

同一腫瘍内における DNA ploidy および epidermal growth factor 染色性の部位別比較—食道癌 7 例において—

琉球大学医学部第 1 外科, *琉球大学医学部附属病院検査部病理

出口 宝 戸田 隆義* 富田 秀司 濱田 雄志
奥島 憲彦 高江州 裕 ファイサル ムアザム
外間 章 武藤 良弘

同一腫瘍内癌細胞の部位別特性の異同の有無を食道癌 7 例において検討した。それぞれ異なった 4 部位および正常粘膜より組織を採取し、顕微蛍光測光法による DNA ploidy とモノクローナル抗体を用いた epidermal growth factor (EGF) の染色程度を比較検討した。その結果、① DNA index は 3 例が部位による差が大であり、DNA ploidy pattern は 5 例に異なる pattern が混在していた。② EGF 染色程度は 1 例のみ 4 部位とも一致し、6 例は部位により染色程度が異なった。③ EGF 染色程度および DNA ploidy pattern が 4 部位とも一致したのは 1 例のみであった。以上の結果より、食道癌の同一腫瘍内における生物学的多様性が示唆された。

Key words: DNA analysis on a esophageal carcinoma, intra tumoral regional heterogeneity, expression of epidermal growth factor

I. はじめに

近年、種々の成長因子とそのレセプター系や DNA ploidy は、癌細胞の増殖や悪性度などの生物学的特性と関与していると報告されている^{1)~3)}。それらは各器官、各種腫瘍における腫瘍個々の多様性の存在についての報告であって²⁾、同一腫瘍内における癌細胞について部位別の比較検討をした報告は少ない。そこで消化器癌のなかでも予後不良とされている食道癌 7 例において、癌細胞を異なる部位より採取し、DNA ploidy と epidermal growth factor (EGF) の染色程度とを指標に、同一腫瘍内における癌細胞の異同性について検討を行なったので報告する。

II. 症例と方法

1. 症例

1988年(1年間)に当教室で経験した食道扁平上皮癌 7 例を対象とした(Table 2)⁴⁾。標本は摘出後 10%中性ホルマリンに 24~48 時間固定後、粘膜面より見た癌病巣で腫瘍の中心を通る食道長軸方向の割線を入れ、この割線に平行に 5mm 幅の切片標本作製した。つぎに、切片標本を断面より観察し、①腫瘍口側先進部、

Table 1 Cases of esophageal carcinoma.

Case No.	Age/Sex	Location	Stage	Histological Grading
1	62 ♂	Im	IV	n ₂ a ₂ m ₀ plo
2	64 ♂	Ce	IV	n ₂ a ₂ m ₀ plo
3	80 ♂	Im	I	n ₀ mp m ₀ plo
4	52 ♂	Iu	IV	n ₄ a ₂ m ₀ plo
5	74 ♂	Ei	IV	n ₄ a ₂ m ₀ plo
6	61 ♂	Ei	III	n ₂ a ₂ m ₀ plo
7	66 ♂	Im	I	n ₀ mp m ₀ plo

②腫瘍中央表層、③腫瘍最深達部、④腫瘍肛門側先進部、および正常粘膜より適切な量の組織を切り出し、パラフィン包埋ブロックとした(Fig. 1)。パラフィン包埋ブロックは 4μm のヘマトキシリンエオジン(HE)染色用および EGF 染色用の薄切り組織切片とそれに連続する DNA 測定用の 100μm の厚切り組織切片を作成した。

2. 方法

1) DNA 測定

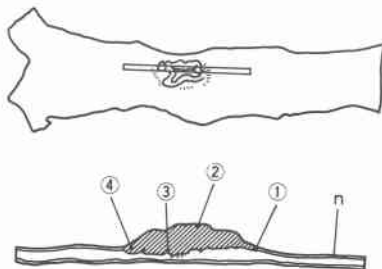
100μm の厚切り組織切片を用いて、細胞単離法による DNA 顕微蛍光測光⁵⁾をおこなった。1 症例につき目的とする癌細胞 500 個、およびコントロールとして同一標本上の小リンパ球 20 個の核 DNA 量を同条件下にて測定し、小リンパ球 20 個の核 DNA 量の平均を 2C として DNA ヒストグラムを作成した⁵⁾。DNA ヒストグ

<1990年4月11日受理>別刷請求先: 出口 宝
〒903-01 沖縄県中頭郡西原町字上原207 琉球大学
医学部第1外科

Table 2 Summary of DNA index, ploidy pattern, expression of EGF and histological differentiation.

