原 著

肺小細胞癌細胞の核形態と核 DNA 量の関係

——化学療法の効果との関連から——

北海道大学医学部第1内科¹⁾, 北海道大学医学部附属病院病理部²⁾阿部 庄作¹⁾ 牧村 士郎¹⁾ 板橋 孝一¹⁾永井 達夫¹⁾ 常田 育宏¹⁾ 川上 義和¹⁾荒川三紀雄²⁾ 遠藤 隆志²⁾ 清水 幹雄²⁾

肺小細胞癌 18 症例の経気管支擦過細胞を用いて核クロマチンの形態と核 DNA 量ヒストグラムパターンとの関係について、化学療法に対する有効性の面から検討した。核 DNA 量の多い B type を示した 7 症例のうち、核クロマチンが微細顆粒状で均一に分布している細胞の多い症例は 6 例と多く、化学療法に対する反応性も良好であった。核 DNA 量の少ない A type を示した 11 症例のうち、核クロマチンが微細顆粒状で均一に分布している細胞の多い症例は 5 例、粗大顆粒状で不均一に分布する細胞の多い症例は 6 例であった。微細顆粒状で均一に分布する細胞の多い症例でも化学療法に対する反応性は不良であった。核クロマチンが微細顆粒状で均一に分布する細胞の多い肺小細胞癌は核 DNA 量も多く、化学療法に対する反応性も比較的良好であった。しかし、核 DNA 量ヒストグラムが A type を示した肺小細胞癌は関連しなかった。肺小細胞癌症例の化学療法に対する反応性などの特異な臨床病態を推定するには核クロマチン形態のみの検討では十分とはいえず、核 DNA 量の測定、分析がより重要であることが示された。

Key words : Small cell carcinoma of the lung—Nuclear DNA content—Nuclear chromatin pattern—Clinical behavior—Response to chemotherapy

I. はじめに

肺小細胞癌は増殖速度、遠隔臓器への転移が非常に速く、肺癌のなかでは最も臨床的悪性度の高い腫瘍であ

Nuclear DNA content of small cell carcinoma of the lung and its relationship to the cytomorphic features

Shosaku, ABE, M.D., Shiro MAKIMURA, M.D., Koichi ITABASHI, M.D., Tatsuo NAGAI, M.D., Yasuhiro TSUNETO, M.D. and Yoshikazu KAWAKAMI, M.D.

The First Department of Internal Medicine, Faculty of Medicine, Hokkaido University Sapporo

Mikio ARAKAWA, C.T., I.A.C., Takashi ENDO, C.T., I.A.C. and Mikio SHIMIZU, C.T., I.A.C.

Department of Pathology, Hokkaido University Hospital

論文別刷請求先 ☎060 札幌市北区北 15 条西 7 丁目 北海道大学医学部第1内科 阿部庄作

昭和 60 年 3 月 14 日受付

昭和 60 年 10 月 11 日受理

る。しかし、一方で化学療法、放射線療法に対する感受性が高く、治療により腫瘍は急速に縮小し、消失することもある。このような肺小細胞癌患者の臨床病態を推測しようとした試みが核クロマチン形態との関連からなされてきた^{5,7,9)}。また、顕微分光測光法、Flow cytometer を用いて肺小細胞癌細胞の核 DNA 量を測定し、化学療法に対する効果、患者の予後などの臨床病態との関連も検討されている^{1-3,12)}。核 DNA 量を測定、分析することは肺小細胞癌細胞の物質代謝活性機能の特徴をより客観的にとらえることが可能であり、肺小細胞癌の特異な臨床病態を推測するための有力な方法である。しかし、核 DNA 量の測定は手技的に繁雑であり、日常の臨床に際して一般的な方法とはなり得ない現状にある。今回、肺小細胞癌患者の擦過細胞を用いて核クロマチン形態と核 DNA 量を同一標本で対比検討し、それらの相互関係、化学療法に対する反応性からみた関係について検討した。

Fig. 1 Even distribution of fine granular chromatin throughout the nuclei (Papanicolaou's stain, $\times 1,000$)

Fig. 2 Coarsely granular chromatin distributed sparsely throughout the nuclei (Papanicolaou's stain, $\times 1,000$)

(a)

(b)

Fig. 3 Typical nuclear DNA histogram pattern in patients with small cell carcinoma of the lung. cell N : measured cell numbers, A.U. : arbitrary unit. Hatched bars indicate DNA histogram in lymphocytes

