 原 著

非小細胞肺癌における癌細胞核 DNA 量と核異型 および臨床病理所見との関係

筑波大学医学研究科¹⁾, 同 基礎医学系病理²⁾, 同 臨床医学系外科³⁾, 同 付属病院病理⁴⁾

山本 達生¹⁾ 堀口 尚²⁾ 菅間 博²⁾ 小形岳三郎²⁾

深沢 政勝⁴⁾ 池沢 剛⁴⁾ 稲毛 芳永¹⁾ 赤荻 栄一³⁾

三井 清文³⁾ 堀 原一³⁾

最近開発されたカラー画像解析装置を用いて, 非小細胞肺癌の核 DNA 量の計測を行い, 同時に計測した細胞形態との関係, および臨床病理所見との関係を検討した。

全症例 63 例中, diploidy は 15 例 (23.8%), aneuploidy は 48 例 (76.2%) にみられた。まず, 得られたヒストグラムパターンから DNA ploidy (diploidy : A 群, aneuploidy : B 群) と細胞周期の S+G2/M 期の細胞数 (増加なし : タイプ 1, 増加あり : タイプ 2) に注目して, A-1 (5 例), A-2 (10 例), B-1 (20 例), B-2 (28 例) の 4 グループに分類した。A 群と B 群間では, 測定しえた核異型度 (核の大きさ, 核の大小不同性, 核縁の不整度) に違いがみられたが ($p < 0.001 \sim 0.05$), タイプ 1 とタイプ 2 とではその核異型度に有意差はなかった。さらに各グループと, 組織型, 腫瘍の進展度 (病期, 腫瘍径, リンパ節転移, 胸膜浸潤, 肺内転移) および患者の予後などの臨床病理所見との関係を検討した結果, A 群と B 群間には明らかな相関はみられなかったが, タイプ 2 はタイプ 1 に比較して, 腫瘍径が大きく, リンパ節転移例が多く, 有意に予後は不良であった ($p < 0.05$)。

以上から, 非小細胞肺癌において, DNA ploidy の異常は, 癌細胞の核異型度とは相関するが, 生物学的悪性度を必ずしも反映しないことが示唆された。

Key words : Lung cancer—Image cytometry—DNA ploidy—Nuclear atypia—Morphometry

I. はじめに

The effect of nuclear DNA content on nuclear atypia and clinicopathological factors in non-small cell lung carcinoma

Tatsuo YAMAMOTO¹⁾, M.D., Hisashi HORIGUCHI²⁾, M.D., Hiroshi KAMMA²⁾, M.D., Takesaburo OGATA²⁾, M.D., Masakatsu FUKASAWA⁴⁾, C.T., Tsuyoshi IKEZAWA⁴⁾, C.T., Yoshihisa INAGE¹⁾, M.D., Eiichi AKAOGI³⁾, M.D., Kiyofumi MITSU³⁾, M.D., Motokazu HORI³⁾, M.D.

¹⁾Doctoral Program in Medical Sciences, ²⁾Department of Pathology, Institute of Basic Medicine, ³⁾Department of Surgery, Institute of Clinical Medicine, University of Tsukuba

⁴⁾Clinical Laboratory, Tsukuba University Hospital

論文別刷請求先 : 305 茨城県つくば市天王台 1 の 1 の 1 筑波大学医学研究科 山本達生

平成 5 年 6 月 10 日受付

平成 5 年 9 月 3 日受理

癌細胞には, 核内の DNA にさまざまなレベルの異常が認められ, その細胞および核の形態や, 組織中の細胞の配列にいたるまで, 異常な表現型, つまり「異型」が常にみられる。形態学的診断の一つである細胞診では, 特に核の異型が癌診断の根拠となっている。一方, 癌遺伝子の検出や核 DNA 量計測をはじめとするさまざまなアプローチが, 癌の生物学的特性の解明を可能にしつつある。しかし, これらの分子生物学的研究成果と, 従来から蓄積された病理形態学的情報とは, いまだに大きな隔りがある。本研究では, 癌細胞にみられる核 DNA 量の異常に注目して, これ

と、核異型度および臨床病理所見との関係を明らかにすることを目的とした。

核DNA量計測から求められるaneuploidyは、固型悪性腫瘍で高率にみられ、生物学的悪性度の指標の一つと考えられるようになった^{1,2)}。原発性肺癌においても、aneuploidyの頻度は56~96%にのぼり、腫瘍の進展度や患者の予後との関係も検討されている^{3~6)}。

