

## Flow cytometry による DNA ploidy pattern と DNA index からみた胃癌遠隔転移様式の検討

近畿大学医学部第1外科

今西 幸雄 黒岡 一仁 山田 博生  
藤井 良憲 佐藤 卓 奥野 清隆  
田中 晃 進藤 勝久 安富 正幸

Flow cytometry (FCM) と病理組織学的因子から胃癌遠隔転移様式の検討を行った。DNA aneuploidy の頻度は、開腹時に遠隔転移が認められた腹膜播種陽性群 P (+) で53.7%、肝転移陽性群 H (+) で80.6%、腹膜播種+肝転移陽性群 P (+) H (+) で74.1%であった。これに対し術後5年以上無再発群 P (-) H (-) では46.3%であり、H (+) と P (+) H (+) は P (-) H (-) に比べ有意に DNA aneuploidy が高率であった ( $p < 0.01$ )。また、DNA index (DI) からの検討では P (+), P (-) H (-) は全例  $DI \leq 1.6$  であるのに対し、H (+), P (+) H (+) では  $DI \geq 1.7$  が27.8%と33.3%に認められた。病理組織学的分化度では、P (+) の68.3%が未分化型であるのに対し、H (+) の77.8%は分化型であり、両群間に有意差を認めた ( $p < 0.001$ )。しかし、P (+) H (+) では病理組織学的分化度に差を認めなかった。

以上のことから、癌細胞核 DNA ploidy pattern, DI と組織分化度は、腹膜播種と肝転移の重要な risk factor であることが示唆された。

**Key words:** flow cytometry, DNA ploidy pattern, DNA index, distant metastasis of gastric cancer

### I. はじめに

胃癌の予後を検討するうえで遠隔転移、とくに腹膜播種と肝転移は重要であり、従来よりその組織型と進展様式に関し、分化癌は肝転移、未分化癌は局所浸潤と腹膜播種が多いと報告されてきた<sup>1)~3)</sup>。さらに、近年では flow cytometry (FCM) の進歩により癌細胞核 DNA ploidy の解析から、その癌細胞の持つ生物学的悪性度が注目されている<sup>4)~8)</sup>。

そこで、今回、著者らは FCM を用いた胃癌細胞核 DNA ploidy pattern, DNA index (DI) および病理組織学的因子より、胃癌遠隔転移様式に関する retrospective study を試み、これらの諸因子が臨床的に有用な因子になりうるかを検討した。

### II. 対象

教室で1981年1月から1988年12月までに切除された胃癌553例中、開腹時に遠隔転移が認められた腹膜播種陽性群 {p (+)} : 41例、肝転移陽性群 {H (+)} :

36例、腹膜播種+肝転移陽性群 {P (+) H (+)} : 27例、および術後5年以上無再発生存群 {P (-) H (-)} : 54例の計158例を対象とした。なお、病理組織学的因子は、胃癌取扱規程<sup>9)</sup>に準じた。

### III. 研究方法

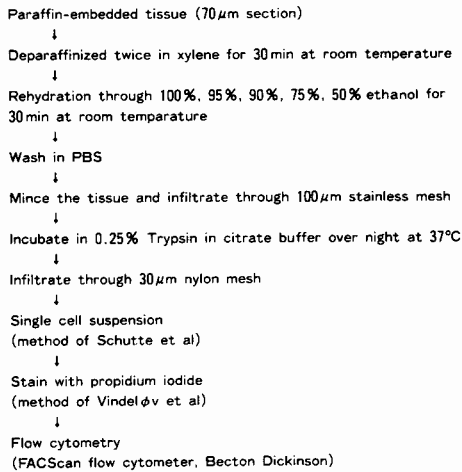
10%中性ホルマリン固定後のパラフィン包埋組織から厚さ6 $\mu$ m, 70 $\mu$ m の切片を交互に作製し、6 $\mu$ m 切片は Hematoxylin-Eosin 染色後、胃癌取扱規程に従い病理組織学的に検討を加えた。70 $\mu$ m 切片は Schutte ら<sup>10)</sup>の方法に準じて single cell suspension を作製し、Vindel $\phi$ v ら<sup>11)</sup>の Detergent Trypsin 法を用い、核染色は propidium iodide で行った。癌細胞核 DNA 量は、single cell suspension の一部を Giemsa 染色し、癌細胞の存在を確認した後、FACScan flow cytometer (Becton Dickinson 社) を用いて  $1 \times 10^4$  個の核 DNA 量を測定し、DNA histogram の解析を行った (Fig. 1)。なお、internal standard は同一組織標本内の浸潤リンパ球を用いた。

