原 著

肺末梢型腺癌の臨床的悪性度と擦過細胞像

東北大学抗酸菌病研究所外科¹⁾, 青森県立中央病院呼吸器外科²⁾,太田総合病院呼吸器外科³⁾, 仙台厚生病院院長⁴⁾太田伸一郎¹⁾ 斎藤 泰紀¹⁾ 佐川 元保¹⁾ 菅間 敬治¹⁾高橋 里美¹⁾ 薄田 勝男¹⁾ 藤村 重文¹⁾ 今井 督²⁾須田 秀一³⁾ 仲田 祐⁴⁾

臨床的悪性度別に擦過細胞形態の定量的解析を行い、擦過細胞診上の予後推定因子を検討した。臨床的悪性度は、I期腺癌の予後と腫瘍陰影の増大速度で評価した。

I期腺癌の絶対的治癒切除例中、術後5年未満に癌死した10例を予後不良群、術後5年以上の生存が確認された24例を予後良好群とした。次に、肺癌集検の胸部間接写真で発見し切除した末梢型腺癌のうち、過去の間接写真にも腫瘍陰影が存在した20例を陰影増大速度小の群、以前に腫瘍陰影は存在しなかった8例を陰影増大速度大の群とした。予後不良群と陰影増大速度大の群を合わせたものを臨床的悪性度大の群、予後良好群と陰影増大速度小の群を合わせたものを臨床的悪性度小の群とした。擦過細胞の、①核小体数、②核小体数の変動係数、③核面積、④核の大小不同性、⑤核径、⑥核円形度、⑦N/C比を画像解析装置で定量的に計測し、両群で比較検討した。

その結果、臨床的悪性度大の群の擦過細胞像では、核1個あたりの核小体数が多く ($p < 0.05$)、核は正円形に近く ($p < 0.05$)、N/C比が大であった ($p < 0.001$)。肺末梢型腺癌の擦過細胞像において核小体数、核円形度、N/C比は予後推定因子となりうると考えられた。

Key words : Lung—Cytomorphometry—Adenocarcinoma—Malignancy

性度との関連性について検討した。

I. 緒 言

肺癌は近年、急速な勢いで増加しており、なかでも腺癌の占める割合は増える傾向にある。これまでに腺癌の予後推定因子として、多くの報告がなされているが^{3,4,7,8,14,17,19,22}、個々の細胞の形態分析から臨床的悪性度を検討した報告は少ない^{6,12,17}。そこで肺末梢型腺癌の擦過細胞診における腫瘍細胞形態の分析を行い、臨床的悪

II. 対象ならびに方法

臨床的悪性度は、I期腺癌の予後と腫瘍陰影の増大速度で評価し、臨床的悪性度別に擦過細胞形態を定量的に分析検討した。

1. I期腺癌の予後からみた臨床的悪性度

昭和48年12月から昭和61年12月までに、当施設に

Study of correlation between clinical malignancy and cytomorphometrical features in peripherally located adenocarcinoma of the lung

Shin-ichiro OHTA¹⁾, M.D., Yasuki SAITOU¹⁾, M.D., Noriyoshi NAGAMOTO¹⁾, M.D., Masami SATOU¹⁾, M.D., Motoyasu SAGAWA¹⁾, M.D., Keiji KANMA¹⁾, M.D., Satomi TAKAHASHI¹⁾, M.D., Katuo USUDA¹⁾, M.D., Sigebumi FUJIMURA¹⁾, M.D., Tadasi IMAI²⁾, M.D., Hideichi SUDA³⁾, M.D., Tasuku NAKADA⁴⁾, M.D.

