日消外会誌　22（7）：1806～1810，1989年

多変量解析による大腸癌核DNA量の予後因子としての評価

長崎大学医学部第1外科
石川　啓　田川　泰　中越　享　平野　達雄
清水　輝久　草野　裕幸　福田　豊　高平　良二
下山　孝俊　三浦　敏夫　富田　正雄

THE PROGNOSTIC SINGNIFICANCE OF CELLULAR DNA CONTENT IN COLORECTAL CANCER USING MULTIVARIATE ANALYSIS

Hiroshi ISHIKAWA, Yutaka TAGAWA, Toru NAKAGOE, Tatsuo HIRANO, Teruhisa SHIMIZU, Hiroyuki KUSANO, Yutaka FUKUDA, Ryouji TAKAHIRA, Takatoshi SHIMOYAMA, Tosio MIURA and Masao TOMITA
The First Department of Surgery Nagasaki University School of Medicine

大腸癌核DNA量の予後因子としての価値を検討する目的で，Coxの比例ハザードモデルにより多変量解析を試みた．方法はパラフィンブロックを用いたB. Schutteらの方法に準じflow cytometerで核DNA量を測定した．236例中DNA diploidyは97例（41.1%）であり，DNA aneuploidyは139例（58.9%）であった．DNA ploidyは臨床病理学的因子の中で，壁深達度，リンパ節転移との間に有意差を認め，Coxの比例ハザードモデルにおいては，回帰係数β値は0.7739危険率0.0033であり，他の病理組織学的因子に優る有意性が認められた．以上の結果より，大腸癌核DNA量は独立した予後因子として有用であることが明かとなった．

索引用語：DNA，大腸癌，大腸癌の予後因子，多変量解析，flow cytometer

はじめに

Flow cytometer（以下FCM）と略す）の発達に伴って迅速かつ客観的な癌細胞核DNA測定が可能となり，その細胞生物学的意義について研究されてきた．なかでも腫瘍の悪性度，とりわけ予後との関係については多くの研究者の注目を集め，肺癌[1)2)]，乳癌[3)]，大腸癌[4)]などの固形腫瘍においては，DNA aneuploidy症例で予後不良であったとの報告がなされている．

一方，医学領域における統計学の普及は，従来の単一因子に対する統計学的解析に加えて，複数の因子を同時に解析し，今回目的とした予後に及ぼす各因子の重みや相互の関連性を客観的に評価する多変量解析を可能にした．そこで著者らは，Coxの比例ハザードモデル[5)]を用いて大腸癌核DNA量の予後因子としての有用性を検討した．

＜1989年2月15日受理＞別刷請求先：石川　啓
〒852　長崎市坂本町7－1　長崎大学医学部第1外科

対象と方法

1）対象

昭和53年より昭和60年までに長崎大学第1外科において切除した大腸癌243症例のホルマリン固定パラフィン包埋ブロックを用いた．243例中，DNA index（以下DIと略す）評価不能例7例を除く236例につき検討した．

2）DNA測定法

腫瘍の全割面を含むブロックから50μmの切片を3～4枚切出し材料とした．検体処理はB.Schutte[6)]らの方法に準じた．すなわちキシレン中で1時間の脱パラを2回繰り返した後，100，95，70，50%エタノール中でおのおの30分間再水和を行った．さらに3次蒸留水中で1時間再水和の後，0.25%トリプシンクエン酸バッファー（3mM trisodiumcitrate, 0.1% Nonidet P40, 1.5mM sperminetetrachloride, 0.5mM Tris,

