日消外会誌　25（1）：58～62，1992年

大腸癌切除例における原発巣とリンパ節転移巣の核DNA量の比較検討

近畿大学医学部第1外科
牛田　伸二　黒岡　一仁　船井　貞往
山田　博生　藤井　良憲　今西　幸雄
松田　泰次　進藤　勝久　安富　正幸

大腸癌143例の核DNA量をflow cytometryを用いて測定し，DNA index（DI）からみたリンパ節転移との関係について検討した．DNA ploidy patternはDNA diploidy：50例，DNA aneuploidy：93例でリンパ節転移を認めたものはそれぞれ，30.0%（15/50），62.4%（58/93）とDNA aneuploidyに有意に高率であった．リンパ節転移陽性率は，DI＝1.3（75.0%），1.5（71.4%），1.6（100%），1.7（70.0%）にやや頻度が高く，これらのDIを示す大腸癌はリンパ節転移をきたしやすい可能性が示唆された．さらに21例についてリンパ節転移巣の核DNA量を測定し原発巣と比較したところ，両者のDIは全例で一致した．

Key words: flow cytometry, nuclear DNA content, lymph node metastasis of colorectal cancer

はじめに

近年，ヒト癌における核DNA量の測定が，flow cytometry（FCM）や顕微蛍光測光法を用いて行われている．大腸癌においてもDNA aneuploidyはDNA diploidyに比べ生物学的悪性度が高く予後が不良であるといわれている[1)~3)]．われわれは大腸癌におけるリンパ節転移の特徴をFCMを用い，核DNA量を測定することにより検討したので報告する．

対象・方法

最近，当教室で切除された大腸癌143例（結腸癌65例，直腸癌78例），およびそのリンパ節転移巣21例を対象とした．

10%中性ホルマリン包埋ブロックより6μmおよび70μmの切片を作成した．6μm切片はHematoxylin-Eosin（HE）染色を行い，大腸癌取扱い規約[4)]に準じて組織学的に検討した．核DNA量の測定は70μm切片を脱パラフィン後再水和を行い癌巣部を採取，Hedleyら[5)]の方法に準じて，0.5%pepsin（pH：1.5，37℃90分）で裸核化し，0.2%RNase（37℃60分）処理後，30μm nylon meshで濾過しsingle cell suspensionを作成，50μg/ml，propidium iodideで核染色を行った．また，原発巣とリンパ節転移巣のDNA index（DI）を比較した21例については，原発巣は腫瘍中心部，腫瘍辺縁部（口側および肛門側）の3か所より標本を作成，リンパ節は転移巣が50%以上を占める転移陽性1群リンパ節（n_1）を用いsingle cell suspensionを作成，HE塗抹標本にて癌細胞が30%以上存在することを確認のうえ，核DNA量を測定した．Flow cytometerはFACScan（Becton Dickinson社製）を用いて1検体あたり1×10^4個の核DNA量を測定しDNAヒストグラムの作成を行った（**Fig. 1**）．Histogramの解析は，腫瘍内浸潤リンパ球をinternal standardとし，単一のG_0/G_1 peakで$0.9<DI<1.1$のものをDNA diploidyとした．また，DNA diploidyのG_0/G_1 peak以外に異なったG_0/G_1 peakを有し，$DI\leqq0.9$または$1.1\leqq DI$をDNA aneuploidyと定義した．統計学的有意差の検定にはχ^2検定を用い，$p<0.05$をもって有意と判定した．

結　果

大腸癌143例のDNA ploidy patternはDNA diploidy：50例（35.0%），DNA aneuploidy：93例（65.0%）であった．DNA ploidy patternとリンパ管侵襲（ly）との関係については，DNA diploidyではly_0が48.0%（24/50），ly_1：24.0%（12/50），ly_2：20.0%（10/50），ly_3：8.0%（4/50）と$ly_{(-)}$が約半数を占め，$ly_{(+)}$ではリンパ節侵襲が高度になるに従いDNA di-

