

大腸癌の深部浸潤に伴う核 DNA 量の変化— —その heterogeneity について—

済生会横浜市南部病院外科

今田 敏夫 須田 嵩 鬼頭 文彦
岡田 賢三 岡田 卓子 福沢 邦康
森脇 義弘 秋山 浩利 竹村 浩

横浜市立大学第1外科

松 本 昭 彦

大腸癌31例(62切片)を対象にして、癌が浸潤していく過程において、核 DNA 量、DNA index、S-phase fraction に、どのような変化が生じるか(癌の heterogeneity)を明らかにすることを目的とし、本研究をおこなった。

1個の癌巣内の表層、深層組織間で DNA ploidy pattern の異なる例は、31例中3例(9.7%)のみで、DNA index は表層2.18、深層2.11と差はなく、また S-phase fraction も、各々、30.4%、28.6%と有意差を認めなかった。

以上の結果から、大腸癌において、表層の癌が深部浸潤する場合は1つのクローンのみが浸潤すると考えられ、表層と深層の癌細胞間の DNA heterogeneity は少ないと考えられた。

Key words: DNA content of colorectal carcinoma, heterogeneity, flow cytometry

はじめに

癌の核 DNA 量は正常細胞に比べて増加していると言われ、flow cytometry を用いた解析結果は生物学的悪性度の判定や予後規定因子の1つとして利用されるようになった¹⁾²⁾。

一方、固形癌はその細胞形態、染色体、細胞表面マーカー、さらに核 DNA 量などの生物学的特性が異なる種々の細胞から構成されている³⁾⁴⁾ので、1つの腫瘍内でも異なった特性(heterogeneity)を表すことは、当然考えられる。

これに対し、腫瘍の一部分のみではなく、複数のサンプルを採取し、腫瘍全体の特性を捕えようとする試みも行われている⁵⁾。

今回、われわれは大腸癌を対象にして、癌が深部浸潤していく過程において、核 DNA 量にどのような変化を生じるかを明らかにする目的で、本研究を行った。

対 象

1991年6月から1992年2月までの9か月間に当院で

<1992年6月17日受理>別刷請求先: 今田 敏夫
〒233 横浜市港南区港区港南台3-2-10 済生会
横浜市南部病院外科

切除した大腸症例のうち、癌が漿膜(外膜)にまで浸潤した、いわゆる Astler & Coller 分類⁶⁾、B2、C2の症例31例(62切片)を対象とした。

大腸癌24例、直腸癌7例、男性18例、女性13例(男女比1.38)で、平均年齢は64.2±9.6歳であった。

方 法

新鮮手術材料から、癌巣の全層の1切片を採取し、粘膜層から粘膜下層までを表層とし、筋層以下の浸潤部を深層とした。また、癌巣から遠位の正常粘膜も採取した。

単細胞を採取するため、おのおのの切片を鉸にて細切し、0.1% TritonX-100にて裸核化したのち、RNase 処理し、propidium iodide (P.I.: 最終濃度10μg/ml)にて核染色した。測定はFACScan (Becton Dickinson Co.)を用いて20,000個の細胞を測定、DNA ヒストグラムを作成、解析した。なお、internal standard は末梢血リンパ球を用いた。

DNA ploidy の判定は1個の G0/G1 peak を示すものを diploid とし、2個以上の G0/G1 peak を示すものを aneuploid とした。DNA index (D.I.) は aneuploid と diploid の G0/G1期のピークチャンネル数の

比で求めた。

coefficient variance (C.V.) は8以下のもののみを有効とした。

また、同じ切片の一部をホルマリン固定し、パラフィン標本を作成した後、Hematoxylin-Eosin 染色し、大腸癌取扱い規約⁷⁾に従って病理組織所見を判定した。

統計処理において有意差の検定は student't test または χ^2 検定を用い、危険率 p が 0.05 未満を有意差ありと判定した。

結 果

1) DNA ploidy pattern と臨床病理学所見

31例中24例(77.4%)に、表層、深層のいずれかに aneuploid が見られた。

性、年齢、占居部位、浸潤度、リンパ節転移の違いによる aneuploid の発生頻度に差は認められなかった (Table 1)。

正常粘膜はすべて diploid を示した。

2) DNA ploidy の違い

表層と深層における DNA ploidy の違いが見られた症例は31例中3例(9.7%)のみであった。この3症例はいずれも表層が diploid で、深層が aneuploid を示した (Fig. 1)。

3) DNA index (D.I.)

