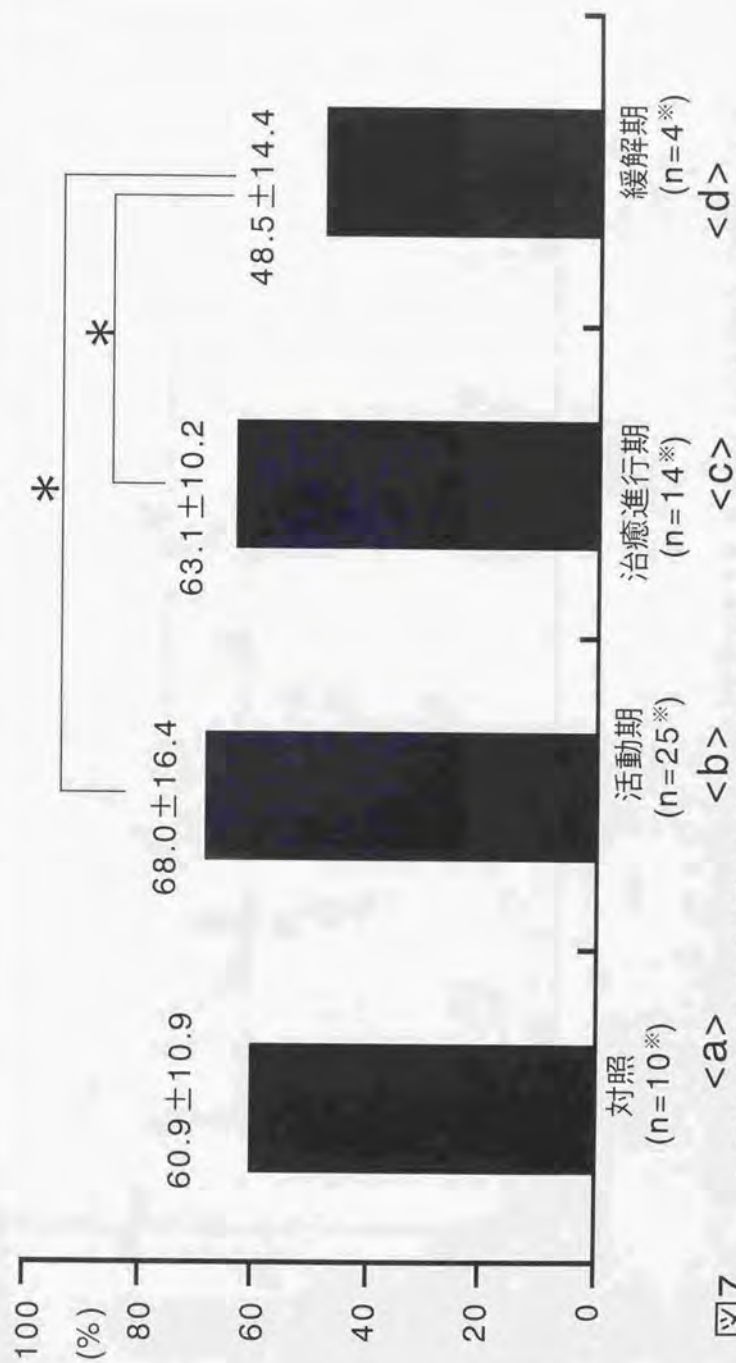


図7 UCの非腫瘍腺管の増殖帯におけるKi-67 labeling index

* 垂直切れの腺管数(図4で検討した腺管に相当)

*: p<0.05

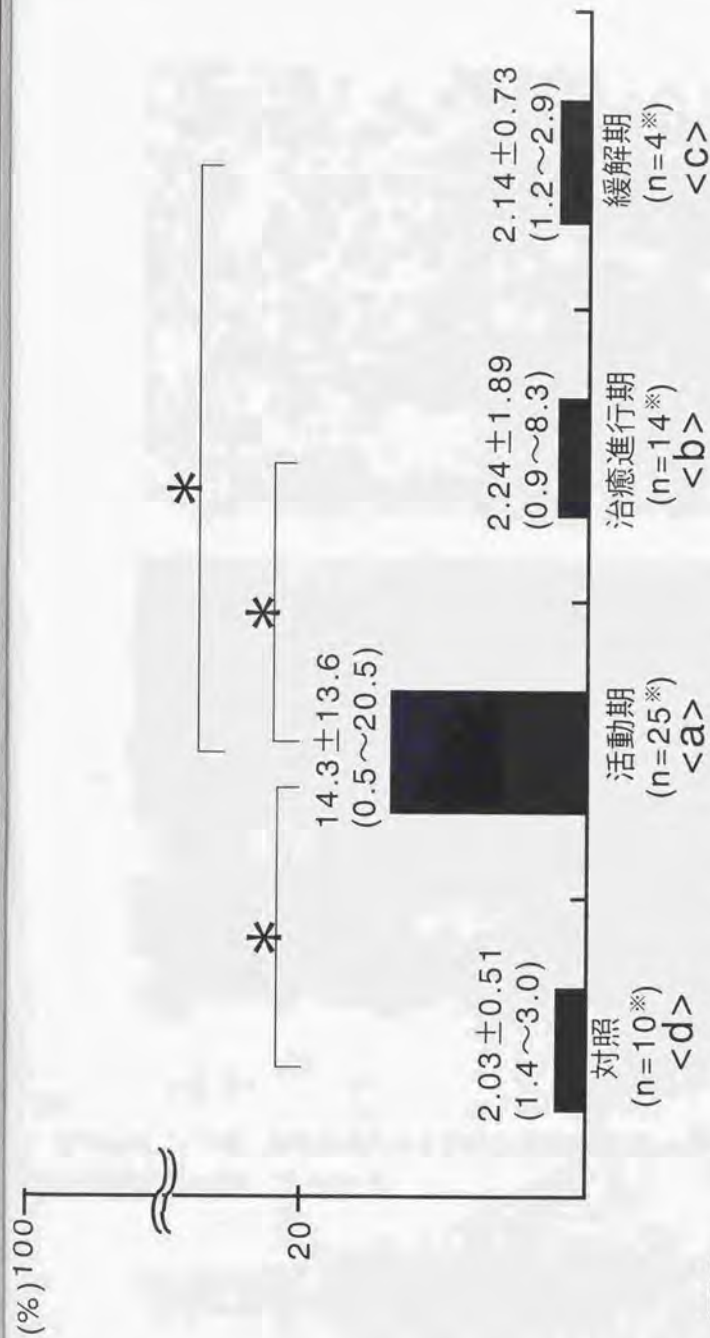


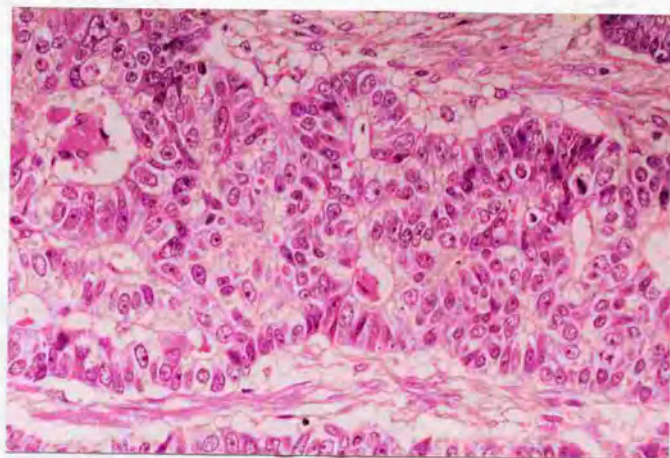
図8

UCの非腫瘍腺管の増殖帯におけるp53とKi-67 labeling indexの比

* 垂直切れの腺管数(図4で検討した腺管に相当)