DNA histogram の解析は、単一の  $G_0/G_1$  peak を DNA diploidy とし、DNA diploidy  $G_0/G_1$  peak 以外

<1993年6月14日受理> 別刷請求先: 今西 幸雄

〒589 大阪狭山市大野東377-2 近畿大学医学部第1外科

**Fig. 1** Flow cytometric analysis of DNA content from paraffin-embedded in gastric cancer. (Schutte-Vindel $\phi$ v method)



に異なった1つ以上のG<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> peakを有するものをDNA aneuploidyとした(Fig. 2)。また、同一癌巢内の異なった部位におけるDIの差異が0.1以上である場合はDNA heterogeneityが存在するとし、その際DNA aneuploidyが少なくとも1か所で認められれば、癌のDNA ploidy patternは、DNA aneuploidyであると判定した。

統計学的処理は $\chi^2$ 検定を用い、 $p < 0.05$ をもって有意と判定した。

#### IV. 結 果

対象158例の平均年齢は62.5 $\pm$ 12.2歳(mean $\pm$ SD), 男女比は2.2:1であった。DNA ploidy patternは、DNA diploidy 39.2% (62/158), DNA aneuploidy 60.8% (96/158)であり、coefficient of variation(CV)

の平均値は5.3 $\pm$ 1.5 (mean $\pm$ SD)であった。

##### 1. 病理組織学的因子と転移様式

病理組織学的分化度を胃癌取扱い規約に準じて、分化型(pap, tub<sub>1</sub>, tub<sub>2</sub>), 未分化型(por, ud, muc, sig)に分類し比較すると、P(+)は未分化型が68.3% (28/41)と高率であるのに対し、H(+)では分化型が77.8% (28/36)と高率であり、両群間に有意差を認めた( $p < 0.001$ )。P(+)H(+)は分化型が51.9% (14/27), 未分化型が48.1% (13/27)であり、P(+)に対し有意な相関を認めなかった。

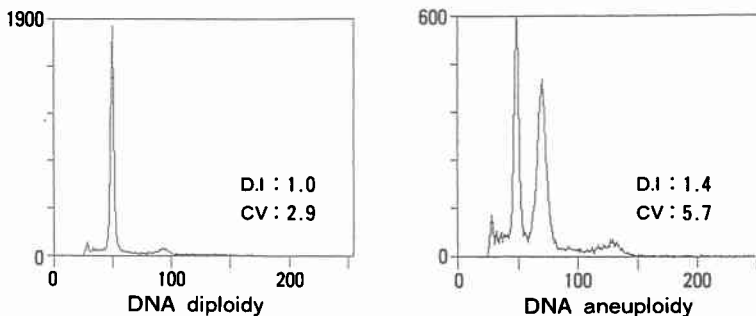
リンパ管侵襲(ly)陽性率は、P(+)が92.7% (38/41), H(+)が97.2% (35/36), P(+)H(+)が96.3% (26/27)といずれも高率であった。P(-)H(-)においても陽性率が83.3% (45/54)と高く、リンパ管侵襲に関しては、有意な相関を認めなかった。静脈侵襲(v)陽性率に関しても、P(+)が61.0% (25/41), H(+)が55.6% (20/36), P(+)H(+)が63.0% (17/27)と、P(-)H(-)の48.1% (26/54)に比べて各転移群で陽性率は高いものの、有意な相関を認めなかった。

リンパ節転移(n)陽性率はP(-)H(-)が63.0% (34/54)であるのに対し、P(+)が90.2% (37/41), H(+)が94.4% (34/36), P(+)H(+)が100.0% (27/27)と各転移群において有意に高率であった( $p < 0.01$ )。しかし、各転移群間では有意な相関を認めなかった(Table 1)。

##### 2. DNA ploidy patternと転移様式

転移様式別にDNA ploidy patternを比較してみると、DNA aneuploidyの頻度はP(+) : 53.7% (22/41), H(+) : 80.6% (29/36), P(+)H(+) : 74.1% (20/27), P(-)H(-) : 46.3% (25/54)であり、H(+)とP(+)H(+)はP(-)H(-)に対し

