

宿題報告

# 細胞核内 DNA 分析による癌の悪性度分類に関する研究 —胃および食道癌を対象として—

福岡大学第2外科

三戸 康郎 平塚 隆三 土器 辰雄

## CYTOPHOTOMETRIC STUDY OF THE DNA CONTENT IN CANCER CELL NUCLEI OF THE STOMACH AND THE ESOPHAGUS IN ASSOCIATION WITH THEIR MALIGNANCY GRADING

Yasuo SANNOHE, Ryuzo HIRATSUKA and Tatsuo DOKI

Second Department of Surgery, Fukuoka University School of Medicine

胃癌113症例および食道癌40例について、顕微分光側光法（落射蛍光法）により、それぞれの癌細胞核 DNA 量を測定し、その histogram の分析から4型の DNA Histogram Pattern を分類し、DNA 量からみた癌の悪性度分類につき検討した。胃癌は DNA Histogram Pattern II型を示すものが多く（46%）、なかでも表層拡大発育型（Super）型胃癌25例は84%がI型を示し、深部浸潤発育型（Pen）胃癌14例ではIII、IV型を示すものが57.2%と多かった。胃切除術後の累積生存曲線でもI型の5生率が70.7%、II型が46.5%、III型が35.8%、IV型が30.9%とDNA量が増すにつれて胃癌の悪性度もまじり予後不良であった。食道癌でも同様の傾向がみられたが、ことにIII、IV型が全体の55%を占め、胃癌より悪性度が強い印象を与えた。胃癌、食道癌ともに DNA Histogram Pattern はリンパ管侵襲所見の程度と強い相関を示した。

索引用語：胃癌，食道癌の核 DNA 量分析，DNA Histogram Patter，癌の悪性度

### はじめに

ヒトの悪性腫瘍は、細胞学的にみれば、体細胞を構成する正常細胞の一部が何らかの原因によって悪性化し、無制限に増殖するようになった1つの細胞集団であって、腫瘍の本態はその臓器を構成する細胞そのものに由来することは異論の余地のない処である。従って細菌感染などのような外敵に対する生体反応とは異って、腫瘍細胞の異常増殖は、正常体細胞の染色体レベルの変化によって惹起されるものと考えられる。このような染色体学的な特徴を各個体の癌腫について詳細に分析して癌腫の性格付けを行い、癌の鑑別診断ならびに治療の選択、適応の面に役立てようというのが本研究の目的である。ヒトの染色体研究は、1956年 Tjio & Levan<sup>1)</sup> が、

さらに1960年には牧野<sup>2)</sup>が組織培養により“ヒトの体細胞の染色体数が46である”という新しい事実を報告して以来飛躍的な発展を遂げ、染色体の数のみならず染色体の1つ1つの形態が正確に分析されるようになった。チャニーズハムスターやマウスを用いた動物実験でも正常体細胞を構成する細胞では、動物の種類によってそれぞれ固有な形態を有する染色体を含む細胞が圧倒的に高い頻度で存在し、この細胞が組織の増殖の主体となり、その種固有の染色体上の遺伝子が増殖の舵を取っていると考えられるようになった。一方腫瘍細胞における染色体研究については、1951年牧野<sup>3)</sup>は吉田肉腫の染色体を詳細に研究し、腫瘍細胞においても正常体細胞の染色体ともまた腫瘍相互間でも異った特有な一定の染色体数と

染色体構成を示す細胞が高頻度に存在し、これがその腫瘍の増殖の主体をなし、腫瘍の性格を支配すると考え、これを種族細胞 (stem cell) であるという概念を提唱した。ヒト腫瘍における染色体研究は、遊離した核分裂像の多い胃癌を中心とする癌性腹水を中心に進められた。牧野<sup>2)</sup>らによる胃癌患者の癌性腹水より得られた染色体 Histogram 分析によると75本の染色体数を有する細胞を種族細胞として、43本から93本まで広く分布している。このようにヒト胃癌細胞の染色体構成も、宿主の正常体細胞 (46本) とは明らかに異なった高倍数性の染色体および特異な形態を示す染色体型をもった細胞が種族細胞となっており、癌腫の増殖の主体をなしていることが明らかとなった。一方、正常体細胞の核酸すなわち RNA と DNA のうち、RNA は細胞内にあってとくに活動的な物質で量的な変化がはげしいが、DNA は核内にあって、細胞の代謝過程における作用の影響を受けず、非常に安定していることから、1948年 Boivin<sup>4)</sup>らは“DNA constancy theory”として同一種の生物の組織において、DNA は極めて一定の値を示し、また、生殖細胞における DNA 量は体細胞の DNA 量の1/2の値を示すと報告している。このことは染色体の重要構成物質が DNA であり、核内における DNA 量は染色体1対ごとに定った値を示すことを裏書きしている。ヒトの各種臓器の固形腫瘍よりの染色体標本作製の技術は、いまだそれらの純粋組織培養が困難であると同様に極めて困難視されており、最近ではこれら固形腫瘍染色体の間接的観察方法として、細胞核内 DNA 量の測定による倍数性の判定が信頼出来るものとして用いられている。

著者らは胃癌および食道癌の染色体レベルでの細胞学的分析を癌細胞核内 DNA 量を測定し検討し、興味ある結果を得たので報告する。

#### 対象および方法

対象症例は萎縮性胃炎5例、胃潰瘍3例、胃 ATP 病変4例、胃癌 (腺癌) 113例および食道癌40例 (扁平上皮癌39例、燕麦細胞癌1例) である。いずれも切除後固定標本を用いたが、DNA 量測定のための標本作製方法としては、切除癌腫10%ホルマリン固定標本より切り出されパラフィン包埋されたブロックより、6micron および30micron の2種類の切片を作成し、6micron 切片の Hematoxylin-eosin 染色標本により癌腫の病巣部の範囲を参照しながら、脱パラフィン・Hematoxylin 染色を施した30micron 切片より、肉眼的あるいは拡大鏡使用下に癌巣部を摘出し、これを細片となし、Potter の

Homogenizer 中に入れ、手動的に homogenization する。このようにして得られた Homogenate を10分間1,500rpm で遠沈した後、上澄み液を除き、沈渣を卵白グリセリンを塗布したスライドガラスの中央に塗抹し、ドライヤーで乾燥させる。同時に同一患者の転移のないリンパ節より同一処理をして得られたリンパ球沈渣を同一スライドの端に塗抹乾燥させコントロールとした。以上の塗抹標本に Feulgen 染色を施し、さらに固有蛍光の除去と核 DNA の Feulgen 蛍光の安定化の目的で1kw の超高圧水銀灯による543nm の波長の緑色光で12時間 post-irradiation する。

以上のようにして得られた Feulgen 染色標本を Olympus MMSP-FR による落射蛍光測定法により核 DNA 量測定を行うが、リンパ球については50~100個を、裸核となって分離された癌細胞核については100~200個の細胞核内 DNA 量を測定した。

測定されたリンパ球の核 DNA 量の平均値をコントロールとし、正常2倍数域値 (2C) とし、各疾患細胞核 DNA 量の相対値を求め、各倍数値を決定した。

### 成 績

#### 1. 胃良性疾患細胞における DNA 量

図1左は正常人10症例のリンパ球1,000個および、胃の萎縮性胃炎5例500細胞・胃潰瘍3例の潰瘍辺縁再生上皮細胞300個の細胞核内 DNA 量の histogram を示したものである。mode となる Peak 値は両者共に 2C であるが、その出現頻度は、コントロールのリンパ球では76%と高頻度を示すのに比べ、胃上皮細胞では、再生上皮細胞を含み、それらの有糸分裂という活動を、それに伴う DNA 合成過程が存在するので2倍数域 (diploid) の DNA 量を有する細胞は53.6%とやや頻度が下降し、高2倍数域細胞が41.1%に、また3倍数域細胞も5%前後に散見されるようになる。