従来の核DNA量の計測は、もっぱら、フローサイトメトリーを用いて行われている。しかし、この方法では、核DNA量の異常と核異型との関連を直接捉えることは困難であった。われわれが開発した、顕微分光測光の原理を応用したカラー画像解析装置システム「NASCA (Nucleic Acid Speedy Color Analyzer)」は、従来から用いられているフローサイトメトリーと、ほぼ同等の精度(変動係数3~5%)で癌細胞の核DNA量の計測が可能であり、同時に同じ標本にて核形態の計測もできるという利点を有する⁷⁾。このカラー画像解析装置の利点を生かして、非小細胞肺癌の核DNA量を計測すると同時に、病理形態異常のなかでもとりわけ重要とされる核の異型度、すなわち核の大きさ、核の大小不同性、核縁の不整度を計測し、これらの関係を検討した。また、癌細胞核DNA量と組織型、腫瘍の進展度、患者の予後との関係もあわせて検討した。

II. 対象と方法

非小細胞肺癌手術例63例を対象とした。その内訳は、腺癌34例、扁平上皮癌20例、大細胞癌5例、カルチノイド4例であった。これらすべての症例は術前治療を受けておらず、また、病期がIII期以上の症例には原則として術後放射線療法、化学療法を含む補助療法を行っている。年齢は27~86歳、平均63.6歳で、男性43名、女性20名であった。

まず、切除された腫瘍の最大面で割を入れ、そこから得られた新鮮捺印標本を2枚以上作製し、95%アルコールで24時間固定した。このうち任意の1枚をパパニコロー染色を行い、癌細胞の存在を確認した。

核DNA量は、新鮮捺印標本中、比較的均等に作製できたものを選択し、Feulgen染色⁸⁾を行い、オリンパス社製光学顕微鏡、ビクター社製CCDカメラ、アビオニクス社製カラー画像解析装置を用い、顕微分光測光の原理によって測定した⁷⁾。得られた計測値は、ラトック社製核DNA量解析ソフトウェア「NASCA」と日本電気社製パーソナルコンピューターPC 9801-DAを使用して解析した。まず、internal

standardとして、同一標本内のリンパ球を合計100個選択し、これらの核DNA量を計測してその平均値を2Cとした。次に1検体につき約500個の癌細胞の核DNA量を計測し、これらからヒストグラムを作成し、以下のように分類した。G1/0期のピークが2.4C以上にあるものをaneuploidyと判定し、diploidyをA群、aneuploidyをB群とした。さらに、S+G2/M期の細胞数の増減は細胞の増殖能の指標になると考え、細胞周期S+G2/M期の細胞数の増加があるものをタイプ2、それ以外のものをタイプ1とした。この2つの要素の組み合わせから、A-1; diploidy, A-2; S+G2/M期の細胞数の増加あるdiploidy, B-1; aneuploidy, B-2; S+G2/M期の細胞数の増加あるaneuploidyの4グループに分類した(図1)。なお、変動係数(Coefficient of Variation, 以下CV値と略)が8%以上のものは、あらかじめ検討対象から除外した。

核異型は、同様に上記のシステムを用いて次のように求めた。まず、癌細胞核DNA量を計測すると同時に、個々の癌細胞の核面積と核周長を計測した。各症例の核の大きさにはそれぞれの癌細胞500個の平均核面積を、核の大小不同性には核面積のばらつき、すなわち標準偏差値を使用した。さらに、核縁の不整度には核周の真円度⁹⁾を次の計算式によって求め、核異型度の指標とした。真円度とは、その値が1より大きいほど、その核が正確な円形から逸脱することを意味する。

$$\text{真円度} = (\text{核周長})^2 \div (\text{核面積} \times 4\pi)$$

また、切除検体に対しては、通常の組織学的検索を行い、組織型および腫瘍径、リンパ節転移の広がり、胸膜浸潤の程度、肺内転移の有無、病理病期などを判定した。組織分類および病期分類は日本肺癌学会分類(肺癌取り扱い規約¹⁰⁾)に従った。

