

筑波大学

博士（医学）学位論文

寄	贈
山本達生氏	平成 年 月 日

DA  
1419  
1994  
HG

# 肺癌におけるDNA ploidy と S phase fraction の 細胞生物学的および臨床病理学的意義

1 9 9 4 年

筑波大学大学院博士課程医学研究科  
山本 達生

# 目次

	頁
第1章 序説	1
第1節 本研究の背景と目的	1
1) 癌における核DNA量の異常について	1
2) 核DNA量測定法の変遷	3
3) カラー画像解析装置「NASCA」について	5
4) 癌における核形態量およびクロマチンパターンについて	6
5) 本研究の目的	7
第2節 本研究の概要	9
第2章 核DNA量測定法に関する検討 － FCM と ICM の比較－	13
第1節 序論	13
第2節 FCM と ICM による培養細胞の核DNA量解析結果の比較	14
1) 対象と方法	14
2) 結果	15
3) FCM と ICM による核DNA量解析に関する考察	16
第3節 臨床材料を対象とした核DNA量解析の問題点について	
－ FCM と ICM の比較－	18
1) 対象と方法	18
2) 結果	20
3) 臨床材料の核DNA量解析における問題点に関する考察	22
第4節 小括	25
第3章 肺癌における DNA ploidy および SPF と核異型の関連について	37
第1節 序論	37
第2節 核形態量及びクロマチンパターンの定量化	39
1) 核形態量の計測	39
2) クロマチンパターンの定量化	39
第3節 細胞周期の違いによる核形態の変化	43
1) 対象と方法	43
2) 結果	43
3) 細胞周期と核形態との関連に関する考察	44
第4節 気管支上皮および肺癌細胞における核異型の定量化	46

1) 対象と方法	46
2) 結果	46
3) 非癌細胞と癌細胞の核異型の定量解析に関する考察	47
第5節 肺癌における DNA ploidy および SPF と核異型の関連について	49
1) 対象と方法	49
2) 結果	50
3) DNA ploidy および SPF と核異型の関連に関する考察	51
第6節 小括	53
第4章 肺癌における DNA ploidy および SPF とがん遺伝子 p53 との関連	64
第1節 序論	64
第2節 肺癌における DNA ploidy および SPF とがん遺伝子 p53 との 関連	66
1) 対象と方法	66
2) 結果	67
3) DNA ploidy および SPF と p53 蛋白発現との関連に関する考察	68
第3節 小括	71
第5章 非小細胞肺癌における DNA ploidy および SPF の臨床病理学的意義	76
第1節 序論	76
第2節 非小細胞肺癌における DNA ploidy および SPF と臨床病理学的因子 との関連	78
1) 対象と方法	78
2) 結果	79
3) DNA ploidy および SPF の臨床病理学的意義に関する考察	81
第3節 小括	83
第6章 総括	94
謝辞	99
関連文献, 学会発表	100
文献	102



## 略号

FCM :	flow cytometry.
ICM :	image cytometry.
DI :	DNA index.
SPF :	S phase fraction.
NASCA :	Nucleic Acid Speedy Color Analyzer.
D-MEM :	Dulbecco's Modified Eagle Media.
PBS :	phosphate buffered saline.
RNase :	ribonuclease.
PI :	propidium iodide.
CV :	coefficient of variation (変動係数) .
n-ICM :	normal-ICM.
f-ICM :	fresh-ICM.
p-ICM :	paraffin-ICM.
p-FCM :	paraffin-FCM.
TNM :	thickening rate in nuclear margin.
CANM :	condensed area rate in nuclear margin.
VCNM :	variation of concentration in nuclear margin.
HE :	hematoxylin eosin.
NSCLC :	non-small cell lung cancer.

## 第1章 序説

### 第1節 本研究の背景と目的

#### 1) 癌における核DNA量の異常について

正常細胞の分裂，増殖は，M期（細胞分裂期）→G1期（M期とS期の間のギャップ）→S期（DNA合成期）→G2期（S期とM期の間のギャップ）の順で行なわれている<sup>1)</sup>．成人の身体を構成する約80兆個の細胞の大部分は，いつも細胞周期を回っているわけではなく，むしろ細胞周期の外にあり，増殖を停止して，それぞれの分化機能を営んでいる．この状態をG0期という<sup>2)</sup>（Fig. 1-1a）．すなわち核は，G0/G1期においては46染色体1組に相当する核DNA量（2C）を有しており，これは胚細胞などを除いて一定（DNA diploidy）である．S期では，この倍量に向かってDNAの合成がすすみ，合成終了後のG2/M期では，G0/G1期のちょうど倍量（4C）のDNAが核に含まれる．この後，細胞分裂終了と同時に核DNA量は2Cに復する．したがって，正常細胞の核DNA量は，基本的には細胞周期を通して2Cと4Cの間で変化する（Fig. 1-1b）．ところが，癌化した細胞では，遺伝子の増幅，染色体数の増減，異常細胞分裂などが起きており，しばしば異常な核DNA量（DNA aneuploidy）を有する細胞が生じる<sup>3)</sup>．この異常核DNA量を持った癌細胞のうち，致死的でないものをあらたな幹細胞 stem cell として，細胞周期が営まれると考えられる<sup>3,4)</sup>．

ここで用いられる DNA diploidy あるいは DNA aneuploidy は，元来，染色体分析で用いられてきた用語である<sup>5)</sup>．すなわち，ヒト正常細胞では23本の染色体を単位として，性細胞は半数体（haploidy），体細胞は2倍体（diploidy）と呼ばれる．このように半数体の整数倍の染色体数を持つものを正数倍数体（euploidy）と呼ぶのに対し，それ以外の染色体数を持つものを異数倍数体（aneuploidy）と呼んでいる．この染色体分析で用いられる diploidy あるいは aneuploidy に対応して，核DNA量解析では，量的に正常細胞と同じ核DNA量を持つ状態を DNA diploidy，それ以外の異常な核DNA量を持つ状態を DNA aneuploidy と呼んでいる．また，核DNA量解析において，核DNA量の状態（DNA ploidy）を客観的に示す指標としては，一般に DNA index

(以下 DI と略す) が用いられる。DI は、リンパ球などの正常細胞の G0/G1 における核DNA量 (2C) と、癌細胞の G0/G1 に於ける核DNA量の比として求められるものである<sup>5~7)</sup>。

癌細胞の特徴を表現する際には、以前から核の大きさ・核の大小不同・核形の不整・クロマチンの濃染などの「異型 (atypia)」と表現される形の変化でとらえる形態学的手法が採られてきた<sup>8)</sup>。しかし、近年になって、遺伝子解析<sup>9)</sup>、染色体分析<sup>10)</sup>、核DNA量解析<sup>11)</sup> のような細胞内の質的レベルで、癌細胞が検討されるようになってきた。このうち、核DNA量解析は1970年代から盛んに行なわれ<sup>12~14)</sup>、多くの知見が集積した。その結果、DNA aneuploidy が、多くの臓器の癌細胞に60~95%と、非常に高頻度にみられることが明らかとなった<sup>3,6,7,15,16)</sup>。一方、非癌細胞にはDNA aneuploidy がほとんどみられないことから<sup>17)</sup>、現在ではいわゆる腫瘍マーカーの一つに数えられている<sup>5~7)</sup>。

この核DNA量解析は、遺伝子解析<sup>9,18)</sup>、染色体分析<sup>10)</sup> などに比較して、簡便に行うことが可能であることが利点である。その測定精度も技術の進歩によって向上している。現在の核DNA量解析では、小さな染色体1本分の増減は現時点では検出困難であるものの<sup>5)</sup>、Barlogie ら<sup>12)</sup> は、染色体数44本以下、53本以上の異常、Vindeløv ら<sup>19)</sup> は4~5本以上の異常は検出が可能であると報告している。

また、核DNA量解析には、DNA ploidy の評価だけでなく、細胞周期解析も含まれる<sup>4)</sup>。すなわち、癌細胞などの対象細胞の核DNA量を測定することによって得られたヒストグラムから、全体の細胞に占めるS期の細胞の割合 (S phase fraction, 以下SPFと略す)<sup>20,21)</sup> やS+G2/M期の細胞の割合 (S+G2/M phase fraction)<sup>22)</sup> を計算して求めることが可能である。これら SPF や S+G2/M phase fraction が高ければ、その腫瘍の増殖能は高いと考えられる<sup>20~22)</sup>。従来、細胞の増殖能の評価には、細胞分裂像の計数法や BrdU (bromodeoxyuridin) 取り込み法<sup>23)</sup> などが用いられてきたが、いずれも手技が繁雑でその応用範囲も限られていた。しかし、核DNA量解析によって比較的容易に増殖能の評価が可能となった。

核DNA量解析によって測定される DNA aneuploidy や SFPなどを指標として癌の悪性度を評価し、患者の予後を推測する試みが多くの悪性腫瘍に関して報告されている<sup>20~22, 24~26)</sup>。また、DNA aneuploidy は前癌病変と癌病変、あるいは良性腫瘍と悪性腫

瘍との鑑別の指標として、実際の臨床で用いられている<sup>16, 17, 20)</sup>。さらに、各腫瘍毎に独自の核DNA量を有しているとの考えから<sup>7, 27)</sup>、癌の原発巣と転移巣との鑑別に用いられ<sup>28)</sup>、癌の progression とともに核DNA量が増加することから化学療法の効果の評価<sup>29, 30)</sup>にも応用されるようになった。

これまでの報告をみると、一般に DNA aneuploidy を示す癌、あるいは SPF が高い癌は悪性度が高く予後が不良であるという報告は多いが<sup>14, 16, 23, 24)</sup>、一方で DNA ploidy と癌の悪性度・予後との間に相関はみられないとする報告も少なからずみられ<sup>20, 31, 32, 33)</sup>、その評価は未だ定まっていない。その原因の1つとして、核DNA量の測定方法および DNA ploidy の評価法が各施設で異なっている現状が挙げられており<sup>11, 16, 35)</sup>、癌細胞における核DNA量解析の意義を確立するうえで大きな障壁となっている<sup>35)</sup>。

核DNA量は癌細胞を客観的・定量的に評価できる重要な指標の一つと考えられるが、癌の原因と考えられている様々な遺伝子の異常との関連は明らかではなく、癌診断の最終根拠となる病理形態学的特徴である核の異型性との関連に関しても、十分な検討がなされていない。

## 2) 核DNA量測定法の変遷

核DNA量の測定原理は、核の DNA の二重鎖に特異的かつ定量的に結合する物質で核を染色して、この物質の量を測定することによって、間接的に核DNA量をあらわすものである。核DNA量の測定法はその染色物質の特性によって、蛍光色素である propidium iodide や ethidium bromide<sup>4)</sup>と、特異蛍光を発しないフォイルゲン色素<sup>36, 37)</sup>の2種類に大別される。すなわち、前者は顕微蛍光測光<sup>38)</sup>やフローサイトメトリー (flow cytometry, 以下 FCM と略す)<sup>4)</sup>で、後者は顕微分光測光法<sup>39)</sup>で用いられる。

歴史的には、まず、細胞の形態観察に加えて細胞の生理・生化学的特性を定量的に捉える試みとして、顕微分光測光法が1942年 Caspersson らによって考案された<sup>40)</sup>。さらにそれを発展する形で、DNAに特異的に結合させた蛍光色素の蛍光量を測定する顕微蛍光測光法が生まれた<sup>41)</sup>。これは従来の顕微分光測光法に比較して、蛍光量そのものを測定するので定量性では優るものの、細胞形態を詳細に観察することは不可

能であった。

1969年にアルゴンイオンレーザーを用いた FCM が VanDilla らによって開発され<sup>42)</sup>、さらに1975年に fluorescence activated cell sorter<sup>43)</sup> が実用化されて以来、FCM は核DNA量測定法の主流となった。

FCM の特徴<sup>44)</sup> は、一度に大量の細胞の測定を可能にしたことにある。その測定原理は、1個1個遊離した細胞を目的に応じた蛍光プローブ（蛍光色素）で標識し、ノズルを通してシース液とともに秒速10mの高速で流す。この細胞を含んだ水流に一定の波長の光、核DNA量解析の場合 488nm アルゴンレーザーを励起光として照射すると、その標識された蛍光プローブ量に比例して散乱光と蛍光の2種類の光が生じる。ここで、散乱光は細胞の大きさ・性状を表わし、蛍光は生物学的特性を表わしている。この蛍光を照射光方向と直角に置いた光電管によって電気的信号に変換し、さらに増幅してオシロスコープに表示すると同時に、その測定結果をコンピュータで解析するのである。FCM の解析能力は高速であり、その速度は毎秒5,000～10,000個に達する。FCM は、核DNA量の測定ならびに細胞周期解析のみならず、細胞表面抗原を利用したリンパ球のサブセットの解析、染色体分析など、きわめて広い分野で利用が可能である<sup>44)</sup>。さらにパラフィンブロックなどの保存材料からの測定も可能であることが確認され<sup>45-47)</sup>、急速に普及した。

しかし、FCM は高速である反面、個々の細胞を同定しながら測定することができないので、対象となる細胞の占める割合が高い検体にのみ測定結果の評価が可能であり、細胞数が少ない検体では目的とする測定が不可能である<sup>48)</sup>。また、細胞液の調整、準備および測定操作が複雑なこと、測定機器が高価なことなども FCM の欠点としてあげられる<sup>48)</sup>。また、測定される核DNA量はあくまで相対量であり、癌細胞の核DNA量の異常を評価するためには、標準となる核DNA量（2C）を持つリンパ球などの非癌細胞（internal standard）が必要である<sup>4)</sup>。手術検体や生検など臨床材料のほとんどの場合、炎症細胞が種々の割合で混入しており、あらためて internal standard を加える必要はないが、造血系腫瘍などでは、ヒトリンパ球やニジマス赤血球などの external standard を加えることが時として必要である<sup>4, 44)</sup>。さらに FCM の最大の欠点として、細胞の形態観察や形態計測が事実上不可能であることがあげられる<sup>48, 49)</sup>。これらの問題点は FCM の測定原理と密接に関連しており、その克服は困難

であると考えられる。そこで、これらの問題点を解決すべく、顕微分光測光を用いた核DNA量の測定、いわゆるイメージサイトメトリー (image cytometry, 以下 ICM と略す) が再び注目され始めた<sup>11, 20~22, 35, 48~50)</sup>。

### 3) カラー画像解析装置「NASCA」について

従来の顕微分光測光法に、エレクトロニクス分野の進歩と画像処理技術の向上を利用して、カラー画像解析装置を用いた細胞核DNA量測定法「NASCA」(Nucleic Acid Speedy Color Analyzer) が筑波大学病理で考案された<sup>51~53)</sup>。この方法は、基本的には顕微分光測光法と同様に、Lambert-Beer の法則<sup>54, 55)</sup>に基づいている。Lambert-Beer の法則とは、「入射光が単一波長で、対象が透明であり、かつ、その中に吸光物質が均一に分布しているならば、入射光の強さに対する透過光の強さの比(透過率)は一定であり、その逆数の対数(すなわち吸光度)が、対象の厚さと吸光物質の濃度に比例する」というものである。すなわち「NASCA」では、塩酸処理によって加水分解されアルデヒド型デオキシリボースを持つ核DNA に特異的に結合したフォイルゲン色素の吸光度から核DNA量を測定している。そのシステムの構成をFig. 1-2 に示す。

従来の顕微分光測光法の最大の問題点は、その測定精度が低いことと測定時間が長いことであった。このうち測定精度を低下させる2つの原因として、分布誤差と非特異的光喪失がある。「NASCA」では、この測定誤差を補正するために次のような方法を採用した。

分布誤差とは、測定対象となる試料内の吸光物質の分布が不均一なため、また試料の厚さが一定でないために生じる誤差である。これを克服するために、従来の顕微分光測光法では走査法が用いられてきたが、物理的にスポット走査が十分でなく誤差の原因となっていた。これに対し「NASCA」ではそもそもの測定対象がCCDカメラから入力されたデジタル化された画像であり、すでに画素(ピクセル; pixel)と呼ばれる区画単位に分割されているので、走査の必要がない。また、このシステムでの1ピクセルは、一辺  $0.33\ \mu\text{m}$  であり、これはほぼ「NASCA」での測定倍率(40倍)での光学顕微鏡の最大分解能、すなわち白色光の平均波長  $550\ \text{nm} \div$  対物レンズの開口数  $0.95 = 0.29\ \mu\text{m}$  に相当するので、分布誤差が測定時の倍率において最小となりうる。

また、走査に要する時間がなくなり、測定時間を大幅に短縮することが可能となった。

一方、非特異的光喪失とは、標本中の細胞の諸構造やそれらに含まれる物質などが、相互に異なる屈折率を有する結果、標本中で光の屈折、反射、回折、偏光による光散乱によって生じる誤差をいう。この誤差を除去するために、顕微分光測光法では2枚の干渉フィルターを用いている。これに対して、本法では測定対象となる画像がカラーであることに着目した。すなわち、測定対象となるフォイルゲン色素の特異吸光曲線にほぼ一致するG成分画像と、ほとんど特異吸光のないB成分画像を直接用い、光喪失を補正する方法である。この方法によって、干渉フィルターを用いることなく、非特異的光喪失の補正が可能となった。

以上の如く、「NASCA」では従来の顕微分光測光法での欠点である分布誤差と非特異的光喪失を、測定対象のデジタル化と、カラー画像のG成分とB成分を用いることによって克服し、測定精度と速度を改善した。

また「NASCA」は、細胞のカラー画像をそのまま測定対象にするため、その詳細な核の形態を画像データとして保存入力が可能である。このデータを利用することによって、従来の顕微分光測光法<sup>39)</sup>やFCM<sup>42~44)</sup>では不可能であった、核DNA量と形態的因子の同時解析を行なうという、新しい分野が開けたといえる。

このように、カラー画像を対象とした新しい顕微分光測光法「NASCA」は、形態観察が可能であるという顕微分光測光法の最大の利点を生かしながら、測定精度と速度の向上を可能にした。「NASCA」は、すでに培養実験系において核DNA量測定に応用されている<sup>56)</sup>。しかし、「NASCA」の臨床材料への応用に関しては、まだ十分な検討はなされていない。また、このシステムは当初、癌細胞自動診断化を目指して開発されたものであるが、核DNA量解析によるDNA ploidy およびSPF だけではその重責は果たせず、あらたなパラメーターが必要とされている。

#### 4) 癌における核形態量およびクロマチンパターンについて

一般に癌細胞と正常細胞を区別するのに、病理形態学的「異型」という特徴が用いられる<sup>8)</sup>。今日の医学では、ほとんどの癌症例は、この「異型」によって病理形態学的に診断され治療されている。がん細胞では、核内のDNAに高度の異常があり、そ

の結果，細胞の形態や組織中の細胞の配列に至るまで，さまざまなレベルで異常な表現型，「異型」が出現すると考えられる<sup>57)</sup>．しかし，これらの評価は病理医の経験によって大きく左右される<sup>58~60)</sup>．最近の ICM の進歩によって，従来から病理学的診断に用いられている癌細胞の核異型（核面積，大小不同，核形不整など）が定量的な測定が可能となり<sup>61~66)</sup>，これらと癌の進展度や患者の予後との関連など，臨床的意義について検討されてきている<sup>63~71)</sup>．一方，多くの悪性腫瘍に関して行なわれた核 DNA 量解析のこれまでの成果によって，癌細胞の DNA ploidy と SPF が，癌の診断および生物学的悪性度を決定する重要な因子のひとつであることが確認されつつある<sup>14, 16, 23, 24)</sup>．

しかし，癌細胞に特徴的にみられる「核異型」あるいは核 DNA 量の異常が，どのような原因で生じるのかについては，未だ明らかではない．近年，癌化に関与する遺伝子，すなわち myc, ras, src などのがん原遺伝子や，Rb, p53 などのがん抑制遺伝子の解析が急速に進み，多くの癌でこれらの遺伝子の増幅，点突然変異，転座などが起こっている．このような異常によって細胞が本来もっている増殖制御や DNA の修復機能などが失われることが，癌化に関与していることが明らかになった<sup>9)</sup>．ヒストン蛋白などの核内蛋白の遺伝子にも同様の異常が起こっており，それが核の形態異常に関与している可能性もある<sup>72, 73)</sup>．

癌以外の分野では，骨髓における赤血球<sup>74)</sup>や胸腺におけるリンパ球の分化<sup>75)</sup>，あるいは細胞周期<sup>38, 76~82)</sup>によって，核形態量および核クロマチンパターンが変化することが知られている．したがって，一般に核の形態は，細胞の分化や核 DNA 量の変化など，様々な細胞の状態やその変化を反映していると信じられている<sup>74, 83)</sup>．

## 5) 本研究の目的

核 DNA 量解析法の進歩に伴い，DNA ploidy と S phase fraction (SPF) の評価が可能となった．多くの癌では，核 DNA 量の異常がみられることが知られ，現在では核 DNA 量解析は癌の補助的診断に用いられている．また，DNA ploidy および SPF と癌の進展度や患者の予後との関連性についても多くの研究がある．しかし，核 DNA 量の解析方法と DNA ploidy および SPF の評価基準が施設によって異なるため，核 DNA 量



解析の意義に対する評価は必ずしも一定していない。また、従来から癌の病理形態学的診断の根拠となっている細胞の形態学的異常，即ち「異型」は核DNA量と密接に関係していると考えられるが，その方面の解析はみられない。さらに，癌細胞では，細胞増殖・細胞周期に関与する遺伝子の異常によって，細胞が本来持っている増殖制御やDNA修復機能などを失うことが明らかにされつつある。しかし，DNA ploidy や SPF が，これら癌細胞の生物学的意義を反映しているか否かの検討もなされていない。

本研究では，以上のような問題点を中心として，まずヒト癌細胞を対象とした核DNA量解析に最も適した方法およびDNA ploidy と SPF の評価法を確立すること，さらに，それによって得られたDNA ploidy および SPF と，癌細胞の核異型および遺伝子異常との関連を明らかにすることによって，癌における核DNA量解析の生物学的意義を追究すると共に，その臨床病理学的価値を確立することを目的とした。

## 第2節 本研究の概要

前節で述べた通り，核DNA量解析によって癌細胞の核DNA量の異常（DNA aneuploidy）やその増殖能（SPF など）を評価することが可能となった．DNA aneuploidy はSPF とともに腫瘍マーカーとして，その診断や治療効果の解析等に広く用いられている．しかし，各施設で核DNA量の測定方法および DNA ploidy の評価法が異なっており，また，DNA ploidy や SPF が癌の悪性度・予後と相関しないとする報告もあり，その評価は未だ定まっていない．さらに DNA ploidy や SPF と癌の原因と考えられている様々な遺伝子の異常との関連は明らかではなく，また癌の病理形態的特徴である核の異型性との関係も未だ十分に解明されていない．

本研究では，培養細胞，気管支上皮細胞，肺癌を対象として，まず「NASCA」の測定の信頼性を培養細胞で確認した後，臨床材料である肺癌切除検体を用いて核DNA量解析を行い，FCM と比較検討した．次に，核異型の定量化を「NASCA」を用いて行い，核異型と DNA ploidy および SPF との関係を検討した．さらに，これら DNA ploidy および SPF と癌抑制遺伝子との関係を検討した．最後に，肺癌における DNA ploidy および SPF の臨床病理学的意義に関して検討した．

具体的には第2章において，「NASCA」の信頼性を確認するために，培養細胞の核DNA量解析を行い，同時に行った FCM の結果と比較した．また，肺癌切除検体を対象に「NASCA」と FCM の両方で核DNA量解析を行い，その結果を比較し，臨床材料を対象に核DNA量解析を行う際の問題点を明らかにした．

第3章では，まず「NASCA」を用いて，あらたにクロマチンパターンの定量化を行った．次に，培養細胞のクロマチンパターンおよび核形態量を測定し，各細胞周期毎の変化を明らかにした．さらに気管支上皮細胞と肺癌を対象として，クロマチンパターンおよび核形態量を測定し，癌細胞の核異型について検討した．

第4章では，第3章で得られた肺癌細胞の核異型の指標，すなわちクロマチンパターンおよび核形態量と，核DNA量解析の結果得られた DNA ploidy および SPF との関係を検討した．

第5章では，多くの癌で高頻度にその異常が指摘されている癌抑制遺伝子p53が，

細胞増殖とDNA 修復に関与していることに着目し、まず p53 の肺癌における発現について検討し、その結果と DNA ploidy および SPF との関係を検討した。

第6章では、肺癌における DNA ploidy および SPF の臨床病理学的意義を明らかにするために、まず、これらと肺癌の組織型および進展度との関係を検討した。次に、Kaplan-Meier 法によって、DNA ploidy および SPF が患者の生存率に与える影響について検討した。さらに、Cox 比例ハザードモデルを用いて予後因子の重みの検討を行い、DNA ploidy および SPF と予後との関連について考察を加えた。

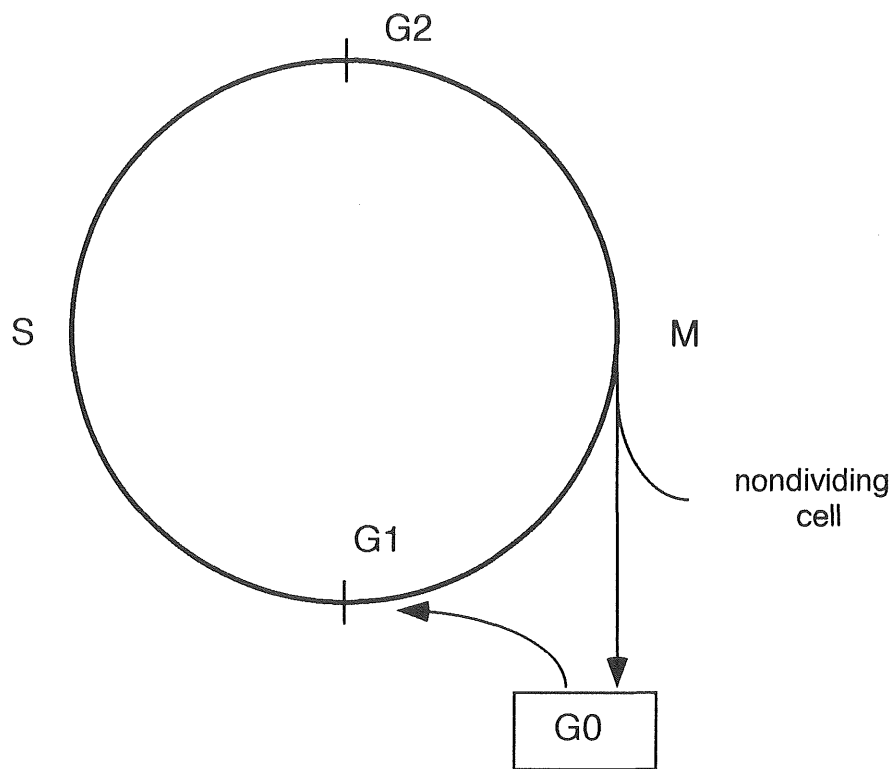


Fig. 1-1a Cell cycle of normal cells

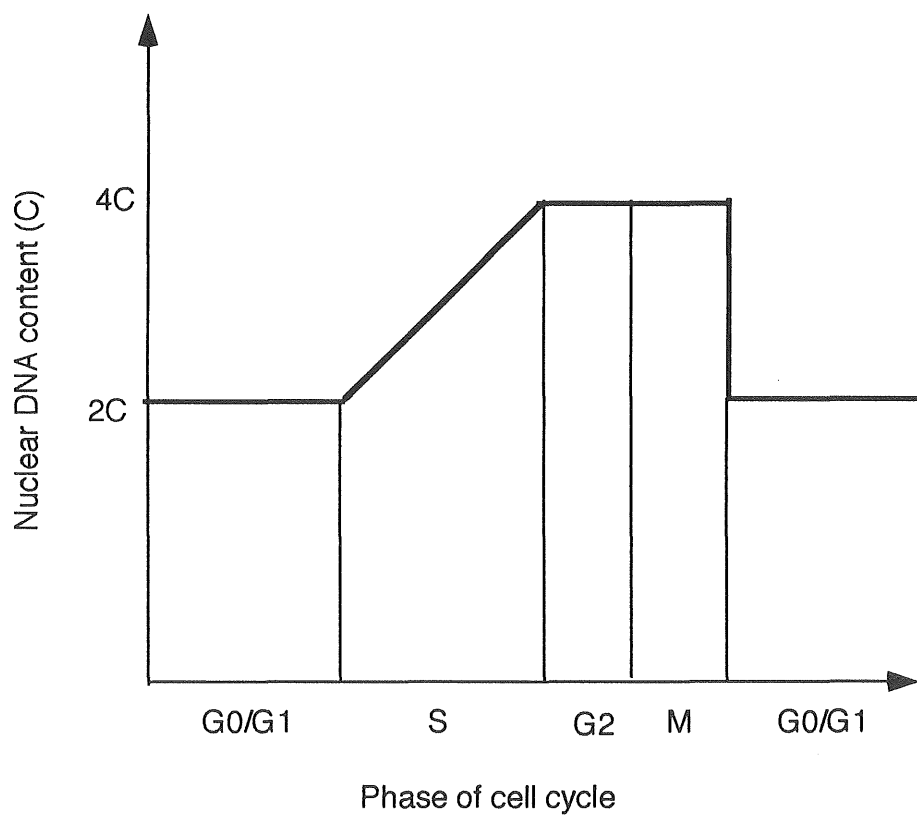


Fig. 1-1b Nuclear DNA content during cell cycle

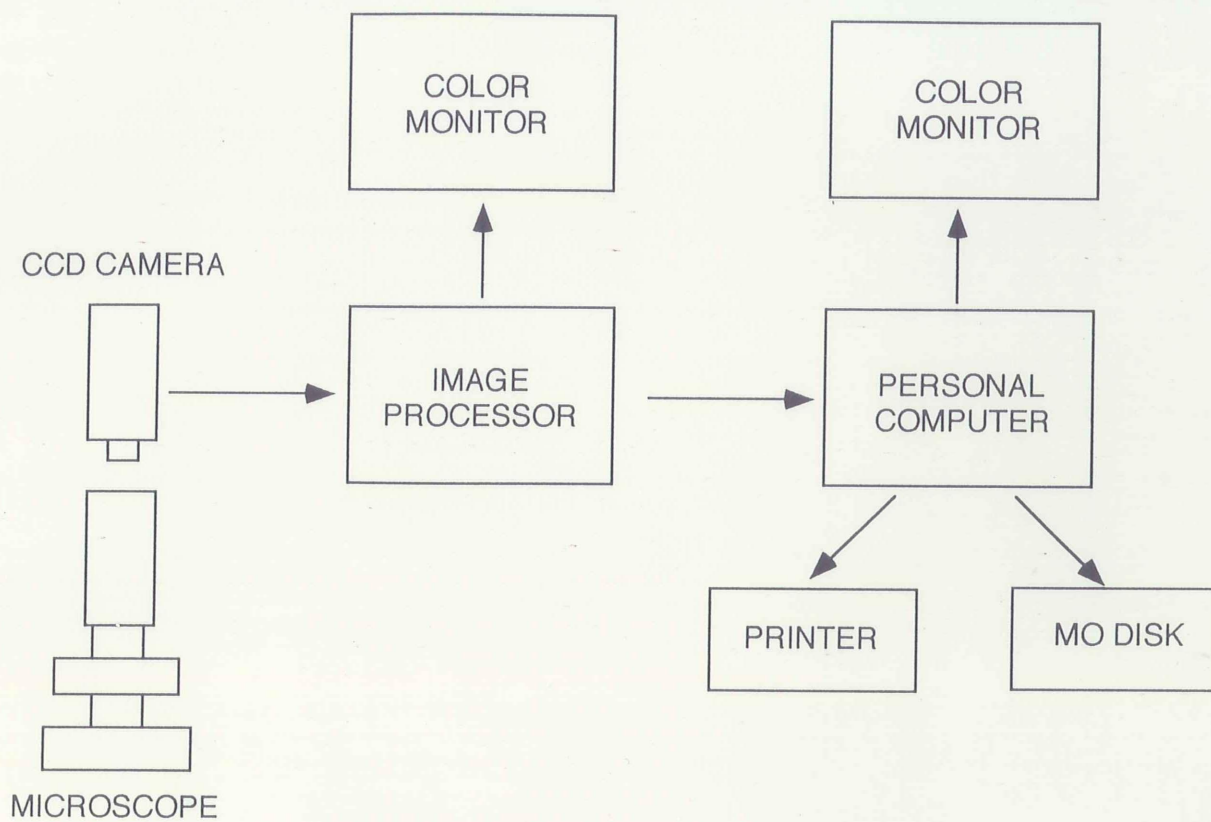


Fig. 1-2 a Hardware of color image analysis system [NASCA]