**Fig. 2** DNA histogram of gastric cancer.



**Table 1** Comparison of histological factor between distant metastatic and non-metastatic cases in gastric cancer

	P(+)	H(+)	P(+)H(+)	P(-)H(-)	p value
Histological type					
Differentiated (pap, tub <sub>1</sub> , tub <sub>2</sub> )	13(31.7)	28(77.8)	14( 51.9)	26(48.1)	p<0.01
Undifferentiated (por, ud, muc, sig)	28(68.3)	8(22.2)	13( 48.1)	28(51.9)	
Lymphatic invasion					
ly (-)	3( 7.3)	1( 2.8)	1( 3.7)	9(16.7)	NS
ly (+)	38(92.7)	35(97.2)	26( 96.3)	45(83.3)	
Venous invasion					
v (-)	16(39.0)	16(44.4)	10( 37.0)	28(51.9)	NS
v (+)	25(61.0)	20(55.6)	17( 63.0)	26(48.1)	
Lymphnode metastasis					
n (-)	4( 9.8)	2( 5.6)	—	20(37.0)	p<0.01
n (+)	37(90.2)	34(94.4)	27(100.0)	34(63.0)	

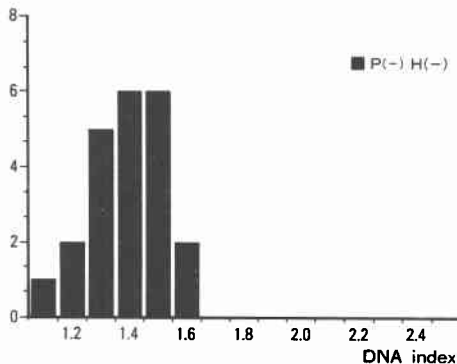
a : p<0.01 NS : not significant ( ) : %

**Table 2** DNA ploidy pattern in distant metastatic and non-metastatic cases of gastric cancer

	P(+)	H(+)	P(+)H(+)	P(-)H(-)
DNA diploidy	19(46.3)	7(19.4)	7(25.9)	29(53.7)
DNA aneuploidy	22(53.7)	29(80.6)	20(74.1)	25(46.3)

a : p<0.01 b : p<0.01 ( ) : %

**Fig. 3** DNA index of non-metastatic cases in gastric cancer.



有意に DNA aneuploidy が高率であった (p<0.01). しかし P (+) と P (-) H (-) では DNA ploidy pattern に関して有意な相関は認めなかった (Table 2).

3. DNA index (DI) と転移様式

P (-) H (-) は1.0≤DI≤1.6の範囲内に集積していた (Fig. 3). 各転移群における DI の集積範囲を比較してみると, P (+) は P (-) H (-) と同様に, 1.0≤DI≤1.6であり, DI に関して両群間に差を認めなかった. これに対し, H (+) と P (+) H (+) はともに1.0≤DI≤2.5であり, 1.7≤DI がそれぞれ 27.8(10/36), 33.3%(9/27) と高率に認められた (Fig. 4).

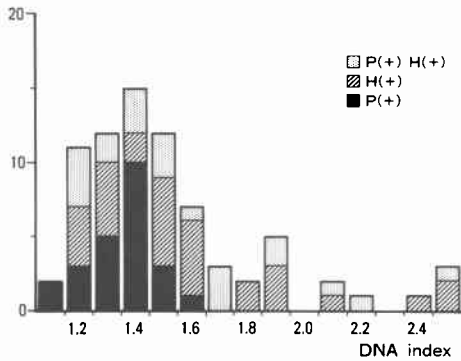
4. 腹膜播種性転移, 肝転移の程度と DNA ploidy pattern の関連性

P<sub>1</sub>・P<sub>2</sub>・P<sub>3</sub>における DNA aneuploidy の頻度はそれぞれ69.2% (9/13)・44.4% (8/18)・50.0% (5/10) であり, 肉眼的腹膜播種の程度と DNA ploidy pattern には有意な相関は認めなかった. また, 肉眼的肝転移の程度と DNA ploidy pattern に関しても, 有意な相関は認めないものの, H<sub>1</sub>・H<sub>2</sub>・H<sub>3</sub>と程度が進むにつれて DNA aneuploidy の頻度が, 66.7%(12/18)・80.0% (4/5)・100.0% (13/13) と高率になる傾向がみられた (Table 3).

