

食道癌の細胞核 DNA 量による悪性度と 担癌宿主の免疫応答に関する研究

久留米大学医学部外科学第1講座(主任:掛川暉夫教授)

入 江 均

CLINICAL STUDIES ON DNA CONTENT AND IMMUNOLOGICAL RESPONSE IN PATIENTS WITH ESOPHAGEAL CARCINOMA

Hitoshi IRIE

First Department of Surgery, Kurume University School of Medicine

(Director: Prof. Teruo Kakegawa)

食道癌の悪性度を明確にするため、腫瘍の悪性度を癌細胞の核 DNA 量の測定によって、また、宿主の免疫応答をモノクローナル抗体 Leu 7 を用いてその陽性細胞浸潤度で検討した。パラフィンブロック標本134症例の DNA index (DI) を flow cytometry を用いて測定し、その90症例の癌局所の Leu 7 陽性細胞浸潤度を間接酵素抗体法で測定した。低分化型扁平上皮癌、未分化癌の84%は diploid を示し、中・高分化型扁平上皮癌では約50%に aneuploid を認めた。中・高分化型の DI 値は、進行度が進むにつれて高値を示した。Leu 7 陽性細胞浸潤度は低分化型・未分化癌で低く、また stage が進むにつれ低くなった。臨床的悪性度が高い早期再発死亡例は $DI \geq 1.7$ で Leu 7 陽性細胞浸潤度が軽度の症例に高頻度に認めた。

索引用語: 食道癌細胞核 DNA 量, パラフィンブロック標本の DNA index, 食道癌細胞の flow cytometry, 食道癌局所の Leu 7 陽性細胞浸潤度

結 言

食道癌は他の消化管癌と比べて予後不良であり、食道癌に特有な生物学的特性をもつと思われる。そこで、病理組織学的に腫瘍の特性を判定できないかという、多くの研究^{1)~3)}がなされている。一方、癌細胞の核 DNA 量は腫瘍の生物学的特性、すなわち悪性度を表わす指標の一つとして考えられており、この課題についても多くの検討^{4)~6)}がなされている。核 DNA 量の測定方法として、最近では flow cytometry (以下 FCM と略す) が用いられるようになってきた。本法の特徴は、多数の細胞を迅速かつ客観的に核 DNA 量を測定することが可能である。FCM を用いた核 DNA 量は、新鮮標本を用いて測定されるのが一般的であるが、新鮮標本で得られた成績から予後を正確に評価するためには、ある一定期間の経過観察が必要となる。そこで、

既に臨床経過を知り得た過去の食道癌症例のパラフィンブロック標本により、癌細胞核 DNA 量について検索が可能となれば、核 DNA 量のもつ臨床的意義がより明確になると考えた。しかし、食道癌の生物学的特性を解析するためには、腫瘍自体のみに着目することなく、癌腫に対する担癌宿主の生体反応についても検討を加えなければならないと判断した。このような観点から、食道癌の生物学的特性について、癌細胞の核 DNA 量測定と癌腫に対する宿主の生体反応を癌局所の免疫応答より検討を加えた。

対象および方法

1981年1月より1987年12月までに当科で切除した胸部食道癌は213例であったが、術前に合併療法の施行されていない141例中、パラフィンブロック標本の保存状態が良好な134例を今回の検索対象とした。これら134例の食道癌取扱い規約⁷⁾に基づいた組織学的進行度は、stage 0 が17例、stage 1 が12例、stage 2 が7例、stage 3 が49例、および stage 4 が49例であった。

なお、1986年1月より1987年7月までの40症例については、新鮮標本とパラフィンブロック標本の DNA histogram を解析し、両標本の結果を検討した。癌細胞核 DNA 量と癌局所の免疫応答反応を測定した症例は90例であり、その内訳は、stage 0 が16例、stage 1 が7例、stage 2 が2例、stage 3 が33例、および stage 4 が32例であった。

1) 食道癌細胞の核 DNA 量についての測定方法

a) 新鮮標本を用いた方法：新鮮標本の検体は手術により摘出された腫瘍組織を用い、採取部位は腫瘍発育先進部位とした。新鮮材料はまず、phosphate buffer saline (PBS) で洗浄し、血液成分を除去した後、両刃カミソリを用いて試料を0.5~1mm 四角に細切した。次に、PBS で1,000unit/ml に調整した dispase (合同酒精社) を加え、37°C 3時間酵素処理し、単離細胞浮遊液を作成した。さらにこの細胞浮遊液を40 μ m のステンレスメッシュでろ過後、PBS で洗浄し、Tris Buffer 200 μ l に浮遊させた。細胞浮遊液に Triton X-100 を加え、裸核にした後、1% RNase 200 μ l を加えて処理した。0.02% ethidium bromide を加え DNA を染色し、flow cytometry (Spectrum III Ortho 社) で DNA histogram を作成した。また、細胞浮遊液の一部をスライドガラス上に塗抹し、Papanicolaou および Giemsa 染色を行い、浮遊細胞の形態や癌細胞純度について検討した。

b) パラフィンブロック標本を用いた方法：10% formaline 液に固定したパラフィン標本より、100 μ m の厚切切片と4 μ m の薄切切片を作成した。薄切切片はヘマトキシリン・エオジン (H.E.) で染色し、病理組織学的検討を行った。厚切切片は60°C の xylene で脱パラフィンを行った後、100%、95%、85%、および75% の濃度の ethanol に順次浸透させて加水操作を行い、PBS 液で洗浄した。次に非特異的蛍光を除去する目的で、5mmol EDTA 加 PBS 液中で約24時間60°C の加温処理を行った。H.E.染色によって腫瘍発育先進部位を確実に採取するとともに、同一症例の非癌部食道正常粘膜も同様の方法で採取した。これらの試料を芦原⁹⁾、蒲池ら⁹⁾¹⁰⁾の方法に準じて、それぞれの検体を0.1% collagenase (Washington 社) に0.2% 牛血清アルブミン2ml を加えた PBS 溶液中に浸し、37°C の waterbath 内で3時間攪拌した。さらに、ダウンス型ホモジナイザー (岩成ガラス KK 製) を用いて細胞浮遊液を作成し、この浮遊液を40 μ m の stainless steel mesh で濾過後 RNase で RNA 処理し、0.025mg/ml Propidium

