原 著

乳癌の定量細胞化学的検討

——核内 DNA 量, 核内タンパク量をパラメーターとした解析——

東京医科大学外科

三浦 弘之

乳癌の生物学的特性をみるべく、乳癌細胞の核内 DNA 量および核内タンパク量を顕微分光測光機を用いて測定した。DNA ヒストグラムを I 型 (2C pattern), II 型 (2C・4C pattern), III 型 (2C・4C serial pattern), IV 型 (aneuploid pattern) に分類し、DNA ヒストグラムおよび核内タンパク/DNA 比が 2.25 (2.0) 以上を示す細胞割合 ($P/C > 2.25$ (2.0) 細胞割合) を検討し、以下の結果を得た。

1) 予後との関係: 3 年 6 ヶ月以内の短期死亡例には I 型がなく, III 型, IV 型の割合が多かった。 $P/C > 2.0$ 細胞割合は、短期死亡例に有意に高く、7 年以上の長期生存例でも高値を示す症例の大部分は 6 年目以降に再発し、担癌生存中であることを認めた。

2) 病期との関係: stage I には I 型が多く, stage III に IV 型が多かった。

3) 組織型との関係: 有意な関係は認められなかった。

4) ER との関係: 陽性例に I・II 型が多く, 陰性例に III・IV 型が多かった。

5) 閉経との関係: 閉経前症例に I・III 型が多く, 閉経後症例に IV 型が多かった。 $P/C > 2.25$ 細胞割合は閉経後に有意に多かった。

DNA ヒストグラムおよび $P/C > 2.25$ 細胞割合は、乳癌の生物学的悪性度、予後推定に有用であると考えられた。

Key words : Breast——Cancer——Microspectrophotometer——DNA analysis

I. はじめに

乳癌症例には、腫瘍径が 2 cm 以下でリンパ節転移がなくても早期に再発・転移を来す症例があり、逆にリンパ節転移があり、分化の悪いと考えられている硬癌であっても、長期生存する症例がある。さらに治療後 10 年を経て再燃してくる症例もある。乳癌の病期分類はその一時的な進行度を表すもので、腫瘍のも

つ潜在的な増殖能、早い時期での微小転移など生物学的動態を予測する手段とはなりえない。近年 flow cytometry や、顕微分光測光、顕微蛍光測光などを用い、固形癌の DNA 解析が試みられ、細胞化学的な面から予後との関連性が検討されている^{1,6,8)}。Flow cytometry は短時間に数多くの細胞を計測できるが、癌細胞以外の正常細胞まで計測されてしまうという欠点がある。これに対し顕微測光は測定に時間がかかるが、個々の細胞を確認できるという大きな利点がある。著者は顕微分光測光法を応用して、テレビ画面による画像解析と、コンピューターによる統計処理のスピード化を可能にした新たな機種を開発し、これを用いて乳癌細胞の定量細胞化学的検討を行った。

Quantitative analysis of nuclear protein and nuclear DNA of breast cancer cases

Hiroyuki MIURA, M.D.

