

## Two color flow cytometry 法を用いた DNA および PCNA 量定量による大腸癌の悪性度の評価

福岡大学医学部第2外科  
吉 武 裕 明

大腸癌100例について two color flow cytometry 法を用いて核 DNA 量と PCNA labeling rate (PCNA LR) を測定し、臨床病理学的因子との関係を検討した。DNA diploid (DD) は33例、DNA aneuploid (DA) は67例であった。同一検体で1次抗体を除いたものを negative control として cut off 値の調整を行い PCNA LR を測定した。PCNA LR の平均値は  $60.25 \pm 14.31\%$  であった。PCNA LR は、DD に比べて DA で高値を示した ( $p < 0.05$ )。PCNA LR が高値で DA の癌は、PCNA LR が低値で DD の癌に比べリンパ節転移、INF、Dukes 分類で stage の進行した症例を多く認めた ( $p < 0.01$ ,  $p < 0.01$ ,  $p < 0.05$ )。予後は、DD の癌と DA の癌との間に有意差を認めなかったが、PCNA LR が高値で DA の癌は、PCNA LR が低値で DD の癌に比べ有意に不良であった ( $p < 0.05$ )。このように迅速かつ客観的評価に優れる flow cytometry による核 DNA 量と PCNA LR の検討は、大腸癌の悪性度の判定に有用な手段の1つと考えられた。

**Key words:** flow cytometry, DNA, PCNA, colorectal cancer

### はじめに

近年種々のモノクローナル抗体が開発され、それらの flow cytometry (FCM) への応用は免疫学や腫瘍学分野で広く活用されている。PCNA (増殖細胞核抗原, proliferating cell nuclear antigen) は、DNA の複製に必須である DNA polymerase  $\delta$  の補助蛋白であり、増殖細胞マーカーとして注目を浴びてきている<sup>1)</sup>。抗 PCNA モノクローナル抗体は特に免疫組織学的に広く利用されてきているが、標本の固定条件の違いにより陽性率がかなり異なることから、その検索には限界があるともされている<sup>2)3)</sup>。一方、FCM では PCNA を用いて培養細胞の増殖活性を検索する報告により、その信頼性は認められている<sup>4)~6)</sup>。

本研究では DNA ploidy pattern (DPP) で一般的に予後が良いとされている DNA diploid (DD) でも予後不良例が存在し、逆に予後不良といわれる DNA aneuploid (DA) で予後が良好な症例が存在するため、抗 PCNA モノクローナル抗体を用いてそのような症例の鑑別が可能かどうかを目的に、また FACScan を使用し two-color 染色法で DPP と PCNA LR

(PCNA 陽性率, PCNA labeling rate) の関連を検討し、より有用な大腸癌悪性度のパラメーターとすることを試みたので報告する。

### 対 象

1990年6月から1993年1月までに福岡大学第2外科教室で手術された単発大腸癌症例のうち、新鮮標本から FCM で DNA ploidy と PCNA LR を測定しえた100例を対象とした。内訳は男55例、女45例で、平均は  $63.8 \pm 10.9$  歳であった。

### 方 法

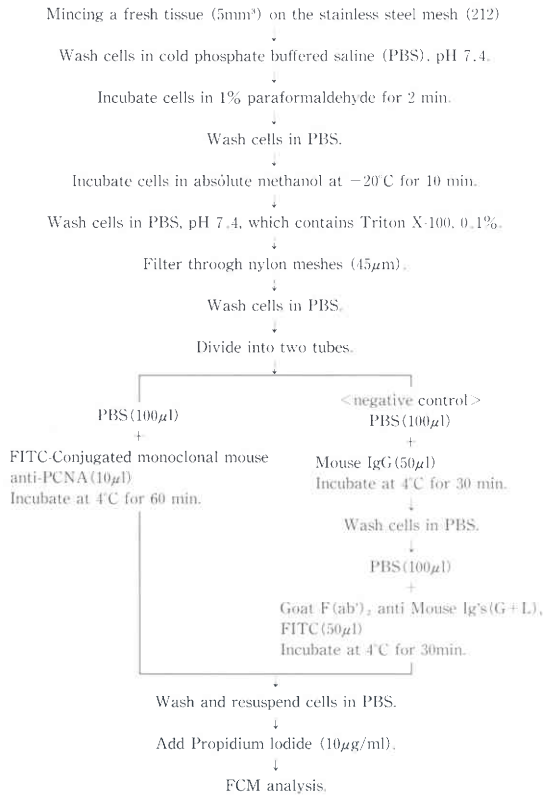
切除手術後、直ちに大腸癌組織で壊死組織の少ない短軸方向の周堤の一部を採取して、compound で包埋後、液体窒素中 ( $-196^{\circ}\text{C}$ ) に凍結保存した。

(1) 腫瘍核 DNA 量および PCNA 量測定

1) 新鮮凍結標本の処理

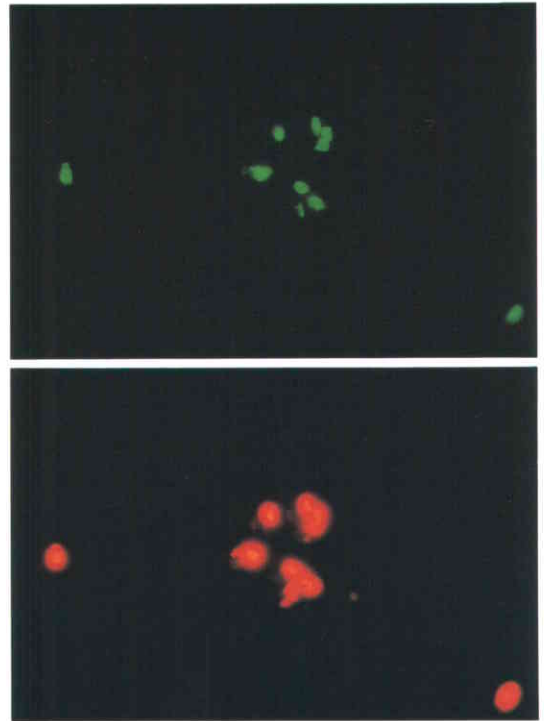
腫瘍組織  $5\text{mm}^3$  を phosphate buffered saline (PBS) で十分に洗浄後、PBS を加えながら金属メッシュ ( $212\ \mu\text{m}$ ) 上で眼科用ハサミを用いて細切した。1% paraformaldehyde (PFA) にて室温・2分間固定後、純メタノールで  $-20^{\circ}\text{C}$ ・10分間固定し、0.1% Triton X-100 含 PBS を加えながらナイロンメッシュ ( $45\ \mu\text{m}$ ) で濾過して細胞浮遊液を作製した。検鏡によって single cell suspension を確認後、この細胞浮遊液を二分し、

**Fig. 1** Procedure of double staining with FITC labeled anti-PCNA monoclonal antibody and PI



一方は対象細胞 ( $1 \times 10^6$  cells) に FITC (fluorescein isothiocyanate) 標識抗 PCNA モノクローナル抗体 PCNA (DAKO, PC-10;  $10 \mu\text{l}$  9 を  $4^\circ\text{C} \cdot 1$  時間反応後 propidium iodide (PI) ( $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ ) で核 DNA を二重染色し, 他方は PI 染色のみの negative control と

**Fig. 2** DNA and PCNA expression in colonic cancer cells as identified by immunofluorescence ( $\times 200$ )



した (Fig. 1, 2).

