

リンパ節転移陰性 (n0) 乳癌の再発に関する臨床病理学的検討

—特に VEGF, PyNPase の発現に関して—

細 川 勝 正

東京医科大学外科学第三講座

(指導：小柳泰久主任教授)

【要旨】 一般にリンパ節転移陰性 (n0) 乳癌は予後良好とされているが、10% 前後に再発を認める。本研究では臨床病理学的因子の検討を行うとともに腫瘍の増殖に関係があるといわれている血管新生に着目し、血管新生因子である Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) および Pyrimidine Nucleoside Phosphorylase (PyNPase) を指標にして n0 乳癌の再発について検索した。n0 乳癌 238 例に対し臨床病理学的検討を加えた結果、触診腫瘍径、組織学的腫瘍径、縦横値において再発群と非再発群の間に有意差を認めた。VEGF と PyNPase の免疫組織染色を行い検討した結果、VEGF 発現では再発群と非再発群の間に有意差を認め、n0 乳癌の再発には血管新生が重要な役割を果たしていることが示された。また、触診腫瘍径、組織学的腫瘍径、縦横値について検討を加えたところ、それらが組織型に深く関連していることが判明し、再発の指標として有用であることがわかった。

緒 言

現在理解されている乳癌症例における最大の予後因子はリンパ節転移である。組織学的にリンパ節転移陰性乳癌 (以下 n0 乳癌) は予後良好であるが、累積 10 年健存率をみると 10% 前後には再発・転移を認める^{1,2)}。従って、n0 乳癌の生物学的性状を検討し、予後不良群を層別化して術後補助療法の必要性の有無を決定すれば、適切な症例に効率良く治療を施行することが可能となる。本研究では、同一施設の統一された手術による条件のもとで診断された n0 乳癌症例を用い、臨床病理学的な面から生物学的性状を検討し、同時に腫瘍の増殖や、転移・再発に影響を及ぼす血管新生に着目し、血管新生因子である Vascular Endothelial Growth Factor (以下 VEGF) および Pyrimidine Nucleoside Phosphorylase (以下 PyNPase) 発現の意義とその臨床病理学的因子との関連について検討した。

研究材料および方法

I. 対象

1988 年から 1996 年までの都立大塚病院において手術の施行された乳癌症例は 688 例であり、このうち、男性乳癌、両側乳癌、重複癌および非浸潤癌を除外した初治療根治浸潤性乳癌は 628 例 (91.3%) であり、組織学的にリンパ節転移陰性の乳癌は 472 例 (68.8%) であった。局所再発及び遠隔転移の生じた 20 例を再発群、手術より 5 年以上経過し再発の見られていない 218 例を非再発群とした。これらの手術にはいずれも同一の胸筋温存乳房切除が施行されている。

II. 方法

1. 臨床的因子

年齢は、49 歳以下、50-59 歳、60 歳以上に分類した。月経歴、出産は問診にて確認した。乳癌取り扱い規約³⁾に準じ、占拠部位、腫瘍の触診上の大き

1998 年 2 月 17 日受付, 1998 年 3 月 3 日受理

キーワード：リンパ節転移陰性乳癌, 血管新生, VEGF, PyNPase, 腫瘍径

(別刷請求先：〒160-0023 東京都新宿区西新宿 6-7-1 東京医科大学病院外科学第三講座 細川勝正)

さ（以下 T），切除標本（剖面）の大きさ（以下 t）を測定した。また，腫瘍の最大剖面の縦と横の積の値を縦横値（以下 dw）として測定し， 2.0 cm^2 以下と 2.1 cm^2 以上に分類し，それぞれ dw1, dw2 とした。また，手術施行日より初再発確認日までを無病期間（disease free interval 以下 D.F.I.）とした。

手術時に摘出した切除標本を 10% ホルマリンで 48 時間固定後，パラフィン包埋を行い， $4\mu\text{m}$ 切片を 4 枚作製し，H-E 染色を行った。脈管侵襲（以下 v），リンパ管侵襲（以下 ly）の評価は，H-E 染色下で癌細胞がそれぞれの脈管内に認められないものを（-），認めるものを（+）とした。組織学的波及度は，g（癌巣が乳腺組織内にとどまるもの），f（乳腺外脂肪に及ぶもの），s（皮膚に及ぶもの）あるいは p（大胸筋に及ぶもの）の 3 段階に分類した。以上の分類は，乳癌取り扱い規約³⁾に準じた。

組織学的異型度は Bloom-Richardson 分類⁴⁾を用いて分類した。すなわち，①腺腔形成性：高度形成は 1 点，中等度は 2 点，低度形成は 3 点とし，②核異型の程度：核の大きさ，形，染色性が均一なものを 1 点，多彩のものを 3 点，中等度を 2 点とし，③核分裂の数：0 個は 1 点，1～4 個は 2 点，5 個以上は 3 点とし，以上①～③の各々の点数を加算して，Grade I：3～5 点，Grade II：6～7 点，Grade III：8～9 点の 3 段階に分類した。エストロゲンレセプター（以下 ER）は RI 法により施行し cut off 値 13 fmol/l 以上を陽性，未満を陰性，プロゲステロンレセプター（以下 PgR）は cut off 値 10 fmol/l 以上を陽性，未満を陰性とした。

2. Flow-cytometry

Hedley の変法⁵⁾にしたがってホルマリン固定パラフィン包埋組織標本検体から FACStar（Becton Dickinson Immunocytometry System, Mountain View, Calif.）を用いて腫瘍組織の ploidy pattern, S-phase fraction（S-phase %）の解析を行った。なお，ploidy pattern の判定は癌 DNA 研究会の用語⁶⁾に従い，diploid は G0/G1 peak が単一で diploid range にあるもの，aneuploid は diploid 以外の全てのものとした。また，S-phase % は FACStar に内蔵されている double discrimination soft ware module（Becton Dickinson Immunocytometry System）にしたがって計算し，n0 症例の 50 例の検体の S-phase % の平均値が $12.450 \pm 10.585\%$ であったことから S-phase % が 13% 未満を low S-phase %，13% 以

