

## 同時性多発非小細胞肺癌症例の臨床病理学的検討

細田 裕<sup>1</sup>・和泉宏幸<sup>1</sup>・新 謙一<sup>2</sup>・千秋智重<sup>2</sup>・  
斎藤和人<sup>2</sup>・篠原直宏<sup>3</sup>・砂盛 誠<sup>4</sup>

**要旨** **目的**．同時性多発非小細胞肺癌は臨床的に単発肺癌と比較して予後不良といわれている．同時性多発肺癌の臨床病理学的特徴についての検討を試みた．**方法**．平成 10 年 4 月から平成 13 年 7 月までに非小細胞肺癌と診断された 83 例のうち同時性多発肺癌と診断され手術を施行した 7 例（15 病巣）について，癌遺伝子 bcl-2，c-erbB-2，癌抑制遺伝子 p53，細胞周期マーカー Ki-67 を用いて検討した．**結果**．癌遺伝子の発現頻度では bcl-2 陽性は 15 病巣中 4 病巣，c-erbB-2 の高度発現は 80% にみられた．p53 は陽性率 100% でさらに陽性細胞が 10% 以上（Labeling index 10 以上）の高度発現を示す病巣は 73.3% であった．Ki-67 は陽性細胞が 20% 以上（Labeling index 20 以上）の高度発現は 33.3% であった．**結論**．p53 並びに c-erbB-2 の高度発現に関してはその頻度は単発肺癌病巣にくらべ同時性多発肺癌病巣に有意に高い傾向を認めた．一般に予後不良といわれている同時性多発肺癌例では腫瘍側の要因として，一部の癌遺伝子，癌抑制遺伝子のより強い関与が示唆された．また同一個体においては，それぞれの病巣間で p53 と Ki-67 の発現頻度（陽性細胞カウント）に統計学的に有意差を認め，これらの指標を半定量的に評価することで比較的簡便に転移か同時多発かを区別できる可能性が示唆された．（肺癌．2002;42:93-97）

**索引用語** 同時多発肺癌，bcl-2，c-erbB-2，p53，Ki-67

## Clinico-pathological Evaluation for Synchronous Multiple Non-small Cell Lung Cancer

Hiroshi Hosoda<sup>1</sup> ; Hiroyuki Izumi<sup>1</sup> ; Kenichi Atarashi<sup>2</sup> ; Tomoshige Chiaki<sup>2</sup> ;  
Kazuhito Saito<sup>2</sup> ; Naohiro Shinohara<sup>3</sup> ; Makoto Sunamori<sup>4</sup>

**ABSTRACT** **Objective.** The incidence of synchronous multiple lung cancers is reported to be 0.3 to 3.6% in lung cancer patients. It has been reported that synchronous multiple lung tumors (SMPLT) cases had poor prognosis in spite of early diagnosis and exploration. We tried to evaluate the difference of clinical and pathological features between synchronous multiple lung cancers and single non-small cell lung cancers using immunostains for oncogenes, oncosuppressors, and the cell cycle-associated marker of each lesion of lung cancer. **Methods.** We examined 83 patients with non-small cell lung cancer who underwent resection in our hospital from 1998 to 2001. There were 7 patients who had synchronous multiple lung cancer: two patients with squamous/squamous cell carcinoma, three patients with adenocarcinoma/adenocarcinoma and one with three adenocarcinomas and one patient with adenocarcinoma/large cell carcinoma. Immunohistochemical study was performed for the 15 lesions in this group of 7 multiple cancer patients and the group of 36 randomly-selected single non-small cell lung cancer patients who had selected at random and the group of 6 patients who had had pulmonary metastatic lesions. p53, Ki-67, c-erbB-2, bcl-2 were selected for immunostaining of each lesion to investigate the characteristics of synchronous multiple lung cancer. **Result.** The rate of positive immunostain-

北信総合病院 <sup>1</sup>呼吸器外科，<sup>2</sup>内科，<sup>3</sup>病理検査科；<sup>4</sup>東京医科歯科大学大学院外科学講座心肺機能外科学。

別刷請求先：細田 裕，北信総合病院呼吸器外科，〒383-8505 長野県中野市西 1-5-63 (e-mail: hosoda@cocoa.ocn.ne.jp)。

Division of <sup>1</sup>Thoracic Surgery, <sup>2</sup>Internal Medicine, and <sup>3</sup>Pathology, Hokushin General Hospital, Japan; and <sup>4</sup>Department of Thoracic and Cardiovascular Surgery, Tokyo Medical and Dental

University, Japan.