2) DNA ヒストグラムと DNA/PCNA サイトグラム

PACScan (Becton Dickinson, USA) を使用し  $1 \sim 2 \times 10^4$  個の細胞の核 DNA 量と PCNA 量を同時に測定した. 標本内の正常組織の核 DNA 量を control

**Fig. 3** DNA histogram of colorectal cancer

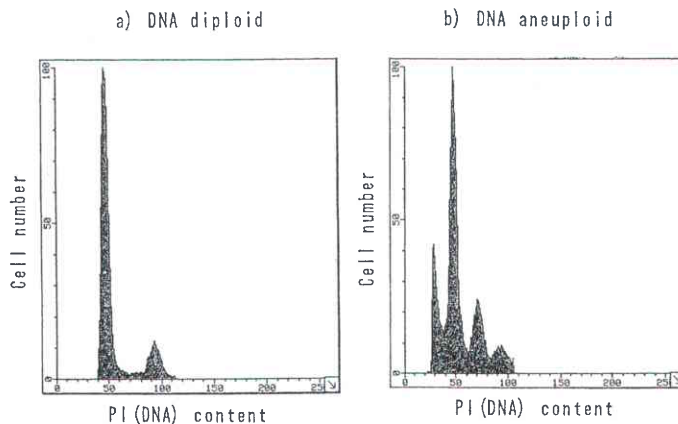


Fig. 4 PI-FITC two parameter analysis of colorectal cancer

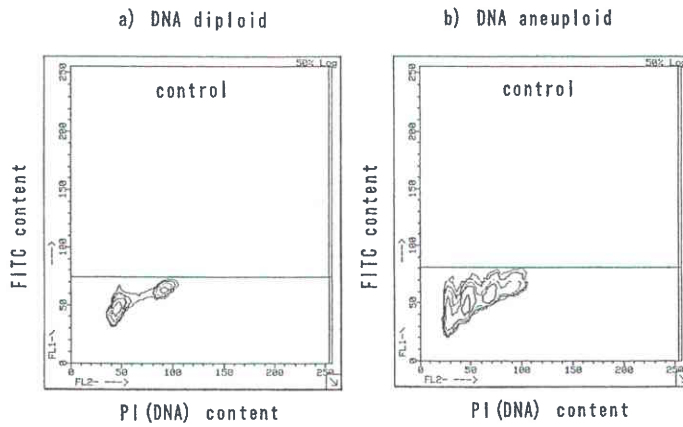


Fig. 5 PI-FITC two parameter analysis of colorectal cancer

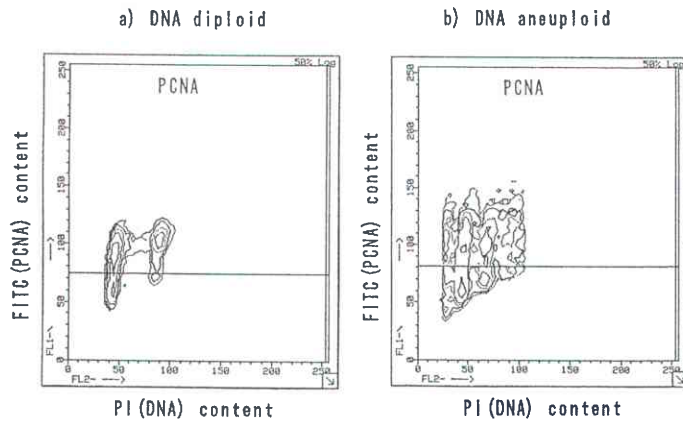
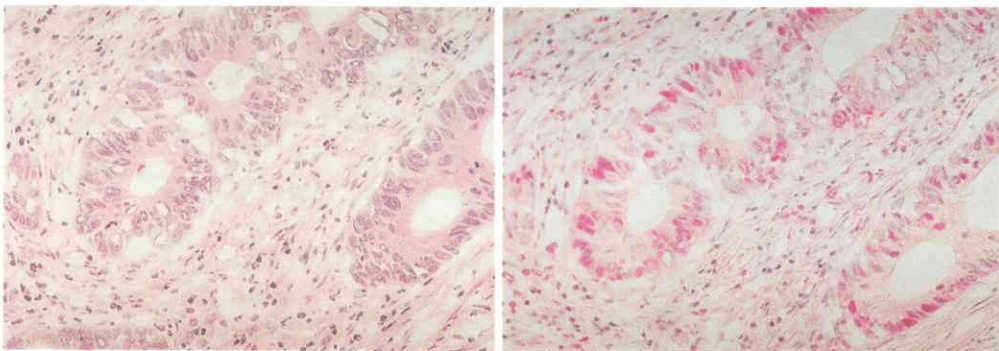


Fig. 6 Colorectal cancer cells which are reactive immunohistochemically with anti-PCNA monoclonal antibody (×200)



とし、DPPは、G0/G1 peakが単一の症例をDNA diploid (DD)、2つ以上G0/G1 peakのあるものをDNA aneuploid (DA) と分類した (Fig. 3)。DNA/

PCNA サイトグラムは、X軸に核DNA量をY軸にPCNA量を表示した。PCNA LRは、negative controlにおけるFITCの最高蛍光強度をcut off値とし、測定

**Table 1** Classification into I~IV group by DNA ploidy pattern and PCNA labeling rate

	n
group I : PCNA LR<56 and DNA diploid	16
II : PCNA LR $\geq$ 56 and DNA diploid	17
III : PCNA LR<63 and DNA aneuploid	33
IV : PCNA LR $\geq$ 63 and DNA aneuploid	34
Total	100

細胞数中の染色陽性細胞数の割合とした (Fig. 4, 5).

## (2) PCNA の免疫組織学的検討

### 1) 処理過程と染色方法

20例については新鮮凍結標本から cryostat で厚さ5  $\mu$ m の凍結切片を作製し、PFA/純メタノールで固定後 ABC 法にて PCNA 免疫組織染色を施した。

### 2) PCNA 陽性率の判定

光学顕微鏡にて、異なる5視野で癌細胞500~1,000個あたりの核が赤色を示す PCNA 陽性細胞率を算出した (Fig. 6). 判定にあたってはこれを3回繰り返し、その平均値を PCNA 陽性細胞率とした。

### (3) 臨床病理学的検討

臨床病理学的項目は大腸癌取扱い規約<sup>7)</sup>によった。Dukes 分類は Turnbull ら<sup>8)</sup>による Dukes 分類変法を用いた。臨床病理学的因子との関係については、PCNA LR と DPP から下記の4群に分けて検討を行った (Table 1).