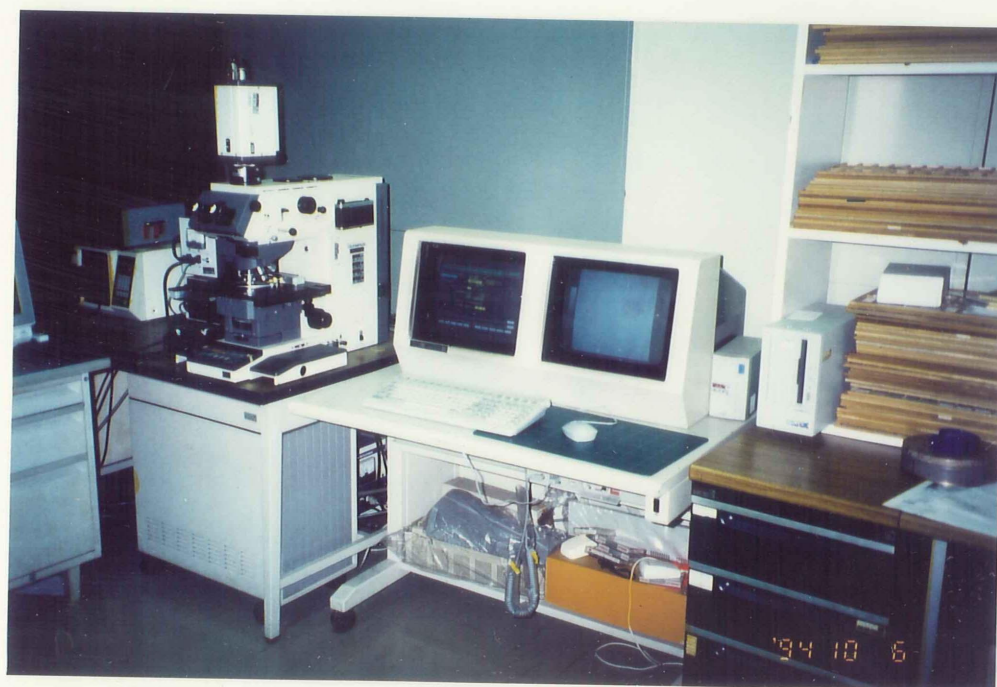


Fig. 1-2 b Photograph of NASCA system

## 第2章 核DNA量解析法に関する検討 ― FCM と ICMの比較―

### 第1節 序論

多くのヒト固形悪性腫瘍で核DNA量の異常が高率にみられることから、癌細胞核DNA量の測定が、新しい細胞診断法の1つとして利用されてきている<sup>16, 60)</sup>。この核DNA量解析は、細胞周期解析も同時に行うので、腫瘍の増殖能に関する情報も提供することができる<sup>20~22)</sup>。

核DNA量測定法には、現在主に2つの方法、すなわちフローサイトメトリー (FCM)<sup>4, 42~47)</sup> とイメージサイトメトリー (ICM)<sup>11, 20~22, 35, 48~50)</sup> が用いられている。FCMは迅速で正確な測定が可能であり、現在ICMよりも多くの施設で使用されている。しかし、コンピューターテクノロジーの進歩と画像処理技術の向上によってICMの処理能力は向上してきており<sup>11, 39, 50, 64, 68, 85, 86)</sup>、FCMのICMに対する優位性は失われつつある<sup>48, 49)</sup>。カラー画像解析装置を用いた核DNA量測定システム

「NASCA」は、フォイルゲン染色された核を、半自動的に癌細胞と非癌細胞とに選別し、核DNA量を測定することを可能にした<sup>51~53)</sup>。

本章の目的は、このICMシステム「NASCA」の信頼性を確認することであり、また「NASCA」が従来のFCMと比較して、核DNA量解析においてどのような利点があるのかを示すことである。まず最初に培養細胞の核DNA量解析を行い、同じ試料について核DNA量解析を行ったFCMの結果と比較した。また、肺癌切除検体の新鮮捺印標本とパラフィン包埋標本を対象に「NASCA」とFCMの両方で核DNA量解析を行い、その結果を比較し、臨床材料を対象に核DNA量解析を行う際の問題点を検討した。

## 第2節 FCM と ICM による培養細胞の核DNA量解析結果の比較

### 1) 対象と方法

ICMシステム「NASCA」の核DNA量解析における信頼性を確認するために、従来から一般に用いられている FCM との比較を行った。この測定比較を行う際、同じ条件の細胞を得るために、再現性が高く調整が容易な培養細胞を測定対象とした。

#### 対象

あらたにヒト肺扁平上皮癌から樹立した培養細胞株 (TKB-31) の15世代目を使用した。この細胞は、10%牛胎児血清 (FCS) 添加 Dulbecco's Modified Eagle Media (D-MEM) (Gibco Lab., USA) を基礎培地とした培養条件下では、フラスコ底面に付着して敷石状に増殖する (Fig. 2-1)。その染色体数分析 (12世代) では、モードは61~62の高3倍体域に分散し、ピークは認められなかった。免疫細胞化学染色でケラチン、ビメンチンは陽性、S-100 protein, NSE (neuron-specific enolase) は陰性であった。前記培養条件下の倍加時間は、倍加時間測定法<sup>87)</sup>により、約44時間と測定された。

#### 細胞の調整

肺癌培養細胞 TKB-31 を0.2%EDTA添加0.0125%トリプシン処理にて継代し、10cmシャーレ (Beckton Dickinson, USA) 3個に分注し、10% FCS 添加 D-MEM で、37℃、5%CO<sub>2</sub>濃度にて、24時間培養した。3個のうち1個のシャーレにはオートクレーブした poly-L-lysine コーティング済スライドガラス (SUPERFROST, MATSUNAMI) を培地中に静置しておき、そのスライドガラス上で細胞が増殖できるようにした。ICM用には、このスライドガラスを取りだし磷酸緩衝生理食塩水

(Phosphate Buffered Saline, PBS, pH 7.4) で3回洗浄した後、速やかに細胞診用固定液 (中性緩衝ホルマリン20%, 酢酸5%, 95%エチルアルコール75%の混合液) に入れ、約1時間固定した。その後フォイルゲン染色<sup>37, 39)</sup>を行なった。まず、脱イオン水でスライドガラスを10分間洗浄した後、5 N 塩酸で、60℃、45分間反応させ、

核内の DNA を加水分解した。シッフ試薬にて室温，暗所で90分間染色した後，アルコールにて脱水，キシレンにて透徹した後，カバーガラス（MUTO-PURE CHEMICALS）にて封入した。FCM用<sup>4,88)</sup>には，まず2個のシャーレ上の培養細胞をPBSでD-MEM培地を洗浄したのち，トリプシン処理を行ない，細胞を単離させた。2回PBSで洗浄・遠心した後，100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Ribonuclease（RNase, Sigma Chemical Co., USA）にて37℃，30分間反応させ細胞内RNAを消化した。核染色は50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  の propidium iodide（以下PIと略す）にて氷上遮光下で1時間行ない測定に供した。ここで核染色に使用したPIはDNA染色で最も一般的に用いられ，アルゴンイオンレーザーから発振される青色光により励起され，赤色の明かるい蛍光を発する。しかしこの色素は，二重鎖DNAの架橋の部位と結合するのみならず，二重鎖のRNAとも結合するので，あらかじめRNaseによってRNAを分解しておく必要がある<sup>88)</sup>。

#### FCM と ICM での測定方法

FCMでの測定には，PIで核染色された肺癌培養細胞浮遊液を冷PBSで適宜希釈し，フローサイトメーター（FACScan, Beckton Dickinson, USA）を用いた。変動係数（Coefficient of Variation, 以下CV値と略す）と細胞周期解析にはパーソナルコンピュータ（Hewlett Packard, USA）および細胞解析プログラム（CellFIT, Beckton Dickinson）を使用した。細胞流量は毎秒100から200個とし，合計20,000個の核を測定した。ここで得られたCV値と細胞周期解析結果を，それぞれ核DNA量の測定精度と細胞の増殖能を評価するのに用いた。ICMでの測定には，フォイルゲン染色されたプレパラート上の肺癌培養細胞核を，カラー画像解析装置「NASCA」を用いて測定した。使用したシステム構成は，光学顕微鏡（VANOX-T, オリンパス），40倍対物レンズ（開口数 0.95）（オリンパス），2.5倍中間レンズ（オリンパス），CCDカメラ（KY-F30, 日本ビクター），自動電圧安定装置（CONSTAC, 日本撈線工業株式会社），カラーイメージアナライザー（SPICA, 日本アビオニクス），マイクロコンピュータ（PC-9801 DA, 日本電気），外部記憶装置（Laser Memory, パイオニア）であった。約20分間に500個の培養細胞を測定した。細胞周期解析には，FCM，ICMともに正規分布近似法<sup>91)</sup>を用いた。

## 2) 結果



肺癌培養細胞株 TKB-31 の核DNA量を、FCM および ICM で測定した。得られた核DNA量ヒストグラムと細胞周期解析結果を Fig. 2-2 および Table 2-1 に示す。いずれも、最初のピークが急峻で、この細胞のG0/G1 (2C) を表わすと考えられる。またこれらの最初のピークからそのX軸上で2倍にあたるところに向かってなだらかなカーブを描いており、それぞれS期、G2/M期 (4C) を示している。FCM および ICM にて得られたヒストグラムの形状は酷似しており、細胞周期解析においても、G0/G1期、S期、G2/M期の細胞の割合は、両者ともほぼ同じ値をとっている。また、測定の精度を表わすと考えられる、最初のピークにおける FCM および ICM のCV 値は、それぞれ 7.8%, 6.5 %であった。

### 3) FCM と ICM による核DNA量解析に関する考察

肺癌培養細胞の核DNA量解析を、FCM と ICM で行ない比較した結果、核DNA量ヒストグラム、細胞周期解析結果、CV 値から、両者の差はほとんどみられなかった。この比較は、測定対象がまったく同一であり、また細胞周期解析法も同一であることから、再現性があると考えられる。

従来から測定精度は、FCM が優れているといわれているが、今回使用した ICM システム「NASCA」は、FCM と比較してほぼ遜色のない測定精度の高さを示した。FCM および ICM の CV 値は、7.8 および 6.5%とやや高い値を示したが、これは、今回用いた培養細胞が、染色体数分析においてモード61~62であるが、ピークは認められず、その染色体数の幅が大きいことが影響している可能性がある。

測定細胞数に関しては、FCM の場合、数万個の細胞を測定することは比較的容易であるが、逆にその測定前の設定などに比較的多量の検体を要することになり、またその構造上、一度測定した細胞は基本的には再測定できないなど、不利な要素となりうる<sup>48,49)</sup>。これに対して「NASCA」は ICM の最大の長所としての形態観察定量が可能であることに加えて、フォイルゲン染色が容易であり調整が簡便なこと、検体の保存性に優れ、測定に要する検体量が少なくて済むという長所を持つ。さらに測定速度に関しても、今回用いた培養細胞のように付着性に増殖する場合、細胞がシート状に

発育し重ならないため、一画面に約80個以上の核を計測することが可能である。このため、「NASCA」が、FCMと同様な精度で核DNA量解析を行なうのに要した時間は、FCMのそれとほぼ同等であった。この特長を生かして、実際に「NASCA」を用いて培養細胞の核DNA量解析を行っており良好な結果を得ている<sup>56)</sup>。

以上のように、核DNA量解析において現在、最も広く用いられている FCM と比較することによって、ICM「NASCA」の信頼性を確認することができた。

### 第3節 臨床材料を対象とした核DNA量解析の問題点について

#### － FCM と ICM の比較 －

前節では FCM と ICM の比較を培養細胞を用いて行なったが、本節では臨床材料すなわち肺癌切除検体を用いて同様の比較を行なうことにより、核DNA量解析の実際上の問題点について検討した。まず最初に、癌細胞の核DNA量の異常と増殖能の亢進の基準を決定するために、非癌細胞（normal-ICM，以下 n-ICM と略す）と癌細胞の比較を行なった。次に、肺癌細胞について FCM と ICM の比較検討を加えた。すなわち、新鮮捺印標本を ICM で測定したもの（fresh-ICM，以下 f-ICM と略す）、パラフィン包埋標本から得られた細胞を ICM で測定したもの（paraffin-ICM，以下 p-ICM と略す）と FCM で測定したもの（paraffin-FCM，以下 p-FCM と略す）の3つを比較した。検体の違いによる比較は f-ICM と p-ICM で、測定方法の違いによる比較は p-FCM と p-ICM で検討した。

#### 1) 対象と方法

##### 対象

非癌細胞として、気管支鏡下の擦過細胞診標本で正常の気管支上皮細胞を含み、かつ癌細胞などの異型細胞がないと診断された5例の標本を任意に選び、その中の正常気管支上皮細胞を測定対象とした（n-ICM）。癌細胞として筑波大学附属病院で切除された46例の肺癌切除検体を用いた。その内訳は、男性34例、女性12例で、年齢は40～86才で平均64才、組織型別には、腺癌22例、扁平上皮癌17例、大細胞癌4例、カルチノイド3例であった。ICM の癌細胞標本として、新鮮捺印標本を切除腫瘍の断面から2枚以上作製した。その1枚をパパニコロー染色して癌細胞の有無を確認した。また、腫瘍部分のホルマリン固定パラフィン包埋標本を作製し、通常の病理学的検索を行い、日本肺癌学会分類<sup>89)</sup>に準じて組織型を決定した。

##### 試料の調整

肺癌新鮮捺印標本（f-ICM）は、切除された腫瘍断面から採取し、前節の方法に準

じてフォイルゲン染色を行なった。正常気管支上皮細胞（n-ICM）のパパニコロー染色<sup>90)</sup>は、フォイルゲン染色の塩酸処理で十分脱色することが可能なので、染色前の脱色過程は省略した。パラフィン包埋標本からの細胞調整（p-ICM, p-FCM）に関しては、Hedley ら<sup>47)</sup>の方法に従って行なった。まず、通常のヘマトキシリン-エオジン染色で、腫瘍細胞が最低20%以上の面積を占めることを確認した後、同部位から2ないし5枚の、厚さ約 50  $\mu$ m の切片を作製した。次に、キシレン、アルコール系列（キシレン 2 回、100%エタノール 2 回、95%エタノール 2 回、90%エタノール 2 回、80%エタノール 1 回、50%エタノール 1 回、PBS 2 回）によって、脱パラフィン、親水処理した。各溶液の交換は遠心分離によって行なった。ピペッティングおよび金属メッシュで機械的に分散した後、0.5%ペプシン（Sigma Chemical Co.）でpH=1.5, 37℃, 60分間、細胞質溶解処理を行ない、40  $\mu$ m のナイロンメッシュで濾過して、遊離裸核細胞を得た。ここで核が裸核となり、十分に分離していることを顕微鏡で確認した。この細胞液の一部を希釈し、サイトスピン（Cytospin 3, Shandon Co., UK）を用いて poly-L-lysine コーティング済スライドガラス上に展開し、前節で用いた細胞固定液で60分間固定後、同様にフォイルゲン染色し、p-ICM 用標本とした。また、この細胞液に前節と同様の RNase 処理と PI 染色を行い、p-FCM 用標本とした。

#### ICM の測定方法

n-ICM, f-ICM, p-ICM には、前節と同様「NASCA」を使用した。核の選別はその吸光度レベル（核の濃さ）と大きさの域値を設定し、自動的に行なった。この設定によって、核の重なり、核断片、その他の人工的産物を迅速に除去した。その後、測定画面上で確認しながら、腫瘍細胞、気管支上皮細胞、リンパ球などを選択した。まず同一標本内に介在するリンパ球50個の核DNA量を測定し、その平均値を 2C とした。次に、1 検体につき、最低100個以上（平均480個、102~1090個）の腫瘍細胞の核DNA量を測定した。この腫瘍細胞の核DNA量ヒストグラムから、最初のピークの核DNA量を求め、これを、先に求めたリンパ球の平均核DNA量値（2C）で除した値をその腫瘍の DNA index（DI）とした。DNA ploidy の決定には、まず正常気管支上皮細胞と癌細胞の DI を求め、境界値を決定した。その境界値より DI が大きいものを aneuploidy, 小さいものを diploidy とした。細胞周期解析は前節に従った。このようにして、DNA ploidy, DI, CV値, SPF を求めた。

## FCM の測定方法

前節同様 FACSscan を用いて、1 検体につき最低10,000個の蛍光染色された核を測定し、DNA ploidy, DI, CV値, SPF を求めた。まず、得られたヒストグラムを次の基準で aneuploidy と diploidy に選別した。すなわち、ヒストグラム上、単一のピークのみ認める場合は、これを diploidy とみなし、 $DI = 1.0$  とした。ピークを複数個認める場合は、aneuploidy とした。この場合の DI は、二番目のピーク（腫瘍細胞）のチャンネル数を最初のピーク（リンパ球などの介在正常細胞）のチャンネル数で除したものとした。

FCM および ICM において、DI が2.0の tetraploidy や腫瘍細胞のピークが複数個存在する polyploidy は aneuploidy に含めた。ヒストグラム上、明らかなピークがなく解析不能の場合を「impossible」とした。f-ICM, p-ICM, p-FCM での代表的な核 DNA量ヒストグラムを示す (Fig. 2-3)。

## 統計学的処理方法

本研究における、測定値は原則として平均±標準偏差で表わし、必要に応じて範囲を併記した。また、臨床材料を用いた2群間の比較には、母集団の分布型に基かない統計処理方法であるノンパラメトリックテストの Mann-Whitney U test あるいは Wilcoxon signed-ranks test を用いた。また 相関については、Spearman の順位相関係数を使用した<sup>92)</sup>。  $p < 0.05$  をもって有意差ありとした。

## 2) 結果

### ICM における正常気管支上皮細胞と肺癌細胞の比較

肺癌細胞の DNA ploidy と 増殖能の評価を行なうため、まず、非癌症例として5例の正常気管支上皮細胞と癌症例として25例の肺癌症例について、核DNA量の測定とその細胞周期解析を行なった (Fig. 2-4)。非癌例は、DI はすべて1.3 未満であり、また SPF も20%未満であった。一方癌症例では DI は0.9から4.0で、SPF は2.0から82%であった。このことから、本研究における DNA ploidy の定義は、 $diploidy < DI = 1.3$ ,  $aneuploidy \geq DI = 1.3$ とした。また、増殖能の評価の基準については、 $SPF < 20\%$ を増殖能の亢進なし、 $SPF \geq 20\%$ を亢進ありとした。

## 核DNA量解析の精度の評価

検体と測定法の違いによる測定精度の比較を行なうために、f-ICM、p-ICM、p-FCMのCV値を算出したところ、それぞれ $4.09 \pm 1.75$  (1.02~6.84)、 $5.31 \pm 1.86$  (2.24~10.5)、 $5.06 \pm 2.66$  (1.41~12.0)であった。これら3群間に有意差は認められなかったが、パラフィン包埋標本からの測定であるp-ICMとp-FCMにはCV値が10%を越えるものが少数みられた。これに対して、新鮮標本をICMで測定したf-ICMのCV値は、最も小さく高精度の測定が可能であった。

## Aneuploidyの検出率

f-ICM、p-ICM、p-FCMでの核DNA量解析の結果をTable 2-2に示す。測定対象となる検体が同一の腫瘍から採取されたのにもかかわらず、aneuploidyの検出率は、測定方法によって、60.9から76.1%とばらつきがみられたが、有意差は認められなかった。新鮮捺印標本を用いたf-ICMでは、最も検出率が高率であり、解析不能の症例はなかった。これに対して、p-FCMやp-ICMなどのパラフィン包埋標本を測定した場合、いくつかの検体で解析不能例がみられた。また、aneuploidyの検出率もf-ICMに比較してp-FCM、p-ICMともに低率であった。p-FCMでの解析不能例は3例であり、これらの標本内には標本調整段階で生じた核の断片が、種々の程度に含まれていた。p-ICMでの解析不能例は1例で、これは細胞調整中に細胞標本が希釈され、スメアされたスライドガラス上に核がほとんどなかったためであった。

## f-ICM、p-ICM、p-FCMでのDIの相関について

腫瘍のDNA ploidyは、DIによって規定される。核DNA量解析における検体による違いと測定方法による違いをみるために、f-ICMとp-ICM、p-ICMとp-FCMでの、DIの相関関係を検討した(Fig. 2-5)。これらの間の相関係数は、それぞれ0.65、0.80であり、よい相関関係がみられた。しかし材料による違いをみたf-ICMとp-ICMの間の相関は、測定方法の違いをみたp-ICMとp-FCMの相関より、弱い傾向がみられた。さらに、いくつかの症例において、DIが大きく異なっており、その結果として、次に述べるようにDNA ploidyの評価に違いがみられた。

## 検体の違いによる不一致例の検討

f-ICMとp-ICMでの測定によるDNA ploidyの違いは、その測定された検体の違いに起因すると考えられる。測定方法はまったく同一であるが、一方は新鮮捺印標本で

あり、他方はパラフィン包埋標本から得られた細胞浮遊液のスメア標本である。検体内容は、細胞調整段階での人工的修飾、すなわち断片化、希釈、濃縮、喪失などの影響を受けるだけでなく、それらが得られた腫瘍の場所もまた、完全に同一ではない。

6例の f-ICM と p-ICM の不一致例の背景を Table 2-3 にまとめた。6例中3例が、f-ICM で diploidy, p-ICM で aneuploidy であり、残りの3例は逆に f-ICM で aneuploidy, p-ICM で diploidy であった。これら6例の不一致例は、組織学的には様々であり、組織型に明らかな傾向はみられなかった。

#### 測定方法の違いによる不一致例の検討

測定方法の違い、すなわち p-ICM と p-FCM での核DNA量解析不一致例も同様に Table 2-3 にまとめた。この2つの測定方法の測定対象はまったく同一の細胞液であり、その違いは測定方法だけである。p-ICM で細胞喪失のため解析不能となった1例を除く6例の不一致例は p-ICM で aneuploidy であった。この6例中3例は、p-FCM で diploidy であり、残る3例はヒストグラム上明らかなピークを認めず、解析不能であった。この解析不能の3例の細胞液中には、ヒストグラムを曖昧にしていると考えられるかなりの量の核断片を含んでいた。今回測定したうち、全ての測定不能症例は、組織学的に扁平上皮癌であり、その中に多量の壊死巣が存在していた (Fig 2-6) 。ICM の場合は、腫瘍細胞のみを視覚的選別することによって、これらの影響を除去することが可能であった。その結果として、明瞭なヒストグラム上のピークを描くことができ、DNA ploidy の決定が可能であった。

#### 細胞周期解析結果の比較

SPF と S+G2/M phase fraction は腫瘍の増殖能を表わすと考えられる。ここでは、diploidy 症例の SPF と S+G2/M phase fraction を p-ICM と p-FCM で測定した (Fig 2-7) 。2つの値はいずれも、p-ICM の方が有意に大きい傾向がみられた。

### 3) 臨床材料の核DNA量解析における問題点に関する考察

この比較で用いた ICM 「NASCA」の精度は、その CV 値が示すように、従来の FCM とほぼ同様に、高いことが示された。特に f-ICM での結果から、新鮮捺印標本では測定不能例がなく、CV 値も良好であった。また f-ICM, p-ICM, p-FCM の DI

が高い相関を示したこと、および CV 値がほぼ同様に低いことから、FCM<sup>45~47)</sup>と同様に ICM も retrospective study が可能であることも示された。

核 DNA 量解析における aneuploidy の検出率は、FCM の場合パラフィンブロックより新鮮標本のほうが高いとの報告<sup>45)</sup>があるが、ICM でも同様の傾向がみられることが今回の検討で明らかとなった。また、f-ICM と p-ICM との比較で 6 例の不一致例がみられた。両者の測定方法は同じではあるが、測定対象となった腫瘍において、捺印標本を作製した断面とパラフィン包埋標本を作製した部分とは、厳密には同一でなく、このことが不一致の原因となった可能性がある。最近の研究では、同一腫瘍の中にも DNA ploidy に違いがあることが示されており<sup>93)</sup>、肺癌においても高率に intratumoral heterogeneity があると報告されている<sup>94)</sup>。このように腫瘍の部位により diploidy や aneuploidy を示すこともあり、正確な DNA ploidy の判断には、同一の腫瘍から多数の部位を採取し検索する必要があると考えられる。

本節での p-ICM と p-FCM の比較によって、ICM ではその計測操作中に視覚的選択操作を行なうために、次の 2 点に関して ICM が FCM より優れていることが判明した。一つは、ICM では核断片や壊死物などの混入による影響の除去が可能であり、他の一つは、ICM では目的とする細胞を選択的に測定可能であることである。

一般に固形癌組織は壊死巣を含むことが多く、また、細胞処理中に核の崩壊が起こりやすい。従って、固形癌組織を材料に用いた場合は、FCM ではこれら壊死物や核崩壊物の混入を避けることは實際上極めて困難である。このことは、FCM の CV 値が ICM のそれよりも大きかった一つの要因と考えられる。今回 FCM において測定不可能な症例が、壊死を伴った角化型扁平上皮癌に多くみられたことも、上記のことを裏付けている。この点については常識的に考えられることであるが、今まで FCM の欠点として具体的には示されていなかった<sup>21, 48, 49)</sup>。ICM では、視覚的に測定対象を選択することが可能であり、また、一度条件を設定すれば、ほぼ自動的に対象とする核のみの測定が可能である。

固形癌組織のように多くの種類の細胞が試料の中に含まれている場合、FCM で測定すると、これらすべての細胞の総合したものが結果として示される。特に、diploidy の癌症例の際には、G0/G1 ピークの中には、通常、癌細胞以外に非癌細胞であるリンパ球等の滲出細胞や正常の上皮・非上皮細胞の測定値も含まれる (Fig. 2-



8) . したがって、このような材料を対象とした測定では、FCM の場合、腫瘍の増殖能の指標となる SPF あるいは S+G2/M phase fraction が実際の値より小さくなり、正確にその増殖能を評価することができない。また、癌細胞が非癌細胞に比して細胞数が極端に少ない試料を測定する場合においても、もし aneuploidy の癌細胞が含まれていても、DNA ploidy の判定が不可能となる。Elsheikh ら<sup>95)</sup> も、FCM で測定した結果が、正常の diploidy の細胞による影響を受けることを指摘している。また、同様の理由で、Frieson ら<sup>96)</sup> は、核DNA量のヒストグラムにて3個以上のピークが存在する multiploidy の場合、SPF は評価の対象とならないと強調した。その点、

「NASCA」による ICM では、画面上で測定する細胞の種類を限定できるので、本研究のように、癌症例毎に正確な DNA ploidy と SPF あるいは S+G2/M phase fraction の値を求めることが可能となった。

核DNA量解析でさらに重要な問題は、ヒストグラムの解釈方法に混乱がみられること<sup>15, 34)</sup> であり、特に盲目的測定を行なう FCM でこの傾向が強い。たとえば、ヒストグラム上、単一のピークが見られる際、FCM では少なくとも次の3つの解釈が成り立つ。

- (1) 腫瘍細胞を含まない正常 diploidy 細胞。
- (2) diploidy の腫瘍細胞と正常 diploidy 細胞。
- (3) diploidy あるいは aneuploidy の腫瘍細胞のみ。

さらに、一部の癌細胞以外の細胞にも aneuploidy がみられるとの報告<sup>17)</sup> もあり、非癌 aneuploidy 細胞と aneuploidy の癌細胞の混在の可能性もある。ICM の場合、細胞を見ながら選択的に測定するため、このような混乱は避けることができる。

「NASCA」を用いた ICM は、核DNA量解析において十分な精度と信頼性をもち、特に扁平上皮癌などの壊死細胞が多く相対的に腫瘍細胞が少ない症例や、diploidy 症例の細胞周期解析において、FCM より優れていることが示された。

## 第4節 小括

ICM システム「NASCA」の信頼性と利点を明らかにするために、肺癌培養細胞、正常気管支上皮細胞および肺癌切除検体を対象に核DNA量解析を行ない、従来から用いられている FCM と比較した。

1. 肺癌培養細胞の核DNA量解析を、FCM と ICM で比較した結果、ヒストグラム、細胞周期解析結果、CV値において、両者の差はほとんどみられなかった。また ICM の測定速度も、FCM で同様な精度で核DNA量解析を行なうのに要した時間とほぼ同等であった。
2. 正常気管支上皮細胞の5例について ICM で核DNA量解析を行なった結果、DI および SPF はすべて1.3未満、20%未満であった。本研究における DNA ploidy の定義は、 $\text{diploidy} < \text{DI} = 1.3$ ,  $\text{aneuploidy} \geq \text{DI} = 1.3$ とした。また、増殖能の評価の基準も SPF で20%をその境界値とした。
3. 「NASCA」を用いた ICM は、FCM と同様に、新鮮標本のみならずパラフィンブロックからの核DNA量解析が可能であった。
4. ICM は FCM に比較して、壊死傾向の強い扁平上皮癌で高頻度みられる核断片などを視覚的に除去し、測定に適した核のみを選択的に測定することが可能であった。
5. ICM は癌細胞と正常細胞を選択的に測定することが可能であり、その結果、FCM よりもヒストグラムの解釈を正確に行なうことが可能である。特にdiploidy 症例の細胞周期解析に優れていることが示された。

Table 2-1. Comparison of CV values and cell cycle distribution in TKB-31 cells measured by flow cytometry (FCM) and image cytometry (ICM)

	No. of measured cells	CV values (%)	Cell cycle (%)		
			G0/G1	S	G2/M
FCM	20,000	7.8	64.0	18.2	17.8
ICM	500	6.5	64.3	19.9	15.8

Table 2-2. A comparative DNA analysis by f-ICM, p-ICM, and p-FCM  
in 46 non-small cell lung cancers

	No of cases (%)		
	f-ICM	p-ICM	p-FCM
Diploidy	11(23.9%)	11(23.9%)	14(30.4%)
Aneuploidy	35(76.1%)	33(71.7%)	28(60.9%)
Impossible	0	2(4.4%)	4(8.7%)
Discordant	6(13.0%)		7(15.2%)

f-ICM, image cytometry of fresh cells

p-ICM, image cytometry of cells from paraffin embedded tissue

p-FCM, flow cytometry of cells from paraffin embedded tissue

Table 2-3. Background of ploidy discordant cases among f-ICM, p-ICM and p-FCM

case no.	f-ICM	p-ICM	p-FCM	case no.	f-ICM	p-ICM	p-FCM
1 (SQ)	D	A	A	7 (SQ)	A	A	D
2 (SQ)	D	A	A	8 (SQ)	A	A	D
3 (AD)	D	A	A	9 (AD)	A	A	D
4 (LCC)	A	D	D	10 (SQ)	A	A	I <sup>a)</sup>
5 (LCC)	A	D	D	11 (SQ)	A	A	I <sup>a)</sup>
6 (AD)	A	D	D	12 (SQ)	A	A	I <sup>a)</sup>
				13 (SQ)	D	I <sup>b)</sup>	D

case no. 1-6; discordant cases between f-ICM and p-ICM,  
7-13; discordant cases between p-ICM and p-FCM.