統計処理には、核DNA量と核面積の比較では、ピアソンの積率相関係数を用いた。また核DNA量ヒストグラムパターンから分類した4グループと組織型、腫瘍径、n因子、p因子、pm因子のおおの2群間の検定にはカイ2乗検定を用いた。生存期間は手術日から死亡までの期間(月)とし、患者の予後の検討では、癌死以外の死亡例を除いた。生存曲線はKaplan-Meier法で算出し、生存曲線の有意差検定はgeneralized Wilcoxon testで行った。それぞれ5%以下の危険率をもって統計学的有意差ありと判定した。

図1 核DNA量ヒストグラムパターンによる分類

III. 結 果

1. 核DNA量ヒストグラムパターンと組織型について (表1)

カラー画像解析装置を用いて非小細胞肺癌細胞の核DNA量を測定した結果、全症例63例中48例76.2%に、B群すなわち aneuploidy が認められた。また全症例中38例60.3%にタイプ2、すなわち S+G2/M期の増幅が認められた。年齢、性、組織型別では、各群間の分布の差は認められなかった。しかし、肺癌のなかでは悪性度が低いと考えられるカルチノイド (定型的カルチノイド) では aneuploidy は1例も認められなかった。

2. 核DNA量ヒストグラムパターンと核異型との関係について

癌細胞の核DNA量と核の異型度を、同時に同一標本を用いて計測し、これらの関係を検討した。まず、癌細胞500個の平均核DNA量と平均核面積との間には、正の相関が認められた (図2)。さらに、A群とB群の比較では、B群のほうが、核の大きさ、核の大小不同性、核縁の不整度が増す傾向がみられた。すなわち、癌細胞の核DNA量が増えれば、その核異型度が増すことが示された。しかし、タイプ1とタイプ2、すなわち細胞の増殖能を表すと考えられる細胞周期 S+G2/M期の細胞数の増減と、核の異型度の間に有意な関係はみられなかった (図3)。

表1 核DNA量のヒストグラムパターンと組織型

組織型	腺癌	扁平上皮癌	大細胞癌	カルチノイド
A-1	2	0	0	3
A-2	3	6	0	1
B-1	14	5	1	0
B-2	15	9	4	0

n=63

図2 平均核DNA量と核面積との関係

3. 核DNA量ヒストグラムパターンと腫瘍の進展度について (表2)

癌細胞の核DNA量ヒストグラムパターンと腫瘍の進展度 (病理病期、腫瘍径、リンパ節転移、胸膜浸潤、肺内転移) について、各因子ごとに表に示した。A群とB群間には、腫瘍の進展度とは、明らかな相関はみられなかったが、タイプ2はタイプ1に比較して、腫瘍径が大きく、リンパ節転移例が多い傾向がみられた。また、これらを組織型別に検討したが、各グループと腫瘍の進展度には有意な関係はみられなかった。

A : diploidy, B : aneuploidy, 1 : S+G2/M fraction not increased, 2 : S+G2/M increased
 *1 : $p < 0.001$, *2 : $p < 0.05$, NS : not significant

図 3 核 DNA 量ヒストグラムパターンと核形態量との関係

表 2 核 DNA 量のヒストグラムパターンと腫瘍の進展度

	DNA ploidy		S+G 2/M fraction	
	A : diploidy	B : aneuploidy	1 : not increased	2 : increased
病期				
1	9 (72.3%)	17 (34.7%)	15 (60.0%)	11 (28.9%)
2	2 (14.3%)	8 (16.3%)	2 (8.0%)	8 (21.1%)
3A	1 (7.1%)	10 (20.4%)	3 (12.0%)	8 (21.1%)
3B	0 (0%)	3 (6.1%)	1 (4.0%)	2 (5.2%)
4	2 (14.3%)	11 (22.4%)	4 (16.0%)	9 (23.7%)
	NS		NS	
腫瘍径				
<3.0 cm	7 (50.0%)	12 (24.5%)	12 (48.0%)	7 (18.4%)
>3.1 cm	7 (50.0%)	37 (75.5%)	13 (52.0%)	31 (81.6%)
	NS		$p < 0.05$	
リンパ節転移				
N-	10 (71.4%)	26 (54.2%)	18 (75.0%)	18 (47.4%)
N+	4 (28.6%)	22 (45.8%)	6 (25.0%)	20 (52.6%)
	NS		$p < 0.05$	
胸膜浸潤				
P-	9 (64.3%)	19 (38.8%)	13 (52.0%)	15 (39.5%)
P+	5 (35.7%)	30 (61.2%)	12 (48.0%)	23 (60.5%)
	NS		NS	
肺内転移				
PM-	12 (85.7%)	38 (77.6%)	21 (84.0%)	29 (76.3%)
PM+	2 (14.3%)	11 (22.4%)	4 (16.0%)	9 (23.7%)
	NS		NS	

