

Flow cytometry による膵頭部癌の核 DNA 量分析 —病理組織学的所見, 予後, 再発形式との関連について—

東京女子医科大学消化器外科 (主任: 羽生富士夫教授)

長谷川 正 治

膵癌の生物学的特性を明らかにする目的で, flow cytometry により膵頭部癌103例の核 DNA 量を測定し, 病理組織学的所見, 予後および再発形式との関係について検討し, 以下の結論を得た. 1. 核 DNA 量と病理組織学的諸因子とは相関関係を認めず, 核 DNA 量は病理組織学的所見とは独立した因子であった. 2. diploid と aneuploid の間では累積生存率に有意差はなかったが, 術後3年以上の長期生存例に限ると6例のうち5例は diploid であった. 3. aneuploid において DNA index (DI) 1.5 を境に low ploidy 群と high ploidy 群に分けると, low ploidy 群は high ploidy 群に比べ予後良好の傾向が得られた. 4. 同一腫瘍内では標本採取部位別の DI に相違を認めなかった. 5. 治癒切除例において肝転移再発は DI 1.5以上で多い傾向があり, 再発のないものはすべて DI 1.5未満であった. 以上より, 膵癌の核 DNA 量は病理組織学的所見とは別の見地に立った予後規定因子として有用であることが示唆された.

Key words: flow cytometry, nuclear DNA content, carcinoma of the head of the pancreas, DNA index prognostic indicator in pancreatic carcinoma

はじめに

癌細胞の中には染色体数の異常を示すものがあり, 核 DNA 量を測定することにより, これを量的変化として間接的にとらえることができる¹⁾. 最近では, 核 DNA 量は良悪性の鑑別や悪性腫瘍の生物学的特性を表わす一指標として有用であるとの種々の報告が見られる. しかしながら, 膵癌における検討はほとんどなされていない. 当教室では膵頭部癌に対して拡大手術を導入後, 切除率および治癒切除率は向上し, 最近では治癒切除例の中から長期生存例が散見されるようになったが²⁾, 病理組織学的所見や進行度が類似しているものでも予後に大きな差が見られることも多く, 病理組織学的諸因子とは別の見地に立った予後因子の規定が望まれる.

以上の観点より, flow cytometry を用いて膵癌の核 DNA 量を測定し, 病理組織学的因子, 予後および再発形式との関連性について検討を行い, 核 DNA 量が個々の症例の生物学的特性を表わし, 予後規定因子の一つに成りうるかどうかを検討した.

対象と方法

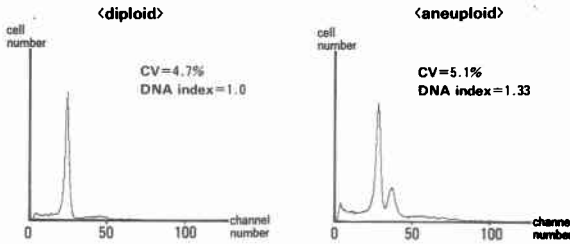
I. 対象

1980年から1986年8月までの間に東京女子医科大学消化器病センター外科で切除した嚢胞腺癌を除く膵部膵管癌117例中103例を対象とした. 男性72例, 女性31例, 平均年齢は62歳であった. また, 遠隔成績については直死, 他病死を除く80例を対象とし, 1988年8月現在までの成績とした.

II. 方法

切除標本のパラフィン包埋組織を用い, 病理組織診で確認した主病巣の部分より全割面を含む40 μ mのパラフィン包埋切片を作成し, Hedley ら³⁾の方法にほぼ準じて行った. キシレンで脱パラフィン操作 (37 $^{\circ}$ C, 15分間, 3回) を行い, ついで, 100%, 95%, 90%, 80%, 70%エタノール, 生理食塩水で順次加水処理 (10~15分間, 1~2回) を行った. 1.0%ペプシンで37 $^{\circ}$ C, 90分間処理し, 金属メッシュで機械的に分散させた後, phosphate buffer solution にて洗浄した. 次に RNase (1,000unit/ml) を1ml 加え, 37 $^{\circ}$ C, 30分間処理し, 続いて Propidium Iodide (100 μ g/ml) 1ml を加えて DNA 染色を行った. 40 μ m のナイロンメッシュにて濾過した後, flow cytometer (CS-20, Syowa

Fig. 1 Representative DNA histograms from paraffin-embedded pancreas carcinoma samples.