* : p < 0.01

a



b

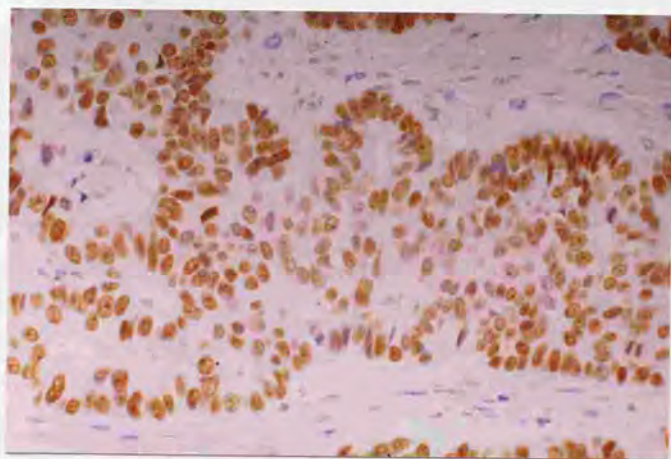
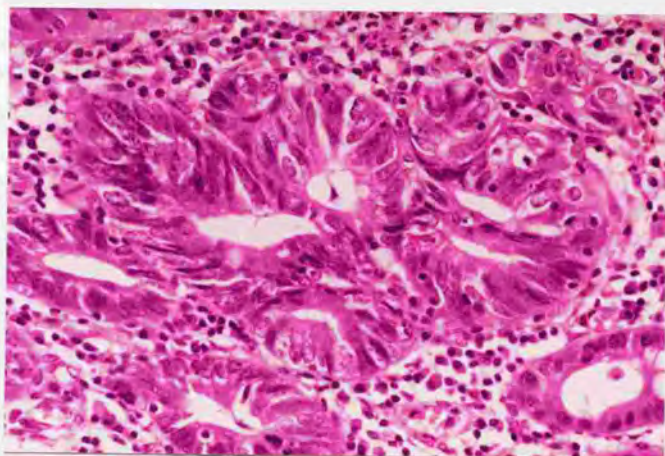


図9

びまん性にp53蛋白過剰発現を示す高異型度癌(進行癌) (a:H・E染色,x100, b:p53免疫染色,x100, NI-5894-3).

a



b

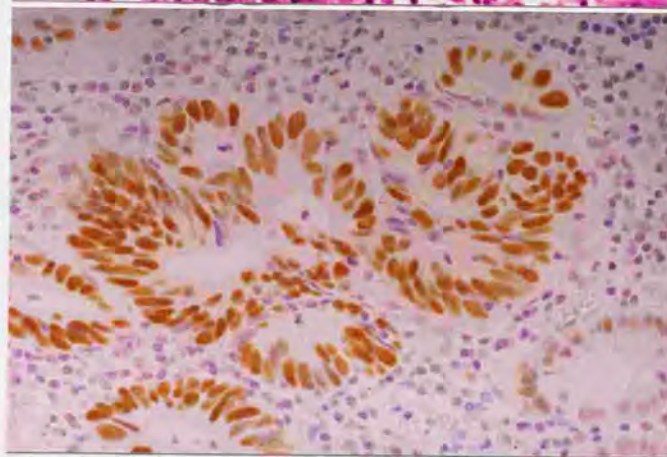
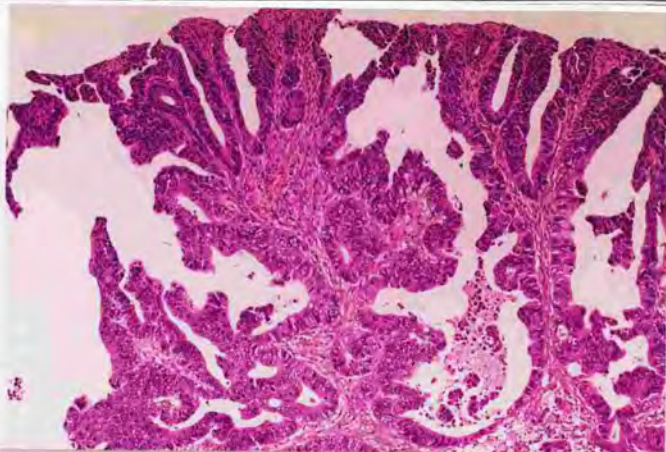


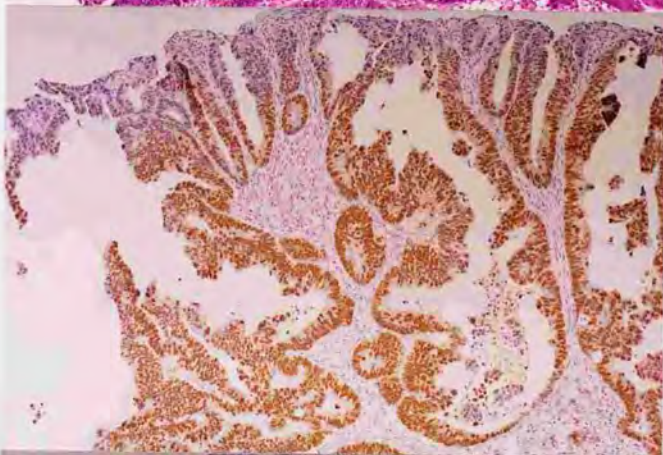
図10

びまん性にp53蛋白過剰発現を示す高異型度癌粘膜内癌(渡辺らの分類), またはhigh-grade dysplasia(Riddellらの分類)(a:H・E染色,x100, b:p53免疫染色,x100, NI-5894-26).

a



b



c

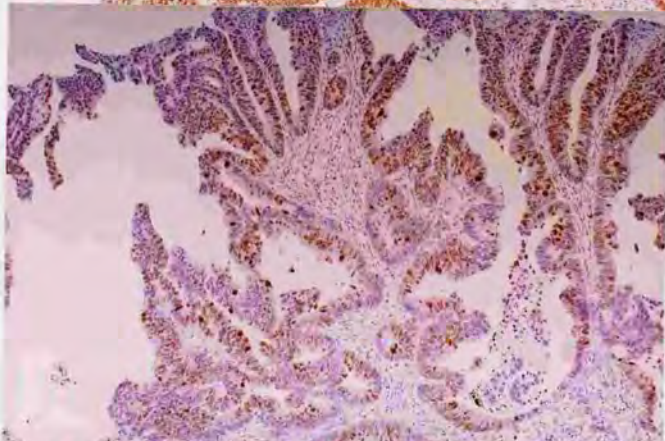


図11 高異型度癌(渡辺らの分類), またはhigh-grade dysplasia(Riddellらの分類). p53およびKi-67陽性細胞は腺管内にびまん性に存在している. (a:H・E染色,x25, b:p53免疫染色,x25, c:Ki-67免疫染色,x25, NI-7032-35).

