原 著

乳腺葉状腫瘍の局所再発と DNA ploidy の関係について

長崎大学第1外科（主任：富田正雄教授）

田 川 泰 山 口 広 之 林 宗 榮 川 副 直 樹
中 崎 隆 行 梶 原 啓 司 岡 忠 之 川 原 克 信
綾 部 公 懿 富 田 正 雄

乳腺葉状腫瘍13症例中3例（うち1例は2回再発）において局所再発を生じた。これらの局所再発を含めた17検体を利用することで、局所再発、組織像、DNA ploidy の関係を検討した。局所再発は3症例に認められ全例腫瘍摘出術を施行された良性病変であった。そこで、腫瘍摘出術施行例に限定すると11切除症例で、局所再発を起こしたものは良性病変9切除症例中3例、境界病変では2切除症例中0例と臨床像と組織像との間に Discrepancy を認めた。また、この局所再発2症例においては良性病変から境界病変への悪性転化傾向を認めた。DNA ploidy について検討すると、局所再発例の検体は全例 DNA diploidy であった。また、DNA aneuploidy は1例において認められたが、この症例は局所再発を起こさなかった。これらのことより、組織像や DNA ploidy 評価は局所再発の予測指標として現在有用性を認めなかった。

索引用語：乳腺葉状腫瘍，局所再発，組織像，DNA ploidy

緒 言

乳腺の葉状腫瘍は線維腺腫の一亜型と考えられている。その発生頻度は線維腺腫の2～10%といわれ¹⁾、現在それ程稀な疾患ではない。しかし、この葉状腫瘍は局所再発や時に遠隔転移を起こすなど、臨床的に良性の線維腺腫と異なり、WHO では細胞密度、異型度、分裂細胞頻度、辺縁浸潤像などを参考に良性、境界病変、悪性の三つの組織分類に区分することを提案している²⁾。良性や境界病変の臨床像から見た悪性度に関しては、切除後局所再発を認めるものの、腋窩リンパ節転移は極めて稀であるといわれている³⁾。一方、悪性（肉腫）は遠隔転移を起こすなど、その臨床病態は多彩である。

近年、フローサイトメトリー（FCM）の技術導入により安易に固形癌の核 DNA 量の測定が可能となり、乳癌の悪性度評価に有用であるとの数多くの論文報告がなされている^{4)~6)}。また、Friedlander ら⁷⁾は卵巣における境界悪性腫瘍の核 DNA 量を FCM で検討している。それによると Aneuploid 症例では詳細な病理学的検索を行うと、明確な浸潤巣が存在し予後不良であっ

たことより、FCM による核 DNA 量検索は病理学的補足や悪性度評価に有用であるとの報告を行っている。そこで、この葉状腫瘍が再発を繰返す内に良性病変から悪性病変へと変化したり⁸⁾、良性病変においても可成の頻度で局所再発を起こすなど⁹⁾、臨床像と病理組織所見との関係が判然としないことより、今回、良性と境界病変の葉状腫瘍の局所再発を検討し、更に細胞生物学的活性の指標になると指摘されている核 DNA 量（DNA ploidy）との関係を明らかにして、その測定の有用性を検討した。

対象と方法

1977年から1988年迄に長崎大学第1外科とその関連病院で手術を受け、病理組織（H.E 染色）で乳腺の葉状腫瘍と診断した13症例と更にこれらの症例の中で局所再発で手術を施行した検体を加えた17切除病変を対象とした。年齢は24歳から67歳の女性で、腫瘍径は1×1～7×6cm 大であった。病理組織分類は Iverson らの診断基準に従い¹⁰⁾、良性（Benign）、境界（Intermediate or Borderline）、悪性（Malignant）の3病変に分類した。良性は12切除病変、境界は5切除病変で、悪性は1例もなかった。手術術式は腫瘍摘出術12切除病変、部分乳房切除術1切除病変、単純乳房切断術4切除病

