フローサイトメトリーによる鼻副鼻腔乳頭腫の核 DNA 量解析

奈良県立医科大学耳鼻咽喉科学教室 (主任: 松永 喬教授)

金田 宏 和, 鶴田 至 宏, 上田 和 孝, 田 中 治
宮 原 裕, 松 永 喬

FLOW CYTOMETRIC ANALYSIS OF DNA PLOIDY IN NASOSINAL PAPILLOMA

HIROKAZU KANATA, M.D., YOSHIHIRO TSURUTA, M.D., KAZUTAKA UEDA, M.D.
OSAMU TANAKA, M.D., HIROSHI MIYAHARA, M.D. and TAKASHI MATSUNAGA, M.D.

Department of Otolaryngology, Nara Medical University, Nara

Using paraffin embedded specimens taken from 32 patients with histologically benign nasosinal papillomas, we conducted nuclear DNA analysis by flow cytometry and studied the biological degree of malignancy in this disease.

Aneuploidy, which is frequently observed in malignant tumors was not seen in any of these nasosinal papilloma cases. Age did not affect either S+G₂M % or polyploid %, two parameters that reflect cell proliferation capacity. Both parameters, S+G₂M % and polyploid %, were higher in inverted papillomas which are more likely to become malignant than epithelial papillomas. In recurrent cases of nasosinal papilloma both S+G₂M % and polyploid % were higher than in nonrecurrent cases. Moreover, the polyploid % was significantly different, supporting speculation that this can be used as a parameter for predicting recurrence of nasosinal papilloma.

Key words: フローサイトメトリー, 鼻副鼻腔乳頭腫, 核 DNA 量

A 95-0674-33241

緒 言

鼻副鼻腔に発生する乳頭腫は、組織学的には良性腫瘍でありながら再発し易く、とくに inverted papilloma は、臨床的には前癌病変とみなされている。しかし、従来の病理組織学的方法のみでは、本症の臨床的な悪性度を評価できず、本疾患の悪性度を評価するには、これらに加えて細胞増殖や異型性を評価する方法が必要と考えられる。1983年に Hedley ら¹⁾ によって報告されたパラフィン包埋標本を用いた flow cytometry による核 DNA 量解析は、病理組織標本で示されない腫瘍の特徴を評価しうるものとして、今日ではすでに評価を受けている。そこで今回、鼻副鼻腔乳頭腫の核 DNA 量を解析し、本疾患の生物学的悪性度を検討したので報告する。

対 象

1980年から1989年までの10年間に当科で手術治療を行った鼻副鼻腔乳頭腫症例のうち、DNA histogramが解析可能であった32例を対象とした。このうち19例は、パラフィン包埋標本で正常粘膜部分のみを trimming し、正常粘膜群として解析し対照群とした。乳頭腫群の内訳は男性23例、女性9例で、平均年齢は53.5歳。正常粘膜群は男性14例、女性5例で、平均年齢は52.9歳であった。

方 法

1) 単離核浮遊液の作製

単離核浮遊液の作製は、すでにわれわれの報告²⁾した方法を用いて行った。まず、パラフィン包埋ブロックを HE 染色標本と比較しながらメスにて壊死や挫滅部分の少ない腫瘍部分のみを trimming し、マイクロームにて 40 μ m 切片を 3 ないし 4 枚作製した。つい

で薄切り切片をキシレンにて10分間室温下で脱パラし、100%, 95%, 70% (各10分) のエタノール、蒸留水で再水和した。さらに0.5%ペプシン液を加え37°Cで60分間処理後、これに0.3%トリプシン液を加え室温で10分間の処理後、トリプシンインヒビター・リボヌクレアーゼ液を加え室温で20分間処理し、細胞単離、裸核化した。これらの試料を遮光状態で150 μ g/ml propidium iodide (以下 PI と略す) にて DNA の蛍光染色を行った。最後に、遮光状態で42 μ m ナイロンメッシュで濾過し、FACScan (Becton Dickinson 社製) によって10000個を測定し、Consort 30 (同社製) により核 DNA 量を解析した (図1)。

また、腫瘍組織と同一条件下で固定、包埋された正常上顎洞粘膜を同様の操作で単離測定し、比較対照検体とした。

2) DNA histogram の解析

DNA histogram の解析には、DNA aneuploidy と後述する S+G₂M %, polyploid % の3つのパラメーターを用いた。まず、DNA aneuploidy の判定は①2つのピークの存在、②それぞれに対応する G₂M 期細胞の存在、③ cytogram 上でそれぞれが核径および DNA 量の異なる細胞集団であること、の以上の条件を満たすものとした。図2に DNA diploidy の histogram と cytogram を示した。

