

学位論文題名

Prognostic Significance of Combined Conventional
and Immunocytochemical Cytology for Peritoneal
Washings in Endometrial Carcinoma

(子宮体癌腹腔洗浄細胞診の予後的意義-免疫細胞染色による検討)

学位論文内容の要旨

I. 緒 言

近年わが国において子宮体癌発生数は顕著に増加しており、2000年における推定罹患数は4800となっている。1988年に国際婦人科産科連合(FIGO)は、それまでの術前に決定される臨床進行期をあらため、手術・病理組織所見に基づく手術進行期に改定した。この進行期には腹腔洗浄細胞診所見が組み入れられており、陽性的場合にはIIIa期と分類される。しかしながら、洗浄細胞診所見の予後的意義については未だ異論の多いところである。洗浄細胞診の予後的意義を解析する場合に以下の因子を考慮しなければならない: 1) 腹腔内に出現した悪性細胞と他の病理組織学的予後因子との関連、および2) 体腔液の細胞診断の難しさである。本研究では、通常のパパニコロウ染色と免疫細胞染色を併用して洗浄細胞診判定を行い、その予後的意義および手術進行期決定因子としての意義を検討した。

II. 対象と方法

(1)対象および洗浄細胞診検体

1989年から1998年の期間に後腹膜リンパ節転移の有無を含む完全な手術進行期決定がなされた115例を対象とした。FIGO手術進行期の内訳は、I期60例、II期11例、III期32例、IV期12例である。術前に化学療法を受けた症例はない。リンパ節郭清は骨盤および傍大動脈領域を含む。8例においては内科的合併症あるいは腹腔内播種の存在のため郭清はおこなわず、CTにて評価した。開腹後ただちに骨盤腔を生理的食塩水50mlで洗浄、20mlを回収し、ヘパリン添加後細胞診判定に提出した。洗浄液は400g 5分間遠心し、上清を捨て、残留液で再懸濁しスライドグラス上に塗沫してパパニコロウ染色を行った。

(2)免疫細胞染色

まずパパニコロウ染色標本を再鏡検し、疑陽性および陽性標本を抽出した。その判定のもととなった細胞集塊にスライドグラスの裏側から印を付け、キシレンに浸してカバーグラスを取り除く。標本を液状封入剤(マリノール、武藤化学)で覆い37°Cで一晩乾燥させる。転写すべき細胞集塊をマリノール上からペンで囲み、同部位をナイフで切り取り、細胞とともに新しいシランコーティンググラスに移した。キシレンに浸しマリノールを溶解除去し、キシレンを100%エタノールで除いた。パパニコロウ染色を0.5%塩酸溶液中で脱色し、塩酸を水で洗い流した。標本をマイクロウェーブ処理し、LSAB法を用いて免疫細胞染色を行った。

(3)抗体

免疫細胞染色には、MOC-31抗体(DAKO, M3525)、抗サイトケラチン5/6抗体(Behringer Mannheim, D5/16 B4)、抗ヒトLCA抗体(DAKO, 2B11-PI)7/26)、抗ヒトp53抗体(DAKO, DO-7)を用いた。

(4)染色結果の判定

免疫染色結果は、細胞集団に反応細胞が 50%以上に認められた場合に陽性とした。LCA 陽性細胞はマクロファージと判定し、サイトケラチン 5/6 陽性で MOC-31 陰性細胞は中皮細胞とした。MOC-31 陽性細胞は上皮細胞と判定し、核異型を認めるものを腺癌細胞とした。

(5)統計学的解析

統計学的解析は χ^2 -検定あるいは Fisher 直接確率検定を用いて行った。無病生存期間は Kaplan-Meier 法により求め、生存率の差の解析にはログランク検定を用いた。予後因子の多変量解析には Cox 比例ハザードモデルを用いた。有意水準は $p<0.05$ に設定した。

III. 結 果

(1)細胞診判定

洗浄細胞診標本の原判定は、陰性 62 例、疑陽性 12 例、陽性 41 例で、陽性率は 35.7%であった。明らかな核異型により悪性細胞を判定するという基準で行った再鏡検結果は、陰性 86 例、疑陽性 18 例、陽性 11 例であった。陽性率は 9.6%であった。再鏡検疑陽性および陽性標本 29 例に免疫染色による検討を加えた。

免疫染色を併用することにより、陽性 11 例中 10 例が腺癌細胞と判定され、疑陽性 18 例中 8 例が腺癌細胞と判定された。この結果、陰性 94 例、疑陽性 3 例、陽性 18 例となった。陽性率は 15.7%であった。疑陽性は 18/115 (15.7%) から 3/115 (2.6%) に有意 ($p<0.001$) に減少した。

