原 著

乳癌細胞診における核面積と臨床病理学的諸因子に関する検討

福島県立医科大学第2外科¹⁾, 同 病理²⁾, 磐城共立病院病理科³⁾渡辺 隆紀¹⁾ 君島 伊造¹⁾ 古川 義英¹⁾ 中山 浩一¹⁾鈴木 真一¹⁾ 二瓶 光博¹⁾ 土屋 敦雄¹⁾ 阿部 力哉¹⁾星 和栄²⁾ 望月 衛³⁾

乳癌における核形態と臨床病理学的諸因子との関連を検討した。原発乳癌 90 例および乳腺良性疾患 13 例を対象とした。May-Grunwald-Giemsa 染色の細胞診標本を用いて約 200 個の核について核面積および核最大長径を画像解析装置を用いて計測した。核面積は乳腺良性疾患に比べて乳癌が有意に大きかった ($P=0.00001$)。乳癌と臨床病理学的因子との検討では、腫瘍径が大きくなるにつれて核面積も有意に大きくなっていた ($P<0.01$)。ホルモンレセプターでは PR 陰性群の方が陽性群に比べて有意に核面積が大きかった ($P<0.01$)。核の大小不同性の指標として核面積標準偏差値を用いたが、腫瘍径 ($P<0.05$) と PR ($P<0.01$) にて有意差を認め、腫瘍径が大きいもの、および PR 陰性群では大小不同性が強かった。

Key words : Breast cancer aspiration—Morphology

I. はじめに

従来、乳腺疾患における細胞診は主として良悪性診断(質的診断)としての役割を担ってきた。しかし生検を除けば、細胞診は手術前にこれから治療しようとする癌細胞そのものを観察できる唯一の方法であり、良悪性診断以上に悪性度を推定することが可能であ

ば、細胞診の臨床上的応用範囲はさらに広がるものと思われる。そこで、術前細胞診の基礎的な検討として、癌細胞の核の大きさに注目し、乳癌の予後に関与するとされている臨床病理学的諸因子との関連について検討した。

II. 対象および方法

教室で 1987 年 3 月から 1990 年 5 月までに手術を施行した原発乳癌のなかで、穿刺吸引細胞診を施行し、結果が陽性であり、かつ十分に細胞が採取されている 90 例を対象とした (Table 1)。さらに乳腺線維腺腫 8 例、乳腺症 5 例の良性疾患 13 例を対照とした。

May-Grunwald-Giemsa 染色の細胞診標本を用い、各症例ごと約 200 個の乳癌細胞の核面積、最大長径を画像解析装置 (日本アビオニクス社製, SPICCA-II) を用いて計測し、臨床病理学的因子である Tnm 因子、組織型、ホルモンレセプター、DNA ploidy pattern との検討を行った。核 DNA 量は、切除標本ホルマリン固定パラフィン包埋乳癌組織の 40 μ m 切片

Nuclear morphometry and clinicopathological variables in breast cancer

Takanori WATANABE¹⁾, M.D., Izo KIMIJIMA¹⁾, M.D., Yoshihide FURUKAWA¹⁾, M.D., Kohichi NAKAYAMA¹⁾, M.D., Shinichi SUZUKI¹⁾, M.D., Mitsuhiro NIHEI¹⁾, M.D., Atsuo TSUCHIYA¹⁾, M.D., Rikiya ABE¹⁾, M.D., Kazuei HOSHI²⁾, M.D., Mamoru MOCHIZUKI³⁾, M.D.