S 期および G₂M 期の細胞数の割合を S+G₂M % とし、これは Becton Dickinson 社の DNA 解析用の software (SFIT[®] および SOBR[®]) を用い、数学的に検体内の G₁ 期、S 期、G₂M 期の割合 (生長曲線) を測定した。また、得られた生長曲線の distribution region、つまり diploid (2c) より高い DNA content をもつ核数の割合、すなわち4倍体より多い核 DNA 量を持つ細胞の割合を測定して polyploid % とした。

核 DNA histogram の比較の指標としては、coefficient of variance (以下 CV 値と略す) を用いた。

結 果

1. 正常粘膜群と乳頭腫群の各種パラメーターによる比較

DNA histogram は平均 CV 値が7.0 $\pm$ 1.6%で、乳頭腫および正常粘膜全例で DNA aneuploidy は1例も認められなかった。平均 S+G₂M % は19.6 $\pm$ 7.9%, 平均 polyploid % は8.9 $\pm$ 5.4%で、比較に用いた正常粘膜群のそれぞれの値より有意に高値であった (P<0.01) (表1)。以下、S+G₂M %, polyploid %

図1 単離核浮遊液の作製方法と染色法

の2つのパラメーターにおいて、乳頭腫症例の各背景因子との関連を検討した。

2. 年齢差の各種パラメーターによる比較

年齢別に平均 S+G₂M %, 平均 polyploid % を検討したところ、両者とも各年齢間での差は認められなかった (図3)。したがって、今回の結果では、加齢によっても乳頭腫細胞の核 DNA 量の差は認められないと思われた。

3. inverted papilloma と epithelial papilloma の各種パラメーターによる比較

鼻副鼻腔乳頭腫は、病理組織学的に内向性への発育成分の多い inverted papilloma と、外向性への発育成分の多い epithelial papilloma に分類され (図4)、前者では癌化傾向があるとされている。一般の病理組織像では両者が混在することが多いが、摘出腫瘍の主成分がいずれであるかで乳頭腫を2群に分け、S+G₂M %, polyploid % の両パラメーターで比較した。いわゆる epithelial papilloma の平均 S+G₂M % は19.1 $\pm$ 6.5%, 平均 polyploid % は7.6 $\pm$ 5.0%で、一方、inverted papilloma の平均 S+G₂M % は22.8 $\pm$ 10.9%, 平均 polyploid % は10.5 $\pm$ 5.7%で、両パラメーター共に inverted papilloma で高い値をとり、危険率10%では有意の差があった (図5)。

4. 鼻副鼻腔乳頭腫の局所再発の有無についての各種パラメーターによる比較

手術後、局所の再発を認めたのは5例であり、その

図2 DNA histogram と cytogram
(症例: 36歳, 男性, 鼻副鼻腔の inverted papilloma)

表1 対象例の検討事項

	乳 頭 腫 群	正常粘膜群
総 数	32	19
性: 男	23	14
女	9	5
平均年齢 (歳)	53.5	52.9
平均CV (%)	7.0±2.1	6.3±1.8
aneuploid	0	0
S+G ₂ M (%)	19.6±7.9	11.8±6.8
polyploid (%)	8.9±5.4	2.3±1.9

うち epithelial papilloma は 2 例であった。

局所再発を認めた症例では、平均 S+G₂M % は 25.6±9.4%, 平均 polyploid % は 13.5±4.8% で、一方、再発のなかった症例では、平均 S+G₂M % は 19.3±10.0%, 平均 polyploid % は 6.9±4.7% であり、局所再発例では両パラメーター共に高い値をとり、S+G₂M % では危険率 10% で、polyploid % では危険率 5% で有意の差があった (図 6)。

考 察

Flow cytometry の出現により従来の方法に比べより簡単に、また迅速に核 DNA 量が測定できるようになり、臨床レベルでも腫瘍細胞の生物学的特性を検討できるようになった。1983年に Hedley らの報告¹⁾により新鮮標本の検討だけでなく、パラフィン包埋標本を用いても核 DNA 量解析が可能であることが判明

図3 S+G₂M % と polyploid % の年齢別比較

した。このことにより多施設の検体などの多数の症例を retrospective に、より短期間に核 DNA 量を測定できるだけでなく、DNA histogram の解析結果と組織学的悪性度、臨床学的悪性度との相関についても検