変, 定型的乳房切断術 1 切除病変であった。

細胞核 DNA 量の測定はホルマリン固定パラフィン包埋組織を用い Schutte らの方法¹¹⁾¹²⁾にて裸核単離細胞を作成し, Vindeløv らの方法¹³⁾にて Propidium iodide (PI) 染色した。すなわち, パラフィン包埋切片から 50 μ m の切片を 2~4 枚切り出し, キシレンにて脱パラフィンを行い, エタノール列と 3 次蒸留水で再水和を行った。その後, 0.25% トリプシン・クエン酸バッファー中の 37℃ で約 12 時間攪拌の後に 50 μ m のナイロンメッシュフィルターで濾過し裸核単離細胞を得た。次にクエン酸バッファー中の細胞浮遊液 200 μ l に Vindeløv らの工夫した A 液 1.8ml, B 液 1.5ml, C 液 1.5ml を順次添加して水中にて 30 分間 PI 染色した。

FCM は FACS IV (Becton-Dickinson 社) を使用した。つまり 488nm のアルゴンイオンレーザーで励起, 620nm long pass filter を用いて約 5,000~10,000 個の細胞につきその PI 蛍光量を測定して DNA histogram を表示させた。なお, 内部標準とした腫瘍内正常細胞のピークチャンネル数にて腫瘍細胞の G1 ピークチャンネル数を除して DNA index (DI) とした。DNA ploidy の判定は DI=1.0 を DNA diploidy (Diploidy) とし, DI=2.0 を DNA tetraploidy (Tetraploidy) とした。それ以外で S+G₂M の存在する stemline を有するものを DNA aneuploidy (Aneuploidy) とした。FACS IV の調整には末梢リンパ球を使用し, Coefficient of variation (CV) が 2.5~3.0 で測定を開

始した。

結 果

局所再発を認めなかった無再発例は 10 症例。腫瘍径は 1×1~7.0×6.5cm。年齢は 24 歳~53 歳で平均 40.7 歳であった。良性病変は 7 症例, 腫瘍摘出術は 5 症例, 単純乳房切断術は 2 症例。一方, 境界病変は 3 症例で, 2 例は腫瘍摘出術を, 細胞診で class V を示した 1 例は定型的乳房切断術を施行されていた (表 1)。DNA ploidy 別では Case 4 (境界病変) の 1 症例において Aneuploidy を呈した。しかし, 他の 9 症例は Diploidy であった。これらの内, Aneuploidy を示した Case 4 の境界病変の組織像を呈示すると, 細胞密度はやや高く, 巨細胞も存在し, 細胞異型性と散在する細胞分裂細胞を認め, 1 部辺縁浸潤像を呈した (図 1, 上)。しかし, 同腫瘍内の別の部位 (別のパラフィン包埋ブロック) における組織像は細胞密度も低く, 細胞分裂細胞を認めず良性病変の組織像を呈し tumor heterogeneity を認めた。この良性部位の DNA ploidy は Diploidy であり (図 1, 下), DNA ploidy においても heterogeneity を示した。この症例は腫瘍摘出術にも拘らず, 7 年目の現在再発を認めていない。

局所再発を認めたのは表 2 に示す如く 3 症例で, 再発病変を加えた 7 切除病変を検討した。初回の手術時検体は 3 例とも良性病変で, 腫瘍径は 2×2~4.0×4.5 cm と無再発症例の中間径の大きさであった。年齢は 36~64 歳で平均 48.0 歳とやや無再発例より高齢であっ

