Flow Cytometry による腎細胞癌の Heterogeneity の検討

北海道大学医学部泌尿器科学教室 (主任: 小柳知彦教授)

永 森 聡

TUMOR HETEROGENEITY OF RENAL CELL CARCINOMA AS ANALYZED BY FLOW CYTOMETRY

Satoshi Nagamori

Department of Urology, Hokkaido University School of Medicine
(Director: Prof. T. Koyanagi)

DNA content in renal cell carcinoma was investigated to examine the tumor heterogeneity and was correlated with their morphologic grades. A total number of 147 paraffin-embedded samples (2~6 samples with a mean of 5) from 30 tumors were analyzed by flow cytometry. DNA aneuploid patterns were demonstrated in 5 of 9 grade 1 tumors (56%), 15 of 18 grade 2 tumors (83%) and 3 of all grade 3 tumors (100%), while aneuploid DNA histograms were exhibited in 20 of 57 grade 1 samples (35%), 45 of 81 grade 2 samples (56%) and 8 of 9 grade 3 samples (89%). DNA aneuploid patterns were demonstrated more significantly in grade 2 and 3 samples than in grade 1 samples ($p<0.02$ and $p<0.01$, respectively). Consequently, 73 samples (50%) showed DNA aneuploid patterns and 74 samples exhibited DNA diploid patterns. Eleven tumors (37%) showed homogeneous DNA ploidy patterns (7 tumors were diploid and 4 tumors were aneuploid only), while 19 tumors (63%) showed DNA heterogeneity, 17 of these 19 tumors demonstrating diploid as well as aneuploid samples. DNA heterogeneity was not found when the tumor samples examined were fewer than 3 samples. However, 19 of 25 tumors (76%) in which more than 4 samples were examined showed DNA heterogeneity, the incidence of which tended to be increased with upgrading of the tumor—3 of 9 (33%) in grade 1 tumors, 13 of 18 (72%) in grade 2 tumors and 3 of all (100%) in grade 3 tumors. In correlation with DNA heterogeneity and morphologic heterogeneity, 13 of 17 tumors (76%) with morphologically heterogeneous grade also showed DNA heterogeneity, while only 6 of 13 tumors (46%) exhibiting morphologically homogeneous grade showed DNA heterogeneity. Eighty-nine samples from morphologic heterogeneous 17 tumors were divided into two groups. One was high grade group and the other was low grade group. Aneuploid samples were exhibited in 24 of 34 samples (71%) for the former group and 25 of 55 samples (45%) for the latter. Aneuploid samples were demonstrated significantly more frequently in the high grade group than in the low grade group ($p<0.02$).

It appears that DNA heterogeneity is exhibited in more than half of renal cell carcinoma. The greater part of heterogeneous tumors have diploid as well as aneuploid samples. Sampling the paraffin-embedded materials, we must choose the part of the highest grade area in its tumor. DNA heterogeneity in renal cell carcinoma appears to be closely related to the numbers of tumor samples examined and their morphologic grades.

Key words: flow cytometry, renal cell carcinoma, heterogeneity

要旨: 29名30腫瘍 (両側1名) の腎細胞癌に対し, Flow Cytometry を用いて, 1腫瘍より複数の検体 (総計147検体) を選択し, その組織学的異型度分類と核 DNA 量及びその多様性 (clonal heterogeneity) との関係を検討した。

1) Grade の上昇とともに DNA aneuploid の占める割合は増加した。2) 30例中23例 (77%) の DNA aneuploid と, 7例 (23%) の DNA diploid を認めたが, 147検体では, diploid, aneuploid の検体はほぼ同数であり, 腎癌の多くはこの混在型であった。3) 30例中19例 (63%) に核 DNA 量の多様性を認め,

これはその検索部位を増やすことにより明確になり、少なくとも4検体以上の検索が必要だった。4) 核DNA量の多様性を示す割合は、Gradeの上昇とともに増加する傾向にあった(Grade 1, 2間 $p < 0.06$)。5) 核DNA量の多様性と組織学的異型度分類における多様性との関係では、組織学的異型度分類に多様性の有る群が無い群に比較して核DNA量にも高率に多様性を認める傾向にあった($p < 0.09$)。6) 組織学的異型度分類に多様性の有る17例、89検体をその異型度により low grade 群、high grade 群の2群に分けると、aneuploidの割合は、前者の45%に対し、後者は71%と有意に高値を示し($p < 0.02$)、検体選択の場合、必ずその腫瘍の最も異型度の高い部分を含めなくてはならないことを示した。7) 4検体以上検索された25例中22例(88%)にはdiploid部分が認められ、大部分の腎癌はDNA diploidで発癌する可能性が示された。