図1右は、いわゆる ATP (良性悪性境界領域病変) 病変4症例、細胞400個の DNA 量を個別に積み重ねた histogram である。mode 値は2倍数域 (正常値) にはなく、2倍数域以上2.5倍数域までの間の値を示す、いわゆる高2倍数域 (hyperdiploid) 値を示すものが48.3%と最も高頻度となり、2倍数域細胞は6%にすぎず、さらに低3倍数域細胞が31.3%、3倍数域以上の値を示すものが15%にみられるようになる。

#### 2. 胃癌細胞における DNA 量

##### A) 胃癌症例113例における DNA モード値

図1 リンパ球, 胃上皮細胞, ATP 上皮細胞の DNA ヒストグラム

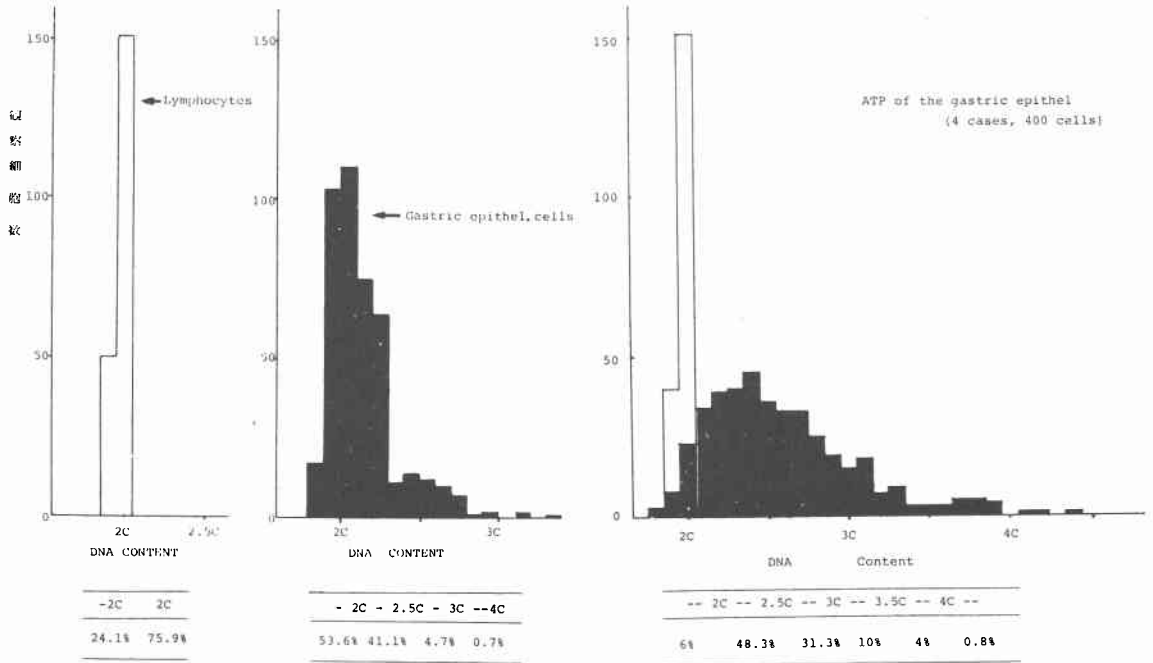
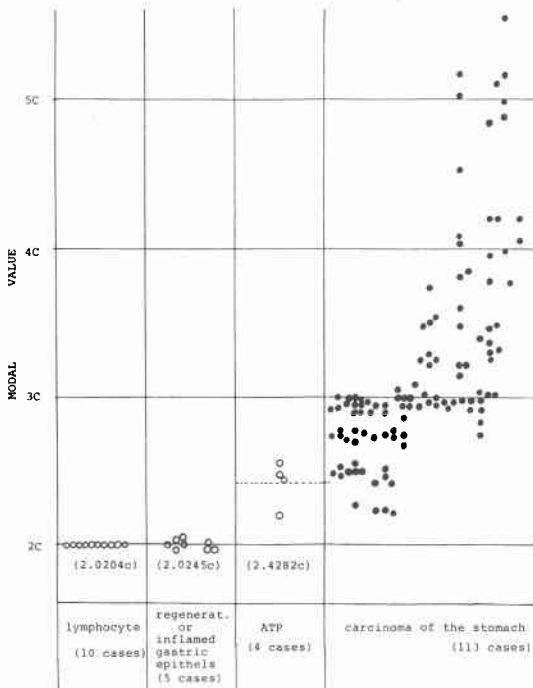


図2 胃炎, ATP 病変, 胃癌症例における DNA Mode 値



胃癌113例の各症例における癌細胞核 DNA 量測定によりえられた histogram の評価を、出現頻度別の平均 DNA 値を考慮した mode 値で代表させ表わしてみると、図2に示すように、リンパ球、胃炎、ATP などにおける DNA-mode 値に比較し、明らかに異常に高い高2倍域から高5倍域にかけての DNA-mode 値を示している。これら胃癌113症例の中、長径2cm以上の広いⅡc様の拡がりを示すいわゆる表層拡大発育型胃癌 (superficial spreading type or Super型) 25例と、長径2cm以上4cm未満のⅡa+Ⅱcまたは BorrmannⅡ型小胃癌で高分化型腺癌が胃壁深層に向って肥大増殖を示す small penetrating type (Pen型) 14例とを、それぞれ○印、⊗印で示してみると(図3)、Super型胃癌の84%が3C以下すなわち低3倍域に mode 値を有し、Pen型胃癌では14例中12例(85.7%)が高3倍域から高5倍域にかけて高い DNA-mode 値を示している。しかし一方では●印で示したその他の胃癌でも半数以上が3C乃至低3倍域の mode 値を示し、mode 値のみからは Super型との DNA 量の差を論ずることは不可能である。