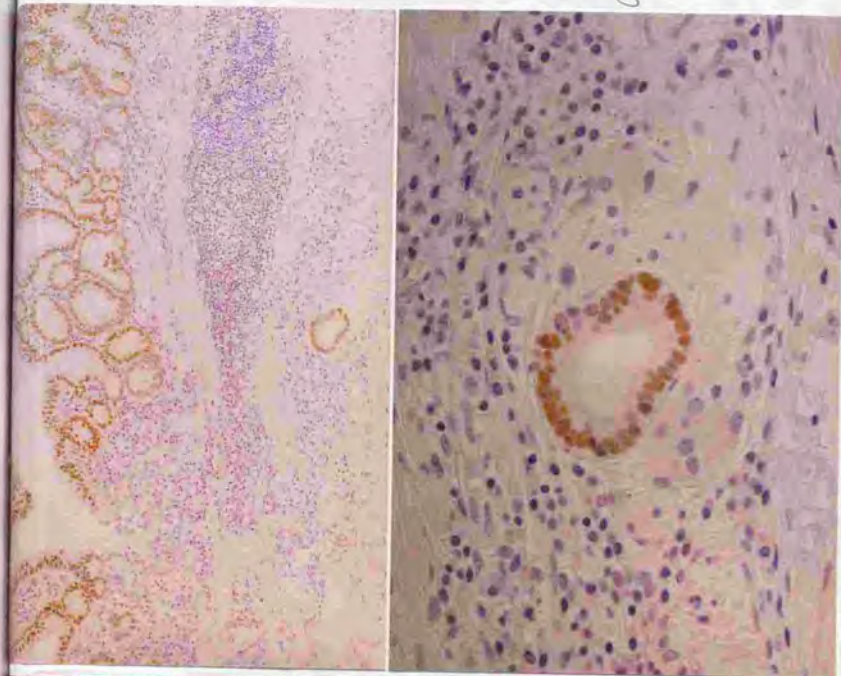
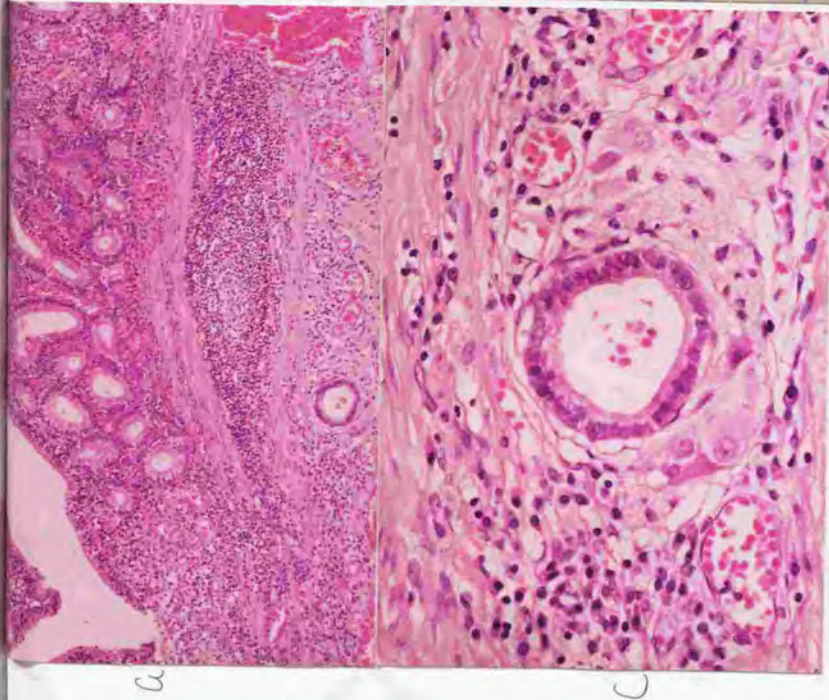
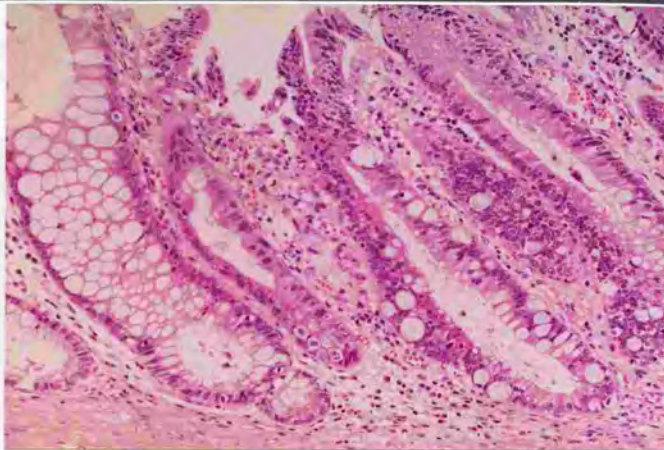
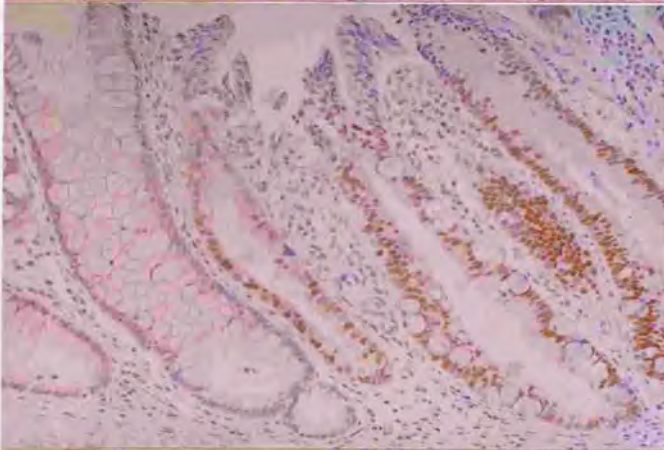


図12 びまん性にp53蛋白過剰発現を示す低異型度癌が粘膜下層に浸潤。癌は粘膜内とMeissner神経叢にみられる
 (a:H・E染色,x25, b:p53免疫染色,x100, c:H・E染色,x100, d:p53免疫染色,x100, NI-3355-29).

a



b



c

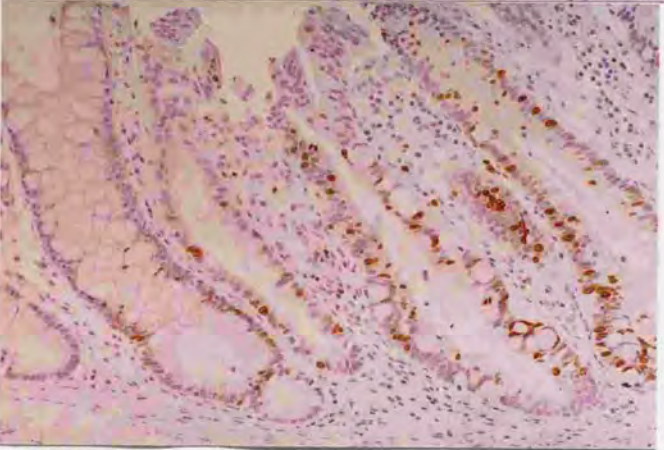
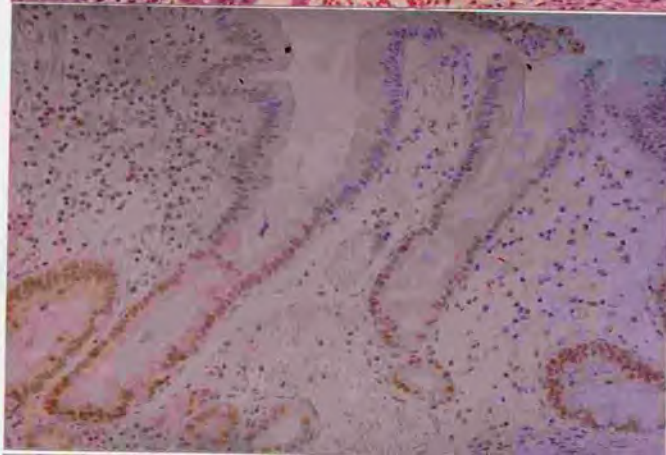


図13 低異型度癌(渡辺らの分類), またはlow-grade dysplasia(Riddellらの分類). 非腫瘍腺管が左側にみられる. p53陽性細胞は腫瘍腺管内にびまん性にみられる. (a:H・E染色,x50, b:p53免疫染色,x50, c:Ki-67免疫染色,x50, NI-7032-35).

