

## 第5章 細胞核DNA量のカラー画像解析装置を用いた顕微測光法の 細胞診標本への応用

### — 肺非小細胞癌の核DNA量と病理形態学的核異型度の比較検討 —

#### 第1節 序 論

最近の研究の進歩により、癌は遺伝子の病気であり、細胞の核DNAの異常であることが明らかにされてきている。細胞が癌化しその悪性度が増すにつれて、段階的にオンコジーンに代表される癌の原因遺伝子の数あるいは量が増加することも言われている。遺伝子の異常は、しばしば染色体レベルの異常を引き起こし、染色体レベルの異常の多くは、核DNA量の異常としてとらえることが可能である。実際、原発組織によって差が有るものの、ヒトの約7割の癌では核DNA量の異常が検出されている(46-49)。近年、癌の臨床研究の上でも細胞の核DNA量の解析が盛んに行われ、癌の診断、予後の推定、治療方針の決定などに用いられようとしている(50-54)。

臨床標本のDNA量の解析法としては、現在は顕微蛍光測光とフローサイトメトリーが一般に用いられているが、それぞれ欠点があり必ずしも実地臨床に適しているとは言えない。核DNA量のカラー画像解析装置を用いた測定方法とこれらの方法と比較してみると、表5-1のようになる。カラー画像解析法の特徴としては、1) 試料の調整が容易で、通常の顕微鏡用スライド標本の形に調整すればよいこと、2) 臨床の細胞診標本のような少量の細胞でも、癌細胞を選択して測定できるため充分計測・解析が可能なこと、3) 標本の比較的長期間の保存が可能なこと、4) 過去の細胞診標本を脱色・再染色することでレトロスペクティブな検討ができること、5) フローサイトメトリーに近い精度で測定できること、6) 同時に核の形態観察さらに形態解析ができることなどがあげられる。

一般に癌の最終診断は、病理形態学的に行われており、熟練した病理医による組織ないし細胞の異型度の判定によってなされている。その判定に際しては、とりわけ細胞の核の異型度、即ち、経験に基づいた核の形態量のパターン抽出がその重要な要素となっている。カラー画像解析装置を用いた核DNA量の測定法は、核DNA量を測

定した同じ細胞で、核の形態量を同時に測定解析すること（上記6）が可能である。すなわち、細胞の核の形態的異型度の定量が同時に可能であり、病理学的なパターン抽出の経験的知識を定量化して利用することができる。

本章では、カラー画像解析法の臨床細胞診標本に応用として、肺癌症例の核DNA量を計測し、DNAヒストグラムの解析を行うとともに、癌細胞の核の形態量を同時に測定し、病理形態学的な癌の診断の根拠とされている核の視覚的異型度と比較検討した。

表 5-1 画像解析法・顕微蛍光測光法・フローサイトメトリーの比較

	画像解析装置 による分光測光	顕微蛍光測光	フローサイト メトリー
対象標本	スライド標本	スライド標本	浮遊細胞標本
試料の調整	容易	容易	難しいことがある 特に固形腫瘍の場合
DNA染色	フォイルゲン 染色	蛍光染色	蛍光染色
標本の長期保存	可	不可	不可
同一標本の再計測	可	不可	不可
精度	高い	低い	高い
CV値	5%前後	10%前後	1-5%
計測速度	比較的速い	遅い	速い
形態観察	同時に可能 選択的測定可	困難	不可

## 第2節 対象と方法

### 2-1. 対象

筑波大学附属病院で手術された肺非小細胞癌例のうち細胞診標本ならびに手術材料において、病理形態学的な検索のなされた32例を対象とした。内訳は、腺癌16例、大細胞癌5例、扁平上皮癌9例、およびカルチノイド2例である。(表5-2)

表5-2 対象

腺癌	16
大細胞癌	5
扁平上皮癌	9
カルチノイド	2
計	32

### 2-2. 試料(標本)の調整

#### 2-2-1) 画像解析用の標本の作製

1. 手術標本の腫瘍断面のうち可能な限り壊死等がなく腫瘍のみからなると思われる部位を肉眼的に選び、同部位の捺印(スタンプ)標本を作製。
2. メタノール-ホルマリン-酢酸(容積比85:10:5)から成る固定液で、室温で1時間固定。
3. 以下の手順でフォイルゲン染色を施し、画像解析用の標本とした。
  - (1) 固定液を洗い流すために、蒸留水で洗浄。
  - (2) 4N塩酸で加水分解。(30℃, 最長30分間)
  - (3) 0.1N塩酸に5分間浸漬。(室温)
  - (4) シッフ試薬(Sigma, USA)でフォイルゲン染色。(室温, 遮光, 90分間)
  - (5) 亜硫酸水を通す。(5分間×3回)

(6) 流水水洗。(10分間)

(7) アルコール，キシレンの脱水系列を通した後，Eukitt (O.Kinder, Germany) で封入。

#### 2-2-2) 病理形態学的異型度の評価用の標本の作製

捺印標本を作製した部位を切り出し，組織標本を作製。通常の手順に従い，HE染色を施し，病理形態学的異型度の評価用の標本とした。

#### 2-3. カラー画像解析法による核DNA量の計測およびDNAヒストグラム解析

核DNA量の測定は第3章で述べたカラー画像解析法により，標本上で500個以上の腫瘍細胞の核を選択的に計測した。

同一標本上のリンパ球の核DNA量を正常二倍体細胞の核DNA量(2C)とみなしてコントロールとし，腫瘍細胞の核DNA量の平均値，標準偏差(単位; C)を算出するとともに，2Cの5%(0.1C)を階級幅としてDNAヒストグラムを作製した。

DNAヒストグラム上，最大ピークをその腫瘍細胞のG1/O期とみなし，G1/OピークのDNA量の2倍量付近に明かなピークが認められる場合には，そのピークを腫瘍細胞のG2/M期とした。また，G1/O期のピークが2.4C以上にあるものをaneuploidと判定した。そして，aneuploidの認められないものをA群，認められるものをB群とした。S+G2/M期の細胞の割合の増減は，細胞の増殖能の指標となると考え，さらに各群の中でG2/M期のピークが明らかで，S+G2/M期の割合が5%以上のものをタイプ2，それ以外のものをタイプ1とした。例えば，Fig. 5-1のヒストグラムはG1/O期ピークが2Cにあり，そのDNA量の2倍量付近に第2のピークが認められ，A-2と分類した。

