

内視鏡下生検材料を用いた胃癌細胞核 DNA 量の測定

恵寿総合病院胃腸科

木村 寛伸 神野 正博 高村 博之 荒川 元
前田 基一 魚岸 誠 素谷 宏

胃癌患者73例において従来の予後因子に加え、内視鏡下生検材料を用い、胃癌の細胞核 DNA 量の測定を行った。胃癌生検材料の DNA aneuploid 症例は早期癌29例中15例 (51.7%)、進行癌44例中34例 (77.3%) に認められ、早期癌の2例、進行癌の8例に DNA multiploidy を認めた。40例の生検と切除標本の DNA ploidy pattern の一致率は95%であった。生検標本の DNA index (DI) の分布は1.0~2.8で、切除標本の DI とよく一致した ($r=0.9426$)。DNA ploidy pattern と臨床病理組織学的諸因子との関係を見ると、漿膜浸潤陽性、リンパ節転移陽性、静脈侵襲陽性、リンパ管侵襲陽性は DNA diploidy 症例に比べ、DNA aneuploidy 症例で有意に高率であった。以上より生検材料を用いて、細胞核 DNA 量を測定することは prospective に癌細胞の生物学的特性を知るのみならず、ひいては治療方針の決定に役立つであろうと考えられた。

Key words: flow cytometry, DNA ploidy of gastric cancer, DNA contents of biopsy specimen

はじめに

種々の悪性腫瘍^{1)~3)}および前癌⁴⁾、境界病変⁵⁾に対して、その malignant potential を検索するうえで、flow cytometry を用いた DNA ploidy の研究がなされるようになってきた。胃癌患者の予後を規定する因子としては、従来の組織学的悪性度とこの DNA ploidy などの生物学的悪性度が知られている¹⁾²⁾。胃癌領域においては、パラフィンを用いた報告が多いが¹⁾、新鮮標本さらには内視鏡下生検材料を用いた報告はまだまだ少ない²⁾。そこで今回われわれは、胃癌患者において従来の予後因子に加え、術前生検標本における細胞核 DNA 量を測定し、その有用性について検討した。

対象と方法

1991年4月から1993年3月までに当科において経験した胃癌73例 (うち早期癌29例、進行癌44例) を対象とした。

細胞核 DNA 量は経内視鏡的に通常の生検鉗子を用い互いに離れた4か所から腫瘍塊を採取し、Triton X100による裸核化を行い、RNase 処理後 propidium iodide にて染色し、FACSscan により10,000個の細胞核の DNA 量を測定し DNA ヒストグラムを作成した。DNA 量の測定は internal standard としてヒトリ

ンバ球を用い、単一の $G_{0/1}$ peak からなるものを DNA diploid とし、複数の $G_{0/1}$ peak からなるものを DNA aneuploid とし、peak 値の比を DNA index (DI) とした。同一症例において DI が10%を越える場合を複数の stem line による DI heterogeneity とし、DNA multiploidy とした。また40例 (早期癌17例、進行癌23例) に対しては切除標本においても DNA 量を測定し、生検材料と比較した。

使用用語は胃癌取扱い規約⁶⁾に従い、統計学的処理は、離散数の検定には χ^2 検定を、連続数の検定には Student t 検定をそれぞれ用いた。

結 果

1. Coefficient of variation (CV 値)

生検材料を用いた細胞核 DNA 量の測定では、coefficient of variation (CV) は全例8%以下で、CV 値の平均は4.24 (2.8~7.9) であった (**Fig. 1**)。

2. 胃癌生検材料の DNA ploidy pattern

胃癌生検材料の DNA aneuploid 症例は早期癌29例中15例 (51.7%)、進行癌44例中34例 (77.3%) に認められ、早期癌の2例 (6.9%)、進行癌の8例 (18.2%) に DNA multiploidy を認めた (**Table 1**)。

3. 生検材料の DNA index (DI) の分布

早期胃癌 (m 癌20例、sm 癌9例) と進行胃癌について、DNA index の分布をみると、早期胃癌に比べて進行胃癌は DNA aneuploid が多く、特に near-diploid

Fig. 1 Distribution of the coefficient of variation (CV)

