日消外会誌　26（9）：2326～2332，1993年

フローサイトメトリーによるDNA heterogeneity検出のための新しいヒストグラム分類の試み

琉球大学第1外科
伊佐　勉　野村　謙　富田　秀司　玉井　修
照屋　剛　出口　宝　草野　敏臣　武藤　良弘

Flow cytometry（FCM）によるDNAヒストグラムの新しい分類を行い，1検体での定量による腫瘍内heterogeneityの検出を試みた．そして，顕微蛍光測光法（static cytofluoro metory；SCM）による成績と比較してその精度を検討し，さらに臨床病理学的所見や予後との関連を検討した．大腸癌30例を対象とした．コンピューターによるDNAヒストグラムのシミュレーション結果を参考にして，aneuploid patternをcoefficient of variation（CV）値を利用しA1 patternとA2 patternに分類した．Diploid pattern 10例中9例（90%）がSCMでhomogeneity，A2 pattern 12例中10例（83.3%）がSCMでheterogeneityを示し，SCMの成績とよく一致した．肝転移，リンパ節転移はA2 pattern症例に陽性率が高く，進行度はA2　pattern症例に進行した症例が多い傾向がみられた．本分類はheterogeneityの検出に有用であり，臨床病理学的所見との関連を追及するのに有用な分類法であると考える．

Key words：hete ogeneity，ploidy typing of DNA histogram，flow cytometry，static cytofluorometry，colon cancer

はじめに

細胞核DNA量定量は，腫瘍の生物学的悪性度の指標としてその有用性が指摘されている．最近では，ploidy patternやDNA indexによる検討だけではなく，腫瘍内のDNA heterogeneityと生物学的悪性度との関連が注目され，flow cytometry（FCM）[1)~3)]や顕微蛍光測光法（static cytofluorometry；SCM）[4)]を用いて検討がなされている．

ところで，aneuploid patternのヒストグラムを検討すると，first peak（diploid peak）のcoefficient of variation（CV）値と比べてsecond peak（aneuploid peak）のそれが比較的小さなpeakと大きなpeakとがみられる．後者は複数のaneuploid peakが重なりあってCV値の大きな1つのpeakを形成している，つまり，heterogeneity症例の可能性はないかと考えた．

そこで，筆者らはFCMによる1検体での定量法で腫瘍内DNA heterogeneityを簡便に検出する目的で，FCMによる新しいploidy pattern分類を考案した．そして，SCMによるheterogeneityの有無とを比較し，さらに臨床病理学的所見や予後との関連を追求し，大腸癌におけるその臨床的意義を検討した．

対象と方法

1．マイクロコンピュータを用いたDNA　ploidy patternのシミュレーション

Cell　cycleのシミュレーションは，小杉らの解析法[5)6)]を用いて，G0/G1期およびG2/M期はガウス分布，S期は台形の分布をとるものとしてプログラムを作成した．そして，複数のcell cycleを1つのヒストグラムに合成し，CV値の大きさやDI値の差によって，ploidy patternがどのように変化するかを検討した．

2．FCMによる新しいDNAヒストグラム分類の作成およびSCMによるheterogeneity判定の成績との比較検討

1）対象

当教室で経験した大腸癌症例のうち，以下に示すような組織採取法を適切に行いえた30症例（1988～1990年）を対象とした．

＜1993年5月11日受理＞別刷請求先：伊佐　勉
〒903-01　沖縄県西原町上原207　琉球大学医学部第1外科

2) 方法

① 組織採取

標本は摘出後10%中性ホルマリン液に24～48時間固定後，腫瘍の中心部を通り腸管の長軸に沿って5mm幅の切片を作成した．つぎに，その切片の断面を観察し，腫瘍口側先進部，中央表層部，最深達部，肛門側先進部の4部位から適切な量の組織を採取し，パラフィン包埋ブロックを作成した．おのおののブロックから4μmの薄切切片とそれに連続する100μmの厚切切片を作成した．薄切切片はHematoxylin-Eosin染色を行い，それを参考にして実体顕微鏡下に，Hematoxylin染色を行った厚切切片から腫瘍組織を採取した．