Denko 社製)にて1~2万個の細胞核 DNA 量を測定し, DNA ヒストグラムを作成した. 同一標本内の正常細胞(間質細胞やリンパ球など)を内部標準とし, DNA ヒストグラム上, 最初のピークの channel number を2倍体 G_0G_1 ピークの channel number とした. 最初のピークに対する2番目のピークの channel number すなわち腫瘍細胞 G_0G_1 ピークの channel number の割合を DNA index (以下 DI) とし, $DI=1.0$ を diploid, $DI \neq 1.0$ を aneuploid と定義した (Fig. 1).

以上より求めた DNA ploidy pattern および DI と, 病理組織学的因子, 予後および再発形式との関連性について検討した. また, 腫瘍最大径が t_3 以上の13症例につき, 腫瘍の全剖面, 中心部, 辺縁部と標本採取部位別の DI を比較した.

統計学的有意差検定には χ^2 検定により, $p < 0.05$ をもって有意差ありと判定した. 生存率は Kaplan-Meier 法により求め, generalized Wilcoxon 法により検定を行った.

なお病理組織学的所見は膵癌取扱い規約に従った.

成 績

I. DNA ヒストグラムにおける最初のピークの coefficient of variation (以下 CV 値) は $6.4 \pm 1.97\%$ (Mean \pm SD) であった. DNA ploidy pattern は, diploid 63例 (61%), aneuploid 40例 (39%) であった. また, 腫瘍最大径が4.1cm 以上 (t_3 以上) で, CV 値の比較的良好な13例 (CV=3.4~7.5) を用いて, 同一標本において全剖面, 中心部, 辺縁部と部位別の DI を求めると, DNA diploidy はどの部位から標本を採取してもすべて $DI=1$ であった. また, DNA aneuploidy も同様にすべて $DI \neq 1$ であり, DI の相違も0.09 以下であった (Table 1). 以上より求めた DNA ploidy pattern と病理組織学的因子および予後との関係について検討を行った.

Table 1 DNA indices from different parts of the tumor over 4.1cm in diameter.

case	DNA index			difference (maximum - minimum)
	total	central	peripheral	
K.K	1.55	1.55	1.50	0.05
S.M	1.52	1.60	1.59	0.08
N.T	1.75	1.76	1.70	0.06
A.F.	1.39	1.48	1.45	0.09
K.Y.	1.41	1.41	1.42	0.01
M.M.	1.62	1.58	1.53	0.09
W.T.	1.79	1.77	1.84	0.07

$\langle \text{DNA diploidy} \rangle$

case	DNA index		
	total	central	peripheral
F.S	1.0	1.0	1.0
B.I	〃	〃	〃
N.T	〃	〃	〃
E.T	〃	〃	〃
N.Y	〃	〃	〃
K.A	〃	〃	〃

Few differences in DNA indices by the sampling sites are observed.

1) 病理組織学的因子と DNA ploidy pattern との関係

腫瘍の大きさ (t), 膵前方被膜浸潤 (s), 膵後方組織浸潤 (rp), 門脈系静脈壁浸潤 (pv), リンパ節転移 (n), 進行度 (stage), 膵外神経叢浸潤 (plx), 膵内神経浸潤 (ne), リンパ管浸潤 (ly), 静脈浸潤 (v) および組織型と DNA ploidy pattern との間には一定の傾向を認めなかった. 浸潤増殖様式 (INF) においては有意差は認めないものの $INF\beta$ は diploid に, $INF\gamma$ は aneuploid に多い傾向を認めた (Table 2).

2) DNA ploidy pattern と累積生存率

術死, 他病死を除く diploid 50例, aneuploid 30例を対象とした. 全切除例, 治癒切除例, 非治癒切除例に分け, おのおのについて DNA ploidy pattern 別に累積生存率を求めたところ, diploid と aneuploid の間では有意差はなく, 予後にはほとんど差はみられなかった (Fig. 2).

II. DNA aneuploidy における DI の頻度分布をみると, 二峰性の分布を示しており (Fig. 3), $DI 1.5$ 未満の low ploidy 群と 1.5 以上の high ploidy 群に分け病理組織学的因子と予後との関係について検討を行った.