a



b



c

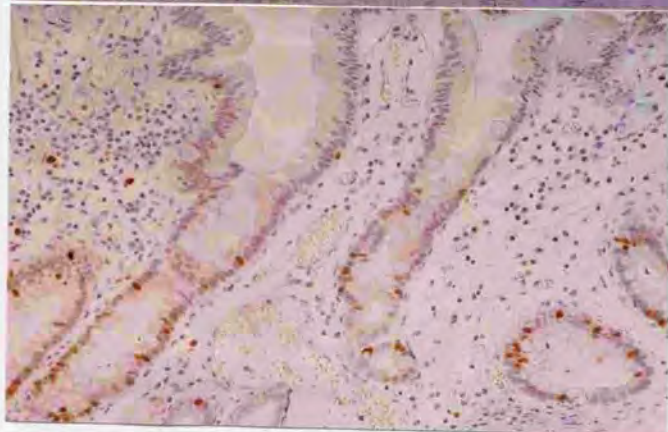
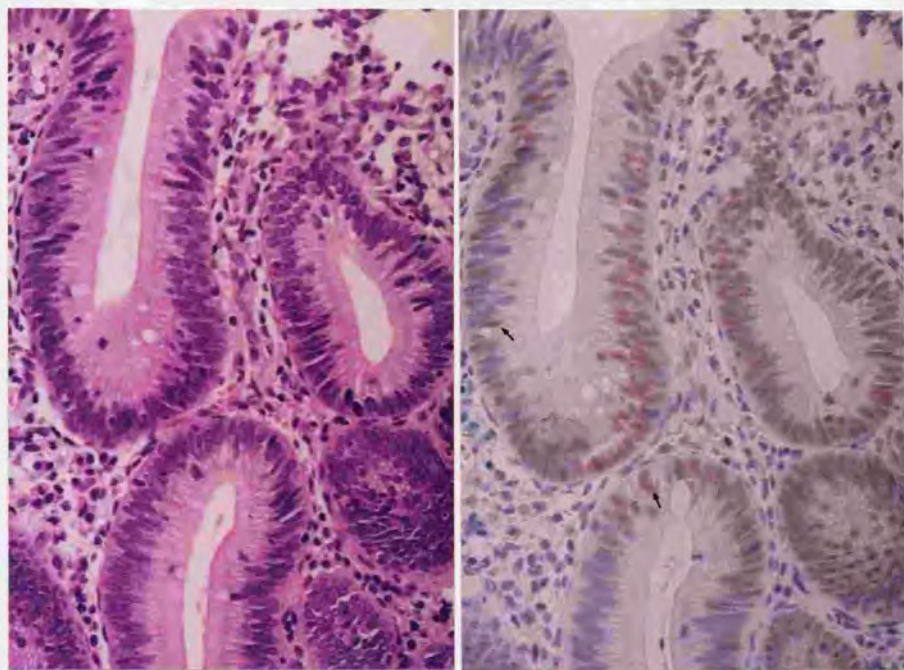


図14 低異型度癌(渡辺らの分類), またはlow-grade dysplasia(Riddellらの分類). p53陽性細胞は中層と深層に位置している. 増殖帯は深層に位置している. (a:H・E染色,x50, b:p53免疫染色,x50, c:Ki-67免疫染色,x50, NI-7032-36b).



a

b

図15

低異型度癌(渡辺らの分類), またはlow-grade dysplasia(Riddellらの分類).
p53陽性細胞(黒矢印)は散在性に分布している(a:H・E染色,x100, b:p53免疫染色,x100).

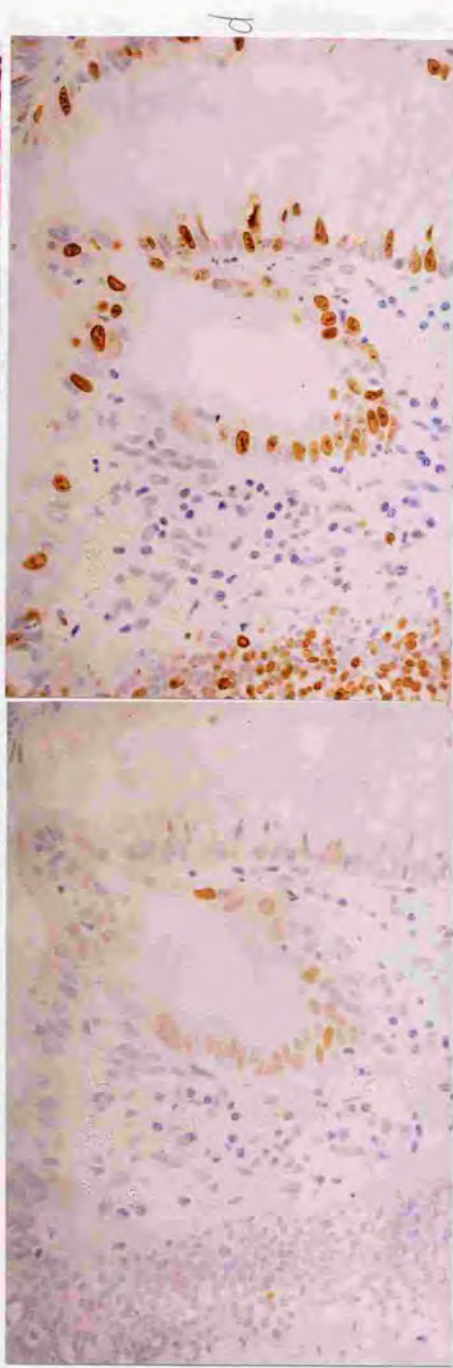
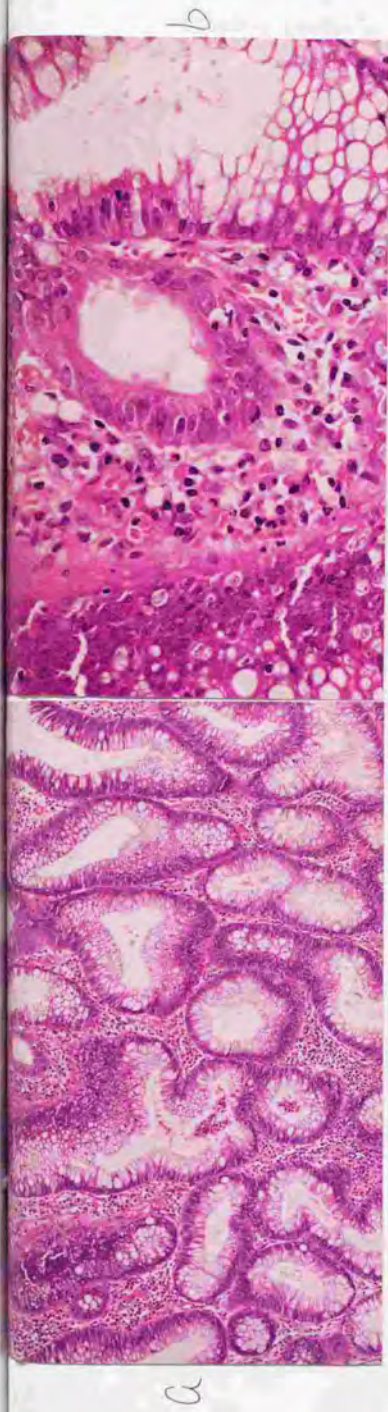


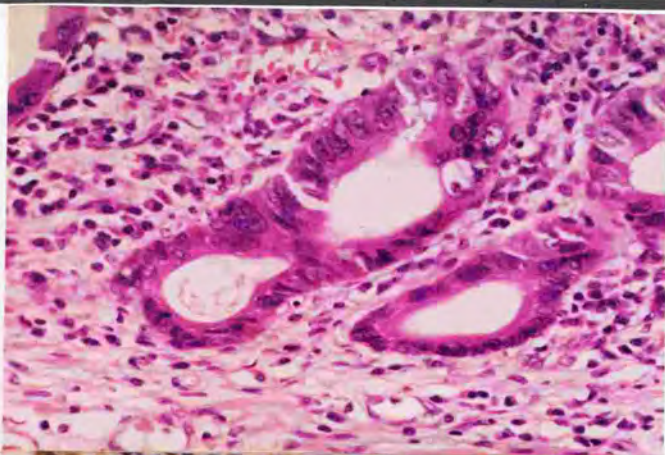
図16 UCにおける腺腫(邊辺らの分類), またはlow-grade dysplasia(Ritueliらの分類, Ip型, I腺管のみp53蛋白過剰発現を示している(巣状集簇性)
 (a)H・E染色,x2.5, b:H・E染色,x100, c:p53免疫染色,x100, d:Ki-67免疫染色,x100, NC-3571-1).