表 1 葉状腫瘍全症例

1) 局所無再発症例					
Case	Age	Tumor size (cm)	Histological classification	Surgical Procedure	DNA Ploidy
1	45	3.1×3.6	Benign	Excisional	Diploidy
2	47	4.5×4.5	Benign	Excisional	Diploidy
3	37	5.4×5.5	Intermediate	Excisional	Aneuploidy
4	38	2.8×2.7	Benign	S. mastectomy	Diploidy
5	54	3.0×3.5	Intermediate	R. mastectomy	Diploidy
6	26	1×1	Benign	Excisional	Diploidy
7	24	3.5×4.5	Intermediate	Excisional	Diploidy
8	35	3×3	Benign	Excisional	Diploidy
9	53	3×4	Benign	Excisional	Diploidy
10	48	6.5×7.0	Benign	S. mastectomy	Diploidy
2) 局所再発症例 (初回手術時)					
11	44	3×4	Benign	Excisional	Diploidy
12	64	2×2	Benign	Excisional	Diploidy
13	36	4.0×4.5	Benign	Excisional	Diploidy

S=Simple R=Radical

図1 局所無再発 Case 4症例の組織像と DNA ploidy (HE 染色, $\times 160$)

た。全ての腫瘍摘出術が施行されていた。DNA ploidy は全て Diploidy であった。次に、初回再発にて手術を受けた3症例中、2例は良性病変で腫瘍摘出術を、1例は境界病変で部分乳房切除術を受けていた。この初回再発手術で得た3検体とも Diploidy であった。更に再発を繰り返したのは1例で、初回病変と初回再発病

変でいずれも良性病変のため腫瘍摘出術を受けた Case 11であった。しかし、2回目の再発時には腫瘍径の増大と境界病変を呈したために単純乳房切断術を施行、4年目の現在再発を認めていない。これらの3病変とも Diploidy であった(表2)。この Case 11の DNA histogram を図2に示したが、いずれの検体も

表 2 局所再発症例

Cases	Age	Tumor size (cm)	Histological classification	Surgical Procedure	DNA Ploidy
Case 11	44	3 × 4	Benign	Excisional	Diploidy
	49 ¹⁾	4 × 4	Benign	Excisional	Diploidy
	50 ²⁾	6 × 7	Intermediate	S. mastectomy	Diploidy
Case 12	64	2 × 2	Benign	Excisional	Diploidy
	67 ¹⁾	3.0 × 3.1	Benign	Excisional	Diploidy
Case 13	36	4.0 × 4.5	Benign	Excisional	Diploidy
	42 ¹⁾	4.5 × 5.5	Intermediate	P. mastectomy	Diploidy

S=Simple P=Partial

¹⁾ First recurrence ²⁾ Second recurrence

図 2 局所再発 (Case 11) 症例の DNA histogram: 左: 初回手術検体, 中: 初回再発手術検体, 右: 第 2 回目再発手術検体。

表 3 線維腺腫と葉状腫瘍における DNA histogram の対比

Histological classification	No. of samples	No. of DNA Ploidy			CV (Mean ± SD)
		Diploidy	Tetraploidy	Aneuploidy	
Fibroadenoma	19	18	1	0	3.3 ± 0.9
Phyllodes tumor	17	16	0	1	7.6 ± 2.3
[Benign]	[12]	[12]		[0]	7.4 ± 1.9
[Intermediate]	[5]	[4]		[1]	7.9 ± 3.8

CV 4.2~4.7と比較的良好な CV の Diploidy であった。また、再発の 3 症例の内、2 症例において再発することで良性病変から境界病変に変化していた (表 2)。

次に葉状腫瘍の DNA histogram の特徴を明らかにするため線維腺腫と対比した (表 3)。線維腺腫 19 例では Diploidy 18 例, Tetraploidy 1 例, Aneuploidy 0 例で平均 CV 3.3 ± 0.9 であった。一方、葉状腫瘍では良性病変 12 切除検体の全てで Diploidy を呈し、平均 CV 7.4 ± 1.9 であった。境界病変では Diploidy 4 検体、

Aneuploidy 1 検体で平均 CV 7.9 ± 3.8 であった。以上より葉状腫瘍の DNA histogram の CV は線維腺腫の DNA histogram の CV より大きかった。また組織分類による良性病変と境界病変との間の CV には大差を認めなかった。DNA ploidy に関しては葉状腫瘍 17 切除例中境界病変の 1 例に Aneuploidy を認め、Aneuploidy の出現頻度は 6% と低率であった。