pH 7.6)中37℃で overnight incubation を行い，50μm ナイロンメッシュに通して裸核単離細胞を得た．Propidium Iodide(以下 PI と略す)染色は Vindelφv[7] らの方法に準じた．すなわちクエン酸バッファー(sucrose 250mM, trisodiumcitrate $2H_2O$ 40mM, dimethylsulfoxide zur synthese 50ml, pH 7.6) 中の細胞浮遊液200μl に A 液 (trypsin 15mg, stock solution [trisodiumcitrate $2H_2O$ 3.4mM, 0.1% Nonidet P40, sperminetetrachloride 1.5mM, Tris 0.5mM, DW_3 2,000ml, pH 7.6] 500ml) 1.8ml を加え室温で10分間静置した．次に B 液 (trypsininhibitor 250mg, RNaseA 50mg, stock solution 500ml, pH 7.6) 1.5 ml を加え室温にて10分後さらに C 液 (PI 208mg, sperminetetrachloride 580mg, stock solution 500ml, pH 7.6)1.5ml を加え氷中にて30分間染色した．FCM は FACS IV (Becton Dickinson 社製)を用い，488nm のアルゴンイオンレーザーで励起して，580nm long pass フィルターを用い，10,000～20.000個の細胞につきその DNA ヒストグラムを表示させた．その際，腫瘍内浸潤リンパ球 (Tumor Infiltrating Lymphocyte 以下 TIL と略す) を内部標準とし，腫瘍細胞の $G_0 \cdot G_1$ ピークチャンネル数をこの値で割ることにより DI 値を求めて DNA 量を評価した．なお DNA ploidy については0.90<DI≦1.10を DNA diploidy，DI>1.10を DNA aneuploidy と定義した．

3) 統計学的解析

背景因子および病理組織学的因子と DNA ploidy に関しては U 検定と χ^2検定(一部 t 検定)を用い，$p<0.05$をもって有意差とした．生存率は Kaplan-Meier 法により求め，generalized Wilcoxon test により有意差を検定した．多変量解析は Cox の比例ハザード回帰分析[5]を用い，目的変量として死亡までの期間をとり，説明変量としては大腸癌取扱い規約に従って腫瘍占居部位，腫瘍最大径，肉眼型，組織型，深達度，静脈侵襲，リンパ管侵襲，リンパ節転移，腹膜播種性転移の9項目の病理組織学的因子のほかに DI 値と DNA ploidy を加えた．なお肝転移は腹膜播種性転移とほとんど同様の分布を示しており，腹膜播種性転移のみを検討した．また Cox の比例ハザード回帰モデルにおいては，各背景因子の分類を順序尺度として2処理した．

結　果

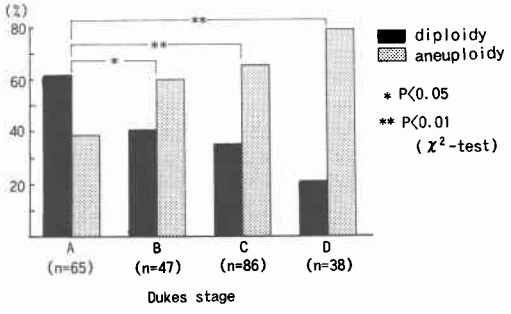
1) 核 DNA 量と臨床病理学的因子との関係

DI 値評価可能な236例中，DAN diploidy は97例 (41.1%) であり，DNA aneuploidy は139例 (58.9%) であった．DNA ploidy と臨床病理学的因子との関係について検討すると，腫瘍径，肉眼型，組織型，腹膜播種性転移との間には有意差を認めなかった．壁深達度では，癌の浸潤が深層に及ぶに従い DNA aneuploidy の割合が増加し，有意差が認められた．大腸癌取扱規約における n 因子と H 因子との関係を検討すると，n 因子とは n_0 と n_1，n_0 と n_4 の間において有意差を認め，n_1，n_4 において DNA aneuploily で占める割合が多かった．また H 因子では H_0 と H_3 の間に有意差を認め，H_3 において DNA aneuploidy の占める割合が多かった(表1)．次に，Dukes 分類により進行度を