Iodide (PI) 1ml を加えて DNA 染色し、FCM を用いて核 DNA 量を測定した。なお、核 DNA 量を測定する細胞浮遊液の一部をスライドガラス上に塗布し、Giemsa 染色で浮遊細胞の形態と癌細胞の純度について鏡検した。また、PI 染色後の浮遊細胞は蛍光顕微鏡下で細胞核の形態を観察し、FCM による測定の検体として使用できるかを判定した。

c) DNA index (DI 値) の算出方法

① 新鮮標本検体を用いた場合：DI 値 = 癌細胞の G₀/G₁ の peak channel number / リンパ球の G₀/G₁ の peak channel number の方式で算定した。

② パラフィンブロック標本を用いた場合：DI 値 = 癌細胞の G₀/G₁ の peak channel number / 非癌部正常粘膜の G₀/G₁ の peak channel number の方式で算定した。

2) 癌局所における免疫応答反応の検索方法

この検索方法は戸次¹¹⁾の報告に準じて行った。すなわち NK 細胞を認識する Leu 7 モノクロナール抗体を用い、陽性細胞浸潤度によって測定を行った。検体はパラフィンブロック標本からの3 μ m の薄切切片を用いた。モノクロナール抗体としては Leu 7 抗体 (Becton Dickinson 社) を使用し、間接酵素抗体法 (ABC 法) で染色し、細胞の同定ならびに分類を行った。Leu 7 抗体は、100倍に希釈し、ウェットチェンバーのなかで、室温で90分間反応させた後、Ca²⁺ および Mg²⁺ を含まない PBS で洗浄した。2次抗体としては、Biotin 標識抗マウス IgM (Vector 社) を用い、さらに3次抗体としては、Abidin-Biotin-Peroxidase complex (ABC キット, Vector 社) をおのおの60分間ずつ反応させた。PBS で洗浄後、0.01% H₂O₂・DAB (3, 3-diancino benzidine, Sigma 社) を加えて発色させた。Leu 7 陽性細胞を黒色化するために、0.5% 硫酸銅溶液に数分間浸し、核染は1% メチルグリーン溶液を用いて行った。食道癌の発育先進部における Leu 7 陽性細胞の浸潤度は、光顕400倍で方眼マイクロメーターを用い、癌発育先進部の250 μ m の範囲内の陽性細胞数を10か所以上検鏡し、その平均値が5個未満を浸潤度 (+)、5~10個を (++) および10個以上を (+++) とし判定した。

3) 食道癌細胞核 DNA 量の解析方法

a) 新鮮標本とパラフィンブロック検体を用いて測定した DI 値の比較：食道癌40症例について、まず新鮮標本を用いて DI 値を測定し、その後パラフィンブロック標本を作成し、作成したブロック標本を用いて

再度 DI 値を測定し、両者の相関関係を検討した。

b) 非癌部食道粘膜の DI 値；134症例すべての非癌部食道粘膜の DI 値を測定した。

c) DI 値と組織学的分化度；134症例中、低分化型扁平上皮癌（以下低分化型）および未分化癌は22例、中分化型扁平上皮癌（以下中分化型）は78例、および高分化型扁平上皮癌（以下高分化型）は34例であった。分化度別に aneuploid の出現頻度を比較した。

d) DI 値と組織学的深達度（a 因子）；低分化型・未分化癌の多くは DI 値1.0を示し、DI 値による比較検討は不可能であったため、中・高分化型112例について検討した。その内訳は、中分化型は78例中、 a_0 症例は28例、 a_{1-2} 症例は40例、および a_3 症例は10例であった。高分化型34例中、 a_0 症例は11例、 a_{1-2} 症例19例および a_3 症例は4例であった。

e) DI 値とリンパ節転移（n 因子）；中・高分化型についてのみ検討した。症例の内訳は、中分化型は78例中、 n_0 症例33例、 n_{1-2} 症例23例および n_{3-4} 症例は22例であった。高分化型は34例中、 n_0 症例は9例、 n_{1-2} 症例は17例および n_{3-4} 症例は8例であった。

f) DI 値と組織学的進行度（stage）；中・高分化型について DI 値との関係を検討した。症例の内訳は中分化型78例中、stage 0 症例は12例、stage 1 5例、stage 2 1例、stage 3 31例および stage 4 が26例であった。高分化型では stage 0 は3例、stage 1 4例、stage 2 5例、stage 3 13例および stage 4 が9例であった。

g) DI 値と予後； R_2C_2 以上の治癒切除が施行され、直死および他病死を除いた65症例について早期再発（18か月以内）死亡例と DI 値との関係を検討した。