考 察

葉状腫瘍の局所再発の発生頻度は 7.5~58% といわれ¹⁴⁾¹⁵⁾、今回の 13 症例でも 23% と高頻度の局所再発率

を呈した。この局所再発は組織型や手術術式などに関係あるとする報告¹³⁾や無関係であるとの報告がある¹⁴⁾¹⁶⁾。しかし、今回の検討では局所再発を起こした症例は全て腫瘍摘出術施行例であり、部分乳房切除術や単純乳房切断術施行例では1例も再発を認めず、手術術式と深く関係していたようである。このことより、現在良性病変に対して縮小手術の傾向にあるも腫瘍摘出術では不十分であり、泉雄ら¹⁷⁾も指摘する如く十分に腫瘍より離れた部分乳房切除術が必要と考えられた。

そこで、今回の17切除病変において手術術式を腫瘍摘出術に限定すると、局所再発を認めた症例は腫瘍摘出術を受けた良性病変9切除症例中3例のうち1例は2回再発し、境界病変では2切除症例中0例であった。悪性病変に対しては不明であるが、このように良性病変において再発を多く認め、臨床像と組織学的所見にdiscrepancyを示した。このように良性病変でも再発することに対し、Chuaら⁹⁾も98例の良性病変中17人の局所再発を認め、全例腫瘍摘出例であったと報告、組織学的に良性病変であっても局所再発の多いことを指摘している。更に、局所再発とbiological behaviorで興味あることは今回も認められた如く、再発を繰返す内に悪性転化傾向を呈する症例が存在するとの報告を見る事である。この事より、組織診断の明らかでない局所再発例に対しては悪性の可能性もあり単純乳房切断術を考慮しても良いのかもしれない。

この様に臨床像と病理組織像のdiscrepancyを認めることから、Muradら¹⁸⁾は12検体の葉状腫瘍をFCMで検討している。彼らによると良性病変では全例Diploidyであったのに対し、悪性病変では4例中3例にAneuploidyを示し、これらはhigh proliferative index (S+G₂M)であったことから、FCMによるDNA ploidy解析は悪性度評価や病理組織の補助手段となり得る事を指摘している。しかし、最近、Layfieldら¹⁹⁾は10例の葉状腫瘍のDNA ploidyを同様に解析し、DNA ploidyは病理組織像、再発転移、腫瘍径や年齢との間に何の関係も認めることが出来なかったと反論している。著者らの結果においても局所再発例は全てDiploidyであった。また、1例のAneuploid症例では腫瘍摘出術にも拘らず局所再発を認めなかった。この事より、biological behaviorを表現すると考えられているDNA ploidy評価と局所再発との間の関係を明らかにすることが出来なかった。

今回、葉状腫瘍の臨床病理学的諸事項とDNA

ploidyの関係を明らかに出来なかった1因に症例数の問題があることは明確な事実である。しかし、またDNA ploidyによる悪性度評価や病理組織との対比を行う場合、このAneuploidyの出現頻度が非常に大切になって来る。例えば、乳癌においては約60%のAneuploidyの出現頻度と云われ2分するの都合の良い研究対象となる。しかし、出現頻度が低いと莫大な症例を必要とするであろう。そこで、葉状腫瘍のAneuploidyの出現頻度に就いての文献をみるといずれの報告も症例数が少ない。Muradら¹⁸⁾は12症例を検討し良性病変で0%、悪性病変で75%、全体で25%と報告している。また、Layfieldら¹⁹⁾は10症例を検討し良性病変で75%、悪性病変で50%、全体で60%と報告し、Muradの結果と異なっている。また、著者らの結果では良性病変0%、境界病変20%、全体で6%と前二者と比較して低率であった。そこで、他の境界悪性腫瘍を参考に検討すると、44症例の卵巣腫瘍では5%⁷⁾、39症例のCongenital melanocytic neviで10%といわれ²⁰⁾、その出現頻度は低い。このことは一施設で症例数を集め難い境界病変のFCMによる研究課題となるであろう。

