

DNA Image Analysis を用いた大腸癌の悪性度評価と
その臨床応用に関する研究

安藤 秀彦

①

DNA Image Analysis を用いた大腸癌の悪性度評価と
その臨床応用に関する研究

安 藤 秀 彦

目 次

I. 緒言	1
II. イメージサイトメトリーを用いた核DNA量測定 —DNA Image Analysis—の有用性に関する基礎的検討	
1. 目的	5
2. 材料と方法	5
3. 結果	7
4. 考察	11
5. 小括	19
III. DNA Image Analysis を用いた大腸早期癌 (sm癌) の悪性度 評価とその臨床応用に関する検討	
1. 研究背景と目的	21
2. 対象と方法	22
3. 結果	24
4. 考察	26
5. 小括	33
IV. DNA Image Analysis による大腸癌の肝転移予知に関する検討 —臨床応用のためのprospective study—	
1. 目的	35
2. 対象と方法	36
3. 結果	36
4. 考察	37
5. 小括	39
V. 総 括	40
VI. 結 語	42
VII. 図 表	43
VIII. 引用文献	82

1. 結 言

近年急速な進歩を遂げつつある分子生物学的手法による解析の結果、癌は遺伝子異常の蓄積による疾患であるという概念が受け入れられつつある¹⁾。正常な細胞が遺伝子異常を積み重ねていくうちに、次第に正常な細胞増殖のコントロールから逸脱し、段階的に癌細胞へと変化する、さらに遺伝子異常が蓄積することにより、分裂速度の速い・転移しやすい悪性度の高い癌細胞となる、と考えられる。大腸癌においては家族性大腸腺腫症および癌家系症候群（遺伝性非ポリポーシス大腸癌、hereditary nonpolyposis colorectal cancer ; HNPCC）の2つの遺伝性疾患の解析から、現在までにAPC, MCC, p53, DCCの癌抑制遺伝子、K-ras及びRER遺伝子の異常が指摘され、大腸癌の発生・発育・進展に関与していると考えられている²⁾。しかし、これらの遺伝子変化によって大腸癌の発育や浸潤・転移のすべてが説明されたわけではない、またこれらの遺伝子異常を臨床に応用することに関しては端緒についたばかりであり、未だ実用には程遠いのが現状である。

一方、複雑なあるいは多段階の遺伝子変化の結果として、癌は秩序を失った分裂と増殖を繰り返し、浸潤・転移という性格を獲得する際に、癌の発育進展に伴って異常な核DNA量を示すことが以前より明らかにされている。この事実を利用して、癌のいわゆる悪性度評価に核DNA量を用いることが試みられてきた³⁾。すなわち、正常な細胞群がdiploidy（2倍体）を示すのに対して癌細胞群はaneuploidy（異数倍体）やpolyploidy（多倍体）を示すことが多く、このploidyパターンを用いれば癌の予後の判定が可能とされてきた。既知の遺伝子異常及び未知の遺伝子変化を含

めて、その遺伝子異常の蓄積の結果として、あるいは染色体の転座や不分離等の結果、癌細胞の核DNA量は増加するものと考えられ、この点において、核DNA量測定は癌の悪性度評価及や臨床上の治療効果判定等に臨床応用が可能と考えられる。実際に大腸癌においては、aneuploidyを示す腫瘍はdiploidyを示す腫瘍に比較して、予後が不良であるというコンセンサスが得られている^{4, 5, 6, 7, 8, 9, 10}。しかしながら、この核DNA量測定は実際の臨床において繁用されるには至っていない。これは①測定方法が煩雑であること、②悪性度評価に用いるには感度・特異度がやや不良であること、等の理由によるものと考えられる。

さて、最近画像処理・解析にコンピューターを導入した細胞イメージ分析装置（イメージサイトメトリー：image cytometry, 以下ICM）が新しく開発され、欧米でもフローサイトメトリー（flow cytometry, 以下FCM）とともに繁用されるようになってきた¹¹。その最大の利点は、テクノロジーの進歩による測定技術の改良によって、核DNA量測定を簡便かつ迅速に行うことができるようになったことである。もし、このICMによる核DNA量測定—DNA Image Analysis—がこれまでの測定法に比較して感度・特異度が高く、また測定方法が簡単で実際的であれば、さらに核DNA量の臨床応用をはかることが可能となる。すでに欧米においては、乳癌の診断治療においてこの核DNA量測定による悪性度評価が行われ、手術適応決定や放射線治療・化学療法に対する反応の評価に利用されている^{12, 13}。

そこで、大腸癌の悪性度評価にDNA Image Analysisを応用することを目的として、まずICMを用いた核DNA量測定に関する基礎的検討を行うこととした。当教室においては、大腸癌の核DNA量測定について、これまでは顕微蛍光測光法

(cytophotofluorometry, 以下CPM) を用いた研究をすすめる成績を報告してきた^{7, 14, 15, 16)}, まず第1に, このCPMによる測定とDNA Image Analysisとの比較をおこない, さらにFCMによる測定との比較を重ねて, ICMの優位性を確かめることとした。第2に, このDNA Image Analysisが大腸癌の悪性度評価に果たして有用か否かを検討するために, このDNA Image Analysisを用いて大腸早期癌(sm癌)について解析をおこなった。早期癌(sm癌)でありながら治療後に再発・転移をきたした症例について, 核DNA量の差異について検討し, 核DNA量が予後規定因子になりうるかどうかを検討した。これは大腸早期癌の治療において, 内視鏡的な治療で完結できるか, あるいは外科的な腸管切除術が必要かどうかを判断をする際に, 核DNA量が有用なリスクファクターとなりうるのではないかと考えたからである。第3に, このDNA Image Analysisという方法論を実際に臨床応用するために, 生の臨床材料を用いて核DNA量の測定をprospectiveに検討した。そして大腸癌治療における課題のひとつである肝転移予知に関して, このprospective studyの検討から, 核DNA量のリスクファクターとしての有用性と実用性についての検討をおこなった。

すなわち, 本研究の目的は, ①ICMという新しい方法論の検討と, ②大腸癌の治療選択に対するDNA Image Analysisの有用性と臨床応用の可能性の検討である。

(1) ICMを用いた核DNA量測定—DNA Image Analysis—についてその基礎的検討をおこない, ICMとCPM・FCMの相関関係を明らかにし, ICMの有用性を確認すること。

(2) DNA Image Analysisを用いて大腸早期癌(sm癌)の悪性度評価をおこな

い、sm癌の治療選択に関する臨床応用の可能性について検討すること。

(3) DNA Image Analysis を用いて大腸癌の悪性度評価をprospectiveにおこ

ない、大腸癌の肝転移予知に関する有用性を検討すること。

の3項目である。

II. イメージサイトメトリーを用いた核DNA量測定—DNA Image Analysis—の有用性に関する基礎的検討

1. 目的

ICMを用いた核DNA量測定—DNA Image Analysis—について、FCM及びCPMとの比較をおこない、その有用性について検討する。また、タッチ標本とICMを用いた核DNA量測定の有用性についても併せて検討する。

2. 材料と方法

当科において外科的に切除された大腸癌症例11例を材料として、FCMによる測定用に細胞浮遊液を、ICM及びCPMによる測定用に細胞単離塗沫標本を作製し、各々の測定法から得られた核DNA量の諸データ（DNA ploidyパターン、DNAindex（以下DI）値、CV値）の相関性について比較検討した。また、タッチ標本の有用性の検討のために、大腸癌16例の新鮮（凍結）標本から、腫瘍表面とその断面のタッチ標本を作製し、表面と断面の核DNA量の差について比較した。また細胞単離標本とタッチ標本の比較のために、同一検体のパラフィン包埋標本から作製した細胞単離標本と、新鮮標本から作製したタッチ標本との双方をICMで測定し比較した。さらに大腸癌8例の新鮮標本または生検標本から、腫瘍表面のタッチ標本を複数個作製し、核DNA量のheterogeneityについて検討した。

1) 標本の作製・染色

パラフィン包埋ブロックからHematoxyline & Eosin染色標本（以下HE標本）と50 μ mの厚切り切片を用意し、表1のごとくHedleyらの方法¹⁷⁾に準じて、顕微鏡

下にHE標本と対比参照しながら、厚切り切片から癌病巣のみを針メスでくりぬき採取し、細胞単離塗沫標本及び細胞浮遊液を作成した。FCM測定用の細胞浮遊液作成においては、表2のごとくHedleyらの方法に加えて、トリプシン処理を行った後に染色を行った。タッチ標本は、あらかじめリジン (poly-L-lysine) をコーティングしたスライドガラス上に、新鮮標本の表面と断面を軽くタッチすることにより細胞を得た。標本をのせたスライドガラスは30分空気乾燥させ、10%中性緩衝ホルマリン液で30分固定、その後脱イオン水で洗浄し、空気乾燥を施して染色に備えた。

染色法は、ICM及びCPMについてはFeulgen染色を、FCMについてはPI (propidium iodide) 染色を施行した。ICMには市販されているCAS DNA染色キット (CAS Quantitative DNA Staining Kit: Becton Dickinson Cellular Imaging Systems, Becton Dickinson and Company, San Jose, CA, USA) を用いた。またCPMによる測定用には、Takamatsuらの方法¹⁸⁾に準じたAzocarmine G-Acriflavine-Feulgen染色による蛍光染色を行って発色させた (表3)。

2) 核DNA量の測定方法と解析

核DNA量の測定に用いた機器は、CPMには落射型顕微蛍光測光装置AH2-QRFL (Olympus社) を、ICMにはイメージサイトメーターCAS200 (図1; Becton Dickinson Cellular Imaging Systems, Becton Dickinson and Company, San Jose, CA, USA) を、FCMにはFACScanフローサイトメーター (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA) を用いた。ICM及びCPMによる測定では、同一標本中に存在する小リンパ球を20~30個測定し、そのモード値をコントロール (2

C) として、顕微鏡下にあるいはモニター上で、実際に計測している細胞を各々確認しながら、100~300個の腫瘍細胞を測定した。核DNA量のヒストグラムの解析にはdiploid及びnon-diploidの2つのploidyパターンに分類した。すなわち、G0/G1ピーク (stem line) が単一で $2.0C \pm 2SD$ に存在し、4Cを越える細胞群をみとめないものをdiploid、それ以外のものはすべてnon-diploidとした。また、non-diploidをさらに分類する必要がある場合には、癌DNA研究会用語検討委員会の報告¹⁹⁾にしたがって、aneuploid (G0/G1ピークがdiploid以外に存在するもの) ; polyploid (基本となる cell cycle から逸脱した整数倍数体を示すもの) ; tetraploid (polyploidのうち4CにG0/G1ピークが存在するもの) ; near-diploid (diploidに類似のもの) とした。特にDI値についてはpeak-DI値 (p-DI : 腫瘍細胞のG0/G1ピークのモード値とコントロール細胞のG0/G1ピークのモード値の比) の他に、測定した全腫瘍細胞の核DNA量の平均 (腫瘍細胞の核DNA量をコントロール細胞の核DNA量 (DI=1) に対する比で表し、これを平均したもの) をmean-DI値 (m-DI) として解析に用いた。また、正常細胞では出現しない4Cを越える細胞群の割合を、 $\% > 4C$ として表現し腫瘍細胞における評価を試みた。

3) 統計学的処理

実験結果の数値は、平均値±標準偏差 (SD) で示した。各測定法で求められたDI値 (p-DI, m-DI) について、2変量の相関性をSpearmanの相関分析を用いて検定した。統計処理ソフトにはStat View 4.11 (Abacus Concepts, Inc.) を用い、5%未満の危険率 ($p < 0.05$) をもって有意と判定した。

3. 結果

(1) イメージサイトメトリーとフローサイトメトリーの相関

ICMとFCMを使って11例の大腸癌症例を測定したところ、11例中10例で同様のploidyパターンが得られ、一致率は90.9%であった(表4)。一致しなかった1例(case 5)は両法による測定とも2C付近にメインピークがあるものの、DI値が微妙に異なったため(ICM: 1.02, FCM: 1.19) ploidyパターンが各々diploidとnon-diploidに判定された。FCMによるCV値が14.8%と不良であったことが原因と考えられた。DI値(p-DI)による両法の比較では良好な相関が得られた($r=0.873$, $p<0.04$; 図2)。またCV値についてはICMが平均 5.93 ± 2.10 (2.66~9.00), FCMが平均 7.27 ± 4.53 (1.30~14.8)と有意差はなかったが、FCMにはばらつきの多いものが3例みられた(CV値: 11.3%, 11.9%, 14.8%)。測定時間に関しては、FCMが平均1分17秒 \pm 1分6秒、ICMが平均13分12秒 \pm 2分25秒で圧倒的にFCMの方が優位であった。

(2) イメージサイトメトリーと顕微蛍光測光法の相関

同一の細胞浮遊液から得られた細胞単離塗沫標本9例をICMとCPMの各々で測定したところ、9例中8例で同様のploidyパターンが得られ(表5)、その一致率は88.9%であった。一致しなかったcase5は、ICMでは2C以外に明かなG0/G1ピークをもつnon-diploidであったが、CPMではdiploidと判定された。また、case2, 4, 6, 9はploidyパターンとしては同じnon-diploidながら、ICMで検出されたG0/G1ピークをCPMでの測定では検出できなかった。この9例のDI値の相関について検討してみると、p-DIについては $r=0.979$ ($p<0.01$)であり、m-DIについても $r=0.980$ ($p<0.01$)で、いずれも良好の相関を示した(図3)。またCV

値についてはICMが平均 7.08 ± 2.23 (4.33~9.77), CPMが平均 8.44 ± 3.22 (2.85~12.50)と有意差はみとめなかったが、ICMの方がばらつきの少ない良好なCV値が得られる傾向があった。

(3) イメージサイトメトリーを使ったタッチ標本の核DNA量測定 (heterogeneityに関する検討)

1) 腫瘍の表面と断面での核DNA量測定

16例の新鮮(凍結)標本から、腫瘍の表面と断面のタッチ標本を作成しICMによる核DNA量測定をおこなったところ、ploidyパターンが一致したものが16例中13例(81.3%)であった(表6)。DI値からその相関関係を検定すると、p-DIについては $r=0.714$ ($p<0.01$)、m-DIについても $r=0.844$ ($p<0.01$)で、いずれも強い相関を示した(図4)、また $\%>4C$ についても $r=0.738$ ($p<0.01$)と強い相関を得た(図5)。

2) 同一組織から得た細胞単離標本とタッチ標本での核DNA量測定

同じ腫瘍からの標本でも、 $50\mu m$ の厚切り切片から得られた細胞単離標本と新鮮標本から得られたタッチ標本とでは対象が異なる可能性がある。そこで8例の同一腫瘍組織から得た細胞単離標本とタッチ標本の双方をICMで測定し、両者が相関するかどうかについて検討した。ploidyパターンは全例同様のパターンを示したが、表7に示すようにp-DI・m-DIとも異なる例が1例(case2)、p-DIのみ解離したものが2例(case1, 5)みとめられた。相関係数はp-DIが $r=0.479$ 、m-DIが $r=0.675$ ($p=0.07$)であり、m-DIには相関の傾向がみられた。

3) 腫瘍表面における複数箇所での核DNA量測定

8例の新鮮標本における腫瘍の表面から、各々3～6ヶ所のタッチ標本を作製し、その核DNA量を測定した。すなわち腫瘍表面でのheterogeneityについて検討したが、同一症例の検体の中でploidyパターンがひとつでも異なる症例が3例(37.5%)にみとめられ、残りの5例(62.5%)はすべてploidyパターンとp-DIにばらつきはみとめられなかった(表8)。heterogeneityをみとめた3例のうち、case3は6ヶ所のうち3ヶ所がdiploidで他の3ヶ所はaneuploidであった。p-DIは6ヶ所とも1.01～1.13の領域に存在したが、 $\% > 4C$ の値に差がみられた。case7はtetraploidのG0/G1ピークが3個の検体のうち2個で検出できなかった。case6はploidyパターンではpolyploidとtetraploidに分かれたが、m-DIの値には大きな差がみられなかった。