上を high S-phase % とした。

3. 免疫組織化学的検討

標本が良好に保存され組織染色可能と判断した転移群 13 例及び非転移群 39 例に対しては免疫組織染色を施した。

1) VEGF 発現

i VEGF 染色

ホルマリン固定パラフィン包埋標本を用いて $4\mu\text{m}$ の連続切片を作成し，Streptavidin Biotin（SAB）法にて行った。免疫組織染色は，抗ヒト VEGF ポリクローナル抗体（Santa Kruz 社，U.S.A）を用いた。酵素抗体法は脱パラフィン処理，脱キシロール後，内因性ペルオキシダーゼを阻止し，正常血清による Back-ground staining を除去した。600 倍希釈一次抗体を 4°C overnight 湿室中で反応させ Blocking KIT（Biotin 液）を全体の 30% の割合で加えた。Biotin 標識二次抗体を湿室中で室温，40 分間反応後，Abidin Biotin Complex（Vector Laboratories 社製）を室温 40 分間反応させ，DAB 溶液で発色，核染色（Hematoxylin）を施行した。

ii 判定基準

200 倍光顕鏡下に検鏡を行い，最も染色された視野を三視野選び，染色された腫瘍細胞に対する数をカウントした。三視野の全腫瘍細胞数に対する比率を求め，染色陽性細胞が 25% 以上のものを VEGF 発現陽性（Fig. 1 (a)），25% 未満のものを VEGF 発現陰性（Fig. 2 (b)）とした。

2) PyNPase 発現

i PyNPase 染色

VEGF 染色と同様に，ホルマリン固定パラフィン包埋標本の $4\mu\text{m}$ の連続切片を用いて Streptavidin Biotin（SAB）法にて行った。一次抗体は，抗ヒト TdR Pase モノクローナル抗体（日本ロシュ社）を 500 倍に希釈して使用した。

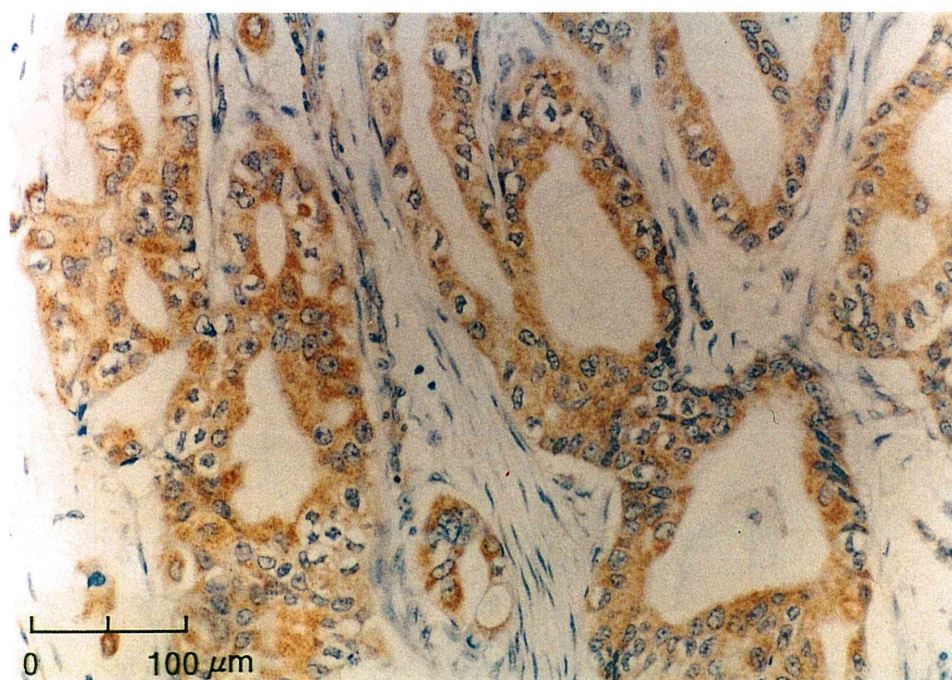
ii 判定基準

癌細胞が全く染まらないか，わずかに染まるが正常の乳腺上皮細胞より染まらないか，同じくらい染まるものを陰性（Fig. 2 (a)），乳腺上皮細胞より濃染する癌細胞を陽性（Fig. 2 (b)）とした。

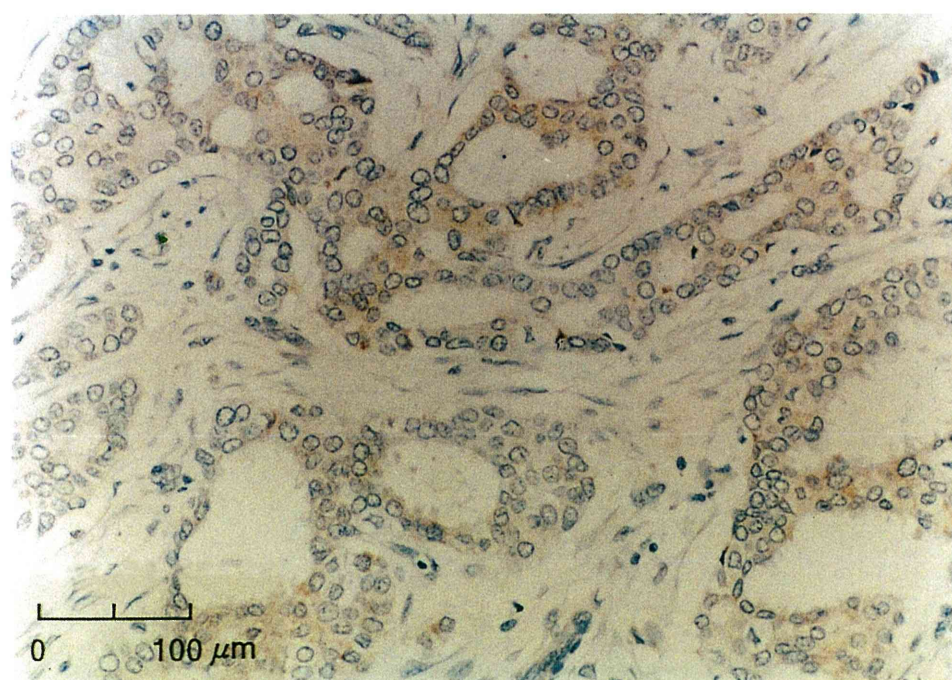
III. 統計処理

単変量解析は χ^2 検定，Fisher の直接法を用いた。累積健存率，生存率は，kaplan-meier 法にて算出し，一般化 Wilcoxon 検定を用いて有意差を検討した。