B) DNA Histogram Pattern の分類

従来、DNA histogram の評価の方法には、mean value

図3 胃癌113症例の DNA Mode 値

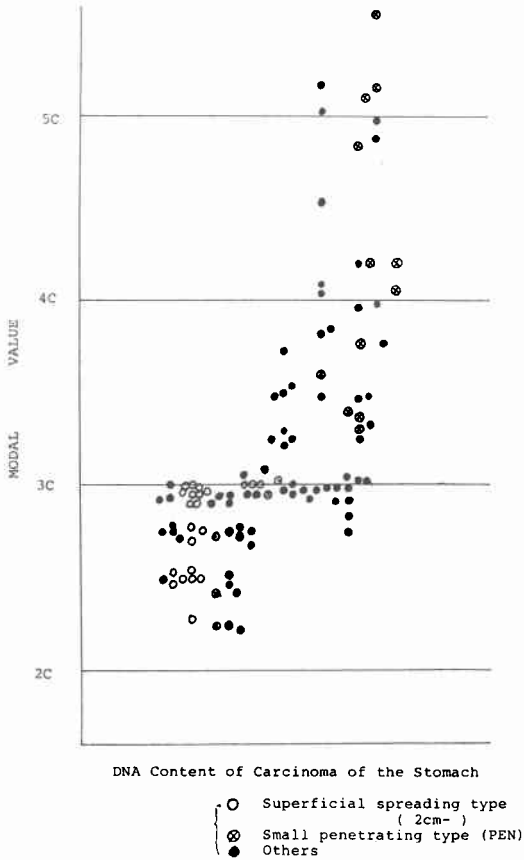


図4-a 低・未分化型腺癌における DNA Mode 値と Histogram Pattern

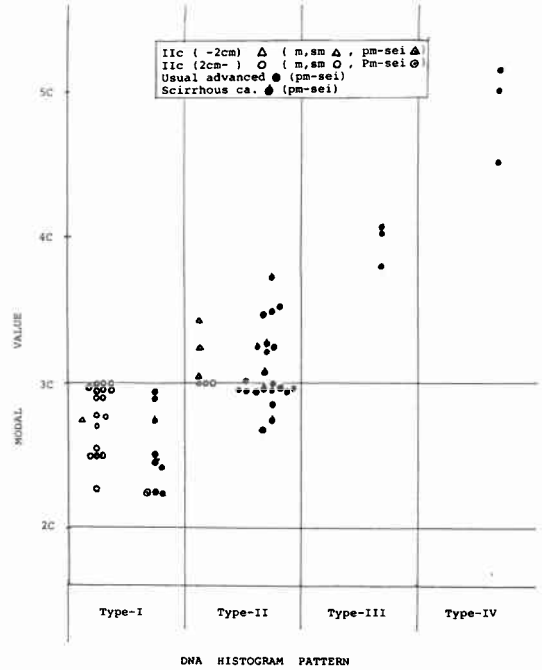
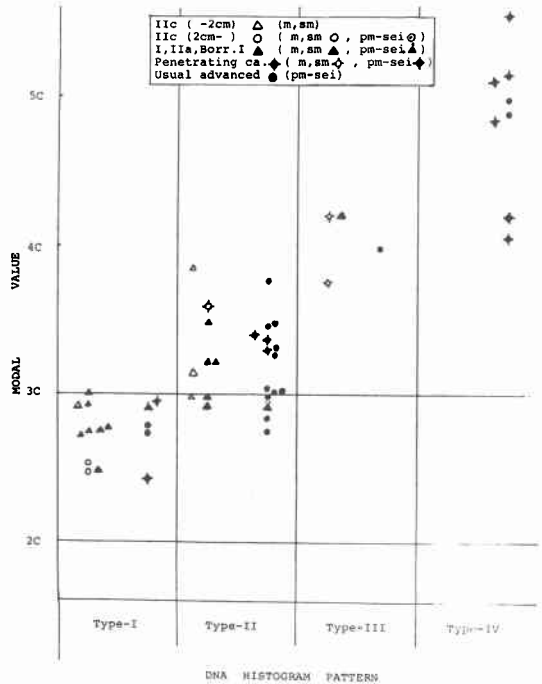
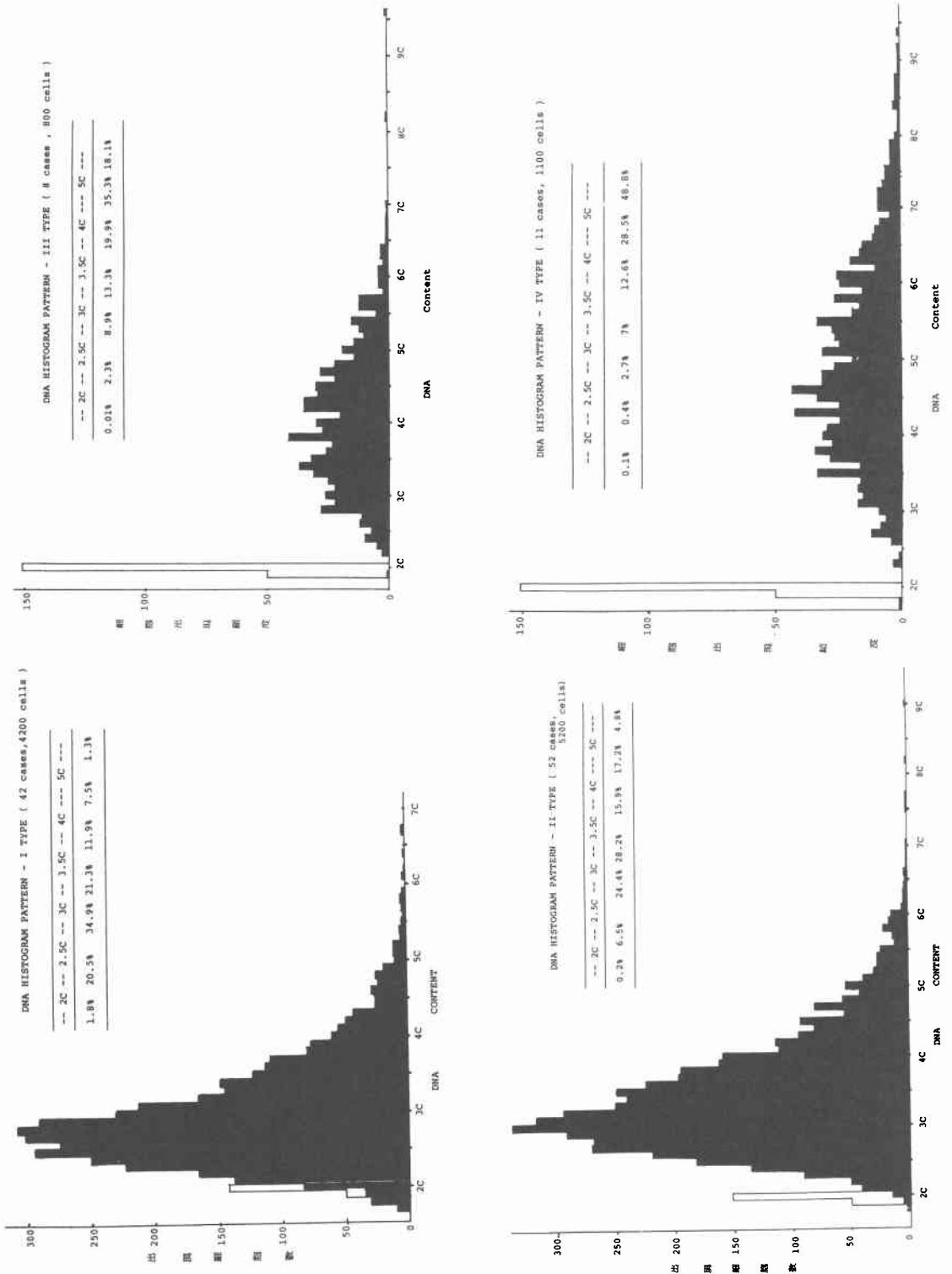


図4-b 高・中分化型腺癌における DNA Mode 値と Histogram Pattern



(中央値)で表す場合や、出現頻度別の平均値を考慮した mode 値及び最も高頻度にみられる倍域値をもって代表させる peak value が用いられているが、これらの評価方法では Peak 値の周辺に出現する DNA 量をもつ細胞の頻度すなわち分散の幅があまり考慮に入れられておらず、ことに癌細胞の DNA 量では4乃至6倍域領域の細胞の出現頻度が重要な意味を有すると考えられる処から、われわれは独自に mode 値と分散の幅を加味した DNA Histogram Pattern の4型を分類した。まず測定された各細胞の DNA 量を、低2倍域、高2倍域、低3倍域、高3倍域、低4倍域、4倍域以上の6つの倍域に区分し、各倍数域区分における細胞の出現頻度を算出して、4型の DNA Histogram Pattern を作成した。すなわち Peak 値が2~3倍域内にあり、3倍域以上の DNA 量を有する細胞の出現頻度が全体の50%を超えないものをI型とし、Peak 値が2~3倍域内にあって