キーワード：フローサイトメトリー、腎細胞癌、核DNA量の多様性

結 言

腎細胞癌の組織学的異型度は核異型度によって分類され¹⁾、これは治療成績並びにFlow Cytometry(以下FCM)によって分析された核DNA量と密接な関係にあることを、既にパラフィン包埋組織を用いる方法で報告してきた²⁾。

腎細胞癌に限らず癌では、少数の癌細胞が出現し肉眼的腫瘍を形成する過程において、癌細胞自身の突然変異を含めた性状の変化が起こるものと考えられている。そして腎細胞癌においても、一人の患者に癌細胞の組織学的多様性(heterogeneity)、つまり一つの腫瘍中に異なる核異型度を持つ癌細胞の存在することは、通常の病理学的検索で観察される現象である³⁾。また腎細胞癌の核DNA量にも、heterogeneityの存在することが報告されており⁴⁾、我々も前回の検討で50例中2例に異なるaneuploid cell cloneを確認している²⁾。

そこで今回、一つの腫瘍より部位の異なる複数のパラフィン包埋ブロックを選択し、その組織学的異型度分類と核DNA量との関係、およびその核DNA量における多様性、いわゆる癌のclonal heterogeneityとの関係を、FCMを用いて検討した。

対象と方法

対象症例：1985年1月より、1987年7月までに北海道大学医学部付属病院泌尿器科にて手術施行された腎細胞癌患者29名を検討対象とした。患者の性別は、男子21例、女子8例、年齢構成は27歳～81歳(平均年齢：62.8歳)であった。患側は、右側13例、左側15例、両側1例、合計30例であった。

標本：ホルマリン固定パラフィン包埋ブロックとして保存されていた摘出腎組織を5 μ に薄切し、脱パラフィン後、通常のH&E染色を行ない、正常部分および

壊死部分が少なく、FCM分析に適していると思われる組織ブロックを一腫瘍につき2～6個、総数147個(平均約5個)選択し、腎癌取り扱い規約⁵⁾に従って組織学的異型度分類を行なった。選択された組織ブロックを50 μ に薄切し、以下の方法による核DNA量分析に用いた。

懸濁液の調整：既報²⁾と同様にHedleyら⁶⁾の方法に準じ、1または2枚の薄切標本をキシレンにて脱パラフィンした後、エタノールで親水化した。ついで、0.5% pepsin液(pH 1.5)と37℃、60分間反応させ核懸濁液を調整した。さらにVindeløvの方法⁷⁾に準じRNase処理後、Propidium iodideにて細胞核のDNA染色を行なった。

核DNA量分析：FCMはCoulter社のEPICS-Cを使用し、測定条件は核の流速を毎秒300個以下になる様に設定し、平均20,000個の核のDNA量をヒストグラムとして表わした。diploid standardとしては、摘出腎より組織学的に明らかに正常部分だけからなる組織ブロックを17個(1腎より最大1ブロック)選択し、同様に核懸濁液として調整し、癌組織の核DNA量測定に先立ち、そのG0/G1期のピーク(2Cピーク)が50チャンネルに来るように調節した⁸⁾。またこの正常組織17例のG2+M期細胞の割合は $3.02 \pm 1.89\%$ であった。

DNAヒストグラムは既報²⁾と同様にCoulter社のソフトウェア(PARA-I program)にて各細胞周期上の細胞の割合、あるいは明らかにaneuploid peakを認めるものはそのピークの位置等を解析した後、DNA index(DI)を求めた。また正常細胞の細胞周期上で、G2+M期の位置に相当する4Cピークの細胞数の総細胞数に占める割合を検討した。DNA ploidyの判定も既報²⁾と同様に、DIが0.8～1.2で、G2+M期細胞の割

