

フローサイトメトリーによる大腸癌の DNA パターンと 臨床病理学的所見, 予後との関連について

浜松医科大学第2外科

小里 俊幸 馬場 正三

浜松医科大学病理学第1講座

小沢 享 史

FLOWCYTOMETRIC DNA ANALYSIS IN COLORECTAL CANCERS AND ITS RELATIONSHIP TO CLINICOPATHOLOGICAL FINDINGS AND PROGNOSIS

Toshiyuki ORI and Shozo BABA

The 2nd Department of Surgery, Hamamatsu University School of Medicine

Takachika OZAWA

The 1st Department of Pathology, Hamamatsu University School of Medicine

1978年から1982年の5年間に教室で外科的切除を行い、予後の判明している大腸癌症例102例を対象として、切除材料のパラフィンブロックを用いて癌細胞核 DNA 量をフローサイトメトリーで測定した。DNA ヒストグラムをパターンより解析し、diploid 69例 (68%), aneuploid 33例 (32%) に分類した。臨床病理学的所見との関連では、リンパ節転移、肝転移で aneuploid の転移率が高かった ($p < 0.05$)。stage 分類では進行した症例に aneuploid が多い傾向を認めた。5年生存率は overall (D: 74.6%, A: 50.6%, $p < 0.05$)、治癒切除例 (D: 92.0%, A: 73.4%) とも aneuploid で低かった。以上より、DNA ヒストグラムで aneuploid を示す大腸癌の生物学的悪性度が示唆された。

索引用語: 大腸癌細胞核 DNA 量, フローサイトメトリー, DNA パターン

緒 言

癌の生物学的特性と予後を知る指標として、現在まで主に、臨床病理組織学的所見により判断を行ってきた。しかし近年、Atkin¹⁾により細胞核 DNA 量が癌の進展や予後を反映する重要な因子であると報告されて以来、注目をあつめ、種々の腫瘍について研究が進められてきている。

本研究では、近年本邦で急速に増加し、将来癌死の1位となると考えられている大腸癌²⁾を対象として、フローサイトメトリーを用いて細胞核 DNA 量の測定を行い、DNA ヒストグラムパターンと臨床病理学的所見および予後との関連性について検討を行った。

対象と方法

1. 対象

1978年から1982年までの5年間において、浜松医科大学第2外科で切除を行った大腸癌症例131例中102例(直腸癌43例, 結腸癌59例)を対象とした。

2. 方法

ホルマリン固定した切除材料のパラフィンブロックを用いて、Hedrey³⁾の方法にほぼ準じて行った。

a) 単離細胞群の作製

切除材料の HE 染色標本を鏡検、癌巢の部位を確認し、そのパラフィンブロックより癌巢の部位を正確に薄切し(30 μ ×3)切り出す。切片を15ml 試験管に入れ、キシレン(4ml, 30分間)にて脱パラフィンを行い、ついで100%, 95%, 70%エタノール(4ml, 20分間)に順次浸し加水を行う。蒸留水で2回洗浄後、生理食塩水で溶解し0.5%としたペプシン(Sigma chem. Co.) 3ml中(2N HClでpH 1.5に調整)で37°C, 30分間 incubateを行う。この間数回 vortexmixer で攪拌する。phosphate buffer solution (PBS) で2回洗浄後、

70%エタノールで固定し、ガーゼ2枚を重ねたフィルターを通し、-20℃で測定日まで保存する。以上の過程で作製した単離細胞群を図1に示す。

b) 細胞核 DNA 量の測定

保存した試料を PBS で1回洗浄後、RNase (1mg/ml)1ml 中で37℃、30分間 incubate を行う。PBS で洗浄後、内部標準としてニワトリ赤血球を入れ、propidiumiodide (50μg/ml) 1ml で室温、30分間放置し DNA 染色を行う。32μm のナイロンメッシュを通し、フローサイトメトリー (EPICSV, Coulter Electronics, USA) にて10,000個の細胞の DNA 量を測定し、DNA ヒストグラムを作製する。フローサイトメトリーの測定条件は、アルゴンレーザーを波長488nm, 出力300mW とし、フィルターは515nm と610nm long pass filter を用いた。

c) DNA ヒストグラムの解析

新鮮切除標本で DNA 測定を行った場合には、内部標準であるニワトリ赤血球は、正常細胞核 DNA 量(2c) の35%の DNA 量に値し、DNA index を求める良き指標となりうる⁴⁾が、パラフィンブロックからもど

した標本で DNA 測定を行った場合には、固定法や固定からの時間の経過などの因子により DNA の染色性が一定せず、内部標準であるニワトリ赤血球は役立たないため⁵⁾、DNA index は算出しなかった。