1) 病理組織学的因子と DNA aneuploidy との関係

Table 2 Association between DNA ploidy pattern and histopathological findings.

		diploid (n=63)	aneuploid (n=40)
t	1	7 (11.1%)	4 (10.0%)
	2	35 (55.6%)	21 (52.5%)
	3	15 (23.8%)	14 (35.0%)
	4	6 (9.5%)	1 (2.5%)
s	0	31 (49.2%)	20 (50.0%)
	e	29 (46.0%)	19 (47.5%)
	i	3 (4.8%)	1 (2.5%)
rp	0	14 (22.2%)	9 (22.5%)
	e	47 (74.6%)	29 (72.5%)
	i	2 (3.2%)	2 (5.0%)
pv	0	34 (54.0%)	23 (57.5%)
	1	16 (25.4%)	5 (12.5%)
	2	13 (20.6%)	12 (30.0%)
n	0	13 (20.6%)	6 (15.0%)
	1	33 (51.6%)	28 (70.0%)
	2	14 (22.4%)	5 (12.5%)
	3	3 (4.8%)	1 (2.5%)
stage	I	1 (1.6%)	0
	II	8 (12.7%)	11 (27.5%)
	III	36 (57.1%)	21 (52.5%)
	IV	18 (28.6%)	8 (20.0%)
plx	-	18 (28.6%)	10 (25.0%)
	+	45 (71.4%)	30 (75.0%)
ne	0	15 (23.8%)	6 (15.0%)
	1	29 (46.0%)	13 (32.5%)
	2	13 (20.6%)	18 (45.0%)
ly	0	1 (1.6%)	2 (5.0%)
	1	8 (12.7%)	6 (15.0%)
	2	25 (39.7%)	10 (25.0%)
	3	29 (46.0%)	22 (55.0%)
v	0	7 (11.1%)	2 (5.0%)
	1	13 (20.6%)	6 (15.0%)
	2	20 (31.7%)	18 (45.0%)
	3	23 (36.5%)	14 (35.0%)
INF	α	1 (1.6%)	2 (5.0%)
	β	42 (66.3%)	19 (47.5%)
	γ	20 (31.7%)	19 (47.5%)
histology	tubular		
	well	18 (28.6%)	10 (25.0%)
	moderately	27 (42.9%)	14 (35.0%)
	poorly	7 (11.1%)	8 (20.0%)
	papillary	8 (12.7%)	6 (15.0%)
adenosquamous	1 (1.6%)	2 (5.0%)	
miscellaneous	2 (3.2%)	0	

No correlation between DNA ploidy pattern and histopathological findings was observed.

腫瘍の大きさ(t), 膵前方被膜浸潤(s), 膵後方組織浸潤(rp), リンパ節転移(n), 進行度(stage), 膵外神経叢浸潤(plx), 膵内神経浸潤(ne), リンパ管浸潤(ly), 静脈浸潤(v) および組織型と二分したDNA aneuploidy との間には一定の傾向を認めず, 唯一門脈系静脈壁浸潤(pv) と $p < 0.005$ にて有意の相関が認められたのみであった (Table 3).

2) DNA aneuploidy と累積生存率

二分したDNA aneuploidy の累積生存率を求めると, 全切除例ではDIが1.5未満の実線群で, 1年, 2年生存率が80%, 34.3%, 50%生存期間が518日であるのに対して, 1.5以上の点線群の生存率はおおの20%, 10%, 50%生存期間が226日であり, 2群間に $p < 0.01$ で有意差を認めた. 治癒切除例では, DIが1.5未満の実線群で50%生存期間が661日であるのに対して, 1.5以上の点線群では273日であり, 有意差は認めないものの, 全切除例同様DI 1.5未満の群で予後良好な傾

Fig. 2 Kaplan-Meier survival curves in patients with diploid tumors and aneuploid tumors. Survival rates between diploid and aneuploid are not statistically significant.

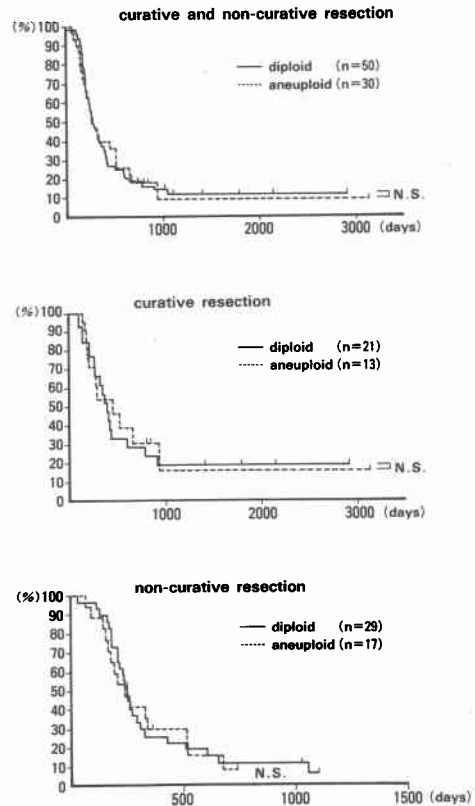
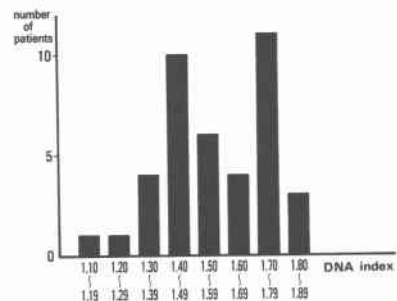