図5 胃癌(113症例)のDNA Histogram Pattern 各型の細胞積重ね histogram



も、3倍以上のものの出現頻度が50%を超えるか、Peak値が3~4倍域内にあって、しかも4倍域以上のDNA量を有する細胞の頻度が40%を超えないものをⅡ型、Peak値が4~6倍域の間にある、4倍域以上を示す細胞の出現頻度が60%を超えないものをⅢ型、60%を超えるものをⅣ型とした。

### C) 胃癌の DNA Histogram Pattern

以上の DNA Histogram Pattern に準じて、胃癌113症例を mode 値との関連で分けてみると、まず、低分化型あるいは未分化型腺癌61例では、図4-aに示す如く Super 型（直径2cm以上のⅡc病変）22例中18例（82%）が DNA Histogram Pattern I型を示し、その他の胃癌で mode 値が3倍域以下のもの20例では、I型が8例、Ⅱ型が12例と同じ低3倍域の mode 値を示していてもⅡ型になるものが多かった。△印で示した長径2cm以下のⅡc（潰瘍辺縁に共存する微小印環細胞型 m~sm 胃癌）4例中3例は、DNA mode 値が高3倍域にあり、DNA Histogram Pattern もⅡ型を示し、将来必ずしも superficial type に移行してゆくとは限らないという感じをいだかせた。次に高分化型あるいは中分化型腺癌52例についてみると（図4-b）、DNA Histogram Pattern I型を示す15例中8例が△印で示したI、Ⅱa型あるいは Borrmann I型の隆起性病変であり、また7cm以上の長径をもつⅡc胃癌3例もI型に属している。Pen 型胃癌14例についてみると、DNA Histogram Pattern I型が2例、Ⅱ型が4例、Ⅲ型が2例、Ⅳ型が6例とⅣ型に最も高頻度に認められ、その悪性度を思わせる。△印で示した長径2cm以下のⅡc 4例はいずれも sm の微小早期胃癌であるが、その中3例が DNA Histogram Pattern Ⅱ型を示し、高3倍域の DNA mode 値を示している。胃癌113例全体でみると、胃癌のDNA量はⅡ型の DNA Histogram Pattern を示すものが比較的多い（46%）傾向にあり、結局長径2cm以上のⅡc（Super 型）25例中21例（84%）が DNA Histogram Pattern I型を、Pen 型14例中12例（85.7%）がⅡ~Ⅳ型を示した。また長径2cm以下のⅡc（mまたはsm 胃癌）8例中ではI型は2例にすぎず、Ⅱ型が6例と微小病変においてすでに癌細胞の悪性度が規定されているような印象を与えた。

図5は、DNA Histogram Pattern I型からⅣ型までの各々の細胞積み重ね histogram 及び各倍域における細胞の出現頻度を表わしたものである。DNA Histogram Pattern I型42例4,200個の細胞核 DNA 量の mode 値

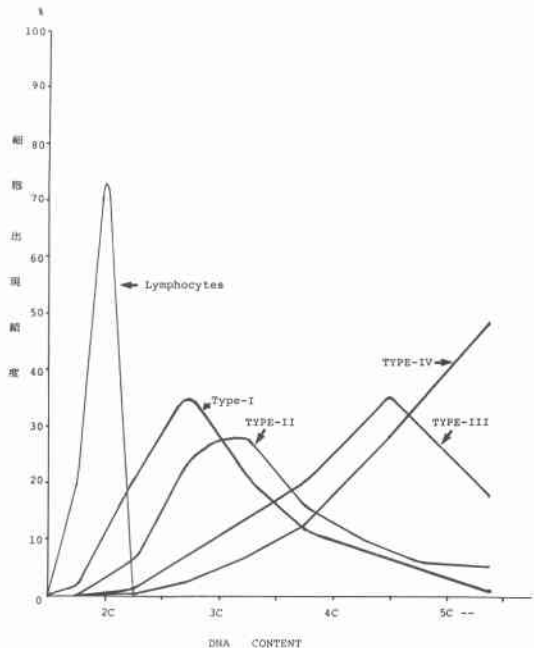
は低3倍域で34.9%と最も高く、高3倍域で21.3%、低4倍域では11.9%と徐々に低下し、4倍域以上のものは8.9%にすぎない。Ⅱ型52例5,200個の細胞の DNA mode 値は高3倍域（28.2%）にあり、低4倍域が15.9%、4倍域以上が22%とI型に較べ増加して来るが6倍域以上のDNA量を示す細胞は極く稀である。DNA Histogram Pattern Ⅲ型8例800個の細胞では、DNA mode 値は4倍~5倍域内にあって35.3%の出現頻度を示しているが、種族細胞が不明確となり、3倍域から5倍域にかけて群雄割拠の様相を呈して来る。しかしその分散の幅は7倍域以内に止っている。Ⅳ型11例1,100個細胞核 DNA histogram ではさらにこの傾向が強くなり、mode 値となる4~5倍域以内の頻度は28.5%と低く5倍域から9倍域にかけて幅広い分散傾向を示してくる。したがって5倍域以上の出現頻度は48.8%と高くなっている。

以上の4型を DNA Histogram Pattern 曲線で表わしてみると、図6に示す如く、I型とⅢ型が鏡面像を描き、Ⅱ型が中間に位し、Ⅳ型が高倍域に向って急上昇して行くのが明らかである。

### D) 胃癌の病理組織学的諸因子・予後と DNA Histogram Pattern との関係

切除胃癌病巣にみられる諸種の病理組織学的予後反映

図6 胃癌の DNA Histogram Pattern 各型



因子と DNA Histogram Pattern との相間について検討してみた。まず癌の胃壁深達度との関係では、IV型においては m, sm 例がなく Se~Si 例 (72.7%) が多い傾向がみられたが、それらの頻度も II 型の Se-Si 例 (59.6%) の頻度との間に有意の差がなく、I 型~III 型においてみられる様に、深達度が深くなる程 DNA 量が増すというような明らかな相関はなく、両者の相関率は26%と低率であった (表1)。

表1 胃癌の壁深達度と DNA Histogram Pattern

DNA Histogram Pattern	胃壁深達度			
	m	sm	pm-sm	se-si
I (42)	14 (33.3%)	12 (28.6%)	6 (14.3%)	10 (23.8%)
II (52)	10 (19.2%)	6 (11.6%)	5 (9.6%)	31 (59.6%)
III (8)	2 (25.0%)	2 (25.0%)	1 (12.5%)	3 (37.5%)
IV (11)	0	0	3 (27.3%)	8 (72.7%)

表2 胃癌のリンパ管侵襲所見・リンパ節転移の程度と DNA Histogram Pattern

DNA Histogram Pattern	Lymphatic permeation		Lymph node metastasis	
	ly(-)	ly(+)(1y2-3)	n(-)	n(+)(n2-3)
I	85.7%	14.3%(11.9%)	76.2%	23.8%(16.7%)
II	57.7%	42.3%(32.7%)	46.1%	53.9%(34.6%)
III	50.0%	50.0%(37.5%)	50.0%	50.0%(25.0%)
IV	27.3%	72.7%(45.5%)	27.3%	72.7%(45.5%)
Total	64.6%	35.4%	55.7%	44.3%