4) Leu 7 陽性細胞浸潤度の解析方法

a) Leu 7 陽性細胞浸潤度と組織学的分化度；癌局所における Leu 7 陽性細胞浸潤度を測定した90症例の内訳は、低分化型・未分化癌15例、中分化型53例、および高分化型が22例であった。これらの症例を組織学的分化度別に、Leu 7 陽性細胞浸潤度について比較検討した。

b) Leu 7 陽性細胞浸潤度と a 因子；深達度別にみた90症例の内訳は a_0 31例、 a_{1-2} 49例、および a_3 が10例であった。これら症例の深達度と Leu 7 陽性細胞浸潤度について検討した。

c) Leu 7 陽性細胞浸潤度と n 因子；リンパ節転移の内訳は n_0 37例、 n_{1-2} 25例および n_{3-4} が28例で、これら n 因子と Leu 7 陽性細胞浸潤度を検討した。

d) Leu 7 陽性細胞浸潤度と stage；stage 別の内訳

は stage 0 16例、stage 1 7例、stage 2 2例、stage 3 33例および stage 4 が32例であり、これら stage 別に Leu 7 陽性細胞浸潤度を検討した。

e) Leu 7 陽性細胞浸潤度と予後； R_2C_2 以上の治癒切除が施行され、直死および他病死を除いた43症例について、早期再発死亡例と Leu 7 陽性細胞浸潤度との関係を検討した。

5) DI 値と Leu 7 陽性細胞浸潤度との関係

DI 値及び Leu 7 陽性細胞浸潤度の両者を測定した90症例について、Leu 7 陽性細胞浸潤度と DI 値との関係を検討した。

6) DI 値と Leu 7 陽性細胞浸潤度よりみたら予後； R_2C_2 以上の治癒切除が施行された症例のうち、直死および他病死を除いた43症例について早期再発死亡例と、Leu 7 陽性細胞浸潤度および DI 値との関係について検討した。

7) 統計学的処理方法

有意差の判定は、student t-test もしくは、 χ^2 -test を用いて $p < 0.05$ を有意差とした。また、平均値のすべて

図1 パラフィンブロック標本よりえられた食道癌細胞浮遊液
A: Giemsa 染色, B: PI 染色像

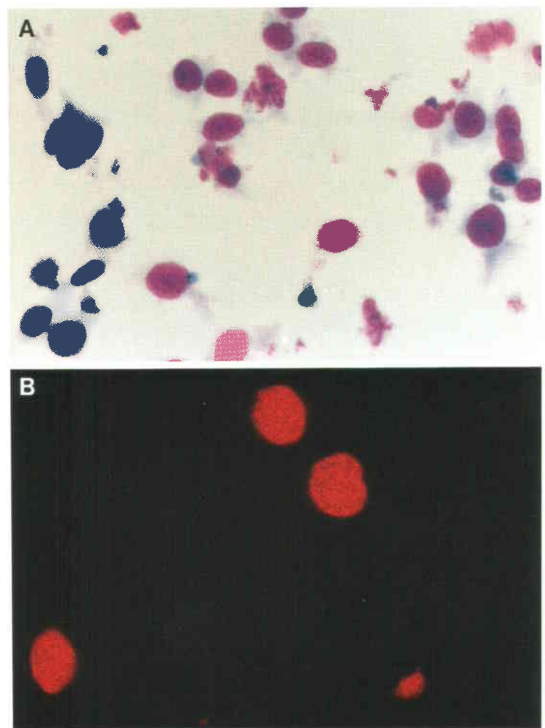
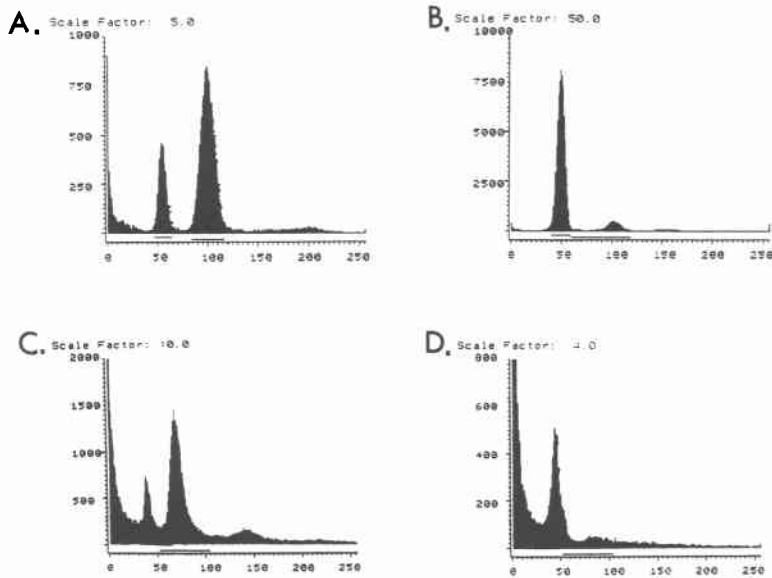


図2 パラフィンブロック標本と新鮮標本よりえられた食道癌細胞の核 DNA histogram の比較

A: aneuploid (新鮮標本), B: diploid (新鮮標本), C: aneuploid (パラフィンブロック標本), D: diploid (パラフィンブロック標本)



は mean±SD で表した。

結 果

1) 食道癌細胞核 DNA 量の解析結果

a) パラフィンブロック標本と新鮮標本との DI 値の関係；パラフィンブロック標本を用いて作成した細胞浮遊液の Giemsa 染色および PI 染色像を図 1 に示した。次に、新鮮標本とパラフィンブロック標本を用いて測定した DNA histogram を図 2 に示した。Coefficient of variation (CV) 値は、新鮮標本では平均は7.7±2.1で、パラフィンブロックでは10.2±3.5%とパラフィンブロック標本がやや高値を示した。diploid の判定は、DI=1.0±0.1として行った。新鮮標本を用いて測定した場合とパラフィンブロック標本を用いた場合の DI 値の相関関係をみると、図 3 に示すように両者間には有意な相関関係 (r=0.98 p<0.01) が認められた。