Fig. 3 Distribution of DNA indices in 40 aneuploid tumors.



向を認めた. 非治癒切除例でも同様に, 有意差は認めないものの, 50%生存期間がDI 1.5未満は518日, DI 1.5以上は194日とDI 1.5未満の群で予後良好な傾向を認めた (Fig. 4).

III. 膵頭部膵管癌切除長期生存例とDNA ploidy

Table 3 Association between DNA aneuploidy and histopathological findings.

		DNA index < 1.5 (n=19)	DNA index ≥ 1.5 (n=24)
t	1	3 (18.7%)	1 (4.2%)
	2	10 (62.5%)	11 (45.8%)
	3	3 (18.7%)	11 (45.8%)
	4	0	1 (4.2%)
s	0	9 (56.3%)	11 (45.8%)
	6	1 (43.7%)	13 (54.2%)
	1	0	0
rp	0	6 (37.5%)	3 (12.5%)
	10	0 (62.5%)	19 (87.5%)
pv	0	14 (87.5%)	10 (42.0%)
	1	1 (12.5%)	4 (58.0%)
	2	1	10 (16.7%)
n	0	2 (12.5%)	4 (16.7%)
	1	13 (87.5%)	15 (83.8%)
	2	1	4
stage	I	0	0
	II	7 (43.8%)	4 (16.7%)
	III	8 (50.0%)	13 (54.2%)
plx	-	1 (6.2%)	7 (29.1%)
	+	6 (37.5%)	4 (16.7%)
na	0	10 (62.5%)	20 (83.8%)
	2	2 (12.5%)	4 (16.7%)
	3	1	6
ly	0	1 (6.3%)	1 (4.2%)
	1	4 (93.7%)	2 (95.8%)
	2	3	7
v	0	1 (6.3%)	1 (4.2%)
	1	1 (93.7%)	5 (95.8%)
	2	9	9
INF	0	0	2 (8.3%)
	9	9 (56.3%)	10 (41.7%)
histology	tubular	7 (43.7%)	12 (50.0%)
	well	5 (31.3%)	5 (20.8%)
	moderately	3 (18.7%)	11 (45.8%)
	poorly	3 (18.7%)	5 (20.8%)
	papillary	4 (25.0%)	2 (8.3%)
adenosquamous	1 (6.3%)	1 (4.2%)	

No correlation was seen between DNA indices and histopathological findings except pv factor in DNA aneuploidy.

pattern

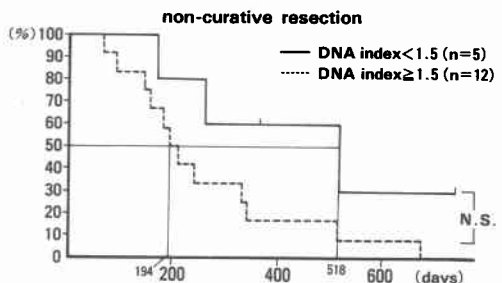
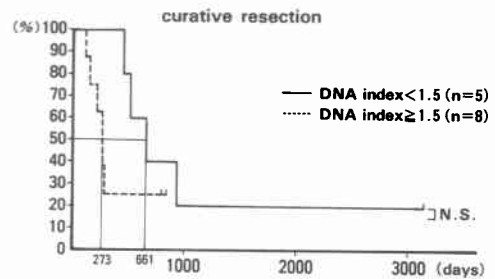
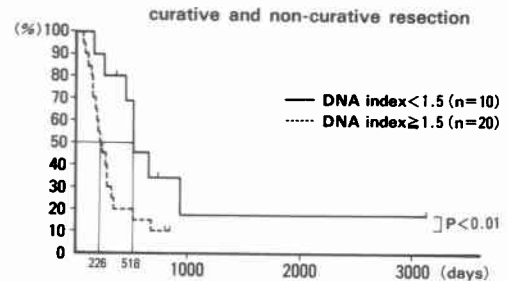
術後3年以上の長期生存6例について病理組織学的所見および治癒度とDNA ploidy patternについて検討すると、各組織学的進展因子とstageは多岐にわたり、何れの因子が予後規定因子となっているのか不明である。症例5の組織学的進展因子はt4, si, rpe, pv2, n3, plx+, ly3, v3, stage4, と病理組織学的には悪性度の高い癌であり、また、症例6はew+にて非治癒切除となったにもかかわらず長期生存が得られているが、これらのDNA ploidy patternは、いずれもdiploidであった。唯一aneuploidを示す症例1は、DI 1.46とlow ploidyであり、組織学的進展因子もt1, s0, rp0, pv0, n1, plx-, と著しく良好であった(Table 4)。

