

癌細胞核 DNA ヒストグラムからみた胃癌 リンパ節および肝転移巣の検討

大阪市立大学第1外科教室

西村 昌憲 曾和 融生 鄭 容錫 芳野 裕明
加藤 保之 久保 俊彰 前川 仁 梅山 馨

AN ANALYSIS OF DNA HISTOGRAM IN BOTH LYMPH NODE AND LIVER METASTASES FROM GASTRIC CANCER

Masanori NISHIMURA, Michio SOWA, Yong-suk CHUNG,
Hiroaki YOSHINO, Yasuyuki KATOH, Toshiaki KUBO,
Hitoshi MAEKAWA and Kaoru UMEYAMA

First Department of Surgery, Osaka City University Medical School

胃癌39例を対象に、第1群リンパ節転移巣と肝転移巣のDNA patternを検討した。胃癌34例のDNA patternはIa型、7例、Ib型12例、II型9例、III型6例であり、第1群リンパ節転移巣ではそれぞれ4例、10例、11例、9例と転移巣でII・III型が増加した。原発巣DNA ploidy patternとの一致率は53%であった。DNA patternの変化症例の検討では、分化型癌、ps(-)癌で polyploid化、aneuploid populationが出現する傾向であった。肝転移胃癌5例のDNA patternは全例II型で転移巣も一致した。以上のことから、原発巣でDNA diploidyを示しても転移巣で生物学的活性の高い細胞が出現することが示唆された。

索引用語：DNA ploidy pattern, 胃癌リンパ節転移, 肝転移胃癌

緒 言

全身のどこにでも転移するというのが悪性腫瘍の最大の特徴である¹⁾が、腫瘍を構成する細胞すべてが同等の転移能を持っているわけではなく、なかに転移能の高い細胞群が存在することが示唆されている²⁾³⁾。一方、癌細胞核DNA量は腫瘍の性格の一端を示唆するとされており、DNA aneuploidyを示すもの、分散幅の広いものは悪性度が高いと報告⁴⁾⁵⁾されている。しかし、悪性度が低いと考えられるDNA diploidyを示す腫瘍でも高度リンパ節転移を認める症例があり、このような症例では転移巣で核DNA量が変化している可能性があり、リンパ節転移巣の核DNA量の測定が重要と思われる。そこで今回われわれは胃癌34例の原発巣およびリンパ節転移巣の核DNA量を測定し、核DNA量の変化について検討を加えた。また開腹

時肝転移を認めた胃癌5例の原発巣と肝転移巣のDNA patternの変化についても併せて検討した。

検査対象および方法

大阪市立大学第1外科で手術を施行した胃癌39例を対象とし、34例については胃癌原発巣と第1群リンパ節転移巣の癌細胞核DNA patternの検討を行い、5例は胃原発巣と開腹時に認めた肝転移巣のDNA patternを検討した。胃癌の臨床病理学的因子の検討は胃癌扱い規約⁶⁾に準じて行った。

癌細胞核DNA測定は芳野⁴⁾の方法に準じ、以下のごとく行った。すなわち10%ホルマリン固定パラフィン包埋ブロックより4 μ の薄切切片と100 μ の厚切切片を作製し、薄切切片よりHE染色標本を作製し、癌巣採取部位を決定した。次いで厚切切片を脱パラフィン後、癌巣部を採取し、0.05%コラゲナーゼ、2%2Na-EDTA処理後超音波処理を行った。えられた癌細胞単離浮遊液を遠沈、洗浄後、オートスミアにて癌細胞核単離塗沫標本を作製した。この標本を0.1% RNaseで