AD, adenocarcinoma; SQ, squamous cell carcinoma;

LCC, large cell carcinoma;

A, aneuploidy; D, diploidy; I, impossible.

a) Undetectable peak.

b) Loss of cells.

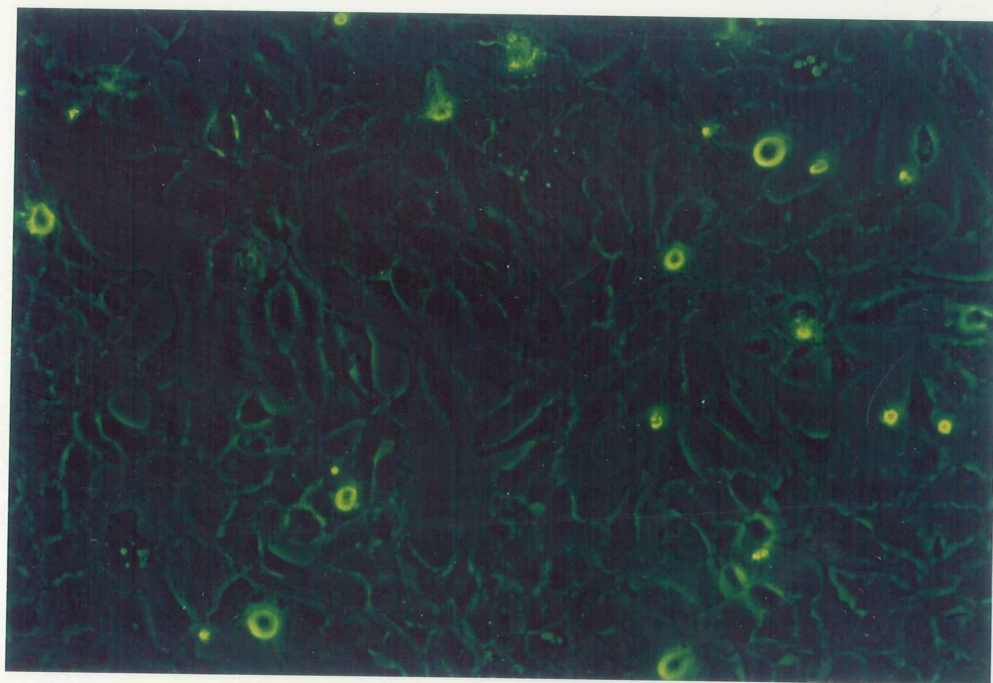


Figure 2-1. A microphotograph of TKB-31 cells used for DNA analysis.  
( $\times 200$ )

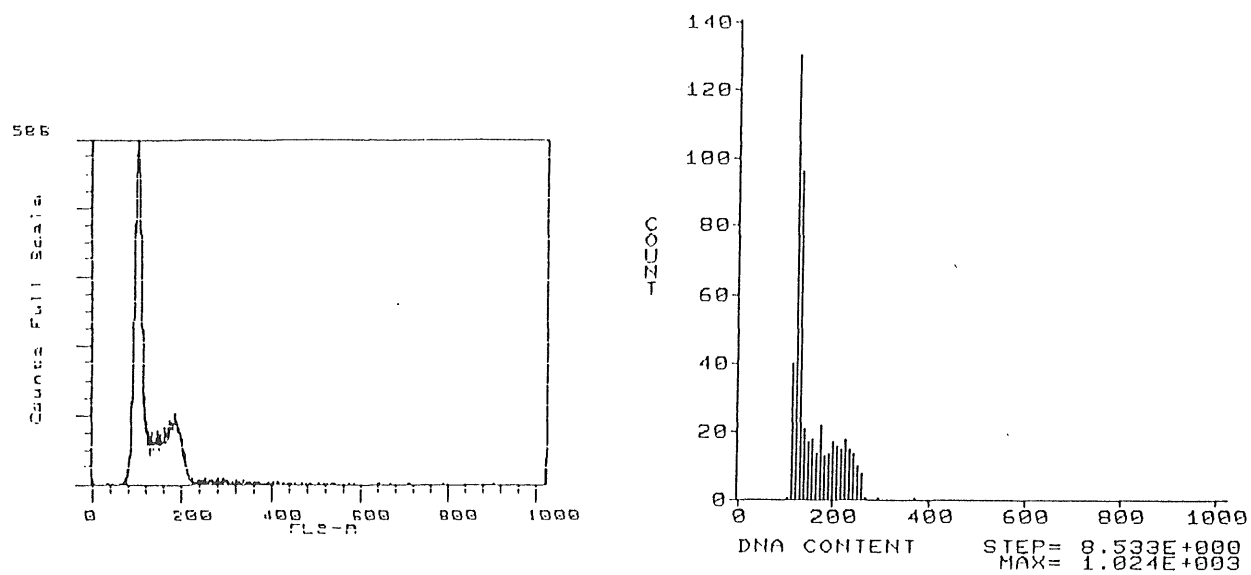
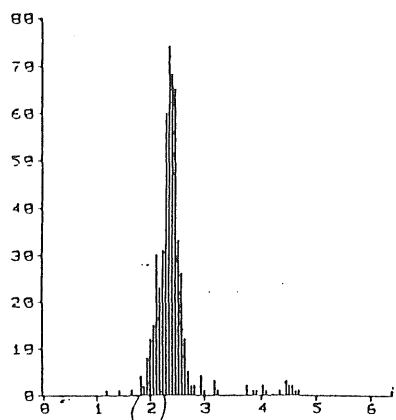
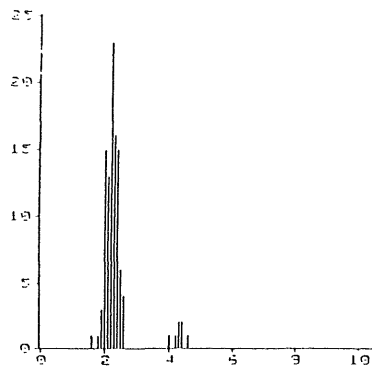


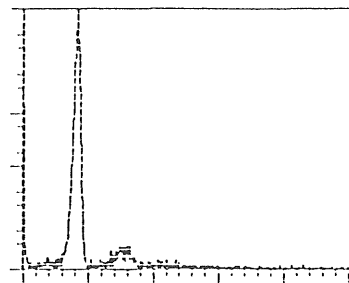
Figure 2-2. DNA histograms of TKB-31 cells by flow cytometry (left) and image cytometry (right).



f-ICM

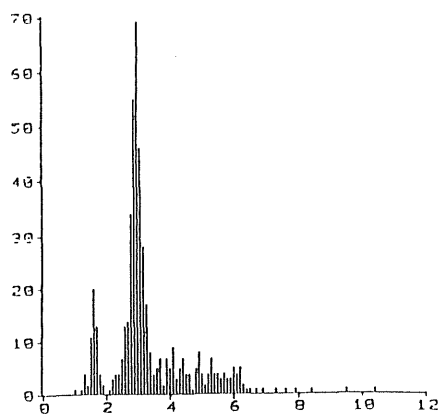


p-ICM

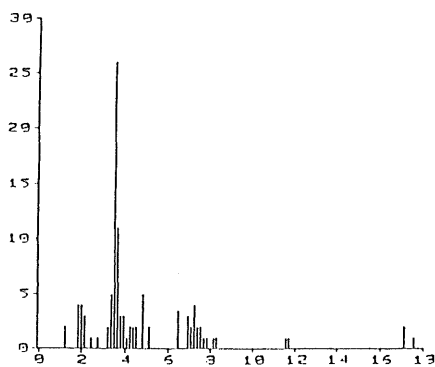


p-FCM

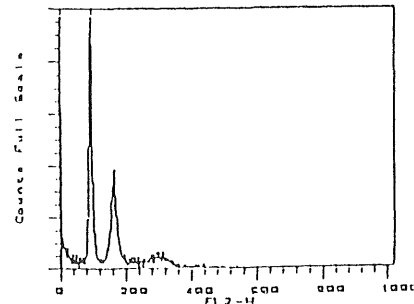
Diploidy case



f-ICM



p-ICM



p-FCM

Aneuploidy case

Figure 2-3. DNA histograms in a diploidy case and an aneuploidy case of lung cancer by f-ICM, p-ICM, and p-FCM.  
Diploidy case; carcinoid, 40 y.o., male.  
Aneuploidy case; squamous cell carcinoma, 72 y.o., male.



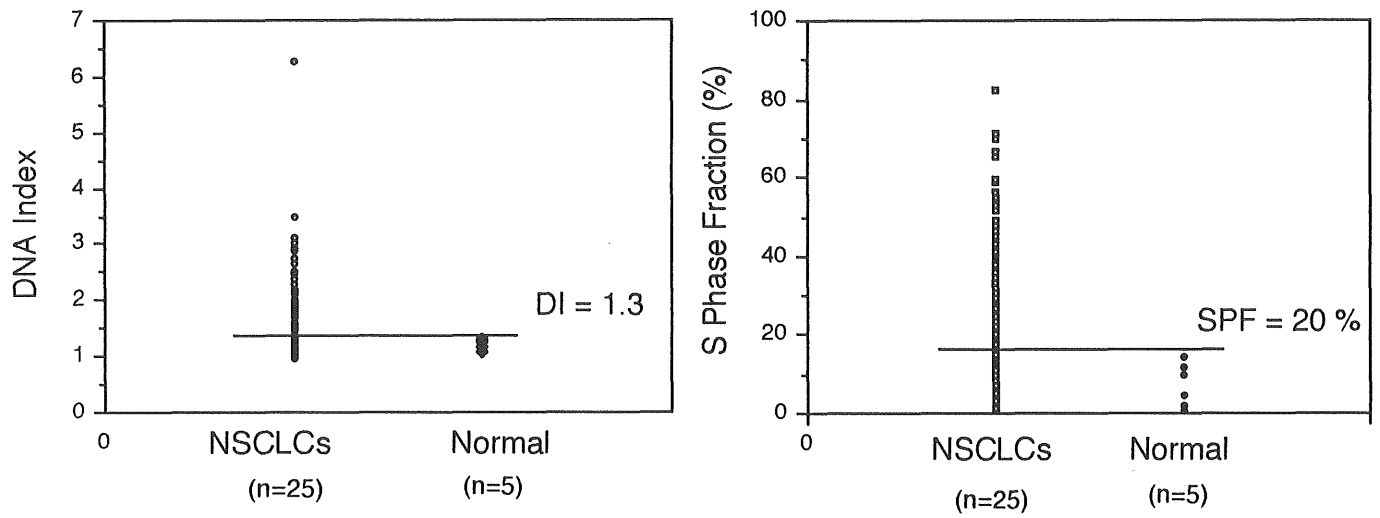


Figure 2-4 Comparison of DNA indices (DIs) and S phase fractions (SPFs) between normal bronchial epithelial cells and non-small cell lung cancer (NSCLC) cells.

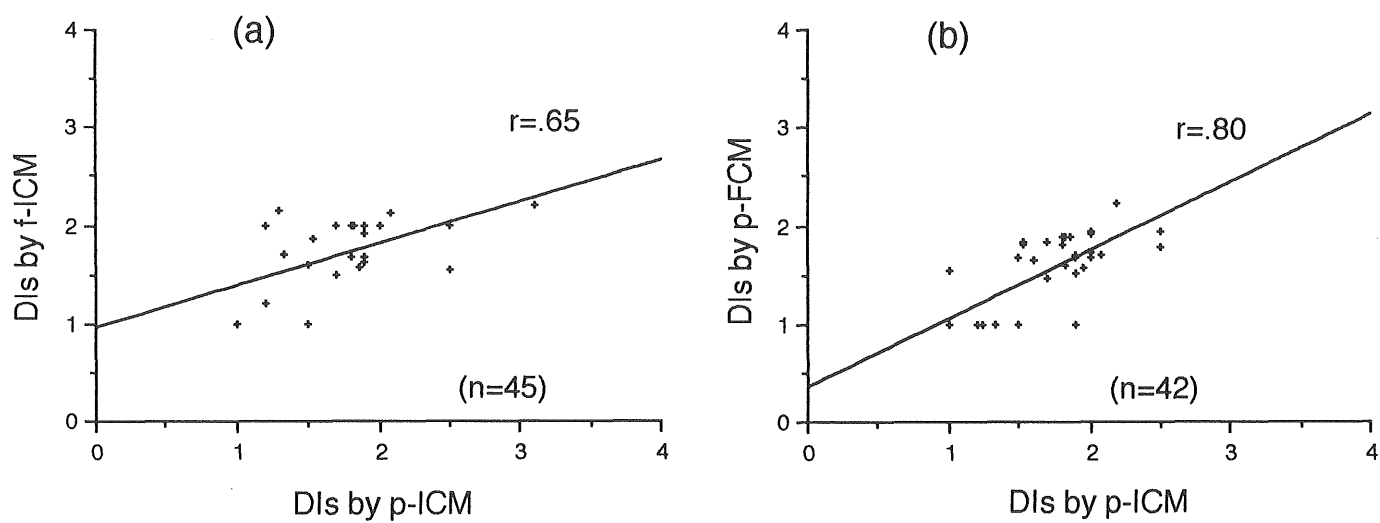


Figure 2-5 Correlation of DIs by f-ICM, p-ICM, and p-FCM in lung cancers.  
(a) f-ICM versus p-ICM, (b) p-ICM versus f-FCM.

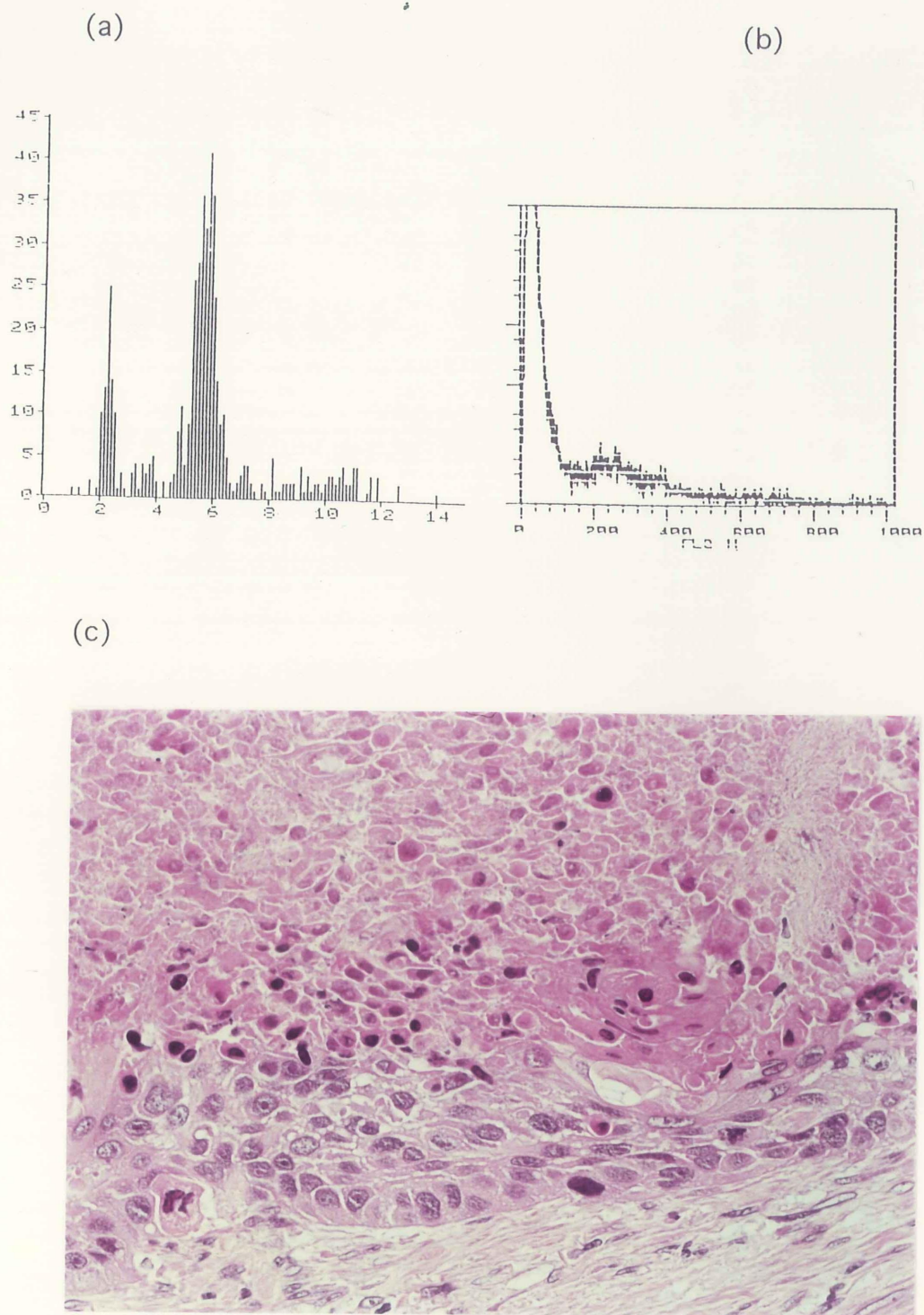


Figure 2-6 A sample of "Impossible Case in p-FCM".

(a) Aneuploidy pattern by p-ICM, (b) "Impossible" by p-FCM,  
 (c) A microphotograph of this case; squamous cell carcinoma,  
 70 y.o. male. ( $\times 400$ )

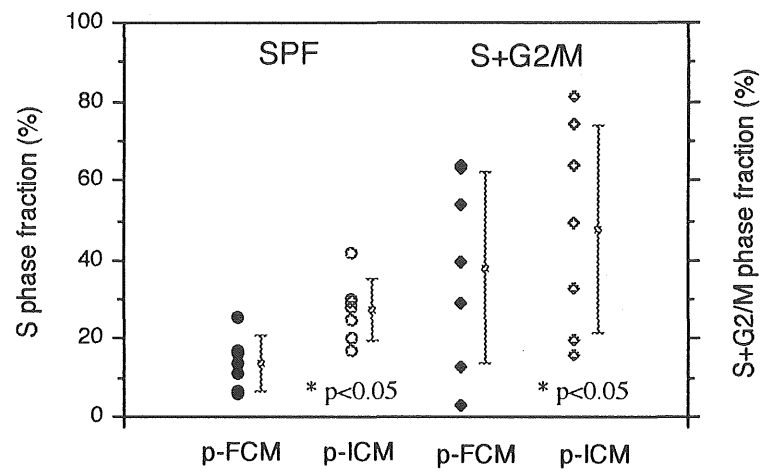


Figure 2-7. S phase fractions (SPFs) and S+G2/M phase fractions by p-ICM and p-FCM in diploid cases (n=6) of lung cancer.  
\*: Wilcoxon signed-ranks test

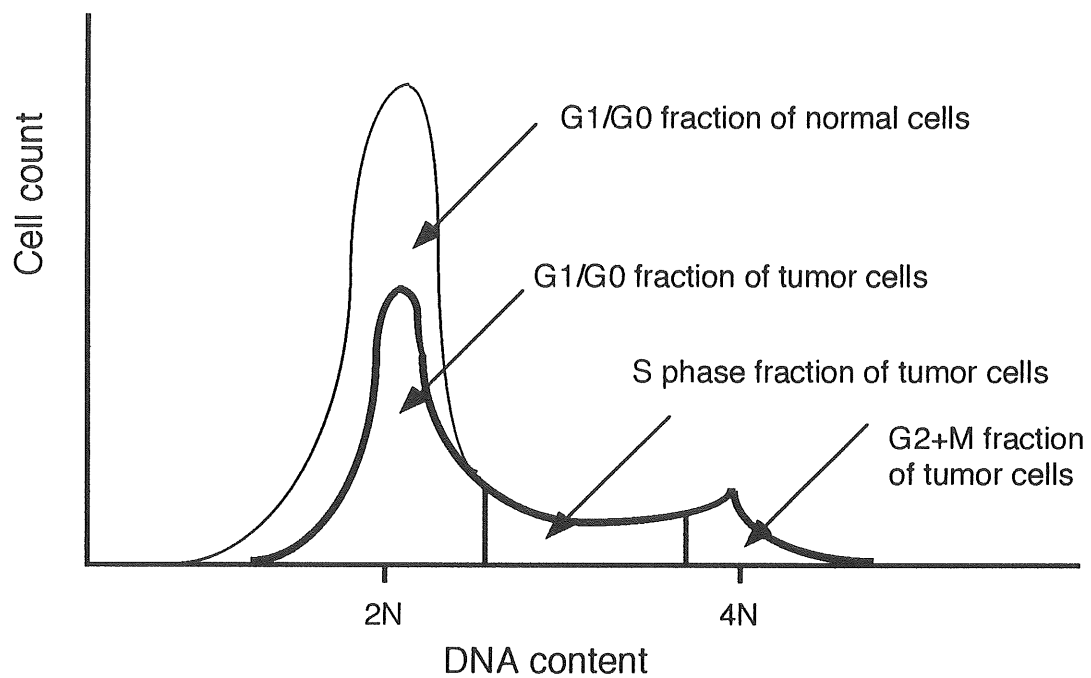


Figure 2-8. A schema of the diploid DNA histogram obtained by FCM. The first peak (G0/G1) includes normal and tumor cells. As a result, the fractions of S and S+G2/M phase of the tumor cells are calculated less than the true values.

### 第3章 肺癌における DNA ploidy および SPF と核異型の関連について

#### 第1節 序論

細胞の構造や形態は、その細胞の機能や状態を反映していると考えられている。正常細胞では、骨髓における赤血球<sup>74)</sup> や胸腺におけるリンパ球<sup>75)</sup> の分化に伴う核クロマチンパターンの変化などが検討されている。また、細胞周期によって核形態および核クロマチンパターンが変化することが、これまでの研究によって明らかにされている<sup>38, 76~81)</sup>。O'Keefe ら<sup>98)</sup> は、培養細胞においてS期での DNA 合成部位の変化を共焦点顕微鏡で観察し、G1期からG2期にいたる間に、合成部位が経時的に変化することを三次元的に示した。筆者もこの追試を行ない同様の結果を得ている (Fig. 3-1)。

正常細胞では、各分化段階での機能と形態は恒常的に維持されるが、癌細胞ではその恒常性が失われ、形態的には「異型」と呼ばれる状態が出現する。この癌の病理学的診断において重要な指標である異型の中で、最も重視されるのは核異型であり、多くの癌で悪性度の指標とされている<sup>8, 99)</sup>。核異型は、核の大きさおよびその大小不同、核形不整、クロマチンパターン、核小体数などによって表現される。しかし、これらの評価は病理医の検鏡経験によって大きく左右される<sup>58~60)</sup>。

核異型の定量化の意義は、従来までの病理医の経験にたよる癌診断をより客観化することにある。すでに1952年に Mellors らが顕微蛍光測光法を用いて試みているが、当時は画像処理技術が未熟であり、失敗に終わった<sup>41)</sup>。近年の画像処理技術の進歩によって、デジタル化した画像から自動的に形態計測ができるようになり、さまざまなアルゴリズムを用いて核異型の定量化が行なわれるようになった<sup>11, 64, 67, 71, 84, 100,</sup>

<sup>101)</sup>。核異型のうち、核面積、核周長、楕円率、核の短径、長径などの形態量は、計測が容易であるため、比較的多くの施設で施行されており<sup>66, 67, 69~71, 84, 101, 102)</sup>、癌と非癌細胞との鑑別診断<sup>66, 101, 102)</sup> に用いられったり、腫瘍の進展度・患者の予後<sup>69, 70)</sup>、治療効果の評価<sup>71)</sup> などの悪性度との相関が示されている。一方、核クロマチンパターンの定量化はまだ試験的段階にある。Pressman が提唱した「Markovian 解析」は、22

の数式によるクロマチンパターンの評価法であり<sup>61)</sup>，いくつかの施設で実際に核異型の定量化に用いられている<sup>62, 68)</sup>．しかしその数式は複雑多岐にわたり，実際の病理細胞診学で用いられるクロマチンパターンの表現，すなわち，微細あるいは粗顆粒状，核縁の肥厚・不整，クロマチン分布の不規則性などとの隔たりは大きい．また，Markovian解析法以外にも，gradient<sup>65)</sup>，エントロピー<sup>34, 61, 64)</sup>などの概念が，クロマチンパターンの定量化に導入されているが，それぞれ一長一短があり，その評価は確立されていない．

本研究を通して使用している ICM システム「NASCA」は，フォイルゲン染色された核のデジタル化カラー画像を一度コンピューターに記憶させることによって，核DNA量の解析だけでなく核面積とその標準偏差，核周長，およびこれらから算出される真円度の他，核の短径，長径，楕円率など，容易に核形態の計測を行うことが可能である<sup>51~53)</sup>．しかし，これらの形態量だけでは核異型を的確に捕らえることは不十分である．

今回，従来から「NASCA」に備わっている核DNA量解析機能と核形態量計測機能に加えて，より統合された細胞核の解析を実現するために，同一の画像を使用して，あらたにクロマチンパターンの定量化を試みた．この際，従来の数式からの応用ではなく，実際のクロマチンパターンの表現を生かすことを原則とした．さらに，これらの核形態量計測とクロマチンパターンの定量化の手法を用いて，肺癌細胞の核異型を評価し，DNA ploidy と SPF との関連について検討した．

## 第2節 核形態量およびクロマチンパターンの定量化

「NASCA」では、フォイルゲン染色された核のカラー画像を一度コンピューターに記憶させ、一画面あたり512×480個のピクセルのうち、測定対象となる核領域のピクセルのみを抽出し、核DNA量の測定を行っている。このデジタル化された核の画像情報から、核異型の定量化を行うことが本節の目的である。

### 1) 核形態量の計測

核異型の定量化において最も広く行われているものが、核面積、核周長、楕円率、核の短径、長径などの核形態量の計測である<sup>66, 67, 69~71, 84, 101, 102</sup>。核形態量としては、現在多くのパラメーターが用いられており、それぞれの臨床病理学的意義が検討されてきている<sup>66, 69~71, 101, 102</sup>。「NASCA」でも、核DNA量解析の際、コンピューターに取り込まれた核のカラー画像から、これらの多くを自動的に算出することが可能である。今回、「NASCA」を使用して核異型を定量化するにあたり、算出可能な多くのパラメーターのうち、癌細胞の核異型の中で最も重要な次の3つを核形態量として選択した。

核の大きさ：核面積の平均値

核の大小不同：核面積のばらつき（標準偏差）

核形の不整：form factor =  $4 \pi \times \text{核面積} / (\text{核周長})^2$

ここで、form factor とは、その値が1より小さいほど、その核が正確な円形から逸脱することを意味する<sup>69, 70</sup>。

### 2) クロマチンパターンの定量化

DNA とヒストン蛋白などからなるクロマチンは、古くから細胞分裂間期に核内に見られる塩基性色素に特異的に染色される顆粒状物質として知られていたが、1963年、Papanicolaou がこれまでの知見を集大成し、癌細胞診断におけるクロマチンの形



態の重要性を明らかにした<sup>103)</sup>。本邦でこのクロマチン形態を定義したものとしては、昭和44年度、厚生省がん研究助成金による「がん細胞の形態学的診断とその開発に関する研究」で公示されたものが知られている<sup>103)</sup>。これによると、クロマチン形態は「構造」「サイズ」「密度」「分布」「核縁」の5つの要素に分類され、それぞれ「網状・顆粒状・無構造」「細網状・粗網状・細顆粒状」「密・疎」「均等・不均等」「薄い・均等・不均等」と定義される。本研究では、従来の数式からの応用ではなく、実際に用いられている上記の如く定義されるクロマチン形態を忠実に表現することを前提にクロマチンパターンを定量化することに努めた。

クロマチンパターンは、濃淡に染色されるクロマチンの織り成すテクスチャークと考えられる<sup>63)</sup>。そこで、本研究では、まずクロマチンの凝集度を検索するために、フォイルゲン反応によって染色される濃度によって、核を濃染領域 (dark area)、中間領域 (intermediate area)、淡染領域 (light area) の3つの領域に分割した。分割する濃度域値を決定するために、フォイルゲン染色され「NASCA」に取り込まれた核の画像をピクセルの集合体とみなし、1ピクセル毎にその吸光度を求め、その分布をヒストグラム上に展開した (Fig. 3-2)。このうち、吸光度が最も大きい、すなわち濃度が最も高いピクセルの濃度を0、核全体の平均濃度を50と定義した。3つの領域の抽出域値を可変として実際の核の抽出を繰り返し、最も視覚的に忠実に分割できる域値を次のごとく決定した。

濃染点 (dark pixel) : 濃度 0 ~ 40

中間点 (intermediate pixel) : 濃度 40 ~ 50

淡染点 (light pixel) : 濃度 50 ~ 100

核内の濃染領域、中間領域、淡染領域は、それぞれ濃染点、中間点、淡染点の合計総数とした。また、核辺縁部 (nuclear margin) は、核面積に相当する円の半径を算出し、その1/4に相当するピクセル数を取り、核の外周からそのピクセル数の範囲に存在するピクセルの合計総数とした。また、少数のピクセルからなる非常に小さい粒子を除去し、パターンを強調するために、濃染領域、淡染領域それぞれに、次のアルゴリズムを用いて、「収縮」、「膨張」の画像処理を汎用画像解析装置 SPICCA を用いて行なった。

「収縮」 : 格子状に並ぶ各ピクセルに注目し、その縦横4方向の隣接するピク

セルのうち、一つでも中央のピクセルと濃度定義が異なる場合は、その中央のピクセルを除去する。

「膨張」：収縮後に残されたピクセルに対して、縦横4方向の粒子を再生し、再構成する。

この「収縮」・「膨張」の画像処理をした後の、濃染領域、淡染領域をそれぞれ、超濃染領域 (ultra-dark area) , 超淡染領域 (ultra-light area) とした。ここまでのフローチャートを Fig. 3-3 に示す。このようにして得られた「核面積」, 「核辺縁部の面積」, 「平均濃度」, 「濃染領域」, 「淡染領域」, 「超濃染領域」, 「超淡染領域」を用いてクロマチンパターンの定量化を次の如く、8項目にわたって行った。

核縁の肥厚 (thickening rate in nuclear margin : TNM) : 核辺縁部の平均濃度を核面積の平均濃度で除したもの。

核縁の凝集度 (condensed area rate in nuclear margin : CANM) : 核辺縁部の濃染領域を核面積の濃染領域で除したもの。

核縁の不均一性 (variation of concentration in nuclear margin : VCNM) : 核辺縁部の濃度分布の分散。

不均等分布 (unevenness of distribution) : 濃染領域と淡染領域の面積の和を、核面積で除したもの。

凝集度 (condensation) : 超濃染領域と超淡染領域の面積の和を、核面積で除したもの。

顆粒度 (granularity) : 超濃染領域と超淡染領域の面積の和を、濃染領域と淡染領域の面積の和で除したもの。

淡明度 (clearing) : 超淡染領域の面積を、核面積で除したもの。

集塊度 (clumping) : 超濃染領域の面積を、核面積で除したもの。

これら8項目のうち、「核縁の肥厚」「核縁の凝集度」「核縁の不均一性」の3項目は、核辺縁部に高濃度のクロマチンが不均一に集まるクロマチンの状態を表わしていると考えられる。また、「不均等分布」は核全体のクロマチンの状態を表わしている。たとえば、ピクセルの濃度分布が均等であれば、中間領域にピクセルが集中し、濃染領域と淡染領域の面積が小さくなり、その結果「不均等分布」の値も小さくなる。「凝集度」「顆粒度」「淡明度」「集塊度」の4項目も、「不均等分布」と同様に、

核全体のクロマチンの状態を表わしている。しかし、その算出の際、いずれも「収縮」「膨張」の画像処理を行うことによって非常に小さい粒子を除去するという操作を含んでおり、「不均等分布」よりもパターンを強調して捉えることが可能である。

ICM システム「NASCA」を用いて、核DNA量測定の際使用しているフォイルゲン染色された核のデジタル化カラー画像から、核異型の定量化を試みた。核形態量として、「核面積の平均値」、「核面積の標準偏差」、「form factor」の3項目を、クロマチンパターンとして、「核縁の肥厚」「核縁の凝集度」「核縁の不均一性」「不均等分布」「凝集度」「顆粒度」「淡明度」「集塊度」の8項目を設定した。

### 第3節 細胞周期の違いによる核形態の変化

一般に核の形態は、細胞周期に伴う核DNA量の変化や細胞の増殖、分化、あるいは癌化など様々な細胞の状態や変化を反映していると考えられている<sup>75)</sup>。細胞周期が進むにしたがって、核面積が増加することは1974年 Sawicki ら<sup>76)</sup>のマウス線維芽細胞での測定以来、いくつかの報告がある<sup>38, 76~81)</sup>。しかし、クロマチンパターンの変化についての検討は、細胞の増殖や分化<sup>74, 75)</sup>、あるいは薬剤の影響<sup>104)</sup>などとの関連で行なわれているが、細胞周期に着目した検討は少ない。

今回、前節であらたに作製した核形態の定量化法を用いて、固定および染色状態がよく、測定が容易な培養細胞を対象として、細胞周期の違いによる核形態の変化についての解析を行なった。

#### 1) 対象と方法

培養細胞にはマウス線維芽細胞株 NIH 3T3 細胞を用いた。細胞の調整およびフォイルゲン染色は、前章の方法に準じて行なった。計測には「NASCA」を用い、512個の培養細胞について、核DNA量、核形態量（核面積、核面積の標準偏差、form factor）、およびクロマチンパターン（核縁の肥厚、核縁の凝集度、核縁の不均一性、不均等分布、凝集度、顆粒度、淡明度、集塊度）を測定した。

測定値は平均±標準偏差で表わし、統計学的処理は、3群の平均値の差の検定として、Kruskal-Wallis test を用いた。 $p < 0.05$ をもって有意差ありとした。

#### 2) 結果

核DNA量を測定して得られたDNAヒストグラムから細胞周期解析を行ない、512個のNIH 3T3 細胞をそれぞれの周期によって分類した。その結果、G0/G1期377個、S期85個、G2/M期50個となった。この3群について、核形態量、クロマチンパターンのそれぞれの測定値を比較した。

### 核形態量と細胞周期との関係

細胞周期別に核形態量の測定結果を比較した (Fig. 3-4) . 核DNA量の合成が行なわれ、細胞周期が進むにしたがって核面積は増加する傾向が認められた ( $p < 0.01$ ) . 一方、核の大小不同を示すと考えられる核面積の標準偏差および核形不整を示す form factor と細胞周期との間には、相関関係はみられなかった.