4) タッチ標本測定時の測定細胞数によるばらつきに関する検討

タッチ標本における細胞を測定する際に、測定細胞数によって得られるデータにばらつきが生じるか否か、どの程度の細胞数が適当かを判断するために5件の検体について各々50,100,150,200,250,300個測定時のDI値・CV値について検討した(表9)。各検体とも測定細胞数の変化によるploidyの変化はみとめられず、DI値は測定細胞数が100～150個の段階からp-DI・m-DI双方ともにほとんど変化はみられなかった。300個測定時のp-DI値との差は100個で0.00～0.15(平均 0.044 ± 0.06)、150個で0.00～0.15(平均 0.042 ± 0.06)であり、同様にm-DI値でみると、100個で0.02～0.09(平均 0.038 ± 0.03)、150個で0.01～0.10(平均 0.038 ± 0.04)であった。ばらつきの程度をCV値から検討してみると(図6)、case4のように測定細胞数が増えるほどCV値が良好となるものもあるが、他

の症例はすべて、100~150個からさらに測定細胞数を増やしても、ほとんどCV値の変化はみられなかった。また、測定細胞数100個ですべての症例がCV値7%以下(平均5.43%)であった。

4. 考察

核DNA量の測定には、現在FCMが最も利用されている。FCMは多数の細胞の測定が短時間で行うことが可能である反面、測定している細胞の形態観察ができない、すなわち目的とする腫瘍細胞以外の細胞(正常リンパ球や壊れた細胞、重なった細胞等)の混入を除外できないという欠点がある。この点においてCPMは測定すべき細胞を顕微鏡下に実際に確認しながら測定するため、腫瘍細胞のみを測定しているという点でFCMと大きく異なる。

当教室においても、CPMを用いた大腸癌の核DNA量測定について研究をすすめてきたが、この方法の最大の短所は、測定効率が著しく悪いこと、また蛍光量が時間とともに減衰するため後日の再評価が不可能な点であった。すなわち、CPMを使った測定では、暗室内で1個1個の細胞に励起光をあててその蛍光量を測定する必要があり、まず小リンパ球の蛍光量を測定してその平均値を2Cとするコントロール設定の段階で時間を要し、かつその誤差を考慮する必要があった。また細胞測定の際に蛍光量が減衰していくため、測定標本の保存と同条件での再検は不可能である。さらに測定した細胞をモニター上で解析することができず、臨床において繁用するには实际的でなかった。

このCPMの短所を克服すべく近年開発されたICMは、画像処理・解析にコンピュータを導入して検体の処理時間を短縮し、迅速かつ簡便な解析を可能にし

た。ICM としては、Becton Dickinson Cellular Imaging Systems社によって開発されたCAS200が最も普及しており、米国においてはそのシェアの90%を占めている²⁰⁾。CAS200は光学顕微鏡、フルカラーディスプレイモニター2台、IBM改良型コンピューター、プリンターから構成されている(図1)。核DNA量の測定においては、塩酸による加水分解の後にFeulgen染色された標本に、単色光を当てるとその核内のDNA量に比例して発色をみとめるが、これを内蔵のCCDカメラがセンサーとして感知し、光の強度に比例した電圧信号を発する。同時にCCDセンサーからx・y軸の走査位置を追跡して、デジタル画像メモリー上に光強度(optical density)とともに画素として保存される。このデジタル化された顕微鏡画像をコンピューターに内蔵された細胞計測プログラムを使用して測定し、また統計学的解析を行うことができる²¹⁾。スライドガラス上の測定すべき細胞を400倍の顕微鏡下で確認し、「測定」のコマンドをおくと、画面上の細胞のリアルタイムでのデジタル画像がモニターにディスプレイされ(図7)、各々の核の光強度(=DNA量)、大きさ等が表示される。鏡検下では2個の細胞ながら、細胞同士が接しているために1個の細胞と機器が認識してしまう場合があるが、このような場合CAS200では、細胞と細胞の境界にラインをインプットすることにより、2個の細胞と認識させ測定することが可能であり有用である。測定操作を繰り返して目標とする細胞数(100~300個)に達したら、測定した全細胞をモニターの画面上に表示して、再度確認することができる(図8)。このステップで混入した癌細胞以外の細胞や壊れた細胞等の不適当な細胞を除外することも可能である。測定結果は同時にヒストグラムやDI値等のデータとして表示される(図9)。このような測定上

の工夫から、CPMに比較してその測定効率は飛躍的に進歩した。また画像処理をコンピュータでおこなっているので、データのみならず画像の保存・再検が可能であることもその利点のひとつである。

1) イメージサイトメトリーとフローサイトメトリーの比較

ICMとFCMについてはその解析データがよく相関することがすでに文献的に報告されている^{22, 23)}。著者の検討においても、ICMとFCMによるploidyパターン一致率は90.9% (10/11)であり、p-DIの比較でも良好な相関が得られた。一致しなかった1例はDI値が1.19 (FCM) と1.02 (ICM) で近い値ではあるが、ICMに比べてFCMのCV値が不良 (ICM: 6.92%, FCM: 14.8%) であったことが原因と考えられた。

FCMによる測定では通常1万個以上の細胞数を得ることが必要で、そのためには材料の組織量がある程度必要である。パラフィン包埋標本であれば、少なくとも50 μ m厚の標本で1 cm²以上は必要と考えられた。また腫瘍組織量の多い標本と比較して早期癌症例や病巣の小さいもの・生検標本などが検体の場合は、事実上FCMでの測定は難しい。また50 μ m厚かつ1 cm²以上の組織片になると、目的とする腫瘍細胞以外のリンパ球や間質の細胞等の混入を当然避けることができない。したがってFCMは、癌細胞を顕微鏡下に直接確認しながら測定するICMとこの点で大きな相違がみられ、またこれが一部のDI値の不一致の原因と考えられた。すなわち、本来検出されるべき異常細胞の集団が、細胞数の多いリンパ球や間質細胞のためにマスクされてしまうことが考えられる。安田ら²⁴⁾によれば、FCMによる測定でdiploidと判定された症例をCPMで検討してみると、本来検出されるべきaneuploidの成分

がマスクされている症例があることを報告している(図10)。これはFCMによる測定で避けられないリンパ球の混入が過度の場合、2Cのピークが高すぎるために、本来測定したい癌細胞のaneuploidの成分が相対的に低くなり、誤ってdiploidと判定されやすいためであり、このため直接鏡検して癌細胞だけをDNA定量できる顕微蛍光測光法の方が有用であるとしている。ploidyパターンの解析において、diploidにきわめて近いパターンでありながらdiploidの基準からはずれるものを、near diploidと判定されるケースがある。FCMでnear diploidと判定されるような場合には、前述のように多数のリンパ球等の正常細胞のためにaneuploidの成分がマスクされてしまった可能性があり、実際に顕微鏡下で確認する必要があると考える。Bauerらの報告によると、諸臓器92例からのタッチ標本をICMで測定したものと、同検体の細胞浮遊液をFCMで測定したものを比較し、両法で測定したDI値について良好な相関が得られたとしている²²⁾。さらに、FCMではdiploidとされた9例をICMではaneuploidと判定し、aneuploidの検出力が高いことを指摘している。検出されなかったaneuploid populationはICMによってnear tetraploidとされたものが多く、これはFCMの測定においてG2+M peakが単に増大したものと解釈されたためとしている。逆にFCMでのみ検出できたaneuploid peakがわずかに3.3%にみられ、これはタッチ標本作製時のサンプリングエラーによるものと推論している。また、Leeらも乳癌50例を材料にしたFCMとICMの比較をおこない、やはり両法においてp-DIがよく相関することを報告している²⁵⁾。故に、ICMはFCMとその測定値においてよく相関し、かつ目的とする腫瘍細胞群の検出力においてFCMよりも優れているといえることができる。

FCMのICMに優る点としては測定効率があげられる。同一検体で細胞測定のための所要時間を比較するとFCMが1~2分、ICMが12~13分であり、FCMの方が格段に迅速であった。しかし、検体の採取・準備、測定機器のセッティング、そして実際の測定までの全過程を総合的に判断して有用性を議論する必要がある。

2) イメージサイトメトリーと顕微蛍光測光法の比較

この2つの方法は、目的とする細胞を実際に顕微鏡下で確認しながら測定している、という点で共通である。両法で求められたploidyパターンは88.9% (8/9) の一致率をみると、DI値 (p-DI, m-DI) はいずれも有意な相関をみとめた。実際に検出すべきnon-diploidの細胞群を、CPMにて認識できずICMで可能であったものが計5例存在した。両法による測定は同一検体の細胞核浮遊液から2枚の細胞単離塗沫標本を作製しておこなったものであり、この際のサンプリングエラーがなかったとすれば、CPMで検出できなかった2例のaneuploid peakを拾い上げることができたICMの方が、その検出力において優れていると考えられる。CV値もICMの方がCPMよりも良好で、ばらつきが少ない傾向がうかがわれた。細胞の蛍光量あるいは吸光度を測定する際に、核の中心部付近の測定能力 (検出力) は両法のいずれでも差異はないと考えるが、核の辺縁部の測定能力に差が生じている可能性がある。すなわち、ICMには核の辺縁境界の認知感度を調節可能なバウンダリー (boundary) という機能が付随しており、染色濃度や染色のムラに左右されずに核の辺縁部までの吸光度をもれなく測定することができる。CPMでは、励起光を核の中心部に当ててその蛍光量を測定するが、全体に満遍なく当てて測定することが難しく、どの核も辺縁部まで測定されているとはいえない。またCPMは、1個1個の核に各々励起

光を当ててその蛍光量を測定する作業の繰り返しであるために、測定効率が著しく悪い。さらに蛍光量が時間の経過とともに減衰していくために、同条件で後日再測定することは不可能である。ICMでは測定時の画像が保存されているために、測定済みのすべての細胞の再検討が容易であり、CPMと異なって蛍光量の測定ではないので、染色後2ヶ月程度は同条件で再測定することが可能である。測定時間については、同条件下で細胞単離塗末標本を両法にて測定した場合、ICMで約15~20分、CPMで約30~40分であり、ICMを用いると処理時間が約1/3~1/2に短縮された。

3) イメージサイトメトリーを使ったタッチ標本の核DNA量測定

大腸癌の核DNA量と予後の関係については、1)aneuploidの症例はdiploid症例に比較して予後が不良であること、2)癌の進行に伴ってaneuploidの比率が増加すること、等のコンセンサスが得られている^{4, 5, 6, 7)}。

従来腫瘍の悪性度を評価するために臨床上用いられてきた臨床病理学的諸因子に加えて、核DNA量は癌の生物学的悪性度の指標として重要な因子であると考えられるが、組織学的所見や腫瘍マーカーなどに比較すると、実際の臨床において活用されているとはいえない。これは核DNA量の測定に際して、検体の採取・標本の作製・核DNA量測定の方法等の手技が煩雑で、しかも測定効率が悪いなどのimpracticalな要因が関与していると考えられる。そこで、大腸癌悪性度評価の指標としてこのDNA Image Analysisを臨床応用するために、検体の採取方法が非常に簡単なタッチ標本を用いることにした。Suitら²⁶⁾は乳癌・腎細胞癌等59例の腫瘍を材料にした解析から、タッチ標本とImage Analysisを用いた解析の有効性について述べている。すなわち、タッチ標本の最大の利点は目的とする材料を検査のた

めに犠牲にすることがない点であり、またパラフィン包埋材料を使った測定における問題、すなわちホルマリン固定条件の差異による問題や細胞単離過程から発生しやすいテクニカルエラー等の問題を容易に解決できうる点にある。新鮮材料のタッチ標本からは非常に明瞭な細胞核が、1回のタッチ操作で300~500個容易に得られ(図11)、ICMによるploidy解析を容易に行うことができる。また、凍結材料からでも、スライドガラス上に細胞がよく展開されるように留意してsamplingを行えば、十分に測定評価が可能な標本を得ることができた。

さて、タッチ標本を材料として腫瘍の生物学的な態度を表現する場合に、腫瘍の表面からのタッチ標本のみで十分なのかどうかを検討するために、16例の新鮮(凍結)標本から、腫瘍の表面と断面のタッチ標本を各々作製し、ICMにて測定をおこなった。その結果ploidyパターンは81.3%(13/16)で一致し(表6)、 $p-DI \cdot m-DI \cdot \% > 4C$ についても良好の相関関係を示した(図4, 5)。すなわち腫瘍の表面と断面の核DNA量は8割方一致すると解釈できるが、一致しなかった症例については腫瘍内核DNA量のheterogeneityを表現したものか、あるいはサンプリングエラーの可能性がある。そこで腫瘍の内部の核DNA量と表面の核DNA量を比較する意味で、同一腫瘍の厚切り切片から得た細胞単離標本と、新鮮標本から得たタッチ標本の双方をICMで測定し、両者の比較検討をおこなった。細胞単離標本はその作製方法で述べたように、腫瘍組織の厚切り切片から腫瘍部分のみを採取するものであり、測定された核DNA量値は腫瘍内部の細胞集団の核DNA量を反映していることになる。さて両者を比較してみると、ploidyパターンは全例同様のパターンを示したが、 $p-DI \cdot m-DI$ 両方とも異なる例が1例(case2)、 $p-DI$ のみ解離したものが

2例 (case1, 5) みとめられた (表7)。case2はメインピークが単離標本では1.73であるのに対してタッチ標本では0.95であることから、タッチ標本において本来腫瘍内に存在するaneuploid populationを検出できなかったことになる。その原因として、①タッチ標本のサンプリングが不適当であったため、あるいは②腫瘍の表面と内部では核DNA量が異なる (heterogeneityの存在) こと、が考えられた。細胞単離法が目的とする腫瘍部位を顕微鏡下に確認しながら採取するのに対して、タッチ標本は腫瘍の表面を直接スライドガラスにimprintしただけのものであり、スライドガラス上に測定すべき腫瘍細胞がうまく捺印されるように検体採取をおこなう必要がある。また、あくまでもタッチ標本は、腫瘍表面の細胞集団の核DNA量を表すことから、腫瘍内部と腫瘍表面の生物学的態度が全く異なる場合には、すなわち腫瘍のheterogeneityが明らかに存在する場合にはその影響を受けてしまうことを覚悟しなければならない。Tomodaらによる大腸癌81例の表層と深層の核DNA量の比較をみても、13.6%に腫瘍内のheterogeneityをみとめている²⁷⁾。

タッチ標本は腫瘍表面の核DNA量しか表現できないという限界を踏まえつつ、できるだけ腫瘍の真の核DNA量に近いデータを提供するには、腫瘍表面内のheterogeneityについても検討しておく必要がある。すなわち腫瘍表面のどこから、何ヶ所サンプリングすればよいか? という問題である。表8に示したように同一病変から3~6ヶ所のタッチ標本作製してploidyパターンを比較してみると、37.5% (3/8) にheterogeneityがみとめられた。Moriwakiらも、胃癌及び大腸癌からの計749個 (60例) の内視鏡下生検標本の核DNA量をそれらの切除標本における核DNA量と比較した結果、30~40%のheterogeneityがみとめられた²⁸⁾と報

告している。またGrahamらによれば大腸癌原発巣25例におけるheterogeneityの頻度は22%であったとしている²⁹⁾。この程度のheterogeneityが存在することを前提とすれば、あとはできるだけサンプリングの数を多くして各症例の真の生物学的態度に迫るべきであるが、Dangouらは小さなaneuploid populationを検出するには4~5ヶ所からの生検が必要としている³⁰⁾。Tomodaらは2~3ヶ所必要としているが²⁷⁾、著者らの検討でも3ヶ所サンプリングするとheterogeneityが明らかになったものが3例存在したことから(表8)、測定の際には異なる複数箇所からのサンプリングを最低限3ヶ所から採取おこない、最も高いDI値を選択する必要があると考える。

腫瘍はもともとheterogeneousな細胞の集団と考えられるが、タッチ標本とICMを用いたDNA Image analysisでは、ある程度の危険率をわきまえて使用すれば、簡便に腫瘍の性格を情報として得ることが可能である。またタッチ標本の作製は、パラフィン包埋標本や細胞浮遊液の作成と異なってきたり容易であり、臨床において応用するためには大変好都合である。すなわち、標本作製から測定まで所要時間約3時間で迅速に結果を供用することが可能であり、また腫瘍の性格(悪性度)をploidyパターンによる「定性」のみならず、m-DIやp-DI・%>4Cなどによって「定量」できること、そしてその最大の利点は、FCMによる測定では不可能なことであるが、タッチ標本を用いることにより、生検標本のような小さな標本でも標本を犠牲にすることなく測定ができること、そしてこれらの情報が術前に提供されうるといふ点にあると考えられた。