IV. 再発形式とDI

術死、他病死を除いた治癒切除32例について再発形式とDIとの関係を見てみると、肝転移再発はDI 1.0の20例中8例(40%)、さらに1.0<DI<1.5の5例中2例(40%)と比べ、DI 1.5以上では7例中5例(71.4%)

Fig. 4 Kaplan-Meier survival curves in patients categorized by DNA index (<1.5, ≥1.5) in DNA aneuploidy.

Upper panel: Survival rates of the patients with DNA index less than 1.5 are better than those of the patients with DNA index more than 1.5 with statistically significant difference. Middle and lower panel: Survival rates in the patients with DNA index less than 1.5 tend to be longer than those of the patients with DNA index more than 1.5 without statistical significance.



と有意差はないもののDIが大きいほど肝転移を来しやすい傾向を認めた。後腹膜再発は3群ともに20~30%とほぼ同率で核DNA量による差異はなかった。また、再発を認めないものは治癒切除32例中5例で、うち4例がDI 1.0のdiploid、1例がDI 1.5未満のaneuploidであり、DI 1.5以上の症例はすべて再発死亡していた (Table 5)。

Table 4 Characteristics of long-term survivors after resection of pancreas head carcinoma.

CASE	histopathological findings											stage	degree of resection	DNA ploidy/petern	term after resection
	t	s	rp	pv	n	px	ne	ly	v	INF	histology				
1	1	0	0	0	1	-	1	3	2	β	well differentiated tubular adenocarcinoma	2	curative	aneuploid (DI=1.46)	8Y. 7M.
2	2	0	0	0	1	-	0	2	2	β	papillary adenocarcinoma	2	curative	diploid	8Y. 1M.
3	3	0	e	1	0	+ 2	1	1	1	β	well differentiated tubular adenocarcinoma	3	curative	diploid	5Y. 11M.
4	1	0	e	2	2	+ 1	3	1	1	β	well differentiated tubular adenocarcinoma	3	curative	diploid	4Y. 11M.
5	4	i	e	2	3	+ 0	3	3	3	γ	papillary adenocarcinoma	4	curative	diploid	3Y. 11M.
6	1	0	e	0	1	+ 0	3	3	3	β	well differentiated tubular adenocarcinoma	3	non-curative (ew+)	diploid	3Y. 1M.

Table 5 Association between DNA index and mode of recurrence after curative resection.

	DNA index		
	1.0	1.0 < < 1.5	≥ 1.5
liver metastasis	8 (40%)	2 (40%)	5 (71.4%)
retro-peritoneal recurrence	6 (30%)	1 (20%)	2 (28.6%)
liver metastasis and retro-peritoneal recurrence	1 (5.0%)	0	0
retro-peritoneal recurrence and dissemination	1 (5.0%)	0	0
lung metastasis	0	1 (20%)	0
no recurrence	4 (20%)	1 (20%)	0
	20 (100%)	5 (100%)	7 (100%)

考 察

近年の著しい画像診断法の進歩にもかかわらず膵癌の早期診断はきわめて困難であり、さらに、その解剖学的特性から容易に周囲の重要臓器や血管系、神経系などに進展するため治療成績は他の消化器癌に比べると著しく不良である⁵⁾。当教室では膵頭部癌に対して1977年以前は主として標準手術を行い、切除率は低く大部分が非治癒切除に終わっていたが、1978年以降、拡大手術を導入して以来、切除率および治癒切除率は飛躍的に向上し、最近では長期生存例が散見されるようになってきた⁶⁾。膵癌の予後推定は従来より組織学的進展因子を中心に行われ、膵癌全国登録症例では腫瘍径が小さく、リンパ節転移がなく、周囲臓器への浸潤がない症例の予後は決して悪くない、とされているが⁷⁾、当教室における術後3年以上の長期生存例においてその背景因子としての組織学的進展因子を見ると、各因子は多岐にわたっており、いずれの因子が予後規定因子となっているのか不明である。また、病理組織学的所見が類似しているものでも予後に大きな差