I 群 : PCNA LR (56%未満) で DD

II 群 : PCNA LR (56%以上) で DD

III 群 : PCNA LR (63%未満) で DA

IV 群 : PCNA LR (63%以上) で DA

患者の転帰については1995年9月現在であらわし、腫瘍死を死亡として扱った。

### (4) 統計学的解析

統計学的検定には  $\chi^2$ -test, generalized Wilcoxon test および Kruskal-Wallis test を用い、生存曲線は Kaplan-Meier 法にて求め、generalized Wilcoxon test および log-rank test にて生存率の解析を行った。

## 成 績

### 1. 腫瘍核 DNA 量と分布様式

大腸癌100例の DPP は、DD 33例 (33%), DA 67例 (67%) であった。測定精度の指標となる CV 値 (coefficient of variation) は、peak channel number と高さの半分の幅より%で表されるが、その平均は  $4.64 \pm 1.08\%$  (2.3~7.0%) であった。また、DA にお

**Table 2** Relationship between DNA ploidy pattern and PCNA labrlng rate

	n	CV (%)	DI	PCNA LR (%)
Diploid	33	$4.77 \pm 1.09$	1.0	$55.57 \pm 14.76$
Aneuploid	67	$4.58 \pm 1.08$	$1.52 \pm 0.24$	$62.56 \pm 13.60$

\* :  $p < 0.05$

いて腫瘍組織内の正常2倍体の位置と検体の2倍体の位置の比率より算出する DNA index (DI) は、1.2から3.0の範囲に分布し、平均値  $1.52 \pm 0.24$  であった。  $1.1 < DI < 1.5$  が29例、  $DI \geq 1.5$  が38例であった (Table 2).

### 2. PCNA LR

PCNA LR の平均は、  $60.25 \pm 14.31\%$  (13.5~90.3%) であった。ABC 法による PCNA 免疫組織染色陽性では、腫瘍細胞の核内に赤色に染色される物質を認めることができる (Fig. 6). そこで両者が同時に測定された20例について、PCNA LR と PCNA 陽性細胞率とを比較すると  $Y = 16.22 + 0.6868 \cdot X$ ,  $r = 0.6864$  ( $p < 0.001$ ) と有意な相関関係を認めた (Fig. 7).

### 3. DI と PCNA LR

DI と PCNA LR との間に有意の相関を認めなかった。

### 4. DPP と PCNA LR

DD 群および DA 群における PCNA LR の平均値はそれぞれ  $55.57 \pm 14.76\%$ ,  $62.56 \pm 13.60\%$  で、DPP によって DD 群と DA 群との間に PCNA LR に有意差を認めた ( $p < 0.05$ ) (Table 2).

### 5. 臨床病理学的因子との関係

DPP と臨床病理学的因子の間には、組織型、壁深達度、脈管侵襲、INF、リンパ節転移 (n 因子)、腹膜播種性転移 (P 因子)、肝転移 (H 因子)、組織学的進行度、Dukes 分類のいずれとも関連を認めなかった (Table 3).

PCNA LR と臨床病理学的因子を検討すると、組織型では、PCNA LR は分化型腺癌に比べて低分化型腺癌で高値を示し、両群間で有意差を認めた ( $p < 0.05$ ). 壁深達度では、PCNA LR は ss (a1) もしくは si (ai) でやや低下したが、m, sm 群と mp 以上群で比較すると、mp 以上群で有意の高値を示した ( $p < 0.05$ ). 脈管侵襲では、陽性の程度が高度になるにつれて PCNA LR は高値を示し、 $ly_{0,1}$  と  $ly_{2,3}$  および  $v_{0,1}$  と  $v_{2,3}$  との間に有意差を認めた ( $p < 0.05$ ). INF に関しては浸潤性

**Table 3** Relationship between DNA ploidy patterns and clinicopathological findings in the colonic cancer

Factor		n	Diploid	Aneuploid
Sex	M	55	19(57.6)	36(53.7)
	F	45	14(42.4)	31(46.3)
Histological type	well	45	14(42.5)	31(46.3)
	mode	45	17(51.5)	28(41.7)
	poor	7	1( 3.0)	6( 9.0)
	others	3	1( 3.0)	2( 3.0)
Depth of invasion	m	2	1( 3.0)	1( 1.5)
	sm	4	2( 6.1)	2( 3.0)
	mp	12	2( 6.1)	10(14.9)
	ss(a1)	19	6(18.2)	13(19.4)
	s(a2)	60	21(63.6)	39(58.2)
	si(ai)	3	1( 3.0)	2( 3.0)
Lymphatic vessel invasion	ly 0	9	4(12.1)	5( 7.5)
	1	54	15(45.5)	39(58.2)
	2	26	11(33.3)	15(22.4)
	3	11	3( 9.1)	8(11.9)
Venous invasion	v 0	11	4(12.1)	7(10.4)
	1	61	17(51.5)	44(65.7)
	2	17	8(24.2)	9(13.4)
	3	11	4(12.1)	7(10.5)
INF	$\alpha$	35	16(48.5)	19(28.4)
	$\beta$	54	15(45.5)	40(59.7)
	$\gamma$	11	2( 6.1)	8(11.9)
Lymph node metastasis	n0	60	18(54.5)	42(62.7)
	n(+)	40	15(45.5)	25(37.3)
Liver metastasis	(-)	85	26(78.9)	59(88.1)
	(+)	15	7(21.1)	8(11.9)
Peritoneal dissemination	(-)	95	31(93.9)	64(95.5)
	(+)	5	2( 6.1)	3( 4.5)
Histological stage	0	17	1(50.0)	1(50.0)
	I	37	4(73.3)	11(26.7)
	II	14	12(69.2)	27(30.8)
	III a	13	5(64.3)	9(35.7)
	III b	19	4(63.6)	7(36.4)
Dukes classification	IV	7	7(63.2)	12(36.8)
	A	21	6(18.2)	15(22.4)
	B	36	12(36.4)	24(35.8)
	C	29	9(27.2)	20(29.9)
	D	14	6(18.2)	8(11.9)

