日消外会誌　23（9）：2227～2231，1990年

進行胃癌における原発巣および転移巣のDNA indexの検討

金沢大学第2外科

松本　尚　米村　豊　津川浩一郎　木村　寛伸
大山　繁和　鎌田　徹　竹川　茂　小坂　健夫
山口　明夫　三輪　晃一　宮崎　逸夫

進行胃癌57例の原発巣および転移巣のDNA index（DI）をflow cytometerを用いて決定し，胃癌におけるDIの多様性(heterogeneity)の有無に関して検討した．原発巣内の数か所を検索したところ，36例（63%）に原発腫瘍内のDIの多様性を認めた．また原発巣と肝転移巣のDIを比較すると，原発巣内のstem lineのうちDIの大きなものが肝転移巣内に認められる傾向にあった（10例中7例）．以上より，DNA ploidy patternを用いての予後の推測，治療法の選択の際にはDIの多様性を十分に考慮する必要があると考えられた．さらに原発巣と転移巣のDIの検討は，転移のメカニズム，再発の予測の上で注目される．

Key words: gastric carcinomas, DNA index, flow cytometry, heterogeneity of DNA ploidy pattern

I. はじめに

近年，flow cytometryや顕微蛍光測光装置を用いて様々な臓器の癌細胞に対する核DNA量の測定が多くの施設において行われている．その結果，DNA ploidy patternは予後を規定する上で重要な因子となり，一般にはDNA aneuploidの予後がDNA diploidに比べ不良であるとされている[1)~5)]．すなわち術前の生検あるいは切除標本からのDNA ploidy patternの解析には，治療法の選択や患者の予後を推測する上で期待が寄せられている．しかし最近になり核DNA量は悪性腫瘍内において一定なものでなく，多様性（heterogeneity）の存在するものであるという報告が多くみられることから[6)~10)]，今回著者らは胃癌においてこのheterogeneityの存在を検討することを目的に，flow cytometryを用い核DNA量を求め，原発巣内および原発巣と転移巣間でのDNA index（DI）を評価したので報告する．

II. 対象と方法

金沢大学第2外科で経験した進行胃癌57例（新鮮標本33例，パラフィン包埋標本24例）を対象とした．48例にリンパ節転移を，13例に肝転移を認め，このうちそれぞれ28例，10例に対して核DNA量の検索が可能であった．方法は，新鮮標本に関しては手術により切除された胃癌組織およびリンパ節転移，肝転移組織より約5mm角の癌巣を5～6か所採取し，これらを70%エタノールで固定後1～2mmに細切，大山らの方法[11)]に準じ0.5%ペプシン溶液（pH 1.5）で37℃で，2時間処理し細胞単離を行った．次いで40μmのナイロンメッシュで濾過後，0.5%Tween 20加PBS溶液で洗浄（1,000rpm 5min.）し，1mg/ml RNase（Sigma Chemical Co., St. Louis U.S.A.）で37℃，30分間インキュベートの後20μg/ml propidium iodide（Sigma Chemical Co.,）でDNA染色を行った．またパラフィン包埋標本に関しては過去に切除された胃癌より1症例につき4～5か所のパラフィン包埋ブロックを用意し，約50μmの薄切切片を5～6枚切り出した．またリンパ節転移，肝転移に関しても同様に薄切切片を切り出した．これらを脱パラした後，Schutteらの方法[12)]に準じて0.25%トリプシン溶液（pH 7.6）で37℃，24時間処理し細胞単離を行い，その後は新鮮標本の場合と同様の方法でDNA染色した．

いずれの場合にも核DNA量の測定にはflow cytometer EPICS PROFILE（Coulter Electronics, Inc., Hialeah, U.S.A.）を用い，標本内の正常細胞を内部コントロールとした．正常2倍体と同じG0G1 peakのみを持つものをDNA diploid，それ以外に複数のG0G1 peakの存在するものをDNA aneuploidとし，DNA indexを左常2倍体細胞の核DNA量と腫瘍細胞の核DNA量との比として算出した．また，測定