(2)病理組織学的予後因子と洗浄細胞診結果との関連

陽性洗浄細胞診と筋層浸潤の深さ ($p<0.05$)、脈管侵襲 ($p<0.005$)、腹膜転移 ($p<0.01$) との間に有意な関連を認めた。洗浄細胞診と無病生存期間との間に有意な ($p<0.0025$) 関連を認めた。癌が子宮にとどまっている 82 例について検討すると、洗浄細胞診は無病生存期間と強い関連を示した ($p<0.0005$)。さらに陽性洗浄細胞診の予後的意義を検討するために、82 例について Cox 回帰分析を行った。82 例のうち、非類内膜腺癌は 2 例のみであったので、組織型は解析から除いた。その結果、単変量解析、多変量解析ともに洗浄細胞診が、子宮に限局した子宮体癌の最も重要な予後因子であった。

洗浄細胞診の意義をさらに検討するために、115 例全例について Cox 回帰分析を用いて、予後因子を進行期関連の因子 (筋層浸潤の深さ、頸部浸潤、卵巣転移、リンパ節転移、腹膜転移) および非進行期因子 (組織型、分化度、核異型度、脈管侵襲) にわけて洗浄細胞診と比較した。

進行期関連因子との解析では、腹膜転移 ($p<0.0001$) とリンパ節転移 ($p<0.01$) が独立した予後因子であった。腹膜転移を解析から除くと洗浄細胞診 ($p<0.005$) とリンパ節転移 ($p<0.01$) が独立した予後因子であった。

非進行期因子との解析では組織型 ($p<0.001$)、分化度 ($p<0.01$)、脈管侵襲 ($p<0.05$) が独立した予後因子であった。洗浄細胞診陽性 18 例中 14 例に p53 免疫染色を施行できた。p53 陰性 5 例には死亡例を認めなかったが、陽性 9 例中 5 例がデータ解析時点で死亡していた。

これらの結果により、洗浄細胞診の予後的意義は非進行期因子に依存しているものの、洗浄細胞診が重要な進行期決定因子であることが明らかとなった。

IV. 考 察

FIGO 進行期では、洗浄細胞診陽性は IIIa 期とされる。しかしながら洗浄細胞診の予後的意義について一定の評価は得られていない。子宮体癌では腹腔内再発がしばしば認められ、腹腔中の悪性細胞が腹腔内再発に関与しているかもしれない。これまで洗浄細胞診の予後的意義の評価が定まらないのには幾つかの要素が関与している。第 1 に、洗浄細胞診における悪性細胞の判定にしばしば偽陽性あるいは偽陰性がおこること、第 2 に、体癌細胞が術前の組織検査など子宮内操作などにより卵管経由で腹腔内に出現し、このような細胞では転移性腫瘍を形成しないかもしれないこと、第 3 に、これまでの報告が必ずしも多変量解析結果に基づいていないことなどである。

これらの問題に答えるために、以下の方針により腹腔洗浄液中の悪性細胞の意義を検討

した。第1に、術前検査の子宮鏡，腹腔鏡に際して，まず子宮鏡施行前に洗淨細胞診を採取し，続いて卵管を金属クリップで閉塞し，子宮鏡施行後に再度洗淨細胞診を採取した。この予備的研究により，子宮鏡が卵管経由での体癌細胞出現を起こすことがあることが明らかとなった。第2に，子宮体癌の手術標本を詳細に病理組織学的に検討し，組織型，脈管侵襲，傍大動脈節転移が独立した予後因子であることを明らかにした。洗淨細胞診の予後的意義はこれらの病理組織学的予後因子との比較の上で検討されなければならない。

本研究により，陽性洗淨細胞診は筋層浸潤・頸部浸潤よりも重要な予後因子であることが明らかとなった。このことは，筋層浸潤の程度で分けられるI期，頸部浸潤があることで決定されるII期よりも進んだステージであるIII期に陽性洗淨細胞診を分類しているFIGO国際進行期分類の妥当性を支持している。また p53 過剰発現を示す細胞の出現は予後不良を示すようであるが，この問題はさらに検討される必要がある。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 長 嶋 和 郎
副 査 教 授 吉 木 敬
副 査 教 授 藤 本 征一郎

学 位 論 文 題 名

Prognostic Significance of Combined Conventional and Immunocytochemical Cytology for Peritoneal Washings in Endometrial Carcinoma

(子宮体癌腹腔洗浄細胞診の予後的意義 - 免疫細胞染色による検討)

1988年に国際婦人科産科連合 (FIGO) は、体癌の臨床進行期をあらため、手術・病理組織所見に基づく手術進行期に改定した。この進行期には腹腔洗浄細胞診所見が組み入れられ、陽性の場合には IIIa 期と分類される。しかしながら、洗浄細胞診所見の予後的意義については未だ異論の多いところである。本研究では、パパニコロウ染色と免疫細胞染色とを併用して洗浄細胞診判定を行い、その予後的意義および手術進行期決定因子としての意義を検討した。