合が10%未満（3.02%+3.5SD 未満）のものを DNA diploid とした。また2C 付近にピークを認めるものの、G2+M 期の位置に相当する4C 細胞の割合が10%以上である場合をDI が2 の tetraploid aneuploid と判定した⁹⁾¹⁰⁾。DI が0.8以下或いは1.2以上の場合 non tetraploid aneuploid と判定し、両者を合わせて DNA aneuploid とした。同一腫瘍内では、DI 値の差が0.2以上のものを異なる cell clone と判定し⁴⁾、検討した検体中一つでも aneuploid を認めた症例を、aneuploid の症例と判定した。

検定は χ^2 検定を用い、 $p<0.05$ を統計学的に有意差ありと判定した。

結 果

DNA ヒストグラムは検討した164検体につき全例解析可能であった。また G0/G1ピークにおける変異係数 (coefficient of variation, CV) は殆どの症例で 2.5~7.0%であった。

今回検討した30腫瘍の組織学的異型度分類と DNA ploidy との関係を Table 1 に示した。各腫瘍の組織学的異型度分類はその最も異型度の高い部分で判定し、Grade 1では9例中5例（56%）、Grade 2では18例中15例（83%）、Grade 3では3例全例（100%）、全体では30例中23例（77%）の aneuploid 認め、Grade の上昇とともに aneuploid 症例の占める割合は増加したが、統計学的に有意差を認めなかった。

腫瘍部分147検体の組織学的異型度分類と DNA ploidy との関係を Table 2 に示した。なお検体の組織学的異型度分類もその最も異型度の高い部分で判定し

た。aneuploid を示した検体の占める割合は Grade 1 検体57例中20例（35%）に対し、Grade 2 検体81例中45例（56%）、Grade 3 検体9例中8例（89%）と Grade の上昇とともに有意に増加した（Grade 1, 2 間 $p<0.02$, Grade 1, 3 間 $p<0.01$ ）。また全体では、diploid, aneuploid を示した検体はそれぞれ74例、73例とほぼ同数であった。

この147検体の検索で明らかに成った、30腫瘍を構成する DNA ploidy の構成パターンを、Table 3 に示した。全て diploid の検体で構成されていた腫瘍は7例（23%）であった。また腫瘍内に一つでも aneuploid の検体を認めた23例の DNA ploidy の構成パターンは、同一の aneuploid cell clone のみで構成されていたもの4例、2種類の異なる aneuploid cell clone で構成されていたもの2例で、残りの17例（57%）は全て diploid と aneuploid が混在し、diploid の他1種類の aneuploid cell clone で構成されていたもの11例、2種類の aneuploid cell clone で構成されていたもの5例（Fig. 1）、3種類の aneuploid cell clone で構成されていたもの1例であった。従って DNA ploidy の構成パターンでは、diploid と1種類の aneuploid cell clone で構成されていた症例が30例中11例（37%）と最も多く、2種類の異なる aneuploid cell clone を持つ症例は全部で7例（23%）あり、3種類の異なる aneuploid cell clone を持つ症例は1例（3%）ときわめて稀であった。検体全てが同一の ploidy で構成されていたのは diploid 7例、aneuploid 4例の合計11例（37%）にすぎず、19例（63%）には ploidy の混在 (clonal heterogeneity) が認められた。

検索ブロック数と、diploid 検体を含む腎細胞癌、aneuploid 検体を含む腎細胞癌の出現頻度を、Table 4 に示した。diploid を含む腎細胞癌は30例中24例（80%）に、6検体検索しえた14例中13例（93%）に、また4検体以上検索しえた25例中22例（88%）の高率に認め

Table 1 組織学的異型度分類と DNA Ploidy

Grade	Diploid (%)	Aneuploid (%)	Total
G 1	4 (44)	5 (56)	9
G 2	3 (17)	15 (83)	18
G 3	0 (0)	3 (100)	3
Total	7 (23)	23 (77)	30

Table 2 147検体の組織学的異型度分類と DNA Ploidy

Grade	Diploid (%)	Aneuploid (%)	Total
G 1	37 (65)	20 (35)	57
G 2	36 (44)	45 (56)	81
G 3	1 (11)	8 (89)	9
Total	74 (50)	73 (50)	147

Table 3 DNA Ploidy Pattern

ヒストグラム	例数
Diploid (D)	7
Aneuploid	23
a. 1種類の Aneuploid	4
b. 2種類の Aneuploid	2
c. 1種類の Aneuploid と D	11
d. 2種類の Aneuploid と D	5
e. 3種類の Aneuploid と D	1