著者らの結果がMuradらやLayfieldらと大きくAneuploidyの出現頻度で異なる理由に互い各症例数が少ないこと以外にも、Aneuploidyの定義やCVの曖昧さもあるようである。いずれのデータにおいてもCVは大きく、著者らの葉状腫瘍の検討でも平均CV 7.6を示していた。このCVはFCMによるデータの信頼度とも云える重要な問題である²¹⁾。そこで、今回の葉状腫瘍のDNA ploidyの信頼性の確認と特徴を明らかにする必要性が生じ、線維腺腫と対比した。線維腺腫の平均CVは3.3で良好なCVを示した。一方、葉状腫瘍は良性病変で平均7.4、境界病変で平均7.9と大きなCVを示した。この大きなCVを示す原因に、粗悪な検体使用、検体作成時の失敗、FCM調整の失敗、それに細胞特性が考えられる。この点に関し、図1の如く同一条件下において大きなCV 8.1と良好なCV 4.9を示した事、線維腺腫で良好なCVを表示できたこと、この2点より今回の大きなCVは葉状腫瘍細胞の特性と考えられる。この事は多分、FCMの機械の進歩と相俟って、near diploidy (Aneuploidy)として出現してくるStemlineの存在が強く示唆され²²⁾、今後症例数を収集し同一条件下に再検討する必要性が将来生じるであろう。

結 語

葉状腫瘍13症例17切除検体を利用することで局所再発を検討し、この検体の DNA ploidy を検索した。

1) 局所再発3症例は全例腫瘍摘出術を施行した良性病変であった。そこで、腫瘍摘出術施行例に限定すると、局所再発を起こした検体は良性病変9切除症例中3例（うち1例は2回再発）で、境界病変では2切除症例中0例と臨床像と組織像との間に Discrepancy を認めた。

2) 局所再発3症例中2例において良性病変から境界病変へと悪性化傾向へ変化した。

3) 局所再発例は再発検体も含め全例 DNA diploidy であった。DNA aneuploidy は1例のみで局所再発を認めなかった症例であった。このことより、DNA ploidy 評価は局所再発の予測として現在有用でなかった。