5. 小括

- ① ICMはDNA ploidyパターンやDI値においてFCMとよく相関する。測定時間はFCMの方がより短時間で測定可能であるが、FCMでの測定にはある程度の大きさの組織片が必要であり、小さな標本の測定は不可能である。ICMはFCMで確認できない腫瘍細胞集団を確認することが可能である。
- ② ICMとCPMはDNA ploidyパターンやDI値においてほぼ相関する。測定に要する時間や再現性・保存性を考慮すると、その利便性においてICMはCPMよりも遥かに優れている。
- ③ ICMを使ったタッチ標本の核DNA量測定では、腫瘍の表面と断面でのploidyパターンが81.3%で一致しており、p-DI・m-DIもよく相関していた。よって、腫瘍表面のタッチ標本から得た核DNA量により、その腫瘍全体をほぼ正確に評価することが可能であり、極めて有用な方法である。

Ⅲ. DNA Image Analysis を用いた大腸早期癌 (sm癌) の悪性度評価とその臨床応用に関する検討

1. 研究背景と目的

近年大腸早期癌に対する内視鏡的治療が著しく進歩し、従来は手術治療を余儀なくされていた症例の一部は、ポリペクトミーや内視鏡的粘膜切除術などにより治療可能となった。すなわち概ね2 cm以下のものは内視鏡的に、それ以上の大きさのものには外科的局所切除による治療が選択され³¹⁾、癌が2 cm以下の患者は大きな手術侵襲を受ける必要がなくなった。病変が粘膜内にある癌 (m癌) にはリンパ節転移のリスクがないため、内視鏡的切除あるいは局所切除で治療は完了することになるが、粘膜筋板を越えて粘膜下層に浸潤する癌 (sm癌) には内視鏡的治療が適切かどうかの判断が必要である。すなわち、一般に大腸sm癌の約10%にはリンパ節転移のリスクがあるとされ³²⁾、これらの症例にはリンパ節郭清を伴う腸切除が必要となるからである。そこで、どのsm癌にリンパ節転移のリスクが高いか、どの症例に腸切除が必要か、を判定することはsm癌の治療法を選択する上で重要である。すなわち、内視鏡的治療にとどめるか、あるいはリンパ節郭清を伴った追加腸切除が必要か、を決定するための客観的な指標はぜひとも必要な情報であり、ここにリンパ節転移のリスクファクターの必要性・重要性が存在する。

再発・転移のもうひとつの問題は、大腸sm癌でも多発性に肝転移や骨転移をきたす例が存在する³³⁾ため、これら血行性の遠隔転移をいかに予測選別し、予防策を講じうるかという点である。この分野も近年急速に分子生物学的手法を用いた検索が

すすめられている^{34, 35)}が、未だ臨床応用に供されているものは少ない。

さて、大腸癌と核DNA量についての文献の中で、大腸早期癌（特にsm癌）の再発・転移に関する核DNA量との関係についての報告は少ない³⁶⁾。核DNA量が再発・転移のリスクファクターとして有用か否かを論じたものはみられず、核DNA量を臨床応用する上において有意義な研究課題と考えられる。そこで、大腸早期癌（sm癌）についてDNA Image Analysisを用いて解析し、sm癌の治療選択上有用な予後指標の設定が可能かどうか、について検討をおこなった。

2. 対象と方法

1) 対象と評価の方法

① 対象は1970年から1993年までに当科および関連施設において内視鏡的切除または腸切除を施行した大腸sm癌61例（結腸癌24，直腸癌37）で、男39例女22例、平均年齢 60.9 ± 11.6 才（32～82才），観察期間は中央値8年11ヶ月（4年～23年）であった。第Ⅱ章-2と同様の方法で、これらのパラフィン包埋標本から細胞単離塗抹標本を作製し、Feulgen染色を施行後、ICMによって核DNA量を測定した。

② ①で測定した核DNA量を評価するために、1) p53遺伝子産物、及び2) 細胞増殖能の指標としてKi-67を免疫組織化学染色にて測定し、核DNA量と比較検討した。

③ 大腸sm癌のリンパ節転移・局所再発に関する予後規定因子について、その予後判定能について検討を加えた。

2) 免疫組織化学染色

免疫組織染色は、抗p53蛋白モノクローナル抗体 (DO-7, Novocastra Laboratories, Newcastle, UK) 及び抗Ki-67モノクローナル抗体 (Anti-Ki-67 clone MIB-1, Immunotech SA, Marseille, France) を用いてABC法 (Avidin-biotin complex immunoperoxidase technique) にておこなった (表10)。すなわち、まず標本を脱パラフィン処理・再水和後、クエン酸緩衝液中で60分煮沸して抗原賦活をおこなった。phosphate buffered saline (PBS) で洗浄後、正常ヤギ血清にて非特異的反応をブロックし、PBSで洗浄した後、1次抗体 (p53 : DO-7, Ki-67 : MIB-1) を組織に重層し4℃で24時間反応させた。PBS洗浄後、2次抗体 (biotinylated goat anti-mouse IgG, DAKO) を室温にて30分間反応させた。さらにPBSにて洗浄後、1.8% H_2O_2 -メタノール液に30分間浸漬し、内因性ペルオキシダーゼを不活化した。次に、流水中で洗浄後、PBSに浸し、ABC complex (Avidin DH-Biotinylated Horseradish peroxidase, VECTASTAIN ABC kit, Vector laboratories, Burlingame, CA) で30分間室温で反応させた。再度PBSにて洗浄後、発色はDAB溶液 (3-3'diaminobenzidine-tetrahydrochloride- H_2O_2 solution) に組織を10分間浸漬して発色させた。流水洗浄後PBSに浸し、核染色はヘマトキシリン液中で10秒間施行、洗浄後透徹・封入した。

測定は、CAS200に付随する免疫組織化学定量プログラムを用いて、腫瘍部分のDABによる発色の吸光度を測定して定量化した。評価方法は、p53についてはCAS200によって定量化された染色陽性面積 (%positive area ; 染色陽性の核面積/全核面積) が5%以上をp53(+)と判定した。Ki-67についても同様に、CAS200によって定量化した染色陽性の核面積比率によって表現し、これをlabeling

index (%L.I.)とした(図12)。

3) 統計学的処理

実験結果の数値は、平均値±SDで示した。統計学的検討には独立した2群間の比較にはMann whitney - U検定を、単変量解析には χ^2 検定を用いて、また多変量解析には重回帰分析を用いて検討した。統計処理ソフトには Stat View 4.11 を用い、5%未満の危険率($p < 0.05$)で有意差ありと判定した。

3. 結果

1) 核DNA量

術後最低2年以上経過しても再発・転移を認めなかった群(対照群:A群)は50例で、リンパ節転移または局所再発を認めた群(B群)が9例、血行性転移を認めた群(C群)が2例であった。各群のm-DIは、それぞれ 1.42 ± 0.28 , 1.86 ± 0.44 , 1.98 ± 0.30 であり、A群とB群、A群とC群との間にはそれぞれ有意な差を認めた($P < 0.01$, $P < 0.04$)(図13)。p-DIは、A群が 1.21 ± 0.34 に対してB群が 1.36 ± 0.49 で、両者間に有意差をみとめなかった。「m-DI > 1.7」をリンパ節転移・局所再発のハイリスクとして設定すると、その感度(sensitivity)・特異度(specificity)・陽性的中値(p.p.v.: positive predictive value)はそれぞれ66.7%(6/9), 93.8%(45/48), 54.5%(6/11)であり、精度(accuracy)は86.4%で他のリスクファクターよりも良好な予後判定能を示した(表11)。また% > 4C (over 4C)に注目してみると、B群は 33.4 ± 22.0 で対照群の 12.0 ± 14.4 より有意に高値($P < 0.01$)であった。「over 4C > 20%」をハイリスクとして設定すると、sensitivity 77.7%, p.p.v. 46.7%, accuracy 82.1

%となり、m-DIに次いで良好な予後判定能を示した。

2) 核DNA量 (m-DI) と p53, Ki-67

m-DIとp53の定量が相関するかどうかについて検討したところ、両者の間には相関はみとめられなかった ($r=0.024$)。図14のごとく、p53陽性率 (positive area比率) は50%以上の群と0~5%前後の2群に明確に分布が分かれた。p53陽性率5%以上をp53陽性としてm-DIと比較してみると、p53 (+) 群のm-DIは平均 1.52 ± 0.33 で、p53 (-) 群は 1.48 ± 0.55 であり両者間に有意差はみとめられなかった ($P=0.30$)。また、p-DI ($P=0.23$)・S-phase比率 (SPF)・%>4C・Ki-67のいずれもp53との間に有意差をみとめなかった (表12)。さらに、m-DIとKi-67 labeling index ($r=-0.271$; 図15)、SPFとKi-67 ($r=-0.084$; 図16)の各々の比較でも有意な相関はみとめられなかった。なお、m-DIと%>4Cについては図17のごとく有意な正の相関を示した ($r=0.812$)。

3) リンパ節転移・局所再発に関する予後判定能

大腸sm癌の再発・転移のうち、リンパ節転移・局所再発に関して核DNA量を含めて臨床病理学的予後因子について χ^2 検定を施行してみたところ、m-DI ($P<0.001$)・静脈侵襲 ($P<0.01$)・とH-inv (癌先進部組織型; Histology at the invasive front, 図18) ($P<0.04$)の3因子が有意であった (表13)。また%>4Cも両群間で有意な差をみとめた ($P<0.01$, 表14)。同様にp53についてsm癌の再発・転移に関する予後判定能について検討したところ、p53 (+)の頻度は対照群で54.5% (12/22)、再発・転移群は60.0% (3/5)であり、有意な相関はみられなかった。また、Ki-67 labeling indexは対照群で $61.0 \pm 19.1\%$ 、再

発・転移群で $78.1 \pm 13.8\%$ と再発・転移群の方が高い傾向があったが、有意差をみとめなかった(表14)。さらに、リンパ節転移・局所再発に関する各種の臨床病理学的因子について、重回帰分析による多変量解析をおこなったところ、壁深達度や組織分化度、脈管侵襲などの従来のリスクファクターは有意ではなく、核DNA量のみが有意な相関(m-DI; $P=0.001$, p-DI; $P=0.033$)を示した(表15)。

4. 考察

1) 核DNA量の定量化—特にm-DIについて—

DNA ploidyパターンは、腫瘍の核DNA量をdiploid・aneuploidと簡潔に表現することが可能で臨床上有意義であるが、これはG0/G1期の細胞群のピークが2Cにあるか否かで判定するものである。2C以外にG0/G1ピークがあるものや2C以外に別の異なるピークをもつ腫瘍は全てaneuploidとするいわゆる定性的表現法である。故に同じaneuploidの腫瘍でもその性格は様々であると考えられ、転移・再発をきたすaneuploidの腫瘍もあれば、転移・再発をおこさないaneuploidの腫瘍も存在する。diploid・aneuploidという定性的評価によって腫瘍の予後判定をしたときに、報告によって評価が分かれるのもここに一因があると考ええる。一方、核DNA量を定量表現する方法としてはDI値が用いられるが、FCMによるDI値はあくまでもG0/G1期の細胞群の核DNA量(p-DI)のみを評価しているにすぎない。FCMでは毛細管に大型の癌細胞を流す場合に測定上の難点があり、また高度の多倍体細胞の測光定量にも難点があるとされ、細胞周期を回っているすべての増殖細胞の評価ができていたとはいえない。一般にこれを補う意味でS期の細胞比率(SPF)が用いられるが、どこからどこまでをS期とするのかの線引きの問題があり、また測定

した細胞に正常の細胞を含むFCMと、含まないICMとではその比率にも当然差異が生じ、評価が一定しない。著者は核DNA量の評価方法として測定した癌細胞すべての核DNA量の平均を表すm-DIを用いた。m-DIはG0/G1期の細胞群とそれ以外の細胞を全て評価していることになる。S期の細胞や多倍体の細胞集団も当然織り込まれて評価されていることになる。これは、測定した細胞が全て顕微鏡下に確認された腫瘍細胞である、というDNA Image Analysisの利点を活かしたものである。測定細胞の中では通常p-DI値をとる細胞数が最も多いので、当然m-DI値に一番影響を与えるが、p-DI値だけでは評価できないS期の細胞や多倍体の細胞集団が確実に評価されることになり有意義であると考ええる。特に正常の細胞周期では出現しえない4Cを越えるの細胞集団の比率($\% > 4C$)とm-DIとの関係を検討したところ、図17のごとく有意な正の相関を示した($r=0.812$)ことから、m-DIにはhigh ploidyを示す細胞群がよく反映されているといえる。大腸sm癌の核DNA量測定において、特にこのm-DIに注目して再発・転移との関連を調べることにした。

2) 大腸sm癌リンパ節転移のリスクファクターとその問題点

大腸癌取り扱い規約³⁷⁾によれば、大腸sm癌の内視鏡的摘除後に追加腸切除をおこなうべき条件、すなわち大腸sm癌のリンパ節転移のリスクファクターとして、①明かな脈管内癌浸潤、②低分化癌あるいは未分化癌、③断端近傍までのmassiveな癌浸潤、があげられており、この条件のうち、1つでもみとめられる症例に対してはリンパ節郭清を伴う腸切除がおこなわれている。

実際に、大腸sm癌に対してわが国ではどのような治療選択がなされているかを小平³⁸⁾の報告にみても、全国12施設における大腸sm癌869例のうち、ポリペク

トミーまたは局所切除術のみによって治療された症例は27.3% (237/869例) にすぎず、残り72.7% (632/869例) の症例には結果的にすべて外科的な腸管切除 (局所切除後の追加腸切除を含む) が行われている。ところが、小平らのアンケート調査集計報告「sm癌細分類からみた転移陽性大腸sm癌の実態」³⁹⁾によると、外科的腸管切除を行って確認されたsm癌のリンパ節転移陽性率は、8.5% (153/1806例) であった。すなわち、実際にリンパ節郭清を伴う腸切除が必要であった症例は、sm癌全体のうちの約10%弱の頻度であるのに対して、現実には約70%強の症例に腸切除がなされており、結果としては不必要な侵襲が多くの症例に加えられたことになる。

当科で経験した大腸sm癌のうち、腸切除の後にリンパ節転移の有無が検索された症例のみについて取り扱い規約によるリスクファクターの陽性的中度を検討してみたが、sm2/sm3 (16.3%)・ly/v (27.3%)・por/mod (33.3%) といずれも満足すべきものではなかった (表11)。これは何に起因するのであろうか？ リスクファクターのひとつである脈管内浸潤について味噌は、脈管内に癌浸潤があるかどうかの判定は、連続切片を作製しない限り完全には捉えることは不可能であり、通常のHE標本での判定も困難なことが多い、としている⁴⁰⁾。また小西によれば、染色の違いや切り出し切片の数の違いにより、静脈浸潤陽性例の頻度は著しく異なるという⁴¹⁾。またVolkらも、内視鏡切除標本では脈管内浸潤の有無の存在を保證することは困難であるとしている⁴²⁾。低分化癌・未分化癌という組織型についての因子については、大腸sm癌のほとんどが高分化癌であり、リスクファクターとしての特異度は高いが感度は極めて低い、断端またはその近傍における浸潤の有無に

ついでにファクターについても、ポリペクトミーの手技や標本作製時の技術に左右される可能性がある⁴³⁾。また、いわゆるsm1～sm3とする癌浸潤度分類についてもその細分類方法について判定者により差異があり、味岡は、特に粘膜内癌部とsm浸潤部の間の判定基準線の設定に問題があり、同じsm浸潤量でも浸潤度判定が異なる場合があると指摘している⁴⁰⁾。岡部は、sm浸潤量をできるだけ正確に表現可能で、しかもどんな肉眼型にも適用可能な計測として、接眼マイクロメーターを用いたsm depth と sm width の測定を行っている⁴⁴⁾。その結果求められた間質内浸潤量分類は、転移・再発と良好な相関を示したと報告しており、客観的で正確な浸潤量測定の一法と考える。

