

第6章 総括

細胞の核DNA量の解析は、医学生物学領域の基礎的な研究ばかりでなく、現代の臨床医学の最大の問題である癌の診断、治療分野に於いても極めて有用である。現在、細胞核DNA量の計測法としてはフローサイトメトリー（FCM）、顕微蛍光測光法、顕微分光測光法が用いられているが、それぞれ種々の問題があり、現時点では実地臨床応用に適しているとは言えない。

最近のエレクトロニクス分野の急速な発達により、撮像・画像解析装置の性能が飛躍的に向上した。これらの技術を顕微測光に応用することにより、核のDNA量の新たな計測法として、細胞核DNA量をカラー画像解析装置を用いて顕微測光する方法を考案した。この方法は顕微分光測光法同様、基本的には Lambert-Beer の法則に基づくものであるが、分光測光法の欠点を改良すべく、カラー画像装置を用いた新たな方法での理論的検討を行った。特に測定の際に最大の問題となる分布誤差と非特異的光喪失について検討した。顕微分光測光法では、分布誤差を減ずるために走査法が用いられるが、物理的な制約の為にスポット走査が充分とは言えず誤差の原因となっている。それに対し、カラー画像解析法では、TVカメラから入力された画像を利用して測定を行うため、測定対象がすでに画素と呼ばれる微小な区画単位に分割（デジタル化）されているので、改めて走査する必要がない。次に、非特異的光喪失に関して、分光測光法では2枚の干渉フィルターを用いることで対処しているが、カラー画像解析法では、撮像装置がカラー対応であることに着目し、より簡便に非特異的光喪失を除去する方法を考えた。すなわち、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、殆ど特異吸光のないB成分画像を直接用いても、フォイルゲン色素の定量が可能であること考案し、理論的に証明した。

カラー画像解析法の理論に基づいて実際に細胞の核DNA量を測定するための、装置の構成、測定のアプローチ・手順を検討した。この際、TVカメラとしては、CCDカメラを用いて構成した。つづいて、実際に非特異的光喪失を除去するための係数 γ を決定し、各種細胞の核DNA量の測定を行い、今回考案したカラー画像解析法の定量性・精度を検討した。その結果、本理論に基づく細胞核DNA量の顕微測光システムは、細胞核DNA量の解析に実用可能であることが示された。

カラー画像解析法の基礎的な応用として、培養癌細胞の核DNAヒストグラム解析

を行った。具体的には、1) 通常の培養条件下の培養癌細胞の核DNAヒストグラムを作製し、FCMの結果と比較した結果、カラー画像解析法とFCMによるDNAヒストグラムパターンはほぼ類似しているが、S期がやや高く、G2+Mのピークがなだらかであった。これは、測定精度と標本処理の違いによるCV値の増大が主な原因と考えられた。2) S期同調培養時のDNAヒストグラムパターンの変化、および血清濃度を下げた時のDNAヒストグラムと増殖曲線の変化について本法を用いて検討した結果、S期同調培養法に伴うDNAヒストグラムの変化、血清濃度を下げた時のDNAヒストグラムの変化を検出することができ、本法は細胞動態の解析法として充分使用可能であると考えられた。また、本法の特徴である形態観察が同時に可能であることを利用して、mitotic indexを算出し核DNAヒストグラムにおけるM期の割合を求めることが出来た。

最後に本法の臨床応用として、肺癌の細胞診標本の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、核の病理形態学的異型度と比較検討した。その結果、約7割の症例にaneuploidが見出され、従来のフローサイトメトリーを用いた報告とほぼ一致した。また、病理学的な異型度を反映する画像解析装置により算出された形態量とDNAヒストグラムを比較検討することが可能となった。

今回、考案した細胞核DNA量のカラー画像解析法は、測定精度とスピードの観点では、従来の顕微測光法とFCMの中間に位置づけられるであろう。しかしながら、カラー画像解析法の特徴としては、試料の調整が容易で、通常少量の細胞によって診断する細胞診標本に応用が可能であること、FCMに近い精度で測定できること、同時に核の形態解析が可能で、これまでの病理形態学的な知識を利用できる可能性あることなどが上げられ、本研究にて開発された細胞核DNA量のカラー画像解析法は、癌診断の実用面において今後大きく貢献すると信ずる。