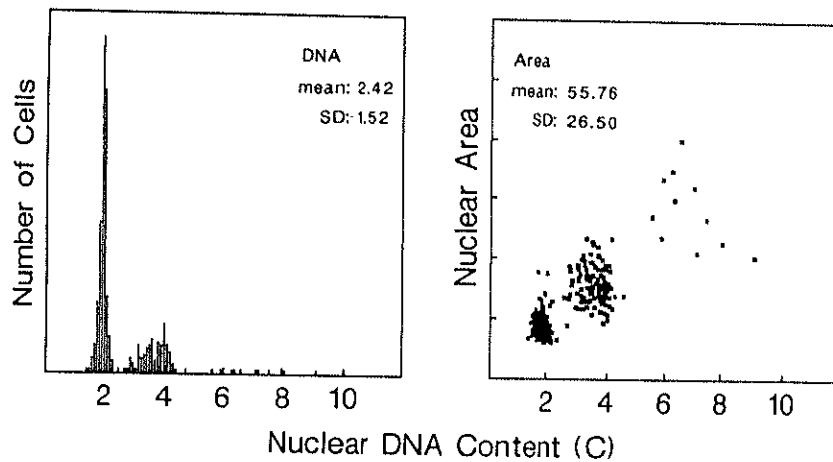


Fig. 5-1 DNAヒストグラム(左)と核DNA量と核面積の散布図(右).  
(腺癌, #3)

#### 2-4. 画像解析による形態量の測定

カラー画像解析装置SPICCA(日本アビオニクス社, 東京)内蔵の画像解析プログラム(IC5098)を用いて, 核DNA量の測定時に二値化抽出された核の画像上で, 核DNA量を計測したのと同じ腫瘍細胞(500個以上)の核の形態量を計測した. 核の形態量としては, 核面積の平均値・標準偏差(単位;  $\mu\text{m}^2$ )ならびに以下の式から核の凹凸度の平均値・標準偏差を算出した.

$$\text{凹凸の度合 SFU} = (\text{周囲長})^2 / (4\pi \times \text{面積})$$

#### 2-5. 病理形態学的核異型度の判定

捺印標本を作製した部位のHE染色標本を用い, 病理形態学的核異型度を

- 1) 核クロマチンの粗慥性
- 2) bizarre cellの出現頻度
- 3) 細胞分裂像の出現頻度
- 4) 核形の不整
- 5) 核の大小不同

の5項目について表5-3の判定基準に従って, 3ないし4段階で3人の病理医で評価した.

表 5-3 == 病理形態学的核異型度の判定基準 =====

1) 核クロマチンの粗礎性

- 1 均一
- 2 粗礎なクロマチンパターン
- 3 核縁の肥厚、粗大なクロマチン顆粒が顕著

2) bizarre cell、3) 細胞分裂像の出現頻度

400倍 10視野平均

- 1 なし
- 2 1 - 5
- 3 5 - 20
- 4 20 -

4) 核形不整

- 1 類円形のみで、核縁不整が殆ど認められない
- 2 類円形だが、核縁不整あり
- 3 多形な核が混在する
- 4 殆どの核が多形を示す

5) 核の大小不同

- 1 大小不同を認めない
- 2 軽度の大小不同を認める
- 3 大小不同が著しい
- 4 異常な大型細胞が存在する

=====

### 第3節 結果

#### 3-1. DNAヒストグラムパターンの解析

DNAヒストグラム・パターンの出現頻度は以下の如くであった。

A-1群	6例
A-2群	4例
B-1群	7例
B-2群	15例

G1/Oピークが2C(付近)にあるA群は、32例中、10例(31%)であった。この群は、正常細胞と同様のDNAヒストグラムパターンを示すものであり、DNA量の測定だけから、正常細胞との区別はできない。G1/Oピークが2.4C以上にあるB群、すなわち、aneuploidの見られるものは、32例中、22例(69%)であった。

B-2群の中には、G1/Oピーク、G2/Mピーク以外に第3のピークが認められ、腫瘍細胞の中に異なるクローン(multi-ploidy)の存在が示唆される症例が5例(16%)認められた。(Fig. 5-2, 表 5-5 中の\*)

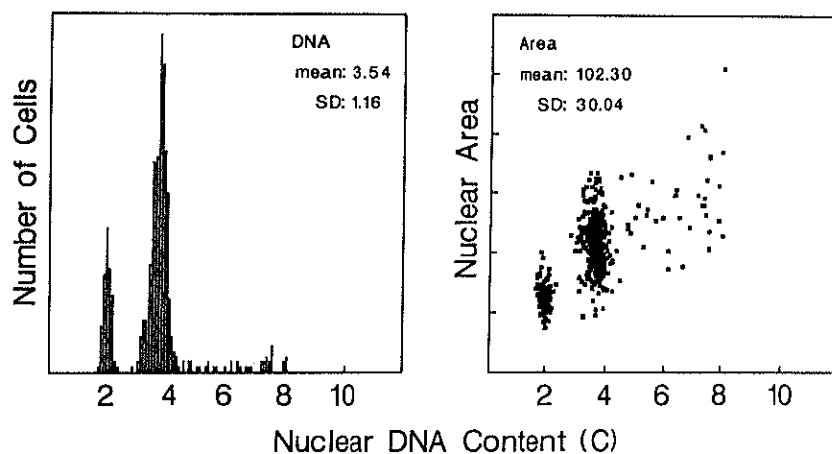


Fig. 5-2 複数のクローンの存在が示唆される症例のDNAヒストグラム(左)と核DNA量と核面積の散布図(右). (腺癌, #8)

