原 著 IV

大腸癌の悪性度に関する検討

——とくに、癌細胞 DNA, RNA 量と
臨床的進行度について——

長崎大学第1外科

富 田 正 雄	下 山 孝 俊	宮 下 光 世
山 岡 憲 夫	横 田 美 登 志	渡 部 誠 一 郎
石 川 啓	王 志 明	川 渕 孝 明
佐 藤 哲 也	白 石 円 樹	古 川 泰 蔵
三 浦 敏 夫		

大腸癌の悪性度を判定する方法として外科的摘出標本から大腸癌細胞の DNA, RNA index を FACS IV を用いて算出し、臨床的経過と対比して癌細胞の増殖活性度より検討した。癌細胞の活性度より見て直腸癌細胞の DNA, RNA index は結腸癌のそれより高く、悪性度が強いことが示された。また癌細胞の DNA, RNA index は臨床病期進行度ともよく一致し、癌細胞の DNA, RNA index は大腸癌の予後を判定するのに有用な指標であることを明らかにした。

索引用語：大腸癌, DNA, RNA, 悪性度, 予後, 臨床的病期

はじめに

癌に対しては集学的治療の有効性が強調され、その治療体系も多岐にわたるようになった。それとともに、癌細胞そのものの悪性度およびそれに対応する宿主の癌進展に対する防御機構についても種々検討がなされ癌治療成績の向上に努力が払われている。

今回大腸癌の癌細胞の悪性度を癌細胞の DNA, RNA 量より検討し、臨床的所見と対比して癌悪性度について検討したので報告する。

I. 研究対象

長崎大学第一外科で昭和61年1月～12月までに入院、切除した大腸癌32症例の摘出新鮮標本より腫瘍の辺縁部を1g前後採取し、細切し0.2% collagenase 1mlあたり1000単位を加え37°C 2時間処理し、50 μ m ナイロンメッシュで濾過して単離細胞浮遊液を作製した後、70%エタノール、アセトン固定した。測定には Darzynkiewicz らの two step acridine orange 染色法に準じ、FACS IV (Beckton Dickinson 社製)を用いて DNA, RNA 量を同時定量し、検体 DNA, RNA peak 値を正常 diploid cell peak 値で除し DNA/RNA index とし

て検討した。また血中および腫瘍内 CEA 値は、CEA 測定用 kit 第1を用いて測定し、cut-off 値4.0ng/ml として検討した。

摘出標本の病理学的所見は大腸癌取扱い規約に準じ臨床的に検討した結果と対比した。

II. 結 果

大腸癌32症例のうち、結腸癌17例と直腸癌15例について DNA, RNA index をみると、表1に示すように DNA および RNA index とともに直腸癌にやや高い傾向がみられたが有意の差は認めなかった。

DNA, RNA index の変化と臨床的癌進行度との関係を表2に示す。すなわち壁深達度からみると、pm 以上の癌深達例に DNA index は高かった ($P < 0.01$)。Dukes 分類でみると RNA index は Dukes A と B および Dukes A と C との間では Dukes 分類の進行に伴い有意に高値を示した。

分化度との関係をみると、DNA index では高分化型と低分化型の間 ($P < 0.05$) および中分化型と低分化型の間 ($P < 0.01$) で有意の差がみられ、癌細胞集団のもつ生物学的特性を DNA の面からみると細胞分化度とよく関連した。一方、RNA index では高分化型と中分

表 1 結腸癌と直腸癌の DNA, RNA Index 比較
(Mean $\pm$ S.D.)

	DNA Index	RNA Index
結腸癌 (n=17)	1.32 $\pm$ 0.30	3.92 $\pm$ 1.46
直腸癌 (n=15)	1.39 $\pm$ 0.50	4.28 $\pm$ 1.48