¹⁾Second Department of Surgery, ²⁾Department of Pathology, Fukushima Medical College

³⁾Department of Pathology, Iwaki Kyouritsu General Hospital

論文別刷請求先: ☎ 960-12 福島県福島市光が丘 1 番地 福島県立医科大学第 2 外科 渡辺隆紀

平成 5 年 5 月 6 日受付

平成 5 年 9 月 3 日受理

Table 1 Clinical characteristics of patients

Primary breast cancer	
Number of patients	90 (female)
Age at diagnosis	51.5±12.3 (range 24-80)
Histological type	
Noninvasive ductal carcinoma	8
Invasive ductal carcinoma	
Papillotubular carcinoma	21
Solid tubular carcinoma	32
Scirrhus carcinoma	24
Special types	
Mucinous carcinoma	4
Invasive lobular carcinoma	1
Clinical stage (Tnm)	
stage I	57
stage II	17
stage III	8
stage IV	8
Benign breast lesion	
Number of patients	13 (female)
Histological type	
Fibroadenoma	8
Mastopathy	5

から裸核単細胞を作り, propidium iodide による核染色を行った後, Epics 751 Flow cytometer (Coulter, USA) を用いて測定した。DNA index が 1.0 を diploid, それ以外を aneuploid とし, 変動係数 8% 以下を評価可能とした。ホルモンレセプターは DCC 法の場合, エストロゲンレセプター (以下 ER) では 3.0 fmol/mgp 以上, プロゲステロンレセプター (以下 PR) では 5.0 fmol/mgp 以上を陽性とし, EIA 法の場合は ER では 15.0 fmol/mgp 以上, PgR では 10.0 fmol/mgp 以上を陽性とした。

統計学的検定は 2 群間の有意差検定には t 検定, 3 群以上の有意差検定には一元配置分散分析, 相関の検定には直線回帰分析 (r), 二次多項式回帰分析 (R), スピアマンの順位相関係数 (rS) を用いた。

III. 結 果

1. 平均核面積と平均核最大長径の関係について

平均核面積 (核面積) と平均核最大長径 (核長径) の相関性について検討した。核面積と核長径は二次多項式回帰分析にて相関係数 $R=0.991$ ($P<0.00001$) と非常に強い相関を示した (Fig. 1)。そこで今回の検討には核の大きさとして, 核面積を代表値とするこ

Fig. 1 Scatter diagram showing correlation between nuclear area and Nuclear diameter. R: multiple correlation coefficient

Fig. 2 Mean nuclear area in the fine needle aspiration specimens

ととした。

2. 乳癌と乳腺良性疾患の平均核面積

乳癌 90 例の核面積の平均は $150.7 \mu\text{m}^2$, 乳腺良性疾患 13 例の核面積の平均は $87.2 \mu\text{m}^2$ であり, 乳癌細胞の核面積は良性疾患の核面積に比べて有意 ($P=0.00001$) に大きかった (Fig. 2)。

3. 乳癌細胞核面積と臨床病理学的因子

年齢, 病期 (stage), 腫瘍径 (T 因子), リンパ節

Table 2 Relationship between nuclear area and clinicopathological factors in breast cancer

Variable	(N)	NA (μm^2)	S.D.	P-value	Variable	(N)	NA (μm^2)	S.D.	P-value
Age					ER status				
~40	(14)	148.9 $\pm$	48.8		(+)	(35)	135.9 $\pm$	47.4	
40~49	(30)	155.6 $\pm$	45.7		(-)	(47)	157.8 $\pm$	53.4	(P<0.1)**
50~59	(22)	140.2 $\pm$	47.8		PR status				
60~69	(15)	170.1 $\pm$	70.3		(+)	(37)	130.5 $\pm$	40.0	
70~	(9)	130.3 $\pm$	48.1	(N.S)*	(-)	(46)	164.7 $\pm$	55.2	(P<0.01)**
Clinical stage					Histological type				
I	(57)	143.6 $\pm$	51.8		TIS	(8)	142.3 $\pm$	43.8	
II	(17)	152.1 $\pm$	48.2		PAP	(21)	147.4 $\pm$	48.8	
III	(8)	187.7 $\pm$	59.2		SOL	(32)	160.2 $\pm$	60.2	
IV	(8)	161.4 $\pm$	43.1	(N.S)*	SC	(24)	141.1 $\pm$	45.6	
T categories					MUC	(4)	163.6 $\pm$	79.4	(N.S)**
T 1	(27)	124.2 $\pm$	32.3		DNA ploidy pattern				
T 2	(52)	160.6 $\pm$	54.0		D	(24)	136.5 $\pm$	49.9	
T 3	(11)	172.4 $\pm$	63.8	(P<0.01)*	A	(36)	160.4 $\pm$	46.1	(P<0.1)**
n categories									
n 0	(54)	147.4 $\pm$	51.3						
n 1	(28)	149.2 $\pm$	52.0						
n 2	(8)	178.1 $\pm$	54.4	(N.S)*					
m categories									
m 0	(82)	149.6 $\pm$	52.8						
m	(8)	161.4 $\pm$	43.1	(N.S)**					