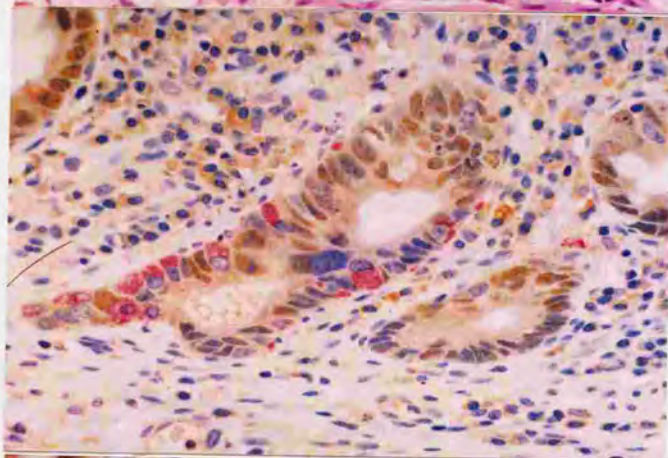
図17

K-ras遺伝子変異の分析. PCR産物をMva Iと反応した後の電気泳動. Wild-typeのPCR産物はMva Iによって切断され(86-bpと20-bp), 86-base pairの破片のバンドが写しだされた(lane 3,4). コドン12に遺伝子変異のあるPCR産物は切断されないため, 106-base pairの破片のバンドが写しだされた(lane 1,2). 最左側のlaneはマーカー.

a



b



c

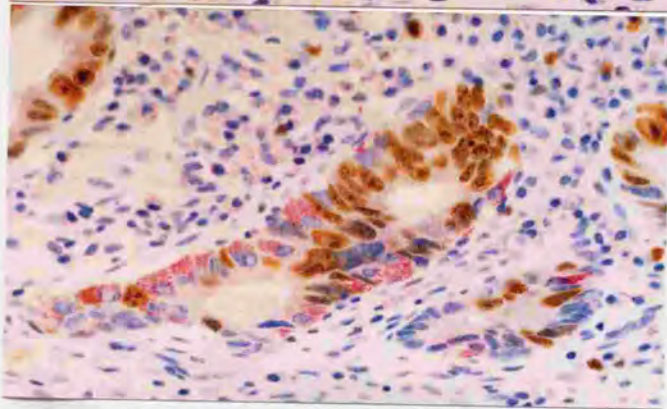


図18 低異型度腺癌(a:H・E染色,x100, NI-3355-24). クロモグラニンA(CGA)陽性腫瘍性内分泌細胞の核はp53およびKi-67染色では染まっていない(b:p53とCGAの2重染色,x100, c:Ki-67とCGAの2重染色,x100).