b) 非癌部食道粘膜の DI 値；134例すべての症例が 1.0であった。

c) 分化度別の aneuploid の出現頻度；図 4 に示すように高分化型は53%，中分化型で46%，低分化型・未分化癌は14%と分化度の高いものほど、aneuploid の出現頻度は高値であった。

d) a 因子と DI 値の関係；中・高分化型について検

図3 食道癌新鮮標本とパラフィンブロック標本による DI 値の比較

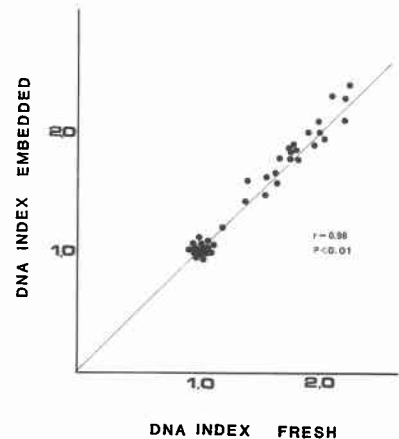
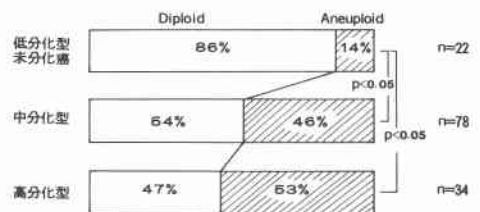


図4 分化度別にみた aneuploid の出現率



討したところ、高分化型は図5に示すように、 a_0 症例のDIの平均値は 1.20 ± 0.41 、 a_{1-2} 症例は 1.38 ± 0.43 、および a_3 症例では 1.85 ± 0.39 であった。中分化型は a_0 症例のDI値の平均値は 1.19 ± 0.33 、 a_{1-2} 症例は 1.37 ± 0.41 および a_3 症例は 1.82 ± 0.55 であった。a因子が高くなるにつれてDI値も高値を示し、高分化型においては a_0 と a_{1-2} の間には有意差 ($p < 0.005$) を認めた。また、中分化型においては a_0 、 a_{1-2} 、および a_3 のすべてに有意差 ($p < 0.05 \sim p < 0.005$) を認めた。

e) n因子とDI値の関係；中・高分化型でみると図6に示すように、高分化型は、 n_0 症例のDI値の平均値は 1.20 ± 0.41 、 n_{1-2} 症例は 1.38 ± 0.43 、 n_3 症例では、

1.85 ± 0.39 であった。中分化型は n_0 症例のDI値の平均値は 1.26 ± 0.37 、 n_{1-2} 症例は 1.30 ± 0.37 、 n_3 症例では 1.57 ± 0.55 であり、高分化型では n_0 と n_{3-4} の間に、また n_{1-2} と n_{3-4} の間に有意差を認めた。中分化型では、 n_0 と n_{3-4} では $p < 0.005$ で、 n_{1-2} と n_{3-4} では $p < 0.05$ で有意差を認めた。

f) stageとDI値の関係；図7に示すように高分化型では、stage 0 および 1 症例のDI値の平均値がいずれも 1.0 ± 0.0 であった stage 2 では 1.38 ± 0.55 、stage 3 では 1.45 ± 0.44 および stage 4 では 1.83 ± 0.37 であった。中分化型では stage 0 症例のDI値の平均値は 1.11 ± 0.22 、stage 1 では 1.21 ± 0.39 、stage 2 では