以上の検定において有意水準 5% 未満を有意差あ

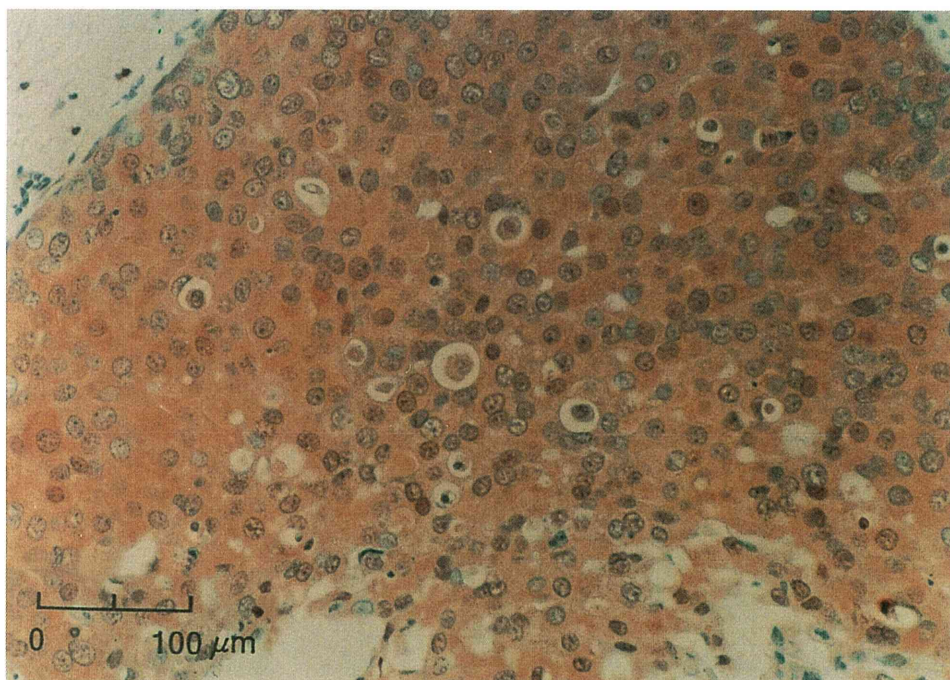


(a) Positive immunohistochemical reaction for VEGF

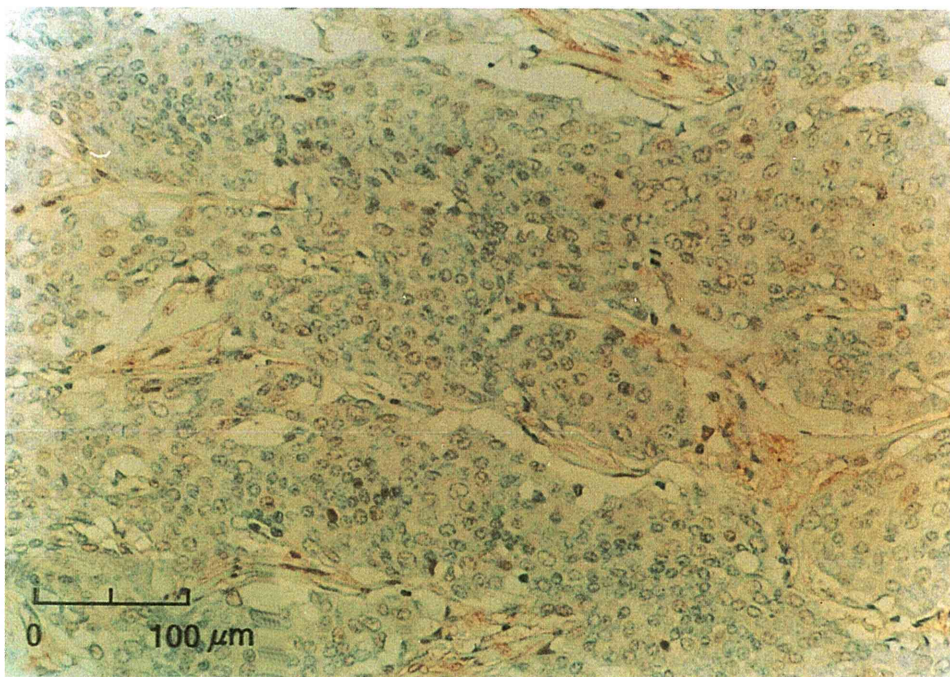


(b) Negative immunohistochemical reaction for VEGF

Fig. 1 Immunohistochemical staining of VEGF in breast cancer (× 200)



(a) Positive immunohistochemical reaction for PyNPase



(b) Negative immunohistochemical reaction for PyNPase

Fig. 2 Immunohistochemical staining of PyNPase in breast cancer ($\times 200$)

りとした。

結 果

I. 再発症例

全 n0 乳癌 472 例のうち再発群は 20 例（4.2%），死亡例は 8 例であった。年齢の平均値は，全体で 52.7 ± 11.3 歳，再発群 52.7 ± 9.7 歳，非再発群 52.9 ± 11.5 歳であり，各群間に有意差は認めなかった。無病期間は 4 ヶ月から 70 ヶ月，平均 32.2 ± 20.7 ヶ月であった。

初発転移部位は，骨 9 例（45%），肺 2 例（10%），肝 2 例（10%），局所再発 4 例（20%），リンパ節再発 2 例（10%），軟部組織 1 例（5%）であった。

II. 再発群と非再発群の比較

14 因子を検討したところ触診腫瘍径（T），組織学的腫瘍径（t），縦横値（dw），組織学的波及度，組織学的悪性度において 2 群間に統計学的有意差を認めた（各々 $p < 0.05$, $p < 0.05$, $p < 0.05$, $p < 0.05$, $p < 0.01$ ）（Table 1）。