( ): %

になるほど PCNA LR は有意の高値を示した ( $p < 0.01$ )。リンパ節転移程度との関連性はなかったが、転移陰性 [n<sub>0</sub>] に比べて、転移陽性 [n (+)] で PCNA LR は高値を示し両群間に有意差を認めた ( $p < 0.01$ )。腹膜播種性転移および肝転移については、転移陽性 P (+)・H (+) と PCNA LR の間に有意差を認めなかった。組織学的進行度では、stage IV 症例を除くと stage が進行するにつれて PCNA LR は高値を示し、stage 0, I と stage II 以上、stage 0, I, II と stage IIIa 以上、stage 0, I, II, IIIa と stage IIIb 以上の間に有意差を認めた ( $p < 0.05$ ,  $p < 0.01$ ,  $p < 0.05$ )。Dukes 分

類では、Dukes' D を除くと stage が進行するにつれて PCNA LR は高値を示し、Dukes' A と Dukes' B 以下、Dukes' A, B と Duens' C, D の間には有意差を認めた ( $p < 0.01$ ) (Table 4)。

Subclass 化における検討では、I ~ IV 群間で組織型、深達度、脈管侵襲、P 因子、H 因子、組織学的に stage において有意差を認めなかった。一方、INF, n 因子、Dukes 分類ではそれぞれ I ~ IV 群間に有意差を認めた ( $p < 0.01$ ,  $p < 0.01$ ,  $p < 0.05$ ) (Table 5)。

6. 累積生存率

大腸癌100例における累積生存率、治癒切除が施行された79例の累積生存率とその各 stage 別の累積生存率についての検討を行った。

1) DNA ploidy pattern と生存率

DD 群に比べて DA 群の予後が悪い傾向を示したものの、両群間において有意差を認めなかった (Fig. 8)。さらに各 stage 別の累積生存率でも有意差を認めなかった。次に DA 群の中でも DNA 量の多寡による生存率の影響を検討するために DA 群を  $1.1 < DI < 1.5$ ,  $DI \geq 1.5$  の 2 群に分けたが、 $DI \geq 1.5$  群が予後不良の傾向を示したものの各群間に有意差を認めなかった (Fig. 9)。

2) PCNA LR と生存率

PCNA LR が60%以上の陽性率を示した症例を H 群、60%未満の症例を L 群として両群間の累積生存率の比較を行ったところ、L 群に比べて H 群が予後不良の傾向を示し両群間に有意差を認めた ( $p < 0.05$ ) (Fig. 10)。しかし、各 stage 別の H 群、L 群別累積生存率では両者間に差を認めなかった。

3) Subclass 化と生存率

I ~ IV 群間の累積生存率は、II, IV, III, I 群の順に予後が良好の傾向を示し、全症例では I 群に比べて IV 群が予後不良の傾向を示し、両群間に有意差を認めた ( $p < 0.05$ ) (Fig. 11)。各 stage 別の累積生存率では有意差を認めなかった。

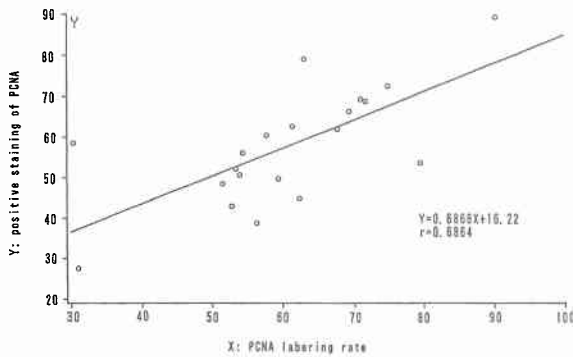
7. 再発との関連について

P<sub>0</sub>, H<sub>0</sub>, n<sub>0</sub>, M (-) の大腸癌に対して治癒切除手術が施行された57症例の局所・転移再発について検討を行った。無再発群は53例、局所・転移再発群は4例 (局所2例、肝1例、リンパ節1例) であった (Table 6)。

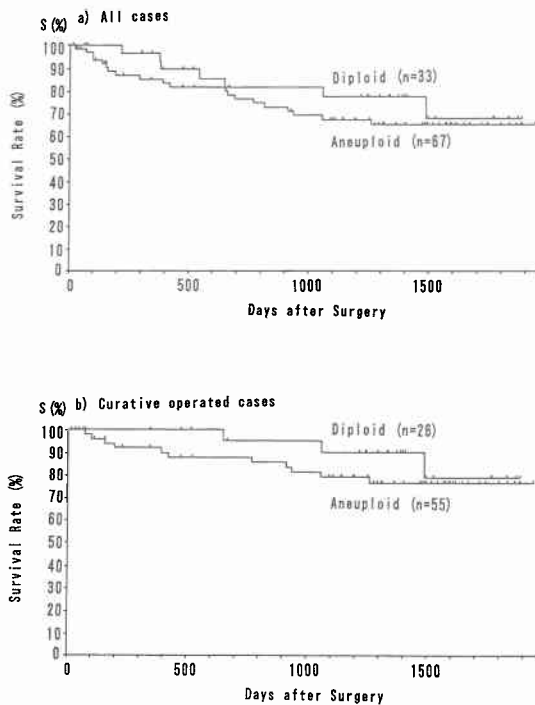
1) DNA ploidy pattern と再発

DD 群と DA 群の両群間において、再発数に有意差を認めなかった。

**Fig. 7** The relationship between PCNA labeling rate and positive staining of PCNA



**Fig. 8** Relationship between DNA ploidy pattern and survival rates



2) PCNA LR と再発

再発数はL群に比べH群で有意に多く、再発群のPCNA LRは、無再発群よりも有意に高値を示した(p<0.05)。

3) Subclass化と再発

無再発群(53例)と局所・転移再発群(4例)との検討ではIとII群間、IIIとIV群間に有意差を認めた(p<0.01)。

**Table 4** Relationship between PCNA labeling rate and clinicopathological findings in the colonic cancer

Factor		n	PCNA LR	
Sex	M	55	60.74±13.80	
	F	45	59.65±15.04	
Histological type	well	45	55.82±14.55	}
	mode	45	63.16±13.27	
	poor	7	70.7 ±13.71	
	others	3	58.75± 4.63	
Depth of invasion	m	2	46.7± 5.51	}
	sm	4	50.83±11.14	
	mp	12	58.13±15.27	
	ss(a1)	19	55.37±13.04	
	s(a2)	60	63.24±13.66	
	si(ai)	3	61.5 ±27.03	
Lymphatic vessel invasion	ly 0	9	53.8 ±11.28	}
	1	54	58.76±14.94	
	2	26	61.90±13.82	
	3	11	68.7 ±11.28	
Venous invasion	v 0	11	55.35±12.62	}
	1	61	59.21±14.08	
	2	17	61.16±15.03	
INF	α	35	53.93±15.83	}
	β	54	62.05±11.85	
	γ	11	72.44±11.03	
Lymph node metasyasis	n0	60	56.25±15.05	}
	n(+)	40	66.40±10.59	
Liver metastasis	(-)	85	59.38±14.64	}
	(+)	15	65.18±11.43	
Peritoneal dissemination	(-)	95	59.98± 4.37	}
	(+)	5	65.3 ±13.27	
Histological stage	0	17	46.7± 5.51	}
	I	37	55.41±14.41	
	II	14	57.35±15.59	
	III a	13	62.99±13.49	
	III b	19	67.72±12.01	
Dukes classification	IV	65	65.1±10.73	}
	A	21	54.44±13.40	
	B	36	57.08±16.46	
	C	29	66.62± 9.99	
	D	14	63.92±12.27	