Case	Site	DNA index	Ploidy pattern	EGF	Differentiation
1	n	1.1	D	(-)	/
	①	1.1	D	(±)	m
	②	1.3	A	(±)	m
	③	1.3	A	(+)	m
2	n	1.0	D	(±)	/
	①	1.1	M	(+)	m
	②	1.2	M	(±)	m
	③	1.1	M	(+)	m
3	n	1.0	D	(±)	/
	①	1.4	M	(++)	w
	②	1.8	M	(++)	w
	③	1.4	M	(++)	w
4	n	1.0	D	(±)	/
	①	1.1	D	(++)	m
	②	1.1	D	(++)	m
	③	1.1	D	(++)	m
5	n	1.1	D	(±)	/
	①	1.5	A	(+)	m
	②	1.4	M	(+)	p
	③	1.4	M	(-)	p
6	n	1.0	D	(++)	/
	①	1.7	A	(+)	m
	②	1.4	A	(+)	m
	③	1.6	A	(+)	m
7	n	1.0	D	(+)	/
	①	1.1	D	(+)	m
	②	1.4	M	(+)	m
	③	1.5	M	(++)	m
④	1.5	M	(+)	m	

Fig. 1 Diagrammatic illustration of multiple sampling from the tumor.



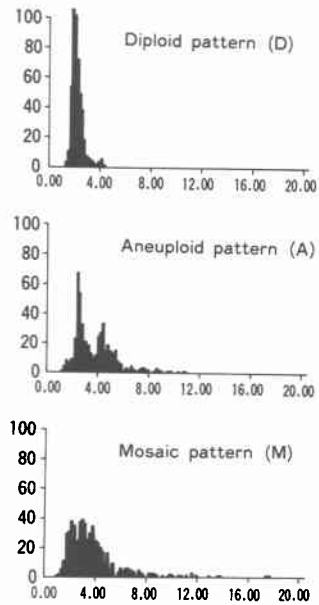
- n Normal mucosa
- ① Oral site of the tumor
- ② Surface of the tumor
- ③ Depths of the tumor
- ④ Anal site of the tumor

ラムのピークより DNA ploidy の stemline として DNA index (2C=DNA index 1) を求め、DNA ploidy pattern を Diploid (D), Aneuploid (A), Mosaic (M) の 3 pattern に分類した⁶⁾ (Fig. 2).

2) EGF 染色

4μm の薄切り組織切片を用いて、一次抗体として抗 EGF 抗体 (Oncor 社) を用いた PAP 法を行った⁷⁾。ここで、一次抗体として正常羊血清を用いた標本を陰性コントロールとした。なおこれらの染色操作は、全標

Fig. 2 DNA ploidy pattern.



本を同時に行った。作製された標本を400倍で鏡検し、3視野中の細胞における EGF 染色陽性細胞数が 0% を EGF 陰性 (-), 30%未満を弱陽性 (±), 30%以上 60%未満を陽性 (+), 60%以上を強陽性 (++) の 4段階に分類した (Fig. 3).

III. 結果

DNA index は、正常粘膜は1.0~1.1であって、癌部においては1.0~1.8となった。4例において4部位による差は0.2以内であったが、3例 (Case 3, 6, 7) が採取部位による差が0.4以上となった。DNA ploidy pattern は、正常粘膜は全て D pattern であった。同一腫瘍内で4部位とも一致したのは2例 (Case 3, 6) で、5例は2パターンが混在していた。混在する2パターンは D pattern と A pattern 1例 (Case 1), A pattern と M pattern 2例 (Case 2, 5), D pattern と M pattern 2例 (Case 4, 7) であった。

EGF は癌部28標本中1標本を除く96%に発現された。EGF 染色程度は1例 (Case 3) のみが4部位とも一致し、6例は部位により染色程度が異なっていた。病理組織学的癌分化度は5例が4部位とも一致し、2例は中分化癌と低分化癌が混在していた。EGF 染色程度および DNA ploidy pattern および癌分化度が4部位とも一致したのは1例 (Case 3) のみであった (Table 2)。EGF 染色程度と癌分化度の関係を検討すると、高分化癌に EGF 染色程度が強く、低分化癌では