III. 触診腫瘍径，組織学的腫瘍径，縦横値と他因子との関連

1. 触診腫瘍径，組織学的腫瘍径，縦横値と臨床病理学的因子

有意差の得られた因子のうち触診腫瘍径，組織学的腫瘍径，縦横値について他の臨床病理学的因子との関連を検討した（Table 2）。

触診および組織学的腫瘍径を 2.0 cm 以下と 2.1 cm 以上，縦横値を 2.0 cm^2 以下と 2.1 cm^2 以上に分類し，各因子との関連性を求めた。T では ly, v, 組織型に有意差を認めた（各々 $p < 0.01$, $p < 0.05$, $p < 0.05$ ）。充実腺管癌と他の組織型とで，T1, T2 との間に有意差（ $p < 0.05$ ）を認めた。すなわち充実腺管癌では他の組織型に比べ触診腫瘍径が大きい傾向にあった。

t および dw では ly, v にのみ有意差を認めた（各々 $p < 0.01$, $p < 0.01$ ）。

2. 触診腫瘍径，組織学的腫瘍径，縦横値と組織型

T, t および dw に関し，それぞれ組織型ごとに平均値を求め比較検討した（Table 3）。T に関しては，平均値はそれぞれ乳頭腺管癌 2.7 cm，充実腺管癌 3.1 cm，硬癌 3.3 cm，その他特殊型 4.9 cm であった。t では平均値はそれぞれ 2.4 cm, 3.0 cm, 2.3 cm, 3.8 cm, dw では平均値はそれぞれ 11.4 cm^2 , 7.8 cm^2 , 4.0

Table 1 Correlation between recurrence of node-negative breast cancer and clinicopathologic factors

	recurrence group (n = 20)	recurrence-free group (n = 218)
Age		
≤ 49	9	96
50~59	6	63
≥ 60	5	59
Menopausal status		
pre-	10	106
post-	10	112
Childbirth		
yes	15	146
no	5	72
Palpable tumor size		
T1 $\leq 2.0 \text{ cm}$	4	98
T2 $\geq 2.1 \text{ cm}$	16	120
Histological tumor size		
t1 $\leq 2.0 \text{ cm}$	7	133
t2 $\geq 2.1 \text{ cm}$	13	85
Depth-width value		
dw1 $\leq 2.0 \text{ cm}^2$	2	94
dw2 $\geq 2.1 \text{ cm}^2$	18	124
Tumor location		
upper-inner	7	66
lower-inner	2	7
upper-outer	9	121
lower-outer	2	15
central	0	9
Histological extension		
g	2	12
f	14	198
s + p	4	8
Histological grade		
Grade I	3	98
Grade II	3	78
Grade III	14	42
ER status		
(+)	8	132
(-)	12	86
PgR status		
(+)	8	137
(-)	12	81
Lymphatic invasion		
(+)	13	129
(-)	7	89
Vascular invasion		
(+)	8	66
(-)	12	152
Histological type		
papillotubular	6	90
solid-tubular	5	82
scirrhus	5	25
others	4	21

(* : $p < 0.05$)

(** : $p < 0.01$)

Table 2 Correlation between clinicopathologic factors and palpable tumor size, histological tumor size and depth + width value

size	T		t		dw	
	～2.0	2.1～	～2.0	2.1～	～2.0	2.1～
Age						
≤ 49	50	57	63	44	31	76
50～59	24	44	42	26	17	51
≥ 60	24	39	42	21	23	40
Menopausal status						
pre-	54	62	71	45	37	79
post-	44	78	76	46	34	88
Childbirth						
yes	61	100	97	64	49	112
no	37	40	50	27	22	55
Tumor location						
upper-inner	33	40	48	25	24	49
lower-inner	2	7	7	2	1	8
upper-outer	52	78	76	54	38	92
lower-outer	8	9	10	7	4	13
central	3	6	6	3	4	5
Histological extension						
g	7	7	6	8	5	9
f	87	125	134	78	61	151
s + p	4	8	7	5	5	7
Histological grade						
Grade I	41	60	55	46	32	69
Grade II	33	48	46	35	28	53
Grade III	24	32	46	10	11	45
ER status						
(+)	60	80	94	46	43	97
(-)	38	60	53	45	28	70
PgR status						
(+)	63	82	98	47	47	98
(-)	35	58	49	44	24	69
Lymphatic invasion						
(+)	44	98	75	67	25	117
(-)	54	42	72	24	46	50
Vascular invasion						
(+)	23	51	35	39	12	62
(-)	75	89	112	52	59	105
Histological type						
papillotubular	49	47	59	37	32	64
solid-tubular	23	64	54	33	18	69
scirrhous	15	15	19	11	12	18
others	11	14	15	10	9	16

(*: p < 0.05)

(**: p < 0.01)

cm², 13.8 cm²であった。T, t では各組織型間での差異は少なかったが, dw では硬癌が他の組織型に比べ平均値が小さかった。

IV. 腫瘍組織の Flow-cytometry による検討

1. ploidy pattern

再発群では diploid 5 例, aneuploid 5 例, 非再発群では diploid 30 例, aneuploid 10 例で, 再発群で

aneuploid の比率が高い傾向にあったが, 統計学的有意差は認めなかった (Table 4)。

2. S-phase %

再発群では low S-phase % 3 例, high S-phase % 7 例, 平均 13.3%, 非再発群では low S-phase % 17 例, high S-phase % 23 例, 平均 8.0% であり, 再発群に high S-phase % が多い傾向にあったが有意

Table 3 Mean palpable tumor size, histological tumor size and length + width value

	papillotubular carcinoma	solid-tubular carcinoma	scirrhous carcinoma	others
T (cm)	2.7	3.1	3.3	4.9
t (cm)	2.4	3.0	2.3	3.8
dw (cm ²)	11.4	7.8	4.0	13.8

Table 4 Correlation between recurrence of node-negative breast cancer and ploidy pattern, S-phase %

		Total	recurrence group	recurrence-free group	
ploidy n = 50	diploid	35(70.0%)	5(50.0%)	30(75.0%)	p = N.S.
	aneuploid	15(30.0%)	5(50.0%)	10(25.0%)	
S-phase n = 50	low	20(40.0%)	3(30.0%)	14(42.5%)	p = N.S.
	high	30(60.0%)	7(70.0%)	23(40.0%)	

差は認めなかった (Table 4).