次に胃癌病巣周辺にみられる脈管侵襲所見のうちリンパ管侵襲所見 (ly) と DNA Histogram Pattern との相関をみると、ly (+) 率は I 型で14.3%、II 型で42.3%、III 型で50%、IV 型で72.5%と極めてよく相関を示し、ことに I 型とIV 型での ly (+) 率に60%もの差が認められ、DNA 量からみても脈管侵襲所見の有無が癌の悪性度を規定する1つの因子となり得ることが明らかとなった (表2)。

リンパ節転移率との関係では、I 型とIV 型との転移率を比較すると50%前後の差が認められるが、DNA Histogram Pattern 各型の比較では明らかな相関は認められなかった (表2)。

以上胃癌の stage 分類に関する s と n との比較からも明らかなように、癌の DNA Histogram Pattern と胃

図7 DNA Histogram Pattern 別にみた胃癌の累積生存率

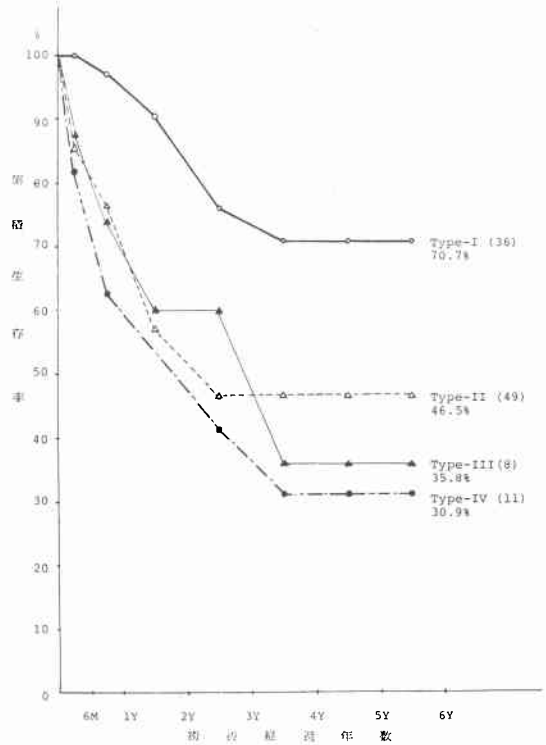
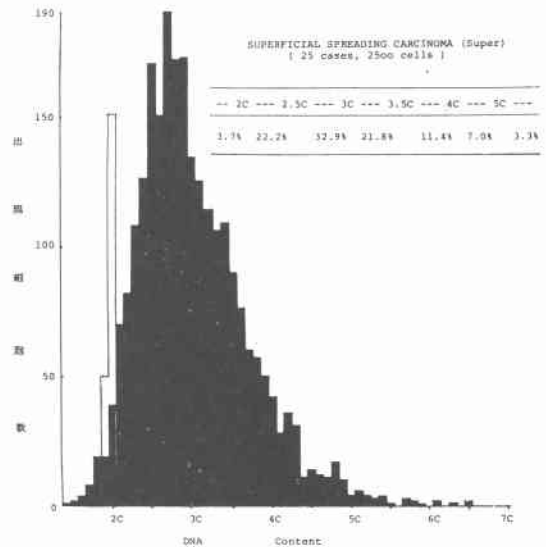


図8 Super 型胃癌の DNA Histogram



癌の進行度 (stage) との相関は認められず、両者の相関率は34.5%と低率であった。

さて対象胃癌113症例の切除術後の予後について消息不明例9例を除いた104例 (92.1%) の累積5年生存率をDNA Histogram Pattern 各型別にみてもと (図7), I型で70.7% II型では46.5%, III型が35.8%, IV型では30.9%と両者は極めてよく相関を示し, DNA Histogram Pattern がI型からIV型になるに従って癌の悪性度が増加し, 臨床的にも予後不良となる傾向がうかがわれた。ことに術後再発死亡例39例の再発型式を検討してみると, III, IV型で肝転移再発例が比較的多い (5/11=45.5%) 傾向がみられた (I型で1/6, II型で7/22)。

E) Super 型胃癌 と Pen 型胃癌の DNA Histogram Pattern

前述の如く Super 型胃癌25例中21例 (84%) が DNA Histogram Pattern I型を示し, Pen 型胃癌14例中6例がIV型, 他の6例がII, III型を残りの2例がI型のDNA Histogram Pattern を示したが, 両者の細胞積み重ねによる DNA histogram をみると, Super 型25例2,500細胞では低3倍域に mode 値 (32.8%) を有し DNA Histogram Pattern I型に全く類似した histogram を示し,

図8 Pen 型胃癌14例1,400個細胞では, 4~5倍域に mode 値 (24.8%) を有し, IV型に類似した DNA histogram を示した (図9)。両者の DNA Histogram Pattern 曲線を, 胃上皮細胞, ATP 病変のそれと同一図面上に描いてみると, 図10の如く, 正常から良性→悪性病変に至る peak 値の変動 (低下, 倍数域への右方移動), 分散の幅の拡大が極めて対照的である点が印象付けられる。

因みに Super 型胃癌25例と Pen 型胃癌14例の累積5年生存率をみてみますと, 前者は全例術後健在であるが, 後者は4年生存率が44.8%と不良である (図11)。

3. 食道癌細胞における DNA 量

胸部食道癌切除例のうち術前放射線照射を施行せず, 病理組織学的所見を充分観察しうる40症例 (扁平上皮癌39例, 燕麦細胞癌1例) について, 胃癌におけると同様な方法で癌細胞核 DNA 量の測定を行った。

図12は, 左側が食道癌の DNA Histogram Pattern I型よりIV型までの各症例の折線グラフ (細線) および各型の平均値グラフ (太線) を, 右側に各型の代表的な症例の histogram を示した。図13は, これらを mode 値との関連で示したものであるが, 両者がよく相関してお

