

大腸癌先進部所見である budding の抗癌剤
治療効果予測における有用性に関する研究

やまでら まさと
山寺 勝人

(外科系プライマリーケア学)

防衛医科大学校

平成31年度

目 次

第 1 章 緒言	1 頁
第 2 章 ヘマトキシリン・エオジン染色による budding 評価の妥当性の検証	6 頁
第 3 章 Stage III 大腸癌における budding の予後因子としての意義	15 頁
第 4 章 化学療法効果予測因子としての budding の意義	21 頁
第 1 節 Stage III 大腸癌におけるフッ化ピリミジン製剤の効果予測についての検討	21 頁
第 2 節 Stage IV 大腸癌におけるオキサリプラチンの治療効果との相関	32 頁
第 5 章 術前内視鏡下生検組織における intratumoral budding と先進部における budding との相関	38 頁
第 6 章 総括	44 頁
第 7 章 結論	46 頁
謝辞	47 頁
引用文献	48 頁
図表	55 頁

第1章 緒言

本邦での大腸癌診療は、2005年以降大腸癌治療ガイドラインによって標準治療が示され、なかでもリンパ節転移を伴う Stage III 大腸癌については、根治術後に再発予防を目的とした術後補助化学療法が推奨されている¹⁻⁵。大腸癌の術後補助化学療法に使用可能な薬剤の代表は、5-フルオロウラシル (fluorouracil, FU) に代表されるフッ化ピリミジン系代謝拮抗剤であるが、近年では、白金製剤であるオキサリプラチンとフッ化ピリミジン系薬剤を併用することにより、フッ化ピリミジン系薬剤単独より高い再発予防効果が得られることが示されている^{6,7}。Stage III 結腸癌を対象とした術後補助化学療法において、オキサリプラチン併用療法は5-FU+I-ロイコボリン (leucovorin, LV) と比較し再発・死亡の相対リスクを約20%減少させることが、欧米で実施された3つのランダム化比較試験で再現性をもって確認されており、本邦の大腸癌治療ガイドライン (2019年度版) でも術後6か月間のオキサリプラチン併用療法が強く推奨されている^{1,2,6,8-11}。一方、オキサリプラチンの有害事象の一つである末梢性ニューロパチーは、程度の差はあるもののほぼ全例に出現し、治療終了後も後遺症として持続する症例も少なくない^{8,12}。また本邦と欧米では Stage III 症例の予後が異なり、比較的予後良好な日本の症例を同等に扱うことの是非について、未だコンセンサスが得られていない。Stage III 大腸癌の術後補助化学療法施行率は年々増加傾向にあるが¹³、効果予測に基づい

たオキサリプラチンの明確な使用基準がないのが現状で、本邦での使用頻度は20～30%程度にとどまっている。

大腸癌に対する術前化学療法の有効性は未確立ではあるが、高度な浸潤を伴うなど、治癒切除が危ぶまれる大腸癌症例に対し術前化学療法を施行することで、根治性を高めることができるとの報告が散見される。一方、化学療法による治療効果が乏しい場合には、腫瘍増大に伴い切除そのものが不可能となる危険性があり、実用化を目指した化学療法に対する効果予測法の確立が期待されている。また、切除不能進行再発大腸癌に対する化学療法も同様に、無効であった際の腫瘍増大や有害事象による治療中断は生命予後に直結し、効果予測に基づいた過不足ないレジメンの選択が求められる。大腸癌領域では使用可能な薬剤の種類が増えたことにより、生存期間の延長に大きく寄与することになった。しかし、効果予測に基づいて選択できる薬剤は限定的であり、精緻な効果予測が今なお未解決の課題として残されている。

大腸癌における簇出 (budding) は、癌発育先進部間質に浸潤性に存在する単個または5個未満の癌細胞から構成される病巣と定義されており (図1)、悪性度規定因子の一つとされてきた¹⁴⁻¹⁷。buddingはpT1大腸癌におけるリンパ節転移の危険因子の一つとして重要視されるようになり、現在では内視鏡的腫瘍切除した検体において大腸癌取扱い規約第8版で規定されるGrade 2以上のbuddingが認められる症例では、その後にリンパ節郭清を含めた標準的な外科的切除が推奨され

ている^{1, 18, 19}。また、進行大腸癌のうちリンパ節転移を有しない Stage II 大腸癌において詳細な検討が重ねられ、budding が高度に認められる症例は再発リスクが高く、予後不良であることが明らかとなっている¹⁷⁻²⁵。

budding の評価法についてはヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色のプレパラートにより評価する方法と、cytokeratin 免疫組織化学染色による評価法がある。この2つの評価法の間で pT1 癌におけるリンパ節転移との相関の強さを比較検討した報告によると、HE 染色による判定の方が転移とより強く相関し、臨床的利用価値が高いことが示されたが²⁶、pT2 以上の進行癌においてどちらの染色法が優位であるかは明確でない。

また、これまでの分子病理学的な検討から budding は上皮間葉転換 (EMT) を組織形態学的に反映している可能性が示唆されてきた²⁷⁻²⁹。加えて近年、EMT の性格を備えた癌細胞は化学療法抵抗性を示すとの報告がある³⁰⁻³²。budding の程度と化学療法抵抗性との関連が明らかとなれば、今後、術後補助化学療法の適応症例を選別する上で臨床上有用なマーカーとなる可能性があるが、化学療法効果予測因子としての意義について検討された報告は少ない。

budding は癌先進部において評価されるため、外科的に切除して初めて検討が可能となる。手術術式決定や術前療法選択に利用することが困難である点は budding の臨床応用を考えた場合に最大の弱点となる。2011 年に Lugli らによって intratumoral budding (ITB) という概念が提唱された。ITB とは、腫瘍表層や中心部

に存在し budding と同様の所見を有した癌巣と定義される。その後、癌の浸潤先進部における本来の budding と ITB との相関や臨床的意義を検討した報告が散見される³³⁻³⁶。しかし、ITB の標準化された評価法は定まっておらず臨床的有用性も明確ではない。内視鏡下生検組織により budding の程度が予測可能となれば、原発巣切除前の段階で術前化学療法の必要性や郭清範囲などの治療方針決定に利用できる等、budding の臨床的意義を更に大きくすることができる。

本研究では、まず、budding の予後因子としての意義が確立している Stage II を対象として HE 染色を利用した budding の評価の妥当性を cytokeratin 染色と比較することで検証し、その上で、臨床的意義の明確でない Stage III 大腸癌症例に同一評価法を適用し、Stage III 大腸癌における budding の臨床的意義を確認した。

次に、budding と化学療法抵抗性との関連について Stage III および IV 症例を用い後方視的研究を実施した。術後経過の解析可能な Stage III 症例においては術後補助化学療法として、現今の標準的治療のキードラッグであるオキサリプラチンが使用されている症例は未だ少なく、フッ化ピリミジン単独もしくは術後補助化学療法未実施症例が大多数を占める。そこで、Stage III 症例を対象に、budding の程度がフッ化ピリミジン単独療法の効果予測因子となりうるかを検討した。また、近年の原発巣切除かつ遠隔転移巣非切除の Stage IV 症例では、全身状態の不良な場合を除きオキサリプラチンを併用した化学療法をほぼ全例に使用していることから、budding の程度とオキサリプラチンを含む化学療法の治療効果との関連

について検討した。

また、術前に生検組織から budding の程度を予測できた場合、原発巣を切除せずとも術前化学療法のレジメン選択に有用な情報が得られる可能性がある。本研究では、術前生検組織中の ITB がこの予測に利用可能かを検討する目的で同一症例の術前生検標本における ITB と手術検体での budding の評価ならびに相関を解析した。

第2章 HE 染色による budding 評価の妥当性の検証

1 背景・目的

budding の評価法については HE 染色での評価のほかに、cytokeratin 免疫組織化学染色による評価法があり、臨床的有用性については controversial である¹⁸。pT1 大腸癌では HE 染色による判定の方がリンパ節転移予測に関して有用であることが報告されている²⁶。本章では Stage II 大腸癌根治切除標本において HE 染色を利用し budding を評価することの妥当性を、cytokeratin 免疫組織染色の結果と比較することで明らかにすることを目的とした。

2 対象・方法

1) 対象

1997 年 1 月から 2005 年 12 月までの間に防衛医科大学校病院で根治切除 (R0 手術) が施行された Stage II 大腸癌の中から、術前治療として化学療法または化学放射線療法が施行された症例を除外した 314 例を対象とした。進行度は TNM (Tumor, node, metastasis) 分類第 8 版に基づき判定し、組織型や脈管侵襲などの病理組織学的所見については大腸癌取扱い規約第 8 版に基づき評価した^{37,38}。

最低 5 年間にわたり術後サーベイランスを全例に対して実施した。外来にて 3

か月ごとに診察および腫瘍マーカー（血清 CEA 値と血清 CA19-9 値）を含む血液検査、6 か月ごとに胸腹部 CT、1～2 年ごとに大腸内視鏡検査を実施した。本研究は防衛医科大学校の倫理委員会において承認を得た（承認番号：簡-126, 1131）。

症例の臨床病理学的背景を表 1 に示す。年齢は 26 歳から 96 歳で中央値 66.5 歳、平均値 66.0 歳であった。男性が 183 人、女性が 131 人で、結腸癌が 73.3%、直腸癌が 26.7%であった。術前の血清 CEA 値が高値（5.0 ng/ml 以上）であった症例は 29.1%であった。リンパ節郭清個数の中央値は 20 個であり、12 個以上郭清された症例は全体の 77.7%存在した。30 例でフッ化ピリミジン系薬剤による術後補助化学療法が施行された。再発例は 33 例認められた。死亡例は 40 例認め、原癌死が 22 例、他癌死が 5 例、他病死または死因不明が 13 例であった。死亡例における生存期間の中央値は 42.7 か月（4.9–123.3 か月）であった。生存例 274 例におけるフォローアップ期間の中央値は 61.5 か月（49.5–135.2 か月）であった。

2) budding の評価

癌発育先進部に浸潤性に認められる単個または 5 個未満の構成細胞からなる癌胞巣を budding と定義し¹⁶、腫瘍先進部を含む代表切片 1 切片を用いて評価した。パラフィン包埋ブロックを 4 μm 厚に薄切し HE 染色用と cytokeratin 染色用に連続 2 切片を作製。HE 染色標本および cytokeratin 染色標本のそれぞれにおいて、budding が最も高度に認められる領域を検索し、200 倍視野内の budding の個数を

カウントした。budding の判定にあたっては、予後転帰を含む全ての臨床病理学的情報を blind にした状態で申請者 (山寺) が施行した。統計学的解析によって設定された budding 個数のカットオフ値によって budding 高度症例と budding 軽度症例の 2 群に分類して検討した。評価の再現性を検証するため、無作為に抽出した 50 症例の病理標本を申請者以外の評価者 (神藤) が独立して評価した。

3) 免疫組織化学染色

キシレンで脱パラフィン後、エタノール濃度を漸減し、親水処理を行った。オートクレーブにて 121°C 15 分間の抗原賦活化の後、5%過酸化水素水を用いて内因性ペルオキシダーゼの抑制を行った。非特異的反応の抑制にはスキムミルクを使用した。マウス抗 cytokeratin モノクローナル抗体 (MNF116; dilution 1:50; Dako, Santa Clara, CA, USA) を一次抗体として 4°C で 24 時間反応させた。その後、二次抗体 (Envision system anti-mouse; DakoCytomation, Glostrup, Denmark) を加え、室温にて 2 時間反応させた。0.1% diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB) 溶液で 5 分間の発色の後、ヘマトキシリンで核染色を施行した。一次抗体を加えないものを陰性コントロールとし、正常の大腸粘膜を内因性陽性コントロールとして染色性を判定した。

4) 統計的解析

統計的解析にあたっては、連続変数については Student の t 検定あるいは Mann-Whitney の U 検定を用いた。カテゴリカル変数についてはカイ 2 乗検定あるいは Fisher の正確検定を用いた。連続変数の相関については Spearman の順位相関係数を用いて解析した。receiver operating characteristic (ROC) 解析によるカットオフ値の決定には Youden index を用いた。budding 判定の評価者間一致度は Cohen の κ 係数を用いて評価した。 κ 係数に基づく一致率の解釈は、 <0.4 : 一致度不良 (poor)、 $0.4\sim0.6$: 中等度の一致 (moderate)、 $0.6\sim0.8$: 良好な一致 (substantial)、 >0.8 : ほぼ完璧な一致 (almost perfect) とした^{39,40}。無再発生存 (RFS) は手術から全ての死亡または初回再発までの期間と定義した。生存曲線は Kaplan-Meier 法によって計算し、log-rank 検定によって解析した。統計モデル同士を比較するために赤池の情報量基準 (Akaike Information Criterion; AIC) を用いた⁴¹。AIC は統計モデルの良さを評価する統計量であり、AIC 値が小さいほど良好なモデルとされている。再発リスクに関する単変量および多変量解析については、術後 5 年の時点での再発死亡を目的変数としてロジスティック回帰分析により行い、変数の投入にはステップワイズ法を用いた。統計学的解析は JMP 13 software (SAS Institute, Cary, NC, USA) を用いて行い、 $P < 0.05$ を有意差ありとした。

3 結果

Cytokeratin 免疫組織染色を用いた HE 染色による budding 判定の妥当性の検討

budding の組織像を図 2 に示す。HE 染色では同定困難であった budding が cytokeratin の免疫組織染色によって認識可能となった (図 2A, 2B)。Cytokeratin 染色で評価された budding の個数についての評価者間の相関度は HE 染色と比較し優れていた (Spearman の順位相関係数, $\rho = 0.774$ vs. $\rho = 0.736$)。budding の個数の中央値は HE 染色を用いた評価で 4 個 (0–20 個)、cytokeratin 染色では 8 個 (0–40 個) であり、cytokeratin 染色で有意に budding 個数が増加した ($P < 0.0001$, 図 3)。

budding 個数に関して HE 染色と cytokeratin 染色には強い正の相関が認められた ($\rho = 0.747$; $P < 0.0001$, 図 4)。

budding 個数のカットオフ値の設定にあたり、5 から 20 まで 16 通りで、DFS を指標とした AIC 値を算出した (図 5)。5 から 20 までのカットオフの範囲では、AIC 値は全般的に HE 染色による評価が cytokeratin 染色と比較し優れていた。最も良好な AIC 値を示すカットオフ値は HE 染色で 7 個、cytokeratin 染色で 17 個であった。HE 染色において 7 個から 11 個までカットオフ値を用いた場合、cytokeratin 染色のどのカットオフ値の AIC 値よりも優れていた。

再発をアウトカムとした budding 個数の至適カットオフ値を求めるために ROC 解析を行ったところ、HE 染色では $AUC = 0.64$ (95%信頼区間, 0.53–0.74; $P =$

0.0021)、cytokeratin 染色では AUC = 0.60 (95%信頼区間, 0.48–0.70; $P = 0.028$) であり両者の AUC に統計学的有意差はみられなかった (図 6)。budding 個数の至適カットオフ値は HE 染色で 7 個となり、感度 51.5%、特異度 73.7%であった。一方、cytokeratin 染色では 16 個となり、感度 36.4%、特異度 83.3%であった。これらのカットオフ値による判定の評価者間一致度は HE 染色では $\kappa = 0.52$ 、cytokeratin 染色では $\kappa = 0.73$ であった。HE 染色、cytokeratin 染色の両者で budding 高度と判定されたのは 45 例 (14.3%)、両者で budding 軽度と判定されたのは 209 例 (66.6%) であった (表 2)。

再発および予後との相関

これまでの検討結果を踏まえて 200 倍視野当たりの budding が、HE 染色では 7 個以上を budding 高度、cytokeratin 染色では 16 個以上を budding 高度と定義した。染色方法ごとに budding 程度別の RFS に関する生存率曲線を図 7 に示す。budding 高度群では budding 軽度群と比較し、HE 染色 (5 年 RFS 率, 80.3% vs. 93.2%; $P = 0.0022$)、cytokeratin 染色 (5 年 RFS 率, 79.9% vs. 91.7%; $P = 0.0057$) ともに有意に予後不良であった。ロジスティック回帰モデルによる再発リスクに関する単変量解析の結果、占居部位 ($P = 0.022$)、リンパ管侵襲 ($P = 0.012$)、静脈侵襲 ($P = 0.0083$)、郭清リンパ節個数 ($P = 0.044$)、術前血清 CEA 値 ($P = 0.011$) および budding の程度 (HE 染色, $P = 0.0036$; cytokeratin 染色, $P = 0.0082$) で有意差が認め

られ (表 3)、これら全てを共変量としてステップワイズ法による多変量解析を行った結果、静脈侵襲 [オッズ比 (OR) 2.25; $P = 0.037$], 術前血清 CEA 値 (OR 2.46; $P = 0.019$) および HE 染色で評価した budding の程度 (OR 2.53; $P = 0.016$) が独立した予後規定因子として選択された。cytokeratin 染色で評価した budding の程度は独立した予後規定因子として選択されなかった。

4 考察

budding の評価については cytokeratin 染色を用いることで、より明瞭に同定が可能となり、診断能の向上に寄与するとの報告がある^{23,26,42-45}。しかし本検討では、cytokeratin 染色で評価した場合に、HE 染色での評価と比較して同定される budding の個数は増加し、かつ判定者間の再現性はより良好であったものの、AIC による予後分別能の検討ではむしろ HE 染色で評価した場合の方が優れていることが示された。臨床的利用価値の点から HE 染色が優れているとの評価は、すでに pT1 症例におけるリンパ節転移との相関に注目した検討から報告がなされているが²⁶、本検討で初めて進行大腸癌の予後予測能においても HE 染色が優れていることが明らかとなった。

大腸癌細胞の細胞質は cytokeratin の免疫染色によって明瞭に識別されるため、単個から 5 個未満の癌胞巣が容易に同定できる点に異論はない。しかし、cytokeratin 染色で budding を評価した場合、腫瘍免疫反応等によって変性やアポト

ーシスに陥った細胞が偽陽性としてカウントされる可能性があり、結果として budding の予後因子としてのインパクトが低下したと推測できる。

200 倍 1 視野当たりの budding 個数の至適カットオフ値について、大腸癌の Stage ごとに様々な報告がされているが^{23,26,46}、文献的検索では上野らが提唱する、HE 染色で 5 個および 10 個が最も広く利用されている¹⁶⁻¹⁸。今回の検討結果から Stage II 大腸癌の評価にあたって、7 から 11 個程度をカットオフ値とした場合に良好な分別能が得られた。上野らの評価基準の妥当性を裏付ける結果である。一方、cytokeratin 染色で評価した場合には至適カットオフ値が大きく異なることが示され、再現性を重視して cytokeratin 染色を導入する場合は HE 染色の判定基準が利用できないことに注意を払う必要がある。