Department of Surgery, Tokyo Medical College

論文別刷請求先 ☎ 160 東京都新宿区西新宿 6 の 7 の 1 東京医科大学外科 三浦弘之

平成元年 12 月 21 日受付

平成 2 年 1 月 26 日受理

表1 長期生存例と短期死亡例

長期生存					短期死亡				
年齢	組織型	病期	備考		年齢	組織型	病期	備考	
1	56	sci	$t_2n_0m_0$	I	1	39	pap	$t_2n_2m_0$ III	3年3月死
2	71	sci	$t_1n_0m_0$	I	2	69	pap	$t_3n_2m_0$ III	2年0月死
3	52	sci	$t_2n_0m_0$	I	3	58	pap	$t_2n_2m_0$ III	2年3月死
4	48	sci	$t_2n_1\beta m_0$	II	4	56	lob	$t_2n_3m_0$ IV	1年2月死
5	54	sci	$t_2n_0m_0$	I	5	56	sol	$t_2n_1m_0$ II	10月死
6	50	sol	$t_1n_0m_0$	I	6	47	sci	$t_2n_0m_0$ I	8月死
7	43	pap	$t_2n_0m_0$	I	7	50	sol	$t_3n_3m_1$ VI	1年2月死
8	53	sol	$t_1n_0m_0$	I	8	46	sci	$t_2n_1m_0$ II	8月死
9	59	sol	$t_1n_0m_0$	I 6年3月再発	9	28	sol	$t_2n_0m_0$ I	2年3月死
10	46	pap	$t_2n_0m_0$	I 6年8月再発	10	54	sci	$t_2n_0m_0$ I	2年4月死
11	55	sol	$t_2n_2m_0$	III 11年6月再発	11	55	sol	$t_2n_0m_0$ I	3年5月死
					12	54	sol	$t_3n_3m_0$ VI	9月死
					13	49	sol	$t_1n_0m_0$ I	2年9月死

pap: papillotubular ca.

sol: solid-tubular ca.

sci: scirrhou ca.

lob: invasive lobular ca.

II. 材料および方法

1. 材料

1977年1月から1987年12月までの11年間に東京医科大学外科で切除された女性乳癌症例のうち、7年以上生存している長期生存例11例と3年6ヵ月以内に癌死した短期死亡例13例のホルマリン固定、パラフィン包埋材料から単離、塗抹した標本を用いた(表1)。

さらに、1986年6月から1988年12月までの2年6ヵ月間に、東京医科大学病院外科で手術された女性乳癌症例のうち、エストロゲンリセプター(ER)が測定された手術材料の捺印標本41例を用いた。年齢は20歳~88歳、平均49.1歳であった。ER陽性21例、陰性20例、閉経前症例23例、閉経後症例18例であった。組織型は、乳頭腺管癌17例、充実腺管癌12例、硬癌9例、浸潤性小葉癌2例、管状癌1例であった。病期分類は、tnm分類で、stage I 22例、stage II 10例、stage III 9例であった。なお、組織・病期分類は、『臨床・病理乳癌取扱い規約』(第9版)¹⁰⁾に従った。

2. 方法

1) 標本作製・染色

癌病巣を含むパラフィン包埋材料から50 μ m切片5片を採取し、図1にしたがって細胞単離を行い、オートスマアを用いて塗抹標本作製した。また外科的

図1 細胞単離法

に摘出された癌病巣をただちに半割し、一方の割面からER測定用の標本を採取し、それに対応する割面から捺印標本を取り、水溶性エアゾール固定剤(サイトキープ®)で固定した。各標本には図2に示すごとくFeulgen-naphtol yellow S二重染色を施した。

2) 核内DNA量・核内タンパク量の測定

核内DNA量および核内タンパク量の測定には、浜松ホトニクス社と共同開発した定量細胞診断テレビカメラシステム(図3)を用い、それぞれ547nmおよび436nmの波長で顕微分光測定を行った。

1症例につき無作為に癌細胞最低100個と対照となる同一標本中の小リンパ球を最低20個測定した。従

図 2 Feulgen-naphthol yellow S 二重染色

図 3 定量細胞診断テレビカメラシステム

来指摘されたごとく¹⁷⁾, 小リンパ球の各測定値に 20% を加えた数値をそれぞれ 2C, 2P とおいたときの癌細胞の核内 DNA および核内タンパク量の相対値を算出し, DNA ヒストグラムを作製した. さらに核内タンパク/DNA 比が 2.25 以上を示す細胞割合 (P/C > 2.25 細胞割合, ただしホルマリン固定標本ではタンパク量が少なくなるため⁷⁾ 2.0 を採用した) について比較検討した.

3) エストロゲンリセプターの測定

大塚アッセイ(株)において, Radio Receptor Assay (Dextran Coated Charcoal 法) を用い¹⁰⁾, 5 fmol/mg cytosol protein 以下を陰性とした.

図 4 DNA ヒストグラム

III. 結 果

DNA ヒストグラムをその型から 4 型に分類した (図 4).

I 型 (2C pattern): 正常細胞と同じ 2C 領域に主ピークが存在し, 3C 以上の細胞が全体の 10% 未満.