3. FACS 解析と臨床病理学的因子

ploidy pattern および S-phase % のいずれも臨床病理学的因子との関連性に有意差を認めなかった。

V. VEGF 発現

1. VEGF 発現と再発形式

再発群では、VEGF 陽性 11 例 (84.6%)、VEGF 陰性 2 例 (15.4%)、非再発群では VEGF 陽性 21 例 (53.8%)、VEGF 陰性 18 例 (46.2%) で、両群間に有意差 ($p < 0.05$) を認めた (Table 5)。

再発形式においては、VEGF 発現陽性では遠隔転移 9 例 (69.2%)、局所再発 1 例 (7.7%)、リンパ節転移 1 例 (7.7%) であったのに対し、VEGF 発現陰性では遠隔転移 1 例 (7.7%)、リンパ行性転移 1 例 (7.7%) であり、局所再発は認められなかった。VEGF 発現陽性では遠隔転移が多い傾向にあったが、有意差は認められなかった。

2. VEGF 発現と D.F.I.

D.F.I. が 2 年未満の症例では VEGF 陽性率が 100%、2 年以上 4 年未満では 80%、4 年以上では 75% であり、D.F.I. が短い程、VEGF 陽性率が高

い傾向にあった (Table 6)。

3. VEGF 発現と臨床病理学的因子

14 因子を検討したところ縦横値にのみ 2 群間に有意差 ($p < 0.05$) を認めた (Table 7)。

4. VEGF 発現と累積健存率、累積生存率

VEGF 陽性と VEGF 陰性の間で、累積健存率に有意差 ($p < 0.05$) を認めたが、累積生存率には有意差は認められなかった (Fig. 3)。

VI. PyNPase 発現

1. PyNPase の発現と再発

再発群と非再発群の間に有意差は認められなかった (Table 5)。再発形式においては、PyNPase 発現陽性では遠隔転移 4 例 (30.8%)、局所再発 1 例 (7.7%)、リンパ節転移 1 例 (7.7%) であったのに対し、PyNPase 発現陰性では遠隔転移 6 例 (46.1%)、リンパ行性転移 1 例 (7.7%) であり、局所再発は認めず、両者間には有意差はなかった (Table 5)。

2. PyNPase 発現と D.F.I.

D.F.I. が 2 年未満の症例では陽性率 100%、2 年以上 4 年未満では 60%、4 年以上では 25% であり、D.F.I. が 4 年未満と 4 年以上の間で、PyNPase 発現

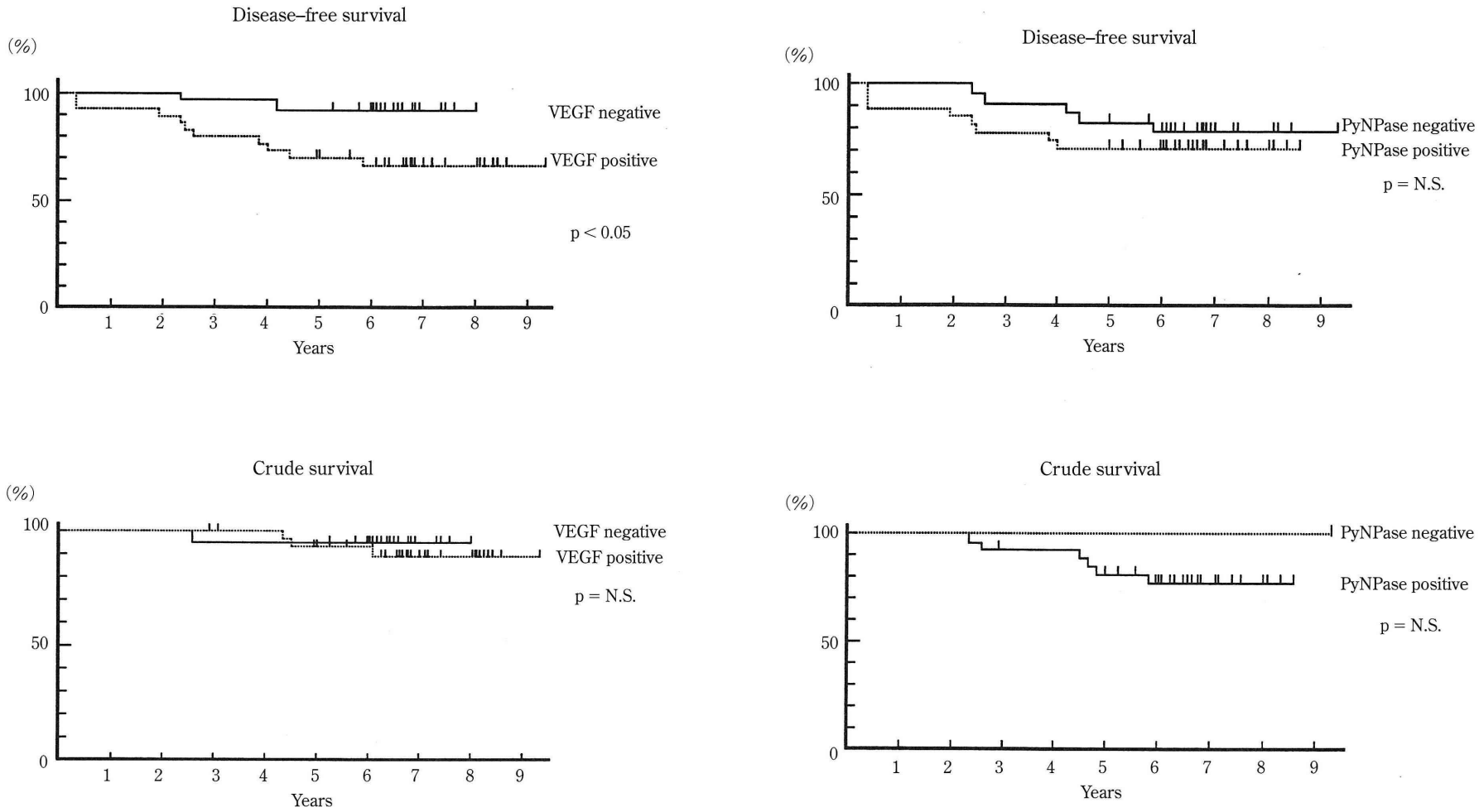


Fig. 3 Crude survival rate and disease-free survival rate by immunohistochemical staining of VEGF and of PyNPase in breast cancer

