Consensus Symposium

細胞核 DNA 量の変化

悪性黒色腫の発達進展過程、汗孔角化症の悪性化過程における細胞核 DNA 量の変化

大塚 藤男^{*1} 池 亨仁^{*2}

渡辺 亮治^{*2} 石橋 康正^{*2}

Summary

DAPI-DNA 顕微蛍光測光を用いて細胞核 DNA 量の観点から、悪性黒色腫における radial and vertical growth phase で悪性度の異なる細胞群が存在すること、高発癌性疾患である汗孔角化症の皮疹部表皮の腫瘍性クローンが増殖、発達し悪性化する過程を明らかにした。いずれも皮膚悪性腫瘍の多段階発展過程の一端を示すものと考えた。

緒 言

悪性腫瘍の発達進展過程には質的に異なるステップがあることが臨床、病理組織学的に知られているが、近年大腸癌の系で遺伝子レベルでの多段階発癌過程が明らかにされつつある¹⁾。悪性黒色腫表在拡大型の色素斑部は radial growth phase (RGP)、結節部分は vertical growth phase (VGP) と呼ばれ、両者は異なる生物学的態度を示すことが知られている²⁾。すなわち RGP と VGP とは黒色腫の発達進展過程にあって臨床的に異なる段階にあるものと考えられている。また汗孔角化症は遺伝性の角化異常症であるが、悪性化を来すことが知られ、近年高発癌性遺伝性の皮膚疾患としての位置付けが認識されつつある^{3)~5)}。汗孔角化症における個々の皮疹も悪性化の進展過程の上で種々の

段階にあることが予想される。

近年、各種ヒト腫瘍の細胞核 DNA 量が測定され、その多くに DNA 量の異常の程度と腫瘍の生物学的態度が良く相関することが見出されている⁶⁾⁷⁾。我々は皮膚腫瘍の生物学的態度が、DAPI-DNA 顕微蛍光測光法を用いて測定した DNA 量の異常の程度に極めて良く反映されることを見出した³⁾⁸⁾。

そこで、上述の悪性黒色腫の RGP と VGP、汗孔角化症皮疹について多段階癌化過程の一端を明らかにすべくその腫瘍細胞核 DNA 量を測定した。

材料と方法

材 料：表在拡大型悪性黒色腫 3 例の RGP と VGP に相当する部分と 16 例の汗孔角化症患者から得た 33 皮疹部標本を用いた。前者では腫瘍細胞、後者では表皮細胞をパラフィン包埋標本から分離した。悪性黒色腫と汗孔角化症皮疹に対し、それぞれ色素性母斑と健常人健常表皮

^{*1} Fujio OTSUKA：筑波大学臨床医学系皮膚科

^{*2} Hyung-In CHI, Ryoji WATANABE, Yasumasa ISHIBASHI：東京大学皮膚科学教室

を対照とした。さらに汗孔角化症との比較のために6例のボーエン病と3例の有棘細胞癌を併せ検討した。

方 法：

ア) DAPI-DNA 顕微蛍光測光法

方法は既に報告してあるが⁽³⁾⁽⁴⁾⁽⁸⁾、概略を以下に述べる。パラフィン包埋組織標本を50 μ mに厚切り、脱パラ後、検索対象部位を切出す。これを酵素、超音波処理して浮遊細胞を得て、スライドガラス上に移す。その核DNAを4, 6-diamidino-2-phenyl-indole (DAPI) にて染色、DAPIの発する蛍光量をOlympus MMSP-RFS microfluorometerで測光する。DNAヒストグラム描出のために1標本中100個以上の細胞核を観察、測光する。測光した蛍光量、すなわちDNA量はコンピューターを用いて記録、解析する。正常2倍体DNA量は、同一標本中に混じているリンパ球核を観察、蛍光量を測光することにより決定する。

イ) DNA量異常程度の解析

DNA量異常の程度はDNA分布ヒストグラムパターンとDNA指数値によって判定し、比較した。

DNA分布ヒストグラムのパターンは大きく3型に分類した。

(1) Diploid pattern: 正常2倍体 (diploid)

DNA量を有する細胞のみ、あるいは加えて少数のSないしG2/M期相当の細胞がみられるパターン

(2) Polyploid pattern: diploid細胞が主要な細胞群を構成するが、多倍体 (polyploid; 2倍体の整数倍をいうが、便宜的に6倍体以上と定義しておく) DNA量を持つ細胞群が比較的少数みられるパターン

(3) Aneuploid pattern: 異数体 (aneuploid), すなわち2倍体量の整数倍でないDNA量を持つ細胞群が主体またはその存在が明らかなパターン

DNA指数値はDNA量変異を一つの数値で表現したもので、1標本中に観察した全腫瘍細

胞核DNA量の平均値を同標本における2倍体DNA量で割って算出される。Diploid細胞のみの時、指数値は1.0であるが、polyploid細胞、aneuploid細胞が多ければ1.0以上の大きい値となる。