¹⁾ Department of Surgery, The Research Institute for

Chest Diseases and Cancer, Tohoku University

²⁾ Department of Thoracic Surgery, Central Hospital of Aomori Prefecture

³⁾ Department of Thoracic Surgery, Ohta General Hospital
⁴⁾ Sendai Kosei Hospital

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

平成元年6月9日受付

平成元年8月25日受理

表1 I期肺癌切除例の予後別の臨床的悪性度と対象例の背景

諸 因 子	予後不良群 (N=10)	予後良好群 (N=24)	
年齢 歳 (Mean±S.D.)	66.7±10.0	57.9±11.9	N.S.
腫瘍径 mm (Mean±S.D.)	31.8± 3.8	32.0±17.8	N.S.
組織亜型			N.S.
乳頭型	7	15	
腺管型	2	3	
細気管支肺胞型	1	6	
組織分化度			N.S.
高分化	2	14	
中分化	6	9	
低分化	2	1	

N.S.: 有意差なし

予後不良群: I期肺癌治療切除例における5年未満癌死例

予後良好群: I期肺癌治療切除例における5年以上生存例

において, R2a 以上のリンパ節郭清を行い, 肺内リンパ節転移も陰性で, 絶対的治癒切除を施行したにもかかわらず術後5年未満に癌死したI期肺癌10例を予後不良群とし, 同様に術後5年以上の生存が確認された24例を予後良好群とした。

2. 腫瘍陰影の増大速度からみた臨床的悪性度

昭和58年度から62年度までの宮城県肺癌集検において胸部間接X線写真(以下, 間接写真)で発見し, 当施設で62年12月までに切除した末梢型肺癌のうち, 過去の間接写真との比較読影が可能で, かつ術前擦過細胞診が陽性であった28例を対象とした。以前に腫瘍陰影がすでに存在した20例を陰影増大速度小の群, 以前に腫瘍陰影はなく新規に発見した8例を陰影増大速度大の群とした。腫瘍陰影増大速度の指標として tumor doubling time を計測した。間接写真の腫瘍陰影をスライドに同一条件で複写し, 画像解析装置(Leitz 社製, A.S.M. image analysis system)に拡大投影して腫瘍陰影の投影面積を計測し, この面積に等しい円の直径を仮の腫瘍径とし, その変化率から Schwartz の式¹⁵⁾より tumor doubling time を算出した。間接写真フィルムの大きさの違い(70 mm, 100 mm)については, 隣接する後方肋骨影の幅を計測し, その拡大率で補正した。以前に腫瘍陰影はなく新規に発見した症例については, X線写真上では, 腫瘍径1.0 cm のものが読影上認識可能な一応の限界とされていることから¹⁸⁾, 便宜上, 1年前の腫瘍径は1.0 cm と仮定して算出した。

3. 擦過細胞形態の定量形態学的分析

I期肺癌の予後不良群と陰影増大速度大の群を合わせたものを臨床的悪性度大の群, I期肺癌の予後良好群と

陰影増大速度小の群を合わせたものを臨床的悪性度小の群とし, 擦過細胞像を両群で比較検討した。

擦過細胞診における腫瘍細胞の定量形態学的検討は, ①核小体数, ②核小体数の変動係数(核小体数の標準偏差/平均核小体数), ③核面積, ④核の大小不同性(核面積の標準偏差/平均核面積), ⑤核径, ⑥核円形度($4\pi \times$ 核面積/細胞周囲長²⁰⁾), ⑦N/C比(核・細胞質比)について行った。なお, ③~⑦については対物油浸レンズ100倍で撮影したカラスライドをもとに画像解析装置(前述)を使用し算出した。原則として1症例につき50個以上の細胞を計測し, その平均値を個々の症例の計測値とした。なお, N/C比については, 核面積/細胞質面積比が0.4以上をN/C比大とした。

III. 結 果

I期肺癌の予後別にみた擦過細胞形態の検討対象例の背景は, 予後不良群10例, 予後良好群24例で, 予後不良群の年齢は平均66.7歳, 予後良好群は平均57.9歳と, 予後不良群でやや高齢の傾向があったが両群に差はなかった。また切除腫瘍最大径も予後不良群と予後良好群とで差はなかった。病理組織像における組織亜型別にも差を認めなかった。分化度別にも予後良好群に高分化腺癌症例が多い傾向にあったが, 統計学的には両群間に差はなかった(表1)。