本検討の limitation について記載する。本検討での budding の評価は癌組織の代表切片 1 切片で実施した。一般的に budding は、全切片を観察したうえで判定する方法が一般的であり、今回採用した判定法では budding の程度を過小評価してしまう可能性がある。しかし日常病理診断において免疫染色は代表 1 切片で行われるのが常であることから、本検討では代表切片 1 切片で budding を評価し、検討に供する方法を採用した。

5 小括

Stage II 大腸癌において HE 染色による budding 評価の妥当性を cytokeratin 染

色との比較により明らかにした。両染色法の意義の差異については、**cytokeratin** 染色では **budding** と判定される病巣数は増加し、観察者間の判定一致率が向上した。一方、予後分別能の点では **HE** がより優れており、予後予測因子としての観点からは **HE** での **budding** 評価の方がインパクトが強かった。

第3章 Stage III 大腸癌における budding の予後因子としての意義

1 背景・目的

budding は pT1 大腸癌におけるリンパ節転移の危険因子の一つとして重要視されている^{1, 18, 19}。また、Stage II 大腸癌において budding の再発リスク因子としての意義が明らかとなっている¹⁷⁻²⁵。本章では Stage III 大腸癌において、budding の予後不良因子としての意義を明らかにすることを目的とした。

2 対象・方法

1) 対象

1999年から2012年の間に防衛医科大学校病院にて根治手術 (R0 手術) を施行し、術後、TNM 分類第8版に基づき³⁷、病理組織学的に診断された Stage III 大腸癌 616 例を対象として後方視的に検討した。術前化学療法あるいは術前化学放射線療法を施行した 3 例は本検討から除外した。また化学療法の薬剤を均一とするため、オキサリプラチンを術後補助化学療法として投与された 27 名は除外した。最終的に 586 例を検討対象とした。

術後サーベイランスは第2章と同様に実施された。本研究は防衛医科大学校の倫理委員会において承認を得た (承認番号: 2414)。

2) budding の評価

癌発育先進部に浸潤性に認められる単個または 5 個未満の構成細胞からなる癌胞巣を budding と定義し、HE 染色の切片で評価した。200 倍視野での budding の個数が 9 個以下の症例を budding 軽度群、10 個以上認められる症例を budding 高度群と分類した¹⁶。この際のカットオフ値の決定は上野ら(2002)の検討結果に基づいて行われた。budding の判定にあたっては、予後転帰を含む全ての臨床病理学的情報を blind にした状態で申請者 (山寺) が施行した。評価の再現性を検証するため、無作為に抽出した 50 症例の病理標本を申請者以外の評価者 (神藤) が独立して評価し、評価者間一致度を κ 係数により評価した。

3) 他の病理学的因子の判定

進行度は TNM 分類第 8 版に基づき判定し、組織型や脈管侵襲などの病理組織学的所見については大腸癌取扱い規約第 8 版に基づき評価した^{37,38}。

4) 統計的解析

統計的解析にあたっては、カテゴリカル変数についてはカイ 2 乗検定あるいは Fisher の正確検定を用いて行った。OS は手術から全ての原因による死亡までの期間、RFS は手術から全ての死亡または初回再発までの期間と定義した。生存解析については Cox 比例ハザードモデルを用いた。生存曲線は Kaplan–Meier 法によ

って計算し、log-rank 検定によって解析した。単変量解析によって $P < 0.05$ が得られた因子を共変量とし、ステップワイズ法によって多変量解析を行った。

budding 判定の評価者間一致度は κ 係数を用いて第 2 章と同様の手法により評価した。統計学的解析は JMP 13 software (SAS Institute, Cary, NC, USA) を用いて行い、 $P < 0.05$ を有意差ありとした。

3 結果

budding と他の病理組織学的所見との相関

budding 高度症例は 234 例で全体の 39.9%であった。budding の程度に関する評価者間の一致率は 81.0%であり、 $\kappa = 0.62$ と良好な一致 (substantial) であった。患者背景を表 4 に示す。budding の程度と他の病理学的悪性度因子との相関については、budding 高度症例は軽度症例と比較し、深達度が深く ($P = 0.023$)、リンパ節転移が高度で ($P < 0.0001$)、脈管侵襲高度症例がより多かった (リンパ管侵襲, $P < 0.0001$; 静脈侵襲, $P = 0.030$)。年齢、性別、腫瘍占居部位および組織型との相関はみられなかった。

budding と予後との相関

観察期間中の死亡は 129 例であり、生存期間の中央値は 30.2 か月 (4.7–97.2 か

月)であった。129例中、110例は原癌死、8例は他癌死、11例は他病死であった。生存症例457例での生存期間は中央値で61.7か月(5.0–122.0か月)であった。再発例191例のうち、79例(41.4%)で再発巣に対する外科的切除が施行された。再発に対する非手術例の112例のうち、53例(47.3%)でオキサリプラチンまたはイリノテカンを用いた化学療法が施行された。再発に対する治療内容は budding の程度によって差は認められなかった。

budding の程度別の OS および RFS についての生存率曲線を図 8A および 8B に示す。budding 高度症例の OS 率は budding 軽度症例と比較し有意に低率であった(5年 OS 率, 72.7% vs. 83.0%; $P = 0.0012$)。RFS 率についても budding 高度症例は budding 軽度症例と比較し有意に低率であった(5年 RFS 率, 56.4% vs. 70.6%; $P = 0.0003$)。RFS に関し、Cox 比例ハザードモデルを用いた単変量解析の結果では深達度、リンパ節転移、リンパ管侵襲、静脈侵襲、budding ならびに術後補助化学療法が有意な再発リスク因子であった(表 5)。これらの有意なリスク因子を用いた多変量解析の結果では、深達度(ハザード比 [HR], 1.50; $P = 0.010$)、リンパ管侵襲(HR, 1.39; $P = 0.028$)、静脈侵襲(HR, 1.58; $P = 0.0016$)、リンパ節転移(HR, 1.92; $P < 0.0001$)、術後補助化学療法(HR, 1.90; $P < 0.0001$)に加え、budding(HR, 1.39; $P = 0.023$)が独立した予後規定因子として選択された。

4 考察

本章では Stage III 大腸癌において budding の予後不良因子としての臨床的意義が明らかになった。後方視的検討であるが、Stage III で確固たる予後因子とみなされているリンパ節転移程度、深達度、術後補助化学療法の有無を共変量とした多変量解析においても budding が独立した予後因子として選択された。大腸癌は上皮由来であるが一部で EMT をおこし浸潤転移能が上昇する。その現象を病理学的に捉えた所見が budding であるとする報告が散見される²⁷⁻²⁹。今回の結果は、すでに原発巣を離れリンパ節に転移が成立した癌においても、EMT を引き起こしている転移能の高い癌細胞の原発巣における存在が、生命に影響を及ぼすようさらなる癌の浸潤転移に影響していることを示しており注目に値する。

一方、EMT を起こした癌細胞は浸潤転移能が上昇するのみでなく、概して抗癌剤に抵抗性を示すことが知られている³⁰⁻³²。EMT では SNAIL、ZEB、TWIST といった転写因子が細胞内エフェクターとして重要な役割を担っているが、一方で SNAIL は大腸癌における 5-FU やオキサリプラチンに対する治療抵抗性に関与する可能性が報告されている^{32,47}。さらに、膵癌ではゲムシタビンの治療抵抗性に ZEB1³¹ が、肝細胞癌では 5-FU 抵抗性に TWIST1⁴⁸ がそれぞれ関与するとされる。また、EMT が幹細胞性を誘導することで癌幹細胞が増加し、間接的に抗癌剤耐性能が強化される可能性もある。Stage III 大腸癌症例では術後補助化学療法の実施率が高く、budding 高度症例では EMT の特性を備えた癌細胞が密に含まれて

いるとすると、抗癌剤抵抗性も予後悪化の一因となっている可能性がある。

「budding を高度に呈する大腸癌は抗癌剤抵抗性を示すか」、「その場合にはいかなる種類の抗癌剤の治療効果に関与するか」は、重要性が高い臨床的疑問であり、次章で検討を行う。

5 小括

Stage III 大腸癌において budding は独立性の高い予後不良因子の一つであることが明らかになった。

第4章 budding の化学療法効果予測因子としての意義

第1節 Stage III 大腸癌におけるフッ化ピリミジン製剤の効果予測についての検討

1 背景・目的

近年では様々な種類の抗癌剤が臨床活用されるようになってきたが、依然としてフッ化ピリミジン製剤は主要薬剤の一つとして利用されている¹。本研究では、Stage III 大腸癌において、フッ化ピリミジン製剤単独投与による術後補助化学療法の効果予測に budding が有用であるかを明らかにすることを目的とした。

なお、一般的に、マイクロサテライト不安定性 (microsatellite instability, MSI) を有する大腸癌症例 (MSI-H 症例) では、アルキル化剤、フッ化ピリミジン製剤、白金製剤に対して抵抗性を示すことが証明されている⁴⁹⁻⁵³。今回の検討はフッ化ピリミジン製剤の効果予測を明らかにすることを目的としているため、DNA ミスマッチ修復機能の保たれた (mismatch repair-proficient, MMR-p) 症例のみを対象とした。なお、本邦では2005年に大腸癌治療ガイドラインが発刊され、Stage III 大腸癌に対する術後補助化学療法が標準治療であることが示された。これを機に術後補助化学療法施行率が上昇しており、治療患者の背景も変化していると考え、2005年を境に2つのコホートに分割し解析を実施した。

2 対象・方法

1) 対象

第3章の対象のうち、MSIのスクリーニングとしてMLH1およびMSH2の免疫組織化学染色を施行し、いずれか一方が陰性のものをDNAミスマッチ修復機能異常 (mismatch repair-deficient, MMR-d) 症例として本検討から除外した⁵⁴⁻⁵⁶。その結果、586例中、37例が除外症例となった。治療時期により2つのコホートに分けて検討した。即ち、1999年～2005年の間に手術が施行された症例をコホート1、2006年～2012年の間に手術が施行された症例をコホート2とした。解析対象とした症例は、コホート1が203例、コホート2が346例であった。

コホート1では、フッ化ピリミジン製剤単独の術後補助化学療法施行群が128例、補助化学療法を施行しなかった手術単独群が75例であった。コホート2では、補助化学療法施行群が203例、手術単独群が143例であった。術後補助化学療法施行群は全例で5-FU製剤単独の化学療法レジメンを完遂した。適用されたレジメンの内訳は、コホート1では5フルオロウラシル(5FU)/ロイコボリン(LV) (Mayoレジメン)⁵⁷が54例、レボホリナート・テガフル・ウラシル内服⁵⁸ (UFT/LV) が59例、5FU/LV [Roswell Park Memorial Institute (RPMI)レジメン]⁵⁹が8例、およびsimplified bimonthly LV and 5-FU⁶⁰ (sLV5FU2) が7例であり、コホート2では、RPMIレジメンが3例、UFT/LV内服が171例、S-1内服⁶¹が13例、お

よびカペシタビン内服⁶²が16例であった。Mayoレジメン、RPMIレジメン、sLV5FU2は5-FUおよびLVの点滴静注によるレジメンで、UFT/LV、S-1、カペシタビンは経口剤内服による治療で、それぞれの治療は効果が同等であることが示されている。全ての症例において、レジメンの管理は既報の要領によって実施された⁵⁷⁻⁶²。

術後サーベイランスは549例全てに対して第2章と同様に実施された。本研究は防衛医科大学校の倫理委員会において承認を得た(承認番号:2414)。

2) budding の評価

第3章と同様に評価した。

3) 免疫組織化学染色

本研究では、MSIのスクリーニングとしてMLH1およびMSH2の免疫組織化学法を実施した(図9)⁶³⁻⁶⁷。免疫組織染色に用いた一次抗体は、マウス抗MLH1モノクローナル抗体(Clone G168-15; BD Biosciences, San Jose, CA, USA)およびマウス抗MSH2モノクローナル抗体(FE11; Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)である。4 μ mに薄切した組織切片をキシレンで脱パラフィン後、エタノール濃度を漸減し、親水処理を行った。オートクレーブにて120°C 15分間の抗原賦活化の後、3%過酸化水素水を用いて内因性ペルオキシダーゼの抑制を行った。非特異的反応の抑

制にはスキムミルクを使用した。抗 MLH1 抗体、抗 MSH2 抗体はそれぞれ 50 倍、100 倍希釈して切片と 24 時間反応させた。二次抗体は Envision system anti-mouse (DakoCytomation) を使用し、室温にて 2 時間反応させた。0.1%の DAB 溶液で 8 分間の発色の後、ヘマトキシリンで核染色を施行した。一次抗体を加えないものを陰性コントロール、正常の大腸粘膜を内因性陽性コントロールとして、MLH1 陰性または MSH2 陰性の症例を MMR-d とした⁵⁴⁻⁵⁶。

4) 統計的解析

統計的解析にあたっては、カテゴリカル変数をカイ 2 乗検定あるいは Fisher の正確検定を用いて行った。疾患特異的生存 (DSS) は手術から大腸癌による死亡までの期間、RFS は手術から全ての死亡または初回再発までの期間と定義した。生存曲線は Kaplan-Meier 法によって計算し、log-rank 検定によって解析した。生存解析については Cox 比例ハザードモデルを用いた。単変量解析によって $P < 0.05$ が得られた因子を共変量とし、強制投入法によって多変量解析を行った。統計学的解析は JMP 13 software (SAS Institute, Cary, NC, USA) を用いて行い、 $P < 0.05$ を有意差ありとした。

3 結果

コホート1とコホート2の患者背景

コホート1の患者背景を表6に示す。化学療法施行群は128例、手術単独群は75例であった。補助化学療法群では手術単独群と比較し、年齢が若く ($P < 0.0001$)、深達度が深く ($P = 0.006$)、リンパ節転移が高度 ($P = 0.049$) で、budding が高度 ($P = 0.009$) の症例が多かった。budding の程度は深達度 ($P = 0.002$) やリンパ節転移 ($P = 0.005$) と相関がみられたが、年齢、性別、腫瘍占居部位、組織型や静脈侵襲との相関はみられなかった。観察期間中、死亡例は59例であり、生存期間は中央値で30.9か月 (6.1–92.1か月) であった。59例中、56例は原癌死、3例は他癌死または他病死であった。生存症例144例での生存期間は中央値で60.9か月 (8.3–105.3か月) であった。再発例66例のうち、25例 (37.9%) で再発巣に対する手術療法が施行された。再発に対する非手術例41例のうち、12例 (29.3%) でオキサリプラチンまたはイリノテカンを用いた化学療法が施行された。本邦では2005年までオキサリプラチンの使用が認められておらず強力なレジメンでの化学療法施行率は低率であった。再発症例に対する治療内容や程度については budding 程度によって差は認められず、再発巣切除施行率は budding 高度症例で15.2%、budding 軽度症例18.2%であった。

コホート2では、補助化学療法施行群では手術単独群と比較し年齢が有意に

若かった ($P < 0.0001$; 表 7)。他の臨床病理学的因子に統計学的有意差は認めなかった。死亡例は 82 例で平均生存期間は中央値で 31.4 か月 (3.9–97.2 か月) であった。死亡例のうち、69 例は大腸癌再発による死亡、4 例が他癌死、9 例が他病死であった。生存例 264 例の観察期間中央値は 64.4 か月 (13.4–128.5 か月) であった。術後再発が認められた 106 例のうち、48 例 (45.3%) で再発巣に対する手術療法が施行された。再発に対する手術が施行されなかった 58 例のうち、34 例 (58.6%) でオキサリプラチンまたはイリノテカンを用いた化学療法が施行された。再発症例における外科的切除率は、budding 高度症例で 43.4%、budding 軽度症例で 47.2%と、budding 程度による差を認めなかった。

MMR タンパク発現の検討

抗 MLH1 抗体陰性は 30 例 (5.1%)、抗 MSH2 抗体陰性は 11 例 (1.9%) であった。抗 MLH1 抗体または抗 MSH2 抗体が陰性を示した症例は 37 例であり全体の 6.3% であった。コホート 1 では抗 MLH1 抗体陰性は 14 例 (6.4%)、抗 MSH2 抗体陰性は 4 例 (1.8%) であり、抗 MLH1 抗体または抗 MSH2 抗体が陰性を示した症例は 16 例 (7.3%) であった。コホート 2 では抗 MLH1 抗体陰性は 16 例 (4.4%)、抗 MSH2 抗体陰性は 7 例 (1.9%) であり、抗 MLH1 抗体または抗 MSH2 抗体が陰性を示した症例は 21 例 (5.7%) であった。これらの MMR タンパク発現陰性 37 例を除外したコホート 1: 203 例、コホート 2: 346 例につき予後解析を実施

した。

探索的検討

まずコホート 1 を用いて探索的検討を行った。化学療法施行群と手術単独群での予後の比較について図 10 に示す。budding 程度別の DSS において、budding 軽度症例では術後補助化学療法による有意な予後改善効果が示されたが (5 年 DSS 率, 93.1% [化学療法施行群, N = 74] vs. 65.5% [手術単独群, N = 57]; $P = 0.0013$)、budding 高度症例では有意差を認めなかった (59.7% [N = 54] vs. 52.4% [N = 18]; N.S.; 図 10A, 10B)。さらに、RFS に関する検討においても、budding 軽度症例では術後補助化学療法施行群と手術単独群の間で有意差を認めるも (5 年 RFS 率, 84.4% vs. 63.1%; $P = 0.011$)、budding 高度症例では有意差は認められなかった (50.5% vs. 50.0%; N.S.; 図 10C, 10D)。

DSS について、budding 程度別の単変量解析および多変量解析を実施した。その結果を表 8 に示す。予後規定因子としての術後補助化学療法は budding の程度によって意義が異なり、budding 軽度群においては単変量解析で有意なリスク因子であった (HR, 3.54; $P = 0.0015$)。budding 高度群においては単変量解析にて深達度とリンパ節転移が有意な予後因子であったが、術後補助化学療法施行の有無は有意ではなかった ($P = 0.58$)。多変量解析においても深達度のみが有意であり、術後補助化学療法は独立した予後因子として選択されなかった。

なお、コホート 1 において budding のほかに予後規定因子となる深達度およびリンパ節転移程度が術後補助化学療法効果と関連するか否かを検討した。T3 症例において術後補助化学療法施行群は手術単独群と比較し有意に予後良好であり (5 年 DSS 率, 83.7% vs. 67.0%; $P = 0.043$)、T4 症例においても手術単独群での 5 年 DSS 率は 29.6% に対し、術後補助化学療法施行群は 68.9% と予後良好な傾向を示した ($P = 0.07$; 図 11A, 11B)。リンパ節転移程度別の検討でも、N1 症例において術後補助化学療法施行群は手術単独群と比較し有意に予後良好であり (5 年 DSS 率, 84.3% vs. 66.0%; $P = 0.026$)、N2 症例においても手術単独群での 5 年 DSS 率は 50.0% に対し、術後補助化学療法施行群は 70.3% と予後良好な傾向を示した ($P = 0.09$; 図 11C, 11D)。T4 および N2 では症例数が少なく統計学的に差は認めないものの、治療の有無による 5 年 DSS の差は T3 あるいは N1 と同程度と見積もられ、T 分類やリンパ節転移程度を利用した効果予測は困難と考えられた。

検証的検討

次にコホート 2 を用いた検討では、budding 軽度症例において術後補助化学療法施行群は手術単独群と比較し有意に予後良好であった (5 年 DSS 率, 94.0% vs. 76.0%; $P < 0.0001$; 5 年 RFS 率, 78.2% vs. 64.7%; $P = 0.014$; 図 12A, 12C)。一方、budding 高度症例においては、術後補助化学療法施行群と手術単独群の予後に有意差を認めなかった (5 年 DSS 率, 83.1% vs. 75.6%; N.S.; 5 年 RFS 率, 59.9% vs.