＜1991年10月9日受理＞別刷請求先：牛田　伸二
〒589　大阪狭山市大野東377－2　近畿大学医学部第1外科

Fig. 1 Preparation of a single cell suspension from paraffin embedded material

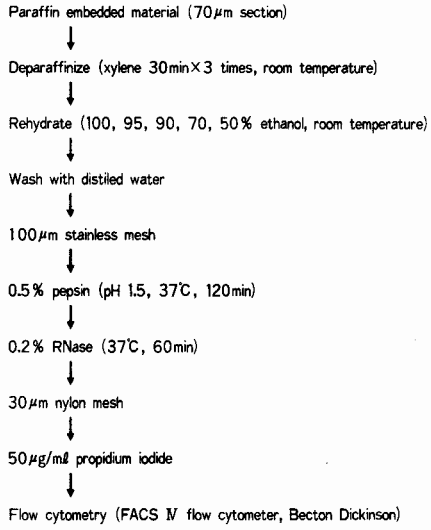


Table 1 Relationship between DNA ploidy pattern and lymphatic invasion (ly)

DNA ploidy pattern	lymphatic invasion				
	ly_0	ly_1	ly_2	ly_3	Total
DNA diploidy	24 (48.0)	12 (24.0)	10 (20.0)	4 (8.0)	50 (100)
DNA aneuploidy	13 (14.0)	28 (30.0)	26 (28.0)	26 (28.0)	93 (100)

( ) : %

ploidy の割合が少なくなっていた．逆に，DNA aneuploidy では ly_0 が14.0%(13/93), ly_1 : 30.0%(28/93), ly_2 : 28.0% (26/93), ly_3 : 28.0% (26/93) と大半が $ly_{(+)}$ であった (**Table 1**).

次に DNA ploidy pattern とリンパ節転移の関係をみると，リンパ節転移陽性率は DNA diploidy : 30.0% (15/50), DNA aneuploidy : 62.4% (58/93) で，DNA aneuploidy において高率であった．これを癌の壁深達度別に検討したところ，リンパ節転移陽性率は DNA diploidy では m, sm : 7.7%, pm : 22.2%, ss(a_1) : 16.7, s(a_2) : 50.0%, s_i(a_i) : 50.0%, DNA aneuploidy では m, sm : 0%, pm : 44.4%, ss(a_1) : 60.9, s(a_2) : 67.9%, s_i (a_i) : 66.7%であり，pm 以上の各壁深達度で DNA aneuploidy において高率であった．また，リンパ節転移陽性率は，DNA diploidy では ss (a_1) : 16.7%, s (a_2) : 50.0%であり，ss (a_1) から s (a_2) に進展する段階で増加していた．一方，

Table 2 Rate of lymphnode metastasis in DNA ploidy pattern by depth of invasion

Depth	DNA ploidy pattern		Total
	DNA diploidy	DNA aneuploidy	
m,sm	1/13 (7.7)	0/2 (0)	1/15 (6.7)
pm	2/9 (22.2)	4/9 (44.4)	6/18 (33.3)
ss (a_1)	2/12 (16.7)	14/23 (60.9)	16/35 (45.7)
s (a_2)	7/14 (50.0)	36/53 (67.9)	43/67 (64.2)
si (a_i)	1/2 (50.0)	4/6 (66.7)	5/8 (62.5)

( ) : %

Table 3 Relationship between DNA ploidy pattern and lymph node metastasis (n)

DNA ploidy pattern	lymphnode metastasis				
	n_0	n_1	n_2	n_3≦	Total
DNA diploidy	35 (70.0)	10 (20.0)	1 (2.0)	4 (8.0)	50 (100)
DNA aneuploidy	35 (37.6)	20 (21.5)	25 (26.9)	13 (14.0)	93 (100)

( ) : %

DNA aneuploidy では，m, sm : 0%, pm : 44.4%と，pm を越える段階でリンパ節転移陽性率が増加していた (**Table 2**). リンパ節転移陽性を示した症例についてみると，DNA diploidy では $n_{1(+)}$ が10例 (20.0%), $n_{2(+)}$ 以上が5例 (10.0%) であったのに対し，DNA aneuploidy では $n_{1(+)}$ が20例(21.5%), $n_{2(+)}$ 以上は38例 (40.9%) と高次のリンパ節転移が高率に認められた (**Table 3**). また，DI とリンパ節転移陽性率の相関について検討した．すなわち，DI を1.1≦DI≦2.1の範囲で0.1ごとに分けて検討したところ，リンパ節転移陽性率は1.3<DI≦1.4 : 75.0% (9/12), 1.5<DI≦1.6 : 71.4% (10/14), 1.6<DI≦1.7 : 100% (6/6), 1.7<DI≦1.8 : 70.0% (7/10) と，これら DI は，その他の DI : 49.0% (25/51) に比べてやや高率であったが有意差はなかった (**Fig. 2**).