II. 対象と方法

対象は病巣擦過細胞診, 経気管支生検により肺小細胞癌と診断し, 核クロマチン形態の観察, 核 DNA 量測定のために十分量の癌細胞を擦過し得た 18 症例である。気管支鏡下に擦過された細胞を型のごとくパパニコロ染色した。細胞の核径は長径, 短径をマイクロメーターで測定した。核クロマチンの形態は微細顆粒状 (Fig. 1), 粗大顆粒状 (Fig. 2), 粗網状, インディアインク状に分類し, 1 標本につき 200 個の細胞を観察した。核クロマ

チンの形態を観察したのち, 同一標本を脱色し, 松本らの変法⁸⁾によりフォイルゲン染色を行い, オリンパス社製 Micro spectro photometer (MSP) を用い, 550 nm の波長で核 DNA 量を測定した。核 DNA 量の測定は核クロマチン形態を観察した細胞にあらかじめ目印をつけておき, フォイルゲン染色したのち, その細胞を主体に 1 標本につき 250 個以上の細胞を用いた。単位は Arbitrary Unit (AU) で表し, 0.5 AU 幅でヒストグラムを作製した。同一標本中のリンパ球 20 個以上の DNA 量を測定し, 対照とした。肺小細胞癌細胞の核 DNA 量ヒストグラムは 2 型に大別した¹⁾。Fig 3-a は分散幅が狭

Table 1 Patient characteristics

	Total	Histogram pattern of nuclear DNA content	
		A type	B type
No. of patients evaluated	18	11	7
Median age	65	64	66
(Range)	(44 ~ 78)	(44 ~ 75)	(57 ~ 78)
Sex { male	15	8	7
female	3	3	0
Clinical stage { II	1	0	1
III	6	5	1
IV	11	6	5
Histologic subtype { oat cell type	5	2	3
Intermediate cell type	7	4	3
unknown	6	5	1

Fig. 4 Nuclear size of "A type" histogram of nuclear DNA content

く、第1モードに著明に集積している型(A type), Fig 3-bは分散幅がやや広く、第1モードへの集積も少ない型(B type)とした。

III. 成 績

肺小細胞癌18症例の臨床的特徴をTable 1に示した。核DNA量ヒストグラムでA typeを示した症例は11例, B typeを示した症例は7例であった。肺小細胞癌症例の年齢, 性, 臨床病期, 組織亜型と核DNA量ヒストグラムパターンとの間にまったく差異を認めなかった。核DNA量ヒストグラムパターンと核径との関係を検討

した。A typeを示した11症例の核径についてFig. 4に示した。測定された2,200個の全細胞の核径は5.6~19.0μまでの範囲内にあり、核径にかなりのばらつきがみられた。各症例の核径の平均は7.9±1.7~11.9±2.3μの範囲にあり、全症例の平均核径は10.3±2.0μであった。核DNA量ヒストグラムでB typeを示した7症例の核径をFig. 5に示した。測定した1,400個の全細胞の核径は6.2~16.2μまでの範囲内にあった。各症例の平均核径は9.1±1.3~11.1±2.1μであり、全症例の平均核径は10.1±1.9μであった。核DNA量ヒストグラムでA typeを示した症例の核径はB typeを示した症例の核径に比して、ばらつきが大きく、大小不同がみ

Fig. 5 Nuclear size of "B type" histogram of nuclear DNA content

Fig. 6 Nuclear chromatin patterns of "A type" histogram of nuclear DNA content

られた。しかし、核径の平均は両者にまったく差がみられず、核 DNA 量ヒストグラムパターンは核径の大小にほとんど影響されていないことが示された。核 DNA 量ヒストグラムパターンと核クロマチン形態との関係を検討した。A type を示した症例の核クロマチン形態について Fig. 6 に示した。微細顆粒状の核クロマチンを示した細胞は 31~91% で平均 68.4% であった。粗大顆粒状の核クロマチンは 8~48% で平均 26.8%、粗網状は 0~9% で平均 2.4%、インディアインク状は 1~7% で平均 2.4% であった。核 DNA 量ヒストグラムで B ty-

pe を示した 7 症例の核クロマチン形態の分布を Fig. 7 に示した。微細顆粒状の核クロマチンを示した細胞は 59~97% で平均 84.8%、粗大顆粒状は 3~31% で平均 12.3%、粗網状は 0~9% で平均 2.3%、インディアインク状は 0~1% で平均 0.6% であった。核クロマチン形態が微細顆粒状で比較的均一に分布し、核の明るくみえる細胞が主体を占める肺小細胞癌のうち、核 DNA 量ヒストグラムが A type を示したのは 11 例中 5 例 (45.5%)、B type を示したのは 7 例中 6 例 (85.7%) であった。ヒストグラムで B type を示した症例の核クロマチ