<1988年12月14日受理> 別刷請求先：西村 昌憲
〒545 大阪市阿倍野区旭町1-5-7 大阪市立大学医学部第1外科

図1 癌細胞核単離塗沫標本作製法

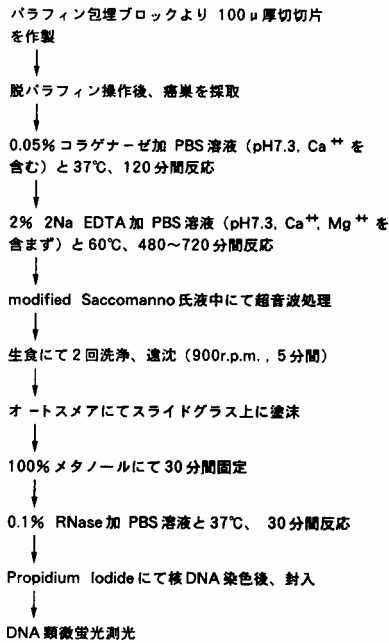
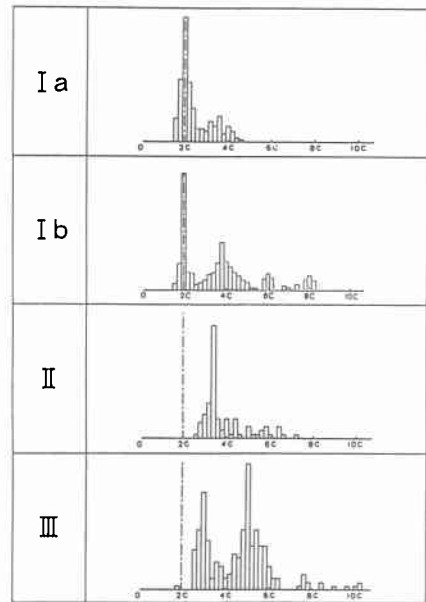


図2 胃癌細胞 DNA ploidy pattern 分類



処理し, Propidium Iodide で染色後, 落射型蛍光顕微鏡 (Nikon P-1) を用いて細胞核 DNA 蛍光を測定した。癌細胞核は200個以上測定し同一標本の小リンパ球50個の蛍光量の平均を 2c と定め, これに対する蛍光量の比で癌細胞核 DNA 量を決定し DNA ヒストグラムを作製した (図1)。

成 績

1) 癌細胞核 DNA ploidy pattern の分類

えられた DNA ヒストグラムを以下のごとく 4 型に分類した (図2)。

Ia 型: 2c 域に peak があり polyploid cell のみられないもの。

Ib 型: 2c 域に peak があり polyploid cell の出現もみられるもの。

II 型: peak が 2c 域よりずれたところにみられる aneuploid pattern を示すもの。

III 型: 2 峰性以上の peak がみられる mosaic pattern を示すもの。

2) 胃癌原発巣および第 1 群リンパ節転移巣の DNA ploidy pattern

原発巣の DNA ploidy pattern は表 1 右に示すごとく Ia 型 7 例, Ib 型 12 例, II 型 9 例, III 型 6 例であった。一方第 1 群リンパ節転移巣では, 表 1 下段に示す

表 1 胃癌原発巣およびリンパ節転移巣 (n₁) の DNA pattern の変化

転移巣 \ 原発巣	I a	I b	II	III	計
I a	2	4	0	1	7 [5]
I b	2	5	2	3	12 [7]
II	0	1	7	1	9 [2]
III	0	0	2	4	6 [2]
計	4	10	11	9	34

□ : 一致例
[] : 変化例

ごとく Ia 型を示すリンパ節転移巣は 4 例, Ib 型 10 例, II 型 11 例, III 型 9 例と原発巣の DNA ploidy pattern に比べ II・III 型が増加した。原発巣と DNA pattern が一致した症例は 18 例 (53%) であり, 変化のみられた症例は Ia 型 7 例中 5 例 (71%), Ib 型 12 例中 7 例 (58%), II 型 9 例中 2 例 (22%), III 型 6 例中 2 例 (33%) と II・III 型で低くなる傾向がみられた。図 3 に原発巣とリンパ節転移巣の DNA ヒストグラムを示す。