さらにリンパ節転移巣の核 DNA 星を測定し，原発巣と比較することにより大腸癌のリンパ節転移における核 DNA 量の変化について検討した．大腸癌原発巣とリンパ節転移巣 $n_{1(+)}$ の核 DNA 量を測定しえたのは21例であり，原発巣の DNA ploidy pattern は DNA diploidy : 5 例 (23.8%), DNA aneuploidy : 16例 (76.2%)であった．ここで原発巣とリンパ節転移の DI の差が0.1以下のとき一致したとすると，21例全例に DI の一致を認めた(**Table 4**). ただし，症例15と18については原発巣に heterogeneity を認めた．症例15で

Fig. 2 DNA index (DI) and rate of lymph node metastasis

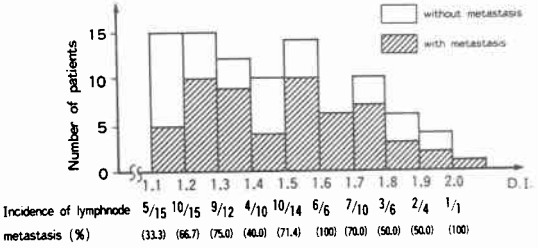
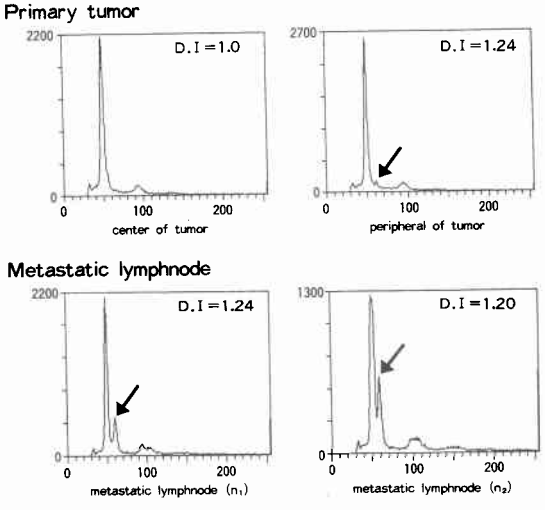


Table 4 DNA index of 21 patients with colorectal carcinoma and metastatic lymph node (Ln)

Case	DNA index		Case	DNA index	
	Prim.	Ln		Prim.	Ln
1. M.K.	1.67	1.72	11. E.K.	1.36	1.36
2. K.Y.	1.0	1.0	12. M.F.	1.56	1.62
3. T.T.	1.47	1.43	13. S.O.	1.39	1.32
4. T.U.	1.0	1.0	14. K.M.	1.0	1.0
5. F.M.	1.0	1.0	15. Y.Y.	*(1.0, 1.24)	1.24
6. M.O.	1.35	1.35	16. M.T.	1.45	1.48
7. S.F.	1.0	1.0	17. A.M.	1.40	1.38
8. A.T.	1.55	1.56	18. M.H.	*(1.68, 2.61)	2.66
9. T.M.	1.36	1.36	19. T.O.	1.67	1.68
10. K.A.	1.19	1.15	20. K.H.	1.33	1.37
			21. S.K.	1.69	1.67

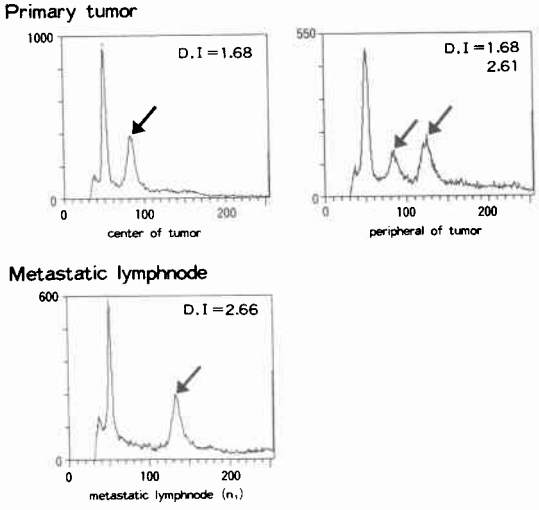
Prim : primary tumor
Ln : metastatic lymph node
*heterogeneity