### 3-2. 画像解析法により測定されたDNAヒストグラムパターン，平均核DNA量と核の形態量の解析

各組織型別のDNAヒストグラムパターン，平均核DNA量と核の形態量（平均核面積およびその標準偏差，平均核凹凸度）を表 5-5 に示す。

### 3-3. 画像解析法によるDNA解析データと細胞核の病理形態学的核異型度の比較

以下に，各ヒストグラムパターンとその症例の組織像とを示す。



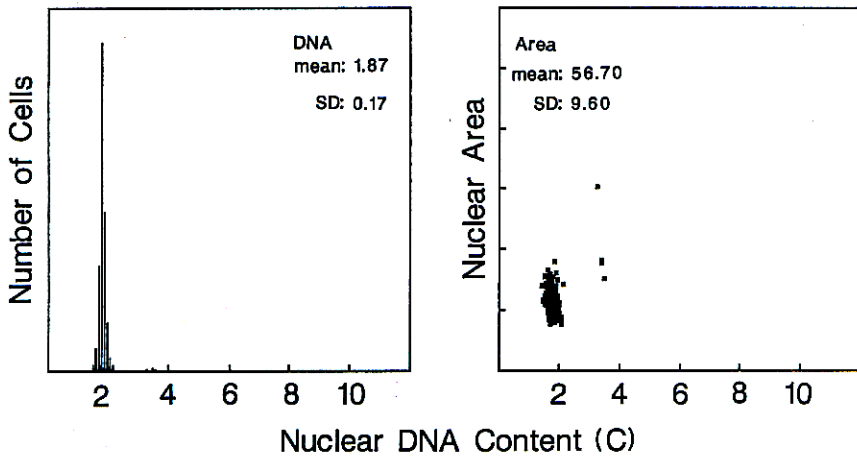


Fig. 5-3a DNAヒストグラム(左)と核DNA量と核面積の散布図(右).  
(腺癌, #14)

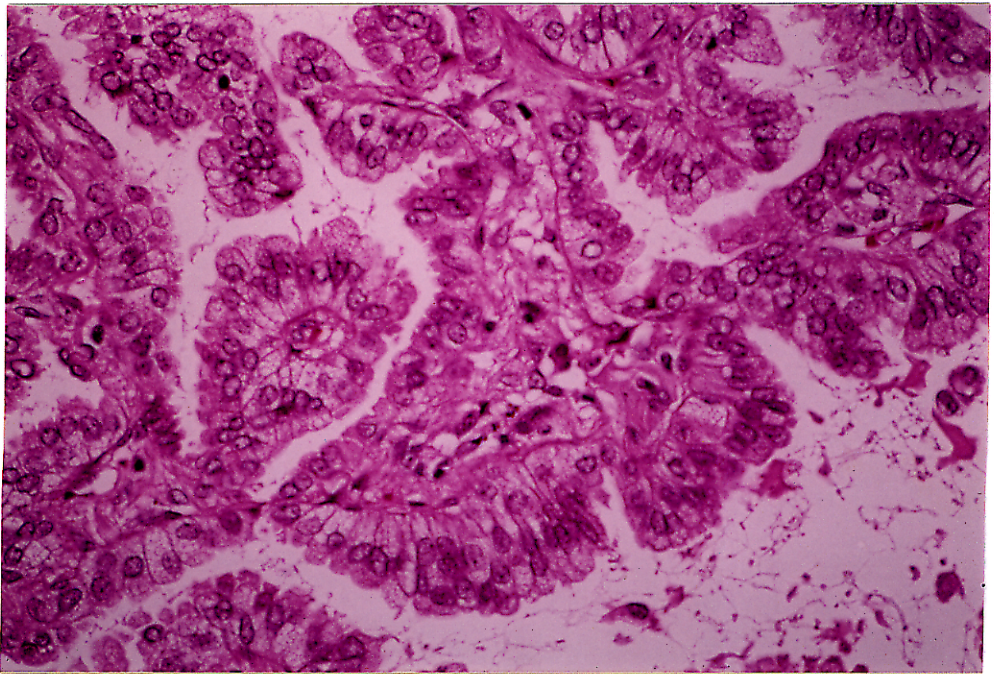


Fig. 5-3b 同症例の組織像。(HE染色)

Fig. 5-3 の症例では、ほとんどの腫瘍細胞の核DNA量は2Cを示し、DNAヒストグラムのパターンは、A-1と分類される。組織学的には、乳頭状構造を呈し、明らかに癌と診断されるが、核異型は軽度で、bizarreな細胞や分裂像は見られない。

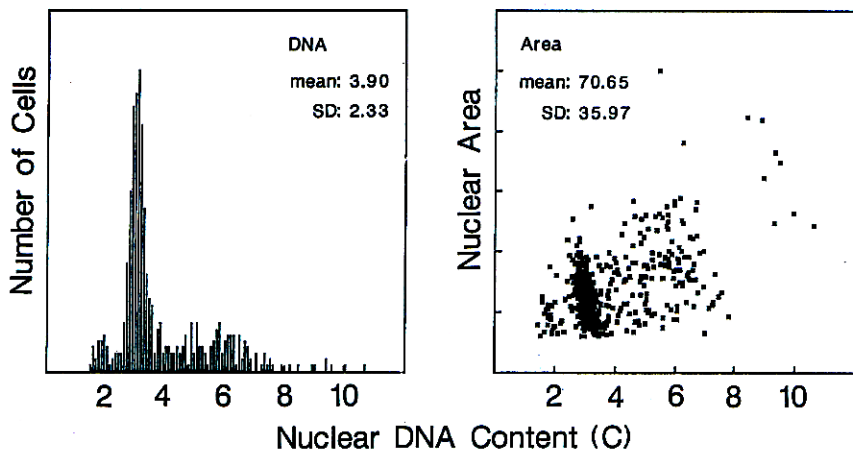


Fig. 5-4a DNAヒストグラム(左)と核DNA量と核面積の散布図(右).  
(大細胞癌, #1)

