原 著

フローサイトメトリーによる肺非小細胞癌
の DNA 量解析

東北大学抗酸菌病研究所外科

太田伸一郎 齊藤 泰紀 今井 督 須田 秀一
 永元 則義 佐藤 雅美 佐川 元保 菅間 敬治
 高橋 里美 薄田 勝男 仲田 祐

フローサイトメトリーにより肺の非小細胞癌 25 例の核内 DNA 量を測定し、DNA Index と切除腫瘍径、N 因子、および術後組織病理分類（以下、術後病期）との関係を比較検討した。

(1) 切除腫瘍径 3 cm 未満と 3 cm 以上の肺癌とで DNA Index に差はみられなかった。(2) 術後病期別には、腺癌の DNA Index は、I・II 期例 (1.18 ± 0.17) に比べ、III・IV 期例 (1.61 ± 0.30) で大であった。扁平上皮癌の DNA Index でも、I・II 期例 (1.05 ± 0.09) に比べ、III・IV 期例 (1.49 ± 0.34) で大であった。非小細胞癌全体では、III・IV 期例 (1.56 ± 0.30) の DNA Index は、I・II 期例 (1.15 ± 0.20) より大であった。(3) N-因子別では、腺癌の縦隔リンパ節転移陽性群（以下 N2 群）の DNA Index (1.52 ± 0.41) は、縦隔リンパ節転移陰性群（以下 N0+N1 群）の DNA Index (1.18 ± 0.17) より大であった。扁平上皮癌においても N2 群の DNA Index (1.49 ± 0.34) は、N0+N1 群の DNA Index (1.05 ± 0.09) より大であった。非小細胞癌全体では、N2 群の DNA Index (1.50 ± 0.34) は、N0+N1 群の DNA Index (1.15 ± 0.20) より大であった。したがって、肺癌細胞の核内 DNA Index の評価により、腫瘍の悪性度および予後をある程度推測しうるものと考えられる。

Key words : Lung cancer—Flow cytometry—DNA index

I. はじめに

腫瘍細胞の DNA 量の多寡は、予後とも深く関係するとされ、また腫瘍の悪性度を評価するうえでも、腫瘍細胞

の DNA 量の測定は意義あるものとされてきた²⁾。一方、フローサイトメトリーの登場で、短時間に多数の癌細胞の DNA 量を測定することが可能となったが、固形腫瘍への応用に際しては数々の問題があり、肺癌細胞の DNA 量解析に関する報告は少ない^{5,6,8)}。著者らは、フローサイトメトリーによる肺癌細胞 DNA 量の測定を試み、DNA Index（腫瘍細胞 DNA 量/正常リンパ球 DNA 量）と、切除腫瘍径、N 因子、および術後組織病理分類（以下、術後病期）との関係を組織型別に比較検討した。

II. 対象ならびに方法

腺癌 14 例、扁平上皮癌 9 例、大細胞癌 2 例の計 25 例を対象とした。手術摘出 1 時間以内に腫瘍辺縁部より組織片を採取し、これを生理食塩水中で 1 mm³ 大に細切

Flow cytometric DNA analysis of non-small cell lung cancer
 Shin'ichirou OTA, M.D., Yasuki SAITOU, M.D., Tadashi IMAI, M.D., Syun'ichi SUDA, M.D., Noriyoshi NAGAMOTO, M.D., Masami SATOU, M.D., Motoyasu SAGAWA, M.D., Keiji KAN'MA, M.D., Satomi TAKAHASHI, M.D., Katuo USUDA, M.D. and Tasuku NAKADA, M.D.