Table 1 DNA ploidy pattern in relation to various clinicopathological features

		Total	Aneuploid	Diploid
Sex	M	18	12(66.7)	6(33.3)
	F	13	9(69.2)	4(30.8)
Location	Colon	24	16(66.7)	8(33.3)
	Rectum	7	5(71.4)	2(28.6)
Depth of invasion	pT 3	25	18(72.0)	7(28.0)
	pT 4	6	3(50.0)	3(50.0)
Lymph node metastases	Pos.	15	11(73.3)	4(26.7)
	Neg.	16	10(62.5)	6(37.5)

(%)

diploid 症例の D.I. は 1.0 であるが、aneuploid を示したものの D.I. を表層と深層で比較すると、表層 21 例の D.I. は 2.18 ± 0.57 、深層 24 例のそれは 2.11 ± 0.43 と差を認めなかった (Table 2)。

4) S-phase fraction

cell cycle の解析をすると、表層の S-phase fraction は $30.4 \pm 8.5\%$ 、と深層のそれの $28.6 \pm 0.43\%$ より高値を取ったが、有意差は無かった。しかも、両者の直線回帰は $Y = 0.805X + 4.364$ 相関係数は 0.819 と強い関連性が見られた (Fig. 2)。

Fig. 1 DNA histograms in 3 cases with DNA heterogeneity (A) DNA histogram in superficial layer, (B) DNA histogram in deep layer

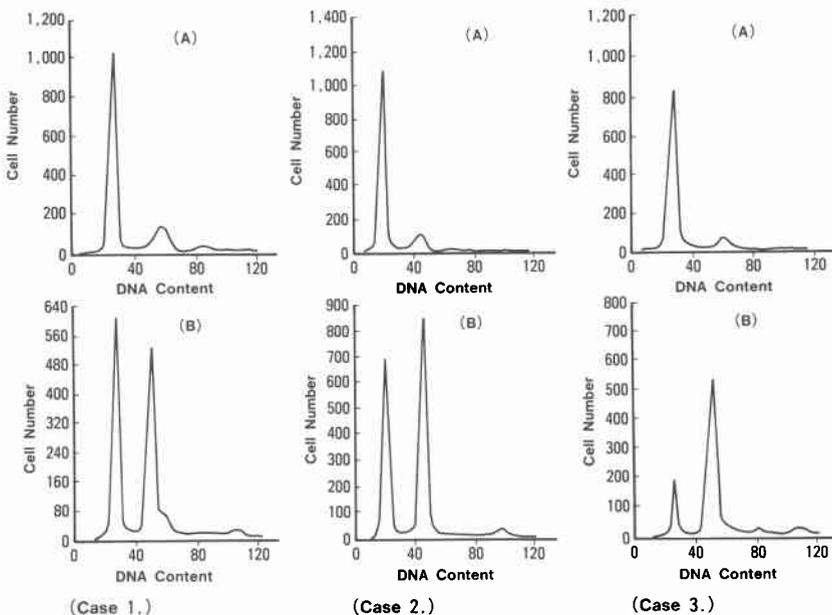
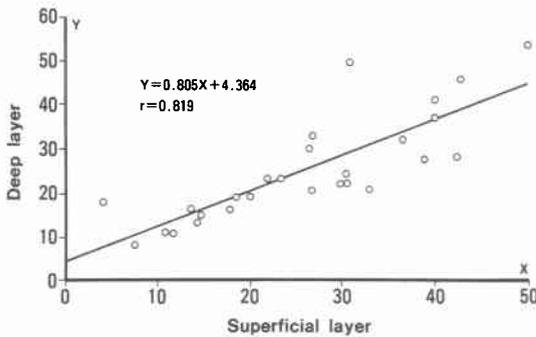


Table 2 Aneuploid rates and DNA indices between in superficial layer and in deep layer

Location	Aneuploid rate	DNA index
Superficial layer	21/31(67.7%)	2.18+/-0.57
Deep layer	24/31(77.4%)	2.11+/-0.43

Fig. 2 The relation of S-phase fractions between superficial layer and deep layer

X: S-phase fractions in superficial layer, Y: S-phase fractions in deep layer



また、正常粘膜の S-phase fraction は 3.8 ± 2.4 と癌巣よりは明らかに低値であった。

考 察

1つの癌巣は種々の性格を有する細胞からなりたっており、多種多様の heterogeneity が存在するといわれている⁸⁾。例えば、組織型1つとってみても、比較的分化型腺癌が多く、細胞の種類が少ない大腸癌でも、1つの癌巣内に粘液分泌が盛んな部位や低分化型癌の部位が混在している像を見ることが珍しくない⁹⁾。