NS : not significant

図 4 a : 核 DNA 量ヒストグラムパターンと生存曲線 (全症例)
 b : 核 DNA 量ヒストグラムパターンと生存曲線 (腺癌)
 c : 核 DNA 量ヒストグラムパターンと生存曲線 (I・II期)

4. 核 DNA 量ヒストグラムパターンと予後について

癌細胞の核 DNA 量ヒストグラムパターンと患者の予後との関係を検討した。その結果、全症例中、細胞周期 S+G 2/M 期の細胞数の増減による分類，すなわち，タイプ 1 とタイプ 2 との間に有意差を認めた (図 4 a)。これに対して，A 群と B 群間では，予後の差は認められなかった。また，組織型別に同様の検討

を行った結果，腺癌 34 例において，同様にタイプ 1 とタイプ 2 との間に有意差を認めた (図 4 b)。一方，病期別に同様の検討を行ったが，各グループ間の予後に有意差は認められなかった (図 4 c)。

IV. 考 察

今回の研究では，癌細胞の核 DNA 量計測と同時

に、細胞形態量の計測も可能である、カラー画像解析装置システム「NASCA」を用いて解析を行った。

核 DNA 量の計測法には、フローサイトメトリー（以下 FCM と略）とイメージサイトメトリー（以下 ICM と略）がある。今までの報告の大多数は FCM を用いての計測であり、われわれが使用した顕微分光測光^{11,12)}および顕微蛍光測光^{13,14)}などの ICM による計測は少ない。その理由として、FCM は、CV 値が 1~2% と小さく高精度であり、また短時間に測定可能であることによる⁷⁾。しかし、最近 Bose らは、FCM、ICM の両者で核 DNA 量を計測し詳細な検討を行った結果、FCM の場合、正常細胞の大量の混入と細胞崩壊物の混入が癌細胞の aneuploidy 検出率を下げていると指摘した¹⁵⁾。この点、ICM では、癌細胞を直接観察確認しながら核 DNA 量を計測することで、個々の癌細胞の異常をより正確に解析することが可能であるという利点がある^{15,16)}。特にわれわれの開発した「NASCA」は、同一標本にて細胞形態量を計測可能である点で、本研究に最も適した方法であると考えられる。

癌細胞における核異型は、癌の悪性度の指標として従来から用いられている。この核異型は、癌化に伴うさまざまな異常の集積の結果と考えられるが、実際に核 DNA 量の異常は、どの程度この核異型と関連するのだろうか。核異型の度合を示すパラメーターには種々のものが考えられるが、今回は、核の大きさ、核の大小不同性、核縁の不整度を計測した。これらのパラメーターをもとに検討した結果、aneuploidy 症例の癌細胞は、diploidy 症例の癌細胞に比較して、核異型が高度であるという結果が得られた。一般に、aneuploidy を示す癌細胞の核は、その DNA 量が増加しており、また、核の大きさは核 DNA 量と正の相関があること¹³⁾から、DNA ploidy と核の大きさとの関係は説明できる。今回の検討では、この核の大きさだけでなく、核の大小不同性、核縁の不整度などの核異型にも、DNA ploidy の異常が関係していることは興味深い。

これに対し、細胞周期 S+G 2/M 期の細胞数の増加と核異型とは相関がみられなかった。一般に核 DNA 量は、細胞が細胞周期を G 0/G 1 期→S 期→G 2 期→M 期と回るのに従って増減する。われわれの解析の結果では、この細胞周期に伴う核 DNA 量の変化は、核異型としてはとらえられないことになる。これは、細胞周期に伴う核 DNA 量の変化が、核異型と相関がみられた DNA ploidy, すなわち癌細胞の stem line の DNA 量の異常による変化よりも、小さ