表 2 臨床的組織学的癌進行度と DNA, RNA Index

壁 深 達 度	DNA Index	RNA Index
m, sm (n=3)	1.02 $\pm$ 0.03	2.95 $\pm$ 0.29
pm 以深 (n=29)	1.39 $\pm$ 0.41	4.21 $\pm$ 1.49
Dukes 分類	DNA Index	RNA Index
Dukes A (n=6)	1.24 $\pm$ 0.42	3.27 $\pm$ 0.57
Dukes B (n=18)	1.35 $\pm$ 0.39	4.27 $\pm$ 1.73
Dukes C (n=8)	1.43 $\pm$ 0.44	4.30 $\pm$ 1.10
分 化 度	DNA Index	RNA Index
高分化腺癌 (n=11)	1.28 $\pm$ 0.36	3.40 $\pm$ 1.25
中分化腺癌 (n=17)	1.42 $\pm$ 0.40	4.54 $\pm$ 1.35
低分化腺癌 (n=2)	1.03 $\pm$ 0.1	5.02 $\pm$ 2.24
リンパ節転移	DNA Index	RNA Index
n(-) (n=25)	1.34 $\pm$ 0.41	4.03 $\pm$ 1.54
n(+) (n=7)	1.39 $\pm$ 0.40	4.29 $\pm$ 1.21
リンパ管侵襲	DNA Index	RNA Index
ly(-) (n=12)	1.24 $\pm$ 0.42	3.26 $\pm$ 0.96
ly(+) (n=20)	1.42 $\pm$ 0.38	4.58 $\pm$ 1.50
静脈侵襲	DNA Index	RNA Index
v(-) (n=16)	1.32 $\pm$ 0.41	4.01 $\pm$ 1.47
v(+) (n=14)	1.41 $\pm$ 0.41	4.13 $\pm$ 1.51

* P < 0.01

** P < 0.05

化型の間 (P < 0.05) で有意の差がみられ、RNA の面からみても同様に細胞分化度により細胞増殖活性の相異がよく反映された。

リンパ節転移の有無との関係をみると、DNA, RNA index 値ともに有意の差はみられなかった。

脈管侵襲との関係をみると ly で ly(-) と ly(+) の間で ly(+) RNA index は高く有意の差を示した (P < 0.05)。しかし、v 因子では DNA, RNA index で有意の差は認められなかった。

血中 CEA 値と DNA, RNA index との関係をみると、血中 CEA 中 10ng/ml 以下の例と 10ng/ml 以上の例との間には、とくに差は認められなかった。一方、組織的 CEA 値でみると、組織 CEA 10³ 以下、5 $\times$ 10³ 以下、10⁴ 以下、10⁴ 以上の間でも、とくに DNA, RNA 値の間で差は認められなかった。

III. 考 察

腫瘍細胞の DNA 分析には flow cytometry (FCM) 法が導入され、客観的に量的評価が可能となり、同時に短時間に分析ができるようになったため、形態的および機能面からの細胞の種類分けが日常臨床にも応用されるようになった¹⁻³⁾。

とくに細胞分析法にも種々の進歩発展がみとめられ、これらの研究は一層推進されたが^{4,5)}、最近では、腫瘍細胞の増殖活性が予後に密接に関連することも明らかになり⁶⁾、悪性腫瘍の集学的治療法の選択および予後判定に利用されるようになった。

腫瘍細胞の増殖活性度の判定から、その予後および有効な治療法の選択が可能となれば悪性腫瘍に対する治療成績は一段と向上するものと考えられるし、その実施の意義は大きいものと期待される。

悪性腫瘍の予後判定に関する指標として、FCM の利用は cell cycle の上で high S-phase であること、および高い DNA index を示すことなどで判定され、肺癌、乳癌、膀胱癌、前立腺癌、大腸癌などに試みられているが、未だ、必ずしも意見の一致を見ていないのが現状である^{8,9)}。

腫瘍細胞の悪性度判定には、aneuploidy および high S-phase 値が短期間の生存期間を予知するのに有用な指標となることをリンパ腫について Blick ら¹⁰⁾ により検討されているが、high RNA index も同様に予後判定に重要な意義があることが示唆されている¹¹⁾。

今回の検討では大腸癌と直腸癌についてみると、直腸癌に DNA および RNA index は高く悪性細胞の増殖活性度は高い傾向が示された。しかも、臨床分類による進行度として壁深達度には DNA index が Dukes 分類の進行度には RNA index がより相関する傾向が見られた。このことは DNA index は病期進行度に一致し、その予後とくに予後不良例を予知する指標となりうると考えられた。

一方、RNA index は Dukes 分類によく一致したことから病期進行に反映された細胞異型度および細胞の増殖活性に関連することが示唆された。

乳癌細胞について Meyer ら¹²⁾により生存率と % S 期細胞との間に密接な関連があることが報告されているが % S 期細胞と病期進行度とはよく相関することを考え合わせると RNA index も有力な予後判定の指標となるものと考えられる。