**Table 3** Relation between DNA ploidy pattern and degree of peritoneal dissemination and liver metastasis in gastric cancer

	DNA diploidy	DNA aneuploidy	p value
Peritoneal dissemination			
P <sub>1</sub>	4(30.8)	9( 69.2)	NS
P <sub>2</sub>	10(55.6)	8( 44.4)	
P <sub>3</sub>	5(50.0)	5( 50.0)	
Liver metastasis			
H <sub>1</sub>	6(33.3)	12( 66.7)	NS
H <sub>2</sub>	1(20.0)	4( 80.0)	
H <sub>3</sub>	—	13(100.0)	

NS: not significant ( ): %

**Fig. 4** DNA index of distant metastatic cases in gastric cancer.

## V. 考 察

近年, FCMを用いた癌細胞核DNA ploidy patternの研究は, 1983年にHedleyら<sup>12)</sup>がパラフィン包埋組織標本から核DNA量測定法を報告して以来, さまざまな癌に関する核DNA ploidy解析の報告がなされ<sup>13)~18)</sup>, その癌細胞自身の持つ生物学的悪性度の指標のひとつとして注目されている。消化器癌において, 従来の病理組織学的因子に加え, 黒岡ら<sup>19)</sup>は大腸癌におけるDNA aneuploidyの生物学的悪性度の強さと肝転移との関連性を報告し, 木村ら<sup>20)</sup>は進行胃癌におけるDNA ploidy patternは予後を規定する重要な因子であるとしている。また, 大山ら<sup>21)</sup>は, Anti-BrdU monoclonal antibodyを用いたFCMによる胃癌の細胞動態の研究から, DNA aneuploidyはDNA diploidyより予後不良であり, S期細胞比率10%以上の症例は10%未満の症例に比して予後不良であると報告している。臨床的応用として中村ら<sup>22)</sup>は, 内視鏡下生検材料を用いて胃癌細胞核DNA量の測定が可能であると

報告している。そこで, 今回, 著者らは進行胃癌の腹膜播種, 肝転移例および無再発長期生存例のDNA ploidy pattern, DNA indexおよび病理組織学的因子を比較し, これら諸因子が, 胃癌における腹膜播種, 肝転移の予測に有用な因子になりうるかについて検討してみた。

従来より胃癌におけるP因子, H因子は予後を左右する重要な因子であり, 未分化癌は腹膜播種が, 分化癌は肝転移が多いと報告されてきた<sup>1)~3)</sup>。再発例においても, 北村ら<sup>23)</sup>は腹膜再発ではporとsigが多く, 肝再発では分化型が多いとし, 高橋ら<sup>24)</sup>も, 低分化型腺癌では腹膜播種が多く, 乳頭状や高分化型腺癌では肝転移が多い傾向にあるが, 必ずしも組織型と腹膜播種, 肝転移とが相関するものではなく, より有用な因子として間質反応を強調し, 髄様型に肝転移が多く, 硬性型に腹膜播種が多いと報告している。著者らの成績でも, 腹膜播種は未分化型が68.3% (28/41)と高率であるのに対し, 肝転移では分化型が77.8% (28/36)と高率であり, 病理組織学的分化度に関して両群間に有意な相関を認めた。次に脈管侵襲とリンパ節転移について比較検討した。著者らの成績では, ly因子およびv因子に関して, P(+), H(+), P(+), H(+), P(-), H(-)の間には有意な相関は認めなかった。曾和ら<sup>25)</sup>も肝転移胃癌におけるv因子とH因子の程度に関連性は認めないと報告する様に, ly因子に関しても腹膜播種や肝転移に関する一定の見解は得られていない。胃癌のリンパ節転移陽性率に関して, 今田<sup>26)</sup>は分化型56.1% (78/139), 未分化型68.2% (73/107)と未分化型に多く, 3個以上のリンパ節転移例では腹膜播種の可能性が高いと報告している。今回, 著者らの対象がstage IVのP因子, H因子を持つ遠隔転移例であり, 各転移群におけるリンパ節転移陽性率もP(-)