Department of Surgery, The Research Institute for Chest Diseases and Cancer, Tohoku University

論文別刷請求先 ☎980 仙台市星陵町 4 の 1 東北大学抗酸菌病研究所外科 太田伸一郎

昭和 62 年 7 月 3 日受付

昭和 62 年 8 月 28 日受理

Table 1 Method of preparation of single cell suspension

①	Mechanical dispersion (Super high speed blender 18,000 rpm, 30 sec)
②	Washing in saline
③	Filtering through stainless mesh (37 μ m)
④	Lymphocyte separation (Ficoll-Paque method)
⑤	Washing in saline
⑥	Fixation (50% ethanol, at least 30 min)
⑦	Nuclear isolaton (10 ⁶ cells/cc, 0.1% pepsin, 10 min, 37°C)
⑧	Washing in saline
⑨	Treatment with RNase (0.1% RNase, 10 min, 37°C)
⑩	Washing in saline
⑪	Staining (50 μ g/ml propidium iodide, 20 min, room temperature)
⑫	Measuring DNA contents by FCM

Fig. 1 Computer-drawn histogram of squamous cell carcinoma of lung cancer (case 16).

B: DNA content of lymphocytes,

M: DNA content of tumor cells in G₀G₁ phaseDNA Index of tumors were determined by ratio of DNA modal values of malignant to benign cells for G₀G₁ populations in each case (M/B)

し, さらに高速ブレンダーで機械的に分散 (18,000 rpm, 30 sec) したのち, 金属メッシュ (37 μ) で濾過し, Ficoll-Paque 液に重層, 遠心 (1,800 rpm, 15 min) し, 上層の破砕物質と, 中層のリンパ球およびマクロファージを可及的に除去した。しかるのち, 下層細胞をサコモノ液 (50% エタノール, 2% カーボワックス) で30分以上冷暗所で固定し保存した。測定時に, 下層の細胞を10⁶ 個/cc に調整し, これをペプシン (半井化学薬品, 0.1%, 37°C, 10 min) で裸核細胞としたのち, RNase 処理 (Sigma, Type I-A, 0.1%, 37°C, 10 min) し, プロピディウム・アイオダイド (Sigma, 50 μ g/ml, 室温, 20 min) で DNA 染色を行った。測定は, Coulter 社, Epics-V 型で行い, 励起光に 488 nm アルゴンレーザーを用い, 515 nm Interference filter, 610 nm longpass filter を通し,

赤色蛍光積分シグナル (IRFL, 相対的蛍光量の指標) を10⁴ 個の細胞につき計測した (Table 1)。機械の調整は標準粒子 (Full Bright, Grade 1, 10 μ , Coulter) を用い, 赤色蛍光積分シグナル (IRFL) と前方散乱光シグナル (LS, 粒子径の指標) の CV 値 (Coefficient of variation, 分散係数) がそれぞれ 3.0 以下となるようにし, 患者末梢血リンパ球の DNA ピークを内部基準 (Internal Standard) として, 腫瘍細胞の相対的核内 DNA 量の測定を行った (Fig. 1)。

III. 結 果

対象症例の組織型, DNA Index (腫瘍細胞 DNA 量/正常リンパ球 DNA 量), 切除腫瘍最大径, N 因子, および

Table 2 DNA Index and histopathological findings of each cases

Case	N-factor (UICC)	Tumor size (cm)	p-TNM stage	DNA Index	CV	cell type
1	0	4.5	I	1.00	6.6	Ad.
2	—	1.8	III*	1.77	18.9	Ad.
3	0	3.2	I	1.12	10.2	Ad.
4	0	1.7	I	1.01	11.9	Ad.
5	0	1.5	I	1.20	9.4	Ad.
6	0	1.5	I	1.31	10.8	Ad.
7	0	2.0	I	1.00	9.6	Ad.
8	1	6.0	II	1.40	12.1	Ad.
9	1	4.5	II	1.36	7.7	Ad.
10	2	2.9	III	1.19	11.5	Ad.
11	2	3.4	III	1.38	13.8	Ad.
12	2	2.9	III	1.98	7.1	Ad.
13	—	8.0	IV (PM ₂)	1.81	6.0	Ad.
14	—	3.6	IV (PM ₁)	1.54	8.3	Ad.
15	0	1.0	I	1.00	9.2	Sq.
16	0	4.8	I	1.20	6.3	Sq.
17	0	6.7	I	1.06	10.8	Sq.
18	1	4.0	II	1.00	9.4	Sq.
19	1	4.0	II	1.00	11.2	Sq.
20	2	5.0	III	1.27	8.4	Sq.
21	2	3.5	III	1.52	9.6	Sq.
22	2	5.5	III	1.96	10.8	Sq.
23	2	8.0	III	1.21	7.3	Sq.
24	0	5.2	I	1.00	14.4	La.
25	0	8.5	I	1.66	10.4	La.