1989～1998年の期間に後腹膜リンパ節転移の有無を含む手術進行期決定がなされた体癌 115 例 (I 期 60 例, II 期 11 例, III 期 32 例, IV 期 12 例) を対象とした。開腹後ただちに骨盤腔を生理的食塩水 50ml で洗浄し、20ml を回収し、ヘパリン添加後細胞診判定した。洗浄液は 400g 5 分間遠心し、上清を捨て、残留液で再懸濁しスライドグラス上に塗沫してパパニコロウ染色を行った。パパニコロウ染色標本を再鏡検し、疑陽性および陽性の判定のもととなった細胞集塊をマイクロウェーブ処理し、LSAB 法を用いて免疫染色を MOC-31 抗体、抗サイトケラチン 5/6 抗体、抗ヒト LCA 抗体、抗ヒト p53 抗体を用いて行った。反応細胞が 50% 以上に認められた場合に陽性とした。MOC-31 陽性細胞は上皮細胞と判定し、核異型を認めるものを腺癌細胞とした。

洗浄細胞診標本の再鏡検結果は、陰性 86 例、疑陽性 18 例、陽性 11 例 (陽性率 9.6%) であった。再鏡検疑陽性および陽性標本の 29 例に免疫染色を併用することにより、陽性 11 例中 10 例が、疑陽性 18 例中 8 例がそれぞれ腺癌細胞と判定された。この結果、陰性 94 例、疑陽性 3 例、陽性 18 例 (15.7%) となった。疑陽性は 18/115 (15.7%) から 3/115 (2.6%) に有意 ($p < 0.001$) に減少した。

免疫染色併用の陽性洗浄細胞診と筋層浸潤の深さ ($p < 0.05$)、脈管侵襲 ($p < 0.005$)、腹膜転移 ($p < 0.01$)、無病生存期間 ($p < 0.0025$) との間に関連を認めた。癌が子宮にとどまっている 82 例について検討すると、洗浄細胞診は無病生存期間と強い関連を示した ($p < 0.0005$)。陽性洗浄細胞診の予後的意義を検討するために、82 例について Cox 回帰分析を行った結果、洗浄細胞診が子宮に限局した体癌の最も重要な予後因子であった。

免疫染色併用洗浄細胞診の予後的意義をさらに検討するために、115 例全例について Cox 回帰分析を用いて、各種の予後因子を進行期関連の因子および非進行期因子とにわけて細胞診所見と比較した解析では、腹膜転移 ($p < 0.0001$) とリンパ節転移 ($p < 0.01$) とが、腹膜転移を除くと洗浄細胞診 ($p < 0.005$) とリンパ節転移 ($p < 0.01$) とがそれぞれ独立し

た予後因子であった。非進行期因子との解析では組織型 ($p < 0.001$)、分化度 ($p < 0.01$)、脈管侵襲 ($p < 0.05$) が独立した予後因子であった。洗浄細胞診陽性の 18 例中 14 例に p53 免疫染色を施行し、p53 陰性 5 例には死亡例を認めなかったが、陽性 9 例中 5 例がデータ解析時点で死亡していた。

これらの結果により、体癌の腹腔洗浄細胞診の予後的意義は非進行期因子に依存しているものの、洗浄細胞診が重要な進行期決定因子であることが明らかとなった。

公開発表に際し、副査の吉木教授より MOC-31 抗体の特異性、p53 染色の程度と予後との関連、細胞集団ではなく、フリー化した癌細胞について免疫染色を行った場合との成績の相違などについて、また主査の長嶋教授からは、腹腔細胞診陽性例に対する術後補助療法の内容、パパニコロウ細胞診における陽性の判定基準、細胞転写操作過程での免疫染色反応性の低下の可能性、原病巣の組織標本上の免疫染色所見との対比、洗浄細胞診標本への遺伝子診断の導入の必要性などについて、それぞれ質問があった。副査の藤本教授からは、洗浄細胞診のこれまでの予後上の評価が一定でなかった理由、腹腔内への癌細胞の出現の時間的経過と形態変化との関係、腹腔内への癌細胞の出現経路と細胞形態の特徴との関係、MOC-31 染色陽性で疑陽性と診断された 3 例の細胞形態の特徴などについて質問があった。

いずれの質問に対しても、申請者は、対象症例の標本検鏡の結果、統計学的解析結果、文献的情報などをもとに概ね妥当な回答をなした。

審査員一同は、免疫細胞染色の併用による腹腔洗浄細胞診所見が体癌の進行期決定因子であることを明らかにしえた本研究の成果を高く評価し、申請者が博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。