図5 高・中分化型扁平上皮癌における a 因子と DI 値の関係

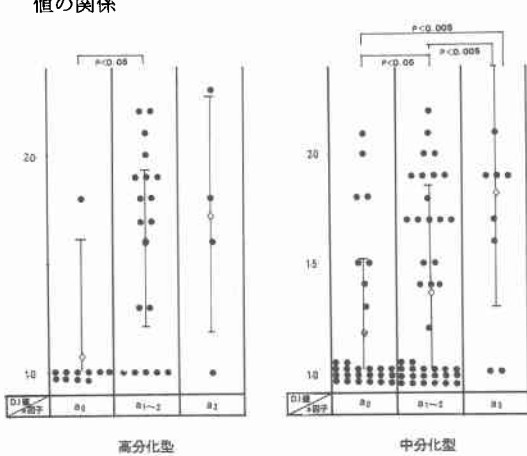


図6 高・中分化型扁平上皮癌における n 因子と DI 値の関係

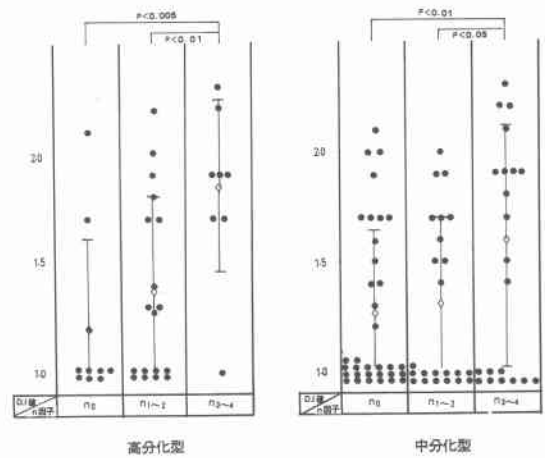


図7 高・中分化型扁平上皮癌の stage と DI 値の関係

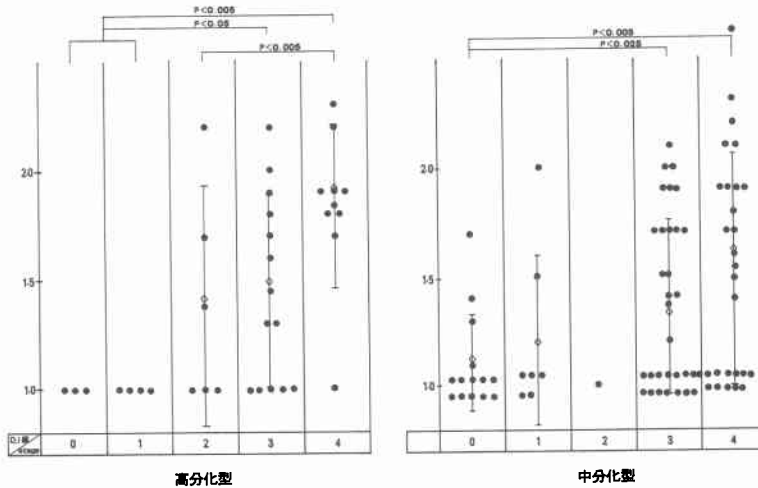


図8 治癒(R₂C₂以上)例における早期再発死亡とDI値の関係

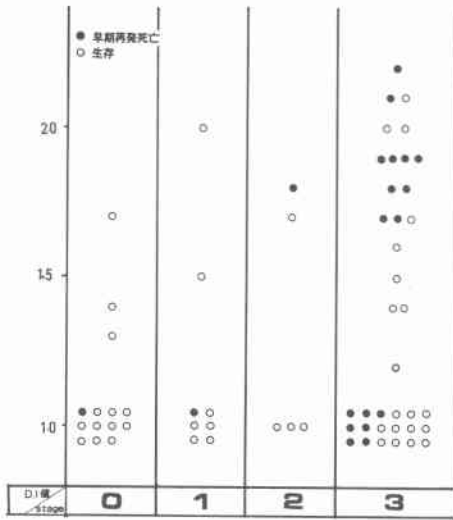
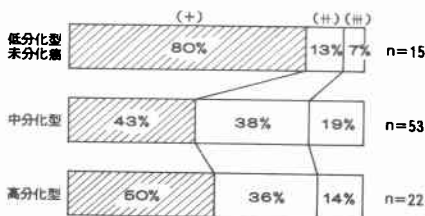


図9 分化度別にみた癌局所における Leu 7 陽性細胞浸潤度



1.0±0.0, stage 3では1.36±0.40およびstage 4では1.53±0.53であった。高分化型ではstage 0および1とstage 3および4, またstage 2とstage 4に有意差(p<0.05~p<0.005)を認めた。中分化型においてはstage 0とstage 3, および4の間に有意差(p<0.025~p<0.005)を認めた。

g) DI値と早期再発死亡との関係; 図8に示すようにDI≥1.7の症例では, 18例中11例(61%)に早期再発死亡を認めたが, 1.1<DI<1.7の症例では早期再発死亡を認めなかった。

4) Leu 7 陽性細胞浸潤度の解析結果

a) 分化度別の Leu 7 陽性細胞浸潤度; 図9に示すように浸潤度(+)以上の症例は高分化型で50%, 中分化型で57%, 低分化型・未分化癌では20%であった。中・高分化型と比較すると低分化型・未分化癌において Leu 7 陽性細胞浸潤度の低い症例が多く認められた。

図10 a, n 因子別にみた Leu 7 陽性細胞浸潤度

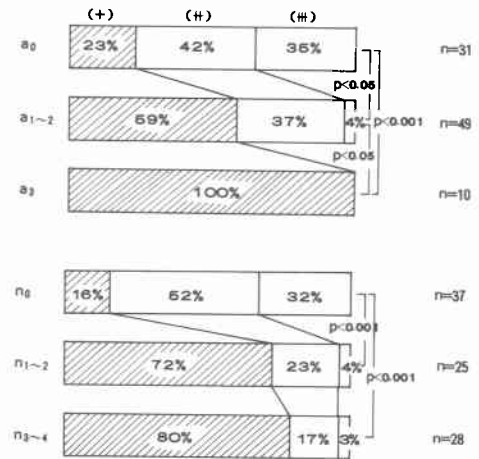
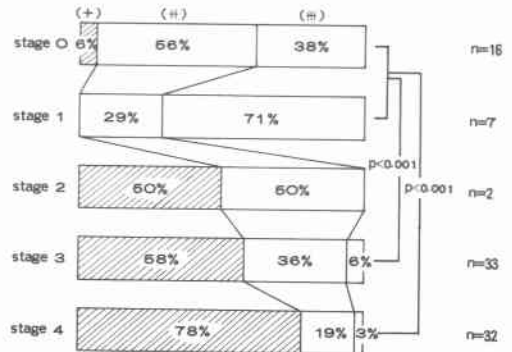


図11 stage 別にみた Leu 7 陽性細胞浸潤度



b) Leu 7 陽性細胞浸潤度と a 因子; 図10に示すように, a₀では35%が浸潤度(##)で, 浸潤度(+)は23%であった。a₁₋₂では浸潤度(+)は59%であり, a₃ではすべて浸潤度(+)の症例であった。深達度が増大するにつれて Leu 7 陽性細胞浸潤度が減弱する傾向を認めた。

c) Leu 7 陽性細胞浸潤度と n 因子; 図10に示すように, n₀症例では浸潤度(##)以上の症例は84%を占めていたが, n₁₋₂症例では浸潤度(+)が全体の72%を示した。一方, n₃₋₄症例では, 浸潤度(+)が80%を占めていた。

d) Leu 7 陽性細胞浸潤度と stage; 図11に示すように, stage 0~1の比較的早期症例では浸潤度(##)以上の頻度は96%(23例中22例)であった。一方, stage 2~4の症例では, 浸潤度(##)の症例は4%(67例中3例)であり, 浸潤度(+)のものはstage 2で50%。