図9 Pen 型胃癌の DNA Histogram

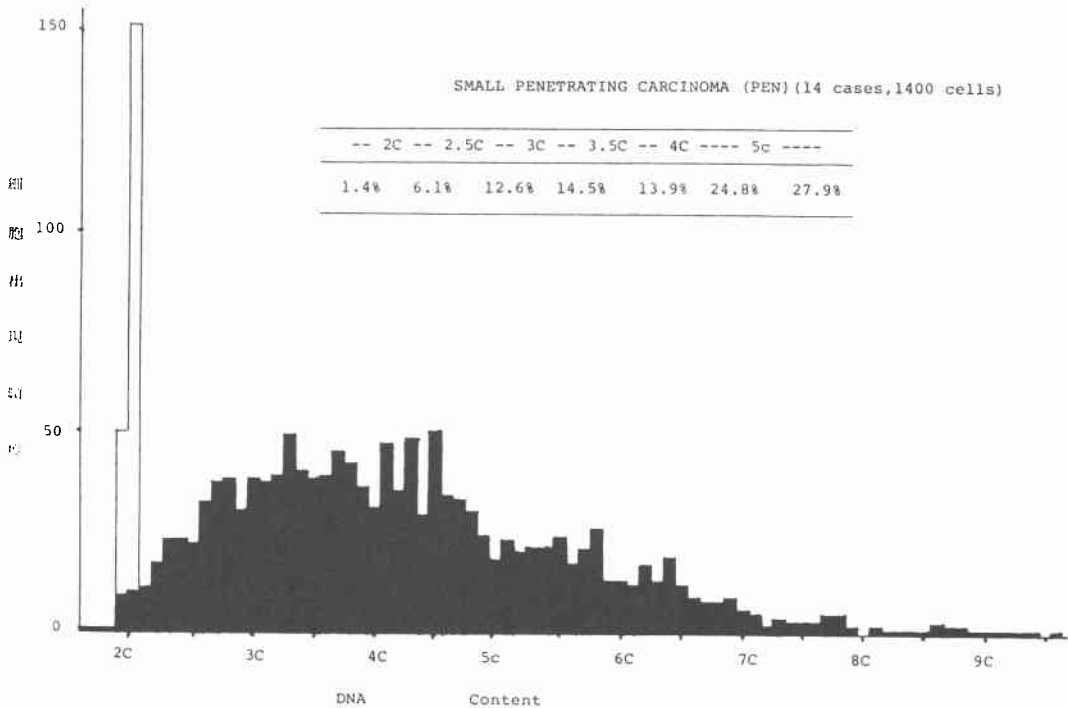




図10 胃炎・ATP・Super & Pen 型胃癌の DNA Histogram Pattern

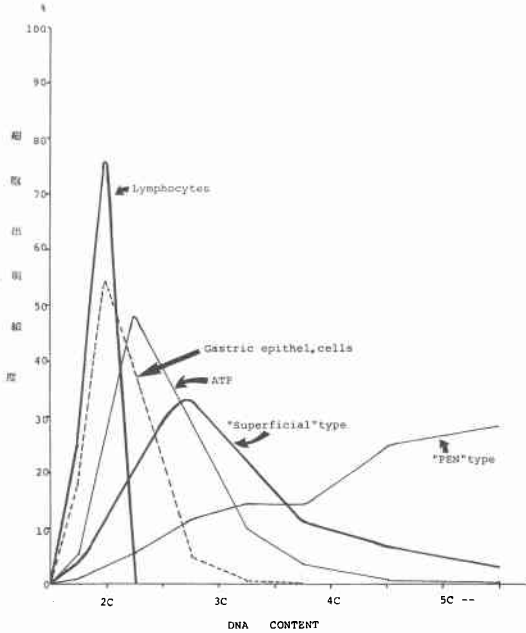


図11 Superficial Type と Pen Type の術後累積生存率

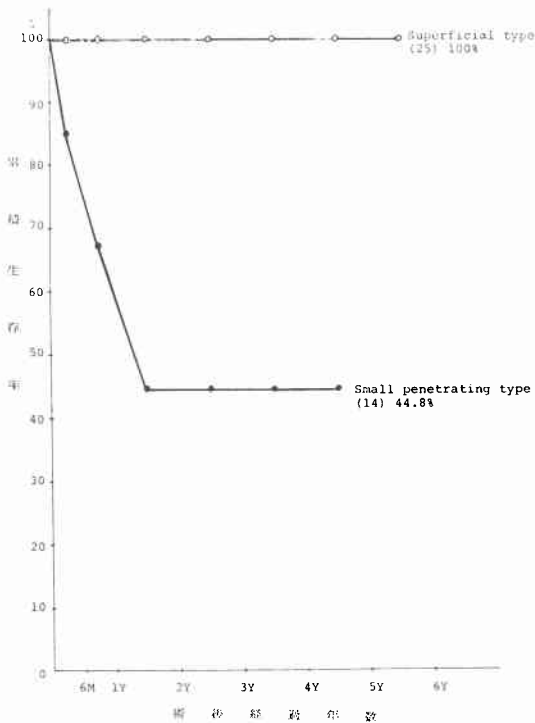
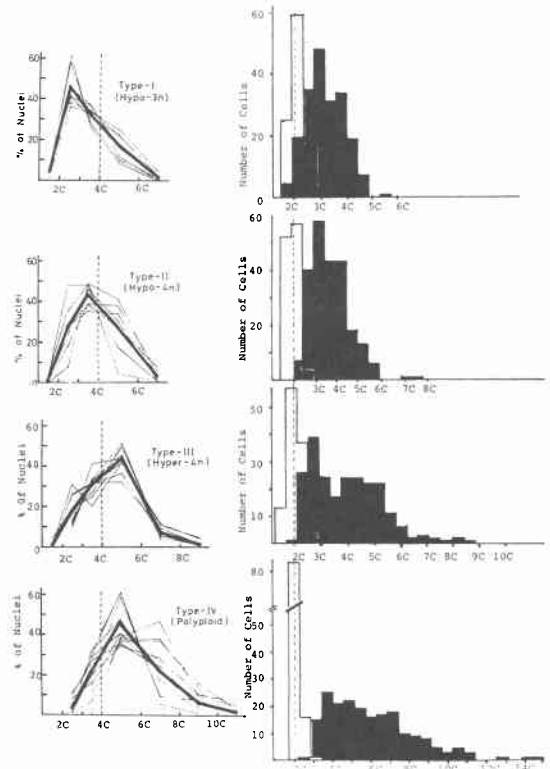


図12 食道癌40症例の DNA Histogram Pattern



り、DNA Histogram Pattern I型が7例、II型が9例、III型が11例、IV型が13例と、胃癌に比較しIII、IV型の頻度が高く(60%)、胃癌に比べ食道癌の方が一般に悪性度が強いという感じを受ける。

まず食道癌におけるDNA Histogram Pattern分類と、切除術後の予後との関係を累積生存率でみると、I型が5年生存率80%、II型が39.4%とI、II型では胃癌の予後と差がないが、III型では3年生存例がなく2年未満生存率が26.7%と低く、IV型では4年生存例がなく、1年未満生存率25%、3年未満生存率が12.5%と低率であった(図14)。

食道癌の病理組織学的諸因子とDNA Histogram Patternとの関係について検討したが、扁平上皮癌の組織分化度との関連では、低分化型においてIV型を示すものが多い傾向にはあったが、高分化型並びに中分化型では両者に相関は認められなかった(表3)。

食道癌単周辺のリンパ管侵襲所見(ly)とDNA Histogram Patternとの相関をみると(表4)、胃癌の場合と同様両者は比較的よく相関を示し、ことにI型のly

図13 食道癌の DNA Mode 値と Histogram Pattern

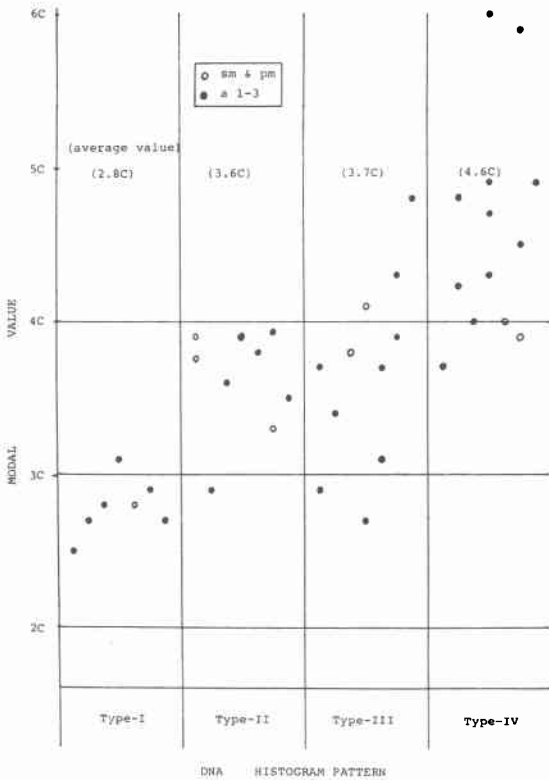


表3 食道癌の組織分化度と DNA Histogram Pattern

DNA Histogram P.	I	II	III	IV	Total
Well different. squam. cell ca.	3	3	9	6	21
Moderately diff. squam. cell ca.	4	5	1	2	12
Poorly different. squam. cell ca.	0	1	1	5	7