### 核クロマチンパターンと細胞周期の関係

同様に、細胞周期別のクロマチンパターンの測定結果を Table 3-1 に示した. いずれの測定項目においても、各細胞周期内でのクロマチンパターンを示す測定値の偏差が大きく有意差はみられなかった.

## 3) 細胞周期と核形態との関連に関する考察

NIH 3T3 細胞核の核DNA量、核形態量、クロマチンパターンを、「NASCA」を用い同時に測定した. 今までの報告例では、細胞周期による細胞形態の変化は、同調培養やフローサイトメーターのセルソーターを用いて解析されてきた<sup>98)</sup>. しかし同調培養の場合、個々の細胞周期の細胞のみを選別するのは困難である. またフローサイトメーターでの細胞選別は、試料の調整などを考えると、その応用範囲は限られている. これに対して、今回使用したシステムでは、個々の細胞の核DNA量を測定することによって、個々の細胞の細胞周期を特定できるのと同時に、核形態量とクロマチンパターンをも同時に測定することが可能であった.

今回の測定結果では、細胞周期を進むにしたがって核面積が増加していた. これは、Sawicki ら<sup>76)</sup> の測定結果と一致している. 今回の検討では、細胞周期が核DNA量によって定義されており、細胞周期が進むことは、すなわち核DNA量が増加していることと同義である. 従って、細胞周期が進むにしたがって核面積が増加したという結果は、以前から指摘されている、核DNA量と核面積に相関関係があるという事実<sup>79, 84, 102)</sup> に矛盾しない. 一方、今回の計測では、核面積の標準偏差すなわち核の大小不同は、細胞周期によって変化しなかった. もし、核面積と核DNA量に比例関係があるとすれば、核DNA量が徐々に増加するS期では核面積もそれに応じて増加するため、大小不同が著しくなるはずである. この矛盾は、以下のように解釈できる. 理論的にはG0/G1

期とG2/M期は、それぞれ2Cあるいは4Cにあるべきである。しかし、核DNA量ヒストグラム上での細胞周期解析では、核DNA量の測定時の誤差を考慮に入れて、G0/G1期とG2/M期にある程度の幅をもたせているため、G0/G1期あるいはG2/M期の細胞の核DNA量にも違いがでてくる。従って、G0/G1期あるいはG2/M期の細胞でもS期と同様に核面積も変化し、大小不同がみられると考えられる。

一方、核クロマチンパターンの細胞周期に伴う変化についての検討結果では、各細胞周期内でのクロマチンパターンの測定値のばらつきが大きく、今回用いたパラメーターでは有意な違いはみられなかった。フォイルゲン染色された核を実際に観察すると、分裂期、あるいは分裂前期のクロマチンは、染色体形成あるいは著明なクロマチンの凝集が認められる。しかし、それ以外の分裂間期の細胞のクロマチンパターンは、非常に多様性に富んでいるため、ある一定の表現すらできない。

O'keefe ら<sup>98)</sup> は、DNA 合成部位は細胞周期によって一定のパターンがあることを示したが、DNA 複製自体と可視のクロマチンの状態との関係は今だ明らかにされていない。一般に、クロマチンパターンは、活動性クロマチン（ユークロマチン）と非活動性クロマチン（ヘテロクロマチン）の分布の違いからくるとされている<sup>105)</sup>。また、Traganos と Newmann らは核構築を決定する因子として、あらたに合成されるヒストン蛋白やその他の核内蛋白の合成の関与を示唆している<sup>72,73)</sup>。細胞周期上のクロマチンの変化を定量的に捉えるには、細胞周期に関連した fos, myc, jun などの遺伝子や<sup>106)</sup>、ヒストンなどの核内蛋白の変化<sup>83)</sup> の解明を含めた詳細な検討が必要と考えられる。

## 第4節 気管支上皮および肺癌細胞における核異型の定量化

核異型の定量化による客観化に関しては、画像解析を応用して現在様々な方法が試みられている<sup>66, 67, 69~71, 84, 101, 102</sup>。しかし、このうちクロマチンパターンの定量化に関しての報告は著しく少ない。現在わが国ではクロマチンパターンの定量的解析はほとんど行われていない。また、いままでの報告は、数学的なクロマチンテクスチャーの表現に留まり、その意味するところが、実際の光学顕微鏡で見られるクロマチンパターンと比較対照できないものが多い<sup>60, 66</sup>。今回考案した定量化の方法は、従来の数式からの応用ではなく、実際のクロマチンパターンの表現を生かしたものである。

前節で培養細胞について試みた、核形態量の計測とクロマチンパターンによる核異型の定量化を、臨床材料である気管支上皮細胞と肺癌細胞に対して行い、癌・非癌の鑑別に関する有用性を検討することを本節の目的とした。

### 1) 対象と方法

対象としては、非癌細胞として気管支上皮細胞を含む擦過細胞診標本5例を、癌細胞として切除肺癌の新鮮捺印標本36例を用いた。切除肺癌の内訳は、腺癌18例、扁平上皮癌14例、大細胞癌2例、カルチノイド2例であった。これらの、フォイルゲン染色および「NASCA」を用いた核形態量（平均核面積、核面積の標準偏差、form factor）、およびクロマチンパターン（核縁の肥厚、核縁の凝集度、核縁の不均一性、不均等分布、凝集度、顆粒度、淡明度、集塊度）の測定は、第2章および前節に準じて行った。

測定値は平均±標準偏差で表わし、統計処理には、ノンパラメトリックテストのMann-Whitney U test を用いた。  $p < 0.05$ をもって有意差ありとした。

### 2) 結果

#### 気管支上皮細胞および肺癌細胞の核形態量の測定結果

気管支上皮細胞からなる非癌症例5例と肺癌症例36例の核形態量の測定結果を Fig. 3-5に示す。非癌症例の平均核面積、核面積の標準偏差値、および form factor は、それぞれ $55.4 \pm 6.20$ 、 $11.0 \pm 1.35$ 、 $0.886 \pm 0.017$ であり、一方癌細胞はそれぞれ、 $80.5 \pm 5.12$ 、 $30.5 \pm 3.05$ 、 $0.835 \pm 0.04$ であった。これらはすべて有意差があり、癌細胞は正常細胞より、核は大きく、大小不同がみられ、核形不整があるという、一般の細胞診所見と一致する結果が得られた。

#### 気管支上皮細胞および肺癌細胞のクロマチンパターンの測定結果

同様に、非癌症例5例と肺癌症例36例のクロマチンパターンの測定結果をTable 3-2に示す。測定したクロマチンパターンの8個のパラメーターのうち、核縁の肥厚、核縁の凝集度、凝集度、顆粒度、淡明度の5個において、非癌症例と肺癌症例の間に有意差が認められた。

また、比較的症例数が多い扁平上皮癌と腺癌において、核形態量とクロマチンパターンの比較を行ったが、有意差は認められなかった。

### 3) 非癌細胞と癌細胞の核異型の定量解析に関する考察

今回、核異型の定量化に用いたパラメーターは、いずれも実際の核異型に対応したものであるが、このうち、核形態量では、平均核面積、核面積の標準偏差値、および form factor で、クロマチンパターンでは、測定した8個のパラメーターのうち、核縁の肥厚、核縁の凝集度、凝集度、顆粒度、淡明度の5個において、非癌症例と肺癌症例の間に有意差が認められた。この結果、今回考案した核異型の客観化の方法は妥当であると考えられた。

クロマチンパターンで非癌と肺癌の間に有意差が認められなかった3つのパラメーターのうち、核縁の不均一性、不均等分布の2つは、「収縮」「膨張」の画像処理を行っていない情報から算出されたものである。また、不均等分布と凝集度の違いは、「収縮」「膨張」の画像処理の有無だけであるにもかかわらず、その p value は、それぞれ  $p=0.057$ 、 $p=0.005$  と、癌・非癌の鑑別の有用性に違いがみられた。このことは、クロマチンパターンの定量化を行う上で、「収縮」「膨張」の画像処理を行うことが重要であること、すなわち、クロマチンの凝集の大きさが重要であることを示



唆している。

一方、従来のパパニコロー染色での細胞診では、癌・非癌を鑑別するのみならず、癌の組織型、すなわち肺癌では扁平上皮癌、腺癌などの鑑別が多くの場合可能である<sup>8)</sup>。しかし、今回の核異型測定では、従来の細胞診では可能であった組織型の鑑別はできなかった。その原因として、測定時に特に扁平上皮癌の角化細胞などの核濃縮が著しいものは、核の厚みがあり、焦点深度が深いため、測定誤差が大きく、対象外としたことが上げられる。細胞診では、扁平上皮癌を診断する際、重要な所見として細胞の角化、変性壊死に伴う核の濃縮、断片化などがある。また、細胞診の所見で重要な、細胞質の所見、細胞の配列などが、この測定では評価できないことも、組織型鑑別ができなかった原因の一つと考えられる。

今回の測定対象は、アルコール固定された塗抹細胞診検体である。一方、組織標本はホルマリンで固定されることが一般的である。両者は、蛋白質に対する凝固作用が異なり、その結果、同じヘマトキシリンで核染色をしても、その核所見は異なることが知られている<sup>103)</sup>。さらに今回使用した標本はすべてフォイルゲン染色であり、その染色性は病理細胞診断で一般に用いられるヘマトキシリンとは全く異なる。したがって、フォイルゲン染色された核では、そのクロマチンの分布、パターン、さらには従来の細胞診で用いられる用語についても、そのままフォイルゲン染色された核に応用することはできないと考えられる。Christen らのグループ<sup>107)</sup> は、カラー画像の RGB 3 成分のうち、R 成分を取りだし、通常の HE 染色された組織標本を対象にクロマチンパターンの定量化を試み、前立腺病変の鑑別に有用であったと報告している。フォイルゲン染色は核 DNA 量の測定が可能であり、その有用性は大きいですが、汎用性を考慮すると、ヘマトキシリン染色での定量化も十分将来性があると考えられる。

以上、核形態量の計測とクロマチンパターンによる核異型の定量化を、臨床材料である気管支上皮細胞と肺癌細胞に対して行い、癌・非癌の鑑別に関する有用性を検討した結果、核形態量では、平均核面積、核面積の標準偏差値、form factor、クロマチンパターンでは、核縁の肥厚、核縁の凝集度、凝集度、顆粒度、淡明度において、非癌症例と肺癌症例の間に有意差が認められた。この結果、今回考案した核異型の客観化の方法は妥当であると考えられた。

## 第5節 肺癌における DNA ploidy および SPF と核異型の関連について

DNAサイトメトリーの研究によって、癌細胞の核DNA量の異常 (aneuploidy) と細胞増殖能 (S phase fraction) の亢進が、癌の診断および生物学的悪性度を決定する重要な因子であることが明らかになった<sup>20, 24~26)</sup>。また、最近のイメージサイトメトリーの進歩によって、従来からの病理診断に用いられている核異型が定量的に測定可能となり、これらの臨床病理学的意義も、肺癌<sup>67, 69)</sup>、乳癌<sup>60)</sup>、肝癌<sup>102)</sup>、皮膚腫瘍<sup>101)</sup>、小児腫瘍<sup>71)</sup> など多くの悪性腫瘍で検討されている。しかし、癌細胞における DNA ploidy および細胞増殖能 SPF と、クロマチンパターンを含めた核異型との関係はいまだ明らかではない。

前節では、「NASCA」をもちいて核形態量とクロマチンパターンの定量化を試み、肺癌細胞と気管支上皮細胞の違いを定量的に評価しえた。ここでは、肺癌において癌の予後因子として重要とされる DNA ploidy および SPF と、経験的に病理学分野で悪性度の指標とされている核形態量およびクロマチンパターンとの関連を明らかにすることを目的とした。

### 1) 対象と方法

対象は、前節で核異型を測定した切除肺癌症例36例であり、核形態量 (平均核面積、核面積の標準偏差, form factor)、クロマチンパターン (核縁の肥厚、核縁の凝集度、核縁の不均一性、不均等分布、凝集度、顆粒度、淡明度、集塊度) に関しては前節の値をそのまま用い、DNA ploidy および SPF に関しては、「NASCA」を用いてあらたに核DNA量解析を行った。その方法および評価は第2章に準じて行なった。すなわち DNA ploidy の定義は、 $\text{diploidy} < \text{DI} = 1.3$ ,  $\text{aneuploidy} \geq \text{DI} = 1.3$  とした。増殖能の評価の基準については、 $\text{SPF} < 20\%$  を増殖能の亢進なし、 $\text{SPF} \geq 20\%$  を亢進ありとした。また、対照として非癌症例5例の測定結果も検討対象に加えた。

測定値は平均±標準偏差で表わし、統計処理には、ノンパラメトリックテストの Mann-Whitney U test を用いた。 $p < 0.05$  をもって有意差ありとした。

## 2) 結果

非癌症例 5 例と、肺癌症例 36 例の DNA ploidy および SPF と、核形態量（平均核面積、核面積の標準偏差、form factor）およびクロマチンパターン（核縁の肥厚、核縁の凝集度、核縁の不均一性、不均等分布、凝集度、顆粒度、淡明度、集塊度）の関連について検討した。まず、核 DNA 量解析の結果から、肺癌症例 36 例は、DNA ploidy の違いによって、diploidy 群 11 例、aneuploidy 群 25 例に分類され、また、増殖能の違いによって、SPF < 20% 群が 16 例、SPF ≥ 20% 群が 20 例と分類された。

### DNA ploidy および SPF と核形態量の関連について

DNA ploidy と増殖能の違いによって、分類された 2 群に関して、それぞれの核形態量（平均核面積、核面積の標準偏差、form factor）の値を比較した（Fig. 3-6）。その結果、aneuploidy 群は diploidy 群に比較して、3 つの核形態量すべてにおいて、有意に異型度が高い傾向がみられた。すなわち、aneuploidy 群の肺癌細胞は、diploidy 群の癌細胞に比較して、核が大きく、大小不同がみられ、核形が不整であった。これに対して、SPF < 20% 群と SPF ≥ 20% 群との間には、核形態量に有意な差を認めなかった。

非癌症例との比較では、diploidy 群で form factor 以外の形態量は、非癌症例との間に有意差を認めなかった。しかしその他の群ではいずれも、非癌症例との間に有意差を認めた。

### DNA ploidy および SPF とクロマチンパターンの関連について

同様に、クロマチンパターン（核縁の肥厚、核縁の凝集度、核縁の不均一性、不均等分布、凝集度、顆粒度、淡明度、集塊度）の値を、diploidy 群と aneuploidy 群、および SPF < 20% 群と SPF ≥ 20% 群に関して、比較した（Table 3-3）。また、それぞれの群間の検定を行い、その p 値を Table 3-4 にまとめた。その結果、aneuploidy 群と diploidy 群の間では、凝集度、顆粒度、淡明度の 3 つのクロマチンパターンにおいて、有意差が認められた。これに対して、SPF < 20% 群と SPF ≥ 20% 群との間には、すべてのクロマチンパターンに、有意な差を認めなかった。

非癌症例との比較では、diploidy 群は、すべてのクロマチンパターンにおいて、非

癌症例との間に有意差を認めなかった。その他の3群と非癌症例との間には、5個から6個のクロマチンパターンに有意差を認めた。

### 3) DNA ploidy および SPF と核異型との関連に関する考察

非癌症例と、肺癌症例のDNA ploidyおよびSPFと、核形態量およびクロマチンパターンとの関連について検討した。DNA ploidy と核形態量との関連について、すでにWang ら<sup>108)</sup> は、aneuploid tumor は、核面積とその偏差、およびform factor がdiploid tumor に比較して大きいと報告している。しかし、クロマチンパターンを含めた検討や、核異型と増殖能との関連を検討した報告はない。

今回の測定結果では、形態量とクロマチンパターンともに、DNA ploidy の違いが影響しており、SPFの増減は関係していなかった。すなわち、核DNA量の異常を示すaneuploidy の癌細胞は、diploidy の癌細胞と比較して、より高度の核の形態異常を伴うが、増殖が盛んな癌細胞とそうでない癌細胞との間には、核異型に違いがみられなかった。この結果は次の問題点を提起している。すなわち、増殖能が高い癌では、核DNA量が2Cより大きいS期あるいはS+G2/M期の細胞が多いにもかかわらず、増殖能の低い癌の細胞の核異型との間に差がないという矛盾が生じた。一般に、細胞周期によって核の形態量が変化することは、すでにいくつかの報告がある<sup>38, 76~81)</sup>。しかし、既に第3節で培養細胞における結果を示したとおり、細胞周期の違いに基づく核異型の評価では、核形態量やクロマチンパターンの違いは明らかとはならず、やはり核DNA量の違いがその核形態に大きく影響を与えることを示すと考えられる。

今回定量化した核異型の指標は、前節で示した如く、その多くが非癌細胞と癌細胞とで違いがみられ、優れた指標であると考えられる。しかし、明らかに細胞診学的に癌細胞と診断できるのにもかかわらず、diploidyの癌細胞の核異型と、非癌細胞の気管支上皮細胞との違いを、明らかにすることができなかった。サイトメトリの最終ゴールは、癌細胞の自動診断にある<sup>63, 68)</sup>。しかし、これらの核DNA量の異常を伴わず核異型の軽度な癌細胞の診断は、この目標を達成するうえで、大きな課題である。

いくつかの施設で、前癌病変のクロマチンパターンの検討を行ない、非癌病変との鑑別が可能であったとしている<sup>60, 62, 63, 65)</sup>。しかし、これらの報告では、核DNA量の

測定を行なっておらず，その前癌病変の評価は形態的なものにとどまっている．これから前癌病変の細胞で，すでに認識可能な核異型をもたらす遺伝子異常を含めた核DNA量の変化があった可能性がある．

いくつかのグループは，個々のパラメーターは有意差のないものを対象に，多変量解析を用いて個々に重み付けを行ない，診断率の向上を試みている<sup>22, 60, 109)</sup>．Dawsonら<sup>21)</sup>は，乳癌を対象に，7つの核異型のパラメーターを計測し，新しいコンピューターテクノロジー「Neural Network」を用いた診断システムによって，70%の正診率を低悪性度病変で得ている．この「Neural Network」は，従来の多変量解析などと比較して，直観的思考や経験的思考といった，より人間に近い判断が可能であり，癌細胞と非癌細胞の違いは大きくない個々の因子を，総合的に出力できる可能性を秘めており<sup>11)</sup>，注目される．しかし現時点では，その個々の測定方法および入力項目は様々であり<sup>35)</sup>，自動診断の正診率の向上を図るためには，それらの入力項目の選択吟味をさらに検討する必要があると考えられる．

## 第6節 小括

肺癌における，DNA ploidy および SPF と癌細胞の核異型との関連を検討した．まず，培養細胞を対象に，あらたにクロマチンパターンの定量化の方法を考案し，細胞周期との関係を検討した．さらに，臨床材料から得た気管支上皮細胞と肺癌細胞の核形態量およびクロマチンパターンの定量化を行い，その結果と核DNA量解析結果から，DNA ploidy および SPF と癌細胞の核異型との関連を検討した．その結論は以下の通りである．

1. 実際の核異型と対応したクロマチンパターンの定量化法をあらたに考案し得た．
2. マウス線維芽細胞の核面積は細胞周期の進行に従って増加したが，核の大小不同性，核形の不整，およびクロマチンパターンに細胞周期毎の変化はみられなかった．
3. 気管支上皮細胞と肺癌細胞との間においては，測定したすべての核形態量，すなわち核面積，大小不同性，核形不整に有意な差がみられた．また，クロマチンパターンに関しても，検討した8個のパラメーターのうち，核縁の肥厚，核縁の凝集度，凝集度，顆粒度，淡明度において有意差が認められた．
4. 非癌症例と，肺癌症例のDNA ploidy およびSPFと，核形態量およびクロマチンパターンの関連について検討した結果，形態量とクロマチンパターンともに，DNA ploidy の違いが影響しており，SPFの増減は関係していなかった．すなわち，核DNA量の異常を示すaneuploidy の癌細胞は，diploidy の癌細胞と比較して，より高度の核の形態異常を伴うが，増殖が盛んな癌細胞とそうでない癌細胞との間には，核異型に違いがみられなかった．

Table 3-1. Chromatin patterns during cell cycle in NIH 3T3 cells

	Phase of cell cycle		
	G0/G1 (n=377)	S (n=85)	G2/M (n=50)
TNM	1.016±0.009	1.019±0.013	1.024±0.012
CANM	0.106±0.088	0.148±0.128	0.110±0.070
VCNM	0.059±0.011	0.060±0.014	0.058±0.011
Unevenness	0.986±0.013	0.986±0.013	0.982±0.011
Condensation	0.445±0.124	0.462±0.201	0.464±0.159
Granularity	0.510±0.294	0.504±0.196	0.518±0.227
Clearing	0.885±0.106	0.828±0.209	0.809±0.167
Clumping	0.101±0.093	0.158±0.197	0.173±0.157

Not significant: Kruskal-Wallis test

TNM: thickening rate of nuclear margin

CANM: condensed area rate in nuclear margin

VCNM: variation of condensation in nuclear margin

Table 3-2. Mean  $\pm$  SD of chromatin patterns in normal bronchial epithelial cells and lung cancer cells

	Normal (n=5)	Lung cancer (n=36)	p value *
TNM	0.982 $\pm$ 0.011	1.014 $\pm$ 0.015	0.0017
CANM	0.581 $\pm$ 0.100	0.293 $\pm$ 0.120	0.003
VCNM	0.127 $\pm$ 0.003	0.119 $\pm$ 0.020	0.1372
Unevenness	0.794 $\pm$ 0.009	0.784 $\pm$ 0.009	0.0575
Condensation	0.513 $\pm$ 0.017	0.607 $\pm$ 0.062	0.005
Granularity	0.642 $\pm$ 0.025	0.768 $\pm$ 0.075	0.0039
Clearing	0.386 $\pm$ 0.036	0.445 $\pm$ 0.055	0.0105
Clumping	0.127 $\pm$ 0.021	0.161 $\pm$ 0.036	0.0575

\*; Mann-Whitney test

TNM: thickening rate of nuclear margin

CANM: condensed area rate in nuclear margin

VCNM: variation of condensation in nuclear margin



Table 3-3. Correlation of chromatin patterns to DNA ploidy and SPF  
in normal bronchial epithelial cells and lung cancer cells

	Normal	Lung Cancer			
		Diploidy	Aneuploidy	SPF < 20%	SPF ≥ 20%
	(n=5)	(n=11)	(n=25)	(n=16)	(n=20)
TNM	0.982±0.011	1.023±0.007	1.014±0.017	1.014±0.015	1.015±0.015
CANM	0.581±0.100	0.257±0.065	0.300±0.137	0.257±0.135	0.304±0.118
VCNM	0.127±0.003	0.152±0.041	0.113±0.013	0.117±0.009	0.120±0.023
Unevenness	0.794±0.009	0.787±0.009	0.784±0.011	0.779±0.003	0.7853±0.010
Condensation	0.513±0.017	0.506±0.062	0.624±0.053	0.597±0.039	0.610±0.069
Granularity	0.642±0.025	0.637±0.025	0.790±0.060	0.759±0.051	0.771±0.084
Clearing	0.386±0.036	0.332±0.071	0.461±0.033	0.445±0.049	0.445±0.059
Clumping	0.127±0.021	0.173±0.009	0.163±0.043	0.152±0.042	0.165±0.036

TNM: thickening rate of nuclear margin

CANM: condensed area rate in nuclear margin

VCNM: variation of condensation in nuclear margin

Table 3-4. p values by Mann-Whitney test on bronchial epithelial cells and lung cancer cells in quantitative cytology

	N vs D	N vs A	N vs SPF1	N vs SPF2	D vs A	SPF1 vs SPF2
TNM	0.0528	0.0022	0.0275	0.0022	0.2664	0.9035
CANM	0.0528	0.0041	0.0275	0.0044	0.8738	0.3960
VCNM	1.0000	0.0956	0.0864	0.2463	0.1123	0.8084
Unevenness	0.4386	0.0519	0.0143	0.1706	0.6338	0.3930
Condensation	1.0000	0.0016	0.0143	0.0114	0.0390	0.6276
Granularity	1.0000	0.0012	0.0143	0.0084	0.0390	0.8084
Clearing	0.4386	0.0022	0.0500	0.0153	0.0262	1.0000
Clumping	0.0528	0.0956	0.2207	0.0578	0.7508	0.7160

N: Normal, M: Malignant, D: Diploidy, A: Aneuploidy,  
 SPF1:  $\text{SPF} < 20\%$ , SPF2:  $\text{SPF} \geq 20\%$

TNM: thickening rate of nuclear margin

CANM: condensed area rate in nuclear margin

VCNM: variation of condensation in nuclear margin

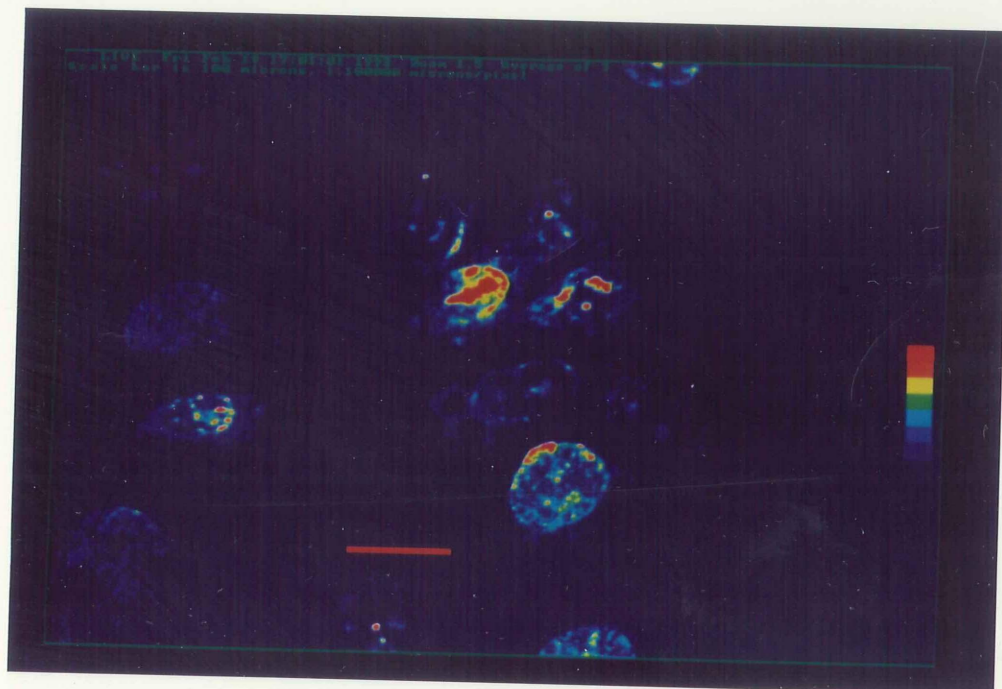


Figure 3-1. A confocal laser scanning microscopic photograph of NIH 3T3 cells immunostained with anti-BrdU antibody. Various patterns of DNA duplication are noted.