Fig. 3 DNA histogram in Case 15. The arrow indicates DNA aneuploidy peak



は，原発巣の腫瘍中心部ではDI＝1.0，口側辺縁部ではDI＝1.24の小さなpeakをもつDNA aneuploidyを示し，リンパ節転移巣はn_1：DI＝1.24，n_2：DI＝1.20であった(**Fig. 3**)．症例18では，原発巣の腫瘍中心部と口側辺縁部ではDI＝1.68，肛門側辺縁部ではDI＝1.68，3.61の2か所にpeakをもつDNA multiploidyを示し，リンパ節転移巣ではDI＝2.66のDNA aneuploidyであった(**Fig. 4**)．

Fig. 4 DNA histogram in Case 18. The arrows indicate DNA aneuploidy peaks



考　察

癌細胞核DNA量は癌細胞の生物学的悪性度を反映するといわれており，これまでにも胃癌，大腸癌，乳癌をはじめ多くの癌について検討されてきた．その結果DNA aneuploidyは悪性度が高く，予後は不良であるとされている[1)~3)]．癌の予後は転移(リンパ節転移，血行性転移)によって決定されることが多い，そこで，われわれは大腸癌を用いて核DNA量からみたリンパ節転移の特徴について検討した．大腸癌のリンパ節転移の頻度は，諸家らの報告によると40～50%[6)~8)]であり，われわれの結果も51%とほぼ同様であった．また，大腸癌におけるDNA ploidy patternとリンパ節転移の頻度については，Kokalら[2)]はDNA diploidy：12.5%，DNA aneuploidy：49.1%，石川ら[9)]はそれぞれ37.1%，56.8%であったと報告している．自験例でもそれぞれ30.0%，62.4%と転移率に多少の差があるものの，リンパ節転移陽性率はDNA aneuploidyに高率であった．また壁深達度別にリンパ節転移陽性率を検討したところ，DNA diploidyではs(a_2)の段階で，DNA aneuploidyではpmの段階でリンパ節転移陽性

率の増加を認めた．また，DNA ploidy pattern とリンパ節転移の関係をみると，DNA diploidy では $n_{1(+)}$ が20.0%と最も多かったのに対し，DNA aneuploidy では $n_{2(+)}$ で26.9%と最も多く認められた．つまり，DNA aneuploidy は DNA diploidy と比較して，より早期の段階で，より高次のリンパ節転移がみられることから，より高いリンパ節転移能をもった細胞集団であることが示唆された．それでは，同じ DNA aneuploidy でも DI によってリンパ節転移能に差があるか，DI とリンパ節転移陽性率との相関について検討したところ，有意差はなかったが1.3<DI≦1.4，1.5<DI≦1.8にリンパ節転移陽性率が高く，これら DI を示す大腸癌はリンパ節転移をきたしやすい可能性が示唆された．これまでに大腸癌の核 DNA 量を DI から検討した報告は少なく，石川ら[9]は DI 値と予後の相関はなかったとしているが，黒岡ら[10]は DI から DNA aneuploidy を low と high aneuploid に分類し，high aneuploidy には肝転移が高率にみられ，予後不良であったとしている．今回，われわれは DNA aneuploidy を示した症例を DI 別に10区分し，リンパ節転移との相関について検討したが，細区分したため各 DI の症例数が少なくなり有意な相関を得ることができなかった．このような癌の悪性度と DI の関係は，今後さらに症例数を重ねて検討する必要があると考えられる．