従来のリスクファクターと同様に、HE標本から判断が可能なものとして注目されているものが、癌浸潤先進部組織の分化度に注目したものである。これは、岡部による「SCI (single cell infiltration)」⁴⁵⁾、林田⁴⁵⁾やHaseら⁴⁶⁾による「budding (簇出)」⁴³⁾、正木⁴³⁾による「H-inv」と各々の表現は異なるが、ほぼ同一の所見を表現している。正木はsm癌浸潤先進部における組織の分化度が低分化ないし粘液結節を形成するもの(図18)をH-inv(+)として、その有用性について報告している。それによると、ポリペクトミー後に追加腸切除を施行したsm癌(76例)について、H-invを従来のリスクファクターとともに多変量解析を用いて比較検討したところ、リンパ節転移のリスクファクターとしてH-inv(+)と腺腫成分併存のみが有意であり、ポリペクトミーを施行せず最初から腸切除施行したsm癌(28例)ではH-inv(+)のみが有意であったという。

従来のリスクファクターは前述のごとく、切除標本の病理組織学的性状から得ら

れる所見を重視したものであり、故に標本の状態や観察の範囲、判定の基準に左右される限界をもっている。従来のリスクファクターによって満足すべき陽性的中度が得られない一因はここにあると考えられ、異なる観点からの、すなわち病理組織所見によらない悪性度評価法が求められる。

3) DNA Image Analysisによる核DNA量測定

再発・転移に関する従来のリスクファクターは、すべてHE標本から得られる病理組織所見を重視した情報であるが、実際の臨床の間では病理組織所見の判定に苦慮し、治療の選択に難渋する例も少なからず存在する。また、どんなファクターであり、臨床に簡便に測定と判定ができることが望ましい。核DNA量測定は、DNAを加水分解することにより生じるデオキシリボースに、定量的にSchiff試薬が結合するFeulgen反応を利用して核DNA量を定量し、腫瘍の生物学的悪性度を表現できるものとして研究が進められてきた。そこで、このDNA Image Analysisによる核DNA量測定が、大腸sm癌の悪性度評価に有用か否か、すなわち、角度を変えた観点から大腸sm癌のリスクファクターとなりうるかどうか、について検討をおこなった。

対象とした61例の大腸sm癌のうち、切除後最低2年以上再発・転移をみとめない対照群とリンパ節転移・局所再発をみとめた群・遠隔転移群のm-DIは、それぞれ 1.42 ± 0.28 , 1.86 ± 0.44 , 1.98 ± 0.30 であり、対照群とリンパ節転移・局所再発群、対照群と遠隔転移群の間にはそれぞれ有意な差を認めた ($P < 0.01$, $P < 0.04$)。p-DIについては対照群が 1.21 ± 0.34 に対して、リンパ節転移・局所再発群が 1.36 ± 0.49 と有意差を認めなかった。また、 $\% > 4C$ の値を比較してみると、リンパ節転移・局所再発群では対照群に比較してやはり有意に高値であったが、遠

隔転移群との間には有意差を認めなかった(図19)。これらのことから、高い核DNA量をもつ原発巣の場合にはリンパ節転移・局所再発のリスクが高いことが予測され、従来のHE標本から判定されるものとは異なった観点からのリスクファクターの設定が可能であると考えられた。仮に「 $m-DI > 1.7$ 」をリンパ節転移のハイリスクとして設定した場合、その陽性的中度は54.5% (accuracy: 86.4%) と最も高く、有効な予後指標になると考えられる(表11)。「 $over\ 4C > 20\%$ 」も陽性的中度46.7% (accuracy: 82.1%) と、従来のリスクファクターよりも良好な予後判定能を示し、応用可能と考えられた。遠隔転移については、核DNA量の高い腫瘍、high ploidyの比率の高い腫瘍が遠隔転移群には多かったが、症例数が少ないためさらに検討を重ねる必要がある。

この方法論による核DNA量測定は、病理組織所見を基にした他のリスクファクターと比較して、判定者の主観が入らない客観的な方法であるという点で趣を異にする。しかしながら、これらはパラフィン包埋標本から得られたデータであり、retrospective studyであることの限界をわきまえる必要がある。よって、この新しい観点からのリスクファクターが実際どの程度有効なものか、その予後判定能について他因子と比較するべく、prospective studyを行うことが必要である。また基礎的検討で明らかになったように、腫瘍内のheterogeneityについても注意が必要である。大腸早期癌であれば腫瘍病変の大きさはある程度限られるので、進行癌と同様に腫瘍の多面性を考慮する必要があるかどうかは不明であるが、やはりheterogeneousな腫瘍の性格をわきまえて、最低3ヶ所程度からのサンプリングが必要であるとする。従来の病理組織学的所見と対比させて用いることはいうまで

もなく、特にタッチ標本では測定不可能な腫瘍内部や腫瘍先進部の情報については、病理組織学的所見を重視することが必要であろう。

4) 核DNA量の意味するもの

核DNA量が表現しているものは何であろうか。一般に腫瘍の悪性度は、①増殖性・浸潤性・転移性や薬剤耐性・放射線耐性などの癌細胞の個性（狭義の悪性度）、②血管新生や抗癌免疫などの宿主の反応、③重複癌や多発癌に象徴される遺伝的背景、等々によって表現される。3)で得られたデータによると、核DNA量の高い腫瘍は転移・再発が多いことから、核DNA量は①の中でも腫瘍の増殖能を主に反映するのではないかと考え、Ki-67による増殖能との比較検討をおこなった。しかし、m-DIとKi-67のlabeling indexについては有意な相関はみとめられなかった（図15）。

さらに遺伝子の面から、大腸癌において腺腫から癌へ進展する段階でその癌化の過程に関与するとされるp53癌抑制遺伝子について、免疫組織化学染色を用いてm-DIとの比較を試みた。p53遺伝子産物は核内に存在し、細胞周期のG1からSへの移行を調節しているともいわれる。しかし、m-DIとp53定量については直線的な相関はみられなかった。またp53陽性（positive areaが5%以上）か否かでm-DIについて比較してみると、p53（+）群が 1.52 ± 0.33 、p53（-）群が 1.48 ± 0.55 であり、両者間に有意差はみとめられなかった。今回検討した大腸sm癌30例のp53陽性率は58.6%（17/29例）であった。リンパ節転移・局所再発のみに関して比較すると、p53陽性率は対照群で54.5%（12/22）、再発・転移群では60.0%（3/5）であり、m-DIとp53の間には有意な相関関係はみとめられなかった。したがっ

て本研究の結果からは、p53は腫瘍が癌か否かの判定、すなわち癌化の判定には有用であるものの、癌の再発や転移に関する悪性度の評価には有用ではないと考えられた。また同様に、発癌の早期の段階で作用するとされるKi-ras遺伝子のpoint mutationについて、山形による実験結果⁴⁷⁾と対照できた15例についてm-DIと比較してみたところ、Ki-ras (+) 群のm-DIが 1.36 ± 0.26 (n=6) であるのに対し、Ki-ras (-) 群のm-DIは 1.48 ± 0.34 (n=9) であり、両者間に有意な相関はみられなかった。大腸癌の発癌・進展に関わるとされる両遺伝子個々との相関がなかったということは、m-DIはこの両遺伝子変化だけでは説明できないDNAの変化を表現している可能性がある。いずれにしても、癌化と発癌の過程において核DNA量が変化を起こすメカニズムの解明を待たねばならないが、核DNA量は複雑な遺伝子変化の結果を表現するものとしてその応用が期待される。

大腸癌の発育・進展に関する様々な分子生物学的解析が現在進みつつあるが、核DNA量は、多段階の遺伝子学的変化の一部を包括した情報として、おそらく腫瘍の増殖能・転移能を含む癌細胞の個性—悪性度—を評価するものとして、現段階で臨床ヘフィードバックすべき悪性度評価の一方法と考える。特に大腸sm癌のリンパ節転移のハイリスク群の選別のマーカーとして有用であると考えられた。

5. 小括

- ① 大腸sm癌において再発・転移をおこす腫瘍は核DNA量 (m-DI) が高く、また %>4Cが高い。
- ② p53遺伝子産物及びKi-67による免疫組織化学的検討において、m-DIはいずれとも有意な相関を示さなかった。

- ③ 大腸sm癌のリンパ節転移・局所再発に関する予後規定因子の中で、核DNA量 (m-DI・%>4C) は最も精度の高い因子であり、リンパ節転移のリスクが高い sm癌をさらに絞り込むための有効なマーカーとなる可能性がある。

IV. DNA Image Analysis による大腸癌の肝転移予知に関する検討

—臨床応用のためのprospective study—

1. 目的

Image Analysisを用いた核DNA量測定、すなわちDNA Image Analysisが、その基礎的検討から、CPMやFCMによる従来法に比較して勝るとも劣らず、また簡便で迅速な測定が可能であることが判明した。特にタッチ標本を用いた測定は、サンプリングが容易であることや術前評価が可能なことから、腫瘍のheterogeneityを考慮する必要はあるものの、十分に臨床応用が可能であると考えられる。一方、大腸sm癌に関するretrospective studyから、深達度は同じsm癌であっても、リンパ節転移や局所再発・遠隔転移をおこすようなsm癌は、有意に核DNA量 ($m-DI \cdot \% > 4C$) が高く、大腸sm癌の再発・転移のハイリスクとなることが判明した。リンパ節転移のハイリスク症例に関しては、リンパ節郭清を伴った腸切除を施行することにより遠隔成績の向上が望め、また不要な追加腸切除を減らすことにより患者のQOL (Quality of Life) の向上に寄与することが期待される。

次に、大腸癌の再発・転移形式のうち遠隔転移について、特に肝転移予知について核DNA量が果たして同様の予後規定因子になるかどうかについて検討した。また、核DNA量の臨床応用の可能性を探るために、進行癌を主な材料にしてタッチ標本とDNA Image Analysisを用いて大腸癌の悪性度評価をprospectiveにおこない、核DNA量の大腸癌の肝転移予知に関するリスクファクターとしての有用性について検討することとした。

2. 対象と方法

対象は1990年から1993年5月までに、東京大学第1外科で外科的に切除を受けた40症例（深達度sm1例、mp4、ss(a1)20、se(a2)11、si4）で、手術後最低2年以上経過して転移・再発を認めない症例が25例、局所再発1例、肝転移14例（同時性9、異時性5例）であった。平均年齢は63.3±9.99才（44～84才）、男女比は約2:1、観察期間は中央値で3年2ヶ月（2年～4年10ヶ月）である。

1) タッチ標本の作成

リジンコーティングしたスライドグラス上に、新鮮標本またはその凍結標本を直接imprintしたタッチ標本をつくり、30分自然乾燥、その後10%中性緩衝formalinで30分間固定した。これを第II章-2の方法に準じてCAS染色キットを用いてFeulgen染色を施し、ICMを用いて測定した。

2) 解析

腫瘍の評価にはm-DIを用い、対象の中でm-DIによって肝転移の発生に差が生じるかどうか、壁深達度や組織型・リンパ節転移・脈管侵襲・stageといった他の臨床病理学的因子と比較して、肝転移の予後を規定する上で差異があるかどうかを検討した。実験結果の数値は平均値±SDで示し、統計学的処理には、独立した2群間の比較にはMann whitney - U検定を、転移に関する各因子単変量解析には χ^2 検定を、多変量解析には重回帰分析を用いて検討した。5%未満の危険率（ $p < 0.05$ ）で有意差ありと判定した。統計処理ソフトにはStat View 4.11を用いた。

3. 結果

肝転移群のploidyパターンは全てnon-diploidで、m-DIは図20のごとく、肝転

移群で平均 1.94 ± 0.46 ，非肝転移群で平均 1.59 ± 0.36 と両群間で有意な差をみとめた ($P < 0.01$)。大腸癌sm癌において設定した「 $m-DI > 1.7$ 」というcut off値を設定したところ、「 $m-DI > 1.7$ 」の16例中9例 (56.3%) に肝転移がみとめられた。異時性肝転移のみに関しては5例中4例が「 $m-DI > 1.7$ 」であった。異時性肝転移群の $m-DI$ は平均 1.86 ± 0.35 で、非肝転移群に比較して有意差はないが高い傾向をみとめた ($p = 0.08$)。年齢・性・腫瘍の深達度・組織型・リンパ節転移・脈管侵襲 (静脈侵襲・リンパ管侵襲)・病期・腫瘍型の臨床病理学的因子に加えて、CEA・CA19-9・DNA ploidyパターン・ $m-DI$ を含め、異時性肝転移の有無について χ^2 検定による単変量解析を試みた。その結果、深達度 ($P < 0.01$)・組織型 ($P < 0.05$)・ $m-DI$ ($P < 0.03$) の3項目が有意であった (表18)。多変量解析においてはどの因子も有意差をみとめるには至らなかったが、 $m-DI$ が $p = 0.09$ と相関の傾向をみとめた (表19)。また異時性肝転移に関する「 $m-DI > 1.7$ 」の感度、特異度、陽性的中度はそれぞれ80.0% (4/5)，72.0% (18/25)，36.4% (4/11)であり、精度は73.3%であった (表20)。

4. 考察

大腸癌の予後を検討する上で遠隔転移、特に肝転移は重要な因子であり、肝転移と核DNA量の関係についてもこれまでに様々な検討がなされてきた^{48, 49)}。その多くはploidyパターンのみから肝転移の予後を論じたものであり、核DNA量と肝転移は関係があるとする報告と、無関係だとする両方の報告がみられる。これはploidyパターンによる「定性」のみで腫瘍の性格 (悪性度) を評価することの限界を表しているものと考えられる。そこで、大腸sm癌におけるretrospective studyから予

後判定に有効な因子となると考えられた「 $m-DI > 1.7$ 」が、肝転移予知因子となるかどうかをprospectiveに検討した。その結果 $m-DI$ は図20のごとく、肝転移群で平均 1.94 ± 0.46 、非肝転移群で平均 1.59 ± 0.36 と両群間で有意差をみとめた。大腸sm癌において設定した「 $m-DI > 1.7$ 」というカットオフ値を設定したところ、「 $m-DI > 1.7$ 」の16例中9例に肝転移が認められ、その陽性的中度は56.3%であった。異時性肝転移群においては5例中4例(80.0%)が「 $m-DI > 1.7$ 」であり、肝転移ハイリスク群の指標となる可能性が示唆された。タッチ標本の短所として、あくまでもスライドグラスにimprintできうる部位(範囲)、すなわち腫瘍表面の細胞集団の核DNA量しか測定できず、腫瘍全体の核DNA量を必ずしも反映しているとはいえない欠点がある。実際に異時性肝転移群でも $m-DI$ が低値だった症例が1例みられた。このような症例にはタッチ標本の限界をふまえて、すなわち腫瘍のheterogeneityを念頭において、複数箇所からのサンプリングを行う必要があると考えられた。

検討症例数が少なく、特に異時性肝転移例が少ないので、今後症例数を重ねて解析をおこない、真に $m-DI$ が肝転移予知の規定因子になるかどうかを判断する必要がある。しかし、異時性に肝転移を起こす症例はすでに手術時に肝にmicrometastasisをおこしていると考えられ、肝転移については同時性も異時性も次元は同じとすれば、同時性を含めた肝転移群と対照群との比較では $m-DI$ が明かな有意差を示したことから、タッチ標本とICMを利用した核DNA量測定は、大腸癌肝転移に対する予後判定の有力な指標となりうると考えられる。測定は簡便でかつ迅速に施行することができるので、大腸癌悪性度の指標としての臨床応用が期

待される。

5. 小括

- ① タッチ標本とDNA Image Analysisを用いた大腸癌の核DNA量測定について prospective study を行ったところ、大腸癌の肝転移予知に有用であった。
- ② 「m-DI>1.7」は大腸癌肝転移のハイリスクである。
- ③ タッチ標本を利用したICMによる核DNA量測定は、簡便かつ迅速に施行することができ、大腸癌肝転移の指標として臨床応用が可能と考えられる。

V. 総 括

近年、悪性腫瘍の治療に対する縮小手術や内視鏡的治療などのQOLを重視した治療が重要視されるようになり、患者の享受する利益や経済効果には飛躍的な進歩がみられている。しかし一方で、縮小手術や内視鏡治療で治療を完結したためにおこる再発や転移をいかに防ぐかという問題、すなわち適応の問題がクローズアップされてきた。

一般に、腫瘍の悪性度判定は病理組織学的所見を主体になされてきたが、同じ組織型や同じ病期であってもその予後は症例によって異なっている。病理組織学的所見は、標本の作製で適切な切り出しを行わないと正確な深達度の診断が不能となったり⁵⁰⁾、高周波電流によるポリペクトミーでは切除断端に熱変性による影響を受けるなどの欠点が存在する。また、同じ腫瘍のHE標本でも高度異型腺腫とするものと癌とするものとに診断がわかれることがある^{51, 52)}。HE標本とは違う次元での腫瘍の悪性度評価が求められる理由がここに存在する。