Ad. : Adenocarcinoma, Sq. : Squamous cell carcinoma, La. : Large cell carcinoma,

— : Lymphnodes not dissected, PM : Intrapulmonary metastasis,

* : Pleuritis carcinomatosa

Table 3 Relationship between DNA Index and tumor size

Tumor size (D)	Cell type	No. of cases	DNA Index (mean±SD)	
D < 3 cm	Ad.	7	1.35±0.38	n.s.
	Sq.	1	1.00	
D ≥ 3 cm	Non-small.	8	1.31±0.37	n.s.
	Ad.	7	1.37±0.26	
	Sq.	8	1.28±0.32	
	Non-small.	17	1.32±0.30	

Ad. : Adenocarcinoma, Sq. : Squamous cell carcinoma,

Non-small. : Non-small cell carcinoma (t-test)

術後病期との関係 (Table 2) をみると、腺癌は 14 例 (術後病期 I 期 6 例, II 期 2 例, III 期 4 例, IV 期 2 例) で、DNA Index は 1.00 から 1.98 まで分布し、切除腫瘍最大径は 1.5 cm から 8.0 cm であった。扁平上皮癌は 9 例 (術後病期の I 期 3 例, II 期 2 例, III 期 4 例) で、DNA Index は 1.00 から 1.96, 切除腫瘍最大径は 1.0 cm から 8.0 cm であった。大細胞癌は 2 例で、ともに術後病期は I 期, DNA Index はそれぞれ 1.00 と 1.66 であ

った。

切除腫瘍最大径が 3 cm 未満と、3 cm 以上の肺癌とで DNA Index を比較検討した (Table 3)。切除腫瘍最大径 3 cm 未満の扁平上皮癌は X 線無所見の 1 例のみで長軸方向への浸潤は 1.0 cm であった (DNA Index=1.00)。切除腫瘍最大径 3 cm 以上の扁平上皮癌は 8 例で DNA Index は 1.28±0.32 であった。一方、切除腫瘍最大径 3 cm 未満の腺癌の DNA Index は 1.35±0.38 (7 例)

Table 4 Relationship between DNA Index and p-TNM stage

p-TNM stage	Cell type	No. of cases	DNA Index (mean±SD)	
I + II	Ad.	8	1.18±0.17	**
	Sq.	5	1.05±0.09	
III + IV	Non-small.	15	1.15±0.20	**
	Ad.	6	1.61±0.30	
	Sq.	4	1.49±0.34	
	Non-small.	10	1.56±0.30	

Ad : Adenocarcinoma, Sq : Squamous cell carcinoma,

Non-small : Non-small cell carcinoma,

* : $p < 0.025$, ** : $p < 0.005$ (t-test)

Table 5 Relationship between DNA Index and N-factors

N-factor	Cell type	No. of cases	DNA Index (mean±SD)	
N0+N1	Ad.	8	1.18±0.17	+
	Sq.	5	1.05±0.09	
N2	Non-small.	15	1.15±0.20	**
	Ad.	3	1.52±0.41	
	Sq.	4	1.49±0.34	
	Non-small.	7	1.50±0.34	

Ad : Adenocarcinoma, Sq : Squamous cell carcinoma,

Non-small : Non-small cell carcinoma

+ : $p < 0.05$, * : $p < 0.025$, ** : $p < 0.005$ (t-test)

で、切除腫瘍最大径 3 cm 以上の腺癌の DNA Index は 1.37 ± 0.26 (7 例) であった。非小細胞癌全体では、切除腫瘍最大径が 3 cm 未満 8 例 (腺癌 7 例, 扁平上皮癌 1 例) の DNA Index は 1.31 ± 0.37 で、切除腫瘍最大径が 3 cm 以上 17 例 (腺癌 7 例, 扁平上皮癌 8 例, 大細胞癌 2 例) の DNA Index は 1.32 ± 0.30 であり、腫瘍径 3 cm 未満と 3 cm 以上の肺癌とで、DNA Index に差はみられなかった (t 検定)。