Fig. 7 Nuclear chromatin patterns of "B type" histogram of nuclear DNA content

Table 2 Relationship between nuclear DNA pattern, nuclear chromatin pattern and response to chemotherapy in patients with small cell carcinoma of the lung

Case	Nuclear DNA pattern	Response to chemotherapy	Nuclear chromatin pattern (%)			
			Fine gr.	Coarse gr.	Coarse reti. gr.	India ink
1. F J	A	NR	56	40	1	3
2. I S	A	—	73	19	7	1
3. K Z	A	NR	85	14	0	1
4. I N	A	NR	84	15	0	1
5. S K	A	NR	91	8	0	1
6. O H	A	NR	48	50	1	1
7. K M	A	PR	71	20	2	7
8. S S	A	PR	39	48	8	5
9. A T	A	—	89	10	0	1
10. M K	A	NR	90	7	1	2
11. Y T	A	NR	56	33	4	7
12. S T	B	PR	94	3	3	0
13. K Y	B	—	97	3	0	0
14. I M	B	PR	87	12	0	1
15. S I	B	NR	90	9	0	1
16. H K	B	CR	82	16	2	0
17. K K	B	NR	59	31	9	1
18. U T	B	PR	95	4	1	1

ン形態はそのほとんどが微細顆粒状の核クロマチンを示したのに反し、A type を示した症例の核クロマチンは多彩で一定の傾向がみられなかった。次に、初回治療として Adriamycin (ADR) 0.6 mg/kg, Cyclophosphamide (CTX) 20 mg/kg, Vincristin (VCR) 1 mg の多剤併用療法を週1回の経静脈的投与で3~5回連続の治療を行い得た15症例の化学療法に対する反応性からみた核クロマチン形態と核DNA量ヒストグラムパターンと

の関係について Table 2 に示した。ヒストグラムが A type を示し、同一の治療を行い得た9症例のうち、化学療法により部分寛解 (PR) 以上の効果を示した症例は2例 (22.2%) のみであった。この2症例の核クロマチンが微細顆粒状を示した細胞は71%, 39%を占めたにすぎず、必ずしも多いとはいえなかった。B type を示した6症例のうち、部分寛解以上の効果を示した症例は4例 (66.7%) にみられた。この4症例の核クロマチン

形態をみると、微細顆粒状を示した細胞は 94, 87, 82, 95% であった。微細顆粒状の核クロマチンを示す細胞が大半を占める (80% 以上) ような肺小細胞癌症例で ADR + CTX + VCR の多剤併用療法を行い得た 9 症例のうち、部分寛解以上の治療効果を示した症例は 4 例 (44.4%) であり、核クロマチンが微細顆粒状を示す細胞の多い肺小細胞癌症例でも必ずしも化学療法に対して良好な治療効果を示すとはいえなかった。部分寛解以上の治療効果を示した 4 症例の核 DNA 量ヒストグラムはすべて B type であり、核クロマチンが微細顆粒状にみえても核 DNA 量の少ない症例ほど化学療法に対して良好な結果を得ることはできなかった。

IV. 考 察

肺小細胞癌は腫瘍の増殖速度、転移速度、転移様式、各種治療に対する反応、患者の転帰など肺癌のほかの組織型に比して非常に特異な臨床病態を示す。このような病態を初診時より推定する目的で肺小細胞癌細胞の核クロマチン形態との関連から検討されてきた。

Horai ら⁵⁾ は微細顆粒状の核クロマチンが均一に分布し、核の明るくみえる細胞が大半を占める肺小細胞癌は粗大顆粒状、粗網状の核クロマチンが不均一に分布する細胞が大半を占める肺小細胞癌より化学療法 (Cyclophosphamide) に対して有効であると報告している。Miyamoto⁹⁾ らは肺小細胞癌細胞の核クロマチン形態と患者の予後との関係を検討し、大形で多辺形の核形を示し、細顆粒状の核クロマチンを示す細胞の多い症例ほど予後は良好であったと報告している。小松ら⁷⁾ もほぼ同様の成績を報告しているが報告者により、対象とされた症例の治療法が異なることから、同一に比較し得ないと考えられる。一方、核 DNA 量の測定、分析から核 DNA 量と肺小細胞癌患者の臨床病態との関連が検討されている。Vindeløv ら¹²⁾ は肺小細胞癌の核 DNA 量を Flow cytometer で測定し、化学療法に著効を示した肺小細胞癌は S 期に相当する細胞が多く占める。しかし S 期の細胞が多くとも化学療法に対して不変であった肺小細胞癌もみられ、必ずしも S 期に相当する細胞が多くとも化学療法に奏効するとはいえないと報告している。Vindeløv の報告は症例により治療法が異なることからいちように論ずることはできないと考えられる。われわれが ADR, VCR, CTX の多剤併用による初回治療の効果と核 DNA 量ヒストグラムとの関係を検討したところ³⁾、化学療法で部分寛解以上の効果を示した症例はヒストグラムで A type を示した 13 例中 2 例 (15.4%) のみであったが、