いためと推定される。以上から、細胞診および組織診で判定される癌細胞の核の異型度は、DNA ploidy によって左右されるが、癌細胞の増殖能を示す S+G 2/M 期の細胞数を必ずしも反映しないと考えられた。

一方、原発性肺癌において、DNA ploidy の異常が癌の進展度や患者の予後などに関与しているとする多くの報告がなされている^{4,17~22)}。しかし、これらの間に相関はなかったとする報告も少なからずみられ^{3,23)}、その評価はいまだ定まっていない。今回のわれわれの検討結果では、aneuploidy と diploidy との間には、病期などの癌の進展度や患者の予後に、有意差はみられなかった。しかし、この検討では、対象症例が少なく、組織型別、病期別の検討も十分でないため、さらに、多くの症例を用いての検討が必要である。

われわれは、DNA ploidy による分類に加えて、核 DNA 量のヒストグラム上の S+G 2/M 期の細胞数の増減により 2 つのタイプに分類し検討した。その結果、S+G 2/M 期の細胞数の増加は、腫瘍の大きさ、リンパ節転移、および患者の予後と、関連性がみられた。最近、従来の核 DNA 量による分類だけでは、悪性度の指標としては十分ではないとの認識から¹⁾、個々の癌細胞の増殖能をあらわしている S 期の割合²⁴⁾や S+G 2/M 期の割合²⁴⁾を核 DNA 量と組み合わせて検討されてきている。われわれの検討の結果においても、DNA ploidy の違いよりも、細胞増殖能の指標となる S+G 2/M 期の細胞数の増加が、癌の進展度および予後に関連していた。

以上のように、今回の検討の結果、癌細胞の核異型度は、diploidy と aneuploidy とで差がみられたが、細胞周期上の S+G 2/M 期の細胞数の増減とは無関係であった。これに反して、患者の予後に関与していたのは、DNA ploidy の違いよりむしろ、S+G 2/M 期の細胞数の増減であった。今回の対象症例の数が十分とはいえないので問題は残るものの、この結果が事実だとすれば、従来から核異型の程度を、癌の悪性度の指標としていたことは、必ずしも適切ではない可能性がある。今後、細胞診において、DNA 解析を加味する意義を検討する際には、DNA ploidy や細胞周期解析だけでなく、核異型などの形態学的変化を含めた基礎的研究が必要と考えられる。

稿を終えるにあたり、ラトックシステムエンジニアリング株式会社技術部の皆様に感謝いたします。

Summary

The effect of nuclear DNA content on nuclear atypia and clinicopathological factors such as histological type, stage, tumor size, node status, pleural invasion, pulmonary metastasis, and survival, in non-small cell lung carcinoma was studied by means of a newly developed color image analyzer system. Sixty-three cases were divided into 15 cases (23.8%) with DNA diploidy and 48 cases (76.2%) with DNA aneuploidy. We classified four groups based on the DNA histogram pattern: A-1 (diploid, 5 cases), A-2 (diploid with S+G 2/M increase, 10 cases), B-1 (aneuploid, 20 cases), and B-2 (aneuploid with S+G 2/M increase, 28 cases). Differences in the degree of nuclear atypia, such as size, anisokaryosis and roundness, were significant between types 1 and 2 ($p < 0.001 \sim 0.05$). However, there was no significant difference between group A and B. Types 1 and 2 significantly correlated with tumor size, node status, and survival ($p < 0.05$), but groups A and B did not correlated with clinicopathological factors. These results indicate that the DNA ploidy status of cancer cells in non-small cell lung carcinoma correlates with nuclear atypia, but not with biological aggressiveness.