このため、今回は DNA ヒストグラムをパターンより解析し、G₀/G₁に単一のピークを示すものを diploid、G₀/G₁のピーク以外に明らかなピーク(測定した細胞数の10%以上)を示すものを aneuploid とした(図2)。

このようにして、DNA パターンより分類した diploid と aneuploid の2群間で、主に大腸癌取扱規程⁶⁾に基づいた臨床病理学的所見と生存率について比較検討を行った。

結果

DNA ヒストグラムの解析の結果、大腸癌102例は diploid 69例(68%)、aneuploid 33例(32%)に分類された。この2群間で以下の検討を行った。

1) 臨床病理学的所見における検討

年齢、腫瘍最大径、術前 CEA 値は Student t 検定、その他の項目は χ^2 検定を行い判定した。

臨床所見について年齢、性比、術前 CEA 値、腫瘍最大径、腫瘍占拠部位で比較検討した(表1)。いずれの

図1 単離細胞群 (×200)

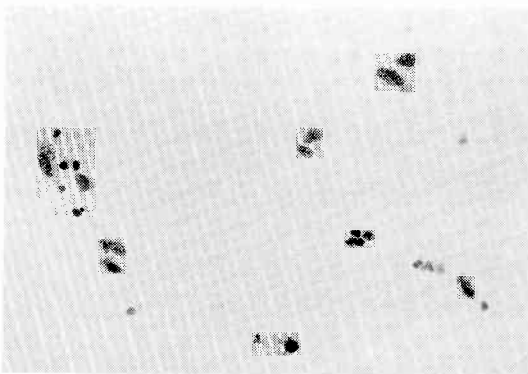


図2 DNA ヒストグラムパターン

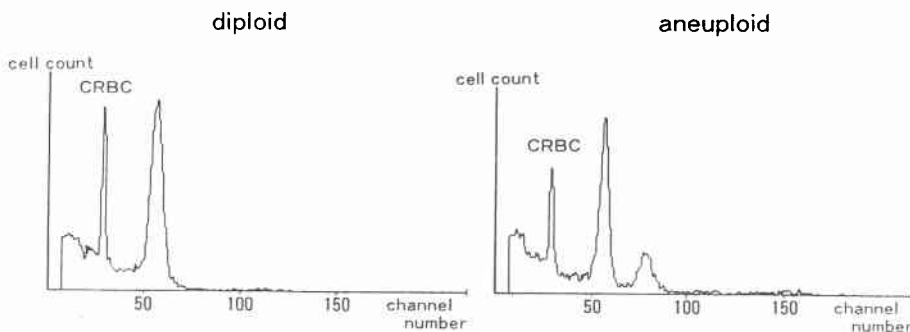


表1 臨床所見と DNA パターン

	diploid (69)	aneuploid (33)
年齢(歳)	59.6±14.5	59.0±13.0
男女比	34 : 35	17 : 16
術前 CEA (ng/ml)	9.7±16.3	10.9±14.9
腫瘍最大径 (cm)	6.2± 2.7	5.8± 1.7
腫瘍占拠部位		
直腸	33 (48%)	10 (30%)
結腸	36 (52%)	23 (70%)

項目においても DNA パターンによる差は認められず、臨床所見と DNA パターンとの間には関連はなかった。

つぎに病理組織学的所見について比較検討した(表2)。組織型, Broders 分類において DNA パターンによる有意な差は認められなかった。しかし、例数は少なかったが、組織型が低分化型で、Broders 4と強い構造異型を示すタイプの癌は、diploid 2例(3%), aneu-

ploid 4例(12%)と aneuploid に多い傾向を認めた。浸潤増殖様式(INF), リンパ管侵襲(ly), 静脈侵襲(v), 壁深達度では両群に差は認められず、DNA パターンとは関連がないと考えられた。しかし壁深達度において、癌浸潤が固有筋層(pm)までにとどまるものは diploid で7例(10%)に認めたが、aneuploid では1例もなかった。つぎにリンパ節転移, 肝転移について検討した。リンパ節転移陽性例は diploid 34例(49%), aneuploid 24例(73%)と aneuploid に多かった(p<0.05), 同様に肝転移陽性例でも diploid 7例(10%), aneuploid 9例(27%)と aneuploid に多く(p<0.05), aneuploid は転移の potentiality が高い傾向が認められた。stage 分類については、全体では DNA パターンによる有意な差はなかったが、先のリンパ節, 肝転移の結果を反映し、stage の進んだ症例は(stage III 以上: diploid 55%, aneuploid 76%) aneuploid に多い傾向が認められた。