3) リンパ節転移巣における DNA ploidy pattern 変化例の検討

リンパ節転移巣で DNA pattern の変化した症例の原発巣での DNA pattern, 深達度, 組織型について検討した。

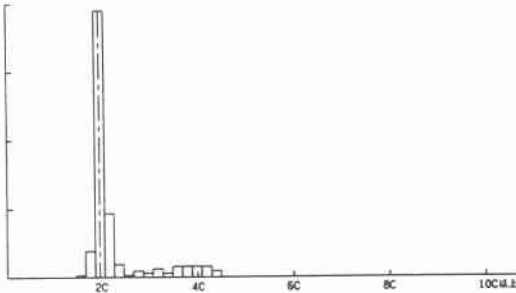
(1) 組織型

組織型を分化型癌 (pap, tub₁, tub₂) と未分化型癌

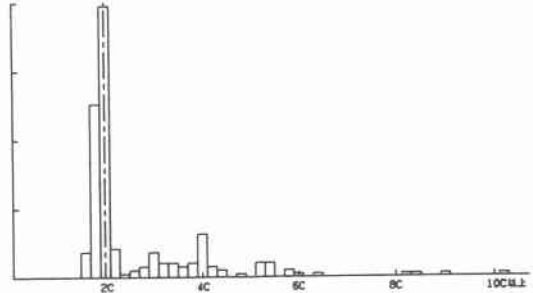
図3 胃癌原発巣およびリンパ節転移巣 (n_1) のDNA ヒストグラム
 症例1 : 原発巣, Ia型, 転移巣, Ib型
 症例4 : 原発巣, Ib, 転移巣, II型

症例 1

原発巣

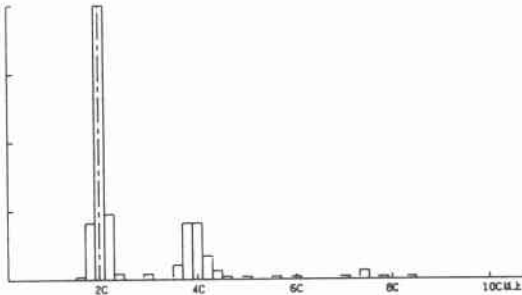


リンパ節転移巣 (n_1)



症例 4

原発巣



リンパ節転移巣 (n_1)

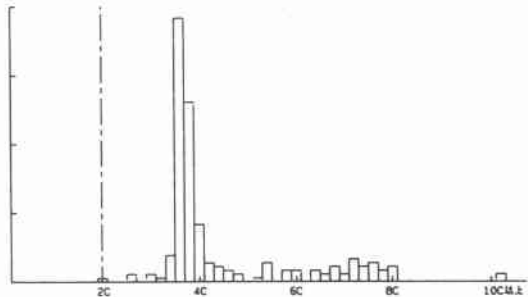


表2 原発巣とリンパ節転移巣 (n_1) のDNA pattern と組織型

症例 No.	組織型		DNA pattern	
	原発巣	転移巣	原発巣	転移巣
分化型癌	1. pap	→ por	Ia	→ Ib
	2. tub ₂	→ por	Ia	→ Ib
	3. pap	→ tub ₂	Ia	→ III
	4. tub ₂	→ por	Ib	→ II
	5. tub ₁	→ tub ₂	Ib	→ III
	6. pap	→ pap	Ib	→ III
	7. pap	→ pap	III	→ II
	8. pap	→ pap	II	→ III
未分化型癌	9. por	→ por	Ia	→ Ib
	10. por	→ por	Ia	→ Ib
	11. por	→ por	Ib	→ Ia
	12. por	→ por	Ib	→ Ia
	13. por	→ por	Ib	→ II
	14. por	→ por	Ib	→ III
	15. por	→ por	II	→ Ib
	16. por	→ por	III	→ II

(por) に大別し検討した。分化型癌では表2に示すごとく8例中6例で polyploid cell あるいは aneuploid

population の出現がみられるのに対し、未分化型癌8例ではその変化に一定の傾向がみられなかった。また分化型癌では、5例において組織型が変化しており、転移巣での低分化の傾向がみられた。

(2) 深達度

予後的漿膜面因子 (ps) 別に検討を加えた。ps (-) 例では8例中6例に polyploid cell, aneuploid population の出現がみられたのに対し、ps (+) 例ではその変化に一定の傾向はみられなかった (表3)。