NA : Nuclear area TIS : Noninvasive carcinoma PAP : Papillotubular carcinoma

SOL : Solid-tubular carcinoma SC : Scirrhus carcinoma MUC : Mucinous carcinoma

D : diploid A : aneuploid

* : One-way analysis of variance ** : Two sample t test

Fig. 3 Nuclear area and tumor diameter. R : multiple correlation coefficient rs : spearman rank correlation coefficient

転移 (n 因子), 遠隔転移 (m 因子), ER, PR, 組織型, DNA ploidy pattern と乳癌細胞核面積について検討した (Table 2). T 因子に関しては, T 1 (2.0

cm 以下), T 2 (2.1~5.0 cm), T 3 (5.1 cm 以上) で核面積はそれぞれ 124.2 μm^2 , 160.6 μm^2 , 172.4 μm^2 であり, T が大きくなるにつれて核面積も有意

Fig. 4 Nuclear area and sex steroid hormone status

Fig. 5 Nuclear area and PR content in PR positive cancer
rS : spearman rank correlation coefficient

に大きくなっていた ($P < 0.01$). 腫瘍径と核面積に関してスピアマンの順位相関係数を求めると $rS = 0.290$ ($P < 0.01$) であり, 腫瘍径が大きくなるにつれて核面積も有意に大きくなっていた (Fig. 3). PRとの関連ではPR陰性の核面積がPR陽性の核面積に比べて有意に大きい結果が得られた ($P < 0.01$). ERにおいてもER陰性はER陽性例に比して核面積が大きく ($P < 0.1$), またDNAのaneuploid例はdiploid例に比して核が大きい傾向がみられ ($P < 0.1$),

Table 3 Relationship between standard deviation of nuclear area and clinicopathological factors in breast cancer

Variable	(N)	S.D. of Nuclear Area	P-value
T categories			
T 1	(27)	42.4	
T 2	(52)	58.9	
T 3	(11)	62.6	($P < 0.05$)*
n categories			
n 0	(54)	52.2	
n 1	(28)	56.5	
n 2	(8)	61.7	(N.S)*
Histological type			
TIS	(8)	52.6	
PAP	(21)	50.1	
SOL	(32)	56.9	
SC	(24)	55.8	
MUC	(4)	49.9	(N.S)**
ER status			
(+)	(35)	49.3	
(-)	(47)	57.6	(N.S)
PR status			
(+)	(37)	45.6	
(-)	(46)	61.6	($P < 0.01$)**
DNA ploidy pattern			
D	(24)	47.2	
A	(36)	59.7	($P < 0.1$)**

TIS : Noninvasive carcinoma PAP : Papillotubular carcinoma

SOL : Solid-tubular carcinoma SC : Scirrhous carcinoma

MUC : Mucinous carcinoma D : Diploid A : Aneuploid

* : One-way analysis of variance ** : Two sample t test

ER, DNA ploidy pattern と核面積との間に有意傾向が認められた。これらホルモンレセプターと核面積の関係を Fig. 4 に示す。PR 陽性, PR 陰性それぞれにおいて ER 陽性陰性別に核面積をみたがあまり関連性は認められず, ER よりも PR が強く核面積に関与していた。そこで, PR 陽性別について PR 値と核面積との関係を見ると, 核面積と PR 値の間には有意な負の相関を認めた ($r_s = -0.408$, $P < 0.05$) (Fig. 5)。