腫瘍陰影の増大速度別にみた細胞形態の検討対象例の背景をみると, 両群に年齢, 切除腫瘍最大径に差を認めなかったが, 陰影増大速度大の群は, 陰影増大速度小の群より, III A 期の進行例が有意に多く存在した(χ^2 検定, $p < 0.05$)。仮に算出した tumor doubling time は, 陰影増大速度大の群では, 平均 110 ± 36 日(最長143日, 最短43日)であり, 陰影増大速度小の群では平均 597 ± 402 日(最長1,659日, 最短164日)であった(t検定, $p < 0.01$)(表2)。

臨床的悪性度別に細胞形態を比較した結果, 臨床的悪性度大の群では, 細胞1個あたりの核小体数は 2.00 ± 0.18 と, 臨床的悪性度小の群の 1.66 ± 0.08 と比較し明らかに多かった(t検定, $p < 0.05$)。また核円形度も, 臨床的悪性度大の群では臨床的悪性度小の群より有意に大であり(Wilcoxon 順位和検定, $p < 0.05$)。臨床的悪性度大の群の核は, 正円形に近いという結果であった。N/C比も臨床的悪性度大の群では, 臨床的悪性度小の群と比べ大であった(χ^2 検定, $p < 0.001$)(表3)。

臨床的悪性度大の群の1例を示す(写真1)。

表 2 腫瘍陰影の増大速度別にみた臨床的悪性度と対象例の背景

諸 因 子	陰影増大速度小 の群 (N=20)	陰影増大速度大 の群 (N=8)	
年齢 (Mean±S.D.)	61.9±9.3	61.3±8.4	N.S.
切除腫瘍径 (mm) (Mean±S.D.)	31.0±8.6	27.8±17.7	N.S.
術後病期			*
I	12	2	
II	3	0	
III A	5	6	
組織亜型			N.S.
乳頭型	18	7	
腺管型	2	1	
細気管支肺胞型	0	0	
分化度			N.S.
高分化	4	0	
中分化	15	8	
低分化	1	0	
D.T. (Days, Mean)	597±402	110±36***	**
Max	1659	143	
Min	164	43	

* I + II期とIII期 p<0.05, χ^2 検定

** p<0.01, t 検定

*** 前年度の腫瘍径は1.0cmと仮定して算出した

D.T.: tumor doubling time

陰影増大速度大の群: 集検胸部写真で前年度無所見の腺癌例

陰影増大速度小の群: 集検胸部写真で前年度有所見の腺癌例

表 3 臨床的悪性度と擦過細胞形態との関連性

検討項目	臨床的悪性度大の群 (N=18)	臨床的悪性度小の群 (N=44)	
① 核小体数 (Mean±S.E.)	2.00±0.18	1.66±0.08	*
② 変動係数 (核小体数の標準偏差/平均核小体数) (Mean±S.E.)	0.46±0.02	0.46±0.01	N.S.
③ 核面積 μm^2 (Mean±S.E.)	93.2±8.9	87.6±3.8	N.S.
④ 核大小不同性 (核面積標準偏差/平均核面積) (Mean±S.E.)	0.32±0.02	0.31±0.01	N.S.
⑤ 核径 μm (Mean±S.E.)	10.6±0.5	10.3±0.2	N.S.
⑥ 核円形度 ($4\pi \times \text{核面積} / \text{細胞周囲長}^2$) (Mean±S.E.)	0.93±0.00	0.92±0.00	**
⑦ 核・細胞質面積比			§
>0.4	13	8	
<0.4	5	36	

* t 検定, p<0.05 ** wilcoxon 順位和検定, p<0.05

§ χ^2 検定, p<0.001 N.S. 有意差なし

臨床的悪性度大の群: 予後不良群と陰影増大速度大の群

臨床的悪性度小の群: 予後良好群と陰影増大速度小の群

写真 1 臨床的悪性度の高い腺癌細胞

写真は、絶対的治癒切除後1年9ヵ月で全身転移で死亡した1期腺癌の予後不良例の擦過細胞像で、平均核小体数は3.67個と多く、核円形度は0.95と正円形にちかく、N/C比は大である (Papanicolaou 染色, $\times 1,000$)