50.9%; N.S.; 図 12B, 12D)。コホート 2 の DSS に関する単変量解析および多変量解析の結果を表 9 に示す。術後補助化学療法は budding 軽度群においては独立した予後規定因子として選択されたが (HR, 4.44; $P < 0.0001$)、budding 高度群においては有意ではなかった ($P = 0.19$)。

4 考察

治療時期の異なる 2 つのコホートのいずれの解析結果においても、budding のフッ化ピリミジン製剤の効果予測因子としての意義が示された。budding 高度症例では DSS、RFS とともに補助化学療法施行群と手術単独群の間で差を認めなかったことから、フッ化ピリミジン製剤単独での補助化学療法による再発抑制効果が乏しい症例群であることが窺われる。一方、budding 軽度症例ではフッ化ピリミジン製剤単独での補助化学療法であっても再発抑制効果が期待でき、例えば基礎疾患を持つ高齢者や全身状態が十分良好でない患者に対する妥当な治療選択肢の一つとなる可能性が考えられる。なお、癌の進展程度を示す T 因子や N 因子は抗癌剤治療効果との関連に乏しかった。T や N 因子は budding と同様に予後規定因子であるが、T や N が癌の広がりの規定する一方で、budding は生物学的特性を表現している。形態として budding を作り出す何らかのメカニズムが抗癌剤抵抗性にも関与している可能性が示唆される。

本検討の欠点として、後方視的研究である点、患者背景の点で術後補助化学

療法施行群と手術単独群の間に大きな相違を認めた点などが挙げられる。後者については両群間にいくつかのバイアスが含まれていると考えられ、慎重なデータの解釈が求められる。考慮すべきバイアスの一つ目は、年齢や既往症等により化学療法の耐容能の低い症例が手術単独群に含まれた可能性、二つ目は、癌の進行などにより再発リスクが高いと判断された症例に抗癌剤治療が行われた可能性がある。これらの群間の背景の差が結果に影響を及ぼす可能性を鑑みて、今回の検討では DSS および RFS の 2 通りで解析を実施した。上に述べた一つ目のバイアスを考慮した場合、手術単独群で再発後に十分な治療が実施できない症例が多いと予想され、DSS の検討では手術単独群に不利に働く。一方、二つ目のバイアスを考慮した場合に、術後補助化学療法施行群に再発リスクの高い症例が偏ることから、再発率も上昇すると予想でき、RFS の検討では術後補助化学療法施行群に不利となる。しかし結果的に、DSS、RFS のいずれの検討でも、また異なる 2 つのコホートにおいても、budding 高度症例では治療の有無によって生存率曲線に差は認められず、budding 軽度症例では術後補助化学療法施行群で予後良好となる結果が示された。後方視的研究であるため断定は困難であるが、budding 軽度症例のみフッ化ピリミジン製剤の効果が期待できる可能性を示唆したデータであると解釈した。一方、budding 高度症例に対してはフッ化ピリミジン製剤では予後の改善は期待できず、フッ化ピリミジン製剤以外の術後補助化学療法が必要であると考えられ、今後の課題と思われた。近年オキサリプラチンの有用性が示され、使用

頻度も上昇している。今後、**Stage III** 大腸癌患者の手術単独例、術後補助化学療法施行例に対し、**prospective** に同様の検討を実施し、オキサリプラチン効果予測における **budding** の意義の解明を試みたいと考えている。

5 小括

大腸癌において **budding** の程度はフッ化ピリミジン製剤の治療効果を予測する指標として利用できる可能性が示唆された。すなわち、**Stage III** 大腸癌症例において術後補助化学療法の適応選別に利用できる可能性がある。

第2節 Stage IV 大腸癌におけるオキサリプラチンの治療効果との相関

1 背景・目的

前節で Stage III 大腸癌においては、budding の程度によって化学療法の治療効果に相違があることが示唆された。とくに budding 高度症例ではフッ化ピリミジン製剤の化学療法に治療抵抗性を示し、より強力なレジメンでの治療が必要となる可能性がある。本邦では 2005 年以降になりオキサリプラチンの使用が普及してきたが、Stage III 大腸癌に対する術後補助化学療法としての使用は限定的で、主として治癒切除不能進行再発症例に使用された経緯がある。本章では Stage IV 大腸癌を利用し budding 高度症例に対するオキサリプラチンの治療効果を budding 軽度症例と比較することで明らかにすることを目的とした。

2 対象・方法

1) 対象

2005 年から 2012 年の間に防衛医科大学校病院で原発巣切除の後、転移巣に対する化学療法の一次治療としてオキサリプラチンを含む化学療法を施行した Stage IV 大腸癌 106 例を対象として後方視的に検討した。106 例中、79 例が FOLFOX 療法 (フルオロウラシル、レボホリナート、オキサリプラチン)、20 例が XELOX

療法 (カペシタビン、オキサリプラチン)、7例が SOX 療法 (S1、オキサリプラチン) であった。分子標的薬の併用は 63 例で施行され、抗 EGFR (epidermal growth factor receptor) 薬が 12 例、抗 VEGF (vascular endothelial growth factor) 薬が 51 例であった。転移臓器は肝が 83 例、肺が 45 例、腹膜播種が 17 例、その他の臓器が 22 例であった。複数臓器に転移がみられた症例は 52 例であった。本研究は防衛医科大学校の倫理委員会において承認を得た (承認番号 : 2415)。

2) budding の評価

第 3 章と同様に評価した。

3) 化学療法効果の判定

化学療法開始前の転移巣のうち、主要な計測可能病変の腫瘍径を CT で評価した。効果判定は治療開始以降、2～3 か月おきに CT で対象病変の腫瘍径の変化を評価した。

4) 統計的解析

統計的解析にあたっては、連続変数については Student の t 検定あるいは Mann-Whitney の U 検定、カテゴリカル変数についてはカイ 2 乗検定を用いて行った。OS は手術から全ての原因による死亡までの期間、疾患特異的生存 (DSS)

は手術から大腸癌による死亡までの期間と定義した。生存曲線は Kaplan–Meier 法によって計算し、log-rank 検定によって解析した。無増悪期間 (TTP) は原発巣切除後から客観的な転移巣増悪までの期間と定義した。客観的奏効割合 (ORR) は最良総合評価が完全奏効 (CR) および部分奏効 (PR) の割合とした。統計学的解析は JMP 13 software (SAS Institute, Cary, NC, USA) を用いて行い、 $P < 0.05$ を有意差ありとした。Water fall plotting は CT で計測された評価可能病変の最大径を基準として変化率 (治療後最も縮小が得られた際の腫瘍径 / 治療前腫瘍径 - 1) を算出し、効果の低い症例順に左から配列した。

3 結果

臨床病理学的背景および budding との相関

原発巣切除時年齢の中央値は 63 歳 (28–85 歳) で男性 62 例、女性 44 例であった。原発巣の腫瘍占居部位は結腸が 53 例、直腸が 53 例であった (表 10)。原発巣の budding 高度群では軽度群と比較し、深達度 T4 症例 ($P = 0.0034$) やリンパ管侵襲高度症例 ($P = 0.029$) の割合が有意に高かったが、リンパ節転移の有無や遠隔転移程度については両群間で差を認めなかった。*RAS* 遺伝子の検索は 77 例に実施され、変異陽性は 35 例に認められた。budding 程度による *RAS* 遺伝子変異の頻度や選択された治療レジメン、また分子標的薬の使用頻度に差はみられなかった。生存

期間の中央値は 23.2 か月 (2.1–99.5 か月) であった。死亡例 82 例のうち、原癌死が 78 例、他病死が 4 例であった。

budding と予後との相関

budding の程度別の OS および DSS についての生存率曲線を図 13A および 13B に示す。budding 高度症例の OS 率は budding 軽度症例と比較し有意に低率であった (5 年 OS 率, 16.9% vs. 38.2%; $P = 0.029$)。DSS 率についても budding 高度症例は budding 軽度症例と比較し有意に低率であった (5 年 DSS 率, 17.5% vs. 38.9%; $P = 0.027$)。

budding 程度別のオキサリプラチンの治療効果

腫瘍の平均縮小率は budding 軽度症例で 19.8%、budding 高度症例で 11.8% であり、統計学的有意差は認められなかった。ORR は budding 軽度症例で 44.4%、budding 高度症例で 40.4%であった (表 11)。図 14 に water fall plotting による腫瘍変化率を図示したものを示す。統計学的に差は出なかったが CR が得られた症例は budding 軽度症例では 2 例、budding 高度症例で 0 例であったのに対し、PD となった症例は budding 軽度症例で 5 例、budding 高度症例で 4 例であった。TTP の中央値は budding 軽度症例で 9.5 か月、budding 高度症例で 9.6 か月と同等であった。

4 考察

本章の検討において Stage IV 大腸癌 106 例を budding 高度症例と軽度症例とに分けて比較したところ、ほぼ同等のオキサリプラチンによる腫瘍縮小効果が確認された。前節の結果から budding 高度症例のフッ化ピリミジン製剤に対する治療抵抗性が示唆されたが、本節の結果からオキサリプラチンを併用することで budding 高度であっても軽度と同等の腫瘍縮小が得られることが確認された。これはオキサリプラチンの budding 高度症例への有効性と理解することができる。本章前節では Stage III 大腸癌の budding 高度症例に対して適用できる術後補助化学療法の探索が今後の課題とされた。本節では stage IV 大腸癌の budding 高度症例に対してオキサリプラチンの有用性が示唆される結果であったことから、オキサリプラチンは stage III 大腸癌の budding 高度症例に用いる薬剤として有力な候補となりうると考えられる。今後、budding 高度症例に対しオキサリプラチンを積極的に使用することを推奨するデータとなりうると考えられた。一方、water fall plotting の結果を細かく見てみると、CR が得られた 2 症例はすべて budding 軽度であった。症例数が少ないため、統計学的に差は出なかったものとする。今後症例を増やして Stage IV での budding とオキサリプラチンを用いた化学療法の効果との関連について、より詳細に明らかにしていきたいと考えている。

Stage IV 症例での budding の意義について検討された報告は少なく^{18,19,68}、とくに化学療法の効果予測に関する文献的報告は皆無である。Stage IV 症例は個々

の症例で治療法が多様であり、後方視的検討ではとくにバイアスが大きくなる。

OS や DSS については、2 次治療、3 次治療の影響が含まれ、1 次治療で使用されたオキサリプラチンの効果を検討することは困難である。この点を考慮し、今回の検討では Water fall plotting や TTP を指標として用いた。しかし、1 次治療で用いられた抗癌剤のレジメンの種類や治療強度、併用する分子標的薬の影響は無視できず、オキサリプラチンの治療効果のみを正確に反映していない可能性もあり、今回の研究の限界と考える。

5 小括

Stage IV 大腸癌の budding 高度症例におけるオキサリプラチンの治療効果について検討した。budding 高度症例であってもオキサリプラチン併用の化学療法レジメンにより budding 軽度症例と同等の治療効果が期待できる。

第5章 術前内視鏡下生検組織における ITB と先進部における budding との相関

1 背景・目的

前章までで budding の化学療法抵抗性の指標としての意義が示唆された。しかしながら budding の評価は癌先進部においてなされるため、外科的に切除して初めて評価が可能であり、手術術式決定や術前療法選択に利用することが困難である。

2011年に Lugli らは、腫瘍表層や中心部に存在し budding と同様の所見を有した癌胞巣を ITB と称し、その臨床的意義を提唱した。ITB と本来の先進部における budding との相関や、直腸癌に対する術前化学放射線療法前の生検組織内 ITB と治療効果との相関、あるいは pT1 癌におけるリンパ節転移との関連などについて報告があり、今後の臨床応用に向けての研究の発展が期待されている^{18, 33-36}。

大腸内視鏡下生検組織中の ITB と切除検体の癌浸潤先進部の budding との相関を検討した報告もあるが、ITB の標準的な評価法は定まっておらず、その臨床的有用性の検証も不十分である。術前の内視鏡下生検組織により budding の程度が予測可能となれば、原発巣切除前の段階で術前化学療法の適応選別に利用できる等、budding の臨床的意義を更に大きくすることができる。

そこで、本章の検討では ITB を生検組織で評価可能か、さらには ITB が切除検体の budding の程度を予測する指標となりうるかを明らかにすることを目的とした。

2 対象・方法

1) 対象

1999 年から 2012 年までの間に防衛医科大学校病院にて根治切除 (R0 手術) が施行された Stage III 大腸癌症例のうち、術前内視鏡下生検が施行された 481 例を対象とした。癌間質を含む癌組織が 200 倍視野全体に認められる生検検体が 1 検体以上存在する症例を評価可能症例とした。癌の質的診断は可能なものの、ITB の評価に適切な検体を有さない症例が 63 例存在し、これらは解析対象から除外した。481 例中、418 例が解析対象となり、その臨床病理学的背景については、手術時年齢の中央値は 65 歳 (28–88 歳) で男性 243 例、女性 175 例であった (表 12)。結腸癌は 231 例、直腸癌は 187 例であった。手術検体における癌浸潤先進部の budding 高度症例は 162 例 (38.8%) に認められた。本研究は防衛医科大学校の倫理委員会において承認を得た (承認番号 : 2568)。

2) ITB の評価

ITB とは、腫瘍表層や中心部に存在し budding と同様の所見を有した癌胞巣と定義されている³⁶。生検組織の HE 染色標本にて ITB を検索し、200 倍視野当たりの最大個数を ITB の個数とした。複数の生検検体が存在する場合には最も個数が多く認められる検体の ITB の個数を採用した。

3) budding の評価

手術検体における癌浸潤先進部の budding は大腸癌取扱い規約第 8 版に基づいて第 3 章と同様に判定した³⁸。評価の再現性の検証も第 2 章第 1 節と同様に行った。

4) 統計的解析

統計的解析において、連続変数については Mann-Whitney の U 検定を用い、2 変量の相関については Spearman の順位相関係数を用いた。budding 高度を陽性アウトカムとした ROC 解析によるカットオフ値の決定には Youden index を用いた。budding 判定の評価者間一致度は κ 係数を用いて第 2 章と同様に評価した。統計学的解析は JMP 13 software (SAS Institute, Cary, NC, USA) を用いて行い、 $P < 0.05$ を有意差ありとした。

3 結果

ITB 個数と切除検体の budding 程度との相関

術前生検検体の組織像を図 15 に示す。ITB の個数は中央値が 1 個 (0–20 個) であり、ITB が認められなかった症例は 179 例 (42.8%) であった。手術検体の budding 高度症例では budding 軽度症例と比較し有意に ITB の個数が高値であった {中央値 2 個 (0–20 個) vs. 1 個 (0–16 個); $P < 0.0001$; 図 16}。手術検体の budding 高度を陽性アウトカムとした ROC 解析の結果、 $AUC = 0.66$ (95%信頼区間, 0.60–0.71; $P < 0.0001$) で ITB 個数の至適カットオフ値は 3 個であった (図 17)。術前生検における ITB の評価による、手術検体の budding 高度症例の予測能は、感度 46.9%、特異度 81.6%、陽性的中率 61.8%、陰性的中率 70.9%であった。ITB 個数で層別に検討した結果、ITB 個数が 2 個以下の症例では切除検体の budding が軽度であるものが多く認められた。一方、ITB 個数が 3 個以上の症例では切除検体の budding が高度である症例の割合が多かった (表 13)。ITB 個数が 2 個以下の症例と 3 個以上の症例を比較すると、切除検体の budding が高度の症例は ITB 個数が 3 個以上の場合に有意に高頻度であった ($P < 0.0001$)。

ITB の評価者間一致度

評価者 2 名の計測した ITB 個数には強い正の相関がみられた (Spearman の順位相関係数, $\rho = 0.71$; $P < 0.0001$)。一方の判定者のデータを用いて得られたカットオフ値によって ITB 軽度群と ITB 高度群の 2 群に分類した際の評価者間一致率は 76.7% であり、 $\kappa = 0.51$ で中等度一致であった。

4 考察

近年、臨床的利用価値の観点から ITB の有用性を主張する報告が認められる³³⁻³⁶。本章の検討から、大腸癌の術前内視鏡下生検組織中の ITB を評価し、その個数が外科的切除検体の budding の程度と相関することが明らかとなった。ITB の臨床応用を考えた場合、budding 予測の特異度の高さから、ITB 高度と判定された場合に高い確度で budding 高度と考えられ、強力な術前療法の適応を考慮するにあたり利用できる可能性がある。一方、ITB の有用性については懐疑的見解を示す報告も存在する^{18,69}。要因の一つとして、検体の質に起因する ITB の評価の不確実性が存在すると考えられる。実臨床では癌の質的診断の精度を高めるために複数個の検体を採取するものの、採取された生検検体の中には、癌組織が観察視野の一部のみに認められるものや、癌間質のない断片化された癌組織のみが含まれる検体があり、これらの症例では正確な ITB が評価困難である。本検討では癌の質的診断は可能なものの、ITB の評価に適切な検体を有さない症例が 2 割程

度存在し、これらは解析対象から除外した。また、同一患者から採取された生検検体間で ITB の所見に差がある症例も存在することから、ITB の分布に関する腫瘍内 heterogeneity も過去の報告における結論が一致しない原因となった可能性がある。すなわち ITB の臨床的価値を高めるためには、今後は生検標本に特化した評価方法を確立すると共に、適切な標本を採取するための生検手法と、適切な評価が可能な標本の作製方法を検討していく必要がある。

大腸癌では先進部と表層部とでは形態学的特徴を異にする症例が高率に存在することや、先進部における所見が癌の悪性度をより反映していることを示した研究成果は数多く論文発表されている。今後はこのような腫瘍形態の特性にも配慮し、タンパク質や mRNA 等の分析による定量的でより客観的な腫瘍悪性度の判定方法も開発し、腫瘍表層部から採取された生検組織の包括的に活用し、患者受益に役立てる試みを続けていきたいと考える。

5 小括

大腸癌の術前生検組織における手術検体の budding の程度が高度の症例は ITB 個数が有意により多かった。ITB 個数が手術検体の budding の程度を反映することが示唆され、ITB は高悪性度症例を術前に選別する一助になる可能性が示唆された。

