

## DNA ploidy pattern よりみた大腸癌肝転移の悪性度の検討

金沢大学第2外科

山口 明夫 鎌田 徹 石田 哲也  
熊木 健雄 西村 元一 加藤 真史  
関野 秀継 小坂 健夫 米村 豊  
宮崎 逸夫

### THE INFLUENCE OF DNA PLOIDY PATTERN ON PROGNOSIS IN HEPATIC METASTASIS OF COLO-RECTAL CANCER

Akio YAMAGUCHI, Tohru KAMATA, Tetsuya ISHIDA,  
Takeo KUMAKI, Gennichi NISHIMURA, Masashi KATO,  
Hidetsugu SEKINO, Takeo KOSAKA, Yutaka YONEMURA  
and Itsuo MIYAZAKI

Department of Surgery, School of Medicine, Kanazawa University

大腸癌肝転移例を対象として、その原発巣および肝転移巣の核DNA量の測定を行い、予後の面より悪性度の検討を行った。肝転移巣の細胞核DNA ploidy patternは原発巣に比べ、よりhigh ploidyを呈する傾向にあった。DNA III型を有する症例では、I、II型に比べてその転移個数が多く、転移程度も高かった。相対非治癒切除16例の再発率はI、II型の50%、45%に対して、III型では80%と高い傾向がみられた。またI、II型の平均生存期間は28カ月、33カ月で、内5例に3年以上の長期生存が得られ、比較的良好であったが、III型では10.7カ月と短く、すべて2年以内に死亡した。以上より肝転移巣核DNA patternは大腸癌肝転移の予後を反映すると考えられた。

索引用語：大腸癌肝転移、核DNA量

#### はじめに

大腸癌はその組織学的特性により肝転移をきたす頻度が高く、近年肝転移巣に対し外科的切除が積極的にとりいれられ、良好な成績も報告されている<sup>1)~6)</sup>。しかし、肝転移程度、転移個数などによりその予後は大きく左右されることより、おのおのの生物学的悪性度に違いがあることが推察される。よって大腸癌肝転移に対する成績の向上には、その悪性度の把握の上になった適切な治療法の選択も重要であると考えられる。

一方細胞核DNA量は悪性腫瘍の悪性度を知る一指標として注目され、各種の癌に測定されている<sup>7)</sup>。大腸癌においても悪性度の面より、核DNA量 histogram と病理組織学的因子との関連の検討が報告されてい

る<sup>8)~10)</sup>。そこで今回著者らは、retrospective に大腸癌肝転移例の原発巣および肝転移巣のDNA ploidy patternの面より、その生物学的特性および悪性度の検討を行い、興味ある知見が得られたので報告する。

#### 対象および方法

当科にて肝転移巣の切除が行われた結腸癌20例、直腸癌11例の大腸癌肝転移31例を対象とした。これらのうち同時性肝転移は23例、異時性肝転移は8例で、うち29例には原発巣のDNA ploidy patternの検索も併せて行った。

核DNA量測定はホルマリン固定後のパラフィンブロックより癌巣部の小組織片を切り出し、脱バラ後細胞単離のため5mM EDTA Hanks液中に60℃で1時間、さらにcollagenaseおよび牛アルブミン加Hanks液で37℃1時間処理した。これをDounce型homogenizerで破碎後、nylon meshでろ過した。さら

に諸富ら<sup>11)</sup>の方法で非特異抗体を除去し、propidium iodide で DNA 染色を行った後に、落射型顕微蛍光測光装置にて DNA 量を測定した。まずリンパ球20個の核 DNA 量を測定し、その平均値を2Cとし、さらに癌細胞100個の核 DNA 量を測定し、リンパ球 DNA 量平均値との相対で ploidy を算出した。核 DNA 量の分布 pattern は、以下のIII型に分類し、その予後などより悪性度の検討を行った。

I型 (low ploidy) : 4c 以上の細胞が10%未満。

II型 (intermediate) : 4c 以上の細胞が10%以上で、かつ6c 以上の細胞が10%未満。

III型 (high ploidy) : 6c 以上の細胞が10%以上。

### 結 果

#### 1. 原発巣と肝転移巣における DNA ploidy pattern の比較

肝転移例の DNA パターンをみると、原発巣では I 型9例、II型13例、III型8例、肝転移巣では I 型3例、II型14例、III型12例とともに high ploidy pattern を示すものが多く見られた。そこで両者を比較すると、DNA パターンがほぼ一致した症例は29例中18例(62.1%)、肝転移巣に比べ原発巣でより high ploidy であるものが1例(3.1%)、原発巣に比べ肝転移巣がより high ploidy となったものが10例(34.5%)と、肝転移巣における核 DNA ploidy pattern は原発巣のそれと比べやや高くなる傾向にあった(表1)。