II 型 (2C・4C pattern): 2C と 4C に主ピークがあり, 2.5~3.4C までの細胞が全体の 5% 以下. この中には 8C に小さなピークを持つものも含まれるが, 5C 以上の細胞は 10% 以下である. また, 特に 4C に主ピークがあり, 2C 領域の細胞が 5% 以下のものを II' 型とした.

III 型 (2C・4C serial pattern): 正常細胞の細胞分裂周期と同様に 2~4C まで連続性があり, 2.5C から 3.4C までの細胞が 5% 以上のもの.

IV 型 (aneuploid pattern): aneuploidy を示すもの. さらに 5C 以上の細胞割合が 10% を越え, 不規則に連続しているものもこの型に含めた.

1. 予後との関係 (図 5)

1) DNA ヒストグラム

短期死亡 13 例中, III 型 5 例 (38.5%), IV 型 6 例 (46.2%) で, この 2 型で 84.7% を占めている. さらに I 型はなく, II 型は 2 例とも II' 型であった. 長期生存例では I 型から IV 型まで均等に分布しているが, II' 型は存在しなかった. また II 型の 1 例および III 型の 2 例は, 術後 6 年以上経過した後再発し, 担癌生存中である.

DNA ヒストグラム	長期生存	短期死亡
I	3	0
II	2	0
II'	0	2
III	3	5
IV	3	6

予後と DNA ヒストグラムの関係

予後と P/C>2.0 細胞割合の関係

図 5 予後との関係

DNA ヒストグラム	pap	sol	sci	others
I	5	0	3	1*
II	4	2	1	
II'	2	1	1	
III	1	2	2	
IV	5	7	2	2**

* tubular ca. pap : papillotubular ca.

** invasive lobular ca. sol : solid-tubular ca.

sci : scirrhous ca.

組織型と DNA ヒストグラムの関係

組織型と P/C>2.25 細胞割合の関係

図 6 組織型との関係

2) P/C>2.0 細胞割合

短期死亡例に有意に高く、長期生存例でも高値を示す症例は、術後6年目以降再発し、拒癌生存であった。

2. 組織型との関係 (図6)

1) DNA ヒストグラム

乳頭腺管癌にはIII型が少なかった。また他の組織型に比較すると、euploidyを示すI型とII型の占める割合が17例中11例(64.7%)と多かった。一方充実腺管癌にはI型がなく、III型とIV型で12例中9例(75%)を占めていた。硬癌は様々なモードを示した。浸潤性小葉癌は2例ともIV型に、管状癌はI型に分類されたが、症例が少ないため、有意な傾向とは断定できなかった。

2) P/C>2.25 細胞割合

各組織型とも0~70%の間に広く分布し、一定の傾向を示さなかった。各組織型の間に有意差はなかつ

た。

3. 病期との関係 (図7)

1) DNA ヒストグラム

Stage IIIでは9例中6例でIV型を示していた。また逆にDNAヒストグラムのI型9例中6例はstage Iに含まれ、II型7例中5例がstage Iに含まれた。しかしstage IにはIII型、IV型もそれぞれ3例、7例含まれており、一定の傾向は得られなかった。

2) P/C>2.25 細胞割合

図で示したごとく、各stage間に有意差を認めなかった。

4. t因子との関係 (図8)

1) DNA ヒストグラム

t1症例にはIII型がなく、III型は5例ともすべてt2症例に含まれた。t3症例には5例中4例がIV型を呈しており、II型、III型は存在しなかった。

DNA ヒストグラム	I	stage II	III
I	6	2	1
II	5	2	0
II'	1	2	1
III	3	1	1
IV	7	3	6

病期と DNA ヒストグラムの関係

病期と P/C > 2.25 細胞割合の関係

図 7 病期との関係

DNA ヒストグラム	t ₁	t ₂	t ₃
I	6	2	1
II	4	3	0
II'	1	3	0
III	0	5	0
IV	8	4	4

t 因子と DNA ヒストグラムの関係

t 因子と P/C > 2.25 細胞割合の関係

図 8 t 因子との関係

2) P/C > 2.25 細胞割合との関係

各因子間に有意差を認めなかった。

5. n 因子との関係

1) DNA ヒストグラム

n2 症例 7 例中 4 例が IV 型であるが、n0 症例においても III 型 3 例、IV 型 6 例と aneuploidy を示す症例があり、一定の傾向は見い出せなかった。