また、癌組織は単一のクローンのみからなっているとは限らず、異なった複数のクローンから成り立っている症例が少なからず存在¹⁰⁾し、DNA ploidy pattern の heterogeneity も当然考えられる。この heterogeneity の定義にも決まったものは無く、(1) 1つの腫瘍内で異なった ploidy pattern を示す組織がある、あるいは、(2) aneuploid pattern をとる中で2個以上の異なった stemline を有するのいずれかの場合を DNA heterogeneity としている報告が多い⁵⁾¹¹⁾¹²⁾。しかし各臓器別にその発生頻度に差がみられるようで、Carey¹³⁾は肺癌症例において90%と非常に高率に DNA ploidy の heterogeneity を認めたと報告している。大腸癌においてもその発生頻度に一定の傾向がな

く、菅井ら¹⁴⁾は78%に見られたと報告しており、佐々木¹⁵⁾は胃癌は40%に見られたのに対し大腸癌は27例中2例(7.4%)に見られたのみであるとし、荒木¹⁶⁾は D. I.にある程度の相違を認めたものの、ploidy pattern の差は全く認めなかったと報告している。これらの差は測定サンプルの純度と測定機器による CV 値の大きさ、染色技術に左右されること、さらに採取されたサンプル数によるものと考えられる。

フォルマリン固定標本から単細胞を分離する方法¹⁷⁾が考案され、DNA ploidy と予後との関連性について retrospective な検討が盛んに行われている¹⁶⁾¹⁸⁾¹⁹⁾が、測定された CV 値は新鮮標本から採取されたものに比べて明らかに大きく、その精度は低い。したがって near-diploid を diploid と判定し²⁰⁾、細かな差異を見いだすことが出来ないために、heterogeneity の率が低くなってしまふ可能性がある。

また、サンプル数に関して、Wersto²¹⁾の大腸癌症例の検索では、2個以下では aneuploid の検出率が低くなり、3個の異なった部位からの採取が必要であると述べている。

報告例からは、癌巣を面とらえた場合には比較的高率には heterogeneity が存在することは確かなようである。

さらに、癌が深部に浸潤していく過程において、核 DNA 量にどのような変化をしていくかを明らかにすることは非常に興味深い点である。いわゆる、縦方向の heterogeneity についての報告例は少ない。芳野²²⁾は胃癌症例において、表層から深層になるにつれ ploidy pattern の変化する例があり、深部の癌細胞の生物学的活性が高まっている可能性があることを示唆している。しかし、われわれの症例では、深部浸潤しても DNA ploidy pattern, D.I., S-phase fraction の変化は少なく、同じクローンのまま深部浸潤していくものと考えられた。あるいは、これは生体環境に合った細胞のクローンだけが発育、浸潤した結果なのかも知れない。

以上の結果から、大腸癌の核 DNA 量は、平面における変化はあるが、縦方向の変化は比較的少なく、癌の表面組織だけからでも深部浸潤部の特徴を把握することがある程度可能であると思われる。したがって、異なった部位からの数片の生検組織からの DNA ヒストグラムの解析が癌の生物学的悪性度の評価、さらには heterogeneity に影響を受けるとされる化学療法などの治療法の選択、の一助となるのではないかと考えら