\* : p<0.01, \*\* : p<0.05

考 察

FCM法の開発により迅速かつ客観的なDNA測定が可能となり悪性腫瘍における核DNA量の意義について詳細に検討されるようになってきた。FCMは核DNA量を測定できるばかりでなく、細胞の種々の抗原量といった他のパラメーターと同時に測定することができる。Two color flow cytometryは、1つの細胞に2種の抗体を用いて二重染色し同時に2つの細胞抗原を測定する手法で、細胞を同時多元的に解析できるのが特徴であり、さらにはmulti-parameter analysisも可能である<sup>9)</sup>。実際、FCMによるmultipar-

**Table 5** Clinicopathological findings in view of DNA ploidy pattern and PCNA labeling rate

Factor		group I	II	III	IV
Sex	M	9(56.2)	10(58.8)	17(51.5)	19(55.9)
	F	7(43.8)	7(41.2)	16(48.5)	15(44.1)
Histological type	well	10(62.5)	4(23.5)	17(51.5)	14(41.2)
	mode	6(37.5)	11(64.7)	13(39.4)	15(44.1)
	poor	0	1( 5.9)	1( 3.0)	5(14.7)
	others	0	1( 5.9)	2( 6.1)	0
Depth of invasion	m	1(6.25)	0	1( 3.0)	0
	sm	2(12.5)	0	2( 6.0)	0
	mp	2(12.5)	0	6(18.2)	4(11.8)
	ss(a1)	4(25.0)	2(11.8)	9(27.3)	4(11.8)
	s(a2)	6(37.5)	15(88.2)	15(45.5)	24(70.6)
	si(ai)	1(6.25)	0	0	2( 5.8)
Lymphatic vessel invasion	ly 0	4(25.0)	0	3( 9.1)	2( 5.9)
	1	9(56.3)	6(35.3)	20(60.6)	19(55.9)
	2	2(12.5)	9(52.9)	8(24.2)	7(20.6)
	3	1( 6.2)	2(11.8)	2( 6.1)	6(17.6)
Venous invasion	v 0	3(18.8)	1( 5.9)	4(12.1)	3( 8.9)
	1	8(50.0)	9(52.9)	24(72.7)	20(58.8)
	2	3(18.8)	5(29.4)	4(12.1)	5(14.7)
	3	2(12.4)	2(11.8)	1( 3.1)	6(17.6)
INF	$\alpha$	10(62.5)	6(35.3)	14(42.4)	5(14.7)
	$\beta$	5(31.3)	10(58.8)	19(57.6)	21(61.8)
	$\gamma$	1( 6.2)	1( 5.9)	0	8(23.5)
Lymph node metasyasis	n0	13(81.3)	5(29.4)	24(72.7)	18(52.9)
	n(+)	3(18.7)	12(70.6)	9(27.3)	16(47.1)
Liver metastasis	(-)	13(81.3)	13(76.5)	31(93.9)	28(82.4)
	(+)	3(18.7)	4(23.5)	2( 6.1)	6(17.6)
Peritoneal dissemination	(-)	15(93.8)	16(94.1)	32(97.0)	32(94.1)
	(+)	1( 6.2)	1( 5.9)	1( 3.0)	2( 5.9)
Histological stage	0	1( 6.3)	0	1( 3.0)	0
	I	4(25.0)	0	7(24.2)	3( 8.8)
	II	7(43.7)	5(29.5)	13(39.4)	14(41.2)
	III a	1( 6.3)	4(23.5)	5(15.2)	4(11.8)
	III b	0	4(23.5)	4( 9.1)	8(11.8)
	IV	3(18.7)	4(23.5)	3( 9.1)	9(26.4)
Dukes classification**	A	5(31.3)	1( 5.9)	11(33.3)	4(11.8)
	B	8(50.0)	4(23.5)	11(33.3)	13(38.2)
	C	0	9(52.9)	8(24.2)	12(35.3)
	D	3(18.7)	3(17.7)	3( 9.2)	5(14.7)

( ) : %, \* : p<0.01, \*\* : p<0.05

ameter 解析を用いた臨床応用例として、婦人科領域での smear を用いた癌検診のスクリーニングがある<sup>10)11)</sup>。最近、細胞の増殖と密接に関連した物質に対する抗体が作製され、通常免疫学的手法によって細胞の増殖能を簡単に知ることが可能になったが、これらの増殖マーカーの細胞レベルでの定量的解析には、客観性のある FCM の利用が便利で、精度さらには測定に要する時間のうえからも有用と考えられる。

細胞核 DNA 量の研究については、Atkin<sup>12)</sup>により細胞核 DNA 量が癌の進展や予後を反映する重要な因子であると報告されて以来、肺癌<sup>13)</sup>、食道癌<sup>14)</sup>、胃癌<sup>15)</sup>においても研究が進められ、臨床病理学的所見とは独立した意味で DPP や予後と密接に関係しているとい

う報告がみられている。大腸癌では、核 DNA 量と臨床病理学的因子との関連については、種々の報告<sup>16)~18)</sup>をみるが、われわれの結果からは、DPP と組織型、壁深達度、脈管侵襲、INF、n 因子、P 因子、H 因子、組織学的 stage、Dukes 分類との間には有意な相関関係を認めず、また DI もいずれの因子とも有意な相関を認めなかった。

また、近年、種々の悪性腫瘍において増殖能や腫瘍関連抗原の発現が、その悪性度と関係するであろうことが報告されてきている<sup>19)</sup>。増殖細胞の指標として、従来<sup>3</sup>H-thymidine (<sup>3</sup>H-TdR) や 5-bromodeoxyuridine (BrdU) による S 期細胞の in vivo 標識が行われてきたが、in vivo 標識は<sup>3</sup>H-TdR による放射性被曝や