表1　病理組織学的背景因子と DNA ploidy pattern

		DNA Diploid No. (%)	DNA Aneuploid No. (%)	analysis
Total		97 (41.1)	139 (58.9)	
Sex	Male	57 (58.8)	78 (56.1)	χ^2-test (n.s.)
	Female	40 (41.2)	61 (43.9)	
Mean age (years)		61.2±12.9	59.9±11.1	t-test (n.s.)
Curability	Curable	80 (82.5)	99 (71.2)	χ^2-test (P<0.05)
	Noncurable	17 (17.5)	40 (28.8)	
Tumor size (cm)		6.12±2.94	5.78±2.08	t-test (n.s.)
Invasiodn	m	3 (3.1)	1 (0.7)	U-test (P=0.007)
	sm	6 (6.2)	4 (2.9)	
	pm	11 (11.3)	6 (4.3)	
	ss(a1)	45 (46.4)	61 (43.9)	
	s (a2)	18 (18.6)	42 (30.2)	
	si(ai)	14 (14.4)	25 (18.0)	
n	n0	61 (62.9)	60 (43.2)	U-test (P=0.003)
	n1	16 (16.5)	34 (24.5)	χ^2-test
	n2	14 (14.4)	28 (20.1)	n0 vs n1 --- P<0.05
	n3	6 (6.2)	11 (7.9)	n0 vs n4 --- P<0.05
	n4		6 (4.3)	他の組み合せ (n.s.)
P	P0	93 (95.9)	130 (93.5)	U-test (n.s.)
	P1	2 (2.1)	4 (2.9)	
	P2	1 (1.0)	2 (1.4)	
	P3	1 (1.0)	3 (2.2)	
H	H0	93 (95.9)	116 (83.4)	U-test (P=0.003)
	H1	2 (2.1)	8 (5.8)	χ^2-test
	H2	1 (1.0)	4 (2.9)	H0 vs H3 --- P<0.05
	H3	1 (1.0)	11 (7.9)	

図1　Dukes 分類と DNA ploidy pattern



分け，DNA ploidy との関係を検討すると，Dukes A，B 間，Dukes A，C 間，Dukes A，D 間で有意差を認めた（図1）．

2）DI 値の多寡による生存率曲線

DNA aneuploidy をその DI 値の多寡により，1.1<DI≦1.5，1.5<DI≦2.0，DI>2.0の3群に分け生存率を検討した．DNA diploidy の5年生存率は77%であり，1.1<DI≦1.5，1.5<DI≦2.0，DI>2.0の5年生存率はそれぞれ43%，54%，58%であり，DNA diploidy に比べ DNA aneuploidy において有意に生存率は不良であったが，DNA aneuploidy 間における DI 値の多寡による生存率の差は認められなかった（図2）．

3）Cox の比例ハザード回帰分析

表2 に Cox の比例ハザード回帰分析で得られた臨床病理学的因子と DI 値に対する回帰係数 β 値とその検定計量 χ^2値，および β 値に対する危険率を示した．予後因子としての独自の重みを表現している β 値が正の値で大きかった因子は，壁深達度とリンパ節転移であり，DI 値においては−0.0818と負の値をとり，予後に及ぼす影響力は小さいと思われた（**表2** 解析Ⅰ）．そこでさらに p<0.05の因子のみを選び出して解析した（**表2** 解析Ⅱ）．β 値が最も大きかったのはリンパ節転移の0.5255であり，壁深達度も0.5080であり，これら2者の危険率はおのおの p=0.0000と p=0002であることより予後因子としての有意差が認められた．一方，DI 値の β 値は0.0406で p=0.8776であり，DNA 量を DI 値として評価した時その予後因子としての有意性は認められなかった．

次に DI 値の代わりに DNA diploidy と DNA aneuploidy の2群に分けて DNA ploidy 別に検討した．β 値は DNA ploidy で最大値0.7039であり，以下壁深達度0.4643，リンパ節転移0.4392と続いた（**表3** 解析Ⅰ）．そこで p<0.05の因子を選択しし再度検討すると，β 値は DNA ploidy において最大値0.7739であり，この β 値に対する危険率は p=0.0033と有意性が認められ，DNA ploidy がリンパ節転移，組織型，壁深達度とともに予後因子としての重みを持つことが明らかになった（**表3** 解析Ⅱ）．