第6章 総括

諸家の報告から budding の評価方法は HE 染色と cytokeratin 免疫染色の 2 種類が存在する。進行癌を評価する上での両者の優劣についてこれまでのところ報告はなかった。第 2 章では、Stage II 大腸癌を対象に比較を実施し、観察者再現性では cytokeratin 免疫染色がやや勝るものの、予後因子としてのインパクトについては HE 染色の優越性が明らかにされた。

第 3 章では HE 染色を用い、Stage III 大腸癌において budding が独立した予後不良因子となることが示された。次に同様の Stage III 症例を用いた第 4 章第 1 節の検討で、budding はフッ化ピリミジン系の抗癌剤抵抗性の指標の一つとなることを明らかにした。またオキサリプラチンによる化学療法を施行した Stage IV 症例を用いた第 4 章第 2 節の検討により、オキサリプラチンが budding 軽度症例のみならず、budding 高度症例に対しても有効な治療効果を発揮する可能性が示唆された。第 5 章では術前生検組織中の ITB を評価することによって手術検体の癌浸潤先進部の budding を術前に予測できる可能性を見出した。

根治切除困難症例においては術前治療の効果によってその後の経過が大きく左右されるため、ITB により術前化学療法の効果予測が可能となれば、適切な化学療法の選択に繋がり、臨床上有益となる可能性がある。現在、抗癌剤抵抗性を示すとされる EMT のマーカーを測定するためには相当の費用が必要となり、実臨

床において利用するのは容易ではない。一方、**budding** は HE 染色にて評価可能で、医療経済的にもメリットが大きい。

今後の課題として、**budding** 程度別にオキサリプラチン併用レジメンの予後改善効果についてさらなる詳細な検討をすすめ、オキサリプラチンを投与する受益が見込まれる症例が **budding** により抽出可能かどうかを解析していくことが必要と考える。また、ITB をはじめとした **budding** の術前予測の精度向上を目指した、より再現性の高い客観的指標の構築が望まれる。これらの課題を克服し、**budding** を指標とした抗癌剤レジメンの使い分けが術前術後を問わず可能となった場合に、過不足ない抗癌剤治療の実践が可能となり、進行大腸癌患者に対する個別化薬物療法の発展および治療成績の向上が達成されるものとする。

第7章 結 論

進行大腸癌の budding を評価するにあたり HE 染色を利用することの妥当性が示された。大腸癌における budding の術後補助化学療法効果予測因子としての意義が明らかになった。すなわち、Stage III 大腸癌において budding の程度はフッ化ピリミジン系の効果予測として用いることができ、budding 軽度症例ではフッ化ピリミジン系に対し感受性が示されたが、budding 高度症例では抗癌剤治療効果が乏しく、他の薬物治療が必要である。Stage IV 大腸癌においては budding 高度症例であってもオキサリプラチンは有用であった。術前生検組織の ITB は先進部の budding の状態を反映しており、budding の術前診断に利用できる可能性がある。

謝辞

稿を終えるにあたり、ご指導、ご高閲を賜りました防衛医科大学校外科学講座の上野秀樹教授に甚大なる感謝の意を表します。また、終始ご教示を頂きました防衛医科大学校外科学講座の神藤英二准教授に深謝いたしますとともに、ご協力いただきました講座の諸先生方に感謝申し上げます。

本研究の主旨は、以下の学会等において発表した。

- ・ 第 116 回日本外科学会定期学術集会（2016 年 4 月、大阪）
- ・ The 2017 American Society of Colon & Rectal Surgeons (ASCRS) Annual Scientific Meeting（2017 年 6 月、シアトル）
- ・ 第 71 回日本消化器外科学会総会（2016 年 7 月、徳島）
- ・ 第 72 回日本大腸肛門病学会学術集会（2017 年 11 月、福岡）
- ・ 第 26 回日本消化器関連学会週間（2018 年 11 月、神戸）

引用文献

1. 大腸癌研究会編, 大腸癌ガイドライン 医師用 2019年版. 金原出版, 2019.
2. Watanabe T, Muro K, Ajioka Y, Hashiguchi Y, Ito Y, Saito Y, et al. Japanese Society for Cancer of the Colon and Rectum (JSCCR) guidelines 2016 for the treatment of colorectal cancer. *Int J Clin Oncol*. 2018; 23: 1–34.
3. Wilkinson NW, Yothers G, Lopa S, Costantino JP, Petrelli NJ, Wolmark N. Long-term survival results of surgery alone versus surgery plus 5-fluorouracil and leucovorin for stage II and stage III colon cancer: pooled analysis of NSABP C-01 through C-05. A baseline from which to compare modern adjuvant trials. *Ann Surg Oncol*. 2010; 17: 959–966.
4. Gill S, Loprinzi CL, Sargent DJ, Thome SD, Alberts SR, Haller DG, et al. Pooled analysis of fluorouracil-based adjuvant therapy for stage II and III colon cancer: who benefits and by how much? *J Clin Oncol*. 2004; 22: 1797–1806.
5. Mamounas E, Wieand S, Wolmark N, Bear HD, Atkins JN, Song K, et al. Comparative efficacy of adjuvant chemotherapy in patients with Dukes' B versus Dukes' C colon cancer: results from four National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project adjuvant studies (C-01, C-02, C-03, and C-04). *J Clin Oncol*. 1999; 17: 1349–1355.
6. Kuebler JP, Wieand HS, O'Connell MJ, Smith RE, Colangelo LH, Yothers G, et al. Oxaliplatin combined with weekly bolus fluorouracil and leucovorin as surgical adjuvant chemotherapy for stage II and III colon cancer: results from NSABP C-07. *J Clin Oncol*. 2007; 25: 2198–2204.
7. Andre T, de Gramont A, Vernerey D, Chibaudel B, Bonnetain F, Tijeras-Raballand A, et al. Adjuvant fluorouracil, leucovorin, and oxaliplatin in Stage II to III colon cancer: Updated 10-year survival and outcomes according to BRAF mutation and mismatch repair status of the MOSAIC study. *J Clin Oncol*. 2015; 33: 4176–4187.
8. Yothers G, O'Connell MJ, Allegra CJ, Kuebler JP, Colangelo LH, Petrelli NJ, et al. Oxaliplatin as adjuvant therapy for colon cancer: updated results of NSABP C-07 trial, including survival and subset analyses. *J Clin Oncol*. 2011; 29: 3768–3774.
9. Haller DG, Taberero J, Maroun J, de Braud F, Price T, Van Cutsem E, et al. Capecitabine plus oxaliplatin compared with fluorouracil and folinic acid as adjuvant therapy for stage III colon cancer. *J Clin Oncol*. 2011; 29: 1465–1471.
10. Andre T, Boni C, Navarro M, Taberero J, Hickish T, Topham C, et al.

- Improved overall survival with oxaliplatin, fluorouracil, and leucovorin as adjuvant treatment in stage II or III colon cancer in the MOSAIC trial. *J Clin Oncol*. 2009; 27: 3109–3116.
11. Andre T, Boni C, Mounedji-Boudiaf L, Navarro M, Tabernero J, Hickish T, et al. Multicenter International Study of Oxaliplatin/5-Fluorouracil/Leucovorin in the Adjuvant Treatment of Colon Cancer (MOSAIC) Investigators: Oxaliplatin, fluorouracil, and leucovorin as adjuvant treatment for colon cancer. *N Engl J Med*. 2004; 350: 2343–2351.
 12. Grothey A, Nikcevich DA, Sloan JA, Kugler JW, Silberstein PT, Dentchev T, et al. Intravenous calcium and magnesium for oxaliplatin-induced sensory neurotoxicity in adjuvant colon cancer: NCCTG N04C7. *J Clin Oncol*. 2011; 29: 421–427.
 13. Ishiguro M, Higashi T, Watanabe T, Sugihara K. Japanese Society for Cancer of the Colon and Rectum Guideline Committee. Changes in colorectal cancer care in Japan before and after guideline publication: a nationwide survey about D3 lymph node dissection and adjuvant chemotherapy. *J Am Coll Surg*. 2014; 218: 969–977.
 14. Shinto E, Jass JR, Tsuda H, Sato T, Ueno H, Hase K, et al. Differential prognostic significance of morphologic invasive markers in colorectal cancer: tumor budding and cytoplasmic podia. *Dis Colon Rectum*. 2006; 49: 1422–1430.
 15. Sy J, Fung CL, Dent OF, Chapuis PH, Bokey L, Chan C. Tumor budding and survival after potentially curative resection of node-positive colon cancer. *Dis Colon Rectum*. 2010; 53: 301–307.
 16. Ueno H, Murphy J, Jass JR, Mochizuki H, Talbot IC. Tumour 'budding' as an index to estimate the potential of aggressiveness in rectal cancer. *Histopathology*. 2002; 40: 127–132.
 17. Ueno H, Price AB, Wilkinson KH, Jass JR, Mochizuki H, Talbot IC. A new prognostic staging system for rectal cancer. *Ann Surg*. 2004; 240: 832–839.
 18. Lugli A, Kirsch R, Ajioka Y, Bosman F, Cathomas G, Dawson H, et al. Recommendations for reporting tumor budding in colorectal cancer based on the International Tumor Budding Consensus Conference (ITBCC) 2016. *Mod Pathol*. 2017; 30: 1299–1311.
 19. Rogers AC, Winter DC, Heeney A, Gibbons D, Lugli A, Puppa G, et al. Systematic review and meta-analysis of the impact of tumour budding in colorectal cancer. *Br J Cancer*. 2016; 115: 831–840.
 20. Betge J, Kornprat P, Pollheimer MJ, Lindtner RA, Schlemmer A, Rehak P, et al. Tumor budding is an independent predictor of outcome in AJCC/UICC

- stage II colorectal cancer. *Ann Surg Oncol*. 2012; 19: 3706–3712.
21. Wang LM, Kevans D, Mulcahy H, O’Sullivan J, Fennelly D, Hyland J, et al. Tumor budding is a strong and reproducible prognostic marker in T3N0 colorectal cancer. *Am J Surg Pathol*. 2009; 33: 134–141.
 22. Nakamura T, Mitomi H, Kanazawa H, Ohkura Y, Watanabe M. Tumor budding as an index to identify high-risk patients with stage II colon cancer. *Dis Colon Rectum*. 2008; 51: 568–572.
 23. Prall F, Nizze H, Barten M. Tumour budding as prognostic factor in stage I/II colorectal carcinoma. *Histopathology*. 2005; 47: 17–24.
 24. Okuyama T, Nakamura T, Yamaguchi M. Budding is useful to select high-risk patients in stage II well-differentiated or moderately differentiated colon adenocarcinoma. *Dis Colon Rectum*. 2003; 46: 1400–1406.
 25. Hase K, Shatney C, Johnson D, Trollope M, Vierra M. Prognostic value of tumor ‘budding’ in patients with colorectal cancer. *Dis Colon Rectum*. 1993; 36: 627–635.
 26. Okamura T, Shimada Y, Nogami H, Kameyama H, Kobayashi T, Kosugi S, et al. Tumor budding detection by immunohistochemical staining is not superior to hematoxylin and eosin staining for predicting lymph node metastasis in pT1 colorectal cancer. *Dis Colon Rectum*. 2016; 59: 396–402.
 27. Yamada N, Sugai T, Eizuka M, Tsuchida K, Sugimoto R, Mue Y, et al. Tumor budding at the invasive front of colorectal cancer may not be associated with the epithelial–mesenchymal transition. *Hum Pathol*. 2017; 60: 151–159.
 28. Bronsert P, Enderle-Ammour K, Bader M, Timme S, Kuehs M, Csanadi A, et al. Cancer cell invasion and EMT marker expression: a three-dimensional study of the human cancer-host interface. *J Pathol*. 2014; 234: 410–422.
 29. Kevans D, Wang LM, Sheahan K, Hyland J, O’Donoghue D, Mulcahy H, et al. Epithelial-mesenchymal transition (EMT) protein expression in a cohort of stage II colorectal cancer patients with characterized tumor budding and mismatch repair protein status. *Int J Surg Pathol*. 2011; 19: 751–760.
 30. Fukazawa S, Shinto E, Tsuda H, Ueno H, Shikina A, Kajiwara Y, et al. Laminin beta3 expression as a prognostic factor and a predictive marker of chemoresistance in colorectal cancer. *Jpn J Clin Oncol*. 2015; 45: 533–540.
 31. Arumugam T, Ramachandran V, Fournier KF, Wang H, Marquis L, Abbruzzese JL, et al. Epithelial to mesenchymal transition contributes to drug resistance in pancreatic cancer. *Cancer Res*. 2009; 69: 5820–5828.
 32. Hoshino H, Miyoshi N, Nagai K, Tomimaru Y, Nagano H, Sekimoto M, et al. Epithelial-mesenchymal transition with expression of SNAI1-induced chemoresistance in colorectal cancer. *Biochem Biophys Res Commun*. 2009;

- 390: 1061–1065.
33. Zlobec I, Hadrich M, Dawson H, Koelzer VH, Borner M, Mallaev M, et al. Intratumoural budding (ITB) in preoperative biopsies predicts the presence of lymph node and distant metastases in colon and rectal cancer patients. *Br J Cancer*. 2014; 110: 1008–1013.
 34. Giger OT, Comtesse SC, Lugli A, Zlobec I, Kurrer MO. Intra-tumoral budding in preoperative biopsy specimens predicts lymph node and distant metastasis in patients with colorectal cancer. *Mod Pathol*. 2012; 25: 1048–1053.
 35. Lugli A, Vlajnic T, Giger O, Karamitopoulou E, Patsouris ES, Peros G, et al. Intratumoral budding as a potential parameter of tumor progression in mismatch repair-proficient and mismatch repair-deficient colorectal cancer patients. *Hum Pathol*. 2011; 42: 1833–1840.
 36. Rogers AC, Gibbons D, Hanly AM, Hyland JM, O’Connell PR, Winter DC, et al. Prognostic significance of tumor budding in rectal cancer biopsies before neoadjuvant therapy. *Mod Pathol*. 2014; 27: 156–162.
 37. Brierley JD, Gospodarowicz MK, Wittekind C. TNM Classification of Malignant Tumors. 8th Edition: Wiley-Blackwell, 2017.
 38. 大腸癌研究会編, 大腸癌取扱い規約 第8版. 金原出版, 2013.
 39. Kundel HL, Polansky M. Measurement of observer agreement. *Radiology*. 2003; 228: 303–308.
 40. Landis JR, Koch GG. An application of hierarchical kappa-type statistics in the assessment of majority agreement among multiple observers. *Biometrics*. 1977; 33: 363–374.
 41. Akaike H. A new look at statistical model identification. *IEEE Trans Automat Contr*. 1974; 19: 716–722.
 42. Ohtsuki K, Koyama F, Tamura T, Enomoto Y, Fujii H, Mukogawa T, et al. Prognostic value of immunohistochemical analysis of tumor budding in colorectal carcinoma. *Anticancer Res*. 2008; 28: 1831–1836.
 43. De Smedt L, Palmans S, Sagaert X. Tumour budding in colorectal cancer: what do we know and what can we do? *Virchows Arch*. 2016; 468: 397–408.
 44. Koelzer VH, Zlobec I, Lugli A. Tumor budding in colorectal cancer-ready for diagnostic practice? *Hum Pathol*. 2016; 47: 4–19.
 45. Koelzer VH, Zlobec I, Berger MD, Cathomas D, Dawson H, Dirschmid K, et al. Tumor budding in colorectal cancer revisited: results of a multicenter interobserver study. *Virchows Arch*. 2015; 466: 485–493.
 46. Lugli A, Karamitopoulou E, Panayiotides I, Karakitsos P, Rallis G, Peros G, et al. CD8+ lymphocytes/ tumour-budding index: an independent prognostic factor representing a ‘pro-/anti-tumour’ approach to tumour host interaction in

- colorectal cancer. *Br J Cancer*. 2009; 101: 1382–1392.
47. Yang AD, Fan F, Camp ER, van Buren G, Liu W, Somcio R, et al. Chronic oxaliplatin resistance induces epithelial-to-mesenchymal transition in colorectal cancer cell lines. *Clin Cancer Res*. 2006; 12(14 Pt 1): 4147–4153.
 48. Uchibori K, Kasamatsu A, Sunaga M, Yokota S, Sakurada T, Kobayashi E, et al. Establishment and characterization of two 5-fluorouracil-resistant hepatocellular carcinoma cell lines. *Int J Oncol*. 2012; 40: 1005–1010.
 49. Pelosof L, Yerram SR, Ahuja N, Delmas A, Danilova L, Herman JG, et al. CHFR silencing or microsatellite instability is associated with increased antitumor activity of docetaxel or gemcitabine in colorectal cancer. *Int J Cancer*. 2014; 134: 596–605.
 50. Vilar E, Scaltriti M, Balmana J, Saura C, Guzman M, Arribas J, et al. Microsatellite instability due to hMLH1 deficiency is associated with increased cytotoxicity to irinotecan in human colorectal cancer cell lines. *Br J Cancer*. 2008; 99: 1607–1612.
 51. Ribic CM, Sargent DJ, Moore MJ, Thibodeau SN, French AJ, Goldberg RM, et al. Tumor microsatellite-instability status as a predictor of benefit from fluorouracil-based adjuvant chemotherapy for colon cancer. *N Engl J Med*. 2003; 349: 247–257.
 52. Carethers JM, Chauhan DP, Fink D, Nebel S, Bresalier RS, Howell SB, et al. Mismatch repair proficiency and in vitro response to 5-fluorouracil. *Gastroenterology*. 1999; 117: 123–131.
 53. Fink D, Nebel S, Aebi S, Zheng H, Cenni B, Nehme A, et al. The role of DNA mismatch repair in platinum drug resistance. *Cancer Res*. 1996; 56: 4881–4886.
 54. Pinol V, Castells A, Andreu M, Castellvi-Bel S, Alenda C, Llor X, et al. Accuracy of revised Bethesda guidelines, microsatellite instability, and immunohistochemistry for the identification of patients with hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *JAMA*. 2005; 293: 1986–1994.
 55. Marcus VA, Madlensky L, Gryfe R, Kim H, So K, Millar A, et al. Immunohistochemistry for hMLH1 and hMSH2: a practical test for DNA mismatch repair-deficient tumors. *Am J Surg Pathol*. 1999; 23: 1248–1255.
 56. Christensen M, Katballe N, Wikman F, Primdahl H, Sorensen FB, Laurberg S, et al. Antibody-based screening for hereditary nonpolyposis colorectal carcinoma compared with microsatellite analysis and sequencing. *Cancer*. 2002; 95: 2422–2430.
 57. Poon MA, O'Connell MJ, Wieand HS, Krook JE, Gerstner JB, Tschetter LK, et al. Biochemical modulation of fluorouracil with leucovorin: confirmatory