Fig. 1 Diploid and two different aneuploid patterns of nuclear DNA histograms in same tumor. A: DI=1, B: DI=1.21, C: DI=2.0

Table 4 検索ブロック数と Diploid, Aneuploid を含む腎癌

ブロック数	例数	Diploid を含む腎癌 (%)	Aneuploid を含む腎癌 (%)	Diploid + Aneuploid の腎癌 (%)
2	1	0 (0)	1 (100)	0 (0)
3	4	2 (50)	2 (50)	0 (0)
4	6	5 (83)	4 (67)	3 (50)
5	5	4 (80)	3 (60)	2 (40)
6	14	13 (93)	13 (93)	12 (86)
計	30	24 (80)	23 (77)	17 (57)

Table 5 検索ブロック数と DNA 量の多様性

ブロック数	例数	DNA 量の多様性 (%)	
		有	無
2	1	0 (0)	1 (100)
3	4	0 (0)	4 (100)
4	6	4 (67)	2 (33)
5	5	3 (60)	2 (40)
6	14	12 (86)	2 (14)
計	30	19 (63)	11 (37)

Table 6 組織学的異型度分類と DNA 量の多様性

Grade	DNA 量の多様性 (%)		Total
	有	無	
G 1	3 (33)	6 (67)	9
G 2	13 (72)	5 (28)	18
G 3	3 (100)	0 (0)	3
計	19 (63)	11 (37)	30

られた。つまり 4 検体以上検索しえた 25 例の約 9 割である 22 例は diploid の検体を含む腎細胞癌であり、約 2/3 の 17 例は diploid と aneuploid の混在で、aneuploid のみで構成されていたのは僅か 3 例であった。

DNA 量の多様性 (clonal heterogeneity) の出現頻度と検索ブロック数および組織学的異型度分類との関係を Table 5, Table 6 に示した。まず検索ブロック数との関係では、3 検体以下の検索では DNA 量の多様性は認められず、4 検体以上検索しえた 25 例中 19 例 (76%)、6 検体検索しえた 14 例では 12 例 (86%) と高率に DNA 量の多様性を認めた。また組織学的異型度分類との関係では、Grade 1 の 9 例中 3 例 (33%)、Grade 2 の 18 例中 13 例 (72%)、Grade 3 の 3 例全例 (100%) と DNA 量の多様性の出現頻度は Grade 1 に比較して、Grade 上昇とともにそれぞれ 2 倍、3 倍と増加する傾向にあった (Grade 1, 2 間, $p < 0.06$)。

DNA 量の多様性と組織学的異型度分類における多様性との関係を Table 7 に示した。ここで組織学的異型度分類が homogeneous な症例とは、異型度が全て同一の検体で構成されていた症例であり、Grade 1: 9 例、Grade 2: 4 例の 13 例であった。このうち DNA 量の多様性を示したのは 6 例 (46%) であった。一方組織学的異型度分類が heterogeneous な症例、つまり組織学的異型度分類に多様性を認めた症例とは、異型度の異なる検体で構成されていた症例であり、Grade

Table 7 組織学的異型度分類における多様性と DNA 量の多様性

Morphology	DNA		Total
	Homogeneous (%)	Heterogeneous (%)	
Homogeneous	7 (54)	6 (46)	13
Heterogeneous	4 (23)	13 (76)	17
Total	11 (37)	19 (63)	30

Table 8 組織学的異型度分類が Heterogeneous な 17 腫瘍 (89 検体) と DNA ploidy

検体の Grade	Diploid (%)	Aneuploid (%)	Total
LOW	30 (55)	25 (45)	55
HIGH	10 (29)	24 (71)	34
Total	40 (45)	49 (55)	89

2: 14 例、Grade 3: 3 例の 17 例であった。このうち DNA 量の多様性を示したのは 13 例 (76%) と、組織学的異型度分類に多様性を認めた症例に DNA 量の多様性を高率に認める傾向にあった ($p < 0.09$)。

Table 8 に組織学的異型度分類に多様性を認めた 17 腫瘍、89 検体と DNA ploidy との関係を示した。検体を、Grade 1 を必ず含み Grade 3 は含まない比較的異型度の低い癌細胞のみからなる検体群、すなわち low grade 群と、Grade 2 のみかあるいは Grade 3 を含む異型度の高い癌細胞よりなる検体群、すなわち high grade 群の 2 群に分けて検討すると、aneuploid の検体の占める割合は、前者の 45% に対し、後者は 71% と有意に高値を示した ($p < 0.02$)。