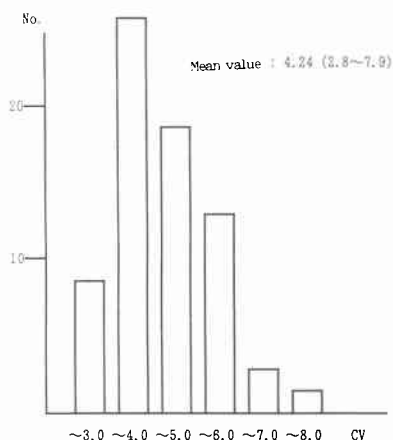


Fig. 3 Relationship between DI of biopsy specimen and DI of resected tumor

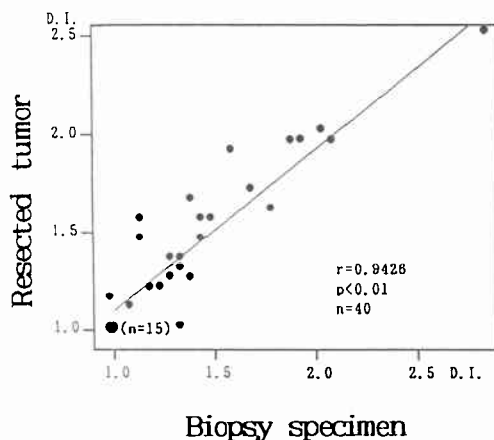


Table 1 DNA ploidy pattern of the gastric cancer

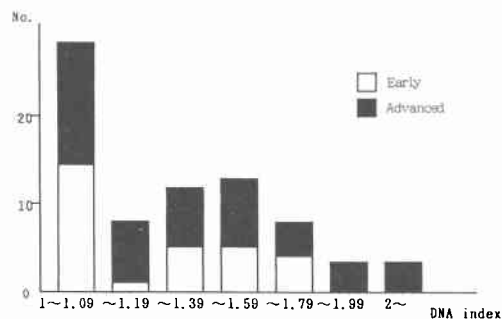
	Diploid	Aneuploid	Multiploid
Early (n=29)	48.3%	51.7%	6.9%
Advanced(n=44)	22.7%	77.3%	18.2%
Total	32.9%	67.1%	13.7%

*p<0.05

Table 2 Relationship between DNA ploidy pattern and clinicopathological features

	Diploid	Aneuploid	P value
H (+)	4.2%	14.3%	0.1869
P (+)	16.7%	28.6%	0.2083
ps (+)	16.7%	39.1%	0.0467
n (+)	27.3%	62.2%	<0.01
ly (+)	15.0%	59.0%	<0.001
v (+)	5.0%	33.3%	0.0134

Fig. 2 Distribution of the DNA index (DI)



およびDIの大きいものに多い傾向が認められた (Fig. 2)。また早期癌においてm癌とsm癌でDIの平均を比較するとm癌は1.13, sm癌は1.45とsm癌で有意に高値であった (p<0.01)。

4. 生検と切除標本の DNA index (DI)

40例の生検と切除標本の DNA ploidy pattern の一致率は95%であった。また生検標本の DI の分布は1.0~2.8で, 切除標本の DI とよく一致した (r=0.9426) (Fig. 3)。

5. DNA ploidy pattern と臨床病理組織学的因子

DNA ploidy pattern と臨床病理組織学的諸因子との関係を見ると, 漿膜浸潤陽性(ps+), リンパ節転移陽性 (n+), 静脈侵襲陽性 (v+), リンパ管侵襲陽性 (ly+) は DNA diploidy 症例に比べ, DNA aneuploidy 症例で有意に高率に高率であった (Table)。また早期癌のリンパ節転移陽性例2例はともに DNA aneuploidy 症例であった。

一方, 早期胃癌において生検材料による DNA ploidy と平均腫瘍径を比較すると, DNA diploidy 症例 (n=14) は3.12cm, DNA aneuploidy 症例 (n=15) は3.10cm と有意差を認めなかった。

考 察

内視鏡下生検材料を用いた flow cytometry による細胞核 DNA 量の測定は, prospective に胃癌細胞の生物学的悪性度を評価する目的での検討であり, 生検材料を用いる場合の DNA 定量の問題点としては, 癌細胞の回収率, DNA ヒストグラムの CV 値, 腫瘍の heterogeneity, 摘出標本との DI の相関性などが挙げられる。癌細胞の回収率に関しては通常の生検鉗子で4