図19 治癒進行期UCでクロモグラニンA陽性内分泌細胞を有する腺管数

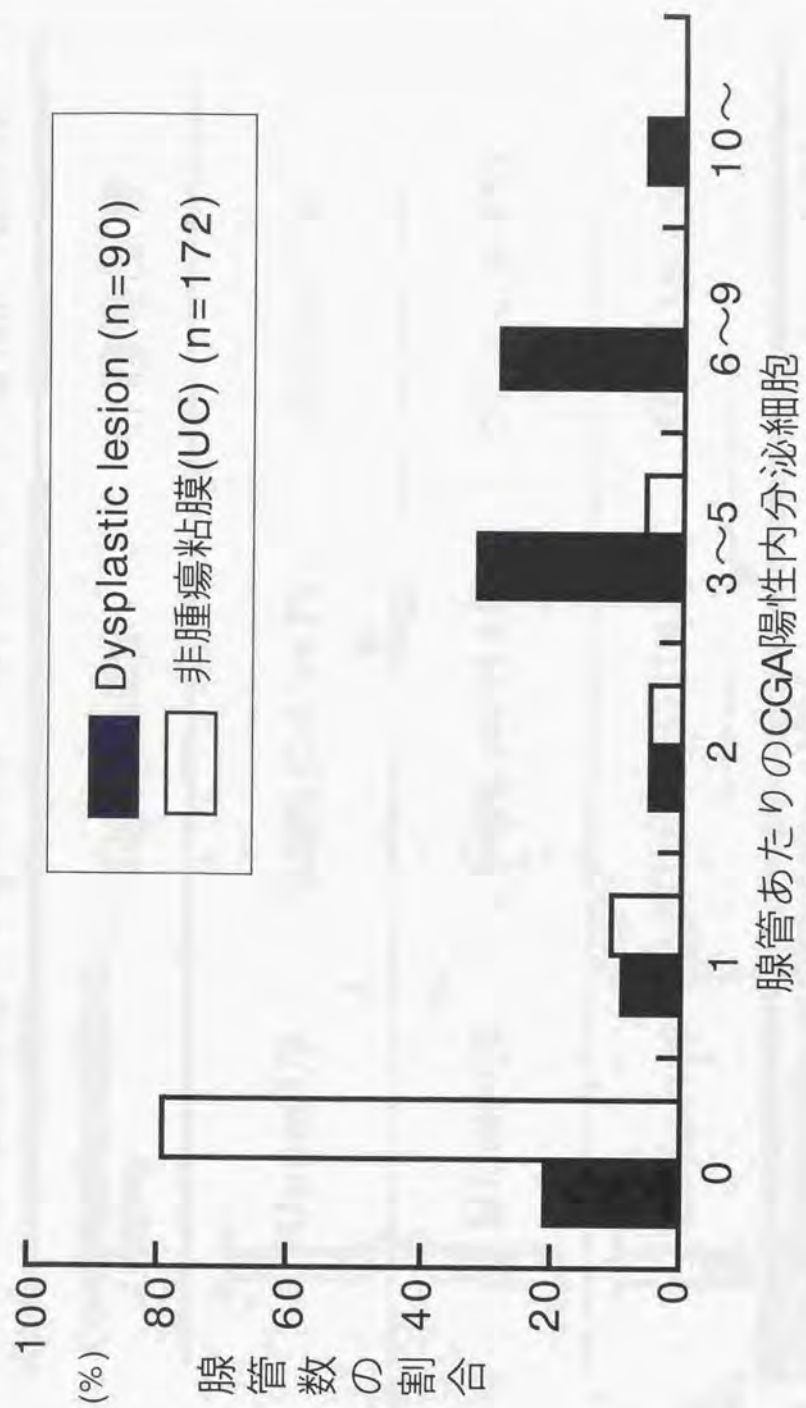


図20

UCの腺管におけるクロモグラニンA陽性内分泌細胞の出現部位



* 組織学的に腺腫に類似したdysplasiaを除く

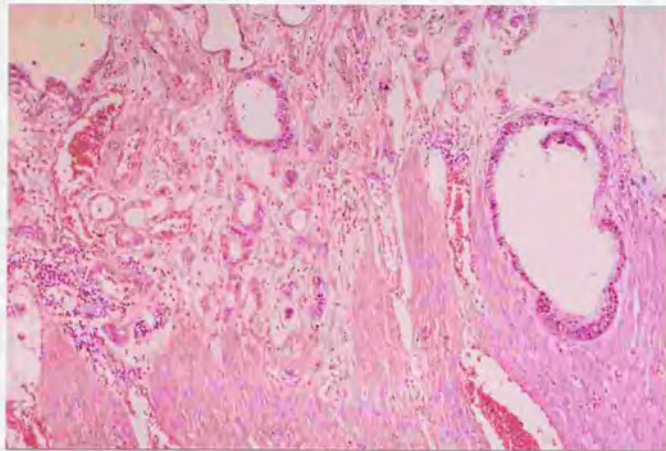
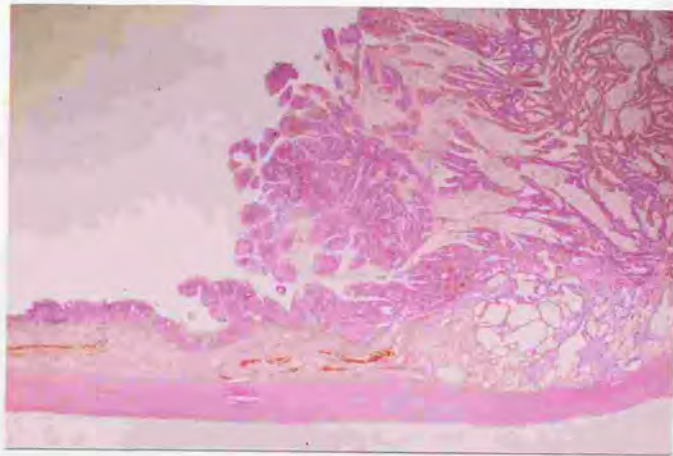
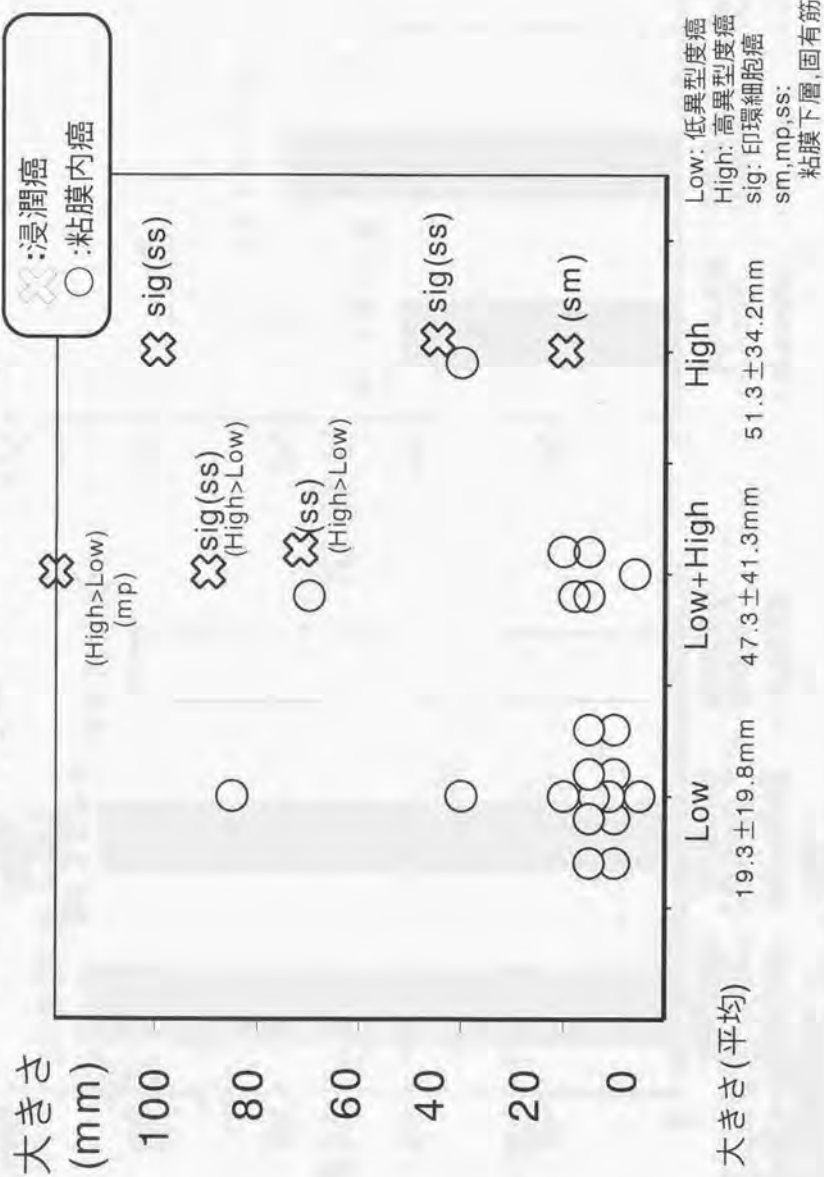


図21

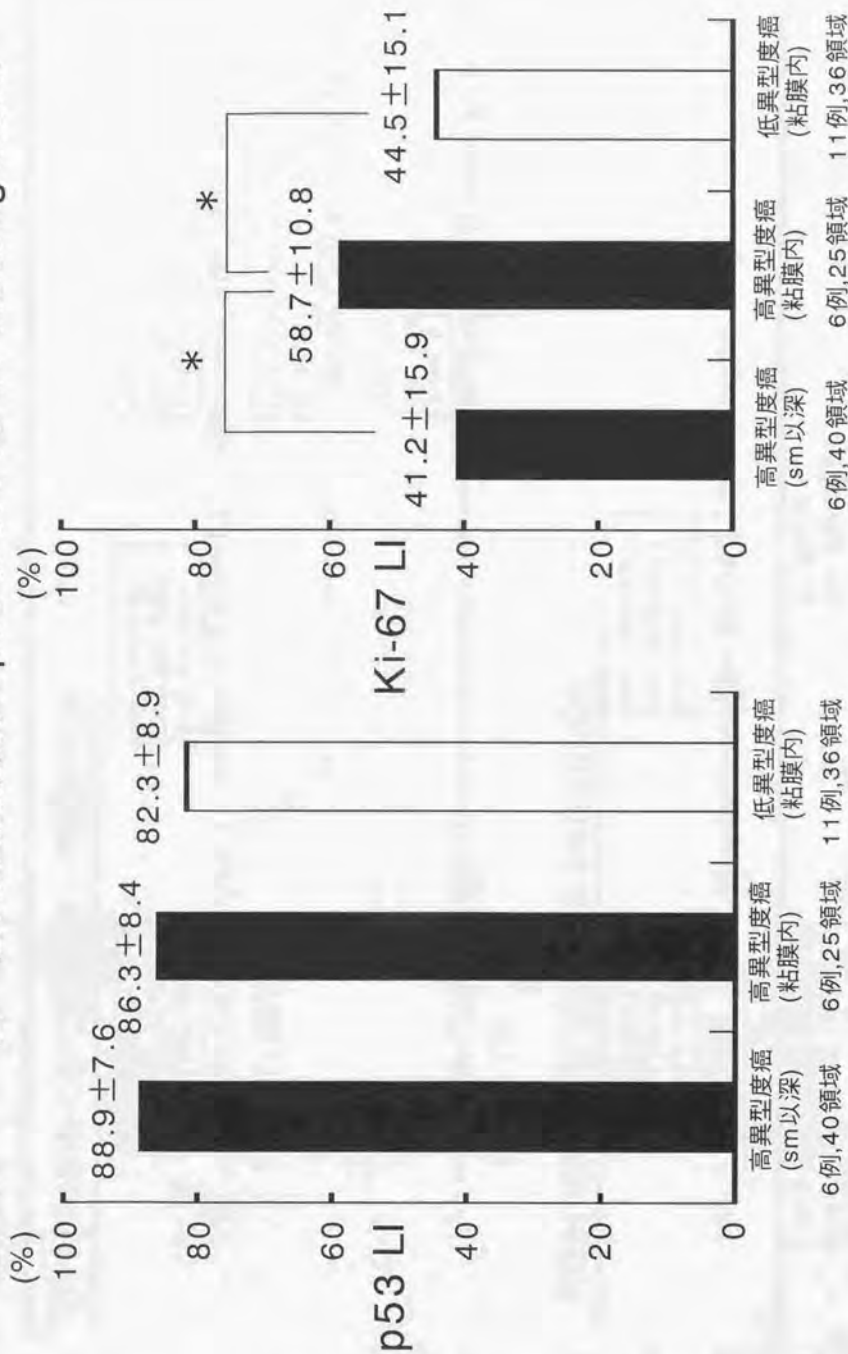
高異型度癌が固有筋層に広く浸潤している(a:H・E染色,x100, b:H・E染色,x25, NI-3355-41).