2) P/C > 2.25 細胞割合

各因子間に有意差を認めなかった。

6. ER との関係 (図 9)

1) DNA ヒストグラム

ER (+) 症例 21 例中、I 型が 7 例 (33.3%)、II 型と II' 型をあわせて 9 例 (42.9%) あり、この 2 型で全体の 76.2% を占めている。また ER (-) 症例 20 例中、III 型 4 例 (20.0%)、IV 型 12 例 (60.0%) で、この 2 型で全体の 80.0% を占めていた。

2) P/C > 2.25 細胞割合

ER (+) 症例では平均 $22.4 \pm 18.9\%$ 、ER (-)

症例では $25.9 \pm 18.4\%$ とやや ER (-) 症例が高いが、有意差は認められなかった。

7. 閉経との関係 (図 10)

1) DNA ヒストグラム

閉経前症例では I 型 9 例中 8 例が、また III 型 5 例中 4 例が含まれ、閉経後症例に比べて、I 型、III 型の占める割合が大きかった。逆に閉経後症例では IV 型が 18 例中 11 例 (61.1%) を占めていた。

2) P/C > 2.25 細胞割合

閉経前症例は $18.8 \pm 17.4\%$ 、閉経後症例では $30.9 \pm 18.2\%$ と、閉経後症例が有意に大きかった ($p < 0.05$)。

IV. 考 察

乳腺腫瘍の良悪性判定の客観的指標として、核 DNA 定量の検討がなされてきた^{13,14)}。その結果、他の固形癌と異なり、乳癌には良性腫瘍あるいは正常乳

DNA ヒストグラム	ER(+)	ER(-)
I	7	2
II	5	2
II'	4	0
III	1	4
IV	4	12

ERとDNAヒストグラムの関係

ERとP/C>2.25細胞割合の関係

図9 ERとの関係

DNA ヒストグラム	Pre-menopause	Post-menopause
I	8	1
II	4	3
II'	2	2
III	4	1
IV	5	11

閉経とDNAヒストグラムの関係

閉経とP/C>2.25細胞割合の関係

図10 閉経との関係

腺組織と同じDNAヒストグラムを呈するものが少なからず存在することがわかった。著者は乳癌の生物学的特性について、核DNA定量のみならず、核タンパク量を測定することにより定量細胞化学的に詳細な検討を行い、臨床的に予後判定や治療法の決定に新たな知見を得ることを目的とした。解析に当たり、以下の2種のパラメーターを検討した。

1) DNAヒストグラム

AuerらによるDNAのヒストグラム分類⁴⁾を基本として、前述のI型からIV型にわけた。さらにII型の中で4Cにのみピークのあるものは、それ自体stem lineである可能性も考慮し、特にII'型とした。I型とII型は主ピーク間に連続性がなく、S期と考えられる細胞の少ない型である。したがって増殖能が低いと考えられ、予後の良い腫瘍と考えられる。一方III型はS期と考えられる細胞が多く、増殖能が高いと考えられる。またIV型はaneuploidyを示す腫瘍で、euploidyを示す腫瘍に比較して、予後が悪いと考えら

れている。先に行ったパラフィンブロックから細胞単離を施し、測定した結果では、3年6ヵ月以内に再発死亡した症例にI型はなく、III型とIV型を合わせると全体14例中11例(78.6%)をしめ、II'型が2例を占めていた。これに対し、7年以上生存している11例においてはII'型はなく、各型ともほぼ同数であったが、III型2例、II型1例に6年目以降の再発が認められた。IV型を呈する症例でも、2C領域とover 5C領域に2つのピークがあり連続性はなく、増殖能は低いと考えられた。短期死亡例には、患者の受診が遅れ、来院時すでに病期の進んでいる症例が多く含まれているが、stage I症例でもヒストグラム上、III型、IV型を示していることが注目すべき点である。すなわち、stage Iの段階でもすでに予後が不良と示唆される。一方長期生存例でIII型を示した2例で再発している点が興味深い。III型における担癌生存・死亡の違いは明確ではないが、手術法、補助療法によるものと考えている。