4）Cox の比例ハザード回帰分析による生存率曲線

DNA ploidy における変数の有利値と不利値，すなわち DNA diploidy と DNA aneuploidy の2群間に

図2　DNA 量と生存率

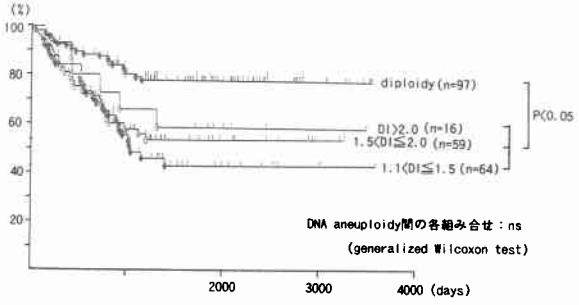


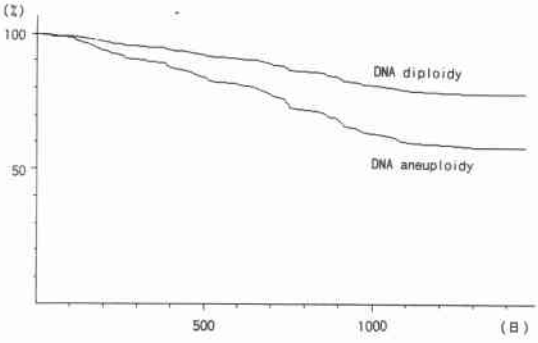
表2　DI 値の予後因子としての評価

	解析Ⅰ			解析Ⅱ（解析ⅠのP<0.05の因子）		
	β	χ^2	危険率	β	χ^2	危険率
占居部位	0.0299	0.39	0.5343			
腫瘍径	-0.0363	0.40	0.5259			
肉眼型	-0.4557	4.85	0.0280	-0.4301	4.41	0.0356
組織型	0.3981	6.61	0.0102	0.4681	11.97	0.0005
深達度	0.5155	10.76	0.0010	0.5080	13.68	0.0002
v	0.2998	2.55	0.1106			
ly	0.3032	4.10	0.0429	0.2867	4.50	0.0339
n	0.4765	20.69	0.0000	0.5255	27.90	0.0000
p	0.3243	1.88	0.1703			
DI	-0.0818	0.09	0.7664	0.0406	0.02	0.8776

表3　DNA ploidy の予後因子としての評価

	解析Ⅰ			解析Ⅱ（解析ⅠのP<0.05の因子）		
	β	χ^2	危険率	β	χ^2	危険率
占居部位	0.0379	0.62	0.4294			
腫瘍径	0.0068	0.01	0.9059			
肉眼型	-0.4366	4.87	0.0273	-0.3550	3.69	0.0547
組織型	0.4103	6.84	0.0089	0.5211	16.63	0.0000
深達度	0.4643	9.46	0.0021	0.5132	14.98	0.0001
v	0.3042	2.77	0.0961			
ly	0.2717	3.18	0.0745			
n	0.4392	17.51	0.0000	0.5545	34.11	0.0000
p	0.3314	1.93	0.1643			
ploidy	0.7039	6.69	0.0097	0.7739	8.65	0.0033

図3　Cox の比例ハザード回帰分析による補正生存率曲線



おける多数の他の関連因子の影響を補正した生存率曲線モデルを図3に示した．4年生存率はDNA diploidyで76.8%であり，一方，DNA aneuploidyでは，58.6%であった．

考　察

臨床医にとって悪性腫瘍患者の予後が推測可能なら，手術を含めた集学的治療に有用な情報となりうる．大腸癌においても，壁深達度，リンパ節転移，肝転移，腹膜播腹性転移などで規定される大腸癌取扱規約分類やDukes分類が予後因子として評価されている．

またMascarel[9]らはムチン産生の有無，リンパ球浸潤の程度が生存率を相関したと報告し，丸岡[10]らは静脈侵襲とリンパ管侵襲が長期予後を含めて高い予後判別能を示し，特に静脈侵襲を侵襲の及んだ層によって再分類すると，その予後判別能は単独因子でありながら，複数因子の組み合わせである病期分類に匹敵したと報告している．

しかし病理組織学的所見にもとづいた因子は，いずれも腫瘍を中心とした組織構築の変化を評価しており，最近では細胞生物学の進歩に伴って，染色体，遺伝子，DNAを中心とした細胞レベルでの予後因子評価の試みもなされてある．なかでも癌細胞核DNA量はFCMの研究の進歩に伴って，迅速かつ客観的な測定が可能となり，広く臨床応用されている．大腸癌においては1962年Wolley[11]らが33例の大腸癌新鮮検体の核DNA量をFCMで測定し，DNA aneuploidyの13人中12人は3～5年以内に死亡したが，DNA diploidyの20人は同期間に6人のみの死亡であったと報告した．しかしながら彼らの報告においては，症例数が少ないうえにDNA aneuploidy群にDukes C，D症例が多く，背景因子が偏っており，はたして生存率の差がDNA ploidyに起因するものか疑問である．一方，Armitage[12]らは，134例の大腸癌のパラフィン包埋ブロックを用いた検討を行い，DNA ploidyと病理学的進行度，組織型の間には相関を認めず，DNA aneuploidyの5年生存率19%に対し，DNA diploidyでは43%であり，DNA ploidyが独立した予後因子であったと報告している．