年齢, n 因子, m 因子, 組織型と核面積との関連性は認められなかった。

次に核の大小不同の指標として核面積の標準偏差値を用いて臨床病理学的因子との検討を行った (Table 3)。T 因子 ($P < 0.05$) と PR ($P < 0.01$) とに有意な関係を認め, 腫瘍径が大きいほど, また PR 陰性例にて核の大小不同性が大きかった。さらに aneuploid においても大小不同性が大きい傾向がみられた ($P < 0.1$)。年齢, n 因子, m 因子, 組織型については核の大小不同性との関係は認められなかった。

IV. 考 察

細胞診は, 特に比較的小さな乳癌においてほかの診断法に比べて診断率が高く¹⁾, 早期の乳癌が増加している現在, ますます細胞診の重要性が大きくなってきている。しかし, 実際の診断に際しては核の異型が明らかで乳癌の診断が容易なものもあれば, これらの変化が少なく診断に苦慮する場合も多い。われわれは従来主観的に判断されてきた核異型について, 特に核の大きさとその不同性のもつ意味を明らかにするために今回の検討を行った。

乳癌の組織形態学の研究の中では, 1950 年代に, Bloom ら²⁾が組織標本上での tubular differentiation, nuclear pleomorphism, mitotic rate の 3 つの因子を用いた Histological Grade により, また Black ら³⁾が乳癌細胞核の形態を指標とした Nuclear Grade を用いて, 組織や核の異型性が強いものの予後が悪いことを報告し, 組織形態と癌の悪性度との関連性を明らかにした。しかし, Histological Grade にしても Nuclear Grade にしても, 観察者の主観により判定されるものであり, 客観性という点で不十分なものであった。その後 Baak ら⁴⁻⁶⁾は乳癌細胞の核分裂の指標である Mitotic activity index が予後因子として重要であり, 先に述べた Grading に比べてより客観的であることを報告している。さらに Aaltomaa⁷⁾, Eskeli-

nen⁸⁾らは単位面積あたりの核分裂数を指標とした M/V index の予後因子としての重要性を述べている。乳癌細胞核の大きさに関しては, Wallgren ら⁹⁾, Zajdela ら¹⁰⁾, Baak ら⁴⁻⁶⁾は核面積を測定し, 核面積が大きいものはその予後が悪いと報告している。しかし Aaltomaa⁷⁾, Eskelinen⁸⁾らのように核面積と予後との間に関連はないとする報告もある。宮内ら¹¹⁾は細胞診標本を用いて, 核面積の標準偏差値を平均核面積で補正した核面積変異係数 (NA. CV) を算出し, これが予後ならびに悪性度に関する重要な因子であると報告している。このように乳癌の核形態と予後に関しては, 組織標本上でも細胞診標本においてもおおまかに核異型が強いものほど予後が悪く悪性度も強いであろうという点で一致しているものの, まだ検討すべき余地が残されているのが現状である。今回われわれは, 乳癌細胞診標本について核面積に関する検討を行ったが, 教室で細胞診を本格的に開始したのが 5 年前であり観察期間が短いために予後に関する検討はできないことから, 予後に関係があるとされている臨床病理学的諸因子との関係について検討した。その結果 T 因子, ER, PR において核面積および核の大小不同性との間に有意な関係 (ER では有意傾向) を認めた。すなわち 1) 腫瘍径が大きくなるにつれて乳癌細胞核が大きくなり, 大小不同性が増加する。2) ER, PR 陰性例では核が大きく大小不同性の強いものが多い, という結果であった。藤田, Nakanishi ら¹²⁾はヒト癌の自然史について初期の癌細胞には末期癌のような高度の細胞異型性が欠けており, 癌の増殖の過程における異常分裂により染色体異常が増加してくると述べている。この説明として, cross linkage 仮説を用いて次のように述べている。「DNA 二重鎖間の cross linkage の存在が異常分裂を引き起こし, 多倍体細胞や異倍体細胞ができ, このような細胞が死滅せず生き残った場合, その分裂によりさらに異常な細胞が出現する」