また新鮮捺印標本の検討では I 型 7 例 (22.0%), II 型 11 例 (26.8%), うち II' 型 4 例 (9.7%), III 型 5 例 (12.2%), IV 型 16 例 (39.0%) であった. 検討した 2 年間で, 再発・転移は III 型および IV 型の各 1 例に認められた.

Fallenius ら⁶⁾は retrospective に 409 例の乳癌症例の穿刺吸引標本を顕微分光測光し, 5 年非再発生存率が DNA ヒストグラム上 type I 90%, type II 74%, type III 52%, type IV 52%, 10 年非再発生存率がそれぞれ 81, 69, 35, 46% であると報告し, 乳癌の予後推定において DNA ヒストグラムが有用であると結論している.

Ewers ら⁵⁾は乳癌において, 病期の進行とともに aneuploidy の出現頻度が増加することを指摘しているが, われわれの症例を tnm 分類の病期別に比較してみると, I 期, II 期では差がなく, III 期に aneuploidy を示す IV 型の割合が多かった. t 因子で考えてみると t 3 症例に IV 型の割合が多いが, t 1 症例にも 19 例中 8 例 (42.1%) も認められ, 一定の傾向はなかった. n 因子で比較しても同様に一定の傾向は認められなかった. したがって, 腫瘍の大きさ, リンパ節への進展とヒストグラムには明らかな関連性がなかった. 局所増殖能やリンパ節転移様式には, DNA と関係のない独立した因子が存在すると考えられる.

一方 ER (+) 症例では I 型と II 型を合わせて 76.2% (16/21), 逆に ER (-) 症例では III 型と IV 型を合わせて 80.0% (16/20) であり, ER (-) 症例に aneuploidy が多い傾向にあった. この結果は Auer ら³⁾の報告と類似しており, ER (+) 症例は, ホルモン療法に感受性が高く, 比較的予後の良い腫瘍である¹²⁾ことの一面を物語っている.

2) P/C > 2.25 細胞割合

正常細胞における細胞周期では, 核内 DNA 量と核内タンパク量の増減に一定の法測がある. すなわち, 核 DNA 合成前期 (G 1 期) は休止期 (G 0 期) に比較して, 核内 DNA 量は増加していないが, 核内タンパク量は増加している. 次の S 期では, 核内 DNA の合成とともに核内タンパク量も増加する. 合成後期 (G 2 期) と分裂期 (M 期) は, 核内 DNA 量は倍加し, 核内タンパク量も増加する^{2,19)}. Dry mass で測定した場合, G 0 期の核内タンパク/DNA 比を 1 とすると, G 1, G 2 M 期は理論上 2.25 以上となる. したがって P/C 比が 2.25 以上を示す細胞割合が多い組織ほど, 増殖能が高いと考えられる.

Gaub ら⁷⁾は naphthol yellow S 染色と顕微分光測光を行い, dry mass で測定した値にきわめて近い値がであることを報告している. そこでわれわれは P/C > 2.25 を示す細胞割合をパラメーターとして評価した. ただしホルマリン固定ではタンパク量が約 1 割少なくなるため, 2.0 を採用した.

術後短期死亡例では, 長期生存例に比べ, 有意に高い値を示した. さらに長期生存例でも高値を示した例のほとんどが, 術後 6 年を経てから再発している. したがって P/C > 2.25 (2.0) 細胞割合は腫瘍の潜在的な増殖能を示唆すると考えられた. なぜ高値例が 6 年目以降に再発するかは, 今後の検討を待たなければならない.