DNA Index を、良好な予後が期待される術後病期 I・II 期症例と、III・IV 期の進行例とで比較検討した (Table 4)。腺癌では、I・II 期例 (8 例, DNA Index = 1.18 ± 0.17) に比べ III・IV 期例 (6 例, DNA Index = 1.61 ± 0.30) の DNA Index は明らかに大であった (t 検定, $p < 0.005$)。扁平上皮癌でも同様に、I・II 期例 (5 例, DNA Index = 1.05 ± 0.09) に比べ III・IV 期例 (4 例, DNA Index = 1.49 ± 0.34) の DNA Index は有意に大であった (t 検定, $p < 0.025$)。非小細胞癌全体では、III・IV 期例 (10 例, DNA Index = 1.56 ± 0.30) の DNA Index は、I・II 期例 (15 例, DNA Index = 1.15 ± 0.20) より有意に大であった (t 検定, $p < 0.005$)。

DNA Index を組織型別に、縦隔リンパ節転移陽性群 (以下, N2 群) と縦隔リンパ節転移陰性群 (以下, N0+

N1 群) とで比較検討した (Table 5)。胸腔内播種を認めた 2 例と癌性胸水の貯留していた 1 例は縦隔リンパ節の郭清を行わなかったことから、この検討対象からは除外した。腺癌の N2 群 (3 例, DNA Index = 1.52 ± 0.41) は、N0+N1 群 (8 例, DNA Index = 1.18 ± 0.17) より有意に DNA Index が大であった (t 検定, $p < 0.05$)。扁平上皮癌でも同様に、N2 群 (4 例, DNA Index = 1.49 ± 0.34) では、N0+N1 群 (5 例, DNA Index = 1.05 ± 0.09) と比べ、DNA Index は明らかに大であった (t 検定, $p < 0.025$)。さらに、非小細胞癌全体では、N2 群 (7 例, DNA Index = 1.50 ± 0.34) は、N0+N1 群 (15 例, DNA Index = 1.15 ± 0.20) より DNA Index は明らかに大であった (t 検定, $p < 0.005$)。

IV. 考 察

腫瘍細胞の DNA 量の多寡は、予後と深く関係するとされているが²⁾、肺癌における予後あるいは悪性度とどのように関係するかは明らかでない。DNA 量を解析する手段の 1 つとして、フォイルゲン反応などにより DNA を染色した腫瘍細胞に励起光を照射し、発生する蛍光を測定する顕微蛍光測定法がある。この方法は、測定者の

主観が入ることや、測定する細胞数が少ないなどの理由で、客観性に欠ける要素が存在する⁸⁾。一方、フローサイトメトリーでは、非常に多くの細胞を測定するため再現性も良く統計学的にも信頼性が高い。

フローサイトメトリーの登場で、短時間に多数の癌細胞の DNA 量を測定することが可能となったが、固形腫瘍への応用に際しては数々の問題があり、肺癌細胞の DNA 量解析に関する報告は少ない^{5,6,8)}。著者らは、フローサイトメトリーにより肺癌細胞の DNA 量を測定し得られた DNA ヒストグラム上から算出した DNA Index と、切除腫瘍最大径、N 因子、および術後病期との関係につき組織型別に比較し、悪性度を評価することが可能であるかどうかを検討した。DNA Index は、DNA ヒストグラム上における腫瘍細胞の相対的 DNA 量を正常細胞の相対的 DNA 量で除した値であり、腫瘍細胞の DNA の量的異常の指標といえる。染色体数とある程度の相関が認められ⁹⁾、S 期細胞の比率とも有意な相関があるとされる⁵⁾。腫瘍細胞の DNA 量を反映する一方で、悪性度の指標になるものと考えられる。