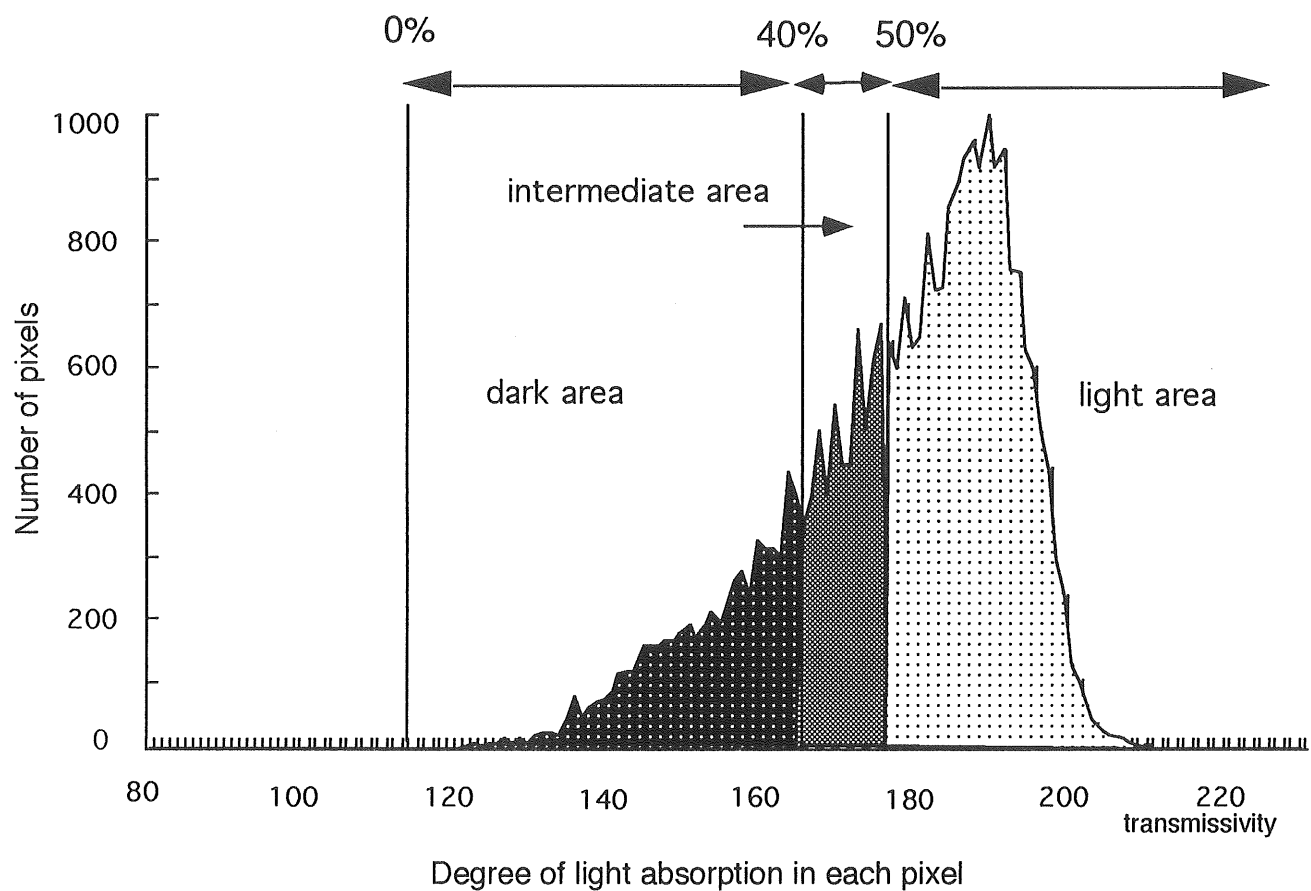
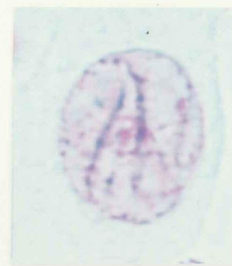


Figure 3-2. A distribution of Feulgen-stained pixels in density within a nucleus. We practically defined threshold levels of dark, intermediate, and light area in the nucleus as 40 and 50 % of the whole absorption values.

1. Nuclear image with Feulgen stain.



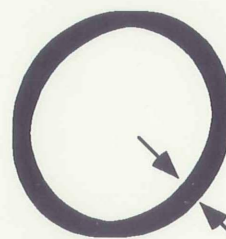
Original nuclear image

2. Nuclear area is automatically extracted.



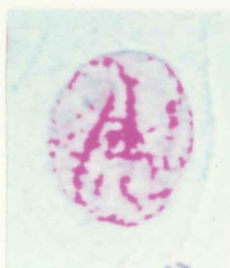
Extracted area

3. Peripheral area is defined.



Nuclear margin

4. Nuclear area is divided into dark, intermediate, and light area.



Dark area

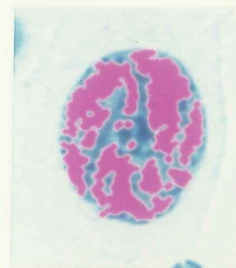


Light area

5. Dark area and light area are converted to "ultra-dark area" and "ultra-light area".



Ultra-dark area



Ultra-light area

Figure 3-3. Flow chart of chromatin pattern analysis.

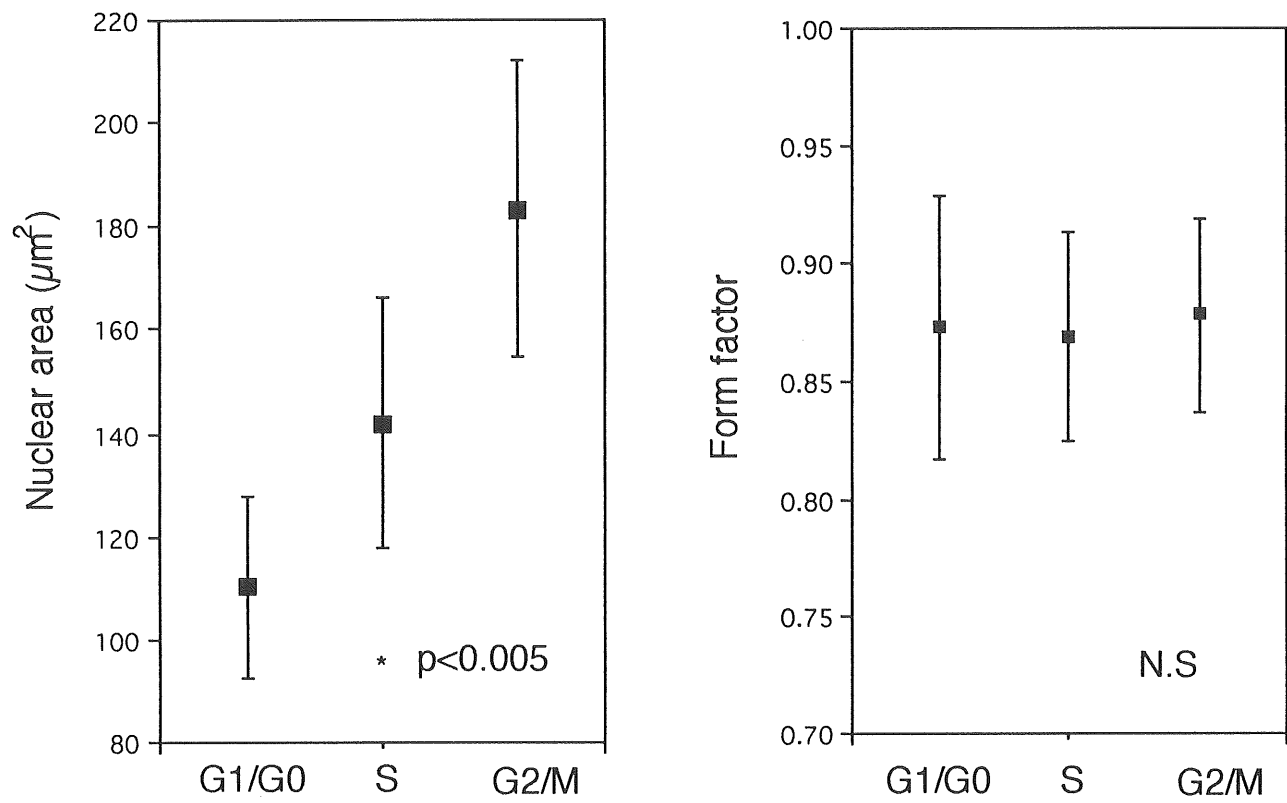
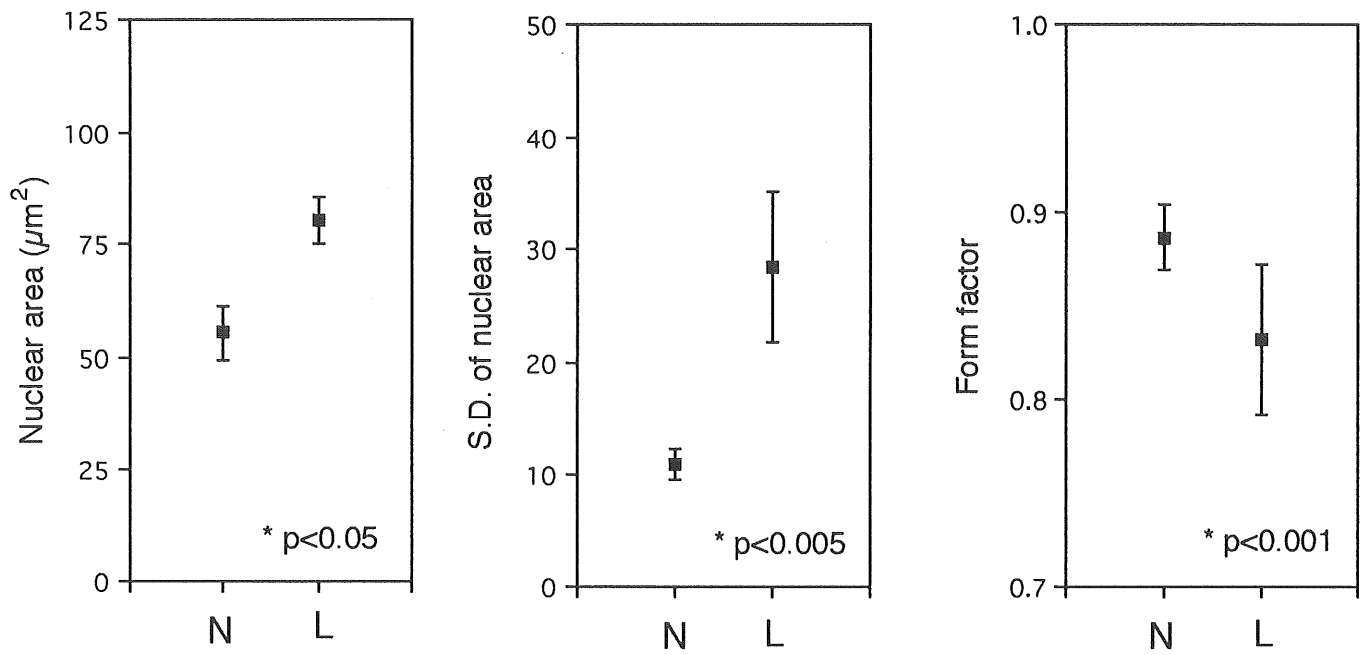


Figure 3-4. Morphometric parameters of nuclei during cell cycle in NIH 3T3 cells.

Number of cells: G0/G1=377, S=85, G2/M=50.

\*  $p < 0.005$  Kruskal-Wallis test, N.S.: not significant.



\* : Mann-Whitney U test

Figure 3-5. Morphometric parameter of nuclear atypia in 5 normal samples and 36 lung cancers.

N: normal samples using bronchial epithelial cells,  
L: lung cancer cells, S.D: standard deviation.

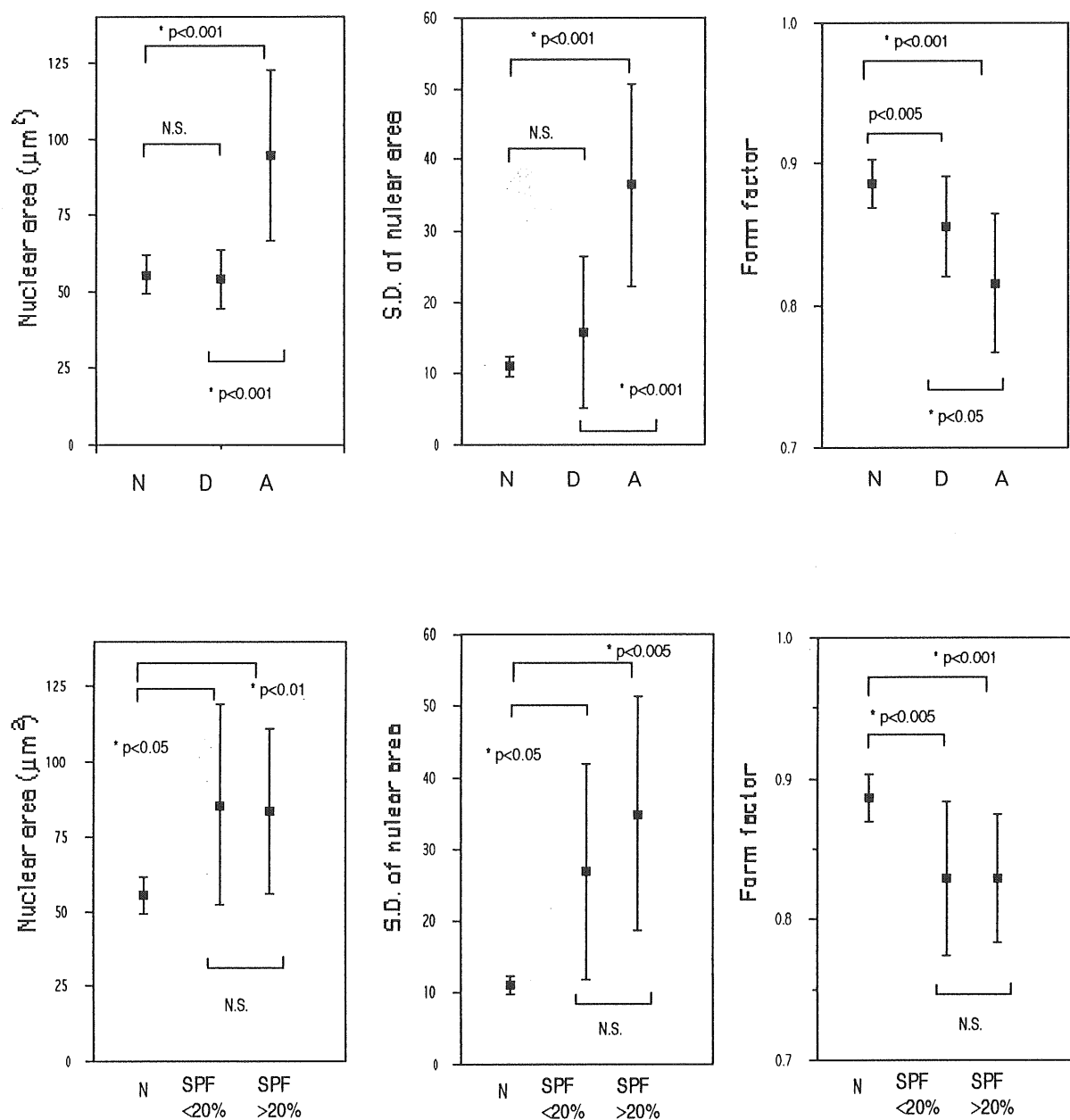


Figure 3-6. Morphometric parameters of nuclear atypia in 5 normal samples and 36 lung cancers. Lung cancers were divided into two groups according to the DNA ploidy status and proliferation activity.

N: normal sample, D: diploidy cases (n=11), A: aneuploidy cases (n=25), SPF < 20% (n=16), SPF  $\geq$  20% (n=18).

\* : Mann-Whitney U test, N.S.: not significant.



## 第4章 肺癌における DNA ploidy および SPF とがん抑制遺伝子 p53 との関連

### 第1節 序論

これまで、癌細胞にみられる DNA ploidy の異常と癌腫そのものの増殖能 SPF の細胞生物学的意義を明らかにするために、これらと核の形態異常との関連に関して検討を行ってきた。その結果、DNA ploidy の異常は核異型と関連しているが、SPF と核異型とは関連しないことが明らかとなった。しかし、癌細胞の DNA ploidy の異常や増殖能が、どのような遺伝子レベルでの異常と関連しているのかは、いまだ明らかにされていない。

近年、癌に対する分子生物学的アプローチが精力的に行われてきており、癌細胞には様々な遺伝子レベルの異常が見られることが明らかとなってきた<sup>9)</sup>。また、癌化には、多くの場合、いくつかの癌あるいはがん抑制遺伝子の異常が段階的に起こることが知られている<sup>18, 110)</sup>。本研究では、癌細胞の DNA ploidy の異常や増殖能の生物学的意義を明らかにするために、数ある癌に関連した遺伝子の中で、がん抑制遺伝子 p53<sup>112~115)</sup> に注目した。なぜなら、p53 は、細胞増殖のみならず、遺伝子および染色体の異常の蓄積に関与していると考えられているからである<sup>112, 114)</sup>。

p53 遺伝子は第17染色体短腕上に存在するがん抑制遺伝子である。その遺伝子産物で、核内に存在する分子量約53kDaの p53 リン酸化非ヒストン蛋白（野生型 p53 蛋白と呼ばれる）は、細胞増殖を制御する機能を持っているが、p53 遺伝子に欠失や点突然変異などが起こると、その本来の機能を失い（変異型 p53 蛋白）、細胞は癌化に向かうとされている<sup>112~116)</sup>。野生型 p53 蛋白が細胞増殖に対していわばブレーキの役目を果たしているとするれば、変異型 p53 蛋白は細胞増殖に有利に働くとも考えられる。この変異型 p53 蛋白を免疫組織化学的に検出することによって、p53 遺伝子の機能を推定することが可能となった。現在、ほとんどすべてのヒトの癌で、高頻度に p53 遺伝子の異常が見出されており、肺癌でも p53 蛋白のアミノ酸変化を伴う点突然変異が高率で見られる<sup>119, 120)</sup>。

最近、この野生型 p53 蛋白が、G1期からS期へ入る点でサイクリン/CDK 複合体

のインヒビターの発現を誘導することによって細胞周期を止めていることが明らかとなった<sup>120)</sup>。このインヒビターは老化した細胞や接触障害のかかった細胞で多量に発現しており、強力に増殖を阻害することがすでにわかっている。この p53 蛋白による細胞周期の停止は、なんらかのダメージを受けた細胞の修復のために行なわれると考えられる。したがって、p53 遺伝子に異常のある細胞では、修復を待たず細胞周期をまわることになるので、遺伝子の増幅が高率に起こり、染色体の異常が蓄積していくと考えられている<sup>120~122)</sup>。このように、p53 遺伝子は、癌化の初期段階において重要な役割を担っていると考えられる<sup>120~122)</sup>。

Sozzi ら<sup>123)</sup> は、気管支上皮における高度異形成上皮に、上皮内癌と同様に、第17染色体短腕の欠失とp53 遺伝子の点突然変異がみられ、肺における発癌の初期段階においてp53 遺伝子の異常が関連していることを示した。Nuova ら<sup>124)</sup> は、気管支上皮において軽度あるいは中等度異形成上皮に比較して、高度異形成上皮に高頻度に変異型 p53 蛋白の発現がみられること、また、肺扁平上皮癌とその周囲の高度異形成上皮には同様の変異型 p53 蛋白の発現がみられることから、肺扁平上皮癌の初期段階に変異型 p53 蛋白が発現する可能性を示唆した。

一方、肺癌<sup>118, 119, 123, 124)</sup> 以外の乳癌<sup>124)</sup>、食道癌<sup>126)</sup>、大腸癌<sup>127, 128)</sup>、胃癌<sup>129)</sup> など、他の臓器においても同様の報告がみられ、p53 遺伝子が多くの組織における発癌に関与していることが示されてきている。また、p53 と臨床病理学的因子との関連については、癌の組織学的分化度<sup>127, 129)</sup> や進行度<sup>125)</sup>、喫煙<sup>128)</sup>、患者の予後<sup>130)</sup> などに関して、いくつかの報告がみられるが、一定の見解は得られていない。

以上のように、がん抑制遺伝子 p53 の異常が、ヒトの多くの癌で認められ、特にその初期段階に関連していることが明らかになってきている<sup>120~123, 125, 126)</sup>。しかし、p53 と癌腫の増殖能との関連についての報告は少なく<sup>130)</sup>、癌における核DNA量の異常との関係に関する検討は未だ行われていない。

本章では、このがん抑制遺伝子 p53 の持つ細胞増殖制御機能とそれによる遺伝子修復機能に着目し、まず、肺癌における変異型 p53 蛋白の発現を免疫組織化学的に検討した。さらに、この変異型 p53 蛋白の発現と、癌細胞の核DNA量異常をあらわすDNA ploidy および癌腫の増殖能を表わす SPF との関連について検討した。

## 第2節 肺癌における DNA ploidy および SPF とがん抑制遺伝子 p53 との関連

肺癌における DNA ploidy および SPF とがん抑制遺伝子 p53 との関連を明らかにするために、まず、肺癌各組織型における p53 蛋白の発現を免疫組織化学的に検討した。さらに、この結果と核DNA量解析で得られた DNA ploidy および SPF との比較検討を行った。

### 1) 対象と方法

#### p53 蛋白の発現について

筑波大学附属病院で切除された肺癌58例の手術標本癌病巣部を検索した。肺癌の組織型は日本肺癌学会分類<sup>92)</sup>にしたがって診断した。その内訳は、腺癌27例、扁平上皮癌23例、大細胞癌4例、カルチノイド2例、腺様嚢胞癌2例である。

使用した抗体は、抗 p53 蛋白モノクローナル抗体 CM-1 (CM-1ウサギポリクローナル, NOVOCASTRA)<sup>132)</sup> である。切除標本はホルマリン固定パラフィン包埋切片を用い、免疫染色は ABC 法 (avidin-biotin-peroxidase complex method)<sup>131)</sup> で行なった。まず、パラフィン切片を内因性ペルオキシダーゼ阻止のため0.6%過酸化水素加メタノールに30分浸した。100倍希釈した CM-1 を200  $\mu$ l 滴下して2時間おき、ビオチン化抗ウサギ IgG 抗体 (ヒストファイン, ニチレイ) を15分間反応させた後、avidin-biotinyl peroxidase complex 希釈液を3分間反応させた。発色には、3,3'-ジアミノベンチジン4塩酸溶液 (和光純薬) で行なった。核染色は、5%メチルグリーン溶液にて、30秒間行なった。CM-1 に対する染色性の評価は、全視野を通し、一部でも明らかな腫瘍細胞の陽性像を認めた症例を p53 陽性とし、また、井上ら<sup>130)</sup>の方法を参考にし、500個の癌細胞を観察し、核染色陽性細胞数の割合が20%以上のものを強陽性、20%未満を陽性、無染色を陰性として発現の状態を検討した。

#### DNA ploidy および SPF について

DNA ploidy および SPF に関しては、今回 p53 蛋白の発現を検討した肺癌58例のうち、核DNA量解析が可能であった46症例を対象として、核DNA量解析を行って求め

た。その方法および評価は、第2章の結果に従って行なった。すなわちDNA ploidy の定義は、 $\text{diploidy} < \text{DI} = 1.3$ ,  $\text{aneuploidy} \geq \text{DI} = 1.3$ とした。また、増殖能の評価の基準も、SPF の値で、20%をその境界値とした。

測定値は平均±標準偏差で表わし、統計処理には、カイ二乗検定を用いた。 $p < 0.05$ をもって有意差ありとした。

## 2) 結果

肺癌における DNA ploidy および SPF とがん抑制遺伝子 p53 の関連を明らかにするために、まず、肺癌各組織型における p53 蛋白の発現を免疫組織化学的に検討した。さらに、この結果と核DNA量解析で得られた DNA ploidy および SPF との比較検討を行った。

### 肺癌における p53 蛋白の発現頻度と発現様式

抗 p53 ポリクローナル抗体 CM-1 によって検索した肺癌組織の p53 蛋白の免疫染色陽性率を組織型別に Table 4-1 に示した。肺癌組織の p53 蛋白の免疫染色陽性率は、全症例58例中、強陽性11例19.0%，陽性16例27.6%の計27例46.6%であった。組織型別の陽性率においては、扁平上皮癌が56.6%と最も高く、ついで腺癌40.2%，大細胞癌25.0%の順であった。これらの組織型別の p53 蛋白の発現頻度には、有意差は認められなかった。

次に肺癌組織における p53 蛋白の発現様式をみると、一般に p53 蛋白は陽性癌細胞の核に限局して、ほぼ均一に染色され、細胞質には染色されなかった。また、陽性細胞の多くは、多少の濃淡はあるものの集団として染色される傾向にあり、特に扁平上皮癌では、ほとんどすべての癌細胞の核に染色される例が多くみられた (Fig. 4-1)。腺癌では、p53 蛋白の発現は、扁平上皮癌のように集団としては染色されず、陽性細胞は陰性細胞の間に散在してみられることが多かった (Fig. 4-2)。

一方、非癌部の肺胞上皮、気管支上皮などの細胞核には p53 蛋白の発現はみられなかった (Fig. 4-1)。

### 肺癌における DNA ploidy および SPF と p53 蛋白の発現との関連

今回 p53 蛋白の発現を検討した肺癌58例のうち、核DNA量解析が可能であった46

症例の結果から、肺癌におけるDNA ploidy および SPF と p53 蛋白の発現との関係を検討した。まず、核DNA量解析の結果から、肺癌症例46例は、DNA ploidyの違いによって、diploidy 群10例、aneuploidy 群36例に分類され、また、増殖能の違いによって、SPF<20%群が19例、SPF $\geq$ 20%群が27例と分類された。

肺癌症例における p53 蛋白の発現頻度を、diploidy 群とaneuploidy 群、および SPF<20%群と SPF $\geq$ 20%群に関して、比較した (Table 4-2)。その結果、diploidy 群のp53 陽性率は、10例中 9 例90.0%であり、aneuploidy 群の36例中15例41.7%に比較して、高い傾向が認められた ( $p<0.05$ )。一方、増殖能を表わすSPFによって症例を2群に分類して、両者の p53 の発現頻度を比較した結果、SPF $\geq$ 20%群での p53陽性率は、27例中16例59.2%であり、SPF<20%群の19例中 5 例26.3%に比較して、高頻度に p53 の発現がみられた ( $p<0.05$ )。

### 3) DNA ploidy および SPF と p53 蛋白発現との関連に関する考察

肺癌において、がん抑制遺伝子 p53 の異常と、核DNA量および癌腫の増殖能との関連を明らかにするために、まず、肺癌各組織型における p53 蛋白の発現を抗 p53 ポリクローナル抗体 CM-1 を用いて免疫組織化学的に検討した。免疫組織化学的に p53 蛋白を検出することは、ホルマリン固定標本でも染色可能なため retrospective study を含めた広い範囲に応用できる利点がある。今回使用した抗 p53 ポリクローナル抗体 CM-1 は、変異型 p53 蛋白を認識する他の p53 モノクローナル抗体と比べても、過剰に発現する変異型 p53 蛋白の検出に十分有用であることが確認されている<sup>131)</sup>。CM-1 は変異型 p53 蛋白とともに野生型 p53 蛋白にも反応するが、野生型の半減期は極めて短いのに対して、変異型は半減期が延長しており、免疫組織化学で検出しているものは変異型と考えられている<sup>133)</sup>。今回の免疫組織化学的検索でも、p53 蛋白は正常細胞にはまったくみられず、癌細胞にのみ発現していた。

変異型 p53 蛋白は野生型 p53 蛋白に対して dominant negative であり、一本の抑制遺伝子内に突然変異が生じて変異型 p53 蛋白が産生されると、もう一方の遺伝子が野生型 p53 蛋白を産生していてもこれに結合し、その活性を抑制する<sup>116)</sup>。野生型 p53 蛋白は細胞増殖を抑制する働きを持つため、変異型 p53 蛋白の出現は細胞増殖

に促進的に働く可能性がある。Mercer ら<sup>134)</sup> は、p53 による細胞増殖制御機構に関して、正常 p53 遺伝子の誘導により DNA polymerase delta の補助因子である PCNA の mRNA が特異的に抑制され、その結果として細胞周期が G1 期から S 期へ入る点で阻害されるためとした。今回の検討で、増殖能が亢進している肺癌症例に変異型 p53 蛋白の発現率が有意に高かったのは、この変異型 p53 蛋白の持つ増殖促進作用が影響している可能性がある。また、肺癌の場合、腺癌における変異型 p53 蛋白の発現が扁平上皮癌より低いことが知られている<sup>135, 136)</sup>。今回の検討結果でも同様に、腺癌の変異型 p53 蛋白の発現率は 40.8% と比較的低かった。またその発現様式に関しても、腺癌は、扁平上皮癌のようにほとんどの癌細胞に発現するような強陽性症例は少なく、陽性細胞は陰性細胞の間に散在してみられた。一般に腺癌は他の組織型よりも doubling time が長く増殖が遅いものが多いと考えられており<sup>137)</sup>、p53 の影響を指摘する報告<sup>130)</sup>もあるが、今回の検討では、対象症例は少ないものの有意差はなく、また、腺癌と扁平上皮癌の発育様式が異なることも考えると、一元的には判断できない。

一方、p53 と DNA ploidy との関連に関しては、予想を覆す結果が得られた。一般に DNA aneuploidy を示す癌細胞では、核 DNA 量の異常をきたしており、遺伝子の増幅、染色体数の増減などが生じていると考えられている。しかし、本研究の結果は、p53 の発現率は、aneuploidy 群に比較して、diploidy 群のほうが高いというものであった。生体内では、p53 は、DNA に障害が加わった時、細胞周期を S 期の直前で停止させ、その修復を待つという働きがあるが<sup>116)</sup>、p53 に異常のある細胞では修復を待たず細胞周期をまわるので、遺伝子増幅が高率に起こり、染色体の異常が蓄積していくと考えられる<sup>120)</sup>。この結果、核 DNA 量の異常をきたすことは十分に考えられる。この一見不可解な結果を説明するものとして、いくつかの可能性が考えられる。まず、がん抑制遺伝子 p53 の異常は必ずしも蛋白レベルの異常、すなわち変異型 p53 蛋白の蓄積をおこさないと考えられており<sup>138~140)</sup>、aneuploidy 群で変異型 p53 蛋白の発現がみられなかった症例の中にも、p53 の遺伝子レベルでの異常がおこっている可能性がある。また、diploidy 群の中には、核 DNA 量解析ではとらえることのできない、遺伝子レベルの異常がおこっていることも考えられる。さらに、免疫組織化学的な p53 蛋白の検出では p53 遺伝子内のエクソン 5 から 8 までの範囲に突然変異が起こった場合、p53 蛋白は高発現となるが、それ以外の範囲で起こった場合は低発現にな

ることも注意を要する<sup>141)</sup>。DNA ploidy とがん抑制遺伝子 p53 とのより詳細な関係を明らかにするためには、さらに、遺伝子レベルでの検討が必要であると考えられる。

以上、がん抑制遺伝子 p53 の持つ細胞増殖制御機能とそれによる遺伝子修復機能に着目し、肺癌における p53 蛋白の発現と DNA ploidy および SPF との関連を検討した。その結果、癌腫の増殖能が高いものは変異型 p53 蛋白の発現率が高いことが明らかとなった。

#### 第4節 小括

肺癌におけるDNA ploidy および SPF とがん抑制遺伝子 p53 との関連を明らかにするために、58例の肺癌を対象として、抗 p53 蛋白ポリクローナル抗体 CM-1を用いて、肺癌細胞における p53 蛋白 の発現頻度と発現様式を免疫組織化学的に検討し、この結果と、核DNA量解析で得られた DNA ploidy および SPF との関係について検討を加え、次の結論を得た。

1. 肺癌における変異型 p53 蛋白の発現頻度は、58例中27例46.6%であり、扁平上皮癌が最も高率であった。
2. 変異型 p53 蛋白の発現様式は、陽性細胞の多くは、多少の濃淡はあるものの集団として出現し、特に扁平上皮癌では、ほとんどの癌細胞に発現する例が多くみられた。一方、腺癌では陽性細胞は陰性細胞の間に、散在してみられた。
3. 変異型 p53 蛋白の発現率は、diploidy 群のほうが aneuploidy 群より高い傾向にあった。DNA ploidy と p53 との関連をみるためには、遺伝子レベルでの解析が重要と考えられる。
4. 変異型 p53 蛋白の発現率は、増殖能の亢進している症例に高く、p53 の細胞増殖促進作用と矛盾しなかった。



Table 4-1. Expression grades of p53 protein in various histologic types of lung cancer

p53 protein expression	Total (n=58)	No. of patients (%)			
		AD (n=27)	SQ (n=23)	LA (n=4)	Others (n=4)
—	31(53.4)	16(59.2)	10(43.4)	3(75.0)	2(50.0)
+	16(27.6)	7(26.0)	6(26.2)	1(25.0)	2(50.0)
++	11(19.0)	4(14.8)	7(30.4)	0	0

— : negative

+ : positive in less than 20% of cancer cells

++ : positive in more than 20% of cancer cells

AD: adenocarcinoma, SQ: squamous cell carcinoma, LA: large cell carcinoma.