Reprints: Hiroshi Hosoda, Division of Thoracic Surgery, Hokushin General Hospital, 1-5-63, Nishi, Nakano-shi, Nagano-ken 383-8505, Japan (e-mail: hosoda@cocoa.ocn.ne.jp)

Received April 13, 2001; accepted February 4, 2002.

© 2002 The Japan Lung Cancer Society

ing for p53 in SMPLT ( 100% ) was higher than in the single tumor group ( 58.3% ) with statistical significance (  $p < 0.01$  ). The rate of high expression ( LI > 10 ) of p53 in the SMPLT group ( 73.3% ) was higher than in the single tumor group ( 38.9% ) with statistical significance (  $p < 0.05$  ). The rate of high expression of c-erbB-2 in SMPLT ( 80% ) was statistically higher than in the single tumor group ( 33.3% ) (  $p < 0.01$  ). No significant difference was seen for bcl-2 and Ki-67 between the SMPLT group and the single tumor group. There were significant differences in the positive cell counts for p53 and Ki-67 between the 1st tumor and the 2nd or the 3rd tumor in SMPLT patients. On the other hand, there was no statistical significance between the primary tumor and pulmonary metastatic lesions in terms of p53 and Ki-67 cell counts. The expression patterns of c-erbB-2 and bcl-2 was very similar to those of the primary lesion. **Conclusion.** p53 and c-erbB-2 tend to be expressed at a higher rate in SMPLT than single lung cancer. That phenomenon suggested that high expression of tumor associated factors may be related to the poor prognosis of SMPLT after surgery. Semicountatative evaluations for immunostains of p53 and Ki-67 or other antigens may be helpful to distinguish multiple tumors between synchronous multiple primary carcinoma and pulmonary metastasis in cases with the same pathology ( *JJLC*. 2002;42:93-97 )

**KEY WORDS** Synchronous multiple lung cancer, bcl-2, c-erbB-2, p53, Ki-67

## 緒言

原発性肺癌における、同時性多発に関しては、手術症例の 0.3 ~ 3.6%<sup>1-8</sup> に認められるとの報告がある。治療の適応を検討する場合、肺内転移との鑑別が問題となり、症例によっては臨床病期が過大評価される可能性がある。1 昨今ヘリカル CT<sup>3</sup> と胸腔鏡手術の普及に伴い、肺内転移と区別すべき多発原発肺癌に遭遇する機会は増加していると考えられる。今回われわれは、同時性多発肺癌の単発肺癌との相違点並びに診断について免疫組織化学的手法を用いて検討し、若干の文献的考察を加えた。

## 方法

当施設において平成 10 年 4 月から平成 13 年 7 月までの 40 カ月間に手術を行った非小細胞肺癌症例 83 例のうち、同時多発肺癌と診断された 7 症例 ( 15 病巣 ) について癌関連遺伝子産物、細胞周期マーカー等を用いて組織学的な特徴について検討した。同時多発癌としての診断基準に関しては、Martini と Melamed<sup>1</sup> らの定義にしたがった ( Table 1 )。

症例は男性 6 例、女性 1 例で平均年齢は  $69.1 \pm 8.9$  歳、扁平上皮癌/扁平上皮癌 2 例 ( 4 病巣 )、腺癌/腺癌 3 例 ( 6 病巣 )、腺癌/腺癌/腺癌 1 例 ( 3 病巣 )、腺癌/大細胞癌 1 例 ( 2 病巣 ) であった。それぞれ術後の切除標本について、腫瘍増殖マーカーとして Ki-67 ( Immunotech 社製、MIB-1 ) をまた癌遺伝子関連蛋白として bcl-2 ( DAKO 社製 clone-124 )、c-erbB-2 ( NOVO Castra 社製 CB11 )、癌抑制遺伝子の p53 ( DAKO 社製 DO-7 ) を用いた。それぞれの標本はホルマリン固定パラフィン包埋切片を使用し、抗原の賦活化にはマイクロウエーブを照射した。また免疫組織化学的手法を用い、同時多発の特徴があるかどうか