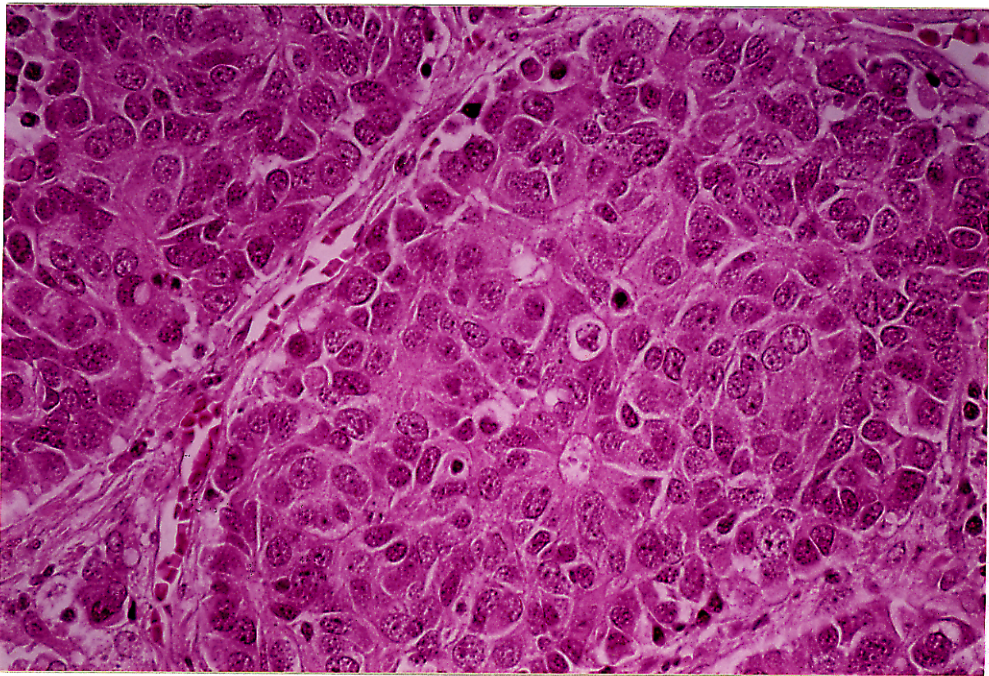


Fig. 5-4b 同症例の組織像。(HE染色)

Fig. 5-4 の症例では、最大ピークは、3C 近くであり、ほぼその2倍の6C 近くに、G2/Mに相当するピークが見られ、B-2と分類される。組織学的には中等度の核異型が見られる。

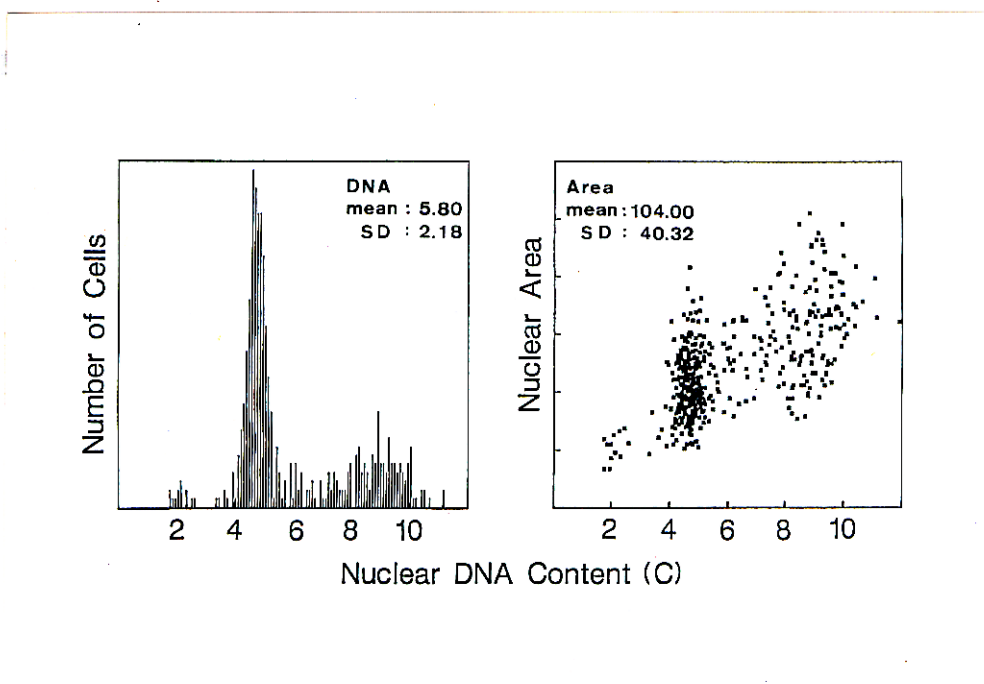


Fig. 5-5a DNAヒストグラム(左)と核DNA量と核面積の散布図(右).  
(腺癌, #17)

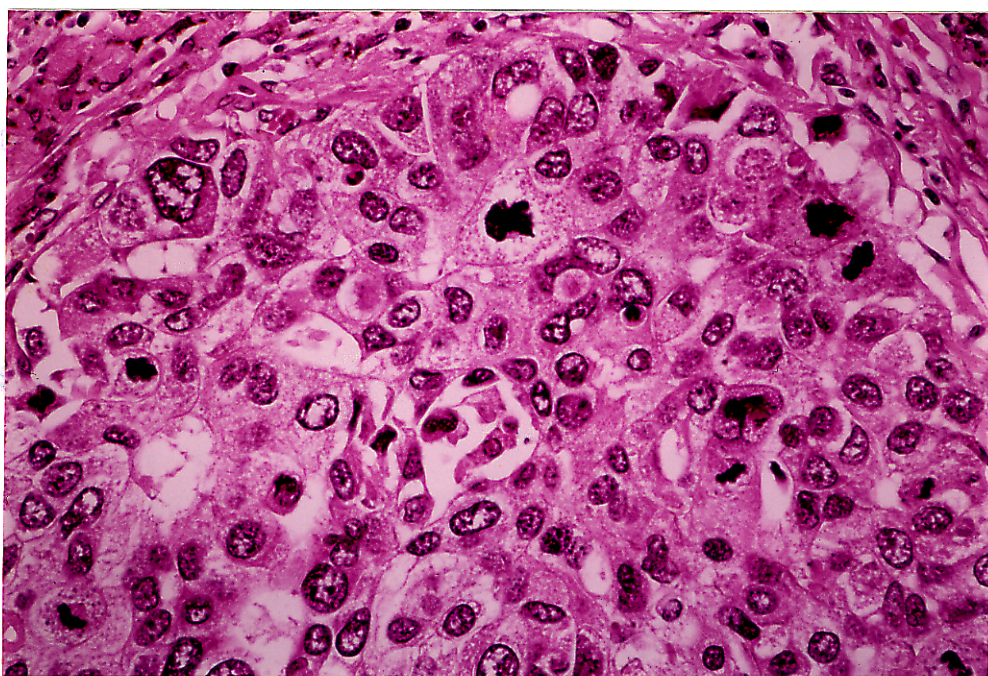


Fig. 5-5b 同症例の組織像。(HE染色)

Fig. 5-5 の症例では aneuploid のピークが, 4C 以上に見られ, B-2 と分類される DNA ヒストグラムパターン. 組織像では, 著しい異型が見られ, bizarre な細胞, 分裂像も多数見られる.