Others consist of 2 carcinoids and 2 adenoid cystic carcinomas.

Table 4-2. Relationship between p53 protein expression and DNA ploidy, proliferation activity in lung cancer

p53 protein expression	No. of patients (%)				
	Total (n=46)	DNA ploidy		Proliferation activity	
		Diploidy (n=10)	Aneuploidy (n=36)	SPF<20% (n=19)	SPF $\geq$ 20% (n=27)
—	22(47.8)	1(10.0)	21(58.3)	14(73.7)	11(40.8)
+	12(26.1)	3(30.0)	9(25.0)	4(21.1)	9(33.3)
++	12(26.1)	6(60.0)	6(16.7)	1 (5.2)	7(25.9)
		*p<0.05		*p<0.05	

— : negative

+

++ : positive in more than 20% of cancer cells

\* : the chi-square test with Yates' continuity correction

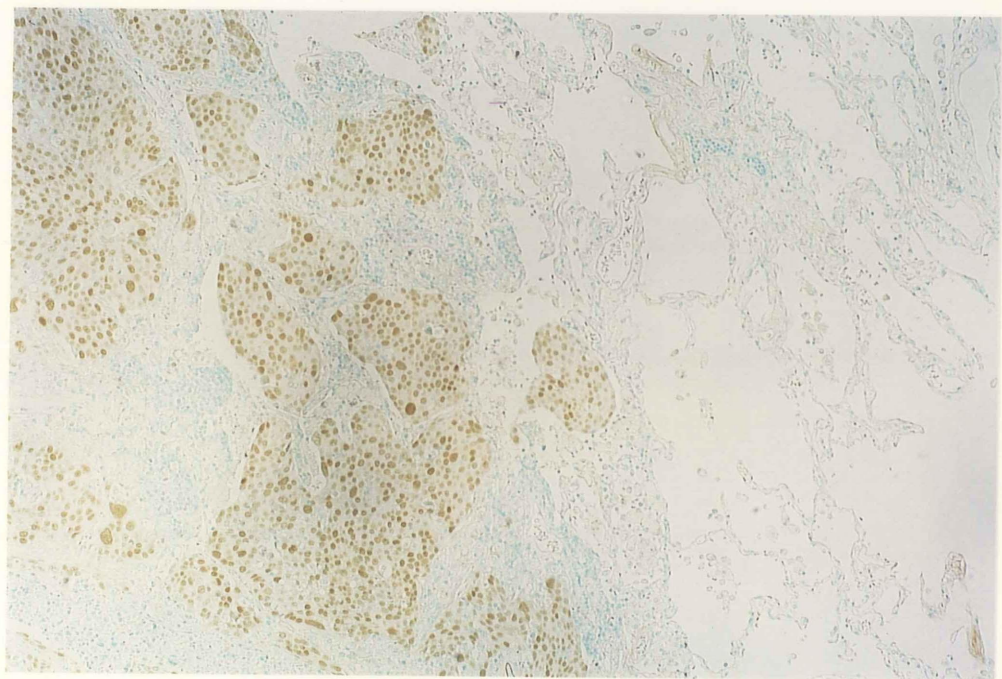
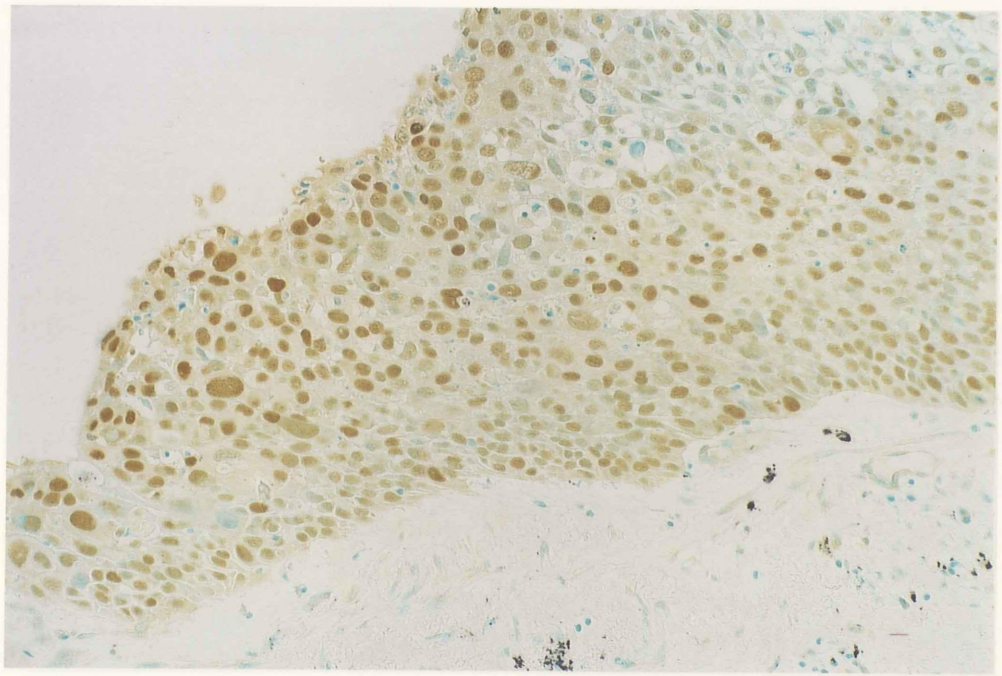


Figure 4-1. Immunohistochemical staining for p53 protein of a squamous cell carcinoma of the lung. Cancer cells show intense and diffuse nuclear staining for p53 protein (top). Staining in the cancer cells contrasts sharply with the absence of staining in the adjacent non-neoplastic lung parenchyma (bottom). (top:  $\times 200$ , bottom:  $\times 100$ )

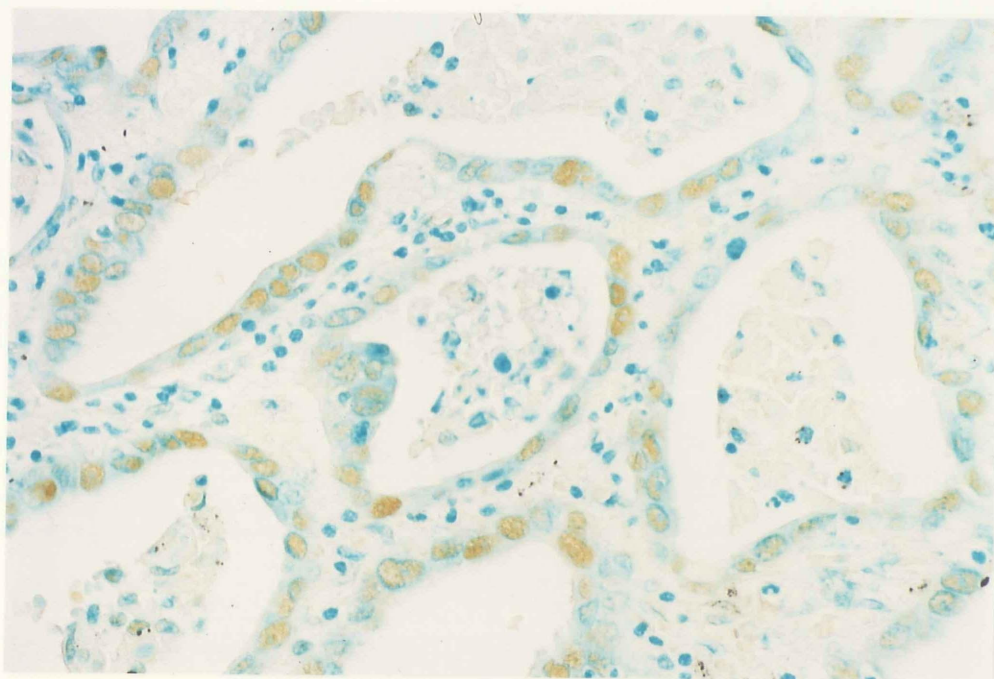


Figure 4-2. Immunohistochemical staining of p53 in adenocarcinoma. Most nuclei of cancer cells lining on the alveolar surface are positive for p53 protein (brown). ( $\times 200$ )

## 第5章 非小細胞肺癌における DNA ploidy および SPF の臨床病理学的意義

### 第1節 序論

これまでに、核DNA量解析によって得られるDNA ploidy と SPF の病理学的および細胞生物学的意義について、第3章と第4章で検討した。その結果、肺癌において、DNA ploidy の異常が、核異型と関連すること、また SPF は癌細胞の p53 蛋白の発現と関連することが明らかとなった。では、このように癌細胞のもつ様々な特性と関連すると考えられる DNA ploidy と SPF が、実際の癌の診断、治療といった臨床では、どのように位置付けされるのであろうか。

現時点では、様々な悪性腫瘍に設定されている TNM 病期分類<sup>142)</sup> は、治療指針決定の基礎となると同時に、病期によってかなり正確に予後を予測しうることが知られている。しかし、実際には TNM 病期だけでは説明できない症例も少なくない。例えば、TNM 病期 I 期、すなわち腫瘍が小さく限局しリンパ節転移がないと診断された肺腺癌症例が術後数ヵ月を経ずして遠隔転移で死亡する一方で、診断時IV期と診断された症例が5年生存するというようなことを、実際の日常臨床で遭遇する。

Takise ら<sup>143)</sup> は、末梢発生の径 2 cm 以下の肺腺癌75例について、様々な病理学的予後因子を多変量解析を用いて検討した。その結果、有意に重要な予後因子は、リンパ節転移、胸膜浸潤、核面積の標準偏差、核分裂指数であり、血管侵襲や中心線維化などは単一で有意差がでるに留まった。重要な予後因子とされた病理学的因子のうち、TNM 病期分類に含まれる前2者を除くと、後2者がいずれも細胞核に表現される異型度と増殖能であることが注目される。より正確な悪性腫瘍の病態の把握には、TNM 病期分類による評価だけでなく、核DNA量解析によって癌細胞の核を詳細にあるいは定量的に観察することが重要であると考えられる。

このように、核DNA量解析の臨床的意義としては、癌の悪性度の指標あるいは予後因子としての重要性があげられる。現在、核DNA量に関する研究は、その測定機器の進歩と普及とともに、とくに臨床医らによって積極的に展開されている<sup>11~14, 20~22)</sup>。その目的は、核DNA量異常が予後因子としてどの程度有用であるかを明らかにするこ

とであり、その背景には、患者の予後をより正確に予測することによって、最良の治療法を選択したい、患者にとって無駄となる治療を回避したいという臨床医の希求がある。従来用いられてきた病期分類以外のより信頼し得るなんらかの方法で、予後不良群を規定できれば、これに対してより強力な治療法を行なうことが可能である。

本章では、肺癌における核DNA量解析の臨床学的意義を明らかにするために、DNA ploidy および SPF と、癌の組織型、進展度、患者の生存率、予後などとの関連について検討を行った。



## 第2節 非小細胞肺癌における DNA ploidy および SPF と臨床病理学的因子との関連

肺癌における核DNA量異常と増殖能亢進の有無，すなわち，DNA ploidy と SPF が，肺癌の予後因子としてどの程度有用であることを明らかにすることを目的に，肺癌の核DNA量解析を，これまでと同様に「NASCA」を用いて測定し，第2章で定義した基準に従って評価した後，従来の臨床病理学的因子との関連を検討した。

### 1) 対象と方法

対象は，筑波大学付属病院呼吸器外科で，1986年から1992年の間に切除された，非小細胞肺癌92例である．その内訳をTable 5-1 に示した．小細胞癌は，肺癌の中でも最も予後が悪く，その他の非小細胞肺癌（non-small cell lung cancer, NSCLC）とは異なる発育増殖を示し，また化学療法の与える影響が非常に大きいため今回の検討からは除外した。

核DNA量解析は，今まで述べてきた方法に従って行い，症例毎に DNA index (DI) と S phase fraction (SPF) を求めた．その評価は，第2章の基準に従って行なった．すなわち DNA ploidy の定義は， $\text{diploidy} < \text{DI} = 1.3$ ， $\text{aneuploidy} \geq \text{DI} = 1.3$ とした．また，増殖能の評価の基準も，SPF の値で，20%をその境界値とした．また肺癌の組織および病期分類は，日本肺癌学会の分類に従った．

測定値は平均±標準偏差で表わし，統計処理には，カイ二乗検定，Mann-Whitney U test および Spearman Rank coefficient test を用いた．また，生存期間は手術日から死亡までの期間とし，在院死および術死も死亡例に含めた．生存率は他病死をその時点での打ち切り例とし，生存曲線の解析は Kaplan-Meier 法<sup>144)</sup> で算出し，各群間の有意差検定は generalized Wilcoxon test <sup>145)</sup> を用いた．予後因子の多変量解析には，Cox 比例ハザードモデル<sup>146)</sup> を用いた．いずれの検定も，危険率  $p < 0.05$  をもって統計学的に有意とした．

## 2) 結果

### 非小細胞肺癌における DNA ploidy および SPF について

「NASCA」を用いて核DNA量解析を非小細胞肺癌92例について行った。その結果、全症例の DI 値は、 $1.81 \pm 0.61$  (0.90~3.97) であり、SPF は、 $30.2 \pm 19.1$  (1.0~82.1) であった。これらを、第2章での定義に基づいて分類すると、DNA ploidy の違いによって、diploidy 群18例19.6%、aneuploidy 群74例79.4%に分類され、増殖能の違いによって、SPF <20%群37例40.2%、SPF  $\geq$ 20%群55例59.8%に分類された。DNA ploidy と SPF との関係では、この両者の間には相関関係はまったくみられず (Fig. 5-1) , また、diploidy 群と aneuploidy 群との間で、増殖能の違いはみられなかった (Fig. 5-2) 。

### 非小細胞肺癌における DNA ploidy および SPF と病理学的因子との関係

今回、核DNA量解析の対象となった非小細胞肺癌92例について、腫瘍の発育進展度を表わすと考えられる、病期分類、腫瘍径、リンパ節転移、胸膜浸潤、転移の各因子について、病理学的に評価した。これらの因子とDNA ploidy および SPF との関連を検討した (Table 5-2) 。その結果、DNA ploidy とこれら病理学的因子との関連はみられなかった。一方、SPF と、腫瘍の進展度を表わす腫瘍径、TNM 因子であるT因子、リンパ節転移の有無、および胸膜浸潤の有無との間に、有意な相関がみられた。

次に、DNA ploidy および SPF と非小細胞肺癌の組織型および分化度との関係について検討した (Table 5-3) 。DNA ploidy に関しては、大細胞癌、腺癌、扁平上皮癌の順でDNA aneuploidy が認められた。一方、SPF は、大細胞癌、扁平上皮癌、腺癌の順であった。さらに腺癌、および扁平上皮癌において組織分化度別の検討を行なった結果、DNA ploidy と分化度の有意な相関はみられなかったが、SPF は、腺癌、扁平上皮癌ともに、高分化度は中および低分化度に比較して SPF が低い傾向にあった ( $p < 0.05$ ) 。カルチノイドは、肺癌の中では悪性度が低いとされており、今回行った核DNA量解析においても、4例すべてが、diploidy で、かつ増殖能の亢進はみられなかった。

### 非小細胞肺癌におけるDNA ploidy および SPF と予後との関係

非小細胞肺癌92例の予後について、diploidy 群とaneuploidy 群との比較、および



SPF < 20% 群と SPF ≥ 20% 群との比較を行なった (Fig. 5-3) . まず, DNA ploidy の違いによる検討では, aneuploidy 群は diploidy 群に比較して予後は不良であった. 一方, 増殖能の違いによる検討では, SPF ≥ 20% 群は SPF < 20% 群に比較して予後は不良であった.

次に, DNA ploidy と SPF の 2 つの因子から, 対象症例を 4 グループに分類して予後の検討を行なった (Fig. 5-4) . すなわち, (a) diploidy でかつ SPF < 20% である群 10 例, (b) diploidy でかつ SPF ≥ 20% である群 8 例, (c) aneuploidy でかつ SPF < 20% である群 27 例, (d) aneuploidy でかつ SPF ≥ 20% である群 47 例の 4 群である. その結果, 同じ DNA ploidy 群の中でも増殖能亢進の有無によって, 予後に違いがみられた. すなわち, (a) 群は (b) 群に比較して, また (c) 群は (d) 群に比較して予後が良好であった. しかし, 増殖能亢進群とそうでない群のなかでは, DNA ploidy の違いによる生存率には有意差はみられなかった. このことから, DNA ploidy の違いよりも, 増殖能亢進の有無の方が, より強く生物学的悪性度を反映していることが示唆される.

さらに, 病期別, 組織型別毎の生存率に関して同様の検討を行った. 病期が I 期の 31 例において, SPF ≥ 20% 群 11 例は SPF < 20% 群 20 例に比較して予後は不良であったが, aneuploidy 群 21 例と diploidy 群 10 例との生存率には有意差はみられなかった (Fig. 5-5) . II 期, III 期, IV 期に関しては, DNA ploidy の違いや増殖能亢進の有無による生存率の違いはみられなかった. 組織型別では, 腺癌において, SPF ≥ 20% 群 20 例は SPF < 20% 群 19 例に比較して, また, aneuploidy 群 33 例は diploidy 群 6 例に比較して予後は不良であった (Fig. 5-6) . しかし, 扁平上皮癌では, いずれも有意差はみられなかった.

#### 非小細胞肺癌における予後因子の検討 - Cox 比例ハザードモデルを用いて

非小細胞肺癌 92 例の予後因子を明らかにするために, 年齢, 性, 病期, TNM 因子, 腫瘍径, DNA ploidy, SPF に関する多変量解析を, Cox 比例ハザードモデルを用いて行なった (Table 5-4) . その結果, 最も予後に関係しているのは, SPF およびリンパ節転移の広がりであり, ついで DNA ploidy, 腫瘍径, 胸膜浸潤の有無, 病期, 年齢, 転移の有無であった.

### 3) DNA ploidy と SPF の臨床病理学的意義に関する考察

非小細胞肺癌92例を対象として核DNA量解析を行い、DNA ploidy および SPF と臨床病理学的因子との関連を検討し、さらに、これらの予後因子としての重要性もあわせて検討した。

DNA ploidy あるいは SPF に代表される増殖能と、病期などの癌の進展度や患者の予後などの生物学的悪性度との関連について、これまでに数多くの報告がある<sup>3, 14, 16, 26, 147)</sup>。肺癌においても同様<sup>19, 30, 32, 33, 53, 148)</sup>に、DNA ploidy や増殖能に関しての知見が集積されている。

今回検討した非小細胞肺癌での DNA aneuploidy の頻度は、これまでの報告と同様に、92例中74例79.4%と高率であった。また、病期や腫瘍径などの腫瘍の進展度との関係においては、SPF が腫瘍径、T因子、リンパ節転移、および胸膜浸潤と有意な相関がみられた。一方、DNA ploidy に関しては、文献的には病期と関連するとの報告もみられるが<sup>148)</sup>、今回の検討では有意な相関はみられなかった。Diploidy 群が aneuploidy 群に比較して、症例の少ないことも影響している可能性がある。

組織型別では、大細胞癌が最も aneuploidy の頻度が高率であったのに対して、肺癌の中でも低悪性度である<sup>8)</sup>カルチノイド4例はすべてdiploidyであった。これは、従来からの肺癌における組織型別の悪性度を反映していると考えられる。

今回の検討において、組織の分化度および患者の生存率に関与していたのは、増殖能をあらわす SPF であり、DNA ploidy の違いは、腺癌での生存率の検討を除いて、有意な相関はみられなかった。文献的には、DNA aneuploidy が病期や予後と相関がみられるとの報告が多いが<sup>16, 26, 149, 150)</sup>、一方で少数ではあるが、DNA ploidy の違いは、必ずしも悪性度を反映しないとの報告もみられる<sup>32, 33)</sup>。このように、DNA ploidy の評価は未だ定まっていない。その原因として、各施設で核DNA量の測定方法や DNA ploidy の評価方法が異なっていることが指摘されており<sup>15, 34, 96, 151, 152)</sup>、癌臨床における核DNA量解析の意義を確立するうえで大きな障壁となっている。本研究では、第2章で正常細胞の測定結果から、DNA ploidy および SPF の評価の定義を行い、評価の曖昧さを除外した。

多変量解析による、非小細胞肺癌における予後因子を検討した結果、SPF がDNA

ploidy よりも重要な予後因子であることが示された。予後因子を多変量解析する場合、その中の 2 要因に強い相関があると、その評価が数例の生存状況によって決定され、本来のその要因の寄与の大きさを表さないことが起こりうるので<sup>153)</sup>、今回の検討では、SPF と DNA ploidy との相関がないことをあらかじめ確認した。

今回の検討では、術後の化学療法や放射線療法の施行の有無およびその効果に関しては検討していない。なぜなら、予後因子とは一般に治療前の因子を指し、これらと一緒に加療効果を多変量解析にかけることに問題があるからである。しかしながら、術後化学療法や放射線療法の効果の程度が予後に影響を与えるのはすでに明白である。今回有意であった因子が良好であった症例に関しては、たとえ他の因子にかかわらず長期生存が得られる可能性が高いので、積極的な治療が必要であると考えられる。

しかし、従来行なわれてきた限られた対象に対する retrospective study では、得られた結論の一般性は限られている。癌における核DNA量解析の意義をより一層高めるためには、まず、核DNA量解析における DNA ploidy および SPF の評価法を統一し<sup>15, 35)</sup>、さらに、十分な数の症例を prospective に検討する必要があると考えられる。

### 第3節 小括

核DNA量解析の臨床学的意義を明らかにするために、非小細胞肺癌を対象として核DNA量解析を行い、DNA ploidy および SPF と癌の組織型、進展度など臨床病理学的因子との関連、さらに、これらの予後因子としての重要性を検討し、次の結論を得た。

1. 非小細胞肺癌におけるaneuploidy の頻度は、79.4%であった。
2. DNA ploidy と SPF との間には相関関係はなく、また、diploidy 群とaneuploidy 群との間で、増殖能の違いはみられなかった。
3. SPF と、腫瘍径、T因子、リンパ節転移の有無、および胸膜浸潤の有無との間に有意な相関がみられたが、DNA ploidy と臨床病理学的因子との関連はみられなかった。
4. DNA ploidy と分化度の有意な相関はみられなかったが、SPF は、腺癌、扁平上皮癌ともに、高分化度は中および低分化度に比較してSPF が低い傾向にあった。
5. 予後因子としては、DNA ploidy よりも SPF が、より重要であった。

Table. 5-1 Characteristics of the patients with non-small cell lung cancer

Gender	male	70
	female	22
Age	mean $\pm$ SD	64.0 $\pm$ 11.0
	range	22~86
Histologic type		
	adenocarcinoma	39
	squamous cell carcinoma	35
	large cell carcinoma	13
	carcinoid	4
Pathologic stage		
	I	31
	II	12
	IIIA	23
	IIIB	7
	IV	19
Total		92

Table 5-2. DNA ploidy and proliferative activity in various clinicopathological factors of 92 non-small cell lung cancers

		No. of cases (%)							
		DNA ploidy				Proliferation activity			
Total cases		Diploidy		Aneuploidy		SPF<20%	SPF≥20%		
Total	92	18		74		37		55	
Stage									
1	31	10	(55.6)	21	(28.4)	22	(59.5)	9	(16.4)
2	12	1	(5.6)	11	(14.9)	2	(5.4)	10	(18.2)
3A	23	4	(22.2)	19	(25.6)	7	(18.9)	16	(29.1)
3B	7	0	(0)	7	(9.5)	1	(2.7)	6	(10.9)
4	19	3	(16.6)	16	(21.6)	5	(13.5)	14	(25.4)
N.S.					N.S.				
Size of Tumor									
≤3.0cm	23	7	(38.9)	16	(21.6)	14	(37.8)	9	(16.4)
>3.1cm	69	11	(61.1)	58	(78.4)	23	(62.2)	46	(83.6)
N.S.					p<0.05				
Tumor status									
T1	19	6	(33.3)	13	(17.6)	12	(32.4)	7	(12.7)
T2	44	7	(38.9)	37	(50.0)	19	(51.4)	25	(45.5)
T3	17	5	(27.8)	12	(16.2)	3	(8.1)	14	(25.4)
T4	12	0	(0)	12	(16.2)	3	(8.1)	9	(16.4)
N.S.					p<0.05				
Lymph Node Metastasis									
N0	47	12	(66.6)	35	(47.9)	25	(69.5)	22	(40.0)
N1	21	3	(16.7)	18	(24.7)	3	(8.3)	18	(32.7)
N2	20	3	(16.7)	17	(23.3)	8	(22.2)	12	(21.8)
N3	3	0	(0)	3	(4.1)	0	(0)	3	(5.5)
N.S.					p<0.05				
Pleural Invasion									
P0	40	12	(66.6)	28	(37.8)	22	(59.5)	18	(32.7)
P1	18	1	(5.6)	17	(23.0)	10	(27.0)	8	(14.6)
P2	12	1	(5.6)	11	(14.9)	1	(2.7)	11	(20.0)
P3	22	4	(22.2)	18	(24.3)	4	(10.8)	18	(32.7)
N.S.					p<0.05				
Intrapulmonary Metastasis									
PM0	73	15	(83.3)	58	(78.4)	32	(86.5)	41	(74.6)
PM1	18	2	(11.1)	16	(21.6)	5	(13.5)	13	(23.6)
PM2	1	1	(5.6)	0	(0)	0	(0)	1	(1.8)
N.S.					N.S.				

N.S. : not significant

Table 5-3. DNA ploidy and proliferation in histological differentiation of 92 non-small cell lung cancers

		No of patients (%)			
		DNA ploidy		Proliferation	
		Diploidy	Aneuploidy	SPF< 20%	SPF≥ 20%
Adenocarcinoma					
Total	39(42.4)	6(15.4)	33(84.6)	19(48.8)	20(51.2)
well	25	5	20	16	9
moderate	7	0	7	1	6
poor	7	1	6	2	5
			N.S.	<i>p</i> <0.05	
Squamous cell carcinoma					
Total	35(38.0)	7(20)	28(80)	11(31.4)	24(68.6)
well	12	1	11	7	5
moderate	21	5	16	3	18
poor	2	1	1	1	1
			N.S.	<i>p</i> <0.05	
Large cell carcinoma					
	13(14.1)	1(7.7)	12(92.3)	3(23.1)	10(76.9)
Carcinoid	4(4.3)	4(100)	0	4(100)	0

N.S.: not significant

Table 5-4. Multivariate survival analysis with Cox's proportional hazard model in 92 non-small cell lung cancers

Variable	Coefficient		t value	p value
	beta	S.E.		
Age	0.041390	0.167445	0.247212	N.S.
Sex	-1.026520	0.523243	-1.961850	N.S.
Stage	0.158910	0.302344	0.525590	N.S.
T factor	-0.130720	0.288361	-0.453320	N.S.
N factor	0.825830	0.250318	3.299140	p<0.05
P factor	0.175150	0.184903	0.948250	N.S.
M factor	0.046880	0.418460	0.112020	N.S.
Tumor size	0.010090	0.010378	0.972470	N.S.
DNA ploidy	0.870146	0.535764	1.624112	N.S.
SPF	1.887688	0.488973	3.860517	p<0.05

S.E.; standard error, N.S.; not significant



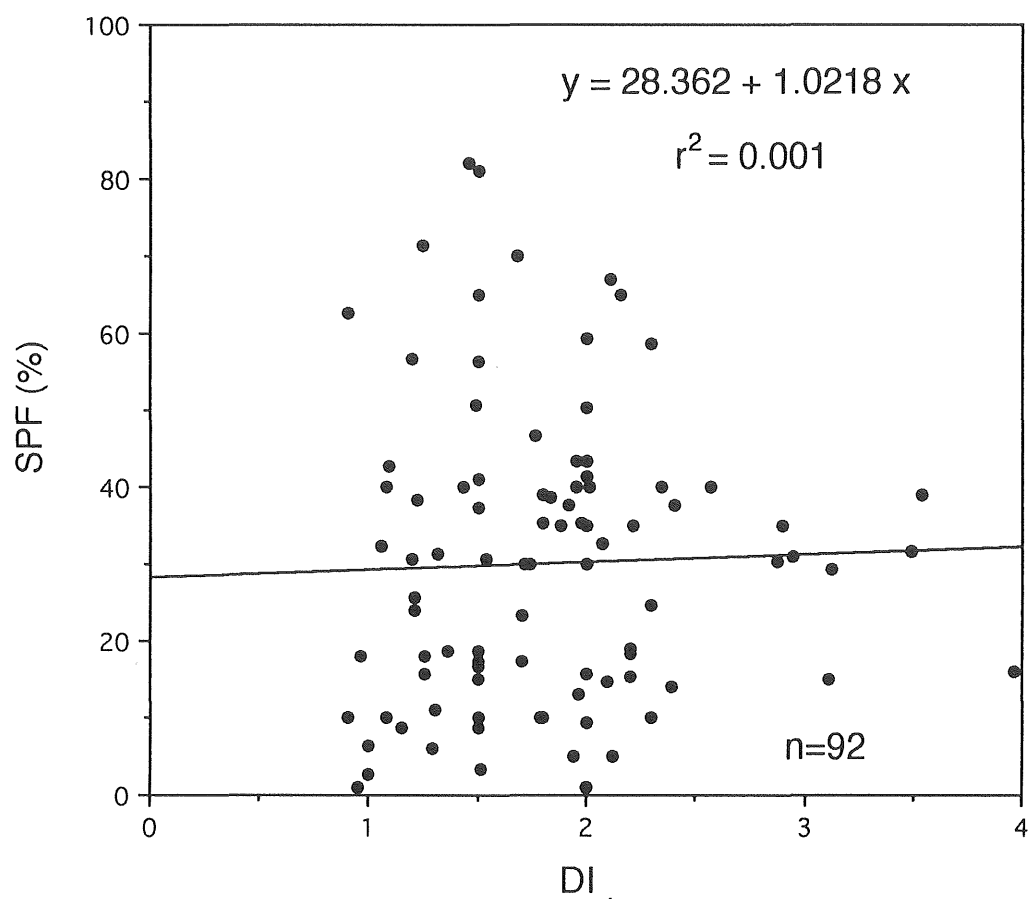


Figure 5-1. Correlation between DNA index (DI) and S phase fraction (SPF) in 92 non-small cell lung cancers.