個腫瘍塊を採取することで、10,000~20,000個の細胞核のDNA量の測定が可能であった。また早期胃癌において生検材料によるDNA ploidyと平均腫瘍径を比較すると、DNA diploidy症例とDNA aneuploidy症例とでは有意差を認めなかった。このことは早期癌においては腫瘍径が小さいがために、内視鏡下生検材料では正常組織が多く混入し、DNA diploidyが高頻度に出現するとは考えにくいものと思われる。石川ら⁷⁾は大腸内視鏡下生検材料を用いた核DNA定量の基礎的検討より、生検個数3個、6個、10個で比較し、生検個数に関係なく、CV値、DI値は一定であったとし、また生検材料におけるDI値は切除材料のDI値と高い相関を示し、生検個数3個において適正なploidyの評価が可能であると結論づけている。また、Scottら⁸⁾は同様に大腸内視鏡下生検材料を用い、表層粘膜の複数の部位から採取することで、パラフィンの全切片と比較して、79%のDNA patternの一致を認めたとしている。今回の検討では、石川らの報告よりさらに1個多い4か所から腫瘍塊を採取し、先の報告と同様に、生検標本のDI値は切除標本ともよく一致し、DNA diploid, aneuploidの一致率も95%と、腫瘍のheterogeneityも克服できるものと考えられた。

胃癌生検材料を用いたflow cytometryによるDNA aneuploidyの出現率に関しては、Odegaardら⁹⁾は39%(7/18)、Deinleinら¹⁰⁾は58%(11/19)、Bronzoら¹¹⁾は71%(12/17)、中村¹²⁾は73%(38/52)と報告し、諸家によって多少ばらつきを認める。これは対象および症例数の相違によるものと考えられる。今回の検討では、DNA aneuploidyの出現率は早期癌で51.7%(15/29)、進行癌で77.3%(34/44)、全体で67.1%と諸家の報告例と比較しても、症例数も多く妥当な数値だと思われる。一般には、パラフィン標本に比べ、新鮮標本ではDNA aneuploidyの出現率が高いといわれている。実際、パラフィン包埋切片を用いたflow cytometryによる著者らの検討¹⁾では、進行胃癌に限れば270例中DNA aneuploidyは150例(55.6%)と今回の検討での77.3%と比較してもパラフィン標本でのDNA aneuploidyの出現率は低い。これは、パラフィン材料では細胞単離が困難な症例も認められ、CV値が不良なため脱落症例が多く出るため、DNA aneuploidyの出現率が落ちるものと思われる。今回の検討では、生検材料による新鮮標本であり、その点CV値も全例8%以下で、3.1~4.0にピークを認め、良好なCV値が得られた。

また、DNA ploidyと予後との関係についてみた検討では、DNA aneuploidy症例はDNA diploidy症例に比べて予後不良とする報告が多く、retrospectiveな著者らの検討¹⁾でも進行胃癌において、治癒切除症例ではDNA diploidy症例の5生率が77.2%であるのに対して、DNA aneuploidy症例では48.2%と有意に予後不良であった。またDNA aneuploidy症例においてDNA index ≥ 1.60 群の5生率が他の群に比べ不良であった。今回の検討でも早期胃癌と進行胃癌について、DNA indexの分布をみると、早期胃癌に比べて進行胃癌はDNA aneuploidyが多く、特にnear-diploidおよびDNA indexの大きいものに多い傾向が認められた。また早期癌においてm癌とsm癌でDIの平均を比較するとm癌は1.13、sm癌は1.45とsm癌で有意に高値であった。パラフィン標本での知見が、生検材料においても適応されれば、DNA indexが大きいものは予後不良の可能性があり、今後のfollow upが必要と考えられる。

またDNA ploidy patternと臨床病理組織学的諸因子との関係をみると、漿膜浸潤陽性、リンパ節転移陽性、静脈侵襲陽性、リンパ管侵襲陽性でDNA diploidy症例に比べ、DNA aneuploidy症例で有意に高率であった。またsm癌のリンパ節転移陽性例2例はともにDNA aneuploidy症例であり、症例数の集積により縮小手術の可能性も考慮されるものと思われる。中村¹²⁾もDNA aneuploidyの出現率は脈管侵襲の高度のものが多くと述べており、このことは、腫瘍細胞の生物学的特性を知るのみならず、術前化学療法を含めた治療方針の一助になる可能性を示唆するものと思われる。

しかしながら、DNA diploidyでしかも治癒切除された症例にもかかわらず予後不良な症例もみられ、DNA ploidyだけで必ずしもその悪性度を評価することはできない。そこで、さらにBrdUrdを用いたS期細胞数¹³⁾や核内増殖関連抗原Ki-67、p105など^{14)~16)}のモノクローナル抗体を用いた胃癌の増殖活性など多方面の解析が必要だと思われる。このように今後細胞増殖関連因子を含め、生検材料を用いて、細胞核DNA量を測定することは、prospectiveに癌細胞の生物学的特性を知るのみならずひいては、治療方針の決定に役立つであろうと考えられた。