**Table 1.** Criteria for diagnosis of multiple primary lung cancer

### Synchronous tumors

- 1 . Tumors physically distinct and separate
- 2 . Histology
  - a . different
  - b . same, but in different segments if
    - ( 1 ) origin from carcinoma in situ
    - ( 2 ) no carcinoma in lymphatics common to both
    - ( 3 ) no extrapulmonary metastasis at time of diagnosis

について検討をした。bcl-2 に関しては陽性群と陰性群、c-erbB-2 に関しては腫瘍部分の面積比で 60% 異常染色された標本を高度発現 (  $\equiv$  ) と 60% ~ 30% を中等度陽性 (  $\equiv$  ) とし 30% 以下を軽度発現 (  $\equiv$  ) とした。p53 と Ki-67 は無作為に選んだ強拡大 1 視野あたり 400 個の細胞をカウントし、そのうちの陽性細胞個数を 5 視野にわたり計測した ( 1 切片あたり総計 2000 個 )。なお各標本の labeling index は上記 5 視野の計測値の平均として評価した。p53 に関しては labeling index ( LI ) が 10 以上を高度発現<sup>12</sup> とし、Ki-67 に関しては LI が 20 以上を高度発現<sup>15</sup> とした。コントロール群は同時期に行った非小細胞肺癌症例 臨床病期 I 期 ~ II 期 77 例のうち、術前化学療法を行っていない症例から 36 例 : 年齢 43 歳 ~ 83 歳 ( 平均  $68.9 \pm 9.4$  歳 ) までの ( 腺癌 26 例、扁平上皮癌 8 例、大細胞癌 2 例 ) を無作為に抽出し、同様の方法で評価を行った。同時多発肺癌群と単発肺癌群の比較には Fisher の直接法による検定 ( F test ) を用い、 $p < 0.05$  を有意とした。また多発肺癌症例の個々の病巣間の比較は 2 群比較は Mann Whitney 'U test また、3 群比較には Kruskal Wallis test を用いて検定を行い、それぞれ  $p < 0.05$  を有

**Table 2.** Clinical and pathological features of the synchronous multiple lung cancer patients

pt.	age	sex	tumor	location	pathology	stage	p53 cell count	ki-67 cell count	c-erbB-2	bcl-2	
(1)	56	m	1st tumor	LUL	md-AD	T1N0	5.6 ± 2.0	5.6 ± 0.8 } p < 0.01	+++	-	
			2nd tumor	LLL	md-AD	T1N0	20.4 ± 2.2				14.9 ± 4.4
(2)	77	f	1st tumor	RML	md-AD	T1N0	13.4 ± 4.3	3.8 ± 2.4 } N.S	+++	-	
			2nd tumor	LUL	wd-AD	T1N0	1.0 ± 0.3				1.4 ± 0.4
(3)	64	m	1st tumor	RLL	md-AD	T1N0	25.4 ± 1.2	9.6 ± 1.4 } p < 0.01	+++	-	
			2nd tumor	RLL	wd-AD	T1N0	1.8 ± 0.2				14.4 ± 2.0
(4)	75	m	1st tumor	RUL	wd-AD	T1N0	23.4 ± 9.1	1.3 ± 0.8 } p < 0.01	-	-	
			2nd tumor	RUL	pd-AD	T1N2	12.2 ± 2.9				26.5 ± 11.3
			3rd tumor	RML	wd-AD	T1N0	0.8 ± 0.5				1.0 ± 0.7
(5)	81	m	1st tumor	LUL	pd-AD	T2N0	21.2 ± 1.2	52.4 ± 4.9 } p < 0.01	+++	+	
			2nd tumor	LUL	large cell	T1N0	95.9 ± 2.2				29.1 ± 3.0
(6)	68	m	1st tumor	RUL	wd-SQ	T1N0	84.2 ± 8.8	15.5 ± 2.0 } p < 0.05	+++	-	
			2nd tumor	RLL	md-SQ	T2N0	99.8 ± 0.5				23.9 ± 6.6
(7)	63	m	1st tumor	RUL	pd-SQ	T1N0	77.7 ± 12.9	29.8 ± 6.6 } p < 0.01	+++	+	
			2nd tumor	RLL	md-SQ	T2N0	43.9 ± 5.6				5.9 ± 2.1

pt indicates patient; LUL, left upper lobe; LLL, left lower lobe; RUL, right upper lobe; RML, right middle lobe; RLL, right lower lobe; wd, well differentiated; md, moderately differentiated; pd, poorly differentiated; AD, adenocarcinoma; SQ, squamous cell carcinoma; LI, labeling index; and N.S., no significant.