Fig. 9 Relationship between DNA index and survival rate

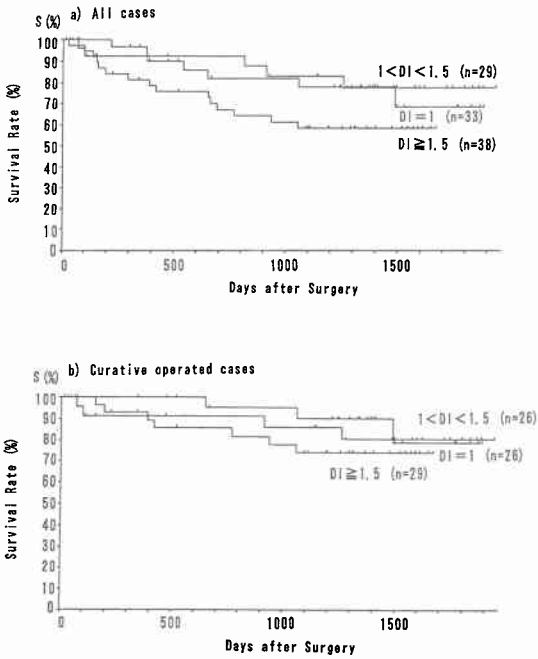


Fig. 10 Relationship between PCNA labeling rate and survival rates

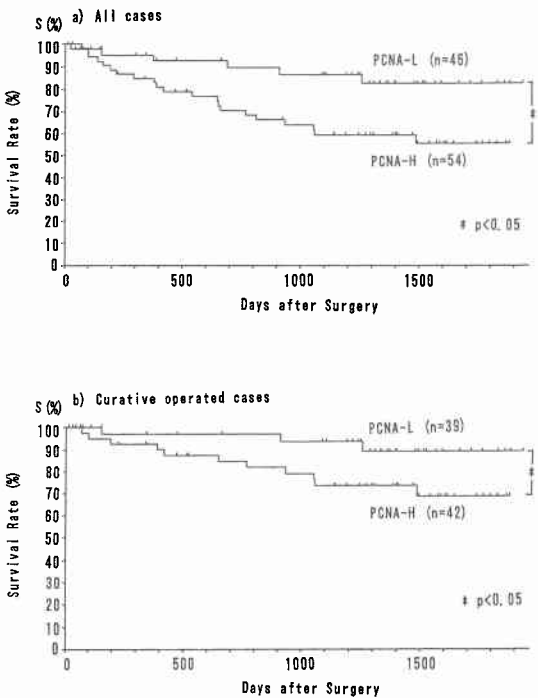
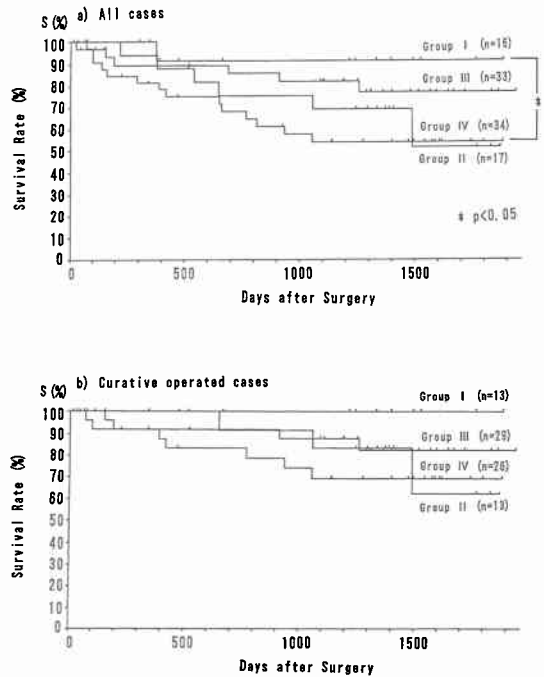


Fig. 11 Survival rates according to I~IV groups by PCNA labeling rate and DNA ploidy pattern



BrdUの発癌性に問題があり、現在では行われていない。これに代って、各種モノクローナル抗体の開発により、DNA合成酵素であるDNA polymerase  $\alpha$ や増殖期核分画抗原であるKi-67など細胞内に存在する蛋白を染色することによって、増殖細胞が識別できるようになってきた<sup>20)21)</sup>。

PCNAはcyclinともよばれる非ヒストン核蛋白質(分子量36kD, 等電点4.8)で、増殖サイクルの主としてG1後期からS期にかけて細胞核内に蓄積し、細胞増殖に直接関与しているDNA合成酵素であるDNA polymerase  $\delta$ の補助因子として機能していることが知られている<sup>1)22)</sup>。抗PCNA抗体は特に免疫組織化学的手法にて広く利用されており、基礎的および臨床分野に有益な情報を提供している。Robbinsら<sup>23)</sup>はヒトの悪性腫瘍においてPCNA陽性細胞の比率が多い腫瘍組織ほど組織学的悪性度や分裂指数が高いことを、西村ら<sup>24)</sup>はヒト大腸腫瘍においてPCNA陽性細胞の比率が腫瘍の異型度と相関していたことを報告している。

そこで、本研究ではFCMでのPCNA LRの測定法について検討した。PCNAの応用上の問題点として、PCNAは固定条件の影響を受けやすく、通常の10%ホ



**Table 6** Recurrence in view of DNA ploidy pattern, PCNA labeling rate or I~IV groups by DNA ploidy pattern and PCNA labeling rate

		n	Recurrence	
			(+)	(-)
DNA ploidy pattern	Diploid	18 (31.6)	2 (11.1)	16 (88.9)
	Aneuploid	39 (68.4)	2 ( 5.1)	37 (94.9)
PCNA LR**		mean	71.55±12.36	54.83±14.90
	L	34 (59.6)	0	34 (100)
	H	23 (40.4)	4 (17.4)	19 (82.6)
group*	I	13 (22.8)	0	13 (100)
	II	5 ( 8.8)	2 (40.0)	3 (60.0)
	III	22 (38.6)	0	22 (100)
	IV	17 (29.8)	2 (11.8)	15 (88.2)

( ): %, \*: p<0.01, \*\*: p<0.05

ルマリンに48時間以上浸漬されたものは染色性の低下を免れないとされている<sup>25)</sup>。中野ら<sup>26)</sup>はエタノールもしくは緩衝ホルマリン固定を行っており、本研究では新鮮生細胞をPFA/メタノール固定し良好の結果を得ている。また、Garciaら<sup>27)</sup>はアルコール系固定パラフィン切片を用いて、免疫組織化学的なPCNA陽性スコアと、同一症例の新鮮材料を用いたFCMで得られた増殖活性とがほぼ一致することを示した。本研究では、PCNA陽性・陰性の境界をFCMで陽性率を算定する際の一般的な方法であるnegative controlにおけるFITC標識最高点とした<sup>28)19)</sup>。この境界により算定されたPCNA LRは、免疫組織化学染色で測定したPCNA陽性率とほぼ一致していることから、サイトグラム上でのこの境界区分は妥当と考えられる。