著者らは、高速ブレンダーによる機械的分散のうちに、ペプシンによる化学的分散を行ったが、比較的良好な細胞分散が得られた。ペプシン処理により、細胞質および結合組織を消化除去し腫瘍細胞の結合性を解くことにより裸核化するとともに、壊死物質や機械的分散の際に生じる破砕物質も取り除かれ、単離細胞化に有用であった。ペプシン処理における至適濃度、処理温度、処理時間については磯部⁹⁾らの方法に準じて行った。RNase の使用の必要性の有無に関してはさまざまに論じられているが^{4,9)}、プロピディウム・アイオダイドなど、核酸の二重鎖部に intercalation する蛍光色素を使用する場合、より正確な DNA 量を測定するためには、二重鎖 RNA を除去する必要がある、RNase 処理は必須のものとする。

切除腫瘍径と DNA Index の関係をみれば腫瘍径が 3 cm 未満と 3 cm 以上の腫瘍との間に DNA Index に差は認められなかった。扁平上皮癌末梢型では腫瘍径が大となるにつれてリンパ節転移や胸膜浸潤の程度が高くなり、大きさや予後が直接的に相関するのに対して、腺癌では癒収縮の機転のために、みかけ上の腫瘍径は予後を正しく評価していない¹⁾とされ、著者らの症例に腺癌が多かったことも関係していると思われる。

腺癌と扁平上皮癌は、ともに術後病期が進むにつれ DNA Index の大きいものが多かった。腺癌では、術後病期 I・II 期 (1.18 ± 0.17) と比較して III・IV 期の DNA Index (1.61 ± 0.30) は有意に大で ($p < 0.005$)、扁平上

皮癌でも、III・IV 期の DNA Index (1.49 ± 0.34) は、I・II 期の DNA Index (1.05 ± 0.09) と比べ、明らかに大であった (t 検定, $p < 0.025$)。非小細胞癌全体でも、III・IV 期の DNA Index (1.56 ± 0.30) は、I・II 期の DNA Index (1.15 ± 0.20) と比べ、明らかに大であった (t 検定, $p < 0.005$)。一方、アクリジン・オレンジで肺癌細胞を染色し、フローサイトメトリーで DNA 量と RNA 量を同時測定した報告⁶⁾では、腺癌は術後病期 III 期例に比較し、I 期例の DNA Index は明らかに小さいものの、扁平上皮癌は DNA Index と術後病期との間に差はみられなかったとされる。

今回の症例では、T-因子に伴う術後病期 III 期は症例 2 の癌性胸水例の 1 例のみであったため、DNA Index と術後病期との関係は、主として N-因子により影響されているものと考えられる。腺癌の N 2 群の DNA Index = 1.52 ± 0.41 は、N 0 + N 1 群の DNA Index = 1.18 ± 0.17 と比べ有意に大であり ($p < 0.05$)、扁平上皮癌でも同様に、N 2 群の DNA Index = 1.49 ± 0.34 は、N 0 + N 1 群の DNA Index = 1.05 ± 0.09 より大であった ($p < 0.025$)。

N 因子、および術後病期が進むにつれて DNA Index が大きくなっていることに関しては、以下のことが考えられる。第一には、高倍数体 (Hyperploidy) の腫瘍は、発生当初から縦隔リンパ節および全身に転移を起こしやすく、周囲臓器に対しても浸潤性に増殖しやすいなどの性格を有する。すなわち悪性度が高いことが考えられる。第二には、発生当初からは必ずしも悪性度が高いとはいえないが、癌が進行していく過程で、異常分裂を繰り返すことにより腫瘍細胞に不均質性 (Heterogeneity) が生じ、細胞選択が行われることにより、しだいに高倍数体 (Hyperploidy) のクローンが優位を占めてくるとなどが考えられる。

肺癌の術後病期と予後はよく相関していること¹⁾、術後病期が進んだ症例には DNA Index の大きいものが多いことを考えると、DNA Index は予後と深く関わっていることが示唆される。Atkin²⁾ らは、1465 例の悪性腫瘍の DNA 量解析から、DNA Index が小さいものの予後は良いとし、乳癌でも、DNA Index の小さい腫瘍は、エストロゲン・レセプターが陽性で予後も良好であることが多いとされる⁷⁾。

しかし、同じ術後病期でも DNA Index に差がみられることから、TNM の各因子のみならずリンパ管侵襲、血管侵襲など腫瘍細胞の遊離性および着床のしやすさなどの悪性度と DNA Index との関係も示唆され、これらは今後の課題と考えられる。