② FCMによるDNA定量と新しいヒストグラム分類の作成

各症例とも4部位の組織片を混合して1検体とした．その後は，Hedleyらの方法[7]に準じて細胞単離し，Vindelφvらの方法[8]に準じて核DNA染色を行った．そして，オートサイトロン®（オルソ社）にて10,000個以上の細胞を測定し，DNAヒストグラムを作成した．それぞれのヒストグラムは，マイクロコンピューターによるシミュレーションの結果を参考にして，新しい分類を行った．

③ SCMによる腫瘍内DNA hcterogeneityの判定

FCMによる1検体での定量法でheterogeneityの検出が可能かを検討するために，SCMでは4部位の組織片をそれぞれ1検体として細胞単離を行い，DNAヒストグラムを作成した．そのヒストグラムから，DNA ploidy pattern, DIを求めた．Heterogeneityの判定は，DIが10%以上異なる2種類以上のaneuploid peakを有する症例またはmosaic patternを呈する部位が1部位以上ある症例を，heterogeneity症例と定義した．そして，4部位のDIの差が10%未満の症例を，hemogeneity症例とした．

④ FCMによる新しいヒストグラム分類による結果とSCMによるheterogeneityの判定成績とを比較検討した．

3. FCMによるDNAヒストグラム分類と臨床病理学的所見，予後との比較検討

臨床病理学的所見は大腸癌取扱い規約[9]に従い，癌の壁深達度，腹膜播種，リンパ管侵襲，静脈侵襲，肝転移，リンパ節転移，組織型，組織学的進行度について検討した．予後はKaplan-Meier法による累積生存率で検討した．

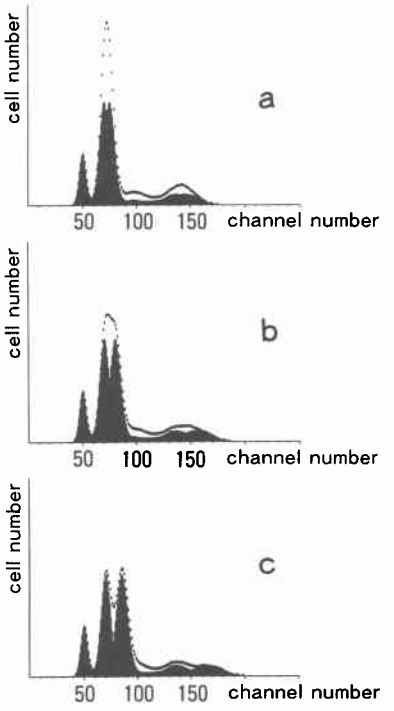
統計学的処理は，臨床病理学的所見についてはカイ2乗検定を用い，生存率については一般化Wilcoxon検定およびZ検定を用いた．

成　績

1. マイクロコンピューターを用いたDNAヒストグラムのシミュレーション

2種類のaneuploid peakを1つのヒストグラムに合成すると，CV値が大きくDI値の差が小さいほど，互いのaneuploid peakが重なりあって1つのpeakとしてしか同定できなかった．今回のFCMにおけるCV値は6.4%であったので，ここではその場合のDI値の差によるヒストグラムの変化を検討した．20%の正常細胞が混入し，2種類のaneuploid cell cycleがそれぞれ40%ずつ含まれているとしてシミュレーションした．DI値を1.4と1.5にするとCV値が7.13%（diploid peakのCV値の1.11倍）のaneuploid peakにしか判断できなかった（**Fig. 1a**）．DI値を1.4と1.6にすると単一のaneuploid peakにしかみえないがCV値は9.08%（diploid peakのCV値の1.42倍）と大きくなった（**Fig. 1b**）．DI値を1.4と1.7にすると明らかな2峰性のpeakを確認することができた（**Fig. 1c**）．