**Table 3.** Comparison of immunohistochemical studies between synchronous multiple lung tumors and single lung cancer

	Synchronous Multiple Lung Tumors n = 15 lesions	Single Lung cancer n = 36 lesions	
p53 positive	100%	58.3%	p < 0.01
p53 (LI > 10)	73.3%	38.9%	p < 0.05
Ki-67 (LI > 20)	33.3%	50.0%	N.S.
c-erbB-2 high expression	80.0%	33.3%	p < 0.01
bcl-2 positive	26.7%	19.4%	N.S.

LI indicates labeling index; and N.S., not significant.

意とした。

当院における組織学的に肺内転移を有した肺切除症例 6 例に関しても、原発巣ならびに転移巣に対して同様の検討を行い、同一組織型同時多発肺癌と比較検討した。肺内転移巣と断定する基準は、主病巣と同一区域内に非連続性に存在し、同一組織型でかつ、転移病巣が脈管の一部に関与しており、組織学的肺内転移であることが明かな病巣とした。

## 結 果

以上の症例(1)から症例(7)までの 15 病巣に関して免疫組織科学的に検討の結果を Table 2 に示す。同時多発肺癌病巣の p53 の陽性率は 100% であったが labeling index で 10 以上の高度発現病巣は 73.3% であった。Ki-67 は labeling index が 20 以上の病巣は 33.3% であった。c-erbB-2 は、全病巣で陽性であったが、高度発現病巣は、15 病巣中 12 病巣で 80% であった bcl-2 は 15 病巣中 4 病巣陽性であった。これらの結果を単発肺癌症例群と

比較すると、p53 の陽性率、並びに p53 の高度発現頻度は有意に単発群より高い傾向を示し、また c-erbB-2 の高度発現に関しても同時多発癌に高い傾向を示した。Ki-67 及び bcl-2 に関しては有意差を認めなかった (Table 3)。

個々の症例に関する多発病巣については 1 個体の各病巣における p53 の陽性細胞数は病巣間で統計的有意差を認めた。Ki-67 では陽性例の少ない 1 例 (症例 2) 以外は統計的有意差を認めた。c-erbB-2 では 2 例に差を認め、bcl-2 は 2 例で発現の差を認めた (Table 2)。病理学的に肺内転移を認めた症例 6 例 (当院例) の 12 病巣に対して、同時多発癌と同様の検討を行ったところ原発巣と転移巣において p53, Ki-67 の陽性細胞数では、6 症例すべて各個体の病巣間に統計的有意差を認めなかった。また c-erbB-2, bcl-2 とともに発現程度はほぼ一致していた (Table 4)。

## 考 察

多発肺癌症例の頻度に関しては、手術例の 0.3 ~ 3.6

**Table 4.** Pathological features of the patients of the lung cancer with pulmonary metastasis

pt.	age	sex	tumor	pathology	p53 cell count	ki-67 cell count	c-erbB-2	bcl-2
(1)	83	m	primary tumor metastatic tumor	pd-AD	0.0 ± 0.0 } N.S 0.0 ± 0.0 }	2.8 ± 0.9 } N.S 3.0 ± 0.6 }	+	-
(2)	67	f	primary tumor metastatic tumor	md-AD	1.3 ± 0.1 } N.S 1.5 ± 0.6 }	1.3 ± 0.7 } N.S 0.6 ± 0.4 }	+++	-
(3)	75	m	primary tumor metastatic tumor	md-SQ	32.1 ± 11.6 } N.S 40.3 ± 10.6 }	36.4 ± 6.6 } N.S 28.7 ± 5.0 }	++	-
(4)	65	m	primary tumor metastatic tumor	md-AD	0.0 ± 0.0 } N.S 0.0 ± 0.0 }	25.6 ± 4.6 } N.S 25.0 ± 3.3 }	+	-
(5)	57	m	primary tumor metastatic tumor	md-AD	0.0 ± 0.0 } N.S 0.0 ± 0.0 }	25.0 ± 3.3 } N.S 24.5 ± 2.3 }	+++	-
(6)	60	m	primary tumor metastatic tumor	wd-AD	95.3 ± 1.4 } N.S 94.1 ± 2.1 }	28.5 ± 2.6 } N.S 26.3 ± 2.2 }	++	-