Fig. 3 Expression of EGF (×50)

a	b	a: (-), negative	b: (±), slight
c	d	c: (+), moderate	d: (++) , intense

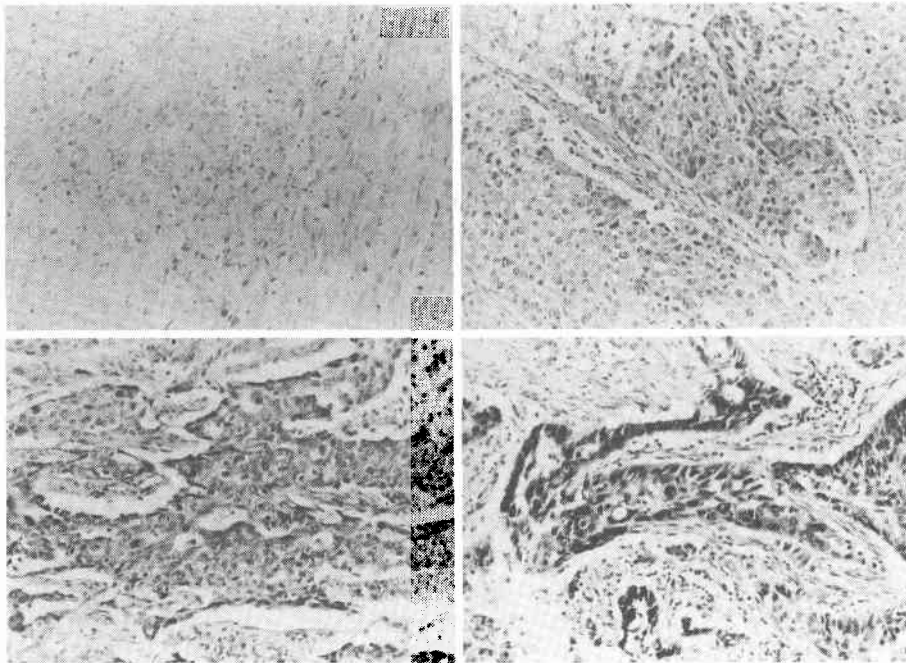


Fig. 4 Relationship between expression of EGF and histologic grade of the differentiation.

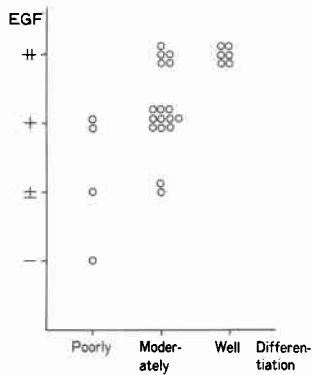
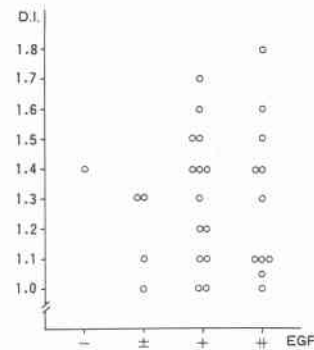


Fig. 5 Relationship between expression of EGF and DNA index.



EGF 染色程度は弱くなる傾向が見られた (Fig. 4). EGF 染色程度と DNA index (Fig. 5), EGF 染色程度と DNA ploidy pattern (Fig. 6) との間に関係は認めなかった。

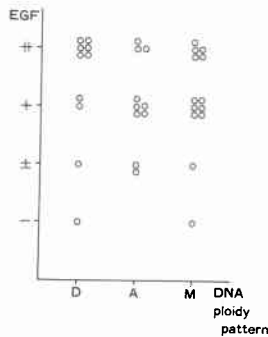
IV. 考 察

近年, flow cytometry や顕微蛍光測光法による DNA 量の定量分析が各種腫瘍を対象として行われ,

とくに臨床では腫瘍の良悪性の鑑別や悪性度の指標, 予後判定の指標として追求されてい^{1)8)~12)}, 食道癌においても同様に研究されている^{2)13)~16)}. しかし同一腫瘍内において, 部位別に DNA 量を定量分析し検討した報告は少ない¹⁷⁾.

DNA 量の測定法として顕微蛍光測光法を用いた. 本法は新鮮材料での測定も可能であるが, 同じ部位での EGF の染色程度および病理組織学的所見の観察を

Fig. 6 Relationship between expression of EGF and DNA ploidy pattern.