Fig. 1 Simulations of DNA histogram by computer

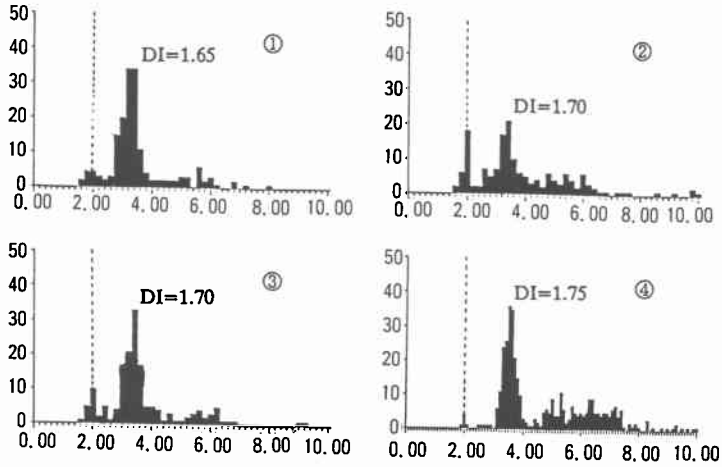


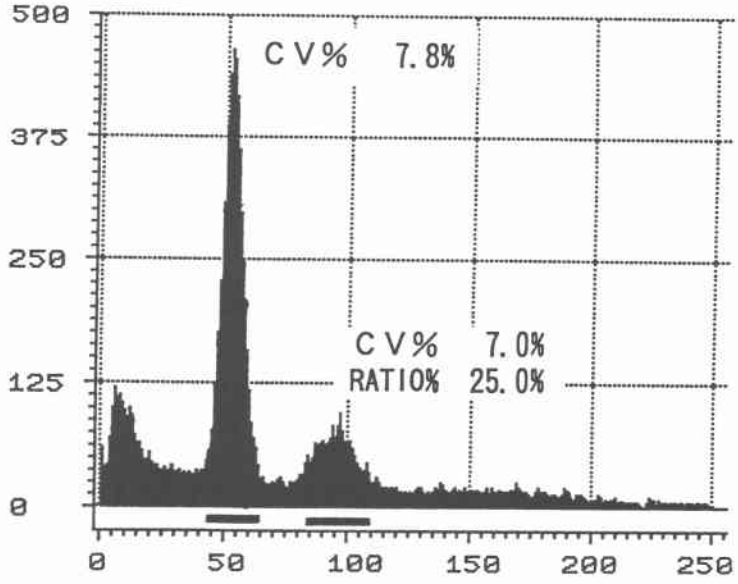
2. FCMによる新しいDNAヒストグラム分類の作成およびSCMによるheterogeneity判定成績との比較検討

① FCMによる新しいDNAヒストグラム分類の作成

前述のシミュレーション結果を参考にして，DNAヒストグラムを3種類に分類した．まず，従来の分類同様，明らかなnon-diploid peakがないものをdiploid pattern（以下，D pattern）とした．そして，明らかなnon-diploid peakを認めるものをaneuploid patternとした．ただし，4C周辺のpeak(tetraploid)の判断は，判定者による主観が入る可能性があり，より客観的な分類にするために，その細胞数に制限を加えた．ここでは，一見non-diploid peakにみえても，その細胞数がdiploid peakの細胞数に占める割合（以下，Ratio%）が20%以下のものはD patternと定義した．そして，Ratio%が20%以上のnon-diploid peakを認めるものをaneuploid patternとした．さらに，シ

Fig. 2　A1 pattern by FCM (bottom histogram) was consistent with homogeneity by SCM (top four histograms)





ミュレーション結果を参考にして，aneuploid pattern のうち non-diploid peak の CV 値が diploid peak の CV 値の1.15倍未満を A1 pattern，1.15倍以上を A2 pattern と定義した．また，明らかに2種類以上の non-diploid peak が認められるものは，heterogeneity 症例という考え方から A2 pattern に含めて分類した．

その結果，D pattern 10例（33.3%），A1 pattern 8例（26.7%），A2 pattern 12例（40%）であった．

従来の分類では aneuploid とされていた症例の中にも，1種類の aneuploid から構成された homogeneity 症例（**Fig. 2**）と，複数の aneuploid から構成され CV 値の大きな1つの aneuploid peak を形成している heterogeneity 症例（**Fig. 3**）があったが，本分類を用いることによって前者を A1 pattern，後者を A2 pattern として区別することが可能であった．