このように癌細胞はその増殖の過程, つまり腫瘍径の増大につれて, 染色体の質的, 量的な異常を蓄積, 増大させていくと推定されるが, 今回の結果からは, 腫瘍の増大に伴って生じる染色体の質的量的異常が核の形態の変化となって表現されるのではないかと考えられる。

ホルモンレセプターと乳癌の予後に関しては, 1977 年の Knight ら¹³⁾の報告以降多くの報告がなされている。予後因子としての, ホルモンレセプターの有用性

に関しては、有用性があるとする報告、ないとする報告がありその評価は定まっていないが有用性があるとする報告が多いようである¹⁴⁻¹⁸⁾。さらに McCarty¹⁹⁾ Alanko²⁰⁾はホルモンレセプターが陰性の乳癌は陽性の乳癌に比べてその生物学的分化度が低いと報告している。また、ホルモンレセプターと核面積については Mossler²¹⁾, Antoniades²²⁾が核の大きいものに ER 陰性が多いと報告している。一方、PR と核面積に関しては今のところその報告はないが、われわれの検討結果では、PR と核面積との間に有意な関係を認め PR 陰性で核が大きかった。そして、ER よりむしろ PR の方が核面積に大きく関与しているという結果であった。

DNA ploidy に関しては、今回の検討では有意傾向を認めたに過ぎないが aneuploid は核 DNA の量的異常を反映しており、それが核の形状に影響を与えることは十分に考えられるので今後症例数を増やしてさらに検討したい。

今回得られた、腫瘍径の増大に伴い核面積も増大するという結果は、腫瘍径の小さい乳癌には核が小さく大小不同性も小さいものが多いということの意味している。腫瘍径が小さい場合の細胞診断では、核の大きさのみでは診断が困難であることを示しており、それ以外の因子を考慮するなどの注意が必要であると考えられた。

将来は予後との関連性について検索をすることにより、この研究の意義を明らかにしていきたい。

Summary

The relationship between the morphometric features of the cell nucleus and clinicopathological variables was investigated in primary breast cancer. The female subjects of the present study were 90 patients with primary breast cancer and 13 patients with benign breast lesions. Fine needle aspiration specimens were stained with May-Grunwald-Giemsa and about 200 nuclei in each sample were measured for mean nuclear area, standard deviation of the nuclear area, and the largest nuclear axis with a morphometric analyzer. The mean nuclear area was significantly larger in breast cancer than in benign breast lesions ($P=0.00001$). The mean nuclear area was significantly increased with an increase in tumor diameter ($P<0.01$). The mean nuclear area was significantly larger in PR-negative than in PR-positive cases ($P<0.01$). Nuclear pleomorphism (indicat-

ing the standard deviation of the nuclear area) of breast cancer cells correlated significantly with nuclear pleomorphism ($P<0.05$), PR status ($P<0.01$). The cases with large diameters and who were PR-negative showed severe nuclear pleomorphism.