図4 鼻副鼻腔乳頭腫の病理組織 (H.E. 染色, $\times 200$)
(A) inverted papilloma
(B) epithelial papilloma

図5 S+G₂M%とpolyploid%の病理組織学的比較
(A) inverted papilloma
(B) epithelial papilloma

討が可能となり,以後多数の報告^{3)~6)}がなされている。

検討に用いたパラフィン包埋標本の固定条件について山崎⁷⁾は,ホルマリン固定までの時間が24時間以内,ホルマリン固定時間が2週間以内のものがDNA indexの検索に有効であり,ホルマリン固定時間が長くなるとPIによる核の染色性が低下するためにピー

クチャンネル数が減少し,その低下の仕方は固定時間にほぼ平衡であったと報告しているが,今回のわれわれが用いた検体は,ホルマリン固定期間やホルマリン固定までの時間の不明なものが多く,CV値が不良であったものは除外した。

近年,悪性腫瘍の細胞学的レベルでの検討は数多く

図6 局所再発の有無と S+G₂M %, polyploid %

行われているが、良性腫瘍の核 DNA 量解析はいまだ報告が少ない。今回、鼻副鼻腔乳頭腫の DNA histogram の解析により、腫瘍細胞の増殖能指数と組織学的悪性度、臨床学的悪性度との相関について比較検討した。従来より鼻副鼻腔乳頭腫は良性腫瘍と定義されているが、鼻副鼻腔乳頭腫を前癌病変として考えた報告^{8)~13)}も多い。また、潰瘍性大腸炎¹⁴⁾や前白血病状態¹⁵⁾¹⁶⁾¹⁷⁾などの前癌病変において、aneuploidy が認められたとする報告もされている。しかし、われわれの基準では、得られた鼻副鼻腔乳頭腫の DNA histogram には DNA aneuploidy を認めなかった。そこで、細胞周期の解析を応用した。すでに、腫瘍細胞の自律性増殖は細胞周期における増殖相細胞の増加として反映されるとの報告⁴⁾¹⁸⁾や、腫瘍の成長を決定する因子は全細胞中の全増殖相細胞数の割合であると言われており¹⁹⁾、腫瘍細胞の増殖能の指標として DNA 合成期である S 期細胞の割合や、S 期を分裂前休止期と分裂期の和である G₂M 期に加えた S+G₂M 期細胞の割合が用いられている²⁰⁾²¹⁾。また、3C 以上や 4C 以上の細胞出現率を増殖能の指標とした報告²¹⁾もある。今回われわれは、パラフィン包埋標本上で腫瘍細胞を比較的厳密に trimming することで、得られた DNA histogram が腫瘍細胞の特性を反映していると考え、S+G₂M 期細胞の割合を S+G₂M %、4C より多い核 DNA 量を持つ細胞の割合を polyploid % とし、この 2 つのパラメーターによって乳頭腫の悪性度評価を行った。

鼻副鼻腔乳頭腫の平均 S+G₂M % は $19.6 \pm 7.9\%$ 、平均 polyploid % は $8.9 \pm 5.4\%$ で、正常粘膜群では、平均 S+G₂M % は $12.1 \pm 6.3\%$ 、平均 polyploid % は $2.6 \pm 1.9\%$ であった。それぞれのパラメーターにおい

て、正常粘膜群に比べて乳頭腫群は有意に高値であり、このことは乳頭腫細胞の増殖能が亢進していることと、2 つのパラメーターにより増殖能の評価が可能であることを示している。

年齢別に S+G₂M %、polyploid % を検討したところ、両者とも各年齢間での差は認められなかった。従来、加齢によって核 DNA 量の異常が認められるとの報告²²⁾もあるが、今回のわれわれの結果では、加齢によっても核 DNA 量の差は認められなかった。したがって、S+G₂M %、polyploid % の両パラメーターは、加齢による影響は受けず、細胞増殖能そのものを反映できたものと思われた。

1963年に Norris¹²⁾ が病理組織形態により乳頭腫を外向性に発育する epithelial papilloma と、内向性に発育する inverted papilloma との 2 つに分類し、その後も同様の分類を用いた報告⁸⁾¹¹⁾²³⁾ がなされている。inverted papilloma では癌との関連についての報告^{8)~13)}が多く、1960年から1985年までに報告された鼻副鼻腔乳頭腫症例を検討した吉田ら²⁴⁾の報告では、癌化した発育形態は全例 inverted papilloma であり、癌化は inverted papilloma に特異的であったと報告している。また、宮原ら²⁵⁾は inverted papilloma と扁平上皮癌の合併例を報告している。今回のわれわれの検討でも、いわゆる epithelial papilloma に比べて inverted papilloma では、S+G₂M %、polyploid % の両パラメーターともに高い結果を得た。これは inverted papilloma の方が epithelial papilloma に比べ高い細胞増殖能を持っている可能性を示し、inverted papilloma は epithelial papilloma とは単に組織学的な発育形態の違いだけではなく、細胞レベルでの生