核DNA量による腫瘍の悪性度評価はこれまでdiploid・aneuploidというパターンで表現する「定性」法であったが、著者はICMを用いてm-DIや%>4Cを「定量」し、その予後判定能についての検討を試みた。大腸sm癌においては、リンパ節転移や局所再発をきたした症例のm-DIは対照群に比較して有意に高く、「m-DI>1.7」が新しい観点からの、すなわち病理組織所見とは異なる角度でのリスクファクターとなることが証明された⁵³⁾。核DNA量の低い腫瘍に対しては、再発・転移のリスクが低いと考えられ、他の病理組織学的所見を併せて検討し、内視鏡的治療の

適応と判断し施行することで、不必要な腸切除を減らしていくことも可能である。

さらに核DNA量の臨床応用を計るために、ICMとタッチ標本を用いた測定法について検討したが、標本の採取から固定・染色・測定までが非常に簡便で迅速であり、核DNA量測定における煩雑さという問題点を飛躍的に解決するものと考えられた⁵⁴⁾。また、heterogeneityに関する検討から、腫瘍表面のタッチ標本でその腫瘍の核DNA量を代表することが可能であることが判明した。

大腸癌の肝転移予知に関して、この方法論を用いてprospectiveな検討をおこなったところ、肝転移群は対照群に比較して明らかにm-DIが高く、異時性肝転移についても高い傾向がみられた。今後はm-DIによって選別された肝転移高危険群に対して、予防的動注化学療法等の治療法を付加して、全体として大腸癌治療成績の向上に結びつけなければならない。

核DNA量が腫瘍の何を表現しているかは不明のままである。近年解析の進んでいる遺伝子学的検索と対照すべく、癌抑制遺伝子p53とm-DI、癌遺伝子Ki-rasとm-DIとの比較を試みたが、両者間に有意な相関はみられなかった。核DNA量の変化が生じるメカニズムについては、今後の分子生物学的解析の結果を待たねばならないが、核DNA量は複雑なあるいは多段階の遺伝子変化の結果を大局的に表現しているものと考えられる。臨床上的応用という観点からは、先に触れたように①大腸早期癌のリンパ節転移のリスクファクターとして、また②腹腔鏡補助下大腸癌切除術等のリンパ節郭清を縮小した手術症例の適応決定に、さらに③内視鏡的大腸癌切除後のサーベイランス間隔の設定等にも利用可能であると考えられ、今後のさらなる臨床応用が期待される。

VI. 結 語

1. イメージサイトメトリーによる核DNA量測定—DNA Image Analysis—は、核DNA量測定において従来法と比較して極めて有用である。
2. 大腸早期癌（sm癌）の悪性度評価においては、特にリンパ節転移のハイリスク症例を核DNA量から選別することが可能であり、臨床上の治療法選択に有効である。
3. タッチ標本とイメージサイトメトリーを用いたprospective studyの結果から、肝転移予知に関してハイリスク症例の選別が可能なが示された。
4. イメージサイトメトリーは、腫瘍の悪性度を簡単・迅速に定量的に判定できる新しい方法論として、今後の臨床応用が期待される。

図・表



图 1 Image cytometer CAS 200

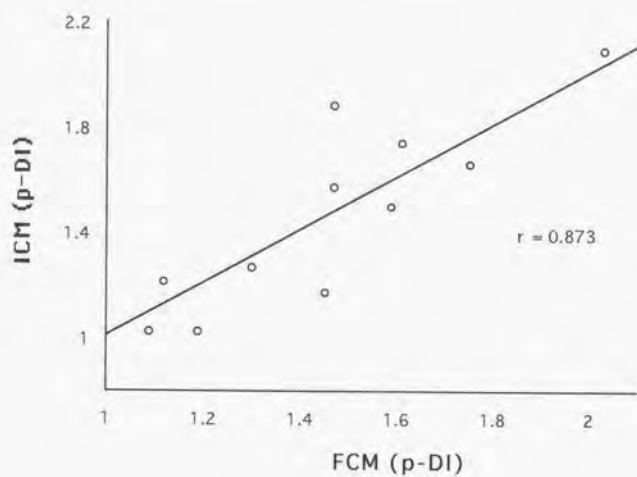


図2 ICM と FCM の相関関係

DI値 (p-DI) による両法の比較では良好な相関が得られた ($P < 0.04$)

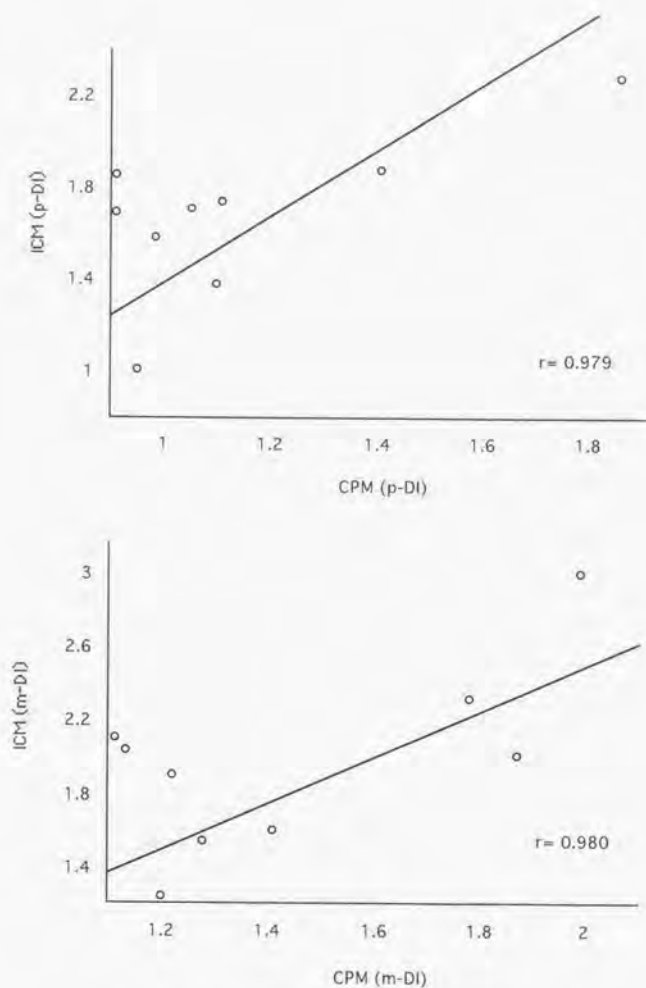


図3 ICM と CPM の相関関係

DI値の相関について検討してみると、p-DIについては $r=0.979$ ($P<0.01$)であり、m-DIについても $r=0.980$ ($P<0.01$)で、いずれも良好の相関を示した

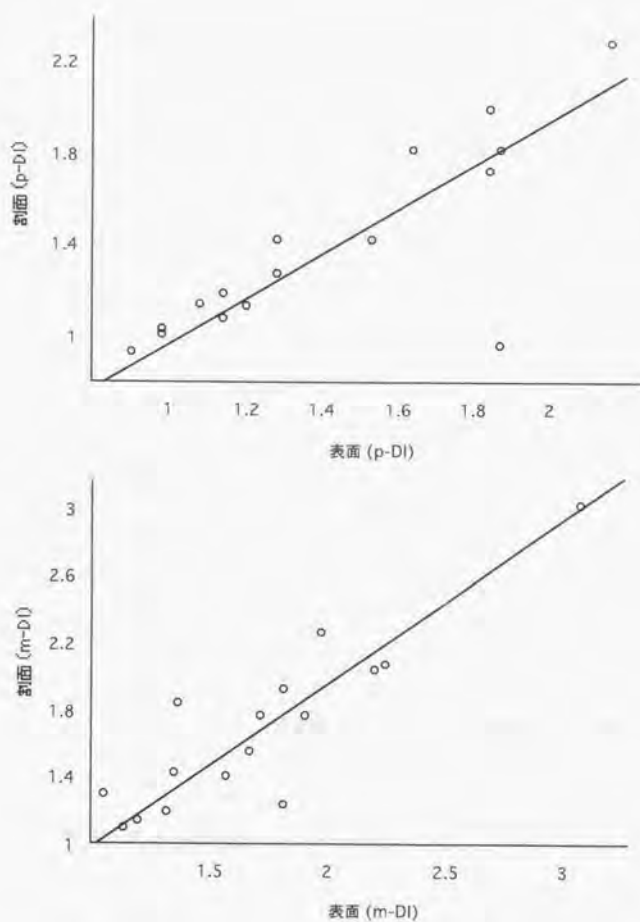


図4 表面のタッチ標本と断面のタッチ標本の相関
(p-DI, m-DI)

腫瘍の表面と断面の核DNA量を比較したところ、p-DIについては $r=0.714$ ($P<0.01$)、m-DIについても $r=0.844$ ($P<0.01$)で、いずれも強い相関を示した

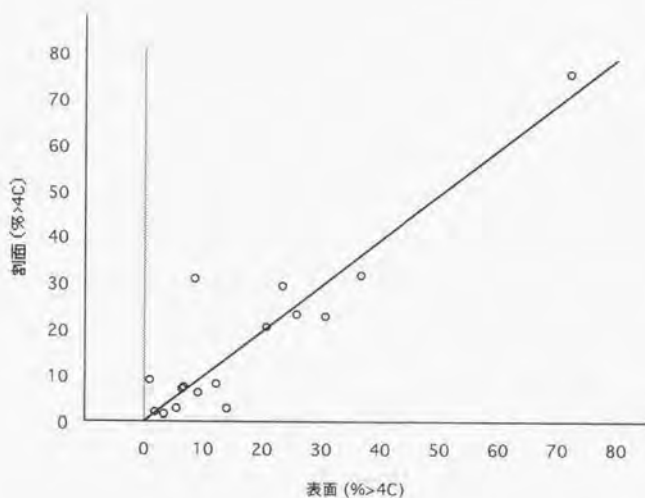


図5 表面のタッチ標本と断面のタッチ標本の相関
(% > 4C)

腫瘍の表面と断面における%>4Cを比較した結果、 $r=0.738$
($P<0.01$) と強い相関を得た

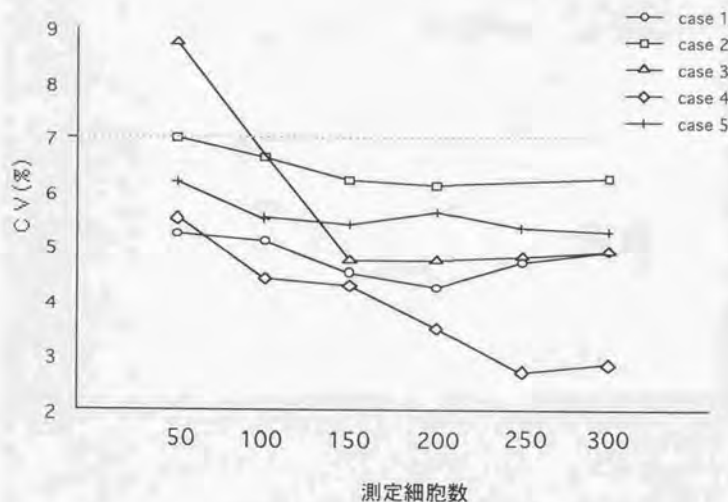


図6 測定細胞数とCV値の変化

case 4のように測定細胞数が増えるほどCV値が良くなるものもあるが、多くは測定細胞数を増やしても100~150個の段階からCV値はほとんど変化せず、測定細胞数100個ですべての症例がCV値7%以下であった



図7 point & classify

顕微鏡下に確認した細胞がモニター上に現れ、目的とする細胞の核面積や光強度、核DNA量等の情報が参照できる。目的の細胞以外のものは指示（クリック）することにより除外される

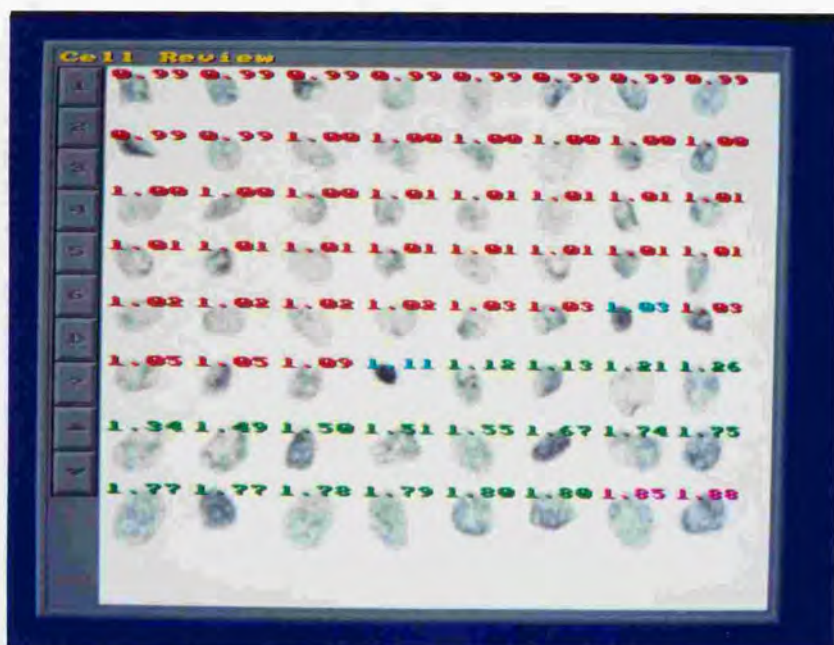


図 8 cells review

測定の完了した細胞が核DNA量（DI値）とともに表示され，再確認が可能

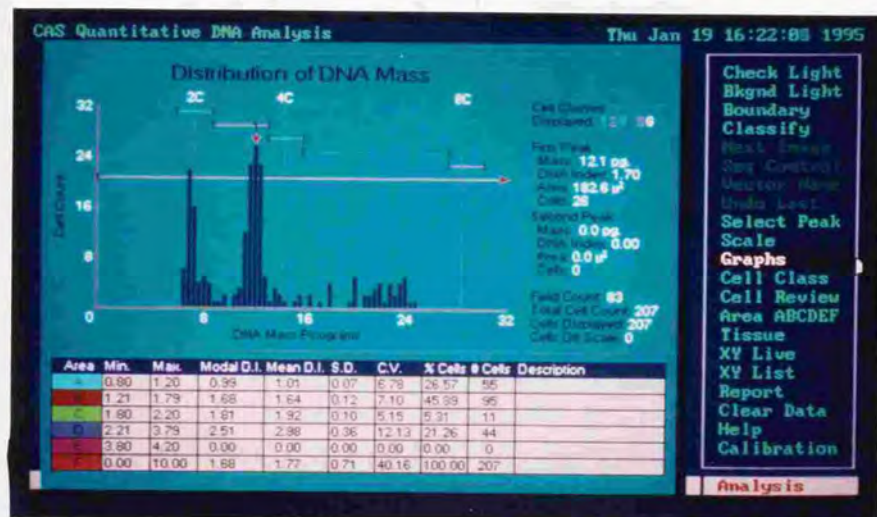
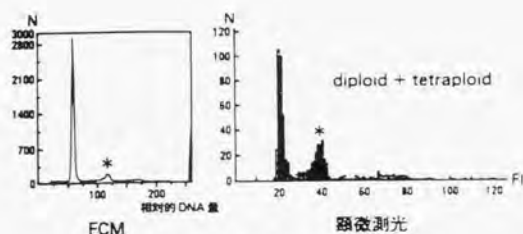
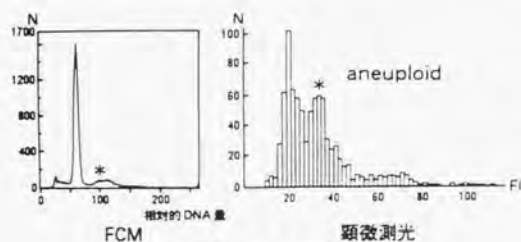


図 9 ICM (CAS200) によるDNA ploidy パターンとDNA index



FCM と顕微蛍光測光の比較—case 1—



FCM と顕微蛍光測光の比較—case 2—

(癌と化学療法1993, 20:726-730より引用)