目的としたため、パラフィン包埋ブロックにした後連続切片で標本を作製し、測定を行った。

DNA index は、3 例が腫瘍内部位による差が 0.4 以上を示す部位がみられた。DNA index はリンパ球を 1 とした場合の DNA ploidy の stemline (G0, G1 期) の相対的 DNA 量であることから、同一腫瘍内で部位による DNA index の不一致を示した前述の症例においては、同一腫瘍内で部位により異なる stemline の癌細胞が存在すると考えられた。

DNA ploidy pattern は 5 例が、同一腫瘍内で部位による pattern の不一致を示した。DNA ploidy pattern は polyploidy の割合が多いほど生物学的悪性度が高く、M pattern, A pattern を示すものは予後不良とされている¹⁶⁾、とくに M pattern を示した部位は、他の pattern を示した部位に比べて、異なる stemline の細胞が多く存在し、増殖期 (S, G2, M 期) にある癌細胞の占める割合が多いことが予測される。また DNA ploidy pattern は癌発生から経時的に D pattern から A pattern へ、そして M pattern へ変化して行くとも考えられている⁹⁾。この DNA ploidy pattern の生物学的悪性度との関係や経時的推移を考慮すると、同一腫瘍内で pattern の不一致を示した 5 例においては、同一腫瘍内で部位により異なる悪性度、あるいは発生からの時間経過が異なる癌細胞、そして増殖能の異なる癌細胞が存在すると想定される。以上より食道癌においては、同一腫瘍内で DNA 量定量分析からみた生物学的特性が部位により異なる症例が存在すると考えられた。

EGF は Cohen らにより¹⁸⁾、マウス顎下腺抽出物から発見されたポリペプチドで、発癌のプロモーターとしての効果を示すことが知られている。そのレセプ

ターである EGF receptor (EGFR) は扁平上皮癌で過剰発現し、癌細胞の増殖活性・悪性度などの生物学的特性の指標になると報告されている^{3)19)~21)}。著者らは抗 EGF 抗体を用いて、同一腫瘍内における異なる部位間で EGF 染色程度の違いについて検討を行った結果、EGF 染色程度と癌分化度に関係が見られた。また、採取された部位により EGF 染色程度が異なる症例が見られ、同一腫瘍でも部位により生物学的特性の違いが存在すると考えられた。しかしながら、対象とした食道癌 7 例においては、癌悪性度の指標として追求されている DNA ploidy と EGF 染色程度との間には密接な関係を見出さなかった。最近、腫瘍における autocrine 現象が論議されており²²⁾、EGF と EGFR はその代表的な系であって、同一腫瘍内でも部位により autocrine システムの発現に差が生じることがあることも予想される。

以上のように同一腫瘍内の生物学的特性の多様性に関しては、1) 癌発生からの時間経過や細胞の増殖時間による世代の違い、2) Multicentric carcinogenesis, などの機序が想定され、今後さらに症例を集積し、各種手法を用いて検討する必要がある。また DNA ploidy や EGF の臨床的意義を評価するにあたっては、多数部位より組織を採取する必要があると考える。

本論文の一部は第 43 回食道疾患研究会および第 48 回九州癌学会において報告した。御指導賜りました、京都府立医科大学第 2 病理学教室藤田哲也教授、浜田新七先生に深甚なる謝意を表します。

文 献

- 1) 西 律, 岡島邦雄, 田口忠宏ほか: 核 DNA 量による乳癌の悪性度診断に関する研究. 日外会誌 89: 576-581, 1988
- 2) 西平哲郎, 赤石 隆, 標葉隆三郎ほか: 細胞生物学的特性に基いた食道癌の治療方針. 日外会誌 88: 1079-1083, 1987
- 3) 池内駿之, 田淵勝彦, 有森正樹: 食道癌の EGF レセプターおよび Transferrin レセプター発現. *Oncologia* 20: 117-123, 1987
- 4) 食道疾患研究会編: 食道癌取り扱い規約, 第 7 版, 金原出版, 東京, 1989
- 5) 浜田新七: 細胞単離法による DNA 蛍光測光法. 日本組織細胞化学会編. 組織細胞化学 1988. 学際企画, 東京, 1988, p25-37
- 6) 浜田新七: 顕微蛍光 DNA 測光法によるヒト大腸腫瘍の解析. 京都府医大誌 94: 129-148, 1985
- 7) Sternberger LA, Hardy PH, Cuculis JJ et al: The unlabeled antibody enzyme method of immunohistochemistry preparation and properties