② SCM による heterogeneity 判定成績との比較検討

この新しい分類法による結果と SCM による heterogeneity 判定結果との比較では，D-pattern 症例は10例中9例（90%）が SCM で homogeneity 症例で

Fig. 3 A2 pattern by FCM (bottom histogram) was consistent with heterogeneity by SCM (top four histograms)

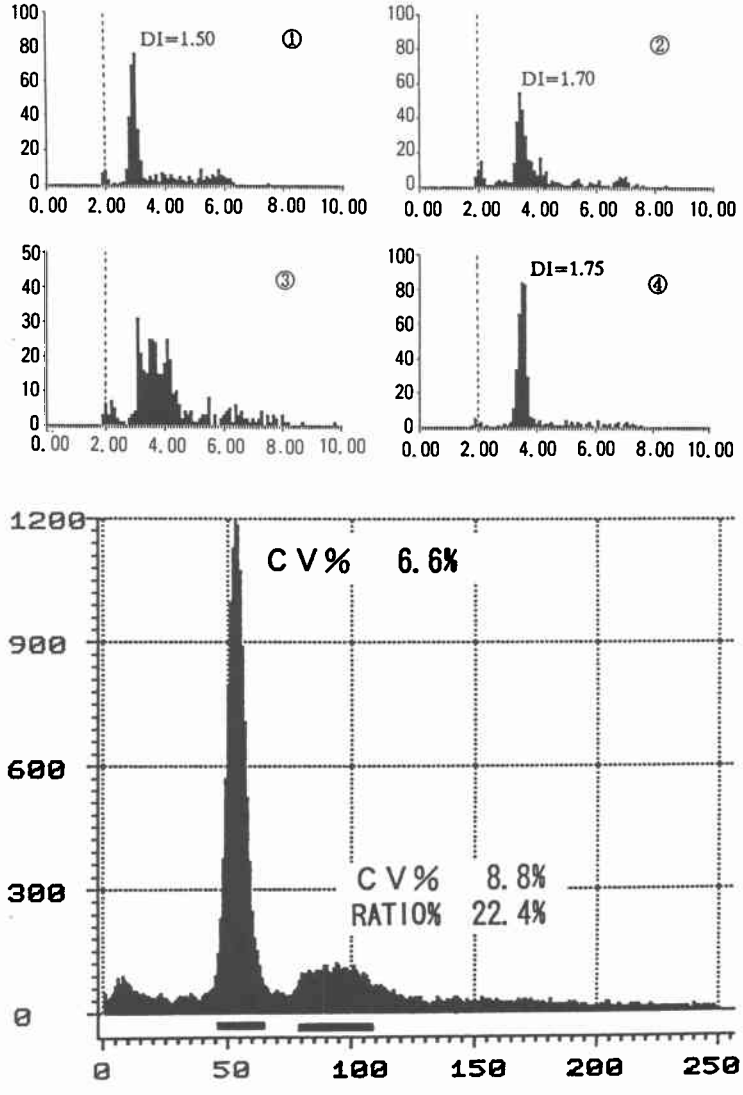
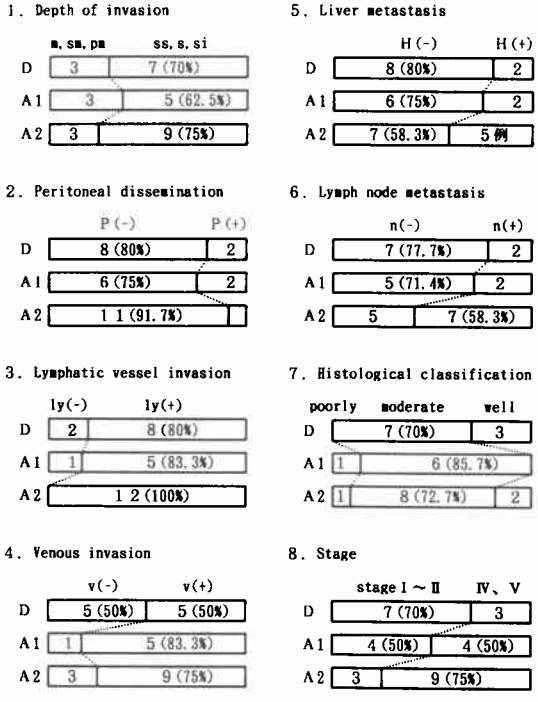