B type を示した 9 例中 6 例 (66.7%) に部分寛解以上の効果を示した。S 期、G₂M 期に相当する細胞の多い肺小細胞癌 (核 DNA 量ヒストグラムで B type) は ADR, VCR, CTX の化学療法に対して有意に良好な効果を示した。核 DNA 量と肺小細胞癌患者の予後について、Johnson ら⁹⁾ は S 期に相当する細胞の多い肺小細胞癌患者の予後は悪いと報告している。一方、Bunn ら⁴⁾ は S 期に相当する細胞の占める割合で肺小細胞癌患者の予後は推定し得ないと報告している。われわれの検討による³⁾と、ほぼ同一の治療 (ADR + CTX + VCR + Radiation) を行い得た肺小細胞癌患者の予後と核 DNA 量との関係をみると、臨床病期が Limited disease でヒストグラムが A type の症例の予後が最も良好であり、Extensive disease で B type の症例は最も悪かった。Limited disease で B type の症例と Extensive disease で A type の症例はほぼ同様で中間にあった。われわれの成績では S 期、G₂M 期に相当する細胞の多い肺小細胞癌は化学療法に有効であったが癌の増殖力も強く、患者の予後は不良となることを示した。現在まで核クロマチン形態と核 DNA 量の面から個々に肺小細胞癌患者の特異な臨床病態について検討されてきたが、核クロマチン形態と核 DNA 量の関連についての検討はほとんどなされていない。ヘマトキシリンは解離性の高い陽性荷電を有する塩基性色素である。ヘマトキシリン染色ではアルミニウムの金属イオンを介して細胞内の解離性の高い陰性荷電物質 (核酸の磷酸基) と密に結合して染色される。すなわち、ヘマトキシリンは塩基性の核蛋白に被覆されていない物質代謝活性の低いヘテロクロマチンを染色し、蛋白合成などの物質代謝活性の高い、核蛋白に被覆されたオイクロマチンはほとんど染色されない。増殖期にある細胞は RNA 合成の活性の高いオイクロマチンにほとんど占められており、細胞の増殖力をヘテロクロマチンの形態で判定することは問題があると考えられる。細胞形態と核 DNA 量の比較検討を肺癌で行った報告はみられないが、胃癌による佐々木ら¹⁰⁾ の報告によると核の大きさと核 DNA 量は相関し、核の大小不同より核 DNA 量を推定しようとしている。肺小細胞癌細胞では核径の平均はほとんど同一であり、核 DNA 量と核径との間に相関関係はみられなかった。子宮頸部扁平上皮癌細胞で核形態と核 DNA 量の関係を比較した杉田ら¹¹⁾ は、微細顆粒状の核クロマチンを有する細胞は核 DNA 量も多いが必ずしも相関しない場合もあることを報告している。今回の検討で核 DNA 量ヒストグラムが B type であった肺小細胞癌の核クロマチンはほとんど微細顆粒状を呈しており、微細顆粒状を示す核クロマチンが

均等に分布する細胞は物質代謝活性が高く、増殖力の強い細胞と考えられた。一方、ヒストグラムで A type を示した肺小細胞癌の核クロマチンは微細顆粒状に均一に分散する細胞も多くみられるが、粗大顆粒状、粗網状で不均一に分散する細胞も多くみられ必ずしも核クロマチン形態から核 DNA 量ヒストグラムパターンを推定し得なかった。このことは化学療法による有効性の相違からも明白である。すなわち、微細顆粒状の核クロマチンが均一に分散している細胞の多い肺小細胞癌のうち、核 DNA 量ヒストグラムが B type の症例では化学療法に有効であったが A type の症例では効果が不良であった。細胞の物質代謝活性が高く、増殖力の強い肺小細胞癌細胞の核クロマチンは微細顆粒状で均一に分布しているが、必ずしも核クロマチン形態のみから細胞の物質代謝活性、増殖力を言及し得ず、肺小細胞癌症例の特異な臨床病態を推測するには核 DNA 量の測定、分析が必要であると考えられた。