その結果、PCNA LRは病理組織学的所見とよく相関し、低分化腺癌、リンパ節転移陽性、脈管侵襲陽性中等度以上で有意に高値を示し、INF、組織学的stage、Dukes分類の進んでいるもので、有意に高値を示した。菊山ら<sup>30)</sup>はBrdUを用いた実験腫瘍の検討から、腫瘍倍増時間 (tumor doubling time) はDNA合成期(S期)細胞標識率と負の相関関係を示すと報告しており、DNA合成期細胞標識率が高値の癌は、浸潤が著しく、また増殖速度も速い可能性があると考えられた。Waldmanら<sup>31)</sup>は膀胱癌でBrdU標識率とPCNA標識率は相関しており増殖能も高いことを報告しており、本研究の結果でn (+)群、INFの進んでいるものでPCNA LRが有意に高値を示したことは、増殖速度が速く、浸潤の著しい癌、また高い転移能を持つ癌とPCNA LRが相関することを示唆していると考えられる。

DPPとPCNA LRとの関係を検討すると、DA群がDD群に比べて高いPCNA LRを示したことより、増殖能の高い癌がDAを呈するという報告<sup>32)</sup>と矛盾しない。そこでDPPとPCNA LRから対象をI群-PCNA LR (56%未満)でDD、II群-PCNA LR (56%以上)でDD、III群-PCNA LR (63%未満)でDA、IV群-PCNA LR (63%以上)でDAの4群に分類し検討を行ったところ、II群はI群に比べ、IV群はIII群よりn (+)およびINF、Dukes分類において進行した症例が有意に多く認められ、大腸癌の悪性度の判定にDPPとPCNA LRの併用が意味あるものと考えられた。

予後は、大腸癌では一般にDA群はDD群に比べ予後不良で予後判定の重要な因子の一つとも考えられている<sup>16)32)</sup>。自験例の検討でも、両群間に有意差はなかったがDA群の方がDD群に比べ予後が悪い傾向を示し、また組織学的stageを考慮しても同様の傾向を認めた。また、Petersenら<sup>33)</sup>はDIが1.5前後の腫瘍が予後が最も悪いと報告している。そこで、われわれもDA群のDNA量の多寡による生存率の差について検討した。DAを $1.1 < DI < 1.5$ 、 $DI \geq 1.5$ の2群に分けそれぞれの生存率を解析したところ、 $DI \geq 1.5$ が予後不良の傾向を示したものの2群間に有意差を認めなかった。DNA量が多い腫瘍の予後が悪くなる機序としては、癌の増殖や浸潤、転移を促進させる遺伝子の増幅の関与などが推察されるが未だに明らかにされていない。自験例では、DIとPCNA LRとの間に相関関係を認めなかった。

大腸癌におけるPCNA LRと予後に関する報告は多くはない<sup>34)</sup>。胃癌において、中野ら<sup>26)</sup>はPCNA LR

平均値44%で2群に分けたところ、PCNA LRが44%を越える群は、それ以下の群よりも予後不良の傾向を示したと報告している。本研究の結果では、PCNA LRの平均値である60%以上の陽性率を示した症例をH群、60%未満の症例をL群として両群間の累積生存率の比較を行ったところ、L群に比べてH群が予後不良の傾向を示した。

これまで癌患者の予後を推定し、治療方針の決定を目的とした核DNA量測定論文が多く発表されている。すなわち、生物学的にheterogenousである癌患者のおのおの予後を、高い精度で予測することは、臨床医学上きわめて重要である。現在のところでは、この核DNA量の変異すなわちDPPのみで患者の予後を確実に判断することは不可能であり、DIに加えproliferative fractionの有用性が注目されているものの核DNA量の測定のみで患者の予後を推測することはできないともいわれている<sup>35)36)</sup>。さらに、DPPを考える場合、多くの悪性腫瘍においてDAは高い頻度で見られ、DAのみをとりあげたのでは、当然ながら不十分と思われる。したがって予後判定は、他の因子も考慮して総合的に行うことでより正確となると考えられる。そこで前述のI～IV群間で予後の検討を行ったところ、II群よりもI群、IV群よりIII群で予後良好の傾向が示され、DPPとPCNA LRを併用するとより詳細な予後判定ができる可能性が示唆された。

一方、悪性腫瘍の治癒切除術後の再発は予後を左右する重要な因子であり、また再発危険例を予知し、迅速に適切な治療と経過観察を行うことは临床上重要なことである。本研究の結果では、DD群とDA群の両群間において再発数に差を認めなかったが、PCNA LR-H群は再発例が多く、さらに、I～IV群における無再発例と再発例の検討では、I群よりII群で、III群よりIV群で再発に有意に多く認めたことより、PCNA LRが、高い転移能を持つ癌の鑑別の一指標になり、DD群とDA群の中でもさらに増殖能が高く悪性度の高い癌を見分けることができると考えられた。

以上、癌の生物学的悪性度を知るひとつの手がかりとして、FCMによる腫瘍細胞核DNA量の測定が脚光を浴び大腸癌の予後判定に広く応用されるようになったが、DAの出現は悪性腫瘍に特有な現象ではなく、また、DAの細胞のみからなる悪性腫瘍も少なくないため、核DNA量のみを病変の悪性度の診断に用いるには限界があり、その悪性度と関係するであろう腫瘍の増殖能をPCNA LRで評価することにより予後

判定をより正確にできると考えられた。Two color flow cytometry法による大腸癌の悪性度の報告は少なく、迅速でかつ客観的評価に優れるFCMを用いたDPPとPCNA LRの測定は、大腸癌の悪性度の判定に有用な手段と1つとなる可能性が示唆された。