良否を検討し、腫瘍純度が40%以上の検体のみを検索対象とした。また、C)に対しては、PI染色した細胞浮遊液を蛍光顕微鏡を用いて核の形態や蛍光強度を観察し、良好な状態を示した検体のみ核DNA量をFCMで測定した。

従来、FCMによるDNA histogram解析には、新鮮な組織材料が必要とされてきた。新鮮標本のデータの臨床的意義を評価するためには、一定期間の臨床経過を観察する必要がある。そこで、臨床経過を知りえた症例のパラフィンブロック標本を用いて測定することが可能となれば、その臨床的意義についても十分検討できるものと考えられる。Hedley¹⁵⁾、Vindelov¹⁶⁾らは、パラフィンブロック標本で、DNA histogramの測定を行い、新鮮標本と近似のDNA histogramが作成できることを報告している。著者もその方法に基づき、パラフィンブロック標本を用いた食道癌細胞の核DNA量の測定を試みた。前述したように、FCMで核DNA量を測定するには、単離細胞浮遊液を作成する必要がある。そこで、単離細胞浮遊液の作成法について検討を加えた。固形腫瘍細胞の分離法は大別して、機械的分散法と酵素およびキレート剤による化学的分散法がある。現在主として用いられている方法は、この両者を組み合わせた方法で、杉田¹⁴⁾らはそれぞれの方法の問題点について考察を加えているが、実際には各施設で種々の方法が行われている。そこで著者は、化学的分散法による細胞分離として、collagenase(牛血清アルブミン添加)を用い、機械的分散法としては、細胞損傷の少ないダウンス型ホモジナイザーを使用した。化学的分散法として用いたコラゲナーゼは、完全裸核にすることは困難であったが、操作が簡便で、FCMの短所を補うための細胞形態の観察ができた。また残存する細胞質の非特異的蛍光もEDTAを加えた加温処理¹⁷⁾で良好なhistogramを作成することができた。

以上の方法で測定したパラフィンブロックの癌細胞核DNA histogramにおけるDNA indexの対比では、相関係数($r=0.98$)と極めて高い相関($p<0.01$)を示した。また、CV値を新鮮標本と比較すると、新鮮標本のCV値が $7.7\pm 2.1\%$ であるのに対し、パラフィンブロック標本のCV値は、 $10.2\pm 3.5\%$ と高値を示したものの両群間に有意差はなく、南¹²⁾が報告したように、diploidは $DI=1.0\pm 0.1$ として判定した。

次に、パラフィンブロック標本を用いた核DNA histogramの測定に対するexternal standardの設定で

あるが、新鮮標本の場合は、ヒト末梢血よりFicoll-Paque法で得られたリンパ球をcontrolとして用いた。しかし、パラフィンブロック標本の場合には、external standardとして、パラフィンブロック標本よりリンパ球のみを採取することは困難である。そこで、著者は自己の末梢血リンパ球を採取し、ホルマリン液で12時間、24時間、48時間と時間を変えて固定した後、その蛍光強度を測定した。ところがその結果、固定時間による蛍光強度の差異が判明した。このことから、手術時に採取したリンパ節や随時採取した末梢血のリンパ球をパラフィンブロック標本にして、個々の症例に対するexternal standardとして用いることは不適当であると考えた。そこで同様のパラフィン包埋過程を経た標本の中で、非癌部正常粘膜を同じ方法で細胞分離し、その G_0/G_1 peak channel numberをexternal standardとして用いた。

さて、今回の食道癌細胞の核DNA histogramを解析した結果をみると、非癌部正常粘膜はすべてdiploidを示したのに対し、癌部では134例中58例(43%)がaneuploidを示した。これまでもBarlogie¹⁸⁾、Leuchfenberger¹⁹⁾らによって固型癌では、aneuploidが高頻度に出現することが報告されている。しかし、aneuploidの出現頻度は必ずしも一致したものではなく、この出現頻度の差異は、aneuploidの設定基準や測定方法に基づくものではないかと考えられる。また、各臓器によってもaneuploidの出現頻度は異なるという報告²⁰⁾もある。

次にDNA histogramと癌の組織学的分化度についてみると、蒲池⁸⁾は顕微鏡蛍光測定法による胃癌の検討からploidy patternを3型に分類し、I型つまりpolyploid cellやaneuploid cellを含まないグループの多くが、未分化癌、低分化型腺癌であったと述べている。しかし、杉町²¹⁾らは食道癌においてaneuploid cellを多く含むtypeは、低分化型扁平上皮癌が多かったと報告している。FCMを用いた測定においても、Temple²²⁾らは、DNA分布パターンと組織学的分化度、進行度および予後を比較検討し、分化度が低いものほど、さらに深達度が進むにつれてpolyploid cellやaneuploid cellが多数出現すると報告している。一方、Petrova²³⁾らは、diploidを示す症例の多くが早期癌か低分化型腺癌であったと報告しており、DNA histogramと組織学的分化度との間には必ずしも一定した見解は得られていない。今回の著者の検討結果では、低分化型・未分化癌では14%にaneuploidを認め

たにすぎず、他はすべて diploid であった。しかし、高分化型では53%、中分化型では46%に aneuploid の出現を認め、分化度の高いものほど aneuploid の出現率は高値を示した。このように、組織学的分化度の相異により、aneuploid の出現頻度が異なる理由については、いまだ明らかにされていない。

さらに、stage と DI 値の関係をみると、DI 値は a 因子、n 因子および stage とともに密接な相関があると報告²¹⁾と、病期による差異はないとする報告²⁰⁾の両者がある。著者の検索結果では、中・高分化型では、a, n 因子や、stage が進むにつれて DI 値は高値を示し、aneuploid の出現頻度も有意に高値を示した。このことは、癌の進行とともに癌細胞核 DNA 量の変異が増幅され、増幅された細胞が stem line を形成することにより G₀/G₁ 期細胞の peak 値が右方に偏位したものと推測¹³⁾される。