物学的性状に違いがあることを意味していた。癌症例では増殖指数や異型性が高まっていることが予想され、すでに、 $S+G_2M\%$ 、 $polypl\text{oid}\%$ の増加は癌化過程を意味すると報告²⁾されている。したがって、これら両パラメーターが高値である *inverted papilloma* では、より癌化傾向が高いと言える。

従来より鼻副鼻腔乳頭腫は組織学的に良性でありながら再発を繰り返し、時には骨破壊をも伴い、真の良性腫瘍とは区別して考えなければならない腫瘍として注目されてきた。その局所再発について検討したところ、局所再発を認めた症例では再発のなかった症例に比べ、 $S+G_2M\%$ 、 $polypl\text{oid}\%$ の両パラメーター共に高い値をとり、 $polypl\text{oid}\%$ では危険率5%で有意の差を認めた。再発とDNA histogramとの関係については、吉田²¹⁾の甲状腺癌における検討で、3C以上の細胞が有意に増加しており、4C以上の細胞も増加する傾向が認められ、さらに3C以上の細胞出現率と手術より再発までの期間には負の相関が認められたと報告している。これら悪性腫瘍の予後に関連した報告は多く、DNA histogramの検討は予後を推測する重要な指標として期待されている。一方、良性腫瘍におけるDNA histogramの細胞増殖能と予後を検討した報告は前述のように少ないが、今回のわれわれが得た結果によると、腫瘍部分をtrimmingして得られたDNA histogramを用いれば、細胞増殖能を示す $S+G_2M\%$ 、 $polypl\text{oid}\%$ の両パラメーターは、鼻副鼻腔乳頭腫の再発に関する予後を推測し得るものと考えられた。また、われわれの32症例で、前述の発育形態と局所再発との関連をみたところ、碓井²⁶⁾や御手洗ら²⁷⁾の報告同様、再発率について *inverted papilloma* と *epithelial papilloma* に差は認められなかった。乳頭腫はもともと緩徐な発育を示す良性腫瘍であり、われわれの約10年ほどの経過観察では、腫瘍の残存があっても顕性化し得ないのかもしれない。しかし、局所再発に関しては、組織学的な悪性度よりもDNA histogramによる細胞レベルでの増殖能の評価が再発を予想する重要な指標であると考えられた。

結 語

乳頭腫32例を対象とし、そのうち正常粘膜部分をtrimmingした19例の正常粘膜群を対照として、核DNA量解析を行い、以下の結果を得た。

- 1) DNA aneuploidyは1例も認めなかった。
- 2) 対照として用いた正常粘膜上皮部分のDNA

histogramから得られた平均 $S+G_2M\%$ 、平均 $polypl\text{oid}\%$ に比べ、乳頭腫のそれは有意に高値であった。

3) $S+G_2M\%$ 、 $polypl\text{oid}\%$ の両パラメーターは年齢に応じて変化はしていなかった。

4) $S+G_2M\%$ 、 $polypl\text{oid}\%$ の両パラメーターは *inverted papilloma* において、*epithelial papilloma* に比べ高値であった。

5) 再発例では非再発例に比べ、 $S+G_2M\%$ 、 $polypl\text{oid}\%$ の両パラメーターは高値であり、 $polypl\text{oid}\%$ では有意差を認めた。