pt indicates patient; wd, well differentiated; md, moderately differentiated; pd, poorly differentiated; AD, adenocarcinoma; SQ, squamous cell carcinoma; LI, labeling index; and N.S., no significant.

%<sup>1-8</sup> と稀である。報告例の年次変化をみると近年増加傾向にあると思われる。<sup>3</sup> 実際の臨床で、異時性多発肺癌（いわゆる second primary）に関しては、頻度も比較的高く<sup>1,2,4-7</sup> 経験する場面も多い。報告されている治療成績も比較的満足すべきものではないかと考えられている。<sup>7</sup> しかしながら同時性多発肺癌の予後に関しては、早期の診断にもかかわらず、病期 I 期の 5 年生存率では 0 ~ 44 %<sup>1,2,4,6,7,10</sup> と不良である。また予後の面から同時性多発肺癌は臨床病期分類を上げ、必要に応じて術前化学療法を考慮すべきとの意見もある。<sup>6</sup> 多肺葉にわたる病巣に対する治療法の限界と肺内転移病巣の包含の可能性をバイアスとして考慮すべきではあるが、今回の検討でも同時多発肺癌症例の 8 例中 7 例（87%）は長期間の重喫煙歴をもっており、有意差はないものの、単発肺癌症例では 36 例中喫煙者 23 例（64%）と比較しても高頻度であった。喫煙をはじめとする外的要因により、発生源地である気管支並びに肺組織に何らかの異常が起こっている可能性<sup>14</sup> は否定できない。

同時多発肺癌において p53 の陽性頻度は高いという報告<sup>11,12</sup> はわれわれ以外にもみられるが、同時性多発肺癌においては p53 の陽性頻度が異時性のそれより高いという報告<sup>13</sup> もあり同時性多発肺癌における p53 の陽性頻度の高さは多発肺癌における生物学的特徴を示していると考えられる。われわれの結果で同時多発肺癌では p53 以外にも c-erbB-2 の発現頻度が単発肺癌に比して高い傾向を認めた。現在では、p53 の過剰発現は分子生物学的な肺癌の予後不良因子とされており<sup>16,17,19</sup> また c-erbB-2 の過剰発現も同様に予後不良の分子生物学的マーカーとされている。<sup>18,19</sup> flow cytometry を用いた同時多発肺癌の研究で多発肺癌では DNA の ploidy の変化が強く認められる傾向があるとの報告<sup>11</sup> から同時多発肺癌は、単発肺癌の群と比較して分子生物学的な意味で予後不良の可能性が高いと思われる。

今回得られた結果から、同時多発非小細胞肺癌の検討に付随して p53 や Ki-67 の陽性細胞数のカウントや c-erbB-2, bcl-2 等の発現頻度の組み合わせが応用できる可能性についても言及したい。同時多発肺癌の診断に関しては p53 の変異パターンを解析し Polymerase Chain Reaction (PCR), single-strand conformation polymorphism による p53 遺伝子の変異の差を用いたり<sup>13</sup> DNA の ploidy の変化を証明すること<sup>11</sup> が、同一組織型多発肺癌に関しては確実性の高い方法と考えられる。しかしこれらは必ずしも簡便とは言い切れない。われわれは p53 や Ki-67 に対する陽性細胞の計測を行い半定量的に腫瘍の特徴を評価し、また c-erbB-2, bcl-2 を用いて定性的にも評価を試みた。

今回の検討では同時多発肺癌の病巣間で p53 の陽性率は統計学的に有意差を認め、また Ki-67 に関しても、7 症例中 6 例までが有意差を認めた。c-erbB-2 や bcl-2 に関しては相違があれば判断の材料になると考えられた。一方、肺内転移巣と原発巣との同様の比較では、p53 及び ki-67 陽性細胞のカウントで腫瘍間に有意差を認めず、また c-erbB-2, bcl-2 の発現程度も原発巣と転移巣で差を認めなかった。