次に細胞増殖の動態を知る上で stem line を見定めることは重要であり、複数の細胞増殖集団が存在する場合には、stem line が複数となる。今回の検討では、複数の stem line を形成したものはわずか 1 例 (0.7%) のみに認めたにすぎなかった。しかし現在の測定法では、極くわずかな細胞集団の stem line を認識することは困難と考える。また、FCM により測定した癌細胞核の DNA histogram の解析においては、次の点に留意しなければならない。つまり、FCM による固形癌の測定では、純粋に腫瘍細胞のみを測定することは不可能であり、histogram 上で癌細胞の stem line と判定したものが、実際に癌細胞の G₀G₁ 期であることを証明することができない。そこで、著者はできる限り腫瘍細胞の純度の高い浮遊液を採取するため、counter flow centrifugal elutriation²⁴⁾などを用いて検討中であるが、腫瘍純度を70~80%に高めた場合においても、同様の stem line を認めている。今回の検索症例の予後を DI 値でみると、早期癌においては、多くの症例が diploid を示し、DI 値により予後を推測することは困難であったのに対し、進行癌の場合、DI 値は予後を推測する大きな指標となる結果を得た。つまり、病理組織学的所見からみて相対的もしくは絶対的治癒切除が行われたと考えられた症例の予後をみても、aneuploid 群では DI \geq 1.7 の症例にのみ早期再発死亡例を認めている。DI 値の高いものは相対的に進行度が低い症例が多いことを考慮し、同一 stage の症例と比較したところ、やはり DI 値の高値なものに早期再発死亡を認めた。しかし、これらの症例の中にも少数な

がら DI 値が高値を示しても長期生存している症例や、DI 値が低値を示したにもかかわらず術後早期に再発死亡した症例なども認められた。

癌細胞の悪性度を考えると、臨床的には予後と直結したものが理解しやすいが、藤田²⁵⁾は、『悪性度とは必ずしも予後と関係するものではなく、細胞の異形度を示している点に注意すべきで、予後において悪性度が有意な腫瘍の場合とさほど意義をもたぬものもある。同一部位の同一の組織像を呈する、同じ大きさの腫瘍では、悪性度の程度が予後とある程度並行しうるが予後は宿主の状態によっても左右されるため、単に腫瘍のみの悪性度で予後を判定することは困難である』と述べている。このことは、予後を腫瘍側因子のみで推測するには限界があることを示唆しており、宿主側の因子、特に癌に対する生体防御反応を含めた両面からの検討が必要と考えられた。

これまで、癌組織に浸潤しているリンパ系細胞は癌に対する担癌宿主の生体反応としてとらえられており、リンパ球浸潤の程度と予後とが比較的相関²⁶⁾²⁷⁾していると考えられている。現在では癌部に浸潤するリンパ系細胞の中でも、natural killer (NK) 細胞と lymphokine activated killer (LAK) 細胞などを中心とした細胞性免疫が重要視^{28)~30)}されている。特に NK 細胞は、悪性腫瘍に対する免疫応答において重要な役割を果たしており、腫瘍増殖を抑制する効果があると言われている。戸次¹¹⁾も、食道癌の腫瘍先進部位における NK 細胞浸潤度 (特に Leu 7 陽性細胞) は、その予後を反映することを報告している。そこで著者は、食道癌の腫瘍先進部における Leu 7 陽性細胞の浸潤程度について検討し、自己食道癌に対する担癌生体の防御反応について検討を加えた。癌の組織学的分化度と leu 7 陽性細胞の浸潤度との関係をみると、低分化型・未分化癌は、中・高分化型と比べて有意に Leu 7 陽性細胞の浸潤度が低下した症例が多く、従来より述べられているように癌腫の分化度による抗原性の相違が示唆された。このことは、一般的に予後不良とされる低分化型・未分化癌では担癌宿主の免疫応答が少なく、容易に浸潤転移をおこすことが推測された。a, n 因子、および stage と Leu 7 陽性細胞浸潤度との関係をみても、癌腫の進行につれて、担癌宿主の癌局所における免疫学的防御反応も低下していると考えられた。また、予後との関連をみても、Leu 7 陽性細胞浸潤度の低い症例に術後早期の再発死亡を認めた。このことより、生体防御能の低下は食道癌の予後を判定する 1 つの指

標と考えられた。

そこで、腫瘍の悪性度因子として DI 値を、宿主の生体防御反応因子として癌局所における Leu 7 陽性細胞浸潤度を指標とし、これら両面より予後を検討したところ、中・高分化型においては、 $DI \geq 1.7$ 、しかも Leu 7 陽性細胞浸潤度が(+)の症例は高率に早期再発死亡していた。しかし DI 値が高値であっても、浸潤度が高いもの、また逆に、DI 値が低値でも浸潤度の低い症例が混在して認められた。そこで、これら症例の予後をみると、DI 値が高値であっても、浸潤度が(++)以上のものであれば比較的長期の生存を認めた。これらの結果から $DI \geq 1.7$ で浸潤度(+)の症例は、たとえ根治手術が施行されても術後の再発の危険性が高いことを意味している。このような症例に対しては、より拡大した手術により en block に癌を完全に摘除するか、もしくは、侵襲の大きな拡大手術ではなく、病巣切除と免疫化学療法で集学的治療を行うかの適応を決定する必要があると考えられた。

腫瘍の生物学的特性と生体防御反応を術前に判別し、個々の癌腫に最も適した治療を行うことが重要であり、今後精度の高い controlled randomized study によって、より明確な治療法を確立したいと考えている。