2) 生存率における検討

表2 病理組織学的所見と DNA パターン

	diploid (69)	aneuploid (33)
組織型		
well	47 (68%)	22 (67%)
moderate	15 (22%)	5 (15%)
poor	2 (3%)	4 (12%)
muconodulare	5 (7%)	2 (6%)
Broders 分類		
1	1 (1%)	0 (0%)
2	54 (78%)	25 (76%)
3	12 (17%)	4 (12%)
4	2 (3%)	4 (12%)
壁深達度		
m~pm	7 (10%)	0 (0%)
ss (a1)	42 (61%)	25 (76%)
s (a2)	15 (22%)	5 (15%)
si (ai)	5 (7%)	3 (9%)
浸潤増殖様式 (INF)		
α	14 (20%)	2 (6%)
β	43 (62%)	26 (79%)
γ	12 (17%)	5 (15%)
リンパ管侵襲 (ly)		
ly(-)	46 (67%)	20 (61%)
ly(+)	23 (33%)	13 (39%)
静脈侵襲 (v)		
v(-)	41 (59%)	18 (55%)
v(+)	28 (41%)	15 (45%)
リンパ節転移 (n)		
n(-)	35 (51%)	9 (27%)
n(+)	34 (49%)	24 (73%)
肝転移 (H)		
H(-)	62 (90%)	24 (73%)
H(+)	7 (10%)	9 (27%)
stage 分類		
I	6 (9%)	0 (0%)
II	25 (36%)	8 (24%)
III	13 (19%)	8 (24%)
IV	14 (20%)	5 (15%)
V	11 (16%)	12 (36%)

*p<0.05

図3 手術症例5年生存率 (diploid 63例, aneuploid 31例)

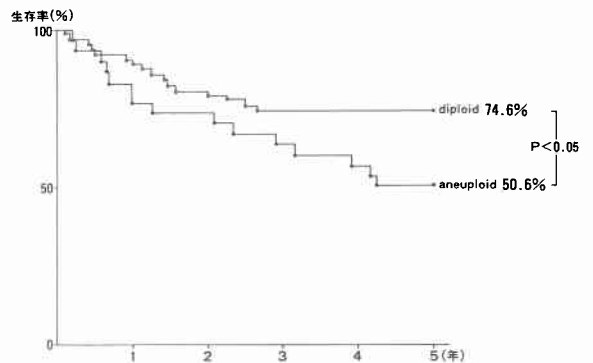


図4 絶対治癒切除症例5年生存率 (diploid 38例, aneuploid 15例)

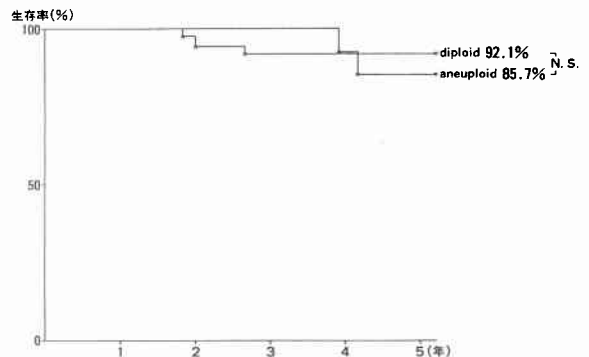
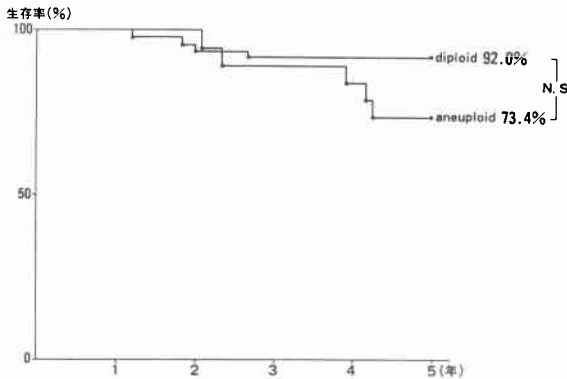


図5 治癒切除症例5年生存率 (diploid 50例, aneuploid 20例)



生存率はKaplan-Meier法⁷⁾により求めた。対象は術死3例、他因死亡5例を除いた全症例(diploid 63例, aneuploid 31例)であり、これらをさらに治癒切除例(diploid 50例, aneuploid 20例)、絶対治癒切除例(diploid 38例, aneuploid 15例)に分けて比較検討した。全症例の5年生存率(図3)は、diploid 74.6%, aneuploid 50.6%でありaneuploidで有意に低かった($p < 0.05$)。絶対治癒切除例の5年生存率(図4)はdiploid 92.1%, aneuploid 85.7%となり、aneuploidで僅かに低率であったが、有意差は消失した。しかし治癒切除例の5年生存率(図5)ではdiploid 92.0%, aneuploid 73.4%となり、有意差は認めないものの、生存率の差は広がった。