Fig. 4 Results of comparative study of FCM with SCM

FCM \ SCM	Heterogeneity	Homogeneity	total
D pattern	1(10%)	9(90%)	10
A1 pattern	5(62.5%)	3(37.5%)	8
A2 pattern	10(83.3%)	2(16.7%)	12
total	16	14	30

Fig. 5 Relationship between ploidy pattern and clinicopathological findings

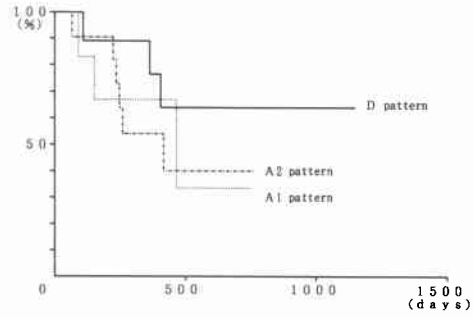


あった．A1 pattern は，5例(62.5%)が heterogenity で，3例(37.5%)が homogeneity 症例であった．A2 pattern は12例中10例(83.3%)が heterogeneity 症例であった(**Fig. 4**)．また，従来の分類法を用いると，明らかに複数の non-diploid peak を認める multiploid 症例は6例しかなかった．

3. FCM による DNA ploidy pattern 分類と臨床病理学的所見，予後との比較検討

いずれの臨床病理学的所見とも，FCM による本分類との間に有意な関連は認めなかった．しかし，肝転移，リンパ節転移は A2 pattern 症例に陽性率が高く，進行程度は A2 pattern 症例に進行した症例が多い傾向がみられた(**Fig. 5**)．

Fig. 6 Survival corves according to DNA ploidy pattern



予後との関連は有意な差は認めなかったが，D pattern では A1および A2 pattern に比較して予後良好である傾向があった(**Fig. 6**)．

考　察

腫瘍の生物学的悪性度や予後推定の指標として細胞核 DNA 量定量の有用性が指摘されている[10]．最近では，その解析の際に腫瘍内の多様性(heterogeneity)を考慮し，複数の部位から標本を採取する必要があるとされ，腫瘍内 DNA heterogeneity が注目されるようになってきた[11]．また，腫瘍内 DNA heterogeneity は aneuploid の検出率を高める意味での重要性だけでなく，臨床病理学的所見や予後との関連が報告されるようになり，生物学的悪性度の観点から注目されるようになってきた[1)~4)]．

DNA heterogeneity の有無は，同一腫瘍内の複数の部位から標本を採取して，それぞれ FCM や SCM で測定し，ploidy pattern や DI 値の違いによって判断されているが，その定義は報告者によって異なる[2]．同一腫瘍内で部位によって diploid と aneuploid が混在する場合を DNA heterogeneity と定義している報告[2)12)]と，DI 値が異なる aneuploid が存在する場合も DNA heterogeneity に含めた報告[3)4)]とがある．いいかえると，前者は同一腫瘍内で部位によって ploidy pattern が異なるという部位別 DNA heterogeneity の概念であり，後者は同一腫瘍内に G0/G1期の核 DNA 量(つまり DI 値)が異なる複数の細胞集団が存在するという DNA stemline heterogeneity(または DI heterogeneity)の概念である．したがって，後者では，1検体による定量でも複数の aneuploid peak を検出できた場合は DNA heterogeneity 症例と判断することができる．Aneuploid の検出率を検討する目的では部位

別 heterogeneity が重要であるが，肝転移などの臨床病理学的所見や予後との関連を検討する場合は，複数の細胞集団が存在することを意味する DNA stemline heterogeneity が適切ではないかと考え，筆者らはそれを用いている．