大腸癌における原発巣とリンパ節転移巣の核 DNA 量を比較した報告では，黒岡[3]は10例中8例(80%)が，Kokal ら[2]は29例中25例(86%)が一致したと述べている．われわれの結果では原発巣とともにリンパ節転移巣の核 DNA 量を測定しえたのは21例であり，このうち2例に原発巣の heterogeneity を認めたものの21例全例において原発巣とリンパ節転移巣の DI の一致をみた．従来より原発巣と転移巣の核 DNA 量の一致しなかった理由としては，原発巣の heterogeneity が存在すること，宿主の問題として癌が原発巣と異なった環境である転移巣で何らかの作用を受けて核 DNA 量が変化することなどが考えられていた．今回の解析結果より，大腸癌の核 DNA 量は DI からみた場合，原発巣とリンパ節転移巣の細胞集団には変化がなく，原発巣の DNA heterogeneity がリンパ節転移巣の細胞集団を決定していると考えられた．ここで DNA heterogeneity を示した2症例について考察をくわえると，症例15では DNA 測定前の検鏡による腫瘍細胞純度は原発巣および転移巣の4検体がすべて50%以上であったにもかかわらず，原発巣では腫瘍中心部で DNA diploidy，腫瘍辺縁で DI=1.24の小さな DNA aneuploid peak を認めた．リンパ節転移巣では n_1 で DI=1.24，n_2 で DI=1.20の明らかな DNA aneuploid peak を認めた．これは，原発巣において DNA diploidy が優勢であるにもかかわらずリンパ節転移をおこした細胞集団は DNA aneuploidy が優勢であったということであり，DNA aneuploidy が易転移性であることを示す例と考えられる．また，症例18では腫瘍中心部は DI=1.68の DNA aneuploidy，辺縁部では DI=1.68，2.61の multianeuploidy であった．それに対しリンパ節転移巣では DI=2.66の DNA aneuploidy であった．これは同じ DNA aneuploidy でも DI の高い細胞集団のほうが，よりリンパ節転移を起こしやすいことを示唆するものと考えられた．

なお，本論文の要旨は，1989年第11回癌とリンパ節研究会において発表した．

文　献

1) Armitage NC, Robins RA, Evans DF et al: The influence of tumor cell DNA abnormalites on survival in colorectal cancer. Br J Surg 72: 828—830, 1985
2) Koka WA, Duda RB, Azumi N et al: Tumor DNA content primary and metastatic colorectal carcinoma. Arch Surg 121: 1434—1438, 1986
3) 黒岡一仁：核 DNA 量 histogram pattern からみた大腸癌の臨床病理学的研究．近畿大医誌 13: 433—448, 1988
4) 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
5) Hedley DW, Fliedlander ML, Tailor IW et al: Method for analysis of celluar DNA content of paraffin-embedded pathological material using flow cytometry. J Histochem Cytochem 31: 1333—1335, 1983
6) 八田昌樹，泉本源太郎，久保隆一ほか：癌の病理組織学的性状と組織反応からみた大腸癌のリンパ節転移に関する研究．日本大腸肛門病会誌 40: 1—7, 1987
7) 山村卓也：大腸癌におけるリンパ節転移の検討．日消外会誌 16: 75—79, 1983
8) 堀田芳樹：リンパ節転移陽性大腸癌における組織多様性の臨床病理学的検討．日消外会誌 22: 100—108, 1989
9) 石川　啓，田川　泰，中越　亨ほか：多変量解析による大腸癌核 DNA 量予後因子としての評価．日消外会誌 22: 1806—1810, 1989
10) 黒岡一仁，船井貞往，松並展輝ほか：大腸癌における DNA index と再発形式に関する検討．FCM-Cell Biology 2: 66—71, 1990

Comparison of DNA Content between Primary Tumor and Metastatic Lymph Node in Colorectal Carcinoma

Shinji Ushida, Kazuyoshi Kurooka, Sadao Funai, Hiromi Yamada, Yoshinori Fujii, Yukio Imanishi, Taiji Matsuda, Katsuhisa Shinodo and Masayuki Yasutomi
First Department of Surgery, Kinki University School of Medicine

Nuclear DNA content was determined in 143 cases of colorectal carcinoma by using flow cytometry, and relationship between DNA index (DI) and lymph node metastasis was studied. Moreover, we determined nuclear DNA content in 21 cases of metastatic lymph nodes and compared them with the primary tumor. With regard to the DNA ploidy pattern, there were 50 cases of DNA diploidy and 93 cases of DNA aneuploidy, so that the respective rates observed in lymph node metastasis were 30.0% (15/50) and 62.4% (58/93). Thus DNA aneuploidy was observed at a significantly higher rate. The lymph node metastatic rate tended to be DI=1.3 (75%), 1.5 (71.4%), 1.6 (100%), and 1.7 (70.0%). In addition, in 21 cases where the nuclear DNA content was determined in the metastatic lymph nodes, the DI between the primary tumor and the metastatic lymph node agreed in all cases.

Reprint requests: Shinji Ushida　First Department of Surgery, Kinki University School of Medicine
377-2 Ohno-higashi, Osaka Sayama, 589 JAPAN