考 察

細胞核DNA量の測定法には、顕微蛍光測光法とフローサイトメトリーなどがある。消化器癌に関しては、欧米ではフローサイトメトリーを用いた研究^{8)~14)}が多いが、本邦では顕微蛍光測光法を用いた報告^{15)~19)}が多く、フローサイトメトリーを用いた報告²⁰⁾は少ない。フローサイトメトリーの利点は測定が簡便、迅速、客観的であり、一度に多数の細胞のDNA量を測定できることにある。一方欠点としては、作製したサンプル(単離細胞群)中に正常細胞(間質細胞、リンパ球など)の混入は避けられないため、癌細胞といっしょに正常細胞のDNA量を測定してしまうことである。しかし今回用いたヒストグラムのパターン解析では、正常細胞が混入していても2C領域にピークを形成するため、癌細胞が正常DNA量(2C)の場合には単一のピークを形成するdiploidとなる。一方異常DNA量の場合には2C領域以外にピークを形成するため、2つ以上の

ピークを示すaneuploidとなり、異常DNA量を持つ大腸癌の判別が可能である。

本研究では、このようにDNAヒストグラムをパターンより解析を行い、大腸癌をdiploidとaneuploidに分類し、両群間で臨床病理学的所見と生存率について比較検討を行った。その結果、リンパ節転移、肝転移についてaneuploidはdiploidに比べて有意に転移率が高率であった。またstage分類においても、有意差はなかったがaneuploidは進行した症例に多い傾斜を認めた。大腸癌のリンパ節転移に関しては、Wolley⁹⁾、Banner¹⁰⁾、佐々木²⁰⁾の報告があり、aneuploidは転移率が高いとされており、われわれの結果と一致する。同様に顕微蛍光測光法を用いた西¹⁷⁾もDNA異常とリンパ節転移に相関を認めたと報告している。癌は、その発生から時間の経過にしたがい進展してゆく過程でさまざまな変異をうけ、異常DNA量をもつ細胞が高頻度に出現すると考えられており²¹⁾、リンパ節、肝転移、癌の進行度とaneuploidに相関を認めたわれわれの結果は、この考え方に従えば妥当な結果であったと考えられる。また例数は少なかったが、壁深達度がpmまでにとどまるものは全例diploidであったという結果も、この考え方を支持するものである。しかしQuirke²²⁾は大腸腺腫の6%にaneuploidを認めたと報告しており、良性腫瘍や早期癌のDNA異常については、さらに症例をふやし詳細に検討する必要がある。

癌細胞DNA量が生命予後を表わす重要な因子となるというAtkin¹⁾の報告以来、種々の癌について検討がなされ、aneuploidは予後不良であることが示された。大腸癌についてもArmitage¹²⁾、Kokar¹³⁾の報告があり、同様の結果が示されている。しかし肝転移症例に限っての検討では生存率に差はなかったという報告¹⁴⁾もある。生存率に関するわれわれの結果では、切除全症例を対象とした場合、aneuploidはdiploidに比べて有意に5年生存率が低かったが、これはaneuploidに進行した症例が多かったこと、すなわち治癒切除率で見るとdiploid 50例/63例(79%)、aneuploid 20例/31例(65%)とaneuploidで低かったことが影響しているとも考えられた。絶対治癒切除例の5年生存率はdiploid 92.1%、aneuploid 85.7%であり差は認めなかった。大腸癌は手術成績が比較的良好な癌であり、当施設においても絶対治癒切除例の5年生存率は90.4%と高率である。このため絶対治癒ができた症例では、予後良好であるためDNAパターンによる影響は少なくなると考えられた。絶対治癒切除例に相対治

癒切除例を加えた治癒切除例の5年生存率は diploid 92.0%, aneuploid 73.4%となり、有意差はないものの生存率の差は拡大した。また治癒切除後に肝、肺転移を生じたが、転移巣切除により5年以上生存しているものを2例に認めたが、これらはいずれも aneuploid であった。以上より、一般的にいえば、aneuploid を示す大腸癌症例は予後不良の傾向があるといつて差し支えないものと考えた。

まとめ

フローサイトメトリーを用いて大腸癌細胞核 DNA 量の測定を行い、DNA ヒストグラムのパターンより diploid と aneuploid に分類し臨床病理学的所見と予後とについて検討した。