図10 FCMによるDNA ploidy解析の問題点

FCMにおいては、測定すべき腫瘍細胞以外の細胞（正常リンパ球や壊れた細胞、重なった細胞）の混入を除外するのが困難であり、これらの細胞のために検出すべきaneuploid peakが隠されてしまう。

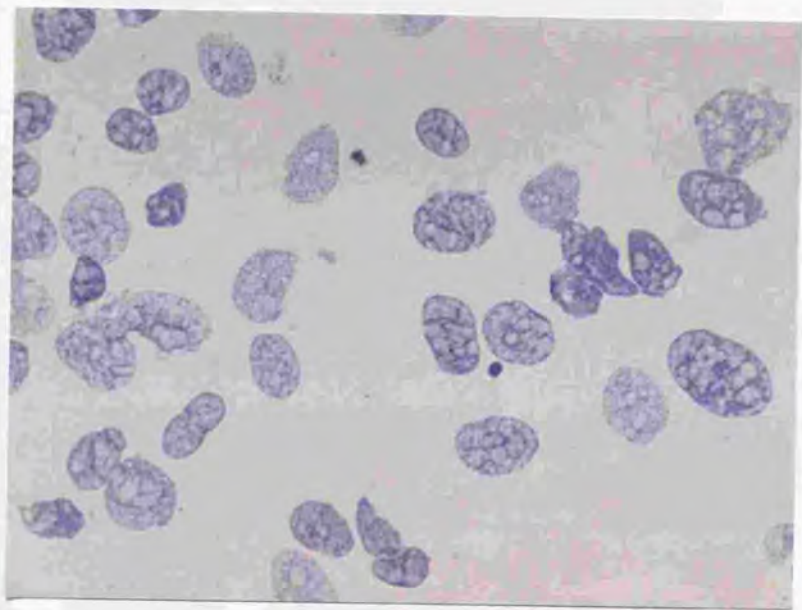


図11 タッチ標本 (Feulgen染色)

新鮮材料からタッチ標本を作製すると非常に明瞭な細胞核を得られ
核DNA量測定も容易である

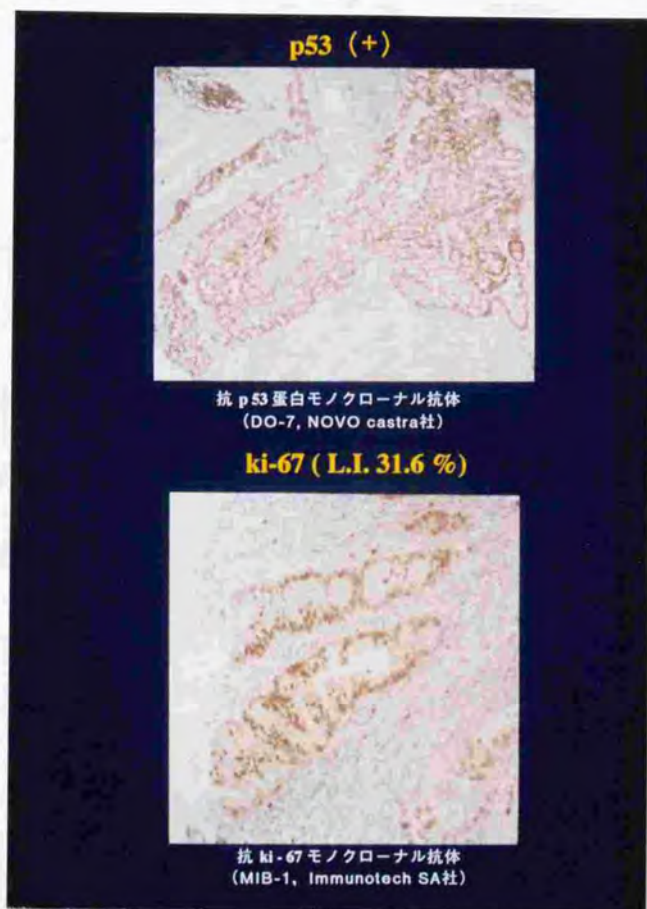


図12 p53及びKi-67免疫組織化学染色（陽性像）

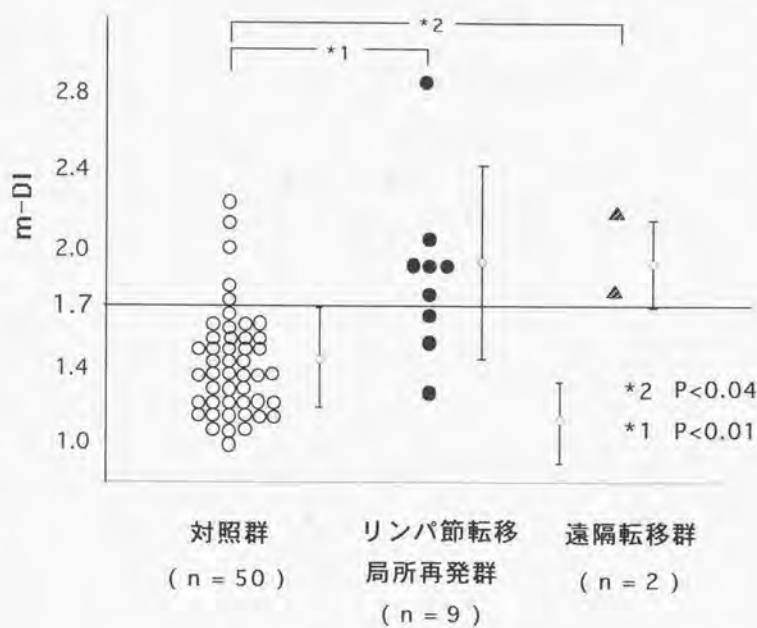


図13 mean-DNA indexによる比較

リンパ節転移・局所再発群、遠隔転移群のm-DIは、対照群よりも有意に高い ($P<0.01$, $P<0.04$)

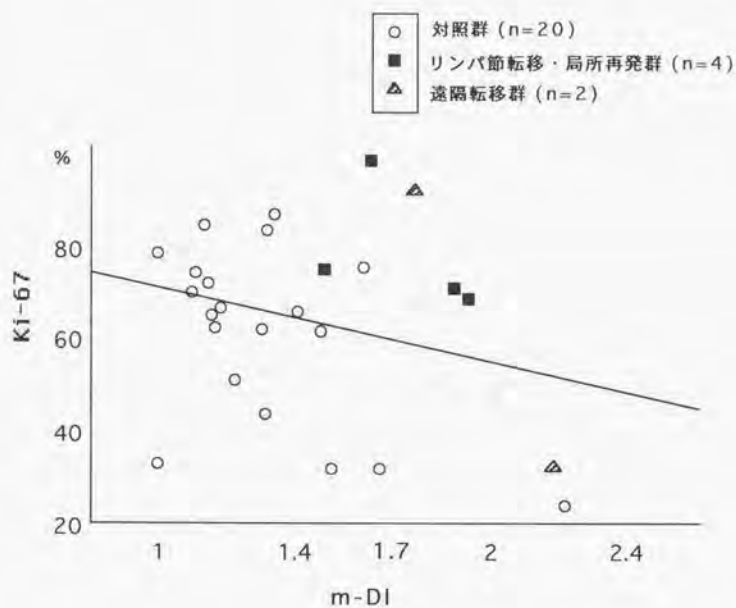


図15 m-DIとKi-67の相関関係

m-DIとKi-67 labeling indexの間には有意な相関はみとめられなかった ($r=-0.271$)

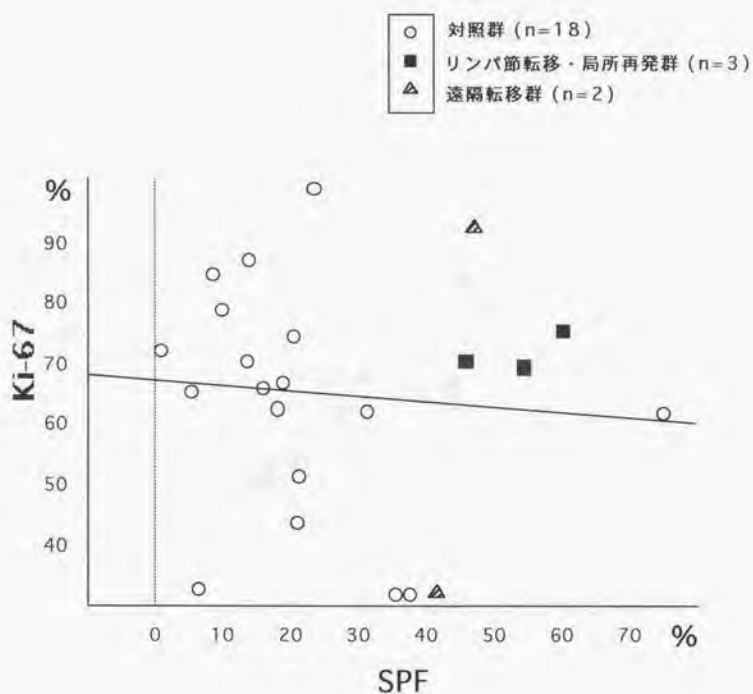


図16 SPF と Ki-67 の相関関係

SPFとKi-67の間には有意な相関はみとめられなかった ($r=-0.084$)

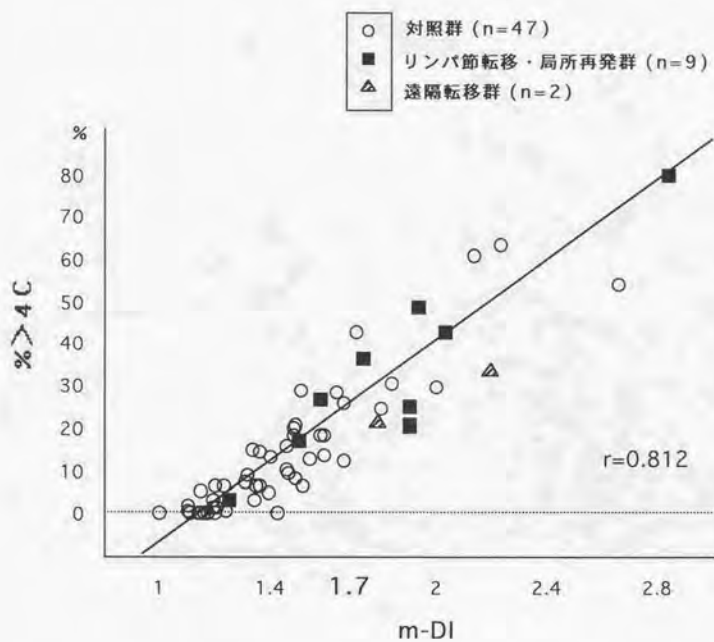


図17 m-DIと%>4Cの相関関係

m-DIと%>4Cは有意な正の相関を示した ($r=0.812$)

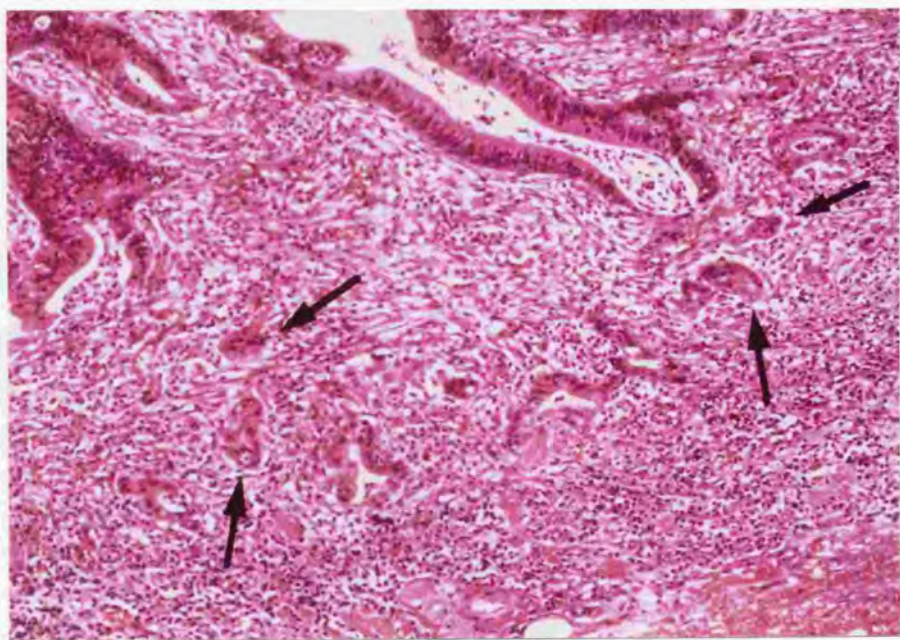


図18 癌浸潤先進部組織型 (H-inv) 陽性

癌浸潤先進部において腺管を形成しない分化度の低い組織像 (矢印)
あるいは粘液結節を形成するものをH-inv(+)とする

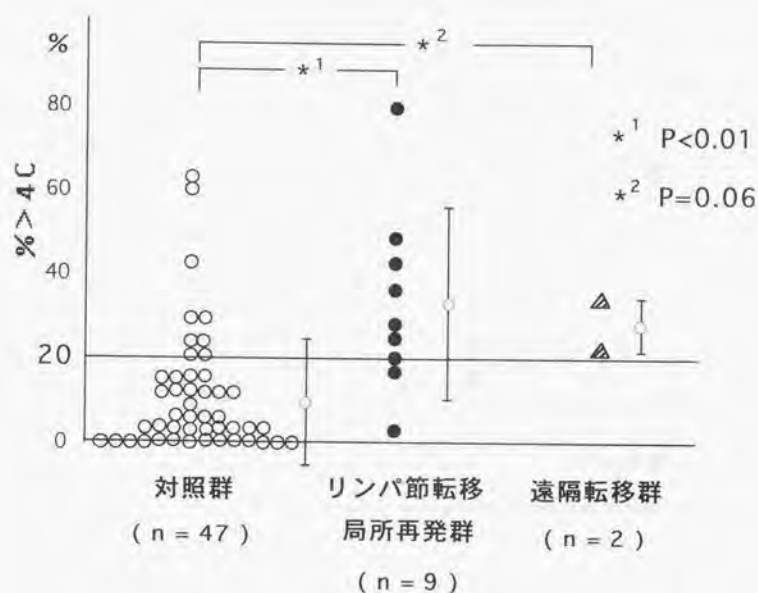


図19 $\% > 4C$ による比較

リンパ節転移・局所再発群は対照群に比較して $\% > 4C$ 値が有意に高い

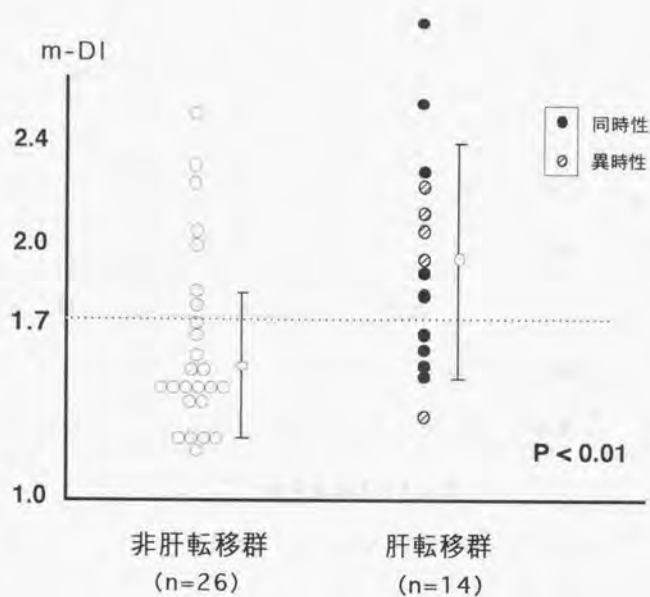


図20 m-DIと肝転移

肝転移群のm-DIは非肝転移群に比較して有意に高い ($P < 0.01$)

表1 細胞単離塗沫標本の作製方法 (Hedleyの原法を一部改変)