4) 肝転移巣の DNA ploidy pattern

開腹時肝転移を認めた胃癌原発巣の DNA ploidy pattern は全例II型を示し、他の pattern はみられなかった。一方、肝転移巣の検討では5例ともII型を示し、原発巣の DNA pattern と一致した (表4)。図4は胃癌原発巣と肝転移巣の DNA ヒストグラムであり、原発巣、転移巣とも 3c 近くに peak を有する aneuploid pattern を示した。

表3 予後的漿膜面因子 (ps) からみた原発巣とリンパ節転移巣 (n₁) での DNA pattern

症例 No.	予後的漿膜面因子 (ps)	DNA pattern	
		原発巣	転移巣
1.	ps (-)	I a →	I b
3.		I a →	III
5.		I b →	III
6.		I b →	III
7.		III →	II
8.		II →	III
13.		I b →	II
14.	I b →	III	
2.	ps (+)	I a →	I b
4.		I b →	II
9.		I a →	I b
10.		I a →	I b
11.		I b →	I a
12.		I b →	I a
15.		II →	I b
16.		III →	II

表4 胃原発巣および肝転移巣の組織型および DNA pattern

症例 No.	原発巣		肝転移巣	
	組織型	DNA pattern	組織型	DNA pattern
34.	tub ₂	II	pap	II
35.	tub ₂	II	tub ₂	II
36.	pap	II	por	II
37.	por	II	pap	II
38.	por	II	por	II

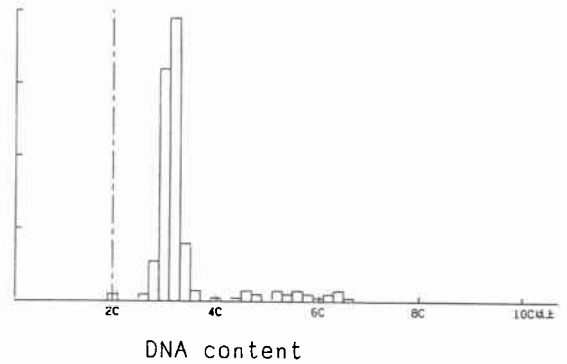
考 察

転移は悪性腫瘍の最も重要な性格の一つである¹⁾が、一つの腫瘍を構成している細胞すべてが同じ転移能を持っているわけではなく、転移能に関する不均一性 (heterogeneity) があり、なかに特に転移能の高い細胞群があることが実験的に示唆されている²⁾³⁾。

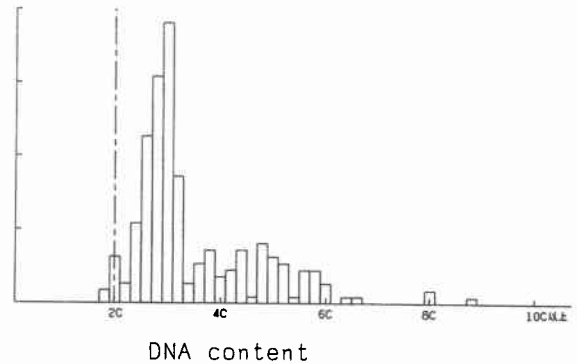
一方癌細胞核 DNA 量は癌細胞の生物学的悪性度を反映するとされ、DNA aneuploidy を示すもの、分散幅の広いものはリンパ節、肝転移陽性率が高く予後不良と報告されている⁴⁾⁵⁾。しかし DNA diploidy を示すものでも転移が皆無というわけではなく、少数ながら高度に転移をきたすものもあり、上述の報告⁶⁾³⁾から推察すると、これらの DNA diploidy を示す腫瘍でも転移に際しては、腫瘍内の転移能の高い細胞群が転移をきたすことが予想される。したがって転移巣の核 DNA 量を測定することは癌の性格をより正確に把握するのに重要と思われる。古田ら⁷⁾も転移巣の核 DNA 量分布パターンの検索は、遺残した転移巣に対する術後補助療法の効果を予測するうえでも重要であると述べている。今回行った検討の結果、原発巣と第1群リンパ節転移巣における DNA pattern の一致率は53%であり、鎌田ら⁸⁾の61%とほぼ同様の成績であった。Flow cytometry を用いた大腸癌、甲状腺癌症例の検