文 献

- 1) 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, 1983.
- 2) 鶴田至宏: ホルマリン固定パラフィン包埋検体を用いたフローサイトメトリーによる頭頸部癌の核DNA量解析—悪性度評価と鼻副鼻腔腫瘍における癌化過程の検討—. *日耳鼻* 94: 561-576, 1991.
- 3) Hoshino T, Nomura K, Wilson CB et al: The distribution of nuclear DNA from human brain-tumor cells. *Flow cytometric studies. J Neurosurg* 49: 13-21, 1978.
- 4) Kawamoto K, Herz F, Wolley RC et al: Flow cytometric analysis of the DNA distribution in human brain tumors. *Acta Neuropathol (Berl)* 46: 39-44, 1979.
- 5) Lehman J, Krug H: Flow-through fluorophotometry of different brain tumors. *Acta Neuropathol (Berl)* 49: 123-132, 1980.
- 6) Mørk SJ, Laerum OD: Modal DNA content of human intracranial neoplasms studied by flow cytometry. *J Neurosurg* 53: 198-204, 1980.
- 7) 山崎弘資: フローサイトメトリーによる食道癌及び大腸癌のDNA ploidyの解析—予後、病理所見、家族歴との関連について—. *日外会誌* 8: 1186-1195, 1989.
- 8) Hyams VJ: Papillomas of the nasal cavity and paranasal sinuses. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 80: 192-206, 1971.
- 9) 石橋敏夫: 鼻副鼻腔の乳頭腫. *日耳鼻* 90: 1927-1932, 1987.
- 10) 酒井俊一: 鼻・副鼻腔癌—頭頸部癌と予防医学—. *JOHNS* 4: 1106-1108, 1988.
- 11) Snyder RN and Perzin KH: Papillomatosis of nasal

- cavity and paranasal sinuses. (Inverted papilloma, squamous papilloma) clinicopathologic study. *Cancer* 30: 668-690, 1972.
- 12) Norris HJ: Papillary lesions of the nasal cavity and paranasal sinuses. Part II inverting papillomas, a study of 29 cases. *Laryngoscope* 73: 1-17, 1963.
 - 13) 上野員義, 河野もと子, 松根彰志, 李 延権, 昇 卓大 他: 鼻副鼻腔乳頭腫の臨床病理学的検討—細胞外成分に着目して—, *耳鼻臨床* 79: 1261-1267, 1986.
 - 14) Hammarberg C, Slezak P, Tribukait B et al: Early detection of malignancy in ulcerative colitis. *Cancer* 53: 291-295, 1984.
 - 15) Barlogie B, Walter H, Gary S: Correlation of DNA distribution abnormalities with cytogenetic findings in human adult leukemia and lymphoma. *Cancer Res* 37: 4400-4407, 1977.
 - 16) Pedersen-Bjergaard J, Vindeløv L, Philip P et al: Varying involvement of peripheral granulocytes in the clonal abnormality-7 in bone marrow cells in preleukemia secondary to treatment of other malignant tumors. Cytogenetic results compared with results of flow cytometric DNA analysis and neutrophil chemotaxis. *Blood* 60: 172-179, 1982.
 - 17) Montecucco C, Riccardi A, Traversi E et al: Proliferative activity of bone marrow cells in primary dysmyelopoietic (preleukemic) syndromes. *Cancer* 52: 1190-1195, 1983.
 - 18) 渡辺郁雄: 新しい技法による細胞動態の研究. *遺伝* 34: 197, 1980.
 - 19) Hoshino T, Wilson CB: Cell kinetic analyses of human malignant brain tumors (Gliomas). *Cancer* 44: 956-962, 1979.
 - 20) Hedley DW, Rugg CA, Gelber RD: Association of DNA index and S-phase fraction with prognosis of nodes positive early breast cancer. *Cancer Res* 47: 4729-4735, 1987.
 - 21) 吉田 明: 甲状腺癌における核 DNA 量と悪性度についての研究. *日外会誌* 85: 1261-1294, 1983.
 - 22) 加治和彦: 細胞加齢と DNA 量, 太田和雄 他編: フローサイトメトリー—手技と実際—, 蟹書房, 東京, 1984, 311-325頁.
 - 23) Oberman HA: Papillomas of the nose and paranasal sinuses. *Am J Clin Pathol* 42: 245-258, 1964.
 - 24) 古田 康, 田中克彦, 木村昌一, 寺山吉彦: 鼻副鼻腔の inverted papilloma—とくに癌— 1064, 1986.
 - 25) 宮原 裕, 松永 喬, 田中 治, 藤田信哉, 北奥恵之 他: 同一鼻・副鼻腔に共存した inverted papilloma と癌の 2 症例. *耳鼻臨床 補* 37: 274-279, 1990.
 - 26) 碓井康子: 鼻・副鼻腔乳頭腫症19例の臨床病理学的検討. *日耳鼻* 87: 665-673, 1984.
 - 27) 御手洗佳代子, 佃 守, 澤木修二, 北村 均: 鼻副鼻腔粘膜の乳頭腫—15例の臨床的, 病理学的観察—, *耳鼻* 29: 789-795, 1983.

本論文の要旨は第29回日本鼻科学会(平成2年9月)において発表した。

(1991年9月24日受稿 1991年11月19日受理)

別刷請求先 〒634 橿原市四条町840

奈良県立医科大学耳鼻咽喉科学教室 金田宏和