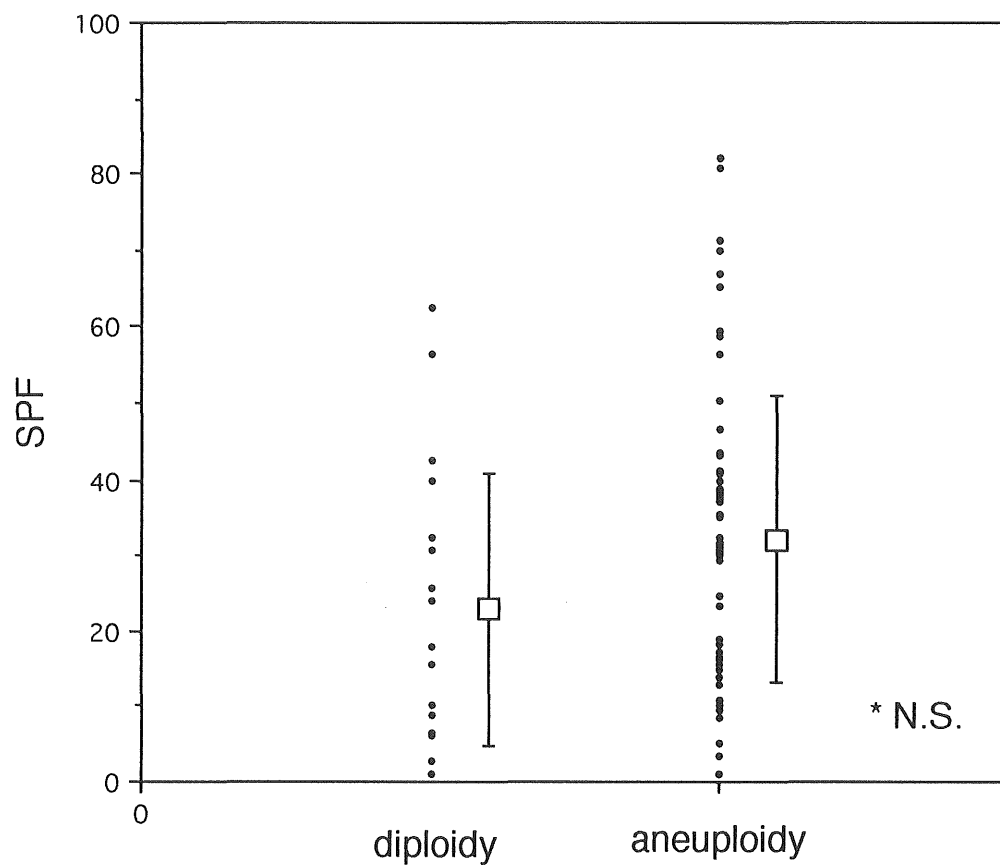


Figure 5-2. S phase fraction (SPF) in diploidy group and aneuploidy group of 92 non-small cell lung cancers.

diploidy group: n=18, aneuploidy group: n=74.

N.S. : not significant, \* : Mann-Whitney test.

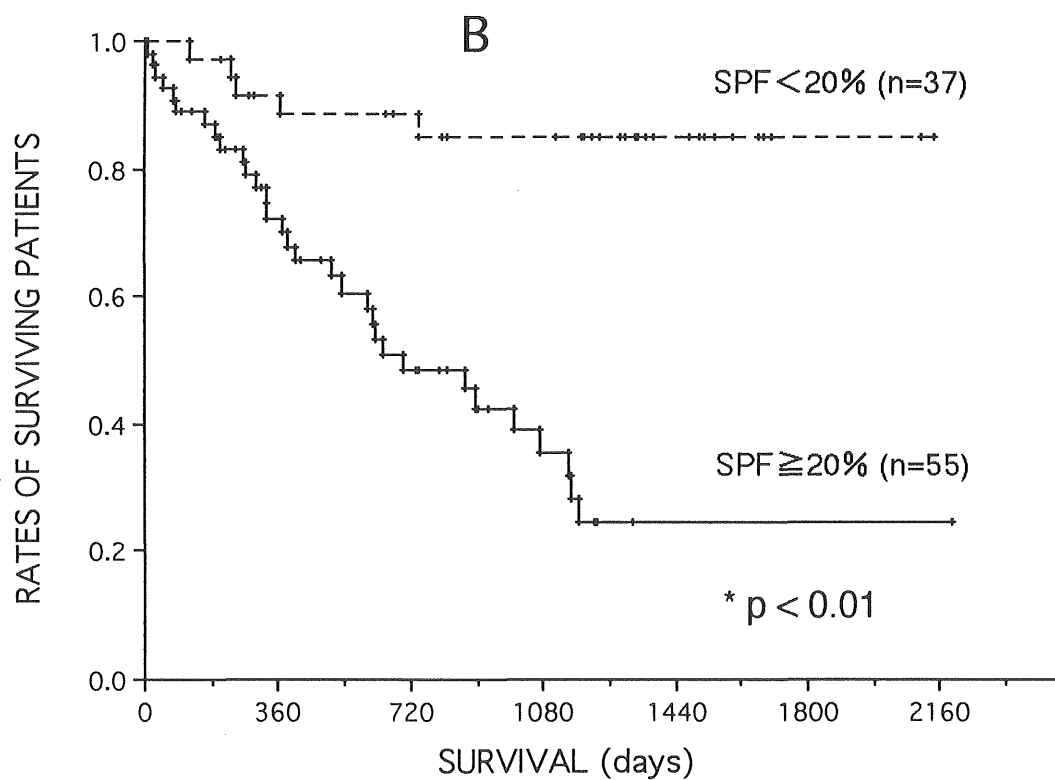
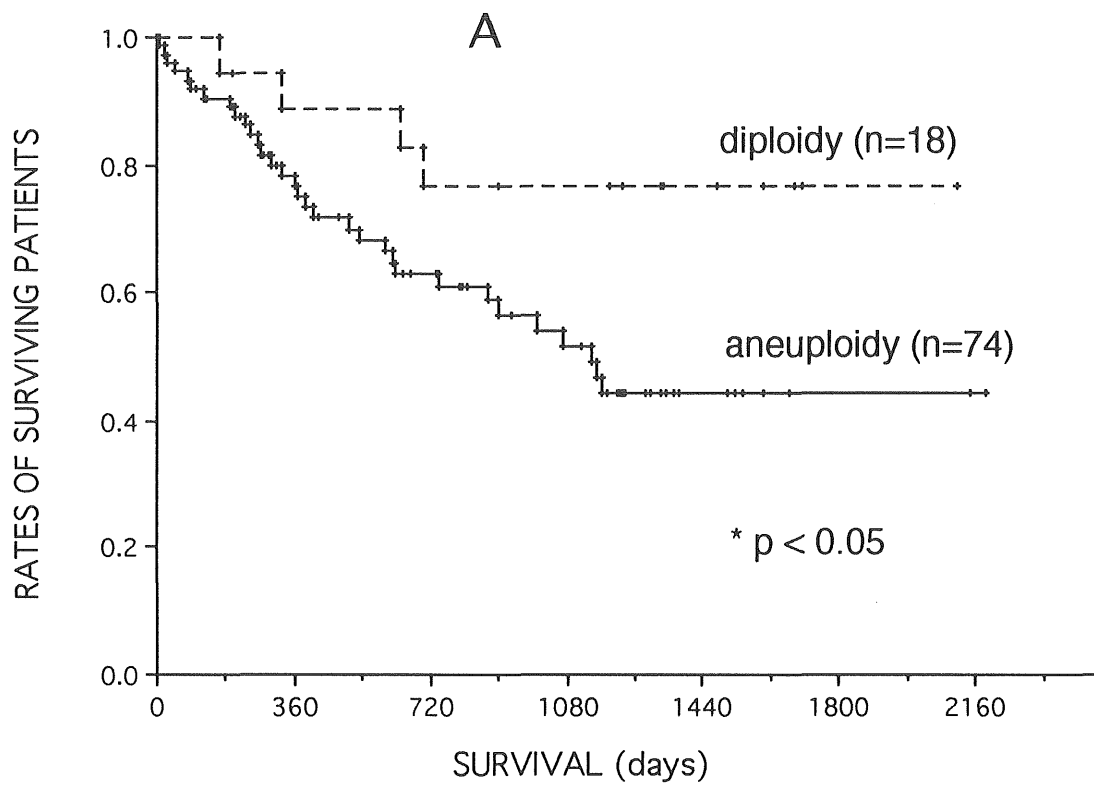


Figure 5-3. Kaplan-Meier survival curves of patients with non-small cell lung cancer, based on DNA ploidy status (A) and the percentage of S phase cells (SPF). \*: generalized Wilcoxon test.

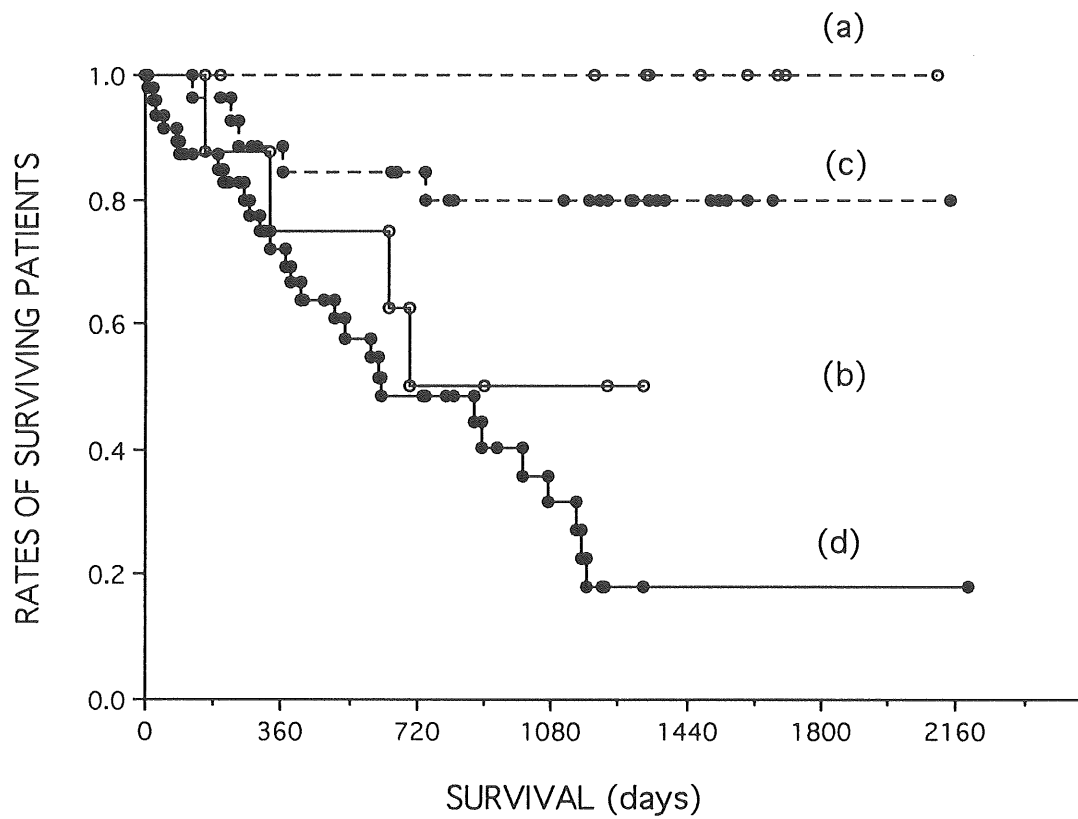


Figure 5-4. Kaplan-Meier curves of patients with NSCLC, who were divided into four groups based on the combination of DNA ploidy status and SPF: (a) diploidy with decreased SPF  $< 20\%$ , (b) diploidy with increased SPF  $\geq 20\%$ , (c) aneuploidy with decreased SPF  $< 20\%$ , (d) aneuploidy with increased SPF  $\geq 20\%$ . (a) vs (c) and (b) vs (d); not significant, (a) vs (b);  $p < 0.05$ , (c) vs (d);  $p < 0.01$ .

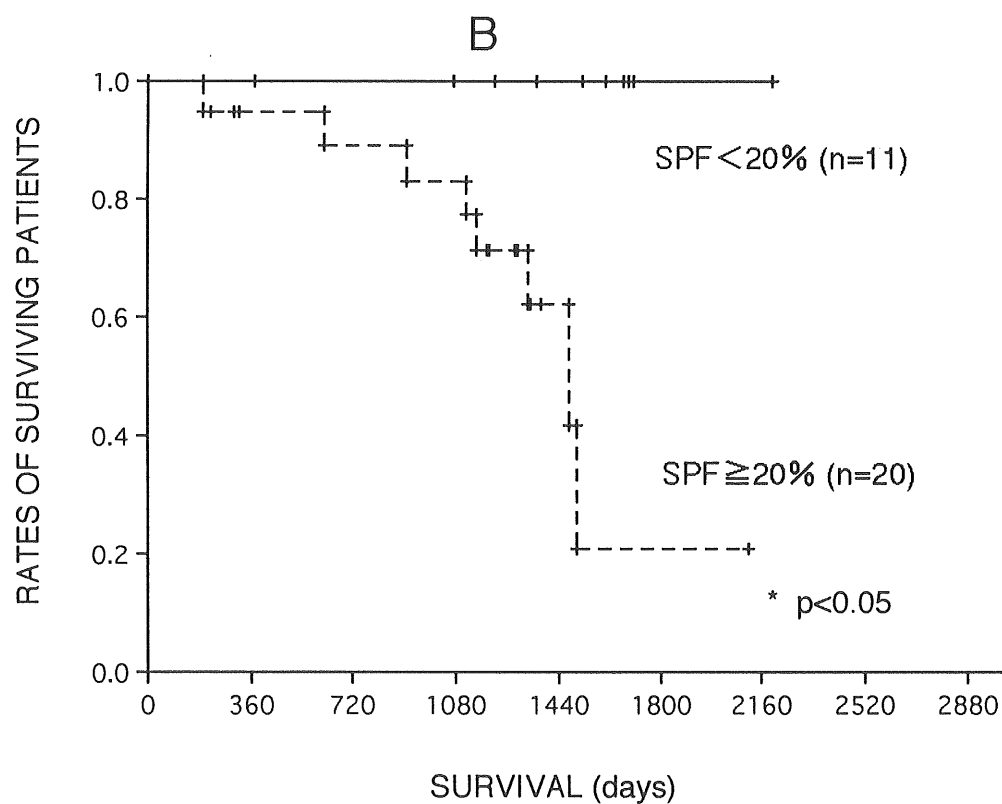
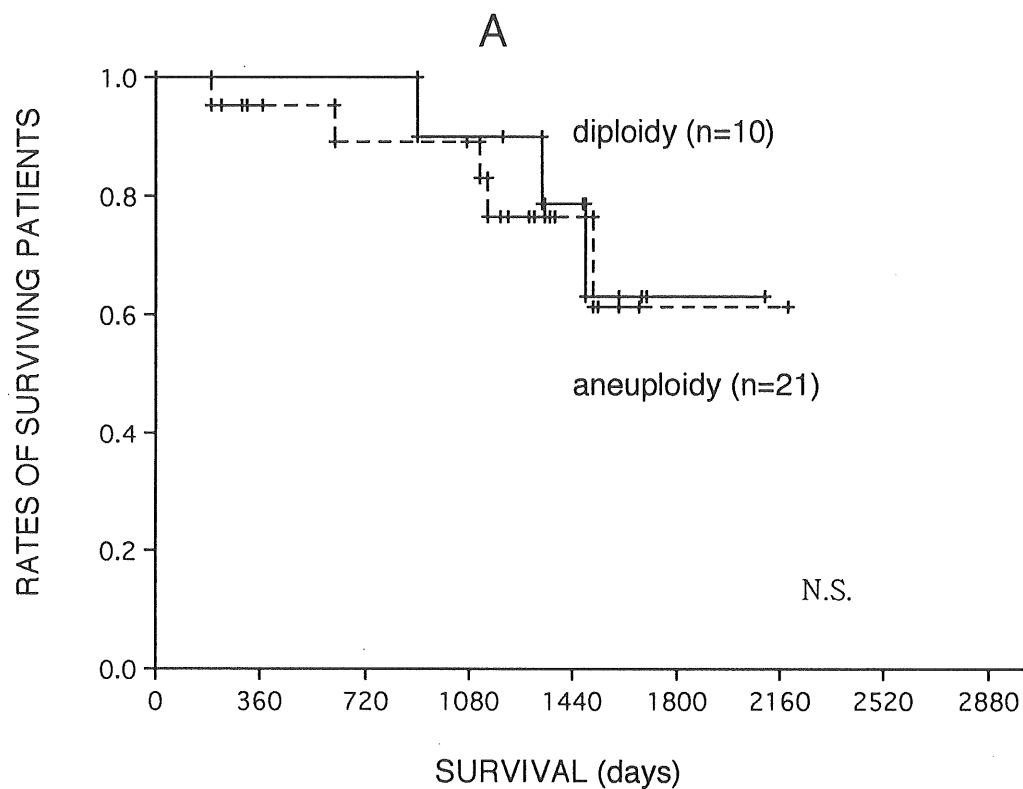


Figure 5-5. Kaplan-Meier curves of patients with stage I NSCLC, based on DNA ploidy status (A) and S phase fraction (B).

\* : generalized Wilcoxon test

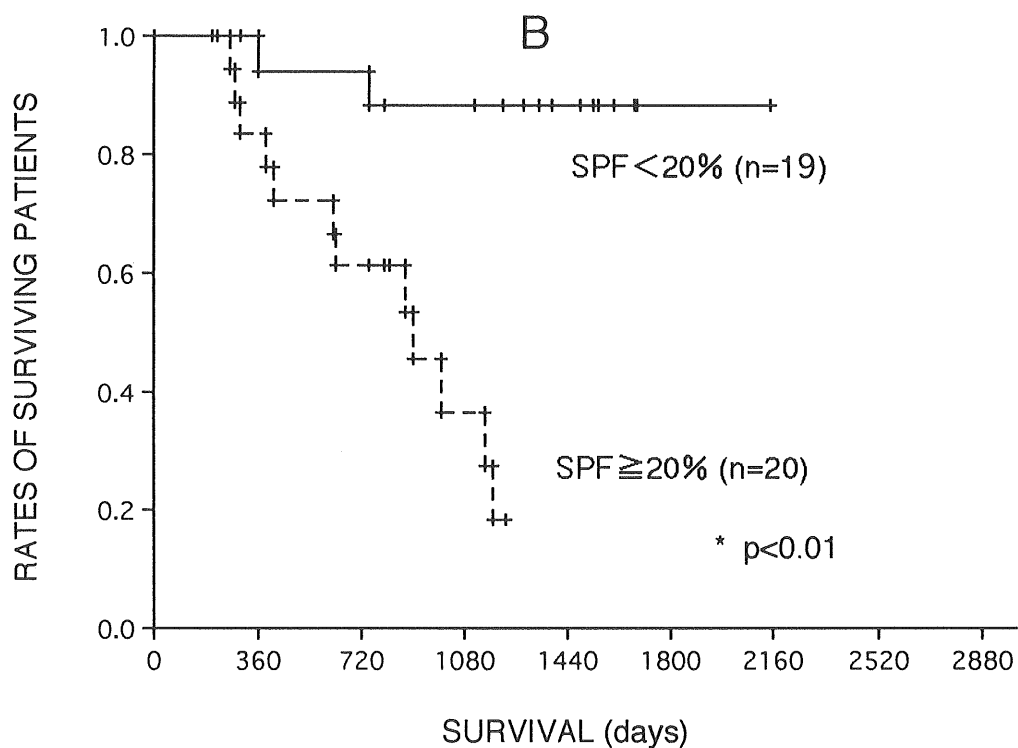
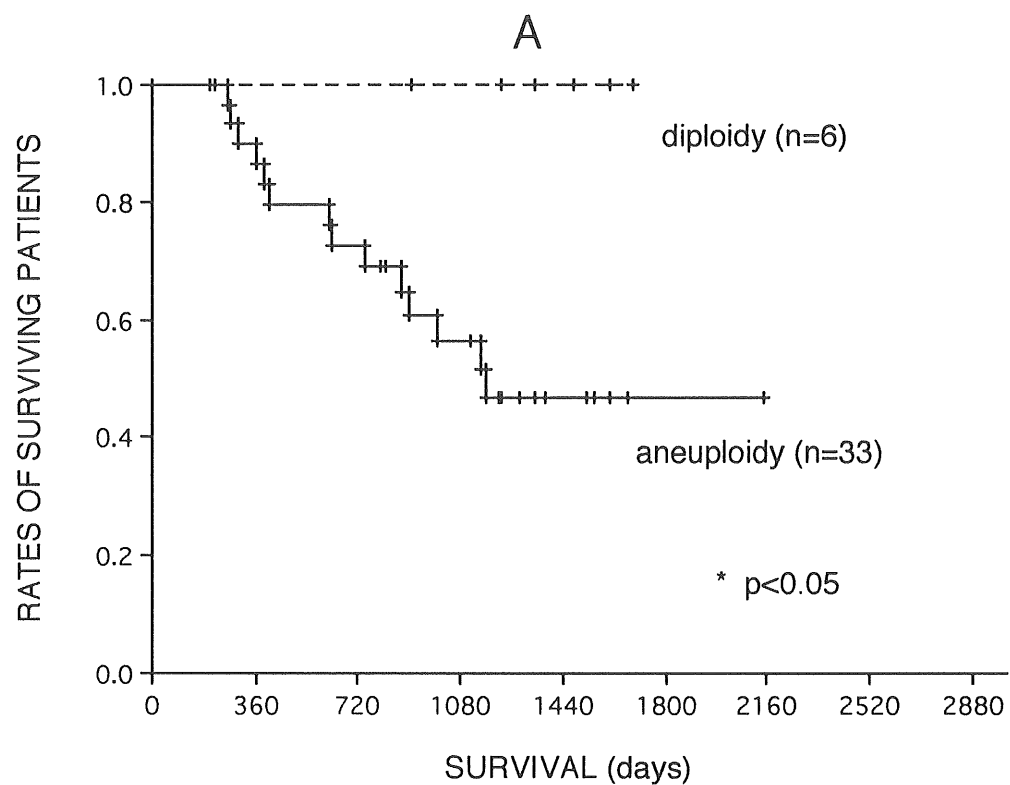


Figure 5-6. Kaplan-Meier curves of patients with adenocarcinoma, based on DNA ploidy status (A) and S phase fraction (B).

\* : generalized Wilcoxon test

## 第6章 総括

核DNA量解析は、Caspersson ら<sup>40)</sup> の顕微分光測光法によって始められ、その後 FCM の普及とともに一般化して、様々な臨床的意義について検討されてきた方法である。核DNA量解析によって、癌細胞の DNA ploidy と SPF を評価することが可能となった結果、多くの癌で DNA aneuploidy や SPF の亢進がみられることが明らかとなってきた。また、これらの DNA aneuploidy と SPF が、癌の診断および悪性度の指標として臨床に応用されてきている。

一方、癌の特徴には、核DNA量の異常以外に、従来から癌診断の根拠となっている組織および細胞の形態学的「異型」や、最近明らかにされつつある遺伝子および染色体レベルの異常などがある。しかし、これらの癌細胞の生物学的特徴である「異型」、「遺伝子異常」などと、核DNA量解析によって評価可能な DNA ploidy と SPF との関係は明らかではない。

著者は1993年に、核DNA量解析システム「NASCA」を用いて、肺癌における DNA ploidy および SPF と核の異型および患者の予後との関係について報告した<sup>53)</sup>。しかし、この時点では対象症例が少なく、また核異型の評価も十分ではなかった。ここでの課題、すなわちクロマチンパターンなどの核異型をより詳細に評価し、核DNA量解析の意義を究明したいという考えが、本研究の出発点であった。本研究は、肺癌における DNA ploidy と SPF の生物学的および臨床病理学的意義を明らかにすることを目的とした研究である。

本研究では、まず、培養細胞を対象として核DNA量解析を行ない、「NASCA」の核DNA量測定信頼性を確認した。また、肺癌切除検体を対象として、FCM との比較を行ない、臨床材料における核DNA量解析の問題点を明らかにした。次に肺癌における核異型の定量化を行い、DNA ploidy および SPF が核異型に対して及ぼす影響を明らかにした。さらに、これら DNA ploidy および SPF と肺癌細胞における癌抑制遺伝子 p53 の異常との関係を検討した。最後に、肺癌において、DNA ploidy および SPF の持つ臨床病理学的意義を明らかにした。

## 「NASCA」とFCMによる肺癌培養細胞と肺癌切除例の核DNA量解析結果の比較

まず、ヒト肺癌由来の培養細胞株（TKB-31）を対象として、本研究を通して核DNA量解析に用いられる「NASCA」と、従来から測定精度が優れているとされているFCMの両者で、核DNA量解析を行ない比較した。その結果、核DNA量ヒストグラム、細胞周期解析結果、CV値において、両者の差はほとんどなく、解析に要した時間もほぼ同等であった。核DNA量解析において「NASCA」は、FCMと遜色のない信頼性を持っていることが確認された。

次に、肺癌切除例の新鮮捺印標本を「NASCA」で測定したもの、同一症例のパラフィンプロックから得られた細胞を「NASCA」で測定したもの、およびそれをFCMで測定したもの、以上3者を比較した。その結果、「NASCA」で測定した新鮮捺印標本とパラフィンプロックとの核DNA量は極めて良好な正の相関を示し、

「NASCA」でも retrospective study が可能であることが証明された。また、

「NASCA」では扁平上皮癌などで高頻度に見られる核破砕物などを視覚的に除去し、また癌細胞とその他の細胞を別々に測定することによって、FCMより正確に目的とする細胞のみの核DNA量解析を行なえることが明らかとなった。従来から指摘されていた核DNA量解析におけるヒストグラムの解釈の混乱を解決する手段として、

「NASCA」が有用であることを示した。（第2章）

## 核形態量およびクロマチンパターンの定量化

核DNA量解析と同時に、核異型の解析が可能なシステムを考案した。これは、核DNA量解析に加えて、核異型の定量化を行なうことによって、より統合された核の解析を可能にした。核形態量として、「核面積の平均値」、「核面積の標準偏差」、

「form factor」の3項目を、クロマチンパターンとして、「核縁の肥厚」「核縁の凝集度」「核縁の不均一性」「不均等分布」「凝集度」「顆粒度」「淡明度」「集塊度」の8項目、合計11項目を核異型の指標として選択した。（第3章）

## 細胞周期の違いによる核形態の変化

一般に、核の形態は細胞周期に伴う核DNA量の変化や細胞の増殖、分化、あるいは癌化など様々な細胞の状態や変化を反映していると考えられているが、クロマチンパ



ターンを含めた細胞周期各段階の核形態をみた報告は少ない。そこで本節では、マウス線維芽細胞（NIH 3T3）において、核DNA量解析と同時に、今回あらたに考案した核形態量、およびクロマチンパターンを測定、解析した。その結果、細胞周期の進行に伴うクロマチンパターンの変化はみられなかったが、核形態量は変化することが明らかとなった。（第3章）

#### 肺癌における DNA ploidy および SPF と核異型の関連

まず、正常気管支上皮細胞と肺癌細胞の核異型の定量化を行ない、両者を比較した結果、測定したすべての核形態量、すなわち核面積、大小不同性、核形不整に有意な差がみられた。また、クロマチンパターンに関しても、算出した8個のパラメーターのうち、核縁の肥厚、核縁の凝集度、凝集度、顆粒度、淡明度において有意差が認められた。今回、核異型の指標として選択した項目は、癌の特徴である核異型を的確に捉えており、癌と非癌の鑑別に有用であることが明らかになった。

さらに、肺癌における DNA ploidy および SPF と核異型の関連を検討した結果、形態量とクロマチンパターンともに、DNA ploidy の違いが影響しており、癌の増殖能を表わす SPF の増減は関係していなかった。すなわち、核DNA量の異常を示す aneuploidy の癌細胞は、diploidy の癌細胞と比較して、より高度の核異型を伴うが、増殖が盛んな癌細胞とそうでない癌細胞との間には、核異型に違いがみられないことが明らかとなった。また、diploidy を示す癌細胞と正常細胞の間にも、核異型に違いがみられなかった。癌細胞の自動診断化において、このような核DNA量の異常がなく、核異型での鑑別も不可能な細胞が存在することから起こる問題点を、どのようにして克服して行くかが今後の課題として残されている。このように、クロマチンパターンの定量化を含めた癌細胞の核異型と DNA ploidy との関連を明らかにした報告はなく、本研究は、癌細胞の自動診断化の流れ<sup>21)</sup>に一石を投じたと考えられる。（第3章）

#### 肺癌における DNA ploidy および SPF とがん抑制遺伝子 p53 との関連

がん抑制遺伝子 p53 は、正常では細胞増殖を制御することによって、障害を受けた遺伝子の修復を行なうとされている。この p53 遺伝子の異常が、ヒトの多くの癌

で認められ、特に癌化の初期段階に関連していることが明らかになってきている。しかし、p53 遺伝子の異常、あるいはその遺伝子産物である 異常な p53 蛋白（変異型 p53 蛋白）の発現と癌腫の増殖能との関連や、核DNA量の異常との関係に関して検討した報告はほとんどない。肺癌における DNA ploidy および SPF と 変異型 p53 蛋白の発現との関連を明らかにするために、肺癌における変異型 p53 蛋白の発現を免疫組織化学的に検討し、さらに核DNA量解析で得られた DNA ploidy および SPF との比較検討を行った。その結果、変異型 p53 蛋白の発現率は、増殖能の亢進している肺癌症例では高く、変異型 p53 蛋白の細胞増殖促進作用と矛盾しないことが明らかとなった。しかし、変異型 p53 蛋白の発現率は、diploidy 群のほうが aneuploidy 群より高い傾向にあり、変異型 p53 蛋白の発現が必ずしも、核DNA量の異常と関係しないことが示唆された。DNA ploidy と がん抑制遺伝子 p53 との関連をみるためには、遺伝子レベルでの解析が必要と考えられる。（第4章）

#### 非小細胞肺癌における DNA ploidy および SPF と臨床病理学的意義

従来から、様々な癌において DNA aneuploidy や SPF が病期や予後と相関があるとする報告が多いが、これらが必ずしも癌の悪性度を反映しないとの報告も少なからずみられる。このように、DNA ploidy や SPF の評価は未だ定まっていない。その原因として、各施設で核DNA量の測定方法や評価方法が異なっていることが指摘されており、癌臨床における核DNA量解析の意義を確立するうえで大きな障壁となっている。本研究では、正常細胞の測定結果から、DNA ploidy および SPF の評価基準を設定し、その評価の曖昧さを排除した。これを踏まえ、非小細胞肺癌を対象として核DNA量解析を行い、DNA ploidy および SPF と癌の組織型、進展度などの臨床病理学的因子との関連、さらに、これらの予後因子としての重要性を検討した。その結果、SPF と、腫瘍径、T因子、リンパ節転移の有無、および胸膜浸潤の有無との間に有意な相関がみられたが、DNA ploidy と臨床病理学的因子との関連はみられないことが明らかとなった。また、DNA ploidy と組織学的分化度との間に有意な相関はみられなかったが、SPF は、腺癌、扁平上皮癌ともに、高分化度肺癌は中および低分化度の肺癌に比較して SPF が低い傾向にあった。さらに予後因子としては、DNA ploidy よりも SPF が、より重要であった。（第5章）

本研究では、DNA ploidy および SPF と、癌の生物学的特徴あるいは臨床病理学的因子との関連を検討し、肺癌における核DNA量解析の持つ意義を明らかにした。しかし、癌における核DNA量解析の意義をより詳細に検討するためには、遺伝子レベルでの解析が必須であり、また、臨床的検討を行なう場合は、評価方法を標準化して、prospective に研究を進める必要があると考えられる。

わが国における肺癌の死亡率は年々急激に増加し、平成3年以来我が国における男性の癌死の第1位を占めており、肺癌の治療成績の向上は重要性を増している。今日、診断法の進歩と検診活動の普及によって、早期診断や早期治療症例が増加しているとはいえ、我が国での肺癌切除例の病期I期症例の5年生存率は60～70%と決して満足できるものではない<sup>158)</sup>。このように肺癌は、最も予後の悪い癌の一つであり、早期発見、早期治療を目指した検診の努力も、他の子宮頸癌や胃癌などに比較してその効果は上がっていないのが現状である。肺癌の多くは発見時にはすでに進行例であり、その多くが手術不能例である。喀痰検診などの普及などによって、より早期の肺癌診断が望まれる由縁である。

DNA aneuploidy が癌に高率にみられることから、核DNA量解析を癌細胞診の診断に応用することが以前から試験的に行われている<sup>8, 35, 62)</sup>。もし、これが実用化すれば、喀痰検診の充実が図れることになる。しかし、核DNA量解析単独で癌の診断を行うことは、第3章第5節で述べたように、diploidy の癌が存在することから困難である。本研究では、核DNA量解析に核異型の定量化を加えることによって癌の自動診断化を目指しているが実用化には至っていない。今後の課題として、これまでのシステムで得ることの可能な癌細胞の特徴量である、核DNA量、核異型などを入力因子として、より統合的に癌・非癌の鑑別が行なえるシステムを考案する必要があると考えている。

## 謝辞

まず最初に、本研究を行なうにあたり、終始御指導いただきました基礎医学系病理学・小形岳三郎教授に深く感謝致します。

大学院での研究を始めるにあたり、多大な御配慮と御尽力いただきました元臨床医学系胸部外科教授（前筑波大学副学長）堀 原一先生に心から感謝致します。

いつも新鮮な御示唆をいただきました臨床医学系胸部外科・三井利夫教授に感謝致します。また、常に新しいことへ向かう情熱を御教唆していただきました臨床医学系胸部外科・三井清文助教授に感謝致します。

研究実施にあたり、直接御指導下さいました菅間 博講師と、同級であり親友でもある堀口 尚前助手と飯島達生講師をはじめとする病理の諸先生方に感謝致します。

本研究をまとめるに際して多大な御協力をいただきました臨床医学系・赤荻栄一講師，研究への情熱を教えていただきました同・鬼塚正孝講師，4年間を通して御支援をいただきました同・石川成美講師に感謝致します。

様々な面で御協力いただきました検査部病理検査部門・鈴木悦主任検査技師，医学専門学群形態系技官・森 敏幸技師をはじめ技官の皆様と，秘書の柳原佐和子さんに感謝致します。

本研究のプログラミングに関して，多大な御協力をいただきましたラトックシステムエンジニアリング株式会社・南郷 脩氏，磯部雅也氏に感謝致します。

予後調査などで協力していただきました筑波大学附属病院呼吸器外科の先生方に感謝致します。

最後に、いつも理解と協力をしてくれた友人たちと、私の家族に感謝します。

## 関連文献，学会発表

### 関連文献

非小細胞肺癌における癌細胞核DNA量と核異型および臨床病理所見との関係

山本達生，堀口 尚，菅間 博，小形岳三郎，深沢政勝，池沢 剛，稲毛芳永，  
赤荻栄一，三井清文，堀 原一：日臨細胞誌. 32：846～852，1993.