H (-) の63.0% (34/54) に比べ、有意に高率であったため、有用な因子として用いられなかった。

そこでFCMを用いた胃癌細胞核DNA ploidy解析から胃癌遠隔転移様式を比較検討してみた。胃癌におけるDNA aneuploidyの出現頻度は、本邦では佐々木<sup>27)</sup>は進行癌で68.0%(30/44), 米村ら<sup>28)</sup>は早期胃癌で60.0%(60/100)と報告している。著者らも60.8%(96/158)と類似の成績を得た。さらに各遠隔転移群におけるDNA aneuploidyの頻度の比較より、P (+) ではP (-) H (-) とDNA ploidy pattern に関して有意な相関を認めないが、H (+) とP (+) H (+) ではP (-) H (-) に比して有意にDNA aneuploidyが高率であることより、DNA aneuploidyと血行性肝転移との関連性が示唆された。

さらに肉眼的腹膜播種性転移、肝転移の程度とDNA ploidy patternの比較では、有意な相関を認めなかったが、肉眼的肝転移がH<sub>1</sub>, H<sub>2</sub>, H<sub>3</sub>と進展するに従い、DNA aneuploidyの出現頻度が66.7%(12/18), 80.0%(4/5), 100.0%(13/13)と高率になることから、DNA aneuploidyの癌細胞は、血行性肝転移を起こしやすいと推測された。

また、DNA index (DI)を用いた遠隔転移様式の比較では、P (+) は全例 $1.0 \leq DI \leq 1.6$ であり、P (-) H (-) と同一範囲内に集積していた。しかし、H (+) では $DI \geq 1.7$ のDNA aneuploidyが27.8%(10/36)に認められ、同様にP (+) H (+) でも33.3%(9/27)に認められたことより、DNA aneuploidyかつ $1.7 \leq DI$ の癌細胞は血行性肝転移を起こしやすいことが示唆された。

以上のことから、胃癌における腹膜播種、肝転移を予測する重要な因子として、従来までの病理組織学的因子、とくに病理組織分化度に加え、DNA ploidy pattern, DNA indexは有用であることが示唆された。今後、さらに胃癌切除後の治療方針を決定するうえで、DNA ploidy patternおよびDNA indexは重要な因子となり得ると推測された。

本研究の一部は平成4年度文部省科学研究助成金(550140195574)によった。

なお、本論文の一部は第38回日本消化器外科学会総会において発表した。

## 文 献

- 1) 坂本純一, 紀藤 毅, 山村義孝ほか: 胃癌の再発および予後のパラメータとしての組織型の意義. 日外会誌 92: 1082-1085, 1991

- 2) 加藤道男, 船坂真里, 島田悦可ほか: Borrmann4型胃癌の臨床病理学的特徴と術後遠隔成績に影響を与える因子についての検討. 日消外会誌 21: 1946-1952, 1988
- 3) 佐伯俊昭, 田中 卓, 西山正彦ほか: 胃癌切除症例における漿膜面浸潤の検討. 日消外会誌 21: 2542-2547, 1988
- 4) Sasaki K, Takahashi M, Hashimoto T et al: Flow cytometric DNA measurement of gastric cancers clinico-pathological implication of DNA ploidy. Pathol Res Pract 184: 561-566, 1989
- 5) Piero T, Lorenzo L, Marcella C et al: Flow cytometric analysis of DNA ploidy pattern from deparaffinized formalin-fixed gastric cancer tissue. Int J Cancer 42: 868-871, 1988
- 6) 刈田幹夫, 多田正弘, 柳井秀雄ほか: Flow cytometryによるDNA量からの各種胃疾患の検討. Gastroenterol Endosc 28: 1999-2002, 1986
- 7) 米村 豊, 宮崎逸夫: DNA ploidy・増殖活性分析による癌の予後判定の有用性と今後の展望. 医のあゆみ 149: 31-34, 1989
- 8) Bronzo R, Heit P, Weissman G et al: Implications of flow cytometry in malignant conditions of the stomach. Am J Gastroenterol 84: 1065-1068, 1989
- 9) 胃癌研究会編: 胃癌取扱い規約. 改訂第11版. 金原出版, 東京, 1985
- 10) 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
- 11) Vindeløv LL, Christensen IJ, Nissen NI: A detergent-trypsin method for the preparation of nuclei for flow cytometric DNA analysis. Cytometry 3: 323-327, 1983
- 12) Hedley DW, Friedlander ML, Taylor IW et al: Method for analysis of cellular DNA content of paraffin-embedded pathological material using flow cytometry. J Histochem Cytochem 31: 1333-1335, 1983
- 13) 佐々木功典, 村上知之: 固形腫瘍の核内DNA量による検討. 臨検 34: 692-697, 1990
- 14) 草野満夫, 櫛部 朗, 伊藤久美子ほか: 核DNA-Ploidy PatternとS期標識率からみた消化器癌の悪性度評価. 日外会誌 92: 1086-1089, 1991
- 15) 船井貞往, 黒岡一仁, 松田泰次ほか: Flow cytometryによる核DNA量からみた大腸癌の悪性度に関する検討. 日外会誌 92: 127-132, 1991
- 16) 佐藤泰彦, 田中淳一, 吉岡 浩ほか: 核DNA量および癌細胞分裂指数からみた胆嚢癌の悪性度—とくにss胆嚢癌の予後について. 日外会誌 92:

- 46—51, 1991
- 17) 山岡憲夫, 内山貴堯, 君野孝二ほか: 多変量解析を用いた肺癌の核DNA量の予後因子としての有用性について. 日外会誌 91: 1608—1616, 1990
- 18) 渡部郁雄: Flow cytometryによる細胞の増殖と分化に関する研究. 最新医 40: 76—79, 1985
- 19) 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 Biol 2: 66—71, 1990
- 20) 木村寛伸, 米村豊, 岩佐和典ほか: Flow cytometryによる進行胃癌のDNA ploidy patternと予後. 日外会誌 92: 288—292, 1991
- 21) 大山繁和, 米村豊, 宮崎逸夫: Anti-BrdU monoclonal antibodyを用いたFlow cytometryによる胃癌の細胞動態の解析. 日外会誌 90: 1848—1854, 1989
- 22) 中村昌弘: Flow cytometryによる胃癌細胞核DNA量の測定—内視鏡下生検材料を用いて. Gastroenterol Endosc 32: 11—19, 1990
- 23) 北村正次, 粟根康行, 荒井邦佳ほか: 再発胃癌に対する病理組織学的検討ならびに集学的治療の効果. 日消外会誌 21: 1030—1036, 1988
- 24) 高橋豊, 磨伊正義, 荻野知己ほか: 胃癌原発巣の発育様式からみた転移形式の検討—とくに腹膜播種および肝転移との関係. 癌の臨 31: 1792—1796, 1985
- 25) 曾和融生, 加藤保之, 芳野裕昭ほか: 肝転移胃癌の検討. 日消外会誌 21: 32—37, 1988
- 26) 今田敏夫: 胃癌の腹膜播種性転移の発生機序に関する研究. 日外会誌 87: 593—603, 1986
- 27) 佐々木功典: 消化器癌のDNA解析. 最新医 40: 85—87, 1985
- 28) 米村豊, 杉山和夫, 鎌田徹ほか: DNA ploidy patternからみた早期胃癌の予後. 日消外会誌 21: 2075—2079, 1988

### Study of DNA Ploidy Pattern and DNA Index Using Flow Cytometry in Distant Metastasis of Gastric Cancer

Yukio Imanishi, Kazuyoshi Kurooka, Hiromi Yamada, Yoshinori Fujii, Suguru Sato, Kiyotaka Okuno,  
Akira Tanaka, Katsuhisa Shindo and Masayuki Yasutomi  
First Department of Surgery, Kinki University School of Medicine

The correlation of DNA ploidy pattern and DNA index (DI) with distant metastasis in advanced gastric cancer was analyzed using flow cytometry in 158 patients who underwent surgery in our institute from 1981 to 1988. The frequency of DNA aneuploidy was 53.7% among 41 cases of peritoneal dissemination, 80.6% among 36 cases of liver metastasis, 74.1% among 27 cases of both, and 46.3% among 54 non-metastatic cases. The DI in all cases of peritoneal dissemination or non-metastasis was from 1.0 to 1.6, whereas the DI in 27.8% of cases of liver metastasis and 33.3% of cases of peritoneal dissemination and liver metastasis was more than 1.7. In terms of histopathological type, 68.3% of cases of peritoneal dissemination originated from undifferentiated adenocarcinoma, whereas 77.8% of cases of liver metastasis originated from differentiated adenocarcinoma. In conclusion, we found that not only histological type but also DNA ploidy pattern and DI were significantly related to distant metastasis in gastric cancer.

**Reprint requests:** Yukio Imanishi First Department of Surgery, Kinki University School of Medicine  
377-2 Ohnohigashi, Osaka-sayama City, 589 JAPAN