また組織学的細胞分化型を高分化型、中分化型および低分化型に分けて DNA, RNA index との関係を検討し、高分化型と中ないし低分化型の間には DNA,

RNA index とともに相関することが認められた。

癌進行の一過程と考えられる組織学的脈管侵襲度と DNA, RNA index との関連性は見出されなかったが、今後さらに多くの症例についてより適確に予後を判定するために DNA, RNA index の意義について検討する必要がある。

むすび

切除された結腸癌17例と直腸癌15例について FACS IVを用いて癌細胞の DNA, RNA index を算出し臨床的進行度と比較検討し予後判定の指標としての意義について考察した。

1) 直腸癌細胞の DNA, RNA index は結腸癌のそれより高く、強い悪性度を示した。

2) 臨床的癌進行度として癌の壁深達度、Dukes 分類および細胞分化型とは DNA, RNA index はよく相関し、悪性度および予後判定の有力な指標となることが判った。

しかし、DNA, RNA index おおのこの意義についてはさらに症例を重ねて検討する必要がある。

文 献

- Gohde W, Dittrich W : Impulsfluorometrie Ein neuartiges Durchfluss verfahren zur ultraschnellen Mengen bestimmung von Zellinhaltsstoffen. *Acta Histochem* 10 : 429-237, 1971
- Kamentski LA, Melamed MR, Derman H : Spectrophotometer : New instrument for ultrarapid cell analysis. *Science* 150 : 630-631, 1965.
- Van Dilla MA, Trujillo TT, Mulaney PF et al : Cell microfluorometry : a method for rapid fluorescence measurement. *Science* 163 : 1213-1214, 1969.
- Crissman HA, Mulaney PF, Steinkamp JA : Methods and application of flow systems for analysis and sorting of mammalian cells. *Methods Cell Biol* 9 : 179-246, 1975.
- Crissman HA, Steinkamp JA : Rapid simultaneous measurement of DNA, protein and cell volume in single cells from large mammalian cell populations. *J Cell Biol* 59 : 766-771, 1973.
- Moran RE, Straus MJ : Labeling indices of human lung cancer : Correlation with histologic type and survival. *Analyt Quant Cytol* 5 : 250-254, 1983.
- Johnson TS, Valdivieso M, Barlogie B et al : Flow cytometric ploidy and proliferative activity in human small cell lung carcinomas : Potential diagnostic and prognostic features. *Proc Am Assoc Cancer Res* 24 : 124, 1983.
- Raber MN, Barlogie B, Latreille J et al : Ploidy proliferative activity and estrogen receptor content in human breast cancer. *Cytometry* 3 : 36-41, 1982.
- Wolley RC, Schreiber K, Koss LG et al : ZNA distribution in human colon carcinoma and its relationship to clinical behavior. *J Natl Cancer Inst* 69 : 15-22, 1982.
- Blick MB, Barlogie B, Hagemester F et al : Cytometry of malignant lymphoma : Comparison with histopathology and prognostic implications. *Proc Am Assoc Cancer Res* 24 : 127, 1983.
- Barlogie B, Alexanian R, Geham EA et al : Marrow cytometry and prognosis in myeloma. *J Clin Invest* 72.
- Meyer JS, Freidman E, Mc Crate MM et al : Prediction of early course of breast carcinoma by thymidine labeling. *Cancer* 51 : 1879, 1983.

Malignant Potential of Colon Cancers in Relation to Cellular DNA and RNA Content

M. Tomita, T. Shimoyama, K. Miyashita, N. Yamaoka,
M. Yokota, S. Watabe, H. Ishikawa, S. Oh, T. Kawabuchi,
T. Sato, E. Shiraishi, T. Furukawa and T. Miura
The First Department of Surgery, Nagasaki University
School of Medicine, Nagasaki

In order to evaluate the degree of malignancy of colon cancer, we attempted to measure the tumor cellular DNA and RNA content using FACS IV. The indices of DNA and RNA in cancer cells taken from surgical specimens were closely correlated with the grade of clinical staging and prognosis.

In conclusion, the measurement of DNA and RNA indices in colon cancer cells is valuable for the prediction of prognosis.

(昭和62年12月1日受付)