が見られることも多く、従来の組織学的進展因子とは別の観点に立った予後規定因子が望まれる。

Flow cytometryの研究、発達に伴い、従来の顕微蛍光測光法に比べ、迅速で大量、かつ客観的な細胞核DNA量の測定が可能となってきた。さらに、これまでの新鮮標本を用いた検討⁸⁾⁹⁾から、1983年Hedleyら⁹⁾によりパラフィン包埋組織を用いて単離細胞を作製し、核DNA量の測定を行う方法が発表されて以来、種々の臓器癌において治療成績の判明している症例に対するretrospectiveな検討が数多く報告され、核DNA量の面から生物学的特性を解明しようとする試みがなされている。一方、膵癌の細胞核DNA量に関する報告は顕微蛍光測光法を用いた報告がわずかに散見されるのみで¹⁰⁾¹¹⁾、flow cytometryを用いた詳細な検討はほとんどなされていない。さらに、予後および再発形式との関連性について検討したのは本研究が本邦初と思われる。

Flow cytometryを用いてパラフィン包埋組織より核DNA量を測定する場合、diploidの指標としてのstandardが問題となってくる。新鮮標本を用いた場合と異なり各標本毎に固定条件が異なっているため、diploidのG₀G₁のピーク値が一定せず、ニワトリ赤血球やニジマス赤血球などをexternal standardとして用いることは不相当である⁸⁾。そこで、各標本ごとに混在する間質系の正常細胞をinternal standardとしてdiploidを決定した¹²⁾。すなわちDNAヒストグラム上、最初のピークをdiploid、2番目のピークをaneuploidとしてDIを求めた¹²⁾¹³⁾。しかしこの場合、DI<1のhypodiploidを示すaneuploidもDI>1とみなされ、誤差が生じることとなるが¹⁴⁾、Hedleyら⁹⁾の報告では固形腫瘍の場合hypodiploidは2%以下とごくわずかであり、臨床上何ら差し支えないと考えられた。石津ら¹⁵⁾は肝細胞癌において腫瘍部と同時に非腫瘍部を加えた資料を別に作製して測定し、その比較によりdiploidを決定しhypodiploidを区別しているが、膵癌は肝細胞癌とは異なり間質系細胞が豊富でそれ自体大量のinternal standardを含んでいると考えられ、また、膵癌のDNAヒストグラムにおけるCV値は他の臓器癌に比べると比較的不良で腫瘍部に非腫瘍部を混入するとますますCV値が悪くなりヒストグラムの解析が困難となるため、前述のごとく腫瘍部のDNAヒストグラムにおいて最初のピークをdiploidとした。

同一腫瘍内におけるDNA stem lineの変化の有無、すなわちDNA heterogeneityの問題についてこれま

でに数多くの報告がある。Hiddemann ら¹⁶⁾は大腸癌において同一腫瘍内の複数個所を検索した結果, aneuploid を示す腫瘍の40%に DNA heterogeneity を認め, さらに DNA heterogeneity を示す aneuploid 腫瘍のおおの1か所のみ検索すると42%は1つの DNA stem line しか同定できなかったとしており, 正確な DNA 量の測定と同一腫瘍内における複数個所での評価の必要性を強調している。そのため, 今回の検討では CV 値の比較的良好な標本13例を用いて同一腫瘍内の全断面, 中心部, 辺縁部と部位別の DI を求めた。DNA diploidy はどの部位から標本を採取してもすべて DI=1で, DNA aneuploidy も同様にすべて DI≠1であり DI の相違も0.09以下であった。したがって, 膵管癌は核 DNA 量に関しては比較的均一で DNA heterogeneity を認めない腫瘍であるといつて差し支えないと考えられた。一方, 他の臓器癌では複数の aneuploid population を示す症例が報告されているが¹⁵⁾¹⁸⁾, 今回の検討ではこのような症例は見られず, 小さな DNA stem line が見逃されている可能性も考えられる。したがって今後はさらに CV 値を良好にすべく検討を重ねて行きたいと考えている。