＜1990年5月9日受理＞別刷請求先：松本　尚
〒920　金沢市宝町13－1　金沢大学医学部第2外科

されたDNA histogramのうちcoefficient of variation(CV)が8.0以下のものを採用し，評価可能な症例のCVの平均値は5.7±1.2（mean±SD, range 2.8～7.9)であった．Aneuploid間のDIの違いについてはその差が10%を越える場合に多様性（heterogeneity）があると定義した．

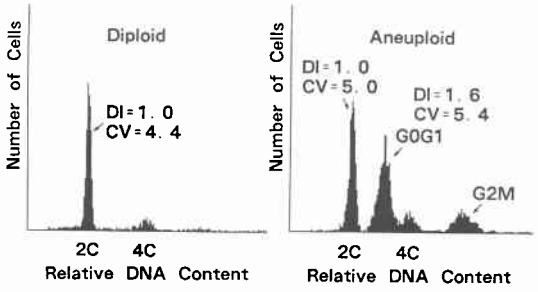
III. 成　績

測定されたDNA histogramを**Fig. 1**に示す．左はDNA diploid（以下diploid)，右はDNA indexが1.6のDNA aneuploid（以下aneuploid）である．

原発巣内の核DNA量のheterogeneityについて見ると，腫瘍内の観察した部位すべてがdiploidであったものは57例中15例（26%)，diploid peakとaneuploid peakが混在するものは30例（53%）であった．すべてがaneuploidであったものは12例（21%）で，このうち6例はDIの異なるaneuploid peakが混在し，diploidおよびaneuploidの混在する30例と合わせて36例(63%)に腫瘍内のDIの多様性を認めた(**Table 1**)．

次に原発巣と転移巣間での核DNA量のheterogeneityについて検討した．核DNA量の検索しえたリンパ節転移巣28例中原発巣，転移巣ともにdiploidのものは1例（4%)，原発巣がdiploidでリンパ節転移巣にaneuploidの見られたもの4例(14%)，原発巣がaneuploidでリンパ節転移巣にdiploidの見られたもの8例（29%)，両者ともにaneuploidのもの15例（53%）であった．これらリンパ節転移巣のうち12例（43%）で原発巣では見られなかったDIを認めた(**Table 2**)．また肝転移巣に関しては10例中原発巣，肝

Fig. 1 DNA histogram from patients with advanced gastric cancer by means of FCM



CV=5.7±1.2(mean±SD)

Table 1 DNA ploidy in primary tumors

Diploid	15 cases (26%)
Diploid + aneuploid	*30 cases (53%)
Aneuploid	12 cases (21%)
single DI	6 cases
multiple DIs	*6 cases

*Heterogeneity

Table 2 Differences between DNA ploidy in primary tumors and in metastatic lymphnode

Primary tumors	Metastatic lymphnode	
	Diploid	Aneuploid
Diploid	1	4(4)
Aneuploid	8(2)	15(6)

Number in parentheses, case which have different DNA indices.

Table 3 Differences between DNA ploidy in primary tumors and in metastatic liver tumors

Primary tumors	Metastatic liver tumors	
	Diploid	Aneuploid
Diploid	1	2(2)
Aneuploid	0	7

Number in parentheses, case which have different DNA indices.

Table 4 Comparison between DNA indices in primary tumors (Prim.) and in metastatic lymphnode (Ln).