Encapsulated Type II Pneumocyte Adenoma: A Case Report and Review of the Literature.  
Yamamoto T., Horiguchi H, Shibagaki T, Kamma H, Ogata T, Mitsui K.: Respiration. 60:  
373-377, 1993.

Clear cell carcinoma of the lung: a case report and review of the literature.

Yamamoto T, Yazawa T, Ogata T, Akaogi E, Mitsui K.: Lung Cancer. 10: 101-106, 1993.

Comparative DNA Analysis by Image Cytometry and Flow Cytometry in Non-small Cell  
Lung Cancer.

Yamamoto T., Horiguchi H., Kamma H., Noro M., Ogata T., Inage Y., Akaogi E., Mitsui K.,  
Hori M., Isobe M.: Jpn J Cancer Res, 85: 1171-1177, 1994.

### 学会発表

Image Cytometric DNA Analysis in Smear Specimens of Non-Small Cell Lung Cancer  
VIth World Conference on Lung Cancer (1991年11月，Melbourne，Australia)

画像解析装置を用いた細胞形態と核DNA量の解析による肺癌切除例臨床像の検討  
第45回日本胸部外科学会総会 (1992年10月，新潟)

カラー画像解析装置を用いた肺癌細胞核DNA量測定の臨床的意義の解析とflow cytometry法との比較検討

第33回日本肺癌学会総会 (1992年11月 名古屋)

非小細胞肺癌治療切除例の予後因子に関する検討—とくに細胞増殖能, 核DNA量, 血管浸潤性について

第34回日本臨床細胞学会総会 (1993年5月 仙台)

非小細胞肺癌における癌細胞核DNA量と核異型および臨床病理所見との関係

第34回日本肺癌学会総会 (1993年11月 東京)

肺癌におけるアポトーシスとc-mycおよび核DNA量ヒストグラムパターンとの関係

第83回日本病理学会 (1994年3月 京都)

Influence of Nuclear DNA Content on Nuclear Atypia and Chromatin Patterns of Non-small Cell Lung Cancer

VIIth World Conference on Lung Cancer (1994年6月 Colorado Springs, USA)

画像解析による癌細胞の核クロマチンパターンおよびDNA分布の数値化

第53回日本癌学会総会 (1994年10月 名古屋)

## 文献

1. 堀田康雄. 細胞周期. 東京大学出版会, 東京, 1983.
2. Alberts B. 細胞の分子生物学. 教育社, 東京, 1990.
3. Friedlander M., Hedley, D., Taylor, I. Clinical and biological significance of aneuploidy in human tumours. *J Clin Pathol.* 37: 961-974, 1984.
4. 野村和弘. 核DNA量の解析. フローサイトメトリー (手技と実際). 太田和雄監修. 蟹書房, 東京, 1988.
5. 高木 滋, 太田和雄. Flow cytometry による腫瘍マーカーとしての異数倍数体の検索. *最新医学* 40: 104-109, 1985.
6. Barlogie B. Cellular DNA content as a marker of neoplasm in man. *Am J medicine* 69: 195-194, 1980.
7. Merkel D.E., Dressler, L.G., McGuire, W.L. Flow cytometry, cellular DNA content, and prognosis in human malignancy. *J Clin Oncol* 5: 1690-1703, 1987.
8. Koss L.G. Diagnostic cytology and its histopathologic bases. 4th ed. Philadelphia: Lippincott, 1992.
9. Yamamoto T. Molecular basis of cancer, Oncogenes and tumor suppressor genes. *Microbiol. Immunol.* 37: 11-22, 1993.
10. Barlogie B. Determination of ploidy and proliferative characteristics of human solid tumors by pulse cytophotometry. *Cancer Res* 38: 3333-3338, 1978.
11. Wied G.L., Bartels, P.H., Bibbo, M., et al. Image analysis in quantitative cytopathology and histopathology. *Hum Pathol* 20: 549-548, 1989.
12. Barlogie B. Correlation of DNA distribution abnormalities with cytogenetic findings in human adult leukemia and lymphoma. *Cancer Res* 37: 4400-4407, 1977.
13. Vindeløv L. Flow microfluorometric analysis of nuclear DNA in cells from solid tumors and cell suspension. *Virchows Arch [Cell Pathol]* 24: 227-242, 1977.
14. Atkin N., Kay, R. Prognostic significance of modal DNA value and other factors in malignant tumours, based on 1465 cases. *Br J Cancer* 40: 210-221, 1979.
15. Wersto R., Liblit, R., Koss, L. Flow cytometric DNA analysis of human solid tumors:

- A review of the interpretation of DNA histograms. *Hum Pathol* 22: 1085-1098, 1991.
16. Sasaki K., Murakami, T. Clinical application of flow cytometry for DNA analysis of solid tumors. *Acta Pathol Jpn* 42: 1-14, 1992.
  17. Hostetter A.L. A Comparative Study of DNA Cytometry Methods for Benign and Malignant Thyroid Tissue. *A.J.C.P* 89: 760-763, 1988.
  18. Bishop J.M. Molecular themes in oncogenesis. *Cell* 64: 235-248, 1991.
  19. Vindelov L.L. Clonal heterogeneity of small cell anaplastic carcinoma of the lung demonstrated by flow-cytometric DNA analysis. *Cancer Res* 40: 4295-4300, 1980.
  20. Remmelink M., Salmon, I., Petein, M., et al. Determination of DNA ploidy, nuclear size, and proliferative activity by means of the computer-assisted image analysis of feulgen-stained nuclei in 68 soft tissue tumors of adults. *Hum Pathol* 25: 694-701, 1994.
  21. Dawson A.E., Norton, J.A., Weinberg, D.S. Comparative assessment of proliferation and DNA content in breast carcinoma by image analysis and flow cytometry. *Am J Pathol* 136: 1115-1124, 1990.
  22. Yeaton P., Kiss, R., Deviere, J., et al. Use of cell image analysis in the detection of cancer from specimens obtained during endoscopic retrograde cholangiopancreatography. *Am J Clin Pathol* 100: 497-501, 1993.
  23. Wilson, G.D., McNally, N.J., Dische, S. et al. Measurement of cell kinetics in human tumor in vivo using bromodeoxyuridin incorporation and flow cytometry. *Br J Cancer* 58: 423-431.
  24. Salmon, I., Kiss, R., Levivier, M., et al. Characterization of nuclear DNA content, proliferation index, and nuclear size in a series of 181 meningiomas, including benign primary, recurrent, and malignant tumors. *Am J Surg Pathol* 17: 239-247, 1993.
  25. Tsutsui S., Kuwano, H., Mori, M., et al. A flow cytometric analysis of DNA content in primary and metastatic lesions of esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer* 70: 2586-2591, 1992.
  26. Tinari N., Natoli, C., Angelucci, D., et al. DNA and S-phase fraction analysis by flow cytometry in prostate cancer. *Cancer* 71: 289-296, 1993.
  27. Barlogie B. Flow cytometry in clinical cancer research. *Cancer Res* 43: 3982-3997, 1983.
  28. 山岡憲夫, 内山貴亮, 君野孝二・他. 肺多発癌の診断基準の検討—核DNA量解析を加味して—. *肺癌*. 30: 993-1003, 1990.



29. 阿部庄作, 牧村士郎, 板橋孝一・他. 肺小細胞癌細胞の核形態と核DNA量の関係—化学療法の効果との関連から—. 日臨細胞誌. 25: 12-19, 1986.
30. Rosell R., Gomez-Codina, J., Camps, C., et al. A randomized trial comparing preoperative chemotherapy plus surgery with surgery alone patients with non-small cell lung cancer. N Engl J Med 330: 153-158, 1994.
31. Pastel-Levy C. DNA flow cytometry of epithelioid sarcoma. Cancer 70: 2823-2826, 1992.
32. Cibas E.S. The effect of tumor size and tumor cell DNA content on the survival of patients with stage 1 adenocarcinoma of the lung. Cancer 63: 1552-1556, 1989.
33. Bunn P. Diagnostic and biological implications of flow cytometric DNA content analysis in lung cancer. Cancer Res 43: 5026-5032, 1983.
34. Stenkvist B., Strande, G. Entropy as an algorithm for the statistical description of DNA cytometric data obtained by image analysis microscopy. Analyt. Cell. Pathol. 2: 159-165, 1990.
35. Gil J. Image analysis in anatomic pathology: what are the issues? Hum Pathol 20: 203-204, 1989.
36. Deitch A.D., Wagner, D., Richart, R.M. Conditions influencing the intensity of the Feulgen reaction. J Histochem. Cytochem. 16: 371-379, 1968.
37. Mikel U.V. Absolute DNA values from Feulgen Microspectrophotometric measurements and quantitative electron microscopy. Analyt Quant Cytol Histol 9: 13-16, 1987.
38. Moser G.C., Fallon, R.J., Keiss, H.K. Fluorometric measurements and chromatin condensation patterns of nuclei from 3T3 cells throughout G1. J Cell Physiol 106: 293-301, 1981.
39. Allison D. Increased accuracy of absorption cytophotometric DNA values by control of stain intensity. J Histochem Cytochem 29: 1219-1228, 1981.
40. Caspersson T. Cell Growth and Cell Function. A cytochemical Study. Norton. New York: 1950.
41. Mellors R.C., Glassman, A., Papanicolaou, G.N. A microfluorometric scanning method for detection of cancer cells. Cancer 5: 458-468, 1952.

42. Van Dilla, M.A., Trujillo, T.T., Mullaney, P.F., et al. Cell microfluorometry: A method for rapid fluorescence measurement. *Science* 163: 1213-1214, 1969.
43. Loken M., Herzenberg, L. Analysis of cell populations with a fluorescence-activated cell sorter. *Ann NY Acad Sci* 254: 163-171, 1975.
44. 高本 滋. 定義および原理. フローサイトメトリー (手技と実際). 太田和雄監修. 蟹書房, 東京, 1988.
45. Schutte B., Reynders, M.F. Flow cytometric determination of DNA ploidy level in nuclei isolated from paraffin-embedded tissue. *Cytometry* 6: 26-30, 1985.
46. Vindelov L.L., Christensen, I.J., Nissen, N.I. A detergent-trypsin method for the preparation of nuclei for flow cytometric DNA analysis. *Cytometry* 3: 323-327, 1983.
47. Hedley D. Method for analysis of cellular DNA content of paraffin-embedded pathological material using flow cytometry. *J Histo Cytochem* 31: 1333-1335, 1983.
48. Ghali V.S., Liau, S., Teplitz, C., et al. A comparative study of DNA ploidy in 115 fresh-frozen breast carcinomas by image analysis versus flow cytometry. *Cancer* 70: 2668-72, 1992.
49. Clemo F.A.S., Crabtree, W.N., Walker, E. Comparison of image analysis and flow cytometric measurements of DNA content of canine transitional cell carcinomas. *Analyt Quant Cytol Histol* 15: 418-426, 1993.
50. Marchevsky A., Gil, J., Jeanty, H. Computerized interactive morphometry in pathology: current instrumentation and methods. *Hum Pathol* 18: 320-331, 1987.
51. 堀口 尚. 細胞核DNA量のカラー画像解析装置を用いた顕微測光法に関する研究. 博士論文. 1991.
52. 菅間 博, 堀口 尚, 小形岳三郎, 他. カラー画像解析装置を用いた核DNA量の定量. *日本臨床* 50: 251-257, 1992.
53. 山本達生, 菅間 博, 堀口 尚, 他. 非小細胞肺癌における癌細胞核DNA量と核異型および臨床病理学的所見との関係. *日臨細胞誌* 32: 846-852, 1993.
54. 日本病理学会編. 病理組織化学とその技術. 医歯薬出版, 東京, 1986.
55. 藤田哲也. 顕微測光法の技術とその定量組織化学への応用. "組織細胞化学 1985" (日本組織細胞化学会編). 学際企画, 東京, 1985.

56. Kamma K., Endo, K., Horiguchi, H., et al. Lung cancer-associated monoclonal antibody 15 that recognized cell growth-related membrane antigen gp85/45 and its growth-inhibitory effect on human lung cancer cells in vivo. *Cancer Res.* 49: 5118-5122, 1989.
57. Bibbo M., Michelassi, F., Bartels, P.H., et al. Karyometric marker features in normal-appearing glands adjacent to human colonic adenocarcinoma. *Cancer Res* 50: 147-151, 1990.
58. Cutler S.J. Prognostic factors in cancer of the female breast: II. Reproducibility of histopathologic classification. *CA Cancer J Clin* 19: 75-82, 1966.
59. Delides G.S. Intralaboratory variations in the grading of breast carcinoma. *Arch Pathol Lab Med* 106: 126-128, 1982.
60. Wolberg W.H., Street, W.N., Mangasarian, O.L. Breast cytology diagnosis with digital image analysis. *Analyt Quant Cytol Histol* 15: 369-404, 1993.
61. Pressman N.J. Markovian analysis of cervical cell images. *J. Histochem. Cytochem.* 24: 138-144, 1976.
62. Dawson A.E., Cibas, E.S., Bacus, J.W., et al. Chromatin texture measurement by Markovian analysis. *Analyt. Quant. Cytol. Histol.* 15: 227-235, 1993.
63. Deligdisch L., Miranda, C., Barba, J., et al. Ovarian dysplasia: nuclear texture analysis. *Cancer* 72: 3253-3257, 1993.
64. Stenkvist B., Westman-Naeser, S., Holmquist, J., et al. Computerized nuclear morphometry as an objective method for characterizing human cancer cell populations. *Cancer Res* 38: 4688-4697, 1978.
65. Spina D. Novel, contrast gradient-oriented, automated chromatin texture analysis. *Virchows Arch [B]* 62: 119-124, 1992.
66. Moragas A., Garcia-bonafe, M., Torres, I, et al. Textural analysis of lymphoid cells in serous effusions; a mathematical morphologic approach. *Analyt Quant Cytol Histol* 15: 165-170, 1993.
67. Burns T.R., Teasdale, T.A., Greenberg, S.D. Use of morphometry as an aid in the differential diagnosis of large cell carcinoma of the lung. *Analyt Quant Cytol Histol* 15:

101-107, 1993.

68. Dawson A.E., Austin, R.E., Weinberg, D.S. Nuclear grading of breast carcinoma by image analysis. *Am J Clin Pathol* 95: 29-34, 1991.
69. Cagle P.T., Langston, C., Fraire, A.E., et al. Absence of correlation between nuclear morphometry and survival in stage I non-small cell lung carcinoma. *Cancer* 69: 2454-2457, 1991.
70. Epstein J.I., Berry, S.J., Eggleston, J.C. Nuclear roundness factor; a predictor of progression in untreated stage A2 prostate cancer. *Cancer* 54: 1666-1671, 1984.
71. Gearhart J.P., Partin, A.W., Leventhal, B., et al. The use of nuclear morphometry to predict response to therapy in Wilms' tumor. *Cancer* 69: 804-808, 1992.
72. Traganos F. Simultaneous staining of ribonucleic and deoxyribonucleic acids in unfixed cells using Acridine Orange in flow cytometric system. *J Histochem Cytochem* 25: 46-56, 1977.
73. Newmann J.R., Juusman, D., Ingram, U.M. Nuclear protein synthesis and phosphorylation in FRIEND erythroleukemia cells stimulated with DMSO. *Exp Cell Res* 111: 277-284, 1978.
74. Giroud F., Gauvain, C., Seigneurin, D., et al. Chromatin texture changes related to proliferation and maturation in erythrocytes. *Cytometry* 9: 339-348, 1988.
75. Moustafa Y., Chancel, J., Rossetti, F. Image analysis of lymphoid cell differentiation in rat thymus throughout development. *Thymus* 19: 127-144, 1992.
76. Sawicki W., Rowinski, J., Swenson, R. Change of chromatin morphology during the cell cycle detected by means of automated image analysis. *J Cell Physiol.* 84: 423-428, 1974.
77. Woldringh C.L., Huls, P.G., Vischer, N.O.E. Volume growth of daughter and parent cells during the cell cycle of *Saccharomyces cerevisiae* a/ $\alpha$  as determined by image cytometry. *J Bacteriol* 175: 3174-3181, 1993.
78. Ferguson M., Ward, D.C. Cell cycle dependent chromosomal movement in pre-mitotic human T-lymphocyte nuclei. *Chromosoma* 101: 557-565, 1992.
79. Diamond L.W., Weisenburger, D.D., Rappaport, H. The relationship between lymphocyte

- nuclear morphology and cell cycle stage in lymphoid neoplasia. *Am J Hematol* 11: 165-173, 1981.
80. Colomb E., Dussert, C., Martin, P. Nuclear texture parameters as discriminant factors in cell cycle and drug sensitivity studies. *Cytometry* 12: 15-25, 1991.
81. Pederson T., Robbins, E. Chromatin structure and the cell division cycle. *J Cell Biol* 55: 322-327, 1972.
82. Pederson T. Chromatin structure and the cell cycle. *Proc Nat Acad Sci USA* 69: 2224-2228, 1972.
83. Adolph K.W., Phelps, J.P. Role of non-histones in chromosome structure; cell cycle variation in protein synthesis. *J Biol Chem* 257: 9086-9092, 1982.
84. Asamura H., Nakajima, T., Mukai, K., et al. DNA cytofluorometric and nuclear morphometric analyses of lung adenocarcinoma. *Cancer* 64: 1657-64, 1989.
85. Gil J., Marchevsky, A.M., Silage, D.A. Applications of computerized interactive morphometry in pathology: I. Tracings and generation of graphic standards. *Lab Invest* 54: 222-227, 1986.
86. Marchevsky A.M., Gil, J., Jeanty, H. Applications of computerized interactive morphometry in pathology. II. A model for computerized generated diagnosis. *Lab Invest* 54: 708-716, 1986.
87. 小山秀樹. 増殖曲線. 組織培養の技術 (第二版). 朝倉書店, 東京, 1988.
88. 野村和弘. 試料作製法. フローサイトメトリー (手技と実際). 太田和雄監修. 蟹書房, 東京, 1988.
89. 肺癌取扱い規約 (改訂第3版). 日本肺癌学会編, 金原出版, 東京, 1988.
90. Bartels P., Bahr, G.F., Bibbo, M., et al. Analysis of variance of the Papanicolaou staining reaction. *Acta Cytol* 18: 522-531, 1974.
91. 渡部郁雄. 細胞周期の解析. フローサイトメトリー (手技と実際). 太田和雄監修. 蟹書房, 東京, 1988.
92. 市原清志. バイオサイエンスの統計学. 南江堂, 東京, 1990.
93. Bonsing B.A. High levels of DNA index heterogeneity in advanced breast carcinomas. *Cancer* 71: 382-91, 1993.

94. Carey F.A., Lamb, D., Bird, C.C. Intratumoral heterogeneity of DNA content in lung cancer. *Cancer* 65: 2266-2269, 1990.
95. Elsheikh T.M. Comparative DNA analysis of solid tumors by flow cytometric and image analyses of touch imprints and flow cell suspensions [see comments]. *Am J Clin Pathol* 98: 296-304, 1992.
96. Frierson H.F. The need for improvement in flow cytometric analysis of ploidy and S-phase fraction. *Am J Clin Pathol* 439-442, 1991.
97. Nakamura H., Morita, T., Sato, C. Structural organizations of replicon domains during DNA synthetic phase in the mammalian nucleus. *Exp Cell Res* 165: 291-297, 1986.
98. O'Keefe R.T., Henderson, S.C., Spector, D.L. Dynamic organization of DNA replication in mammalian cell nuclei: spatially and temporally defined replication of chromosome-specific a-satellite DNA sequences. *J Cell Biol* 116: 1095-1110, 1992.
99. Henson D.E. The histological grading of neoplasm. *Arch Pathol Lab Med* 112: 1091-1096, 1988.
100. Wolberg W.H., Mangasarian, O.L. Multisurface method of pattern separation for medical diagnosis applied to breast cytology. *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 9193-9196, 1990.
101. Sanchez P., Vidal, L., Parrado, C., et al. Application of morphometric methods to the cytologic study of intradermal nevi. *Analyt Quant Cytol Histol* 14: 386-390, 1992.
102. Kuo S., Lai, M., Liu, Y. et al. Nuclear area and DNA content in tumor and nontumor portions of hepatocellular carcinoma. *Analyt Quant Cytol Histol* 16: 153-158, 1994.
103. 田嶋基男. 臨床細胞学. 名古屋大学出版会, 名古屋, 1993.
104. Aubele, M., Jutting, U., Rodenacker, K., et al. Quantitative evaluation of radiation-induced changes in sperm morphology and chromatin distribution. *Cytometry* 11: 586-594, 1990.
105. Yunis J.J., Yasmineh, W.G. Heterochromatin, satellite DNA, and cell function. *Science* 174: 1200-1209, 1971.
106. Furukawa Y., Piwnicka-Worms, H. cdc2 gene expression at the G1 to S transition in human T lymphocytes. *Science* 250: 805-812, 1990.

107. Christen R., Xiao, J., Minimo, C., et al. Chromatin texture features in hematoxylin and eosin-stained prostate tissue. *Analyt Quant Cytol Histol* 15: 383-388, 1993.
108. Wang N., Stenkivist, B.G., Tribukait, B. Morphometry of nuclei of the normal and malignant prostate in relation to DNA ploidy. *Analyt Quant Cytol Histol* 14: 210-216, 1992.
109. Presti B., Weidner, N., Weinberg, D.S. Automated nuclear grading of renal cell carcinoma by digital image analysis. *Lab Invest* 62: 80A, 1990.
110. Weinberg R.A. Tumor suppressor genes. *Science* 254: 1138-1146, 1991.
111. Nigro J.M., Baker, S.J., Preisinger, A.C. Mutations in the p53 gene occur in diverse human tumour types. *Nature* 342: 705-708, 1989.
112. Levine A.J., Momand, C.A. The p53 tumor suppressor gene. *Nature* 351: 453-456, 1991.
113. Hollstein M., Sidransky, D., Vogelstein, B., et al. p53 mutations in human cancers. *Science* 253: 49-53, 1991.
114. Fields S., Jang, S.K. Presence of a potent transcription activating sequence in the p53 protein. *Science* 249: 1046-1049, 1990.
115. Oren M. The p53 cellular tumor antigen: gene structure, expression and protein properties. *Biochem Biophys Acta* 823: 67-78, 1985.
116. Baker S.J., Preisinger, A.C., Jessup, J.M., et al. p53 gene mutations occur in combination with 17p allelic deletions as late events in colorectal tumorigenesis. *Cancer Res.* 50: 7717-7722, 1990.
117. Vojtesek B., Bartek, J., Midgley, C.A., et al. An immunochemical analysis of the human nuclear phosphoprotein p53. New monoclonal antibodies and epitope mapping using recombinant p53. *J Immunological Methods* 151: 237-244, 1992.
118. Takahashi T., Carbone, D., Takahashi, T., et al. Wildtype but not mutant p53 suppresses the growth of human lung cancer cell lines bearing multiple genetic lesions. *Cancer Res.* 52: 2340-2343, 1992.
119. Takahashi T., Nau, M.M., Chiba, I., et al. A frequent target for genetic abnormalities in lung cancer. *Science* 246: 491-494, 1989.

120. Vogelstein B., Kinzler, K.W. p53 function and dysfunction. *Cell* 70: 1992.
121. Miller C.W., Simon, K., Also, A., et al. p53 mutations in human lung cancers. *Cancer Res.* 52: 1695-1698, 1992.
122. D'Amico D., Carbone, D., Mitsudomi, T., et al. High frequency of somatically acquired p53 mutations in small cell lung cancer cell lines and tumors. *Oncogene* 7: 339-346, 1992.
123. Sozzi G., Miozzo, M., Donghi, R., et al. Deletions of 17p and p53 mutations in preneoplastic lesions of the lung. *Cancer Res* 52: 6079-6082, 1992.
124. Nuorva K., Soini, Y., Kamel, D., et al. Concurrent p53 expression in bronchial dysplasia and squamous cell lung carcinomas. *Am J Pathol* 142: 725-732, 1993.
125. Umekita Y., Takasaki, T., Yoshida, H. Expression of p53 protein in benign epithelial hyperplasia, atypical ductal hyperplasia, non-invasive and invasive mammary carcinoma: an immunohistochemical study. *Virchows Archiv* 424: 491-494, 1994.
126. Wang L., Hong, J., Qiu, S., et al. Accumulation of p53 protein in human esophageal precancerous lesions: A possible early biomaker for carcinogenesis. *Cancer Res* 53: 1783-1787, 1993.
127. Hanski C., Bornhoeft, G., Shimoda, T., et al. Expression of p53 protein in invasive colorectal carcinomas of different histologic types. *Cancer* 70: 2772-2777, 1992.
128. Yamaguchi A., Kurosaka, Y., Fushida, S., et al. Expression of p53 protein in colorectal cancer and its relationship to short-term prognosis. *Cancer* 70: 2778-2784, 1992.
129. Joypaul B.V. Expression of p53 protein in normal dysplastic and malignant gastric mucosa: An immunohistochemical study. *J Pathol* 170: 279-283, 1993.
130. 井上博元, 小川純一, 正津 晃. 肺癌におけるp53発現と細胞増殖能, 予後との関係. *肺癌* 34: 153-159, 1994.
131. Midgley C.A., Fisher, C.J., Bartek, J., et al. Analysis of p53 expression in human tumors: an antibody raised against human p53 expressed in *Escherichia coli*. *J Cell Sci* 101: 183-189, 1992.
132. Hsu S.M., Raine, L., Fanger, H. Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immuno-peroxidase techniques: A comparison between ABC and unlabeled (PAP)



- procedures. *J Histochem Cytochem* 29: 577-588, 1981.
133. Finlay, C.A., Hinds, P.W., Tan, T.H., et al. Activating mutations for transformation by p53 produce a gene product that forms an hsc 70-p53 complex with altered half-life. *Mol Cell Biol* 8: 531-539, 1988.
  134. Mercer W.E. Growth suppression induced by wild-type p53 protein is accompanied by selective down-regulation of proliferating-cell nuclear antigen expression. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 1958-1962, 1991.
  135. Caamano J., Ruggeri, B., Momiki, S., et al. Detection of p53 in primary lung tumors and non-small cell lung carcinoma cell lines. *Am J Pathol* 139: 839-845, 1991.
  136. Kishimoto Y., Murakami, Y., Shiraishi, M., et al. Aberrations of the p53 tumor suppressor gene in human non-small cell carcinomas of the lung. *Cancer Res.* 52: 4799-4804, 1992.
  137. Straus M.J. Growth characteristics of lung cancer. *Lung Cancer, Clinical Diagnosis and Treatment.* New York: Grune & Stratton, 1983. 19-32.
  138. Vahakangas, K.H. Mutations of p53 and ras genes in radon-associated lung cancer from uranium miners. *Lancet* 339: 576-580, 1992.
  139. Takahashi T. Identification of intronic point mutations as an alternative mechanism for p53 inactivation in lung cancer. *J Clin Invest* 86: 363-369, 1990.
  140. Lehman T.A. p53 mutations, ras mutations, and p53-heat shock 70 protein complexes in human lung carcinoma cell lines. *Cancer Res* 51: 4090-4096, 1991.
  141. Bodner S.M., Minna, J.D., Jensen, S.M., et al. Expression of mutant p53 proteins in lung cancer correlates with the class of p53 gene mutation. *Oncogene* 7: 743-749, 1992.
  142. TNM, Classification of malignant tumours. Springer-Verlag, 1987.
  143. Takise A., Kodama, T., Shimosato, Y. Histopathologic prognostic factors in adenocarcinomas of the peripheral lung less than 2 cm in diameter. *Cancer* 61: 2083-2088, 1988.
  144. Kaplan E.L., Meier, P. Nonparametric estimation from incomplete observations. *J Am Stat Assoc* 53: 457-481, 1958.
  145. Gehan E.A. A generalized Wilcoxon test for comparing arbitrarily singly-censored

- samples. *Biometrika* 52: 203-223, 1965.
146. 富永祐民. 治療効果判定のための実用統計学 (改訂版). 蟹書房, 東京, 1993.
  147. Merkel D., McGuire, W. Ploidy, proliferative activity and prognosis. *Cancer* 65: 1194-1205, 1990.
  148. Albe, X., Vassilakos, P., Guarnori, K., et al. Independent prognostic value of ploidy in colorectal cancer. A prospective study using image cytometry. *Cancer* 66: 1168-1175, 1990.
  149. Isobe H. Prognostic and therapeutic significance of the flow cytometric nuclear DNA content in non-small cell lung cancer. *Cancer* 65: 1391-1395, 1990.
  150. Morgan S.A. Flow cytometric analysis of Hoechst 33342 uptake as an indicator of multi-drug resistance in human lung cancer. *Br J Cancer* 60: 282-7, 1989.
  151. Esteban J. Effects of various fixatives and fixation conditions on DNA ploidy analysis. *Am J Clin Pathol* 95: 460-466, 1991.
  152. Batsakis J.G., Sneige, N., El-Naggar, A.K. Flow cytometric (DNA content and S-phase fraction) analysis of breast cancer. *Cancer* 71: 2151-2153, 1993.
  153. 浜島信之, 佐々木隆一郎, 柴田敦子, 他. 相関の強い2つの予後因子を比例ハザードモデルで解析した場合のハザード比. *日癌治* 24: 1015-1019, 1989.
  154. Naruke, T., Goya, T. Tsuchiya, R., et al. Prognosis and survival of patients with stage I adenocarcinoma based on the new international staging system. *J. Thorac Cardiovasc Surg.* 76: 440-447, 1988.