-
1. 顕微鏡下にHE染色標本の組織像と対比しつつ, 50 μ mの厚切り切片から測定目的の癌病巣を正確に針メスでくり貫き, 分離採取
 2. キシレンによる脱パラフィン処理 (室温, 30分)
 3. 100%methanol 10ml, 2NHCl 2mlにて洗浄. 蒸留水にて3回水洗
 4. 0.5% pepsin液 (Sigma製) を (2NHClにてpH1.5に調整) 2ml加え, よく攪拌しながら37℃の恒温槽で60分加温
 5. 1500rpm, 5分遠心分離 (生理食塩水にて水洗, 遠心分離を2回繰り返す)
 6. 遠心分離の沈渣に生食を8ml加え, shock waveで10秒間超音波処理
 7. 40 μ m孔のフィルターにて細胞核懸濁液を濾過
 8. Auto smear (サクラ精器) にて処理 (2000rpm, 5分) し, 細胞核単離塗沫標本を作製, 風乾の後染色
-

表2 細胞浮遊液の作製とDNA染色方法 (FCM)

1. 顕微鏡下にHE染色標本の組織像と対比しつつ、50 μ mの厚切り切片から測定目的の癌病巣を正確に針メスでくり貫き、分離採取
2. キシレンによる脱パラフィン処理 (室温, 30分)
3. 100,95,70,50%エタノール列で再水和 (室温, 各10分) 後、蒸留水にて2回水洗
4. 0.5%pepsin液 (Sigma製, 0.9%NaClに溶解して2 NHClにてpH1.5に調整) を1ml加え、よく攪拌しながら37 $^{\circ}$ Cの恒温槽で60分加温
5. 1500rpm 5分遠心分離 (生理食塩水にて水洗, 遠心分離を2回繰り返す)
6. 沈渣にSolution A^{*1}を0.9mlとクエン酸緩衝液0.1ml加え, 10分処理
7. Solution B^{*2}を0.75mlを加え, 10分処理
8. Solution C^{*3}を0.75mlを加え, 40 μ m孔のfilterにて細胞核懸濁液を濾過

*¹ Solution A : trypsin (Life technologies, Inc. N.Y., USA) 0.015 g, stock solution 500 ml, pH 7.6

*² Solution B : trypsin inhibitor (Worthing biochemical corporation, New Jersey, USA) 0.25 g, ribonuclease A (Worthing biochemical corporation, New Jersey, USA) 0.05 g, stock solution 500 ml, pH 7.6

*³ Solution C : propidium iodide (Molecular Probes, Inc. Oregon, USA) 0.208g, spermine tetrahydrochloride (Reserch biochemicals international, Inc. MA, USA) 0.580 g, stock solution 500 ml, pH 7.6

stock solution : trisodium citrate 2 g, Nonidet P-40 (Sigma) 2 ml, tris (hydroxymethyl) aminomethane (Sigma) 0.121 g, distilled water 2000 ml

表3 DNA染色方法 (CPM, ICM)

(1) Azocarmine G-Acriflavine-Feulgen染色 (Takamatsuらの方法による)

1. アルコール列 (100→95%) で再水和し, 水洗
2. 遮光した0.02% Azocarmine G 溶液 (25 °C) で90秒間染色し, 染色液の赤色がでなくなるまで水洗
3. 5 N HCl (25 °C) にて30分加水分解
4. 水洗後, 0.001% Acriflavine-Schiff試薬で10分反応 (7 °C)
5. Acriflavine-rinse液で2分ずつ3回洗い, 水洗
6. 風乾後, 無蛍光樹脂にて封入

(2) CAS DNA染色キットによる染色 (Feulgen染色)

1. 5 N HCl (常温) にて30分加水分解
 2. 染色液 (0.1 N HCl 100mlに染色用試薬 1 vialの割合で調製) 中で60分染色
 3. リンス液 (0.05 N HCl 300mlにリンス用試薬 1 vialの割合で調製) を用いて2分ずつ3回洗浄
 4. 脱イオン水で3回洗浄
 5. 1%塩酸アルコール (70%エタノール100mlに37% HCl 1mlの割合で調製) で5分間処理
 6. アルコール列にて脱水, キシレンで透徹
 7. 合成樹脂で封入
-

表4 FCM vs ICM (DNA ploidy パターン, DNA index, CV 値)

case	DNA ploidy		DNA index (p-DI)		CV (%)	
	FCM	ICM	FCM	ICM	FCM	ICM
1	N	N	1.12	1.21	9.00	7.73
2	N	N	1.47	1.88	11.30	4.75
3	N	N	1.75	1.66	4.80	6.95
4	N	N	1.47	1.57	1.60	5.92
5	N	D	1.19	1.02	14.80	6.92
6	D	D	1.09	1.02	8.30	8.49
7	N	N	1.30	1.27	4.40	9.00
8	N	N	1.45	1.17	11.90	4.55
9	N	N	2.03	2.09	*	5.18
10	N	N	1.59	1.50	5.30	2.66
11	N	N	1.61	1.74	1.30	3.07

*: 欠損値

11例中10例で同様のploidyパターンが得られ、一致率は90.9%であった
case 5はDI値が微妙に異なったためdiploidとnon-diploidに判定された

表5 CPM vs ICM (DNA ploidy パターン, DNA index, CV値)

case	DNA ploidy		DNA index (p-DI)		DNA index (m-DI)		CV (%)	
	CPM	ICM	CPM	ICM	CPM	ICM	CPM	ICM
1	N	N	1.10	1.37	1.41	1.60	9.56	9.77
2	N	N	1.11	1.73	1.78	2.31	7.60	5.25
3	N	N	1.86	2.27	1.99	2.99	5.81	5.88
4	N	N	0.85	1.73	1.03	2.14	5.81	6.36
5	D	N	0.91	1.84	1.16	1.97	8.82	4.77
6	N	N	1.05	1.70	1.28	1.54	2.85	9.64
7	N	N	1.41	1.87	1.87	2.00	11.18	4.33
8	D	D	0.95	1.00	1.20	1.24	5.81	8.14
9	N	N	1.01	1.61	1.22	1.90	12.50	9.63

case2, 4, 5, 6, 9において, CPMでみとめられなかったG0/G1ピークがICMにより検出された

表6 表面 vs 剖面 (タッチ標本: DNA ploidy, p-DI, m-DI, %>4C)

case	DNA ploidy		p-DI		m-DI		%>4C	
	表面	剖面	表面	剖面	表面	剖面	表面	剖面
1	N	N	1.28	1.42	1.71	1.77	25.71	23.08
2	D	N	0.98	1.03	1.05	1.30	0.85	8.82
3	D	D	1.14	1.19	1.35	1.43	6.78	7.38
4	N	N	1.53	1.42	1.67	1.55	12.00	8.05
5	N	D	1.08	1.14	1.32	1.19	5.45	2.54
6	D	D	1.14	1.08	1.20	1.14	3.33	1.56
7	N	N	2.16	2.28	3.07	3.02	71.97	75.19
8	N	D	1.87	0.96	1.81	1.23	13.93	2.86
9	N	N	1.84	1.72	2.20	2.04	36.54	31.58
10	N	N	1.28	1.27	1.36	1.84	8.63	31.11
11	N	N	1.84	1.99	1.81	1.92	20.66	20.62
12	N	N	1.20	1.13	1.90	1.77	6.29	7.07
13	N	N	0.90	0.93	1.57	1.40	9.12	6.31
14	D	D	0.98	1.01	1.14	1.10	1.92	1.89
15	N	N	1.87	1.81	2.24	2.07	30.67	22.73
16	N	N	1.64	1.81	1.97	2.26	23.45	29.22

腫瘍の表面と剖面のタッチ標本でploidy/パターン的一致したものは81.3% (13/16) であった

表7 細胞単離標本 vs タッチ標本 (ICMによる測定)

case	DNA ploidy		p-DI		m-DI		CV (%)	
	単離	タッチ	単離	タッチ	単離	タッチ	単離	タッチ
1	N	N	1.37	0.98	1.60	1.43	9.77	4.15
2	N	N	1.73	0.95	2.51	1.66	6.23	5.49
3	N	N	1.61	1.65	1.90	1.53	9.63	6.55
4	N	N	1.73	1.67	2.14	1.94	6.36	5.84
5	N	N	1.84	1.07	1.97	1.89	4.77	6.41
6	N	N	1.70	1.49	1.54	1.66	9.64	6.67
7	N	N	1.87	1.84	2.00	2.08	4.33	3.72
8	D	D	1.00	0.97	1.24	1.43	8.14	4.07

同一腫瘍から得た細胞単離標本とタッチ標本の双方をICMで測定してみると、p-DI・m-DI両方とも異なる例が1例(case2), p-DIのみ解離したものが2例(case1, 5) みとめられた

表8 腫瘍表面複数箇所からのタッチ標本による核DNA量

	ploidy	p-DI	CV(%)	m-DI	%>4C	SPF(%)
case1 (周堤左)	tetra	2.00	3.31	2.33	69.42	26.45
(周堤右)	tetra	2.04	3.47	2.47	83.62	21.55
(周堤上)	tetra	1.95	4.73	2.45	75.22	33.63
(周堤下)	tetra	1.86	3.29	2.21	32.06	22.14
(陥凹部)	tetra	1.90	3.61	2.16	35.83	20.83
case2 (周堤左)	aneu	1.90	3.95	2.51	53.04	31.30
(周堤右)	aneu	1.85	2.47	2.78	63.73	33.33
(周堤上)	aneu	1.85	2.74	2.80	64.22	36.70
(周堤下)	aneu	1.77	3.98	2.54	59.32	38.98
(陥凹1)	aneu	1.73	3.41	2.81	55.77	29.81
(陥凹2)	aneu	1.75	2.16	2.85	56.36	39.03
case3 (生検1)	aneu	1.11	3.95	1.65	30.84	19.63
(生検2)	aneu	1.06	1.72	1.73	37.29	35.59
(生検3)	di	1.05	1.91	1.34	16.22	16.22
(生検4)	aneu	1.13	3.75	1.77	31.30	22.61
(生検5)	di	1.01	2.60	1.42	14.16	23.89
(生検6)	di	1.02	3.48	1.34	16.39	23.77
case4 (表面1)	aneu	1.11	2.61	1.83	33.61	31.97
(表面2)	aneu	1.05	1.66	2.08	47.41	23.28
(表面3)	aneu	1.20	3.13	1.90	6.29	24.63
case5 (表面1)	aneu	1.13	4.75	2.04	46.36	32.73
(表面2)	aneu	1.08	5.30	2.21	57.76	22.41
(表面3)	aneu	0.90	2.98	1.57	21.62	43.24
case6 (表面1)	poly	1.12	2.00	2.98	81.30	9.76
(表面2)	tetra	2.32	2.82	2.94	83.06	8.87
(表面3)	tetra	2.10	3.23	3.07	96.21	50.00
case7 (表面1)	tetra	1.81	1.79	2.22	39.55	17.16
(表面2)	aneu	1.27	4.07	1.71	29.52	17.14
(陥凹部)	aneu	1.42	2.94	1.77	24.79	20.51
case8 (表面1)	di	1.17	3.30	1.23	4.50	4.50
(表面2)	di	1.04	4.05	1.24	10.16	12.50
(表面3)	di	1.11	6.43	1.20	7.50	4.17

di : diploid aneu : aneuploid tetra : tetraploid poly : polyploid

同一症例でploidyパターンがひとつでも異なる症例が3例(37.5%)にみとめられた

表9 測定細胞数による各パラメーターの変化

測定細胞数		50	100	150	200	250	300
case 1	p-DI	1.58	1.59	1.59	1.58	1.58	1.58
	m-DI	1.79	1.88	1.84	1.86	1.87	1.85
	%>4C	22.64	27.72	25.33	26.00	27.27	25.91
	CV (%)	5.23	5.10	4.52	4.25	4.70	4.90
case 2	p-DI	1.75	1.75	1.71	1.71	1.71	1.71
	m-DI	1.80	1.94	1.99	1.98	1.96	1.96
	%>4C	12.73	22.00	26.97	29.77	28.69	27.67
	CV (%)	6.99	6.64	6.23	6.11	*	6.26
case 3	p-DI	1.22	1.31	1.34	1.31	1.31	1.29
	m-DI	1.45	1.45	1.52	1.52	1.53	1.54
	%>4C	14.81	12.17	18.00	17.73	19.52	19.60
	CV (%)	8.72	*	4.73	4.74	4.80	4.90
case 4	p-DI	1.50	1.50	1.50	1.54	1.50	1.50
	m-DI	2.00	1.86	1.80	1.87	1.84	1.83
	%>4C	27.45	22.12	18.54	22.28	20.40	20.59
	CV (%)	5.51	4.45	4.30	3.53	2.72	2.83
case 5	p-DI	1.73	1.73	1.73	1.73	1.88	1.88
	m-DI	2.04	2.16	2.08	2.15	2.17	2.18
	%>4C	34.00	35.92	30.77	34.80	35.60	36.00
	CV (%)	6.21	5.53	5.43	5.61	5.36	5.29

*: 欠損値

測定細胞数が増加してもploidyの変化はみとめられず, DI値も100~150個の段階からほとんど変化しない

表10 免疫組織染色の方法 (p53遺伝子産物及びKi-67)

1. キシレンにて脱パラフィン (各30分 x 6回)
2. アルコール列にて再水和
3. 95℃クエン酸緩衝液の中で60分煮沸し抗原賦活, 20分で自然冷却
4. PBSにて5分ずつ3回洗浄
5. PAPペンにて検体の周囲をマーキング
6. 10% normal goat serumでブロッキング処理 (30分, 室温)
7. 1次抗体 (p53 : DO-7, Ki-67 : MIB-1) で処理 (4℃, overnight)
8. PBSにて5分ずつ3回洗浄
9. 2次抗体 (抗マウスIgG, 5% normal goat serumで100倍希釈) で処理 (30分, 室温)
10. PBSにて5分ずつ3回洗浄
11. 内因性ペルオキシダーゼをブロッキング (30% H₂O₂ 9 ml入りメタノール141 ml溶液中で処理, 30分, 室温)
12. 流水中で10分洗浄後PBSに浸す
13. ABC complexで処理 (30分, 室温)
14. PBSにて5分ずつ3回洗浄
15. DAB solution (Warm PBS 10 ml, DAB tablet--1tab, 3% H₂O₂--75 μ l) で処理 (10分, 室温)
16. 流水中で5分洗浄後PBSに浸す
17. ヘマトキシリン液中で10秒処理後, 流水で洗浄
18. エタノール列で脱水, キシレンにて透徹後合成樹脂で封入

表11 リスクファクターの感度・特異度・陽性的中度・精度

	sensitivity	specificity	p.p.v.	accuracy	
m-DI > 1.7	66.7	93.8	54.5	86.4	%
over 4C > 20%	77.7	83.0	46.7	82.1	
por / mod	22.2	92.0	33.3	82.7	
ly / v	66.7	67.3	27.3	67.2	
H-inv	85.7	57.4	23.1	61.1	
sm 2, 3	100	14.6	16.3	26.8	

「m-DI>1.7」が最もPPV・精度の高いリンパ節転移・局所再発のリスクファクターである

表12 p53とDI, SPF, %>4C, Ki-67

	p53 (+)	p53 (-)	P
m-DI	1.52 ± 0.33	1.48 ± 0.55	0.30
p-DI	1.36 ± 0.32	1.28 ± 0.54	0.23
SPF	31.1 ± 22.0	22.2 ± 13.5	0.31
% >4C	12.2 ± 11.3	17.7 ± 27.1	0.84
Ki-67	65.7 ± 18.0	60.5 ± 24.2	0.56

p53はp-DI・m-DI・S-phase比率 (SPF) ・%>4C・Ki-67のいずれとも有意な相関を
みとめなかった

表13 リンパ節転移・局所再発に関する臨床病理学的因子 (sm癌)

(単変量解析)

		対照群	転移・再発群	P
Age		60.6 ± 11.4	58.5 ± 17.3	N.S.
Sex	male	31	6	N.S.
	female	19	3	
Depth	sm 1	7	0	N.S.
	sm 2	11	3	
	sm 3	30	5	
Histology	well	46	7	N.S.
	mod, por	4	2	
ly	(-)	36	5	N.S.
	(+)	13	4	
v	(-)	45	5	P<0.01
	(+)	4	4	
H-inv	(-)	27	1	P<0.04
	(+)	20	6	
Ploidy	diploid	24	2	N.S.
	non-diploid	26	7	
m-DNA index	m-DI≤1.7	45	3	P<0.001
	m-DI>1.7	5	6	

表14 リンパ節転移・局所再発に関する予後判定能 (sm癌)