#### 文 献

- 1) Bravo R, Frank R, Blundell P et al: Cyclin/PCNA is the auxiliary protein of DNA polymerase- $\delta$ . *Nature* 326 : 515-517, 1987
- 2) Hall PA, Levison DA, Woods AL et al: Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) immunolocalization in paraffin sections; An index of cell proliferation with evidence of deregulated expression in some neoplasms. *J Pathol* 162 : 285-294, 1990
- 3) 鈴木孝夫, 岸本浩次, 家泉桂一ほか: 増殖細胞核抗原(PCNA)の基礎的検討. *臨検* 36 : 81-84, 1992
- 4) Goran L, Eng MT, Goran R: Flow cytometric multiparameter analysis of proliferating cell nuclear antigen/cyclin and Ki-67 antigen, a new view of the cell cycle. *Exp Cell Res* 187 : 111-118, 1990
- 5) Goran L, Goran R: Flow cytometric analysis of proliferation associated nuclear antigens using washless staining of unfixed cells. *Cytometry* 13 : 230-240, 1992
- 6) 今堀 巧, 河本圭司: Flow cytometryによるPCNA (proliferating cell nuclear antigen)をマーカーとした増殖期細胞の定量と細胞周期の検討. *Human Cell* 6 : 66-70, 1993
- 7) 大腸癌研究会編: 大腸癌取扱い規約. 改訂第5版. 金原出版, 東京, 1994
- 8) Turnbull RB, Kyle K, Watson FR et al: Cancer of the rectum: The influence of the no-touch isolation technic on survival rates. *Ann Surg* 166 : 420-427, 1967
- 9) 久下 栄: Two-color flow-cytometryの現状とその問題点. *最新医* 39 : 302-307, 1984
- 10) Habbersett MC, Shapiro M, Bunnag B et al: Quantitative analysis of flow microfluorometric data for screening gynecologic cytology specimens. *J Histochem Cytochem* 59 : 766-771, 1973
- 11) 西谷 巖, 井筒俊彦, 市川茂樹ほか: Flow cytometry-computer運動による子宮癌細胞のmultiparameter解析. *癌と治療* 9 : 1164-1178, 1982
- 12) Atkin NB, Kay R: Prognostic significance of modal DNA and other factors in malignant tumors, based on 1465 cases. *Br J Cancer* 40 : 210-221, 1979
- 13) Drings VM, Mattern P, Sonka J et al: Prognostic significance predictive test in non-small cell lung carcinoma. *Cancer* 56 : 1396-1403, 1985
- 14) 長谷川正樹: 食道癌の悪性度に関する研究—フローサイトメトリーを用いた核DNA量の測定—. *日外会誌* 91 : 191-200, 1990
- 15) 関川浩司, 土屋敦雄, 佐藤尚紀ほか: 胃癌の組織型と核DNA量に関する臨床病理的検討. *日消外会誌* 22 : 2784-2788, 1989

- 16) 石川 啓, 田川 泰, 中越 享ほか: 大腸癌核 DNA 量の予後因子としての有用性. 日本大腸肛門病会誌 41: 927-933, 1988
- 17) 安藤善郎, 土屋敦雄, 関川浩司ほか: Flow cytometry による核 DNA 量からみた大腸癌の生物学的悪性度の研究. 日外会誌 9: 1571-1575, 1989
- 18) 船井貞住, 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—DNA ploidy pattern と肝転移の関連性について. 日外会誌 92: 127-132, 1991
- 19) 米村 豊, 沢 敏治, 橋本哲夫ほか: 胃癌における癌関連抗原発現様式と予後. 日消外会誌 20: 2299-2304, 1987
- 20) Gerdes J, Lemke H, Baisch H et al: Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67. J Immunol 133: 1710-1715, 1983
- 21) Tsutsuni Y, Hori S, Onoda N: An immunohistochemical marker for proliferating cells in normal and neoplastic human tissues. Am J Clin Pathol 93: 643-650, 1990
- 22) Mathews MB, Berstein RM, Franza BR et al: Identity of the proliferating cell nuclear antigen and cyclin. Nature 303: 374-376, 1984
- 23) Robbins BA, Vega D, Ogata K et al: Immunohistochemical detection of proliferating cell nuclear antigen in solid human malignancies. Arch Pathol Lab Med 111: 841-845, 1987
- 24) 西村和彦, 細川洋平, 藤本荘太郎ほか: PCNA 免疫と組織化学によるヒト大腸腫瘍の進展に伴う細胞増殖と増殖の場の変化の検討. 日消病会誌 90: 647-654, 1993
- 25) 松野吉宏, 向井 清: 増殖細胞核抗原(PCNA). 病理と臨 9: 879-883, 1991
- 26) 中野 浩, 生目田公夫, 仲吉昭夫ほか: Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA)発現率による胃癌増殖活性の評価—その基礎的検討と臨床応用について—. 日外会誌 94: 580-592, 1993
- 27) Garcia RL, Coltrera MD, Gown AM: Analysis of proliferative grade using anti-PCNA/cyclin monoclonal antibodies in fixed, embedded tissue. Am J Pathol 4: 733-739, 1989
- 28) 高瀬浩造: Flow cytometry を用いた蛍光標識モノクローナル抗体染色陽性細胞の算定方法. 最新医 40: 45-48, 1985
- 29) Kimura H, Yonemura Y, Alan LE: Flow cytometric quantitation of the proliferation-associated nuclear antigen p105 and DNA content in advanced gastric cancers. Cancer 68: 2175-2180, 1991
- 30) 菊山成博: Bromodeoxyuridine および免疫組織化学的手法を用いたヒト癌細胞動態の基礎的, 臨床的研究. 日外会誌 90: 355-363, 1989
- 31) Waldman FM, Carroll PR, Kerschmann R et al: Centromeric copy number of chromosome 7 is strongly correlated with tumor grade and labeling index in human bladder cancer. Cancer Res 14: 3807-3813, 1991
- 32) Scott NA, Rainwater LM, Wieand HS et al: The relative prognostic value of flow cytometric DNA analysis and conventional clinicopathological criteria in patient with operable rectal cancer. Dis Colon Rectum 30: 513-520, 1987
- 33) Petersen SE, Bichel P, Lorentzen M: Flow cytometric demonstration of tumor cell subpopulations with different DNA content in human colorectal carcinoma. Eur J Cancer 15: 383-386, 1979
- 34) Astrid M, Masafumi T, Eleke F: The prognostic significance of proliferating cell nuclear antigen, epidermal growth factor receptor, and mdr gene expression in colorectal cancer. Cancer 71: 2454-2460, 1993
- 35) Hedley DW: Flow cytometry using paraffin embedded tissue; five-years on. Cytometry 15: 229-241, 1989
- 36) 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

### Evaluation of DNA and PCNA by Two Color Flow Cytometric Analysis in Colorectal Cancers

Hiroaki Yoshitake

Second Department of Surgery, School of Medicine, Fukuoka University

Two color flow cytometric analysis of DNA and a labeling rate of proliferating cell nuclear antigen (PCNA LR) was performed on cancer cells of 100 cases with colorectal carcinoma in relation to clinicopathological factors. DNA analysis demonstrated a diploid pattern in 33 cases and aneuploid in 67 cases. The mean of PCNA LR was significantly higher in cases with aneuploid pattern than in those with diploid pattern. Regarding as lymph node metastasis, IFN $\gamma$  and advanced Dukes classification were more frequent in cases with high PCNA LR and aneuploid pattern than in those with low PCNA LR and diploid DNA ( $p < 0.01$ ,  $p < 0.01$ ,  $p < 0.05$ ), respectively. The survival rate was significantly lower in cases with high PCNA LR and aneuploid pattern than in those with low PCNA LR and diploid pattern. These results suggest that DNA-PCNA dual fluorescence analysis by flow cytometry might give effective parameter on evaluation of malignant potency of the colorectal carcinoma.

**Reprint requests:** Hiroaki Yoshitake The Second Department of Surgery, School of Medicine, Fukuoka University  
Fukuoka, 814-80 JAPAN