中島ら¹⁵⁾は大腸癌の核内 DNA 量と核内タンパク量を測定し, 肝転移のある症例に P/C > 2.0 細胞割合が高いと報告しており, 池田ら¹¹⁾は肺癌の T 1 症例に関し retrospective に検討を行い, 予後不良群に有意に P/C > 2.0 細胞割合が多いと報告している. したがって P/C > 2.25 (2.0) 細胞割合は, 癌の悪性度と関連があると考えられる. しかし捺印標本の検討では, 組織型, 病期, t 因子, n 因子, ER の有無ではいずれも有意差を認めなかった. 唯一, 閉経前症例に比べて, 閉経後症例が有意に高い傾向にあった. 一般的に加齢にともない, 正常細胞内のタンパク量が低下し, 正常細胞能が低下するとされている¹⁸⁾. 腫瘍細胞に関しては, Huang ら⁹⁾が 39 歳以下の若年者肺癌症例と 70 歳以下の高齢者肺癌症例について検討しており, 核内 DNA 量の平均値には有意差が認められなかったが, 核内タンパク量では若年者症例が高齢者症例に比べて優位に高値であると報告している. 閉経後に再発率が高いという報告はない. 今回の検討では, 閉経後症例に ER (-) 症例が多かったこともあるが, 乳癌の場合, 閉経によりホルモン状態が変わるため, 加齢による細胞タンパク質の減少以上に働く要因があるものと考えられる. しかし組織型, 病期, ER が同じ症例ならば, P/C > 2.25 細胞割合が大きい症例ほど, 予後が悪いと予想される.

乳癌は術前の診断法 (穿刺の有無, 腫瘍摘出の有無など), 術後補助療法, 患者の受診の遅れ (patient delay) など予後に関して様々な要因が働くため, DNA のみで予後を推定するのは困難である. しかし, 同一診断手技を用い, 同一治療を行った同病期の腫瘍を比較するならば, 以上の 2 パラメーターが有用であると考えられる. 本研究の結果から, 乳癌の生物

学的特性の一面を解明できた。この2つのパラメーターは、臨床的に乳癌の予後判定、治療法の選択に有用であることを認めた。

V. ま と め

顕微分光測光法を用いて、乳癌細胞の核内DNA量および核内タンパク量を測定し検討を加えた。DNAヒストグラム、 $P/C > 2.25$ 細胞割合を検討することにより、乳癌の生物学的特性、予後が推定できると考え、さらに臨床的に治療法の選択に有用と考えられた。

稿を終えるにあたり、終始指導とご校閲を賜った恩師、早田義博教授に深甚なる謝意を表します。また直接ご指導いただきました加藤治文助教授、小中千守博士に厚くお礼申し上げますとともに、ご協力いただきました教室員各位に深謝いたします。

なお本稿の要旨は、第29回日本臨床細胞学会総会および第89回日本外科学会総会において発表した。

Summary

Quantitative microspectrophotometry was performed in female breast cancer cases by dual parameter analysis of cellular nuclear protein and nuclear DNA contents using the Feulgen-naphthol yellow staining method. Tumors were studied by means of cell suspensions made from paraffin embedded blocks in 24 cases and imprint smears in 41 cases. The DNA histograms were classified into 4 types: type 1 showed a 2C pattern, type 2 showed 2C·4C patterns, type 3 showed a 2C·4C serial pattern and type 4 showed aneuploid pattern. The results were follows.

In the cases that died within 42 months, the proportion of types 3 and 4 was high and percentage of cells with over 2.0 nuclear protein to nuclear DNA ratio ($P/C > 2.0$ cell percentage) was significantly higher ($p < 0.05$). Even in long survivor many patients who showed a high $P/C > 2.0$ cell percentage had tumor recurrence over 6 years after therapy.

In stage 3 cases the proportion of type 4 was high. In contrast, in type 1 cases the proportion of stage 1 cases was high.

There was no significant difference in the histological type. In estrogen receptor positive cases the proportion of type 1 and 2 was high (76.2%), and in negative cases the proportion of type 3 and 4 was high. (80.0%)

In premenopausal cases the proportion of types 1 and 3 was high, but in postmenopausal cases the proportion of type

4 was high. $P/C > 2.25$ cell percentage was significantly higher in postmenopausal cases ($p < 0.05$).