	対照群	転移・再発群	P
p-DNA index	1.21 ± 0.34	1.36 ± 0.49	N.S.
m-DNA index	1.42 ± 0.28	1.86 ± 0.44	P<0.001
%>4C	12.0 ± 14.4	33.4 ± 22.0	P<0.01
p-53	54.5 % (12/22)	60 % (3/5)	N.S.
Ki-67	61.0 ± 19.1	78.1 ± 13.8	N.S.

m-DIと%>4Cのみが転移・再発群で有意に高い

表15 sm癌のリンパ節転移のハイリスク
(多変量解析)

	回帰係数	標準誤差	t 値	P
年齢	0.008	0.010	0.663	0.514
性別	0.456	0.269	1.653	0.104
p-DI	1.232	0.543	2.269	0.033
m-DI	-2.262	0.591	3.825	0.001
組織型	-0.185	0.506	0.365	0.718
H-inv	-0.388	0.566	0.686	0.500
腺腫併存	-0.040	0.262	0.165	0.871
部位	-0.090	0.271	0.333	0.743
ly / v	-0.448	0.472	0.949	0.353
size	-0.002	0.010	0.189	0.852
sm 2, 3	-0.100	0.175	0.565	0.578
type	0.070	0.204	0.352	0.728
PG	-0.278	0.464	0.600	0.554

表16 異時性肝転移に関する臨床病理学的諸因子
(単変量解析)

liver meta		(-)	(+)	P
Age		62.7±10.8	65.8 ± 7.6	N.S.
Sex	male	17	5	N.S.
	female	8	0	
Depth	sm, mp	3	1	P<0.01
	ss, a1	17	1	
	se, a2	5	1	
	si, ai	0	2	
Histology	well	17	2	P<0.05
	mod	7	1	
	por	1	2	
Lymphnode	n 0	18	3	N.S.
	n 1	5	2	
	n 2	2	0	
ly	(-)	19	2	N.S.
	(+)	6	3	
v	(-)	15	3	N.S.
	(+)	10	2	
stage	1	2	1	N.S.
	2	14	2	
	3	8	2	
	4	1	0	
Type	0	1	1	N.S.
	1	3	0	
	2	21	4	
	3	0	0	
CEA	CEA≤5	20	2	N.S.
	>5	5	3	
CA19-9	CA19-9≤37	16	3	N.S.
	>37	4	2	
Ploidy	diploid	8	1	N.S.
	non-diploid	17	4	
m-DNA index	m-DI≤1.7	18	1	P<0.03
	m-DI>1.7	7	4	

表17 異時性肝転移の予後規定因子
(多変量解析)

	回帰係数	標準誤差	t 値	P
p-DI	0.040	0.572	0.070	0.945
m-DI	-0.248	0.138	1.793	0.090
リンパ節転移	0.271	0.506	0.535	0.600
ly	-0.531	0.422	1.259	0.224
v	0.070	0.302	0.243	0.811
stage	-0.002	0.555	0.003	0.997
深達度	0.020	0.287	0.082	0.936
組織型	-0.201	0.290	0.691	0.498
CEA	-0.286	0.336	0.849	0.407
CA19-9	-0.531	0.344	1.540	0.141

表18 異時性肝転移の予後規定因子

	sensitivity	specificity	p.p.v.	accuracy	
m-DI > 1.7	80.0	72.0	36.4	73.3	%
深達度 (se/a2以上)	60.0	80.0	37.5	76.7	
組織型 (por / mod)	60.0	47.1	27.3	66.7	
静脈侵襲 (v)	40.0	60.0	16.7	56.7	
stage (3以上)	40.0	64.0	18.2	60.0	
CEA	60.0	80.0	37.5	76.7	
CA19-9	40.0	80.0	33.3	72.0	

「m-DI>1.7」は最も感度が高く、またCEA等に比較してPPVや精度も良好である

引用文献

- (1) Vogelstein, B., Fearon, E. R., Hamilton, S. R., Kern, S. E., Preisinger, A. C., Leppert, M., Nakamura, Y., White, R., Smits, A. M., Bos, J. L. Genetic alterations during colorectal-tumor development. *N Engl J Med* 1988;319(9):525-32.
- (2) Miyaki, M., Seki, M., Okamoto, M., Yamanaka, A., Maeda, Y., Tanaka, K., Kikuchi, R., Iwama, T., Ikeuchi, T., Tonomura, A., et, a. l. Genetic changes and histopathological types in colorectal tumors from patients with familial adenomatous polyposis. *Cancer Res* 1990;50(22):7166-73.
- (3) Merkel, D. E., McGuire, W. L. Ploidy, proliferative activity and prognosis. DNA flow cytometry of solid tumors. [Review]. *Cancer* 1990;65(5):1194-205.
- (4) Albe, X., Vassilakos, P., Helfer, G. K. Independent prognostic value of ploidy in colorectal cancer. A prospective study using image cytometry. *Cancer* 1990;66:1168-75.
- (5) Kokal, W., Sheibani, K., Terz, J., Harada, J. R. Tumor DNA content in the prognosis of colorectal carcinoma. *Jama* 1986;255(22):3123-7.
- (6) 安藤善郎. DNA flow cyotometry からみた大腸癌の予後に関する検討. *日外会誌* 1990;91:1700-1709.

- (7) 金 殷植, 金 政錫, 沢田俊夫, 久保田芳郎, 鈴木公孝, 渡辺聡明, 蛟島伸一, 篠崎大, 津野ネルソン, 武藤徹一郎. 大腸pm癌の発育形態における DNA ploidy, PCNA 分布についての検討. 癌と化学療法 1993;20:784-787.
- (8) Ahnen, D. J. Abnormal DNA content as a biomarker of large bowel cancer risk and prognosis. [Review]. Journal of Cellular Biochemistry Supplement 1992;.
- (9) Kearney, T. J., Price, E. A., Lee, S., Silberman, A. W. Tumor aneuploidy in young patients with colorectal cancer. Cancer 1993;72(1):42-5.
- (10) Russo, A., Bazan, V., Plaja, S., Leonardi, P., Bazan, P. Patterns of DNA-ploidy in operable colorectal carcinoma: a prospective study of 100 cases. Journal of Surgical Oncology 1991;48(1):4-10.
- (11) Bosari, S., Lee, A. K., Wiley, B. D., Heatley, G. J., Hamilton, W. M., Silverman, M. L. DNA quantitation by image analysis of paraffin-embedded colorectal adenocarcinomas and its prognostic value. Mod Pathol 1992;5(3):324-8.
- (12) Masters, J. R., Camplejohn, R. S., Millis, R. R., Rubens, R. D. Histological grade, elastosis, DNA ploidy and the response to chemotherapy of breast cancer. British Journal of Cancer 1987;55(4):455-7.
- (13) Zbieranowski, I., Le, R. J., Jackson, S. M., Olivotto, I. The use of

sequential fine-needle aspiration biopsy with flow cytometry to monitor radiation induced changes in breast carcinoma.

Analytical Cellular Pathology 1992;4(1):13-24.

- (14) Masaki, T., Muto, T., Suzuki, K., Morioka, Y. A microspectrophotometric study of DNA ploidy patterns of colorectal adenomas. Gastroenterol Jpn 1991;26(6):721-7.
- (15) Muto, T., Masaki, T., Suzuki, K. DNA ploidy pattern of flat adenomas of the large bowel. Dis Colon Rectum 1991;34(8):696-8.
- (16) Tsioulis, G., Muto, T., Kubota, Y., Masaki, T., Suzuki, K., Akasu, T., Morioka, Y. DNA ploidy pattern in rectal carcinoid tumors. Dis Colon Rectum 1991;34(1):31-6.
- (17) Hedley, D. W., Friedlander, M. L., Taylor, I. W., Rugg, C. A., Musgrove, E. A. Method for analysis of cellular DNA content of paraffin-embedded pathological material using flow cytometry. J Histochem Cytochem 1983;31(11):1333-5.
- (18) Takamatsu, T., Nakanishi, K., Onouchi, Z., Fukuda, M., Fujita, S. Nonspecific ("pseudo-plasmal") dye-binding in the Feulgen nuclear stain and its blocking by azocarmin G. Histochemistry 1980;66(2):169-80.
- (19) 鈴木宏志, 木村 修, 西平哲郎, 藤田哲也, 芦原 司, 福田 優, 貝原信明, 進藤勝久, 田口忠広, 是永大輔, 松本好市, 浜田新七, 浦田洋二, 実方一典, 岡島

邦雄. 癌DNA研究会用語検討委員会報告. 癌の臨床 1991;37(1):1-3.

- (20) 安藤秀彦, 澤田俊夫, 武藤徹一郎. 細胞イメージ分析装置 (イメージサイトメトリー). 検査と技術 1995;23:75.
- (21) Bacus, J. W., Grace, L. J. Optical microscope system for standardized cell measurements and analyses. *Applied Optics* 1987;26(16):3280-3293.
- (22) Bauer, T. W., Tubbs, R. R., Edinger, M. G., Suit, P. F., Gephardt, G. N., Levin, H. S. A prospective comparison of DNA quantitation by image and flow cytometry. *Am J Clin Pathol* 1990;93(3):322-6.
- (23) Fausel, R. E., Burleigh, W., Kaminsky, D. B. DNA quantification in colorectal carcinoma using flow and image analysis cytometry. *Anal Quant Cytol Histol* 1990;12(1):21-7.
- (24) 安田範夫, 福島龍之, 斎藤優子, 中井 茂, 村上 泰, 松本久徳. フローサイトメトリーによるDNA Ploidy解析の問題点—混入単核球の影響について—. 癌と化学療法 1993;20(6):726-730.
- (25) Lee, A. K., Dugan, J., Hamilton, W. M. Quantitative DNA analysis in breast carcinomas: a comparison between image analysis and flow cytometry. *Modern Pathology* 1991;4:178-82.
- (26) Suit, P. F., Bauer, T. W. DNA quantitation by image cytometry of touch preparations from fresh and frozen tissue. *American Journal of Clinical Pathology* 1990;94(1):49-53.

- (27) Tomoda, H., Kakeji, Y., Inoue, T. Flow cytometric analysis of variations in the DNA content of superficial and deep layers in colorectal cancer. *Journal of Surgical Oncology* 1994;57(1):46-9.
- (28) Moriwaki, S., Kimura, O. Correlation of DNA content between endoscopic biopsy and surgically resected specimens in gastric and colorectal cancer. *Journal of Gastroenterology* 1995;30(2):162-8.
- (29) Graham, R. A., Teague, K., Mclemore, D., Cleary, K., et al, N. A. Regional DNA content heterogeneity in colonic adenocarcinoma: prognostic significance in patients with liver metastases. *Journal of Surgical Oncology* 1992;50(4):228-32.
- (30) Dangou, J. M., Kiss, R., DePrez, C., Jeannot, M. C., Fastrez, R., Pasteels, J. L., Verhest, A. Heterogeneity of DNA ploidy, proliferation index and nuclear size in human colorectal carcinomas. *Analytical & Quantitative Cytology & Histology* 1993;15(1):23-31.
- (31) 沢田俊夫, 正木忠彦, 武藤徹一郎. 大腸sm癌の治療方針. *外科治療* 1993;69(3):289-293.
- (32) Muto, T., Kamiya, J., Sawada, T., Kusama, S., Itai, Y., Ikenaga, T., Yamashiro, M., Hino, Y., Yamaguchi, S. Colonoscopic polypectomy in diagnosis and treatment of early carcinoma of the large intestine.

Dis Colon Rectum 1980;23(2):68-75.

- (33) 大島秀男, 沢田俊夫, 斎藤幸夫, 洲之内広紀, 正木忠彦, 津野寛和, 武藤徹一郎.
多発性肝・骨転移を来した大腸sm癌の1例. 胃と腸 1994;29:1293-1296.
- (34) Ishimaru, G., Ookawa, K., Yamaguchi, N., Sakamoto, M., Hirohashi, S., Muto, T., Yokota, J. Allelic losses associated with the metastatic potential of colorectal carcinoma. Int J Oncology 1994;5:267-273.
- (35) 赤木純児, 小川道雄. 癌関連遺伝子と血行性転移. 消化器外科 1995;18:1923-1931.
- (36) Kay, E. W., Mulcahy, H. E., Curran, B., O'Donoghue, D. P., Leader, M. An image analysis study of DNA content in early colorectal cancer. European Journal of Cancer 1996;.
- (37) 大腸癌研究会編. 大腸癌取扱い規約. 1994;(第5版):29-30.
- (38) 小平進. 早期大腸癌の再発(1)臨床病理. 消化器外科展望 1994;2:36-42.
- (39) 小平進, 八尾恒良, 中村恭一, 渡辺英伸, 丸山雅一, 牛尾恭輔, 下田忠和, 岩下明德. sm癌細分類からみた転移陽性大腸sm癌の実態 アンケート調査集計報告. 胃と腸 1994;29:1137-1142.
- (40) 味岡洋一, 渡辺英伸, 小林正明, 前尾征吾, 吉田光宏, 斎藤英俊, 佐々木正貴. 大腸sm癌の細分類(浸潤度分類)とその問題点. 胃と腸 1994;29:1117-1125.
- (41) 小西文雄. 大腸癌の静脈侵襲に関する臨床病理学的検討. 日病会誌

1983;80:31-41.

- (42) Volk, E. E., Goldblum, J. R., Petras, R. E., Carey, W. D., Fazio, V. W.
Management and outcome of patients with invasive carcinoma
arising in colorectal polyps [comment]. *Gastroenterology*
1995;109(6):1801-7.
- (43) 正木忠彦, 武藤徹一郎. 早期癌の内視鏡的治療と手術. 癌の臨床
1994;40:1410-1415.
- (44) 岡部聡. 大腸sm癌の転移のリスクファクターに関する検討. 日本大腸肛門病
会誌 1994;44:952-956.
- (45) 林田啓介, 磯本浩晴, 白水和雄. 大腸sm癌の検討一特に脈管侵襲と簇出につ
いて一. 日本大腸肛門病会誌 1987;40:119-126.
- (46) Hase, K., Shatney, C., Johnson, D., Trollope, M., Vierra, M.
Prognostic value of tumor "budding" in patients with colorectal
cancer [see comments]. *Dis Colon Rectum* 1993;36(7):627-35.
- (47) Yamagata, S., Muto, T., Uchida, Y., Masaki, T., Higuchi, Y., Sawada,
T., Hirooka, T. Polypoid growth and K-ras codon 12 mutation in
colorectal cancer. *Cancer* 1995;75(4):953-7.
- (48) Yamaguchi, A., Ishida, T., Takegawa, S., Nishimura, G., Kanno, M.,
Kosaka, T., Yonemura, Y., Izumi, R., Miyazaki, I. Flow-cytometric
analysis of colorectal cancer with hepatic metastases and its
relationship to metastatic characteristics and prognosis.

Oncology 1990;47(6):478-82.

- (49) Tsushima, K., Nagorney, D. M., Rainwater, L. M., Adson, M. A., Farrow, G. M., Ilstrup, D. M., Lieber, M. M. Prognostic significance of nuclear deoxyribonucleic acid ploidy patterns in resected hepatic metastases from colorectal carcinoma. Surgery 1987;102(4):635-43.
- (50) 武藤徹一郎. 大腸ポリープ・ポリポースス. (第1版 ed.) 東京: 医学書院, 1993:237-239.
- (51) 渡辺英伸, 味岡洋一. 早期大腸癌の病理組織診断—その差はどこにあるのか. 胃と腸 1992;27(6):667-671.
- (52) 猪狩亨, 前田義治, 滝澤登一郎, 小池盛雄. 早期大腸癌の病理診断の問題点. CURRENT THERAPY 1994;12(5):9-14.
- (53) 安藤秀彦, 正木忠彦, 武藤徹一郎. sm大腸癌の転移と再発: リスクファクターを中心に. 消化器外科 1996;19:311-317.
- (54) 安藤秀彦, 澤田俊夫, 斎藤幸夫, 洲之内広紀, 正木忠彦, 鈴木公孝, 浜口正章, 鮫島伸一, 篠崎大, 津野ネルソン, 坂口正高, 内山雅之, 樋口芳樹, 大島秀男, 武藤徹一郎. イメージサイトメトリー (ICM) による大腸癌核DNA量測定—タッチ標本による大腸癌予後判定の可能性について—癌と化学療法 1994;21(Supplement 1):89-94.