れる。

文 献

- 1) Enker WE: Flow cytometric determination of tumor cell DNA content and proliferative index as prognostic variables in colorectal cancer. *Colon Rectal Surg* 3: 1—33, 1990
- 2) Armitage NC, Robins RA, Evans DF et al: The influence of tumor cell DNA abnormalities on survival in colorectal cancer. *Br J Surg* 72: 823—830, 1985
- 3) 森 茂郎: 癌遺伝子. *病理と臨* 9: 884—889, 1991
- 4) 竹村清一, 小原 剛, 岡村毅与志: ヒト大腸癌における Epidermoid growth factor (EGF) の免疫組織化学的研究. *日消病会誌* 87: 1160—1167, 1990
- 5) Hiddemann W, Von Bassewitz DB, Kleinemeier HJ et al: DNA stemline heterogeneity in colorectal cancer. *Cancer* 58: 258—263, 1985
- 6) Astler VB, Collier FA: The prognostic significance of direct extension of carcinoma of the colon and rectum. *Ann Surg* 139: 846—851, 1954
- 7) 大腸癌研究会編: 大腸癌取扱い規約. 第4版. 金原出版, 東京, 1985
- 8) 富田秀司, 武藤良弘, 高江州裕ほか: 大腸癌における腫瘍内多様性の検討—DNA ploidy と免疫組織を用いて—. *日本大腸肛門病会誌* 44: 22—29, 1991
- 9) 喜納 勇: 大腸癌の病理. 土屋周二編. 外科 Mook 6. 金原出版, 東京, 1979, p31—47
- 10) 谷川充彦, 下松谷匠, 高橋康司ほか: In vitro 制癌剤感受性試験 Sintillation assay の開発とその臨床応用. *癌と化療* 16: 1880—1887, 1989
- 11) Peterson SE, Bichel P, Lorentzen M: Flow cytometric demonstration of tumor-cell subpopulations with different DNA contents in human colorectal adenocarcinomas. *Eur J Cancer* 15: 383—386, 1978
- 12) Quirke P, Dyson JED, Dixon MF et al: Heterogeneity of colorectal adenocarcinomas evaluated by flow cytometry and histopathology. *Br J Cancer* 51: 99—106, 1985
- 13) Carey FA, Lamb D, Bird CC: Intratumoral heterogeneity of DNA content in lung cancer. *Cancer* 65: 2266—2269, 1990
- 14) 菅井 有, 佐々木功典, 高山和夫ほか: 大腸癌における DNA ploidy heterogeneity の検討. *Cytomet Res* 1: 147—152, 1991
- 15) Sasaki K, Hashimoto T, Kawachino K et al: Intratumor regional differences in DNA ploidy of gastrointestinal carcinomas. *Cancer* 62: 2569—2575, 1988
- 16) 荒木靖三: Flow cytometry による直腸細胞核 DNA 量測定に関する研究. *日外会誌* 90: 1965—1975, 1989
- 17) Hedley DW, Friedlander ML, Taylor IW: Method for analysis of cellular DNA content of paraffin-embedded pathological material using flow cytometry. *J Histochem Cytochem* 31: 1333—1335, 1983
- 18) Quirke P, Daxon M, Clayden AD: Prognostic significance of DNA aneuploidy and cell proliferation in rectal adenocarcinomas. *J Pathol* 151: 285—291, 1987
- 19) Scott NA, Rainwater LM, Wieand HS: The relative prognostic value of flow cytometric DNA analysis and conventional clinicopathologic criteria in patients with operable rectal carcinoma. *Dis Colon Rectum* 30: 513—520, 1987
- 20) 石川 哲, 田川 泰, 梶原啓司ほか: パラフィンブロックからの核 DNA 量評価不能検体のくふう. *医のあゆみ* 145: 185—186, 1988
- 21) 芳野裕明: 胃癌の細胞核 DNA パターンに関する研究—とくに臨床病理組織学的所見との関連について—. *日外会誌* 89: 522—533, 1988
- 22) Wersto RP, Liblit RL, Deitch D et al: Variability in DNA measurements in multiple tumor samples of human colonic carcinoma. *Cancer* 67: 106—115, 1991

Heterogeneity of DNA Content According to the Depth of Invasion in Colorectal Cancer

Toshio Imada, Takashi Suda, Fumihiko Kito, Kenzo Okada, Takako Okada,
Kuniyasu Fukuzawa, Yoshihiro Moriwaki, Hirotohi Akiyama,
Hirosi Takemura and Akihiko Matsumoto*

Department of Surgery, Saiseikai Yokohamashi Nambu Hospital

*First Department of Surgery, Yokohama City University, School of Medicine

Thirty-one cases of colorectal carcinoma were investigated for intratumor heterogeneity in DNA ploidy, DNA index, and S-phase fraction. DNA content of samples from the superficial layer and the deep layer in the same

tumor was determined by flow cytometry. Heterogeneity of the DNA ploidy pattern was observed in 3 cases (9.7%). The DNA index was 2.18 and 2.11 and the S-phase fraction was 30.4% and 28.6% in the superficial and deep layers, respectively. These data indicate a low degree of intratumoral heterogeneity of DNA content according to the depth of invasion in colorectal carcinoma.

Reprint requests: Toshio Imada Department of Surgery, Saiseikai Yokohamashi Nambu Hospital
3-2-10 Konan-dai, Konan-ku, Yokohama, 233 JAPAN