(+)率が14.3%にすぎないのに対し、IV型では69.2%と高率で、ここでもリンパ管侵襲所見が食道癌切除後の予後と密接に関係していることが明らかとなった。

その他、食道癌の壁深達度やリンパ節転移の程度との関係についても検討したが、いずれも DNA Histogram Pattern 分類との間に有意の相関は見出しなかった。

考 察

わが国における癌の診断ならびに治療は、ことに胃癌

図14 DNA Histogram Pattern 別にみた食道癌の累積生存率

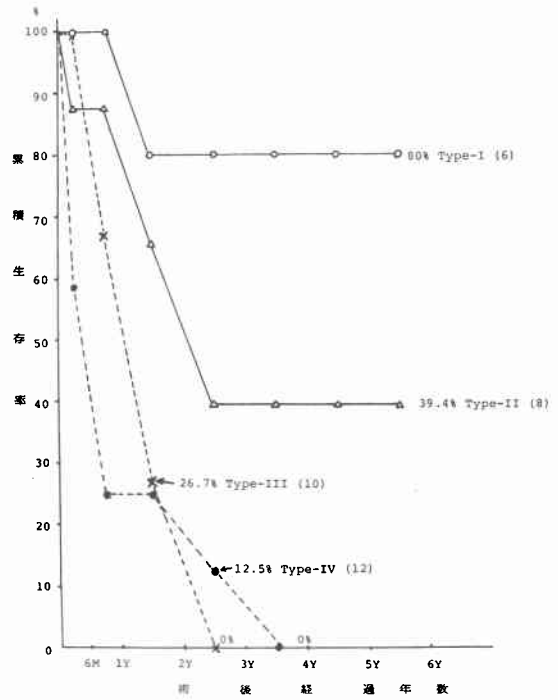


表4 食道癌リンパ管侵襲所見と DNA Histogram Pattern

DNA H-P	I	II	III	IV	Total
ly(-)	6	7	9	4	26
ly(+)	0	2	0	4	6
ly(++)	1	0	1	3	5
ly(+++)	0	0	1	2	3
ly %	14.3%	22.2%	18.2%	69.2%	35.0%

45.8%

および食道癌など消化管癌の外科治療の面において飛躍的な発展を遂げ、近年免疫化学合併療法の導入によって、外科手術後の遠隔治療成績に著しい向上がみられている。このような癌治療技術のめざましい進歩、開発に伴い、一方ではそのむだのない適切な適応や限界の問題の解決がより切実に望まれるようになってつつある。さて、癌組織は、その発育増殖の場面において正常体細胞とは著しく異ったいわゆる悪性化の様相を呈するとはいえ、

その細胞学的レベルにおける本態は、その癌腫の寄生する臓器を構成する組織細胞に由来するものであり、正常細胞の染色体レベルの変化によって惹起された臓器機能破綻現象と考えてさしつかえなからう。従って癌細胞の性格は正常体細胞の場合と同様遺伝子の担加体である染色体の中に潜んでおり、この性格の差が癌組織の増殖様相の差として、癌の病理組織像や臨床上の発育増殖速度を規定していると思われる。もちろん癌腫の増殖を考える場合、臓器内外への発育進展の様相は癌細胞そのものの性格と同時に、担癌生体のもつ抵抗力との兼ね合いの下に論じられなければならないが、前述した種族細胞説 (stem cell theory) によると“多くの cell lines のモザイクである癌腫がある個体のある臓器に発育増殖する場合、その環境に対し抵抗力のある性質をもち、その環境に最も適応力のある cell line の他の cell lines の増殖を凌駕して盛んに増殖して種族細胞となり、その癌腫の発育増殖の舵を取る”と考えられている。従って周囲の環境の如何にかかわらず、同じ染色体数および構成を示す癌腫は、その発育増殖において類似した性格を有すると考えられる。以上のような癌細胞における染色体学的な特徴が、癌腫の性格分析に基づく癌の適正な治療の選択の分野において重要な役割を果すものと思われる。

癌腫の染色体学的研究は、動物実験の面では牧野(1951)<sup>9)</sup>を中心に Baylenth<sup>9)</sup>(1952), Levan & Hauschka<sup>7)</sup>(1952, 1953), Tjio<sup>11)</sup>(1954) らにより、また、1960年代になって、外村<sup>8)</sup>(1961), 牧野<sup>9)</sup>(1963), Hauschka<sup>10)</sup>(1961) などによって人の癌性胸腹水の腫瘍細胞の染色体観察が行われるようになり、人類腫瘍細胞の染色体構成も、その宿主である正常体細胞とは明かに異った高倍数性の染色体数および特異な形態を示す染色体型をもった細胞が種族細胞となって腫瘍の性格を支配しており、同一臓器の腫瘍でも腫瘍相互間で異った染色体を有していることが明かとなった。

著者ら<sup>11)12)</sup>はこの様な染色体学的特徴を、日常胃癌、食道癌を中心とする癌治療の場面、ことに癌の悪性度分析による適切な手術手技、制癌化学療法を選択の面で役立て得ないかとの点に着目し、術前の癌腫よりの生検標本や切除標本の固形癌腫よりの染色体分析を行おうと試みたが、間質組織の多い癌巣からの癌細胞の遊離操作の困難さや、分裂核板の発見の難しさなどもあって、染色体の間接的な観察方法である細胞核内 DNA 量の測定により染色体の倍数性を判定する方法を用いた。

癌細胞の DNA 量が正常体細胞のそれに比べ著しく増

加し、また良性でも異型度がますますつれて mode 値の頻度が低化し、分散の幅が広がることは Leuchtenberger<sup>13)</sup>(1974), 加藤<sup>14)</sup>(1977), 篠塚<sup>15)</sup>(1975), 小島<sup>16)</sup>(1953) らによって報告されている。

癌細胞の核 DNA 量の分析を癌の臨床的悪性度や予後との関連で検討した報告は比較的少なく、Yoshida<sup>17)</sup>(1970) らのハムスター胎児細胞の発癌過程による染色体変化の分析や、Atkin<sup>18)19)</sup> の卵巣癌患者や乳癌患者における DNA 量の低倍域群と高倍域群における転移範囲や予後の比較、Zetterberg<sup>20)</sup>(1976) の前立腺癌における組織分化度と核 DNA 量との比較報告がみられるが、いずれも、DNA 量が高倍数域にモード値をもつほど臨床的悪性度が増加すると述べている。以上の諸家の報告にみられる DNA 量の表現には、種族細胞を主にした peak 値や、それぞれの倍域における出現頻度を考慮した mode 値をもって代表させているが、著者らは、悪性度が増すにつれて現れて来る高倍数(6倍域以上)の DNA 量の広がり(分散)の幅や、4倍域以上の細胞の出現頻度が悪性度を規定する上で極めて重要な意味を持つという考えから、mode 値と分散の幅を加味した DNA Histogram Pattern 4型を分類し、これに従って胃癌および食道癌の切除標本より、癌細胞核 DNA 量を測定し、臨床上的悪性度および予後と比較検討してみた。