これまでに腫瘍細胞の核 DNA 量と病理組織学的所見との関係について種々の臓器癌で報告されてきた。リンパ節転移, 肝転移さらには進行度や組織型などと相関を認めたとする報告が数多くある一方で, 病理組織学的諸因子とは無関係であったという報告¹⁷⁾も見られる。今回の膵癌における検討では, DNA ploidy pattern は病理組織学的諸因子との間に有意の相関は全く見られなかった。さらに, DNA aneuploidy において DI 1.5を境に DNA 量の多寡により二分して病理組織学的諸因子との関係について検討を行ったが, pv 因子と相関が見られたのみで他の因子とは一定の関係を認めなかった。したがって, 膵癌の核 DNA 量は病理組織学的所見とは独立した1つの因子であるといえることができる。

核 DNA 量と予後との関係についても多く論じられてきたが¹⁾, 膵癌における検討は本邦においてはまだない。一般に, diploid を示す腫瘍に比べ aneuploid を示す腫瘍の方が予後は不良とされている¹¹⁾¹³⁾¹⁶⁾¹⁷⁾。今回, DNA ploidy pattern 別に累積生存率を求めたところ, diploid と aneuploid の間にほとんど差は見られなかった。しかしながら, 長期遠隔成績についてみると3年以上の長期生存6例のうち5例は diploid であった。さらに, この中には ew+にて非治癒切除となった

症例も含まれており, diploid に予後良好の傾向が得られた。したがって, 膵頭部癌切除例の長期生存に対する必須条件として diploid は重要な因子と考えられた。

次に, DI 1.5を境に二分した DNA aneuploidy の予後についてみると, 全切除例で DI 1.5未満の群は DI 1.5以上の群より有意に予後が良好であった ($p < 0.01$)。さらに, 治癒切除例, 非治癒切除例に分けても, 各症例数が減るために有意差は消失するものの同様の傾向が見られた。Teodori ら¹⁸⁾は肺非小細胞癌で, 高橋ら¹⁹⁾はヌードマウス移植ヒト消化器腺癌株で, DI が大きいほど腫瘍の doubling time が短いと報告しており, 膵癌においても腫瘍の増殖力が予後に強く影響しているものと考えられた。

膵癌は治癒切除がなされても早期に肝転移, 後腹膜再発が認められるため, 予後が非常に悪い⁵⁾。しかしながら, 3年以上再発の見られない症例や中には非治癒切除に終わっても長期生存の得られる症例が存在し, このことは組織学的進展因子のみでは説明することができない。そこで, 治癒切除例における再発形成と核 DNA 量との関連について検討を行った。症例数が少ないため有意差は見られないが, 肝転移再発は DI 1.5以上で多い傾向があり, 再発を認めない5例はすべて DI 1.5未満であった。このことより, 再発という観点から見ても, 核 DNA 量が悪性度を表す一因子として重要であることが示唆された。一方, 後腹膜再発は DI=1.0, $1.0 < DI < 1.5$, $DI \geq 1.5$ の3群とも20~30%とはほぼ同率で, 核 DNA 量による影響は少なく, むしろ後腹膜郭清の程度や膵臓の解剖学的特性⁵⁾などの因子が影響しているものと考えられた。今後は症例数を増やしてさらに検討を続けて行きたいと考えている。

稿を終えるにあたり, 御指導, 御校閲を賜りました羽生富士夫教授に深甚なる謝意を表します。また本研究に直接御指導, 御助言を頂いた今泉俊秀講師, 膵胆道外科研究班の諸先生方, ならびに実験に多大なる御協力を頂いた旭川医科大学第2外科学教室水戸勉郎教授, 草野満夫講師, および同教室の諸先生方に厚く御礼申し上げます。

本論文の一部は第6回癌 DNA 研究会, 第30回日本消化器病学会大会, 第33回日本消化器外科学会総会において発表した。

文 献

- 1) Barlogie B, Raber MN, Schumann J et al: Flow cytometry in clinical cancer research. *Cancer Res* 43: 3982-3997, 1983
- 2) 今泉俊秀, 羽生富士夫, 中村光司ほか: 膵頭部癌に