#### 2. 肝転移程度と細胞核 DNA ploidy pattern

検討症例の肝転移程度は H1 19例、H2 9例、H3 3例

表1 原発巣と肝転移巣における DNA ploidy pattern

|              | 肝転移巣DNAパターン |     |      | 計  |    |
|--------------|-------------|-----|------|----|----|
|              | I型          | II型 | III型 |    |    |
| 原発巣 DNA パターン | I型          | 3   | 5    | 0  | 8  |
|              | II型         |     | 8    | 5  | 13 |
|              | III型        |     | 1    | 7  | 8  |
|              | 計           | 3   | 14   | 12 | 29 |

表2 肝転移巣核 DNA ploidy pattern 別の肝転移程度

| 転移程度 | H 1 | H 2 | H 3 |
|------|-----|-----|-----|
| I型   | 3   | 1   | 0   |
| II型  | 10  | 2   | 2   |
| III型 | 6   | 6   | 1   |
| 計    | 19  | 9   | 3   |

であったが、その転移程度と肝転移巣の DNA ploidy pattern との関係を見ると、I、II型では H1が多いのに対し、III型では13例中約半数の7例が H2、H3と高度であった(表2)。

#### 3. 肝転移個数と肝転移巣 DNA ploidy pattern

肝転移個数は1個15例、2~3個9例、4個以上7例であり、その核 DNA ploidy pattern をみると、単発15例中 I、II型が12例(80%)と low ploidy であったのに対し、転移巣が4個以上みられる症例の DNA pattern は7例中6例(86%)がIII型と転移個数が多くなるにつれ転移巣核 DNA 量は多くなる傾向がみられた(表3)。

#### 4. 肝転移例の手術根治度と DNA ploidy pattern

31例の手術根治度は相対非治癒切除20例、絶対非治癒切除11例であった。その根治度を、DNA ploidy pattern でみると、I型、II型ではおのおの75%、71%に相対非治癒切除が可能であったのに対し、III型では半数の46%が絶対非治癒切除に終わった(表4)。

#### 5. 肝転移巣 DNA ploidy pattern と予後

表5は核 DNA ploidy pattern 別の生存期間を示しているが、I型およびII型の50%生存期間が36カ月、24カ月、平均生存期間が28.0カ月、32.7カ月にに対し、

表3 肝転移個数と転移巣 DNA ploidy pattern

| 転移個数 | 1  | 2-3 | 4 |
|------|----|-----|---|
| I型   | 3  | 1   | 0 |
| II型  | 9  | 4   | 1 |
| III型 | 3  | 4   | 6 |
| 計    | 15 | 9   | 7 |

表4 手術根治度と転移巣 DNA ploidy pattern

| 相対非治癒切除 |          | 絶対非治癒切除  |
|---------|----------|----------|
| I型      | 3 (75%)  | 1 (25%)  |
| II型     | 10 (71%) | 4 (29%)  |
| III型    | 7 (54%)  | 6 (46%)  |
| 計       | 20 (65%) | 11 (35%) |

表5 肝転移巣 DNA ploidy pattern 別の生存期間

|      | 50%生存期間 | 平均生存期間 |
|------|---------|--------|
| I型   | 36か月    | 28.0か月 |
| II型  | 24か月    | 32.7か月 |
| III型 | 9か月     | 10.7か月 |
| 計    |         | 23.1か月 |

表6 相対非治癒切除例における DNA ploidy pattern と再発率 (術後6か月以上経過例)

| DNA パターン | 再発率         |
|----------|-------------|
| I型       | 50% (1/2)   |
| II型      | 45% (5/11)  |
| III型     | 80% (4/5)   |
| 計        | 56% (10/19) |

表7 原発巣および肝転移巣の DNA ploidy pattern の組合せと予後

(術後1年経過例22例)

|              |      | 肝転移巣DNAパターン |      |      |
|--------------|------|-------------|------|------|
|              |      | I型          | II型  | III型 |
| 原発巣 DNA パターン | I型   | ○○○○        | ○○○○ |      |
|              | II型  |             | ●●●○ | ●●●○ |
|              | III型 |             | ○    | ○●●● |