Investigation of the DNA histogram and $P/C > 2.25$ (2.0) cell percentage allows estimation of the character and prognosis of breast cancer cases.

文 献

- 1) Atkin, N.B.: Modal deoxyribonucleic acid value and survival in carcinoma of the breast, *Br. Med. J.*, 29: 271~272, 1972.
- 2) Auer, G.: Nuclear protein content and DNA-histon interaction, *Exp. cell Res.*, 75: 231~236, 1972.
- 3) Auer, G.U., Caspersson, T.O., Gustafsson, S.A., et al.: Relationship between nuclear DNA distribution and estrogen receptors in human mammary carcinomas, *Analyt. Quant. Cytol.*, 2: 280~284, 1980.
- 4) Auer, G., Caspersson, T.O. and Wallgren, A.S.: DNA content and survival in mammary carcinoma, *Analyt. Quant. Cytol.*, 2: 161~165, 1980.
- 5) Ewers, S.B., Langstrom, E., Baldetop, B., et al.: Flow cytometric DNA analysis in primary breast carcinoma and clinicopathological correlations, *Cytometry*, 5: 408, 1984.
- 6) Fallénius, A.G., Auer, G.U. and Carstensen, J.M.: Prognostic significance of DNA measurement in 409 consecutive breast cancer patients, *Cancer*, 62: 331~341, 1988.
- 7) Gaub, J., Auer, G. and Zetterberg, A.: Quantitative cytochemical aspects of a combined Feulged-Naphthol yellow S steining procedure for the simultaneous determination of nuclear and cytoplasmic proteins and DNA in mammarian cells, *Exp. cell Res.*, 92: 323~332, 1975.
- 8) Hedley, D.W., Rugg, C.A. and Taylor, I.W.: Influence of cellular DNA content on disease-free survival of stage II breast cancer patients, *Cancer Res.*, 44: 5395~5398, 1984.
- 9) Huang, M., Kato, H., Konaka, C., et al.: Quantitative cytochemical differences between young and old patients with lung cancer, *Chest*, 88: 864~869, 1985.
- 10) 飯田泰啓, 徳田康孝, 新井圭輔・他: ^{125}I -Estrogenを用いるヒト乳癌の細胞質エストロゲン・レセプターの測定, *核医学*, 24: 327~333, 1987.
- 11) 池田徳彦, 小中千守, 加藤治文・他: 肺腺癌 T1 症例の定量細胞化学的検討, *日臨細胞誌*, 27: 699, 1988.
- 12) Knight, III, W.A., Livingston, R.B. and Gregory, E.J.: Estrogen receptor as an independent prognostic fac-

- tor for early recurrence in breast cancer, *Cancer Res.*, 37: 4669~4671, 1977.
- 13) 小中千守: 乳腺腫瘍細胞の核 DNA 定量による診断学的研究, *日臨細胞誌*, 19: 127~139, 1979.
 - 14) 小山博記: 乳腺症, 乳癌組織の核 DNA 量に関する顕微分光測光法による研究, *大阪大学医学雑誌*, 17: 105~116, 1965.
 - 15) 中島 厚, 木村幸三郎, 永楽 仁・他: 原発性大腸癌の細胞核 DNA-蛋白量を指標とした悪性度評価, *東医大誌*, 47: 492~503, 1989.
 - 16) 乳癌研究会編: 臨床・病理乳癌取扱い規約, 金原出版, 東京, 1988.
 - 17) Wagner, D., Richart, R.M. and Turner, J.Y.: DNA contents of human endometrial gland cells during the menstrual cycle *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 100: 90~97, 1968.
 - 18) Yong, V.R., et al.: Total human body protein synthesis in relation to protein requirement at various ages, *Nature*, 253: 192~193, 1975.
 - 19) Zetterberg, A.: Synthesis and accumulation of nuclear and cytoplasmic proteins during interphase in mouse fibroblasts in vitro, *Exp. Cell Res.*, 42: 500~511, 1966.
-