考 察

腎細胞癌に組織学的多様性が存在することは既に明白な事実である。近年 FCM の登場により、その病理組織学的パラメーターの一つである核の異型度との関係が検討され、我々もこの核異型度を生物学的に、しかも客観的に評価可能であることを報告してきた²⁾⁸⁾。これまでの検討により、腎細胞癌において、DNA ploidy は重要な予後因子であり、aneuploid を示す症例は diploid を示す症例に比較して有意に予後が不良であることが示されている²⁾¹¹⁾¹²⁾。しかし前回の検討でも、diploid を示しながらも予後不良であった症例も少数ながら存在し、その説明として aneuploid を detect しえなかった可能性も示唆された。つまり、大きな固形癌である腎細胞癌の ploidy 決定をこれまでの多くの

報告でも、その中の一つの組織ブロックだけでの検討でなされてきたという事実と、その妥当性、つまり腎細胞癌には一つの腫瘍中に組織学的多様性と同様に、DNA 量にも多様性が存在するのかが大きな問題であると思われた。

Ljungberg らは、その一連の腎細胞癌の核 DNA 量解析の中で、25腫瘍より 1 腫瘍につき 8 sample の新鮮組織を分取し、11腫瘍(44%)に DNA の clonal heterogeneity を認めたと報告した⁴⁾。そこで今回我々は、Ljungberg らの様に新鮮組織を分取し、それを 2 分して核異型度と核 DNA 量の関係を検討するといった方法ではなく、既にパラフィン包埋組織として保存されているものより、前述のごとく FCM 分析に適したもののだけを選択した結果、1 腫瘍より 2～6 検体(平均 5 検体)と多少幅のある検体数となったが、すべての検体で DNA 量が解析可能であり、また新たな事実も判明した。

今回検討した 30 例中 clonal heterogeneity を認めたのは 19 例(63%)であり、この 19 例中 17 例(89%)は diploid と aneuploid の混在であった。これを Ljungberg ら⁴⁾の報告と比較してみると、clonal heterogeneity の出現頻度では我々が 20% 程度上回っていた。これを検体レベルで比較してみると、彼等が 196 検体中 135 検体(69%)を diploid あるいは near diploid としているのに対し、我々は 147 検体中 74 検体(50%)に過ぎず、彼等の報告ではすでに検体レベルで、diploid あるいは near diploid と判定された症例が多い事に気が付く。これは aneuploid の判定基準による差であると思われた。つまり前回の報告²⁾でも指摘した如く、我々が tetraploid aneuploid と判定している症例の何割かを、彼等は diploid と判定している可能性があり、従ってこの DNA ploidy の判定にはある程度の統一した基準が必要であると思われた。しかしいづれにせよ、腎細胞癌の約半数には clonal heterogeneity が存在し、しかもその約 9 割は diploid と aneuploid の混在であることが判明した。

これを他の固形癌と比較してみると、Vindeløv ら¹³⁾は肺の small cell anaplastic carcinoma 29 例中 6 例(21%)に異なる ploidy を認め、Prey ら¹⁴⁾は breast carcinoma 8 例中 2 例(25%)に clonal heterogeneity を認め、Hiddemann ら¹⁵⁾は colorectal carcinoma 88 例中 72 例(82%)に aneuploid を認めそのうち 29 例(33%)に multiple aneuploid DNA stemlines を認めたと報告し、Sasaki ら¹⁶⁾は gastric carcinoma 15 例中

6 例(40%)に intratumor heterogeneity を認め、このうち 3 例は diploid と aneuploid の混在であり、colorectal carcinoma 27 例中 2 例(7.4%)に intratumor heterogeneity を認めたと述べ、Kallioniemi ら¹⁷⁾は breast carcinoma の 24%、ovarian carcinoma の 21%に clonal heterogeneity を認めたと報告している。このように癌の種類の違いにより clonal heterogeneity の発現頻度は異なり、腎細胞癌以外では 20～40% 程度の報告が多い様であるが、腎細胞癌では Ljungberg ら⁴⁾の 44%、我々の 63% とその頻度は他の癌に比較して高率である様に思われた。