通常、肺内転移病巣は、周囲組織との関係、組織構築などから診断が容易なことが多い。しかしながら、同一組織型の同時多発肺癌と鑑別を要する場合、p53, Ki-67, c-erbB-2, bcl-2 を用いた免疫組織科学的な半定量的評価や発現率の組み合わせも診断に応用できる可能性を示唆していると考えられた。

## REFERENCES

1. Martini N, Melamed MR. Multiple primary lung cancers. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 1975;70:606-612.
2. Ferguson MK, DeMeester TR, DesLauriers J, et al. Diagnosis and management of synchronous lung cancers. *J*

- Thorac Cardiovasc Surg.* 1985;89:378-385.
- 3 . 栗山啓子, 三谷 尚, 鳴海善文, 他 . 同時性肺多発癌(末梢型腺癌)に対する高分解能 Thin-section CT の応用 . 日本医放会誌 . 1988;48:687-693.
  - 4 . Verhagen AF, van de Wal HJ, Cox AL, et al. Surgical treatment of multiple primary lung cancers. *Thorac Cardiovasc Surgeon.* 1989;37:107-111.
  - 5 . Rohwedder JJ, Weatherbee L. Multiple primary bronchogenic carcinoma with a review of the literature. *Am Rev Resp Disease.* 1974;109:435-445.
  - 6 . Pommier RF, Vetto JT, Lee JT, et al. Synchronous non-small cell lung cancers. *Am J Surg.* 1996;171:521-524.
  - 7 . Mathisen DJ, Jensik RJ, Faber LP, et al. Survival following resection for second and third primary lung cancers. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1984;88:502-510.
  - 8 . Wang X, Christiani DC, Mark EJ, et al. Carciogen exposure, p53 alteration, and K-ras mutation in synchronous multiple primary lung carcinoma. *Cancer.* 1999;85:1734-1739.
  - 9 . 下里幸雄 . 肺癌 その組織発生, 分化, 予後因子について . 日病会誌 . 1983;75:29-57.
  - 10 . Rosengart TK, Martini N, Ghosn P, et al. Multiple primary lung carcinoma: prognosis and treatment. *Ann Thorac Surg.* 1991;52:773-779.
  - 11 . Ichinose Y, Hara N, Ohta M, et al. Synchronous lung cancers defined by deoxyribonucleic acid flow cytometry. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1991;102:418-424.
  - 12 . Matsuzoe D, Hideshima T, Ohshima K, et al. Discrimination of double primary lung cancer from intrapulmonary metastasis by p53 gene mutation. *Br J Cancer.* 1999;79:1549-1552.
  - 13 . Hiroshima K, Toyozaki T, Kohno H, et al. Synchronous and metachronous lung carcinomas: molecular evidence for multicentricity. *Pathol Int.* 1998;48:869-876.
  - 14 . 米山武志, 小池 薫, 江口研二, 他 . 肺癌の bed side epidemiology 臨床的重複癌の分析 . 日胸 . 1984;43:733-741.
  - 15 . Siba M, Kohno H, Kakizawa K, et al. Ki-67 immunostaining and other prognostic factors including tobacco smoking in patient with resected non-small cell lung carcinoma. *Cancer.* 2000;89:1457-1465.
  - 16 . Quinlan DC, Daviddson AG, Summaers CL, et al. Accumulation of p53 protein correlates with a poor prognosis in human lung cancer. *Cancer Res.* 1992;52:4828-4831.
  - 17 . Horio Y, Takanashi T, Kuroishi T, et al. Prognostic significance of p53 mutation and 3p deletions in primary resected non-small cell lung cancer. *Cancer Res.* 1993;53:1-4.
  - 18 . Tateishi M, Ishida T, Mitsudomi T, et al. Prognostic value of c-erbB-2 protein expression in human lung adenocarcinoma and squamous cell carcinoma. *Eur J Cancer.* 1991;27:1372-1375.
  - 19 . Strauss GM, Kwiatkowski DJ, Harpole DH, et al. Molecular and pathologic markers in stage I non-small-cell carcinoma of the lung. *J Clin Oncol.* 1995;13:1265-1279.