- evidence of improved therapeutic efficacy in advanced colorectal cancer. *J Clin Oncol*. 1991; 9: 1967–1972.
58. Carmichael J, Popiela T, Radstone D, Falk S, Borner M, Oza A, et al. Randomized comparative study of tegafur/uracil and oral leucovorin versus parenteral fluorouracil and leucovorin in patients with previously untreated metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol*. 2002; 20: 3617–3627.
 59. Petrelli N, Douglass HO, Jr., Herrera L, Russell D, Stablein DM, Bruckner HW, et al. The modulation of fluorouracil with leucovorin in metastatic colorectal carcinoma: a prospective randomized phase III trial. Gastrointestinal Tumor Study Group. *J Clin Oncol*. 1989; 7: 1419–1426.
 60. Figier A, Perez–Staub N, Carola E, Tournigand C, Lledo G, Flesch M, et al. FOLFOX in patients aged between 76 and 80 years with metastatic colorectal cancer: an exploratory cohort of the OPTIMOX1 study. *Cancer*. 2007; 110: 2666–2671.
 61. Yoshida M, Ishiguro M, Ikejiri K, Mochizuki I, Nakamoto Y, Kinugasa Y, et al. S-1 as adjuvant chemotherapy for stage III colon cancer: a randomized phase III study (ACTS-CC trial). *Ann Oncol*. 2014; 25: 1743–1749.
 62. Twelves C, Wong A, Nowacki MP, Abt M, Burris H, 3rd, Carrato A, et al. Capecitabine as adjuvant treatment for stage III colon cancer. *N Engl J Med*. 2005; 352: 2696–2704.
 63. Karahan B, Argon A, Yildirim M, Vardar E. Relationship between MLH-1, MSH-2, PMS-2, MSH-6 expression and clinicopathological features in colorectal cancer. *Int J Clin Exp Pathol*. 2015; 8: 4044–4053.
 64. Mangold E, Pagenstecher C, Friedl W, Fischer HP, Merkelbach-Bruse S, Ohlendorf M, et al. Tumours from MSH2 mutation carriers show loss of MSH2 expression but many tumours from MLH1 staining. *J Pathol*. 2005; 207: 385–395.
 65. Hall G, Clarkson A, Shi A, Langford E, Leung H, Eckstein RP, et al. Immunohistochemistry for PMS2 and MSH6 alone can replace a four antibody panel for mismatch repair deficiency screening in colorectal adenocarcinoma. *Pathology*. 2010; 42: 409–413.
 66. Shinto E, Hashiguchi Y, Ueno H, Kobayashi H, Ishiguro M, Mochizuki H, et al. Pretreatment CD133 and cyclooxygenase-2 expression as the predictive markers of the pathological effect of chemoradiotherapy in rectal cancer patients. *Dis Colon Rectum*. 2011; 54: 1098–1106.
 67. Shia J, Tang LH, Vakiani E, Guillem JG, Stadler ZK, Soslow RA, et al. Immunohistochemistry as first-line screening for detecting colorectal cancer patients at risk for hereditary nonpolyposis colorectal cancer syndrome: a 2-

antibody panel may be as predictive as a 4-antibody panel. *Am J Surg Pathol.* 2009; 33: 1639–1645.

68. Kanazawa H, Mitomi H, Nishiyama Y, Kishimoto I, Fukui N, Nakamura T, et al. Tumour budding at invasive margins and outcome in colorectal cancer. *Colorectal Dis.* 2008; 10: 41–47.
69. Thies S, Guldener L, Slotta-Huspenina J, Zlobec I, Koelzer VH, Lugli A, et al. Impact of peritumoral and intratumoral budding in esophageal adenocarcinomas. *Hum Pathol.* 2016; 52: 1–8.

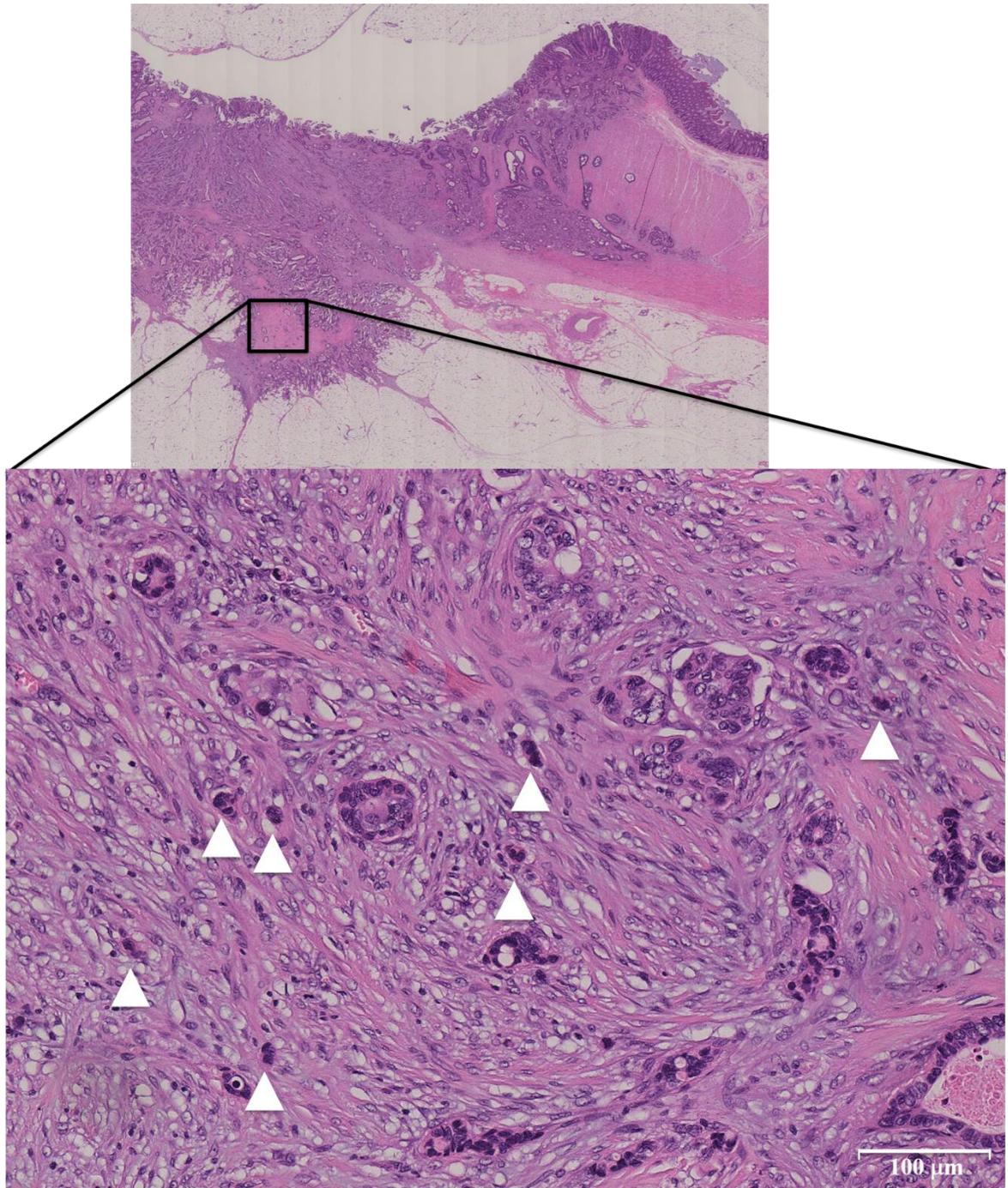


図 1. 腫瘍先進部での budding の組織学的所見 (ヘマトキシリン・エオジン染色;
ルーペ像および 200 倍視野)
単個または 5 個未満の癌胞巢 (矢頭)

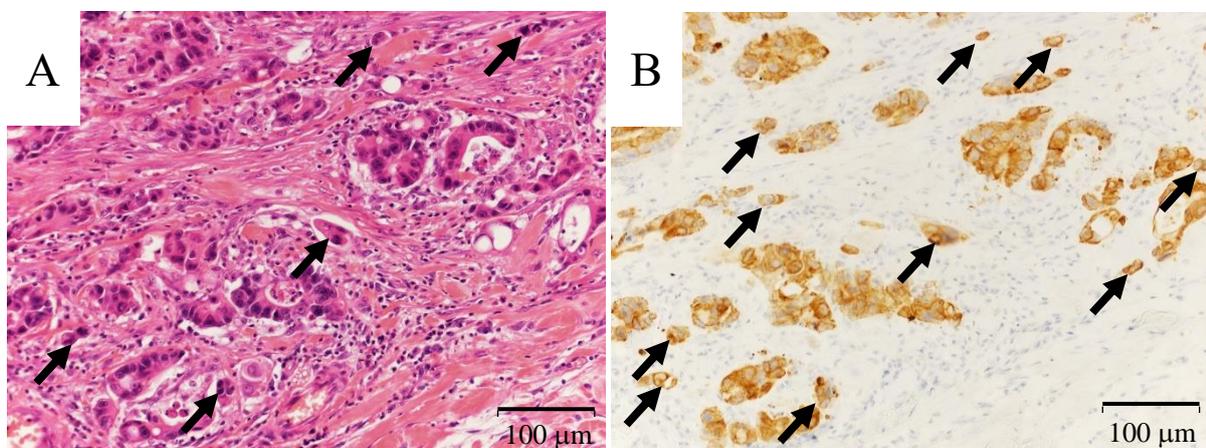


図 2. 大腸癌先進部の組織学的所見 (200 倍視野)

A, ヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色; B, cytokeratin 染色
budding (矢印)

HE 染色で判別困難な一部の budding が cytokeratin 染色により明瞭に認められる。

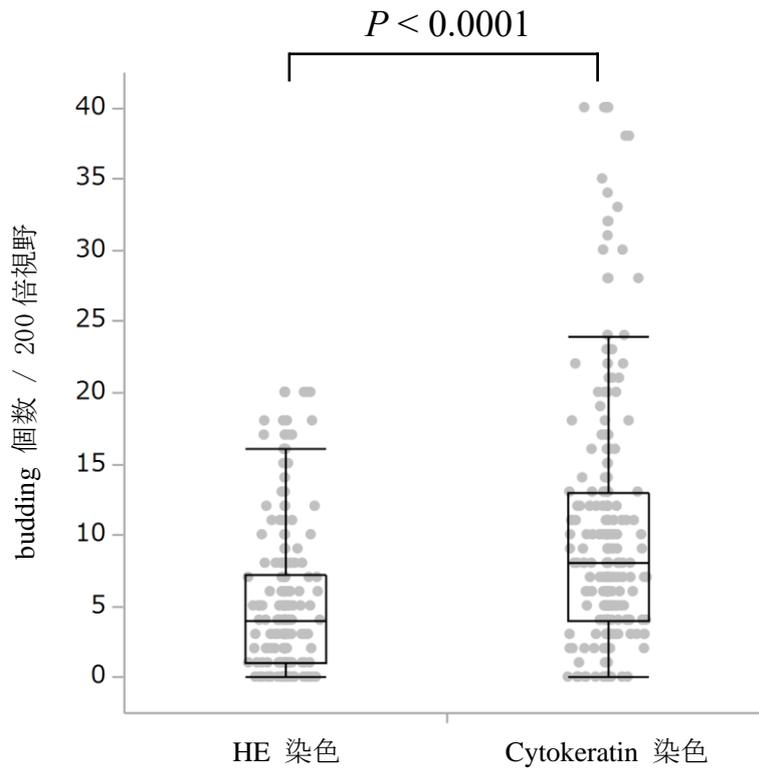


図 3. 染色法による budding 個数の相違

ヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色標本および cytokeratin 免疫組織染色標本のそれぞれにおいて、budding が最も高度に認められる領域を検索し、200 倍視野内の budding の個数をカウントした。budding の個数の中央値は HE 染色を用いた評価で 4 個 (0–20 個)、cytokeratin 染色では 8 個 (0–40 個) と、cytokeratin 染色で有意に budding 個数が増加した ($P < 0.0001$)。

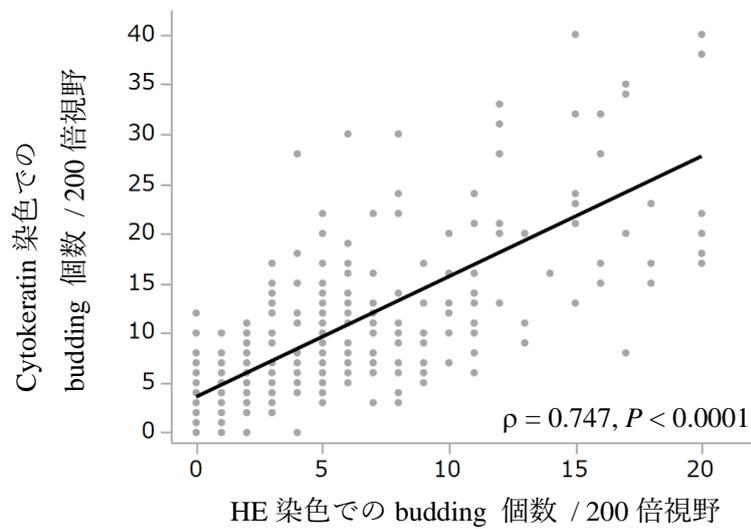


図 4. 異なる染色法により評価された budding 個数の相関

ヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色標本および cytokeratin 染色標本のそれぞれにおいて、budding が最も高度に認められる領域を検索し、200 倍視野内の budding の個数をカウントした。HE 染色での budding 個数と cytokeratin 染色での budding 個数には正の相関が認められた (Spearman の順位相関係数, $\rho = 0.747; P < 0.0001$)。

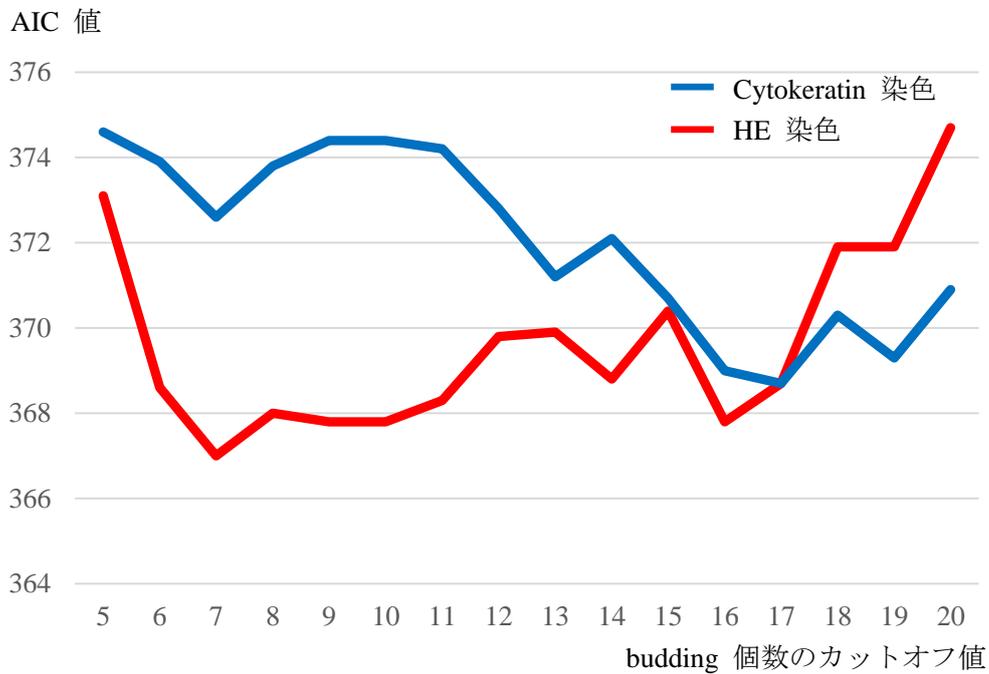


図 5. budding 個数のカットオフ値別の無再発生存に関する赤池情報量基準 (AIC)
 赤線：ヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色、青線：cytokeratin 染色
 AIC 値が小さいほど良好なモデルであり、最も良好な AIC 値は HE 染色では budding 個数のカットオフ値が 7 個のときで 367.0、cytokeratin 染色では 17 個のときで 368.7 であった。

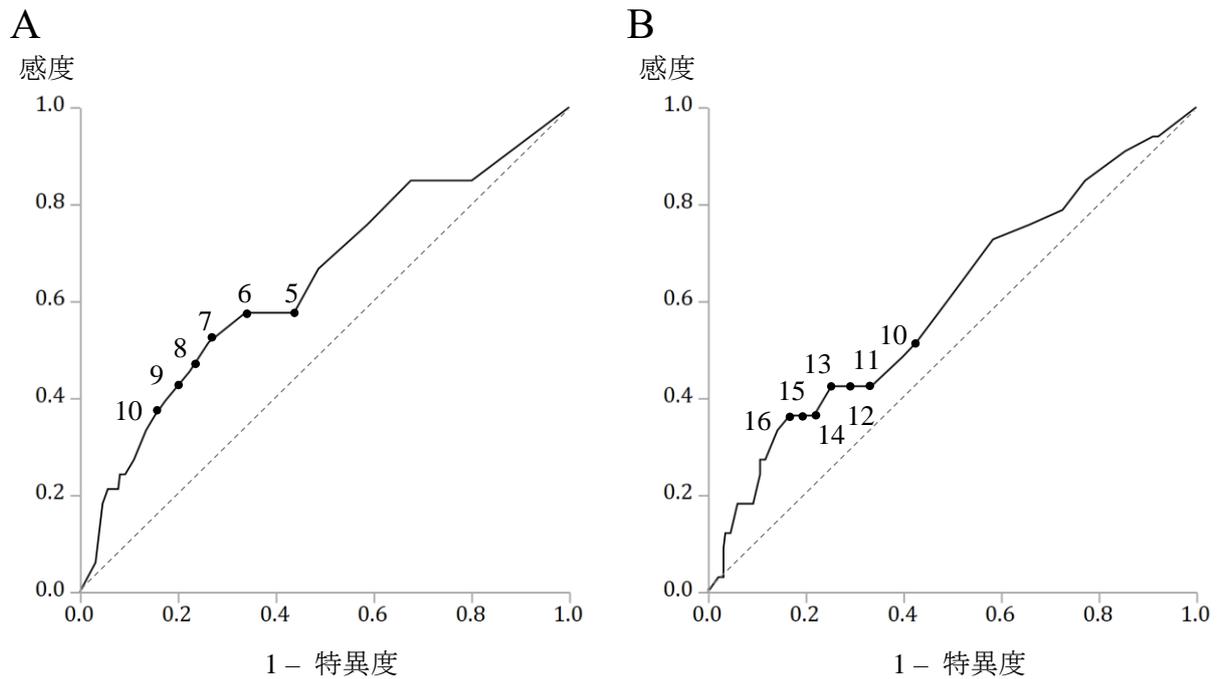
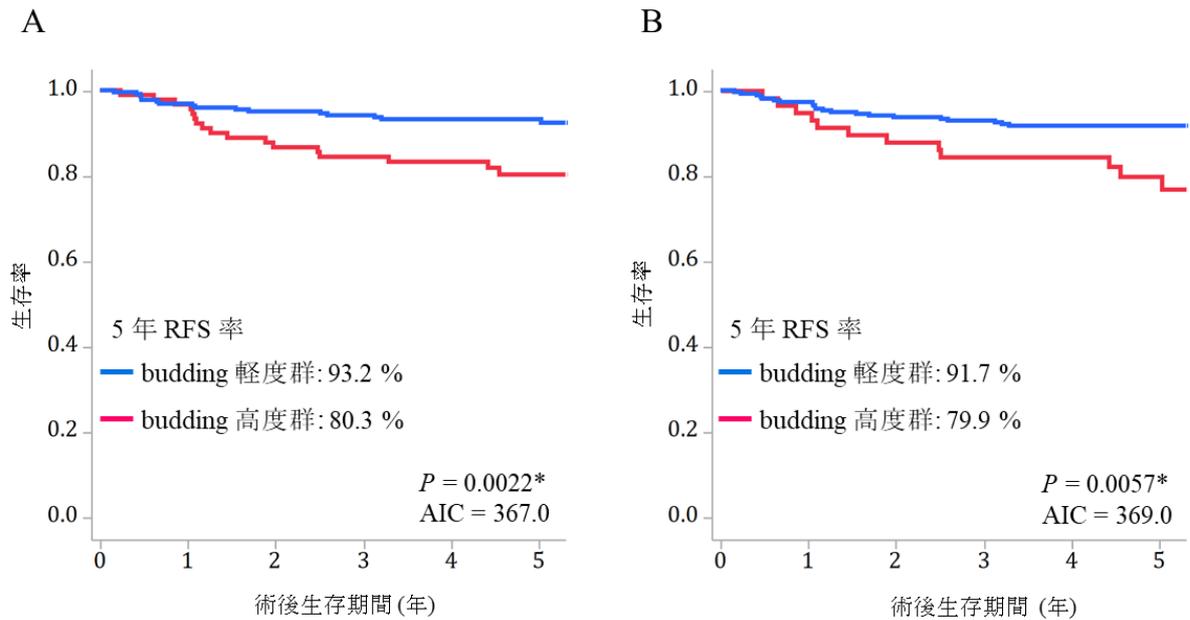