文 献

- 1) Sasaki, K., Murakami, T.: Clinical application of flow cytometry for DNA analysis of solid tumor, *Acta Pathol. Jpn.*, 42: 1~14, 1992.
- 2) Merkel, D.E., McGuire, W.L.: Ploidy, proliferative activity and prognosis, *Cancer*, 65: 1194~1205, 1990.
- 3) Cibas, E.S., Melamed, M.R., Zaman, M.B., et al.: The effect of tumor size and tumor cell DNA content on the survival of patients with stage I adenocarcinoma of the lung, *Cancer*, 63: 1552~1556, 1989.
- 4) Isobe, H., Miyamoto, H., Shimizu, T., et al.: Prognostic and therapeutic significance of the flow cytometric nuclear DNA content in non-small cell cancer, *Cancer*, 65: 1391~1395, 1990.
- 5) Tirindelli-Dansi D., Teodori, L., Mauro, F., et al.: Prognostic significance of flow cytometry in lung cancer. A 5-year study, *Cancer*, 60: 844~851, 1987.
- 6) 羽田 均, 磯部 宏, 宮本 宏・他: 原発性肺腺癌の分化度, 組織亜型分類および細胞亜型分類と核 DNA 量との関係, *日臨細胞誌*, 28: 477~482, 1989.
- 7) 菅間 博, 堀口 尚, 深沢政勝・他: 画像解析装置を用いた DNA 量の測定法, *日本臨床*, 50: 251~257, 1992.
- 8) Schulte, E.K.W.: Standardization of the Feulgen reaction for absorption DNA image cytometry: a review, *Analyt Cell Pathol*, 3: 167~182, 1991.
- 9) Gearhart, J.P., Partin, A.W., Leventhal, B., et al.: The use of nuclear morphometry to predict response to therapy in wilms' tumor, *Cancer*, 69: 804~808, 1992.
- 10) 肺癌取り扱い規約, 日本肺癌学会編, 金原出版, 1985.
- 11) 阿部庄作, 牧村士郎, 板橋孝一・他: 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係から—, *日臨細胞誌*, 25: 12~19, 1986.
- 12) 柴 光年, 山口 豊, 山川久美・他: 末梢発生小型肺腺癌の細胞形態と予後に関する検討—特に腫瘍細胞の形態計測および DNA 定量による研究, *肺癌*, 29: 237~245, 1989.
- 13) Asamura, H., Nakajima, T., Mukai, K., et al.: DNA cytofluorometric and nuclear morphometric analyses of lung adenocarcinoma, *Cancer*, 64: 1657~1664, 1989.
- 14) Nakamura, H., Noguchi, M., Tsuchiya, R., et al.: DNA cytofluorometric and nuclear morphometric analysis of lung adenocarcinoma, *Modern Pathol.*, 3: 314~320, 1990.
- 15) Bose, K.K., Allison, D.C., Hruban, R.H., et al.: A comparison of flow cytometric and absorption cytometric DNA values as prognostic indicators for pancreatic carcinoma, *Cancer*, 71: 691~700, 1993.
- 16) Ghali, V.S., Liao, S., Teplitz, C., et al.: A comparative study of DNA ploidy in 115 fresh-frozen breast carcinomas by image analysis versus flow cytometry, *Cancer*, 70: 2668~2672, 1992.
- 17) 宮本 宏, 磯部 宏, 遠藤隆志・他: 肺扁平上皮癌の細胞形態像および核 DNA 量と予後, *日臨細胞誌*, 29: 829~834, 1990.
- 18) Morgan, S.A., Watson, J.V., Twentyman, P.R., et al.: Flow cytometric analysis of Hoechst 33342 uptake as an indicator of multi-drug resistance in human lung cancer, *Br. J. Cancer*, 60: 282~287, 1989.
- 19) Sahin, A.A., Ro, J.Y., El-Naggar, A.K., et al.: Flow cytometric analysis of the DNA content of non-small cell lung cancer, *Cancer*, 65: 530~537, 1990.
- 20) Teodori, L.: Non-small cell lung carcinoma: Tumor characterization on the basis of flow cytometrically determined cellular heterogeneity, *Cytometry*, 4: 174~183, 1983.
- 21) Zimmerman, P.V., Hawson, G.A., Bint, M.H., et al.: Ploidy as a prognostic determinant in surgically treated lung cancer, *Lancet* 2: 530~533, 1987.
- 22) 山岡憲夫, 内山貴堯, 吾妻康次・他: Flow cytometry による非小細胞肺癌の核 DNA 量の解析—予後を中心とした悪性度評価との関連性について—, *肺癌*, 30: 9~18, 1990.
- 23) Bunn, P., Carney, D., Gazdar, A., et al.: Diagnostic and biological implications of flow cytometric DNA content analysis in lung cancer, *Cancer Res.*, 43: 5026~5032, 1983.
- 24) Volm, M., Drings, P., Mattern, J., et al.: Prognostic significance of DNA patterns and resistance-predictive tests in non-small cell lung carcinoma, *Cancer*, 56: 1396~1403, 1985.