図4 胃癌原発巣および肝転移巣の DNA ヒストグラム

原 発 巣



肝 転 移 巣



討では、68~86%^{9)~11)}が一致したと報告されており、われわれの観察結果よりも高い値であった。これは検索臓器、DNA pattern の分類法による違いもあると思われるが、Flow cytometry は一度に1~2万個もの多量の細胞核を測定しうるため、蛍光顕微測光では認識できない小さな subpopulation も検出でき、一致率が高くなったものと思われる。その反面、Flow cytometry では正常細胞の混入を避けえないという欠点があり、原発巣と転移巣の癌細胞の各 population の多寡を正確には決定できないものと思われる。しかし、Flow cytometry による測定でも少数ながら明らかにリンパ節転移巣で核 DNA 量が変化している症例の報告もあり¹⁰⁾¹¹⁾、その機序として原発巣での小さな subpopulation が転移巣で優位な増殖を示すように

なつたと推察されている。しかし胃癌のリンパ節転移巣の DNA pattern の変化について検討がなされた報告はまだ少なく、鎌田らの報告⁹⁾を除けば少数例の検討⁷⁾¹²⁾¹³⁾にとどまっている。

今回の検索結果からみると、原発巣で aneuploid pattern, mosaic pattern を示す II・III型ではリンパ節転移巣で DNA pattern が変化する症例は少なく、肝転移巣では全例変化がみられず、原発巣の DNA pattern と一致した。DNA pattern Ia型では転移巣で polyploid 化するものが多くみられ、Ib型では aneuploid population の出現が多くみられた。したがって原発巣が aneuploid cell から構成される腫瘍では DNA pattern にほとんど変化がみられないが、Ia・Ib型を示す腫瘍では、転移に際してはより生物学的活性の高い aneuploid population の出現や polyploid 化をきたす場合があると考えられる。Atkin ら¹²⁾は転移巣、再発巣において 5 例中 4 例において DNA/Chromosome 比の増加、すなわち Chromosome 1 個あたりの平均 DNA 量の増加を認めており、Leuchtenberger ら¹⁴⁾はリンパ節転移巣で原発巣より幅広い DNA の分布を認めたと報告している。また、川口ら¹⁵⁾はラット腹水肝癌 AH 7974 の眼球内転移巣から癌細胞を採取、培養し、左心室内に注入するという in vitro-in vivo の操作を繰り返すことによって眼球転移率が増加したと報告し、そのクローン染色体数を調べたところ、最初は 76% が 40~50 本の間分布するのに対し、1, 6, 10 回目の操作の後では 80% が 60~80 本の間分布したと述べている。鎌田ら⁹⁾は胃癌 33 例のリンパ節転移巣の核 DNA 量を測定し、リンパ節転移巣が high ploid に変化しているものが 1 例、low ploid になっているものが 4 例であったと述べ、転移巣での high ploid 化の傾向を指摘している。今回、胃原発巣での組織型・深達度別に DNA pattern の変化を検討した結果では、分化型癌・ps(-)癌で polyploid 化、aneuploid population 出現がみられたが、未分化型癌・ps(+)-癌では一定の傾向がみられなかった。芳野⁴⁾、杉山ら⁵⁾の指摘するごとく原発巣で aneuploid pattern, high ploid を示す症例は一般にリンパ節転移陽性率が高く、悪性度が高いことは事実であるが、分化型癌・ps(-)癌では胃癌原発巣が生物学的活性の低いと考えられる DNA pattern を示してもリンパ節転移巣でより生物学的活性の高い細胞群が出現することが示唆された。かかる事実は原発巣内に潜在する polyploid cell, aneuploid cell が転移したものであるか、あるいは転

移した場での癌細胞の増殖の過程で polyploid 化、aneuploid cell が出現したのかその機序は明らかでないが癌の進展、増殖の複雑性を示唆するものとして興味あるものと思われた。