V. 結 論

フローサイトメトリーによる腫瘍細胞のDNA解析は、固形腫瘍における細胞分散法、腫瘍細胞を効率良く回収する方法など、いまだ確立されていない状態であり多くの問題点を有しているが、短時間に膨大な数の細胞を測定することが可能で、非常に多くの情報を得ることが可能である。そのパラメータとしてのDNA Indexは、腫瘍のN-因子および術後病期をある程度反映しており、悪性度および予後を推測するうえで有用と考えられる。

Summary

The DNA contents of 25 operated lung cancers (14 adenocarcinomas, 9 squamous cell carcinomas, and 2 large cell carcinomas) were analyzed using flow cytometry. The DNA Index was not correlated with tumor size.

In adenocarcinoma, the DNA Index was significantly lower ($p < 0.005$) in stages I and II (mean = 1.18 ± 0.17) than in stages III and IV (mean = 1.61 ± 0.30), and the DNA Index was significantly higher ($p < 0.005$) in the cases with mediastinal lymphnodal metastasis (mean = 1.52 ± 0.41) than in the cases without mediastinal lymphnodal metastasis (mean = 1.18 ± 0.17).

In squamous cell carcinoma, the DNA Index was significantly lower ($p < 0.025$) in stages I and II (mean = 1.05 ± 0.09) than in stages III and IV (mean = 1.49 ± 0.34), and the DNA Index was significantly higher ($p < 0.025$) in the cases with mediastinal lymphnodal metastasis (mean = 1.49 ± 0.34) than in the cases without mediastinal lymphnodal metastasis (mean = 1.05 ± 0.09).

In non-small cell carcinoma, the DNA Index was significantly lower ($p < 0.005$) in stages I and II (mean = 1.15 ± 0.20) than in stages III and IV (mean = 1.56 ± 0.30), and the DNA Index was significantly higher ($p < 0.005$) in the cases with mediastinal lymphnodal metastasis (mean = 1.50 ± 0.34)

than in the cases without mediastinal lymphnodal metastasis (mean = 1.15 ± 0.20).

There was a significant correlation between the DNA Index and the p-TNM stage, especially the N-factor.

文 献

- 1) 赤荻栄一：病理組織学的観点からみた肺癌の外科治療成績，抗研誌，35：157～167，1985。
- 2) Atkin, N.B., and Kay, R.: Prognostic significance of modal DNA value and other factors in malignant tumors based on 1465 cases, Brit. J. Cancer, 40: 210～221, 1979.
- 3) Barlogie, B., Hittelman, W., et al.: Correlation of DNA distribution abnormalities with cytogenetic findings in human adult leukemia and lymphoma, Cancer Res., 37: 4400～4407, 1977.
- 4) Deitch, A.D., Law, H. and White, R.D.: A stable propidium iodide staining procedure for flow cytometry, J. Histochem. Cytochem., 30: 967～972, 1982.
- 5) 磯部 宏, 伊藤正美・他: Flow cytometry による原発性肺癌細胞の核DNA量の解析, 肺癌, 27: 125～132, 1987.
- 6) Moran, R.E. and Melamed, M.R.: Flow Cytometric Analysis of Human Lung Cancer. Correlation with Histologic Type and Stage, Analyt. Quant. Cytol., 6: 99～104, 1984.
- 7) Olszewski, W., Darzynkiewicz, Z., et al.: Flow cytometry of breast carcinoma: I. Relation of DNA ploidy level to histology and estrogen receptor, Cancer, 48: 980～984, 1981.
- 8) Olszewski, W., Darzynkiewicz, Z., Claps, M.L., et al.: Flow Cytometry of Lung Carcinoma. a Comparison of DNA Stemline and Cell Cycle Distribution with Histology, Analyt. Quant. Cytol., 4: 90～94, 1982.
- 9) Taylor, I.W., Milthore, B.K.: An evaluation of DNA fluorochrome, staining techniques, and analysis for flow cytometry, J. Histochem. Cytochem., 28: 1224～1232, 1980.