4) 葉状腫瘍の DNA histogram の特徴は大きな CV であった。

貴重な検体の提供を頂いた佐世保市立総合病院、健保諫早病院の外科の先生方に深く感謝します。尚、本論文は第48回日本癌学会総会（名古屋）において発表した。

文 献

- 1) 泉雄 勝, 平井利幸: 所謂 Cystosarcoma phyllodes の臨床, 外科治療 49: 249—256, 1983
- 2) World Health Organization 世界保健機関 (WHO) 乳腺腫瘍の組織分類, 癌の臨 28: 1207—1224, 1982
- 3) Halverson JD, Hori-Rubiana JMD: Cystosarcoma phyllodes of the breast. Am Surg 40: 295—301, 1974
- 4) Thorud E, Fossa SP, Vaage S, et al: Primary breast cancer, flow cytometric DNA pattern in relation to clinical and histopathologic characteristics. Cancer 57: 808—811, 1986
- 5) Hedley DW, Rugg CA, Alam BP, Ng, et al: Influence of cellular DNA content on disease-free survival of stage II breast cancer patients. Cancer Res 44: 5395—5398, 1984
- 6) Raber MN, Barlogie B, Latreille J, et al: Ploidy, proliferative activity and estrogen receptor content in human breast cancer. Cytometry 3: 36—41, 1982
- 7) Friedlander ML, Russell P, Taylor IW, et al: Flow cytometric analysis of cellular DNA content as an adjunct to the diagnosis of ovarian tumors of borderline malignancy. Pathology 16: 301—306, 1984
- 8) McDivitt RW, Urban JA, Farrow JP: Cystosarcoma phyllodes. Johns Hopkins Med J 120: 33—45, 1967
- 9) Chua CL, Thomas A: Cystosarcoma phyllodes tumors. Surg Gynecol Obstet 166: 302—306, 1988
- 10) Iverson RE, Hegg SI: Cystosarcoma phyllodes presenting as massive unilateral breast hypertrophy in an adolescent. Ann Plast Surg 4: 315—322, 1980
- 11) Schutte B, Reynders MMJ, Bosman FT, et al: Flow cytometric determination of DNA ploidy level in nuclei isolated from paraffin embedded tissue. Cytometry 6: 26—30, 1985
- 12) 田川 泰: パラフィン包埋組織からの細胞核分散法, 臨検査 34: 1812—1815, 1990
- 13) Vindeløv LL, Christen IJ, Nissen NI: A detergent trypsin method for the preparation of nuclei for flow cytometric DNA analysis. Cytometry 3: 323—327, 1983
- 14) Contarini O, Urdaneta JF, Hagan W, et al: Cystosarcoma phyllodes of the breast, A new therapeutic proposal. Am Surg 48: 157—166, 1982
- 15) Blichert TM, Hansen JHP, Oh, et al: Clinical course of cystosarcoma phyllodes related to histological appearance. Surg Gynecol Obstet 140: 929—932, 1975
- 16) Jurf AA, Hawk WA, Crile G: Cystosarcoma phyllodes. Surg Gynecol Obstet 146: 358—364, 1978
- 17) 泉雄 勝: 乳腺葉状腫瘍の診断と治療, 55 例の再検討の結果から, 医のあゆみ 153: 685, 1990
- 18) Murad TM, Hines JR, Beal J, et al: Histopathological and clinic correlations of cystosarcoma phyllodes. Arch Pathol Lab Med 112: 752—756, 1988
- 19) Layfield LJ, Hart J, Neuwirth H, et al: Relation between DNA ploidy and the clinical behavior of phyllodes tumors. Cancer 64: 1486—1489, 1989
- 20) Stenzinger W, Suter L, Schumann: DNA aneuploidy in congenital melanocytic nevi, Suggestive evidence for premalignant changes.

- J Invest Dermatol 82 : 569—572, 1984
- 21) 河本圭司 : CV 値の調整. 河本圭司, 赤木 清, フ
ローサイトメトリー入門, 第 1 版, 医学書院, 東京,
1987, p10—13
- 22) 佐々木功典, 田中一成, 荻野 哲他 : FCM による
aneuploidy 細胞核検出の限界. 癌の臨 32 : 900
—902, 1986

CORRELATION BETWEEN LOCAL RECURRENCE AND DNA PLOIDY ON BREAST PHYLLODES TUMOR

Yutaka TAGAWA, Hiroyuki YAMAGUCHI, Souei LIN, Naoki KAWAZOE, Takayuki NAKAZAKI,
Keiji KAJIWARA, Tadayuki OKA, Katsunobu KAWAHARA,
Hiroyoshi AYABE and Masao TOMITA

First Department of Surgery, Nagasaki University School of Medicine

Thirteen cases of breast phyllodes tumor have been experienced and 3 of them had local recurrence. Seventeen surgical samples obtained from these 13 cases including 3 recurred ones were studied in terms of correlations between local recurrence and histologic appearance or DNA ploidy, to determine if this analysis would help to predict the clinical behavior.

As to histologic appearance, all cases of recurrence occurred after treatment with excisional procedure and were histologically benign tumors. For that reason, when the evaluation was limited to the disease treated with excisional procedure, recurrence was seen in 4 of 9 benign and none of 2 borderline lesion. This fact indicated that histologic appearance showed discrepancy in relation to clinical behavior.

As to DNA ploidy, diploidy was seen in all of recurrent tumors. Two in three recurrent cases changed to borderline from benign tumors but also were diploid cases. While aneuploidy appeared in one case of borderline and this case had not recurrence in spite of excisional procedure.

As described above, we were unable to document any correlations between local recurrence, histologic appearance and DNA ploidy.