図 6. 再発をアウトカムとした ROC 曲線

A, ヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色で評価した budding 個数

B, cytokeratin 染色で評価した budding 個数

HE 染色では $AUC = 0.64$ (95%信頼区間, 0.53–0.74; $P = 0.0021$)、cytokeratin 染色では $AUC = 0.60$ (95%信頼区間, 0.48–0.70; $P = 0.028$) であった。至適カットオフ値は HE 染色で 7 個、cytokeratin 染色で 16 個であった。



患者数							患者数						
軽度群	223	215	211	208	188	125	軽度群	255	247	239	235	211	140
高度群	91	87	79	75	65	43	高度群	59	55	52	49	43	28

図 7. Stage II 大腸癌 314 例の budding 程度別の生存曲線

A, ヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色; B, cytokeratin 染色

200 倍視野あたりの budding 個数によって分類し、HE 染色による評価では 0-6 個を軽度群、7 個以上を高度群とし、cytokeratin 染色による評価では 0-15 個を軽度群、16 個以上を高度群とした。いずれの評価法による budding においても高度群は軽度群と比較し有意に予後不良であった (A, $P = 0.0022$; B, $P = 0.0057$; * log-rank 検定)。無再発生存 (RFS) に関する赤池情報量基準 (AIC) は、cytokeratin 染色での budding 判定と比較し、HE 染色での budding 判定の方が値が小さく、後者の方がより良好なモデルであった。

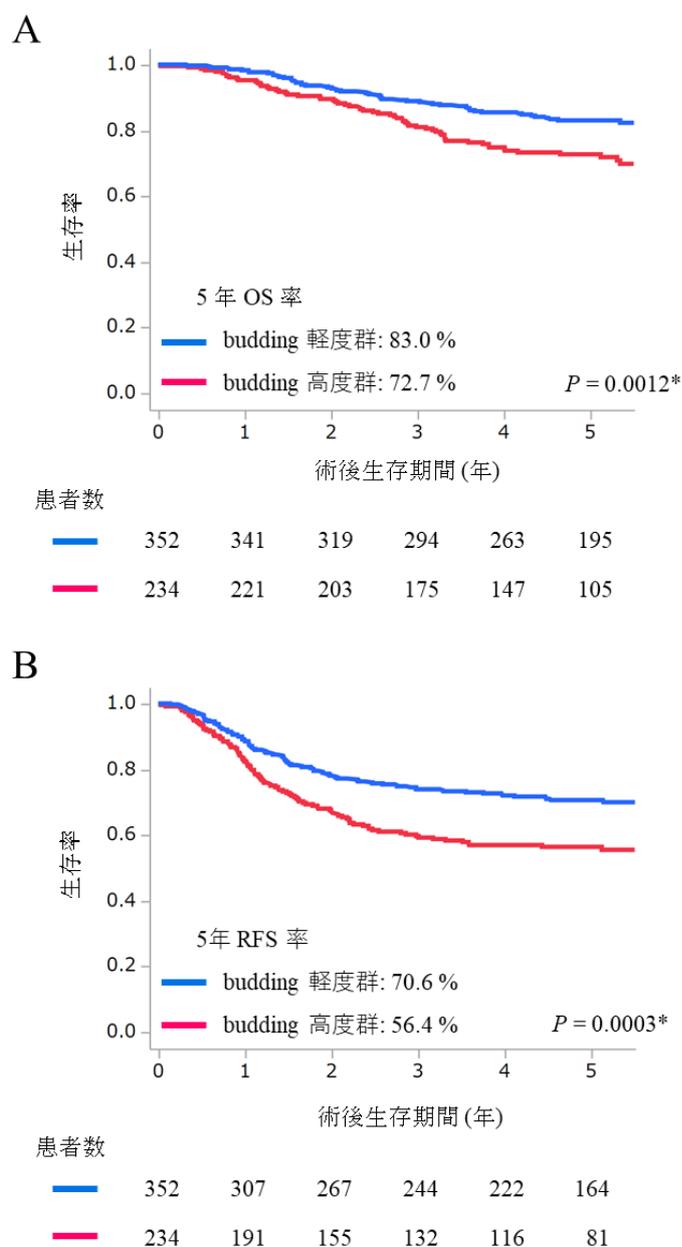


図 8. Stage III 大腸癌 586 例の budding 程度別生存曲線

A, 全生存 (OS); B, 無再発生存 (RFS)

200 倍視野あたりの budding 個数によって分類し、0-9 個を軽度群、10 個以上を高度群とした。budding 高度群は軽度群と比較し有意に予後不良であった (OS, $P = 0.0012$; RFS, $P = 0.0003$; * log-rank 検定)。

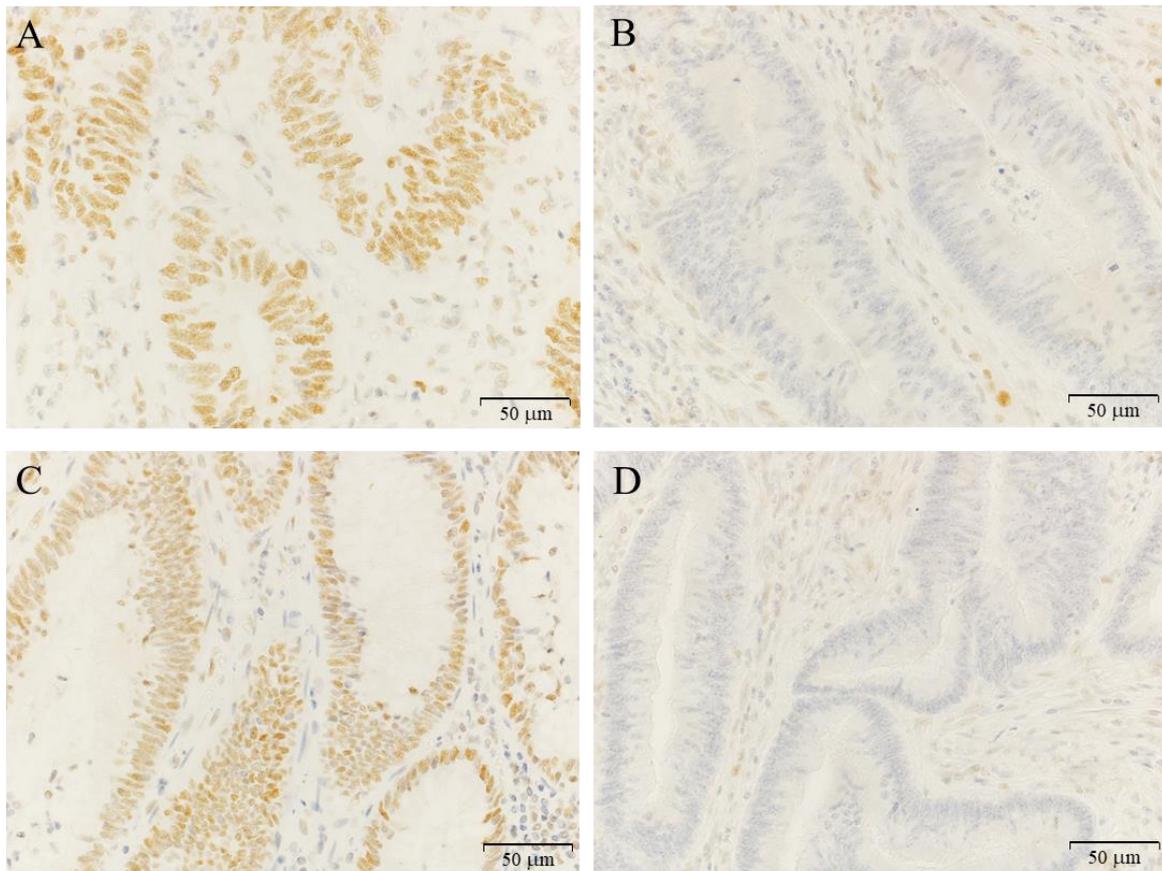


図 9. DNA ミスマッチ修復 (MMR) タンパク質の免疫組織染色

A, MLH1 陽性例; B, MLH1 陰性例; C, MSH2 陽性例; D, MSH2 陰性例

MLH1 陰性は 30 例 (5.1%)、MSH2 陰性は 11 例 (1.9%) であった。MLH1 陰性または MSH2 陰性は 37 例 (6.3%) であった。

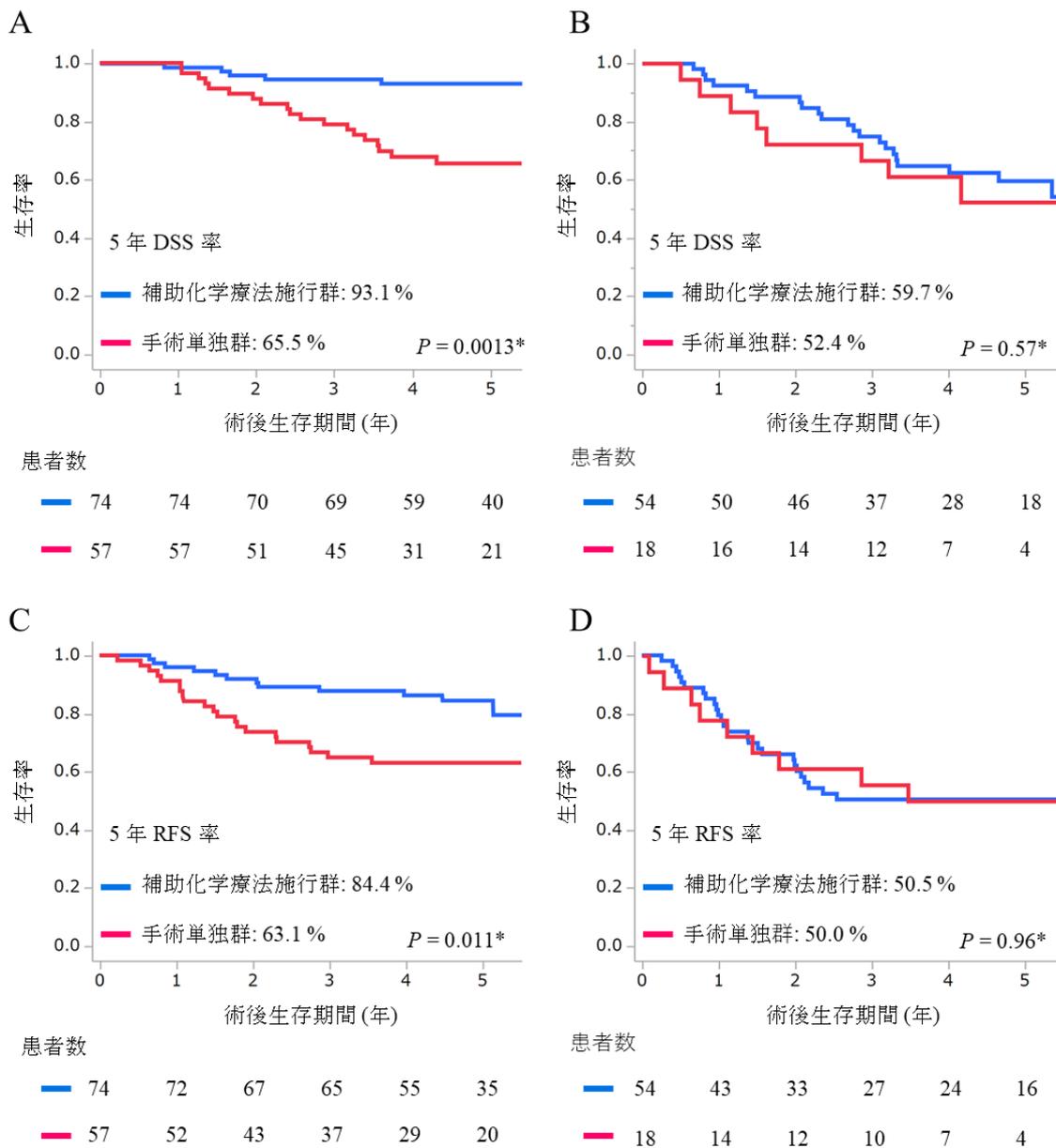


図 10. 補助化学療法施行群と手術単独群の間の生存曲線の比較 (コホート 1)

疾患特異的生存 (DSS): A, budding 軽度症例; B, budding 高度症例

無再発生存 (RFS): C, budding 軽度症例; D, budding 高度症例

budding 軽度症例においては補助化学療法群と手術単独群で予後に有意差を認めた (DSS, $P = 0.0013$; RFS, $P = 0.011$; * log-rank 検定)。budding 高度症例においては両群間に有意差を認めなかった。

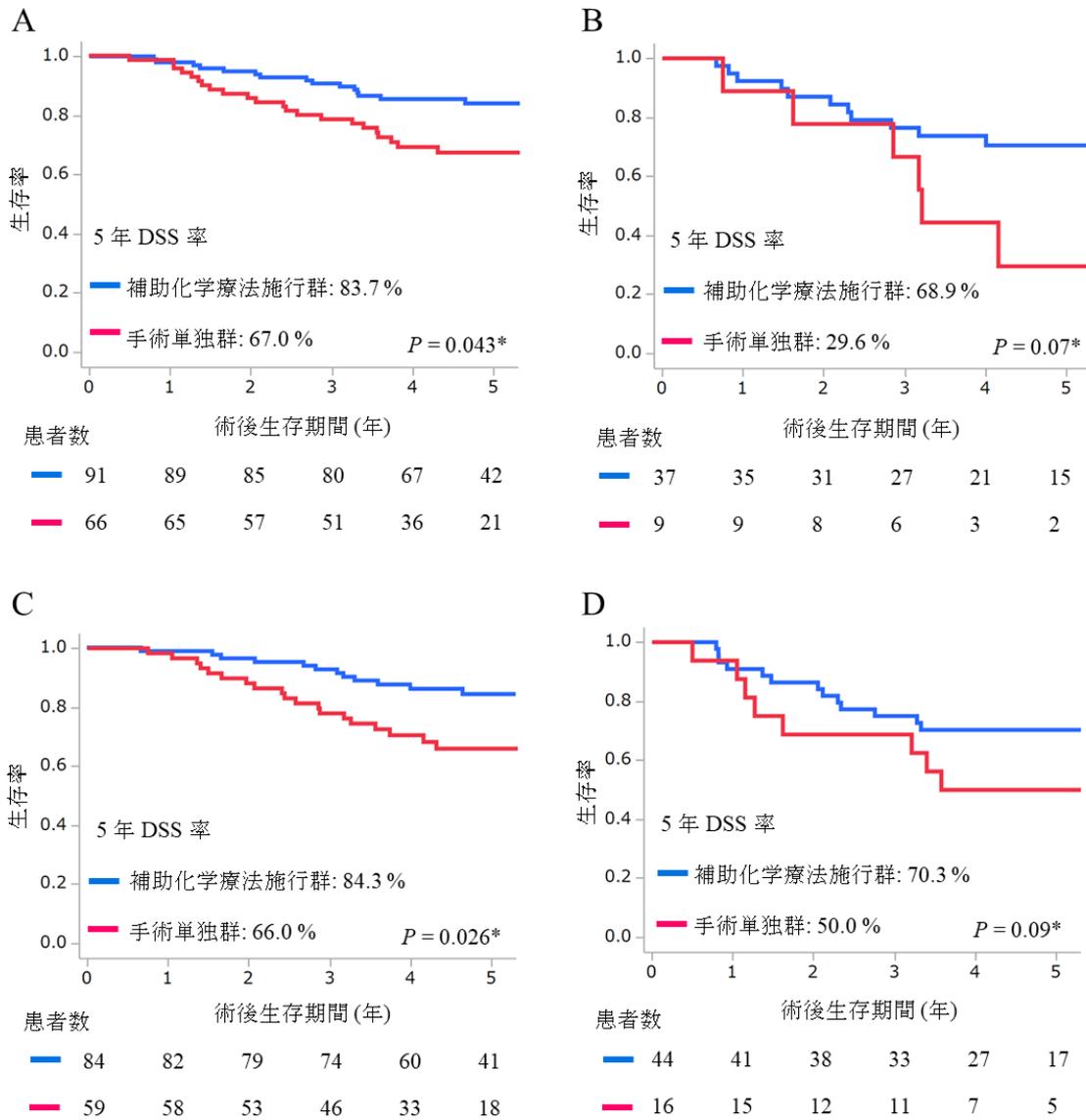


図 11. 補助化学療法施行群と手術単独群との間の疾患特異的生存 (DSS) 曲線の比較 (コホート 1)