V. ま と め

肺小細胞癌の経気管支擦過細胞を用いて、核クロマチン形態と核 DNA 量の相関、化学療法に対する反応性について検討した。核 DNA 量ヒストグラムで B type を示した症例の核クロマチンは微細顆粒状で均一に分布している細胞が多く、化学療法に対する反応性も良好であった。核 DNA 量ヒストグラムで A type を示した症例の核クロマチンは微細顆粒状で均一に分布する細胞と粗大顆粒状で不均一に分布する細胞の多い症例がみられた。核クロマチンが微細顆粒状で均一に分布する細胞の多い症例でも、ヒストグラムで A type を示した症例は化学療法に対する反応性が不良であった。核クロマチン形態と核 DNA 量とに相関関係のみられない肺小細胞癌もみられた。肺小細胞癌の特異な臨床病態を核クロマチン形態より推定しうる場合もあるが、核 DNA 量の検討がより重要であることを示した。

Summary

The relationship between the nuclear DNA patterns of tumor cells obtained by brushing the bronchoscopy and cytomorphologic features of 18 patients with small cell carcinoma of the lung, was investigated. The nuclear DNA content was measured at 550 nm using a Microspectrophotometer. The DNA histogram pattern was classified into "type A" containing a higher proportion of G₀G₁-phase cells and "type B" containing a higher

proportion of S, G₂ M-phase cells.

The diameter of the nuclei was distributed to $10.1 \pm 2.0 \mu$ from $10.1 \pm 1.9 \mu$ and did not differ between the two types.

The nuclear chromatin pattern of the tumor cells with type B histogram pattern showed finely granular chromatin evenly distributed throughout the nuclei.

However, the nuclear chromatin pattern of the tumor cells with type A showed finely granular chromatin and coarsely granular chromatin distributed sparsely throughout the nuclei.

The small cell carcinoma with type B showed a good response tumor to chemotherapy whereas the case with type A showed a poor response tumor.

There was a strong correlation between the nuclear DNA histogram pattern and the response to chemotherapy; however, the nuclear chromatin pattern was not statistically different from the response to chemotherapy.

These results indicated that the nuclear DNA histogram pattern may be an indicator that can be used to speculate the clinical behavior of patients with small cell carcinoma of the lung.

文 献

- 1) 阿部庄作, 川上義和: 肺小細胞癌細胞の核 DNA 量と臨床病態との関連, 日胸疾会誌, 22: 861~867, 1984.
- 2) Abe, S., Makimura, S., Itabashi, K., et al.: Prognostic significance of nuclear DNA content in small cell carcinoma of the lung, *Cancer*, 56: 2025~2030, 1985.
- 3) 阿部庄作, 板橋孝一, 牧村士郎・他: 肺小細胞癌の核 DNA 量と化学療法の効果, 肺癌, 25: 487~493, 1985.
- 4) Bunn, P.A., Carney, D.N., Gazdar, A.F., et al.: Diagnostic and biological implications of flow cytometric DNA content analysis in lung cancer, *Cancer Res.*, 43: 5026~5032, 1983.
- 5) Horai, T., Sone, H., Takenaga, A., et al.: Cytologic characteristics of oat cell carcinoma of the lung in relation to the effect of chemotherapy, *Cancer*, 47: 22~26, 1981.
- 6) Johnson, T.S., Valdivieso, M., Barlogie, B., et al.: Flow cytometric ploidy and proliferative activity in human small cell lung carcinoma; potential diagnostic and prognostic features, *Proc. Am. Assoc. Cancer Res.*, 24: 124, 1983.
- 7) 小松彦太郎, 上野喜三郎, 川村光夫・他: 肺小細胞癌の細胞学的特徴と予後に関する検討, 日臨細胞誌, 23: 351~

- 358, 1984.
 - 8) 松本謙治, 岸上義彦, 野田 定・他: Feulgen反応の自動染色装置に関する研究, 日臨細胞誌, 10: 148~154, 1971.
 - 9) Miyamoto, H., Inoue, S., Abe, S., et al.: Relationship between cytomorphologic features and prognosis in small-cell carcinoma of the lung, *Acta Cytol.*, 26: 429~433, 1982.
 - 10) 佐々木功典, 萩野哲明, 川内野和孝・他: ヒト胃癌細胞核 DNA 量の測定, 日臨細胞誌, 21: 687~692, 1982.
 - 11) 杉田道夫, 室谷哲弥, 杉下 匡・他: Flow cytometry および顕微蛍光測光法による子宮頸部扁平上皮癌細胞の形態と核 DNA 量の相関, 日臨細胞誌, 23: 503~508, 1984.
 - 12) Vindeløv, L.L., Hansen, H.H., Gersel, A., et al.: Treatment of small-cell carcinoma of the lung monitored by sequential flow cytometric DNA analysis, *Cancer Res.*, 42: 2499~2505, 1982.
-