Case	Prim.				Ln	
1	1.0	1.0	1.0	1.1	1.0	1.0
2	1.0	1.0	1.0	1.4	1.0	1.0
3	1.0	1.0	1.7		1.0	1.0
4	1.0	1.0	1.0	1.7	1.0	1.0
5	1.0	1.0	1.0	2.1	1.0	1.0
6	1.0	1.3	1.4	1.4	1.0	1.0
7	1.3	(1.4 2.3	1.4	1.4	1.0	1.0
8	1.5	1.6	1.9	1.9	1.0	1.0
9	1.6	1.6	1.6	1.6	1.0	1.6
10	(1.7 2.8	1.7	1.7	1.8	1.5	1.5
11	2.4	2.4	2.4		1.3	
12	1.0	1.0	1.0		1.0	
13	1.0	1.0	1.1	1.3	1.0	1.1
14	1.0	1.0	1.7	1.7	1.0	1.9
15	1.0	1.0	(1.7 2.7	(1.7 2.7	1.7	1.7
16	1.0	1.6	1.6	1.6	1.0	1.6
17	1.1	1.2	1.2	1.2	1.3	
18	1.6	1.6	1.6	1.6	1.6	1.6
19	(1.3 2.6	(1.3 2.5	1.3	1.8	1.8	
20	(1.5 2.7	(1.6 2.7	2.6	2.7	(1.5 2.7	2.7
21	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.2
22	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.6
23	1.0	1.0	1.0	1.0	1.2	1.5
24	1.0	1.0	1.0		2.4	3.0
25	1.0	1.0	1.0	1.2	1.0	1.8
26	1.0	1.0	1.7	1.8	1.2	1.7
27	1.0	1.4	1.4	1.4	1.0	2.3
28	1.0	1.4	1.4	1.4	1.4	1.4

(: seen plural DNA indices in same sample.

Table 5 Comparison between DNA indices in primary tumors (Prim.) and in metastatic liver tumors (Lv).

Case	Prim.				Lv	
1	1.6	1.6	1.6	1.6	1.0	1.5
2	1.0	1.0	1.0		1.0	
3	1.6	1.6	1.6	1.6	1.6	1.6
4	1.0	1.0	1.0	1.0	1.7	
5	1.0	1.0	1.0	1.0	2.0	
6	1.0	1.0	1.1	1.3	1.4	
7	1.0	1.0	1.5		1.4	
8	1.0	1.0	1.7	1.7	1.9	
9	1.0	1.0	1.8	1.9	1.2	2.8
10	1.0	1.3	1.4	1.4	1.4	

転移巣ともにdiploidは1例(10%)，原発巣がdiploidで肝転移巣がaneuploidは2例（20%），原発巣がaneuploidで肝転移巣がdiploidのものは見られず，両者ともaneuploidであるものが7例（70%）であった．これら肝転移巣のうち3例（30%）で原発巣には見られなかったDIを認めた（**Table 3**）．

原発巣とリンパ節転移巣のDIの変化を比較検討した（**Table 4**）．症例1～11は原発巣内のDIの小さいcell populationが転移したと考えられる例を（Type A），症例12～20は両者のDIがhomogenousである例を(Type B)，また症例21～28は原発巣内のDIの大きいcell populationが転移したと考えられる例（Type C）である．肝転移巣について同様の検討をすると，Type Aは1例，Type Bが2例，Type Cが7例に見られた（**Table 5**）．

また組織型に関して原発巣内および原発巣と転移巣間でheterogeneityは認められず，また術後の化学療法については個々の症例でさまざまであり核DNA量と化学療法に関して一定の傾向は見い出せなかった．

IV．考　察

消化器癌における予後の向上は，拡大郭清手術による局所およびリンパ節再発の制御に起因するところが多い．しかしながら，術前術後を通じリンパ節転移，肝転移，腹膜播種などの有無，またはこれらの再発についての予測に関しての知識は十分ではない．このため最近では，癌遺伝子や細胞増殖因子の発現を通して癌細胞の生物学的特性を知ることにより，転移の有無あるいは予後などを推測する試みがなされるようになってきた[13)14)]．そのひとつとして，腫瘍の細胞内核DNA量が重要な予後規定因子となることが，種々の固形腫瘍に関して報告されている[1)~5)]．その結果，一般にはDNA aneuploidの予後がDNA diploidに比べ不良であるとされており，最近では従来の顕微蛍光測光装置に加え，flow cytometryを用いることにより，術前の生検材料からも核DNA量の測定が可能となっている．したがって，DNA ploidy patternの解析には，治療法の選択や患者の予後を推測する上で期待が寄せられている．