文 献

- 1) Kimura H, Yonemura Y: Flow cytometric analysis of nuclear DNA content in advanced

- gastric cancer and its relationship with prognosis. *Cancer* 67 : 2588—2593, 1991
- 2) 木村寛伸, 高村博之, 前田基一ほか: 内視鏡下生検材料を用いた胃癌細胞核 DNA の測定. *医のあゆみ* 161 : 223-224, 1992
 - 3) Kimura H, Yonemura Y, Kadoya N et al: Prognostic factors in primary gastrointestinal leiomyosarcoma: A retrospective study. *World J Surg* 15 : 771—777, 1991
 - 4) Kimura H, Kanno M, Takamura H et al: Histopathologic and flow cytometric analysis of colorectal polyps resected at endoscopy. *Eur Surg Res* 25 : 187—192, 1993
 - 5) 木村寛伸, 高村博之, 前田基一ほか: 胃平滑筋腫瘍の臨床病理学および核 DNA 量からの検討. *Endosc Forum digest dis* 8 : 20—24, 1992
 - 6) 胃癌研究会編: 胃癌取扱い規約. 改訂第 11 版. 金原出版, 東京, 1984
 - 7) 石川 啓, 田川 泰, 宮下光世ほか: 大腸内視鏡下生検材料を用いた核 DNA 定量の基礎的検討. *Gastroenterol Endosc* 30 : 1950—1954, 1988
 - 8) Scott NA, Grande JP, Weiland LH et al: Flow cytometric DNA patterns from colorectal cancers—How reproducible are they? *Mayo Clin Proc* 62 : 331—337, 1987
 - 9) Odegaard S, Hostmark J, Skagen DW et al: Flow cytometric DNA studies in human gastric cancer and polyps. *Scand J Gastroenterol* 22 : 1270—1276, 1987
 - 10) Deinlein E, Schmidt H, Riemann J-F et al: DNA flow cytometric measurements in inflammatory and malignant human gastric lesions. *Virchows Arch* 402 : 185—193, 1983
 - 11) Bronzo R, Heit P, Weissman G et al: Implications of flow cytometry in malignant condition of the stomach. *Am J Gastroenterol* 84 : 1065—1068, 1989
 - 12) 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
 - 13) 木村寛伸, 米村 豊, 鎌田 徹ほか: 胃癌生検材料を用いた BrdUrd および IdUrd の 2 重染色による腫瘍細胞の生長解析. *日外会誌* 92 : 1037, 1991
 - 14) Kimura H, Yonemura Y, Miyazaki I: Proliferative activity in advanced gastric cancer with Ki-67 and propidium iodide: Analysis by flow cytometry. *Int J Oncol* 1 : 265—269, 1992
 - 15) Kimura H, Yonemura Y, Epstein AL: Flow cytometric quantitation of the proliferation-associated nuclear antigen p105 and DNA content in advanced gastric cancers. *Cancer* 68 : 2175—2180, 1991
 - 16) Kimura H, Yonemura Y, Miyazaki I: Proliferative activity in gastric cancer with cell cycle-related monoclonal antibodies Ki-67 and p105: Analysis by flow cytometry. *J Surg Oncol* 51 : 174—178, 1992

Flow Cytometric Analysis of Nuclear DNA Content in Human Gastric Cancer Cells Obtained from Endoscopically Biopsied Specimens

Hironobu Kimura, Masahiro Kanno, Hiroyuki Takamura, Hajime Arakawa, Kiichi Maeda,
Makoto Uogishi and Hiroshi Sodani
Department of Gastroenterology, Keiju Hospital

Flow cytometric (FCM) DNA studies were performed on cell suspensions of biopsy specimens from gastric mucosa in 73 patients with gastric cancer. DNA aneuploidy was detected in 49 tumors (67.1%), that is, in 51.7% (15/29) of early gastric cancers and 77.3% (34/44) of advanced gastric cancers. The DNA index (DI) ranged from 1.0 to 2.8. A significant correlation was found between the DI of biopsy materials and that of surgically obtained ones ($r=0.9426$). Serosal invasion, lymph node metastasis, lymphatic invasion, and vascular invasion were significantly higher in aneuploidy than in diploidy ($p<0.05$). The prevalence of aneuploidy in endoscopically obtained specimens may provide additional prognostic information and information on biologic variables.

Reprint requests: Hironobu Kimura Department of Surgery, Yatsuo General Hospital
7-42 Fukushima, Yatsuo-machi, Nei-gun, Toyama, 939-23 JAPAN