図22 細胞異型度別のUC随伴大腸癌の大きさ



Low: 低異型度癌
 High: 高異型度癌
 sig: 印環細胞癌
 sm, mp, ss: 粘膜下層, 固有筋層, 漿膜下層

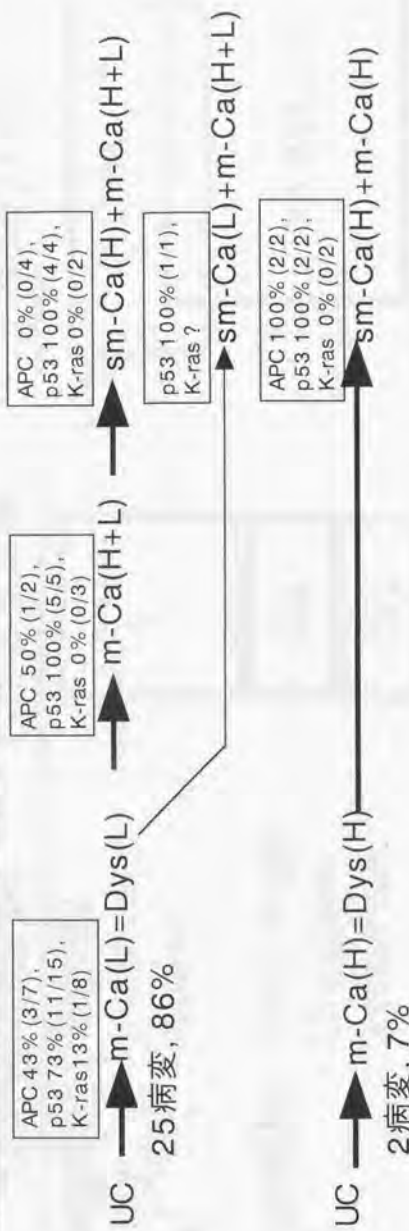
図23 高・低異型度癌別のp53およびKi-67 labeling index



*: p < 0.01

図24 UC随伴癌の進展における遺伝子変化

Dysplasia-carcinoma sequence



Adenoma-carcinoma sequence



表1 Riddellら・厚生省・渡辺の分類の比較

Riddellら分類

厚生省分類

Negative Normal
Inactive
Active

Indefinite Prob Nega.
Unknown
Prob. Posi.

Positive Dysplasia
(low)
Dysplasia
(high)

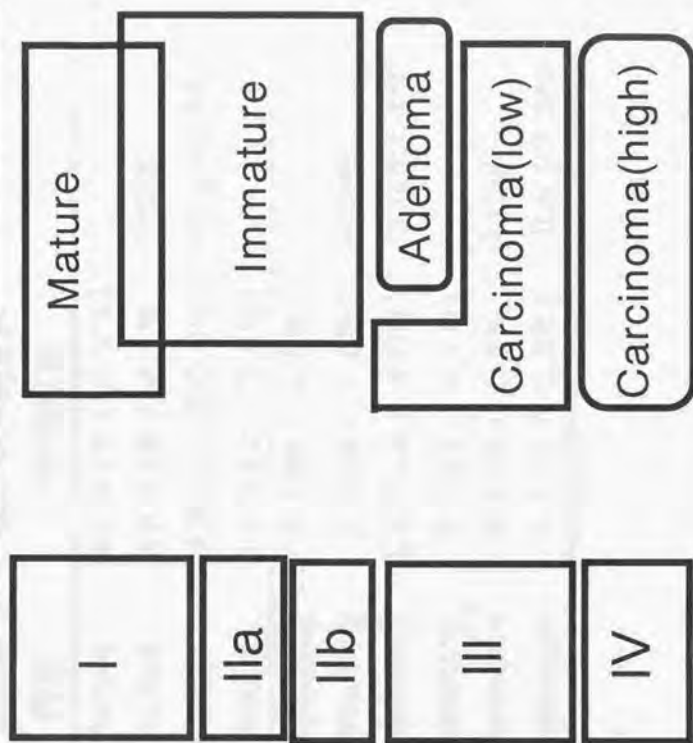


表2 腫瘍非合併UC例の臨床病理学的データ

症例 番号	年齢 性別	発症 期間 (月)	期間 (月)	炎症の 病期	p53陽性腺管数 / 計測腺管	平均値	
1	40M	F	6	Total	Active	43/424 (10.1%)	
2	61M	F	4	Total	Active	48/299 (16.1%)	平均値
3	21F	F	6	Total	Active	143/467 (30.6%)	16.9 ± 9.5%
4	36F	R	120	Total	Active	11/102 (10.8%)	
5	42F	R	24	Total	Resolving	7/167 (4.2%)	
6	27F	R	30	Total	Resolving	5/328 (1.5%)	平均値
7	25F	R	60	Total	Resolving	28/706 (4.0%)	3.0 ± 1.4%
8	24M	R	120	Total	Resolving	6/286 (2.1%)	
9	10F	F	12	Total	Remission	3/540 (0.6%)	平均値
10	26F	R	24	Total	Remission	1/323 (0.3%)	0.5 ± 0.2%

F: First attack R: Relapse

表3 腫瘍非合併 UCにおけるp53陽性腺管出現頻度

炎症の病期	p53陽性腺管出現頻度(Mean±SD %)
UC (10 cases) 活動期(n=4)	16.9±9.5 ^{abd}
治癒進行期(n=4)	3.0±1.4 ^{ace}
緩解期(n=2)	0.5±0.2 ^{bcf}
対照 (非UC 82 cases)	0.4±1.0 ^{def}

e:p<0.01, b,d:p<0.05, a,c:p<0.10, f:not significant

表4

UCにおける垂直切れの腺管あたりのp53陽性細胞の染色様式

p53染色様式を呈する腺管数

炎症の病期

散在性 巣状集簇性 びまん性

UC

活動期	25	0	0
治癒進行期	14	0	0
緩解期	4	0	0
対照	10	0	0

合計

53 0 0

表5 UCの非腫瘍腺管の腺管長と増殖帯長，および腺管に占める増殖帯の比率

	腺管長(μm)	増殖帯長(μm)	増殖帯長/腺管長(%)
対照	(n=10) 530 \pm 101	185 \pm 48	36.0 \pm 8.8
活動期	(n=25) 463 \pm 163	294 \pm 141	61.5 \pm 11.1
治癒進行期	(n=14) 475 \pm 118	293 \pm 101	58.5 \pm 14.2
緩解期	(n=4) 675 \pm 330	265 \pm 94	44.0 \pm 13.4

n:検討腺管数, *

Mean \pm SD

病変

p53染色様式#

	(-)	(+)	(++)	(+++)	(++)(+++)	(++)(+++)	(++)(+++)	(++)(+++)
UC 症例								
Carcinoma(sm~)	(n=6)	0	0	0	6	6	100%	100%
Dysplasia(high)	(n=6)	0	0	0	6	6	100%	100%
Dysplasia(low)	(n=15)	4	0	0	11	11	73%	73%
腺腫	(n=37)	35	2	0	0	0	5%	5%
非腫瘍		36	4	2*	0	0	0%	0%
非IBD 症例								
Carcinoma(sm~)##	(n=48)	20	6	6	22	22	58%	58%
Carcinoma(m)(high)##	(n=46)	13	4	4	29	29	63%	63%
Carcinoma(m)(low)##	(n=60)	40	11	11	9	9	33%	33%
腺腫##	(n=113)	111	2	0	0	0	2%	2%
正常粘膜		178	92*	0	0	0	0%	0%

; (-):陽性細胞なし, (+):散在性, (++) :果状集簇性, (+++) :びまん性

; 辺りの分類による

* ; Number of tubule

表7

UCおよび非炎症性腸疾患のAPC変異および5q LOHの頻度

	APC mutation				5q LOH			
	Matsuda 1995	Redston 1995	Kern 1994	Tarmin 1995	Yin 1993	Greenwald 1992	Tarmin 1995	Kern 1994
UC								
Carcioma	33% (2/6)	0% (0/5)	0% (0/5)					25% (1/4)
HGD	50% (1/2)	43% (3/7)	100% (1/1)	6% (2/33)	36% (16/45)	33% (13/39)	29% (9/31)	0% (0/1)
LGD	43% (3/7)	14% (1/7)	0% (0/3)					-
Adenoma	56% (4/7)	-	-	-	-	-	-	-
Indefinite	-	0% (0/14)	-	-	-	-	-	-
Negative	-	0% (0/17)	-	-	-	-	-	-
Non-IBD								
Carcinoma	-	-	-	74% (7/23)	-	56% (5/9)	-	-
Adenoma	-	-	-	-	-	-	-	-