またこれらの報告に共通していることは、複数の検体にて DNA ploidy を判定するため、単一の検体にて DNA ploidy を判定している報告と比較して、その aneuploid の症例の発現頻度が増加する傾向にあることであった。腎細胞癌について、単一の検体にて DNA ploidy を判定している報告では、aneuploid の症例の出現頻度は、Baisch ら¹⁸⁾の 45%、Schwabe ら¹⁹⁾の 39%、Otto ら¹¹⁾の 51%、我々の前回の報告²⁾では 66%、また low grade の腎細胞癌について検討した Rainwater ら¹⁰⁾は 48%、同様に low grade の腎細胞癌のみを検討した我々の報告⁸⁾では 41%と、我々の前回の報告を除いては 40～50% の頻度であった。これに対し、複数の検体にて DNA ploidy を判定している報告では、aneuploid の症例の出現頻度は、Ljungberg ら²⁰⁾は 63%、今回の我々の結果は 77% とその出現頻度は明らかに増加傾向にあった。これは今回我々の検討した単一の検体 147 検体における aneuploid の出現頻度が 50% に過ぎないのに対し、これを症例単位でみてみると、77% の症例が aneuploid を示したという結果が、これらの事情を良く反映していると思われた。

DNA ploidy を予後因子として考えた場合、DNA ploidy 解析の主たる目的は、いかに正確に aneuploid を detect するかであり、その意味でも、clonal heterogeneity の存在しうる癌腫は全てその DNA ploidy 判定には、複数の検体による解析が必要であると思われた。

腎細胞癌を構成する DNA の ploidy パターンでは、diploid と aneuploid の混在型が最も多く 17 例(57%)であり、diploid を含むもの 24 例(80%)に対し、aneuploid のみで構成されていたものは僅か 6 例(20%)に過ぎなかった。Ljungberg ら²¹⁾の 44 例の腎細胞癌の検討では、diploid と aneuploid の混在型は 17 例(39%)であったが、diploid を含む腎細胞癌 35 例(80%)に対

し, aneuploid のみで構成されていた腎細胞癌は僅か 9 例 (20%) とほぼ我々と同様の結果であった。これを 4 検体以上とある程度十分に検討しえた 25 例について考えてみると, diploid と aneuploid の混在型は 68% になり, diploid を含むもの 22 例 (88%) に対し, aneuploid のみで構成されているものは僅か 3 例 (12%) に過ぎなかった。従って腎細胞癌の約 9 割には必ず diploid 部分が認められ, 癌細胞の発生が monoclonal なものであり, aneuploid cell は diploid cell には戻らないと仮定するなら, この結果は腎細胞癌の多くは diploid で発癌し, その progression の過程であるものには mutation により aneuploid cell clone が生じ, その中のまたあるものはさらに mutation を繰り返し, 新たな aneuploid cell clone を生みながら進展する可能性を示唆するものと思われた。

この DNA の clonal heterogeneity の出現と検索された検体数との関係では, Table 5 に示した如く, 検体数を増やすことにより, その存在が明確になる傾向にあり, 検索すべき検体数については, 少なくとも 4 検体以上の検索は必要であると思われた。

組織学的異型度分類と DNA の clonal heterogeneity との関係では, Grade 1 に比較して Grade 2, Grade 3 の症例に, それぞれ 2 倍, 3 倍の高頻度に clonal heterogeneity を認める傾向にあった。また組織学的異型度分類および DNA 量における heterogeneity との関係では, DNA 量の clonal heterogeneity の出現頻度は, 組織学的に homogeneous なものには 13 例中 6 例 (46%) であるのに対し, 組織学的に heterogeneous な 17 例では 13 例 (76%) と高頻度に認められる傾向にあり, 組織学的異型度分類との関係では, 核異型の程度だけではなく, その組織学的異型度分類における heterogeneity と密接な関係があるものと推測された。

腎細胞癌の clonal heterogeneity あるいは aneuploid を高率に detect するためには, まず検体数を 4 検体以上にすれば良い事は前述したが, 次にこの検体の選択上問題となって来るのは, 組織学的異型度分類に heterogeneity を認める症例である。つまり, 異型度が混在している場合, いったいどの部分を選択すれば, 最も効果的に aneuploid を detect 出来るのであろうか。そこで, Table 8 に示した様に, 組織学的異型度分類に heterogeneity を認めた症例について, その検体を low grade 群と, high grade 群との 2 群に分けて検討してみると, この 2 群間の aneuploid の出現率は