○ 1年以上生存 ● 1年以内死亡

III型ではそれぞれ9カ月、10.7カ月ときわめて予後不良であり、I型、II型に5例の3年以上長期生存例が見られたのに対しIII型の症例はすべて2年以内に死亡した。また相対非治癒切除が可能で、かつ術後6か月以上経過している19例の再発率を見ると、I、II型の50%、45%にたいしIII型では80%と高く、low ploidy に比べ high ploidy 例の再発率が高くなる傾向にあった(表6)。また術後1年を経過した23例において原発巣と肝転移巣のおおの核 DNA ploidy pattern の組合せからその予後を検討した。原発巣 DNA pattern がI型である8例の肝転移巣 DNA ploidy pattern はすべてIもしくはII型であり、それらに1年以内死亡例は見られなかった。一方原発巣核 DNA ploidy pattern がII型およびIII型では14例中9例(64.3%)に1年以内の死亡が見られ、特に肝転移巣でIII型を示すものは1年以内の死亡率が8例中6例75%ときわめて高率であった。

考 察

大腸癌の組織像の多くは高分化腺癌であり、一般的に slow growing な増殖を示すが、同時に肝転移をきたす頻度が高いこともよく知られ、その頻度は10~20%といわれている。よって治療成績の向上にはその対策が重要となり、最近では肝転移巣の積極的な切除が行われているが、その予後は転移程度や転移個数などに大きく左右される。Cady ら<sup>12)</sup>は肝転移切除例の検討にてその転移個数に着目し、3個以下では肝転移再発が13%であったのに対し、4個以上での再発

率は80%もの高率に見られ、両者には生物学的な悪性度の相違があると推察している。また私どもは肝転移切除術後に長期生存がみられた症例を経験しているが<sup>9)</sup>、それらの転移個数は1~2個であり同じ大腸癌肝転移といえども悪性度に差があると思われる。したがってその悪性度の解明は適切な治療の選択および予後の推測に重要である。

ところで細胞核 DNA 量は細胞の増殖動態を反映し、腫瘍の悪性度を知る一指標となるとされ、各種の癌において予後との相関が検討されている。米村ら<sup>13)</sup>は ps (-) 胃癌において核 DNA ploidy pattern は病理組織学的進行度以上に予後を規定する因子となりうることを示した。大腸癌においても悪性度の面より癌細胞核 DNA histogram と病理組織学的因子との関連の検討が行われ、松嶋<sup>10)</sup>は DNA 量 histogram がリンパ管侵襲およびリンパ節転移程度と強い相関を示すことを報告している。Melamed ら<sup>8)</sup>は Flow cytometry にて、大腸癌の予後と DNA とは相関を示さなかったとしている。しかし Armitage ら<sup>9)</sup>は134例の大腸癌の検討にて、細胞核 DNA ploidy pattern は組織学的進行度と相関しなかったが、その予後は diploid に比べて aneuploid では5年生存率が有意に低かったとしている。つまり細胞核 DNA 量の測定はその生物学的悪性度を反映し、従来の進行度とはまったく別の予後規定因子となりうることは想像に難くない。そこで私どもは今回大腸癌肝転移例において原発巣および肝転移巣の細胞核 DNA 量の ploidy pattern を予後の面より検討を加えた。

同一症例における原発巣と肝転移巣の DNA ploidy pattern を比較すると、肝転移巣の DNA 量の大多数は intermediate もしくは high ploidy であり、原発巣より low ploidy を示した症例は29例中1例に過ぎず、肝転移巣においてより high ploidy 化する傾向がみられた。鎌田ら<sup>14)</sup>も胃癌において肝転移巣が原発巣より high ploidy 化しているものは11例中7例の高率であったとし、その原因として肝臓において腫瘍細胞が増殖因子と接する機会が多くなるからであると推察している。しかし同一症例で大きさの異なる肝転移巣での DNA ploidy pattern が一致していたことより、high ploidy な癌細胞が肝に着床しやすいということも考えられ、その詳細はいまだ不明である。また肝転移巣の細胞核 DNA 量が high ploidy なものほどその転移程度は高く、転移個数も多くなり、絶対非治癒切除に終わることが多かった。これは4個以上の肝転移

を有する大腸癌の悪性度は高いという Cady らの推論を支持するものと思われた。一方 Kokal ら<sup>15)</sup>は flow cytometry にて原発巣の DNA 量は予後をみる一指標となるが、肝転移巣の DNA 量と予後には相関がみられなかったと報告している。しかし私どもの検討では low ploidy と high ploidy の予後を比較すると、I 型、II 型の平均生存期間 28.0 カ月、32.7 カ月に対し III 型では 10.7 カ月と短く、また相対比治癒切除が可能であった 19 例の再発率を見ても、I 型、II 型の 50%、45% に対し III 型では 5 例中 4 例の 80% と高率であった。つまり high ploidy pattern を呈する肝転移症例ではその悪性度が高いため、肝での癌の着床力がつよく、切除可能であっても手術時すでにほかに転移巣が存在し、再発の可能性が高いと考えられた。よって high ploidy 症例の予後の向上には術後の積極的な集学的治療も必要であると思われた。