Table 5 Correlation between VEGF and recurrence, PyNPase and recurrence

	recurrence form		
	long-distance	local	lymphatic
VEGF positive	9(69.2%)	1(7.7%)	1(7.7%)
VEGF negative	1(7.7%)	0(0.0%)	1(7.7%)

	recurrence form		
	long-distance	local	lymphatic
PyNPase positive	4(30.8%)	1(7.7%)	1(7.7%)
PyNPase negative	6(46.1%)	0(0.0%)	1(7.7%)

Table 6 Correlation between expression of VEGF and PyNPase in recurrence group and disease-free interval

D.F.I. (yesars)	VEGF positive rate (%)	PyNPase positive rate (%)
< 2	100	100
2 ≤ < 4	80	60
4 ≤	75	25

D.F.I. (months)		
VEGF positive	66.3 ± 31.0	p = N.S.
VEGF negative	72.5 ± 15.8	
PyNPase positive	31.8 ± 20.4	p = N.S.
PyNPase negative	57.7 ± 10.8	

率に差異を認めた。すなわち VEGF と同様に、D. F. I. が短いほうが、PyNPase 陽性率は高かった (Table 6)。

3. PyNPase 発現と臨床病理学的因子

何れの因子においても、再発の有無に関しては有意差はなかった (Table 7)。

4. PyNPase 発現と累積健存率、累積生存率

累積健存率、累積生存率ともに有意差は認められなかった (Fig. 3)。

VII. VEGF と PyNPase との関係

VEGF と PyNPase の発現を比較検討した結果、VEGF、PyNPase とともに陽性 20 例、VEGF 陽性かつ PyNPase 陰性 12 例、VEGF 陰性かつ PyNPase 陽性 8 例、VEGF、PyNPase とともに陰性 12 例であった。VEGF、PyNPase とともに発現するものは、いずれか一方のみ発現するものより多く、VEGF と PyNPase に共発現の傾向がみられたが、有意差はなかった (Table 8)。

Table 7 Correlation between VEGF, PyNPase and clinicopathologic factors

	VEGF positive (n = 32)	VEGF negative (n = 20)	PyNPase positive (n = 28)	PyNPase negative (n = 24)
Age				
≤ 49	15	5	7	13
50~59	7	9	9	7
≥ 60	10	6	12	4
Menopausal status				
pre-	16	5	5	16
post-	16	15	23	8
Childbirth				
yes	26	15	22	19
no	6	5	6	5
Palpable tumor size				
T1 ≤ 2.0 cm	4	8	8	4
T2 ≥ 2.1 cm	28	12	20	20
Histological tumor size				
t1 ≤ 2.0 cm	17	15	12	18
t2 ≤ 2.1 cm	15	5	16	4
Depth-width value				
dw1 ≤ 2.0 cm ²	5	9	4	10
dw2 ≤ 2.1 cm ²	27	11	24	14
Tumor location				
upper-inner	8	9	11	6
lower-inner	3	0	2	1
upper-outer	18	7	12	13
lower-outer	2	1	1	2
central	1	3	2	2
Histological extension				
g	0	0	0	0
f	29	19	25	23
s + p	3	1	3	1
Histological grade				
Grade I	13	9	10	12
Grade II	11	7	11	7
Grade III	8	4	7	5
ER status				
(+)	17	11	17	11
(-)	15	9	11	13
PgR status				
(+)	22	12	20	14
(-)	10	8	8	10
Lymphatic invasion				
(+)	22	12	21	13
(-)	10	8	7	11
Vascular invasion				
(+)	8	4	10	2
(-)	24	16	18	22
Histological type				
papillotubular	9	2	6	5
solid-tubular	15	12	13	14
scirrhous	3	2	3	2
others	5	4	6	3

(* : p < 0.05)

Table 8 Correlation between VEGF and PyNPase

	PyNPase+	PyNPase-	Total
VEGF+	20 (38.5%)	12 (23.1%)	32 (61.6%)
VEGF-	8 (15.4%)	12 (23.1%)	20 (28.4%)
Total	28 (53.8%)	24 (46.2%)	52 (100.0%)

p = N.S.

考 察

乳癌ではリンパ節転移の有無が有力な予後決定因子であり、n0乳癌は予後良好であると言われている⁷⁾。しかし、本邦においては10%前後に再発がある^{1,2)}とされている。当院における再発率は4.2%であり、比較的低値であった。欧米においてはこの頻度は高く、30%との報告⁸⁾もある。

本邦における乳癌は欧米と進行度をそろえてみても予後が良く、生物学的性状に違いがあるともいわれており、n0乳癌における再発率は前述の如く約1/3の頻度である。従って、本邦における乳癌の生物学的性状に相関した的確な因子を解析する必要性がある。1989年の乳癌研究会の報告⁹⁾では、腫瘍径、核分裂頻度、組織学的波及度、組織型がその因子であるとされているが、他の因子の重要性を報告するグループ¹⁰⁾もあり統一の見解は得られていない。さらに、最近では遺伝子を中心とした研究が注目されている。本研究では腫瘍の増殖や再発・転移に大きく関与している血管新生に着目し、血管新生因子とされているVEGFとPyNPaseについて、再発、予後との関連および臨床病理学的因子との関連について検討した。

その結果、臨床的因子としての年齢、月経歴、占拠部位、出産歴に関しては有意差は認められなかったが、腫瘍径において有意差が認められた（Table 1）。乳癌では腫瘍径が大きくなるに従って再発の頻度が高くなるということは多く報告されており、Rosenら¹¹⁾もn0乳癌においても独立した重要な予後因子であるとしている。本研究では、従来のT因子、t因子に加え縦横値も検討項目とした（Table 2）。