胃癌においては、先に井口ら<sup>21)</sup>は、癌の胃壁内における発育増殖のパターンの観察から、胃粘膜面を横にゆくりと拡って予後の良好な表層拡大発育型(Super型)と、小さくても胃壁を縦軸方向に急速に肥大発育して、肝転移など臓器転移を来した予後不良な深部浸潤発育型(Pen型)胃癌が対照的にみられることを報告したが、DNA Histogram Pattern による著者らの検討でも両者の癌の性格には明らかに対照的な細胞学的特徴があり、Super型胃癌は、低3倍域に DNA peak 値を有し、分散の幅の狭い I 型の DNA Histogram Pattern を示し、Pen型胃癌は高4倍域に peak 値を有し、種族細胞の不明瞭な、高倍域(8~9倍域)まで分散の幅の広い DNA Histogram Pattern III, IV型を示すものが多かった。累積生存率でも Super型は全例5年生存しているのに対し、Pen型は44.8%と低い5年生存率を示した。胃癌の DNA 量は全体としては3~4倍域の間に mode 値を示す DNA Histogram Pattern II型が多く、その切除後の適隔成績も、DNA Histogram Pattern I型が累積5年生存率が70.7%、II型が46.5%、III型が35.8%、IV型が30.9%と DNA 量が増すにつれて予後不良と

なる傾向がみられた。このような傾向は食道癌の DNA 分析においても同様で、I型(80%)、II型(39.4%)の予後は胃癌のI、II型とほぼ同じ5年生存率を示すが、III、IV型では4年生存例がなく極めて予後不良で、しかも食道癌症例の頻度分布がIII、IV型に多いことが、胃癌に比べ食道癌がより悪性であるという印象を与える原因となっていた。胃癌においても食道癌においても、それらの病理組織学的予後反映因子の中では、癌巣周辺にみられるリンパ管侵襲所見(Iy)が、DNA量分析による悪性度分布と比較的よく相関を示していたことは、癌の中にはその発生の初期から脈管侵襲を起こしやすいものとそうでないものとの性格が供しているという印象を与えた。

以上、DNA量分析による胃および食道癌の染色体学的観察は、癌の性格付けの面で1つの指標となりうることを明らかにしたが、今後さらに発癌機構の解明や制癌剤感受性の決定の面で何らかの手がかりとなりうる可能性を充分もっており、癌治療の将来の進歩に一翼を荷うものとして期待される。

#### まとめ

胃癌113例および食道癌40例の癌細胞核DNA量測定の結果、つぎの如き興味ある成績を得た。

1. 胃上皮細胞(萎縮性、再生性胃炎)のDNA量は、2倍域にpeak値を有するが、リンパ球のそれに比べ低頻度で、高3倍域までの分散が5%前後にみられた。

ATP病変のDNA量は高2倍域にmode値を有し、3倍域以上のもも15%に認められた。

2. 胃および食道癌のDNA量は、4型のDNA Histogram Patternに分類出来た。

3. 胃および食道癌のDNA Histogram PatternがI型からIV型になる程、切除術後の5年生存率が低下し、DNA量が増加する程度の悪性度が増大する傾向が伺えた。

4. 癌の病理組織学的予後反映因子の1つであるリンパ管侵襲像はDNA Histogram Pattern分類と極めてよく相関を示した。

5. 胃癌の中でもSuper型胃癌はDNA Histogram Pattern I型(84%)を示し、Pen型胃癌はIII、IV型(57.2%)を示すものが多く、両者の対照的な性格がDNA量分析によっても明かとなった。

6. 胃癌ではDNA Histogram Pattern II型(46%)を示すものが最も多く、食道癌ではIII、IV型(55%)が

比較的多く、両者の悪性度の差の原因がDNA量分析でも明かとなった。

(本研究の一部は、昭和55年度福岡県対ガン協会ガン研究助成金の援助を受けた)

#### 文 献

- 1) Tjio, J.H. and Levan, A.: The chromosome number of man. *Hereditas*, **42**: 1—6, 1965.
- 2) 牧野佐二郎: 人類の染色体—臨床医学への応用— pp. 177, 1963, 紀伊国屋新書, 東京.
- 3) Makino, S.: A cytological study of the Yoshida Sarcoma, an ascites tumor of white rats. *Chromosoma*, **4**: 649—674, 1952.
- 4) Boivin, A.R. and Vendrely, C.R.: *Acad. Sci. Paris*, **226**: 1061, 1948. (Cited in Mendelsohn, M.L.: The two-wavelength method of microspectrophotometry. II. A set of table to facilitate the calculations. *J. Biophys. & Biochem. Cytol.*, **4**: 415—416, 1958).
- 5) Makino, S.: The cycle of tumor cells in a transplant generation of the Yoshida Sarcoma. *Proc. Jap. Acad.*, **27**: 287—291, 1951.
- 6) Bayreuther, K.: Der Chromosomenbestand des Ehrlich-Ascites-Tumors der Maus. *Z. Naturforsch.*, **1**: 554—557, 1952.
- 7) Levan, A. and Hauschka, T.S.: Chromosome numbers of three mouse ascites tumors. *Hereditas*, **38**: 251—255, 1952.
- 8) 外村 晶: 人類の染色体とその異常. 産科と婦人科, **28**: 1634—1642, 1959.
- 9) 牧野佐二郎: 腫瘍の増殖と染色体. 細胞化学シンポジウム, **10**: 177—202, 1961.
- 10) Hauschka, T.S.: The chromosome inotogeny and oncogeny. *Cancer Res.*, **21**: 957, 1961.
- 11) 三戸康郎, 岡本龍治: DNA量よりみた胃癌の染色体分析—とくに早期胃癌を中心として—, 癌の臨床, **14**: 105—113, 1968.
- 12) Sannohe, Y. and Hiratsuka, R.: Clinico-pathological significance of the DNA histogram pattern in cancer cell nuclei of the stomach and the esophagus. *Gastroenterologia Japonica*, **16**: 25—32, 1981.
- 13) Leuchtenberger, C., Leuchtenberger, R. and Davis, A.M.: A microspectrophotometric study of the DNA content in cells of normal and malignant human tissues. *Amer. J. Pathol.*, **30**: 65—85, 1959.
- 14) 加藤治文, 早田義博: 肺扁平上皮癌の発癌過程とDNA分析—気管上皮扁平上皮化生, carcinoma in situ及び角化扁平上皮癌の細胞について, 肺癌, **17**: 267—278, 1977.
- 15) 篠塚孝男: 顕微分光測光法による子宮頸癌各種

- 病変の核 DNA の解析. 日本臨床細胞学会雑誌, **14**: 112—120, 1975.
- 16) 小島吉雄: 人癌における DNA 量と染色体. 日本臨床, **19**: 2295—2303, 1961.
- 17) Yoshida, T., Kuroki, T., Masuji, H. and Sato, H.: Chromosomal alteration and the development of tumors. XX. Chromosome change in the course of malignant transformation in vitro of hamster embryonic cells by 4-nitroquinoline 1-oxide and its derivative, 4-hydroxyaminoquinoline 1-oxide. *Gann*, **61**: 131—143, 1970.
- 18) Atkin, N.B.: Modal DNA value and chromo-  
some number in ovarian neoplasia. *Cancer*, **27**: 1064—1073, 1971.
- 19) Atkin, N.B.: Modal deoxyribonucleic acid value and survival in carcinoma of the breast. *Brit. Med. J.*, **29**: 271—272, 1972.
- 20) Zetterberg, A. and Esposti, P.L.: Cytophotometric DNA analysis of aspirated cells from prostatic carcinoma. *Acta. Cytologica.*, **20**: 46—57, 1976.
- 21) 井口 潔: 胃癌進展パターンにあらわれた表層拡大および深部浸潤発育ポテンシャル. 癌の臨床, **13**: 551, 1967.
-