ところで，前述したように CV 値の大きな aneuploid peak は，stemline heterogeneity 症例ではないかと考えた．佐々木ら[13]は，aneuploid(near diploid) の検出限界をマイクロコンピューターで分析しているが，同じような考え方で，まず2種類の aneuploid peak の検出限界を前述のように検討してみた．1検体内に正常細胞と2種類の aneuploid が存在するとき，aneuploid peak の DI 値の差が大きければ，それぞれの peak を確認することが可能であり，heterogeneity と判断することができる．しかし，DI 値の差が小さくなると互いに重なりあって1つの peak にみえるようになる．このような症例の場合，部位別 heterogeneity があればそれぞれのサンプルでの DI 値を測定し，その違いで stemline heterogeneity を検出することができる．しかし，部位別 heterogeneity がなければ，ヒストグラム上では互いに重なりあって，1つの aneuploid peak しか検出できず，stemline heterogeneity の存在を見逃してしまうことになる．しかし，その1つにみえる peak の CV 値は，正常細胞の peak の CV 値と比較してより大きくなっていた．したがって，それを考慮してヒストグラムを分類すると stemline heterogeneity の検出率を高めることができると考えた．また，複数の部位からのサンプルを1検体として測定し，stemline heterogeneity を検出する方法も可能ではないかと考え前述のような検討を行った．

ところで，腫瘍内 DNA heterogeneity の検出法としては FCM や SCM が用いられているが，それぞれ一長一短がある[14]．今回の検討では，ヒストグラムの新しい分類法が有用であるかを検討するために，癌細胞を選択的に測光できる SCM を用いて，それぞれの部位の検体を測光しその成績と比較した．また，今回の検討はパラフィンブロックを用いて行ったが，パラフィンブロックは癌細胞を正確に採取できることや retrospective な検討が可能であることから，臨床的な検討には非常に有用である．多少 CV 値が大きくとも，それを考慮した新しい分類法を用いることによって，heterogeneity の検出率を高めることができると考えこのような検討を行った．また，この分類は新鮮標本でも同様に用いることができ，さらに検出率を高めることが可能ではないかと期待される．

マイクロコンピューターによるシミュレーションの結果を参考にして前述のように分類すると，D pattern 症例の90%は SCM で homogeneity 症例であった．A1 pattern は，1種類の aneuploid からなる homogeneity 症例や，diploid と1種類の aneuploid からなる heterogeneity 症例が含まれていたが，FCM での識別は不可能であった．A2 pattern は83.8%は SCM で heterogeneity 症例であった．要約すると，本分類による D pattern は homogeneity，A1 pattern は1種類の aneuploid からなる homogeneity，または1種類の aneuploid と diploid からなる heterogeneity，A2 pattern は2種類以上の aneuploid からなる heterogeneity として，SCM の成績とよく一致した．また，本分類では A2 pattern は12例であり，そのうち10例が SCM で heterogeneity であることが証明されたのに対し，従来の分類法を用いると，明らかに複数の non-diploid peak を認める multiploid 症例は6例しかなく，本分類は heterogeneity 検出に有用であった．

今回の検討では，4c 周辺の aneuploid (tetraploid) の条件をその細胞数が2c 領域の細胞数の20%以上とし，A1 pattern と A2 pattern の境界を1.15倍として良好な結果をえたが，その数値に関しては今後症例を増やして検討する必要があると思われる．

臨床病理学的所見や予後と本分類との間に有意に関連は認めなかった．しかし，肝転移，リンパ節転移は A2 pattern 症例に陽性率が高く，進行度は A2 pattern 症例に進行した症例が多い傾向がみられ，症例を増やしさらに検討をすすめる必要があると思われる．

したがって，FCM による aneuploid peak の CV 値を利用した本分類は，heterogeneity の検出に有用であり，臨床病理学的所見との関連を追求するのに有用な分類法であると考える．