表 5-4 DNAヒストグラムパターン，平均核DNA量と核の形態量  
(平均核面積およびその標準偏差，平均核凹凸度)

組織型	症例 番号	DNAヒスト グラムパターン	DNA量 の平均(C)	核面積の 平均( $\mu\text{m}^2$ )	核面積の 偏差	核凹凸度の 平均
Adeno- carcinoma	1	A-1	1.87	52.92	14.10	1.145
	2	A-1	2.29	56.83	14.44	1.255
	3	A-2	2.42	55.76	26.50	1.172
	4	B-1	3.57	57.59	16.52	1.350
	5	B-1	2.62	51.54	12.43	1.249
	6	B-1	4.14	75.31	21.03	1.168
	7	B-2*	4.39	115.83	56.07	1.159
	8	B-1*	3.54	102.30	30.04	1.183
	9	B-2	5.31	111.34	59.42	1.263
	10	B-2*	2.86	65.63	25.89	1.186
	12	B-1	3.96	85.79	31.13	1.311
	13	B-2	3.43	82.56	31.94	1.233
	14	A-1	1.87	56.70	9.60	1.092
	15	B-2	2.15	57.77	16.32	1.189
	16	B-2	3.75	103.24	38.52	1.160
	17	B-2	5.80	104.00	40.32	1.293
	Large cell carcinoma	1	B-2	3.90	70.65	35.97
2		B-1	5.12	135.36	46.91	1.188
3		B-2	4.01	59.41	22.93	1.174
4		B-2	4.41	99.56	61.35	1.211
5		B-2*	3.41	93.12	34.34	1.149
Squamous cell carcinoma	1	A-1	2.12	53.54	14.04	1.218
	2	B-2*	3.94	75.15	26.57	1.281
	3	A-2	2.17	48.67	12.85	1.170
	4	B-2	3.47	73.77	33.17	1.126
	5	A-1	1.94	45.91	8.45	1.235
	6	A-2	2.42	72.46	41.72	1.206
	7	B-2	4.67	62.55	33.06	1.440
	8	B-2	1.79	58.20	15.57	1.145
	9	B-1	3.16	86.88	27.32	1.196
Carcinoid	1	A-1	2.16	57.12	13.67	1.116
	2	A-2	2.58	35.33	1.60	1.131

\* multi-ploidy(+)

病理形態学的核異型度とDNAヒストグラムパターンの比較を表 5-5 に示す。(形態学的な異型度は、数字が大きい程、異型が強いことを表している。)

Aneuploid の認められるB群では、細胞分裂像を除く病理形態学的な核異型度が強い傾向があった。また、aneuploid ピークの位置が、2Cより大きくはずれるほど、核異型度が強い傾向があった。タイプ1、タイプ2の間では、細胞分裂像に有意な差が見られた。また、B-1群とB-2群の間で形態学的な異型度の強さを比べてみると、B-2群で異型度が強い傾向があるが、A-1群とA-2群の間でははっきりした差はみられなかった。

### 3-4. 画像解析により得られた核の形態量との病理形態学的核異型度の比較

#### ○ 病理形態学的異型度と平均核DNA量

形態学的異型度と平均核DNA量の関係をグラフ Fig. 5-6 に示す。

平均DNA量が大きな症例ほど、クロマチンの粗澁性、核形の不整、大小不同の程度が大きくなる傾向が見られた。また、bizarre cellの出現頻度、細胞分裂像の出現頻度との間には統計的な有意差はなかった。

#### ○ 病理形態学的異型度と平均核面積

病理形態学的異型度と平均核面積の関係をグラフ Fig. 5-7 に示す。

平均核面積が大きいほど、大小不同、クロマチンの粗澁性の程度が大きくなる傾向が見られたが、bizarre cellの出現頻度、細胞分裂像の出現頻度、核形の不整との間には有意な関係は見られなかった。

表 5-5 病理形態学的核異型度とDNAヒストグラムパターン

1) 核クロマチンの粗髄性

異型度	A-1	A-2	B-1	B-2
1	3	1	1	0
2	2	3	5	10
3	1	0	1	5

異型度	A群	B群	異型度	タイプ1	タイプ2
1	4	1	1	4	1
2	5	15	2	7	13
3	1	6	3	2	5
	10	22(*)		13	19

(\* p<0.05)

2) bizarre cell の出現頻度

異型度	A-1	A-2	B-1	B-2
1	4	3	4	2
2	1	1	2	7
3	0	0	0	4
4	1	0	1	2

異型度	A群	B群	異型度	タイプ1	タイプ2
1	7	6	1	8	5
2	2	9	2	3	8
3	0	4	3	0	4
4	1	3	4	2	2
	10	22(*)		13	19

(\* p<0.05)

3) 細胞分裂像の出現頻度

異型度	A-1	A-2	B-1	B-2
1	2	1	1	0
2	0	1	2	2
3	2	0	2	1
4	2	2	2	12

異型度	A群	B群	異型度	タイプ1	タイプ2
1	3	1	1	3	1
2	1	4	2	2	3
3	2	3	3	4	1
4	4	14	4	4	14
	10	22		13	19(*)

(\* p<0.05)

(表 5-6 続き)

4) 核形不整

異型度	A-1	A-2	B-1	B-2
1	2	2	2	1
2	3	2	2	6
3	1	0	3	7
4	0	0	0	1

異型度	A群	B群	異型度	タイプ1	タイプ2
1	4	3	1	4	3
2	5	8	2	5	8
3	1	10	3	4	10
4	0	1	4	0	1
	10	22(*)		13	19

(\* p<0.025)

5) 核の大小不同

異型度	A-1	A-2	B-1	B-2
1	3	1	2	0
2	1	3	2	4
3	2	0	3	9
4	0	0	0	2

異型度	A群	B群	異型度	タイプ1	タイプ2
1	4	2	1	5	1
2	4	6	2	3	7
3	2	12	3	5	9
4	0	2	4	0	2
	10	22(*)		13	19

(\* p<0.01)