明らかに異なり, 異型度の高い癌細胞よりなる検体群が有意に高率に aneuploid を示した。つまり同一の腫瘍中でも, その組織学的異型度分類の高い部分ほど aneuploid を示す確率が有意に高く, 検体の選択時にはこのことを考慮し, 必ずその腫瘍の最も異型度の高い部分を含む検体を選択すべきであると思われた。

腎細胞癌において, DNA の clonal heterogeneity の検索が重要であるのは, DNA ploidy が重要な予後因子であるばかりではなく²⁾¹¹⁾¹²⁾, 異なった ploidy の cell clone は, 抗癌剤や放射線に対してそれぞれが異なった感受性²²⁾²³⁾や転移能²⁴⁾を持っているというように, 異なった生物学的特性を示す可能性が高いことである。腎細胞癌の治療は, 外科的治療以外では, インターフェロンの投与以外には有効な治療手段はなく, この抗癌剤や放射線に対して治療抵抗性であるという事実は, この腎細胞癌のもつ clonal heterogeneity と矛盾しないと思われた。従って, 今後の腎細胞癌の治療, 特に化学療法では, この clonal heterogeneity を考慮した, つまりその腫瘍を構成する個々の cell clone に有効な抗癌剤の組み合わせ等の検討にも応用されうる有力な方法ではないかと思われた。

結 語

腎癌パラフィン包埋標本を用い, 1 腫瘍より複数の検体を選択し, その組織学的異型度分類と核 DNA 量及びその多様性 (clonal heterogeneity) との関係を FCM にて検討し, 以下の結論を得た。1) 核 DNA 量とその多様性は, 組織学的異型度分類と密接な関係にあった。2) 検体数では少なくとも 4 検体以上の検索が必要であり, その腫瘍の最も異型度の高い部分を含めて解析する必要があった。3) 腎癌の多くは diploid と aneuploid の混在型で, 大部分の腎癌は diploid で発癌する可能性が示された。

稿を終えるにあたり, 終始御指導, 御校閲を賜った小柳知彦教授に厚く感謝の意を表します。また, 直接御指導いただいた坂下茂夫前北海道大学講師 (現帯広厚生病院泌尿器科部長) に深く感謝致します。

本論文の要旨は, 第 76 回日本泌尿器科学会総会, 第 47 回日本癌学会総会において報告した。

文 献

- 1) Skinner, D.G., Colvin, R.B., Vermillion, C.D., Pfister, R.C. and Leadbetter, W.F.: Diagnosis and management of renal cell carcinoma. A clinical and pathologic study of 309 cases. *Cancer*, 28, 1165—1177, 1971.
- 2) 永森 聡, 坂下茂夫, 小柳知彦, 井上和秋: Flow