一方，悪性腫瘍はその強い増殖力により，組織型をはじめとする腫瘍内の生物学的特性は常に一様なものではないと考えられ，核DNA量に関しても腫瘍内において一定なものではなく，多様性（heterogeneity）の存在するものであるという報告が多く見られるようになってきている[6)~10)]．そこで今回著者らは胃癌におけるheterogeneityの存在を検討することを目的に，原発巣内および原発巣と転移巣間でのDNA index（DI）を評価した．

固形腫瘍に対する原発巣内の核DNA量のheterogeneityに関する報告は胃癌においてはSasakiら[7)]が15例中6例（40%）に，またAretxabalaら[8)]は37例中12例（33%）にそれぞれDIの相違を認めたとしている．著者らの検討では57例中36例（63%）と諸家の報告に比べ高率であるが，特にDNA diploidとDNA aneuploidの混在している症例が30例（53%）あり，このような例では生検あるいは切除標本によるDNA ploidyの検索でDNA diploidと判定される可能性があると考えられた．このことはDNA ploidy patternを用いての予後の推測，あるいは将来的に治療法を選択する一助とする際に十分考慮されなければならない．

核DNA量のheterogeneityに関して，原発巣内での報告は種々にみられるものの，原発巣と転移巣についての検討はきわめて少ない[15)16)]．転移のメカニズムの探求や再発の予測をする上で，こういった検討は将来注目されると考えられる．著者らは核DNA量の検索が可能であった転移巣において，リンパ節転移では28例中12例（43%）に，肝転移では10例中3例（30%）に原発巣にはみられなかったDIを認めている．さらに原発巣内のどのようなstem lineが転移巣内に認められたかを，3つのTypeに分け検討した．すなわち，原発巣内のDIの小さいcell populationが転移したと考えられるものをType A，原発巣と転移巣のDIがhomogenousなものをType B，原発巣内のDIの大きいcell populationが転移したと考えられるものをType Cとした．これによるとリンパ節転移巣ではType Aが11例，Type Bが9例，Type Cが8例と一定の傾向をみなかったのに対し，肝転移巣ではType

Aは1例，Type Bが2例，Type Cが7例とDIの大きなstem lineが肝転移巣内に認められる傾向にあった．大山ら[17]は腫瘍の増殖活性とDIとは相関関係にあると報告しており，したがって増殖活性の高いstem lineが肝転移をおこしやすいと考えることができる．

転移巣内に原発巣にはみられなかったDIが出現していた点に関しては，転移した後に増殖する過程で腫瘍細胞のDIが変化していくのか，あるいは原発巣内にとらえきれなかった別のcell populationが存在しそれが転移したのかは興味深いところであるが，今回の検討により原発巣内には高率にheterogeneityが存在していることから後者の機序が考えやすい．しかしながらこのように原発巣と転移巣間でのDIの相違を検討する際には化学療法による影響などを考慮する必要もあり，短絡的に結論づけるのは危険であろう．なぜなら抗癌剤に対して感受性の高いものは消滅し，抵抗性のあるもののみが生き残るとすれば，原発巣や転移巣のDIは容易に変化しうると考えられるからである．今後はさらに，脾内移植法[18]を用いた肝転移モデルなどによる転移腫瘍細胞の研究が期待される．