- of soluble antigen and antibody complex (horse radish-antihorse radish peroxidase) and its use in identification of spirochetes, *J. Histochem. Cytochem* 18 : 314-333, 1970
- 8) Hamada S, Itoh R, Fujita S: DNA distribution pattern of the so-called severe dysplasias and small carcinomas of the colon and rectum and its possible significance in the tumor progression. *Cancer* 61 : 73-79, 1988
 - 9) 香川恵造: 蛍光顕微 DNA 定量法による Liver Cell Dysplasia および肝癌の解析. 京都府医大誌 90 : 13-31, 1981
 - 10) 小島宗門, 渡邊 決: 副腎皮質癌の5例. 内分泌外科 4 : 159-161, 1987
 - 11) 後藤浩志, 大内清沼, 大和田正紀ほか: 胆嚢癌における核 DNA pattern の解析. 日外会誌 89 : 1843-1849, 1988
 - 12) 平出星夫, 玉態正悦, 鶴 純明: 乳癌における核 DNA 量の臨床的意義と抗癌剤の影響. 医のあゆみ 134 : 181-182, 1985
 - 13) Sannohe Y, Hiratsuka R: Clinico pathological significance of the DNA histogram patterns in cancer cell nuclei of the stomach and esophagus. *Gastroenterol Jpn* 16 : 25-32, 1981
 - 14) Sugimachi K, Ide H, Okamura T et al: Cytophotometric DNA analysis of mucosal and submucosal carcinoma of esophagus. *Cancer* 53 : 2683-2687, 1984
 - 15) Matsuura H, Sugimachi K, Facs, Ueo H et al: Malignant potential of squamous cell carcinoma of esophageal predictable by DNA analysis. *Cancer* 57 : 1810-1814, 1986
 - 16) Sugimachi K, Matsuura H, Kai H et al: Prognostic factors esophageal carcinoma: Univariate and multivariate analyses. *J Surg Oncol* 31 : 108-112, 1986
 - 17) Sakaki K, Hashimoto T, Kawachino K et al: Intratumoral regional differences in DNA ploidy of gastrointestinal carcinomas. *Cancer* 62 : 2569-2575, 1988
 - 18) Cohen S: Isolation of a mouse submaxillary gland protein accelerating in cisor eruption and eyelid opening in the newborn animal. *J Biol Chem* 237 : 1555-1562, 1962
 - 19) 米村 豊, 杉山和夫, 鎌田 徹ほか: 胃癌における Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) 活性と予後. 日外会誌 89 : 1611-1615, 1988
 - 20) Sainsbury JRC, Farndon JR, Sherbet GV et al: Epidermal growth factor receptors and oestrogen receptors in human breast cancer. *Lancet* 16 : 364-366, 1985
 - 21) Neal DE, Marsh C, Bennet MK et al: Epidermal growth factor receptors in human bladder cancer: Comparison of invasive and superficial tumors. *Lancet* 8525 : 366-368, 1985
 - 22) Sporn MB, Roberts AB: Autocrine growth factors and cancer. *Nature* 313 : 745-747, 1986

Differences of DNA Ploidy Patterns and Expression of Epidermal Growth Factor in Variat Sites of a Esophageal Carcinoma-Reports of Seven Cases

Shigeru Deguchi, Takayoshi Toda*, Syuji Tomita, Yushi Hamada, Norihiko Okushima,
Yutaka Takaesu, Fasal A Muazzam and Yoshihiro Muto
First Department of Surgery, Ryukyu University, School of Medicine
*Clinical Laboratory, Ryukyu University Hospital

To study the intratumoral regional differences in DNA ploidy and the expression of epidermal growth factor (EGF) of esophageal carcinoma, multiple samples from different sites of a tumor each of seven patients were subjected to DNA analysis and immunohistochemical examination for EGF. Every patient showed intratumoral regional differences in DNA index and a marked regional differences (0.4 or more) were found in three patients. Intratumoral regional differences in DNA ploidy were observed in five patients. Regarding EGF expressions, six patients showed regionally different degrees and the degree of EGF expression as closely related to the histological differentiation of the carcinoma. However, there was no certain relationship between DNA ploidy and EGF expression. The results suggest that esophageal carcinoma may constitute a feature of intratumoral regional polymorphism.

Reprint requests: Shigeru Deguchi First Department of Surgery, Ryukyu University School of Medicine
207 Aza-Uehara, Nishiharamachi, Nakagamigun, 903-01 JAPAN