- Cytometry による腎癌パラフィン包埋組織の核 DNA 量解析. 日泌尿会誌, 79, 1355—1363, 1988.
- 3) 中西正一郎, 柏木 明, 坂下茂夫, 丸 彰夫, 小柳知彦, 有門克久, 森 達也, 川倉宏一, 大橋伸生, 山田智二, 腎細胞癌の病理組織学的検討—核型による悪性度と予後について—. 日泌尿会誌, 75, 1637—1645, 1984.
 - 4) Ljungberg, B., Stenling, R. and Roos, G.: DNA content in renal cell carcinoma with reference to tumor heterogeneity. *Cancer*, 56, 503—508, 1985.
 - 5) 日本泌尿器科学会. 他編, 腎癌取扱規約, p. 70—71, 金原出版, 東京, 1983.
 - 6) Hedley, D.W., Friedlander, M.L., Taylor, I.W., Rugg, C.A. and Musgrove, E.A.: Method for analysis of cellular DNA content of paraffin-embedded pathological material using flow cytometry. *J. Histochem. Cytochem.*, 31, 1333—1335, 1983.
 - 7) Vindeløv, L.L., Christensen, I.J. and Nissen, N. I.: A detergent-trypsin method for preparation of nuclei for flow cytometric DNA analysis. *Cytometry*, 3, 323—327, 1983.
 - 8) 永森 聡, 坂下茂夫, 榊原尚行, 小柳知彦: 凍結標本を用いた Flow Cytometry による low grade 腎癌の核 DNA 量解析—組織学的異型度分類との比較検討—. 日泌尿会誌, 79, 462—468, 1988.
 - 9) Tribukait, B., Rönström, L. and Esposti, P.L.: Quantitative and qualitative aspects of flow DNA measurements related to the cytologic grade in prostatic carcinoma. *Analyt. Quant. Cytol.*, 5, 107—111, 1983.
 - 10) Rainwater, L.M., Hosaka, Y., Farrow, G.M., and Lieber, M.M.: Well differentiated clear cell renal carcinoma: Significance of nuclear deoxyribonucleic acid patterns studied by flow cytometry. *J. Urol.*, 137, 15—20, 1987.
 - 11) Otto, U., Baisch, H., Huland, H. and Klöppel, G.: Tumor cell deoxyribonucleic acid content and prognosis in human renal cell carcinoma. *J. Urol.*, 132, 237—239, 1984.
 - 12) Ljungberg, B., Forsslund, G., Stenling, R. and Zetterberg, A.: Prognostic significance of the DNA content in renal cell carcinoma. *J. Urol.*, 135, 422—426, 1986.
 - 13) Vindeløv, L.L., Hansen, H.H., Christensen, I.J., Thomsen, M.S., Hirsch, F.R., Hansen, M. and Nissen, N.I.: Clonal heterogeneity of small-cell anaplastic carcinoma of the lung demonstrated by flow-cytometric DNA analysis. *Cancer Res.*, 40, 4295—4300, 1980.
 - 14) Prey, M.U., Meyer, J.S., Stone, K.R. and Mcdivitt, R.W.: Heterogeneity of breast carcinomas determined by flow cytometric analysis. *J. Surg. Oncol.*, 29, 35—39, 1985.
 - 15) Hiddemann, W., von Bassewitz, D.B., Kleinemeier, H.J., Schulte-Brochterbech, E., Hauss, J., Lingemann, B., Buchner, T. and Grundmann, E.: DNA stemline heterogeneity in colorectal cancer. *Cancer*, 58, 258—263, 1986.
 - 16) Sasaki, K., Hashimoto, T., Kawachini, K. and Takahashi, M.: Intratumoral regional differences in DNA ploidy of gastrointestinal carcinomas. *Cancer*, 62, 2569—2575, 1988.
 - 17) Kallioniemi, O.P.: Comparison of fresh and paraffin-embedded tissue as starting material for DNA flow cytometry and evaluation of intratumor heterogeneity. *Cytometry.*, 9, 164—169, 1988.
 - 18) Baisch, H., Otto, U., Köning, K., Klöppel, G., Kollermann, M. and Linden, W.A.: DNA content of human kidney carcinoma cells in relation to histological grading. *Br. J. Cancer*, 45, 878—886, 1982.
 - 19) Schwabe, H.W., Adolphs, H.D. and Vogel, J.: Flow-cytometric studies in renal carcinoma. *Urol. Res.*, 11, 121—125, 1983.
 - 20) Ljungberg, B., Stenling, R., and Roos, G.: Tumor spread and DNA content in human renal cell carcinoma. *Cancer Res.*, 48, 3165—3167, 1988.
 - 21) Ljungberg, B., Stenling, R., and Roos, G.: Flow cytometric DNA analysis of renal cell carcinoma—A study of fine needle aspiration biopsies in comparison with multiple surgical samples. *Analyt. Quant. Cytol.*, 9, 505—508, 1987.
 - 22) Yung, W.-K. A., Shapiro, J.R. and Shapiro, W. R.: Heterogeneous chemosensitivities of subpopulations of human glioma cells in culture. *Cancer Res.*, 42, 992—998, 1982.
 - 23) Tofron, P.J., Vines, C.M., Meyn, R.E., Wike, J. and Brock, W.A.: Heterogeneity in radiation sensitivity within human primary tumor cell cultures as detected by the SCE assay. *Br. J. Cancer*, 59, 54—60, 1989.
 - 24) Fidler, I.J. and Kripke, M.: Metastasis results from preexisting variant cells within a malignant tumor. *Science*, 197, 893—895, 1977.

(1989年11月16日受理)