1. リンパ節転移、肝転移において aneuploid は diploid に比べて有意に転移率が高かった。

2. stage の進行した症例は aneuploid に多い傾向を認めた。

3. 壁深達度が pm までにとどまる癌は、例数は7例と少なかったが全例 diploid であった。

4. 切除例の5年生存率において aneuploid は diploid に比べて有意に低かった。治癒切除例においても aneuploid は低い傾向にあった。

以上より DNA パターンで aneuploid を示す癌は転移の potentiality が高く、その予後も不良であるため積極的な治療と注意深い経過観察が必要であると考えられる。

稿を終えるにあたり、御指導、御校閲をいただいた浜松医科大学第2外科、阪口周吉教授ならびに浜松医科大学病理学第1講座、喜納 勇教授に深謝致します。

文 献

- 1) Aktin N, Kay R: Prognostic significance of modal DNA value and other factors in malignant tumors, based on 1465 cases. *Br J Cancer* 40: 210—221, 1979
- 2) 平山 雄: 大腸ガンの疫学的変遷と今後の展望. *日臨* 39: 2006—2016, 1981
- 3) Hedrey D, Friedlander M, Taylor I et al: Method for analysis of cellular DNA content of paraffin-embedded pathological material using flow cytometry. *J Histochem Cytochem* 31: 1333—1335, 1983
- 4) Vindelov L, Christensen I, Nissen N: Standardization of high-resolution flow cytometric DNA analysis by the simultaneous use of chicken and trout red blood cells as internal reference standards. *Cytometry* 3: 328—331, 1983
- 5) Hedrey D, Friedlander M, Taylor I: Application of DNA flow cytometry to paraffin-embedded archival material for the study of aneuploid and its clinical significance. *Cytometry* 6: 327—333, 1985
- 6) 大腸癌研究会編: 臨床・病理、大腸癌取り扱い規約、改訂第3版、金原出版、東京、1983
- 7) Kaplan E, Meier P: Nonparametric estimation from incomplete observations. *J Am Stat Assoc* 53: 457—481, 1958
- 8) Barlogie B, Drewnko B, Schumann J et al: Cellular DNA content as a marker of neoplasia in man. *Am J Med* 65: 195—203, 1980
- 9) Wolley R, Schreiber K, Koss L et al: DNA distribution in human colon carcinomas and its relationship to clinical behavior. *JNCI* 69: 15—22, 1982
- 10) Banner B, Vega J, Roseman D et al: Should flow cytometric DNA analysis precede definitive surgery for colon carcinoma?. *Ann Surg* 202: 740—744, 1985
- 11) Quirke P, Dyson J, Dixon M et al: Heterogeneity of colorectal adenocarcinomas evaluated by flow cytometry and histopathology. *Br J Cancer* 51: 99—106, 1985
- 12) Artimage N, Robins R, Evans D et al: The influence of tumor cell DNA abnormalities on survival in colorectal cancer. *Br J Surg* 72: 828—830, 1985
- 13) Kokar W, Sheibani K, Terz J et al: Tumor DNA content in the prognosis of colorectal carcinoma. *JAMA* 225: 3123—3127, 1986
- 14) Finan P, Quirke P, Dixon M et al: DNA aneuploid a good prognostic indicator in patients with advanced colorectal cancer?. *Br J Cancer* 54: 327—330, 1986
- 15) 浜田新七: 顕微蛍光分光法によるヒト腸腫瘍の解析. *京都府医大誌* 94: 129—148, 1985
- 16) 三戸康郎、平塚隆三、土器辰雄: 細胞核内 DNA 分析による癌の悪性度分類に関する研究. *日消外会誌* 15: 531—543, 1982
- 17) 西 律、岡島邦雄、富士原彰ほか: 核 DNA 量よりみた直腸癌のリンパ節転移の検討. *日臨外医会誌* 47: 1396—1402, 1986
- 18) Inokuchi K, Komada Y, Sasaki O et al: Differentiation of growth pattern of early gastric carcinoma determined by cytophotometric DNA analysis. *Cancer* 51: 1138—1141, 1983
- 19) 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. *日本大腸肛門病会誌* 38: 798—808, 1985
- 20) 佐々木巧典: 消化器癌の DNA 解析. *最新医* 40: 85—87, 1985
- 21) Nowell P: The clonal evolution of tumor cell population. *Science* 194: 23—28, 1976
- 22) Quirke P, Fozard J, Dixon M et al: DNA aneuploid in colorectal adenomas. *Br J Cancer* 53: 477—481, 1986