IV. 考 察

肺癌は近年、急速な勢いで増加しており、なかでも腺癌の占める割合は増える傾向にある。末梢型腺癌では、小型でも n2 や p2~p3 である症例も多く¹⁾、また小型

の孤立性陰影として早い時期に発見され治癒手術がなされた症例においても、術後比較的早い時期に遠隔転移などにより死亡する症例が存在するなど、腺癌の予後の推測はむずかしい。個々の腺癌症例の予後の推定が可能となれば、治療計画の作成、外来追跡の間隔・期間の設定など、臨床の面で有益である。

これまでに腺癌の予後推定因子として、病期²²⁾、分化度⁴⁾、血管浸潤の有無⁸⁾、核分裂指数¹⁷⁾、腫瘍中心部の線維化の程度³⁾、所属リンパ節の反応性¹⁹⁾、腫瘍細胞の核内DNA量の多寡^{7,14)}、などが報告されている。しかしながら、個々の細胞形態の分析から予後推定因子を検討した報告は少ない^{6,12,17)}。

肺癌の診断に広く行われている擦過細胞診は、細胞の変性が少ないため個々の腫瘍細胞の所見を詳細に分析することが可能であり、擦過細胞診における腫瘍細胞所見も新たな予後推定因子となりうる可能性がある。そこで、腺癌の擦過細胞診における腫瘍細胞形態の定量的分析を行い、臨床的悪性度との関連性について検討した。

擦過細胞診の細胞形態の検討は、主として核所見について検討した。理由は、一般に細胞診断学上の悪性細胞の最も重要な特徴は¹⁰⁾、①核・細胞の大小不同性、②核構造の異常・核の過染色性、③N/C比、とされ核所見が重要視されることや、定量的な形態解析が比較的容易に行われることによる。

臨床的悪性度を、本研究では、腫瘍細胞の増殖の旺盛さ、浸潤のしやすさ、ならびに遠隔転移の生じやすさと定義した。臨床的悪性度は、臨床的には予後、ならびに腫瘍陰影の増大速度に反映するものと考え、I期腺癌の絶対的治癒切除施行例の予後の良し悪しと、腫瘍陰影の増大速度の大小を臨床的悪性度の指標とした。

絶対的治癒切除を施行したI期腺癌の予後を臨床的悪性度の指標に選んだ理由は、さまざまな術後組織病理分類上の諸因子を単純化し、細胞本来の悪性度を評価することが目的であったことによる。本来、良好な予後が期待されるI期腺癌であっても、R2a以上のリンパ節郭清を行い肺内リンパ節転移も陰性で絶対的治癒切除を施行したにもかかわらず5年未満に癌死した症例は、当施設において13.4%に存在しており、これらの症例は切除時、すでに微小転移巣を形成しているなどの理由で¹¹⁾、悪性度がきわめて高い症例と考えられる。しかしながら、細胞本来の悪性度がそれほど大ではない症例の末期像も含まれている可能性があり、肺癌を発見するまでの期間の長短によるバイアスがかかり、その腫瘍の本来の臨床的悪性度を必ずしも反映していない場合があると思われる。

肺癌集検例の陰影増大速度を臨床的悪性度の一つの指標として検討した理由は、肺癌集団検診における腫瘍陰影の新規発見例には進行例が多いとされることが²¹⁾、集検経年受診者については、肺癌発見までの時間的経過を、肺癌集検の間接写真の適及的検討で把握することが可能で、陰影の経年変化を同一条件で分析しうることによる。以前に腫瘍陰影はなく新規に発見した症例は、以前に腫瘍陰影がすでに存在した症例より、ⅢA期の進行例が多く存在したことで、X線写真上の腫瘍陰影の増大速度は、腫瘍の臨床的悪性度を反映しているものと判断される。間接写真上の腫瘍陰影から tumor doubling time を算出した結果、以前に陰影が存在せず新規に発見し陰影増大速度大と考えられる群は、以前に陰影がすでに存在し陰影増大速度小と考えられる群と比べ tumor doubling time に明らかな差が認められ (t 検定, $p < 0.01$)、両群の分け方は妥当であったと考える。