文 献

- 1) 小山博紀, 野口眞三郎・他: 乳癌の穿刺吸引細胞診の現状, 乳癌の臨床, 5: 10~18.
- 2) Bloom, H.J.G., Richardson, W.W.: Histological grading and prognosis in breast cancer, Br. J. Cancer, 11: 359~377, 1957.
- 3) Black, M.M., Speer, F.D.: Nuclear structure in cancer tissues, Surg. Gynecol. Obstet., 105: 97~102, 1957.
- 4) Baak, J.P.A., Dop, H.V., et al.: The value of morphometry to classic prognosticators in breast cancer, Cancer, 56: 374~382, 1985.
- 5) Tosi, P., Baak, J.P.A., et al.: Correlation between morphometrical parameters and disease-free survival in ductal breast cancer treated only by surgery, Appl. Pathol., 4: 33~42, 1986.
- 6) Uytendinck, A.M., Baak, J.P.A., et al.: Limited prognostic value of cellular DNA content to classical and morphometrical parameters in invasive ductal breast cancer, Am. J. Clin. Pathol., 89: 301~307, 1988.
- 7) Aaltomaa, S., Lipponen, P., et al.: Nuclear morphometry and mitotic indices as prognostic factors in breast cancer, Eur. J. Surg., 157: 319~324, 1991.
- 8) Eskelinen, M., Lipponen, P., et al.: DNA flow cytometry, nuclear morphometry, mitotic indices and steroid receptors as independent prognostic factors in female breast cancer, Int. J. Cancer, 51: 555~561, 1992.
- 9) Wallgren, A., Silfversward, C., et al.: Evaluation of needle aspirates and tissue sections as prognostic factors in mammary carcinoma, Acta Cytol., 20: 313~318, 1976.
- 10) Zajdela, A., et al.: The relation of prognosis to the nuclear diameter of breast cancer cells obtained by cytologic aspiration, Acta Cytol., 23: 75~80, 1979.
- 11) 宮内 充: 術前穿刺吸引細胞診標本における乳癌細胞核異型度の客観的評価—核面積変異係数と病理組織学的所見および術後遠隔成績との関連について—, 日外会誌, 92: 1642~1649, 1991.
- 12) 藤田哲也, 桂 奏・他: 微小癌から進行癌へ—ヒト癌プログレーションの自然史, 代謝, 28: 291~297, 1991.

- 13) Knight, W.A., Livingston, R.B., et al. : Estrogen receptor as an independent prognostic factor for early recurrence in breast cancer, *Cancer Res.*, 37 : 4669~4671, 1977.
 - 14) 二瓶光博 : 乳癌の予後因子としての Hormone Receptor および内分泌療法選択の指標としての Tam 法の検討, *福島医学誌*, 39 : 53~64, 1989.
 - 15) Raemaekers, J.M.M., Beex, L.V.A.M., et al. : Disease-free interval and estrogen receptor activity in tumor tissue of patients with primary breast cancer : analysis after long-term follow up, *Breast Cancer Research and treatment*, 6 : 123~130, 1985.
 - 16) Hahnel, R., Wooding, T., et al. : Prognostic value of estrogen receptors in primary breast cancer, *Cancer*, 44 : 671~675, 1979.
 - 17) Hilf, R., Feldstein, M.L., et al. : The lack of relationship between estrogen receptor status and response to chemotherapy, *Cancer*, 46 : 2797~2800, 1980.
 - 18) Howat, J.M.T., Barnes, D.M., et al. : The association of cytosol estrogen and progesterone receptors with histological features of breast cancer and early recurrence of disease, *Brit. J. Cancer*, 47 : 629~640, 1983.
 - 19) McCarty, K.S. Jr, Barton, T.K., et al. : Correlation of estrogen receptors with histologic differentiation in mammary carcinoma, *Cancer*, 46 : 2851~2858, 1980.
 - 20) Alanko, A., Makinen, J., et al. : Correlation of estrogen and progesterone receptors and histological grade in human primary breast cancer, *Acta. Path. Microbiol. Immunol. Scand., Sect. A*, 92 : 311~315, 1984.
 - 21) Mossler, J.A., McCarty, K.S., et al. : Correlation of mean nuclear area with estrogen receptor content in aspiration cytology of breast carcinoma, *Acta Cytologica*, 26 : 417~421, 1982.
 - 22) Antoniades, K. and Spector, H. : Correlation of estrogen receptor levels with histology and cytomorphology in human mammary cancer, *A.J.C.P.*, 7 : 497~503, 1979.
-