- 対する拡大手術の意義と問題点. 膵臓 3: 153-155, 1988
- 3) Hedley 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
 - 4) 日本膵臓学会編: 膵癌取り扱い規約. 第3版, 金原出版, 東京, 1986
 - 5) 羽生富士夫, 今泉俊秀: 膵臓癌治療のプロトコール. 臨外 42: 929-938, 1987
 - 6) 今泉俊秀, 羽生富士夫: 膵頭部癌長期生存例の背景因子. 胆と膵 8: 1653-1656, 1987
 - 7) 奥村修一, 斉藤洋一: 膵臓癌治療のプロトコール. 臨外 42: 939-946, 1987
 - 8) Vindeløv LL: Flow microfluorometric analysis of nuclear DNA in cells from solid tumors and cell suspensions. *Virchow Arch [B]* 24: 227-242, 1977
 - 9) Vindeløv LL, Christensen IJ, Nissen NI: A detergent-trypsin method for the preparation of nuclei for flow cytometric DNA analysis. *Cytometry* 3: 323-327, 1983
 - 10) Kozuka S, Nagasawa S, Tsubone M et al: DNA content of pancreatic duct hyperplasia and carcinoma. *Gann* 73: 119-123, 1982
 - 11) 片桐 一: 膵癌のDNA量分析, 特に腫瘍径および組織学的所見との関連について. 日消外会誌 21: 2262-2270, 1988
 - 12) Fossa SD, Thorud E, Shoaib MC et al: DNA flow cytometry of cells obtained from old paraffin-embedded specimens. A comparison with results of scanning absorption cytometry. *Pathol Res Pract* 181: 200-205, 1986
 - 13) Kallioniemi O, Hietanen T, Mattila J et al: Aneuploid DNA content and high S-phase fraction of tumour cells are related to poor prognosis in patients with primary breast cancer. *Eur J Cancer Clin Oncol* 23: 277-282, 1987
 - 14) Hedley DW, Friedlander ML, Taylor IW: Application of DNA flow cytometry to paraffin-embedded archival material for the study of aneuploidy and its clinical significance. *Cytometry* 6: 327-333, 1985
 - 15) 石津寛之, 内野純一, 宇野良衛ほか: 核DNA ploidy pattern よりみた肝細胞癌の生物学的特性. 肝臓 29: 1078-1086, 1988
 - 16) Hiddemann W, Von Bassewitz DB, Kleinemeier HJ et al: DNA stemline heterogeneity in colorectal cancer. *Cancer* 15: 258-263, 1986
 - 17) Armitage NC, Robbins RA, Evans DF et al: The influence of tumor cell DNA abnormalities on survival in colorectal cancer. *Br J Surg* 72: 828-830, 1985
 - 18) Teodori L, Tirindelli-Danesi D, Mauro F et al: Non-small-cell lung carcinoma: Tumor characterization on the basis of flow cytometrically determined cellular heterogeneity. *Cytometry* 4: 174-183, 1983
 - 19) 高橋 豊, 磨伊正義, 草間 悟: 消化器癌のDNAパターンと発育速度との相関. *Oncologia* 21: 112-113, 1988

Analysis of Nuclear DNA Content in Carcinoma of the Head of the Pancreas Using Flow Cytometry with Special Reference to Histopathological Findings, Prognosis and Mode of Recurrence

Masaharu Hasegawa

Department of Gastroenterological Surgery, Tokyo Women's Medical College
(Chairman: Prof. Fujio Hanyu)

Nuclear DNA content of paraffin-embedded specimens from 103 patients with carcinoma of the head of the pancreas was measured by flow cytometry. In order to determine the biological characteristics of pancreatic carcinoma from the viewpoint of nuclear DNA content, the relationship between nuclear DNA content and histopathological findings, prognosis, and recurrence was studied. No correlation between nuclear DNA content and histopathological findings was observed. There was no statistically significant difference in cumulative survival rates between diploid and aneuploid tumors. On the other hand, five of six patients who survived more than 3 years had diploid tumors. In patients with aneuploid tumors, the survival rates for patients with a DNA index less than 1.5 tended to be higher than those for patients with a DNA index 1.5 or more. Intratumor variation in DNA index from different parts of the tumor was not observed. In patients who received curative resection, those with a DNA index 1.5 or more tended to have liver metastasis and none of the patients with a DNA index less than 1.5 had recurrence. Nuclear DNA content appears to be an important prognostic factor in pancreatic carcinoma, independent of histopathological findings.

Reprint requests: Masaharu Hasegawa Department of Surgery, Tokyo Metropolitan Toshima Hospital
33-1 Sakaecho, Itabashiku, Tokyo, 173 JAPAN