A, T3 症例; B, T4 症例; C, N1 症例; D, N2 症例

* log-rank 検定

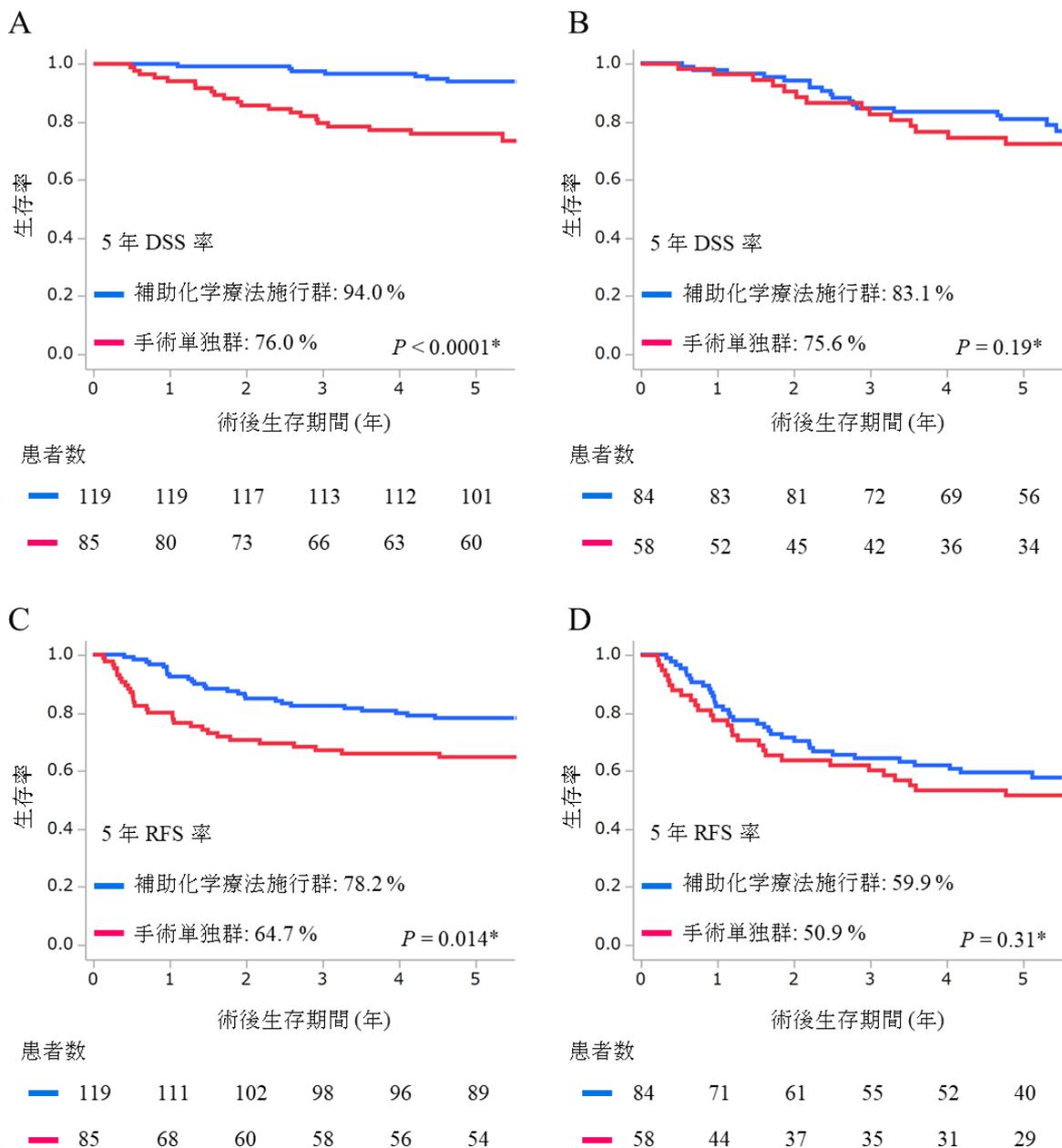


図 12. 補助化学療法施行群と手術単独群の間の生存曲線の比較 (コホート 2)
疾患特異的生存 (DSS); A, budding 軽度症例; B, budding 高度症例
無再発生存 (RFS); C, budding 軽度症例; D, budding 高度症例
budding 軽度症例においては補助化学療法群と手術単独群で予後に有意差を認めた (DSS, $P < 0.0001$; RFS, $P = 0.014$; * log-rank 検定)。budding 高度症例においては両群間に有意差を認めなかった。

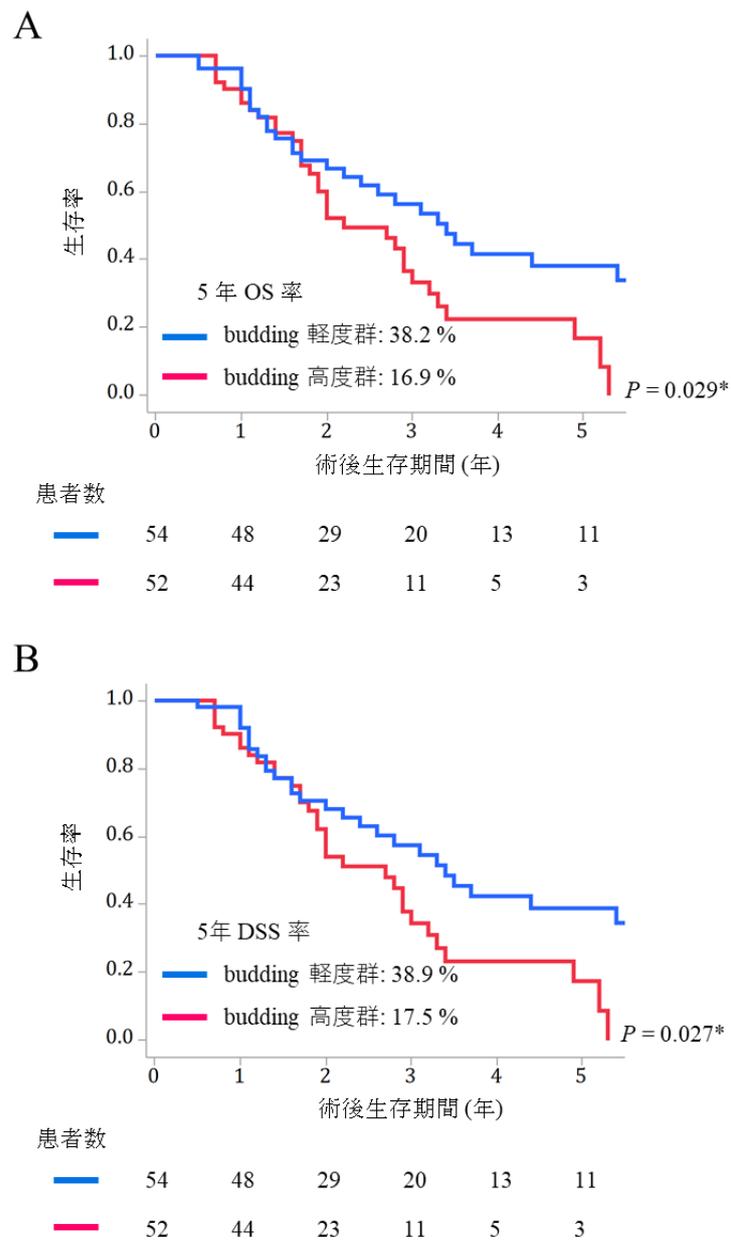


図 13. Stage IV 大腸癌 106 例の budding 程度別生存曲線

A, 全生存 (OS); B, 疾患特異的生存 (DSS)

200 倍視野あたりの budding 個数によって分類し、0-9 個を軽度群、10 個以上を高度群とした。budding 高度群は軽度群と比較し有意に予後不良であった (OS, $P = 0.029$; DSS, $P = 0.027$; * log-rank 検定)。

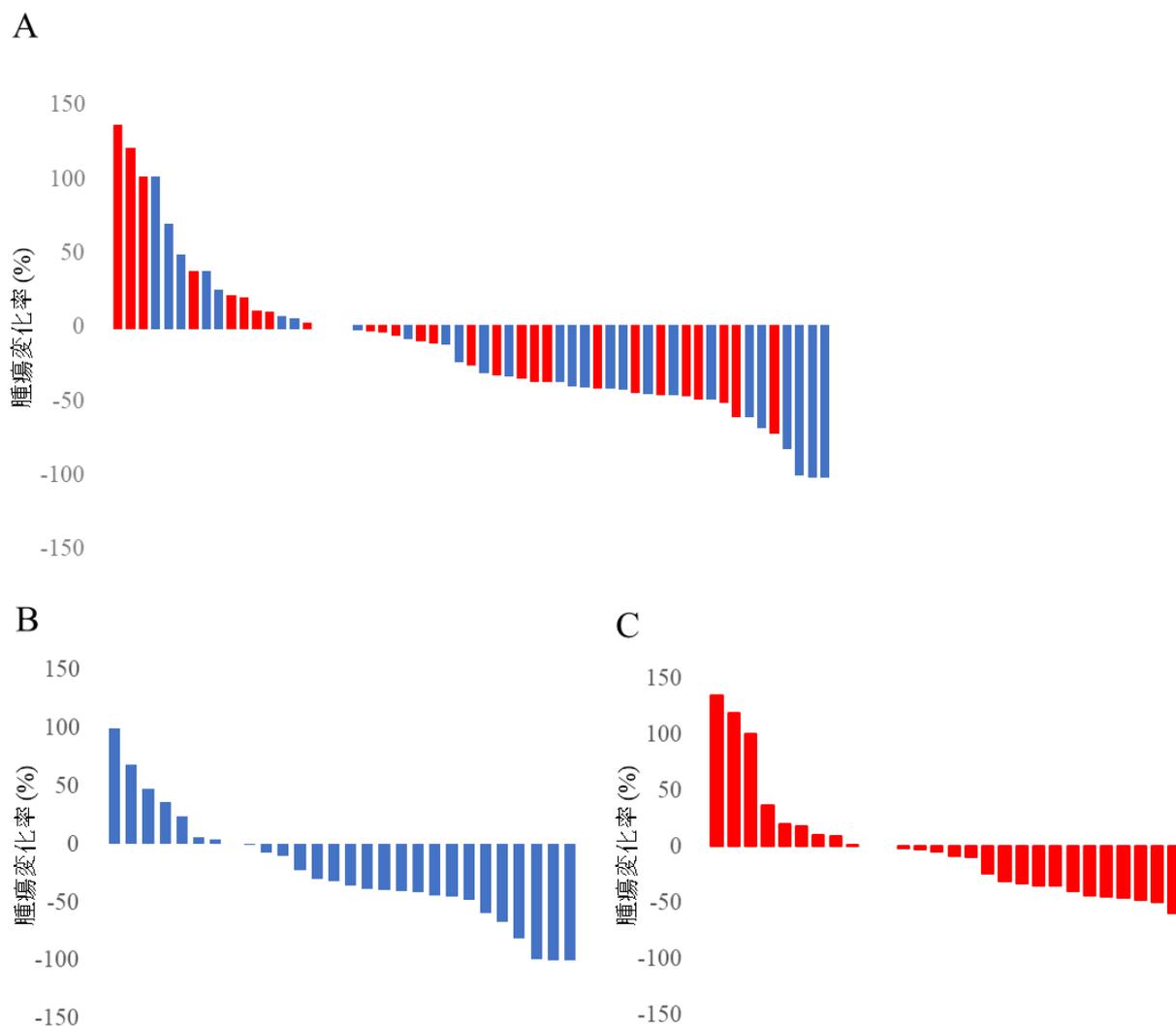


図 14. Stage IV 大腸癌症例の腫瘍変化率に関する water fall plotting
 A, 全症例 (青色, budding 軽度症例; 赤色, budding 高度症例)
 B, budding 軽度群; C, budding 高度群

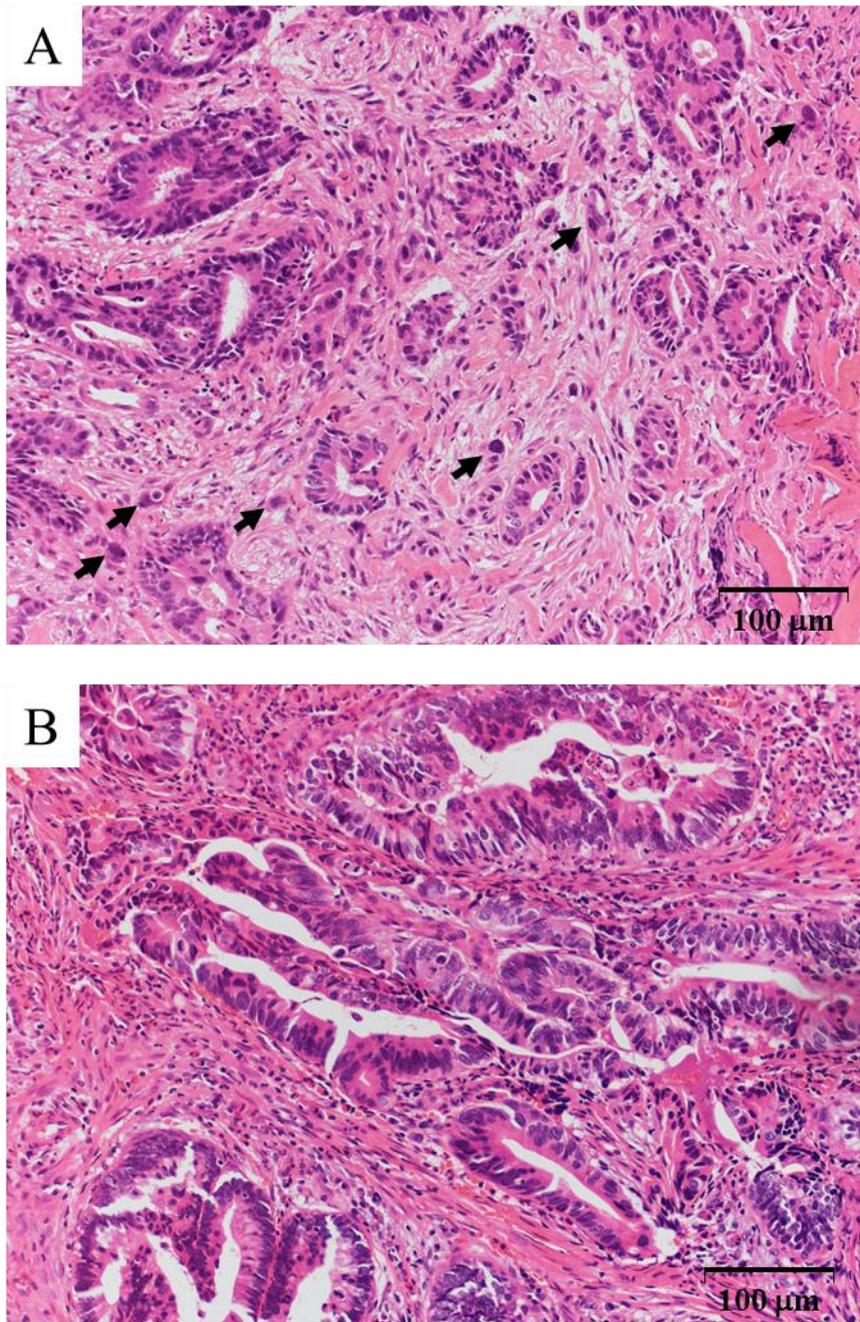


図 15. 内視鏡下生検検体の組織所見

A, intratumoral budding (ITB; 矢印) が多数認められる症例

B, ITB が認められない症例

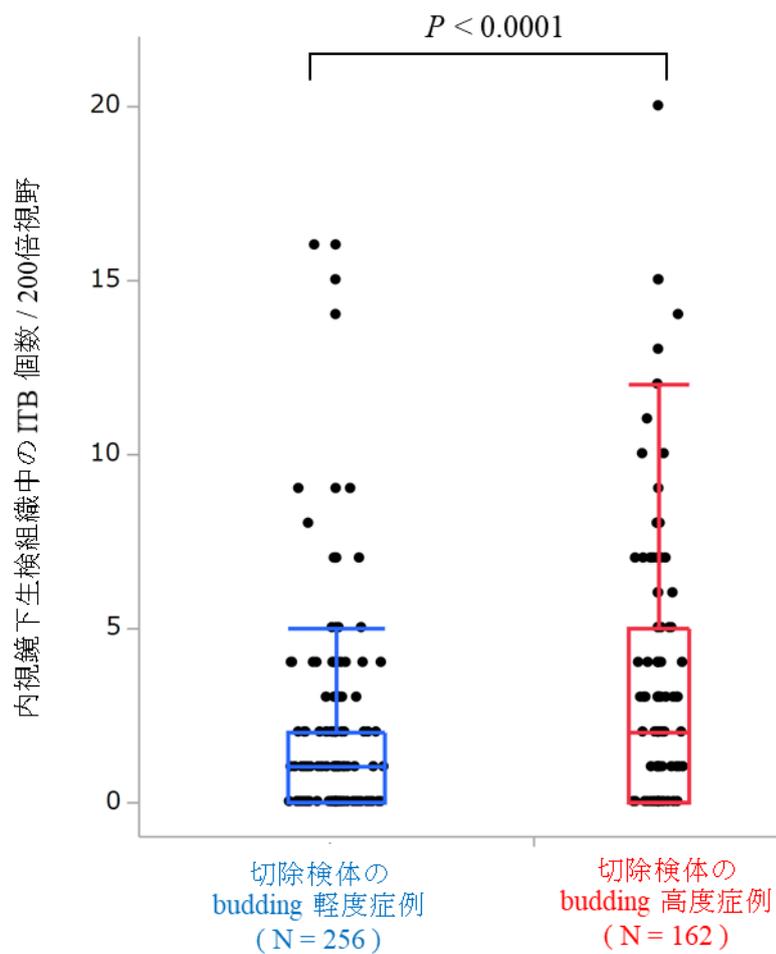


図 16. 切除検体の budding 程度別の内視鏡下生検組織中の intratumoral budding (ITB) 個数の比較

ITB 個数は budding 軽度症例で中央値 1 個 (0–16 個)、budding 高度症例で中央値 2 個 (0–20 個) であり、Mann–Whitney の U 検定では budding 高度症例で有意に個数が多かった ($P < 0.0001$)。

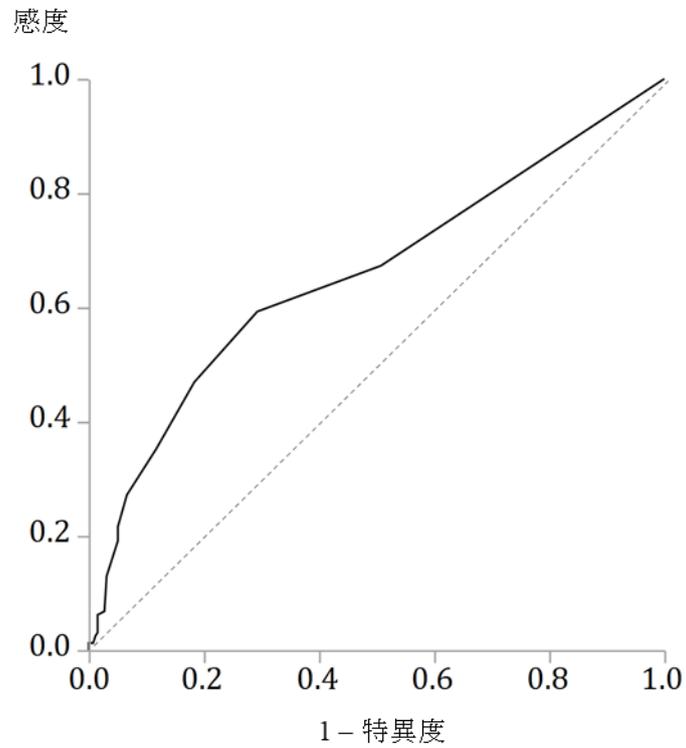


図 17. 手術検体の budding 高度を陽性アウトカムとした ROC 解析

AUC = 0.66 (95%信頼区間: 0.60–0.71, $P < 0.0001$) であり、Youden index に基づき ITB 個数の至適カットオフ値を 3 個とした場合、感度 46.9%、特異度 81.6%、陽性的中率 61.8%、陰性的中率 70.9%であった。