肝転移に関しても、胃癌・大腸癌などで原発巣で aneuploid pattern を示すものに肝転移が多いと報告⁴⁾⁹⁾¹⁶⁾されており、曾和ら¹⁶⁾は肝転移胃癌 7 例の検討で、DNA pattern はすべて II・III型を示したと報告している。今回われわれの観察結果もこれと一致するものであった。また肝転移巣の DNA ploidy pattern も原発巣と同じ pattern を示したが、原発巣が生物学的活性の高いと考えられる細胞群から構成されており、DNA pattern に変化が生じなかったものと考えられる。しかし鎌田らの報告⁹⁾にみられるごとく、胃癌の肝転移巣では原発巣と異なる pattern をとるとする成績もあり、胃癌原発巣と転移巣との DNA ploidy pattern の検討はなお多くの課題を残しているものと考えられた。

結 語

胃癌 39 例の原発巣および第 1 群リンパ節転移巣、肝転移巣の癌細胞核 DNA 量を測定し以下の結論をえた。

1. 胃癌原発巣の DNA ploidy pattern は Ia 型 7 例、Ib 型 12 例、II 型 9 例、III 型 6 例であり同一症例の第 1 群リンパ節転移巣の DNA ploidy pattern はそれぞれ 4 例、10 例、11 例、9 例と原発巣に比べ II・III 型が増加する傾向であった。
2. 原発巣とリンパ節転移巣の DNA ploidy pattern の一致率は 53% であった。
3. 分化型癌、ps(-)癌はリンパ節転移巣で、polyploid cell および aneuploid population の出現が増加した。
4. 一方、未分化型癌、ps(+)-癌では DNA pattern の変化に一定の傾向はみられなかった。
5. 肝転移 5 例の検討では、原発巣の DNA pattern はすべて II 型を示し、転移巣でも一致した。

文 献

- 1) Baldwin RW, 佐藤春郎 監訳：癌の免疫と転移。講談社、東京、1979, p1-49
- 2) Fidler IJ: Selection of Successive Tumour Lines for Metastasis. Nature New Biol 242: 148-149, 1973
- 3) Fidler IJ: Biological Behavior of Malignant Melanoma Cells Correlated Their Survival in Vivo. Cancer Res 35: 218-224, 1975

- 4) 芳野裕明：胃癌細胞核 DNA パターンに関する研究—とくに臨床病理組織学的所見との関連について—。日外会誌 89：522—533, 1988
- 5) 杉山和夫, 米村 豊, 鎌田 徹ほか：Stage I・II 胃癌における核 DNA プロイディパタンの解析。北陸外会誌 423—27, 1985
- 6) 胃癌研究会編：胃癌取り扱い規約。改訂第11版。金原出版, 東京, 1985
- 7) 古田雄一, 小堀嶋一郎, 森岡恭彦ほか：ヒト胃癌原発巣と転移巣の癌細胞核 DNA 量についての比較検討。癌の臨 33：1777—1782, 1987
- 8) 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
- 9) Kokal WA, Duda RB, Azumi N et al：Tumor DNA content in primary and metastatic colorectal carcinoma. Arch Surg 121：1434—1439, 1986
- 10) Joensuu H, Klemi PJ：Comparison of nuclear DNA content in primary and metastatic differentiated thyroid carcinoma. AJCP 89：35—40, 1988
- 11) Arends JW, Schutte B, Wiggers T et al：Comparison of phenotypic and genotypic features in human primary large bowel carcinomas and lymph node metastases. Cancer Res 47：4342—4344, 1987
- 12) Atkin NB, Mattinson G, Baker MC：A comparison of the DNA content and chromosome number of fifty human tumours. Br J Cancer 20：87—101, 1966
- 13) Böhm N, Sandritter W：DNA in human tumors：A cytofluorometric study. Curr Top Pathol 60：151—219, 1975
- 14) Leuchtenberger C, Leuchtenberger R, Davis AM：A microspectrophotometric study of the deoxyribose nucleic acid (DNA) content in cells of normal and malignant human tissues. Am J Pathol 30：65—85, 1959
- 15) 川口隆憲, 渡辺一男, 杉野 隆ほか：転移性腫瘍の問題点。病理学の立場から。最新医 41：2229—2235, 1986
- 16) 曾和融生, 加藤保之, 芳野裕明ほか：肝転移胃癌の検討—とくに髄様型低分化腺癌と核 DNA との関連について—。日消外会誌 21：32—37, 1988