稿を終えるにあたり御指導、御校閲を賜った第 1 外科の掛川暉夫教授ならびに免疫学教室の横山三男教授に深甚なる謝意を表します。また、御教示賜りました京都府立医科大学第 1 病理学教室の芦原 司教授と終始直接御指導賜りました山名秀明博士に深謝します。

本論文の要旨は第 30 回消化器外科学会総会、第 4 回関西フローサイトメリー研究会、第 41 回日本脳部外科学会総会において発表した。

文 献

- 1) 新井裕二：食道癌術後遠隔成績に関する臨床病理学的研究—とくに m, sm 癌と進行癌の対比—。日消外会誌 16：1291—1301, 1983
- 2) 秋山 洋, 宮園 光, 鶴丸昌彦ほか：食道癌の悪性度と肉眼型の相関について。日外会誌 81：1044—1048, 1980
- 3) 田中乙雄：壁内進展形式の特性からみた食道癌の臨床病理学的検討。日胸外会誌 27：1132—1144, 1979
- 4) 佐々木泰二：核 DNA 量食道癌の検討。東北医誌 93：13—23, 1980
- 5) 平塚隆三：食道癌の DNA 量測定による臨床病理学的研究。福岡医誌 72：556—574, 1981
- 6) 米村 豊, 杉山和夫, 鎌田 徹ほか：胃癌における

DNA ploidy pattern と悪性度。Oncologia 20：24—31, 1987

- 7) 食道疾患研究会編：食道癌取り扱い規約。第 6 版。金原出版、東京、1984
- 8) 芦原 司, 楠崎克之, 竹下秀之ほか：顕微蛍光測光法による定量的病理学—骨軟部腫瘍の解析を含むで。整外基礎化学 11：6—15, 1984
- 9) 蒲池正浩：DNA-RNA 顕微蛍光多量測光法によるヒト胃癌細胞の増殖動態解析—病理形態および癌の成長と関連して—。京都府医大誌 93：861—877, 1984
- 10) 芦原 司, 藤田哲也：定量的組織細胞化学。日本組織細胞化学会編。組織細胞化学。東京、学際企画、1982, p229—247
- 11) 戸次史敏：食道癌局所の生体防御反応に関する研究—特に、癌浸潤リンパ球についての免疫組織化学的解析と予後との関係について—。久留米医会誌 49：675—690, 1986
- 12) 南 泰三：Flow cytometry による食道癌 DNA histogram の検討。久留米医会誌 50：339—356, 1987
- 13) 芦原 司, 蒲池正浩, 楠崎克之ほか：落射型顕微蛍光多量測定法による定量的組織細胞化学。良性悪性の細胞の解析。臨病理 31：33—43, 1983
- 14) 杉田道夫, 室谷哲弥, 杉下 匡ほか：核 DNA 分析における新しい組織分散法の応用。癌の臨 28：1530—1536, 1982
- 15) Hedly DW, Friedlander ML, Taylor IW et al: Method for Analysis of cellular DNA content of paraffin-embedded pathological material using flow cytometry. J Histochem Cytochem 31：1333—1335, 1983
- 16) Vindelov LL, Christensen IF, Nissen NI: A detergent-trypsin method for the preparation of nuclei for flow cytometric DNA analysis. Cytometry 3：323—327, 1983
- 17) 諸富直文：パラフィン組織を用いた細胞核、顕微蛍光測光法—新しい方法の試み。医のあゆみ 133：191, 1985
- 18) Barlogie B, Raber M, Schuman J et al: Flow cytometry in clinical cancer research. Cancer Res 43：3982—3997, 1983
- 19) Leuchtenberger CR, Dausis A: A micro spectrophotometric study of DNA content in cells of normal and malignant human tissue. Am J Pathol 30：65—85, 1974
- 20) 山岡憲夫, 田川 泰, 宮下光世ほか：各臓器別固形癌の悪性度判定に関する研究。外科治療 55：116—117, 1987
- 21) 杉町圭蔵, 松浦 弘：DNA 量分布パターンからみた食道癌の悪性度判定に関する研究。Oncologia 20：14—23, 1987

- 22) Temple WJ, Sugarbaker EV, Thronswate JT et al: Correlation of cell cycle analysis with Duke's staging in colon cancer patients. *J Surg Res* 28 : 314—318, 1980
- 23) Petrova AS, Subrichina GN, Tschistjokova OV et al: Flow cytofluorometry., Cytomorphology and histology in gastric carcinoma. *Oncology* 37 : 318—324, 1980
- 24) 塩月一英: Counter flow centrifugal elutiation (CCE)ならびに蛍光偏光解析を応用した白血球の細胞動態に関する基礎的研究. *アレルギー* 35 : 124—136, 1986
- 25) 藤田哲也, 芦原 司: 成長と増殖. 菅野晴夫, 小林博編, 腫瘍病理学. 東京, 朝倉書店, 1971, p39—60
- 26) Handley WS: The pathology of melanotic growth in relation to their operative treatment. *Lancet* 1 : 927—933, 1907
- 27) Black MM, Freeman C, Mork TH et al: Prognostic significance of microscopic structure of gastric carcinomas and their regional lymph nodes. *Cancer* 27 : 703—711, 1971
- 28) 森 箴郎: ヒトNK細胞の細胞形態と病理—とくにHNK-1陽性細胞について—. *臨免疫* 16 : 363—368, 1984
- 29) 前之原箴穂: Natural Killer (NK) 活性に関する実験的臨床的研究. —とくに腫瘍移植ヌードマウスと消化器癌患者におけるNK活性—. *医研究* 54 : 301—315, 1984
- 30) 漆崎一郎, 新津洋司郎, 石谷邦彦ほか: 消化器癌と免疫—NK活性など. *最新医* 37 : 1186—1195, 1982