今回の検討においては，DNA ploidyと臨床病理学的因子の間では壁深達度，リンパ節転移，肝転移との間に有意差が認められた．すなわち，腫瘍の発育に従ってDNA aneuploidyの割合が増加し，またDNA aneuploidyが転移に対して何らかの促進的な使用を有することとが示唆された．DNA量をDI値により，$0.9<DI\leqq1.10$，$1.10<DI\leqq1.50$，$1.50<DI\leqq2.00$，$DI>2.00$に細分化し，DNA量の多寡による生存率を検討すると，DNA diploidyとDNA aneuploidyの間には有意差が認められた．しかしDNA aneuploidyの3群間では，$1.1<DI\leqq1.50$で最も予後不良であったものの，有意差は認められなかった．この点に関しては肺癌における著者らの検討でDI値の増加に伴って予後が不良であった結果と異なる点である．この相違点はDI値と予後，すなわち腫瘍の悪性度の関係を検討するうえで興味深いところである．腫瘍細胞は正常細胞に比して遺伝的に不安定であり，突然変異を起こしやすいことが知られている．したがって腫瘍細胞がより悪性化の性格を獲得すると，それに伴ってより遺伝的に不安定になるという tumor progressionの概念[13]を考えた時，DI値の高い腫瘍は，すなわちより遺伝的に不安定なために，その悪性度は高く予後は不良であると考えられる．しかしながら今回の検討においては，大腸癌核DNA量をDI値として評価すると，予後因子としての有意性は認められなかった．この点に関してはFCMにおけるDNA量の評価は，細胞当りの核DNA量をgrossに捕えられており，微小染色体，均質染色領域の出現といった染色体レベルでの変化や，特定の染色体上での癌遺伝子の増幅などの変化を反映することが困難であることもその一因を負うものと考えられた．

2群間の生存率曲線を解析するに際しては群間の背景因子を同一にする必要がある．通常は便宜的に同一病期における生存率を検討することが多い．図2においては，DNA aneuploid症例をDI値によって3群に分けて解析したため，各群間の症例数が少なくなり，背景因子に関する検討は行わなかった．そこでDukes分類によって病期を分け同一病期による生存率を検討すると，Dukes A，B，Cでは有意差を認めず，Dukes Cにおいてのみ有意にDNA diploidyの生存率が良好であった[14]．しかしながら，Dukes分類を同一にすることはすなわち，壁深達度，リンパ節転移，遠隔転移の3つの背景因子について同一化されたのみであり，他の腫瘍径，組織型，肉眼型，脈管侵襲，リンパ管侵襲などの諸因子についての厳密な一定化は不可能である．そこで今回のように症例数が比較的少ないのに考慮すべき因子の数が多く，かつ群間に偏りが生じている場合には，多変量解析法を応用して統計学的に偏りの影響を補正した群間の成績を比較することが有用である．Cox比例ハザードモデルは重回帰分析と生命表