転移性は癌細胞が有する一特徴であり、その過程には脈管内への癌細胞の進入、臓器への着床、その部位での増殖などがあげられるが、それには癌細胞が元来有する生物学的悪性度も関与していると考えられる。今回 retrospective な検討にて肝転移巣の核 DNA ploidy pattern が大腸癌肝転移例の悪性度を反映することが示唆された。また原発巣の細胞核 DNA ploidy pattern を見ると、low ploidy には 1 年以内死亡例が見られなかったのに対し、intermediate では 9 例中 6 例 (67%)、high ploidy では 5 例中 3 例 (60%) の高率に 1 年以内死亡がみられたことより、今後 prospective に原発巣の DNA の検討を行い、術前に各大腸癌の悪性度を把握し、治療に役立てていきたいと考えている。

#### まとめ

1) 大腸癌肝転移巣の細胞核 DNA ploidy pattern は 29 例中 18 例 (62.1%) に原発巣との一致をみたが、10 例 (34.5%) は原発巣に比べてより high ploidy を呈した。

2) DNA ploidy pattern III 型の症例は I 型、II 型に比べて肝転移程度が高く、またその転移個数をみても、I、II 型に 4 個以上の転移を示したものが 17 例中 1 例にすぎなかったのに対し、III 型では 13 例中 6 例と高率であった。

3) 相対非治癒切除可能 19 例の術後再発率は I 型、II 型の 50%、45% に対して III 型では 80% ときわめて高率であった。

4) I 型、II 型の肝転移例の平均生存期間は 28.0 カ

月、32.7 カ月と比較的良好であったが、III 型では 10.7 カ月と短く、すべて 2 年以内に死亡した。

以上より肝転移巣細胞核 DNA ploidy pattern は大腸癌肝転移例において、その予後を推定する一因子となりうると思われた。

#### 文 献

- 1) 池田孝明, 堀 雅晴, 中川 健ほか: 大腸癌肝転移・肺転移の頻度と切除の意義. 日本大腸肛門病学会誌 37: 685-690, 1984
- 2) 森谷亘皓, 小山靖夫, 北條慶一: 大腸癌肝転移の検討—転移巣の切除とその遠隔成績を中心に—. 日本大腸肛門病学会誌 36: 1-6, 1983
- 3) 山口明夫, 関野秀継, 桐山正人ほか: 大腸癌肝転移の検討—肝転移巣切除例を中心に—. 北陸外会誌 4: 47-52, 1985
- 4) Fortner JB, Silva JS, Golbey RB et al: Multivariate analysis of a personal series of 247 consecutive patients with metastases from colorectal cancer. 1. Treatment by hepatic resection. Ann Surg 199: 306-316, 1984
- 5) Adson MA, Heerden JA, Adson MH et al: Resection of hepatic metastases from colorectal cancer. Arch Surg 119: 647-651, 1984
- 6) 山口明夫, 熊木建雄, 関野秀継ほか: 大腸癌の肝転移に対する切除例の検討. 日消外会誌 20: 1055-1059, 1987
- 7) Matuura H, Sugimachi K, Ueno H et al: Malignant potentiality of squamous cell carcinoma of the esophagus predicatable by DNA analysis. Cancer 57: 1810-1814, 1986
- 8) Melamed MR, Enker WE, Banner P et al: Flow cytometry of colorectal carcinoma with three-year follow-up. Dis Colon Rectum 29: 184-186, 1986
- 9) Armitage NC, Robins RA, Evans DF et al: The influence of tumour cell DNA abnormalities on survival in colorectal cancer. Br J Surg 72: 828-831, 1985
- 10) 松嶋一晃: 大腸癌の進展度と癌細胞核 DNA 量に関する臨床病理学的研究. 日本大腸肛門病学会誌 38: 798-808, 1985
- 11) 諸富直文, 蒲池正浩, 香川惠造ほか: パラフィン組織を用いた細胞核 DNA 顕微鏡光側光法. 医のあゆみ 133: 191-193, 1985
- 12) Cady B, McDermott WV: Major hepatic resection for metachronous metastases from colon cancer. Ann Surg 201: 204-209, 1985
- 13) 米村 豊, 杉山和夫, 鎌田 徹ほか: 胃癌における細胞核 DNA ploidy pattern と胃癌の悪性度. Oncologia 20: 24-31, 1987
- 14) 鎌田 徹, 米村 豊, 杉山和夫ほか: 胃癌原発巣と転移巣の核 DNA 量分布パターンの検討. 医のあゆみ 139: 123-124, 1986
- 15) Kokal WA, Duta RB, Azumi N et al: Tumor DNA content in primary and metastatic colorectal carcinoma. Arch Surg 121: 1434-1439, 1986