I期腺癌の予後不良群と腫瘍陰影増大速度大の群を合わせた、いわゆる、臨床的悪性度大の群と、I期腺癌の予後良好群と腫瘍陰影増大速度小の群を合わせた、いわゆる、臨床的悪性度小の群との検討では、臨床的悪性度大の群では臨床的悪性度小の群と比較し、核1個当たりの平均核小体数は多く (t 検定, $p < 0.05$)、核円形度は大であり (Wilcoxon 順位と検定, $p < 0.05$)、N/C比は大であった (χ^2 検定, $p < 0.01$)。臨床的悪性度の高い細胞では、核1個当たりの平均核小体数は多く、核は正円形に近く、N/C比は大であるといえる。

腺癌細胞の悪性度について、宝来ら⁶⁾は高分化腺癌の擦過細胞診における細胞像から、核は大きく類円形で、クロマチンは密に均等に分布し、核小体は大きく複数存在し、N/C比の大きい腺癌細胞の臨床的悪性度は高いと、同様の結果を報告している。本研究は、これを定量形態学的に裏づける結果であった。

これまでに定量形態学的手法を用いて肺腺癌に関する予後推定因子を検討した報告として、下里¹⁷⁾は、核異型度の指標 (核の長径の標準偏差/核の平均長径) が腺癌の予後と相関があったとしているが、今回検討した核の大小不同性 (核面積の標準偏差/平均核面積) では差はみられなかった。また、美谷島¹²⁾は、3 cm 以下の肺腺癌の検討で、核径あるいは核面積の測定が予後判定の有用な指標であったとしているが、今回の検討では核径・核面積に差はなかった。これらは、組織切片からの検討であり、固定法の違い、検体の採取量の違い、対象症例の細胞型・組織型・分化度・病期の違い、などによると考えられる。今後、細胞型・組織型・分化度・病期などをそろえて検討する必要があると思われる。

核小体の多寡については、核小体は、rRNA の合成やリボゾームの形成の場であることから²⁾、一般には、増殖が旺盛でタンパク質合成の盛んな細胞では顕著となると考えられる。細胞周期でみると、ヒトの細胞では分裂前期と分裂終期に核小体は複数存在するが、これも短期間のことであり、ヒトでは小さくわかれた核小体はほとんどみることとはないとされる²⁾。このことから、核小体数の多寡は、癌細胞の分裂増殖の活動性を反映していると考えられ、核小体数の多寡は、悪性度を評価する上でよい指標になると考えられる。

また、円形に近い核を有し、N/C 比が大である細胞の臨床的悪性度が高かったことに関しては、核内のクロマチンが豊富で核が緊満し、細胞の核が相対的に大きいことを意味しているものと思われる。

Lung Cancer Study Group の報告⁵⁾によると、術後病期がⅡ期・Ⅲ期である腺癌の術後化学療法は有効とされるが、Ⅰ期腺癌については外科治療の成績が良好であることもあり、その術後化学療法の必要性に関しては、いまだ明確にはされていない。しかしながら、本研究によれば、擦過細胞所見上、核 1 個当たりの核小体数が多く、N/C 比が大で、核形不整に乏しい細胞から構成されている症例の臨床的悪性度は比較的高いと考えられることから、これらの症例に関しては、術後化学療法を主体とした強力な補助療法、ならびに遠隔転移の早期発見治療を目的とした慎重な経過観察を行うことが望ましいと思われる。

V. 結 語

肺末梢型腺癌の臨床的悪性度と擦過細胞像との関連性について検討した。Ⅰ期腺癌症例の予後の良し悪しと、腫瘍陰影の増大速度を、臨床的悪性度の指標とした。

その結果、擦過細胞形態上、核は正円形で、核 1 個当たりの核小体数が多く、N/C 比の大きい細胞からなる肺末梢型腺癌症例の臨床的悪性度は高く、これらの諸因子は予後推定因子となりうると考えられた。

本論文の要旨は第 30 回日本臨床細胞学会総会のワークショップⅢにて発表した。

Summary

Cytomorphometric analysis of peripherally-located pulmonary adenocarcinoma was performed in brushing specimens. The correlation between clinical malignancy and cytomorphometric features of such peripherally-located adenocarci-

noma was as evaluated.