法を組み合わせた統計的手法であり，時間tにおけるある個体の瞬間死亡率と標準的個体の瞬間死亡率の比の対数値が，その個体の予後因子の値に適当な重みβをかけ，その総和で表わされると仮定している．したがって多数の因子を考慮して，各因子独自の重みを計算したり，同時に多数の他の関連因子の影響を除いた補正生存率曲線を求めることが可能である[15]．今回の検討においては，DNA量をDI値として表わした時には，予後因子としての重みを表現した回帰係数βは0.0406となり，他のリンパ節転移，壁深達度，組織型，リンパ管侵襲と比較して有意差を認めなかった．しかしながら，DNA diploidy，DNA aneuploidyの2群に分けて再検討すると，そのβ値は0.7739となりリンパ節転移，組織型，壁深達度に優る値となり，しかもβ値の危険率もp=0.0033であり，選択した因子の中で有意性のある予後因子の1つであった．この結果は大腸癌核DNA量がDI値ではなく，DNA ploidy patternとして評価した時にその予後因子として有用であることを示している．Kokal[16]らも74例の大腸癌における検討で，DNA aneuploidyは独立した予後因子であり，他の臨床病理的諸因子の中で最も予後を反映する因子であると述べている．またScott[17]らは121例の直腸癌のDNAヒストグラムを測定し，Coxの比例ハザード分析の結果最も独立した予後因子はDNA量と手術時の病変の拡がりであったと述べている．しかしながら503例の大腸初発癌について7種類の統計モデルを使用して予後因子を解析した丸岡ら[10]が指摘するように，各種の統計モデルは必ずしも同じ結論を導くとは限らず，それぞれ特性をもつことを理解する事も必要かと思われた．核DNA量はもとより，より簡便な染色体分析法，遺伝子分析法の開発とともに，従来の組織レベルでの予後因子に加えて細胞レベルでの予後因子を評価することで，より正確な予後の評価を可能とし，ひいては治療成績の向上に貢献するものと確信する．

稿を終えるにあたり，コンピューターによる統計解析に多大の御助力を賜わりました協和発酵(株)長門英俊氏，鈴木英明氏に深く感謝致します．

文　献

1) Drings VM, Mattern P, Sonka J et al: Prognostic significance of DNA patterns and resistance predictive test in non-small cell lung carcinoma. Cancer 56：1396—1403, 1985
2) 山岡憲夫：原発性肺癌の細胞内DNA-RNA量を指標とした悪性度評価の試み—特にFlow cytometryを応用して—．日癌治療会誌 22：2252—2264, 1987
3) Hedley W, Rugg CA, Gelber RD: Association of DNA index and S-phase fraction with prognosis of nodes positive early breast cancer. Cancer Res 47：4729—4735, 1987
4) Streffer C, Beuningen DV, Gross E et al: Predictive assays for the therapy of rectum carcinoma. Radiother Oncol 5：303—310, 1986
5) Cox DR: Regression models and life tables. J Roy Stat Soc B 32：187—220, 1972
6) Schutte B, Reynders MMJ, Bosman FF et al: Flow cytometric determination of DNA ploidy level in nuclei isolated from paraffin-embedded tissue. Cytometry 6：26—30, 1985
7) Vindelφv LL, Christensen IJ, Nissen NI: A detergent-trypsin method for the preparation of nuclei for flow cytometric DNA analysis. Cytometry 3：323—327, 1983
8) 大腸癌研究会編：大腸癌取扱い規約．改訂第4版．金原出版，東京，1985
9) Mascarel AD, Coindre JM, Mascarel ID et al: The prognostic significance of specific histologic features of carcinoma of the colon and rectum. Surg Gynecol Obstet 153：511—514, 1981
10) 丸岡康洋，前谷俊三，戸部隆吉：大腸癌の予後に関する病理学的因子の統計学的解析．日外会誌 89：181—191, 1988
11) Wolley RC, Schreiber K, Koss LG et al: DNA distribution in human colon carcinomas and its relationship to clinical behavior. JNCI 69：15—22, 1982
12) Armitage NC, Robins RA, Evans DF et al: The influence of tumor cell DNA abnormalities on survival in colorectal cancer. Br J Surg 72：828—830, 1985
13) Nowel PC: The clonal evolution of tumor cell populations. Science 194：23—28, 1976
14) 石川　啓，田川　泰，中越　享ほか：大腸癌核DNA量の予後因子としての有用性（パラフィンブロックを用いたFCMによる検討）．日本大腸肛門病会誌 41：927—933, 1988
15) 富永祐民：治療効果判定のための実用統計学．蟹書房，東京，1987, p123—134
16) Kokal W, Sheibani K, Terz J et al: Tumor DNA content in the prognosis of colorectal carcinoma. JAMA 255：3123—3127, 1986
17) Scott NA, Grande JP, Weilland LH et al: Flow cytometric DNA patterns from colorectal cancers —How reproducible are they? Mayo Clin Proc 62：331—337, 1987