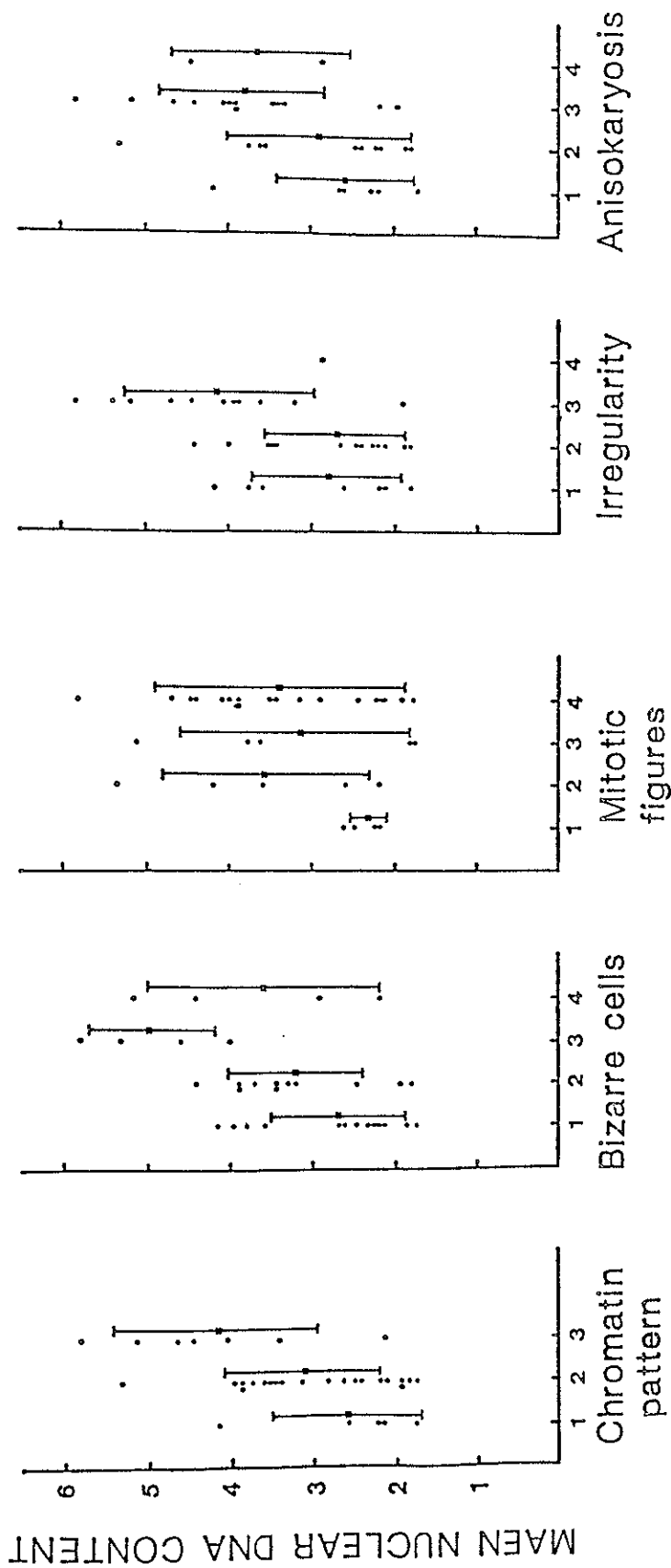


Fig. 5-6 Mean nuclear DNA content and pathological nuclear atypia.



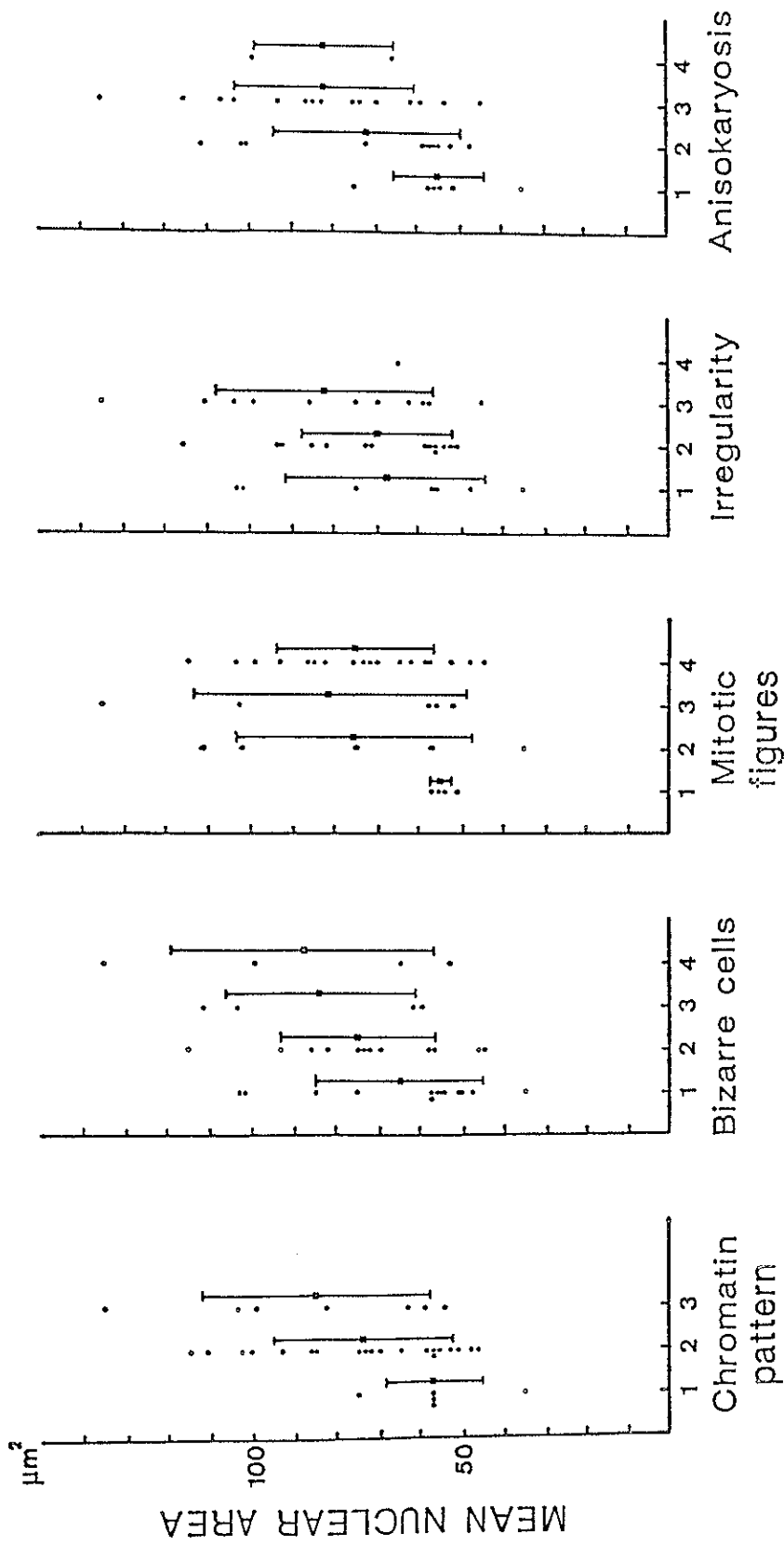


Fig. 5-7 Mean nuclear area and pathological nuclear atypia.