In brushing specimens of pulmonary adenocarcinoma, cytomorphologic features of specimens from patients with clinically more malignant cases revealed numerous nucleoli, a round nuclear shape ($4\pi \times \text{nuclear area/perimeter}^2$), and a large nuclear area/cytoplasmic area ratio (N/C ratio).

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，抗酸菌病研究雑誌，35：157～167，1983。
- 2) Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., et al. : Molecular Biology of the Cell, pp. 426～427, Garland Publishing, New York, 1983.
- 3) 橋本武志，下里幸雄，児玉哲郎・他：肺の末梢に発生した小型腺癌，大細胞癌の臨床病理学的研究，特に腫瘍中心部線維化巣の形態と予後との関連について，肺癌，18：381～390，1978。
- 4) 服部正次，池上晴通，建石竜平・他：肺腺癌の組織亜型分類および分化度別にみた術後成績，肺癌，19：361～369，1979。
- 5) Holmes, E.C., Hill, L.D. and Gail, M. : A randomized comparison of the adjuvant therapy on resected stage II and III non-small cell carcinoma of the lung, Ann. Surg., 202：335～341，1985。
- 6) 宝来 威，南雲サチ子：肺腺癌の手術予後に関わる細胞形態，日臨細胞誌，20：721，1981。
- 7) 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。
- 8) 君塚五郎，林 豊：肺癌の病理組織学的研究—ことに悪性度との関連について—，肺癌，19：167～175，1979。
- 9) Kimura, Y. : A histochemical and ultrastructural study of adenocarcinoma of the lung, Am. J. Surg., Pathol., 2：253～264，1978。
- 10) Koss, L.G. : Diagnostic cytology and its histopathologic bases, Vol. 1, Third. Edition, p. 93, J.B. Lippincott Company, Philadelphia, 1979。
- 11) Matthews, M.J., Kanhouwa, S., Pickren, J., et al. : Frequency of residual and metastatic tumors in patients undergoing curative surgical resection for lung cancer, Cancer Chemother. Resp., 3：63～68，1973。
- 12) 美谷島季彦：肺腺癌の形態計測学的検討：特にその鑑別診断ならびに予後との関連について，肺癌，26：289～297，1986。
- 13) 宮本 宏，伊藤政美，高岡和夫・他：肺腺癌の組織像と予後との関係，肺癌，25：1023～1029，1985。
- 14) 太田伸一郎，斎藤泰紀，今井 督・他：フローサイトメトリによる肺非小細胞癌の DNA 量解析，日臨細胞誌，26：926～931，1987。

- 15) Schwartz, M. : A biomathematical approach to clinical tumor growth, *Cancer*, 14 : 1272~1294, 1961.
 - 16) Shimosato, Y., Kodama, T. and Kameya, T. : Morphogenesis of peripheral type adenocarcinoma of the lung in Shimosato, Y., Melamed, M.R., Nettesheim, P. (eds), *Morphogenesis of Lung Cancer*, volume I, pp. 65~89, CRC Press, Boca Raton, 1982.
 - 17) 下里幸雄 : 肺癌 ; その組織発生, 分化, 予後因子について, *日病会誌*, 72 : 29~57, 1983.
 - 18) Straus, M.J., Janis, M.G. and Moran, R.E. : Pathogenesis and therapy of lung cancer, p 616, Marcel Dekker, Inc., New York, 1978.
 - 19) 高倉英博, 広橋悦雄, 下里幸雄・他 : 肺末梢腺癌, Stage Ia の所属リンパ節における形態学的免疫応答と予後, 癌の臨床, 29 : 777~784, 1983.
 - 20) 高岡和夫 : 肺腺癌の臨床的・病理学的研究—特に発生母細胞に基づく亜型分類と悪性度について—, *北海道医学雑誌*, 62 : 41~53, 1987.
 - 21) 薄田勝男, 高橋里美, 菅間敬治・他 : 肺癌集検宮城方式における X 線写真による発見例の評価—診断過程の分析及び適及的検討—, *肺癌*, 28 : 343~352, 1988.
 - 22) 吉村克俊, 山下延男・他 : 全国集計よりみた肺癌の治療と予後を左右する因子—日本 TNM 分類肺癌委員会報告, *肺癌*, 22 : 117~127, 1982.
-