組織学的因子においては、組織学的波及度と組織学的悪性度に有意差を認め、脈管・リンパ管浸襲、ER、PgRには差は見られなかった。組織型では、

乳頭腺管癌の割合が高かったが、腫瘍径の大きいもののほど充実腺管癌の占める比率は高くなっていた（Table 3）。

一般に、生物学的性状より硬癌では早期より転移をきたすこと、充実腺管癌では大きくなっても予後の良い症例があることが知られている。

このため、有意差の得られた腫瘍径因子と組織学的因子を組み合わせ、詳細に検討した結果、充実腺管癌で他の組織型と比べ有意に触診腫瘍径が大きく、また縦横値の平均値の検討では硬癌が他の組織型に比べ有意に小さく、腫瘍径に関して組織型が強く影響することが判明した。また、脈管浸襲においても腫瘍径にて分類すると有効な因子となった。今後のn0乳癌の治療方針決定のためには組織型、脈管浸襲を加味した腫瘍径が重要な因子である可能性が示唆された。

乳癌におけるDNA ploidy patternの解析の評価は多様であり、一定の評価を受けるに至っていない。これらは検体作成法やヒストグラムの解析法の違いによると考えられている¹²⁾。一般に、aneuploid症例の予後が悪いと言われている¹³⁾が、今回の解析では差は見られなかった（Table 4）。S-phase%は増殖能を示すとされ有用であるとする報告が多い¹⁴⁾が、cut off値の決め方などに統一の見解がないため成績にばらつきが多い。さらに、最近ではploidy pattern、S-phase%のいずれをも独立した因子とするには限界があるという意見もある¹⁵⁾。

n0乳癌における再発形式は、リンパ行性のものは少なく、9割前後は血行性あるいは局所再発である^{1,2)}。本研究においてもn0乳癌転移群20例中血行性転移14例（70%）、局所再発例4例（20%）、リンパ節再発2例（10%）であり、n0乳癌の再発・転移には血行性転移が重要な役割をしていると考えられる。血管新生は腫瘍の増大に必要不可欠である¹⁶⁾が、血管新生によって腫瘍周囲の血管網が

発達することは、血行性転移をより起こしやすくする環境をつくり出している。n0 乳癌の再発・転移と、原発腫瘍の血管新生との関連性を検討することは血行性転移を考える上で有意義であり、転移・再発の有力な規定因子となりうると思われる。

腫瘍血管新生には種々の因子および抑制因子が関与していることが知られる。その代表的なものとして VEGF, platelet-derived endothelial cell growth factor (PD-ECGF), basic fibroblast growing factor (bFGF) などがあげられている。このうち、PD-ECGF は遺伝子解析の結果、ヒトにおいては大部分が、PyNPase として存在する thymidine phosphorylase (dThdPase) と同一のものであることが証明されている¹⁷⁾。今回の解析に際しては VEGF および PyNPase を用いたが、VEGF は血管新生の全過程に作用し、その中でも特に血管内皮細胞の増殖をになっているといわれている。VEGF はさらにいくつかのサブタイプが報告されており¹⁸⁾、今回は VEGF₁₆₅ に対する抗体を用いた。これは、VEGF₁₆₅ は塩基性ドメインを持ち、細胞膜表面に付着する性質を持つことと抗体の力価を考慮したためである。一方、PyNPase の血管新生作用の機序は明らかになってはいないが、thymidine から PyNPase によって産生される 2-deoxyribose が活性の本体であるとされている。この 2-deoxyribose も内皮細胞の chemotaxis 作用を有し、癌組織の内皮細胞の増殖に働いていることが示唆されている¹⁹⁾。

n0 乳癌再発・転移と VEGF 発現の検討 (Table 5) では、再発群と非再発群の間で VEGF 発現に有意差が認め ($p < 0.05$) られたが、PyNPase の発現には有意差はみられなかった。さらに VEGF では、臨床病理学的因子として有意差の得られた腫瘍径との関連において通常の T 因子や t 因子とは相関せず、縦横値のみと相関した (Table 7)。秋山ら²⁰⁾ は腫瘍断面径ではなく浸潤径の絶対量が予後を決めると報告しており、今回の結果を加味すると血管新生が単なる腫瘍径よりも、実際の腫瘍体積に依存すると考えられる。また、PyNPase の発現 (Table 8) では有意差がみられなかったことは、VEGF が PyNPase に比して再発という現象に強く関与する因子であることを示している。このことは、遠隔転移を来した症例の割合いからも認められた。しかし、いずれの染色においても n0 乳癌再発群の D.F.I. との関係では (Table 6)、D.F.I. が短い程、陽

性率が高いという結果が得られた。また、この両者の間には共発現の傾向がみられた。これは戸井らの報告²¹⁾ を裏付けるものであり、両者の共通発現は作用機序からみて、相補的、相乗的に血管新生の亢進に関与していると思われる。従って、n0 乳癌の再発に原発腫瘍の血管新生が関与すると考えられ、n0 乳癌の症例では腫瘍径の大きいものに対して血管新生因子を測定することは再発の予測に関して意味のあることと考えられた。

以上の如く、今回の結果からは n0 乳癌の再発には、従来言われてきた腫瘍径、組織学的悪性度および組織学的波及度に加え縦横値 (特に 2 cm^2 以上)、血管新生 (特に VEGF 発現)、組織型 (特に硬癌) が深く関わっていることが考えられる。これら 3 因子を悪性度因子としてその再発率を検討したところ、3 因子そろった n0 乳癌の再発率は 66.7%、2 因子の場合の再発率は 39.1%、1 因子の場合は 10.5% であり、すべての再発症例にこれら 3 因子のいずれかの因子が関与しており、項目数別に再発率が明瞭に分類された。この結果は 3 因子が n0 乳癌の再発に深く関わっている可能性を示唆し、悪性度因子を組み合わせることでより予後推測や術後治療決定の補助となりうると思われる。

結 語

1. n0 乳癌を対象に臨床病理学的検討を行うとともに VEGF および PyNPase の免疫組織染色を行い、再発・転移と原発腫瘍の血管新生との関連を検討した。