○ 核面積%CV (Coefficient of Variation)と病理学的な核の大小不同の比較

画像解析装置で測定した核面積のバラツキと病理形態学的に判定される核の大小不同を比較した。肺癌は組織型により、核の大きさが異なるが（一般に大細胞癌が最も大きく、扁平上皮癌、腺癌の順に小さくなる）、今回は各組織型の区別をせずに取り扱っており、単純に核面積のバラツキの指標である標準偏差を比べることは意味がないと考えられる。また、肉眼的に大小不同を判定する場合、その標本において最も数の多い核の大きさを基準にしていると考えられる。そこで、面積の標準偏差を平均核面積で標準化（核面積標準偏差÷平均核面積×100＝核面積%CV）した上で比較した。（Fig. 5-8）

核面積%CVが大きいほど、視覚的に判定される大小不同の程度も強くなる傾向があり、特に大小不同がありと判断されるものは、核面積%CVが30を越える傾向が認められた。

○ 核の凹凸度と病理学的な核形不整, bizarre cell の出現の比較

核の形状は、病理学的に悪性の判定の重要な指標の一つとなる。そこで病理形態学的な異型度のうち、核形の不整, bizarre cellの出現頻度と画像解析装置によって計測された核の凹凸度を比較検討した結果を表 5-6 に示す。（凹凸の度合いが大きくなるほど凹凸度係数SFUは1より大きくなる。）

表 5-6 凹凸度係数SFUの平均

異型度	1	2	3	4
核形不整	1.146	1.215	1.264	1.186
bizarre cell の出現頻度	1.195	1.213	1.293	1.211

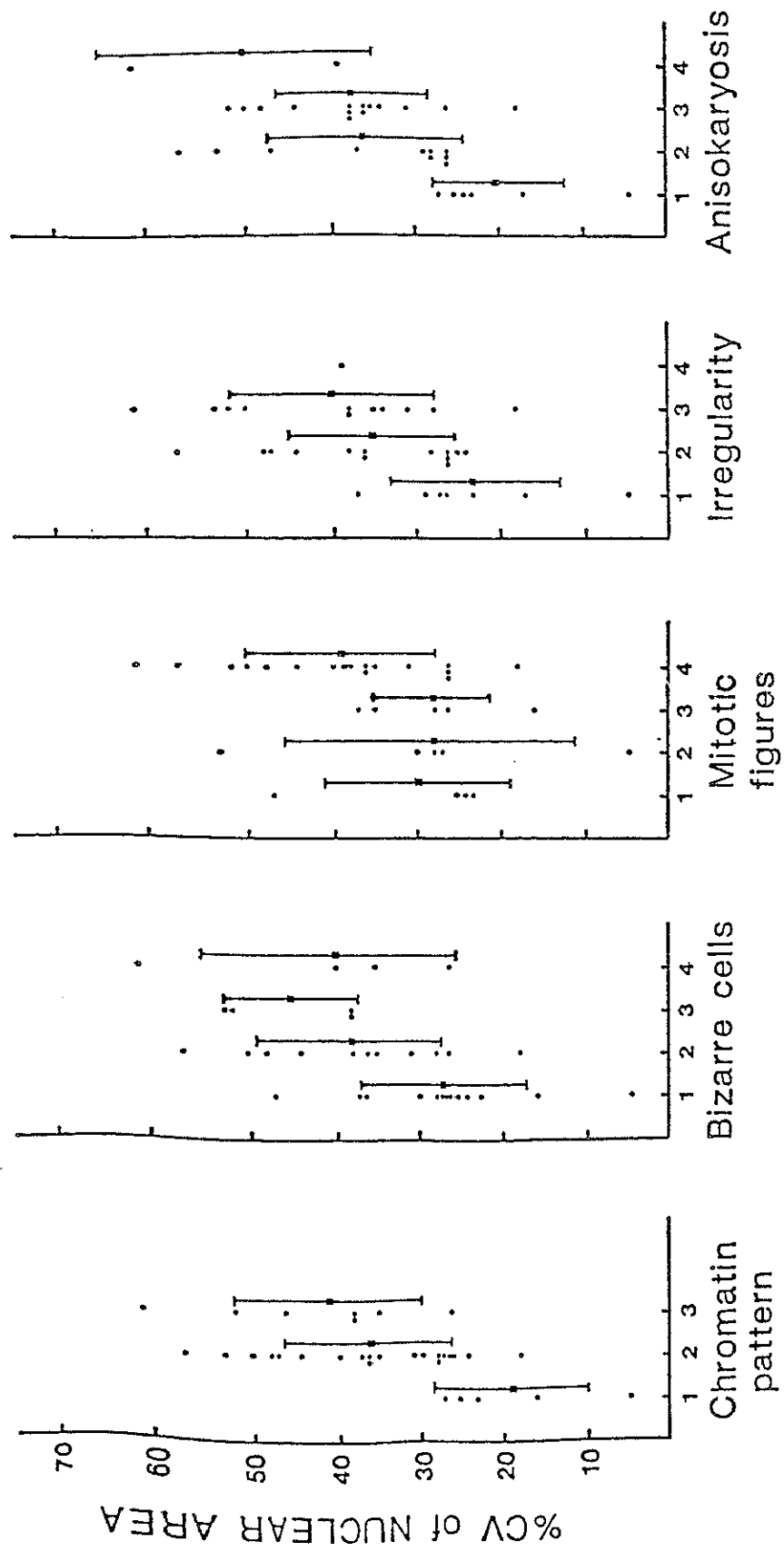


Fig. 5-8

Coefficient value of nuclear area and pathological nuclear atypia.