稿を終えるにあたり，シミュレーションプログラム作成についてご指導いただきましたもとぶ野毛病院上田裕一博士に深く感謝いたします．

文　献

1) 松嶋哲哉，是永大輔，安達洋祐ほか：DNA heterogeneity からみた大腸癌の進展とリンパ節転移．消癌の発生と進展　3：191—194，1991
2) 菅井　有，佐々木功典，高山和夫ほか：大腸癌における DNA ploidy heterogenoity の検討．Cytometry Res 1：147—152，1991
3) 辻田和紀，船橋公彦，渡邊正志ほか：大腸癌における腫瘍内 DNA Heterogeneity に関する検討．日

本大腸肛門病会誌　45：266—272, 1992
4) 伊佐　勉, 玉城　哲, 野原正史ほか：大腸癌腫瘍内DNA Heterogeneityと臨床病理学的所見, 予後との関連について. 日本大腸肛門病会誌　45：812—817, 1992
5) Kosugi Y, Ikebe J, Sekine M et al: Computer aided analysis of cell-cycle phase from cytophotometric histogram. IEEE Trans Biomed Eng 25：429—434, 1978
6) 池辺　潤：細胞内DNAヒストグラムのパターン処理によるガン診断法に関する研究. 病態生理 5：316—317, 1986
7) Hedley DW, Friedlander ML, Taylor IW et al: Method for analysis of celluler DNA content of parafin-embedded pathological material using flow cytometry. J Histochem Cytochem 31：1333—1335, 1983
8) Vindelφv LL, Christensen IJ, Nissen NI: A detergent trypsin method for the preparation of nuclei for flow cytometric DNA analysis. Cytometry 3：323—327, 1983
9) 大腸癌研究会編：臨床・病理　大腸癌取扱い規約. 改訂第4版. 金原出版, 東京, 1985
10) Williams NN, Daly JM: Flow cytometry and prognostic implications in patients with solid tumors. Surg Gynecol Obstet 171：257—266, 1990
11) 佐々木功典, 村上知之, 高橋　学ほか：消化器癌における腫瘍内DNA ploidyのheterogeneity. 消癌の発生と進展　1：233—236, 1989
12) Wersto RP, Libit RL, Deitch D et al: Variability in DNA mesurements in multiple tumor samples of human colonic carcinoma. Cancer 67：106—115, 1991
13) 佐々木功典, 田中一成, 荻野哲朗ほか：FCMによるaneuploidy細胞核検出の限界—マイコンによるシミュレーション—. 癌の臨　32：900—902, 1986
14) Cusick EL, MacIntosh CA, Krukowski ZH et al: Comparison of flow cytometry with static densitometry in papillary thyroid carcinoma. Br J Surg 77：913—916, 1990

A Novel Ploidy Typing of Flow Cytometric DNA Histogram for the Detection of DNA Heterogeneity

Tsutomu Isa, Ken Nomura, Syuji Tomita, Osamu Tamai, Tsuyoshi Teruya, Shigeru Deguchi, Toshiomi Kusano and Yoshihiro Muto
First Department of Surgery, Ryukyu University School of Medicine

A novel ploidy typing of flow cytometric DNA histograms by measurement of single mixed specimens was devised for accurate detection of intratumoral DNA heterogeneity. The results were compared with those obtained by static cytofluorometry (SCM) to investigate the accuracy of this method, and its relationship to clinicopathological findings and prognosis in 30 cases of colon cancer was investigated. To simulate the DNA histogram by computer, the aneuploid pattern was divided into A1 and A2 patterns by the coefficient of variation of the aneuploid peak. Nine of ten diploid pattern cases (90%) showed homogeneity by SCM, and ten of 12 A2 pattern cases (83.3%) showed heterogeneity by SCM. The results with this method were consistent with the results obtained by SCM. Tumors with the A2 pattern showed a tendency toward higher frequency of liver metastasis, lymph node metastasis and a more advanced stage. This ploidy typing might be useful for detection of heterogeneity and investigation of the relationship to clinicopathological findings and prognosis.

Reprint requests: Tsutomu Isa　The First Department of Surgery, Ryukyu University School of Medicine
207 Uehara, Nishihara-cho, Okinawa, 903-01 JAPAN