2. 再発群 13 例中 11 例 (84.6%)、非再発群 39 例中 21 例 (53.8%) に VEGF 発現を認め、両者に有意差を認めた。

3. VEGF の発現は縦横値と関連性があり、腫瘍の大きさと血管新生に関連があることが示唆された。

4. 腫瘍径の小さいものでも硬癌では再発率が高く、縦横値を加味すると、再発に対する指標として有用であることが示された。

5. 無病期間が短い程 VEGF, PyNPase の発現率が高く、術後 2 年以内の早期再発により強く血管新生が関与していることが示された。

文 献

- 1) 佐伯菊子：リンパ節転移陰性（n0）乳癌の予後に関する臨床病理学的検討. 日外会誌 **96**：168～173, 1995
- 2) 宮川隆平：リンパ節転移陰性（n0）乳癌の臨床病理学的検討. 東女医大誌 **65**：158～169, 1995
- 3) 乳癌学会編：臨床・病理. 「乳癌取り扱い規約第12版」金原出版, 東京, 1997
- 4) Bloomn H.J.G., Richardson W.W : Histological grading and prognosis in bresst cancer. Br. J. Cancer **11** : 359～377, 1957
- 5) Hedley DW, Friedlander ML, Taylar IW, Rugg CA, Musgrove EA : Method for analysis of cellular DNA content of paraffin-embedded pathological material using flow cytometry. J. Histochem Cytochem. **31** : 1333～1335, 1983
- 6) 鈴木宏志, 木村 修, 西平哲郎, 藤田哲也, 芦原司, 福田 優, 貝原信明, 進藤勝久, 田口忠宏, 是永大輔, 松本好市, 浜田新七, 浦田洋二, 実方一典, 岡島邦雄：癌 DNA 研究会用語検討委員会報告. 癌の臨床 **37** : 1～3, 1991
- 7) 浅越辰男：乳癌摘出標本リンパ節の病理組織学的検索と術後遠隔成績. 慶應医誌 **58** : 517～535, 1981
- 8) Dressler LG, Seamer LC, Owens MA, Clark GM, McGuire WL : DNA flow cytometry and prognostic factors in 1331 frozen breast cancer specimens. Cancer **61** : 420～427, 1988
- 9) 小山博記, 浅石和昭, 吉本賢隆, 榎本耕治, 山本浩, 内田 賢, 富永 健, 飯野祐一, 三浦重人, 稲治英生, 宮内啓輔, 高嶋成光, 野村雍夫, 青木浩二：n0 乳癌再発例の検討. 乳癌の臨床 **4** : 69～75, 1989
- 10) 浅越辰男, 花谷勇治, 土井美幸, 三吉 博, 蓮見直彦, 長岡信彦, 葉梨圭美, 小平 進：n0 乳癌再発因子としての腫瘍周囲リンパ球浸潤の意義. 日臨外医学会誌 **56** : 1791～1798, 1995
- 11) Rosen PP, Groshen S, Saigo PE, Kinne DW, Hellman S : A long-term follow up study of survival in stage I (T1 N0 M0) and Stage II (T1 N1 M0) breast carcinoma. J Clin Oncol. **7** : 355～366, 1989
- 12) 天野定雄, 黒須康彦, 秦 怜志, 柴田昌彦, 三宅洋, 滝沢秀博：n0 乳癌症例の検討—再発例を中心に—. 日大医誌 **54** : 223～228, 1995
- 13) Hedley DW, Rugg CA, Ng ABP, Taylor IW : Influence of cellular DNA content on disease free survival of Stage II breast cancer patients. Cancer Res. **44** : 5395～5402, 1984
- 14) Clark GM, Dressler LG, Owens MA, Pounds G, Oldaker T, McGuire WL : Prediction of relapse or survival in patients with node-negative breast cancer by DNA flow cytometry. New Engl J Med. **320** : 627～633, 1989
- 15) Babiak J, Hugh J, Poppema S : Significance of c-erb B-2 complication and DNA aneuploidy cancer **70** : 770～775, 1992
- 16) Folkman J, Shing Y : Angiogenesis. J. Biol. Chem. **267** : 10931～10934, 1992
- 17) Sumizawa T, Furukawa T, Haraguchi M, Yosimura A, Takeyasu A, Ishizawa M, Yamada Y, Akiyama S : Thymidine phosphorylase activity associated with platelet-derived endothelial cell growth factor. J. Biochem **114** : 9～14, 1993
- 18) Houck KA, Ferrara N, Winer J, Cachianes G, Li B, Leung DW : The vascular endothelial growth factor family: Identification of a fourth molecular species and characterization of alternative splicing of RNA. Mol Endocrinol. **5** : 1806～1814, 1991
- 19) Miyadera K, Sumizawa T, Haraguchi M, Yoshida H, Konstanty W, Yamada Y, Akiyama S : Role of thymidine phosphorylase activity in the angiogenic effect of platelet-derived endothelial cell growth factor/thymidine phosphorylase. Cancer Res. **55** : 1687～1690, 1995
- 20) 秋山 太, 坂元吾偉, 菊地昌弘：乳管内進展型における乳管外浸潤と予後についての臨床病理学的研究. 乳癌の臨床 **4** : 429～441, 1989
- 21) 戸井雅和, 山本 豊, 谷口忠明, 佐治重衡, 林 和雄, 富永 健：乳癌における血管新生誘導因子の発現と調節. 癌と化学療法 **23** : 75～79, 1996

Clinicopathological study on recurrence of node-negative breast cancer with special reference to expression of VEGF and PyNPase

Katsumasa HOSOKAWA

The Third Department of Surgery, Tokyo Medical University

Node-negative (n0) breast cancer generally has a favorable prognosis, but about 10% of the cases recur. In this study, we investigated clinicopathological factors including angiogenesis considered to be involved in tumor growth to assess its relationship with the recurrence of n0 breast cancer by examining angiogenesis factors, VEGF and PyNPase. In a total of 238 patients with n0 breast cancer, palpable tumor size, histological tumor size and depth + width value were significantly different between the recurrence group and the recurrence-free group. When immunohistological staining for VEGF and PyNPase was performed, VEGF expression rate was high in the recurrence group compared with the recurrence-free group, and also showed a significant difference in relation to palpable tumor size. These results suggest that angiogenesis has an important role in the recurrence of n0 breast cancer. It was also revealed that palpable tumor size, histological tumor size and depth + width value are closely related to histological type, suggesting that these factors are useful as indicators of cancer recurrence.

〈Key words〉 Node-negative breast cancer, Angiogenesis, VEGF, PyNPase, Clinicohistological tumor size