### 3-5. 画像解析装置で同時に測定される核DNA量と核面積の比較

画像解析装置で、同時に測定した腫瘍細胞の核DNA量の平均と、核面積の平均の関係をみると、グラフ（Fig.5-9）のようになる。正の相関が認められ、相関係数は0.76であった。

## 第4節 考 察

カラー画像解析装置を用いた核DNA量の顕微測光法の臨床応用として、肺癌擦印細胞診標本上で核DNAヒストグラムの解析を行った結果、約7割の症例にaneuploidのヒストグラムパターン（B群）が見られた。この値は、従来のフローサイトメトリーを用いて肺癌の手術組織を検索した報告とほぼ同じである(55-60)。正常細胞には、aneuploidパターンは認められず、これのみで癌の診断を下すことが可能な所見である。また、aneuploidパターンを示した中でも、特に、G1/G0ピークが2Cから大きく外れているものや、3つ以上のピークが存在するものが見られた。こうした症例は、多段階的にオンコジーンを始めとする遺伝子の異常をきたしていたり、同一癌内に複数のクローンが存在して癌の生物学的な悪性度が高いことが最近指摘されている(61-63)。こうした所見は、癌の診断のみではなく患者の予後、治療方針を決定する上で極めて重要と考えられる。画像解析装置を用いる本法では、正常細胞の混入割合の高いことが多いフローサイトメトリーに比べて、腫瘍細胞を選択的に測定し、癌細胞により特異的DNAヒストグラムを得ることができるので、こうした異常なヒストグラムが得られやすいと考えられる。

しかし、aneuploidパターンの認められなかった症例(A群)では、このDNA量解析のみでは癌の判定は出来ない。S+G2/M期の細胞の割合の増減は、細胞の増殖能の指標となる考え、今回、この割合が低い群(タイプ1)と高い群(タイプ2)に分けて検討を試みたが、本法の精度の問題もあり、現時点ではその評価は難しい。今後、多数の正常細胞の解析を行い、DNAヒストグラム上で正確にS+G2/Mの割合を算定し、その正常の上限を決めることができれば、A-2群の一部は正常・異常の判定ができるかもしれない。

DNAヒストグラムパターンと病理形態学的な核異型度の視覚的な指標を比較検討した結果、病理学的な核の異型度は、aneuploidの認められる症例ほど強い傾向があり、DNAヒストグラムの異常との関連性が認められた。

カラー画像解析装置を用いた核DNA量の顕微測光法の最大の利点は、核DNA量の解析のみではなく核の種々の形態量を同時に解析出来ることである。そこで、癌の最終的な診断の根拠とされる核の病理学的異型度と、画像解析装置により算出された形態量の比較検討を行った結果、病理学的な核の異型度判定の各指標は、画像解析によって算出される核面積、核面積%CV(coefficient of variation)、核の凹凸度の形態量により、ある程度代表し得る可能性が示唆された。

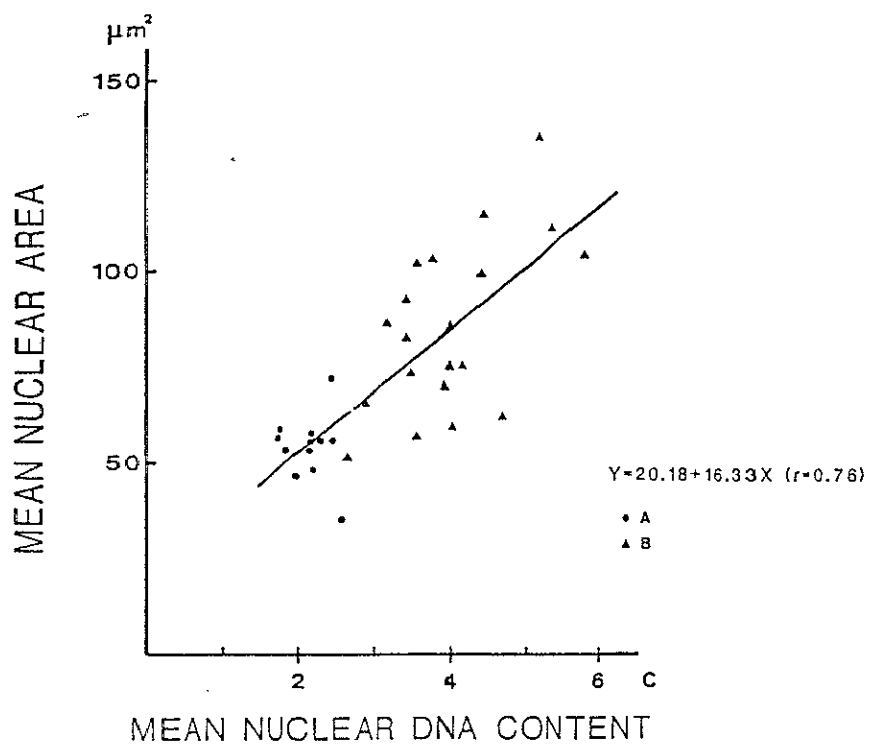


Fig. 5-9

Correlation between mean nuclear DNA content and mean nuclear area.

## 第5節 小 括

細胞核DNA量のカラー画像解析装置を用いた顕微測光法の臨床応用として、細胞診標本上で核DNAヒストグラムの解析を行った。対象としては手術的に切除された肺非小細胞癌例の32例を用い、手術材料の捺印細胞診標本から、核DNA量の計測、DNAヒストグラムの解析を行うとともに、同じ標本を用いて核の形態量を同時に計測し、同症例のHE組織標本上で核の病理形態学的異型度を評価して比較検討した。

その結果、約7割の症例に癌の確定所見と考えられるaneuploidヒストグラムパターンが見出され、従来のフローサイトメトリーを用いた肺癌の核DNA解析の報告とほぼ一致した。また、aneuploidパターンを示した中には、G1/G0ピークが2Cから大きく外れているものや、3つ以上のピークが存在するものが見られた。

DNAヒストグラムパターンと病理形態学的な核異型度の指標との比較では、病理学的な核の異型度は、aneuploidの認められる症例ほど強い傾向があり、核DNAヒストグラムの異常に反映されることが考えられた。

画像解析装置により算出された形態量と病理形態学的な異型度の比較検討では、病理学的な核の異型度判定の各指標は、画像解析によって算出される核の面積、核面積%CV (coefficient of variation)、核の凹凸度の形態量により、代表できる可能性が示唆された。

カラー画像解析装置を用いた核DNA量の顕微測光法は、核DNAの定量、ヒストグラム解析ばかりでなく、癌の病理形態学的な診断根拠となる核の形態情報を同時に利用解析できるという従来の方法にはない特徴を備えており、今後の臨床応用が期待される。