結 果

表在拡大型悪性黒色腫のRGPとVGP:

VGPでは全例にaneuploid細胞群の存在が確認され、ヒストグラムはaneuploid patternであった。一方、RGPでは明らかなaneuploid細胞群を認めず、polyploid細胞も1例に少数出現したのみであった(図1)。すなわち、2例がdiploid pattern, 1例がpolyploid patternであった。VGPのDNA指数値は1.85, 2.13, 1.89であり、対応するRGPでは1.30, 1.71, 1.09であった⁹⁾。

汗孔角化症と細胞核DNA量: 16例の汗孔角化症患者の33皮膚部標本のDNA分布ヒストグ

図1. 表在拡大型悪性黒色腫 radial growth phase と vertical growth phase のDNA分布ヒストグラム

図2. 汗孔角化症のDNA分布ヒストグラム

- A: 健常人対照皮膚表皮, 正常 diploid pattern である
 B: 汗孔角化症表皮, tetraploid 細胞が多い
 C: 汗孔角化症表皮, polyploid 細胞を比較的多数認める
 D: ボーエン病表皮部分, 多数の polyploid 細胞を認める

ラムは, diploid pattern(図2 A), diploid 細胞を中心としながら hyperdiploid あるいは多数の tetraploid 細胞を有するパターン (図2 B), あるいは polyploid pattern (図2 C) を示した。

Polyploid pattern は, 16例中 8例, 33標本中 42%と高頻度にみられた。Polyploid 細胞は少

図3. 汗孔角化症のDNA指数値分布
 ()内は検討標本数

数のものから比較的多数出現するものまで様々であった(図2 C)。健常人対照皮膚の表皮細胞には polyploid 細胞をはじめとする異常DNA量を持つ細胞を認めなかった³⁾。さらにDNA分布ヒストグラムを詳細に検討すると, 一部の皮膚疹部表皮(図2 C)はボーエン病(図2 D)に近いパターンを示した。DNA指数値を算出すると汗孔角化症皮膚疹部表皮は健康皮膚からボーエン病に相当する領域に幅広く分布した(図3)。

考 案

表在拡大型悪性黒色腫におけるVGPはRGPと異なって, DNA分布ヒストグラムパターンとDNA指数値, すなわちDNA量の面から見て異なる細胞群が存在すると思われた。ヒストグラムパターンでaneuploidyが強まる程, DNA指数値が大きい程, 悪性度が高いと考えられるので¹⁰⁾, VGPにはRGPと比較して腫瘍の生物学的態度の面でより悪性度の高い細胞

群が存在することが分かる。局面上に結節を形成すると予後が悪化するといわれる悪性黒色腫によく対応する所見であり、悪性黒色腫の進展過程に異なる段階が存在すること、進展過程が多段階的であることが示唆される。

汗孔角化症皮疹部表皮のDNA分布ヒストグラムは polyploid pattern や hyperdiploid から tetraploid のDNA量を持つ細胞群の増加が明らかな diploid pattern を呈することが多く、腫瘍性クローンが存在することが示唆される。さらに、皮疹によってはそのDNAヒストグラムがボーエン病に近いものから、健常表皮に類似するものまで様々であった。DNA指数値もボーエン病や有棘細胞癌のような高値を示すものから、健常表皮のごとき低値を示す皮疹まで様々であった。これら所見は汗孔角化症皮疹から悪性腫瘍が統発しうることが細胞学的に示すものであるが、一方で汗孔角化症皮疹部表皮に存在する腫瘍性クローンは皮疹によりその増殖、発達程度が異なっていることを表している。DNA量異常の細胞学的側面から明らかな段階的発達過程を峻別することはできないものの、

汗孔角化症皮疹の悪性化に多くの段階が存在しうることを示唆する所見と考えられる。

以上、DAPI顕微蛍光測光法によるDNA量の検索は色素性腫瘍や表皮前癌性病変の発達進展過程を明らかにし、その多段階発癌の一端を臨床的、細胞学的に捉え得たことを示した。

文 献

- 1) Kern, S. E. et al.: JAMA, 261: 3099-3103, 1989.
- 2) Clark, W. H. et al.: Human Pathol., 15: 1147-1165, 1984.
- 3) Otsuka, F. et al.: Cancer, 63: 891-896, 1989.
- 4) Otsuka, F. et al.: J. Am. Acad. Dermatol., 23: 355-359, 1990.
- 5) Otsuka, F. et al.: J. Cancer Res. Clin. Oncol., 117: 55-60, 1991.
- 6) Barlogie, B. et al.: Am. J. Med. 69: 195-203, 1980.
- 7) Bohm, N. et al.: Curr. Top. Pathol., 60: 151-218, 1975.
- 8) Chi, H. I. et al.: J. Invest. Dermatol., 95: 154-157, 1990.
- 9) 池亨仁, 他: 日皮会誌, 99: 493-497, 1989.
- 10) 上田純嗣, 他: 日皮会誌, 99: 1396-1397, 1989.