Indefinite : indefinite for dysplasia, Negative : negative for dysplasia

表8 UC例におけるクロモグラニンA陽性内分泌細胞, パネート細胞
およびp53陽性未分化細胞の核形態計測による比較検討

	核			
	検索 細胞数	面積 (μm^2)	周径 (μm)	長径 短径 (μm)
1) p53陽性dysplasiaにおける CGA陽性内分泌細胞	59	34.5 \pm 13 ^a	24 \pm 4.1 ^b	8.8 \pm 1.8 ^c 5.4 \pm 1.4 ^d
2) 非腫瘍粘膜における CGA陽性内分泌細胞	44	21.6 \pm 7.0 ^e	19 \pm 3.0 ^f	7.6 \pm 1.4 ^g 3.9 \pm 0.9 ^h
3) p53陽性dysplasiaにおける パネート細胞	22	31.2 \pm 10 ⁱ	23 \pm 4.3 ^j	8.6 \pm 2.0 ^k 5.3 \pm 1.1 ^m
4) 非腫瘍粘膜における パネート細胞	41	20.2 \pm 7.0 ⁿ	18 \pm 3.2 ^r	7.2 \pm 3.2 ^s 3.9 \pm 0.9 ^t
5) Dysplasiaにおける p53陽性未分化細胞	255	32.9 \pm 19 ^u	24 \pm 7.1 ^v	9.1 \pm 3.0 ^w 4.8 \pm 1.6 ^x

a-e, b-f, c-g, d-h, i-n, j-r, k-s, m-t : p<0.01
a-i, b-j, c-k, d-m, a-u, b-v, c-w, d-x, i-u, j-v, k-w, m-x : Not significant

表9 UC腫瘍病変におけるp53・Ki-67
陽性内分泌細胞出現頻度

病変	病変数	p53染色様式	p53(+) CGA陽性細胞数 / 計測CGA陽性細胞数	Ki-67(+) CGA陽性細胞数 / 計測CGA陽性細胞数
Carcinoma	(n=6)	びまん性	0 / 37	3 / 37 (8.1%)
Dysplasia(high)*	(n=5)	びまん性	0 / 35	2 / 32 (6.3%)
Dysplasia(low)*	(n=9)	びまん性	0/465	21/434 (4.8%)
Dysplasia(low)*	(n=2)	散在性	0 / 3	0 / 6 (0.0%)
合計			0/540	26/509 (5.1%)

* 組織学的に腺腫に類似したdysplasiaを除く

表10 UC腫瘍病変におけるp53・Ki-67
陽性パネート細胞出現頻度

病変	病変数	p53染色様式	p53(+) パネート細胞数 / 計測パネート細胞数	Ki-67(+) パネート細胞数 / 計測パネート細胞数
Carcinoma	(n=6)	びまん性	0 / 0	0 / 0
Dysplasia(high)*	(n=5)	びまん性	0 / 0	0 / 0
Dysplasia(low)*	(n=9)	びまん性	0/61	0/54
Dysplasia(low)*	(n=2)	散在性	0 / 4	0 / 2
合計			0/65	0/56

* 組織学的に腺腫に類似したdysplasiaを除く

表 11 UCのp53蛋白過剰発現を示す腫瘍病変における
未分化細胞のp53・Ki-67陽性細胞出現頻度

病変	病変数	p53陽性細胞出現頻度	Ki-67陽性細胞出現頻度
粘膜下浸潤癌 粘膜部分	6	92.8% (1) (1633/1759)	64.9% (5) (665/1025)
sm部分	6	97.5% (2) (1014/1040)	37.1% (6) (396/1067)
High-grade dysplasia ※	6	93.8% (3) (935/996)	67.5% (7) (815/1207)
Low-grade dysplasia ※	11	93.1% (4) (889/955)	67.9% (8) (741/1091)
Total	23	94.1% (4471/4750)	59.6% (2617/4390)

p<0.01 : (1)-(2), (2)-(3), (2)-(4), (5)-(6), (6)-(7), (6)-(8)

Not significant : (1)-(3), (1)-(4), (3)-(4), (5)-(7), (5)-(8), (7)-(8)

※ 組織学的に腺腫に類似したdysplasiaを除く

表12 UCの粘膜下以深浸潤癌6病変における高・低異型度癌の頻度

癌の主な細胞学的異型度(波辺の分類)

m → sm

浸潤癌の数(深達度)

1) Low → Low

0

2) Low > High → Low < High

1 (mp)

3) Low < High → High

2 (ss)*

4) High → High

3 $\left\{ \begin{array}{l} 1(sm) \\ 2(ss)** \end{array} \right.$

m, sm, mp: 粘膜, 粘膜下層, 固有筋層

Low: 低異型度癌
High: 高異型度癌

※うち1つは印環細胞癌

※※2つとも印環細胞癌

表13 UC随伴大腸癌における浸潤癌面積と粘膜内癌面積の比

癌の細胞学的異型度		癌面積の比(mm ²)
m	→ sm (No. of lesion)	浸潤部面積/粘膜内面積
1)	Low(well) → Low(well)	なし
2)	Low+High	
	→ Low+High (n=1) (Low(well)(sm1) High(well)(mp)	6.6x10 ⁻⁵ 10.0
	→ High (n=2)	
	Low(well)+High(well) → High(well)	27.5
	Low(well)+High(sig) → High(sig)	18.8
3)	High → High (n=3)	
	High(well) → High(well)	2.4x10 ⁻²
	High(sig) → High(sig)	6.4
	High(sig) → High(sig)	44.7

sm1: 粘膜下層の上1/3に浸潤.

Well: 高分化型腺癌

sig: 印環細胞癌

表14 UC随伴病変におけるp53蛋白過剰発現

	Matsuda	Ilyas	Harpaz	Chaubert	Taylor
	1995	1994	1994	1994	1993
UC					
Carcinoma	100% (6/6)	100% (3/3)	61% (34/56)	22% (2/9)	52% (11/21)
Dysplasia(high)	100% (6/6)	67% (4/6)	83% (10/12)		45% (5/11)
Dysplasia(low)	73% (11/15)	40% (2/5)	50% (11/22)		11% (1/9)
Adenoma	5% (2/37)	-	-	-	-
Non neoplasm	0% (0/3642)*	-	-	-	0% (0/20)#
Villous rege.	0% (0/487)*	-	-	0% (0/6)	-
Active	0% (0/1292)*	-	-	0% (0/7)	-
normal	0% (0/863)*	-	-	0% (0/4)	-
Non-IBD					
Carcinoma	60% (25/42)	-	-	-	48% (10/21)
Adenoma	2% (2/113)	-	-	-	-

*:No. of tubules, #:No. of patients

表15

UC随伴大腸病変におけるK-ras変異の頻度

	Matsuda Japan	Burmer USA	Tsuda Japan	Bell UK	Redston USA	Chaubert Swiss	Meltzer USA	Chen USA
Carcinoma	0% (0/7)	0% (0/12)	7% (1/15)	24% (8/33)	20% (1/5)	22% (2/9)	25% (1/4)	60% (3/5)*
HGD	0% (0/5)	8% (1/12)	0% (0/19)	0%	43% (3/7)	38% (3/8)	33% (2/6)	33% (1/3)*
LGD	13% (1/8)	0% (0/1)	0% (0/10)	0% (0/8)	14% (1/7)	40% (2/5)	0% (0/6)	-
Adenoma	20% (4/20)	-	-	0% (0/2)	-	-	-	-
HP	-	-	-	-	-	-	-	-
Indefinite	-	0% (0/3)	-	-	36% (5/14)	-	0% (0/5)	0% (0/8)*
Non-dyspl.	-	-	-	0% (0/5)	0% (0/17)	-	-	0% (0/2)*
Villous rege.	-	-	-	-	-	16% (1/6)	-	-
Regenerating	-	-	0% (0/4)	-	-	-	-	-
Active	0% (0/2)	-	-	-	-	29% (2/7)	-	-
Normal	-	-	-	-	-	0% (0/4)	-	-

*:No. of patients