文　献

1) Hedley DW, 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
2) Emdin SO, Stenling R, Roos G: Prognostic value of DNA content in colorectal carcinoma. Cancer 60：1282—1287, 1987
3) 小坂健夫，伊井　徹，松本　尚ほか：FCMをもちいたDNA ploidyおよびDNA indexと大腸癌の予後に関する検討．日本大腸肛門病会誌 43：61—66, 1990
4) Yonemura Y, Sugiyama K, Fujimura T et al: Correlation of DNA ploidy and proliferative activity in human gastric cancer. Cancer 62：1497—1502, 1988
5) Friedlander ML, Hedley DW, Taylor IW et al: Influence of cellular DNA content on survival in advanced ovarian cancer. Cancer Res 44：397—400, 1984
6) Teodori L, Tirindelli D, Mauro F et al: Non-small-cell lung carcinoma: Characterization on the basis of flow cytometrically determined cellular heterogeneity. Cytometry 4：174—183, 1983
7) Sasaki K, Hashimoto T, Kawachino K et al: Intratumoral regional differences in DNA ploidy of gastrointestinal carcinomas. Cancer 62：2569—2575, 1988
8) Aretxabala X, Yonemura Y, Sugiyama K et al: Gastric cancer heterogeneity. Cancer 63：791—798, 1989
9) Hiddemann W, Bassewitz DB, Kleinemeier H et al: DNA stemline heterogeneity in colorectal cancer. Cancer 58：258—263, 1986
10) Smit V, Cornelisse CJ, Jong D et al: Analysis of tumor heterogeneity in a patient with synchronously occurring female genital tract malignancies by DNA flow cytometry, DNA fingerprinting, and immunohistochemistry. Cancer 62：1146—1152, 1988
11) 大山繁和，米村　豊，二宮　致ほか：Bromodeoxyuridineの生体内投与による胃癌の細胞動態の解析．医のあゆみ 150：511—512, 1989
12) Schutte B, Reynders MMJ, Bosman FT et al: Flow cytometric determination of DNA ploidy level in nuclei isolated from paraffin-embedded tissue. Cytometry 6：26—30, 1985
13) 米村　豊，杉山和夫，鎌田　徹ほか：DNA ploidy, ras p21の発現からみたBorrmann 4型胃癌の予後の検討．日消外会誌 22：1995—1999, 1989
14) Yonemura Y, Sugiyama K, Fujimura T et al: Epidermal growth factor receptor status and S-phase fractions in gastric carcinoma. Oncology 46：158—161, 1989
15) 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
16) 荒木靖三：Flow cytometryによる直腸癌細胞核DNA量測定に関する研究—DNA ploidy patternと臨床病理学的所見および術後遠隔成績との関連についての検討—．日外会誌 90：1965—1975, 1989
17) 大山繁和，米村　豊，伏田幸夫ほか：Flow cytometerを用いた胃癌の細胞増殖動態の解析．医のあゆみ 148：367—368, 1989
18) 森川清志：ヒト癌の肝転移モデルとしてのヌードマウス脾内移植法．Oncologia 22：100—102, 1989

Evaluation of DNA Indices in Primary and Metastatic Tumors in Advanced Gastric Carcinoma

Hisashi Matsumoto, Yutaka Yonemura, Kouichiro Tsugawa, Hironobu Kimura, Shigekazu Oyama,
Toru Kamata, Shigeru Takegawa, Takeo Kosaka, Akio Yamaguchi,
Kouich Miwa and Itsuo Miyazaki
Second Department of Surgery, School of Medicine, Kanazawa University

Regional differences in DNA indices (DIs) in 57 advanced gastric carcinoma were analyzed and evaluated for heterogeneity from the aspect of DIs in the primary tumor and between primary and metastatic tumors by flow cytometry. Five or six samples were taken from different primary tumor sites. Intratumoral differences in DIs were observed in 36 of 57 cases (63%). In contrast with DIs of primary and liver metastatic tumors, the tumor cell population which had a high DI in the primary tumor had a tendency to be found in the metastatic lesion (70%). Therefore, heterogeneity of DIs, as revealed from the DNA ploidy pattern, must be considered for giving a prognosis and the decide on the treatment. Investigation of differences in DIs between primary and metastatic tumors may suggest the expectation of recurrence or the mechanism of metastasis.

Reprint requests: Hisashi Mastumoto Second Department of Surgery, School of Medicine, Kanazawa University
13-1 Takara-machi, Kanazawa, 920 JAPAN