表 1. Stage II 大腸癌の患者背景

		症例数 (%)	
		(N = 314)	
年齢	65 歳未満	143	(45.5)
	65 歳以上	171	(54.5)
性別	男性	183	(58.3)
	女性	131	(41.7)
占居部位	右側結腸 ^a	106	(33.8)
	左側結腸	124	(39.5)
	直腸	84	(26.7)
腫瘍径	45 mm 未満	131	(41.7)
	45 mm 以上	183	(58.3)
深達度	T3	255	(81.2)
	T4	59	(18.8)
組織型	tub1, pap	141	(44.9)
	tub2	154	(49.0)
	por, muc, sig	19	(6.1)
リンパ管侵襲	ly0/1	280	(89.2)
	ly2/3	34	(10.8)
静脈侵襲	v0/1	225	(71.7)
	v2/3	89	(28.3)
リンパ節郭清個数	12 個以上	244	(77.7)
	12 個未満	70	(22.3)
術前血清 CEA 値 ^b	5.0 ng/ml 未満	217	(70.9)
	5.0 ng/ml 以上	89	(29.1)

^a 盲腸から横行結腸脾弯部

^b 術前 CEA 未検査または不明 : 8 例
CEA, 癌胎児性抗原

表 2. 異なる染色法により評価された budding 程度の相関

	Cytokeratin 染色 ^b		P 値
	budding 軽度群 (N = 255)	budding 高度群 (N = 59)	
HE 染色 ^a			<u><0.0001</u>
budding 軽度群 (N = 223)	209 (66.6%)	14 (4.5%)	
budding 高度群 (N = 91)	46 (14.6%)	45 (14.3%)	

^a HE 染色: budding 軽度, 0-6 個; budding 高度, 7 個以上 (200 倍視野)

^b cytokeratin 染色: budding 軽度, 0-15 個; budding 高度, 16 個以上 (200 倍視野)

HE, ヘマトキシリン・エオジン

表 3. 再発リスクに関する単変量および多変量解析

因子	単変量解析			多変量解析		
	オッズ比	95%信頼区間	P 値	オッズ比	95%信頼区間	P 値
占居部位						
右側大腸 ^a	1					
左側大腸	3.14	1.18–8.39	<u>0.022</u>	–	–	–
腫瘍径						
45 mm 未満	1					
45 mm 以上	1.29	0.61–2.72	0.51	–	–	–
組織型						
高分化 ^b	1					
低分化 ^c	1.00	0.22–4.54	1.0	–	–	–
深達度						
T3	1					
T4	2.06	0.92–4.60	0.08	–	–	–
リンパ管侵襲						
ly0/1	1					
ly2/3	3.14	1.29–7.66	<u>0.012</u>	–	–	–
静脈侵襲						
v0/1	1			1		
v2/3	2.68	1.29–5.58	<u>0.0083</u>	2.25	1.05–4.80	<u>0.037</u>
術後補助化学療法						
あり	1					
なし	1.02	0.40–2.60	0.96	–	–	–
郭清リンパ節個数						
12 個未満	2.20	1.02–4.73	<u>0.044</u>	–	–	–
12 個以上	1					
術前血清 CEA 値 ^d						
5.0 ng/ml 未満	1			1		
5.0 ng/ml 以上	2.58	1.24–5.37	<u>0.011</u>	2.46	1.16–5.23	<u>0.019</u>
budding 個数 (HE 染色)						
7 個未満	1			1		
7 個以上	2.97	1.43–6.18	<u>0.0036</u>	2.53	1.19–5.40	<u>0.016</u>
budding 個数 (cytokeratin 染色)						
16 個未満	1					
16 個以上	2.84	1.31–6.18	<u>0.0082</u>	–	–	–

^a 盲腸から横行結腸脾弯部; ^b tub1, tub2, pap; ^c por, muc, sig; ^d 術前 CEA 未検査または不明: 8 例
CEA, 癌胎児性抗原; HE, ヘマトキシリン・エオジン

表 4. Stage III 大腸癌の患者背景

因子	カテゴリー	症例数 (%)				P 値
		budding ^a 軽度群 (N = 352)		budding ^a 高度群 (N = 234)		
年齢	中央値 (範囲)	66	(28-89)	66	(35-89)	0.43
性別	男性	208	(59.1)	129	(55.1)	0.34
	女性	144	(40.9)	105	(44.9)	
占居部位	右側結腸 ^b	79	(22.4)	47	(20.1)	0.23
	左側結腸	127	(36.1)	83	(35.5)	
	直腸	146	(41.5)	104	(44.4)	
組織型	高分化 ^c	322	(91.5)	207	(88.5)	0.72
	低分化 ^d	30	(8.5)	27	(11.5)	
深達度	T1-3	280	(79.5)	167	(71.4)	<u>0.023</u>
	T4	72	(20.5)	67	(28.6)	
リンパ節転移 ^e	N1	281	(79.8)	151	(64.5)	<u><0.0001</u>
	N2	71	(20.2)	83	(35.5)	
リンパ管侵襲	ly0/1	261	(74.1)	120	(51.3)	<u><0.0001</u>
	ly2/3	91	(25.9)	114	(48.7)	
静脈侵襲	v0/1	211	(59.9)	119	(50.9)	<u>0.030</u>
	v2/3	141	(40.1)	115	(49.1)	
術後補助化学療法	あり	221	(62.8)	168	(71.8)	<u>0.024</u>
	なし	131	(37.2)	66	(28.2)	

^a budding 程度: 軽度, 0-9 個; 高度, 10 個以上 (200 倍視野)

^b 盲腸から横行結腸脾弯部; ^c tub1, tub2, pap; ^d por, muc, sig; ^e TNM 分類

表 5. Stage III 大腸癌の無再発生存に関する単変量および多変量解析

因子	単変量解析			多変量解析		
	HR	95% CI	P 値	HR	95% CI	P 値
年齢 (65 歳以上 vs. 65 歳未満)	1.03	0.78–1.37	0.81	–	–	–
占居部位 (左側 vs. 右側 ^a)	1.44	1.01–2.12	<u>0.043</u>	–	–	–
組織型 (低分化 ^b vs. 高分化 ^c)	1.37	0.87–2.06	0.16	–	–	–
深達度 (T4 vs. T1–3)	1.81	1.34–2.42	<u>0.0001</u>	1.50	1.10–2.03	<u>0.010</u>
リンパ節転移 (N2 vs. N1) ^d	2.12	1.59–2.81	<u><0.0001</u>	1.92	1.42–2.58	<u><0.0001</u>
リンパ管侵襲 (ly2/3 vs. ly0/1)	1.74	1.31–2.29	<u>0.0001</u>	1.39	1.04–1.86	<u>0.028</u>
静脈侵襲 (v2/3 vs. v0/1)	1.82	1.38–2.41	<u><0.0001</u>	1.58	1.19–2.11	<u>0.0016</u>
budding (高度 vs. 軽度)	1.66	1.26–2.19	<u>0.0003</u>	1.39	1.05–1.85	<u>0.023</u>
術後補助化学療法 (なし vs. あり)	1.46	1.10–1.93	<u>0.0093</u>	1.90	1.41–2.54	<u><0.0001</u>

^a 盲腸から横行結腸脾弯部; ^b por, muc, sig; ^c tub1, tub2, pap; ^d TNM 分類

HR, ハザード比; CI, 信頼区間

表 6. Stage III 大腸癌 (コホート 1) の患者背景

因子	カテゴリー	症例数 (%)		P 値
		術後補助化学療法 施行群 (N = 128)	手術単独群 (N = 75)	
年齢	中央値 (範囲)	62 (33–86)	71 (44–88)	<0.0001
性別	男性	73 (57.0)	43 (57.3)	0.97
	女性	55 (43.0)	32 (42.7)	
占居部位	結腸	78 (60.9)	40 (53.3)	0.29
	直腸	50 (39.1)	35 (46.7)	
深達度	T1–3	91 (71.1)	66 (88.0)	0.006
	T4	37 (28.9)	9 (12.0)	
組織型	高分化 ^a	111 (86.7)	70 (93.3)	0.14
	低分化 ^b	17 (13.3)	5 (6.7)	
静脈侵襲	v0/1	83 (64.8)	52 (69.3)	0.51
	v2/3	45 (35.2)	23 (30.7)	
budding ^c	軽度	74 (57.8)	57 (76.0)	0.009
	高度	54 (42.2)	18 (24.0)	
リンパ節転移 ^d	N1	84 (65.6)	59 (78.7)	0.049
	N2	44 (34.4)	16 (21.3)	

^a tub1, tub2, pap; ^b por, muc, sig; ^c budding 程度: 軽度, 0–9 個; 高度, 10 個以上 (200 倍視野)

^d TNM 分類

表 7. Stage III 大腸癌 (コホート 2) の患者背景

因子	カテゴリー	症例数 (%)				P 値
		術後補助化学療法 施行群 (N = 203)		手術単独群 (N = 143)		
年齢	中央値 (範囲)	64	(28–84)	74	(49–89)	<u><0.0001</u>
性別	男性	111	(54.7)	86	(60.1)	0.31
	女性	92	(45.3)	57	(39.9)	
占居部位	結腸	110	(54.2)	87	(60.8)	0.22
	直腸	93	(45.8)	56	(39.2)	
深達度	T1–3	163	(80.3)	112	(78.3)	0.65
	T4	40	(19.7)	31	(21.7)	
組織型	高分化 ^a	188	(92.6)	130	(90.9)	0.57
	低分化 ^b	15	(7.4)	13	(9.1)	
静脈侵襲	v0/1	108	(53.2)	69	(48.3)	0.36
	v2/3	95	(46.8)	74	(51.7)	
budding ^c	軽度	119	(58.6)	85	(59.4)	0.88
	高度	84	(41.4)	58	(40.6)	
リンパ節転移 ^d	N1	149	(73.4)	113	(79.0)	0.23
	N2	54	(26.6)	30	(21.0)	

^a tub1, tub2, pap; ^b por, muc, sig; ^c budding 程度: 軽度, 0–9 個; 高度, 10 個以上 (200 倍視野)

^d TNM 分類

表 8. Stage III 大腸癌 (コホート 1) における budding 程度別の予後因子に関する単変量および多変量解析 (探索的検討)

因子	単変量解析			多変量解析		
	HR	95% CI	P 値	HR	95% CI	P 値
budding^a 軽度症例 (N = 131)						
組織型 (低分化 ^b vs. 高分化 ^c)	1.24	0.30–3.56	0.73	–	–	–
深達度 (T4 vs. T1–3)	1.57	0.55–6.59	0.44	–	–	–
リンパ節転移 ^d (N2 vs. N1)	1.21	0.47–2.73	0.67	–	–	–
静脈侵襲 (v2/3 vs. v0/1)	1.60	0.72–3.43	0.24	–	–	–
術後補助化学療法 (なし vs. あり)	3.54	1.60–8.58	<u>0.0015</u>	–	–	–
budding^a 高度症例 (N = 72)						
組織型 (低分化 ^b vs. 高分化 ^c)	1.34	0.45–3.26	0.57	–	–	–
深達度 (T4 vs. T1–3)	2.41	1.15–5.07	<u>0.020</u>	2.18	1.03–4.63	<u>0.042</u>
リンパ節転移 ^d (N2 vs. N1)	2.08	1.00–4.40	<u>0.049</u>	1.83	0.87–3.92	0.11
静脈侵襲 (v2/3 vs. v0/1)	1.26	0.59–2.61	0.55	–	–	–
術後補助化学療法 (なし vs. あり)	1.27	0.53–2.76	0.58	–	–	–

^a budding 程度: 軽度, 0–9 個; 高度, 10 個以上 (200 倍視野); ^b por, muc, sig; ^c tub1, tub2, pap; ^d TNM 分 DSS, 疾患特異的生存; HR, ハザード比; CI, 信頼区間

表 9. Stage III 大腸癌 (コホート 2) における budding 程度別の予後因子に関する単変量および多変量解析 (検証的検討)

因子	単変量解析			多変量解析		
	HR	95% CI	P 値	HR	95% CI	P 値
budding^a 軽度症例 (N = 204)						
組織型 (低分化 ^b vs. 高分化 ^c)	2.96	1.00–7.06	<u>0.049</u>	2.92	0.93–7.68	0.06
深達度 (T4 vs. T1–3)	2.43	1.13–4.97	<u>0.025</u>	1.40	0.61–3.02	0.42
リンパ節転移 ^d (N2 vs. N1)	1.92	0.84–4.03	0.11	–	–	–
静脈侵襲 (v2/3 vs. v0/1)	3.02	1.46–6.72	<u>0.0027</u>	3.27	1.53–7.50	<u>0.0020</u>
術後補助化学療法 (なし vs. あり)	4.51	2.15–10.35	<u><0.0001</u>	4.44	2.09–10.31	<u><0.0001</u>
budding^a 高度症例 (N = 142)						
組織型 (低分化 ^b vs. 高分化 ^c)	3.45	1.46–7.28	<u>0.0066</u>	3.07	1.25–6.79	<u>0.017</u>
深達度 (T4 vs. T1–3)	1.18	0.53–2.42	0.67	–	–	–
リンパ節転移 ^d (N2 vs. N1)	3.75	1.95–7.35	<u><0.0001</u>	2.86	1.46–5.71	<u>0.0019</u>
静脈侵襲 (v2/3 vs. v0/1)	2.07	1.07–4.20	<u>0.030</u>	2.03	1.02–4.21	<u>0.045</u>
術後補助化学療法 (なし vs. あり)	1.55	0.80–2.97	0.19	–	–	–

^a budding 程度: 軽度, 0–9 個; 高度, 10 個以上 (200 倍視野); ^b por, muc, sig; ^c tub1, tub2, pap; ^d TNM 分類 DSS, 疾患特異的生存; HR, ハザード比; CI, 信頼区間

表 10. Stage IV 大腸癌 106 例の臨床病理学的背景

因子	カテゴリー	budding ^a 軽度群 (N = 54)		budding ^a 高度群 (N = 52)		P 値
年齢						0.19
中央値 (範囲)		66	(43-85)	62	(28-81)	
性別						0.53
	男性	30	(55.6)	32	(61.5)	
	女性	24	(44.4)	20	(38.5)	
占居部位						0.12
	結腸	23	(42.6)	30	(57.7)	
	直腸	31	(57.4)	22	(42.3)	
組織型						0.52
	高分化 ^b	48	(88.9)	44	(84.6)	
	低分化 ^c	6	(11.1)	8	(15.4)	
深達度						<u>0.0034</u>
	T3	33	(61.1)	17	(32.7)	
	T4	21	(38.9)	35	(67.3)	
リンパ管侵襲						<u>0.029</u>
	ly0/1	41	(75.9)	29	(55.8)	
	ly2/3	13	(24.5)	23	(44.2)	
静脈侵襲						0.93
	v0/1	10	(18.5)	10	(19.2)	
	v2/3	44	(81.5)	42	(80.8)	
リンパ節転移						0.41
	なし	8	(14.8)	9	(17.3)	
	あり	46	(85.2)	43	(82.7)	
遠隔転移						0.82
	M1a	30	(55.6)	30	(57.7)	
	M1b	24	(44.4)	22	(42.3)	
RAS 遺伝子変異						0.65
	なし	22	(40.8)	17	(32.7)	
	あり	16	(29.6)	19	(36.5)	
	不明	16	(29.6)	16	(30.8)	
分子標的薬併用						0.24
	抗 EGFR 薬	8	(14.8)	4	(7.7)	
	抗 VEGF 薬	22	(40.8)	29	(55.8)	
	なし	24	(44.4)	19	(36.5)	

^a budding 程度: 軽度, 0-9 個; 高度, 10 個以上 (200 倍視野)

^b tub1, tub2, pap; ^c por, muc, sig

表 11. Stage IV 大腸癌の budding 程度別の腫瘍縮小効果

	budding ^a 軽度群 (N = 54)	budding ^a 高度群 (N = 52)	P 値
腫瘍縮小率 (%) ^a	19.8 ± 46.0	11.9 ± 44.4	0.42
ORR (%)	44.4	40.4	0.67
TTP (月) ^b	9.5 (1.1–98.1)	9.6 (0.6–27.2)	0.71

^a budding 程度: 軽度, 0–9 個; 高度, 10 個以上 (200 倍視野)

^b 平均 ± 標準偏差; ^c 中央値 (範囲)

ORR, 客観的奏効割合; TTP, 無増悪期間

表 12. Stage III 大腸癌 418 例の臨床病理学的背景

因子	カテゴリー	症例数	(%)
年齢	65 歳未満	192	(45.9)
	65 歳以上	226	(54.1)
性別	男性	243	(58.1)
	女性	175	(41.9)
占居部位	右側結腸 ^a	87	(20.8)
	左側結腸	144	(34.5)
	直腸	187	(44.7)
組織型	高分化 ^b	382	(91.4)
	低分化 ^c	36	(8.6)
深達度	T1-3	331	(79.2)
	T4	87	(20.8)
budding ^d	軽度	256	(61.2)
	高度	162	(38.8)
リンパ管侵襲	ly0/1	268	(64.1)
	ly2/3	150	(35.9)
静脈侵襲	v0/1	245	(58.6)
	v2/3	173	(41.4)
リンパ節転移 ^e	N1	313	(74.8)
	N2	105	(25.2)

^a 盲腸から横行結腸脾弯部; ^b tub1, tub2, pap; ^c por, muc, sig

^d budding 程度: 軽度, 0-9 個; 高度, 10 個以上 (200 倍視野)

^e TNM 分類

表 13. 術前内視鏡下生検組織中の intratumoral budding (ITB) 個数別の budding 程度の分布

ITB 個数	症例数		
	budding ^a 軽度群 (N = 256)	budding ^a 高度群 (N = 162)	
0	126	53	}
1	55	13	
2	28	20	
3	17	19	} $P < 0.0001$
4	13	13	
5	4	9	
6	0	4	
7 以上	13	31	

^a budding 程度: 軽度, 0-9 個; 高度, 10 個以上 (200 倍視野)